

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

課題番号：22KC1005

令和4-6年度 総合研究報告書

令和7(2025)年3月

研究代表者：鈴木 勉

目次

令和 4-6 年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業) (課題番号：22KC1005)

令和 4-6 年度 総合研究報告書「3 年間のまとめ」

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

I.	令和 4-6 年度 総合研究報告書「3 年間のまとめ」	
	指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究	----- 1
	鈴木 勉 (湘南医療大学 薬学部)	
II.	令和 4-6 年度 分担研究報告書「3 年間のまとめ」	
	研究-1：幻覚発現薬の評価を目指した試験法の開発	----- 7
	鈴木 勉 (湘南医療大学 薬学部)	
	研究-2：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究	----- 22
	松田正彦 (湘南医療大学 薬学部)	
	研究-3：幻覚作用を有する薬物の合成	----- 32
	栗原正明 (湘南医療大学 薬学部)	
	研究-4：摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価	----- 37
	森 友久 (星薬科大学 薬学部)	
	研究-5：幻覚剤 DOI によるマウス行動異常—伏臥位を基本的指標として 評価する実験系	----- 45
	北中純一 (兵庫医科大学 薬学部)	
	研究-6：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究	----- 57
	増川太輝 (横浜市立大学 医学部)	
III.	3 年間の研究成果の刊行に関する一覧表	----- 67

令和4-6年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業：22KC1005)

総合研究報告書

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

研究代表者 鈴木 勉

(湘南医療大学 薬学部)

指定薬物は、薬物による中枢興奮や抑制作用を実験動物の自発運動を含む一般行動観察、脳内アミン量の変化、受容体結合実験などの結果から指定が行われているが、幻覚作用の評価は非常に困難である。これまで、幻覚発現薬の評価には、マウスによる head twitch response (HTR) が主に用いられているが、その判別が困難である等から評価法の改良や新たな評価法の開発が求められている。市中に次々と出回る幻覚発現薬物を速やかに評価して、規制に繋げるためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発や各評価法の適正を明らかにすることが望まれる。

そこで本研究では、指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究（厚生労働科学研究費補助金、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業、課題番号：22KC1005）において基礎研究を実施した。本研究では、幻覚発現薬として κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 4-iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI) を使用することで指定薬物の指定に係る実験動物を用いた試験法の評価を実施した。本研究成果によって、既存の試験法に加えて精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発に繋がった。

[分担研究-1：幻覚発現物質の評価検証を目指した試験法の開発] 鈴木 勉

乱用目的に次々と合成され、市中に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発が望まれる。また、幻覚作用を客観的に評価するためには、定量化・数値化する必要がある。本研究では、幻覚発現薬として κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用しマウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験を実施した。さらに、幻覚発現薬による幻覚発現時には情動異常を引き起こす可能性が考えられるため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。条件づけ場所嗜好性試験においては、 κ -オピオイド受容体および 5-HT₂ 受容体作動薬で嫌悪効果を認められた。この嫌悪効果は、おそらく幻覚発現薬の幻覚作用に起因している可能性が考えられる。したがって、

本試験を用いることでこの嫌悪作用を指標とした幻覚作用の評価が可能ではないかと考えられる。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ -オピオイド受容体作動薬および 5-HT₂ 受容体作動薬で情動異常を検出できた。したがって、本試験（条件づけ場所嗜好性試験（嫌悪効果の評価）およびガラス玉覆い隠し試験）を用いることで、幻覚作用発現に伴う情動異常が評価可能であると考えられる。

【分担研究-2：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究】 船田正彦

未規制の乱用薬物である危険ドラッグには、幻覚作用を示す薬物が存在する。幻覚作用の評価方法は確立しておらず、法規制のためには正確に幻覚作用の評価を行うシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示唆されている。セロトニン受容体作用薬を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの HTR に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。HTR を定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。マグネットメーターは、ポリウレタン銅線を使用して、直径 16 cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。実験には、ICR 系マウスを使用した。マウスの頭蓋表面に強力な磁力を有するマグネットをデンタルセメントで留置して、装置内での HTR の動きで感知される電気信号を測定した。装置上部より、ビデオ撮影を行い、行動変化と電気信号の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。幻覚を誘発する薬物として、セロトニン 5-HT₂ 受容体作用薬の 4-Iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI)および選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体作用薬である 4-bromo-3,6-dimethoxybenzo cyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide (TCB-2)を使用した。DOI および TCB-2 投与後、HTR の特異的なシグナルの検出を行った。DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。DOI による HTR は選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬の (R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1- (R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl] -4-piperinemethanol (MDL100907) により完全に抑制された。以上の結果から、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。セロトニン受容体作用薬によるマウスの首振り反応の発現には、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。本解析手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

[分担研究-3：幻覚作用を有する薬物の合成] 栗原正明

幻覚作用を有すると考えられるオピオイド受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。 κ オピオイド受容体作動薬として U50,488H の合成を行った。7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、トータル収率約 20% で U50,488H を合成することができた。次に光学活性体の合成を行いたい。

[分担研究-4：摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価] 森 友久

乱用が問題となる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚を有し、自発運動を強く亢進するとされてきた。そのため乱用に関する蓋然性評価において、精神刺激薬様の摂取感覚あるいは自発運動促進効果が蓋然性評価の指標とされてきた。これらの結果は、指定薬物の指定に係る試験法として、少なくとも 1 つの指標による評価では、十分な評価が難しいことを示唆している。本分担研究課題では、様々なタイプの幻覚発現薬によって引き起こされる行動変化を評価しうる系の構築を目指すため、本研究では、危険ドラッグとして用いられ構造変換が容易な phenylpiperadine 誘導体に着目して検討することとした。そこで、1-(3-trifluoromethylphenyl)piperadine (TFMPP)、1-(3-chlorophenyl)-piperadine (3-CPP) および phenylpiperadine による MDMA の弁別刺激効果に対する一般化試験、さらにこれらの自発運動に及ぼす影響を検討した。その結果、phenylpiperadine および 3-CPP は MDMA 様の弁別刺激効果を示したものの、TFMPP は一般化しかなかった。一方、自発運動の測定において、TFMPP は運動亢進を示したものの、phenylpiperadine および 3-CPP は自発運動に影響を及ぼさなかった。このように phenylpiperadine 構造を有する薬物においても精神刺激薬様の摂取感覚を持つにも関わらず、自発運動に影響を及ぼさない薬物が確認され、蓋然性評価系において、少なくともいくつかの評価系の組み合わせることが重要であると確認された。今後は、乱用が懸念される NMDA 受容体拮抗薬および κ -受容体作動薬の乱用予測のための評価系について検討していく。

[分担研究-5：幻覚剤 DOI によるマウス行動異常—伏臥位を基本的指標として評価する実験系] 北中純一

幻覚発現薬の動物実験による評価としては、簡便な行動観察に基づく、再現性の良い指標が強く望まれる。人間に対して幻覚作用を有する 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) によって引き起こされるマウス異常行動 (前肢洗顔行動・後肢引っ掻き行動・伏臥位) は DOI の用量依存的に発現頻度が増加した。DOI 誘発異常行動と大脳皮質・線条体および側坐核・海馬各部位におけるモノアミン代謝との間に相関は認められなかった。したがって幻覚発現薬による異常行動は、ICR 系マウスを実験動物とした場合、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度とが用量依存性、発現強度の相関性の観点から有効な観察基準と考えられた。幻覚発現薬を繰り返し投与した場合、DOI 反復投与は、水平方向の運動量を増加させなかった。伏臥位のみ、

DOI 連続投与によってその発現が有意に増強した。伏臥位の観察は、一般的な睡眠姿勢とは明らかに異なり、簡便に行動観察されることから、投与量に応じて強度が変化する伏臥位は、幻覚発現薬の作用強度を評価する上で有用な指標となり得る。投与頻度の上昇が伏臥位発現強度の上昇を引き起こすことは、DOI が誘発する主たる作用であることを想定させ、人間での幻覚発現効果とその相関を想定させる。したがって、本研究結果は、マウスを用いた伏臥位測定を実施すれば、stimulant の薬理学的特性を持たない幻覚発現薬 DOI の効果を簡便かつ定性的に反映する行動指標となることを示唆する。

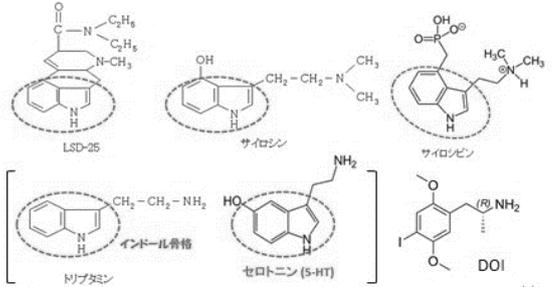
[分担研究-6：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究] 増川太輝

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、従来、アミノ酸脱炭酸酵素によるドパミンへの変換を介して作用し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。我々は、ドーパの遊離が、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって増加するのに対して、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制させること、ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化が、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルによって抑制されることを見出してきた。これらのことは、ドーパが精神症状の一部に関与することを示す。本研究においては、ドーパの遊離、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。5-HT_{2A} 受容体とドーパ/GPR143 シグナルとの関連性を明らかにするため、GPR143 欠損マウスを用いて、5-HT_{2A} 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) の薬理作用を野生型と比較・検討した。その結果、GPR143 欠損マウスにおいて野生型と比較し、DOI による運動量増加作用および側坐核における c-Fos 発現増加作用が増強した。次に、マイクロダイアリシスを用いて、ドーパ、ドパミン、5-HT の同時測定を試みたところ、側坐核におけるこれらの神経伝達物質の検出が可能となった。さらに、5-HT_{2A} 受容体発現 CHO 細胞に DOI を処置すると、ERK リン酸化レベルが上昇し、DOI の効果は GPR143 の共発現により増強した。これらの結果は、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を負に修飾することを示す。

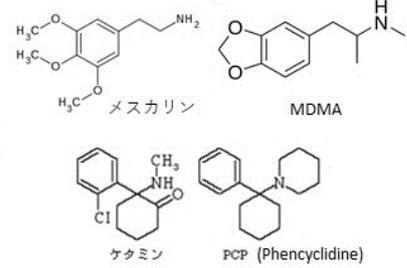
幻覚作用を有する薬物 (図 1)

幻覚作用を有する薬物 (hallucinogen)

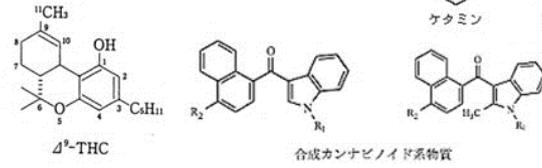
- 5-HT系
(5-HT_{2A/2C} R-agonist)
LSD-25、マジックマッシュルーム、
その他



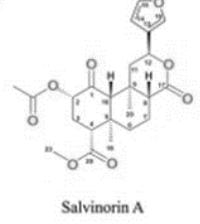
- NMDA系 (NMDA R-antagonist)
PCP (フェンサイクリジン)
ケタミン: 解離性麻酔薬 (副作用: 悪夢・幻覚)



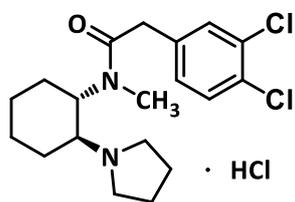
- CB系 (CB R-agonist)
大麻 (Δ^9 -THC)
中枢: 主にCB1受容体



- κ -Opioid系 (κ -opioid R-agonist)
サルビア・ディビノラム: ヒトでの乱用 (幻覚: 解離性)
(*Salvia divinorum*)



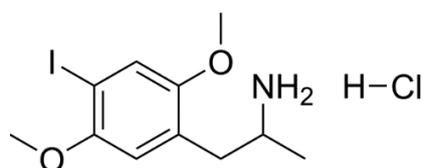
本研究課題にて合成した薬物 (図 2)



(±)-U50,488H

trans-(±)-3,4-Dichloro-*N*-methyl-*N*-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]

benzeneacetamide hydrochloride



DOI

4-Iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine

令和4～6年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究「3年間のまとめ」

分担研究報告書

分担研究課題:幻覚発現薬の評価を目指した 試験法の開発

研究分担者:鈴木 勉 湘南医療大学 薬学部

研究協力者:加藤英明 湘南医療大学 薬学部

【研究要旨】

乱用目的に次々と合成され、市中に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発が望まれる。また、幻覚作用の客観的評価として、定量化・数値化が必要と考えられる。本研究では、幻覚発現薬として κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 4-iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI) を使用し、マウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験を実施した。さらに、幻覚発現時には情動異常を引き起こす可能性が考えられるため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。条件づけ場所嗜好性試験においては、 κ オピオイド受容体および 5-HT₂ 受容体作動薬により嫌悪効果が認められた。この嫌悪効果は、おそらく幻覚発現薬の幻覚作用に起因していると考えられる。したがって、本試験を用いることで嫌悪作用を指標とした幻覚発現薬による幻覚作用の評価が可能と考えられる。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ オピオイド受容体作動薬および 5-HT₂ 受容体作動薬で情動異常を検出できたことから、幻覚発現薬の幻覚発現作用に伴う情動異常が評価可能であると考えられる。

A. 研究目的

指定薬物は中枢神経系に作用して、興奮若しくは、抑制又は幻覚作用を発現する薬物に分類される。これらを指定薬物として指定するにあたり、薬物による中枢興奮作用や抑制作用については自発運動量、脳内アミン量の変化、受容体結合実験などの結果から指定が

行われているが、幻覚作用の評価は非常に困難である。これまでに幻覚作用を発現することが知られている 5-HT_{2A} 受容体作動薬などは、マウスにおいて首振り反応 Head Twitch Response (HTR) を誘発することが明らかにされている。また、薬物を摂取した時の感覚効果の評価する薬物弁別法では幻覚作用を発現す

ることが知られている 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) の弁別刺激効果に対して 5-HT_{2A} 受容体作動薬の 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が一般化することから類似した感覚効果を示す可能性が明らかにされている。さらに、 κ オピオイド受容体作動薬であるサルビノリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている。 κ オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す。加えて、NMDA 受容体拮抗薬の phencyclidine (PCP) や ketamine なども幻覚作用を発現する。しかし、これらの 3 種類の幻覚発現薬の類似点や相違点も明確にされていない。次々と乱用目的に合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発や上記 3 種類の幻覚発現薬と各評価法への適正を明らかにすることが望まれる。そこで、本研究では先ず κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用し、マウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference test) を実施した。さらに、幻覚発現薬では情動異常を引き起こす可能性が考えられたため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl、25-30 g、日本クレア) を使用した。動物実験は、湘南医療大学動物実験委員会の承認を得て行った。

使用薬物：研究分担者が合成した κ オピオイド受容体拮抗薬である (\pm)-U50,488H (trans-(\pm)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]benzeneacetamide hydrochloride)) および セロトニン 5-HT₂ 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) を使用した。また、デキストロメトルファン (富士フィルム和光純薬) を用いた。いずれの薬物も生理食塩液 (大塚製薬) に溶解して使用した。

1. 条件づけ場所嗜好性試験

条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference test: CPP 法) では、白・黒 2 コンパートメントボックス (15 × 30 × 15 cm、幅×全長×高さ) を使用した。ボックスの特徴としては、黒のボックスは平らな床面、白のボックスは凹凸のある床面で構成されており、ボックスの視覚 (実験装置壁面の色: 白および黒) および触覚 (実験装置床面の材質: 凹凸) の違いがある。薬物の条件づけの方法は、プレ試験法およびカウンターバランス法の組み合わせを改良した方法を採用した。薬物の条件づけ開始前日 (day -1) に白・黒 2 コンパートメントボックスの滞在時間 (15 分間) を測定し、白・黒 2 コンパートメントボックスの各滞在時間を指標に層別無作為に群分けし、試験する群の中で薬物と溶媒の投与と各ボックスの組み合わせ (薬物-白、薬物-黒、溶媒-白、溶媒-黒) の偏りをなくした条件づけの方法とした。条件づけは次のように行った。午前の条件づけでは、動物に溶媒である生理食塩液を投与して白あるいは黒のボックスに一定時間 (30 分間) 閉じ込めた。次に、8 時間の間隔を置い

た午後の条件づけでは、動物に薬物を投与して黒あるいは白のボックスに一定時間 (30 分間) 閉じ込めた。これらの操作を 1 セッションとし、この条件づけを 3 セッション (day 1-3) 繰り返した。条件づけ終了 24 時間後の day 4 および 96 時間後の day 7、さらに 7 日後の day 14 に試験試行を行った。試験試行では、動物に薬物および溶媒ともに投与せず、白・黒ボックスの滞在時間 (15 分間) を測定した。データの解析は、薬物処置側ボックスの滞在時間から溶媒処置側ボックスの滞在時間を差し引いた値を CPP スコアとした。プレ試験法では薬物処置側のボックスにおける、条件づけの前と後の滞在時間の変化を計算し CPP スコアとした。これらの値がプラス (+) であれば、条件づけした薬物の報酬効果が発現し、マイナス (-) であれば薬物処置側のボックスからの回避行動すなわち嫌悪効果が発現したとして評価した (Fig. 1)。

2. ガラス玉覆い隠し試験

ガラス玉覆い隠し試験は、ラット用飼育ケージ (27×44×19 cm、幅×全長×高さ) を用いて、約 5 cm の深さで床敷きを敷き詰めた。ガラス玉が床敷きに埋もれないように上から押し固めた床敷き上に 25 個のガラス玉を均等に配し、30 分間自由に探索させた。薬物投与 15 および 30 分後、真上から観察した時、2/3 以上床敷きが覆いかぶさっているガラス玉の数 (number of buried marbles) を観察した。ガラス玉覆い隠し試験は、薬物の急性投与後および CPP 試験における day 4、7 および 14 の試験試行後に実施した (Fig. 2)。

3. 統計解析

すべてのデータは、In stat 3 for Windows (GraphPad) により解析した。行動薬理的データは、平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) として表記し、統計学的有意差の評価は、Dunnett の多重比較検定を用いた。

C. 研究結果

1. 条件づけ場所嗜好性試験

条件づけ場所嗜好試験の結果、day 4 および 7 において U50,488H 1 mg/kg 投与群では、生理食塩液対照群と比較して有意な CPP スコアのマイナス (-)、すなわち嫌悪効果が認められた (Fig. 3)。また、day 4 において DOI 3 mg/kg 投与群では、生理食塩液対照群と比較して有意な CPP スコアのマイナス (-)、すなわち嫌悪効果が認められた (Fig. 4)。

2. ガラス玉覆い隠し試験

ガラス玉覆い隠し試験の結果、U50,488H 0.3、1 および 3 mg/kg 急性投与群においては、15 および 30 分後において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の低下が認められた (Fig. 5)。また、CPP 試験における day 4 の試験試行後に実施した本試験の結果、30 分後の U50,488H 1 mg/kg 投与群において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の増加が認められた (Fig. 6)。DOI 0.3 および 1 mg/kg 急性投与群においては 15 分後に、1 および 3 mg/kg 投与群においては 30 分後において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の低下が認められた (Fig. 7)。また、CPP 試験における day 4 の試験試行後に実施した本試験の結果、15 分後

の DOI 3 mg/kg 投与群、30 分後の DOI 1 および 3 mg/kg 投与群において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の増加が認められた (Fig. 8)。ガラス玉覆い隠し試験の結果、デキストロメトルファン 10 および 40 mg/kg の 15 分後、40 mg/kg の 30 分後の急性投与群において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の低下が認められた (Fig. 9)。

D. 考察

κ オピオイド受容体作動薬であり、ヒトでも乱用されているサルビノリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている¹⁾。 κ オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す^{2,3)}。他の先行研究と同様に CPP 法において κ オピオイド受容体作動薬で嫌悪効果が認められている。 κ オピオイド受容体作動薬は、高用量投与では鎮静作用が認められる。U50,488H 10 mg/kg での条件づけによる嫌悪効果の消失が認められたのはこの鎮静作用に起因すると考えられる。さらに、本研究では、5-HT₂ 受容体作動薬 DOI 誘発の嫌悪効果を初めて捉えることに成功した。U50,488H および DOI による嫌悪効果は、幻覚発現薬の幻覚作用に起因している可能性が考えられる。幻覚作用に起因すると考えられる嫌悪効果は、U50,488H では最終投与の 4 日後まで少なくとも持続していることが明らかとなった。一方、DOI では同様の嫌悪効果は認められなかったため、幻覚作用に起因した嫌悪効果は U50,488H の方が強度であることが考えられた。このように、本試

験を用いることで、嫌悪作用を指標とした幻覚発現薬の幻覚作用を定量化・数値化して評価できる可能性が示唆された。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H 0.3-3 mg/kg の急性投与において情動異常を検出できた。この情動異常は、U50,488H による幻覚発現に起因する可能性も考えられた。さらに、3 日間の条件づけ終了 24 時間後の day 4 においても U50,488H 1 mg/kg 投与群で情動異常を検出できた。この情動異常は、複数回の U50,488H 投与による嫌悪効果を伴う幻覚発現が情動に影響を及ぼした可能性が考えられた。5-HT₂ 受容体作動薬 DOI 0.3-3 mg/kg の急性投与において情動異常を検出することができた。この情動異常は、U50,488H と同様に幻覚発現に起因している可能性が考えられる。さらに、3 日間の条件づけ終了 24 時間後の day 4 の DOI 1 および 3 mg/kg 投与群、さらに day 7 の DOI 3 mg/kg 投与群で情動異常を検出できた。この情動異常は、複数回の DOI 投与による嫌悪効果を伴う幻覚発現が情動に影響を及ぼしたと考えられた。幻覚作用に起因すると考えられる情動異常は、DOI では最終投与の 4 日後まで少なくとも持続していることが明らかとなった。情動面での影響は、U50,488H に比べ DOI の方がより強力であると考えられた。さらに、市販薬乱用もされている NMDA 受容体拮抗薬デキストロメトルファン投与群でも情動異常を検出することができた。

本試験を用いることで、幻覚発現薬の幻覚発現に伴う情動異常を評価することが可能であると考えられた。

E. 結論

幻覚作用の客観的評価が困難な要因として、定量化・数値化が難しいことが考えられる。本研究では、幻覚発現薬により条件づけ場所嗜好性試験において嫌悪効果が認められた。この嫌悪効果は幻覚発現を比較的短期間の計5日間で評価可能であり、かつ定量化・数値化できる可能性が考えられた。

F. 参考文献

- 1) Brito-da-Costa AM, Dias-da-Silva D, Gomes NGM, Dinis-Oliveira RJ, Madureira-Carvalho Á.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of salvinorin A and *salvia divinorum*: clinical and forensic aspects. *Pharmaceuticals* 14(2), 116, 2021.
- 2) Jay PM, Benjamin BL, Shuang L, John EP.: Charles Chavkin Prior activation of kappa opioid receptors by U50,488 mimics repeated forced swim stress to potentiate cocaine place preference conditioning. *Neuropsychopharmacology* 31 (4) ,787-794, 2006.
- 3) Ehrich JM, Messinger DI, Knakal CR, Kuhar JR, Schattauer SS, Bruchas MR, Zweifel LS, Kieffer BL, Phillips PE, Chavkin C.: Kappa opioid receptor-induced aversion requires p38 MAPK activation in VTA dopamine neurons. *J Neurosci.* 35(37), 12917-12931, 2015.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. ○鈴木 勉, 加藤英明, 船田正彦: 日本における薬物の乱用, 依存の現状と問題点. *ペインクリニック* (2024) 4, 839-846.
2. 鈴木 勉, 長谷川真司, 加賀谷 肇: 「ダメ.ゼッター。」普及運動は医療用麻薬の適正使用に影響しているか? *緩和医療薬学雑誌* (2024) 17, 17-24.
3. Azuma Y, Koike K, Chiba H, Mitamura A, Tsuji H, Kawasaki S, Yokota T, Kanemasa T, Morioka Y, Suzuki T, Fujita M: Efficacy of naldemedine on intestinal hypomotility and adhesions in rodent models of postoperative ileus. *Biol Pharm Bull* (2023) 46, 1714-1719.
4. 鈴木 勉: 【別冊秋号オピオイド】(PART2)基礎編 オピオイド身体依存のメカニズム. *LiSA 別冊* (2022) 29, 165-168.
5. Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H and Kagaya H: A questionnaire-based study on the “Dame. Zettai (Never Ever.)” drug abuse prevention campaign and the medical use of narcotic agents. *Jpn J Pharm Palliat Care Sci* (2022) 15, 121-128.

2. 学会発表

1. 鈴木 勉, 長谷川真司, 加賀谷肇: 医療用大麻のあり方を議論する Pro & Con 大麻の規制と人体影響: 日本アロマセラピー学会 2024. 11. 2-3 (東京都品川区)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他

特になし

条件づけ場所嗜好性試験 (CPP test)による評価

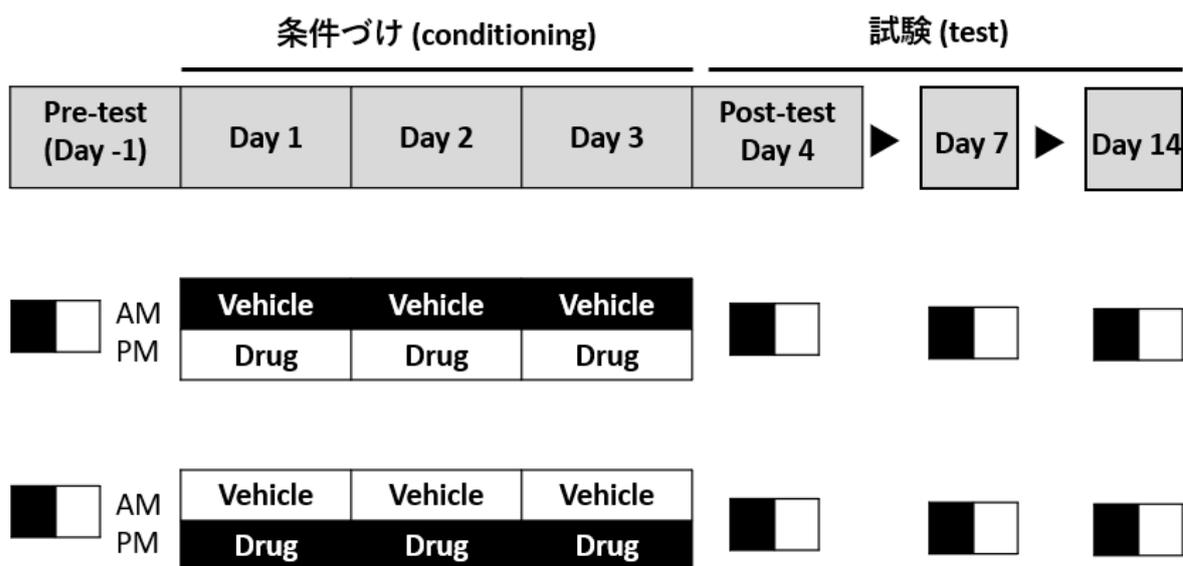
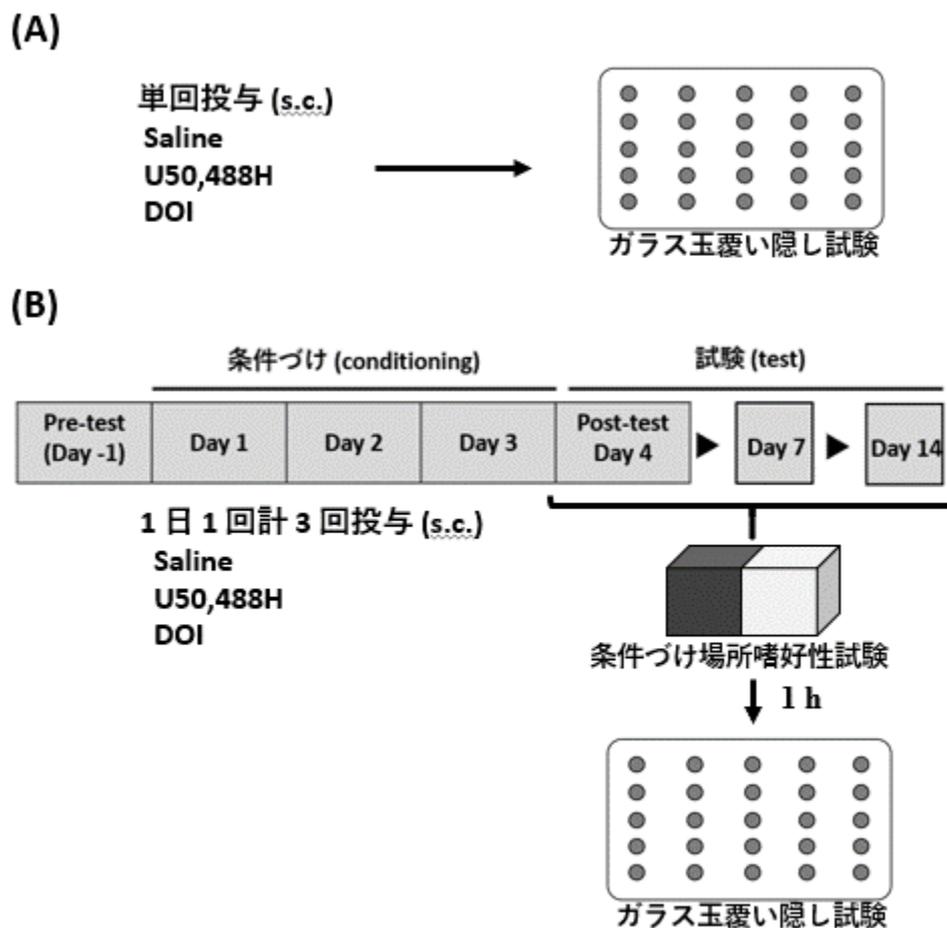


Fig. 1

条件づけ場所嗜好性試験による評価スケジュール

ガラス玉覆い隠し試験による評価

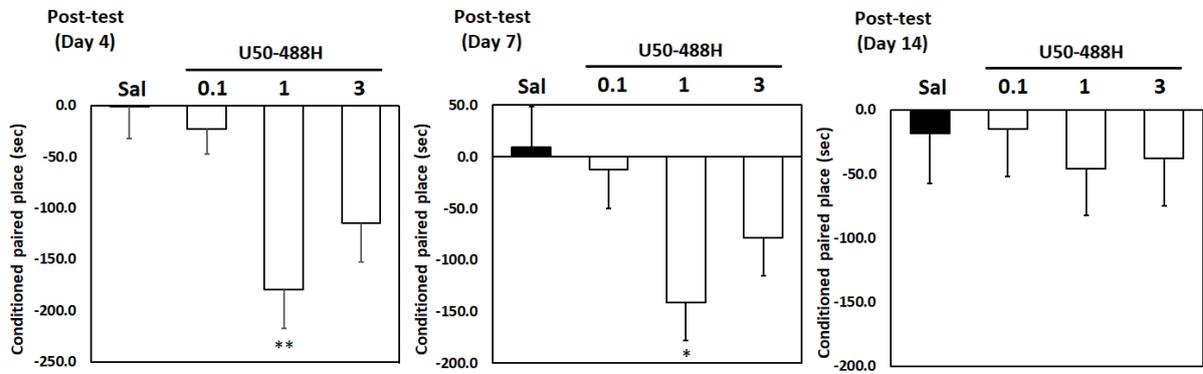


薬物の単回投与後 (A) および条件づけ場所嗜好試験の試験 1 時間後 (B) に評価

Fig. 2

ガラス玉覆い隠し試験による評価スケジュール

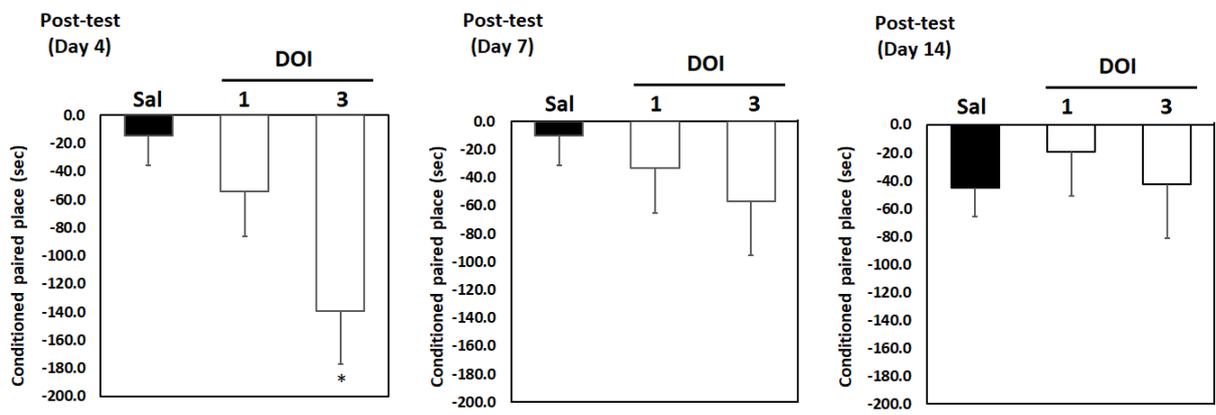
薬物の単回投与後 (A) および条件づけ場所嗜好試験の試験 (test) 1 時間後 (B) に実施



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 3

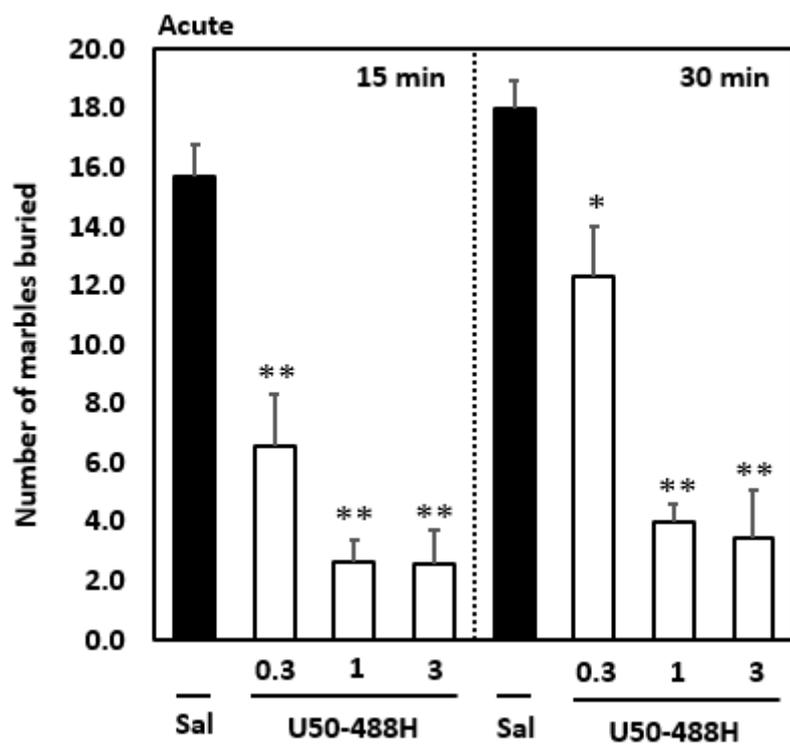
条件づけ場所嗜好性試験による U50-488H の評価



*: $p < 0.05$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 4

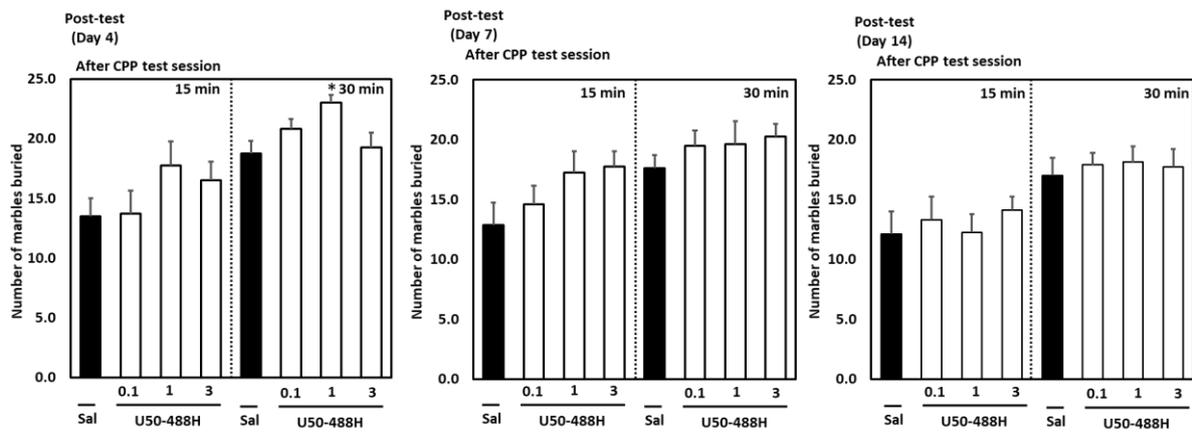
条件づけ場所嗜好性試験による DOI の評価



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 5

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価（急性投与）



*: $p < 0.05$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 6

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価

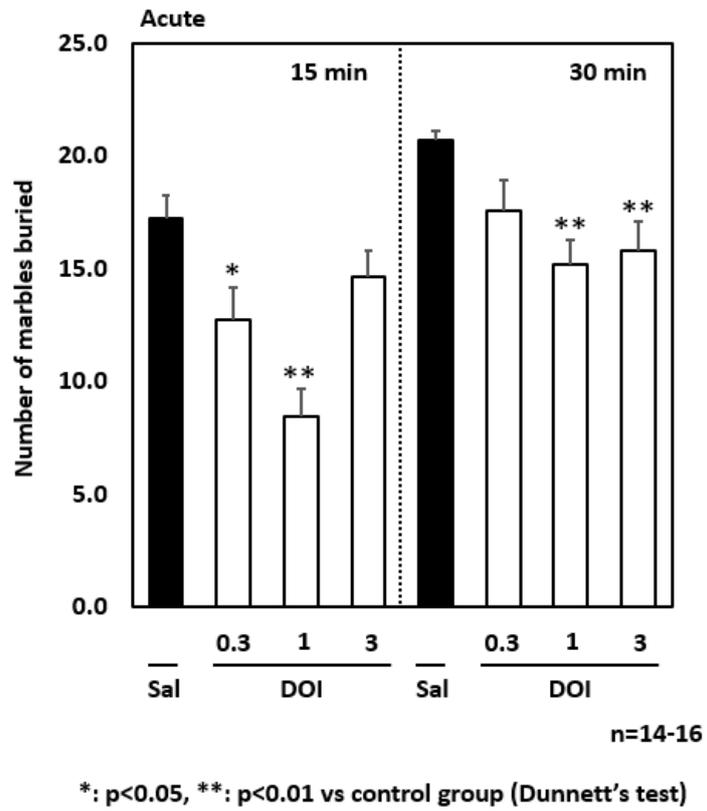
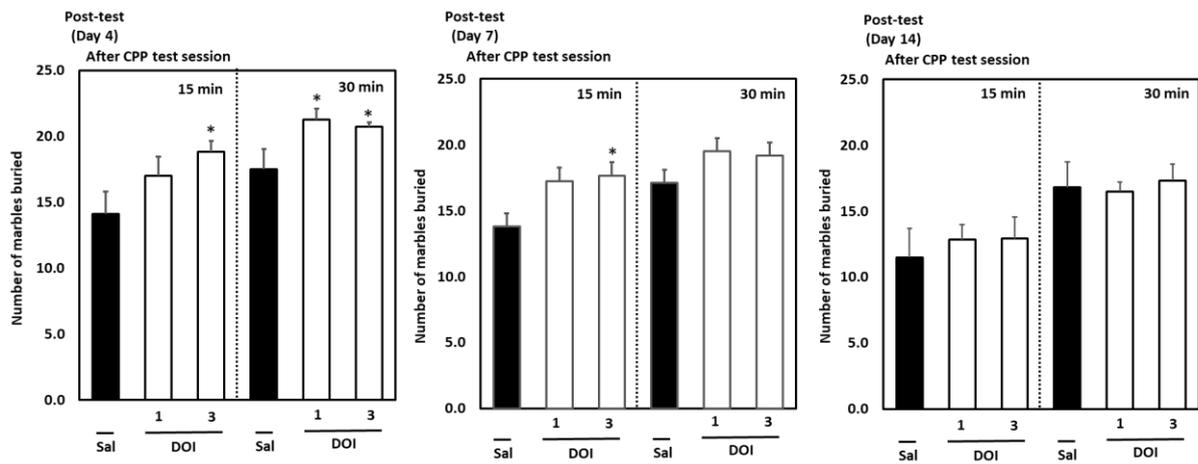


Fig. 7

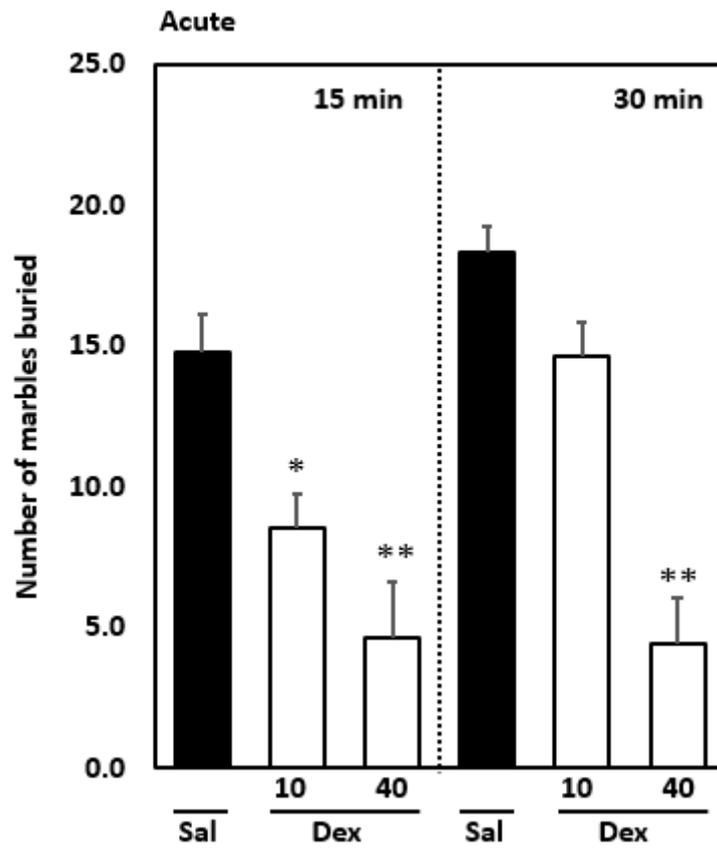
ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価 (急性投与)



*: $p < 0.05$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 8

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 9

ガラス玉覆い隠し試験によるデキストロメトルファンの評価

令和 4-6 年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究「3年間のまとめ」

分担研究報告書

危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

分担研究者：船田正彦 湘南医療大学 薬学部

研究協力者：池上大悟 湘南医療大学 薬学部

【研究要旨】

未規制の乱用薬物である危険ドラッグには、幻覚作用を示す薬物が存在する。幻覚作用の評価方法は確立しておらず、法規制のためには正確に幻覚作用の評価を行うシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示唆されている。セロトニン受容体作用を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 HTR に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。HTR を定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。マグネットメーターは、ポリウレタン銅線を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。実験には、ICR 系マウスを使用した。マウスの頭蓋表面に強力な磁力を有するマグネットをデンタルセメントで留置して、装置内での HTR の動きで感知される電気信号を測定した。装置上部より、ビデオ撮影を行い、行動変化と電気信号の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。幻覚を誘発する薬物として、セロトニン 5-HT₂ 受容体作用薬の 4-iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI)および選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体作用薬である 4-bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide (TCB-2)を使用した。DOI および TCB-2 投与後、HTR の特異的なシグナルの検出を行った。DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。DOI による HTR は選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬の (R)-(+)- α -(2,3-dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperinemethanol (MDL100907)により完全に抑制された。

以上の結果から、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。セロトニン受容体作用薬によるマウスの首振り反応の発現には、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。本解析手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

A. 研究目的

危険ドラッグとして合成カンナビノイド、カチノン系化合物、オピオイド化合物および催幻覚物質などが流通し、事件事故、健康被害が発生しており、世界的な問題となっている¹⁾。

催幻覚物質として、インドールアミン系とフェニルアルキルアミン系という 2 つの化学構造を有する化合物群が知られている。フェニルアルキルアミン系幻覚剤として、フェニルイソプロピルアミン (2,5-ジメトキシ-4-ヨードアンフェタミン (DOI)、2,5-ヨードアンフェタミン (DOI)、ジメトキシ-4-メチルアンフェタミン (DOM) などが流通している²⁾。こうした化合物群は、ラットやマウスの動物実験において、特徴的な首振り反応 Head Twitch Response (HTR)を示すことが報告されており、幻覚作用を反映する行動モデルとして注目されている^{3,4)}。

幻覚作用を示す危険ドラッグの法規制のためには、幻覚作用を適切に評価するためのシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係性を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示

唆されている^{3,4)}。セロトニン受容体作用を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl、25 - 30g、日本クレア) を使用した。

使用薬物：セロトニン 5-HT₂ 作用薬である 4-Iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI, Sigma-Aldrich) および選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体作用薬である 4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide (TCB-2, Tocris) を使用した。また、選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬としては (R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperinemethanol (MDL100907, Tocris) を使用した。

1. マグネットメーターの作製

マグネットメーターは、ポリウレタン銅線

(絶縁部含めて 0.26mm 径銅線) を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。装置内の磁石の動きにより誘発される電気信号を PowerLab 26T (AD AD INSTRUMENTS、U.S.A.)により検出し、LabChart(LCS100/8、(AD AD INSTRUMENTS、U.S.A.)を使用して解析した(Fig. 1)。

2. マウス首振り反応の検出

マウスの頭蓋表面にネオジウム磁石 (4mm X 4mm X 2mm, 375mg) をデンタルセメントで留置した。1 週間の回復を待って、マウスをマグネットメーター内に入れ、装置内でのマウス首振り反応(HTR)の動きで感知される磁力変化を測定した。

ビデオ解析：ビデオカメラ (Handycam, Sony, 4K FDR-AX60)にて行動変化を録画し、首振り反応の出現を解析した。

幻覚を誘発する薬物として、DOI を使用した。装置上部より、ビデオ撮影を行い、行動変化と磁力変化の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。同様に、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用薬 TCB-2 の効果も測定した。

3. 統計解析

全てのデータは、Prism 7 for Mac OS X により解析した。行動薬理学的データおよび電気信号の解析データは一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、ポストホックテストとして Dunnett's multiple comparison test により比較した。

C. 研究結果

1. マグネットメーターの作製

マウスの頭蓋表面にネオジウム磁石を留置したマウスに DOI(1)を投与し、装置内へ入れると、一定の振幅の中に鋭いスパイク信号が確認された(Fig. 2A)。鋭いスパイク信号が確認された部分では、マウスは頭部を高速で振る行動が発現していた。そこで、ビデオによる行動変化と電気信号として得られる波形から、HTR に関連する電気信号のみを抽出する条件設定として、適切なフィルター処置条件を検討した(Fig. 2B)。その結果、行動変化から得られる電気信号の波形について、40-200Hz のフィルター処理を行うことで、HTR の特異的なシグナルとして分離できることが明らかになった(Fig. 2C)。

2. マウス首振り反応の検出

マグネットメーターの使用 (40-200Hz のフィルター処理) で、DOI 投与後、多数の HTR の発現を確認することが可能であった。また、DOI の用量依存的な HTR の発現が確認された(Fig. 3)。同様に、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用薬 TCB-2 投与においても、HTR の特異的なシグナルを分離することが可能であった(Fig. 3)。設定条件では、DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。これらの効果は、選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬である MDL100907 の前処置により完全に抑制された(Fig. 4)。

D. 考察

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTRを定量化できる自動測定装置の開発を試みた。HTRを定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。

マグネットメーターとして、ポリウレタン銅線のコイルを作製し、直径15cmの円筒ビーカーに装着した。マウスの頭蓋表面にネオジウム磁石を留置したマウスにDOIを投与し、装置内へ入れると、一定の振幅の中に鋭いスパイク信号が確認された。鋭いスパイク信号が確認される部分では、マウスは頭部を高速で振る行動が発現していた。ビデオによる行動変化と電気信号として得られる波形を比較検討することにより、40-200Hzのフィルター処理を行うことで、HTRの特異的なシグナルとして分離できることが明らかになった。幻覚を誘発する薬物として、セロトニン5-HT₂作用薬であるDOI投与後、ビデオによる行動変化と電気信号として得られる波形から、HTRの特異的なシグナルを分離することが可能であった。設定条件では、DOI投与により用量依存的なHTRの発現が確認された。以上の結果から、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。

ヒトにおける幻覚作用とHTRの関連性から、HTRは、5-HT_{2A}受容体作用薬による幻覚作用を反映する行動指標の一つとして注目されて

いる^{5,6,7,8}。本結果からも、セロトニン5HT_{2A}受容体作用薬TCB-2¹⁰においてHTR発現が確認されたことから、セロトニン5-HT_{2A}受容体がHTR発現に関与することが明らかになった。

一方、セロトニン系化合物以外の催幻覚薬ではHTRの発現が認められないため、HTRの幻覚作用のモデルとしての価値は限定的と考察されている⁹。セロトニン系化合物については、マウスを用いたHTRアッセイを、ヒトにおける幻覚作用を予測するための前臨床モデルとして用いることが可能であると考えられる。

本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

E. 結論

本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) United Nations Office on Drugs and Crime, Early Warning Advisory on NPS, 2022.

- <https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/Details/275dd468-75a3-4609-9e96-cc5a2f0da467>
- 2) Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004; 101:131–181. [PubMed: 14761703]
 - 3) Halberstadt AL, Geyer MA. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology.* 2011; 61:364–381. [PubMed: 21256140]
 - 4) Canal CE, Morgan D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug Test Anal.* 2012 Jul-Aug;4(7-8):556-76. doi: 10.1002/dta.1333. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22517680; PMCID: PMC3722587.
 - 5) González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q, Sealfon SC, Gingrich JA. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* 2007 Feb 1;53(3):439-52. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.008. PMID: 17270739.
 - 6) Halberstadt AL, Geyer MA. Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice: detection of the behavior based on the dynamics of head movement. *Psychopharmacology (Berl).* 2013 Jun;227(4):727-39. doi: 10.1007/s00213-013-3006-z. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23407781; PMCID: PMC3866102.
 - 7) Halberstadt AL, Geyer MA. Effects of the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I) and superpotent N-benzyl derivatives on the head twitch response. *Neuropharmacology.* 2014 Feb;77:200-7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.025. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012658; PMCID: PMC3866097.
 - 8) Halberstadt AL, Chatha M, Klein AK, Wallach J, Brandt SD. Correlation between the potency of hallucinogens in the mouse head-twitch response assay and their behavioral and subjective effects in other species. *Neuropharmacology.* 2020 May 1;167:107933. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019. 107933. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31917152; PMCID: PMC9191653.
 - 9) Canal CE, Morgan D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug Test Anal.* 2012 Jul-Aug;4(7-8):556-76. doi: 10.1002/dta.1333. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22517680; PMCID: PMC3722587.
 - 10) McLean TH, Parrish JC, Braden MR, Marona-Lewicka D, Gallardo-Godoy A, Nichols DE. 1-Aminomethylbenzocycloalkanes: conformationally restricted hallucinogenic phenethylamine analogues as functionally selective 5-HT2A receptor agonists. *J Med Chem.* 2006 Sep 21;49(19):5794-803. doi: 10.1021/jm060656o. PMID: 16970404.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦: 海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 54: 36-42, 2023.

2. 学会発表

- 1) 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用の評価と包括規制に関する研究. 第53回日本神経精神薬理学会年会 シンポジウム(東京、2023年7月21日)
- 2) 船田正彦. 米国におけるオピオイド乱用・依存問題の現状. 2023年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (岡山、2023年10月14日)
- 3) Tsukasa Tomizawa, Shuntaro Kikukawa, Hironobu Arita, Kayo Nakamura, Kosho Makino, Hidetsugu Tabata, Tetsuta Oshitari, Hideaki Natsugari, Masahiko Funada, Hideyo Takahashi. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Opioid μ -Receptor Antagonists The 11th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference (in Macao) Aug. 2023.
- 4) 菊川俊太郎、有田浩暢、富澤宰、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、

船田正彦、富山健一、高橋秀依「フェンタニル骨格に由来する新規オピオイド μ 受容体アンタゴニストの創製」第84回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(東京、2023年5月)

- 5) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の構造活性相関」日本薬学会 第143年会 (札幌、2023年3月)
- 6) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の合成と構造活性相関」第66回日本薬学会関東支部大会 (横浜、2022年9月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし

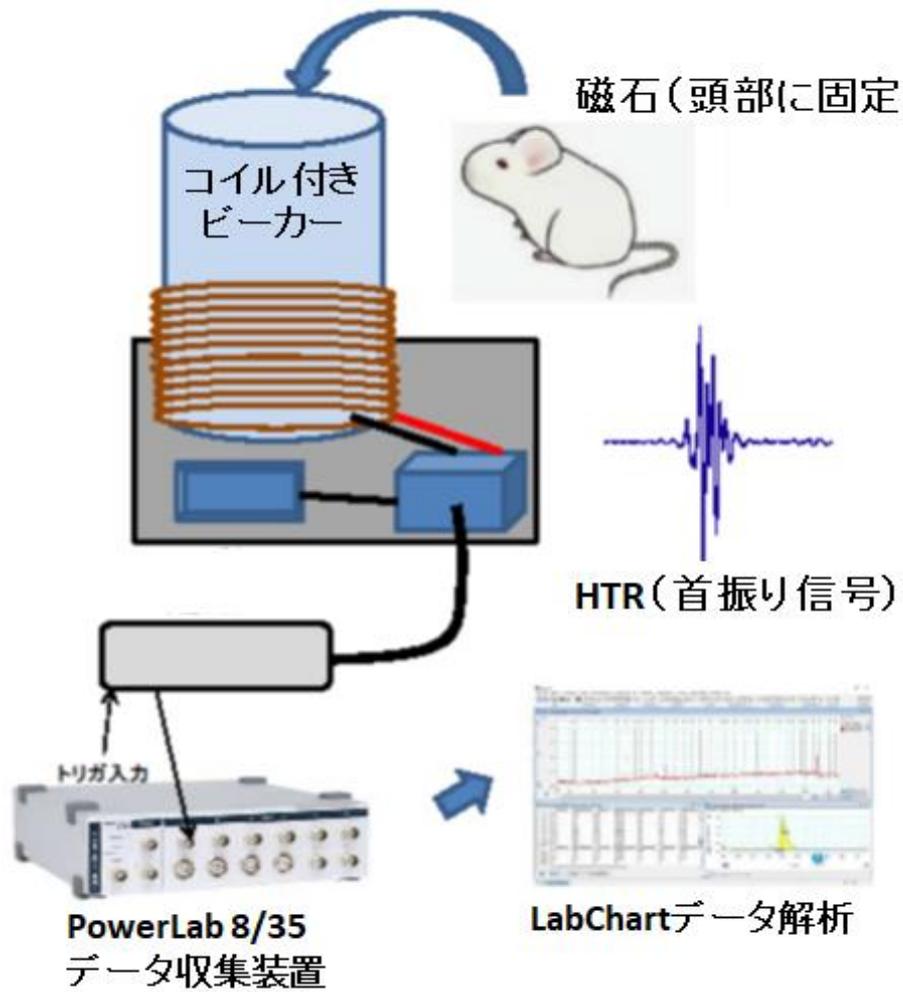


Fig. 1. マグネットメーター

銅線コイルを巻いた円筒状の磁力測定装置を作製した。ポリウレタン銅線（絶縁部含めて 0.26mm 径銅線）を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。麻酔下、頭蓋部へネオジウム磁石(4mm X 4mm X 2mm, 375mg) をデンタルセメントにて固定し 1 週間の回復を待って、行動変化を測定した。

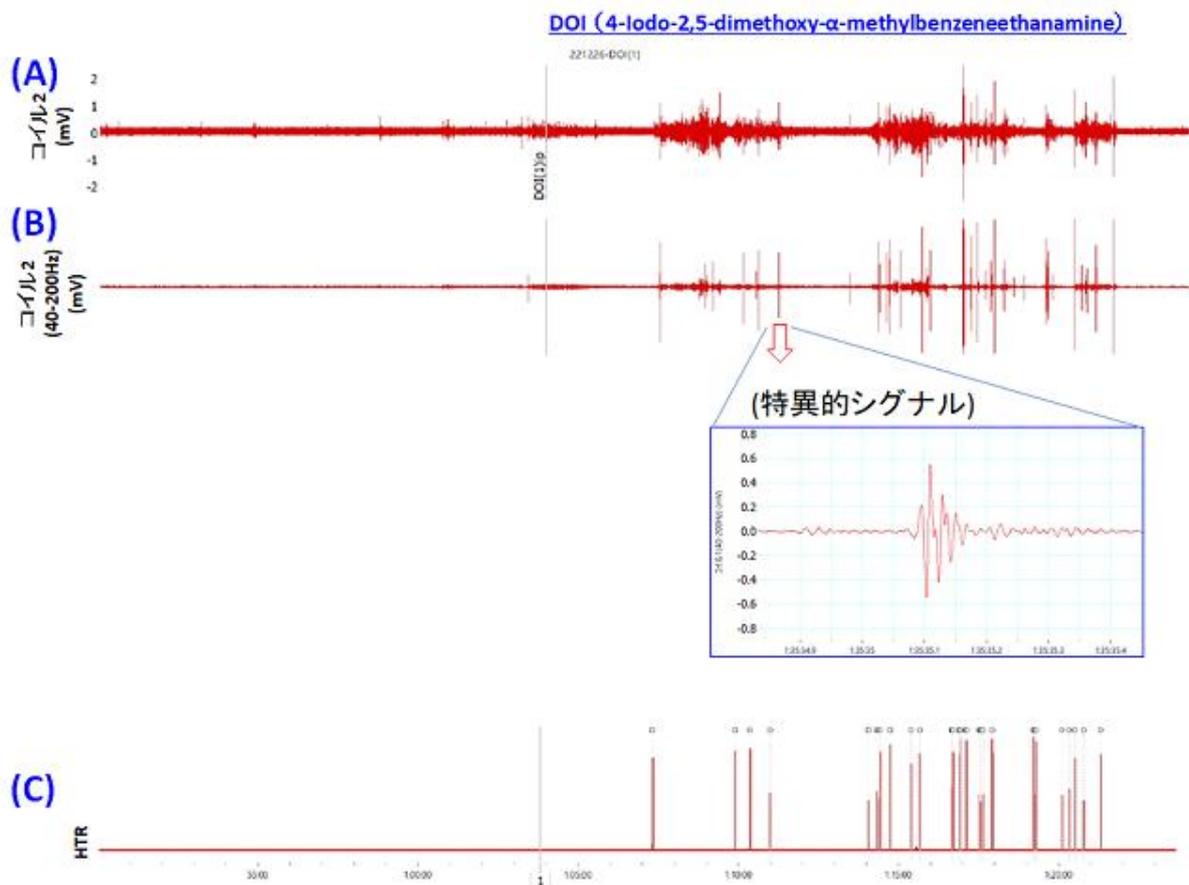


Fig. 2. マウス首振り反応の解析

(A) マウスの行動変化により、磁力変化が検出された

(B) ビデオ解析とフィルター処理により、特異的な定量的測定が可能になった。

◎40-200Hz のフィルター処理＝特異的なシグナルとして、波形の特徴を確認

(C) ○印：首振り反応(HTR)

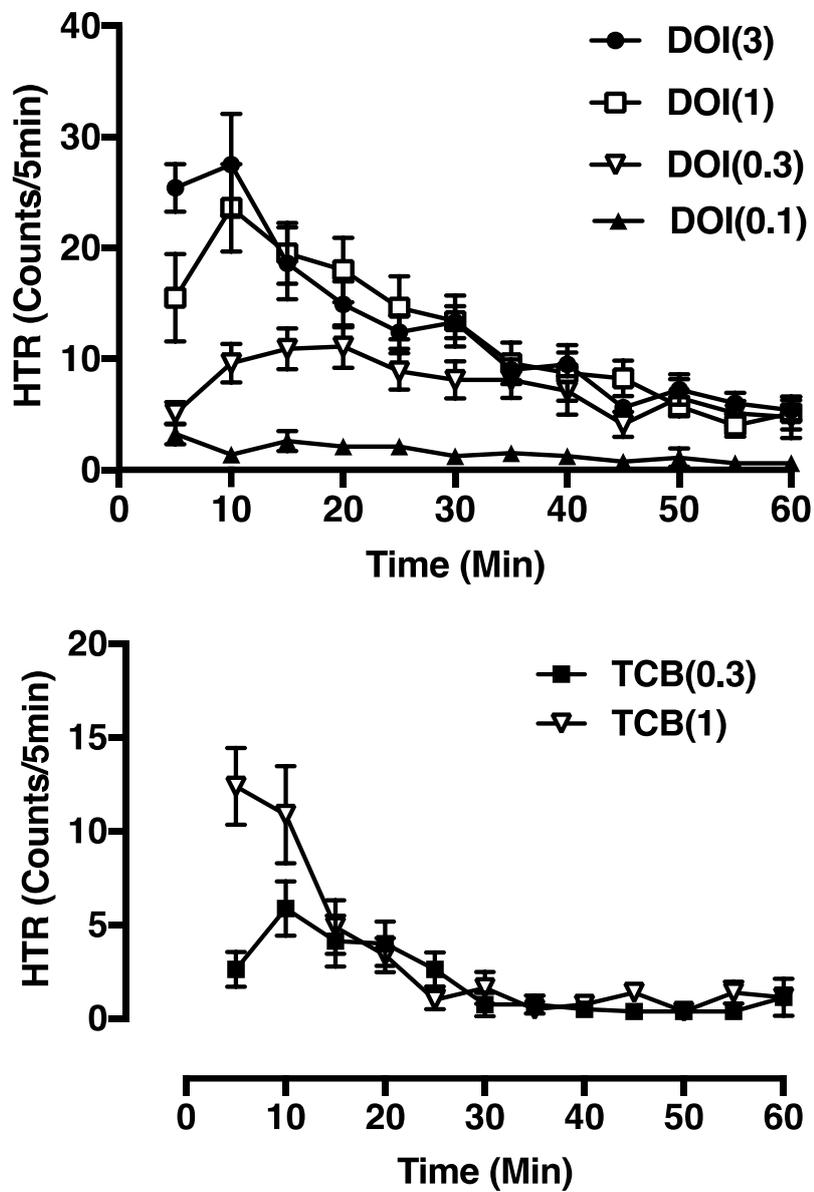


Fig. 3. セロトニン作用薬による首振り反応
 DOI (0.1-3 mg/kg), TCB-2 (0.1-3 mg/kg)による首振り反応(HTR) 5分ごとの行動変化

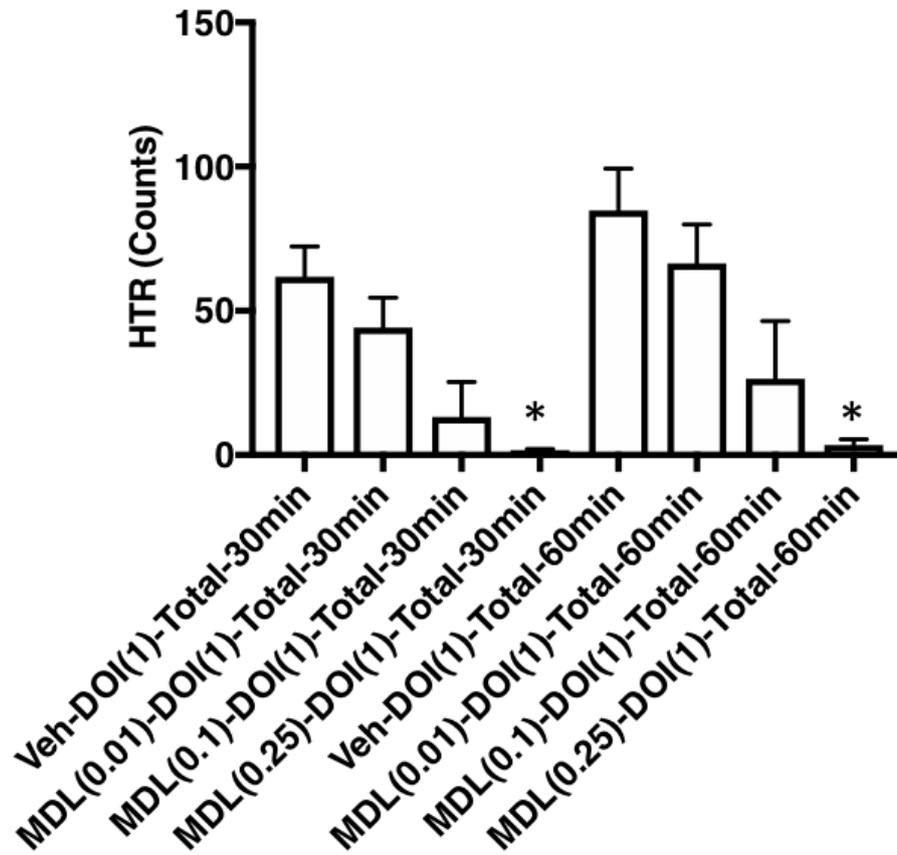


Fig. 4. セロトニン受容体の役割
 DOI (1 mg/kg)による首振り反応(HTR) に対するセロトニン 5HT2A 受容体拮抗薬 MDL100907 の影響.

令和 4 -6 年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究「3年間のまとめ」

分担研究報告書

幻覚作用を有する薬物の合成

分担研究者：栗原正明 湘南医療大学 薬学部

協力研究者：市丸 嘉 湘南医療大学 薬学部

【研究要旨】

[緒言] 幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。

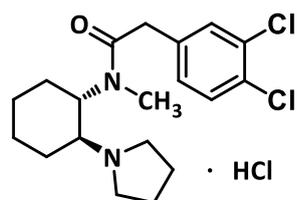
[結果] セロトニン受容体に作用する化合物 U50,488H の合成を行った。

[考察] 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、トータル収率約 20%で U50,488H を合成することができた。次に光学活性体の合成を行いたい。

A. 研究目的

危険ドラッグが依然として大きな社会問題となっている。それに伴い、危険ドラッグの速やかな規制が求められており、そのための迅速な評価法開発が急務となっている。評価法の検討には、使用する化合物の供給が必要不可欠である。本研究では幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。

合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。



(±)-U50,488H

Fig. 1

B. 研究方法

参考文献 1,2)に従って U50,488H の合成を行った。出発原料として 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を用いた。

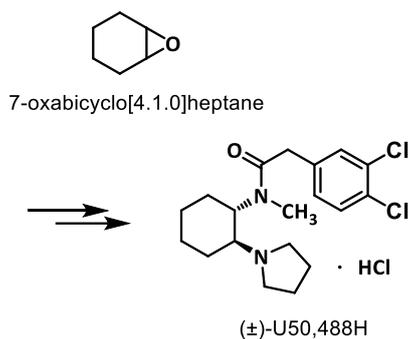


Fig. 2

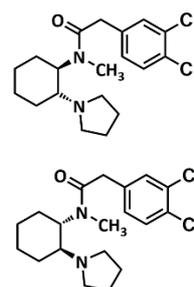


Fig. 3

C. 研究結果

7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、トータル収率約 20% で U50,488H を合成することができた。(Fig. 3)

X 線構造解析により構造を確認した。(Fig. 4) 合成した U50,488H 塩酸塩として、評価を行う各分担研究者に供した。

D. 考察

U50,488H キラルな分子であるので、鏡像体間で生物活性が違ふことが予測される。光学活性な U50,488H 合成することは重要なことと考えられるので、光学活性を得る方法の検討を行うことを考えたい。

E. 結論

7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、6 段階でトータル収率約 20% で U50,488H 合成した。合成した U50,488H 塩酸塩として、評価を行う各分担研究者に供した。

今後も、幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行う。

F. 参考文献

- 1) J. González-Sabín, et al., *Chem. Eur. J.*, 2004, 10, 5788–5794.
- 2) P.L. Chesis and M.J. Welch, *Appl. Radiat. Isot.*, 1990, 41, 267–273.

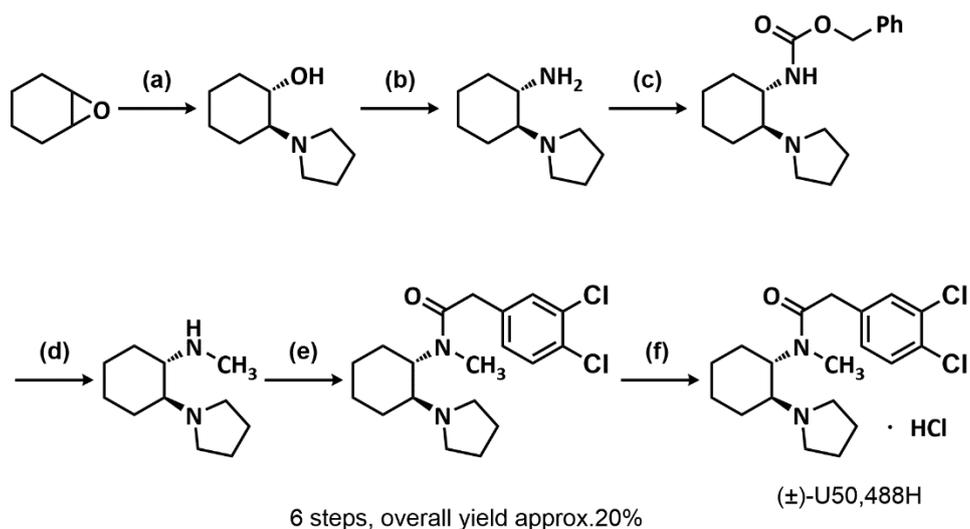
G. 研究発表

1. 論文発表
 - 2) Moriya S, Funaki K, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.: Synthesis and properties of PNA containing a dicationic nucleobase based on N4-benzoylated cytosine.: *Bioorg Med Chem Lett.* 2023 May 15;88:129287.
 - 3) Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.: Bis(nitrato- κ O)(1,4,8,11-tetra-aza-cyclo-tetra-decane- κ 4 N)zinc(II) methanol monosolvate.: *IUCrdata.* 2022 Aug 31;7(Pt 8):x220854.
 - 4) Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T:
PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA: *Peptide Science 2021, 2022*, 111-112
2. 学会発表
 - 1) 大環状ポリアミン-亜鉛錯体の単結晶 X 線結晶構造解析：市丸 嘉、加藤 紘一、小池 透、黒崎 博雅、栗原 正明：日本薬学会第 143 年会（2023/03）
 - 2) 市丸嘉, 加藤紘一, 栗原正明, 黒崎博雅：アントラセンを導入した Bis(2-picoyl)amine 誘導体-亜鉛錯体の DNA 光切断活性：第 67 回日本薬学会関東支部大会（2023/9/16, 東京）
 - 3) Shun-suke Moriya, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Strand invasion by PNA containing preQ1: 第 50 回国際核酸化学シンポジウム（2023/11/1-3）宮崎
 - 4) Shun-suke Moriya, Mai Kiyosue, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Properties of peptide nucleic acid containing n4 - bis(aminomethyl)-benzoylated cytosine for enhanced DNA binding: 第 60 回ペプチド討論会（2023/11/8-10）滋賀

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他

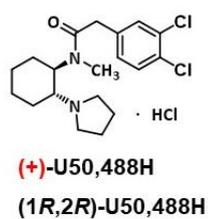
特になし



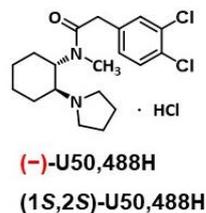
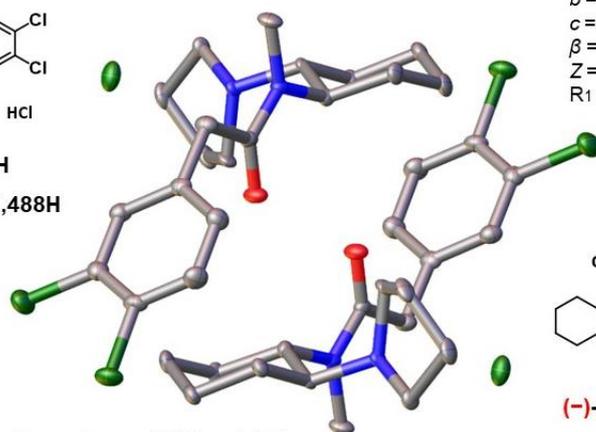
- (a) Pyrrolidine, C₂H₅OH, reflux, 16 h, 75–85%
 (b) CH₃SO₂Cl, triethylamine (TEA), aq NH₃, 0oC to r.t., 16 h, quant
 (c) Cbz-Cl, TEA, 0oC to r.t., 5 h, 60–75%
 (d) LiAlH₄, THF, r.t., 16 h, quant
 (e) 1,1'-Carbonyldiimidazole, THF, r.t., 4 h, 40–50%
 (f) HCl, ethanol, r.t., 5 min, quant

Fig. 4

合成した(±)-U50,488Hの単結晶X線構造解析(XRD)



Space group: *P21/n*
 C₁₉H₂₆Cl₂N₂O · HCl · CH₃OH
a = 8.77080(10) Å
b = 18.5599(2) Å
c = 13.6323(2) Å
 β = 105.012(2)°
 Z = 4
 R₁ = 5.41%, wR₂ = 15.88%



The thermal ellipsoids are drawn at 50% probability.
 All hydrogen atoms and solvate CH₃OH are omitted for clarity.

Fig 4 合成した(±)-U50,488Hの単結晶X線構造解析(XRD)

Fig. 5

令和4-6年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究「3年間のまとめ」

分担研究報告書

摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価

分担研究者：森 友久 星薬科大学 薬学部

【研究要旨】

乱用が問題となる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚を有し、自発運動を強く亢進させるとされてきた。そのため乱用に関する蓋然性評価において、精神刺激薬様の摂取感覚あるいは自発運動促進効果が蓋然性評価の指標とされてきた。しかしながら我々の近年の研究では、いくつかの幻覚を発現するカチノン系薬物では、こうした相関が認められず、これらの結果は、指定薬物の指定に係る試験法として、少なくとも1つの指標による評価では、十分な評価が難しいことを示唆している。本分担研究課題では、様々なタイプの幻覚誘発薬によって引き起こされる行動変化を評価しうる系の構築を目指すため、本年度は、構造変換が容易な phenylpiperadine 誘導体に着目し、解析法について検討することとした。そこで、1-(3-trifluoromethylphenyl)piperadine (TFMPP)、1-(3-chlorophenyl)-piperadine (3-CPP) および phenylpiperadine による MDMA の弁別刺激効果に対する般化試験、さらにこれらの自発運動に及ぼす影響を検討した。その結果、phenylpiperadine および 3-CPP は MDMA 様の弁別刺激効果を示したものの、TFMPP は般化しかなかった。一方、自発運動の測定において、TFMPP は運動亢進を示したものの、phenylpiperadine および 3-CPP は自発運動に影響を及ぼさなかった。このように phenylpiperadine 構造を有する薬物においても精神刺激薬様の摂取感覚を持つにも関わらず、自発運動に影響を及ぼさない薬物が確認され、蓋然性評価系において、少なくともいくつかの評価系の組み合わせることが重要であると確認された。今後は、乱用が懸念される NMDA-遮断薬および α -受容体作動薬の乱用予測のための評価系について検討していくこととし、現在、弁別刺激効果ならびに自発運動の測定に着手している。

A. 研究目的

依存形成薬物には独特な感覚効果、即ち自覚効果があり、これを求めて精神依存が引き起こされ、乱用される。この薬物を摂取した時の感覚効果を動物において判別する試験法としては薬物弁別法が古くから用いられてきている。薬物弁別法ではヒトにおいて摂取した薬物により誘発される自覚効果を動物における弁別刺激効果と定義し、薬物の摂取感覚効果の類似性の証明や作用機序を解明することが可能となる。近年問題となってきた危険ドラッグは、幻覚作用をはじめとする自覚効果を引き起こすとされている。また、危険ドラッグを含めて多くの薬物は、自発運動に影響を及ぼすことも知られている。

近年社会問題となった危険ドラッグの乱用は、法の網をくぐり抜けるため既知の骨格に対して様々な修飾がなされた薬物が流通し、社会問題となってきた。こうした問題に対して、多くの危険ドラッグの共通構造であるカチノンあるいはカンナビノイド系の骨格に対する包括規制により危険ドラッグの乱用問題は鎮静化がなされてきている。しかしながら、これまでに乱用が問題となった機序を有する別の骨格、あるいは諸外国で乱用

が問題となってきたいるピペリジン系薬物、NMDA 受容体遮断薬あるいはオピオイド受容体作動薬の類自体の乱用問題に備える必要が出てきている。一方で、新たなタイプの危険ドラッグが出現した場合に、これらを評価する評価系の構築が十分ではないのが現状である。そこで、摂取感覚および行動変化による薬物乱用の評価による蓋然性評価のための評価系を検討することとした。

B. 実験方法

薬物弁別法

1. 実験動物及び飼育条件

Fischer 344 系雄性ラット (オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を用いた。この動物は恒温恒湿室 (23±1 °C、55±5 %) においてプラスチックゲージ内で飼育し、8:00 点灯、20:00 消灯の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお、薬物弁別法で使用したラットについては、体重が 230 g 程度になるよう摂餌制限を行った。なお飲水 (水道水) は自由とした。

2. 弁別装置

実験には、オペラントボックス (model GT8810、小原医科産業株式会社、東京) を使用した。オペラントボックス内の床はグリットとし、ボックス内には左右に 2 つのレバーを設置し、左右のレバーの間に強化子の給仕皿が 1 つ設置されているものを使用した。また、強化子として精密錠剤型飼料 (20 mg; 小原

医科産業株式会社、東京) を用いた。

3. 弁別訓練

MDMA、U50,488H あるいは quinpirole と vehicle との弁別訓練を開始する前に、すべてのラットにレバー押し訓練を行った。レバー押し訓練には左右どちらかのレバーが提示され、LLRLLRR (L= 左、R= 右) の順序でまず Fixed Ratio (FR) 1 強化スケジュールでレバー押し訓練を行った。また、1 セッションは 15 分とし、レバーを押すと強化子が与えられるスケジュールを用いた。1 セッションのレバー押し回数が 40 回に達した時点で FR1 におけるレバー押しが確立されたものとし、徐々に FR2、FR4、FR6、FR8、さらに FR10 へと増加させた。

FR10 での反応率 (response rate) が安定した後、薬物と vehicle との弁別訓練を FR10 スケジュールで行った。弁別訓練では 1 セッションを 15 分間とし、弁別訓練開始 30 分前に 薬物または vehicle を皮下投与した。各セッションの投与順序は DDVV... (D=薬物、V=Vehicle) とし、薬物もしくは溶媒投与時の左右のレバーの選択は、動物の嗜好性による片寄り (ばらつき) を避けるためにカウンターバランス法 (L=D、R=V の対応と L=V、R=D の対応の装置をそれぞれ 2 組用意した) を使用した。弁別獲得の基準は、最初の強化子を得るためのレバー押しの回数を First Food Pellet (FFP) として測定し、訓練において 5 日間連続して $FFP \leq 12$ (正反応率 83% 以上) となった場合を弁別獲得とし、弁別訓練は弁別獲得後も継続した。

4. 般化試験

般化試験は、薬物およびその溶媒の弁別獲得後、弁別訓練を継続しながら 3 日間連続して $FFP \leq 12$ を達成した際に行った。テストセッションは、ラットがオペラントボックス内の左右いずれかのレバーを合計 10 回押した時点で終了とした。また、セッション開始から 15 分が経過した時点で 10 回のレバー押し反応を認めなかった場合は反応が崩壊したと判断し、セッションを終了した。

統計解析

実験における測定値は、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) として表示した。テストセッションにおいては、総レバー押し回数に対する薬物側レバー押し回数の割合 (%) で求めた。訓練薬物の弁別刺激効果に対し、80 % を超えて薬物側レバー押し反応を示したものを般化とし、50-79 % の範囲を部分般化とし、50 % を下回る薬物側レバー押し反応を示したものを般化しなかったと判断した。また、反応率 (response rate) はレバーを問わず、10 回反応するまでの時間を 1 分間あたりのレバー押し回数に換算して求めた。自発運動量における統計解析には、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M) として表記し、統計学的有意差の評価は、Two-way ANOVA によって解析した後は、Bonferroni test に従って post-hoc test によって行った。

C. 結果

1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine(TFMPP) および 1-(3-chlorophenyl)-piperidine (3-CPP)

を用いて MDMA の弁別刺激効果に対する般化試験を行ったところ、前年度、3-CPP は MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示し、TFMPP は般化を示さなかったことから、本年度はさらに phenylpiperadine による般化試験を行った。その結果、phenylpiperadine は、MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示した(図 1)。これらの結果が自発運動量変化に相関するか否かについて検討したところ、MDMA の弁別刺激効果に般化を示した 3-CPP および phenylpiperadine では自発運動の亢進作用を示さなかったものの、TFMPP では弱いながらも自発運動亢進作用を示した(図 1)。

NMDA 拮抗薬についての蓋然性評価を行うための系の構築のために ketamine を用いて行動評価を行った。Ketamine は、5-20mg/kg の範囲で用量依存的な自発運動亢進作用が認められた。Ketamine (10 mg/kg)により発現する自発運動促進効果の機序を解析するために、prepro-enkephalin 欠損マウスを用いて C57BL/6J マウスの運動量と比較検討したところ、prepro-enkephalin 欠損マウスにおいて自発運動の有意な低値が確認された。本研究結果を受容体レベルで検討するために、各選択的受容体拮抗薬について検討したところ、naloxone (1 mg/kg) は影響を与えずに naltrindole は、ketamine により誘発される自発運動促進効果を有意に抑制した。さらに、細胞内伝達において、検討したところ、塩化リチウムは、ketamine により誘発される自発運動促進効果に対して影響を及ぼさなかったが、PF-2545920 はほぼ完全に抑制した。

Katamine の依存性をより正確に捉えるた

めに MDMA、U50,488H あるいは quinpirole という幻覚誘発と密接に関連する薬物によって誘発される摂取感覚と ketamine により発現する感覚との類似性を検討したところ、ketamine は MDMA、U50,488H および quinpirole の弁別刺激効果に対していずれも部分的に般化した。

D. 考察

Piperidine 誘導体の評価:ほとんどの依存形成薬物は、脳内のモノアミン神経系を活性化することにより精神刺激薬様の摂取感覚効果を誘発すると同時に、齧歯類においては自発運動促進効果を引き起こす。このような背景からこれまで自発運動促進効果が引き起こされる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚効果を引き起こし、自発運動を検討することは、薬物依存性を評価する指標として有用であるとされてきた。特に、近年乱用が問題となってきた幻覚誘発物質は、自己投与方法あるいは条件付け場所嗜好性試験によって強い精神依存を引き起こしにくいことから自発運動あるいは摂取感覚効果による評価の必要性が高まっていた。昨年度、麻薬に指定されている TFMPP および 3-CPP を用いて MDMA 様の弁別刺激効果の発現の有無について検討したところ、3-CPP は MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示したのに対し、TFMPP は般化を示さなかった。これらの結果をもとに従来の一般的な考え方が当てはまるか否かを検討したところ、TFMPP によって自発運動促進効果が認められたものの、3-CPP では自発運動促進効果は認められなかった。3-TFMPP および 3-CPP は phenylpiperadine 骨格を有

し、これまで世界各国においても乱用がカチノン系薬物と比べ問題となつてこなかったが、各国でカチノン系薬物の規制が強まり、今後、誘導体化がしやすいピペラジン誘導体の合成および乱用が懸念される。そこで、置換基を持たない phenylpiperadine そのものに依存形成能があるかについて検討したところ、phenylpiperadine は、自発運動促進効果に影響を及ぼさなかったものの、MDMA 様の弁別刺激効果を有していることが示された。以上の結果より、phenylpiperadine 骨格を有する薬物の評価において、自発運動促進効果と MDMA 様の弁別刺激効果に相関は認められないものの、いずれも乱用の危険性があることを示唆された。こうした自発運動促進効果と MDMA 様の弁別刺激効果の間に相関が認められない例はカチノン系ドラッグのいくつかには認められており、セロトニン系受容体を刺激する母核を持った薬物の蓋然性評価においては、少なくとも1つの評価系では十分ではなく、自発運動と MDMA 様の弁別刺激効果、あるいは行動観察などを含め複数の評価系を用いて検討する必要があると考えられた。

NMDA-拮抗薬の評価： NMDA-受容体を遮断して依存性を発現すると考えられている ketamine の行動変化を評価することにより乱用に関する蓋然性評価系の構築についての検討を行った。Ketamine を処置することにより用量依存的な歩行失調を伴う自発運動促進効果が認められた。このうち 10mg/kg の ketamine によって発現する自発運動促進効果は、enkephalin 欠損マウスおよび δ -受容

体拮抗薬である naltrindole によって抑制された。また、GSK-3 β を阻害する塩酸リチウムでは、ketamine の効果は抑制されなかったものの phosphodiesterase 10 阻害薬である PF-2545920 によってほぼ完全に抑制された。これらの抑制が認められた条件では、methamphetamine によって発現する自発運動促進効果は全く抑制されないことが一般的に知られているため、ketamine の精神刺激作用の発現機序は methamphetamine による機序とは明らかに異なることが示唆された。よって、今後は、本研究結果をもとに、全く新たな評価系として NMDA-遮断作用を有する薬物を評価する系を構築していく。

さらに、弁別刺激効果を指標に蓋然性評価系の構築を行うことを念頭に、幻覚誘発薬としての ketamine の感覚について検討した。幻覚を発現する機序を持つ MDMA、U50,488H (κ -受容体作動薬)あるいは quinpirole (D_2 -受容体作動薬)の摂取感覚の弁別を可能としたラットを用いて ketamine との類似性を般化試験により検討した。その結果、ketamine はいずれの薬物の弁別刺激効果に対して部分的般化を示した。以上のように、ketamine は、各種幻覚誘発物質とある程度共通する感覚を有しており、ketamine の感覚との類似性は、幻覚誘発薬の乱用を予測する系の構築に重要であると考えられた。今後 ketamine により弁別を獲得した動物を作製し、こうした動物によって NMDA-拮抗薬に特有の感覚から乱用の危険性についての蓋然性評価系を検討していく。

E. 結論

弁別刺激効果による蓋然性評価と比べ、自発運動促進効果による評価は非常に簡便でスクリーニング的にも非常に有用と考えられてきた。しかしながら、蓋然性評価において、乱用の危険性があるものの、運動の活性化作用を有さない薬物が多数存在するために自発運動に頼った評価では、多くの偽陰性が懸念される。弁別刺激効果においては、その選択性の高さから訓練薬物と機序が異なる場合には、類似性を示さないことが十分に想定される。乱用が予測される新規化合物の蓋然性評価において、こうした各評価系の特徴を考えた上でも、評価する構造に特異的な行動変化を評価出来る評価系をいくつか構築し、これらを使用して包括的に評価する必要があると考えられる。

F. 参考文献

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida S, Hamada Y, Narita M, Sato D, Tanaka K, Mori T, Tezuka H, Suda Y, Tamura H, Aoki K, Kuzumaki N, Narita M. Elucidation of the mechanisms underlying tumor aggravation by the activation of stress-related neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. (2023) Mol Brain. 16:18.

- 2) Sato D, Hamada Y, Narita M, Mori T, Tezuka H, Suda Y, Tanaka T, Yoshida S, Tamura H, Yamanaka A, Senba E, Kuzumaki N, Narita M. Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D1-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens. (2022) Molecular Brain 15:17.
- 3) Mori T, Yamashita K, Takahashi K, Mano S, Sato D, Narita M. Characterization of the discriminative stimulus effect of quinpirole: Further evidence for functional interaction between central dopamine D₁/D₂-receptors. (2022) Pharmacol Biochem Behav. 213:173314.
- 4) Mori T, Iwase Y, Uzawa N, Takahashi Y, Mochizuki A, Fukase M, Shibasaki M, Suzuki T. Synergistic effects of MDMA and ethanol on behavior: possible effects of ethanol on dopamine D₂-receptor-related signaling. (2021) Addict Biol e13000.
- 5) Mori T, Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T. Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice. (2021) Behav Brain Res. 396: 112802.
- 6) Mori T, Takemura Y, Arima T, Iwase Y, Narita M, Miyano K, Hamada Y, Suda Y, Matsuzawa A, Sugita K, Matsumura S, Sasaki S, Yamauchi T, Higashiyama K, Uezono Y, Yamazaki M, Kuzumaki N, Narita M. Further investigation of the rapid-onset and short-duration action of the G protein-biased μ -ligand

oliceridine. Biochem Biophys Res Commun
(2021) 534: 988-994.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

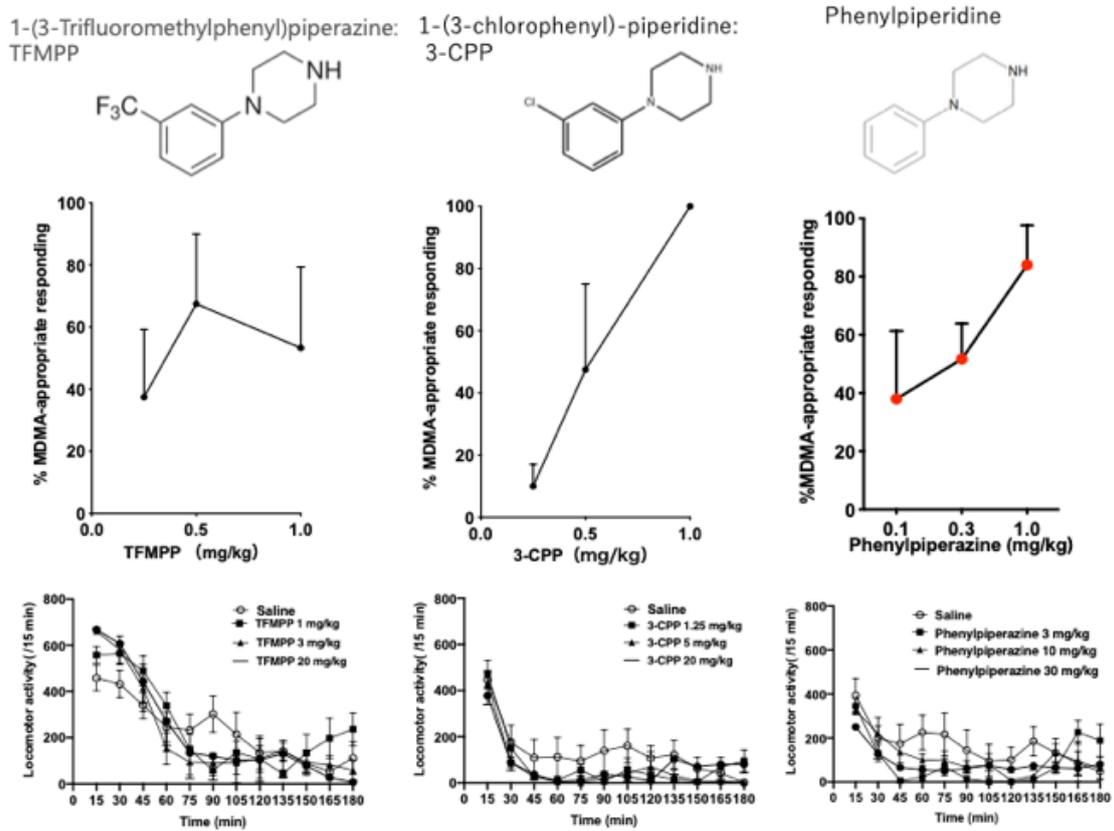


図1 1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine(TFMP:左)、1-(3-chlorophenyl)-piperidine (3-CPP:中央) および phenylpiperazine(右)の構造 (上段パネル)、MDMA の弁別刺激効果に対する般化 (中段パネル) および自発運動に及ぼす効果 (下段パネル)

分担研究報告書

幻覚剤 DOI によるマウス行動異常—伏臥位を基本的指標として評価する実験系

分担研究者：北中純一 兵庫医科大学 薬学部

【研究要旨】

人間に対して幻覚作用を有する 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) によって引き起こされるマウス異常行動（前肢洗顔行動・後肢引っ掻き行動・伏臥位・首振り行動）のうち、首振り行動以外は DOI の用量依存的に発現頻度が増加した。DOI 誘導異常行動と大脳皮質・線条体および側坐核・海馬各部位におけるモノアミン代謝回転との間に相関は認められなかった。幻覚発現物質を繰り返し投与した場合、DOI 連続投与は、水平方向の運動量を増加させなかった。伏臥位のみ、DOI 連続投与によってその発現が有意に増強した。伏臥位の観察は、一般的な睡眠姿勢とは明らかに異なり、簡便に行動観察されることから、投与量に応じて強度が変化する伏臥位は、幻覚発現物質の作用強度を評価する上で有用な指標となり得る。

A. 研究目的

小動物実験によって幻覚作用を有する指定薬物の指定に係る基本的評価指標を確立するため、5-HT_{2A} 受容体アゴニストである 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) をマウスに投与した場合の異常行動について、その発現様式、時間依存性、各異常行動間の頻度の相関性を検討する。脳特に大脳皮質、線条体および側坐核、海馬各

部位におけるモノアミンおよびその代謝物の量的変動を調べ、異常行動との相関関係を調べる。特に伏臥位は、他の行動と区別しやすく、いずれも観察によって客観的に評価する上で有用と考えられる。異常行動が幻覚発現物質によって単一の受容体たんぱく質に結合することで発現するならば、投与する幻覚剤の用量や頻度に依存して、行動の変化、特に異常行動も増悪すると考えられる。またそのような異常を示す場合、連続投与後の休

薬によって退薬症状が発現することも考えられる。

本研究は期間中に、(1) DOI の単回投与による異常高騰パターンの分類にはじまり、その用量依存性をふくめ観察の簡便さを追求した。(2) DOI 連続投与後に休薬して、改めて DOI 単回投与のち 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬 Volinanserin を投与すると、退薬症状が認められるか否かを検討した。特に、DOI を繰り返し投与したのち、DOI を改めて単回投与したときに認められる異常行動についてそのパターンや頻度・強度を観察して評価した。

B. 研究方法

ICR 系雄性マウス (実験時 11-12 週齢) に対して、生理食塩水に希釈した DOI の 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg を皮下投与 (s.c.) し、直ちに観察用アクリルボックス (30×30×35 cm 高; 床面に約 25 g 分の木くず) に入れて行動観察および Supermex センサによる水平方向総運動量の測定を行った。行動観察は、投与薬物が知らされていない熟練した複数の観察者によって行われた。DOI による特異的な行動の観察項目は、前肢洗顔行動・伏臥位・後肢引っ掻き行動・首振り行動とし、30 秒ごとに前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動の回数を記録し、伏臥位や首振りが確認されたか否かを記録した。観察後直ちに脳各部位を摘出して液体窒素中に保存した。モノアミンおよびその代謝物含量は、電気化学検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (ECD-HPLC) で検出した。

マウスに対して、生理食塩水に希釈した

DOI の 1.0 mg/kg を一日一回、一週間にわたり皮下投与 (s.c.) し (day 1~day 7)、直ちにホームケージに戻した。二日間 (day 8, 9) 休薬の間 Y 字迷路試験 (day 8) を実施した。その後 (day 10) DOI の 2.0 mg/kg を皮下投与し、その後 1.0 mg/kg volinanserin を腹腔投与して、行動観察および運動量の自動測定を行った。そのために、観察用アクリルボックスに入れて行動観察および Supermex センサによる水平方向総運動量の測定を行った。行動観察は、投与薬物が知らされていない熟練した複数の観察者によって行われた。DOI による特異的な行動の観察項目は、伏臥位 (Prone position) のほか、簡便に観察データが取得できる毛づくろい (Grooming)、口周りの行動 (Chewing)・立ち上がり (Rearing) とし、1 分刻みで記録した。

(観察のポイント)

Grooming: 健康なマウスが自分の体を清潔にするために行う生理的な行動 (前肢で頭、顔、耳、腹、臀部、尻尾などに触れる、自身の体をなめる、後肢で体を搔くなど、毛づくろいを含む全身に対する動作)

Chewing: 口周りの行動。壁、床を舐める、床敷きを噛むなど咀嚼運動も含むが **Grooming** は含まない。

Rearing: 後肢立ち 前肢を壁にかけ、後肢で立ち上がる動作及び立ち上がった姿勢。

Prone position (腹臥位): うつぶせの体位で前肢を前に出し、腹ばいになった体勢のこと

また day 10 では mood の変化を調べるため高架式十字迷路試験および尾懸垂試験も併せて実施した。

(倫理面への配慮) 兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得た(承認課題第 20-059A 号(改訂) および第 22-303A 号(改訂))。「動物実験に関する日本薬理学会指針」ならびに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」

(日本学術会議、2006 年 6 月 1 日) および兵庫医科大学動物実験規定を遵守した。動物逃避防止を徹底し実験動物に苦痛を与えないよう最大限配慮を行い、人道的エンドポイントを十分配慮のうえ安全対策を講じて、承認を受けた実験室でのみ実施した。

C. 研究結果

水平方向の総運動量測定について、タイムコースは新奇環境への馴化パターンを示しており興奮性は認められなかったが、DOI 用量が高いほど総運動量は大きい傾向を示した。特に 1.0 mg/kg, s.c.での運動量は対照群と比較して有意に増加した。行動指標としては、前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動は DOI 投与 15 分で主に観察され、20 分過ぎまで継続しその後頻度は減少した。引き続き、伏臥位が発現し、投与 1 時間まで継続した。特に前肢洗顔行動と伏臥位が発現頻度間で、強い相関関係が認められた(図 1)。首振り投与後 1 時間内に観察が間断的に継続した。首振り行動以外の異常行動は DOI の用量反応性を示した。Y 字迷路試験では、DOI 誘発短期空間記憶障害が確認された(図 2)。

脳内モノアミン量(ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン、およびそれらの代謝物)の変動と、そこから導き出されるモノア

ミン代謝回転の程度に関して、ECD-HPLC 測定の結果、行動変化に相関するようなモノアミン代謝回転の変動は認められなかった。

新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験において、1.0 mg/kg DOI 投与はそれら新奇環境への関心度の低下とみられる行動(新奇物体への接触頻度低下およびガラス玉埋め総数の減少)が確認された。

DOI 連続投与実験について、水平方向の総運動量測定について、タイムコースは新奇環境への馴化パターンを示しており繰り返し投与によって興奮性は認められなかった。Day8 における休薬期間では、自発的行動交替率(および運動量)に変化はなかった(図 3)。

Day 10 における行動試験では、DOI 連続投与により高架式十字迷路試験において運動量の減少が認められた。しかし mood の変化は繰り返し投与の影響はなく(尾懸垂試験)、単回投与として day 10 で投与した 2.0 mg/kg DOI 群と対照群との間で有意な差を認め、特に Open arm での滞在時間の延長が確認された(図 4)。

特異的な行動の観察項目について(day 10)、伏臥位のみ繰り返し投与によって有意に強い伏臥位が確認された(図 5)。そのほかの毛づくろいや口周りの行動、立ち上がりについては、DOI の連続投与はその後の DOI 作用に影響しなかった。

D. 考察

前肢洗顔行動と伏臥位は、いずれも DOI の用量依存的に発現し、かつそれらの発現頻度間には強い相関関係 ($R^2 = 0.6197$) が認められた。一方、たとえば後肢引っ掻き行動 (投与後 0-20 分) と伏臥位 (投与後 20-60 分) との間 ($R^2 = 0.1213$)、あるいは、前肢洗顔行動 (60 分間) と後肢引っ掻き行動 (60 分間) の頻度間では相関関係は認められなかった ($R^2 = 0.4587$) (図 1)。この結果は、ICR 系マウスを用いた場合、DOI のような幻覚作用を有している薬物の異常行動指標として、投与後前肢洗顔行動、そして引き続いて伏臥位が認められた場合、DOI の幻覚作用を評価する行動基準となり得ることを示している。従来、首振り行動は幻覚剤のげっ歯類における、よく知られた反応である (1,2)。しかし本研究で用いた実験系では、もっとも用量反応性に乏しい行動パターンであった。首振り行動は特異な行動の一つであり、明らかに DOI 投与で誘導されているので、動物種 (あるいはその系統) に影響を受けている結果の可能性は否定できない。評価系としては、幻覚剤の作用の強さを検定あるいは予測する上で、用量反応性を考慮しなければならない。その用量反応性については、マウスのおかれた研究環境の違い (たとえば観察ボックス内の環境=床敷きの有無など) に起因する可能性がある。

DOI 投与マウスは、5-HT₂ 受容体を介した短期空間記憶力の低下がマウスにおいて認められているため (図 2)、新奇環境への順化は影響を受けることが予想された。事実、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験に

おける測定パラメータの減少は、新奇環境への関心の低下を示しており、それが前肢洗顔行動や伏臥位といった異常行動に影響している可能性がある。

DOI の連続投与は、記憶障害についてむしろ認められなかったが、その後のさらなる DOI 投与後の運動量変化や mood (不安や抑うつ) に大きな影響を与えるものではなかった。しかしながら DOI 単回投与で用量依存的に認められる伏臥位については、DOI 連続投与後の、さらなる DOI 単回投与によって、より強い伏臥位発現を確認した (図 5)。このことは、DOI が作用して伏臥位を引き起こすメカニズムが、DOI 誘発幻覚作用を表現するマウスの代表的行動ととらえてよいと考えることが出来る。

E. 結論

幻覚剤による異常行動は、ICR 系マウスを実験系とした場合、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度とが、用量依存性、発現強度の相関性の観点から有効な観察基準と考えられた。そのなかで、幻覚剤の動物実験による評価としては、簡便な行動観察に基づく、再現性の良い指標が強く望まれる。その観点からは、伏臥位を記録することは他の行動と明確に区別することが出来て実施しやすいと考えられる。また、投与頻度の上昇が伏臥位発現強度の上昇を引き起こすことは、DOI が誘発する主たる作用であることを想定させ、人間での幻覚効果とその相関を想定させる。したがって、本研究結果は、マウスを用いた伏臥

位測定を実施すれば、stimulant の薬理学的特性を持たない幻覚剤 DOI の効果を簡便かつ定性的に反映する行動指標となることを示唆する。

F. 参考文献

- 1) Halberstadt A.L. & Geyer M.A. Effect of hallucinogens on unconditioned behavior. *Curr Top Behav. Neurosci.* **36**, 159-199 (2018).
- 2) Canal C.E. & Morgan D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug Test Anal.* **4(7-8)**, 556-76 (2012)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Takashi Y., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Nishitani Y. & Sato T. Therapeutic potential for KCC2-targeted neurological diseases. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **59**, 431-438 (2023)
- 2) Kitanaka J., Kitanaka N., Tomita K., Hall S.F., Igarashi K., Uhl G.R. & Sato T. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors block morphine-induced locomotor activation, Straub tail, and depression of rearing in mice via a possible central action. *Neurochem. Res.*, **48(7)**, 2230-2240 (2023)

- 3) Tomita K., Oohara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Sugimura, M. & Sato, T. Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression via neuroinflammation induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice. *Heliyon* **9(12)** e22784 (2023).
- 4) Oka M., Yoshino R., Kitanaka N., Hall F.S., Uhl G.R. & Kitanaka J. Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Dependence and Abuse Liability of Alcohol. *Alcohol Alcohol.* **59(2)** agad086 (2024).
- 5) Kitanaka N., Arai K., Takehara K., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & Kitanaka J. Opioid receptor antagonists reduce motivated wheel running behavior in mice. *Behav. Pharmacol.* **35(2/3)**114-121 (2024)
- 6) Kobayashi C., Kitanaka N., Nakai M., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & Kitanaka J. Protein phosphatase 2A inhibitors: A possible pharmacotherapy for benzodiazepine dependence. *J. Pharm. Pharmacol.*, DOI: 10.1093/jpp/rgae136 (2024)

2. 学会発表

- 1) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、仲井聖典、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、佐藤友昭。μオピオイド受容体選択的拮抗薬単独与薬によるマウス動機付け行動への影響 第16回日本緩和医療薬学会

2023. 5. 26-28 (神戸)
- 2) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭. オピオイド受容体拮抗薬のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響 第 64 回日本神経病理学会総会学術研究会/第 66 回日本神経化学学会大会 合同大会 2023. 7. 6-8 (神戸)
 - 3) 北中純一、北中順恵、湯瀬祥、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好. 幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine は短期空間記憶や気分の障害を引き起こす 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 4) 湯瀬祥、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一. 幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine によって引き起こされる行動異常の特徴について. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 5) 北中順恵、新井香奈代、竹原薫生子、富田和男、五十嵐健人、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭、北中純一. オピオイド受容体拮抗薬ナロキソン単回投与のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 6) 仲井聖典、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、藤井舞、津嶋祐一郎、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一. GSK-3 阻害薬 CHIR-99021 前処置はモルヒネによる Straub の挙尾反応と退薬症状を抑制する. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 7) 松田健太郎、北中順恵、濱名貴大、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. GSK-3 阻害薬 LY2090314 前処置による覚せい剤誘導過運動・常同行動への効果. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 8) 濱名貴大、北中順恵、仲井聖典、松田健太郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害薬 Wortmannin は、覚せい剤誘導繰り返し嗅ぎ行動および噛み行動を抑制し、その結果常同行動の発現全体を緩和する. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
- 北中純一、北中順恵、仲井聖典、濱名貴大、藤井舞、松田健太郎、津嶋祐一郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭. 選択的 GSK3 阻害薬による実験的モルヒネ退薬症状の緩和. 第 17 回日本緩和医療薬学会 2024. 5. 24-26 (東京)

- 9) 五十嵐健人、F. Scott Hall、北中純一、北中順恵、田中康一、富田和男、佐藤友昭. グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 阻害薬である SB216763 はゼブラフィッシュのモルヒネ条件付け場所選好性を阻害する. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会大会 合同大会 (NEURO2024) 2024. 7. 24-27 (福岡)
- 10) 北中純一、北中順恵、松田健太郎、濱名貴大、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭. GSK3 阻害薬 LY2090314 による覚せい剤常同行動の抑制. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会大会 合同大会 (NEURO2024) 2024. 7. 24-27 (福岡)
- 11) 北中順恵、天方詞子、森田千晶、仁木理子、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. PI3K 阻害薬 Wortmannin による覚せい剤常同行動の抑制. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会大会 合同大会 (NEURO2024) 2024. 7. 24-27 (福岡)
- 12) 北中純一、北中順恵、松田健太郎、湯瀬祥、濱名貴大、仲井聖典、上田紫暉、服巻里佳、山本ひとみ、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭. チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブはマウスにおける覚せい剤誘発過運動を減弱する. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 13) 北中順恵、山本ひとみ、藤井舞、津嶋祐一郎、仲井聖典、上田紫暉、服巻里佳、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. GSK3 選択的阻害薬ラドゥビグルシブはモルヒネの鎮痛作用に影響せず、急性症状・退薬症状を抑制する. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 14) 山本ひとみ、北中順恵、仲井聖典、富田和男、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、上田紫暉、服巻里佳、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. 幼若マウスに対する幻覚剤 U50, 488H の影響と大防風湯の作用について. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 15) 上田紫暉、北中順恵、服巻里佳、山本ひとみ、富田和男、五十嵐健人、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭、北中純一. 幻覚剤 Kappa オピオイド受容体アゴニスト U50, 488H 作用の基本的行動評価指標について. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 16) 服巻里佳、北中順恵、上田紫暉、山本ひとみ、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. 幻覚剤 2, 5-dimethoxy-4-Iodoamphetamine を連続投

与した際に認められるマウスの行動変化. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)

- 17) 富田和男、高橋将世、五十嵐健人、桑原義和、北中純一、北中順恵、田中康一、上川善昭、栗政明弘、佐藤友昭. ヒト細胞にナノ銀処理を行うとミトコンドリア機能変化を介して ACE2 発現が減少する. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

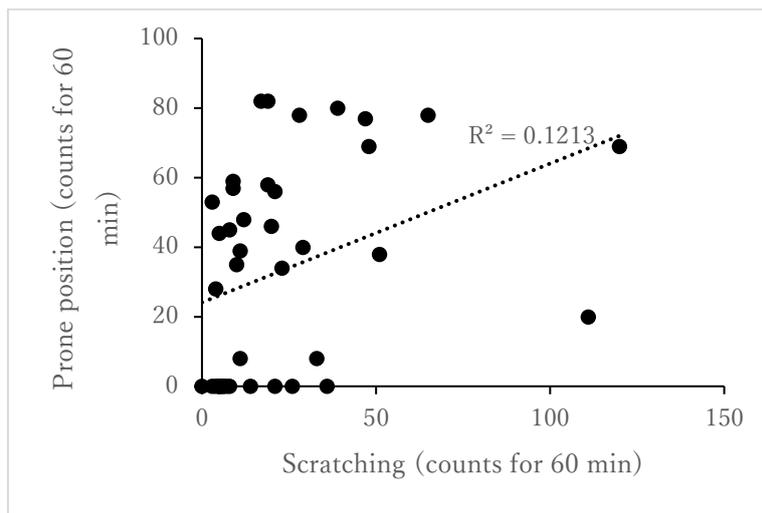
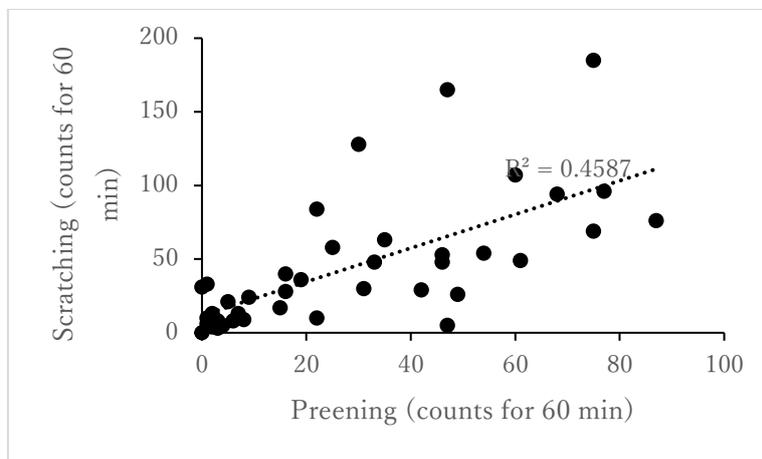
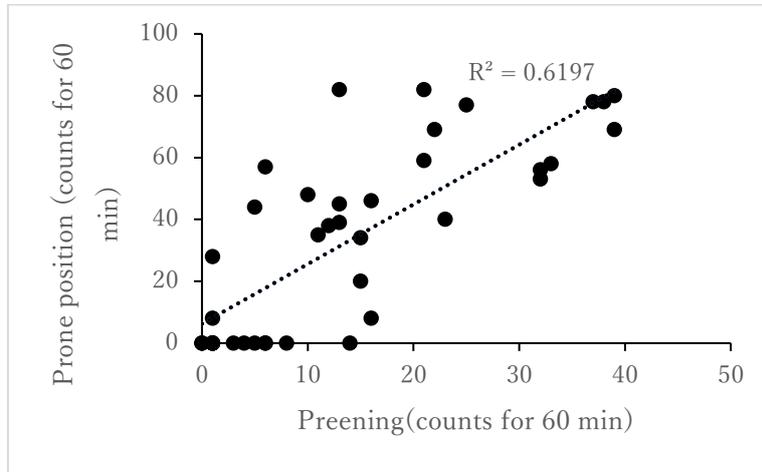


図 1. DOI 誘発異常行動間の相関関係

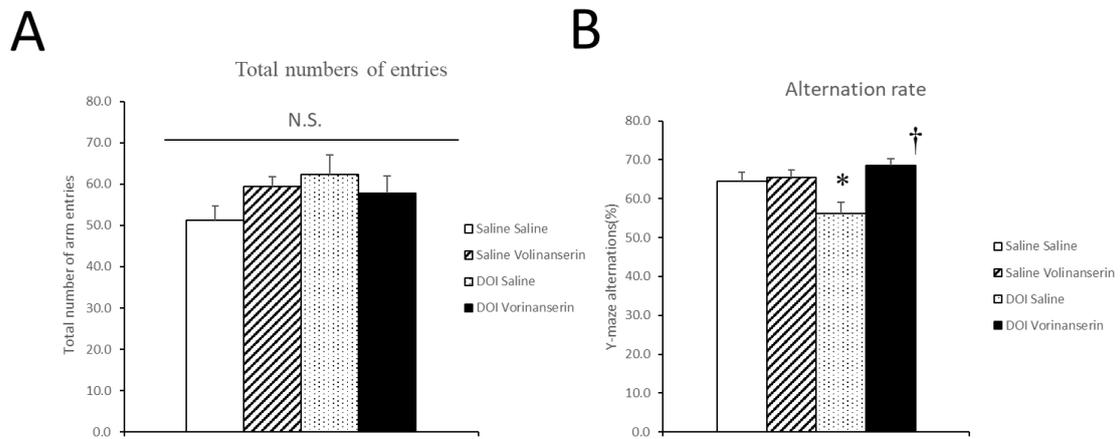


図2. DOI 誘発短期空間記憶障害

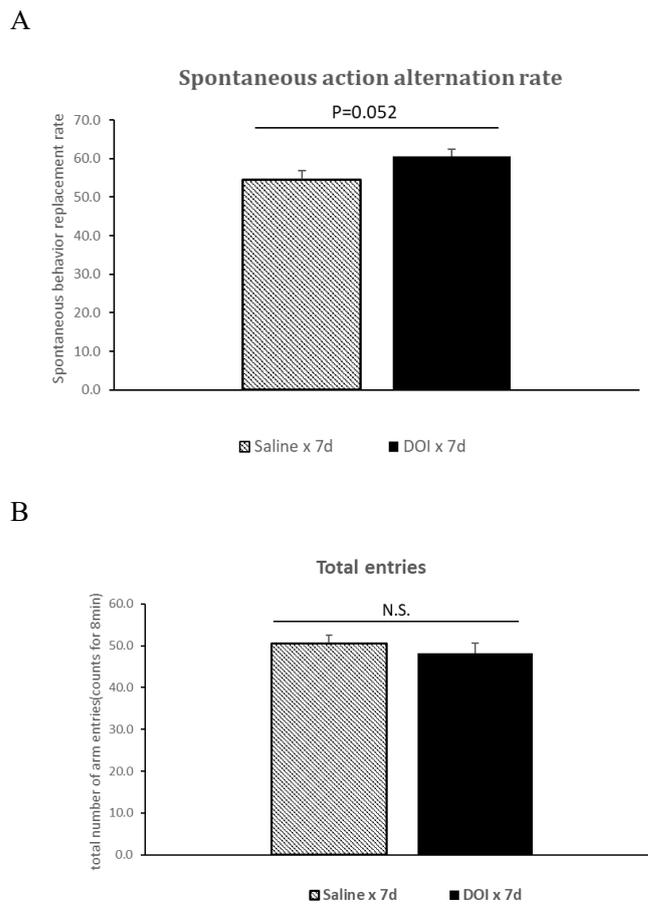
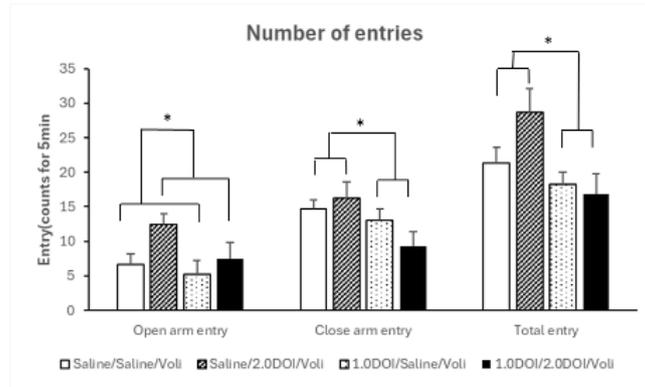


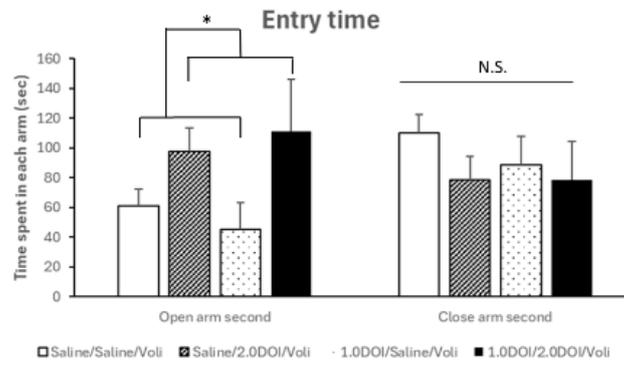
図3. Y字迷路試験結果 (day 8)

A: 自発の行動交替率 B: 総運動量

A



B



C

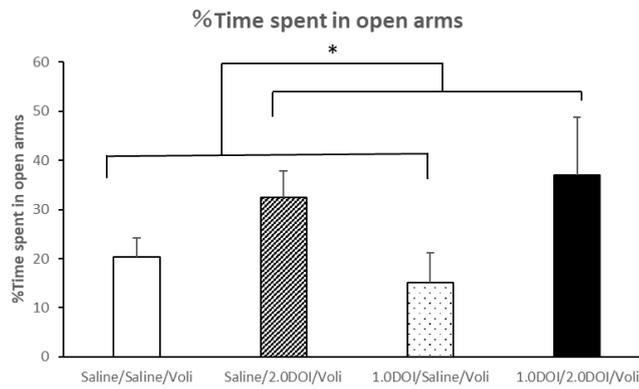


図 4. 高架式十字迷路試験結果 (day 10)

- A: アームへの侵入回数 B: 各アームへ侵入した累積時間
C: オープンアームでの滞在時間 (%)

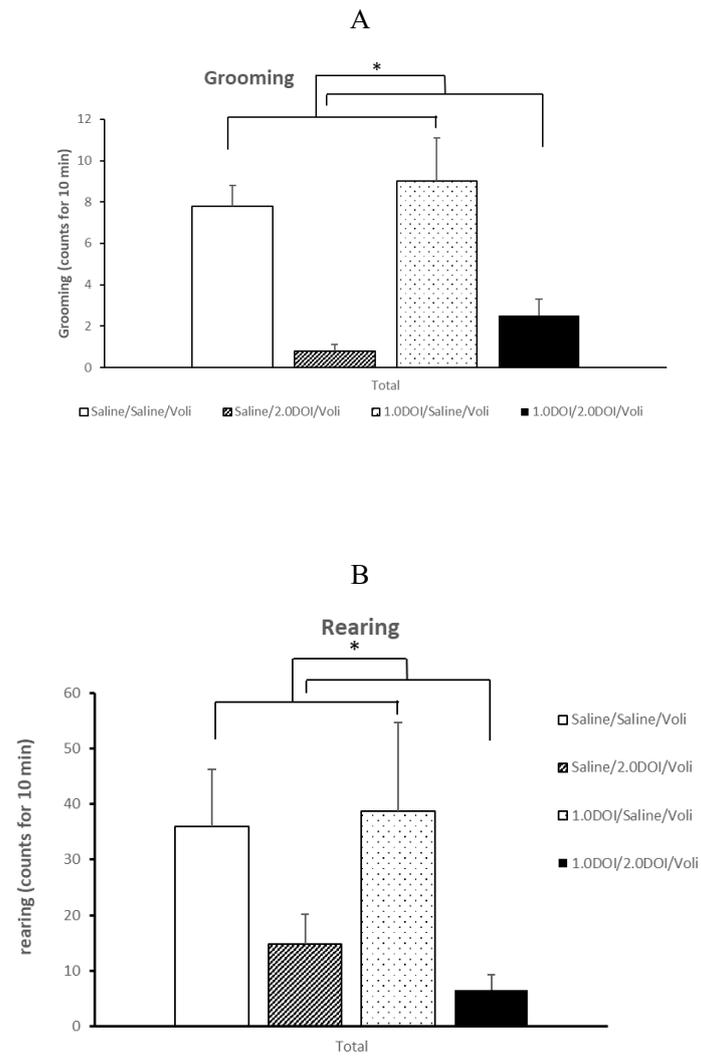


図 5. 特異的行動の強度 (day 10)

A: 毛づくろい B: 伏臥位

令和4-6年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究「3年間のまとめ」

分担研究報告書

危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

分担研究者：増川太輝 横浜市立大学 医学部

【研究要旨】

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、従来、アミノ酸脱炭酸酵素によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。我々は、ドーパの遊離が、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって増加するのに対して、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制させること、ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化が、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルによって抑制されることを見出してきた。これらのことは、ドーパが精神症状の一部に関与することを示す。本研究においては、ドーパの遊離、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

セロトニン 2A 受容体とドーパ/GPR143 シグナルとの関連性を明らかにするため、GPR143 欠損マウスを用いて、セロトニン 2A 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) の薬理作用を野生型と比較・検討した。結果、GPR143 欠損マウスにおいて野生型と比較し、DOI による運動量増加作用および側坐核における c-Fos 発現増加作用が増強した。次に、マイクロダイアリシスを用いて、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定を試みたところ、側坐核におけるこれらの神経伝達物質検出が可能となった。さらに、セロトニン 2A 受容体発現 CHO 細胞に DOI を処置すると、ERK リン酸化レベルが上昇し、DOI の効果は GPR143 の共発現により増強した。これらの結果は、GPR143 がセロトニン 2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

A. 研究目的

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬であ

る。ドーパの薬理作用は、アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。一方において、我々は、ドーパが神経伝

達物質として機能する知見を集積してきた¹⁾。

ドーパは、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって遊離され、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制する。ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステル (DOPA CHE) によって抑制される^{2,3)}。長い間、ドーパに対する受容体は不明であったが、我々は、眼白子症の原因遺伝子産物である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の GPR143 がドーパ受容体の一つであることを見出した⁴⁾。GPR143 欠損 (GPR143 KO) マウスを用いて表現型解析を行った結果、ニコチンによる運動量変化および報酬効果が、GPR143 KO マウスにおいて野生型 (WT) と比較し、減弱した⁵⁾。また、抗精神病薬の薬理作用についても GPR143 KO マウスにおいて抑制される⁶⁾。これらのことは、精神賦活薬によって遊離されたドーパが、GPR143 を介して精神症状を発現することを示す。

本研究においては、ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離および、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、6-12 週齢の GPR143 KO マウスおよび WT マウス (体重 20-28 g) を用いた。

動物実験は、横浜市立大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 F-A-23-010)。

2. 運動量測定

自発運動量を評価するため、マウスは運動量測定試験の少なくとも 1 時間前に防音室の環境に順化させた。その後、使用するマウスをそれぞれ 70 ルクスの照明条件に設定されたチャンバー (50×50×40cm³) に入れた。移動距離 (cm) は 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) および saline 投与前 60 分、後 120 分間記録した。Open field での活動は、画像ソフト (TimeOFER4 : O'Hara & Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて定量化した。

3. 免疫染色

DOI (1 mg/kg) または saline を腹腔内投与し、1 時間後に、イソフルラン (3%) の吸入麻酔下で、4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。側坐核を含む 50 μm の切片をビブラトームを用いて作成した。抗 c-Fos 抗体 (1:1000, Cell Signaling) を用いて、一次抗体反応後、Alexa fluoro 488 goat anti-rabbit IgG plus 抗体により可視化した。また DAPI を用いて核を可視化した。蛍光シグナルは、AX 顕微鏡 (Leica) により観察した。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を計測し、定量化した。

4. 神経伝達物質遊離量測定

ドーパ、ドパミンおよびセロトニンを同時に測定するために、マイクロダイアリシスを行った。マウスをイソフルラン (3%) の吸入麻酔下で、脳定位装置を用いて頭部を固定し、ガイド (AG-6) およびダミー (AD-6) カニューレ (Eicom, Kyoto, Japan) を側坐核 (Bregma より前方 1.5 mm、左右 0.9 mm、深さ 4.9 mm) に挿入した。手術から 2 日後、マイクロダイア

リシスプローブ (FX-I-6-02, Eicom, Kyoto) を留置していたガイドカニューレに挿入し、2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で、リングル液を注入した。2 時間の馴化後、20 分おきにサンプルを回収した。サンプルは、等量の 0.1% ギ酸を含む超純水を展開溶媒として混合し、測定まで -80°C で保存した。回収したサンプルにおけるドーパ、ドパミン、セロトニンの濃度は、MicroLC-MS/MS (Xevo TQS, MA, U.S.A) により測定した。分析カラムには UPLC column ACQUITY HSS T3 C18 (WT186003539, Waters, MA, U.S.A)、とガードカラムには guard column (WT186003976, Waters, MA, U.S.A) を、移動相には 3% アセトニトリルと 0.1% ギ酸を含む超純水を用いた。

5. ウェスタンブロット解析

セロトニン 2A (5-HT2A) 受容体-mCherry を安定に発現している Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に、FuGENE6 を用いて Gpr143-flag および pSN-flag プラスミドでそれぞれ導入した。2 日間の培養後、DOI (1 および 10 μM) を処理し、免疫沈降バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 0.1% Nonidet P-40, 0.1% プロテアーゼ阻害剤) で溶解した。サンプルを SDS-PAGE (9%) で分離、PVDF メンブレンに転写し、抗 extracellular signal-regulated kinase (ERK)、pERK 抗体 (#9102, #9101, Cell Signaling) を用いて各タンパク質量を定量した。

6. 統計解析

全てのデータは、平均値±標準誤差により示し、Prism 10 により解析した。データは三元または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、ポストホックテストとして、Tukey's または Bonferroni's multiple comparison test により比較した。

C. 研究結果

1. GPR143 は DOI による薬理作用を負に制御する

GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を修飾するか否かを明らかにするため、まず、DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与による自発運動促進作用を WT および GPR143 KO マウスを用いて比較・検討した。DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させた。その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,26)=39.76$, $P<0.001$; genotype, $F(1,26)=5.430$, $P=0.028$; interaction, $F(1,26)=4.757$, $P=0.038$, 図 1)。次に、DOI (1 mg/kg) 投与による側坐核における c-Fos 発現変化について検討した。運動量と同様、DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させ、その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,16)=94.77$, $P<0.001$; genotype, $F(1,16)=2.951$, $P=0.105$; interaction, $F(1,16)=5.543$, $P=0.032$, 図 2)。

2. ドーパ、ドパミン、セロトニンは側坐核より遊離する

我々は昨年度の報告においてドーパとドパ

ミンの同時測定系を確立している⁶⁾。検出時間を延長させたところ、ドーパ、ドパミンに加えてセロトニンのスタンダードシグナルが検出され、このシグナルは側坐核におけるマイクロダイアリシスサンプルでも確認できた(図3)。よって脳内における3種類の神経伝達物質の同時測定系が確立できた。来年度には幻覚薬によるドーパ遊離の変化を解析する予定である。

3. GPR143 は DOI による ERK のリン酸化を抑制する

次に、5-HT2A 受容体と GPR143 の直接的な機能連関を明らかにするため、5-HT2A 受容体を安定的に発現する CHO 細胞に GPR143 を発現させ、DOI 刺激による ERK のリン酸化反応を検討した。DOI は ERK のリン酸化タンパク質量を増加させたが、その効果は GPR143 を発現させることにより増強した(dose, $F(2,28)=35.50$, $P<0.001$; plasmid, $F(1,14)=4.726$, $P=0.047$; interaction, $F(2,28)=4.619$, $P=0.019$, 図4)。これらの結果は、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に制御することを示唆する。

D. 考察

本研究では、GPR143 KO マウスにおいて DOI による運動量促進作用および c-Fos 発現増加作用が増強された。また、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定系を確立した。これらの結果は、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

ドーパは、GPR143 のリガンドなので、内在性に遊離するドーパが、5-HT2A 受容体の機能

を制御する可能性が高い。ドーパの遊離は、メタンフェタミンやニコチンなどのドパミン神経賦活薬によって、増加する。メタンフェタミンおよびニコチンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬である DOPACHE により抑制される^{2,3)}。今後は、ドーパが GPR143 を媒介し、精神症状を示すのか？ドーパは、指定薬物による幻覚作用を媒介するのか？ドーパはどのような指定薬物によって遊離されるのか？を明らかにする必要がある。

GPR143 は、他の GPCR と複合体を形成することによって、その機能を修飾することが報告されている。実際に GPR143 は、アドレナリン $\alpha 1$ 受容体との機能連関を介して生理的な血圧調節を担う⁴⁾。線条体において、ドパミン D2 受容体と相互作用し、ドパミン D2 受容体を介する薬理作用を調節する^{6,7)}。本年度の CHO 細胞を用いた実験結果より、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に修飾することが明らかとなった。このことは、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を複合体形成を介して抑制している可能性を示唆する。GPR143 とセロトニン 2A 受容体との機能連関メカニズムについて、更なる検討が必要である。

E. 結論

本研究では、① GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を抑制することを明らかにし、②ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離測定系を確立した。ドーパ測定系が指定薬物の評価に有効であるかを検討する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Misu Y, Goshima Y. Is L-dopa an endogenous neurotransmitter? *Trends Pharmacol Sci* 1993;14(4):119-23.
- 2) Goshima Y, Miyamae T, Nakamura S *et al.* Ventral tegmental injection of nicotine induces locomotor activity and L-DOPA release from nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 1996; 309(3):229-33.
- 3) Matsushita N, Misu Y, Goshima Y. *In vivo* antagonism of the behavioral responses to L-3,4-dihydroxyphenylalanine by L-3,4-dihydroxyphenylalanine cyclohexyl ester in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2009;605(1-3):109-13.
- 4) Masukawa D, Koga M, Sezaki A *et al.* L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular alpha1-adrenergic receptor. *JCI Insight* 2017; 2(18). pii: 90903. doi: 10.1172/jci.insight.90903.
- 5) Masukawa D, Nishizawa D, Goshima Y, *et al.* Genetic associations of single nucleotide polymorphisms in the L-DOPA receptor (GPR143) gene with severity of nicotine dependence in Japanese individuals, and attenuation of nicotine reinforcement in Gpr143 gene-deficient mice. *J Pharmacol Sci.* 2020;144(2): 89-93.
- 6) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, *et al.* Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal

cholinergic interneurons. *J Neurosci.* in press.

- 7) Masukawa D, Kitamura S, Goshima Y, *et al.* Coupling between GPR143 and dopamine D2 receptor is required for selective potentiation of dopamine D2 receptor function by L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the dorsal striatum, *J Neurochem*, 2023; doi: 10.1111/jnc.15789.
- 8) Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004; 101:131–181. [PubMed: 14761703]

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masukawa D (corresponding author), Takahagi R, Nakao Y, Goshima Y. L-DOPA Receptor GPR143 Functionally Couples with Adrenergic α 1B Receptor at the Second Transmembrane Interface. *Biol Pharm Bull.* 46: 869-873, 2023
- 2) Uchimura H, Kanai K, Arai M, Inoue M, Hishimoto A, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate. *J Pharmacol Sci.* 152: 178-181, 2023
- 3) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, Otaki M, Kanai K, Yamasaki M, Watanabe M, Kambe Y, Murata K, Takada Y, Arisawa T, Kobayashi K, Tajika R, Miyazaki T, Yamaguchi M, Lazarus M, Hayashi Y, Itohara S, de Kerchove d'Exaerde A, Nawa H, Kim R, Bito H, Momiyama T, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an

L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* in press.

2. 学会発表

1) 荒井柗美、増川太輝、北村慧、大瀧百々代、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介してハロペリドールによる錐体外路様症状を修飾する第 95 回日本薬理学会年会 (2022 年 11 月 30 日-12 月 3 日)

2) 荒井柗美、増川太輝、鈴木江津子、北村慧、大瀧百々代、靱山俊彦、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介して haloperidol 誘発性錐体外路様症状を修飾する. 第 147 回日本薬理学会関東部会 (2023 年 3 月 21 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他

特になし

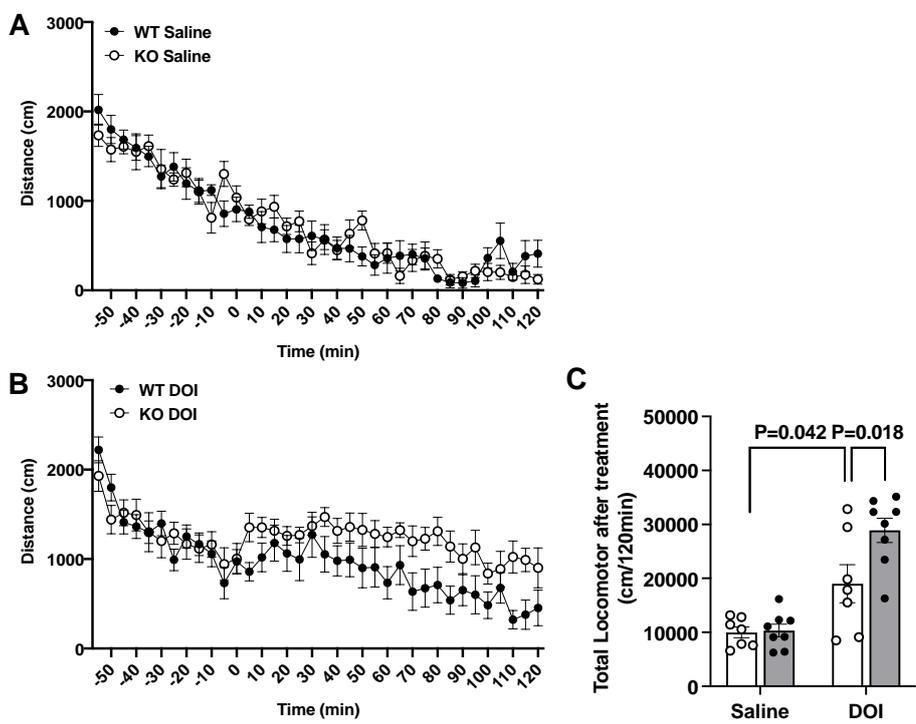


Fig. 1. DOI 投与による運動量の変化

(A) 生理食塩液 (Saline) または (B) DOI (1 mg/kg)腹腔内投与前後の WT マウスおよび GPR143 KO マウスにおける運動量変化。(C) は薬物投与後の総運動量を示す。

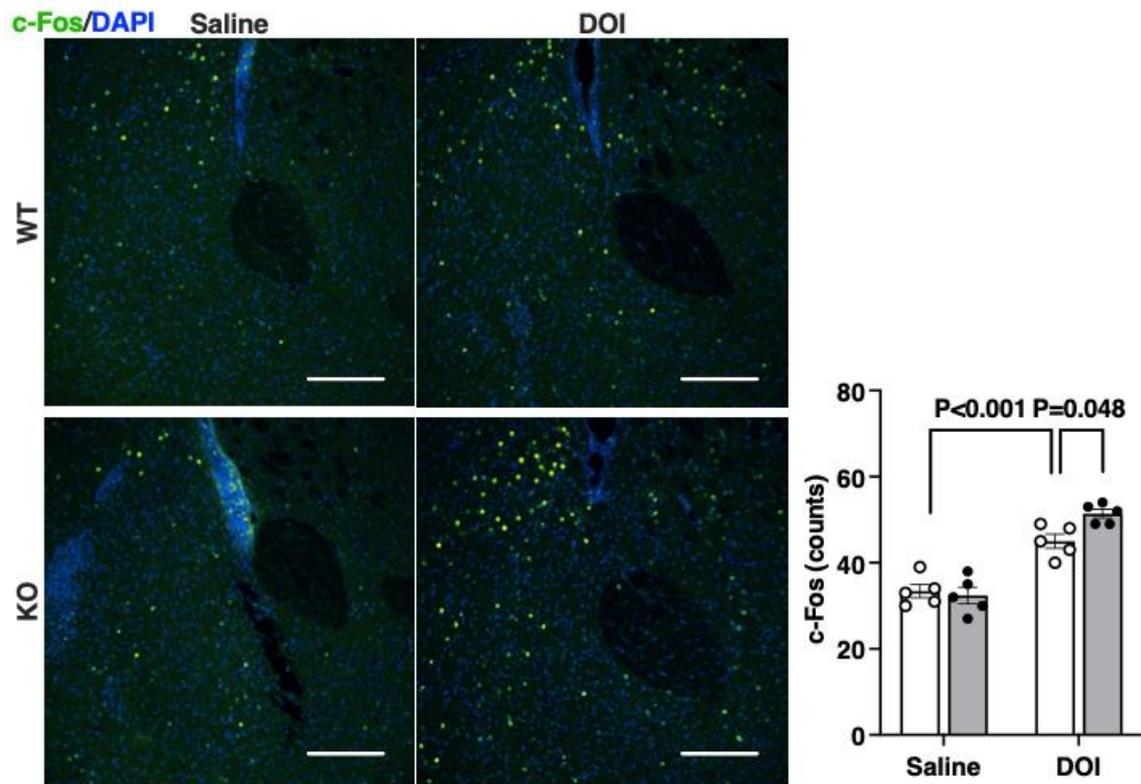


Fig. 2. DOI 投与による側坐核における c-Fos 発現変化

生理食塩液 (Saline) または DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与後の WT マウスおよび GPR143 KO マウス側坐核における c-Fos 発現変化 (左図)。緑で c-Fos、青で DAPI を示す。スケールバーは 200 μm 。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を定量化したもの (右図)。

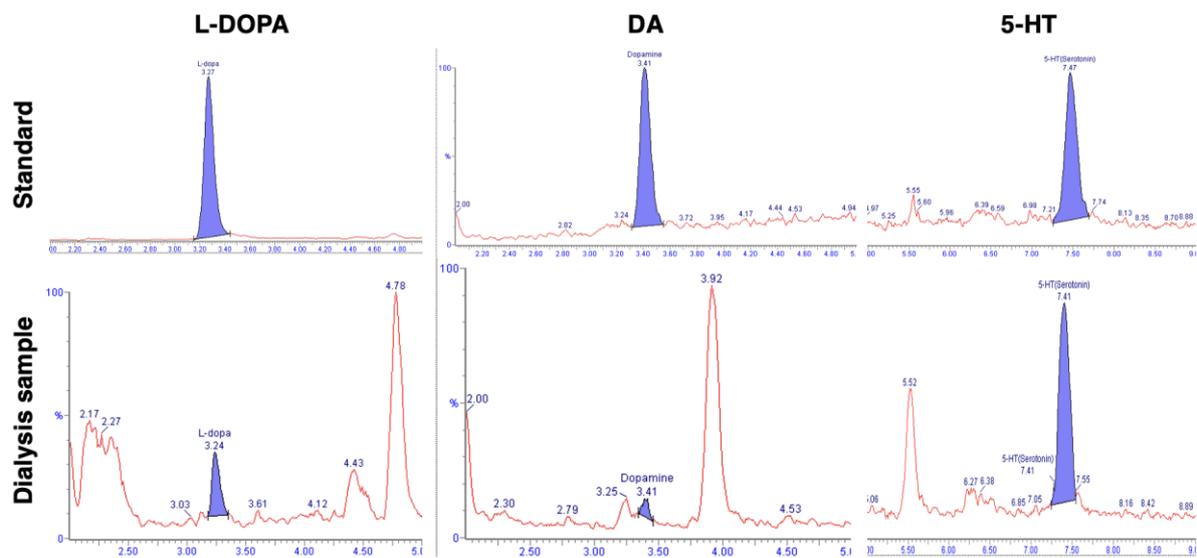


Fig. 3. 側坐核における L-DOPA、ドパミン (DA)、セロトニン (5-HT) の遊離
 LC-MS/MS を用いて L-DOPA、DA、5-HT のスタンダード (上図) および側坐核における遊離を
 検出したもの (下図)。スタンダードとダイアリスサンプルでほぼ同じリテンションタイムを示
 すピークが得られた。

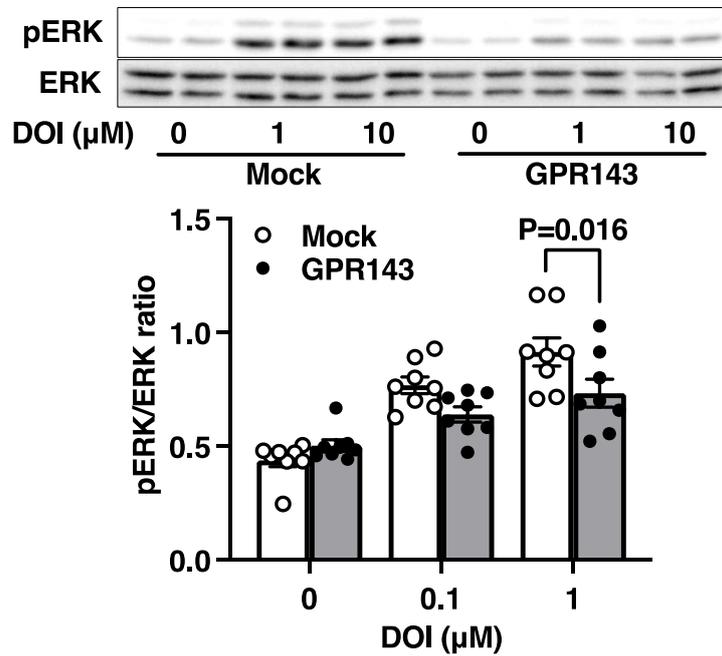


Fig. 4. GPR143 は DOI による ERK のリン酸化応答を抑制する

GPR143 もしくは Mock ベクターを発現させた 5-HT_{2A} 受容体発現 CHO 細胞に、DOI (1, 10 μM) を処置した際のリン酸化 ERK (pERK) タンパク質の発現変動。定量データは pERK/ERK のシグナル比を計算することにより算出した。

3年間の研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ペー ジ
森 友久			生体毒性情報学 第2版	京都 廣川書店	京都	2023	1-238

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H, Kagaya H.	A questionnaire-based study on the “Dame. Zettai. (Never. Ever.)” drug abuse prevention campaign and the medical use of narcotic agents	Jpn J Pharm Palliat Care Sci	15	121-128	2022
鈴木 勉	【別冊秋号オピオイド】(PART2)基礎編 オピオイド身体依存のメカニズム	LiSA 別冊	29別冊	165-168	2022
鈴木勉、加藤英明、船田正彦	日本における薬物の乱用、依存の現状と問題点	ペインクリニック	45(8)	839-846	2024
船田正彦	危険ドラッグの依存性	精神科	41	239-247	2022

船田正彦	海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	54	36-42.	2023
Mori T, Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T.	Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice	Behav Brain Res	396	112802	2021
Sato D, Hamada Y, Narita M, Mori T, Tezuka H, Suda Y, Tanaka T, Yoshida S, Tamura H, Yamanaka A, Senba E, Kuzumaki N, Narita M.	Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D1-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens	Molecular Brain	15	17	2022
Mori T, Yamashita K, Takahashi K, Mano S, Sato D, Narita M	Characterization of the discriminative stimulus effect of quinpirole: Further evidence for functional interaction between central dopamine D ₁ /D ₂ -receptors	Pharmacol Biochem Behav	213	173314	2022
Mori T, Takemura Y, Arima T, Iwase Y, Narita M, Miyano K, Hamada Y, Suda Y, Matsuzawa A, Sugita K, Matsumura S, Sasaki S, Yamauchi T, Higashiyama K, Uezono Y, Yamazaki M, Kuzumaki N, Narita M.	Further investigation of the rapid-onset and short-duration action of the G protein-biased μ -ligand oliceridine	Biochem Biophys Res Commun	534	988-994	2021

Yoshida S, Hamada Y, Narita M, Sato D, Tanaka K, <u>Mori T</u> , Tezuka H, Suda Y, Tamura H, Aoki K, Kuzumaki N, Narita M.	Elucidation of the mechanisms underlying tumor aggravation by the activation of stress-related neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.	Molecular Brain	16	18	2023
Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, <u>Kurihara M</u> , Kittaka A, Sugiyama T.	PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA	Peptide Science 2021	2022	111-112	2022
Ichimaru Y, Kato K, <u>Kurihara M</u> , Jin W, Koike T, Kurosaki H.	Bis(nitrato- κ O)(1,4,8,11-tetra-azacyclo-tetra-decane- κ 4 N)zinc(II) methanol monosolvate.	IUCrdata	7(Pt 8)	x220854.	2022
Yuyama M, Misawa T, Demizu Y, Kanaya T, <u>Kurihara M</u> .	Design and synthesis of novel estrogen receptor antagonists with acetal containing biphenylmethane skeleton	Results in Chemistry	3	100124	2021
Moriya S, Shibasaki H, Kohara M, Kuwata K, Imamura, Y, Demizu Y, <u>Kurihara M</u> , Kittaka A, Sugiyama T.	Synthesis and characterization of PNA oligomers containing preQ1 as a positively charged guanine analogue	Bioorg Med Chem Lett	39	127850	2021
Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., <u>Kitanaka J.</u> , Kitanaka N., Takashi Y., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Nishitani Y. & Sato T.	Therapeutic potential for KCC2-targeted neurological diseases.	Jpn. Dent. Sci. Rev.	59	431-438	2023

Kitanaka J., Kitanaka N., Tomita K., Hall S.F., Igarashi K., Uhl G.R. & Sato T.	Glycogen synthase kinase-3 inhibitors block morphine-induced locomotor activation, Straub tail, and depression of rearing in mice via a possible central action.	Neurochem.	48(7)	2230-2240	2023
Tomita K., Oohara Y., Igarashi K., <u>Kitanaka J.</u> , Kitanaka N., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Sugimura, M. & Sato, T.	Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression via neuroinflammation induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice.	Heliyon	9(12)	e22784	2023
Oka M., Yoshino R., Kitanaka N., Hall F.S., Uhl G.R. & <u>Kitanaka J.</u>	Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Dependence and Abuse Liability of Alcohol.	Alcohol Alcohol.	59(2)	agad086	2024
Kitanaka N., Arai K., Takehara K., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & <u>Kitanaka J.</u>	Opioid receptor antagonists reduce motivated wheel running behavior in mice.	Behav. Pharmacol.	35(2/3)	114-121	2024
Kobayashi C., Kitanaka N., Nakai M., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & <u>Kitanaka J.</u>	Protein phosphatase 2A inhibitors: A possible pharmacotherapy for benzodiazepine dependence	J. Pharm. Pharmacol.		10.1093/jp p/rgae136	2024

<u>Masukawa D</u> (corresponding author), Takahagi R, Nakao Y, Goshima Y.	L-DOPA Receptor GPR143 Functionally Couples with Adrenergic α 1B Receptor at the Second Transmembrane Interface.	Biol Pharm Bull.	46	869-873	2023
Uchimura H, Kanai K, Arai M, Inoue M, Hishimoto A, <u>Masukawa D</u> (corresponding author), Goshima Y.	Involvement of the L- DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate.	J Pharmacol Sci.	152	178-181	2023
Arai M, Suzuki E, Kitamura S, Otaki M, Kanai K, Yamasaki M, Watanabe M, Kambe Y, Murata K, Takada Y, Arisawa T, Kobayashi K, Tajika R, Miyazaki T, Yamaguchi M, Lazarus M, Hayashi Y, Itohara S, de Kerchove d'Exaerde A, Nawa H, Kim R, Bito H, Momiyama T, <u>Masukawa D</u> (corresponding author), Goshima Y.	Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons.	J Neurosci.	44(11)	e15042320 24.	2024
Inoue M, <u>Masukawa D</u> , Goshima Y	L-DOPA receptor GPR143 inhibits neurite outgrowth via L-type calcium channels in PC12 cells.	J Pharmacol Sci	156(1)	45-48	2024

Tajika R, <u>Masukawa D</u> , Arai M, Nawa H, Goshima Y	Opposite regulation by L -DOPA receptor GPR143 of the long and short f orms of the dopamine D 2 receptors.	J Pharmacol Sci	156(2)	77-81	2024