

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの化学的特性及び in vitro 薬理特性の検討

研究分担者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

植物成分由来危険ドラッグの cannabinoid 受容体への機能性の評価

研究要旨: 11α -HHC, 11β -HHC, 及びそれらのアセチル化体 11α -HHC-*O*-acetate, 11β -HHC-*O*-acetate, また, Δ^9 -THC 及び Δ^8 -THC のアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate の 6 化合物を対象として, ヒト cannabinoid 受容体 (CB_1 及び CB_2) に対するアゴニスト活性を明らかにするために, ヒトリコンビナント受容体を用いて, ^{35}S -GTP γ S 結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した. その結果, 本研究で検討した濃度範囲では, 11α -HHC-*O*-acetate は有意な受容体活性化は認められなかったが, Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC 及び 11β -HHC-*O*-acetate は, 陽性化合物 CP-55,940 と比較して弱い効果ではあったが, CB_1 受容体作用を有していることが確認された. また, CB_2 受容体に対しては, アセチル化体 4 化合物はほとんど活性を示さなかったが, 11α -HHC 及び 11β -HHC は弱いながらもアゴニスト活性を有することが示唆された.

A. 研究目的

近年, 大麻の代替品として, 大麻の幻覚作用の主体である麻薬成分 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) や Δ^8 -THC と構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している. Hexahydrocannabinol (HHC) は大麻成分 cannabidiol (CBD) を原料として合成され, 流通製品からは 2 種類の異性体 (11α -HHC 及び 11β -HHC) が同時に検出される. HHC は令和 4 年 3 月に指定薬物に指定されたが, 規制後すぐに類似の新規化合物を含有する製品が出現して問題となっている. 規制化合物である HHC, Δ^9 -THC 及び Δ^8 -THC の水酸基をアセチル化した HHC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate は, 新たに国内流入が確認されている代表的な大麻成分由来化合物である. これらの化合物については, 人が摂取した際にどのような危険性があるのか, 現在までに国内外において薬理的特性を検討した報告がなく, 早急な検討が必要である.

大麻の主活性成分である Δ^9 -THC は, cannabinoid 受容体 CB_1 及び CB_2 受容体のパーシャルアゴニストである. cannabinoid 受容体 CB_1 及び CB_2 受容体は GPCR (G protein-coupled receptor; Gタンパク質共役受容体) の一種である. リガンドの GPCR に対するアゴニスト活性を評価する手法のひとつとして, GPCR を過剰発現させた細胞膜に非加水分解性 GTP が結合する量を測定する手法がある. GPCR にアゴニストが作用すると, GPCR が活性化してコンフォメーションが変化することで, Gタンパク質複合体の結合部位が露出する. これにより, G α タンパク質において GDP が放出されて GTP が結合する. 通常, GTP は G α タンパク質の GTPase 活性 (代謝分解) によって GDP に加水分解され, γ 位のリン酸は除去放出される. この際, GTP として, 放射性標識された非加水分解性の GTP 類似体である ^{35}S - γ -GTP (Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate; GTP の末端 (γ 位) のリン酸基を ^{35}S で標識) を用いると, ^{35}S - γ -GTP は非加水分解性であるため, 細胞膜から ^{35}S リン酸基が除去されることなく,

³⁵S-γ-GTPが結合したままの状態となり検出される。そのため、細胞膜に結合した³⁵S-γ-GTPの量(放射エネルギー)を測定することで、GPCRの活性化を評価することが可能である。

本研究では、11α-HHC, 11β-HHC, 及びそれらのアセチル化体 1α-HHC-O-acetate, 11β-HHC-O-acetate, また、Δ⁹-THC 及び Δ⁸-THC のアセチル化体 Δ⁹-THC-O-acetate 及び Δ⁸-THC-O-acetateの6化合物を対象として、ヒトカンナビノイド受容体(CB₁及びCB₂)に対するアゴニスト活性を明らかにするために、ヒトリコンビナント受容体を用いて、³⁵S-GTPγS結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した。

B. 研究方法

以下の試験は、積水メディカル株式会社に委託して実施した。

①試験試料

11α-HHC, 11β-HHC, 1α-HHC-O-acetate, 11β-HHC-O-acetate, Δ⁹-THC-O-acetate 及び Δ⁸-THC-O-acetate は国立衛研で合成したものを使用した^{1), 2), 3)}。陽性物質 CP-55,940 は Sigma 社, トレーサー [³⁵S]-Guanosine 5'-(γ-thio) triphosphate (³⁵S-GTPγS) は PerkinElmer Life & Analytical Sciences 社, ヒトリコンビナントクロニンレセプター cannabinoid CB₁ 及び Cannabinoid CB₂ は Eurofins 社, Guanosine 5'-diphosphate sodium salt (GDP) は Sigma 社, Dimethyl sulfoxide (DMSO) は関東化学から入手した。

②試料溶液

被験物質 6 化合物及び陽性物質 CP-55,940 を秤量し、DMSO で溶解して、最終濃度 (1x10⁻¹²~1x10⁻⁵ mol/L の 8 濃度) の 100 倍濃度の溶液を調製した。更に、調製した濃度の溶液を、試験用水で 10 倍希釈することにより被験物質溶液及び陽性物質溶液を調製した(用時調製)。同様に、陽性物質 CP-55,940 を DMSO で溶解し、最終濃度 (1x10⁻⁶ mol/L) の 100 倍濃度の溶液を調製した。更に、調製した溶液を、試験用水で 10 倍希釈し

て 100% 反応溶液を調製した(用時調製)。

②測定方法

1) 総結合算出用チューブには 10% DMSO を、100% 反応量算出用チューブには 100% 反応溶液を、被験物質及び陽性物質の反応量算出用チューブには被験物質溶液あるいは陽性物質溶液をそれぞれ 50 μL 添加した (DMSO の最終濃度は 1%)。

2) 1) のそれぞれの溶液に、緩衝液 (100 mmol/L NaCl 及び 10 mmol/L MgCl₂ を含む 20 mmol/L HEPES-NaOH pH 7.4) 100 μL, トレーサー (³⁵S-GTPγS) 溶液 100 μL, GDP 溶液 50 μL, レセプター (cannabinoid CB₁ または Cannabinoid CB₂) 溶液 200 μL を添加し、30°C 60 分間インキュベートした。

3) 2) の溶液をセルハーベスターにより濾過 (GF/C, Whatman, PBS 処理) し、氷冷した PBS 3 mL で 3 回洗浄した。

4) 濾紙を測定バイアルビンに移し、液体シンチレーター (PICO-FLUOR™ PLUS) 5 mL を添加し、液体シンチレーションカウンターで測定 (測定時間 2 min) した。

④反応率の計算

以下の式により算出した。

反応率: $[(B - B_0) / (B_{max} - B_0)] \times 100 (\%)$

B: 被験物質存在下での反応放射エネルギー (個別値)

B₀: 被験物質非存在下での反応放射エネルギー (basal 量) (平均値)

B_{max}: 最大反応溶液 (アゴニスト溶液) 存在下での反応放射エネルギー (平均値)

陽性物質に関しても被験物質と同様に反応率を算出した。

EC₅₀ 値は、ロジスティックモデルによる非線形回帰の結果から推定した。

$Y = 0 + 1 / [1 + 10^{\{-\beta \times (X - ED_{0.5})\}}]$

Y (反応量比): $(B - B_0) / (B_{max} - B_0)$

ED_{0.5}: EC₅₀ の常用対数

β: 傾き (Hill 係数)

X: 被験物質濃度の常用対数

C. 結果及び考察

対象 6 化合物について、ヒトリコンビナントカンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体を用いて、³⁵S-GTPγS 結合を指標としたアゴニスト活性評価を行った。結果を、Table 1 及び Table 2 に示した。CB₁ 受容体に対するアゴニスト活性は、最も活性が強かった 11β-HHC の EC₅₀ 値が 7.96×10⁻⁶ mol/L であったが、その他の化合物の EC₅₀ 値は >1×10⁻⁵ mol/L であった。また、陽性化合物 CP-55,940 が 100%の活性を示す 1 x 10⁻⁵ mol/L (10 μM) の濃度において、11α-HHC 16%、11β-HHC 52%、11β-HHC-O-acetate 35%、Δ⁸-THC-O-acetate 21%、Δ⁹-THC-O-acetate 9%の活性を示したが、11α-HHC-O-acetate は活性が認められなかった。カンナビノイド CB₁ 受容体に対しては、11α-HHC/11α-HHC-O-acetate よりも、11β-HHC/11β-HHC-O-acetate の方が、アゴニスト活性が強いことが示唆された。

カンナビノイド CB₂ 受容体に対しては、いずれの化合物も EC₅₀ 値は >1×10⁻⁵ mol/L であり、1 x 10⁻⁵ mol/L (10 μM) における活性においても、11α-HHC 18%、11β-HHC 20%であったが、その他アセチル化体は、本実験条件では、ほとんど活性を示さなかった。

カンナビノイド類は脂溶性が高く、水系溶媒に溶解性が悪いことを考慮して、本研究で検討した被験物質の濃度範囲の上限を 1×10⁻⁵ mol/L (10 μM) に設定した。しかし、最高濃度を、5×10⁻⁵ mol/L もしくは 1×10⁻⁴ mol/L に設定すれば、各化合物のアゴニスト活性をより明確に観察できた可能性が考えられる。今回は、同条件下で、Δ⁸-THC 及び Δ⁹-THC の評価は実施しなかったが、11α-HHC と 11α-HHC-O-acetate、また 11β-HHC と 11β-HHC-O-acetate のヒトカンナビノイド CB₁、CB₂ 受容体に対するアゴニスト活性を比較すると、アセチル化体の方が、わずかに活性が弱い可能性が考えられた。

D. 結論

対象 6 化合物について、ヒトカンナビノイド受容体 (CB₁ 及び CB₂) に対するアゴニスト活性を明らかにするために、ヒトリコンビナント受容体を用いて、³⁵S-GTPγS 結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した。その結果、本研究で検討した濃度範囲では、11α-HHC-O-acetate は有意な受容体活性化は認められなかったが、Δ⁹-THC-O-acetate、Δ⁸-THC-O-acetate、11α-HHC、11β-HHC 及び 11β-HHC-O-acetate は、陽性化合物 CP-55,940 と比較して弱い効果ではあったが、CB₁受容体作用を有していることが確認された。また、CB₂受容体に対しては、アセチル化体 4 化合物はほとんど活性を示さなかったが、11α-HHC 及び 11β-HHC は弱いながらもアゴニスト活性を有することが示唆された。

E. 参考論文

- 1) 厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究」令和 4 年度研究分担報告「植物成分由来危険ドラッグの分析用標品合成及びインシリコによる活性予測評価法の検討」出水庸介
- 2) 厚生労働科学研究補助金(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)「危険ドラッグ等の乱用薬物の迅速識別に関する分析情報の収集及び危害影響予測のための研究」令和4年度研究分担報告「危険ドラッグの合成に関する研究」出水庸介
- 3) 厚生労働科学研究補助金(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)「法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究」令和 4 年度研究分担報告「新規麻薬類の標品合成に関する研究」三澤隆史

F. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

なし

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

Table 1 Reaction Ratio and EC₅₀ Values of ³⁵S-GTPγS Binding of Test Substances on Cannabinoid CB1 (Human) Receptor

Substance	Substance concentration (mol/L)								EC ₅₀ (mol/L)
	1×10 ⁻¹²	1×10 ⁻¹¹	1×10 ⁻¹⁰	1×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	
	Reaction ratio (%)								
11α-HHC	3.24	4.35	4.35	1.00	0.00	0.00	0.00	15.98	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	5.69	24.10	52.26	7.96×10 ⁻⁶
11α-HHC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	0.00	0.00	5.13	0.13	6.88	34.58	>1×10 ⁻⁵
Δ8-THC- <i>O</i> -acetate	1.10	0.00	2.82	4.69	0.00	0.00	2.18	20.93	>1×10 ⁻⁵
Δ9-THC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	2.98	0.00	0.00	0.00	0.54	8.57	>1×10 ⁻⁵
CP55940	0.95	0.00	0.88	28.00	66.59	81.27	93.00	100.00	4.74×10 ⁻⁹

Data are expressed as the mean values of duplicate sample.

Table 2 Reaction Ratio and EC₅₀ Values of ³⁵S-GTPγS Binding of Test Substances on Cannabinoid CB2 (Human) Receptor

Substance	Substance concentration (mol/L)								EC ₅₀ (mol/L)
	1×10 ⁻¹²	1×10 ⁻¹¹	1×10 ⁻¹⁰	1×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	
	Reaction ratio (%)								
11α-HHC	2.69	4.79	9.20	4.97	8.11	3.28	3.91	17.93	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.66	19.52	>1×10 ⁻⁵
11α-HHC- <i>O</i> -acetate	1.84	0.00	2.20	0.00	0.00	0.00	0.00	2.66	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.28	>1×10 ⁻⁵
Δ8-THC- <i>O</i> -acetate	0.00	4.67	0.00	0.00	0.00	0.91	0.00	5.40	>1×10 ⁻⁵
Δ9-THC- <i>O</i> -acetate	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	>1×10 ⁻⁵
CP55940	1.21	0.00	8.86	61.88	82.22	96.92	96.30	100.00	7.59×10 ⁻¹⁰

Data are expressed as the mean values of duplicate sample.