

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの行動薬理特性の検討

研究分担者:船田正彦 湘南医療大学薬学部薬理学教室 教授

研究要旨:本研究では、大麻成分の化学構造に類似した半合成カンナビノイドである Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate について、運動活性に対する影響とカンナビノイド受容体作用の有無を検討した。1) 行動薬理的解析: Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate による運動活性および体温に対する影響を検討した。 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate により、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これら効果は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、カンナビノイド CB_1 受容体が関与することが明らかになった。2) CB_1 受容体作用: ヒト CB_1 受容体発現細胞株 CHO- CB_1 細胞により解析した。 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC 及び 11β -HHC-O-acetate の添加により細胞内 Ca^{2+} が増加し、この効果は CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。陽性対象薬である CP-55,940 と比較して弱い効果ではあったが、 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC 及び 11β -HHC-O-acetate は CB_1 受容体作用を有していることが確認された。 11α -HHC-O-acetate のみ有意な受容体活性化は認められなかったが、動物実験において薬理作用の発現を認めることから、その活性には生体内における代謝の関与が示唆された。

本研究により、 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate を摂取した場合に認められる薬理作用には、 CB_1 受容体が関与していると考えられる。本解析結果から、これらの化合物を乱用することにより健康被害の発生が危惧される。 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate は適切な法規制を施す必要があると考えられる。

研究協力者

富山県一 国立精神・神経医療研究センター精神
保健研究所薬物依存研究部 室長

A. 研究目的

Hemp から抽出されるカンナビノイドを利用して合成される Hexahydrocannabinol (HHC) などの半合成カンナビノイド (Semi-synthetic

cannabinoid) が乱用され、健康被害の発生が懸念されている¹⁾。米国では、新たに tetrahydrocannabinol (THC) のアセチル化体である Δ^9 -THC-O-acetate や Δ^8 -THC-O-acetate を含む製品の流通が確認されている²⁾。我が国でも半合成カンナビノイドの流通拡大が懸念されるが、これらの薬理作用は不明な点が多い。

そこで、本研究では Δ^9 -THC-O-acetate,

Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性を明確にする目的で, 1) 行動薬理学的特性, 2) カンナビノイド受容体作用について検討を行った.

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, 20 - 25g, 日本クレア) を使用した. 本動物実験は, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの動物実験倫理問題検討委員会により承認された動物実験計画書に従って実施した.

使用薬物: Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate を使用した (国立医薬品食品衛生研究所より提供). 合成カンナビノイド CP-55,940 (Tocris Bioscience), カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬として AM251 (Tocris Bioscience), カンナビノイド CB₂ 受容体拮抗薬として AM630 (Tocris Bioscience) を使用した.

1. 運動活性及び体温に対する影響

Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate 及び陽性対象として CP-55,940 により誘発される無動状態は, バートテストにより測定した. 直腸体温は, デジタル温度計 (SANWA, TH3 型) を用いて測定した. 対照群は溶媒である 10% DMSO 含有生理食塩液を投与した. それぞれの測定は, 薬物もしくは溶媒投与後の 180 分間行った.

カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg, i.p.) は, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate 投与の 15 分前に処置した.

2. カンナビノイド受容体作用の解析

Chinese Hamster Ovary (CHO) チャイニーズハムスター卵巣細胞にヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし, 発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞を確立した. この細胞を使用して, 細胞内カルシウム濃度を測定した. 96 穴ブラックプレート (Greiner) に 5×10^4 cells/well と なるように播種し, 37°C · 5.0% CO₂ 条件下で培養した. 24 時間後, Fluo-4 を 1 時間取り込ませ, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate 及び陽性対象として CP-55,940 添加による蛍光強度の変化を, Flexstation II により測定した. データは蛍光強度 (Relative Fluorescence Units, RFU) として解析した.

C. 結果

1. 運動活性及び体温に対する影響

Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate は, それぞれ 20 mg/kg の投与により, カタレプシー様無動状態及び直腸体温の下降が ICR マウスにおいて観察された (Fig. 1A-L). 一方で, カンナビノイド CB₁ 受容体の強力な作用薬である CP-55,940 は, 1mg/kg の投与によってカタレプシー様無動状態及び直腸体温の下降が発現した (Fig. 1M-N). 続いて, それぞれの化合物について CB₁ 受容体の関与を調べるために, CB₁ 受容体拮抗薬である AM251 を前処置の影響を検討した. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate (20 mg/kg) の投与 90 分後および 11 α -HHC 及び 11 α -HHC-O-acetate (20 mg/kg) の投与 180 分後において, カタレプシー様無動状態および体温下降はカンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg) の前処置により, 有意に抑制された (Fig. 2A-L).

2.カンナビノイド受容体作用の解析

CHO-CB₁ 細胞を利用して、 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate 及び CP-55,940 のカンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用を検討した. 陽性対象である CP-55,940 の EC₅₀ は 7.42×10^{-7} M であった (Fig. 3A). 一方で, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate は 40 μ M で有意な蛍光の増加が認められた (Fig. 3B). 11 α -HHC-O-acetate については, 本試験濃度では, 有意な増加は認められなかった. CB₁ 受容体に対する Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate の有意な活性作用は, カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (10 μ M) の前処置により完全に抑制された. 一方, CB₂ 受容体拮抗薬 AM630 ではいずれの化合物においても抑制作用が認められなかった (Fig. 4).

D. 考察

本研究では, 大麻成分の化学構造に類似した 6 種類の半合成カンナビノイドである Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性およびカンナビノイド受容体作用について検討した.

動物を用いた実験では, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性を解析した. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の投与によって, カタレプシー様無動状態および体温下降が発現した. 同様に, 6 種類の半合成カンナビノイドの薬理作用は, CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 で抑制されることから, カンナビノイド CB₁ 受容体を介して発現することが確認された. 一方, 陽性対象である合成カンナビノ

イドの CP55,940 は, これら 6 種類の半合成カンナビノイドと比較して, 低用量で有意なカタレプシー様無動状態および体温下降が発現した. したがって, 今回評価を行った半合成カンナビノイドの薬理作用の発現強度は, 既存の合成カンナビノイドと比較して弱いと考えられる.

細胞実験では, CHO-CB₁ 細胞を利用して, カンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用を検討した. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate の添加により, 蛍光強度は有意に増加した. また, これらの効果は, カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制され, CB₁ 受容体に対する活性作用が確認された. 一方, これらの半合成カンナビノイドの活性強度は, 陽性対象である CP-55,940 と比較すると弱いものであった.

細胞実験において, 11 α -HHC-O-acetate は高濃度の添加において, 蛍光強度が増加する傾向は認められたものの, 有意な受容体活性化は認められなかった. 本研究では, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 α -HHC は動物試験において, 薬理作用の発現が確認された. したがって, 11 α -HHC-O-acetate は脱アセチル化等の代謝の影響を受け, 11 α -HHC に変換されると想定され, 代謝物も薬理作用の発現に関わる可能性が示唆された. 以上の結果から, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate は, CB₁ 受容体を介して作用が発現するものと考えられる.

Hemp から抽出されるカンナビノイドを利用した半合成カンナビノイド自体の生体に対する影響については, まだよくわかっていない. 一方, こうした化合物は使用方法によって有害な作用を引き起こす可能性が指摘されている. 近年, THC またはニコチンを含有する電子タバコの使用によって肺損傷の発生が報告され

ている³⁾。これらの患者の多くは、回収された気管支肺胞洗浄液からビタミン E アセテートが検出されている。ビタミン E アセテートは加熱により、ケテンが生成される可能性があり、ケテンによって肺が損傷される可能性が指摘されている³⁾。 Δ^8 -THC-O-acetate などカンナビノイドのアセチル化体は、ビタミン E アセテートと類似の構造を含み、加熱吸引条件下でケテンの生成が報告されている⁴⁾。したがって、新たに登場する半合成カンナビノイドの乱用は、予期せぬ健康被害を引き起こす可能性がある。こうした半合成カンナビノイド自体の健康被害については、継続してモニタリングしていくことが必要である。

本研究により、 Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate を摂取した場合に認められる薬理作用には、 CB_1 受容体が関与していると考えられる。

E. 結論

大麻成分を利用した半合成カンナビノイド Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate の行動薬理学特性を検討した。本研究から、 Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate は CB_1 受容体作用薬としての特性を有することが明らかになったことから、その乱用により健康被害発生の危険性が高く、適切な規制を行う必要があると考えられる。

F. 参考文献

- 1) EMCDDA technical expert meeting on hexahydrocannabinol (HHC) and related cannabinoids.
<https://www.emcdda.europa.eu/news/2022/emcdda-technical-expert-meeting-hexahydrocannab>

inol-hhc-and-related-cannabinoids_en. (Last accessed: February 6, 2023)

- 2) Alaina K Holt, Justin L Poklis, Michelle R Peace: Δ^8 -THC, THC-O Acetates and CBD-di-O Acetate: Emerging Synthetic Cannabinoids Found in Commercially Sold Plant Material and Gummy Edibles. *J Anal Toxicol.* 2022;6(8):940-948.
- 3) Blount BC, Karwowski MP, Shields PG, Morel-Espinosa M, Valentin-Blasini L, Gardner M, Braselton M, Brosius CR, Caron KT, Chambers D, Corstvet J, Cowan E, De Jesús VR, Espinosa P, Fernandez C, Holder C, Kuklennyik Z, Kusovschi JD, Newman C, Reis GB, Rees J, Reese C, Silva L, Seyler T, Song MA, Sosnoff C, Spitzer CR, Tevis D, Wang L, Watson C, Wewers MD, Xia B, Heitkemper DT, Ghinai I, Layden J, Briss P, King BA, Delaney LJ, Jones CM, Baldwin GT, Patel A, Meaney-Delman D, Rose D, Krishnasamy V, Barr JR, Thomas J, Pirkle JL: Vitamin E Acetate in Bronchoalveolar-Lavage Fluid Associated with EVALI. *N Engl J Med.* 2020; 382(8):697-705.
- 4) Kaelas R Munger, Robert P Jensen, Robert M Strongin: Vaping Cannabinoid Acetates Leads to Ketene Formation. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35(7):1202-1205.

G. 健康危険情報

本研究成果は、大麻成分を利用した半合成カンナビノイド Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性に関する評価解析であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

G. 研究発表

学会発表

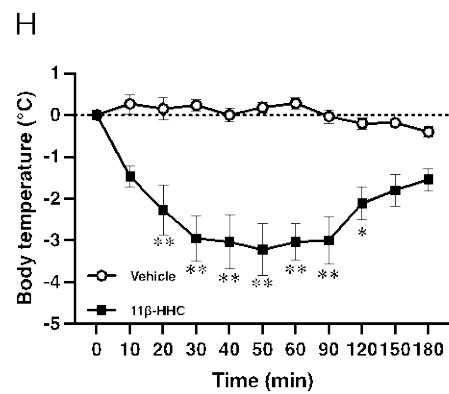
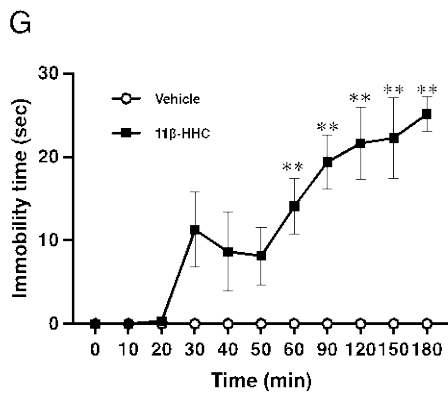
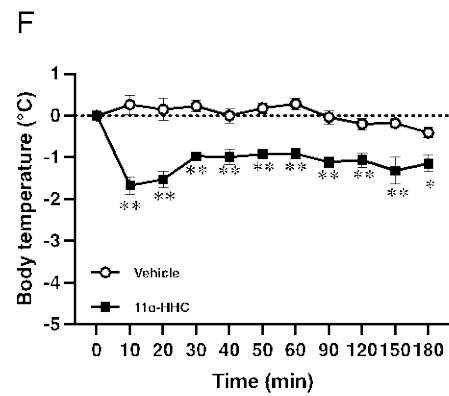
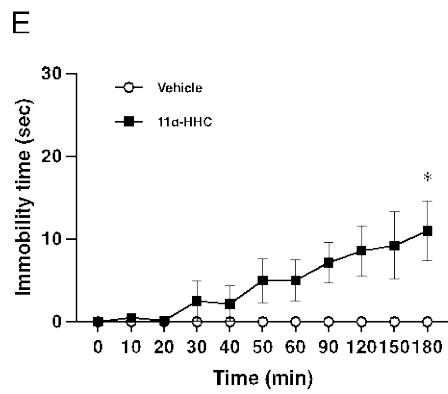
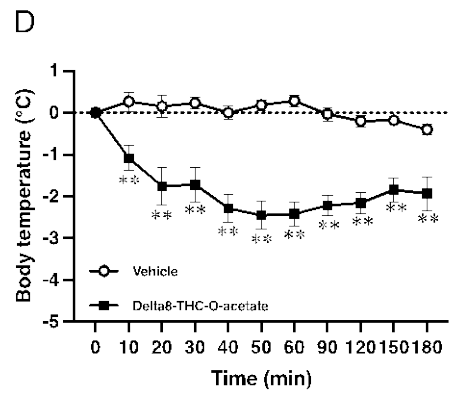
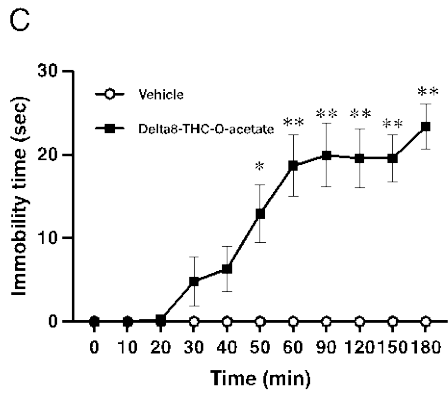
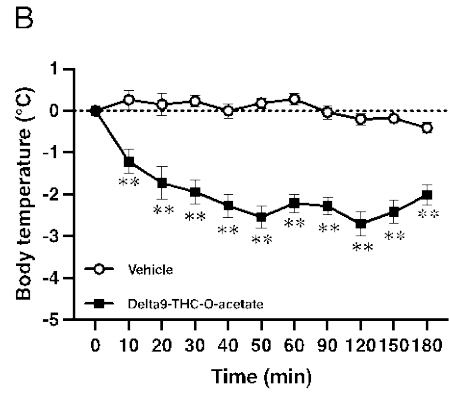
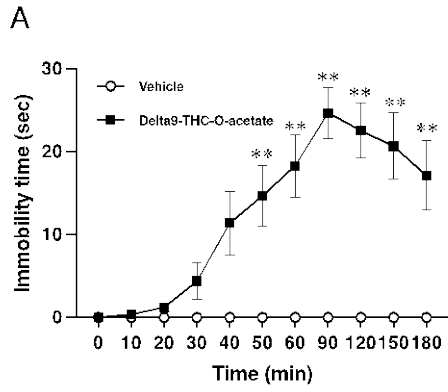
なし

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



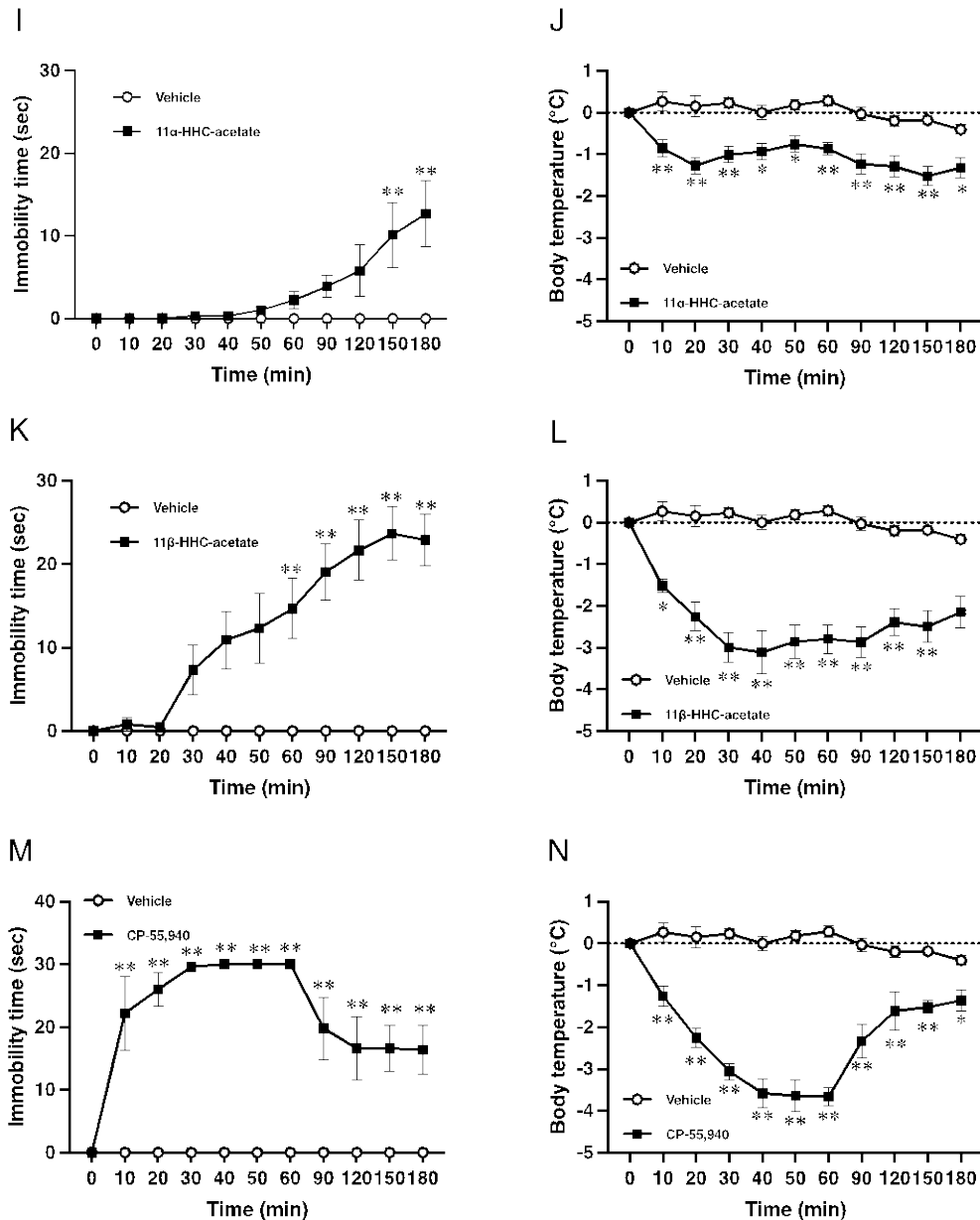
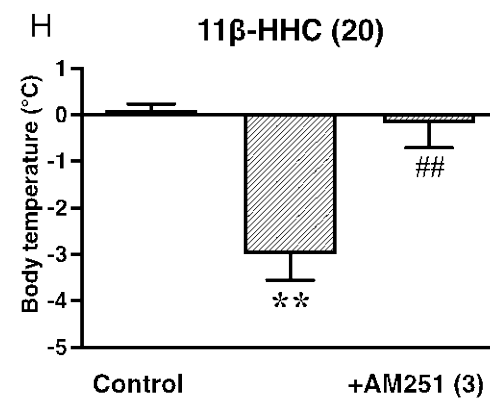
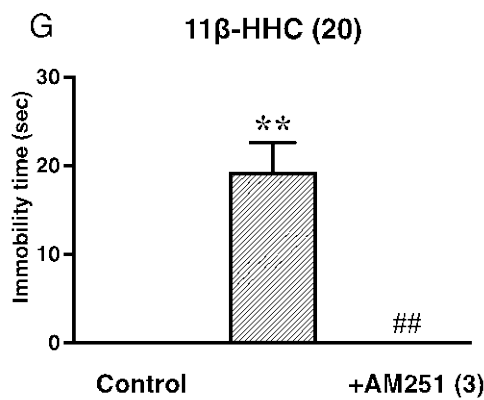
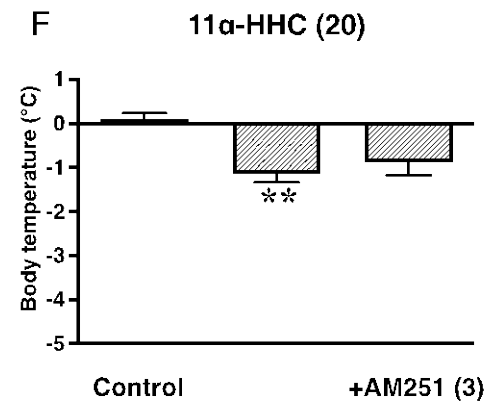
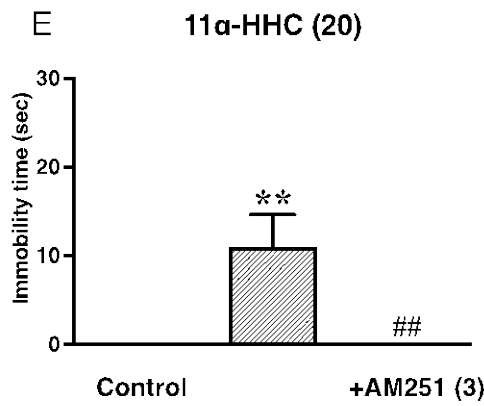
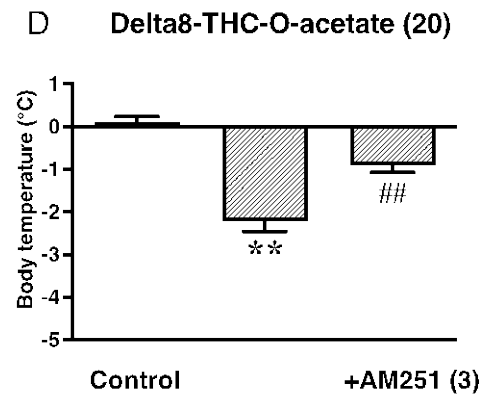
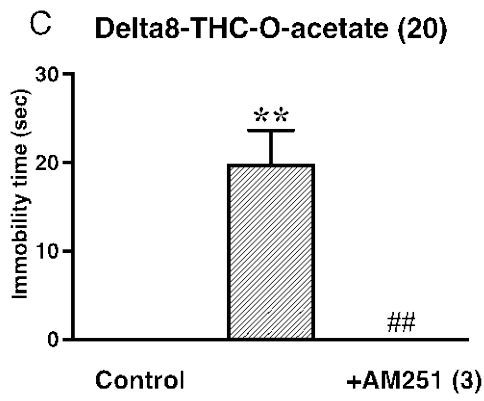
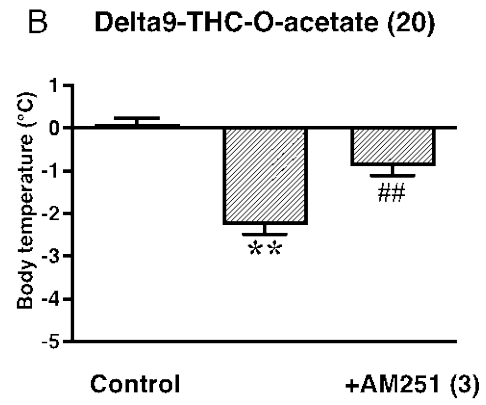
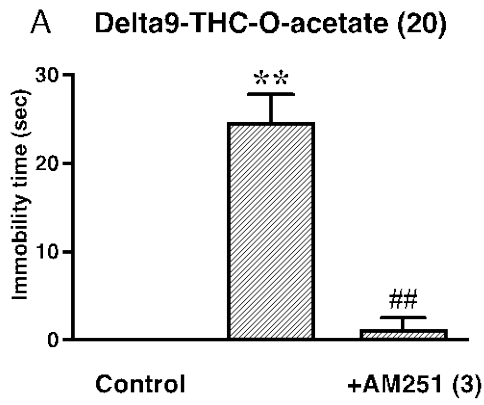


Fig. 1. (運動活性及び体温に対する影響)

The effect of semi-synthetic cannabinoids and synthetic cannabinoid CP-55,940 on general behavior and rectal temperature in mice. (Left) The effect of Δ^9 -THC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.), Δ^8 -THC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.), 11 α -HHC (20 mg/kg, i.p.), 11 β -HHC (20 mg/kg, i.p.), 11 α -HHC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.), 11 β -HHC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.) and CP-55,940 (1 mg/kg, i.p.) on the incidence of immobility with the forelimbs placed on a standard horizontal bar (4 cm high). (Right) Similarly, the effect of Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate and CP-55,940 on the body temperature. Each column represents the mean with S.E.M. of 9-12 animals in Δ^9 -THC-O-acetate (A, B), Δ^8 -THC-O-acetate (C, D), 11 α -HHC (E, F), 11 β -HHC (G, H), 11 α -HHC-O-acetate (I, J), 11 β -HHC-O-acetate (K, L) or CP-55,940 (M, N)-treated group. Statistical analysis was conducted via one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparison post-test by comparing target levels to a vehicle-treated cell (control). * p <0.05, ** p <0.01 vs. saline (SAL)-treated group.



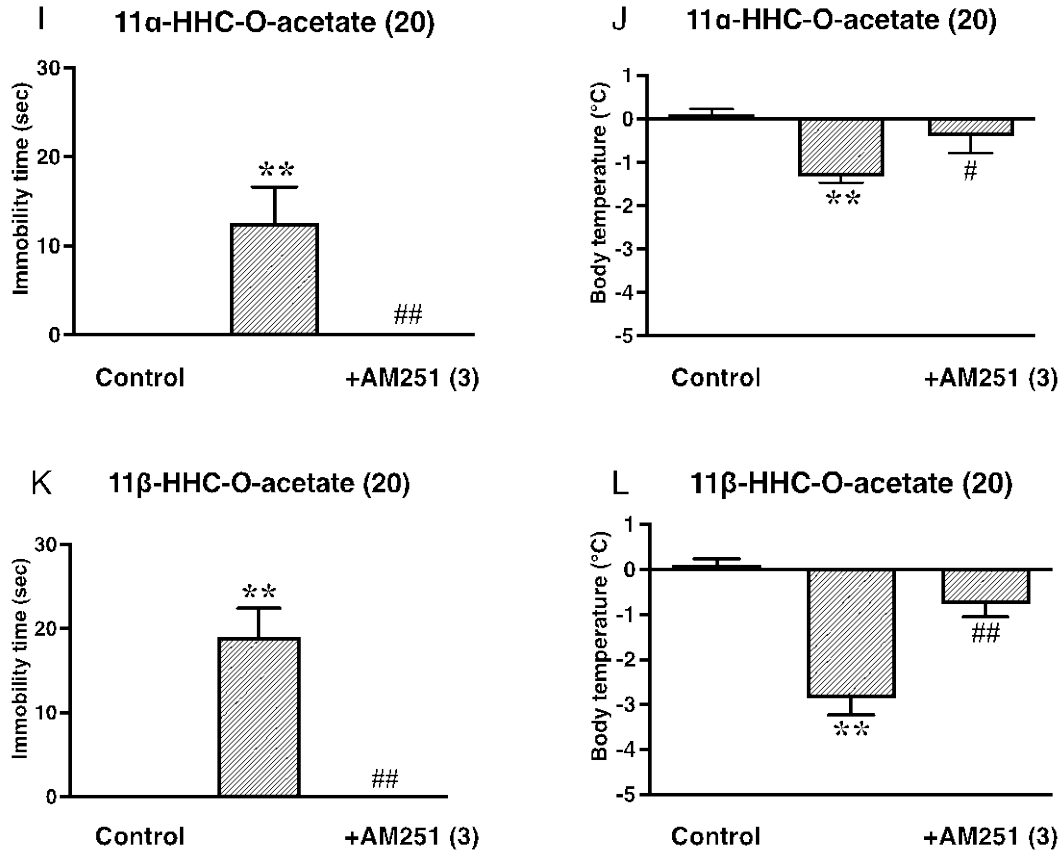


Fig. 2. (CB₁ 受容体拮抗薬併用による運動活性及び体温に対する影響)

For antagonist study, CB₁ antagonist AM251 (3 mg/kg, i.p.) was administered 15 min before treatment of Δ⁹-THC-O-acetate, Δ⁸-THC-O-acetate, 11α-HHC, 11β-HHC, 11α-HHC-O-acetate and 11β-HHC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.). Columns show the effect of pretreatment with AM251 on the maximum effect exhibited by Δ⁹-THC-O-acetate, Δ⁸-THC-O-acetate, 11β-HHC and 11β-HHC-O-acetate at 90 min, 11α-HHC and 11α-HHC-O-acetate at 180 min. Mean ± SEM calculated by 2-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test for multiple comparisons in each condition (n=6-12). ***p*<0.01 vs. saline (SAL)-treated group. #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs. Δ⁹-THC-O-acetate (A, B), Δ⁸-THC-O-acetate (C, D), 11α-HHC (E, F), 11β-HHC (G, H), 11α-HHC-O-acetate (I, J) and 11β-HHC-O-acetate (K, L)-acetate treated group.

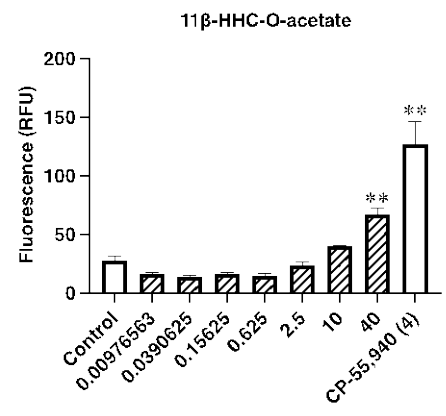
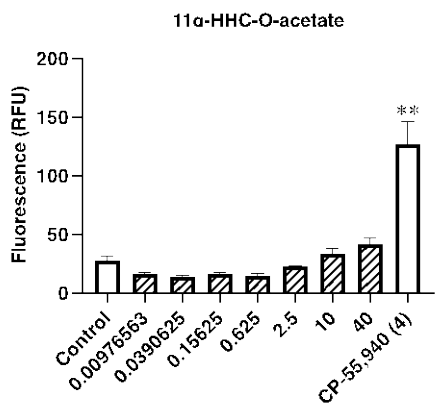
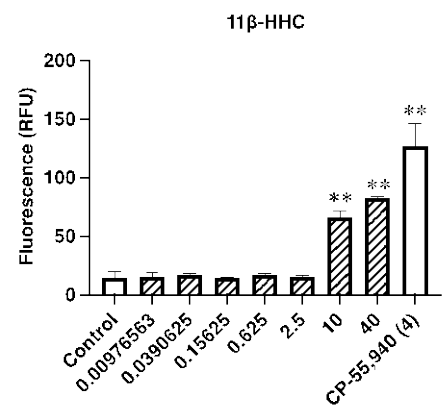
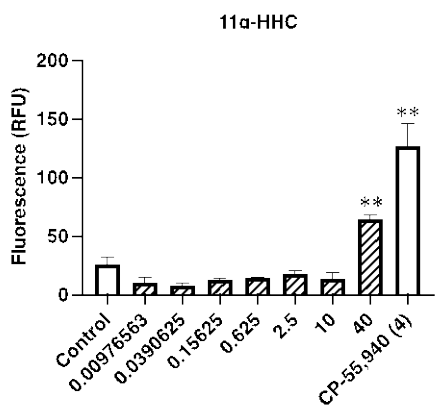
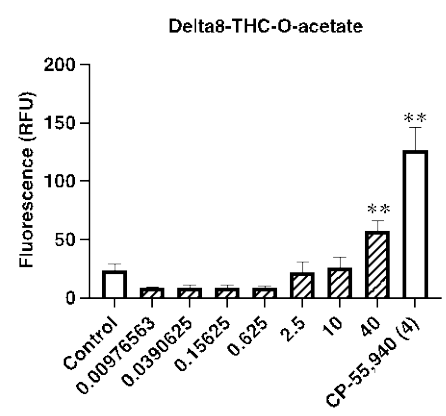
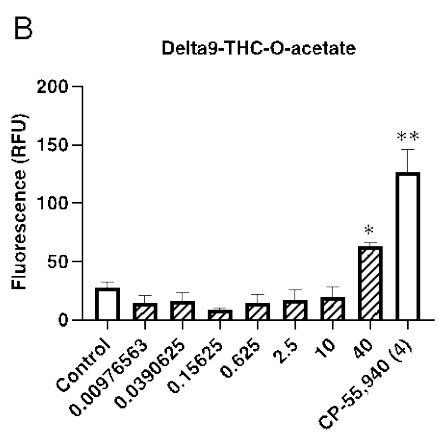
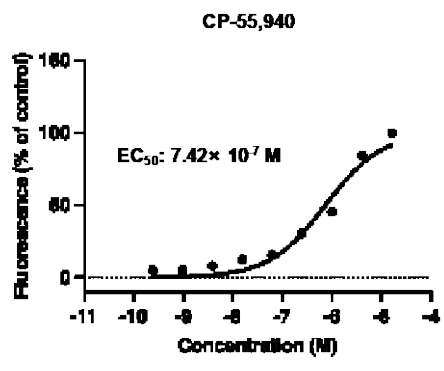
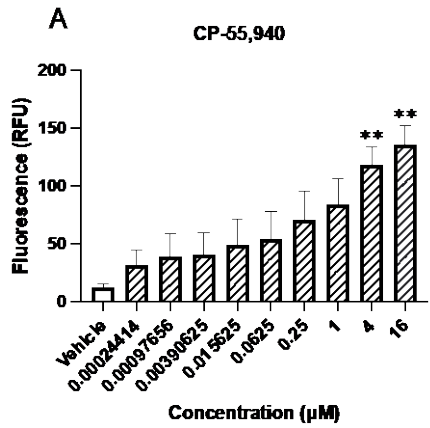


Fig. 3. (カンナビノイド受容体作用の評価)

Effect of synthetic cannabinoid on intracellular Ca^{2+} in CHO-CB₁ cells. (A) Changes in intracellular Ca^{2+} levels were data as changes in fluorescence in the FlexStation II (left graph). EC₅₀ values were calculated from the best-fit curves for the treatment of CP-55,940 on the experiment using Prism EC₅₀ curve-fitting algorithm (right graph). (B) Fluorescence measurements corresponding to increases in intracellular Ca^{2+} levels following simultaneous activation by Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate and 11 β -HHC-O-acetate. Treatment of CP-55,940 (4 μM) was used as a positive control. Each column represents the mean with SEM of three independent experiments. Statistical analysis was conducted via ANOVA and Dunnett's multiple comparison post-test by comparing target levels to a vehicle-treated cell (control). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control-treated group.

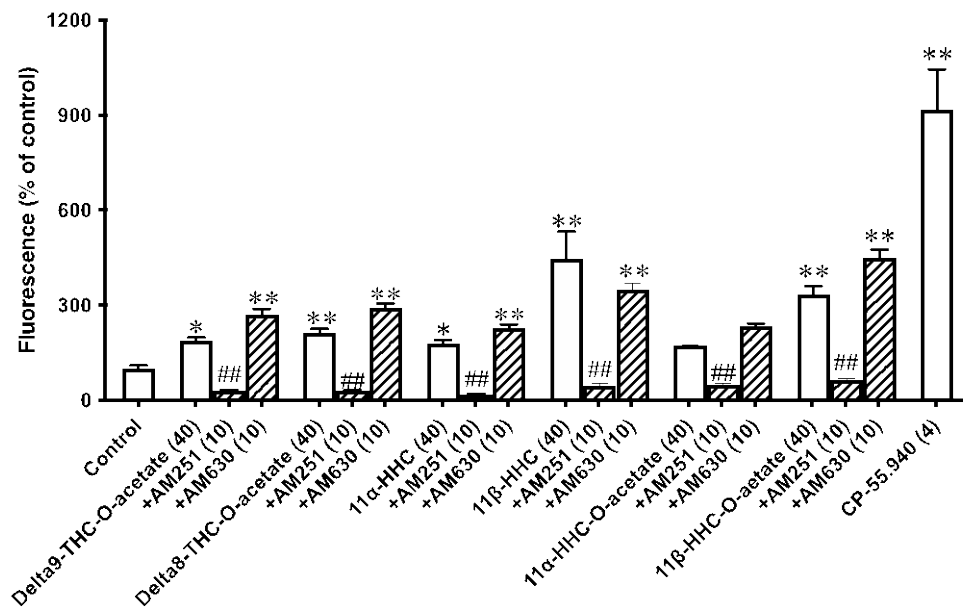


Fig. 4. (カンナビノイド受容体作用の評価)

Effect of synthetic cannabinoid on intracellular Ca^{2+} in CHO- CB_1 cells. For antagonist study, AM251 (CB_1 antagonist, 10 μM) or AM630 (CB_2 antagonist, 10 μM) was administered 15 min before administration of Δ^9 -THC-O-acetate (40 μM), Δ^8 -THC-O-acetate (40 μM), 11 α -HHC (40 μM), 11 β -HHC (40 μM), 11 α -HHC-O-acetate (40 μM) and 11 β -HHC-O-acetate (40 μM). Treatment of CP-55,940 (4 μM) was used as a positive control. Results were expressed in relative fluorescence units (RFU). Statistical analysis was conducted via ANOVA and Dunnett's multiple comparison post-test by comparing target levels to a vehicle-treated cell (control) or semi-synthetic cannabinoids. ** $p < 0.01$ vs Control-treated group. ## $p < 0.01$ vs. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate and 11 β -HHC-O-acetate.