

令和5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

分担研究報告書

分担研究課題:幻覚発現物質の評価検証を目指した
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・数値化する必要がある。本研究では、幻覚発現薬と作用機序が類似する 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の幻覚作用を評価可能であると考えられる。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。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} 受容体アゴニストなどは、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を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-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の弁別刺激効果に対して 5-HT_{2A} 受容体アゴニストの 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が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 (承認番号 8 号および 11 号)。

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 (±)-U50,488H (trans-(±)-3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl) cyclohexyl]benzeneacetamide hydrochloride)) および セロトニン 5-HT₂ 作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) を使用した。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)の違いが条件刺激となっている。薬物の条件づけの方法は、前試験法およびカウンターバランス法を組み合わせた方法を採用した。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。動物に薬物あるいはその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、6 時間の間隔を置き、薬物および溶媒の投与とボックスの組み合わせを入れ替え、再度ボックスに一定時間閉じ込めた。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 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。前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の発現として評価した。

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。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 および 7 の試験試行後に実施した。

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。行動薬理学的データは、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. 1)。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. 2)。

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. 3)。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. 4)。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. 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、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. 6)。

D. 考察

κ オピオイド受容体アゴニストであり、ヒトでの乱用も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 での条件づけで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と考えられる。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 の方が強度として強いことが考えられた。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・数値化して評価可能であると考えられた。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ことも考えられた。さらに、3 日間の投与の条件づけ終了 24 時間後の day 4 にも 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と考えられた。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できた。この情動異常は、U50,488H と同様に幻覚発現に起因することも考えられた。さらに、3 日間の

投与の条件づけ終了 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。

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が評価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、幻覚発現薬と考えられる薬物において条件づけ場所嗜好性試験で嫌悪効果を認めた。この嫌悪効果は幻覚発現を比較的短期間となる計 5 日間で評価可能であり、かつ定量化・数値化できると考えられた。さらに、ガラス玉覆い隠し試験で情動異常を認めた。この情動異常は幻覚発現を定量化・数値化していると考えられた。これまでの研究成果も踏まえつつ、幻覚を評価するための現行法の

改良や新たな簡便で効率的な評価法の確立に向けて研究を進めていきたい。

F. 参考文献

- 1) Brito-da-Costa AM, Dias-da-Silva D, Gomes NGM, Dinis-Oliveira RJ, Madureira-Carvalho A.: 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) 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.* (2022) 15: 121-128.
- 2) 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別冊 165-168.
- 3) 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.
- 4) 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.

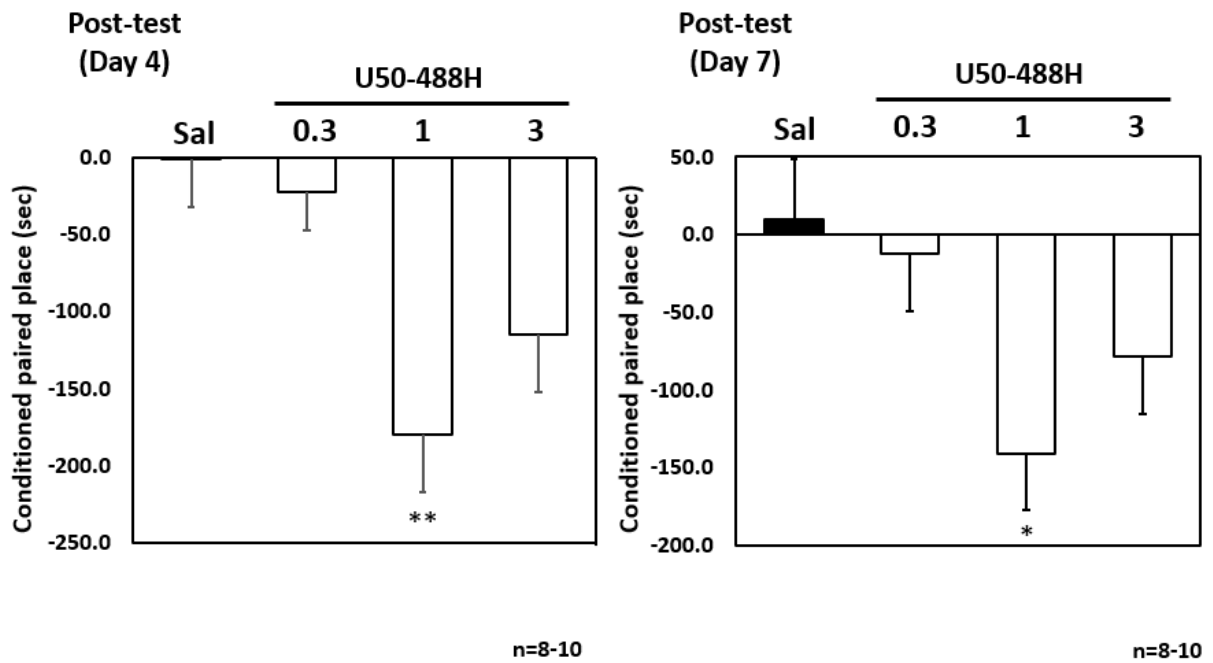
2. 学会発表

- 1) 鈴木 勉, 長谷川真司, 加賀谷肇:「ダメ。ゼッタイ。」普及運動は医療用麻薬の適正使用に影響しているか? : 日本薬学会第 114 年会 2024.3.28-31 (神奈川県横浜市)

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

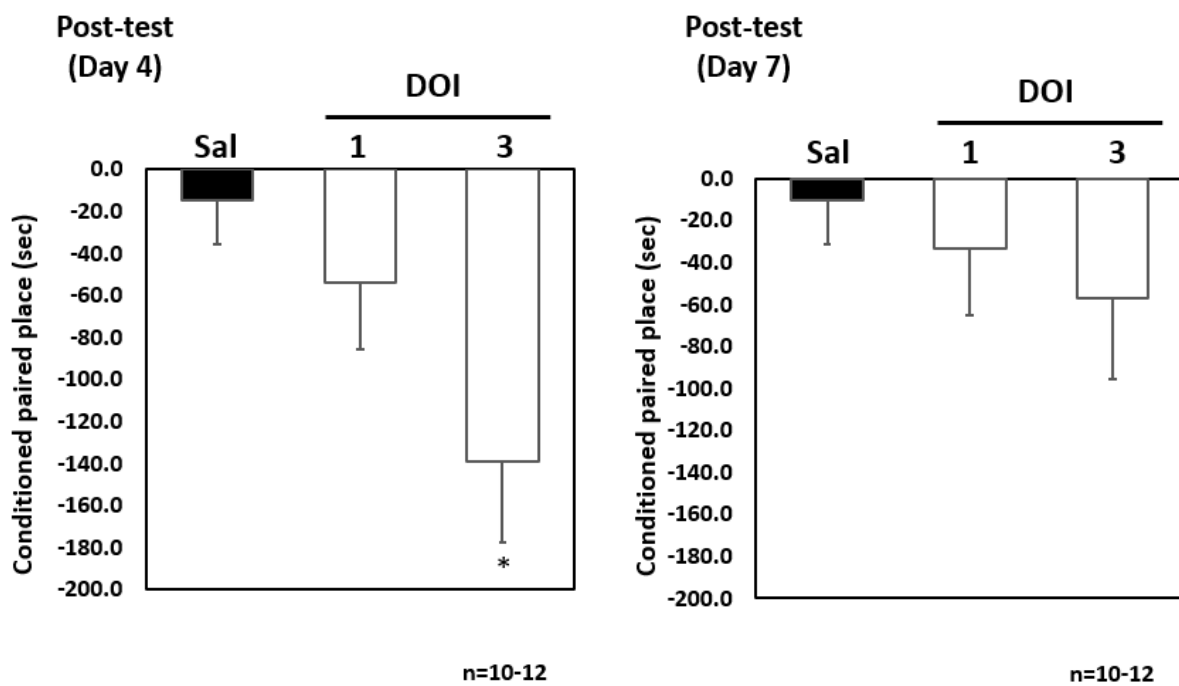
特になし



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

Fig. 1

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. 2

条件づけ場所嗜好性試験による DOI の評価

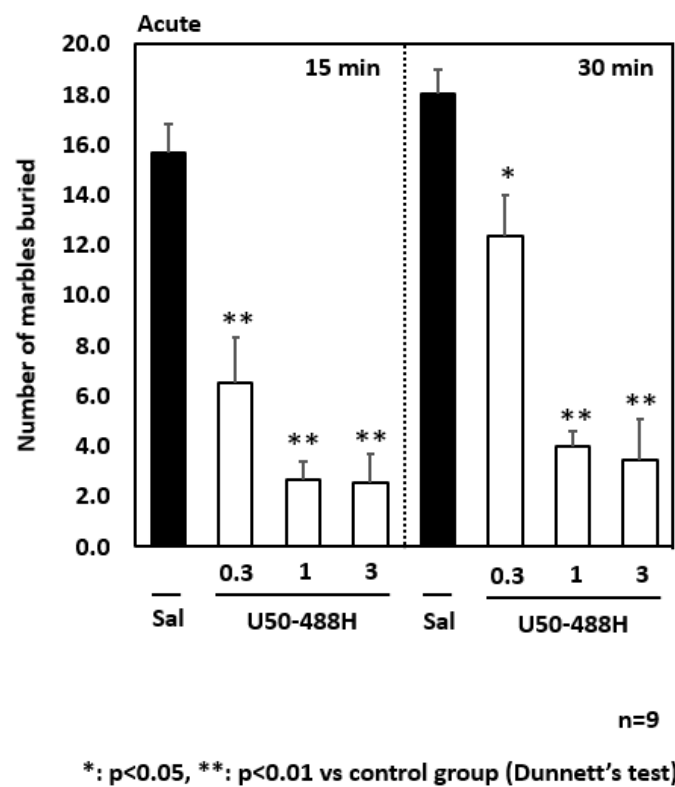


Fig. 3

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価 (急性投与)

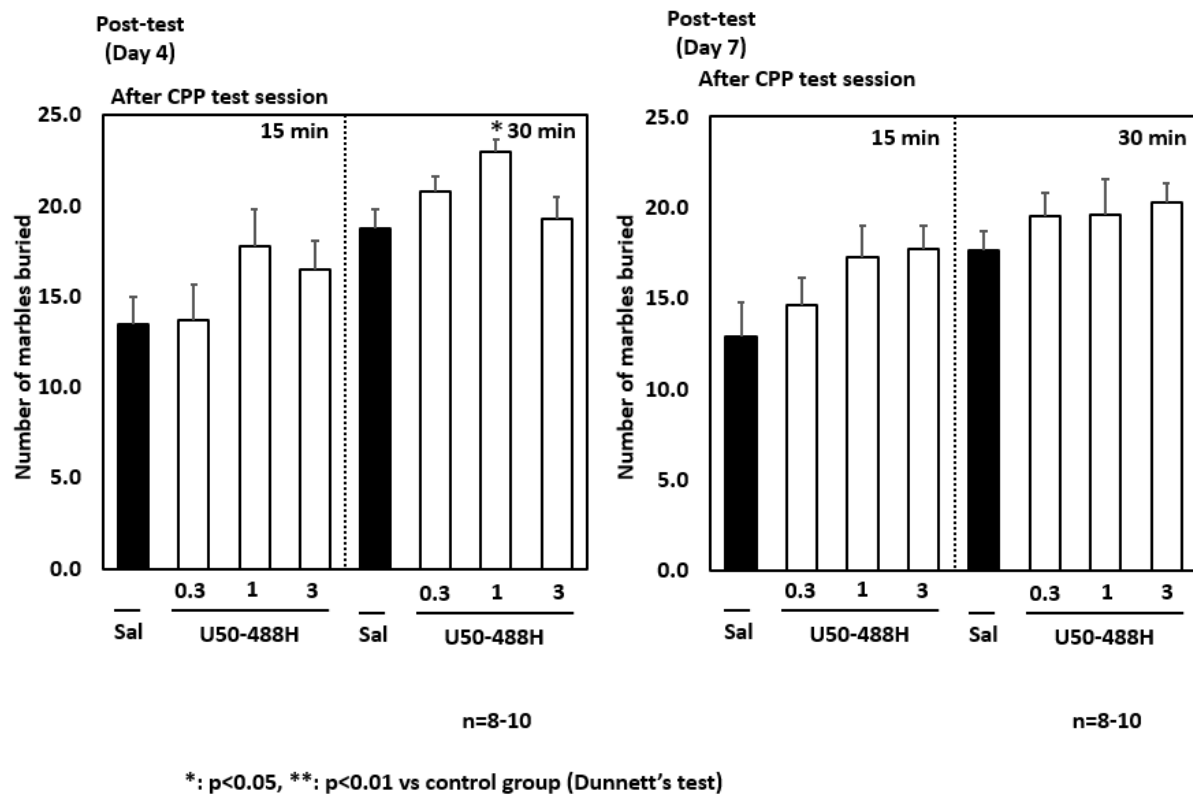


Fig. 4

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価

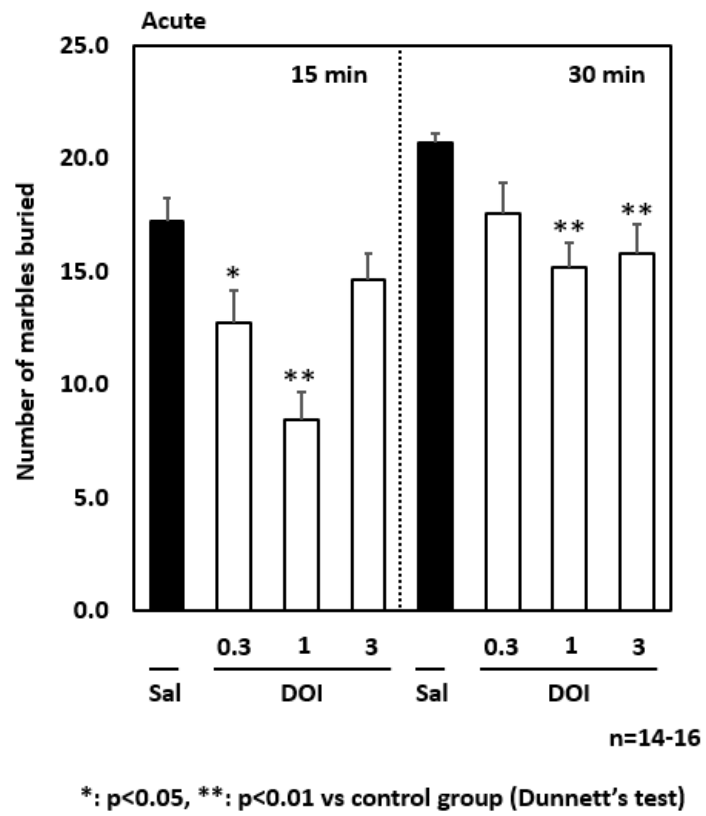


Fig. 5

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価（急性投与）

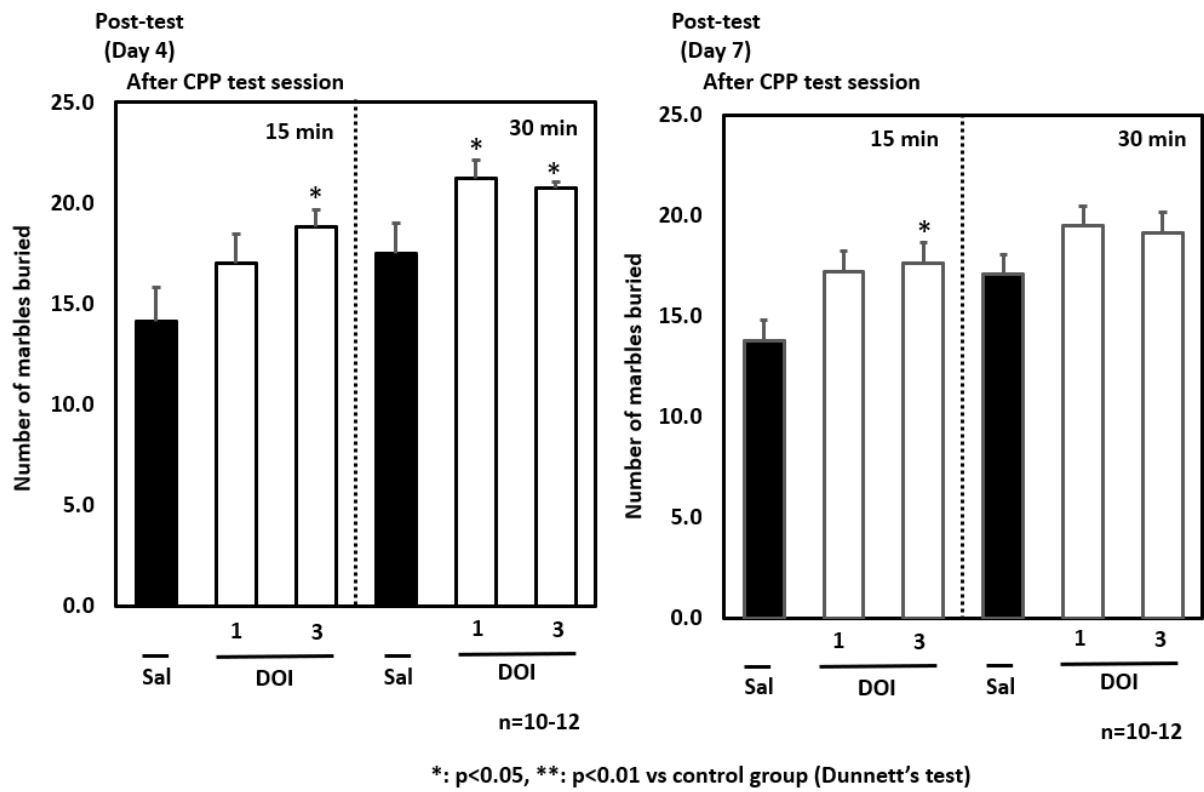


Fig. 6

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価