

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

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 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 の回数と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^{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 INSTRUMENTS、U.S.A.)により検出し、LabChart(LCS100/8、(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

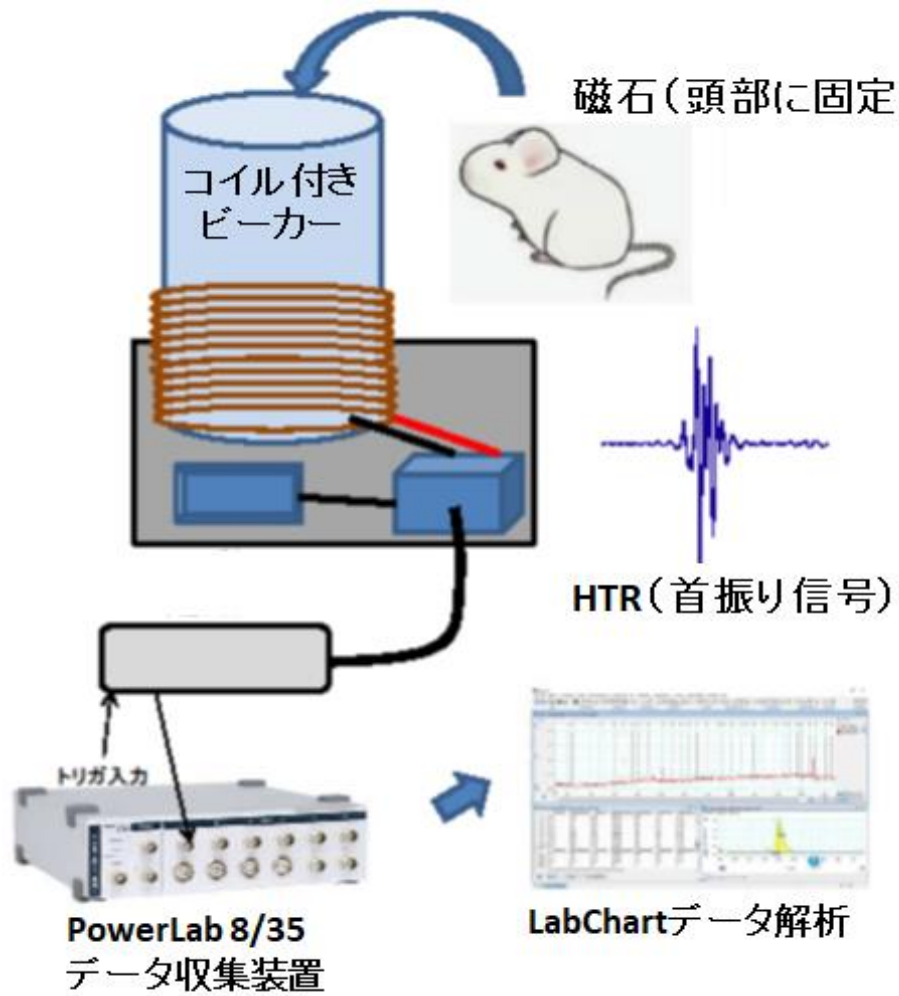


Fig. 1. マグネットメーター

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。

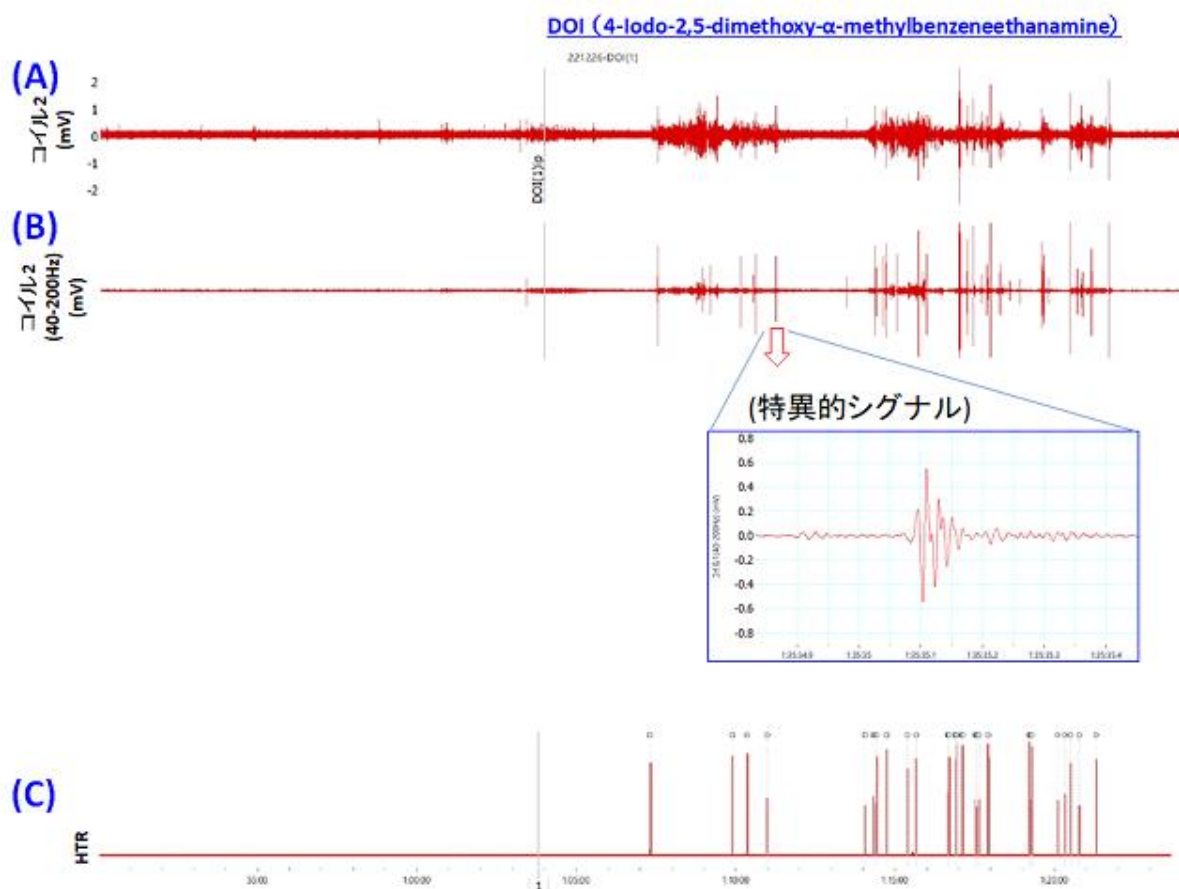


Fig. 2. マウス首振り反応の解析

(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)

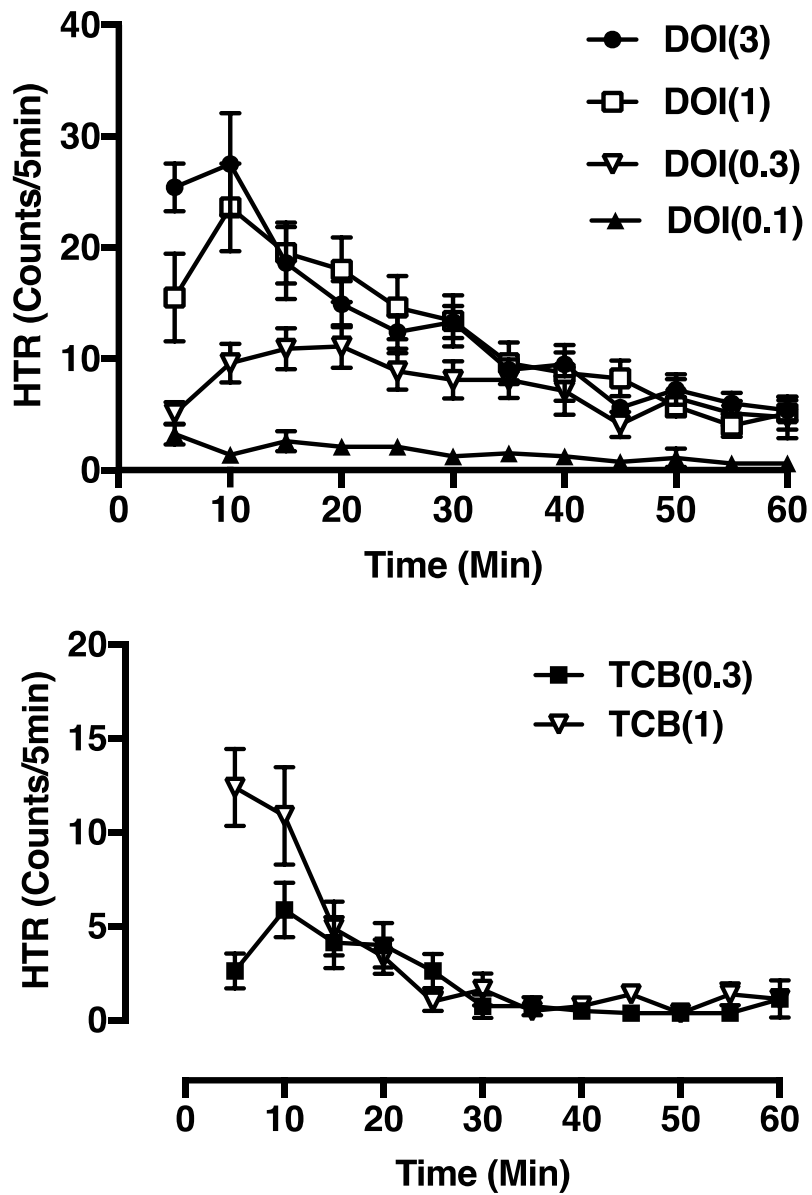


Fig. 3. セロトニン作用薬による首振り反応
 DOI (0.1-3 mg/kg), TCB-2 (0.1-3 mg/kg)による首振り反応(HTR) 5分ごとの行動変化

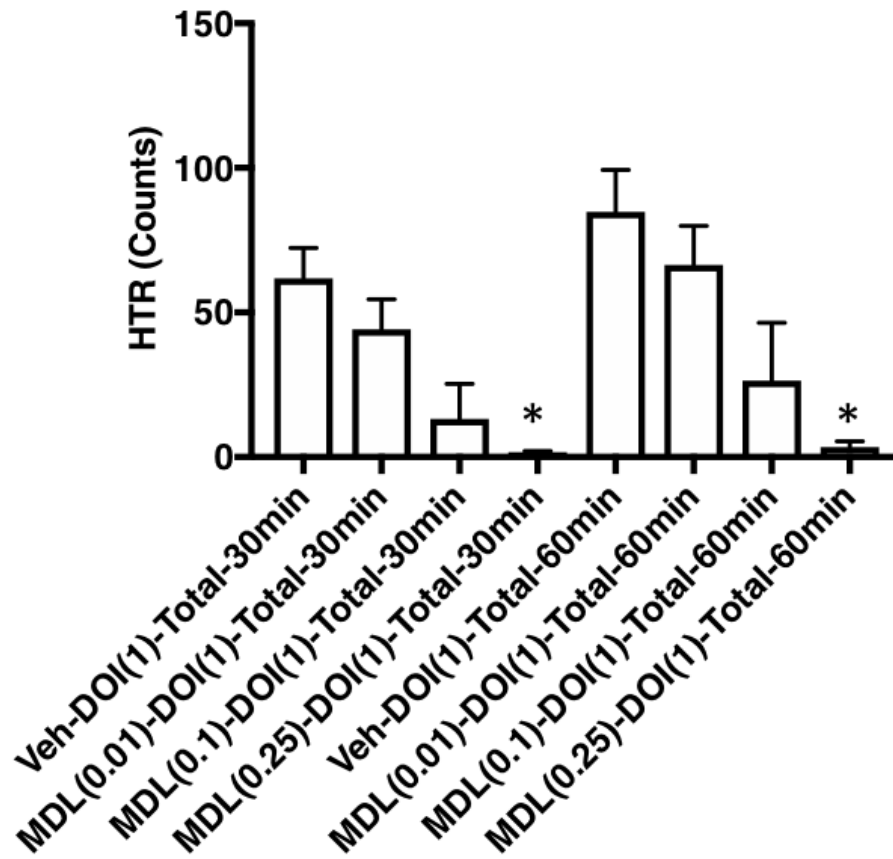


Fig. 4. セロトニン受容体の役割
 DOI (1 mg/kg)による首振り反応(HTR) に対するセロトニン 5HT2A 受容体拮抗薬 MDL100907 の影響.