

令和4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

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 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ペペリジン系薬物、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

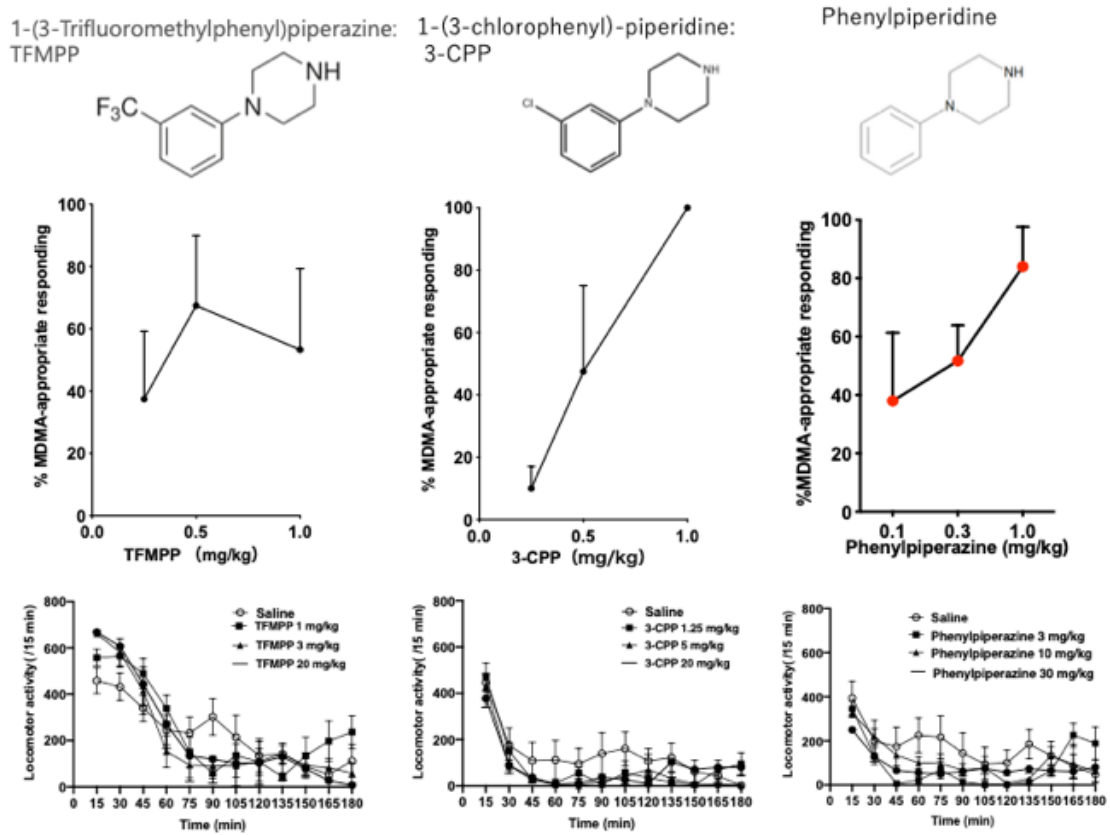


図1 1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine(TFMP:左)、1-(3-chlorophenyl)-piperidine (3-CPP:中央) および phenylpiperazine(右)の構造 (上段パネル)、MDMA の弁別刺激効果に対する般化 (中段パネル) および自発運動に及ぼす効果 (下段パネル)