

令和4～6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「3年間のまとめ」

分 担 研 究 報 告 書

分担研究課題:幻覚発現薬の評価を目指した
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、市中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・数値化が必要と考えられる。本研究では、幻覚発現薬として 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 4-iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (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 受容体作動薬により嫌悪効果が認められた。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による幻覚作用の評価が可能と考えられる。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ことから、幻覚発現薬の幻覚発現作用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} 受容体作動薬などは、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} 受容体作動薬の 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が一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。

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 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) を使用した。また、デキストロメトルファン (富士フィルム和光純薬) を用いた。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) の違いがある。薬物の条件づけの方法は、プレ試験法およびカウンターバランス法の組み合わせを改良した方法を採用した。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。午前の条件づけでは、動物に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、8 時間の間隔を置いて

た午後の条件づけでは、動物に薬物を投与して黒あるいは白のボックスに一定時間 (30 分間) 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、さらに 7 日後の day 14 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。プレ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が発現したとして評価した (Fig. 1)。

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。薬物投与 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、7 および 14 の試験試行後に実施した (Fig. 2)。

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. 3)。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. 4)。

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. 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、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. 6)。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. 7)。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. 8)。ガラス玉覆い隠し試験の結果、デキストロメトルファン 10 および 40 mg/kg の 15 分後、40 mg/kg の 30 分後の急性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低下が認められた (Fig. 9)。

D. 考察

κ オピオイド受容体作動薬であり、ヒトでも乱用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)}。他の先行研究と同様に 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 での条件づけによる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可能性が考えられる。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 の方が強度であることが考えられた。このように、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・数値化して評価できる可能性が示唆された。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可能性も考えられた。さらに、3 日間の条件づけ終了 24 時間後の day 4 においても 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可能性が考えられた。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することができた。この情動異常は、U50,488H と同様に幻覚発現に起因している可能性が考えられる。さらに、3 日間の条件づけ終了 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。さらに、市販薬乱用もされている NMDA 受容体拮抗薬デキストロメトルファン投与群でも情動異常を検出することができた。

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を評価することが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、幻覚発現薬により条件づけ場所嗜好性試験において嫌悪効果が認められた。この嫌悪効果は幻覚発現を比較的短期間の計5日間で評価可能であり、かつ定量化・数値化できる可能性が考えられた。

F. 参考文献

- 1) Brito-da-Costa AM, Dias-da-Silva D, Gomes NGM, Dinis-Oliveira RJ, Madureira-Carvalho Á.: 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. ○鈴木 勉, 加藤英明, 船田正彦: 日本における薬物の乱用, 依存の現状と問題点. *ペインクリニック* (2024) 4, 839-846.
2. 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? *緩和医療薬学雑誌* (2024) 17, 17-24.
3. Azuma Y, Koike K, Chiba H, Mitamura A, Tsuji H, Kawasaki S, Yokota T, Kanemasa T, Morioka Y, Suzuki T, Fujita M: Efficacy of naldemedine on intestinal hypomotility and adhesions in rodent models of postoperative ileus. *Biol Pharm Bull* (2023) 46, 1714-1719.
4. 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, 165-168.
5. Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H and 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. 学会発表

1. 鈴木 勉, 長谷川真司, 加賀谷肇: 医療用大麻のあり方を議論する Pro & Con 大麻の規制と人体影響: 日本アロマセラピー学会 2024. 11. 2-3 (東京都品川区)

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

条件づけ場所嗜好性試験 (CPP test)による評価

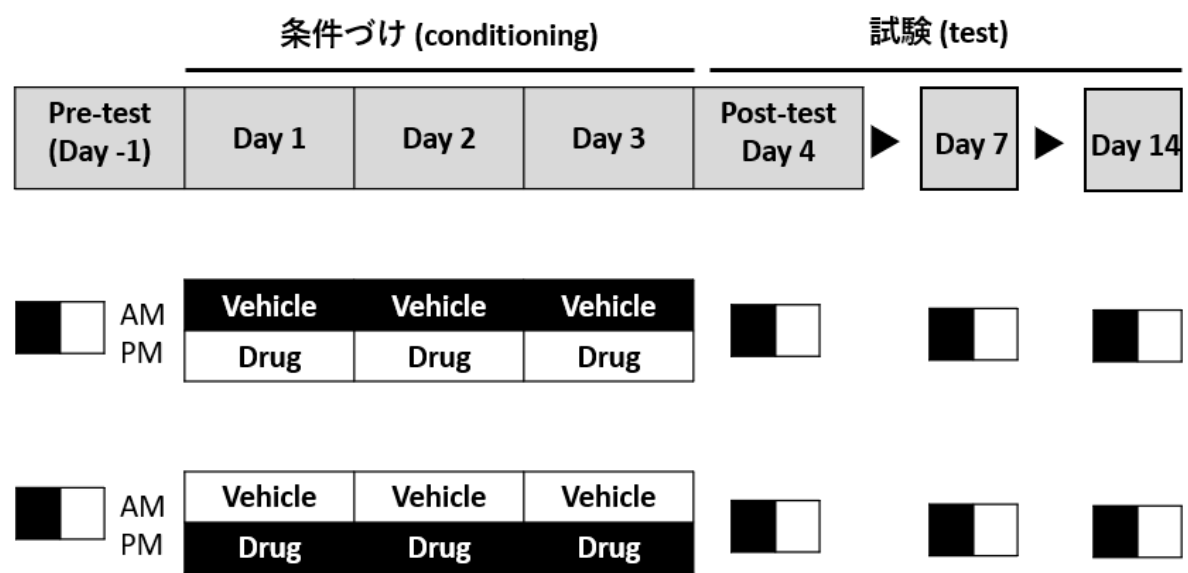
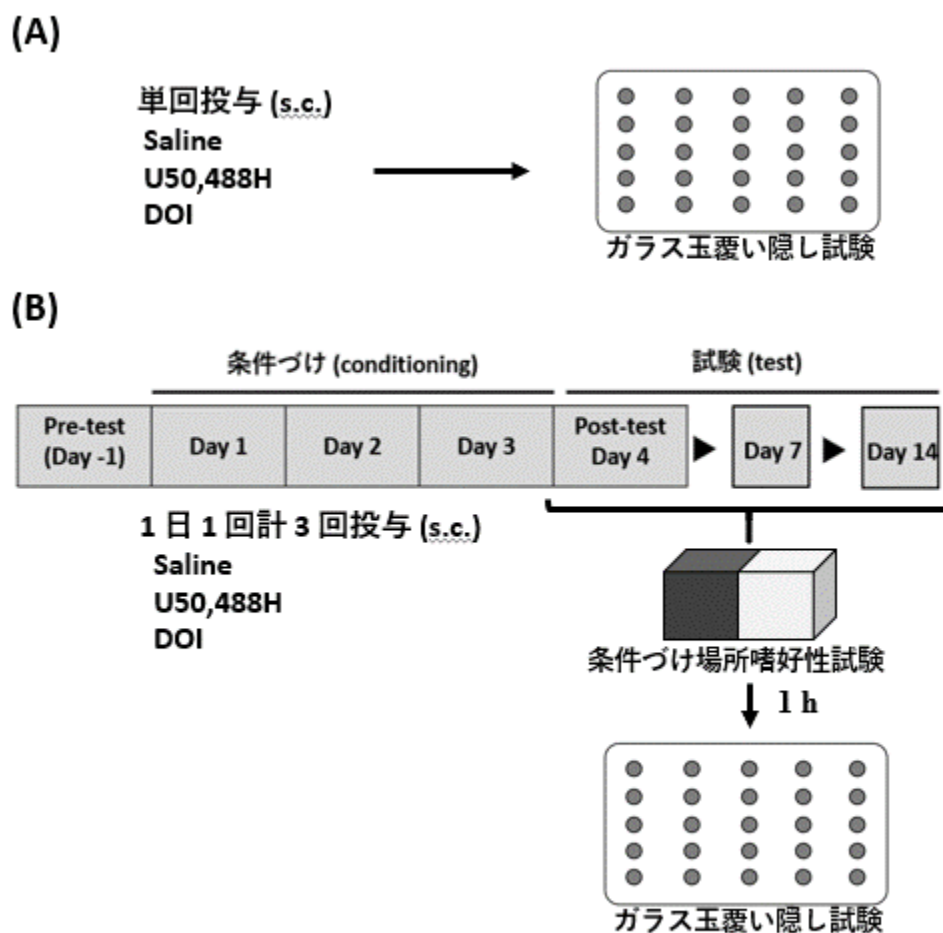


Fig. 1

条件づけ場所嗜好性試験による評価スケジュール

ガラス玉覆い隠し試験による評価

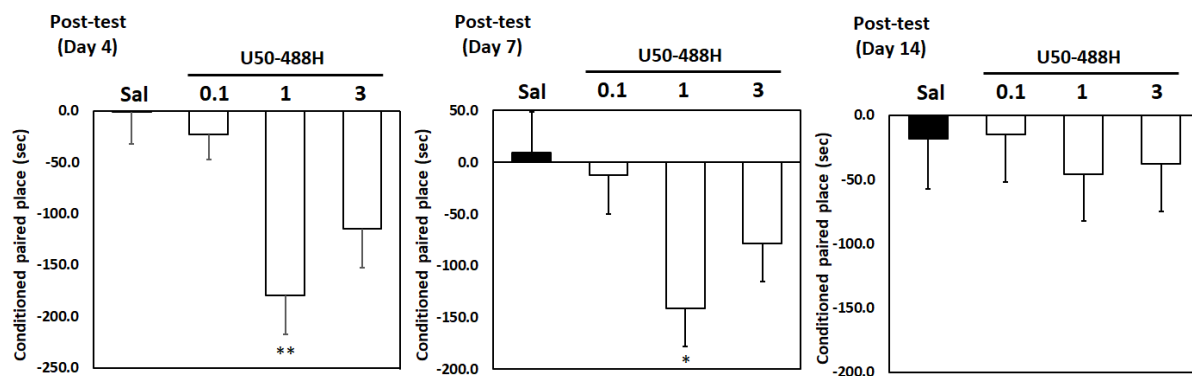


薬物の単回投与後 (A) および条件づけ場所嗜好試験の試験 1 時間後 (B) に評価

Fig. 2

ガラス玉覆い隠し試験による評価スケジュール

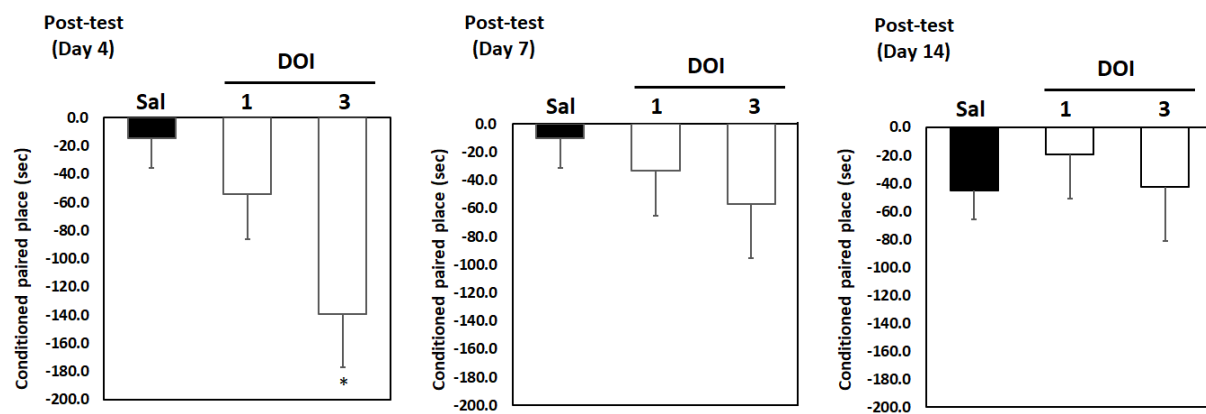
薬物の単回投与後 (A) および条件づけ場所嗜好試験の試験 (test) 1 時間後 (B) に実施



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

Fig. 3

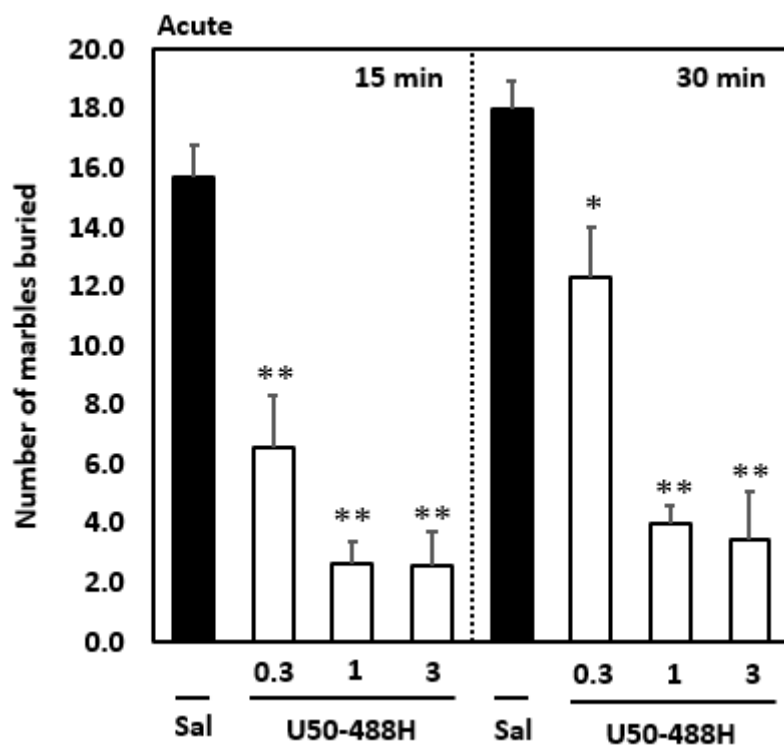
条件づけ場所嗜好性試験による U50-488H の評価



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

Fig. 4

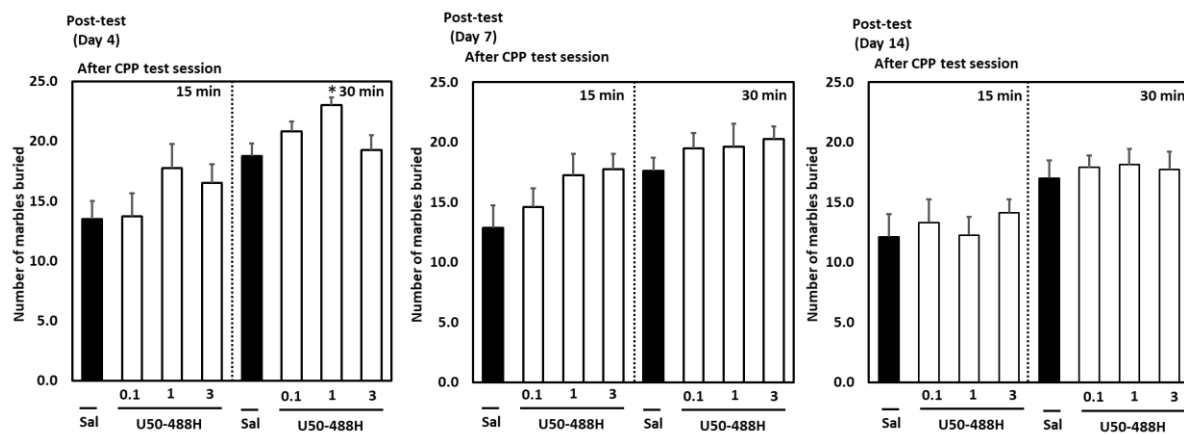
条件づけ場所嗜好性試験による DOI の評価



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

Fig. 5

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価（急性投与）



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

Fig. 6

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価

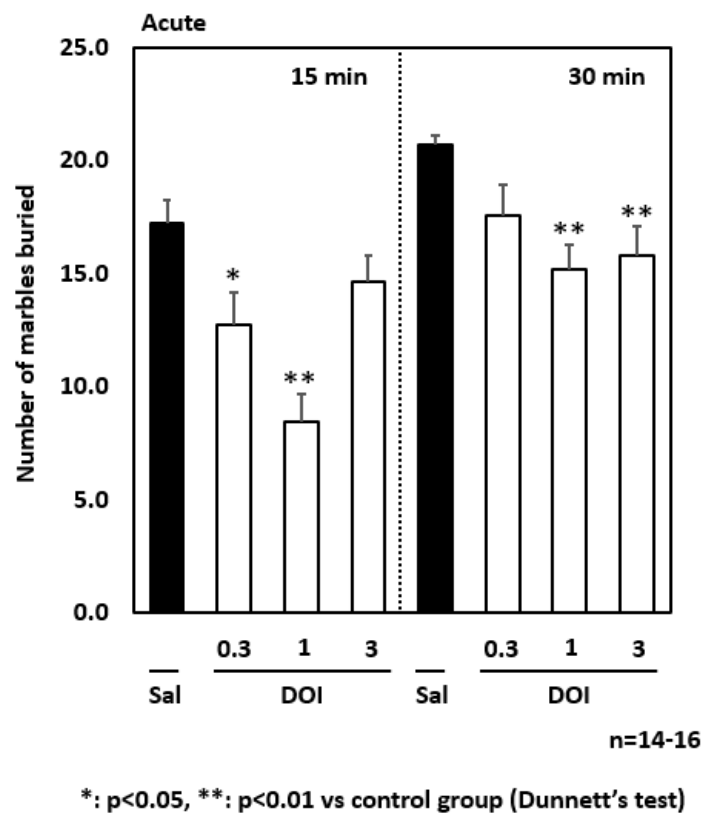
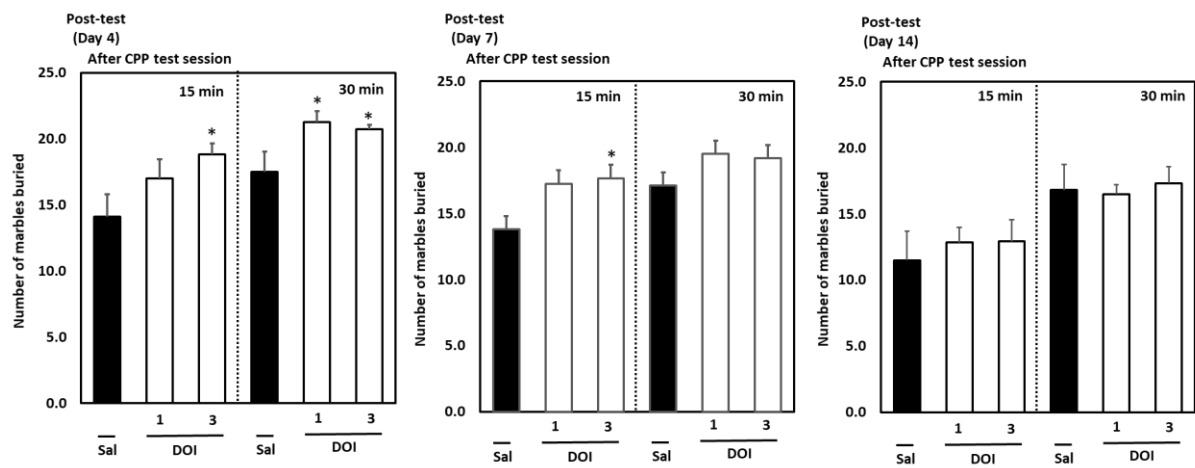


Fig. 7

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価（急性投与）



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

Fig. 8

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価

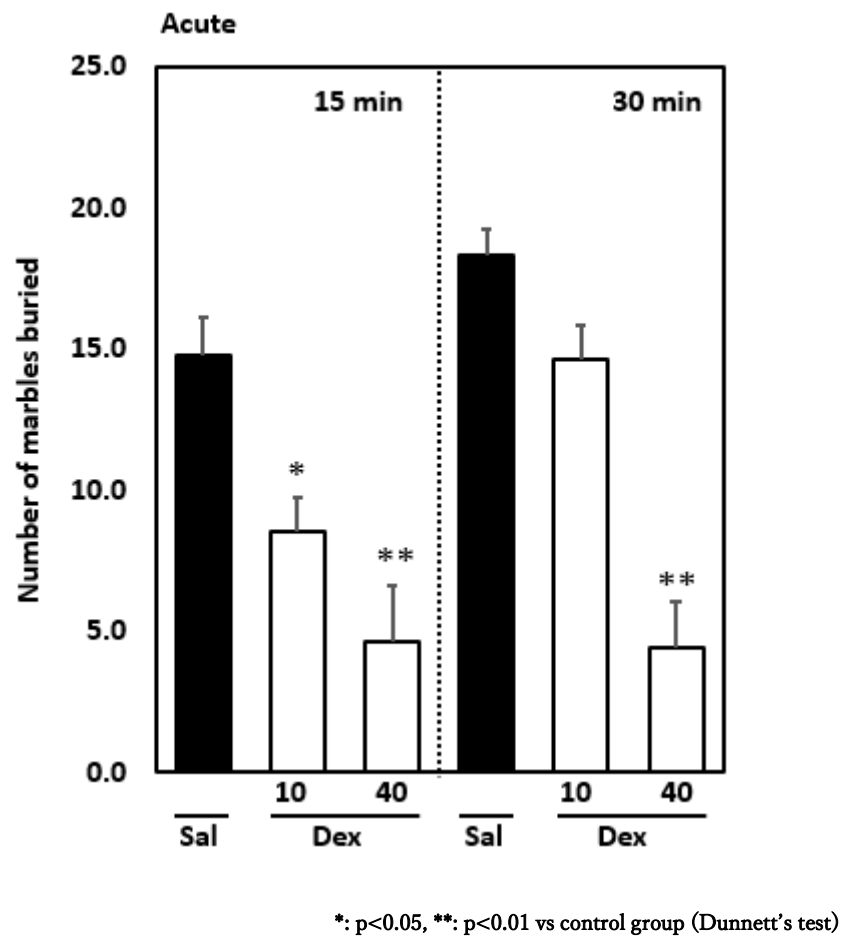


Fig. 9

ガラス玉覆い隠し試験によるデキストロメトルファンの評価