

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

幻覚剤 DOI によるマウス行動異常—伏臥位を基本的指標として評価する実験系

分担研究者：北中純一 兵庫医科大学 薬学部

【研究要旨】

人間に対して幻覚作用を有する 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) によって引き起こされるマウス異常行動（前肢洗顔行動・後肢引っ掻き行動・伏臥位・首振り行動）のうち、首振り行動以外は DOI の用量依存的に発現頻度が増加した。DOI 誘導異常行動と大脳皮質・線条体および側坐核・海馬各部位におけるモノアミン代謝回転との間に相関は認められなかった。幻覚発現物質を繰り返し投与した場合、DOI 連続投与は、水平方向の運動量を増加させなかった。伏臥位のみ、DOI 連続投与によってその発現が有意に増強した。伏臥位の観察は、一般的な睡眠姿勢とは明らかに異なり、簡便に行動観察されることから、投与量に応じて強度が変化する伏臥位は、幻覚発現物質の作用強度を評価する上で有用な指標となり得る。

A. 研究目的

小動物実験によって幻覚作用を有する指定薬物の指定に係る基本的評価指標を確立するため、5-HT_{2A} 受容体アゴニストである 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) をマウスに投与した場合の異常行動について、その発現様式、時間依存性、各異常行動間の頻度の相関性を検討する。脳特に大脳皮質、線条体および側坐核、海馬各

部位におけるモノアミンおよびその代謝物の量的変動を調べ、異常行動との相関関係を調べる。特に伏臥位は、他の行動と区別しやすく、いずれも観察によって客観的に評価する上で有用と考えられる。異常行動が幻覚発現物質によって単一の受容体たんぱく質に結合することで発現するならば、投与する幻覚剤の用量や頻度に依存して、行動の変化、特に異常行動も増悪すると考えられる。またそのような異常を示す場合、連続投与後の休

薬によって退薬症状が発現することも考えられる。

本研究は期間中に、(1) DOI の単回投与による異常高騰パターンの分類にはじまり、その用量依存性をふくめ観察の簡便さを追求した。(2) DOI 連続投与後に休薬して、改めて DOI 単回投与のち 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬 Volinanserin を投与すると、退薬症状が認められるか否かを検討した。特に、DOI を繰り返し投与したのち、DOI を改めて単回投与したときに認められる異常行動についてそのパターンや頻度・強度を観察して評価した。

B. 研究方法

ICR 系雄性マウス（実験時 11-12 週齢）に対して、生理食塩水に希釈した DOI の 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg を皮下投与（s.c.）し、直ちに観察用アクリルボックス（30×30×35 cm 高；床面に約 25 g 分の木くず）に入れて行動観察および Supermex センサによる水平方向総運動量の測定を行った。行動観察は、投与薬物が知らされていない熟練した複数の観察者によって行われた。DOI による特異的な行動の観察項目は、前肢洗顔行動・伏臥位・後肢引っ掻き行動・首振り行動とし、30 秒ごとに前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動の回数を記録し、伏臥位や首振りが確認されたか否かを記録した。観察後直ちに脳各部位を摘出して液体窒素中に保存した。モノアミンおよびその代謝物含量は、電気化学検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー（ECD-HPLC）で検出した。

マウスに対して、生理食塩水に希釈した

DOI の 1.0 mg/kg を一日一回、一週間にわたり皮下投与（s.c.）し（day 1～day 7）、直ちにホームケージに戻した。二日間（day 8, 9）休薬の間 Y 字迷路試験（day 8）を実施した。その後（day 10）DOI の 2.0 mg/kg を皮下投与し、その後 1.0 mg/kg volinanserin を腹腔投与して、行動観察および運動量の自動測定を行った。そのために、観察用アクリルボックスに入れて行動観察および Supermex センサによる水平方向総運動量の測定を行った。行動観察は、投与薬物が知らされていない熟練した複数の観察者によって行われた。DOI による特異的な行動の観察項目は、伏臥位（Prone position）のほか、簡便に観察データが取得できる毛づくろい（Grooming）、口周りの行動（Chewing）・立ち上がり（Rearing）とし、1 分刻みで記録した。

（観察のポイント）

Grooming：健康なマウスが自分の体を清潔にするために行う生理的な行動（前肢で頭、顔、耳、腹、臀部、尻尾などに触れる、自身の体をなめる、後肢で体を掻くなど、毛づくろいを含む全身に対する動作）

Chewing：口周りの行動。壁、床を舐める、床敷きを噛むなど咀嚼運動も含むが Grooming は含まない。

Rearing：後肢立ち 前肢を壁にかけ、後肢で立ち上がる動作及び立ち上がった姿勢。

Prone position（腹臥位）：うつぶせの体位で前肢を前に出し、腹ばいになった体勢のこと

また day 10 では mood の変化を調べるため高架式十字迷路試験および尾懸垂試験も併せて実施した。

(倫理面への配慮) 兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得た(承認課題第 20-059A 号(改訂) および第 22-303A 号(改訂))。「動物実験に関する日本薬理学会指針」ならびに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」

(日本学術会議、2006 年 6 月 1 日) および兵庫医科大学動物実験規定を遵守した。動物逃避防止を徹底し実験動物に苦痛を与えないよう最大限配慮を行い、人道的エンドポイントを十分配慮のうえ安全対策を講じて、承認を受けた実験室でのみ実施した。

C. 研究結果

水平方向の総運動量測定について、タイムコースは新奇環境への馴化パターンを示しており興奮性は認められなかったが、DOI 用量が高いほど総運動量は大きい傾向を示した。特に 1.0 mg/kg, s.c.での運動量は対照群と比較して有意に増加した。行動指標としては、前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動は DOI 投与 15 分で主に観察され、20 分過ぎまで継続しその後頻度は減少した。引き続き、伏臥位が発現し、投与 1 時間まで継続した。特に前肢洗顔行動と伏臥位の発現頻度間で、強い相関関係が認められた(図 1)。首振り投与後 1 時間内に観察が間断的に継続した。首振り行動以外の異常行動は DOI の用量反応性を示した。Y 字迷路試験では、DOI 誘発短期空間記憶障害が確認された(図 2)。

脳内モノアミン量(ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン、およびそれらの代謝物)の変動と、そこから導き出されるモノア

ミン代謝回転の程度に関して、ECD-HPLC 測定の結果、行動変化に相関するようなモノアミン代謝回転の変動は認められなかった。

新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験において、1.0 mg/kg DOI 投与はそれら新奇環境への関心度の低下とみられる行動(新奇物体への接触頻度低下およびガラス玉埋め総数の減少)が確認された。

DOI 連続投与実験について、水平方向の総運動量測定について、タイムコースは新奇環境への馴化パターンを示しており繰り返し投与によって興奮性は認められなかった。Day8 における休薬期間では、自発的行動交替率(および運動量)に変化はなかった(図 3)。

Day 10 における行動試験では、DOI 連続投与により高架式十字迷路試験において運動量の減少が認められた。しかし mood の変化は繰り返し投与の影響はなく(尾懸垂試験)、単回投与として day 10 で投与した 2.0 mg/kg DOI 群と対照群との間で有意な差を認め、特に Open arm での滞在時間の延長が確認された(図 4)。

特異的な行動の観察項目について(day 10)、伏臥位のみ繰り返し投与によって有意に強い伏臥位が確認された(図 5)。そのほかの毛づくろいや口周りの行動、立ち上がりについては、DOI の連続投与はその後の DOI 作用に影響しなかった。

D. 考察

前肢洗顔行動と伏臥位は、いずれも DOI の用量依存的に発現し、かつそれらの発現頻度間には強い相関関係 ($R^2 = 0.6197$) が認められた。一方、たとえば後肢引っ掻き行動 (投与後 0-20 分) と伏臥位 (投与後 20-60 分) との間 ($R^2 = 0.1213$)、あるいは、前肢洗顔行動 (60 分間) と後肢引っ掻き行動 (60 分間) の頻度間では相関関係は認められなかった ($R^2 = 0.4587$) (図 1)。この結果は、ICR 系マウスを用いた場合、DOI のような幻覚作用を有している薬物の異常行動指標として、投与後前肢洗顔行動、そして引き続いて伏臥位が認められた場合、DOI の幻覚作用を評価する行動基準となり得ることを示している。従来、首振り行動は幻覚剤のげっ歯類における、よく知られた反応である (1,2)。しかし本研究で用いた実験系では、もっとも用量反応性に乏しい行動パターンであった。首振り行動は特異な行動の一つであり、明らかに DOI 投与で誘導されているので、動物種 (あるいはその系統) に影響を受けている結果の可能性は否定できない。評価系としては、幻覚剤の作用の強さを検定あるいは予測する上で、用量反応性を考慮しなければならない。その用量反応性については、マウスのおかれた研究環境の違い (たとえば観察ボックス内の環境=床敷きの有無など) に起因する可能性がある。

DOI 投与マウスは、5-HT₂ 受容体を介した短期空間記憶力の低下がマウスにおいて認められているため (図 2)、新奇環境への順化は影響を受けることが予想された。事実、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験に

おける測定パラメータの減少は、新奇環境への関心の低下を示しており、それが前肢洗顔行動や伏臥位といった異常行動に影響している可能性がある。

DOI の連続投与は、記憶障害についてむしろ認められなかったが、その後のさらなる DOI 投与後の運動量変化や mood (不安や抑うつ) に大きな影響を与えるものではなかった。しかしながら DOI 単回投与で用量依存的に認められる伏臥位については、DOI 連続投与後の、さらなる DOI 単回投与によって、より強い伏臥位発現を確認した (図 5)。このことは、DOI が作用して伏臥位を引き起こすメカニズムが、DOI 誘発幻覚作用を表現するマウスの代表的行動ととらえてよいと考えることが出来る。

E. 結論

幻覚剤による異常行動は、ICR 系マウスを実験系とした場合、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度とが、用量依存性、発現強度の相関性の観点から有効な観察基準と考えられた。そのなかで、幻覚剤の動物実験による評価としては、簡便な行動観察に基づく、再現性の良い指標が強く望まれる。その観点からは、伏臥位を記録することは他の行動と明確に区別することが出来て実施しやすいと考えられる。また、投与頻度の上昇が伏臥位発現強度の上昇を引き起こすことは、DOI が誘発する主たる作用であることを想定させ、人間での幻覚効果とその相関を想定させる。したがって、本研究結果は、マウスを用いた伏臥

位測定を実施すれば、stimulant の薬理学的特性を持たない幻覚剤 DOI の効果を簡便かつ定性的に反映する行動指標となることを示唆する。

F. 参考文献

- 1) Halberstadt A.L. & Geyer M.A. Effect of hallucinogens on unconditioned behavior. *Curr Top Behav. Neurosci.* **36**, 159-199 (2018).
- 2) Canal C.E. & 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.* **4(7-8)**, 556-76 (2012)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Takashi Y., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Nishitani Y. & Sato T. Therapeutic potential for KCC2-targeted neurological diseases. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **59**, 431-438 (2023)
- 2) Kitanaka J., Kitanaka N., Tomita K., Hall S.F., Igarashi K., Uhl G.R. & Sato T. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors block morphine-induced locomotor activation, Straub tail, and depression of rearing in mice via a possible central action. *Neurochem. Res.*, **48(7)**, 2230-2240 (2023)

- 3) Tomita K., Oohara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Sugimura, M. & Sato, T. Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression via neuroinflammation induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice. *Heliyon* **9(12)** e22784 (2023).
- 4) Oka M., Yoshino R., Kitanaka N., Hall F.S., Uhl G.R. & Kitanaka J. Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Dependence and Abuse Liability of Alcohol. *Alcohol Alcohol.* **59(2)** agad086 (2024).
- 5) Kitanaka N., Arai K., Takehara K., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & Kitanaka J. Opioid receptor antagonists reduce motivated wheel running behavior in mice. *Behav. Pharmacol.* **35(2/3)**114-121 (2024)
- 6) Kobayashi C., Kitanaka N., Nakai M., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & Kitanaka J. Protein phosphatase 2A inhibitors: A possible pharmacotherapy for benzodiazepine dependence. *J. Pharm. Pharmacol.*, DOI: 10.1093/jpp/rgae136 (2024)

2. 学会発表

- 1) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、仲井聖典、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、佐藤友昭. μ オピオイド受容体選択的拮抗薬単独与薬によるマウス動機付け行動への影響 第 16 回日本緩和医療薬学会

2023. 5. 26-28 (神戸)
- 2) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭. オピオイド受容体拮抗薬のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響 第 64 回日本神経病理学会総会学術研究会/第 66 回日本神経化学学会大会 合同大会 2023. 7. 6-8 (神戸)
 - 3) 北中純一、北中順恵、湯瀬祥、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好. 幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine は短期空間記憶や気分の障害を引き起こす 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 4) 湯瀬祥、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一. 幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine によって引き起こされる行動異常の特徴について. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 5) 北中順恵、新井香奈代、竹原薫生子、富田和男、五十嵐健人、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭、北中純一. オピオイド受容体拮抗薬ナロキソン単回投与のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 6) 仲井聖典、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、藤井舞、津嶋祐一郎、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一. GSK-3 阻害薬 CHIR-99021 前処置はモルヒネによる Straub の挙尾反応と退薬症状を抑制する. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 7) 松田健太郎、北中順恵、濱名貴大、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. GSK-3 阻害薬 LY2090314 前処置による覚せい剤誘導過運動・常同行動への効果. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
 - 8) 濱名貴大、北中順恵、仲井聖典、松田健太郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害薬 Wortmannin は、覚せい剤誘導繰り返し嗅ぎ行動および噛み行動を抑制し、その結果常同行動の発現全体を緩和する. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸) 北中純一、北中順恵、仲井聖典、濱名貴大、藤井舞、松田健太郎、津嶋祐一郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭. 選択的 GSK3 阻害薬による実験的モルヒネ退薬症状の緩和. 第 17 回日本緩和医療薬学会 2024. 5. 24-26 (東京)

- 9) 五十嵐健人、F. Scott Hall、北中純一、北中順恵、田中康一、富田和男、佐藤友昭. グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 阻害薬である SB216763 はゼブラフィッシュのモルヒネ条件付け場所選好性を阻害する. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会大会 合同大会 (NEURO2024) 2024. 7. 24-27 (福岡)
- 10) 北中純一、北中順恵、松田健太郎、濱名貴大、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭. GSK3 阻害薬 LY2090314 による覚せい剤常同行動の抑制. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会大会 合同大会 (NEURO2024) 2024. 7. 24-27 (福岡)
- 11) 北中順恵、天方詞子、森田千晶、仁木理子、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. PI3K 阻害薬 Wortmannin による覚せい剤常同行動の抑制. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会大会 合同大会 (NEURO2024) 2024. 7. 24-27 (福岡)
- 12) 北中純一、北中順恵、松田健太郎、湯瀬祥、濱名貴大、仲井聖典、上田紫暉、服巻里佳、山本ひとみ、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭. チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブはマウスにおける覚せい剤誘発過運動を減弱する. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 13) 北中順恵、山本ひとみ、藤井舞、津嶋祐一郎、仲井聖典、上田紫暉、服巻里佳、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. GSK3 選択的阻害薬ラドゥビグルシブはモルヒネの鎮痛作用に影響せず、急性症状・退薬症状を抑制する. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 14) 山本ひとみ、北中順恵、仲井聖典、富田和男、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、上田紫暉、服巻里佳、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. 幼若マウスに対する幻覚剤 U50, 488H の影響と大防風湯の作用について. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 15) 上田紫暉、北中順恵、服巻里佳、山本ひとみ、富田和男、五十嵐健人、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭、北中純一. 幻覚剤 Kappa オピオイド受容体アゴニスト U50, 488H 作用の基本的行動評価指標について. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)
- 16) 服巻里佳、北中順恵、上田紫暉、山本ひとみ、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一. 幻覚剤 2, 5-dimethoxy-4-Iodoamphetamine を連続投

与した際に認められるマウスの行動変化. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)

- 17) 富田和男、高橋将世、五十嵐健人、桑原義和、北中純一、北中順恵、田中康一、上川善昭、栗政明弘、佐藤友昭. ヒト細胞にナノ銀処理を行うとミトコンドリア機能変化を介して ACE2 発現が減少する. 第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本生理学会/第 98 回日本薬理学会合同大会 (APPW2025) 2025. 3. 17-19 (千葉)

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

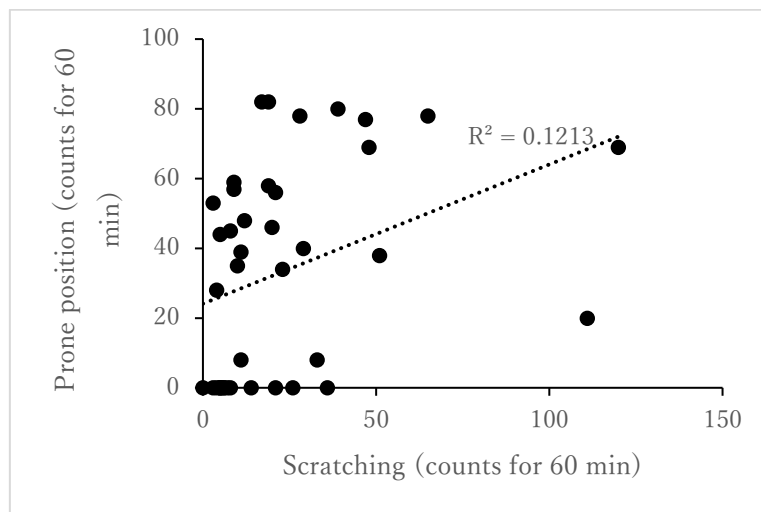
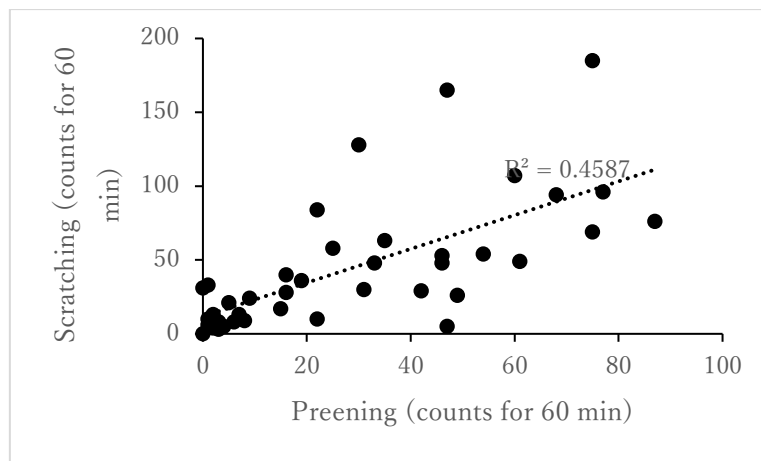
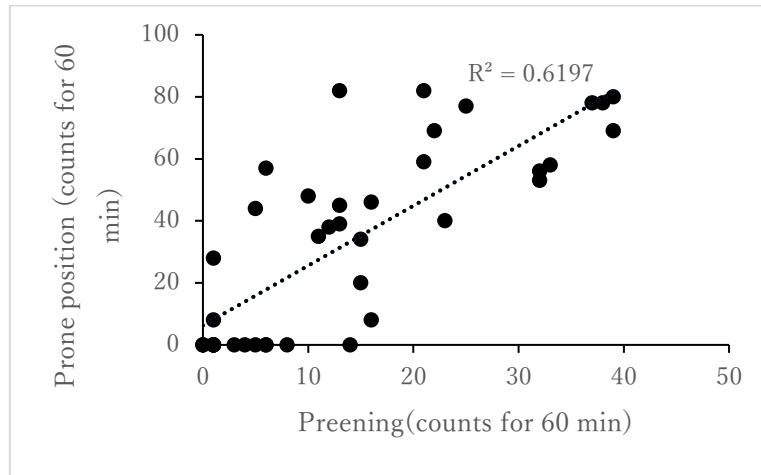


図1. DOI 誘発異常行動間の相関関係

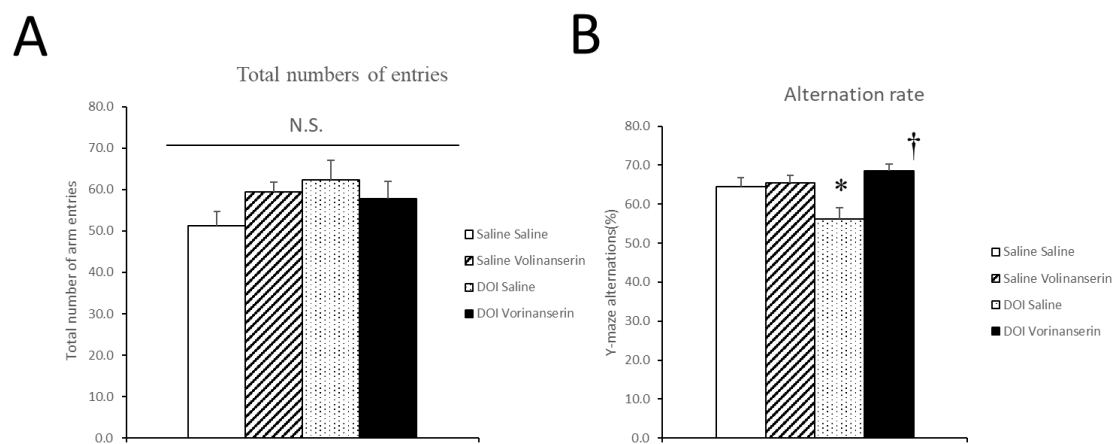


図2. DOI 誘発短期空間記憶障害

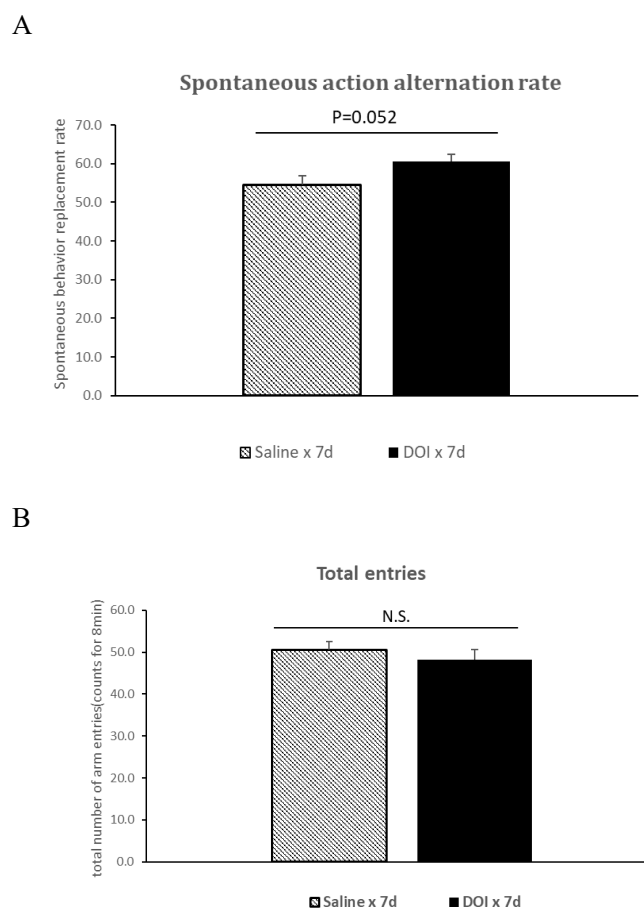
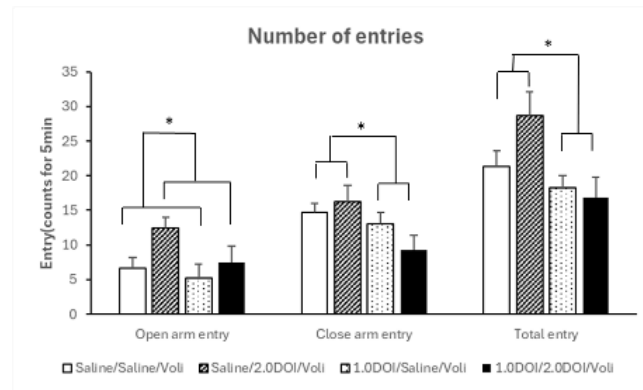


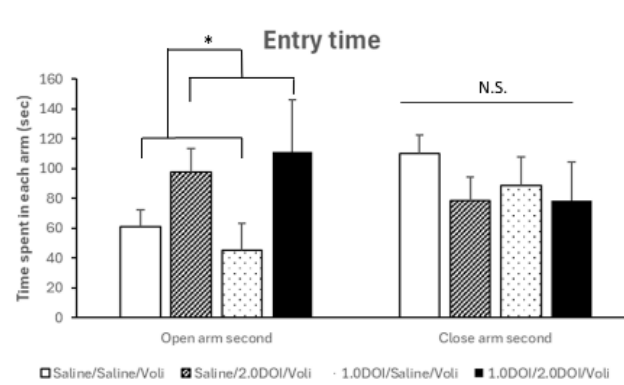
図3. Y 字迷路試験結果 (day 8)

A : 自発の行動交替率 B : 総運動量

A



B



C

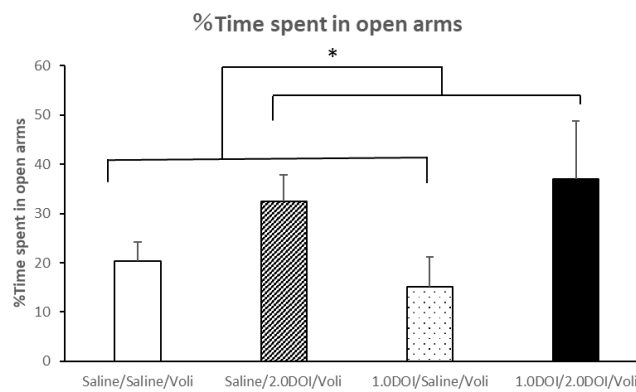


図 4. 高架式十字迷路試験結果 (day 10)

A: アームへの侵入回数 B: 各アームへ侵入した累積時間

C: オープンアームでの滞在時間 (%)

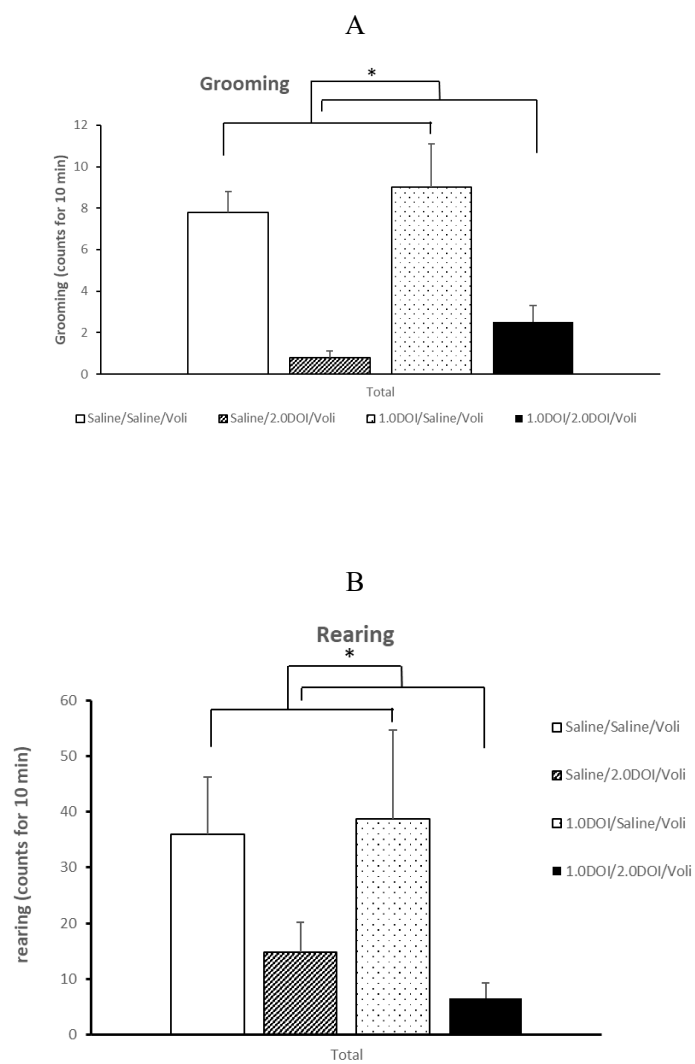


図 5. 特異的行動の強度 (day 10)

A: 毛づくろい B: 伏臥位