

令和7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：幻覚発現物質のマウスを用いた 新規試験法の確立

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】

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、幻覚発現薬として κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬 DOI を使用し、マウスを用いた条件づけ場所嫌悪性試験を実施した。さらに、幻覚発現薬により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。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-HT_{2A/2C} 受容体作動薬による情動異常を検出することができた。これらの評価手法を用いることで、幻覚発現薬の幻覚発現に伴う情動異常を評価に用いることが可能と考えられる。本内容は、*Neuropsychopharmacology Reports* 誌に発表した。

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様の感覚効果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

般化することから類似した幻覚作用様の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ンリン 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。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幻覚発現薬と各評価法の妥当性を明らかにすることが望まれる。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、本研究では、 κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H、5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬 DOI を使用し、マウスを用いた条件づけ場所嫌悪性試験 (conditioned place aversion: CPA) および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 5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬である 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。(Fig. 1)

1. 条件づけ場所嗜好性試験

条件づけ場所嫌悪性試験 (CPA) は、白黒の 2-コンパートメント CPP (conditioned place preference) 装置を用いて実施した。装置は白色 (凹凸床) 区画および黒色 (平滑床) 区画から構成され、各区画の滞在時間を赤外線センサーにより測定した。プレ試験では、薬物未投与下で 15 分間各区画間を自由に探索させ、各区画の滞在時間を測定した後、群分けを行った。条件づけは 3 日間、1 日 2 回実施し、午前に生理食塩水 (10 mL/kg)、午後に薬物を投与し、それぞれ異なる区画へ 30 分間閉じ込めた。試験は day 4、7 および 14 に実施し、薬物非投与下で 15 分間各区画間を自由に探索させ、各区画での滞在時間を測定した。CPA スコアは、薬物条件づけ区画と対照区画の滞在時間差からプレ試験時の値を差し引いて算出し、正値を報酬効果、負値を嫌悪効果の指標とした。(Fig. 2)

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、マウスを 30 分間自由に探索させた。薬物投与後ケージにマウスを入れ 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 day 4、7 および 14 の試験試行後に実施した。

(Fig. 2)

2. 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

U50,488H (0.3、1、および 3 mg/kg, s.c.) を用いた条件づけ後の day 4、7 および 14 における結果を Fig. 3A–C に示した。U50,488H 1 mg/kg 投与群では、day 4 (1 mg/kg ; $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$) および day 7 (1 mg/kg ; $p < 0.05$) において、生理食塩水対照群と比較して有意な CPA スコアを示したが、day 14 では認められなかった。DOI (1 および 3 mg/kg, s.c.) を用いた条件づけ後の day 4、7 および 14 における結果を Fig. 4A–C に示した。DOI 3 mg/kg 投与群では、Day 4 (3 mg/kg ; $p < 0.01$) において、生理食塩水対照群と比較して有意な CPA スコアを示したが、day 7 および 14 では認められなかった。

2. ガラス玉覆い隠し試験

U50,488H (0.3、1、および 3 mg/kg, s.c.) 急性投与直後 15 分および 30 分における影響を Fig. 5A に示した。U50,488H のすべての用量投与群において、生理食塩水対照群と比較して、15 分後 (0.3、1、および 3 mg/kg ; $p < 0.01$) および 30 分後 (0.3 mg/kg ; $p < 0.05$ 、1 および 3 mg/kg ; $p < 0.01$) にガラス玉覆い隠し数の有

意な減少が認められた。DOI (0.3、1、および 3 mg/kg, s.c.) 急性投与直後 15 および 30 分における影響を Fig. 5B に示した。DOI の各用量投与群において、生理食塩水対照群と比較して、15 分後 (0.3 mg/kg ; $p < 0.05$ 、1 mg/kg ; $p < 0.01$) および 30 分後 (1 mg/kg ; $p < 0.01$ 、3 mg/kg ; $p < 0.01$) にガラス玉覆い隠し数の有意な減少が認められた。U50,488H (0.3、1、および 3 mg/kg, s.c.) 条件づけ群における、day 4、7、および 14 の CPA 試験 1 時間後の結果を Fig. 6A–C に示した。Day 4 において、U50,488H 1 mg/kg 条件づけ群では、30 分後のみ (1 mg/kg ; $p < 0.05$)、生理食塩水対照群と比較してガラス玉覆い隠し数の有意な増加が認められた。DOI (1 および 3 mg/kg, s.c.) 条件づけ群における、day 4、7、および 14 の CPA 試験 1 時間後の結果を Fig. 7A–C に示した。Day 4 において、DOI 条件づけ群では、15 分後 (3 mg/kg ; $p < 0.05$) および 30 分後 (1 および 3 mg/kg ; $p < 0.05$) に、生理食塩水対照群と比較してガラス玉覆い隠し数の有意な増加が認められた。さらに Day 7 においても、DOI 条件づけ群では 15 分後 (3 mg/kg ; $p < 0.05$) に有意な増加が認められた。

D. 考察

κ オピオイド受容体作動薬であり、ヒトにおける乱用も報告されているサルビノリン A (salvinorin A) は、幻覚作用を有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、条件づけ場所嫌悪性試験において一般的に嫌悪効果を示すことが知られている^{2,3)}。本研究においても、 κ オピオイ

ド受容体作動薬 U50,488H の反復投与により CPA が認められ、嫌悪効果を有することが確認された。さらに、その嫌悪効果は条件づけ終了後も一定期間持続していたことから、U50,488H による情動面への影響が比較的長く維持される可能性が示唆された。また、代表的な 5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬である DOI においても CPA が認められた。DOI は幻覚発現作用を有する薬物として知られており、本研究で認められた嫌悪効果についても、5-HT_{2A/2C} 受容体活性化に伴う情動・認知機能変化が関与している可能性が考えられた。特に DOI では、条件づけ後数日間にわたり嫌悪効果が認められたことから、情動面への影響は U50,488H と比較してより強く、持続的である可能性が考えられた。一般に、ヒトにおいて快感的あるいは幻覚的に認識される作用であっても、実験動物では嫌悪行動として観察される場合がある。本研究で認められた CPA は、幻覚発現関連薬物による不快感情や異常知覚に伴う情動変化を反映している可能性が考えられた。そのため、CPA は幻覚発現関連薬物の情動影響を評価する上で有用な行動指標となる可能性が示唆された。さらに本研究では、 κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H (0.3–3 mg/kg) の急性投与により、ガラス玉覆い隠し行動の変化が認められ、情動面あるいは認知面への影響が検出された。この変化は、U50,488H の κ オピオイド受容体活性化に伴う幻覚様作用や嫌悪効果と関連している可能性が考えられた。さらに、3 日間の条件づけ終了 24 時間後である day 4 においても、U50,488H 1 mg/kg 投与群で同様の変

化が認められた。このことから、複数回投与に伴う嫌悪記憶あるいは幻覚様作用に関連した情動変化が持続している可能性が示唆された。一方で、高用量群では変化が減弱する傾向も認められ、過去の報告における鎮静作用の関与とも一致する可能性が考えられた。また、DOI (0.3–3 mg/kg) の急性投与においても、同様にガラス玉覆い隠し行動の変化が認められた。本研究で認められた変化についても、5-HT_{2A/2C} 受容体活性化に伴う情動・認知機能への影響が関与している可能性が考えられた。さらに、3 日間の条件づけ終了 24 時間後の day 4 における DOI 1 および 3 mg/kg 投与群、ならびに Day 7 の DOI 3 mg/kg 投与群においても同様の変化が認められた。これらの結果から、DOI による情動面への影響は最終投与後数日間持続する可能性が示唆された。特に DOI においては、U50,488H と比較してより長期間変化が認められたことから、5-HT_{2A/2C} 受容体系を介した情動・認知変化は、より強く持続する可能性が考えられた。本研究で用いたガラス玉覆い隠し試験は、一般に不安様行動や強迫様行動を評価するための行動薬理試験として知られている。しかしながら、本研究では、幻覚発現関連薬物投与後に、単純な抗不安作用のみでは説明困難な行動変化が認められた。これらの変化は、幻覚様作用そのものを直接反映しているわけではないものの、幻覚発現に伴う情動的あるいは認知的変化を間接的に反映している可能性が考えられた。また、本研究グループでは、幻覚様作用の客観的評価法として HTR 解析系の構築も進めており、DOI 誘発 HTR に 5-HT_{2A} 受容

体が重要であることを確認している。HTR は幻覚様作用との関連性が高い指標として広く用いられているが、本研究で用いたガラス玉覆い隠し試験では、HTR とは異なる側面、すなわち幻覚発現に伴う嫌悪効果や情動異常を評価できる可能性が考えられた。そのため、本試験は HTR を補完する行動評価法として有用である可能性が示唆された。さらに、条件づけ後にも行動変化が認められたことから、本試験系は急性薬理作用のみならず、薬物投与経験に伴う情動変化や嫌悪記憶の形成についても評価できる可能性が考えられる。一方で、本試験は幻覚作用を直接定量化するものではなく、情動・認知変化を反映した二次的指標である可能性も考えられる。そのため、HTR、薬物弁別試験、定量的行動観察、脳活動解析など、他の評価系と組み合わせた統合的解析が重要であると考えられた。

E. 結論

CPA およびガラス玉覆い隠し試験を用いた行動変化の評価は、幻覚発現関連薬物による嫌悪効果や情動異常を簡便かつ迅速に評価できる可能性があり、指定薬物評価における補助的評価法の一つとして有用であることが示唆された。一方で、その妥当性については、さらなる薬理的検証および他指標との比較検討が必要であると考えられた。本内容は、*Neuropsychopharmacology Reports* 誌にて発表⁴⁾した。

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.
- 4) Kato H, Ichimaru Y, Kurihara M, Sogawa K, Funada M, Suzuki T: Possible involvement of hallucinogenic effects in the aversive effects induced by kappa-opioid and 5-HT_{2A/2C} receptor agonists in mice. *Neuropsychopharmacol Rep.* 45(4): e70075, 2025.

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Kato H, Ichimaru Y, Kurihara M, Sogawa K, Funada M, Suzuki T: Possible involvement of hallucinogenic effects in the aversive effects induced by kappa-opioid and 5-HT_{2A/2C} receptor agonists in mice. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2025; 45(4): e70075.
- 2) Sogawa K, Kato K, Sano M, Nakayoshi T, Yoshioka H, Kato H, Oda A, Funada M.

Ssuzuki T. Kurihara M. Ichimaru Y: Indirubin derivatives bearing an oxirane moiety are promising chemosensitizers for combination treatment in pancreatic cancer. Med Chem Res. 2025; 35: 105-117.

- 3) 加藤英明, 曾川甲子郎, 細谷龍一郎, 清水典史, 浅野哲, 加賀谷肇, 鈴木勉: 医療用麻薬が関わる医療事故およびヒヤリ・ハット事例調査. 神奈川県公衆衛生学雑誌 2025, 71, 49-51.
- 4) Mori T, Shibasaki M, Fukuma E, Uzawa N, Suzuki T. Emesis and constipation induced by methadone and the active metabolite of tramadol (M1) in animals, J Appl Toxicol., (2026) 46, 551-559.

2. 学会発表

- 1) 加藤英明、曾川甲子郎、細谷龍一郎、清水典史、浅野 哲、鈴木 勉：フェンタニルから考えるオピオイド危機と医療安全—国内外の課題と対策. 日本薬学会第 146 年会 2026.3 (大阪府大阪市)
- 2) 加藤英明、鈴木 勉：全国における飲酒状況と肝機能の年次推移に関するオープンデータ解析. 第 45 回アルコール医学生物学研究会学術集会 2026.2 (宮城県仙台市)
- 3) 加藤英明、曾川甲子郎、鈴木 勉：オピオイド製剤が関わる医療事故およびヒヤリ・ハット事例調査. 神奈川県薬剤師会学術フォーラム in 湘南医療大学 2025.11 (神奈川県横浜市)
- 4) 加藤英明、曾川甲子郎、鈴木 勉：医療麻薬が関わる医療事故およびヒヤリ・ハット

事例調査. 神奈川県公衆衛生学会 2025.11 (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

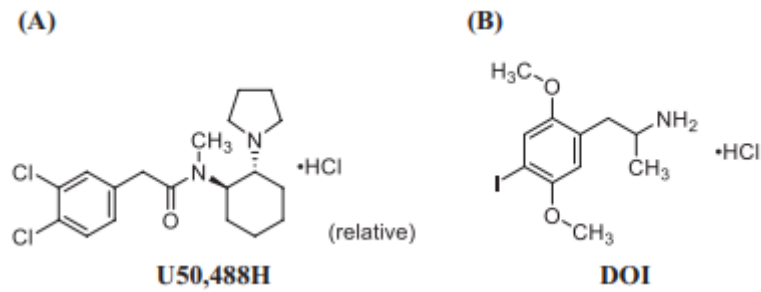
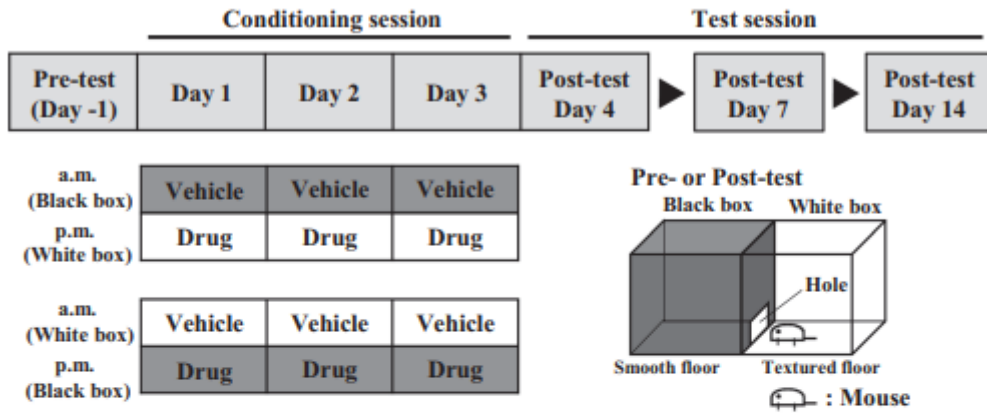


Fig. 1 Chemical structures of U50,488H and DOI. We synthesized the κ -opioid receptor agonist U50,488H (A) and the 5-HT_{2A/2C} receptor agonist DOI (B) and administered them to mice, respectively. (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)

(A) CPA test



(B) Marble-burying test

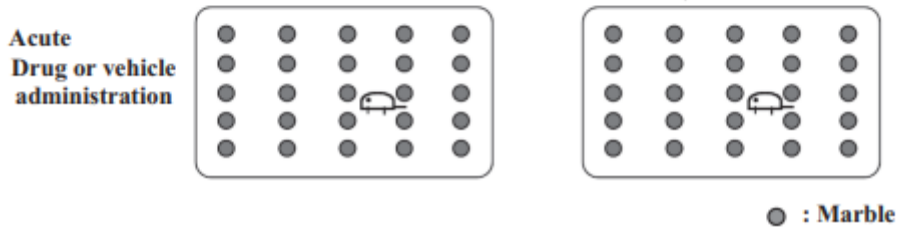


Fig. 2 Schedule of conditioned place aversion (CPA) and marble-burying tests. In the present study, the CPA and marble-burying tests were performed with U50,488H and DOI to establish a method for evaluating substances with hallucinogenic effects. U50,488H and DOI were administered acutely or once daily for 3 days. CPA tests were performed on Days 4, 7, and 14 (A). The marble-burying test was performed after a single administration, and also on Days 4, 7, and 14 after the CPA test (B). (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)

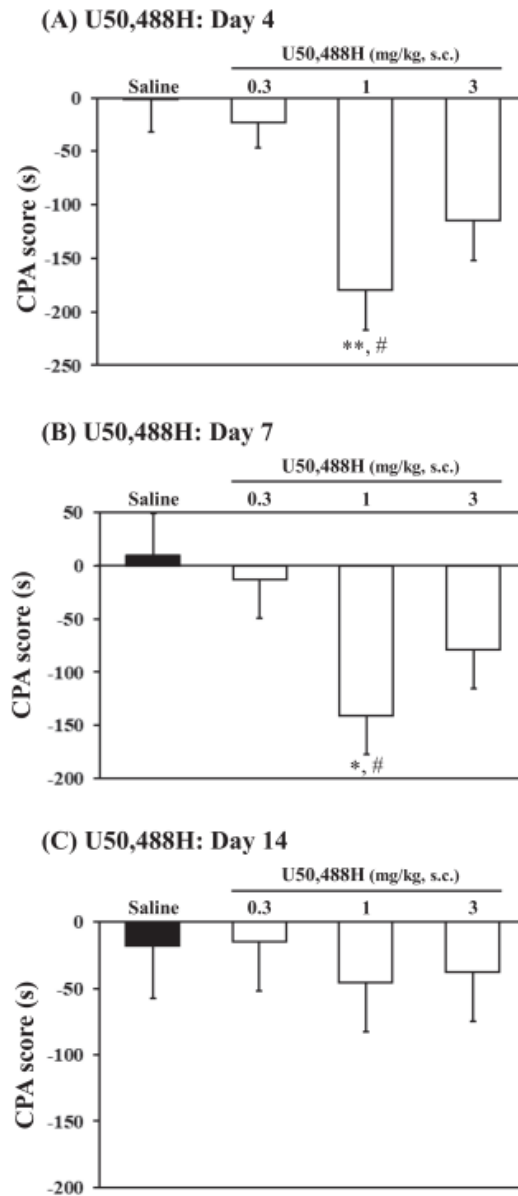


Fig. 3 U50,488H-induced place aversion in mice. Conditioned place aversion (CPA) tests were performed by administering U50,488H (0.3, 1, 3 mg/kg, s.c.) or saline to mice twice daily for 3 days, in the morning and afternoon. CPA scores for the test sessions were measured for 900 s each on Days 4, 7, and 14. CPA scores (s) for the time spent in each black or white box were calculated from the difference between the postconditioning and preconditioning test scores. Each column represents the mean scores with S.E.M. of eight to ten animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus saline control (Dunnett's multiple comparison test; daily analysis). # $p < 0.05$ versus saline control (Dunnett's multiple comparison test; multiple-day analysis). (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)

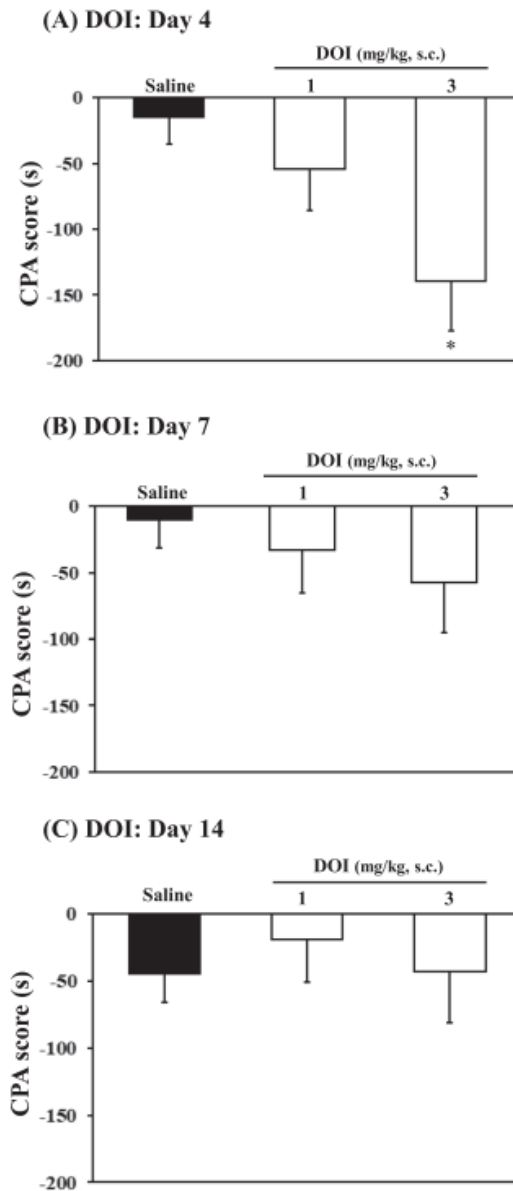
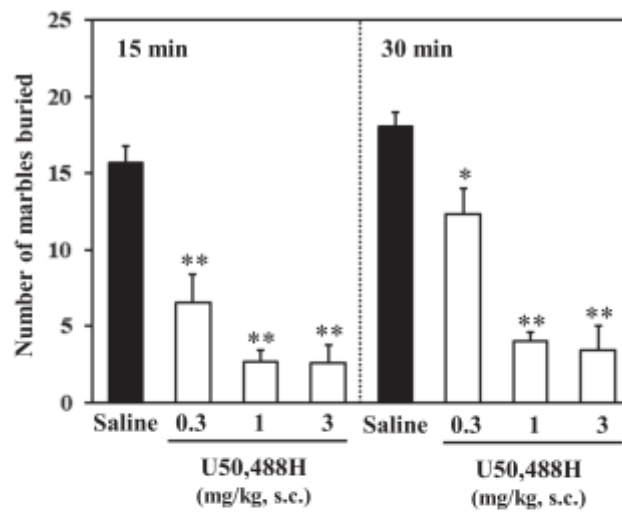


Fig. 4 DOI-induced place aversion in mice. Conditioned placeaversion (CPA) tests were performed by administering DOI (1 and 3 mg/kg, s.c.) or saline to mice twice daily for 3 days, in the morning and afternoon. CPA scores for the test sessions were measured for 900 s each on Days 4, 7, and 14. CPA scores (s) for the time spent in each black or white box were calculated from the difference between the postconditioning and preconditioning test scores. Each column represents the mean scores with S.E.M. of ten to twelve animals. * $p < 0.05$, versus saline control (Dunnett's multiple comparison test; daily analysis). (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)

(A) U50,488H: Acute



(B) DOI: Acute

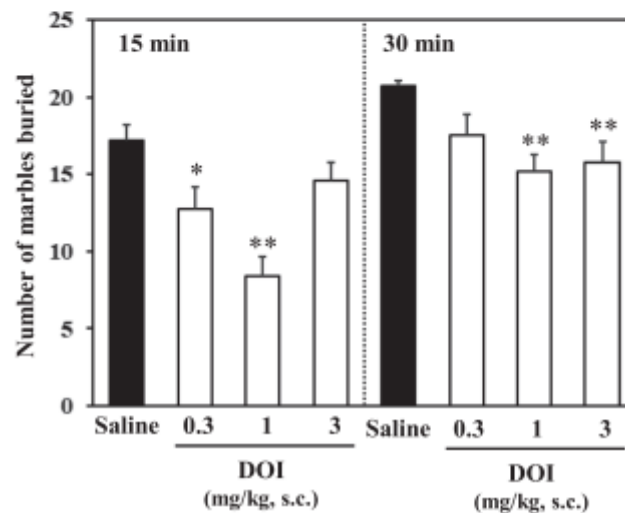


Fig. 5 Marble-burying behavior after acute administration of U50,488H and DOI. Acute administration of U-50488 H (0.3, 1, and 3 mg/kg, s.c.) (A) and DOI (0.3, 1, and 3 mg/kg, s.c.) (B) was evaluated by marble-burying test in mice. The number of marbles buried 15 and 30 min after administration of U-50488H and DOI were counted. Twenty-five marbles were placed in the field. Each column represents the mean counts with S.E.M. of nine (A) and 14 to 16 (B) animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus saline control (Dunnett's multiple comparison test; daily analysis). (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)

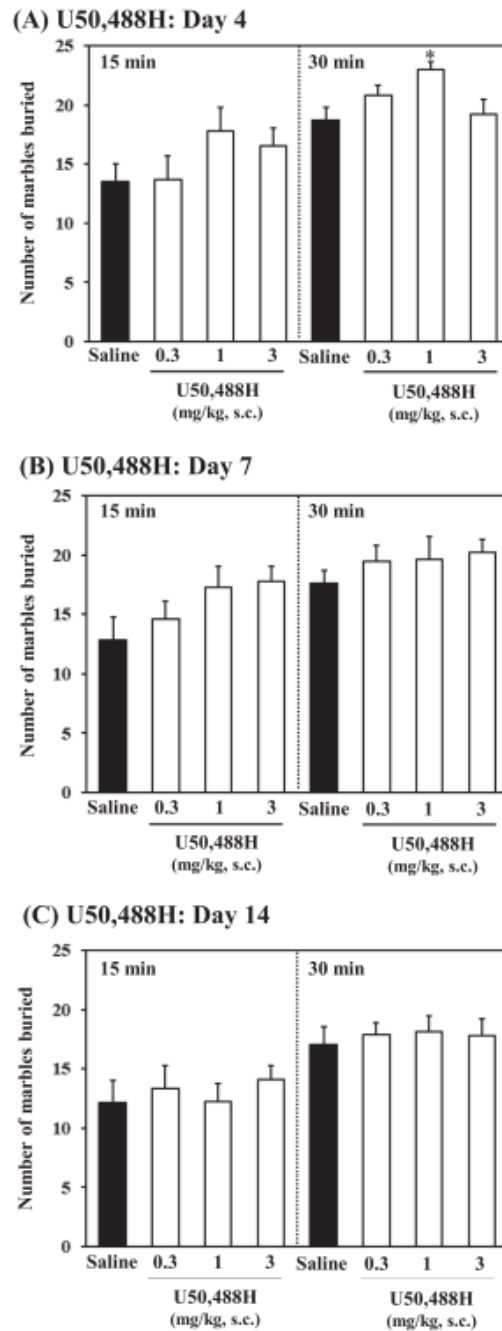


Fig. 6 Marble-burying behavior in U50,488H- conditioned mice. Marble-burying tests were performed 1 h after the CPA post-conditioning test in the U-50488H (0.3, 1, and 3 mg/kg, s.c.) or saline-conditioning groups in mice on Days 4 (A), 7 (B), and 14 (C). The number of buried marbles at 15 and 30 min were counted. Twenty-five marbles were placed in the field. Each column represents the mean counts with S.E.M. of eight to ten animals. * $p < 0.05$, versus saline control (Dunnett's multiple comparison test; daily analysis). (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)

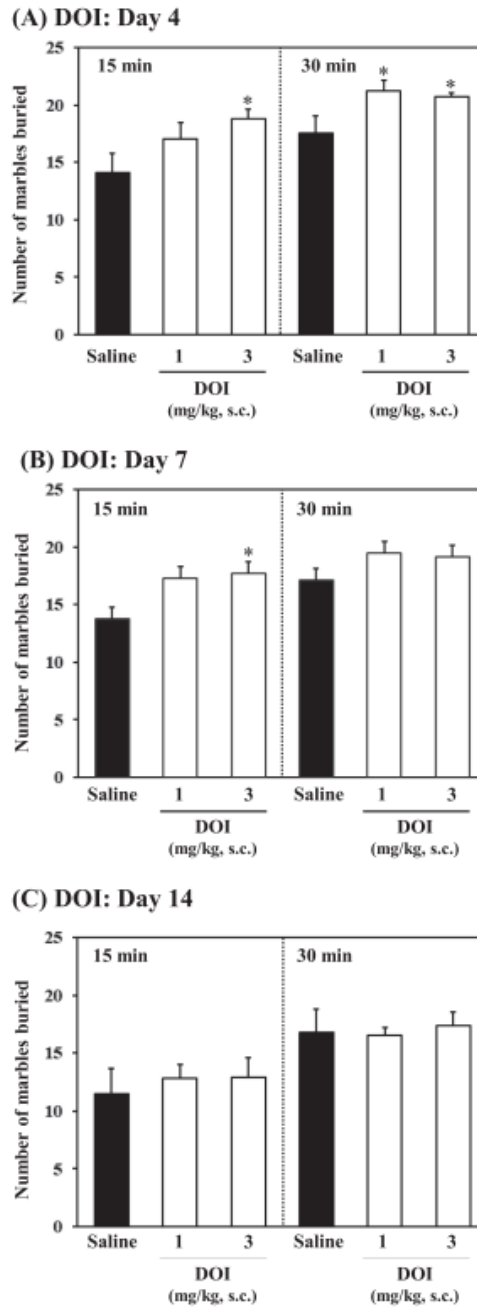


Fig. 7 Marble-burying behavior in DOI-conditioned mice. Marble-burying tests were performed 1 h after the CPA test session in the DOI (1 and 3 mg/kg, s.c.) or saline- conditioning groups in mice on Days 4 (A), 7 (B), and 14 (C). The number of buried marbles at 15 and 30 min were counted. Twenty-five marbles were placed in the field. Each column represents the mean counts with S.E.M. of 10 and 12 animals. * $p < 0.05$, versus saline control (Dunnett's multiple comparison test; daily analysis). (*Neuropsychopharmacology Reports* 45: e70075, 2025)