

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07184

研究課題名(和文)危険ドラッグ誘発痙攣に関する研究：定量化とグルタミン酸神経の役割

研究課題名(英文)Studies on new psychoactive substances-induced seizures: quantification and the role of glutamatergic transmission

研究代表者

船田 正彦 (Funada, Masahiko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 薬物依存研究部・室長

研究者番号：20299530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、危険ドラッグによる痙攣発現メカニズムに関する詳細な研究を実施する目的で、痙攣の発現強度を、客観的かつ定量的に測定する実験解析システムの開発を試みた。脳波の変化に着目して、マウス痙攣強度定量のための脳波解析システムの構築に成功した。本試験法は、薬物の痙攣誘発性の迅速評価法として利用可能である。危険ドラッグによる痙攣発現については脳波振幅の増大、無動状態では脳波振幅の減少により異常行動の定量化が可能であることが明らかとなった。また、合成カンナビノイドの痙攣発現には、CB1受容体および海馬におけるグルタミン酸遊離増加が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

危険ドラッグの乱用により、痙攣を伴う救急搬送事例や交通事故の発生等が頻発し、世界的に大きな社会問題となっている。危険ドラッグによる痙攣発現については、その原因となる危険ドラッグが特定されていないのが現状である。その理由は、危険ドラッグに関する痙攣評価システムが存在しないためである。本研究において、痙攣定量化システムの構築に成功したことは、同一条件下で危険性情報を共有するために極めて重要である。本研究成果は、危険ドラッグの流通を迅速に規制するため、世界標準となる危険ドラッグ誘発痙攣に関する科学的評価システムとして有用である。

研究成果の概要(英文)：The intentional ingestion of synthetic cannabinoids can cause severe toxicity and lead to seizures. Here, we investigated the effects of acute administration of synthetic cannabinoids on the induction of epileptic seizures by monitoring electroencephalographic activity in freely moving mice. Abnormal spike-wave discharges (>twofold baseline amplitude) were accompanied by epileptiform behavior: rigid posture, tail extension, rearing with forepaws extended, jumping, and intermittent tonic-clonic jerking movements. Abnormal spike-wave discharges and behavioral changes were suppressed by pretreatment with the selective CB1 receptor antagonist AM-251, but not with the selective CB2 receptor antagonist AM-630. These findings demonstrate that our electroencephalograph recording system can be used to quantify new psychoactive substance-induced seizures, and further suggest that the induction of epileptic seizures by synthetic cannabinoids is mediated by CB1, but not CB2 receptors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：毒性 医薬品安全性学 薬物治療 トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグをはじめとする薬物乱用問題は、世界各国に浸透しており、深刻な社会問題となっている。危険ドラッグを規制するためには、規制根拠となる「有害作用に関する科学的データの収集」が必須となる。危険ドラッグの流通を規制し、健康被害の発生を抑制するため、危険ドラッグの有害作用に関する科学的評価システムの構築が急務である。

危険ドラッグとして流通している合成カンナビノイドは、大麻に含まれる神経活性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(THC)と類似の作用を示す化合物群である。これまでに、合成カンナビノイドの摂取により、痙攣発現を伴う救急搬送事例が報告されている(McQuade et al., 2013)。一方で、合成カンナビノイドの摂取により運動機能の低下を引き起こす無動状態の発現が確認されている。現在までのところ、危険ドラッグである合成カンナビノイドによる痙攣や無動状態を引き起こす運動機能異常発現メカニズムに関する詳細な検討は進んでいない。その原因は、危険ドラッグによる運動機能異常の発現強度を、客観的かつ定量的に解析する実験解析システムが存在しないことが挙げられる。危険ドラッグ乱用による健康被害のなかでも痙攣の発現は特に重篤な症状であるため、客観的かつ定量的な痙攣特性の解析システム構築に関する研究は重要である。

2. 研究の目的

危険ドラッグが痙攣発現に関与していることは想定されているものの、どのタイプの危険ドラッグが関与しているかは不明である。その原因は、マウスなどの動物実験において、危険ドラッグによる痙攣の発現強度を、客観的かつ定量的に解析する実験解析システムが存在しないことが挙げられる。てんかんなどの病態解析から、痙攣の発現と脳波以上の関連性については多くの報告がなされており、脳波を指標とした痙攣の解析は客観的な評価法としての可能性が高いと考えられる(Tsiptsios et al., 2010)。

本研究では、危険ドラッグによる痙攣発現メカニズムに関する詳細な研究を実施する目的で、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物による痙攣の発現について行動変化と脳波変化の相関性を検討し、脳波解析による痙攣特性の定量的解析システムの構築を試みた。一方、合成カンナビノイドは、痙攣と相反する無動状態を引き起こすことが報告されているが、脳波との関連性についての解析は行われていない。そこで、合成カンナビノイドによる痙攣と無動状態の発現について、同一の実験系で解析することで、脳波を指標とした有害作用の評価法についても併せて検討した。

3. 研究の方法

危険ドラッグとして最大の流通量が確認されている合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物をターゲットにして、ICR マウスを使用して痙攣発現時ならびに無動状態の脳波変化、および脳内グルタミン酸遊離変動について検討した。

(1) 危険ドラッグによる痙攣発現時の異常脳波の検討

ICR マウスを対象として、頭蓋内脳波図測定装置(PINNACLE社製)により無麻酔・無拘束条件における頭蓋内脳波測定を実施した。合成カンナビノイド(10種類: CP-55,940, JWH-018, JWH-250, AB-CHMINACA, AM-2201, APINACA, AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, RCS-4, RCS-8)およびカチノン系化合物(8種類)投与後、痙攣様行動変化の発現の有無ならびに脳波への影響を検討した。痙攣発現時に確認される異常脳波(ベースラインより増大を示す振幅の数)を定量化し、痙攣発現強度の指標としての妥当性を検証した。

(2) 合成カンナビノイドによるカタレプシー様無動状態発現の検討

合成カンナビノイド(10種類: CP-55,940, JWH-018, JWH-250, AB-CHMINACA, AM-2201, APINACA, AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, RCS-4, RCS-8)によって誘発されるカタレプシー様無動状態の継続時間を測定した。無動状態発現時に確認される異常脳波(ベースラインより縮小を示す振幅の数)を定量化し、無動状態発現強度の指標としての妥当性を検証した。異常脳波についての差異を検討し、脳波の変化から痙攣もしくは無動発現予測のための観察時間、解析パラメーターの測定条件についてまとめた。

(3) 異常脳波発現におけるカンナビノイド受容体の役割

合成カンナビノイド(10種類: CP-55,940, JWH-018, JWH-250, AB-CHMINACA, AM-2201, APINACA, AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, RCS-4, RCS-8)によって誘発される痙攣およびカタレプシー様無動状態に対するカンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 およびカンナビノイド CB2 受容体拮抗薬 AM630 の前処置の影響を検討した。

(4) 痙攣発現における責任脳部位の同定

合成カンナビノイドの AM-2201 による痙攣発現後に脳スライスを作製し、神経活性マーカーである c-Fos に着目して、c-Fos 陽性細胞の変動について免疫染色法により解析した。

(5) 痙攣発現におけるグルタミン酸遊離

バイオセンサーを用いた脳内グルタミン酸濃度変動の検討：グルタミン酸測定用のバイオセンサー（酵素センサー）を利用して、マウスを対象として、海馬および小脳をターゲットとしたグルタミン酸濃度の測定を行なった。

4. 研究成果

(1) 危険ドラッグによる痙攣発現時の異常脳波の検討

合成カンナビノイド(10種類: CP-55,940, JWH-018, JWH-250, AB-CHMINACA, AM-2201, APINACA, AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, RCS-4, RCS-8)投与 15分以内で痙攣様行動が観察され、その行動変化時の脳波を測定したところ、ベースから2倍以上の振幅を有する異常脳波が確認された。合成カンナビノイド投与による痙攣様行動出現数と、痙攣発現時に確認される異常脳波数(ベースラインより増大を示す振幅の数)は相関性があり、痙攣発現強度の指標としての脳波を利用できることが示唆された。カチノン系化合物(8種類)投与では、運動量の著しい増加、すなわち運動促進作用が発現したが、痙攣の発現は確認されなかった。

(2) 合成カンナビノイドによるカタレプシー様無動状態発現の検討

合成カンナビノイド(10種類: CP-55,940, JWH-018, JWH-250, AB-CHMINACA, AM-2201, APINACA, AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, RCS-4, RCS-8)投与 30分後に、カタレプシー様無動状態が観察され、その行動変化時の脳波を測定したところ、ベースから1/2倍程度の振幅を有する異常脳波が確認された。カタレプシー様無動状態出現時間と、異常脳波の出現持続時間は相関しており、行動抑制の指標に脳波の変化を利用できることが示唆された。

(3) 異常脳波発現におけるカンナビノイド受容体の役割

合成カンナビノイド(10種類: CP-55,940, JWH-018, JWH-250, AB-CHMINACA, AM-2201, APINACA, AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, RCS-4, RCS-8)によって誘発される痙攣およびカタレプシー様無動状態は、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。同様に、合成カンナビノイドによって誘発される異常脳波についても AM251 の前処置により完全に抑制された。一方、カンナビノイド CB2 受容体拮抗薬 AM630 の前処置では、行動変化および異常脳波の発現は有意な影響を受けなかった。

(4) 痙攣発現における責任脳部位の同定

合成カンナビノイド AM-2201 投与による痙攣発現後に脳スライスを作製し、神経活性マーカーである c-Fos に着目して、c-Fos 陽性細胞の変動について免疫染色法により解析した。その結果、海馬内の c-Fos 陽性細胞が増加していた。この変化は、CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により有意に抑制され、一方、CB2 受容体拮抗薬 AM630 の前処置では影響が認められなかった。

(5) 合成カンナビノイドによる痙攣発現時のグルタミン酸遊離変化：合成カンナビノイドによる痙攣発現時のグルタミン酸遊離変化を検討した。合成カンナビノイドの AM-2201、AB-CHMINACA 投与による痙攣様行動発現時、海馬内グルタミン酸遊離は増加していた。一方、無動状態では海馬内グルタミン酸遊離に影響は認められず、小脳内グルタミン酸遊離の減少が確認された。合成カンナビノイドによる痙攣発現には、海馬におけるグルタミン酸遊離増加が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、合成カンナビノイドによる無動状態発現には、小脳におけるグルタミン酸遊離の減少が関与すると考えられる。

本研究では脳波解析システムを利用して、危険ドラッグの運動機能異常の定量的実験解析システムの構築を試みた。危険ドラッグによる痙攣発現については脳波振幅の増大、無動状態では脳波振幅の減少により異常行動の定量化が可能であることが明らかとなった。また、合成カンナビノイドの異常行動発現には、CB1 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、合成カンナビノイドによる痙攣発現には、海馬におけるグルタミン酸遊離増加が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、合成カンナビノイドによる無動状態発現には、小脳におけるグルタミン酸遊離の減少が関与すると考えられる。また、カチノン系化合物では、痙攣は発現せず、著しい中枢興奮作用が発現した。カチノン系化合物の中枢興奮作用についてはグルタミン酸以外の神経伝達物質が関与するものと推察された。

本研究で確立した痙攣解析システムは、危険ドラッグの痙攣発現強度を、客観的かつ定量的に検出する手法として有用であると考えられる。本研究において開発した痙攣定量化システムは、危険ドラッグによる痙攣発現の危険性を迅速に検出できることから、危険ドラッグ流通規制のための科学的根拠を提供するための有用な手法として貢献が期待される。

<引用文献>

McQuade, D., Hudson, S., Dargan, P.I., Wood, D.M., First European case of convulsions related to analytically confirmed use of the synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201. Eur. J. Clin. Pharmacol. 69, 2013, 373-376.

Tsiptsios DI, Howard RS, Koutroumanidis MA., Electroencephalographic assessment of patients with epileptic seizures. *Expert Rev Neurother.* 10(12), 2010, 1869-1886. doi: 10.1586/ern.10.175.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Funada Masahiko、Takebayashi-Ohsawa Mika、Tomiyama Ken-ich	4. 巻 408
2. 論文標題 Synthetic cannabinoids enhanced ethanol-induced motor impairments through reduction of central glutamate neurotransmission	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115283 ~ 115283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2020.115283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 船田 正彦、三島 健一	4. 巻 140(2)
2. 論文標題 薬物乱用のトレンド：ポスト危険ドラッグとしての大麻問題を考える	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 171-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 富山 健一、船田 正彦	4. 巻 140(2)
2. 論文標題 米国における大麻規制の現状：医療用途と嗜好品	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 179-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 船田 正彦、富山 健一	4. 巻 140(2)
2. 論文標題 大麻成分の依存性と細胞毒性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 205-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.	4. 巻 20
2. 論文標題 The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Toxicol.	6. 最初と最後の頁 120-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/ s11419-020-00527-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山田理沙, 嶋根卓也, 船田正彦	4. 巻 54(6)
2. 論文標題 レクリエーション・セッティングにおける危険ドラッグ使用パターンの男女別検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本アルコール・薬物医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 272-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 船田正彦
2. 発表標題 大麻を巡る国際社会の動向とわが国の現状。「シンポジウム：激動するわが国の薬物乱用・依存問題：最近のトピックス」.
3. 学会等名 第116回日本精神神経学会学術総会, 宮城 (Web開催), 2020年9月29日.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船田正彦
2. 発表標題 大麻の有害性：細胞を利用した有害作用の評価。「シンポジウム：大麻についての基礎から臨床まで」.
3. 学会等名 第55回日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 福岡 (Web開催), 2020年11月23日.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 舩田正彦
2. 発表標題 大麻成分の有害作用に関する研究：依存性と細胞毒性
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舩田正彦
2. 発表標題 薬物乱用に関する最新海外事情:大麻と危険ドラッグをめぐる諸問題
3. 学会等名 第 12 回日本旅行医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Funada, M
2. 発表標題 The harmful effects of new psychoactive substances (NPS) : assessment of drug abuse liability and cytotoxicity.
3. 学会等名 International Conference on New Psychoactive Substances (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Funada, M., Tomiyama, K.
2. 発表標題 Effects of cannabinoids on neuronal activity in mouse cerebellar cultures assessed using multi-electrode array techniques.
3. 学会等名 College on problems of drug dependence (CPDD) 81th Annual scientific meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------