

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10554

研究課題名（和文）MSイメージングによるカンナビノイド類の標的神経細胞同定と単一細胞薬物動態解析

研究課題名（英文）Identification of target neurons and pharmacokinetic analysis of cannabinoids by MS imaging

研究代表者

草野 麻衣子（Kusano, Maiko）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：60733574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：大麻の活性成分である 9-THC及び新旧世代の合成カンナビノイドJWH-018と AB-CHMINACAについて、薬物投与したマウスから採取した脳試料より抽出を行い、前処理及び分析バリデーションを含む脳内神経伝達物質のLC/MS/MSによる同時分析条件の確立を行った。薬物3種をそれぞれマウスに投与し、行動実験によって作用の違いを記録した。さらに、薬物投与後にマウス脳を採取し、確立したLC/MS/MS分析法を用いて比較した。従来のMALDI-MSイメージングやマトリックスを用いない新規イメージング基盤を用いたMSイメージングも行い、マウス脳中の薬物および神経伝達物質のイメージングも行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成カンナビノイドに関するこれまでの研究から、同じCB1受容体に作用する化合物でも親和性の違いや惹起する異常行動などが大きく違うことが明確になっている。天然由来の 9-THCと比較して、新旧世代合成カンナビノイドの影響の違いは脳内分布の違いによるものなのか、受容体との親和性の違いによるものなのか、あるいは神経伝達物質の応答の違いによるものなのかを明確にすることは法医学・薬物代謝学・毒性学・脳機能学の観点からも非常に意義があり、このような危険ドラッグの毒性評価及び解明は社会的にも非常に意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：Delta-9-THC, the primary psychoactive component of cannabis, and the new synthetic cannabinoids of different generations (JWH-018 and AB-CHMINACA) were compared for their effects on neurotransmitter responses in mice brain. To achieve this, LC/MS/MS method was developed and validated for the simultaneous detection of the cannabinoids and neurotransmitters of interest extracted from mice brain.

研究分野：法中毒学

キーワード：分析化学 薬物動態 合成カンナビノイド LC/MS/MS 神経伝達物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に深刻な社会問題となった「危険ドラッグ」の中でも最も流通・乱用が多かった大麻様の中枢抑制作用をもたらす合成カンナビノイド (SC) は、カンナビノイド受容体 (CB1 あるいは CB2) を介して作用する。JWH-018 などの第一世代 SC は CB1 受容体に対する親和性は大麻の活性成分である Δ^9 -THC と同等かそれ以上であったが、第二世代以降の新規 SC の CB1 受容体への親和性は極めて高くなり、急性毒性が強いばかりでなく異常行動を誘発することが示されている。例えば、天然由来の Δ^9 -THC と比較すると JWH-018 の CB1 受容体に対する親和性は約 5 倍、第三世代 SC である AB-CHMINACA は約 81 倍である。

CB1 受容体は主に中枢神経系に存在し、脳内においては海馬、大脳皮質、線条体、小脳などに特に多い。SC について CB 受容体への親和性などの結合キネティクスや代謝経路については多く報告されているが、その薬理作用については未だに不明である。CB1 アゴニストの作用は自発運動の低下、痛覚抑制、体温低下、カタレプシー等があるが、新規 SC の摂取による臨床症状はこれらの他に錯乱、興奮、前向性健忘、頻脈、嘔吐、心毒性、さらに痙攣やてんかん重積症等が報告されている。近年、SC による脳機能への影響については、海馬のシナプス前 CB1 受容体の活性化によりグルタミン酸及び GABA 神経伝達の抑制や長期増強の妨害が報告されており、また、天然由来の Δ^9 -THC 及び JWH-018 が CB1 受容体を介して痙攣発作を誘導することも確認された。同じ受容体へ作用する Δ^9 -THC と SC だが、全く異なる作用の原因が単純に脳内分布の違い、CB1 受容体への親和性の強さの違い、あるいは脳内の新たな標的細胞を介した神経伝達の変化の違いによるものなのかはまったくわかっていない。異なる毒性機序を解明するためには、(1) 脳内の標的細胞を介した神経伝達の変化の違いを探る解析法が必要であり、かつ(2) Δ^9 -THC および新旧 SC の CB 受容体への異なる作用の原因を追究し、危険性の高い SC の作用機序を解明することが必要であった。そのために、まずはマウス脳中から Δ^9 -THC および新旧 SC と同時に神経伝達物質を効率的に抽出し、高感度に検出・定量が可能な分析法の構築が求められた。

2. 研究の目的

Δ^9 -THC と合成カンナビノイド JWH-018 及び AB-CHMINACA について、薬物投与したマウス脳における薬物分布と神経伝達物質の変化の相関を高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC/MS/MS) による一斉分析と神経細胞の機能的マッピング (イメージング) により、天然由来カンナビノイドと新旧世代 SC の作用の違い及び毒性機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

C57BL/6 マウス (6-8 週齢・雄性) をイソフルラン麻酔下において断首後に脳を採取し、脳の半分はイメージング用切片作成のためそのまま冷凍保存した。もう半分は LC/MS/MS 分析用試料とし、脳試料：水 (1 : 5) ホモジネートを 3 倍量のアセトニトリル (0.1% ギ酸) を用いて除タンパクした後、Captiva EMR Lipid を用いて脂質除去精製を行ったものを分析試料とした。

(2) 装置と分析条件

装置：島津製作所製 NexeraX2 及び AB Sciex 製 QTRAP6500 + LC-MS/MS システム、分析条件：Intrada Amino Acid (100 x 3 mm; Intakt)、移動相：[A] methanol/water/formic acid (80/20/0.3), [B] methanol/100 mM ammonium formate (30/70) によるグラジエント (20%B (0-1 min), 20-50%B (1-2 min), 50-100%B (2-10 min), 100%B (10-12 min))、流速：0.6 mL/min、カラムオープン温度：40、イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI, positive)、測定モード：MRM。

4. 研究成果

(1) マウス脳中の新旧 SC 及び神経伝達物質の一斉分析法の構築

前処理法の条件検討

本研究でターゲットとしている化合物は水溶性と脂溶性の化合物の両方を含んでおり、さらに脳試料中には質量分析時に問題となる夾雑物が多く存在するため、脳試料の前処理には十分な検討が必要であった。多様なターゲット化合物抽出のため、除タンパク法を用いることとした。アセトニトリル、メタノール、および過塩素酸による除タンパクの比較を行った結果、過塩素酸は酸が強すぎたため本研究でターゲットとしている薬物の分析に影響を及ぼしたため不適切とした。神経伝達物質のうち、アセチルコリン等は質量分析時にイオン強度が高すぎたため、分析試料の希釈を要した。

LC-MS/MS 分析

薬物投与したマウスの脳を採取し 10 部位（大脳皮質、小脳、線条体、中隔、海馬、視床下部、間脳、中脳、橋・延髄、脊髄）に腑分けし、それぞれの部位で分析を行えることを確認した（図 1）。通常脂溶性の薬物分析に用いられる C18 逆相カラムと、順相と陽イオン交換のミックスモードのアミノ酸分析用カラムを用いてターゲット化合物のイオン化条件の最適化、およびマウス脳に薬物を添加したサンプルにおいて、アミノ酸分離カラムが神経伝達物質および薬物のピーク形状、ベースライン分離などで優れた結果を示したことからこちらのカラムを選択した。

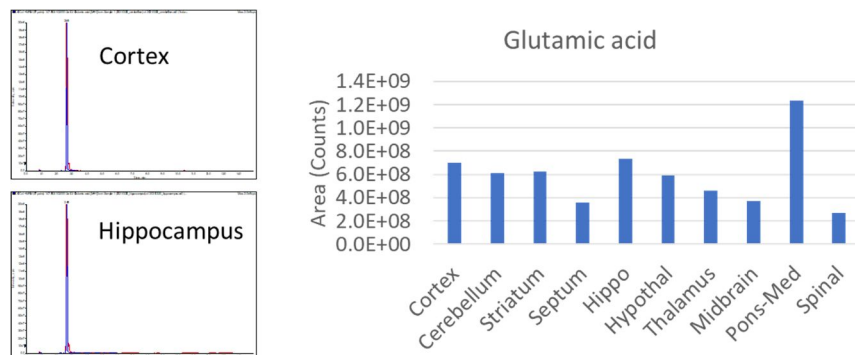


図 1 マウス脳中（部位別）のグルタミン酸分析結果（ターゲット化合物の 1 例）

（ 2 ）薬物投与マウスの行動解析

それぞれの薬物を投与したマウスの行動解析から、9-THC、JWH-018、および AB-CHMINACA は同じカンナビノイド受容体を介して作用するが 9-THC<JWH-018<AB-CHMINACA の順に急性毒性が強く異常行動を誘発することが確認できた（図 2）。

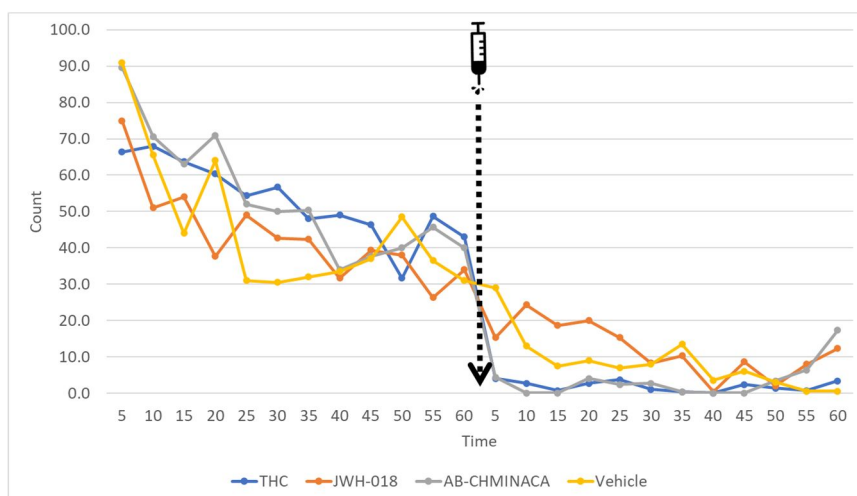


図 2 薬物投与マウスのオープンフィールドテスト結果

（ 3 ）薬物投与マウス脳の MS イメージング

単一細胞 MS イメージングの前検討として 9-THC、JWH-018、あるいは AB-CHMINACA を投与したマウス脳の MALDI-MS イメージング、さらにはマトリックスを用いない新規イメージング基盤（DIUTHAME）を用いて MS イメージングを行い、脳内の薬物分布と神経で立つ物質の分布イメージの採取を試みた。DIUTHAME 使用の検討では、本研究でターゲットとしている化合物すべての明瞭なイメージングは困難であったため、改良が必要であることが確認された。

本研究は 2020 年度および 2021 年度のコロナ禍によりテレワーク推進や研究代表者が分析を行っていた共通機器室のスケジュール制限など、実験が制限される期間があった。さらには、研究代表者が 2021 年度途中より所属機関変更となり、新たな研究環境の構築と、研究遂行に必要な THC および麻薬類を愛知県から東京都へ移管（譲渡）する手続きに時間がかかり、研究をその間休止せざるを得なかったため予定していた研究成果の達成は困難であった。なお、本研究は現在引き続き継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	澤田 誠 (Sawada Makoto)		マウス実験および神経細胞解析の指導
研究協力者	石場 厚 (Ishiba Atsushi)		合成カンナビノイドの合成

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