様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １１ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2023～2024
課題番号：２３Ｋ１８３８７

研究課題名（和文）大麻中微量活性物質の有効性及び毒性評価のための多面的プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Development of a multdimentional palatform for assessing effects and toxicity of active compounds in cannabis

研究代表者
石井　晃（ISHII, Akira）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：３０２５２１７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,700,000円

研究成果の概要（和文）：　大麻は世界的に使用されている乱用薬物であるものの、一方で難治性てんかん等の治療等に有効であり、今後医療への応用がさらに広がることが期待される。本研究では、大麻の微量成分の有効性や危険性を評価するための多面的プラットフォームを構築する。
　まず、培養細胞を用いたプラットフォームで大麻抽出物（CS)及び合成カンナビノイドを比較したところ、合成カンナビノイドと異なり、高濃度のCSでは、細胞死及び全般的代謝を抑制した。また、CSにカンナビノイド受容体拮抗薬を加えて観察したところ、投与後24時間ではカンナビノイド受容体を介さない代謝物変動が想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　大麻は、広く使用される乱用薬物であり、さらに深刻な薬物乱用につながるゲートウェイドラッグであるが、他方、その医療応用は近年著しく確定している。しかし、大麻に含まれる微量成分の解析は始まったばかりであり、未だ十分とは言えない。これらの状況を鑑みると、大麻抽出物や抽出物に含まれる微量成分の有効性や危険性を迅速かつ客観的に評価する多面的プラットフォームを構築することは、乱用薬物としての観点からは社会の安全に繋がり、医療の観点からは、さらなる医療応用に資するものであり、その学術的及び社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cannabis is a drug-of-abuse used widely; it is a gateway drug leading to more serious drugs-of-abuse. It has also been applied to alleviate various pathological states, e.g. some types of epilepsy, nausea or vomiting caused by cancer treatment. In this project, we try to construct a multi-facetted platform for evaluating various compounds in cannabis extract (CS). In a cultured cell line derived from hypothalamic neurons, GT1-7, exposure of CS inhibited general metabolisms and reduced cell death. In metabolomic experiments, CS affected various metabolic pathways e.g. citric acid cycle, pentose phosphate cycle, and some amino acid metabolisms. CS may have affected metabolisms not via cannabinoid receptors, especially in cases 24 hours after its exposure.

研究分野：法中毒学

キーワード：大麻　カンナビノイド　カンナビノイド受容体　メタボロミクス　質量分析

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

（1）大麻は、古い歴史を有し、現在では、日本で最も広く使用されている乱用薬物の一つである。大麻はいわゆるゲートウェイドラッグとしてとらえられており、大麻使用の後に、より強い作用を有する乱用薬物に移行する可能性が高いことが指摘されている。従って、大麻の乱用については、正確な現状把握に基づいて、危険性の啓蒙を含む、広範囲にわたる対策が望まれる。
（2）一方、医療や治療を目的とした大麻の使用については、古代より試みられてきた。近代においては、長く規制が行われてきたが、最近になり、ドラスティックな変化が起きている。欧州薬物・薬物依存監視センター（EMCDDA）による 2018 年の総説では、大麻成分の医療応用が可能な対象として、制吐剤、AIDS による消耗状態等に対する食欲の増進、多発性硬化症に対する疼痛や痙性の改善、非がん性の慢性疼痛、緩和医療、難治性てんかんの治療が挙げられている。特に、Dravet 症候群や Lennox-Gastaut 症候群に対しては、従来の抗てんかん薬にカンナビジオール（CBD）を追加することにより、有意にてんかん発作の回数を減少させたという。このように、大麻成分の医療応用は、今後さらに拡大することが予想される。
（3）しかし、一方で、多くの国で、大麻は乱用薬物として規制されており、特にΔ^9-テトラヒドロカンナビノール（THC）は、日本では厳しく規制されている。この点は重要であり、目的や用途によっては、THC を除去する必要があり、これは大きな技術的隘路と考えられ、有効かつ安全な THC の除去法を開発する必要がある。
（4）もう一つ重要な点としては、天然の大麻は多数の微量関連化合物を含んでいるものの、未だその作用機序や有用性については、未知の部分が大きいことが挙げられる。現在、医療用大麻は、抽出された THC や CBD が主流であるが、これら化合物の他にも、多種類のカンナビノイド及びテルペノイド化合物が含まれており、その成分や作用については未だ明らかにはなっておらず、大麻草からの抽出物の使用も期待される。その場合、有害作用の強い成分の除去を行い、同時に微量活性成分の有効性や毒性の評価を行う必要がある。また、微量成分の有効性や毒性の評価については、細胞モデルや動物モデルなど、いくつかのモデルが想定されるものの、それぞれのモデルには一長一短があり、各モデルを実際に動かすことにより、その長所や短所を明確にし、提示する必要がある。

２．研究の目的
　上で述べられた点を考慮し、本研究の目的を以下のように設定した。
（1）大麻の微量活性成分、特に今回は生薬としての総合的評価を行うことが可能となるような、毒性評価、薬理作用及び有効性評価の多面的プラットフォームを構築する。
（2）一つ目は、培養細胞を用いたプラットフォームである。このプラットフォームの利点としては、条件のコントロールが容易で、関与する因子の解釈もしやすいという利点がある。一方、培養細胞の種類によって反応が異なり、個体レベルにおける反応と相違が認められることもあり、次の実験動物を用いたプラットフォームと併用することが必要と考えられる。
（3）もう一つは、実験動物を用いたプラットフォームである。実験動物は、個体レベルでの反応、特に行動への影響を観察できるという利点がある。このプラットフォームでは、種、strain、飼育条件で反応が異なる可能性があるため、留意が必要である。
（4）大麻中微量成分の生理活性を多面的に評価するには、上記二種類のプラットフォームを使い分けることが必要と考えられる。また、カンナビノイド受容体は、主に中枢神経系で発現している CB1 受容体、末梢神経、ミクログリア、免疫系などで発現している CB2 受容体があり、これらの作用を各々の受容体について検討する必要がある。今回、特異的アゴニストやアンタゴニストを用いることにより、両プラットフォームで検討し、大麻化合物の CB1 及び CB2 受容体への影響を分離して検討する。
（5）上述の結果を踏まえ、個々の（あるいは未知の）微量活性成分の探索プロジェクトにつなげていく。

３．研究の方法

（1）大麻抽出成分の作成
　大麻草 100 ㎎を、液体窒素冷却下でマルチビーズショッカーを用いて粉砕し、クロロホルム 1 mL を加えて 4℃で 1 時間抽出した。抽出後、遠心して上清を回収し、クロロホルムを窒素気流下で乾固した。大麻草 100 ㎎に対して、100 μL となるように適量の DMSO を加えて溶解し、遠心後その上清を大麻抽出物（CS）とした。
（2）細胞死及び全体的代謝の検討
　培養細胞を用いたメタボローム解析を行うために、モデル細胞として視床下部由来 GT1-7 を用い、10% FBS DMEM-Ham’s F12 培地で培養した。96-well プレートに GT1-7 を 5×10^4/well になるように播種し、翌日 HU210 ないし CS を DMSO に溶解したものを添加して培地交換した。培地交換後、3 時間ないし 24 時間インキュベートし、LDH assay(細胞死)ないし CCK8 assay(全体

的代謝)を行い、LDH assay は 490nm、CCK8 assay は 450nm で吸光度を測定した。

（3）HU210 ないし CS によるメタボロームへの影響

（2）で記載した培養条件で 6-well プレートに GT1-7 を 1.5×10^6/well になるよう播種し、翌日 20 μM HU210 ないし 1,000 μg/mL CS を含む培地に交換し、コントロールとしてカンナビノイド含有試料と同量の DMSO を添加した培地を用いた。3 時間後、氷冷 PBS で 2 回細胞を洗浄した後、1 ppm の Glutamic acid-$^{13}C_5$,$^{15}N_1$（内部標準: IS）を添加した氷冷メタノールを 700 μL 加え、セルスクレーパーで全細胞を回収し、液体窒素で凍結し、次の実験まで -80℃で保存した。

（4）培養細胞における CS による CB1 及び CB2 受容体の影響解析

（2）で記載した培養条件で 6-well プレートに GT1-7 を 1.5×10^6/well になるよう播種し、翌日、AM251（CB1 受容体アンタゴニスト)、AM630（CB2 受容体アンタゴニスト)は 10 μM、CS は 1 mg/mL になるよう添加し、3 時間ないし 24 時間後に培地を吸引し、氷冷 PBS で 2 回細胞を洗浄した後、0.5 μg/mL の Glutamic acid-$^{13}C_5$,$^{15}N_1$（IS）を添加した氷冷メタノールを 700 μL 加え、セルスクレーパーで全細胞を回収し、液体窒素で凍結し、次の実験まで -80℃で保存した。実験条件は、コントロール、 10 μM AM251、 10 μM AM630、1 mg/mL CS、1 mg/mL CS + 10 μM AM251、1 mg/mL CS + 10 μM AM630 である。

（5）メタボローム抽出・誘導体化条件

細胞試料を液体窒素で 2 分間凍結し、次いで 37℃ 1,400 rpm で二分間融解後、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。これを 1 サイクルとして、3 サイクル凍結融解を行い、その後、4 ℃で 15,000 g 5 分間遠心して上清を回収して次のステップに進んだ。

クオリティコントロール(QC)としては、すべての条件の試料を同量採取して混合したものを、上記の条件で調製して使用した。

上述の上清に、クロロホルム及び蒸留水（DW）を 2:1:1 の割合で混合し、4℃、1,400 rpm で 10 分間攪拌後、上記と同様の条件で遠心分離を行い、水層を回収した。回収した水層は室温で 60 分間濃縮遠心し、その上清を液体窒素で 5 分間凍結し、凍結乾燥器を用いてオーバーナイトで乾燥した。乾燥した試料を 20 mg/mL のメトキシアミン・ピリジン溶液で溶解し、20 分間ソニケーション後、30℃、1,400 rpm で 90 分インキュベートした。遠心後、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセタミド (MSTFA)を加え、37℃、1,400 rpm で 30 分間インキュベートして誘導体化を行い、誘導体化後試料をガスクロマトグラフ－タンデム質量分析計 (GC-MS/MS)を用いて分析した。

メタボローム解析は、各代謝物のピーク面積を IS で補正し、QC 試料における測定値の相対標準偏差 (RSD)が 25 %以下の代謝物を対象とし、解析ソフトとして metaboanalyst 6.0 を用いた。

（6）実験動物の行動に対する CS の影響評価

7 週齢の C57BL6/J（B6J）マウスを使用し、1 週間馴化後、7 日間連続して CS を腹腔内投与した。投与量は、10 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg とした。行動解析は、day 1、day 4、day 7 で行い、行動量は 1 時間の B6J の移動量をカウントで計測し、立ち上がり回数も同様に回数をカウントした。

４．研究成果

（1）細胞死に対する HU210 と CS の影響

HU210 添加群では、HU210 は 3 時間では 50 μM 、24 時間では 20 μM から細胞死が増加した。同様に CCK を用いて代謝への影響を調べたところ、HU210 では 3 時間で 50 μM で、24 時間では 10 μM から代謝が減少していることがわかった。

一方、大麻抽出物は投与後 3 時間では顕著な細胞毒性や代謝への影響は観察されず、24 時間においては、500 μg/mL 以上で細胞死と代謝を抑制した（下の図 1 参照)。

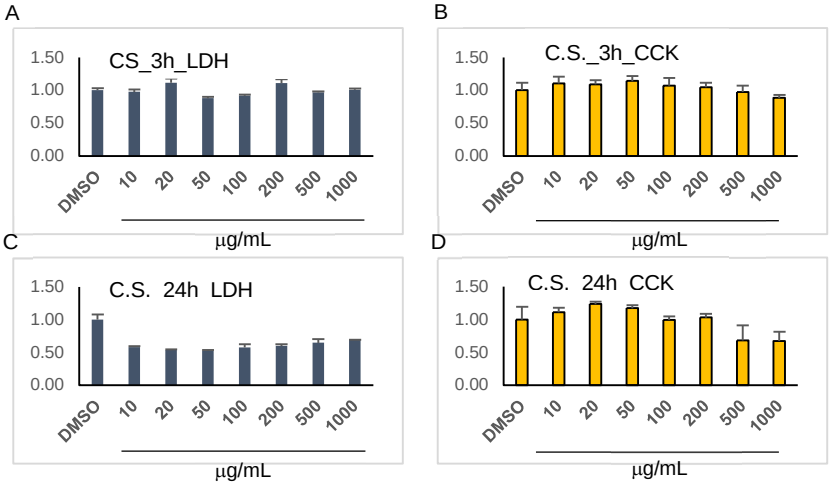

図１　大麻抽出物投与後 3 時間における細胞死（A）と全体的代謝（B)、24 時間後における細胞死（C）と全体的代謝(D)への影響

（2）CS 及び HU210 添加群のメタボロームへの影響

メタボロミクスを用いた代謝経路への影響を検討した。これら成分について多変量解析を行ったところ、主成分分析（PCA）で、HU210 及び CS 添加群のいずれにおいても、コントロールから添加群が分離できた（下の図２参照）。

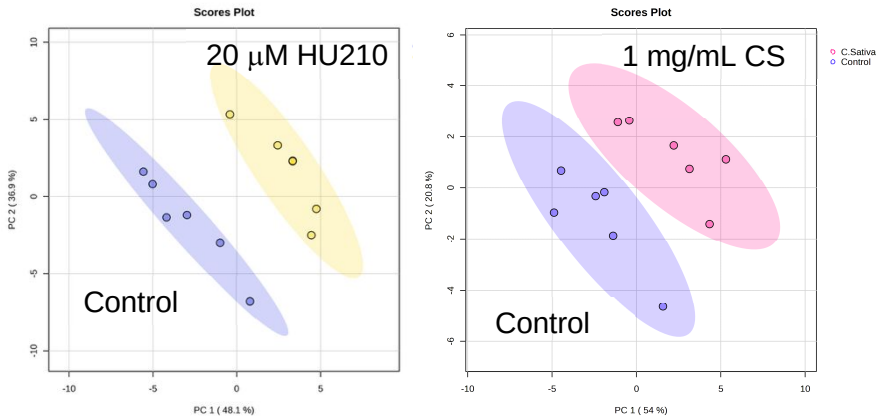

図２ GT1-7 細胞における HU210（左)と大麻抽出物（右）の代謝プロファイルの主成分分析

パスウェイ解析を行ったところ、HU210 と CS の両者で変動したものは、クエン酸回路、ペントース・グルクロン酸相互変換系、アスコルビン酸・アルダル酸代謝があり、HU210 のみで変動した経路はグリセロリン脂質・グリセロ脂質代謝や一部のアミノ酸代謝があり、CS のみで変動したものは、タウリン・ヒポタウリン代謝、ピルビン酸代謝、一部のアミノ酸代謝であった。

（3）CS の CB1 および CB2 受容体作用の解析

これらの実験を踏まえ、GT1-7 細胞を用い、CS の CB1 及び CB2 受容体への作用を検討することとした。この実験におけるメタボローム解析には、3 時間後の試料では 99 成分、24 時間後の試試料では 102 成分を用いて解析した。上述したように、CB1 および CB2 受容体の作用をおのおの検討するため、CB1 受容体アンタゴニストとして AM251、CB2 アンタゴニストとして AM630 を用いた。AM251 と AM630 そのものが代謝に影響を与えうるため、コントロールと AM251 ないし AM630 で変動した代謝物を除外したところ、作用 3 時間後の試料は 70 成分、24 時間後の試料では 78 成分が対象となった。

これら成分について多変量解析を行ったところ、３時間後の試料については、主成分分析（PCA）では分離される群は認められなかったものの、部分的最小二乗法（PLSDA）では、AM630-CS 群がコントロール群と分離していた（下の図３参照）。

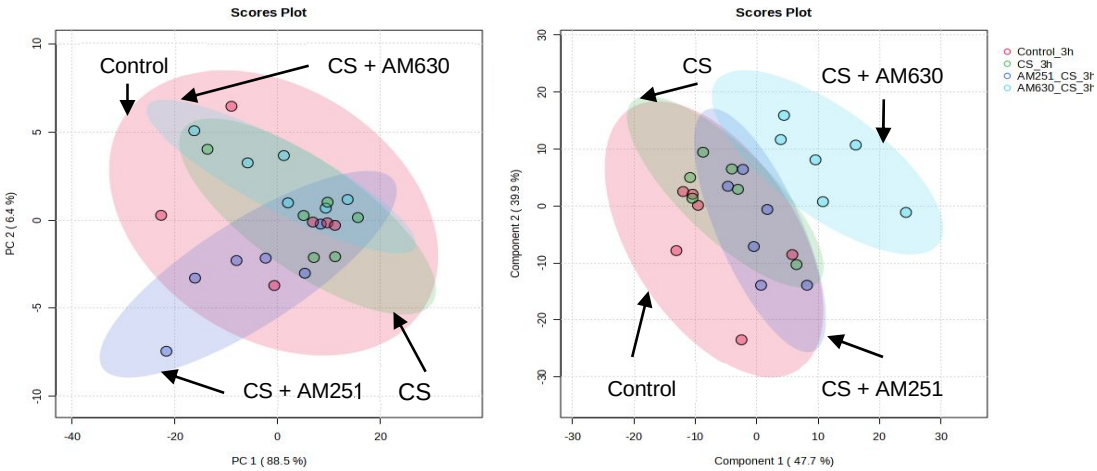

図３　GT1-7 細胞における大麻抽出物及びアンタゴニスト投与後３時間後における各群の多変量解析　左：主成分分析（PCA）　右：部分的最小二乗法（PLSDA）

次いで、２４時間後の試料についても同様の解析を行ったところ、CS 添加で変動した２１成分中、カンナビノイド受容体を阻害することで有意に変動した成分はなかった（下の図４参照）。

これらの結果から、CS 投与３時間後の試料では、各カンナビノイド受容体を介した代謝物の変動及び、これら受容体を介さない代謝物の変動が存在することが示唆された。一方で、投与 24

時間後の試料では、カンナビノイド受容体を阻害しても CS による代謝物の変動には有意な変化は認められなかったことから、24 時間後においては、カンナビノイド受容体を介さない代謝物変動の可能性が考えられた。投与 3 時間と 24 時間後の差は、カンナビノイド受容体の脱感作や受容体発現が変動していることも想定された。

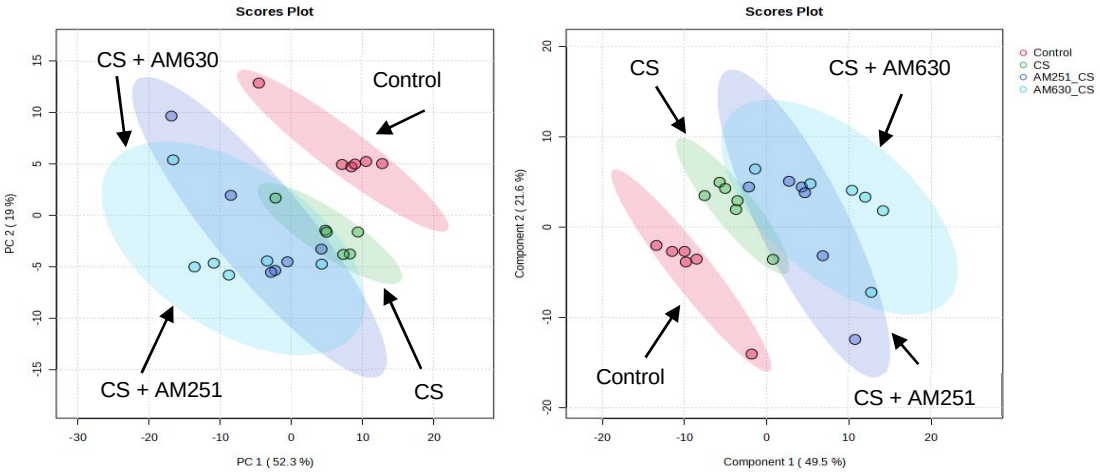

図４　GT1-7 細胞における大麻抽出物及びアンタゴニスト投与後 24 時間後における各群の多変量解析　左：主成分分析（PCA）　右：部分的最小二乗法（PLSDA）

(4) 実験動物の行動に対する CS の影響

行動解析の結果、CS の投与量によらず、行動量、立ち上がり回数ともに顕著な変動はなかった。今回の解析では有意な変動はなかったものの、今回はグロスな行動解析を行ったのみであり、中枢および末梢神経系において何らかの変化があった可能性は考えられる。今後は投与後に回収した臓器や血液等を解析することで CS の影響を解析する予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 名取 雄人、水野 大、川原 正博、石井 晃
２．発表標題 カンナビノイドがマウス視床下部由来GT1-7の代謝変動に及ぼす影響解析
３．学会等名 日本薬学会第144年会
４．発表年 2024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
研究分担者	名取　雄人 (NATORI Yujin) (80610104)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

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