

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18908

研究課題名(和文)乱用実態に即した危険ドラッグやその不純物毒性の総合的評価

研究課題名(英文)Comprehensive evaluation of recreational drugs and their impurity toxicity according to actual abuse situation

研究代表者

光本 明日香(貝崎明日香)(Kaizaki-Mitsumoto, Asuka)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：70407443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：危険ドラッグ製品(以下RD)の主な摂取方法である吸入による生体影響を明らかにするため、RDの小動物吸入曝露装置を開発し、RDの主要成分である合成カンナビノイド(以下SC)の作用を検討した。UR-144等、ある種のSCは吸入時の加熱により熱分解物を生成することや、吸入後、初期に興奮作用を示すことを明らかにした。また、熱分解物は親化合物に比べ、CB1受容体活性が強いことを明らかにした。さらに興奮作用発現メカニズムについても検討した。その他、SC、合成カチノンの単成分及び併用時の依存性について検討し、合成カチノンであるalpha-PVPは、覚せい剤と同様の機序で依存性を生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Drug abusers most often smoke 'herbal incense' as a cigarette or inhale it using a smoking tool. In order to clarify the biological effect of inhalation, we developed the recreational drug-inhalation system for small animals. It was revealed that some kind of synthetic cannabinoids (SC) such as UR-144 generates thermal decomposition by heating at the time of inhalation and shows an excitatory action at the beginning after inhalation. In addition, the thermal decomposition revealed that CB1 receptor activity is stronger than that of the parent compound. We also examined the excitatory mechanism. In addition, we investigated the dependence of SC and synthetic cathinone on single component and concomitant use, and revealed that alpha-PVP stimulates the reward pathway by increasing the extracellular dopamine levels and CREB phosphorylation in the nucleus accumbens shell, eventually causing positive reinforcement.

研究分野：毒物学

キーワード：危険ドラッグ 合成カンナビノイド 合成カチノン 吸入曝露 熱分解物

1. 研究開始当初の背景

(1) 覚せい剤、大麻や麻薬など、乱用を目的とした薬物は、製造、輸入、所持、譲渡や譲受などがそれぞれ対応する法律で禁じられている。しかし近年、これらの規制対象薬物の化学構造を一部変化させた化合物、いわゆるデザイナードラッグ(危険ドラッグ)が流通するようになった。販売者は“脱法(合法)ドラッグ”などとして違法性を秘匿し、乱用目的にも拘らず、「ハーブ」や「パスソルト」などと称して人体に適用しない旨の注意書きを添えて、インターネット上や自販機を含む街中で販売される。覚せい剤などに比べ入手が容易であることから、特に若年層におけるゲートウエイドラッグとなっているだけでなく、作用が強いものについては覚せい剤の代替薬物となりうる状況が危惧される。また、最近ではこれらの危険ドラッグの使用者が、他者を巻き込む重大な交通事故を起こしたり、自ら健康被害を被る等の事例が相次いで報告されており、深刻な社会問題となっている。

(2) 現在流通している危険ドラッグ、特にハーブと呼ばれる植物片に薬物を混入・吸収させた危険ドラッグ製品の多くは、タバコ葉と同様に喫煙され、あるいは喫煙具を利用して吸入されている。申請者はこれまでに乱用薬物の流通実態を把握するため、危険ドラッグ製品を多く分析してきた。その過程で、混入された薬物が NMR、HPLC や元素分析では極めて純度が高いことが示されているにもかかわらず、GC-MS クロマトグラム上で複数のピークを与える事例をしばしば経験している。このことは、危険ドラッグが気化する際に熱分解あるいは構造変化していることを示唆する。しかし、危険ドラッグの生体影響は、混入薬物と標的受容体との親和性や脳内シナプス間隙モノアミン量の増加作用などで評価され、熱分解物等の生体影響については全く明らかにされていない。

(3) 多くの危険ドラッグ製品には複数の合成カンナビノイドに加え、合成カチノン、フェネチラミン、フェンサイクリジンあるいはトリプタミン誘導体などが混入している。合成カンナビノイドは精神抑制作用、合成カチノン等は精神賦活作用を持つが、これらの混合物によって精神作用がどのように変化するかは明らかでない。また、合成カンナビノイド、合成カチノンの単成分あるいは混合物が依存性形成するののかについても知られていない。

2. 研究の目的

背景(1)の対策として、これまで、薬物乱用を防止するために規制が強化され、構造類似体の包括規制も行われるようになってきた。しかし、流通する危険ドラッグ製品の生体作用の詳細はほとんど明らかにされていない。すなわち、一部の危険ドラッグの作用は報告があるものの、単独の薬物の腹腔内投与によ

るものが中心で、実際の乱用実態を反映したものではない。そこで本申請研究では、危険ドラッグの乱用実態に即して、投与ルート、不純物の作用あるいは異なる薬物の併用効果を考慮した危険ドラッグ製品の生体作用の解明を行うことを目的とする。

背景(2)を解決するために、吸入時の加熱により発生する燃焼煙中の成分分析を行い、NMR 分析で熱分解物の構造を確定する。また、親化合物・熱分解物各々の *in vivo* での作用(行動薬理、脳内シナプス間隙モノアミン量の測定など)を検討するとともに、*in vitro* で標的受容体との親和性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 危険ドラッグの熱分解物の同定・定量

合成カンナビノイドおよび合成カチノンに、電気炉を用いて継時的に熱を加え、HPLC により分解物の有無を確認した。また、NMR により構造決定を行った。

当研究室で開発した小動物吸入曝露装置を用いて、合成カンナビノイド(UR-144、XLR-11、MAM2201)と植物片を混合した「疑似危険ドラッグ」を燃焼し、発生した煙を採取した。燃焼煙中に含まれる親化合物と熱分解物の存在比を確認した。

(2) 吸入曝露試験

煙曝露用ゲージにマウスを入れ、順化させた後、小動物吸入曝露装置で疑似危険ドラッグ製品を燃焼し、一定時間マウスに煙を吸入させた。その際の自発運動量および体温を nano-tag で測定した。(nano-tag は加速度センサーにより自発運動量をカウントする、体内埋め込み式の自発運動量測定装置であり、同時に体温測定も可能である。)

曝露煙を捕集し、メタノール中に成分を溶解させた後、HPLC を用いて薬物量を測定し、曝露煙中の濃度を決定した。曝露煙中の薬物濃度と、マウスの呼吸量から、マウスが吸入したと考えられる薬物量を求めた。吸入曝露による作用が親化合物によるものか、熱分解によるものかを明らかにするため、各々を腹腔内投与し、吸入曝露時の作用(体温、自発運動量、カタレプシー)と比較した。

(3) 作用メカニズムの解明

危険ドラッグの熱分解物の生理活性

合成カンナビノイドおよびその熱分解物のカンナビノイド受容体(CB₁)への結合活性を、ヒト CB₁ を発現した CHO-K1 細胞を用いて Calcium mobilization assay により測定した。

脳内神経伝達物質の測定

(2)の結果より、吸入曝露時に観察された一過性の興奮作用は、熱分解物によるものだと考えられたため、XLR-11 熱分解物を用いて、下記検討(マイクロダイアリシス法)を行った。

マウスを麻酔し、脳固定装置台に固定し、側坐核あるいは線条体にマイクロダイアリシスプローブを挿入した。翌日、XLR-11 熱分

解物を投与し、一定時間脳細胞外液を採取した。HPLC-ECD システムを用いて、細胞外液に含まれるドーパミン量の測定を行った。

各受容体阻害薬による影響

CB₁ 受容体アンタゴニスト AM251、ドーパミン D₁ 受容体阻害薬 SCH23390、ドーパミン D₂ 受容体阻害薬スルピリドを前処置した後、XLR-11 熱分解物を投与した。XLR-11 熱分解物処置前から、処置後 2 時間までの体温、自発運動量の測定およびカタレプシーの評価を行った。

(4) 危険ドラッグの依存性評価と作用機序

合成カチノンである alpha-PVP、合成カンナビノイドである UR-144、MAM2201 の単成分あるいは混合物を用いて、CPP (Condition Place Preference) 法により依存性形成の有無を評価した。

黒箱は平らな床面、白箱は凹凸のある床面で構成される白・黒 2 コンパートメントボックスを使用した。

-1. 5 日間スケジュール (条件付け 3 回)
Day 1 に Pre-condition を行い、Day 2-4 に Condition (各日 1 セッション)、Day 5 に Post-condition を行った。

-2. 12 日間スケジュール (条件付け 9 回)
Day 1 に Pre-condition を行い、Day 2-4 に Condition (各日 1 セッション)、Day 5 に Post-condition 1 回目を行った。Day 6-11 に Condition (各日 1 セッション)、Day 12 に Post-condition 2 回目を行った。

-1、-2 に示した Pre-condition、Condition、Post-condition の方法は下記の通りである。

Pre-condition: 15 分間マウスを自由に行き来させ、各ボックスに滞在する時間を測定した。長く滞在した (嗜好性を示す) 方を溶媒処置ボックス、他方を薬物処置ボックスとした。

Condition: 薬物または溶媒を腹腔内投与し、白または黒ボックスに 30 分間閉じ込めた。6 時間後、薬物、溶媒およびボックスの組み合わせを入れ替え、30 分間ボックスに閉じ込めた。これを 1 セッションとした。

Post-condition: Pre-condition と同様に各ボックスの滞在時間を測定した。Post-condition で薬物処置ボックスに滞在した時間から、Pre-condition で薬物処置ボックスに滞在した時間を差し引いた値を CPP スコア (sec) とした。

なお、自己投与法および他施設での CPP 法により依存性形成が確認されているモルヒネ、メタンフェタミンを用いて、本 CPP 法 5 日間スケジュールを行い、他の報告で依存性形成を認めない低用量では、本条件でも嗜好性を示さず、他の報告で依存性形成を認める用量では本条件でも嗜好性を示すことを確認した。

依存性形成メカニズムを検討するため、マイクロダイアリシス法を用いて、alpha-PVP 投与後の側坐核のドーパミン量を測定した。また、嗜好性が獲得された後 (3 日連続

alpha-PVP を投与した翌日) マウスの脳切片を作成し、免疫染色により、側坐核におけるリン酸化 CREB (cAMP response element binding protein) の発現についても検討した。

4. 研究成果

(1) 危険ドラッグの熱分解物の同定・定量

これまでの危険ドラッグ製品の成分分析の結果、危険ドラッグ製品に含まれていることが明らかになった合成カンナビノイドのうち、シクロプロピル環を持つ UR-144、XLR-11、A796260 を電気炉で加熱した。

加熱時間を 5 分から一晩に設定し、各サンプルを HPLC、NMR で分析した結果、5 分の加熱では、親化合物と熱分解物が混在しており、10~30 分後には全てが熱分解物になった。これらの熱分解物は、いずれも親化合物のシクロプロピル環が開環した構造であった。一方、さらに加熱を続けると熱分解が進み、合成カンナビノイドの体をなさないほどに分解されることが明らかになった。

小動物吸入曝露装置で UR-144 あるいは XLR-11 を含む疑似危険ドラッグ製品を燃焼させ、曝露ケージ内を燃焼煙で満たした後 (燃焼開始 1 分後) ケージ内の煙を採取し、HPLC を用いて測定した結果、親化合物と熱分解物の存在比はおよそ 1:3 で、熱分解物が多く含まれていた。以上のことから、吸入で乱用される危険ドラッグ製品の生体影響を明らかにするには、親化合物のみならず熱分解物の作用解明が必要であることが明らかとなった。

一方、シクロプロピル環を持たない合成カンナビノイドである MAM2201 を含む疑似危険ドラッグ製品を燃焼させても、熱分解物は生じなかった。

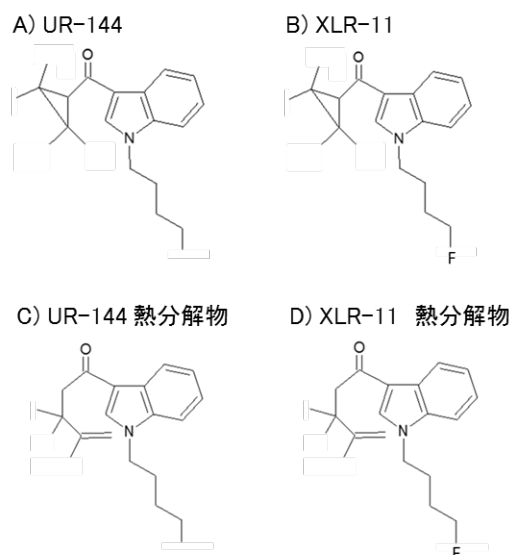


Fig. 1. UR-144, XLR-11 およびその熱分解物の構造式

(2) 吸入曝露試験

小動物吸入曝露装置を用いて、マウスに合

成カンナビノイド (UR-144 または XLR-11) を含む疑似危険ドラッグ製品の燃焼煙を曝露した結果、吸入曝露後、早期に一過性の興奮作用を示した後、無動を生じることが明らかとなった。また、体温低下も認められた。UR-144、XLR-11、これらの熱分解物を腹腔内投与し、吸入曝露との作用比較を行った結果、親化合物の投与は興奮作用を示さず、熱分解物のみが興奮作用を示した。

合成カンナビノイドの特徴として知られている無動(カタレプシー)、体温低下は親化合物、熱分解物ともに認められたが、熱分解物の方が作用は強かった。

(3) 作用メカニズムの解明

上記(2)の結果より、熱分解は親化合物に比べ CB₁ 受容体活性が強い可能性が考えられたため、ヒト CB₁ を発現した CHO-K1 細胞を用いて各々の CB₁ 受容体活性を検討した。熱分解物は、親化合物に比べ、約 4 倍 CB₁ 受容体活性が強いことが明らかとなり、熱分解による無動誘発作用、体温低下作用が親化合物よりも強いのは、CB₁ 受容体活性が強いためであることが示された。

CB₁ 受容体アンタゴニストである AM251 前処置により、一過性の興奮作用、無動誘発作用、体温低下作用のいずれも抑制されたことから、吸入曝露および熱分解物の腹腔内投与によって観察される興奮作用に CB₁ 受容体が関与していると考えられた。しかし、9-THC や他の CB₁ 受容体活性の強い合成カンナビノイドの投与において興奮作用が認められないとの報告があることから、UR-144 や XLR-11 の熱分解による興奮作用は CB₁ 受容体刺激だけで生じるものではないと考えられた。

熱分解物により生じる興奮作用のメカニズムを明らかにするため、マイクロダイアリシス法を用いて、細胞外ドパミン量の測定を行った。これまでの研究で、合成カチノンである alpha-PVP による自発運動量の増加は線条体のドパミン量増加によるものであることを明らかにしてきており、また、メタンフェタミンなどの覚醒剤による自発運動量増加にも線条体のドパミンが関与していることが明らかになっているが、UR-144、XLR-11 の熱分解は、いずれも線条体のドパミン量増加を引き起こさなかった。

本研究遂行中に、合成カンナビノイドである JWH-250、JWH-073 は、側坐核のドパミンを増加させることで興奮作用を示すという報告がなされた (Ossato A et al. 2016. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.)。そこで UR-144、XLR-11 熱分解投与後の側坐核のドパミン量測定を行ったところ、コントロール群の 1.5 倍程度に上昇することが示された。Ossato らの報告においても、側坐核のドパミン量の増加は 1.5 倍程度であったことから、一部の合成カンナビノイドは側坐核においてドパミンを増加させることが明らかになったと考えられるが、この上昇は、依存性形成薬物投与時に見られるドパミン上昇

に比べ、わずかな変動であり、この程度のドパミン増加が興奮作用を引き起こしているとは考え難かった。

そこで、ドパミンが興奮作用に関与しているのかを明らかにするため、ドパミン D₁ 受容体阻害剤、ドパミン D₂ 受容体阻害剤を前処置した後、XLR-11 熱分解物を投与した。しかし、D₁、D₂ 受容体阻害によって、興奮作用の抑制は認められなかった。以上のことから、UR-144、XLR-11 熱分解物による興奮作用にドパミンが関与している可能性は低いと考えられた。

(4) 危険ドラッグの依存性評価

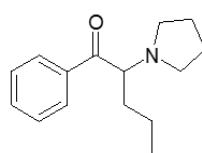
Alpha-PVP は低用量では 9 回の条件付けにより嗜好性 (依存性) を示し、高用量では 3 回の条件付けにより嗜好性を示したことから、alpha-PVP は用量依存的に嗜好性を示すと考えられた。一方、合成カンナビノイドである UR-144 や MAM2201 は本実験条件において嗜好性を示さなかった。

UR-144 または MAM2201 と、(3 回の条件付けでは嗜好性を示さない) 低用量の alpha-PVP を混合したものを用いて、3 回の条件付けを行っても嗜好性は示されなかった。このことから、合成カンナビノイドは alpha-PVP の依存性形成能を増強しないと考えられた。

Alpha-PVP 投与後、速やかに側坐核の細胞外ドパミン量の増加が認められ、投与後 20 ~ 30 分後には投与前の 20 数倍のドパミン量となった。投与 2 時間後においても通常時の 5 倍以上のドパミン量が確認された。

依存形成能を示す容量の alpha-PVP を 3 日間連続投与したマウスの側坐核において、有意なリン酸化 CREB の上昇が認められた。これらの結果から、alpha-PVP はメタンフェタミンと同様に、中脳辺縁ドパミン系の投射先である側坐核のドパミンを上昇させ、ドパミンシグナルを活性化させることにより CREB のリン酸化を引き起こし、精神依存を形成することが示唆された。

A) α-PVP



B) MAM2201

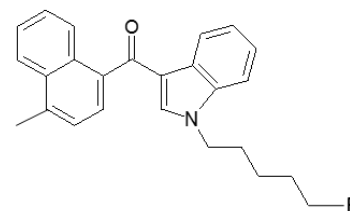


Fig.2. α-PVP, MAM2201 の構造式

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kaizaki-Mitsumoto A, Hataoka K, Funada M, Odanaka Y, Kumamoto Hiroki, Numazawa S

Pyrolysis of UR-144, a synthetic cannabinoid, augments an affinity to human CB1 receptor and cannabimimetic effects in mice.

J Toxicol Sci. 2017; 42: now printing. 査読有

Kaizaki-Mitsumoto A, Noguchi N, Yamaguchi S, Odanaka Y, Matsubayashi S, Kumamoto H, Fukuhara K, Funada M, Wada K, Numazawa S.

Three 25-NBOMe-type drugs, three other phenethylamine-type drugs (25I-NBMD, RH34, and escaline), eight cathinone derivatives, and a phencyclidine analog MMXE, newly identified in ingredients of drug products before they were sold on the drug market.

Forensic Toxicol. 2016;34:108-114. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Kaizaki-Mitsumoto A, Hataoka, Hattori N, Tanaka S, Numazawa S

Alpha-PVP induces the rewarding effect via activating dopaminergic neuron

日本薬理学会第 90 年会 2017 年 3 月

長崎ブリックホール(長崎)

光本(貝崎)明日香、渡邊 円香、宮本和幸、佐々木 純、林 宗貴、沼澤 聡
急性カフェイン中毒例におけるカフェインおよび代謝物の血中濃度推移

日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月

仙台国際センター(仙台)

篠岡恭子、光本(貝崎)明日香、沼澤聡
合成カンナビノイド UR-144 熱分解物のマウスにおける精神薬理作用

日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月

仙台国際センター(仙台)

清水 菜津美、篠岡 恭子、光本(貝崎)明日香、沼澤 聡

α-PVP の精神作用発現機構

フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016 年 9 月

昭和大学旗の台キャンパス(東京)

宮本和幸、丸田雄一、高安弘美、渡邊円香、光本明日香、田中広紀、向後麻里、佐々木純、沼沢聡、林宗貴

血液透析が奏功した急性カフェイン中毒の 2 例

第 38 回日本中毒学会総会 2016 年 7 月

朱鷺メッセ(新潟)

昭和大学旗の台キャンパス(東京)

阿部 和正、青木 悟、光本 明日香、沼澤 聡
CPP 法を用いた危険ドラッグ成分の精神依存性評価

日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月

パシフィコ横浜(横浜)

青木 悟、阿部 和正、高橋 瑠理子、光本明日香、沼澤 聡

危険ドラッグの吸入暴露装置の開発と検証

日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月

パシフィコ横浜(横浜)

光本(貝崎)明日香、野口 直輝、山口 紗希、小田中 友紀、松林 智子、熊本 浩樹、船田 正彦、和田 清、沼澤 聡

新規危険ドラッグ原料の構造決定

日本法中毒学会第 34 年会 2015 年 6 月

九州大学医学部百年講堂(福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

昭和大学薬学部生体制御機能薬学講座毒物学部門

<http://www10.showa-u.ac.jp/~toxicol/index.htm>

昭和大学学術業績リポジトリ

<http://meta.lilitory.showa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光本(貝崎)明日香(KAIZAKI-MITSUMOTO Asuka)

昭和大学・薬学部生体制御機能薬学講座・毒物学部門・助教

研究者番号: 70407443