

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19272

研究課題名(和文) 合成カンナビノイド依存モデルマウスの構築と依存形成因子の探索

研究課題名(英文) Development of the synthetic cannabinoid-dependent mouse and investigation of its formation factor

研究代表者

財津 桂 (Zaitzu, Kei)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30700546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：「危険ドラッグ」として乱用が拡大し、急性中毒事故等が発生している「合成カンナビノイド」の一つであるAM-2201を長期連続投与したマウス的大脑等について、内因性代謝物の総体解析であるメタボローム解析ならびに遺伝子発現解析を実施した。メタボローム解析の結果、急性中毒時に観察されていたエネルギー代謝の擾乱が長期投与後にはコントロールのレベルに近づいていることが明らかとなった。また、エネルギー代謝に関連する遺伝子の発現も長期投与後に有意差が観察されなかった。以上の結果、長期投与によって薬物耐性が生じ、合成カンナビノイドによって誘引されるエネルギー代謝の擾乱が収束していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The synthetic cannabinoid AM-2201, which has been abused worldwide, was chronically administered to drug-naive ICR male mice (6-week, n=6) for 7 days. After chronic administration, the cerebrum specimens were collected by dissection under anesthesia, and mass-spectrometry based metabolome analysis and gene expression analysis using real-time qPCR were executed. Metabolome analysis revealed that AM-2201 administered and control groups were unsatisfactory separated in PCA score plots: chronic administration of AM-2201 did not cause energy metabolism disruption, contrary to the acute toxic effect of AM-2201 which has been show to alter energy metabolism in the cerebrum. In addition, four genes related to energy metabolism were not significantly expressed in the chronically administered mice. These results suggests that energy metabolism of the chronically administered mice recovered to their original state by tolerance due to chronic administration of AM-2201.

研究分野：法中毒学

キーワード：メタボローム解析 遺伝子発現解析 合成カンナビノイド 分析化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 危険ドラッグの乱用

近年、「危険ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)」と呼ばれる薬物の流通・乱用が世界的に大きな社会問題となっており、その乱用防止施策は我が国にとっても非常に重要な喫緊の課題である。危険ドラッグの乱用は2000年頃から徐々に拡大し、当初はフェネチルアミン系薬物やトリプタミン系薬物といった薬物群が乱用されていたが、近年では合成カンナビノイド類とカチノン系薬物が主として乱用されている。

このうち、乱用されている合成カンナビノイド類は、主としてカンナビノイド受容体のアゴニストであるものが多く、特に、中枢神経系に高発現するとされている CB1 受容体のアゴニストであるものが多い。乱用されている合成カンナビノイド類は、大麻の主たる薬理活性物質である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) と比較しても、CB1 受容体への結合親和性が極めて高いものが多いとされている。また、近年の合成カンナビノイド類の乱用拡大に伴い、合成カンナビノイド類の摂取による急性中毒事故も発生しており、法中毒学的に非常に重要な対象薬物群である。

(2) 研究代表者のこれまでの研究経緯

これまでに研究代表者は、合成カンナビノイド類の主代謝経路の解析に加え、糖類やアミノ酸、脂肪酸等の内因性代謝物の総体解析手法であるメタボローム解析を用いて、合成カンナビノイド類を投与したラットの大脳メタボロームのプロファイリングを行った結果、合成カンナビノイドの1つである MA M-2201 ((1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl)(4-methyl-1-naphthalenyl)-methanone) がラット大脳においてエネルギー代謝に影響を及ぼすことを明らかとした。一方で、研究代表者は覚せい剤メタンフェタミン、コカイン、モルヒネの依存形成にエネルギー代謝の擾乱が関連していることを見出しており、エネルギー代謝の変動と依存性薬物の関連性を示唆してきた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、合成カンナビノイド類はエネルギー代謝に影響を及ぼすことで、薬物依存の形成や長期的な生体内影響を及ぼすことが示唆される。

そこで、本研究では、危険ドラッグとして乱用されていた合成カンナビノイド類である AM-2201 (1-[(5-Fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-[naphthalen-1-yl]methanone) を用いて、オペラント装置を用いた自己投与法による薬物依存モデルマウスの構築を検討するとともに、そのモデルマウスの大脳等のメタボローム解析を実施することを目的とした。その際特に、メタボローム解析については、新たなイオン化法である探針エレクトロス

プレーイオン化法(PESI)とタンデム質量分析(MS/MS)を組み合わせた新たなメタボローム解析法について検討を行い、開発した本手法ならびにガスクロマトグラフィータンデム質量分析(GC/MS/MS)によるメタボローム解析をマウス生体試料の分析に応用した。さらに、エネルギー代謝の変動に関連する mRNA について、リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析を行うことで、合成カンナビノイドによる薬物依存性評価や長期投与における生体への影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PESI/MS/MS によるメタボローム解析法の検討

メタボライト標準品を用いて、PESI-MS/MS (島津製作所製タンデム型質量分析計 LCMS-8040 および PESI イオン源) における Selected reaction monitoring (SRM) トランジションおよびコリジョンエネルギー (CE) の条件検討を行い、PESI/MS/MS による分析条件を最適化した。

(2) マウスによる自己投与法の検討

6週齢の ICR 雄性マウスを用いて、オペラント装置 (Med Associates Inc. 製) を用いたエサ出し条件づけの検討および頸動脈カニューレシオンの検討を行った。さらに、マウス自己投与条件の検討を行った。

(3) 合成カンナビノイド AM-2201 の長期連続投与マウスの検討

6週齢の ICR 雄性マウスを用いて、合成カンナビノイド AM-2201 を 2 mg/kg/day で1週間連続投与し、最終投与後、2時間の絶食期間をおいた後に、イソフルラン麻酔下で解剖を実施し、血液を腹部大動脈より採取後、脳等の生体試料を採取した。血液は血清とし、採取後の試料は直ちに液体窒素を用いて凍結し、分析時まで -80 °C で保存した。

(4) メタボローム解析およびリアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析

得られた生体試料について、PESI/MS/MS および GC-MS/MS (島津製作所製ガスクロマトグラフィータンデム質量分析計 GCMS-TQ8040) によるメタボローム解析を実施した。さらに、リアルタイム PCR (Thermo Fisher Science 製 StepOne) を用いた遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) PESI/MS/MS による直接メタボローム解析法の構築

PESI/MS/MS の概要を図 1 に示す。PESI/MS/MS は先端直径 700 nm の極細針を用いて、試料のサンプリングとイオン化をほぼ同時に行うことが可能である。

また、検出装置にタンデム型質量分析計を用いているため、二段階の質量分離によって

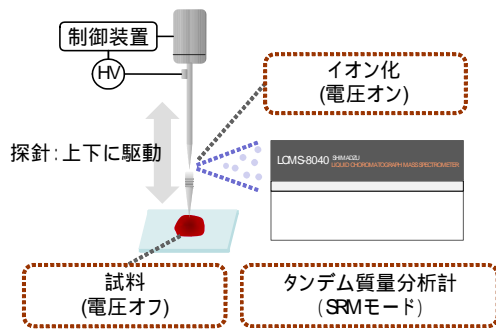


図 1 PESI/MS/MS の装置の概要

高選択性を有していることから、化合物の高い同定能力を有している。本分析装置を用いて、PESI/MS/MS による直接分析法の条件を検討した。

6 週齢の ICR 雄性マウスの大脳を採取し、PESI/MS/MS の分析条件を検討した。その結果、大脳より前処理操作を行うことなく、直接、26 成分のメタボライトの分析を行うことが出来た。そこで、開発した本手法を用いて、合成カンナビノイド AM-2201 を投与したマウスの大脳試料を分析し、得られたメタボライトのプロファイルを主成分分析で解析した結果を図 2 に示す。

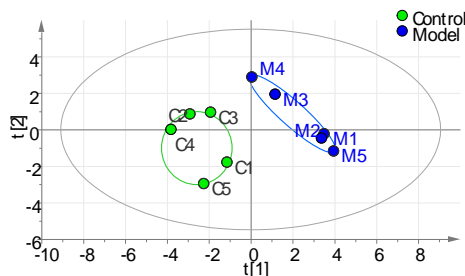


図 2 AM-2201 投与マウスの大脳メタボローム・プロファイルの PCA スコアプロット (緑色：コントロールマウス、青色：投与マウス)

図 2 に示すように、AM-2201 投与マウス群とコントロール群は PCA スコアプロット上で第一主成分軸上に沿って良好に分離した。群分離に寄与したメタボライトをローディングプロットで抽出した後、Welch's t-test を用いて有意差検定を行ったところ、エネルギー代謝に関する成分について、有意差が観察された。また、本実験で得られた結果は、これまでに我々がラットに対して MAM-2201 を投与して得られた結果と同様の傾向を示した。

以上のことから、PESI/MS/MS によって、前処理操作を行うことなく、臓器試料からであっても、直接メタボライトのプロファイルを得ることが可能であることが示された。

(2) マウスによる自己投与法の検討結果

6 週齢の ICR 雄性マウスに麻酔下で頸動脈カニューレーションを実施し、自己投与法の条件検討を行った。しかし、カニューレーションの血管内の固定位置や AM-2201 投与量の条件付けに予想以上に時間を費やすことがわかったため、当初の予定通り、既報を参考に長期投与による動物実験に切り替えて、実験を継続することとした。なお、カニューレーションの固定位置や自己投与法の条件付けについては、現在も引き続き検討を進めている。

(3) 合成カンナビノイド AM-2201 の長期連続投与マウスの検討

6 週齢の ICR 雄性マウスに AM-2201 を 2 mg/kg/day で 7 日間連続投与を行い、最終投与後に解剖を実施した。得られた脳等の生体試料について、メタボローム解析を行った。大脳メタボローム解析の結果を図 3 に示す。

AM-2201 の長期連続投与マウス群とコントロール群はスコアプロット上における分離が不完全であったことから、AM-2201 の慢性投与によって耐性が生じ、急性毒性時に観察されていたエネルギー代謝の擾乱が収束していることが示唆された。

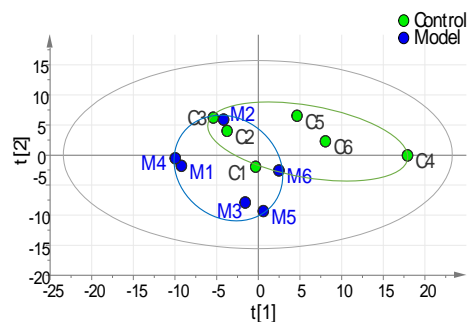


図 3 AM-2201 慢性投与マウスおよびコントロールマウスの大脳メタボローム・プロファイルの PCA スコアプロット (緑色：コントロールマウス、青色：投与マウス)

さらに、エネルギー代謝に関連する 4 種類の mRNA について、リアルタイム PCR による相対遺伝子発現解析を行った。この結果を次ページの図 4 に示す。

相対遺伝子発現解析の結果、今回対象とした遺伝子においては長期連続投与モデルにおいて有意差を示す遺伝子は観察されなかった。この結果とメタボローム解析の結果を併せて考察すると、AM-2201 の長期連続投与の結果、CB1 アゴニストに対する耐性が生じ、その結果、エネルギー代謝の変動やエネルギー代謝に関連する mRNA の発現がコントロールのレベルと同等の状態に還元していることが示唆された。

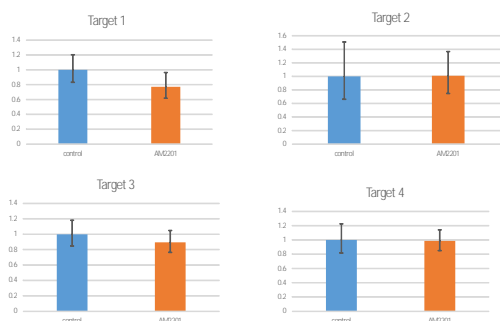


図4 マウス大脳におけるエネルギー代謝関連 mRNA の相対発現解析の結果 (青: コントロール、オレンジ: 長期連続投与マウス)

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5件)(全て査読有)

1. Kei Zaitzu(Corresponding Author), Yumi Hayashi, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Application of metabolomics to toxicology of drugs of abuse: a mini review of metabolomics approach to acute and chronic toxicity studies. Drug Metabolism and Pharmacokinetics 2016; 31: 21-26.
2. Kei Zaitzu(Corresponding Author), Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Tomomi Ohara, Kenta Nakagiri, Maiko Kusano, Hiroki Nakajima, Tamie Nakajima, Tetsuya Ishikawa, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Intact endogenous metabolite analysis of mice liver by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its preliminary application to in vivo real-time analysis. Analytical Chemistry, 2016, 88 (7), pp 3556-3561
3. Maiko Kusano, Kei Zaitzu(Corresponding Author), Mayumi Yamanaka, Kazuaki Hisatsune, Tomomi Asano, Kentaro Taki, Yumi Hayashi, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Development of a mass spectrometric hydroxyl-position determination method for the hydroxyindole metabolites of JWH-018 by GC-MS/MS. Journal of Mass Spectrometry, 2016, 51 (5) :350-357.
4. Maiko Kusano, Mayumi Yamanaka, Kei Zaitzu(Corresponding Author), Hiroshi Nakayama, Jun'ichi Nakajima, Takako Moriyasu, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Regioisomeric

differentiation of the alkyl-substituted synthetic cannabinoids JWH-122 and JWH-210 by GC-EI-MS/MS. Forensic Toxicology, 2016, 34 (2): 304-315.

5. Kei Zaitzu(Corresponding Author), Hiroshi Nakayama, Mayumi Yamanaka, Kazuaki Hisatsune, Kentaro Taki, Tomomi Asano, Tooru Kamata, Munehiro Katagi, Yumi Hayashi, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. High resolution mass spectrometric determination of the synthetic cannabinoids MAM-2201, AM-2201, AM-2232 and their metabolites in postmortem plasma and urine by LC/Q-TOFMS. International Journal of Legal Medicine 2015; 129(6): 1233-1245.

[学会発表](計14件)

1. Kei Zaitzu, Yumi Hayashi, Maiko Kusano, Kazuaki Hisatsune, Tomomi Ohara, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Hiroshi Tanihata, Hitoshi Tsuchihashi, Tetsuya Ishikawa, Akira Ishii. Direct drug analysis in serum by probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry and its preliminary application to a real-time metabolism study. MSACL-US 2017 9th Annual Conference & Exhibits, 2017年1月26日、「Palm Springs (USA)」
2. Kei Zaitzu, Development of a user-friendly automated drug-quantification system and its application to Forensic Toxicology. Forensic Toxicology and Drug Analysis Technology Forum of China 2016, 2016年9月22日、「Taiyuan(China)」
3. Yumi Hayashi, Kei Zaitzu, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii, Tetsuya Ishikawa. Application of Intact Metabolome Analysis by Probe Electrospray Ionization (PESI)/MS/MS to Local Distribution Analysis and in vivo Real-time Monitoring. The Association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab (MSACL 2016 EU), 2016年9月12日、「Salzburg (AUSTRIA)」
4. Kei Zaitzu, Yumi Hayashi, Hiroaki Kanayama, Ryosuke Takagi, Saki Noda, Maiko Kusano, Toshikazu Minohata, Jun-ichi Azuma, Nobuhiro Kanayama, Tetsuya Ishikawa, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Real-time Monitoring of Glutamic Acid in Mouse Brain by Direct Coupling of Microdialysis to Tandem MS

- with the Newly Developed On-line Desalting System. The Association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab (MSACL 2016 EU)、2016年9月12日、「Salzburg (AUSTRIA)」
5. Yumi Hayashi, Kei Zaitzu, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Maiko Kusano, Hitoshi Tsushihashi, Akira Ishii, Tetsuya Ishikawa. Intact metabolome analysis of mice biological tissues by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS) and its application to real-time analysis. RSC Tokyo International Conference 2016、2016年9月9日、「Makuhari Messe (Chiba・Chiba-city)」
 6. Maiko Kusano, Kei Zaitzu, Yumi Hayashi, Saki Noda, Tomomi Ohara, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Ultrafast and direct detection of drugs of abuse in serum by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS). The 54th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists、2016年8月31日、「Brisbane (Australia)」
 7. 久恒一晃、財津 桂、林 由美、瀧 健太朗、浅野 友美、石場 厚、肥田 宗政、草野 麻衣子、土橋 均、石井 晃、マウスを用いた合成カンナビノイド JWH-018 および AM-2201 の胆汁排泄の評価、日本法中毒学会 35 年会、2016 年 7 月 1 日、「大阪産業創造館 (大阪府・大阪市)」
 8. Kei Zaitzu, Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Tetsuya Ishikawa, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Intact metabolome analysis of mice biological tissues by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry and its preliminary application to real-time analysis. 64th Conference of American Society for Mass Spectrometry、(oral presentation, 2016/6/7、「San Antonio (USA)」
 9. Kei Zaitzu, Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Tamie Nakajima, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Tetsuya Ishikawa, Akira Ishii. Real-time metabolome analysis by probe electrospray ionization-tandem mass Spectrometry (PESI-MS/MS): preliminary challenge to real-time metabolomics. Pittcon Conference&EXPO 2016, (poster presentation, 2016 年 3 月 8 日、「Atlanta (USA)」
 10. 財津 桂、質量分析を用いた危険ドラッ

- グの代謝物構造推定、平成 27 年度地方衛生研究所全国協議会東海北陸支部衛生化学部会、2016 年 2 月 5 日、「ぎふメディアコスモス (岐阜県・岐阜市)」
11. 林 由美、財津 桂、村田 匡、大原倫美、中切健太、草野麻衣子、那須民江、中島宏樹、石川哲也、土橋 均、石井 晃. 探針エレクトロスプレー/タンデム質量分析 (PESI/MS/MS) によるマウス肝臓内のメタボローム直接分析法 (インタクト・メタボローム分析法) の構築、第 40 回日本医用マススペクトル学会年会、2015 年 9 月 17 日、「アクトシティ浜松 コンgressセンター (静岡県・浜松市)」
 12. 財津 桂、質量分析を用いた危険ドラッグの代謝物構造推定および代謝経路の特定、TMS 研究会、2015 年 7 月 30 日、「東京大学本郷キャンパス 山上会館 (東京都・文京区)」
 13. 財津 桂、林 由美、木村 友哉、瀧 雄太、小崎 朋子、山中麻友美、草野麻衣子、土橋 均、石井 晃. セロトニン症候群モデルラットの脳および血漿メタボローム解析、第 42 回 日本毒性学会学術年、2015 年 6 月 30 日「石川県立音楽堂、(石川県・金沢市)」
 14. Yumi Hayashi, Kei Zaitzu, Tasuku Murata, Hiroki Nakajima, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii, Tetsuya Ishikawa. Intact metabolome analysis of mice liver by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry (PESI-MS/MS)、63rd Conference of American Society for Mass Spectrometry、2015 年 6 月 1 日、「St. Louis(USA)」

〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)

名称：質量分析装置及び該装置を用いた生体試料の分析方法

発明者：財津 桂、林 由美、村田 匡
権利者：株式会社島津製作所、国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/075064

出願年月日：2016 年 8 月 26 日

国内外の別：国内・国外 (PCT)

名称：イオン交換膜電気透析装置

発明者：財津 桂、林 由美、金山 伸広、金山 裕亮

権利者：国立大学法人名古屋大学、株式会社サンアクティス

種類：特許

番号：2016-165694

出願年月日：2016 年 8 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/legal/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

財津 桂 (ZAITSU, Kei)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30700546

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

林 由美 (HAYASHI, Yumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教