

## $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Treatment Enhances the Immobility Time during the Forced Swimming Test in Mice

Shozo CHIDORI<sup>1)</sup>, Nobuaki EGASIRA<sup>2)</sup>, Tomomi MATSUDA<sup>2)</sup>,  
Emi KOUSHI<sup>2)</sup>, Hiroshi NAGAI<sup>1)</sup>, Michiko MATSUSHITA<sup>1)</sup>,  
Naoki UCHIDA<sup>1)</sup>, Kenichi MISHIMA<sup>2)</sup>, Katsunori IWASAKI<sup>2)</sup>,  
Michihiro FUJIWARA<sup>2)</sup> and Ryoji NISHIMURA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Psychiatry, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka University

<sup>2)</sup> Department of Neuropsychopharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

**Abstract :** In the present study, we examined the effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), the principal psychoactive component of marihuana, on the immobility time during the forced swimming test (FST), a test with a high predictivity of antidepressant efficacy in human depression, in mice. THC enhanced the immobility time in the FST at doses of 0.3, 1, 3, and 6 mg/kg (i.p.). On the other hand, cannabinal (CBN) and cannabidiol (CBD), the major nonpsychoactive components of marihuana, had no effect on the immobility time in the FST. Moreover, we also found that THC (6 mg/kg i.p.) had no effect on the motor function such as the locomotor activity or motor coordination in both open-field and rota-rod tests. SR141716, a CB<sub>1</sub> receptor antagonist, reversed the THC (6 mg/kg i.p.) induced enhancement of the immobility time in the FST at a dose of 3 mg/kg (i.p.). These findings therefore suggest that THC enhances the immobility time in the FST through CB<sub>1</sub> receptor.

**Key words :** Forced Swimming Test,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, CB<sub>1</sub> receptor, SR141716

## 強制水泳試験における大麻成分 THC の不動時間延長作用に関する研究： カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体の関与

千鳥 正三<sup>1)</sup> 江頭 伸昭<sup>2)</sup> 松田 智美<sup>2)</sup>  
合志 英美<sup>2)</sup> 永井 宏<sup>1)</sup> 松下 満彦<sup>1)</sup>  
内田 直樹<sup>1)</sup> 三島 健一<sup>2)</sup> 岩崎 克典<sup>2)</sup>  
藤原 道弘<sup>2)</sup> 西村 良二<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 福岡大学医学部精神医学教室

<sup>2)</sup> 福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室

**要約 :** Delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (THC) は大麻中の主要な化合物のひとつであり、その作用機序について数多くの研究が報告されている。今回、我々は THC を投与したマウスに対して抗うつ薬のスクリーニングに用いられる強制水泳試験 (FST) を行い、不動時間に対する THC の作用について検討を行った。THC 投与30分後に FST, Rota-rod test, および open-field test を行い、不動時間に及ぼす影響と運動機能に及ぼす影響を測定した。THC (0.3mg/kg i.p.) は、運動機能を低下させることなく FST による不動時間を延長した。そして、それらの不動時間延長は CB<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストである SR141716 (3mg/kg) によって短縮した。これらのことより、THC による FST の不動時間延長作用には CB<sub>1</sub> 受容体が重要な役割を果たしていることが考えられた。

**キーワード :** 強制水泳試験,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, CB<sub>1</sub> receptor, SR141716

## は じ め に

現在、大麻は WHO によって乱用薬物の一つとして定義されており、その経験者は全世界で約 4 億人を越えるであろうといわれている。日本においても 1948 年に大麻取締法が制定され、大麻の所持や栽培は規制されているが麻薬事犯の検挙者においては大麻使用者が最も多く、薬物乱用において中核的位置を占めている。大麻乱用者はそれを使用することで得られる酩酊感、陶酔感を求めて大麻を乱用するようになるが、大麻にはこのような精神作用の他に幻覚、妄想などの知覚変容、被刺激性の増大、抑うつその他に自発性、興味、関心の減退を呈する無動機症候群<sup>1)~3)</sup>を引き起こすことが知られており、それらに対する治療についても対応が急がれる。

大麻中には 60 種類以上のカンナビノイド化合物が含まれており、主な精神作用を示す本体は  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) である。他に、 $\Delta^9$ -THC に比べて精神作用が弱い  $\Delta^8$ -THC, cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol などが含まれている。

1988 年に Devane と Howlett ら<sup>4)</sup> によって THC の誘導体である CP55, 940 を用いた研究から cannabinoid (CB) 受容体の存在が明らかにされ、1990 年に Matsuda らが<sup>5)</sup>、ラットでの大脳皮質 cDNA ライブラリーから CB 受容体をコードする cDNA をクローニングしたことから急速に発展し始めた。CB 受容体は CB<sub>1</sub> と CB<sub>2</sub> 受容体に分類されており<sup>6)</sup>、膜 7 回貫通で G $\alpha$ あるいは G $\beta$  蛋白質と共役した受容体である。CB<sub>1</sub> 受容体は黒質、淡蒼球、海馬、小脳の分子層、大脳皮質などを中心に強く発現し<sup>5), 7)~9)</sup>、その発現量は GABA 受容体やグルタミン酸受容体に匹敵するほど存在することから、運動、学習・記憶といった脳の高次機能調節において重要な役割を果たしていることが考えられている。

近年、感情障害であるうつ病は大きな社会問題となっており抗うつ薬の開発が数多くなされている。その中で、難治性のうつ病患者が大麻を喫煙することでうつ状態が改善したとの報告があり、大麻がうつ病治療薬となる可能性が示唆されている<sup>10)</sup>。しかし、慢性的に大麻を使用した際に、うつ状態を示したとの報告がされている<sup>11)</sup> など、大麻がうつ病に対してどのような影響を与えるのか一定の見解は得られていない。また、ラットにうつ病の要因とされる慢性的なストレスを与えることで海馬における CB<sub>1</sub> 受容体のダウンレギュレーションや内因性カンナビノイド含有量の減少が起こるという報告もあり<sup>12)</sup>、うつ病における内因性カンナビノイドシステムの関与についての動物を用いた研究も行われている<sup>13)</sup>。

本研究では THC の精神作用の中でも特に意欲の低下

やうつ症状について調べるために、THC を投与したマウスに対して抗うつ薬のスクリーニングに用いられる強制水泳試験を行い、不動時間に対する THC の作用について検討を行った。

## 方 法

実験動物は、6 週齢（体重 20~30g）の ddY 系雄性マウス（九動）を用いた。餌（CE-2；日本クレア、東京）と水は自由に摂取できるようにした。飼育環境は、室温 23 $\pm$ 2℃、絶対湿度 60 $\pm$ 2% および 12 時間の明暗周期（7:00 AM 点灯）とした。

### 1. 試薬および調整方法

THC, CBD および CBN（九州大学薬用資源制御教室 正山征洋教授より供与）、SR141716（Sanofi Research）を 1% Tween 80（Difco laboratories, Detroit Michigan, USA）に乳化して用いた。

### 2. 強制水泳試験を用いた不動時間の測定

実験には、塩化ビニール製の円筒形の水槽を使用した。水槽は、直径 11cm、高さ 18cm であり、これに 25℃前後の水を床面から 10cm のところまで入れた。この水槽内でマウスを泳がせ、その時の行動変化を Micro-Act Scratching Test 1.03（Neuroscience Inc. 東京）で解析した。この装置は、マウスの前肢に微細かつ強力マグネットを装着し、その磁力線の変化によって発生するコイル電流を高感度 AC アンプで増幅し電位変換するものである。測定は 1 日目に 15 分間、2 日目に 5 分間の試行を行った。なお、本装置内でマウスが静止している時間を不動時間とした。

### 3. Open-field 法を用いた自発運動量の測定

Hall の Open-field 装置は、底面の直径 60cm、壁の高さ 50cm、壁の上縁の直径 80cm のバケツ状のもので、内面は灰白色に塗り、底面はほぼ等面積の 19 区画に線を引いたもので、装置の底面中心上の 80cm の高さに 100W の白熱電球を置き、装置内は常に一定の明るさに保っておく。マウスを装置の中心に静かに入れ、3 分間における ambulation（底面の区画を横切った回数）を専用の記録用紙（バケツの底面と同じ区画が描いてある）を用いて測定した。また、観察中に発現する、立ち上がり動作（rearing）、身繕い（grooming）、洗顔動作（preening）、排便（defecation）、排尿（urination）の回数も記録した。

### 4. Rota-rod 法を用いた協調運動の測定

Rota-rod 法の装置（Neuroscience Inc.）は直径 3

cm のプラスチック製の棒で、この上にマウスを回転方向と逆に頭を向けて乗せ、落下するまでの時間 (Latency to fall; sec) を測定した。薬物投与前に 5 および 15 回転 (5, 15rpm) において装置に慣れさせ、30 分以上時間を経て薬物実験を行った。観察時間は最大 120 秒とした。

## 5. 実験手続き

THC, CBD, CBN および SR141716 は腹腔内投与の 60 分後に強制水泳試験 2 日目における不動時間に及ぼす影響と運動機能に及ぼす影響を測定した。

## 6. 統計処理

強制水泳試験における不動時間は Bonferroni/Dunn の多重比較検討を行い、Open-field 法, Rota-rod 法は対応のない Student's *t*-test (unpaired *t*-test) を行った。

## 結 果

### 1. 強制水泳試験における不動時間に対する CB の作用

THC, CBD, CBN, SR141716 の強制水泳試験における不動時間に対する影響を検討した。その結果, THC 0.3, 1, 2 および 6mg/kg の腹腔内投与により有意な不動時間の延長がみられた (第 1 図)。一方, CBD および CBN は不動時間に影響を与えなかった (第 2, 3 図)。

### 2. Open-field 法を用いた自発運動量の測定

THC による不動時間延長が運動機能の低下によるもの

なのかどうかを明らかにするために、Open-field 法を用いた自発運動量の測定を行った。その結果, THC 1mg/kg の腹腔内投与は自発運動量を有意に増加させ, THC 6mg/kg 投与は自発運動量に影響を与えなかった (第 4 図)。

### 3. Rota-rod 法を用いた協調運動の測定

THC による不動時間延長が運動機能の低下によるものなのかどうかを明らかにするために、Rota-rod 法を用いた協調運動の測定を行った。その結果, THC 1 および 6mg/kg の腹腔内投与は協調運動に影響しなかった (第 5 図)。

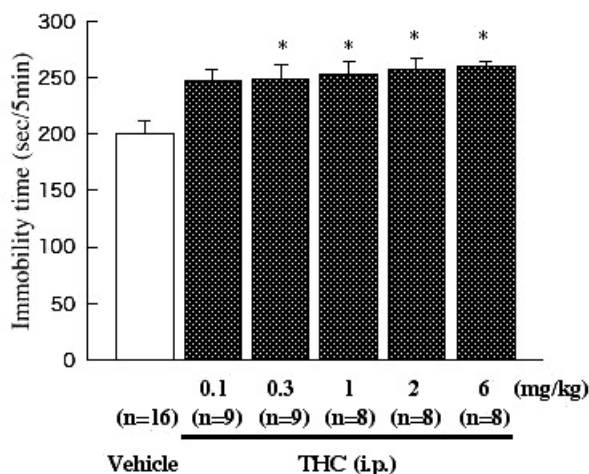


図 1 強制水泳試験における不動時間に対する THC の作用。投与 60 分後の不動時間に対する作用  
\**p* < 0.05 vs vehicle. (Bonferroni test).

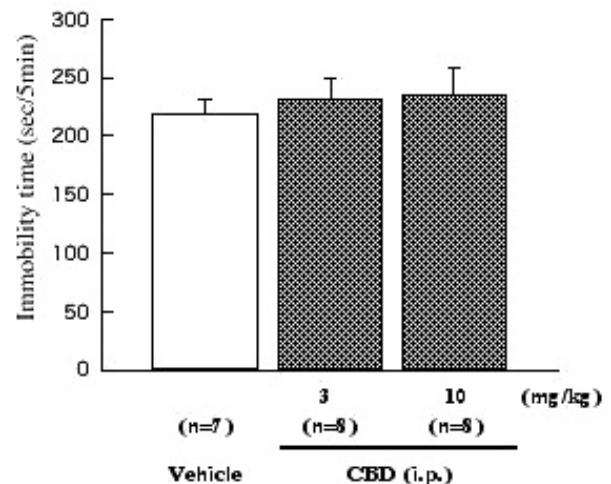


図 2 強制水泳試験における不動時間に対する CBD の作用。投与 60 分後の不動時間に対する作用 (Bonferroni test).

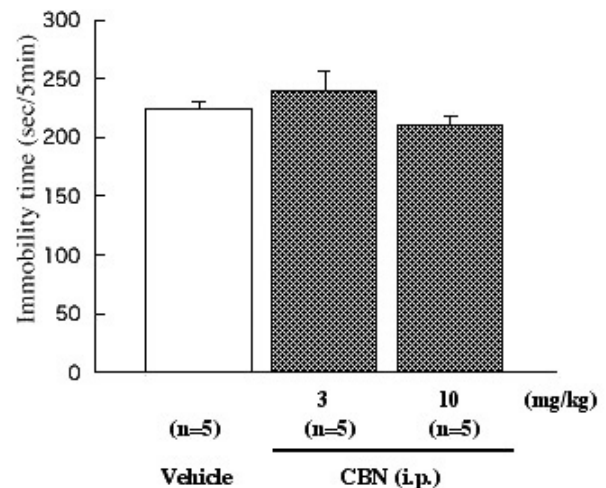


図 3 強制水泳試験における不動時間に対する CBN の作用。投与 60 分後の不動時間に対する作用 (Bonferroni test).

#### 4. THC による不動時間延長に対する CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の作用

THC 6mg/kg による不動時間延長に対する CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である SR141716 の作用を検討した。その結果、SR141716 は単独投与において不動時間に短縮傾向がみられたが、有意な差はみられなかった (第 6 図)。さらに、SR141716 は THC による不動時間延長を 3 mg/kg の用量において拮抗した (第 7 図)。

#### 考 察

今回、THC の精神作用の中でも意欲の低下やうつ症

状について調べるために、マウスの強制水泳試験における不動時間に対する THC の作用について検討を行った。その結果、THC 投与により有意な不動時間の延長作用がみられた。ヒトにおける研究では大麻摂取が抑うつや意欲低下を引き起こす臨床研究は数多くみられており<sup>1)-3)</sup>、今回、THC が強制水泳試験において不動時間延長作用を示したことは臨床報告と一致していた。THC の投与でマウスやラットにおいて、ストレスに関連する corticosterone の分泌が増加することが報告されており<sup>15)</sup>、ストレスはうつ病を引き起こすことから、今回の THC による不動時間延長にはストレスの関与が考えられる。一方、他の大麻成分である CBD および

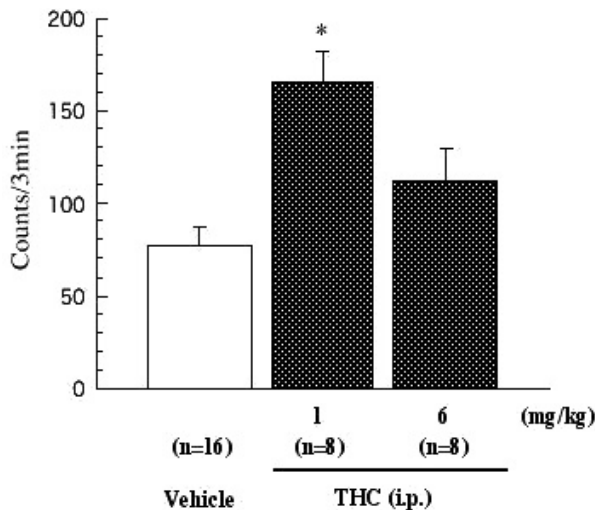


図 4 open-field 法を用いた自発運動量に対する THC の作用。投与 60 分後の自発運動量に対する作用 (Student's *t*-test)。

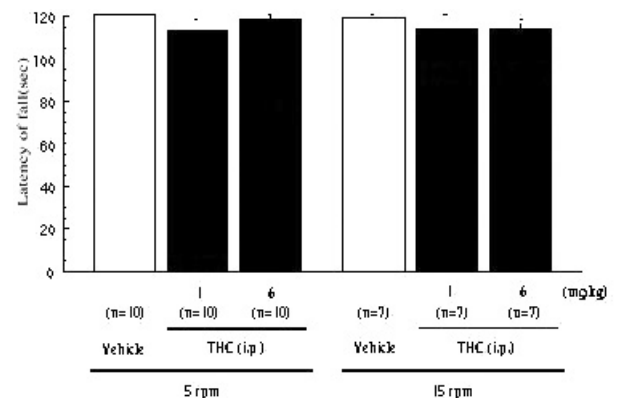


図 5 Rota-rod 法を用いた自発運動量に対する THC の作用。投与 60 分後の自発運動量に対する作用 (Student's *t*-test)。

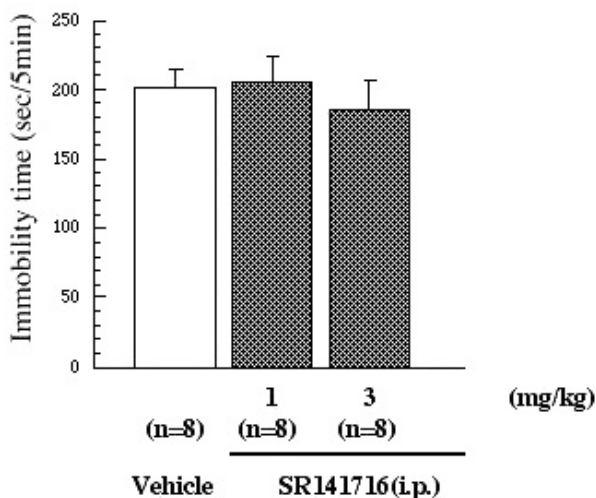


図 6 強制水泳試験における不動時間に対する SR141716 の作用。投与 60 分後の不動時間に対する作用 (Bonferroni test)。

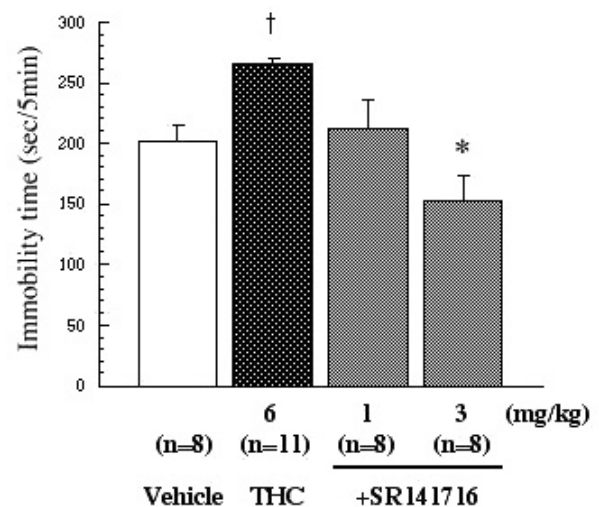


図 7 THC による不動時間延長に対する SR141716 の作用。投与 60 分後の不動時間延長に対する作用  
†*p* < 0.05 vs vehicle. \**p* < 0.05 vs vehicle. (Bonferroni test)。



CBN は不動時間に対して影響を与えなかった。ラットにおける研究でも、大麻成分の中で CBD および CBN は精神作用に対する影響は弱いことが報告されており<sup>14)</sup>、今回の強制水泳においても同様の結果が得られた。これらのことから、THC は大麻摂取による抑うつや意欲低下における活性成分であることが示唆された。

次に我々は、THC による不動時間延長作用が運動機能の低下によるものかどうかを明らかにするために Open-field 法を用いた自発運動量の測定と Rota-rod 法を用いた協調運動の測定を行った。その結果、THC 1mg/kg 投与により自発運動量の増加がみられた以外は何ら影響はみられず、不動時間に影響を与えられそうような自発運動量の低下は認められなかった。さらに、協調運動にも変化はみられず、不動時間延長は運動機能の低下によるものではないことが考えられた。THC は CB<sub>1</sub> 受容体に対して partial agonist として作用することが知られている<sup>16)</sup>。そこで THC による不動時間延長作用における CB<sub>1</sub> 受容体の関与について調べるために、CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である SR141716 の作用を検討した。その結果、SR141716 は単独投与では不動時間に有意な影響はみられなかったが、THC による不動時間延長を有意に短縮した。これらのことから、THC による不動時間延長は CB<sub>1</sub> 受容体を介していることが考えられた。ラットに慢性的なストレスを与えることで海馬における CB<sub>1</sub> 受容体のダウンレギュレーションや内因性 CB 量の減少がみられるという研究報告<sup>12)</sup> もあり、CB<sub>1</sub> 受容体はストレスやうつに深く関与していることが示唆された。これまでにヒトにおける研究では大麻摂取により、抑うつや意欲低下が引き起こされることが、数多く報告されているが、動物実験においては殆ど報告されていない。今回マウスにおいて運動機能を障害せず、強制水泳試験の不動時間を延長したという結果はヒトにおける大麻摂取が抑うつや意欲低下を生じることについて動物を用いて再現できる可能性を示唆している。今後、この動物モデルを用いて発現機序の解明を行っていきたいと考えている。

## 参 考 文 献

- 1) Mcglathlin WH and West LJ: marihuana problem: an overview. *Am J Psychiatry* 125 : 370-378, 1968.
- 2) Maugh TH: Marihuana: the grass may no longer be greener. *Science* 185 : 683-685, 1974.
- 3) Maugh TH: Marihuana (II): dose it damage the brain. *Science* 185 : 775-776, 1974.
- 4) Davene W. A., Dysarz F. A. 3<sup>rd</sup>., Johnson M. R., Melvin L. S., Howlett A. C., (1988) Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain., *Mol. Pharmacol.*, 34, 605-613.
- 5) Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C. and Bronner T. I., (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA., *Nature.*, 346, 561-564.
- 6) Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaa M., (1993) Molecular characterization of a peripheral for cannabinoids. *Nature.*, 365, 61-65.
- 7) Malilleux P., Vanderhaeghan J. J., (1992) Localization of cannabinoid receptor in the Human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons., *Neurosci. Lett.*, 148, 173-176.
- 8) Matsuda L. A., Bonner T. I., (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain., *J. Comp. Neurol.*, 327, 535-550.
- 9) Moldrich G., Wenger T., (2000) Localization of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor in the rat brain., *An immunohistochemical study. Peptides.*, 21, 1735-1742.
- 10) 矢部 武, (1998) 医療マリファナの軌跡, 亜紀書房.
- 11) Mato S, Robbe D, Puente N, Grandes P, Manzoni OJ. (2005) Presynaptic homeostatic plasticity rescues long-term depression after chronic Delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol exposure. *J Neurosci.* 14; 25(50) : 11619-27.
- 12) Hill M. N., Patel S., Carrier E. J., Rademacher D. J., Ormerod B. K., Hillard C. J., Gorzalka B. B., (2005) Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress., *Neuropsychopharmacology*, 30(3), 508-515.
- 13) Manzanares J, Uriguen L, Rubio G, Palomo T. (2004) Role of endocannabinoid system in mental diseases. *Neurotox Res.* ; 6(3) : 213-24.
- 14) Steger RW, Murphy LL, Bartke A, Smith MS. (1990) Effects of psychoactive and nonpsychoactive cannabinoids on the hypothalamic-pituitary axis of the adult male rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 37(2) : 299-302.
- 15) Manzanares J, Corchero J., Fuentes J. A. (1999) Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increased in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res.*, 839, 173-179.
- 16) Wiley JL, Jefferson RG, Grier MC, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. (2001) Novel pyrazole cannabinoids: insights into CB(1) receptor recognition and activation. *J Pharmacol Exp Ther.* ; 296(3) : 1013-22.

(平成18. 5. 9受付, 18. 6.27受理)