

大麻成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol による超音波発声に関する行動薬理学的研究

明瀬 孝之

福岡大学薬学部生体機能制御学教室 〒814-0180 福岡市城南区8-19-1

Behavioral study on Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced ultrasonic vocalization in rat

Takayuki Myose

Dept. Neuropharmacol. Fukuoka Univ. Sch. Pharm. Sci.

8 - 19 - 1 Nanakuma, Jonanku, Fukuoka 814 - 0180, Japan

Abstract

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) is known to have various pharmacological effects mediated through activation of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in rodents. In adult rats, 22- and 50-kHz ultrasonic vocalizations (USVs) serve as an effective communication system and as indicators of negative and positive states, respectively. The present study was performed to determine whether THC affects USVs in adult rats, and to determine the roles of cannabinoid receptors in these effects. THC (1, 3 mg/kg) was administered intraperitoneally to adult male Wistar rats 60 minutes before measurement of USVs. The CB₁ antagonist, SR 141716 (3, 6 mg/kg), or CB₂ antagonist, AM630 (1, 10 mg/kg), was administered intraperitoneally 10 minutes before THC. USVs were measured during a 5-minute period without air puff stimulus or with air puff stimulus. THC did not affect 22- or 50-kHz USVs without air puff stimulus. On the other hand, THC significantly increased the number of 22-kHz USVs, but not 50-kHz USVs, after air puff stimulus. Moreover, SR 141716 at 6 mg/kg, but not AM 630 at either dose, inhibited the increase in number of 22-kHz USVs induced by THC after air puff stimulus. These results suggest that THC induced changes in sensitivity to aversive air puff stimuli through CB₁ receptors, and as a result increased emission of 22-kHz USVs in rats.

keywords : Δ^9 -tetrahydrocannabinol, ultrasonic vocalization, CB₁ receptor, 22-kHz USV, air puff stimulus

【目的】

大麻 (cannabis, marijuana) は、2016年度、世界で約1億9千万人が使用していると推定される^[1]。我が国においても、平成25年以降大麻事犯による検挙者が年々増加し、昨年度、検挙者が3,000人を超えた^[2]。大麻は中毒性が低いと報告され、海外では治療薬や嗜好品として使用が拡大している。そのため、大麻使用に対して危険性がないという間違った安全神話が増えつつある。

ヒトの大麻喫煙時は、鎮痛、食欲亢進、口渇、目の充血など多様な身体作用を示す。その一方で、幸福感、幻覚、感覚異常、自発性の低下など精神的な作用を生じる^[5]。このように大麻は、多様な薬理作用をヒトで示す。しかし、大麻成分を用いた動物実験では、多幸福感、陶酔感、幻覚、感覚異常、口渇などの作用は報告されていない。このように大麻の薬理作用は、ヒトと動物で異なり未だに不明確である。

大麻草には、カンナビノイド (cannabinoid, CB) 類、テルペン類やアルカロイド類などの約740種類の成分が含まれている^[4]。その中でも2大活性成分として Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) 及びCannabidiol

がある。THCは、CB受容体の部分作動薬であり、投与量によって自発運動量、体温、感覚に対して二相性の作用を示す。加えて、大麻に含まれるTHC量は、年々増加しており^[5]、大麻の薬理作用もTHC含有量の増加に伴い変化していると考えられる。さらに大麻には、カンナビノイドを含む薬効成分が数多く含まれており、その多くが代謝活性物を持っている。そのため、大麻の薬理作用は複雑かつ変化しているために理解することが困難となっている。

ヒトが大麻を摂取すると、平衡感覚、空間感覚、視覚や聴覚など感覚に異常を生じる。そのため、音、接触、光などの外来刺激に対して過度の反応を示すことがある^[3]。これまで我々の研究では、大麻によるカタレプシー様不動状態において音や空気刺激を負荷すると、一瞬で不動状態が解けることや、von Frey test 及びPrepulse inhibition testにおいて、大麻は、接触刺激、音刺激に対する感覚を亢進することを観察している^[6]。このように動物においても大麻による感覚異常を生じることを明らかにしている。しかし、これらの実験は、拘束下で定量性がない主観的な評価であった。そこで我々は、ラットが発声する超音波に着目して、ラットの感覚機能を非侵襲的で客観的かつ定量性のある新規の評価系確立を行った。

超音波は、ヒトが感知できない高い周波数帯(20 kHz以上)の音である。齧歯類は、超音波発声(ultrasonic vocalizations)を介してコミュニケーションをとることが知られている^[7]。近年の超音波発声に関する研究から、ラットが発声する超音波は大きく3分類され、成熟期の高周波数帯および低周波数帯と、新生児期の高周波数帯がある。成熟ラットは、薬物や環境など様々な生体外刺激によって超音波を発声する特徴があり、嗜好性、ストレス反応、社会性・協調性の指標に用いられている。このようにラットの発声する超音波を測定することは、ラットの生理行動または情動行動を測定できる。

そこで我々は、ラットの発声する超音波を指標として、新たな行動評価の確立を行うために、ラットが超音波を発声する環境条件を検討し、発声状況、ソノグラムを詳細に解析し、実験条件の設定を行った。次に、新規の評価系を用いた大麻成分による感覚異常を検討した。

【実験方法】

1. ラットの超音波発声の特性と感覚機能を測定するための新規評価系の確立

実験動物は、8-10週齢(体重250～350g)のWistar系雄性ラット(九動)を用いた。測定環境として、新規環境提示装置、電気刺激負荷装置及び空気刺激負荷装置の3つの測定環境を用意した。新規環境提示は、飼育用チップ(ケアフーズ：ハムリー株式会社)を敷いたアクリルボックス(29×29×30cm)を用いて、ラットを装置内に入れた後、5分間超音波を測定した。電気刺激負荷装置は、床面に金属グリッド(全てのグリッドにおける通電を確認済み)を設置したアクリルボックス(22×30×26cm)と、SHOCK GENERATOR SCRAMBLER MODEL SGS-002(室町機械、東京)を用いて、ラットを装置内に入れ、0.5Aの電流を負荷した後、5分間超音波測定した。空気刺激負荷装置は、アクリルボックス(29×29×30cm)とair-puff stimulus(Neuroscience Inc. 東京)を用いて、ラットを装置内に入れ、空気刺激(設定圧力が0.3 MPa、口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)をラット背面へ向けて天井面の高さから1秒ごとに12, 24, 36回の連射を行い、その後、5分間超音波を測定した。

2. 空気刺激による低周波数帯の超音波発声に対する大麻成分THCの影響

実験動物は、8-10週齢(体重250～350g)のWistar系雄性ラット(九動)を用いた。

高頻度の空気刺激による検討では、測定前日に非空気刺激条件で5分間のPre試行を行い、全てのラットに低周波数帯の発現が無いことを確認し、高周波数帯の結果をもとに群分けを行った。その後、THCを腹腔内投与の1時間後から、1分間の馴化の後、36回の空気刺激(設定圧力が0.3 MPa、口径1 mmの

ノズルから100分の1秒間の噴射)を行い、直後5分間のラットの超音波を測定した。

高頻度の空気刺激による検討では、測定前日に12回の空気刺激負荷(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)後の5分間のPre試行を行い、全てのラットに低周波数帯の発現が無いことを確認し、高周波数帯の結果をもとに群分けを行った。その後、THCを腹腔内投与の1時間後から、1分間の馴化の後、12回の空気刺激(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)を行い、直後5分間のラットの超音波を測定した。

3. 大麻成分THCによる感覚異常におけるCB₁受容体の関与

実験動物は、8-10週齢(体重250~350g)のWistar系雄性ラット(九動)を用いた。高頻度の空気刺激による検討では、測定前日に非空気刺激条件で5分間のPre試行を行い、全てのラットに低周波数帯の発現が無いことを確認し、高周波数帯の結果をもとに群分けを行った。その後、CB₁受容体拮抗薬SR141716をラットの腹腔内に投与し、その10分後にTHC 10 mg/kgを投与した。THCを腹腔内投与の1時間後から、1分間の馴化の後、36回の空気刺激(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)を行い、直後5分間のラットの超音波を測定した。

低頻度の空気刺激による検討では、測定前日に12回の空気刺激負荷(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)後の5分間のPre試行を行い、全てのラットに低周波数帯の発現が無いことを確認し、高周波数帯の結果をもとに群分けを行った。その後、CB₁受容体拮抗薬SR141716をラットの腹腔内に投与し、その10分後にTHC 3 mg/kgを投与した。THCを腹腔内投与の1時間後から、1分間の馴化の後、12回の空気刺激(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)を行い、直後5分間のラットの超音波を測定した。

4. 低頻度の空気刺激条件下での大麻成分Δ⁹-tetrahydrocannabinolによるラットの低周波数帯の超音波発声増加作用に対するCannabidiolの影響

低頻度の空気刺激による検討では、測定前日に12回の空気刺激負荷(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)後の5分間のPre試行を行い、全てのラットに低周波数帯の発現が無いことを確認し、高周波数帯の結果をもとに群分けを行った。その後、THC及びCBDを同時に投与した。薬物を腹腔内投与の1時間後から、1分間の馴化の後、12回の空気刺激(設定圧力が0.3 MPa, 口径1 mmのノズルから100分の1秒間の噴射)を行い、直後5分間のラットの超音波を測定した。

5. 統計処理

統計処理には、一元分散配置分析後、Dunnett's testを用いて多重比較検定を行った。なお、危険率5%以下が認められる場合を統計学的に有意差ありとした。

【結果】

1. ラットの超音波発声の特性和感覚機能を測定するための新規評価系の確立

我々は各種刺激条件によって発声するラットの超音波を非拘束状況下で調べた。その結果、縦軸を周波数、横軸を発声時間で表すソノグラフより、広い周波数領域を持つノイズ音と、ラットの低周波数帯(20-30 kHz)で数百ミリ秒持続する超音波発声と、高周波数帯(45-100 kHz)で数十ミリ秒持続する超音波発声の3種類の波形が認められた(Fig.1A, B, C)。その中で、触覚刺激である空気刺激や痛覚刺激である電気刺激によって低周波数帯の超音波発声が増加し、加えて、両感覚刺激は負荷の強さに依存してそ

の発声回数を増加させた。また、各実験条件下で発声したノイズ音と超音波発声を、縦軸を発声時間、横軸を周波数とした分布図で示し、ノイズ音、高周波数帯及び低周波帯の超音波の特性を確認した (Fig.1D)。これらの結果から、ノイズ音、高周波数帯及び低周波帯の超音波の測定条件を設定した (Table.1)。また、これ以降の実験では、大麻による感覚機能の変化を評価するために、触覚刺激である空気刺激による低周波数帯の超音波発声を用いて以下の検討を行った (Fig.2)。

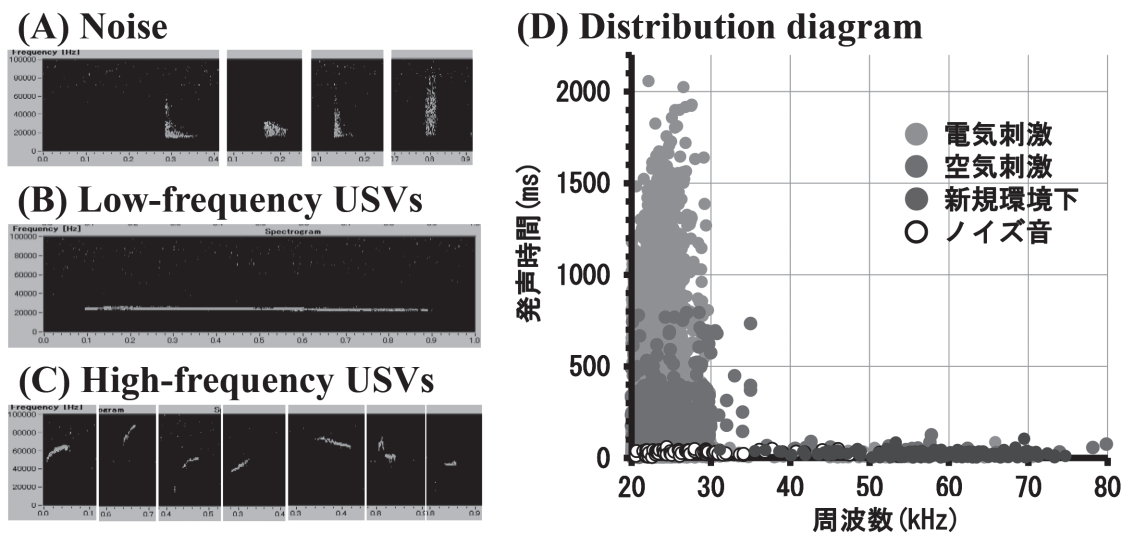


Fig.1 Waveform of noise (A), low (B) and high (C)-frequency USVs and, distribution diagram of ultrasonic wave under each experimental condition (D).

Table.1 Measurement conditions of ultrasonic vocalization

	低周波数帯 (22 kHz USVs)	高周波数帯 (50 kHz USVs)	運動に伴う ノイズの波形
波形の特徴	狭い周波数帯 長い発声時間	比較的幅のある周波数帯 短い発声時間	広い周波数帯に渡って 観測される短い音
観測周波数 (kHz)	15 ~ 30 kHz	45 ~ 100 kHz	15 ~ 45 kHz
発声時間 (ms)	100 ms 以上	100 ms 以下	100 ms 以下
音圧 (mV)	± 20 ~ 数百 mV	± 50 ~ 数百 mV	± 50 ~ 数百 mV

波形の例



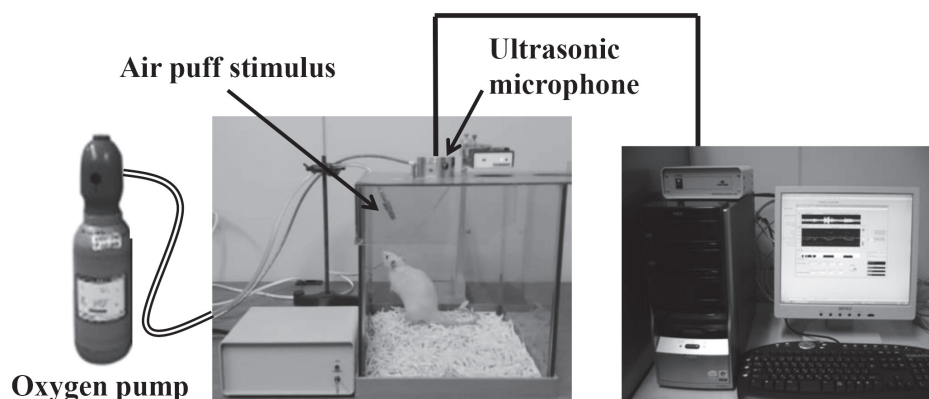


Fig.2 Measurement equipment for tactile function using air puff stimulus and ultrasonic vocalization.

2. 空気刺激による低周波数帯の超音波発声に対する大麻成分THCの影響

THCは、使用条件や環境条件によって薬理作用が変化することが知られている。そこで本実験では、空気刺激を負荷回数12または36回と刺激強度を変化させて、THCが感覚機能に対して作用を変化させるか検討した。その結果、THC 10 mg/kg は、36回空気刺激を加えた後に発声する低周波数帯の超音波の増加を有意に抑制した (Fig.3A)。一方、THC 3 mg/kg は、12回空気刺激を加えた後に発声する低周波数帯の超音波を有意に増加した (Fig.3B)。これらの結果から、THCは、触覚機能に対して鈍麻と鋭敏の相反する作用を示すことが明らかとなった。

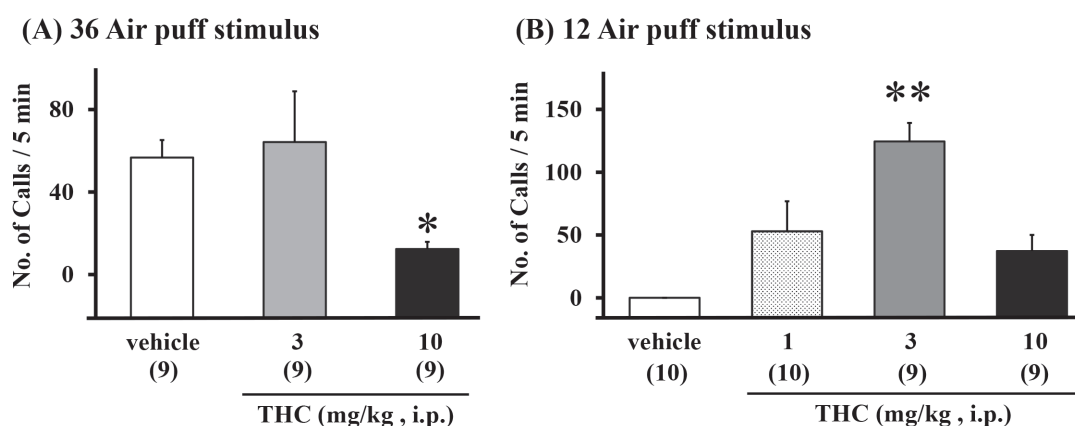


Fig.3 Effects of THC on low-frequency USVs after 36 air puff stimulus (A) or 12 air puff stimulus (B).

3. 大麻成分THCによる感覚異常におけるCB₁受容体の関与

これまでの研究から、THCはCB₁受容体に結合することで、体温低下、自発運動量の変化及び学習・記憶障害など中枢作用を発現することが知られている。そこで、THCによる触覚機能の変化にCB₁受容体が関与しているか検討した。その結果、CB₁受容体拮抗薬SR141716は、THCによる36回空気刺激条件下での低周波数帯の発声回数減少を有意に抑制し (Fig.4A)、一方、THCによる12回空気刺激条件下での増加した低周波数帯を有意に抑制した (Fig.4B)。これらの結果から、CB₁受容体は、THCによる触覚機能の鈍麻作用及び鋭敏作用の両方に関与していることがわかった。

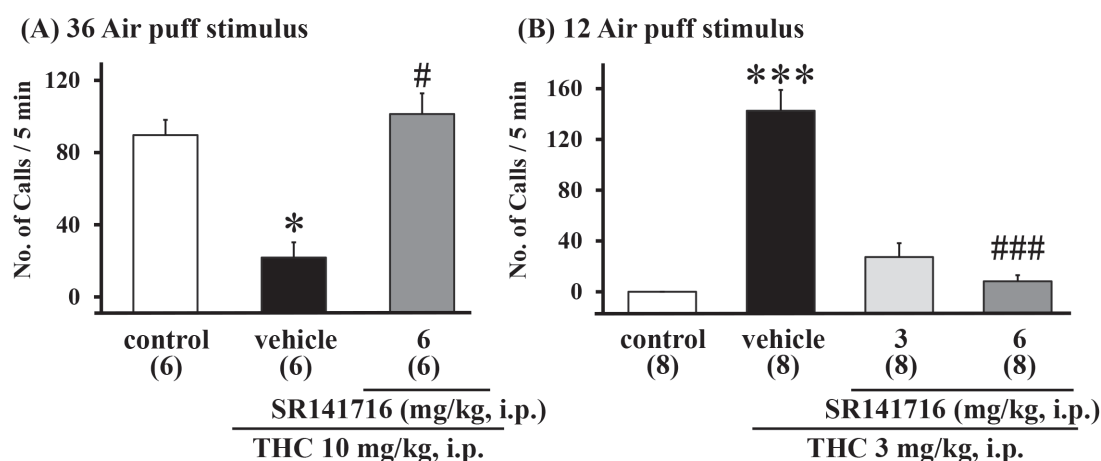


Fig.4 Effects of SR 141716 on increase in number of 22-kHz USVs induced by THC after 36 air puff stimulus (A) or 12 air puff stimulus (B).

4. 12回空気刺激条件下での大麻成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinolによるラットの低周波数帯の超音波発声増加作用に対するCannabidiolの影響

CBDは、THCによる精神作用を抑制し、一方で、THCによる鎮痛作用や食欲増進作用を増強するなど、THCと相互作用する代表的な大麻成分である。本研究では、CBDが、THCによる触覚過敏に対して影響するか検討した。その結果、CBD 3,10mg/kgは、12回空気刺激負荷条件下でのTHCによる低周波数帯の超音波発声の増加を抑制した。このことから、大麻に含まれるCBD量は、大麻による触覚異常を抑制する上で重要な要因であると考えられる (not data shown)。

【考察】

本章では、成熟ラットの超音波発声を利用した新たな感覚機能の評価系を確立するために、ノイズ波形と超音波発声波形の違いについて述べ、解析条件の設定を行った。ラットを実際に用いた新規環境提示時の検討では、歩行運動などによって発声すると思われるノイズが多数収録された。これらはソノグラム上では同時に周波数が20～90 kHzと広い周波数帯に渡って検出された。同時に、ラット50-kHz USVsと呼ばれる超音波発声が多く検出され、これらはソノグラム上では狭い周波数帯の中で様々な変化を伴った多彩なパターンで見られ、実際の数値としては32～75 kHzの範囲の音として現れた。さらに、これらノイズと50-kHz USVsは共通して、100 ms未満の長さの音として収録されたため、変換された数値上でこれらを区別するためには周波数による線引きが必要であった。そこで、それぞれの超音波の密集度合いや、混在する確率などを考慮した結果、今後は45 kHz以上の超音波を成熟ラットが発する高周波数帯の超音波発声として扱う事とした。一方、電気刺激及び空気刺激では、比較的低い周波数帯で発声時間の長い超音波がみられた。この超音波発声の音声情報の分布を見た時に、明らかに20～30 kHzの周波数帯に集中しており、またなおかつ100 ms以上の分布が多数検出された。よって今後は30 kHz以下かつ、100 ms以上の発声を低周波数帯の超音波として扱う事とした (Table.1)。

次に、設定した条件で、大麻による感覚異常を捉えるための評価系として、空気刺激下における超音波発声に対する大麻成分THCの影響について検討した。その結果、THCは、36回空気刺激による低周波数帯の発声を抑制し、一方、12回空気刺激による低周波数帯の発声を増加した。これらの結果から、THCは、

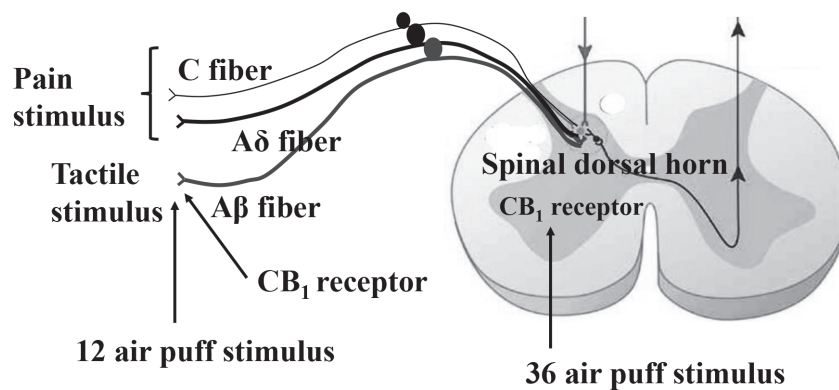


Fig.5 The hypothesis is that CB₁ receptors have different effects on tactile function depending on the expression site.

刺激の強度によって触覚機能に対して鈍麻作用と鋭敏作用の相反する作用を示すことが明らかとなった。さらに、CB₁受容体拮抗薬SR 11716とTHCの併用実験の結果から、THCによる触覚機能の変化にはCB₁受容体が関与していることが明らかになった。CB₁受容体は神経末端部分に発現し、神経伝達物質の放出調整に関わっている。THCは、CB₁受容体の部分作動薬であることが知られており、一般的に部分作動薬は、受容体の活性が高くなった時に抑制し、活性が低くなる時に増加する傾向にある。このことから触覚機能に対する相反する影響は、THCがCB₁受容体の部分作動薬であることが大きく関与していると考えられる。さらに、CB₁受容体は、中枢神経の末端を中心に発現していると考えられていたが、近年、皮膚表面や感覚神経の末端部分にも発現していることが報告されている。皮膚や感覚神経に発現するCB₁受容体の働きなどは未だ解明されていない。これまで脊髄後角部分のCB₁受容体は、THCによる痛覚の抑制に関与しており、末端からの感覚伝達を抑制すると考えられてきた。一方の本実験で見られたTHCによる触覚に対する過敏作用には、末梢のCB₁受容体が関与していることが示唆される (Fig.5)。

大麻草には700種類以上の有効成分が含有されており、それぞれの成分が相互作用（アントラージュ効果）することで、大麻草の薬理作用が変化すると考えられる。特に大麻成分の中で重要とされるのが、CBDとTHCである。CBDは、THCによる有害作用を抑制し、鎮痛や食欲増進といった薬理作用を増強するとされており、この相互作用を活かして、THCとCBDの合剤が、海外で販売されている^[8, 9]。そこで、本研究では、THCによる触覚機能の変化に、CBDを併用することで、作用に変化がみられるか検討した。その結果、CBDは、THCによる12回空気刺激に対する触覚過敏作用を抑制することが分かった。これは、大麻草による感覚異常を抑制するために、CBDの含有量が重要であることを示している。

本研究は、ラット超音波発声を用いて、非拘束下で簡便で客観的かつ定量性のある新規感覚機能の評価系として有用であることを示した。この評価系は、触覚機能の発現機序の解明やその新薬開発への応用が期待できる。また、大麻成分THCの薬理作用には感覚異常があることを動物実験レベルで明らかにし、大麻使用の危険性を示した。

【参考文献】

- [1] 世界保健機関 依存性薬物専門家委員会 (WHO / ECDD) 2018年 第4回資料
- [2] 警察庁薬物銃器対策課「平成29年度統計資料」

- [3] 世界保健機関 依存性薬物専門家委員会 (WHO / ECDD) cannabis report 2015
- [4] Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Oct; 30(10):515-27
- [5] Executive Office of the President of the United States of America. NATIONAL DRUG CONTROL STRATEGY 2016
- [6] Sano K, Mishima K, Koushi E, Orito K, Egashira N, Irie K, Takasaki K, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Uchida N, Egawa T, Kitamura Y, Nishimura R, Fujiwara M. Delta9-tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization is mediated by decreased 5-HT neurotransmission in the nucleus accumbens due to the action of glutamate-containing neurons. *Neuroscience.* 2008 Jan 24; 151(2):320-8.
- [7] Portfors CV. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 46(1):28-34 (2007)
- [8] Morgan CJ, Curran HV. Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. *Br J Psychiatry.* 2008 Apr; 192(4):306-7.
- [9] Morgan CJ, Schafer G, Freeman TP, Curran HV. Impact of cannabidiol on the acute memory and psychotomimetic effects of smoked cannabis: naturalistic study: naturalistic study [corrected]. *Br J Psychiatry.* 2010 Oct; 197(4):285-90.