

Measuring the bioactivity of phytocannabinoid cannabidiol from cannabis sources, and a novel non-cannabis source.

大麻由来の植物性カンナビノイド「カンナビジオール」と、大麻以外の新規由来の植物性カンナビノイドの生物活性を測定。

D. Cushing<sup>1\*</sup>, S. Kristipati<sup>2</sup>, R. Shastri<sup>2</sup>, & B. Joseph<sup>1</sup> 1: Peak Health Center, Los Gatos, CA

2: Endocrine BioTech, Newark, CA

## 概要

植物性カンナビノイドであるカンナビジオール (CBD) は、免疫学的に非常に多くの効果をもたらすことが示されています。CBDは、カンナビノイド受容体2 (CB2) との相互作用により、エンドカンナビノイドシステムに作用します。CBDとCB2の親和性 (私たちは生物活性と呼んでいます) は、臨床サンプルではほとんど検査されていません。私たちは、生物活性レベルの制御されていない変動が、多くのCBD実験を混乱させていると考えています。4つのパートからなる本研究では、CBD研究をより科学的にコントロールすることができる効率的な生物活性試験を検証します。このテストを用いて、異なる植物器官から得られたCBDの生物活性を比較するとともに、加工方法が生物活性の決定に役割を果たしているかどうかを調べました。また、Humulus Kriya (H. Kriya、米国特許第15/932,529号、2018年) と名付けられた、商業的な量のCBDを生産できる新規の非大麻植物の生物活性と加工要因を調べます。また、現在市場で販売されているいくつかのCBD単離/抽出物の生物活性をテストし、H. Kriyaの花序から抽出されたImmunAGというCBD製品と比較しています。その結果、植物の花序から抽出したCBDが最も高い生理活性を示すことがわかりました。次に、頂芽・葉、葉柄、最後に茎が続きます。H. KriyaはCannabis Sativaに似た生物活性プロファイルを持っていることがわかります。大麻ベースの市販CBD製品の生物活性レベルは非常に低く、ばらつきがあることがわかりました。ImmunAGでは有意に高い生物活性レベルが見られます。

近年、植物性カンナビノイドであるカンナビジオール (CBD) に関わる科学研究が非常に盛んに行われています (Burstein, 2015; Zuardi, 2008)。CBDは、好ましいとは言えないまでも、許容できる安全性プロファイルを持っているようで (Iffland, & Grotenhermen, 2017; Devinsky et al., 2016)、抗不安薬、抗うつ薬、抗精神病薬、抗けいれん薬、制吐薬、抗酸化薬、抗炎症薬、抗動脈硬化薬、抗腫瘍薬などの作用があることが示されています (Ligresti, De Petrocellis, & Di Marzo, 2016)。てんかん、不安、精神病、大脳基底核疾患の動物モデルにおいて保護作用があることが示されています (Ligresti, De Petrocellis, & Di Marzo, 2016)。また、抗がん作用も示されています (Pisantiら、2017年)。

CBDが作用する受容体のうち、カンナビノイド受容体2 (CB2) は、免疫系に最も偏在しており、よく研究されています (Malfitano, Basu, Maresz, Bifulco, & Dittel, 2014)。CB2は、NK細胞、B細胞、単球、CD4+細胞、CD8+細胞、T細胞、好中球に存在し (Malfitano, Basu, Maresz, Bifulco, & Dittel, 2014; Tanasescu, Gran, & Constantinescu, 2013; Pacher & Mechoulam, 2011)、カンナビノイドによる炎症やその他の免疫機能の制御の鍵となるメディエーターであると考えられています (Ashton & Glass, 2007; Xiong et al., 2012; Lunn et al., 2006; McKallip et al., 2002; McKallip, Lombard, Martin, & Nagarkatti, 2002)。

ここでは、CBDがCB2と相互作用する親和性を「生物活性」と呼んでいます<sup>1,2</sup>。これまで、CBDの生理活性を調べるには、高価で寿命の短い生物学的ツール（トランスフェクトしたCHO膜など）を使用してきました。CBDサンプルの生物活性をテストし、その後、臨床試験に使用する実験は、実施するには非常に高価で時間がかかるものでした。私たちは、生物活性レベルの制御されていない変動が、多くのCBD実験を静かに混乱させていると考えています。

CBDの生物活性のばらつきの要因は、これまで明らかにされていません。考えられるのは、植物内の器官の供給源と、抽出/加工方法です。これらの要因は、サプライヤーによって大きく異なります。CBDが伝統的に抽出されてきた植物であるCannabis Sativaを取り巻く多くの法的問題が、この特異性を助長しています。米国では、連邦政府がすべての大麻ベースのCBD抽出を禁止しているにもかかわらず（Mead, 2017）、いくつかの州政府は、大麻ベースのCBD製品の供給を認可する独自の法律を持っています（Cambron, Guttmanova, & Fleming, 2017）。州政府が資金提供している研究では、合法市場で栽培・使用されているものとは異なるカンナビノイドプロファイルを持つ大麻植物が利用されています（Vergara et al.）独立して運営されている、商業部門の民間組織が資金提供している研究では、独自のCBD単離物/抽出物を利用することが多いです（例えば、Frenchら、2017年）。これらを総合すると、法律、規制、慣行は、CBDの生物活性のばらつきの問題を強化しています。

本論文では、CBD研究をより科学的にコントロールすることを可能にする、より効率的な生物活性試験の検証を行います。大麻由来のCBDの生物活性の原因となる2つの要因、すなわちCBDが抽出される植物器官のソースと抽出方法を調べます。また、Humulus Kriya (H. Kriya、米国特許第15/932,529号、2018年)と名付けられた、商業的な量のCBDを生産することができる新規の独自の非大麻植物の生物活性、器官ごとの生物活性、および抽出方法を調べます。そして、現在市場で販売されているいくつかのCBD単離物/抽出物の生物活性をテストし、故意に制御された生物活性因子を持つH. Kriyaから抽出されたCBDと比較します。

### 実験1：新規性、有効性、拡張性のあるCBD生物活性試験

2014年にイスラエルのTikun Olam社から入手したAvidekelの植物から、音波分画と超遠心分離により高純度の天然由来のCBD分子を抽出した。このリファレンスサンプルに対して、組換えヒトCB2を発現させたCHO細胞の膜画分を用いて、[3h]-CP55940置換アッセイを行いました。さらに、MCA（米国特許第62,599,501号（2017年）に記載）の結合をこの参照サンプルについて試験しました。結果として得られた変位および結合値を、26のCBDサンプル（Natural Hemp Solutions, Atlanta Georgiaから取得）を比較する基準としました。

私たちは、26のサンプルについて、CHO CB2の結合とMCAの結合の間に相関関係があるかどうかを調べました。もしMCAの結合がCHO-CB2と相関していれば、より迅速で効率的なテストのためにMCAを代わりに使用することができます。

1 生物活性とは、リガンドが目的のターゲットに接触したときに生じる生体反応の強さを意味する。一般的に、生物活性の高いリガンドは、より顕著な効果をもたらす。生物活性は、物質が膜を通過して体内の目的の場所に到達するまでの拡散速度であるバイオアベイラビリティと混同してはならない。

2 CBDは、CB2受容体のアゴニストに強力に拮抗し（Pertwee, 2008; Thomas et al., 2007）、CB2のインバースアゴニストとしても機能することが示されている（Pertwee, 2008; Pertwee et al.）CBDは、[35S]GTPγSの結合とRhoの活性化を妨げるアンタゴニストとして作用し（Rybergら、2007年、Whyteら、2009年、Fordら、2010年）、Ca<sup>2+</sup>の動員を調節し（Laucknerら、2008年）、β-アレスチンの動員を調節する（Yinら、2009年）。CB2インバースアゴニズムは、免疫細胞の移動を阻止し、炎症を減少さ

せることができる(Lunn et al., 2006)。CBDは、マクロファージ、ミクログリア細胞、および好中球の移動を強力に阻害する(Walter et al., 2003; Sacerdote et al., 2005)。CBDによるマクロファージの走化性の阻害は、CB2選択的なアンタゴニストであるSR144528によって防ぐことができる(Sacerdote et al., 2005)。CBDは、ヒトCB2受容体を発現させたCHO細胞によるフォルスコリン刺激によるサイクリックAMP産生を強力に阻害する (Gauson, Stevenson, Thomas, Baillie, Ross, & Pertwee, 2007)。

## 結果

組換えヒトCB2と最も親和性の高いMCAの両方に対する結合親和性を、高純度のCBD分子が示す結合親和性に対する割合として表1に示しました。ピアソン相関分析を用いたところ、これらは高い相関関係にあることがわかりました（ピアソン係数=0.97）。このように、MCAを用いてCBDの生物活性を予測することはMCAを用いてCBDの生物活性を高い精度で予測することができます。

## 考察

私たちは、CBDの生物活性試験を成功させ、拡張可能な方法を検証しました。生物活性値は、我々が分離できた最も純粋なCBD分子のCHO-CB2結合と比較して、0と1の間の割合で表されます。数値が低いほど生物活性が低いこととなります。CBD分子の生物活性が0.5以下の場合、生物活性が1の分子の半分の強さでCBD-CB2の結合が観察されると考えられます。

## 実験2：植物の器官による大麻CBDの生物活性

生産者の間では、大麻の器官ごとにCBDの収量が異なり、花序が最も高い収量を示すことがよく知られています3。(しかし、異なる器官から抽出されたCBDの生物活性については、これまで調査されたことがありませんでした。

実験1で検証された生物活性テストを用いて、米国、インド、中国、チェコから入手した48種類の品種の大麻から4つの部位を調べました。花序、葉柄、頂芽/葉、茎の4つの部位を別々に試験しました。花序については、音波分画と超遠心分離を組み合わせて精製試料を得ました。また、冷溶剤抽出を用いて、花序、葉柄、頂芽/葉、茎からCBDを得ました。

## 結果

生物活性について、植物器官を唯一の因子とした1x5 ANOVAと適切なポストホック比較を行いました。生物活性の平均値と標準誤差をプロットしました。

Sample	MCA Affinity	CB2 Affinity
1	0.78	0.81
2	0.34	0.42
3	0.25	0.29
4	0.32	0.3
5	0.34	0.36
6	0.31	0.33
7	0.24	0.25
8	0.29	0.34
9	0.32	0.3
10	0.29	0.31
11	0.25	0.25
12	0.31	0.32
13	0.35	0.33
14	0.31	0.31
15	0.25	0.26
16	0.3	0.31
17	0.27	0.24
18	0.25	0.24
19	0.32	0.29
20	0.21	0.24
21	0.26	0.24
22	0.44	0.41
23	0.33	0.41
24	0.81	0.8
25	0.3	0.22
26	0.19	0.22
27	0.78	0.81

表1：CBD生産植物26種のMCA対CB2複合体の結合親和性。両者は高い相関関係にあった ( $r = .97$ )。

Leveneの検定では、臓器間の分散が不均一であることが示されました  $F(4,235) = 6.05, p < 0.001$ 。そのため、Wilcox (2012) によると、ロバストな ANOVA を実施しました。その結果、遠心分離機で抽出した花序CBD ( $M = 0.96, SD = 0.02$ )、溶媒で抽出した花序CBD ( $M = 0.86, SD = 0.04$ )、溶媒で抽出した花序CBD ( $M = 0.86, SD = 0.04$ ) の生物活性に有意な差が見られました。04)、葉柄から溶媒抽出したCBD ( $M = 0.54, SD = 0.03$ )、頂芽/葉から溶媒抽出したCBD ( $M = 0.4, SD = 0.04$ )、茎から溶媒抽出したCBD ( $M = 0.19, SD = 0.02$ )、 $F(4, 70.38) = 9885.21, p < 0.001$ 。(20%トリミングした平均値を上に表示した)。

ロバストな事後比較(Mair & Wilcox, 2016)により、CBDソースの各カテゴリ間に有意な差があることがわかりました。(各比較のpsihat値と、それに関連する信頼区間は表2を参照)。要約すると、最高の生物活性を持つCBDは各植物の花序に見られ、葉柄、先端の芽/葉、茎では生物活性が減少していました。芽、葉、茎ではそれぞれ生物活性が低下していました(図1参照)。

表2.生理活性のロバストワンウェイANOVAポストホック比較のPsihatと対応する信頼区間値(括弧内)。各ポストホック比較のPsihat値は、20%トリムド平均を用いて得られた。対応する95%信頼区間値は括弧内に示した。関連するすべてのp-値は<.001であった。

	Inflorescence	Petioles	Apical Buds/Leaves	Stalks
Inflorescence Centrifuge	-.205 [-.222 to -.187]	-.769 [-.781 to -.756]	-.669 [-.685 to -.654]	-.344 [-.360 to -.329]
Inflorescence		-.563 [-.583 to -.545]	-.464 [-.486 to -.443]	-.140 [-.161 to -.119]
Petioles			.099 [.082 to .117]	.424 [.407 to .441]
Apical buds/Leaves				.325 [.305 to .344]

## ヘンプ植物の生物活性

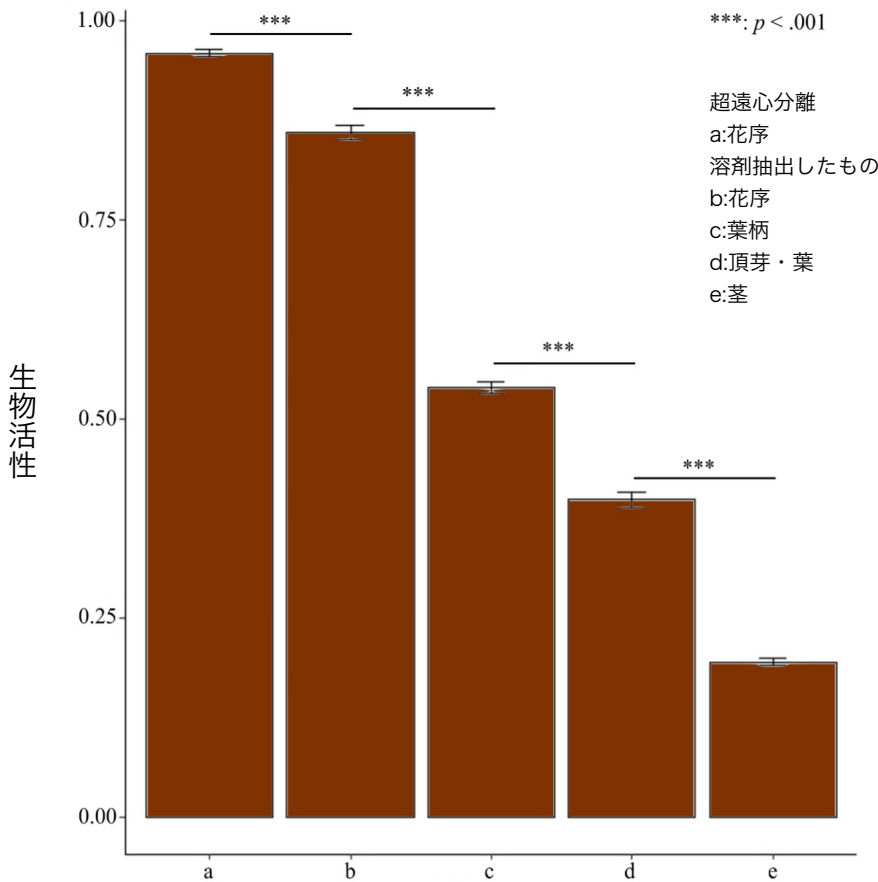


図1：生物活性が最も高いのは花序であるという、非常に正統的なパターンが現れています。CBDソースaは超遠心分離で得られた。CBDソースb,c,d,eは冷溶剤エタノール抽出で得られた。上に示した標準誤差は、統計的に最も保守的な推定値を示すために、トリムされていない平均値から得られたものです。

### 考察

今回の結果では、抽出方法による違いが見られました。音波分画と超遠心分離の組み合わせで、最も生物活性の高いCBDが得られました。音波分画と超遠心分離は、実験室での労力と設備を要する方法であり、大量生産には適していません。一方、エタノール溶媒抽出では、生物活性の低下はわずかですが、スケールアップが可能で、比較的安価に実施できます。そのため、CBDを商業的に生産する際には、エタノール溶媒抽出がはるかに一般的な手順となっています<sup>4</sup>。

エタノール抽出を行った植物の器官の中で、CBDの生物活性には正則的なパターンがあることが分かりました。生物活性は花序が一番高く、茎から抽出されたCBDよりも5倍の値を示しました。生物活性の高いCBDの生産には、花序のみを使用すべきです。商業的なCBDサプライヤーが、抽出前に植物の茎や樹皮からのバイオマスを混ぜた場合、製品の生物活性が低くなってしまうことがあります。

### 実験3：大麻ではない新規の植物由来のCBDの生物活性を調べる

CBDを生産するHumulusファミリーの植物を使って、Humulus Kriyaという新しい植物が開発されました。この植物はTHCを生産せず、GRAS (FDA Title 21, Volume 3, Sec 182.2- CAS 8060-28-4) とみなされる科の植物であり、FSSAI (インド食品安全基準局) から「食品成分」として認定されています。Scheduled Listの分類には該当しないはずですが。実験2と同じ方法で、H. Kriyaの各部位の生物活性プロファイルを検証しました。

### 結果

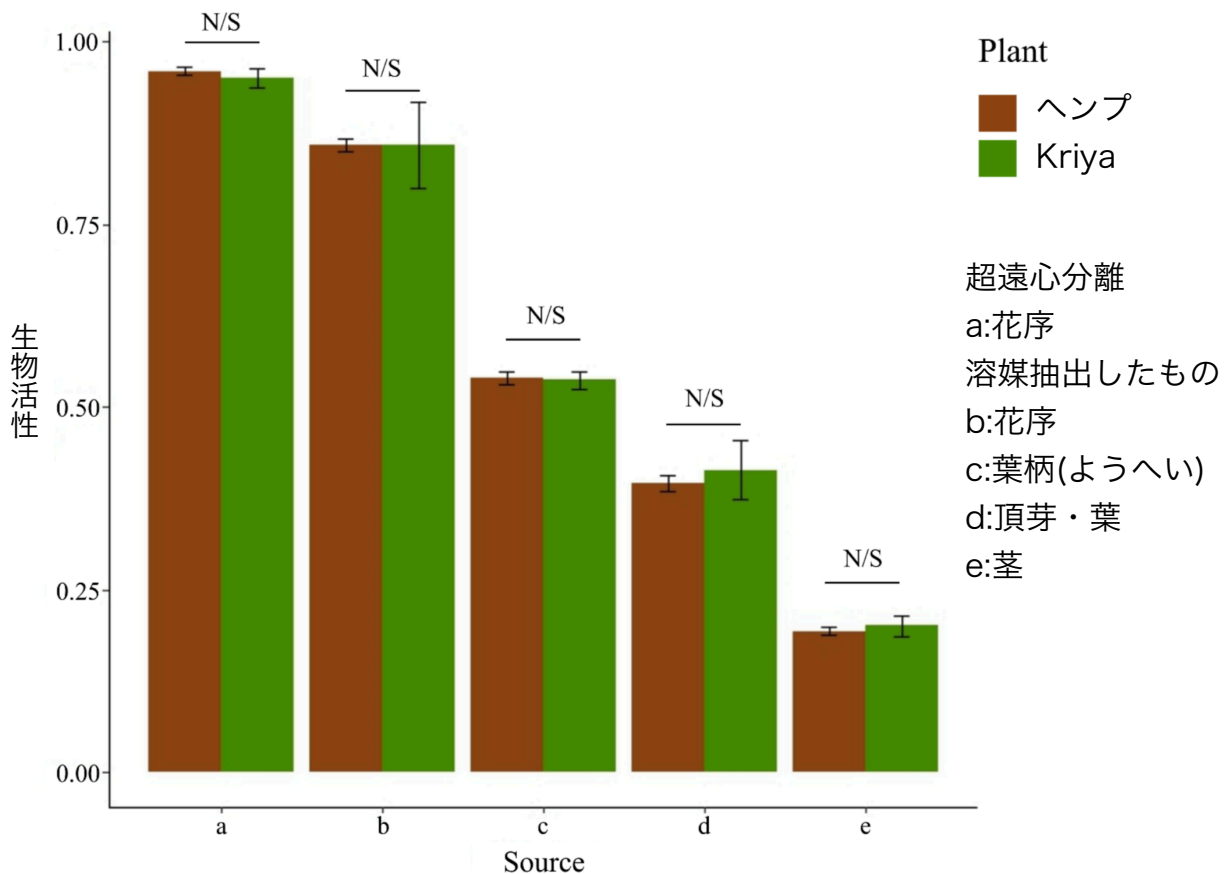
我々のサンプルは、インドのImmunAG LLPから提供された6つのH.Kriyaの植物 (ImmunAG, LLP, Indiaより提供) と、ImmunAGのオイル抽出物31サンプルです。

Welch's tを用いて、5つのグループのH. KriyaのCBD生物活性を大麻サンプルと比較しました (植物ごとに得られた個々の生物活性スコアは付録2に記載されています)。遠心分離したH. Kriyaの花序のCBD ( $M = 0.95$ ,  $SD = 0.01$ ) は、大麻サンプルと比較して生物活性に違いは見られなかった、 $t(8.6594) = 1.74$ ,  $p = 0.12$ 。溶媒抽出された花序のCBD ( $M = .86$ ,  $SD = .06$ ) は、差がなく、 $t(5.3803) = 0.007$ ,  $p = .99$ でした。溶媒抽出した葉柄のCBD ( $M = 0.54$ ,  $SD = 0.01$ ) は、 $t(14.123) = 0.373$ ,  $p = 0.715$ と差がありませんでした。溶媒抽出した葉のCBD ( $M = 0.41$ ,  $SD = 0.04$ ) は、 $t(6.164) = -1.0212$ ,  $p = 0.346$ と差がありませんでした。溶媒抽出した茎のCBD ( $M=0.20$ ,  $SD=0.01$ ) には差がなく、 $t(7.322) = -1.143$ ,  $p=0.289$ となりました。H. Kriyaは、我々がテストした大麻の系統と同一のCBD生物活性プロファイルを持っているように見えます。比較結果を図3に示します。

### 考察

我々は、植物の様々な部分から抽出されたCBDについて、H. KriyaとCannabisの間で同一のCBD生物活性を見出しました。H. Kriyaは、CBD研究のための実行可能なカンナビスの代替品であると思われます。H. KriyaのCBDは、THC混入のリスクがありません。インドの食品安全基準局から食品成分として認定されています。

## Kriya植物とヘンプの生物活性



### 実験4：市販のCBD製品の生物活性を調べる

市販のCBDサンプルの生物活性を調べられたことはありません。私たちは、過去2年間の市販の大麻ベースの製品の分析結果を公表します。これらのサンプルは、ベンダー（Natural Hemp Solutions、Centuria Foods、BSPG、Isodiol、Hammer Enterprises など）から直接私たちに送られてきたものと、サードパーティから送られてきたものです。私たちは、個々のベンダーの生物活性結果を意図的に公表せず、すべてのベンダーの生物活性結果を匿名でまとめて発表しました。

CBD以外にも多くのカンナビス分子があります。大麻/カンナビス以外からのCBDの供給源として発表されているのは、酵母とフムルスです。私たちはしばらく試みましたが、酵母から抽出されたCBDのサンプルを得ることができませんでした。私たちは、H. Kriya（ImmunAG）から抽出したCBDの生物学的活性をテストし、市販の大麻製品と比較しました。

### ImmunAGとヘンプ製品の比較

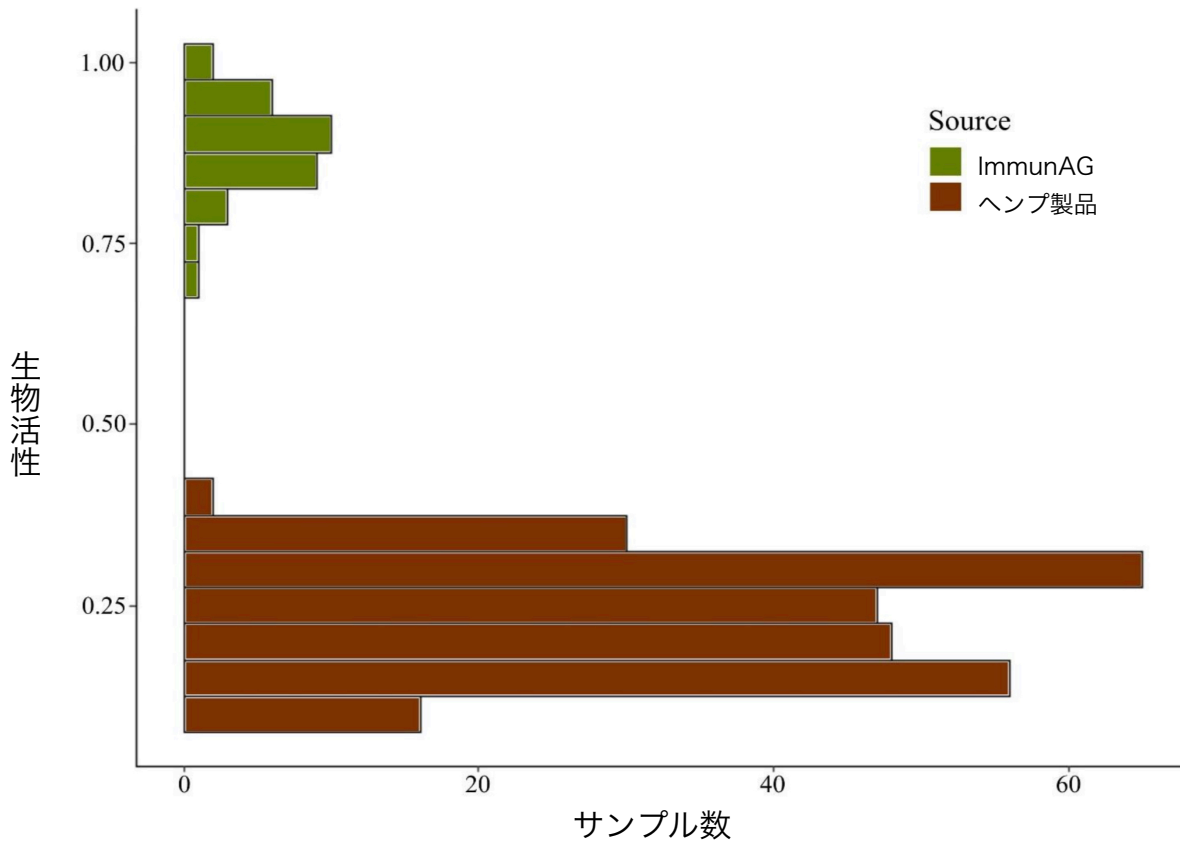


図3：H. KriyaベースのImmunAGは、ヘンプの市販品に比べ、すべてのサンプルで高い生物活性を示している。

### 結果

市販サンプルの生物活性の最小値は0.11、最大値は0.41でした。ImmunAGの生物活性の最小値は0.72で、最大値は0.98でした。両クラスの製品の生物活性スコアを図3に示します。

ImmunAGのCBD生物活性 ( $M = 0.88, SD = 0.06$ ) と市販品 ( $M = 0.23, SD = 0.07$ ) を比較したところ、Welch's tにより生物活性に有意な差があることがわかりました、 $t(41.288) = 53.41, p < 0.001$ 。



## 考察

市販のCBDの生物活性は低く、生物活性の低い器官である茎、幹、樹皮、葉と一致した値を示しました。これは、サプライヤーが規制を遵守し、質量を増やすために、茎、幹、葉を多く含むバイオマスを使用している可能性があります。注意しなければならないのは、生物活性の低いCBDは、望ましい強度の免疫学的細胞シグナルを生成しない可能性があるということです。市販されているCBDの生物活性もかなりばらつきがあり、最小で0.11、最大で0.41でした。最も高い市販のサンプルは、最も低いサンプルの約4倍の効力を持っていました。生物活性の低いCBDを放置しておく、医療行為や研究に支障をきたし、誤った結果を招く可能性があります。

ImmunAGのサンプルは、0.72から0.98の範囲で、最も低いImmunAGの生物活性は、最も高い市販のヘンプのCBDの生物活性よりも高い値でした。これは、ImmunAGがH. Kriyaの花序からのみ作られていることから、驚くべきことではありません。監査の結果、慎重に管理された加工条件が、ImmunAGが著しく高い生物活性を維持することを可能にしていることが明らかになりました。加工条件がCBDの生物活性に及ぼす影響については、次の論文で発表する予定です。

## 結論

モノクローナル抗体を用いてCBDの生物活性を測定することは可能であることがわかりました。植物の器官によって抽出されたCBDの生物活性は異なり、花序の生物活性が最も高く、茎・幹の生理活性が最も低いことがわかりました。私たちは、大麻に似た生物活性プロファイルを持つ、非大麻のCBD生産植物H. Kriyaを評価しました。市販されている麻・大麻由来のCBD製品は生物活性が低いことがわかりました。そのH.Kriyaを原料とした市販のCBD製品は、最も高い生物活性を持つことがわかりました。

CBDとCB2の相互作用は、幅広い免疫学的効果をもたらします。私たちが調査したサンプルは、生物活性のレベルが大きく異なっていました。私たちは、生物活性レベルが過去の研究結果を無意味に混乱させている可能性が高いと考えています。CBDを医学研究に利用する科学的研究では、生物活性レベルが最も高い製品を使用するように努めるべきです。