

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働科学特別研究事業)

MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに
精神依存発現メカニズムの解明

課題番号 : 38

研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 : 船田正彦

目次

I. 総括研究報告書	
MDMA及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明 -----	1
松田正彦	
研究-1: MDMA および 5-MeO-DIPT 精神依存性評価とその形成メカニズムの解明-----	4
研究-2: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究-----	15
研究-3: MDMA および 5-MeO-DIPT 使用経験者に対する聞き取り調査-----	25
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	47
III. 研究成果の刊行物・別冊-----	47

MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明

主任研究者: 船田正彦¹

研究協力者: 浅沼幹人²、宮崎育子²、周曉華¹、松原新³、和田清¹

(¹国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部、²岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学、³Rainbow Ring)

【研究要旨】

MDMA および脱法ドラッグ 5-MeO-DIPT の精神依存性と神経毒性の発現およびその脳内メカニズムを検討し、化学物質の乱用危険度を推測する動物研究の実験バッテリー構築を試みた。また、MDMA および脱法ドラッグの研究・評価の際の基礎資料を提供する目的で、それらの使用に関する臨床データの収集を試みた。1) MDMA および 5-MeO-DIPT の行動解析: MDMA および 5-MeO-DIPT の精神依存形成能は、マウスを使用し Conditioned place preference(CPP)法により評価した。MDMA および低用量の 5-MeO-DIPT で報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、高用量の 5-MeO-DIPT においては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPT は精神作用(精神病様作用)などの有害作用を有する可能性がある。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。2) MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性に関して培養細胞を使用して評価した。その結果、MDMA および 5-MeO-DIPT は細胞障害作用を有し、特に 5-MeO-DIPT は強力な毒性を有することが明らかになった。さらに、MDMA との併用は細胞毒性を増強させることから、5-MeO-DIPT と MDMA の併用は脳内ドパミン細胞に影響を与え、非常に危険であると考えられる。3) 脳内モノアミンに対する影響: 物質の乱用危険度を推測する実験バッテリー構築の一環として、脳内の生化学的マーカー同定を試みた。MDMA 投与後に、側坐核を分画し HPLC 法に従ってドパミンおよび代謝産物の含量を測定した。MDMA 投与により、ドパミンおよび 3-MT 含量の増加が確認された。4) MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現: MDMA 処置による側坐核の遺伝子発現変動をマイクロアレイ(3130 種)法で解析した。MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加(1.5 倍以上)し、90 個の遺伝子が低下(1.5 倍以下)していた。また、MDMA 処置による側坐核のタンパク質発現変動を二次元電気泳動法にて解析した。その結果、3 つのタンパク質で変動が確認された。MDMA によるタンパク質および遺伝子の変動については、単一のマーカーは同定できなかった。今後詳細な解析が必要である。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考に CPP 試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。加えて、現在までに指定された規制薬物を化学構造およびその効果から幾つかのタイプに分類し、CPP 法にて試験を行いタイプ別の評価系を確立する必要があると考えられる。また、物質の乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、脳内のドパミンおよびその代謝産物の変動が利用できると考えられる。薬物の神経毒性については、MDMA および 5-MeO-DIPT が神経毒性を有することが明らかになり、培養細胞系を利用した評価バッテリーは特に有用であることが示唆された。5) MDMA および脱法ドラッグの研究・評価の際の基礎資料を提供する目的で、MDMA および 5-MeO-DIPT 使用経験者に対する使用時の体験に関する聞き取り調査を実施した。症例例数が MDMA 6 例、5-MeO-DIPT 15 例で詳細な解析は困難であったが、薬物使用時の状況把握に役立つ貴重な資料となった。こうした物質の臨床作用を把握するためには、本調査研究のような ethnographic な質的調査が不可欠である。本研究はその意味で、わが国初の調査研究であり、今後、本調査研究のような作業が必要になる。

A. 研究目的

本研究では、MDMA および脱法ドラッグである 5-MeO-DIPT の精神依存性と神経毒性の発現に関する基盤的検討を行った。すなわち、MDMA および 5-MeO-DIPT の精神依存性と神経毒性の発現およびその脳内メカニズムを検討し、化学物質の乱用危険度を推測する動物研究の実験バッテリー構築を試みた(研究-1:MDMA および 5-MeO-DIPT 精神依存性評価とその形成メカニズムの解明、研究-2:MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究)。また、MDMA および脱法ドラッグの研究・評価の際の基礎資料を提供する目的で、使用時の体験に関する聞き取り調査を実施した(研究-3:MDMA および 5-MeO-DIPT 使用経験者に対する聞き取り調査)。

本研究を通じ、1) 物質の乱用危険性を推測する動物研究の実験バッテリー構築の可能性を検討した。また、2) 乱用危険性を予測しうる生化学的マーカー候補の検索を行った。さらに、3) 化学物質の乱用実態調査を通じ、その臨床作用の特徴について検討した。

B. 方法および結果

研究-1:MDMA および 5-MeO-DIPT 精神依存性評価とその形成メカニズムの解明

1) MDMA および 5-MeO-DIPT の行動解析:MDMA および 5-MeO-DIPT の精神依存形成能は、マウスを使用し Conditioned place preference(CPP)法により評価した。MDMA および低用量の 5-MeO-DIPT の条件付けで報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、高用量の 5-MeO-DIPT においては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPT は精神作用(精神病様作用)などの有害作用を有する可能性がある。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。2) 脳内モノアミンに対する影響:物質の乱用危険度を推測する実験バッテリー構築の一環として、脳内の生化学的マーカー同定を試みた。MDMA 投与後に、側坐核を分画し HPLC 法に従ってドパミンおよび代謝産物の含量を測定した。MDMA 投与により、ドパミンおよび 3-MT 含量の増加が確認された。3)

MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現: MDMA 処置による側坐核の遺伝子発現変動をマイクロアレイ(3130 種)法で解析した。MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加(1.5 倍以上)し、90 個の遺伝子が低下(1.5 倍以下)していた。また、MDMA 処置による側坐核のタンパク質発現変動を二次元電気泳動法にて解析した。その結果、3 つのタンパク質で変動が確認された。MDMA によるタンパク質および遺伝子の変動については、単一のマーカーは同定できなかった。今後詳細な解析が必要である。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考に CPP 試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。加えて、現在までに指定された規制薬物を化学構造およびその効果から幾つかのタイプに分類し、CPP 法にて試験を行いタイプ別の評価系を確立する必要があると考えられる。また、物質の乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、脳内のドパミンおよびその代謝産物の変動が利用できると考えられる。

研究-2:MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究

MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性に関して培養細胞を使用して評価した。その結果、MDMA および 5-MeO-DIPT は細胞障害作用を有し、特に 5-MeO-DIPT は強力な毒性を有することが明らかになった。さらに、MDMA との併用は細胞毒性を増強させることから、5-MeO-DIPT と MDMA の併用は脳内ドパミン細胞に影響を与え、非常に危険であると考えられる。薬物の神経毒性については、MDMA および 5-MeO-DIPT が神経毒性を有することが明らかになり、培養細胞系を利用した評価バッテリーは特に有用であることが示唆された。

研究-3:MDMA および 5-MeO-DIPT 使用経験者に対する聞き取り調査

MDMA および脱法ドラッグの研究・評価の際の基礎資料を提供する目的で、MDMA および 5-MeO-DIPT 使用経験者に対する使用時の体験に関する聞き取り調査を実施した。症例数 MDMA 6 例、

5-MeO-DIPT 15例で詳細な解析は困難であったが、薬物使用時の状況把握に役立つ貴重な資料となった。こうした物質の臨床作用を把握するためには、本調査研究のような ethnographic な質的調査が不可欠である。本研究はその意味で、わが国初の調査研究であり、今後、本調査研究のような作業が必要になろう。

C. 考察

MDMAおよび5-MeO-DIPTの精神依存形成能を、マウスを使用しConditioned place preference(CPP)法により評価した。今回の実験条件では、MDMAおよび低用量の5-MeO-DIPTの条件付けで報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、高用量の5-MeO-DIPTにおいては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPTは精神依存形成能を有し、さらに精神作用(精神病様作用)などの有害作用を併せ持つ可能性がある。

薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考にCPP試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。また、MDMAおよび5-MeO-DIPTの神経毒性に関して培養細胞を使用して評価した。その結果、MDMAおよび5-MeO-DIPTは細胞障害作用を有し、特に5-MeO-DIPTは強力な毒性を有することが明らかになった。さらに、MDMAとの併用は細胞毒性を増強させることから、5-MeO-DIPTとMDMAまたは覚せい剤の併用は脳内ドパミン細胞に影響を与え、非常に危険であると考えられる。物質の乱用危険度を推測する実験バッテリー構築の一環として、脳内の生化学的マーカー同定を試みた。MDMAによる脳内モノアミン含量に対する影響については、ドパミンおよび3-MT含量の増加が確認された。3-MTはドパミン遊離の指標になると考えられており、ドパミン遊離が中枢興奮作用および精神依存形成に関与していると考えられる。したがって、ドパミン含量および代謝産物の増加および減少は、中枢作用を反映しており、生化学的マーカーの一つとして有用であることが示唆された。MDMAによるタンパク質および遺伝子の変動については、単一のマーカーは同定できなかった。今後詳細な解析が必要である。また、本調査研究のような

ethnographicな質的調査データは、脱法ドラッグの流行予測などに利用できるものと考えられる。

D. 結論

薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考にCPP試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。加えて、現在までに指定された規制薬物を化学構造およびその効果から幾つかのタイプに分類し、CPP法にて試験を行いタイプ別の評価系を確立する必要があると考えられる。また、物質の乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、脳内のドパミンおよびその代謝産物の変動が利用できると考えられる。薬物の神経毒性については、MDMAおよび5-MeO-DIPTが神経毒性を有することが明らかになり、培養細胞系を利用した評価バッテリーは特に有用であることが示唆された。さらに、MDMAおよび脱法ドラッグの流行予測などの研究・評価の際の基礎資料を得ることは非常に重要であり、本調査研究のような ethnographic な質的調査が不可欠であろう。

化学物質の乱用実態調査を通じ、その物質の依存性および神経毒性に関する研究を迅速に行う総合的なシステムを構築する必要があると考えられる。

E. 健康危険情報

本研究は、依存性薬物と脱法ドラッグの依存性および神経毒性に関する研究であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

F. 研究発表

なし。

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

MDMA および 5-MeO-DIPT 精神依存性評価とその形成メカニズムの解明

研究担当者： 船田正彦（国立精神・神経センター 精神保健研究所 依存性薬物研究室長）

研究協力者： 周 曉華（国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

研究目的：MDMAおよび脱法ドラッグ5-MeO-DIPTの精神依存性の評価および依存形成の脳内メカニズム解析を行った。1) MDMAおよび5-MeO-DIPTの行動解析：MDMAおよび5-MeO-DIPTの精神依存形成能を、マウスを使用しConditioned place preference(CPP)法により評価した。今回の実験条件では、MDMAおよび低用量の5-MeO-DIPTの条件付けで報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、高用量の5-MeO-DIPTにおいては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPTは精神作用(精神病様作用)などの有害作用を有する可能性がある。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考にCPP試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。2) 脳内モノアミンに対する影響：物質の乱用危険度を推測する実験バッテリー構築の一環として、脳内の生化学的マーカー同定を試みた。薬物依存形成において重要な中脳辺縁系ドパミン神経系に着目し、主要投射先である側坐核をターゲットとした。MDMA(10 mg/kg)および5-MeO-DIPT(10 mg/kg)投与1時間後に、側坐核を分画しHPLC-EGD法に従って、ドパミンおよび代謝産物の含量を測定した。MDMAによる脳内モノアミン含量に対する影響については、ドパミンおよび3-MT含量の増加が確認された。3-MTはドパミン遊離の指標になると考えられており、ドパミン遊離が中枢興奮作用および精神依存形成に関与していると考えられる。したがって、ドパミン含量および代謝産物の増加および減少は、中枢作用を反映しており、生化学的マーカーの一つとして有用であることが示唆された。3) MDMAによる脳内遺伝子およびタンパク質発現：MDMA処置による側坐核の遺伝子発現変動をマイクロアレイ(3130種)法で解析した。MDMA投与によって、56個の遺伝子が増加(1.5倍以上)し、90個の遺伝子が低下(1.5倍以下)していた。また、MDMA処置による側坐核のタンパク質発現変動を二次元電気泳動法にて解析した。その結果、3つのタンパク質で変動が確認された。MDMAによるタンパク質および遺伝子の変動については、単一のマーカーは同定できなかった。今後詳細な解析が必要である。

薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考にCPP試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。加えて、現在までに指定された規制薬物を化学構造およびその効果から幾つかのタイプに分類し、CPP法にて試験を行いタイプ別の評価系を確立する必要があると考えられる。また、物質の乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、脳内のドパミンおよびその代謝産物の変動が利用できると考えられる。

A. 研究目的

近年、インターネット等の通信手段の普及により、薬物等の化学物質に関する情報伝播は非常に高速化し、その対象は不特定多数の広範囲になっている。それに伴い薬物等の化学物質の取引は容易かつ迅速になり、

幾つかの化学物質は乱用され重大な社会問題となっている。なかでも、法的規制を受けない化学物質である通称“脱法ドラッグ”や3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)に代表される“クラブ・ドラッグ”の乱用は若年層を中心に浸透しているのが現状である。一方、国内で流通が確認されている脱法ドラッグ

グやクラブ・ドラッグの精神依存性および神経毒性発現の有無に関する動物実験は実施されていない。こうした化学物質について、使用用量、期間、頻度および混入物質の有無などにより強力な精神依存性が生じる危険性や未知の毒性などが発現する危険性が存在する。そこで、覚せい剤などの依存性薬物との比較を通じ、脱法ドラッグやクラブ・ドラッグの依存形成の強度と神経毒性について明確にするのは緊急課題である。

本研究では、MDMA および脱法ドラッグである 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT)¹⁾ の精神依存性と神経毒性の発現に関する基盤的検討を行った。本研究を通じ、1) 物質の乱用危険性を推測する動物研究の実験バッテリーおよびガイドライン構築を目指す。さらに、2) 乱用危険性を予測しうる生化学的マーカー候補の検索を行った。今回の研究では、MDMA による脳内モノアミン、タンパク質および遺伝子発現レベルの変動に関する解析を行った。

薬物による遺伝子発現の変動を探索する方法として、開発された DNA chip 法(マイクロアレイ法)が注目されている²⁾。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っており、薬物依存形成の責任遺伝子の同定にも応用が期待できる。本研究では同一条件下で多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、MDMA の急性投与において変動する脳内遺伝子群のスクリーニングを試みた。脳内タンパク質の発現変動の検討は、多くのタンパク質の変動を一括で網羅的解析する目的で、二次元電気泳動法を利用した。

本研究を通じ、物質の乱用危険度を迅速に推測する動物研究の実験バッテリーおよび生化学的マーカー同定を試みた。本研究から得られる脱法ドラッグやクラブ・ドラッグ使用の危険性に関する科学的証拠は、将来的に乱用拡大につながる化学物質を迅速に特定し規制薬物指定への早期の対策が可能になる。

B. 方法

使用動物: すべての実験には、ICR 系雄性マウス(20-25g)を使用した。

1. MDMA、5-MeO-DIPT による運動活性への影響

MDMA(1-15 mg/kg, s.c.)および 5-MeO-DIPT(1-20

mg/kg, s.c.)により、誘発される運動活性を自発運動量測定装置(BR-AS01, バイオリサーチセンター社)を用いて検討した。

2. MDMA、5-MeO-DIPT の精神依存性評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP)法を用いた。白黒2区画の CPP 装置(ENS-CPP, Neuroscience 社)を用いて、MDMA(1-10 mg/kg, s.c.)もしくは 5-MeO-DIPT(0.5-10 mg/kg, s.c.)を1日おきに投与し、50 分間装置内に閉じ込め、6 日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である生理食塩液を投与し、薬物および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした(Table 1)。テストセッションは、7 日目に薬物および溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 1. MDMA、5-MeO-DIPT 条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎: 薬物、○: 溶媒、T: テスト(薬物、溶媒ともに処置せず)

3. MDMA、5-MeO-DIPT による脳内モノアミンに対する影響

MDMA(10 mg/kg, s.c.)もしくは 5-MeO-DIPT(10 mg/kg, s.c.)投与 1 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核(nucleus accumbens)を含む limbic forebrain を分画³⁾した(Figure 1)。

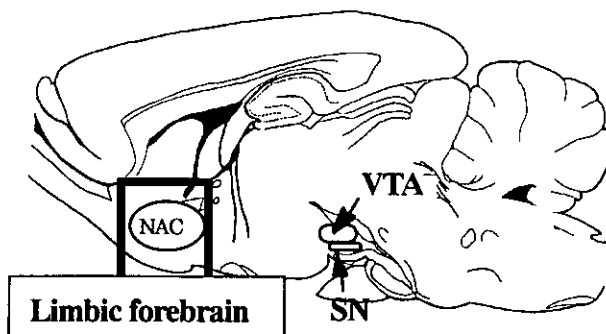


Figure 1. Diagram showing location of coronal section of limbic forebrain tested. VTA: ventral tegmental area, SN: substantia nigra, NAC: nucleus accumbens.

高速液体クロマトグラフ法に従い、内標準物質としてインプレテレンールを使用し、ドパミン、セロトニンおよびそれぞれの代謝産物の測定を行った。ドパミン代謝産物としては、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanilic acid (HVA)、3-methoxytyramine (3-MT)、セロトニンの代謝産物としては 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)を測定した。

4. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与 4 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核(nucleus accumbens)を含む limbic forebrain を分画²⁾し、mRNA の抽出を行った(Figure 1)。ラベル方法としては、プライマーとして oligo dT(18) primer (300 pmol) を使用し、polyA RNA を鋳型として reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3-dUTP および Cy5-dUTP を取込ませた。また、内部標準物質として lambda polyA RNA (50 pg)を反応時に等量ずつ添加した。遺伝子発現のスクリーニングはマウス由来既知遺伝子 4277 種の解析が可能である IntelliGene (Mouse CHIP Set II, 宝酒造: <http://www.takara-bio.co.jp/>)を用いて行った。Cy3 および Cy5 の各波長は、Affymetrix 428 Array Scanner により検出した。データの解析には、BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2.を用いた。Cy3-dUTP および Cy5-dUTP ラベルによる蛍光強度から scatter plot を作製し、内部標準物質として加えた lambda および house keeping (β -actin) 遺伝子の発現蛍光強度に対する変化率を算出し、1.5 倍以上の変動が認められた遺伝子群を抽出した。

5. 二次元電気泳動によるタンパク質発現解析

MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与 24 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核(nucleus accumbens)を含む limbic forebrain を分画した(Figure 1)。可溶化溶液でサンプル調整後、二次元電気泳動は Immobililine dry strip (pH 4-7, Amersham Biosciences 社)を使用し、等電点電気泳動を行った。二次元目は SDS-PAGE 9-18% アクリルアミド濃度勾配ゲルを使用して行った。泳動完了後、ゲルの染色は SYPRO Ruby 染色 (170-3125, Bio-Rad) により行った。

C. 結果

1. MDMA、5-MeO-DIPT による運動活性への影響

MDMA (5 および 10mg/kg)により著しい運動促進作用が発現し、中枢興奮作用を有することが示された(Figure 2)。また、5-MeO-DIPT (2mg/kg)において運動促進作用の発現が確認された。一方、5-MeO-DIPT (1,5 および 10mg/kg)においては運動量に著明な影響は認められなかった。

2. MDMA、5-MeO-DIPT の精神依存性評価

マウスを使用し Conditioned place preference (CPP)法による精神依存性の評価を行った(Figure 3)。MDMA (1-10 mg/kg, s.c.)もしくは 5-MeO-DIPT (0.5-10 mg/kg, s.c.)を投与し、50 分間装置内に閉じ込め、6 日間にわたって条件付けを行った。MDMA (5 および 10 mg/kg)および 5-MeO-DIPT (0.5 mg/kg)の条件付けによって CPP すなわち報酬効果が発現した。一方、5-MeO-DIPT (10 mg/kg)により著明な嫌悪作用が発現した。

3. MDMA、5-MeO-DIPT による脳内モノアミンに対する影響

薬物依存形成において重要な中脳辺縁系ドパミン神経系に着目し、主要投射先である側坐核をターゲットとした。MDMA (10 mg/kg)および 5-MeO-DIPT (10 mg/kg)投与 1 時間後に、側坐核を分画し HPLC-ECD 法に従って、ドパミン、セロトニンおよびそれぞれの代謝産物の含量を測定した(Figure 4)。MDMA 投与によりドパミン、3-MT 含量は有意に増加し、一方、DOPAC および HVA 含量は減少していた。セロトニン含量においては影響が認められず、代謝産物である 5-HIAA は減少していた。ドパミン遊離のインデックスと考えられる 3-MT/DA 比率は著明に増加していた。5-MeO-DIPT 投与では、ドパミンおよびセロトニン含量には影響は認められず、3-MT 含量のみが有意に減少していた。3-MT/DA 比率は減少していた。

4. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与 4 時間後の limbic forebrain における遺伝子発現変動を検討した。4277

種の遺伝子の発現変化を検討した結果、安定した発現量が認められた 3130 種の遺伝子群について変化率を算出した (Figure 5)。MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、90 個の遺伝子が低下 (1.5 倍以下) していた。変動が確認された遺伝子群を機能から 4 つに分類したところ、transcription factor に関する gene: 6-7%、signal transducer 関連 gene: 29-33% および enzyme 関連 gene: 30-40% 程度であった。また、機能が明確でない gene が 20-30% 含まれていた (Figure 6)。

5. 二次元電気泳動によるタンパク質発現解析

MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与 24 時間後に limbic forebrain におけるタンパク質レベルの変動を検討した。タンパク質発現の変動を二次元電気泳動法にて解析した結果、3 つのタンパク質の変動が確認された (Figure 7)。

D. 考察

MDMA および 5-MeO-DIPT の精神依存形成能を、マウスを使用し Conditioned place preference (CPP) 法により評価した。今回の実験条件では、MDMA および低用量の 5-MeO-DIPT の条件付けで報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、高用量の 5-MeO-DIPT においては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPT は精神作用 (精神病様作用) などの有害作用を有する可能性がある。MDMA で報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、5-MeO-DIPT においては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPT は精神作用 (精神病様作用) などの有害作用を有する可能性がある。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考に CPP 試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。

物質の乱用危険度を推測する実験バッテリー構築の一環として、脳内の生化学的マーカー同定を試みた。現在までに、依存性薬物による精神依存形成および中枢興奮作用の発現には中脳辺縁系ドパミン神経系の

関与が示唆されている⁴⁷⁾。そこで、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核を含有する limbic forebrain を標的部位として、脳内モノアミンに対する影響を検討した。MDMA 投与では、limbic forebrain においてドパミンおよび 3-MT 含量の増加が確認された。3-MT はドパミン遊離の指標になると考えられており⁵⁾、ドパミン遊離が中枢興奮作用および精神依存形成に関与していると考えられる。一方、5-MeO-DIPT 投与では 3-MT 含量の減少が確認され、嫌悪作用の発現に関与することが示唆された。したがって、化学物質投与による脳内ドパミン含量および代謝産物の増加および減少は、中枢作用を反映しており、その化学物質の乱用危険性を予測するための生化学的マーカーの一つとして有用であることが示唆された。

マイクロアレイ法は多数の遺伝子群から薬物投与で特異的変動を示す遺伝子を同定する手法として有用である⁶⁾。同様に、二次元電気泳動法はサンプルの総タンパク質から薬物投与で特異的変動を示すタンパク質を同定する方法として利用されている。こうした網羅的解析法は、薬物依存形成に関与する遺伝子およびタンパク質の発見に有用である。

本研究では、マイクロアレイ法により MDMA 急性投与により変動する遺伝子の検索を行った。その結果、遺伝子発現、細胞内情報伝達系制御および酵素に関連する遺伝子発現が変動していることが明らかになった。MDMA による遺伝子変動については、数が多く単一のマーカーは同定できなかった。同様に、二次元電気泳動法により、MDMA 急性投与により変動するタンパク質の検索を行った。その結果、3 つのタンパク質の変動が確認された。現在、これらのタンパク質に関して、その構造を解析中である。今回の結果からは、MDMA により変動する単一の生化学的マーカーは同定できなかった。

マイクロアレイによる解析から遺伝子発現を制御する遺伝子発現に変動が認められた。現在までに依存性薬物の慢性投与によって、遺伝子発現の調節機構に変化が生じていることが報告されており³⁾、こうした遺伝子に着目したカスケードの解析は興味深いと考えられる。今後は、それぞれの遺伝子およびタンパク質の発現変動の意義については、相互作用および慢性投与サンプルの解析なども含めて多角的に解析する必要があると考えられる。

E. 結論

薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。したがって、中枢興奮作用の発現用量を参考にCPP試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。加えて、現在までに指定された規制薬物を化学構造およびその効果から幾つかのタイプに分類し、CPP法にて試験を行いタイプ別の評価系を確立する必要があると考えられる。また、物質の乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、脳内のドーパミンおよびその代謝産物の変動が利用できると考えられる。今後は、網羅的解析システム(マイクロアレイおよび二次元電気泳動法)による遺伝子およびタンパク質の発現変動解析を行い、脳内生化学的マーカーの検索が重要である。こうした一連の評価システムにより、国内で流通が確認されている脱法ドラッグやクラブ・ドラッグの精神依存性の検討を行い、危険化合物の迅速な発見に活用できると考えられる。また、将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し規制薬物指定への早期の対策に有用であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Drug Enforcement Administration, Department of Justice. Schedules of controlled substances: temporary placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine into Schedule I. Final rule. Fed Regist. 68, 16427-1630, 2003.
- 2) Franklin K.B.J., Paxinos G.: The mouse brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego 1997.
- 3) Hope H.E., Nye M.B., Kelz D.W. et al.: Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of the altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatment. Neuron, 13, 1235-1244, 1994.
- 4) Pierce R.C., Kalivas P.W.: A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. Brain Res Brain Res Rev, 25: 192-216, 1997.
- 5) Ponzio F., Achilli G., Perego C., Algeri S.: Differential effects of certain dopaminergic drugs on the striatal concentration of dopamine metabolites, with special reference to 3-methoxytyramine. Neurosci. Lett. 27: 61-67, 1981.
- 6) Tanaka T., Jaradat S.A., Lim M.K.: Genomic-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97: 9127-9131, 2000.
- 7) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. Drug Alcohol Depend, 51: 141-153, 1998.

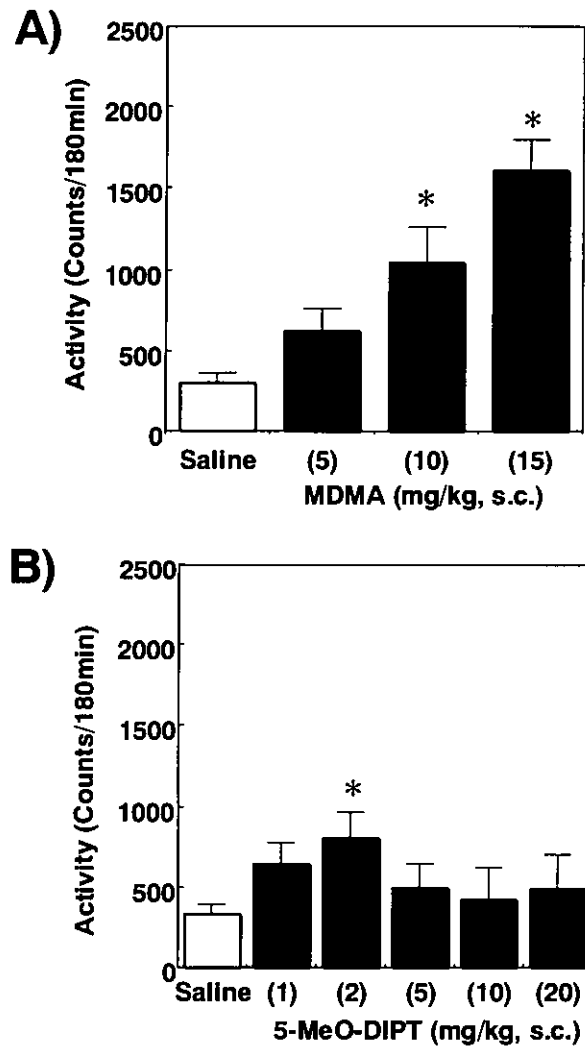


Figure 2. Effect of acute treatment with MDMA or 5-MeO-DIPT on the locomotor activity in mice. A) Total locomotor activity changes after acute administration of MDMA (5-15 mg/kg, s.c.) in mice. B) Total locomotor activity changes after acute administration of 5-MeO-DIPT (1-20 mg/kg, s.c.) in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 180 min after drug treatment.

*P<0.05 vs. saline-treated group.

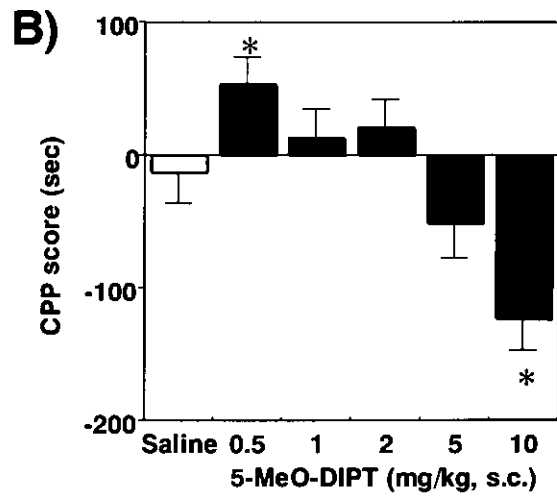
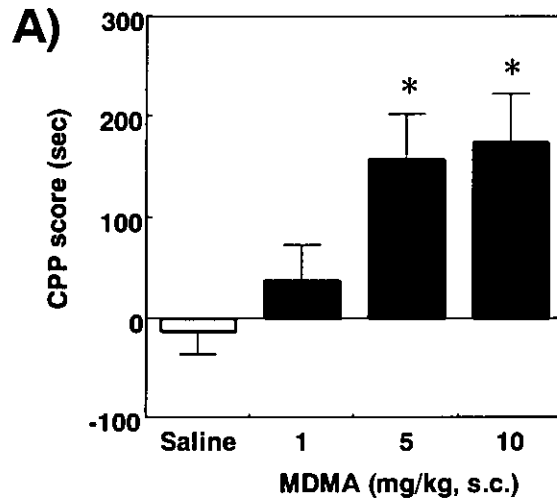


Figure 3. Effect of MDMA or 5-MeO-DIPT on place conditioning in mice. A) Place conditioning produced by MDMA (1-10 mg/kg, s.c.). B) Place conditioning produced by 5-MeO-DIPT (0.5-10 mg/kg, s.c.). Conditioning sessions (3 for drug; 3 for saline) were conducted. On day 7, test of conditioning was performed. Conditioning scores (CPP score) represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the saline-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 8 - 14 animals.

*P<0.05 vs. saline-treated group.

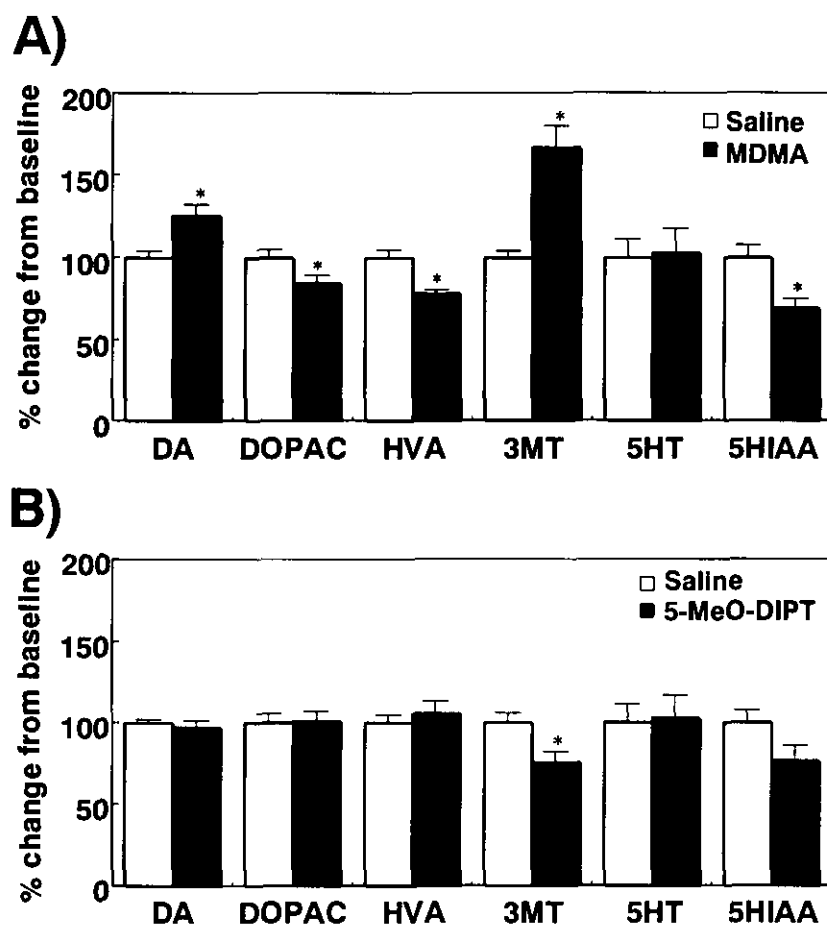


Figure 4. Effect of MDMA or 5-MeO-DIPT on monoamine level in the mouse limbic forebrain. Mice were sacrificed 60 min after MDMA (A, 10mg/kg, s.c.) or 5-MeO-DIPT (B, 10 mg/kg, s.c.) injection. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals.

*P<0.05 vs. saline-treated group.

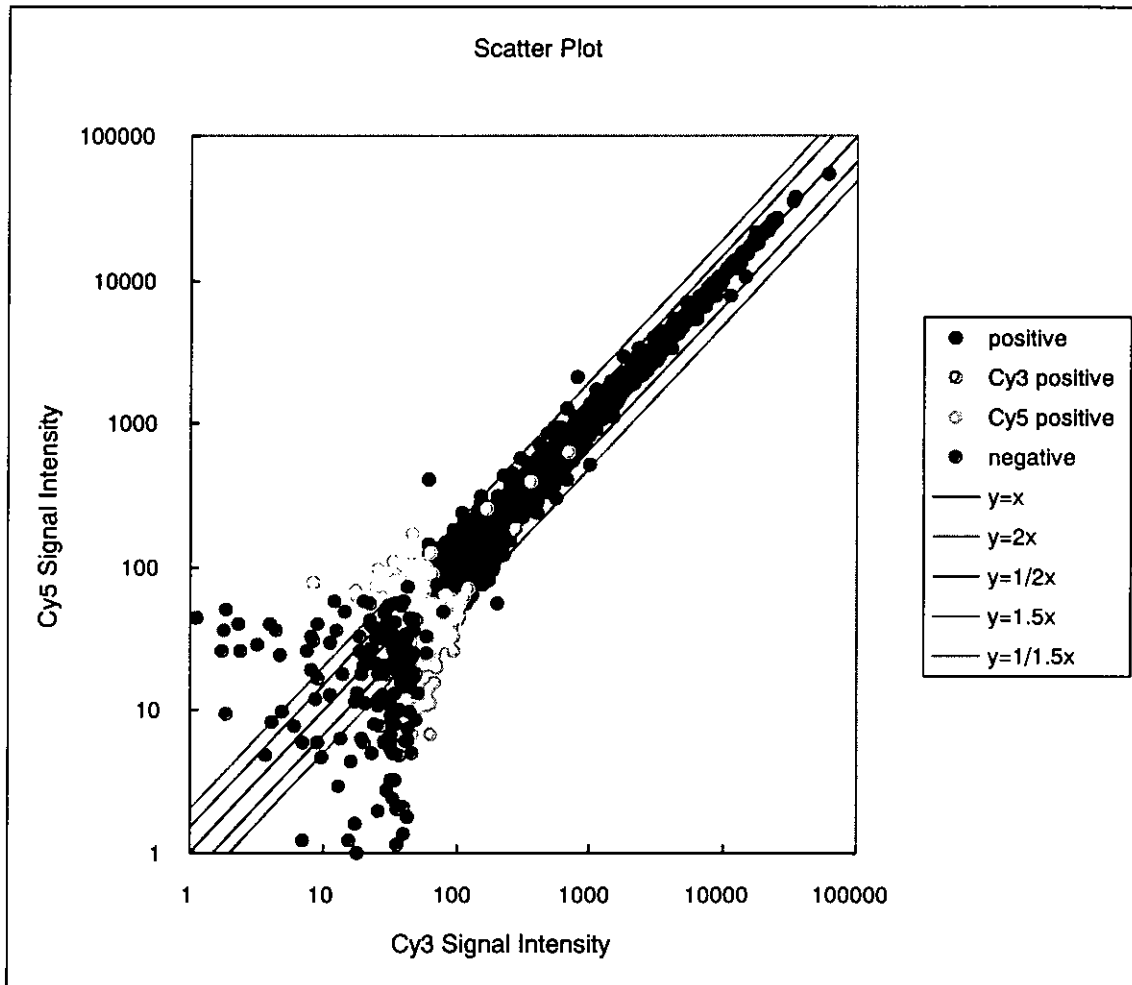
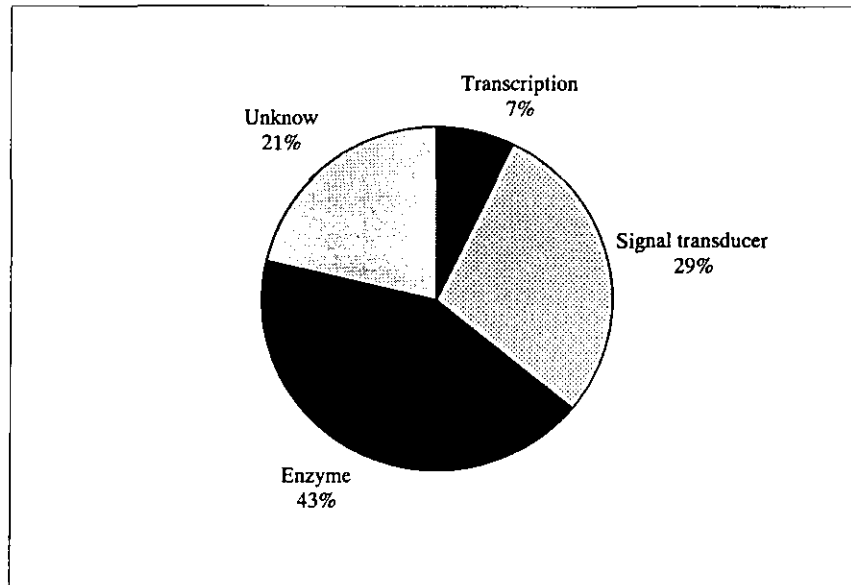


Figure 5. Expression profiling of 4277 genes between MDMA (Cy5) treatment and saline (Cy3) treatment in the mouse limbic forebrain. For each gene, average expression levels were calculated from two independent hybridization for the limbic forebrain, and displayed on a scatter plot.

A) MDMA-induced increases in gene expression



B) MDMA-induced decreases in gene expression

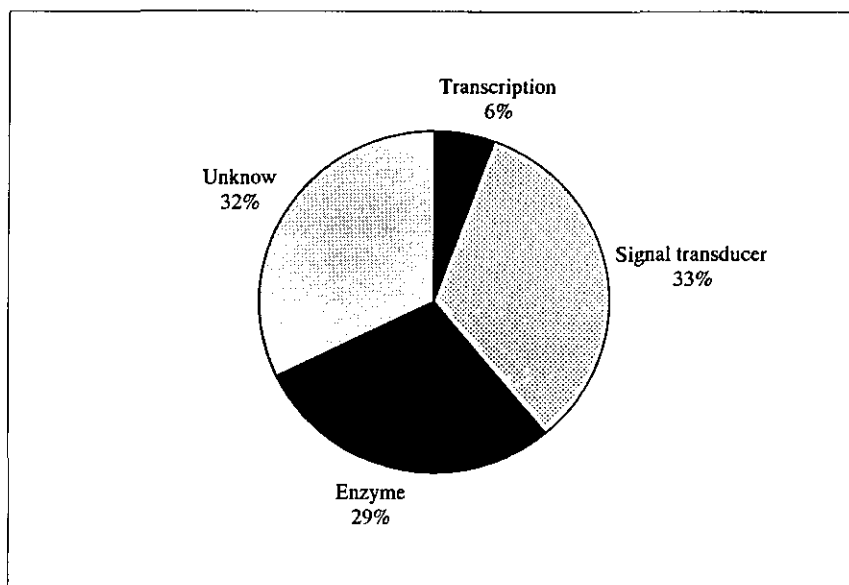


Figure 6. Profiling of MDMA(10mg/kg, s.c.)-induced changes in gene expression in the mouse limbic forebrain. 56 genes showed increase greater than 1.5-fold. 90 genes showed decrease greater than 1/1.5-fold. Each of these genes, including transcription factor, signal transducer and enzyme, were candidates to contribute to brain adaptation to MDMA.

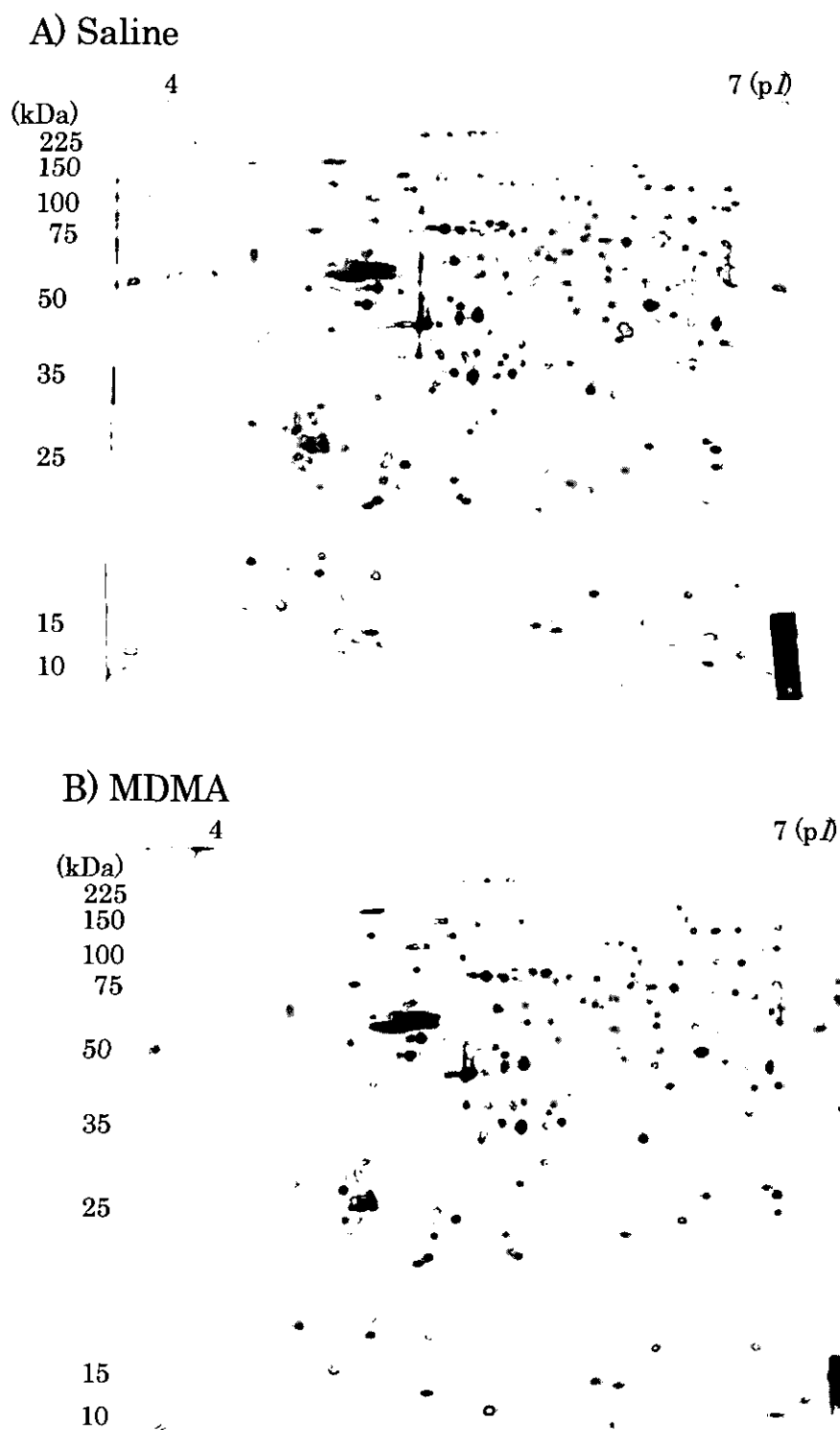


Figure 7. Effect of acute treatment with MDMA on the level of protein in the mouse limbic forebrain by two-dimensional gel electrophoresis. Mice were sacrificed 24h after MDMA (10mg/kg, s.c.) injection. Two-dimensional gel of test proteins stained with SYPRO Ruby.

MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究

研究担当者: 浅沼幹人(岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助教授)

研究協力者: 宮崎育子(岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学)

【研究要旨】

研究目的: 脱法ドラッグとして乱用が社会問題となっている 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT) のドパミン神経毒性ならびに MDMA およびメタンフェタミン(METH)との併用効果を明確にする。実験では、2 種のドパミン系細胞である B65 細胞および CATH.a 細胞を用い、5MeO-DIPT、MDMA および METH 単独暴露ならびに 5MeO-DIPT と MDMA および METH の併用暴露を行い、24 時間後の細胞毒性(LDH 放出量測定)、形態学的変化を検討した。結果: 5MeO 単独暴露によりいずれの細胞においても用量依存的な LDH 放出量の著明な増加が認められた。また、100 μ M から核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化がみられ、500 μ M 以上で著明な細胞死が惹起された。MDMA および METH 単独暴露では、1 mM 以上で一部にアポトーシス様形態変化が、2 mM 以上で LDH 放出量の増加が認められた。5MeO+METH の併用暴露では、両細胞ともに、単独では LDH 放出量増加のみられない濃度の MDMA および METH (500 μ M、1 mM)は 5MeO (500 μ M)による LDH 放出量の増加をさらに増強し、相乗効果がみられた。B65 細胞での形態学的変化については、単独では障害性のみられない MDMA および METH (500 μ M)は 5MeO (500 μ M)でみられる細胞死ならびにアポトーシス様形態変化を著明に増強した。結論: ドパミン系細胞では MDMA および METH が高濃度(1 mM 以上)の暴露により細胞毒性ならびに細胞死を惹起するのに対し、5MeO-DIPT は比較的低濃度(100 μ M 以上)でアポトーシス様細胞死を惹起しうることを明らかにした。また、5MeO-DIPT と MDMA もしくは METH との同時併用暴露により細胞毒性ならびにアポトーシスが相乗的に増強されることが判明した。この結果から、5MeO-DIPT と MDMA もしくは METH の同時乱用は強いドパミン神経毒性をもたらす、非常に危険であると考えられる。

A. 研究目的

5MeO-DIPT、MDMA、METH のドパミン神経毒性ならびにそれらの併用による神経毒性の変化を明らかにするために、2 種類のドパミン系培養神経細胞を用いて、5MeO-DIPT、MDMA、METH の添加ならびに 5MeO-DIPT と MDMA あるいは METH との同時添加を行い、細胞毒性ならびに形態学的変化をアポトーシスの有無も含め評価した。

B. 方法

1. ドパミン系神経細胞への 5MeO-DIPT 暴露

ラットドパミン系神経細胞株 B65 細胞(3.1×10^4 cells/cm²)およびマウス由来ドパミン含有細胞 CATH.a 細胞(1.0×10^5 cells/cm²)を用いて、継代

48 時間後(B65)および 24 時間後(CATH.a)に、5MeO-DIPT Lot.1 あるいは Lot.2 (最終濃度 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) を添加し、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性を培地中への LDH 放出量を測定し評価した。

2. 5MeO-DIPT のドパミン系神経毒性への MDMA 同時添加の効果

B65 細胞(3.1×10^4 cells/cm²)および CATH.a 細胞(1.0×10^5 cells/cm²)をそれぞれ 48 時間および 24 時間培養した。5MeO-DIPT (Lot.1)(最終濃度 100 μ M, 500 μ M) と MDMA (最終濃度 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM)を添加し、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性を LDH 放出量の測定により評価した。また、4% paraformaldehyde による固定の後、Hoechst33342

による核染色を行い、アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

3. 5MeO-DIPTのドパミン系神経毒性へのMETH同時添加の効果

B65 細胞(3.1×10^4 cells/cm²)および CATH.a 細胞(1.0×10^5 cells/cm²)を継代 48 時間後および 24 時間後に、5MeO-DIPT (Lot.1)(最終濃度 100 μ M, 500 μ M) と METH (最終濃度 250 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 4 mM)を添加した。添加後 24 時間培養し、形態学的変化を観察し、LDH 放出量を測定し細胞毒性を評価し、Hoechst33342 による核染色を行い、アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

C. 結果

1. ドパミン系神経細胞への 5MeO-DIPT 暴露

2 種類のドパミン系細胞 B65 細胞、CATH.a 細胞に 5MeO-DIPT Lot.1 あるいは Lot.2 を添加したところ、いずれの細胞においても 500 μ M 以上で LDH 放出量の著明な用量依存的な増加が認められた(Figure 1)。また形態学的には、100 μ M から障害がみられ、500 μ M 以上で著明な細胞死が惹起された。さらに、形態学的変化ならびに LDH 放出量について、5MeO-DIPT Lot.1 と Lot.2 による差異はみられなかった(Figure 1)。

2. 5MeO-DIPT のドパミン系神経毒性への MDMA 同時添加の効果

B65 細胞、CATH.a 細胞に 5MeO-DIPT (0-2 mM)、MDMA (0-2 mM)、5MeO-DIPT (0, 100 or 500 μ M)+MDMA (0-2 mM)を 24 時間暴露し、細胞生存率の指標となる LDH 放出量を測定し、まず B65 細胞で形態学的変化を観察した(Figure 2)。5MeO-DIPT 単独では、100 μ M から傷害がみられ 500 μ M 以上で著明な細胞死がみられた。MDMA 単独では、1 mM 以上の高濃度の暴露で細胞死がみられた。5MeO-DIPT+MDMA の同時添加では、単独では障害性のみられない MDMA (500 μ M)を 5MeO-DIPT (500 μ M)と併用すると、5MeO-DIPT (500 μ M)単独でみられる細胞障害がさらに増強さ

れた。

生化学的な細胞障害の指標として両細胞から培地中への LDH の放出量を測定した(Figure 3)。B65 細胞、CATH.a 細胞ともに 5MeO-DIPT 単独では、形態学的変化と同様に LDH 放出量は 500 μ M から用量依存的な増加がみられた。MDMA 単独添加の場合、1 mM 以下では LDH 放出量は不変で、2 mM で有意に増加した。5MeO-DIPT+MDMA の同時暴露ではとくに B65 細胞において、単独では障害性のみられない MDMA (50-500 μ M)を 5MeO-DIPT (500 μ M)と併用すると、5MeO-DIPT (50-500 μ M)単独でみられる LDH の放出をさらに増強し、相乗効果がみられた。

アポトーシスに特徴的な核の形態変化を見るために B65 細胞で Hoechst 染色(核蛍光染色)を行った(Figure 4)。5MeO-DIPT 単独添加では、100 μ M 以上から核の凝縮、分葉化といったアポトーシス様の形態変化が認められた。MDMA 単独暴露での細胞死についても、高濃度(1 mM)添加の場合の一部で同様のアポトーシス様の核の形態変化がみられた。単独ではアポトーシス様変化のみられない MDMA (500 μ M)を 5MeO-DIPT (500 μ M)と同時暴露すると、5MeO-DIPT (500 μ M)単独でみられるアポトーシス様変化がさらに増強された。

3. 5MeO-DIPTのドパミン系神経毒性へのMETH同時添加の効果

MDMA と同様に、2 種類のドパミン系細胞(B65 細胞、CATH.a 細胞)に 5MeO-DIPT (0-2 mM)、METH (0-4 mM)、5MeO-DIPT (0, 100 or 500 μ M)+MDMA (0-4 mM)を 24 時間暴露し、LDH 放出量を測定し、B65 細胞で形態学的変化を観察した(Figure 5)。METH 単独では、1 mM より細胞死が見えはじめ、2 mM 以上の高濃度の暴露ではじめて明らかな細胞死が認められた。5MeO-DIPT (500 μ M)と METH (500 μ M)を同時暴露すると、5MeO-DIPT (500 μ M)単独でみられる細胞死がさらに著明になった。

両細胞からの LDH の放出量についても MDMA と同様に検討した(Figure 6)。METH 単独暴露で

は、MDMA 単独添加の場合と同様に、1 mM 以下では LDH 放出量は不変で、2 mM 以上で有意に増加した。5MeO-DIPT+METH の併用暴露では、両細胞ともに、単独では LDH 放出量増加のみられない METH (500 μ M, 1 mM)を 5MeO-DIPT (500 μ M)と併用すると、5MeO-DIPT (500 μ M)単独でみられる LDH 放出量の増加がさらに増強され、相乗効果がみられた。

B65 細胞への 5MeO-DIPT と METH 添加後の Hoechst 染色での核の形態学的変化についても検討した(Figure 7)。METH 単独暴露では高濃度(1 mM)で一部に核の凝縮などのアポトーシス様の形態変化がみられた。単独では障害性のみられない METH (500 μ M)を 5MeO-DIPT (500 μ M)と併用すると、5MeO-DIPT (500 μ M)単独でみられるアポトーシス様変化が増強された。

D. 考察および結論

5MeO-DIPT、MDMA、METHのドパミン系神経細胞への暴露を行い細胞毒性について検討した結果、METHおよびMDMAが高濃度(1 mM以上, 24時間)の暴露によりLDHの放出といった細胞障害ならびに細胞死を惹起するのに対し、5MeO-DIPTは約1/10の比較的低濃度(100 μ M以上, 24時間)で細胞死を惹起しうることを明らかにした。また、METHでみられるドパミン神経細胞死は主に特徴的な核の形態変化を伴うアポトーシスであることから、アポトーシスに特徴的な核の形態変化をHoechst染色で検討した。その結果5MeO-DIPTおよび高濃度のMDMAは、高濃度のMETHと同様のアポトーシス様細胞死を惹起していた。これらより、5MeO-DIPTはドパミン神経細胞に対してMDMAやMETHよりも強い神経毒性を発揮すると考えられる。さらに、5MeO-DIPTとMDMAあるいはMETHとの同時併用暴露の検討により、単独暴露では障害性のみられない濃度のMDMAあるいはMETHを5MeO-DIPTと併用すると、5MeO-DIPTによる細胞障害(LDHの放出量)ならびにアポトーシス様の細胞死がさらに相乗的に増強されることが判明した。B65細胞では低濃度のMDMA (50, 100 μ M)と5MeO-DIPTとの併用においても相乗効果が認められたことから、5MeO-DIPTとMETHの併用に比べ、

5MeO-DIPTとMDMAの併用の方が同じ濃度では、よりドパミン神経毒性が強いと考えられる。これらの結果からも、5MeO-DIPTとMDMAあるいはMETHの同時乱用は強い神経毒性をもたらす、非常に危険であると言えよう。

E. 参考文献

- 1) Asanuma, M., Hayashi, T., Ordonez, S.V., Ogawa, N. and Cadet, J.L.: Direct interactions of methamphetamine with the nucleus. *Mol. Brain Res.*, 80: 237-243, 2000.

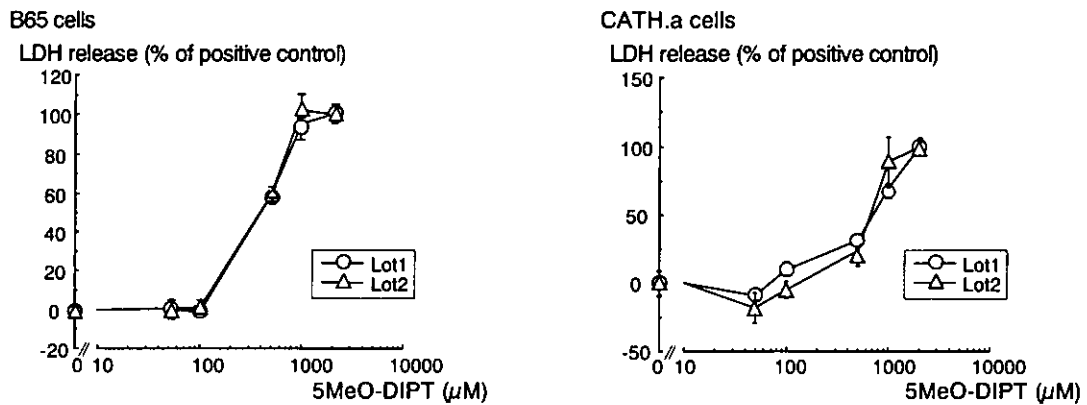


Figure 1. LDH release from dopaminergic B65 cells or CATH.a cells after 24-hour exposure to different lots of 5MeO-DIPT. Each value mean \pm SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control.