

2004-00016A

平成 16 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)

植物由来催幻覚成分の薬物依存性
および細胞毒性の評価

課題番号 : H16-特別-021

研究報告書

平成 17 年 3 月

主任研究者 : 船田正彦

平成 16 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)

植物由来催幻覚成分の薬物依存性
および細胞毒性の評価

課題番号：H16-特別-021

研究報告書

平成 17 年 3月

主任研究者：船田正彦

目次

I. 総括研究報告書	
植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価-----	1
主任研究者：船田正彦	
II. 分担研究報告書	
1) 植物由来催幻覚成分の薬物依存性評価システム構築に関する研究-----	7
分担研究者：船田正彦	
2) 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究-----	21
分担研究者：浅沼幹人	
3) サルビア葉およびその関連製品中の催幻覚作用成分-----	43
分担研究者：安田一郎	
4) ハルマラの栽培と催幻覚成分に関する研究-----	54
分担研究者：安田一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	61
IV. 研究成果の刊行物・別冊-----	62

植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価

主任研究者 船田正彦

(国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部 依存性薬物研究室長)

【研究要旨】

植物（ハルマラ）由来幻覚成分である *harmine* もしくは *harmaline* の精神依存性および神経毒性の発現を検討した。脱法ドラッグの乱用危険度と毒性を推測する評価システムの構築を試みた。また、植物由来催幻覚成分に関する鑑定・評価の基礎資料を提供する目的で、実際に販売されている植物（サルビアおよびハルマラ）に含有される催幻覚成分の精製単離およびその分析法の開発を試みた。1) 行動解析：規制薬物である *methamphetamine* (MAP)、*3,4-methylenedioxy-methamphetamine* (MDMA)、脱法ドラッグ *5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine* (5-MeO-DIPT) および *harmine* を投与し、運動量の測定を行った。MAP および MDMA の投与により、著明な運動促進作用が発現した。一方、*harmine* (1-20mg/kg) 投与では、用量依存的に運動抑制作用が発現した。薬物の精神依存形成能は、マウスを使用し *conditioned place preference* (CPP) 法により報酬効果を評価した。MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および *harmine* により報酬効果が発現し、精神依存形成能を有することが確認された。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もしくは低用量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：薬物投与 1 時間後に、側坐核を分画し HPLC 法に従ってドパミン、セロトニンおよび代謝産物の含量を測定した。MAP、MDMA および *harmine* 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。乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、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。また、*harmine* では側坐核、線条体、海馬および中脳においてドパミンの変動と比較して、セロトニンの著しい増加が確認された。したがって、*harmine* の中枢作用の発現にセロトニン神経系が重要な役割を果たしていると考えられる。3) MAP および MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現：MAP および MDMA 投与 4 時間後の側坐核における遺伝子発現変動をマイクロアレイ法で解析した。MAP および MDMA の投与により共通して *glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ) 発現レベルが増加していた。GILZ は中枢興奮薬の依存形成の危険性を予測する生化学的マーカーの 1 つである可能性が示唆された。また、MAP および 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、双方の薬物処置で共通の変動パターンを示す 3 つのタンパク質を同定した。MAP および MDMA による遺伝子およびタンパク質の変動については、そのマーカーとしての意義について今後詳細な解析が必要である。4) 細胞毒性の評価：ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とセロトニン系培養神経細胞 B65 細胞を用いて、*harmaline*、*harmine* の添加ならびに MDMA あるいは MAP との同時添加を行い、細胞毒性 (LDH 放出量測定) と形態学的変化を検討した。*Harmaline* あるいは *harmine* 単独暴露によりいずれの細胞においても、LDH 放出量の著明な増加が認められた。また、セロトニン系培養神経細胞においては、*harmaline* および *harmine* と MDMA もしくは MAP 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た。したがって、*harmaline* および *harmine* はドパミン系およびセロトニン系神経に対して強い毒性を有しており、特に MDMA もしくは MAP の同時乱用は強いセロトニン神経毒

性をもたらす危険性があると考えられる。5) 催幻覚作用成分の単離精製：サルビアの催幻覚作用成分とされるサルピノリンAをサルビア葉から抽出し、単離精製した。異なる店舗で購入したサルビア葉 4種は、いずれもサルピノリンA含量は0.3%前後とほぼ一定の値であった。また、濃縮サルビア製品について、サルピノリンA含有量を解析したところ、表示倍率とサルピノリンA含量に相関が全くないものがあった。表示倍率が必ずしも実際の含量を反映していないことから、不用意な使用によって強い幻覚作用を引き起こし、不慮の事故に発展する危険性は高いと考えられる。また、都内で購入した3系統のハルマラ種子について検討した結果、植物の花、葉、果実の形態から *Peganum harmala* L.と同定された。種子中の催幻覚成分を測定したところ、ハルマリン及びハルミンの含量は60~65mg/g 及び30~40mg/g であった。国内で販売されているハルマラ種子に、催幻覚成分が含まれていることが確認された。ハルマラ植物は、種子の発芽率は高く栽培は容易である。薬物としての興味から、ハルマラ栽培が今後国内で広がる恐れもあり、栽培規制、販売規制が必要ではないかと考えられる。脱法ドラッグは人工的に合成されたデザイナーズドラッグと植物系脱法ドラッグに分けることができる。本研究で実施した乱用危険度と毒性を推測する研究システムは、デザイナーズドラッグと植物系脱法ドラッグの双方の評価に有用であると考えられる。また、デザイナーズドラッグおよび植物系脱法ドラッグともに、主要成分の精製単離とその分析法開発の重要性が示された。脱法ドラッグの構造や性状を鑑定するシステムと、その乱用危険度と毒性を推測する研究システムの融合および連携が重要であると考えられる。こうした総合的な評価システムが、迅速に機能することにより、脱法ドラッグによる重大な健康被害の発生を未然に防ぐものと期待される。

分担研究者：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)

分担研究者：安田一郎
(東京都健康安全研究センター
医薬品部 研究科長)

A. 研究目的

脱法ドラッグの乱用は大きな社会問題となっている。脱法ドラッグとしては合成品であるデザイナーズドラッグと天然植物が乱用されており、特に、幻覚作用を発現する物質が主流となっている。天然植物は葉や茎などでの取引および種苗の状態での取引が可能であり、合成化学物質と比較してその入手は容易である。現在、多くの種類の幻覚成分含有の天然植物が取引されている。

こうした脱法ドラッグの特性を評価することは急務である。本研究では、植物（ハルマラ）由来幻覚成分である *harmine* もしくは *harmaline* の精神依存性および細胞毒性の発現を検討した。脱法ドラッグの乱用危険度と毒性を推測する評価システムの構築を試みた（分担1：植物由来催幻覚成分の薬物依存性評価システム構築に関する研究、分担2：植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究）。また、植物由来催幻覚成分に関する鑑定・評価の基礎資料を提供する目的で、実際に販売されている植物（サルビアおよびハルマラ）に含有される催幻覚成分の精製単離およびその分析法の開発を試みた（分担3：サルビア葉およびその関連製品中の催幻覚作用成分、分担4：ハルマラの栽培と催幻覚成分に関する研究）。

本研究を通じ、1) 物質の乱用危険性および神経毒性の発現を推測する研究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得る生化学的マーカー候補の検索を行った。さらに、3) 植物系脱法ドラッグ

グの催幻覚成分の鑑定および分析法の確立を行った。脱法ドラッグ規制に向け、迅速かつ総合的な薬物依存性および毒性評価システム構築に関する基盤研究を行った。

B. 研究方法

1. 植物由来催幻覚成分の薬物依存性評価システム構築に関する研究

植物（ハルマラ）由来幻覚成分である *harmine* もしくは *harmaline* の運動活性に対する影響と精神依存性を検討した。すべての実験にはマウスを使用した。1) 行動解析：規制薬物である *methamphetamine* (MAP)、*3,4-methylenedioxymethamphetamine* (MDMA)、脱法ドラッグ *5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine* (5-MeO-DIPT) および *harmine* を投与し、運動量の測定を行った。薬物の精神依存形成能は、*conditioned place preference* (CPP)法により報酬効果を評価した。2) 脳内モノアミンに対する影響： *Harmine* 投与後に、側坐核、線条体、海馬および中脳を分画し HPLC 法に従ってドパミン、セロトニンおよび代謝産物の含量を測定した。3) MAP および MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現：MAP および MDMA 投与 4 時間後の側坐核における遺伝子発現変動をマイクロアレイ法で解析した。また、MAP および 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。

2. 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究

神経毒性の評価：ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とセロトニン系培養神経細胞 B65 細胞を用いて、*harmaline*、*harmine* の添加ならびに MDMA あるいは MAP との同時添加を行い、細胞毒性 (LDH 放出量測定) と形態学的変化を検討した。また、*Hoechst33342* による核染色を行い、アポトーシス様の形態学的変化についても検討した。

3. サルビア葉およびその関連製品中の催幻覚作用成分

1) サルビア幻覚成分の単離精製：都内の店舗で購入したサルビア葉をサンプルとした。抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い分取 HPLC にかけた。2) 流通品の含量実態調査：分析方法は、HPLC-PDA を用いた。サルピノリン A は、保持時間及び UV スペクトルにより確認を行い、ピーク高さ法で定量した。

4. ハルマラの栽培と催幻覚成分に関する研究

種子の成分分析：植物材料は、都内で購入したハルマラ種子(H-1~3)の3系統と種子交換で導入した *P. harmala*(H-4~7)の4系統の計7系統を用いた。成分抽出後、TLC による確認試験を行った。ハルマリン及びハルミンの定量は、HPLC (ODS カラム) により行った。

C. 研究結果

1. 植物由来催幻覚成分の薬物依存性評価システム構築に関する研究

1) 行動解析：MAP および MDMA の投与により、著明な運動促進作用が発現した。一方、*harmine* (1-20mg/kg) 投与では、用量依存的に運動抑制作用が発現した。薬物の精神依存形成能は、マウスを使用し *conditioned place preference* (CPP)法により報酬効果を評価した。MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および *harmine* により報酬効果が発現し、精神依存形成能を有することが確認された。2) 脳内モノアミンに対する影響：MAP、MDMA および *harmine* 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。また、*harmine* では側坐核、線条体、海馬および中脳においてドパミンの変動と比較して、セロトニンの著しい増加が確認された。3) MAP および MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現：MAP および MDMA の投与により共通して *glucocorticoid-induced leucine zipper*

(GILZ) 発現レベルが増加していた。また、MAP および MDMA 双方の薬物処置で共通の変動パターンを示す3つのタンパク質を同定した。

2. 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究

Harmaline あるいは harmine 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、50 μM 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、100 μM 以上で著明な細胞死が惹起された。また、セロトニン系培養神経細胞においては、harmaline および harmine と MDMA もしくは MAP 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た。

3. サルビア葉およびその関連製品中の催幻覚作用成分

サルビアの催幻覚作用成分とされるサルピノリンAをサルビア葉から抽出し、単離精製した。異なる店舗で購入したサルビア葉4種は、いずれもサルピノリンA含量は0.3%前後とほぼ一定の値であった。また、濃縮サルビア製品について、サルピノリンA含有量を解析したところ、表示倍率とサルピノリンA含量に相関があるものと全くないもの、同一製品であってもサルピノリンA含量と他の含有成分が大きく異なるものがあった。

4. ハルマラの栽培と催幻覚成分に関する研究

都内で購入した3系統のハルマラ種子について検討した結果、植物の花、葉、果実の形態から *Peganum harmala* L. と同定された。種子中の催幻覚成分を測定したところ、ハルマリン及びハルミンの含量は60~65mg/g 及び30~40mg/g であった。

D. 考察

1. 薬物依存性評価システム構築

薬物の精神依存性を評価するシステム構築を試みた。MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および植物（ハルマラ）由来幻覚成分である harmine 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、MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および harmine 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。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から低用量側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ために、脳内の生化学的マーカー同定を試みた。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。MAP、MDMA および harmine 投与では、limbic forebrain においてドパミンおよび 3-MT 含量の著明な増加が確認された。特に、harmine 投与では著明な 3-MT 増加が発現した。化学物質投与による脳内ドパミン含量および代謝産物 3-MT の増加もしくは減少は、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。さらに、harmine では側坐核、線条体、海馬および中脳においてドパミンの変動と比較して、セロトニンの著しい増加が確認された。したがって、harmine の中枢作用の発現にセロトニン神経系が重要な役割を果たしていると考えられる。脳組織内のモノアミン量の測定は簡便かつ高感度であり、今後も脱法ドラッグの特性を判断する生化学的マーカーとして有用である。

マイクロアレイ法および二次元電気泳動法により、MAP および MDMA 急性投与により変動する遺伝子 (GILZ) およびタンパク質(3種)を同定した。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の発見や乱用危険性を予測するマーカーの同定に有用である。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。

2. 神経細胞毒性発現に関する研究

植物由来の脱法ドラッグ（ハルマラ）の催幻覚成分である *harmaline* および *harmine* のドパミン系神経細胞ならびにセロトニン系神経細胞への添加ならびに *MDMA* あるいは *MAP* との同時添加を行い、細胞毒性ならびに形態学的変化について検討した。

ドパミン系およびセロトニン系培養神経細胞では、*MDMA* および *MAP* が高濃度の暴露により細胞毒性ならびに細胞死を惹起し得るのに対して、*harmaline* および *harmine* は比較的低濃度(50 μM 以上)(IC_{50} : 200 μM 前後)で細胞死を惹起しうることを明らかにした。また、核染色による形態学的観察から、*harmaline* および *harmine* は核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を惹起することがわかった。これらより、*harmaline* および *harmine* はドパミン系およびセロトニン系神経に対して、規制薬物の *MDMA* や *MAP* よりもはるかに強い毒性を発揮すると考えられる。さらに、*harmaline*、*harmine* の *MDMA* あるいは *MAP* との併用暴露では、セロトニン系の B65 細胞において、単独では障害性のみられない濃度の *MDMA* あるいは *MAP* は *harmaline*、*harmine* 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を相乗的に増強することが判明した。しかし、このような *harmaline*、*harmine* の神経毒性の増強効果は、ドパミン系 CATH.a 細胞では認められなかった。これらの結果から、*harmaline*、*harmine* の *MDMA* あるいは *MAP* との同時乱用はセロトニン系神経細胞に強い神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。

3. サルビア関連製品中の催幻覚作用成分

サルビア葉から抽出したサルビノリンAを標準品として、サルビア葉およびその関連製品に含有されるサルビノリンAを定量した。

サルビア葉や濃縮サルビアの使用法やその品質自体が一定でないことが示された。流通品の表示倍率が必ずしも実際の含量を反映していないこと、使用量の表記が不確かであることなどを考え合わせると、不用意な使用によって強い幻覚作用を引き起こし、不慮の事故に発展する危険性は高いと考えられる。

4. ハルマラの催幻覚成分に関する研究

ハルマラ種子のハルマリリン及びハルミンの定量値は 60~65mg/g 及び 30~40mg/g であり、実際、催幻覚成分を含有していることが明らかになった。この分析値から人への作用量を試算した結果、2g 程度の種子の服用で幻覚作用が現れると考えられる。都内繁華街で市販されているこれらのハルマラ種子は、1包 5g 入りであり、この半分も服用すれば理論的には幻覚作用が現れることになる。ハルマラ種子の発芽率は高く、栽培が容易であることから、本植物の国内での蔓延が懸念される。ハルマラは栽培規制、販売規制の必要な植物と考えられる。

E. 結論

植物（ハルマラ）由来の催幻覚成分である *harmine* は精神依存形成能およびセロトニン神経系に作用して、細胞毒性を発現する危険性を有することが明らかになった。また、実際に販売されている植物中にも催幻覚成分が含まれていることが確認された。植物系の脱法ドラッグの危険性が明らかになった。

脱法ドラッグは人工的に合成されたデザインドラッグと植物系脱法ドラッグに分けることができる。本研究で実施した乱用危険度と毒性を推測する研究システムは、デザインドラッグと植物系脱法ドラッグの双方の評価に有用であると考えられる。

脱法ドラッグの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、薬物の神経毒性発現の有無については、培養細胞を利用する方法は、迅速かつ正確な評価が可能であり、有用性が明確になった。さらに、デザイナーズドラッグおよび植物系脱法ドラッグともに、主要成分の精製単離とその分析法開発の重要性が示された。

脱法ドラッグの構造や性状を鑑定するシステムと、その乱用危険度と毒性を推測する研究システムの融合および連携が重要であると考えられる。こうした、総合的な評価システムが迅速に機能することにより、脱法ドラッグによる重大な健康被害の発生を未然に防ぐものと期待される。

F. 健康危険情報

本研究は、規制薬物と脱法ドラッグの依存性および細胞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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Funada M, Zhou X, Satoh M, Wada K., Profiling of methamphetamine-induced modifications of gene expression patterns in the mouse brain. *Ann N Y Acad Sci.* (2004) 1025:76-83.

2. 学会発表

- 1) Funada, M., Zhou, X., Sato, M. and Wada, K.: Role of dopamine receptors on abused solvent toluene-induced hyperlocomotion in mice. *Problem of Drug Dependence (CPDD) 2004. 66th annual scientific meeting. San Juan, Puerto Rico.* 2004, 6, 15.
- 2) 宮崎育子、浅沼幹人、三好 耕、小川紀雄、船田正彦: 5MeO-DIPT のドパミン神経毒性に関する検討. 第 34 日本神経精神薬理学会, 東京, 2004, 7, 23.
- 3) 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄, 船田正

彦: 5MeO-DIPT によるドパミン神経細胞毒性. 第 47 回日本神経化学大会・第 27 回日本神経科学大会, 大阪, 2004, 9, 22.

- 4) 福田達男、荒金真佐子、吉澤政夫、鈴木幸子、森本陽治、中嶋順一、安田一郎: 植物系ドラッグハルマラ *Harmala* の原植物と鑑定 に関する研究、日本生薬学会第 51 回年会、神戸、2004.09.09.
- 5) 河野安昭、梅沢誠、渡辺大介、伊藤栄利子、新江徹、中村憲久、安田一郎、高橋美佐子、瀬戸隆子、長嶋真知子、三宅啓文、奥本千代美: 東京都における脱法ドラッグの試買調査 1. 平成 15 年度にみる最近の傾向、第 37 回日本薬剤師会学術大会、青森、2004.10.10.
- 6) 安田一郎、高橋美佐子、瀬戸隆子、長嶋真知子、三宅啓文、奥本千代美、河野安昭、梅沢誠、渡辺大介、伊藤栄利子、新江徹、中村憲久: 東京都における脱法ドラッグの試買調査 2. 試験法の変遷とその成果、第 37 回日本薬剤師会学術大会、青森、2004.10.10.
- 7) 湯澤順司、石川雅健、武田宗和、阿部勝、今井一登、角山泰一郎、稲垣伸洋、黒川城司、佐々木直哉、鈴木忠、高橋美佐子、安田一郎: 脱法ドラッグ分析の現状、第 19 回日本中毒学会東日本地方会、東京、2005.02.05.
- 8) 浜野朋子、安田一郎、塩田寛子、中嶋順一; 植物ドラッグ サルビア及びその関連製品に含有される成分について; 日本薬学会 第 125 年会; 東京; 2005.3.31

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

なし。

植物由来催幻覚成分の薬物依存性評価システム構築に関する研究

分担研究者： 船田正彦（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】

規制薬物である methamphetamine (MAP)、3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)、脱法ドラッグ 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) および植物（ハルマラ）由来幻覚成分である harmine の精神依存性の評価を行い、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。1) MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および harmine の行動解析：薬物を投与し、運動量の測定を行った。MAP および MDMA の投与により、著明な運動促進作用が発現した。一方、harmine (1-20mg/kg) 投与では、用量依存的に運動抑制作用が発現した。薬物の精神依存形成能は、マウスを使用し conditioned place preference (CPP) 法により報酬効果を評価した。MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および harmine により報酬効果が発現し、精神依存形成能を有することが確認された。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：薬物投与 1 時間後に、側坐核を分画し HPLC 法に従ってドパミン、セロトニンおよび代謝産物の含量を測定した。MAP、MDMA および harmine 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。乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、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。また、harmine では側坐核、線条体、海馬および中脳においてドパミンの変動と比較して、セロトニンの著しい増加が確認された。したがって、harmine の中枢作用の発現にセロトニン神経系が重要な役割を果たしていると考えられる。3) Harmine 処置後の行動変化：Harmine (20mg/kg) を 2 時間間隔で 4 回投与し、3 日後に MAP 投与による運動促進作用を測定した。Harmine 投与 3 日後、動物の運動量は有意に増加していた。一方、MAP 投与による運動促進作用は、その持続時間が有意に抑制された。したがって、harmine 連続処置を経験することにより、一定の効果を得るため、通常より多量の MAP を摂取するようになる危険がある。4) MAP および MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現：MAP (4 mg/kg) および MDMA (10 mg/kg) 投与 4 時間後の側坐核における遺伝子発現変動をマイクロアレイ (3130 種) 法で解析した。MAP 投与によって、144 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) していた。興味深いことに、MAP および MDMA の投与により共通して glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) 発現レベルが増加していた。GILZ は中枢興奮薬の依存形成の危険性を予測する生化学的マーカーの 1 つである可能性が示唆された。また、MAP および 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、双方の薬物処置で共通の変動パターンを示す 3 つのタンパク質を同定した。MAP および MDMA による遺伝子およびタンパク質の変動については、そのマーカーとしての意義について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。

A. 研究目的

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”さらに大麻などの天然植物の乱用は若年層を中心に浸透している。インターネット等の通信手段の普及により、薬物等の化学物質および植物に関する摂取時の効果や乱用方法などの情報伝播は高速化し、その発信対象は不特定多数の広範囲になっている。脱法ドラッグとしては合成品と天然植物が乱用されており、特に、幻覚作用を発現する物質が主流となっている。天然植物は葉や茎などでの取引および種苗の状態での取引が可能であり、合成化学物質と比較してその入手は容易である。現在、多くの種類の幻覚成分含有の天然植物が取引されている。なかでも、法的な規制がされていないハワイヤンウッドローズ、ハルマラおよびサルビアなどの強力な催幻覚成分を含有する植物の取引は容易かつ頻繁に行われている。こうした幻覚成分を含有する植物について、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。すなわち、幻覚成分含有植物の依存形成の強度と神経毒性について迅速に評価する系を確立するのは緊急課題である。

本研究では、規制薬物として覚せい剤である methamphetamine (MAP)、MDMA、脱法ドラッグである 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT)¹⁾および植物(ハルマラ)由来幻覚成分である harmine の精神依存性の評価を行った。本研究を通じ、1) 化学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の構築を試みた。また、2) 乱用危険性を予測する生化学的マーカー候補の基礎的な検索を行った。今回の研究では、MAP および MDMA による脳内モノアミン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^{6,7)}。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、MAP および MDMA 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。

本研究では、物質の乱用危険度と神経毒性を迅速に推測する研究バッテリーの構築を目指す。さらに、生化学的マーカーの同定により、規制薬物と脱法ドラッグ使用の危険性に関する科学的証拠を収集する。本研究を通じ、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. 研究方法

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。

使用薬物：規制薬物としては methamphetamine (MAP)、3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)、脱法ドラッグとしては 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) および植物(ハルマラ)由来幻覚成分である harmine を使用した。

1. 薬物処置による運動活性への影響

MAP (1-2 mg/kg, s.c.)、MDMA (1-15 mg/kg, s.c.)、5-MeO-DIPT (1-20 mg/kg, s.c.) および harmine (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. 薬物の精神依存性評価

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、MAP(1-2 mg/kg, s.c.)、MDMA(1-10 mg/kg, s.c.)、5-MeO-DIPT(0.5-10 mg/kg, s.c.)もしくはharmine(0.25-5 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. 薬物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. 薬物処置による脳内モノアミンに対する影響

MAP(2 mg/kg, s.c.)、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²⁾した。同様に、harmine(10mg/kg)投与1時間後にマウス全脳を摘出し、limbic forebrain、線条体、中脳および海馬を分画した。

高速液体クロマトグラフ法に従い、内標準物質としてイソプレテレノールを使用し、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-dihydroxy-phenylacetic 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. MAP中枢興奮作用に対するharmine処置の影響

前処置として、harmine(20 mg/kg)を2時間間隔で4回投与した。薬物投与3日後にMAP(2 mg/kg, s.c.)投与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。

5. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

MAP(4 mg/kg, s.c.)および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を含むlimbic forebrainを分画²⁾し、mRNAの抽出を行った。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。

6. 二次元電気泳動によるタンパク質発現解析

MAP(4 mg/kg, s.c.)および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を含むlimbic forebrainを分画した。可溶化溶液でサンプル調整後、二次元電気泳動はImmobiline 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。得られたスポットの、タンパク質の同定分析は、MASCOT により行った。

C. 研究結果

1. 薬物処置による運動活性への影響

Harmine (1-20mg/kg) 投与では、用量依存的に運動抑制作用が発現した(Fig. 1A)。MAP (1 および 2 mg/kg)、MDMA (10 および 15 mg/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 (Fig. 2A)。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(5, 10 および 20 mg/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. 薬物の精神依存性評価

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。Harmine (1 および 5mg/kg) の条件付けによって CPP すなわち報酬効果が発現した(Fig. 1B)。同様に、MAP (1 および 2 mg/kg)、MDMA (5 および 10 mg/kg) および 5-MeO-DIPT(0.5 mg/kg)では報酬効果が発現した(Fig. 2B)。一方、5-MeO-DIPT (10 mg/kg) により著明な嫌悪作用が発現した。

3. 薬物処置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含有する limbic forebrain をターゲットとした^{3,4,8)}。MAP (2 mg/kg)、MDMA (10 mg/kg) および 5-MeO-DIPT (10 mg/kg) 投与 1 時間後に、limbic forebrain 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(Table 2)。

MAP 投与によりドパミン、3-MT 含量は有意に増加し、一方、DOPAC は減少し、HVA 含量は減少傾向が認められた。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。同様に、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。

Harmine 処置の場合、limbic forebrain および線条体において、有意なドパミンおよび 3-MT 含量の増加が確認された(Fig. 3A,B)。3-MT/DA 比率は著明に増加していた。一方、DOPAC および HVA 含量は有意な減少が認められた。また、harmine では側坐核、線条体、海馬および中脳においてドパミンの変動と比較して、セロトニンの著しい増加が確認された(Fig. 3A-D)。

4. MAP 中枢興奮作用に対する harmine 処置の影響

前処置として、harmine (20mg/kg) を 2 時間間隔で 4 回投与した。薬物投与 3 日後の動物のベースの運動量は増加していた(Fig. 4, B)。一方、MAP (2mg/kg, s.c.)投与により誘発される運動促進作用は、ピークの運動量に影響は認められなかったが、その持続時間は有意に短縮していた(Fig. 4A, C)。

5. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

MAP (4 mg/kg, s.c.) および 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。MAP 投与によって、144 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) していた (Fig. 5A)。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 : 16%、signal transducer 関連 gene : 37% および enzyme 関連 gene : 26% 程度であった。また、機能が明確でない gene が 21% 含まれていた。MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) していた (Fig. 5B)。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 : 7%、signal transducer 関連 gene : 29% および enzyme 関連 gene : 43% 程度であった。また、機能が明確でない gene が 21% 含まれていた。興味深いことに、MAP および MDMA の投与により共通して glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mRNA 発現レベルが増加していた。

6. 二次元電気泳動によるタンパク質発現解析

MAP (4 mg/kg, s.c.) および MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与 24 時間後の 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 つのタンパク質の発現増加が確認された (Fig. 6)。

D. 考察

薬物の精神依存性を評価するシステム構築を試みた。MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および植物 (ハルマラ) 由来幻覚成分である harmine 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、MAP、MDMA、5-MeO-DIPT および harmine 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、高用量の 5-MeO-DIPT

の使用により、精神作用 (精神病様作用) などの有害作用が発現する可能性がある。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から低用量側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^{3,4,8}。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 を標的的部位として、脳内モノアミンに対する影響を検討した。MAP、MDMA および harmine 投与では、limbic forebrain においてドパミンおよび 3-MT 含量の著明な増加が確認された。特に、harmine 投与では著明な 3-MT 増加が発現した。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もしくは減少は、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。さらに、harmine では側坐核、線条体、海馬および中脳においてドパミンの変動と比較して、セロトニンの著しい増加が確認された。したがって、harmine の中枢作用の発現にセロトニン神経系が重要な役割を果たしていると考えられる。脳組織内のモノアミン量の測定は簡便かつ高感度であり、今後も脱法ドラッグの特性を判断する生化学的マーカーとして有用である。

植物 (ハルマラ) 由来幻覚成分である

harmine の連続処置後の行動変化を検討した。動物のベースの運動量は増加しており、harmine 処置により運動機能に変化が生じることが示された。一方、MAP 投与により誘発される運動促進作用は、ピークの運動量に影響は認められなかったが、その持続時間は有意に短縮していた。したがって、harmine 連続処置を経験することにより、一定の効果を得るため、通常より多量の MAP を摂取するようになる危険がある。

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利用されている^{6,7)}。本研究では、マイクロアレイ法により MAP および MDMA 急性投与により誘導される（増加する）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。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の発見や乱用危険性を予測するマーカーの同定に有用である。MAP および MDMA による遺伝子発現変動について、双方の薬物で共通して増加する遺伝子群の抽出を試みた。その結果、glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) を見出した。同様に、二次元電気泳動法により、MAP および 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。MASCOT によりこれらのタンパク質を同定した。現在、これらのタンパク質に関して、その機能を解析中である。今回の結果で得られた、生化学的マーカーは薬物依存性を推測する上で、有用であると考えられる。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。

E. 結論

植物（ハルマラ）由来幻覚成分である

harmineが精神依存形成能を有することを見出した。また、harmineは覚せい剤の効果を調節する作用を有し、覚せい剤との併用は、重大な健康被害を引き起こす可能性が示唆された。

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からそれより低用量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、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。マイクロアレイ法による解析からはGILZの重要性を見出した。GILZについては脱法ドラッグによる評価を進める必要がある。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更なる検索が必要である。

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) Louk J. M., Vanderschuren J., Donne Schmidt, E., et al.: A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J. Neurosci.*, 19(21): 9579-9586, 1999.
- 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) Sokolov, B.P., Polesskaya, O.O., Uhl, G.R.: Mouse brain gene expression changes after acute and chronic amphetamine. *J. Neurochem.* 84: 244-252, 2003.
- 7) 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.
- 8) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*, 51: 141-153, 1998.

G. 研究発表

1. 論文発表
- 2) Funada M, Zhou X, Satoh M, Wada K., Profiling of methamphetamine-induced modifications of gene expression patterns in the mouse brain. *Ann N Y Acad Sci.* (2004) 1025:76-83.
- 3) 船田正彦、佐藤美緒、周曉華、金井裕子、和田清. 揮発性有機溶剤の精神依存形成メカニズム. *日本精神神経薬理学雑*

誌.(2005) 25:1-9.

2. 学会発表

- 1) 船田正彦、周曉華、佐藤美緒、和田清：トルエンによる運動促進作用発現におけるドーパミン神経系の役割. 第34日本神経精神薬理学会，東京，2004，7，23.
- 2) Funada, M., Zhou, X., Sato, M. and Wada, K.: Role of dopamine receptors on abused solvent toluene-induced hyperlocomotion in mice. Problem of Drug Dependence (CPDD) 2004. 66th annual scientific meeting. San Juan, Puerto Rico. 2004, 6, 15.
- 3) 宮崎育子、浅沼幹人、三好 耕、小川紀雄、船田正彦: 5MeO-DIPT のドーパミン神経毒性に関する検討. 第34日本神経精神薬理学会，東京，2004，7，23.
- 4) 船田正彦: 条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価：基礎と応用. 薬理学サマーセミナー2004「ストレス、不安、依存-行動実験のあり方と戦略」，葉山，2004，9，1.
- 5) 宮崎育子，浅沼幹人，小川紀雄，船田正彦：5MeO-DIPTによるドーパミン神経細胞毒性. 第47回日本神経化学大会・第27回日本神経科学大会，大阪，2004，9，22.

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

なし。

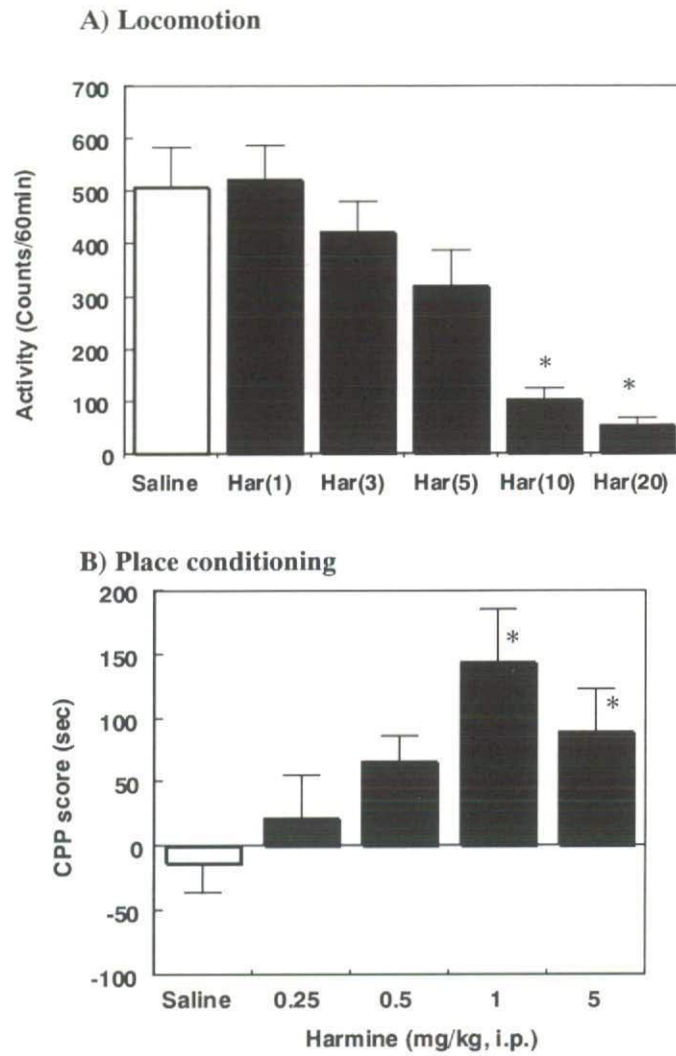
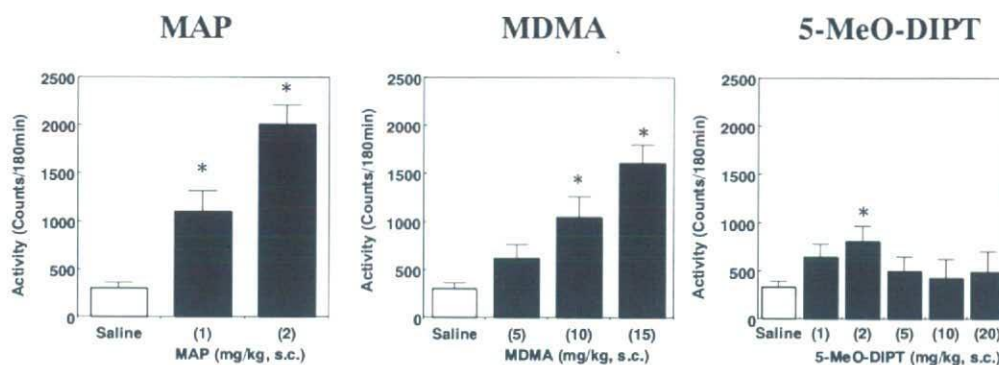


Fig. 1. A) Effect of acute treatment with harmine on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of harmine in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-12 animals for 180 min after drug treatment. B) Effect of harmine on place conditioning in mice. Place conditioning produced by harmine (0.25 – 5 mg/kg). 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 10 - 14 animals.

* $P < 0.05$ vs. saline-treated group.

A) Locomotion



B) Place conditioning

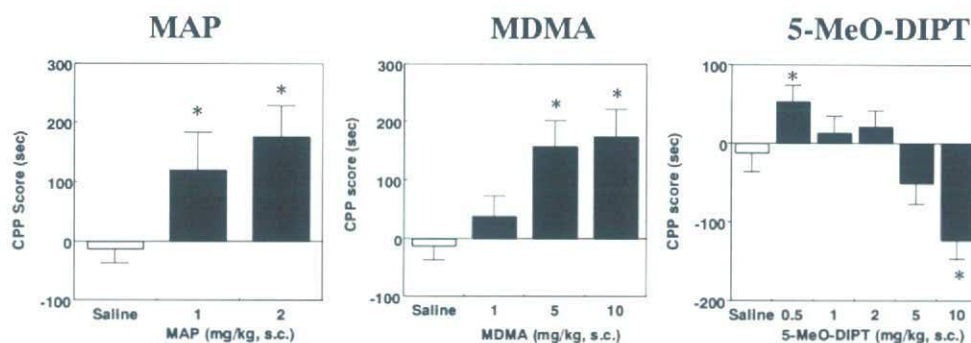


Fig. 2. A) Effect of acute treatment with methamphetamine (MAP), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) or 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of MAP, MDMA or 5-MeO-DIPT in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 180 min after drug treatment. B) Effect of MAP, MDMA or 5-MeO-DIPT on place conditioning in mice. Place conditioning produced by MAP (1-2 mg/kg, s.c.), MDMA (1-10 mg/kg, s.c.) or 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.

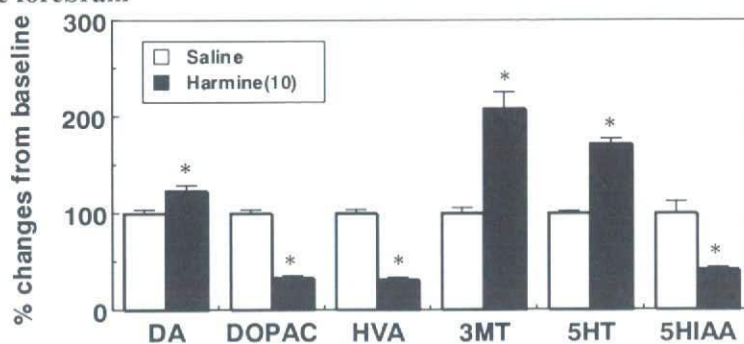
Table 2. Effect of MAP, MDMA or 5-MeO-DIPT on monoamine level in the mouse limbic forebrain.

	Saline	MAP (2)	MDMA (10)	5-MeO-DIPT (10)
DA	100.0 ± 3.5	149.2 ± 5.0 *	126.0 ± 6.0 *	98.0 ± 3.0
DOPAC	100.0 ± 4.2	82.6 ± 4.0 *	84.8 ± 4.0 *	101.1 ± 6.0
HVA	100.0 ± 4.6	92.0 ± 2.5	77.7 ± 2.5 *	106.0 ± 7.0
3MT	100.0 ± 5.0	144.6 ± 14.0 *	167.2 ± 12.5 *	76.0 ± 6.0 *
5HT	100.0 ± 3.0	119.0 ± 13.2	103.0 ± 14.0	111.0 ± 14.0
5HIAA	100.0 ± 3.0	99.8 ± 7.0	69.2 ± 5.0 *	77.0 ± 8.4

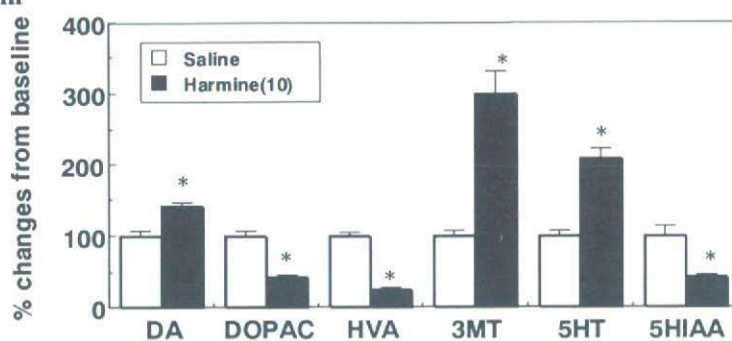
Mice were sacrificed 60 min after MAP (2 mg/kg, s.c.), MDMA (10 mg/kg, s.c.) or 5-MeO-DIPT (10 mg/kg, s.c.) injection. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals.

*P<0.05 vs. Saline-treated group.

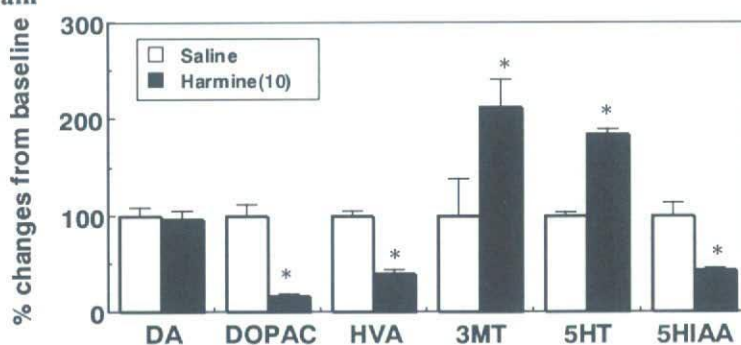
A) Limbic forebrain



B) Striatum



C) Midbrain



D) Hippocampus

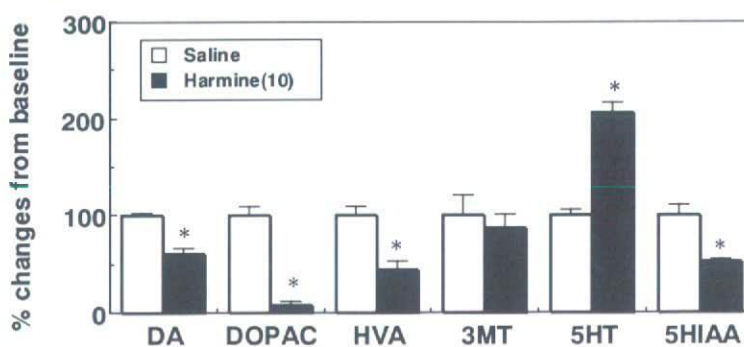


Fig. 3. Effect of harmine on monoamine level in the mouse brain. Mice were sacrificed 60 min after harmine (10 mg/kg, i.p.) injection. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals. *P<0.05 vs. saline-treated group.