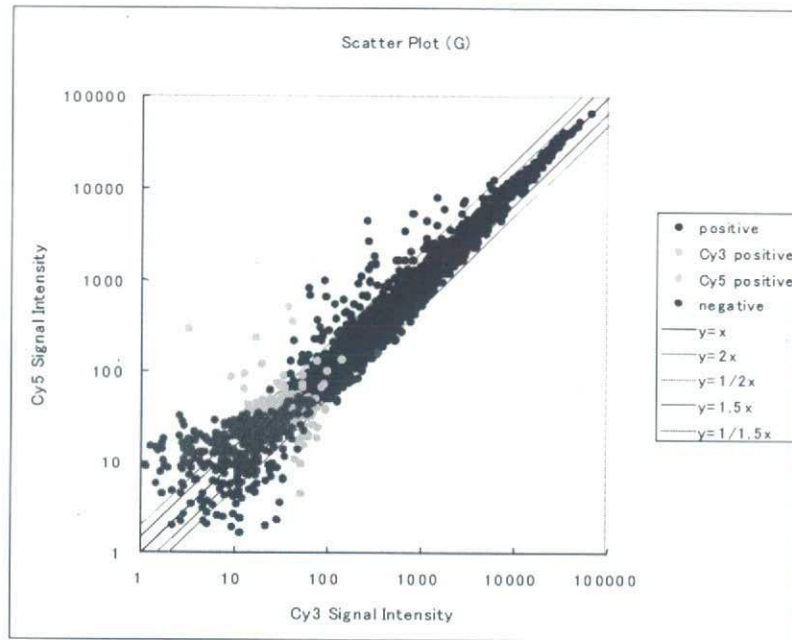


Fig. 4. Effect of repeated treatment with harmine on methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice. Mice were injected with harmine (20 mg/kg, i.p.) or saline at 9:00, 11:00, 13:00 and 15:00 h. Three days after the last harmine injection, methamphetamine-induced hyperlocomotion were assessed in mice. Each data represents the mean with S.E.M. of 10 animals.  
 \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group.

### A) MAP



### B) MDMA

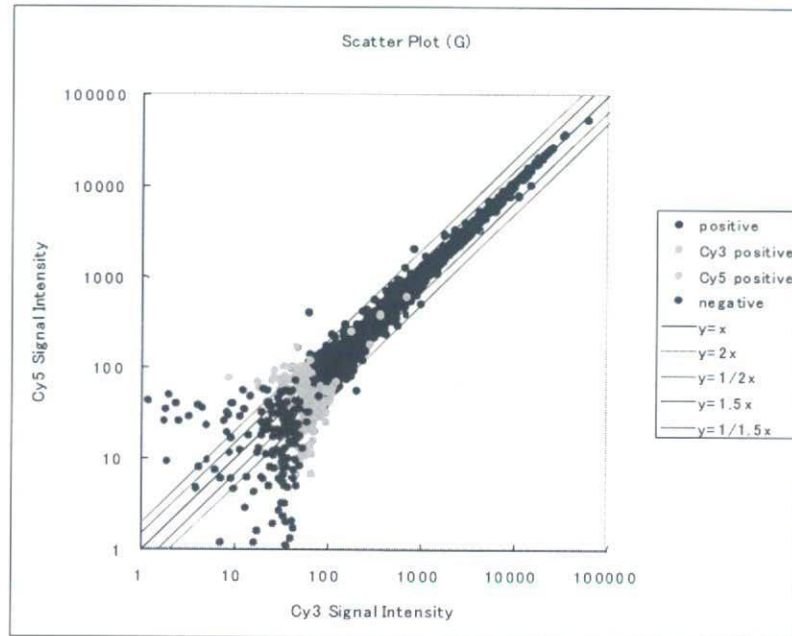


Fig. 5. Profiling of MAP (4 mg/kg, s.c.) or MDMA(10 mg/kg, s.c.)-induced changes in gene expression in the mouse limbic forebrain. A) 144 genes in MAP-treated group showed increase greater than 1.5-fold. B) 56 genes in MDMA-treated group showed increase greater than 1.5-fold. Each of these genes, including transcription factor, signal transducer and enzyme, were candidates to contribute to brain adaptation to MAP or MDMA. Expression profiling of 4277 genes between MAP, (Cy5), 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.

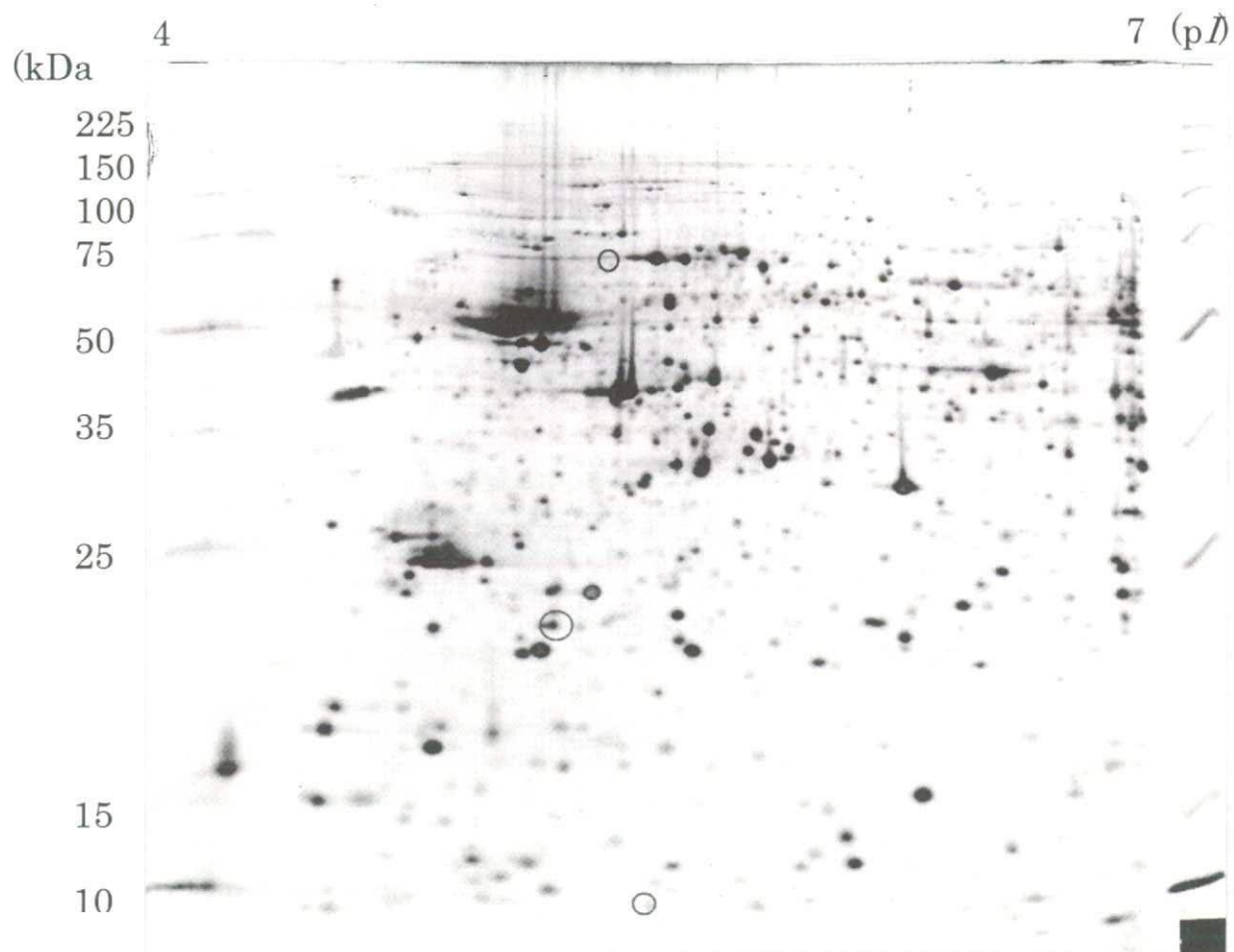


Fig. 6. Profiling of MAP (4 mg/kg, s.c.) or MDMA(10 mg/kg, s.c.)-induced changes in protein expression in the mouse limbic forebrain. Effect of chronic treatment with MAP or MDMA on the level of protein in the mouse limbic forebrain by two-dimensional gel electrophoresis. Mice were sacrificed 24h after MAP (4 mg/kg, s.c.) or MDMA (10mg/kg, s.c.) injection once daily for 6 days. Two-dimensional gel of test proteins stained with SYPRO Ruby. Three proteins were modified by both MAP and MDMA treatment (circle).

## 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究

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）  
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：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 のドパミン系神経あるいはセロトニン系神経への毒性ならびに MDMA あるいはメタンフェタミン (METH) との併用による神経毒性の変化を明らかにするために、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 METH との同時添加を行い、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。同時に、合成系脱法ドラッグとして、5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT) および 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT) の細胞毒性と比較した。結果：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 (IC<sub>50</sub>: 200  $\mu$ M 前後)。また、50  $\mu$ 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、100  $\mu$ 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。harmaline、harmine の MDMA あるいは METH との併用暴露では、B65 細胞において、単独では LDH 放出量増加の低い濃度の MDMA (50  $\mu$ M-1 mM) および METH (250  $\mu$ M-1 mM) は、harmaline、harmine (50, 100  $\mu$ 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が、CATH.a 細胞ではみられなかった。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 (100, 500  $\mu$ M) および METH (250, 500  $\mu$ M) は harmaline、harmine (50, 100  $\mu$ 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。一方、5MeO-DMT 単独暴露では、いずれの細胞においても 500  $\mu$ M 以上ではじめて細胞死が惹起された (IC<sub>50</sub>: 1 mM 以上)。5MeO-DIPT 単独では、いずれの細胞においても用量依存的な LDH 放出量の増加が認められ (IC<sub>50</sub>: 500  $\mu$ M 前後)、500  $\mu$ M 以上で細胞死が著明となった。結論：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 METH が高濃度 (IC<sub>50</sub>: 1 mM 以上)、5MeO-DMT および 5MeO-DIPT が比較的高濃度 (IC<sub>50</sub>: 1 mM 以上および 500  $\mu$ M) 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  $\mu$ 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、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 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、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 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 METH 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。

### A. 研究目的

これまでに、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) のモノアミン神経毒性について検討し、5MeO-DIPT は比較的低濃度 (100  $\mu$ M 以上) でアポトーシス様細胞死を惹起しうること、さらに合成麻薬 MDMA および覚醒剤メタンフェタミン

(METH) との同時併用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を明らかにした<sup>1)</sup>。

今回、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 のドパミン系神経あるいはセロトニン系神経への毒性ならびに MDMA あるいは METH との併用による神経毒性の変化を明らかにするために、ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞

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 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。また、合成系脱法ドラッグとして、5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT)、5MeO-DIPT の細胞毒性についても比較検討した。

## B. 研究方法

### 1. モノアミン系培養神経細胞への harmaline、harmine、5-MeO-DMT、5MeO-DIPT 暴露

マウス由来ドパミン含有細胞 CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) およびラットモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を用いて、継代 24 時間後 (CATH.a) および 48 時間後 (B65) に、harmaline、harmine、5-MeO-DMT および 5MeO-DIPT (最終濃度  $50 \mu\text{M}$  ~  $2 \text{mM}$ ) 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 放出量を測定した。

### 2. harmaline、harmine、5MeO-DIPT の神経細胞毒性への MDMA 同時添加の効果

CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) および B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) をそれぞれ 24 時間および 48 時間培養した。harmaline、harmine (最終濃度  $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ ) あるいは 5MeO-DIPT (最終濃度  $100 \mu\text{M}$ 、 $500 \mu\text{M}$ ) を MDMA (最終濃度  $50 \mu\text{M}$  ~  $2 \text{mM}$ ) と同時に添加し、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. harmaline、harmine、5MeO-DIPT の神経細胞毒性への METH 同時添加の効果

CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) および B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を継代 24 時間後およ

び 48 時間後に、harmaline、harmine (最終濃度  $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ ) あるいは 5MeO-DIPT (最終濃度  $100 \mu\text{M}$ 、 $500 \mu\text{M}$ ) を METH (最終濃度  $250 \mu\text{M}$  ~  $4 \text{mM}$ ) と同時に添加した。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. 研究結果

### 1. ドパミン系培養神経細胞への harmaline 暴露と MDMA、METH 同時添加の効果

ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞に harmaline を添加したところ、 $50 \mu\text{M}$  以上で細胞障害性の指標となる LDH 放出量の用量依存的な増加が認められた ( $\text{IC}_{50}$ : 約  $250 \mu\text{M}$ ) (Fig. 1A)。また形態学的には、 $50 \mu\text{M}$  から障害がみられ、 $100 \mu\text{M}$  以上で著明な細胞死が惹起された。CATH.a 細胞に harmaline (0, 50 or  $100 \mu\text{M}$ ) + MDMA (0-2 mM)、harmaline (0, 50 or  $100 \mu\text{M}$ ) + METH (0-4 mM) を 24 時間暴露し、LDH 放出量を測定した。MDMA 単独添加の場合、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した (Fig. 1B)。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 (Fig. 1C)。しかし、harmaline + MDMA あるいは harmaline + METH の同時暴露では、MDMA あるいは METH による harmaline の神経毒性に対する相乗効果は認められなかった (Fig. 1B & 1C)。

### 2. モノアミン系セロトニン含有神経細胞への harmaline 暴露と MDMA、METH 同時添加の効果

セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞に harmaline を添加したところ、 $100 \mu\text{M}$  以上で LDH 放出量の用量依存的な増加が認められ、 $\text{IC}_{50}$  は  $100$ - $200 \mu\text{M}$  であった (Fig. 2A)。B65 細胞に harmaline (0, 50 or  $100 \mu\text{M}$ ) + MDMA (0-2

mM)、harmaline (0, 50 or 100  $\mu$ M)+METH (0-4 mM)を24時間暴露し、LDH放出量を測定した。MDMA単独添加の場合、1 mM以下ではLDH放出量は有意なものの軽微な増加で、2 mMで有意に増加した(Fig. 2B)。harmaline+MDMAの同時暴露では、単独では障害性の低いMDMA (50  $\mu$ M-1 mM)はharmaline (50, 100  $\mu$ M)でみられるLDH放出量の増加(細胞障害)をさらに増強した(Fig. 2B)。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(Fig. 2C)。harmaline+METHの同時暴露では、単独では障害性のないMETH (250  $\mu$ M-1 mM)はharmaline (50, 100  $\mu$ M)でみられるLDH放出量をさらに増強した(Fig. 2C)。

また形態学的には、harmaline単独では50  $\mu$ Mから障害がみられ、100  $\mu$ M以上で著明な細胞死が惹起された(Fig. 3 & 5)。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。harmaline+MDMAの同時添加では、単独では障害性のみられないMDMA (100, 500  $\mu$ M)をharmaline (50, 100  $\mu$ M)と併用すると、harmaline単独でみられる細胞障害がさらに増強された(Fig. 3)。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(Fig. 4)。harmaline単独添加では、50  $\mu$ 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 (100, 500  $\mu$ M)をharmaline (50, 100  $\mu$ M)と同時暴露すると、harmaline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(Fig. 4)。METH単独添加での形態学的変化では、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(Fig. 5)。単独では障害性のみられないMETH (250, 500  $\mu$ M)をharmaline (50, 100  $\mu$ M)と併用する

と、harmaline単独でみられる細胞障害がさらに増強された(Fig. 5)。B65細胞へのharmaline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(Fig. 6)。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 (250, 500  $\mu$ M)をharmaline (50, 100  $\mu$ M)と併用すると、harmaline単独でみられるアポトーシス様変化が増強された。

### 3. ドパミン系培養神経細胞へのharmine暴露とMDMA、METH同時添加の効果

ドパミン含有CATH.a細胞へのharmine添加では、50  $\mu$ M以上でLDH放出量の用量依存的な増加が認められた(IC<sub>50</sub>:約200  $\mu$ M)(Fig. 7A)。また形態学的には、50  $\mu$ Mから障害がみられ、100  $\mu$ M以上で著明な細胞死が惹起された。CATH.a細胞にharmine (0, 50 or 100  $\mu$ M)+MDMA (0-2 mM)、harmine (0, 50 or 100  $\mu$ M)+METH (0-4 mM)を24時間暴露し、LDH放出量を測定した。harmine+MDMAあるいはharmine+METHの同時暴露では、MDMAあるいはMETHによるharmineの神経毒性に対する相乗効果は認められなかった(Fig. 7B & 7C)。

### 4. モノアミン系セロトニン含有神経細胞へのharmine暴露とMDMA、METH同時添加の効果

セロトニン含有B65細胞にharmineを添加したところ、50  $\mu$ M以上でLDH放出量の用量依存的な増加が認められ、IC<sub>50</sub>は約200  $\mu$ Mであった(Fig. 8A)。B65細胞にharmine (0, 50 or 100  $\mu$ M)+MDMA (0-2 mM)、harmine (0, 50 or 100  $\mu$ M)+METH (0-4 mM)を24時間暴露し、LDH放出量を測定した。harmine+MDMAの同時暴露では、単独では障害性の低いMDMA (50  $\mu$ M-1 mM)はharmine (50, 100  $\mu$ M)でみられるLDH放出量の増加をさらに増強した(Fig. 8B)。harmine+METHの同時暴露では、単独では障害性のないMETH (250  $\mu$ M-1

mM)は harmine (50, 100  $\mu$ M)でみられる LDH 放出をさらに増強した(Fig. 8C)。

B65 細胞の形態学的変化については、harmine 単独では 50  $\mu$ M から障害がみられ、100  $\mu$ M 以上で著明な細胞死が惹起された(Fig. 9 & 11)。harmine+MDMA の同時添加では、単独では障害性のみられない MDMA (100, 500  $\mu$ M)を harmine (50, 100  $\mu$ M)と併用すると、harmine 単独でみられる細胞障害がさらに増強された(Fig. 9)。Hoechst 染色(核蛍光染色)では、harmine 単独添加の 50  $\mu$ 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。単独ではアポトーシス様変化のみられない MDMA (100, 500  $\mu$ M)を harmine (50, 100  $\mu$ M)と同時暴露すると、harmine 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(Fig. 10)。harmine+METH 同時添加での形態学的変化では、単独では障害性のみられない METH (250, 500  $\mu$ M)を harmine (50, 100  $\mu$ M)と併用すると、harmine 単独でみられる細胞障害がさらに増強された(Fig. 11)。核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 METH (250, 500  $\mu$ M)を harmine (50, 100  $\mu$ M)と併用すると、harmine 単独でみられるアポトーシス様変化が増強された。

#### 5. ドパミン系培養神経細胞、モノアミン系セロトニン含有神経細胞への 5MeO-DMT 暴露の効果

ドパミン含有 CATH.a 細胞に 5MeO-DMT を添加したところ、細胞毒性は低く 1 mM ではじめて LDH 放出量の増加が認められ、IC<sub>50</sub> は 1 mM 以上であった(Fig. 13A)。形態学的にも、5MeO-DMT (1 mM)から障害がみられ、著明な細胞死を惹起するには 2 mM 必要であった。また、セロトニン含有 B65 細胞への 5MeO-DMT 添加においても、毒性は低く 500  $\mu$ M 以上で LDH 放出量の増加が認められ、IC<sub>50</sub> は 1.5 mM 以上であった(Fig. 13B)。また形態学的には、5MeO-DMT 単独では 1 mM から障害がみられるものの細胞死は軽度であ

った。

#### 6. ドパミン系培養神経細胞への 5MeO-DIPT 暴露と MDMA、METH 同時添加の効果

ドパミン系 CATH.a 細胞に 5MeO-DIPT を添加したところ、500  $\mu$ M 以上で LDH 放出量の用量依存的な増加が認められ、IC<sub>50</sub> は約 500  $\mu$ M であった(Fig. 14A)。また形態学的には、100  $\mu$ M から障害がみられ、500  $\mu$ M 以上で著明な細胞死が惹起された。5MeO-DIPT+MDMA の同時暴露では、MDMA による 5MeO-DIPT の神経毒性に対する相乗効果は認められなかった(Fig. 14B)。しかし、5MeO-DIPT+METH の併用暴露では、単独では LDH 放出量増加のみられない METH (500  $\mu$ M, 1 mM)を 5MeO-DIPT (500  $\mu$ M)と併用すると、5MeO-DIPT 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(Fig. 14C)。また、形態学的な観察においても、5MeO-DIPT (500  $\mu$ M)と METH (500  $\mu$ M)を同時暴露すると、5MeO-DIPT 単独でみられる細胞死がさらに著明になった。

#### 7. セロトニン含有神経細胞への 5MeO-DIPT 暴露と MDMA、METH 同時添加の効果

セロトニン含有 B65 細胞への 5MeO-DIPT (0-2 mM)添加では、LDH 放出量は 500  $\mu$ M から用量依存的な増加がみられ、IC<sub>50</sub> は約 500  $\mu$ M であった(Fig. 15A)。また、形態学的観察では、100  $\mu$ M から傷害がみられ 500  $\mu$ M 以上でアポトーシス様の形態変化を伴う著明な細胞死がみられた。5MeO-DIPT+MDMA の同時暴露では、単独では障害性のみられない MDMA (50-500  $\mu$ M)を 5MeO-DIPT (500  $\mu$ M)と併用すると、5MeO-DIPT 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(Fig. 15B)。形態学的な観察においても、単独では障害性のみられない MDMA (500  $\mu$ M)を

5MeO-DIPT (500  $\mu$ M) と併用すると、5MeO-DIPT (500  $\mu$ M) 単独でみられるアポトーシス様変化ならびに細胞障害がさらに増強された。さらに、5MeO-DIPT+METH の併用暴露においても、単独では LDH 放出量増加のみられない METH (500  $\mu$ M、1 mM) を 5MeO-DIPT (500  $\mu$ M) と併用すると、5MeO-DIPT 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 (Fig. 15C)。単独では障害性のみられない METH (500  $\mu$ M) を 5MeO-DIPT (500  $\mu$ M) と併用すると、5MeO-DIPT (500  $\mu$ M) 単独でみられるアポトーシス様形態変化ならびに細胞死がさらに増強された。

#### D. 考察

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 METH 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 METH が高濃度 (IC<sub>50</sub>: 1 mM 以上)、5MeO-DMT および 5MeO-DIPT が比較的高濃度 (IC<sub>50</sub>: 1 mM 以上および 500  $\mu$ M) 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  $\mu$ M 以上) (IC<sub>50</sub>: 200  $\mu$ M 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 METH あるいは合成系脱法ドラッグの 5MeO-DMT、5MeO-DIPT 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 METH 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 METH 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 MDMA あるいは METH による 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 METH 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。

#### E. 結論

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 が、ドパミン系およびセロトニン系培養神経細胞において、規制薬物の MDMA および METH、合成系脱法ドラッグの 5MeO-DMT および 5MeO-DIPT による神経毒性に比べ、比較的低濃度 (50  $\mu$ 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、セロトニン系神経細胞においては、harmaline および harmine と MDMA もしくは METH との同時併用により、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。これら結果から、harmaline および harmine は、モノアミ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 METH と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いえる。

#### F. 参考文献

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究. 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」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P15-24, 2004.



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci. Lett.*, 354: 59-63, 2004.
2. Miyoshi, K., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J., Katayama, T., Tohyama, M. and Ogawa, N.: DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317: 1195-1199, 2004.
3. Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y. and Ogawa, N.: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J. Neurochem.*, 89: 1490-1497, 2004.
4. Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular basis of anti-apoptotic effects of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human glioma cells. *Neurochem. Res.*, 29: 1529-1536, 2004.
5. Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Expression of metallothionein-III and cell death in differentiated catecholaminergic neuronal cells. *Neurol. Res.*, 26: 671-676, 2004.
6. Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tsuji, T. and Ogawa, N.: Specific gene expression and possible involvement of inflammation in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1025: 69-75, 2004.
7. Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res.*, 1029: 120-123, 2004.
8. Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 10: 695-700, 2004.
9. Hozumi, I., Asanuma, M., Yamada, M. and Uchida, Y.: Metallothioneins and neurodegenerative diseases. *J. Health Sci.*, 50: 323-331, 2004.
10. Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Ogawa, N.: Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med. Okayama*, 58: 221-233, 2004.
11. 浅沼幹人, 宮崎育子: 遺伝子改変によるパーキンソン病モデル. *脳の科学*, 292 (2004年増刊号): 165-170, 2004.
12. 小川紀雄, 浅沼幹人, 田中健一: Parkinson 病薬物治療の将来- 進行抑制薬実現の可能性. *医学のあゆみ*, 208: 583-588, 2004.
13. 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: 実験的パーキンソニズムに使われる薬剤ー MPTP, 6-ヒドロキシドパミンならびにロテノン. *医薬ジャーナル*, 40: 111-116, 2004.
14. 浅沼幹人: 酸化ストレスとミトコンドリア機能障害, 炎症反応- 孤発性パーキンソン病とドパミン神経毒研究から得たもの. *内科*, 93: 611-615, 2004.
15. 小川紀雄, 浅沼幹人, 三好 耕: パーキンソン病における細胞死の機序. *日本臨床*, 62: 1629-1634, 2004.
16. Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Shimizu, M., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Pramipexole has ameliorating effects on levodopa-induced abnormal dopamine turnover in parkinsonian striatum and quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. *Neurol. Res.*, in press.

17. Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. Neuroscience, in press.

## 2. 学会発表

1. 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: マンガン誘発ドパミン神経毒性に対するパーキンの保護効果とドパミンキノンの関与. 第45回日本神経学会総会, 東京, 2004, 5, 13.
2. 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: メタンフェタミンのドパミン神経毒性におけるチロシナーゼの関与. 第31回日本脳科学学会, 宮崎, 2004, 6, 11.
3. 宮崎育子, 浅沼幹人, 東 洋一郎, 小川紀雄: マンガン誘発神経毒性に対するパーキンの保護効果とドパミンの関与. 第31回日本脳科学学会, 宮崎, 2004, 6, 11.
4. 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.
5. 浅沼幹人: 薬物依存・毒性発現にかかわる分子の分子生物学的検索—網羅的プロファイリングを中心に. 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.
6. 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: マンガン誘発ドパミン神経毒性とパーキンの保護効果におけるキノン体生成の関与. 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, 21.
7. 三好 耕, 大西一成, 浅沼幹人, 宮崎育子, Francisco Diaz, 小川紀雄: DISC1 は中心体タンパク kendrin と結合する. 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.

8. 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.
9. Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Transplantation of tyrosinase-producing cells into parkinsonian model. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2004, 10, 26.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

特許取得	特になし
実用新案登録	特になし
その他	特になし

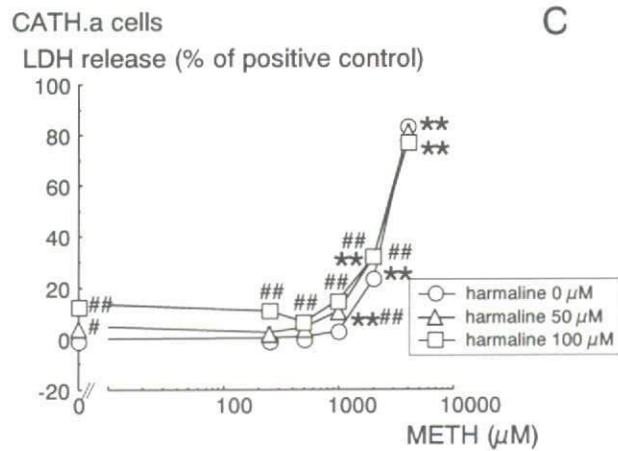
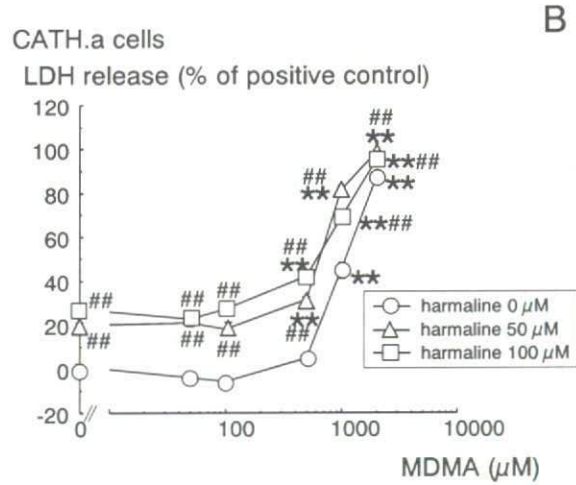
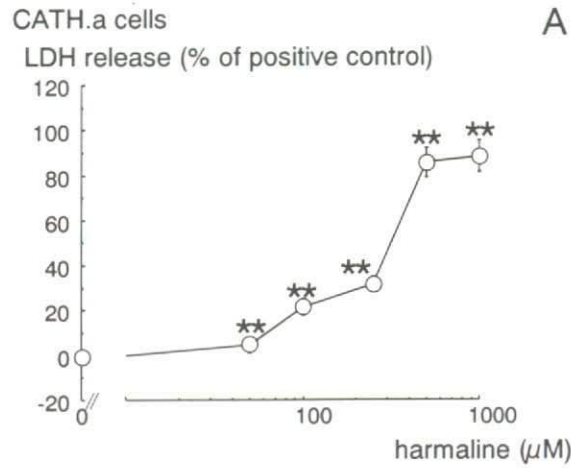


Fig. 1. Changes in released LDH from dopaminergic CATH.a cells after exposure to harmaline, and MDMA or METH for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. each control group without MDMA or METH. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. MDMA/METH-dose-matched control group without harmaline.

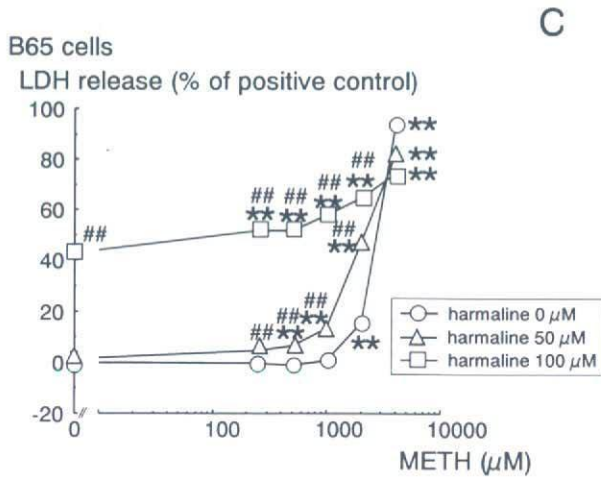
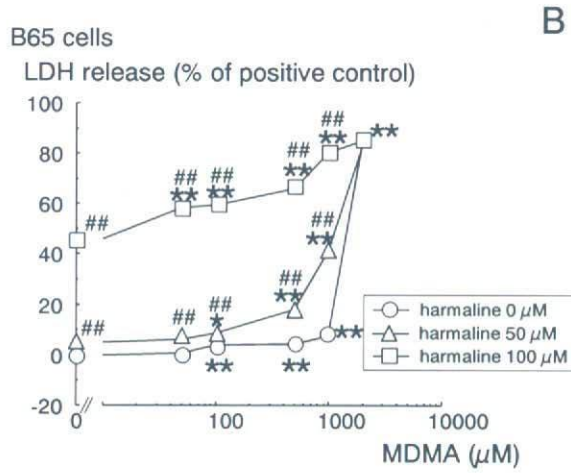
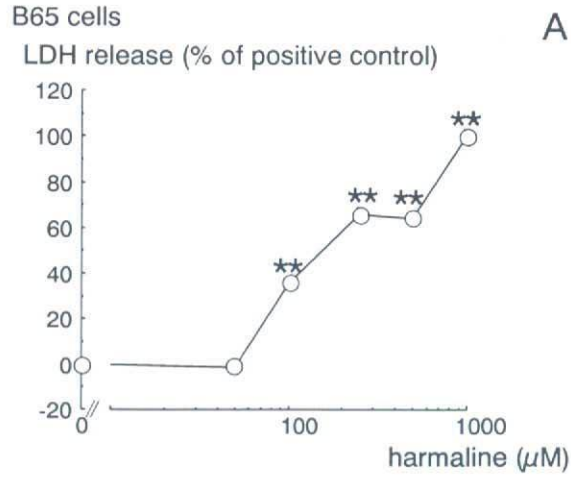


Fig. 2. Changes in released LDH from serotonergic B65 cells after exposure to harmaline, and MDMA or METH for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. each control group without MDMA or METH. # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs. MDMA/METH-dose-matched control group without harmaline.

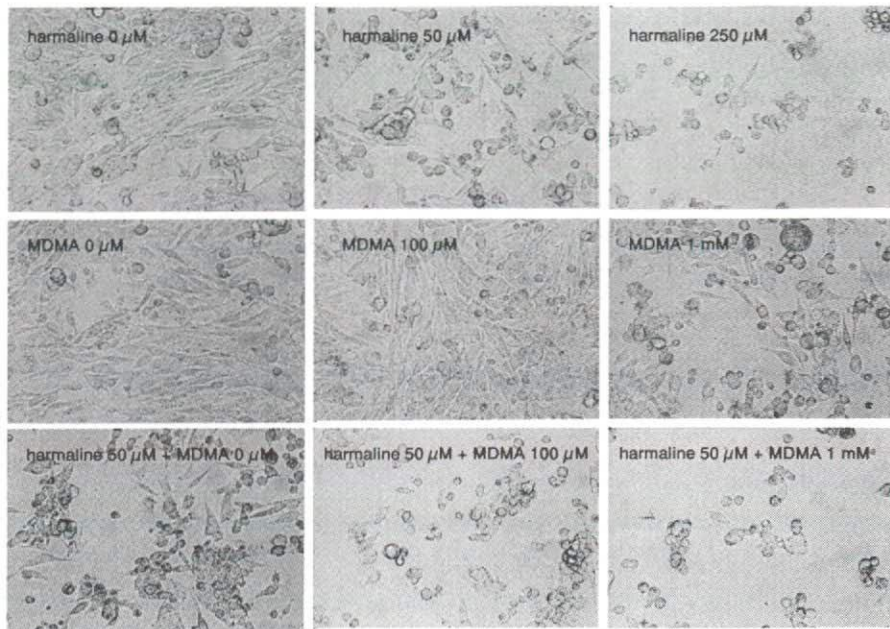


Fig. 3. Photographs of B65 cells treated with harmaline and/or MDMA (final concentration: 0, 100  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours.

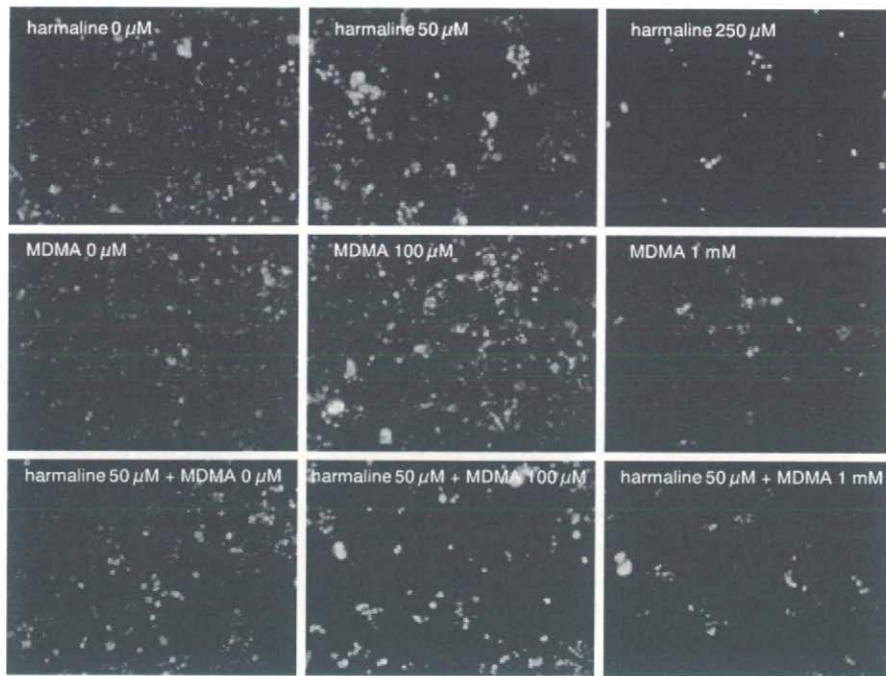


Fig. 4. Nuclear staining of B65 cells treated with harmaline and/or MDMA (final concentration: 0, 100  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours. Nuclei were visualized by incubation with Hoechst33342 dye.

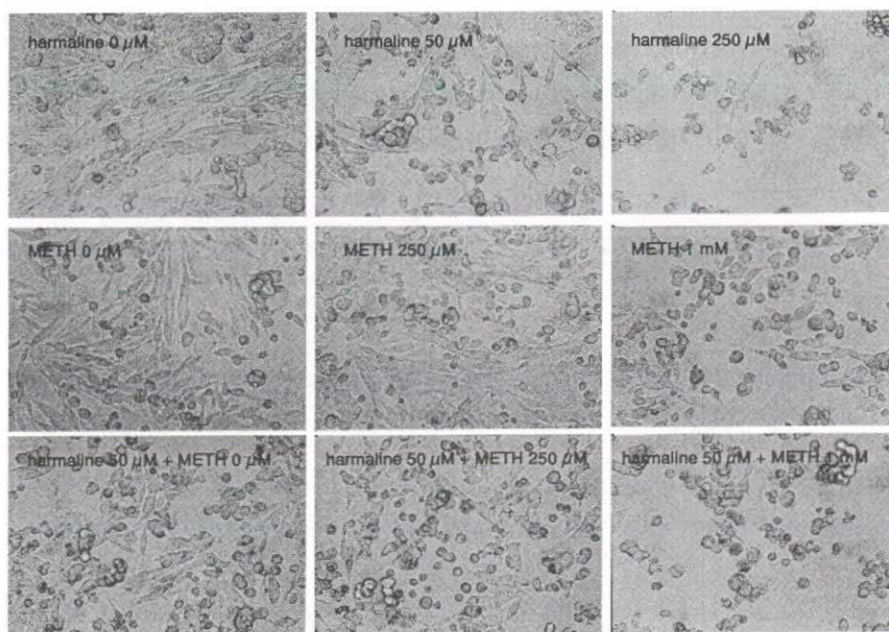


Fig. 5. Photographs of B65 cells treated with harmaline and/or METH (final concentration: 0, 250  $\mu\text{M}$ , 1 mM) for 24 hours.

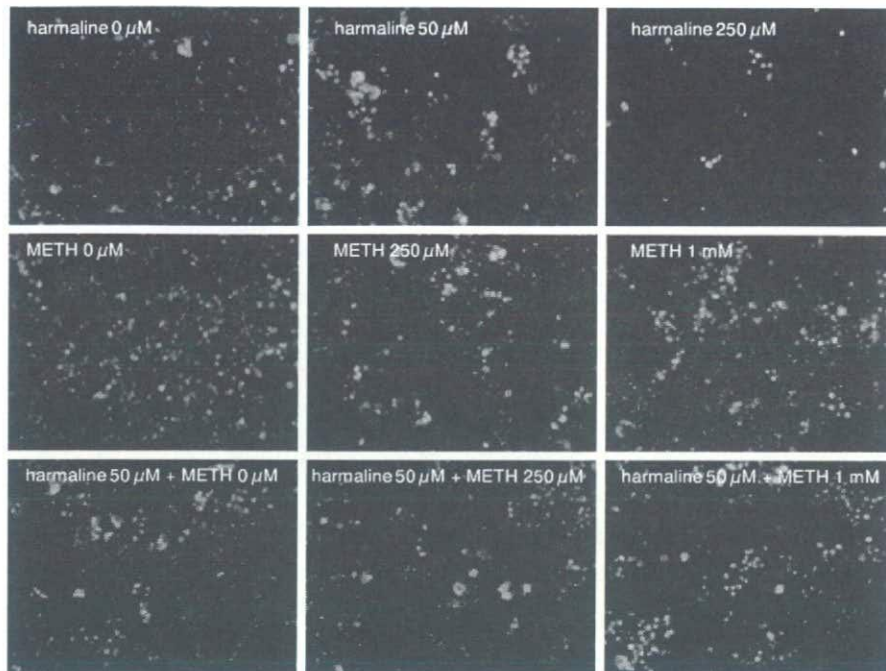


Fig. 6. Nuclear staining of B65 cells treated with harmaline and/or METH (final concentration: 0, 250  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours. Nuclei were visualized by incubation with Hoechst33342 dye.



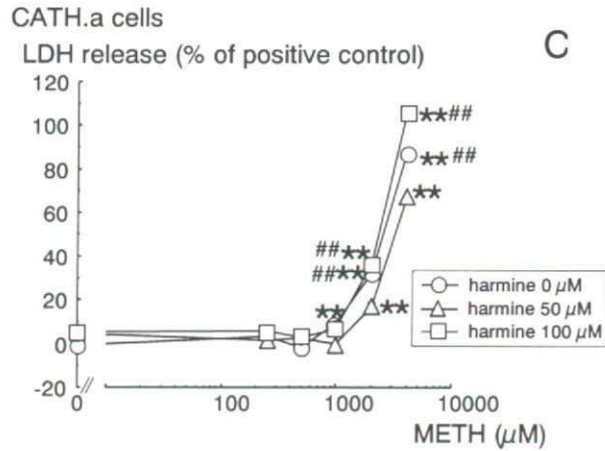
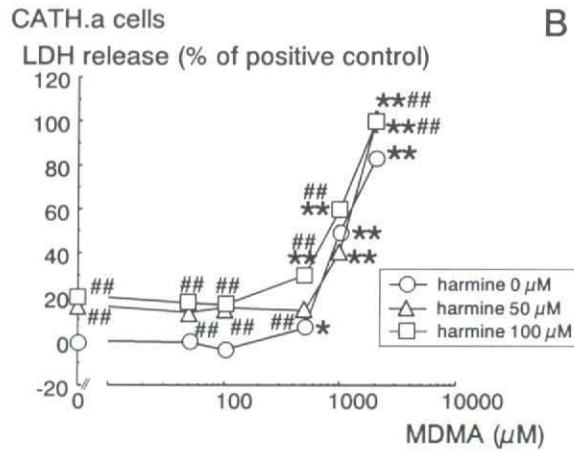
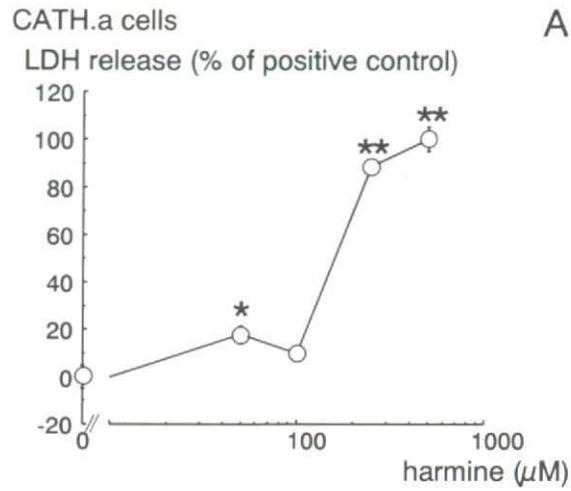


Fig. 7. Changes in released LDH from dopaminergic CATH.a cells after exposure to harmine, and MDMA or METH for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. each control group without MDMA or METH. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. MDMA/METH-dose-matched control group without harmine.

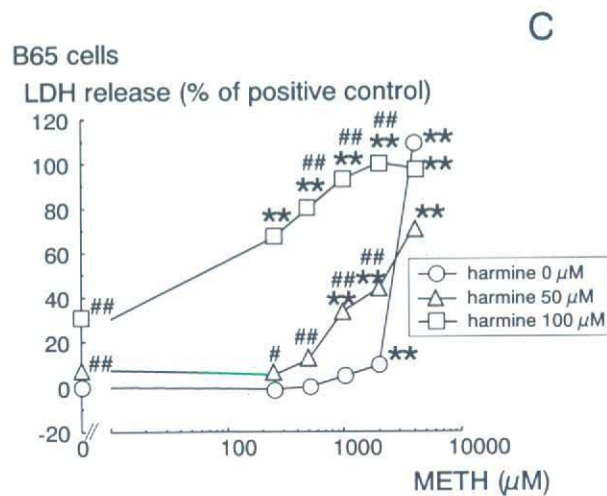
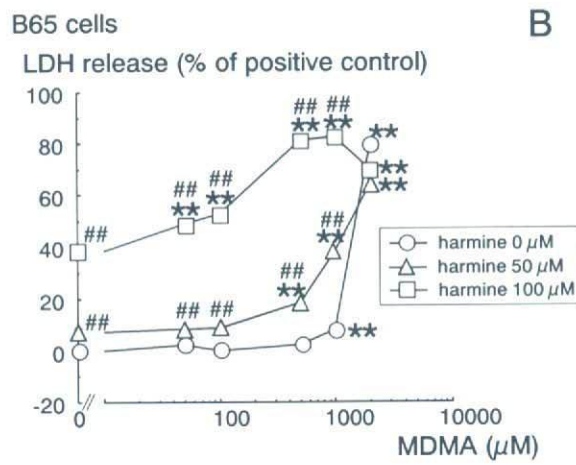
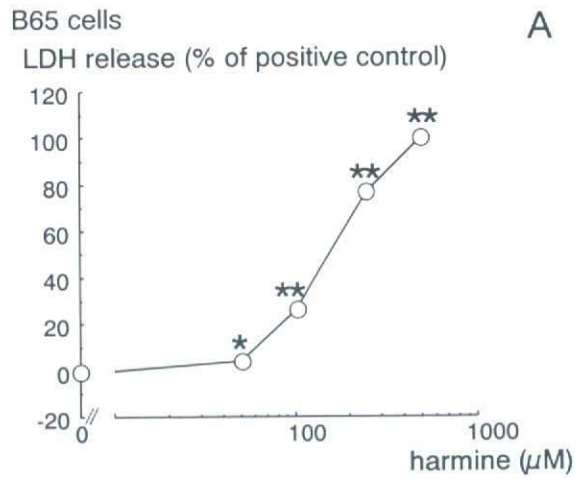


Fig. 8. Changes in released LDH from serotonergic B65 cells after exposure to harmine, and MDMA or METH for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. each control group without MDMA or METH. # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs. MDMA/METH-dose-matched control group without harmine.

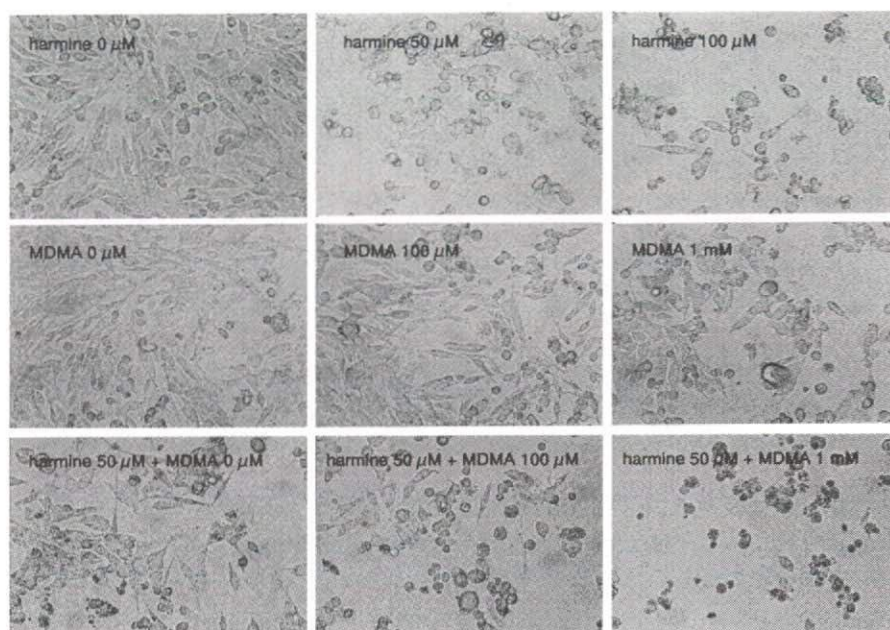


Fig. 9. Photographs of B65 cells treated with harmine and/or MDMA (final concentration: 0, 100  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours.

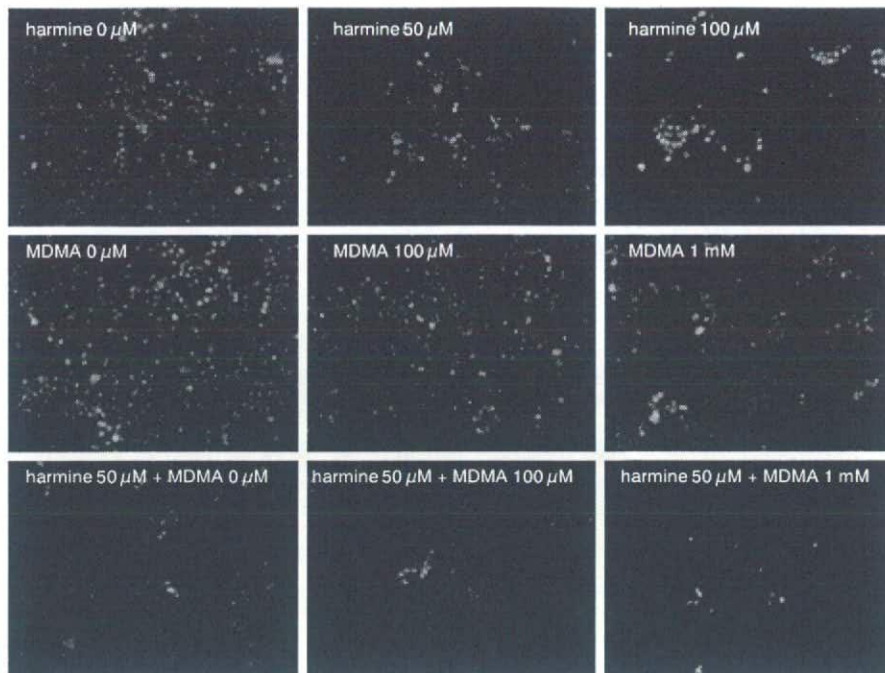


Fig. 10. Nuclear staining of B65 cells treated with harmine and/or MDMA (final concentration: 0, 100  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours. Nuclei were visualized by incubation with Hoechst33342 dye.