

Fig. 2 Performance of prepulse inhibition (PPI) in mice treated with methamphetamine (MAP) repeatedly. Mice were administered saline (SAL) or MAP (1 mg/kg) once a day for 7days. On the 7th day, animals were placed in the test box immediately after the treatment with MAP, and they were tested. Values are the means \pm S.E. ** $P < 0.01$ vs corresponding SAL-treated mice. ns: not significant. TH^{+/-}: tyrosine hydroxylase heterozygous, NR2A^{+/-}: NMDA receptor subunit $\epsilon 1$ knockout.

定したところ、saline 投与マウスのそれに比べ有意に増加していた (Fig. 3)。しかし、TH^{+/-}および NR2A^{+/-}マウスではそのような活性の増加は認められなかった。一方、saline 投与野生型マウスと TH^{+/-}および NR2A^{+/-}マウスの PKA 活性には差が認められなかった (Fig. 3)。

4. MAP 連続投与により誘発される精神行動障害発現時における側坐核の CaMKII および CREB 活性の変化

MAP の連続投与により精神行動障害を発現した野生型マウスの側坐核における CaMKII および CREB 活性をウエスタン法により解析したところ、saline 投与マウスのそれらに比べ有意に増加していた (Fig. 4)。しかし、TH^{+/-}および NR2A^{+/-}マウスではそのような活性の増加は認められなかった。一方、saline 連続投与野生型マウスと TH^{+/-}および NR2A^{+/-}マウスの CaMKII および CREB 活性に差は認められなかった (Fig. 4)。

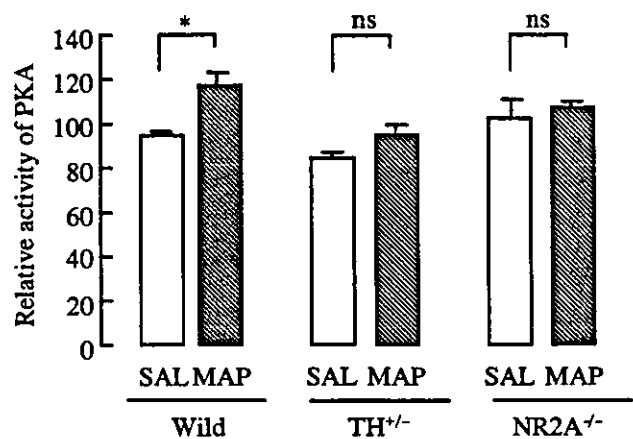


Fig. 3 Relative activity of protein kinase A (PKA) in the nucleus accumbens of mice pretreated with methamphetamine (MAP) repeatedly. Mice were administered saline (SAL) or MAP (1mg/kg) once a day for 7days. On the 7th day, mice were sacrificed 30min after treatment with MAP. Values are the means \pm S.E. * $P < 0.05$ vs. SAL-treated mice. ns: not significant. TH^{+/-}: tyrosine hydroxylase heterozygous, NR2A^{+/-}: NMDA receptor subunit $\epsilon 1$ knockout.

D. 考察

MAP は、ドパミン作動性神経系を亢進させることから³⁾、MAP の連続投与により誘発される精神行動障害には、ドパミン作動性神経系機能異常が関与していると示唆されている。本研究において、野生型マウスに MAP を連続投与すると、認知障害の1つである情報感覚処理機能障害は、運動過多の増強 (逆耐性) と同様に惹起されたが、先天的に脳内ドパミン作動性神経系が障害されている TH^{+/-}マウスでは、これらの精神行動障害は惹起されなかった。情報感覚処理機能障害は、ドパミン受容体作動薬によって惹起されること、ドパミン作動性神経機能を低下させると緩解されることから、MAP の連続投与による運動過多の増強と同様に 情報感覚処理機能障害の発現にはドパミン作動性神経系が深く関与することが示唆される。一方、MDMA は、シナプス間隙のセロトニン量を増加させ、セロトニン 52A 受容体を活性化させ、その結果ドパミンの放出を促進し、ドパミン作動性神経系を賦活する⁸⁾。したがって、本

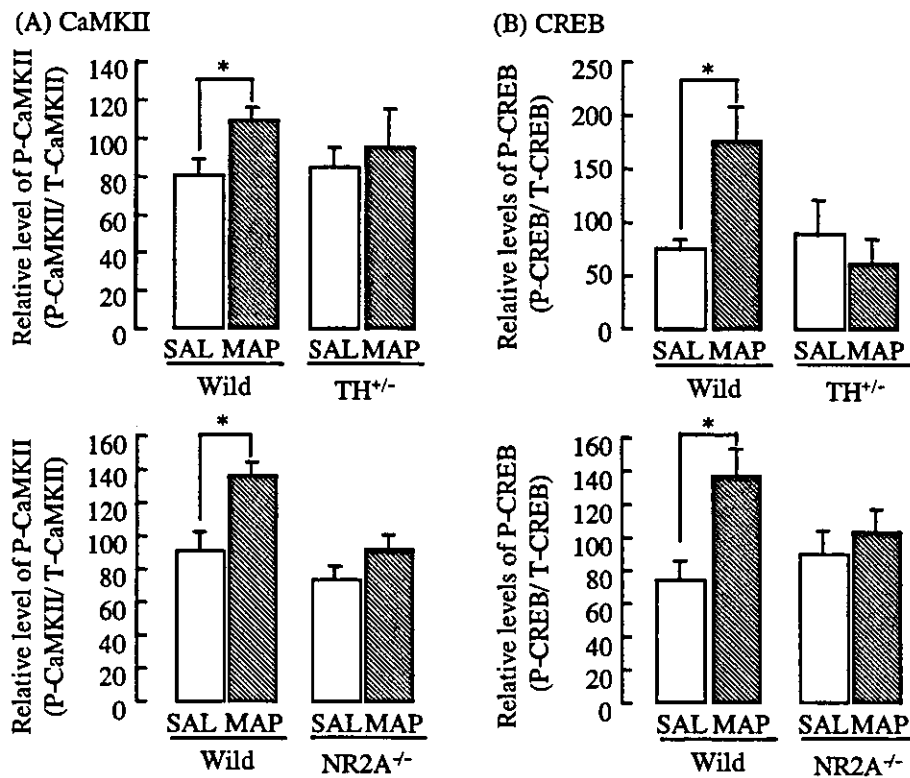


Fig. 4 Relative levels of phosphorylated CaMKII (A) and CREB (B) in the nucleus accumbens of mice treated with methamphetamine (MAP) repeatedly. Mice were administered saline (SAL) or MAP (1mg/kg) once a day for 7 days. On the 7th day, mice were sacrificed 30 min after treatment with MAP. Values are the means \pm S.E. * $P < 0.05$ vs corresponding SAL-treated mice. CaMKII: Ca²⁺/calmodulin kinase II, P-CaMKII: phosphorylated CaMKII, T-CaMKII: total CaMKII, CREB: cyclic AMP response element binding protein, P-CREB: phosphorylated CREB, T-CREB: total CREB. TH^{+/-}: tyrosine hydroxylase heterozygous, NR2A^{+/-}: NMDA receptor subunit $\epsilon 1$ knockout.

研究において MAP 同様、MDMA の連続投与によって運動過多の増強 (逆耐性) が惹起されたのは、セロトニン作動性神経系を介するドパミン作動性神経系の賦活化が関与していると示唆される。しかし、この点についてはさらに検討する必要がある。

MAP は脳内においてドパミン遊離量を増加させ⁹⁾、後シナプスのドパミン受容体に対する刺激を増強させるので、精神行動障害の発現にはドパミン受容体を介したシナプス可塑に関わる細胞内情報伝達の変化が関与していると示唆される。ドパミン受容体が刺激されると、G 蛋白質を介して adenylyl cyclase が活性化し、cAMP 量が増加す

る。その結果 PKA が活性化され、種々の蛋白のリン酸化反応という一連の変化を促す。本研究において、精神行動障害を示した MAP 連続投与マウスの側坐核におけるドパミン受容体を介するシグナル伝達系の変化について解析したところ、PKA、CaMKII および CREB の活性の増大が認められた。しかし、精神行動障害を惹起しなかった TH^{+/-}マウスでは、このような活性の増大は認められなかった。CREB は、神経の可塑的変化に関わる多くの遺伝子発現を制御する転写因子の一つ¹⁰⁾ であり、PKA および CaMKII、IV などの種々のプロテインキナーゼにより活性化される¹²⁾。CREB の活性化は、その下流において c-fos¹³⁾、

BDNF¹⁴⁾、TH¹⁵⁾などの遺伝子の転写活性を促進し、神経の可塑的变化を引き起こすと考えられている。したがってMAP連続投与による精神行動障害の発現には、これらのシナプスの可塑的变化につながる分子の異常な活性化が関与していることが示唆される。ドパミン作動性神経機能が遺伝的に低下しているTH^{-/-}マウスでは、MAP連続投与による側坐核のPKA、CaMKII、CREB活性の増強が認められなかったことから、精神行動障害が惹起されなかったものと示唆される。

MAP連続投与によってドパミン受容体を介して活性化されるPKAは、転写因子であるCREBのみならずNMDA受容体機能も制御している¹⁶⁾、¹⁷⁾。NMDA受容体が活性化され、細胞内へのCa²⁺が流入されるとCaMKIIは活性化される¹⁸⁾。このことからMAP連続投与によって惹起される精神行動障害の発現には、ドパミン受容体を介するシグナル伝達系だけでなくNMDA受容体を介するシグナル伝達系も関与している可能性が示唆される。本研究において、MAP連続投与野生型マウスにおいて惹起された運動過多の増強および情報処理感覚機能障害といった精神行動障害は、遺伝的にNMDA受容体機能が低下しているNR2A^{-/-}マウスでは認められなかった。さらに精神行動障害を惹起しなかったNR2A^{-/-}マウスは、MAP連続投与野生型マウスの側坐核において認められたようなPKA、CaMKIIおよびCREBの活性の増大は認められなかった。したがって、PKAが側坐核におけるドパミン作動性神経とグルタミン酸作動性神経とのネットワーク構成に関わる重要なメディエーターであることが示唆される。

E. 結論

MAP連続投与によって側坐核におけるドパミン作動性神経系機能が亢進された結果、ドパミン受容体を介するPKA/CaMKII、CREBなどの神経可塑性に関わる細胞内情報伝達系が増強され、ド

パミン作動性神経系とグルタミン酸作動性神経系の異常な神経ネットワークが構築され、MAP誘発行動障害が惹起されるものと推察される。

【参考文献】

1. Robinson, T.E. and Becker, J.B.: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal model of amphetamine psychosis. *Brain Res. Rev.*, 11: 157-198, 1986.
2. Srisurapanont, M., Ali, R., Marsden, J. et al.: Psychotic symptoms in methamphetamine psychotic in-patients. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 6: 347-352, 2003.
3. Brown, J.M., Riddle, E.L., Sandoval, V. et al.: A single methamphetamine administration rapidly decreases vesicular dopamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302: 497-501, 2002.
4. Vanderschuren, L.J. and Kalivas, P.W.: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151: 99-120, 2000.
5. 一ノ瀬真琴, 倉田健一, 清水賢ら: 本邦におけるMDMA関連精神障害の乱用背景・診断・治療の検討. *精神医学*, 46: 1105-1112, 2004.
6. Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H. et al.: Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J. Biol. Chem.*, 270: 27235-27243, 1995.
7. Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I. et al.: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Nature*, 373: 151-155, 1995.
8. Yamamoto, B.K., Nash, J.F., Gudelsky, G.A.: Modulation of methylenedioxymethamphetamine-

- induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273: 1063-1070, 1995.
9. Nishijima, K., Kashiwa, A., Hashimoto, A. et al.: Differential effects of phencyclidine and methamphetamine on dopamine metabolism in rat frontal cortex and striatum as revealed by in vivo dialysis. *Synapse*, 22: 304-312, 1996.
 10. Mayr, B. and Montminy, M.: Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 599-609 (2001).
 11. Lonze, B.E. and Ginty, D.D.: Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35: 605-623 (2002).
 12. Dash, P.K., Karl, K.A., Colicos, M.A. et al: cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Sci. USA*, 88: 5061-5065, 1991.
 13. Ginty, D.D., Bonni, A. and Greenberg, M.E.: Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*, 77: 713-725, 1994.
 14. Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B. et al.: Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20: 709-726, 1998.
 15. Ghee, M., Baker, H., Miller, J.C. et al.: AP-1, CREB and CBP transcription factors differentially regulate the tyrosine hydroxylase gene. *Mol. Brain Res.*, 55: 101-114, 1998.
 16. Westphal, R.S., Tavalin, S.J., Lin, J.W. et al.: Regulation of NMDA receptor by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science*, 285: 93-96, 1999.
 17. Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P. et al.: Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.*, 278: 20196-20202, 2003.
 18. Ghosh, A. and Greenberg, M.E.: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 26: 239-247, 1995.
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Hamdy M. M., Noda Y., Miyazaki M., Mamiya T., Nozaki A., Nitta A., Sayed M. Assi A.-A., Gomaa A., Nabeshima, T.: Molecular mechanisms in dizocilpine-induced attenuation of development of morphine dependence: an association with cortical Ca²⁺/calmodulin-dependent signal cascade. *Behav. Brain. Res.*, 152: 263-270, 2004.
 - 2) Ren X., Noda Y., Mamiya T., Nagai T., Nabeshima T.: A neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, prevents the development of morphine dependence and tolerance linked to the extracellular signal-regulated protein kinase. *Behav. Brain. Res.*, 152: 243-250, 2004.
 - 3) Nagai T., Yamada K., Yoshimura M., Ishikawa K., Miyamoto Y., Hashimoto K., Noda Y., Nitta A., Nabeshima T.: Tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 3650-3655, 2004.
 - 4) Miyamoto Y., Yamada K., Nagai T., Mori H., Mishina M., Furukawa H., Noda Y., Nabeshima T.: Behavioural adaptations to addictive drugs in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 151-158, 2004.
 - 5) Mizoguchi H., Yamada K., Mizuno M., Mizuno T., Nitta A., Noda Y., Nabeshima T.: Regulations of

methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 65: 1293-1301, 2004.

2. 学会発表

- 1) 溝口博之, 毛利彰宏, 丹羽美苗, 水野朋子, 山田清文, 野田幸裕, 新田淳美, 鍋島俊隆. メタンフェタミン誘発行動障害における Matrix metalloproteinase (MMP)/Tissue inhibitor of Matrix metalloproteinase (TIMP) システムの関与. 第 105 回日本薬理学会近畿部会 (徳島市, 2004. 6)
- 2) 村井里菜, 野田幸裕, 永井拓, 鍋島俊隆. フェンシクリジン連続投与マウスに認められる情動障害におけるグルタミン酸作動性神経系の関与. 第 34 回日本神経精神薬理学会/第 26 回日本生物学的精神医学会・合同年会 (東京, 2004. 7).
- 3) Mouri A., Noda Y., Noda A., Furukawa H. and Nabeshima T. Repeated treatment with phencyclidine impairs latent learning in mice: association with the cortical Ca²⁺/Calmodulin kinase II. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪, 2004. 9)
- 4) 大谷晋, 新田淳美, Cen Xiaobo, Zhao Yinglan, 野田幸裕, 川越徹也, 鍋島俊隆. 神経保護作用および薬物依存形成抑制作用を示す疎水性ジペプチド Leu-Ile の脳内結合タンパクの同定. 第 106 回日本薬理学会近畿部会 (京都, 2004. 11)
- 5) 野田幸裕, 鍋島俊隆. 非競合的 N-methyl-D-aspartate 受容体拮抗薬を連続投与したマウスに認められる精神行動障害と N-methyl-D-aspartate 受容体シグナル伝達系の変化. 日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム (大阪, 2004. 7).
- 6) 野田幸裕, 鍋島俊隆. NMDA 受容体機能障害による認知障害の分子機序: グルタミン酸作動性神経系の関与. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪, 2004. 9).
- 7) 毛利彰宏, 野田幸裕, 鍋島俊隆. フェンシクリジン連続投与マウスに認められる認知障害の分子機構. 第 5 回 ABC 研究会 (大阪, 2004. 10).

methamphetamine 探索行動（“渴望”）ならびに 知的機能におよぼす MDMA の影響

分担研究者：山本経之

研究協力者：縄田陽子、平仁田尊人

（九州大学大学院薬学府医療薬科学専攻薬効解析学分野）

[研究要旨]

本研究は、①覚醒剤 methamphetamine (MAP) 自己投与方法 (ラット) を用いての MAP 探索行動 (“渴望”) ならびに ②object recognition 法 (マウス) を用いての認知機能に及ぼす 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の作用を検討した。MAP 自己投与方法ラットの MAP 探索行動は、少量の MAP-priming 投与 (1.0mg/kg,i.p.) により誘発されたが、MDMA-priming 投与 (3.2-10mg/kg,i.p.) では誘発されなかった。一方、MDMA (10mg/kg,i.p.) は MAP (3.2mg/kg,i.p.) と同様に ICR 系マウスの自発運動量を増加させた。この MDMA の自発運動量増加作用は、カンナビノイド CB1 受容体ノックアウトマウス [CB1 (-/-) マウス] では減弱した。object recognition 実験において、CB1 (+/+) マウスの新奇物体へのアプローチ時間は、MDMA 7 日間反復投与後休薬 7 日目では有意に減少した。しかしながら、このアプローチ時間の減少は CB1 (-/-) マウスでは全く認められなかった。以上、MDMA は MAP 探索行動を誘発せず、化学構造上類似点を有しても、MAP と必ずしも同様の作用態度を示すわけではない事が分かった。また、MDMA の作用は一部 CB1 受容体を介して発現する事が示唆された。

A. 研究目的

3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA: 通称 Ecstasy) は覚醒剤 methamphetamine (MAP) および幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM) の化学構造に類似する薬物で (Fig.1)、近年その乱用の拡大が問題となっている。これまでに MDMA の依存性に関する詳細な研究はなされ

ておらず、临床上重要な薬物への渴望の再燃・再発に焦点を当てたものは皆無である。また、MDMA は依存性のみならず、記憶・認知機能の障害等を惹起し、休薬後も持続する事が報告されている³⁾。これまで我々は MAP 探索行動 (“渴望”) の発現に脳内カンナビノイドシステムが関与する事¹⁾、また大麻の活性成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) が作業記憶の障害を誘発する事²⁾を報告した。今回、薬物自己投与実験法を用いて、MDMA が MAP 探索行動を誘発するか否かを検討した。また、脳内カンナビノイドの側面から、MDMA が自発運動量および休薬後の認知機能に

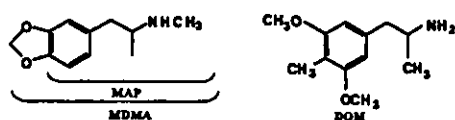


Fig.1. MDMA、MAP 及び DOM の化学構造式

及ぼす影響を、カンナビノイド CB1 受容体 KO [CB1(-/-)] マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

薬物自己投与実験には体重 250-350g の Wistar 系雄性ラット [九動(株)] を、また自発運動量および認知機能に関する実験には体重 30-40g の ICR 系雄性マウス [チャールズ・リバー(株)] を用いた。

2. 使用薬物

3,4-methylenedioxymethamphetamine・HCl (MDMA A : 岐阜薬科大学・薬化学教室、岩村樹憲助教授から供与) および methamphetamine・HCl [MAP : 大日本製薬(株)] は生理食塩液 [大塚製薬(株)] に溶解した。

3. 薬物自己投与実験法

MAP 自己投与用カテーテルはシラスティックカテーテル [外径 1.0mm、内径 0.5mm ; カネカメディクス(株)] を使用し、ラットの右頸静脈から挿入し、先端を心耳の入り口直前に留置した。オペラント箱 [29cm×23cm×33cm ; ニューロサイエンス(株)] は、active lever と inactive lever の 2つが装着されている。ラットが active lever を 1 回押せば、MAP (0.02mg/100 μ L/infusion) が薬物関連刺激 (drug-associated cue : 音; 85dB/2.9kHz, 光; 200lux) と共に微量注入される。10 日間の MAP 自己投与実験後、MAP を生理食塩液に置換しての 5 日間の消去過程 (cue 呈示なし) を行った。その 6 日目に、薬物関連刺激および薬物 (MAP、MDMA、DOM および THC) の priming 投与を行い、MAP 探索行動に及ぼす影響を検討した。

4. エサを正の強化子としたレバー押し行動課題

薬物自己投与実験直後に food pellet [45mg ; Bioserve[®], ホルトン興業社(株)] を正の強化子とし

てレバー押し実験 (fixed ratio 1) を行った。ラットが 30 個の food pellet を獲得するまでの時間を experimental time として測定し、1200 秒を cut off time とした。

5. 自発運動量の測定

マウスの自発運動量は赤外線エリアセンサー (形 F5B、オムロン社製) を用いて、点灯 (10W) 下に 60 分間、テストケージ (22.5×33.8×14.0cm) にて測定した。測定は MDMA (10mg/kg,i.p.) の単回投与時ならびに 7 日間の反復投与時の 2 回行った。

6. novel object recognition 課題

MDMA 反復投与後休薬 7 日目に、本実験を行った。本課題は、①open field 内に 2 つの同一物体 (金属製、高さ 5cm の球状の物体) の存在下にマウスを 10 分間放置し (pre-trial) 、その 3 時間後に ②片方を形状の全く異なる物体 (円錐状の物体) に置き換え、各物体に対するアプローチ時間を測定した (test-trial) 。アプローチ時間は、物体から 1cm 外につけられた円内にマウスの四肢のいずれかが触れた時間を測定した。

7. 統計学的処理

値は全て平均 \pm 標準誤差で表した。二群間の有意差検定には、Bonferroni / Dunn test を用いた。

C. 研究結果

1. MDMA の MAP 探索行動に及ぼす作用

MAP 自己投与 10 日目のレバー押し回数は、36.9 \pm 8.3 回であった。その後 MAP を生理食塩液に置換するとレバー押しは徐々に減少し、5 日目には 4.6 \pm 0.9 回となった。薬物関連刺激および MAP-priming 投与 (1.0mg/kg,i.p.) により、レバー押し回数は増加 (MAP 探索行動) した (Fig.2) 。しかしながら、MDMA 3.2 および 5.6mg/kg の

priming 投与ではレバー押し回数に変化は認められなかった (Fig.3) 。 MDMA 10mg/kg での active lever のレバー押し回数は大部分の動物で0回となった。この時、MAP 探索行動実験直後の餌を強化子としたレバー押し行動も MDMA 10mg/kg の用量により抑制された。一方、DOM (1.0-10mg/kg,i.p.) および THC (0.32-3.2mg/kg,i.p.) の priming 投与では、レバー押し回数に変化は認められなかった (Fig.3) 。

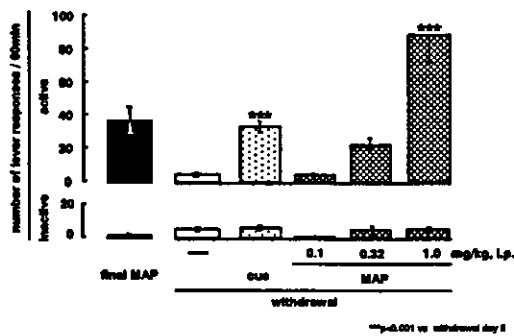


Fig.2. MAP 探索行動に対する薬物関連刺激および MAP-priming 投与の作用

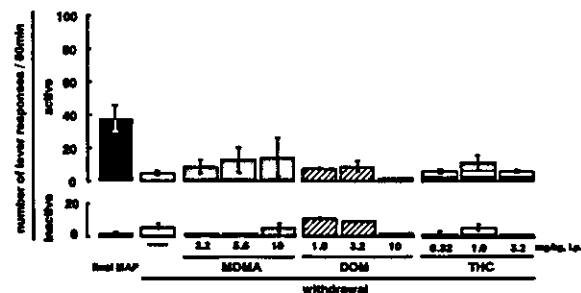


Fig.3. MAP 探索行動に対する MDMA-, DOM-および THC-priming 投与の作用

2. MDMA の自発運動量に及ぼす作用

ICR 系マウスの自発運動量は、MAP (1.0, 3.2mg/kg,i.p.) および MDMA (3.2, 10mg/kg,i.p.) の単回投与により用量依存的に増加した (Fig.4) 。この MDMA 10mg/kg の自発運動量増加作用は CB1 (-/-) マウスでは減弱した (Fig.5) 。 MDMA 10mg/kg 反復投与では、単回投与による自発運動量増加作用は増強されず、単回投与と同程度の自

発運動量であった。一方、CB1 (-/-) マウスでは、MDMA 10mg/kg 反復投与による自発運動量増加作用は全く認められなかった (Fig.5) 。

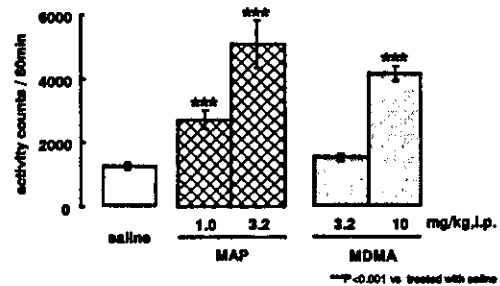
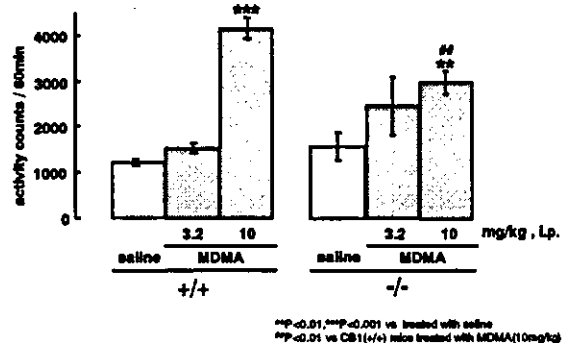


Fig.4. MAP および MDMA の自発運動量に及ぼす影響

単回投与



7 日間反復投与

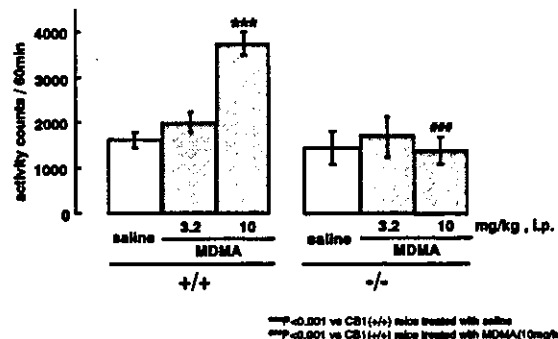


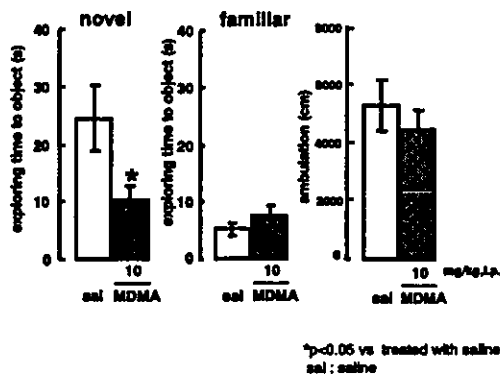
Fig.5. MDMA の単回および反復投与による自発運動量に及ぼす影響

3. MDMA の認知機能に及ぼす作用

MDMA (10mg/kg,i.p.) 7 日間反復投与後休養 7 日目の物体に対する CB1 (+/+) および (-/-) マ

ウスのアプローチ時間 (pre-trial) には、生理食塩液投与群と比較して差は認められなかった。一方、CB1 (+/+) マウスでは、MDMA (10mg/kg,i.p.) 7日間反復投与後休薬7日目の test-trial での既存物体 (familiar) に対するアプローチ時間には、生理食塩液投与群と比較して差は認められなかった。一方、新奇物体 (novel) に対するアプローチ時間は減少した。また、この時の open-field 内での自発運動量には差は認められなかった。しかしながら、CB1 (-/-) マウスでは、既存物体および新奇物体に対するアプローチ時間は共に生理食塩液投与群と比較して全く差は認められなかった。また、この時の自発運動量にも差は認められなかった (Fig.6)。

CB1 (+/+) マウス



CB1 (-/-) マウス

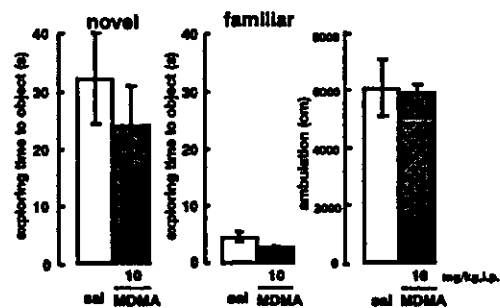


Fig.6. MDMA 7日間反復投与後、休薬7日目の認知行動の変化

D. 考察

MDMA 及び MAP はその化学構造の類似性と

共に、ドパミントランスポーター (DAT) 阻害作用⁶⁾ならびに自発運動量増加作用⁴⁾など、数多くの薬理学的作用の類似点が報告されている。しかし、MDMA は MAP 探索行動を発現せず、MAP と異なる作用態度を示した。高用量の MDMA 10mg/kg は MAP 探索行動を誘発しないばかりか、餌を強化子としたレバー押し行動を抑制した。Spanos らは、MDMA (7.5mg/kg,i.p.) がセロトニン症候群/常同行動を惹起する事を報告⁷⁾している。この事から考えると、MDMA のレバー押し行動の抑制作用は 5-HT 神経系の活性化に基づくセロトニン症候群/常同行動の発現に基因する事が示唆される。また、セロトニントランスポーター (SERT) の阻害作用は MDMA の方が MAP よりも 10 倍強い。逆に、DAT 阻害作用は MAP の方が 10 倍強い²⁾。この点から考えると、MDMA によるレバー押し行動の抑制作用は 5-HT 神経系の活性化による鎮静作用に基因する可能性が示唆される。また、幻覚作用を有する DOM や THC が MAP 探索行動を起こさなかった点では、MDMA の MAP 探索行動に対する作用は MAP よりも幻覚薬に類似していると言える。

MDMA の自発運動量増加作用は、CB1 (-/-) マウスでは減弱した。近年、Tzavara らは amphetamine による自発運動量増加作用が CB1 受容体拮抗薬によって減弱する事を報告⁸⁾している。これらの知見から、MDMA の自発運動量増加作用は一部 CB1 受容体の活性化を介して発現する可能性が示唆される。

CB1 (+/+) マウスでは、MDMA 7日間反復投与後休薬7日目における認知機能は障害されていた。臨床的にも Fox らは MDMA の休薬時に認知機能が障害されている事を報告³⁾し、本動物実験の結果を支持している。この MDMA による認知機能障害作用は CB1 (-/-) マウスでは全く認められなかった。従って、MDMA による認知機能障害作用もまた、CB1 受容体を介して発現する可能

性が示唆される。

E. 結論

MDMA は MAP 探索行動を誘発せず、化学構造上類似点を有しても、MAP と必ずしも同様の作用態度を示すわけではない事が分かった。また、MDMA の作用は一部 CB1 受容体を介して発現する事が示唆された。

【参考文献】

- 1) Anggadiredja K., Nakamichi M., Hiranita T., et al.: Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. *Neuropsychopharmacology*, 29 : 1470-1478, 2004
- 2) Bankson MG., Cunningham KA.: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin-dopamine interactions. *J Pharmacol Exp Ther.*, 297 : 846-52, 2001
- 3) Fox HC., McLean A., Turner JJ., et al.: Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ("ecstasy") polydrugusers. *Psychopharmacology*, 162:203-214, 2002
- 4) Gold LH., Koob GF.: MDMA produces stimulant-like conditioned locomotor activity. *Psychopharmacology*, 99 : 352-356, 1989
- 5) Miyamoto A., Yamamoto T., Watanabe S.: Effect of repeated administration of delta 9-tetrahydrocannabinol on delayed matching-to-sample performance in rats. *Neurosci Lett.*, 201 : 139-142, 1995
- 6) Nash JF., Brodtkin J.: Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.*, 259 :820-825, 1991

7) Spanos LJ., Yamamoto BK.: Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-) MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, 32 : 835-840, 1989

8) Tzavara ET., Davis RJ., Perry KW., et al.: The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol.*, 138 : 544-553, 2003

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Anggadiredja, K. Sakimura, T. Hiranita, T. Yamamoto.: Naltrexone attenuates cue- but not drug-induced methamphetamine seeking: a possible mechanism for the dissociation of primary and secondary reward. *Brain Res.*, 1021 : 272-276, 2004
- 2) K. Anggadiredja, M. Nakamichi, T. Hiranita, H. Tanaka, Y. Shoyama, S. Watanabe, T. Yamamoto.: Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. *Neuropsychopharmacology*, 29 : 1470-1478, 2004
- 3) T. Hiranita, K. Anggadiredja, C. Fujisaki, S. Watanabe, T. Yamamoto.: Nicotine attenuates relapse to methamphetamine-seeking behavior (craving) in rats. *Ann NY Acad Sci.*, 1025 : 504-507, 2004
- 4) T. Yamamoto, K. Anggadiredja, T. Hiranita.: New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: a role for the endocannabinoid-arachidonic acid pathway in drug reward and long-lasting relapse to drug taking. *J. Pharmacol. Sci.*, 96 : 382-388, 2004
- 5) T. Yamaguchi, T. Kubota, S. Watanabe and T. Yamamoto.: Activation of brain prostanoid EP3 receptors via arachidonic acid cascade during behavioral suppression induced by delta8-tetrahydro-

cannabinol. J Neurochem., 88 : 148-154, 2004

6) 荒木久美子, 山本経之, ラットのオペラント行動を用いての知的機能の検索法, 日薬理誌, 124 : 3-9, 2004

7) 崎村克也, 平仁田尊人, 宮本道彦, 永田健一郎, 山本経之, 薬物への渴望 (craving) の再燃・再発モデルとその発現機序日薬理誌, 2005 (in press)

2. 学会発表

1) 山本経之, K. Anggadiredja, 平仁田尊人, 渡辺繁紀, シンポジウム-脳内大麻の研究動向と新展開-“薬物依存/脳内報酬系に関わる脳内カンナビノイドシステム”(オーガナイザー&シンポジスト), 第77回日本薬理学会年会(大阪, 2004年3月)

2) 首藤隆秀, 黒岩真帆美, 濱村みつ子, 島添隆雄, 渡辺繁紀, 山本経之, メタンフェタミン逆耐性現象に対するドーパミン受容体アゴニスト反復投与の効果, 第6回ブレインサイエンス研究会(福岡, 2004年5月)

3) T. Yamamoto, K. Anggadiredja, T. Hiranita, Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade, International symposium for opioid and pain-related peptide in Sendai (Sendai, Japan, 2004, July)

4) 崎村克也, K. Anggadiredja, 平仁田尊人, 山本経之, メタンフェタミン探索行動の再燃における扁桃体基底外側核の役割-内因性カンナビノイドとの関連性, 第34回日本神経精神薬理学会年会(東京, 2004年7月)

5) 崎村克也, 平仁田尊人, 宮本道彦, K. Anggadiredja, 山本経之, メタンフェタミン摂取行動及び探索行動発現における扁桃体基底外側核/内因性カンナビノイドの関与, 第10回日本行動薬理研究会(宮城, 2004年8月)

6) 山本経之, 平仁田尊人, 崎村克也, 薬物への渴

望(craving)を如何にして捉えるか-その行動薬理的戦略を探る-, 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」(神奈川, 2004年8月)

7) 山本経之, K. Anggadiredja, 平仁田尊人, 覚醒剤 methamphetamine への渴望(craving)の再燃における脳内 cannabinoid system の関与, 第6回感情・認知・行動(ABC)研究会(大阪, 2004年11月)

8) 藤崎千恵, 山村悠介, 平仁田尊人, 山本経之, 覚醒剤メタンフェタミン探索行動に対する新規化合物(-)-BPAP の作用, 第57回日本薬理学会西南部会(福岡, 2004年11月)

9) 平仁田尊人, 崎村克也, K. Anggadiredja, 藤崎千恵, 山本経之, 覚醒剤メタンフェタミン探索行動(“渴望”)における側坐核中核部ニコチン性 Ach 受容体の役割, 第8回ニコチン・薬物依存研究フォーラム学術年会(名古屋, 2005年3月予定)

10) 崎村克也, 平仁田尊人, K. Anggadiredja, 山本経之, 扁桃体, 側坐核における内因性カンナビノイドシステム-覚せい剤メタンフェタミン探索行動の発現における役割, 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005年3月予定)

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特願 2004-33996 「薬物依存症治療薬 [(-)-BPAP]」;(2004年11月25日)

MDMA のセロトニン放出および神経毒性発現の分子機序の解明

分担研究者 金子周司

共同研究者 中川貴之、山内陽介、鈴木祐一

（京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野）

〔研究要旨〕 本研究では、3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン（MDMA）によるセロトニン放出および神経毒性発現のメカニズムを分子レベルで明らかにするため、*Xenopus* 卵母細胞発現系を用いて MDMA の各種モノアミントランスポーターに対する影響を電気生理学的に測定する系を樹立するとともに、セロトニン神経を含む中脳切片の培養法を確立し、MDMA によるセロトニン神経毒性を評価した。まず、*Xenopus* 卵母細胞発現系において、各種モノアミントランスポーター（SERT、DAT、NET）を発現させた卵母細胞において基質輸送に伴う内向き電流応答を検出し、それらが各々の阻害剤により抑制されることを確認した。また、SERT におけるセロトニンの基質輸送内向き電流応答は、MDMA（10 μ M）を適用することにより減弱された。また、新生児ラット脳より調製した中脳切片培養において、縫線核およびその周辺部に抗 tryptophan hydroxylase に対する免疫陽性細胞が、また黒質付近に抗 tyrosine hydroxylase に対する免疫陽性細胞が多数観察され、本中脳切片培養系においてそれぞれセロトニン神経およびドパミン神経が含まれていることが確認できた。さらに、本中脳切片培養系に MDMA（0.1-10 μ M）を 48 時間暴露したが、セロトニン含有量に顕著な変化は見られなかった。

A. 研究目的

3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン（MDMA：通称エクスタシー）は、覚醒剤であるアンフェタミンやメタンフェタミン（METH）と類似の構造をしており、他の依存性薬物と同様に精神依存を形成させ、また精神毒性をも誘発することが知られているが、METH などとは異なり、その作用は主にセロトニン神経を介するものであるとされている。すなわち、その作用機序としては、セロトニン神経終末におけるセロトニン放出促進作用および再取込み阻害作

用促進作用および再取込み阻害作用、セロトニン代謝酵素の一つである MAO-A 阻害作用などにより、シナプス間隙のセロトニン量を一過性に上昇させ¹³⁾、その後、セロトニン合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase (TPH) を阻害することにより、セロトニンを枯渇させることなどが知られている⁴⁶⁾。これらの知見から、MDMA の主な作用点として、セロトニン神経終末に存在するセロトニントランスポーター（SERT）が推察されている⁵⁾。

しなしながら、MDMA の SERT に対する作用の分子メカニズムには未だ不明な点が多く、また、ドパミントランスポーター (DAT)、あるいはノルエピネフrintランスポーター (NET) に対する作用も明らかにされていない。一方、SLC6 ファミリーに属するこれらのモノアミントランスポーターは Na^+/Cl^- 依存性であり、基質の取り込みと同時に Na^+ が細胞内輸送される。そのため、基質輸送に伴い電流応答が生じる。このことを利用し、本研究では、まず、*Xenopus* 卵母細胞発現系を用いて MDMA の SERT、DAT および NET に対する影響を電気生理学的に測定する系を樹立することを目的とした。

また、MDMA は、比較的選択的にセロトニン神経に対して神経毒性を有することが知られているが²⁾、本研究では、この MDMA セロトニン神経毒性のメカニズムを *in vitro* で評価するため、細胞の分散培養系と比較してより *in vivo* に近い状態にある脳組織切片培養系を選択し、セロトニン神経の起始核である縫線核を含む中脳冠状切片を培養することを試みた。また、セロトニン神経毒性を評価することを目的に、細胞内セロトニン含量を測定し、MDMA および METH によるセロトニン神経毒性を検討した。

B. 研究方法

1. cRNA 注入卵母細胞の調製

ラット由来のセロトニントランスポーター (SERT)、ヒト由来のドパミントランスポーター (DAT)、ラット由来のノルエピネフrintランスポーター (NET) をコードするプラスミド DNA を制限酵素 *Sca I* によりリニアライズし、SERT に関しては、SP6 RNA ポリメラーゼ、DAT、NET に関しては T7 RNA ポリメラーゼを用いて各々の cRNA を合成した (mMESSAGE mMACHINE, Ambion, TX, USA)。低温麻酔を施したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の腹腔内より卵巣を摘出し、0.66 mg/ml コラゲナーゼ (Wako Pure

Chemical Industries, Osaka, Japan) を含む培養液中で 21°C、90 分、緩やかに振とうし卵母細胞を覆う濾胞を除去した。Dummont 分類の V~VI 相 (直径が 1 mm 以上) のもので、動物極と植物極の境界が鮮明な卵を選択し、SERT、DAT、NET の cRNA をそれぞれ一細胞あたり、25 ng 注入し、ペニシリン (10 U/ml)、ストレプトマイシン (10 µg/ml)、ピルビン酸 (0.3 mg/ml) を含む Barth 変法培養液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl_2 , 0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.82 mM MgSO_4 , 2.4 mM NaHCO_3 , 7.5 mM Tris, pH 7.6) 中で 2~4 日培養した。

2. 電気生理学的測定

記録溶液には通常 Frog Ringer 溶液 (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) を用い、酸性条件下には pH 5.5 に調製した Frog Ringer 溶液 (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM MES 10mM, pH 5.5) を用いた。卵母細胞をチャンバーの溝に静置し、重力を利用して記録溶液を流速 1.5 ml/min で灌流した。Whole-cell 膜電流の測定は、膜電位固定用増幅器 (OC-725C; Warner Instrument, Hamden, CT, USA) に接続された、3 M KCl を充填した 2 本のガラス電極 (抵抗: 1-2 MΩ) を細胞内に刺入し、膜電位を -80 mV に固定して行った。全ての薬物は記録溶液に溶解して用いた。電流、電位の出力はフラットペンレコーダーで記録した。

3. 縫線核を含む培養中脳切片の作成

生後 2-3 日齢の SD ラットを断頭後、脳を摘出し、骨膜を除去してから氷冷 HBSS 中で冷却後、濾紙上でフェザー剃刀を用いて両端の不要な部位を除去した。その後 slice chopper を用いて縫線核を含む必要な中脳部位を 350 µm 厚で適当な枚数切断し、氷冷した 7 ml の培地中で切片を分離し、最終的に縫線核を含む切片 4 枚を選んで、ポアサイズ 0.4 µm の多孔質膜上 (Millicell-CM,

Millipore Corporation) に置くことにより、37°C、5% CO₂/95% O₂環境下気液界面で培養を行った。培養液は、切片作成の翌日およびそれ以後は2日毎に新鮮な25% horse serum 含有 MEM に変更し、実験には培養12-14日目の培養切片を使用した。

4. 免疫組織化学

培養中脳切片を4% paraformaldehyde 中で4°C、2時間固定した後、免疫染色を行うことにより切片中の神経細胞を確認した。一次抗体としては Sheep anti-Tryptophan Hydroxylase (TPH) 抗体、および Rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (TH) 抗体 (いずれも Chemicon Int.) を用い、それぞれ適切な2次抗体を用いることにより、蛍光およびDAB発色により可視化した。

5. 培養中脳切片中のセロトニン含量の測定

最終濃度が0.1-10 μM となるように PBS に溶解した MDMA あるいは METH を、培養液中に添加した。セロトニン神経毒性の評価は、MDMA あるいは METH の48時間の処置終了直後、および処置終了よりさらに7日間の培養後に細胞内セロトニン含有量を測定することにより行った。すなわち、培養切片を回収後、10 mM Na₂S₂O₅、1 mM EDTA を含む0.1N 過塩素酸中にて組織をホモジナイズ、さらにソニケーションを行い、細胞を破碎した。これを15,000 rpm で15分間遠心分離し、その上清をpH 3.5に調整後、0.22 μm のフィルターで濾過して、可溶性画分のサンプルとした。サンプル中のセロトニン含量の測定は、高速液体クロマトグラフィーにより行った。すなわち、移動層として17%メタノール、230 mg/ml 1-オクタンスルホン酸ソーダおよび5 mg/ml EDTA を含有する0.1 M クエン酸-0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液を用い、0.23 ml/min の流速で灌流した。サンプル30 μl 中のモノアミン類は、分離カラム CA-50DS (Eicom) により分離

し、グラファイト電極を装着した電気化学検出器 (+550 mV vs Ag/AgCl 参照電極) により検出し、得られたピーク面積からセロトニン含量を計算した。

C. 研究結果

1. 基質輸送に関連した電流応答

cRNA 溶液を注入していない卵母細胞にセロトニン (5-HT)、ドパミン (DA)、ノルエピネフリン (NE) を灌流させても電流応答は検出されなかった。一方、SERT の cRNA を注入した卵母細胞では、灌流液中に5-HT (10 μM) を加えたとき、安定した内向き電流応答が観察された。同様に、DAT あるいは NET の cRNA を注入した卵母細胞では、灌流液中にそれぞれ DA (10 μM) あるいは NE (10 μM) を加えたとき、安定した内向き電流応答が観察された (Fig.1)。

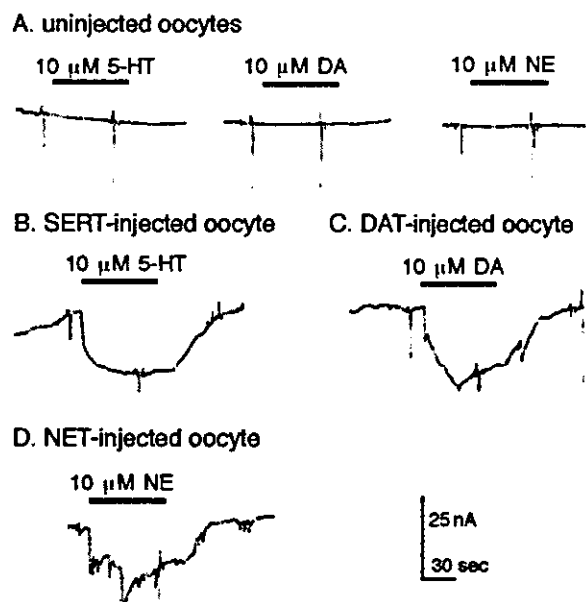


Fig.1 各モノアミントランスポーターを発現させた卵母細胞での基質輸送に伴う内向き電流応答

未注入 (A) あるいは SERT (B)、DAT (C)、NET (D) cRNA を注入した *Xenopus* 卵母細胞に、5-HT (10 μM)、DA (10 μM) あるいは NE (10 μM) を処置し、whole cell 電流応答を記録した。

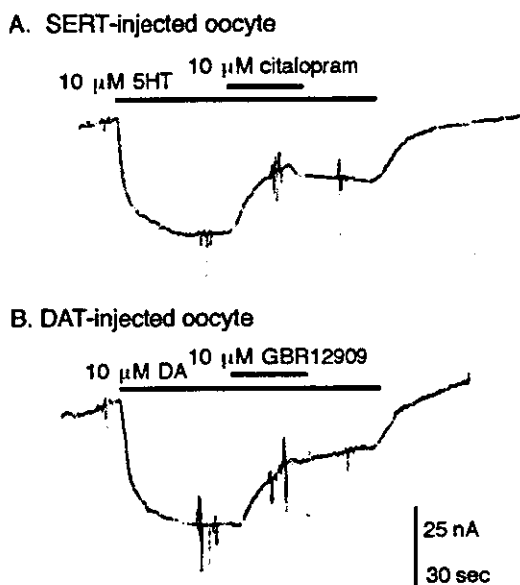


Fig.2 SERT および DAT における基質輸送電流に対する選択的阻害薬の効果

SERT (A) あるいは DAT (B) cRNA を注入した *Xenopus* 卵母細胞において、それぞれ 5-HT (10 μM) あるいは DA (10 μM) を処置し、その後、それぞれの選択的阻害薬 citalopram (10 μM) あるいは GBR12909 (10 μM) を追加した。

2. 各種阻害薬の影響

基質輸送に関連した電流応答に対し、トランスポーターの選択的阻害薬の効果を検討した。-80 mV に電位固定した SERT 注入卵母細胞に対して、5-HT (10 μM) を加えたときの基質輸送電流の平均値は 36.6 ± 3.1 nA ($n=9$) であったが、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 citalopram (10 μM) 存在下では電流は 4.1 ± 4.3 nA ($n=5$) に減少した。また、DAT 注入卵母細胞に対して、DA (10 μM) を加えたときの基質輸送電流の平均値は 30.0 ± 7.3 nA ($n=6$) であったが、DAT 阻害薬 GBR12909 (10 μM) 存在下では電流は 8.6 nA ($n=2$) に減少した (Fig.2)。

3. セロトニントランスポーターの pH 感受性

-80 mV に電位固定した SERT 注入卵母細胞に pH 5.5 の Frog Ringer 溶液を灌流させると、持続した内向きの電流応答 (48.9 nA) を観測した。

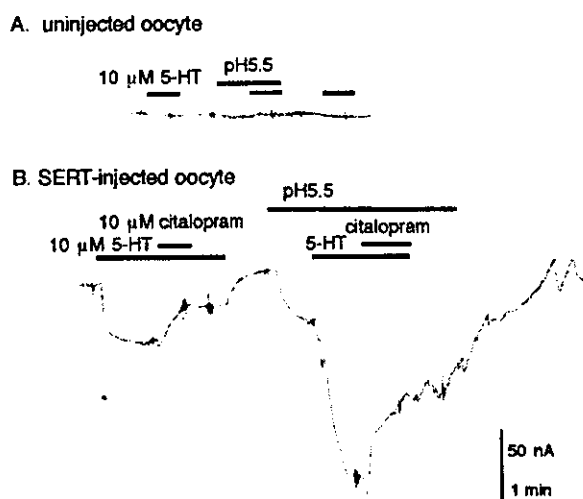


Fig.3 SERT の pH 感受性

未注入 (A) あるいは SERT cRNA (B) を注入した *Xenopus* 卵母細胞における 5-HT (10 μM) 処置による内向き電流応答および citalopram (10 μM) の抑制効果を、pH 7.4 灌流液中あるいは pH 5.5 灌流液中で比較した。

また、pH 7.4 の灌流液中に 5-HT (10 μM) を加えたときの内向き電流応答の平均値は 43.2 nA であったが、pH 5.5 の灌流液に換えると 5-HT (10 μM) 加えたときの内向き電流応答の平均値は 112.5 nA ($n=2$) に増加した。更に pH 5.5 条件下で citalopram (10 μM) を加えた場合、56.8 nA ($n=1$)

SERT-injected oocyte

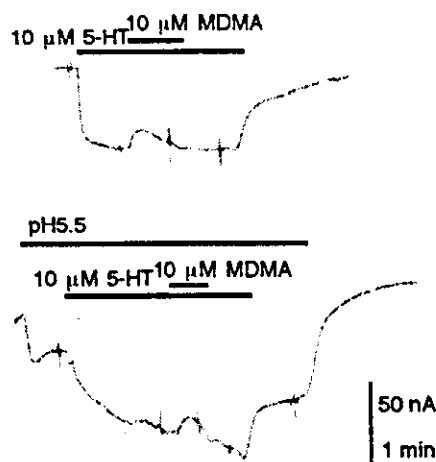


Fig.4 SERT の基質輸送電流に対する MDMA の効果

SERT cRNA を注入した *Xenopus* 卵母細胞における 5-HT (10 μM) 処置による内向き電流応答に対する MDMA (10 μM) 処置による効果を、pH 7.4 (上段) あるいは pH 5.5 (下段) 灌流液中で検討した。

ram (10 μ M) を加えた場合、56.8 nA ($n=1$) に減少した (Fig.3)。

4. セロトニントランスポータの基質輸送電流に対する MDMA の効果

MDMA の効果を検討した結果、MDMA (10 μ M) 存在下では基質輸送電流の平均値は 40.9 nA から 21.6 nA ($n=2$) に減少した。また pH 5.5 の灌流液に換えると、MDMA (10 μ M) 存在下では基質輸送電流の平均値は 47.7 nA から 40.9 nA ($n=1$) に一部抑制された (Fig.4)。

5. 培養中脳切片におけるセロトニン神経およびドパミン神経の存在

培養した中脳切片中でセロトニン神経およびドパミン神経が存在するかを確認するため、anti-TPH 抗体および anti-TH 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、縫線核およびその周辺部に多数の TPH 陽性細胞が (Fig.5)、また黒質付近

に多数の TH 陽性細胞が確認できた (Fig.6)。

6. 培養中脳切片におけるセロトニン神経毒性の評価

まず、無処置の培養中脳切片から調製した可溶性画分においてモノアミン含量を高速液体クロマトグラフィーにより測定したところ、溶出時間約 11 分の位置にセロトニンの代謝物である 5-HIAA のピークが、また、溶出時間約 25 分の位置にセロトニンのピークが認められ、本切片中におけるセロトニンの含量は約 6 mmol/g tissue であると計算された。この培養中脳切片に、選択的セロトニン神経毒である 5,7-dihydroxytryptamine (200 μ M) を 48 時間処置し、処置終了直後および処置終了から 7 日後における細胞内セロトニン含量を測定した結果、いずれもセロトニン含量は著明に減少した。そこで、各濃度の MDMA あるいは METH (0.1~10 μ M) を 48 時間処置し、処置終了直後および処置終了

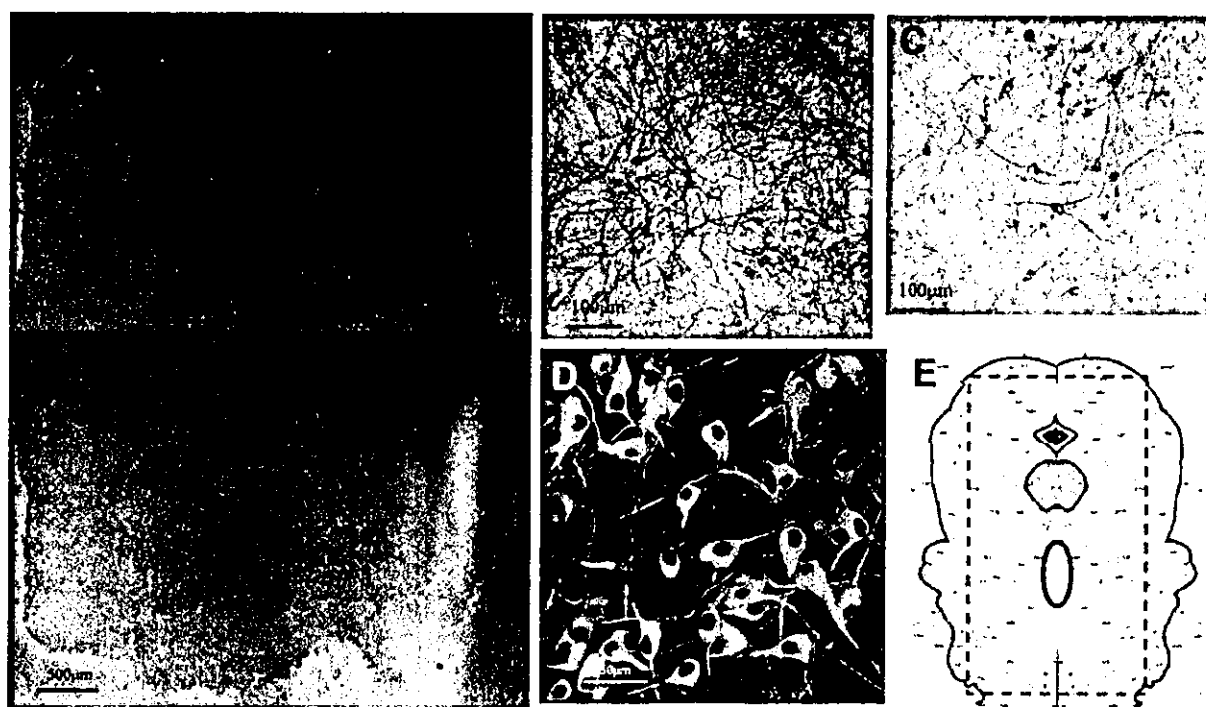


Fig.5 縫線核を含む培養中脳切片の TPH 免疫染色像

A) TPH 抗体による免疫染色を行った培養中脳切片全体の写真、B,C) 枠内の拡大図、D) TPH 抗体を用いた蛍光免疫染色、E) 新生児ラットの中脳切片

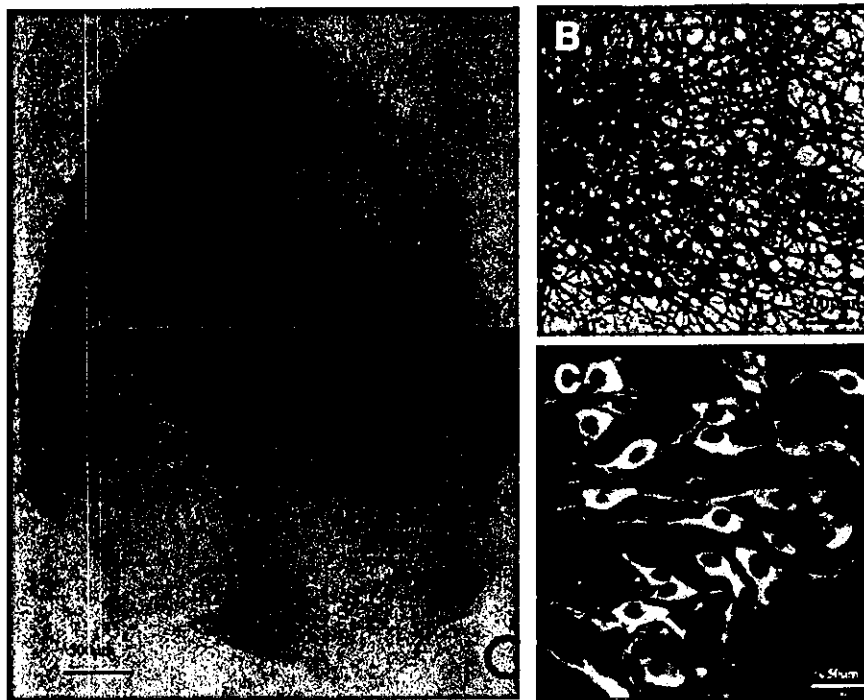


Fig.6 縫線核を含む培養中脳切片のTH免疫染色像

A) TH抗体による免疫染色を行った培養中脳切片全体の写真、B) 枠内の拡大図、C) TH抗体を用いた蛍光免疫染色

から7日後における細胞内セロトニン含量を同様に測定した。しかしながら、いずれの場合に

においてもセロトニン含有量に著明な変化は認められなかった (Fig.7)。

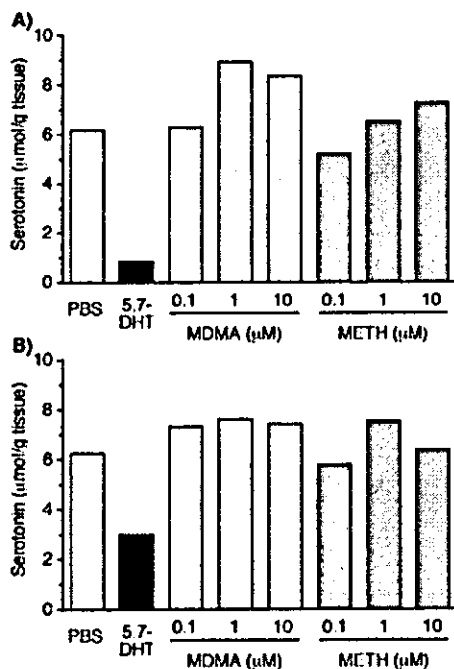


Fig.7 培養中脳切片中のセロトニン含量に対するMDMAおよびMETH処置の影響

培養中脳切片にPBS、5,7-DHT (200 μM)、MDMA (0.1-10 μM) あるいはMETH (0.1-10 μM) を48時間処置した。処置終了直後 (A) あるいはさらにその7日後 (B) に、HPLC による中脳切片中のセロトニン含量を測定した。n=1-2。

D. 考察

まず、*Xenopus*卵母細胞発現系において、3種のNa⁺/Cl⁻依存性モノアミントランスポーター (SERT、DAT、NET) のcRNAを導入した卵母細胞において、それぞれの基質輸送に伴う内向き電流応答を検出し、また、それらが各々の阻害剤により抑制されることを確認した。さらに、SERTにおけるセロトニンの基質輸送電流は、pH感受性があることを新たに見出し、さらに、MDMAの処置により、僅かではあるが抑制されることを認めた。

また、縫線核を含む中脳冠状切片の培養を行い、縫線核およびその周辺部に多数のセロトニン合成酵素TPH陽性細胞を、また黒質付近に多数のドパミン合成酵素THの陽性細胞を認めた。さらに、本切片中のセロトニン含量を測定したところ、大量のセロトニンおよびその代謝物5-HIAAが含まれることを確認した。これらのことから、今回の条件下で作製した中脳培養切片中

において、セロトニン神経ならびにドパミン神経が存在することが確認できた。しかしながら、本切片中において、SERT あるいは DAT などが発現していることは未だ確認できておらず、これらの確認を急ぐ必要がある。この中脳培養切片に対して選択的セロトニン神経毒である 5,7-dihydroxytryptamine を処置することにより、セロトニン含量が著明に減少した。この結果は、本切片中におけるセロトニン含量の減少が、セロトニン神経毒性を反映することを示すものであり、これにより本実験系の妥当性が確認できた。しかしながら、MDMA および METH (0.1~10 μ M) を同様に処置しても、セロトニン含量に顕著な変化は見られなかった。このことから、少なくともこの条件下では、比較的低濃度の MDMA および METH (10 μ M 以下) のセロトニン神経に対する神経毒性は弱いものであると考えられる。今後、温度や pH、代謝物の有無など様々な条件下における神経毒性についても検討していく。

E. 結論

本研究において、3種のNa⁺/Cl⁻依存性モノアミントランスポーターSERT、DAT、NETの電気生理学的解析が可能な*Xenopus*卵母細胞発現系を作製することに成功し、MDMAのモノアミントランスポーターへの作用機構を分子レベルで解析することを可能とした。さらに、セロトニン神経およびドパミン神経を有する中脳切片培養系を作製することに成功し、MDMAおよびMETHによるセロトニン神経毒性あるいはドパミン神経毒性を*in vitro*で評価していくことを可能とした。

[参考文献]

1) Leonardi, E.T. and Azmitia, E.C.: MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10: 231-238,

1994.

- 2) Lyles, J. and Cadet, J.L.: Methylenedioxyamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res. Rev.*, 42: 155-168, 2003.
- 3) Rudnick, G. and Wall, S.C.: The molecular mechanism of "Ecstasy" [3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1817-1821, 1992.
- 4) Schmidt, C.J.: Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxyamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 1-7, 1987.
- 5) Simantov, R.: Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). *Life Sci.*, 74: 803-814, 2004.
- 6) Stone, D.M., Stahl, D.C., Hanson, G.R. and Gibb, J.W.: The effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 22: 128: 41-48, 1986.

F. 研究発表

学会発表

- 1) 鈴木祐一、中川貴之、南 雅文、金子周司: Effects of methamphetamine on *in vitro* mesocorticolimbic dopaminergic system reconstructed using organotypic slice co-cultures. 第28回日本神経科学大会、横浜、2005.7 (予定)

メタンフェタミンにより誘発される認知障害の機構の解明と治療法の確立

分担研究者：山田清文

研究協力者：永井拓、東岸由里子、小林香奈、田熊一徹

（金沢大学大学院自然科学研究科病院薬学）

[研究要旨]

メタンフェタミン（METH）依存患者では認知障害が認められると報告されている。しかし、この認知障害を反映した動物モデルの報告は少ない。本研究では、新奇物質探索試験を用いて認知記憶に対するMETHの作用について検討し、覚醒剤依存における認知記憶障害モデルの作製を試みた。さらに、METH誘発性認知記憶障害の発現機序についても検討した。

METH (1 mg/kg) を7日間連続投与すると、訓練から1時間後の保持試行では障害は認められなかったが、24時間後の保持試行では認知記憶の有意な低下が認められた。また、METHによる認知記憶障害は、METHの断薬から28日間経過した後でも認められた。Clozapine (3 mg/kg)はMETH誘発性認知記憶障害を有意に改善したが、haloperidol (1 mg/kg)には効果は認められなかった。ドパミンD1受容体アンタゴニストSCH23390をMETHと併用投与すると、METH誘発性認知記憶障害の形成は抑制されたが、ドパミンD2受容体アンタゴニストracloprideはMETH誘発性認知記憶障害に影響しなかった。

正常マウスを新奇objectに10分間暴露すると、その直後に前頭前皮質においてmitogen-activated protein kinase (ERK1/2)の活性化が認められ、この活性化は暴露30分後には消失した。一方、METH (1 mg/kg) を7日間連続投与したマウスでは、正常マウスで観察されたようなERK1/2の活性化は認められなかった。また、MAP kinase kinase (MEK) 阻害薬であるPD98059 (2 μg/1 μL/side)を訓練試行30分前に前頭前皮質へ微量注入すると、訓練試行から24時間後の保持試行における認知記憶が溶媒投与群に比べ有意に障害された。さらに、MEK阻害薬のSL327 (30および50 mg/kg, i.p.) およびSCH23390を訓練試行前に投与すると、24時間後の保持試行における認知記憶は溶媒投与群に比べ有意に低下したが、1時間後の保持試行では有意な効果は認められなかった。したがって、METH誘発性認知記憶障害には、前頭前皮質におけるドパミンD1受容体-ERK1/2経路の機能障害が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

比較的少量の覚醒剤を実験動物に反復投与すると、しだいに移所運動促進などの急性薬理効果の増強効果が形成され、長期間断薬しても、少量の覚醒剤の再投与や非特異的ストレスの負荷によりこの増強効果が再燃する。この現象は行動感

作あるいは逆耐性と呼ばれ¹⁾、その経過がヒトの覚醒剤精神病に酷似することから、統合失調症や精神病性障害の形成・発現機序の研究によく用いられている。さらに、統合失調症の陽性症状はドパミン作動性神経系の過活動に起因するという「ドパミン過剰仮説」に基づいて、この動物モデ

ルが新規治療薬の開発に利用されてきた。

近年、覚醒剤精神病患者および統合失調症患者において、認知記憶障害がみられることから、認知記憶障害を反映した動物モデルの開発が望まれている。ラットに 4 mg/kg の METH を 2 時間間隔で 4 回投与し、1 週間後に空間記憶の指標である Morris water maze と非空間記憶の指標である新奇物質認知記憶試験を行った場合、空間記憶は障害されていないが非空間記憶に障害がみられ、これは投与から 3 週間後にも認められ、持続的であると報告されている^{2,3)}。また、METH 処置から 3 週間後においても、線条体ドパミントランスポーターと海馬セロトニントランスポーターが減少していることから、これらトランスポーターの減少が METH 誘発性記憶障害に関わっていることが示唆されている。しかし、これまでに報告された METH による認知記憶障害は、ドパミン作動性神経系やセロトニン作動性神経系の神経変性を伴うような短期間に高用量の METH 処置により誘発したものである。したがって、現段階では覚醒剤精神病や METH 依存患者の認知記憶障害を反映した有用な動物モデルはほとんどない。

本研究では、低用量の METH の反復投与により覚醒剤精神病モデルの作製を試み、METH 誘発性認知記憶障害を新奇物質探索試験 (Novel object recognition test, NORT) により評価した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には ICR 系雄性マウスを使用した。動物は実験を開始する前、少なくとも 1 週間は室温 23±1°C、湿度 50±5% で、9:00AM-9:00PM 明期の明暗サイクルの部屋で飼育し、水および餌は自由に摂取させた。なお、本研究は金沢大学動物実験委員会の承認を得て、倫理的な配慮のもとで行った。

2. 新奇物質認知記憶試験 (NORT)⁴⁾

実験装置はアクリル製のオープンフィールド (30×30 cm, 高さ 35 cm) を用いた。Object には円柱の積木、ゴルフボール、コンセントのアダプターを組み合わせ用いた。マウスを装置に入れ、馴化を 3 日間行った (10 分間/日)。訓練試行は、異なる 2 個の object を置いた装置内にマウスを入れ、10 分間行った。保持試行は、2 個の object の片方を新奇 object と置き換えた装置内に動物を入れ、5 分間行った。保持試行は訓練試行の 1 時間あるいは 24 時間後に行った。訓練試行および保持試行において、2 個の object に対するそれぞれの探索 (接触、臭いかぎなど) 時間を測定した。訓練試行においては 2 個の object のいずれかを探索した時間と総探索時間との比を、保持試行においては新奇 object を探索した時間と総探索時間との比を探索嗜好性として示した。保持試行における探索嗜好性を認知記憶の指標とした。

3. プレパルス抑制 (PPI) 試験

SR-LAB 驚愕反応測定システム (San Diego Instruments) を用いて驚愕反応 (startle amplitude, SA) を測定した。65 dB の背景雑音下 (BG) で 10 分間馴化させた後、120 dB, 40 msec の音刺激 (P) と、その 100 msec 前に 73, 77, 81 dB, 20 msec の前刺激を加えた音刺激 (pP) を与えた。最初に P を 5 回提示し、次に BG、pP または P を 10 から 22 sec の間隔でランダムにそれぞれ 10 回提示し、最後に P を 5 回提示した。音刺激と同期させて 1 sec の間、1 msec 間隔で SA を記録し、最大 SA 値を測定した。得られたデータから、PPI (%) を $(SA_p - SA_{pp}) / SA_p \times 100$ として算出した。SA_p: P 提示時の最大 SA 値 (全 20 回のうち最初と最後の 5 回は除く)、SA_{pp}: pP 提示時の最大 SA 値。

4. Western blotting 法