

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^{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 を標的部位として、脳内モノアミンに対する影響を検討した。MAP および MDMA 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。3-MT はドパミン遊離の指標になると考えられており⁹⁾、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。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利用していく予定である。

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。GILZ に関しては選択的に作用する薬物が存在しない。そこで、GILZ antisense を作製し、GILZ の役割について行動薬理的な検討を行った。GILZ antisense 前処置により、MAP および MDMA の報酬効果の発現が抑制されることから、GILZ mRNA の誘導は MAP および MDMA の精神依存形成に関与することが明らかになった。GILZ は glucocorticoid により発現が誘導される遺伝子であることから、MAP および MDMA による精神依存形成において glucocorticoid を中心とする下垂体副腎系の制御に変化が生じている可能性が示唆された。MAP の逆耐性形成において中脳辺縁ドパミン神経系が重要な役割を果していることが報告されている^{4,8)}。一方、生体内の corticosterone 量の変動は中脳辺縁ドパミン神経系に影響を与えることが報告されていることから³⁾、おそらく、MAP 慢性投与によって生じる下垂体副腎系の異常がドパミン神経系に影響を与えているものと考えられる。今後は、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である中脳部位(腹側被蓋野 VTA)における mRNA 変動に関する詳細な検討も加え、GILZ の機能解析を行う必要があると考えられる。

薬物の毒性評価を迅速に行うために培養細胞を利用するシステム構築を試みた。MAP、MDMA および 5-MeO-DIPT 暴露による培養神経細胞への影響を検討した。その結果、MAP 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、5-MeO-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。これらより、5-MeO-DIPT は培養神経細胞に対して、MAP および MDMA に比較して強力な神経毒性を発揮すると考えられる。さらに、5-MeO-DIPT と MAP あるいは MDMA 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 MAP あるいは MDMA を 5-MeO-DIPT と併用すると、5-MeO-DIPT 単独による細胞障害(LDH の放出量)が相乗的に増強されることが判明した。また、in vivo での評価でも、MAP と 5-MeO-DIPT の併用投与でドパミン神経系に障害の発生が認められた。

これらの結果から、5-MeO-DIPT はそれ自身で強力な毒性を有するとともに、MAP あるいは MDMA の同時乱用は強力な神経毒性をもたらす、重大な健康被害が発生する危険性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予定である。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。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、その有用性が明確になった。

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および神経毒性の検討を行い、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。

[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., Poleskaya, 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.

F. 研究発表

1. 論文発表

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

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

なし。

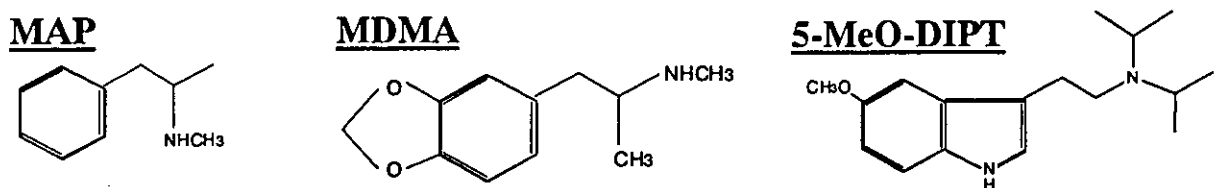
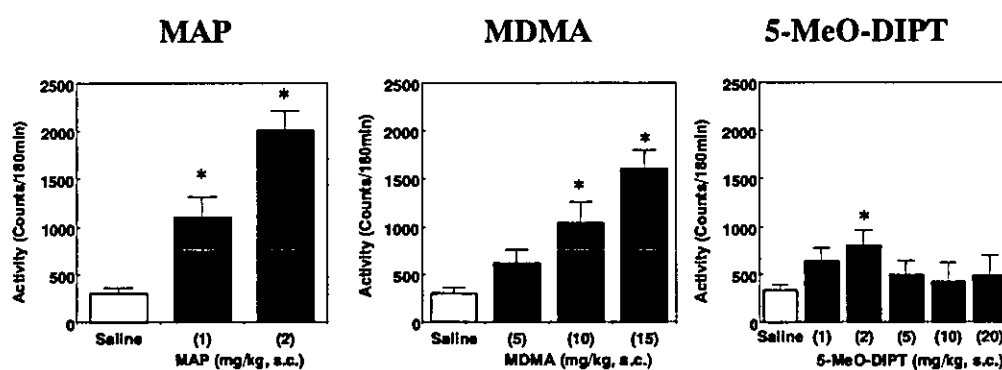


Fig. 1. Chemical structures of drugs. Methamphetamine (MAP), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT).

A) Locomotion



B) Place conditioning

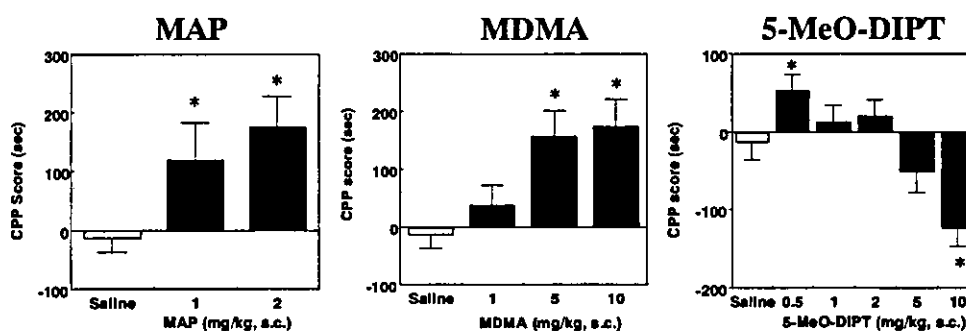


Fig. 2. A) Effect of acute treatment with MAP, MDMA or 5-MeO-DIPT on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of MAP, MDMA or 5-MeO-DIPT in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 180 min 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.

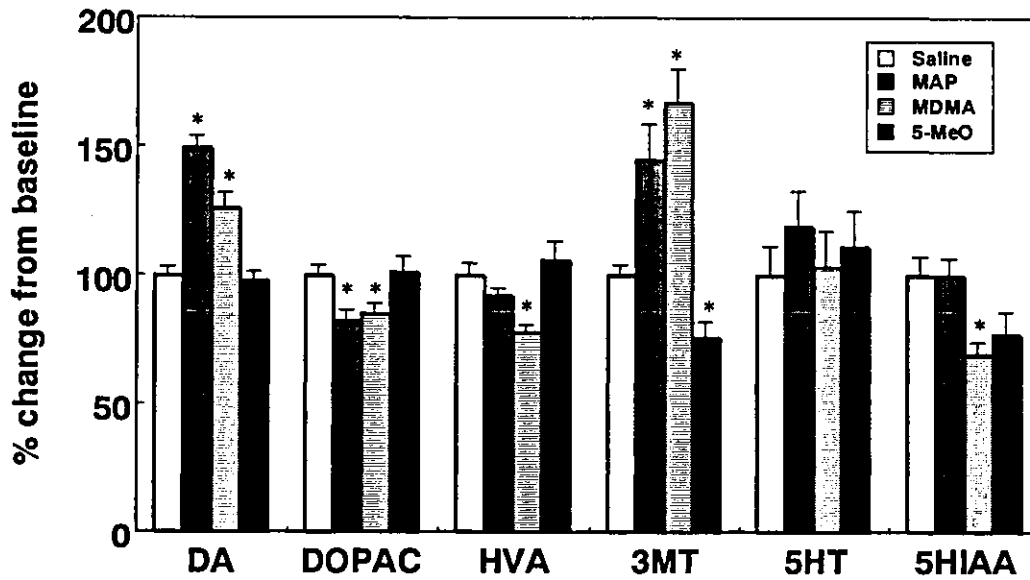


Fig. 3. Effect of MAP, MDMA or 5-MeO-DIPT on monoamine level in the mouse limbic forebrain. Mice were sacrificed 60 min after MAP (2 mg/kg, s.c.), MDMA (10 mg/kg, s.c.) or 5-MeO-DIPT (10 mg/kg, s.c.) injection. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals. *P<0.05 vs. saline-treated group.

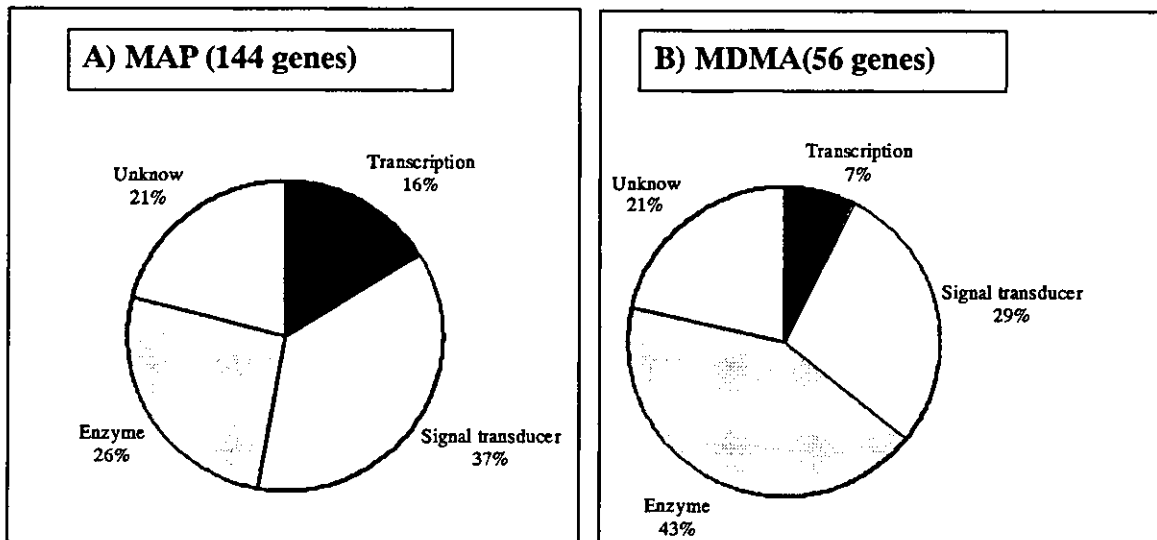


Fig. 4. Profiling of MAP (4 mg/kg, s.c.) or MDMA(10 mg/kg, s.c.)-induced changes in gene expression in the mouse limbic forebrain. A) 144 genes in MAP-treated group showed increase greater than 1.5-fold. B) 56 genes in MDMA-treated group showed increase greater than 1.5-fold. Each of these genes, including 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.

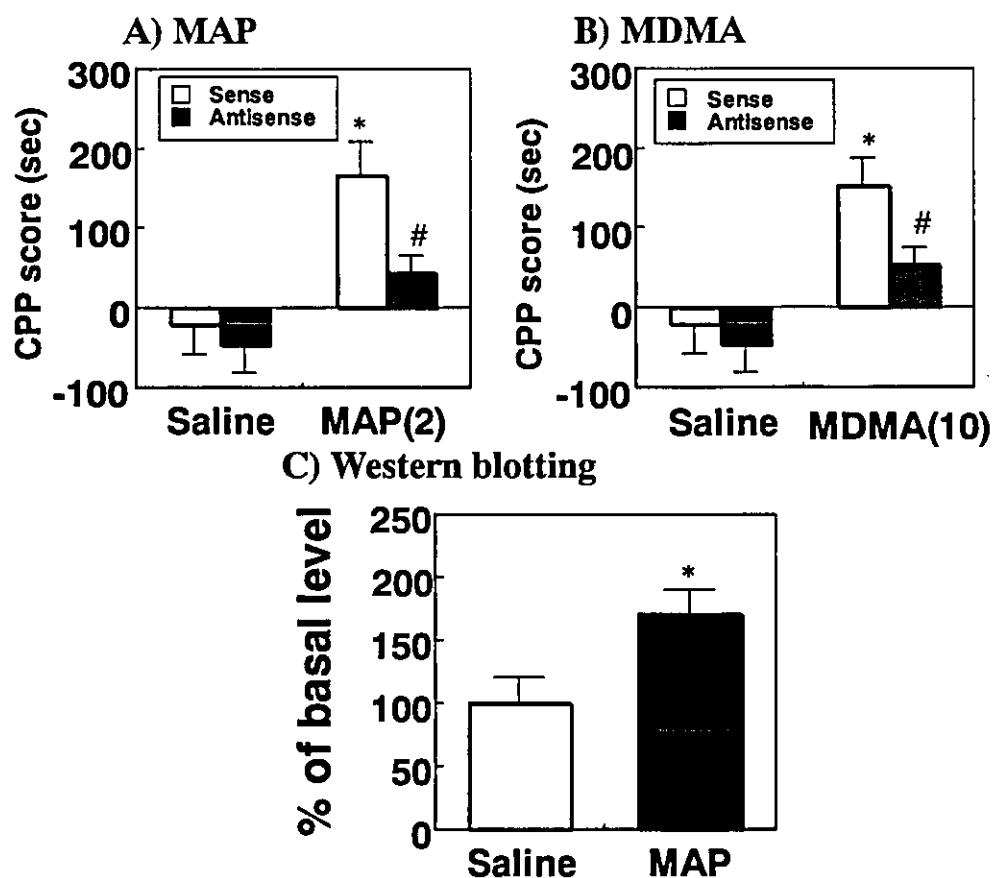


Fig. 5. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) on the expression of methamphetamine- or MDMA-induced rewarding effects in mice. A) Effect of pretreatment with GILZ antisense (10 nmol/icv, 5 days) on the expression of methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.)-induced rewarding effect in mice. B) Effect of pretreatment with GILZ antisense (10 nmol/icv, 5 days) on the expression of MDMA (10 mg/kg, s.c.)-induced rewarding effect in mice. * $P < 0.05$ vs. sense-pretreated acute treatment with MAP group, # $P < 0.05$ vs. sense-pretreated chronic treatment with MAP group. C) Effect of repeated treatment with MAP (2 mg/kg, s.c.) on the GILZ protein level in the limbic forebrain. * $P < 0.05$ vs. repeated treatment with saline group.

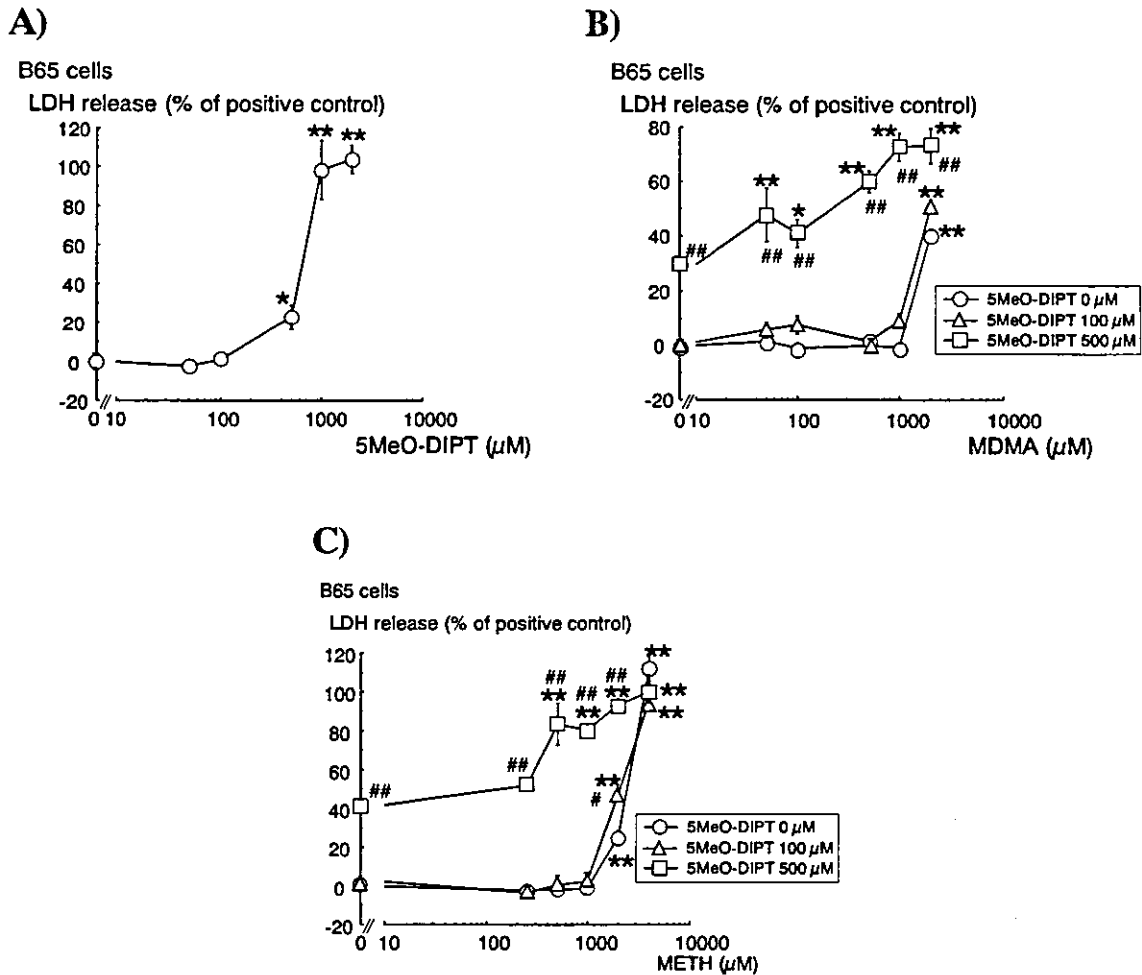


Fig. 6. A) Changes in released LDH from B65 cells after exposure to 5-MeO-DIPT for 24 hours. Each value mean \pm SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group. B) Effects of cotreatment with 5-MeO-DIPT on METH-induced LDH release from B65 cells after 24-hour exposure. 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. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. MDMA-dose-matched control group without 5-MeO-DIPT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. each control group without MDMA. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. MDMA-dose-matched control group without 5-MeO-DIPT. C) Effects of cotreatment with 5-MeO-DIPT on METH-induced LDH release from B65 cells after 24-hour exposure. 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 METH. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. METH-dose-matched control group without 5-MeO-DIPT.

厚生科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業）研究
依存性薬物および未規制薬物による神経毒性と精神病の発現機序に関する研究
分担研究報告書

分担研究課題：ストレスと覚醒剤依存形成：ヒスタミン神経系の役割を中心に

覚せい剤とストレスによる精神障害発現における H1 受容体の役割

分担研究者：谷内一彦

研究協力者：櫻井映子、奥田友宏、代紅梅、加藤元久、倉増敦朗、岡村信行

東北大学大学院医学系研究科・機能薬理学分野

研究要旨

ヒスタミン神経系は覚醒の維持など多くの機能を持ち重要なアミン系神経系である(1)。我々は今まで H1、H2、H3 受容体遺伝子欠損マウス、HDC(histidine decarboxylase) knockout mouse を用いた研究から中枢ヒスタミン神経がメタンフェタミン(MAP)逆耐性形成などの有害な刺激に対して抑制的に作用する可能性を示してきた。今年度は覚醒剤精神病が、統合失調症と類似していることから、統合失調症の陰性症状のモデルである isolation stress を H1 受容体欠損マウスに負荷し、社会的隔離ストレスと MAP 逆耐性モデルを組み合わせたマウスにおいて驚愕反応とモリス水迷路試験を行い、精神障害発現と依存形成におけるヒスタミン H1 受容体の役割を検討した。野生型マウスに与えた社会的隔離ストレスは、MAP の驚愕反応における効果を著明に増大させた。しかし HIKO マウスには社会的隔離ストレスと MAP の逆耐性形成による効果が認められなかった。また社会的隔離ストレスにより野生型マウスの空間認知機能は低下したが、HIKO マウスでは変化しなかった。H1 拮抗作用が覚せい剤とストレスによる精神障害の発現抑止に関係していることが示唆された。

A. 研究目的

覚醒剤精神病の発症には逆耐性現象の構築、及びストレスによる誘発が深く関わっている。覚醒剤使用時にはドパミンが過剰に遊離されるが、その時に賦活されるドパミン神経系からのドパミンの遊離増加は、ドパミン受容体を介してヒスタミン神経系を賦活する。ヒスタミン神経系の賦活は覚醒剤反復投与による逆耐性形成を遅延させることをヒスタミン受容体リガンドやヒスタミン受容体遺伝子欠損マウスおよびヒスタミン合成酵素遺伝子欠損マウスなどを使用して報告してき

た。また ^{11}C -doxepin を用いた PET 研究で、統合失調症患者や薬物依存患者の脳において H1 受容体が低下していることを報告している(2,3)。また OTC に含まれるクロルフェニラミンはそれ自身の持つ相互作用により血中 MAP 濃度を増加しその作用増強することを明らかにした(4)。すなわちヒスタミン神経系の低下は覚醒剤による逆耐性を増強し、ヒスタミン神経系の賦活は抑制すると考えている。本年度は覚醒剤精神病が、統合失調症と類似していることから、統合失調症の陰性症状のモデルである isolation stress を H1 受

容体欠損マウスに負荷し、MAP 逆耐性モデルの形成におけるストレスの役割を検討し、精神障害発現と依存形成におけるヒスタミン H1 受容体の役割を研究した。

【方法】HIKO マウスとその野生型を離乳後(3 週齢)個別飼育して、社会的隔離ストレスを 4 週間与え、グループで飼育した群と比較した。測定した行動は自発運動量(スーパーメックス®、室町機械)と驚愕反応と事前音刺激による驚愕反応の減弱(PPI)、およびモリス水迷路による空間認知機能である。驚愕反応はコロンバス社製の Responder-X®を使用した。またそれぞれの群に MAP (1 mg/kg) を単回投与または 7 日間連続投与し、1 週間休薬後、再投与を行なったモデルについて、PPI を測定した。

【結果】野生型マウスでは社会的隔離ストレスを 4 週間与えると、グループ飼育群に比べ有意に驚愕反応が増加し、PPI が低下していた。しかし、HIKO マウスではこのような社会的ストレスの効果が見られなかった。図 1 に驚愕反応の amplitude を、図 2 には PPI の抑制率 (%) を示した。空間認知機能を調べたモリスの水迷路の実験でも、図 3 に示したように野生型に社会的隔離ストレスを与えたマウスでは、グループ飼育のマウスに比べ空間認知機能が低下していたが、HIKO マウスでは、社会的隔離ストレスによる空間認知機能の低下が認められなかった。さらに社会的隔離ストレスに対する単回または連続投与した MAP の効果について検討したところ、図 3 に示したように、野生型では MAP の投与により PPI の変化が見られたが、HIKO ではこの場合も社会的隔離ストレスと MAP 逆耐性による変化はなかった。

【考察】野生型マウスに与えた社会的隔離ストレスは、MAP の効果を増大させた。また、MAP の連続投与による逆耐性形成後には空間認知機能が低下していた。しかし HIKO マウスには社会的隔離ストレスも MAP の逆耐性形成の効果も認められなかった。したがって精神障害発現と依存形成においてヒスタミン H1 受容体は重要な役割を持っている可能性が示唆された。MARTA (multi-acting receptor-targeted antipsychotics) に代表されるように多くの抗精神病薬が強い H1 作用を持っている。H1 受容体拮抗作用は副作用である眠気や体重増加に関係していると考えられ、治療効果との関係は今まで不明であった。今回の社会的隔離ストレスと MAP 逆耐性の影響に関する神経科学的な研究から、H1 受容体の遮断が H1 拮抗作用を持つ MARTA などの治療効果に関係していることが示唆された。

【文献】

- (1) Watanabe T & Yanai K. (2001). Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. *Tohoku J. Exp. Med.* 195: 197-217.
- (2) Iwabuchi K, Yanai K, et al. (2004). Metamphetamine and Brain Histamine: A Study Using Histamine-Related Genes Knockout Mice. *Ann N.Y. Acad Sci.* 1025: 129-134.
- (3) Iwabuchi K, Yanai K, et al. (2005) A PET study of histamine H1 receptors in the schizophrenic patients assessed by [¹¹C]doxepin. *Eur. Neuropsychopharmacology* 15: 185-91.
- (4) Okuda T, Yanai K, et al. (2004) Drug interaction between methamphetamine and antihistamines : behavioral changes and tissue concentration of methamphetamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 505: 135-144.

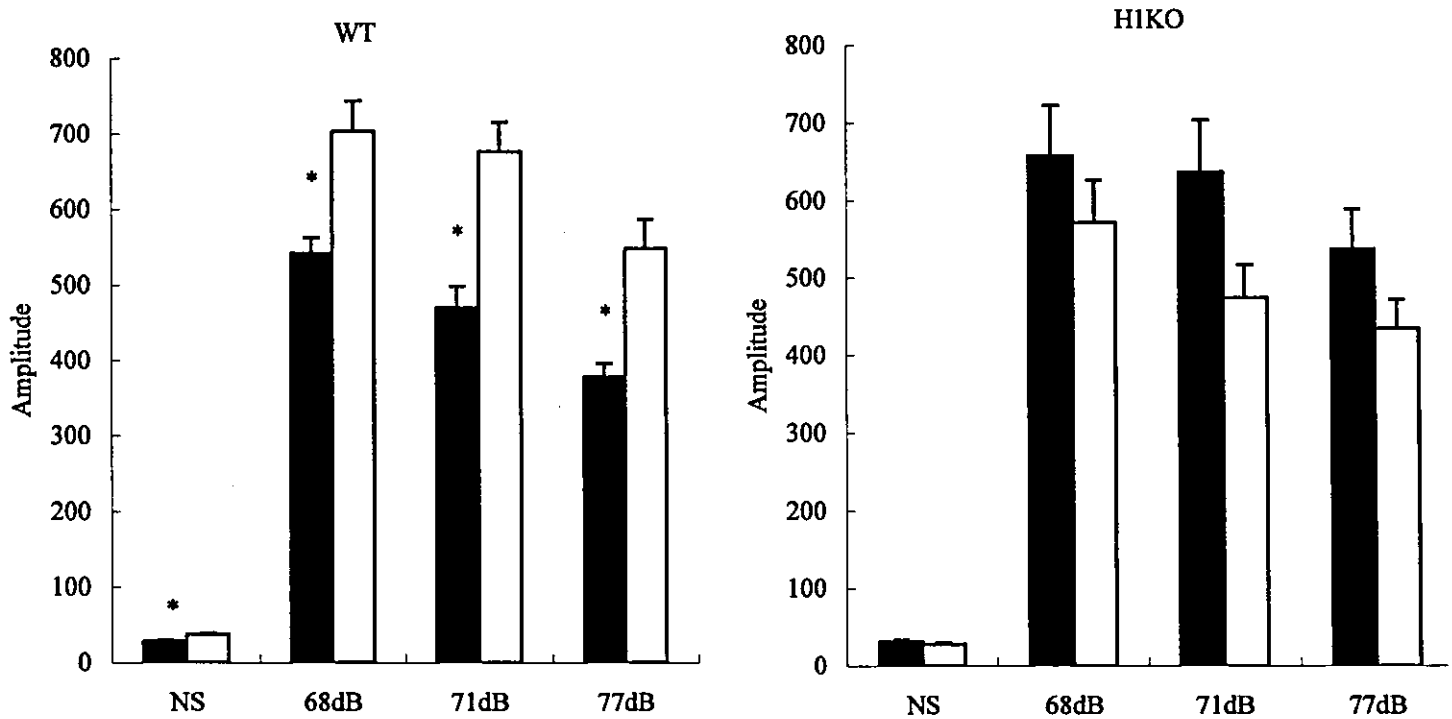


図 1. 社会的隔離ストレスと H1 受容体：驚愕反応の amplitude

120dB の大きな音刺激による驚愕反応; 120dB より 100 msec 事前に弱い音刺激を与えた時の驚愕反応の振幅を調べた。■グループ飼育マウス、□社会的隔離ストレス負荷マウス。

Mann-Whitney U-test *P<0.05

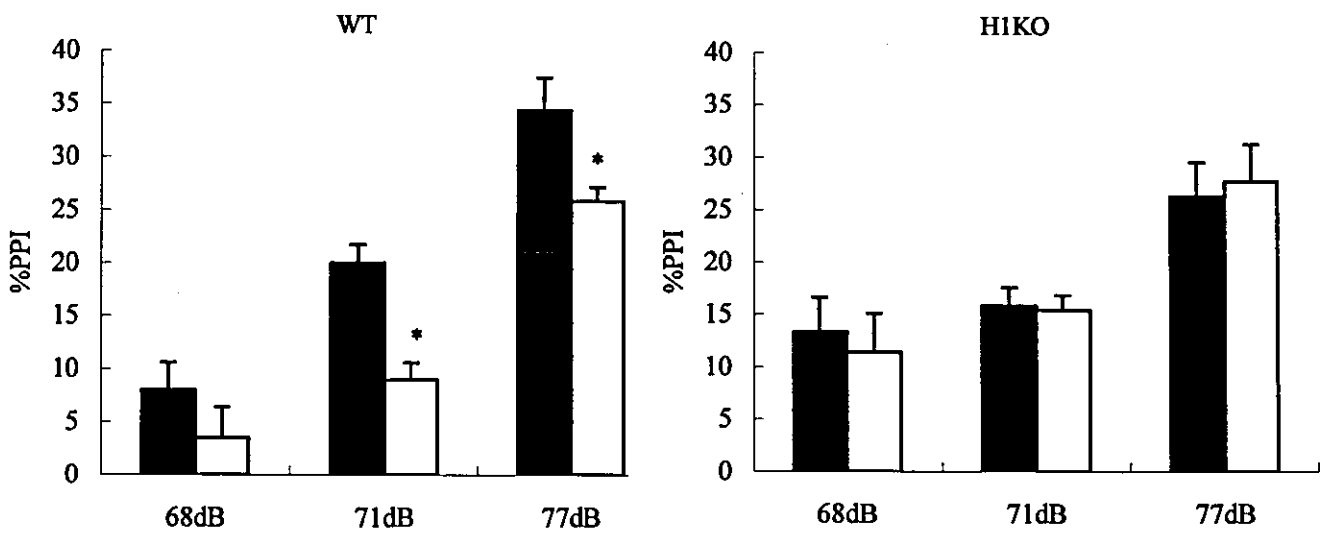


図2. 社会的隔離ストレスと H1 受容体：事前音刺激による驚愕反応抑制率
PPI：120dB より 100 msec 事前に弱い音刺激を与えた時の驚愕反応の抑制を調べる。統合失調症では PPI が生じないことが報告されている。■グループ飼育マウス、□社会的隔離ストレス負荷マウス。Mann-Whitney U-test *P<0.05

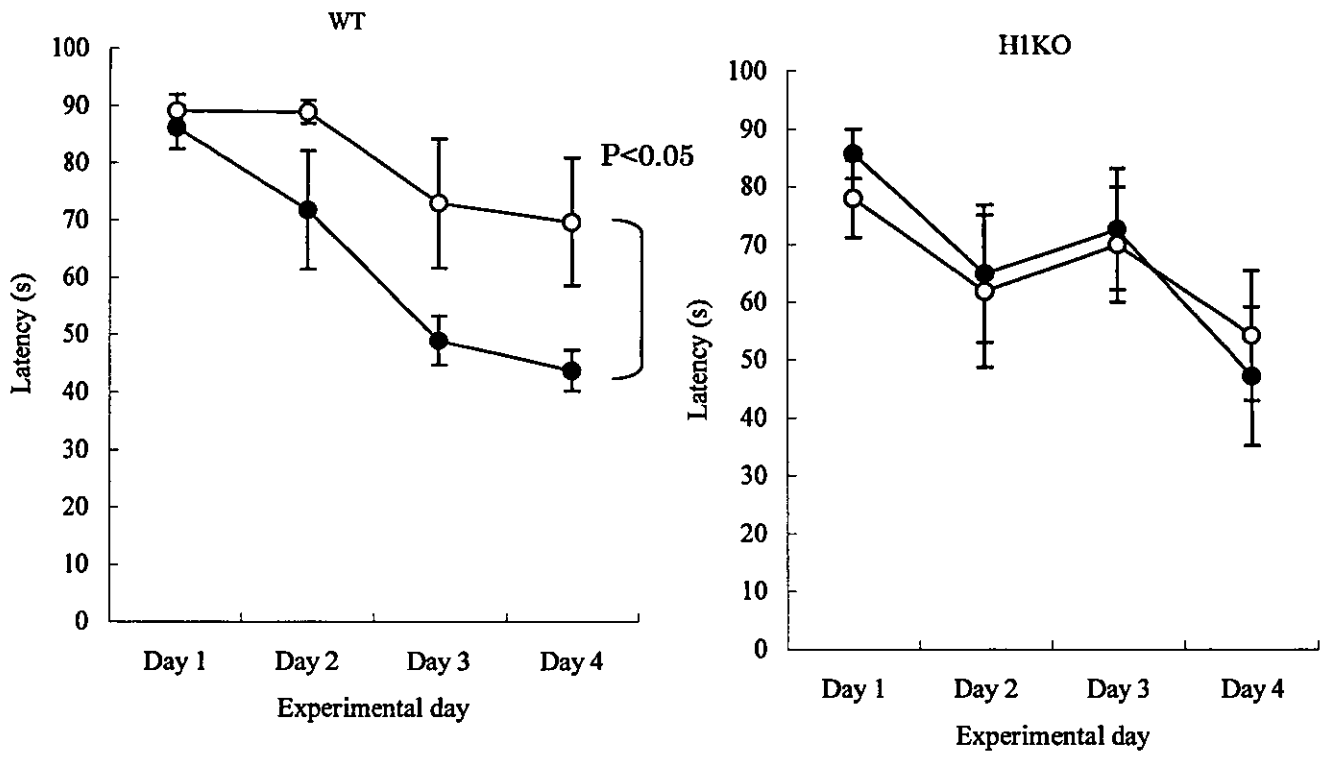


図3. 社会的隔離ストレスと H1 受容体：モリス水迷路による空間認知機能
 ●グループ飼育マウス、○社会的隔離ストレス負荷マウス。

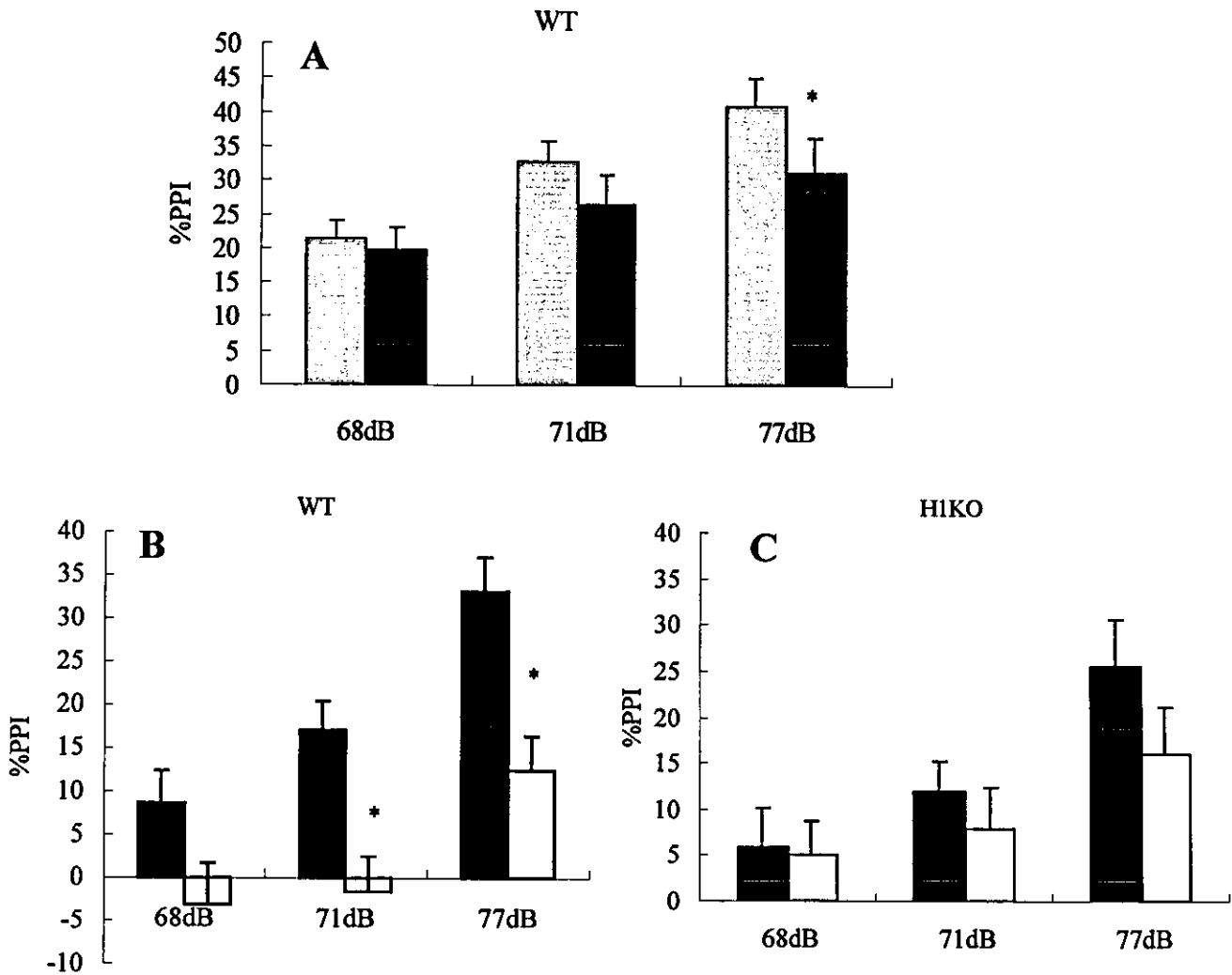


図4. 社会的隔離ストレスとMAP逆耐性形成を負荷したマウスにおける驚愕反応。MAP (1 mg/kg) を投与して驚愕反応の事前音刺激による抑制を計測した。

A: 野生型マウスにMAP (1 mg/kg) 単回投与におけるPPI。B: 隔離ストレス+MAP逆耐性モデルにおけるPPI (野生型マウス)。C: 隔離ストレス+MAP逆耐性モデルにおけるPPI (HIKOマウス)。HIKOとその野生型では明確な差が認められる。■グループ飼育マウス、□社会的隔離ストレス負荷マウス。 Mann-Whitney U-test *P<0.05

未規制を含む依存性薬物の精神神経毒性と標的分子への作用機序の解明

分担研究者：曾良一郎¹

研究協力者：沼知陽太郎¹、小原可久¹、山下元康¹、福島攝¹、近江香予¹、岩村樹憲²、岩淵好治³、小林秀昭¹

(¹東北大学大学院医学系研究科精神・神経生物学分野、²岐阜薬科大学薬化学教室、³東北大学大学院薬学研究科合成制御化学分野)

【研究要旨】

最近本邦での乱用が増加しているメチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) と 5-MeO-DIPT (5-methoxy-N, N-diisopropyltryptamine) は、セロトニン神経伝達を増強させると考えられている。MDMA と 5-MeO-DIPT のモノアミン系を介した神経毒性の機序を解明するため、ドーパミントランスポーター (DAT) とセロトニントランスポーター (SERT) のノックアウト (KO) マウスで、両薬物による体温変化と神経毒性を調べた。

MDMA の LD₅₀ は野生型 < DAT+/- < SERT-KO < DAT-KO だった。MDMA 80mg/kg では、野生型、DAT-KO、SERT-KO で有意に体温が上昇したが、DAT/SERT ダブル KO マウスの体温は変化しなかった。5-MeO-DIPT の LD₅₀ は野生型マウスで MAP と MDMA より低く、野生型 < DAT+/- であった。MAP 45mg/kg によって、野生型マウスの視床下部と側坐核の IL-1 β mRNA が有意に上昇したが、DAT/SERT-ダブル KO マウスでは変化がなかった。

MDMA と 5-MeO-DIPT の神経毒性は DAT 欠損で低下したので、ドーパミン神経伝達の関与が示唆された。また、5-MeO-DIPT の毒性は MAP と MDMA よりも高いことが示された。MDMA の体温上昇作用には、DAT もしくは SERT の発現が必須で、致死毒性とは必ずしも相関しないことが示された。さらに、MAP の体温上昇作用には DAT と SERT のどちらかが必要で、視床下部 IL-1 β mRNA の上昇と相関することが示唆された。

A. 研究目的

従来、我が国の乱用薬物は、覚醒剤とトルエンが主流であった。しかし最近になって、新規の規制薬物であるメチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) や、法規制が検討されている脱法ドラッグの 5-MeO-DIPT (5-methoxy-N, N-diisopropyl tryptamine) の乱用が激増し、深刻な問題となっている [1]。覚醒剤であるメタンフェタミン (MAP) が主にドーパミン (DA) 作動性神経終末で

releaser として作用するのに対して、MDMA はドーパミン (DA) に加えてセロトニン (5-HT) 作動性神経終末に対して releaser として作用する [2]。5-MeO-DIPT はセロトニン神経系に対してアゴニストとして作用すると考えられている [3]。両薬物とも乱用によって、DA、5-HT 神経に毒性を及ぼすと考えられている。MDMA に関しては齧歯類やサルを用いた、神経毒性に関するいくつかの先行研究があるが、5-MeO-DIPT の神経毒性の機序は明らか

かではない。

今年度は、MDMA と 5-MeO-DIPT のモノアミン系を介した神経毒性の機序を解明することを目的に、ドーパミントランスポーター (DAT) とセロトニントランスポーター (SERT) のノックアウト (KO) マウスで、両薬物による体温変化と神経毒性を調べた。

B. 研究方法

1. 実験動物

全ての実験は東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可のもとに行った。実験には 18-32 週齢の 129/C57 混合遺伝背景の KO マウスを用いた。DAT/SERT ダブル KO マウスは、既報に従い DAT-KO マウスと SERT-KO マウスを交配して作製した [4]。マウスの遺伝子型は、尻尾断片組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて判別した。

2. 薬剤

塩酸 MAP (ヒロポン) は大日本製薬 (大阪) から購入した。塩酸 MDMA は、岐阜薬科大で合成したものをを用いた。塩酸 5-MeO-DIPT は、購入した品を東北大学薬学研究科にて精製して用いた。

3. 体温測定と致死毒性：

薬剤を投与して 0~60 分後の体温変化を、15 分おきに測定した。測定には Physitemp Instruments 社 (Clifton, NJ, USA) の体温測定装置 BAT-10 と、マウス直腸温測定プローブ RET-3 を用いた。

致死毒性は、塩酸 MDMA もしくは塩酸 5-MeO-DIPT 生理食塩水溶液を投与して 1 時間までの死亡を観察した。1 時間後も生存しているマウスは速やかに安楽死させ、死亡率を算出した。

4. RT-PCR

MAP 45mg/kg を投与した野生型、DAT/SERT ダブルノックアウトマウスについて、1 時間後に断頭、氷上で脳を採取し、視床下部、側坐核、線条体、前頭葉皮質を分画、-80 度で保存した。これらの脳組織から定法で total RNA を抽出、逆転写反応

により cDNA を合成した。IL-1 β mRNA 発現量を QuantumRNA 18S Internal Standards (Ambion, CA, USA) を内部標準として、Gene Specific Relative RT-PCR Kits (Ambion, CA, USA) を用いて半定量的に解析した。

5. 免疫組織化学

MAP 45mg/kg、もしくは MDMA 80mg/kg を投与して 1 週間後に、野生型マウスをペントバルビタールにより麻酔した後、心臓から生理食塩水、固定液としてパラフォルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) を順に還流した。脳を取り出し、同固定液で一晩後固定を行った後、15% スクロースを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 中に保存した。ミクロトームにより 20 ミクロン厚の冠状切片を作成しスライドガラスに貼り付けた後、ブロッキング液に浸しブロッキングした。ドーパミン神経のマーカーとして、抗チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH)、抗ドーパミントランスポーター抗体、抗体を選択した。また、セロトニン神経のマーカーとして抗セロトニン抗体を選択した。それぞれの抗体を反応させた後、リン酸生理食塩水で洗浄し、さらに蛍光標識した二次抗体を反応させた。反応後、リン酸生理食塩水で洗浄し、封入後染色を Leica 社の蛍光顕微鏡で観察した。

6. 統計解析

薬物によるマウスの体温変化と IL-1 β mRNA 発現量に関しては one-way ANOVA を用いた。統計ソフトは SPSS For Windows を用いた。

C. 研究結果

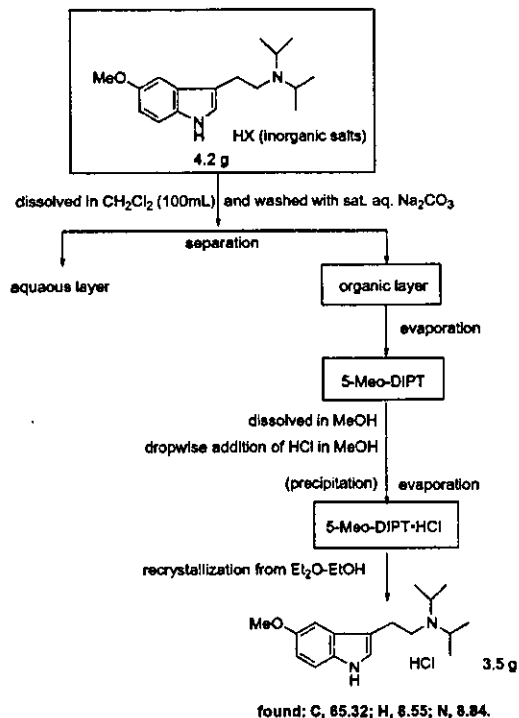
1. 5-MeO-DIPT の精製

購入した 5-MeO-DIPT は、東北大学薬学研究科にて精製した。HPLC と NMR では、純度には大きな問題は認めなかった。しかし、元素分析の結果が理論値と一致せず、実際には (複数の) 塩酸塩であると予想された。このため中和、再塩化、結晶化

を行い、ほぼ理論値通りの塩酸塩を得た(図1)。

図1 5-MeO-DIPTの精製

Preparation of 5-MeO-DIPT·HCl from the commercial sample



@ Internet catalog: Free base: $C_{17}H_{26}N_2O$ showed an acceptable purity by HPLC and 1H NMR but unacceptable elemental analysis data

Theoretical value: C, 74.41; H, 9.55; N, 10.21.

found: C, 59.75; H, 7.82; N, 8.03.

Cf. Theoretical data for the HCl salt: $C_{17}H_{26}N_2O$

C, 65.68; H, 8.75; N, 9.01.

2. MDMAと5-MeO-DIPTの致死毒性

MDMAは、30、80、130mg/kgの3種類の用量で検討した。結果を図2と表1に示す。野生型のLD50に比べて、DATヘテロKOのLD50はわずかに増加、SERT-KOマウスとDAT-KOマウスではそれぞれ、野生型の1.2倍、1.6倍にLD50が増加していた。

5-MeO-DIPTは、50、75、100mg/kgの用量で検討した。結果を図3と表2に示す。野生型のLD50に比べて、DATヘテロKOとDATヘテロ/SERT-KO

マウスのLD50は約1.1倍に増加していた。

図2 MDMAの致死毒性

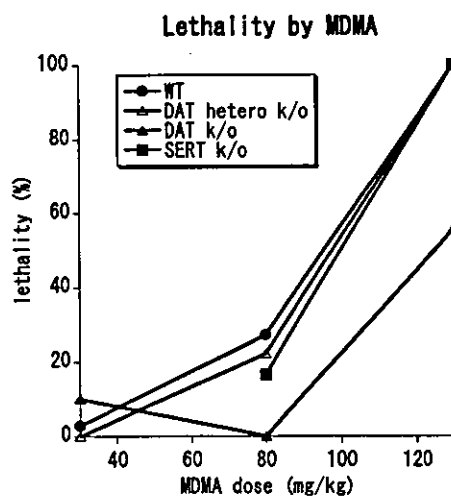


表1 MDMAのLD50

遺伝子型	LD50 (mg/kg)
野生型	86.8
DATヘテロKO	89.3
DAT-KO	141.7 (野生型の1.6倍)
SERT-KO	100 (野生型の1.2倍)

図3 5-MeO-DIPTの致死毒性

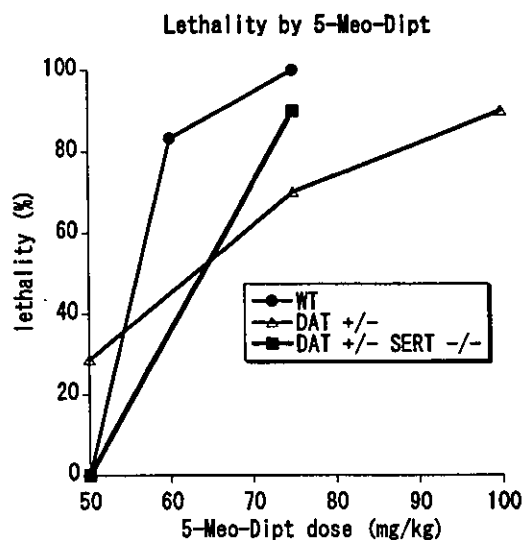


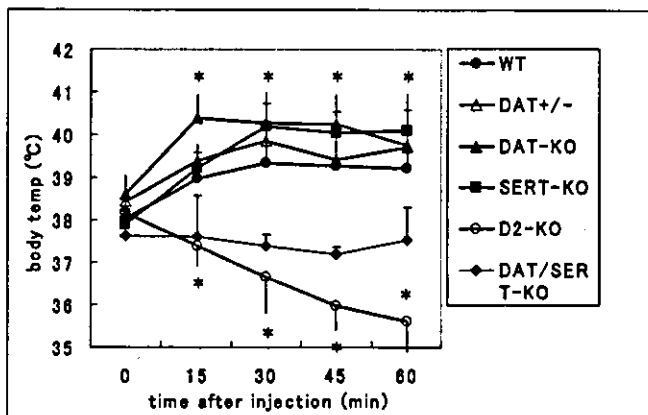
表 2 5-MeO-DIPT の LD50

遺伝子型	LD50 (mg/kg)
野生型	58.7
DAT ヘテロ KO	64.5 (野生型の 1.1 倍)
DAT ヘテロ SERT-KO	63.9 (野生型の 1.1 倍)

3. MDMA による体温変化

MDMA80mg/kg により、野生型、DAT ヘテロ、DAT-KO、SERT-KO マウスでは、投与直前に比べて 15 分後から 60 分まで体温が有意に上昇した。この中では、DAT-KO マウスが一番著しい体温上昇を示した。しかし、D2 受容体 KO マウスは MDMA80mg/kg 投与後 15-60 分まで有意の体温低下を認め、DAT/SERT ダブル KO マウスでは、MDMA で体温が変化しなかった (図 4)。

図 4 MDMA 80mg/kg による体温変化 (*: p<0.05, ANOVA)



4. MAP による脳内 IL-1β mRNA の発現変化

視床下部、側坐核、線条体、前頭葉皮質の IL-1β mRNA について、18S rRNA との比を取った結果を図 5a から d に示す。野生型マウスの視床下部と側坐核の IL-1β mRNA は、生理食塩水に比べて MAP45mg/kg によって有意に発現が上昇し、線条体、前頭葉皮質では変化しなかった。これに対して DAT/SERT ダブル KO マウスでは、いずれの脳部位でも MAP による変化を認めなかった。

図 5 a MAP 45mg/kg による視床下部 IL-1β mRNA の変化 (**: p<0.01, ANOVA)

Hypothalamic expression of IL-1β mRNA

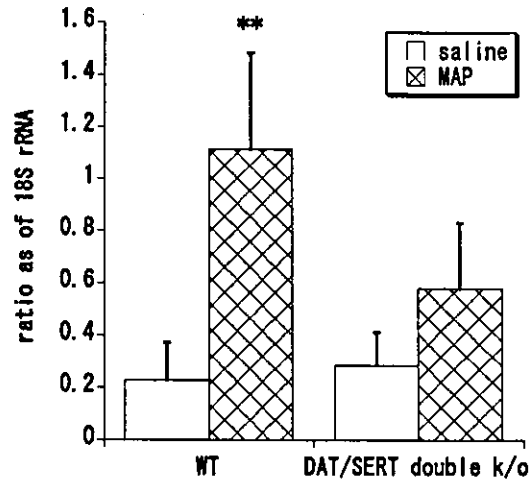


図 5 b MAP 45mg/kg による側坐核 IL-1β mRNA の変化 (*: p<0.05, ANOVA)

Accumbal expression of IL-1β mRNA

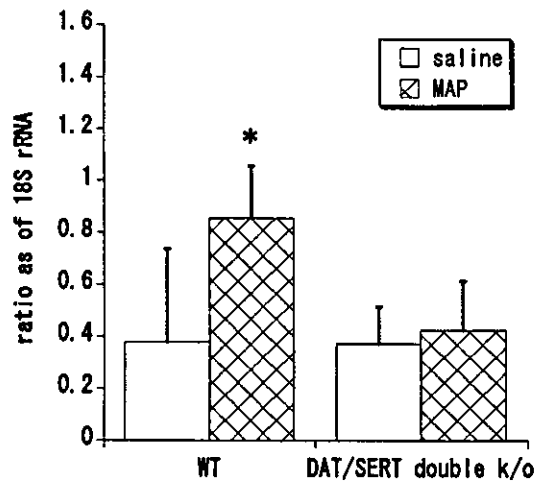


図 5 c MAP 45mg/kg による線条体 IL-1 β mRNA の変化

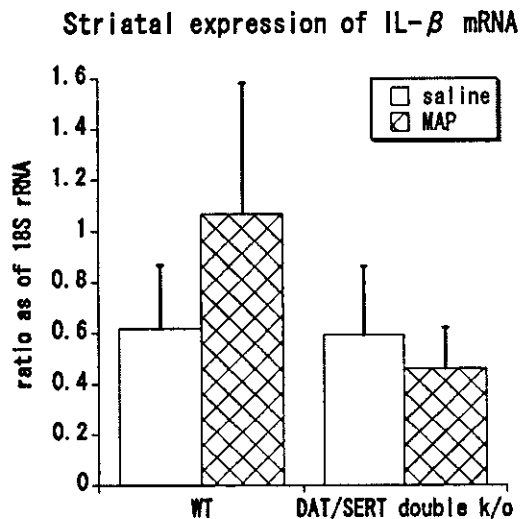
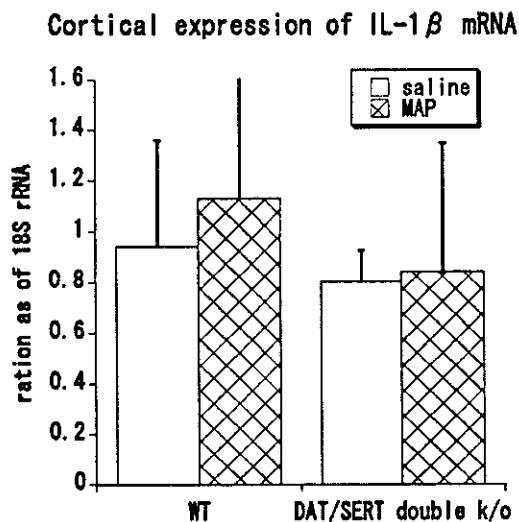


図 5 d MAP 45mg/kg による前頭葉皮質 IL-1 β mRNA の変化



5. MAP と MDMA の神経毒性

生理食塩水、MAP45mg/kg、MDMA80mg/kg を投与して1週間後の、野生型マウスの線条体における抗 TH 抗体による免疫組織染色の画像を図 6 a から c に、抗 DAT 抗体による画像を図 6 d から f に示す。図 6 g から i については、同マウスの前頭葉

皮質における抗 5-HT 抗体による画像を示す。線条体 TH と DAT の免疫活性は、MAP によって著しく減弱、MDMA では MAP に比べて程度は低い、やはり減弱を認めた。前頭葉皮質 5-HT の免疫活性も、MAP で減弱、MDMA では若干の減弱を認めた。

図 6 a 生理食塩水投与野生型マウスの線条体 TH

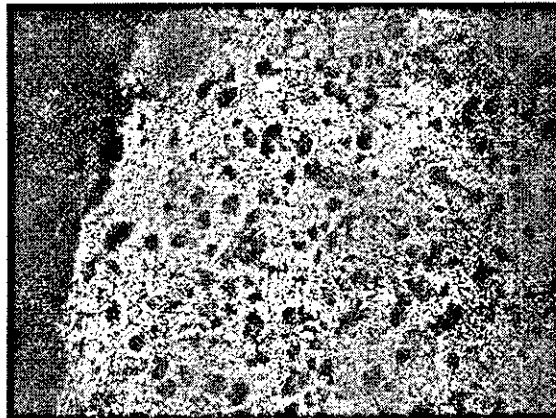


図 6 b MAP 投与野生型マウスの線条体 TH

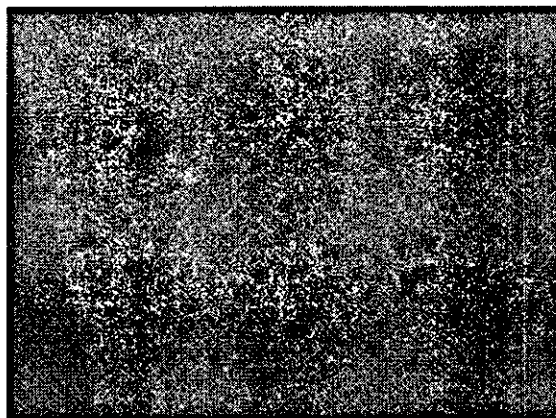


図 6 c MDMA 投与野生型マウスの線条体 TH

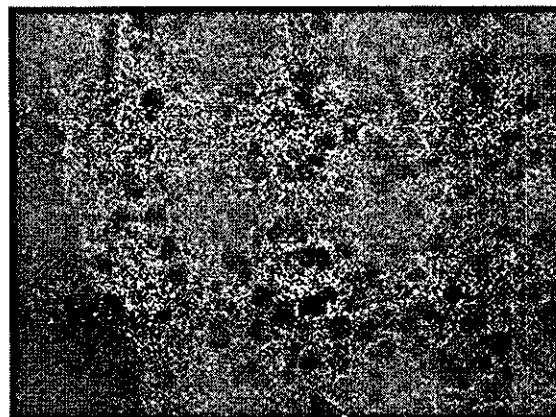


図 6 d 生理食塩水投与野生型マウスの線条体 DAT

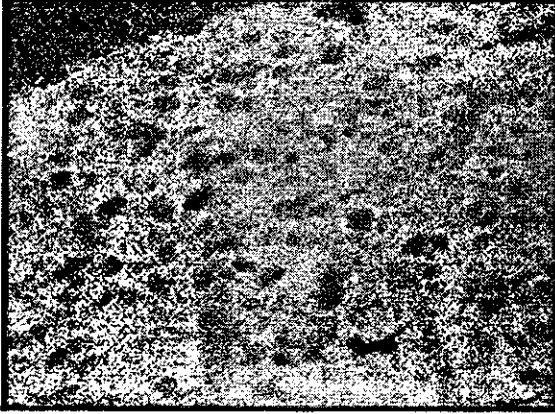


図 6 g 生理食塩水投与野生型マウスの前頭葉 5-HT

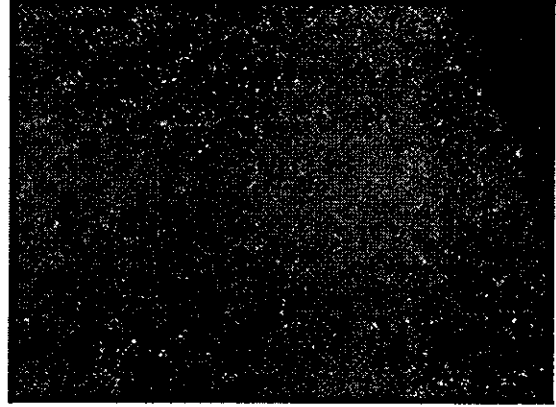


図 6 e MAP 投与野生型マウスの線条体 DAT

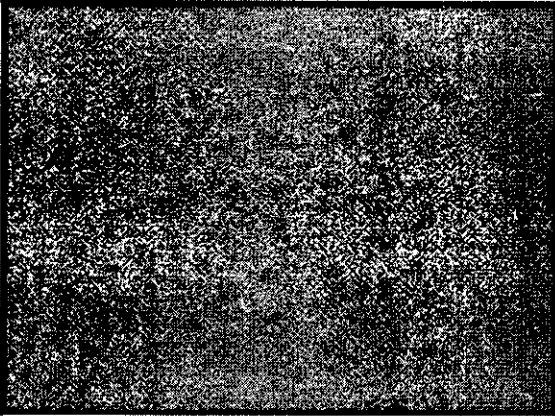


図 6 h MAP 投与野生型マウスの前頭葉 5-HT

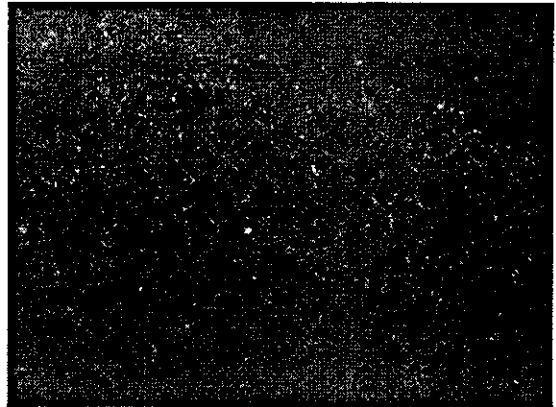


図 6 f MDMA 投与野生型マウスの線条体 DAT

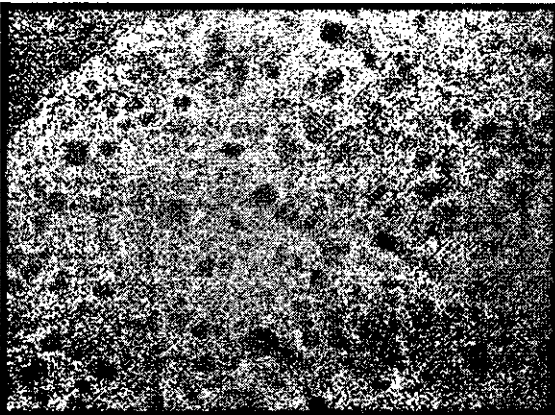
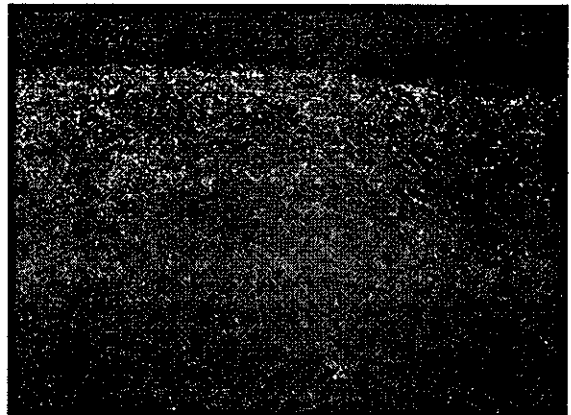


図 6 i MDMA 投与野生型マウスの前頭葉 5-HT



D. 考察

MDMA の致死毒性は、WT>DAT ヘテロ KO>SERT-KO>DAT-KO の順で、DAT と SERT 欠損に伴って減弱した。これは MAP の致死毒性と同様の傾

向であった。MAP は DAT への親和性が SERT への親和性に比べて高く、MDMA はその逆であることが知られている。しかし、今回の結果から、MDMA の致死毒性は SERT よりも DAT に依存する部分が多いことが示された。

5-MeO-DIPT は、MAP と MDMA よりも毒性が強く、危険な薬物であることが示された。また、5-MeO-DIPT の致死毒性は DAT ヘテロ KO マウスで減弱、それに SERT 欠損が加わっても変化しなかった。5-MeO-DIPT は 5-HT 受容体アゴニストと想定されるが、毒性は DAT 発現の影響を受けると考えた。

MDMA は、野生型、DAT-KO、SERT-KO マウスで MAP と同様の体温上昇を引き起こした。MAP による体温上昇は DAT で減弱するが、MDMA では興味深いことに、DAT-KO マウスで体温上昇が最も顕著だった。DAT-KO マウスは MDMA の致死毒性が減弱したこと方、MDMA による致死毒性と体温上昇作用は、必ずしも関連しないことが示された。また、D2-KO マウスは MAP と同様、MDMA でも体温が下降した。一方、MAP で逆説的に体温が下降した DAT/SERT-ダブル KO マウスは、MDMA で体温が変化しなかった。従って、MDMA と MAP は共通の体温上昇作用を有し、これは、(1) DAT と SERT のいずれかが必須で、(2) D2 受容体を介している、ことが示された。

MAP は野生型マウスの視床下部と側坐核で部位特異的に IL-1 β mRNA の発現を増加させた。線条体と皮質では変化を認めなかった。MAP で体温が下降した DAT/SERT-ダブル KO マウスでは、いずれの脳部位でも変化を認めなかった。

MAP は線条体の TH と DAT、前頭葉皮質の 5-HT の免疫活性を著しく減弱させ、DA と 5-HT 神経終末の変性を引き起こした[5]。これに対して MDMA は、DA と 5-HT 神経に対する神経毒性が MAP に比べて弱かった[2]。上記のように、MDMA の致死毒性は SERT よりも DAT に依存するが、DA 神経そのものに対する変性作用は MAP より弱いことが示さ

れた。また、MDMA は SERT への親和性が MAP よりも高いが、5-HT 神経に対する変性作用も MAP より弱いことが示された。

E. 結論

以上の結果を表 3 に示す。MDMA と 5-MeO-DIPT の致死毒性は、主に DAT に依存することがわかった。MDMA の DA、5-HT 神経に対する毒性は MAP よりも弱かった。次年度以降は、MAP、MDMA の毒性に対する DAT、SERT 欠損の影響、及び 5-MeO-DIPT の DA、5-HT 神経に対する毒性を検討する予定である。

	MAP	MDMA	5-MeO-DIPT
体温	↑ DAT > SERT dependent	↑ SERT > DAT dependent	
致死毒性	strong DAT dependent	moderate DAT dependent	very strong DAT dependent
神経毒性	strong DA = 5-HT	moderate DA = 5-HT	

[参考文献]

1. 小原可久, et al., インターネットを用いた未規制薬物乱用の実態調査. 日本神経精神薬理学雑誌, 2004. 24: p. 316-318.
2. Green AR, M.A., Elliott JM, O'Shea E, Colado MI., *The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy")*. Pharmacol Rev., 2003.
3. Meatherall, R. and P. Sharma, *Foxy, a designer tryptamine hallucinogen*. J Anal Toxicol, 2003. 27(5): p. 313-7.
4. Sora, I., et al., *Cocaine reward models:*

conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(13): p. 7699-704.

5. Cadet, J.L., S. Jayanthi, and X. Deng, *Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis.* Faseb J, 2003. 17(13): p. 1775-88.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hall, F.S., Goeb, M., Li, X.F., Sora, I. and Uhl, G.R.: Mu opioid receptor knockout mice display reduced cocaine conditioned place preference but enhanced sensitization of cocaine-induced locomotion. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 121: 123-130, 2004.
- 2) Koizumi, H., Hashimoto, K., Kumakiri, C., Shimizu, E., Sekine, Y., Ozaki, N., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Takei, N. and Iyo, M.: Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 126: 43-45, 2004.
- 3) Yamamoto, T., Nishizaki, I., Nukada, T., Kamegaya, E., Furuya, S., Hirabayashi, Y., Ikeda, K., Hata, H., Kobayashi, H., Sora, I. Yamamoto, H.: Functional identification of ASCT1 neutral amino acid transporter as the predominant system for the uptake of L-serine in rat neurons in primary culture. *Neurosci. Res.*, 49: 101-111, 2004.
- 4) Mansikka, H., Zhao, C., Sheth, R. N., Sora, I., Uhl, G. and Raja, S. N.: Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. *Anesthesiology*, 100: 912-921, 2004.
- 5) Shen, H. W., Hagino, Y., Kobayashi, H., Shinohara-Tanaka, K., Ikeda, K., Yamamoto, H., Yamamoto, T., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Hall, F. S., Uhl, G. R. and Sora, I.: Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1790-1799, 2004.
- 6) Ide, S., Minami, M., Satoh, M., Uhl, G. R., Sora, I. and Ikeda, K.: Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1656-1663, 2004.
- 7) Yamamoto, H., Imai, K., Takamatsu, Y., Kamegaya, E., Hara, Y., Shimada, K., Yamamoto, T., Shen, H. W., Hagino, Y., Kobayashi, H., Ide, S., Sora, I., Koga, H. and Ikeda, K.: Changes in expression of the mouse homologues of KIAA genes after subchronic methamphetamine treatment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1025: 92-101, 2004.
- 8) Han, W., Ide, S., Sora, I., Yamamoto, H. and Ikeda, K.: A possible genetic mechanism underlying individual and interstrain differences in opioid actions: focus on the mu opioid receptor gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1025: 370-375, 2004.
- 9) Ide, S., Kobayashi, H., Tanaka, K., Ujike, H., Sekine, Y., Ozaki, N., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Ikeda, K. and Sora, I.: Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1025: 316-324, 2004.
- 10) Hironaka, N., Ikeda, K., Sora, I., Uhl, G. R. and