

覚醒剤およびMDMAによる精神障害の発現と依存形成の分子機序

分担研究者：野田幸裕^{1,2}

研究協力者：鍋島俊隆²，毛利彰宏²，森瀬貴子²，溝口博之²，新田淳美²，北市清幸³，岩村樹憲⁴

（¹名城大学薬学部医療薬学科病態解析学，²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学，³名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻，⁴岐阜薬科大学薬化学）

【研究要旨】

本研究では、MDMA連続投与による運動過多の増強（逆耐性）の形成過程におけるドパミン作動性神経系およびグルタミン酸作動性神経系の関与について調べた。野生型マウスにMDMA（10 mg/kg/day）を7日間連続投与すると、MDMA誘発運動過多は増強され、逆耐性が形成された。MDMA連続投与マウスの側坐核における細胞外ドパミン遊離量は、MDMA単回投与マウスのそれと比べ有意に増加していた。しかし、ドパミン合成機能を遺伝的に低下させたチロシン水酸化酵素遺伝子変異（TH^{-/-}）マウス、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体機能を遺伝的に低下させたNMDA受容体サブユニットε1遺伝子欠損（NR2A^{-/-}）マウスおよび低親和性NMDA受容体拮抗薬であるメマンチンをMDMAと連続併用投与したマウスでは、MDMA連続投与による運動過多の増強や細胞外ドパミン遊離量の増加は、認められなかった。以上の結果から、MDMAの連続投与によって側坐核におけるドパミン作動性神経機能が亢進された結果、ドパミン作動性神経系とグルタミン酸作動性神経系の間に異常なネットワークが構築され、運動過多が増強されたものと示唆される。一方、MDMA連続投与マウスの認知機能を調べたところ、MDMA連続投与マウスでは水探索試験および新規物質認識試験において認知機能が障害されており、両認知機能障害はメマンチンの連続併用投与により抑制された。今後、MDMAによる認知機能障害の分子機構におけるグルタミン酸作動性神経系の関与について詳細に検討する予定である。

A. 研究目的

遊興用ドラッグである3, 4-メチレンジオキシメタンフェタミン（MDMA：エクスタシー）の乱用は、欧米諸国ばかりでなく、日本においても深刻な社会問題となっている。すなわち、MDMAは、安全な薬であるという誤解のもとに従来の覚醒剤（MAP：メタンフェタミン）乱用群と異なり、社会的逸脱群でない若年層に急速に

普及している¹⁾。MDMAは、遊興的使用量でも明らかな精神毒性を示し、日本で最も乱用されているMAPと同様に、精神障害は使用を中止した後も残遺し、長期使用により重度の精神障害を発症させることが知られている¹⁾。MAPの連続投与により誘発される精神行動障害の発現には、ドパミン作動性神経機能異常の一次的な作用と、二次的な分子レベルでの機能変化およ

び他の神経回路との相互作用、特に側坐核におけるグルタミン酸作動性神経系との相互作用が関与していることが示唆されている²⁾。しかし、MDMAの連続投与による精神行動障害の発現におけるドパミン作動性神経系およびグルタミン酸作動性神経系の関与は明らかではない。

そこで、MDMA連続投与により誘発される精神行動障害のうち、自発性障害の指標として運動過多の増強、認知機能障害の指標として水探索試験および新規物質認識試験での認知障害を用い、精神行動障害の発現機序について行動薬理学的および生化学的に検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、野生型である6-8週齢のC57BL/6J系雄性マウス(日本エスエルシー、静岡)、チロシン水酸化酵素遺伝子変異($TH^{+/}$)³⁾およびN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体サブユニット $\epsilon 1$ 遺伝子欠損($NR2A^{-/-}$)⁴⁾マウスを使用した。動物は実験を開始する前少なくとも3日間は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ で、明暗サイクル(明期8時~20時)の室内にて飼育し、水および餌は自由に摂取させた。なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部動物実験指針およびPrinciples of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985)に準じて行った。

2. 薬物

実験には、我々が合成したMDMAおよび非競合的NMDA受容体拮抗薬のメマンチン(SIGMA, MO, USA)は、生理食塩水に溶解し、10mL/kgの投与用量に調整した。メマンチン(7.5mg/kg i.p.)はMDMA投与15分前に連続

併用投与した。

3. 運動量測定試験

MDMA(10mg/kg)を1日1回7日間連続皮下投与した。MDMA投与1日目、3日目、5日目および7日目にマウスを自発運動量測定ケージ(縦30cm, 横47.5cm, 高さ35cm)に入れ、投与直後から60分間の自発運動量をSCANET SV-10(メルクエスト, 富山)により測定した。

4. 水探索試験

運動量測定試験終了2日後から水探索試験を行った。すなわち、訓練試行(MDMA休薬2日目)では、十分に水を与えたマウスに3分間自由に装置内を探索させた。訓練試行終了後、直ちにマウスをホームケージに戻し、テスト試行を開始するまで絶水した。テスト試行(MDMA休薬3日目)は、訓練試行の翌日に行った。訓練試行終了後、絶水したマウスを再びテスト装置内に置き、水を飲むまでの時間(finding latency)を記録した。訓練試行を経験しなかったマウス(非訓練群)についても同様にテスト試行を行い、これらのマウスのデータとの比較から、マウスの基礎的な潜在学習能力を評価した。

5. 新規物質認識試験

水探索試験のテスト試行終了日から3日間、新規物質認識試験に用いる装置(objectなし)に各マウスを慣らした(MDMA休薬3日目~5日目)。MDMA休薬6日後から新規物質認識試験を行った。中央に2種類の異なったobjectを離して設置した装置内にマウスを入れ、各objectに対する探索嗜好行動を10分間測定した(訓練試行: MDMA休薬6日目)。訓練試行24時間後に、2種類のobjectのうち片方のobjectを全く異なった新規objectと置換し、各objectに対

する探索嗜好行動を10分間測定した(テスト試行:MDMA休薬7日目)。

6. マイクロダイアリシス法

MDMA連続投与6日目において、マウスをペントバルビタール(40mg/kg i.p.)で麻酔し、頭部を脳固定器に固定した。ガイドカニューレ(AG-6, Eicom, 京都, 日本)は、Franklin and Paxinos⁵⁾の脳図譜にしたがって、左側坐核(AP+1.7, ML+0.75, 頭蓋骨表面からDV-4.0)に挿入し、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。手術の翌日マウスを実験に用いた。

人工脳脊髄液(147mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂)を1.2μl/minの流速で灌流させた長さ1mmの同中心型微小透析用プローブ(AI-6-1; Eicom)をガイドカニューレに挿入した。この微小透析用プローブを通して回収された灌流液を高速液体クロマトグラフィーに接続したオートインジェクターのサンプルループに集め、10分ごとに高速液体クロマトグラフィーに注入した。回収された灌流液中のドーパミンは電気化学的検出器(HTEC-500, Eicom)により測定した。

透析された細胞外ドーパミン量が、30分(10分毎、3回連続)以上安定したことを確認してから、MDMAを投与した。

7. 統計解析

結果は平均値±標準誤差として示した。得られた結果は、分散分析を行い、各群間比較には、Bonferroniの多重比較検定法を用いた。なお、危険率が5%以下の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. MDMA連続投与により誘発される運動過多の増強(逆耐性の形成)

野生型マウスにMDMA 10mg/kgを7日間連続投与し、1、3、5および7日目に運動量を測

定したところ、3、5および7日目の測定日の運動量は、saline投与野生型マウスのそれらに比べて有意に増加した(Fig. 1a)。MDMA投与7日目の野生型マウスの運動量は、投与1日目のそれに比べて有意に増加しており、逆耐性が認められた(Fig. 1a)。一方、3あるいは5日目におけるMDMA投与TH^{+/+}およびNR2A^{-/-}マウスの運動量は、saline投与マウスのそれらより有意に増加していたが、野生型マウスに認められたような運動過多の増強(逆耐性)は認められなかった(Fig. 1b, c)。Saline投与マウスの運動量はいずれの日においても同程度であった(Fig. 1a, b, c)。

MDMA連続投与マウスに認められる運動過多の増強が、非競合的NMDA受容体拮抗薬のメマンチンの前投与によりどのように影響されるか検討した。メマンチン(7.5 mg/kg)単回投与は、MDMAにより誘発される運動過多に対して影響を与えなかった(Fig. 2)。しかし、MDMA投与前にメマンチンを7日間連続併用

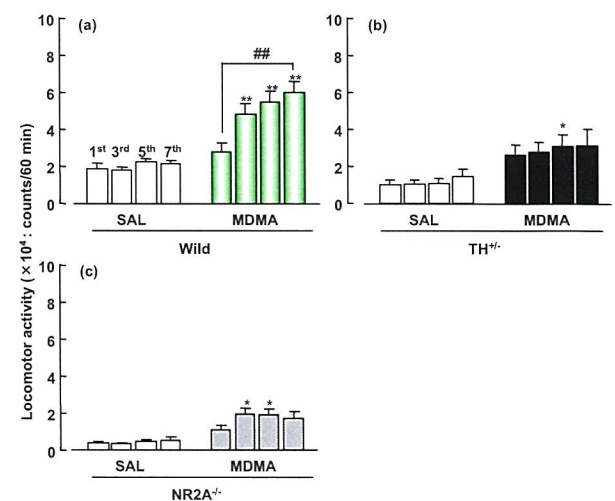


Fig. 1

Development of behavioral sensitization to MDMA-induced hyperlocomotion in (a) wild-type, (b) TH^{+/+} and (c) NR2A^{-/-} mice. Mice were administered MDMA (10 mg/kg s.c.) or saline (SAL) once a day for 7 days. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day, animals were treated MDMA 30 min after placement in the test cage. Locomotor activity was measured for 60 min. *P<0.05 **P<0.01 vs corresponding SAL-treated mice. ##P<0.01 vs the 1st day. TH^{+/+}: tyrosine hydroxylase mutant, NR2A^{-/-}: NMDA receptor subunit ϵ 1 knockout.

投与すると、MDMAによる運動過多の増強が抑制された (Fig. 2)。メマンチン単回投与マウスにおける運動量は、saline 投与マウスのそれと差はなかった (データ示さず)。また、saline 投与マウスの運動量はいずれの日においても同程度であった (Fig. 2)。

2. MDMA 連続投与マウスにおける側坐核からのドパミン遊離能

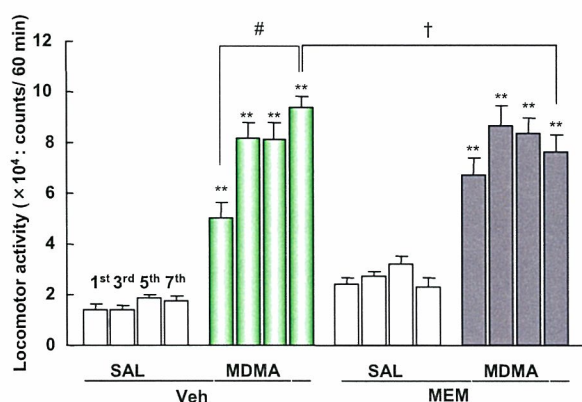


Fig. 2

Effect of memantine (MEM) on the behavioral sensitization to MDMA-induced hyperlocomotion. Mice were administered MDMA (10 mg/kg, s.c.) or saline (SAL) once a day for 7 days. MEM or vehicle (Veh) was pretreated 15 min before MDMA treatment. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day, mice were placed in the test cage and measured locomotor activity for 60 min. Values are the means $\pm$ S.E. ** P < 0.01 vs corresponding Veh/SAL-treated mice. # P < 0.05 vs the 1st day. † P < 0.05 vs corresponding Veh/MDMA-treated mice.

ドパミン作動性神経系の神経終末部である側坐核は、中枢興奮薬により惹起される精神行動障害および精神依存の発現・形成に重要な役割を果たしている部位である6)。野生型マウスにMDMA (10mg/kg) を単回投与すると、saline 投与マウスと比較して側坐核における細胞外ドパミン遊離量が有意に増加した (Fig. 3a)。MDMA (10mg/kg) を7日間連続投与し7日目に側坐核における細胞外ドパミン遊離量を測定したところ、MDMA 単回投与野生型マウスのそれに比べて有意に増大していた (Fig. 3a)。しかし、MDMA 連続投与 TH^{+/+} および NR2A^{-/-} マウスあるいはメマ

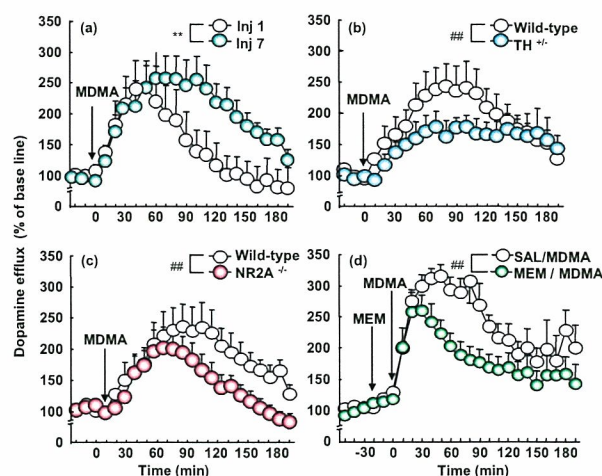


Fig. 3

MDMA-induced dopamine release in the nucleus accumbens of (a) wild-type, (b) TH^{-/-}, (c) NR2A^{-/-} and (d) memantine-treated mice. The extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens of MDMA-treated mice were measured by in vivo microdialysis. Mice were administered MDMA (10mg/kg, s.c.) acutely (injection 1) or repeatedly (injection 7: once a day for 7 days). Memantine (MEM) was pretreated 15 min before every MDMA treatment. Values are the means $\pm$ S.E. ** P < 0.01 vs injection 1. ## P < 0.01 vs wild-type or SAL/MDMA-treated mice. TH^{-/-}: tyrosine hydroxylase mutant, NR2A^{-/-}: NMDA receptor subunit ϵ 1 knockout.

ンチン連続併用投与マウスでは、野生型マウスに認められたような細胞外ドパミン遊離量の増加の増大は認められなかった (Fig. 3b, c, d)。

3. MDMA 連続投与マウスにおける認知機能

水探索試験の訓練試行における探索行動 (歩行量およびノズルへの接触回数) には生理食塩水およびMDMA 連続投与マウスの間には有意な差がなかった (データを示さず)。

テスト試行において、saline を連続投与し、訓練試行を行ったマウスの finding latency は、非訓練マウスのそれと比較して有意に短縮した。この結果は、本水探索試験において、マウスが潜在学習を獲得していることを示している。一方、MDMA を連続投与し、訓練試行を行ったマウスの finding latency は、saline を連続投与し、訓練試行を行ったマウスと比較して有意に延長しており (Fig. 4a)、MDMA 連続投与マウスにおいて潜在学習の障害が認められた。

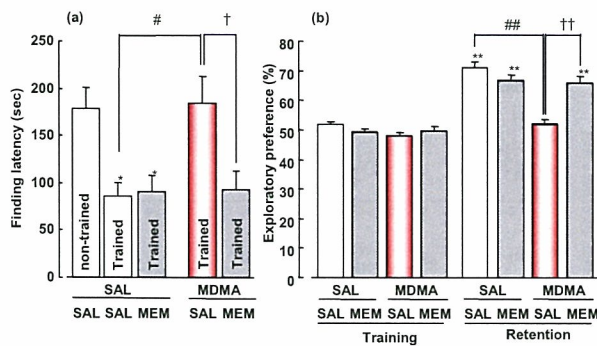


Fig. 4

Effect of memantine on the impairment of (a) latent learning and (b) novel object learning induced by repeated MDMA treatment. Mice were administrated MDMA (10 mg/kg, s.c.) once a day for 7 days. Memantine (MEM) was pretreated 15 min before every MDMA treatment. Latent learning and novel object learning in MDMA-treated mice were subjected training of each task 2 and 6 days, respectively after the last treatment. The test in each task was performed 1 day after the training. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs corresponding non-trained or training, SAL/SAL-treated mice. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs trained or retention, SAL/SAL-treated mice. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs trained or retention, MDMA/SAL-treated mice. SAL: saline.

新規物質認識試験の訓練試行時において MDMA連続投与マウスは、各objectに対して約50%の割合で探索嗜好行動 (exploratory preference) を示した (Fig. 4b)。テスト試行における MDMA連続投与マウスでは、新規objectに対する exploratory preferenceはsaline連続投与マウスのそれに比べ有意に低下しており、新規物質認識学習の障害が認められた (Fig. 4b)。

MDMA投与前にメマンチンを7日間連続併用投与すると、水探索試験のテスト試行において、finding latencyは短縮され、改善作用が認められた (Fig. 4a)。同様に、新規物質認識試験を行ったところ、新規objectに対する exploratory preferenceは有意に増加し、MDMA連続投与マウスのそれよりも有意に増加しており、認知障害が改善された (Fig. 4b)。

D. 考 察

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 $5\text{-HT}_2\text{A}$ 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ことが報告されている⁷⁾。MAPの連続投与により誘発される運動過多の増強あるいは精神依存の形成には、ドパミン作動性神経系機能異常が関与していることが示唆される^{8, 9)}。本研究において、野生型マウスに MDMAを連続投与すると、運動過多の増強 (逆耐性) が惹起され、MDMA連続投与マウスにおける MDMAによるドパミン遊離量は、MDMA急性投与マウスのそれと比較して有意に増大していた。しかし、先天的に脳内ドパミン作動性神経系が障害されている $\text{TH}^{-/-}$ マウスでは、運動過多の増強およびドパミン遊離量の増大は認められなかった。したがって、MDMA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の賦活化が関与していると示唆されるが、今後、セロトニン作動性神経系との関係についても検討する必要がある。

MAP連続投与によりドパミン受容体を介する細胞内情報伝達系が活性化され、転写因子ばかりでなく、NMDA受容体機能が制御されており^{10, 11)}、NMDA受容体が活性化されると、細胞内への Ca^{2+} が流入し、さらに細胞内情報伝達系が活性化される¹²⁾。このことから MDMA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細胞内情報伝達系だけでなくNMDA受容体を介する細胞内情報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、MDMA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ドパミン遊離量増加の増大は、遺伝的にNMDA受容体機能が低下している $\text{NR2A}^{-/-}$ マウスや非競合的NMDA受容体拮抗薬のメマンチンの連続併用投与マウスでは認められなかった。中枢興奮薬もしくはドパミン受容体作動薬により惹起される運動過多の増強 (逆耐性)^{13, 14)} がNMDA受容体拮抗薬によって抑制される。

MDMAによる精神行動障害の発現にもドパミン作動性神経系のみならずグルタミン酸作動性神経系も深く関与することが示唆される。したがって、MDMA連続投与によりドパミン作動性神経系およびグルタミン酸作動性神経系の双方での異常な神経ネットワークが構築された結果、精神行動障害が惹起されたものと示唆される。

一方、MDMAによる精神障害は、使用を中止した後も残遺し、長期使用により重度の精神障害を発症させることが知られている1)。本研究においてもMDMA連続投与後、休薬したマウスにおいて認知障害の1つである水探索試験における潜在学習および新規物質認識試験における探索嗜好行動の障害が認められた。両認知障害は、メマンチンの連続併用投与マウスでは認められなかった。したがって、MDMA連続投与マウスに認められる認知障害は、休薬後も持続的に惹起されることから、MDMA連用によりNMDA受容体が長期的に変化し、それに関連する遺伝子発現およびその調節機構(グルタミン酸作動性神経系)が変化している可能性が示唆される。しかし、MDMAによる認知障害の発現機序については今後さらに詳細に検討する必要がある。

E. 結 論

MDMAの連続投与によって側坐核におけるドパミン作動性神経機能が亢進された結果、ドパミン作動性神経系とグルタミン酸作動性神経系の間に異常なネットワークが構築され、運動過多が増強されたものと示唆される。今後、MDMAによる認知機能障害の分子機構におけるグルタミン酸作動性神経系の関与について詳細に検討する予定である。

【参考文献】

- 1) 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.
- 2) Vanderschuren, L.J., 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.
- 3) 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.
- 4) Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I. et al.: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *Nature*, 373: 151-155, 1995.
- 5) Paxinos, G., Franklin, K.B.J.: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition*. Academic Pr, 2000.
- 6) Koob, G.F.: Drug of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci*, 13: 177-184, 1992.
- 7) 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.
- 8) Kalivas, P.W., Stewart, J.: Dopamine

transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.*, 16: 223-244, 1991.

- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Ghosh, A., Greenberg, M.E.: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 26: 239-247, 1995.
- 13) Karler, R., Calder, L.D., Chaudhry, I.A. et al.: Blockade of 'reverse tolerance' to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.*, 45: 599-606, 1989.
- 14) Kim, H.S., Jang, C.G.: MK-801 inhibits methamphetamine-induced conditioned place preference and behavioral sensitization to apomorphine in mice. *Brain Res. Bull.*, 44: 221-227, 1997.

Wang MW, Wang D, Mizoguchi M, Noda Y, Nabeshima T. Inhibition of neprilysin by infusion of thiorphan into the hippocampus causes accumulation of amyloid β and impairment of learning and memory. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press, 2005.

- 2) Mouri A, Zou LB, Iwata N, Saido TC, Wang D, Wang MW, Noda Y, Nabeshima T. Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid beta and impairment of learning and memory. *Behav. Brain Res.*, 168, 83-91, 2006.
- 3) Ishikawa K, Kajita Y, Hasegawa Y, Noda Y, Yoshida J, Nabeshima T. Irinotecan therapy in a 12-year-old girl with recurrent brain stem glioma and without functional polymorphisms in UGT1A1 activity: case report. *J. Neurooncol.* 74, 283-286, 2005.
- 4) Nagai T, Noda Y, Ishikawa K, Miyamoto Y, Yoshimura M, Ito M, Takayanagi M, Takuma K, Yamada K, Nabeshima T. The role of tissue plasminogen activator in methamphetamine-related reward and sensitization. *J. Neurochem.* 92, 660-667, 2005.
- 5) Enomoto T, Noda Y, Mouri A, Shin EJ, Wang D, Murai R, Hotta K, Furukawa H, Nitta A, Kim HC, Nabeshima T. Long-lasting impairment of associative learning is correlated with dysfunction of NMDA-ERK signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Mol. Pharmacol.*, 68, 1765-1774, 2005.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zou LB, Mouri A, Iwata N, Saido TC,

2. 著書・総説

- 1) Noda Y, Nabeshima T. Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate

receptors. Eur. J. Pharmacol. 500, 121-128, 2004.

- 2) Noda Y, Nabeshima T. Involvement of signal transduction cascade via dopamine-D1 receptors in phencyclidine dependence. Ann N. Y. Acad. Sci. 1025, 62-68, 2004.
- 3) 亀井浩行, 野田幸裕, 山田清文, 鍋島俊隆. 薬物依存と前頭前野. Clinical Neuroscience, 23: 682-684, 2005.

3. 学会発表

国内発表

- 1) Yan Yijin, 山田清文, 溝口博之, 野田幸裕, 永井拓, 新田淳美, 鍋島俊隆. Tissue plasminogen activator (tPA) knockout mice over-respond to morphine self-administration mediated by dopamine D1 receptor. 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, 2005.3.)
- 2) 永井拓, 石川和宏, 宮本嘉明, 橋本和樹, 野田幸裕, 新田淳美, 山田清文, 鍋島俊隆. 麻薬依存における組織プラスミノゲン活性化因子/プラスミン系シグナルの役割. 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, 2005.3.)
- 3) 宮本嘉明, 山田清文, 永井拓, 森寿, 三品昌美, 古川宏, 野田幸裕, 鍋島俊隆. 依存性薬物誘発行動変化におけるNMDA受容体 $\epsilon 1$ サブユニットの役割. 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, 2005.3.)
- 4) 宮崎雅之, 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆. メタンフェタミン誘発精神行動障害の発現機序に関する研究. 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, 2005.3.)
- 5) 溝口博之, 山田清文, 水野誠, 水野朋子, 新田淳美, 野田幸裕, 鍋島俊隆. ドーパミン受容体の活性化を介したERK1/2/Elk-1シグナルによるメタンフェタミンの報酬効果の調節. 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, 2005.3.)
- 6) 溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰宏, 新田淳美, 野田幸裕, 坂野喜子, 鍋島俊隆. ラットにおけるメタンフェタミン誘発細胞外ドーパミン量の増大に対するMMP/TIMPの調節機構. 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, 2005.3.)
- 7) 永井拓, 野田幸裕, 石川和宏, 宮本嘉明, 伊藤美奈, 高柳匡徳, 田熊一敏, 亀井浩行, 山田清文, 鍋島俊隆. メタンフェタミンの報酬効果における組織プラスミノゲン活性化因子の関与. 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, 2005.3.)
- 8) 丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 斉藤邦明, 清島満, Liya Shen, 野田幸裕, 鍋島俊隆. TNF- α およびGDNFを介したメタンフェタミン依存に対するLeu-Ileの抑制効果. 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, 2005.3.)
- 9) 毛利彰宏, 野田幸裕, 野田明宏, 新田淳美, 古川宏, 鍋島俊隆. 依存性薬物フェンシクジリン連続投与により惹起される認知障害とその分子機序の解明. 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, 2005.3.)
- 10) 村井里菜, 野田幸裕, 永井拓, 堀江里奈, 新田淳美, 鍋島俊隆. 依存性薬物フェンシクリジン連続投与マウスに認められる精神行動障害におけるグルタミン酸神経系の関

- 与. 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, 2005.3.)
- 11) 鍋島俊隆, 野田幸裕(シンポジウム). グルタミン酸神経系機能障害と統合失調症. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 12) 野田幸裕, 鍋島俊隆(シンポジウム). N-メチル-D-アスパラギン酸受容体機能障害による認知障害の分子機序. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 13) 毛利彰宏, 野田幸裕, 野田明宏, 新田淳美, 古川宏, 鍋島俊隆(ミニシンポジウム). フェンシクリジン連続投与に認められる認知障害に対するクロザピンの作用. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 14) 溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰宏, 水野朋子, 野田幸裕, 新田淳美, 坂野喜子, 鍋島俊隆. ラットのメタンフェタミン誘発行動障害におけるMMP/TIMPシステムのドーパミンシグナルを解した調節. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 15) 永井拓, 野田幸裕, 石川和宏, 宮元嘉明, 伊藤美奈, 高柳匡徳, 田熊一徹, 山田清文, 鍋島俊隆. メタンフェタミン報酬効果における組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)の役割. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 16) 丹羽美苗, 新田淳美, 山田清文, 斉藤邦明, 清島満, Liya SHEN L., 野田幸裕, 鍋島俊隆. メタンフェタミン依存に対するLeu-lleの治療薬としての可能性. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 17) 新田淳美, 岑小波, 大谷晋, 小沢直也, 野田幸裕, 鍋島俊隆. 培養神経細胞においてジペプチドはCRBEを介してGDNFを発現させる. 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005.3.)
 - 18) 丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 斉藤邦明, 清島満, Liya S., 野田幸裕, 鍋島俊隆. GDNFの産生誘導剤Leu-lleのメタンフェタミン依存抑制効果. 第107回日本薬理学会近畿部会(金沢, 2005.6.)
 - 19) 石川和宏, 新田淳美, 溝口博之, 毛利彰宏, 村井里菜, 宮本嘉明, 野田幸裕, 北市清幸, 山田清文, 鍋島俊隆. メタンフェタミン連続投与による脳内ニューログリカンCの発現変化. 第51回日本薬学会東海支部総会・大会(岐阜, 2005.7.)
 - 20) 丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 柴田葉子, 斉藤邦明, 清島満, Liya Shen, 野田幸裕, 鍋島俊隆. A possibility of Leu-lle as a novel therapeutic agent for morphine-induced dependence. 第48回日本神経化学会大会(福岡, 2005.9.)
 - 21) 村井里菜, 野田幸裕, 毛利彰宏, 新田淳美, 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の発現における前頭前皮質グルタミン酸伝達系の関与. 第108回日本薬理学会近畿部会(西宮, 2005.11.)

国際学会

- 1) Nabeshima T, Ishikawa K, Nitta A, Mizoguchi H, Mohri A, Murai R, Miyamoto Y, Noda Y, Kitaichi K and Yamada K. Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. 8th World Congress of Biological Psychiatry (Vienna, Austria, 2005. 6.)
- 2) Nabeshima T, Nakajima A, Mizoguchi H, Nitta A, Noda Y and Yamada K. The brain areas related to methamphetamine dependence

in rats. 8th World Congress of Biological Psychiatry (Vienna, Austria, 2005. 6.)

- 3) Nagai T, Noda Y, Ishikawa K, Miyamoto Y, Ito M, Takuma K, Yamada K and Nabeshima T. Tissue plasminogen activator participates in methamphetamine-related reward and locomotor sensitization. 35th Annual meeting Society for Neuroscience (Washington, DC, USA, 2005. 11.).
- 4) Yan Y, Nitta A, Mizoguchi H, Noda Y, Yamada K and Nabeshima T. Reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in C57BL/6J mice demonstrated by intravenous self-administration. 35th Annual meeting Society for Neuroscience (Washington, DC, USA, 2005. 11.).
- 5) Noda Y and Nabeshima T. An animal model of Schizophrenia: Involvement of dysfunction of NMDA receptor-signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine. The 3rd Takeda Science Foundation Symposium on PharmaScience (Tokyo, 2005. 12.).
- 6) Cen X, Nitta A, Ohya S, Zhao Y, Ozawa N, Mouri A, Ibi D, Wang L, Suzuki M, Saito K, Ito Y, Kawagoe T, Noda Y, Ito Y, Furukawa S and Nabeshima T. An analogue of dipeptide-like structure of FK506 increases GDNF expression through CREB activated by Hsp90/Akt signaling pathway. Japan-Canada: Joint Workshop on Brain Science (Tokyo, 2006. 1.)
- 7) Niwa M, Nitta A, Yamada Y, Nakajima A, Saito K, Seishima M, Shen L, Noda Y, Furukawa S and Nabeshima T. An inducer for GDNF and TNF- α protects

methamphetamine-induced reward and sensitization. Japan-Canada: Joint Workshop on Brain Science (Tokyo, 2006.1.)

（±）-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) によって 誘発される薬物探索行動ならびに認知機能障害に関する研究

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研究院薬効解析学分野）

【研究要旨】

本研究では、①薬物自己投与法（ラット）を用いての（±）-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) 摂取行動およびその休薬時におけるMDMA探索行動（“渴望”）の発現の有無について、また②novel object recognition法（マウス）を用いての認知機能に及ぼすMDMAの作用を検討した。

Wistar系雄性ラットでのMDMA自己投与行動は、0.32mg/0.1 ml (FR1)の用量で成立した。MDMA摂取行動最終日（20日目）のレバー押し回数は 9.2 ± 1.5 回、また20日間のMDMA総摂取量は 32.2 ± 2.5 mgであった。その後MDMAを生理食塩液に置換し、自己投与実験を続けた（消去過程）。その1日目のレバー押し回数は 37.7 ± 12.7 回と増加したが、経目的に減弱し、15日目には 5.6 ± 0.7 回に減少した。休薬16日目に、薬物関連刺激呈示ならびにMDMA-priming投与（3.2mg/kg, i.p.）を行うと、レバー押し回数は有意に増加した（MDMA探索行動；生理食塩液自己投与下）。これら2つの刺激で誘発されたMDMA探索行動は、いずれもカンナビノイドCB1受容体拮抗薬AM251（3.2mg/kg, i.p.）により抑制された。

novel object recognition法におけるICR系雄性マウスの新奇物体に対するアプローチ率は、 82.1 ± 3.5 %であった。一方、MDMA（10mg/kg, i.p.）7日間の反復投与後の休薬時では、この新奇物体へのアプローチ率は有意に低下し、認知機能障害が認められた。この障害は休薬1日目より7日目の方が強かった。しかしながら、MDMAとAM251（3.2mg/kg, i.p.）とを併用投与すると、この認知機能障害は出現しなかった。さらに、MDMAによるこの障害は、カンナビノイドCB1受容体欠損マウスでは認められなかった。

以上の結果から、MDMAには依存性があり、休薬時に薬物探索行動を発現する事が分かった。さらに、MDMA探索行動ならびにMDMA休薬時に認められる認知機能障害は、少なくともCB1受容体の活性化を介して誘発される事が示唆された。

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

化学構造を併せ持つ薬物であり、記憶・認知機能を持続的に障害する事が知られている²⁾。近年その乱用の拡大が問題視されているが、依存性に関する詳細な研究はなされていない。一方、我々は脳内カンナビノイドシステムがMAP探

索行動(“渴望”)の発現¹⁾ならびにモルヒネ退薬症候の発現に關与する事⁵⁾、また大麻の活性成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol(Δ^9 -THC)が作業記憶を障害する事³⁾を報告した。今回、薬物自己投与実験法を用いて、MDMAによる薬物探索行動の誘発の可能性、ならびに休薬後の認知機能に及ぼす影響を、カンナビノイドシステムの側面から検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

薬物自己投与実験にはWistar系雄性ラット[株九動、250-350g]を使用した。認知機能に関する実験にはカンナビノイドCB1受容体欠損[CB1(-/-)]マウス[Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Université Libre de Bruxelles・Prof. Catherine Ledentより供与、30-40g]ならびに、ICR系雄性マウス[株チャールズ・リバー、30-40g]を用いた。

2. 使用薬物

3,4-methylenedioxymethamphetamine・HCl(MDMA:岐阜薬科大学・薬化学教室、岩村樹憲助教授から供与)は生理食塩液[株大塚製薬]に溶解した。また、AM251 trifluoroacetate(Sigma-Aldrich, Inc.)はDMSO[株和光純薬工業]、Tween-80[株林純薬工業]ならびに生理食塩液に溶解した。

3. 薬物自己投与実験法

MDMA自己投与訓練開始前に、ラットはあらかじめ餌ペレットを正強化子としたレバー押し行動を獲得させる。その後自己投与用のカテーテルの静脈内留置手術を行った。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;株カネカメディクス]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。実験には2つのレバーが装着されたオペラント箱[29cm×23cm×33cm;株ニューロサイエンス]を使用した。ラットがレバーを1回押せば、MDMA(0.10または0.32 mg/100 μ L/infusion)が薬物関連刺激(drug-associated cue:音;85dB/2.9kHz,光;200 lux)と共に微量注入される。20日間のMDMA自己投与実験後、MDMAを生理食塩液に置換した自己投与実験(cue呈示なし)を続けた(消去過程)。レバー押し行動が減弱した時点で、薬物関連刺激の呈示およびMDMAのpriming投与を行い“渴望”の指標としてのMDMA探索行動(生理食塩液自己投与下でのレバー押し反応)の発現の有無を調べた。

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;Holton Industries Co. LTD.)を正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(experimental time)を測定した。1200秒をcut off timeとした。

5. novel object recognition課題

本実験はMDMA 10mg/kg(i.p.)／日の7日間に渡る反復投与後、休薬1および7日目に行った。本課題は、①open field装置(直径70cm)内に同一の金属製物体(高さ5cmの球状物体)を2つ置き、マウスを10分間放置した(pre-trial)。その3時間後に②片方を形状の全く異なる物体(円錐状物体)に置き換え、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アプローチ時間として10分間に渡り測定した(test-trial)。結果は、exploratory

preference (%) = $t_B / (t_A + t_B) \times 100$ として算出した (t_A : test-trialでの既存物体へのアプローチ時間、 t_B : test-trialでの新奇物体へのアプローチ時間)。

6. 統計学的処理

値は全て平均±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摂取行動ならびに MDMA探索行動

MDMA自己投与1日目のMDMAの注入回数は、0.10mg/0.1 ml自己投与ラットでは 9.2 ± 1.5 回、0.32mg/0.1 ml自己投与ラットでは 4.8 ± 1.0 回であった (Fig. 1A)。0.10mg/0.1ml自己投与ラットはその後ほぼ一定回数を注入し、最終日20日目の注入回数は 10.2 ± 3.9 回となった。20日間の総注入回数は 171.5 ± 39.9 回、総摂取量は 18.7 ± 4.5 mgであった [Fig. 1B (a), (b)]。一方、0.32mg/0.1 ml自己投与ラットの注入回数は徐々に増加し、最終日20日目の注入回数は 8.2 ± 1.0 回であった。20日間の総注入回数は 100.9 ± 10.0 回、総摂取量は 32.2 ± 2.5 mgであった [Fig. 1B (a), (b)]。MDMAを生理食塩液に置換しての退薬1日目では、0.10mg/0.1ml自己投与ラットのレバー押し回数は 9.3 ± 3.0 回となり、その10日目には 4.3 ± 0.5 回に減少した。一方、0.32mg/0.1ml自己投与ラットの退薬1日目のレバー押し回数は 37.7 ± 12.7 回に増加し、その10日目も 15.8 ± 3.4 回と高く20日目に 5.6 ± 0.7 回に減少した (Fig. 2)。退薬11日目に薬物関連刺激呈示ならびにMDMA (1.0、3.2mg/kg, i.p.)-priming投与しても、0.10mg/0.1ml自己投与群のレバー押し回数はいずれも増加しなかった。一方、退薬16日目での薬物

関連刺激呈示によって、0.32mg/0.1ml自己投与群のレバー押し回数は、有意に増加した (37 ± 7.4 回: $F[1,16] = 12.7, p < 0.01$ vs 休薬15日目)。さらに、MDMA (1.0mg/kg, i.p.)-priming投与はレバー押し回数に変化を与えなかったが、3.2mg/kgのpriming投与は、有意にレバー押し回数を増加させた (26.0 ± 4.5 回: $F[1,16] = 12.7, p < 0.01$ vs 休薬15日目) (Fig. 3)。

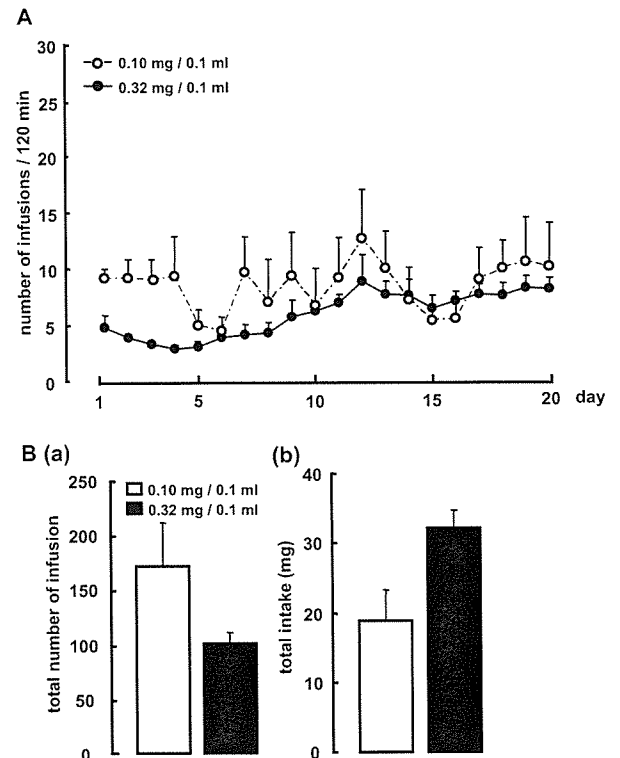


Figure 1.

Intravenous MDMA taking behavior in rats. A, Number of infusions in a daily for 20 days. B (a), Total number of infusions for 20 days in MDMA self-administrated rats. (b), Total intake for 20 days in MDMA self-administrated rats.

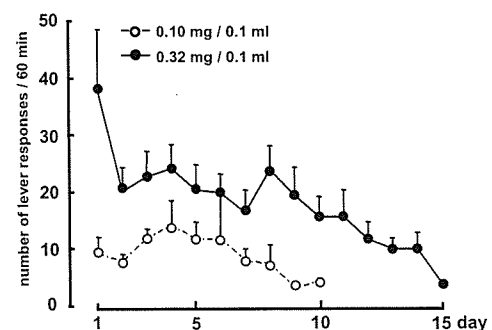


Figure 2.

Extinction behavior in MDMA-trained rats.

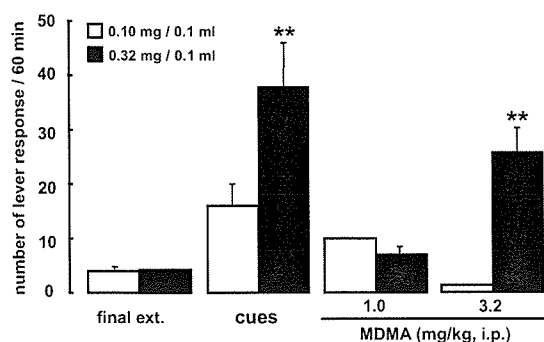


Figure 3.

Effect of re-exposure to MDMA-associated cue or MDMA-priming injection (1.0 or 3.2 mg/kg, i.p.) on MDMA-seeking behavior in rats. Data represents mean $\pm$ S.E. number of lever responses during the final day of extinction, and reinstatement tests. The tests were performed on day 11 (MDMA self-administering rats at 0.10 mg/0.1 ml) or 16 (MDMA self-administering rats at 0.32 mg/0.1 ml) of withdrawal under saline infusion (FR1). ** $p < 0.01$ versus on day 15 of extinction in MDMA self-administering rats at 0.32 mg/0.1 ml

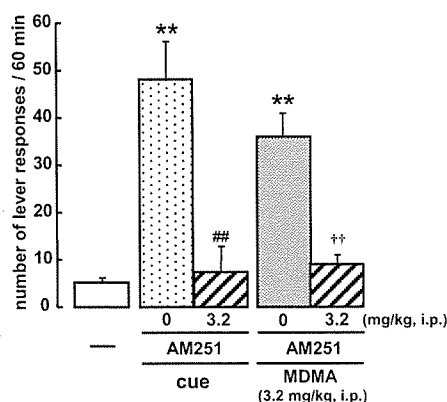


Figure 4.

Effect of a CB1 receptor antagonist, AM251, on reinstatement of MDMA-seeking behavior in rats. Data represent the mean $\pm$ SE. ** $p < 0.01$ versus on day 16 of extinction; * $p < 0.01$ versus non pretreated group challenged with cues; ++ $p < 0.01$ versus only MDMA (3.2 mg/kg, i.p.) - priming injection group.

薬物関連刺激によるMDMA探索行動は、AM251 (3.2mg/kg, i.p.) により有意に抑制された (7.4 ± 5.4 : $F[1,10] = 14.8$, $p < 0.01$ vs AM251非投与群)。さらに、MDMA (3.2mg/kg, i.p.) -priming投与によるMDMA探索行動も、AM251 (3.2mg/kg, i.p.) により有意に抑制された (9.0 ± 2.1 : $F[1,4] = 24.6$, $p < 0.01$ vs AM251非投与群) (Fig. 4)。しかし、その直後に行った餌を正の強化子としたレバー押し行動には影響がなかった。

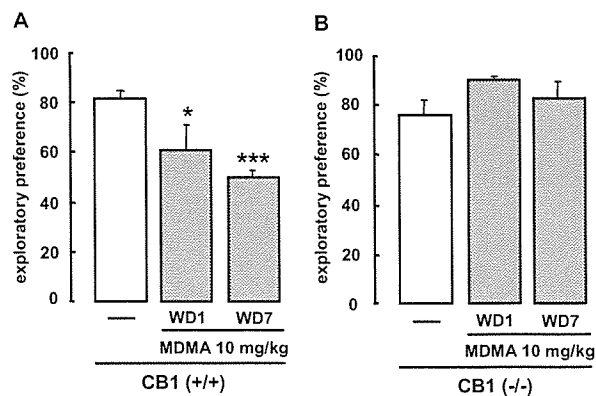


Figure 5.

Effect of repeated administration of MDMA on performance in novel object recognition task in mice. A, Exploratory preference in the test trial in CB1 (+/+) mice. Test trial was measured 3 hrs after the pre-trial. Novel object recognition task was performed in 1 or 7 days after the last treatment with vehicle or MDMA (10 mg/kg, once a day for 7 days). Data represent mean $\pm$ SEM (n=5-8). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus MDMAuntreated mice. B, Exploratory preference in the test trial in CB1 (-/-) mice.

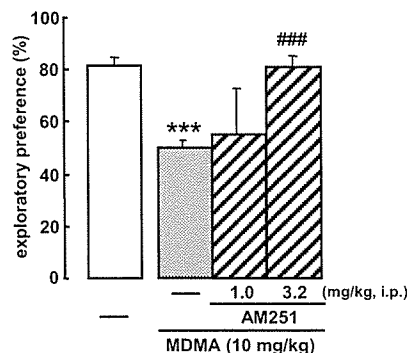


Figure 6.

Effect of MDMA with or without AM251 on performance in novel object recognition task in CB1 (+/+) mice. Novel object recognition task was performed in 7 days after the last treatment with vehicle, MDMA (10mg/kg, once a day for 7 days) with or without AM251 (1.0 or 3.2mg/kg). Exploratory preference in the test trial. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ versus MDMA untreated CB1 (+/+) mice; ### $p < 0.001$ versus MDMA (10mg/kg) treated CB1 (+/+) mice.

2. MDMAが認知機能に及ぼす作用

MDMA (10 mg/kg, i.p.) 7日間の反復投与後、休薬1および7日目の物体に対するCB1 (+/+) マウスのアプローチ時間 (pre-trial) 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、MDMA休薬1および7日目のtest-trialでの既存物体に対するアプローチ時間には対照群と比べ差はなかったが、新奇物体に対するアプローチ時間は有意に減少し、認知機能障害が認められた (Fig. 5A)。しかしながら、MDMAと

AM251 (3.2 mg/kg, i.p.) との併用投与群には、認知機能障害は出現しなかった (Fig. 6)。さらに、MDMA によるこの障害は、CB1 (-/-) マウスでは全く認められなかった (Fig. 5B)。

D. 考 察

MDMA は薬物自己投与行動が成立し、覚醒剤 MAP に代表される中枢興奮薬と同様に正の強化効果を有する事が分かった。その休薬時には MDMA 摂取量に依存してレバー押し行動の消去に抵抗性が認められた。MDMA 自己投与ラットで認められるこの消去抵抗性は、MAP 自己投与ラットでは認められない事 1)、4) を考えると、この抵抗性は MDMA に特徴的な傾向であることが示唆される。また、MDMA 自己投与ラットは、薬物関連刺激ならびに MDMA-priming 投与により薬物探索行動を誘発する事が分かった。さらに、これらの MDMA 探索行動がカンナビノイド CB1 受容体拮抗薬によって抑制された事から、MDMA 探索行動は CB1 受容体の活性化を介して起こる事が示唆される。我々は、既に MAP の渴望再燃に内因性カンナビノイドが促進的に働く事を報告した 1)。これらを考え合わせると、カンナビノイドシステムは、依存性薬物の種類に関わらず (少なくとも興奮性薬物では)、薬物への渴望の再燃に重要な役割を演じている可能性が示唆される。

一方、MDMA 反復投与後の休薬時には、認知機能障害が認められた。この認知機能障害は MDMA 反復投与時に CB1 受容体拮抗薬を併用投与および、CB1 受容体欠損マウスでは認められなかった。このことから MDMA 休薬時に認められる認知機能障害は、MDMA 投与による CB1 受容体の活性化を介して発現する事が示唆される。これまで我々は Δ 9-THC が作業

記憶を障害する事 3) を明らかにしたが、近年 MDMA の退薬時に、記憶に重要な役割を演じている海馬において CB1 受容体の upregulation が起る結果を得ている (unpublished data)。これらの事を考慮に入れると、MDMA 休薬時に認められる認知機能障害は CB1 受容体の活性化に基づく記憶の障害に起因する事が示唆される。

E. 結 論

ラットでの MDMA 自己投与が成立し、休薬時に薬物探索行動を発現する事が分かった。さらに、MDMA 探索行動ならびに MDMA 反復投与後の休薬時に認められる認知機能障害は、少なくとも CB1 受容体の活性化を介して起こっている可能性が示唆される。

【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) Fox H.C., McLean A., Turner J.J., et al.: Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ("ecstasy") polydrugusers. *Psychopharmacology*, 162:203-214, 2002
- 3) 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
- 4) Hiranita T., K. Anggadiredja, Fujisaki C. et al.: Nicotine attenuates relapse

to methamphetamine-seeking behavior (craving) in rats, In Current Status of Drug Dependence. Ann NY Acad Sci., 1025: 504-507, 2004

- 5) Yamaguchi T., Hagiwara Y., Tanaka H., et al.: Endogenous cannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, attenuates naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent mice. Brain Res., 909: 121-126, 2001

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Anggadiredja K., Yamaguchi T., Tanaka H., Shoyama Y., Watanabe S., Yamamoto T.: Decrease in prostaglandin level is a prerequisite for the expression of cannabinoid withdrawal: A quasi abstinence approach. Brain Res., 1066: 201-205, 2005
- 2) Shuto T., Kuroiwa M., Hamamura M., Yabuuchi K., Shimazoe T., Watanabe S., Nishi A., Yamamoto T.: Reversal of methamphetamine-induced behavioral sensitization by repeated administration of a dopamine D1 receptor agonist. Neuropharmacology, 2006 in press
- 3) Hiranita T., Sakimura K., Nawata Y., Anggadiredja K., Yamamoto T.: The possibility of nicotinic activators as craving killers in methamphetamine dependence. Proc Natl Acad Sci U S A., acceptable
- 4) 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, 126:24-29, 2005
- 5) 山本経之, Kusnandar 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, 分子精神医学, 5:94-96, 2005

2. 学会発表

- 1) 崎村克也, 平仁田尊人, Kusnandar Anggadiredja, 山本経之, 扁桃核, 側坐核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)
- 2) 窪田剛志, 平仁田尊人, 山口拓, 山本経之, モルヒネ探索行動の再燃および身体依存形成におけるアラキドン酸カスケードの関与, 第14回神経行動薬理若手研究者の集い(横浜, 2005年3月)
- 3) 平仁田尊人, 崎村克也, Kusnandar Anggadiredja, 藤崎千恵, 山本経之, 覚醒剤 methamphetamine 探索行動(“渴望”)における側坐核中核部内ニコチン性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)
- 4) 平仁田尊人, 宮本道彦, 崎村克也, Kusnandar Anggadiredja, 藤崎千恵, 山本経之, ラット縁前方皮質内ニコチン性ACh受容体の活性化による覚醒剤メタンフェタミン探索行動の抑制, 第78回日本薬理学会年会(横浜, 2005年3月)
- 5) 山本経之, 大麻・覚醒剤のラット知的機能に及ぼす影響, 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)
- 6) 窪田剛志, 平仁田尊人, 山口拓, 山本経之, モルヒネ探索行動の再燃および身体依存形成におけるアラキドン酸カスケードの関与, 第35回日本神経精神薬理学会(大阪,

2005年7月)

- 7) 縄田陽子, 平仁田尊人, 山本経之, 薬物探索行動の再燃および認知機能に及ぼす合成麻薬MDMAの作用—内因性カンナビノイドの側面から, 第35回日本神経精神薬理学会(大阪, 2005年7月)
- 8) 平仁田尊人, 崎村克也, 縄田陽子, Kusnandar Anggadiredja, 山本経之, 海馬内ニコチン性ACh受容体の活性化は覚醒剤methamphetamineへの“渴望”を抑制する, 第35回日本神経精神薬理学会(大阪, 2005年7月)
- 9) 当原真奈美, 井上和秀, 山本経之, 認知機能障害における内因性カンナビノイド／アラキドン酸カスケードの関与, 第58回日本薬理学会西南部会(長崎, 2005年11月)
- 10) 平仁田尊人, 崎村克也, 縄田陽子, Kusnandar Anggadiredja, 井上和秀, 山本経之, 覚醒剤methamphetamineへの“渴望”は扁桃体内ニコチン性ACh受容体の活性化により抑制される, 第58回日本薬理学会西南部会(長崎, 2005年11月)
- 11) Yamamoto T., Hiranita T., Anggadiredja K.: Nicotinic agonists inhibit reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in rats. ACNP 44th Annual Meeting, (Waikoloa, Hawaii, 2005, December)
- 12) 崎村克也, 平仁田尊人, 井上和秀, 山本経之, 覚せい剤メタンフェタミンに対する渴望の発現における内因性カンナビノイドシステム／グルタミン酸神経系相互作用, 第79回日本薬理学会年会(横浜, 2006年3月)
- 13) 縄田陽子, 平仁田尊人, 井上和秀, 山本経之, 合成麻薬MDMA探索行動(“渴望”)の発現における内因性カンナビノイドシステムの関与, 第79回日本薬理学会年会(横浜,

2006年3月)

- 14) 崎村克也, 平仁田尊人, 山本経之, メタンフェタミンに対する“渴望”の再燃における大脳辺縁系の役割, 第15回神経行動薬理若手研究者の集い(千葉; 2006年3月予定)
- 15) 縄田陽子, 平仁田尊人, 山本経之, 合成麻薬MDMA($\pm$ 3,4-methylenedioxymethamphetamine; “Ecstasy”)により誘発される認知機能障害におけるカンナビノイドCB1受容体の関与, 第15回神経行動薬理若手研究者の集い(千葉, 2006年3月予定)
- 16) Hiranita T., Sakimura K., Nawata Y., Anggadiredja K., Yamamoto T.: Hippocampal nicotinic activators are possible craving killers in methamphetamine dependence. CINP Asia Pacific Regional Meeting, (Pattaya, Thailand, 2006, March)

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，泉 貴也，樋口 萌

（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、MDMAなどの依存性薬物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、1) 昨年度樹立したセロトニン神経を含む中脳冠状切片培養系を用い、MDMAによるセロトニン遊離およびその神経毒性を評価するとともに、2) 新たに樹立した中脳皮質辺縁ドパミン-グルタミン酸神経脳切片共培養系を用いて、MDMAおよびメタンフェタミン（METH）によるドパミン遊離に対する影響を検討した。また、3) *Xenopus* 卵母細胞発現系を用いて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した。

- 1) セロトニン神経含有中脳冠状切片培養系において、セロトニン神経選択的神経毒5,7-DHTを処置すると、切片中におけるセロトニン含有量が顕著に減少し、また、この作用は選択的セロトニン再取り込み阻害薬により抑制された。また、本切片にMDMAあるいはMETHを暴露したところ、遊離されるセロトニン量は濃度依存的に増加し、切片中におけるセロトニンおよび5-HIAA含有量は、濃度依存的に減少した。本実験系は、セロトニン神経に対するMDMAの作用をin vitroで解析していく上で有用な系になると考えられる。
- 2) 中脳腹側被蓋野（VTA）、側坐核（NAc）および内側前頭前皮質（mPFC）を含む3枚の切片をそれぞれ隣接させて共培養した中脳皮質辺縁脳切片共培養系において、TH陽性のドパミン神経がVTAからNAcおよびmPFCに投射している様子が確認できた。本脳切片共培養系に、MDMAおよびMETHを30分間処置することにより、濃度依存的にドパミン遊離が促進されたが、MDMAの作用はMETHと比較して弱いものであった。また、比較的低濃度のMETH（10 μ M）を6日間反復処置すると、METHによるドパミン遊離作用が有意に増強された（ドパミン神経感作）。このドパミン遊離増強現象は、NMDA受容体拮抗薬により阻害され、mPFCを含まない2枚のVTA/NAc共培養切片では認められなかった。
- 3) セロトニントランスポーター（SERT）を発現させた*Xenopus* 卵母細胞に、MDMA（0.3-10 μ M）を適用したところ、濃度依存的な内向き電流応答が検出された。また、ドパミントランスポーター（DAT）に対しても、ドパミンより弱いながらも内向き電流応答が検出された。一方、SERTを発現させた卵母細胞に5-MeO-DIPT（10 μ M）を適用すると、選択的セロトニン再取り込み阻害薬を適用した時に見られるような内向きリーク電流の減少が検出された。これらの結果より、MDMAはSERTお

よびDATによって輸送されること、一方、5-MeO-DIPTはSERTの自発活動を抑えることが示唆される。

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り込み阻害作用、セロトニン代謝酵素の一つであるMAO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^{4,8)}、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^{9,11)}。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¹⁰⁾。またMDMAは、その連続摂取により、比較的選択的にセロトニン神経に対して神経毒性を示すことが知られているが⁵⁾、そのメカニズムには未だ不明な点が多い。我々は昨年度、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に成功した。1) 本年度は、まず、本脳切片培養系の評価系としての妥当性を確認し、MDMAの短時間および長時間処置によるセロトニン遊離作用、および組織中におけるセロト

ニン含量を測定することによりセロトニン神経毒性を評価し、METH処置の場合と比較した。

一方、MDMAは、セロトニン神経を介して間接的に、およびドパミン神経終末に存在するドパミントランスポーター (DAT) に作用して直接的に、中脳皮質辺縁ドパミン神経終末からドパミン遊離も促進させることが知られている^{2,14)}。これまでに、METHやMDMAなどの依存性薬物による報酬効果や行動感作などの現象は、中脳腹側被蓋野 (VTA) から側坐核 (NAc) および内側前頭前皮質 (mPFC) へ投射する中脳皮質辺縁ドパミン神経の過剰促進と、mPFCからNAcおよびVTAに投射するグルタミン酸神経系による調節が重要な役割を担っていることが指摘されているが^{7,12)}、その詳細は未だ明らかでない。2) 本研究では、脳切片共培養系を用いて、中脳皮質辺縁ドパミン神経-グルタミン酸神経ネットワークを*in vitro*で再構築させ、METHおよびMDMAの単回および反復処置によるドパミン遊離に対する影響を検討し、そのメカニズムを検討した。

一方、MDMAのモノアミントランスポーターに対する作用の分子メカニズムについて、これまでSERT、DAT、ノルエピネフリントランスポーター (NET) に対して、基質取り込み阻害作用、基質放出作用があることが報告されている¹³⁾。また、モノアミントランスポーターは基質の取り込みと同時にNa⁺が細胞内輸送され、基質輸送に伴い電流応答が生じることが知られているが、基質輸送電流の点から、MDMAが各々のモノアミントランスポーターに対しどのような作用をもつかについては未だ明らかにされていない。そこで本研究では、*Xenopus* 卵

母細胞発現系を用いてMDMAのSERTおよびDATに対する影響を電気生理学的に測定する系を樹立した。

B. 研究方法

1. 縫線核含有中脳切片培養系および中脳皮質辺縁脳切片共培養系の作成

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、slice chopperを用いて350 μ m厚で必要な部位を切断し、氷冷した培地中で切片を分離した。縫線核含有中脳切片培養系を作製する場合は縫線核を含むレベルで中脳切片を単体で、中脳皮質辺縁脳切片共培養系を作製する場合はFig.1のように、VTAを含む中脳切片、NAcを含む切片、mPFCを含む切片を作製し、それら3枚の切片を互いに近傍に並べて、ポアサイズ0.4 μ mの多孔質膜上(Millicell-CM, Millipore Corporation)に置くことにより、37 $^{\circ}$ 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に変更した。縫線核含有中脳切片培養系の場合は12-14日間の培養後、中脳皮質辺縁脳切片共培

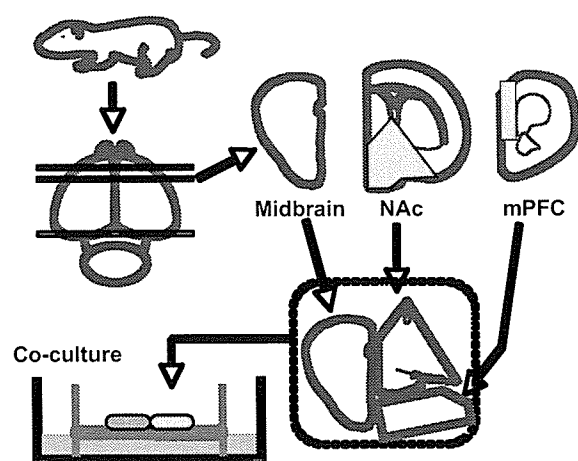


Fig.1 中脳皮質辺縁脳切片共培養系の作製法

養系の場合は18日間以上の培養後、実験に用いた。

2. 免疫組織化学

培養中脳切片を4% paraformaldehyde中で4 $^{\circ}$ 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、あるいは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、蛍光あるいはDAB発色により可視化した。

3. 培養中脳切片中のセロトニン神経毒性の評価

セロトニン神経毒性の評価は、薬物処置後、細胞内のセロトニン含有量およびその代謝産物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)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、10mM Na₂S₂O₅、1mM 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15,000rpmで15分間遠心分離し、その上清をpH 3.5に調整後、0.22 μ m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。なお、培養中脳切片中に含まれるセロトニン神経の量がスライス毎に異なるため、得られた結果は、処置を行う前日に測定したbasalレベルでの5-HIAA遊離量で補正した。

4. 遊離セロトニンおよびドパミン量の測定

培地をリングル液に交換し、15分間のインキュベーション後、薬物を溶解したリングル液にさらに交換した。30分間インキュベートした後、リングル液を回収し、1N HClO₄添加後、