

- press, 2006. [Epub 2005 Sep 7]
- 3) Kamei, H., Nagai, T., Nakano, H., Togan, Y., Takayanagi, M., Takahashi, K., Kobayashi, K., Yoshida, S., Maeda, K., Takuma, K., Nabeshima, T. and Yamada, K.: Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK 1/2 activation in the prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry*, 59: 75-84, 2006.
 - 4) Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Yamada, K., Nagai, T., Bito, H., Tanaka, Y., Kitaoka, S., Ushikubi, F., Nabeshima, T. and Narumiya, S.: Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 16066-16071, 2005.
 - 5) Yamada, K., Takayanagi, M., Kamei, H., Nagai, T., Dohniwa, M., Kobayashi, K., Yoshida, S., Ohhara, T., Takuma, K. and Nabeshima, T.: Effects of memantine and donepezil on amyloid β -induced memory impairment in a delayed-matching to position task in mice. *Behav. Brain Res.*, 162: 191-199, 2005.
 - 6) Nagai, T., Kamei, H., Ito, M., Hashimoto, K., Takuma, K., Nabeshima, T. and Yamada, K.: Modification by the tissue plasminogen activator-plasmin system of morphine-induced dopamine release and dopamine-dependent hyperlocomotion, but not antinociceptive effect in mice. *J. Neurochem.*, 93: 1272-1279, 2005.
 - 7) Nagai, T., Noda, Y., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Yoshimura, Y., Ito, M., Takayanagi, M., Takuma, K., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The role of tissue plasminogen activator in methamphetamine-related reward and sensitization. *J. Neurochem.*, 92: 660-667, 2005.
- ## 2. 総説・著書
- 1) 永井拓, 田熊一徹, 山田清文: 脳と組織プラスミノゲン活性化因子. *脳*21, 8: 437-442, 2005.
 - 2) 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 (臨床神経科学)*, 23: 682-684, 2005.
 - 3) 山田清文, 永井拓, 中島晶, 鍋島俊隆: 覚せい剤および麻薬に共通する依存関連分子の検索. *日本薬理学雑誌*, 126: 49-53, 2005.
 - 4) 田熊一徹, 山田清文, 松田敏夫: グリア細胞の遅発性アポトーシス. *Clinical Neuroscience (臨床神経科学)*, 23: 181-183, 2005.
 - 5) Yamada, K., Nagai, T. and Nabeshima, T.: Drug dependence, synaptic plasticity, and tissue plasminogen activator. *J. Pharmacol. Sci.*, 97: 157-161, 2005. [Epub 2005 Jan 30]
 - 6) 永井拓, 山田清文, 鍋島俊隆: 遺伝子改変動物における情動性の評価. *日本薬理学雑誌*, 125: 71-76, 2005.
 - 7) 山田清文, 鍋島俊隆 (分担執筆): ストレスと行動. *ストレスの事典* (河野友信, 石川俊男編). 44L-46L. 浅倉書店, 東京, 2005.
 - 8) 山田清文: 抗不安薬, 催眠鎮静薬. *南山堂医学大辞典第19版*. 印刷中, 南山堂, 2005.
- ## 3. 学会発表
- ### 国内学会
- 1) 永井拓, 伊藤美奈, 田熊一徹, 鍋島俊隆, 山田清文: 組織プラスミノゲン活性化因子 / プラスミンによるドパミン作動性神経系

- の制御. 第16回マイクロダイアリス研究会(東京), (2005. 12. 3).
- 2) 伊藤美奈, 永井拓, 亀井浩行, 橋本和樹, 中道範隆, 鍋島俊隆, 田熊一敏, 山田清文: ニコチン精神依存形成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関与. 日本薬学会北陸支部第113回例会(金沢), (2005. 11. 20).
 - 3) 高月公博, 永井拓, 小林加奈, 洞庭生悟, 高橋健次, 高柳匡徳, 田熊一敏, 山田清文: Delayed matching to position 課題における作業記憶に関する責任部位同定の試み. 日本薬学会北陸支部第113回例会(金沢), (2005. 11. 20).
 - 4) 深草亜由美, 永井拓, 伊藤美奈, 亀井浩行, 鍋島俊隆, 田熊一敏, 山田清文: モルヒネ誘発性ドパミン遊離におけるプロテアーゼ活性化受容体の関与. 日本薬学会北陸支部第113回例会(金沢), (2005. 11. 20).
 - 5) 洞庭生悟, 永井拓, 高柳匡徳, 小林加奈, 田熊一敏, 鍋島俊隆, 山田清文: 放射状迷路を用いたmethamphetamineにおける作業記憶障害モデルに対する抗精神病薬の治療効果. 第108回日本薬理学会近畿部会(西宮), (2005. 11. 11).
 - 6) 洞庭生悟, 永井拓, 高柳匡徳, 小林加奈, 田熊一敏, 鍋島俊隆, 山田清文: 放射状迷路を用いたmethamphetamineにおける記憶障害モデルの作成と抗精神病薬clozapineの効果. 第15回日本医療薬学会年会(岡山), (2005. 10. 1-2).
 - 7) 伊藤美奈, 永井拓, 亀井浩行, 橋本和樹, 田熊一敏, 鍋島俊隆, 山田清文: ニコチン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48回日本神経化学学会大会(福岡), (2005. 9. 28-30).
 - 8) 高橋健次, 亀井浩行, 永井拓, 田熊一敏, 山田清文: 組織化学的手法を用いたprepulse inhibition に関する脳神経回路の同定. 第11回日本行動薬理研究会(千歳), (2005. 8. 5-6).
 - 9) 永井拓, 伊藤美奈, 田熊一敏, 鍋島俊隆, 山田清文: 線条体における脱分極刺激誘発性ドパミン遊離に対するprotease activated receptor-1の関与. 第28回日本神経科学大会(横浜), (2005. 7. 26-28).
 - 10) 小林香奈, 永井拓, 亀井浩行, 田熊一敏, 東岸由里子, 中野寛子, 鍋島俊隆, 山田清文: 認知記憶に対する前頭前皮質のドパミンD1受容体/ERK1/2シグナルの関与. 第28回日本神経科学大会(横浜), (2005. 7. 26-28).
 - 11) 洞庭生悟, 永井拓, 高柳匡徳, 小林加奈, 田熊一敏, 鍋島俊隆, 山田清文: 空間作業記憶に関連する海馬におけるextracellular signal-regulated kinaseのリン酸化. 第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理合同年会(大阪), (2005. 7. 6-8).
 - 12) 高橋健次, 永井拓, 田熊一敏, 山田清文: c-Fos マッピングによるprepulse inhibition に関する脳神経核の同定. 第107回日本薬理学会近畿部会(金沢), (2005. 6. 24).
 - 13) 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, 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. 22-24).
 - 14) 永井拓, 小林香奈, 東岸由里子, 中野寛子, 亀井浩行, 橋本和樹, 田熊一敏, 鍋島俊隆, 山田清文: ドパミンD1受容体/ERK1/2シグナルによる認知記憶の制御. 第14回神経行動薬理若手研究者の集い(横浜), (2005. 3.

- 21).
- 15) 山田清文, 中島晶, 永井拓, 宮本嘉明, 間宮隆吉, 水野誠, Tran Manh Hung, 新田淳美, 北市清幸, 長谷川高明, 斎藤邦明, 清島満, Kim Hyoung Chun, 鍋島俊隆: メタンフェタミン依存および神経毒性に対する内因性保護因子TNF- α の作用. 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. 18).
- 16) 永井拓, 石川和宏, 宮本嘉明, 橋本和樹, 野田幸, 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. 18).
- 17) 永井拓, 野田幸裕, 石川和宏, 宮本嘉明, 伊藤美奈, 高柳匡徳, 田熊一敬, 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. 18).
- 18) 永井拓, 亀井浩行, 橋本和樹, 伊藤美奈, 田熊一敬, 鍋島俊隆, 山田清文: モルヒネの自発運動量増加作用およびドパミン遊離作用に対する組織プラスミノゲン活性化因子関連分子の効果. 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. 18).
- 19) 伊藤美奈, 永井拓, 橋本和樹, 亀井浩行, 田熊一敬, 鍋島俊隆, 山田清文: ニコチンにより誘発される神経伝達物質遊離に対する組織プラスミノゲン活性化因子/プラスミン経路の関与. 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. 18).
- 20) 中島晶, He Jue, Zeng Nan, 新田淳美, 山田清文, 鍋島俊隆: メタンフェタミン弁別刺激によるc-Fosタンパクの脳部位特異的発現. 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. 18).

国際学会

- 1) Yamada, K., Nagai, T., Ito, M., Takuma, K. and Nabeshima, T.: The role of tissue plasminogen activator in methamphetamine-related reward and sensitization. The American College of Neuropsychopharmacology (ACNP) 44th Annual Meeting (Symposium "Molecular Mechanism of Drug Dependence Induced by Amphetamine and Related Drugs"), (Hawaii, USA), (2005. 12. 11-15).
- 2) 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. 12-16).
- 3) 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. 12-16).
- 4) Mizoguchi, H., Yan, Y., Nagai, T., Nitta, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Tissue plasminogen activator (tPA) knock-out mice

overrespond to morphine self-administration mediated by dopamine D1 receptor. 35th Annual meeting Society for Neuroscience (Washington, DC, USA), (2005. 11. 12-16).

5) Mizoguchi, H., Yamada, K., Mizuno, M., Mizuno, T., Nitta, A., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Regulation of methamphetamine reward by ERK1/2/Elk-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. Taiwan-Japan Joint Seminar (Nagoya, Japan), (2005. 8. 8).

6) 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. 28-7. 3).

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

脳内セロトニン神経におけるMDMAの神経傷害に対する ミノサイクリンの保護作用

分担研究者：伊豫雅臣¹

研究協力者：張 淋¹，清水栄司¹，橋本謙二²

(¹千葉大学大学院医学研究院・精神医学，²千葉大学社会精神保健教育研究センター)

【研究要旨】

本研究では、MDMA投与によって引き起こされる脳内セロトニン神経およびドパミン神経の神経傷害に対する抗生物質ミノサイクリンの効果について検討した。MDMA投与によるマウス脳内セロトニン、ドパミンおよびこれらの代謝物の減少は、ミノサイクリンの投与によって有意に抑制された。また免疫組織化学的手法により、MDMA投与による脳内セロトニン・トランスポーター(5-HTT)およびドパミン・トランスポーター(DAT)の減少は、ミノサイクリンの前投与により有意に抑制された。さらにミノサイクリンはMDMA投与によるミクログリアの活性化を有意に抑制することも判った。以上の結果より、MDMA投与によるセロトニン神経およびドパミン神経の傷害に対してミノサイクリンは保護作用を示すことが判った。ミノサイクリンは臨床的に使用されている薬剤であるため、MDMA乱用による精神障害および神経障害の治療薬として有用であると思われる。

A. 研究目的

合成麻薬MDMAを乱用すると脳内のセロトニン神経が傷害を受けることが知られているが、現在のところ、詳細なメカニズムは明らかにされていない。我々は、以前よりMDMAのセロトニン神経に対する神経傷害の機序について研究を進めているが³⁻⁸⁾、MDMAはセロトニン神経のみならずドパミン神経に対しても傷害を与えることが知られている^{2,9)}。

一方、最近の研究より、MDMAの投与によって脳内のグリア細胞の一つであるミクログリアが活性化することが報告されている¹⁰⁾。またミクログリアの活性化を抑制する作用を有する抗生物質ミノサイクリンが、いろいろな神経障害

に対して神経保護作用を有することが報告されている^{1,11)}。最近我々は、ミノサイクリンが覚せい剤投与による行動異常(急性の過活動と繰り返し投与による逆耐性形成)および脳内ドパミン神経系の傷害を抑制することを見出した。

本研究では、MDMA投与によって引き起こされる脳内セロトニン神経および脳内ドパミン神経の傷害に及ぼすミノサイクリンの効果を調べた。

B. 研究方法

1. 実験動物

今回の実験には、7週齢の雄性Balb/Cマウス(日本チャールズ・リバー社)を使用した。

マウスにMDMA(10mg/kg, SC)を3時間間隔で3回投与した。ミノサイクリン(40mg/kg, IP)は、MDMA投与30分前、およびその後12時間間隔でミノサイクリンを投与し、MDMA投与3日後にマウスを断頭、あるいはかん流固定した。前頭皮質、海馬および線条体のセロトニン、ドパミンおよび代謝物(5-HIAA, DOPAC)は、HPLCで測定した。またセロトニン・トランスポーター(5-HTT)およびドパミン・トランスポーター(DAT)の免疫組織化学を行なった。さらに、ミクログリアの活性化を観察するためにCD11b免疫組織化学を同様に行なった。

C. 研究結果

MDMA(10 mg/kg x 3)の投与による前頭皮質、海馬および線条体におけるモノアミン(セロトニン、ドパミン)およびその代謝物の減少は、ミノサイクリンの前投与によって有意に抑制された。さらに免疫組織化学において、MDMA投与による5-HTT, DATの密度の減少およびミクログリアの活性化は、ミノサイクリンの前投与によって有意に抑制された。

D. 考察

最近の報告により、MDMAの神経傷害にミクログリアの関与が指摘されている¹⁰⁾。今回の研究結果より、ミノサイクリンはMDMA投与によるミクログリアの活性化を抑制することにより、ミクログリア活性に対する抑制作用がミノサイクリンの作用に関与している可能性が推測される。

E. 結論

ミノサイクリンは抗生物質として臨床的に使用されている安全性は高い薬剤である。本研究の結果より、ミノサイクリンはMDMA投与に

よる精神障害および神経障害の治療薬として有用であると思われる。

【参考文献】

- 1) Domercq, M. and Matute, C.: Neuroprotection by minocyclines. TIPS, 25: 609-612, 2004.
- 2) Green, A.R., Mechan, A.O., Elliott, J.M., et al.: The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy"). Pharmacol. Rev., 55: 463-508, 2003.
- 3) Hashimoto, K., Goromaru, T.: Reduction of in vivo binding of [3H]paroxetine in mouse brain by MDMA. Neuropharmacol., 29: 633-639, 1990.
- 4) Hashimoto, K., Goromaru, T.: Reduction of [3H]6-nitroquipazine-labelled 5-hydroxytryptamine uptake sites in rat brain by MDMA. Fundam. Clin. Pharmacol., 4: 635-641, 1990.
- 5) Hashimoto, K., Goromaru, T.: Reversal of acute effects of MDMA in rat brain by 1-piperonylpiperazine. Res. Commun. Subst. Abuse, 13: 127-136, 1992.
- 6) Hashimoto, K., Goromaru, T.: Study of MDMA-induced neurotoxicity in rat brain using specific in vivo binding of [3H]6-nitroquipazine. Res. Commun. Subst. Abuse, 13: 191-201, 1992.
- 7) Hashimoto, K., Maeda, H. and Goromaru, T. (1992) Antagonism of MDMA-induced neurotoxicity in rat brain by 1-piperonylpiperazine. Eur. J. Pharmacol., 228: 171-174.
- 8) Hashimoto, K., Maeda, H., Goromaru, T.:

Effects of benzylpiperazine derivatives on the neurotoxicity of MDMA in rat brain. *Brain Res.*, 590: 341-344, 1992.

- 9) Morton J.: Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 79-86, 2005.
- 10) Orío, L., O'Shea, E., Sanchez, V., et al.: MDMA increases interleukin-1 β levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J. Neurochem.*, 89: 1445-1453, 2004.
- 11) Yong, V.W., Wells, J., Giuliani, F., et al.: The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol.*, 3: 744-751, 2004.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itoh, K., Hashimoto, K., Shimizu, E., Sekine, Y., Ozaki, N., Inada, T., Harano, M., Iwata, N., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Nakata, K., Ujike, H. and Iyo, M. Association study of the brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan. *Am. J. Med. Genet.*, 132B: 70-73, 2005.
- 2) Ogai, M., Iyo, M., Mori, N., Takei, N.: A right orbitofrontal region and OCD symptoms: a case report. *Acta. Psychiatr. Scand.*, 111: 74-76, 2005.
- 3) Okamoto, H., Shimizu, E., Ozawa, K., Hashimoto, K. and Iyo, M. Lithium augmentation in milnacipran-refractory depression for the prevention of relapse following electroconvulsive therapy. *Aust. N.Z. J. Psychiatry*, 39: 108, 2005.
- 4) Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L.H. and Iyo, M. Elevated glutamine/glutamate ratio in cerebrospinal fluid of first episode and drug naive schizophrenic patients. *BMC Psychiatry*, 5: 6, 2005.
- 5) Koike, K., Hashimoto, K., Fukami, G., Okamura, N., Zhang, L., Ohgake, S., Koizumi, H., Matsuzawa, D., Kawamura, N., Shimizu, E. and Iyo, M. The immunophilin ligand FK506 protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mouse striatum. *Neuropharmacology*, 48: 391-397, 2005.
- 6) Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Uchida, N., Nomura, A., Ohtani, K., Kishimoto, M., Morio, A., Imamura, T., Sakai, A., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Kuroda, S.: A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia. *Neurosci. Lett.*, 376: 182-187, 2005.
- 7) Hashimoto, T., Hashimoto, K., Matsuzawa, D., Shimizu, E., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H. and Iyo, M. A functional glutathione-S-transferase P1 polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. *Am. J. Med. Genet.*, 135B: 5-9, 2005.
- 8) Koizumi, H., Hashimoto, K., Shimizu, E., Iyo, M., Mashimo, Y. and Hata, A. Further

- analysis of microsatellite in the BDNF gene. *Am. J. Med. Genet.*, 135B: 103, 2005.
- 9) Nishiyama, T., Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Inada, T., Furukawa, T., Ozaki, N.: Haplotype association between GABA(A) receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J.*, 5: 89-95, 2005.
- 10) Hashimoto, K., Koizumi, H., Nakazato, M., Shimizu, E. and Iyo, M. Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: Recent findings and its pathophysiological implications. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, 29: 499-504, 2005.
- 11) Salama, R.H., Muramatsu, H., Shimizu, E., Hashimoto, K., Ohgake, S., Watanabe, H., Komatsu, N., Okamura, N., Koike, K., Shinoda, N., Okada, S., Iyo, M. and Muramatsu, T. Increased midkine levels in sera from patients with Alzheimer's disease. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, 29: 611-616, 2005.
- 12) Hashimoto, K., Shimizu, E. and Iyo, M. Dysfunction of glia-neuron communication in pathophysiology of schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rev.*, 1: 151-163, 2005.
- 13) Shiraishi, T., Kikuchi, T., Fukushi, K., Shinotoh, H., Nagatsuka, S.I., Tanaka, N., Ota, T., Sato, K., Hirano, S., Tanada, S., Iyo, M., Irie, T.: Estimation of Plasma IC50 of Donepezil Hydrochloride for Brain Acetylcholinesterase Inhibition in Monkey Using N-[11C]methylpiperidin-4-yl Acetate ([11C]MP4A) and PET. *Neuropsychopharmacology*, 30: 2154-2161, 2005.
- 14) Koike, K., Hashimoto, K., Takai, N., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Nakazato, M., Okamura, N., Stevens, KE, Freedman, R. and Iyo, M. Tropicsetron improves deficits in auditory P50 suppression in schizophrenia. *Schizophrenia Res.*, 76: 67-72, 2005.
- 15) Yamada, K., Ohnishi, T., Hashimoto, K., Ohba, H., Iwayama-Shigeno, Y., Takao, H., Toyota, T., Minabe, Y., Nakamura, K., Shimizu, E., Itokawa, M., Mori, N., Iyo, M. and Yoshikawa, T. Identification of multiple serine racemase (SRR) mRNA isoforms and genetic analyses of SRR and DAO in schizophrenia and D-serine levels. *Biol. Psychiatry*, 57: 1493-1503, 2005.
- 16) Kobayashi, K., Shimizu, E., Hashimoto K., Koizumi, H., Ohgake, S., Okamura, N., Koike, K., Matsuzawa, D., Nakazato, M. and Iyo, M. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with panic disorder: as a biological predictor of response to group cognitive behavioural therapy. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, 29: 658-663, 2005.
- 17) Shimizu, E., Hashimoto, K., Itoh, K., Kobayashi, K., Mitsumori, M., Koizumi, H., Ohgake, S., Okamura, N., Koike, K., Matsuzawa, D., Kumakiri, C., Nakazato, M., Komatsu, N. and Iyo, M. No association of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms with panic

- disorder. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, 29: 708-712, 2005.
- 18) Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L.H. and Iyo, M. Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, 29: 767-769, 2005.
- 19) Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Uchida, N., Nomura, A., Otani, K., Kishimoto, M., Morio, A., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N.: The X-box binding protein 1 (XBP1) gene is not associated with methamphetamine dependence. *Neurosci. Lett.*, 383: 194-198, 2005.
- 20) Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshiya, Y., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Inada, T., Ozaki, N.: Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 8: 1-5, 2005.
- 21) Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Shimizu, E., Fujisaki, M. and Iyo, M. Functional polymorphism of the glutathione peroxidase 1 gene is associated with personality traits in healthy subjects. *Neuropsychobiology*, 52: 68-70, 2005.
- 22) Ohgake, S., Hashimoto, K., Shimizu, E., Koizumi, H., Okamura, N., Koike, K., Matsuzawa, D., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Shirayama, Y. and Iyo, M. Functional polymorphism of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis. *Addiction Biol.*, 10: 145-148, 2005.
- 23) Hashimoto, K., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, C., Okada, S., Takei, N. and Iyo, M. No changes in serum epidermal growth factor levels in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.*, 135: 257-260, 2005.
- 24) Hashimoto, K., Koike, K., Shimizu, E. and Iyo, M. $\alpha 7$ Nicotinic receptor agonists as potential therapeutic drugs for schizophrenia. *Curr. Med. Chem. - CNS Agents*, 5: 171-184, 2005.
- 25) Hashimoto, K., Fujita, Y., Shimizu, E. and Iyo, M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. *Eur. J. Pharmacol.*, 519: 114-117, 2005.
- 26) Hashimoto, K., Iyo, M., Freedman, R. and Stevens, K.E. Tropicisetron improves deficient inhibitory auditory processing in DBA/2 mice: role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Psychopharmacol.* 183: 13-19, 2005.
- 27) Shiina, A., Nakazato, M., Mitsumori, M., Koizumi, H., Shimizu, E., Fujisaki, M., Iyo, M.: An open trial of outpatient group therapy for bulimic disorders: combination program of cognitive behavioral therapy with assertive training and self-esteem enhancement. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 59: 690-696, 2005.

- 28) Sekine, Y., Ouchi, Y., Takei, N., Yoshikawa, E., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Okada, H., Minabe, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Tsukada, H., Iyo, M., Mori, N.: Brain serotonin transporter density and aggression in abstinent methamphetamine abusers. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63: 90-100, 2006.
- 29) Shimizu, E., Hashimoto, K., Ohgake, S., Koizumi, H., Okamura, N., Koike, K., Fujisaki, M. and Iyo, M. Association between angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion gene functional polymorphism and novelty seeking personality in healthy females. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, 30: 99-103, 2006.
- 30) Iwayama, Y., Hashimoto, K., Nakajima, M., Toyota, T., Yamada, K., Shimizu, E., Itokawa, M., Hoshika, A., Iyo, M. and Yoshikawa, T. Analysis of correlation between serum D-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes. *Neurosci. Lett.*, 394: 101-104, 2006.
- 31) Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshiya, Y., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Inada, T., Ozaki, N.: Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 9: 77-81, 2006..
- 32) Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H. and Iyo, M. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, in press.
- 33) Shimizu, E., Hashimoto, K., Ochi, S., Fukami, G., Fujisaki, M., Okamura, N., Koike, K., Watanabe, H., Nakazato, M., Shinoda, N., Komatsu, N., Morita, F. and Iyo, M. Posterior cingulate metabolite changes may reflect cognitive deficits in schizophrenia, more than the left and right medial temporal lobes: a proton magnetic resonance spectroscopy investigation. *J. Psychiatry Res.*, in press.
- 34) Hashimoto, K., Fujita, Y. and Iyo, M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology*, in press.
- 35) Ide, S., Kobayashi, H., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Tanaka, K., Shen, H., Iwahashi, K., Itokawa, M., Minami, M., Satoh, M., Ikeda, K., Sora, I.: Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J.*, in press.
- 36) Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T., Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S., Yagi, T., Yuasa, S.: Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J. Biol. Chem.*, in press.

2. 学会発表

- 1) Hashimoto, K., Hikida, T., Sawa, A. and Iyo, M. (2005) Levels of D-serine, L-serine, glutamate, glutamine, and glycine in postmortem brain of schizophrenia, bipolar disorder and major depression. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 12-16, 2005.
- 2) Okamura, N., Reinscheid, R.K., Civelli, O., Ohgake, S., Iyo, M. and Hashimoto, K. (2005) Protective effect of neuropeptide S on dizocilpine-induced psychosis and neurotoxicity. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 12-16, 2005.
- 3) Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Shimizu, E., Maeda, K., Suzuki, Y., Mashimo, Y., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Hata, A., Sawa, A. and Iyo, M. (2005) Haplotype analysis of PICK1 gene polymorphisms and association with methamphetamine abusers in Japanese subjects. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 12-16, 2005.
- 4) Zhang, L., Hashimoto, K., Shimizu, E. and Iyo, M. (2005) Protective effect of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 12-16, 2005.
- 5) Stevens, K.E., Iyo, M., Freedman, R. and Hashimoto, K. (2005) Tropicisetron, a 5-HT₃ receptor antagonist and $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist, improves sensory inhibition in DBA/2 mice. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 12-16, 2005.
- 6) Ohgake, S., Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Koizumi, H., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Iyo, M. (2005) Abnormal sensory motor gating and social interaction in midkine-deficient mice and the effects of antipsychotic treatment. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 12-16, 2005.
- 7) 張 琳, 橋本謙二, 清水英司, 伊豫雅臣: 覚醒剤による行動異常およびドパミン神経系の障害におけるミノサイクリンの効果. 第32回日本脳科学会, 2005年6月.
- 8) 橋本佐, 橋本謙二, 松澤大輔, 清水栄司, 関根吉統, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 原野陸生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 氏家寛, 伊豫雅臣: 覚醒剤精神病とGlutathione S-transferase P1機能的遺伝子多型との関連について. 第32回日本脳科学会, 2005年6月.
- 9) 小池香, 橋本謙二, 高井信幸, 清水栄司, 小松尚也, 渡邊博幸, 中里道子, 岡村斉恵, Karen E. Stevens, Robert Freedman, 伊豫雅臣: 統合失調症の聴覚誘発電位P50の抑制障害に対するトロピセトロンの効果. 第32回日本脳科学会, 2005年6月.
- 10) 橋本謙二, 山田和男, 大西哲生, 大羽尚子, 茂野佳美, 鷹尾 瞳, 豊田倫子, 三辺義雄, 中村和彦, 清水栄司, 糸川昌成, 森 則夫, 吉川武男, 伊豫雅臣: 統合失調症患者にお

けるセリンラセマーゼ遺伝子の解析. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年6月.

- 11) 小池香, 橋本謙二, 高井信幸, 清水栄司, 小松尚也, 渡邊博幸, 中里道子, 岡村斉恵, Karen Stevens, Robert Freedman, 伊豫雅臣: 統合失調症の聴覚誘発電位P50の抑制障害に対するトロピセトロンの効果. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年6月.
- 12) 大掛真太郎, 清水栄司, 橋本謙二, 岡村斉恵, 小池 香, 小泉裕紀, 松澤大輔, 橋本 佐, 張 琳, 伊豫雅臣: ミッドカイン遺伝子多型と統合失調症との関連研究. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年7月.
- 13) 橋本謙二, 藤田有子, 小池 香, 清水栄司, 伊豫雅臣: PCP誘発認知機能障害におけるフルボキサミンの改善作用: シグマ-1受容体の関与. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年7月.
- 14) 小澤公良, 橋本謙二, 清水栄司, 伊豫雅臣, 岸本 充, 石倉 浩: 妊娠マウスにおける免疫活性化が仔の神経発達に与える影響. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年7月.
- 15) 清水栄司, Ragaa salama H.M., 村松寿子, 橋本謙二, 大掛真太郎, 渡邊博幸, 小松尚也, 岡村斉恵, 小池 香, 篠田直之, 岡田真一, 伊豫雅臣, 村松 喬: アルツハイマー病患者における血清ミッドカインの上昇. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年7月.
- 16) 橋本佐, 橋本謙二, 松澤大輔, 清水栄司,

関根吉統, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 氏家寛, 伊豫雅臣: 覚醒剤精神病とGlutathione S-transferase T1 (GSTT1) 遺伝子多型との関連について. 第35回日本神経精神薬理学会・第27回日本生物学的精神医学会合同年会, 2005年7月.

- 17) 深見悟郎, 橋本佐, 清水栄司, 伊豫雅臣, 橋本謙二: EtizolamおよびEthyl loflazepateが事象関連電位P300に及ぼす影響. 第17回日本アルコール精神医学会, 2005年9月.
- 18) 清水栄司, 成田 都, 渡邊博幸, 小島 尚, 宮武亮輔, 藤崎美久, 橋本謙二, 伊豫雅臣: methylone急性中毒: 脱法ドラッグ単回使用により, 一過性緊張状態を呈した一例. 第17回日本アルコール精神医学会, 2005年9月.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

依存性薬物および未規制薬物の薬物依存評価システム構築： フェネチルアミン誘導体に関する研究

分担研究者：船田正彦¹

研究協力者：浅沼幹人²，宮崎育子²，青尾直也¹，和田 清¹

(¹国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部，²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経制御学講座神経情報学)

【研究要旨】

違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)であるフェネチルアミン誘導体2,5-dimethoxy-4-(n)-propylthio-phenethylamine (2C-T-7)の精神依存性と細胞毒性の発現を検討した。

- 1) 2C-T-7の行動解析：2C-T-7による運動活性に対する影響を検討した。2C-T-7 (1, 2.5mg/kg)により運動促進作用が発現した。高用量の2C-T-7 (30mg/kg)により運動抑制が発現した。2C-T-7の精神依存形成能は、マウスを使用しconditioned place preference (CPP)法により評価した。2C-T-7 (0.5-20mg/kg)の条件付け(1日1回6日間、3：溶媒、3：薬物)では有意な報酬効果および嫌悪効果の発現は確認されなかった。一方、2C-T-7条件付け終了後、methamphetamine (MAP、2mg/kg)を投与したところ有意な報酬効果が確認された。さらに、2C-T-7処置マウスではMAP誘発運動促進作用は有意に増強されていた。2C-T-7を慢性使用した場合、MAPの報酬効果および中枢興奮作用を増強する危険性が示された。単独で報酬効果を確認しがたい薬物の場合、その薬物の慢性処置後MAPなどの行動薬理作用を評価することにより、危険性を推測する手法が有用であると考えられる。
- 2) 2C-T-7の細胞毒性：2C-T-7の細胞毒性に関して培養細胞(B65細胞およびCATH.a細胞)を使用してLDH放出量を指標に評価した。その結果、2C-T-7は細胞毒性を有することが明らかになった。2C-T-7の細胞毒性は、5-MeO-DIPTの効果と比較して非常に強力であった(約5倍程度)。
- 3) 脳内モノアミンに対する影響：2C-T-7投与後に、側坐核を分画しHPLC法に従ってドパミン、セロトニンおよび代謝産物の含量を測定した。2C-T-7 (1mg/kg)投与により、ドパミン代謝産物量およびセロトニン代謝産物量は増加しており、ドパミンおよびセロトニン代謝回転は増加していた。一方、2C-T-7 (20mg/kg)投与では、ドパミン代謝産物量に影響は認められなかったが、セロトニン代謝産物量は減少しておりセロトニン代謝回転の低下が確認された。2C-T-7の低用量によりドパミンおよびセロトニン神経系は活性化させる可能性が示唆された。
- 4) 2C-T-7によるglucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) 発現：MAPおよびMDMAの投与により共通して側坐核におけるGILZ mRNA発現レベルが増加していた。同様に、2C-T-7投与でも

GILZ mRNA発現の増加が認められた。GILZ発現の誘導は、薬物依存形成の危険性を予測する生化学的マーカーの1つである可能性が示唆された。

本研究より、フェネチルアミン誘導体である2C-T-7は非常に強力な細胞毒性を有することが明らかになった。また、2C-T-7は覚せい剤や麻薬の作用を増強することから、いわゆるgate-way drugとなり得る危険性があると考えられる。

A. 研究目的

薬物乱用は若年層を中心に浸透しているのが現状であり、麻薬として規制されている3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)に代表される“クラブ・ドラッグ”の乱用は、依然大きな社会問題である。一方、インターネット等の通信手段の普及により、薬物等の化学物質に関する情報伝播は非常に高速化している。それに伴い様々な化学物質の取引は容易かつ迅速になっている。近年、乱用を目的として売買されている法的規制を受けない違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)の氾濫は重大な社会問題となっている。国内で流通が確認されている違法ドラッグとしては、既に麻薬指定されている5-methoxy -N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) 1)に類似したトリプタミン誘導体と覚せい剤類似骨格を有するフェネチルアミン誘導体2)が知られている。こうした化学物質について、使用用量、期間、頻度および混入物質の有無などにより強力な精神依存性が生じる危険性や未知の毒性などが発現する危険性が存在する。したがって、薬物の精神依存性および神経毒性発現の有無を評価する動物実験などの基礎的な検討が必要である。覚せい剤およびMDMAなどの依存性薬物との比較を通じ、違法ドラッグの依存形成の強度と神経毒性について明確にするのは緊急課題である。

本研究では、規制薬物であるmethamphetamine (MAP)、MDMAおよび違法ドラッグである

フェネチルアミン誘導体2,5-dimethoxy-4-(*n*)-propylthio-phenethylamine (2C-T-7)の精神依存性と神経毒性の発現に関する基盤的検討を行った。本研究を通じ、¹⁾フェネチルアミン誘導体の乱用危険性を推測する動物研究の実験バッテリーの構築を試みた。また、²⁾薬物乱用危険性を予測しうる生化学的マーカー候補の基礎的な検索を行った。今回の研究では、2C-T-7による脳内モノアミンおよび遺伝子発現レベルの変動に関する解析を行った。昨年度、マイクロレイ法を用いて、MAPおよびMDMAの急性投与において変動する脳内遺伝子群の検索結果から、glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)の重要性を見出している³⁾。そこで、2C-T-7投与によるGILZ mRNA発現レベルの変動を解析した。

本研究では、フェネチルアミン誘導体の乱用危険度と神経毒性を迅速に推測する研究バッテリーの構築を目指す。さらに、生化学的マーカーの同定により、規制薬物と違法ドラッグ使用の危険性に関する科学的証拠を収集する。本研究を通じ、将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し、規制薬物指定への早期の対策が可能になる。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR系雄性マウス(20 - 25g)を使用した。

使用薬物：規制薬物はmethamphetamine (MAP)、3,4-methylenedioxy-methamphetamine

(MDMA)、違法ドラッグとしてはフェネチルアミン誘導体である2,5-dimethoxy-4-(n)-propylthio-phenethylamine (2C-T-7, Fig. 1) およびトリプタミン誘導体である5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) を使用した。

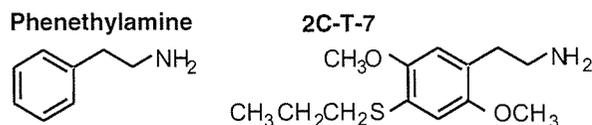


Fig. 1.

Chemical structures of phenethylamine and 2,5-dimethoxy-4-(n)-propylthio-phenethylamine (2C-T-7).

1. 2C-T-7によるhead twitch行動

2C-T-7 (2.5mg/kg, i.p.) により誘発されるhead twitch行動を観察した。環境適応後、薬物投与10分以降より、5分間にわたってhead twitch回数を測定した。また、2C-T-7により誘発されるhead twitch行動に対する5-HT1A受容体拮抗薬WAY100635および5-HT2A受容体拮抗薬ketanserin前処置の効果を検討した。

2. 2C-T-7による運動活性への影響

2C-T-7 (1-30mg/kg, i.p.) により誘発される運動活性を、自発運動量測定装置 (BR-AS01, バイオリサーチセンター社) を用いて測定した。

3. 2C-T-7の精神依存性評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP) 法を用いた。白黒2区画のCPP装置 (ENS-CPP, Neuroscience社) を用いて、2C-T-7 (0.25-20mg/kg, i.p.) を1日おきに投与し、40分間装置内に閉じ込め、6日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である生理食塩液を投与し、薬物および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした

(Table 1)。テストセッションは、7日目に薬物および溶媒ともに投与せず、15分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 1. 薬物条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎:薬物、○:溶媒、T:テスト(薬物、溶媒ともに処置せず)

4. 2C-T-7前処置によるMAP精神依存性および運動促進作用に対する影響

CPP法に従い、2C-T-7 (0.25-20mg/kg, i.p.) を1日おきに投与し、40分間装置内に閉じ込め、6日間にわたって条件付けを行った後、8日目にMAP (2mg/kg) を投与し15分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。同様に、2C-T-7 (10mg/kg, i.p.) を1日おきに3回投与し、その後MAP (1mg/kg) を投与し180分間の運動活性を、自発運動量測定装置 (BR-AS01, バイオリサーチセンター社) を用いて測定した。

5. 2C-T-7による脳内モノアミンに対する影響

2C-T-7 (1, 20mg/kg, i.p.) 投与1時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核を含むlimbic forebrainを分画4)した。高速液体クロマトグラフ法に従い、内標準物質としてイソプレテレノールを使用し、ドパミン、セロトニン、ノルアドレナリンおよび関連代謝産物の測定を行った。ドパミン代謝産物としては、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanilic acid (HVA)、3-methoxytyramine (3-MT)、セロトニンの代謝産物としては5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) を測定した。

6. 培養神経細胞を利用した神経毒性の評価

ラット由来モノアミン系セロトニン神経細胞株B65細胞 (3.1×10^4 cells/cm²) およびマウス由来ドパミン含有神経細胞株CATH.a細胞 (1.0×10^5 cells/cm²) を用いて、継代48時間後に実験を開始した。2C-T-7 (最終濃度25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM) および5-MeO-DIPT (最終濃度50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2mM) を添加し、24時間培養後、細胞毒性の生化学的パラメーターとして、培地中へのLDH放出量を測定し評価した。

7. GILZ 遺伝子発現解析

MAP (4mg/kg, s.c.)、MDMA (10mg/kg, s.c.) 2C-T-7 (10mg/kg, i.p.) および2,5-dimethoxy-4-ethyl- thiophenethylamine (2C-T-2, 10mg/kg, i.p.) 投与4時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核を含むlimbic forebrainを分画⁴⁾し、mRNAの抽出を行った。プライマーとしてrandom primer (hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₆, TAKARA) を使用し、polyA RNAを鋳型としてreverse transcriptaseにより逆転写反応でcDNAを合成した。GILZ primer を作成し、RT-PCR法により解析した。データはhouse keeping (β -actin) 遺伝子の発現強度に対する変化率を算出することにより解析した。

C. 研究結果

1. 2C-T-7によるhead twitch行動

2C-T-7 (1, 2.5mg/kg) 投与により用量依存的なhead twitch行動が誘発された (Fig. 2)。2C-T-7 (2.5mg/kg) によるhead twitch行動は、5-HT_{2A}受容体拮抗薬ketanserinの前処置によりほぼ完全に抑制された。一方、5-HT_{1A}受容体拮抗薬WAY100635の前処置では、有意な影

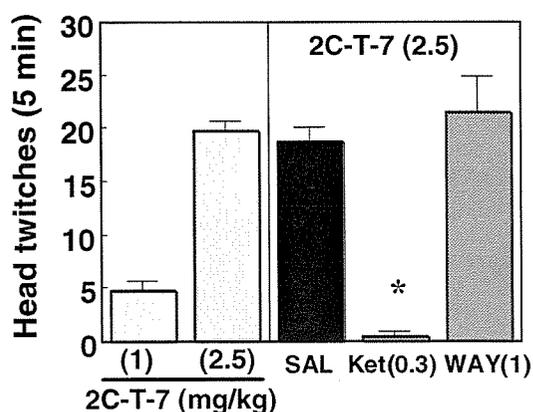


Fig. 2.

Effect of acute treatment with 2C-T-7 on the head twitch behavior in mice. Animals were administered with 2C-T-7 (2.5 mg/kg, i.p.) and immediately placed into the Plexiglas cage. After 10 min, the head twitch behavior was observed for 5 min. For antagonist study, ketanserin (Ket, 0.3 mg/kg) or WAY100635 (WAY, 1 mg/kg) was administered 10 min before treatment of 2C-T-7. Each column represents the mean with S.E.M. of 10 - 12 animals. *P<0.05 vs. saline-treated group.

響を受けなかった。

2. 2C-T-7による運動活性への影響

2C-T-7 (1, 2.5mg/kg) 投与により運動促進作用が発現し、中枢興奮作用を有することが示された (Fig. 3A)。一方、高用量である2C-T-7 (30mg/kg) 投与群においては運動抑制効果が発現した。

3. 2C-T-7の精神依存性評価

マウスを使用しConditioned place preference (CPP) 法による精神依存性の評価を行った (Fig. 3B)。2C-T-7 (0.25-20mg/kg) の条件付けによって有意なCPPすなわち報酬効果もしくは嫌悪作用の発現は認められなかった。

4. 2C-T-7前処置によるMAP精神依存性および運動促進作用に対する影響

2C-T-7 (0.25-20mg/kg, i.p.) を1日おきに投与し、6日間にわたって条件付けを行った後、8日目にMAPを投与し15分間の白区画および黒

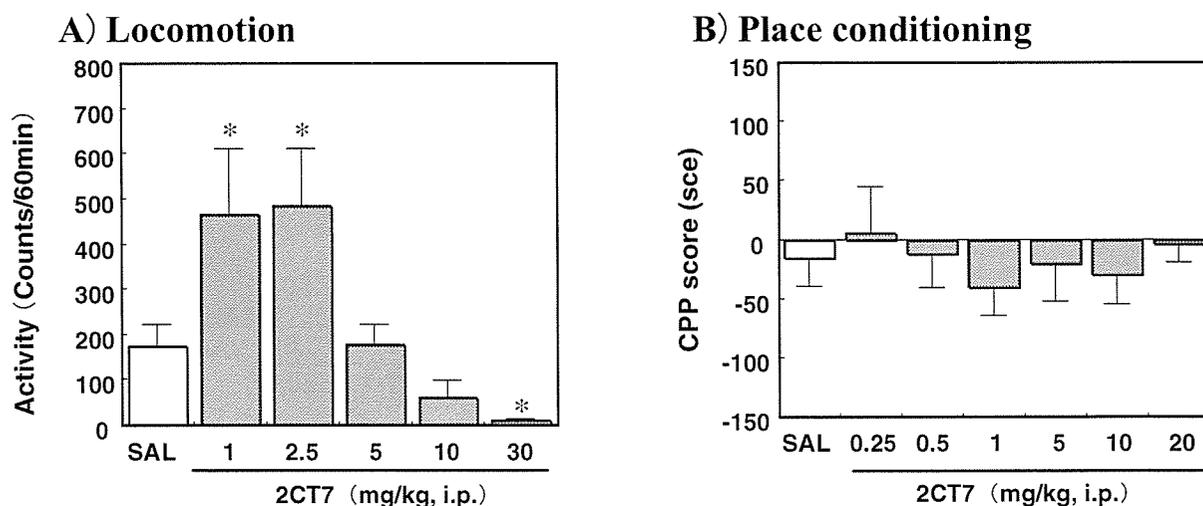


Fig. 3.

A) Effect of acute treatment with 2C-T-7 on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of 2C-T-7 in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 60 min after drug treatment. B) Effect of 2C-T-7 on place conditioning in mice. Place conditioning produced by 2C-T-7 (0.25-20 mg/kg, i.p.). 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.

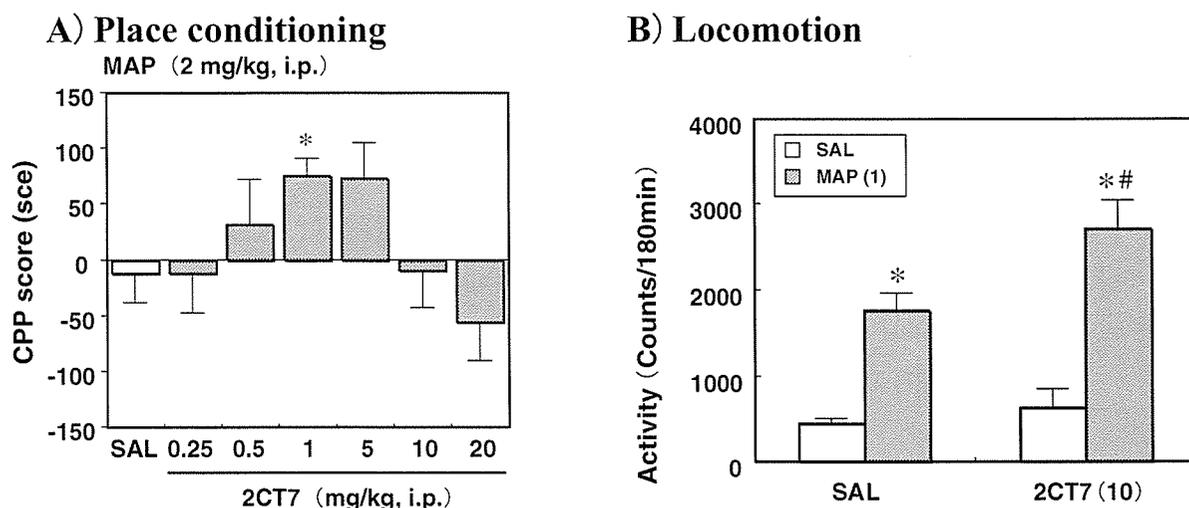


Fig. 4.

A) Effect of MAP on place conditioning in the 2C-T-7-pretreated mice. Place conditioning produced by 2C-T-7 (0.25-20 mg/kg, i.p.). Conditioning sessions (3 for drug; 3 for saline) were conducted. On day 8, test of conditioning was performed. Animals were administered with methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, i.p.) and immediately placed into the drug-paired place. After 5 sec, the door were raised and animals allowed to explore the apparatus for 900sec. 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. B) Effect of MAP-induced hyperlocomotion in the 2C-T-7-pretreated mice. Animals were administered with 2C-T-7 (10 mg/kg, i.p.) three times (on day 1,3,5). On the day 8, effect of MAP (1 mg/kg, i.p.) on the locomotor activity was examined in the 2C-T-7-pretreated mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 180 min after drug treatment.

* $P < 0.05$ vs. saline-treated group. # $P < 0.05$ vs. saline-pretreated MAP-group

区画の滞在時間を測定した (Fig. 4A)。その結果、2C-T-7 (1, 5mg/kg, i.p.) 条件付け経験群では、MAP投与により有意な報酬効果の発現が

確認された。同様に、2C-T-7 (10mg/kg, i.p.) 経験群ではMAP (1mg/kg) 投与による自発運動促進作用は、有意に増強されていた (Fig. 4B)。

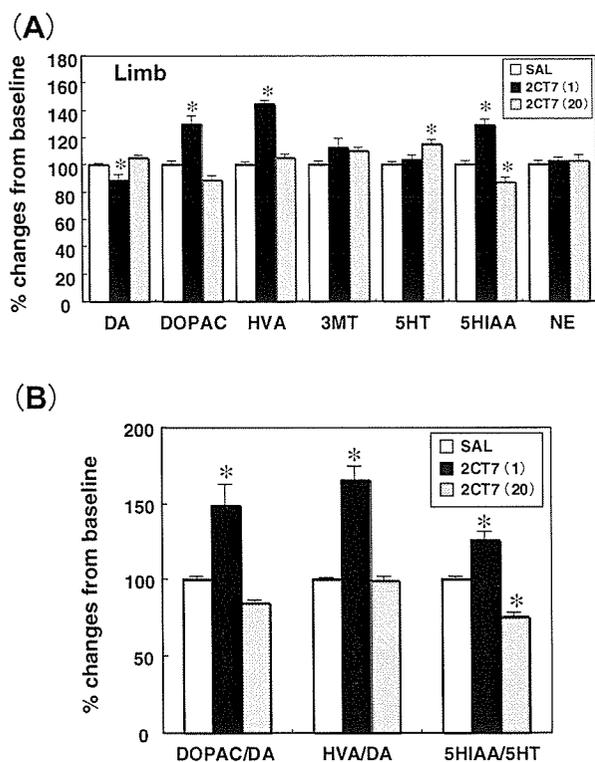


Fig. 5.

Effect of 2C-T-7 on monoamine level in the mouse limbic forebrain. Mice were sacrificed 60 min after 2C-T-7 (1, 20 mg/kg, i.p.) injection. A) Dopamine (DA), Serotonin (5-HT), Noradrenalin (NA) and metabolites. B) Metabolism ratio. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals. *P<0.05 vs. saline-treated group.

5. 2C-T-7による脳内モノアミンに対する影響

薬物依存形成において重要な中脳辺縁系ドパミン神経系に着目し、主要投射先である側坐核を含有するlimbic forebrainをターゲットとした。2C-T-7 (1, 20mg/kg) 投与1時間後に、limbic forebrainを分画しHPLC-ECD法に従って、モノアミン関連物質の含量を測定した(Fig. 5A)。2C-T-7 (1mg/kg) 低用量ではドパミン含量が有意に低下し、代謝産物であるDOPACおよびHVA含量は有意に増加していた。一方、セロトニン含量は変化が認められなかったが、代謝産物である5-HIAAは有意に増加していた。2C-T-7 (20mg/kg) 高用量ではドパミンおよび代謝産物には有意な影響が認められなかった。一方、セロトニン含量は有

意に増加し、5-HIAAは有意に減少していた。2C-T-7各用量において、ノルアドレナリン含量に影響はなかった。ドパミンおよびセロトニンの代謝回転を算出した結果をFig. 5Bに示した。2C-T-7低用量では、DOPAC/DA、HVA/DAおよび5-HIAA/5-HT比率は著明に増加していた。2C-T-7高用量では、DOPAC/DAおよびHVA/DA比率に影響は認められなかった。一方、5-HIAA/5-HT比率は著明に低下していた。

6. 培養神経細胞を利用した神経毒性の評価

ラット由来モノアミン系セロトニン神経細胞株B65細胞およびマウス由来ドパミン含有神経細胞株CATH.a細胞を用いて、2C-T-7および5-MeO-DIPT添加後、LDH放出量を測定した(Fig. 6)。B65細胞では、2C-T-7 100 μ M、5-MeO-DIPT 500 μ Mより有意なLDH放出量の増加が確認された。CATH.a細胞においては2C-T-7 25 μ M、5-MeO-DIPT 100 μ Mより有意なLDH放出量の増加が確認された。形態学的にも同様な濃度より障害がみられ、著明な細胞死が惹起された。2C-T-7と5-MeO-DIPTは両細胞において強力な毒性を発現し、その強度は2C-T-7>5-MeO-DIPTであった。

7. GILZ遺伝子発現解析

MAP、MDMA、2C-T-7および2C-T-2投与4時間後のlimbic forebrainにおけるGILZ遺伝子発現変動を検討した(Fig. 7)。その結果、すべての薬物においてGILZ mRNAレベルの有意な増加が認められた。

D. 考察

違法ドラッグとして流通が確認されているフェネチルアミン誘導体 2C-T-7の薬理学的特性に関して検討した²⁾。まず、2C-T-7による行

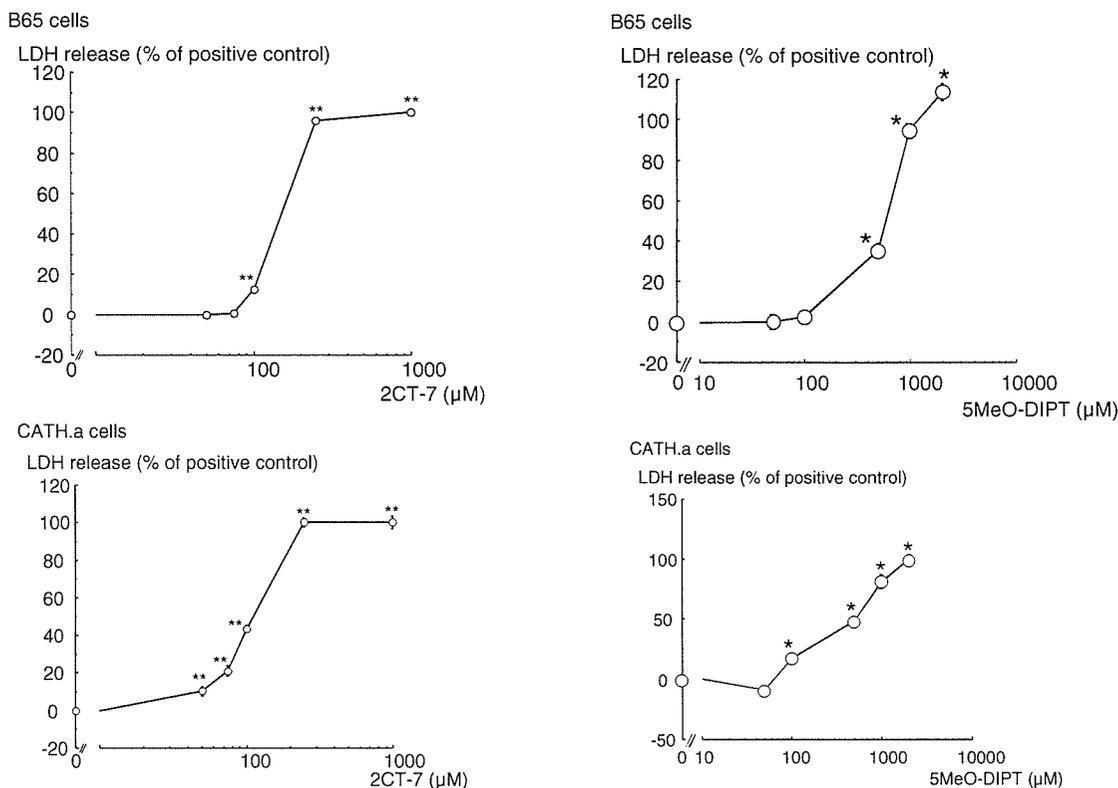


Fig. 6.

Changes in released LDH from B65 cells or CATH.a cells after exposure to 2C-T-7 or 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

% changes (GILZ/Actin)

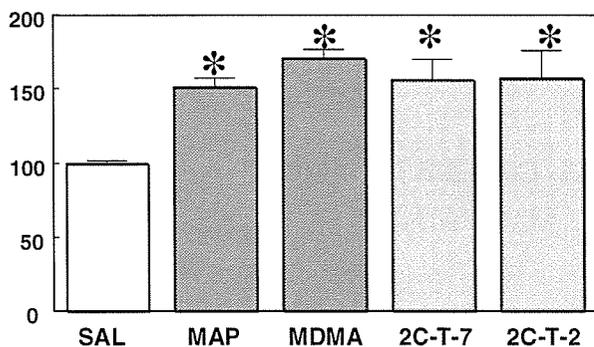


Fig. 7.

Profiling of drug-induced changes in glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expression in the mouse limbic forebrain. Mice were sacrificed 240 min after MAP (4 mg/kg), MDMA (10 mg/kg), 2C-T-7 (10 mg/kg) and 2C-T-2 (10 mg/kg). Changes of GILZ mRNA level were examined using RT-PCR assay. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals. * $P < 0.05$ vs. saline-treated group.

動変化を指標に、セロトニン受容体の役割を解析した。その結果、2C-T-7は5-HT_{2A}受容体を介して作用を発現することが明らかになった。

次に、2C-T-7の精神依存形成能を、マウス Conditioned place preference (CPP) 法により評価した。今回の実験条件では、2C-T-7の報酬効果および嫌悪効果は確認されなかった。一方、2C-T-7の条件付け(3回の薬物経験)後に、MAPを投与したところ、2C-T-7条件付け区画における滞在時間の延長が確認された。生理食塩液群ではこのような効果が発現しないことから、2C-T-7の前投与は、MAPによる報酬効果の発現を強めていると考えられる。昨年度実施した我々の解析では、薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性から、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判明している⁵⁾。本研究において運動活性の検討では、2C-T-7の低用量では運動促進作用が確認された。興味深いことに、今回のCPP試験条件下では2C-T-7単独の報酬効果は確認できなかったが、運動促進作用が発現する2C-T-7の低用量ではMAPの報酬効果が発現した。したがって、化学物質の中樞興奮作用の発現用量を参考に、単独もしくは前処置後のMAP投与によりCPP試験を行うことにより、効率良く精神依存性を評価できると考えられる。フェネチルアミン誘導体のうち、主に5-HT_{2A}受容体を介して作用を発現する薬物において、こうした評価法が有効であると考えられる。また、2C-T-7は覚せい剤や麻薬の作用を増強することから、いわゆるgate-way drugとなり得る危険性があると考えられる。

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樞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^{6,7)}。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。2C-T-7低用量投与では、ドパミン、セロトニン共にその代謝産物含量および代謝回転の増加が引き起こされることから、脳内のドパミンおよびセロトニン神経系は活性化される可能性が示唆された。一方、2C-T-7高用量投与では、セロトニンのみ、その代謝産物含量および代謝回転の低下が引き起こされることから、脳内のセロトニン神経系機能が抑制的に調節される可能性が示唆された。また、ノルアドレナリン含量は影響がなかったことから、2C-T-7は脳内ドパミンおよびセロトニン神経系を主に調節していると考えられる。2C-T-7

低用量ではドパミン神経系を介して、報酬効果や中樞興奮作用が発現するものと推察された。化学物質投与による脳内ドパミンおよびセロトニン含量およびそれぞれの代謝産物の増加および減少は、中樞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、違法ドラッグの特性を判断する生化学的マーカーとして有用であると考えられる。

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。2C-T-7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、2C-T-7および5-MeO-DIPTともにLDHの放出といった細胞障害ならびに細胞死を惹起することが明らかになった。毒性発現強度は、2C-T-7>5-MeO-DIPTであった。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を惹起するのに対し、2C-T-7は約1/40 (25 μ M以上)、5-MeO-DIPTは約1/10の(100 μ M以上)の低濃度で細胞障害を惹起しうることを明らかにした。これらより、2C-T-7および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。これらの結果から、2C-T-7の乱用は強力な神経毒性をもたらし、重大な健康被害が発生する危険性があると考えられる。

昨年度、マイクロアレイ法^{3,8)}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。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