

2. N(1)に両親媒性置換官能基を有する N(4)-アリールピペラジン類およびその構造類縁体化合物の細胞毒性

N-アリールピペラジンおよび 4-アリール-4-ヒドロキシピペリジンはそのもの自体がセロトニンあるいはドパミン受容体に対するアゴニスト活性を有しているが、N(1)に各種の置換官能基を導入することによりオピオイド受容体への親和性も認められる。このような化合物のうちで、オピオイド受容体に作用する止瀉薬であるロペラミドに細胞増殖抑制作用が認められた。そこで Fig. 5 に示した化合物を合成し、NG108-15 細胞に対する細胞増殖抑制作用を検討した (Table 3)。

Table 3. Cell viability of NG108-15 with mCPP related compounds (100 μ M) by MTT assay.

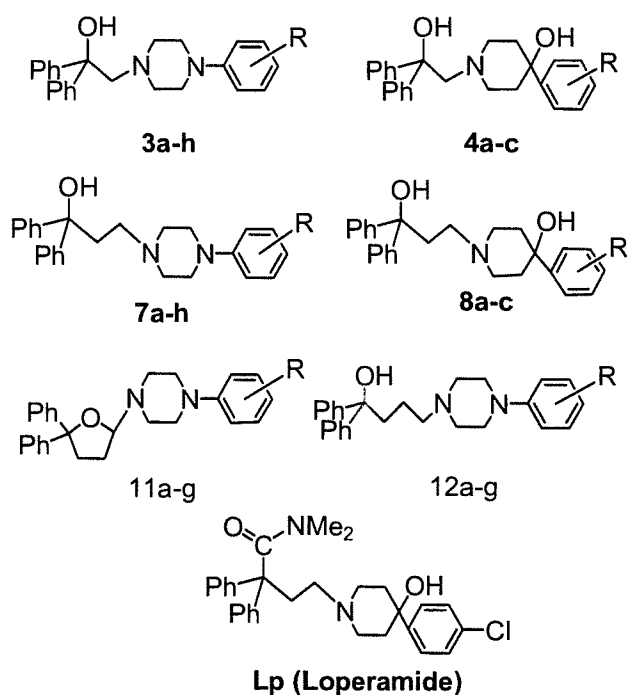
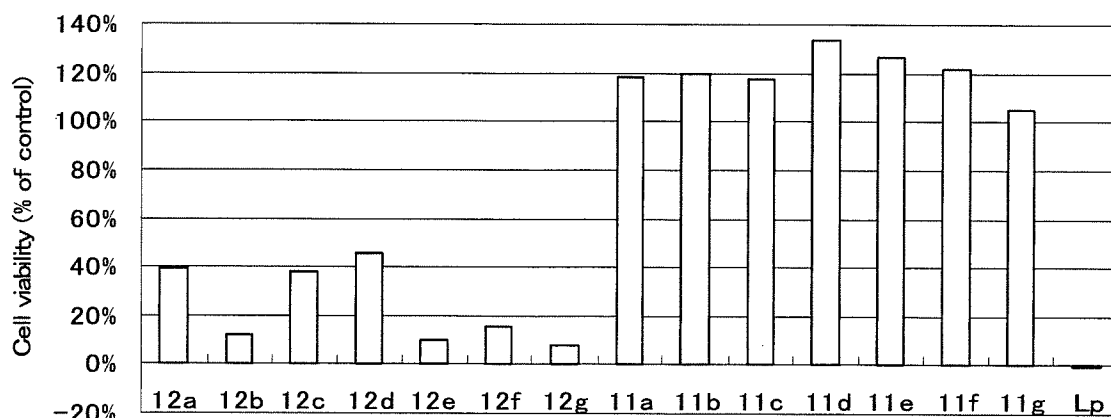
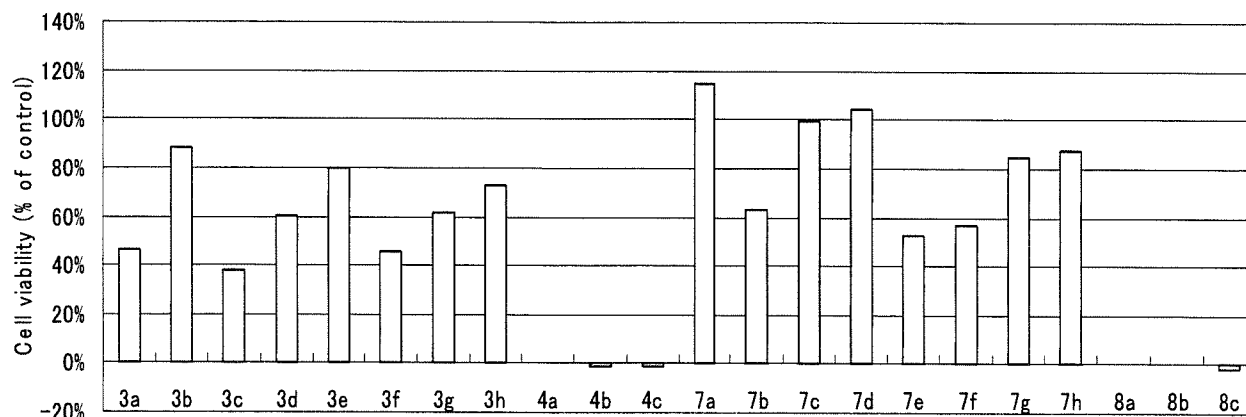


Fig. 5



mCPP 由来の N(4)-arylpiperazine 誘導体よりもハロペリドールやロペラミドと同じヘテロ環分子骨格である 4-aryl-4-hydroxypiperidine 誘導体の方がいずれも高い活性を示した。また、piperazine 誘導体に関して比較した場合、主鎖の炭素数が 4 つの場合、つまり 2,2-diphenyl-4-arylpiperazin-1-ylbutanol 誘導体において高い活性を示す傾向が見られた。

D. 考察

1. MDMA やメスカリン類縁の 2C の合成中間体であるアリールニトロオレフィン類は、いずれもかなり強い細胞増殖抑制作用を示した。上述の生物活性評価では神経芽腫ハイブリドーマ NG108-15 についてのみ示したが、3,4,5-trimethoxyphenyl-2-nitropropene は、ヒト大腸がん由来細胞 HCT116、ヒト前立腺がん由来細胞 PC-3 に対しても 5 μ M 濃度で完全に細胞増殖抑制作用を示した。この化合物は *in vitro* 実験において、アミノ酸であるシステインのチオール基、あるいはリジンのアミノ基と不可逆的に反応した。タンパク分子中の遊離システインやアルギニン、リジンなどの塩基性アミノ酸などと不可逆的に反応する可能性があり、今回の細胞毒性作用が一過性ではなく持続的である可能性が示唆された。

2. mCPP およびその類似化合物から化学合成によって得られる化合物の中で、脂溶性基（2 つの芳香族環と 3~4 炭素鎖構造）と親水性基（水酸基あるいはアミド基）をともに持つ（両親媒性）ものに細胞増殖抑制作用が認められた。これらはニトロオレフィンのような不可逆付加反応性を持たないが、その両親媒性のために細胞膜への親和性が高いと予想される。またセロトニン受容体などへのアゴニスト活性により向精神薬様の作用発現を示すものが多数知られており、薬物乱用・脱法ドラッグとして施用されるとき、神経細胞死による神経系の変性が引き起こされる可能性がある。

E. 結論

粗悪な MDMA 類似の合成脱法ドラッグに含まれるアリールニトロオレフィン類が強い細胞毒性作用を示すことを明らかにした。この不純物はタンパク分子中のシステインやリジンなどと不可逆反応し、体内貯留する可能性が高い。したがって微量の混入不純物であるニトロオレフィン類ではあるが、脱法ドラッグの反復施用により全身的悪影響が懸念される。

セロトニン、ドパミン、オピオイドなどの受容体に作用して向精神作用を示す mCPP 誘導体についても、いくつかの化合物がかなり強い細胞毒性作用を示すことを明らかにした。化合物の構造的な特性から中枢組織への移行性が大きいことが予測され、薬物乱用による神経細胞への悪影響が懸念される。

[参考文献]

1. Glennon, R.A. (2002) 'Foye's Principles of Medicinal Chemistry', 5th ed., Williams, D.A., Lemelke, T.L. (eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Inc., Philadelphia, pp.434-452.
2. a) Nicols, D.E., Hoffman, A.J., Oberlender, R.A., *et al.* (1986) *J. Med. Chem.*, **29**, 2009-2015, b) Heinzelman, R.V. *Org. Synth. col. vol. IV*, **1963**, 573-576, c) Glennon, R.A.; Liebowitz, S.M.; Anderson III, G.M. *J. Med. Chem.* **1980**, **23**, 294-299.
3. a) Seiji I.; Katsuhiko M.; Tetsuichi S.; Tadaaki H. *J. Med. Chem.* **1976**, **19**, 433-436, b) Nagasawa, H.; Nagura, F.; Mohamad, S. B.; Uto, Y.; Zhu, J. W. *Phytomedicine*, **2000**, **6**, 403-409.
4. a) Iwamura, T.; Uesawa, Y.; Kataoka, T.; Tokuyama, S.; Ueda, H. *Gifu Yakka Daigaku Kiyo*, **2005**, **54**, 45-50, b) Yoshida, A.; Tokuyama, S.; Iwamura, T.; Ueda, H. *Inter. J. Mol. Med.*, **2000**, **6**, 329-335.
5. a) Stokbroekx, R. A.; Vandenberk, J.; Van Heertum,

A. H. M. T.; Van Laar, G. M. L. W.; Van der Aa, M. J. M. C. *J. Med. Chem.*, **1973**, *16*, 782-786, b) 中 泉 朋子, 修士論文, **2004**, 岐阜薬科大学, 岐阜, c) Crombie, L.; Davies, J. S.; Whiting, D. A. Noel *J. Chem. Soc., C*, **1971**, 304-312, d) Corey, E. J.; Chaykovsky, M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 1353-1364, d) Chini, M.; Crotti, P.; Macchia, F. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 5939-5942, d) Loozen, H. J. J.; Godefroi, E. F.; Besters, J. S. M. M. Novel and efficient route to 5-arylated γ -lactones. *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 892-894, e) Ross, N. A.; Bartsch, R. A. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 360-366, f) Wright, J. L.; Gregory, T. F.; Bigge, C. F.; Boxer, P. A.; Serpa, K. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2469-2477, g) Moldvai, I.; Szantay, C., Jr.; Szantay, C. *Heterocycles*, **2001**, *55*, 2147-2155, h) Kitade, Y.; Hirota, K.; Maki, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 4835-4836.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kinoshita, H., Osamura, T., Mizuno, K., Kinoshita, S., Iwamura, T., Watanabe, S., Kataoka, T., Muraoka, T., Tanabe, G. (2006) *Chem. Eur. J.*, **12**, 3896-3904.
2. Watanabe, S., Miura, Y., Iwamura, T., Nagasawa, H., Kataoka, T. (2007) *Tetrahedron Lett.*, **48**, 813-816.

2. 学会発表

1. 小田 誠, 岩村樹憲, 片岡 貞「乱用薬物の中樞作用を解明するための 3,4-methylenedioxymethamphetamine をモデルとした化合物の合成」日本薬学会第 126 年会・仙台・2006 年 3 月.
2. 周 金培, 岩村樹憲, 片岡 貞, 「Synthesis of piperidine derivatives with potential antitumor

activity」日本薬学会第 126 年会・仙台・2006 年 3 月.

3. 長山智幸, 岩村樹憲, 片岡 貞「腫瘍細胞増殖抑制作用を有するアリールピペリラジン型化合物の合成」日本薬学会第 126 年会・仙台・2006 年 3 月.
4. Kimura, S., Iwamura, T., Watanabe, S., Nagasawa, H., Kataoka, T. “Asymmetric Morita-Baylis-Hillman reaction using chiral thiocarbonate”, 22nd International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur, 大宮・2006 年 8 月
5. 財津 桂, 鎌田寛恵, 三木昭宏, 片木宗弘, 岩村樹憲, 土橋 均「3,4,5-トリメトキシアンフェタミン(TMA)および異性体の分析」第 12 回法科学技術学会・東京・2006 年 11 月
6. 長山智幸, 岩村樹憲, 片岡 貞, 永澤秀子, 「がん細胞増殖抑制作用を有するアリールピペリジン型化合物の合成」日本薬学会第 127 年会・富山・2007 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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：¹野田幸裕

研究協力者：²鍋島俊隆，²毛利彰宏，²森瀬貴子，²新田淳美，³岩村樹憲

（¹名城大学大学院薬学研究科病態解析学 ²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部，
³岐阜薬科大学薬化学）

[研究要旨]

本研究では、MDMA の連続投与による認知障害の発現機序を調べるため、認知機能と海馬セロトニン作動性神経の機能の関係について行動薬理学的および神経化学的に検討した。また、MDMA 連続投与による認知障害やセロトニン作動性神経毒性が、ミトコンドリア内カルシウムレベルの変化によるかどうかについても検討した。新奇物質探索試験のテスト試行において、saline 連続投与マウスでは新奇 object に対する探索行動時間が既存 object のそれに比べて有意に増加したが、MDMA (10 mg/kg s.c.) 連続投与マウスでは、そのような増加は認められず、認知障害が惹起されていた。このような認知障害は、MDMA 最終投与から 20 日間後においても認められた。MDMA 連続投与マウスにフルオキセチンを訓練試行前に投与すると、新奇 object に対する探索行動時間は有意に増加し、認知障害が改善された。MDMA 連続投与マウスの海馬セロトニン含有量は、saline 連続投与マウスのそれに比べて有意に減少していた。MDMA 連続投与により海馬ミトコンドリアへのカルシウム流入は有意に増加していた。シクロスポリン A を MDMA と連続併用投与すると、MDMA 連続投与マウスに認められた認知障害、ミトコンドリア内カルシウム濃度の増加および海馬セロトニン含有量の減少は緩解された。以上の結果から、MDMA の連続投与による認知障害の発現にはセロトニン作動性神経の機能低下が関与していることが示唆された。また、認知障害に関連した海馬セロトニン作動性神経の機能障害の形成過程には、MDMA 連続投与による海馬ミトコンドリア内へのカルシウム流入の増加が関与しているものと推察される。

A. 研究目的

依存性薬物の乱用は、世界的な規模で深刻な社会問題になっている。合成麻薬である 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) は、覚醒剤に比べ安全な薬物であるという誤解の下に、特に若年層において“エクスタシー”などの俗称で呼ばれ急速に普及し乱用されている¹。MDMA は摂取すると多幸感、不安緩解などの精神作用を生じ、長期使用に伴い、抑うつ、不安、パニック症

候群、および認知機能低下、記憶障害が惹起される。これらの障害は、休薬後、数カ月から数年にわたり持続することが知られている²。MDMA の長期使用においては、細胞内セロトニン含有量が減少し、セロトニン作動性神経終末の変性などのセロトニン作動性神経に対して毒性が生じることが知られている³。しかし、その詳細な機序については、まだ不明な点が多く解明されていない。

ミトコンドリアは、エネルギー産生という細胞の生存において非常に重要な役割を果たしていると共に、アポトーシスの制御においても中心的な役割を果たしていることが明かとなっている^{4,5}。こうしたミトコンドリアの機能にはミトコンドリア内のカルシウム濃度が重要であることが報告されている⁶。ミトコンドリア内のカルシウム濃度は恒常的に維持されているが、ミトコンドリア内へのカルシウム流入の増加により、膜透過性が亢進し、膨化、膜電位の低下が引き起こされ、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore: mPTP) の開口によりミトコンドリアの機能障害が引き起こされる⁷。シクロスポリン A は、mPTP を構成するシクロフィリン D に作用し、mPTP の開口を阻害する阻害薬として知られている⁸。

本研究では、MDMA 連続投与により惹起される認知機能障害の発現機序の解明を目的とし、MDMA を連続投与したマウスの認知機能および海馬セロトニン機能、海馬内ミトコンドリアのカルシウム濃度について検討を行った。さらに MDMA 連続投与により惹起される認知障害およびセロトニン作動性神経障害に対するシクロスポリン A の作用について検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には、6-8 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス（日本エスエルシー、静岡）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 ± 1 °C、湿度 50 ± 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。

実験には、我々が合成した MDMA、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルオキセチン (SIGMA 社、米国) およびミトコンドリア膜安定化作用を持つシクロスポリン A (ノバルティスファーマ株式会社、東京) を使用した。MDMA およびフルオキセチンは生理食塩水に溶解し、シクロスポリン A は予め液体に調整されたものを生理食塩水で希釈し、10 mL/kg の投与用量に調整した。

2. 新奇物質認識試験 (novel-object recognition test: NORT)

マウスを open-field box (40×40×29 high cm) に入れ、10 分間の馴化を 3 日間行った。馴化 3 日目の翌日に、2 種類の異なった object を box 内に離して置き、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）。訓練試行の 24 時間後に、2 種類の object のうち片方の object を全く異なった新奇 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）。それぞれの object に対する探索嗜好行動の割合を、object へのアプローチ時間より算出した。

3. 海馬セロトニン含有量の測定

マウスを断頭し、氷冷下で各脳部位を摘出し、使用するまで -80°C で保管した。内部標準物質（イソプロテレノール）を加え、0.2 M 過塩素酸の存在下で超音波によりホモジナイズし、除タンパクを行った。遠心分離 (20,000 g×15 min) により上清採取したものを酢酸ナトリウムで pH 調整し、フィルターろ過したものをサンプルとした。サンプル中のセロトニンの含有量は、電気化学的検出器 (HTEC-500、Eicom、京都) を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD: HTEC-500、Eicom) を用いて測定した。

4. ミトコンドリア内カルシウムレベルの測定

マウスをウレタン (2.6 g/kg i.p.) で麻酔した後、ホモゲナイジングバッファー (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.2) を還流し、氷冷下で各脳部位を摘出した。マウス2匹分のサンプルをプールし、サンプルをガラス製ホモゲナイザーを用いて1 mLのホモゲナイジングバッファー中でホモゲナイズした。その後、遠心分離 (1,200 g×10 min) により得られた上清を再び遠心分離 (10,000 g×10 min) し、EDTA を含まないホモゲナイジングバッファーでペレットを懸濁し、再度遠心分離 (10,000 g×10 min) した。そのペレットを懸濁したものをミトコンドリア分画とした。抽出したミトコンドリアをタンパク定量し、ミトコンドリアタンパク 250 µg にカルシウム蛍光指示薬である 5 µM Rhod-2AM およびレスピレーションバッファー (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 10 mM succinate, phosphate buffer pH 7.2) を加えて、サンプル調整を行った。調整したサンプルは、蛍光測定装置 Fluoroskan Ascent (大日本住友製薬株式会社、大阪) を用いて測定した (励起波長 544 nm、測定波長 590 nm)。値はコントロールを 100 として計算した。

5. 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、一元配置の分散分析を行い、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 連続投与マウスにおける認知機能

マウスに MDMA (5、10 および 20 mg/kg s.c.) を 7 日間連続投与し、6 日間休薬後に新奇物質認識試験 (novel-object recognition test: NORT) を行った。訓練試行において、saline 連続投与マウスお

よび MDMA 連続投与マウスはそれぞれの object に対して約 50 % の割合で探索嗜好行動 (exploratory preference) を示した。テスト試行において saline 連続投与マウスでは新奇 object に対する exploratory preference が増加したが、MDMA (10 および 20 mg/kg s.c.) 連続投与マウスでは、そのような有意な増加は認められなかった (Fig. 1a)。MDMA の 10 mg/kg を 7 日間連続投与し 20 日間休薬した後に NORT を行ったところ、6 日間休薬 (Fig. 1a) と同様に、認知障害が認められた (Fig. 1b)。一方、マウスに MDMA (10 mg/kg s.c.) を単回投与し 6 日間の休薬後に認知機能を検討したところ、MDMA 単回投与マウスは、saline 単回投与マウスと同様に新奇 object に対する exploratory preference が増加し、認知障害は認められなかった (Fig. 1c)。

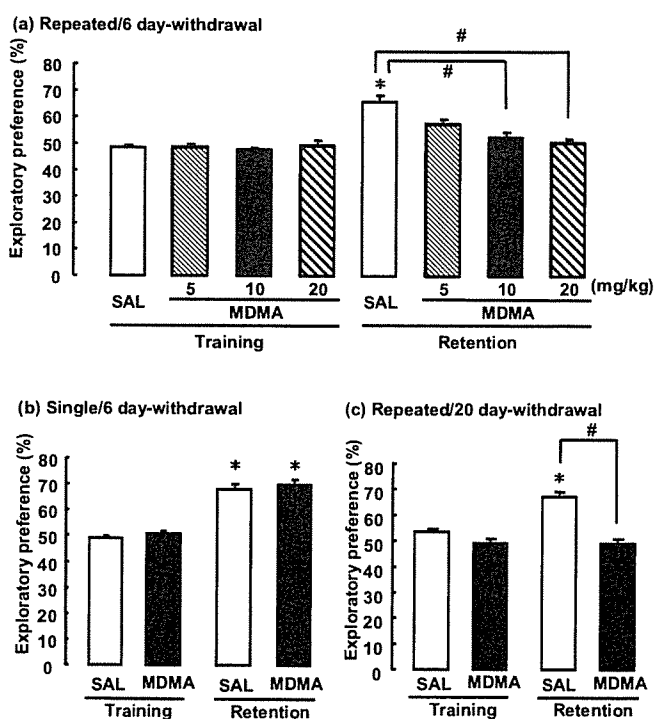


Fig. 1 The effect of MDMA on performance in a novel-object recognition test. (a) The performance of novel-object recognition test in mice treated with MDMA repeatedly. Mice were treated MDMA (5, 10 or 20 mg/kg s.c.) once a day for 7 days, and then were subjected training session of novel-object recognition test 6 days after the last treatment. (b) The performance of novel-object recognition test in mice treated with single MDMA. Mice were treated with single MDMA (10 mg/kg s.c.), and then were subjected training session of novel-object recognition test 6 days after MDMA treatment. (c) The performance of novel-object recognition test in mice treated with MDMA repeatedly. Mice were treated with MDMA (10 mg/kg s.c.) once a day for 7 days, and then were subjected training session of novel-object recognition test 20 days after the last treatment. The retention session was performed 24 hr after the training session. Values are the means ± S.E. * $p < 0.05$ vs. corresponding training. # $p < 0.05$ vs. SAL-treated, trained mice. SAL: saline.

2. MDMA 連続投与による海馬セロトニン作動性神経系への影響

MDMA 連続投与によるセロトニン作動性神経系への影響を検討するため、マウスに MDMA を 7 日間連続投与し 6 日間休薬した後の海馬セロトニン含有量を測定した。MDMA 連続投与マウスの海馬セロトニン含有量は、saline 連続投与マウスのそれと比較して有意に減少していた (Fig. 2)。

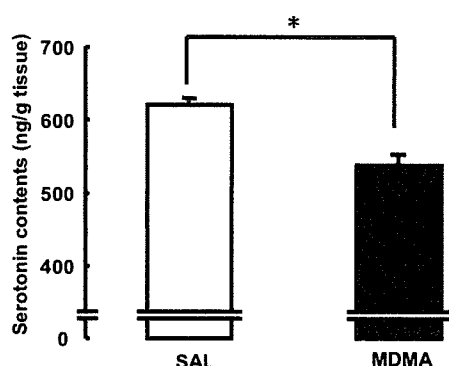


Fig. 2 The hippocampal serotonin contents. Mice were treated with MDMA (10 mg/kg s.c.) for 7 days and serotonin contents in the hippocampus were measured on 6 days after the last injection of MDMA. Values are the means $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ vs. SAL-treated mice. SAL: saline.

3. MDMA 連続投与マウスに認められる認知障害に対する SSRI の効果

MDMA 連続投与マウスに認められる認知障害にセロトニン作動性神経系の機能障害が関与しているかどうか検討するため、セロトニン作動性神経系を賦活化する選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) であるフルオキセチン (10 mg/kg s.c.) が、MDMA (10 mg/kg s.c.) 連続投与マウスに認められる認知障害を改善するかどうか調べた。フルオキセチンを訓練試行前に投与した MDMA 連続投与マウスでは、テスト試行における新奇 object に対する exploratory preference は、MDMA 連続投与マウスのそれと比較して、有意に増加した (Fig. 3)。フルオキセチンを saline 連続投与マウスに投与しても訓練試行およびテスト試行における exploratory preference に対して何ら

影響を与えなかった (Fig. 3)。

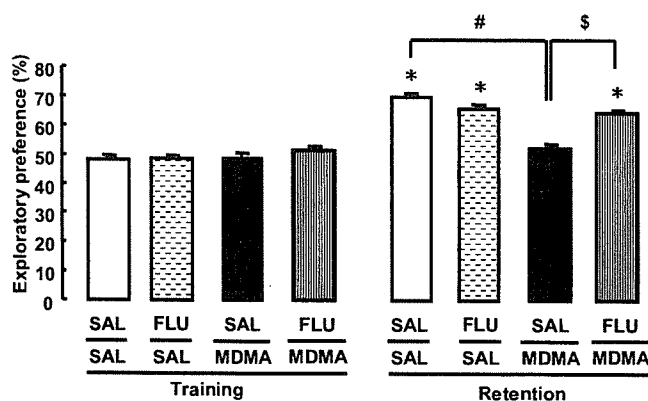


Fig. 3 The effect of fluoxetine on MDMA-induced cognitive impairment in a novel-object recognition test. Mice were treated with MDMA (10 mg/kg s.c.) once a day for 7 days, and then were subjected training session of novel-object recognition test 6 days after the last treatment. Fluoxetine (10 mg/kg i.p.) was administered 30 min before training session. The retention session was performed 24 hr after the training session. Values are the means $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ vs. corresponding training. # $p < 0.05$ vs. (SAL+SAL)-treated, trained mice. \$ $p < 0.05$ vs. (MDMA+SAL)-treated, trained mice. SAL: saline, FLU: fluoxetine.

4. MDMA 連続投与マウスの海馬におけるミトコンドリアの機能変化

マウスに MDMA を 7 日間連続投与し、最終投与 3 時間後にマウスの海馬を摘出し、抽出したミトコンドリアを用いてミトコンドリア内カルシウムレベルを測定した。

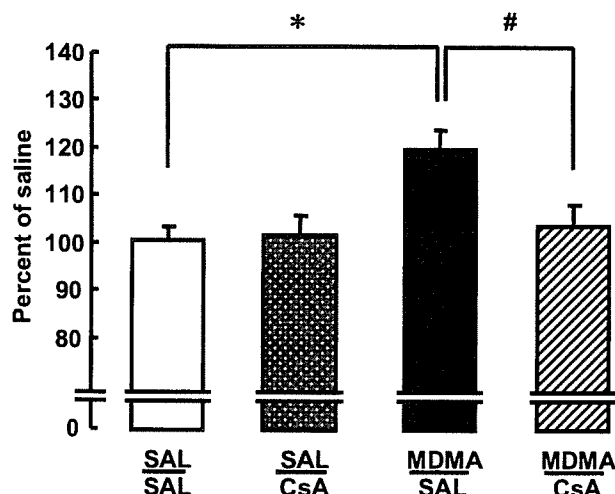


Fig. 4 The changes of intramitochondrial Ca^{2+} level in the hippocampus of mice treated with MDMA repeatedly. Mice were treated with MDMA (10 mg/kg s.c.) once a day for 7 days. Cyclosporin A (10 mg/kg i.p.) was administered 30 min before every treatment with MDMA (10 mg/kg s.c.) for 7 days. Intramitochondrial Ca^{2+} level was measured 3 hr after the last injection of MDMA. Values are mean $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ vs. (SAL+SAL)-treated mice. # $p < 0.05$ vs. (SAL+MDMA)-treated mice. SAL: saline, CsA: cyclosporin A.

MDMA 連続投与マウスの海馬ミトコンドリア内カルシウムレベルは、saline 連続投与マウスのそれと比較して有意に増加していた (Fig. 4)。ミトコンドリア膜安定化作用を有するシクロスポリン A を MDMA (10 mg/kg s.c.) 投与 30 分前に 7 日間連続併用投与したところ、MDMA 連続投与マウスに認められた海馬ミトコンドリア内カルシウムレベルの増加は、有意に抑制された (Fig. 4)。

5. MDMA 連続投与マウスに認められる認知障害および海馬セロトニン含有量の減少に対するシクロスポリン A の効果

MDMA 連続投与により惹起される認知障害およびセロトニン作動性神経毒性に対するミトコンドリア膜安定化作用を持つシクロスポリン A の効果を検討した。

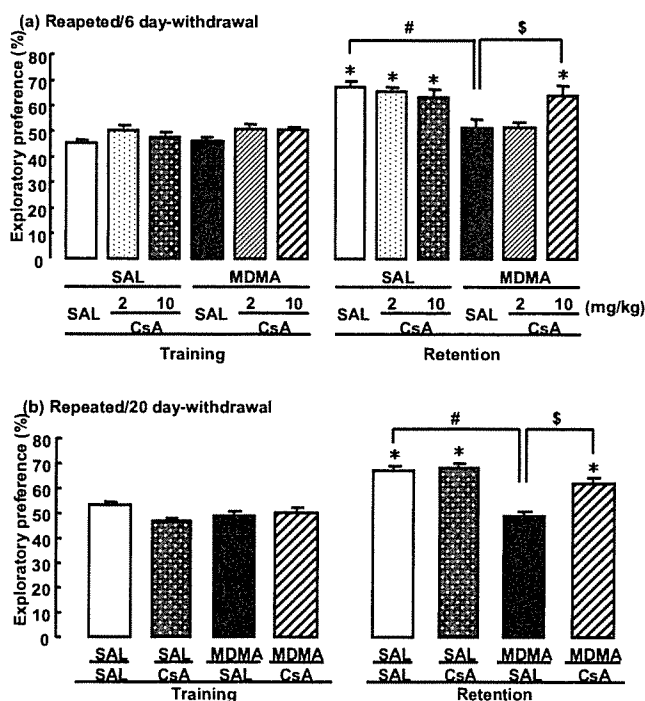


Fig. 5 The effect of cyclosporin A on MDMA-induced cognitive impairment in a novel-object recognition test. Mice were treated with MDMA (10 mg/kg s.c.) once a day for 7 days, and then were subjected training session of novel object test 6 days (a) or 20 days (b) after the last treatment. Cyclosporin A (a: 2 and 10 mg/kg b: 10 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before every treatment with MDMA (10 mg/kg s.c.) for 7 days. The retention session was performed 24 hr after the training session. Values are means $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ vs. corresponding training. # $p < 0.05$ vs. (SAL+SAL)-treated, trained mice. \$ $p < 0.05$ vs. (SAL+MDMA)-treated, trained mice. SAL: saline, CsA: cyclosporin A.

MDMA (10 mg/kg s.c.) とシクロスポリン A (10 mg/kg i.p.) を 7 日間連続併用投与した後 6 日間および 20 日間休薬したマウスでは、新奇 object への exploratory preference が MDMA 連続投与マウスと比較して有意に増加しており、MDMA 連続投与により惹起された認知障害が抑制されていた (Fig. 5a,b)。

同様に、マウスに MDMA (10 mg/kg s.c.) とシクロスポリン A (10 mg/kg i.p.) を 7 日間連続投与し、6 日間休薬したマウスでは、MDMA 連続投与による海馬セロトニン含有量の減少が有意に抑制されていた (Fig. 6)。

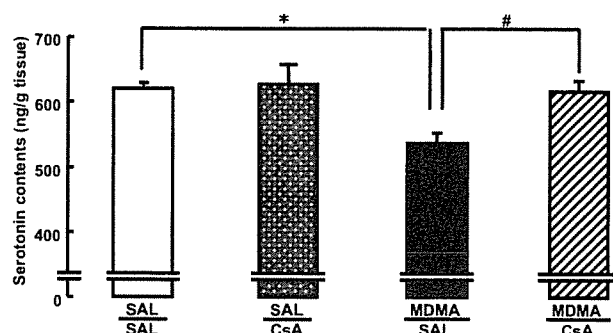


Fig. 6 The effect of cyclosporin A on MDMA-induced decrease of serotonin contents in the hippocampus of mice treated with MDMA repeatedly. Mice were treated with MDMA (10 mg/kg s.c.) once a day for 7 days. Cyclosporin A (10 mg/kg i.p.) was administered 30 min before every treatment with MDMA (10 mg/kg s.c.) for 7 days. Serotonin contents in the hippocampus were measured on 6 days after the last injection of MDMA. Values are the means $\pm$ S.E. * $p < 0.05$ vs. (SAL+SAL)-treated mice. # $p < 0.05$ vs. (SAL+MDMA)-treated mice. SAL: saline, CsA: cyclosporin A.

D. 考察

ヒトにおいて MDMA の長期使用により、言語、予期、作業記憶など幅広い認知機能障害が認められること⁹、動物実験ではラットにおいてモリス水迷路試験における空間学習が障害されることが報告されている¹⁰。本実験において、NORT を用いて MDMA 単回および連続投与マウスの認知機能を調べたところ、MDMA の連続投与により新奇物質探索能が障害され、この障害は、休薬後も長期間にわたり維持されていた。MDMA は、セロトニン作動性神経終末に存在するセロトニントランスポーター、小胞性モノアミントランス

ポーターおよびモノアミン代謝酵素 MAO-A を阻害することにより、一過性にシナプス間隙のセロトニン量を増加させることが知られている^{11, 12}。一方、MDMA の長期または高用量の使用によってセロトニンの長期枯渇が生じ、その結果、セロトニン作動性神経終末の変性などが惹起される³。このセロトニン作動性神経毒性には、MDMA がセロトニン作動性神経終末のセロトニントランスポーターから取り込まれ、MDMA の代謝物によるフリーラジカルの産生や酸化ストレスが関与していることが示唆されている³。また、MDMA による記憶障害の重症度は、脳脊髄液中のセロトニンの代謝物である 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) の減少の程度に比例することが報告されている¹³。本実験において、MDMA を連続投与したマウスの海馬セロトニン含有量が減少していたことから、MDMA を連続投与するとセロトニン作動性神経系の機能が障害されることが示唆された。MDMA 連続投与マウスに認められる認知障害は、SSRI であるフルオキセチンによって緩解された。以上のことから、MDMA の連続投与による認知障害には、セロトニン作動性神経機能の低下が関与していることが示唆された。

近年、ミトコンドリアがアポトーシスの制御に重要な役割を果たしていることから、神経変性疾患においてミトコンドリア機能変化が関与していることが報告されている¹⁴。ミトコンドリアが関与するアポトーシスの発現機序として、ミトコンドリア内へのカルシウム流入の増加により、ミトコンドリア膜透過性の亢進、膨化、膜電位の低下が引き起こされ、膜腔間に存在するチトクローム C が放出され、アポトーシスが惹起されるものと考えられている⁵。本実験において MDMA 連続投与マウスにおけるミトコンドリア内のカルシウムレベルは、saline 連続投与マウスのそれと比較して、有意に増加していた。mPTP に作用して

ミトコンドリア膜の安定化作用を有するシクロスポリン A を MDMA と連続併用投与したところ、MDMA 連続投与マウスに認められたミトコンドリア内カルシウムレベルの増加、認知障害およびセロトニン作動性神経毒性を有意に抑制した。したがって、MDMA の連続投与によるセロトニン作動性神経毒性にはミトコンドリアの機能変化が関与しており、シクロスポリン A は MDMA の連続投与によるミトコンドリアの機能変化を抑制することで、MDMA によるセロトニン作動性神経毒性や認知障害を抑制したものと示唆された。

E. 結論

MDMA により惹起される認知障害は、MDMA の連続投与によりセロトニン作動性神経毒性が引き起こされたことによるものと考えられる。そのセロトニン作動性神経毒性は、ミトコンドリアの機能変化が少なくとも一部、関与していることが推察される。

【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. McCann UD and Ricaurte GA: Lasting neuropsychiatric sequelae of (±)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in recreational users. J Clin Psychopharmacol, 11: 302-305 (1991).
3. Lyles J and Cadet JL: Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. Brain Res Rev, 42: 155-168 (2003).
4. Duchon MR: Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. Mol Aspects Med, 25: 365-451 (2004).

5. Zamzami N and Kroemer G: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 67-71 (2001).
 6. Nicholls DG: A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog Brain Res*, 63: 97-106 (1985).
 7. Ichinose M, Yonemochi H, Sato T et al.: Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress. *Am J Physiol*, 284: H2235-H2241 (2003).
 8. Broekemeier KM, Dempsey ME and Pfeiffer DR: Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem*, 264: 7826-7830 (1989).
 9. Bhattachary S and Powell JH: Recreational use of MDMA or "ecstasy": Evidence for cognitive impairment. *Psychol Med*, 31: 647-658 (2001).
 10. Sprague JE, Preston AS, Leifheit M et al.: Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): Effects on spatial learning. *Physiol Behav*, 79: 281-287 (2003).
 11. Rudnick G and Wall SC: The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 1817-1821 (1992).
 12. Leonardi ET and Azmitia EC: MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*, 10: 231-238 (1994).
 13. McCann UD, Mertl M, Eligulashvili V et al.: Cognitive performance in (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") users: a controlled study. *Psychopharmacology (Berl)*, 143: 417-425 (1999).
 14. Mattson MP: Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 120-129 (2000).
- F. 研究発表**
- 1. 論文発表**
- 1) Niwa M, Nitta A, Yamada Y et al.: Tumor necrosis factor-alpha and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol Psychiatry*, inpress, 2007
 - 2) Niwa M, Nitta A, Yamada Y et al.: An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor-alpha protects against methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol Psychiatry*, inpress, 2006
 - 3) Cen X, Nitta A, Ohya S et al.: An analog of a dipeptide-like structure of FK506 increases glial cell line-derived neurotrophic factor expression through cAMP response element-binding protein activated by heat shock protein 90/Akt signaling pathway. *J Neurosci*, 26: 3335-3344, 2006.
 - 4) Ishikawa K, Nitta A, Mizoguchi H et al.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int J Neuropsychopharmacol*, 9: 407-415, 2006.
- 2. 著書・総説**
- 1) Nabeshima T, Mouri A, Murai R et al.: Animal model of schizophrenia: dysfunction of NMDA receptor-signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Ann N Y Acad Sci.*, 1086:160-168, 2006.
 - 2) Mouri A, Noda Y, Mizoguchi H et al.: Dysfunction of glutamatergic systems and potential animal models of schizophrenia. *Nippon Yakurigaku Zasshi (Japanese Review)*,

127: 4-8, 2006.

3. 学会発表

国内発表

- 1) 毛利彰宏, 野田幸裕, 野田明宏, 新田淳美, 古川宏, 鍋島俊隆: フェンシクリジン連続投与による前頭皮質ドパミンおよびグルタミン酸作動性神経系の機能低下と認知機能障害. 第 79 回日本薬理学会年会 (横浜, 2006. 3. 8-10)
- 2) 村井里菜, 野田幸裕, 鍋島俊隆: フェンシクリジン連続投与マウスに認められる情動障害の発現における前頭皮質グルタミン酸トランスポーターの関与. 第 4 回 21 世紀 COE 若手研究フォーラム「名古屋大学発のブレイクスルーをめざして」(名古屋, 2006. 4. 28)
- 3) 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 古川宏, 鍋島俊隆: 統合失調症モデル動物を用いた認知障害の分子機序の解明および抗精神病薬の効果. 第 4 回 21 世紀 COE 若手研究フォーラム「名古屋大学発のブレイクスルーをめざして」(名古屋, 2006. 4. 28)
- 4) 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: GDNF および TNF- α 誘導剤はメタンフェタミン依存を抑制する - 覚せい剤依存症治療薬の開発を目指して -. 第 17 回 21 世紀 COE プログレスレポート会議《神経再生・発生》(名古屋大学医学部 21 世紀 COE プログラム「神経疾患・腫瘍の統合分子医学の拠点形成」)(名古屋, 2006. 7. 26)
- 5) 村井里菜, 野田幸裕, 永井拓, 松井香奈枝, 亀井浩行, 新田淳美, 松葉和久, 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過程における神経 - グリア細胞の関与. 第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋郡, 2006. 9. 1-2)
- 6) 松井香奈枝, 野田幸裕, 亀井浩行, 村井里菜, 毛利彰宏, 永井拓, 新田淳美, 松葉和久, 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過程における前頭皮質 NMDA-CaMK II 伝達系の関与. 第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋郡, 2006. 9. 1-2)
- 7) 溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 糸原重美, 坂野喜子, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連続投与による異常行動とマトリクスメタロプロテアーゼの生理活性変化. 第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋郡, 2006. 9. 1-2)
- 8) 王大勇, 野田幸裕, 周園, 新田淳美, 鍋島俊隆: Role of Dopamine in synergistic effects of galantamine and risperidone on phencyclidine-treated mice. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36 回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神経化学学会大会合同年会 (名古屋, 2006. 9. 14-16)
- 9) 村井里菜, 野田幸裕, 仲嶋一範, 澤明, 鍋島俊隆: Biochemical and behavioral abnormalities in mice suppressed endogenous DISC1 during neurodevelopment. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36 回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神経化学学会大会合同年会 (名古屋, 2006. 9. 14-16)
- 10) 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: Involvement of GDNF and TNF- α in inhibitory effects of Leu- Ile on methamphetamine-induced dependence. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36 回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神経化学学会大会合同年会 (名古屋, 2006. 9. 14-16)
- 11) 毛利彰宏, 野田幸裕, 森瀬貴子, 江崎光剛, 新田淳美, 亀井浩行, 松葉和久, 鍋島俊隆: Involvement of glutamatergic-dopaminergic systems in MDMA-induced psychobehavioral deficits. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36 回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神経

化学会大会合同年会（名古屋, 2006. 9. 14-16）

- 12) 奥野友香, ZENG Nan, 丹羽美苗, 宮崎雅之, 野田幸裕, 新田淳美, 鍋島俊隆: ストレス誘発うつ病モデル動物におけるニコチン連続投与による抗うつ作用. 第 110 回日本薬理学会近畿部会（京都, 2006. 11. 10）
- 13) 森瀬貴子, 野田幸裕, 毛利彰宏, 江崎光剛, 亀井浩行, 新田淳美, 松葉和久, 岩村樹憲, 鍋島俊隆: MDMA 連続投与マウスに認められる自発行動および認知行動障害におけるミトコンドリアの関与. 第 110 回日本薬理学会近畿部会（京都, 2006. 11. 10）

国際学会

- 1) 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, Japan, January 18, 2006)
- 2) Noda Y, Mizoguchi H, Yan Y, Yamada K and Nabeshima T: Involvement of ERK1/2 signaling pathway in seeking behaviors induced by methamphetamine in place preference and self-administration (Symposium). RIKEN Brain Science Institute One-Day Workshop “Topics in Reward and Addiction” (Tokyo, Japan, March 13, 2006)
- 3) Nitta A, Cen X, Ohya S, Mouri A, Ibi D, Noda Y, Furukawa S and Nabeshima T: An analog of a dipeptide-like structure of FK506 increases glial cell line-derived neurotrophic factor expression through cAMP response element-binding protein activated by heat shock protein 90/Akt signaling pathway. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, U.S.A., October 14-18, 2006)
- 4) Niwa M, Nitta A, Yamada Y, Saito K, Seishima M,

Shen L, Noda Y and Nabeshima T: An inducer for GDNF and TNF- α protects methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, U.S.A., October 14-18, 2006)

MAP および MDMA に基づく薬物探索行動（“渴望再燃”）

の脳内機序の解明とその治療薬開発に関する研究

分担研究者：山本経之¹

研究協力者：縄田陽子¹、平仁田尊人²

（¹長崎国際大学薬学部薬理学研究室、²九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、ACh 神経系および内因性カンナビノイドシステムの観点から①methamphetamine (MAP) ならびに (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の薬物自己投与法（ラット）を用いての休薬時における薬物探索行動（“渴望”）の発現機序の解明ならびに、②novel object recognition 法（マウス）を用いて MDMA 投与に基づく認知機能に及ぼす影響を検討した。

10 日間の MAP（0.02 mg/0.1 ml, i.v., FR1）自己投与実験後、MAP を生理食塩液に置換して 5 日間同様のレバー押し実験を行った。その 6 日目に MAP 関連刺激（音・光）の再提示および少量の MAP-priming 投与により、MAP 探索行動（生理食塩液自己投与下でのレバー押し行動）が惹起された。いずれの MAP 探索行動も、nicotine、ACh 分解酵素阻害薬 donepezil ならびにカンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前頭前皮質内への微量注入により抑制された。この nicotine ならびに donepezil による MAP 探索行動の抑制作用はニコチン性 ACh 受容体拮抗薬 mecamylamine により拮抗されたが、ムスカリン性 ACh 受容体拮抗薬 scopolamine では拮抗されなかった。

MDMA (10 mg/kg, i.p.) 7 日間の反復投与後、休薬 1 および 7 日目に、novel object recognition 法を用いて認知機能障害の発現の有無を調べた。MDMA 休薬時においてマウスの新奇物体への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。MDMA と AM251 との併用投与では、この認知機能障害は出現しなかった。同様に CB1 受容体欠損マウスでは、MDMA によるこの認知機能障害は全く認められなかった。MDMA 休薬時における認知機能障害時では、海馬における CB1 受容体の発現量は有意に増加した（休薬 7 日目）。この増加も AM251 の MDMA との併用投与により抑制される傾向が認められた。一方、前頭前皮質でも CB1 受容体発現量の増加傾向が認められたが、線状体では差がなかった。以上より、前頭前皮質における CB1 受容体の活性化がニコチン性 ACh 伝達の抑制を介して、MAP 探索行動の発現に促進的に働いている事が示唆された。また 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も、CB1 受容体の活性化を介して発現している事が示唆された。

A. 研究目的

我々は、これまでに覚せい剤 methamphetamine (MAP) 探索行動 (“渴望”) が、脳内カンナビノイド CB1 受容体の活性化を介して発現することを報告した¹⁾。また、昨年度の報告会では (±)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA : 通称 Ecstasy) によってその薬物自己投与行動が成立し、その退薬時に MDMA 探索行動が発現することを報告した。さらに、MDMA 探索行動もまた CB1 受容体の活性化を介して発現することが分かった。CB1 受容体は脳内において種々の神経伝達物質の遊離を制御する事が知られている⁸⁾。中でも GABA、glutamate ならびに ACh 神経終末に存在し、上記の神経伝達物質の遊離を制御している事が報告されている^{2), 8)}。一方では、choline acetyltransferase (ChAT) の活性が MAP 乱用者の脳内で低下している事が報告されており⁶⁾、MAP 乱用に伴い ACh 神経機能が低下する事が示唆される。そこで、本研究では第一に ACh 神経系が MAP 探索行動の発現に関与するか否かを検討した。加えて CB1 受容体と ACh 受容体の MAP 探索行動発現における相互関与の有無についても検討した。

第二に、MDMA は臨床では休薬後においても記憶・認知機能を持続的に障害する事が知られている³⁾。そこで、MDMA が休薬後の認知機能に及ぼす影響について、カンナビノイドシステムの側面から行動薬理学的ならびに生化学的に検討した。

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 [株日本エスエルシー、250-350g] を使用した。認知機能に関する実験には 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

methamphetamine [MAP : (株) 大日本製薬]、3,4-methylenedioxymethamphetamine · HCl (MDM : 岐阜薬科大学・薬化学教室、岩村樹憲助教授から供与)、(-)-nicotine di-(-)-tartrate [Research Biochemicals, Natick]、donepezil [(株) エーザイから供与]、mecamylamine [Sigma-Aldrich, Inc.]ならびに (-) -scopolamine [Sigma-Aldrich, Inc.]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

MAP 自己投与訓練に先立ち、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た。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 1.0 mm、内径 0.5 mm ; 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 [29 cm×23 cm×33 cm ; 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、MAP (0.02 mg/100 μ L/infusion) が薬物関連刺激 (drug-associated cue : 音; 85 dB/2.9 kHz, 光; 200 lux) と共に微量注入される。10日間の MAP 自己投与実験後、MAP を生理食塩液に置換した自己投与実験 (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 MAP-priming 投与を行い “渴望” の指標としての MAP 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オペラント課題

薬物自己投与実験直後に food pellet (45 mg; Holton Industries Co. LTD.) を正強化子としてオペ

ラント行動実験 (fixed ratio 1) を行い、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 10 mg/kg (i.p.) / 日の 7 日間反復投与後、休薬 1 および 7 日目に行った。本課題は、①open field 装置 (直径 70 cm) 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. ウェスタンブロッティング

水中で融解させたサンプルを 10 % polyacrylamidegel の各ウェルに 20 μ l ずつ加え、SDS Running buffer 中、一定電圧下 (100 V) で約 1 時間電気泳動した。ブロッティングの前処置として、フィルターペーパーおよびスポンジを blotting buffer に浸透させた。Hybond-P (PVDF) メンブレンは 100 % methanol に浸した後、MilliQ 水で洗浄し、blotting buffer に 10 分間以上浸透させた。電気泳動終了後、ゲルを blotting buffer で洗浄し、メンブレン、フィルターペーパーならびに、スポンジとともにウェット式ブロッティング装置にセットし、一定電圧下 (100 V) で 1 時間転写した。転写終了後、メンブレンを blocking buffer により、室温で 1 時間ブロッキングした。続いて、TBS で洗浄後、1 次抗体反応を行った。1 次抗体反応溶液には、抗 CB1 抗体を blocking buffer に

1000 倍希釈したものを用い、4℃で一晩振盪した。反応終了後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体反応溶液には、HGP 標識抗ウサギ IgG 抗体を、blocking buffer に 1000 倍希釈したものを用い、室温で 1 時間振盪した。二次抗体反応終了後、メンブレンを TBS-T により洗浄し、ECL plus Western Blotting Reagents および LAS-3000 (ルミノイメーシングアナライザー, FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて、化学発光法により、目的タンパク質のバンドを検出した。

7. 統計学的処理

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

C. 研究結果

1. MAP 探索行動発現における ACh 神経系の関与

MAP 自己投与最終日のラットのレバー押し回数は 35.8 ± 5.2 回であった。その後 MAP を生理食塩液に置換するとそのレバー押しは徐々に低下し、5 日目のレバー押し回数は 3.6 ± 0.7 回となった。退薬 6 日目に (生理食塩液自己投与下)、MAP 関連刺激および MAP (1.0 mg/kg, i.p.) priming を与えると、有意なレバー押し行動の増加が認められ、MAP 探索行動が発現した。nicotine (1.0 μ g/side) ならびに ACh 分解酵素阻害薬である donepezil (3.2 μ g/side) の前頭前皮質内への微量注入は、これら 2 つの誘発因子によって惹起された MAP 探索行動を有意に抑制した (Fig. 1A)。さらに、これら 2 つの薬物による MAP 探索行動の抑制作用は、ニコチン性 ACh 受容体拮抗薬である mecamylamine (10 μ g/side) により拮抗されたが、ムスカリン性 ACh 受容体拮抗薬である scopolamine (3.2 μ g/side) では拮抗されなかった (Fig. 1B)。

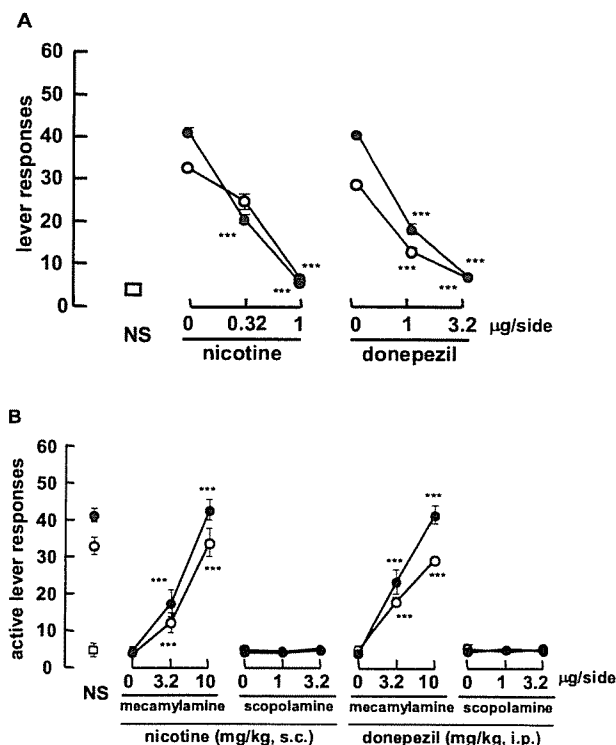


Figure 1

Effects of intracranial nicotine and donepezil injected into the prefrontal cortex. Open squares, open and closed circles represent groups given non-stimuli (NS), MAP-associated cues, and MAP-priming injections. *** $P < 0.001$, compared with the cue and MAP-priming injection alone.

一方、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 (32 $\mu\text{g/side}$) の前頭前皮質内への微量注入は、MAP 探索行動を有意に抑制した (Fig. 2A)。この抑制作用もまた mecamylamine (10 $\mu\text{g/side}$) により拮抗されたが、scopolamine (3.2 $\mu\text{g/side}$) では拮抗されなかった (Fig. 2B)。

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. 3)。

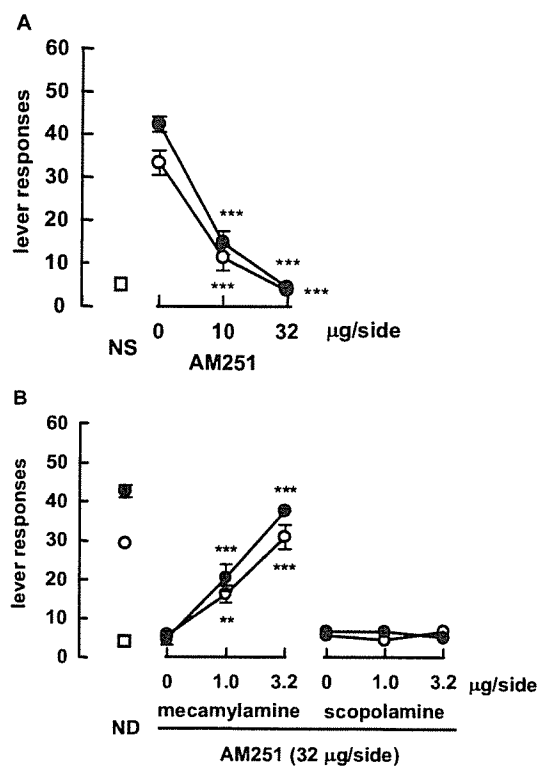


Figure 2

A. Effects of microinjection of AM251 into the prefrontal cortex on relapse to MAP-seeking behavior induced by MAP-associated cues and MAP-priming injection. Open squares, open and closed circles represent groups given non-stimuli (NS), MAP-associated cues, and MAP-priming injections ($n = 7$, each). ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared with the cue presentation and MAP-priming injection alone.

B. Effects of non-selective nicotinic and muscarinic acetylcholine receptor antagonist (mecamylamine and scopolamine, respectively) into the prefrontal cortex on the AM-251-induced attenuation of the relapse induced by the cues and MAP-priming injection.

Open squares, open and closed circles represent groups given non-stimuli (NS), MAP-associated cues, and MAP-priming injections, respectively. ND; non-drugs. ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared with AM251-pretreated groups given the cues and MAP-priming injection.

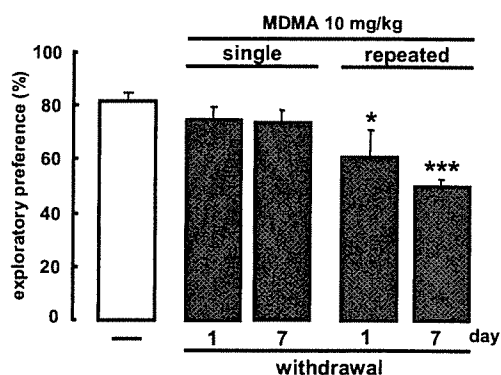


Figure 3

Effect of repeated administration of MDMA on performance in novel object recognition task in mice. Exploratory preference in the test trial in mice. Test trial was measured at 3 hr after the pre-trial. NORT 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 average $\pm$ SEM ($n=5-8$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus MDMA-untreated mice.

この MDMA による認知機能障害は、AM251 (3.2 mg/kg, i.p.) と MDMA を併用投与することにより出現しなかった (Fig. 4A)。さらに、退薬 7 日目での AM251 の単回投与は、MDMA による認知機能障害を改善した (Fig. 4B)。

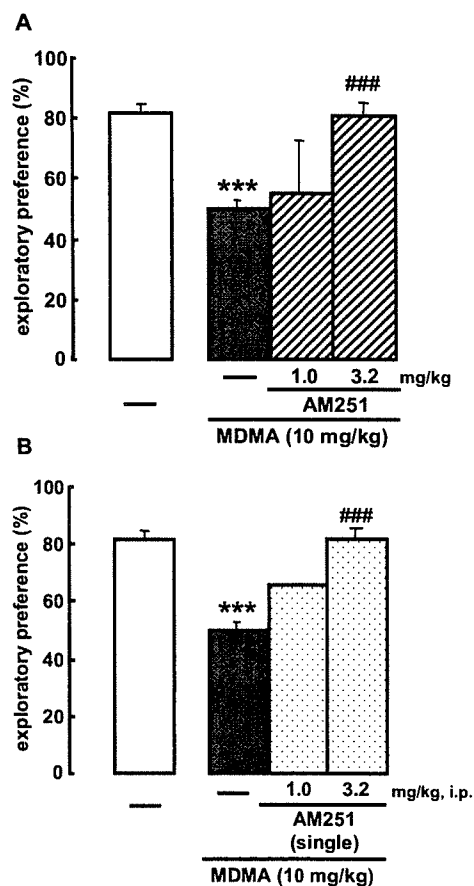


Figure 4

Effect of AM251 on MDMA induced impairment of performance in novel object recognition task. A. Effect of MDMA and MDMA co-administered with AM251 on performance in NORT in mice. NORT was performed in 7 days after the last treatment with vehicle, MDMA (10 mg/kg, once a day for 7 days) or co-administered AM251 (MDMA: 10 mg/kg, AM251: 1 or 3.2 mg/kg, once a day for 7 days). Exploratory preference in the test trial. B. Effect of single administration of AM251. Data represent average $\pm$ SEM (n=5-8). ***P<0.001 versus MDMA untreated CB1 (+/+) mice; ###P<0.001 versus MDMA (10 mg/kg) treated mice.

この認知機能障害発現時には、海馬における CB1 受容体の発現量は有意に増加していた (休薬 7 日目) (Fig. 5A)。この増加は、AM251 の MDMA との併用投与により抑制される傾向が認められた (Fig. 5B)。一方、前頭前皮質でも CB1 受容体発現量の増加傾向が認められたが、線状体では差がなかった (Fig. 5A)。

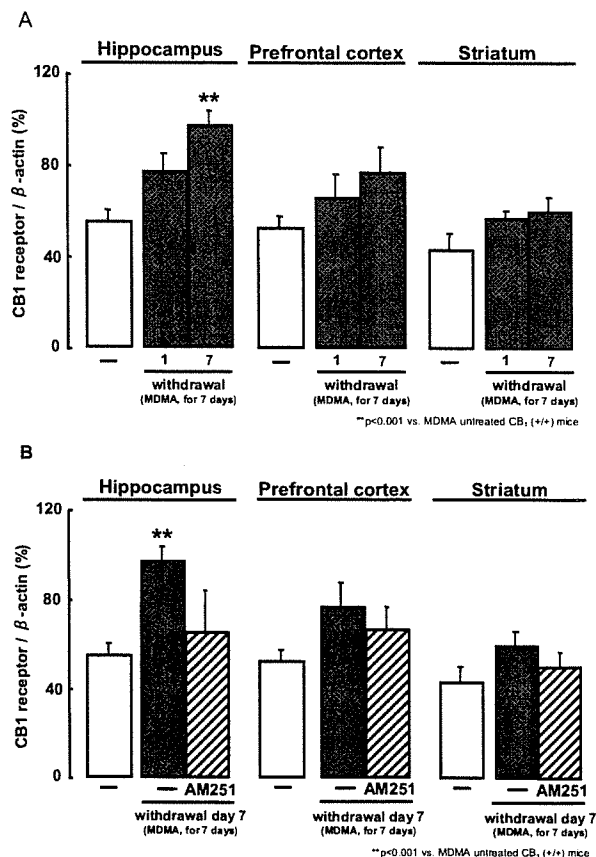


Figure 5

Effect of MDMA on levels of CB1 receptor protein in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum in mice. Levels of CB1 receptor was measured on day 1 or day 7 of withdrawal from repeated MDMA. A. Effect of MDMA on levels of CB1 receptor protein in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum on withdrawal day 1 or day 7 of withdrawal from repeated MDMA. B. Effect of AM251 co-administered with MDMA on levels of CB1 receptor protein in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum on withdrawal day 7 of withdrawal from repeated MDMA. Data represent average $\pm$ SEM (n=3-8). *P<0.05, **P<0.01 versus MDMA untreated mice. vehicle: vehicle-treated mice

D. 考察

MAP 探索行動は前頭前皮質内への nicotine、donepezil ならびに AM251 の微量注入により抑制されたことから MAP 探索行動の発現には少なくとも前頭前皮質内での ACh 神経系の機能低下または CB1 受容体の活性化が重要である事が示唆される。また、上記 3 種の薬物による MAP 探索行動の抑制作用は mecamylamine により拮抗されたが scopolamine では拮抗されなかったことより、MAP 探索行動の発現には ACh 受容体のサブタイプの中でもニコチン性 ACh 受容体の不活性化が

重要である事が示唆される。我々は以前に lidocaine の脳内微量注入法を用いた実験から、MAP 探索行動の発現には前頭前皮質が重要である事を報告している⁵⁾。今回の検討から、さらに、前頭前皮質内における CB1 受容体およびニコチン性 ACh 受容体が MAP 探索行動の発現に重要である事が示唆された。CB1 受容体は、脳内において ACh 神経終末に存在し、ACh 遊離を抑制的に制御している事が近年報告されている^{2), 8)}。以上を考慮すると、MAP 探索行動は、前頭前皮質内 CB1 受容体の活性化を介したニコチン性 ACh 受容体の不活性化に基因する事が示唆される。

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。 Δ^9 -THC を初めとする cannabinoid 類は、作業記憶を障害する事が知られている⁷⁾。本実験における認知機能障害は MDMA 反復投与時に CB1 受容体拮抗薬 AM251 を併用投与した動物では認められなかった。さらに、休薬時のこの認知機能障害は CB1 受容体拮抗薬によって改善された。一方、CB1 受容体の脳内分布は記憶に重要な役割を演じている海馬に多く発現している事が知られている⁴⁾。本実験において海馬における CB1 受容体発現量は、MDMA による認知機能障害発現時には有意に増加していた。以上の知見より、MDMA 休薬時に認められる認知機能障害は、海馬の CB1 受容体の活性化を介しての作業記憶障害に基づく事が示唆される。

E. 結論

MAP 探索行動の発現は CB1 受容体の活性化を介してのニコチン性 ACh 受容体の不活性化に基因する事が示唆される。また MDMA の反復投与により、その休薬時に著名な認知機能障害 (novel object recognition 法) が誘発された。その障害は海馬の CB1 受容体の活性化を介して起こる事が示唆される。CB1 受容体拮抗薬がこの障害を改善する事から、薬物依存症ならびに薬物乱用に伴う

認知機能障害に対する治療薬としての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) Degroot A., Kofalvi A., Wade MR., Davis RJ., Rodrigues RJ., Rebola N., Cunha RA., and Nomikos GG.: CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Mol Pharmacol.*, **70**: 1236-1245, 2006
- 3) Fox HC., McLean A., Turner JJ., et al.: Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ("ecstasy") polydrugusers. *Psychopharmacology.*, **162**: 203-214, 2002
- 4) Herkenham M., Lynn AB., Johnson MR., Melvin LS., de Costa BR. and Rice KC.: Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.*, **11**: 563-583, 1991
- 5) 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.*, **103**: 8523-8527, 2006
- 6) Kish SJ., Kalasinsky KS., Furukawa Y., Guttman M., Ang L., Li L., Adams V., Reiber G., Anthony RA., Anderson W., Smialek J., and DiStefano L.: Brain choline acetyltransferase activity in chronic, human users of cocaine, methamphetamine, and heroin. *Mol Psychiatry*, **4**: 26-32, 1999
- 7) 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

8) Schlicker E., Kathmann M.: Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci.*, **22**: 565-572, 2001

9) 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) Hiranita T., Nawata Y., Sakimura K., Anggadiredja K., Yamamoto T.: The possibility of nicotinic activators as craving killers in methamphetamine dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**: 8523-8527, 2006

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*, **50**: 991-997, 2006

3) 縄田陽子、山本経之、依存性薬物としてのMDMAの臨床ならびに行動薬理学的特徴、医学のあゆみ、**217**: 1167-1170, 2006

4) 山本経之、縄田陽子、當原真奈美、脳内endocannabinoidの異常性に基づくマウスの知的機能障害、分子精神医学、2007、in press

2. 学会発表

1) 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)－優秀ポスター受賞

2) 平仁田尊人、縄田陽子、北市清幸、山本経之、覚醒剤メタンフェタミン探索行動（“渴望”）■カンナビノイド CB1 受容体及び α4β2 型ニコチン性 ACh 受容体の相互関与、第 27 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム（和歌山、2006 年 9 月）

3) 北市清幸、中山寛尚、縄田陽子、平仁田尊人、山本経之、メタンフェタミンおよびモノアミンの脳内挙動における有機カチオントランスポーター、organic cation transporter-3 の関与、第 12 回日本行動薬理研究会（石川、2006 年 9 月）

4) 山本経之、教育講演：精神薬理学の領域における動物モデル－その妥当性と問題点、三学会（第 28 回日本生物学的精神医学会、第 36 回日本神経精神薬理学会および第 49 回日本神経化学学会大会）合同年会（名古屋、2006 年 9 月）

5) Hiranita T., Nawata Y., Kitaichi K., and Yamamoto T., Suppression of methamphetamine-seeking behavior by a cannabinoid CB1 receptor antagonist via the activation of nicotinic transmission in the prelimbic cortex., 三学会（第 28 回日本生物学的精神医学会、第 36 回日本神経精神薬理学会および第 49 回日本神経化学学会大会）合同年会（名古屋、2006 年 9 月）

6) Nawata, Y., Hiranita, T., Kitaichi, K. and Yamamoto, T., Cognitive impairment induced by MDMA (Ecstasy) involves cannabinoid CB1 receptors, 三学会（第 28 回日本生物学的精神医学会、第 36 回日本神経精神薬理学会および第 49 回日本神経化学学会大会）合同年会（名古屋、2006 年 9 月）－優秀演題受賞

7) 平仁田尊人、山本経之、覚醒剤メタンフェタミン探索行動はニコチンにより抑制される、薬物及びニコチン精神薬理シンポジウム（東京、2006 年 9 月）

8) 山本経之、縄田陽子、當原真奈美、脳内

endocannabinoid の異常性に基づくマウスの知的機能障害、第8回感情・認知・行動(ABC)研究会（東京、2006年10月）

9) 北市清幸、中山寛尚、山本経之、脳における有機カチオントランスポーターOCT3 発現抑制時の行動薬理学的特性および神経化学的变化、第59回日本薬理学会西南部会。（那覇、2006年11月）

10) 平仁田尊人、縄田陽子、北市清幸、山本経之、覚醒剤メタンフェタミン探索行動の発現における副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) の関与、第59回日本薬理学会西南部会（那覇、2006年11月）

11) 北市清幸、中山寛尚、縄田陽子、山本経之、SLC トランスポーターOTC3 の発現調節と神経行動薬理学的変化、第1回トランスポーター研究会（東京、2006年12月）－優秀ポスター賞受賞

12) 平仁田尊人、縄田陽子、北市清幸、山本経之、覚醒剤メタンフェタミン探索行動の再燃における副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) の役割、第80回日本薬理学会年会（名古屋、2007年3月）