

inhibition of the startle reflex in mice. *Biol. Psychiatry*, in press.

- 10) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itoharu, S., Banno, Y. and Nabeshima, T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice. *J. Neurochem.*, in press.
- 11) Yan, Y., Yamada, K., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Transient drug-primed but persistent cue-induced reinstatement of extinguished methamphetamine-seeking behavior in mice. *Behav. Brain Res.*, 177:261-268, 2007.
- 12) Ito, M., Nagai, T., Mizoguchi, H., Fukakusa, A., Nakanishi, Y., Kamei, H., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K.: Possible involvement of protease-activated receptor-1 in the regulation of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion by the tissue-plasminogen activator-plasmin system. *J. Neurochem.*, in press.

2. 総説・著書

- 1) 田熊一徹, 山田清文, 松田敏夫: 中枢神経系のアポトーシスにおけるミトコンドリアの役割に関する研究. *日本薬理学雑誌*, 127:349-354, 2006.
- 2) 山田清文: 覚せい剤により誘発される記憶障害一発症機構と薬物治療. *医学のあゆみ*, 217:1171-1173, 2006.
- 3) 永井拓, 鍋島俊隆, 田熊一徹, 山田清文: モルヒネ依存形成における組織プラスミノゲン活性化因子の役割. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*, 41:23-30, 2006.

3. 学会発表

国内学会

- 1) 伊藤美奈, 永井拓, 中道範隆, 溝口博之, 亀井

浩行, 鍋島俊隆, 田熊一徹, 山田清文: ニコチンの報酬効果における tPA-plasmin-PAR1 シグナルの役割. 第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2007.03.14-16).

- 2) 伊藤幸男, 田熊一徹, 溝口博之, 永井拓, 鍋島俊隆, 山田清文: メタンフェタミン誘発性認知障害に対するミノサイクリンの効果. 第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2007.03.14-16).
- 3) 姫野友紀子, 田熊一徹, 保科有希, 新井佐和子, 大野佑城, 舩津瑤子, 永井拓, 溝口博之, 小池浩司, 井上正樹, 山田清文: 閉経後認知症障害モデルマウスの作成. 第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2007.03.14-16).
- 4) 衣斐大祐, 田熊一徹, 小池宏幸, 溝口博之, 山田清文: 幼若期長期隔離飼育による海馬歯状回の神経新生抑制と認知・行動発達異常の発現. 第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2007.03.14-16).
- 5) 田熊一徹, 福崎笑子, 永井拓, 溝口博之, David M. Stern, Shirley ShiDu Yan, 山田清文: Alzheimer 病におけるミトコンドリア機能破綻の分子機序. 第 80 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2007.03.14-16).
- 6) 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: メタンフェタミン誘発性行動障害におけるマトリックスメタロプロテアーゼの動態変化: 細胞外ドパミン遊離量の調節. 第 17 回マイクロダイアリシス研究会 (東京), (2006.12.02).
- 7) 中出順也, 溝口博之, 深草亜由美, 田熊一徹, 鍋島俊隆, 山田清文: てんかんモデル動物における Matrix Metalloproteinase-9 の動態と機能解析. 日本薬学会北陸支部第 115 回例会 (富山), (2006.11.12).
- 8) 深草亜由美, 永井拓, 溝口博之, 鍋島俊隆, 田

- 熊一敞, 山田清文: 組織プラスミノゲン活性化因子によるメタンフェタミン誘発性ドーパミン遊離の増強. 日本薬学会北陸支部第 115 回例会 (富山), (2006.11.12).
- 9) 衣斐大祐, 田熊一敞, 小池宏幸, 溝口博之, 山田清文: 幼若期長期隔離飼育マウスの発達障害モデルとしての有用性. 第 110 回日本薬理学会近畿部会 (京都), (2006.11.11).
 - 10) 姫野友紀子, 田熊一敞, 保科有希, 新井佐和子, 永井拓, 溝口博之, 小池浩司, 井上正樹, 山田清文: 更年期障害モデル動物の記憶障害に対するエストロゲンの効果. 第 16 回日本医療薬学会年会 (金沢), (2006.09.30-10.01).
 - 11) 山田清文, 永井拓, 伊藤美奈, 中道範隆, 亀井浩行, 深草亜由美, 鍋島俊隆, 田熊一敞: Role of tPA-plasmin system in nicotine reward. 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), (2006.09.14-16).
 - 12) 伊藤美奈, 永井拓, 溝口博之, 田熊一敞, 山田清文: Release of tissue plasminogen activator in the nucleus accumbens by drugs of abuse. 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), (2006.09.14-16).
 - 13) 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, 糸原重美, 坂野喜子, 鍋島俊隆: MMP-2/9 deficient mice show reduced responses to METH in behavioral changes and dopamine release. 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), (2006.09.14-16).
 - 14) 前田健二, 杉野春日子, 廣瀬 毅, 北川 久, 永井 拓, 溝口博之, 田熊一敞, 山田清文: repeated administration of phencyclidine and MK-801 decreases the neurogenesis in the dentate gyrus. 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), (2006.09.14-16).
 - 15) 伊藤幸男, 田熊一敞, 中道範隆, 溝口博之, 永井拓, 山田清文: ZSET1446 improves the object recognition impairment by repeated methamphetamine treatment in 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 回日本神経化学会大会合同年会 (名古屋), (2006.09.14-16).
 - 16) 福崎笑子, 田熊一敞, 永井 拓, David M. Stern, Shirley ShiDu Yan, 山田清文: Neuronal uptake of amyloid β -peptide and its cellular toxicity. 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), (2006.09.14-16).
 - 17) 姫野友紀子, 田熊一敞, 保科有希, 新井佐和子, 永井拓, 溝口博之, 小池浩司, 井上正樹, 山田清文: Effects of chronic stress and estrogen on contextual fear conditioning in ovariectomized 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 回日本神経化学会大会合同年会 (名古屋), (2006.09.14-16).
 - 18) 永井拓, 中道範隆, 小林香奈, 伊藤幸男, 鍋島俊隆, 田熊一敞, 山田清文: Dopamine D1 receptor/ERK1/2 activation regulates long-term retention of recognition memory in 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 回日本神経化学会大会合同年会 (名古屋), (2006.09.14-16).
 - 19) 山田清文, 永井 拓, 伊藤美奈, 中道範隆, 亀井浩行, 深草亜由美, 鍋島俊隆, 田熊一敞: Role of tPA-plasmin system in nicotine reward. 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), (2006.09.14-16).
 - 20) Yan, Y., Yamada, K., Niwa, M., Nitta, A., and

- Nabeshima, T.: Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in GDNF mutant 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回日本神経化学会大会合同年会(名古屋), (2006.09.14-16).
- 21) 玉置啓祐, 福井正樹, 吉田浩平, 前田紗弥香, 鎌倉昌樹, 山田清文, 米田幸雄: Regulation of adult neurogenesis by traumatic experience in 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回日本神経化学会大会合同年会(名古屋), (2006.09.14-16).
- 22) 深草亜由美, 永井 拓, 溝口博之, 鍋島 俊隆, 田熊一敬, 山田清文: メタンフェタミン連続投与により誘発されるドーパミン遊離増強における tPA-plasmin 系の関与, 生体機能と創薬シンポジウム 2006 (福岡), (2006.09.08-09).
- 23) 玉置啓祐, 山田清文, 前田紗弥香, 米田幸雄: トラウマ体験による成熟脳内神経細胞新生の制御. 第12回日本行動薬理研究会(能登), (2006.09.01-02).
- 24) 新井佐和子, 高橋健次, 永井拓, 亀井浩行, 田熊一敬, 山田清文: Prepulse inhibition に関与する脳神経回路網とメタンフェタミンの作用. 第12回日本行動薬理研究会(能登), (2006.09.01-02).
- 25) 伊藤幸男, 田熊一敬, 溝口博之, 永井拓, 山田清文: メタンフェタミン誘発性認知障害モデルに対する ZSET1446 の治療効果にはドーパミン D1 受容体/ERK1/2 シグナルが関与する. 第12回日本行動薬理研究会(能登), (2006.09.01-02).
- 26) 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(能登), (2006.09.01-02).
- 27) 衣斐大祐, 田熊一敬, 小池宏幸, 溝口博之, 山田清文: 幼若期マウスの学習記憶・情動発達に対する長期隔離飼育の影響. 第12回日本行動薬理研究会(能登), (2006.09.01-02).
- 28) 新井佐和子, 保科有希, 姫野友紀子, 田熊一敬, 永井拓, 山田清文: 更年期認知障害モデルに対するイチヨウ葉エキス(EGb761)の効果. 第3回サプリメント研究会(岐阜), (2006.7.29-30).
- 29) 伊藤美奈, 永井拓, 山田清文: ニコチンによる精神依存形成における組織プラスミノーゲン活性化因子/プラスミンシグナルの関与. 第41回日本アルコール・薬物医学会総会(京都), (2006.07.27-28).
- 30) 新井佐和子, 永井 拓, 高橋健次, 亀井浩行, 田熊一敬, 山田清文: プレパルス抑制の制御に関与する神経回路の同定. 第29回日本神経科学大会(京都), (2006.07.19-21).
- 31) 伊藤幸男, 田熊一敬, 中道範隆, 溝口博之, 永井拓, 山田清文: 覚醒剤誘発性認知障害モデルにおける ERK1/2 シグナル系の役割. 日本薬学会北陸支部第114回例会(金沢), (2006.07.08).
- 32) 小池宏幸, 田熊一敬, 永井拓, 溝口博之, 中津史, 大野博司, 山田清文: アダプター蛋白複合体 μ 3B サブユニット欠損マウスの多動性に対する GABA 作動薬の効果. 日本薬学会北陸支部第114回例会(金沢), (2006.07.08).
- 33) 玉置啓祐, 山田清文, 米田幸雄: トラウマ体験マウスを用いた成熟脳内神経細胞新生の解析. 日本薬学会北陸支部第114回例会(金沢), (2006.07.08).
- 34) 福崎笑子, 田熊一敬, 永井 拓, David M. Stern, Shirley ShiDu Yan, 山田清文: マウス培養神経細胞における A β の細胞内移行と細胞障害. 第109回日本薬理学会近畿部会(倉敷),

(2006.06.16).

- 35) 深草亜由美, 永井拓, 伊藤美奈, 亀井浩行, 鍋島俊隆, 田熊一徹, 山田清文: モルヒネによる精神依存形成における tPA-plasmin-PAR-1 系の関与. 第 109 回日本薬理学会近畿部会 (倉敷), (2006.06.16).

- 36) Yan, Y., Nitta, A., Yamada, K., and Nabeshima, T.: Relapse of methamphetamine-seeking behavior in mice. 第 109 回日本薬理学会近畿部会 (倉敷), (2006.06.16).

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

国際学会

- 1) Yamada, K., Nagai, T., Yijin, Y., and Nabeshima, T.: Regulation by tissue plasminogen activator-plasmin system of morphine reward by protease activated receptor-1. The 2006 International Narcotic Research Conference (St. Paul, Minnesota, USA), (2006.07.09-14).
- 2) Yamada, K., Ito, M., Nagai, T., Nakamichi, N., Mizoguchi, H., Kamei, H., Fukakusa, A., Takuma, K. and Nabeshima, T.: Targeting the tPA-plasmin-protease activated receptor-1 system for the treatment of nicotine dependence. 18th Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology (Fukui, Japan), (2006.09.23-24).
- 3) Nagai, T., Ito, M., Nakamichi, N., Kamei, H., Fukakusa, A., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K.: Tissue plasminogen activator-plasmin system regulates rewarding effect of nicotine by activating protease activated receptor 1. 36th Annual meeting Society for Neuroscience (Atlanta, USA), (2006, 10.14-18).

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

覚せい剤投与による行動異常および脳内ドパミン神経系の 神経傷害に対するミノサイクリンの治療効果

分担研究者：伊豫 雅臣¹

研究協力者：張 琳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]

最近我々は、覚せい剤や合成麻薬MDMAの投与によって引き起こされる脳内ドパミン神経系およびセロトニン神経系の神経傷害に対する抗生物質ミノサイクリンの効果を報告した。本年度は、覚せい剤の繰り返し投与によって形成された逆耐性およびドパミン神経系に対する神経傷害に対するミノサイクリンの治療効果（後投与の効果）を検討した。ミノサイクリンの後投与は覚せい剤によって形成された逆耐性を有意に改善し、その効果はミノサイクリンの投与中断後も観察された。また覚せい剤投与によって引き起こされる脳内ドパミントランスポーターの減少は、ミノサイクリンの後投与によって改善されることが判った。ミノサイクリンは臨床的に使用されている安全な薬剤であるため、覚せい剤乱用による精神障害および神経傷害の治療薬として有用であると思われる。

A. 研究目的

覚せい剤を乱用すると脳内のドパミン神経系が傷害を受けることが知られているが、これらの神経傷害を治療する薬剤は現在のところ無い。最近我々は、第二世代の抗生物質ミノサイクリンが、覚せい剤投与による行動異常（急性の過活動および逆耐性の形成）、ドパミン神経傷害(1, 2) および合成麻薬MDMA投与によるセロトニン神経傷害(3)を抑制する作用を有することを報告した。

今回、覚せい剤投与の繰り返し投与によって形成された逆耐性およびドパミン神経系の傷害に対してミノサイクリンが治療効果を示すかどうかを調べた。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には7～8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。逆耐性形成の実験では、生理食塩水あるいは覚せい剤（3 mg/kg）を1日に1回5日間投与して、1週間の断薬後、溶媒あるいはミノサイクリン（40 mg/kg）を1日1回14日間投与した。最終投与翌日あるいは2週間後に、覚せい剤（1 mg/kg）を投与して行動評価を行なった。

ドパミン神経系の傷害の実験では、生理食塩水あるいは覚せい剤（3 mg/kg）を3時間間隔で3回投与し、最終投与6時間後に溶媒あるいはミノサイクリン（40 mg/kg）を投与した。この投与を1日2回（12時間間隔）7日間行なった。最終投与の翌日にかん流固定し、ドパミントランスポーターの免疫組織化学を行なった。

C. 研究結果

覚せい剤の繰り返し投与によって形成された逆耐性は、ミノサイクリン（40 mg/kg）の投与によって有意に軽減され、その効果はミノサイクリン最終投与14日後でも観察された（Figure 1A and 1B）。

さらに覚せい剤の繰り返し投与による脳内ドーパミン神経系への傷害（ドーパミントランスポーターの減少）は、ミノサイクリンの後投与（7日間の投与）によって有意に改善された（Figure 2）。

D. 考察

本研究より、ミノサイクリンは覚せい剤投与によって引き起こされた逆耐性や神経傷害を治療できる可能性が示唆された。ミノサイクリンは臨床的に使用されている安全な薬剤であるため、覚せい剤乱用による精神障害および神経傷害の治療薬として有用であると思われる。

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の高い薬剤である。本研究の結果より、ミノサイクリンは覚せい剤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。

[参考文献]

- 1). Zhang, L., Kitaichi, K., Fujimoto, Y., Nakayama, H., Shimizu, E., Iyo, M. and Hashimoto, K. (2006) Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1381-1393.
- 2). Hashimoto, K., Tsukada, H., Nishiyama, S., Fukumoto, D., Kakiuchi, T. and Iyo, M. (2007) Protective effects of minocycline on the

reduction of dopamine transporters in the striatum after administration of methamphetamine: A PET study in conscious monkeys. *Biol Psychiatry* in press.

- 3). Zhang, L., Shirayama, Y., Shimizu, E., Iyo, M. and Hashimoto, K. (2006) Protective effects of minocycline on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 544, 1-9.
- F. 研究発表
1. 論文発表
1. Zhang, L., Kitaichi, K., Fujimoto, Y., Nakayama, H., Shimizu, E., Iyo, M. and Hashimoto, K. (2006) Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1381-1393.
8. Zhang, L., Shirayama, Y., Shimizu, E., Iyo, M. and Hashimoto, K. (2006) Protective effects of minocycline on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 544, 1-9.
9. Hashimoto, K., Fujita, Y., Ishima, T., Hagiwara, H. and Iyo, M. (2006) Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of tropisetron: Role of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 553, 191-195.
10. 橋本謙二、藤田有子、伊豫雅臣（2006）Phencyclidine投与によるマウスの認知機能障害はfluvoxamineの亜慢性投与によって改善される：シグマ-1受容体の役割。臨床精神

薬理 9 : 2359-2370.

11. Shimizu, E., Watanabe, H., Kojima, T., Hagiwara, H., Fujisaki, M., Miyatake, R., Hashimoto, K. and Iyo, M. (2007) Combined intoxication with methylone and 5-MeO-MIPT. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 288-291.
12. Hashimoto, K., Fujita, Y. and Iyo, M. (2007) Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology* in press.
13. Hashimoto, K., Tsukada, H., Nishiyama, S., Fukumoto, D., Kakiuchi, T. and Iyo, M. (2007) Protective effects of minocycline on the reduction of dopamine transporters in the striatum after administration of methamphetamine: A PET study in conscious monkeys. *Biol. Psychiatry* in press.
14. Zhang, L., Shirayama, Y., Iyo, M. and Hashimoto, K. (2007) Minocycline attenuates hyperlocomotion and prepulse inhibition deficits in mice after administration of the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropsychopharmacology* in press.
15. Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Miyatake, R., Shirayama, Y., 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. (2007) Identification of functional polymorphisms in the promoter region of the human PICK1 gene and their association with methamphetamine psychosis. *Am. J. Psychiatry* in press.
2. 学会発表
1. Okamura, N., Reinscheid, R.K., Civelli, O., Ohgake, S., Iyo, M. and Hashimoto, K. : Protective effect of neuropeptide S on dizocilpine-induced psychosis and neurotoxicity. Sixth International Congress of Neuroendocrinology, Pittsburgh, Pennsylvania, June 19-22, 2006.
2. Hashimoto, K., Fujita, Y., Ishima, T., Chaki, S., and Iyo, M. : Phencyclidine-induced cognitive deficits are ameliorated by subsequent subchronic administration of glycine transporter-1 inhibitor and D-serine. The 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, GA, USA. October 14-18, 2006.
3. Zhang, L., Shirayama, Y., Iyo, M. and Hashimoto, K. : Minocycline attenuates hyperactivity and prepulse inhibition deficits in mice after administration of NMDA receptor antagonist dizocilpine. The 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, GA, USA. October 14-18, 2006.
4. Hagiwara, H., Iyo, M. and Hashimoto, K. : Protective effect of mithramycin on neurotoxicity in mice after repeated administration of methamphetamine. The 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, GA, USA. October 14-18, 2006.
5. Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Miyatake, R., Shirayama, Y., 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. : PICK1 polymorphisms and association with methamphetamine psychosis. The 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, GA, USA. October 14-18, 2006.
6. 萩原裕子、橋本謙二、伊豫雅臣 : 覚せい剤投与によるドーパミン神経障害に対するmithramycinの効果. 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（2006）

3. その他
特になし。

7. 萩原裕子、伊豫雅臣、橋本謙二：覚せい剤投与におけるドパミン神経傷害に対するmithramycinの効果. 第18回日本アルコール精神医学会・第9回ニコチン・薬物依存研究フォーラム・平成18年度合同学術総会（2006）

8. 張 琳、白山幸彦、清水栄司、伊豫雅臣、橋本謙二：合成麻薬MDMA投与による脳内セロトニン神経系およびドパミン神経系の傷害に対する抗生物質ミノサイクリンの保護作用. 第18回日本アルコール精神医学会・第9回ニコチン・薬物依存研究フォーラム・平成18年度合同学術総会（2006）

9. 松澤大輔、橋本謙二、宮武良輔、白山幸彦、清水栄司、前田和久、鈴木洋一、真下陽一、関根吉統、稲田俊也、尾崎紀夫、岩田仲生、原野睦夫、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、氏家 寛、羽田 明、澤 明、伊豫雅臣：PICK1遺伝子多型と覚せい剤乱用者との関連. 第18回日本アルコール精神医学会・第9回ニコチン・薬物依存研究フォーラム・平成18年度合同学術総会（2006）

10. 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、原野睦夫、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、氏家 寛、伊豫雅臣：覚せい剤精神病とGlutathione S-transferase P1, T1機能的遺伝子多型との関連. 第18回日本アルコール精神医学会・第9回ニコチン・薬物依存研究フォーラム・平成18年度合同学術総会（2006）

3. その他
無し

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。

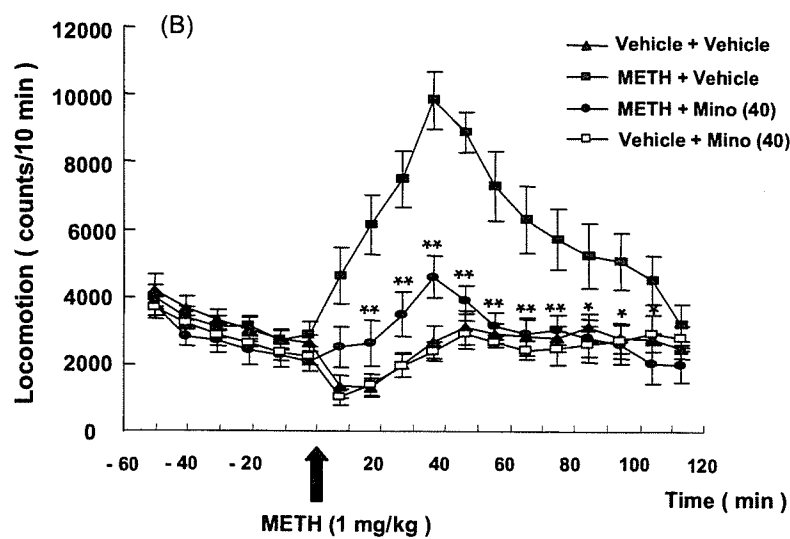
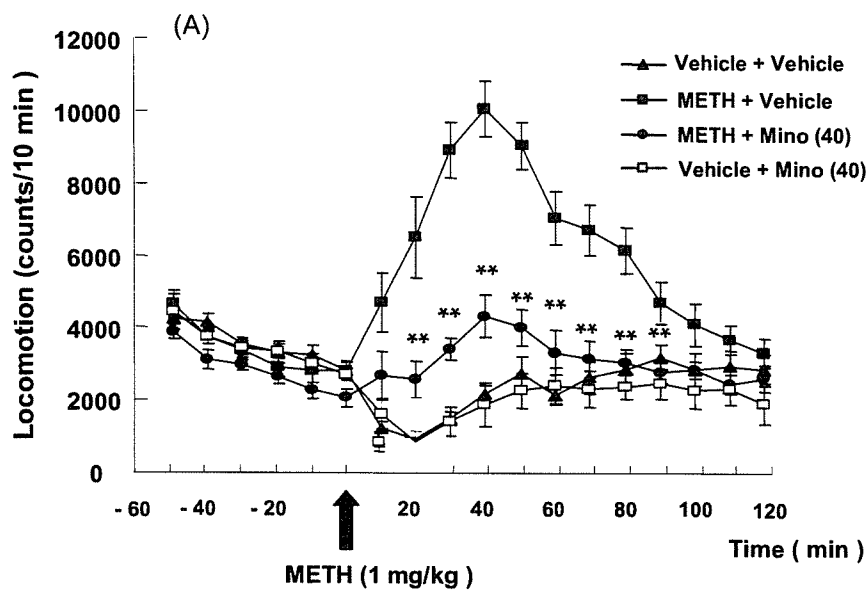


Figure 1. Methamphetamine-induced sensitization in mice is attenuated by subsequent subchronic administration of minocycline. Twenty four hours (A) and 14 days (B) after the final administration of minocycline (40 mg/kg/day for 14 days).

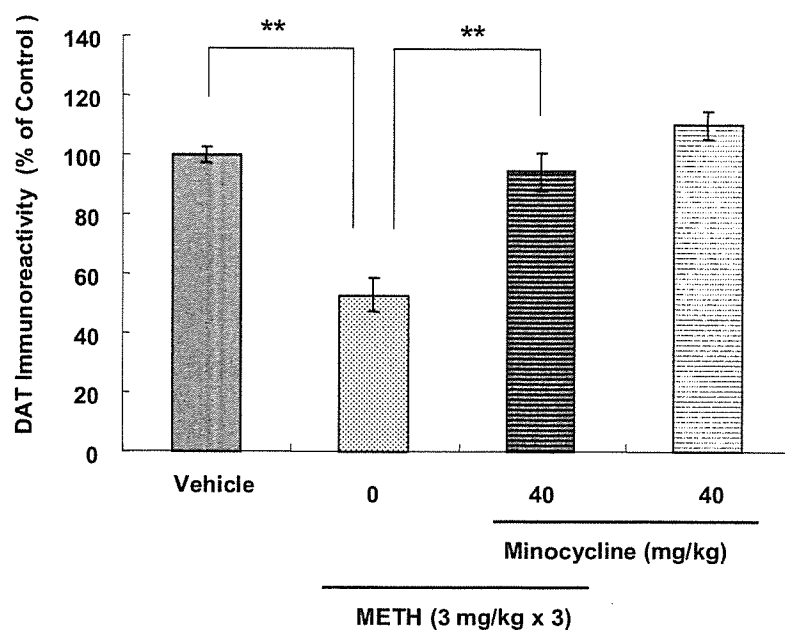


Figure 2. METH-induced neurotoxicity in mouse striatum is attenuated by subsequent subchronic administration of minocycline. Reduction of dopamine transporter (DAT) in mouse striatum by methamphetamine (3 mg/kg x 3, s.c.) was attenuated by subsequent repeated administration of minocycline (40 mg/kg/day for 7 days). In contrast, repeated administration of minocycline (40 mg/kg/day for 7 days) did not alter the density of DAT in mouse striatum.

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： メチロン（MDMA 類似誘導体）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]

メチロン(2-methylamino-1-[3,4-methylenedioxy-phenyl]propan-1-one)は麻薬として規制されている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の benzylic position がケトン基に修飾されたもので、違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として流通が確認されている。本研究では、メチロンの精神依存性および細胞毒性の評価を行い、MDMA 類似構造を有する化学物質の乱用危険度および毒性を推測する研究システムの構築を試みた。1) MDMA およびメチロンの行動解析：実験には ICR 系雄性マウスを使用した。MDMA の投与により、著明な運動促進作用が発現した。同様に、メチロンによっても用量依存的かつ著明な運動促進作用が発現した。この効果は、ドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 の前処置で有意に抑制された。メチロンは MDMA と同等の中枢興奮作用を有し、その効果の発現にはドパミン神経系が関与していることが明らかになった。薬物の精神依存形成能は、マウスを使用し conditioned place preference (CPP)法により報酬効果発現の有無を指標に評価した。MDMA およびメチロンの条件付けにより報酬効果が発現し、精神依存形成能を有することが確認された。また、メチロンの報酬効果は、ドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 の併用で有意に抑制された。2) 側坐核内ドパミン遊離に対する影響：メチロン (10 mg/kg)による側坐核内ドパミン遊離量を脳内透析法にて測定した。高速液体クロマトグラフ法に従い、ドパミン、ドパミン代謝産物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)および homovanilic acid (HVA)を測定した。脳内透析法により検討した結果、ドパミン遊離の有意な増加が確認された。メチロンの精神依存形成に中脳辺縁系ドパミン神経が関与しており、その主要投射先である側坐核内のドパミン遊離増加作用が重要であると考えられる。3) 薬物弁別試験：メチロンは MDMA と般化し、MDMA 類似の薬物刺激特性を有することが明らかとなった。メチロンは MDMA 同様の作用を有し、乱用される危険性が極めて高いものと危惧される。4) 細胞毒性の評価：ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とセロトニン系培養神経細胞 B65 細胞を用いて、メチロン添加 24 時間後の細胞毒性（LDH 放出量測定）を検討した。メチロン、MDMA の単独暴露により、いずれの細胞においても LDH 放出量の増加が認められた。本研究において、メチロンに着目して解析を行い MDMA の benzylic position がケトン基に修飾されても、MDMA と同等の精神依存性および毒性が発現することが明らかになった。したがって、MDMA 類似誘導体の構造において、この部分の構造修飾に希少差異があっても、MDMA と類似した効果を発現する危険性を有すると考えられる。CPP 法による依存性評価および培養細胞による毒性の評価は、迅速かつ効率的に科学的データを得ることが可能であり、違法ドラッグを規制薬物として指定するために有用な評価システムである。今後は、依存性薬物の化学構造および構造修飾に着目し、多くの化合物について、その薬物依存性と毒性発現の関連性についての検討が不可欠である。

A. 研究目的

覚せい剤などの薬物乱用は、依然として大きな

社会問題である。同様に、違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の乱用は、特に若年層を中心に浸透している。多くの違法ドラッグは、麻薬、覚

せい剤などの規制薬物の構造に酷似しており、僅少の構造差異のため「法的規制を受けない薬物」と称され、流通している。

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。その中でも麻薬として規制されている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) に構造が類似した 2-methylamino-1-[3,4-methylenedioxyphenyl]propan-1-one (メチロン) の流通が確認されており、現在最も爆発的な広がり懸念される違法ドラッグの 1 つである (Fig. 1)³⁾。メチロンは MDMA の β ケトン誘導体であり、通称“ミサイル、メチ、メシ”などとして錠剤や粉末で取引されている。

メチロンは MDMA と非常に構造が似ているため、MDMA 同様の依存形成能を有する可能性が考えられる。また、メチロン単独もしくは混入物質の有無などにより、さらに強力な精神依存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細胞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細胞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メチロンの精神依存性と細胞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) メチロンなどの MDMA 類似誘導体の乱用危険性を推測する動物研究、2) 細胞毒性の発現を評価する実験バッテリーの構築を試みた。また、3) 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。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：行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (20 - 25g) もしくは C57/BL6J 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

2-methylamino-1-[3,4-methylenedioxyphenyl]propan-1-one (メチロン) を使用した。

1. メチロンによる運動活性への影響

メチロン (5, 10mg/kg, i.p.) および MDMA (5 mg/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 (ACTIMO-100, バイオリサーチセンター社) を用いて測定した。5 時間の環境適応後、薬物投与から 120 分間にわたって運動量を測定した。また、メチロンにより誘発される行動変化に対するドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 もしくはドパミン D2 受容体拮抗薬 sulpiride 前処置の効果を検討した。

2. メチロンの精神依存性評価

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、メチロンを 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。また、メチロンとドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 もしくはドパミン D2 受容体拮抗薬 sulpiride 前処置の併用条件付けの影響も検討した。

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、溶媒ともに無処置）

3. メチロンのドパミン遊離に対する影響

メチロン (10 mg/kg) による側坐核⁴⁾内ドパミン遊離量をマイクロダイヤリシス法にて測定した。高速液体クロマトグラフ法に従い、ドパミン、ドパミン代謝産物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) および homovanilic acid (HVA) を測定した。

4. 薬物弁別試験

MDMA と生理食塩液の弁別訓練を行なった。薬物弁別の訓練は、C57/BL6J マウスを正常発育体重の 80% になるように摂餌制限下で行なった。マウス用 Five Hole Nose Poke operant chamber

(MED-NP5M-D1) を使用して、FR10 schedule で MDMA による訓練および薬物の般化試験を行った。

5. 培養神経細胞を利用した細胞毒性の評価

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)および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)を用いて、継代 48 時間後に実験を開始した。メチロン(最終濃度 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) および MDMA (最終濃度 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) 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。

C. 研究結果

1. メチロンによる運動活性への影響

メチロンにより用量依存的な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. 2)。また、メチロン 10 mg/kg で発現する運動促進作用は、ドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 により有意に抑制された(Fig. 3A)。一方、ドパミン D2 受容体拮抗薬 sulpiride 前処置では、高用量においてのみ、部分的な抑制が認められた(Fig. 3B)。

2. メチロンの精神依存性評価

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。メチロンの条件付けによって用量依存的な CPP の発現、すなわち報酬効果の発現が認められた(Fig. 4A)。メチロンによって発現する報酬効果はドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 の前処置により有意に抑制された(Fig. 4B)。一方、ドパミン D2 受容体拮抗薬 sulpiride 前処置では、有意な影響は認められなかった(Fig. 4B)。

3. メチロンのドパミン遊離に対する影響

メチロン(10 mg/kg) 投与により、側坐核内で有意なドパミン遊離増加が確認された。一方、代謝産物である DOPAC および HVA は有意な減少が認められた (Fig. 5)。

4. 薬物弁別試験

MDMA の弁別を獲得した動物において、メチロンの般化試験を行った。メチロンは用量依存的に、MDMA との般化 (MDMA 正反応率 80%以上) が認められた(Fig. 6)。メチロンは MDMA と類似

した薬物弁別刺激効果(自覚効果、中枢作用)を有することが判明した。

5. 培養神経細胞を利用した細胞毒性の評価

メチロンおよび MDMA 添加による LDH 放出の解析結果を Fig. 7 に示した。ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞にメチロンを添加したところ、1 mM まで細胞障害性の指標となる LDH 放出量は不変で、2 mM において有意な増加が認められた。MDMA 添加の場合、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した。セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞にメチロンを添加したところ、1 mM まで LDH 放出量は不変で、2 mM で LDH 放出量の有意な増加が認められた。MDMA 添加の場合、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した。メチロン添加では、ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞とセロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞ともに同等の毒性の発現が確認された(毒性発現強度: DA=5HT)。MDMA 添加では、ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞と比較してセロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞において、低濃度での毒性の発現が確認された(毒性発現強度: DA<5HT)。

D. 考察

違法ドラッグとして流通が確認されている MDMA 類似誘導体であるメチロンの薬理学的特性に関して検討した³⁾。メチロンの運動活性に対する効果を検討したところ、著しい運動促進作用が発現した。メチロンは強力な中枢興奮作用を示す事が明らかとなった。次に、メチロンの精神依存形成能を、マウス Conditioned place preference(CPP)法により評価した。メチロンの条件付けにより、用量依存的な報酬効果の発現が認められた。

メチロンによる運動促進作用と報酬効果の発現用量を比較すると、運動促進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確認された。したがって、メチロンなどの MDMA 類似誘導体において、中枢興奮作用(運動促進作用)の発現用量を参考に、CPP 試験を行うことにより、効率良く精神依存性を評価できると考えられる⁵⁾。

現在までに、依存性薬物による中枢興奮作用の発現および精神依存形成には中脳辺縁系ドパミン神経系の関与が示されている^{6,7)}。そこで、メチ

ロンによる中枢興奮作用の発現および精神依存形成におけるドパミン神経系の役割を検討した。メチロンの運動促進作用発現におけるドパミン受容体の役割を解析した結果、メチロンはドパミン D1 受容体を介して作用を発現することが明らかになった。同様に、メチロン報酬効果の発現は、ドパミン受容体拮抗薬併用により、有意に抑制された。したがって、メチロンの精神依存形成には、ドパミン D1 受容体が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、メチロン投与により側坐核においてドパミン遊離は増加した。本研究より、メチロンの中枢興奮作用の発現および精神依存形成には、側坐核でのドパミン遊離増加が関与しており、それに伴うドパミン D1 受容体への作用が重要であると考えられる。したがって、メチロンなどの MDMA 類似誘導体は、覚せい剤やコカインなどの依存性薬物と同様に、中脳辺縁系ドパミン神経系に作用を及ぼし、精神依存形成を引き起こす危険性が示唆された。側坐核内でのドパミン遊離の増加は、物質の乱用危険度を推測する脳内の生化学的マーカーとして有用であると考えられる。

本研究では、薬物弁別試験により、メチロンと MDMA の弁別刺激効果の類似性について検討した。MDMA と生理食塩液の弁別を獲得した動物において、メチロンは MDMA と般化が認められた。したがって、メチロンは MDMA と類似した弁別刺激効果を有することが判明した。メチロンは、MDMA と類似した自覚効果（中枢神経作用）を有する可能性が示唆された。メチロンは MDMA の β ケトン誘導体であり、MDMA の β ケトン化部分以外の構造部位が、MDMA 同様の中枢作用の発現に関わる可能性がある。多数の MDMA 類似誘導体の効果を、迅速に評価するために有用な評価方法である。

メチロンと MDMA の毒性発現について、培養細胞により比較検討した。ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞およびセロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞において、メチロンおよび MDMA の添加により、LDH 放出が惹起され、細胞障害の発現が確認された。ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞およびセロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞に対する LDH 放出量の比較をすると、メチロン < MDMA であり、MDMA が強力な細胞毒性を惹起する危険性を有することが判明した。メチロンは MDMA の β ケトン誘導体であり、MDMA の β ケトン化された構造部分が細胞障害発生に関わるものと推察された。一方、メチロン添加では、ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細

胞とセロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞ともに同等の毒性の発現が確認された(毒性発現強度：DA=5HT)。MDMA 添加では、ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞と比較してセロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞において、低濃度での毒性の発現が確認された(毒性発現強度：DA<5HT)。したがって、メチロンの β ケトン化部位が、セロトニン神経系に対する選択制も制御している可能性が示唆された。今後、MDMA 類似誘導体における当該構造部位に着目し、細胞毒性発現の強度を比較することは重要である。

以上の結果から、メチロンは中枢興奮作用および精神依存形成能を有することが明らかとなった。メチロンの中枢興奮作用の発現および精神依存形成には、側坐核でのドパミン遊離増加が関与しており、それに伴うドパミン D1 受容体への作用が重要であると考えられる。したがって、メチロンなどの MDMA 類似誘導体は、他の依存性薬物と同様に、中脳辺縁系ドパミン神経系に作用を及ぼし、精神依存形成を引き起こす危険性が示唆された。一方、メチロンの細胞毒性の発現は MDMA と比較して弱いものの、細胞障害を惹起する可能性が明らかになった。

これらの結果から、メチロンを乱用すると精神依存を形成する危険性が極めて高いことが明らかになった。また、メチロンの乱用は細胞毒性をもたらす、重大な健康被害が発生する危険性があると考えられる。

E. 結論

メチロンの行動解析から、MDMA 類似誘導体の精神依存形成能の評価においては、中枢興奮作用の発現用量を参考に CPP 試験を行うことにより、効率良く被検物質の精神依存性を評価できると考えられる。MDMA 類似誘導体においては、被検薬物の側坐核内のドパミン遊離の増加作用が乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして利用できると考えられる。また、薬物弁別試験法は、MDMA 類似誘導体の様に、わずかな構造差異に基づく薬物依存性の予測には極めて有効であると考えられる。被検薬物の構造を吟味し、標準とする依存性薬物を慎重に選択する必要がある。薬物の細胞毒性発現の有無については、培養細胞を利用する方法は、迅速かつ正確な評価が可能であり有用性である。

こうした評価システムにより、国内で流通が確

認されている違法ドラッグの精神依存性および細胞毒性の検討を行い、危険化合物の迅速な発見に活用できると考えられる。また、将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し、規制薬物指定への早期の対策に有用であると考えられる。

[参考文献]

- 1) Drug Enforcement Administration, Department of Justice. Schedules of controlled substances: temporary placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine into Schedule I. Final rule. Fed Regist. 68: 16427-16430, 2003.
- 2) De Boer, D., Bosman, I.: A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. Pharmacy World and Science. 26: 110-113, 2004.
- 3) Bossong M.G., Van Dijk J.P., Niesink R.J.M.: Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? Addiction Biology 10: 321-323, 2005.
- 4) Franklin K.B.J., Paxinos G.: The mouse brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego 1997.
- 5) 船田 正彦: 条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価: 基礎と応用. 日本薬理学雑誌 126: 10-16, 2005.
- 6) Pierce R.C., Kalivas P.W.: A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. Brain Res Brain Res Rev, 25: 192-216, 1997.
- 7) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. Drug Alcohol Depend, 51: 141-153, 1998.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦、佐藤美緒、青尾直也、和田清. トルエン精神依存形成における脳内モノアミン神経系の役割. 日本アルコール・薬物医学学会雑誌 41(1):31-38 (2006).
- 2) Narimatsu S, Yonemoto R, Saito K, Takaya K, Kumamoto T, Ishikawa T, Asanuma M, Funada M, Kiryu K, Naito S, Yoshida Y, Yamamoto S,

Hanioka N. Oxidative metabolism of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. Biochem Pharmacol. 71(9): 1377-1385 (2006).

- 3) Sogawa C, Sogawa N, Tagawa J, Fujino A, Ohyama K, Asanuma M, Funada M, Kitayama S. 5-Methoxy-N, N-diisopropyltryptamine (Foxy), a selective and high affinity inhibitor of serotonin transporter. Toxicology Letters (in press).

2. 学会発表

- 1) 船田正彦、青尾直也、和田清. メチロンの行動変化におけるドパミン神経系の役割. 第36回日本神経精神薬理学会. 名古屋 9月14-16日 (2006).
- 2) 青尾直也、和田清、船田正彦. 新規デザイナードラッグ“メチロン”の行動変化と神経毒性に関する研究. 日本薬学会. 生体機能と創薬シンポジウム. 福岡 9月8-9日 (2006).

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

なし。

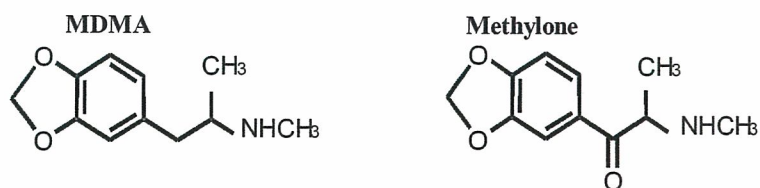


Fig.1. Chemical structures of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 2-methylamino-1-[3,4-methylenedioxyphenyl]propan-1-one (methylone).

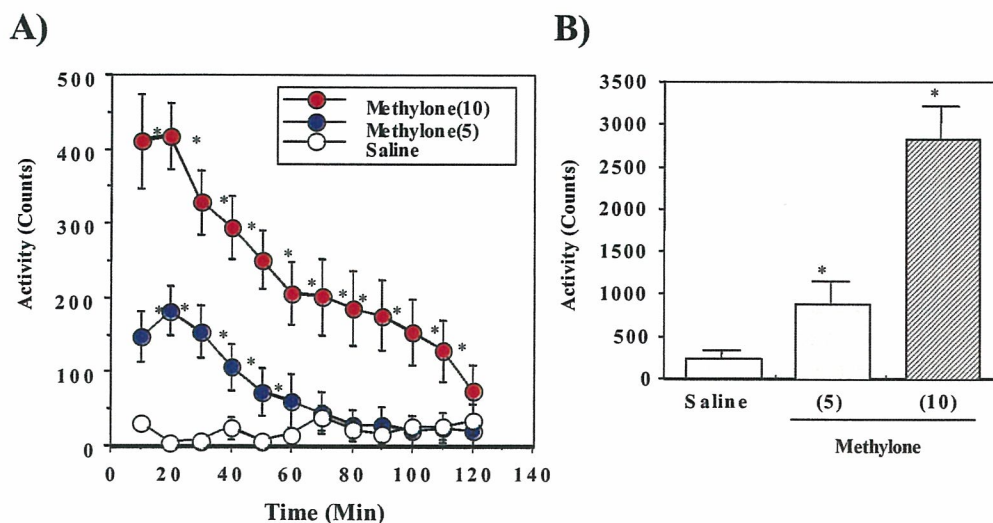


Fig. 2. Effect of acute treatment with methylone on the locomotor activity in mice. A) Time course changes in methylone-induced hyperlocomotion. Each plot represents the mean locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals. B) Total locomotor activity changes after acute administration of methylone in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 120 min after drug treatment. * $P < 0.05$ vs. saline-treated group.

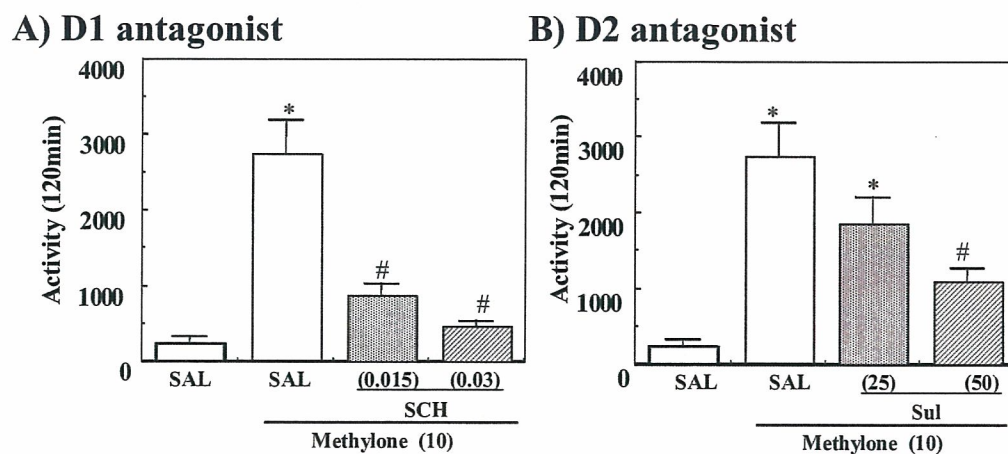


Fig. 3. Effect of pretreatment with the dopamine antagonist on methylone-induced hyperlocomotion in mice. A) SCH23390 (SCH) was administered 10 min before treatment of methylone. B) Sulpiride (Sul) was administered 10 min before treatment of methylone. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 10-14 animals for 120 min after drug treatment. * $P < 0.05$ vs. SAL (saline) group. # $P < 0.05$ vs. SAL (saline)-Methylone group.

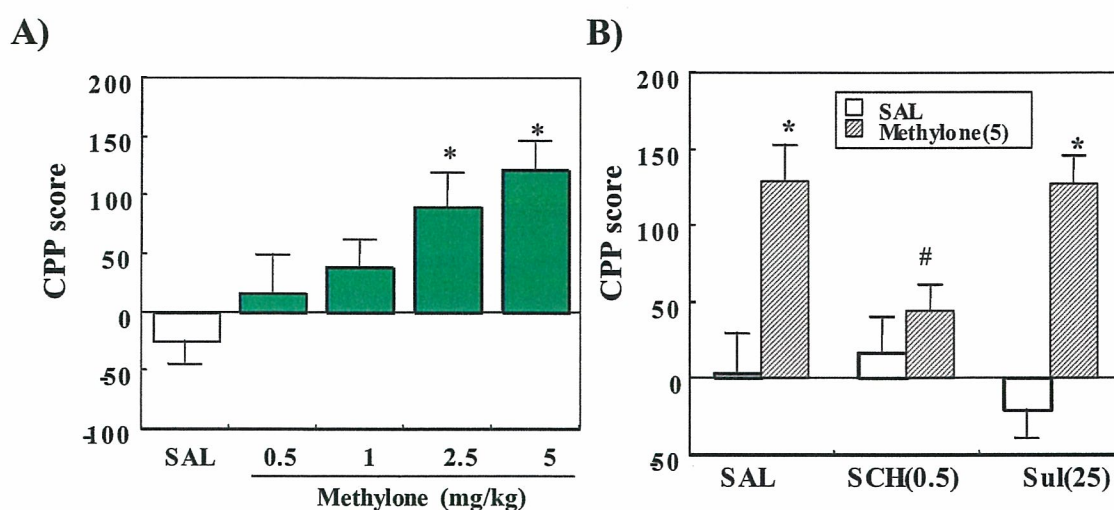


Fig. 4. A) Place conditioning produced by methylone (0.5-5 mg/kg, i.p.) in mice. Conditioning sessions (3 for drug; 3 for saline) were conducted. On day 7, test of conditioning was performed. Conditioning scores (CPP score) represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the saline-paired place. B) Effect of pretreatment with the dopamine antagonist on the place conditioning by methylone in mice. For antagonist study, SCH23990 (SCH) or sulpiride (Sul) was administered 10 min before treatment of methylone. Each column represents the mean with S.E.M. of 10 - 14 animals. * $P < 0.05$ vs. SAL (saline) group. # $P < 0.05$ vs. SAL (saline)-Methylone group.

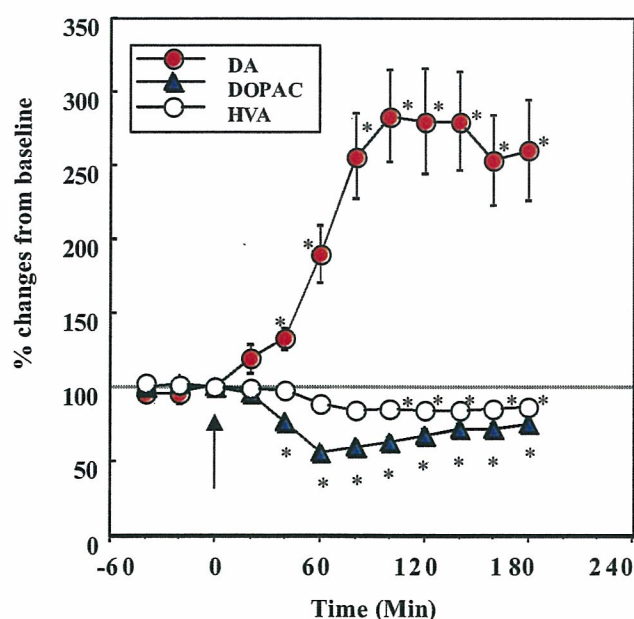


Fig. 5. Effect of methylone on the level of dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanilic acid (HVA) in the dialysate of the nucleus accumbens. Mice were treated with methylone (10 mg/kg, i.p., arrow). Each plot represents the mean with S.E.M. of 10 animals. * $P < 0.05$ vs. basal level.

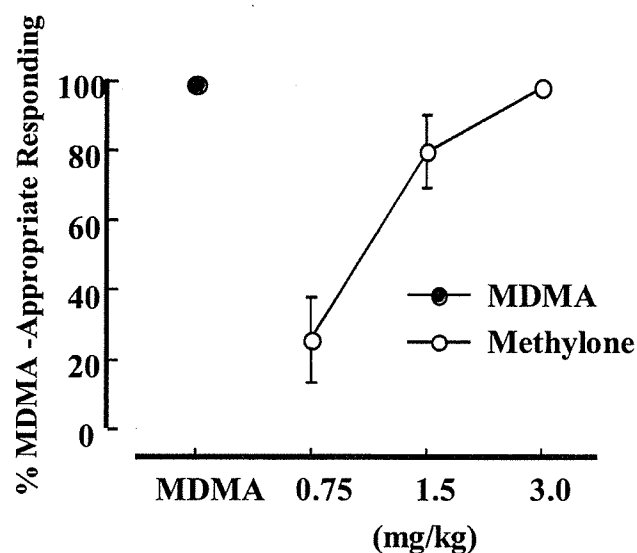


Fig. 6. Effect of methylnone in mice trained to discriminate 3.0 mg/kg MDMA from saline. The percentage of MDMA-appropriate responding is shown as a function dose during substitution test session. Each plot represents the mean $\pm$ SEM of 10 animals.

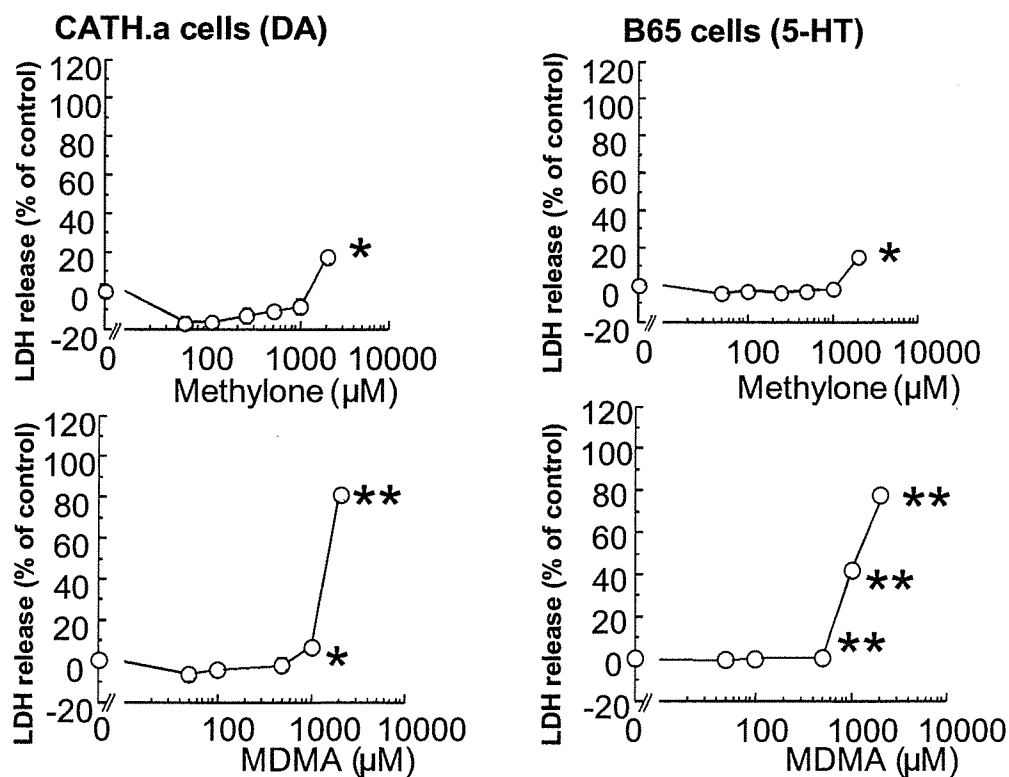


Fig. 7. Changes in released LDH from CATH.a cells or B65 cells after exposure to methylnone or MDMA for 24 hours. Each value mean $\pm$ SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. * P <0.05, ** P <0.01 vs. control group.

覚醒剤および MDMA による依存形成におけるヒスタミン H3 受容体の役割

分担研究者：谷内一彦

研究協力者：奥田友宏、加藤元久、岡村信行、倉増敦朗、櫻井映子、渡邊建彦

東北大学大学院医学系研究科・機能薬理学分野

[研究要旨]

【背景と目的】中枢ヒスタミン神経には様々な機能があり、大きく興奮性作用と抑制性作用に分けることができる。興奮性作用には覚醒の維持、認知機能などがあり、抑制性作用には摂食、痙攣、ストレスなどに対する抑制が考えられている。中枢ヒスタミン神経の機能に関する研究は第一世代抗ヒスタミン薬を用いた古典的行動薬理学を中心に発展してきたが、近年新しく開発されたヒスタミン H3 受容体遺伝子欠損マウスを用いてヒスタミン神経の抑制性作用を検討した。【対象と方法】動物はヒスタミン H3 受容体遺伝子欠損マウスを用い、薬剤にはメタンフェタミンと 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)を用いた。行動は自発運動量と Conditioned Place Preference による薬物の嗜好性で評価した。さらに、Caudate putamen と Nucleus accumbens における c-Fos タンパク質の発現を調べた。【結果】ヒスタミン H3 受容体欠損マウスはメタンフェタミンを急性投与した時だけ野生型マウスと比べて運動量が少なく、慢性投与による運動量の増加（逆耐性現象）は野生型マウスと有意差がなかった。Conditioned Place Preference の結果もヒスタミン H3 受容体欠損マウスと野生型マウスの間に有意差はなかった。一方、MDMA では CPP には有意差はなかったが、慢性投与後の運動量はヒスタミン H3 受容体欠損マウスの方が野生型マウスより有意に少なかった。【考察】ヒスタミン H3 受容体欠損マウスではヒスタミンの遊離に抑制がかからないため遊離が亢進していると考えられるが、メタンフェタミンによる逆耐性現象も依存形成も抑制されなかった。ただ、ヒスタミン H3 受容体欠損マウスではメタンフェタミン急性投与による運動量は減少しており、中枢ヒスタミン神経が急性効果に対しては抑制作用を示す可能性が示唆された。一方、MDMA の慢性投与による効果に対しては抑制する可能性があることから、中枢ヒスタミン神経がセロトニン神経に対して、より強い抑制作用を持つ可能性が示唆された。【まとめ】本研究では中枢ヒスタミン神経の抑制性作用について新たに開発されたヒスタミン H3 受容体欠損マウスを用いて検討した。ヒスタミン神経の覚醒剤による逆耐性や依存形成に対する抑制作用については、依然として不明な点が多く、更なる研究が必要であると考えられた。

A. 研究目的

ヒスタミンには H1、H2、H3、H4 の 4 つの受容体が同定されており、このうち H1、H2、H3 受容体の 3 つが中枢神経系に発現していることがわか

っている。ヒスタミン H3 受容体は Gi タンパク質と共役し、自己受容体としてヒスタミン自身の遊離を抑制するだけでなく¹⁾、ヘテロ受容体として他の神経伝達物質の遊離も抑制することがわか

っている²⁾。ヘテロ受容体によって遊離が抑制される神経伝達物質にはドパミン³⁾、セロトニン⁴⁻⁶⁾、GABA⁷⁾、グルタミン酸⁸⁾ などがある。生体内において自己受容体とヘテロ受容体のどちらが優位に作用しているかについての報告はないが、中枢ヒスタミン神経にドパミン神経に対する抑制作用があると仮定すると、自己受容体の欠損によってヒスタミンの遊離は亢進すると考えられるので、中枢ヒスタミン神経によるドパミン神経の抑制作用が強く発現すると考えられる。逆にヘテロ受容体の欠損によってドパミンの遊離が亢進するのでドパミン神経の作用が増強すると考えられる。ヒスタミン H3 受容体拮抗薬であるチオペラマイド (thioperamide) を用いた研究によると、チオペラマイドはマウスにおいてアンフェタミンによる過剰運動を抑制する⁹⁾、ラットにおいてメタンフェタミンの自己投与を促進する^{10, 11)}、マウスにおいてコカイン報酬効果を増強する¹²⁾ ことが報告されている。今年度は、メタンフェタミンによって惹起される影響についてヒスタミン H3 受容体ノックアウトマウスを用いて測定し、ヒスタミン H3 受容体欠損がどのような影響をもたらすか検討した。

B. 1 動物

本研究ではヒスタミン H3KO マウス (T. Lovenberg 博士より供与) とその野生型マウス (WT, C57BL/6J) を使用した。マウスの週齢はおよそ 12 週齢であった。マウスは 1 ケージ当り 4~5 匹、室温は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は $50 \pm 10\%$ 、12 時間毎の自動照明の環境で飼育した。餌と水は行動実験中以外は自由に摂取できるようにした。行動実験は 9 時から 18 時の間で行い、すべての実験は東北大学動物実験委員会の承諾を得て行った。本研究は NIH の実験動物使用ガイドラインに基づいて行った。

2 行動実験

(1) 運動量測定

運動量は赤外線センサーシステム (SUPER-MEX[®], Muromachi-Kikai, Tokyo, Japan) を用いて測定した。これは幅 40 cm、長さ 50 cm、高さ 35 cm に仕切られたそれぞれの区分に赤外線センサーが取り付けられており、動物から放射される熱エネルギーを感知し、運動量を測定する装置である。運動量は薬物投与後 3 時間測定した。初日 (day 0) に生理食塩水を投与して基礎運動量を測定、翌日からメタンフェタミン 1 mg/kg 又は 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) 5 mg/kg を 7 日間連続投与して 1 日目 (day 1)、4 日目 (day 4)、7 日目 (day 7) に運動量を測定した。

(2) Conditioned place preference (CPP)

CPP はコロンバス社製 CPP 測定装置を用いて行った。測定箱はアクリル製で中央のギロチンドアによって 2 つの区域 (21 x 20 x 20 cm) に区切られ、半分は黒色、もう半分は白色で出来ている。測定の際、マウスは箱の中央に置いて実験を開始した。測定箱の底部にはマウスの動きを測定する水平センサーが取り付けられている。実験はコンディショニング前 (day 1, 2)、コンディショニング (day 3-10)、コンディショニング後 (day 11) に分けることができる。1 日目は測定箱を区切るのギロチンドアを取り除いて 20 分間自由に箱内を探索させ、2 日目にコンディショニング前の測定を行った。コンディショニング前のデータからヒスタミン H3KO マウスと野生型マウスの双方とも、黒領域に嗜好性をしめした。ヒスタミン H3KO マウスは白領域に 410 ± 23 秒、黒領域に 853 ± 23 秒滞在し、野生型マウスは白領域に 413 ± 27