

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。

本研究から、4FMP および PMMA は覚せい剤と類似した作用を発現する可能性があり、乱用される危険性が極めて高く、麻薬などの規制薬物として指定する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Drug Enforcement Administration, Department of Justice. Schedules of controlled substances: temporary placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine into Schedule I. Final rule. Fed Regist. 68: 16427-1630, 2003.
- 2) 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) Rösner P, Quednow B, Girreser U, Junge T.: Isomeric fluoro-methoxy-phenylalkylamines: a new series of controlled-substance analogues (designer drugs). *Forensic Sci Int*. 148: 143-156. 2005.
- 4) Glennon RA, Ismaiel AE, Martin B, Poff D, Sutton M.: A preliminary behavioral investigation of PMMA, the 4-methoxy analog of methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 31: 9-13, 1988.
- 5) Franklin K.B.J., Paxinos G.: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego 1997.
- 6) 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.

- 7) 船田正彦: MDMA および 5-MeO-DIPT 精神依存性評価とその形成メカニズムの解明. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」 研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P4-14, 2004
- 8) 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.
- 9) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*, 51: 141-153, 1998.
- 10) Broderick P.A., Phelix C.F.: I. Serotonin (5-HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior. II. basis for 5-HT-DA interaction in cocaine dysfunctional behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 21: 227-260. 1997.
- 11) White F.J.: Cocaine and the serotonin saga. *Nature*. 393: 118-119. 1998.

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 船田正彦: 違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ). *日薬理誌*. 130: 433-435. 2007.
 - 2) 船田正彦、青尾直也: 薬物依存性の評価法-条件付け場所嗜好性試験を中心に-. *日薬理誌*. 130: 128-133. 2007.
 - 3) Sogawa C, Sogawa N, Tagawa J, Fujino A, Ohyama K, Asanuma M, Funada M, Kitayama S.: 5-Methoxy-N,N-diisopropyl-

tryptamine (Foxy), a selective and high affinity inhibitor of serotonin transporter. Toxicol Lett. 170(1): 75-82. 2007.

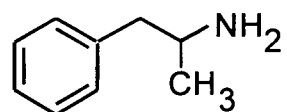
- 4) 船田正彦、青尾直也、和田清：有機溶剤による精神依存形成メカニズム。日本神経精神薬理学雑誌 28: 7-10, 2008.

2. 学会発表

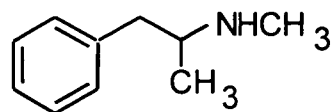
- 1) 船田正彦、青尾直也、浅沼幹人、宮崎育子、花尻（木倉）瑠理、合田幸広、和田清：違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の精神依存性および神経毒性：フェネチルアミン誘導体の評価。第42回日本アルコール薬物・医学会総会。大津。9月28日。2007.
- 2) 船田正彦：有機溶剤による精神依存形成メカニズムの解明-治療薬の可能性について-。第37回日本神経精神薬理学会 札幌 7月11-13日。2007.
- 3) 青尾直也、和田清、船田正彦：フェネチルアミン誘導体の弁別刺激特性。第37回日本神経精神薬理学会 札幌 7月11-13日。2007.
- 4) 船田正彦：違法ドラッグの精神依存性及び神経毒性の評価。第50回日本薬学会 関東支部会 東京 10月6日。2007.
- 5) Funada M., Aoo N., Wada K.: Influence of repeated inhalation of toluene on methamphetamine-induced behavioral changes in mice. College on problems of drug dependence (CPDD) 69th Annual scientific meeting, Quebec City, Canada June 16-21 (2007).

H. 知的財産権の出願・登録状況

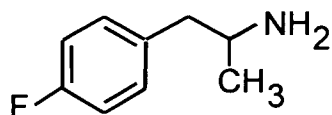
特許取得、実用新案登録、その他特になし。



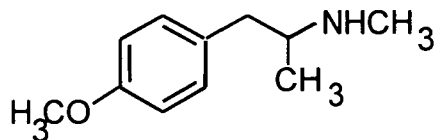
Amphetamine



Methamphetamine



4-Fluoroamphetamine



4-Methoxymethamphetamine

Fig. 1. Chemical structures of amphetamine, methamphetamine, 4-fluoroamphetamine (4FMP) and 4-methoxymethamphetamine (PMMA).

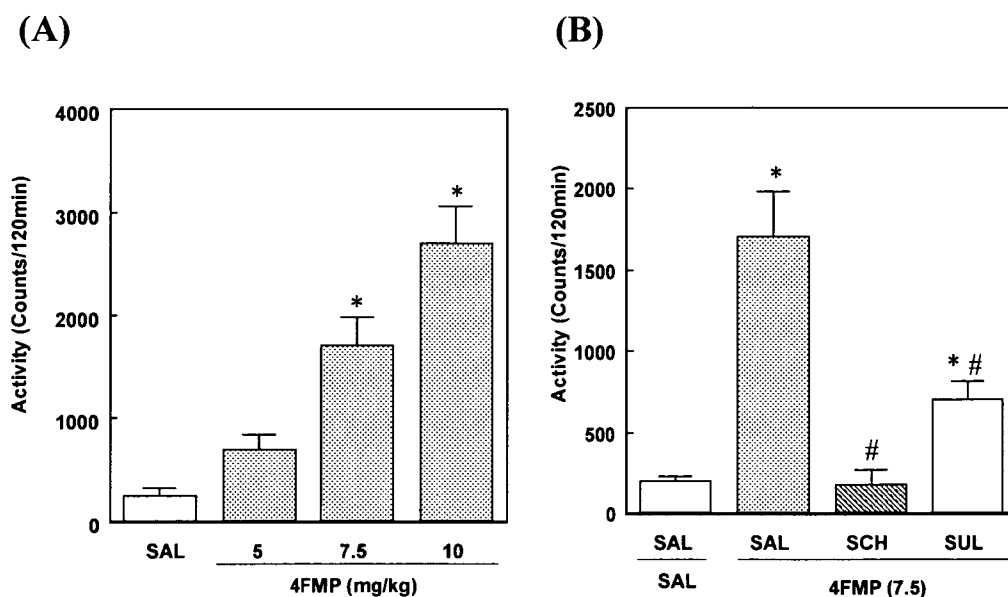


Fig. 2. (A) Effect of acute treatment with 4-fluoroamphetamine (4FMP) on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of 4FMP (5-10 mg/kg, i.p.) in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 12-14 animals for 120 min after drug treatment. (B) Effect of pretreatment with a dopamine D1 receptor antagonists SCH23390 (SCH) or a dopamine D2/3 receptor antagonists sulpiride (SUL) on the 4FMP-induced hyperlocomotion in mice. For antagonist study, SCH (0.03 mg/kg) or SUL (50 mg/kg) was administered 10 min before treatment of 4FMP (7.5 mg/kg). Each column represents the mean with S.E.M. of 10 - 12 animals.

(A) * $P < 0.05$ vs. saline (SAL)-treated group. (B) * $P < 0.05$ vs. saline (SAL)-SAL-treated group. # $P < 0.05$ vs. saline (SAL)- 4FMP-treated group.

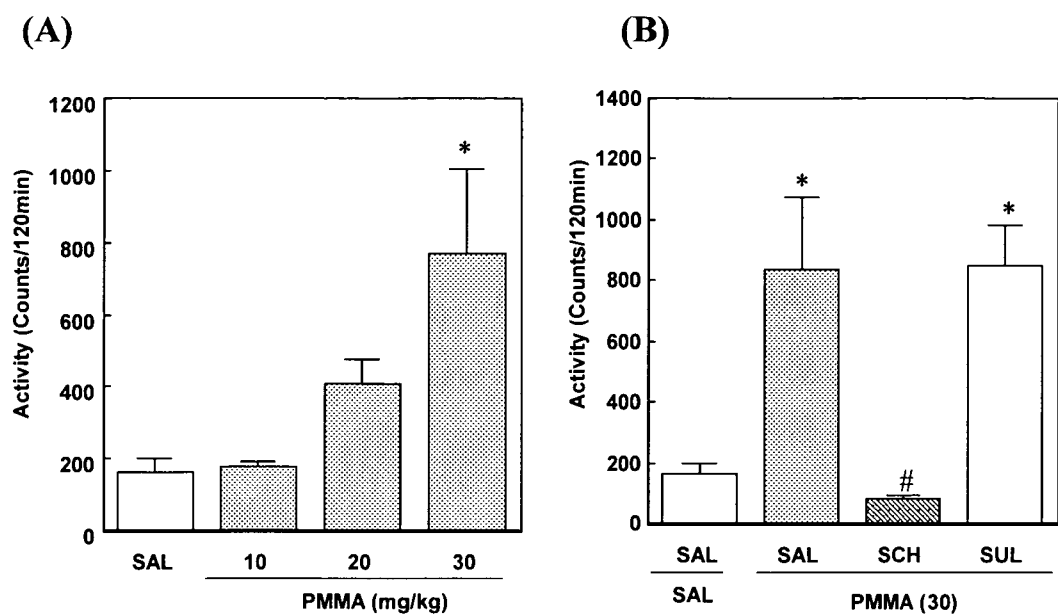


Fig. 3. (A) Effect of acute treatment with 4-methoxymethamphetamine (PMMA) on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of PMMA (10-30 mg/kg, i.p.) in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 12-14 animals for 120 min after drug treatment. (B) Effect of pretreatment with a dopamine D1 receptor antagonists SCH23390 (SCH) or a dopamine D2/3 receptor antagonists sulpiride (SUL) on the PMMA-induced hyperlocomotion in mice. For antagonist study, SCH (0.03 mg/kg) or SUL (50 mg/kg) was administered 10 min before treatment of PMMA (30 mg/kg). Each column represents the mean with S.E.M. of 10 - 12 animals.

(A) * $P < 0.05$ vs. saline (SAL)-treated group. (B) * $P < 0.05$ vs. saline (SAL)-SAL-treated group. # $P < 0.05$ vs. saline (SAL)- PMMA-treated group.

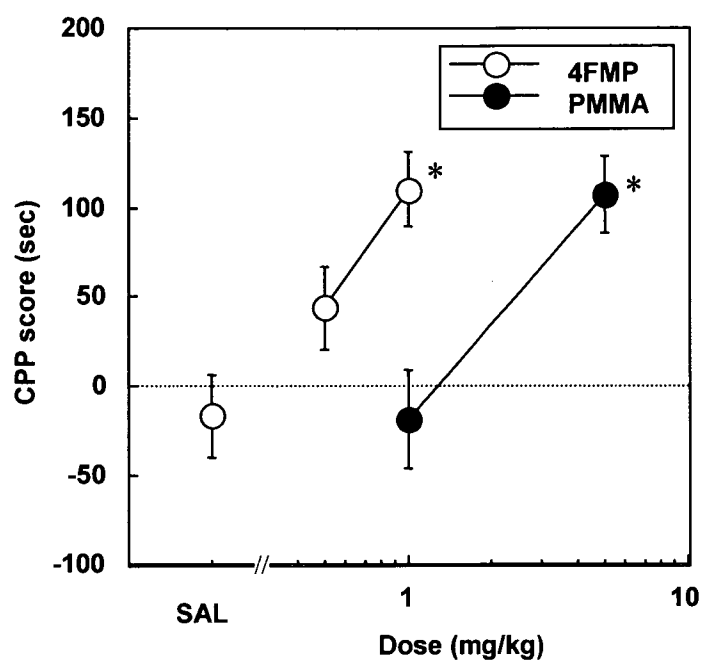
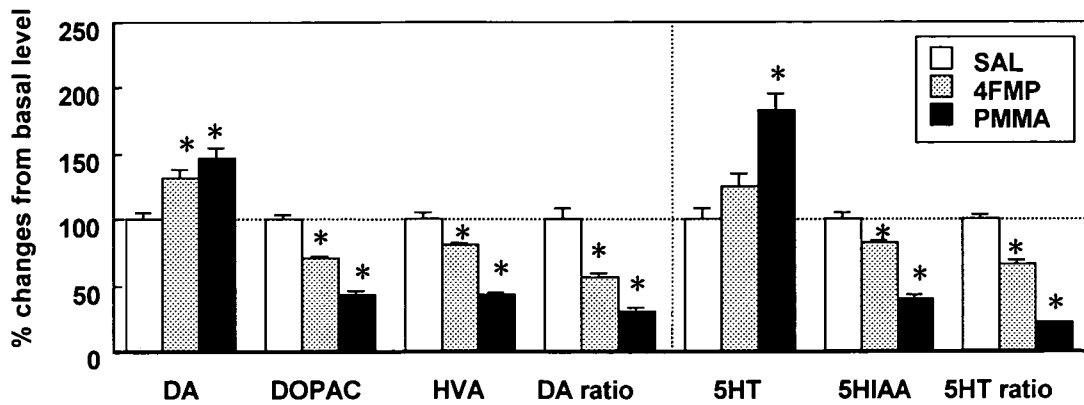


Fig. 4. Effects of 4-fluoroamphetamine (4FMP) or 4-methoxymethamphetamine (PMMA) on place conditioning in mice. Place conditioning produced by 4FMP or PMMA. Conditioning sessions (3 for drug; 3 for saline) were conducted. On day 7, test of conditioning was performed. Conditioning scores (CPP score) represent 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 11 - 16 animals.
 *P<0.05 vs. saline (SAL)-treated group.

A) Limbic forebrain



B) Midbrain

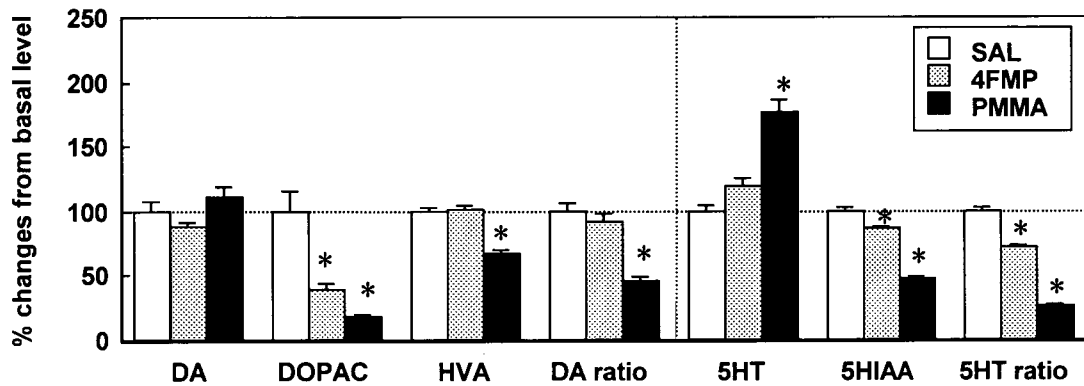


Fig. 5. Effects of 4-fluoroamphetamine (4FMP) or 4-methoxymethamphetamine (PMMA) on monoamine levels in the mouse limbic forebrain (A) and midbrain (B). Mice were sacrificed 30 min after 4FMP (10 mg/kg, i.p.) or PMMA (10 mg/kg, i.p.) injection. The concentration of monoamines (dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)) were analyzed using a HPLC system. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals. DA ratio=(DOPAC+HVA)/DA, 5HT ratio=5HIAA/5HT. *P<0.05 vs. saline (SAL)-treated group.

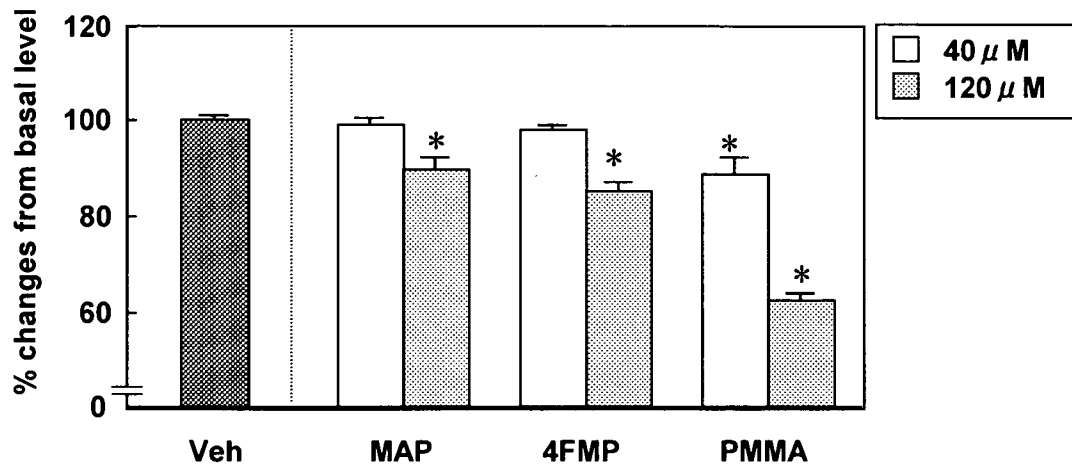


Fig. 6. Effects of 4-fluoroamphetamine (4FMP) or 4-methoxymethamphetamine (PMMA) on monoamine oxidase activity in the mouse limbic forebrain. Each reaction contained 1mM *p*-tyramine as the substrate and incubated for 60 min after 4FMP (40 and 120 μ M) or PMMA treatment. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals.

*P<0.05 vs. vehicle (Veh)-treated group.

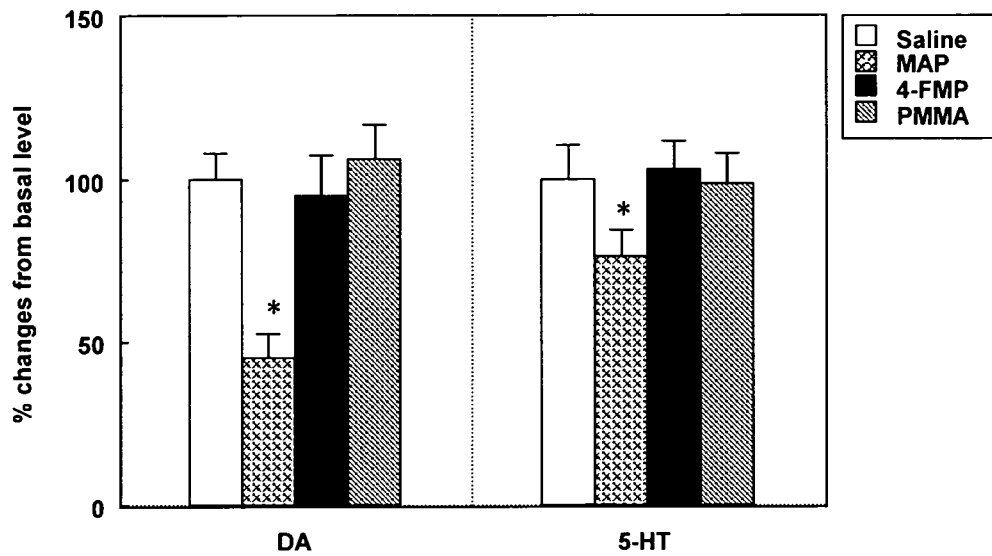


Fig. 7. Effects of treatment with methamphetamine (MAP), 4-fluoroamphetamine (4FMP) or 4-methoxymethamphetamine (PMMA) on monoamine levels in the striatum. Mice received three injections of each drug (15 mg/kg, i.p.) or saline at 3-h intervals. Mice were sacrificed 3 days after drug treatment. The contents of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) were analyzed. Each column represents the mean with S.E.M. of 6-8 animals.

*P<0.05 vs. saline-treated group.

分担研究報告書

違法ドラッグの薬物弁別刺激特性：覚せい剤類似化合物の評価

分担研究者：青尾直也（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

研究協力者：船田正彦（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

覚せい剤である methamphetamine (MAP) とその化学構造が類似した違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）4-fluoroamphetamine (4FMP)、4-methoxymethamphetamine (PMMA) の流通が確認されている。本研究では、違法ドラッグの依存性評価法の一環として薬物弁別実験を用いて MAP と違法ドラッグである 4FMP、PMMA の自覚効果（薬理効果）の類似性を評価した。1) MAP を用いた薬物弁別実験の確立：MAP (1.0 mg/kg) の FR10 スケジュールによる訓練で用量依存的に弁別刺激効果が認められたことから、MAP を標準薬とした薬物弁別実験を行う際の訓練条件が明らかになった。2) MAP 訓練動物における 4FMP、PMMA の般化試験：MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、4FMP、PMMA の般化試験を行った結果、4FMP は般化が認められた。一方、PMMA は MAP に最大 50% 程度の般化が認められた。このことから、4FMP は MAP と類似した自覚効果（薬理効果）を有することが明らかになった。一方、PMMA は部分的に類似した自覚効果（薬理効果）を有していると考えられる。

本研究では、覚せい剤である MAP を標準薬とした薬物弁別実験を行う際の訓練条件が明らかになった。さらに、違法ドラッグである 4FMP は MAP と類似した自覚効果（薬理効果）、PMMA は部分的に類似した自覚効果（薬理効果）を有していることを明らかにした。MAP を標準薬（訓練薬）とした薬物弁別試験は、MAP 類似構造を有する違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の評価に有効である。

A. 研究目的

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¹⁾。国内では覚せい剤である methamphetamine (MAP) に類似した違法ドラッグ 4-fluoroamphetamine (4FMP)、4-methoxymethamphetamine (PMMA) の流通が確認されている。

依存性薬物の評価は条件付け場所嗜好性試験法²⁾、自己投与試験法³⁾など、様々な行動

薬理学的研究により検討されている。薬物弁別試験法は、薬物が有する自覚効果を評価する手法である⁴⁾。一方、現在までマウスを用いた薬物弁別試験法の報告は少なく、遺伝子改変マウスなどモデル動物が多いことから、マウスを使用した薬物弁別試験法の確立は重要である。この手法を用いて、既に規制されている薬物の自覚効果（薬理効果）と違法ドラッグの自覚効果（薬理効果）の類似性を評価することが可能である。この薬物弁別試験法は簡易かつ迅速に薬物の自覚効果を評価できるため、数多い違法ドラッグの特性を解析

するために有用な方法であると考えられる⁵⁾。

本研究では、規制薬物である MAP を訓練薬物として用いた薬物弁別実験の確立を行い、MAP と違法ドラッグである 4FMP および PMMA の自覚効果（薬理効果）の類似性を評価した。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、C57BL/6J マウス (Jcl、20–25g、日本クレア) を使用した。

使用薬物：規制薬物は methamphetamine (MAP)、違法ドラッグとしては、MAP 類似の誘導体である 4-fluoroamphetamine (4FMP)、4-methoxymethamphetamine (PMMA) を使用した。

1. MAP を用いた薬物弁別実験の確立

C57BL/6J マウスは正常発育体重の 80% になるように摂餌抑制を行った。既存のマウス用 Five Hole Poke operant chamber (MED-NP5M-D1、ニューロサイエンス社) を用い、FR10 スケジュールで薬物弁別の訓練を行った (Fig.1)。チャンバーは等間隔に位置する 2 カ所を反応 Hole とした。訓練は MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液を訓練の 15 分前に腹腔内投与した⁴⁾。また、訓練時間は 15 分間とした。

2. MAP 訓練動物における MAP の弁別刺激効果

MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、MAP の般化試験を行った。試験は MAP (0.1, 0.5, 1.0 mg/kg) および生理食塩液を試験の 15 分前に腹腔内投与した。また、試験時間は 15 分間とした。

3. MAP 訓練動物における 4FMP の般化試験

MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食

塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、4FMP の般化試験を行った。試験は 4FMP (0.5, 1.0, 3.0 mg/kg) および生理食塩液を試験の 15 分前に腹腔内投与した。また、試験時間は 15 分間とした。

4. MAP 訓練動物における PMMA の般化試験

MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、PMMA の般化試験を行った。試験は PMMA (0.5, 1.0, 3.0 mg/kg) および生理食塩液を試験の 15 分前に腹腔内投与した。また、試験時間は 15 分間とした。

C. 研究結果

1. MAP 訓練動物における MAP の弁別刺激効果

MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、MAP (0.1, 0.5, 1.0 mg/kg) および生理食塩液の弁別刺激効果について検討した。その結果、MAP は用量依存的に弁別刺激効果が認められた。また、15 分間の平均反応数は用量依存的に有意な低下が認められた (Fig.2)。

2. MAP 訓練動物における 4FMP の般化試験

MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、4FMP (0.5, 1.0, 3.0 mg/kg) の般化試験を行った。その結果、4FMP は MAP に用量依存的な般化が認められた。また、15 分間の平均反応数に影響は認められなかった (Fig.3)。

3. MAP 訓練動物における PMMA の般化試験

MAP (1.0 mg/kg) および溶媒である生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、PMMA (0.5, 1.0, 3.0 mg/kg) の般化試験を行った。その結果、PMMA は MAP に最大 50% 程度 (3.0 mg/kg 投与時) の般化が認められた。ま

た、15 分間の平均反応数に影響は認められなかった(Fig.4)。

D. 考察

違法ドラッグとして流通が確認されている 4FMP、PMMA は覚せい剤である MAP の類似物質である。本研究では、MAP の弁別刺激効果獲得のための実験条件および 4FMP、PMMA の自覚効果(般化試験)について MAP との比較検討を行った。

MAP の弁別獲得の訓練は、MAP (1.0 mg/kg) の FR10 スケジュールによる訓練により用量依存的な弁別刺激効果が認められた。この時、15 分間の平均反応数は有意な低下が認められた。この結果は、ラットを用いて MAP の弁別刺激効果の評価を行っている先行研究と同様の結果であった⁶⁾。これらのことから、マウスを用いて、覚せい剤である MAP を標準薬として薬物弁別実験を行う際の訓練条件が明らかになった。

MAP および生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、4FMP の般化試験を行った結果、用量依存的な般化が認められた。したがって、4FMP は MAP と類似の弁別刺激特性を有することが明らかになった。

MAP および生理食塩液で薬物弁別訓練を行った動物を用いて、PMMA の般化試験を行った結果、最大 50%程度 (3.0 mg/kg 投与時) の部分的な般化が認められた。したがって、PMMA と MAP の中枢作用が部分的に類似しているものと考えられる。一方、データには示していないが、さらに PMMA の高用量 (5.0 mg/kg) を用いて般化試験を行った結果、指標となる Hole へ反応が認められなくなり、弁別刺激効果の評価が不可能であった (10 例中 9 例が無反応)。

これらの結果から、4FMP は MAP と同じ自覚効果 (薬理効果)、また PMMA は部分的に類似した自覚効果 (薬理効果) を有していると考えられる。

E. 結論

覚せい剤である MAP を標準薬として薬物弁別実験を行う際の訓練条件を確立した。さらに、違法ドラッグである 4FMP は MAP と同じ自覚効果 (薬理効果) を有し、また PMMA は部分的に類似した自覚効果 (薬理効果) を有していることを明らかにした。これらの結果から、薬物弁別試験法は規制されている薬物の薬理効果を標準とすることで、規制薬物と違法ドラッグの薬理効果の類似性を評価することが可能であることが明らかになった。さらに、薬物弁別試験法は、数多い違法ドラッグの自覚効果を迅速に評価できるため、規制のための科学的データの収集に適していると考えられる。

人において、4FMP および PMMA は MAP と類似した作用を発現する可能性が高く、規制薬物として指定する必要がある。

F. 参考文献

- 1) 船田正彦, 青尾直也: MDMA 類似誘導体の薬物依存性評価システム構築に関する研究. 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「脱法ドラッグの構造修飾特性とその依存性および神経毒性発現の関連性」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P9-21, 2005.
- 2) 船田正彦, 佐藤美緒, 青尾直也, 和田清: 依存性薬物による脳内遺伝子群の発現調節. 生体の科学. 56: 323-327, 2005.
- 3) Deneau G., Ynagita T., Seevera MH.: Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia*, 16(1): 30-48, 1969.
- 4) William EF., Andrew WH., Justin RE., Sadia A., Richard AR., Jerrold CW., Andrew C.,

Kenner CR., Lames HW.: Hallucinogen-like action of 2,5-dimethoxy-4-(n)-propylthiophentylamine (2C-T-7) in mice and rats. *Psychopharmacology*, 181: 496-503, 2005.

- 5) 青尾直也, 船田正彦: オペラント行動実験を利用した違法ドラッグ依存性評価法の確立. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)「脱法ドラッグの構造修飾特性とその依存性および神経毒性発現の関連性」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-29, 2006.
- 6) Munzar P., Baumann MH., Shoaib M., Goldberg SR.: Effects of dopamine and serotonin-releasing agents on methamphetamine discrimination and self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 141(3): 287-96, 1999.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦, 青尾直也. 薬物依存性の評価一条件付け場所嗜好性試験を中心に一. *日薬理誌* 130: 128-133, 2007.
- 2) 船田正彦, 青尾直也, 和田 清: 有機溶剤による精神依存形成メカニズム. *日本神経精神薬理学雑誌* 28(1): 7-10, 2008.

2. 学会発表

- 1) M. Funada, N. Aoo, K. Wada: Influence of repeated inhalation of toluene on methamphetamine-induced behavioral changes in mice. College on problems of drug dependence (CPDD) 69th Annual scientific meeting, Quebec City, Canada June 2007.6.16-21

2) 青尾直也, 和田 清, 船田正彦: フェネチルアミン誘導体の弁別刺激特性. 第 29 回日本生物学的精神医学会. 第 37 回日本神経精神薬理学会. 札幌. 2007.7.11-13.

3) 船田正彦, 青尾直也, 浅沼幹人, 宮崎育子, 花尻瑠理, 合田幸広, 和田 清: 違法ドラッグ (いわゆる脱法ドラッグ) の精神依存性および精神毒性: フェネチルアミン誘導体の評価. 第 42 回日本アルコール・薬物医学会. 大津. 2007.9.28-29.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

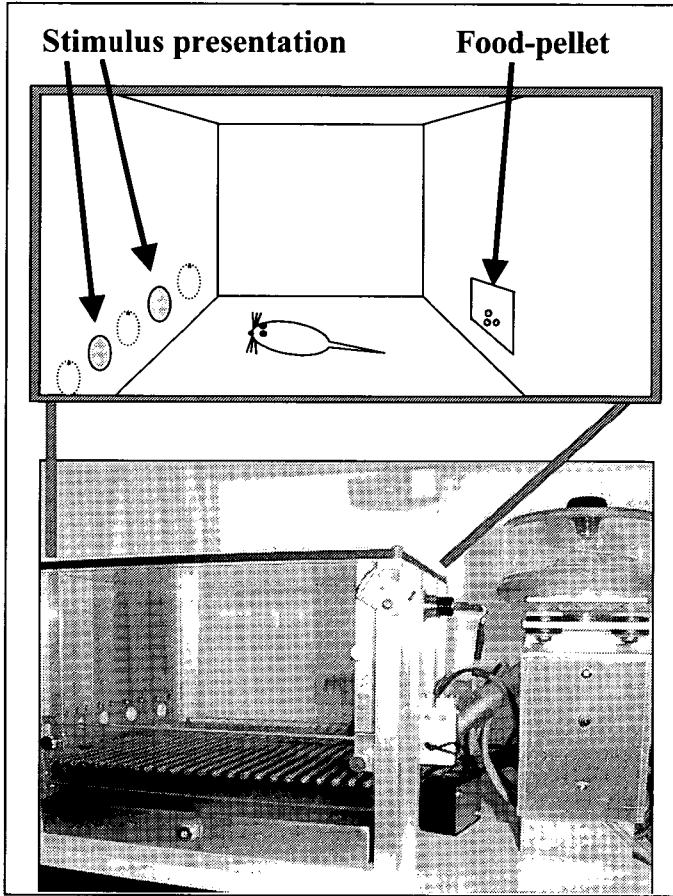


Fig. 1. Schematic diagram showing the hole configuration of five-hole box.

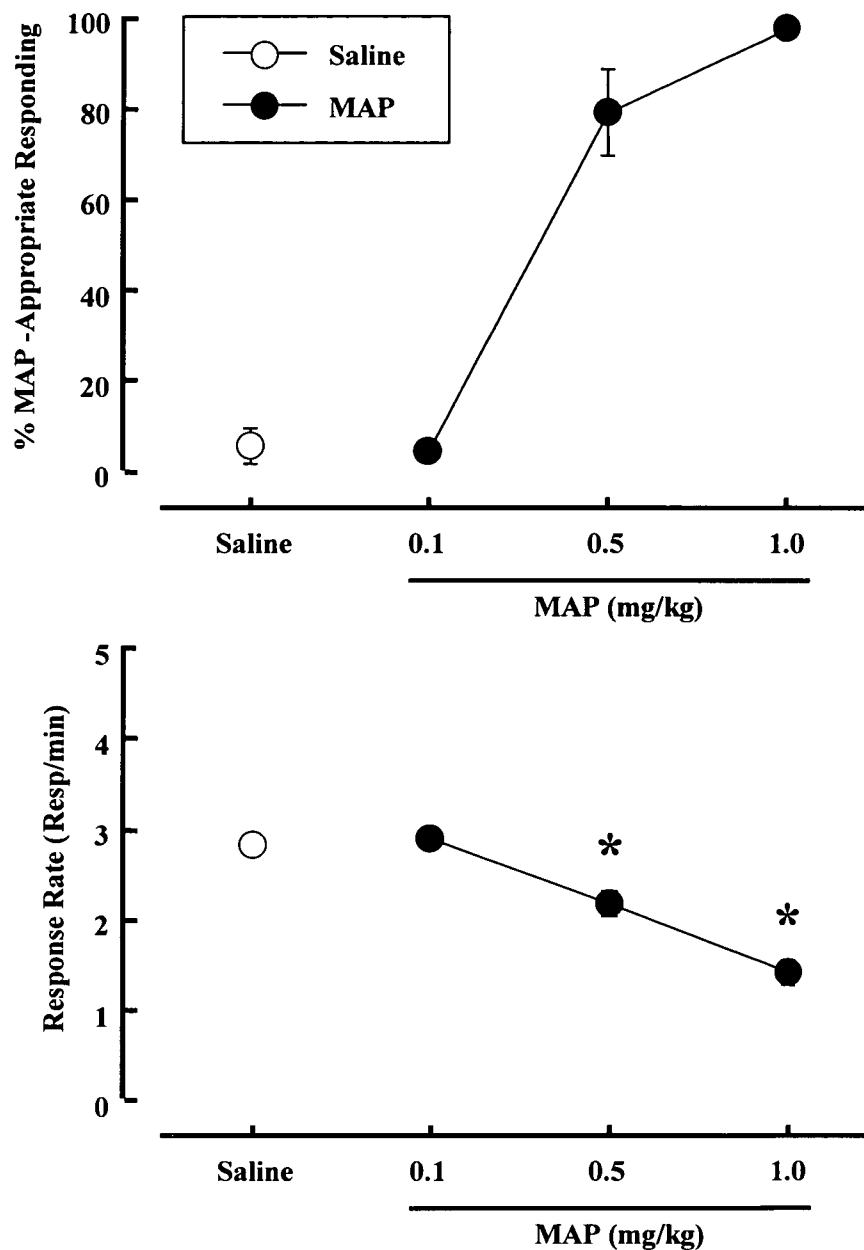


Fig. 2. Results of generalization test in mice (n=12) trained to discriminate methamphetamine (MAP, 1.0 mg/kg) from saline vehicle (upper panel). Mean (\pm SEM) percent drug-appropriate responding following administration of various doses MAP. The animal's response rates are shown in the lower panel. *Response rate was significantly ($p < 0.05$) different from the saline control response rate.

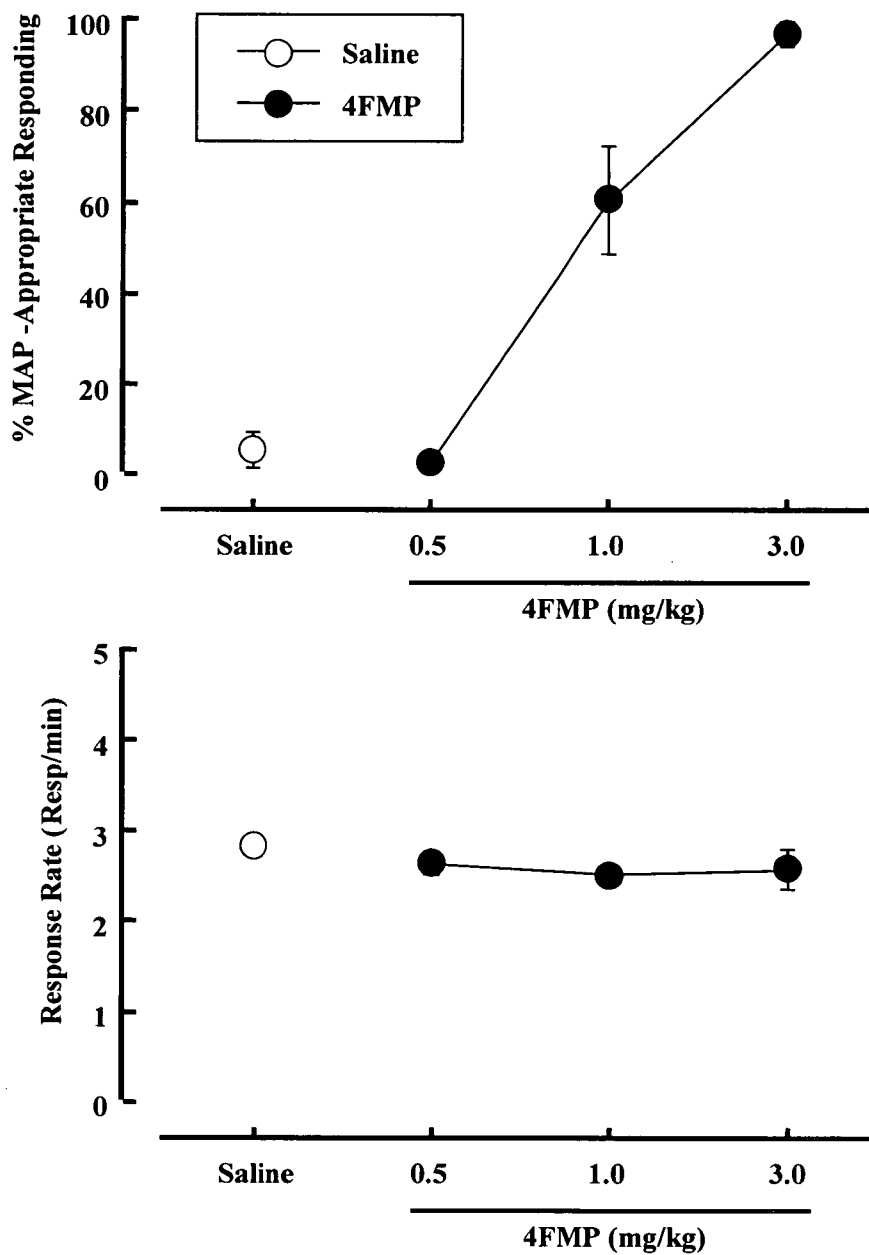


Fig. 3. Results of generalization test in mice (n=12) trained to discriminate methamphetamine (MAP, 1.0 mg/kg) from saline vehicle (upper panel). Mean (\pm SEM) percent drug-appropriate responding following administration of various doses 4-fluoroamphetamine (4FMP). The animal's response rates are shown in the lower panel.

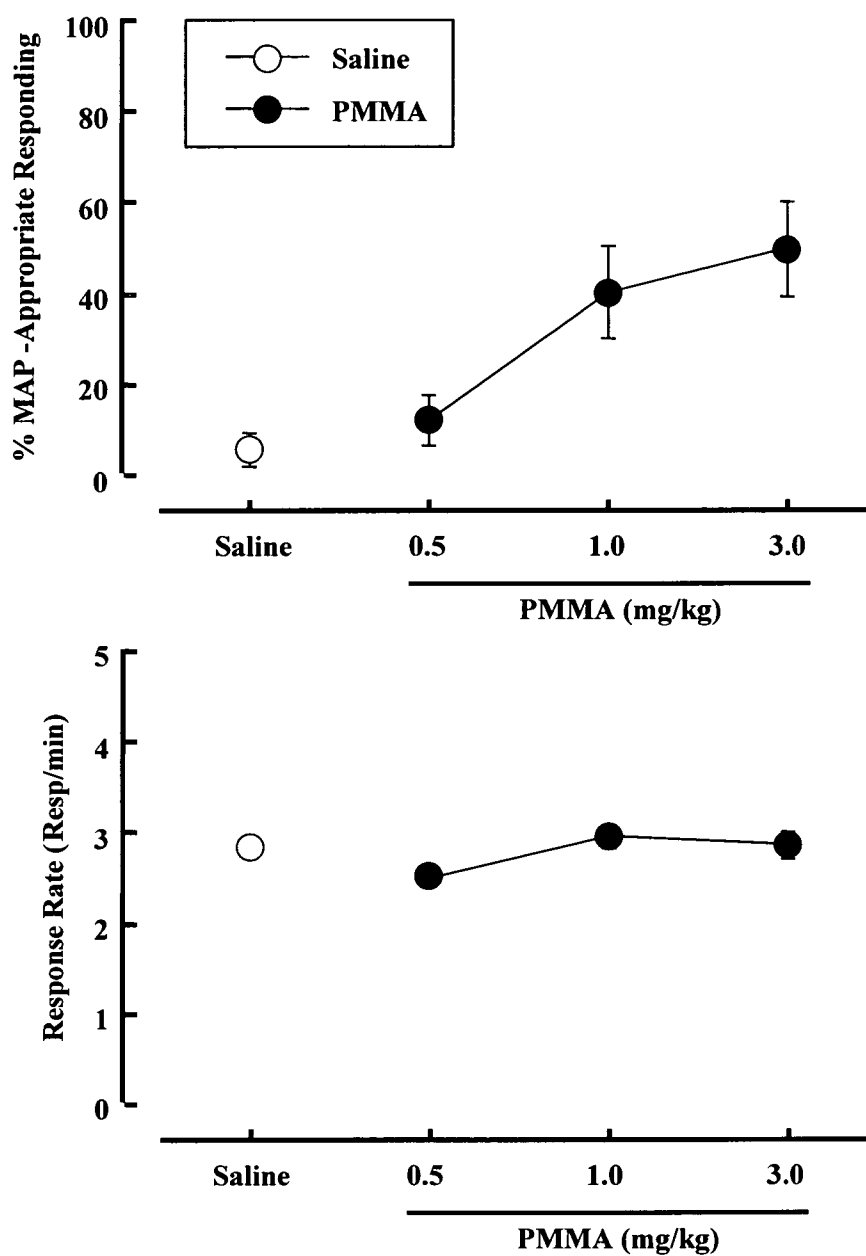


Fig.4. Results of generalization test in mice (n=12) trained to discriminate methamphetamine (MAP, 1.0 mg/kg) from saline vehicle (upper panel). Mean (\pm SEM) percent drug-appropriate responding following administration of various doses 4-methoxymethamphetamine (PMMA). The animal's response rates are shown in the lower panel.

分担研究報告書

違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究

分担研究者：浅沼幹人（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 准教授）

研究協力者：宮崎育子（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 助教）

【研究要旨】

研究目的：覚せい剤に構造が酷似しているフェネチルアミン系違法ドラッグである 4-fluoroamphetamine (4FMP), 4-methoxymethamphetamine (PMMA) は、最近広く流通し、乱用されている。4FMP, PMMA のドパミン系神経あるいはセロトニン系神経への細胞毒性ならびに MDMA あるいはメタンフェタミン (METH) との併用による神経細胞毒性ならびに形態学的変化を明らかにするために、これらのドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞への添加ならびに MDMA あるいは METH との同時添加を行い、24 時間後の細胞毒性 (LDH 放出量測定)、形態学的変化を検討した。また、4FMP, PMMA 添加による細胞内モノアミン含量の変化を検討し、多くのモノアミン神経作動性の違法ドラッグで認められるモノアミン酸化酵素阻害活性と神経細胞毒性との相関の有無についても評価した。結果：4FMP, PMMA の単独暴露により CATH.a 細胞、B65 細胞のいずれの細胞においても 1-2 mM 以上ではじめて細胞死が惹起された (IC₅₀: 1 mM 以上)。この単独による毒性は規制薬物の、METH, MDMA やメチロンの毒性 (IC₅₀: 1-2 mM 以上) とほぼ同等であったが、他のフェネチルアミン系違法ドラッグである「2CT シリーズ」に比べ軽度であった。しかし、CATH.a 細胞、B65 細胞において、単独では障害性のみられない濃度の 4FMP あるいは PMMA と、単独では障害性の低いあるいは認められない濃度の MDMA (100 μM-2 mM) あるいは METH (250 μM-2 mM) を併用暴露すると、著明な LDH 放出量の増加ならびにアポトーシス様の形態変化を伴う細胞死が認められた。4FMP 単独添加は両細胞において MDMA, METH と同様にドパミン、セロトニン含量を低下させ、PMMA 単独添加は CATH.a 細胞ではドパミン含量を低下させたが、B65 細胞のセロトニン量に影響しなかった。さらに、MDMA, METH との併用暴露による著明な細胞障害の発現と異なり、ドパミン、セロトニン含量の低下に対する増悪作用はみられなかった。結論：4FMP, PMMA は、単独では障害性のない濃度であっても、非障害性の低濃度の MDMA もしくは METH との同時併用により、ドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を惹起した。これらの結果から、4FMP, PMMA は、特に MDMA もしくは METH との同時乱用を行った場合に、強いドパミンおよびセロトニン神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。また、細胞内モノアミン含量の変化と細胞障害の程度が相関しないことから、モノアミン酸化酵素阻害活性に代表されるモノアミン量への作用だけでは、これらの乱用薬物の神経毒性を測ることができないことも明らかになった。したがって、乱用薬物の神経毒性評価における培養神経細胞を用いた添加実験の有用性を改めて確認できた。

A. 研究目的

これまでに、違法ドラッグ(脱法ドラッグ)として乱用が社会問題となっている 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT)および植物由来の違法ドラッグ(ハルマラ)の催幻覚成分である harmaline および harmine のモノアミン(ドパミン、セロトニン)神経毒性について検討し、これらの薬剤が比較的 low 濃度でアポトーシス様細胞死を惹起しうること、さらに合成麻薬 MDMA および覚せい剤メタンフェタミン(METH)との同時併用により細胞毒性ならびにアポトーシスが相乗的に増強されることを明らかにした^{1), 2)}。さらに、MDMA の構造類似体のメチロン(平成 19 年 2 月麻薬指定)が単独暴露では強い毒性は示さないものの、MDMA もしくは METH との同時乱用では強いセロトニン神経毒性をもたらすことを明らかにした³⁾。また、昨年度は「2CT シリーズ」と称されるフェネチルアミン系の違法ドラッグ 2CT-7(平成 18 年 4 月麻薬指定), 2CT-4, 2CT-2, 2CI(平成 19 年 4 月より指定薬物)が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞において、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い神経毒性を示すこと、さらにセロトニン系神経細胞においては、低濃度の MDMA もしくは METH との同時併用により、2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2CI のアポトーシス様の細胞死が相乗的に増強されることを明らかにした⁴⁾。

違法ドラッグ(脱法ドラッグ)はその構造が規制薬物に類似しており、規制薬物に指定されても次々に別の類似構造をもつ化学物質が乱用されていることから、違法ドラッグ(脱法ドラッグ)および規制薬物の構造修飾による神経毒性変化を検討することにより、特定の構造と神経毒性の相関を明らかにし、薬物乱用の危険性および神経毒性を予測することが急務となっている。

覚せい剤アンフェタミン、METH に構造が酷似しているフェネチルアミン系違法ドラッ

グである 4-fluoroamphetamine (4FMP), 4-methoxymethamphetamine (PMMA)は、最近広く流通し、乱用されている。4FMP, PMMA とともに平成 19 年 4 月より「指定薬物」に指定されたが、その神経毒性は十分に評価されていない。本年度は、4FMP, PMMA のドパミン系神経あるいはセロトニン系神経への細胞毒性の有無を明らかにする目的で、4FMP, PMMA のドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞への添加ならびに MDMA あるいは METH との併用添加を行い、神経細胞毒性ならびに形態学的変化を評価した。また、4FMP, PMMA 添加による細胞内モノアミン含量の変化を検討し、多くのモノアミン神経作動性の違法ドラッグで認められるモノアミン酸化酵素阻害活性と神経細胞毒性との相関の有無についても評価した。

B. 研究方法

1. モノアミン系培養神経細胞への 4FMP および PMMA 暴露

マウス由来ドパミン含有細胞 CATH.a 細胞(1.0×10^5 cells/cm²)およびラットモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞(3.1×10^4 cells/cm²)を用いて、継代 24 時間後に、4FMP あるいは PMMA (最終濃度 50 μ M~2 mM) を添加し、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性を培地中への LDH 放出量を測定した。

2. モノアミン系培養神経細胞への 4FMP, PMMA と MDMA, METH の同時添加の効果

CATH.a 細胞(1.0×10^5 cells/cm²)および B65 細胞(3.1×10^4 cells/cm²)をそれぞれ 24 時間培養した。4FMP あるいは PMMA (最終濃度 1~2 mM) を MDMA (最終濃度 50 μ M~2 mM) あるいは METH (最終濃度 250 μ M~4 mM) と同時に添加し、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性を LDH 放出量の測定により評価した。また、細胞を 4%

paraformaldehyde による固定の後、Hoechst33342による核染色を行い、アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

3. 4FMPおよびPMMA添加の培養神経細胞内モノアミン含量への効果

CATH.a細胞(1.0×10^5 cells/cm²)およびB65細胞(3.1×10^4 cells/cm²)を継代24時間後に、4FMP, PMMA (最終濃度1~2 mM), MDMA (最終濃度500 μM/1 mM), METH (最終濃度1 mM/2 mM)の単独添加を、あるいは4FMP, PMMAとMDMA, METHの同時添加を行った。添加後24時間培養し、細胞を掻き取り、0.2M過塩素酸でホモジナイズし、12000 rpm, 20分間遠心し得られた上清を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した。細胞内のモノアミンおよびそれらの代謝産物は、EICOMPAK MA-50DS (エイコム) カラムを用いた電子化学検出器(ECD)付きHPLC(トーン)で測定した。

C. 研究結果

1. ドパミン系培養神経細胞への4FMP暴露とMDMA、METH同時添加の効果

ドパミン含有培養神経細胞CATH.a細胞に4FMP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においてはじめて著明な増加が認められた(Fig. 1A)。CATH.a細胞に4FMP (0, 1 or 1.5 mM)+MDMA (0-2 mM)、4FMP (0, 1 or 1.5 mM)+METH (0-4 mM)を24時間暴露し、LDH放出量を測定した。MDMA単独添加の場合、1 mM以下ではLDH放出量は不変で、2 mM以上で有意に増加した(Fig. 1B)。METH単独暴露では、MDMA単独添加の場合と同様に、1 mM以下ではLDH放出量は不変で、2 mM以上で有意に増加した(Fig. 1C)。しかし、4FMP+MDMAの同時暴露では、単独では障害性の低いMDMA (500 μM-1 mM)は4FMP (1, 1.5 mM)でみられるLDH放出量の増加(細胞障害)を著明に増強した(Fig. 1B)。

4FMP+METHの同時暴露においても、単独では障害性のないMETH (250 μM-1 mM)は4FMP (1, 1.5 mM)でみられるLDH放出をさらに増強した(Fig. 1C)。

また形態学的には、4FMP単独では1 mM以上から軽度の細胞死が認められ、1.5 mM以上で有意な細胞死がみられた(Figs. 2 & 3)。MDMA単独では、2 mM以上の高濃度の暴露で細胞死がみられた。4FMP+MDMAの同時添加では、単独では障害性のみられないMDMA (100, 500 μM)と単独では障害の軽微な4FMP (1 mM)を併用添加すると、著明な細胞死が惹起された(Fig. 2)。METH単独添加での形態学的変化では、1 mMより細胞死が見えはじめ、2 mM以上の高濃度の暴露ではじめて明らかな細胞死が認められた(Fig. 3)。単独では障害性がみられないあるいは軽微なMETH (500 μM, 1 mM)と単独では障害性の軽微な4FMP (1 mM)を併用添加すると、著明な細胞死がみられた(Fig. 3)。

細胞内モノアミンおよびその代謝産物含量の変化については、形態学的には軽微な細胞障害がみられる4FMP (1 mM)単独添加により、MDMA (500 μM)、METH (1 mM)添加と同様のドパミン、DOPACの著明な減少がみられた(Fig. 4)。しかし、4FMP (1 mM)+MDMA (500 μM)あるいは4FMP (1 mM)+METH (1 mM)では、LDH放出量の著明な増強が認められたにもかかわらず、ドパミン、DOPACの減少は増悪しなかった(Fig. 4)。

2. モノアミン系セロトニン含有神経細胞への4FMP暴露とMDMA、METH同時添加の効果

セロトニン含有培養神経細胞B65細胞に4FMPを添加したところ、1 mMまでLDH放出量は不変で、2 mMにおいてはじめて有意な増加が認められた(Fig. 5A)。B65細胞に4FMP (0, 1 or 2 mM)+MDMA (0-2 mM)、4FMP (0, 1 or 2 mM)+METH (0-4 mM)を24時間暴露し、LDH放出量を測定した。MDMA単独添加の場合、1 mM以下ではLDH放出量は不変