

Fig.4. Results of generalization test in mice (n=12) trained to discriminate CP-55,940 (0.1 mg/kg) from vehicle (upper panel). Mean ( $\pm$ SEM) percent drug-appropriate responding following administration of various doses Win55212-2, ACEA or JWH-133. The animal's response rates are shown in the lower panel.

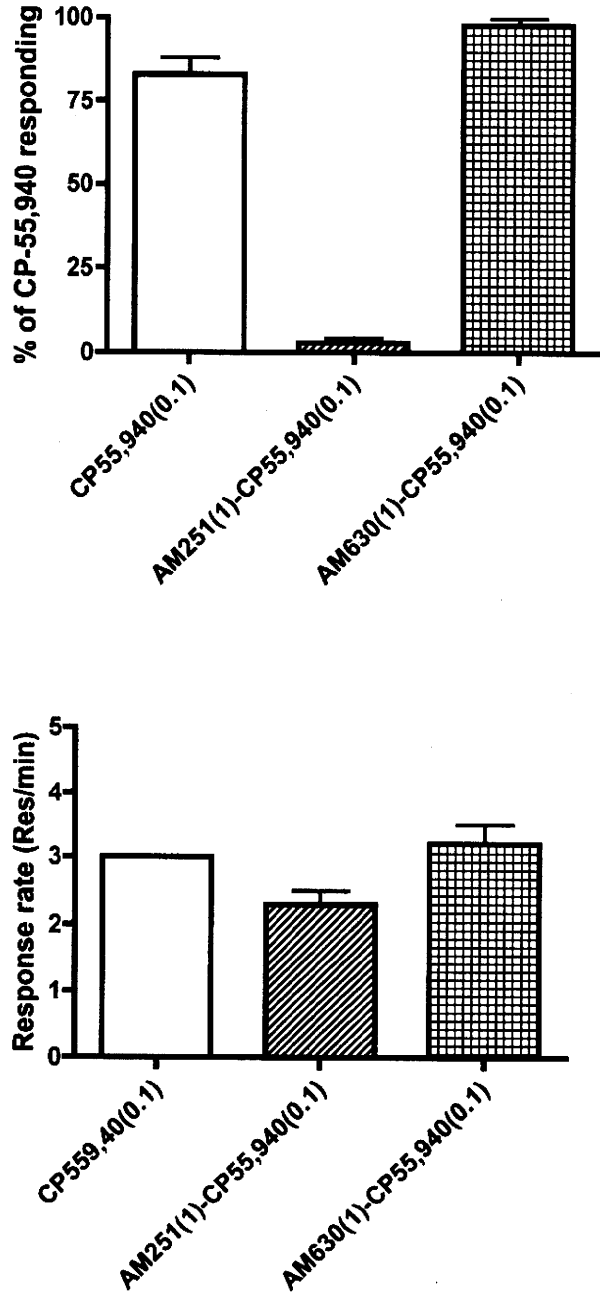


Fig.5. Results of generalization test in mice (n=12) trained to discriminate CP-55,940 (0.1 mg/kg) from vehicle (upper panel). Mice were pre-treated with AM251 (1 mg/kg) or AM630 (1 mg/kg) for 15 min prior to challenge with CP-55,940. Mean ( $\pm$ SEM) percent drug-appropriate responding following administration of dose CP-55,940 (0.1 mg/kg). The animal's response rates are shown in the lower panel.

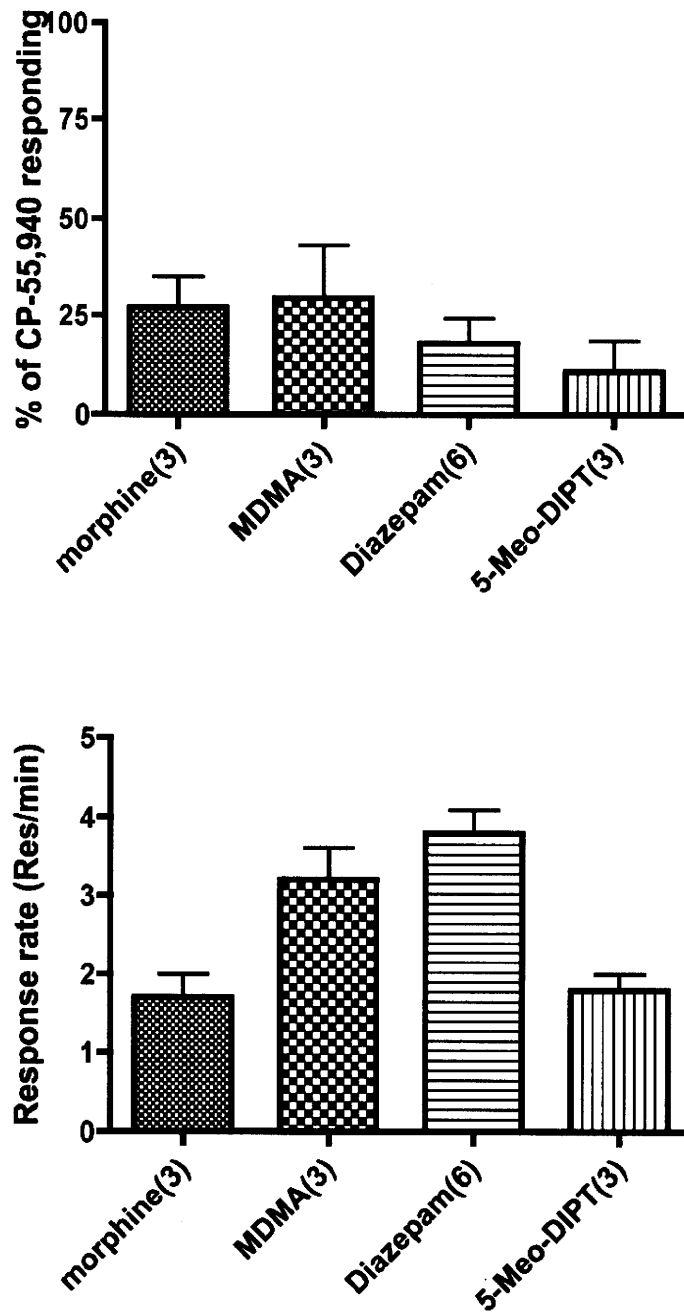


Fig.6. Results of generalization test in mice (n=12) trained to discriminate CP-55,940 (0.1 mg/kg) from vehicle (upper panel). Mean ( $\pm$ SEM) percent drug-appropriate responding following administration of various doses morphine (3 mg/kg), MDMA (3 mg/kg), Diazepam (6 mg/kg) or 5-Meo-DIPT (3 mg/kg). The animal's response rates are shown in the lower panel.

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発症機序と乱用実態把握に関する研究  
(H21-一般-031)

分担研究報告書

フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討

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：昨年度、フェネチルアミン系の違法ドラッグ「2C シリーズ」のなかでも、指定及び規制を免れ最近広く流通し、乱用されている 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C) が、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有することを明らかにした。今年度は、同じく「2C シリーズ」であり、昨年度検討した 2C-C と類似の骨格を有する trichloro-2C-H (T-2C-H) の神経細胞毒性を明らかにする目的で、T-2C-H 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、活性酸素種に対する蛍光指示薬を用いて、暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成についても検討した。結果：CATH. a 細胞、B65 細胞のいずれの細胞においても、T-2C-H 単独添加により低濃度から用量依存的な LDH 放出量の著明な増加が認められた。この T-2C-H 単独添加 (24 時間) による細胞毒性を他の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C と LDH 放出量の IC<sub>50</sub> で比較すると、CATH. a 細胞では 2CT-7 (100 μM)、T-2C-H (100 μM) > 2C-C (150 μM)、2CT-2 (150 μM)、2CT-4 (200 μM) > 2C-I (250 μM)、B65 細胞では T-2C-H (100 μM) > 2CT-7 (150 μM)、2C-I (150 μM) > 2CT-2 (250 μM) > 2CT-4 (300 μM)、2C-C (350 μM) であり、規制薬物のメタンフェタミン (METH)、MDMA やメチロンの毒性 (IC<sub>50</sub>: 1-2 mM 以上) に比べはるかに高度であった。B65 細胞への 24 時間添加においては、T-2C-H は核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を 2C-C よりも比較的低濃度 (75~100 μM) で惹起した。T-2C-H の 2C-C との B65 細胞への併用暴露では、単独では障害性のみられない濃度の T-2C-H (25 μM) は、2C-C (100~500 μM) による LDH 放出量の増加ならびにアポトーシス様の形態変化をさらに増強させ、T-2C-H による 2C-C の神経毒性に対する相乗効果がみられた。さらに B65 細胞への添加 3 時間後の早期の検討では、2C-C は 250 μM 以上で細胞体の萎縮ならびに細胞質内の空胞化を伴う形態変化を示すのに対して、T-2C-H はさらに低濃度 (100 μM) からこれらの変化を惹起した。2C-C、T-2C-H とともに非常に低濃度 (50-100 μM) において、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させた。結論：T-2C-H は、他の「2C シリーズ」と同様に、単独でドパミン系神経細胞ならびにセロトニン系神経細胞に対して強い細胞毒性を示すこと、その毒性は「2C シリーズ」のなかでも極めて強いこと、さらに非常に低濃度の T-2C-H はセロトニン系神経細胞における 2C-C の神経毒性を増強させることを明らかにした。本検討の結果とこれまでの検討結果をあわせると、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」は、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対して強い細胞毒性を示し、MDMA、METH との併用あるいは「2C シリーズ」同士の同時乱用はとくにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に強い神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。さらに、「2C シリーズ」のなかでも 2CT-7, T-2C-H, 2C-C がドパミン系神経細胞に対して、

## 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低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 および覚醒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<sup>1), 2)</sup>。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<sup>3)</sup>。

平成 19 年度は、覚醒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:平成 19 年 4 月より指定薬物)、4-methoxymethamphetamine (PMMA:平成 19 年 4 月より指定薬物)が、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することを明らかにした<sup>4)</sup>。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、さらに乱用薬物の神経毒性評価において培養神経細胞を用いた添加実験が有用であることを示した。

平成 20 年度は、phenylpiperazine (PP), 1-(2-chlorophenyl)-piperazine (2CPP), 1-(4-chlorophenyl)-piperazine (4CPP), 1-(4-methoxyphenyl)-piperazine (4MPP:平

成 19 年 4 月より指定薬物)といった覚醒剤に構造が類似しているピペラジン系違法ドラッグが、ドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対して、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種の生成を伴う神経障害および細胞死を惹起することを明らかにした。また、神経保護の面において重要であるアストロサイトに対しても同程度の細胞毒性を引き起こすことを明らかにし、これらのピペラジン系違法ドラッグが、神経細胞にとって極めて毒性の強い薬物であることを示した。さらに、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、迅速かつ感度良く、しかも定量的に細胞障害性を評価できる方法として、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であることを示した<sup>5)</sup>。

また、これらの検討に先立って、平成 18 年度にはフェネチルアミン系の違法ドラッグのなかでも「2C シリーズ」と称される 2,5-dimethoxy-4-propylthiophenethylamine (2CT-7:平成 18 年 4 月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4:平成 19 年 4 月指定薬物、平成 20 年 1 月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenethylamine (2CT-2:平成 19 年 4 月指定薬物、平成 20 年 1 月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I:平成 19 年 4 月指定薬物、平成 20 年 1 月より麻薬指定)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、また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, 2C-I 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<sup>6)</sup>。さらに昨年度には、「2C シリーズ」のなかでも、指定及び規制を免れ、最近広く流通し、乱用されている

2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C) が、他の「2C シリーズ」と同様に、強い神経細胞毒性を示し、MDMA あるいは METH との同時添加がセロトニン系神経細胞に強い神経毒性をもたらすこと、また、形態変化が認められない低濃度あるいは早期においても細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした<sup>7)</sup>。これらの結果から、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」は、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対して強い細胞毒性を示し、MDMA あるいは METH との同時乱用はとくにセロトニン系神経細胞に強い神経毒性をもたらす、なかでも 2CT-7, 2C-C がドパミン系神経細胞に対して極めて強い神経毒性を発揮すると考えられた。

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いくつかの障害指標を用いて多角的に、しかも迅速に明らかにし、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。

そこで本年度は、フェネチルアミン系ドラッグ「2C シリーズ」であり、昨年度検討した 2C-C と類似の骨格を有する trichloro-2C-H (T-2C-H) の神経細胞毒性を明らかにする目的で、T-2C-H 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 細胞への添加を行い、神経細胞毒性ならびに形態学的変化を 2C-C のそれらと比較し評価した。また、活性酸素種に対する蛍光指示薬を用いて、暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. モノアミン系培養神経細胞への T-2C-H

### および 2C-C 暴露

マウス由来ドパミン含有細胞 CATH. a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) 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 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を用いて、それぞれ継代 24、48 時間後に、T-2C-H (最終濃度 50~500  $\mu$ M) および 2C-C (最終濃度 50~500  $\mu$ M) を添加し、3、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性の指標として培地中への LDH 放出量を測定した。また、T-2C-H および 2C-C (最終濃度 25~100  $\mu$ M) 添加 3 時間後のミトコンドリアにおける活性酸素種生成を、活性酸素種に対する蛍光指示薬である MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XRos を用いて検出した。

### 2. モノアミン系培養神経細胞への 2C-C と T-2C-H の同時添加の効果

B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を 48 時間培養した。2C-C (最終濃度 50~500  $\mu$ M) を T-2C-H (最終濃度 25  $\mu$ M、75  $\mu$ M) 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。

## C. 研究結果

### 1. ドパミン系培養神経細胞への T-2C-H および 2C-C 暴露の効果

ドパミン含有培養神経細胞 CATH. a 細胞に T-2C-H を 24 時間添加したところ、50  $\mu$ M 以上で細胞障害性の指標となる LDH 放出量の用量依存的な増加が認められた。IC<sub>50</sub> は約 100  $\mu$ M であった (Fig. 1)。また形態学的には、2C-C 単独では 50  $\mu$ M 以上から軽度の細胞死が認められ、100  $\mu$ M 以上で著明な細胞死が惹起された。

また、昨年度と同様に CATH. a 細胞に 2C-C を 24 時間添加したところ、今回の条件では 100  $\mu$ M 以上で LDH 放出量の用量依存的な増加が認められ、IC<sub>50</sub> は約 150  $\mu$ M であった (Fig. 2)。形態学的にも、2C-C 単独では 100  $\mu$ M 以上から細胞死が惹起された。

## 2. モノアミン系セロトニン含有神経細胞への T-2C-H および 2C-C 暴露の効果

セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞に T-2C-H を 24 時間添加したところ、100  $\mu\text{M}$  においてすでに LDH 放出量の有意な増加が認められ、用量依存的に増加しており、 $\text{IC}_{50}$  は約 100  $\mu\text{M}$  (75~125  $\mu\text{M}$ ) であった (Fig. 3 & Fig. 7)。また形態学的には、T-2C-H 単独では比較的低濃度の 75~100  $\mu\text{M}$  から核の凝縮、分葉化といったアポトーシス様の形態変化が認められ、250  $\mu\text{M}$  以上で著明なアポトーシス様細胞死が惹起された (Fig. 3 & Fig. 8)。

一方、B65 細胞への 2C-C の 24 時間添加では、250  $\mu\text{M}$  以上で LDH 放出量の用量依存的な増加が認められ、今回の条件において  $\text{IC}_{50}$  は約 350  $\mu\text{M}$  であった (Fig. 4)。また形態学的には、2C-C 単独では 250  $\mu\text{M}$  以上から核の凝縮、分葉化といったアポトーシス様の細胞死が惹起された (Fig. 4)。

薬剤添加 3 時間後の暴露早期の検討を行ったところ、2C-C では 250  $\mu\text{M}$  以上で細胞体の萎縮ならびに細胞質内の空胞化を伴う形態変化が認められるのに対して、T-2C-H ではさらに低濃度の 100  $\mu\text{M}$  からこれらの変化が認められた (Fig. 5)。T-2C-H の 250  $\mu\text{M}$  以上では添加 3 時間後にはすでに核の凝縮、分葉化といったアポトーシス様の形態変化を伴う著明な細胞死が認められた。薬剤添加 3 時間後のミトコンドリアにおける活性酸素種生成 (MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XRos) は、2C-C、T-2C-H とともに 50-100  $\mu\text{M}$  といった形態変化が認められない非常に低濃度から高まっていた (Fig. 6)。

## 3. モノアミン系セロトニン含有神経細胞への 2C-C 細胞毒性への T-2C-H 同時添加の効果

B65 細胞に T-2C-H (0, 25 or 75  $\mu\text{M}$ ) + 2C-C (0~500  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間暴露し、LDH 放出量を測定した。2C-C 単独添加の場合、100  $\mu\text{M}$  以下では LDH 放出量は不変で、250  $\mu\text{M}$  で有意に増加した (Fig. 7)。T-2C-H + 2C-C の同時暴

露では、単独では障害性のみられない T-2C-H (25  $\mu\text{M}$ ) は 2C-C (100~500  $\mu\text{M}$ ) でみられる LDH 放出量の増加 (細胞障害) を著明に増強させた (Fig. 7)。また逆に、単独では障害性のみられない 2C-C (50, 100  $\mu\text{M}$ ) は T-2C-H (75  $\mu\text{M}$ ) でみられる LDH 放出量の増加を有意に増強させた (Fig. 7)。

また形態学的検討では、2C-C 単独添加では、250  $\mu\text{M}$  以上から核の凝縮、分葉化といったアポトーシス様の形態変化が認められた (Fig. 8)。T-2C-H + 2C-C の同時添加では、単独ではそれぞれ障害性のみられない 2C-C (100  $\mu\text{M}$ ) と T-2C-H (25  $\mu\text{M}$ ) を併用すると、アポトーシス様の細胞死が惹起された (Fig. 8)。また、軽度の障害を惹起する 2C-C (250  $\mu\text{M}$ ) と単独では障害性のみられない T-2C-H (25  $\mu\text{M}$ ) を併用した場合には、2C-C 単独でみられるアポトーシス様の細胞死が著明に増強された (Fig. 8)。

## D. 考察

フェネチルアミン系ドラッグ「2C シリーズ」で、2C-C と類似の骨格を有する T-2C-H のドパミン系神経細胞 CATH. a 細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞 B65 細胞への添加を行い、細胞毒性ならびに形態学的変化について検討した。さらに、暴露早期における形態学的変化と細胞内における活性酸素種生成についても検討した。

ドパミン系神経細胞 CATH. a 細胞において、規制薬物である METH, MDMA やメチロン<sup>3)</sup> やフェネチルアミン系違法ドラッグ 4FMP, PMMA<sup>4)</sup>、ピペラジン系違法ドラッグ PP<sup>5)</sup> が、高濃度 ( $\text{IC}_{50}$ : 1 mM 以上) の暴露により細胞毒性ならびに細胞死を惹起するのに対して、T-2C-H ははるかに低濃度 ( $\text{IC}_{50}$ : 100  $\mu\text{M}$ ) で細胞毒性ならびに細胞死を惹起しうることを明らかにした。このドパミン系神経細胞 CATH. a 細胞への単独添加による細胞毒性を他の「2C シリーズ」<sup>6, 7)</sup> と LDH 放出量の  $\text{IC}_{50}$  で比較すると、2CT-7 (100  $\mu\text{M}$ )、T-2C-H (100  $\mu\text{M}$ ) > 2C-C (150

μM)、2CT-2 (150 μM)、2CT-4 (200 μM) > 2C-I (250 μM)であった。ドパミン系神経に対して、「2C シリーズ」は、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い毒性を発揮するが、なかでも 2CT-7, T-2C-H, 2C-C がドパミン系神経細胞に対して極めて強い神経毒性を有することが明らかになった。

一方、モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞への添加実験では、規制薬物である METH, MDMA やメチロン<sup>3)</sup>やフェネチルアミン系違法ドラッグ 4FMP, PMMA<sup>4)</sup>、ピペラジン系違法ドラッグ PP<sup>5)</sup>が、高濃度 (IC<sub>50</sub>: 1 mM 以上)の暴露により細胞毒性ならびに細胞死を惹起するのに対して、T-2C-H は極めて低濃度 (IC<sub>50</sub>: 100 μM) で細胞毒性ならびに細胞死を惹起した。この モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞への 2C-C 単独添加による細胞毒性を他の「2C シリーズ」<sup>6,7)</sup>と LDH 放出量の IC<sub>50</sub> で比較すると、T-2C-H (100 μM) > 2CT-7 (150 μM)、2C-I (150 μM) > 2CT-2 (250 μM) > 2CT-4 (300 μM)、2C-C (350 μM) であり、前述のドパミン系神経細胞 CATH. a 細胞への毒性とほぼ同等であり、MDMA やメチロンの B65 細胞への毒性 (IC<sub>50</sub>: 2 mM 以上)<sup>3)</sup>に比べ極めて高度であった。また、形態学的観察から、他の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C<sup>6,7)</sup>と同様に T-2C-H は、核の凝縮、分業化などのアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を比較的 low 濃度 (100 μM 以上)より惹起することを明らかにした。これに対して、MDMA および METH は、高濃度 (1 mM 以上)暴露によりはじめてアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を惹起される<sup>7)</sup>。これらより、「2C シリーズ」は、ドパミン系神経細胞への毒性に比べるとやや軽度ではあるが、モノアミン系セロトニン含有神経に対しても、規制薬物 MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い細胞毒性を発揮するといえる。なかでも T-2C-H, 2CT-7, 2C-I がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い神経毒性を有することが明らかになった。

さらに、T-2C-H の 2C-C との B65 細胞への

併用暴露では、単独では障害性のみられない濃度の T-2C-H (25 μM)は、2C-C (100~500 μM)による細胞障害 (LDH の放出量)ならびにアポトーシス様の細胞死を相乗的に増強することが判明した。このような相乗効果は、他の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C と MDMA あるいは METH との B65 細胞への併用添加でみられる神経細胞毒性の増強効果<sup>6,7)</sup>と同様であった。

これらの結果から、T-2C-H は、他の「2C シリーズ」と同じように、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対して強い細胞毒性を示し、その毒性は「2C シリーズ」のなかでも極めて強く、単独では障害性のみられない非常に低濃度の T-2C-H はセロトニン系神経細胞における 2C-C の神経毒性を増強させることが明らかになった。

さらに本検討では、24 時間暴露後の細胞毒性に加えて、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 3 時間後という暴露早期の形態学的変化とミトコンドリアにおける活性酸素種生成についても検討した。その結果、T-2C-H では 2C-C よりも低濃度の 100 μM 添加 3 時間後から細胞体の萎縮ならびに細胞質内の空胞化といった形態変化がみられ (2C-C では 250 μM 以上)、T-2C-H の 250 μM 以上では添加 3 時間後にはすでに著明なアポトーシス様の細胞死が認められた。

また、形態変化が認められない低濃度 (50~100 μM)の T-2C-H 添加 3 時間後においても細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成の亢進が認められた。一昨年度のピペラジン系違法ドラッグ 2CPP, 4CPP, 4MPP、昨年度の 2C-C の B65 細胞への添加 3 時間後においても、形態変化が認められない低濃度暴露での細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成の亢進が認められた<sup>5,7)</sup>。したがって、T-2C-H, 2C-C は暴露早期よりミトコンドリアの機能障害ならびに酸化ストレスを惹起し得る可能性が示唆された。また、このような蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出



法は、迅速かつ感度良く、しかも定量的に早期からの細胞障害性を評価できる方法であるといえる。

## E. 結論

本検討の結果とこれまでの検討結果をあわせると、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H は共通して、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対して強い細胞毒性を示し、MDMA, METH との併用あるいは「2C シリーズ」同士の同時乱用はとくにセロトニン系神経細胞に強い神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。さらに、「2C シリーズ」のなかでも 2CT-7, T-2C-H, 2C-C がドパミン系神経細胞に対して、T-2C-H, 2CT-7, 2C-I がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い神経毒性を有していることを明らかにできた。

## F. 参考文献

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究. 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). P15-24, 2004.
- 2) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 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)「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-42, 2005.
- 3) 浅沼幹人, 宮崎育子: 脱法ドラッグ(違法ドラッグ)の構造修飾に基づく神経毒性発現の研究. 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). P22-33, 2006.

- 4) 浅沼幹人, 宮崎育子: 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. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P36-64, 2008.
- 5) 浅沼幹人, 宮崎育子: 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. 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P81-108, 2009.
- 6) 浅沼幹人, 宮崎育子: 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. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P30-65, 2007.
- 7) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグによる神経・細胞毒性の発現機序に関する多角的検討. 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P38-55, 2010.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Kimoto, N., Kikkawa, Y., Takeshima, M., Miyoshi, K. and Murata, M.: Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte. Ann.

- Neurol., 67: 239-249, 2010. (published online October 2, 2009)
- 2) Morimoto, N., Nagai, M., Miyazaki, K., Ohta, Y., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Matsuura, T., Asanuma, M. and Abe, K.: Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J. Neurosci. Res.*, 88: 1804-1811, 2010.
  - 3) Kitamura, Y., Yagi, T., Kitagawa K., Shinomiya, K., Kawasaki H., Asanuma, M. and Gomita, Y.: Effects of bupropion on the forced swim test and release of dopamine in the nucleus accumbens in ACTH-treated rats. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 382: 151-158, 2010. (published online June 6, 2010)
  - 4) Doi, M., Miyazaki, I., Nagamachi, T., Shinomiya, K., Matsunaga, H., Sendo, T., Kawasaki, H., Asanuma, M., Gomita, Y. and Kitamura, Y.: Effects of imipramine and lithium on the suppression of cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Acta Med Okayama*, 64: 219-223, 2010.
  - 5) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Antioxidative and neuroprotective effects of metallothioneins on dopaminergic neurons. In: (ed.) Kozyrev, D. and Slutsky, V., *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects*, Nova Science Publishers, New York, pp557-568, 2010.
  - 6) Miyazaki, I., Asanuma, M., Kikkawa, Y., Takeshima, M., Murakami, S., Miyoshi, K., Sogawa, N. and Kita, T.: Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity. *Glia*, 59: 435-451, 2011.
  - 7) Kitamura, Y., Doi, M., Kuwatsuka, K., Onoue, Y., Miyazaki, I., Shinomiya, K., Koyama, T., Sendo, T., Kawasaki, H., Asanuma, M. and Gomita, Y.: Chronic treatment with imipramine and lithium increases cell proliferation in the hippocampus in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 34: 77-81, 2011.
  - 8) Ishida, S., Kawasaki, Y., Araki, H., Asanuma, M., Matsunaga, H., Sendo, T., Kawasaki, H., Gomita, Y. and Kitamura, Y.: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the central amygdaloid nucleus alter naloxone-induced withdrawal following a single exposure to morphine. *Psychopharmacology*, in press.
- ## 2. 学会等発表
- 1) 竹島美香, 宮崎育子, 吉川友理, 喜多大三, 浅沼幹人: L-テアニンはアストロサイトのグルタチオンを増加させ, 過剰ドパミンによる神経細胞死を抑制する. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16.
  - 2) 宮崎育子, 吉川友理, 竹島美香, 浅沼幹人: 活性化アストロサイトにおけるドパミントランスポーターを介したドパミン特異的メタロチオネイン誘導. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16.
  - 3) 村田麻衣子, 浦添夏帆, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: 培養ドパミン神経系におけるメタンフェタミン神経毒性に対するドコサヘキサエン酸の作用. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16.
  - 4) 土居真穂, 長町智子, 江川真希, 宮崎育子, 川崎博己, 千堂年昭, 浅沼幹人, 北村佳久: ACTH 反復投与ラットを用いた海馬歯状回における細胞増殖およびアストログリア活性に及ぼす影響. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
  - 5) 八木貴彦, 宮崎敏明, 北川航平, 四宮一昭, 浅沼幹人, 千堂年昭, 北村佳久: ACTH 反復投与ラットを用いた bupropion の抗

- うつ効果におけるドパミン神経機能の関与. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
- 6) 石田 茂, 生田祐一, 浅沼幹人, 松永 尚, 千堂年昭, 荒木博陽, 川崎博己, 北村佳久: Nicotine の扁桃体内注入は morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘導条件付け場所嫌悪行動を抑制する. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
- 7) 生田祐一, 石田 茂, 宮崎育子, 浅沼幹人, 荒木博陽, 松永 尚, 北村佳久, 千堂年昭: Morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘導条件付け場所嫌悪行動および c-Fos 発現に対するニコチン受容体の関与. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
- 8) 田中健一, 難波 雄, 小郷裕也, 園田佳奈子, 田村明子, 浅沼幹人: アセチルコリンエステラーゼ阻害薬ガラントミンのニコチン受容体を介した学習能力改善作用. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.18.
- 9) 浅沼幹人: アストロサイトを標的とした神経保護の可能性. 第 51 回日本神経学会総会 ランチョンセミナー5, 東京, 2010.5.20.
- 10) 浅沼幹人, 宮崎育子: 線条体アストロサイトにおける L-DOPA およびドパミンの取り込みと代謝. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 2010.5.21.
- 11) 石田 茂, 河崎陽一, 浅沼幹人, 松永 尚, 千堂年昭, 荒木博陽, 川崎博己, 北村佳久: Morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘発条件付け場所嫌悪行動に対する扁桃体中心核内  $\alpha 7$  ニコチン受容体の関与. 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 徳島, 2010.7.8.
- 12) Ishida, S., Ukutani, T., Miyazaki, I., Asanuma, M., Matsunaga, H., Senndo, T., Araki, H., Kawasaki, H., Kitamura, Y.: Involvement of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on the conditioned place aversion induced by naloxone in single-dose morphine-treated rats. The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (World Pharma2010), Copenhagen, 2010.7.17-23.
- 13) Kitamura, Y., Doi, M., Hayashi, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Kawasaki, H.: Influence of the suppression of cell proliferation and neurogenesis in the ability of antidepressants in an ACTH-induced animal model of treatment-resistant. The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (World Pharma2010), Copenhagen, 2010.7.17-23.
- 14) 三好 耕, 笠原恭輔, 宮崎育子, 浅沼幹人: リチウムは神経細胞 1 次繊毛を伸長する. 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会, 神戸, 2010.9.3.
- 15) 宮崎育子, 吉川友理, 竹島美香, 三好 耕, 喜多大三, 浅沼幹人: アストロサイトによるドパミンキノン毒性に対する神経保護. 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会, 神戸, 2010.9.3.
- 16) 浦添夏帆, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: アセチル-L-カルニチンの培養グリア細胞系への作用. 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 埼玉, 坂戸, 2010.9.10-12.
- 17) 竹島美香, 宮崎育子, 喜多大三, 浅沼幹人: 緑茶成分テアニンはアストログリアでのグルタチオン合成促進を介して酸化ストレスによる神経細胞死を抑制する. 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 埼玉, 坂戸, 2010.9.10-12.
- 18) 竹島美香, 宮崎育子, 吉川友理, 村上真樹, 喜多大三, 浅沼幹人: 緑茶成分テアニンのアストロサイトでの抗酸化機構の賦活作用とドパミン神経保護効果. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台,

2010.9.15.

- 19) 宮崎育子, 吉川友理, 竹島美香, 三好 耕, 船田正彦, 浅沼幹人: フェニルアルキルアミン系違法ドラッグによるモノアミン神経毒性に関する検討. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 20) 浦添夏帆, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: 培養グリア細胞系におけるメタンフェタミン細胞毒性に対するアセチル-L-カルニチンの作用. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 21) 石田 茂, 河崎陽一, 浅沼幹人, 松永 尚, 千堂年昭, 荒木博陽, 川崎博己, 北村佳久: Morphine 単回投与ラットの naloxone 誘発退薬行動に対する nicotine の効果における扁桃体の関与. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 22) 田中健一, 難波 雄, 八木崇夫, 園田佳奈子, 浅沼幹人: 一過性健忘モデルマウスに対するニコチン性アセチルコリン受容体  $\alpha 7$  サブユニット作動薬の学習能力改善作用. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 23) 三好 耕, 笠原恭輔, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人: 繊毛が媒介する非シナプス性の神経伝達と精神疾患. 第32回日本生物学的精神医学会, 北九州, 2010.10.9.
- 24) 笠原恭輔, 三好 耕, 宮崎育子, 浅沼幹人: メタンフェタミンが神経細胞一次繊毛に及ぼす影響. 第32回日本生物学的精神医学会, 北九州, 2010.10.9.
- 25) 浦添夏帆, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: メタンフェタミンによるグリア細胞毒性発現とアセチル-L-カルニチンの細胞保護効果につ

いて, 第63回日本薬理学会西南部会・第20回日韓薬理学会合同セミナー, 鹿児島, 2010.11.26.

#### 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

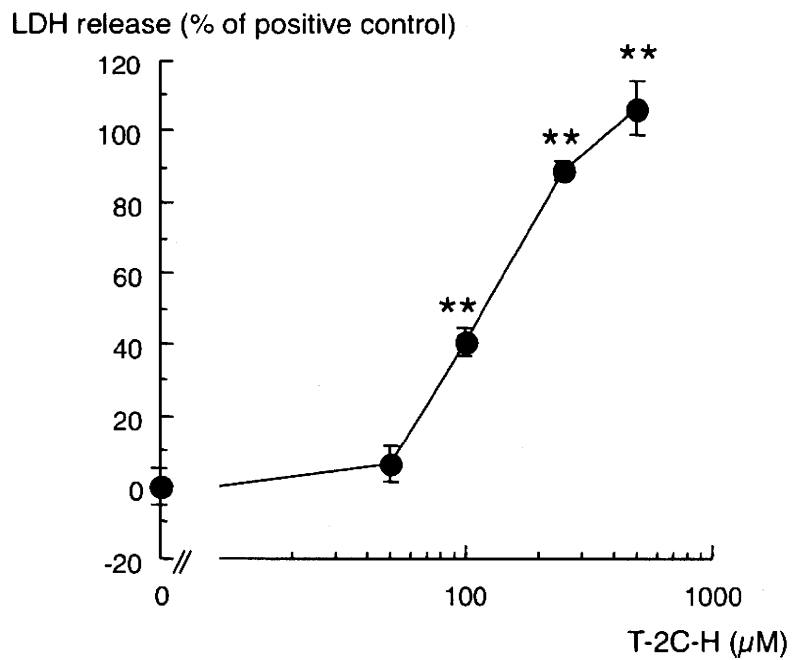


Fig. 1. Changes in released LDH from dopaminergic CATH.a cells after exposure to T-2C-H (final concentration: 0-500  $\mu$ M) for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.001$  vs. control group without T-2C-H.

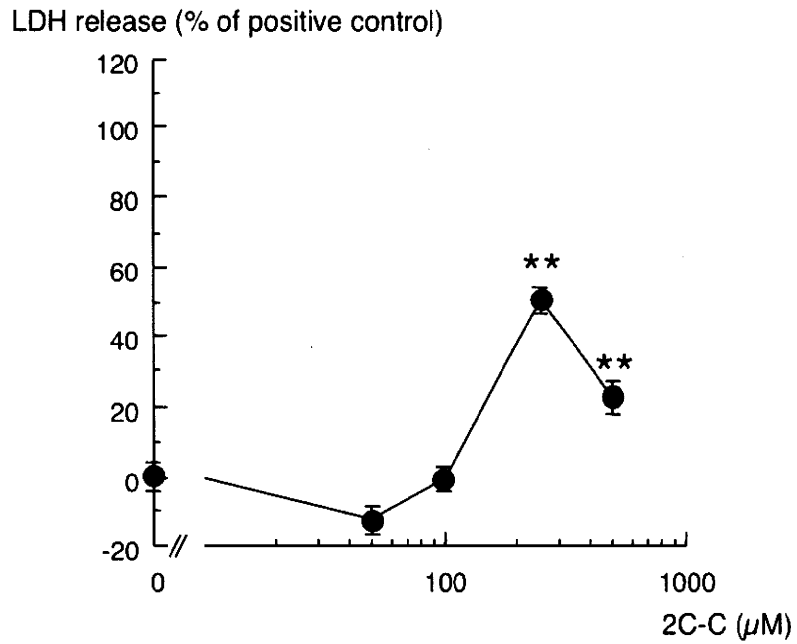


Fig. 2. Changes in released LDH from dopaminergic CATH.a cells after exposure to 2C-C (final concentration: 0-500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.001$  vs. control group without 2C-C.

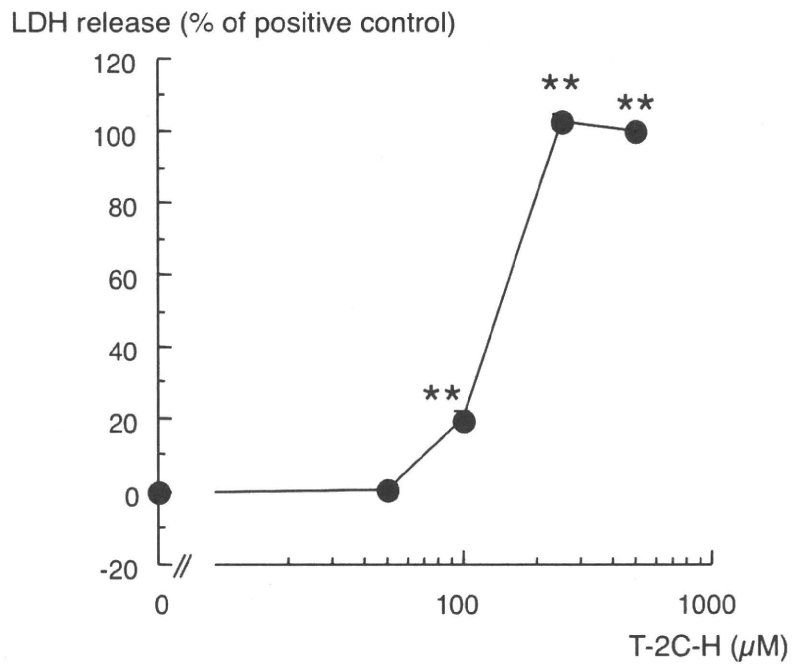
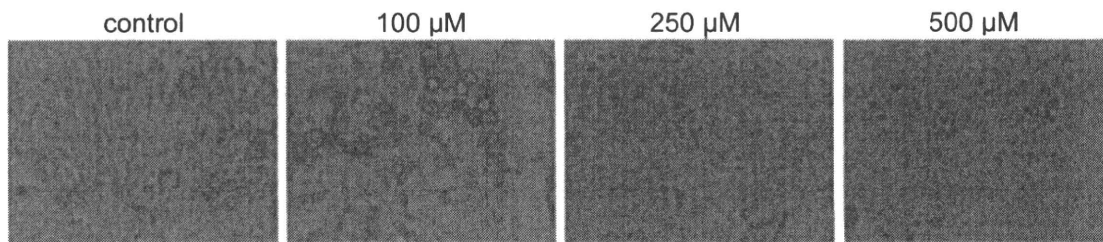


Fig. 3. Photographs of serotonergic B65 cells treated with T-2C-H (final concentration: 0, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours (upper). Changes in released LDH from B65 cells after exposure to T-2C-H (final concentration: 0-500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours (lower). Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.001$  vs. control group

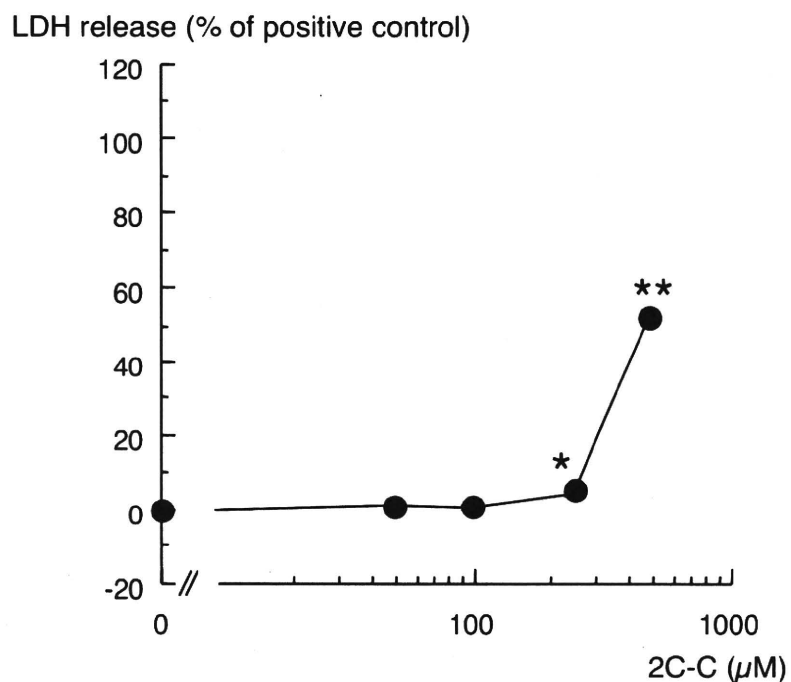
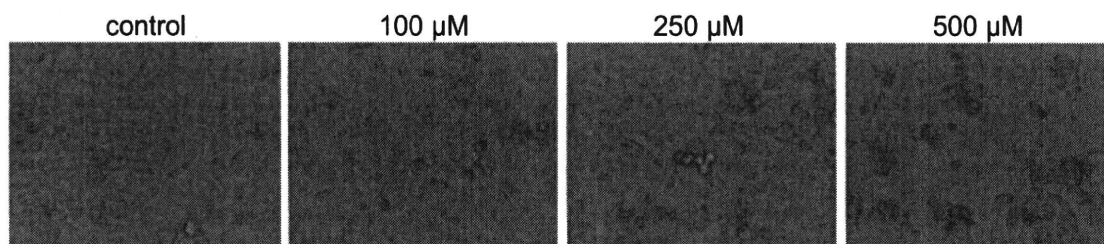


Fig. 4. Photographs of serotonergic B65 cells treated with 2C-C (final concentration: 0, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours (upper). Changes in released LDH from B65 cells after exposure to 2C-C (final concentration: 0-500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours (lower). Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.001$  vs. control group without 2C-C.



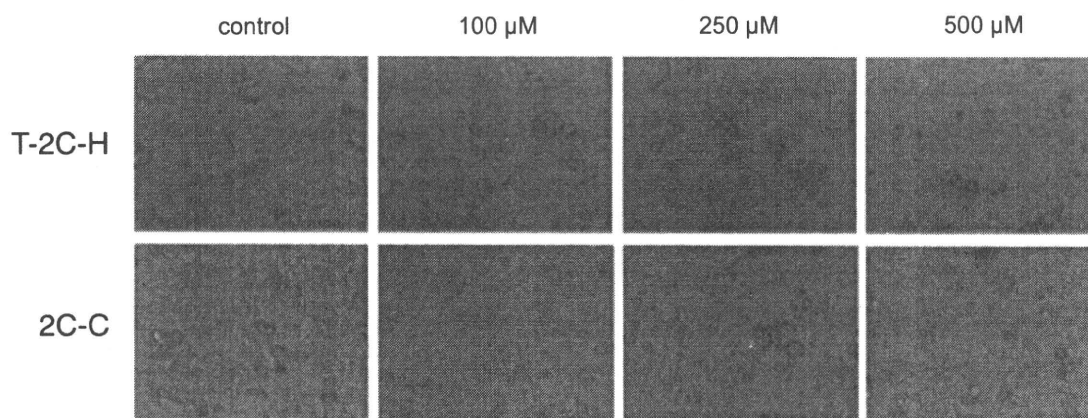


Fig. 5. Photographs of serotonergic B65 cells treated with T-2C-H or 2C-C (final concentration: 0, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours.

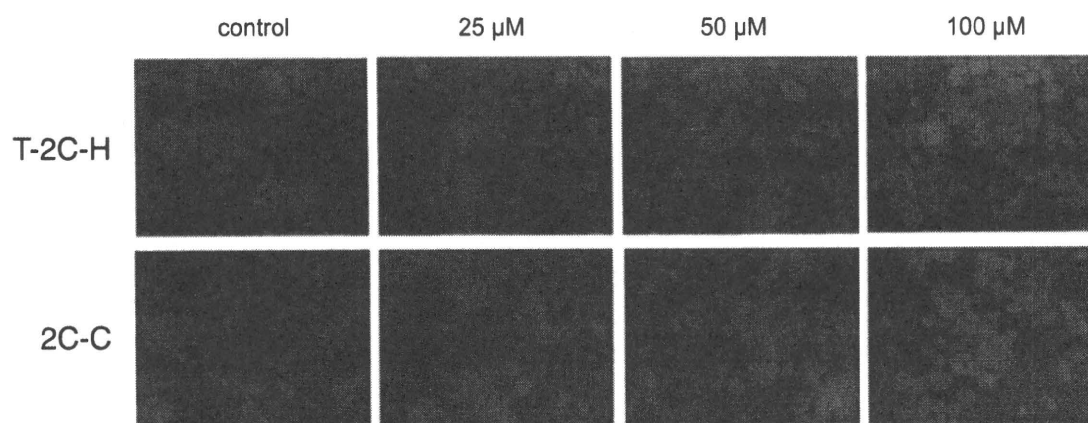


Fig. 6. Photographs and reactive oxygen species (ROS) formation in B65 cells exposed to T-2C-H or 2C-C (final concentration: 0, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. Mitochondrial ROS formation was detected by MitoTracker (CM- $\text{H}_2\text{XRos}$ ).

B65 cells

LDH release (% of positive control)

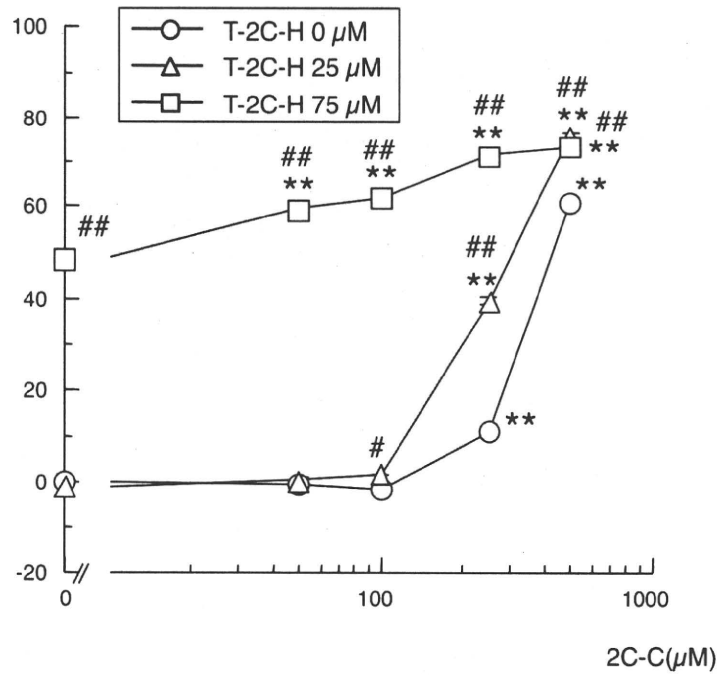


Fig. 7. Changes in released LDH from B65 cells after exposure to T-2C-H (final concentration: 0, 25, 75  $\mu\text{M}$ ) + 2C-C (final concentration: 0-500  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \*\* $p < 0.001$  vs. each control group without 2C-C. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.001$  vs. 2C-C-dose-matched control group without T-2C-H.

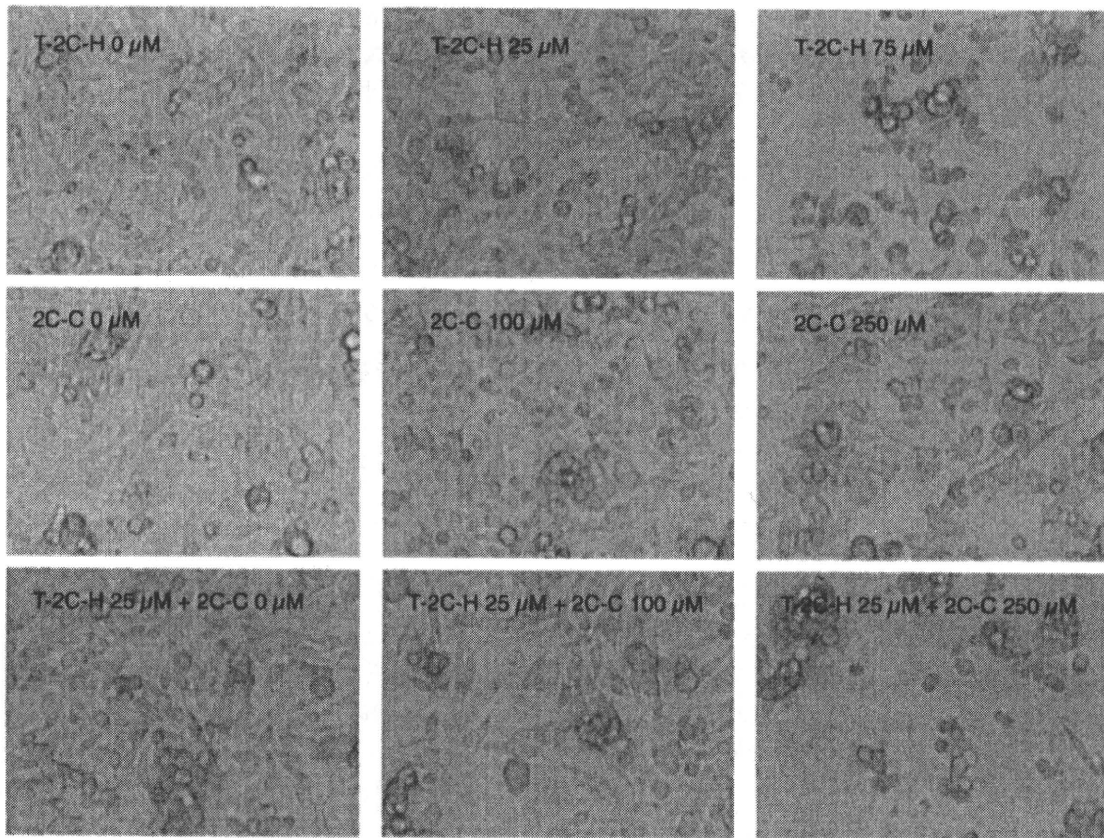


Fig. 8. Photographs of B65 cells treated with T-2C-H (final concentration: 0, 25, 75  $\mu\text{M}$ ) and/or 2C-C (final concentration: 0, 100, 250  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours.

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発症機序と乱用実態把握に関する研究  
(H21-医薬-一般-031)

分担研究報告書

クラブユーザーにおける MDMA 等のクラブドラッグ乱用実態に関する研究

分担研究者：嶋根卓也（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：日高庸晴（宝塚大学看護学部）

：和田 清（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】

クラブユーザーにおける MDMA 等のクラブドラッグの乱用経験や乱用者の特徴を把握することを目的に、クラブイベントの来場者に対し、ノートパソコンを用いた実態調査を行った。

研究協力の得られた 3 店舗のクラブで開催された計 4 回のイベントで、673 枚のエントリーカード（参加券）を配布し、324 名より調査協力を得た（回収率 48.1%）。重複回答者および回答に不備があった者を除く 305 名を分析対象とし、以下の知見を得た。

1. 対象者となったクラブユーザーの 33.8%は何らかの薬物使用経験を有し、大麻が 32.1%と最も高く、MDMA7.9%、覚せい剤 6.2%、コカイン 6.2%、有機溶剤 4.6%、ケタミン 3.3%と続いた。諸外国のクラブユーザーに比べれば低い値であるが、国内の一般住民や青少年と比較すると顕著に高い値である。

2. MDMA 使用者の特徴は次の 5 点である。

- ①30 代男性が中心
- ②クラブカルチャーとの親和性が高い
- ③多剤乱用者が多い
- ④薬物使用に伴うエピソードが豊富
- ⑤攻撃的行動との合併例が多い

3. 薬物使用経験者が数多く集まるクラブという場・空間は、薬物乱用・依存に対する予防介入を効率的に行えるセッティングの一つである。薬物使用による健康被害に関する正しい情報を提供するとともに、相談援助につなげるような予防介入が必要である。

A. 研究目的

近年、MDMA 等のクラブドラッグと呼ばれる薬物に関連する事件が相継ぎ、社会的な関心が高まっている。クラブドラッグとは、MDMA に代表される、クラブイベントや野外音楽イベント（レイブパーティ等）で使用されることが多いとされる薬物の総称である。MDMA の他には、Ketamine（ケタミン）、

Methamphetamine（覚せい剤）、Cocaine（コカイン）、LSD(d-lysergic acid diethylamide)、gamma-hydroxybutyrate (GHB)、フルニトラゼパム（ロヒプノール、他）などを含めることもある<sup>1,2)</sup>。

MDMA(3,4-methylenedioxyamphetamine)は、覚せい剤(methamphetamine)と幻覚薬(mescaline)の 2 つの化学構造を有し、中枢興奮作用と幻覚作用を併せ持つ薬物である。撰