

【特集】

メチレンジオキシ・ピロバレロンの中枢神経作用 —マイクロダイアリシス法を用いて—

Influence of Methylenedioxypropylamphetamine on Central Nervous System
-Using Microdialysis Method-

不破達¹、児玉亨²、本多芳子²、田中豊人¹、久保喜一¹
大橋則雄¹、中江大¹、小縣昭夫¹

1 東京都健康安全研究センター 2 東京都神経科学総合研究所

Tatsu FUWA¹, Tohru KODAMA², Yoshiko HONDA², Toyohito TANAKA¹,
Yoshikazu KUBO¹, Norio OHASHI¹, Dai NAKAE¹, Akio OGAT^{1*}

1 Tokyo Metropolitan Institute of Public Health.

2 Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience.

要旨：脳内局所微量透析法（マイクロダイアリシス法）と高速液体クロマトグラフィーとの組み合わせによって、メチレンジオキシ・ピロバレロン（MDPV）投与によるマウス線条体内神経細胞外のドーパミン（DA）とセロトニン（5-HT）量の経時的変化を調べた。それに加えて、行動量の測定実験と連続投与による中枢神経損傷の有無について、免疫組織化学による実験をおこなった。マイクロダイアリシスによる生体試料回収は10分間隔で行い、MDPV経口投与から2時間半後までおこなった。線条体内神経細胞外のDA量がMDPV投与から30分の間に210%、30分から60分の間に208%増加した。5-HT量の変化は観察されなかった。MDPVのDA作動性神経作用は類似薬物MDMA、METHと比較して緩やかで、短時間であった。なお、DA量と行動量の変化からマウス線条体内の神経細胞外DA量が200%以上増加すると行動量増加を引き起こすと考えられた。MDPVの神経毒性は今回の実験からは観察されなかった。

キーワード：マイクロダイアリシス、ドーパミン、メチレンジオキシ・ピロバレン、線条体

Abstract: Extracellular levels of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) were assayed in striatum of freely moving mice using microdialysis and high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EC), following oral administration of methylenedioxypropylamphetamine (MDPV). As well as these experiment, we performed the measurement of locomotor and behavior activities, and examined whether central nerve injury was caused by repetitive administration using an immunohistochemical method. Dialysates were assayed at 10 minute intervals until 2.5 hours after an oral administration of MDPV. DA extracellular content was 210% of control at 0-30minutes and 208% at 30-60 minutes. But 5-HT was not significantly influenced by MDPV administration. Increasing of the DA level was more moderate by MDPV than other amphetamine like stimulants; methamphetamine and MDMA. It was thought that the augmentation of locomotor and behavior activities increased, when dopamine content became more than 200% of the control level in striatum. The neurotoxicity of MDPV was not observed in this experiment.

Keywords : microdialysis, dopamine, methylenedioxypropylamphetamine, striatum

社会的意義：東京都は、都内において、薬物が濫用され、薬物による被害が深刻化している状況を踏まえ、薬物の濫用から青少年をはじめとする都民の健康と安全を守るとともに、都民が平穏にかつ安心して過ごすことができる健全な社会の実現を図ることを目的として、国に先駆けて、平成17年4月から「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を制定した。薬物の規制にあたっては、ヒトでの健康被害を予測可能な、動物実験等による科学的根拠に基づいた生体影響に関する情報が必要とされる。東京都健康安全研究センターでは、これまで、独自に開発した生体影響試験等を実施し、条例で定められた知事の付属機関である「東京都薬物情報評価委員会（現在は東京都脱法ドラッグ専門調査委員会と改名）：以下「委員会」と略す」にその資料を提供している。「委員会」はこれらの資料を含め、薬物の危険性に関する情報についての調査を行い、知事に報告する。その結果、条例により知事指定薬物に指定された薬物については、東京都は調査結果を国にあげるとともに、独自に規制を行ってきた。このような東京都の動きをきっかけとして、厚生労働省は、薬事法を改正（第二条第十四項関係）し、中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚的作用（当該作用の維持又は強化の作用を含む。）を有する蓋然性が高く、かつ、人の身体に使用された場合に保健衛生上の危害が発生するおそれがある物質を「指定薬物」として、平成19年4月より取り締まり規制を強化した。

上述のように東京都や国における薬物濫用に関する規制は強化されてきているが、規制を行うにあたっての科学的根拠、中枢神経作用に関する生体影響の科学的情報は依然として乏しく、さらなる情報が求められている。

本研究は薬物等の中枢神経作用の科学的情報をより多く、また、迅速に得るために計画されたものである。

マイクロダイアリシス（脳内局所微量透析）法による脳内のモノアミンを含む生体試料の回収により、神経伝達物質などの生体内濃度の変化を実験動物が生きたまま無拘束状態で追跡でき、「いわゆる脱法ドラッグ」等の薬物や中枢神経に作用する物質がどの神経伝達物質作動性神経系にどの程度の影響を及ぼすかを端的に調べることができる。従来の行動観察試験成績とインビトロによる細胞レベルの試験成績にマイクロダイアリシス法による生体影響試験成績を加えることによって、より多くの情報が得られるものと期待される。

今回は食欲抑制作用のあるピロバレロンの3,4メチレンジオキシの化学構造類似物であり、メチレンジオキシ・フェネチルアミン由来のメチレンジオキシ・メタンフェタミン（MDMA）と同様な効果があるといわれているメチレンジオキシ・ピロバレロン（MDPV）について検討したので報告する。

1. はじめに

中枢神経作用物質は神経伝達物質の各種合成酵素や分解酵素に作用するもの、特異的トランスポータ分子に作用するもの、特異的な神経受容体に結合するものなど、薬物の作用部位は多岐にわたる。いずれにしても、中枢神経作用物質の多くは神経シナプス間隙の特異的な神経伝達物質量の増減を引き起こす。従って、薬物がどの神経伝達物質の増減を引き起こすか、その増減程度と持続時間を明らかにすることによって薬物の中枢神経薬理作用を知ることができる。

神経伝達物質を神経軸索終末に放出する神経を伝達物質に「作動性」を付け、例えばドーパミン作動性神経と呼ぶ。線条体 (Striatum) には、ほとんどの伝達物質作動性神経の軸索終末が形成されている。黒質に起始細胞を持つドーパミン作動性神経、縫線核に起始細胞を持つセロトニン作動性神経、大脳皮質に起始細胞を持つグルタメート作動性神経、線条体内の介在神経であるアセチルコリン作動性神経、青班核に起始細胞を持つノルアドレナリン作動性神経などの神経終末が存在している (Carlson 2006)。従って、実験動物の線条体に刺入されたマイクロダイアリシス・プローブ (プローブ) から神経伝達物質を含んだ試料を経時的に回収する微量透析法 (マイクロダイアリシス法) と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とを組み合わせることによって、ほとんどの神経伝達物質量の経時的動向を調べることができる。

覚醒剤として知られるメチレンジオキシ・メタンフェタミン (MDMA) は興奮作用と幻覚作用があり、セロトニン (5-HT) の放出を刺激する。また、MDMA の類似薬物であるメタンフェタミン (METH) と同様に、神経細胞外のドーパミン (DA) 量を増加させる (Gough et al. 2002)。これら急性作用に加え、濫用によって MDMA と METH は DA 作動性神経および 5-HT 作動性神経を破壊することが知られている (Brown et al. 2000; McCann et al. 1998; Mayerhofer et al. 2001; Quinton et al. 2006)。メチレンジオキシ・ピロバレロン (MDPV) は食欲抑制作用のあるピロバレロンの 3,4-メチレンジオキシの化学構造類似物で (図 1)、メチレンジオキシ・フェネチルアミン由来の MDMA およびメチロンと同様な効果があるといわれている (MDPV-Wikipedia, 2007; Meltzer et al. 2006)。しかし、MDPV の中枢神経作用に関する生体影響の科学的情報はほとんど報告されていない。

そこで MDPV を対象薬物として、マイクロダイアリシス法によって線条体内神経細胞外 DA と 5-HT 量の測定を試みた。また、行動実験と連続投与実験の成績との関連を考察し、マイクロダイアリシス法による薬物スクリーニングの有用性について検討した。

2. 実験方法

2-1. 実験概要

マウス線条体からの脳内生体試料採取日はプローブ刺入・固定・留置外科手術の翌日 (MDPV 2mg/kg体重投与) と翌々日 (MDPV 20mg/kg体重投与) とした。試料採取当日、手術からの回復を確認したマウスを 30cmx30cmx40cm のアクリル製箱に入れ、自由行動下でプローブをマイクロポンプ (エイコム社 ESP-64) に接続して、透析液を毎分 4 μ l の流速で 90 分間流し、続いて 30 分間毎分 2 μ l の流速で流した後に試料採取を開始した。試料採取開始から 30 分後に蒸留水を経口投与した。蒸留水投与から 1 時間後に MDPV を経口投与し、MDPV 投与から 2 時間半後まで試料採取を行った。採取された試料は一旦 -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存し、その後、HPLC と電気化学検出器によって DA と 5-HT の量を測定した。試料回収が終わったマウスはペントバルビタール 70mg/kg 腹腔内注射による深麻酔下で、心臓カテーテルによって 4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定し、脳を摘出した。凍結マイクロトーム (Tissue-Tek Cryo, 2000) によって、脳は前頭断面の 20 μ m 凍結薄片にした。薄片は DA の合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の抗体による免疫組織化学染色後、スライドガラスに貼り付け、メチル緑色素による RNA (核) 染色をおこなった。その後カバーガラスで包埋して、光学顕微鏡によってプローブの刺入痕跡

を観察し、プローブが線条体に刺入されていることを確認した。マイクロダイアリシス実験は東京都神経科学総合研究所心理学研究部門実験室において、行動量測定実験と連続投与実験は東京都健康安全研究センターにおいて、それぞれおこなった。

2-2. 動物

マイクロダイアリシス法の実験にはCrj:CD1(ICR)系雄性マウス（日本チャールス・リバー）生後8週令、体重34~39g（実験開始時）の6匹を用いた。搬入後、室温25°C、湿度50%、照明時間午前6から午後6時までの飼育環境室で固形試料CE-2（日本クレア）を与え3日間飼育し、搬入から4日目にプローブ脳内刺入・固定・留置術を行った。

行動観察実験および連続投与実験にはCrj:CD1(ICR)系雄性マウス5週令、体重30~34g（日本チャールス・リバー）、各々3匹を用いた。

全ての実験は国立衛生研究所のAnimalsのCareとUseのためのガイドラインに従い、東京都神経科学研究所及び健康安全研究センターの動物実験の倫理委員会及び動物実験委員会の審査を得て行われた。

2-3. 試験薬物

薬事監視課が市場入手し、健康安全研究センター医薬品研究科において純度80%（HPLC分析）のMDPVと判定されたものを試験薬とした。行動観察実験および連続投与実験には対照薬物としてMDMA（市場入手、純度：HPLC分析99.8%）、METH（日本住友製薬、Lot.3712、純度99.9%）を使用した。

薬物は1mgを1ml蒸留水で希釈し、20mg/kg体重投与量の水溶液として用いた。2mg/kg体重投与量の場合1mg/ml溶液をさらに蒸留水で10倍に希釈した0.1mg/ml溶液を用いた。

MDPVの2mg/kg体重、METHの2mg/kg体重、MDMAの20mg/kg体重の投与量は人の1回の服用量の10倍量に相当する。なお、薬物の使用に際しては当生体影響研究科の麻薬取り扱者の佐藤かな子氏の管理下で行った。

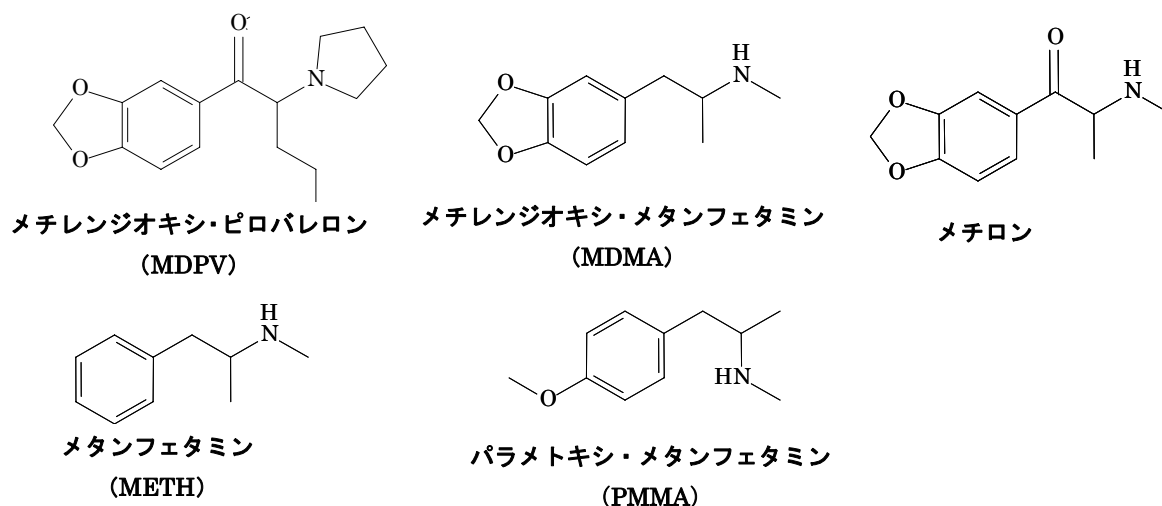


図1. 本論文に記載されている薬物の構造式

これら薬物はフェネチルアミン系に属する薬物である。フェネチルアミン系の薬物は興奮剤の性質を持つものが多いが、覚醒、幻覚、エクスタシーなど様々な作用を持つことが知られている。

2-4. プローブのマウス線条体内刺入・固定・留置術

ペントバルビタール麻酔下（腹腔内注射50mg/kg体重）で脳定位固定台にマウス頭部を固定し、脳定位術によって、プローブ（エイコム社D-I-6-02）をマウス線条体に刺入した。プローブ先端位置は頭蓋骨冠矢状縫合の交差点（Bregma）を基点として、吻側方向に0.7mm、正中線より1.6mm、脳表面より背腹側方向に深さ2.8mmとした。刺入されたプローブはプローブ周辺の頭蓋骨に固定したアンカー・ビス3本とともに歯科用セメントで覆い固定・留置した。

2-5. 試料採取法

マイクロポンプ（エイコム社ESP-64）に接続されたプローブからの透析液を毎分2 μ lの流速で透析し、フラクションコレクター（エイコム社EFC-82）を用いて、4°Cに冷却されたポリプロピレンチューブに10分おきに、それぞれ20 μ lの透析液を回収し、分析時まで-80°Cに保存した。なお、透析溶液の組成はpH 7.4、Na⁺: 155.0mM、Ca²⁺: 1.1mM、K⁺: 2.9mM、Mg²⁺: 0.8mMであった。

2-6. 神経伝達物質DA、5-HT量の測定・分析

10分間隔で採取された20 μ lの各試料についてDAと5-HT量をHPLCと電気化学の検出により測定した。それぞれピーク波形積分値を求め、試料採取開始後の30分間の平均値を100%とし、蒸留水投与後の30分間、MDPV投与前の30分間、MDPV投与から2時間半後までの30分間おきの平均値の変化率を求めた。なお、検出条件を以下に列記した。

1) 検出限界: 0.5fmol、2) 分離カラム: エイコム社製PP-ODS、3) 移動相: 99%0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)+1%メタノール、500mg/Lデカンスルホン酸ナトリウム(SDS)(ナカライテスク)、50mg/L EDTA-2Na、4) 移動相流速: 500 μ l/min、5) 分析温度: 25°C、6) 作用電極: グラファイト電極、7) 参照電極: 銀・塩化銀、8) 設定電圧: +400 mV vs. Ag/AgCL

2-7. 行動量測定

蒸留水、MDPV (20mg/kg 体重)、MDMA (20mg/kg 体重)、METH (2mg/kg 体重) をそれぞれ経口投与し、投与直後から3時間後までの行動量を測定した。小動物運動解析装置（東洋産業株式会社製 ANIMATE AT 420E）によって移動距離、動作回数を計測した。計測値は10分間の値とした。

2-8. 連続投与実験

マウスにMDMAおよびMDPVの20mg/kg体重投与、METHの2mg/kg体重投与をそれぞれ1日に2回行い（午前9時と午後5時）、5日間連続して合計10回の投与をおこなった。最終投与日から2週間経過した時点で、マウスは深麻酔下（70mg/kg体重ペントバルビタール腹腔内注射）で心臓カテーテルによって4%パラフォルムアルデヒド（2%飽和ピクリン酸含む）で還流固定し、脳を摘出した。摘出後、同固定液で一昼夜間、後固定し、その後20%ショ糖緩衝液で浸透圧調整をした。浸透圧調整後、脳を瞬間凍結して免疫組織化学の手技操作まで-80°Cにて冷凍保存した。凍結ミクロトームによって厚さ20 μ mの前頭断面凍結薄切標本を作製し、浮遊法による免疫組織化学を行った。線条体内のDA作動性神経軸索および終末、縫線核の5-HT作動性神経の損傷の有無を調べるために、それぞれ抗DAトランスポータ(DAT)抗体、抗TH抗体、抗5-HT抗体による免疫組織化学を行った。

2-9. 免疫組織化学法と観察

抗TH抗体(CHEMICON社, AB152)は2000倍、抗DAT抗体(CHEMICON社, MAB369)は10000倍、抗5-HT抗体(CHEMICON社, MAB352)は200倍に希釈して1次抗体反応をお

こなつた。抗TH抗体反応に続き、ビオチン化抗ラビット正常血清（VECTOR社, BA-1000）、抗DAT抗体反応及び抗5-HT抗体反応に続き、ビオチン化抗ラット正常血清（VECTOR社, BA-9400）をそれぞれ400倍に希釈して2次抗体反応をおこなつた。2次抗体反応後、ABC法によって増感し、抗TH抗体陽性反応像を得るためにジアミノベンチジンによる茶色に発色、抗DAT抗体および抗5-HT陽性反応像を得るためにニッケル・ジアミノベンチジンによる黒色に発色した。これら免疫組織化学反応後、スライドガラスに貼り付け、メチル緑色素によってRNA（核）染色後、カバーガラスによって封入した。これら標本を光学顕微鏡（オリンパス社製AH-2）にて観察するとともに、CCDカメラで映像をデジタル化して、パーソナルコンピュータ（Windows XP）の画像収録システム（オリンパス社製DP Controller）によって画像収録した。

3. 結果及び考察

3-1. プローブのマウス脳内刺入法

刺入法には2通りの方法がある。一つは径の太いステンレス製パイプをガイド・パイプとして脳に刺入し、固定・留置し、その外科手術から1週間程度の回復を待って、プローブをガイド・パイプ内に挿入する方法である。この方法は術後の回復を待てる点で優れているが、小型のマウスが実験動物の場合、脳の大きさに比して太すぎるパイプが脳に刺入され、脳組織の物理的損傷程度が大きくなる。従って、ラットには使われるが、マウスの実験に採用されることが少ない。もう一つは今回採用したプローブを脳に直接刺入して、留置・固定する方法である。この方法は術後3日以降で透析膜周囲凝固がおこるため、試料回収が困難になる。従って、術後2日以内にマイクロダイアリシスをおこなう必要があった。刺入術から比較的短い経過時間後に試料採取するため、採取された試料が安定しにくいことが懸念された。しかしながら、マウスはプローブ刺入・固定・留置術の麻酔から約3時間後に覚醒し、外科手術の翌日には水と餌の摂取を認め、行動に異常は認められなかった。また、神経伝達物質量測定値は薬物投与前で安定しており、投与後の経時変化が検出できた。

以上のことからマウスの実験では、プローブを直接、刺入・固定・留置した試料採取法の採用は適切な選択であったと考えられた。また、外科手術を含め4日間で実験成績が得られ、*in vivo*の中樞神経作用試験としては迅速な試験方法といえる。

3-2. 線条体内神経細胞外DA量

図2にMDPV投与前後の線条体内神経細胞外DA量の経時変化をグラフで示した。それぞれ10分間の採取試料からDA量をHPLCで測定し、それぞれピーク波形積分値を求め、連続する3つの計測値すなわち30分間のDA量の平均値を求めた。試料採取開始から30分後までの平均値を100%とし（図2のCont bar）、その後の30分間の平均値との比率をDA量の変化としてグラフに示している。試料採取開始から30分後に、経口投与による影響を調べるために蒸留水を経口投与した。蒸留水投与後の30分間のDA量はほとんど変化しな

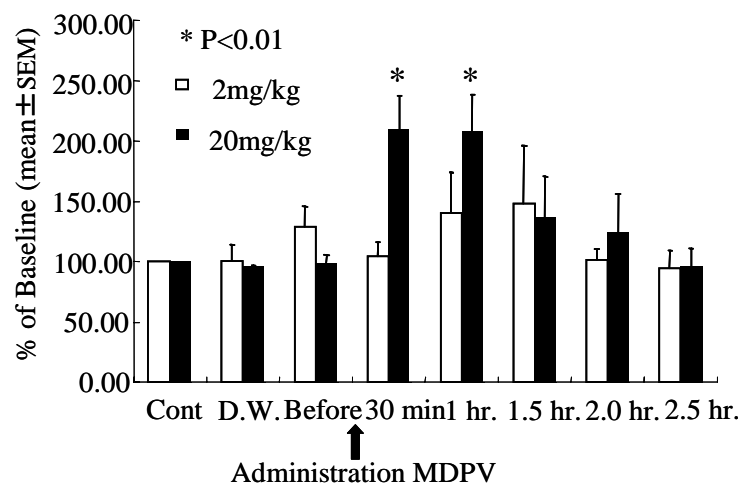


図2. 線条体内神経細胞外DA量の経時変化
 (説明文中参照)

った (図2のD.W. bar)。その後の30分間はMDPV投与前の状態を調べるために試料を採取した。この時点でも有意な増減は認められなかった (図2のBefore bar)。MDPV投与後は30分おきにDA量の変化を求めた。2mg/kg体重投与では投与後、わずかに増加する傾向を示したが、有意差を認めなかった (図2の30 min~2.5 hr open bar)。20mg/kg体重投与では投与後の30分間に約210%、30分後から1時間後の間で約208%のDA量増加が認められた (図2の30 min, 1 hr closed bar)。この増加は投与前の量と比較して、 $p < 0.01$ 水準の有意差を示した。投与から1時間以降で、DA量は漸次減少していった (図2の2.5 hr closed bar)。

線条体内神経細胞外DA量は類似薬物MDMAによっても増加する。Goughらはマイクロダイアリスによって、MDMA (20 mg/kg体重) の皮下注で線条体内神経細胞外DA量が約1時間後に投与前に比べ1000%近くに増加し、3時間経過した時点でも200%以上の増加を認め、METH (2.5 mg/kg体重) の皮下注で700%近くのDA量増加を示し、投与前のDA量に戻るには3時間以上の時間経過を必要とする実験成績を報告している (Gough et al. 2002)。

我々は、今回の実験とは別に、MDMAの類似薬物PMMA (20 mg/kg体重) の経口投与でDA量は投与後1時間後に投与前の約170%程度の増加にとどまる成績を得ている (不破他, 2008)。

以上のようにMDPVは他のフェネチルアミン系の類似薬物と同様に、線状体内神経細胞外のドーパミン量を増大させる作用があった。投与方法や薬物の純度の違いもあり、短絡的に比較できないが、MDPVの神経細胞外DA量増加を引き起こす中枢神経薬理作用はMETH、MDMAのそれよりも弱く、PMMAのそれよりも強いものと考えられた。

3-3. 線条体内神経細胞外 5-HT 量

類似薬物のMDMAは5-HTの放出を促進することが知られている。Goughらは20mg/kg体重のMDMA皮下注によって、線条体内神経細胞外5-HT量が投与40分後に600%程度増加し、投与後2時間半以降に投与前の量に戻る実験成績を報告している (Gough et al, 2002)。このことからすれば、MDPVも線条体内神経細胞外の5-HT量を増加させる作用があると考えられたが、予想に反して、5-HT量の有意な増加を認めるには至らなかった。

本実験とは別に、我々は、MDMAの類似薬物PMMA (20 mg/kg体重) 経口投与実験では線条体内神経細胞外の5-HT量増加が投与前の約3200%という著明な増加を検出した (不破他, 2008)。このPMMA投与実験はMDPVを対照薬物とした実験と同時期に、同じ手法を用いておこなっているため、MDPV投与による5-HT量の有意な変化が検出できなかったのは手技的な不備によるものではないと考えられる。(PMMAは昨年、都知事指定薬に指定され、今年になって厚生労働大臣の指定薬とされた。)

以上のように、MDPVはMDMAに化学構造が類似し、その作用が同じといわれるが、5-HTの放出は刺激されなかった。このことは化学構造類似薬物でもその中枢神経作用は異なることを示した実験結果といえる。

3-4. 行動量とDA量

図3は蒸留水、MDPV (20 mg/kg体重)、MDMA (20 mg/kg体重)、METH (2 mg/kg体重) をそれぞれ経口投与した後のマウスの移動距離 (A) と行動回数 (B) の変化推移を示している。

蒸留水投与マウス (Δ) は、行動解析装置内に入れられた直後は移動距離、行動回数ともに一時的に大きな値を示した。この行動量は経口投与手技によるマウスの興奮状態と解析装置内に入れられたという異所性探索行動を反映した結果と考えられる。しかしながら、この状態は長くは続かず、その後の増加は認められず、時間経過にともない右下がりの曲線を描き減少した。

MDPV (\bullet)、MDMA (\blacktriangle) 及びMETH (\circ) 投与による行動量の変化推移は蒸留水投与の対照群マウス (Δ) のものと明らかに異なるパターンを示した。MDPV投与による測定開始直後の行動量は移動距離、行動回数とも蒸留水投与と同様に高い値を示した。しかしながら、その後

は蒸留水投与マウスとは異なり投与から30~40分経過した時点まで測定開始直後よりも却って増加し続けた。その後、投与から1時間後にほぼ測定開始時の値に戻り、その後漸次減少していった。1時間以降も行動量は蒸留水投与マウスと比較して高い値を示していた。

一方、類似薬物のMDMAおよびMETH投与では測定開始直後に移動距離、行動回数とも蒸留水投与マウスと同様に高い値を示したが、その後の時間経過に伴う行動量の変化推移は蒸留水投与マウスとは異なっていた。METH投与マウスの行動回数が時間経過に伴って、わずかに減少していく傾向を認める以外はいずれも測定開始の高い値を維持し続け3時間経過した時点でも減少しなかった。これらの結果はMETHおよびMDMAは投与後比較的長い時間行動量を増加させる興奮作用があることを示す成績といえる。

以上のように、MDPVはMDMA、METHと同様に、行動量を増加させる興奮作用を持つ薬物であったが、MDMA、METHと比較し、行動に影響を与える作用時間は短く、その程度も小さいと考えられた。

線条体内神経細胞外のDA量増加は運動量を増加させることが知られている (Carlson, 2006; Kuczenski et al, 1989)。今回のDA量と行動量測定の実験結果からもDA作動性神経系が行動量増加に深い関わりを持っていることが確認された。MDPVによる行動量の増加が顕著に認められる投与から1時間までの間の線条体内神経細胞外DA量は200%以上に増加していた。

MDMA及びMETH投与マウスの行動量は投与直後から3時間後まで高い値を維持していた。一方、DA量はMDMA (20mg/kg) ならびにMETH (2.5mg/kg) 皮下注投与から1時間経過した時点で1000%ならびに700%と著明な増加を示し、漸次減少していき、3時間後では400%ならびに200%以上の増加値を示すことがGoughらによって報告されている (Gough et al, 2002)。

これらのことから、線条体内神経細胞外DA量が200%以上増加すると行動量増加を表出させる。言い換えれば、200%のDA量増加値が行動量増加の閾値と推測された。また、今回の実験とは別にMDMAの類似薬PMMA (20mg/kg体重) 経口投与実験からもDA量増加200%が行動量増加の閾値と思える実験成績が得られている (不破他, 2008)。PMMA投与によって線条体内の神経細胞外DA量の増加は投与から30分から1時間半後の間で約170%程度の増加にとどまり、200%増加に達しなかった。一方、行動量の増加は観察されなかった。

今回の実験ではノルアドレナリン量は測定しなかった。一般にノルアドレナリンの神経細胞外放出が行動に及ぼす作用は興奮性である。また、類似薬物のMDMAはノルアドレナリンの放出を刺激することが知られている (Carlson, 2006; White et al, 1996)。従って、DA作動性神経の興奮作用に加えて、MDPVは線条体内神経細胞外のノルアドレナリン量の増加を引き起し、ノ

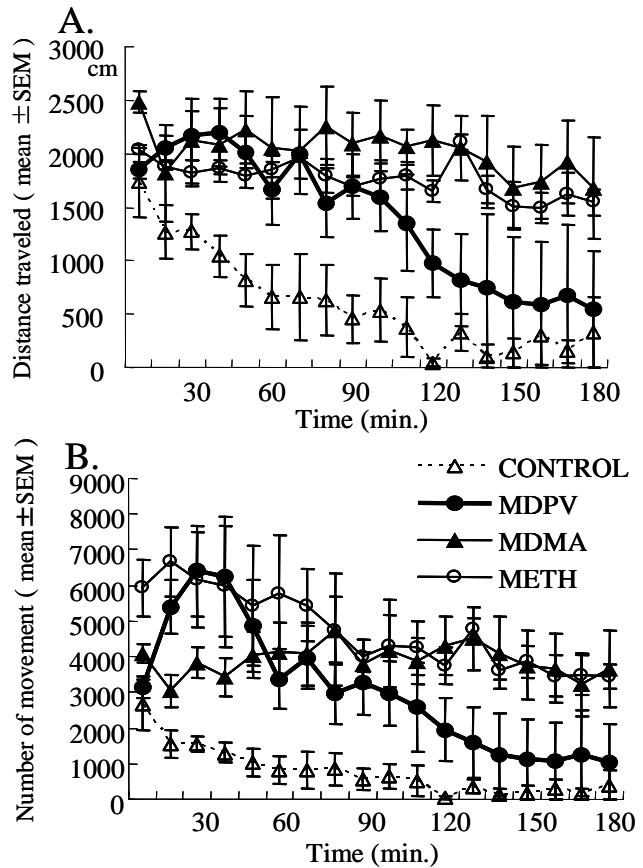


図3. 行動量の変化推移

A: 10分間の移動距離、B: 10分間の行動回数
 蒸留水をcontrol群として、MDPV,MDMA,METH投与群の行動量変化推移を示す。(説明文中参照)

ルアドレナリン作動性神経の興奮作用が行動量増加を引き起こしている可能性がある。今回の実験結果の移動距離および行動回数がMDPV投与から1時間以降でも蒸留水投与マウスと比べ高い値を示していたことからその可能性が考えられた。

3-5. 連続投与実験

MDMA、METH は DA 作動性神経および 5-HT 作動性神経を損傷することが知られている (Brown et al, 2000; Mayerhofer et al, 2001; Quinton et al, 2006)。また、MDMA の類似薬物 METH を長期にわたり濫用した人の線条体内 DA 作動性神経終末の減少が知られている (McCann et al, 1998)。これら神経の損傷は酸化ストレス (oxidative stress)、興奮毒性 (excitotoxicity)、ミトコンドリア機能障害 (mitochondrial dysfunction) が関与していると考えられている (Quinton et al, 2006)。

今回は MDPV 連続投与による DA 作動性神経と 5-HT 作動性神経に及ぼす神経毒性を免疫組織化学によって調べた。

図 4 は、上段から蒸留水 (DW)、MDPV、MDMA、METH をそれぞれ 1 日 2 回、5 日間連続投与し、最終投与日から 2 週間経過したマウス脳の免疫組織化学組織の光学顕微鏡写真の例を示した。図 4 の A には線条体 (Striatum) 部の抗 DAT 抗体免疫組織化学像 (黒色) を示している。DAT は DA 作動性神経の軸索と神経終末に局在するので、抗 DAT 抗体免疫組織化学陽性像は DA 作動性神経の軸索と終末を識別する。MDMA および METH の連続投与で染色濃度の減少が認められるのに対して、MDPV 投与では染色濃度の減少は認められなかった。なお、図には示さなかったが、抗 TH 抗体による免疫組織化学の成績も同様であった。TH は DA の前駆物質チロシンから DA を合成する際の補酵素である。そのため抗 TH 抗体の陽性細胞は DA 作動性神経を識別できる。

図 4-B は背側縫線核 (Dorsal Raphe nucleus) の神経細胞群の抗 5-HT 抗体免疫組織化学陽性神経細胞 (黒色) の例を示している。MDMA および METH 投与では抗 5-HT 抗体によって染め出された 5-HT 作動性神経細胞の萎縮および細胞数の減少が観察された。これに対して、MDPV 投与による縫線核 5-HT 作動性神経の萎縮及び細胞数の減少は観察されなかった。

以上のように、今回の MDPV 連続投与実験では DA 作動性神経ならびに 5-HT 作動性神経に

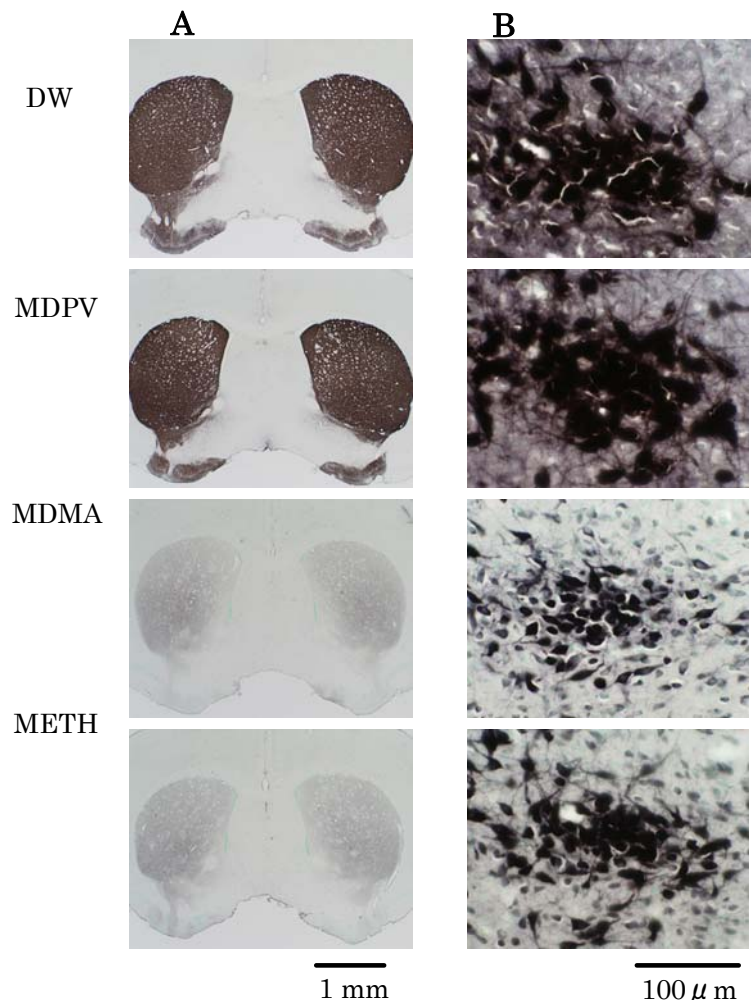


図4. 連続投与後のマウス脳薄切標本の免疫組織化学像の例
A: 線条体部の抗DAT抗体の免疫組織化学染色例。B: 背側縫線核の神経細胞群の抗5-HT抗体に陽性反応を示す神経細胞 (説明文中参照)

何らかの損傷をうかがわせるような免疫組織化学像の所見を認めなかった。MDPVによるDAの放出量がMDMAの約5分の1、METHの約3分の1と少ないことから想像して、DA作動性神経に損傷を及ぼすほどの効力を持たなかったのかもしれない。一方、MDPVによる5-HT量の増減が認められなかったことから、MDPVは5-HT作動性神経には作用せずに、毒性を持たないと考えられた。

今回のMDPVの投与量は人の1回の服用量に換算すると100倍量に当たる。この投与量を連続5日、1日2回行った実験結果であった。しかしながら、人の濫用ではMDPVは比較的短時間で連続的に服用される例がインターネットで紹介されている(約1時間おきに7回)(Erowid Experience Vaults Report, 2008)。このことからすれば、MDPVの神経毒性を調べるに当たって、マウスの実験においては今回よりも頻回に投与する必要があるのかもしれない。また、類似薬物のMDMAがノルアドレナリンの神経細胞外への放出を促進することが知られているが、ノルアドレナリンに関する実験は行っていない。従って、今回の実験結果からだけではMDPVが中枢神経細胞を変性させるような神経毒性が無いとは言い切れない。

4. まとめ

MDPVは類似薬物のMDMAとMETHと同様にDA作動性神経への興奮作用を有する薬物であると考えられた。DA作動性神経への作用時間はMDMA、METHよりも短く、その作用程度も弱いものと考えられた。また、線条体内神経細胞外のDA量が投与前の200%以上に増加すると行動量の増加を引き起こすと考えられた。

一方、5-HT作動性神経への作用を示さなかったという点で化学構造式の類似薬物MDMAとは異なった。

また、MDPVによるDAならびに5-HT作動性神経の損傷は観察されなかった。しかしながら、ノルアドレナリン作動性神経、投与の量および頻度など、神経毒性の有無については更に検討する必要があるかもしれない。

マイクロダイアリシスによる実験はどの神経伝達物質作動性神経に、どの程度、どのぐらいの時間、作用するかを明らかにでき、その成績からある程度、薬物による行動変化や神経損傷の背景を知ることができる。また、実験結果は短期間で得られ、迅速な薬物スクリーニング法と言える。

本報文は、東京都健康安全研究センター研究年報第58号(2007)に掲載された論文の内容を基に、一部加筆・修正を加えたものである。

参考資料:

1. Brown, P. and Molliver, M.E. (2000), Dual Serotonin (5-HT) Projections to the Nucleus Accumbens Core and Shell: Relation of the 5-HT Transporter to Amphetamine Induced Neurotoxicity. *The J. Neurosci.*, 20(5), 1952-1963
2. Erowid Experience Vaults Report. (2008),
<http://www.erowid.org/experiences/exp.php?ID=47047>
3. Gough, B., Imam, S.Z., Blough, B., Slikker, W.Jr., Ali, S.F. (2002), Comparative Effects of Substituted Amphetamines (PMA, MDMA, and METH) on Monoamines in Rat Caudate.- A Microdialysis Study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 965, 410-420
4. Kuczenski, R., Segal, D. (1989), Concomitant Characterization of Behavioral and Striatal Neurotransmitter Response to Amphetamine Using in vivo microdialysis. *J Neurosci.* 9(6),

2051-2065

5. Mayerhofer, A., Kovar, KA., Schmidt, WJ. (2001), Changes in serotonin, dopamine and noradrenaline levels in striatum and nucleus accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats. *Neurosci.Lett.*, 308(2), 99-102
6. McCann, U.D., Wong, D.F., Yokoi, F., Villemagne, V., Dannls, R.F. and Ricaurte, G.A. (1998), Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: Evidence from positron emission tomography studies with [¹¹C]WIN-35,428. *J. Neurosci.*, 18, 8417-8422
7. MDPV-Wikipedia, the free encyclopedia, (2007), <http://en.wikipedia.org/wiki/MDPV>
8. Meltzer, P.C., Bultler, D., Deschamps, J.R., and Madras, B.K. (2006), 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one(Pyrovalerone) Analogues: A Promising Class of Monoamine Uptake Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 49, 1420-1432.
9. Quinton, M.S. and Yamamoto B.K. (2006), Causes and Consequences of Methamphetamine and MDMA Toxicity. *The AAPS Journal*, 8(2)337-347
10. White, SR., Obradovic, T., Imel, KM., Wheaton, MJ. (1996), The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 49(5), 455-79
11. Carlson, N.R. (泰羅雅登、中村克樹 監訳) (2006), カールソン・神経化学テキスト・脳と行動・原書8版, 4章精神薬理学, p102-134, 丸善
12. 不破達, 小縣昭夫, 田中豊人, 福森信隆, 久保喜一, 湯澤勝廣, 安藤弘, 矢野範男, 長澤明道, 高橋博, 中江大, 上原真一, 上村尚, 本多芳子, 児玉亨 (2008). 違法ドラッグ、パラメトキシメタンフェタミン(PMMA)の中枢神経作用. 日本薬学会代128年会, 要旨集3, p121