

脳マイクロダイアリシス法を用いた

乱用薬物の中枢モノアミンに及ぼす影響評価に関する研究

瀧上 由貴

2014

目 次

【略語】	1
【緒言】	2
第一章 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) と methamphetamine との併用が 中枢に及ぼす影響の評価	4
1-1 実験方法	6
1-1-1 使用動物	6
1-1-2 脳マイクロダイアリシス条件	6
1-1-3 マイクロダイアリシスプローブの回収率	7
1-1-4 薬物投与	7
1-1-5 脳内薬物濃度の定量	9
1-1-6 中枢モノアミン濃度の定量	12
1-1-7 統計解析	13
1-2 結 果	14
1-2-1 薬物投与後の脳内薬物濃度の解析	14
1-2-2 薬物投与後の中枢 dopamine および serotonin 濃度変動の解析	20
1-2-3 脳内薬物濃度および中枢モノアミン濃度における相関性の解析	23
1-3 考 察	25
1-4 小 括	26
第二章 合成 ketamine 誘導体 methoxetamine が中枢モノアミン濃度に及ぼす影響の評 価	27
2-1 実験方法	28
2-1-1 使用動物	28
2-1-2 脳マイクロダイアリシス条件	28
2-1-3 薬物投与	29
2-1-4 中枢モノアミン濃度の定量	30
2-1-5 統計解析	31
2-2 結 果	32
2-2-1 Methoxetamine 投与後の線条体, 側坐核, 前頭前野における中枢 dopamine およ び serotonin 濃度変動の解析	32
2-2-2 前頭前野における中枢 dopamine および serotonin 濃度に対する methoxetamine	

と ketamine の影響の比較.....	34
2-3 考 察.....	37
2-4 小 括.....	38
【結論】	39
【使用試薬及び機器】	40
【引用文献】	45
【謝辞】	50

【略語】

aCSF, artificial cerebrospinal fluid

AUC, area under the curve

CL, clearance

C_{\max} , peak concentration

DIB-Cl, 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride

ECD, electrochemical detection

EDTA·2Na, ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid disodium salt dehydrate

HPLC, high-performance liquid chromatography

i.d., internal diameter

i.p., intraperitoneal

LOD, limit of detection

MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine

MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine

Methoxetamine, 2-(3-methoxyphenyl)-2-(ethylamino)cyclohexanone

mPFC, prefrontal cortex

MRT, mean residence time

S.D., standard deviation of mean

SDS, sodium 1-decansulfonate

$T_{1/2}$, half-life

T_{\max} , time to reach peak concentration

【緒言】

薬物乱用は、医薬品でない薬物を不正に使用することをいい、多幸感や興奮作用、社会性の向上、不安感の軽減、幻覚などの精神作用を得ようとするためにおこなわれるが、過度の精神作用が傷害事件や交通事故¹⁾、また、様々な身体症状、健康被害、死亡例^{2,3)}など社会的に有害な現象を引き起こす。そのため、日本においても、大麻取締法、覚せい剤取締法、麻薬および向精神薬取締法により、薬物乱用防止につながる法規制がなされてきた。しかしながら、既に規制されている薬物乱用は根深く、覚せい剤の *methamphetamine* や合成麻薬の *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)* の不正使用が未だに確認されている⁴⁾。MDMA の多くは、*methamphetamine* などの複数の薬物と共に混在する製品として流通⁵⁾しているほか、精神作用の向上を求めて複数の同系薬物を乱用者が意図的に摂取する事例⁶⁻⁸⁾が多く存在する。これらの点を考慮すると、薬物乱用によるヒトへの健康被害は、今後ますます複雑かつ深刻なものとなることが予想される。さらに、規制薬物の代替品となるような合成 *ketamine* 誘導体⁹⁾ や合成 *cathinone* 類¹⁰⁾、合成 *cannabinoid*¹¹⁾ など、法規制に対して回避可能な構造に改変された薬物も新たに見出され、法規制と薬物乱用との応酬が続いている。そこで近年、このような薬物を迅速に規制することを目的として、薬物が中枢神経系に及ぼす影響を考慮した、医薬品医療機器等法 (旧薬事法) の指定薬物制度¹²⁾ や包括指定制度が策定された。また、薬物乱用防止への取り組みとして、薬物乱用によって生じる生体への悪影響についての情報発信や啓発活動なども多くなされている。

一方、科学的な立場から、薬物乱用防止に対して、薬物が中枢へ及ぼす影響を明らかにすることが求められている。こうした背景のもと、法中毒の領域において、ヒトにおける症例報告^{13,14)}をはじめ、動物を用いた行動・依存性試験¹⁵⁾、*dopamine* 神経や *serotonin* 神経などの中枢モノアミン神経系への作用機序解明を目指した検討¹⁶⁻²⁰⁾ など、様々なアプローチで科学的エビデンスの構築がなされている。なかでも中枢神経系への作用機序解明に重要となる中枢モノアミンの解析に関しては、摘出した動物脳の中枢モノアミン含量解析による神経毒性の評価¹⁶⁾、ノックアウト動物を用いた関連受容体の解析¹⁷⁾、薬物のモノアミントランスポーターへの結合親和性評価^{18,19)}、脳マイクロダイアリス法を用いた中枢モノアミン濃度の解析²⁰⁾ などがおこなわれてきた。脳マイクロダイアリス法は、先端に透析膜を有するプローブを標的脳部位に挿入することで、生きた動物脳より経時的に試料を得ることが出来ることから、脳に移行した薬物濃度や脳内の神経伝達物質の定量を簡便に行う上で有用な方法である²¹⁾。したがって、脳マイクロダイアリス法を用いた薬物動態あるいは薬力学による解析により、脳へ移行した薬物と中枢モノアミンとの関連性評価や、新たな薬物または複数薬物の併用による中枢への影響評価をおこなうことができると考えられる。

そこで著者は、合成麻薬 MDMA と合成 *ketamine* 誘導体 *methoxetamine* の中枢での作用機序解明を目的として、薬物投与後のラットもしくはマウスに脳マイクロダイアリス

法を適用し、中枢モノアミンである dopamine (Fig. 1a) および serotonin (Fig. 1b) への影響を評価した。まず、合成麻薬 MDMA に関して、MDMA 単独投与時あるいは methamphetamine との併用投与時における、脳へ移行した薬物と中枢モノアミン濃度との関連性の解析をおこなった。次に、中枢モノアミンへの影響が未だ評価されていない、合成 ketamine 誘導体 methoxetamine について、methoxetamine 投与が及ぼす中枢モノアミン濃度への影響を経時的に評価した。

以下、これらの結果について、二章にわたり論述する。

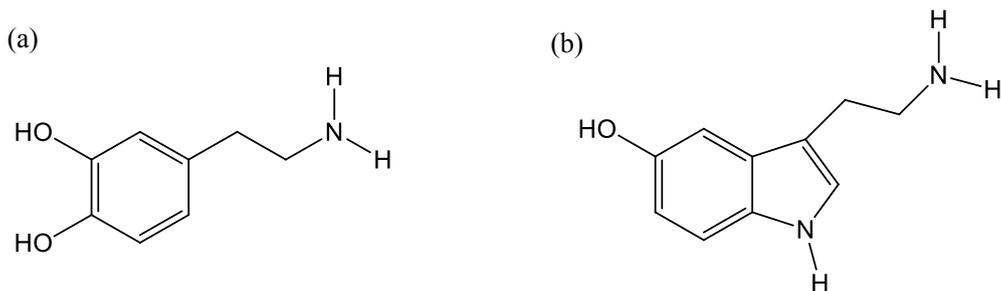


Fig. 1. Structures of dopamine (a) and serotonin (b).

第一章 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) と methamphetamine との併用が中枢に及ぼす影響の評価

Amphetamine 系合成麻薬 MDMA は、錠剤という形状や有名なロゴを模した外見から、若年層を中心に乱用されている⁵⁾。流通している MDMA 錠剤の負の特徴として、不均一な MDMA 含有量^{5, 22-23)} や, methamphetamine, amphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), caffeine など様々な薬物の混在⁵⁾ があげられる。また、摂取時毎で異なる錠数の摂取^{6, 24-25)} や, methamphetamine などの薬物との同時摂取⁶⁻⁸⁾ が多く報告されていることから、MDMA によって生じる中枢作用や有害事象は複雑かつ重篤になることが予測される。したがって、薬物乱用によって生じる生体への悪影響についての情報発信や啓発活動をおこっていく上では、不均一な MDMA 摂取量や methamphetamine など同系薬物との併用の中枢へ及ぼす影響に関する知見が重要となる。

MDMA は、中枢に移行後、モノアミントランスポーター阻害作用やモノアミン放出促進作用、モノアミンオキシダーゼ阻害作用を介し、中枢モノアミン濃度を増加させることで様々な薬理作用を発現する²⁶⁾。なかでも、dopamine や serotonin 濃度の変化は、多幸感や精神刺激作用、共感性²⁷⁾、不安感の軽減²⁸⁾、幻覚²⁹⁾の原因であるだけでなく、体温調節中枢に影響をもたらすことにより、MDMA による重篤な有害事象の一つである異常高熱も誘発すると考えられている³⁰⁻³⁴⁾。これらのことから、dopamine や serotonin 濃度を指標とした解析は、MDMA の作用機序を解明する上で意義があるものと考えられる。これまでも、これらを指標とした、MDMA による神経毒性評価のための中枢モノアミン含有量の解析¹⁶⁾ や、行動と中枢モノアミン濃度の関連性評価³⁵⁾、脳マイクロダイアリス法を用いた中枢モノアミン濃度変動の解析²⁰⁾ などを通じて、作用機序の解明が試みられてきた。薬物の中枢での作用機序を解明する上では、薬物濃度と中枢モノアミン濃度との関連性が重要であるが、この関連性について詳細に検討した研究はほとんどなく、エビデンスが不足している。

そこで第一章では、MDMA 錠剤摂取の中枢への影響評価を最終目的として、脳マイクロダイアリス法を用いた脳内薬物濃度の定量と中枢モノアミンの dopamine および serotonin 濃度の定量によって、脳へ移行した薬物濃度と中枢モノアミン濃度との関連性評価をおこなった。まず、不均一な MDMA 含有量を想定した評価として、異なる投与量の MDMA をラットに投与し、線条体における薬物濃度と dopamine および serotonin 濃度を定量した。次に、MDMA と methamphetamine の同時摂取を想定した評価のため、MDMA と methamphetamine を併用投与したラットについて、同様の検討をおこなった。最後に、得られた結果を用いて、脳へ移行した薬物濃度と dopamine および serotonin 濃度との関連性を解析した。本章での薬物濃度の定量では、MDMA (Fig. 2a) と methamphetamine (Fig. 2c) の代謝物、MDA (Fig. 2b) と amphetamine (Fig. 2d) も分析対象とし、薬物の代謝と脳移行に関して考察をおこなった。

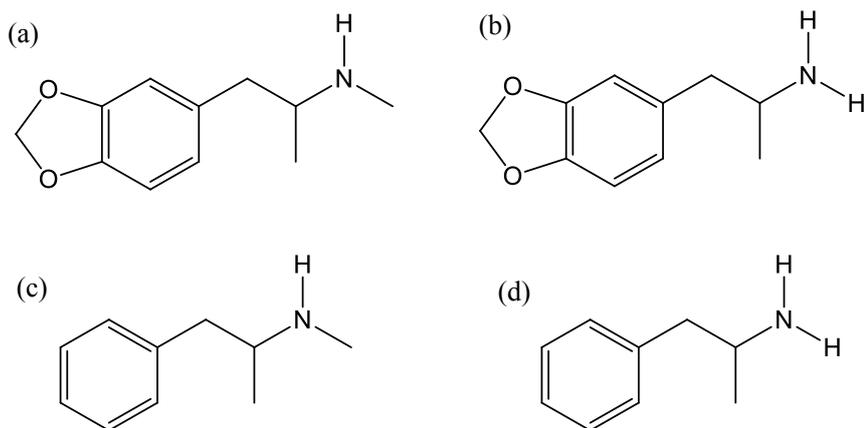


Fig.2. Structures of analytical targets, MDMA (a), its metabolite, MDA (b), methamphetamine (c), its metabolite, amphetamine (d).

1-1 実験方法

1-1-1 使用動物

雄性 Wistar 系ラット (8 週齢; 体重, 270-320 g) を使用した. 飼育環境は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 12 時間 (8:00-20:00) の明暗サイクルとし, 飼料 (固形飼料 CE, オリエンタル酵母工業) 及び水道水は自由に摂取できるものとした. 全ての実験操作は, 長崎大学動物実験規則を遵守しておこなった.

1-1-2 脳マイクロダイアリシス条件

カルバミド酸エチル (1.5 g/kg, 腹腔内 (intraperitoneal, *i.p.*) 投与) を用いて麻酔したラットを, 脳定位固定装置 SR-5R に固定した. 頭皮を切開して頭蓋骨を露出させた後, ドリルで頭蓋骨に透析プローブ挿入のための直径約 2 mm の穴を開け, プローブを挿入した. プローブには MAB6 (膜長 4 mm; ポリエーテルスルホン膜; カットオフ値 15,000 kDa) を用いた. プローブの挿入部位は Paxinos & Watson の脳地図³⁶⁾にしたがい, 左線条体 (A, +0.6 mm; L, 3.0 mm from bregma; H, -7.0 mm from skull surface) とした. CMA/100 マイクロインジェクションポンプを用いて, 灌流液の人工脳脊髄液 artificial cerebrospinal fluid (aCSF) を 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ で灌流した.

プローブ挿入後, 組織損傷による内因性物質の影響を除くために, 1 時間灌流し, ベースラインとして 20 分間, 10 分間隔にて脳透析液の採取をおこなった. その後, 薬物を *i.p.* 投与し, 投与後 3 時間まで 10 分間隔, 以後 10 時間まで 1 時間間隔で脳透析液を採取した.

脳透析液採取での中枢モノアミンの分解を防ぐため, 保存液として 100 mM ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA \cdot 2Na) を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 3.5) を予めサンプリングチューブに添加 (試料:保存液 = 4:1 (v/v)) し, 氷上にて採取した. 採取した脳透析液は 2 つに分割し, 一方を蛍光誘導体化後, 高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC)-蛍光分析による薬物濃度の定量に, もう一方を前処理なしに, HPLC-電気化学検出 (electrochemical detection, ECD) 分析による中枢モノアミン濃度の定量に供した.

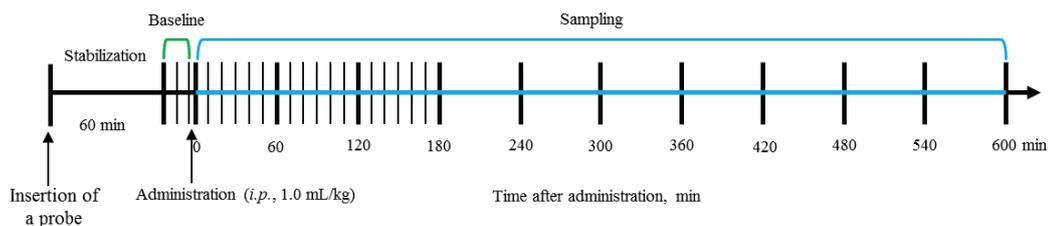


Fig. 3. Sampling schedule

1-1-3 マイクロダイアリシスプローブの回収率

プローブの *in vivo* の回収率 ($R_{in vivo}$) は、既報^{37,38)} に従って *in vitro* の回収率 ($R_{in vitro}$), 損失率 ($L_{in vitro}$) および *in vivo* の損失率 ($L_{in vivo}$) を用いて算出した。回収率の算出には, MDMA (100 ng/mL), MDA (50 ng/mL), methamphetamine (100 ng/mL), amphetamine (50 ng/mL), dopamine (25 nM), serotonin (25 nM) となるように添加した aCSF を用いた。 $R_{in vivo}$ は以下の式を用いて算出した。

$$R_{in vivo} = L_{in vivo} \times (R_{in vitro} / L_{in vitro})$$

その結果, MDMA, MDA, methamphetamine, amphetamine, dopamine, serotonin の $R_{in vivo}$ はそれぞれ, 12.4%, 10.1%, 11.5%, 11.3%, 8.5%, 15.0% と算出された。得られた回収率を用いて, 透析液中の各薬物およびモノアミン濃度を, 脳内濃度に換算し, 解析をおこなった。

1-1-4 薬物投与

本研究で検討した投与群は以下の通りである。

MDMA 12 mg/kg + saline (n = 4)

MDMA 25 mg/kg + saline (n = 4)

Methamphetamine 10 mg/kg + saline (n = 4)

MDMA 12 mg/kg + methamphetamine 10 mg/kg (n = 4)

MDMA は生理食塩水に懸濁させ, 超音波処理後, メンブランフィルターでろ過したものを使用した。また, methamphetamine は生理食塩水で希釈したものを使用した。

本研究で用いた MDMA 12 mg/kg の用量は, 70 kg のヒトにおいて約 164 mg に相当する用量である³⁹⁾。MDMA 錠 1 錠中には 1-245 mg の MDMA が含まれていると報告がある^{5,23-24)} ため, 今回用いた MDMA 用量はヒトが摂取しうる用量に相当すると考えられる。

また, MDMA 25 mg/kg の用量は, MDMA 12 mg/kg と methamphetamine 10 mg/kg を MDMA に換算したものである。MDMA 12 mg/kg 投与群と MDMA 25 mg/kg 投与群とを比較することで, 異なる用量の MDMA による影響を考察し, MDMA 25 mg/kg 投与時と MDMA 12 mg/kg と methamphetamine 10 mg/kg の併用時とを比較することで, MDMA と methamphetamine の併用による影響を考察した。

投与する薬物はラットの体重 100 g 当たり 0.1 mL となるように調製し、全て *i.p.* 投与した。MDMA もしくは methamphetamine の単独投与時には、薬物投与後、直ちに生理食塩水を投与した。また、MDMA と methamphetamine の併用投与時には、MDMA 溶液を投与後、直ちに methamphetamine 溶液を投与した。

1-1-5 脳内薬物濃度の定量

薬物の蛍光誘導体化操作

ラット脳透析液中の MDMA, methamphetamine, それぞれの代謝物 MDA, amphetamine を HPLC-蛍光検出法を用いて定量するにあたり, 得られた脳透析液の半量を蛍光誘導体化試薬の 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl) によって蛍光誘導体化した. 本法で用いた蛍光誘導体化操作を Chart 1 に示す. 蛍光誘導体化操作は, 既報の MDMA と MDA の定量法⁴⁰⁾ を基におこなった. MDMA と DIB-Cl との反応式を Fig. 4 に示す.

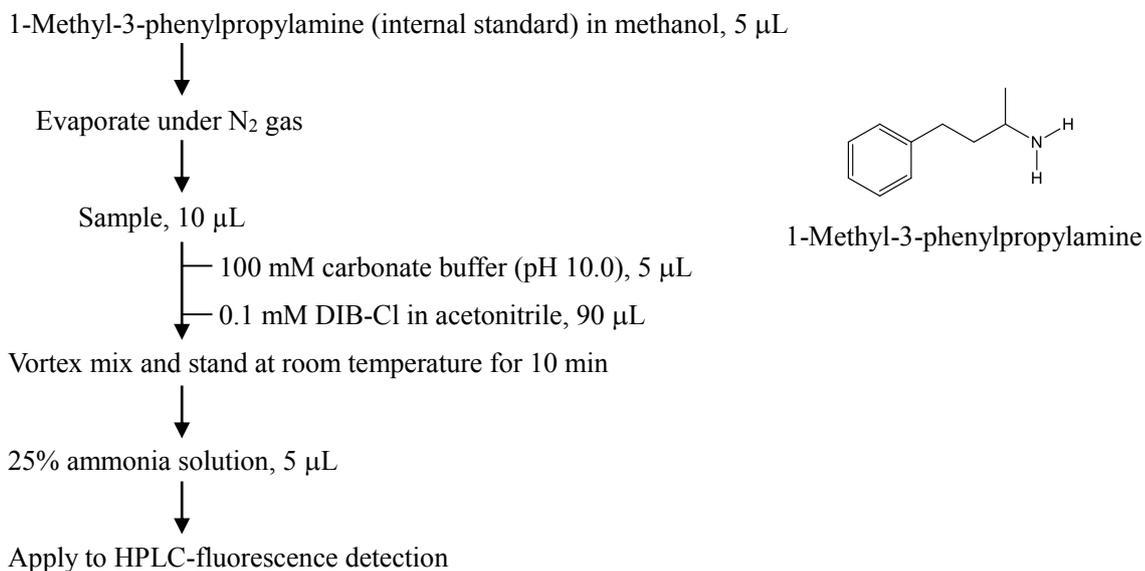


Chart 1. Derivatization procedure of dialysate for HPLC-fluorescence detection.

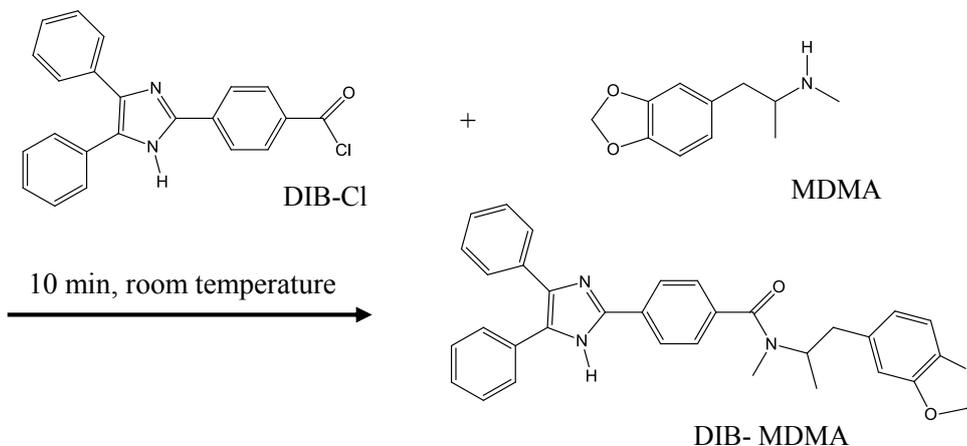
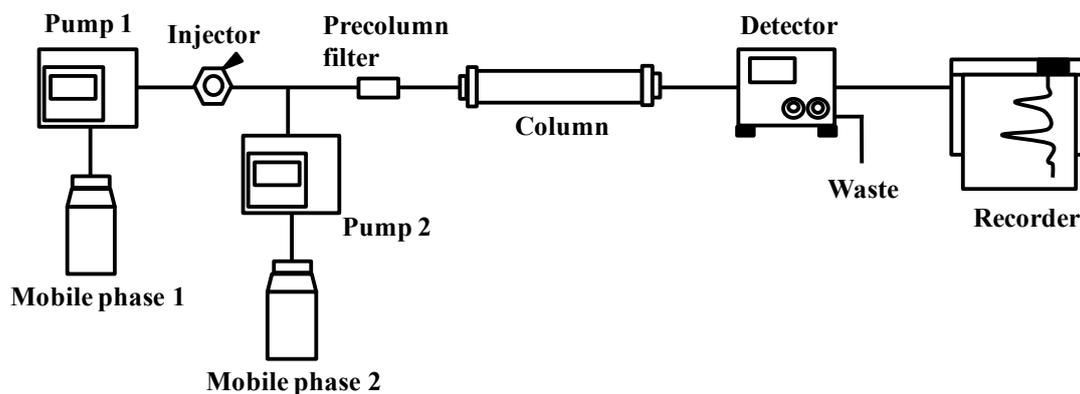


Fig. 4. Reaction scheme of MDMA with DIB-Cl.

HPLC-蛍光分析法におけるシステム概略図及び条件

MDMA, MDA, methamphetamine および amphetamine の定量に用いた HPLC-蛍光分析法におけるシステム概略図と条件を Fig. 5 に示す.

溶離液には 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) / acetonitrile / methanol / 2-propanol (= 50:45:5:2, v/v/v/v) の混液を使用し, 流速 1.5 mL/min にて送液した. 分析対象溶出後に検出される DIB-Cl 由来のブランクピークを除くため, 試料注入約 30 分後に acetonitrile / H₂O (=70:30, v/v) の混液を流速 2.0 mL/min で 10 分間送液し, カラムの洗浄をおこなった.



Pump 1, Shimadzu LC-10AT_{VP}

Pump 2, Shimadzu LC-10AS

Detector, Shimadzu RF-10A_{XL}

Column, Wakopak Handy ODS (150×4.6 mm, i.d., 5 μm)

Mobile phase 1, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) / acetonitrile / methanol / 2-propanol = 50:45:5:2 (v/v/v/v)

Mobile phase 2, acetonitrile / H₂O = 70:30 (v/v)

Column temperature, 30°C

Flow rate 1, 1.5 mL/min

Flow rate 2, 2.0 mL/min

Wavelength, $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$

Injection volume, 20 μL

Fig. 5. HPLC-fluorescence system and conditions for determination of drugs.

検量線および検出下限

脳内薬物の定量に用いた検量線およびシグナルノイズ比 (signal-to-noise ratio) が 3 の場合の検出下限を Table 1 に示す. 検量線は内標準法によって作成した. 検量線作成に用いた内標準物質 1-methyl-3-phenylpropylamine の濃度は, 低濃度側においては 20 ng/mL, 高濃度側においては 200 ng/mL とした.

Table 1 Calibration curves and limits of detection for determination of MDMA, MDA, methamphetamine and amphetamine.

	Range (ng/mL)	Equation* ¹ ($y = ax + b$)	r^2 * ²	LOD* ³ (ng/mL)
MDMA	2.5-50	$y = 0.038x - 0.029$	0.997	1.63
	25-1000	$y = 0.004x - 0.011$	0.997	
MDA	2.5-25	$y = 0.080x - 0.053$	0.995	1.19
	12.5-500	$y = 0.009x - 0.054$	0.998	
Methamphetamine	2.5-50	$y = 0.051x - 0.075$	0.997	1.84
	25-1000	$y = 0.006x - 0.159$	0.992	
Amphetamine	2.5-25	$y = 0.156x - 0.051$	0.996	0.47
	12.5-500	$y = 0.015x - 0.030$	0.998	

*1, y = peak height ratio (/ internal standard), x = concentration of standard (ng/mL).

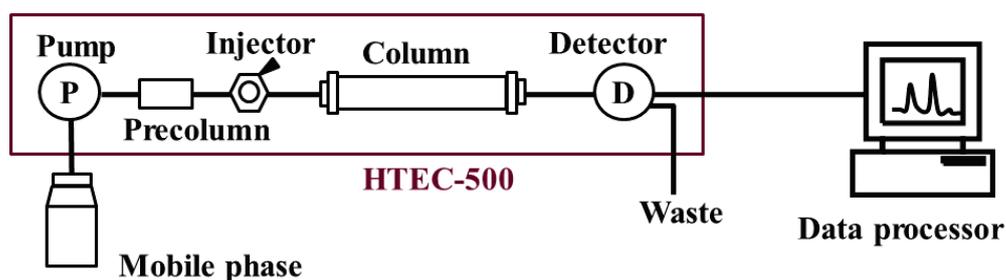
*2, correlation coefficient.

*3, limit of detection at a signal-to-noise ratio of 3.

1-1-6 中枢モノアミン濃度の定量

HPLC-電気化学検出 (ECD) 法におけるシステム概略図および条件

中枢モノアミンの dopamine および serotonin の定量に用いた HPLC-ECD システム概略図および条件を Fig. 6 に示す. システムには送液ポンプ, デガッサ, 恒温槽及び電気化学検出器が一体となった HTEC-500 を用いた. EICOM PP-ODS II カラムで試料中の dopamine と serotonin を分離し, 電気化学検出器で検出, PowerChrom version 2.3 ソフトウェアを用いて算出したピーク面積から定量をおこなった.



System, HTEC-500

Column, EICOM PP-ODS II (30×4.6 mm, i.d., 2 μm)

Column temperature, 25°C

Mobile phase, 1.5% methanol in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.4) containing 50 mg/L EDTA·2Na and 500 mg/L sodium 1-decansulfonate (SDS)

Flow rate, 0.5 mL/min

Working electrode, WE-3G (graphite)

Reference electrode, RE-100 (Ag / AgCl)

Applied potential, +400 mV

Injection volume, 10 μL

Fig. 6. HPLC-ECD system and conditions for determination of dopamine and serotonin.

検量線および検出下限

脳内モノアミン濃度の定量に用いた検量線とシグナルノイズ比 (signal-to-noise ratio) が 3 の場合の検出下限を Table 2 に示す. 検量線は絶対検量線法によって作成した.

Table 2 Calibration curves and limits of detection for determination of dopamine and serotonin.

	Range (nM)	Equation* ¹ (y = ax + b)	r* ²	LOD* ³ (nM)
Dopamine	0.05-500	y = 3.30x - 5.45	1.000	0.008
Serotonin	0.05-500	y = 6.87x - 0.77	1.000	0.006

*1, y = peak area (s·mV), x = concentration of standard (nM).

*2, correlation coefficient.

*3, limit of detection at a signal-to-noise ratio of 3.

1-1-7 統計解析

解析した透析液中の薬物濃度と dopamine, serotonin 濃度は, 回収率によって脳内濃度に換算した. 薬物投与後のピーク濃度 (peak concentration, C_{max}) および最高血中濃度到達時間 (time to reach peak concentration, T_{max}) は原データから, 半減期 (half-life, $T_{1/2}$), 濃度時間曲線下面積 (area under the curve, AUC_{0-600}), 滞留時間 (mean residence time, MRT_{0-600}), およびクリアランス (clearance, CL) は, モーメント解析⁴¹⁾によって算出した. 各パラメータの算出式を以下に示す.

$$T_{1/2} = 0.693 / k \text{ (rate constant)}$$

$$AUC_{0-600} = \int_0^{600} Cp dt$$

$$MRT_{0-600} = \int_0^{600} tCp dt / \int_0^{600} Cp dt$$

$$CL = \text{dose} / AUC_{0-600}$$

2 群における有意差は Student's *t*-test によって, 3 群以上の比較には, Scheffe's post-hoc test を用いた. *P* 値が 0.05 未満の時, 有意差ありと判定した. なお, 全ての統計解析は, JMP® Pro 10 (SAS Institute Japan 株式会社, 東京) を用いた.

1-2 結果

1-2-1 薬物投与後の脳内薬物濃度の解析

MDMA および MDA の脳内濃度推移

12 mg/kg MDMA, 25 mg/kg MDMA 単独投与時および 12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine 併用投与時の MDMA と代謝物 MDA の脳内濃度推移を解析した。薬物投与後 600 分までの濃度時間曲線を Fig. 7 に、モーメント解析によるパラメータを Table 3 に示す。MDMA の投与量が 12 mg/kg から 25 mg/kg に増加するに伴い、脳内 MDMA の C_{\max} は 1847.9 ng/mL から 6077.7 ng/mL へと有意に増加した ($P=0.01$, Scheffe's post-hoc test) (Fig. 7a, Table 3)。また、MDMA の AUC_{0-600} についても、348.0 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ から 1490.9 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ へと有意に増加した ($P=0.01$, Scheffe's post-hoc test) (Table 3)。さらに、12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine 併用投与群における MDMA の C_{\max} 及び AUC_{0-600} は、それぞれ 3308.1 ng/mL, 689.8 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ を示し、12 mg/kg MDMA 単独投与群と比較して増加する傾向にあったものの有意差はなかった。MDMA の CL については、25 mg/kg MDMA 単独投与群および 12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine 併用投与群ではそれぞれ 5.6 mL/min, 5.3 mL/min を示し、12 mg/kg MDMA 単独投与群の 11.0 mL/min と比較して、有意に低下した (Table 3)。代謝物 MDA について、MDMA と同様、MDMA の用量が 12 mg/kg から 25 mg/kg に増加するにしたがい、 C_{\max} は 327.1 ng/mL から 1351.9 ng/mL, AUC_{0-600} は 107.9 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ から 483.4 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ へと上昇した (Fig. 7b, Table 3)。また、10 mg/kg methamphetamine 併用時には、 C_{\max} 及び AUC_{0-600} はそれぞれ 492.7 ng/mL, 166.6 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ であったが、12 mg/kg MDMA 単独投与群との間で有意差は認められなかった ($P>0.05$, Scheffe's post-hoc test)。

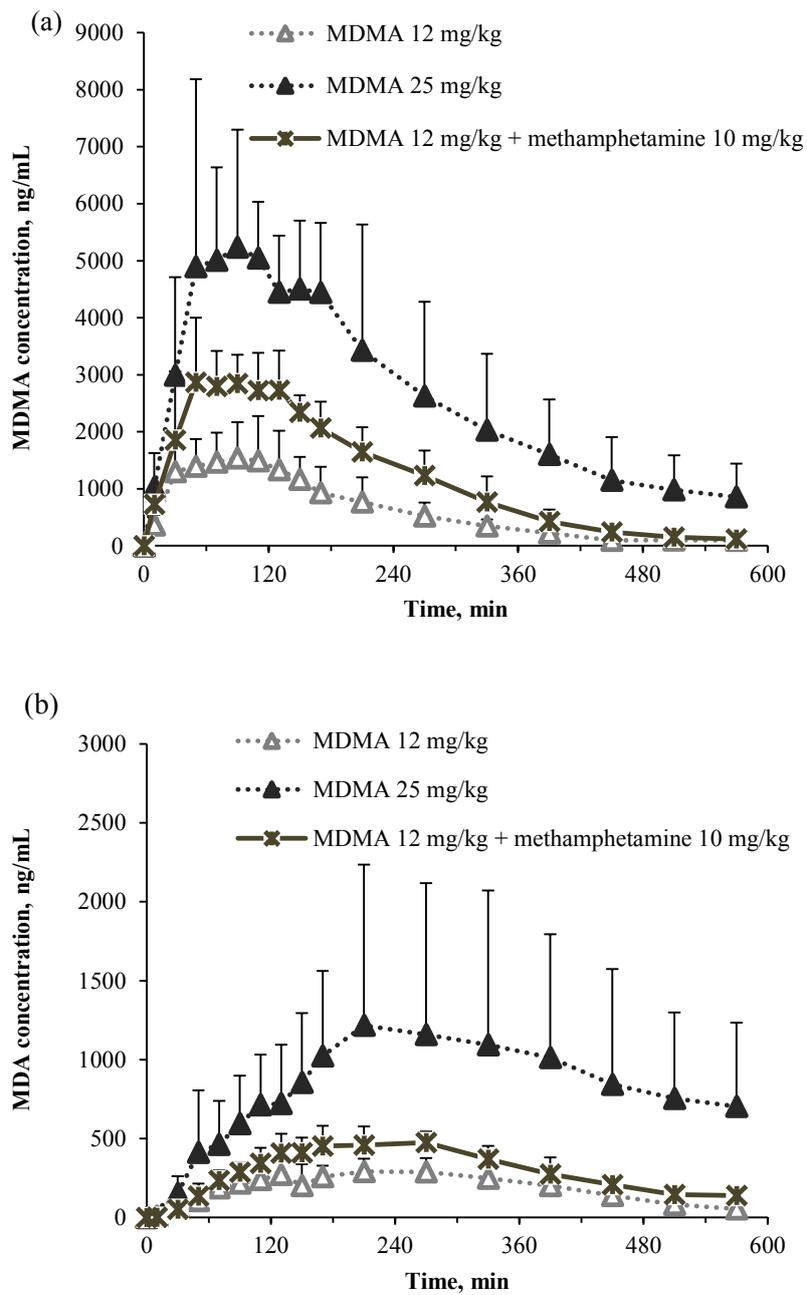


Fig. 7. Time-concentration profiles of extracellular MDMA (a) and MDA (b) after sole administration of MDMA (12 and 25 mg/kg, *i.p.*) and co-administration of MDMA (12 mg/kg, *i.p.*) and methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) as determined by microdialysis in ethylcarbamate-anesthetized rats. Each point represents the mean + standard deviation of mean (S.D.) (n = 4).

Table 3 Pharmacokinetic parameters of MDMA and MDA after sole administration of MDMA (12 and 25 mg/kg, *i.p.*) and co-administration of MDMA (12 mg/kg, *i.p.*) with methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*)

	MDMA 12 mg/kg	MDMA 25 mg/kg	MDMA 12 mg/kg + methamphetamine 10 mg/kg
<i>MDMA</i>			
C _{max} , ng/mL	1847.9 ± 599.8	6077.7 ± 2484.1*	3308.1 ± 674.2
T _{max} , min	85.0 ± 55.1	85.0 ± 30.0	95.0 ± 44.3
T _{1/2} , min	84.6 ± 12.1	175.4 ± 73.1	96.7 ± 27.3
AUC ₀₋₆₀₀ , µg·min/L	348.0 ± 120.3	1490.9 ± 657.4*	689.8 ± 129.4
MRT ₀₋₆₀₀ , min	170.9 ± 31.7	205.2 ± 39.9	171.3 ± 32.6
CL, mL/min	11.0 ± 3.0	5.6 ± 2.3*	5.3 ± 0.9*
<i>MDA</i>			
C _{max} , ng/mL	327.1 ± 63.5	1351.9 ± 936.1	492.7 ± 90.2
T _{max} , min	205.0 ± 79.0	290.0 ± 116.6	230.0 ± 49.0
T _{1/2} , min	150.2 ± 79.0	503.5 ± 309.2	182.5 ± 111.7
AUC ₀₋₆₀₀ , µg·min/L	107.9 ± 27.7	483.4 ± 360.2	166.6 ± 31.9
MRT ₀₋₆₀₀ , min	258.5 ± 26.9	300.2 ± 32.7	271.9 ± 16.9

Data were represented as mean ± S.D.

P-values were calculated by Scheffe's post-hoc test for the three groups

* *P* < 0.05, vs. MDMA (12 mg/kg) group (Scheffe's post-hoc test)

Methamphetamine および amphetamine の脳内濃度推移

10 mg/kg methamphetamine 単独投与時および 12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine 併用投与時の methamphetamine と代謝物 amphetamine の脳内濃度推移を解析した。薬物投与後 600 分までの濃度時間曲線を Fig. 8 に、モーメント解析によるパラメータを Table 4 に示す。10 mg/kg methamphetamine 単独投与群の C_{\max} は、2757.1 ng/mL を示し、12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine 併用投与時の C_{\max} は 2675.1 ng/mL となり、2 群間で有意差は認められなかった ($P > 0.05$, Student's *t*-test) (Fig. 8a, Table 4)。一方、MDMA の併用により、methamphetamine の MRT_{0-600} は 123.0 分から 210.3 分へと有意に延長し ($P < 0.05$, Student's *t*-test) (Table 4)、 AUC_{0-600} は 671.7 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ となり、10 mg/kg methamphetamine 単独投与時の 401.8 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ と比較して増加傾向を示した ($P > 0.05$, Student's *t*-test) (Table 4)。また、代謝物の amphetamine は methamphetamine と同様の挙動を示し、MDMA との併用投与群の MRT_{0-600} および AUC_{0-600} の値は methamphetamine 単独投与群と比較して、2 倍程度の高値を示した (Table 4)。

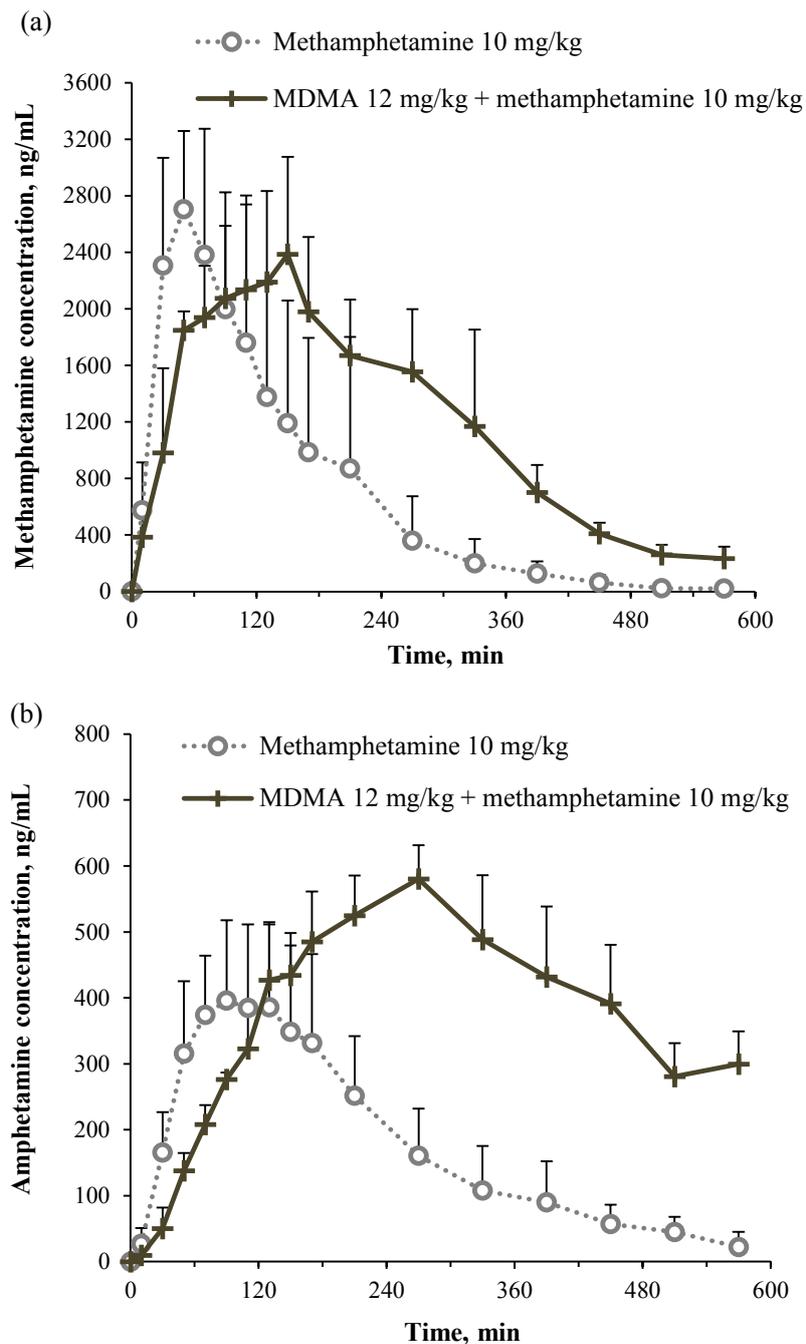


Fig. 8. Time-concentration profiles of extracellular methamphetamine (a) and amphetamine (b) after sole administration of methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) and co-administration of MDMA (12 mg/kg, *i.p.*) and methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) as determined by microdialysis in ethylcarbamate-anesthetized rats. Each point represents the mean + S.D. (n=4).

Table 4 Pharmacokinetic parameters of methamphetamine and amphetamine after a sole administration of methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) with / without MDMA (12 mg/kg, *i.p.*)

	Methamphetamine 10 mg/kg	MDMA 12 mg/kg + methamphetamine 10 mg/kg
<i>methamphetamine</i>		
C _{max} , ng/mL	2757.1 ± 626.0	2675.1 ± 594.3
T _{max} , min	45.0 ± 10.0	110.0 ± 36.5 [†]
T _{1/2} , min	70.4 ± 20.8	117.6 ± 34.6
AUC ₀₋₆₀₀ , µg·min/L	401.8 ± 213.6	671.7 ± 151.2
MRT ₀₋₆₀₀ , min	123.0 ± 17.4	210.3 ± 6.5 [†]
CL, mL/min	8.8 ± 4.0	4.6 ± 1.1
<i>amphetamine</i>		
C _{max} , ng/mL	452.0 ± 81.8	580.5 ± 51.2 [†]
T _{max} , min	115.0 ± 44.3	270.0 ± 0.0
T _{1/2} , min	109.3 ± 32.3	309.0 ± 143.8 [†]
AUC ₀₋₆₀₀ , µg·min/L	98.2 ± 23.3	217.4 ± 27.4 [†]
MRT ₀₋₆₀₀ , min	187.4 ± 34.2	301.4 ± 7.2 [†]

Data were represented as mean ± S.D.

P-values were calculated by Student's *t*-test for the two groups

[†] *P* < 0.05, vs. methamphetamine (10 mg/kg) group (Student's *t*-test)

1-2-2 薬物投与後の中枢 dopamine および serotonin 濃度変動の解析

Dopamine および serotonin の濃度変動

12 mg/kg, 25 mg/kg MDMA 単独投与時, 10 mg/kg methamphetamine 単独投与時, 12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine 併用投与時の dopamine および serotonin 濃度の脳内変動について検討した. 薬物投与後 600 分まで濃度時間曲線を Fig. 9 に, モーメント解析によるパラメータを Table 5 に示す. 25 mg/kg MDMA 単独投与時の dopamine の C_{max} (882.1 nM) および AUC_{0-600} (123.4 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) は, 12 mg/kg MDMA 投与時の C_{max} (196.8 nM) と AUC_{0-600} (29.9 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) と比較して, いずれも約 4 倍の上昇がみられた (Fig. 9a, Table 5). また, 10 mg/kg methamphetamine 単独投与時の dopamine の C_{max} は 12 mg/kg, 25 mg/kg MDMA 単独投与群と比較して顕著に上昇し, 1687.3 nM を示した ($P < 0.05$, Scheffe's post-hoc test) (Fig. 9a, Table 5). また, 12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine を併用すると, C_{max} は 1823.5 nM となり, 25 mg/kg MDMA 単独投与時と比較して増加する傾向がみられた. AUC_{0-600} に関しても, MDMA と methamphetamine の併用時における AUC_{0-600} (243.4 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) は, 12 mg/kg, 25 mg/kg MDMA 単独投与群と比較しても有意に増加した ($P < 0.05$, Scheffe's post-hoc test) (Fig. 9a, Table 5).

Serotonin の C_{max} に関しては, 12 mg/kg および 25 mg/kg MDMA 投与群, 10 mg/kg methamphetamine 投与群との間に有意差は認められなかった (12 mg/kg MDMA, 50.7 nM; 25 mg/kg MDMA, 43.2 nM; 10 mg/kg methamphetamine, 36.9 nM) (Table 5). また, 12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine の併用時において, C_{max} は 183.3 nM と他群と比較して高値を示したが, 個体間で大きなばらつきがみられ, 有意な差はなかった ($P > 0.05$, Scheffe's post-hoc test) (Fig. 9b, Table 5). また, MDMA と methamphetamine 併用群の AUC_{0-600} (11.4 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) についても, MDMA 単独投与群, methamphetamine 単独投与群と比較して高値を示す傾向にあったが, 顕著な差は認められなかった ($P > 0.05$, Scheffe's post-hoc test) (Fig. 9b, Table 5).

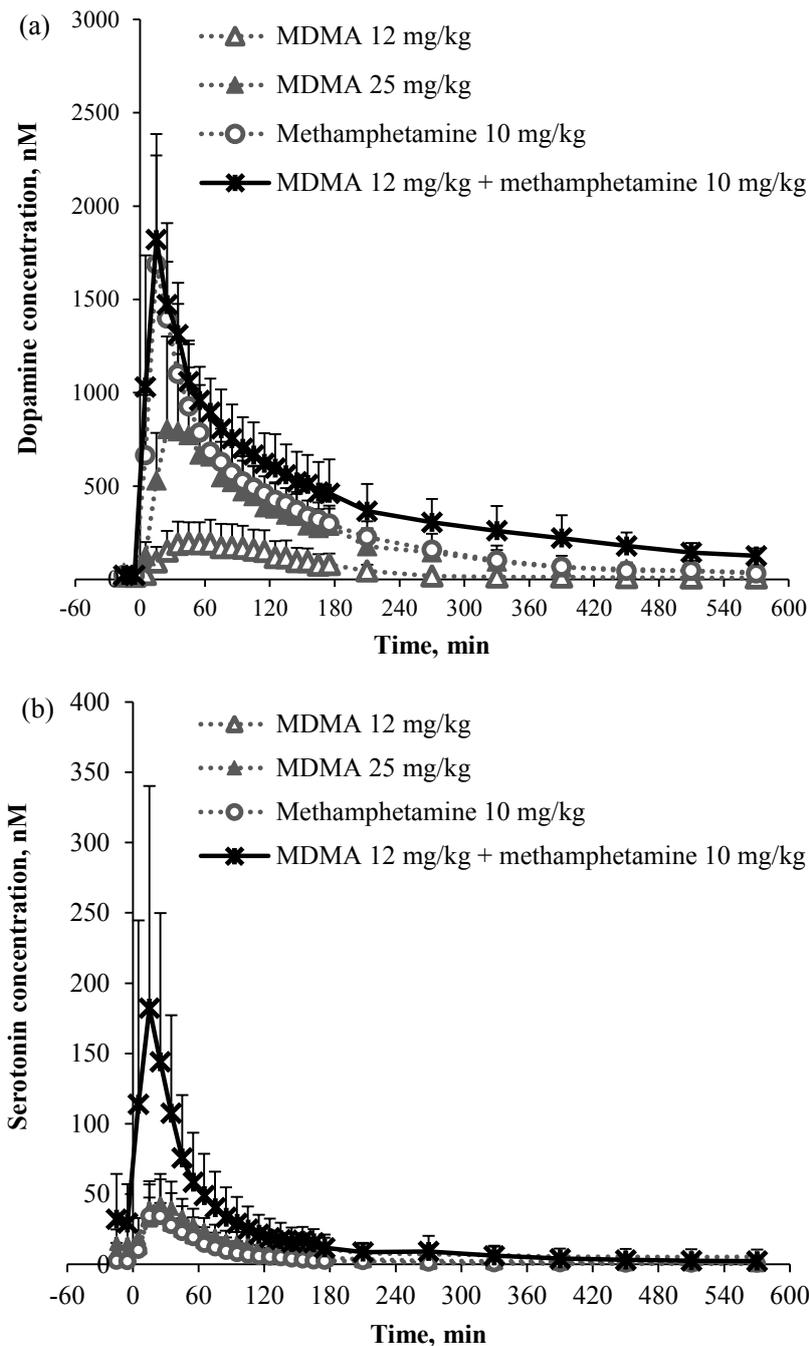


Fig. 9. Time-concentration profiles of extracellular dopamine (a) and serotonin (b) after sole administration of MDMA (12 and 25 mg/kg, *i.p.*) or methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) and co-administration of MDMA (12 mg/kg, *i.p.*) with methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) as determined by microdialysis in ethylcarbamate-anesthetized rats. Each point represents the mean + S.D. ($n = 4$).

Table 5 Moment parameters of dopamine and serotonin after sole administration of MDMA (12 and 25 mg/kg, *i.p.*) or methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) and co-administration of MDMA (12 mg/kg, *i.p.*) with methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*)

	MDMA 12 mg/kg	MDMA 25 mg/kg	Methamphetamine 10 mg/kg	MDMA 12 mg/kg + methamphetamine 10 mg/kg
<i>Dopamine</i>				
C _{max} , nM	196.8 ± 100.6	882.1 ± 421.7	1687.3 ± 584.5*	1823.5 ± 560.6*
T _{max} , min	42.5 ± 20.6	35.0 ± 14.1	15.0 ± 0.0	17.5 ± 5.0
AUC ₀₋₆₀₀ , μM·min	29.9 ± 17.5	123.4 ± 47.3	159.9 ± 50.9*	243.4 ± 65.7*, **
MRT ₀₋₆₀₀ , min	151.9 ± 41.5	150.4 ± 28.8	123.0 ± 31.4	171.9 ± 27.8
<i>Serotonin</i>				
C _{max} , nM	50.7 ± 23.8	43.2 ± 17.6	36.9 ± 12.6	183.3 ± 157.2
T _{max} , min	25.0 ± 8.2	25.0 ± 8.2	22.5 ± 5.0	17.5 ± 5.0
AUC ₀₋₆₀₀ , μM·min	4.9 ± 2.5	6.1 ± 3.2	2.6 ± 1.0	11.4 ± 8.4
MRT ₀₋₆₀₀ , min	110.4 ± 17.2	164.3 ± 73.4	80.2 ± 16.1	105.9 ± 30.2

Data were represented as mean ± S.D.

P-values were calculated by Scheffe's post-hoc test for the four groups

* *P* < 0.05, vs. MDMA (12 mg/kg) group (Scheffe's post-hoc test)

** *P* < 0.05, vs. MDMA (25 mg/kg) group (Scheffe's post-hoc test)

1-2-3 脳内薬物濃度および中枢モノアミン濃度における相関性の解析

脳へ移行した薬物濃度と dopamine および serotonin 濃度との因果関係を評価するため、薬物動態学的因子と中枢モノアミン濃度との相関性を解析した。まず、脳内薬物量の指標である C_{\max} および AUC_{0-600} について、中枢モノアミン濃度の AUC_{0-600} との相関性を解析したところ、有意な相関はみられなかった (data not shown)。次に、薬物と中枢モノアミンの濃度時間曲線 (Fig. 10) を比較すると、脳内への薬物移行よりも脳内モノアミン濃度の上昇が速いことから、薬物投与初期における薬物の脳移行動態が中枢モノアミン濃度に影響すると考えた。そこで、脳内薬物濃度の C_{\max} と T_{\max} 間の近似直線 (C_{\max}/T_{\max}) の傾き v を、薬物投与初期における薬物の脳移行動態の指標と仮定し、中枢モノアミン濃度の AUC_{0-600} との相関性を解析した。その結果, dopamine では $r = 0.66$, serotonin では $r = 0.50$ の有意な相関性を示した ($P < 0.05$) (Fig. 11)。

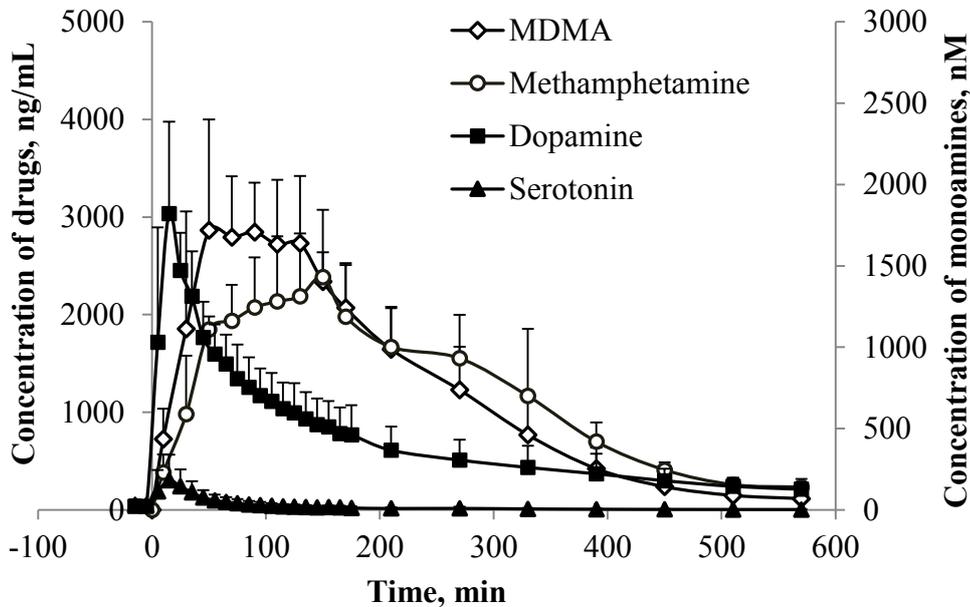


Fig. 10. Time-concentration profiles of extracellular MDMA, methamphetamine, dopamine and serotonin after co-administration of MDMA (12 mg/kg, *i.p.*) with methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) as determined by microdialysis in ethylcarbamate-anesthetized rats. Each point represents the mean + S.D. ($n = 4$).

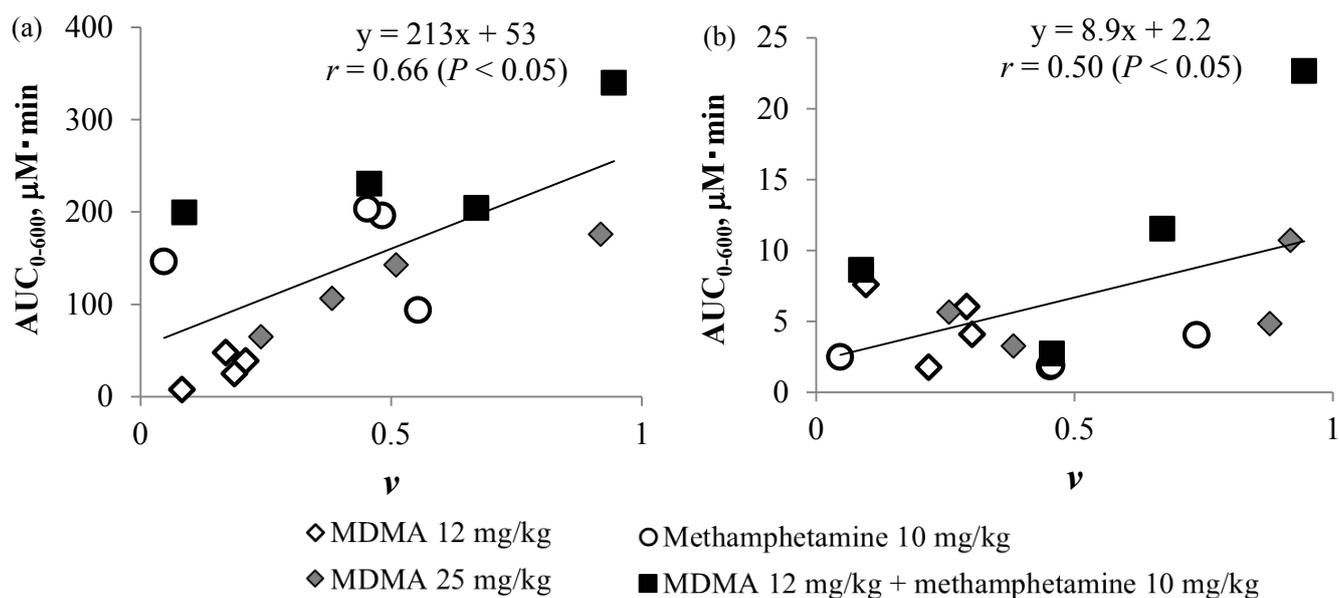


Fig. 11. Correlation between slopes of approximation straight line (ν) for drugs absorption and AUC_{0-600} of dopamine (a) or serotonin (b). $P < 0.05$, Pearson's correlation coefficient.

1-3 考察

本章では、MDMA 錠剤摂取を想定した中枢に及ぼす影響の評価を目的として、薬物を投与したラット線条体における薬物濃度の動態学的解析と dopamine および serotonin 濃度の薬力学的解析をおこなった。まず、不均一な MDMA 含有量^{5,23-24)}を想定し、異なる MDMA 用量を用いて評価した。次に、MDMA 錠剤摂取において起こり得る MDMA と methamphetamine の同時摂取⁵⁾が中枢に及ぼす影響について、ラットに併用投与することで検討した。さらに、得られた結果を用いて、線条体における薬物濃度とモノアミン濃度の相関性を解析し、薬物動態学的因子とモノアミン濃度との関連性を評価した。

まず、異なる MDMA 用量を用いて検討した結果、MDMA 単独投与時の C_{max} 及び AUC_{0-600} は、12 mg/kg 投与群と比較して 25 mg/kg 投与群では 3-4 倍の有意な上昇がみられた (Fig. 7a, Table 3)。この MDMA 濃度の上昇は、増加した投与量の影響を上回るものであったが、MDMA のラット脳への蓄積は非線形的に増加するという報告⁴²⁾を支持するものであった。このような結果が得られた一因として、MDMA 25 mg/kg 単独投与群の MDMA のクリアランス (CL) が MDMA 12 mg/kg 単独投与群と比較して顕著に低下していることにあると考えられる。また、中枢モノアミン濃度を解析した結果について、MDMA 用量が 12 mg/kg から 25 mg/kg へと増加すると、serotonin の C_{max} には差はなかったが、 AUC_{0-600} はわずかに増加傾向を示した (Fig. 9b, Table 5)。一方で、dopamine の C_{max} 及び AUC_{0-600} は 4 倍程度まで上昇し (Fig. 9a, Table 5)、線条体における MDMA 濃度の上昇に応じた変化がみられた。Serotonin と dopamine との間で異なる結果が得られた要因として、MDMA は serotonin 神経に強く作用する⁴³⁾ことが考えられ、検討に用いた MDMA 用量では、serotonin に対する影響が飽和に近いことが推測される。以上をまとめると、投与する MDMA が増加すると、線条体における MDMA 濃度が非線形的に上昇し、その変化に応じた中枢モノアミン濃度の上昇が引き起こされることが示された。

次に、12 mg/kg MDMA と 10 mg/kg methamphetamine の併用投与による影響を検討した結果、12 mg/kg MDMA 単独投与群と比較して MDMA の CL が有意に低下し、 C_{max} および AUC_{0-600} は上昇する傾向にあった (Fig. 7a, Table 3)。MDMA の代謝物 MDA については、methamphetamine との併用による有意な変化はなかった (Fig. 7b, Table 3) ことから、MDMA と methamphetamine の併用により、MDMA の脳からの排出過程に影響が生じ、MDMA 濃度が上昇したことが予想される。一方、MDMA と methamphetamine 併用群において methamphetamine の C_{max} は methamphetamine 単独投与群との差は観察されなかったものの、 MRT_{0-600} の有意な延長と、 AUC_{0-600} の増加傾向がみられた (Fig. 8a, Table 4)。これまでの報告で、MDMA と amphetamine は脳から血液へ物質を排出させる P-糖タンパクの基質である可能性が示されており⁴⁴⁻⁴⁶⁾、Ketabi-Kiyanvash らの報告からは高濃度の MDMA は P-糖タンパクを阻害すると考えられている⁴⁷⁾。したがって、MDMA と methamphetamine の併用時には P-糖タンパクを介した薬物の排出過程の飽和や阻害などが生じ、MDMA と

methamphetamine 濃度が上昇したと推測されるが、詳しい機序は不明である。また、中枢モノアミン濃度を解析した結果、MDMA と methamphetamine 併用群の dopamine の C_{\max} および AUC_{0-600} は、12 mg/kg, 25 mg/kg MDMA 投与群と比較して有意に増加した (Fig. 9a, Table 5)。また、serotonin の C_{\max} と AUC_{0-600} についても、MDMA と methamphetamine 併用時には、12 mg/kg, 25 mg/kg MDMA 単独投与群と比較して増加傾向を示した (Fig. 9b, Table 5)。これらの結果から、MDMA と methamphetamine を併用すると、各薬物を単独投与した時と比較して脳内薬物濃度が上昇し、モノアミンに対する影響が増加することで作用が増強する可能性が示された。今回の結果は、MDMA と methamphetamine を併用したラットにおいて、急性の有害事象がより強く発生した^{48, 49)} 結果を支持するものとなったと思われる。

最後に、中枢モノアミン濃度を決定する薬物動態学的因子を検討するため、脳内薬物濃度の C_{\max} と T_{\max} 間の近似直線 (C_{\max}/T_{\max}) の傾き v を、薬物投与初期における薬物の脳移行動態の指標と仮定し、中枢モノアミン濃度 AUC_{0-600} との相関性の解析をおこなった。その結果、傾き k と脳内アミン濃度の AUC_{0-600} との間に有意な正の相関がみられた。このことから、MDMA や methamphetamine の投与初期の脳移行動態が、脳内モノアミン濃度に影響する因子の一つであることが推測される。

1-4 小 括

以上本章では、薬物を投与したラット線条体における薬物濃度、および dopamine と serotonin 濃度を解析し、その関連性の評価をおこなった。まず、異なる MDMA 投与量を用いた検討では、MDMA 投与量が増加すると、MDMA の脳への移行が非線形的に増加すること、また、その移行量に応じて dopamine 濃度が上昇することが確認された。次に、MDMA と methamphetamine の併用投与をおこなった検討では、それぞれの単独投与時と比較して、線条体における MDMA および methamphetamine 濃度の増加が認められ、これらの薬物濃度に対応した形で dopamine および serotonin 濃度が上昇した。さらに、中枢モノアミン濃度を決定する薬物動態学的因子を検討するため、線条体における薬物濃度とモノアミン濃度の関連性を解析した。その結果、薬物投与初期における脳への薬物移行動態と中枢モノアミン濃度変化に関連性がある可能性が示された。これらの知見は、不均一な MDMA 含有量や様々な薬物の混在が知られている MDMA 錠剤の摂取では、投与量に依存しない形で薬物が脳へ移行し、その脳移行動態が、中枢への薬理作用や有害事象につながる可能性を示している。更なる検討が必要であるが、今回得られた知見は、MDMA 錠剤摂取が中枢へ及ぼす影響についての有益な基礎的情報となると考える。

第二章 合成 ketamine 誘導体 methoxetamine が中枢モノアミン濃度に及ぼす影響の評価

Methoxetamine (Fig. 12a) とよばれる ketamine (Fig. 12b) 誘導体の薬物乱用が, 2010 年より新たに見出されるようになった⁹⁾. Methoxetamine は ketamine と同様に, 多幸感, 幻覚作用, 解離現象などの中枢作用や, 統合失調症様作用などの身体症状を引き起こす^{9, 50-52)} が, その作用は ketamine と比較して強力であるといわれている^{9, 50)}.

Ketamine は γ -aminobutyric acid (GABA) 神経系において, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗作用を示し^{9, 50, 53)}, 中枢モノアミンの dopamine や serotonin を放出させることで, 多様な作用を引き起こすことが知られている^{52, 54-55)}. なかでも, 前頭前野における dopamine 濃度の上昇は, ketamine 誘発性の統合失調症様作用に関与すると報告されている^{55, 56)}.

一方, methoxetamine も NMDA 受容体拮抗作用を有するが, その拮抗作用⁵⁷⁾ は ketamine と比較して強力であることから, methoxetamine は ketamine よりも強く中枢へ作用すると予想される. しかしながら, methoxetamine に関する研究は症例報告が主流であり, 中枢モノアミンへの影響評価や作用機序の解明に関する研究は殆どおこなわれていない. そこで第二章では, methoxetamine の中枢モノアミンへの影響を評価することを目的として, 脳マイクロダイアリシス法を用いて methoxetamine を投与したマウス脳内 dopamine および serotonin 濃度の定量をおこなった. まず, methoxetamine を投与したマウスの線条体, 側坐核および前頭前野における dopamine と serotonin 濃度を定量し, methoxetamine が異なる脳部位に与える影響の評価をおこなった. 次に, methoxetamine と ketamine をそれぞれ投与したマウス前頭前野における dopamine および serotonin 濃度の定量をおこない, methoxetamine と ketamine がモノアミン濃度に及ぼす影響を解析した.

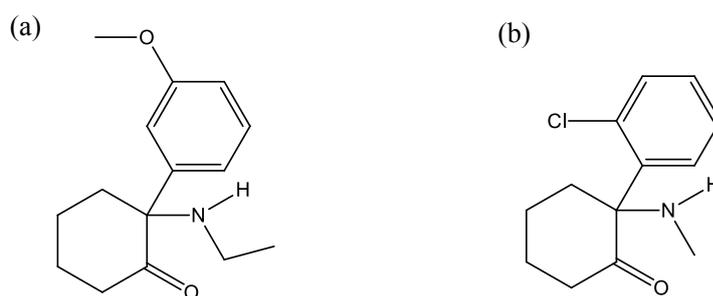


Fig. 12. Structures of methoxetamine (a) and ketamine (b).

2-1 実験方法

2-1-1 使用動物

雄性 ddY 系マウス (6 週齢; 体重, 25-32 g) を使用した. 飼育環境は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 12 時間 (8:00-20:00) の明暗サイクルとし, 飼料 (固形飼料 CE) 及び水道水は自由に摂取できるものとした. 全ての実験操作は, 長崎大学動物実験規則を遵守しておこなった.

2-1-2 脳マイクロダイアリシス条件

カルバミド酸エチル (1.5 g/kg, *i.p.* 投与) で麻酔したマウスを, 脳定位固定装置 SR-5R に固定した. 頭皮を切開して頭蓋骨を露出させた後, ドリルで頭蓋骨に透析プローブ挿入のための直径約 2 mm の穴を開け, プローブを挿入した. プローブには AI-6-01-M (膜長 1 mm; セルロース膜; カットオフ値 50 kDa) を用いた. プローブの挿入部位は Franklin & Paxinos の脳地図⁵⁸⁾ に従い, 左線条体 (A, +1.2 mm; L, +1.4 mm from bregma; H, -3.2 mm from skull surface), 左側坐核 (A, +1.2 mm; L, +1.4 mm from bregma; H, -5.0 mm from skull surface) および左前頭前野 (A, +1.8 mm; L, +0.3 mm from bregma; H, -3.0 mm from skull surface) とした. 線条体および側坐核については, amphetamine 系薬物の主な作用部位である⁶⁰⁾ ことから, amphetamine 系薬物と比較する上で選択した. 灌流液の aCSF は, CMA / 100 マイクロインジェクションポンプによって, 流速 $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$ にて送液した.

プローブ挿入後, 組織損傷による内因性物質の影響を除くために, 90 分間の灌流をおこなった. その後, ベースラインとして 30 分間と薬物投与 (*i.p.*) 後 100 分間まで, 10 分間隔で透析液を採取した.

脳透析液採取での中枢モノアミンの分解を防ぐため, 保存液として 100 mM EDTA \cdot 2Na を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 3.5) を予めサンプリングチューブに添加 (試料:保存液 = 4:1 (v/v)) し, 氷上にて採取した. 採取した脳透析液は HPLC-ECD 分析に供し, 中枢モノアミン濃度の定量をおこなった.

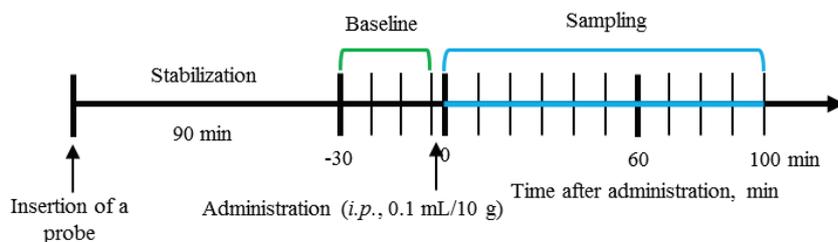


Fig. 13. Sampling schedule

2-1-3 薬物投与

本研究で検討した投与群は以下に示す.

Saline (control) (n = 3)

20 mg/kg methoxetamine (n = 3)

19 mg/kg ketamine (n = 3)

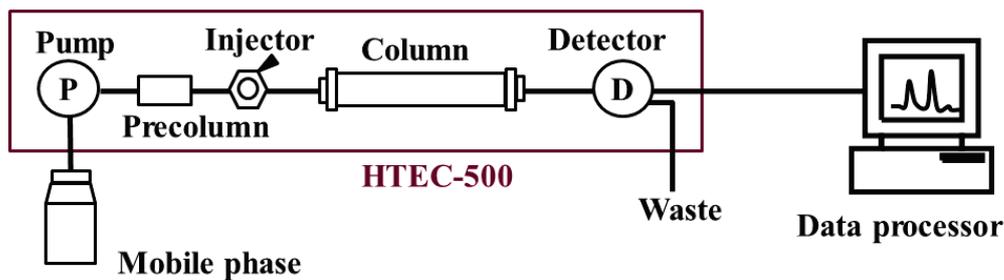
38 mg/kg ketamine (n = 3)

Methoxetamine および ketamine は生理食塩水に溶解したものを使用した. 19 mg/kg ketamine の用量は, 20 mg/kg methoxetamine とモル換算で当量となる. 投与する薬物はマウスの体重 10 g 当たり 0.1 mL となるように調製し, 全て *i.p.* 投与した.

2-1-4 中枢モノアミン濃度の定量

HPLC-電気化学検出 (ECD) 法におけるシステム概略図および条件

Dopamine と serotonin の定量に用いた HPLC-ECD システム概略図および条件を Fig. 14 に示す. 検討における試料注入量は 20 μ L とした.



System, HTEC-500

Column, EICOM PP-ODS II (30 \times 4.6 mm, i.d., 2 μ m)

Column temperature, 25 $^{\circ}$ C

Mobile phase, 1.5% methanol in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.4) containing 50 mg/L EDTA \cdot 2Na and 500 mg/L SDS

Flow rate, 0.5 mL/min

Working electrode, WE-3G (graphite)

Reference electrode, RE-100 (Ag / AgCl)

Applied potential, +400 mV

Injection volume, 20 μ L

Fig. 14. HPLC-ECD system and conditions for determination of dopamine and serotonin.

検量線および検出下限

脳内モノアミン濃度の定量に用いた検量線とシグナルノイズ比 (signal-to-noise ratio) が 3 の場合の検出下限を Table 6 に示す. 検量線は絶対検量線法によって作成した.

Table 6 Calibration curves and limits of detection for determination of dopamine and serotonin.

	Range (nM)	Equation* ¹ (y = ax + b)	r* ²	LOD* ³ (nM)
Dopamine	0.05-50	y = 3.06x - 0.77	1.000	0.01
Serotonin	0.025-50	y = 8.77x + 0.03	1.000	0.002

*1, y = peak area (s·mV), x = concentration of standard (nM).

*2, correlation coefficient.

*3, limit of detection at a signal-to-noise ratio of 3.

2-1-5 統計解析

Dopamine と serotonin 濃度は, 得られた baseline の濃度を用いて, baseline% に換算した. 投与後 100 分までの薬物投与後の C_{max} および T_{max} は原データから, AUC₀₋₁₀₀ および MRT₀₋₁₀₀ は, モーメント解析⁴¹⁾により算出した. 各パラメータの算出式を以下に示す.

$$AUC_{0-100} = \int_0^{100} Cp dt$$

$$MRT_{0-100} = \int_0^{100} tCp dt / \int_0^{100} Cp dt$$

Baseline との有差は Dunnett's test によって検証した. また, 3 群以上の比較には, Tukey-Kramer test を用いた. P 値が 0.05 未満の時, 有意差ありと判定した. なお, 全ての統計解析は, JMP® Pro 10 を用いた.

2-2 結果

2-2-1 Methoxetamine 投与後の線条体, 側坐核, 前頭前野における dopamine および serotonin 濃度変動の解析

20 mg/kg methoxetamine 投与時の, 線条体, 側坐核および前頭前野における dopamine と serotonin 濃度変動について検討した. Methoxetamine 投与後 100 分までの濃度時間曲線を Fig. 15 に示す. 線条体と側坐核において, 20 mg/kg methoxetamine 投与による dopamine や serotonin 濃度の上昇はみられなかった. 一方, 前頭前野における dopamine と serotonin の C_{\max} は, baseline からそれぞれ 643.3%, 279.2% まで有意に上昇した ($P < 0.01$, Dunnett's test).

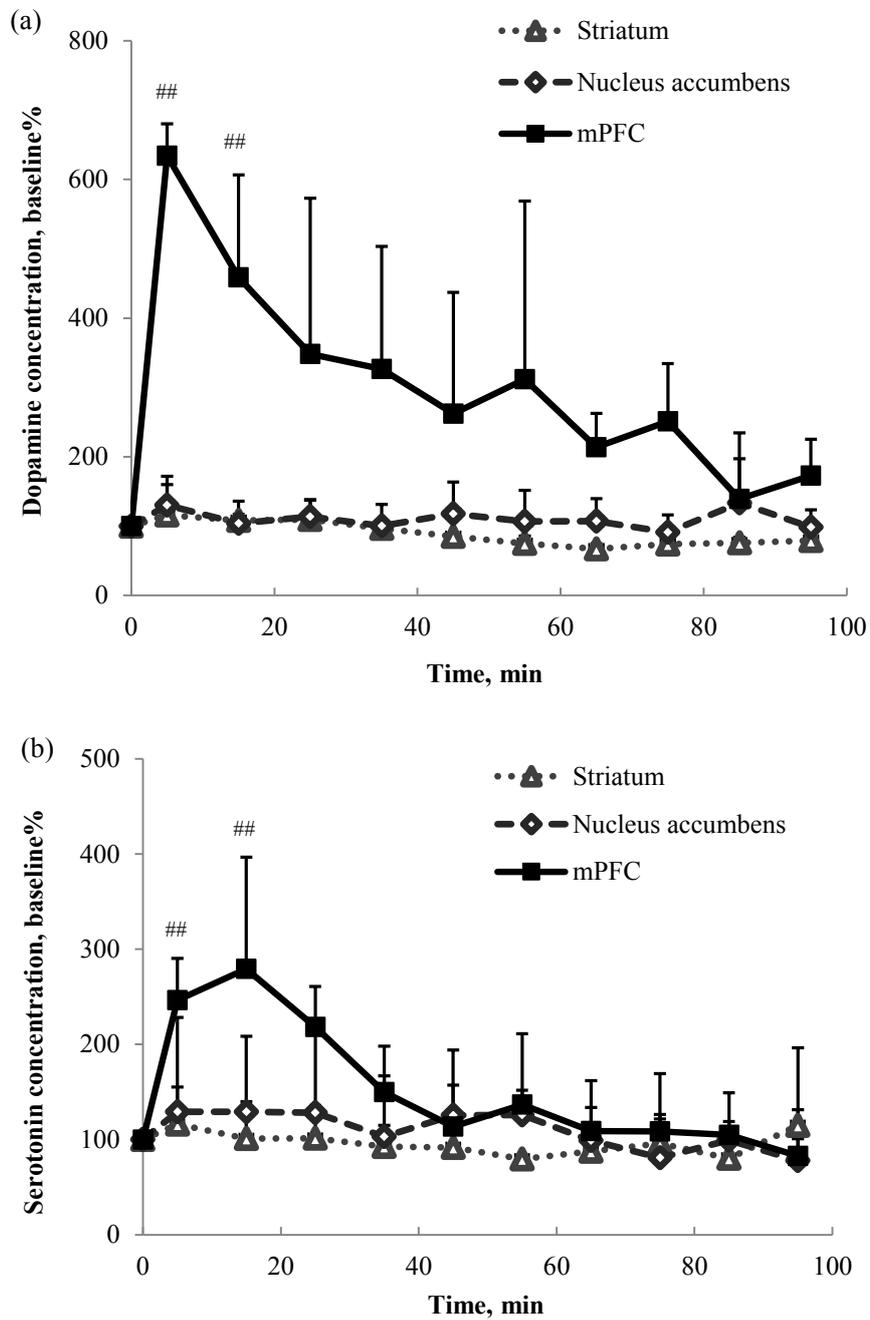


Fig. 15. Time concentration profiles of dopamine (a) and serotonin (b) in striatum, nucleus accumbens, and mPFC after administration of 20 mg/kg methoxetamine (*i.p.*).

Each point represents the mean + S.D. (n = 3).

P-values were calculated by Dunnett's test compared to baseline.

##*P* < 0.01, vs. baseline.

2-2-2 前頭前野における dopamine および serotonin 濃度に対する methoxetamine と ketamine の影響の比較

Control 群, 20 mg/kg methoxetamine 投与群, 19 mg/kg および 38 mg/kg ketamine 投与群の前頭前野における dopamine と serotonin の濃度変動を検討した. 薬物投与後 100 分までの濃度時間曲線を Fig. 16 に, モーメント解析によるパラメータを Table 7 に示す. まず, dopamine については, ketamine 投与後, C_{\max} (baseline%) および AUC_{0-100} ($\times 10^3$ baseline% \cdot min) は, ketamine の用量に応じて増加する傾向にあった (C_{\max} : control, 103.3; ketamine 19, 115.0; ketamine 38, 188.1; AUC_{0-100} : control, 5.2; ketamine 19, 7.8; ketamine 38, 10.4) (Fig. 16a, Table 7). また, 20 mg/kg methoxetamine 投与後の C_{\max} は 643.4% まで上昇し, AUC_{0-100} は 29.0×10^3 baseline% \cdot min を示した (Fig. 16a, Table 7). Methoxetamine 投与群におけるこれらの値は, 他群と比較すると有意に高い値であった ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test). 次に, serotonin 濃度について, ketamine 投与後の C_{\max} (baseline%) と AUC_{0-100} ($\times 10^3$ baseline% \cdot min) は, dopamine と同様に用量に応じて増加した (C_{\max} : control, 100.6; ketamine 19, 134.9; ketamine 38, 185.1; AUC_{0-100} : control, 5.8; ketamine 19, 9.8; ketamine 38, 11.3) (Fig. 16b, Table 7). また, 20 mg/kg methoxetamine 投与時の serotonin の C_{\max} は 285.9% を, AUC_{0-100} は 14.7×10^3 baseline% \cdot min を示し, ketamine 投与時と比較して上昇する傾向を示した ($P > 0.05$, Tukey-Kramer test) (Fig. 16b, Table 7).

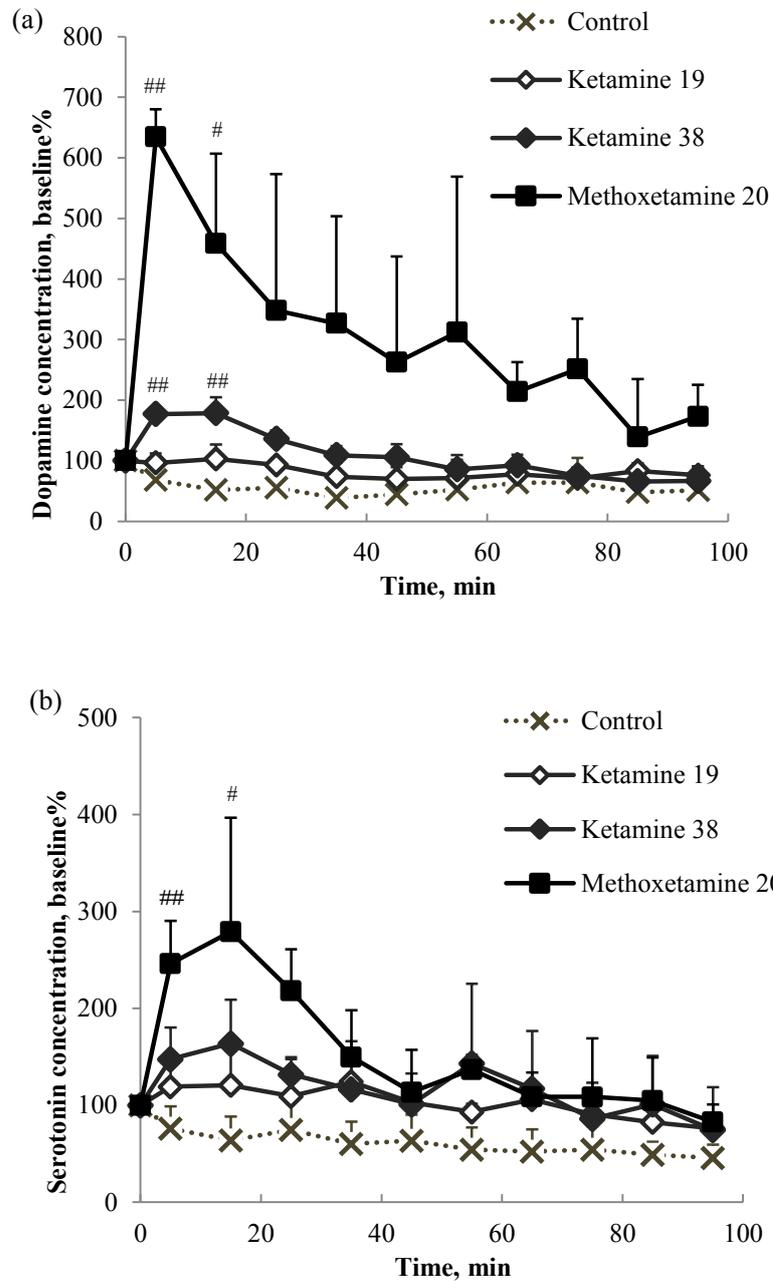


Fig. 16. Time-concentration profiles of dopamine (a) and serotonin (b) in the mPFC after administration of saline (control), 19 or 38 mg/kg ketamine (ketamine 19 / ketamine 38), or 20 mg/kg methoxetamine (methoxetamine 20).

Each point represents the mean + S.D. (n = 3).

P-values were calculated by Dunnett's test compared to baseline.

#*P* < 0.05, vs. baseline; ##*P* < 0.01, vs. baseline.

Table 7 Moment parameters (C_{max} , AUC_{0-100} and MRT_{0-100}) of dopamine and serotonin in the mPFC after administration of saline (control), 19 mg/kg or 38 mg/kg ketamine (ketamine 19 / ketamine 38), or 20 mg/kg methoxetamine (methoxetamine 20).

	Control	Ketamine 19	Ketamine 38	Methoxetamine 20
<i>Dopamine</i>				
C_{max} , baseline%	103.3 ± 5.6 ^c	115.0 ± 12.7 ^c	188.1 ± 19.5 ^b	634.3 ± 45.9 ^a
AUC_{0-100} , ×10 ³ baseline%·min	5.2 ± 1.3 ^b	7.8 ± 0.5 ^b	10.4 ± 0.2 ^b	29.0 ± 11.7 ^a
MRT_{0-100} , min	45.9 ± 3.6 ^c	44.8 ± 2.2 ^{bc}	38.9 ± 1.4 ^{ab}	37.7 ± 2.4 ^a
<i>Serotonin</i>				
C_{max} , baseline%	100.6 ± 1.1 ^b	134.9 ± 31.1 ^{ab}	185.1 ± 40.7 ^{ab}	285.9 ± 111.0 ^a
AUC_{0-100} , ×10 ³ baseline%·min	5.8 ± 2.0 ^b	9.8 ± 1.5 ^{ab}	11.3 ± 2.9 ^{ab}	14.7 ± 2.8 ^a
MRT_{0-100} , min	42.8 ± 1.5 ^a	44.5 ± 2.5 ^a	42.3 ± 6.3 ^a	38.5 ± 5.7 ^a

Each data represents the mean ± S.D. (n = 3).

P-values were calculated by Tukey-Kramer test for the four groups.

Significant differences are indicated by different lower-case alphabetic characters (*P* < 0.05).

2-3 考察

本章では, methoxetamine が中枢モノアミンに及ぼす影響についてのエビデンスを構築することを目的とし, methoxetamine を投与したマウス脳内 dopamine および serotonin 濃度の解析をおこなった. まず, 前頭前野, 線条体および側坐核の複数脳部位において, methoxetamine 投与後の dopamine と serotonin 濃度への影響を検討した. 次に, 有害事象のひとつである統合失調症様作用への関与が示唆されている前頭前野^{55, 56)}における影響について, methoxetamine と ketamine との比較をおこなった.

まず, 線条体, 側坐核および前頭前野の 3 つの部位において methoxetamine が中枢モノアミンに及ぼす影響を検討した結果, 20 mg/kg methoxetamine の用量では, 線条体と側坐核の dopamine や serotonin 濃度に影響をもたらさなかった (Fig. 15). 一方, 前頭前野においては, 20 mg/kg methoxetamine により, dopamine と serotonin の C_{max} はそれぞれ 643.3% と 279.2% まで顕著に上昇し ($P < 0.05$, Dunnett's test) (Fig. 15), AUC_{0-100} も control 群と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Student's *t*-test) (Table 7). これまでの報告において, ketamine はラット線条体の dopamine 神経系⁵⁹⁾ や側坐核の dopamine 濃度に影響を与えなかった⁶⁰⁾ という結果が得られていることから, 今回検討した methoxetamine についても同様の結果が得られたといえる. これらの結果から, methoxetamine は前頭前野に強く影響し, dopamine や serotonin 濃度を上昇させ, 統合失調症様作用の発生に関与していることが推測される. ここで, 第一章において検討した amphetamine 系薬物の MDMA や methamphetamine についてみると, これらの薬物により, ラット線条体の dopamine および serotonin 濃度が上昇した. 池田らによっても, 10 mg/kg MDMA の投与によるラット線条体の dopamine と serotonin 濃度の上昇²⁰⁾ が示されており, また, Bauman らは 3 mg/kg MDMA がラット側坐核の dopamine と serotonin 濃度を有意に上昇させたことを報告している⁶¹⁾. このように, amphetamine 系薬物は線条体や側坐核の dopamine や serotonin 濃度を上昇させるという特性を有するといえる. 一方で, methoxetamine についてみると, 今回の検討では, 線条体と側坐核の dopamine および serotonin 濃度に対する変化は認められなかった. したがって, methoxetamine が影響を与える部位が, 既存の amphetamine 系薬物とは異なることが推測される.

次に, 前頭前野の dopamine および serotonin 濃度に対する methoxetamine の影響について, ketamine との比較をおこなった. 19 mg/kg および 38 mg/kg ketamine 投与時には, dopamine と serotonin の C_{max} と AUC_{0-100} はそれぞれ用量に応じて上昇する傾向にあった (Fig.16, Table 7) が, 20 mg/kg methoxetamine 投与時には, dopamine の C_{max} と AUC_{0-100} はさらなる上昇がみられ, ketamine 投与群と比較して有意に高い値であった ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test) (Table 7). また, 20 mg/kg methoxetamine 投与時における serotonin の C_{max} と AUC_{0-100} についても, 有意差はなかったが, ketamine 投与群と比較して高値を示す傾向にあった (Fig.16, Table 7). このように, methoxetamine は ketamine と比較して, 前頭前野に

おけるモノアミン濃度が高くなる結果が得られたが, methoxetamine の NMDA 受容体拮抗作用が ketamine よりも強い⁵²⁾ ことが, その要因の一つであると考えられる.

2-4 小 括

以上本章では, 中枢モノアミンに対する影響に関してこれまで報告されていない ketamine 誘導体 methoxetamine が, 中枢モノアミンに与える影響を解明するため, 脳マイクロダイアリシス法により methoxetamine を投与したマウス脳内 dopamine および serotonin 濃度の定量をおこなった. まず, methoxetamine を投与したマウスを用いて, 複数脳部位における dopamine および serotonin 濃度を定量したところ, 線条体や側坐核において変化はみられなかったが, 前頭前野では dopamine と serotonin が顕著に上昇した. これらの結果は, methoxetamine は, 線条体や側坐核よりも前頭前野におけるモノアミン放出へ及ぼす影響が大きいことを示唆するものである. さらに, methoxetamine を投与したマウス前頭前野における dopamine および serotonin 濃度に与える影響について ketamine と比較した結果, dopamine と serotonin 濃度上昇作用は ketamine よりも強力であることが示された. 今回の検討結果は, methoxetamine が中枢へ及ぼす影響についての有用な基礎的情報となると考える.

【結論】

本研究では、合成麻薬 MDMA と合成 ketamine 誘導体 methoxetamine の中枢での作用機序解明を目的として、薬物投与後のラットもしくはマウスに脳マイクロダイアリス法を適用し、薬物が中枢モノアミン dopamine および serotonin に与える影響を評価した。MDMA については、不均一な MDMA 量や他の薬物の混在が、脳移行動態に影響し、この脳移行動態が中枢モノアミンと関連する可能性を見出した。一方、中枢モノアミンに対する影響が未だ明らかにされていない methoxetamine に関する評価を行い、methoxetamine は、中枢において前頭前野におけるモノアミン放出に対して影響をもたらし、また ketamine と比較して強力に中枢へ作用する可能性を示した。本研究で得られた成果は、薬物乱用防止活動において有益な基礎的情報となると考える。

【使用試薬及び機器】

— 第一章 —

試薬, 溶媒等

- 水: 純水製造装置ピュアライン WL-21p (ヤマト科学株式会社, 東京) で製造したイオン交換水を, メンブランフィルター (JGWP04700, 0.2 μm , 日本ミリポア株式会社) にてろ過したものをを用いた.
- 超純水: SimPak® 1 kit (日本ミリポア株式会社) を用いて精製した超純水を用いた.
- Saline: 日本薬局方生理食塩液 大塚生食注 (大塚製薬株式会社, 東京) を用いた.
- Acetonitrile: HPLC 用 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた.
- Methanol: HPLC 用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- 2-Propanol: HPLC 用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- NaHCO_3 : 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Na_2CO_3 : 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Sodium 1-decanesulfonate: 試薬特級 (シグマアルドリッチジャパン株式会社, 東京) を用いた.
- $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$: 試験研究用 (株式会社同仁化学研究所, 熊本) を用いた.
- NaCl : 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- KCl : 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- CaCl_2 : 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- HCl : 容量分析用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- CH_3COOH : 容量分析用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Dopamine: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Serotonin: 関東化学株式会社製を用いた.
- Phosphoric acid: HPLC 用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Ethyl carbamate: 試薬一級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.

緩衝液調製方法

- 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)

50 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (3.90 g/500 mL イオン交換水) 及び 50 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (17.91 g/1000 mL イオン交換水) の各溶液を適量混和し, pH 7.0 に調整した.

- 100 mM リン酸緩衝液 (pH 5.4)

100 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (15.60 g/1000 mL 超純水) 及び 100 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (17.91 g/500 mL 超純水) の各溶液を適量混和し, pH 5.4 に調整した.

- 100 mM リン酸緩衝液 (pH 3.5)

前述の方法で調製した 100 mM リン酸緩衝液 (pH 5.4) にリン酸を適量滴下し, pH 3.5 に調整した.

- 100 mM 炭酸緩衝液 (pH 10.0)

100 mM 炭酸水素ナトリウム水溶液 (840.1 mg/100 mL 超純水) 及び 100 mM 炭酸ナトリウム水溶液 (1059.9 mg/100 mL 超純水) の各溶液を適量混和し, pH 10.0 に調整した.

aCSF 調製方法

塩化カリウム 0.0093 g, 塩化ナトリウム 3.653 g, 塩化マグネシウム六水和物 0.101 g, リン酸二水素ナトリウム 0.0390 g, リン酸水素二ナトリウム 0.448 g を超純水で溶解させ, 別に溶解させた塩化カルシウム 0.0666 g を加えて混和し, 全量 500 mL とした後, メンブレンフィルター (Millex®-LG Sterile, 0.2 µm, 日本ミリポア株式会社) でろ過した.

Dopamine 及び serotonin 標準溶液の調製方法

- Dopamine: 100 mg/L EDTA・2Na を含む 100 mM HCl を用いて 10 mM になるように調製したものを保存溶液とし, 分解を防ぐために -4°Cで冷凍保存した.
- Serotonin: 100 mg/L EDTA・2Na を含む 100 mM CH₃COOH を用いて 10 mM になるように調製したものを保存溶液とし, 分解を防ぐために -4°Cで冷凍保存した.

使用機器

- HPLC-蛍光システム

- Column: Wakopak Handy ODS (150×4.6 mm, i.d., 6 µm, 和光純薬工業株式会社)
- Fluorescence detector: Shimadzu RF-10Axl (島津製作所, 京都)
- Pump 1: Shimadzu LC-10ATvp (島津製作所)
- Pump 2: Shimadzu LC-10AS (島津製作所)
- Recorder: FBR-2 (東ソー株式会社)
- Injector: 7725i 型インジェクター (Rheodyne)

- HPLC-ECD システム

- Analytical system: HTEC-500 (株式会社エイコム, 京都)
- Column: EICOMPAK PP-ODS II (30×4.6 mm, i.d., 2 µm, 株式会社エイコム)

- Data processor: EPC-500 (株式会社エイコム)

投与薬物

- MDMA: MDMA を含有する錠剤 (101.76 mg/tablet) を乳鉢ですり潰したものに、生理食塩水を加えて超音波処理後、懸濁液をメンブランフィルター (Millex®-LG Sterile, 0.2 μm , 日本ミリポア株式会社) でろ過した。その後生理食塩水で希釈したものを使用した。
- Methamphetamine: ヒロポン® (大日本住友製薬株式会社) を生理食塩水で溶解したものを使用した。

ラット脳マイクロダイアリシス法

- 脳定位固定装置: SR-5R (株式会社成茂化学器械研究所, 東京)
- マイクロインジェクションポンプ: Microinjection pump CMA/100 (CMA Microdialysis, スウェーデン)
- リキッドスイッチ: Liquid switch CMA/110 (CMA Microdialysis)
- マイクロダイアリシスプローブ: MAB6 (Polyethersulfone, 15,000 Dalton's cut-off, 4 mm membrane length, ALS/Microbiotech., スウェーデン)
- 灌流液: aCSF (125 mM NaCl, 0.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM KCl, 1.0 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM CaCl_2 /超純水)
- 流速: 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$
- 採取時間: 薬物投与前 20 分間及び薬物投与後 3 時間まで 10 分間隔, 以後 10 時間まで 1 時間間隔で試料を採取した。

— 第二章 —

試薬、溶媒等

- 超純水: SimPak® 1 kit (日本ミリポア株式会社) を用いて精製した超純水を用いた。
- Saline: 日本薬局方生理食塩液 大塚生食注 (大塚製薬株式会社) を用いた。
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。
- Sodium 1-decanesulfonate: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。
- EDTA $\cdot 2\text{Na}$: 試験研究用 (株式会社同仁化学研究所) を用いた。
- NaCl: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。
- KCl: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。
- CaCl_2 : 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた。

- HCl: 容量分析用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- CH₃COOH: 容量分析用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Dopamine: 試薬特級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Serotonin: 関東化学株式会社製を用いた.
- Phosphoric acid: HPLC 用 (和光純薬工業株式会社) を用いた.
- Ethyl carbamate: 試薬一級 (和光純薬工業株式会社) を用いた.

緩衝液調製方法

- 100 mM リン酸緩衝液 (pH 5.4)

100 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (15.60 g/1000 mL 超純水) 及び 100 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (17.91 g/500 mL 超純水) の各溶液を適量混和し, pH 5.4 に調整した.

- 100 mM リン酸緩衝液 (pH 3.5)

前述の方法で調製した 100 mM リン酸緩衝液 (pH 5.4) にリン酸を適量滴下し, pH 3.5 に調整した.

aCSF 調製方法

塩化カリウム 0.0093 g, 塩化ナトリウム 3.653 g, 塩化マグネシウム六水和物 0.101 g, リン酸二水素ナトリウム 0.0390 g, リン酸水素二ナトリウム 0.448 g を超純水で溶解させ, 別に溶解させた塩化カルシウム 0.0666 g を加えて混和し, 全量 500 mL とした後, メンブレンフィルター (Millex®-LG Sterile, 0.2 µm, 日本ミリポア株式会社) でろ過した.

Dopamine 及び serotonin 標準溶液の調製方法

- Dopamine: 100 mg/L EDTA・2Na を含む 100 mM HCl を用いて 10 mM になるように調製したものを保存溶液とし, 分解を防ぐために -4°Cで冷凍保存した.
- Serotonin: 100 mg/L EDTA・2Na を含む 100 mM CH₃COOH を用いて 10 mM になるように調製したものを保存溶液とし, 分解を防ぐために -4°Cで冷凍保存した.

使用機器

- HPLC-ECD システム

- Analytical system: HTEC-500 (株式会社エイコム)
- Column: EICOMPAK PP-ODS II (30×4.6 mm, i.d., 2 µm, 株式会社エイコム)
- Data processor: EPC-500 (株式会社エイコム)

投与薬物

- Ketamine: ケタラール®筋注用 (第一三共プロファーマ, 東京) を用い, 適宜生理食塩

水で希釈調製をおこなった。

- Methoxetamine: 西進株式会社より購入し、生理食塩水で溶解して調製した。

マウス脳マイクロダイアリシス法

- 脳定位固定装置: SR-5R (株式会社成茂化学器械研究所)
- マイクロインジェクションポンプ: Microinjection pump CMA/100 (CMA Microdialysis)
- リキッドスイッチ: Liquid switch CMA/110 (CMA Microdialysis)
- マイクロダイアリシスプローブ: A-I-6-01-M (Polyethersulfone, 15,000 Daltons cut-off, 1 mm membrane length, 株式会社エイコム)
- 灌流液: aCSF (125 mM NaCl, 0.5 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 2.5 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2.5 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂·6H₂O, 1.2 mM CaCl₂/超純水)
- 流速: 2.0 μL/min
- 採取時間: 薬物投与前 30 分間及び薬物投与後 100 分間まで 10 分間隔で試料を採取した。

—その他—

- pH meter: Horiba F-8L pH meter (株式会社堀場製作所, 京都)
- Membrane filter: Millex®-LG Sterile, 0.2 μm (日本ミリポア株式会社)
Millipore filter JGWP 04700, 0.2 μm (日本ミリポア株式会社)
- Sonicator: Branson 1510 J-DTH, Branson 5510 J-MT (ヤマト科学株式会社)
- Syringe: テルモシリンジ SS-01T, 1 mL (テルモ株式会社, 東京)
ニプロシリンジ GA 08-400, 3 mL (ニプロ株式会社, 大阪)
- Needle: フローマックス 27G×3/4", S.B. (ニプロ株式会社)
フローマックス 27G×1/2", S.B. (ニプロ株式会社)

【引用文献】

- 1) Brady J.E., Li G., 2014. Trends in alcohol and other drugs detected in fatally injured drivers in the United States, 1999-2010. *Am J Epidemiol.* 179, 692-699.
- 2) Takekawa K., Ohmori T., Kido A., Oya M., 2007. Methamphetamine body packer: acute poisoning death due to massive leaking of methamphetamine. *J Forensic Sci.* 52, 1219-1222.
- 3) Tuusov J., Vals K., Tõnisson M., Riikoja A., Denissov G., Väli M., 2013. Fatal poisoning in Estonia 2000-2009. Trends in illegal drug-related deaths. *J Forensic Leg Med.* 20, 51-56.
- 4) National Police Agency of Japan, 2013. The White Paper on 2013. National Agency, Tokyo, Japan.
- 5) Teng F., Wu S., Liu C., Li J., Chien C., 2006. Characteristics and trends of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets found in Taiwan from 2002 to February 2005. *Forensic Sci Int.* 161, 202-208.
- 6) Silins E., Copeland J., Dillon P., 2009. Patterns and harms of pharmaceutical drug use among ecstasy users in Australia. *Adicciones.* 21, 347-362.
- 7) Fox H.C., McLean A., Turner J.J.D., Parrott A.C., Rogers R., Sahakian B.J., 2002. Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ("ecstasy") polydrug users. *Psychopharmacology.* 162, 203-214.
- 8) Kaye S., Darke S., Dufloy J., 2009. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-related fetalities in Australia: Demographics, circumstances, toxicology and major organ pathology. *Drug and Alcohol Depend.* 104, 254-261.
- 9) Corazza O., Schifano F., Simonato P., Fergus S., Assi S., Stair J., Corkery J., Trincas G., Deluca P., Davey Z., Blaszkowski U., Demetrovics Z., Moskalewicz J., Enea A., di Melchiorre G., Mervo B., di Furia L., Farre M., Flesland L., Pasinetti M., Pezzolesi C., Pisarska A., Shapiro H., Siemann H., Skutle A., Enea A., di Melchiorre G., Sferrazza E., Torrens M., van der Kreeft P., Zummo D., Scherbaum N., 2012. Phenomenon of new drugs on the Internet: the case of ketamine derivative methoxetamine. *Hum Psychopharmacol.* 27, 145-149.
- 10) Kikura-Hanajiri R., Uchiyama N., Kawamura M., Ogata J., Goda Y., 2013. Prevalence of new designer drugs and their legal status in Japan. *Yakugaku Zasshi.* 133, 31-40.
- 11) Kikura-Hanajiri R., Uchiyama N., Goda Y., 2011. Survey of current trends in the abuse of psychotropic substances and plants in Japan. *Leg Med (Tokyo).* 13, 109-115.
- 12) Abe T., 2013. Current and future legislation of illegal drugs in Tokyo. *Yakugaku Zasshi.* 133, 3-5.
- 13) Sano R., Hasuike T., Nakano M., Kominato Y., Itoh H., 2009. A fatal case of myocardial damage due to misuse of the "designer drug" MDMA. *Leg Med (Tokyo).* 11, 294-297.

- 14) Claffey C., 2011. A 26-year-old woman with sudden onset cerebral edema. *J Emerg Nurs.* 37, 55-56.
- 15) Liu Y., Le Foll B., Liu Y., Wang X., Lu L., 2008. Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. *ScientificWorldJournal.* 8, 1228-1245.
- 16) Perrine S.A., Ghoddoussi F., Michaels M.S., Hyde E.M., Kuhn D.M., Galloway M.P., 2010. MDMA administration decreases serotonin but not N-acetylaspartate in the rat brain. *Neurotoxicology.* 31, 654-661.
- 17) Granado N., Ares-Santos S., Oliva I., O'Shea E., Martin E.D., Colado M.I., Moratalla R., 2011. Dopamine D2-receptor knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA. *Neurobiol Dis.* 42, 391-403.
- 18) Fleckenstein A.E., Haughey H.M., Metzger R.R., Kokoshka J.M., Riddle E.L., Hanson J.E., Gibb J.W., Hanson G.R., 1999. Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function. *Eur J Pharmacol.* 382, 45-49.
- 19) Han D.D., Gu H.H., 2006. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol.* 6, 6-12.
- 20) Ikeda R., Igari Y., Fuchigami Y., Wada M., Kuroda N., Nakashima K., 2011. Pharmacodynamic interactions between MDMA and concomitants in MDMA tablets on extracellular dopamine and serotonin in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 660, 318–325.
- 21) Benveniste H., 1989. Brain microdialysis. *J Neurochem.* 52, 1667-1679. *Review.*
- 22) Makino Y., Tanaka S., Kurobane S., Nakauchi M., Terasaki T., Ohta S., 2003. Profiling of illegal amphetamine-type stimulant tablets in Japan. *J Health Sci.* 49, 129-137.
- 23) Morefield K.M., Keane M., Felgate P., White J.M., Irvine R.J., 2011. Pill content, dose and resulting plasma concentrations of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in recreational 'ecstasy' users. *Addiction.* 106, 1293-1300.
- 24) Greene S.L., Dargan P.I., O'connor N., Jones A.L., Kerins M., 2003. Multiple toxicity from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"). *Am J Emerg Med.* 21, 121-124.
- 25) Irvine R.J., Keane M., Felgate P., McCann U.D., Callaghan P.D., White J.M., 2006. Plasma drug concentrations and physiological measures in 'dance party' participants. *Neuropsychopharmacol.* 31, 424-430.
- 26) Hall A.P., Henry J.A., 2006. Acute toxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *Br J Anaesth.* 96, 678-685.
- 27) Baylen C.A., Rosenberg H.A., 2006. A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction.* 101, 933-947.
- 28) Verheyden S.L., Henry J.A., Curran V.H., 2003. Acute, sub-acute and long-term subjective consequences of 'ecstasy' (MDMA) consumption in 430 regular users. *Hum Psychopharmacol.* 18, 507-517.

- 29) Sadzot B., Baraban J.M., Glennon R.A., Lyon R.A., Leonhardt S., Jan C.R., Titeler M., 1989. Hallucinogenic drug interactions at human brain 5-HT₂ receptors: implications for treating LSD-induced hallucinogenesis. *Psychopharmacology*. 98, 495–499.
- 30) Mechan A.O., Esteban B., O’Shea E., Elliott J.M., Colado M.I., Green A.R., 2002. The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ‘ecstasy’) to rats. *Br J Pharmacol*. 135, 170-180.
- 31) Cole J.C., Sumnall H.R., 2003. The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev*. 27, 199-217.
- 32) Lyles J., Cadet J.L., 2003. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res Rev*. 42, 155-168.
- 33) Docherty J.R., Green A.R., 2010. The role of monoamines in the changes in body temperature induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and its derivatives. *Br J Pharmacol*. 160, 1029-1044.
- 34) Numachi Y., Ohara A., Yamashita M., Fukushima S., Kobayashi H., Hata H., Watanabe H., Hall F.S., Lesch K.P., Murphy D.L., Uhl G.R., Sora I, 2007. Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur J Pharmacol*. 572, 120-128.
- 35) Vidal-Infer A., Roger-Sánchez C., Daza-Losada M., Aguilar M.A., Miñarro J., Rodríguez-Arias M., 2012. Role of the dopaminergic system in the acquisition, expression and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in adolescent mice. *PLoS One*. 7, e43107.
- 36) Paxinos G., Watson G., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, fifth ed. Academic Press, California.
- 37) Sun Y., Nakashima M.N., Takahara M., Kuroda N., Nakashima K., 2002. Determination of bisphenol A in rat brain by microdialysis and column switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*. 16, 319-326.
- 38) Wada M., Yokota C., Ogata Y., Kuroda N., Yamada H., Nakashima K., 2008. Sensitive HPLC-fluorescence detection of morphine labeled with DIB-Cl in rat brain and blood microdialysates and its application to the preliminarily study of the pharmacokinetic interaction between morphine and diclofenac. *Anal Bioanal Chem*. 391, 1057-1062.
- 39) Mechan U.D., Ricaurte G.A., 2001. Caveat emptor: editors beware. *Neuropsychopharmacology*. 24, 333-334.
- 40) Tomita M., Nakashima N.M., Wada M., Nakashima K., 2007. Sensitive determination of MDMA and its metabolite MDA in rat blood and brain microdialysates by HPLC with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*. 21, 1016-1022.
- 41) Yamaoka K., Nakagawa T., Uno T., 1978. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinetic Biopharm*. 6, 547-558.

- 42) Chu T., Kumagai Y., DiStefano E.W., Cho A.K., 1996. Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem Pharmacol.* 51, 789-796.
- 43) Rothman R.B., Baumann M.H., 2002. Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates. *Pharmacol Ther.* 95, 73-88.
- 44) Pal D., Mitra A.K., 2006. MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1, 323-339.
- 45) Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L., Melamed M.R., Bertino J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 695-698.
- 46) Mann H., Ladenheim B., Hirata H., Moran T.H., Cadet J.L., 1997. Differential toxic effects of methamphetamine (METH) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in multidrug-resistant (*mdr 1a*) knockout mice. *Brain Res.* 769, 340-346.
- 47) Ketabi-Kiyanvash N., Weiss J., Haefeli W.E., Mikus G., 2003. P-glycoprotein modulation by the designer drugs methylenedioxymethamphetamine, methylenedioxyethylamphetamine and paramethoxyamphetamine. *Addict Biol.* 8, 413-418.
- 48) Clemens K.J., van Nieuwenhuyzen P.S., Li K.M., Cornish J.L., Hunt G.E., McGregor I.S., 2004. MDMA ("ecstasy"), methamphetamine and their combination: long-term changes in social interaction and neurochemistry in the rat. *Psychopharmacology.* 173, 318-325.
- 49) Clemens K.J., Cornish J.L., Li K.M., Hunt G.E., McGregor I.S., 2005. MDMA ("ecstasy"), methamphetamine and their combination: Order of administration influences hyperthermic and long-term adverse effects in female rats. *Neuropharmacol.* 49, 195-207.
- 50) Hofer K.E., Grager B., Müller D.M., Rauber-Lüthy C., Kupferschmidt H., Rentsch K.M., Ceschi A., 2012. Ketamine-like effects after recreational use of methoxetamine. *Ann Emerg Med.* 60, 97-99.
- 51) Corazza O., Assi S., Schifano F., 2013. From "Special K" to "Special M": the evolution of the recreational use of ketamine and methoxetamine. *CNS Neurosci Ther.* 19, 454-460.
- 52) Wood D.M., Davies S., Puchnarewicz M., Johnston A., Dargan P.I., 2012. Acute toxicity associated with the recreational use of the ketamine derivative methoxetamine. *Eur J Clin Pharmacol.* 68, 853-856.
- 53) Rosenbaum C.D., Carreiro S.P., Babu K.M., 2012. Here today, gone tomorrow...and back again? A review of herbal marijuana alternatives (K2, Spice), synthetic cathinones (bath salts), kratom, *Salvia divinorum*, methoxetamine, and piperazines. *J Med Toxicol.* 8, 15-32.
- 54) Chatterjee M., Verma R., Ganguly S., Palit G., 2012. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology.* 63, 1161-1171.

- 55) Lorrain D.S., Baccei C.S., Bristow L.J., Anderson J.J., Varney M.A., 2003. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience*. 117, 697-706.
- 56) Kamiyama H., Matsumoto M., Otani S., Kimura S.I., Shimamura K.I., Ishikawa S., Yanagawa Y., Togashi H., 2011. Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience*. 177, 159–169.
- 57) Roth B.L., Gibbons S., Arunotayanun W., Huang X.P., Setola V., Treble R., Iversen L., 2013. The ketamine analogue methoxetamine and 3- and 4-methoxy analogues of phencyclidine are high affinity and selective ligands for the glutamate NMDA receptor. *PLoS One*. 8, e59334.
- 58) Franklin K.B.J., Paxinos G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, California.
- 59) Koshikawa N., Tomiyama K., Omiya K., Kobayashi M., 1988. Ketamine anaesthesia has no effect on striatal dopamine metabolism in rats. *Brain Res*. 444, 394–396.
- 60) Masuzawa M., Nakao S., Miyamoto E., Yamada M., Murao K., Nishi K., Shingu K., 2003. Pentobarbital inhibits ketamine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens: a microdialysis study. *Anesth Analg*. 96, 148–152.
- 61) Baumann M.H., Clark R.D., Rothman R.B., 2008. Locomotor stimulation produced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is correlated with dialysate levels of serotonin and dopamine in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 90, 208-217.

【謝辞】

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました長崎大学 黒田直敬教授、長崎国際大学 中島憲一郎教授、ならびに九州保健福祉大学 和田光弘教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本論文の作成にあたり、ご懇切なる御助言とご校閲を賜りました長崎大学 西田孝洋教授、川上 茂教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、多くの有益なご助言を頂きました池田理恵博士、長崎大学大学院医薬品情報学分野の皆様、心より御礼申し上げます。

最後に、実験の一部にご協力頂きました、葛島美季学士、釜谷奈未学士、池田朝美さんに深く感謝いたします。

2015 年 3 月 渕上 由貴