



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	乙第 号
学位記番号	論 第1629号
氏 名	松本 智寛
授与年月日	平成 26年 7月 29日
学位論文の題名	<p>5-hydroxytryptamine- and dopamine-releasing effects of ring-substituted amphetamines on rat brain: a comparative study using <i>in vivo</i> microdialysis (ラット脳における芳香環置換アンフェタミン類の5-ヒドロキシトリプタミン及びドーパミン放出作用: <i>in vivo</i>脳微小透析法を用いた比較研究)</p> <p>European Neuropsychopharmacology, in press</p>
論文審査担当者	主査: 飛田 秀樹 副査: 松川 則之, 青木 康博

論文内容の要旨

緒言 主要な濫用薬物であるアンフェタミン(AMP)誘導体は、多彩な薬理作用を有する薬物群である。AMP は中枢神経刺激作用を有する代表的な薬物であるが、置換基の導入によりその薬理学的特性が著しく変化する。例えば、*N*-メチル化によりその中枢刺激作用は増強され、一方、AMP のベンゼン環への置換基の導入は幻覚作用を発現させる。ベンゼン環に3つの置換基が導入された化合物である2,5-ジメトキシ-4-メチルアンフェタミン(DOM)に至っては、中枢刺激作用はほぼ消失し純粋な幻覚発現薬として作用するものと考えられている。こうした AMP 誘導体の作用機序として、脳内モノアミン類に対する様々な作用に基づいて種々の仮説が提唱されている。今回、化学構造を段階的に変化させた7種のアンフェタミン誘導体(MAP, 4-MTA, PMA, PMMA, MDMA, DOI, TMA)を用いて、*in vivo* マイクロダイアリシス法により脳細胞外液中の5-HT 及び DA 濃度の濃度変化を測定して比較検討した。また、モノアミン酸化酵素(MAO)を用いた *in vitro* 酵素阻害実験により、モノアミン代謝への影響を評価した。

実験方法 (1) マイクロダイアリシス…8 週齢 Wistar/ST 雄性ラットの新線条体(CPu)及び海馬に対して、ハロタン麻酔下でガイドカニューレを挿入し、24 h の回復期間をおいた後、透析プローブを挿入した。5-HT 及び DA のベースライン濃度を測定した後、5 mg/kg の各 AMP 誘導体を *i.p.* 投与し、20 min 間隔で透析液を回収した。モノアミン濃度は HPLC-ECD にて分析し、ベースラインに対する百分率で示した。(2) MAO 阻害作用…ヒトリコンビナント MAO-A 及び B について、各タンパク質濃度 125 及び 50 μ g/mL の酵素液として調製し、100 mM リン酸緩衝液(pH7.4)及び阻害剤(各 AMP 誘導体)を加えて 37°C で 15 min プレインキュベーションし、基質としてベンジルアミンを加えて反応を開始した。120 min 後、速やかに氷冷して反応を停止させ、冷酢酸エチル及び内標準を添加して液液抽出を行った後、GC-MS にて分析し、各薬物の阻害能を IC_{50} として求めた。

結果及び考察 強力な中枢刺激薬である MAP は、DA 濃度をベースラインの約 1460%にまで著増させ、5-HT 濃度についても約 870%と大きく上昇させた。中枢刺激作用と幻覚作用を併せ持つと言われる MDMA は、DA 約 520%、5-HT 約 770%と両者とも著増させたが、MAP と異なり 5-HT 増加が優位であった。ベンゼン環のパラ位モノ置換体である PMA、PMMA、4-MTA については、いずれも 5-HT 濃度を 500%以上に著増させたが、DA については辛うじて有意に増加させたものの、約 150-290%と微増に留まった。一方、ベンゼン環トリ置換体である DOI 及び TMA については、DA、5-HT ともに有意な上昇は認められなかった。即ち、5-HT、DA 両者に対して著しい放出促進作用がある MAP に対して、パラ位にメトキシ基を導入した PMA は DA 放出作用が急激に減弱した。更に、PMA の両メタ位にメトキシ基が導入されると、5-HT 放出作用までが失われることから、メタ位及びパラ位がモノアミン放出促進作用の選択性に重要な役割を担っているものと推察された。また、DOI 及び TMA の構造類似体である DOM もまた、5-HT 及び DA 増加を惹起しない。しかしながら、DOM は強力な 5-HT_{2A/2C} 受容体の部分作動薬であることから、DOI、TMA についても同様の作用機序を有する可能性が示唆される。MAO 阻害作用については、200 μ M で阻害能を示さなかった TMA を除き、総ての薬物で MAO-B よりも MAO-A 阻害作用の方が強かった。特に、ベンゼン環パラ位モノ置換体である PMA、PMMA、4-MTA の阻害作用が強く、MAO-A に対する IC_{50} は 0.25-1.7 μ M であり、脳内モノアミン濃度の上昇に影響を与える可能性が示唆された。Glennon らは AMP 誘導体の薬物弁別試験の結果を詳細に検討し、従来の AMP 型中枢刺激薬、DOM 型幻覚薬の他に、いずれとも般化しない第3の薬物群として PMMA を代表格とする“empathogen”の存在を提示した。PMMA は、PMA、4-MTA とともに、5-HT 濃度を著増させる一方で DA 濃度を僅かしか増加させない特性を有し、更に MAO-A に対して強い阻害作用を示す薬物であった。この特性は、MAP や MDMA のような強い中枢刺激作用を有する薬物や、DOI や TMA のような

5-HT 及び DA 濃度に影響を与えない薬物とは一線を画す特性であり、“empathogen”を特徴付けるパラメータとして利用できる可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

【研究目的】 主な濫用薬物となっているアンフェタミン(AMP)誘導体は、置換基の導入位置によりその薬理学的特性が著しく変化し、多様な薬理作用を有する薬物群である。AMP 誘導体の作用機序として、脳内モノアミンに対する様々な作用に基づいた仮説が提唱されている。本研究は、段階的に化学構造を変化させた7種のAMP誘導体(MAP, MDMA, PMA, PMMA, 4-MTA, DOI, TMA)を動物へ投与し、*in vivo* マイクロダイアリシス法により脳細胞外液中セロトニン(5-HT)及びドーパミン(DA)の濃度変化を比較検討した。さらに、モノアミン酸化酵素(MAO)を用いた *in vitro* 酵素阻害実験により、モノアミン代謝への影響を評価した。

【材料と方法】(1) マイクロダイアリシス法は、8週齢 Wistar/ST 雄性ラットの新線条体及び海馬へ透析プローブを挿入し、5 mg/kg の AMP 誘導体を腹腔内投与した後 20 min 毎に透析液を回収した。モノアミン濃度は、AMP 誘導体投与前のベースラインに対する百分率として求めた。(2) MAO 阻害作用実験は、ヒトリコンビナント MAO-A 及び B を用いて酵素液を調製し、100 mM リン酸緩衝液(pH7.4)及び阻害剤(各 AMP 誘導体)を加えて 37°C で 15 min プレインキュベーションし、基質としてベンジルアミンを加えて反応を開始した。120 min 後、速やかに反応を停止させ、酢酸エチル及び内標準を添加して抽出を行った後、GC-MS にて分析し、各薬物の阻害活性を IC₅₀ として求めた。

【結果】 MAP は、DA 濃度をベースラインの約 1460%にまで著増させ、5-HT 濃度についても約 870%と大きく上昇させた。MDMA は、DA 約 520%、5-HT 約 770%と両者とも著増させたが、MAP と異なり 5-HT 増加が優位であった。*p*-モノ置換体である PMA、PMMA、4-MTA については、いずれも 5-HT 濃度を 500%以上に著増させたが、DA については辛うじて有意に増加させたものの、約 150-290%と微増に留まった。一方、ベンゼン環トリ置換体である DOI 及び TMA については、DA、5-HT ともに有意な上昇は認められなかった。以上の特性を比較するために各薬物の最大増加率を用いて DA/5-HT 比を求めたところ、MAP で 1.67 と高値を示し、MDMA では 0.68 であった。また、*p*-モノ置換体では 0.23-0.35 と低値を示した。MAO 阻害作用については、200 μ M で阻害活性を示さなかった TMA を除き、総ての薬物で MAO-B よりも MAO-A 阻害活性の方が強かった。特に、*p*-モノ置換体である PMA、PMMA、4-MTA の阻害活性が強く、MAO-A に対する IC₅₀ は 0.25-1.7 μ M であった。

【結論】 多様な AMP 誘導体の薬理学的特性が、脳内モノアミン濃度の変化と MAO 阻害活性の強度によって特徴付けられ得る可能性が示唆された。

【審査内容】 審査委員会におけるスライド発表ののち、主査(飛田秀樹教授)からは、*in vivo* マイクロダイアリシス-HPLC 法における電解電位や SC-50DS カラムについての測定原理に関する質問、他ドーパミン代謝物の動態について等の論文に関する12項目の質問、第一副査(松川則之教授)からは、酵素の特性やガスクロマトグラフィーについての一般的質問、メタ位のみ修飾された場合についてはどうか等の詳細な論文に関する8項目の質問、第二副査(青木康博教授)からは、アンフェタミン群の他の毒性はないか、最近の機器の進歩が覚醒剤関係の分析にどのような影響が出たのかについて等の専門分野を中心とする4項目の質問がなされた。申請者からは、これら質問について満足する内容の回答が得られた。

本委員会では、本論文筆頭著者は学位論文の内容を十分理解し大学院博士と同等の学力を有しているものと判断し、博士(医学)の学位を授与するのに相応しいと判定した。