

薬物乱用防止を目的とした向精神薬の *In vitro* スクリーニング法

佐藤かな子,* 野中良一

In Vitro Screening of Psychoactive Drugs to Prevent the Abuses

Kanao SATOH* and Ryouichi NONAKA

*Department of Environmental Health and Toxicology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

(Received August 6, 2008; Accepted September 24, 2008; Published online September 26, 2008)

The Tokyo Metropolitan Government in Japan enacted an “Ordinance concerning the abuse prevention of the psychoactive drugs” in April 2006 that prohibited the manufacture, cultivation, sales, possession, use, *etc.*, of these drugs. Therefore, we constructed a reproducible, simple, and small-scale determination method of the psychoactive drugs for the re-uptake and the release of monoamines (dopamine, serotonin and norepinephrine), and the activation of [³⁵S] guanosine-5'-*O*-(3-thio)-triphosphate binding to guanine nucleotide-binding proteins (G proteins). These assays were then applied to study the effects of different kinds (phenethylamine derivatives, tryptamine derivatives, and piperazine derivatives) of non-medically used psychoactive drugs on monoamine re-uptake and release, and G-protein binding. The results suggested that some drugs strongly act on the central nerve system to the same extent as the drugs. This assay system was able to designate psychoactive drugs as prohibited substances in accordance with criteria set forth by the Tokyo Metropolitan government.

Key words—psychoactive drug; re-uptake; release; G protein binding; dopamine; serotonin

1. はじめに

東京都では、違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）を健康被害の未然防止、犯罪の防止及び薬物乱用防止等の目的で、1996年から都内のアダルトショップ、ビデオ店、ドラッグ専門店等で購入し、東京都健康安全研究センター（都健安研、旧都立衛生研究所）で含有成分に関して試験検査を行っている。その結果、医薬品成分が検出された製品を取り扱っていた店舗には、製品の販売中止、回収等の指示を行い、都民に製品の危険性を周知させるため、報道公表を行ってきた。しかし、インターネットや路上における販売はあとを絶たず、違法ドラッグによる事件や健康被害が頻発し、また、これらの薬物の使用は、覚せい剤や麻薬等の乱用への入口となるものが危惧されていた。そこで東京都は、2005年4月1日に「東京都薬物の濫用防止に関する条例」¹⁾を制定し、4回に渡り、9種類の薬物、2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl) ethanamine (2C-I), *N*-isopropyl-

1-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)-*N*-methylethan-2-amine (5-MeO-MIPT), *N*-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl) butan-2-amine (MBDB), 1-(3-chlorophenyl) piperazine (3CPP), 1-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl) propan-2-amine (5-MeO-AMT), 1-(2,4,5-trimethoxyphenyl) propan-2-amine (TMA-2), 2-(4-ethylthio-2,5-dimethoxyphenyl) ethanamine (2C-T-2), 1-(4-methoxyphenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (PMMA), 2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl) propan-1-one (Methylone) を知事指定薬物²⁾とし、取締りを行ってきた。この条例において「薬物」とは、大麻取締法、覚せい剤取締法、麻薬及び向精神薬取締法、あへん法、毒物及び劇物取締法施行令で規制する薬物を除くもののうち、これらと同等に、興奮、幻覚、陶酔その他これらに類する作用を人の精神に及ぼす物で、それを乱用することにより人の健康に被害が生じると認められるものである。条例では、知事指定薬物は製造、栽培、販売、授与が禁止され、2年以下の懲役若しくは100万円以下の罰金という罰則刑がある。東京都の取り組みを受けて、国は9種類の薬物のうち4種類 (MBDB, 3CPP,

東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 (〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1)
e-mail: Kanao_Satou@member.metro.tokyo.jp

TMA-2, Methylone) を麻薬へ指定し、さらに 2007 年 4 月 1 日に違法ドラッグを指定薬物として規制するための「薬事法の一部を改正する法律」を施行した。³⁾ その結果、残る 5 種類が薬事法指定薬物（さらに 2008 年 1 月に 2C-I と 2C-T-2 を麻薬指定）となり、知事指定薬物 9 種類がすべて条例から除外された。薬事法指定薬物とは、「中枢神経系の興奮若しくは抑制または幻覚的作用（当該作用の維持または強化の作用を含む）を有する蓋然性が高く、かつ、人の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」として、厚生労働大臣が指定する物質であるとされた。

東京都では、条例により薬物を指定するに当たり、薬物の危険性に関する情報について調査を行い、その結果を知事に報告するための付属機関として、東京都薬物情報評価委員会（委員会）を設置した。¹⁾ 委員会が薬物の危険性に関する情報の分析及び評価をするために、都健安研では、薬物の純度試験、動物へ投与した際の行動及び神経症状観察、脳神経伝達系への影響を調べ、その結果を委員会に基礎的データとして提供している。精神刺激、幻覚、快楽、体重減少、宗教的儀式等、様々な目的で多くの人々に利用されてきた薬物は、cocaine, morphine, lysergic acid diethylamide (LSD) など主に植物由来であった。しかし、ここ最近の 10 年間は、化学的に合成されたものが多く出回り、精神に作用する薬物は中枢神経系を修飾すると考えられているが、確かな作用機序は明らかにされていない。精神に作用する薬物の多くは、ドーパミン (DA)、セロトニン (5-HT)、アドレナリン作動性神経系を含むモノアミン神経伝達組織を修飾する。麻薬 cocaine は DA, 5-HT, ノルエピネフリン (NE) の再取り込みを抑制し、覚せい剤 methamphetamine (MAP) は DA, 5-HT, NE の遊離を促進し、また合成麻薬 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) は 5-HT の遊離を促進することによって中枢神経系を刺激し、作用を発揮する。筆者らは、薬物が脳神経伝達系に作用するか否かを調べるために、*in vitro* スクリーニング系を構築し、それにより得られた結果を委員会に提出している。

薬物の中枢神経作用は広範囲であり、中枢神経系への作用を特定する方策も多岐に渡っている。そこで、ラット脳から調製したシナプス画分を用い、神

経伝達を司るニューロンに対する作用を前シナプス側及び後シナプス側に分け、それぞれ簡便な *in vitro* スクリーニング法の詳細を報告してきた。^{4,5)} 薬物は、前シナプス側において、神経伝達物質である DA, 5HT, NE のシナプス間隙での濃度を増加させることにより、興奮作用をもたらし、後シナプス側では、ドラッグは直接受容体と結合し、グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G-タンパク質) を活性化することにより作用を発揮すると考えられている (Fig. 1)。そこで、薬物の前シナプス側における伝達物質の再取り込み阻害作用及び遊離促進作用と、後シナプス側における G-タンパク質活性化作用を測定した。本総説では、これら *in vitro* スクリーニング法の紹介と、これらの方法を用いて調べた、薬物の作用をまとめて報告する。

2. 違法ドラッグ *In vitro* スクリーニング法

2-1. 再取り込み阻害作用⁴⁾

ラット脳シナプトソームは、Fleckenstein ら⁶⁾ に準じたわれわれの報告⁴⁾ に従って精製した。オス SD ラット (300–400 g) の頭をエーテル麻酔下切断し、脳を速やかに摘出し、線条体と皮質を単離した。各々の組織は、25 倍容量の冷 0.32 M ショ糖溶液中でテフロンホモジナイザーにてゆっくり 10 回ホモジナイズ後、800 xg, 12 分間, 4°C で遠心し、上清をさらに 22000 xg, 20 分間, 4°C で遠心した。ここで得られた沈殿を Krebs-Ringer 緩衝液 (pH 7.4, 含 126 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄, 16 mM sodium phosphate, 11 mM glucose, 1 mM ascorbate, 1 μM pargyline = 緩衝液 A) に分散し、シナプトソームとした。線条体シナプトソーム (StP₂) は DA の測定に、皮質シナプトソーム (CxP₂) は 5-HT と NE

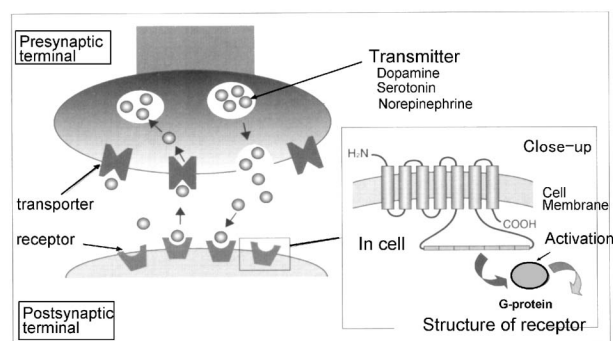


Fig. 1. Model of Neurotransmission

This figure by Inoue²⁴⁾ was modified slightly.

の測定に使用した。

再取り込み阻害作用測定は、Rothman^{7,8)}らに準じたわれわれが報告した方法⁴⁾に従ってシナプトソームの精製後直ちに開始した。ドラッグの3種類のモノアミンに対する影響を、96穴プレート3枚を用意し同時に並行して測定した。プレートにシナプトソーム 50 μ l (StP₂: DA 測定 30 μ g タンパク量/穴, CxP₂: 5-HT 及び NE 測定 70 μ g タンパク量/穴) と様々な濃度のドラッグ希釈溶液 25 μ l を加え、10分間 37°C でプレインキュベーション後、終濃度 63 nM [³H]DA, 125 nM [³H]5-HT, 125 nM [³H]NE の 25 μ l をそれぞれのプレートに添加することにより反応を開始した。5分間 37°C で反応後、セルハーベスターによりガラスフィルター (Whatman GF/C) 上に急速真空ろ過することにより反応を終了させた。フィルター上に保持された残渣は、結合していない放射性同位元素を除去するために、冷緩衝液 A で洗ったのち、フィルターを丸く穴の形に切断し、1枚ずつ 1.5 ml のシンチレーターの入ったバイアルの中に入れ、1晩抽出後、フィルター上に保持された放射活性量を測定した。 [³H]5-HT 再取り込みは、DA や NE の神経端末への取り込みを妨げるために 100 nM nomifensine と 200 nM GBR12935 存在下で測定した。DA と 5-HT の非特異的な再取り込み量は、それぞれ 10 μ M GBR12909 と 10 μ M citalopram 存在下で得た値とし、NE のそれは反応温度 0°C で得た値とした。特異的な結合量は、全再取り込み量から非特異的な再取り込み量を差し引くことによって求めた。これらの結果から再取り込み阻害曲線を作成し、薬物の半阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。

2-2. 遊離促進作用⁴⁾ ラット脳シナプトソーム精製は、1 μ M reserpine を 0.32 M ショ糖溶液と緩衝液 A に加え、2-1. 節で述べた再取り込み阻害作用と同様に行い、精製後直ちにわれわれの報告⁴⁾に従って遊離促進作用を実施した。

遊離促進作用測定は、3本の試験管を用意し、DA の測定用に StP₂, 5-HT と NE の測定用に CxP₂ を加え、さらにそれぞれの試験管に 5 nM [³H]DA (30分間), 5 nM [³H]5-HT (60分間), 又は 7 nM [³H]NE (60分間) を加えたのち、振とうしながら、25°C で反応した。 [³H]5-HT 遊離促進実験においては 100 nM nomifensine と 100 nM GBR12935 存在下

で反応させた。反応後、シナプトソーム混液 75 μ l (StP₂: DA 測定 30 μ g タンパク量/穴, CxP₂: 5-HT 及び NE 測定 70 μ g タンパク量/穴) を様々な濃度のドラッグ 25 μ l が入った 3枚の 96穴プレートに加えた。それぞれの反応は3つの系列を並行して実施した。25°C で反応 5分後 (DA と 5-HT), 30分後 (NE), セルハーベスターにて急速真空ろ過することにより反応を終了させ、以後の操作は 2-1. 節の再取り込み阻害作用と同様に行った。非特異的な遊離量は、DA と NE では 10 μ M tyramine, また 5-HT では 100 μ M の tyramine 存在下での反応値とした。特異的な遊離量は、全遊離量から非特異的な遊離量を差し引くことによって求めた。これらの結果から遊離促進曲線を作成し、薬物の 50% 活性化濃度 (EC₅₀) を求めた。

2-3. G-タンパク結合作用⁵⁾ ラット脳シナプトソームは Fleckenstein ら⁶⁾に準じた方法に従って精製した。⁵⁾ オス SD ラット (300-400 g) の頭をエーテル麻酔下切断し、脳を速やかに摘出し、線条体と皮質を単離した。25倍容量の冷 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.6, 含 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM dithiothreitol=緩衝液 B) 中、テフロンホモジナイザーにて 20回ホモジナイズし、800 xg, 12分, 4°C で遠心後、得られた上清をポリトロンでホモジナイズした。続いて 22000 xg で 20分間遠心分離し、沈殿に 20倍量の緩衝液 B を加え、ポリトロンでホモジナイズした。この懸濁液に終濃度 250 μ g/ml となるようにサポニンを加え、0°C で 30分間静置後、100000 xg, 20分間, 4°C で遠心した。ここで得られた沈殿を緩衝液 B に 3-6 mg/ml タンパク質濃度として懸濁し、小分けして実験時まで -80°C で保存した。

G-タンパク結合作用は、25 mM 緩衝液 B-10 μ M 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) 中で測定した。⁵⁾ 96穴プレート 2枚を用い、各ウェルには様々な濃度の薬物溶液を 25 μ l 分注し、さらに解凍した線条体シナプトソーム (2 μ g タンパク/穴, DA 測定) 又は皮質シナプトソーム (4 μ g タンパク/穴, 5HT and NE 測定) と終濃度 150 μ M GDP 混液 25 μ l を加えた。プレートを 30°C で 20分間、反応後、0.1 nM [³⁵S]guanosin-5'-O-(3-thio) triphosphate (GTP γ S) を 25 μ l 加え、30°C で 90分間反応した。セルハーベスターにより急速真空ろ過するこ

とにより反応を終了し、フィルター上に保持された残渣は、2-1. 節の再取り込み阻害作用と同様に処理した。活性化値は、モノアミン類若しくは薬物で活性化した GTP γ S 結合値から、コントロール値（薬物を溶解した 0.1% 溶媒）を差し引いて求めた。活性化曲線を作成し、薬物の 50% 活性化濃度 (EC₅₀) を求めた。測定可能な最高濃度でも最大活性化値が得られなかった薬物については、basal な結合に対する活性化した割合 (%E_{max}) で示した。薬物による G-タンパク活性化作用が認められたときは、モノアミン受容体選択的アンタゴニスト 7 種類の存在下において再度測定を行い、活性化を抑えたアンタゴニストから、どのモノアミンの受容体に結合したのかを判定した。アンタゴニストは、SCH23390 (DA 受容体の 1 を認識=DA D₁), sulpiride (DA 受容体の 2 を認識=DA D₂), methiothepin (5-HT 受容体の 1 と 6 と 7 を認識=5-HT_{1,6,7}), WAY100635

(5-HT 受容体の 1A を認識=5-HT_{1A}), SB224289 (5-HT 受容体の 1B を認識=5-HT_{1B}), yohimbine (NE 受容体の α 2 を認識=NE α 2), propranolol (NE 受容体の β を認識=NE β) を用いた。

3. 測定薬物

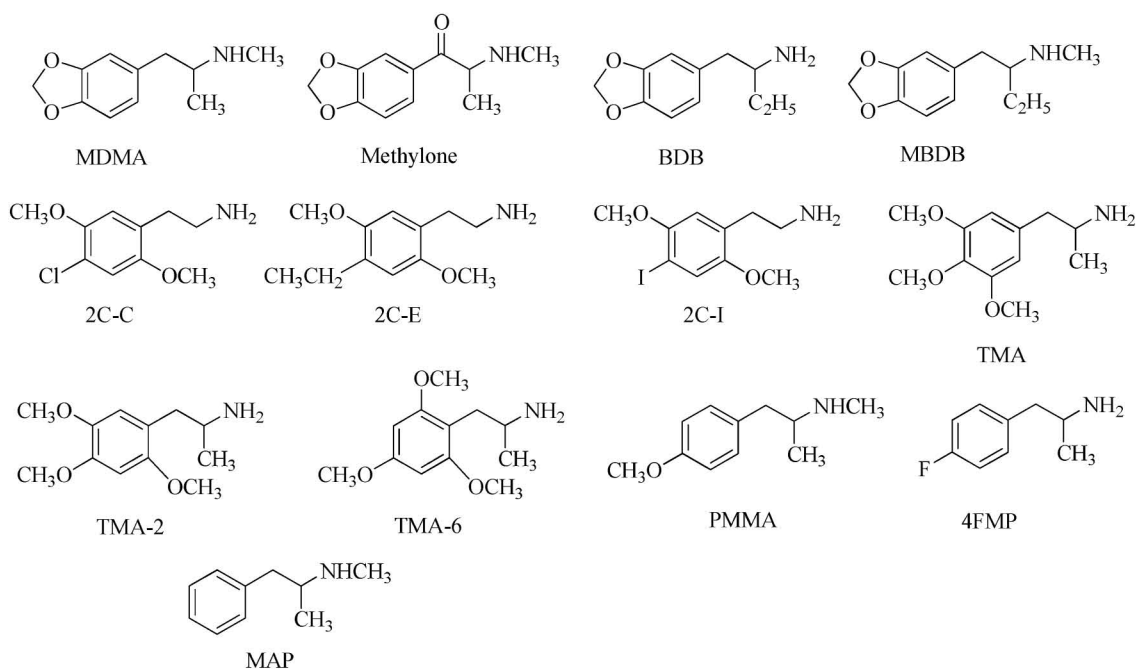
脳神経伝達系への影響を調べたドラッグ名とその省略名及び HPLC により確認した純度及び現在の指定根拠（麻薬、覚せい剤、薬事法指定薬物）を Table 1 に、それぞれの化学構造式を Fig. 2 に示す。薬物を構造式からフェネチルアミン系、トリプタミン系、ピペラジン系と大まかに分類した。薬物は、都内のアダルトショップ、露店等にて購入した。Cocaine (武田薬品) と MAP (大日本住友製薬) を陽性対照とした。薬物は、測定緩衝液若しくは 0.1% DMSO 含有測定緩衝液に溶解し、最大濃度 10⁻⁴ M まで検討した。

Table 1. Psychoactive Drugs Characteristics

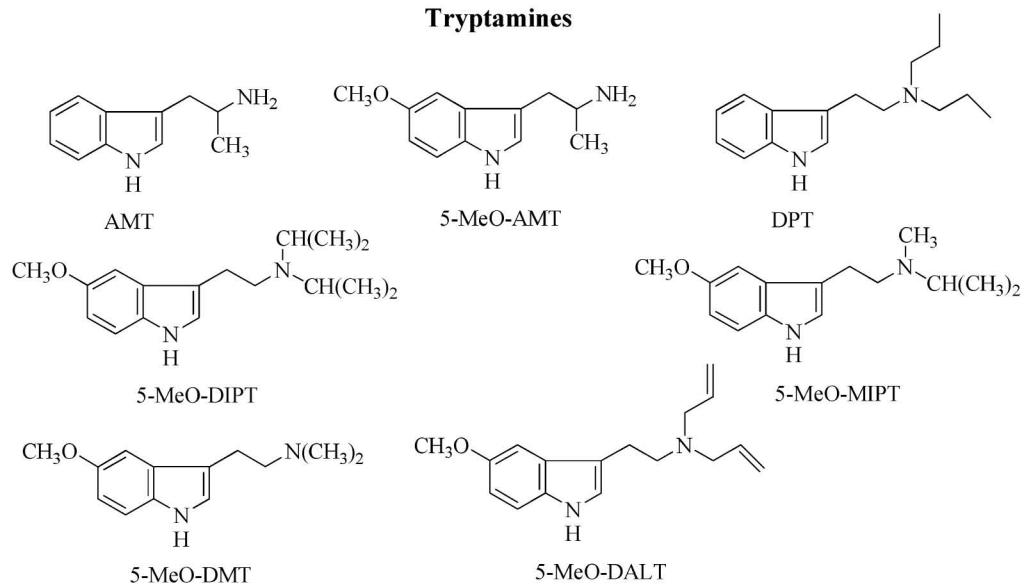
Drugs	Abbreviations	Purity (%)	Control Law ^{a)}
Phenethylamines			
3,4-Methylenedioxymethamphetamine	MDMA	98.0	N.C.L. ^{b)}
2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl) propan-1-one	Methylone	98.8	N.C.L.
1-(3,4-Methylenedioxyphenyl) butan-2-amine	BDB	97.1	P.A.L. ^{c)}
N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl) butan-2-amine	MBDB	99	N.C.L.
2-(4-Chloro-2,5-dimethoxyphenyl) ethanamine	2C-C	94.2	P.A.L.
2-(4-Ethyl-2,5-dimethoxyphenyl) ethanamine	2C-E	100	P.A.L.
2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl) ethanamine	2C-I	99.1	N.C.L.
3,4,5-Trimethoxyamphetamine	TMA	99.3	N.C.L.
1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl) propan-2-amine	TMA-2	98.6	N.C.L.
1-(2,4,6-Trimethoxyphenyl) propan-2-amine	TMA-6	98.1	P.A.L.
1-(4-Methoxyphenyl) -N-methylpropan-2-amine	PMMA	96.3	P.A.L.
1-(4-Fluorophenyl) propan-2-amine	4FMP	>98	P.A.L.
Methamphetamine	MAP	>99.9	S.C.L. ^{d)}
Tryptamines			
3-(2-Aminopropyl) indol	AMT	99.0	N.C.L.
1-(5-Methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl) propan-2-amine	5-MeO-AMT	92.7	P.A.L.
N,N-Dipropyltryptamine	DPT	96.9	P.A.L.
3-[2-(Diisopropylamino) ethyl] -5-methoxyindol	5-MeO-DIPT	96.1	N.C.L.
N-Isopropyl-1-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl) -N-methylethan-2-amine	5-MeO-MIPT	99.5	P.A.L.
5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine	5-MeO-DMT	91.7	P.A.L.
N,N-Diallyl-5-methoxytryptamine	5-MeO-DALT	87.8	P.A.L.
Piperazines			
1-(3-Chlorophenyl) piperazine	3CPP	98.0	N.C.L.
1-(4-Methoxyphenyl) piperazine	4MPP	90.0	P.A.L.
1-Benzylpiperazine	BZP	98.0	N.C.L.

a) 2008/07/25. b) Narcotic Control Law of Japan. c) Pharmaceutical Affairs Law of Japan. d) Stimulant Control Law of Japan.

Phenethylamines



Tryptamines



Piperazines

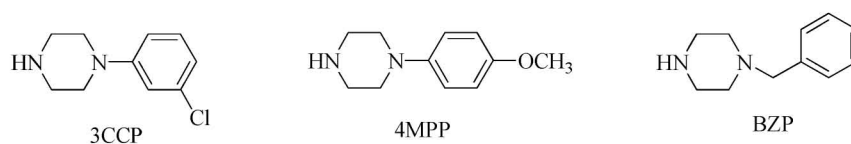


Fig. 2. Structures of the Designer Drugs.

4. 測定結果

4-1. 再取り込み阻害作用 Cocaine, MAP,
代表的な薬物の再取り込み阻害曲線を Fig. 3 の(a-

f) に、測定した薬物すべての IC_{50} 値を Table 2 に示す。Cocaine 及び MAP は、DA, 5-HT, NE に対して IC_{50} 値がそれぞれ 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-7} M オーダーと

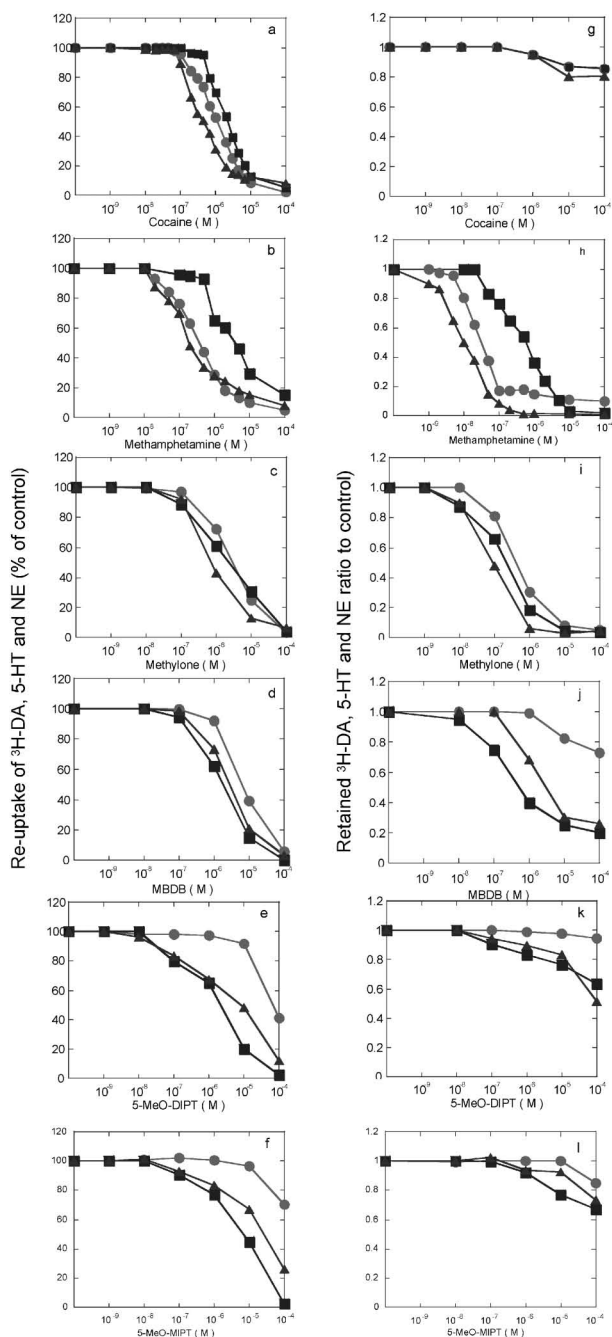


Fig. 3. Re-uptake Inhibition and Release Acceleration of Monoamines by Cocaine, Methamphetamine and Some Designer Drugs in Rat Brain Synaptosome.⁴⁾

Synaptosome fraction from striatum (StP₂) was used for the assay of DA, and that from cortex (CxP₂) was used for the assays of 5HT and NE. ●: DA, ■: 5-HT; ▲: NE. a-f: re-uptake, g-l: release. a and g: cocaine, b and h: methamphetamine, c and i: Methyloone, d and j: MBDB, e and k: 5-MeO-DIPT; f and l, 5-MeO-MIPT.

非常に強く再取り込みを阻害した。

フェネチルアミン系 MDMA, methylone, BDB, MBDB, 4FMP は, cocaine や MAP (フェネチルアミン系) に匹敵するほど作用が強かった。しかし、

PMMA は DA に対する作用のみが MAP の約 1/40 分の 1 と減少し, 2C-I, 2C-E, 2C-C はまず DA への作用が消失し, 5-HT, NE に対する作用も弱くなった。さらに TMA, TMA-2, TMA-6 には, DA, 5-HT, NE に対する再取り込み阻害作用を認めなかった。

トリプタミン系では, AMT の 5-HT に対する作用が cocaine と MAP より約 10 倍強く, DA と NE に対しては同等であった。トリプタミン骨格の側鎖が 5-MeO-AMT, DPT, 5-MeO-DIPT のようにかさ高くなると, DA, 5-HT, NE への作用が MAP の約 50-200 分の 1 と弱くなり, 5MeO-DALT には再取り込み阻害作用が消失した。

ピペラジン系の 3 種類の薬物の作用は強く, cocaine や MAP とほぼ同等であったが, DA への作用は約 1/5 から最大で 1/130 と弱くなるが, 3CPP のように 5-HT に対して約 10 倍強くなるものがあつた。

4-2. 遊離促進作用 Cocaine, MAP, 代表的な薬物の遊離促進曲線を Fig. 3 の (g-l) に, 測定した薬物すべての EC₅₀ 値を Table 3 に示す。

MAP の作用は非常に強く, EC₅₀ 値は DA, 5-HT, NE に対してそれぞれ 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M オーダーだった。Cocaine には, 遊離促進作用を認めず, 特異的な再取り込み阻害剤であることを裏付ける結果であつた。

フェネチルアミン系 MDMA, methylone, BDB, PMMA, 4FMP はほぼ MAP に匹敵するほどの強い作用があるが, MBDB に関しては, 5-HT, NE に対しての作用は強いが, DA への作用が消失した。2C-C は NE に, また TMA は 5-HT に弱い作用を認めたが, 2C-I, 2C-E, TMA-2, TMA-6 には DA, 5-HT, NE に対する遊離促進作用はなかつた。

トリプタミン系では, AMT の DA に対する作用は MAP の約 1/10 だったが, 5-HT に対しては約 10 倍強く, NE に対しては同程度だった。AMT の 5 位にメトキシ基が付いた 5-MeO-AMT の 5-HT に対する作用はほぼ同程度であったが, DA と NE に対しては約 1/100 と弱かった。DPT, 5-MeO-DIPT, 5-MeO-MIPT, 5-MeO-DMT, 5MeO-DALT には遊離促進作用を認めなかつた。

ピペラジン系の 3 種類の薬物は, BZP に 5-HT に対する作用がない以外は, それぞれのモノアミン

Table 2. The Effects of Drugs on Monoamine Re-uptake into Rat Brain Synaptosome⁴⁾

Drugs	Re-uptake (IC ₅₀ , M) ^{a)}		
	DA	5-HT	NE
Phenethylamines			
MDMA	1.4±0.32×10 ⁻⁶	7.2±1.9×10 ⁻⁷	6.6±2.1×10 ⁻⁷
Methylone	2.9±0.67×10 ⁻⁶	2.3±0.58×10 ⁻⁶	7.4±2.4×10 ⁻⁷
BDB	7.9±1.9×10 ⁻⁶	1.6±0.42×10 ⁻⁶	2.8±0.89×10 ⁻⁶
MBDB	6.3±1.4×10 ⁻⁶	1.8±0.48×10 ⁻⁶	2.7±0.75×10 ⁻⁶
PMMA	1.4±0.32×10 ⁻⁵	4.7±0.78×10 ⁻⁷	2.2±0.48×10 ⁻⁶
4FMP	7.7±1.6×10 ⁻⁷	6.8±1.5×10 ⁻⁶	4.2±1.2×10 ⁻⁷
2C-I	n.e. ^{b)}	7.9±1.9×10 ⁻⁵	3.7±1.2×10 ⁻⁵
2C-E	n.e.	7.2±1.6×10 ⁻⁵	8.9±2.7×10 ⁻⁵
2C-C	n.e.	3.1±0.78×10 ⁻⁵	6.3±1.8×10 ⁻⁵
TMA	n.e.	n.e.	n.e.
TAMA-2	n.e.	n.e.	n.e.
TMA-6	n.e.	n.e.	n.e.
Tryptamines			
AMT	7.3±1.9×10 ⁻⁷	3.8±0.74×10 ⁻⁷	4.0±0.72×10 ⁻⁷
5-MeO-AMT	1.8±0.35×10 ⁻⁵	2.9±0.71×10 ⁻⁶	3.7±0.62×10 ⁻⁵
DPT	2.3±0.48×10 ⁻⁵	2.9±0.69×10 ⁻⁶	9.1±2.0×10 ⁻⁶
5-MeO-DIPT	6.5±1.1×10 ⁻⁵	2.2±0.41×10 ⁻⁶	8.2±1.9×10 ⁻⁶
5-MeO-MIPT	n.e.	6.4±1.8×10 ⁻⁶	2.6±0.45×10 ⁻⁵
5-MeO-DMT	n.e.	4.1±0.91×10 ⁻⁶	3.3±0.45×10 ⁻⁵
5-MeO-DALT	n.e.	n.e.	n.e.
Piperazines			
BZP	1.9±0.42×10 ⁻⁶	2.0±0.36×10 ⁻⁵	6.2±1.4×10 ⁻⁷
3CPP	1.2±0.22×10 ⁻⁵	3.3±0.69×10 ⁻⁷	2.5±0.58×10 ⁻⁶
4MPP	4.8±0.9×10 ⁻⁵	4.6±0.83×10 ⁻⁶	6.2±1.3×10 ⁻⁶
Positive controls			
Cocaine	8.5±2.2×10 ⁻⁷	2.1±0.52×10 ⁻⁶	3.4±1.1×10 ⁻⁷
MAP	3.7±0.96×10 ⁻⁷	4.0±0.97×10 ⁻⁶	2.0±0.67×10 ⁻⁷

Mean±S.D. (three independent assays). Each assay was carried out by using different fresh rat brain synaptosome.
a) Drug concentrations giving half-maximal inhibition. b) No effect at 10⁻⁴ M of each drug.

に対する作用を認めたが、MAPと比較すると弱く、約1/50から1/200の強さだった。

4-3. G-タンパク結合作用 線条体及び皮質から精製したシナプトソームのモノアミン類によるG-タンパク結合曲線をそれぞれFig. 4(A)及び(B)に示す。線条体シナプトソームには3種類の受容体が存在しているが、皮質シナプトソームのほとんどが、5-HTとNE受容体だった。Figure 4(A)における線条体シナプトソームのDA受容体は、SCH22390とsulpirideの存在下で測定したところ活性化をそれぞれ44%と43%抑えたので、DA₁及びDA₂が半々であることが明らかになった。Figure 4(B)における皮質シナプトソームの5-HT受容体は、methiothepin, WAY100635, SB224289

の結果から、5-HT_{1A}と5-HT_{1B}が半々だった (Table 4)。また、皮質シナプトソームのNE受容体は、propranololの影響はなく、yohimbineのみが活性を抑えたことから、NE_{α2}だった (Table 4)。

作用を示した薬物の皮質シナプトソームにより測定した結果をFig. 5(A)及び(B)に示すが、測定した24薬物のうち12薬物にG-タンパク結合作用を認めた。CocaineとMAPには、作用を認めなかった。

フェネチルアミン系では、14薬物のうち2C-C, 2C-E, 2C-Iのみ作用を認めしたが、2C-Cの作用が最も強く、測定した最高濃度である10⁻⁴ Mでも最大結合値が得られなかったためEC₅₀値は求められないが、basalな結合に対する活性化した割合である

Table 3. The Effects of Drugs on Monoamine Release from Rat Brain Synaptosome⁴⁾

Drugs	Release (EC ₅₀ , M) ^{a)}		
	DA	5-HT	NE
Phenethylamines			
MDMA	2.0±0.46×10 ⁻⁷	5.8±1.5×10 ⁻⁸	8.6±2.3×10 ⁻⁸
Methylone	3.8±0.88×10 ⁻⁷	2.2±0.64×10 ⁻⁷	9.3±2.6×10 ⁻⁸
BDB	2.3±0.56×10 ⁻⁶	1.8±0.51×10 ⁻⁷	5.4±1.5×10 ⁻⁷
MBDB	n.e. ^{b)}	5.4±1.6×10 ⁻⁷	3.3±0.87×10 ⁻⁶
PMMA	1.6±0.38×10 ⁻⁶	4.8±1.1×10 ⁻⁸	9.4±2.3×10 ⁻⁷
4FMP	2.0±0.48×10 ⁻⁷	7.3±2.4×10 ⁻⁷	3.7±0.89×10 ⁻⁸
2C-I	n.e.	n.e.	n.e.
2C-E	n.e.	n.e.	n.e.
2C-C	n.e.	n.e.	1.0±0.31×10 ⁻⁴
TMA	n.e.	1.6±0.45×10 ⁻⁵	n.e.
TAMA-2	n.e.	n.e.	n.e.
TMA-6	n.e.	n.e.	n.e.
Tryptamines			
AMT	1.8±0.42×10 ⁻⁷	6.8±2.1×10 ⁻⁸	7.9±1.9×10 ⁻⁸
5-MeO-AMT	1.5±0.38×10 ⁻⁶	4.6±1.4×10 ⁻⁷	8.9±2.1×10 ⁻⁶
DPT	n.e.	n.e.	n.e.
5-MeO-DIPT	n.e.	n.e.	n.e.
5-MeO-MIPT	n.e.	n.e.	n.e.
5-MeO-DMT	n.e.	n.e.	n.e.
5-MeO-DALT	n.e.	n.e.	n.e.
Piperazines			
BZP	6.0±1.8×10 ⁻⁷	n.e.	6.8±1.8×10 ⁻⁸
3CPP	6.3±1.1×10 ⁻⁵	2.8±0.92×10 ⁻⁸	1.4±0.41×10 ⁻⁶
4MPP	1.1±0.31×10 ⁻⁵	3.2±0.95×10 ⁻⁶	1.5±0.42×10 ⁻⁶
Positive controls			
Cocaine	n.e.	n.e.	n.e.
MAP	2.8±0.65×10 ⁻⁸	7.9±2.3×10 ⁻⁷	1.1±0.29×10 ⁻⁸

Mean±S.D. (three independent assays). Each assay was carried out by using different fresh rat brain synaptosome.

a) Drug concentrations giving half maximal acceleration. b) No effect at 10⁻⁴ M of each drug.

Table 4. Antagonist Experiments for Monoamine- or Drug-stimulated [³⁵S]GTPγS Binding in Rat Brain Membranes⁵⁾

Antagonist (10 ⁻⁶ M)	Receptor selectivity	Percent of inhibition by antagonist on G protein stimulation							
		Striatum				Cortex			
		DA	5-HT	NE	2C-C	2C-I	5-MeO-AMT	5-MeO-DMT	5-MeO-DALT
SCH23390	DA D ₁	44	— ^{a)}	—	0	0	0	26	0
Sulpiride	DA D ₂	43	—	—	0	0	0	6	0
Methiothepin	5-HT _{1,6,7}	—	85	—	82	100	100	86	69
WAY100635	5-HT _{1A}	—	48	—	—	—	—	—	—
SB224289	5-HT _{1B}	—	48	—	—	—	—	—	—
Yohimbine	NE _{α2}	—	—	91	0	0	—	0	0
Propranolol	NE _β	—	—	0	—	—	—	—	—

Assays in striatal and cortical membranes were carried out by determining 10⁻⁵ M monoamine- or drug-induced [³⁵S]GTPγS binding in the presence of antagonists at 10⁻⁶ M. Results are expressed as the mean % of inhibition of three-five independent experiments (n=3). The S.D. values were less than 4%. a) experiment not performed.

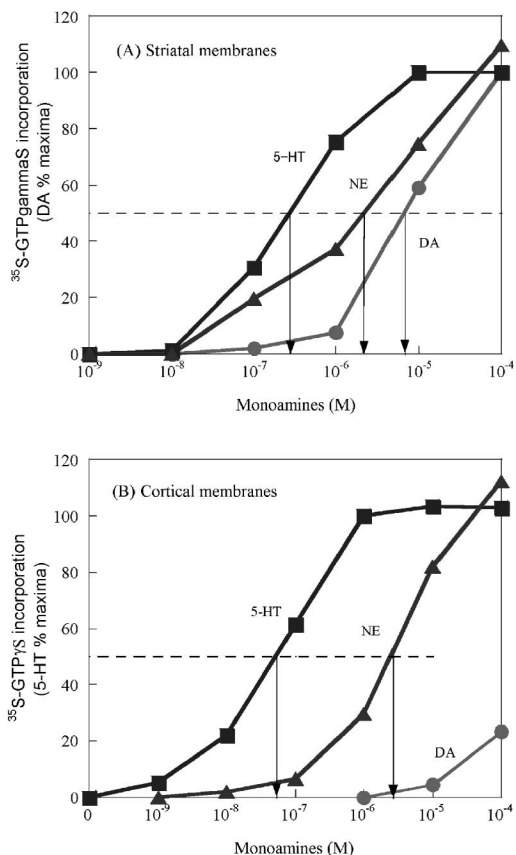


Fig. 4. Representative Concentration-response Curves for [³⁵S] GTPγS Binding by Monoamines in the Striatal (A) and Cortical (B) Membranes.⁵⁾

Specific [³⁵S]GTPγS binding was measured in the presence of various concentrations of monoamines (DA, 5-HT, and NE) as described in Methods. The results in (A) were obtained with the striatal membranes and expressed as the percent of the specific binding of DA at 10⁻⁴ M. The results in (B) were obtained with the cortical membranes and expressed as the percent of the specific binding of 5-HT at 10⁻⁶ M. The data represent the mean values of three independent experiments (n=3) and the S.D. values are less than 5%. ●: DA, ■: 5HT, ▲: NE.

E_{max} 値は約 40%を示し、それを 5-HT の最大活性と比較すると約 80%の結合量だった (Table 5). 次に強かったのは 2C-I で、2C-E が 3 つの中で最も弱かった。2C-C と 2C-I がどの種の受容体を認識したかは、線条体シナプトソームにより測定した結果が皮質シナプトソームと同様であったことより、DA 受容体への結合ではないと想定できたが、Table 4 に示した通り SCH22390, sulpiride, yohimbine では阻害せず、methiothepin のみが 82%及び 100% 阻害したことから、いずれも 5-HT₁ 受容体だった。

トリプタミン系では、7 薬物が作用を示したが、5-MeO-DMT が最も強く、10⁻⁷ M オーダの EC₅₀ 値、約 60% E_{max}, 5HT の最大活性と比較すると 115% の結合量だった (Table 5). 5MeO-DALT と 5-

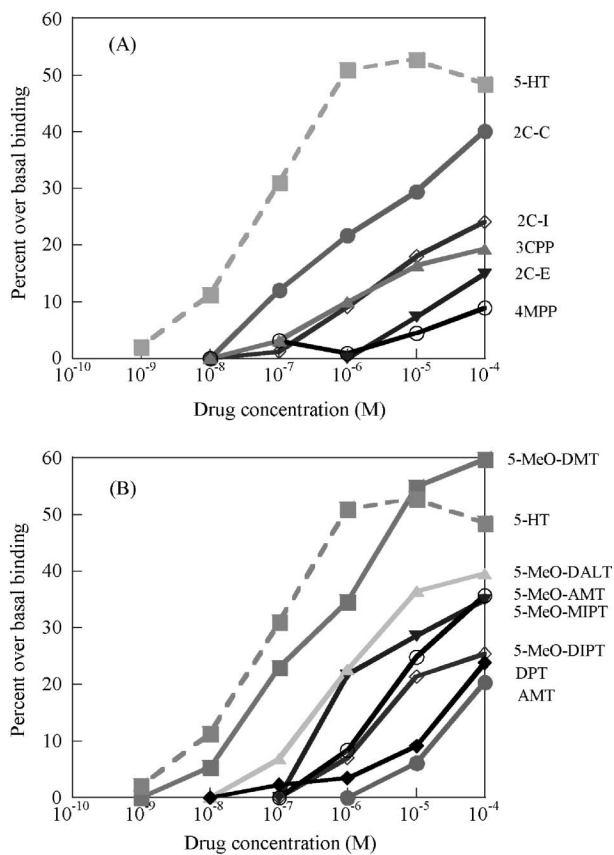


Fig. 5. Representative Concentration-response Curves for [³⁵S] GTPγS Binding by Various Psychoactive Drugs in Cortical Membranes⁵⁾

Specific [³⁵S]GTPγS binding was measured in the presence of various concentrations of psychoactive drugs. (A) and (B) indicate the results from phenethylamine, piperazine, and tryptamine derivatives, respectively. The results are expressed as the percentage of the basal binding (0.1% DMSO) and represent mean values of three independent experiments (n=3). The S.D. values are less than 5%. (A) ■ (dotted line); 5-HT, ●: 2C-C, □: 2C-I, ▼: 2C-E, ▲: 3CPP, ○: 4MPP. (B) ■: 5-HT (dotted line), ■: 5-MeO-DMT, ▲: 5-MeO-DALT, ▼: 5-MeO-AMT, ○: 5-MeO-MIPT, □: 5-MeO-DIPT, ◆: DPT, ●: AMT.

MeO-DIPT の EC₅₀ 値は 10⁻⁷ M と 10⁻⁶ M オーダであり、AMT, 5-MeO-AMT, DPT, 5-MeO-MIPT は 10⁻⁴ M でも最大結合値を得られなかった。5-MeO-DALT, 5-MeO-AMT, 5-MeO-MIPT は、約 40% E_{max}, 5-HT の最大活性と比較すると約 70%の結合量だった (Table 5). 5-MeO-DIPT, DPT, AMT は 2C-I と同程度の作用だった。5-MeO-AMT, 5-MeO-DMT, 5-MeO-DALT が結合した受容体は、いずれも methiothepin のみが阻害したことから、5-HT₁ だった (Table 4).

ピペラジン系では、2 薬物が作用を示したが、その作用は弱く、3CPP の EC₅₀ 値は 10⁻⁷ M オーダ、約 20% E_{max}, 5-HT の最大活性と比較すると

Table 5. Potencies of 5-HT, NE and Designer Drugs Determined by [³⁵S]GTPγS Binding to Cortical Membranes⁵⁾

Compound	EC ₅₀ (M)	%E _{max} ^{a)}	% of 5-HT maxima ^{b)}
5-HT	4.9±0.76×10 ⁻⁸	51.9	100
NE	3.0±0.81×10 ⁻⁶	57.2	110
Phenethylamines			
2C-C	nd ^{c)}	40.1	77
2C-E	nd	14.9	29
2C-I	nd	24.1	46
Tryptamines			
AMT	nd	20.4	39
5-MeO-AMT	nd	34.9	67
DPT	nd	23.7	46
5-MeO-DIPT	2.5±0.63×10 ⁻⁶	25.4	49
5-MeO-MIPT	nd	35.6	68
5-MeO-DMT	3.8±0.88×10 ⁻⁷	59.8	115
5-MeO-DALT	6.6±1.5×10 ⁻⁷	39.6	76
Piperazines			
3CPP	9.3±2.1×10 ⁻⁷	19.4	37
4MPP	nd	8.9	17

a) The % E_{max} value represents the percent maximal increase in the [³⁵S]GTPγS binding above the basal binding. b) The maximal % increase in [³⁵S]GTPγS binding over basal binding is expressed as a percentage of the maximal 5-HT response, which is set to 100%. c) nd: EC₅₀ value not determined because binding was not maximum at 10⁻⁴ M. Each assay was carried out in 3-6 independent experiments (n=3). Mean±S.D.

約 40% の結合量であり (Table 5), Table 4 に示した通り受容体はいずれも 5-HT₁ だった。4MPP の作用は非常に弱いものであった。

5. おわりに

違法ドラッグは、多幸感や快感を高め、幻覚や興奮作用があるとされるものであり、中枢神経系に対する様々な作用によって言われているが、その効果や作用機構は不明確な部分が多い。本総説において、ドラッグのモノアミン神経伝達系への影響を明らかにするために、ラット脳シナプトソームを用いて、指標とした 3 種類のモノアミン類 (DA, 5-HT, NE) に対して同時に測定できる、再取り込み阻害、遊離促進、G-タンパク結合作用を調べる *in vitro* 試験法を紹介した。これらの方法を用いて、各ドラッグの作用を陽性対照とした cocaine (モノアミン再取り込み阻害剤) と MAP (モノアミン遊離促進剤) と比較検討した。結果は、既報^{7,9,10)} 通り cocaine は再取り込み阻害作用のみを示し、MAP は非常に強くモノアミンを遊離したが、同時に非常に強く再取り込みも阻害した。G-タンパク活性化

測定方法はモノアミン類の用量作用曲線が既報^{11,12)} とほぼ一致しており、cocaine と MAP に G-タンパク活性化作用は認められなかった。

フェネチルアミン系薬物において、MDMA は 1970 年代に MAP 類の構造類似体 (デザイナードラッグ) として開発された最も一般的な精神活性薬¹³⁾ であるが、ラット、サル、ヒト^{13,14)} に対して有害反応が明らかになったために、多くの国でその使用が禁止され、日本でも麻薬に指定された。主な副作用は、大脳皮質の 5-HT 軸索の破壊であるほか、体温調節、食行動と生体リズムに関係する視床下部領域も影響を受ける。¹³⁾ この MDMA と methyline, BDB, MBDB, PMMA, 4FMP は、前シナプス側でのモノアミン再取り込み阻害と遊離促進に関して、MAP (フェネチルアミン系) と同等か、あるいはそれ以上の作用を有しているものがあつたが、後シナプス側で G-タンパク活性化作用は MAP と同様にいずれも認められなかった。全体として、MDMA 類似体 (methyline, BDB, MBDB) は DA 作動系においては MAP より影響は弱いだが、5-HT 作動性神経伝達に及ぼす作用はそれより強かつた。しかし、MDMA のようにメチレンジオキシ基を有せず、MAP の 4 位にメトキシ基が置換した PMMA は、前シナプス側での再取り込み阻害及び遊離促進作用の DA 作動系においてのみが MAP に比べて弱くなり、また後シナプス側で G-タンパク活性化作用は MAP と同様に認められなかった。2 個のメトキシ基のある 2C-I, 2C-E, 2C-C は、前シナプス側でのモノアミン再取り込み阻害と遊離促進に関しての作用は非常に弱かつたが、5-HT₁ 受容体を介して後シナプス側での作用が認められた。3 個のメトキシ基がある TMA, TMA-2, TMA-6 は、前シナプス側での作用は弱いか、あるいは認められず、さらに後シナプス側における作用はなかつた。メチレンジオキシ基の有無や、メトキシ基の数が、神経伝達系に影響を与えていることが考えられた。TMA, TMA-2, TMA-6 は、生体に影響する¹⁵⁾ ことが知られており、TMA と TMA-2 は 5-HT₂ に強い親和性があるとの報告¹⁶⁾ がある。G-タンパク測定用シナプトソーム精製を検討した結果、界面活性剤サポニンで処理をし、さらに緩衝液に DPCPX を加えることにより、DA, 5-HT, NE の 3 種類の受容体を同時に認識させることに成功したが、5-HT 受容体に

関しては、5-HT₁ を認識しているが 5-HT₂ は認識していないと考えている。DA, 5-HT₁, 5-HT₂, NE 受容体を一緒に認識するシナプトソームを精製することが今後の課題である。

トリプタミン系薬物の乱用による傷害事件が、最近、報告¹⁷⁻¹⁹⁾されている。トリプタミン系薬物の中でも AMT は最も強いモノアミン類の再取り込み阻害と遊離促進作用を示したが、遊離促進作用の方が再取り込み阻害作用より強かった結果から、生体内における AMT の中枢神経系作用は、モノアミンの遊離が促進されることによるのかもしれない。さらに、5-HT 作動性神経系における AMT の影響は MAP のそれより強く、一方 DA 及び NE 系における作用は MAP と類似していた。AMT 構造の 5 位にメトキシ基を有する 5-MeO-AMT はモノアミン 3 種類の再取り込みを阻害して、遊離を促進したが、その作用は AMT のそれより弱かった。5-MeO-DIPT, 5-MeO-MIPT, 5-MeO-DMT は、比較的強くモノアミン類の再取り込みも阻害したが、遊離促進作用はほとんど示さなかった。これらの薬物は二級あるいは三級アミノ基を持つが、AMT と 5-MeO-AMT は一級アミノ基を有していることから、トリプタミン系薬物がモノアミン遊離促進作用を起こすためには、一級アミノ基が不可欠かもしれないと考えている。5-MeO-DALT には前シナプス側に対する影響は認められなかったが、後シナプス側の 5-HT に作用した結果、中枢神経作用を示すことを明らかにした。また、調べたトリプタミン系薬物はすべて、少なくとも 5-HT₁ 受容体を介して G-タンパク活性化作用を認めた。

ピペラジン系である BZP と 3CPP が、精神作用に影響することが報告²⁰⁻²²⁾されている。前シナプス側において、3CPP は 5-HT 神経系に強い作用を示したが、BZP は 5-HT の再取り込み阻害作用は弱く、さらに遊離促進作用にはほとんど影響せず、4MPP はモノアミンの再取り込みを阻害し、遊離を促進したが、3CPP ほど作用は強くなかった。また、3CPP と 4MPP は弱いながらも G-タンパク活性化作用を認めたが、BZP にはその作用がなかった。これらの結果から、ピペラジン側鎖のある一定の長さが、G-タンパク活性化作用に起因している可能性があると考えている。

本総説で紹介した、*in vitro* の 3 試験法は、前シ

ナプス（再取り込み阻害作用、遊離促進作用）及び後シナプス（G-タンパク結合作用）側におけるドラッグのモノアミン神経伝達系に及ぼす影響を迅速に調べることができるスクリーニング方法である。また、再現性に優れ、1 回の測定において 5 種類のドラッグの作用を調べることができ、都健安研において平行して実施している動物への行動及び神経症状観察の *in vivo* スクリーニング²³⁾と一致した結果を得ている。したがって、今回紹介した *in vitro* の試験法は、新たに出回る可能性がある既存の麻薬や覚せい剤の置換基を少し変更した、デザイナーズドラッグに対して、ヒトへの作用を予想できる有用なスクリーニング法である。さらに、複数の薬物を混和した、いわゆるカクテルドラッグや、最近、化学系ドラッグの取締りが厳しくなったために増えてきた植物系ドラッグについても、モノアミン神経伝達系に及ぼす影響を検索する上で有用な方法であることを明らかにすることができた。

謝辞 薬物の購入に関してご助力、ご助言を頂きました東京都福祉保健局健康安全室薬事監視課の皆様へ感謝いたします。また、薬物の分析データを提供していただきました健安研医薬品部医薬品研究科の皆様へ感謝いたします。構造活性相関に関してご助言を頂きました東京理科大学理学部佐藤 毅教授へ感謝いたします。さらに、ここに紹介した研究を進行するに当たり終始ご助力、ご助言を頂き、本総説の執筆を薦めてくださいました長井二三子元薬理研究科長、上村 尚元環境保健部長、大橋則雄生体影響研究科長、中江 大参事研究員、小縣昭夫環境保健部長にこの場をお借りして御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) 〈http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/soumu/fkhk/2005/0504/0504_2.html〉, 2008/07/25
- 2) 〈<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/yakuji/kansi/datudora/tijisitei/tijisitei.html>〉, 2008/07/25
- 3) 〈<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/11/s1109-4.html>〉, 2008/07/25
- 4) Nagai F., Nonaka R., Satoh K., Kamimura H., *Eur. J. Pharmacol.*, **559**, 132-137 (2007).
- 5) Nonaka R., Nagai F., Ogata A., Satoh K.,

- Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2328–2333 (2007).
- 6) Fleckenstein A. E., Metzger R. R., Wilkins D. G., Gibb J. W., Hanso G. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 834–838 (1997).
 - 7) Rothman R. B., Baumann M. H., Dersch C. M., Romero D. V., Rice K. C., Carro F. I., Partilla J. S., *Synapse*, **39**, 32–41 (2001).
 - 8) Rothman R. B., Clark R. D., Partilla J. S., Baumann M. H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 1191–1199 (2003).
 - 9) Cunningham K. A., Callahan P. M., *Psychopharmacology*, **104**, 177–180 (1991).
 - 10) Fleckenstein A. E., Gibb J. W., Hanson G., *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 1–13 (2000).
 - 11) Geurts M., Hermans E., Maloteaux J.-M., *Life Sci.*, **65**, 1633–1645 (1999).
 - 12) Rinken A., Finnman U.-B., Fuxe K., *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 155–162 (1999).
 - 13) Parrott A., Morinan A., “Moss M., Scholey A., MDMA/Ecstasy and neurotoxicology. In Understanding Drugs and Behaviour,” Wiley & Sons, West Sussex, England, 2004, pp. 76–81.
 - 14) Green A. R., Mehan A. O., Elliott J. M., O’Shea E., Colado M. I., *Pharmacol. Rev.*, **55**, 463–508 (2003).
 - 15) Glennon R. A., Young R., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **17**, 603–607 (1982).
 - 16) Titeler M., Lyon R. A., Glennon R. A., *Psychopharmacology*, **94**, 213–216 (1988).
 - 17) Drug Enforcement Administration (DEA), Department of Justice. Schedules of controlled substances: temporary placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamine into Schedule I. Final rule. Fed Regist 68, 2003, 16427–16430.
 - 18) Drug Enforcement Administration (DEA), Department of Justice. Schedules of controlled substances: placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamine into schedule I of the Controlled Substances Act. Final rule. Fed Regist. 69, 2004, 58950–58953.
 - 19) Fantegrossi W. E., Harrington A. W., Kiessel C. L., Eckler J. R., Rabin R. A., Winter J. C., Coop A., Rice K. C., Woods J. H., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **83**, 122–129 (2006).
 - 20) Samanin R., Caccia S., Bendotti C., Borsini F., Invernizzi R., Pataccini R., Mennini T., *Psychopharmacology.*, **68**, 99–104 (1980).
 - 21) Bauman M. H., Clark R. D., Budzynski A. G., Partilla J. S., Blough B. E., Rothman R. B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1025**, 189–197 (2004).
 - 22) Bauman M. H., Clark R. D., Budzynski A. G., Partilla J. S., Blough B. E., Rothman R. B., *Neuropsychopharmacology.*, **30**, 550–560 (2005).
 - 23) Fukumori N., Tanaka T., Ando H., Kubo K., Yuzawa K., Nonaka R., Satoh K., Nagai F., Ogata A., Kamimura H., Abstract of papers, the 125th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March 2005, No 3, p. 108.
 - 24) Inoue M., “New Trends in Seven-transmembrane-domain Receptor Research” ed. by Satoh K., Ishiyaku-shuppan, Tokyo, 2001, pp. 144–148.