

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590673

研究課題名（和文） 合成麻薬MDMAの分子毒性病態解析

研究課題名（英文） Molecular-toxic and -pathological analyses for a synthetic narcotic, MDMA

研究代表者

高安 達典 (TAKAYASU TATSUNORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80154912

研究成果の概要（和文）：MDMA を用いた細胞レベルと個体レベルにおける毒性発現解析において、マウス脳、心臓と肝臓における細胞内 mRNA 因子解析、血清学的解析及び法医中毒学的解析を合わせて複合的に解析された。MDMA による行動毒性は細胞形態変化濃度より低濃度で示されることが再確認された。しかし細胞変形濃度と個体死亡時における血中濃度比はおおよそ 2 倍のレベルであることが示唆された。MDMA 腹腔内 40mg/kg 投与時の肝臓 mRNA 因子解析と血清 ALT 値の解析から炎症反応の発症が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study on toxicity of cell level and animals with MDMA, mRNA analyses in the brain, heart and liver of the mouse, serum ALT analysis of the heart blood, and toxicological analysis of MDMA in the heart blood are comprehensively analyzed. MDMA concentrations of heart blood in the mouse with abnormal action were lower than those added in the culture cells which had abnormal. MDMA lethal level in the blood of the mouse was about 1/2 level of that in the abnormal cells. In MDMA dose of 40 mg/kg body weight, inflammation in the liver was suggested by the analyses of mRNA factors and serum ALT level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：MDMA, 合成麻薬, 分子レベル, 毒性機構, 細胞レベル, 個体レベル

1. 研究開始当初の背景

合成麻薬 MDMA は現在急速に犯法的薬物として世界中広範に流布し、近年日本においても重要な乱用薬物の一つであり、ここ数年摂取量も急激に上昇している。従って、これは本邦における乱用薬物の研究においても、緊急かつ重要な研究分野となってきた。MDMA は

幻覚剤として錠剤・カプセルの形で経口摂取されているが、精神的依存性があり、且つヒトにおいて急性中毒時、悪性高熱、心細動、横紋筋融解症、DIC や肝・腎障害を起こすことも報告されている。しかし、その毒性機構における細胞毒性や細胞中でのサイトカインなどの生体因子の役割は明らかにされて

いない。

近年、腫瘍壊死因子(TNF α)やインターフェロン(IFN γ)などの細胞内諸因子の研究は飛躍的に発展しており、それらの細胞内での役割も詳細に解析されつつある。TNF α はTNFレセプター1(TNFR1)を介してFADD因子を動員し、カスパーゼ(8)に働きアポトーシスに関する重要な因子であり、更にTNFR1を介してTRAF因子を動員しNF κ BやJNK因子の活性化による炎症応答反応も行っている。サイトカインは免疫系だけでなく、脳の神経細胞においても強く発現し、生体内で重要な役割を演じている。

本研究は合成麻薬MDMAによる細胞毒性の毒性機序について、分子免疫学的観点と、法医中毒学的観点及び法医病理組織学的観点等を合わせた複合的視点から研究を行う点が独創的である。即ち、動物における諸因子の応答をmRNAの発現レベルで分析・解析し分子免疫学的観点から生体反応の研究と同時に、細胞及び組織の組織学的変化についても検討する。更に、法医中毒学的にはMDMA等の濃度を分析し、どの位のMDMA濃度で、どのような種々の変化が観察されるかを詳細に解析し、それらの毒性実体を、多角的に分子レベルからマクロレベルまで広範囲な研究を行う点に特色がある。

2. 研究の目的

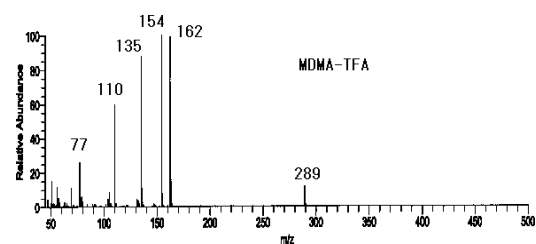
本研究において、合成麻薬MDMAによる毒性機序について、1)血管内皮細胞を用い、2)実験動物としてマウスを用いて主に脳、心臓と肝に焦点をあて、腫瘍壊死因子(TNF α)、インターロイキン(IL)やサイトカインなどの細胞内因子の増減を明らかにし、合成麻薬MDMAの毒性機序におけるそれら因子の役割について明らかにし、更に血清学的解析及び法医中毒学的解析を合わせた、複合的視点から総合的に研究を行う。即ち、MDMAの毒性に関して、細胞レベルと個体レベルの相同・相違や、個体レベルの毒性変化(特に心臓、肝腎毒性および幻覚)と連動する因子(分子免疫学的諸因子、血清学的因子)があるかどうかを含め詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法・結果

合成麻薬MDMAは市販されていないため、自家合成した。合成方法はBroun Uら(J Pharmaceu Sci, 69, 192, 1980)の方法で合成した。合成されたMDMA塩酸塩は融点測定した結果148 $^{\circ}$ Cであり、これまでの報告と一致した。NMR法で合成されたMDMA塩酸塩はクロロホルムd1に溶解し測定したところこれまでの文献値と一致した。薄層クロマトグラフィーによる検査では、トキシラボAシステムによる分析結果においてRf値はMDMA(0.22)、

の単一スポットであり、発色は第1ステージ(コバルトブルー)、第2ステージ(淡青色)、第3ステージ蛍光(暗色)および第4ステージ(茶色)であった。DB-5カラムを用いたガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)法によるトリフルオロアセチル化MDMAの電子衝撃マスマスペクトルはm/z154, 162, 135, 110, などのフラグメントイオンとm/z289の分子イオンが見られ(図1)、およびヘプタフルオロブチル誘導体化するとm/z254, 210, 162, 135などのフラグメントイオンとm/z389の分子イオンが見られ確認・同定された。従って、合成されたMDMA塩酸塩は各種クロマトグラフィーにより純品であることが判明した。

図1 MDMA-TFAのマスマスペクトル



ヒト血管内皮細胞毒性試験において、ヒト血管内皮細胞(正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞, クラボー)は常法に従って低血清血管内皮細胞増殖培地(クラボー)を用いて8-9回系代培養し最後の培養後6ないし12穴マイクロタイタープレートにて2-3日培養し細胞を増殖させ、次の実験に使用した。前記合成麻薬MDMAを10 μ Mから20mM、即ち2.3 μ g/mLから4.6mg/mLまでの最終濃度になるよう培地に添加し、細胞の形態を1, 4, 24および48時間観察した。1時間では5mM(1.1mg/mL)濃度で形態に変化を起こし、10および20mMでは細胞は死滅した。さらに4時間以上では2mM(0.48mg/mL)でも細胞の形態に変化を起こした。(図2-1, 2-2)しかし、それ以下の濃度では1時間から48時間の間細胞の形態に変化は起こらなかった。従って、細胞形態レベルでは0.48mg/mLまでのMDMA濃度で毒性は示されなかった。

図2-1 MDMA10 mMを添加した細胞(4時間経過, 死滅)

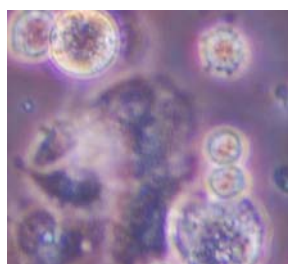
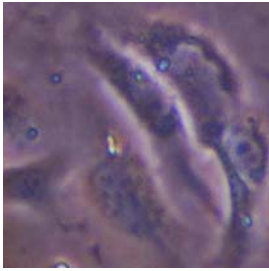


図 2-2 MDMA 0.1 mM を添加した細胞 (4 時間経過, 正常)



一方マウス (BALB/C 種, 30g 前後) を用いた MDMA 投与実験において, 初めに腹腔内投与方法による LD50 値を求めたところ, オスで 75 mg/kg をメスで 70 mg/kg の評価であった。次に MDMA 腹腔内投与体重 kg 当たり 2, 10 および 40mg を投与した場合の症状は 2mg 投与の場合はやや普段よりは落ち着かない様態を約 1 時間後まで示した。10mg 投与の場合は首を頻りに動かすなどの落ち着かない様態を明確に示し 4-6 時間持続した。40mg 投与の場合は激しく興奮し投与後約 8 時間までは持続していた。以上中毒症状として, マウスにおいて, 少なくとも 2 mg/kg 以上の投与量で異常な症状が発現し, その症状も投与量増加に従って異常症状も大きくなり加えて時間も長くなる傾向であった。また, MDMA 腹腔内投与 2 mg/kg を 1 日置きに 4 回行った後, 5 回目に 40mg 投与した場合の症状は一回投与の場合と大きな変化は見られなかった。

MDMA 濃度の測定方法: 血液 (心内血) 各 0.3 を分取し, 内部標準物質として MDA プロピル (自家合成品) を 10 μ g/10 μ L 添加した。0.3mL 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 11.0) 添加混合, pH チェックを行い pH 10-11 を確認。この溶液を Extrelut NT カラム (1.2g) に適用。45 分間放置後, 10mL 酢酸エチルで溶出した。これを窒素気流下で約 0.1mL に濃縮。無水 TFA 50 μ L 添加, 窒素封入後, 55°C, 20 分間反応させた。窒素ガス気流で無水 TFA 乾固後, 100 μ L 酢酸エチルに再溶解し, その 1 μ L を GC-MS 分析機にアプライした。GC-MS 装置は Thermo Fisher Scientific Trace GC-MS (USA) を用い, 使用カラムは DB-17MS, 15m x 0.25 mm x 0.25 μ m (J&W Scientific, Agilent Technologies, USA) を用いた。分離のためのカラム温度は 50°C から 310°C までの昇温を行った。キャリアーガスはヘリウムを用い 0.8 mL/分で行った。イオンの検出は EI-正イオン検出モードで, m/z 45-550 範囲のスクリーンモードで行った。検量線は 0.05-20 μ g/mL の範囲で作製した。この範囲で濃度と面積比の間に相関係数 0.999 の直線が得られた。

MDMA 腹腔内 40mg 投与時の心内血中 MDMA 濃度 (遊離塩 μ g/g) は平均値で 103 (0.5 時間),

72.2 (1 時間), 68.6 (2 時間), 6.53 (6 時間) であった。従って, MDMA 投与の場合も行動毒性は細胞毒性より低濃度で示されることが改めて確認された。

さらに MDMA 腹腔内 40mg 投与時の場合, 炎症の目安となる血清 ALT 値を測定した。使用した血清は採取した心内血から分離した。血清 ALT 値の測定には Dri-Chem 3500V (富士フィルム) を用いて行った。MDMA 腹腔内投与 2 時間後血清 ALT 値は (114)、同 8 時間後 (97)、同 24 時間後 (268) となり、生食水を投与したブランクの血清 ALT 値は (38) であることから投与 2 時間後から軽い炎症反応が起きている可能性が示唆された。

MDMA 腹腔内 40mg 投与時における, 大脳, 心臓および肝臓の mRNA の発現実験を行った。使用したマウスは BALB/C 種, 30g 前後のオスを使用した。対照実験は MDMA の代わりに生食水を用いた。同時に行った組織学的解析は解析中である。

mRNA の分離精製と cDNA の作製および PCR 法: mRNA の分離精製は常法に従ってフェノールクロロホルム抽出について, ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて臓器試料をホモゲナイズ後, クロロホルムを用いて抽出した。その上清にイソプロパノールを加え総 mRNA を沈殿させた。さらに 70% エタノールを加え精製した。この沈殿物を遠心分離で集め, DEPC 処理水で再溶解のため, 60°C, 10 分間加熱後, 冷却した。総 mRNA 濃度は 260nm の吸光度を測定し求めた。cDNA の作製には総 mRNA 試料とオリゴ dT (インビトロジェン) を用いて 70°C 10 分間反応させ, 更にジチオスレイトール下で dNTP と逆転写酵素 (インビトロジェン) を用いて 42°C 50 分間反応させ cDNA を作製した。各種因子として, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, Fas および FasL を選択し, その mRNA の検出のため, 上記作製した cDNA に各種因子のプライマー 2 種, dNTP と耐熱性ポリメラーゼ (Gene Taq, ニッポンジーン) を用いて 30-40 サイクル増幅した。分離検出にはエチジウムブロマイドを加えたアガロースゲルを用いた電気泳動を行って, バンドの検出を行った。

大脳における mRNA の発現は対照に比して IL-1 β と TNF- α では 8 時間と 24 時間ではやや低下していた。これに対して IL-6 や FasL 因子はやや高い傾向であった。免疫系において炎症急性期に発現する IL-1 β とこれを抑える役割をもつ IL-6 が逆の傾向を持って大脳で発現していることが明らかになり, 大脳においてはこれらの因子は別の作用を持っている可能性を示唆している。即ち, MDMA により興奮しているマウス大脳において IL-1 β の mRNA の発現は低下傾向を示し, IL-6 の

それは逆に高い傾向を示していた。更に、免疫系以外にも重要な因子である腫瘍壊死因子 TNF- α も興奮しているマウス大脳において IL-1 β と同様 mRNA の発現は低下傾向を示し、今後の分析が待たれる。また、MCP-1 と Fas 因子は一定の傾向を示さなかった。

心臓において、mRNA の発現は対照に比して IL-1 β では 8 時間と 24 時間で高い発現傾向を示したが、IL-6 と TNF- α の 24 時間で発現低下傾向が見られた。その他の MCP-1, Fas および FasL は殆ど変化しなかった。MDMA の心臓毒性についてはさらに多くの因子を解析する必要がある。

肝臓において、mRNA の発現は対照に比して IL-1 β では 8 時間で高い発現を、24 時間でもやや高い発現傾向を示した。TNF- α も 8 時間で高い発現を示したが、24 時間では元に低下していた。更に FasL でも 8、24 時間ともやや高い発現傾向を示した。これらに対して、MCP-1 は 8 時間では変化がなかったが、24 時間ではやや低下傾向であった。Fas 因子は 8 時間および 24 時間とも殆ど変化しなかったが、IL-6 因子はブランク実験も含め何れも発現はなかった。IL-1 β , TNF- α および FasL 因子の発現高値傾向から炎症の発症との関連が示唆されるが、この点と前記の血清 ALT 値の測定結果が一致している。即ち、軽い炎症反応が肝臓で起きていることを示唆する結果と解析される。

4. 研究成果

以上の結果から、本研究における合成麻薬 MDMA における毒性機構の解析から、1) 細胞レベルと個体レベルにおける毒性発現濃度の比較において、細胞レベルにおいて MDMA 2mM (0.48 mg/mL) 以上に於いて明らかな形態変化をおこしていたが、個体レベルでは 6.53-103 μ g/g (μ g/mL と近似) の血中 MDMA 濃度を示し行動毒性はより低濃度で示されることが改めて確認された。しかし、MDMA 投与量 40 mg/kg 投与時の最高血中濃度は 0.103 mg/g であり、LD50 値が 70-75 mg/kg を考慮すると死亡時の最高血中濃度は約 0.2 mg/g と推定され、動物死亡と細胞死毒性濃度の最低値はおおよそ 2 倍のレベルであることが示唆された。

2) 実験動マウスの脳、心臓と肝臓に焦点をあて、腫瘍壊死因子(TNF α)、インターロイキン(IL)やサイトカインなどの細胞内因子の増減を明らかにし、合成麻薬 MDMA の毒性機序におけるそれら因子の役割について、MDMA により興奮しているマウス大脳において IL-1 β および TNF- α の mRNA の発現は低下傾向を示し、IL-6 のそれは逆に高い傾向を示していた。更なる詳細な検討が期待される。心臓において、mRNA の発現は対照に比して IL-1 β では 8 時間と 24 時間で高い発現傾向を示

したが、IL-6 と TNF- α の 24 時間で発現低下傾向が見られた。肝臓において、mRNA の発現は対照に比して IL-1 β と FasL では 8 時間で高い発現を、24 時間でもやや高い発現傾向を示した。TNF- α も 8 時間で高い発現を示したが、24 時間では元に低下していた。IL-1 β , TNF- α および FasL 因子の発現高値傾向から炎症の発症との関連が示唆された。以上限定された因子の解析だけでは限界があることが判り、これらの因子以外の広範な解析が必要と考えられた。

3) まとめ：細胞レベルと個体レベルにおける毒性発現濃度の比較、マウス脳、心臓と肝臓における細胞内因子解析、血清学的解析及び法医中毒学的解析を合わせた複合的視点から、合成麻薬 MDMA における毒性機構について、MDMA による行動毒性は細胞形態変化濃度より低濃度で示されることが再確認された。しかし細胞変形濃度と個体死亡時における血中濃度比はおおよそ 2 倍のレベルであることが示唆された。MDMA 腹腔内 40mg 投与時の肝臓 mRNA 因子解析と血清 ALT 値の解析から弱い炎症反応の発症が示唆された。

今後、更なる広範な因子の解析が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等は全て準備中のものである。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高安 達典 (TAKAYASU TATSUNORI)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：80154912

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし