

令和元年5月28日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09197

研究課題名(和文) 危険ドラッグの脳内取込み様式と脳内報酬系における毒性形成機構の神経科学的解明

研究課題名(英文) Evaluation of the neurochemical effects of diphenidine, a new psychoactive substance, on the dopaminergic reward system by using rat brain microdialysis

研究代表者

清水 恵子 (SHIMIZU, Keiko)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90312462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：危険ドラッグの一つであるジフェニジンは、黒質から線条体へ投射されるA9神経系よりも、腹側被蓋野から辺縁系(側坐核・海馬・扁桃体等)と皮質(前頭前野)に投射されるA10神経系、いわゆる脳内報酬系を優位に刺激していることが示唆された。その刺激は、投与を繰り返すに従ってその程度が小さくなっていく傾向が観察された。

脳移行については、末梢投与後30分をピークとするジフェニジンの脳移行が観察された。阻害剤の検討では、P-糖蛋白質と有機カチオントランスポーターの阻害剤を前投与することによってジフェニジンの脳中濃度上昇が観察され、これらのトランスポーターによる脳からの能動的な排出が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジフェニジンの毒性機序を解明し、既存の違法薬物(覚せい剤や麻薬)の毒性と比較研究することは、法医診断学的に意義深い。ジフェニジンの中枢毒性に関する詳細な神経科学的検討は、未だ報告されていなかった。ジフェニジンを含め、基本構造で分類される様々なタイプの危険ドラッグの血液脳関門通過様式及びその依存毒性を明らかにすることは、今後も出現が続くと予想される新規危険ドラッグの毒性機序を推定・検討する上でも極めて有用である。

研究成果の概要(英文)：Diphenidine (DPD), one of the new psychoactive substances, stimulated A10 nervous system which is projected from ventro tegmental area to limbic system (nucleus accumbens, hippocampus, amygdala etc.) and to medial prefrontal cortex rather than A9 nervous system which is projected from substantia nigra to striatum. DPD was detected in the dialysate from rat brain after i.p. injection. The highest concentrations were observed at 30 minutes and the concentrations were decreased time-dependent manner. The DPD concentration in the dialysate was significantly increased by pretreatment of P-glycoprotein inhibitors and also an organic cation transporter inhibitor. However, no difference was identified between DPD levels in the blood of the inhibitors and saline pretreatment groups. The results indicated that P-glycoprotein and organic cation transporter has an important role in the transportation of DPD across the blood-brain barrier.

研究分野：法医学

キーワード：ジフェニジン 危険ドラッグ マイクロダイアリシス 薬物依存 側坐核 ドパミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグとは、覚せい剤や大麻などの違法薬物とよく似た成分を含む化学物質を示すが、法的な定義はない。従来の違法薬物や麻薬の化学構造を組み変えたものが多く「デザイナーズドラッグ」とも呼ばれていた。2015年5月1日において、厚生労働省令で規制される薬物は、包括指定により2297物質が指定薬物の対象となっていた。包括指定による指定構造を微妙に改変しつつ作用を保ち、さらに、包括指定すらすり抜ける薬物が登場する可能性は今後も高い。この様にして作られた新規ドラッグは、元の薬物からは予想もしていなかった強い毒性を持つ可能性が想定され、その毒性を事前に評価する事は不可能である。毒物の歴史を顧みるならば、有機リン系農薬と神経ガスは、微細な構造の違いで、その毒性は比較にならない差を有したのと同様である。事実、危険ドラッグ使用に関連した死亡者数は、2012及び2013年はそれぞれ8及び9人であったが、2014年には112人となっている(警察庁)。従って、その毒性機序を解明し、既存の違法薬物(覚せい剤や麻薬)の毒性と比較研究することは、法医診断学的に意義深い。危険ドラッグに指定される化合物は、化学構造上、(1)合成カンナビノイド系、(2)トリプタミン系、(3)フェネチルアミン・カチノン系、(4)ピペラジン系、(5)アリルシクロヘキシルアミン系、(6)ニトライト系・亜硝酸エステル系等に分類されている。我々は司法解剖において、アリルシクロヘキシルアミン系に属するフェンシクリジン(PCP)やケタミンの構造類似体であるジフェニジンが関与した薬物中毒死を経験した。アリルシクロヘキシルアミン系はNMDA受容体に拮抗し、GABA作用性神経の興奮を抑制すると推定されているが、ジフェニジンの中枢毒性に関する詳細な神経科学的検討は、未だ報告されておらず、法医学的にジフェニジンの中枢神経毒性解明は急務である。血液脳関門(BBB)の通過様式及びその依存毒性を明らかにすることは、今後も出現が続くと予想される新規ドラッグの毒性機序を推定・検討する上でも、本研究は極めて有用である。

2. 研究の目的

本研究は、指定薬物ジフェニジンのBBB通過様式と、脳内報酬系(中脳辺縁系ドーパミン作動性神経系)における依存毒性形成機構を、*in vivo*ブレインマイクロダイアリシス法を用いた神経科学的手法により解明し、併せて死亡に繋がる毒性を評価することを目的とする。さらに、これらの知見をもとに、毒性阻害機構の理解から治療法を検討する。将来的応用研究による社会貢献の可能性をも模索する。

3. 研究の方法

(1) ジフェニジンのドーパミン神経作用の解明

ジフェニジンが脳内報酬系のA10神経系を刺激し、依存症を形成する可能性を考慮して検討を行った。マイクロダイアリシス法は、半透膜を介して、半透膜内を流れる灌流液(リンゲル液)中に、半透膜外の細胞外液成分(神経伝達物質)が濃度依存性に流入することを利用した実験方法である。Slc:Wistar/ST系雄性ラットに麻酔下で透析プローブを側坐核、前頭前野または線条体に埋め込み、翌日無麻酔・無拘束下で透析を開始し、15分毎にHPLC/ECDに自動注入してノルエピネフリン、ドーパミンおよびセロトニンの定量を行った。その後、ジフェニジンを10または20mg/kgとなる様に腹腔内投与し、さらに定量を続けた。同時に赤外線センサーによる自発的運動量の解析を行った。連続投与は、プローブ埋込の翌日から、3日間連続でのジフェニジン投与を行い、単回投与の結果と比較した。

(2) ジフェニジンのBBB通過様式の解明

ジフェニジンを末梢投与し、*in vivo*ブレインマイクロダイアリシス法を用いて脳内の細胞外液にどの程度現れるか測定し、血液中濃度との比較から中枢移行の程度を算出した。この通過様式が、受動拡散であるのか、何らかの輸送担体を介しているのかを、BBBに発現している各種担体の被輸送物質の末梢前投与(拮抗作用)において、ジフェニジン脳内取り込み量が変化するか否かによって、通過に関連する担体について検討した。

4. 研究成果

(1) ジフェニジンのドーパミン神経作用の解明

ジフェニジン投与直後から自発的運動量の増加と脳各部位におけるドーパミンおよびノルエピネフリンの濃度上昇が観察された。その程度は前頭前野で最も強く、ドーパミンが平常時の約10倍、ノルエピネフリンが約5倍であった。側坐核でもドーパミンが約5倍、ノ

ルエピネフリンが約 4 倍の上昇を示したのに対し、線条体では共に 2 倍程度の上昇に留まった。いずれの部位においてもセロトニンの顕著な変動は認められなかった。これらの結果により、ジフェニジンは黒質から線条体へ投射される A9 神経系よりも、腹側被蓋野から辺縁系（側坐核・海馬・扁桃体等）と皮質（前頭前野）に投射される A10 神経系、いわゆる脳内報酬系を優位に刺激していることが示唆された。また構造類似体であるケタミンは、ノルエピネフリン量を大きく変動させ、ドーパミンや自発的運動量への影響は限定的であった (Fig.1)。連続投与における検討では、ジフェニジンの投与が引き起こす前頭前野におけるノルエピネフリンおよびドーパミンの濃度上昇について、投与を繰り返すに従ってその程度が小さくなっていく傾向が観察された。その傾向は側坐核における濃度変化や自発的運動量の変化には認められなかった (Fig.2)。しかし、検討数が未だ少ないために再検討を必要とする。

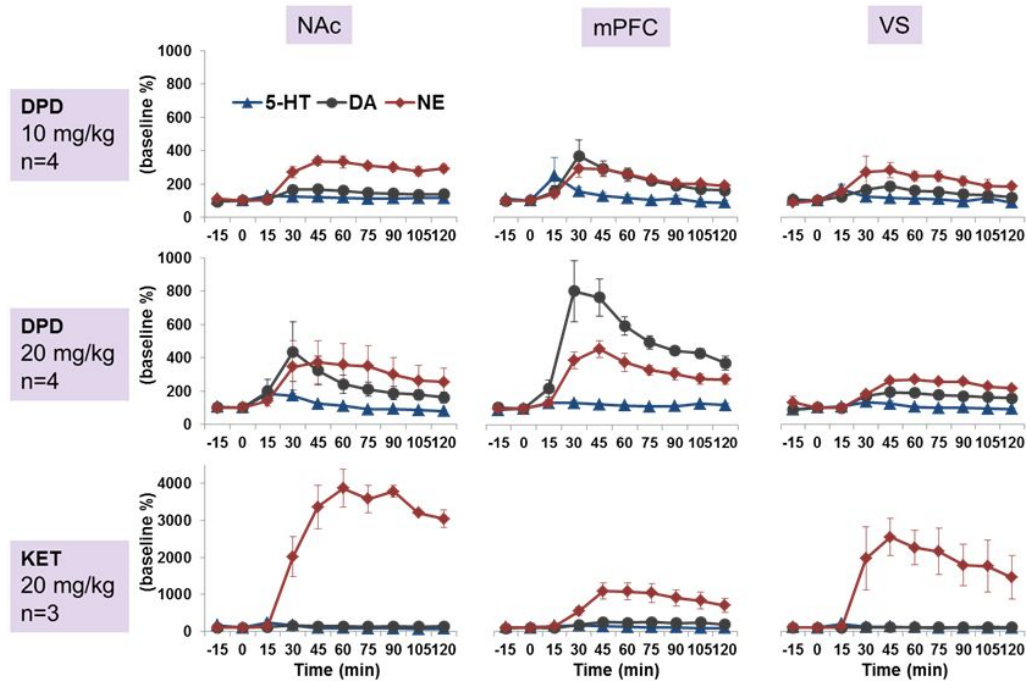


Fig. 1. Changes of the amount of extracellular monoamines by i.p. injection of the drug in each part of the brain.

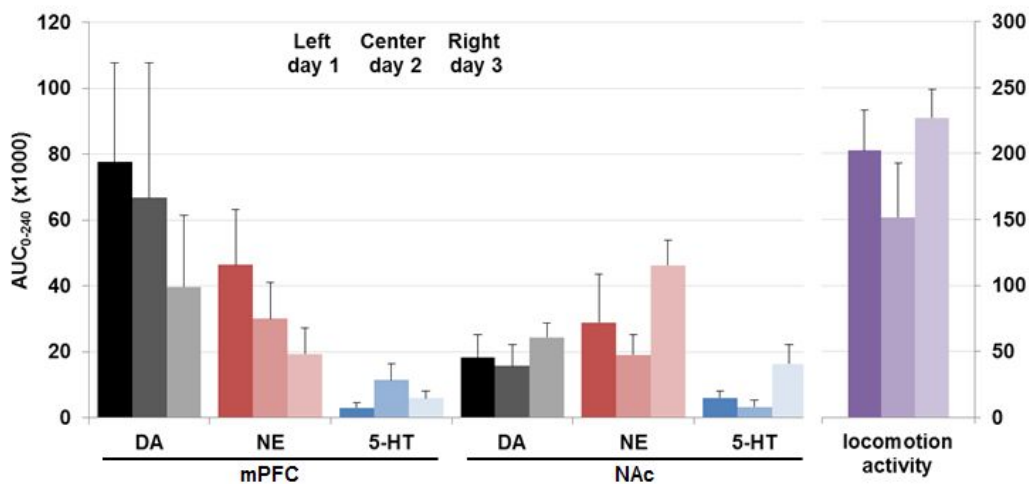


Fig. 2. Effect of repeated administration of 20 mg/kg DPD.

(2) ジフェニジンの BBB 通過様式の解明

前頭前野に透析プローブを挿入し、ジフェニジン投与後 15 分ごとに分画採取した透析液を分析したところ、投与後 30 分をピークとするジフェニジンの脳移行が観察された (Fig.3)。阻害剤の検討では、P 糖蛋白質と有機カチントランスポーターの阻害剤を前投与することによってジフェニジンの脳中濃度上昇が観察され、これらのトランスポーターによる脳からの能動的な排出が示唆された。

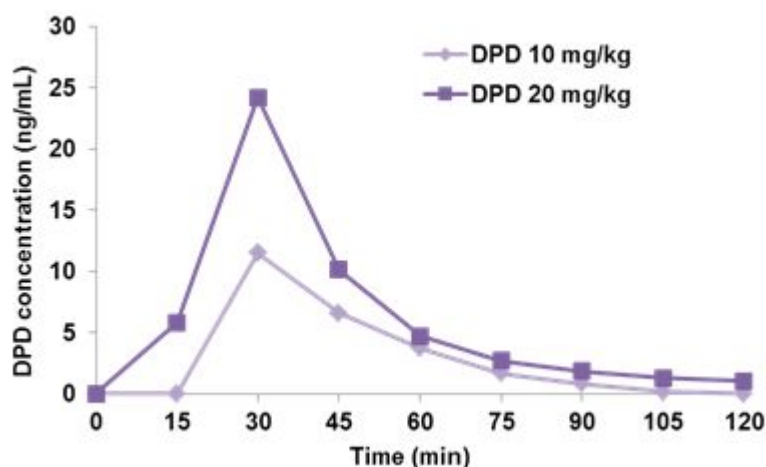


Fig. 3. DPD concentration in dialysate collected from mPFC after i.p. injection.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

(1) Katsuhiro Okuda, Masaru Asari, Hiroki Tanaka, Shotaro Isozaki, Hiromi Yamada, Kie Horioka, Ayaka Yoshida, Kazuo Matsubara, Hiroshi Shiono, Keiko Shimizu, Mechanistic study of diphenidine, a new psychoactive substance, for the neurochemical effect by using rat brain Microdialysis. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会) 2018 年

(2) Katsuhiro Okuda, Hiroki Tanaka, Masaru Asari, Kie Horioka, Kazuo Matsubara, Hiroshi Shiono, Keiko Shimizu, Evaluation of the neurochemical effects of diphenidine, a new psychoactive substance, on the dopaminergic reward system by using rat brain microdialysis. Neuroscience 2017 (国際学会) 2017 年

(3) 奥田勝博, 田中宏樹, 浅利 優, 堀岡希衣, 早川 輝, 磯崎翔太郎, 吉田あやか, 松原和夫, 塩野 寛, 清水恵子, ラット脳マイクロダイアリスによるジフェニジンの脳内報酬系への影響評価. 第 101 次日本法医学会学術全国集会 2017 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥田 勝博
 ローマ字氏名：(OKUDA, Katsuhiro)
 所属研究機関名：旭川医科大学
 部局名：医学部
 職名：助教
 研究者番号(8 桁)：00389115

研究分担者氏名：田中 宏樹
 ローマ字氏名：(TANAKA, Hiroki)
 所属研究機関名：旭川医科大学
 部局名：医学部
 職名：助教
 研究者番号(8 桁)：70596155

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：浅利 優
 ローマ字氏名：(ASARI, Masaru)

研究協力者氏名：松原 和夫
 ローマ字氏名：(MATSUBARA, Kazuo)