

片側パーキンソン病マウスを用いた脱法ドラッグ生体影響試験

不破 達, 児玉 亨, 本多 芳子, 野中 良一, 大橋 則雄, 鈴木 仁, 森 謙一郎
中江 大, 小縣 昭夫

Investigation of the Effects of Uncontrolled Drugs on the Central Nervous System *in Vivo* Using Hemi-Parkinson's Disease Mice

Tatsu FUWA, Tohru KODAMA, Yoshiko HONDA, Ryouichi NONAKA, Norio OHASHI, Jin SUZUKI,
Ken'ichiro MORI, Dai NAKAE and Akio OGATA

片側パーキンソン病マウスを用いた脱法ドラッグ生体影響試験

不破 達*, 児玉 亨***, 本多 芳子***, 野中 良一*, 大橋 則雄*, 鈴木 仁**, 森 謙一郎**
中江 大***, 小縣 昭夫***

片側パーキンソン病マウスの行動観察による脱法ドラッグ生体影響試験を試みた。マウスの一侧の黒質緻密層にカテコールアミン神経選択毒の6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を注入して、片側パーキンソン病マウスを作製した。ドーパミン (DA) 受容体に直接結合するアポモルフィンの微量投与によって、6-OHDA注入側の反対側方向への回転運動が生じたマウスを行動観察実験に用いた。このマウスは神経細胞外DA量を増す薬物投与では注入側方向への回転運動が生じ、セロトニン作動性神経作用薬物の投与では回転運動は観察されなかった。これらの結果から、本試験法は脱法ドラッグ生体影響試験として有用であることが判明した。

キーワード: 片側パーキンソン病マウス, 6-ヒドロキシドーパミン, 脱法ドラッグ, 除神経感受性増大, ドーパミン, 行動観察

はじめに

東京都は平成17年4月、「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を制定した。これに伴い、条例で定められた知事の附属機関である「東京都薬物情報評価委員会」（現在は東京都脱法ドラッグ専門調査委員会と改名：以下委員会と略す）が設置された。我々は生体影響試験による科学的情報を委員会に提出し、都、国が薬物の規制を行うにあたっての科学的根拠を示してきた。しかしながら、薬物の中枢神経作用の中には、現行の生体影響試験で判定できないものもあり、これらの判定を可能にする試験法の開発が必要とされている。

我々は既に、マイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器 (HPLC-ED) 分析とを組み合わせた脱法ドラッグ生体影響試験で、覚醒剤に類似する脱法ドラッグがマウス線条体内神経細胞外のドーパミン (以下DAと略す) 量を増加させることを明らかにしている¹⁾。しかしながら、脱法ドラッグの中には、DA受容体に直接結合する薬物がある可能性があり、それら薬物は神経細胞外モノアミン量の分析からは判定することができなかった。

1970年に、Urban Ungerstedtらによって、片側パーキンソン病モデルラットが紹介された²⁾。それは、DA作動性神経起始細胞が存在する中脳黒質緻密層 (substantia nigra pars compacta, 以下SNcと略す) あるいは前脳基底部と外側視床下部を吻-尾側方向に通過する神経線維束の内側前脳束 (medial forebrain bundle, 以下MFBと略す) の左脳か右脳かのどちらか片側に、カテコールアミン神経選択毒である6-ヒドロキシドーパミン (以下6-OHDAと略す) を局所微量注入し、黒質線条体DA作動性神経系を損傷させ、

注入側 (以下傷害側という) の線条体内DAを枯渇させたラットである。傷害側の線条体内のDA受容体を持つ神経細胞は除神経感受性増大を引き起こすため、このラットにDA受容体に直接結合するアポモルフィンを極微量投与すると、傷害側の線条体内DA受容体を持つ2次神経細胞の興奮が生じ、その結果、注入側の反対側 (以下、健常側) 方向への回転運動が生じる³⁾。これに対して、DA放出を増加させるメタンフェタミン (以下METHと略す) の投与では、健常側の線条体内の神経細胞外DA量が増加し、傷害側方向への回転運動が生じる。これら行動観察から、6-OHDA局所微量注入による片側パーキンソン病モデルラットの作製が成功したかどうかは判定される^{2,3)}。理論上、片側パーキンソン病モデルラットを用い、脱法ドラッグのDA作動性神経への作用の有無を調べることができる。

脱法ドラッグ生体影響試験では、脱法ドラッグ市場に流通する薬物の入手は難易度が高く、入手量が少ない場合が多いため、小型の実験動物を用い、投与量を少なくする必要がある。

以上のことから、片側パーキンソン病マウスを用いた脱法ドラッグ生体影響試験法の開発を試みた。

実験方法

1. 実験動物および実験概要

CrIj:CD1(ICR)系雄性マウス (日本チャールズリバー), 実験開始時, 8週齢, 体重34 g~39 g, 34 匹を用いた。搬入後、室温25°C, 湿度50%, 照明時間午前6時から午後6時までの飼育環境室で固形飼料 CE-2 (日本クレア) を与え7日間飼育し、搬入から8日目に、右脳のMFBかSNcのどちらかに微量の6-OHDAを注入した。注入から10日後に、マウス

* 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

** 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*** 東京都健康安全研究センター環境保健部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

**** 東京都神経科学総合研究所心理学研究部門 183-8526 東京都府中市武蔵台 2-6

の腹腔内にアポモルフィンを注射して、健常側方向への一定方向の回転運動が生じたマウスだけを継続飼育した。これらの内の3匹のマウスを用いて、腹腔内に薬物注射することによって生じる回転運動の行動観察実験を行った。行動観察実験は14日間以上の間隔で行った。最終実験日に、脳を摘出し、黒質線条体ドーパミン神経系の変性状態とアポモルフィン投与による左右の線条体の神経細胞の興奮状態を調べる目的で、免疫組織化学を行った。

なお、全ての実験は健康安全研究センター倫理審査委員会の審査を得て、動物実験管理規定に従って、おこなった。

2. 試薬

パーキンソン病マウス作成試薬として、6-OHDA (SIGMA, 115K-4613, 純度96%以上(HPLC)), アスコルビン酸 (Wako, 012-04802) を使用した。

行動観察の投薬試験試薬として、アポモルフィン (SIGMA, Lot 50K0790, 純度99%), 神経細胞外DA放出を増強するMETH (大日本住友製薬純度99.0%), セロトニン (以下5-HTと略す) 作動性神経に作用する1-(3-クロロフェニル) ピペラジン (Aldrich 製品コード125180 分子式/分子量 $C_{10}H_{13}ClN_2 \cdot HCl=196.68$, CAS番号65369-76-8) (以下3CPPと略す) を使用した。これに加え、都薬事監視課が市場入手し、医薬品研究科で精製した、純度99.7%の3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (以下MDMAと略す) と純度80%の2-(ピロリジン-1-イン) -1-(3,4-メチレンジオキシフェニル)ペンタン-1-オン (以下MDPVと略す) を使用した。

免疫組織化学用の試薬として、抗チロシン水酸化酵素 (以下THと略す) 抗体 (CEMICON MAB352), 抗c-Fos抗体 (abcam ab7963), ビオチン化抗ラビットIgG (VECTOR, BA-1000), アビジン・ビオチン混合キット (VECTOR, VECTASTAIN Elite ABC KIT), 標識酵素ジアミノベンチジン (DAKO, Lot 10016115, 以下DABと略す), 過酸化水素 (Wako, 086-07445), ヤギ正常血清 (Wako, 143-06561), 牛血清アルブミン (Wako, Albumin, Bovine Chon Fraction V powder, Lot F30627), 硫酸ニッケル (II) アンモニウム六水和物 (ナカライ, Lot M6E3803) を使用した。

その他の試薬として、日本薬局方生理食塩水 (大塚製薬), 塩化ナトリウム (Wako, 191-01665), リン酸水素二ナトリウム12水 (Wako, 196-02835), リン酸二水素ナトリウム二水和物 (Wako, 192-02815) を使用した。

3. 脳内6-OHDA注入法

アスコルビン酸 0.2%を含む生理食塩水で2 mg/mLの6-OHDA希釈溶液とした。10 μ Lのハミルトンマイクロシリンジのステンレス針に、先端の直径が80~100 μ mで、先端を角度40°に鋭利に研磨した微小ガラス管を接着し、これに6-OHDA希釈液を充填した。ペントバルビタールナトリウム50~60 mg/kg体重の腹腔内注射による麻酔下で、マウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、脳定位固定術によって、

6-OHDA希釈溶液を毎分0.1 μ Lの流速で圧注入した。注入部は右脳のMFBとSNcとした。それぞれ、頭蓋骨冠矢状縫合の交差点 (ブレグマ) を基点にして、MFBは尾側に1.45 mm, 正中線から右へ1.25 mm, 脳表面から腹側方向に深さ4.8 mmとし、SNcは尾側方向に3.2 mm, 正中線から右に1.3 mm, 脳表面から4.4 mmとした。これら部位への移動は、マイクロマニピュレータ (成茂科学 SM-11) によっておこなった。

4. 片側パーキンソン病マウス作製の判定方法

片側パーキンソン病マウスの作製に成功したかを判定するために、6-OHDA注入術から10日後のマウスに、生理食塩水で希釈したアポモルフィン0.25 mg/kg体重を腹腔内注射し、飼育ケージに戻して行動観察した。Fig. 1 BとFig. 2 Aに示したように、注射後5分以内に10回以上の健常側への回転運動が生じ、注射後約45分経過した時点でも、その一定方向の回転運動が持続して観察されたマウスだけを継続飼育した。

5. 免疫組織化学法

最終実験日に、アポモルフィン投与から1時間経過した時点で、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下 (70 mg/kg体重腹腔内注射) で、心臓カテーテルを介して、4%パラホルムアルデヒド (飽和ピクリン酸0.2%含む) で灌流固定した。灌流固定後、摘出した脳を1昼夜同固定液に浸した後、氷晶防止のために30%ショ糖リン酸緩衝液に浸して、脳組織にショ糖を浸み込ませた。その後、瞬間凍結して-80°Cに保存した。凍結脳を凍結マイクロトーム (ライカ CM 3050S) で厚さ20 μ mの前頭断面薄切標本にし、不凍液に回収し、免疫組織化学の手技まで、-30°Cに保存した。

薄切標本は以下の抗体による免疫組織化学に用いた。DA神経の損傷程度を調べるために、抗TH抗体 (希釈濃度 1:8000, 4°C・一昼夜反応), アポモルフィン投与による中枢神経系内の神経細胞興奮領域を調べるために、神経細胞興奮の標識となる⁴⁾、抗c-Fos抗体 (希釈濃度 1:6000, 4°C・2昼夜反応) による免疫組織化学をおこなった。免疫組織化学操作は薄切標本を液中に浮遊させておこなう浮遊法にて、酵素抗体法 (DAB標識酵素) の間接法を採用し、増感するためにアビジン・ビオチン反応 (ABC) 法を用いた (詳細略)。

結果

1. 片側パーキンソン病マウス作製

Fig. 1に6-OHDAのマウス脳内注入部の模式図 (A) を示した。片側パーキンソン病マウス作製では、MFBに6-OHDA希釈溶液2~3 μ Lを注入するのが一般的である。そこで、マウスの片側MFBへ6-OHDA希釈溶液を1.5 μ L注入した。しかし、摂食・飲水行動を消失して、死にいたるマウスが検出された (7匹中5匹)。染料のメチレンブルーを同じ方法で同容量注入した結果、注入側の反対側にもおよぶメチレンブルーの広い範囲への拡散が確認されたことから、MFBの

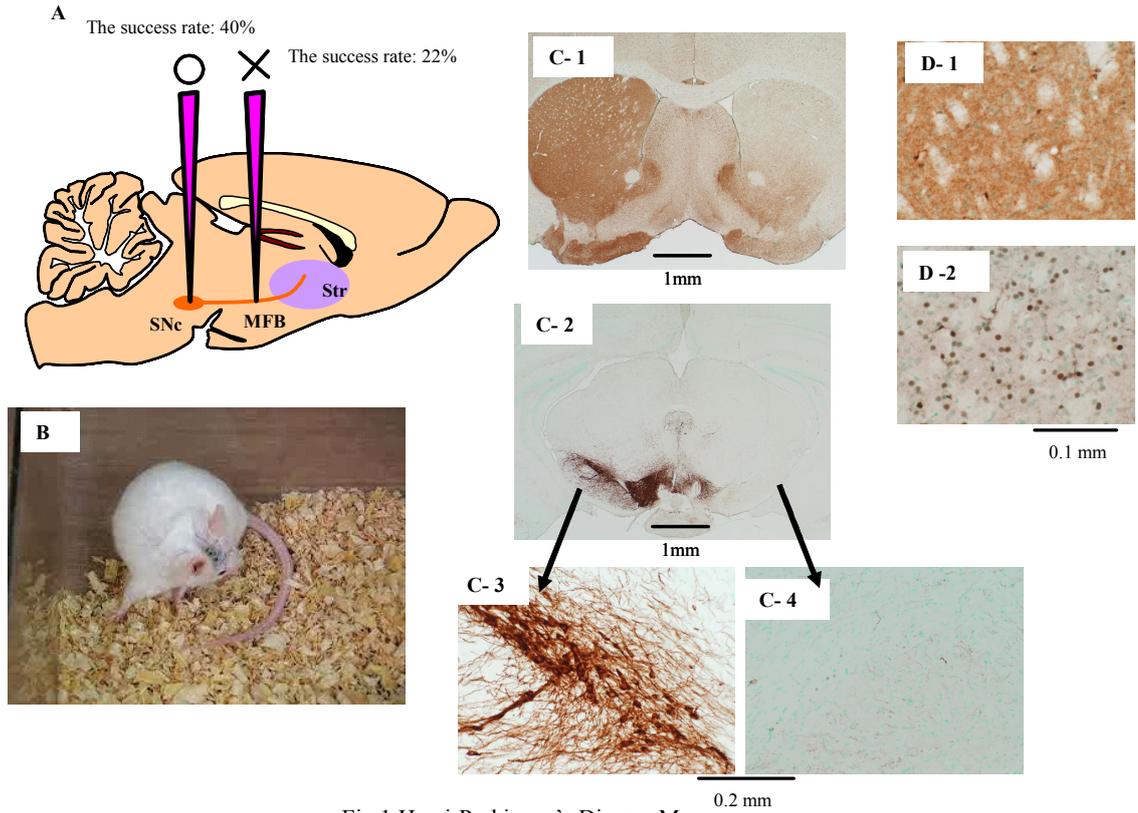


Fig.1 Hemi-Parkinson's Disease Mouse

A: Scheme of 6-OHDA injection site, B: Apomorphine-induced posture (turns to the intact side direction), C: Immunohistochemical microphotographs of Anti-TH-antibody reacted neurons, C-1: Striatum DA terminals, C-2 & C-3: SNc DA neurons, C-4: disappearance of the DA neurons, D: Immunohistochemical microphotograph of W-stain with Anti-TH antibody and Anti-c-Fos antibody reacted neurons in Striatum inducing apomorphine, D-1: intact side, D-2: lesion side.

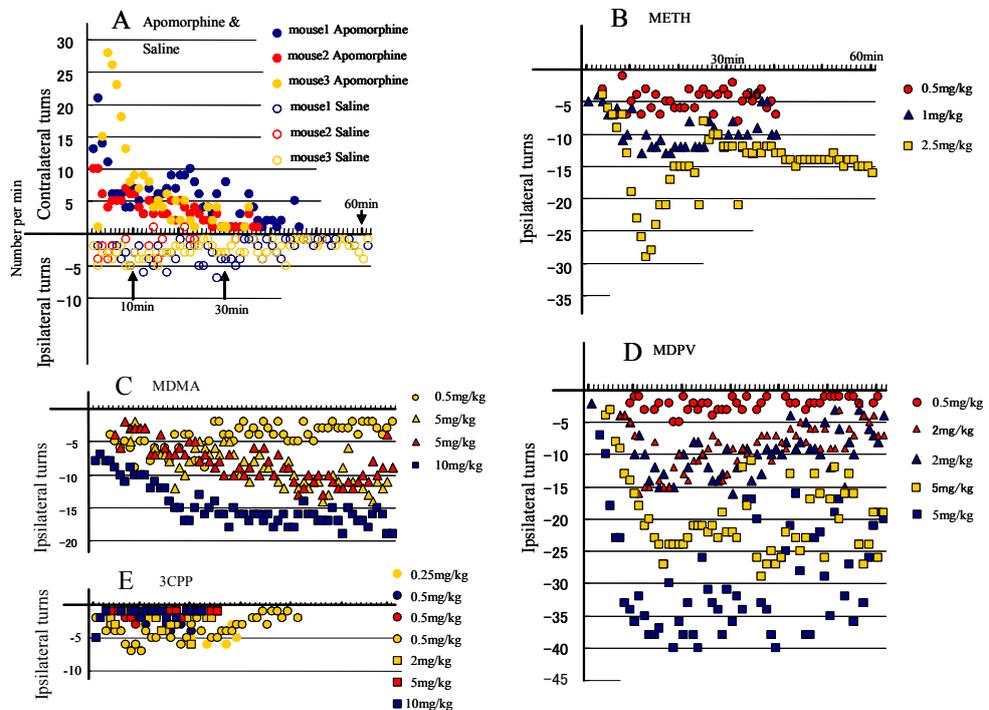


Fig.2 Direction and Number of Turns per min. by Drug Administration

A: Apomorphine & saline-induced turns, B: METH-induced turns, C: MDMA-induced turns, D: MDPV-induced turns, E: 3CPP-induced turns.

近傍に位置するドーパミン作動性神経を含む視床下部の食欲中枢が6-OHDAによって傷害を受け、摂食・飲水行動に影響したと考えられた。そこで、6-OHDA希釈溶液を1.5 μL から0.3 μL に減じて注入した。それによって、死に至るマウスは18匹中1匹に改善した。しかしながら、作製された片側パーキンソン病マウスは18匹中4匹で、成功率は22%と低かった。成功率を改善するために、右脳のSNcに6-OHDA希釈溶液を0.2~0.3 μL 注入した。それによって、9匹中4匹の片側パーキンソン病マウスの作製に成功し、成功率は約40%に改善した。この内の3匹のマウスを用い、薬物投与による回転運動の行動観察実験を行った。

Fig. 1 Bに、右脳のSNcに6-OHDAを注入したマウスにアポモルフィンを投与して健常側方向への回転運動が生じたマウスの姿勢を示した。Fig. 2には、薬物投与から1時間後までの1分間に生じた健常側への回転数を+数値で、傷害側への回転数を-数値で、プロットして示している。Fig. 2のA~Eのプロットの色はそれぞれ同じマウスから得られた実験成績である。Fig. 2Aに、0.25 mg/kg体重のアポモルフィン腹腔内注射によって、3匹のマウスの1分間に生じた回転数をそれぞれプロット(●)した。何れのマウスも投与後5分以内に10回以上の健常側方向への一定方向の回転運動が認められ、投与後45分程度まで、回転し続けた。

Fig. 1C, Dに、アポモルフィン微量投与によって、健常側方向に回転運動が生じたマウスの免疫組織化学の成績を示した。CにはDABによって茶色に染色した抗TH抗体免疫組織化学による、線条体部(C-1)と黒質部(C-2, C-3, C-4)の染色像を示した。Dには、線条体部のDABによって茶色に染色した抗TH抗体陽性神経軸索終末と、硫酸ニッケル(II)アンモニウム六水和物0.02%を含むDABによって黒色に染色した抗c-Fos抗体陽性細胞の2重染色像を示した。THは、DAの前駆物質であるチロシンからDAを合成する際の補酵素である。そのため、抗TH抗体の陽性細胞はDA作動性神経を標識している。また、c-Fosは神経細胞の興奮を標識する最初期遺伝子タンパクであり、神経細胞核内に存在する。片側パーキンソン病マウスでは、線条体部のDA作動性神経軸索終末変性消失(C-1, D-2)と黒質部のDA作動性起始神経細胞の変性消失(C-2, C-4)が観察された。また、c-Fos陽性細胞は、健常側方向への回転が認められたアポモルフィン投与マウスの傷害側の線条体に観察された(D-2)。

2. 生理食塩水投与による回転運動

Fig. 2 Aに生理食塩水投与によって1分間に生じた回転数をプロット(○)した。マウス3例ともに、傷害側方向への回転運動が観察された。一分間に観察される回転数は1~5回の範囲以内が多く、稀に7回程度の回転が生じた。

3. METHによる回転運動

Fig. 2 Bに、METH投与によって、1分間に生じた回転数をプロットした。投与後1時間以上続く傷害側への回転運動

が観察され、投与量に依存して、回転数は増加した。生理食塩水投与と比較して、最小投与量の0.5 mg/kg体重投与でも1分間に5回以上の傷害側への回転運動が多く認められた。

4. MDMA による回転運動

Fig. 2 Cに投与量0.5~10 mg/kg体重のMDMA投与によって1分間に生じた回転数をプロットした。5 mg/kg体重投与量以上で、傷害側への一定方向の回転運動が生じた。投与後1時間以上、傷害側方向のみへの回転運動が観察され続けた。

5. MDPV による回転運動

Fig. 2 Dに投与量0.5~5 mg/kg体重のMDPV投与によって1分間に生じた回転数をプロットした。低量(0.5 mg/kg体重)投与では、有意な回転運動は認めなかったが、2 mg/kg体重投与量以上で傷害側への回転運動が観察され、投与量に依存して回転数を増加した。これら回転運動は傷害側への方向のみ生じ、投与後1時間経過した時点でも認められ続けた。

6. 3CPP による回転運動

Fig. 2 Eに投与量0.25~10 mg/kg体重の3CPP投与によって1分間に生じる回転数をプロットした。生理食塩水投与によるものと比較して、3CPP投与では片側パーキンソン病マウスは有意な傷害側方向への回転運動を引き起こさないことが確認された。

考 察

右脳のSNcに6-OHDAを微量注入したマウス腹腔内に微量(0.25~0.5 mg/kg体重投与量)のアポモルフィンを注入すると、健常側方向への一定方向の回転運動が生じた。この回転運動は6-OHDA注入側の黒質のDA作動性起始細胞の90%以上が変性消失し、6-OHDA注入側の線条体内DAが枯渇したマウスに認められ、除神経感受性増大を引き起こした注入側線条体のDA作動性2次神経細胞が、通常では効果がない極微量の投与によって興奮することによって生じることが知られている³⁾。Fig. 1(C, D)に示したように、免疫組織化学(抗TH抗体、抗c-Fos抗体)による実験成績は、黒質線条体DA作動性神経の変性消失とアポモルフィン投与による傷害側線条体の神経細胞の興奮を視覚的に確かめたものであった。一方、神経細胞外DA量放出を増大させるMETHは健常側の線条体内神経細胞外DA量を増加させ、DA2次神経細胞を興奮させ、傷害側方向への回転運動を起こさせることが知られている²⁾。

片側パーキンソン病マウスへの水投与でも傷害側方向への回転運動が誘発された。この回転運動は片側の黒質線条体DA作動性神経の変性による左右の脳のドーパミン量の差を反映したものと考えられる。このことは、薬物投与によって傷害側への回転運動が生じた場合、その回転運動が薬物投与によるものであるかを判定する際に参考となる実

験成績であった。

今回、回転運動観察に用いた薬物はMETH, MDMA, MDPV及び3CPPであった。METHは神経細胞外DA放出を増強し、片側パーキンソン病ラットは傷害側方向への回転運動を引き起こすことが知られている²⁾。アポモルフィン投与実験結果に加え、今回のマウスでのMETH投与実験からも片側パーキンソン病マウス作製の成功を確認するものであった。フェネチルアミン系に分類されるMDMAはエクスタシー・ドラッグと言われている。ラットの成績ではあるが、MDMAは線条体内神経細胞外DA量を10倍程度、5-HT量を4-6倍程度、両者を増加させることが知られている^{5,6)}。MDPVはフェネチルアミン系に分類される薬物で、麻薬であるメチロンの化学構造式に類似し、DAの神経細胞外レベルを上昇させる。我々は既に、マイクロダイアリス法による生体影響試験によって、MDPVは神経細胞外DA量を増加作用があることを明らかにしている¹⁾。なお、MDPVは平成21年1月に薬事法第2条第14項に規定する指定薬物に指定されている。3CPPはピペラジンに分類される薬物であり、主に5-HT作動性神経に強く作用する⁷⁾。我々は既に、ピペラジンに分類される脱法ドラッグの生体影響試験に際して、その陽性対照薬物としての3CPPがマウス線条体内神経細胞外5-HT量が3倍程度、増加させることを確かめている(東京都脱法ドラッグ専門調査委員会資料として提出)。

今回の実験では、アポモルフィン以外には微量投与による健常側方向への回転運動を誘発する試験薬はなかった。いずれも傷害側方向への回転運動であった。これら有意な回転運動を起こさせる薬物は、全て神経細胞外DA量を増加させる薬物であった。これら結果とアポモルフィン投与結果から、本試験法によって、薬物のDA作動性神経への作用を判定できることが明らかとなった。

一方、3CPP投与では、有意な回転運動が観察されなかった。3CPPはDA作動性神経への作用は弱く、5-HT作動性神経に強く作用する薬物である⁷⁾。従って、薬物投与によって、有意な回転運動を誘発させない薬物はDA作動性神経作用よりも5-HT作動性神経に強く作用する薬物であることを疑う必要があると考えられた。

本試験法は、一定方向への回転運動が生じるか否かにより、統計処理を行う必要がなく、脱法ドラッグの中樞神経作用を判定できる。また、パーキンソン病マウスは長期の飼育が可能であり、薬物耐性形成を考慮して、投薬実験の間隔を十分に持つことによって、複数の薬物の生体影響試験をおこなえるという利点がある。したがって、少数のマウスで脱法ドラッグ生体影響試験を行えることから、パーキンソン病マウス作製成功率約40%でも十分にこの試験法は活用可能と考えられた。

なお、現在のところ、*in vivo*の5-HT作動性神経作用試験

法は、マイクロダイアリス法による神経細胞外レベルの測定以外はなく、直接5-HT作動性神経受容体に結合する薬物の判定方法がない。この点は検討課題である。

ま と め

我々は都、国が薬物の規制を行うにあたっての科学的根拠を示してきた。併行して、新たな脱法ドラッグ生体影響試験法の開発をおこなってきた。

脱法ドラッグにはDA受容体に直接結合する薬物がある可能性があり、*in vivo*では、それら薬物は神経細胞外モノアミン量の分析からは判定することができなかった。

カテコールアミン神経選択的毒である6-OHDAを1側の黒質緻密層に微量注入による片側パーキンソン病マウスを作製し、脱法ドラッグ生体影響試験の開発を試みた。

片側パーキンソン病モデルは一般にラットが用いられるが、脱法ドラッグの*in vivo*生体影響試験では投与量を少なくする必要から、マウスの片側パーキンソン病モデルを用いることにした。片側パーキンソン病マウスの作製には技術的な熟達を要するが、パーキンソン病マウスは長期間にわたって継続飼育が可能であり、複数の薬物投与実験に用いることができるため、少数の片側パーキンソン病マウスで脱法ドラッグ生体影響試験が可能であった。

片側パーキンソン病マウスの行動観察実験は統計処理を必要とせず、回転運動の方向によって、神経細胞外のDA量を増加させる薬物か、あるいはDA受容体に直接結合する薬物であるかを判定できる。また、有意な回転運動を誘発しない薬物は5-HT作動性神経に作用する薬物の可能性を示す結果であった。

文 献

- 1) 不破達, 児玉亨, 他: 化学生物総合管理誌WEB学会誌, **5**(1), 62-71, 2009.
- 2) Ugerstedt, -U., Arbuthnott, -G.W.: *Brain Res.*, **24**, 485-493, 1970.
- 3) Costall, -B., Kelly, -M.E., Naylor, -R.J.: *Neuropharmacol.*, **22**, 295-302, 1983.
- 4) Graybiel, -A.M., Moratalla, -R., Robertson, -H.A.: *Proc. Nat. Aca. Sci.*, **87**, 6912-6916, 1990.
- 5) Gough, -B., Imam, -S.Z., Blough, -B., Slikker, -W., Ali, -S.F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **965**, 410-420, 2002.
- 6) White, -S.R., Obradovic, -T., Imel, -K.M. and Wheaton, -M.J.: *Progress In Neurobiology*, **49**, 455-479, 1996.
- 7) Nagai, -F., Nonaka, -R., Satoh, -K. and Kamimura, -H.: *Eur. J. Pharmacol.*, **559**, 132-137, 2007.

**Investigation of the Effects of Uncontrolled Drugs on the Central Nervous System *in Vivo*
Using Hemi-Parkinson's Disease Mice**

Tatsu FUWA^{*}, Tohru KODAMA^{****}, Yoshiko HONDA^{****}, Ryouichi NONAKA^{*}, Norio OHASHI^{*}, Jin SUZUKI^{**},
Ken'ichiro MORI^{**}, Dai NAKAE^{***} and Akio OGATA^{***}

The present study was designed to investigate the efficacy of behavioral observations in Hemi-Parkinson's Disease mice for uncontrolled drug effects on the central nervous system (CNS). The mice were produced by unilateral stereotaxic injection of the catecholaminergic neurotoxin, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), into the substantia nigra pars compacta (SNc). Only mice exhibiting turns contralateral to the 6-OHDA-injected side following administration of apomorphine were used for the test. The drugs that cause an increase in extracellular dopamine levels induced turns ipsilateral to the 6-OHDA-injected side. Serotonergic-acting drugs did not induce the turning behavior. These results indicate that this behavior test is useful for detecting the *in vivo* effects of uncontrolled drugs on the CNS.

Keywords: hemi-Parkinson's disease mouse, 6-hydroxydopamine, uncontrolled drug, denervation hypersensitivity, dopamine, behavior observation

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

** Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Dept. of Pharmaceutical Sciences, Division of Drugs
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

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

**** Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Dept. of Psychology
2-6, Musashidai, Fuchu, Tokyo Japan