

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15147

研究課題名（和文）フェネチルアミン系危険ドラッグのトキシコフォア同定を目指した構造毒性相関研究

研究課題名（英文）Structure-toxicity relationship of designer drug having phenethylamine moiety

研究代表者

古武 弥一郎 (KOTAKE, YAICHIRO)

広島大学・医歯薬保健学研究院（薬）・准教授

研究者番号：20335649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：危険ドラッグによる被害を防止するためには、特に強力な作用を有する危険ドラッグの化学構造を明らかにし、真に危険な化学構造を有する物質を優先的に規制する必要がある。そこで本研究では、フェネチルアミン系危険ドラッグの候補となりうる誘導体を合成し、覚せい剤に関連する *in vitro* および *in vivo* 活性を調べた。その結果、ドパミン再取り込み阻害作用が最も強く、自発的運動量も増加し、依存性も強い特定の化合物が見出された。

研究成果の概要（英文）：We synthesized candidates of designer drugs having phenethylamine moiety and examined methamphetamine-related *in vitro* and *in vivo* activities. As a result, we found the particular compound having strong dopamine uptake inhibitory activity, locomotor activity, and dependency.

研究分野：衛生薬学

キーワード：危険ドラッグ 構造毒性相関 フェネチルアミン

1. 研究開始当初の背景

2000年を過ぎた頃から、当時は合法ドラッグとよばれた薬効のあるハーブ類やマジックマッシュルームが、インターネットの普及により流行し始めた。

個々の化学物質の毒性を精査してから規制するのでは間に合わないため、現在は包括規制(世間に出回る危険性が精査されていないドラッグ候補と同様の化学構造を持つ物質を包括的に規制すること)が行われている。一方で化学産業や医薬品産業にとっては、包括規制によりこれらの化学物質を原材料として使用することができなくなり、医薬品をはじめとする有用な化学物質の製造が困難になったり、これまで以上のコストがかかったりすることが懸念されている。

このように不必要な規制が行われないようにするためには、真に危険な作用を有する化学構造を明らかにし、その部分構造を有する化合物「のみ」をいち早く規制する必要があるが、そのような研究は全く行われていない。その大きな原因は、危険ドラッグが社会問題となるここ数年以前は規制が行われておらず、特定の化学構造を有するドラッグのみが流通しており、どのような化学構造を有する危険ドラッグが、我々にとって有害で危険を脅かすかについては問題にならなかったためである。

しかし近年、危険ドラッグが社会問題となるにつれて危険ドラッグの包括規制が進み、その結果、法の網を潜り抜けるため様々なバリエーションを有する危険ドラッグが世の中に蔓延するに至った。その現状は、これまで全く毒性が調べられていない新規の化学物質を用いて人体実験を行っているに等しく、2014年には危険ドラッグが原因と考えられる事件・事故により100名以上が死亡している。現在は小康状態にあるもののいつ再燃してもおかしくない状態であり、科学的根拠に基づく対策が必要である。

2. 研究の目的

覚せい剤の構造に近く、高い興奮性を有するフェネチルアミン系危険ドラッグに着目し、その候補物質を申請者らの有する有機合成技術を用いて合成し、神経細胞培養系および覚せい剤を評価する際に用いる *in vivo* 評価系を用いてトキシコフォアの同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1. フェネチルアミン誘導体の合成

ピペリジン構造を持つフェネチルアミン誘導体 23 化合物を合成した。Fig. 1 に示す化合物を中心にアッセイに用いた。(Erwan *et al.* 2006)

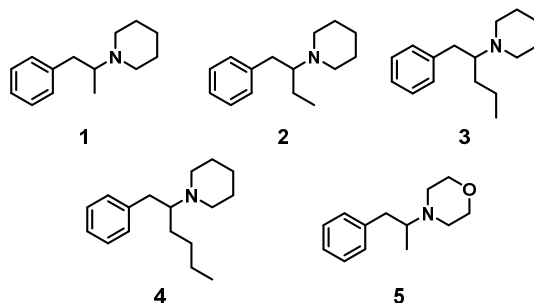


Fig. 1 Chemical structures of synthetic compounds

2. 細胞毒性試験

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対しそれぞれの化合物を曝露し、WST-1 アッセイを行い、細胞生存率を測定した。

3. ドパミン再取り込み阻害試験

SH-SY5Y に化合物を曝露した後に [^3H] ドパミンを取り込ませ、細胞内に取り込まれた量を液体シンチレーションカウンターによって測定した。ポジティブコントロールとして、ドパミントランスポーター (DAT) を特異的に阻害すると考えられている GBR12909 を用いた。

4. ドパミン放出促進試験

SH-SY5Y に [³H] ドパミンを取り込ませた後に化合物を曝露し、細胞内に残存する [³H] ドパミンを測定することにより放出されたドパミン量を計算した。ポジティブコントロールとして小胞モノアミン放出促進作用が知られているチラミンを用いた。

5. 自発的運動量

化合物 1~5 を DBA マウスに腹腔内投与することによるマウスの自発運動量の亢進を調べるため、オープンフィールドテストを行った。オープンフィールドテストは Hall の方法 (Hall, 1932; Walsh and Cummins, 1976) を参考にこれを改良して行った。

6. 条件づけ場所嗜好性試験 (CPP 試験)

マウスの精神依存性形成における化合物 1~5 の影響を調べるため、白黒ボックスを用いた条件づけ場所嗜好性試験 (CPP 試験) を行った。CPP 試験は自己投与試験に変わる依存性を測定する簡便な試験として近年用いられている方法であり、白と黒の部屋それぞれに対する場所嗜好性に対して化合物の投与がどれだけ影響を及ぼすのかを測定する試験である。以下の論文 (Thomas *et al.*, 2014; Hensleigh *et al.*, 2014; Zongsheng *et al.*, 2014) を参考に、化合物・生理食塩水の投与をそれぞれ 3 日間計 6 日間、測定時間 30 分で行った。化合物 1~5 は、10 および 30 mg/kg の各化合物を腹腔内投与により行った。

4. 研究成果

1. 細胞毒性試験

細胞生存率を測定した結果、化合物 3 が 1,000 μM で約 50%、化合物 4 が 1,000 μM でほぼ 0% となったが、300 μM 以下の濃度では 1~5 全ての化合物において有意な細胞毒性は認められなかった。

2. ドパミン再取り込み阻害試験

ドパミン再取り込みの IC₅₀ 値は、化合物 3 および 4 で 1 μM 以下と低い値を示したが、化合物 1, 2 のように炭素鎖の短縮に伴い IC₅₀ 値は上昇した。

3. ドパミン放出促進試験

化合物 3 が 10 μM 以上の濃度でコントロールの約 2 倍ドパミン放出活性が認められたが、それ以外の化合物に目立った活性は認められなかった。

4. 自発的運動量

化合物 3 は投与後 10 分、20 分、30 分全ての測定ポイントでコントロールの 2 倍以上自発的運動量が上昇しており、高い興奮性が認められた。

5. 依存性

やはり化合物 3 において高い依存性が認められた。

6. 考察

すべての結果を考慮すると、側鎖がプロピル基の化合物 3 に高い興奮性と依存性が認められ、そのメカニズムとして強力なドパミン再取り込み阻害作用、および中程度のドパミン放出促進作用が認められた。このように危険ドラッグの候補化合物群について構造毒性相関を調べていくことにより、強力な作用を有する危険ドラッグの構造を予測することができ、早期の規制につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Sakamoto S, Miyara M, Sanoh S, Ohta S, Kotake Y. Mild MPP⁺ exposure-induced glucose starvation enhances autophagosome synthesis

and impairs its degradation. *Sci. Rep.* **7**, 46668 (2017). doi: 10.1038/srep46668.

2. Santoh M, Sanoh S, Ohtsuki Y, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S. Acetaminophen analog N-acetyl-m-aminophenol, but not its reactive metabolite, N-acetyl-p-benzoquinone imine induces CYP3A activity via inhibition of protein degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 639-644 (2017). doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.073.

3. Ishida K, Kotake Y, Sanoh S, Ohta S. Lead-induced ERK activation is mediated by GluR2 non-containing AMPA receptor in cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 303-309 (2017). doi: 10.1248/bpb.b16-00784.

4. Ishida K, Tsuyama Y, Sanoh S, Ohta S, Kotake Y. Perfluorooctane sulfonate induces neuronal vulnerability by decreasing GluR2 expression. *Arch. Toxicol.* **91**, 885-895. doi: 10.1007/s00204-016-1731-x.

5. Miyara M, Kotake Y, Tokunaga W, Sanoh S, Ohta S. Mild MPP⁺ exposure impairs autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. *J. Neurochem.* **139**, 294-308 (2016). doi: 10.1111/jnc.13700.

6. *Miyara M, *Umeda K, Ishida K, Sanoh S, Kotake Y, Ohta S. Protein extracts from cultured cells contain nonspecific serum albumin. (*co-first) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1164-1167 (2016). doi: 10.1080/09168451.2016.1151338.

7. Umeda K, Kotake Y, Miyara M, Ishida K, Sanoh S, Ohta S. Methoxychlor and fenvalerate induce neuronal death by reducing GluR2

expression. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 255-264 (2016). doi: 10.2131/jts.41.255.

8. Asanagi M, Yamada S, Hirata N, Itagaki H, Kotake Y, Sekino Y, Kanda Y. Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 207-215 (2016). doi: 10.2131/jts.41.207.

〔学会発表〕(計4件)

1. 佐能正剛, 渡部祥子, 須山翔太, 梅原祥太, 奥田勝博, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 古武弥一郎, 太田 茂 フェネチルアミン誘導体およびカチノン誘導体の in vitro/in vivo 薬物動態評価 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年9月11日 東京

2. 古武弥一郎, 梅原祥太, 須山翔太, 渡部祥子, 奥田勝博, 佐能正剛, 太田 茂 フェネチルアミン系危険ドラッグのトキシコフォア同定を目指した構造毒性相関研究 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年9月10日 東京フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年9月11日 東京

3. 渡部祥子, 佐能正剛, 須山翔太, 梅原祥太, 山頭征岳, 江尻洋子, 古武 弥一郎, 太田 茂 カチノン誘導体における肝細胞三次元培養系を用いた共通代謝物の探索 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年9月11日 東京

4. 渡部祥子, 佐能正剛, 梅原祥太, 山頭征岳, 江尻洋子, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 古武弥一郎, 太田 茂 肝細胞の三次元培養系およびヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたカチノン誘導体の共通代謝物の探

索 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27
日 仙台

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古武 弥一郎 (KOTAKE YAICHIRO)
広島大学大学院医歯薬保健学研究院・准教

授

研究者番号 : 20335649

(2)研究分担者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号 : 60160503