

Fig. 4. Effect of the synthetic cannabinoid on the creatine kinase activity in human rhabdomyosarcoma cells. A) The NADH standard curve. B) Changes of NADH levels were measured at 120 min after synthetic cannabinoid CP-55,940 (CP, 30 μ M) using a plate reader. Creatine kinase (CK) activities were expressed as the optical density (OD) value at a wavelength of 450 nm. ** $P < 0.01$ vs. vehicle (Veh)-treated group.

分担研究報告書

コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの有害性予測法に関する研究

分担研究者：栗原正明（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長）

【研究要旨】

昨年度はカチノン系化合物の包括指定を行うために QSAR（定量的構造活性相関）法による予測値を効果的に用いることでその範囲を検討した。本年度は、包括指定の範囲を拡張するために、長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物について活性予測を行った。

A. 研究目的

長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物の包括指定範囲の検討を行うことを目的とした。

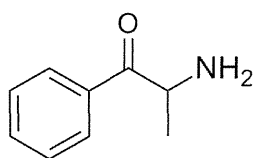


図 1：カチノン (Cathinone)

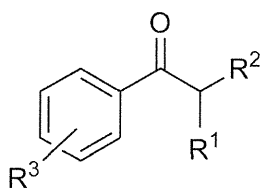


図 2：カチノン系化合物

B. 研究方法

昨年度は、カチノン系化合物（図 2）において流通化合物等を考慮し、活性に重要な 3 つの置換基 (R^1, R^2, R^3) を決め、そのバリエーションにより考えられる 504 化合物(表 1) について QSAR 法によって活性予測を行った。QSAR 式は 28 個の活性既知化合物より求めた。

本年度はカチノン系化合物の置換基 R^2 にさらに長い炭素鎖 (*n*-butyl, *n*-pentyl, *n*-hexyl, *n*-heptyl, *n*-octyl, *n*-nonyl) を検討した。

表 1

R^1	methyl, ethyl, <i>n</i> -propyl	3 種
R^2	NH ₂ , NHCH ₃ , NHC ₂ H ₅ , N(CH ₃) ₂ , N(CH ₃)(C ₂ H ₅), N(C ₂ H ₅) ₂ , pyrrolidinyl	7 種
R^3	H, 2-methyl, 3-methyl, 4-methyl, 2-ethyl, 3-ethyl, 4-ethyl, 2-OCH ₃ , 3-OCH ₃ , 4-OCH ₃ , 3,4-methylenedioxy, 2,3-methylenedioxy, 2-F, 3-F, 4-F, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I	24 種
3 x 7 x 24 = 504 化合物		

C. 研究結果

(1) 既知の活性値

昨年度は、参考文献 1-3 より、ドパミン取り

込み作用に対する 50%抑制濃度 (IC50 値) 28 化合物 (表 2) を用いた本年度はこれにさらに 7 化合物を加えた。(表 3)

(2) QSAR の方法と解析結果

QSAR 解析には、化学計算パッケージ MOE を用いた。用いた記述子は AutoQuaSAR プログラムにより MOE に搭載されている全て 2D 記述子から選択されたものである。構築した QSAR 式を以下に示した。

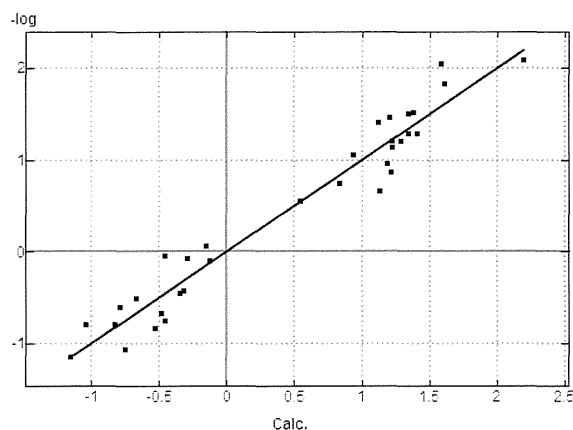


図 3 35 化合物から構築した QSAR モデル

D. 考察

昨年度 28 化合物から構築した QSAR 式と 35 化合物から構築した QSAR 式を比較するために、活性既知化合物 35 に 2 つの QSAR 式を適用した。

E. 結論

35 化合物から構築した QSAR 式を用いた場合の方がより、実測値近い予測値を得られた。今後長鎖アルキル基を有するカチノン系の予測に用いると効果的であると考えられる。今後、包括規制に利用していく予定である。

F. 参考文献

- 1) Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME; Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro; *Br J Pharmacol.* 2013, 168, 458-470.
- 2) Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW, Hanson GR.; Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function.; *Eur J Pharmacol.* 1999, 382, 45-49.
- 3) Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK.; 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors.; *J Med Chem.* 2006, 49, 1420-32.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita, H., Demizu, Y., Shoda, T., Sato, Y., Oba, M., Tanaka, M., Kurihara, M.: Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2403–2408(2014)
- 2) Nagakubo, T., Demizu, Y., Kanda, Y., Misawa, T., Shoda, T., Okuhira, K., Sekino, Y., Naito, M., Kurihara, M.: Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25, 1921–1924
- 3) T. Shoda, K. Okuhira, M. Kato, Y. Demizu, H. Inoue, M. Naito, M. Kurihara: Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 87-89 (2014)
- 4) T. Misawa, Y. Demizu, M. Kawamura, N. Yamagata, M. Kurihara: Structural

development of stapled short helical peptides as vitamin D receptor (VDR)-coactivator interaction inhibitors
Bioorg. Med. Chem. **2015**, 23, 1055–1061

2. 学会発表

なし。

I. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし。

表 2 : ドパミン取り込み阻害活性が既知の化合物とその活性(IC₅₀ 値, μ M)

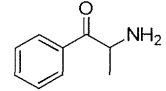
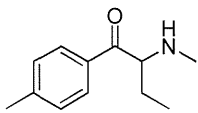
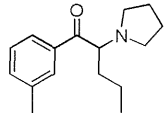
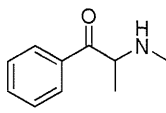
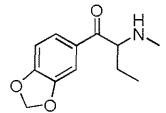
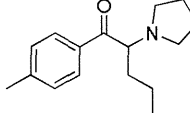
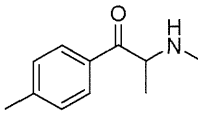
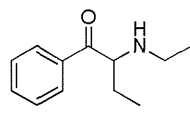
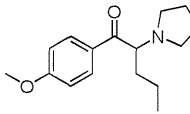
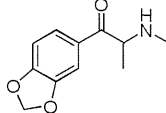
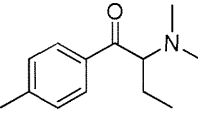
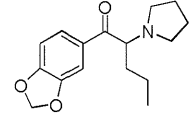
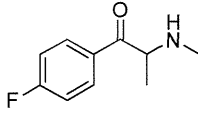
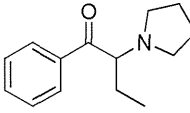
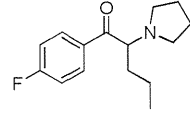
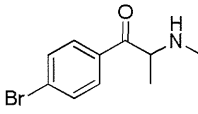
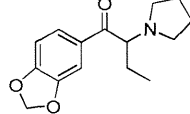
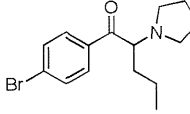
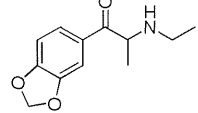
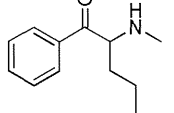
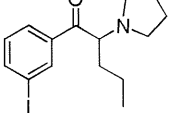
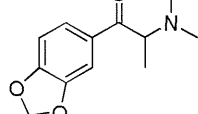
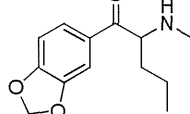
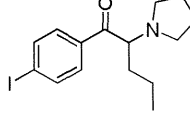
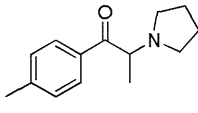
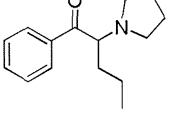
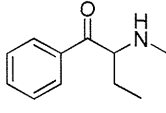
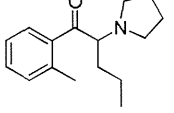
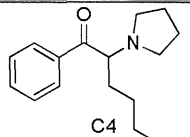
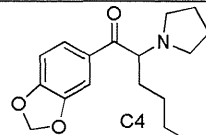
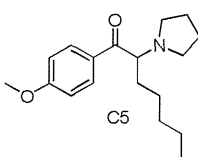
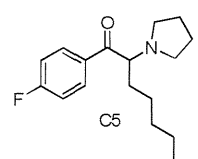
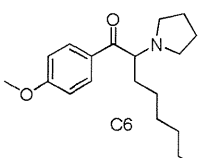
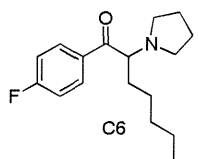
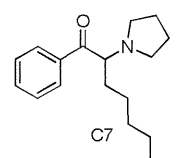
	カチノン系化合物	DAT (μ M)		カチノン系化合物	DAT (μ M)		カチノン系化合物	DAT (μ M)
1		14	11		6.92	21		0.063
2		1.12	12		2.90	22		0.035
3		3.31	13		1.21	23		0.283
4		4.82	14		6.36	24		0.031
5		6.35	15		0.138	25		0.185
6		11.7	16		0.110	26		0.040
7		5.68	17		1.27	27		0.052
8		4.04	18		0.874	28		0.032
9		2.40	19		0.052			
10		2.70	20		0.063			

表 3 追加した7化合物のドパミン取り込み阻害活性値

	新規カチノン系化合物	DAT (μM)
29	 C4	0.015
30	 C4	0.0092
31	 C5	0.088
32	 C5	0.073
33	 C6	0.22
34	 C6	0.77
35	 C7	0.0084

分担研究報告書

培養細胞を用いた覚せい剤類似化合物の新規検出システムの構築

分担研究者：富山健一（放射線医学総合研究所緊急被ばく医療研究センター）

研究協力者：船田正彦（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として、覚せい剤と類似構造を有するカチノン系誘導体の流通とその乱用が問題となっている。カチノン誘導体は、中枢興奮作用を有しており、その薬理機序は脳内神経伝達物質のドーパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニンの遊離促進および再取り込みの阻害であると考えられる。流通の形態としては、ハーブ、リキッドそしてパウダーなど様々な形態で販売されている。現在これらの製品から未規制の薬物を検出には、検出方法等の問題から非常に時間がかかっている。そこで本研究では、流通している製品より簡便に未知の未規制薬物を検出するために、動物を用いた行動薬理的試験や GS-MS のような高度な技術を必要とする検出系とは異なり、薬物の作用点であるドーパミントランスポーター(DAT)、ノルエピネフリントランスポーター(NET)そしてセロトニントランスポーター(SERT)を安定的に発現する細胞株を作成し、生物学的応答をもとに薬理効果から薬物の種類を推測可能なスクリーニングシステム構築を試みた。マルチクローニングサイトに DAT、NET そして SERT 遺伝子を挿入したベクター CMV6-Entry と Viafect を用いて CHO 細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DAT および SERT タンパク質を発現する安定細胞株を得ることができた。今後は、この細胞を用いて各モノアミントランスポーター機能の確認を進め、ラジオアイソトープを使用しない簡便で正確なスクリーニングシステムの構築を行う。

A. 研究目的

薬物乱用は若年層を中心に浸透しているのが現状であり、麻薬として規制されている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の乱用などは、依然大きな社会問題である。一方で、近年の新たな傾向として麻薬等に規制されている薬物と類似の構造を持つ化合物をいわゆる脱法ドラッグとして乱用するケースが急増している。これは、すなわち違法薬物の乱用から法的に処罰を受けない未規制薬物の乱用へと流行がシフトしていることを現している。また、脱法ドラッグ乱用の増加に伴い、意識障害、嘔吐、けいれん、呼吸困難

などの健康被害が報告されている。こうした脱法ドラッグの取り締まりには包括規制を導入するなど様々な対策が行われている。しかしながら、脱法ドラッグは、ハーブ、リキッド、パウダーなど様々な形態で流通しており、これらの製品からの薬物検出には高価な分析機器と熟練のオペレーターが必須であり、また解析結果を得るまでに時間がかかるため、迅速な販売停止および取り締まりに位たるまでに時間を要している。そこで本研究では、流通している脱法ドラッグより、迅速かつ簡便に薬物を検出可能なシステム構築として、培養細胞を用いたスクリーニングシステムの構築を試みた。カチノン系誘導体の薬理作用

は、脳内の神経伝達物質であるドパミン、ノルエピネフリンやセロトニンの遊離促進やこれらを運搬するトランスポーターの働きを阻害するモノアミン再取り込み阻害作用を有している。本研究では、薬物検出スクリーニングシステムで用いる培養細胞として、メタンフェタミン、カチノン系誘導体の作用点であるドパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニントランスポーターをそれぞれ安定発現させた細胞株の樹立を行う。

B. 研究方法

1. CHO 細胞への遺伝子導入

Human dopamine transporter (hDAT, NM_001044; Gene Symbol: SLC6A3)、human 5-HT transporter (SERT, NM_001045; Gene Symbol: SLC6A4)および human norepinephrine transporter (NET, NM_005230; Gene Symbol: ELK3)のプラスミドを adgdege 社より入手し CMV6-Entry (C-terminal Myc and DDK Tagged; ORIGENE, Rockville, MD)に組み込んでタンパク質の発現安定株作成に使用した。本ベクターの特徴は、ORF の C 末端側に Myc タグおよび DDK タグがついており、tagged Protein(タグ融合タンパク質)発現に最適化されている(図 1)。CMV6-Entry の ORF 領域には DAT、SERT および NET の DNA プラスミド(図 2)が組み込まれており、薬剤選別のためにネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている。本プラスミドベクターを用いて CHO 細胞に遺伝子導入を行った。CHO 細胞は、3.5 cm ディッシュを用いて 10%FBS-DMEM/F12 (P/S は不含)中で 2.5×10^5 数となるように調製し 24 時間培養した。遺伝子導入試薬は ViaFect (Promega)を使用した。Opti-MEM I (Life Technologies)を 2 本のマイクロチューブに 125 μ L ずつ用意した。1 本目のマイクロチューブでは、プラスミドベクター 2.5 μ g : Opti-MEM I 125 μ L の割合で混合した。もう一方のマイクロチューブには、ViaFect 7.5 μ L : Opti-MEM I 125 μ L の割合で混合した。その後

2 つの溶液を混ぜて 3 秒ほどボルテックスで混和し、室温で 10 分間静置した。2.5 mL の 10%FBS-DMEM/F12 (P/S は不含)で培養している CHO 細胞に ViaFect とプラスミドベクターの混合物(250 μ L)を加え、ディッシュをゆすって拡散させた。インキュベーター内で 48 時間 37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO₂条件下で培養した。

2. プラスミドベクター導入細胞の薬剤選別

プラスミドベクターにはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている。そこで遺伝子導入が成功した細胞のみを失敗した細胞を選別するために薬剤選別培地を調製し、ネオマイシン耐性株のみが生き残るまで薬剤選別を行った。培養を開始する前に CHO 細胞のネオマイシンに対するキルカーブの検討を行った。ネオマイシンは、Geneticin® reagent (Life Technologies, Inc.)を用いた。Geneticin 濃度は、0.5 mL/500mL、1 mL/500mL、5 mL/500mL、8 mL/500mL、10 mL/500mL、20 mL/500mL の条件で CHO 細胞を 7 日間培養し最適濃度を決定した。プラスミドベクターを導入した CHO 細胞は、トランスフェクションの 48 時間後に最適な Geneticin 含有薬剤選別培地にて継続的に培養した。培地は 3 日毎に交換し 3 週間薬剤圧下で培養した。

3. モノアミノトランスポーター mRNA 発現の解析

CHO 細胞より遺伝子導入 48 時間後および細胞継代時に total RNA を回収した。回収方法は、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてそのプロトコルに従った。Total RNA(1000ng)は PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)を用いて cDNA の合成に使用した。この cDNA を用いて DAT、SERT、NET の mRNA 発現解析を行った。Primer 配列は図 3 に示す。

4. モノアミノトランスポーター発現の免疫染色

薬剤選別培地にて培養 3 週間目の CHO 細胞に 4%パラホルムアルデヒドを加え 1 時間室温で固定した。その後 0.5% Triton-x を含む

PBS で細胞を処理した。PBS で細胞を洗浄し、4%FBS 入りの PBS でブロッキングを室温 1 時間行った。一次抗体は、Anti-Dopamine Transporter (1:100, Millipore, Bedford, MA; MAB369)、Anti-Serotonin Transporter (1:100, Millipore, Bedford, MA; AB1594P)、anti-NET (1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を用いて 4°C のオーバーナイトにて抗体反応を行った。TBS-Tween で洗浄を 3 回行った。二次抗体は、Alexa 488 anti-rabbit IgG、anti-rat IgG、anti-mouse IgG (Life Technologies) を 1:100 濃度で TBS-Tween に希釈し、ヘキストを加えて室温で 60 分間反応させた。その後、細胞は TBS-Tween で洗浄を 3 回行った。

C. 研究結果

1. プラスミドベクター導入と薬剤選択

SLC6A3 (DAT) および SLC6A4 (SERT) を導入した CHO 細胞は 48 時間後 8 割程度の細胞集団を確認した。ELK3 (NET) を導入した CHO 細胞では HEK293 と同様に細胞数が他と比べて低かった。トランスフェクションを行った CHO 細胞は、プラスミド含有培地を捨て、Geneticin® reagent を 100 µL/10mL で含む 10%FBS-DMEM/F12 に培地を置き換え細胞の維持継代を行った。CHO 細胞における Geneticin® reagent のキルカーブを調べた結果、Geneticin® reagent の濃度は、5-10 mL/500 mL 濃度において 5 日目の間で CHO をほぼ死滅させた。逆に 20 mL/500mL では 24 時間で細胞が死に始めたため本実験では 5mL/500mL を薬剤選択濃度とした。継代は行わず 3 日おきに薬剤選択培地を交換しながら細胞の維持を行った結果、薬剤選別 1 週間で通常の CHO はほぼ死滅した。SLC6A3 (DAT)、ELK3 (NET) および SLC6A4 (SERT) を導入した CHO は 1 週間経過した時点ではほとんど細胞増殖は認められなかったが 2 週間程度で細胞増殖が認められた。

2. DAT、NET および SERT の発現解析

薬剤選択で維持継代されている樹立安定株より RNA を回収し、RT-PCR 法によって DAT、NET そして SERT の遺伝子発現の確認を行った。その結果、48 時間後からそれぞれ特異的な遺伝子の発現が確認された(図 4)。このとき NET をトランスフェクションした CHO 細胞における遺伝子発現は他の発現株と比較して著しく低かった。これはトランスフェクション後の細胞数も反映していると考えられる。ここからさらに薬剤セレクションを開始し 3 週間目の細胞においてはすべての細胞で遺伝子発現が確認された。

本 RT-PCR の結果から、遺伝子導入を行った CHO は薬剤選択を経て、各トランスポーターの発現した安定発現細胞株の樹立に成功したことを示している。

D. 考察

違法ドラッグとして流通が確認されている覚せい剤 (アンフェタミンおよびメタンフェタミン) 類似化合物、カチノン系誘導体の作用点であるモノアミントランスポーターを安定発現する培養細胞株の樹立を試みた。本研究では、クローニングサイトに SLC6A3 (DAT)、ELK3 (NET) および SLC6A4 (SERT) の遺伝子を導入したベクター CMV6-Entry と ViaFect を用いて、CHO 細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DAT および SERT を安定発現する CHO 細胞株を得ることができた。前年度樹立した HEK293 細胞は薬剤セレクションの途中で発現低下が認められた事、継代を繰り返すうちに細胞の贈職能が落ちる事、さらに NET 遺伝子導入で、HKE-293 細胞が死滅してしまうため、安定株の樹立が難航していた。現在、安定培養している細胞株の中からより均一な細胞集団を得るためのクローニングを限界希釈法で行っている。クローン細胞樹立後、各トランスポーターの機能評価を行うために、トリチウムラベルをしたドパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニンを用いて再取り込み阻害作用を

検討し、トランスポーターの働きを確認する。トリチウムでラベルをした放射性同位体 3,4-Dihydroxyphenylethylamine, [ring-2,5,6-3H]-、5-Hydroxytryptamine, [3H(G)]-, Norepinephrine, levo-[ring-2,5,6-3H]- は PerkinElmer より購入済みである。また、ドパミン取り込み阻害薬として GBR 12909 dihydrochloride(Tocris)、セロトニン取り込み阻害薬として Citalopram hydrobromide (Tocris)、ノルエピネフリン取り込み阻害薬として Desipramine hydrochloride (Tocris)を小購入した。これらを用いて機能が正常に働くモノアミントランスポーターを発現した CHO 細胞株を用いて、アイソトープを使わない簡便で安全かつ正確な薬物スクリーニングシステムを構築し、一般に流通している製品より薬物検出を試みる予定である。また、カチノン誘導体の細胞毒性を迅速に評価するために、効率的なこれらモノアミントランスポーターを発現する神経系細胞株の確立を行い、現在の初代培養による神経細胞を用いた細胞毒性試験もより短時間かつ簡便なスクリーニングを目指す。現在、間様系幹細胞を用いることで効率よく神経細胞の分化誘導が可能となっている(図 6)。今後は、この間様系幹細胞に DAT 等の遺伝子を導入し、これら機能的タンパク質を発現する神経細胞への分化を試みる予定である。

E. 結論

脱法ドラッグに含まれるカチノン誘導体は、非常に強力な中枢興奮作用および精神依存形成能を有している可能性が高く、その乱用は大変危険である。因果関係は明らかではないが、脱法ドラッグ使用中の死亡例や暴力事件も発生していることから、こうした違法性の高い薬物の迅速な取り締まりが求められる。流通規制のための法的整備は、包括規制による類縁化合物の一斉規制や麻薬指定の迅速化によって体制は整いつつある一方で、現場レベルでの製品からの薬物検出には一定の時間

を必要とする現状は問題である。そのため誰もが利用可能で、正確かつ安定した簡便な薬物検出システムの構築は必須である。現在我々は、こうした問題を打開するための薬物スクリーニングシステムの構築および実用化を目指し、本研究でその足がかりとなる培養細胞の作成に成功した。さらにこの樹立安定細胞株は、カチノン誘導体の選択的作用点を有していることから、その細胞毒性の評価も可能であると考えられる。今後は、早期の実用化を目指した研究をすすめていくことになる。

また、我々は培養細胞とは別に動物を用いた行動評価および精神依存性を評価するシステムを構築している。したがって、培養細胞および動物を用いた薬理学的試験を組み合わせた一連の評価システムにより、国内で流通が確認されている違法ドラッグの検出、精神依存性および神経毒性の検討を行い、危険化合物の迅速な発見に活用できると考えられる。また、将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し規制薬物指定への早期の対策に有用であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Tomiyama, M. Funada : Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 274:17-23. 2013.

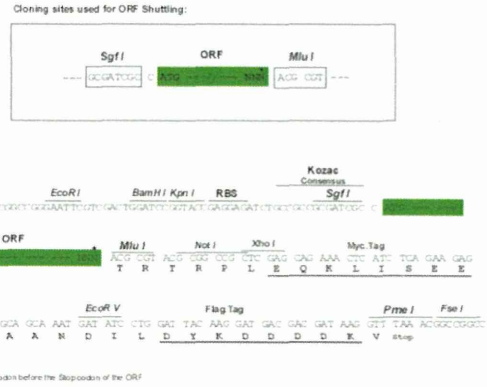
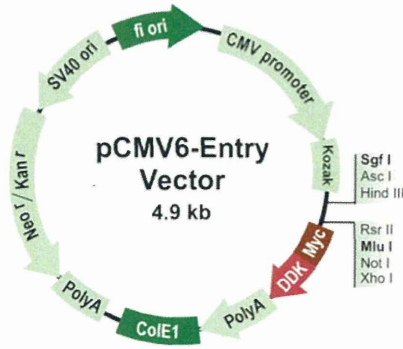
2. 学会発表

- 1) 船田正彦、富山健一、和田清、脱法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドの神経細胞毒性、平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、岡山コンベンションセンター、10 月 5 日・2013 年
- 2) M. Funada, K. Tomiyama, K. Wada, ROLE

OF DOPAMINE SYSTEM IN
EXPRESSING BEHAVIORAL AND
CYTOTOXICOLOGICAL PROPERTIES
OF MDPV IN MICE., 75th Annual
Meeting-College on Problems of Drug
Dependence. June 15-20, 2013, San Diego,
CA, USA.

J. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし。



Vector: pCMV6-Entry (C-terminal Myc and DDK Tagged)

図 1. pCMV6-Entry vector MAP

遺伝子導入のために ORIGENE より販売されているネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ薬剤選択可能なベクターを使用した。

```
>CMV-F 5'-CGCAAAATGGGGCGTAGGCCGTG-3'
TTAGTGAACCCCTCAGAAATTCAGATCGGATACGGGCCCCCCCCCTGGAGCTCGAGCTACGTCACCCGCGGA
CACAGCCGCGGCTGCCCCGAGGACCGGFAAAGTTCCCTTCGCCAGCCGATCCAGTCTTCTGGCGCGGA
TGAACCCGAGGTGCGAGCCGAGAGAACAGGGGGAGACAGGGTCCAGAGCAGGCCCCCTGGGGGCGGAA
AACTCCGGAGCTGCTGGTGGTGAAGAGCGCAACGGCGCTCGAGTGGCTTCCTGGGGCCCGGGAAGCGGAC
CCGAGCCCGGGGAGACTGGGGCAAGAGATCGACTTCCTGCTGCTGCAGAGACGGGGGCCGCTTGAACCGTAC
TGGCCAAAGCTGGCCCTCCCTCCCTACCTGCTACAAAGAACGGGGGCCGCTTGGCTTGAACCGTAC
ACTGTTCCPTATCATCGCGGGAGTCCCTGCTGCTACAGTGGAGCTGGCTCTGGGACAGTCAACCGGGGAG
GGGGCTGCCACCCTTCGAAAAATCTGCCATTCTCAAGAGCTGGCTGATGCTGCTATGCTGATCCGCG
TGTACCTGGCTCTACACAACTCATCATCCGCTGGTGCAGCTACTACTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CAACCTGCCCTGGACGACTTGGGCCAGCTCGAAGAGCCCAACTCTACGAGCCCGAGCTCCCTCAAT
GGCTCCGCTTGGCAACCACAACTGACTCCAACTCAAACTTCAAGCCGCGAGCCGAGTTTATAGAC
GTTGTCCTGCACCTTCAAGAGAGCGGAAATCATACATGGCTGCCCCAATGGAGCTCCGCTGCTGCT
CTGCTGATGCTGCTGCTCATCTGCTGGATTTTAAAC
```

DAT

```
>CMV-F 5'-CGCAAAATGGGGCGTAGGCCGTG-3'
TACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACATAGGGGAGACCAAGCTTTGGTACCGAGCTGGTACCACT
AGTAACGGGGCCGAGTGGCTGGAAATCTCGAGATATCCATCACAAGTGGGGCCGGCTCTAGAAGTAGTGG
ATCCCCGGGCTCGAGGAATCCAAATCCAAAGACCACCCGAGGATCAATGGGATCTTGGCAGATGGACA
TCAGTGTCAATTAACAACAGCAGGAATGGAGAGCAGCGGCTTGAATTCAGAAAGCAGGATATAGGGTGT
GAAGATGGAGAGATTCAGGAAACGGAGTCTACAGAAGGTGTTCCACCCCGAGGGACAAAGTGG
AGTCCGGCAAAATCCAAAGGGGACCGAGCTTCCAGTCCGCTGGGAGATGACACACCGGACCTC
TATCCAGGAGCACCAACCGTGTAGTGGCTAGCTTCCATCAAGGGGACCGGAGACCTGGGGCAAGAG
GTGGATTCCTTCCTGAGTGTGTGGCTGCTGCCTGGACCTGGGCAATGTCTGGGGCTCCCTAGATAT
GTACAGAAATGGAGGGGGGCACTGCTCCTCCCTGAGACATCATGGCCATTTTGGGGAAATCCCGCT
CTTTCATAGGAGCTGGCATGGGAGATCACAGAAATGGATGTCAATATGGAGAAAATCTCC
CCGATTTTCAAGGGATGGTTAGCCACTCATCACTTTCTTATGCTTTCATATTCCTCTACAAACCA
TCATGGCTGGGGCTTACTACTCATCTCTCCTTCAGGGACCA
```

SERT

```
>CMV-F 5'-CGCAAAATGGGGCGTAGGCCGTG-3'
TCGCTACTAGAGAACCACTGCTTACTGGCTTA7CGAAATTAATCGACTCAGTTATAGGGAGACCA
AGCTGGCTAGCTTTAAACTTAAGCTTGGTACCAATGATGATGAAAGCAAATGCTCCCTGGGACTCATGT
CTTCCCTGGTGGCCCCGGTAAAGAGCCCAATCGCTGGGCCCGAAGGAGCTGGAGTCACTCTTTGTCAA
GGAGCAGAAGGGAGTGCAGCTCACCAAGTCCAGCTTCAACCAACCCGGGAGAGCCCGTGGAGGCCAG
GATGGGAGACCTGGGCCAAGAGATCGACTTCTCTGCTGCTCATGCTTGGCTTGTGGTGGACCTGGCCA
ACGCTGGGGCTTCCGCTACCTTGTGCTACAAAATATGGTGGCGGCTTCTGCTGCTCCCTACCTGCTTT
CATGGCTCAPTGCTGGATGCCACTTTTCTACTAGGAGCTGGGGCTTCCGGCAGTCAACAGGGAGGGGCC
GCTGGTGTGGAGATCTGGCCCATAGTAAAGGTGCTGGCGTTCAGGGTCACTGATCTCACTGTATG
TGGCTTCTTCAACAGCTCATGCTGCTGGGCTGGAGCTTCTGCTGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CCCTGGATCCACTGCAACACTTCCGAAAGCCCGCAACTCTGGATGCGCATCTTGGTGACTCCAGT
GGAGCAGCTGGGGCTCAAGCACCTTTGGGACCACTCTGGCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TGCACCTCACCAAGCACTGGACTGBCGACTGGGGCTTCCGCTGGAGCTCAACG
```

NET

図 2. モノアミントランスポーター遺伝子 sequence 解析結果。
pCMV6-Entry の ORF 領域には上記配列の DAT、SERT および NET が組み込まれている。

SERT (319bp) F catctggaaaggcgtcaag
R cgaaacgaagctcgtcatg

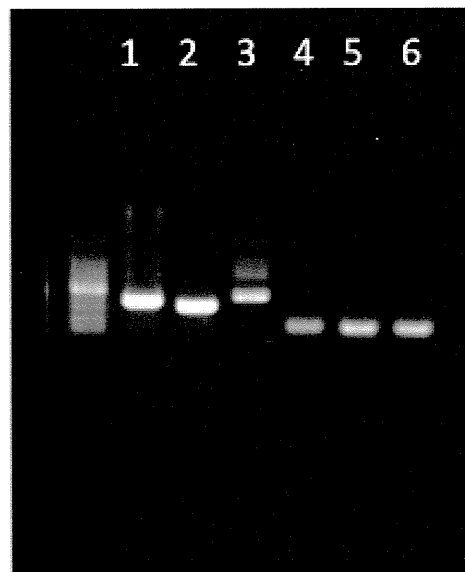
NET (395bp) F CTTCTGGCGCGGATGAA
R ATGGGCAGATTTTCCAAACG

DAT (370bp) F AAGAGCAAATGCTCCGTGGGA
R CCCTGTTGAACTGGCCGAGG

図. 3. トランスポーター遺伝子発現解析用のプライマー配列および各遺伝子のバンドサイズを示す。



トランスフェクション48時間後



トランスフェクション3週間後

図. 4. トランスフェクション CHO の遺伝子発現

EV: empty vector 導入の CHO 細胞、DAT、SERT、NET の順で発現解析。48 時間後では NET 発現はまだ少なかった。トランスフェクション 3 週間後で薬剤圧下における遺伝子発現。1: DAT、2: SERT、3: NET、4: DAT-CHO の GAPDH、5: SERT-CHO の GAPDH、6: NET-CHO の GAPDH。

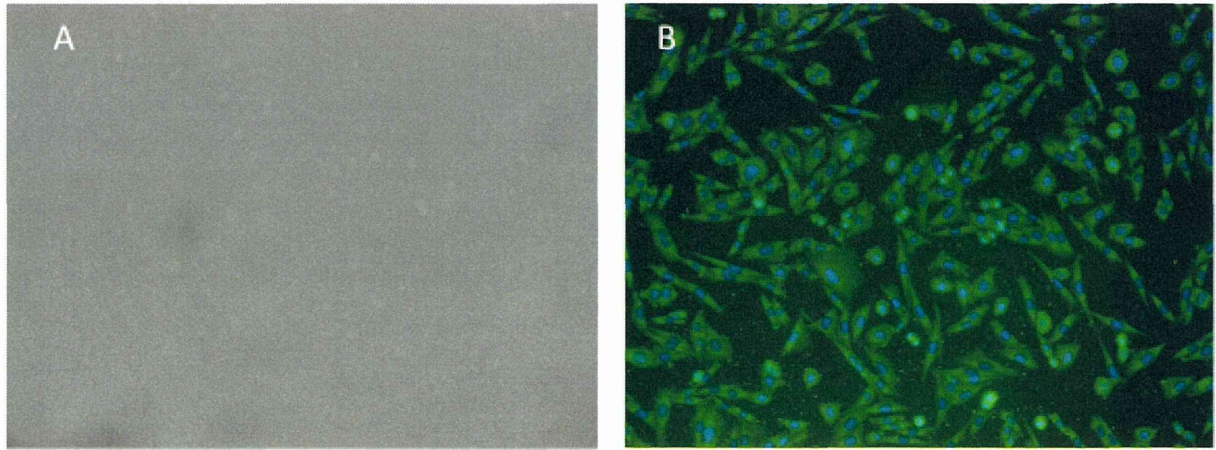


図.5. モノアミントランスポータータンパク発現解析

A: 明視野における CHO 細胞。B: Anti-Serotonin Transporter (1:100, Millipore, Bedford, MA; AB1594P) を免疫染色にて確認した。緑色に染まっている細胞が SERT 陽性細胞である。青色は細胞核を示す。DAT および NET も同様に染色像を示す(data not shown)。

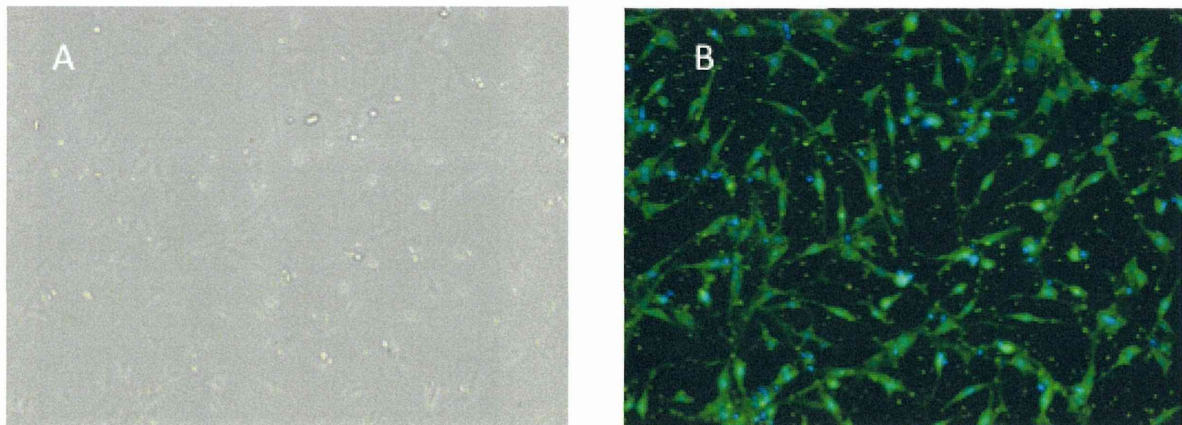


図.6. 間葉系幹細胞からの神経細胞への分化

A: 明視野における間葉系細胞。B: Anti- β tubulin III (1:100, Millipore) を免疫染色にて確認した。緑色に染まっている細胞が β tubulin III 陽性の神経細胞である。青色は細胞核を示す。

分担研究報告書

合成危険ドラッグの神経細胞毒性—構造相関の評価

分担研究者：浅沼幹人（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座神経ゲノム学 教授）
研究協力者：宮崎育子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助教）

【研究要旨】

研究目的：フェネチルアミン系危険（違法）ドラッグ（PCA, 4FMP, PMMA, 「2C シリーズ」の 2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H）、ピペラジン系危険（違法）ドラッグ（PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP）、カチノン系危険（違法）ドラッグ（ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT）のドパミン系・セロトニン系神経毒性と構造との相関を包括的に検討した。結果および結論：覚醒剤 AMP, METH 構造類似体である PCA, 4FMP, PMMA は、いずれの細胞においても AMP, METH と同程度の神経毒性を発現しており、4 位の修飾によるそのモノアミン神経毒性への影響は少ないと考えられた。フェネチルアミン系危険（違法）ドラッグ「2C シリーズ」は、2,5 位に dimethoxy 基を有する共通骨格によりドパミン系・セロトニン系神経細胞に対して、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い毒性を発揮する。さらに、4 位の共通修飾構造がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられた。最近乱用が問題視されている fluoro 基を有するカチノン系危険（違法）ドラッグも含め広義のフェネチルアミン系危険（違法）ドラッグが有するカテコールアミンに類似した骨格が少なくともドパミン系神経細胞に対する強い親和性をもたらすと考えられた。また、カチノン骨格はあまり強い神経毒性を呈さないが、カチノン類のベンゼン環の fluoro 基による修飾はさらにそのドパミン神経細胞毒性を低下させると考えられた。さらに、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の危険（違法）ドラッグの曝露早期における神経細胞障害性を明らかにできることから、迅速かつ感度良く、しかも軽微な細胞障害性を評価できる方法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

これまでに、危険（違法、脱法）ドラッグの培養神経細胞を用いた神経細胞毒性に関する一連の検討を行ってきた。

平成 15-17 年度には、当時脱法ドラッグとして乱用が社会問題となった 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT) および植物由来のハルマラの催覚成分である harmaline および harmine のモノアミン（ドパミン、セロトニン）神経毒性について検討し、これらの薬剤が比較的低濃

度でアポトーシス様細胞死を惹起しうること、さらに合成麻薬 MDMA および覚醒剤メタンフェタミン(METH)との同時併用により細胞毒性ならびにアポトーシスが相乗的に増強されることを明らかにした^{1),2)}。さらに、MDMA の構造類似体のメチロン(平成 19 年 2 月麻薬指定)が単独暴露では強い毒性は示さないものの、MDMA もしくは METH との同時乱用では強いセロトニン神経毒性をもたらすことを明らかにした³⁾。

平成 19 年度は、覚醒剤に構造が酷似しているフェネチルアミン系危険（違法）ドラッグ

である 4-fluoroamphetamine (4FMP : 平成 19 年 4 月より指定薬物)、4-methoxymethamphetamine (PMMA : 平成 19 年 4 月より指定薬物)が、低濃度であっても、低濃度の MDMA もしくは METH との同時併用により、ドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を惹起することを明らかにした⁴⁾。

平成 20 年度は、ピペラジン系危険 (違法) ドラッグ phenylpiperazine (PP), 1-(2-chlorophenyl)-piperazine (2CPP), 1-(4-chlorophenyl)-piperazine (4CPP), 1-(4-methoxyphenyl)-piperazine (4MPP: 平成 19 年 4 月より指定薬物)が、ドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対して、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種の生成を伴う神経障害および細胞死を惹起することを明らかにした。また、アストロサイトに対しても細胞毒性を引き起こすことを明らかにし、これらのピペラジン系危険 (違法) ドラッグが、神経細胞にとって極めて毒性の強い薬物であることを示した。さらに、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、迅速かつ感度良く、しかも定量的に細胞障害性を評価できる方法として、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であることを示した⁵⁾。

また、これらに先立って平成 18 年度には、フェネチルアミン系危険 (違法) ドラッグである「2C シリーズ」と称される薬物群のうち、2,5-dimethoxy-4-propylthiophenethylamine (2CT-7 : 平成 18 年 4 月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4 : 平成 19 年 4 月指定薬物、平成 20 年 1 月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenethylamine (2CT-2 : 平成 19 年 4 月指定薬物、平成 20 年 1 月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I : 平成 19 年 4 月指定薬物、平成 20 年 1 月より麻薬指定)が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞において、規制薬物の MDMA、メチロンや METH

よりもはるかに強い神経毒性を示すこと、またセロトニン系神経細胞においては、低濃度の MDMA もしくは METH との同時併用により、2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I のアポトーシス様の細胞死が相乗的に増強されることを明らかにした⁶⁾。平成 23 年度は、「2C シリーズ」のなかでも 2CT-7, 2CT-2, 2C-I が、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の暴露早期においてセロトニン系神経細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした⁷⁾。平成 21, 22 年度には、「2C シリーズ」のなかでも、規制を免れ、広く流通し、乱用されている 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C: 平成 19 年 4 月より指定薬物)および 2C-C と類似の骨格を有する trichloro-2C-H (T-2C-H)が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い神経細胞毒性を示すこと^{8,9)}、さらに非常に低濃度の T-2C-H はセロトニン系神経細胞における 2C-C の神経毒性を増強させること⁹⁾を明らかにした。また、2C-C, T-2C-H は形態変化が認められない低濃度あるいは早期においても細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした^{8,9)}。これらの結果から、フェネチルアミン系危険 (違法) ドラッグの「2C シリーズ」の共通骨格が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を示すと考えられた。

平成 24 年度は、インドールアルカロイド系危険 (違法) ドラッグの 5MeO-DALT について検討し、5MeO-MIPT, 5MeO-DMT と同様に 5MeO-DIPT よりも神経毒性が軽度であることから、5MeO-DIPT のインドール骨格に加え側鎖の diisopropyl 基が強い神経細胞毒性を惹起する可能性を推測できた¹⁰⁾。さらに、カチノン系危険 (違法) ドラッグの ethcathinone (エトカチノン)、覚醒剤類似体の para-chloroamphetamine (PCA)の神経細胞毒性について検討し、セロトニン含有神経細胞にはほとんど毒性を示さないのに対して、ドパ

ミン系神経細胞には中等度の毒性を有することを示した。ethcathinoneと同様にMDMA類似のメチロンが、MDMAに比べて両細胞系に対して比較的毒性が弱いことから、カチノン骨格をとることにより、神経毒性が低下すると推測できた¹⁰⁾。さらに、平成25年度はfluoro基を有するカチノン系危険(違法)ドラッグである2-fluorocathinone (2-FCAT)、3-fluorocathinone (3-FCAT) および4-fluorocathinone (4-FCAT)の神経細胞毒性を検討したところ、ドパミン系・セロトニン系両神経細胞に対してほとんど形態的な毒性を示さないが、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法では形態変化をきたさない濃度でのミトコンドリアでの活性酸素生成の亢進という細胞障害性を検出することができた。

危険(違法)ドラッグはその構造が規制薬物に類似しており、規制薬物に指定されても次々に別の類似構造をもつ化学物質が乱用されていることから、危険(違法)ドラッグおよび規制薬物の神経毒性と構造相関を明らかにし、薬物乱用の危険性および神経毒性を予測することが急務となっている。

そこで、本年度はこれまで明らかにしてきた多種のドラッグの神経毒性を包括的に、特に毒性構造相関を再評価した。具体的には、平成19年度～平成25年度までにその神経細胞毒性を検討したフェネチルアミン系危険(違法)ドラッグ(PCA, 4FMP, PMMA, 「2Cシリーズ」の2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H)、ピペラジン系危険(違法)ドラッグ(PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP)、カチノン系危険(違法)ドラッグ(ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT)のドパミン系・セロトニン系神経毒性と構造との相関を検討した。

B. 研究方法

1. モノアミン系培養神経細胞への危険(違法)ドラッグ暴露

マウス由来ドパミン含有細胞CATH.a細胞(1.0×10^5 cells/cm²)およびラットモノアミン

系セロトニン含有神経細胞株B65細胞(3.1×10^4 cells/cm²)を用いて、それぞれ継代24、48時間後に、危険(違法)ドラッグPCA, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H, PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP, ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT(最終濃度50 μM~2 mM)を添加し、3、24時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性の指標として培地中へのLDH放出量を測定した。また、細胞を4% paraformaldehydeによる固定の後、Hoechst33342による核染色を行い、アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

2. モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞への危険(違法)ドラッグ暴露早期のミトコンドリアでの活性酸素種生成の評価

モノアミン系セロトニン含有神経細胞株B65細胞(3.1×10^4 cells/cm²)を用いて、継代48時間後に、PCA, 2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H, PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP, ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT(最終濃度50 μM~500 μM)添加3時間後のミトコンドリアにおける活性酸素種生成を、活性酸素種に対する蛍光指示薬であるMitoTracker CM-H₂XRosを用いて検出した。

C. 研究結果

1. モノアミン系培養神経細胞へのPCA, 4FMP, PMMA暴露の効果

フェネチルアミン系危険ドラッグのなかでも覚醒剤アンフェタミン(AMP), METH構造類似体であるPCA, 4FMP, PMMAのドパミン系培養神経細胞CATH.a細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞B65細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した(表1-1)。

ドパミン系培養神経細胞CATH.a細胞への24時間添加では、PCAは500 μM以上という比較的高濃度で細胞死が惹起された(LDH放出量によるIC₅₀:約1 mM)。4FMPは1 mM

から細胞死がみられ、2 mM においてはじめて著明な LDH 放出量増加が認められた (LDH 放出量による IC₅₀: >2 mM)。PMMA については、さらに細胞毒性は軽度で、形態変化、LDH 放出量ともに 2 mM 以上で障害が認められた。これらは、METH, MDMA 単独添加の場合にみられる、1 mM 以下では LDH 放出量は不変で、1-2 mM 以上で有意に増加するという細胞毒性とほぼ同レベルの結果であった。

セロトニン含有 B65 細胞への添加においては、4FMP と PMMA は CATH.a 細胞への添加と同様に 2 mM 以上ではじめて障害が認められた。しかし、PCA は、セロトニン含有 B65 細胞に対して比較的強い毒性を示し、250 μM 以上の 3 時間暴露により細胞死、アポトーシス様形態変化およびミトコンドリアにおける活性酸素種生成 (MitoTracker CM-H₂XRos のシグナル) の増加がみられた。

2. モノアミン系培養神経細胞への「2C シリーズ」暴露の効果

フェネチルアミン系危険ドラッグ「2C シリーズ」の 2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H のドパミン系 CATH.a 細胞とセロトニン含有 B65 細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した(表 1-2)。

ドパミン系 CATH.a 細胞への 24 時間添加では、METH, MDMA 単独添加の場合 (LDH 放出量による IC₅₀: >1 mM) に比べ、いずれのドラッグでもはるかに低濃度(50 μM 以上)(IC₅₀: 100-250 μM)で細胞毒性ならびに細胞死を惹起した。LDH 放出量の IC₅₀ で細胞毒性を比較すると、2CT-7 (100 μM)、T-2C-H (100 μM) > 2C-C (150 μM)、2CT-2 (150 μM)、2CT-4 (200 μM) > 2C-I (250 μM) であった。

セロトニン含有 B65 細胞への 24 時間添加においても、METH, MDMA やメチロンの毒性(IC₅₀: 1-2 mM 以上)に比べはるかに高い細胞毒性がみられ、LDH 放出量の IC₅₀ で細

胞毒性を比較すると、T-2C-H (100 μM) > 2CT-7 (150 μM)、2C-I (150 μM) > 2CT-2 (250 μM) > 2CT-4 (300 μM)、2C-C (350 μM) であった。薬剤添加 3 時間後の曝露早期における形態学的変化については、2C-I, 2C-C の 250 μM 以上で細胞質内の空胞化といった変化がみられ、T-2C-H ではより低濃度の 100 μM から細胞体の萎縮ならびに細胞質内の空胞化といった形態変化がみられ、250 μM 以上で著明なアポトーシス様の細胞死がみられた。ミトコンドリアにおける活性酸素種生成は、「2C シリーズ」全ての薬剤において 50-100 μM といった形態変化が認められない非常に低濃度から高まっていた。

3. モノアミン系培養神経細胞へのピペラジン系危険ドラッグ PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP 暴露の効果

ピペラジン系危険ドラッグ PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP のドパミン系 CATH.a 細胞とセロトニン含有 B65 細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した(表 1-3)。

ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞への 24 時間添加では、PP は 2 mM 以上においてはじめて形態学的な変化と著明な LDH 放出量増加が認められ (LDH 放出量による IC₅₀: >2 mM)、これは METH, MDMA, 4FMP, PMMA (LDH 放出量による IC₅₀: >1 mM) と同程度であった。2CPP, 4CPP, 4MPP については 250 μM-500 μM の 24 時間曝露において著明な細胞死が惹起された。形態学的変化、LDH 放出量により細胞障害性を比較すると、4CPP (LDH 放出量による IC₅₀: 300 μM) > 2CPP (500 μM) > 4MPP (LDH アッセイ系への影響のため評価できず) > PP (>2 mM) の順に強かった。

セロトニン含有 B65 細胞への 24 時間添加においても、CATH.a 細胞の場合とほぼ同様の 4CPP (LDH 放出量による IC₅₀: 300 μM) > 2CPP (500 μM) > 4MPP > PP (>2 mM) の順

の細胞毒性が認められた。薬剤添加3時間後の曝露早期における形態学的変化については、PP, 4MPPでは500 μ M以上で、2CPP, 4CPPでは250 μ M以上で細胞体の萎縮を伴う形態変化がみられ、さらに形態変化が認められない低濃度（PPで250 μ M以上、2CPP, 4CPPでは50-100 μ M、4MPPでは100 μ M以上）においても細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成の亢進が認められた。

4. モノアミン系培養神経細胞へのカチノン系危険ドラッグ ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT 曝露の効果

カチノン系危険ドラッグ ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT のドパミン系 CATH.a 細胞とセロトニン含有 B65 細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに曝露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した(表 1-4)。

ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞への24時間添加では、ethcathinone で比較的高濃度の500 μ M以上で形態変化とLDH放出量の増加(IC_{50} =約750 μ M)が認められたのに対して、2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT では曝露最大用量の1 mMまで明らかな細胞障害は認められなかった。

セロトニン含有 B65 細胞への24時間薬剤曝露においては、ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT のいずれの薬剤でも、形態変化およびLDH放出量の増加はみられなかった。しかし、曝露後早期の3時間においては、ethcathinone の比較的高濃度(500 μ M以上)の曝露により、軽度の細胞死と細胞体の萎縮、空胞化、核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化が認められ、2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT でも1 mMにおいてのみ軽度のアポトーシス様形態変化が認められた。薬剤添加3時間後のミトコンドリアにおける活性酸素種生成については、2-FCAT 曝露では変化なかったが、比較的高濃度である500 μ M以上の ethcathinone, 3-FCAT および 4-FCAT 曝露において活性酸素種生成の増加

が認められた。

D. 考察

これまでに、ドパミン系・セロトニン系両神経細胞を用いて危険(違法)ドラッグの神経毒性について検討してきたが、それぞれの毒性発現レベルを比較することで、危険ドラッグの毒性構造相関を包括的に評価することを試みた。

フェネチルアミン系危険(違法)ドラッグのなかでも覚醒剤 AMP, METH 構造類似体である PCA, 4FMP, PMMA は、いずれの細胞においても AMP, METH と同程度の神経毒性を発現していた。これら3剤はいずれもベンゼン環の4位が修飾を受けたものであり、4位の修飾によるそのモノアミン神経毒性への影響は少ないと考えられた。

また、フェネチルアミン系危険(違法)ドラッグのなかで側鎖修飾を受けた類似体の多い「2Cシリーズ」は、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い毒性を発揮した。なかでも 2CT-7, T-2C-H, 2C-C, 2CT-2 がドパミン系神経細胞に対して、T-2C-H, 2CT-7, 2C-I がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い神経毒性を有することが明らかになった。2,5位に dimethoxy 基を有する共通骨格がその強い神経毒性をもたらすと考えられる。また、2CT-7, 2CT-2, 2C-I は、2,5位の dimethoxy 基だけでなく、4位の thiophenethylamine 基、iodophenethylamine 基といった直鎖構造が極めて類似している。このような4位の共通修飾構造がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられる。T-2C-H は、その基本骨格である 2C-C や他の「2Cシリーズ」と同様に、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を示し、その毒性は「2Cシリーズ」のなかでも極めて強く、特にセロトニ

ン系神経細胞においては 2C-C よりも強い神経毒性を発揮する。したがって、3,6 位の chlorophenethylamine 構造は、ドパミン神経毒性には影響しないが、セロトニン神経毒性を増強すると考えられる。

ピペラジン系危険(違法)ドラッグ PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP の両神経細胞における神経毒性は AMP, METH, PCA などとほぼ同程度であり、「2C シリーズ」と比較すれば弱い、特に 2CPP, 4CPP, 4MPP については 50-100 μ M の比較的 low 濃度でも暴露早期からミトコンドリアでの活性酸素種の生成を伴う神経障害および細胞死を惹起することがわかった。さらに、これらピペラジン系危険(違法)ドラッグはいずれも神経保護の面において重要であるアストロサイトに対しても細胞毒性を引き起こすことから⁵⁾、神経細胞にとって毒性の強い薬物と考えられる。

フェネチルアミン系「2C シリーズ」のドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対する強い神経毒性^{6,7,8,9)}に比較して、カチノン系危険(違法)ドラッグの ethcathinone (エトカチノン)、覚醒剤類似体の PCA の細胞障害性は軽度である¹⁰⁾。しかも、ethcathinone、PCA のいずれもセロトニン含有神経細胞には弱い毒性しか示さないのに対して、ドパミン系神経細胞には中等度の毒性を示した。これらの薬剤も広くフェネチルアミン系に包括されること、「2C シリーズ」を含む多くのフェネチルアミン系危険ドラッグがドパミン系・セロトニン系両神経細胞に強い細胞障害性を示すことから、広義のフェネチルアミン系危険(違法)ドラッグが有するカテコールアミンに類似した骨格が少なくともドパミン系神経細胞に対する強い親和性をもたらすと考えられる。さらに、ethcathinone と同様にメチロンが、MDMA に比べて両細胞に対しての毒性が強くないことから³⁾、カチノン骨格を有する薬剤のモノアミン神経細胞毒性は比較的弱いと考えられた。

さらに、カチノン系危険(違法)ドラッグ ethcathinone とその類似体で fluoro 基を有する

2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT の神経細胞毒性については、ethcathinone がドパミン系神経細胞に対して中等度の神経細胞毒性を示すのに対して、2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT はドパミン系・セロトニン系神経細胞のどちらの細胞に対してもほとんど毒性を示さなかった。また、fluoro 基の付加される位置が 2, 3, 4 位のいずれであっても、神経毒性に差異はないことがわかった。これらのことから、カチノン類のベンゼン環が fluoro 基で修飾されることにより、そのドパミン神経細胞毒性が低下すると推測できた。

セロトニン含有神経細胞への暴露早期における細胞障害性についての検討では、「2C シリーズ」全ての薬剤において形態変化が認められない非常に低濃度(50-100 μ M)からミトコンドリアにおける活性酸素種生成(MitoTracker CM-H₂XRos のシグナル)の増加がみられた。また、ピペラジン系危険(違法)ドラッグについても形態変化が認められない低濃度の暴露においても早期にミトコンドリアでの活性酸素種生成の亢進が認められた。さらに、カチノン系ドラッグの 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT のいずれにおいても、高濃度暴露(1 mM)の 3 時間後においてのみ軽度のアポトーシス様形態変化が認められ、LDH 放出量に変化がなかったのに対して、活性酸素種生成の検出法では形態変化をきたさない濃度(500 μ M)でのミトコンドリアでの活性酸素生成の亢進という細胞障害性を検出できた。このように、形態変化がほとんどみられない比較的 low 濃度の危険(違法)ドラッグ暴露早期においてセロトニン系神経細胞内でのミトコンドリアでの活性酸素種生成を検出できる。蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、迅速かつ感度良く、しかも軽微な細胞障害性を評価できる方法として、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であると考えられる。

E. 結論