

令和4年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究(21KC1003)

分担研究報告書

危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる

標的生体分子系の探索研究-2

～モノアミントランスポーターを標的とした

有害性スクリーニングの検討2～

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機構学 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機構学 講師）

【研究要旨】

[緒言] これまでの検討結果から、モノアミントランスポーターへの直接作用が危険ドラッグ/乱用薬物の神経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられたので、昨年度はドパミン・セロトニントランスポーター(DAT・SERT)を恒常的に発現している CHO-DAT 細胞、CHO-SERT 細胞を用いて危険ドラッグの細胞毒性を検討したが、神経毒性が比較的軽度であり、モノアミンの取り込み、貯蔵、放出ができる機構をもつ培養神経細胞株を用いる必要があると考えられた。そこで、今年度は危険ドラッグ/乱用薬物の DAT への作用の有無を評価するために、CHO-DAT 細胞に加えてドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を反応させ、固定後クリック反応でドパミンを蛍光標識することで DAT への競合反応の有無を検出するアッセイ系の構築を試みた。また、マウス線条体の粗膜分画から免疫沈降で得られた DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグ/乱用薬物と反応させ、BEACONにより蛍光偏光を測定することにより DAT への結合活性の有無を評価する *in vitro* 評価系の確立についても試みた。[結果と考察] 非神経細胞 CHO-DAT 細胞でのクリック反応では、アルキン化ドパミンの蛍光は観察できなかった。次に、CATH.a 細胞を用いてアルキン化ドパミン(DAtracer)を反応させ、クリック反応による蛍光標識を行ったところ、DAtracer の DAT への結合と考えられる細胞膜上の蛍光陽性シグナルが、濃度依存的に増加することが確認でき、非標識ドパミンの同時添加により抑制されたことから、DAtracer の DAT への作用に対してドパミンが競合していると考えられ、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーのアッセイ系を確立できた。また、methyldone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制され、DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。しかし、検出される蛍光シグナルは強くなく、一様の変化を示さないものもあり、蛍光シグナル抑制の判断は容易ではなく定量性に課題が残る。危険ドラッグの結合活性の BEACON での *in vitro* 評価系の確立については、免疫沈降では十分な DAT 蛋白量を得ることができなかったため、今後リコンビナント DAT 蛋白を用いて検討する予定にしている。

A. 研究目的

これまでに、培養神経細胞を用いて、危険（違法、脱法）ドラッグの神経細胞毒性に関する検討を行い、毒性発現のプロファイルならびに構造毒性相関を明らかにしてきた¹⁾¹⁴⁾。これらの知見は、一定の構造を有する薬剤を指定薬物にすることで包括的に規制することの必要性、重要性を示すものである。しかし、次々に別の類似構造をもつ化学物質が製造され、流通・乱用されていることから、危険ドラッグおよび類似化学物質の危険性および精神・神経毒性を予測する技術、すなわち精神・神経毒性発現の蓋然性の指標となる生体分子への作用を簡便に迅速に評価できるスクリーニング法の確立が求められている。

平成15年度から平成26年度まで、ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞 B65 細胞を用いて、のちに麻薬指定されたものも含む以下の危険ドラッグの神経毒性および毒性構造相関について検討してきた¹⁾¹⁴⁾。植物由来催幻覚物質：harmaline, harmine, インドールアルカロイド系：5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT), N-isopropyl-5-methoxy-N-methyltryptamine (5MeO-MIPT), 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT), 5-methoxy-N,N-diallyltryptamine (5MeO-DALT), フェネチルアミン系：methydone (メチロン), 4-fluoroamphetamine (4FMP), 4-methoxymethamphetamine (PMMA), 「2C シリーズ」 2,5-dimethoxy-4-propyl thiophenethylamine (2CT-7), 2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4), 2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenethylamine (2CT-2), 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I), 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C), trichloro-2C-H (T-2C-H), ピペラジン系：phenylpiperazine (PP), 1-(2-chlorophenyl)-piperazine (2CPP), 1-(4-chlorophenyl)-piperazine (4CPP), 1-(4-methoxyphenyl)-piperazine (4MPP),

カチノン系：ethcathinone (エトカチノン), 2-fluorocathinone (2-FCAT), 3-fluorocathinone (3-FCAT), 4-fluorocathinone (4-FCAT)。その結果、harmaline, harmine 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^{2,3)}、MDMA や覚せい剤 methamphetamine (METH)の構造類似体の methydone, 4FMP, PMMA が、低濃度から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^{3,4,6)}、ピペラジン系 PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP は、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、極めて強い神経毒性を惹起することを明らかにした⁷⁾。フェネチルアミン系「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H が単独で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おいてMDMA やMETH よりもはるかに強い神経毒性をもたらすことを示し、「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セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を示すこと、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ことを明らかにした^{5,8-10,13,14)}。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があることを示し^{1,11)}、カチノン骨格の神経毒性は弱い、そのベンゼン環の修飾はさらにドパミン神経細胞毒性を低下させることも明らかにした^{11,12)}。

平成20年度から平成26年度の各種危険ドラッグのモノアミン系神経細胞への障害性の検討において、蛍光指示薬によるミトコンドリアでの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ドラッグ暴露早期において細胞内での活性酸素種生成を検出できることから、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、乱用薬物の神経障害性の評価

に有用であることを明らかにした⁷⁻¹⁴⁾。

平成 27 年度から平成 29 年度には、危険ドラッグの精神・神経毒性発現の蓋然性を示す共通の作用点となりうると考えられるモノアミン酸化酵素 monoamine oxidase (MAO)の阻害活性について、発光性 MAO 基質による MAO 活性の発光検出システムを用いて検討し、フェネチルアミン系、ピペラジン系、インドールアルカロイド系などの粉末・顆粒状乱用ドラッグの水溶液およびアロマオイルに混じた乱用ドラッグの MAO 阻害活性を高感度で検出できること、小型キット化すれば簡便なスクリーニング法になりうることを明らかにした¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

平成 30 年度、令和元年度は、組織損傷に応じて細胞外へ放出され炎症惹起に働く damage-associated molecular patterns (DAMPs)であり、脳卒中(脳梗塞、脳出血)、脳外傷、てんかん、神経因性疼痛モデルにおいて発現が誘導され、中和抗体投与により神経障害が有意に抑制される¹⁸⁾ことが報告されている核内 DNA 結合タンパク質 High mobility group box-1 (HMGB1)に着目し、METH 急性投与神経毒性モデルマウスでの HMGB1 血中濃度の上昇と神経細胞での核外移行、高体温、ドパミン神経終末の脱落が、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与により有意に抑制できること¹⁹⁾、13 種の乱用薬物、危険ドラッグ(METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C, PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine)のモノアミン系培養神経細胞への曝露早期における HMGB1 の核外移行と神経細胞障害性が、2CT-7 を除いて相関しており、HMGB1 発現および核外移行は神経障害、特に神経炎症の鋭敏な指標となりうること²⁰⁾を明らかにした。さらに令和 2 年度には、HMGB1 の核外移行だけでなく、細胞内でのスーパーオキシドなど活性酸素種生成など複数の早期神経障害指標を用いて神経毒性発現の蓋然性をスクリーニングすることが望ましいことを提唱した²¹⁾。

このようなドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞

B65 細胞を用いた危険ドラッグおよび類似関連化合物の神経毒性および毒性構造相関、神経炎症や酸化ストレスの誘導性についての検討結果¹⁾⁻¹⁴⁾から、神経細胞のモノアミントランスポーター、すなわちドパミントランスポーター(DAT)あるいはセロトニントランスポーター(SERT)への直接作用が神経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられた。そこで、モノアミントランスポーターの DAT や SERT を強制発現している細胞を用いることで、より鋭敏に感度よく細胞障害性を評価できないかと考え、昨年度令和 3 年度は DAT, SERT を恒常的に発現している chinese hamster ovary (CHO)細胞(CHO-DAT, CHO-SERT)を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ曝露による細胞毒性および形態変化について検討したところ、2CT-7, 2CT-4, 2C-C, harmaline, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, PP で細胞死およびアポトーシス様の形態変化が認められたが、CATH.a 細胞、B65 細胞に比べ軽度であり、特に METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA などのフェネチルアミン系ドラッグの細胞毒性は、CATH.a 細胞や B65 細胞では顕著であるのに比べ、CHO-DAT 細胞、CHO-SERT 細胞では全く認められなかった²²⁾。これらより、危険ドラッグの細胞毒性発現には神経伝達物質の存在および放出が必要であり、細胞毒性を評価指標にするにはモノアミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもっている培養神経細胞株を用いる必要があると考えられた²²⁾。

そこで、今年度は危険ドラッグ/類似関連化合物の DAT への作用の有無を評価するために、DAT 恒常発現 CHO-DAT 細胞に加えて、ドパミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもっているドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミンおよび危険ドラッグ/乱用薬物を細胞に添加・反応させた後に固定し、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、標識ドパミンと危険ドラッグ/乱用薬物の DAT への競合反応の有無を検出するクリックケミストリーでのアッセイ系の構築を試みた。また、マウス線条体の粗膜分画から DAT 抗体に

よる免疫沈降で得られた DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグあるいは類似関連化合物と反応させ、BEACON により蛍光偏光を測定することにより DAT への結合活性の有無を評価する in vitro 評価系の確立についても試みた。

B. 研究方法

1. クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた DAT 恒常発現 CHO 細胞およびドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞における危険ドラッグの DAT への作用の評価

ラット DAT の遺伝子導入により作成された DAT 恒常発現細胞株である CHO-DAT 細胞 (十川千春先生より分譲) を用いた²³⁾。親株の CHO 細胞も対照として用いた。CHO-DAT 細胞、CHO 細胞を継代して 96 ウェル培養プレートに播種して (1.0×10^5 cells/cm²)、48 時間後に、1-100 μ M アルキン化ドパミン (DAtracer) および危険ドラッグあるいは類似関連化合物を細胞に添加し、37°C で 30 分間反応させる。4% paraformaldehyde で固定した後、Cu⁺触媒下で蛍光アジド (2.5 μ M Azide fluor 488) とのクリック反応 (室温、30 分間) により細胞膜上の DAT に結合あるいは取り込まれたドパミンを蛍光標識する。PBS による洗浄の後、蛍光強度を測定することで、標識ドパミンと危険ドラッグ/類似関連化合物との DAT への競合反応の有無を検出する。

また、ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を継代して 96 ウェル培養プレートに播種して (5.0×10^5 cells/cm²)、48 時間後に、10 種の乱用薬物/危険ドラッグ: METH (最終濃度 2 mM), MDMA (1 mM), methyline (2 mM), 4-fluoroamphetamine (4FMP: 2 mM), 4-methoxymethamphetamine (PMMA: 2 mM), phenylpiperazine (PP: 2 mM), 2,5-dimethoxy-4-propylthio-phenethylamine (2CT-7: 250 μ M), 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT: 2 mM), N-isopropyl-5-methoxy-N-methyltryptamine (5MeO-MIPT: 2 mM) および harmaline (250 μ M) あるいはドパミン (50 μ M) を添加し、次いで 1-

100 μ M アルキン化ドパミン (DAtracer) を添加し、37°C で 30 分間反応させる。固定後、上述の蛍光アジド (2.5 μ M Azide fluor 488) とのクリック反応 (室温、30 分間) により細胞膜上の DAT に結合あるいは取り込まれたドパミンを蛍光標識して、蛍光強度の測定および蛍光顕微鏡による蛍光シグナルの観察を行い、標識ドパミンと危険ドラッグ/類似関連化合物との DAT への競合反応の有無を評価する。

2. 線条体粗膜分画からの DAT 蛋白に対する危険ドラッグの結合活性の in vitro 評価系

マウス線条体組織 (約 15 mg) を protease inhibitor 入りの PBS 200 μ l でホモジナイズし、12,000 rpm, 20 分間遠沈し粗膜分画を得る。線条体粗膜分画から DAT 抗体による免疫沈降 (Dynabeads Protein G IP kit) で得られた DAT 蛋白を抽出する。DAT 蛋白を Alexa Fluor 488 labeling kit を用い蛍光標識し、蛍光標識 DAT 蛋白と危険ドラッグあるいは類似関連化合物と反応させ、BEACON により蛍光偏光を測定し、DAT への結合活性の有無を評価する。

C. 研究結果

1. クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた DAT 恒常発現 CHO 細胞およびドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞における危険ドラッグの DAT への作用の評価

DAT 恒常発現 CHO-DAT 細胞にアルキン化ドパミン (DAtracer) を添加・反応させた後に固定し、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識したところ、アルキン化ドパミンの蛍光は観察できなかった。

次に、ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミン (DAtracer) を反応させ固定後、蛍光アジドとのクリック反応によりドパミンを蛍光標識するクリックケミストリーを行った。DAtracer の濃度依存的に DAT への結合と考えられる細胞膜上の蛍光陽性シグナルが検出され、DAtracer (最終濃度 50 μ M) において最大強度を示した (Fig. 1)。この

DAtracer (50 μ M)での蛍光シグナルは、50 μ M 非標識ドパミン添加により抑制されていた(Fig. 1)。さらに、DAtracer (50 μ M)の DAT への結合作用に対する 10 種の乱用薬物/危険ドラッグ (各 500 μ M, 1 mM)添加の影響を調べた。2CT-7, harmaline では著明な神経細胞死のために DAtracer の蛍光シグナルが全く観察できなかった。高用量での神経細胞死とともに、methylone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、DAtracer (50 μ M)の蛍光シグナルが抑制されていた(Fig. 2a-c)。また、インドールアルカロイド系の 5MeO-DMT と 5MeO-MIPT については、高用量での神経細胞死はみられるものの、DAtracer の蛍光シグナルは一樣の変化はなく、明らかな減退はみられなかった。

なお、このクリック反応による DAT に結合したアルキン化ドパミン(DAtracer)の蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡では検出できるものの、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光強度測定で測定できるほど強いものではなかった。

2. 線条体粗膜分画からの DAT 蛋白に対する危険ドラッグの結合活性の in vitro 評価系

培養細胞や動物などを用いない in vitro 評価系を確立することを目指して、線条体粗膜分画から DAT 抗体を抽出し、蛍光標識して危険ドラッグと反応させ BEACON による蛍光偏光の変化により DAT 結合活性を評価することを試みた。しかし、線条体粗膜分画から得られた DAT 蛋白は非常に少なくアッセイ系を確立することはできなかった。

D. 考察

これまでのドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞ならびにセロトニン含有神経細胞 B65 細胞を用いた危険ドラッグおよび類似化学物質の危険性および精神・神経毒性、毒性発現のプロファイルならびに構造毒性相関に関する検討結果¹¹⁻¹⁴⁾から、それぞれの薬剤のモノアミントランスポーター(DAT, SERT)への直接作用が神

経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられたので、DAT を標的とした危険ドラッグの有害性スクリーニング方法の確立を試みた。

1. クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた DAT 恒常発現 CHO 細胞およびドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞における危険ドラッグの DAT への作用の評価

危険ドラッグ/類似関連化合物の DAT への作用の有無を評価するにあたり、ドパミンの DAT への作用を非 RI により可視化する方法として、蛍光標識ドパミンを細胞膜上の DAT に作用させ方法が考えられるが、分子量の大きい蛍光物質によりドパミンの DAT への結合、取り込みが阻害されてしまう可能性が高い。そこで、アルキン化ドパミンを生細胞に反応させ DAT に結合、取り込みさせた後に固定し、蛍光アジドとのクリック反応によりドパミンを蛍光標識するクリックケミストリーの手法を用いた。まず、CHO-DAT 細胞にアルキン化ドパミン(DAtracer)を添加・反応させた後に固定し、クリック反応により蛍光アジドでドパミンの蛍光標識を試みたところ、蛍光シグナルは観察できなかった。昨年度の細胞毒性に関する検討では、CHO-DAT 細胞では危険ドラッグ/類似関連化合物の細胞毒性が比較的軽度であった²²⁾。今回のアルキン化ドパミンによる DAT への作用が CHO-DAT 細胞ではみられなかったことから、危険ドラッグ/類似関連化合物のモノアミントランスポーターへの作用を検討するには、モノアミンの取り込み、貯蔵、放出の機構をもつ培養神経細胞株を用いる必要性が考えられた。

そこで次に、ドパミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもっているドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミンを反応させ、固定後クリック反応による蛍光標識を行ったところ、アルキン化ドパミン(DAtracer)の DAT への結合と考えられる細胞膜上の蛍光陽性シグナルが、濃度依存的に増加することが確認でき、非標識ドパミンの同時

添加により抑制されたことから、アルキン化ドパミン(DAtracer)の DAT への作用に対して非標識ドパミンが競合していると考えられ、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーのアッセイ系を確立できた(Fig. 1)。この CATH.a 細胞におけるクリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いて乱用薬物/危険ドラッグの DAT への作用の評価を行ったところ、主にフェネチルアミン系、ピペラジン系のドラッグ、methylone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、アルキン化ドパミンの蛍光シグナルが同時添加で抑制されており、DAT への競合拮抗作用を有していることが認められた(Fig. 2a-c)。2CT-7, harmaline については用いた用量では神経細胞死、細胞脱落が著明なためにアルキン化ドパミンの蛍光シグナルが全く観察できなかった。これらの結果から、クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いて乱用薬物/危険ドラッグにより蛍光シグナルの抑制、減弱あるいは消失が認められた場合には、DAT への競合拮抗作用ないしは強力な細胞毒性を有していると評価できる。インドールアルカロイド系の 5MeO-DMT と 5MeO-MIPT では、高用量での神経細胞死はみられるものの、アルキン化ドパミンの蛍光シグナルは一部減退がみられるが一様の変化はみられなかったことから、インドールアルカロイド系危険ドラッグの DAT への作用はほとんどみられないのかもしれない。なお、この方法では蛍光強度測定ができるほどの強い蛍光がみられるわけではなく、蛍光顕微鏡での観察によることから強い抑制があれば DAT への作用を判断できるが、蛍光シグナル抑制の判断は必ずしも容易ではなく定量性に問題があるといわざるを得ない。

2. 線条体粗膜分画からの DAT 蛋白に対する危険ドラッグの結合活性の in vitro 評価系

迅速に危険ドラッグおよび類似関連化合物の DAT への結合、取り込み活性を評価するためには、培養細胞や動物などを用いない in

vitro 評価系が有用であると考えられる。そこで、線条体粗膜分画から DAT 抗体を用いた免疫沈降により抽出した DAT 蛋白を蛍光標識して、危険ドラッグと反応させ BEACON による蛍光偏光の変化により DAT 結合活性を評価することを試みたが、線条体粗膜分画から得られる DAT 蛋白量が BEACON アッセイを行うに十分でなくアッセイ系を確立することはできなかった。次年度は、高価ではあるが、ヒトリコンビナント DAT 蛋白を用いて、蛍光標識し BEACON アッセイ系の確立を目指したい。

E. 結論

ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミンおよび危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーでのアッセイ系を構築することができた。methylone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、アルキン化ドパミンの蛍光シグナルが同時添加で抑制され、DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。しかし、検出される蛍光シグナルは強くなく一様の変化を示さないものもあり、蛍光シグナル抑制の判断は容易ではなく、定量性に課題が残る。

線条体の粗膜分画から免疫沈降で得られた DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグ/乱用薬物と反応させ、BEACON (蛍光偏光測定) により DAT への結合活性を評価する in vitro 評価系の確立も試みたが、蛍光を検出できるほどの DAT 蛋白量を得ることができなかった。今後リコンビナント DAT 蛋白を用いた BEACON アッセイ系の確立を検討する。

F. 参考文献

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究.

- 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
 (厚生労働科学特別研究事業)「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P15-24, 2004.
- 2) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P21-42, 2005.
 - 3) 船田正彦, 竹林美佳, 宮崎育子, 浅沼幹人, 青尾直也, 和田 清: ハルミンの薬物依存性ならびに細胞毒性の評価: 植物由来催幻覚成分の有害作用について. 精神保健研究, 61(28): 61-72, 2015.
 - 4) 浅沼幹人, 宮崎育子: 脱法ドラッグ(違法ドラッグ)の構造修飾に基づく神経毒性発現の研究. 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「脱法ドラッグの構造修飾特性とその依存性および神経毒性発現の関連性」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P22-33, 2006.
 - 5) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P30-65, 2007.
 - 6) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P36-64, 2008.
 - 7) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P81-108, 2009.
 - 8) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグによる神経・細胞毒性の発現機序に関する多角的検討. 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P38-55, 2010.
 - 9) 浅沼幹人, 宮崎育子:フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P42-57, 2011.
 - 10) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグの早期神経細胞毒性の簡易迅速評価. 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P37-49, 2012.
 - 11) 浅沼幹人, 宮崎育子:培養細胞を用いた違法ドラッグの神経細胞毒性評価と構造相関. 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). P49-68, 2013.
 - 12) 浅沼幹人, 宮崎育子:培養細胞を用いたカチノン系違法ドラッグの神経細胞毒性評価. 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金

- (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2014.
- 13) 浅沼幹人, 宮崎育子: 合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価. 平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2015.
 - 14) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, 38: 394-408, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s11419-020-00527-w>
 - 15) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～. 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2016.
 - 16) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして2～. 平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2017.
 - 17) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして3～. 平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2018.
 - 18) 西堀正洋: DAMP としての HMGB1 と抗 HMGB1 抗体療法. 日本薬理学雑誌, 151 (1): 4-8, 2018.
 - 19) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発～神経炎症関連分子 HMGB1 を指標にして～. 平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2019.
 - 20) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発～神経炎症関連分子 HMGB1 を指標にして2～. 令和元年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2020.
 - 21) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発～酸化ストレスマーカー dHEt を指標にして～. 令和 2 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者:船田正彦). 2021.
 - 22) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる標的生体分子系の探索研究～モノアミントランスポーターを標的とした有害性スクリーニングの検討～. 令和 3 年度厚生労働科学研究費

補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2022.

- 23) Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Sora, I. and Kitayama, S.: Methylone and monoamine transporters: correlation with toxicity. *Curr. Neuropharmacol.*, 9: 58-62, 2011.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imafuku, F., Miyazaki, I., Sun, J., Kamimai, S., Shimizu, T., Toyota, T., Okamoto, Y., Isooka, N., Kikuoka, R., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Central and enteric neuroprotective effects by *Eucommia ulmoides* extracts on neurodegeneration in rotenone-induced parkinsonian mouse. *Acta Med. Okayama*, 2022, 76(4): 373-383. doi: 10.18926/AMO/63889

2. 学会発表

- 1) 正井加織, 中山裕太, 宮崎育子, 浅沼幹人: ストレプトゾトシン脳室内投与による孤発性アルツハイマー病モデルマウスの行動学的・組織学的検討. 第31回神経行動薬理若手研究者の集い, 福岡 (オンライン), 2022.3.6.
- 2) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 村上真樹, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: 部位特異的アストロサイト-ミクログリア連関がもたらすロテノン誘発ドパミン神経障害. 第95回日本薬理学会年会, 博多 (オンライン), 2022.3.7.
- 3) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 村上真樹, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: 農薬ロテノン曝露による部位特異的アストロサイト-ミクログリア相互連関と

ドパミン神経細胞への影響. 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会, オンライン, 2022.3.28.

- 4) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Murakami, S., Sogawa, C., Sogawa, N., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Region-specific astrocyte-microglia interaction promotes rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity, 第63回本神経学会学術大会, 東京, 2022.5.18.
- 5) 宮崎育子, 西山千春, 菊岡 亮, 名越武, Kyle Quin, 禅正和真, 浅沼幹人: 妊娠・授乳期エポキシ樹脂 BADGE 曝露による新生仔マウス脳発達異常におけるエストロゲン受容体βの関与. 第49回日本毒性学会学術年会, 札幌, 2022. 7. 1.
- 6) 浅沼幹人, 宮崎育子, 都 明希, 小林壯太郎, 津田光希, 小野鈴香, 正井加織: 農薬ロテノン慢性皮下投与パーキンソン病モデルマウスにおける腸管細胞環境の変化. 第49回日本毒性学会学術年会, 札幌, 2022. 7. 2.
- 7) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Targeting zinc-binding protein metallothionein in astrocytes for dopaminergic neuroprotection. The 8th International Symposium on Metallomics, Kanazawa, Japan, 2022.7.12.
- 8) 宮崎育子, 小林壯太郎, 津田光希, 都 明希, 小野鈴香, 正井加織, 浅沼幹人: パーキンソン病の脳腸病態を再現しうるモデル動物における腸管神経障害機構の検討. 第16回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 東京, 2022. 7. 22.
- 9) 宮崎育子, 正井加織, 進 浩太郎, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: パーキンソン病の脳腸病態を再現しうるモデル動物におけるメタロチオネイン発現変化. メタルバイオサイエンス研究会 2022, 京都, 2022. 10. 19.
- 10) 西田優花, 嶋田勝光, 十川千春, 宮崎育子, 富田美穂子, 靄島弘之, 浅沼幹人, 村上 聡, 十川紀夫: 抜歯後組織修復に

おけるメタロチオネインの関与. メタル
バイオサイエンス研究会 2022, 京都, 2022.
10. 20.

- 11) 浅沼幹人, 宮崎育子, 進 浩太郎, 都 明
希, 正井加織, 小林壯太郎, 津田光希,
小野鈴香: パーキンソン病の脳・腸神経
変性を再現できるロテノン曝露モデルマ
ウスにおける腸管細胞環境の変化. 第 96
回日本薬理学会年会, 横浜, 2022. 12. 2.
- 12) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千
春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: パ
ーキンソン病モデルにおける α シヌクレ
イン発現と神経変性へのグリア細胞部位
特異性の関与. 第 96 回日本薬理学会年会,
横浜, 2022. 12. 2.

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

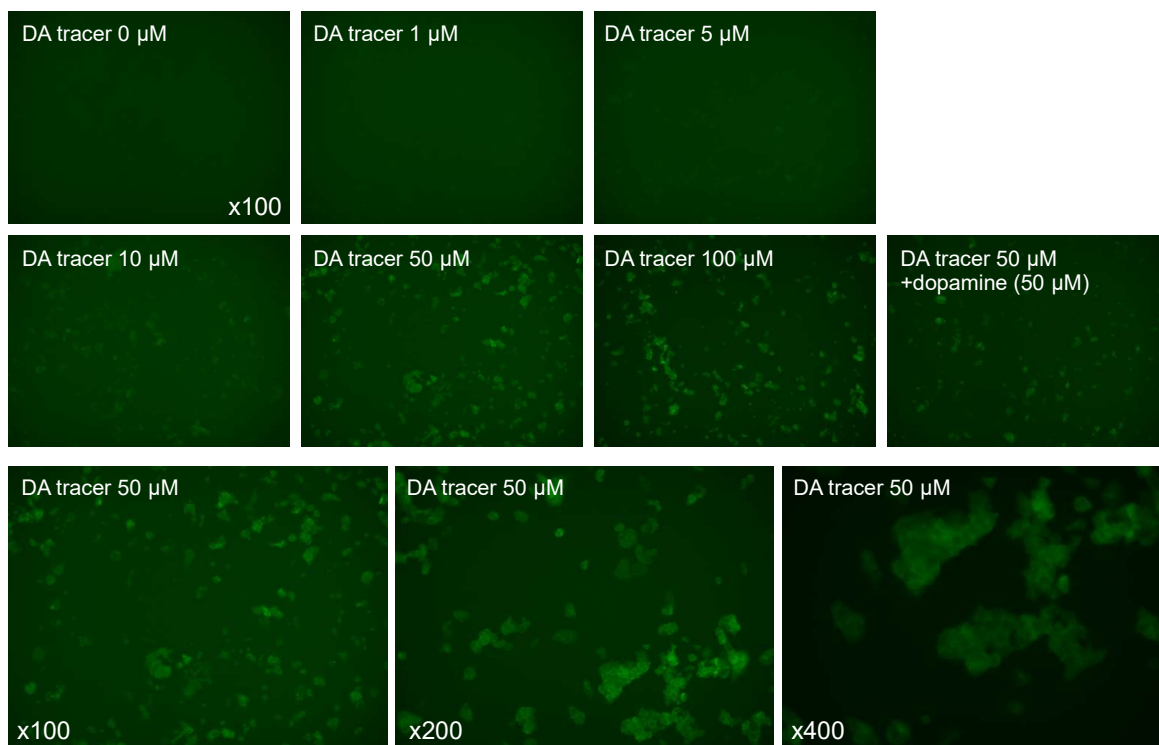


Fig. 1. アルキン化ドパミン(DAtracer)の蛍光アジドとのクリック反応による蛍光標識法を用いたDATへの作用の可視化とそれに対する非標識ドパミンの競合拮抗作用

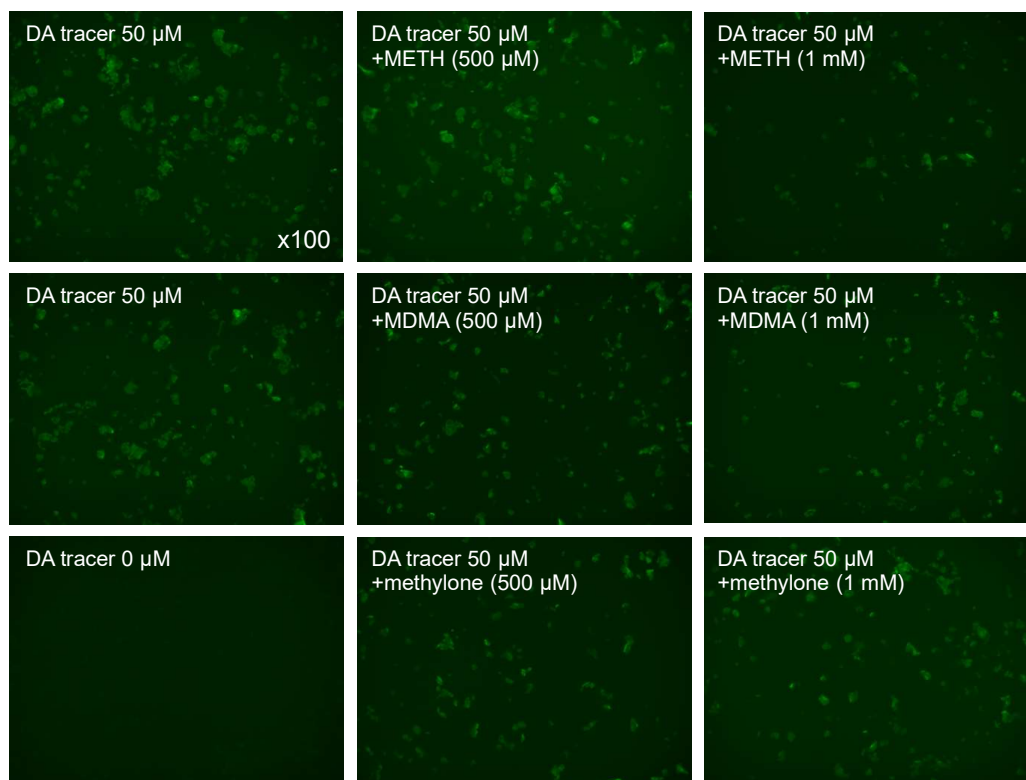


Fig. 2a. アルキン化ドパミン(DAtracer)のDATへの作用とそれに対する各種危険ドラッグ/乱用薬物の競合拮抗作用

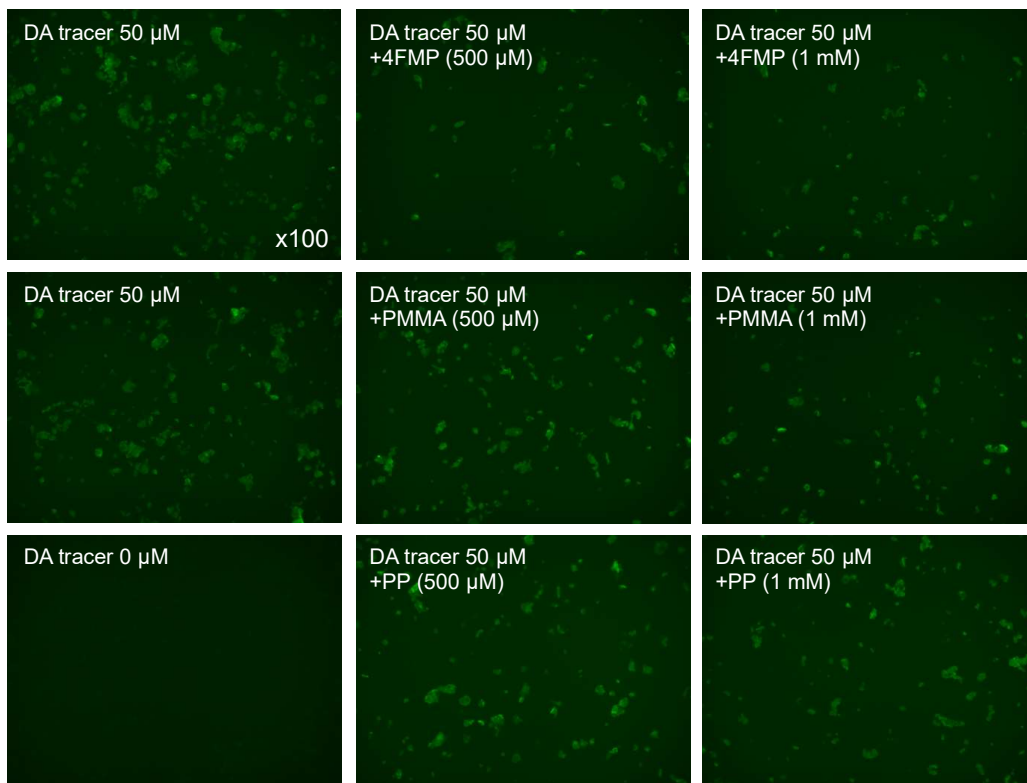


Fig. 2b. アルキン化ドパミン(DA tracer)のDATへの作用とそれに対する各種危険ドラッグ/乱用薬物の競合拮抗作用

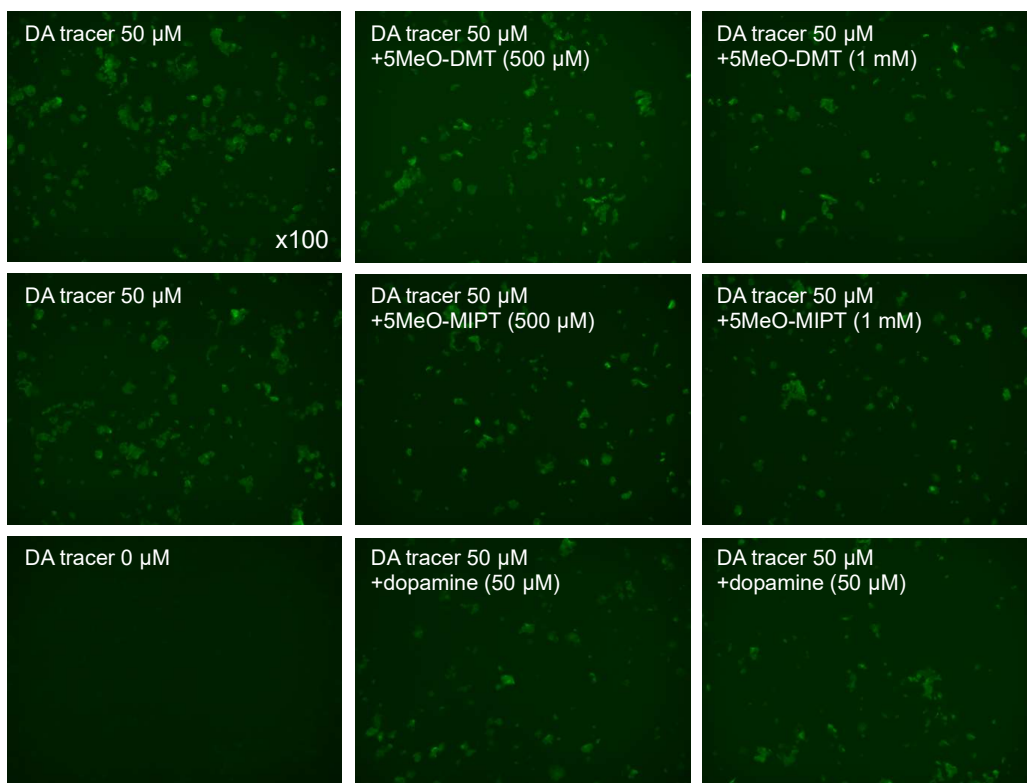


Fig. 2c. アルキン化ドパミン(DA tracer)のDATへの作用とそれに対する各種危険ドラッグ/乱用薬物の競合拮抗作用