

令和 5 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-3

～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3～

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] ドパミン・セロトニントランスポーター(DAT・SERT)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、これまで2年度にわたり、培養細胞を用いた検討を行ってきた。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、いくつかのフェネチルアミン系、ピペラジン系のドラッグが DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。一方、非細胞 *in vitro* 評価系を確立するためには、DAT 蛋白のみならず連関蛋白の存在が重要と考えられる。そこで今年度は、脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)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により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。

[結果と考察] マウス線条体の粗膜分画に 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蛍光シグナルが確認できた。また、フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これら危険ドラッグ/乱用薬物の DAT あるいはドパミンレセプターへの競合拮抗と考えられる作用は、昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーの結果と 4FMP を除いて同様の結果であった。用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。

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⁾⁴⁾。

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関連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: methylone (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 methylone, 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¹¹⁾、カチノン骨格の神経毒性は弱い¹¹⁾が、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¹¹⁻¹⁴⁾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、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⁾。

昨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、ドパミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもつ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、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を構築することができた²³⁾。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、ドパミンとこれら危険ドラッグ/乱用薬物の DAT への競合拮抗作用を検出した。また、マウス線条体の粗膜分画からの免疫沈降で得られた DAT 蛋白を用いた in vitro 評価系の確立についても試みたが DAT への結合を検出することができなかった。非細胞系において DAT への作用の有無を評価するためには、DAT 蛋白のみならず関連蛋白の存在が重要と考えられた。

そこで、今年度は脳組織粗膜分画に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)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により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。

B. 研究方法

クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた危険ドラッグの線条体粗膜分画への作用の評価

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、PBS 1 ml で再懸濁させ粗膜分画標品を得た。粗膜分画標品 100 μ l/well をゼラチンコートした 96 穴プレートに添加して 4°C で 30 分間静置した。PBS での洗浄の後、6 種のフェネチルアミン系、ピペラジン系の乱用薬物/危険ドラッグ：METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, PP あるいはドパミン(各最終濃度 50 μ M)を添加し、次いで 100 μ M アルキン化ドパミン(DAtracer: 最終濃度 50 μ M)を添加し、37°C で 30 分間反応させた。さらに PBS による洗浄の後、Cu+ 触媒下で蛍光アジド(12.5 μ M Azide fluor 488)とのクリック反応(室温、30 分間)により粗膜分画標品に結合したドパミンを蛍光標識して、PBS による洗浄の後、蛍光強度の測定(ex 488 nm, em を行うことで、標識ドパミンと危険ドラッグ/類似関連化合物の粗膜分画標品への競合反応の有無を評価した。

C. 研究結果

クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた線条体粗膜分画への危険ドラッグの作用の評価

マウス線条体の粗膜分画に DAtracer を反応させ、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い蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光強度測定を行ったところ、DAtracer (50

μ M)の DAT への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた。

また、DAtracer (50 μ M)とともにフェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物(各最終濃度 50 μ M)の添加を行ったところ、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された(表 1)。しかし、今回用いた濃度(各最終濃度 50 μ M)では methylone, 4FMP, PP での DAtracer の蛍光シグナルの明らかな抑制は認められなかった。

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¹⁾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、これまで2年度にわたり、培養細胞を用いた 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てきた。特に昨年度は、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²³⁾。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。この細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーでは、DAT への競合拮抗作用を可視化できるものの、細胞培養の必要があること、定量性が不十分であること、蛍光シグナルの抑制が DAT への競合拮抗作用によるのか強力な細胞毒性・細胞死によるものか判別するのが難しいことなど問題があった。

一方で、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、培養細胞を用いない非細胞系 in vitro 評価系が有用であると考えられる。非細胞系において DAT への作用の有無を評価するためには、DAT 蛋白のみならず関連蛋白の存在が重要と考えられた。そこで今年度は、脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)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により DAT への競合反応を in vitro で評価することを試みた。

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、昨年度の細胞系での検討²³⁾と同様に、アルキン化ドパミン(DAtracer)を脳組織粗膜分画標品に反応させ DAT に結合させた後に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、マウス線条体の粗膜分画標品に 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 の粗膜分画標品への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた(表1)。昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーにおいて、細胞膜上の蛍光陽性シグナルが、濃度依存的に増加し、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 (あるいはドパミンレセプター) への作用に対して非標識ドパミンが競合していることを確認している²³⁾。今回の DAtracer の粗膜分画標品への結合についての検討では非修飾ドパミン(50 μM)の同時添加により抑制されなかったが、DAtracer はクロム化されにくいものに対して非修飾ドパミンは容易にクロムへ酸化され赤褐色に着色しているので、粗膜分画標品中に存在するモノアミン酸

化酵素など酸化酵素類によりドパミンが酸化され、DAT (あるいはドパミンレセプター) への結合がみられなくなることを示唆しているのかもしれない。

次に、この脳組織粗膜分画標品へのアルキン化ドパミン(DAtracer)の結合活性をみるクリック反応標識法を用いて、フェネチルアミン系、ピペラジン系の乱用薬物/危険ドラッグの DAT への作用の評価を行ったところ、MDMA > METH, PMMA > methyone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーでは、methyone, 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²³⁾、4FMP を除いて同様の結果であり、これらの乱用薬物/危険ドラッグが DAtracer の DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗していることを示していると考えられた。今回の脳組織粗膜分画標品へのアルキン化ドパミン(DAtracer)の結合活性をみるクリックケミストリーでは乱用薬物/危険ドラッグの用量依存性については検討できておらず、粗膜分画標品への非特異的結合を抑制することも今後の課題である。また、培養細胞を用いない非細胞系 in vitro 評価系である利点はあるものの、前述したようにドラッグによっては粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響で結合が阻害される可能性も考えられる。

アルキン化物質とアジド化物質とのクリック反応での蛍光標識法は、アルキン化ドパミン(DAtracer)の DAT への取り込み、結合をみるだけでなく、リガンドをアルキン化あるいはアジド化してクリック反応で標識することにより、様々なトランスポーターやレセプターへの薬物の結合活性の評価できる有用なツールとなりうる。カンナビノイド受容体アンタゴニストのアルキン化物質を用いたクリック反応で、合成危険ドラッグのカンナビノイド受容体への結合活性を評価することも可能であろう。

E. 結論

脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)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により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methyloone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これらの危険ドラッグ/乱用薬物がアルキン化ドパミンの DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗していることを示していると考えられる。

用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。

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) 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-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～. 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」研究報告書（主任研究者：船田正彦）。2023.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 4) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Multifunctional Metallothioneins as a Target for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Antioxidants*, 12(4): 894, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12040894>
- 5) Murata, H., Phoo, M.T.Z., Ochi, T., Tomonobu, N., Yamamoto, K., Kinoshita, R., Miyazaki, I., Nishibori, M., Asanuma, M. and Sakaguchi, M.: Phosphorylated SARM1 is involved in the pathological process of rotenone-induced neurodegeneration. *J. Biochem.*, 174(6): 533-548, 2023. doi: 10.1093/jb/mvad068
- 6) Masai, K., Nakayama, Y., Shin, K., Sugahara, C., Miyazaki, I., Yasuhara, T., Date, I. and Asanuma, M.: Neurogenesis impairment with glial activation in the hippocampus-connected regions of intracerebroventricular streptozotocin-injected mice. *Neurosci. Lett.*, 820: 137598, 2024. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137598

2. 学会発表

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子, 進 浩太郎, 都 明希, 小林壯太郎, 津田光希, 小野鈴香, 小川賢透, 正井加織: 脳・腸神経変性を再現できるパーキンソン病モデルにおける腸管バリア機能の破綻, 炎症反応. 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台, 2023.3.18.
- 2) 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: 中脳神経細胞における α シヌクレイン発現とロテノン誘発神経障害へのグリア細胞部位特異性の関与. 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台, 2023.3.19.
- 3) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Sogawa, C., Sogawa, N., Kitamura, Y. and Asanuma,

- M.: Mesencephalic glia contributes to alpha-synuclein expression and neurotoxicity in parkinsonian model, 第 64 回日本神経学会学術大会, 千葉, 2023.6.1.
- 4) 宮崎育子, 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ドパミン神経障害. シンポジウム: ミクログリア毒性学, 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19.
- 5) 正井加織, 中山裕太, 進浩太郎, 宮崎育子, 浅沼幹人: ストレプトゾトシン脳室内投与孤発性アルツハイマー病モデルマウスにおけるグリア細胞活性化の領域特異性. 第 66 回日本神経化学学会大会, 神戸, 2023.7.6.
- 6) 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: ロテノン曝露による中脳神経細胞における α シヌクレイン発現誘導と神経障害へのグリア細胞部位特異性の関与. 第 17 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres(MDSJ), 大阪, 2023.7.21.
- 7) 浅沼幹人: 危険ドラッグの神経細胞毒性発現の蓋然性スクリーニングにむけた標的
- 生体分子系の探索. シンポジウム: 危険ドラッグにおける乱用・流通規制の現状と研究の最前線, 第 53 回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 2023.9.7.
- 8) 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: パーキンソン病の環境要因農薬ロテノンによる中脳ドパミン神経障害と α シヌクレイン発現へのグリア部位特異性の関与. 第 53 回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 2023.9.7.
- 9) 浅沼幹人, 一瀬愛花, 三澤一華, 小川賢透, 進浩太郎, 宮崎育子: メタロチオネイン発現を誘導するアストロサイトのセロトニン 1A 受容体刺激による神経突起伸長作用の検討. メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜, 2023.10.5-6.

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1 線条体組織粗膜分画へのアルキン化ドパミン(DAtracer)の結合活性の蛍光アジドとのクリック反応による評価と各種危険ドラッグ/乱用薬物の拮抗作用

	蛍光強度
Control vehicle	189.30
Dopamine (50 μ M)	187.38
METH (50 μ M)	134.92
MDMA (50 μ M)	108.23
Methylone (50 μ M)	175.14
4FMP (50 μ M)	197.22
PMMA (50 μ M)	135.89
PP (50 μ M)	247.84