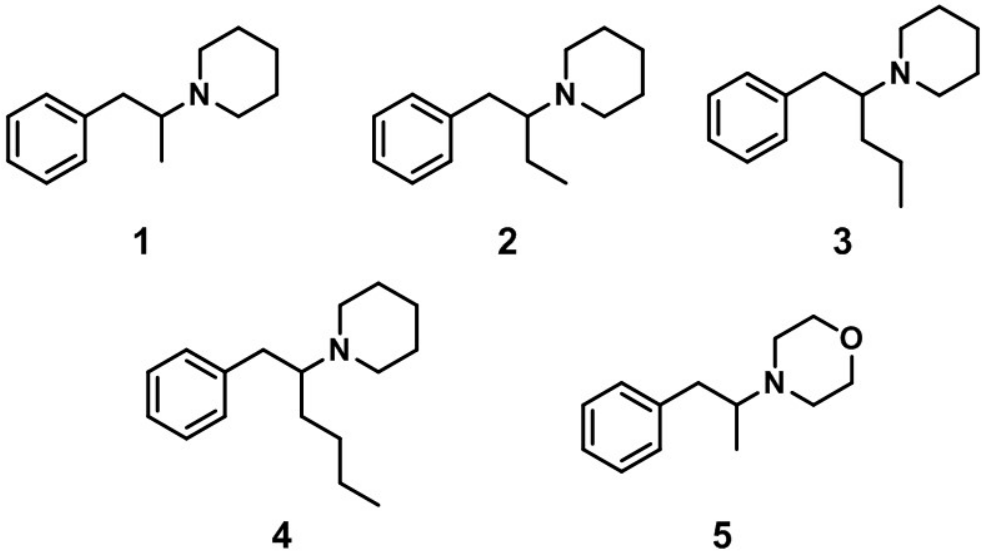
5　ジフェニジンの毒性発現に必要な部分構造同定	太田　茂

【目的】近年、危険ドラッグの蔓延が大きな社会問題となっている。化学物質の工業的利用において障害となる安易な規制を避けるためには、特に強力な作用を有する危険ドラッグの構造を明らかにし、真に危険な化学構造を有する物質のみを優先的に規制する必要がある。そこで本研究では、指定薬物ジフェニジンの毒性発現に、ジフェニジン化学構造のどの部分が重要であるかを明らかにする目的で研究を行った。

【方法】指定薬物ジフェニジンに化学構造の似たフェネチルアミン誘導体を合成し、その一部に関して細胞毒性、ドパミン再取り込み阻害試験、ドパミン放出促進試験、自発的運動量測定試験、条件づけ場所嗜好性試験を行い、構造とこれら活性の相関を調べた。

【結果】化学構造の違いと各活性の関係に一定の相関が認められた。特に化合物 3 は強力なドパミン再取り込み活性を有しており、かつ報酬効果に対する精神依存性が認められた。これらの結果から、ピペリジン構造と、1 位にプロピル基程度の大きさの炭素鎖を有する構造がジフェニジンに関連する毒性に重要であると考えられる。

実験に用いた化合物の構造式



5. ジフェニジンの毒性発現に必要な部分構造同定

太田　茂

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 生体機能分子動態学研究室

Key words：ジフェニジン，危険ドラッグ，神経毒性，興奮作用，精神依存

緒　言

1800 年代に合成されたアンフェタミンは 1900 年代に入るとアメリカで市販薬として販売されはじめ、徐々にアメリカ社会に蔓延していった。我が国においても戦前に疲労回復薬、いわゆるヒロポンとして医薬品として販売されていた。第二次世界大戦に突入すると戦前に立つ兵士の疲労回復薬として大量に合成・使用され、終戦により備蓄が世間に放出された。戦後の混乱の中で覚せい剤は瞬く間に蔓延したため、覚せい剤取締法が制定・施行された。これにより覚せい剤は厳しく規制されることになったが、2000 年頃から覚せい剤の持つフェネチルアミン骨格や大麻の成分であるカンナビノイドの構造を変化させたいわゆる危険ドラッグ（当時は脱法ドラッグと呼ばれていた）が大きな社会問題となった。危険ドラッグは、その化学構造から合成カンナビノイド系、カチノン系、フェネチルアミン系、トリプタミン系などに分類され、少し構造を変化させても薬効が残るため、構造を規制しても次の化合物が出回るというイタチごっこの状態が続いていた。

危険ドラッグの中でも特に強力な興奮作用を有するフェネチルアミン系化合物は、小胞モノアミントランスポーター（VMAT）やドパミントランスポーター（DAT）に作用することでシナプス間隙のドパミン濃度を増加させ、興奮作用を示すと考えられている。また投与されたマウスは運動量が増加し、薬物に対する依存性を示す。これまでに行われてきた危険ドラッグに関する研究のほとんどは、既に出回っている危険ドラッグを対象に化合物標品を用いてサンプルを定量したり、その危険性を動物実験により調べたりするいわば後追いの研究であった。本来であれば、流通する前にあらかじめ真に危険性の高い化学構造を予測し、その化合物および周辺化合物のみを規制する必要がある。そこで本研究では、指定薬物であるジフェニジンの化学構造を基にフェネチルアミン誘導体を合成し、自発的運動量と精神依存の発現に必要な構造の同定を目的とした構造毒性相関に関するパイロットスタディを行った。

方　法

1. フェネチルアミン誘導体の合成

指定薬物であるジフェニジンの化学構造を参考に、ピペリジンを有する化合物を合成した［1］。また、ピペリジン化合物群の中でも特に強い活性を持った炭素鎖が 3 の化合物に着目し、アミンに置換した化合物を合成した。

2. 細胞毒性試験

カテコールアミン系ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y に各化合物を曝露し、WST-1 assay 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 細胞に化合物 1～5 ならびにジフェニジンを曝露した後、トリチウム標識ドパミンを取り込ませ、トリチウム標識ドパミンが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り測定した。各化合物は 0.001～1000 μM で曝露し、陽性対照（PC）として DAT を特異的に阻害する GBR12909 を用いた。

4. ドパミン放出促進試験

SH-SY5Y にトリチウム標識ドパミンを取り込ませた後に化合物を曝露し、一定時間経過後にトリチウム標識ドパミンの細胞内残存量を測定した。各化合物を 0.001～100 μM で曝露し、コントロールとして強力ではないものの小胞モノアミン放出促進作用の知られている内在性物質チラミンを用いた。

5. 自発的運動量測定試験

化合物 1, 3～5 ならびにジフェニジンの 5 化合物を ICR マウスに腹腔内投与し、運動量を測定した。自発的運動量測定試験としてオープンフィールドテストを用いた［2］。

6. 条件づけ場所嗜好性試験（CPP 試験）

化合物 1, 3 ならびにジフェニジンを、ICR マウスに 10 および 30 mg/kg で腹腔内投与し、白黒ボックスを用いた CPP 試験により薬物の報酬効果に対する精神依存性形成を評価した。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る。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およぼすかを評価する。過去の文献［3～5］を参考に、化合物・生理食塩水の投与をそれぞれ 3 日間の計 6 日間、測定時間を 30 分として行った。

7. 統計処理

図 2 においては Tukey の検定を行い、また図 3 においては pretest 群と test 群の分散を F 検定により比較したのち、t 検定を行った。$^{*}p < 0.05$ および $^{**}p < 0.01$ を有意差ありとした。

結果および考察

1. フェネチルアミン誘導体の合成

約 20 種類の化合物を合成し、それらの化合物を NMR で確認した後に塩酸塩化を行った。
このうち図 1 に示す 1～5 の化合物を中心に以下の活性評価を行った。

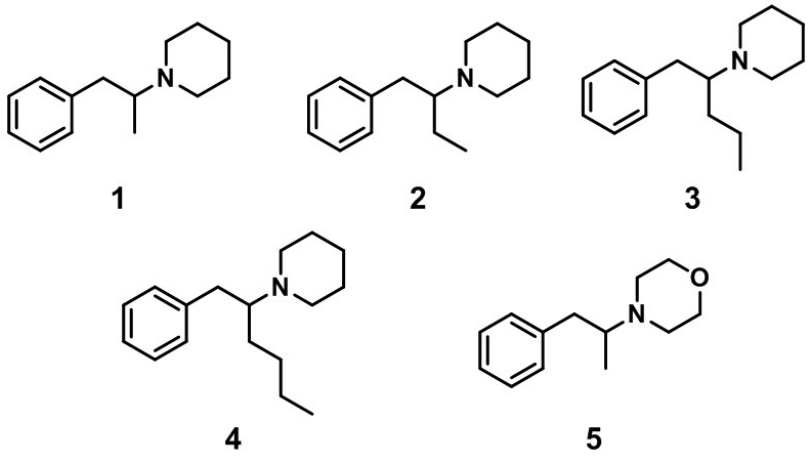


図 1. 実験に用いた化合物の構造式

2. 細胞毒性試験

最高濃度の 1 mM を用いたとき、化合物 3 で細胞生存率が約 50%に、化合物 4 で細胞生存率が 0%となった以外に有意な細胞生存率の低下は認められなかった。炭素鎖の伸長に伴って細胞毒性は増加した。また、アミン部分の置換は細胞毒性に影響を与えなかった。これらの中に強い細胞毒性を有する化合物は存在しないことが明らかとなった。

3. ドパミン再取り込み阻害試験

化合物 3 が IC_{50} 値約 1 μM と、ジフェニジンやその他の検証化合物と比較して強力なドパミン再取り込み阻害活性を示した。また化合物 3 に対し炭素鎖の伸長を行った化合物 4 も 3 と同程度の強い活性を持つことが明らかとなった。それに対して、炭素鎖の短縮に伴い活性の低下が認められ、アミン部分を置換した化合物 5 に関しては、ドパミン再取り込み阻害活性は非常に弱かった。

4. ドパミン放出試験

ドパミン再取り込み阻害活性の強かった化合物 3 に最も強い放出促進作用が認められたがチラミンと同程度であり、1～5 に強力なドパミン放出作用は認められなかった。

5. 自発的運動量測定試験

強力なドパミン再取り込み阻害活性を有する 3 は、自発的運動量の顕著な亢進が認められ、その活性が持続したことから、強力な興奮作用を有することが明らかとなった（図 2）。それに対して、アミン部分の置換を行った化合物 5 において、生理食塩水投与の対照群と比較して自発的運動量は抑制傾向にあった。

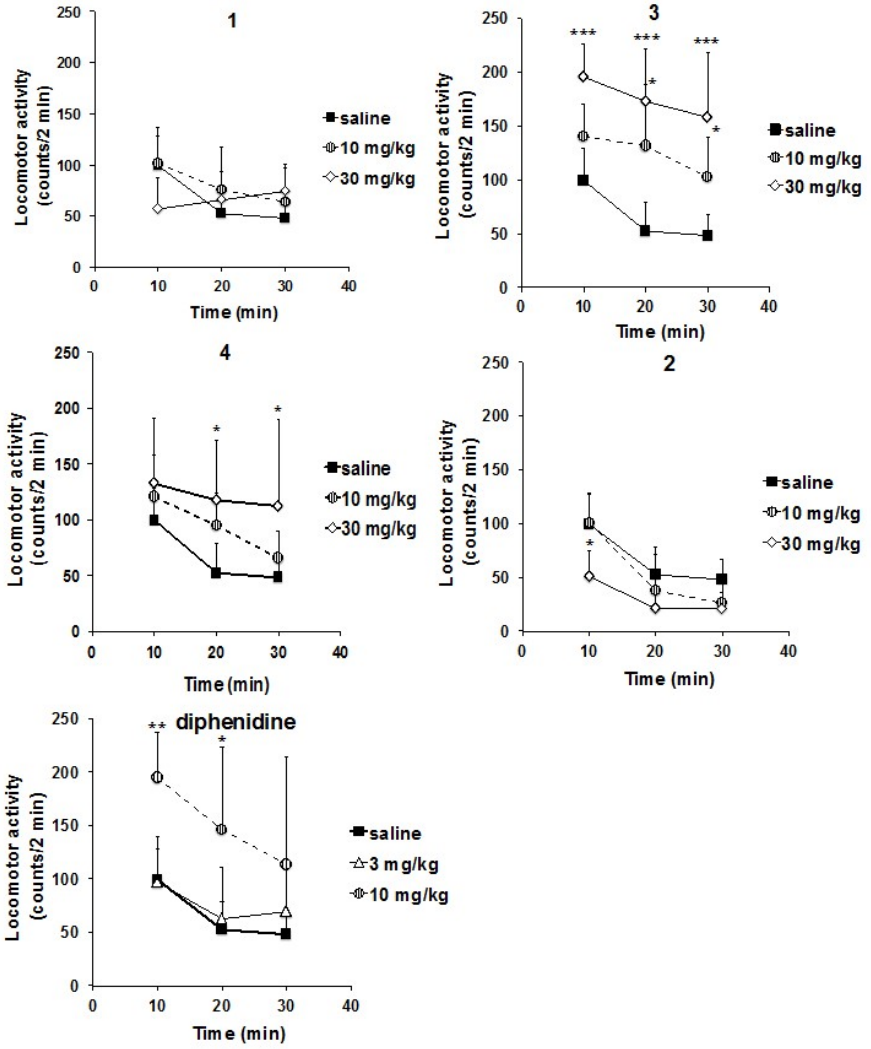


図 2. オープンフィールドテストを用いた自発的運動量の結果

6. 条件づけ場所嗜好性試験（CPP 試験）

化合物 3 において報酬効果に対する精神依存性が認められた（図 3）。化合物 3 は強力なドパミン再取り込み活性を有することから、ドパミン再取り込み阻害作用が 3 の報酬効果に対する精神依存を惹起している可能性が考えられる。

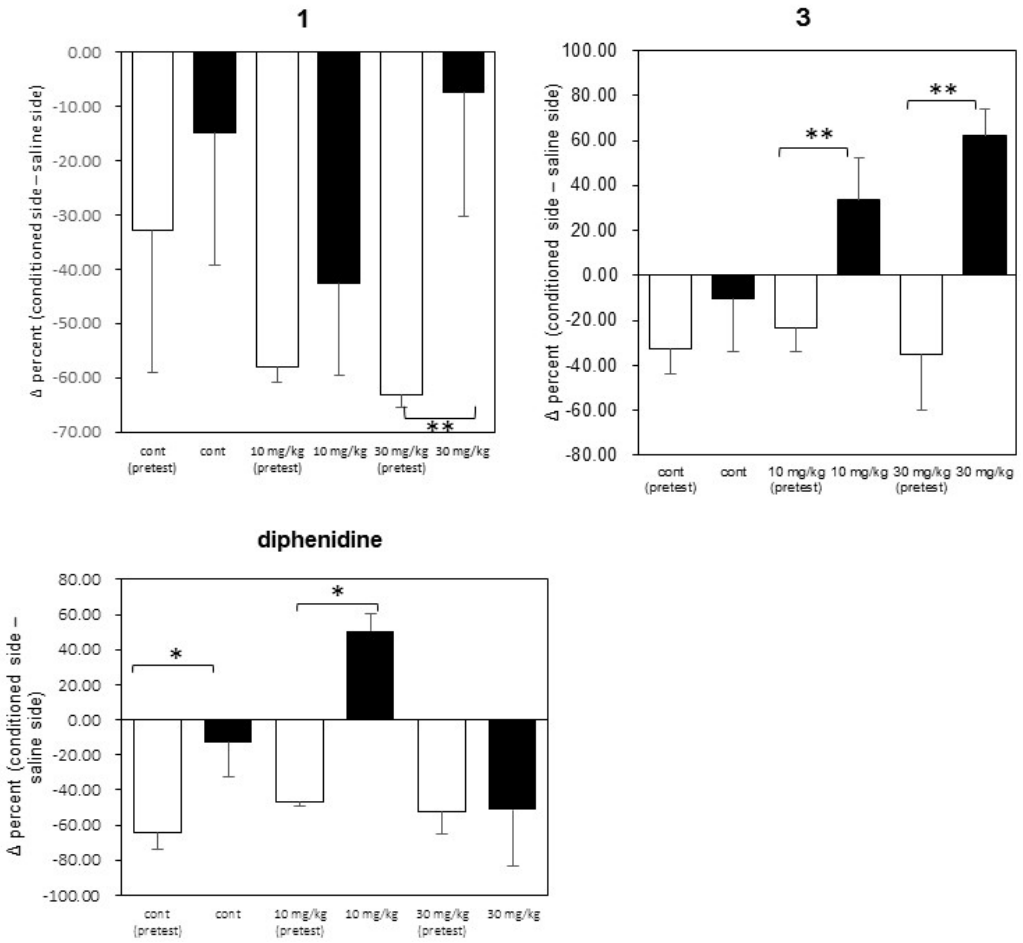


図 3. CPP 試験による条件づけ場所嗜好性の結果

以上の結果をジフェニジンと化合物 3 の化学構造を比較して考えると、ピペリジン構造と、1 位にプロピル基程度の大きさの炭素鎖を有する構造がジフェニジンに関連する毒性に重要であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、広島大学大学院医歯薬保健学研究科生体機能分子動態学研究室において実施されたものであり、ご協力いただいた研究室の皆様に感謝いたします。

文　献

1) Le Gall E, Troupel M, Nédélec J-Y. (2006). One-step three-component coupling of aromatic organozinc reagents, secondary amines, and aromatic aldehydes into functionalized diarylmethylamines. Tetrahedron 62, 9953–9965. DOI:10.1016/j.tet.2006.08.008

2) Cummins RA, Walsh RN. (1976). The Open-Field: A critical review. Psychological Bulletin 83, 482–504. PMID: 17582919

3) Roughan JV, Coulter CA, Flecknell PA, Thomas HD, Sufka KJ. (2014) The conditioned place preference test for assessing welfare consequences and potential refinements in a mouse bladder cancer model. Plos One 9, e103362. DOI:10.1371/journal.pone.0103362

4) He Z, Chen Y, Dong H, Su R, Gong Z, Yan L. (2014) Inhibition of vesicular glutamate transporters contributes

to attenuate methamphetamine-induced conditioned place preference in rats. Behav Brain Res. 267,1-5. DOI:10.1016/bbr.2014.02.047

5) Hensleigh E, Pritchard LM. (2014) The effect of early environmental manipulation on locomotor sensitivity and methamphetamine conditioned place preference reward. Behav Brain Res. 268, 66-71. DOI:10.1016/j.bbr.2014.03.045