

中国製ダイエット食品から検出された
N-ニトロソフェンフルラミンの脳神経系への影響-その2-*

佐藤 かな子, 野中 良一, 大橋 則雄, 中江 大, 小縣 昭夫, 佐藤 毅

中国製ダイエット食品から検出された *N*-ニトロソフェンフルラミンの脳神経系への影響-その2-*

佐藤 かな子**, 野中 良一**, 大橋 則雄**, 中江 大**, 小縣 昭夫**, 佐藤 毅***

米国で肥満症の治療に用いられていたFenfluramine (Fen)のニトロソ誘導体である*N*-Nitrosofenfluramine (*N*-fen)を含む中国製ダイエット用健康食品の摂取後に、死亡例を含む肝障害が多発した。Fenは、セロトニン (5HT) レベルを低下させて、食欲を抑制させる結果、抗肥満作用があることから、*N*-fenを同様の結果を期待して添加されたと考えられる。そこで食欲抑制作用の有無を明らかにするために、*N*-fenを合成し、マウスに経口投与し、脳5HT神経系への影響についてFen投与群と比較検討した。凍結脳切片を用いた定量的オートラジオグラフィの結果、*N*-fenにおいては5HT神経系活動量の低下はほとんど認められなかったが、Fenには強い低下作用を認めた。以上の結果から、*N*-fenにはマウスにおいて5HT神経線維を介した食欲抑制作用は無いことを明らかにした。

キーワード : *N*-ニトロソフェンフルラミン, フェンフルラミン, セロトニン, 中枢神経系,
中国製ダイエット用健康食品

はじめに

中国から輸入された生薬主体のダイエット用健康食品の摂取後に、劇症肝炎や急性肝炎など死亡例を含む重篤な肝機能障害が多発し、その被害者数は800人以上で、うち肝障害による死亡3名が報告された。これらのダイエット食品について肝障害を引き起こす可能性のある物質の特定に厚生労働省が取り組んだ結果、生薬そのものには含有しない化学物質、*N*-nitrosofenfluramine 1-ethyl-1-{1-methyl-2-[3-(trifluoromethyl) phenyl]ethyl}-2-oxohydrazine: *N*-fen (Fig. 1A) の存在が明らかになった。同省は*N*-fenが肝障害を引き起こす可能性があるとして、食品に添加してその製品を販売することを禁止した¹⁾。しかし、*N*-fenに関する基礎的データの報告は無いため、生体作用は全く明らかになっていなかった。*N*-fenは食欲抑制剤として使用されたfenfluramine (*N*-ethyl- α -methyl-*m*-trifluoromethyl-phenylethylamine: Fen) (Fig. 1B) をニトロソ化して得られる化合物である。Fenはセロトニン (5HT) 作動性の食欲抑制剤として米国で肥満治療に医薬品として使用されていたが、心臓に異常を起こす副作用が明らかとなり、1997年に使用が禁止された。また、Fenとハーブ茶との併用によって肝障害が惹起された報告はあるが、Fen自体の副作用として肝障害の報告はなかった²⁻³⁾。しかし、症例報告⁴⁻¹¹⁾より、*N*-fenが薬物性肝障害を起こしたと推測されていた。そこで、我々はマウスに*N*-fenを1週間連続経口投与し、体重減少効果の有無及び肝機能への影響を中心に検討した結果¹²⁾、マウスの摂餌量及び体重に有意な変化は認められなかったが、肝臓および腎臓重量の増加、血清中のアルカリフォスファターゼの上昇、アラニンアミノトランスフェラーゼおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの上昇傾向、ビリルビンの減少

を認めた。さらに、肝臓および腎臓組織像の変化、および肝薬物代謝酵素活性の上昇も認めた。これらの結果から、*N*-fenは胆汁うっ滞を含む薬剤性肝障害及び腎障害を起す恐れがある化学物質であることを報告した¹²⁾。

さらに、Fenは肥満治療に用いられるこの種の薬物の原型である覚せい剤メタンフェタミン (Fig. 1C) やアンフェタミン (Fig. 1D) などの構造類似体である。しかし、Fenは交感神経興奮性のアミンであるが、中枢刺激作用よりも抑制作用が強いという点で、アンフェタミン類とはその薬理活性はやや異なっている。Fenの食欲抑制作用のメカニズムは解明されていないが、脳の視床下部の5HT作動性ニューロンから放出される5HTの再吸収を抑制し、食欲中枢機能を減退させる結果であると考えられている^{14, 15)}。 *N*-fen

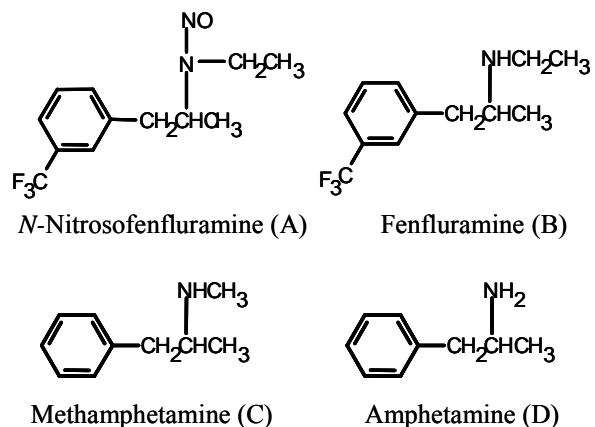


Fig. 1. Chemical Structures¹⁶⁾

* 東京都健安研七報, 57, 381-386, 2006

** 東京都健康安全研究センター 環境保健部 生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*** 東京理科大学理学部

は、Fen同様に食欲抑制効果を期待されてダイエット用健康食品に使用されたものと考えられていたが、*N-fen*の食欲抑制作用の有無についての報告は無かった。そこで、この作用に着目して、*N-fen*の中枢神経系に及ぼす影響を明らかにするために、神経伝達物質であるモノアミン（ドーパミン（DA）、5HT、ノルエピネフリン（NE））を指標とした再取り込み阻害と遊離促進作用をFenと比較検討した結果を前報にて報告した¹⁶⁾。*N-fen*の5HTの再取り込み阻害作用は、Fenの約100-1000分の1と非常に弱く、また、モノアミン遊離促進作用は、Fenと異なりほとんど無かったという前回の実験結果は、*N-fen*には5HT神経線維を介した食欲抑制作用は認められないことを示唆した¹⁶⁾。

今回は、*N-fen*には5HT神経線維を介した食欲抑制作用は無いことをより明らかにすることを目的として、*N-fen*およびFenを投与したマウス脳を用いて、定量的オートラジオグラフィによる5HT神経系への影響を比較検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

(±)-Fen塩酸塩、亜硝酸ナトリウムはWako Pure Chem. Ind. (Osaka, Japan)より特級品を購入した。クロロホルムはKanto Kagaku Co.Ltd. (Tokyo, Japan)特級試薬、シリカゲル(70-230 mesh ASTM)はMerck Ind. (Frankfurter, Germany)、アセトニトリルはNakalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)の液体クロマトグラフィ用を用いた。³H-paroxetine (19 Ci/mmol)はPerkinElmer Inc. (Wellesley, MA)より購入した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2. *N-fen*の合成

前報に従って合成した¹²⁾。(±)-Fen塩酸塩0.535 g (2 mmol)を水8 mlに溶解し、塩酸性条件下で水1 mlに溶解した亜硝酸ナトリウム0.425 g (5 mmol)を氷冷下攪拌しながら滴下した。約1時間反応後、反応液をクロロホルムで抽出した。抽出液を減圧留去し、得られた黄色の油状物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィ（溶出溶媒はヘキサン:酢酸エチル=2:1）で精製して(±)-*N-fen*を得た。収率は90%であった。合成した*N-fen*は、IR、¹H-NMR及びマススペクトルを測定して既知データ¹⁷⁾と比較確認した。純度をこれらのスペクトルデータおよび高速液体クロマトグラフィ（資生堂 ナノスペースSI-1；カラム、ナカライテスクCOSMOSIL 5C₁₈-AR-II；検出器、Photodiode Array Detector WATERS 996；移動層、アセトニトリル:水:リン酸:SDS = 100 ml:100 ml:0.2 ml:1.2 g）で確認した結果、95%以上だった。

3. 被検試薬投与

4週齢のCrj:CD-1(ICR)オスマウス(Charles River Inc., Kanagawa, Japan)を購入し、1週間馴化飼育後、*N-fen*およびFen投与を開始した。*N-fen*投与量は、健康被害をもたらしたダイエット用健康食品の1つであるチャソゲンピの

カプセルを分析した結果、1.9%含まれていたことから算出した。*N-fen*は、ヒトの1日摂取量0.52 mg/kgの100倍量となる52 mg/kgを、Fenは48 mg/kgを投与した。オリーブオイルと混和した被検試薬、およびオリーブオイル（対照群）を各々1日1回午前中に7日間連続強制経口投与した。マウスは、1ケージあたり1匹で飼育し、室温22~24°C、湿度50~60%、照明12時間、換気回数毎時10回の動物室で飼育し、一般飼料(CE-2, Clea Japan Inc., Tokyo, Japan)および水は自由に摂取させた。また、一般症状の観察、体重、摂餌量の測定を毎日行った。動物に関する全ての研究は、UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animalsに従っておこなった。

投与終了24時間後に断頭と殺し、血液を採取後、脳を摘出し、測定まで-80°Cで保存した。

4. 脳内5HTトランスポーターの測定

-80°Cに保存しておいた*N-fen*、Fenおよびオリーブオイル投与マウスの脳を-20°Cに約1時間放置後、凍結切片作製装置を用いて、15 μm厚さの切片を作製した。切片をスライドガラス上に接着し、4°Cで45分間放置後、-80°Cに保存した。定量的オートラジオグラフィの操作は、Apple等¹⁵⁾の方法に従った。切片を室温に戻し、50 mM Tris-HCl緩衝液（含300 mM NaCl, pH7.4, buffer-A）中に15分間浸漬後、1 nM ³H-paroxetine (4,200 dpm/0.1 ml)を含む100 ml buffer-A溶液に室温で90分間反応させた。反応後、切片を4°Cのbuffer-A中に120分間、2回、最後に4°Cの蒸留水に30秒間浸し、洗浄した。4°Cで風乾後、さらに55°Cで10分間乾燥した。乾燥した各切片とスタンダード (³H-Microscales, 3.8-4,070 Bq/mg, Amersham Bio. Corp., NJ, USA)をイメージングプレート (Type BAS-TR, Fuji-Film, Tokyo, Japan)上に室温で2~3週間曝露した。得られた画像をComputer-assisted Device (MCID system, Imaging Research Co. Ltd, Canada)により解析した。

結果

1. 一般症状および脳重量

N-fen、Fen投与群および対照群ともに試験期間7日間における行動、外観の異常および下痢、体重変化などは認められず、投与終了まで全例が生存した。解剖時、脳の重量変化は認められなかった。

2. 脳5HT神経系に対する影響

*N-Fen*を投与したマウス脳について、5HT再取り込み阻害剤であるparoxetineの結合阻害作用をFen及びコントロールとしてオリーブオイル投与群と比較検討することにより、*N-fen*の5HT神経再取り込み部位への影響を調べた。脳オートラジオグラフィの結果をFig. 2に、その画像をコンピューターにて解析し、コントロールに対する結合阻害率をFig. 3に示した。*N-Fen*投与群では、各測定部位において、対照

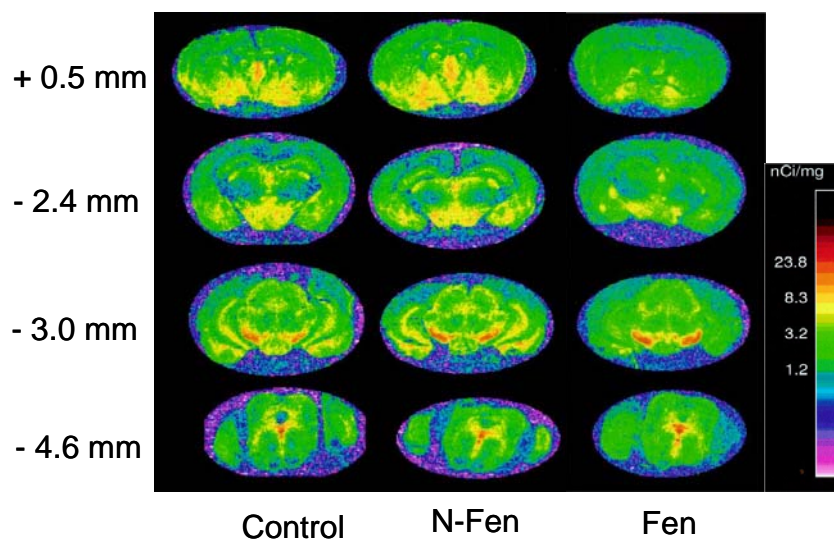


Fig. 2. Effects of *N*-nitrosifenfluramine (*N*-fen) and fenfluramine (Fen) treatment on densities of ^3H -paroxetine binding sites in mouse brain¹²⁾. Animals received either vehicle, *N*-fen or Fen. They were sacrificed 24 hr following the last oral administration and processed for ^3H -paroxetine autoradiography as detailed in Materials and Methods. These are pseudocolor digital images of autoradiograms generated by apposing to imaging plate. Levels according to the atlas of Hof *et al.*¹⁸⁾ are described in parentheses. Autoradiogram of ^3H -micro-scales used for quantitative analysis also shows the standard tritium concentration sequences increasing from blue to red.

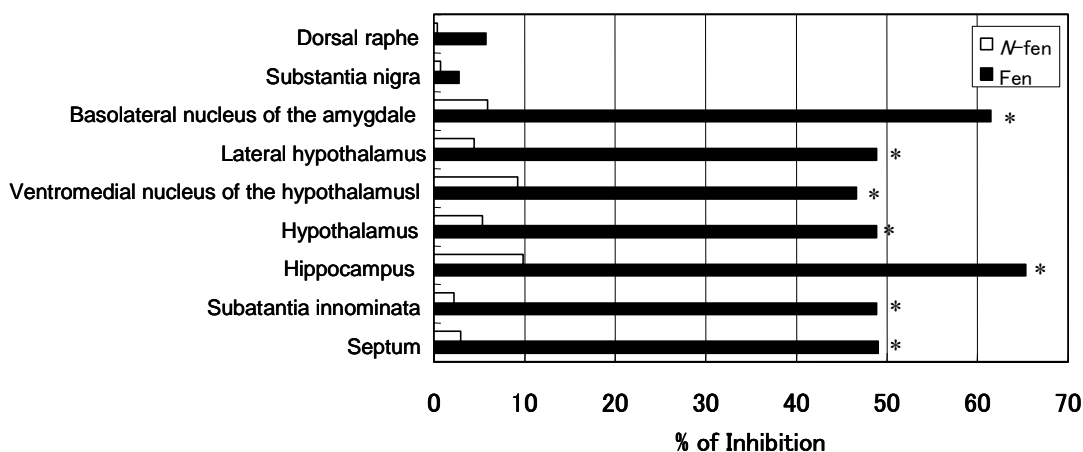


Fig. 3. Effects of *N*-nitrosifenfluramine, fenfluramine and olive oil treatment on the density of ^3H -paroxetine-labeled serotonin uptake sites in mice brain. Mice were oral administration *N*-nitrosifenfluramine (52 mg/kg body weight, $n = 10$), fenfluramine (48 mg/kg body weight, $n = 4$), and control (olive oil, $n = 7$). Quantification of autoradiogram (Fig. 2) was performed using computerized digital image analysis as described in Materials and Method, expressed as percentage of olive oil-treated controls. The statistical significance of data was calculated using Student's *t*-test. *Significantly different ($P < 0.01$) from control (olive oil). $\text{SD} < 9.7\%$.

群より約2~10%のparoxetine結合低下を示したが、有意差は認められなかった。一方、Fen投与群では、5HT神経支配を受けている扁桃体 (basolateral nucleus of the amygdale), 視床下部の1部分であり節食中枢のある視床下部外側核

(lateral hypothalamus), 同じく視床下部の1部分であり満腹中枢がある視床下部腹内側核 (ventromedial nucleus of the hypothalamus), 視床下部 (hypothalamus) 全体, 海馬 (hippocampus), 無名質 (substantia innominata), 中隔核

(septum) において, paroxetine結合が約45~60%と有意に減少することを認めた ($P < 0.01$). しかし背側縫線核 (dorsal raphe) と黒質 (substantia nigra) においては有意な減少はなかった.

考 察

Fenは5HTの遊離を促進し, また5HT神経線維に作用し軸索を脱落させ, 持続的に脳内5HTレベルを低下させた結果, 食欲を減退させると報告されている^{14, 15}. マウスへのFen投与では, 脳の5HT輸送系をコントロールに比べて約45-60%抑制したのに対して, 同用量のN-fenは最大でも約10%しか抑制しないという結果を得た. 従って, N-fenには5HT神経線維を介した, 食欲抑制効果は無いものと考えられた.

著者等は, 現在までに, N-fen短期連続マウス投与試験を実施し, 体重, 摂餌量ともに投与群に有意な変化はなかったが, 薬剤性肝障害や腎障害を起こす可能性があること^{12, 13}, さらにFenはモノアミン作動性神経系におけるDA, 5HT, NEの再取り込み阻害及び遊離促進に非常に強い作用を示したが, N-fenにはこれらの作用はほとんど認められないか, あってもFenより100-1000分の1と非常に弱いことを報告している¹⁶. さらに, 今回の定量的オートラジオグラフィによる5HT神経系への影響を比較検討した結果, N-fenには5HT神経線維を介する作用がほとんど認められなかった. これらの結果を考え合わせると, N-fenには中枢神経系を介した食欲を抑制する効果はほとんど無いものと考えられ, 胆汁うっ滞を含む薬剤性肝障害および腎障害を起す化学物質である可能性を明らかにした.

文 献

- 1) 中国製ダイエット用健康食品 (未承認医薬品) に関する調査結果 (概要)
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/index.html> (2008年7月11日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) Mostefa-Kara, N., Pauwels, A. and Pines, E. *et al.*: *Lancet*, **340**, 674, 1992.
- 3) Corns, C. and Metcalfe, K.: *J. Royal Soc. Prom. Health*, **122**, 213-219, 2002.
- 4) Hanawa, N., Nagayama, R. and Takamori, Y. *et al.*: *Acta Hepatol. Jap.*, **44**, 109-112, 2003.
- 5) Kumashiro, R., Hino, T., and Koga, Y. *et al.*: *Acta Hepatol. Jap.*, **44**: 113-116, 2003.
- 6) Koga, H., Taguchi, J. and Ishii, K. *et al.*: *Acta Hepatol. Jap.*, **44**: 117-12, 2003.
- 7) Lau, G., Lo, D. S. and Yao, Y. J. *et al.*: *Med Sci Law*, **44**: 252-63, 2004.
- 8) Kawata, K., Takehira, Y., and Kobayashi, *et al.*: *Intern. Med.*, **42**: 1188-1192, 2003.
- 9) Kanda, T., Yokosuka, O., and Tada M. *et al.*: *J. Gastroenterol Hepatol.*, **18**, 999-1005, 2003.
- 10) Kawaguchi, T., Harada, M. and Arimatsu, H. *et al.*: *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **19**, 349-350, 2004.
- 11) Adachi, M., Saito, H. and Kobayashi, H. *et al.*: *Ann. Intern. Med.*, **139**, 488-492, 2003.
- 12) Kanako, Satoh, Ryouichi, Nonaka. and Yukie, Tada. *et al.*: *Arch. Toxicol.*, **80**, 614-619, 2006.
- 13) 多田幸恵, 佐藤かな子, 野中良一 他, 研究年報, **56**, 359-362, 2005.
- 14) Hasegawa, M. and Nabeshima, T.: *J. Toxicol. Sci.*, **27** (Suppl 1), 11-16, 2002.
- 15) Appel, N. M., Mitchell, W. M., and Contrera, J. F. *et al.*: *Synapse*, **6**, 33-44, 1990.
- 16) 佐藤かな子, 野中良一, 長井二三子 他, 研究年報, **57**, 381-386, 2006.
- 17) Beckett, A. H. and Grookes, G.: *Tetrahedron*, **24**, 1283-1287, 1967.
- 18) Hof P.R., Young W.G., and Bloom F.E., *et al.*, *Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains*, 2000, Elsevier, Amsterdam.

**Effects of *N*-Nitrosfenfluramine, a Component of Chinese Dietary Supplement for Weight Loss,
on Monoamines Neurotransmission-2-**

Kanako SATOH*, Ryouichi NONAKA*, Norio OHASHI*, Dai NAKAE*, Akio OGATA* and Tsuyoshi SATOH**

Many cases of hepatopathy including deaths have frequently occurred after ingestion of Chinese dietary supplements for weight loss containing *N*-nitrosfenfluramine (*N*-fen), a nitroso derivative of fenfluramine (Fen), which was used for the treatment of obesity in the USA. Since Fen decreases appetite by decreasing the serotonin level and exhibits an antibiotic effect, *N*-fen may have been added, expecting a similar effect. Thus, we synthesized *N*-fen and orally administered it to mice, and investigated its effect on the liver as well as the effect on the cerebral serotonin nervous system to investigate whether *N*-fen exhibits an anorectic effect. The effect of *N*-fen on the serotonin (5HT) nervous system was examined by quantitative autoradiography of the mouse brain, and *N*-fen did not decrease the 5HT nerve activity.

Keywords: *N*-Nitrosfenfluramine, Fenfluramine, Serotonin, Central nervous system, Chinese diet supplement

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** Tokyo University of Science