

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

佐藤 かな子*, 野中 良一*, 長井 二三子*, 小縣 昭夫*, 上村 尚*, 佐藤 毅**

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

Kanako SATOH*, Ryouichi NONAKA*, Fumiko NAGAI*, Akio OGATA*, Hisashi KAMIMURA* 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 is 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 investigated its effect on the cerebral serotonin nervous system to investigate whether *N*-fen exhibits an anorectic effect. Effects of reuptake and release of monoamine neurotransmitters (dopamine (DA), serotonin (5HT), and norepinephrine (NE)) were investigated. *N*-fen slightly inhibited 5HT reuptake, and did not inhibit the reuptakes of DA and NE. Moreover, *N*-fen did not affect the release of the 3 monoamines. These findings suggested that *N*-fen did not have a serotonin nerve fiber-mediated anorectic effect.

Keywords: *N*-ニトロソフェンフルラミン *N*-Nitrosfenfluramine, フェンフルラミン Fenfluramine, セロトニン serotonin, ドーパミン dopamine, ノルエピネフェリン norepinephrine, 肝障害 hepatopathy, 中枢神経系 central nervous system, 中国製ダイエット用健康食品 Chinese diet supplement

はじめに

2001年から2002年にかけて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。厚生労働省が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取り組み、分析の結果、成分表示になく天然化合物ではない化学物質、*N*-nitroso fenfluramine 1-ethyl-1-{1-methyl-2-[3-(trifluoromethyl) phenyl] ethyl}-2-oxohydrazine: *N*-fen (Fig. 1A) の含有が明らかになった。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、その根拠となる*N*-fenに関する基礎的データはほとんど報告されておらず、生体作用は明らかになっていない。*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⁾。*N*-fenはFenと同様のダイエット効果を期待して添加されたと考えられ、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るが、その作用は、ほとんど明らかになっていなかった。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、それらの結果を報告した^{12, 13)}。マウスの摂餌量及び体重に変化は認められず、肝臓重量の増加、血清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を認めた。また、肝臓組織像の変化、及び肝臓の薬物代謝酵素活性の上昇も認めた。更に、腎臓重量の増加、及び腎臓組織像の変化、血清ビリルビンの減少も認めた。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ことを報告した¹²⁾。

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。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

* 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

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京理科大学理学部

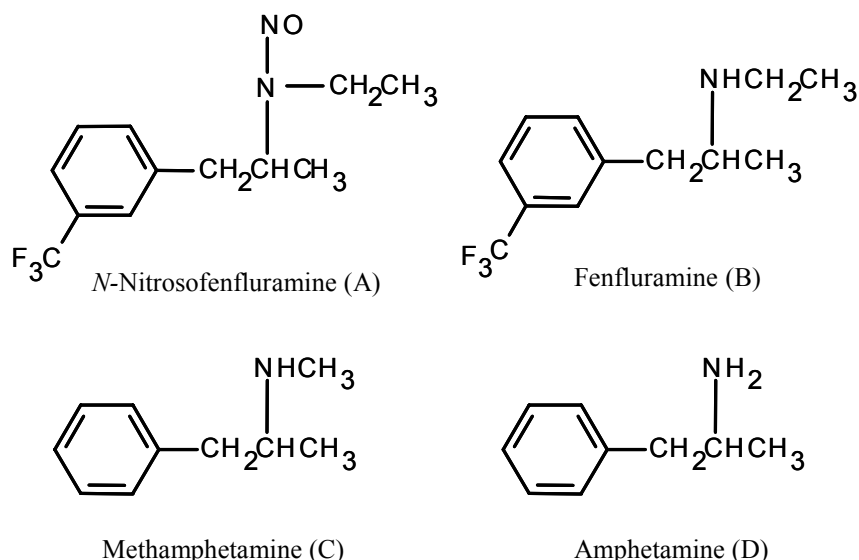


Fig. 1. Chemical Structures

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⁾。そこで、*N-fen*にも同様の食欲抑制作用があるのかを明らかにする目的で、脳シナプトゾームを調整し、モノアミン [ドーパミン (DA), 5HT, ノルエピネフリン (NE)] 作動神経系に及ぼす影響についてFenと比較検討した。

実験方法

1. 試薬

(±)-Fen 塩酸塩、亜硝酸ナトリウムは和光純薬 (大阪, 日本)より特級品を購入した。クロロホルムは関東化学 (東京, 日本) 特級試薬, シリカゲル (70-230 mesh ASTM) はメルク (フランクフルト, ドイツ), アセトニトリルはナカライテスク (京都, 日本) の液体クロマトグラフィー用を用いた。nomifensine, reserpine, GBR 12935, GBR 12909, citraplan, tyramine はシグマ-アルドリッチ (ミズリー, アメリカ), ³H-DA (59.3 Ci/mmol), ³H-5HT (30 Ci/mmol), ³H-NE (52 Ci/mmol)はパーキンエルマー (マサチューセッツ, アメリカ)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

(±)-Fen 塩酸塩 (0.535 g, 2 mmol, Fig. 1) を水 8 ml に溶解し、塩酸酸性条件下で水 1 ml に溶解した亜硝酸ナトリウム (0.425 g, 5 mmol) を氷冷下撹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ー (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* (Fig. 1) は、IR, H-NMR 及びマススペクトルを測定して既知データ¹⁶⁾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ー(装置

: 資生堂 ナノスペース SI-1, フォトダイオードアレイ検出器 WATERS 996; カラム: ナカライテスク COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 測定波長 210 nm; 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. 脳シナプトゾームの調製

シナプトゾームの調製方法は Rothman 等¹⁷⁾の方法に準じた。約 300 g の雄ラット (Crj:CD, 日本チャールスリバー, 神奈川, 日本) 脳から線条体および皮質部位を摘出し、ガラス製テフロンホモジナイザーを用いて 0.32 M ショ糖液で 10%ホモジネートを作成した。800×g で 12 分遠心し、上清を 22,000×g で 20 分遠心後、沈澱を Krebs-Ringer 緩衝液 (pH 7.4, KR-緩衝液) に懸濁させ (線条体: 4 mg タンパク/ml, 皮質: 25 mg タンパク/ml), 速やかにモノアミンの再取り込み阻害及び遊離促進実験に用いた。

4. ³H-DA, ³H-5HT, ³H-NE の再取り込み阻害実験

DA の再取り込み阻害実験には線条体から作成したシナプトゾーム, 5HT と NE の再取り込み阻害実験は皮質から作成したシナプトゾームを用いた。KR-緩衝液にて調整した各種濃度の *N-fen* もしくは Fen 溶液を 96 穴マイクロプレートの 1 穴あたり 25 μl, シナプトゾーム 50 μl を分注した。5HT に関する実験では, DA 及び NE 末端への取り込みを阻害するため, 終濃度 100 nM nomifensine と 100 nM GBR 12935 存在下で行った。混和後, 37°C で 10 分間プレインキュベートし, ³H 標識モノアミン溶液 (DA: 63 nM, 5HT: 125 nM, NE: 85 nM) 25 μl を分注, 混和し, 37°C で 5 分間インキュベートした。セルハーベスター (Filter Mate, パーキンエルマー) を用いて, 急速吸引ろ過することにより反応を停止した。ろ紙 (GF/C, ワットマン) を冷 PBS で 3 回洗浄

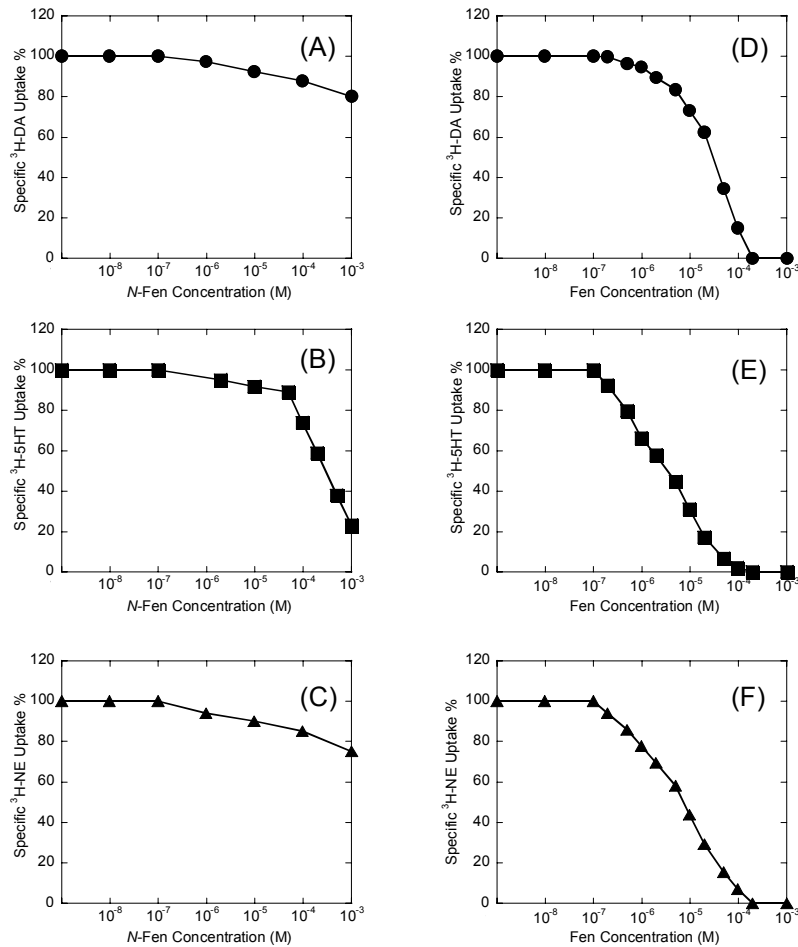


Fig. 2. Inhibition of *N*-Nitrosfenfluramine and Fenfluramine for Uptake of ^3H -Dapamine, ^3H -Serotonin and ^3H -Norepinephrine. Uptake inhibition assays were examined in rat brain synaptosomes. Crude synaptosomes were prepared and assays were conducted as described under Materials and Methods. A – C; *N*-nitrosfenfluramine, D – F; fenfluramine. Three separate experiments ($n = 3$). The SD was less than 1.8%. A and D; dopamine (●), B and E; serotonin (■), C and F; norepinephrine (▲)

Table 1. The Effects of *N*-Nitrosfenfluramine and Fenfluramine on Monoamine Reuptake into Rat Brain Synaptosome (The IC_{50} Value).

	Reuptake (IC_{50} , M)		
	DA	5HT	NE
<i>N</i> -Nitrosfenfluramine	$>1.0 \times 10^{-3}$ a)	3.0×10^{-4}	$>1.0 \times 10^{-3}$ b)
Fenfluramine	3.0×10^{-5}	3.5×10^{-6}	7.1×10^{-6}

a) and b); Specific monoamines uptake at 1.0×10^{-3} M were 81 and 75%, respectively.

後、測定試験管に入れ、シンチレーター (LUMASAFETM Plus, ルマック, オランダ) 2.5 ml を加えて、1日放置後、液体シンチレーションカウンターによりフィルター上の放射能を測定した。DAに関する実験では $10 \mu\text{M}$ GBR12909, 5HTに関する実験では $10 \mu\text{M}$ citalopram 存在下、及びNEに関する実験では 0°C における値をそれぞれの非特異的取り込み量とした。各々の再取り込み阻害曲線を作成し、50%阻害

濃度 (IC_{50} 値) を求めた。

5. ^3H -DA, ^3H -5HT, ^3H -NE の遊離促進実験

シナプトゾームの調製は、 0.32M ショ糖液及び KR -緩衝液に $1 \mu\text{M}$ reserpine を添加した以外は、再取り込み阻害実験と同様に行い、以下に述べる遊離促進実験は、Rothman 等¹⁸⁾の方法に準じた。 6.6 ml のシナプトゾーム懸濁液とて調

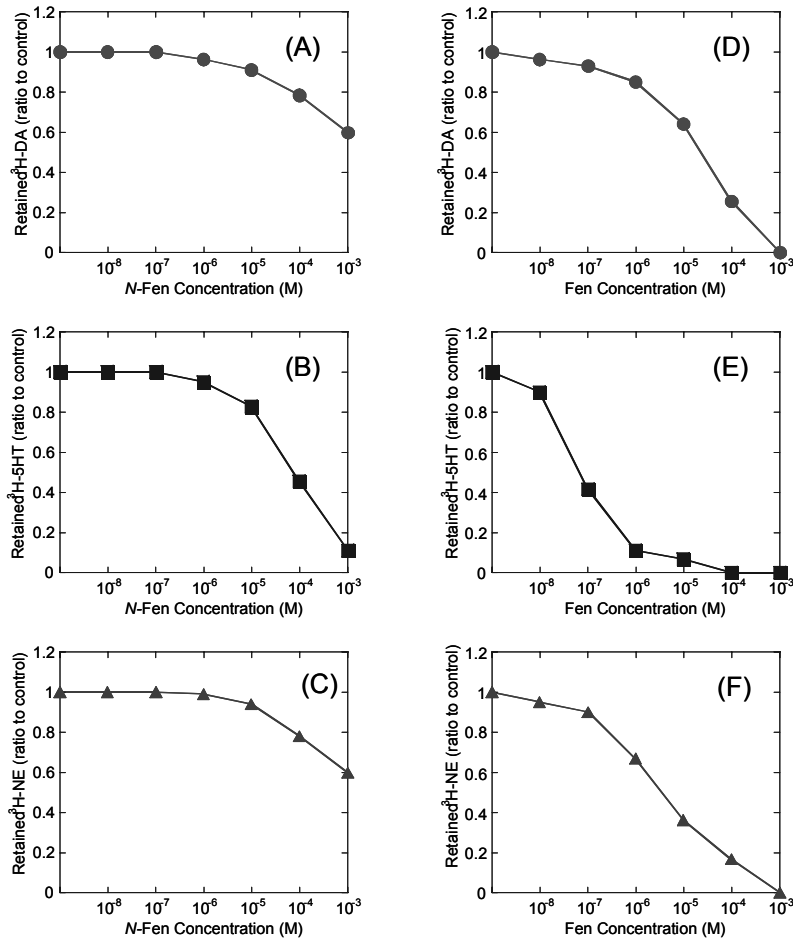


Fig. 3. Effects of *N*-Nitrosfenfluramine and Fenfluramine for Release of ^3H -Dapamine, ^3H -Serotonin and ^3H -Norepinephrine. Release assays were examined in rat brain synaptosomes. Crude synaptosomes were prepared and assays were conducted as described under Materials and Methods. A – C; *N*-nitrosfenfluramine, D – F; fenfluramine. Three separate experiments ($n = 3$). The SD was less than 2.0%. A and D; dopamine (●), B and E; serotonin (■), C and F; norepinephrine (▲)

Table 2. The Effects of *N*-Nitrosfenfluramine and Fenfluramine on Monoamine Release into Rat Brain Synaptosome (The EC_{50} Value)

	Release (EC_{50} , M)		
	DA	5HT	NE
<i>N</i> -Nitrosfenfluramine	$>1.0 \times 10^{-3\text{a}}$	7.6×10^{-5}	$>1.0 \times 10^{-3\text{b}}$
Fenfluramine	2.3×10^{-5}	6.5×10^{-8}	3.2×10^{-6}

a) and b); Retained monoamines (ratio to control) at 1.0×10^{-3} M were 0.60 and 0.59, respectively.

整した終濃度 $5 \text{ nM } ^3\text{H-DA}$ (30 分間), $5 \text{ nM } ^3\text{H-5HT}$ (60 分間) あるいは $7 \text{ nM } ^3\text{H-NE}$ (60 分間) 溶液 3.3 ml をそれぞれ試験管に加え, 振とう下 25°C でプレインキュベーションした. 5HT に関する実験は, DA 及び NE 末端への取り込みを阻害するため, $100 \text{ nM nomifensine}$ 及び 100 nM GBR 12935 存在下で行なった. 96 穴マイクロプレートにプレインキュベーション終了後の懸濁液を $75 \mu\text{l}$ /ウェル及び各種濃度の *N*-fen と Fen 溶液 $25 \mu\text{l}$ /ウェル添加した. 25°C で 5 分

(DA 及び 5HT) あるいは 30 分 (NE) 間インキュベート後, 再取り込み阻害実験と同様に急速ろ過・洗浄を行ない, ろ紙上の放射能を測定した. DA 及び NE に関する実験では $10 \mu\text{M tyramine}$, 5HT に関する実験では $100 \mu\text{M tyramine}$ 存在下における値をそれぞれの非特異的取り込み量とした. 遊離促進曲線を作成し, 50%遊離促進濃度 (EC_{50} 値) を算出した.

結 果

1. $^3\text{H-DA}$, $^3\text{H-5HT}$, $^3\text{H-NE}$ の再取り込み阻害作用

N-fen の $^3\text{H-DA}$, $^3\text{H-5HT}$, $^3\text{H-NE}$ 再取り込みに対する影響を *Fen* と比較した (Fig. 2, Table 1). *N-fen* は $^3\text{H-5HT}$ の再取り込み阻害作用を認めたが, その作用は非常に弱く, IC_{50} 値は 3.0×10^{-4} M であり, 1.0×10^{-3} M の高濃度でも完全に阻害しなかった. また *N-fen* は, $^3\text{H-DA}$ と $^3\text{H-NE}$ の再取り込みを 1.0×10^{-3} M でもそれぞれ約 20% と 25% しか抑えなかった. 一方, *Fen* は 2×10^{-7} M で $^3\text{H-5HT}$, $^3\text{H-NE}$ の再取り込みを阻害し始め, 2×10^{-4} M でいずれも完全に阻害した. IC_{50} 値は, 5HT で 3.5×10^{-6} M, NE で 7.1×10^{-6} M であり, 5HT のほうが NE の再取り込み阻害作用より約 2 倍強かった. さらに, *Fen* の $^3\text{H-DA}$ 再取り込み阻害作用は 5HT と NE よりやや弱く, IC_{50} 値は 3.0×10^{-5} M だった. これらの結果より, *N-fen* の再取り込み阻害作用は, *Fen* と比べると非常に弱いことが明らかになった.

2. $^3\text{H-DA}$, $^3\text{H-5HT}$, $^3\text{H-NE}$ の遊離促進作用

N-fen の $^3\text{H-DA}$, $^3\text{H-5HT}$, $^3\text{H-NE}$ 遊離促進に対する影響を *Fen* と比較した (Fig. 3, Table 2). *N-fen* は, 1.0×10^{-6} M で $^3\text{H-5HT}$ の遊離を促進し始め, IC_{50} 値は 7.6×10^{-5} M だった. さらに, *N-fen* の $^3\text{H-DA}$ 及び $^3\text{H-NE}$ 遊離促進作用は弱く, 1.0×10^{-3} M という高濃度でも, 約 40% しか促進しなかった. 一方, *Fen* は 1×10^{-8} M で 5HT 遊離を促進し始め, EC_{50} 値は 6.5×10^{-8} M だった. また, *Fen* の $^3\text{H-NE}$ 及び $^3\text{H-DA}$ 遊離促進作用も強く, EC_{50} 値はそれぞれ 3.2×10^{-6} M および 2.3×10^{-5} M だった. *N-fen* は, 5HT の遊離促進作用を示したが, *Fen* の約 1000 分の 1 と非常に弱く, DA 及び NE の遊離促進作用はほとんど認められなかった.

考 察

N-fen を含有したダイエット健康食品である茶素減肥 (チャソゲンピ) あるいはせん乃素こう囊 (センノモトコウノウ) を摂取した結果, 薬物性急性肝障害を起こし, 死亡例が報告された. 我々は, *N-fen* をマウスに 1 週間連続投与することにより, *N-fen* に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ことを報告した¹²⁾. *N-fen* は, 肥満治療に食欲抑制剤として米国で医薬品として使用されていた *Fen* の *N*-ニトロソ誘導体であり, 同様の効果を期待されてダイエット食品に使用されたものと考えられている. しかし, *N-fen* の食欲抑制のメカニズムはおろか, その作用の有無についても明らかにされていなかった. *Fen* は, セロトニン (5HT) レベルを低下させて, 食欲を減退させる結果, 抗肥満作用があることから, *N-fen* についても, この作用を調べる必要があると考えた. そこで, 3 種類のモノアミン (DA, 5HT, NE) 作動神経系に及ぼす影響について, 脳シナプトソームを調整し, *Fen* と比較検討した.

Fen はモノアミン作動神経系における 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, それらの強さは既報値^{19, 20)} とほぼ一致した. しかし, 本報告で

示したように, *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 と非常に弱いものだった. したがって, *N-fen* にはセロトニン神経線維を介した, 食欲抑制効果は無いものと考えた.

N-fen マウス短期連続投与試験では, 体重, 摂餌量ともに投与群に有意な変化はなかったこと¹²⁾ と, セロトニン神経線維を介する作用がほとんど認められなかった今回の結果を考え合わせると, *N-fen* には食欲を抑制する, つまりダイエット効果はほとんどないことを明らかにした. *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可能性のみが示唆された.

ま と め

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. その健康食品中に, 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-Nitrosfenfluramine* (*N-fen*) が含有していた. そこで *N-fen* を合成し, 食欲を減退させる効果の有無を明らかにするために脳セロトニン神経系への影響について調べた. 神経伝達物質のモノアミン (DA, 5HT, NE) の再取り込み阻害と遊離促進作用について, *Fen* と比較検討した. *N-fen* は 5HT の再取り込みを阻害したが, その作用は *Fen* の約 100-1000 分の 1 と非常に弱く, DA および NE の再取り込み阻害作用は, ほとんど認められなかった. 又, *N-fen* は *Fen* と異なり, 3 種類のモノアミン遊離促進作用には, ほとんど影響が無かった.

以上の結果は, *N-fen* にはセロトニン神経線維を介した食欲抑制作用は無いことを示唆した

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>
- 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. Inter. 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, 2006.
- 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) Beckett, A. H. and Grookes, G.: *Tetrahedron*, **24**, 1283-1287, 1967.
- 17) Rothman, R. B., Lewis, B. and Dersch, C. *et al.*: *Synapse*, **14**, 34-39, 1993.
- 18) Rothman, R. B., Partilla, J. S. and Baumann, M. H. *et al.*: *Synapse*, **35**, 222-227, 2000.
- 19) Rothman, R. B., Baumann, M. H. and Dersch, C. M. *Synapse*, **95**, 32-41, 2001.
- 20) Rothman, R. B., Clark, R. D. and Partilla, J. S., Baumann, M. H. *et al.*: *JPET*, **305**, 1191-1199, 2003.