

新規な芳香族アミノ酸TIQ型閉環体の
検出と薬理活性の検討

中 川 秀 彦

新規な芳香族アミノ酸TIQ型閉環体の

検出と薬理活性の検討

中 川 秀 彦

目 次

序論	4
第一章 TIC類のラット脳における内在性についての検討	
1 TIC類の検出条件の検討	16
(1) GC/MS法、GC/SIM法を用いた検出法について	
(2) TIC類の二重誘導化法の検討	
(3) 誘導化物のバッファーによる洗浄効果	
(4) TIC類のモノアシル化誘導化法の検討	
(5) HPLC/ECDを用いた検出法について	
(6) HTIC、MHTICの酸化電位測定	
(7) TIC類のHPLC/ECDによる分析条件	
2 GC/SIM法を用いたラット脳からのTIC類の検出と定量	34
(1) ラット脳からのTIC類抽出法	
(2) ラット脳からのTIC類の検出	
(3) ラット脳内TIC類の定量	
3 HPLC/ECDを用いたラット脳からのTIC類の検出	41
(1) ラット脳からのTIC類抽出法	41
(2) ラット脳からのTIC類の検出	
4 ラット脳各部位におけるTIC類含量	45
(1) ラット脳各部位からのTIC類の抽出法	
(2) 各部位におけるTIC含量	
5 考察	50
(1) 脳内分布について	

(2) カテコールOメチルトランスフェラーゼによる代謝

第二章 TIC類の薬理活性についての検討

- | | | |
|-----|---------------------|----|
| 1 | 自発的運動量に及ぼす影響 | 54 |
| (1) | オープンフィールドテストについて | |
| (2) | TIC類の投与による自発的運動量の変化 | |
| 2 | 痛覚感受性に及ぼす影響 | 60 |
| (1) | テールフリックテストについて | |
| (2) | TIC類の鎮痛活性について | |
| 3 | TIC類の脳内移行性についての検討 | 63 |
| (1) | TIC類のラット腹腔内投与 | |
| (2) | ラット脳内からのTIC類の抽出法 | |
| (3) | TIC類投与時のラット脳内TIC類含量 | |
| 4 | 考察 | 67 |
| (1) | 芳香族アミノ酸との比較 | |
| (2) | 脳内分布と薬理活性の関連について | |

第三章 TICを含むペプチドアナログに関する検討

- | | | |
|-----|-------------------------------------|----|
| 1 | N末にTICを有するジペプチドアナログの合成 | 69 |
| (1) | キョートルフィンアナログについて | |
| (2) | TIC-L-Arginineの合成 | |
| 2 | N末にTICを有するジペプチドアナログの鎮痛活性 | 73 |
| (1) | 腹腔内投与におけるジペプチドアナログの効果 | |
| (2) | 脳室内投与におけるジペプチドアナログの効果について
の予備的実験 | |
| 3 | 考察 | 78 |

(1) キョートルフィン鎮痛に関する調節機構	
(2) ジペプチドアナログの鎮痛機構への関与の可能性	
第四章 TIC類の内在性と生理的役割についての考察	
1 生体内での生成機構に関する推定	81
(1) CIユニットについて	
(2) 生成反応に関して	
2 生理的役割について	87
結論	88
実験の部	89
参考文献	106
謝辞	108

序論

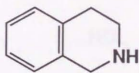
フェネチルアミン化合物は、dopamineをはじめとして、神経伝達に関与しているものが多いと考えられる。あるものは神経伝達物質そのものとして、あるものはその前駆体或いは代謝物として存在していると考えられるが、それぞれの化合物は生体内で酵素的に合成代謝されている。その代謝過程が神経伝達物質の生成であったり、あるいはその不活化であったりする事から、フェネチルアミン化合物の代謝過程は神経伝達の調節、制御に関わる可能性が大きいと考えられる。このようなフェネチルアミン化合物について新たな代謝経路を検索することは、代謝化学的興味ばかりでなく神経化学的にも興味深い。即ち、新たな代謝経路の発見は一連の化合物の生成、代謝を通した新たな調節機構を予想させ、これまでより複雑で微妙な調節過程の可能性を示すことになると思われる。

フェネチルアミン化合物の代謝反応としては、monoamine oxydase B (MAO-B) による1級アミンの酸化反応、 β -hydroxylaseによる β 位水酸化反応が知られている。このほかにdopamineの様にカテコール構造を有するものは、catechol-O-methyl transferase (COMT)によるcatecholのmono O-methyl化が知られている。MAO-Bによるdopamineの代謝物はdihydroxyphenylacetaldehydeであるがこれはdihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、さらにhomovanilic acid (HVA)へと代謝される。

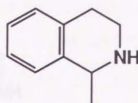
Dopamineの一連の生成反応においてはtyrosineからdihydroxyphenylalanine (DOPA)が生成する過程、即ちtyrosine hydroxylase (THase)によるm-位水酸化反応が律速反応であり、dopamine生成量はこの酵素によって調節されている。この酵素はdopamineによってフィードバック制御されていることから、dopamineの量自体が自身の調節に関与していることになり、dopamineの代謝過程もこの調節に

関与していると考えることができる。フェネチルアミン類について新たな代謝反応が見出されれば、これもこの調節に関与している可能性があると言うことができる。L-DOPAを投与したパーキンソン病患者の尿中から初めて見出されるdopamineの代謝物とされているsalsolinolは、THaseの阻害活性を有していることが報告されている (Weiner, 1978)。このことは、dopamineからsalsolinolへと代謝される過程がdopamine生成の調節に関与していることを示唆している。

1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (TIQ)、及び1-methyl TIQ (1MeTIQ) (Fig. O-1) は内性化合物として、ラット脳より発見され、その後ヒト、サル、ネコ、マウスにおいても存在が示された脳内アミンである (Kohno, 1986; Ohta, 1987; Niwa, 1987)。これらの化合物は、2-phenylethylamineを前駆体として生合成されていると考えられている (Scheme O-1) (Makino, 1990a)。即ち、2-phenylethylamineとC1ユニットが縮合閉環しTIQが、またC2ユニットと縮合閉環し1MeTIQが生成する。このうち、1MeTIQについてはMakinoら (1990a) によって、生体内では(S)-1MeTIQが多く存在すること、Tasakiら (1994) によってマウス脳のmicrosomes + cytosol分画 (S11.5)を用いたin vitroの反応系において2-phenylethylamineとacetaldehydeからタンパク量依存的に1MeTIQが生成することが示されており、この過程が酵素関与である可能性を示唆している。このようなTIQ骨格を形成するような代謝反応は、in vitroの反応ではいくつかの例がみられる (Cohen, 1970; Bate, 1981) が、in vivoの例としてはL-DOPA投与のパーキンソン病患者尿から発見されたsalsolinolが知られ (Sandler, 1973) 比較的詳しく検討がなされている。Salsolinolは神経伝達物質dopamineがC2ユニットと1MeTIQの場合と同様に縮合閉環し生成すると考えられ (Fig. O-2)、L-DOPA投与のパーキンソン病患者ばかりでなく健常者の尿中、また脳にも存在することが報告されている (Sjoquist, 1982; Collins, M.A., 1982)。健常者に比べ、L-DOPA投与していないパーキンソン病患者では尿中のsalsolinol

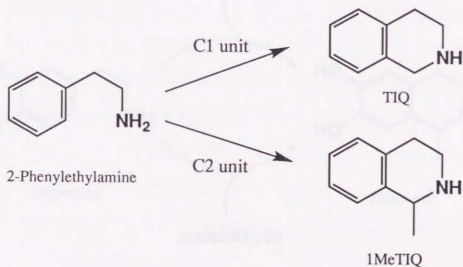


1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline
(TIQ)

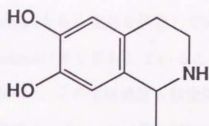


1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline
(1MeTIQ)

Fig. O-1 Structures of TIQ and 1MeTIQ

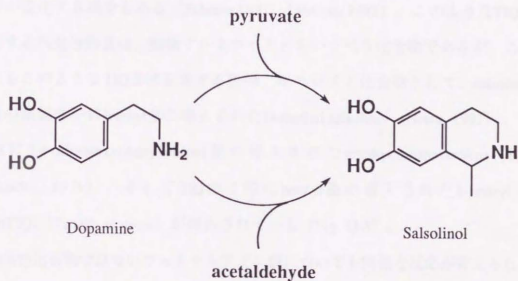


**Scheme O-1 Proposed biosynthesis pathways of
TIQ and 1MeTIQ**



1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline
(salsolinol)

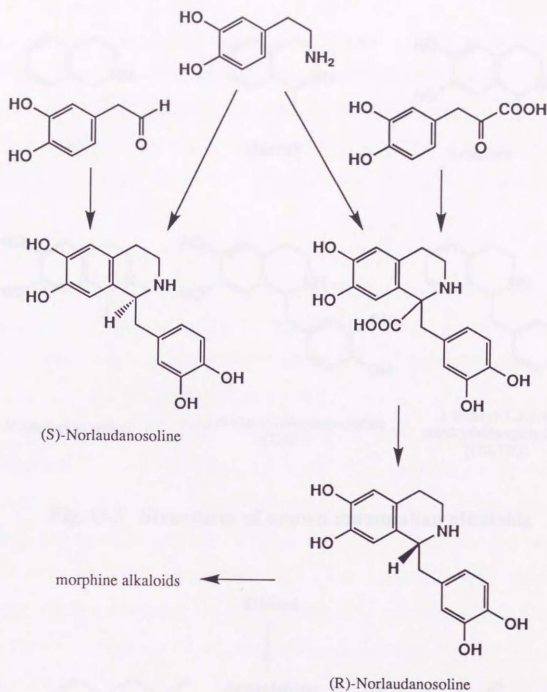
Fig. O-2 Structure of Salsolinol



Scheme O-2 Cyclization scheme of dopamine to salsolinol

含量が低下していることが示されており (P. Dostert, 1988)、このことはパーキンソン病に特徴的な脳内dopamine量の減少がsalsolinol生成量の減少につながったと考えられる。また、salsolinolの場合も1MeTIQと同様に、L-DOPA投与しない場合、かつラセミ体のsalsolinolを含む食品を摂取していない場合は、生体内ではラセミ体ではなく(R)-salsolinolが多く存在していることが示されており (Dostert, 1987; Strolin Benedetti, 1989)、この生成過程も酵素関与である可能性が考えられている。アルコール摂取によってsalsolinol量が増加することが報告されていることから (Dostert, 1991; Myers 1985)、salsolinolが生成する際のC2ユニットはacetaldehydeとも考えられるが、pyruvateをC2ユニットとしても生成がみられ (Dostert, 1990) 定説はない (Scheme O-2)。また、ある種の植物によるnorlaudanosoline生成のように生成する化合物の光学異性体によって縮合閉環する相手が変わる場合もある (Scheme O-3) (Brossi, 1982)。このようなTIQ骨格を有する内性物質は、動物アルカロイドともいふべき化合物であるが、このほかにもこのようなTIQ骨格を有する動物アルカロイド化合物として、salsolinolの2位の窒素原子にmethyl基の導入されたN-methyl salsolinol (Niwa, 1991)、また1位に3,4-dihydroxyphenylmethyl基の導入されたtetrahydropapaveroline (THP) (Sandler, 1973)、そしてTIQの1位にbenzyl基の導入された1-benzyl TIQ (1BnTIQ) (Tasaki, in press) が報告されている (Fig. O-3)。

内性化合物ではないフェネチルアミン類についても同様な反応が考えられる。その例として、覚醒剤amphetamineのアルコール中毒モデルラットによる代謝反応が挙げられる。Amphetamineを、アルコールを飲料水に混合して長期間投与し作成したアルコール中毒モデルラットに腹腔内投与したところ、脳内よりamphetamineがC2ユニットを得て縮合閉環した化合物と考えられる1,3-dimethyl TIQが見出された (Scheme O-4) (Makino, 1990b)。この化合物についても代謝によって生成した化合物は(1S)-1,3-dimethyl TIQが多く、酵素の関与が示唆される



Scheme O-3 Presently established pathways for the formation of (S)- and (R)-norlaudanosoline from dopamine

(S)-Norlaudanosoline is synthesized by (S)-norlaudanosoline synthetase and not utilized in morphine alkaloids synthesis. (R)-norlaudanosoline is synthesized by the Hahn synthesis. (reference: Brossi, A., 1982)

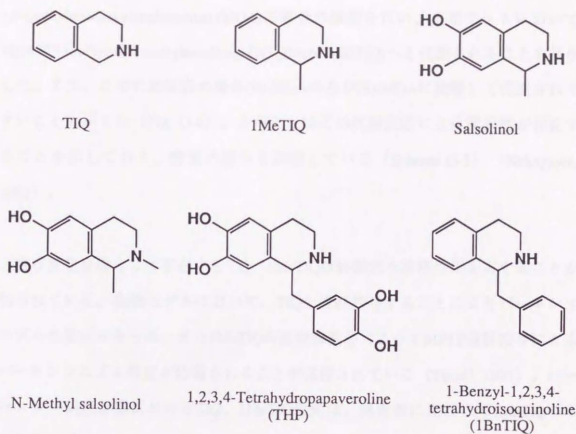
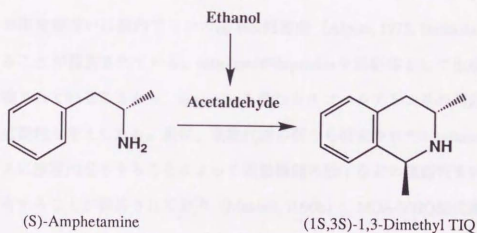


Fig. O-3 Structures of known mammalian alkaloids



Scheme O-4 Formation of 1,3-dimethyl TIQ from (S)-amphetamine in the intoxicated rat

(K.Tamiya, 1994)。筆者は、同様な代謝反応について、合成麻薬 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) の場合の検討を行い、正常ラットにおいて MDA が 3-methyl-6,7-methylenedioxy TIQ (3Me6,7MDTIQ) へと代謝されることを見出した。また、この代謝反応の場合 (R)-MDA の方が (S)-MDA に比較して代謝されやすいことも示した (Fig. O-4)。このことはこの代謝反応に立体選択性が存在することを示しており、酵素の関与を示唆している (Scheme O-5) (Nakagawa, 1993)。

内在性化合物として存在する TIQ、1MeTIQ は特徴的な薬理作用を有することが知られている。動物モデルにおいて、TIQ を連続投与することによりパーキンソニズムの発症がみられ、また 1MeTIQ の連続前投与によって MPTP 連続投与によるパーキンソニズム発症が防御されることが報告されている (Tasaki, 1991)。パーキンソン病患者脳における TIQ、1MeTIQ 含量は、健常者に比較して 1MeTIQ のみが顕著に減少していることと照らし合わせると、TIQ、1MeTIQ の量的変動がヒトにおけるパーキンソニズム発症の原因であると考えられることも出来る (Tasaki, 1991)。また、salsolinol については、dopamine の生合成の律速段階である tyrosine hydroxylase の阻害能 (Weiner, 1978) や monoamine oxidase B (MAO B) (Giovine, 1976) の阻害能或いは脳内アミンの up take 阻害能 (Alpers, 1975; Heikkila, 1971) を有することが報告されている。salsolinol が dopamine を前駆体として生成することが示唆されていることから、dopamine を含むカテコールアミン系の調節に働いている可能性も考えられる。更に、薬物代謝の面から研究された 1,3-dimethyl TIQ はマウスに腹腔内投与することによって運動機能の低下などの運動性を抑制する作用を有することが報告されており (Makino, 1990b)、MDA の TIQ 型代謝物である 3Me6,7MDTIQ も自発的運動量を減少させる作用を有していた (Nakagawa, 1993)。2-Phenylethylamine の生理的役割については不明な点は多いが、dopamine、amph-

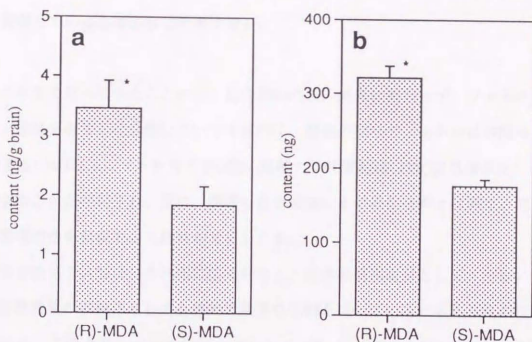
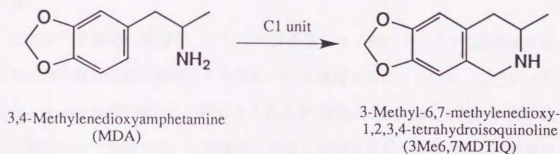


Fig. O-4 Content of TIQ-type metabolite of (R)- or (S)-MDA (3Me6,7MDTIQ) in the rat brain and urine

Content of TIQ-type metabolite (3Me6,7MDTIQ) of (R)- or (S)-MDA in the (R)- or (S)-MDA treated rat brain (a) and urine (b). The content in the brain was measured at 5 hr after treatment, and that in the urine was for 24 hr after treatment. * $p < 0.05$



Scheme O-5 Cyclization of MDA to 3Me6,7MDTIQ in the normal rat

tamine, MDAが運動量を増加させる方向に作用することを考えると、これらの例では、TIQ型に閉環した化合物はそれぞれ対応する母化合物とは異なる薬理活性を発現していると考えることが出来る。

これまで述べてきたことから、化合物の内在、外来に関わらず、フェネチルアミン骨格を有する化合物について生体内に、酵素の関与で（あるいは非関与で）C1あるいはC2ユニットを得てTIQ型に閉環する代謝経路（TIQ型閉環反応）が存在することが想起され、更に、閉環した生成物はその母化合物とは異なる何らかの薬理活性を発現する可能性が考えられる。

芳香族アミノ酸は、生体内に広く分布し、生体の構成成分として、あるいは神経伝達物質の前駆体として生体内で重要な役割を担っていると考えられる化合物である。このうち、phenylalanine, tyrosine, dihydroxyphenylalanine (DOPA) (Fig. O-5) はその構造中にフェネチルアミン骨格を含んでいる。前述の例から考えれば、これらの芳香族アミノ酸も生体内でTIQ骨格を有する化合物へと閉環する可能性が考えられる。生成する閉環体はTIQ-3-carboxylic acid誘導体となるがこれをTIC類、TIC誘導体と呼ぶことにする (Scheme O-6)。更に、閉環した化合物は母化合物である芳香族アミノ酸自身とは異なる生理活性を発現する可能性も考えられる。

このような仮定に基づき、これらの芳香族アミノ酸についてTIQ型閉環反応とこれに伴う薬理活性の発現の可能性について検討することとした。こういった反応を、*in vitro*の系で検討した例はみられるが (Obata-Sakamoto, 1981)、芳香族アミノ酸について動物を用いて具体的に検討した例は未だない。また、生成物であるTIQ骨格を有する芳香族アミノ酸閉環体についても内在性化合物としては知られていない。そこで、ラット脳を試料としてTIQ型の芳香族アミノ酸閉環体の検出を試み、またこれら閉環体の薬理活性についての検討を行った。更に、これら

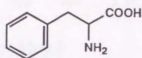
の閉環体はアミノ酸であることからペプチド鎖中にこれらの化合物が組み入れられている可能性も考えられる。そこでphenylalanineのTIQ型閉環体についてこれをジペプチド中に組み込んだ化合物についても若干の検討を行った。



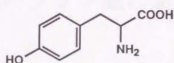
Fig. O-3 Structure of aromatic amino acids



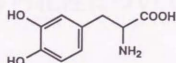
Scheme O-4 Proposed cyclization scheme of aromatic amino acids to TIQ derivative



L-Phenylalanine

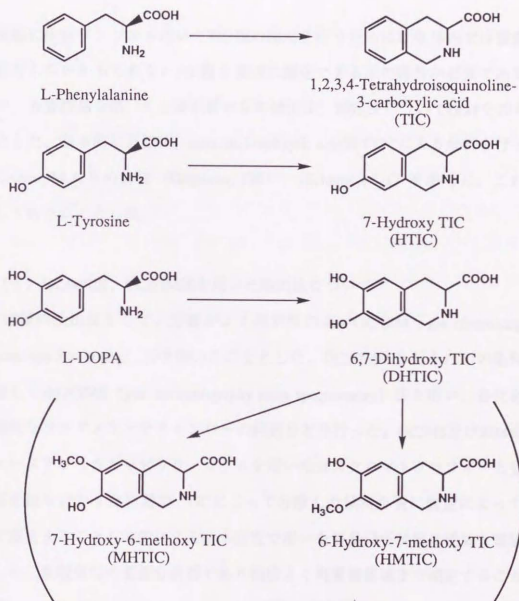


L-Tyrosine



L-DOPA

Fig. O-5 Structure of aromatic amino acids



Scheme O-6 Proposed cyclization scheme of aromatic amino acids to TIC derivatives

第一章 TIC類のラット脳における内在性について の検討

1 TIC類の検出条件の検討

実際に生体サンプルを用いてTIC類の検出を行うためには生体内では微量にしか存在しないかもしれないTIC類を適切に測定できる系の構築が必要である。そこで、合成標品を用いて生体試料からの抽出法、測定法について検討を加えることとした。基本的な方法は、salsolinol-carboxylic acid類でGCによる分析を行っているCollins, M.A.らの方法 (Origitano, 1984) (Scheme I-1-1) を参考に、これを改良して行うこととした。

(1) GC/MS法、GC/SIM法を用いた検出法について

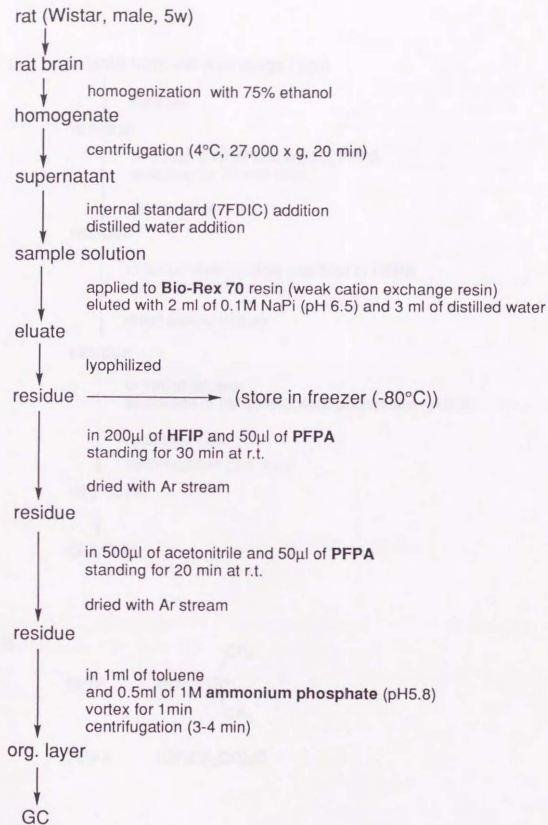
TIC類の検出法として、分離がよく選択性の高いGC/SIM (gas chromatography selected ion monitoring) 法を用いることとした。GC/SIM法を行うための条件検討に際してはGC/MS (gas chromatography mass spectrometry) 法を用い、各化合物に特徴的なフラグメントマスナンバーの同定などを行った。GC/MS及びSIM法は、フーズドシリカキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた装置で、GCによって分離した試料を更に質量によって分離して測定することを可能にする。本研究で用いた質量分析装置は磁場と電場を利用した二重収束型の質量分析器であり精度よく高質量領域まで測定することが出来る。GC/MS測定では、GCによって分離した化合物についてスキャン測定をす

ることでもマススペクトルを得ることが出来、化合物の同定に非常に有効である。一方、GC/SIM測定では、限られた少数の質量数について選択的にイオン強度の検出を行うため時間的に精度の良いクロマトグラムを得ることが可能であり、定量性のよいまた感度の高い測定を行うことが出来る。それぞれの状況に応じて両方法を使い分けることとした。

(2) TIC類の二重誘導化法の検討

TIC類はアミノ酸であるため通常の条件では非常に気化しにくく、本来はGCによる分析には適さない。このような気化しにくい化合物のGCによる分析の問題を解決するため、古くから測定試料に対する誘導化法が開発されてきた。目的化合物を気化しやすい形に誘導化し、この誘導体について測定を行うものであるが、反応性が高く収率のよい反応試剤がこれに適する。有名な誘導化剤としてはTMS化剤が知られている。これは、主としてアルコール、フェノール類の誘導化に用いられる。TIC類はアミノ酸であるため、GCによる分析に適するように誘導化を行う場合には、カルボキシル基、アミノ基の2つの官能基を保護することが考えられる。そこで、Collins, M.A.らの採用している二重の誘導化、即ちTIC類のカルボキシル基をエステル化、アミノ基をアミド化する方法で、エステル化試剤としては hexafluoroisopropyl alcohol (HFIP) を、またアミド化試剤としては perfluoropropionic anhydride (PFPA) を用いて検討することとした。誘導化反応の手順はまずPFPA、HFIP混合溶液中でエステル化を行い、次にこれを乾固して acetonitrile 中でPFPAと反応させアミド化を行うというものである (Scheme I-1-2)。標品について、ここに示した方法で誘導化を行いGC/MS測定を行って各化合物の特徴的フラグメントピークの検出を行ったところ、HFIP-PFP化された化合物の分子イオンピークは観測されず、二重の誘導化が行われているか否かについて判定できなかった。この場合のGC/MS測定は、イオン化の効率が良いがフラグ

メントピークが強く観察されやすいとされているEI (pos) (electron impact/positive ion detection)法で行ったため分子イオンピークの検出が出来なかった可能性も考えられた。そこで分子イオンピークが検出されやすいとされている化学イオン化法を用いて同様の測定を行ってみることとした。EI法が熱電子の衝突によって試料のイオン化を行っているのに対し、化学イオン化法はガス状の有機化合物を熱電子によってまずイオン化し、イオン化したガス分子が試料に衝突してこれをイオン化するというものであり、EI法に比べて穏やかなイオン化法であるということが出来る。ここで行った化学イオン化法では、イオン化させるガスとしてメタンを用いその結果生じる試料の陰イオンを検出する、NICI (negative ion chemical ionization)法を行った。その結果、表に示した様にここでもHFIP-PFP化された化合物の分子イオンピークは検出されず、代わりにPFP化のみ進行したと考えられるカルボン酸に特徴的なフラグメントピーク、即ちPFP化体の分子イオンピークより質量数で18少ないピークが観測された (Table I-1-1)。このことから、誘導化反応においてHFIPによるエステル化は進行しておらずPFP化のみ進行していると考えられた。確認のため、HFIPによる誘導化の操作を行わずPFPAによる誘導化のみ行ったものについて同様にGC/MS測定を行ったところ、同一保持時間にピークを与えたことから、やはりPFP化のみ進行していることが示された。従って、誘導化反応に関してはPFPAによるアミド化のみ行うこととした。



Scheme I-1-1 Work up procedure of sample preparation for GC

HFIP: hexafluoroisopropylalcohol

PFPA: perfluoropropionic anhydride

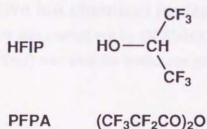
reference: Origitano, T.C., *J. Chromatogr.*, **311**, 17-49 (1984)

- a.
- ```

 eluate from ion exchange resin
 ↓
 dried up
 ↓
 residue
 ↓
 in 200μl of HFIP and 50μl of PFPA
 standing for 30 min at r.t.
 ↓
 dried with Ar stream
 ↓
 residue
 ↓
 in 500μl of acetonitrile and 50μl of PFPA
 standing for 20 min at r.t.
 ↓
 dried with Ar stream
 ↓
 residue
 ↓
 in 1 ml of toluene
 and 0.5 ml of 1M ammonium phosphate (pH5.8)
 ↓
 vortex for 1 min
 centrifugation (3-4 min)
 ↓
 org. layer
 ↓
 GC/SIM

```

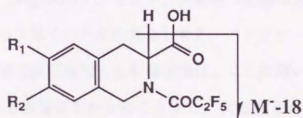
b.



### Scheme I-1-2 Derivatization of samples for GC/SIM

a) derivatization procedure, b) structures of derivatizing agents

| compounds | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | molecular weight of<br>HFIP-PFP form | unique fragment m/z<br>(relative intensity) |
|-----------|------------------|------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|
| TIC       | H                | H                | 323                                  | <b>305</b>                                  |
| DHTIC     | OH               | OH               | 647                                  | <b>629</b> (2), 482(100)                    |
| HTIC      | H                | OH               | 485                                  | <b>467</b> (15), 319(100)                   |
| MTIC      | H                | OCH <sub>3</sub> | 353                                  | <b>335</b>                                  |
| MHTIC     | OCH <sub>3</sub> | OH               | 515                                  | <b>497</b> (20), 349(100)                   |
| HMTIC     | OH               | OCH <sub>3</sub> | 515                                  | <b>497</b> (25), 349(50), 163(100)          |



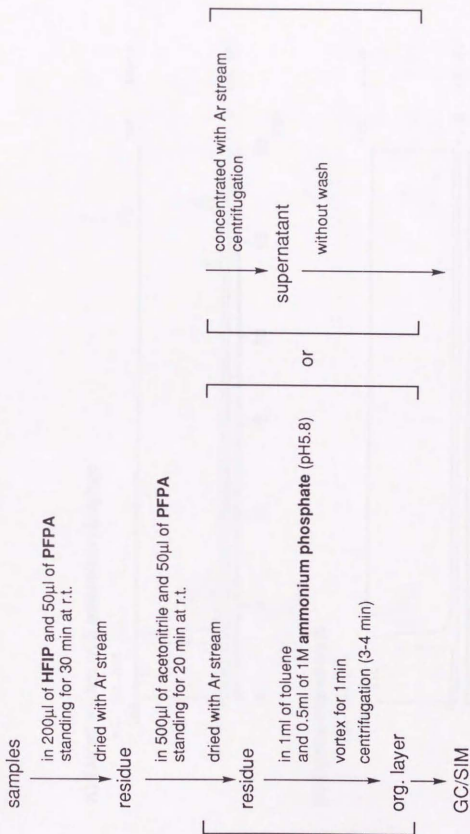
**Table I-1-1** Fragment m/z of mass spectra of TIC derivatives by negative ion chemical ionization method

Measurement was carried out by GC/(NICI)MS described in Experimental Part. Methane (about  $10^{-3}$  Torr) was used for ionization gas.

### (3) 誘導化物のバッファーによる洗浄効果

生体試料を分析する場合には、生体成分由来の夾雑物が測定を妨害することが考えられる。このような夾雑物を減少させる目的で、参考とした方法では誘導化反応後誘導化物をpH5.8のリン酸アンモニウムバッファーで洗浄している。この方法を用いると誘導化試料中に存在している水溶性の夾雑物を除くことが可能であると思われる。しかし、バッファーによる洗浄は夾雑物を減少させる一方、誘導化物の分解も招く可能性が考えられる。比較的大量の目的物を検出する場合には、バッファーによる洗浄を行っても目的物は充分検出可能な量誘導体として存在していると考えられるため有効な操作であるといえるが、微量分析の場合は、夾雑物の減少、誘導化物の分解の両者の兼ね合いとなるだろう (Scheme I-1-3)。合成標品を用いた誘導化物のGC/MS測定では、図に示したようにバッファーによる洗浄を行った場合目的物ピークの線幅が広がり、誘導化物の分解が起こっていることが示された (Fig. I-1-1)。そこで、夾雑物の影響はSIM法を用いた選択的なイオン検出によって除くことが出来ると考え、バッファーによる洗浄は行わないこととした。誘導化反応後加える有機溶媒は、はじめ用いていたtolueneに代えてacetonitrileとしても影響はなかったことから、反応液をそのまま遠心し上清をとることとした (Fig. I-1-2)。

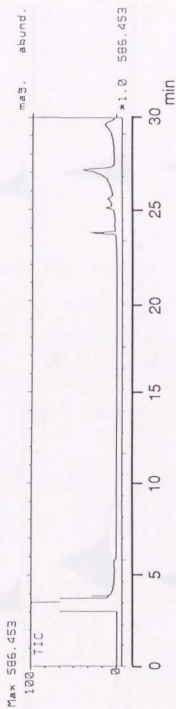




**Scheme I-1-3 Work Up Procedure of Sample Derivatization for GC/SIM with or without buffer washing**

HFIP=hexafluoroisopropanol, PFPA=perfluoropropionic anhydride

A) Extract washed with ammonium phosphate



B) Extract without wash

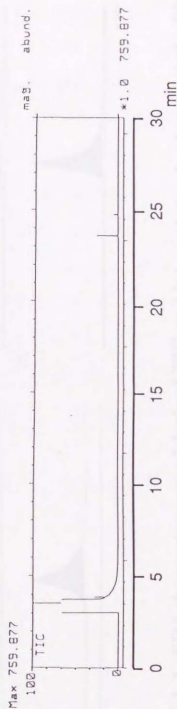
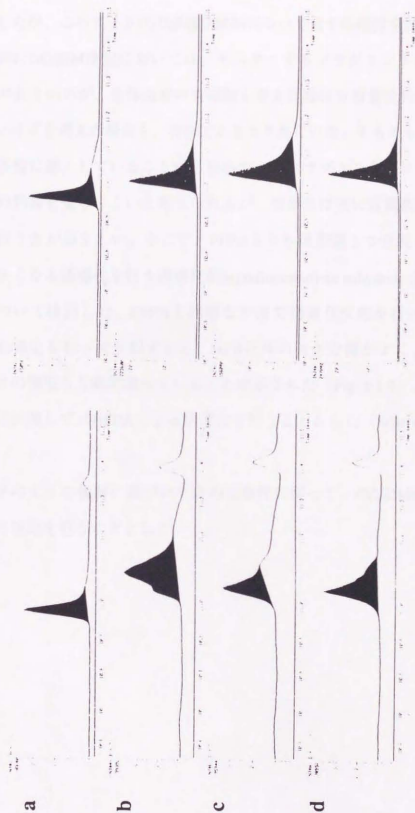


Fig. I-1-1 Total ion chromatogram of TIC extracted from standard solution according to the work up procedure



**Fig. 1-1-2 SIM chromatogram of derived TIC and internal standard extracted with various solvents**

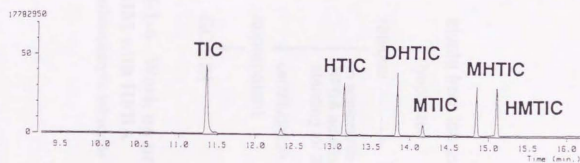
a) acetonitrile, b) acetonitrile+toluene, c) acetonitrile+ethyl acetate, d) acetonitrile+methylene chloride.  
left: internal standard (7FDIC), right: TIC.

#### (4) TIC類のモノアシル化誘導化法の検討

前項(2)において、二重の誘導化は進行せずアミノ基のアミド化のみ行うこととしたが、このアミド化の誘導化試剤について若干の検討を加えることとした。一般的にGC/SIM測定においては、モニターするフラグメントピークのマスナンバーが大きい方が、生体由来の夾雑物を考えた場合も質量分析器のバックグラウンドノイズを考えた場合も、有利であるとされている。そもそも誘導化試剤にフッ素を多量に導入していることから検出すべきフラグメントマスナンバーは他の夾雑物の影響を受けにくいと考えられるが、出来れば更に質量数の大きい領域で測定を行う方が望ましい。そこで、PFPAよりも炭素鎖1つ分長く、質量数にして50大きくなる誘導化を行う誘導化剤heptafluorobutyric anhydride (HFBA)による誘導化について検討した。PFPAと同様な方法で誘導化反応を行った試料についてGC/MS測定を行って比較すると、HFB化体の方が分離がよく、また各化合物のピークの強度も比較的揃っていることが示された (Fig. I-1-3)。このことから、誘導化に関してはHFBAによる誘導化を行うこととした (Scheme I-1-4)。

以上のような検討に基づいて定めた条件に従って、GC/SIM法による生体試料からの検出を行うこととした。

A) HFBA



B) PFPA

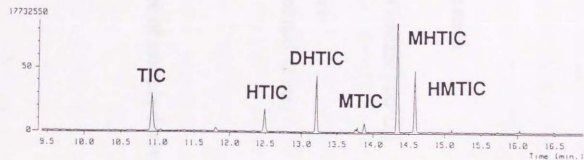
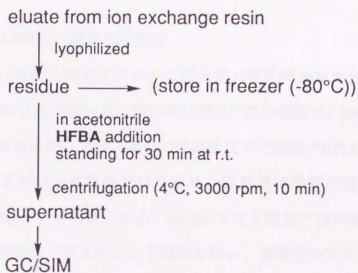


Fig. I-1-3 Total ion chromatogram of authentic TIC derivatives with HFBA or PFPA





**Scheme I-1-4 Work up procedure of sample derivatization for GC/SIM with HFBA**

HFBA: heptafluorobutyric anhydride

#### (5) HPLC/ECDを用いた検出法について

GC/SIM法以外の検出方法によるTIC類の検出も検討することとし、電気化学検出器ECDを備えたHPLCによる分析の条件について検討した。電気化学検出器は、セルに電極を配しこれに特定の電圧をかけることで目的化合物の酸化還元による電流を測定するものであるが、酸化あるいは還元されるものだけを検出するため、電圧の設定を適切に行えば感度よく目的物の測定が出来る。TIC類のうち、芳香環に水酸基を有するものは酸化されやすくECDによって測定可能と考えられる。

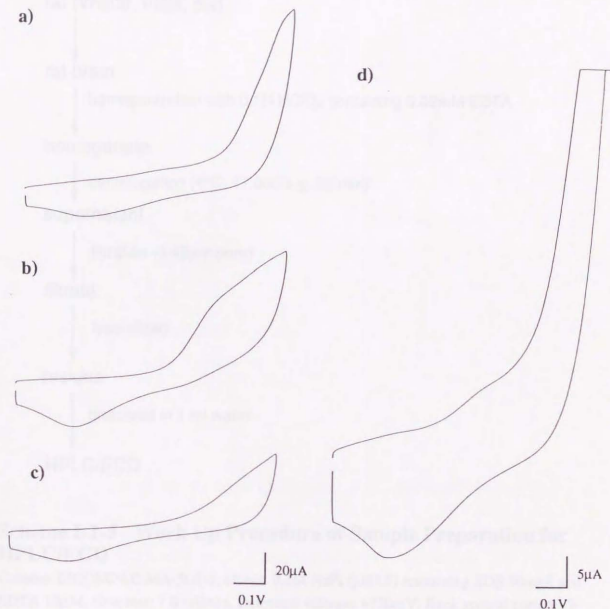
#### (6) HTIC、MHTICの酸化電位測定

TIC類のうち、HTIC、MHTICについて酸化還元電位の測定を行った。測定はcyclic voltammetryによって行った。酸化電位測定の際の溶媒は、pH4.3のリン酸ナトリウム緩衝液を用いた。アミノ酸などの高極性の化合物でHPLC/ECDを行う際にはODSカラムを用いた逆相系で行うため、移動層は酸性の緩衝液を用いる(pH3.5 NaPi buffer)。このことから、同様にかなり酸性の強い条件での酸化電位を測定するのが妥当と考えた。白金電極を用い、緩衝液中でのHTIC、MHTICそれぞれの酸化電位を測定したところ、HTICでは、600mV付近に小さい酸化波が検出され、更に700mVを越える電位で大きな酸化波が検出された。また、MHTICでは700mV付近にやはり小さな酸化波がみられ、また800mVを越える電位でも酸化波が観測された (Fig. I-1-4)。溶媒であるリン酸ナトリウム緩衝液のみでの測定でも800mVを越える電位ではかなり酸化電流が観測されることから、酸化波が小さいため検出の感度に問題が残るものの、緩衝液は酸化されにくく目的化合物は酸化される電位として750mVを測定電圧とすることとした。

#### (7) TIC類のHPLC/ECDによる分析条件

HTIC、MHTICについて生体試料からの検出を行うため、HPLCの分析条件を

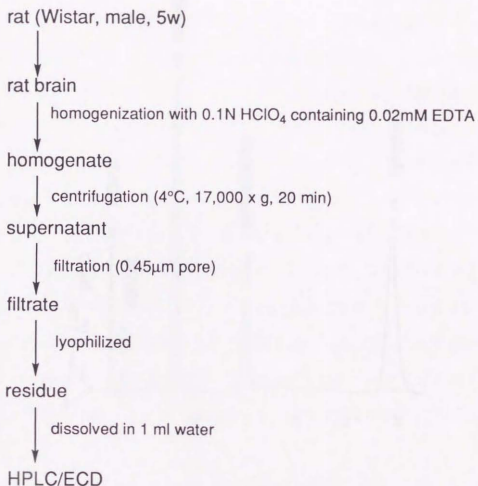
検討した。試料調製は脳内アミン、アミノ酸の分析を行うための定法に従い、0.02mM EDTAを含む0.1N 過塩素酸で試料をホモジナイズしこれを冷却遠心して上清をとった。通常はこれをそのままHPLC/ECD分析の試料とするが、微量分析のため、これをさらに凍結乾燥して濃縮し分析に供した (Scheme I-1-5)。HPLCの移動層条件は、一般的なモノアミン分析の条件を改良した。一般的なモノアミン分析では、ODSカラムを用い、pH3.5のリン酸ナトリウムバッファーに分離をよくするためのイオンペア試薬sodium octyl sulfate (SOS)、移動層中に混入していると思われる金属イオンをトラップするためのEDTAを混合し、これとmethanolを9:1の容積比で混合し、これを移動層とする。実際の分析では、イオンペア試薬としてはsodium dodecyl sulfate (SDS)を用いた。SDSの濃度は種々検討したが、アミノ酸の保持時間には大きな影響を与えなかった。一方、EDTAは、検出電流の安定性に大きな影響を与えた。特に問題としている数nAレベルの電流の検出ではEDTAの存在が不可欠であった。しかし、EDTA自身が酸化される性質を有しており高濃度すぎるとback ground currentを増加させると考えられる。一般的なモノアミン分析条件で、脳内に存在すると考えられるdopamine、epinephrine、norepinephrine、DOPA、tyrosineとHTIC、MHTICとはよい分離が得られた (Fig. I-1-5)。



**Fig. I-1-4 Cyclic voltammograms of HTIC and MHTIC**

Each of HTIC 3.9mg hydrobromide and 4.5mg of MHTIC hydrochloride was dissolved in 20ml of 0.1M NaPi (pH4.39). Measurement was carried out in 0.1M NaPi (pH4.39) after Ar gas bubbling for 5min. Pt electrode was used. Sweep rate was 20sec/V. Measurement range was 0 to +1V. Reference was S.C.E.

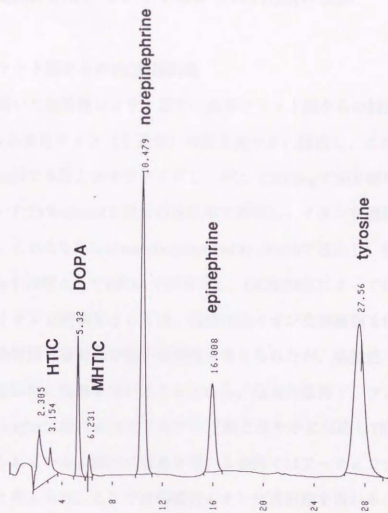
a) HTIC, b) MHTIC, c) solvent, d) HTIC( a x5 )



#### **Scheme I-1-5 Work Up Procedure of Sample Preparation for HPLC/ECD**

Column: EICOMPAC MA-5ODS, eluent: 0.1M NaPi (pH3.5) containing SDS 50mg/l and EDTA 10µM, flow rate: 1.0 ml/min, Detection voltage: +750mV, Back ground current: 3-7nA.





**Fig. I-1-5 Chromatogram of authentic TIC derivatives by HPLC/ECD**

EICOMPAK MA-50DS (EICOM) was used. Eluent was the mixed solvent of 0.1M NaPi (pH3.5) containing SDS 50mg/l and methanol (9:1(v/v)). Flow rate was 1.0ml/min. Detection voltage was +750mV.

## 2 GC/SIM法を用いたラット脳からのTIC類の検出

### (1) ラット脳からのTIC類抽出法

標品を用いた条件検討より、以下の条件でラット脳からの抽出を行った。無処置のWistar系雄性ラット（5週令）の脳を速やかに摘出し、これを5ml/g wet brainの75%ethanolで氷浴上ホモジナイズし、4℃、27000xgで20分間冷却遠心し、その上清を用いた75%ethanolと同量の蒸留水で希釈し、イオン交換樹脂カラムにアブライした。これを0.1M sodium phosphate buffer (NaPi)で溶出し、溶出液を凍結乾燥後acetonitrileを溶媒としてHFBAで誘導化し、GC/SIM法によって分析した（Scheme I-2-1）。イオン交換樹脂としては、弱酸性陽イオン交換樹脂を用いた。弱酸性陽イオン交換樹脂は吸着力が弱い可能性も考えられたが、強酸性イオン交換樹脂を用いると溶出時に塩基を用いることとなる。塩基性条件下、フェネルアルミン類はPictet-Spengler反応によってアルデヒド類と速やかに反応しTIQ化合物を与えることが知られている。溶出に塩基を用いる条件ではアーティファクトが生成しやすくなると考えられ、ここでは弱酸性イオン交換樹脂を用いることが妥当と考えられた。

弱酸性イオン交換樹脂はBio-Rex 70（Bio-Rad社製）を用いた。いくつかのイオン交換樹脂について、標品を用いて回収実験を行ったが、Bio-Rex 70を含め、いずれのイオン交換樹脂も良好な回収率は示さなかった。アブライ速度を遅くする、樹脂量を増やす等の改善を行えば回収率は上昇すると考えられるが、アーティファクトの生成などの危険性も考え速やかな処理を優先した。比較的よい回収率が得られたBio-Rex 70を用いることとし、検量線に用いる試料も同様の条件でイオン交換樹脂を通した（Table I-2-1）。回収率が低い場合、測定値から試料中の実値を換算する際に誤差が生じやすいが、検量線試料も同様にイオン交換樹脂を通すことで換算せずに定量を行うこととした。

ラット脳の摘出から抽出操作まではすべて氷浴上で行い、凍結乾燥後に保存する場合に-80℃で凍結保存した。

### (2) ラット脳からのTIC類の検出

無処置のWistar系ラット脳からの抽出試料をGC/SIM法で分析しTIC類の検出を行った。標品を合成した6種のTIC類、すなわちTIC、HTIC、MTIC、DHTIC、MHTIC、HMTICについて、それぞれの化合物のマススペクトルにおいて特徴的な2つのフラグメントマスナンバーをモニターし、各化合物について2つのSIMクロマトグラムを得た。このうち、tyrosineのTIQ型閉環体に相当するHTIC及び、3-O-methyl DOPAの閉環体に相当するMHTICについては両方のSIMクロマトグラム上に合成標品と一致する保持時間にピークが検出され (Fig. I-2-1)、これら2つのピークの強度比は合成標品のそれとほぼ一致した。このことより、これら2つの化合物がラット脳抽出試料中に存在することが示された。HTIC、MHTIC以外のTIC類については検出されなかった。

### (3) ラット脳内TIC類の定量

各TIC類についてラット脳内含量をGC/SIM法を用いて定量しところ、HTICについては9.58 pmole/g brain またMHTICについては48.1 pmole/g brainであった。抽出操作中に生成すると考えられるアーティファクト量を評価するため、芳香環の3,5位に重水素の導入された3,5-dideuterotyrosine (Tyr-d<sub>2</sub>)および2,5,6位に重水素の導入された2,5,6-trideutero DOPA (DOPA-d<sub>3</sub>) (Fig. I-2-2)を用い、これをラット脳内に存在すると考えられる量 (生化学実験講座11, 1977) とほぼ同量、無処置のラット脳に添加して同様にホモジネートし、生成する重水素化されたTIC類を定量した。これらの重水素化されたTyr-d<sub>2</sub>或いはDOPA-d<sub>3</sub>から生成するTIC化合物は、いずれの場合も重水素が2つ保持されたTIC-d<sub>2</sub>誘導体となる。そこで、それぞれのTIC誘導体のフラグメントマスナンバーよりも質量数で2だけ大きい質量

数をモニターしここに現れた標品と保持時間の一致するピークについて定量を行ったところ、HTICおよびHMTICではほとんどアーティファクトは生成しないことが示された (Fig. I-2-3)。また、MHTICではアーティファクトの生成が見られたが、その量は無処置ラット脳で検出された量に比べて少量であった (Fig. I-2-3)。これらの結果より、ラット脳内に、tyrosineの閉環体に相当するHTICと3-O-methyl DOPAの閉環体に相当するMHTICが内在性化合物として存在することが示された。これらの化合物はこれまで内在性化合物としては知られておらず、これらのTIC誘導体が新規内在性異常アミノ酸であることが示唆された。

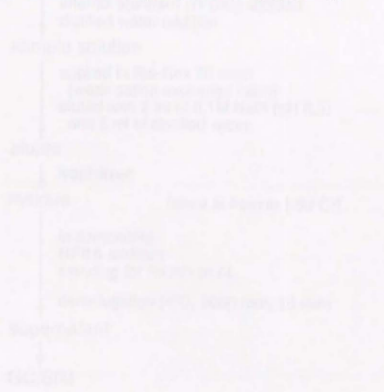
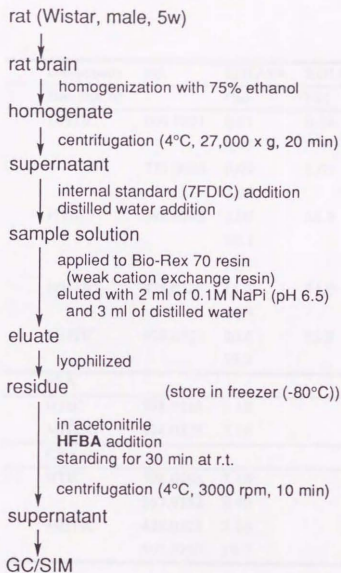


Figure I-2-3: Work Up Procedure of Sample Preparation from Rat Brain for GC/MS

The rat brain (100 mg) was homogenized with 1 mL of 0.1 M HCl and 1 mL of 0.1 M NaOH.



**Scheme I-2-1 Work Up Procedure of Sample Preparation from rat brain for GC/SIM**

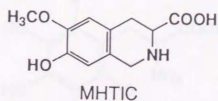
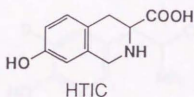
Rat was decapitated under anesthetization with ether. HFBA: heptafluorobutyric anhydride



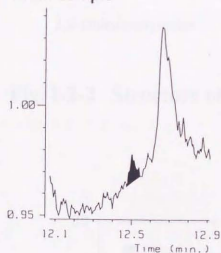
| compounds  | m/z      | EDTA1% | EDTA10% |
|------------|----------|--------|---------|
| Bio-Rex 70 |          | (%)    | (%)     |
| DHTIC      | 609.9971 | 0.81   | 0.14    |
|            |          | 0.45   |         |
|            | 779.0060 | 0.69   | 1.03    |
|            |          | 2.09   |         |
| HTIC       | 398.0268 | 2.09   | 38.9    |
|            |          | 10.1   |         |
|            |          | 13.9   |         |
| HMTIC      | 428.0325 | 11.4   | 74.0    |
|            |          | 44.9   |         |
| MHTIC      | 428.0325 | 20.6   | 16.2    |
|            |          | 33.1   |         |
| PSA        |          |        |         |
| HTIC       | 398.0268 | 7.18   |         |
| MHTIC      | 428.0325 | 2.16   |         |
| CBA        |          |        |         |
| HTIC       | 398.0268 | 7.18   |         |
|            | 567.0152 | 8.49   |         |
| MHTIC      | 428.0325 | 2.16   |         |
|            | 597.0250 | 19.7   |         |

**Table I-2-1 Recovery of TIC derivatives from the ion exchange resins**

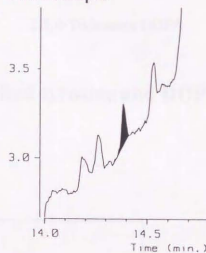
Bio-Rex 70 and CBA are the weak cation exchange resins. PSA is the anion exchange resin. Bio-Rex 70 resins swelled with 0.1M NaPi containing 10%EDTA and 1%EDTA were tested.



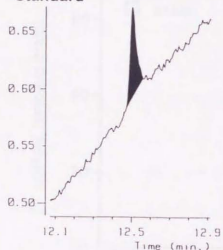
Brain Sample



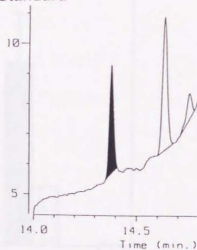
Brain Sample



Standard



Standard



**Fig. I-2-1 SIM chromatogram of rat brain sample and authentic compounds**

Measurement was carried out by GC/SIM method under the condition discribed in Experimental Part.

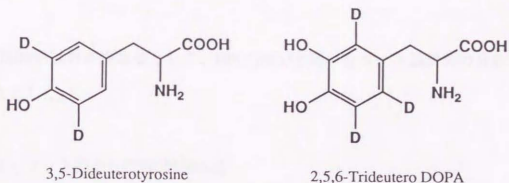


Fig. I-2-2 Structure of deuterized tyrosine and DOPA

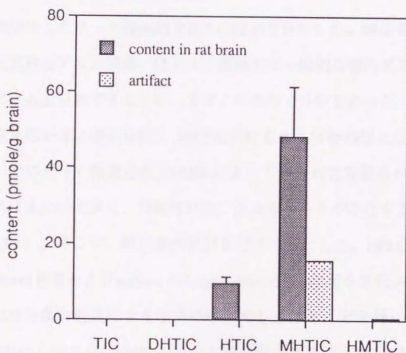


Fig. I-2-3 Content of TIC derivatives in the rat brain

The content in the non-treated rat brain was represented in the left column, and the artifact was in the right at each compounds. The artifact was evaluated by administration of deuterized amino acids.

### 3 HPLC/ECDを用いたラット脳からのTIC類の検出

GC/SIM法以外の検出法として、HPLC/ECDを用いたラット脳試料の分析も行うこととした。

#### (1) ラット脳からのTIC類抽出法

ラット脳からの抽出は標品を用いた検討によって定めた方法に従い行った (Scheme I-1-5)。ラット脳摘出から凍結乾燥までの操作は全て氷浴上で行い、凍結乾燥後保存する場合は-80℃で凍結保存した。

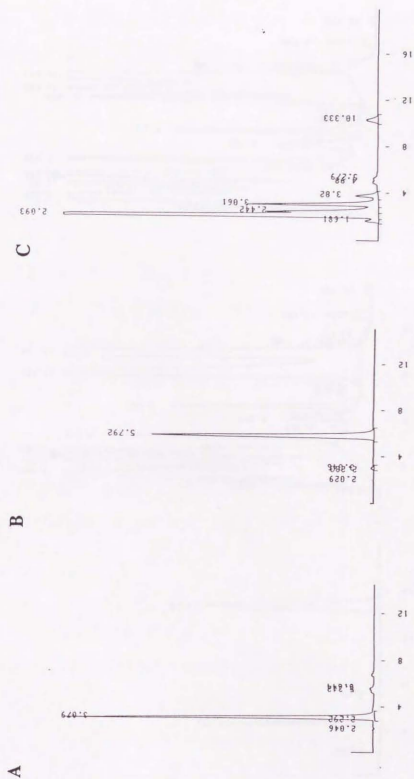
#### (2) ラット脳からのTIC類の検出

前項で抽出したラット脳試料をHPLC/ECDで分析した。標品を用いた検討では脳内の代表的なアミン類或いはアミノ酸類とは一般的な脳内アミン分析条件でクロマトグラム上分離できたため、まずこの条件で分析を行った。実際のラット脳抽出試料を用いると標品HTIC、MHTICに対応する保持時間にピークが見いだされたが、そのピーク強度はGC/SIM法によって得られた定量値から推定される強度に比べはるかに大きく、目的物以外に重なるピークが存在すると考えられた。

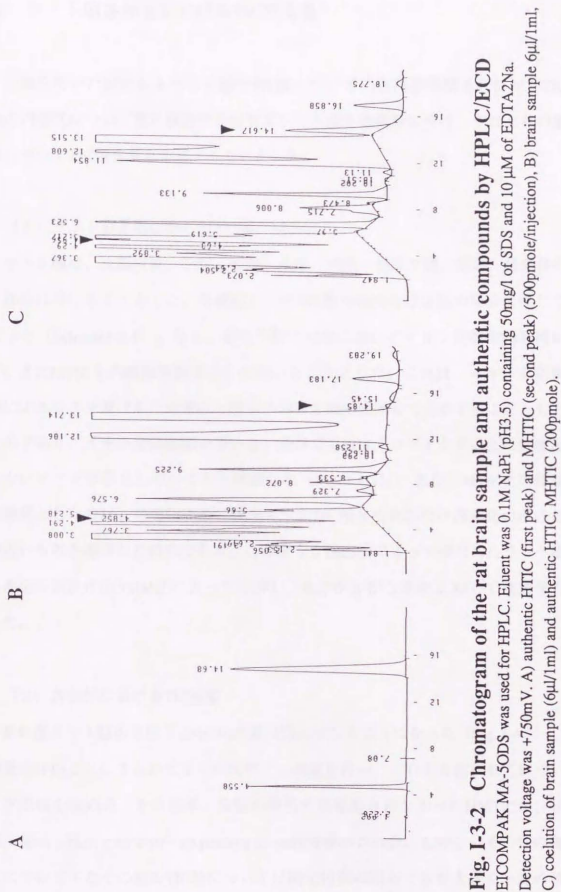
(Fig. I-3-1)。そこで、更に条件検討を行うこととした。HPLC移動層中に含まれるmethanol含量およびsodium dodecyl sulfate (SDS)含量を変化させて検討したところ、SDS含量は標品による検討の時と同じくほとんど分離に影響は与えず、methanolを全く加えないNaPi (pH3.5)を移動層とすることでMHTICは、比較的良好な分離が得られた。HTICは、保持時間が短いため、完全な分離は難しく、ピークトップがかろうじて分離する程度の分離が得られた。このようにして、無処置ラット脳試料において分析を行ったところ、この条件においても標品と一致する保持時間のピークが見いだされた。このピークは、標品とのco-eluteによって面

積の増加が確認され、HTIC、MHTICであることが示された (Fig. 1-3-2)。このことより、HPLC/ECDによってもHTIC、MHTICがラット脳内在性化合物であることが示唆された。





**Fig. 1-3-1 Chromatogram of the rat brain sample and authentic compounds by HPLC/ECD**  
 EICOMPAK MA-50DS was used for HPLC. Eluent was the mixed solvent of 0.1M NaPi (pH3.5) containing 50mg/l of SDS, and methanol (9:1(v/v)). Detection voltage was +750mV. A) authentic HTIC, B) MHTIC, C) brain sample.



#### 4 ラット脳各部位におけるTIC類含量

全脳を用いた分析によって2種のTIC類について内在性が示唆されたが、TIC類の内在性について更に検討する目的でラット脳を各部位に分け、それぞれの部位についてTIC類含量を定量することとした。

##### (1) ラット脳各部位からのTIC類の抽出法

ラット脳は、大脳皮質、小脳、延髄、中脳、視床・視床下部、海馬、線条体の7部位に分けることとした。各部位からのTIC類の抽出法は全脳の場合に準じて行った (Scheme I-2-1)。但し、各化合物の抽出においてイオン交換樹脂を用いず、またMTICを内部標準物質として用いることとした。これは、イオン交換樹脂によるロスを避けるため遠心上清をそのまま凍結乾燥して分析することとしたものであり、イオン交換樹脂を用いない条件でもSIMクロマトグラム上に分離出来ないピークは存在しないことを確認した (Fig. I-4-1)。また、MTICを内部標準物質としたのは、誘導化の際に検出すべきTIC類と出来るだけ誘導化の反応性の近いものを選択した結果である。このような抽出法によって抽出したラット脳各部位の試料はGC/SIM法によって分析し、保存が必要な場合は-80℃で凍結保存した。

##### (2) 各部位におけるTIC含量

無処置ラット脳各部位ごとのTIC含量は図に示したようになった (Fig. I-4-2)。定量は10匹ごとにまとめて1つの試料とし測定を行い、これを4回計40匹について平均値を求めた。その結果、全脳の検出では見出されなかったHMTICが、延髄、視床・視床下部で10~20 pmole/g tissue程度検出された。しかし、その他の部位についてまたその他のTIC類については測定値間のばらつきが大きく一定の傾

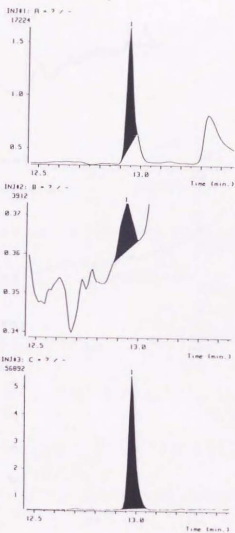
向は得られなかった。全脳の検出では見出されなかったHMTICが、部位ごとの定量時に見出されたのはHMTICが、限られた部位に少量存在していたため全脳を用いた分析時には測定の検出限界を下回ってしまったことによると考えられた。



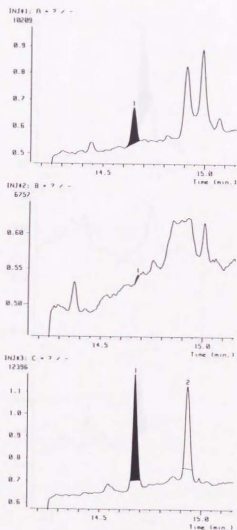
Fig. 1-4-13. SIM chromatograms of authentic TIC derivatives and brain extract samples separated by the ion exchange resin.

Chromatograms were recorded on a 500 MHz spectrometer. The samples were dissolved in methanol/water (1:1) and injected into the ion exchange resin. The mobile phase was 0.1 M sodium acetate, pH 4.0.

## HTIC



## MHTIC

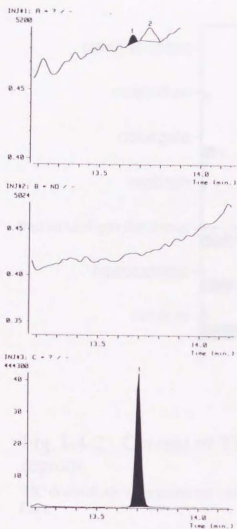


**Fig. I-4-1a** SIM chromatograms of authentic TIC derivatives and brain extract without purification by the ion exchange resin

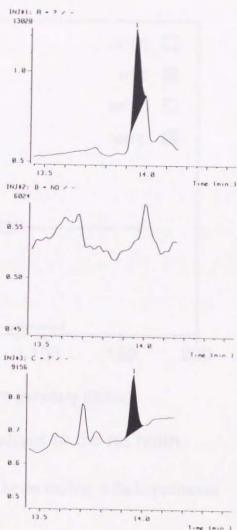
Measurement was carried out by GC/SIM method under the condition described in Experimental Part. upper=brain sample + authentic compound, middle=brain sample, lower=authentic compound



## DHTIC



## MTIC



**Fig. I-4-1b SIM chromatograms of authentic TIC derivatives and brain extract without purification by the ion exchange resin**

Measurement was carried out by GC/SIM method under the condition described in Experimental Part. upper=brain sample + authentic compound, middle=brain sample, lower=authentic compound

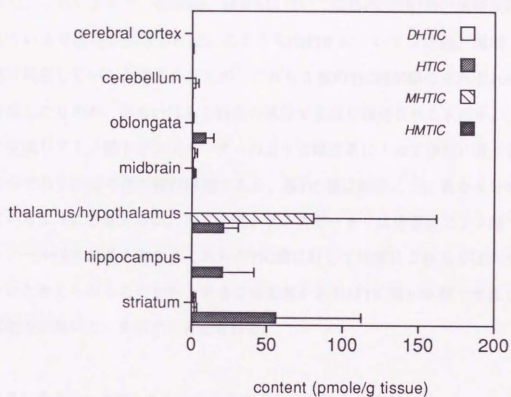


Fig. I-4-2 Content of TIC derivatives in the rat brain regions

TIC derivatives were extracted and measured by the method in the Experimental Part.

## 5 考察

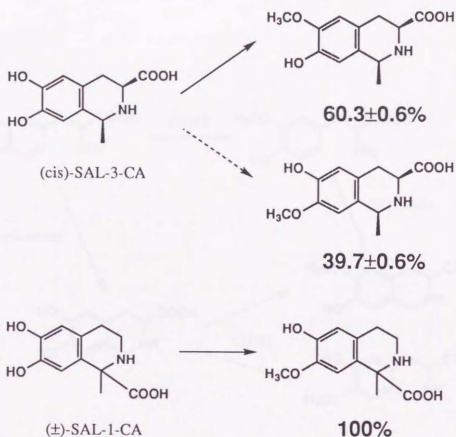
### (1) 脳内分布について

ラット全脳を用いた分析、更にラット脳各部位ごとのTIC類の定量によって、HTIC、MHTIC、HMTICの3種のTIC誘導体がラット脳内に存在することが示唆された。これによって、tyrosine、DOPAについて生体内でTIQ型の閉環反応が進行している可能性が示唆された。このうちHMTICについては延髄、視床・視床下部に局在していると考えられたが、これら3種のTIC類が脳のそれぞれの部位で生成したものか、あるいはある特定の部位で生成し輸送されたものか、また末梢で生成しアミノ酸トランスポーターのような輸送系によって中枢に取り込まれたものであるかは今後の検討課題である。各TIC類は部位ごとに異なる分布を示しているようにも見えるが、アミノ酸トランスポーターは芳香族アミノ酸かつフェノール性水酸基を有するこれらのTIC類に対して厳密にこれらを区別する事はないと考えられることから、大きな分布差があればTIC類が中枢で生成している可能性が高いことを示すと考えられる。

### (2) カテコールOメチルトランスフェラーゼによる代謝

Dopamineは、catechol-O-methyl transferase (COMT)によって3位がモノメチル化され3-O-methyldopamineとなることが知られている。同様にDOPAも3位の水酸基がモノメチル化され3-O-methyl DOPAへと代謝されることが知られている。ラット脳の分析よりMHTIC、HMTICが検出されたことは、この化合物がDOPAを前駆体としてCOMTによる代謝と閉環反応を経て生成している可能性を示唆する。Collins, M.A. (1983)によると3-carboxyl salsolinolのCOMTによる代謝では、dopamineなどと異なり、6位(dopamineの3位に対応)、7位(同じく4位に対応)両方にモノメチル化が進行することが報告されている。また、1-carboxyl

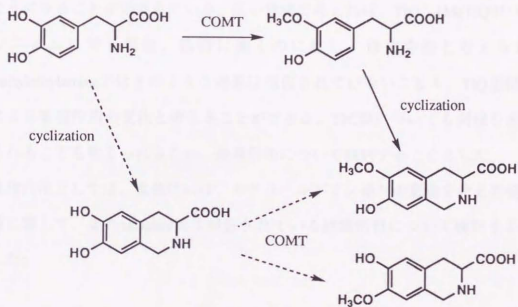
salsolinolでは、6位には全くメチル化が進行せず7位にのみモノメチル化が起こることも示されている (Scheme I-5-1)。このことからTIC類のようなTIQ骨格を有するcatechol類も7位にモノメチル化が進行すると考えられる。全脳の検出においてMHTICのみが検出されたことは、DOPAのTIQ型閉環反応においてはまずDOPAのCOMTによる3位モノメチル化が起こりその後閉環する経路が主であり、先に閉環しその後COMTによるモノメチル化が進行する経路はマイナーであることを示していると考えられる (Scheme I-5-2)。一方、ラット脳各部位ごとのTIC類の検出において部位によってはHMTICが検出されたことは、ある限られた部位においては先に閉環しその後モノメチル化される経路も存在することを示唆するものと考えられる。HMTICが生成する部位においては、そのDOPAからの中間体であるDHTICも生成しているはずであるがこれは見いだされない。これはCOMTによる代謝が速いと考ええると合理的に説明される。SalsolinolのCOMTによる代謝実験では、その代謝速度はdopamineやnorepinephrineに比べて3～5倍速いことが知られており (Collins, A.C., 1973)、DHTICのCOMTによる代謝も速いことが予想できる。



**Scheme I-5-1 Mean percentage distribution ( $\pm$ S.D.) in rat striatum, hypothalamus, and hippocampus of the (6-) and (7-) O-methylated phenolic metabolites of two catecholic TIC derivatives**

Six rats per TIC derivative were used. (cis)-SAL-3-CA: *cis*-salsolinol-3-carboxylic acid, (±)-SAL-1-CA: (±)-salsolinol-1-carboxylic acid.

reference: Origiano, T.C., *J. Neurochem.*, **41**, 1569-1575 (1983)



**Scheme I-5-2 Proposed O-Methylation Pattern of DOPA and TIC Derivatives by Catechol-O-methyl Transferase (COMT)**



## 第二章 TIC類の薬理活性についての検討

序論でも述べたように、amphetamine、MDAには運動量増加作用があるのに対し、TIQ型閉環体である1,3-dimethyl TIQ及び3-methyl-6,7-methylenedioxy TIQでは運動機能障害や運動量減少作用が認められ、閉環することで逆の薬理作用を有するようになることが示されている。広い意味で考えれば、TIQ、1MeTIQがパーキンソニズムに対し発症、防御に働くのに対し、母化合物と考えられる2-phenylethylamineではそのような効果は報告されていないことも、TIQ型閉環反応による薬理作用の変化と考えることができる。TIC類についても同様な変化がみられることも考えられるため、薬理作用について検討することとした。

薬理作用としては、具体的には、カテコールアミン系への影響を考え自発的運動量に関して、またsalsolol類で報告されている鎮痛活性について検討することとした。

### 1 自発的運動量に及ぼす影響

Tyrosine、DOPAはカテコールアミン系神経伝達物質の前駆体である。このことからカテコールアミン系への影響を考え、TIC類の自発的運動量に与える影響について検討した。

#### (1) オープンフィールドテストについて

検討に際しては古典的な自発的運動量測定法であるオープンフィールドテストを用い、そのパラメータとして移所行動(ambulation)及び立ち上がり動作(rearing)について運動量を測定した。オープンフィールドテストはHallの方法

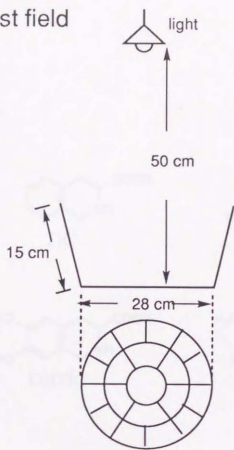
(Hall, 1934)を参考にこれを改良して行った。具体的には、各薬物を腹腔内投与したマウスをテストフィールド中心に置き、2分間にマウスが行う探索行動のうち移動量と立ち上がり動作回数を測定した (Fig. II-1-1)。

## (2) TIC類の投与による自発的運動量の変化

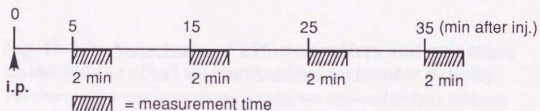
自発的運動量に及ぼす影響は、5種のTIC誘導体即ちTIC、DHTIC、HTIC、MHTIC、MHTICと、Histidine閉環体即ちspinacineについて測定した (Fig. II-1-2)。

合成したTIC類及びHis閉環体について2つの用量、2mg base/kg (塩基として2mg/kgとなる量) 及び10mg base/kgを腹腔内投与し、投与5分後から10分ごとに自発的運動量を測定した。その結果、DHTICとspinacineをのぞくすべての化合物で、対照とした生理食塩水投与群に対して、投与後5分で運動量の増加がみられ、この効果は時間の経過とともに速やかに消失した (Fig. II-1-3)。また、10mg base/kg投与の場合よりも、より低用量である2mg base/kg投与の場合の方がこの効果は著しかった。HTICでは、2mg base/kg投与後5分の測定ではマウスが激しく動き回り飛び上がる動作もみられ、テストフィールドから飛び出してしまふ個体もあった。これに対し、DHTICとspinacineではいずれの用量でも対照群と差が認められなかった。自発的運動量増加作用のみられた化合物で、より低用量でその効果が強かったことは、これらの化合物が自発的運動量増加作用だけでなく運動機能毒性を有することを示唆していると思われ、比較的低用量では自発的運動量増加のみに働き高用量になると毒性も発現するようになると考えられる。

**a. Test field**

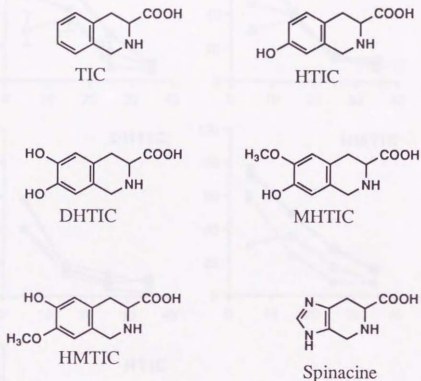


**b. Time Schedule**



**Fig. II-1-1 Test field (a) and measurement schedule (b) of open field test**

The measurement was carried out in the dimm and silent room from 8 a.m. to 12 a.m.



**Fig. II-1-2 Structures of TIC derivatives and spinacine tested for the effect on spontaneous locomotor activity**

The effect on spontaneous locomotor activity was measured by open field test.

Spinacine is the cyclization product of histidine.

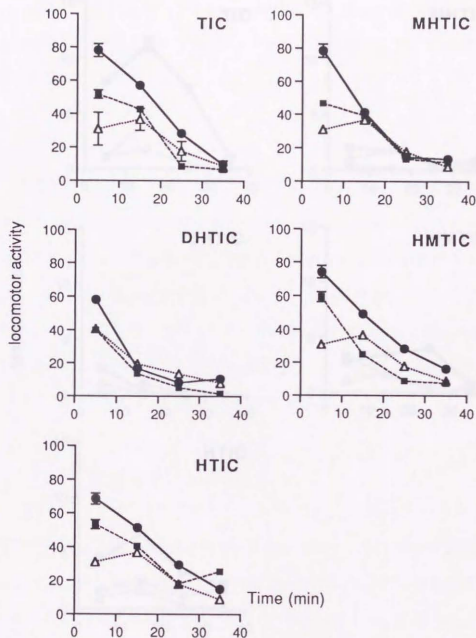


Fig. II-1-3a Effects of TIC derivatives on locomotor activity in mice

The score in ambulation was represented in each graph.

-----■----- 10 mg base/kg    —●— 2 mg base/kg    .....△..... saline

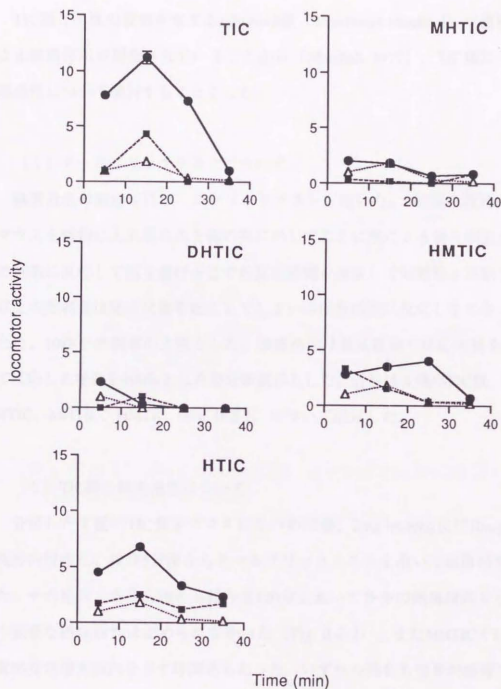


Fig. II-1-3b Effects of TIC derivatives on locomotor activity in mice

The score in rearing was represented in the graph.

-----■----- 10 mg base/kg    —●— 2 mg base/kg    .....△..... saline



## 2 痛覚感受性に及ぼす影響

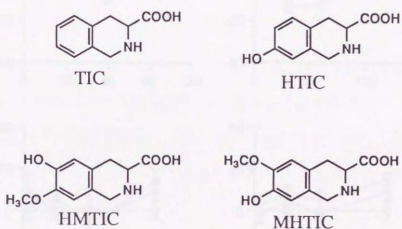
TIC類と同様の骨格を有するsalsolinol類 (3-carboxyl salsolinol) で腹腔内投与による鎮痛作用が報告されていることから (Marshall, 1977)、TIC類についても鎮痛活性について検討することとした。

### (1) テールフリックテストについて

鎮痛活性の測定にはテールフリックテストを用いた。TIC類を腹腔内投与したマウスを暗箱に入れ尾のみを箱の外に出してここに熱による痛み刺激を与え、この刺激に反応して尾を避けるまでの反応時間を測定して対照群と比較した。10秒以上の熱刺激は尾に火傷を起してしまい以後熱刺激に反応しなくなってしまうため、10秒を熱刺激の上限とした。鎮痛活性は無処置時の反応時間を0%、10秒で反応した場合を100%とした百分率表示とした。活性は4種のTIC類、即ちTIC、HTIC、MHTIC、HMTIC (Fig. II-2-1) について測定した。

### (2) TIC類の鎮痛活性について

合成した4種のTIC類をマウスに2つの用量、2mg base/kg及び10mg base/kgを腹腔内投与し、投与5分後からテールフリックテストを用いて鎮痛活性を測定した。その結果、各化合物とも投与後120分において多少の鎮痛傾向を示したものの顕著な鎮痛活性は認められなかった (Fig. II-2-2)。またMHTICでは、逆に痛覚感受性増大傾向を示す時間帯もあった。いずれの場合も効果が顕著でなく、これらの化合物に痛覚感受性を変化させる作用があると判定することはできなかった。



**Fig. II-2-1 Structures of TIC derivatives tested for the effect on pain sensitivity**

The effect on pain sensitivity was measured by tail flick test.

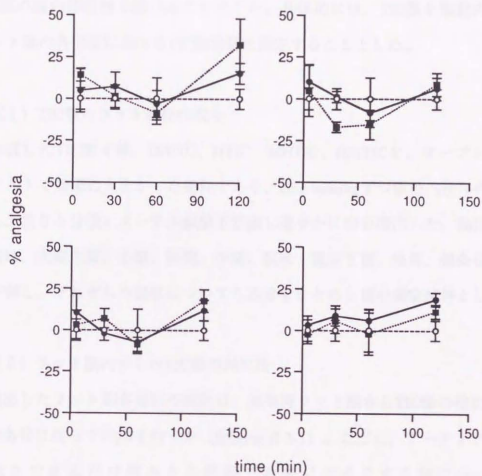


Fig. FII-2-2 Effect of TIC derivatives on pain sensitivity

The effect of pain sensitivity was measured by tail flick test. Values are represented at percentage of the response time to the limit time (10sec).

---○--- saline —●— 10mg/kg —■— 2mg/kg

### 3 TIC類の脳内移行性についての検討

TIC類の薬理作用についてさらに詳しく検討する目的で、ラット脳についてTIC類の脳内移行性を調べることにした。具体的には、TIC類を腹腔内投与したラット脳の各部位におけるTIC類含量を測定することとした。

#### (1) TIC類のラット腹腔内投与

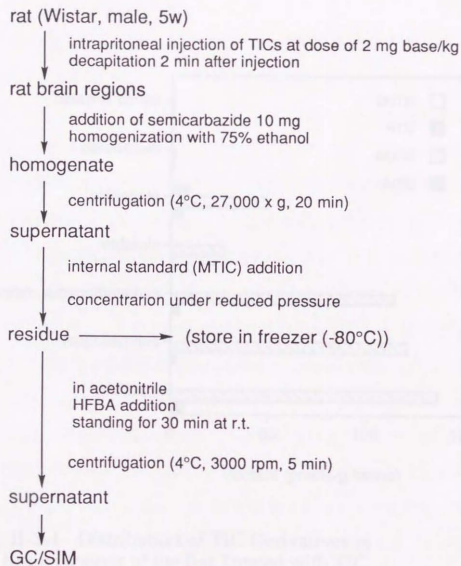
合成したTIC類4種、DHITC、HTIC、MHTIC、HMTICを、オープンフィールドテストで効果の大きかった条件である、2mg base/kgずつ腹腔内投与の条件で投与し、投与5分後にエーテル麻酔下断頭し速やかに脳を摘出した。摘出したラット脳は、大脳皮質、小脳、延髄、中脳、視床・視床下部、海馬、線条体の7部位に分割し、それぞれの部位について5匹分をまとめ1回の測定試料とした。

#### (2) ラット脳内からのTIC類の抽出法

摘出したラット脳各部位の試料は、無処置ラット脳からTIC類の検出を行った時の条件に従って抽出を行った (Scheme II-3-1)。ただし、アーティファクトの生成をできるだけ押さえる目的でホモジナイズする前に semicarbazide (10mg/sample) を添加した。Semicarbazideは、速やかにアルデヒド、ケトン類と反応するため、系中に存在するアルデヒド類をトラップし、アーティファクトの生成を防ぐと考えられる。具体的には、摘出したラット脳各部位試料を semicarbazide 10mg を添加した後ホモジナイズし、これに内部標準物質を加えて冷却遠心した。遠心後上清をとってこれを減圧乾固し、残渣をHFBAによって誘導化した。

#### (3) TIC類投与時のラット脳内TIC類含量

前述のように抽出操作を行ったラット脳試料をGC/SIM法によって分析し、定量した。その結果、DHTICについてはラット脳のいずれの部位においても検出されず、そのほかのTIC類に関しては大脳皮質、小脳を除くいくつかの部位において検出された (Fig. II-3-1)。DHTICが検出されなかったことは、TIC類のうちDHTICのみが自発的運動量増加作用を示さなかったこととよく対応しており、DHTICが作用を示さなかった理由の1つとして中枢への移行性が低いことが考えられた。そのほかのTIC類については、HTICが投与量の0.3%検出され延髄に分布し、MHTICが投与量の7%が検出され延髄をはじめとして中脳、視床・視床下部、海馬、線条体に分布した。HMTICも延髄を始め、視床・視床下部、海馬、線条体に分布したがその量は無処置のラット脳のそれと同程度であり、HMTICについては脳移行性があまり高くない可能性も考えられた。



**Scheme II-3-1** Work up procedure of sample preparation for GC/SIM in measurement of distribution of TIC derivatives in the rat brain



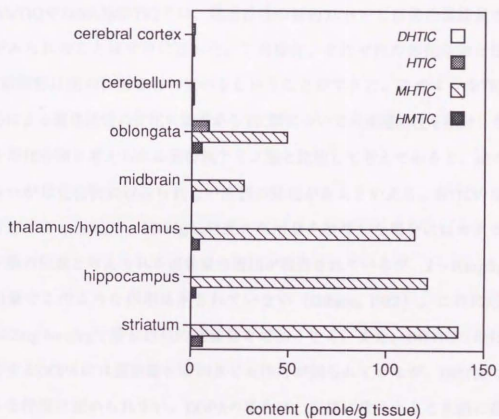


Fig. II-3-1 Distribution of TIC Derivatives in the Brain Regions of the Rat Treated with TIC Derivatives Peripherally

TIC derivatives were injected intraperitoneally at dose of 2 mg base/kg.

#### 4 考察

##### (1) 芳香族アミノ酸との比較

薬物代謝における amphetamine や MDA の TIQ 型閉環反応の生成物である 1,3-diMeTIQ や 3Me6,7MDTIQ では、薬理活性の検討において自発的運動量の減少作用がみられたことはすでに述べた。この場合、それぞれの母化合物と比べ、TIQ 型閉環体は逆の作用を有しているということができた。このような TIQ 型閉環反応による薬理活性の変化の類推から TIC 類についても薬理活性を検討したが、これを母化合物と考えられる芳香族アミノ酸と比較して考えてみると、逆の作用ではないが母化合物にはみられない活性の発現があるといえる。HTIC の母化合物に対応する tyrosine は、100mg/kg 程度の高用量を投与した場合にはカテコールアミン系の促進と考えられる運動量の増加が報告されているが、2~10mg/kg 程度の低用量でこのような作用は示されていない (Gibson, 1982)。これに対し、HTIC は 2mg base/kg で最も自発的運動量を増加させる。また、DHTIC の母化合物に対応する DOPA には運動量を増加させる作用が知られているが、DHTIC ではこのような作用は認められない。DOPA の場合は、末梢に投与すると末梢に存在する aromatic amino acid decarboxylase によって脱炭酸され中枢への移行率が低くなることから低用量では自発的運動量増加がみられないこともあるが、その場合も末梢脱炭酸酵素阻害剤を同時投与することで末梢での濃度が上昇し中枢移行性が高まり運動量の増加につながる。しかし、DHTIC の場合はより高用量である 10mg base/kg で自発的運動量増加作用は低下したことから、この点でも両者は異なる活性を有していると思われる。MHTIC、HMTIC については具体的に比較を行うことはできないが、母化合物である 3-或いは 4-O-methyl dopamine は dopamine の COMT 代謝物に対応し、これが自発的運動量増加作用を有するとは考えにくい。

このように TIC 類についても、母化合物と考えられる芳香族アミノ酸とは異な

る薬理活性を発現していると考えられ、amphetamineやMDAと同様にTIQ型閉環反応によって異なる活性を有する化合物へと変換されることが示唆される。

## (2) 脳内分布と薬理活性の関連について

TIC類は一部の化合物を除いて自発的運動量増加作用があることが示されたが、一般的に自発運動はdopamine神経系と関連があるとされ、特に側坐核のdopamine神経の活動が自発的運動量に影響すると言われている。TIC類を腹腔内投与した場合の脳内分布について検討した結果より、TIC類は大脳皮質、小脳には分布せずカテコールアミン系神経の比較的多く分布すると考えられる部分に分布していた。これは、自発的運動量に影響を及ぼすことと対応しているが、側坐核への分布は直接検討していない。今回の部位分け法では、側坐核は線条体、あるいは一部が中脳に含まれると考えられるが、これらの部位に特に大量のTIC類が分布しているとはいえないことから、側坐核への影響が直接自発的運動量に影響を与えているものか、或いは側坐核以外のカテコールアミン系神経全体への影響が自発的運動量に反映されているのかは判定できなかった。

### 第三章 TICを含むペプチドアナログに関する検討

TIC類は典型的なアミノ酸ではないが、芳香族アミノ酸の1種と考えることができる。この観点から、生体内にTIC類を含むペプチド類が生成している可能性を考えることもできる。典型的アミノ酸ではないことからペプチド合成中にこれが組み入れられる可能性は低いと考えられるが、ペプチド鎖中の芳香族アミノ酸残基がTIQ型閉環反応によってTIC類へと変換される可能性は考えられる。このような観点から、ペプチド鎖中にTIC誘導体を含むような化合物について検討を加えることとした。

#### 1 N末にTICを有するジペプチドアナログの合成

まず最もシンプルなTIC類であるTICそのものを含むものを考え、ペプチドとしても最も単純なジペプチドを取り上げることとした。具体的には、中枢投与で鎮痛活性を示すkyotorphin (L-Tyr-L-Arg)を規範とし、N末にTICを含むジペプチド、TIC-L-Argについて検討することとした。

##### (1) キョートルフィンアナログについて

Kyotorphinは、ウシ脳からnaloxoneに拮抗するin vivo鎮痛作用を指標に抽出された内在性ジペプチドであるがこれは大槽内投与でMet-enkephalinの遊離を促進し、鎮痛活性を発揮することが知られている (Takagi, 1979)。天然型のペプチドであるため、速やかにpeptidaseで分解され効果を失い、末梢投与では中枢まで到達せず効果を示さない。このアナログとしてTIQ型に閉環した化合物を含むペプチドを考えた場合、peptidaseによる分解を受けにくく末梢投与でも効果を有する可

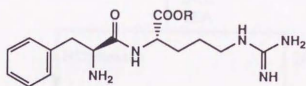
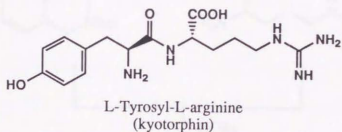
能性が考えられる。このような観点から、TIC-L-Argを考え検討することとした。本来ならば、kyotorphinのN末TyrがTIQ型に閉環した化合物であるHTIC-L-Argについて検討すべきところであるが、合成の簡便さから初期の検討を行う化合物としてTIC-L-Argを選択した。そこで、対照化合物としてTIC-L-Argの母化合物に相当するジペプチドとしてL-Phe-L-Argも合成し、比較検討することとした (Fig. III-1-1)。

## (2) TIC-L-Arginineの合成

TIC-L-Argの合成は、一般的なペプチド合成法に従って行った (Scheme III-1-1)。まずTICをN-Boc化し、これとL-Arg methyl ester dihydrochlorideをDMF中でDCCを縮合剤として縮合した。この時TEAを加えて塩酸をトラップし、また副生成物であるdiacyl ureaの生成を防ぐためHOBtを加えた。縮合して得られたBoc-TIC-L-Arg methyl esterはそのまま塩化水素飽和dioxaneを作用させ脱Boc化してTIC-L-Arg methyl esterを、また2N NaOHでエステル加水分解した後脱Boc化してTIC-L-Argとした。

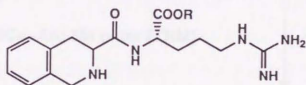
L-Phe-L-Arg、及びそのmethyl esterの合成は、TIC-L-Arg類の合成法に準じて行った。





R=H: L-Phenylalanyl-L-arginine (FR)

R=Me: L-Phenylalanyl-L-arginine methyl ester (FRM)

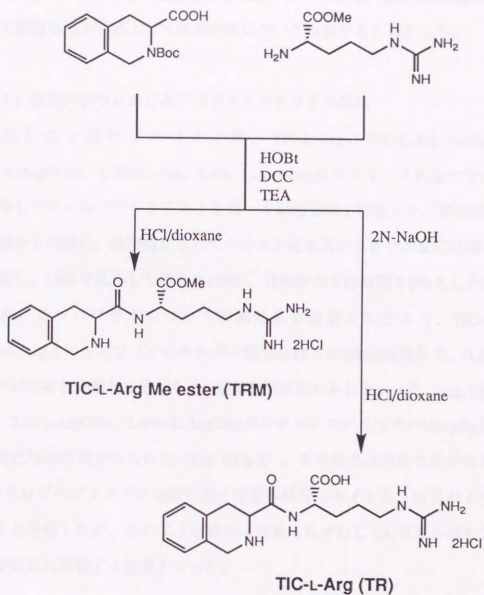


R=H: TIC-L-arginine (TR)

R=Me: TIC-L-arginine methyl ester (TRM)

**Fig. III-1-1** Structure of kyotorphin and its analogue containing TIQ moiety





Scheme III-1-1 Synthesis of dipeptide containing TIQ moiety

## 2 N末にTICを有するジペプチドアナログの鎮痛活性

Kyotorphinが中枢投与で鎮痛効果を発揮することから、合成したTIC-L-Arg類について鎮痛活性を指標として薬理活性について検討することとした。

### (1) 腹腔内投与におけるジペプチドアナログの効果

合成した4種のジペプチド類、TIC-L-Arg、TIC-L-Arg methyl ester (TIC-L-ArgOMe)、L-Phe-L-Arg、L-Phe-L-ArgOMeについて、これをマウスに腹腔内投与してテールフリックテストを用いて鎮痛効果を測定した。鎮痛活性はTIC類の場合と同様に、熱刺激によってマウスが尾を避けるまでの反応時間を測定して評価し、10秒で反応した場合を100%、対照群の反応時間を0%とした百分率で表した。各ジペプチドについて鎮痛効果を測定したところ、TIC-L-Arg、L-Phe-L-Argといったフリーのカルボン酸化合物では10mg/kg投与で、0.5% c.m.c.投与の対照群と比較して差がなく、鎮痛活性は認められなかった (Fig. III-2-1)。一方、TIC-L-ArgOMe、L-Phe-L-ArgOMeのメチルエステル体では10mg/kg投与で痛覚感受性増加作用がみられた (Fig. III-2-2)。その効果は両者で差がなかった。TICを含むジペプチドでは分解が遅く中枢へ移行しやすくなり活性がより大きく現れると予想したが、そのような効果は認められずむしろC末カルボキシル基の状態が活性に影響する結果となった。

### (2) 脳室内投与におけるジペプチドアナログの効果についての予備的実験

腹腔内投与によっては中枢への移行性が低いと考えられ、また規範としたkyotorphinも中枢投与で効果を発揮することから、TIC-L-Argについても中枢への投与を行いkyotorphinとの比較を行うことを考えた。ここでは、1匹のラットを用いて予備的に中枢投与の実験を行った結果を述べる。SD系ラットの右側脳室

に手術によってガイドカニューレを装着し、術後4週間を経た後これを通して薬物の投与を行い、テールフリックテストを行って鎮痛活性を測定した。薬物はTIC-L-Arg、L-Phe-L-Arg、kyotorphinについて検討し、各薬物はkyotorphinのED50程度の量を投与した (Satoh, 1983; Vaught, 1982)。

その結果、kyotorphinでは投与後5分から10分にかけてわずかな鎮痛活性がみられたのに対し、TIC-L-Argでは痛覚感受性増加作用がみられた (Fig. III-2-3)。また、L-Phe-L-Argは効果がみられなかった。薬理実験後ラット脳を摘出し、脳切片を観察したところカニューレは確かに右脳室内に挿入されており、その部分には沈着物がみられた (Fig. III-2-4)。TIC-L-Argを投与した場合に痛覚感受性の増大がみられたことからこの化合物が中枢に存在すると考えられているkyotorphinレセプターを阻害している可能性も考えられる。

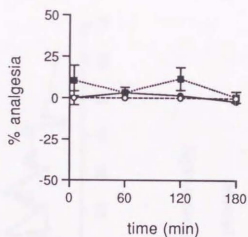


Fig. III-2-1 Effect of dipeptide on pain sensitivity

FR: L-Phenylalanyl-L-arginine, TR: TIC-L-arginine.

---○--- cmc —●— FR .....■..... TR

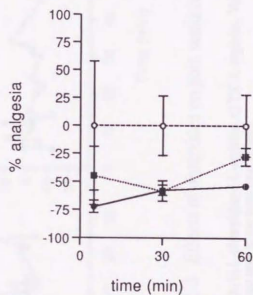


Fig. III-2-2 Effect of dipeptide methyl ester on pain sensitivity

FRM: L-Phenylalanyl-L-arginine methyl ester, TRM: TIC-L-arginine methyl ester

---○--- cmc —●— FRM .....■..... TRM

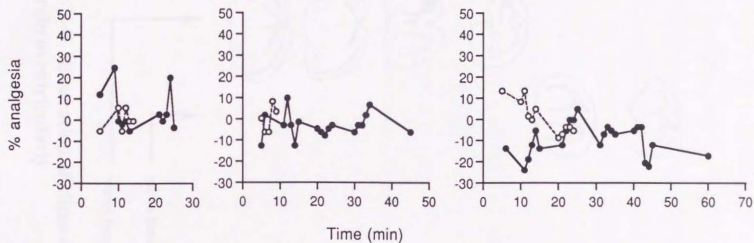


Fig. III-2-3 Effects of dipeptides on pain sensitivity at intracerebroventricular injection

a) kyotorphin, b) L-phenylalanyl-L-arginine, c) TIC-L-arginine. Values are represented as percentage to the response time to the limit time (10sec).

---○--- saline    —●— dipeptides at dose of 148 nmole/injection

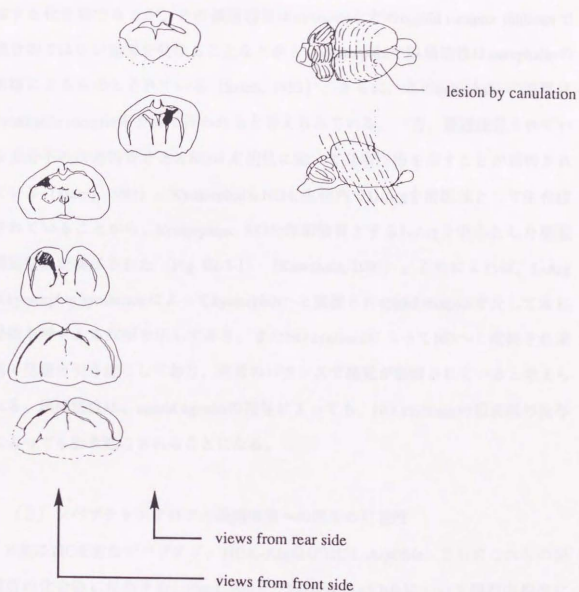


Fig. III-2-4 Illustration of slices of the rat brain treated dipeptides intracerebroventricularly



### 3 考察

#### (1) キョートルフィンの鎮痛に関する調節機構

Kyotorphin (L-Tyr-L-Arg)は、内在性のジペプチドで大槽内投与で鎮痛活性を発揮する化合物であるが、その鎮痛効果はnaloxoneなどのopioid receptor inhibitorで競合的ではない阻害を受けることなどから、kyotorphinの鎮痛活性はenkephalinの遊離によるものとされている (Sato, 1983)。さらに、このenkephalinの遊離はkyotorphin receptorを介して行われると考えられている。一方、最近注目されている低分子の伝達物質であるNOは末梢性に働いて発痛作用を示すことが報告されている (Haley, 1992)。KyotorphinもNOも生体内でL-Argを前駆体として生合成されていることから、kyotorphin、NOを作用物質とするL-Argを中心とした痛覚調節機構が提示された (Fig. III-3-1) (Kawabata, 1993)。これによれば、L-Argはkyotorphin synthetaseによってkyotorphinへと変換されopioid receptorを介して常に発痛を押さえる作用を示しており、またNO synthaseによってNOへと変換され末梢で発痛を引き起こしており、両者のバランスで痛覚が制御されていると考えられる。鎮痛活性は、opioid agonistの投与によっても、NO synthaseの阻害剤の投与によっても引き起こされることになる。

#### (2) ジペプチドアナログの鎮痛機構への関与の可能性

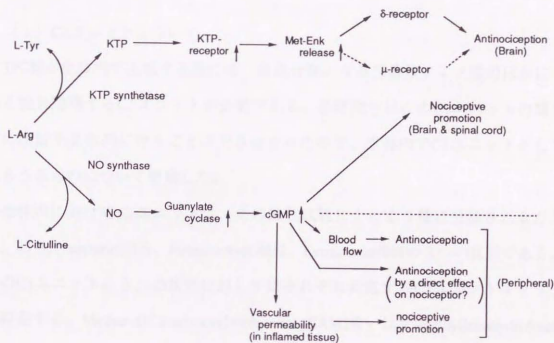
N末にTICを含むジペプチド、TIC-L-Arg及びTIC-L-ArgOMe、さらにこれらの閉環前の化合物に相当するL-Phe-L-Arg及びL-Phe-L-ArgOMeについて腹腔内投与による鎮痛活性を測定したところ、フリーのカルボン酸化合物であるTIC-L-Arg及びL-Phe-L-Argは活性を示さず、TIQ型に閉環したことによって鎮痛活性が増強されることはなかった。一方、TIC-L-ArgOMe及びL-Phe-L-ArgOMeは痛覚感受性増強作用がみられた。これらの化合物は末梢に投与しているため、中枢に存在する

と考えられるkyotorphin receptorの阻害を介する機構で痛覚感受性増大がみられたとは考えにくい。前述の痛覚調節機構を考慮すれば、これらのジペプチドメチルエステルがL-Argの供給源となってNOを介する発痛機構を作動させたと考えることができる。ただし、これらのジペプチドメチルエステルがこの条件下でペプチド分解されるかさらに分解によって生成したL-ArgOMeがNO synthaseの基質になるかについては問題が残る。

また、TIC-L-Argを脳室内投与した場合に痛覚感受性増大傾向がみられたことは、末梢では作用を示さなかったこの化合物を中枢に投与したことでkyotorphin receptorを阻害し、作用を発現したと考えることができる。



Fig. 10. Proposed scheme of pain control by L-arginine.  
Ref. A. Nishikawa et al. J. Pharmacol. Sci. 73:10 (1995)



**Fig. III-3-1 Proposed scheme of pain control by L-arginine**

Ref. A. Kawabata et al, Br. J. Pharmacol., 109, 73-79 (1993)

## 第四章 TIC類の内在性と生理的役割についての考察

### 1 生体内での生成機構に関する推定

#### (1) C1ユニットについて

TIC類が生体内で生成する際には、母化合物となる芳香族アミノ酸のほかにもこれと縮合閉環するC1ユニットが必要である。本研究ではこのC1ユニットの関与の検討を具体的に行うことはできなかったため、生体内でC1ユニットとして働きうるものについて考察した。

生体内におけるC1ユニットは、その酸化状態によって3種に分類されるだろう。即ち、methanol相当、formaldehyde相当、formic acid相当の3つの状態である。このC1ユニットの3つの状態に対してはそれぞれ対応するC1ユニットキャリアが存在する。MethanolはS-adenosylmethionine (SAM) あるいは $N^5$ -methyltetrahydrofolate ( $N^5MeTHF$ ) として、formaldehydeは $N^5N^{10}$ -methylene THF あるいは $N^{10}$ -formyl THF として、またformic acidは $N^5N^{10}$ -methenyl THF として存在している。生体内においてペプチド側鎖あるいは核酸のN-メチル化等はSAMによって行われるものがあることが知られている。THFはC1ユニットを保持したままNADPHによる酸化還元によって $N^5N^{10}$ -methyleneTHFと $N^5N^{10}$ -methenylTHFの間を相互に行き来することができる。また、SAMは $N^5MeTHF$ からmethionineを経て生成する。このほかにもTHF系にC1ユニットを渡す存在としてはglycine、serineなどがある (Fig. IV-1-1)。さらに少量であるがフリーのformaldehydeが生体内に存在するとする報告もある (Laduron, 1975)。さらに、リン酸化されたformaldehydeは高い反応性を有することも報告されている (Smithers, 1987; Jahansou, 1990)。これらのC1ユニットのうちTIC生成に関与すると考えられるものは、1級アミンとの反応性やPictet-Spengler反応からの類推から酸化状態がformaldehyde相当のものが妥当と考

えられる。生体内で formaldehyde がフリーの状態 で長時間存在することは考えにくい ため、生体内で利用しう る formaldehyde 相当 としては  $N^5N^{10}$  methylene THF か 或いは遊離した直後の formaldehyde を考えるのが妥当であらう。本反応が酵素的に行われているとすれば、フリーの formaldehyde を利用するのは難しいと考えられる。補酵素としても利用可能で比較的安定な  $N^5N^{10}$  methylene THF が C1 ユニッ トになっている可能性が高い。これについては、in vitro の系を構築し検討する価値がある と考える。一方、非酵素的な反応によって TIC 類が生成しているとすれば フリーの formaldehyde と反応して生成している可能性も考えられる。

TIC 型に閉環する場合、アルデヒド以外にも salsolinol の例のように  $\alpha$  ケト酸が導入された後脱炭酸する可能性も考えられる。C1 ユニットに関しては、対応する  $\alpha$  ケト酸は glyoxylic acid であり、これは非常に不安定で生体内で反応に関与できるほど長寿命で存在するとは考えにくい。従って、C1 ユニットとして  $\alpha$  ケト酸が利用される可能性は少ないと考えられる。

また、S. hassjoo における DHTIC 生成の場合のように、1 位の炭素に acetate が導入される例も報告されており (Obata-sasamoto, 1981)、C1 ユニット以外のものが導入される可能性も検討する必要があると考えられる。

## (2) 生成反応に関して

TIC 類の生成反応の様式に関しては合成化学的な研究においても明確に機構が明らかにされていないわけではない。比較的よく検討されている salsolinol についても C2 ユニットとして pyruvate が導入されるとする考え方が主流であるが (Dostert, 1990)、ethanol 摂取によって salsolinol 量が増加する とする報告から acetaldehyde と縮合すると考えることもでき (Dostert, 1991; Myers, 1985)、また、pyruvate との縮合に関してもその反応機構は明らかにされていない。Salsolinol では、2 つの反応機構が示されており、TIC についてもこれらの反応機構と類似の様式で反応している と考えることもできる (Scheme IV-1-1)。一方、histidine の閉環体である



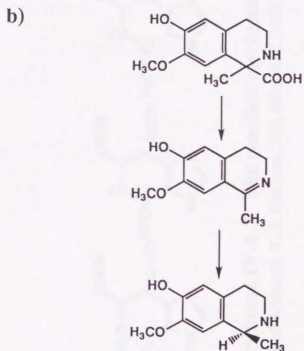
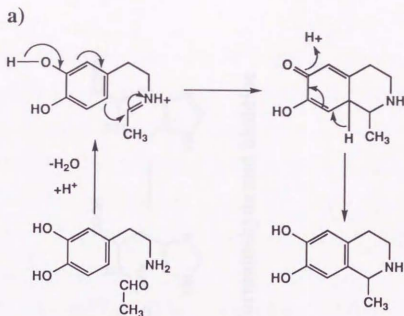
spinacineではformaldehydeが水和した形で反応することが示唆されており (Scheme IV-1-2)、C1ユニットが反応する場合salsolinolとは全く異なる機構による可能性も考えられる。HMTIC、DHTICの場合は閉環に6位の水酸基が関与してsalsolinolと同様な経路を経て生成すると考えることができるが、6位に水酸基の存在しないHTIC、MHTICについてはsalsolinolタイプではなくspinacineのような反応によって生成すると考えた方がよい。

Fig. IV-1-1 Interaction of one carbon, intrahydroxylate covalent complexes, and some of the metabolite products and precursors of these complexes.

Ref. Akiyama, K.C., "Chemistry and Biology of Nicotinic Pathways", Academic Press, Chicago, 1977, pp. 267-289.

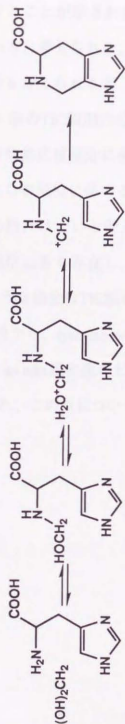






#### Scheme IV-1-1 Two proposed schemes of formation of salsolinols

a) pictet-spengler cyclization, b) oxidation-reduction sequence of the product of Hahn type cyclization (condensation with  $\alpha$ -keto acids). Ref: Brossi, A., Beta-carboline and tetrahydroisoquinolines, Alan R. Liss, inc., New York, 1982, pages 125-133



**Scheme IV-1-2 The reaction mechanism of formaldehyde and histidine**

Ref: Kitamoto, Y., J. Biochem., 263, 4686-4692 (1988)

## 2 生理的役割について

ラット脳内に存在することが示されたHTIC、MHTIC、HMTICは内在性化合物として生成されていると考えられる。これらの化合物は、生体内で何らかの役割を担っている可能性も考えられるが、具体的にこの点については検討を行っていない。無処置ラット脳のTIC類脳内分布や、TIC類を腹腔内投与した場合の脳内分布をみると、比較的基底核部分に多く分布しているように見える。カテコールアミン系物質がこれらの部位に多いことは合理的であるが、芳香族アミノ酸自体はこの部位に多い必然性はないと考えられる。Dopamine等のTIQ型閉環反応を行う酵素がこれらの部位に多く存在し、本来は基質でない芳香族アミノ酸をTIC類へと変換しているような場合はTIC類に生理的意義はないことも考えられるが、salsolinolとの構造類似性から、tyrosine hydroxylase阻害能や、MAO、COMT阻害能、またカテコールアミンup take阻害能などカテコールアミン系の調節に働いている可能性はあると考えられ、この点について活性を検討する必要があると思われる。

## 結論

本研究において以下の結果を得た。

- 1) 無処置ラットの脳内にHTIC、MHTIC、HMTICの3種の新規内源性異常アミノ酸が存在することを示した。
- 2) これらのTIC類の脳内分布は一様ではなかった。
- 3) TIC類は腹腔内投与で自発的運動量増加作用を有していた。ただし、DHTICとspinacineはこの作用を有していなかった。
- 4) TIC類は腹腔内投与した場合、中枢に移行し、大脳皮質、小脳を除く脳内の各部位に分布した。ただし、DHTICは中枢移行性がみられなかった。
- 5) TICをN末に有するジペプチドTIC-L-Argは、腹腔内投与で痛覚感受性に影響を与えなかった。脳室内投与で感受性の増大がみられた。一方この化合物のメチルエステル体は腹腔内投与で痛覚感受性を増大させた。

これらの結果より次のことが示唆される。

- 1) 生体内でtyrosine、DOPAは、TIQ型閉環反応によって対応するTIC誘導体に変換される。
- 2) 生成したTIC類は自発的運動量の増加を引き起こしうる。
- 3) ジペプチドL-Phe-L-Argが脳内でTIC-L-Argに変換されれば、この化合物は痛覚感受性に影響を与える。

本研究によって、芳香族アミノ酸のうちいくつかについても生体内反応としてTIQ型閉環反応が存在し、この反応の生成物が母化合物と異なる薬理活性を発現することが示された。芳香族アミノ酸についても生体内TIQ型閉環反応による代謝過程の存在が示唆され、フェネチルアミン骨格を有する化合物におけるこの生体内反応の一般性が拡張された。

## 実験の部

### 第一章の実験

#### 1 標品合成

##### (1) TIC

L-Phenylalanine 5.01g を濃塩酸 38.5ml 中に溶解し、これに 37% formalin を 11.5ml 加えて 100℃ で 4 時間加熱攪拌した。冷却後、析出物を濾取し冷水及び acetone で洗浄した後乾燥した。無色粉末、3.48g。これを 1N アンモニア水で中和し、沈殿物を濾取乾燥して無色粉末を得た。2.51g (収率 46.7%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.07-3.14 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=11.2Hz, J<sub>2</sub>=16.8Hz), δ 3.27-3.32 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=4.8Hz, J<sub>2</sub>=16.8Hz), δ 4.31 (d, 2H, J=4.8Hz), δ 4.36-4.40 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=4.4Hz, J<sub>2</sub>=10.4Hz), δ 7.26 (s, 4H), δ 9.73 (br, 1.5H), IR: 付 2 参照

##### (2) DHTIC

DL-DOPA 2.1g を 0.5 硫酸 122ml 中に溶解し、これに 37% formalin 12ml を加えて室温で 24 時間攪拌した。これを氷浴中で 2N 水酸化ナトリウムを用いて (28ml) 中和し、しばらく攪拌した後析出した沈殿物を濾取、乾燥した。pale pink powder, 0.79g (収率 36.9%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.71-2.78 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=16Hz, J<sub>2</sub>=11.2Hz), δ 2.92-2.98 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=16.8Hz, J<sub>2</sub>=4.8Hz), δ 3.45-3.49 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=10.8Hz, J<sub>2</sub>=4.8Hz), δ 3.92 (s, 2H), δ 6.52 (s, 1H), δ 6.56 (s, 1H), δ 9.11 (br), IR: 付 2 参照。L-DOPA で同様の反応を行ったが析出物が生成せず、DHTIC は得られなかった。

##### (3) spinacine

L-Histidine 塩酸塩 1 水和物 3.0g を水 30ml 中に溶解し、37% formalin 1.63ml を加えて 120℃ で 1 時間加熱攪拌した。冷却後、減圧下溶媒を溜去し、40ml のメタノールで洗浄した後乾燥し、colorless powder を得た。2.07g (収率 71.1%)。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 3.08-3.15 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=10.3Hz, J<sub>2</sub>=16.9Hz), δ 3.39-3.45 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=5.5Hz, J<sub>2</sub>=16.9Hz), δ 4.20 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=5.5Hz, J<sub>2</sub>=10.3Hz), δ 4.40-4.44 (d, 1H, J=15.8Hz), δ 4.55-4.59 (d, 1H, J=15.4Hz), δ 8.69 (s, 1H), m.p.: 246-252℃

##### (4) 4-(3'-Acetoxy-4'-methoxybenzylidene)-2-methyl-oxazolin-5-one (AMBMO)

Isovaniline 13.0g、N-acetyl glycine 9.2g、sodium acetate (anhydrous) 7.85g を無水酢酸中 27ml に入れ、150℃ で 1 時間加熱攪拌し、その後室温で一晩静置した。これを濾取し、エタノール懸濁させ不溶物を濾取し乾燥した。yellow powder 17.38g (収率 73.9%)。

##### (5) α-Acetoamino-(3'-acetoxy-4'-methoxy)-cinnamic acid (AAAMC)

AMBMO 40.6g を acetone 400ml 水 400ml の混合溶媒に懸濁し、90℃ で一晩加熱還流した。冷却後析出している黄色個体を濾取、乾燥した。yellow powder 17.3g (収



率40.0%)。

(6) 3-Hydroxy-4-methoxyphenylalanine (HMPhe) hydrochloride

AAAMCl 3gをethanol 12mlに懸濁させこれに10% Pt/C 157mgを加え水素ガスで置换し、室温で反応液が完全に黒色になるまで19時間攪拌した。反応後、セライトを用いて不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮してviscous oilを得た。これを再びethanolに溶解し減圧濃縮してamorphousを得た(N, O-diacetyl HMPhe中間体)。

得られたamorphousを10%塩酸13mlに溶解し、120℃で6時間加熱還流した。冷却後約4℃で静置すると結晶が析出したのでこれを濾取した。colorless needles 0.57g (収率51.9%)。

(7) 6-Hydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (HMTIC)

HMPhe hydrochloride 300.3mgに水0.6ml、37% formaldehyde 0.6mlを加えて70℃で1時間加熱還流した。冷却後析出物を濾取乾燥した。pale yellow powder 184.1mg (収率58.5%) (HMTIC hydrochloride)。これをアンモニア水で中和し、析出物を濾取乾燥後、水から再結晶した。colorless needles (収率60.7%)。これを以後の反応に用いた。また、HMTIC hydrochlorideをethanol/ether混合溶媒より再結晶した。pale yellow powder (収率74.1%)。これを薬理試験に用いた。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.91-2.98 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=11.6Hz, J<sub>2</sub>=14Hz), δ 3.09-3.14 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=5.2Hz, J<sub>2</sub>=17.2Hz), δ 3.72 (s, 3H), δ 4.17 (s, 2H), δ 4.28-4.32 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=5.2Hz, J<sub>2</sub>=11.2Hz), δ 6.64 (s, 1H), δ 6.79 (s, 1H), δ 9.12 (s, 1H), δ 9.60 (br, 1.6H)。IR: 付2参照

(8) Ethyl 7-methoxy-6-(1-phenyl-5-tetrazoloxo)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylate (TetMTICEt)

HMTIC 814.5mgをethanol 26.7mlに加え、これに塩化水素飽和ethanol 6.3mlを加えて100℃で10時間加熱還流した。冷却後減圧濃縮して析出物を濾取乾燥した。colorless crystal 922.6mg (収率87.9%) (HMTIC ethyl ester hydrochloride)。

Ester体 1.0gをacetone 50mlに加え、これに更にpotassium carbonate 2.06g、5-chloro-1-phenyl-1H-tetrazole 1.01gを加え70℃で24時間加熱還流した。冷却後不溶物を濾去し濾液を減圧乾固、これに塩化水素飽和ethanol 2.5mlを加え75mlのethyl acetateで希釈した後析出する結晶を濾取乾燥した。colorless solid 1.40g (収率98.2%)。

(9) 7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (MTIC) hydrochloride

TetMTICEt 1.2gを酢酸中に加えこれに10% Pd/C (50% wet) 400mgを加えて水素雰囲気下50℃6時間加熱攪拌した。冷却後セライトを用いて不溶物を濾去した後減圧濃縮し、残さを3N塩酸10mlに溶解しethyl acetate 10mlで2回抽出し、水層をそのまま120℃で3時間加熱還流した。冷却後減圧濃縮し、静置すると結晶が析出した。これを濾取乾燥した。colorless powder 480.4mg (収率65.0%)。これをethanol/ether混合溶媒で再結晶し、薬理試験に用いた。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ

2.97-3.04 (dd, 1H,  $J_1=11.6\text{Hz}$ ,  $J_2=16.8\text{Hz}$ ),  $\delta$  3.19-3.25 (dd, 1H,  $J_1=5.2\text{Hz}$ ,  $J_2=17.2\text{Hz}$ ),  $\delta$  3.72 (s, 3H),  $\delta$  4.27 (s, 2H),  $\delta$  4.33-4.37 (dd, 1H,  $J_1=4.8\text{Hz}$ ,  $J_2=11.2\text{Hz}$ ),  $\delta$  6.84-7.18 (s+d+d, 3H),  $\delta$  9.64 (br, 1.5H), IR: 付2 参照

(10) 7-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (HTIC) hydrobromide

MTIC300.7mgを臭化水素酸 (47%) 2mlに加え140℃で1.5時間加熱還流した。冷却後析出物を濾取し乾燥した。pale orange powder 262.8mg。これをethanol/ether混合溶媒で再結晶した。colorless powder 220.9mg (収率78.8%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.92-2.99 (dd, 1H,  $J_1=11.6\text{Hz}$ ,  $J_2=16.4\text{Hz}$ ),  $\delta$  3.14-3.19 (dd, 1H,  $J_1=5.2\text{Hz}$ ,  $J_2=16.8\text{Hz}$ ),  $\delta$  4.28 (s, 2H),  $\delta$  4.32-4.36 (dd, 1H,  $J_1=4.8\text{Hz}$ ,  $J_2=11.2\text{Hz}$ ),  $\delta$  6.56-7.07 (s+d+d, 3H),  $\delta$  9.48 (s, 3H), IR: 付2 参照。なお、HTICについて別の合成法として、3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA)とformaldehydeからTIQ型閉環体を生成する反応に習い、O-benzyl tyrosine 450mgをparaformaldehyde 117mgと40℃で加熱攪拌して反応させる方法を試みたが、閉環したO-benzyl HTICは得られず、O-benzyl N-formyl tyrosineが生成した (収率76.7%)。このN-formyl体は、phosphorus oxy trichlorideを用いて閉環させることを試みたが、これは分離不能な他種類の生成物を与え、目的物を得ることはできなかった。

(11)  $\alpha$ -Acetoamino-(4'-acetoxy-3'-methoxy)-cinnamic acid (AAMAC)

4-(4'-Acetoxy-3'-methoxybenzylidene)-2-methyl-oxazolin-5-one (MABMO)1.5gをacetone15ml/水15ml混合溶媒中に溶解し、90℃で20時間加熱還流した。冷却後約半分の容量まで減圧濃縮し、析出物を濾取乾燥した。pale yellow powder 685.4mg (収率42.9%)。

(12) 7-Hydroxy-3-methoxyphenylalanine (MHPhe) hydrochloride

AAMAC 504.6mgを、ethanol 4.6mlに溶解し、これに60.9mgの10%Pd/Cを加えて水素雰囲気下室温で一晩攪拌した。これをセライトを用いて不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮してcolorless oilを得た。これを10%塩酸5mlに溶解し、120℃で13時間加熱還流して冷却後減圧濃縮し、析出した結晶を濾取乾燥した。slightly brown crystals 241.6mg (収率56.7%)。

(13) 7-Hydroxy-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (MHTIC) hydrochloride

MHPhe hydrochloride 199.3mgを37% formalin 0.4mlに溶解し、70℃で1時間加熱還流した。冷却後析出した固体を濾取乾燥した。colorless powder 166.7mg。これをethanol/ether混合溶媒で再結晶し、薬理試験に用いた (colorless powder 124.0mg、収率59.1%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.95-3.02 (dd, 1H,  $J_1=10.8\text{Hz}$ ,  $J_2=16.4\text{Hz}$ ),  $\delta$  3.13-3.19 (dd, 1H,  $J_1=4.8\text{Hz}$ ,  $J_2=16.8\text{Hz}$ ),  $\delta$  3.73 (s, 3H),  $\delta$  4.14 (s, 2H),  $\delta$  4.29-4.32 (dd, 1H,  $J_1=4.8\text{Hz}$ ,  $J_2=11.2\text{Hz}$ ),  $\delta$  6.62 (s, 1H),  $\delta$  6.80 (s, 1H),  $\delta$  9.09 (s, 1H),  $\delta$  9.64 (br, 1.7H), IR: 付2 参照

(14) 7-Fluoro-1,2-dihydroisoquinoline-3-carboxylic acid (7FDIC) hydrochloride  
p-Fluorophenylalanine 302.8mgを濃塩酸2.3mlに溶解し、これに37% formalin 0.7ml

を加えて100℃で4時間加熱還流した。冷却後析出物を濾取乾燥し、ethanolから再結晶した。colorless crystals 52.8mg (収率13.8%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 5.15 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>N), δ 7.30 (t, 2H, J=8.8Hz, Ar), δ 7.74 (dd, 2H, J<sub>1</sub>=8.8Hz, J<sub>2</sub>=5.6Hz)

## 2 TIC類の分析条件検討

### (1) HFIP-PFP化反応

標品の場合は、標品TIC誘導体を75% ethanolに溶解しこれを減圧乾固した後HFIP200  $\mu$ lとPFP A50  $\mu$ lを加えてvortexした後室温で静置し30分後Ar気流によって溶媒を蒸発させ濃縮した。これにacetonitrile 500  $\mu$ lとPFP A50  $\mu$ lを加えてvortexし更に30分静置した。

イオン交換樹脂から溶出した場合は、溶出液を凍結乾燥したのち上記と同様に、HFIP200  $\mu$ lとPFP A50  $\mu$ lを加えてvortexした後室温で静置して30分後Ar気流によって溶媒を蒸発させ濃縮し、これにacetonitrile 500  $\mu$ lとPFP A50  $\mu$ lを加えてvortexし更に30分静置した。GC/MS(EI), fr.m/z: TIC: m/z305, m/z186, HTIC: m/z467, m/z348, MTIC: m/z335, m/z216, DHTIC: m/z629, m/z510, MHTIC: m/z497, m/z378, HMTIC: m/z497, m/z378, 7FDIC: m/z340, m/z312

### (2) リン酸アンモニウムバッファーによる誘導化物の洗浄

誘導化反応後、リン酸アンモニウムバッファーで洗浄する場合は、誘導化反応液をAr気流によってほぼ乾固し、これにtolueneを1ml加え更に0.5mlの1M ammonium phosphate buffer (pH5.8)を加えて直ちにvortexし、遠心して2層に分離した後有機層を取った。

バッファーによる洗浄を行わない場合は、誘導化反応後遠心して不溶物を沈降させた後上清をとった。或いは、誘導化後Ar気流によって溶媒をごく少量まで濃縮した後、toluene, ethyl acetate, methylene chlorideのいずれかを1ml加え、vortexしたのち遠心して上清をとり、GC/SIM法で分析してピークを比較した。

### (3) PFP化反応、HFB化反応

PFP化: 標品の場合は、標品TIC誘導体を75% ethanolに溶解しこれを減圧乾固した後acetonitrile 500  $\mu$ lとPFP A50  $\mu$ lを加えてvortexし30分静置した。

イオン交換樹脂溶出液の場合は、これを凍結乾燥あるいは減圧下で乾固し、壁に付着した残さを掻き落として、これにacetonitrile 500  $\mu$ lとPFP A50  $\mu$ lを加えてvortexし30分静置した。その後不溶物を除くため3000rpmで5~10分間遠心した後上清をとった。GC/MS(EI), fr.m/z: TIC: m/z305, m/z186, HTIC: m/z467, m/z348, MTIC: m/z335, m/z216, DHTIC: m/z629, m/z510, MHTIC: m/z497, m/z378, HMTIC: m/z497, m/z378, 7FDIC: m/z340, m/z312

HFB化: 標品の場合は、標品TIC誘導体を75% ethanolに溶解しこれを減圧乾固した後acetonitrile 500  $\mu$ lとHFB A50  $\mu$ lを加えてvortexし30分静置した。

イオン交換樹脂溶出液の場合は、これを凍結乾燥あるいは減圧下で乾固し、壁

に付着した残さを掻き落として、これにacetonitrile 500  $\mu$ l と HFBA 50  $\mu$ l を加えて vortex し 30 分静置した。その後不溶物を除くため 3000rpm で 5~10 分間遠心した後上清をとった。GC/MS(EI), fr.m/z: TIC: m/z 355, m/z 186, HTIC: m/z 567, m/z 398, MTIC: m/z 385, m/z 216, DHTIC: m/z 779, m/z 610, MHTIC: m/z 597, m/z 428, HMTIC: m/z 597, m/z 428, 7FDIC: m/z 390, m/z 362

#### (4) イオン交換樹脂の回収実験

Bio-Rex 70 に関しては、標品TIC類を 8ml の 75% ethanol に溶解し、これを実際の抽出操作と同様に同量の蒸留水で希釈してカラムにアプライし、0.1M NaPi (pH 6.5) 2ml 及び蒸留水 2ml で溶出した。これを凍結乾燥して誘導化し、GC/SIM 法で分析した。バッファーで溶出する代わりに 0.1N 塩酸を用いる方法も行ったが回収率に影響は変化なかった。PSA (Analytichem) は官能基としてカルボキシル基を有する固相抽出カラムであるが、この場合は標品TIC類を 8ml の 75% ethanol に溶解し、これを実際の抽出操作と同様に同量の蒸留水で希釈して無処置の PSA カラムにアプライし、0.1N 塩酸 1ml で溶出してこれを凍結乾燥誘導化して GC/SIM 法で分析した。また、CBA カラムは 2 級アミンを官能基として有する固相抽出カラムであるが、この場合は標品TIC類を 8ml の 75% ethanol に溶解し、これを実際の抽出操作と同様に同量の蒸留水で希釈して CBA カラムにアプライし、やはり 0.1N 塩酸 1ml で溶出し、凍結乾燥誘導化して GC/SIM 法で分析した。

#### (5) GC/MS法、GC/SIM法測定条件

誘導化した試料 10  $\mu$ l をオートサンプラーを用いて GC に注入した。

##### a) GC/MS(EI)法による標品のマススペクトル測定

装置は、HP5890seriesII/JEOL SX-102A/JEOL complement system を用いて行った。

GC: カラム = Rtx-5,  $\phi$  0.25mm  $\times$  30m, 膜厚 0.25  $\mu$ m (RESTEX 社)、オープン温度 = 130 $^{\circ}$ C (5min)-12 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C (5min)、インジェクタ温度 = 220 $^{\circ}$ C、インジェクションモード = splitless (0.5min) 或いは split、キャリアガス = He, 10psi

MS: イオン源温度 = 250 $^{\circ}$ C、イオン化電圧 = 70V、イオン化電流 = 300  $\mu$ A、加速電圧 = 8kV、分解能 = 1000

##### b) GC/MS(NICI)法による標品のマススペクトル測定

装置は、HP5890seriesII/JEOL SX-102A/JEOL complement system を用いて行った。

GC: カラム = Rtx-5,  $\phi$  0.25mm  $\times$  30m, 膜厚 0.25  $\mu$ m (RESTEX 社)、オープン温度 = 130 $^{\circ}$ C (5min)-12 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C (5min)、インジェクタ温度 = 220 $^{\circ}$ C、インジェクションモード = splitless (2min)、キャリアガス = He, 10psi

MS: イオン源温度 = 250 $^{\circ}$ C、イオン化電圧 = 70V、イオン化電流 = 300  $\mu$ A、イオン化ガス = methane (10-3 Torr 程度)、加速電圧 = -200V、分解能 = 1000

##### c) GC/SIM法による測定

装置は、HP5890seriesII/JEOL SX-102A/JEOL complement system を用いて行った。

GC: カラム = Rtx-5,  $\phi$  0.25mm  $\times$  30m, 膜厚 0.25  $\mu$ m (RESTEX 社)、オープン温度 = 130 $^{\circ}$ C (5min)-12 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C (5min)、インジェクタ温度 = 220 $^{\circ}$ C、インジェクションモード = splitless (2min)、キャリアガス = He, 10psi



MS: イオン源温度=250℃、イオン化電圧=70V、イオン化電流=300 $\mu$ A、加速電圧=8kV、コレクタスリット=300 $\mu$ m、スイッチング速度=100ms

### 3 ラット脳を試料としたTIC類検出法

#### (1) ラット脳からのTIC類抽出法

##### a) イオン交換樹脂を用いる場合

無処置のWistar系雄性ラット(5週令)をエーテル麻酔下断頭し速やかに脳を摘出した後、氷浴上で75%ethanolを用いてホモジナイズし、これを4℃、27000 $\times$ gで20分間冷却遠心した。この上清をとり、ホモジナイズに用いた75%ethanolと同量の蒸留水で希釈し、後述する前処理を行った弱酸性陽イオン交換樹脂Bio-Rex 70 (Bio-Rad) 3mlのカラムにアブライした。アブライ後、カラムに0.1M NaPi (pH6.5) 2ml及び蒸留水2mlを流して溶出し、溶出液に内部標準物質(7FDIC, 10nmole)を添加し凍結乾燥した。標品(各1pmole、10pmole、100pmole)についても同様の処理をして検量線用試料とした。

弱酸性陽イオン交換樹脂Bio-Rex 70は、蒸留水で一晩膨潤した後、前処理として次に述べる洗浄を行った。まず3N塩酸中で1時間緩やかに攪拌して洗浄し、洗液がpH6以上になるまで蒸留水で洗浄した。次に3N水酸化ナトリウムで1時間緩やかに攪拌した後、洗液がpH8以下になるまで蒸留水で洗浄し、更に膨潤液を1%EDTA(或いは10%EDTA)を含む0.1M NaPi (pH6.5)に交換し、カラムに充填した。

##### b) イオン交換樹脂を用いない抽出法

無処置のWistar系雄性ラットをエーテル麻酔下断頭し速やかに脳を摘出した後、氷浴上で75%ethanolを用いてホモジナイズし、これを4℃、27000 $\times$ gで20分間冷却遠心した。この上清をとり、これに内部標準物質(7FDIC, 10nmole)を添加し減圧下乾固した。標品(各1pmole、10pmole、100pmole)についても75%ethanol溶液を乾固して検量線用試料とした。

#### (2) 誘導化反応条件

イオン交換樹脂溶出液を凍結乾燥または減圧下で乾固した後、或いはホモジネート遠心上清を乾固した後、壁に付着した残さを掻き落として、これにacetonitrile 200 $\mu$ lとHFBA 30 $\mu$ lを加えてvortexし30分静置した。その後不溶物を除くため3000rpmで5~10分間遠心した後上清をとった。検量線用試料も同様に誘導化した。

#### (3) GC/SIM法によるTIC類の測定条件

誘導化した試料1 $\mu$ lをオートサンプラーで注入した。装置は、HP5890seriesII/JEOL SX-102A/JEOL complement systemを用いて行った。コンタミネーションをさけるためラット脳試料を分析した後検量線試料を分析し、これを用いてラット脳試料中のTIC類の定量を行った。

GC: カラム=Rtx-5,  $\phi$  0.25mm $\times$ 30m, 膜厚0.25 $\mu$ m (RESTEX社)、オープン

温度=130℃(5min)-12℃/min-250℃(5min)、インジェクタ温度=220℃、インジェクションモード=splitless (2min)、キャリアガス=He, 10psi

MS: イオン源温度=250℃、イオン化電圧=70V、イオン化電流=300  $\mu$ A、加速電圧=8kV、コレクタスリット=300  $\mu$ m、スイッチング速度=100ms

### 3 HTIC、MHTICの酸化電位測定法

#### (1) 試料の調製

HTIC hydrobromide、MHTIC hydrochlorideについて試料を調製した。HTIC hydrobromide 3.9mg (14.2  $\mu$  mole)をとり、0.1N NaPi (pH4.39) 20mlに溶解した。MHTIC hydrochlorideも4.5mg (11.8  $\mu$  mole)をとり、0.1N NaPi (pH4.39) 20mlに溶解した。

#### (2) 酸化還元電位の測定

回転リングディスク電極を装備した酸化還元測定装置を用い、セルに試料をいれた後Arガスを5分間以上バブルして溶存酸素を除いた後、0~+1Vの範囲で、掃引速度は20sec/V、Pt電極を作動極とし飽和カロメルロ電極を参照電極として測定を行った。

### 4 ラット脳試料のHPLC/ECD分析法

#### (1) 移動相の調製

0.1M NaPi (pH3.5)にsodium dodecylsulfateを50mg/l、EDTA2Naを10  $\mu$ Mとなるように加え、これとmethanolを9:1の容積比で混合してこれを移動相Aとした。また、methanolを加えないものを調製し、これを移動相Bとした。

#### (2) 標品TIC類のHPLC/ECD分析

装置は、HITACHI 655-15/EICOM ECD-100を用いた。カラムはEICOMPAK MA-50DS ( $\phi$  0.26cm $\times$ 15cm, EICOM)を用い、流速1ml/minとした。検出側はカーボングラフアイトを作動極、Ag/AgCl電極を参照電極として用いた。検出電圧は+750mVとした。移動相Aを用い、norepinephrine、DOPA、tyrosine、epinephrine、HTIC、MHTICそれぞれを10  $\mu$ M含む試料溶液を調製し、これを10  $\mu$ lアブライシ分析した。

#### (3) ラット脳試料のからのTIC類抽出法

Wistar系、雄性ラット(5週令)をether麻酔下断頭し、氷浴上で速やかに脳を摘出した。これに0.02mM EDTAを含む0.1N過塩素酸を脳湿重量あたり5mlの割合で加えホモジナイズし、これを4℃、27000 $\times$ gで20分間冷却遠心して上清を取り、凍結乾燥して1mlの蒸留水を加えて溶解し、HPLC/ECD用の試料とした。

#### (4) ラット脳試料のHPLC/ECD分析

上記(3)のように調製した試料をHPLC/ECDで分析した。また比較のため標品HTIC、MHTICも同時に分析した。装置は、HITACHI 655-15/EICOM ECD-100を



用いた。カラムはEICOMPAK MA-50DS ( $\phi$  0.26cm $\times$ 15cm, EICOM)を用い、移動相A、Bそれぞれを移動相として流速1ml/minで分析した。検出側は作動極としてカーボングラファイトを、参照電極としてAg/AgCl電極を備えたセルを用いた。検出電圧は+750mVとした。1回の分析あたりラット脳抽出試料を6~10 $\mu$ lアンプライした。

## 5 ラット脳各部位におけるTIC類の検出

### (1) ラット脳部位分け法

無処置Wistar系雄性ラット(5週令)をether麻醉下断頭し氷浴上で速やかに脳を摘出し、これを大脳皮質、小脳、延髄、中脳、視床・視床下部、海馬、線条体の7部位の分割した。まず、摘出したラット脳を背側の脳皮質と小脳の境目から大脳皮質の後端に沿うように腹側に向かって切断し、小脳、延髄部分と大脳皮質その他の部分に分割した。小脳側は、小型のスパテルを用いて切断面側から組織の境目に沿って背側腹側上下2つに分離した。大脳皮質側は、背側からスパテルを用いて大脳皮質を脳橋部分から左右に分け、中脳部分を露出させた。さらに左右に分けるように組織の境目から大脳皮質をはがしていき、白色の部分が現れたので、これが皮質側に含まれるようにスパテルで剥ぎ分けた。左右の皮質をはがした後残った部分を桃白色と白色の2つの部分に上下に切断し、中脳と視床・視床下部を得た。はがした皮質部分は内側に丸まっている後端を注意深くスパテルを差し入れて広げるようにのばしていき、弓形になって大脳皮質に包まれている海馬を大脳皮質から引き離した。残った大脳皮質部分の中央にある放射状繊維の見える部分をその縁からスパテルを少しずつはき取るように差し入れて手前に分離し、線条体を得た。残りの部分を大脳皮質としてまとめた。それぞれの部位はホモジネートするまで-80℃で保存した。

### (2) TIC類抽出法

ラット脳各部位を10匹分あわせ、75% ethanol (5ml/g wet tissue)を用いてホモジナイズした。これを4℃、27000 $\times$ gで20分間冷却遠心してこの上清を取り、これに内部標準物質(MTIC, 10nmole)を添加して減圧下乾固した。標品(各1pmole、10pmole、100pmole)についても75% ethanol溶液を減圧乾固して検量線用試料とした。

### (3) 誘導化法

減圧乾固した後、壁に付着した残さを剥ぎ落とし、acetonitrileを100 $\mu$ lないし200 $\mu$ l加えて、これにHFBA30 $\mu$ lを加えて30分間静置した。誘導化反応後遠心して不溶物を沈降させ上清をとった。

### (4) GC/SIM法測定条件

誘導化した試料1 $\mu$ lをオートサンプラーで注入した。装置は、HP5890seriesII/JEOL SX-102A/JEOL complement systemを用いて行った。コンタミネーションをさけるためラット脳試料を分析した後に検量線試料を分析し、これ

を用いてラット脳試料中のTIC類の定量を行った。

GC: カラム=Rtx-5,  $\phi$  0.25mm $\times$ 30m, 膜厚0.25  $\mu$ m (RESTEX社)、オープン温度=130 $^{\circ}$ C(5min)-12 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C(5min)、インジェクタ温度=220 $^{\circ}$ C、インジェクションモード=splitless (2min)、キャリアガス=He, 10psi

MS: イオン源温度=250 $^{\circ}$ C、イオン化電圧=70V、イオン化電流=300  $\mu$ A、加速電圧=8kV、コレクタスリット=300  $\mu$ m、スイッチング速度=100ms

## 第二章の実験

### 1 自発的運動量に及ぼす影響の測定

#### (1) オープンフィールドテスト法

直径28cm、深さ15cmの桶の底面を19の升目に区切り、これをテストフィールドとした。暗く、静かな部屋にテストフィールドを設置し、その直上50cmから60Wの白熱灯で照らした状態でテストを行った。テストは、ddY系雄性マウス(6週令)を用い、1匹ずつテストフィールド中央に置き2分間に横切った升目数移動量として計測した。また、テストフィールドから両前肢をはなして立ち上がった回数を計測し、立ち上がり動作回数とした。計測は、二人の観測者によって行いこれを平均した。

#### (2) TIC類の投与による自発的運動量の変化

TIC類5種(TIC、HTIC、DHTIC、MHTIC、HMTIC)とspinacineについて、オープンフィールドテストを行った。各薬物を0.2mg base/ml、1.0mg base/mlの生理食塩水溶液とし、これをddY系雄性マウス(6週令、25 $\sim$ 30g)に2mg base/kg、10mg base/kgの用量で腹腔内投与し、それぞれ投与後5分、15分、25分、35分にオープンフィールドテストを行った。対照として、生理食塩水投与(0.2ml)についても測定を行った。1薬物1用量について6匹ずつ測定を行い平均値をとった。

### 2 痛覚感受性に及ぼす影響の測定

#### (1) テールフリックテストについて

熱による痛み刺激を与える刺激部とセンサー及びこれに連動したストップウォッチを装備したテールフリックテスト用の装置を用いて痛み刺激に対する感受性を測定した。本装置は、マウスが痛み刺激に反応して尾を避けるとセンサーが働き自動的に反応時間を表示する仕組みになっている。テストは、ddY系雄性マウス(6週令)を暗箱に入れ、ここから尾のみを出して付け根から1/3程度の部分に熱による痛み刺激を与え、反応時間を計測して行った。刺激の強度は、無処置のマウスが3.5 $\sim$ 4.5秒で反応する強さに設定し、10秒で反応しない場合は直ちにテストを終了して反応時間を10秒とした。鎮痛活性は、各マウスについて薬物投与前

に測定を行い無処置時の反応時間を計測しておき、これを基準として反応時間との差を取り、生理食塩水投与の場合を0%、反応時間10秒の場合を100%として百分率で表した。

## (2) TIC類の鎮痛活性の測定

TIC類4種 (TIC, HTIC, MHTIC, HMTIC) について、テールフリックテストを行った。各薬物を0.2mg base/ml、1.0mg base/mlの生理食塩水溶液とし、これをddY系雄性マウス (6週令) に2mg base/kg、10mg base/kgの用量で腹腔内投与し、それぞれ投与後5分、30分、60分、120分にテールフリックテストを行った。対照として、生理食塩水投与 (0.3ml) についても測定を行った。1薬物1用量について6匹ずつ測定を行い平均値をとった。

## 3 TIC類の脳内移行性の測定法

### (1) TIC類のラット腹腔内投与及びラット脳部位分け法

TIC類4種 (HTIC, DHTIC, MHTIC, HMTIC) をそれぞれ1.0mg base/mlずつ含む生理食塩水溶液を調製した。Wistar系雄性ラット (5週令) 5匹にこのTIC類溶液を各TIC類について2mg base/kgずつとなるよう腹腔内投与し、投与5分後にether麻酔下断頭し、速やかに脳を摘出した。摘出したラット脳は前述した方法 (第一章の実験 5 (1)) によって、7部位 (大脳皮質、小脳、延髄、中脳、視床・視床下部、海馬、線条体) に分け、ホモジネートするまで-80℃で保存した。

### (2) ラット脳内からのTIC類の抽出法

ラット脳各部位を5匹分あわせ、氷浴上で75% ethanol (5ml/g wet tissue) に1試料あたり10mgのsemicarbazideを添加してホモジナイズした。これに内部標準物質 (MTIC, 10nmole) を添加し、4℃、27000×gで20分間遠心して上清を取り、減圧下乾固した。標品 (各1pmole、10pmole、100pmole) についても75% ethanol溶液を減圧乾固して検量線用試料とした。

### (3) ラット脳試料の誘導化反応

減圧乾固した後、壁に付着した残さを剥ぎ落とし、acetonitrileを100 $\mu$ lに加え、これにHFBA30 $\mu$ lを加えて30分間静置した。誘導化反応後遠心して不溶物を沈降させ上清をとった。

### (3) GC/SIM法の測定条件

HFBA誘導化した試料1 $\mu$ lをオートサンプラーで注入した。装置は、HP5890seriesII/JEOL SX-102A/JEOL complement systemを用いて行った。コンタミネーションをさけるためラット脳試料を分析した後に同様に誘導化した検量線試料を分析し、これを用いてラット脳試料中のTIC類の定量を行った。

GC: カラム=Rtx-5,  $\phi$  0.25mm×30m, 膜厚0.25 $\mu$ m (RESTEX社)、オープン温度=130℃(5min)-12℃/min-250℃(5min)、インジェクタ温度=220℃、インジェクションモード=splitless (2min)、キャリアガス=He, 10psi

MS: イオン源温度=250℃、イオン化電圧=70V、イオン化電流=300  $\mu$ A、加速電圧=8kV、コレクタスリット=300  $\mu$ m、スイッチング速度=100ms

### 第三章の実験

#### 1 ジペプチドアナログの合成

##### (1) N-Boc-TIC

TIC 2.0gをdioxane/水 (2/1) 混合溶媒中に溶解し0℃に冷却し、これに1N NaOH 11.4mlとBoc<sub>2</sub>O 2.48gを加えて室温で1時間攪拌した。これを減圧濃縮した後pHを3にあわせethyl acetateで抽出した。有機層を水で洗浄した後乾燥し、減圧濃縮してoilを得た。これをn-hexane中でtriturateした後減圧乾固した。2.34g (収率72.9%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.4-1.5 (m, (16H), Boc),  $\delta$  3.2 (br.d, 2H),  $\delta$  4.6 (br, 2H),  $\delta$  7.1 (s, 4H)

##### (2) BocTIC-L-Arginine methyl ester (BTRM)

BocTIC 2.0gとL-Arginine methyl ester dihydrochloride 1.48gをDMF 24.4mlに溶解し、これにHOBt 0.83g、TEA 0.9ml、DCC 1.40gを氷浴上で加え、4℃にして20時間攪拌した。酢酸を3滴加えて反応を停止した後不溶物を濾去し、これに水125mlを加えてH<sub>2</sub>O飽和1-butanolで抽出した。有機層をそれぞれ1-butanolを飽和させた1N酢酸、1Nアンモニア水、水で洗浄したのち減圧濃縮した。得られたoilをethyl acetate中に溶解し不溶物を濾去した後減圧濃縮する操作を繰り返しamorphousを得た。吸湿性。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.5 (br.s, 16H, Boc+CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta$  3.0-3.3 (br, 2-3H, PhCH<sub>2</sub>C),  $\delta$  3.6 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OCO),  $\delta$  4.6 (br.s, PhCH<sub>2</sub>N),  $\delta$  4.6-4.8 (br, 2H, methyne),  $\delta$  7.0 (br.s, 4H, Ar),  $\delta$  7.0-7.8 (m), IR: 1660cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  C=N+NHCO), 1740cm<sup>-1</sup> (OCO), 3000cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  CH<sub>3</sub>), 3350cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  HN<sup>G</sup>)

##### (3) TIC-L-Arginine methyl ester (TRM) dihydrochloride

BTRM 312mgを少量の無水dioxane中に溶解し、これに塩化水素飽和dioxane 2-3mlを滴下して4℃で攪拌した。一晚攪拌後溶媒を減圧下溜ろ、濃縮してviscous oilを得た。これをethanol/benzene混合溶媒中に溶解し濃縮して、pale yellow amorphousを得た。保存する場合は冷凍保存した。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.8 (br, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta$  3.1-3.5 (m, 4H, PhCH<sub>2</sub>C+NCH<sub>3</sub>),  $\delta$  3.7 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OCO),  $\delta$  4.4 (s, PhCH<sub>2</sub>N),  $\delta$  4.1-4.6 (br, 2H, methyne)

##### (4) TIC-L-Arginine (TR) dihydrochloride

BTRM 0.51gをmethanol 7mlに溶解し2N NaOH 0.6mlを加えて0℃で17時間攪拌した。攪拌後2N塩酸を用いて反応液をpH5調整し、これを減圧下濃縮してmethanolをできるだけ除いた。濃縮液に少量の蒸留水を加えて希釈し、これを蒸留水を飽和させた1-butanol 70mlで抽出した。有機層を取って減圧下濃縮し、pale yellow amorphousを得た。これを無水dioxane 30mlに溶解し、塩化水素飽和dioxaneを白濁



が増えなくなるまで滴下して5℃で一晩攪拌した。攪拌後減圧下濃縮し、pale yellow powderを得た。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.58-1.82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ 2.99-3.14 (m, 4H, PhCH<sub>2</sub>C+NCH<sub>2</sub>), δ 4.26-4.30 (br.s, 4H, PhCH<sub>2</sub>N+methyne), δ 7.27 (s, 5H, Ar), δ 7.38-9.90 (m), IR: 1660cm<sup>-1</sup>(ν C=N+NHCO), 1730cm<sup>-1</sup>(COOH), 3000cm<sup>-1</sup>(ν CH<sub>2</sub>), 3400cm<sup>-1</sup>(ν HN<sup>G</sup>)

(5) Boc-L-Phenylalanine-L-Arginine methyl ester (BFRM)

Boc-L-Phenylalanine 2.67gとL-Arginine methyl ester dihydrochloride 2.07gをDMF 34mlに溶解し、これにHOBt 1.16g、TEA 1.25ml、DCC 1.95gを水浴上で加え、4℃にして20時間攪拌した。酢酸を3滴加えて反応を停止した後不溶物を濾去し、これに水170mlを加えてH<sub>2</sub>O飽和1-butanolで抽出した。有機層をそれぞれ1-butanolを飽和させた1N酢酸、1Nアンモニア水、水で洗浄したのち減圧濃縮した。得られたoilを無水etherで5回triturateしてcolorless solidを得た(3.97g)。これをethyl acetate中に溶解し不溶物を濾去し減圧濃縮する操作を繰り返しcolorless amorphousを得た。3.48g(収率82.1%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.27-1.32 (d, 10H, Boc), δ 1.62-1.89 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ 2.86-3.25 (m, 4H, PhCH<sub>2</sub>C+NCH<sub>2</sub>), δ 3.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OCO), δ 4.50 (m, 2H, methyne), δ 7.13-8.26 (m), IR: 1660cm<sup>-1</sup>(ν C=N+NHCO), 1740cm<sup>-1</sup>(ν OCO), 3000cm<sup>-1</sup>(ν CH<sub>2</sub>), 3350cm<sup>-1</sup>(ν HN<sup>G</sup>)

(6) L-Phenylalanine-L-Arginine methyl ester (FRM) dihydrochloride

BFRM 509.3mgを少量の無水dioxane中に溶解し、これに塩化水素飽和dioxane 2-3mlを加えて4℃で攪拌した。3日間攪拌後溶媒を減圧下溜ろ、濃縮してviscous oilを得た。これをethanol/benzene混合溶媒中に溶解し濃縮して、colorless amorphousを得た。保存する場合は冷凍保存した。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.8 (br, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ 3.0-3.2 (m, 4H, PhCH<sub>2</sub>C+NCH<sub>2</sub>), δ 3.7 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OCO), δ 4.1-4.6 (br, 2H, methyne), δ 7.2 (s, 5H, Ar), δ 7.3-7.9 (m, 3-4H)

(7) L-Phenylalanine-L-Arginine (FR) dihydrochloride

BFRM 1.05gをmethanol 10mlに溶解し2N NaOH 1.5mlを加えて0℃で17時間攪拌した。攪拌後2N塩酸を用いて反応液をpH5調整し、これを減圧下濃縮してmethanolをできるだけ除いた。濃縮液に少量の蒸留水を加えて希釈し、これを蒸留水を飽和させた1-butanol 50mlで抽出した。有機層を取って減圧下濃縮し、colorless amorphousを得た。これを無水dioxane 30mlに溶解し、塩化水素飽和dioxaneを白濁が増えなくなるまで滴下して5℃で一晩攪拌した。攪拌後減圧下濃縮し、colorless amorphousを得た。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.54-1.82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ 2.92-3.20 (m, 4H, PhCH<sub>2</sub>C+NCH<sub>2</sub>), δ 4.15 (s, 1H, methyne), δ 4.22 (s, 1H, methyne), δ 7.34 (s, 5H, Ar), δ 7.38-9.08 (m), IR: 1660cm<sup>-1</sup>(ν C=N+NHCO), 1730cm<sup>-1</sup>(ν OCO), 3000cm<sup>-1</sup>(ν CH<sub>2</sub>), 3400cm<sup>-1</sup>(ν HN<sup>G</sup>)

(8) 一連のジペプチド化合物は、0.5mlの1%thymine (1N NaOHsoln.)、1mlの2% 8-hydroxyquinoline (EtOHsoln.)を1mlのジペプチド水溶液(含1%EtOH)に加えて0℃に冷却し2分後0.5mlの冷NaClOaq.を加えさらに3分後室温で3mlのMeOHを加えて生ずるguanidyl基の呈色(491-494nm)を測定し、guanidyl基の存在を確認した。

## 2 ジベプチドアナログの鎮痛活性測定法

### (1) 腹腔内投与におけるジベプチドアナログに活性測定法

TR 2HCl, FR 2HClをそれぞれ0.5mg/ml 0.5% sodium carboxymethylcellulose (c.m.c.)懸濁液とし、これをddY系マウス (7週令, 25g) に10mg/kgの用量で腹腔内投与し、投与後5分、60分、120分、180分に前述した方法 (第二章の実験 2 (1)) と同様の方法でテールフリックテストを行って反応時間を測定した。ただし、1群 (1薬物1用量) についてマウス4匹を用い、活性の表示は、0.5% c.m.c.投与の対照群の反応時間の平均値を0%、反応時間10秒を100%とした百分率表示とした。

また、TRM 2HCl, FRM 2HClをそれぞれ0.4mg/ml 0.5% c.m.c.懸濁液として、これをddY系マウス (6週令) に6.67mg/kgの用量で腹腔内投与し、投与後5分、30分、60分に前述した方法 (第二章の実験 2 (1)) と同様の方法でテールフリックテストを行って反応時間を測定した。この場合、1群 (1薬物1用量) についてマウス3匹を用い、活性の表示は、0.5% c.m.c.投与の対照群の反応時間の平均値を0%、反応時間10秒を100%とした百分率表示とした。

### (2) 脳室内投与におけるジベプチドアナログの活性測定法

Sprague-Dawley (SD) 雄性ラット (8週令, 1匹) の右側脳室にステンレス製のガイドカニューレを装着する手術を行った (付3参照)。術後の回復を待って、4週後脳室内投与による鎮痛活性の測定を行った。Kyotorphin (フナコシ) 5mgを500  $\mu$ lの生理食塩水に溶解し29.66nmole/ $\mu$ l溶液とした。また、FR 2HCl 19.7mgを2mlの生理食塩水に溶解し、25nmole/ $\mu$ l溶液とした。TR 2HCl 9mgを0.96mlの生理食塩水に加えたが完全には溶解しなかった。そこで、Ethanolを300  $\mu$ l/2ml salineまで加えたがそれでも完全には溶解しなかった。このため TR 2HClは9mgを0.96mlの生理食塩水に加え、よくsonicationした後その上清を投与することとした。

ガイドカニューレを装着したSDラットに、ether麻酔して身体を布で巻いて固定し、麻酔からさめるのを待ってkyotorphin 148.3nmole (5  $\mu$ l)、FR 2HCl及びTR 2HCl 147.5nmole (5.9  $\mu$ l) (TRはすべて溶解したとしたときの計算量) をそれぞれ2分から3分40秒かけてガイドカニューレを通して脳室内投与した。投与後身体を布で巻いたまま、尾に熱刺激を加えてテールフリックテストを行い、これを薬物を投与することに繰り返した。薬物は、実験1日目にsaline、kyotorphin、kyotorphin、2日目にsaline、saline、FR、saline、3日目にsaline、TR、4日目にsaline、kyotorphinを投与し、それぞれ投与後最大で60分後まで測定を行った。実験を行う日毎になにも投与しない状態の反応時間を測定した。

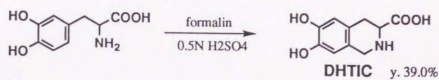
### (3) 脳室内投与後のラット脳切片の観察

脳室内投与を行ったSD系ラットの脳を摘出し、これを大脳皮質の後端に沿うように前後2つに背側から腹側にかけて斜めに切断し、この線に平行に剃刀を用いてスライスした。これを37% formalin溶液に浸し、観察した。

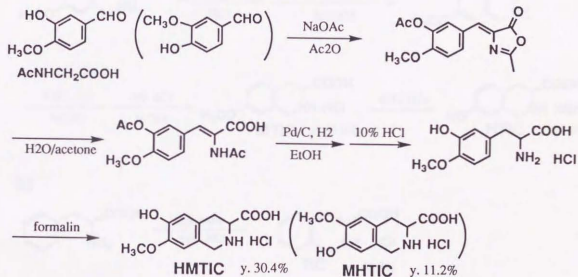


付1 TIC誘導体の合成スキーム

a)



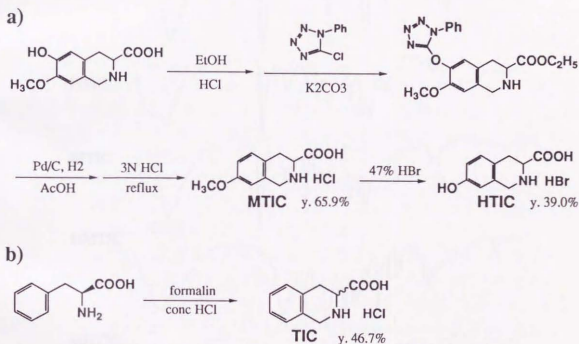
b)



a) Synthesis of DHTIC (Ref; A. Brossi et al, Helv. Chim. Acta, 55, 15-21 (1972))

b) Synthesis of HMTIC and MHTIC (Ref; A. Miyake et al, J. Takeda Res. Lab., 43, 53-76 (1984))

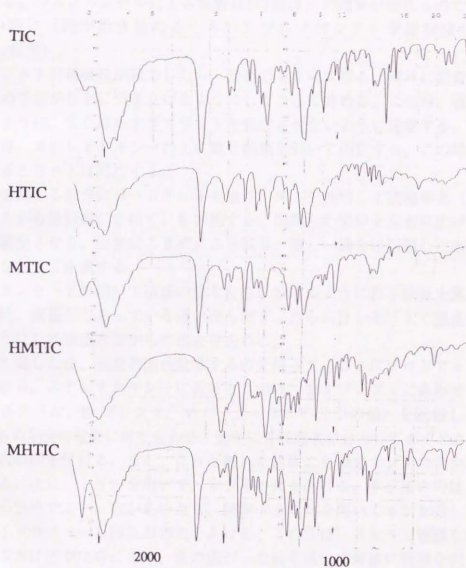
付1 TIC誘導体の合成スキーム (続き)



a) Synthesis of MTIC and HTIC (Ref; A. Miyake et al, J. Takeda Res. Lab., 43, 53-76 (1984))

b) Synthesis of TIC (Ref; K. Hayashi et al, Chem. Pharm. Bull., 31, 312-314 (1983))

## 付2 TIC誘導体の赤外スペクトル



### 付3 ガイドカニューレ挿入法

(1) SDラットをエーテル麻酔する。ラットにソムノベンチル (約60mg/kg) を腹腔内投与する (腹の皮膚をつまみ上げて針をたてるように差し込む)。投与後ケージに移し麻酔がかかるのを待つ。5分ほどしてかからない場合はエーテル麻酔し、再度ソムノベンチルを腹腔内投与する。この場合の投与量は1回目より少なくする。ソムノベンチルによる麻酔は1時間ほどで効果が切れるので、手術中はその前に (髭が動き始めるくらい) ソムノベンチルを追加投与する (20mg/kg程度)。

(2) ラットの前後肢が脱力したら、頭部の毛を刈り取る。両耳に固定具をいれ軽く締め手前から上に引き上げるようにしてさらに締める。この時、緩すぎて外れないように、また締めすぎてラットを死亡させないように注意する。両耳を固定した後、ステレオタキシーの上に載せ前歯を引いて固定する。この時前歯を引きすぎるとラットは死亡する。

(3) 切開する部分にヨードチンキを塗り、メスを使用して頭部中央 (両目の間やや後ろから後頭部にかけて) を切開する。切開した部分を左右に広げ、頭部の筋肉を露出させる。出血はこまめにふき取り、激しい場合は切開した皮膚の断面を焼くなどして止血する。

(4) ランセットを用いて頭部の筋を左右に分けるように剥ぎ頭蓋を露出させる。この時、頭蓋をおおっている薄い膜も剥ぎ、さらにランセットで頭蓋表面をこするようにして頭蓋表面からの出血を止める。

(5) 止血した後、頭蓋表面が乾燥するのを待って、ここにアロンアルファを均一に塗る。ステレオタキシーに針をとりつけ、まずプレグマにあわせてこの位置 (L: ラテラル、B: プレグマ、V: バーティカルの3つの値) を記録しこれを基準に、右側脳室の位置に針を合わせ、静かに骨表面までおろしてガイドカニューレ挿入用穴の印を付ける。また、これと離れた位置にも固定ネジ用の穴をあける印を付ける。次に、ドリルを用いて、ネジ用の穴をあける。ネジ用の穴はネジの径よりも小さめでよい。穴があいたら、精密ドライバを用いてネジを差し込む。また、ガイドカニューレ挿入用の穴をあける。この穴は、ドリルで硬膜を破らない程度の深さにはやや広めにあげ、先の曲がった針を用いて最後に硬膜を引っかけるように剥がす。

(6) ステレオタキシーにガイドカニューレを取り付け、穴をあけた側脳室直上の脳表面にあわせる。ガイドカニューレをゆっくり (数分かけて) と下げ、3.6mm下げたところで止め、このままデンタルセメントを筆で塗り付け固定する。デンタルセメントが充分乾いたところでステレオタキシーをはずす。

(7) 糸付きの手術用針で、切開した部分を縫合する。ペニシリンGを10万単位、1mlの生理食塩水に溶解し、そのうち0.5mlを縫合した傷口に投与し、残り0.5mlを両後肢に筋注する。余った場合は腹腔内投与する。その後、ラットをステレオタキシーからはずし、1匹ずつケージに入れ1週間以上飼育する。

## 参考文献

- Alpers, H.S., McLaughlin, B.R., Nix, W.M. and Davis, V.E., *Biochem. Pharmacol.*, 24, 1391-1396 (1975)
- Bates, H.A., *J. Org. Chem.*, 46, 4931-4935 (1981)
- Brossi, A., Beta-carbolines and Tetrahydroisoquinolines, Alan R. Liss, Inc., 1982, p125-133
- Cohen, G. and Collins, M., *Science*, 167, 1749-1751 (1970)
- Collins, A.C., Cashaw, J.L. and Davis, V.E., *Biochem. Pharmacol.*, 22, 2337-2348 (1973)
- Collins, M.A., Hannigan, J.J., Oigitano, T., Moura, D. and Osswald, W., Beta-carbolines and Tetrahydroisoquinolines, Alan R. Liss, Inc., 1982, p155-166
- Collins, M.A. and Oigitano, T.C., *J. Neurochem.*, 41, 1569-1575 (1983)
- Doert, P., Strolin Benedetti, M. and Dedieu, M., *Pharmacol. Toxicol.*, 60, Suppl. 1, 13 (1987)
- Dostert, P., Strolin Benedetti, M. and Dordain, G., *J. Neural Transm.*, 74, 61-74 (1988)
- Dostert, P., Strolin Benedetti, M., Allievi, V. and Dordain, G., *J. Neural Transm.*, 81, 215-223 (1990)
- Dostert, P., Strolin Benedetti, M., Dordain, G. and Varney, D., *J. Neural Transm. [GenSect]*, 85, 51-59 (1991)
- Duarte, I.D.G., Dos Santos, I.R., Lorenzetti, B.B. and Ferreira, S.H., *Eur. J. Pharmacol.*, 217, 225-227 (1992)
- Gibson, C.J., Deikel, S.M., Young, S.N. and Binik, Y.M., *Psychopharmacol.*, 76, 118-121 (1982)
- Giovine, A., Renis, M. and Bertolino, A., *Pharmacology*, 14, 86-94 (1976)
- Haley, J.E., Dickenson, A.H. and Schachter, M., *Neuropharmacology*, 31, 251-258 (1992)
- Hall CS, *J. Comp. Psychol.*, 17, 89-108 (1934)
- Heikkila, R., Cohen, G., Dembiec, D., *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 179, 250-258 (1971)
- Jahansouz, H., Scherubel, D.M. and Himes, R.H., *FEBS Lett.*, 262, 366-368 (1990)
- Kawabata, A., Umeda, N and Takagi, H, Br. *J. Pharmacol.*, 109, 73-79 (1993)
- Kohno, M., Ohta, S. and Hirobe, M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 140, 448-454 (1986)
- Laduron, P. and Leysen, J., *Biochem. Pharmacol.*, 24, 929-932 (1975)
- Makino, Y., Tasaki, Y., Ohta, S. and Hirobe, M., *Biochem. Environmental Mass Spectrom.*, 19, 415-419 (1990a)
- Makino, Y., Ohta, S., Tasaki, Y., Tachikawa, O., Kashiwasake, M. and Hirobe, M., *J. Neurochem.*, 55, 963-969 (1990b)



- Marshall, A., Hirst, M. and Blum, K., *Experientia*, 33, 754-755 (1977)
- Myers, W.D., Mackenzie, L., Ng, K.T., Singer, G., Smythe, G.A. and Duncan, M.W., *Life Sciences*, 36, 309-314 (1985)
- Nakagawa, H., Makino, Y., Yoshida, Y., Ohta, S. and Hirobe, M., *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 579-582 (1993)
- Niwa, T., Takeda, N., Kaneda, N., Hashizume, Y. and Nagatsu, T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 144, 1084-1089 (1987)
- Niwa, T., Takeda, N., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Yoshida, M., Dostert, P., Naoi, M. and Nagatsu, T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 177, 603 (1991)
- Obata-Sasamoto, H., Komamine, A. and Saito, K., *Z. Naturforsch.*, 36c, 921-924 (1981)
- Ohta, S., Kohno, M., Makino, Y., Tachikawa, O. and Hirobe, M., *Biomed. Res.*, 8, 453-456 (1987)
- Origitano, T.C. and Collins, M.A., *J. Chromatogr.*, 311, 17-29 (1984)
- Sandler, M., Bonham-Carter, S., Hunter, K.R. and Stern, G.M., *Nature*, 241, 439-443 (1973)
- Satoh, M., Takagi, H., *神経研究の進歩*, 27, 509-516 (1983)
- 生化学実験講座 vol.11, 日本生化学会編, 1977, p1076-1100
- Sjoquist, B., Eriksson, A. and Windblad, B., *Beta-carbolines and Tetrahydroisoquinolines*, Alan R. Liss, Inc., 1982, p57-67
- Smithers, G.W., Jahansou, H., Kofron, J.L., Himes, R.H. and Reed, G.H., *Biochem.*, 26, 3943-3948 (1987)
- Strolin Benedetti, M., Dostert, P. and Carminati, P., *J. Neural Transm. [GenSect]*, 78, 43-51 (1989)
- Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. and Amano, H., *Nature*, 282, 410-412 (1979)
- Tamiya, K., 修士論文(1994)
- Tasaki, Y., Makino, Y., Ohta, S. and Hirobe, M., *J. Neurochem.*, 57, 1940-1943 (1991)
- Tasaki, Y., 博士論文 (1994)
- Tasaki, Y., Kotake, Y., Makino, Y., Ohta, S. and Hirobe, M., *Alzheimer's and Parkinson's Disease: Recent Advances*, ed. I. Hanin, A. Fisher and M. Yoshida, Plenum, New York, in press
- Vaught, J.L. and Chipkin, R.E., *Eur. J. Pharmacol.*, 79, 167-173 (1982)
- Weiner, C.D. and Collins, M.A., *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2699-2703 (1978)



## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました、薬学部薬品代謝化学教室  
広部 雅昭 教授に深く感謝いたします。

また、本研究を遂行する際、終始直接ご指導いただき、励まして下さいました、  
医学部保健栄養学教室 太田 茂 助教授に心より感謝いたします。

さらに、本研究に関して討論して頂き、貴重なご意見を下さいました、薬学部  
薬品代謝化学教室 長野 哲雄 助教授、増野 匡彦 博士、樋口 恒彦 博士  
をはじめとして薬学部薬品代謝化学教室の皆様深く感謝いたします。

また、質量分析器を用いた微量分析に関して技術的なご指導ご意見を下さいま  
した 厚生省関東甲信越地区麻薬取締官事務所 牧野 由紀子 博士、脳室内投  
与に関する技術をご指導下さいました 医学部保健栄養学教室 高井 克治 教  
授、中丸 映子 助手に感謝いたします。

化合物の合成に関して機器分析をして下さいました 中央分析室の皆様 に感  
謝いたします。

博士課程に進学する事を承諾し、修了まで見守ってくれた父母に感謝します。



