

分担研究報告書

## フェンタニル類縁化合物の行動薬理学的特性の解析

分担研究者：船田正彦（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

研究協力者：富山健一（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

---

### 【研究要旨】

本研究では、4 種類のフェンタニル類縁化合物についてオピオイド受容体作用の解析、運動活性に対する影響並びに細胞毒性の有無を検討した。

1. Fentanyl (FN) : N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-propanamide
2. Acrylfentanyl (Acr) : N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-propenamide
3. Furanylfentanyl (FuF) : (N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide)
4. Tetrahydrofuranylfentanyl (THFF) : N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenyltetrahydrofuran-2-carboxamide

1) オピオイド受容体作用 : CHO- $\mu$  受容体発現細胞を利用して、オピオイド受容体作用を解析した。4 種類のフェンタニル類縁化合物の添加により、濃度依存的な蛍光発光が確認された。この作用は、 $\mu$  受容体拮抗薬 ( $\beta$ -FNA) の前処置により完全に抑制された。4 種類のフェンタニル類縁化合物は  $\mu$  受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。2) 行動解析 : 4 種類のフェンタニル類縁化合物による運動活性に対する影響を検討した。フェンタニル類縁化合物の投与により、用量依存的な運動促進作用が発現した。運動促進作用の発現強度は、Acr=FN>FuF>>THFF であった。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン前処置によって有意に抑制された。4 種類のフェンタニル類縁化合物の運動促進作用は、オピオイド受容体を介して発現する作用であることが明らかになった。3) 細胞毒性の評価 : CHO- $\mu$  細胞を使用して、薬物添加による細胞生存率の評価を行った。医薬品である morphine では細胞生存率に影響は認められなかった。一方、フェンタニル類縁化合物の処置では、細胞生存率が低下した。毒性発現強度は、Acr=FuF>>FN>THFF であった。

本研究により、フェンタニル類縁化合物は強力な中枢興奮作用を有することが明らかになった。また、高濃度のフェンタニル類縁化合物を処置することにより、細胞毒性の発現も確認された。したがって、4 種類のフェンタニル類縁化合物の乱用により、重篤な健康被害の発生が危惧される。本研究から、4 種類のフェンタニル類縁化合物 FN、Acr、FuF、THFF はオピオイド  $\mu$  受容体を介して中枢興奮作用を示し、高濃度では細胞毒性を示すことから、乱用により健康被害を示す危険性があると考えられる。フェンタニル類縁化合物はオピオイド  $\mu$  受容体に作用することから、CHO- $\mu$  細胞を利用した蛍光強度解析データは、有害作用の推測に利用できる可能性が示唆された。

---

## A. 研究目的

ヘロインを始めとするオピオイド系薬物の乱用は過量摂取による死亡など、重篤な健康被害を及ぼす。米国やカナダにおいて、フェンタニルやフェンタニル類縁化合物の流通が拡大しており、乱用に基づく健康被害は大きな社会問題となっている<sup>1,2)</sup>。危険ドラッグとして流通している新規のフェンタニル類縁化合物については、その薬理作用や有害作用については、不明な点が多い。2015年以降、米国や欧州では、フェンタニル類縁化合物、Acrylfentanyl (Acr)、Furanylfentanyl (FuF)、Tetrahydrofurfanylfentanyl (THFF)による死亡例が報告されていることから<sup>3)</sup>、これらの薬物に関して、中枢作用および毒性に関する解析が必要である。

本研究では4種類のフェンタニル類縁化合物: FN、Acr、FuF、THFFの薬理学的特性及び中枢作用を明確にする目的で、1) オピオイド受容体作用、2) 運動活性に対する影響、3) 報酬効果、4) 細胞に対する毒性について検討を行った。

## B. 研究方法

使用動物: すべての行動薬理実験には、ICR系雄性マウス (Jcl, 20 - 25g, 日本クレア) を使用した。

使用薬物:

1. Fentanyl (FN): N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-propanamide
  2. Acrylfentanyl (Acr): N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-propenamide
  3. Furanylfentanyl (FuF): (N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide)
  4. Tetrahydrofurfanylfentanyl (THFF): N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenyltetrahydrofuran-2-carboxamide
- を使用した(化学構造: Fig.1)。

### 1. フェンタニル類縁化合物のオピオイド受容体作用

Chinese Hamster Ovary (CHO)チャイニーズハムスター卵巣細胞にヒト-オピオイド  $\mu$  受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO- $\mu$  細胞を樹立した。この細胞を使用して、細胞内カルシウム濃度を測定した。96穴ブラックプレート(BD Falcon)に  $5 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、 $37 \pm 5.0\% \text{CO}_2$  条件下で培養した。24時間後、Fluo-4を1時間取り込ませ、フェンタニル類縁化合物添加による蛍光強度の変化を、Flexstation IIにより測定した。

### 2. フェンタニル類縁化合物による運動活性への影響

フェンタニル類縁化合物により誘発される運動活性を、自発運動量測定装置(ACTIMO-100, バイオリサーチセンター社)を用いて測定した。3時間の環境適応後、薬物投与から120分間にわたって運動量を測定した。フェンタニル類縁化合物により誘発される行動変化に対するオピオイド受容体拮抗薬ナロキソン前処置(薬物投与の30分前投与)の効果を検討した。

### 3. 細胞毒性の評価

CHO細胞にヒト-オピオイド  $\mu$  受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO- $\mu$  細胞を樹立し、毒性評価に用いた。CHO- $\mu$  細胞は10%FBS含有HyClone™ Ham's Nutrient Mixture F12 (GE Healthcare)にG418 (0.4 mg/mL)を加えて維持し、毒性評価前日に96 well black plate (BD)に  $1.0 \times 10^4$  cells/well で調製した。フェンタニル類縁化合物を10% FBS含有Hyclone mediumに最終濃度60および120  $\mu\text{M}$  となる調製し CHO- $\mu$  細胞に添加して24時間培養した。細胞の生存率を、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)のプロトコールに従って解析した。

## C. 研究結果

## 1. フェンタニル類縁化合物のオピオイド受容体作用

CHO- $\mu$  細胞を利用して、フェンタニル類縁化合物 FN、Acr、FuF、THFF のオピオイド  $\mu$  受容体作用を解析した。すべてのフェンタニル類縁化合物の添加により、濃度依存的な蛍光量の増加が確認された(Fig. 2)。これらのフェンタニル類縁化合物による蛍光強度の増加作用は、選択的  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬 ( $\beta$ -FNA, 0.1 $\mu$ M) の前処置により完全に抑制された(Fig. 3)。フェンタニル類縁化合物 FN、Acr、FuF、THFF はオピオイド  $\mu$  受容体を介して薬理作用を示すことが明らかになった。

## 2. フェンタニル類縁化合物の行動薬理学的特性

FN、Acr、FuF、THFF (1 mg/kg, i.p.)によって、運動促進作用が発現し、中枢作用を有することが明らかになった(Fig. 4)。運動促進作用の発現強度は、Acr=FN>FuF>>THFF であった。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン(5 mg/kg)の前処置によって有意に抑制された(Fig. 5)。

## 3. フェンタニル類縁化合物の細胞毒性

FN、Acr、FuF、THFF、morphine (Mor) 処理 24 時間後に CHO- $\mu$  細胞の細胞生存率を評価した。Mor 処置では細胞生存率に影響は認められなかった。FN、Acr、FuF、THFF の処置により、細胞生存率は有意に低下した(Fig. 6)。細胞毒性発現強度は、Acr=FuF>>FN>THFF であった。

### D. 考察

本研究では、4 種類のフェンタニル類縁化合物 FN、Acr、FuF、THFF のオピオイド受容体作用、中枢作用および細胞毒性に関する評価を行った。

細胞実験では、オピオイド  $\mu$  受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO- $\mu$  細胞を樹立し、薬理的解析に利用した。蛍光発

光の検出より、4 種類のフェンタニル類縁化合物は、オピオイド  $\mu$  受容体作用薬であることを確認した。CHO- $\mu$  細胞の蛍光発光強度における EC<sub>50</sub> 値の比較より、オピオイド  $\mu$  受容体作用の強度は、Acr=FN>FuF = THFF であった。

次に、フェンタニル類縁化合物の行動薬理学特性を解析した。FN、Acr、FuF、THFF の投与により、運動促進作用が発現し、中枢作用を有することが明らかになった。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬ナロキソンによって抑制されることから、FN、Acr、FuF、THFF の中枢作用は、オピオイド受容体を介して発現することが確認された。運動促進作用の発現強度は、Acr=FN>FuF>>THFF であった。この強度は、CHO- $\mu$  細胞の蛍光発光強度における EC<sub>50</sub> 値 (Acr=FN>FuF = THFF)と一致していた。したがって、CHO- $\mu$  細胞の蛍光発光強度より、フェンタニル類縁化合物の有害作用を推測できる可能性が示唆された。

依存性薬物による精神依存形成および中枢興奮作用の発現には中脳辺縁ドパミン神経系の関与が示唆されている。現在までに、フェンタニルはオピオイド  $\mu$  受容体に結合し、側坐核においてドパミン遊離量の増加を引き起こすことが報告されている<sup>4,5)</sup>。フェンタニル類縁化合物による中枢興奮作用の発現および精神依存形成には、側坐核におけるドパミン遊離量の増加が関与していると考えられる。

また、4 種類のフェンタニル類縁化合物の高濃度では、細胞毒性が発現することから、乱用による有害作用の発現が危惧される。

本研究の解析から、フェンタニル類縁化合物による中枢興奮作用強度並びに細胞毒性発現強度は、CHO- $\mu$  細胞の蛍光発光強度における EC<sub>50</sub> 値 (Acr=FN>FuF = THFF)と一致することが明らかになった。したがって、CHO- $\mu$  細胞の蛍光発光強度より、フェンタニル類縁化合物の有害作用を推測できる可能性が示唆された。また、フェンタニル類似化合物の化学構造の特性として、基本骨格のアミド基に結合するエチル基と比較して、アクリル基は同程度の強力な作用を示し、フラニル基およびテトラヒドロフラ

ニル基では作用が減弱することが示唆された。

本研究の評価結果より、4種類のフェンタニル類縁化合物 FN、Acr、FuF、THFF は強力な中枢作用と精神依存形成能を有することが確認された事から、より厳格な法規制を施す必要があると考えられる。

#### E. 結論

本研究から、4種類のフェンタニル類縁化合物 FN、Acr、FuF、THFF はオピオイド  $\mu$  受容体を介して中枢興奮作用を示し、高濃度では細胞毒性を示すことから、乱用により健康被害を示す危険性があると考えられる。フェンタニル類縁化合物はオピオイド  $\mu$  受容体に作用することから、CHO- $\mu$  細胞を利用した蛍光強度解析データは、有害作用の推測に利用できる可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) Rudd, R. A., Puja, S., Felicita, D., & Scholl, L.: Increases in drug and opioid- involved overdose deaths - United States, 2010-2015. Morbidity and Mortality Weekly Report, 65 (50-51), 1445-1452, (2016).
- 2) Young, M. M., Pirie, T., Buxton, J. A., Hosein, S. F.: The Rise of Overdose Deaths Involving Fentanyl and the Value of Early Warning. Canadian Journal of Addiction, 6(3), 13-17, (2015).
- 3) Guerrieri D, Rapp E, Roman M, Thelander G, Kronstrand R.: Acrylfentanyl: Another new psychoactive drug with fatal consequences. Forensic Sci Int. 277:e21-e29, (2017).
- 4) Yoshida Y, Koide S, Hirose N, Takada K, Tomiyama K, Koshikawa N, Cools AR. Fentanyl increases dopamine release in

rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. Neuroscience. 92(4): 1357-1365, (1999).

- 5) Di Chiara G., Imperato A.: Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. J Pharmacol Exp Ther. 244(3): 1067-1080, (1988).

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Funada, M., Takebayashi-Ohsawa, M., Synthetic cannabinoid AM2201 induces seizures: Involvement of cannabinoid CB1 receptors and glutamatergic transmission. Toxicology and applied pharmacology, 338:1-8, (2018).

2) Funada M., Evaluation of harmful effects of new psychoactive substances: current status and issues. 日本薬理学雑誌. 150(3): 135-140, (2017).

3) Kaizaki-Mitsumoto A, Hataoka K, Funada M, Odanaka Y, Kumamoto H, Numazawa S., Pyrolysis of UR-144, a synthetic cannabinoid, augments an affinity to human CB1 receptor and cannabimimetic effects in mice. J Toxicol Sci, 42(3): 335-341, (2017).

4) 船田正彦, 大澤美佳, 岩野さやか, 富山健一: ポスト「危険ドラッグ」は何か? 精神科治療学 32(11); 1493-1496, (2017).

##### 2. 学会発表

1) Funada M: Identification of new psychoactive substances: Opioid receptor agonist in CHO cells expressing the

cloned human mu opioid receptor. CPDD  
79th Annual Scientific Meeting,  
Montréal, Canada, 2017. 6.17-22.

2) 大澤美佳, 船田正彦: 合成カンナビノ  
イド AM2201 により発現する異常行動の  
解析. 平成 29 年度日本アルコール・薬物依  
存関連学会合同学術総会, 神奈川, 2017 年  
9 月 8 日.

3) 伊藤哲朗, 古川諒一, 神山恵理奈, 川  
島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 筑本貴郎, 永  
井宏幸, 多田裕之, 船田正彦, 北市清幸:  
危険ドラッグ蔓延防止に向けた岐阜県に  
おける取り組み(2): 合成カンナビノイド代  
謝物の同定と異性体の構造識別. 平成 29  
年度日本アルコール・薬物依存関連学会合  
同学術総会, 神奈川, 2017 年 9 月 8 日.

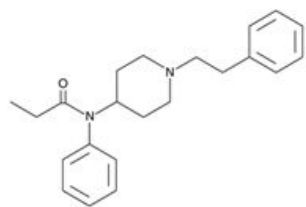
4) 船田正彦: 薬物依存性評価; その方法  
と意義. 日本安全性薬理研究会 第 9 回学  
術年会, 東京, 2018 年 2 月 9 日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

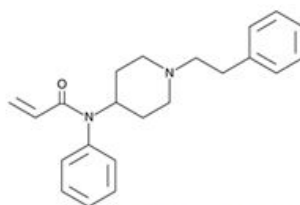
特許取得、実用新案登録、その他  
特になし

#### 健康危険情報

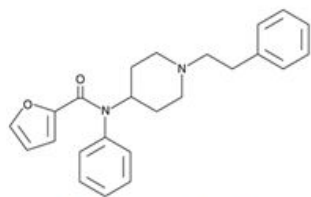
本事業成果は、指定薬物の精神依存性およ  
び細胞毒性に関する評価解析であり、結果は  
すべて健康危険情報に該当する。



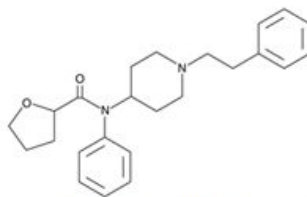
**Fentanyl**



**Acrylfentanyl**



**Furanylfentanyl**



**Tetrahydrofuranylfentanyl**

Fig. 1. Chemical structures of fentanyl analogues.

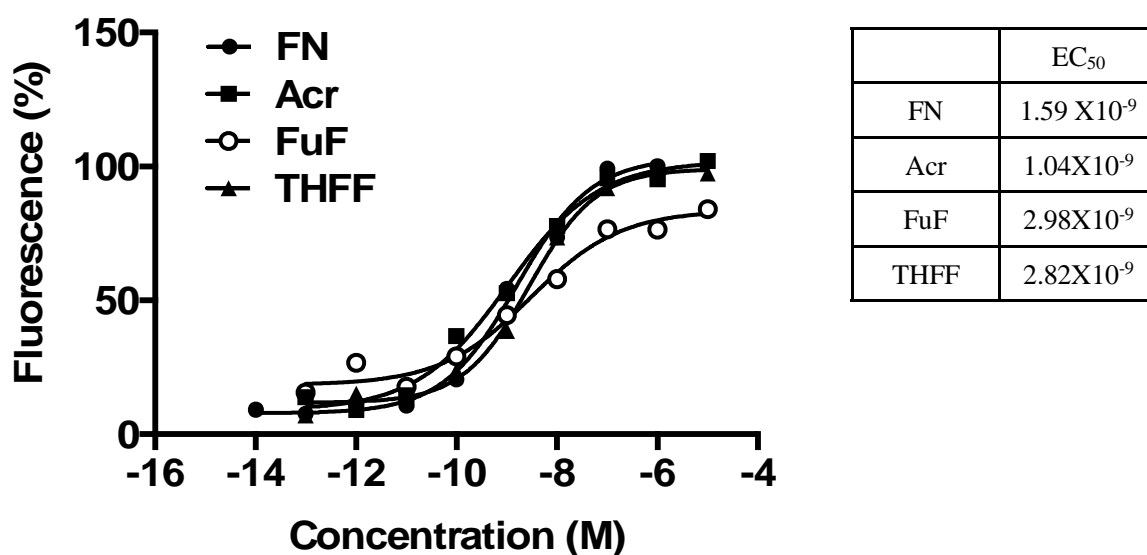


Fig. 2. Effects of fentanyl analogues on intracellular Ca<sup>2+</sup> in CHO- $\mu$  cells. (A) Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels were detected as changes in fluorescence in the FlexStation II. Fluorescence measurements corresponding to increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels following simultaneous activation by fentanyl (FN), acrylfentanyl (Acr), Furanylfentanyl(FuF) or tetrahydrofuranlylfentanyl(THFF). Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. Each plot represents the mean with S.E.M. of three independent experiments.

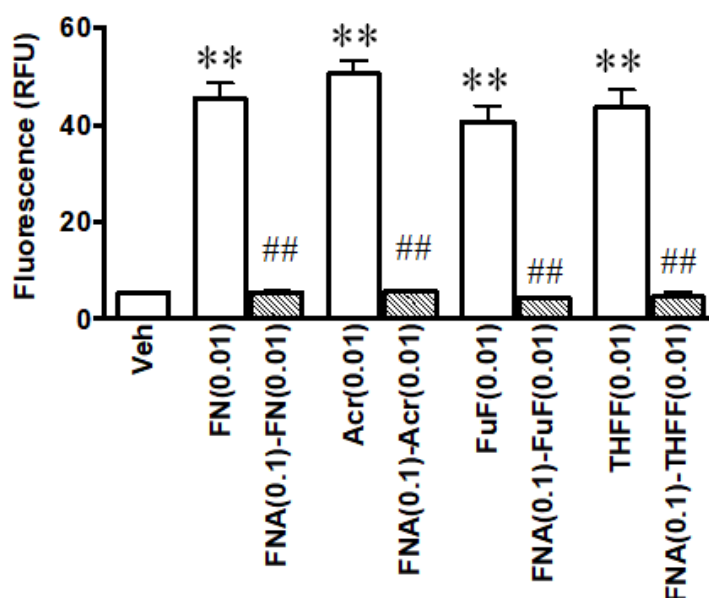


Fig. 3. Effects of pretreatment with  $\mu$ -opioid receptor antagonist  $\beta$ -funaltrexamine (FNA) on fentanyl analogues-induced elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in CHO- $\mu$  cells. Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels were detected as changes in fluorescence in the FlexStation II. Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. \*\*P<0.01 vs. vehicle (Veh)-treated group. ##P<0.01 vs. fentanyl analogues-treated group.

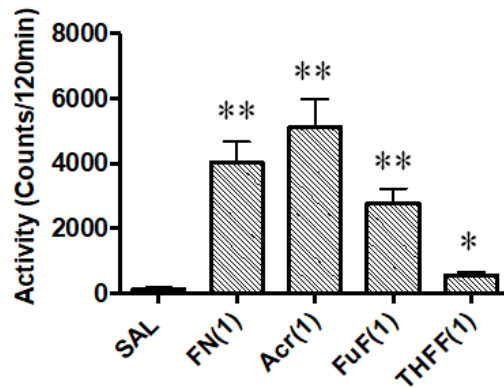


Fig. 4. Effect of acute treatment with fentanyl analogues on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of fentanyl (FN, 1 mg/kg), acrylfentanyl (Acr, 1 mg/kg), Furanylfentanyl (FuF, 1 mg/kg) or tetrahydrofuranlylfentanyl (THFF, 1 mg/kg)-treated in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 120 min (n=12 to 16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. \*P<0.05 or \*\*P<0.01 vs. saline (SAL)-treated group.

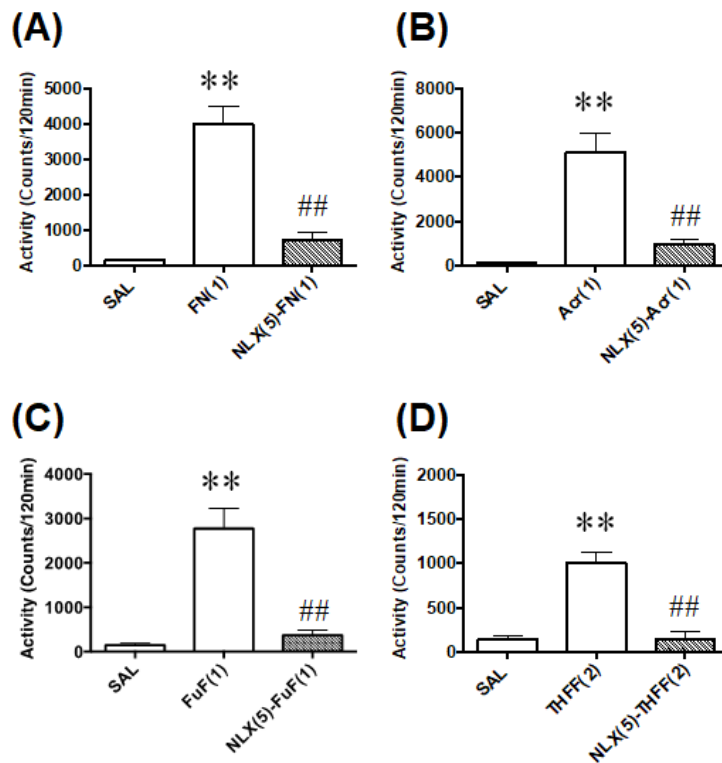


Fig. 5. Effect of pretreatment with a opioid receptor antagonist naloxone on the fentanyl analogues-induced hyperlocomotion in mice. Effect of pretreatment with a opioid receptor antagonist naloxone (NLX, 5 mg/kg, pre 30 min) on the (A) fentanyl (FN, 1 mg/kg), (B) acrylfentanyl (Acr, 1 mg/kg), (C) Furanylfentanyl (FuF, 1 mg/kg) or (D) tetrahydrofuranlylfentanyl (THFF, 2 mg/kg) -induced hyperlocomotion were examined in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 120 min (n=12 or 16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. \*\*P<0.01 vs. SAL-treated group. ##P<0.01 vs. fentanyl analogue-treated group.



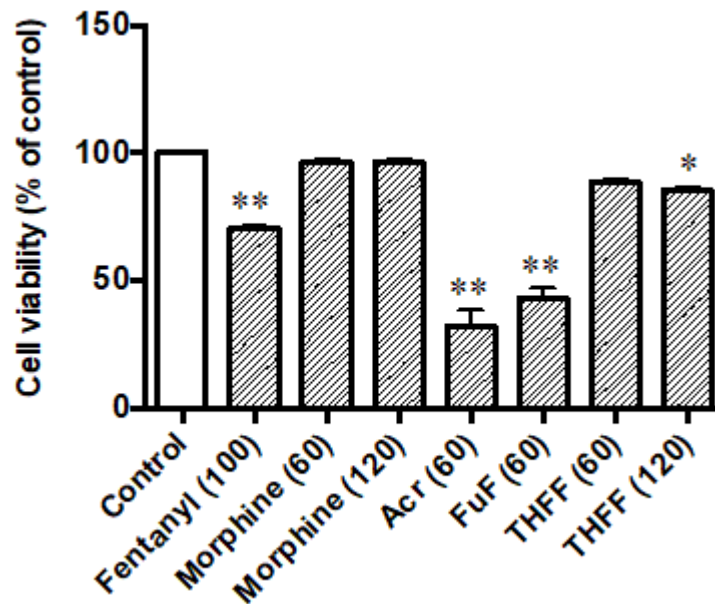


Fig. 6. Cell viability in CHO- $\mu$  after treatment with fentanyl analogues. The relative value of cell viability compared to the baseline value for control (0.05% DMSO) and CHO- $\mu$  treated with Fentanyl, Morphine, Acr, FuF, THFF, (60-120  $\mu$ M) for 24 h. Mean percent changes  $\pm$  S.E.M. are shown. Statistical significance was evaluated with one-way analysis of variance. The Dunnett's multiple comparison test was used to determine significant differences in the percentage of cells showing cell viability (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) from that observed in controls at the 24 h time point.