

令和4年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

精神活性物質の迅速検出法ならびに
有害作用評価法開発に関する研究

課題番号：20KC1003

総括研究報告書
分担研究報告書

[3年間のまとめ]
総合研究報告書
分担研究報告書

令和5年3月

研究代表者：船田正彦

目次

令和4年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業) (課題番号: 20KC1003)

精神活性物質の迅速検出法ならびに 有害作用評価法開発に関する研究

I. 令和4年度 総括研究報告書 船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	-----	1
II. 令和4年度 分担研究報告書		
研究-1: 細胞を利用した薬物検出法に関する研究 船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)	-----	7
研究-2: 新規精神活性物質の合成とその微量分析に関する研究 高橋秀依 (東京理科大学 薬学部)	-----	18
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	26
IV. 令和2~4年度 総合研究報告書 [3年間のまとめ] 船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)	-----	27
V. 令和2~4年度 分担研究報告書 [3年間のまとめ]		
研究-1: 細胞を利用した薬物の有害作用並びに検出法に関する研究 船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)	-----	34
研究-2: 新規精神活性物質の合成とその微量分析に関する研究 高橋秀依 (東京理科大学 薬学部)	-----	39
VI. 3年間の研究成果の刊行に関する一覧表	-----	44

令和4年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業：20KC1003)
精神活性物質の迅速検出法ならびに有害作用評価法開発に関する研究

総括研究報告書

精神活性物質の迅速検出法ならびに有害作用評価法開発に関する研究

研究代表者 船田正彦
(湘南医療大学 薬学部 教授)

【研究要旨】

精神活性物質 (Psychoactive Substances) は、中枢神経系に作用し、精神活動を調整する物質の総称である。近年、世界各国で新しい合成物質が登場し、新規精神活性物質(New Psychoactive Substances) として流通が拡大しており、乱用に基づく死亡事例などの健康被害は大きな社会問題となっている。新規に合成されたオピオイド化合物や合成カンナビノイドなどは、危険ドラッグの主成分であり、欧米を中心に流通が続いている。米国では新しい骨格を持つフェンタニル誘導体が流通拡大し、過量摂取による死亡事例が報告されており、「オピオイド・クライシス」として大きな社会問題となっている。オピオイド化合物については薬物依存性の問題も深刻であることから、新規オピオイド化合物の検出と有害作用を迅速に推測するための手法を確立することは重要な課題となっている。同様に、引き続き新しい合成カンナビノイドおよびオピオイド化合物が登場する状況下で、標準品として危険ドラッグのライブラリーを作製し、有害作用の評価や機器分析による微量分析法について検討することが急務である。

本研究では、オピオイド化合物の検出と作用強度を予測するための細胞樹立を試みた。更に、検出の機動性を高める目的で、持ち運び可能な細胞利用による薬物検出器の作製を実施した。また、危険ドラッグの化合物ライブラリーを作製し、機器分析による微量分析法について検討した。

【研究-1：細胞を利用した薬物検出法に関する研究】

本研究では、オピオイド化合物の検出と作用強度を予測するための細胞樹立を試みた。更に、検出の機動性を高める目的で、持ち運び可能な細胞利用による薬物検出器の作製を実施した。

オピオイド化合物の作用評価細胞の構築に関しては、オピオイド化合物の作用点である μ 受容体発現細胞にカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。本細胞を利用して、フェンタニルと6種類の新規フェンタニル誘導体 (SDFV-63、SDFV-92、SDFV-93、SDFV-94、SDFV-99 および SDFV-100) の作用強度の比較を行った。その結果、SDFV-92、SDFV-93 および SDFV-99 の処置によって濃度依存的な蛍光量の増加が確認された。一方、SDFV-63、SDFV-94 および SDFV-100 では蛍光量の増加は認められなかった。フェンタニル誘導体の僅少構造差異により、作用強度が異なることが明らかになった。次に、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器を作製した。量販型の8連型PCRチューブを利用して、CHO- μ -GCaMP細胞を培養した。チューブ内へオピオイド化合物(フェンタニル、SDFV-92、SDFV-93 および SDFV-99)を添加したところ、蛍光発光を検出することが可能であった。一方、SDFV-63、SDFV-94 および SDFV-100 では有意な蛍光発色は検出されず、 μ 受容体作用薬の選択的な検出が可能であった。小型蛍光検出器の実用化へ向けて、

細胞の培養法、検出のためのプロトコールを作成することができた。

以上の結果から、薬物が作用する受容体の発現細胞は、作用強度の予測に利用可能である。同様に、受容体の発現細胞を利用した薬物の検出法は、薬物の化学構造特性に依存しない包括的検出法として有用である。また、小型検出器の利用により、省スペースでの利用も可能となり、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。

[研究-2：新規精神活性物質の合成とその微量分析に関する研究]

本研究では、昨年度に引き続き、精神活性化作用が期待される様々な化合物の化合物ライブラリーを作製した。今年度は合成カンナビノイド 21 種類、カチノン系及び 3-FPE 併せて 22 種類、フェンタニル 8 種類、フェンタニルの代謝物 2 種類の合成を完了した。最近、欧米で違法に使用されているフェンタニル誘導体については、これまで合成した化合物が合計で 101 種（2023 年 1 月 7 日現在）となり、標準品として提供できる化合物ライブラリーを作製することができた。フェンタニル誘導体については、特に立体構造に着目した分子設計及び合成を行っており、いくつかの誘導体については、軸不斉異性体を安定な化合物として単離することができ、研究代表者に薬理活性を調べていただいている。すでに昨年度、既存の μ 受容体拮抗薬であるナロキソンを超える高い拮抗作用を有する SDFV-63F を見出すことができた。今年度は、これに加えて、SDFV-63F には劣るが、 μ 受容体に対して拮抗作用を示す SDFV-93F を創出することができた。SDFV-63F 及び SDFV-93F の絶対配置の決定をめざし、CD 測定及び ECD の計算を行った結果、 μ 受容体拮抗作用を示すエナンチオマーは aS 体であることがわかった。もう一方のエナンチオマーである aR 体はアゴニスト活性を示すが、この理由について μ 受容体との相互作用を明らかにすべく、計算化学を用いたドッキングスタディも行った。並行して、これらの化合物ライブラリーの微量分析にも取り組み、ラマン分光法による網羅的分析を行い、危険ドラッグ類の化合物ライブラリーデータベースに追加した。

結論：(1) 本研究では、オピオイド作用薬の検出用細胞として CHO- μ -GCaMP 細胞の樹立ならびに小型蛍光検出器の作製に成功した。本細胞はオピオイド化合物に関して、化学構造特性に依存しない包括的検出用に応用可能である。また、本研究で作製した小型検出器の利用により、機動性の向上と省スペースでの利用も可能となり、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。(2) 本研究により、合成カンナビノイド、カチノン系及び FPE 誘導体、フェンタニル誘導体の合成を完了した。フェンタニル誘導体については、これまで合成した化合物が合計で 101 種（2023 年 1 月 7 日現在）となり、標準品として提供できる化合物ライブラリーを作製することができた。このような化合物ライブラリーは世界に唯一の貴重な化合物ライブラリーである。標準品として麻薬取締部や公的な研究機関からの要望に応じて提供可能である。また、ラマン分光による分析データなども世界的に貴重であり、麻薬取締部等からの要請に応じて提供し、微量分析のための活用が期待される。

本研究成果から、危険ドラッグであるフェンタニル化合物について、細胞を利用した薬物検出システムは、迅速な薬物検出法として有用であり、小型蛍光検出器の併用により取り締まりや救急救命の場面での利用が期待できる。また、本研究で合成を進めた合成カンナビノイド及びフェンタニルの化合物ライブラリーは世界に唯一の「危険ドラッグライブラリー」である。このような危険ドラッグライブラリーおよびそのデータベースは、危険ドラッグの法的な規制強化や薬理活性及び毒性の検討に役立つと考えられる。今後は、この危険ドラッグライブラリーを利用して、細胞を利用した危険ドラッグの有害作用評価および薬物検出システムを進展させていく予定である。

研究代表者：船田正彦

湘南医療大学 薬学部 教授

分担研究者：高橋秀依

東京理科大学 薬学部 教授

A. 研究目的

精神活性物質 (Psychoactive Substances) は、中枢神経系に作用し、感情や認知などの精神活動を調整する物質の総称である。規制薬物の麻薬や覚醒剤、医薬品として利用される向精神薬に加え、嗜好品として使用されるタバコやアルコールなどが含まれる。近年、世界各国で新しい合成物質が登場し、新規精神活性物質 (New Psychoactive Substances) として流通が拡大しており、乱用に基づく死亡事例などの健康被害は大きな社会問題となっている。

わが国では、危険ドラッグが代表的な精神活性物質であり、合成カンナビノイド、カチノン系化合物およびオピオイド化合物などが引き続き、指定薬物として規制が進んでいる。危険ドラッグ蔓延における最大の問題点は、国内で流通する段階では、その多くが「未規制化合物」である点である。しかしながら、その作用は麻薬や覚醒剤と類似した効果を示すのである。現在の危険ドラッグ流通に関しては、使用規制および厳格な流通規制を敷くことで、表面上は落ち着きを取り戻している。一方、世界に目を向けると依然として合成カンナビノイドやオピオイド化合物などは新規精神活性物質として流通が拡大しており、乱用に基づく死亡事例などの健康被害は大きな社会問題となっている。特に、オピオイド化合物については、欧米を中心に流通が続いており社会問題となっている。オピオイド化合物のなかでもフェンタニル誘導体は、多くの類縁化合物が流通している。米国では、新しい骨格を持つフェンタニル誘導体が流通拡大し、過量摂取による死亡事例が報告されてお

り、「オピオイド・クライシス」として大きな社会問題となっている。United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC, 国連薬物犯罪事務所) が注意を要する監視対象薬物として、100種類を超える新規のフェンタニル誘導体がリストアップされている。

こうした新規合成薬物である危険ドラッグ使用により健康被害が発生した場合、救急医療現場では迅速な薬物検出が必要となっている。危険ドラッグは化学構造の一部が変化している類縁薬物が多数存在するため、一括で検出する手法の開発が必要となっている。同様に、引き続き新しい危険ドラッグが登場するなか、標準品として危険ドラッグのライブラリーを作製し、有害作用の評価や機器分析による微量分析法について検討することが急務である。

本研究では、危険ドラッグが作用する薬物受容体等の機能タンパク質に着目し、危険ドラッグ検出用細胞を作製ならびに持ち運び可能な小型検出機器の開発を目的とした。本年度は、細胞を用いてオピオイド化合物の作用および検出用の細胞を作出するため、樹立安定株である CHO 細胞を利用して、ヒト-オピオイド μ 受容体およびカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。オピオイド化合物のなかでも、近年の流通が問題となっているフェンタニル誘導体の評価を行った。また、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器の作製を試みた。また、危険ドラッグの化合物ライブラリーを作製し、機器分析による微量分析法について検討した。

B. 各研究の目的、方法、結果

[研究-1: 細胞を利用した薬物検出法に関する研究]

船田正彦

湘南医療大学 薬学部 教授

合成カンナビノイドやオピオイド化合物は、危険ドラッグの主成分であり、欧米を中心に流通が続いており社会問題となっている。オピオイド化合物においては、多種類のフェンタニル類縁体および他の新しい化合構造を有する化合物が流通しており、オピオイド化合物をターゲットとした迅速な薬物検出手法の確立が課題となっている。本研究では、オピオイド化合物の検出と作用強度を予測するための細胞樹立を試みた。更に、検出の機動性を高める目的で、持ち運び可能な細胞利用による薬物検出器の作製を実施した。

オピオイド化合物の作用評価細胞の構築に関しては、オピオイド化合物の作用点である μ 受容体発現細胞にカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。また、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器の作製を試みた。据え置き式の蛍光プレートリーダーを利用して、標準薬のフェンタニルを使用して、CHO- μ -GCaMP 細胞による解析を実施したところ、オピオイド μ 受容体作用を示す蛍光発光が確認された。また、6 種類の新規フェンタニル誘導体について、CHO- μ -GCaMP 細胞による解析を実施したところ、蛍光発光を示す化合物と示さない化合物の存在が確認された。同様に、小型蛍光検出器を使用して、6 種類の新規フェンタニル誘導体について検討したところ、蛍光発光を示す化合物と示さない化合物の存在が確認され、この結果は、据え置き式の蛍光プレートリーダーでの結果と一致した。

[研究-2: 新規精神活性物質の合成とその微量分析に関する研究]

高橋秀依

東京理科大学 薬学部 教授

本研究では、精神活性化作用が期待される様々な化合物の合成に取り組んでいる。多く

は未規制であるが、市中に流通する際には、化学構造が少しずつ異なる多様な種類が出回ることになるため、化合物ライブラリー化を目指す必要がある。そのため、網羅的な化合物合成によって標準品として用いることができるライブラリー構築を行っている。さらに、違法薬物として用いられた際に、迅速かつ簡便に検出できる新たな微量分析法としてラマン分光測定を引き続き行い、分析データを一層拡充している。これまでに引き続き、精神活性化作用が期待される様々な化合物の化合物ライブラリーを作製した。今年度は合成カンナビノイド 21 種類、カチノン系及び 3-FPE 併せて 22 種類、フェンタニル 8 種類、フェンタニルの代謝物 2 種類の合成を完了した。最近、欧米で違法に使用されているフェンタニル誘導体については、これまで合成した化合物が合計で 101 種 (2023 年 1 月 7 日現在) となり、標準品として提供できる化合物ライブラリーを作製することができた。フェンタニル誘導体については、特に立体構造に着目した分子設計及び合成を行っており、いくつかの誘導体については、軸不斉異性体を安定な化合物として単離することができ、研究代表者に薬理活性を調べていただいている。すでに昨年度、既存の μ 受容体拮抗薬であるナロキソンを超える高い拮抗作用を有する SDFV-63F を見出すことができた。今年度は、これに加えて、SDFV-63F には劣るが、 μ 受容体に対して拮抗作用を示す SDFV-93F を創出することができた。SDFV-63F 及び SDFV-93F の絶対配置の決定をめざし、CD 測定及び ECD の計算を行った結果、 μ 受容体拮抗作用を示すエナンチオマーは aS 体であることがわかった。もう一方のエナンチオマーである aR 体はアゴニスト活性を示すが、この理由について μ 受容体との相互作用を明らかにすべく、計算化学を用いたドッキングスタディも行った。並行して、これらの化合物ライブラリーの微量分析にも取り組み、ラマン分光法による網羅的分析を行い、危険ドラッグ類の化合物ライブラリーデータベースに

追加した。

C. 考 察

1. 細胞を利用した薬物検出法に関する研究

オピオイド化合物をターゲットとして、オピオイド化合物の作用および検出用の細胞を作出するため、樹立安定株である CHO 細胞を利用して、ヒト-オピオイド μ 受容体およびカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。機能評価には、近年の流通が問題となっているフェンタニル誘導体を使用した。6 種類のフェンタニル誘導体について、評価を実施したところフェンタニルと同様の強力な μ 受容体作用を示す化合物群とほとんど作用を示さない化合物群に分類された。2 つの群の化学構造の差異と作用の関連性を検証すると、フェンタニルのアシル部の炭素数が増加すると μ 受容体への作用強度が低下する傾向が認められた。以上の結果から、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞による機能評価は、濃度依存性の解析から作用強度の比較が可能であり有害作用の比較に利用可能である。

一方、今回使用した 6 種類のフェンタニル誘導体では、作用の有無が明確であったにも関わらず、化学構造の差異は僅少であり、従来型の化学構造に対する抗原抗体反応を利用する検出手法では、作用比較は困難であると想定される。しがたって、細胞を利用した検出法は、物質の存在の検出に加え、作用発現も予測できる点で有用な手法であると考えられる。次に、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器の作製を試みた。製作した小型蛍光検出器の解析データは、従来の大型蛍光プレートリーダーの検出結果と一致しており、薬物検出のための小型検出器として使用可能であることが確認された。

本研究では、オピオイド作用薬の検出用細

胞の CHO- μ -GCaMP 細胞の樹立ならびに小型検出の作製に成功した。本細胞はオピオイド化合物に関して、化学構造特性に依存しない包括的検出用に応用可能である。また、本研究で作製した小型検出器の利用により、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。

2. 新規精神活性物質の合成とその微量分析に関する研究

本研究では、危険ドラッグ化合物ライブラリーの作製を実施した。フェンタニル誘導体の化学合成では、第三級アミドに基づくジアステレオマーの存在を明らかにしただけでなく、軸不斉異性体を安定な化合物として単離することができた。軸不斉異性体の薬理活性の評価から、フェンタニルを超える高いオピオイド μ 受容体アゴニスト活性を示すものが見いだされた。一方で、オピオイド μ 受容体アンタゴニスト活性を示し、既存のアンタゴニストであるナロキソンを超えるものも見出されている。現在の法規制においては、立体化学に関する記述がなく、すべての立体異性体について一様に規制されている。しかし、フェンタニル誘導体については軸不斉異性体の一方がアゴニスト活性、もう一方がアンタゴニスト活性を示すことから、今後の医薬品候補化合物として有用になる可能性がある。また、分析法については、質量分析 (MS) や、IR に加えてラマン分光法によるスペクトル解析も進めたが、特にラマン分光法が最も簡便かつ迅速で汎用性が高いと考えられる。今後、危険ドラッグ化合物ライブラリーのデータベースに加えることで、違法薬物鑑定に役立つと考える。

D. 結 論

本研究では、オピオイド作用薬の検出用細胞として CHO- μ -GCaMP 細胞の樹立ならびに小型蛍光検出器の作製に成功した。本細胞は

オピオイド化合物に関して、化学構造特性に依存しない包括的検出用に応用可能である。また、本研究で作製した小型検出器の利用により、機動性の向上と省スペースでの利用も可能となり、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。

化合物ライブラリーについては、本研究により、合成カンナビノイド、カチノン系及びFPE誘導体、フェンタニル誘導体の合成を完了した。フェンタニル誘導体については、これまで合成した化合物が合計で101種（2023年1月7日現在）となり、標準品として提供できる化合物ライブラリーを作製することができた。このような化合物ライブラリーは世界に唯一の貴重な化合物ライブラリーである。標準品として麻薬取締部や公的な研究機関からの要望に応じて提供可能であり、危険ドラッグ類の法的な規制強化や薬理活性及び毒性の検討に役立つと考える。また、化合物の分析データも世界的に貴重であり、麻薬取締部等からの要請に応じて提供し、微量分析のために活用していただくことができる。特に、ラマン分光による分析データは、微量の化合物についても安全かつ簡便に取得することができることを明らかにした。今後、犯罪現場において本分析法及び分析データを装備したラマン分光測定機器を用いることができれば、現場の警察官等によっても、迅速かつ簡便に違法薬物を鑑定することが可能になると考える。

E. 健康危険情報

本研究は、危険ドラッグの検出に関する研究であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦:危険ドラッグの依存性. 精神科, 41: 239-247, 2022.
- 2) 船田正彦:海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 54: 36-42, 2023.

2. 学会発表

- 1) 菊川俊太郎、有田浩暢、金瀬薫、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、高橋秀依：フェンタニル誘導体の合成とその構造活性相関、日本薬学会第142年会、オンライン、2022年3月26-28日
- 2) 富澤 幸、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依：フェンタニル誘導体の構造活性相関、第66回日本薬学会第142年会、オンライン、2022年3月26-28日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特願 RKF-072PCT :

高橋秀依、牧野宏章、有田浩暢、菊川俊太郎、富沢幸、船田正彦、富山健一. オピオイド受容体拮抗剤及び医薬組成物。

特願 2021-158379 :

発明の名称「オピオイド受容体拮抗剤及び医薬組成物」、・特許出願人 学校法人東京理科大学、国立精神・神経医療研究センター

令和4年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業：20KC1003)
精神活性物質の迅速検出法ならびに有害作用評価法開発に関する研究

分担研究報告書

細胞を利用した薬物検出法に関する研究

研究分担者：船田正彦（湘南医療大学 薬学部 薬理学研究室）

協力研究者：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】

新規に合成されたオピオイド化合物や合成カンナビノイドなどは、危険ドラッグの主成分であり、欧米を中心に流通が続いている。米国では新しい骨格を持つフェンタニル誘導体が流通拡大し、過量摂取による死亡事例が報告されており、「オピオイド・クライシス」として大きな社会問題となっている。オピオイド化合物については薬物依存性の問題も深刻であることから、新規オピオイド化合物の検出と有害作用を迅速に推測するための手法を確立することは重要な課題となっている。そこで本研究では、オピオイド化合物の検出と作用強度を予測するための細胞樹立を試みた。更に、検出の機動性を高める目的で、持ち運び可能な細胞利用による薬物検出器の作製を実施した。

オピオイド化合物の作用評価細胞の構築に関しては、オピオイド化合物の作用点である μ 受容体発現細胞にカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。本細胞を利用して、フェンタニルと 6 種類の新規フェンタニル誘導体（SDFV-63、SDFV-92、SDFV-93、SDFV-94、SDFV-99 および SDFV-100）の作用強度の比較を行った。その結果、SDFV-92、SDFV-93 および SDFV-99 の処置によって濃度依存的な蛍光量の増加が確認された。一方、SDFV-63、SDFV-94 および SDFV-100 では蛍光量の増加は認められなかった。フェンタニル誘導体の僅少構造差異により、作用強度が異なることが明らかになった。

次に、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器を作製した。量販型の 8 連型 PCR チューブを利用して、CHO- μ -GCaMP 細胞を培養した。チューブ内へオピオイド化合物(フェンタニル、SDFV-92、SDFV-93 および SDFV-99)を添加したところ、蛍光発光を検出することが可能であった。一方、SDFV-63、SDFV-94 および SDFV-100 では有意な蛍光発色は検出されず、 μ 受容体作用薬の選択的な検出が可能であった。小型蛍光検出器の実用化へ向けて、細胞の培養法、検出のためのプロトコールを作成することができた。

以上の結果から、薬物が作用する受容体の発現細胞は、作用強度の予測に利用可能である。同様に、受容体の発現細胞を利用した薬物の検出法は、薬物の化学構造特性に依存しない包括的検出法として有用である。また、小型検出器の利用により、省スペースでの利用も可能となり、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。

A. 目的

合成カンナビノイドやオピオイド化合物は、危険ドラッグの主成分であり、欧米を中心に流通が続いており社会問題となっている。オピオイド化合物においては、フェンタニル誘導体の他に新しい骨格を持つ化合物が流通拡大している(1)。特に米国では、新しい骨格を持つフェンタニル誘導体が流通拡大し、過量摂取による死亡事例が報告されており、「オピオイド・クライシス」として大きな社会問題となっている(2)。こうした新規合成薬物である危険ドラッグ使用により健康被害が発生した場合、救急医療現場では迅速な薬物検出が必要となっている。危険ドラッグは化学構造の一部が変化している類縁薬物が多数存在するため、一括で検出する手法の開発が必要となっている。

本研究では、危険ドラッグが作用する薬物受容体等の機能タンパク質に着目し、危険ドラッグ検出用細胞を作製ならびに持ち運び可能な小型検出機器の開発を目的とした。本年度は、細胞を用いてオピオイド化合物の作用および検出用の細胞を作出するため、樹立安定株である CHO 細胞を利用して、ヒト-オピオイド μ 受容体およびカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。オピオイド化合物のなかでも、近年の流通が問題となっているフェンタニル誘導体の評価を行った。また、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器の作製を試みた。

B. 方法

使用薬物：

- *N*-(2-ethyl-6-methylphenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide (SDFV-63)
 - *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide (SDFV-92)
 - *N*-(2-isopropyl-6-methylphenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide (SDFV-93)
 - *N*-(2-ethyl-6-methylphenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-thiophenecarboxamide (SDFV-94)
 - *N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide (SDFV-99)
 - *N*-(2-ethyl-6-methylphenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-3-furancarboxamide (SDFV-100)
- を使用した(東京理科大学高橋先生より供与 Fig.1)。対照薬物としては、フェンタニル (FN: 第一三共) を使用した。選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬として(*E*)-4-[[5 α ,6 β]-17-cyclopropyl-methyl]-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]amino]-4-oxo-2-butenoic acid methyl ester hydrochloride (β -FNA, Tocris Bioscience)を使用した。

1. 新規オピオイド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 μ 受容体およびカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 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 (Greiner) に 5×10^4 cells/well となるように播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。24 時間後、新規オピオイド化合物であるフェンタニル誘導体 SDFV-63、SDFV-92、SDFV-93、SDFV-94、SDFV-99 および SDFV-100 添加による蛍光強度の変化を、Flexstation 3 により測定した。データは蛍光強度

(Relative Fluorescence Units, RFU)として解析した。

2. 小型蛍光検出器の作製

蛍光検出部として、光ファイバプローブ式蛍光検出器 (日本板硝子)を利用した。PCR チューブの保持部分は、チューブごとにプローブが直下で検出できるように保持ボックスを作成した (Fig. 2)。

自立蛍光検出細胞のCHO- μ -GCaMP細胞をPCR用チューブ(FastGene 0.2mL, 8連チューブ, 日本ジエネティクス)に 1×10^4 cells/tubeとなるように播種し、37°C・5.0% CO₂条件下で1時間静置した。その後、fentanyl (FN, 1 μ M)、フェンタニル誘導体(1 μ M)を添加し、蛍光量の変化を測定した。また、選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬 β -FNA (2.5 μ M)前処置の影響も併せて検討した。

C. 結果

1. 新規オピオイド化合物のオピオイド受容体作用

CHO- μ -GCaMP細胞を利用して、FN、SDFV-63、SDFV-92、SDFV-93、SDFV-94、SDFV-99 およびSDFV-100 の μ 受容体作用を解析した。CHO- μ -GCaMP細胞においてFN、SDFV-92、SDFV-93 およびSDFV-99の処置によって濃度依存的な蛍光量の増加が確認された (Fig.3A)。それぞれの50%効果濃度 (EC₅₀値, M)はFN: 8.1×10^{-9} 、SDFV-92 : 6.2×10^{-9} 、SDFV-93 : 5.3×10^{-8} およびSDFV-99 : 5.82×10^{-9} であった。また、SDFV-92 (2.5 μ M)、SDFV-93 (2.5 μ M)およびSDFV-99 (2.5 μ M)の蛍光強度の増加作用は、選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬 β -FNA (2.5 μ M)の前処置により完全に抑制された。一方、同様の濃度範囲において、SDFV-63、SDFV-94 およびSDFV-100では蛍光量

の増加は認められず、高濃度 (20 μ M)のみで蛍光量の増加が確認された (Fig.3B)。CHO- μ -GCaMP細胞を利用して、FN、SDFV-63、SDFV-92、SDFV-93、SDFV-94、SDFV-99 およびSDFV-100の μ 受容体作用のまとめをFig. 4に示した。

2. 新規小型蛍光検出器の機能評価

PCRチューブ内でCHO- μ -GCaMP細胞を維持し、FN、SDFV-63、SDFV-92、SDFV-93、SDFV-94、SDFV-99 およびSDFV-100添加(すべて1 μ M)による蛍光発光強度の解析を行った。FNの添加によって濃度依存的な蛍光量の増加が確認された (Fig. 5)。この蛍光強度の増加作用は、選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬 β -FNA (2.5 μ M)の前処置により完全に抑制された。薬物濃度を30nMに固定して、影響を検討したところ、FN、SDFV-92、SDFV-93 およびSDFV-99 (30nM)の添加によって蛍光量の増加が確認された (Fig. 6)。一方、SDFV-63、SDFV-94 およびSDFV-100 (30nM)の添加では、蛍光発光は確認されなかった。

D. 考察

オピオイド化合物や合成カンナビノイドは、危険ドラッグの主成分であり、欧米を中心に流通が拡大しており、世界規模での社会問題となっている。危険ドラッグの流通は、規制強化にもかかわらず、依然として終息しておらず、流通薬物の種類も多様化している。最大の原因は、特定の薬物を規制しても、次々に新しい薬物が登場する状況が続いている点である。こうした状況を打破するために、危険ドラッグの確実な検出とその作用を迅速に評価するシステムを構築することが望まれる。

本研究では、危険ドラッグが作用する薬物受容体に着目し、危険ドラッグ検出用細胞を作製ならびに持ち運び可能な小型検出器の開発を試みた。

オピオイド化合物をターゲットとして、オピオイド化合物の作用および検出用の細胞を作出するため、樹立安定株である CHO 細胞を利用して、ヒト-オピオイド μ 受容体およびカルシウムセンサータンパク質 GCaMP を導入して、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞を構築した。機能評価には、近年の流通が問題となっているフェンタニル誘導体を使用した。6 種類のフェンタニル誘導体について、評価を実施したところフェンタニルと同様の強力な μ 受容体作用を示す化合物群 (SDFV-92, SDFV-93 および SDFV-99) とほとんど作用を示さない化合物群 (SDFV-63, SDFV-94 および SDFV-100) に分類された。2 つの群の化学構造の差異と作用の関連性を検証すると、フェンタニルのアリル部の炭素数が増加すると μ 受容体への作用強度が低下する傾向が認められた。以上の結果から、自立蛍光検出細胞となる CHO- μ -GCaMP 細胞による機能評価は、濃度依存性の解析から作用強度の比較が可能であり有害作用の比較に利用可能である。

一方、今回使用した 6 種類のフェンタニル誘導体では、作用の有無が明確であったにも関わらず、化学構造の差異は僅少であり、従来型の化学構造に対する抗原抗体反応を利用する検出手法では、作用比較は困難であると想定される。しがたって、細胞を利用した検出法は、物質の存在の検出に加え、作用発現も予測できる点で有用な手法であると考えられる。オピオイド化合物の精神作用の発現では、脳内 μ 受容体の活性化が必須であることから、CHO- μ -GCaMP 細胞は新規オピオイド化合物において精神作用の発現予測に役立つと考えら

れる。

次に、細胞を利用した薬物検出法の実効性と利便性を高める目的で、持ち運び可能な小型蛍光検出器の作製を試みた。細胞が発する蛍光の測定には、プレートリーダー等の検出機器が必要である。機能評価をする場合は、薬物添加からの正確な経時変化を解析する必要がある。一方、物質の検出を主たる目的とする場合、一定時間後の蛍光強度を測定することで対応は可能となる。従来利用されている蛍光プレートリーダー等の精密検出器では、移動のたびに測定のセンサー部分の軸補正などが必要であり、モバイル使用は想定されていない。そこで、本研究では、持ち運び可能とするため、明視野での使用可能な 1 チャンネルの検出センサーを利用して定点測定が可能となる小型蛍光検出装置を作製した。

8 連 PCR チューブに CHO- μ -GCaMP 細胞を静置後、フェンタニルを使用して、小型蛍光検出装置の検出機能を評価したところ、フェンタニルの濃度依存的な蛍光発光を検出できることが判明した。フェンタニルと同様に、フェンタニル誘導体を添加したところ、蛍光量の増加が確認された。フェンタニルと同様の強力な μ 受容体作用を示す化合物群 (SDFV-92, SDFV-93 および SDFV-99) とほとんど作用を示さない化合物群 (SDFV-63, SDFV-94 および SDFV-100) に分類された。製作した小型蛍光検出器の解析データは、従来大型蛍光プレートリーダーの検出結果と一致しており、薬物検出のための小型検出器として使用可能であることが確認された。

本研究では、オピオイド作用薬の検出用細胞の CHO- μ -GCaMP 細胞の樹立ならびに小型検出の作製に成功した。本細胞はオピオイド化合物に関して、化学構造特性に依存しない包括的検出に

用可能である。また、本研究で作製した小型検出器の利用により、機動性の向上と省スペースでの利用も可能となり、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。

E. 結論

本研究では、オピオイド作用薬の検出用細胞としてCHO- μ -GCaMP細胞の樹立ならびに小型蛍光検出器の作製に成功した。本細胞はオピオイド化合物に関して、化学構造特性に依存しない包括的検出用に応用可能である。また、本研究で作製した小型検出器の利用により、機動性の向上と省スペースでの利用も可能となり、危険ドラッグの発見や救急現場での原因薬物の検出などに応用が期待される。

F. 参考文献

1. Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. Synthetic opioids: a review and clinical update. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2022 Dec 10; doi: 10.1177/20451253221139616.
2. Roxburgh A, Nielsen S. Twenty-year trends in pharmaceutical fentanyl and illicit fentanyl deaths, Australia 2001-2021. *Int J Drug Policy.* 2022 Nov;109:103854. doi: 10.1016/j.drugpo.2022.103854.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦：危険ドラッグの依存性. 精神科, 41: 239-247, 2022.
- 2) 船田正彦：海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義. 医薬品医療機

器レギュラトリーサイエンス, 54: 36-42, 2023.

2. 学会発表

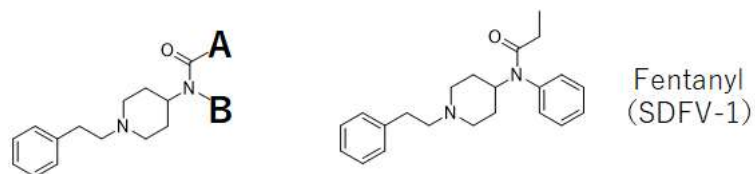
- 1) 船田正彦：危険ドラッグの最新海外事情, 第20回日本旅行医学会, Web開催, 2022年5月21日.
- 2) 富澤幸菊、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏莉英昭、船田正彦、高橋 秀依：フェンタニル誘導体の構造活性相関, 日本薬学会 第140年会, 札幌, 2022年3月25日.

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、危険ドラッグの細胞毒性および依存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。



化合物ID	IUPAC名	A	B
SDFV-1	N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-propanamide	Et	
SDFV-63	N-(2-ethyl-6-methyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide		
SDFV-92	N-(2-chloro-6-methyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide		
SDFV-93	N-(2-isopropyl-6-methyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide		
SDFV-94	N-(2-ethyl-6-methyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-thiophenecarboxamide		
SDFV-99	N-(2,6-dimethyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide		
SDFV-100	N-(2-ethyl-6-methyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-3-furancarboxamide		

Fig.1. Chemical structure of fentanyl derivatives.

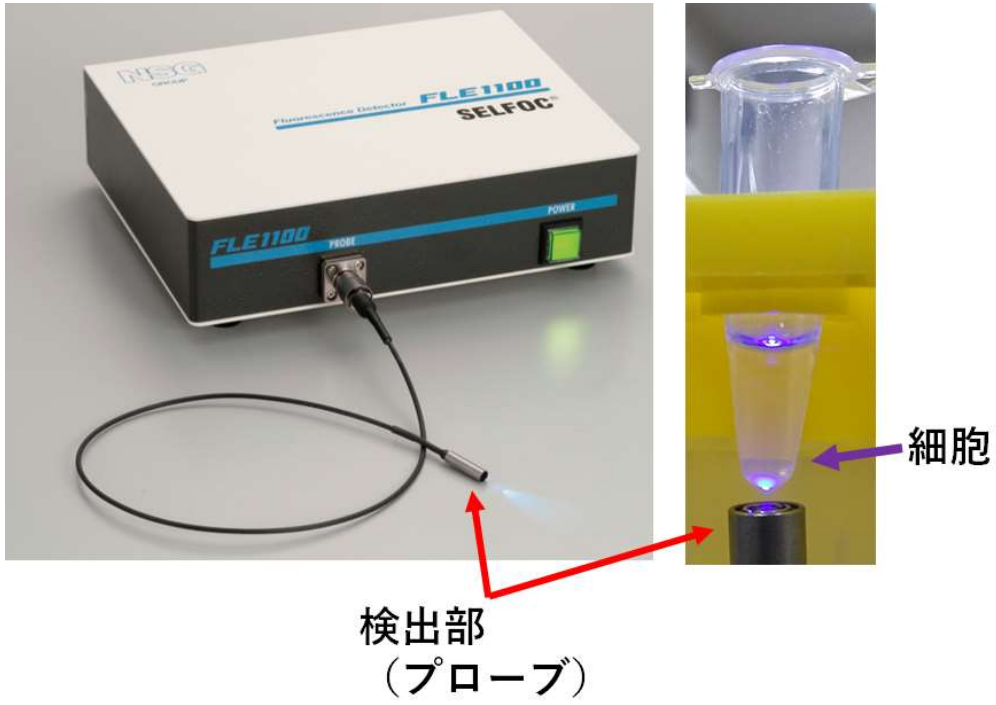


Fig.2. Compact fluorescence detector for mobile use using probes of optical fiber.

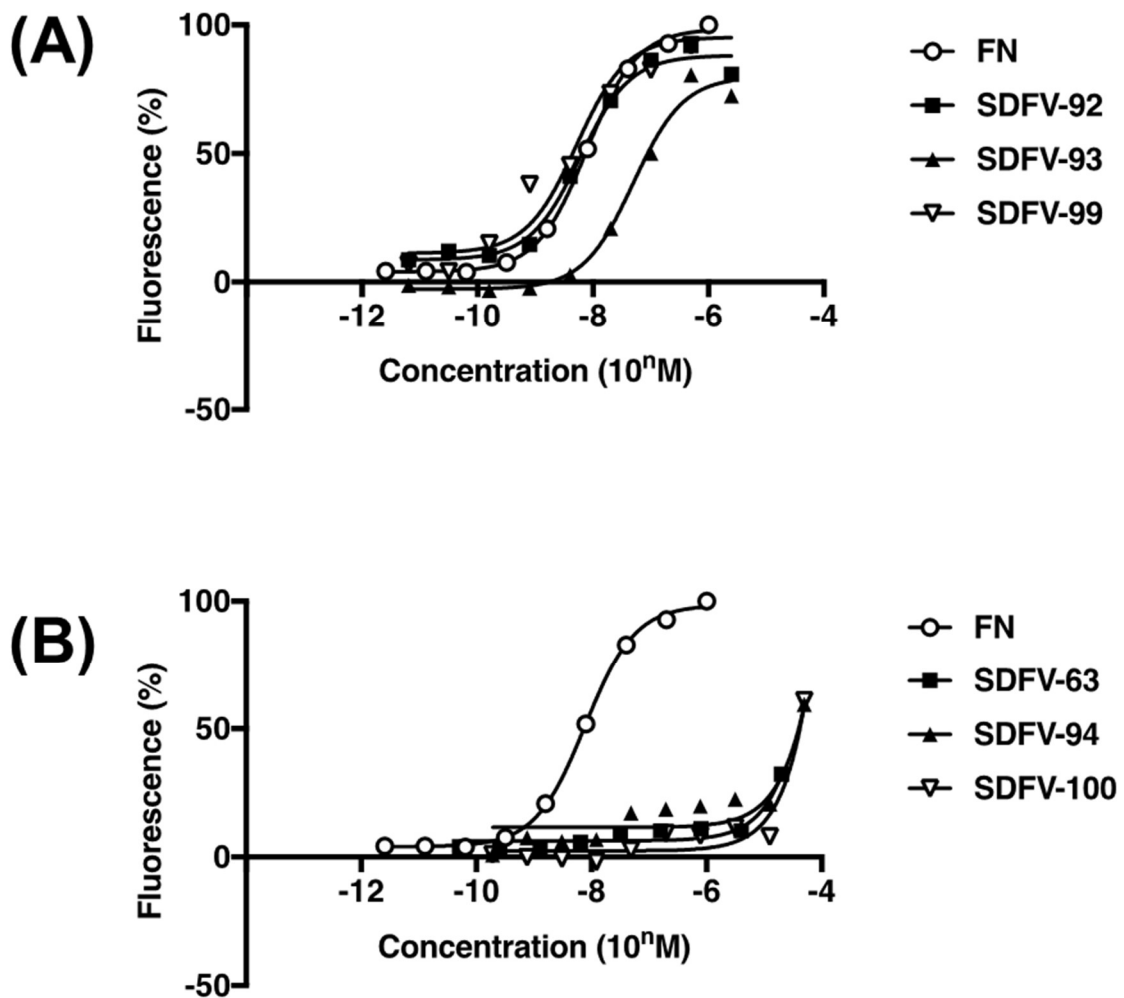
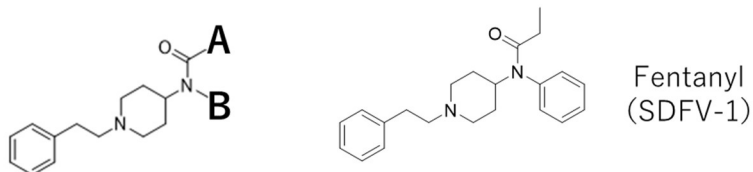


Fig.3. Effect of opioid μ receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- μ -GCaMP cells. (A) Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl derivatives. (A) FN (2.56 nM-1 μ M), SDFV-92 (51.2 nM-20 μ M), SDFV-93 (51.2 nM-20 μ M) and SDFV-99 (51.2 nM-20 μ M). (B) FN (2.56 nM-1 μ M), SDFV-63 (51.2 nM-20 μ M), SDFV-94 (51.2 nM-20 μ M) and SDFV-100 (51.2 nM-20 μ M). Results are expressed as mean (n=3).

FN, SDFV-63, SDFV-92, SDFV-93, SDFV-94, SDFV-99, SDFV-100



化合物 ID	IUPAC名	A	B	μ受容体活性
SDFV-1	N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-propanamide	Et		◎
SDFV-63	N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide			▲
SDFV-92	N-(2-chloro-6-methylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide			◎
SDFV-93	N-(2-isopropyl-6-methylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide			◎
SDFV-94	N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-thiophenecarboxamide			▲
SDFV-99	N-(2,6-dimethylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-2-furancarboxamide			◎
SDFV-100	N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-3-furancarboxamide			▲

Fig.4. Effect of opioid μ receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- μ -GCaMP cells. (A) Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl derivatives.

◎(SDFV-92, SDFV-93 and SDFV-99) : Strong agonistic action on μ -receptors.

▲(SDFV-63, SDFV-94 and SDFV-100) : Weak agonistic action on μ -receptors.

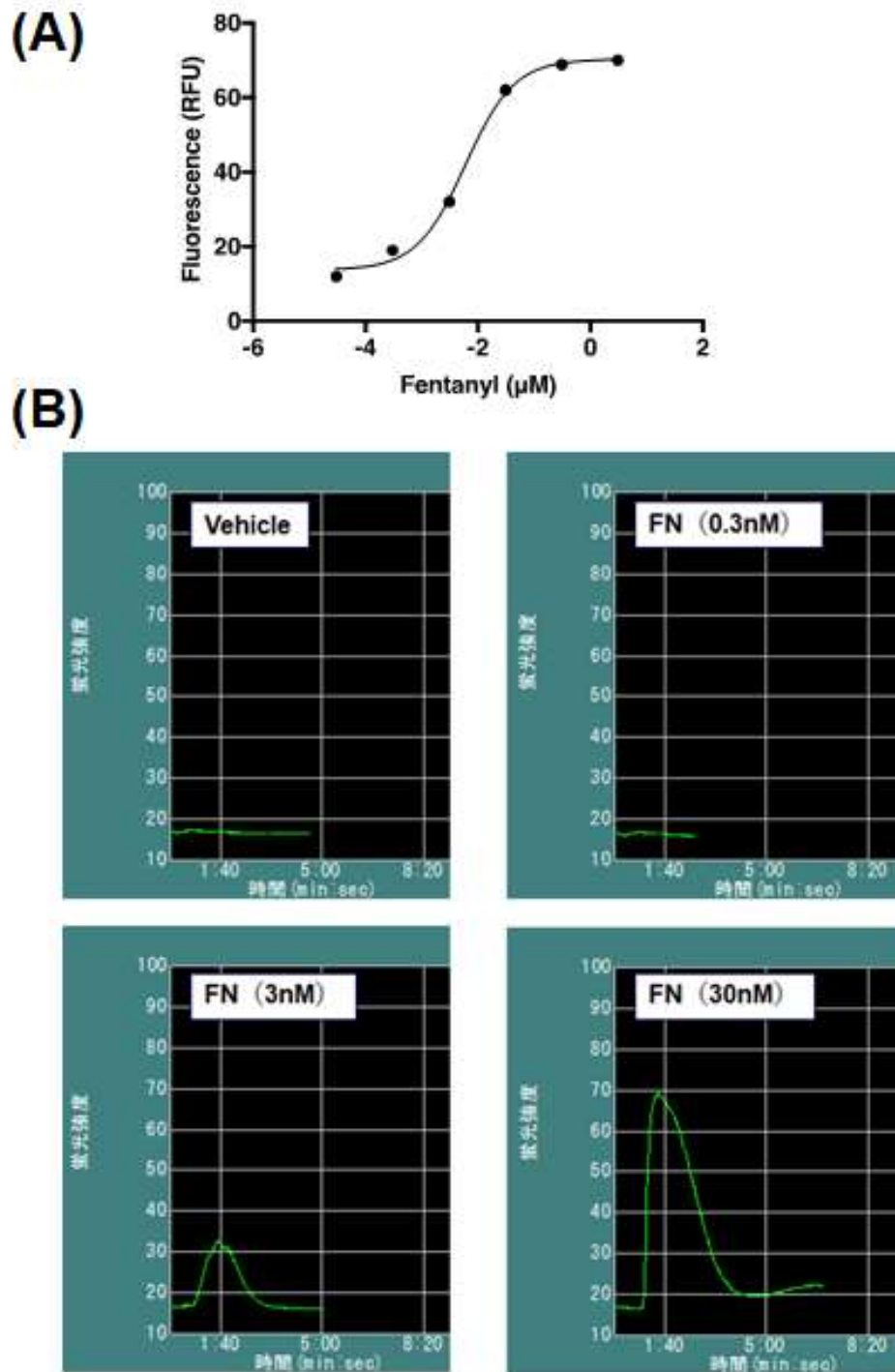


Fig.5. Effect of opioid μ receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- μ -GCaMP cells using probes of optical fiber. (A) Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl (FN: 0.00001-0.01 μM), Vehicle (V). Results are expressed as mean ($n=3$). (B) Changes in fluorescence levels over time after treatment with fentanyl (FN) in the CHO- μ -GCaMP cells using probes of optical fiber.

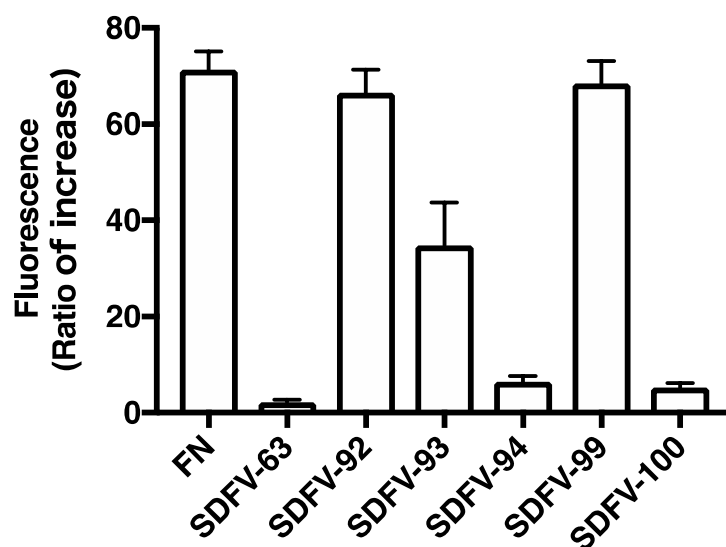


Fig.6. Effect of opioid μ receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- μ -GCaMP cells using probes of optical fiber. Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl derivatives. Fentanyl (FN :30nM), SDFV-63 (30nM), SDFV-92 (30nM), SDFV-93 (30nM), SDFV-94 (330nM), SDFV-99 (30nM), SDFV-100 (30nM). Vehicel (V). Results are expressed as mean (n=3).

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>船田正彦</u>	危険ドラッグの依存性.	精神科	41	239-247	2022
<u>船田正彦</u>	海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義.	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	54	36-42	2023

厚生労働大臣 殿

機関名 湘南医療大学
 所属研究機関長 職名 学長
 氏名 大屋敷 芙志枝

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 精神活性物質の迅速検出法ならびに有害作用評価法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 湘南医療大学 薬学部・教授
 (氏名・フリガナ) 船田 正彦・フナダ マサヒコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：湘南医療大学 動物実験に関する規程)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	湘南医療大学 薬学部	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 学校法人東京理科大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 浜本 隆之

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 精神活性物質の迅速検出法ならびに有害作用評価法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 東京理科大学 薬学部薬学科・教授
(氏名・フリガナ) 高橋 秀依・タカハシ ヒデオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。