

平成 30～令和 2 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)
総合研究報告書 (H30-医薬-一般-004)
危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究

分担研究報告書 [3 年間のまとめ]

危険ドラッグに関する動物実験と細胞実験の統合的データ解析

研究分担者 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)
研究協力者 阿久根陽子 (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)

【研究概要】

[研究テーマ：危険ドラッグに関する動物実験と細胞実験の統合的データ解析]

[緒言] 危険ドラッグの流通は大きな社会問題である。流通している危険ドラッグの種類は多様化しており、有効かつ迅速な有害作用の評価法を構築することが望まれる。本研究では、フェンタニル類縁化合物および合成カンナビノイドについて、動物実験と細胞実験から得られるデータの関連性について検討した。

[方法] 行動薬理的解析：フェンタニル類縁化合物および合成カンナビノイドの運動促進作用について検討した。細胞実験：薬物の作用点に着目して、CHO- μ 細胞および CHO-CB₁ 細胞を使用して、受容体活性強度を解析した。

[結果] 行動薬理的解析：フェンタニル類縁化合物において運動促進作用が発現し、これらの作用はオピオイド受容体拮抗薬ナロキソンの前処置により抑制された。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。合成カンナビノイドにおいては、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。これら作用はカンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 前処置によって抑制された。無動状態の発現には、カンナビノイド CB₁ 受容体が関与することが明らかになった。細胞実験：CHO- μ 受容体発現細胞を利用して、フェンタニル類縁化合物のオピオイド受容体作用強度を解析した。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、 μ 受容体拮抗薬 (β -FNA) の前処置により完全に抑制された。フェンタニル類縁化合物による運動活性と μ 受容体作用の強度についてその相関性を解析したところ、フェンタニル類縁化合物による運動促進作用の発現強度と μ 受容体作用の強度には正の相関性が認められた。同様に、CHO-CB₁ 受容体発現細胞を利用して、合成カンナビノイドのカンナビノイド受容体作用強度を解析した。合成カンナビノイドの添加により、濃度依存的な蛍光発光が確認された。合成カンナビノイドによる細胞毒性与 CB₁ 受容体作用の強度についてその相関性を解析したところ、合成カンナビノイドによる細胞毒性の発現強度と CB₁ 受容体作用の強度には正の相関性が認められた。

[考察] フェンタニル類縁化合物の中枢作用 (中枢興奮作用や精神依存形成) については、 μ 受容体が重要であるため、CHO- μ 受容体発現細胞を利用して作用強度を解析することが可能である。同様に、合成カンナビノイドについては、CB₁ 受容体を介して中枢作用および細胞毒性が発現することから CB₁ 受容体発現細胞を利用して有害作用強度を解析することが可能であると考えられ

る。また、フェンタニル類縁化合物の運動促進作用と μ 受容体作用の強度、合成カンナビノイドによる細胞毒性の発現強度と CB_1 受容体作用の強度には正の相関性が認められた。危険ドラッグの作用点に着目して、動物実験と細胞実験から得られるデータの関連性を解析することで、中枢作用（中枢興奮作用や精神依存形成）および細胞毒性を予測できる可能性が示唆された。

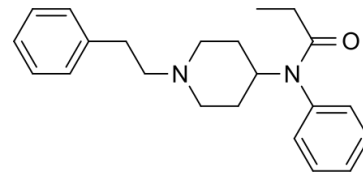
【結論】本研究より、危険ドラッグの中枢作用を推測する指標として、運動促進作用および運動抑制作用の発現が利用できることが明らかになった。同様に、機能タンパク質の発現培養細胞による活性強度の評価は、迅速かつ客観的な評価手法として有用であると考えられる。行動薬理学的手法による中枢作用の評価と培養細胞による活性強度の評価から構成される解析システムは、危険ドラッグの有害作用の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。

【緒言】

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「合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物」の化学構造に着目し、類似したものを一括で規制するいわゆる「包括規制」の導入が進んでいる。一方、危険ドラッグの種類は合成カンナビノイドやカチノン系化合物以外の、オピオイド系薬物のフェンタニル類縁化合物などが登場している。こうした危険ドラッグの迅速な規制のためには、包括的な有害作用の評価法を構築することが望まれる。

本研究では、フェンタニル類縁化合物および合成カンナビノイドについて、運動活性に対する影響、細胞毒性および薬物受容体の活性強度について検討した。フェンタニル類縁化合物についてはオピオイド μ 受容体、合成カンナビノイドについては CB_1 受容体をターゲットとして受容体活性化の強度を比較検討した。行動薬理学的手法による中枢作用に関するデータと培養細胞による薬物受容体に対する活性強度データの相関性を検討し、危険ドラッグの中枢作用発現予測を行うためのシステム構築を試みた。

1) フェンタニル類縁化合物の中枢作用解析法に関する研究（1年目）



Fentanyl (FN)

新規精神活性物質であるフェンタニル類縁化合物 Cyclopropyl fentanyl (CF)、Methoxyacetyl fentanyl (Meth F)、ortho-Fluorofentanyl (OFF)、parafluoro butyrfentanyl (PFB)、paramethoxybutyrfentanyl (PMB)についてオピオイド受容体作用の解析並びに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。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。5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。また、CHO- μ 受容体発現細胞を利用して、5種類のフェンタニル類縁化合物のオピオイド受容体作用強度を解析した。5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、 μ 受容体拮抗薬 (β -FNA) の前処置により完全に抑制された。5種類のフェンタニル類縁化合物は μ 受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。薬物によ

る運動活性と μ 受容体作用の強度についてその相関性を解析したところ、フェンタニル類縁化合物による運動促進作用の発現強度と μ 受容体作用の強度には正の相関性が認められた。フェンタニル類縁化合物はオピオイド μ 受容体に作用することから、CHO- μ 細胞を利用した蛍光強度解析データは、中枢作用の推測に利用できる可能性が示唆された。また、フェンタニルの基本化学構造を元に、包括指定対象範囲を定義できる可能性が示唆された。

2) 合成カンナビノイドの中枢作用解析法に関する研究 (2年目)

本研究では、合成カンナビノイドのうち carboxamide を含有する AB-FUBINACA (N-[(1S)-1-(aminocarbonyl)-2-methylpropyl]-1-(4-fluorophenyl)methyl]-1H-indazole-3-carboxamide, AB-FUB)、5-Fluoro-AMB (methyl 2-([1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl] carbonyl)amino)-3-methylbutanoate, 5F-AMB)、5F-MDMB-PICA (methyl (2S)-2-([1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carbonyl]amino)-3,3-dimethylbutanoate, 5F-MD)、4F-MDMB-BINACA (methyl (S)-2-(1-(4-fluorobutyl)-1H-indazole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate, 4F-ADB)について、行動薬理学的特性並びに細胞毒性の発現に関する検討を行った。行動解析として、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB による運動活性および体温に対する影響を検討した。4種類の合成カンナビノイドにより、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これら効果は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬 AM251 前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、カンナビノイド CB_1 受容体が関与することが明らかになった。4種類の合成カンナビノイドの精神依存形成能は、マウスを使用し conditioned place preference (CPP)法により評価した。4種類の合成カンナビノイドの条件付けにより有意な CPP の発現が確認された。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は精神依存形成能を有する危険性が示唆された。4種

類の合成カンナビノイドの受容体作用について、 CB_1 受容体発現細胞株 CHO- CB_1 細胞により解析した。4種類の合成カンナビノイドの添加により、細胞内 Ca^{2+} が増加し、この効果は CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は CB_1 受容体作用薬であることを確認した。マウス limbic area の初代培養神経細胞を使用して、4種類の合成カンナビノイド添加による細胞生存率の評価を行った。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の添加 24 時間後の細胞生存率は有意に低下し、細胞毒性の発現が確認された。本研究から、4種類の合成カンナビノイドはカンナビノイド CB_1 受容体を介して中枢抑制作用を示し、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。合成カンナビノイドはカンナビノイドに作用することから、CHO- CB_1 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。また、合成カンナビノイドのうち carboxamide を含む基本化学構造を元に、包括指定対象範囲を定義できる可能性が示唆された。

3) フェンタニル類縁化合物の行動薬理学的特性とオピオイド受容体活性の関連性 (3年目)

本研究では、12種類のフェンタニル類縁化合物について運動活性に対する影響およびオピオイド受容体活性化強度の検討を行った。行動解析として、ICR系雄性マウスを使用して、12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 (1 mg/kg, i.p.) の投与により、著明な運動促進作用が発現した。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 (1 mg/kg, i.p.) 前処置によって有意に抑制された。12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。次に、オピオイド μ 受容体発現細胞 (CHO- μ 細胞) を利用し

て、オピオイド受容体作用を解析した。12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、 μ 受容体拮抗薬 (β -FNA) の前処置により完全に抑制された。12種類のフェンタニル類縁化合物は μ 受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。以上の結果を元に、オピオイド受容体活性強度と中枢神経作用予測についての検討を行った。12種類のフェンタニル類縁化合物による運動促進作用と、CHO- μ 細胞実験で得られた μ 受容体活性化強度の相関性を検討した。フェンタニル類縁化合物による運動促進作用と μ 受容体活性化強度との相関性を検討したところ、有意な相関性が確認された。

本研究により、フェンタニル類縁化合物はオピオイド受容体を介して、強力な中枢興奮作用を示すことが確認された。また、CHO- μ 細胞による解析から、フェンタニル類縁化合物の作用発現については、 μ 受容体活性が重要であることが明らかになった。フェンタニル類縁化合物による運動促進作用と μ 受容体活性化強度において有意な相関性が確認されたことから、フェンタニル類縁化合物による中枢興奮作用は μ 受容体活性化強度の解析から予測できると考えられる。本研究から、フェンタニル類縁化合物は中枢興奮作用を示すことから、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主にオピオイド μ 受容体に作用することから、CHO- μ 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。

【総括】

本研究により、フェンタニル類縁化合物はオピオイド受容体を介して、強力な中枢興奮作用を示すことが確認された。また、CHO- μ 細胞による解析から、フェンタニル類縁化合物の作用発現については、 μ 受容体活性が重要であることが明らかになった。フェンタニル類縁化合物による運動促進作用と μ 受容体活性化強度において有意な相関性が確認されたことから、フェ

ンタニル類縁化合物による中枢興奮作用は μ 受容体活性化強度の解析から予測できると考えられる。本研究から、フェンタニル類縁化合物は中枢興奮作用を示すことから、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主にオピオイド μ 受容体に作用することから、CHO- μ 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。

同様に、合成カンナビノイドについては、カンナビノイド CB_1 受容体を介して中枢抑制作用を示し、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。合成カンナビノイドはカンナビノイドに作用することから、CHO- CB_1 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。

本研究より、危険ドラッグの中枢作用を推測する指標として、運動調節機能評価が利用できることが明らかになった。また、危険ドラッグが作用する薬物受容体について、その受容体発現細胞による解析データから得られる活性強度に基づいて、中枢作用の発現予測が可能であった。行動薬理学的手法による中枢作用の評価と培養細胞による機能タンパク質活性予測から構成される解析システムは、中枢作用発現の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。危険ドラッグの作用する薬物受容体などの機能タンパク質に着目して、その活性強度から中枢作用を予測できる可能性が確認できた。

【研究業績】

1. 論文発表

- 1) [Funada M, Takebayashi-Ohsawa M.:](#) Synthetic cannabinoid AM2201 induces seizures: Involvement of cannabinoid CB_1 receptors and glutamatergic transmission. *Toxicol Appl Pharmacol.* 338:1-8, 2018.
- 2) [船田正彦:](#) 薬物依存の分子機構. *Clinical Neuroscience*, 36:1437-1440, 2018.

- 3) Myose T, Shirakawa A, Irie K, Yamashita Y, Nakano T, Takase Y, Matsuo K, Satho T, Tuchihashi R, Kinjo J, Tanaka H, Morimoto S, Funada M, Sano K, Mishima K.: Δ 9-Tetrahydrocannabinol elicited 22-kHz ultrasonic vocalization changes after air puff stimulus through CB1 receptor in adult rats. *Neurosci Lett.* 701:132-135, 2019.
 - 4) 船田正彦: 米国の大麻規制と薬物乱用防止. *日本薬剤師会雑誌.* 71(2), 75, 2019.
 - 5) 船田正彦, 三島健一: 薬物乱用のトレンド: ポスト危険ドラッグとして的大麻問題を考える. *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2), 171-172, 2020.
 - 6) 富山健一, 船田正彦: 米国における大麻規制の現状: 医療用途と嗜好品. *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2), 179-192, 2020.
 - 7) 船田正彦, 富山健一: 大麻成分の依存性と細胞毒性. *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2), 205-214, 2020.
 - 8) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00527-w>
 - 9) Funada M, Takebayashi-Ohsawa M, Tomiyama KI. Synthetic cannabinoids enhanced ethanol-induced motor impairments through reduction of central glutamate neurotransmission. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2020) Dec 1;408:115283. doi: 10.1016/j.taap.2020.115283. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33068620.
 - 10) Tomiyama KI, Funada M. Synthetic cannabinoid CP-55,940 induces apoptosis in a human skeletal muscle model via regulation of CB1 receptors and L-type Ca^{2+} channels. *Arch Toxicol.* 95(2):617-630, (2021).
2. 学会発表
- 1) Funada, M., Takebayashi-Ohsawa, K, Tomiyama, K.: Synthetic cannabinoid AM2201 induces epileptic seizures by enhancing glutamatergic transmission in the hippocampus. College on problems of drug dependence (CPDD) 80th Annual scientific meeting, San Diego, CA, USA., 2018.6.11-16.
 - 2) Funada, M., Tomiyama, K.: Establishment of screening method for selective NMDA receptor antagonist using HEK-293 cell line expressing NR1/NR2B. College on problems of drug dependence (CPDD) 80th Annual scientific meeting, San Diego, CA, USA., 2018.6.11-16.
 - 3) 伊藤哲朗, 首村菜月, 松久貴哉, 川島英頌, 神山恵理奈, 曾田翠, 筑本貴郎, 永井宏幸, 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(3): 合成カンナビノイド代謝物の同定と異性体の構造識別. 第53回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 横浜, 2018年9月8-10日.
 - 4) 竹林美佳, 船田正彦: 合成カンナビノイド AM2201 による痙攣発現の解明: グルタミン酸神経系の役割. 第48回日本神経精神薬理学会. 東京. 2018年11月14-16日.
 - 5) Funada, M., Tomiyama, K.: Effects of cannabinoids on neuronal activity in mouse cerebellar cultures assessed using multi-electrode array techniques. College on problems of drug dependence (CPDD) 81th Annual scientific meeting, San Antonio, TX, USA., 2019.6.11-16.
 - 6) Funada, M.: The harmful effects of new psychoactive substances (NPS): assessment of drug abuse liability and cytotoxicity. International Conference on New Psychoactive Substances, Taipei, TAIWAN. 2019.7.11-15.
 - 7) 山田理沙, 嶋根卓也, 船田正彦: レクリエーション・セッティングにおける危険ドラッグ使用の実態調査. 2019年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 北海道, 2019年10月5日.
 - 8) 船田正彦, 富山健一: 大麻成分の有害作用に関する研究: 依存性と細胞毒性. 第49回

日本神経精神薬理学会, 福岡, 2019年10月12-13日.

- 9) 富山健一, 船田正彦: 国内外における大麻規制の現状: 医療応用と嗜好品. 第49回日本神経精神薬理学会, 福岡, 2019年10月12-13日
- 10) 船田正彦: 薬物乱用に関する最新海外事情: 大麻と危険ドラッグをめぐる諸問題. 日本旅行医学会 2019年第12回東京大会, 東京, 2019年11月7日.
- 11) 船田正彦, 富山健一: 薬物乱用の変遷: 危険ドラッグから大麻へ. 第29回神経行動薬理若手研究者の集い, 横浜, 2020年3月15日.
- 12) 富山健一, 船田正彦: 大麻および関連化合物の依存性と細胞毒性. 第29回神経行動薬理若手研究者の集い, 横浜, 2020年3月15日.
- 13) 船田正彦: 大麻を巡る国際社会の動向とわが国の現状. 「シンポジウム: 激動するわが国の薬物乱用・依存問題: 最近のトピックス」. 第116回日本精神神経学会学術総会, 宮城 (Web開催), 2020年9月29日.
- 14) 船田正彦: 大麻の有害性: 細胞を利用した有害作用の評価. 「シンポジウム: 大麻についての基礎から臨床まで」. 第55回日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 福岡(Web開催), 2020年11月23日.

3. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得: 特になし

実用新案登録: 特になし

その他: 特になし