

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と
オピオイド受容体活性の関連性

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）

【研究要旨】

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。

1) 行動解析：実験には、ICR系雄性マウスを使用し、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。2) オピオイド受容体作用：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。3) オピオイド受容体活性強度と中枢神経作用予測：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。

A. 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。新精神活性物質（New Psychoactive Substances, NPS）として、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世界的な社会問題となっている^{1,2)}。2015

年以降、米国や欧州では、フェンタニル類縁化合物である acrylfentanyl、furanylfentanyl、tetrahydrofuranylfentanyl などの新規精神活性物質による死亡例が報告されている^{3,4)}。米国でのフェンタニル類縁化合物などの合成オピオイドの過剰摂取による死亡例については、2010年に14.3%であったが2016年は45.9%へ増加していることが明らかになっている。わが国でも危険ドラッグとして、フェンタニル類縁化合物が流通しており、今後も新規の危険ドラッグの登場が危惧されている^{5,6)}。新規のフェンタニル類縁化合物において、その薬理作用や有害作用については不明な点が多い。フェンタニル類縁化合物に関して、中枢作用を中心とした乱用危険性予測に関する研究が必要である。

本研究では、United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC, 国連薬物犯罪事務所)⁶⁾が注意を要する新規合成オピオイドとしてリストしている12種類のフェンタニル類縁化合物について、中枢作用および薬理学的特性に関する検討を行った。1) 中枢作用については、マウスの運動活性に対する影響、2) 薬理学的特性については、オピオイド μ 受容体発現細胞を使用したオピオイド μ 受容体活性化強度について検討を行った。また、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、 μ 受容体活性化強度の相関性について合わせて検討した。

B. 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. 2-Fluorobutyrfentanyl
2. 2-Methoxyfuranylfentanyl
3. 3-Fluorofentanyl
4. 3-Phenylpropanoylfentanyl
5. 4-Methoxyfentanyl
6. Benzodioxolefentanyl
7. Crotonylfentanyl(麻薬)

8. Cyclohexyl Fentanyl
 9. meta-Methylfentanyl
 10. ortho-methyl methoxy acetyl fentanyl
 11. Tetramethylcyclopropanefentanyl
 12. 2-Methylfentanyl
- を使用した(化学構造: Fig.1)。

1. 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60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。

2. 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 μ 受容体をトランスフェクションし、 μ 受容体発現安定細胞株 (CHO- μ 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 5×10^4 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、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。CHO- μ 細胞のオピオイド受容体選択性の評価においては、オピオイド μ 受容体作用薬: [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO)、オピオイド δ 受容体作用薬: [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE)、オピオイド κ 受容体作用薬: U-50,488H を使用した。

3. 相関性解析

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について検討した。相

関性の解析は、Prism 7 for Mac OS X、Linear Regression により行った。

C. 結果

1. フェンタニル類縁化合物の行動薬理学的特性

12 種類のフェンタニル類縁化合物 (1 mg/kg, i.p.)によって、運動促進作用が発現し、中枢興奮作用を有することが明らかになった(Fig. 2)。これらの運動促進作用の発現は、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。

2. フェンタニル類縁化合物のオピオイド受容体作用

作出した CHO- μ 細胞について、フェンタニル(FN)、オピオイド μ 受容体作用薬 DAMGO、オピオイド δ 受容体作用薬 DPDPE およびオピオイド κ 受容体作用薬 U-50,488H 添加による影響を検討したところ、FN、DAMGO において、濃度依存的な蛍光量(relative fluorescence unit: RFU)の増加が確認された(Fig. 3)。作出した CHO- μ 細胞は、オピオイド μ 受容体の選択的な機能評価が可能であることが確認された。そこで、CHO- μ 細胞を利用して、12 種類のフェンタニル類縁化合物のオピオイド μ 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. 4)。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 μ オピオイド受容体拮抗薬 (β -FNA, 0.1 μ M) 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はオピオイド μ 受容体を介して薬理作用を示すことが明らかになった。

3. 相関性解析

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 (蛍光強度) の相関性について検討した(Fig. 5)。フェンタニル類縁化合物 (1 mg/kg, i.p.) による運動量 (60 分間の総カウント)

と μ 受容体活性化強度 (0.001 μ M) との相関性を検討したところ、有意な相関性 $R^2=0.83$ ($Y=46.3X+347$, Slope: $F(1,10)=49.21$, $P<0.0001$) が認められた。

D. 考察

本研究では、12 種類のフェンタニル類縁化合物の中枢作用およびオピオイド受容体作用に関する評価を行った。

フェンタニル類縁化合物の行動薬理学特性を解析した。フェンタニル類縁化合物の投与により、運動促進作用が発現し、中枢興奮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、フェンタニル類縁化合物の中枢興奮作用は、オピオイド受容体を介して発現することが確認された。フェンタニル類縁化合物による中枢興奮作用の発現強度と、化学構造との関連性を見ると、フェンタニルのカルボン酸アミドの置換基の差異により調整を受けている可能性が示唆された。特にカルボニル基に直接結合する置換基の総炭素数の増加により、中枢興奮作用の発現強度が低下する可能性が示唆された⁷⁾。

次に、細胞実験では、オピオイド μ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO- μ 細胞を樹立し、薬理的解析に利用した。CHO- μ 細胞に、フェンタニルおよび選択的オピオイド μ 受容体作用薬 DAMGO を添加すると、濃度依存的な蛍光発光が確認された。一方、オピオイド δ 受容体作用薬 DPDPE およびオピオイド κ 受容体作用薬 U-50,488H では著明な蛍光発光は確認されなかった。したがって、樹立した CHO- μ 細胞は、オピオイド μ 受容体機能について選択的に解析が可能であると考えられる。CHO- μ 細胞に、12 種類のフェンタニル類縁化合物を添加すると、濃度依存的な蛍光発光が確認された。12 種類のフェンタニル類縁化合物は、オピオイド μ 受容体作用薬であることを確認した。

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（蛍光強度）の相関性について検討した。その結果、フェンタニル類縁化合物による運動量と μ 受容体活性化強度には有意な相関性 $R^2=0.83$ が認められた。したがって、CHO- μ 細胞の蛍光発光強度の解析から、フェンタニル類縁化合物の運動促進作用すなわち中枢興奮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 μ 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^{8,9)}。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。

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の発現強度は、CHO- μ 細胞の蛍光発光強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞の蛍光発光強度の解析から、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。

本研究の評価結果より、12 種類のフェンタニル類縁化合物は著明な中枢興奮作用を有することが確認されたことから、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、12 種類のフェンタニル類縁化合物はオピオイド μ 受容体を介して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、中枢作用、依存性および細胞毒性などの有害作用の発現予測に利用できる可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Giorgetti A, Centola C, Giorgetti R. Fentanyl novel derivative-related deaths. *Hum Psychopharmacol*. 2017 May;32(3). doi: 10.1002/hup.2605. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28635020.
- 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) Drummer OH. Fatalities caused by novel opioids: a review. *Forensic Sci Res*. 2018 May 7;4(2):95-110. doi: 10.1080/20961790.2018.1460063. PMID: 31304441; PMCID: PMC6609322.
- 4) Jones CM, Einstein EB, Compton WM. Changes in Synthetic Opioid Involvement in Drug Overdose Deaths in the United States, 2010-2016. *JAMA*. 2018 May 1;319(17):1819-1821. doi: 10.1001/jama.2018.2844. PMID: 29715347; PMCID: PMC6583033.
- 5) 中嶋 順一, 鈴木仁, 牛山慶子, 坂本美穂, 吉田正雄, 市川瑤子, 高橋美佐子, 鈴木淳子, 齋藤友里, 清水聖子, 植村望美, 小林一絵, 内本勝也, 長嶋真知子, 清水雅子, 浦出朋子, 守安貴子, 栗田雅行: 危険ドラッグから検出された薬物に関する理化学試験結果(平成 26 年度). 東京健安研セ年報, 66, 103-115, 2015.
- 6) Current NPS Threats: Vol. III, October. 2020. United Nations Office on Drugs and Crime(UNODC).
- 7) Casy AF, Huckstep MR. Structure-activity studies of fentanyl. *J Pharm Pharmacol*. 1988 Sep;40(9):605-8. doi: 10.1111/j.2042-7158.1988.tb05318.x. PMID: 2907025.
- 8) 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).

- 9) 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) 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 Ca²⁺ channels. *Arch Toxicol.* 95(2):617-630, (2021).
- 2) 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.
- 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. Δ9-Tetrahydrocannabinol elicited 22-kHz ultrasonic vocalization changes after air puff stimulus through CB1 receptor in adult rats. *Neurosci Lett.* 701:132-135, (2019).

2. 学会発表

- 1) Funada M., Tomiyama, K: Effects of cannabinoids on neuronal activity in mouse cerebellar cultures assessed using microelectrode array techniques. CPDD 81th Annual Scientific Meeting, San Antonio, Texas, U.S.A., 2019. June 15-19.
- 2) Funada M., Tomiyama, K: Synthetic cannabinoid AM2201 induces epileptic seizures

by enhancing glutamatergic transmission in the hippocampus. CPDD 80th Annual Scientific Meeting, San Diego, California, U.S.A., 2018. June 8-12.

- 3) 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.
- 4) 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.

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。

No.	Common Substance Name	構造式	INCB	WHO-ID
1	2-fluoro butyrfentanyl		N-(2-fluorophenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)butyramide	2
2	2-methoxy furanyl fentanyl		2-Furanylfentanyl ortho-2-isopropylphenyl analogue N-(2-methoxyphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-furancarboxamide; 2-Furanylfentanyl ortho-2-methoxyphenyl analogue; ortho-methoxy	5
3	3-fluorofentanyl		meta-fluorofentanyl; N-(3-fluorophenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)propionamide; N-(3-fluorophenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]propanamide	9
4	3-phenylpropanoylfentanyl		N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-benzenepropanamide; N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]-3-phenylpropanamide; N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N,3-diphenylpropanamide; β '-phenylfentanyl	12
5	4'-methoxy fentanyl		p-methoxy fentanyl; N-(4-Methoxyphenyl)-N-(1-phenethyl-4-piperidinyl)propanamide	15
6	benzodioxole fentanyl		N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylbenzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide	23
7	crotonyl fentanyl		(2E)-N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-2-butenamide; (E)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylbut-2-enamide	32
8	cyclohexyl fentanyl		N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylcyclohexanecarboxamine	33
9	meta-methylfentanyl		N-(3-methylphenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)propanamide; N-(3-Methylphenyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]propanamide; fentanyl meta-tolyl analogue	41
10	ortho-methyl methoxyacetyl fentanyl		2-methoxy-N-(o-tolyl)-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-acetamide; o-methyl methoxyacetyl fentanyl; 2-Methyl Methoxyacetyl fentanyl	63
11	tetramethylcyclopropanefentanyl		N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]-2,2,3,3-tetramethylcyclopropane-1-carboxamide; Tetramethylcyclopropane-F	64
12	2-methyl fentanyl		N-[2-methyl-1-(2-phenethyl)piperidin-4-yl]-N-phenylpropanamide	71

Fig. 1. Chemical structures of fentanyl analogues.

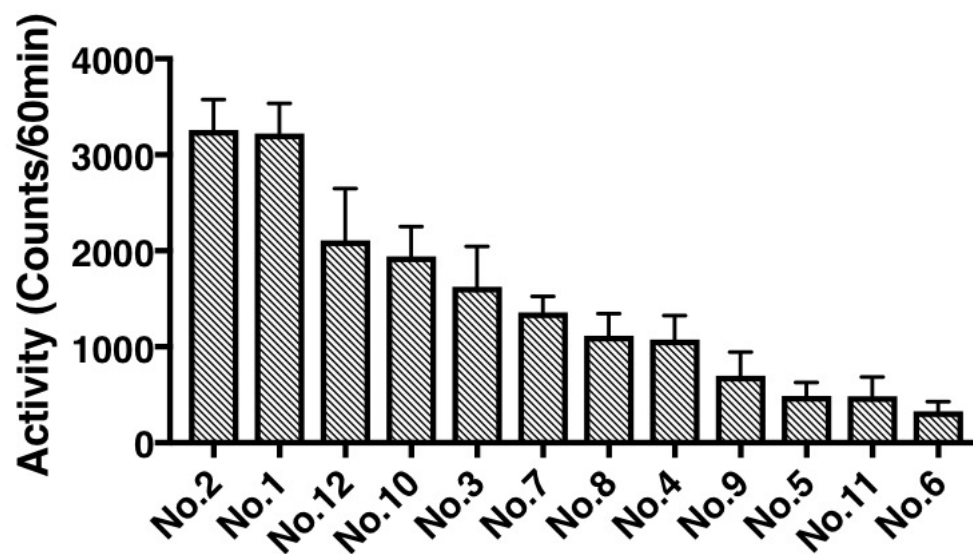


Fig. 2. Effect of acute treatment with fentanyl analogues on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity counts after acute administration of fentanyl analogues (No.1 to No.12, 1 mg/kg)-treated in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 60 min (n=8).

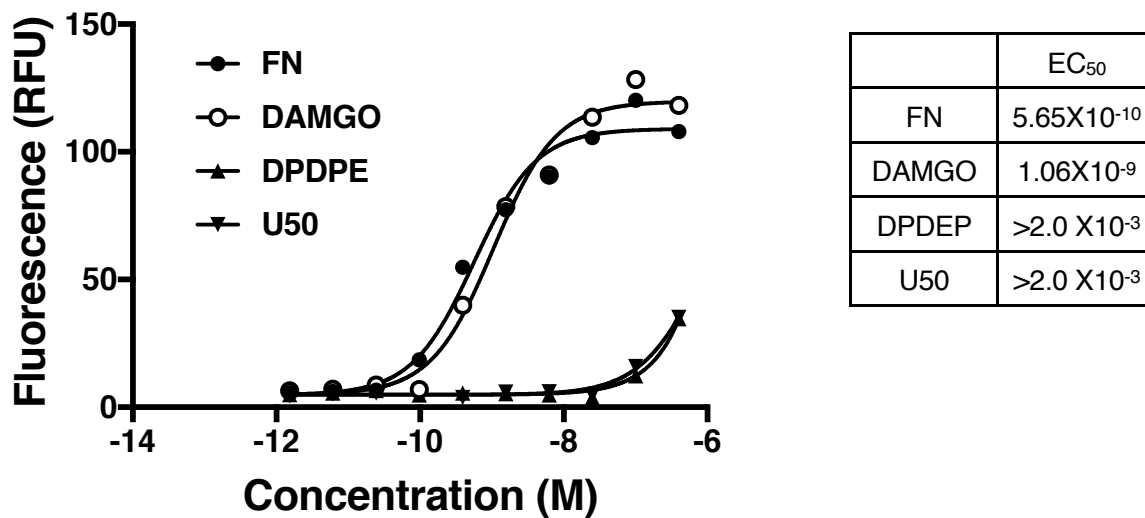


Fig. 3. Effects of opioid agonists on intracellular Ca²⁺ in CHO-μ cells. (A) Changes in intracellular Ca²⁺ levels were detected as changes in fluorescence (relative fluorescence unit, RFU) in the FlexStation II. Fluorescence measurements corresponding to increases in intracellular Ca²⁺ levels following simultaneous activation by fentanyl (FN), [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO), [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE) or U-50488H (U50). Each point represents the mean with S.E.M. of three independent experiments.

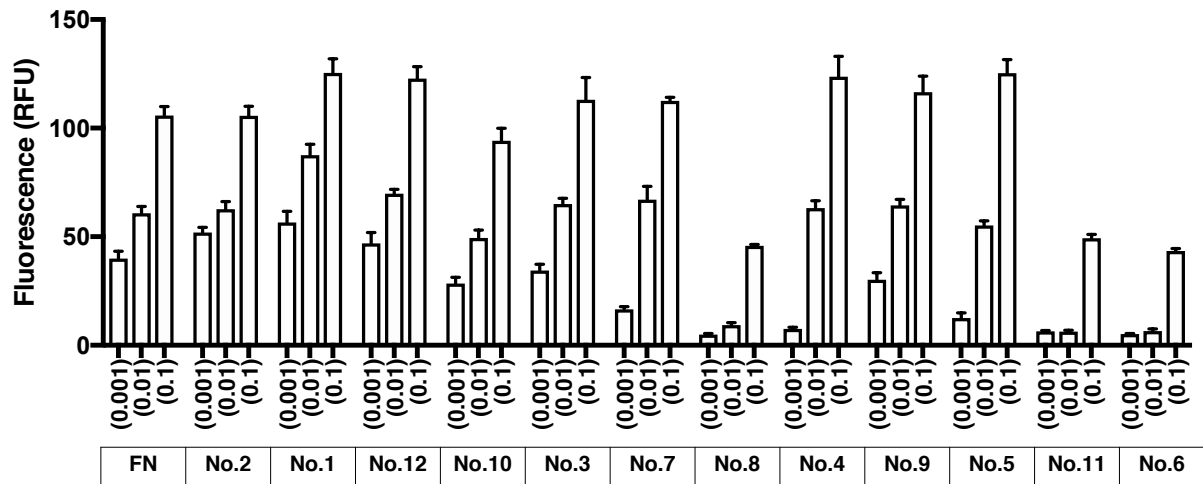


Fig. 4. Effects of 12 fentanyl analogues on intracellular Ca^{2+} in CHO- μ cells. (A) Changes in intracellular Ca^{2+} levels were detected as changes in fluorescence (relative fluorescence unit, RFU) in the FlexStation II. Fluorescence measurements corresponding to increases in intracellular Ca^{2+} levels following simultaneous activation by fentanyl (FN) and 12 fentanyl analogues (0.001-0.1 μ M). Each point represents the mean with S.E.M. of three independent experiments.

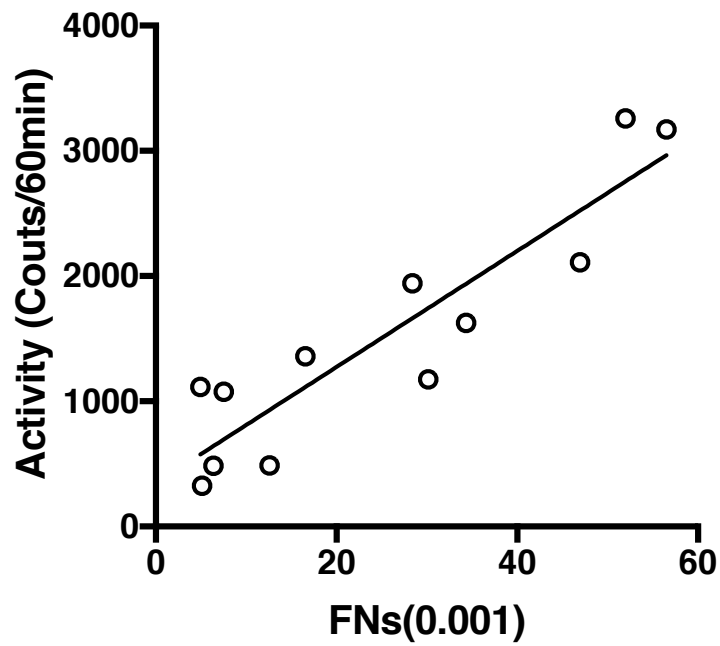


Fig. 4. Relationship between fentanyl analogues-induced locomotor activity and fentanyl analogues-induced elevation of intracellular Ca^{2+} levels in CHO- μ cells. fentanyl analogues (FNs, 0.001 μM)-induced changes in intracellular Ca^{2+} levels were detected as changes in fluorescence (relative fluorescence unit, RFU) in the FlexStation II. Normalized data of fentanyl analogues-induced locomotor activity and elevation of intracellular Ca^{2+} levels in CHO- μ cells by a regression line using Prism 7. $R^2=0.83$ [$Y=46.3X+347$, Slope: $F(1,10)=49.21$, $P<0.0001$.]