

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  $\mu$  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- $\mu$ -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- $\mu$ -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、 $\mu$  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  $\mu$  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- $\mu$ -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  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬として(*E*)-4-[[5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ]-17-cyclopropyl-methyl]-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]amino]-4-oxo-2-butenoic acid methyl ester hydrochloride ( $\beta$ -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  $\mu$  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- $\mu$ -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  $5 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、37°C・5.0% CO<sub>2</sub> 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- $\mu$ -GCaMP細胞をPCR用チューブ(FastGene 0.2mL, 8連チューブ, 日本ジェネティクス)に $1 \times 10^4$  cells/tubeとなるように播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で1時間静置した。その後、fentanyl (FN,  $1 \mu\text{M}$ )、フェンタニル誘導体( $1 \mu\text{M}$ )を添加し、蛍光量の変化を測定した。また、選択的 $\mu$ オピオイド受容体拮抗薬 $\beta$ -FNA ( $2.5 \mu\text{M}$ )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- $\mu$ -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 $\mu$ 受容体作用を解析した。CHO- $\mu$ -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( $\text{EC}_{50}$ 値, M)はFN: $8.1 \times 10^{-9}$ 、SDFV-92 :  $6.2 \times 10^{-9}$ 、SDFV-93 :  $5.3 \times 10^{-8}$  およびSDFV-99 :  $5.82 \times 10^{-9}$ であった。また、SDFV-92 ( $2.5 \mu\text{M}$ )、SDFV-93 ( $2.5 \mu\text{M}$ )およびSDFV-99 ( $2.5 \mu\text{M}$ )の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 ( $2.5 \mu\text{M}$ )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 ( $20 \mu\text{M}$ )のみで蛍光量の増加が確認された (Fig.3B)。CHO- $\mu$ -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 $\mu$ 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- $\mu$ -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 $1 \mu\text{M}$ )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 $\mu$ オピオイド受容体拮抗薬 $\beta$ -FNA ( $2.5 \mu\text{M}$ )の前処置により完全に抑制された。薬物濃度を $30 \text{nM}$ 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 ( $30 \text{nM}$ )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 ( $30 \text{nM}$ )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  $\mu$  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- $\mu$ -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  $\mu$  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  $\mu$  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- $\mu$ -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  $\mu$  受容体の活性化が必須であることから、CHO- $\mu$ -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- $\mu$ -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  $\mu$  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- $\mu$ -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- $\mu$ -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

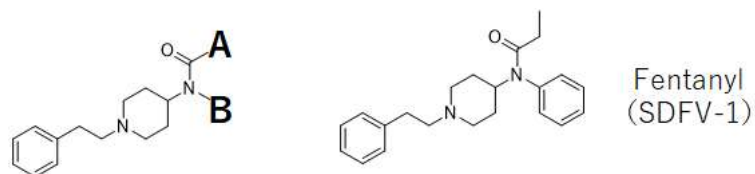
- 1) 船田正彦：危険ドラッグの最新海外事情, 第20回日本旅行医学会, Web開催, 2022年5月21日.
- 2) 富澤幸菊、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏莉英昭、船田正彦、高橋 秀依：フェンタニル誘導体の構造活性相関, 日本薬学会 第140年会, 札幌, 2022年3月25日.

## 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.

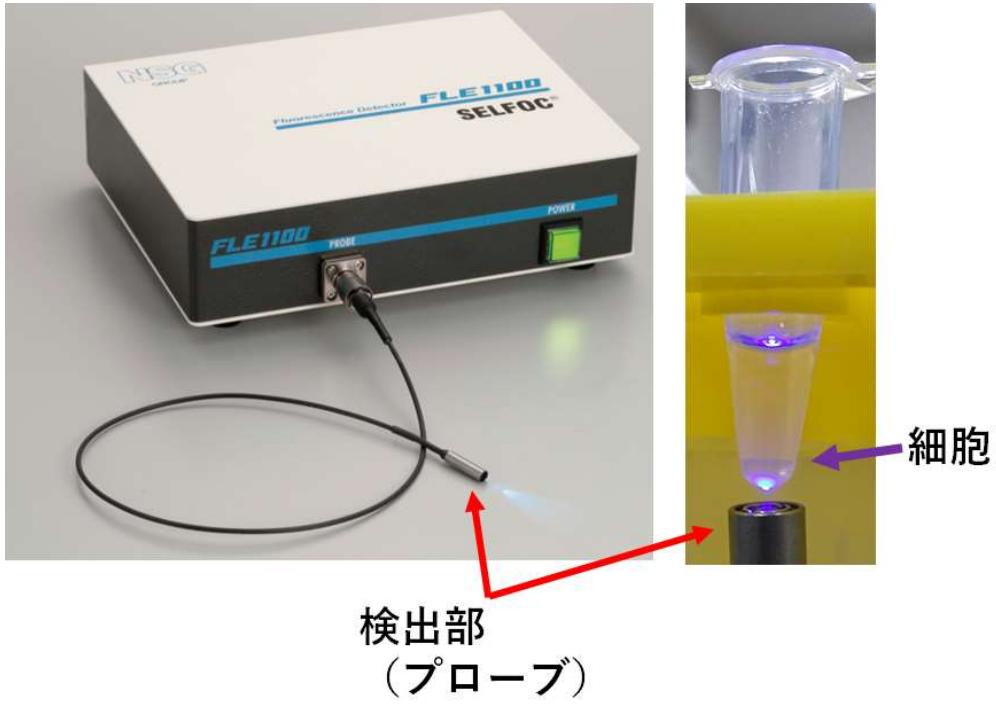


Fig.2. Compact fluorescence detector for mobile use using probes of optical fiber.

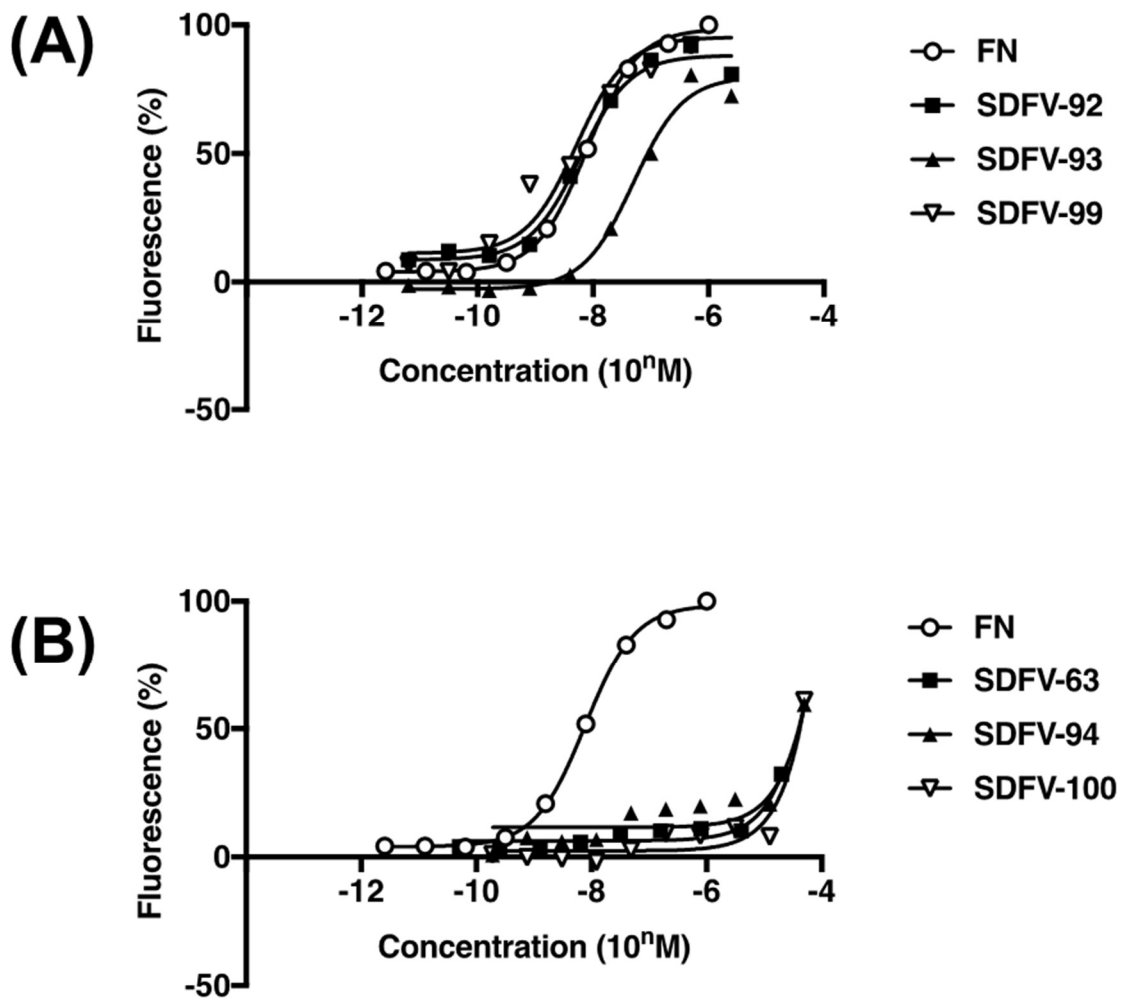
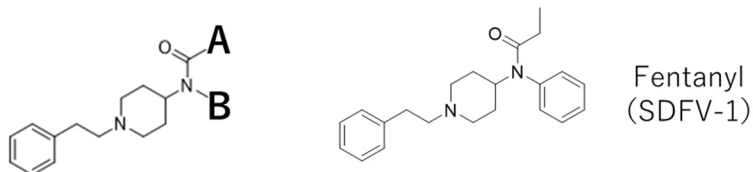


Fig.3. Effect of opioid  $\mu$  receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- $\mu$ -GCaMP cells. (A) Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl derivatives. (A) FN (2.56 nM-1  $\mu$ M), SDFV-92 (51.2 nM-20  $\mu$ M), SDFV-93 (51.2 nM-20  $\mu$ M) and SDFV-99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

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

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

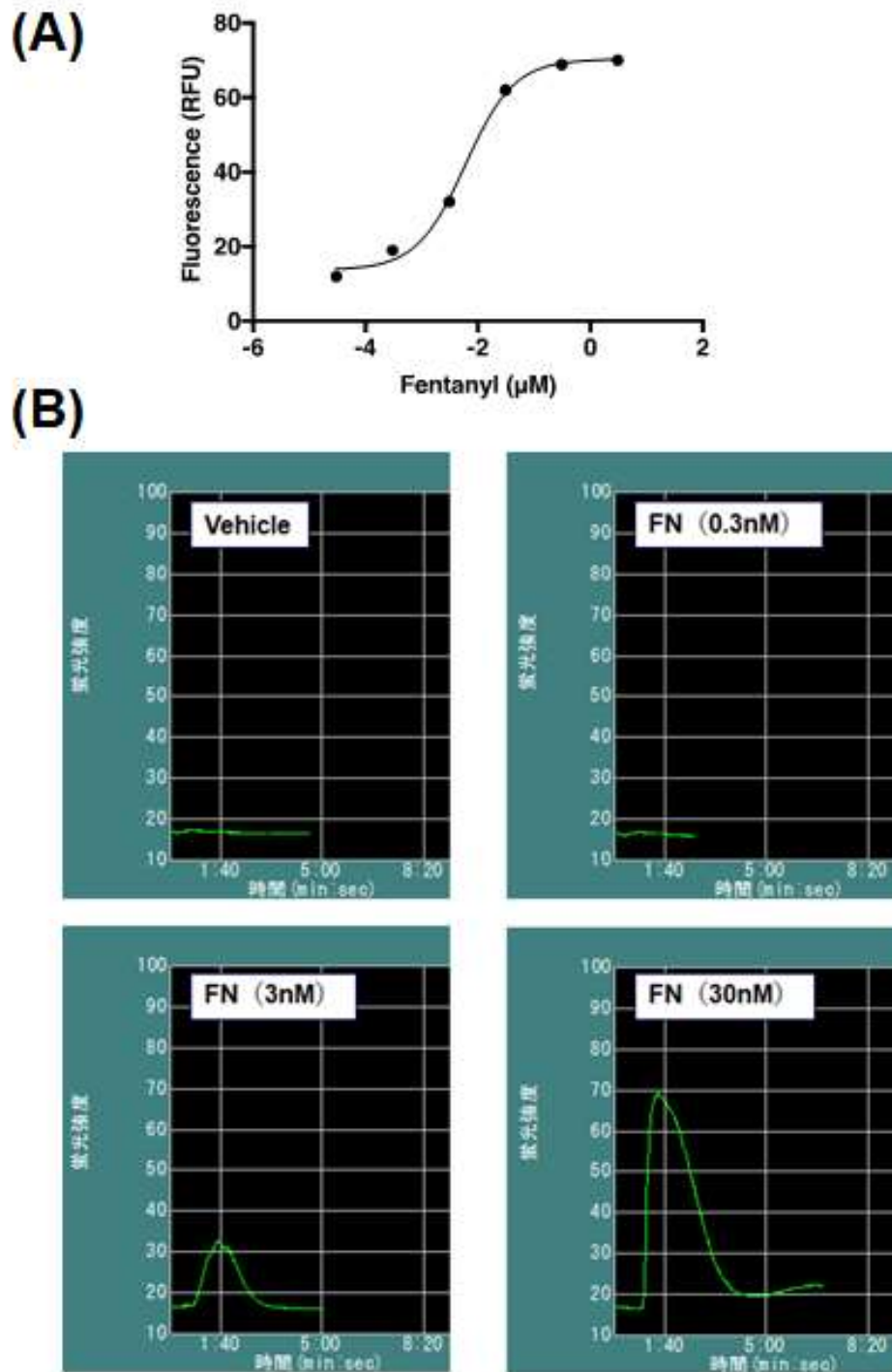


Fig.5. Effect of opioid  $\mu$  receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- $\mu$ -GCaMP cells using probes of optical fiber. (A) Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl (FN: 0.00001-0.01  $\mu$ M), Vehicel (V). Results are expressed as mean (n=3). (B) Changes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

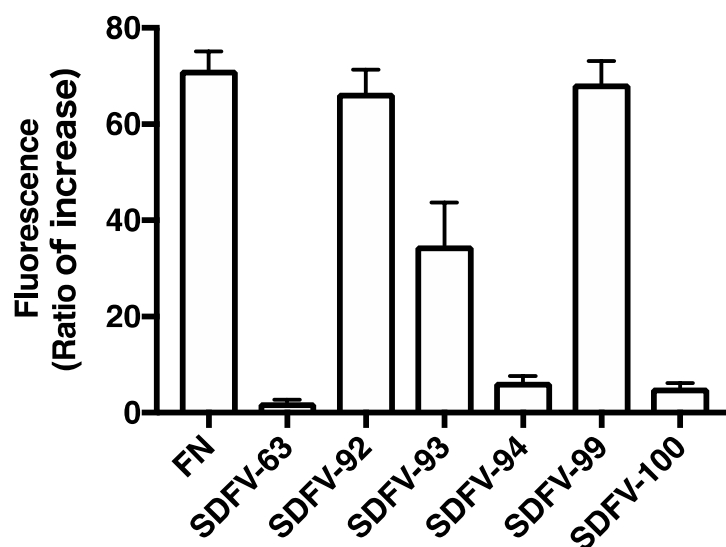


Fig.6. Effect of opioid  $\mu$  receptors agonistic actions of fentanyl derivatives in the CHO- $\mu$ -GCaMP cells using probes of optical fiber. Changes of fluorescence were observed after treated with fentanyl derivatives. Fentanyl (FN :30nM), SDFV-63 (30nM), SDFV-92 (30nM), SDFV-93 (30nM), SDFV-94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