

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