

令和2～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 [3年間のまとめ]

## 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

研究分担者 船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)

### 【研究概要】

[研究テーマ：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]

[緒言] 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。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の乱用に基づく健康被害が多発した。海外では、合成カンナビノイドに加えフェンタニル誘導体を中心としたオピオイド化合物の流通拡大が問題となっている。合成カンナビノイドおよびオピオイド化合物について、多くの類縁化合物が登場していることから、化学構造に依存する従来型の薬物検出法に加え、迅速かつ包括的な薬物検出法および有害作用の評価法の導入が必須となっている。本研究では、細胞を利用して、合成カンナビノイドおよびオピオイド化合物の薬物検出とその毒性を同時に検出する手法の開発を試みた。

[結果] 合成カンナビノイド検出細胞の構築に関しては、細胞毒性の発現と密接に関わるアポトーシスの誘導に着目し、アポトーシス誘導タンパク質 Bid もしくは caspase-3 の活性化を蛍光発光で検出できる細胞作出を実施した。本研究では、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞および CHO-CB<sub>1</sub>-Casp3 細胞を作出し、本細胞における合成カンナビノイド添加後の蛍光値増加は、細胞毒性発現の指標になることが明らかになった。オピオイド化合物については、ヒト-オピオイド  $\mu$  受容体を発現する CHO(CHO- $\mu$ )細胞を利用して、オピオイド受容体活性化を蛍光指示薬フリーで蛍光検出できる CHO- $\mu$ -GCaMP 細胞を作出した。CHO- $\mu$ -GCaMP 細胞は、フェンタニルおよび新規合成フェンタニル化合物の検出が可能であった。また、CHO- $\mu$ -GCaMP 細胞を利用した検討において、新規に開発した小型蛍光検出器による検出結果は、据置型プレートリーダーによる解析結果と完全に一致した。

[考察] 本研究では、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞および CHO-CB<sub>1</sub>-Casp3 細胞を作出し、本細胞における合成カンナビノイド添加後の蛍光値増加は、細胞毒性発現の指標になることが明らかになった。したがって、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞および CHO-CB<sub>1</sub>-Casp3 細胞は、合成カンナビノイドによる細胞毒性発現の予測に使用可能であると考えられる。同様に、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体アゴニスト以外の薬物では蛍光値の増加が認められないことから、特に有害作用を示す危険性のある合成カンナビノイドの検出に利用できると考えられる。オピオイド化合物については、CHO- $\mu$ -GCaMP 細胞は、自立蛍光発光型の細胞としてフェンタニル類縁化合物の検出が可能であった。CHO- $\mu$ -GCaMP 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、 $\mu$  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。

[結論] 本研究より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。

---

## 緒言

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、150 種類を超える合成カンナビノイドおよびオピオイド化合物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

### 1) 合成カンナビノイド

合成カンナビノイド検出細胞の構築に関しては、細胞毒性の発現と密接に関わるアポトーシスの誘導に着目し、アポトーシス誘導タンパク質 Bid を蛍光発光で検出できる細胞作出を実施した。合成カンナビノイドの作用点であるカンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体発現細胞にアポトーシス誘導タンパク質 Bid と赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を融合させた Bid-DsRed2 を導入し、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞を作成した。

CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞に CP-55,940 を添加したところ、濃度依存的に Bid-DsRed2 由来の蛍光値が増加した。CP-55,940 (20 μM) の添加 10 分で有意に蛍光値が上昇し、時間の経過とともに減少が認められた。蛍光顕微鏡の観察結果から、Bid-DsRed2 は、正常時細胞質に均一に分布していた。一方、CP-55,940 (20 μM) 添加 120 分後の細胞質では、Bid-DsRed2 は凝集し、強い蛍光を発していた。また、CP-55,940 (20 μM) の添加 120 分後における細胞生存率を測定したところ、著明かつ有意な細胞生存率の減少が認められた。Bid-DsRed2 はアポトーシスが誘導されるとミトコンドリアに集積され、励起することで蛍光値が増加することが明らかとなった。

次に、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞の薬物選択性を確認するために、AM251、JWH-015、CBD および cocaine を添加して、Bid-DsRed2 の蛍光値の変化および細胞生存率を測定した。その結果、薬物添加 120 分の時点で、蛍光値の増加および細胞毒性の発現は認められなかった。CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞では、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体アゴニスト以外の薬物は著明な効果を示さないことが判明した。

本研究では、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞を作出し、本細胞における合成カンナビノイド添加後の蛍光値増加は、細胞毒性発現の指標になることが明らかになった。したがって、CHO-CB<sub>1</sub>-Bid 細胞は、合成カンナビノイドによる細胞毒性発現の予測に使用可能であると考えられる。同様に、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体アゴニスト以外の薬物では蛍光値の増加が認められないことから、特に有害作用を示す危険性のある合成カンナビノイドの検出に利用できると考えられる。

## 2) オピオイド化合物

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物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  $\mu$  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。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- $\mu$ -GCaMP 細胞による解析を実施したところ、オピオイド  $\mu$  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- $\mu$ -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。

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。したがって、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- $\mu$ -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。

### 【総括】

(1) 本研究では、CHO-CB1-Bid細胞を作出し、本細胞における合成カンナビノイド添加後の蛍光値増加は、細胞毒性発現の指標になることが判明した。CHO-CB1-Bid細胞は、合成カンナビノイドによる細胞毒性発現の予測に使用可能であると考えられる。同様に、カンナビノイドCB1受容体アゴニスト以外の薬物では蛍光値の増加が認められないことから、合成カンナビノイドの検出への応用も期待できる

(2) 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。

本研究成果は、新規化学構造を有する危険ドラッグが次々に登場する状況に対応するための、総合的な薬物有害作用評価システムおよび検出システムとして、重要な役割を果たすと考えられる。

### 【研究業績】

#### 1. 論文発表

- 1) 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>.
- 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) 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<sup>2+</sup> channels. *Arch Toxicol.* 95(2):617-630, (2021).
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 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パターンの男女別検討、日本アルコール・薬物医学会雑誌 54(6), 272-285, (2020).
- 8) 船田正彦, 富山健一: 大麻規制の現状と課題. *都薬雑誌*, 43: 4-7, 2021.
- 9) Tomiyama K, Funada M: Synthetic cannabinoid CP-55,940 induces apoptosis in a human skeletal muscle model via regulation of CB<sub>1</sub> receptors and L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Arch Toxicol.* 95(2): 617-630, 2021.
- 10) 船田正彦: 危険ドラッグの依存性. *精神科*, 41: 239-247, 2022.

- 11) 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: 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.
- 2) 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) Funada M., Tomiyama K: Effects of cannabinoids on ethanol-induced motor impairment using the rotarod performance test in mice. CPDD 83th Annual Scientific Meeting, U.S.A. June 22, 2021: Web Zoom.
- 4) 富山健一, 船田正彦: 北米における嗜好用大麻の使用実態について, 令和3年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 三重, 2021年12月17-19日.
- 5) 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.
- 6) 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.

## 3. 知的財産権の出願・登録状況

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 RKF-072PCT

実用新案登録: 特になし  
その他: 特になし