

分担研究報告書

新規オピオイド化合物の中樞作用とオピオイド受容体作用の関連性

分担研究者：船田正彦（湘南医療大学 薬学部 薬理学研究室）

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）

【研究要旨】

[緒言] 危険ドラッグ N,N-diethyl-5-nitro-2-[(4-propoxyphenyl)methyl]-1H-benzimidazole-1-ethanamine: propoxynitazene (Protonitazene)、2-[(4-ethoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-1H-benzimidazole-1-ethanamine: etodesnitazene (Etazene)、2-[(4-ethoxyphenyl)methyl]-5-nitro-1-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)-1H-benzimidazole: N-pyrrolidino etonitazene (Etonitazepyne) および 1-{2-methyl-4-[(2E)-3-phenylprop-2-en-1-yl]butan-1-one (2-Methyl-AP-237) について、オピオイド受容体作用の解析、運動活性に対する影響および精神依存性について検討した。1) オピオイド受容体作用: CHO- μ 受容体発現細胞を利用して、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 のオピオイド受容体作用を解析した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 は μ 受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。2) 行動解析: protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 による運動活性に対する影響を検討した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の投与により、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 naloxone 前処置によって有意に抑制された。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。3) 精神依存性の評価: 薬物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。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の条件付け (1日1回6日間、3:薬物、3:溶媒) を行ったところ、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 においてそれぞれ有意な CPP の発現が確認された。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の条件付けによって報酬効果の発現が確認されたことから、精神依存形成能を有する危険性が示唆された。

本研究により、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 は強力な中枢興奮作用と精神依存形成能を有することが明らかになった。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の中枢興奮作用の発現並びに精神依存形成には、オピオイド μ 受容体作用が関与している可能性が示唆された。本研究の解析から、オピオイド化合物による中枢興奮作用および精神依存性の発現強度は、オピオイド μ 受容体作用強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞による機能解析から、オピオイド化合物の中枢興奮作用や精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

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^{1,2)}。近年、フェンタニルやフェンタニル類縁化合物とは構造が異なる新規オピオイド化合物の流通が拡大しており、乱用に基づく健康被害は大きな社会問題となっている^{3,4,5)}。しかしながら、危険ドラッグとして流通している新規オピオイド化合物については、その薬理作用や有害作用について、不明な点が多い。

本研究では protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の薬理学的特性及び中枢作用を明確にする目的で、1) オピオイド受容体作用、2) 運動活性に対する影響、3) 報酬効果について検討を行った。

本研究では、オピオイド化合物の行動薬理学的特性と作用点であるオピオイド μ 受容体に対する作用について検討し、行動薬理学的特性の発現とオピオイド μ 受容体作用との関連性について検討した。また、本研究から得られる動物実験と細胞による実験からのデータの関係性を解析することで、危険ドラッグが示す中枢作用予測法の妥当性について考察した。

B. 研究方法

使用動物:すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl, 25-30g、日本クレア) を使用した。

使用薬物: Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 を使用した(Fig.1)。

選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬(E)-4-[[5 α ,6 β]-17-Cyclopropylmethyl]-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]amino]-4-oxo-2-butenic acid methyl ester hydrochloride (β -FNA, Tocris Bioscience)、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone (Sigma) 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 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 5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C・5.0% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、新規オピオイド化合物 protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II 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. 新規オピオイド化合物による運動活性への影響

Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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 120 分間にわたって運動量を測定した。

また、Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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 naloxone 前処置 (薬物投与の 30 分前投与) の効果を検討した。

3. 新規オピオイド化合物の精神依存性評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP) 法を用いた。白黒 2 区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、1 日に 1 回条件付けを 6 日間にわたって行った。初日に Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 または溶媒である生理食塩液 (SAL) を投与し、30 分間装置内に閉じ込めた。翌日は、薬物と溶媒である SAL の組み合わせを入れ替え、薬物もしくは SAL を投与し、30 分間装置内に閉じ込めた (Table 1)。

7 日目はテストセッションとして、薬物および溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 1. 薬物条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒 (午前)	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒 (午後)	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎：薬物、○：溶媒、T：テスト（薬物、溶媒ともに処置せず）

4. 統計解析

全てのデータは、Prism 7 for Mac OS X により解析した。行動薬理的データおよび細胞による解析データは一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、ポストホックテストとして Dunnett's multiple comparison test により比較した。

C. 研究結果

1. 新規オピオイド化合物のオピオイド受容体作用

CHO- μ 細胞を利用して、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の μ 受容体作用を解析した。CHO- μ 細胞において protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の刺激により有意な蛍光量の増加が確認された。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の EC_{50} はそれぞれ 7.0×10^{-11} M、 9.9×10^{-12} M、 6.8×10^{-13} M および 4.6×10^{-8} M であった (Fig.2A)。Protonitazene (0.01 μ M)、etazene (0.01 μ M)、etonitazepyne (0.01 μ M) および 2-methyl-AP-237 (0.1 μ M) 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 (25 μ M) の前処置により完全に抑制された (Fig.2B)。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。

2. 新規オピオイド化合物の運動活性への影響

Protonitazene (0.1 mg/kg)、etazene (1 mg/kg)、etonitazepyne (0.04 mg/kg) および 2-methyl-AP-237 (20 mg/kg) の腹腔内投与によって、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. 3)。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬である naloxone (3 mg/kg) の前処置により抑制された (Fig. 4)。

3. 新規オピオイド化合物の精神依存性評価

マウスを使用し conditioned place preference (CPP) 法による精神依存性の評価を行った。Protonitazene (0.1 mg/kg, i.p.)、Etazene (1 mg/kg, i.p.)、Etonitazepyne (0.01 mg/kg, i.p.) および 2-Methyl-AP-237 (20 mg/kg, i.p.) の条件付けによって CPP の発現、すなわち報酬効果の発現が認められた (Table 1)。

D. 考察

本研究では、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 のオピオイド受容体作用、中枢作用、精神依存性に関する評価を行った。

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。蛍光発現の検出により、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 は、オピオイド μ 受容体作用薬であることを確認した。

次に、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の行動薬理学特性を解析した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の投与により、運動促進作用が発現し、中枢作用を有することが明らかになった。この効果は、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone によって抑制されることから、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の中枢作用は、オピオイド受容体を介して発現することが確認された。

Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の精神依存形成能に関しては、conditioned place preference (CPP) 法により評価した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の条件付けにより、有意な報酬効果の発現が確認された。したがって、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-

methyl-AP-237 は精神依存形成能を有することが示唆された。

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系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⁶⁷⁾。こうした薬理学的特性に基づいて、側坐核においてドパミン遊離量の増加が発現したことで、中枢興奮作用および精神依存が発現したものと考えられる。

これまでの報告では、オーストラリアにおいて etazene の使用によって呼吸抑制と低血圧による意識消失が報告されている⁸⁾。また、Etonitazepyne は、フェンタニルやモルヒネよりも強力な μ 受容体に対するアゴニスト活性を有しており、米国やカナダなどで死亡例も報告されている^{9, 10)}。2-Methyl-AP-237 についても、 μ 受容体に対するアゴニスト活性が認められ、2020年2月から2021年4月の間で4件の死亡事故が報告されている¹¹⁾。本研究結果においても、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 は強力な中枢作用と精神依存形成能を有することから、その乱用の拡大には特に注意を要すると考えられる。

本研究の解析から、オピオイド化合物による中枢興奮作用および精神依存性の発現強度は、オピオイド μ 受容体作用強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞による機能解析から、オピオイド化合物の中枢興奮作用や精神依存性などの有害作用を推測できることが示唆された。本研究の行動解析および細胞解析データパターンを拡大することで、オピオイド化合物の包括指定が可能であると考えられる。

本研究で確認された動物実験とオピオイド受容体発現細胞による機能解析法は、総合的な有害作用評価システムとして、評価の迅速化のために有用な手法であると考えられる。さらに、オピオイド化合物における包括指定導入へ寄与する解析手法であると期待される。

E. 結論

本研究の解析から、オピオイド化合物による中枢興奮作用および精神依存性の発現強度は、オピオイド μ 受容体作用強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞による機能解析から、オピオイド化合物の中枢興奮作用や精神依存性などの有害作用を推測できることが示唆された。本研究の行動解析および細胞解析データパターンを拡大することで、オピオイド化合物の包括指定が可能であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Rudd RA, Puja S, Felicita D, Scholl L. Increases in drug and opioid- involved overdose deaths - United States, 2010-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65: 1445-1452, 2016.
- 2) Young MM, Pirie T, Buxton JA, Hosein SF. The Rise of Overdose Deaths Involving Fentanyl and the Value of Early Warning. *Canadian Journal of Addiction.* 6: 13-17, 2015.
- 3) Krotulski AJ, Papsun DM, Walton SE, Logan BK. Metonitazene in the United States-Forensic toxicology assessment of a potent new synthetic opioid using liquid chromatography mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 13: 1697-1711, 2021.
- 4) Verougstraete N, Vandeputte MM, Lyphout C, Cannart A, Hulpia F, Van Calenbergh S, Verstraete AG, Stove C. First Report on Brorphine: The Next Opioid on the Deadly New Psychoactive Substance Horizon? *J Anal Toxicol.* 44: 937-946, 2021.

- 5) SE Walton, AJ Krotulski, BK Logan. A Forward-Thinking Approach to Addressing the New Synthetic Opioid 2-Benzylbenzimidazole Nitazene Analogs by Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry (LC-QQQ-MS). *J Anal Toxicol.* 246: 221-231, 2022.
- 6) 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: 1357-1365, 1999.
- 7) 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: 1067-1080, 1988.
- 8) Schumann JL, Syrjanen R, Alford K, Mashetty S, Castle JW, Rotella J, Maplesden J, Greene SL. Intoxications in an Australian Emergency Department Involving 'Nitazene' Benzylbenzimidazole Synthetic Opioids (Etodesnitazene, Butonitazene and Protonitazene). *J Anal Toxicol.* 2022 Aug 19:bkac062. doi: 10.1093/jat/bkac062.
- 9) Vandeputte MM, Krotulski AJ, Walther D, Glatfelter GC, Papsun D, Walton SE, Logan BK, Baumann MH, Stove CP. Pharmacological evaluation and forensic case series of N-pyrrolidino etonitazene (etonitazepyne), a newly emerging 2-benzylbenzimidazole 'nitazene' synthetic opioid. *Arch Toxicol.* 96:1845-1863. 2022.
- 10) Montanari E, Madeo G, Pichini S, Busardò FP, Carlier J. Acute Intoxications and Fatalities Associated With Benzimidazole Opioid (Nitazene Analog) Use: A Systematic Review. *Ther Drug Monit.* 44: 494-510, 2022.
- 11) Fogarty MF, Vandeputte MM, Krotulski AJ, Papsun D, Walton SE, Stove CP, Logan BK. Toxicological and pharmacological characterization of novel cinnamylpiperazine synthetic opioids in humans and in vitro including 2-methyl AP-237 and AP-238. *Arch Toxicol.* 96: 1701-1710, 2020.

G. 研究発表

1. 論文発表

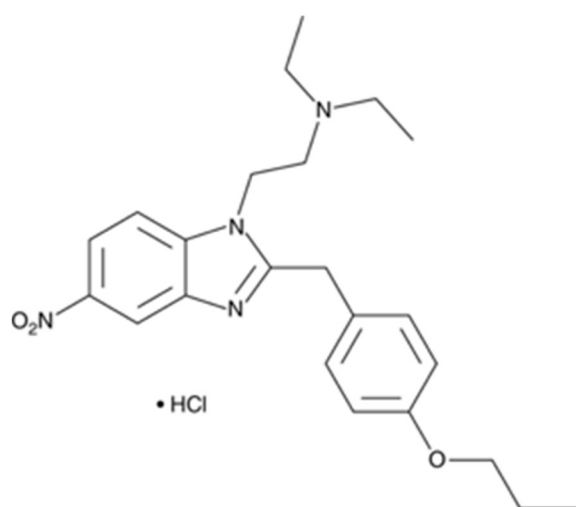
- 1) 船田正彦: 危険ドラッグの依存性. *精神科*, 41: 239-247, 2022.
- 2) 船田正彦: 海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 54: 36-42, 2023.

2. 学会発表

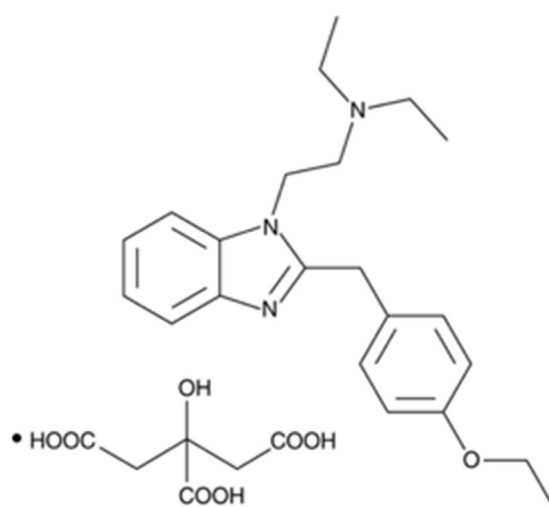
- 1) 船田正彦: 危険ドラッグの最新海外事情, 第20回日本旅行医学会, Web開催, 2022年5月21日.
- 2) 富澤幸菊、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋 秀依: フェンタニル誘導体の構造活性相関, 日本薬学会 第140年会, 札幌, 2022年3月25日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

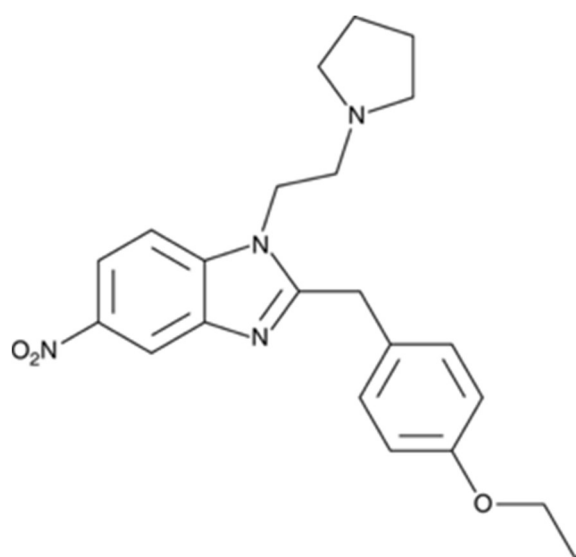
特許取得、実用新案登録、その他
特になし



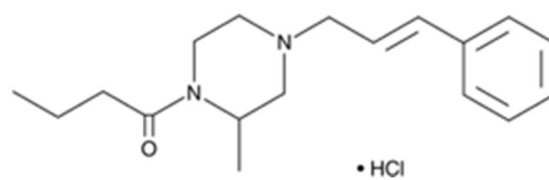
Protonitazene



Etazene



Etonitazepyne



2-Methyl-AP-237

Fig. 1. (薬物の化学構造)

Chemical structures of protonitazene, etazene, etonitazepyne or 2-Methyl-AP-237.

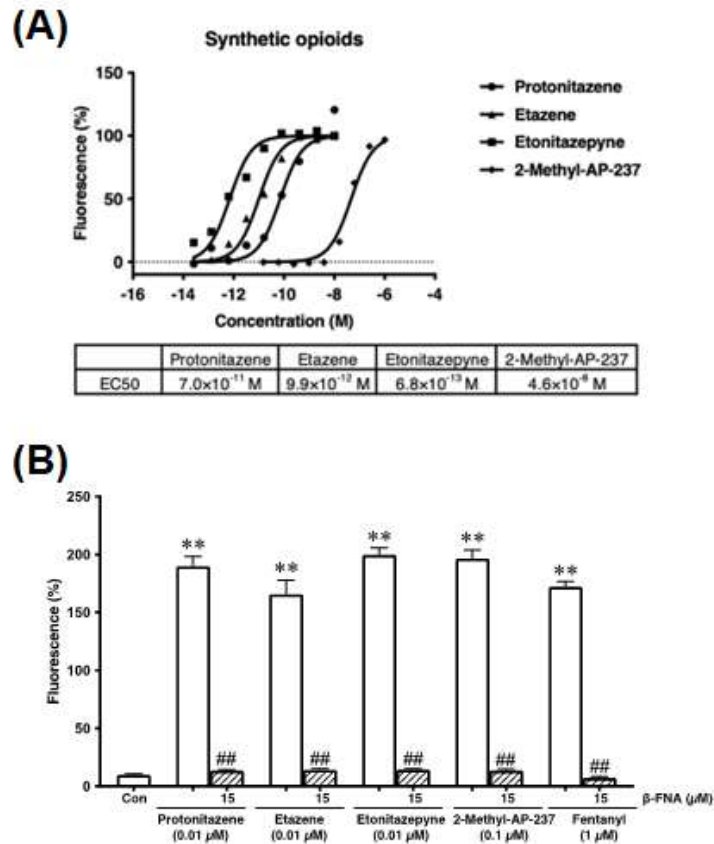


Fig. 2. Effect of treatment with Protonitazene, Etazene, Etonitazepyne or 2-methyl-AP-237 on calcium signal in cloned human μ opioid receptors expressed CHO cells. (A) Changes in intracellular Ca^{2+} levels were detected as changes in fluorescence in the Flexstation II. Each plot represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. The effective concentration 50% (EC_{50}) values calculated using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). (B) Effect of pretreatment with μ opioid receptor antagonist β -funaltrexamine (β -FNA) on protonitazene, etazene, etonitazepyne or 2-methyl-AP-237-induced elevation of intracellular Ca^{2+} levels in CHO- μ cells. Changes in intracellular Ca^{2+} levels were detected as changes in fluorescence in the Flexstation II. Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. Results were expressed in relative fluorescence units (RFU). ** $p < 0.01$ vs. control. ### $p < 0.01$ vs. protonitazene-treated groups, etazene-treated groups, etonitazepyne-treated groups or 2-methyl-AP-237-treated groups.

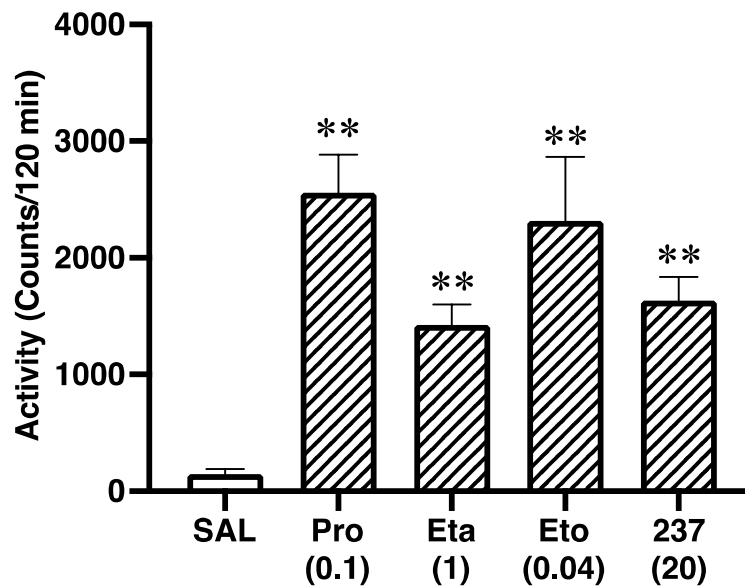


Fig. 3. Effect of acute treatment with protonitazene on the locomotor activity in mice. Total locomotor activity changes after acute administration of protonitazene (Pro, 0.1 mg/kg), Etazene (Eta, 1 mg/kg), Etonitazepyne (Eto, 0.04 mg/kg) or 2-Methyl-AP-237 (237, 20 mg/kg)-treated in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 120 min (n=16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. ** $p < 0.01$ vs. SAL-treated group.

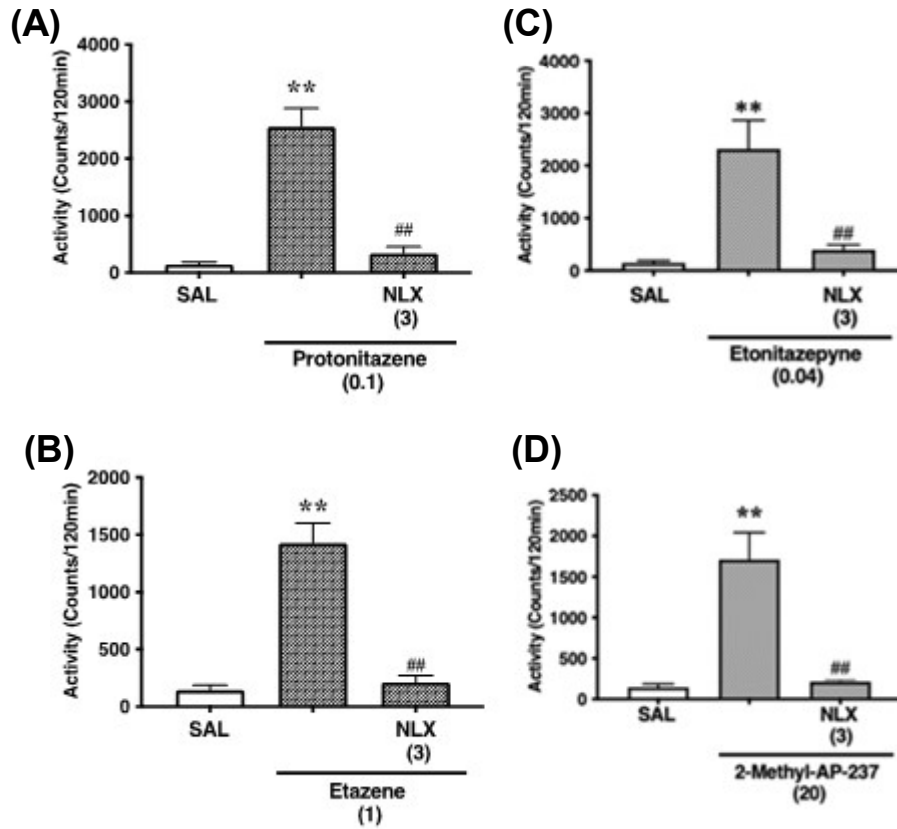


Fig. 4. Role of opioid receptor on the synthetic opioid-induced hyperlocomotion in mice. Effect of pretreatment with the opioid receptor antagonist naloxone (NLX, 3 mg/kg, pre 30 min) on the acute administration of protonitazene (0.1 mg/kg), Etazene (1 mg/kg), Etonitazepyne (0.04 mg/kg) or 2-Methyl-AP-237 (20 mg/kg)-induced hyperlocomotion were examined. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 10 min (n=16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. ** $p < 0.01$ vs. SAL-treated group. ## $p < 0.01$ vs. opioid-treated group.

Table 1 Effects of the synthetic opioids on place conditioning in mice.

CPP score					
Dunnett's multiple comparisons test	SAL	Protonitazene (0.1)	Etodesnitazene (1)	Etonitazepyne (0.01)	2-Methyl-AP-237 (20)
Mean	7.32	104.4	59.7	94.82	71.27
SEM	±10.79	±14.56	±13.12	±13.02	±21.73
<i>p</i> value summary (vs SAL)		<i>p</i> <0.01	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.01	<i>p</i> <0.05

Effects of new psychoactive substances on place conditioning in mice. Place conditioning produced by Protonitazene (0.1 mg/kg), Etazene (1 mg/kg), Etonitazepyne (0.04 mg/kg) or 2-Methyl-AP-237 (20 mg/kg). Conditioning sessions (3 for drug; 3 for saline) were conducted. On day 7, test of conditioning was performed. Conditioning scores (CPP score) represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the saline-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 12 animals. *p*<0.05, *p*<0.01 vs. saline (SAL)-treated group.