

分担研究報告書

新規オピオイド化合物の中枢作用とオピオイド受容体作用の関連性
-Butonitazene の薬理学的特性並びに薬物依存性の評価-

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】

本研究では、危険ドラッグである 2-[(4-butoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine (butonitazene) 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、精神依存性並びに細胞毒性の有無を検討した。

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、butonitazene のオピオイド受容体作用を解析した。Butonitazene 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。Butonitazene 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：Butonitazene による運動活性に対する影響を検討した。Butonitazene の投与により、用量依存的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 naloxone、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬である raclopride 前処置によって有意に抑制された。Butonitazene の運動促進作用は、ドパミン受容体を介して発現す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。Butonitazene の条件付け (1 日 1 回 6 日間、3 : 薬物、3 : 溶媒) を行い、butonitazene の条件付けによって有意な CPP の発現が確認された。Butonitazene 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。4) 培養細胞による毒性評価：マウス forebrain の初代培養神経細胞を使用して、butonitazene 添加による細胞生存率の評価を行った。Butonitazene 添加 24 時間後の細胞生存率は有意に低下し、細胞毒性の発現が確認された。

本研究により、butonitazene 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。Butonitazene の中枢興奮作用の発現並びに精神依存形成には、ドパミン神経系が関与している可能性が示唆された。また、高濃度の薬物を処置することにより、細胞毒性の発現も確認された。したがって、butonitazene の乱用により、重篤な健康被害の発生が危惧される。Butonitazene は強力な中枢作用と精神依存形成能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。

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 butonitazene の薬理学的特性およ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、および4) 細胞毒性について検討を行った。

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, 20 - 25g, 日本クレア) を使用した。本動物実験は、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの動物実験倫理問題検討委員会により承認された動物実験計画書に従って実施した (承認番号 2021001R4)。

使用薬物: Butonitazene 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-Aldrich)、ドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 (Sigma-Aldrich)、ドパミン D2 受容体拮抗薬 raclopride (Sigma-Aldrich) 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、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 (Molecular Devices) を 1 時間取り込ませ、新規オピオイド化合物 butonitazene 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

Butonitazene 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。

Butonitazene 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。また、butonitazene により誘発される行動変化に対するドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬 raclopride 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。Butonitazene または生理食塩液 (SAL) を投与し、30 分間装置内に閉じ込め、翌日は、薬物を経験した動物に SAL を投与し、そうでない動物は薬物を投与し 30 分間装置内に閉じ込めた (Table 1)。

テストセッションは、7 日目に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、溶媒ともに投与せず)

4. ドパミン遊離に対する影響

三種混合麻酔 (メデトミジン 0.4 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg) による麻酔下で、マウスを脳固定装置 (Narishige, Co.) に固定し、中脳辺縁ドパミン神経系の主要

投射先である側坐核 (from bregma: anterior, +15 mm; lateral, -0.9 mm; ventral, -4.9 mm)をターゲットとして、透析用プローブ (Eicom, Co., D-I-6-01)を外科的に植込み、歯科用セメントにて頭蓋に留置した。手術終了 24 時間後、プローブ内人工脳脊髄液 (147.0 mM NaCl, 4 mM KCl and 1.2 mM CaCl₂, 0.9 mM MgCl₂)で 2 μL/min の流速により灌流した。微量生体試料分析システム HTEC 500 (Eicom, Co.)を用いて、透析液中のドパミン濃度を 20 分間隔で測定した。Butonitazene 投与による影響を検討した。

5. 細胞毒性の評価

胎生 15 日目の新生胎児より forebrain を切り出し氷冷した Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies)に入れ、組織の洗浄を行った。その後、脳組織は Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotech) および gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotech)に移し、プロトコルに従って脳組織のホモジネーションを行った。組織懸濁液は、MACS Neuro Medium (with NeuroBrew-21, 2 mM L-glutamine; Miltenyi Biotech)で懸濁した。細胞懸濁液を BD Falcon™ セルストレーナー(BD Falcon Biosciences)で濾過し、未消化の組織や細胞塊を除去した。得られた細胞懸濁液は、poly-L-lysine コートした 96 well black plate (Greiner)に 5.0×10^4 cells/well で撒き、37°C・5.0% CO₂ 条件下で 2 日間培養した。MACS Neuro Medium (with 10 μM cytosine arabinoside, NeuroBrew-21, 2 mM L-glutamine)に置換して 24 時間培養した。Cytosine arabinoside 含有 MACS Neuro Medium を除去し、MACS Neuro Medium にて細胞を維持し、12 日目に神経細胞毒性試験を行った。Butonitazene を無血清 MACS Neuro Medium に最終濃度 31.25-500 μM となるように調製し forebrain culture に添加して 24 時間培養した。細胞の生存率を CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)のプロトコルに従って解析した。

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、butonitazene の μ 受容体作用を解析した。CHO-μ 細胞において butonitazene および対照薬として麻薬である isotonitazene と morphine の刺激により有意な蛍光量の増加が確認された。Butonitazene、isotonitazene および morphine の EC₅₀ は、それぞれ 1.167×10^{-8} M、 5.739×10^{-9} M、 3.901×10^{-7} M であった (Fig.2A)。Butonitazene (0.1 μM)、isotonitazene (0.1 μM) および morphine (10 μM) 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 (5 μM) の前処置により完全に抑制された (Fig.2B)。Butonitazene は、isotonitazene や morphine と同様にオピオイド 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による運動活性への影響

Butonitazene (5 mg/kg, i.p.)によって、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 (Fig. 3AB)。Butonitazene (5 mg/kg, i.p.) の効果は、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone (3 mg/kg, i.p.)の前処置により抑制された (Fig. 4A)。同様に、butonitazene (5 mg/kg, i.p.)によって誘発される運動促進作用はドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬 raclopride の前処置により有意に抑制された (Fig. 4B)。

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。Butonitazene (5 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 (Fig. 5)。

4. 新規オピオイド化合物のドパミン遊離作用

Butonitazene の中枢興奮作用用量を参考に、マイクロダイヤリシス法により、ドパミン遊離に対する影響を検討した。Butonitazene (5 mg/kg,

i.p.)によって、側坐核において有意なドパミン遊離の増加が確認された (Fig. 6)。

5. Butonitazene の細胞毒性の評価

Butonitazene および morphine 処理 24 時間後に forebrain の初代培養神経細胞の細胞生存率を評価した。医療用麻薬である morphine では細胞生存率に影響は認められなかったが、危険ドラッグである butonitazene は、濃度依存的に細胞生存率の低下を示した (Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、butonitazene のオピオイド受容体作用、中枢作用、精神依存性および細胞毒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。蛍光発光の検出により、butonitazene 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、butonitazene の行動薬理学特性を解析した。Butonitazene 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、butonitazene 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。また、butonitazene の運動促進作用は、ドパミン D1 受容体拮抗薬およびドパミン D2 受容体拮抗薬の前処置により抑制された。これらの結果から、butonitazene の中枢作用の発現には、ドパミン神経系が関与しており、ドパミン D1 受容体およびドパミン D2 受容体の双方の関与が示唆された。

Butonitazene の精神依存形成能を、conditioned place preference (CPP) 法により評価した。Butonitazene 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、butonitazene 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^{6,7)}。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。また、butonitazene は、濃度依存的に細胞生存率の低下を示すことから、乱用による有害作用の発現が危惧される。イタリアでは、死亡事例から butonitazene が検出されたケースが報告されている⁸⁾。オーストラリアでは、butonitazene を含む合剤を服用後、ナロキソンで治療を受けた症例が報告されている⁹⁾。アメリカでも、死亡事例から検出されており、butonitazene を含む nitazene 系化合物は公衆衛生上の脅威となっている¹⁰⁾。

本研究の評価結果により butonitazene 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。

E. 結論

本研究から、新規オピオイド化合物である butonitazene は中枢興奮作用および精神依存性を示すことから、その乱用により重大な健康被害発生の危険性が極めて高く、麻薬として規制する必要がある。

F. 引用文献

- 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, Cannaeert 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) 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.* 244: 494-510, 2022.

9) 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 Butonitazene). *J Anal Toxicol.* 2022 Aug 19:bkac062. doi: 10.1093/jat/bkac062.

10) Walton SE, Krotulski AJ, Logan BK. 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.* 46: 221-231, 2022.

G. 研究発表

- 1) 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用の評価と包括規制に関する研究. 第 53 回日本神経精神薬理学会年会 シンポジウム (東京、2023 年 7 月 21 日)
- 2) 船田正彦. 米国におけるオピオイド乱用・依存問題の現状. 2023 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (岡山、2023 年 10 月 14 日)
- 3) Tsukasa Tomizawa, Shuntaro Kikukawa, Hironobu Arita, Kayo Nakamura, Kosho Makino, Hidetsugu Tabata, Tetsuta Oshitari, Hideaki Natsugari, Masahiko Funada, Hideyo Takahashi. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Opioid μ -Receptor Antagonists

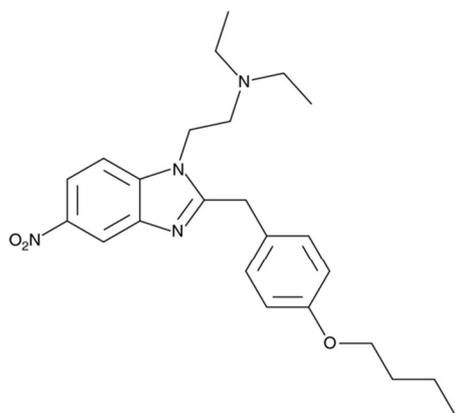
The 11th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference (in Macao) Aug. 2023.

- 4) 菊川俊太郎、有田浩暢、富澤宰、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、富山健一、高橋秀依「フェンタニル骨格に由来する新規オピオイド μ 受容体アンタゴニストの創製」第 84 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(東京、2023 年 5 月)
- 5) 富澤宰、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 143 年会 (札幌、2023 年 3 月)
- 6) 富澤宰、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合成と構造活性相関」第 66 回日本薬学会関東支部大会 (横浜、2022 年 9 月)

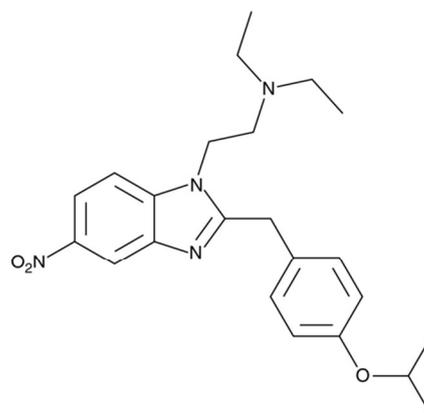
H. 知的財産権の出願・登録状況

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。

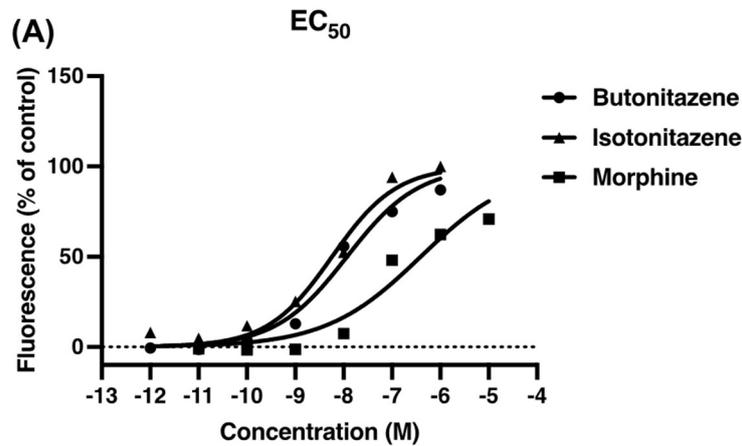


Butonitazene



Isotonitazene (麻藥)

Fig. 1. Chemical structures of butonitazene and isotonitazene.



	Butonitazene	Isotonitazene	Morphine
EC_{50}	1.167e-008	5.739e-009	3.901e-007

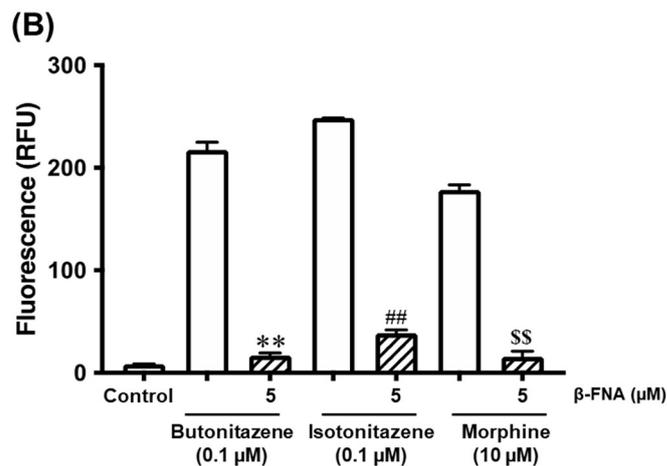


Fig. 2. Analysis of the opioid receptor action of butonitazene

(A) Effect of treatment with butonitazene, isotonitazene or morphine on calcium signal in cloned human μ opioid receptors expressed CHO cells. 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 butonitazene, isotonitazene or morphine-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. butonitazene-treated groups. ## $p < 0.01$ vs. isotonitazene-treated groups. \$\$ $p < 0.01$ vs. morphine-treated groups.

Butonitazene

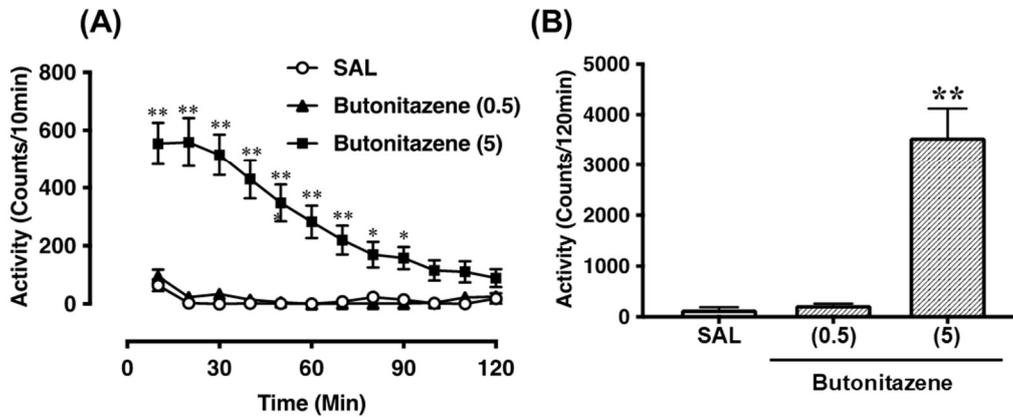


Fig. 3. Effect of butonitazene on locomotor activity in mice

Effect of acute treatment with butonitazene on the locomotor activity in mice. (A) Time course changes after acute administration of butonitazene (0.5 or 5 mg/kg, i.p.)-induced hyperlocomotion in mice. Each point represents the mean activity counts with S.E.M. for 10 min (n=16). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, saline (SAL)-treated group versus (vs) butonitazene-treated group for individual time points, two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. (B) Total locomotor activity changes after acute administration of butonitazene (0.5 or 5 mg/kg, i.p.)-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.

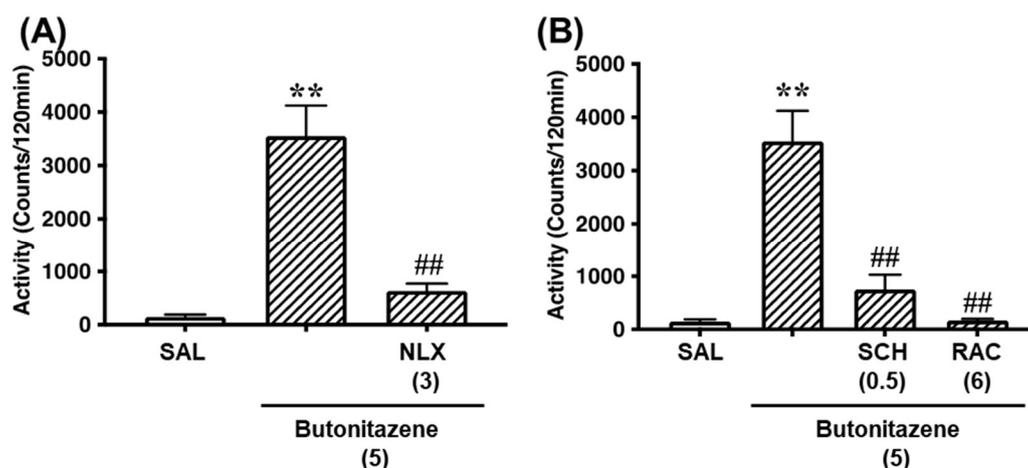


Fig. 4. Pharmacological properties of butonitazene in expression of hyperlocomotion in mice

(A) Effect of pretreatment with an intraperitoneal injection of an opioid receptor antagonist naloxone (NLX, 3 mg/kg, pre 30 min) on the butonitazene (5 mg/kg, i.p.)-induced hyperlocomotion in mice. 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. butonitazene-treated group.

(B) Effect of pretreatment with an intraperitoneal injection of a dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 (SCH, 0.5 mg/kg, pre 30 min) or a dopamine D2 receptor antagonist raclopride (RAC, 6 mg/kg, pre 30 min) on the butonitazene (5 mg/kg, i.p.)-induced hyperlocomotion in mice. 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. butonitazene-treated group.

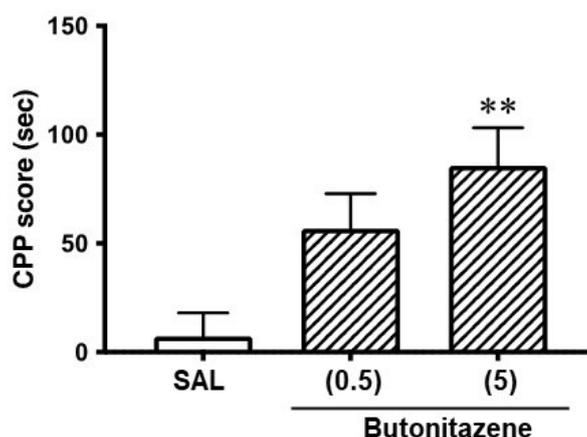


Fig. 5. Place conditioning produced by butonitazene in mice

Effects of new psychoactive substances on place conditioning in mice. Place conditioning produced by butonitazene (0.5 and 5 mg/kg, i.p.). 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. ** $p < 0.01$ vs. saline (SAL)-treated group.

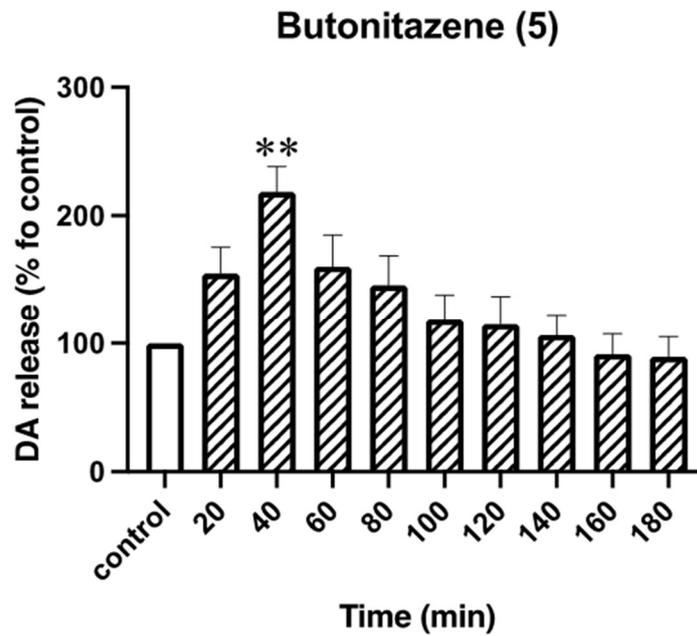


Fig. 6. Effect of butonitazene on dopamine release in the nucleus accumbens
 Effects of treatment with butonitazene on the dialysate dopamine level in the nucleus accumbens.
 Butonitazene (5 mg/kg, i.p.) was injected at time 0. The data are expressed as percentages of the
 corresponding baseline levels with S.E.M of 6 mice. Dunnet's posttest was also applied on each graph.
 ** $p < 0.01$ vs. basal levels.

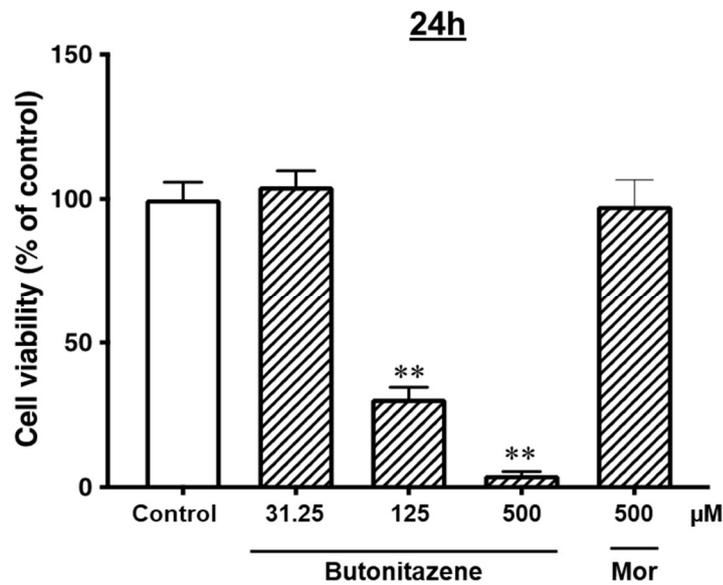


Fig. 7. Evaluation of cytotoxicity for butonitazene

Cell viability in forebrain cultures after treatment with butonitazene or morphine (Mor). The relative value of cell viability compared to the baseline value for control and forebrain cultures treated with butonitazene (31.25-500 μM) and Mor (500 μM) for 24 h. Mean percent changes ± S.E.M. are shown. Statistical significance was evaluated with one-way analysis of variance. The Dunnett's multiple comparison test was used to determine significant differences in the percentage of cells showing cell viability from that observed in controls at the 24 h time point. ** $p < 0.01$ vs. control.