

分担研究報告書

細胞を利用した薬理作用及び物質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】

フェネチルアミン系の危険ドラッグで、セロトニン受容体作用薬を示すとされる 2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine (DOC) について、セロトニン受容体発現細胞を利用した薬理作用解析および行動薬理学的特性の発現に関する検討を行った。セロトニン受容体作用薬の薬理作用評価細胞の構築に関しては、CHO-5HT<sub>2A</sub> 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-5HT<sub>2A</sub>-GCaMP 細胞を構築した。本細胞を利用して、DOC と 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2CI)、2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) および 3 種類の N-Methoxybenzyl-phenethylamines (NBOMes) : 25I-NBOMe、25B-NBOMe、25P-NBOMe について解析した。その結果、EC<sub>50</sub> 値は 2CI : 9.9X10<sup>-8</sup>、DOI : 2.0X10<sup>-9</sup>、DOC : 8.8X10<sup>-8</sup>、25I-NBOMe : 5.42X10<sup>-11</sup>、25B-NBOMe : 3.30X10<sup>-13</sup>、25P-NBOMe : 7.1X10<sup>-10</sup> であった。3 種類の NBOMes については、2CI、DOI、DOC より強力であった。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作製した、持ち運び可能な小型蛍光検出器での検出を確認した。量販型の 8 連型 PCR チューブを利用して、CHO-5HT<sub>2A</sub>-GCaMP 細胞を培養した。チューブ内へ 25I-NBOMe、25B-NBOMe、25P-NBOMe 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。小型蛍光検出器の実用化へ向けて、セロトニン系の薬物検出に関して、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。行動薬理学解析では、DOI および DOC は Head-twitch response (HTR) を誘発した。この HTR は、5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 ketanserin の前処置により有意に抑制されたことから、セロトニン 5-HT<sub>2</sub> 受容体、特に、5-HT<sub>2A</sub> 受容体の関与が示唆された。このように細胞を利用した解析によりターゲットとなる受容体を特定し、行動薬理学的実験へ反映させることで、迅速な中枢神経系の有害作用の予測に役立つと考えられる。

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

幻覚作用を示す薬物の乱用が広がっており、社会問題となっている。特に、セロトニン受容体に作用する薬物において、多くの新しい骨格を持つ化合物が流通拡大している<sup>1)</sup>。

N-Methoxybenzyl-phenethylamines (NBOMes) は、2C クラスのフェネチルアミンの置換誘導体である。米国では、複数の NBOMes が流通しており、2013 年には、3 つの化合物 25I-NBOMe、25C-NBOMe、25B-NBOMe が初めて、米国の規制薬物法でスケジュール I 化合物に分類された<sup>2)</sup>。

Suzuki らは 20 例の NBOMes 乱用による毒中毒症状を解析し、中枢神経系への影響を指摘している<sup>3)</sup>。一方、自律神経系への影響も強力で、頻脈 (85%)、高血圧 (65%)、発熱 (25%) が観察されている。同様に、クレアチンキナーゼの上昇 (45%) を伴う横紋筋融解症の発症も確認されている。

同様に、Lipow らの文献調査において救急搬送された 42 名の患者での中毒症状を解析している<sup>4)</sup>。その結果、中毒症状では、26 人 (62%) に頻脈、22 人 (52%) に高血圧、11 人 (26%) に 1 回以上の痙攣発作がみられた。34 人 (81%) が幻覚を経験し、22 人 (52%) が激しい衝動を経験した。また、13 例 (31%) で ICU レベルの治療が必要とされた。NBOMes は強力な幻覚作用に加え健康被害が深刻であることが示唆されている。

このように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、細胞を用いてセロトニン受容体作用薬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-セロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 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-5-HT<sub>2A</sub>-GCaMP 細胞を構築した。幻覚作用が発現するとされるセロトニン受容体作用薬の評価を行った。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での検出可否についても検討した。

## B. 方法

使用薬物：

- 2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine (DOC)

- 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2CI)
- 2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI)
- N-Methoxybenzyl-phenethylamines (NBOMes) : 25I-NBOMe、25B-NBOMe、25P-NBOMe

を使用した(Fig. 1)。

### 1. 新規セロトニン作用薬のセロトニン受容体作用

Chinese Hamster Ovary (CHO)チャイニーズハムスター卵巣細胞にヒト-セロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 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-5-HT<sub>2A</sub>-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 5×10<sup>4</sup> 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、2CI、DOI、DOC、25I-NBOMe、25B-NBOMe および 25P-NBOMe 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-5-HT<sub>2A</sub>-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 1×10<sup>4</sup> cells/tube となるように播種し、37°C・5.0% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間静置した。その後、DOI、25I-NBOMe、25B-NBOMe および 25P-NBOMe (1 μM)を添加し、蛍光量の変化を測定した。

### 3. Head-twitch の評価

薬物投与による head-twitch response (HTR)の誘発を測定した。DOC により誘発される HTR を Miyata らの手法に従って測定した<sup>5)</sup>。また、HTR の誘発性薬物として DOI を使用した。DOI および DOC により誘発される HTR に対する 5-HT<sub>2</sub>受容

拮抗薬 ketanserin (試験薬投与の 30 分前投与)の効果を検討した。マウスをプラスチック製個別ケージ(22cm×12.5cm×15cm)に移し、DOI および DOC 投与 10 分間の HTR の誘発回数を測定した。

## C. 結果

### 1. セロトニン受容体作用

CHO-5-HT<sub>2A</sub>細胞を利用して、2CI、DOI および DOC の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体作用を解析した。2CI、DOI および DOC の添加により、濃度依存的な蛍光量の増加が確認された(Fig.3A)。2CI (0.25, 1 μM)、DOI (0.25, 1 μM)および DOC (1, 4 μM)による蛍光強度の増加作用は、選択的 5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 ketanserin (Ket, 10 μM) の前処置により完全に抑制された(Fig.3B)。2CI、DOI および DOC は 5-HT<sub>2A</sub> 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. 新規小型蛍光検出器の機能評価

PCR チューブ内で CHO-5-HT<sub>2A</sub>-GCaMP 細胞を維持し DOI、25I-NBOMe、25B-NBOMe および 25P-NBOMe 添加 (すべて 1μM)による蛍光発光強度の解析を行った。薬物の添加によって、シャープなピークが得られ、蛍光量の増加が確認された (Fig. 4)。

### 3. Head-twitch に対する影響

Head-twitch response (HTR)の誘発薬物として用いられている DOI (1mg/kg, i.p.)によって有意な HTR の誘発を確認した。さらに DOI によって誘発される HTR は、5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 ketanserin (0.6 mg/kg)の前処置により有意に抑制された(Fig. 5A)。本手法を用いて DOC (4 mg/kg, i.p.)による HTR の誘発を解析したところ、有意な HTR 誘発作用を有することが明らかになった。DOC (4 mg/kg, i.p.)によって誘発される HTR 誘発作用は 5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬 ketanserin (0.6 mg/kg)の前処置により有意に抑制された (Fig.5B)。

## D. 考察

オピオイド化合物、合成カンナビノイド、セロトニン受容体作用薬は、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。

セロトニン受容体作用薬をターゲットとして、薬理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-セロトニン 5HT<sub>2A</sub>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-5-HT<sub>2A</sub>-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セロトニン受容体作用薬を使用した。評価したセロトニン受容体作用薬は、強力なセロトニン 5HT<sub>2A</sub>受容体刺激作用を有することが明らかになった。また、行動薬理的解析より、セロトニン受容体作用薬である DOI および DOC は Head-twitch response (HTR)を誘発した。この HTR は、5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬 ketanserin の前処置により有意に抑制されたことから、セロトニン 5-HT<sub>2</sub>受容体、特に、5-HT<sub>2A</sub>受容体の関与が示唆された。このように細胞を利用した解析によりターゲットとなる受容体を特定し、行動薬理的実験へ反映させることで、迅速な中枢神経系の有害作用の予測に役立つと考えられる。

以上の結果から、自立蛍光検出細胞となる CHO-5-HT<sub>2A</sub>-GCaMP 細胞による機能評価は、ターゲットとなる受容体を特定し、薬理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と考えられる。

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。セロトニン受容体作用薬の精神

作用の発現では、脳内セロトニン受容体の活性化が必須であることから、CHO-5-HT<sub>2A</sub>-GCaMP 細胞は新規オセロトニン受容体作用薬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的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-5-HT<sub>2A</sub>-GCaMP細胞を静置後、セロトニン受容体作用薬を使用して、小型蛍光検出装置の検出機能を評価したところ、薬物の処置により蛍光発光を検出できることが判明した。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、セロトニン受容体作用薬の検出用細胞のCHO-5-HT<sub>2A</sub>-GCaMP細胞の樹立ならびに小型検出の作製に成功した。本細胞はセロトニン受容体作用薬に関して、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。

## E. 結論

本研究では、セロトニン受容体作用薬の検出用細胞としてCHO-5-HT<sub>2A</sub>-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

セロトニン受容体作用薬に関して、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. Morini, L., Bernini, M., Vezzoli, S., Restori, M., Moretti, M., Crenna, S., ... & Groppi, A. (2017). Death after 25C-NBOMe and 25H-NBOMe consumption. *Forensic science international*, 279, e1-e6.
2. Drug Enforcement Administration. Department of Justice. Schedules of controlled substances: temporary placement of three synthetic phenethylamines into schedule I. Final order. *Fed Regist.* 2013;78(221):68716-68719.
3. Suzuki J, Dekker MA, Valenti ES, et al. Toxicities Associated With NBOMe Ingestion—A novel class of potent hallucinogens: A review of the literature. *Psychosomatics.* 2015;56(2):129-139.
4. Lipow M, Kaleem SZ, Espiridion E. NBOMe Toxicity and Fatalities: A Review of the Literature. *Transformative Medicine (T-Med).* 2022; 1(1):12-18. doi: <https://doi.org/10.54299/tmed/most8578>.
5. Miyata S, Hirano S, Kamei J.: Diabetes inhibits the DOI-induced head-twitch response in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 177: 224-229, 2004.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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

- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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  $\mu$ -Receptor Antagonists The 11th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference (in Macao) Aug. 2023.
- 14) 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  $\mu$  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)
- 15) 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)
- 16) 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

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。

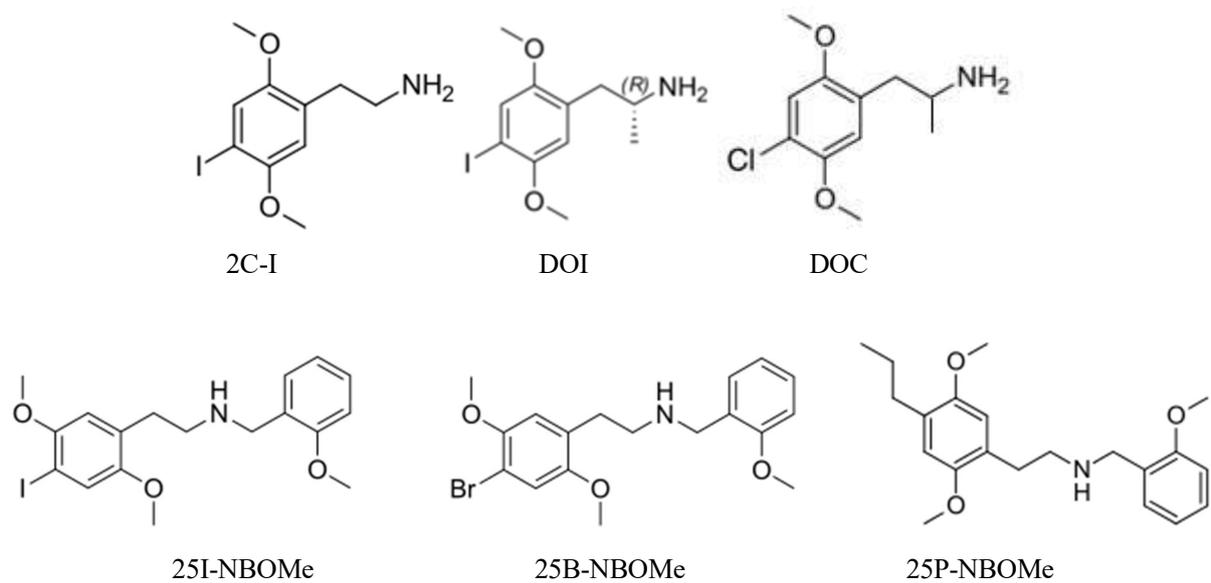


Fig.1. Chemical structure of phenylethylamines.

2C-I (2,5-Dimethoxy-4-iodophenethylamine)

DOI (2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine)

DOC (2,5-Dimethoxy-4- chloroamphetamine)

N-Methoxybenzyl-phenethylamines (NBOMes) : 25I-NBOMe, 25B-NBOMe, 25P-NBOMe

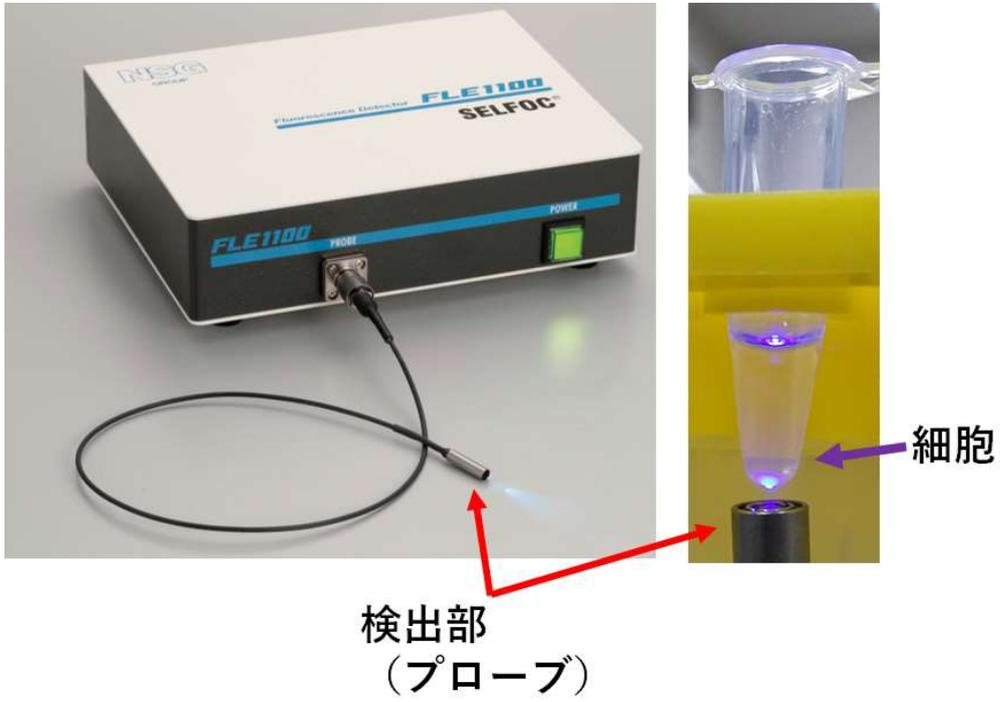
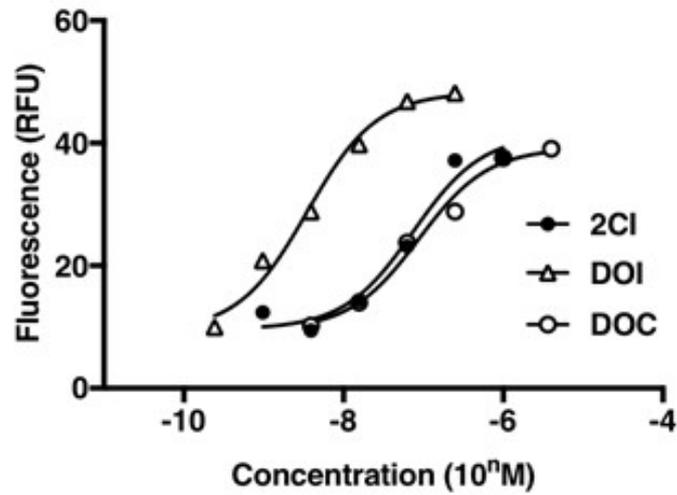


Fig.2. Compact fluorescence detector for mobile use using probes of optical fiber.

(A)



(B)

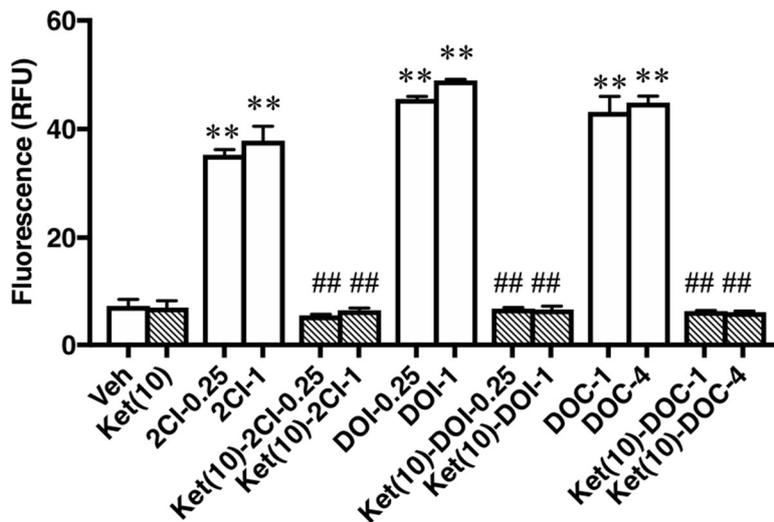


Fig.3. Effect of serotonin receptor agonists on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level in the CHO-5HT<sub>2A</sub>-GCaMP cells.

(A) Changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels were detected as changes in fluorescence in the Flexstation 3. Results are expressed as mean (n=3). (B) Effect of pretreatment with 5HT<sub>2</sub> receptor antagonist ketanserin (Ket) on 2CI, DOI or DOC-induced elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in CHO-5HT<sub>2A</sub>-GCaMP cells. Changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels were detected as changes in fluorescence in the Flexstation 3. Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments.

\*\*P<0.01 vs Veh-treated group. ###P<0.01 vs. 2CI, DOI or DOC-treated group.

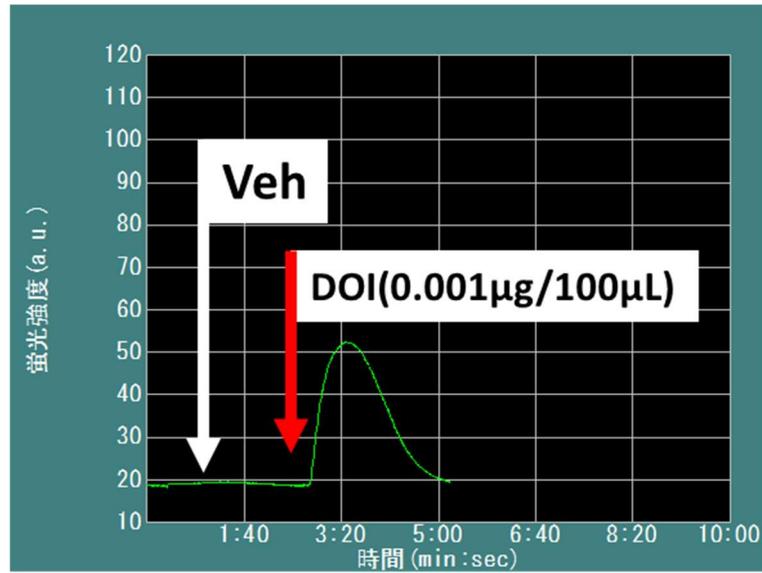


Fig.4. Effect of serotonin receptors agonistic actions of DOI in the CHO-5HT<sub>2A</sub>-GCaMP cells using probes of optical fiber. Changes of fluorescence were observed after treated with DOI or vehicle (Veh).

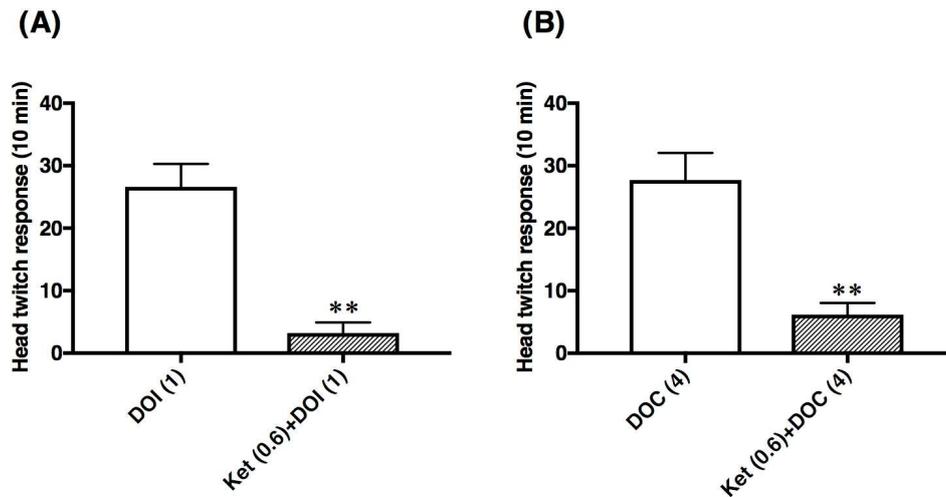


Fig. 5. (2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine の head twitch に対する影響)

Effect of acute treatment with 2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine on the head twitch response in mice. (A) Total head twitch response changes after acute administration of 2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI, 1 mg/kg, i.p.) in mice. Effect of pretreatment with a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ketanserin (Ket, 0.6 mg/kg, pre 30 min) on the DOI (1 mg/kg)-induced head twitch response in mice. Each point represents the total head twitch response counts with S.E.M. for 10 min (n=5). (B) Total head twitch response changes after acute administration of 2,5-Dimethoxy-4-chloroamphetamine (DOC, 4 mg/kg, i.p.) in mice. Effect of pretreatment with a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ketanserin (Ket, 0.6 mg/kg, pre 30 min) on the DOC (4 mg/kg)-induced head twitch response in mice. Each column represents the total head twitch response counts with S.E.M. for 10 min (n=6). Dunnett's posttest was also applied on each graph. \*\*P<0.01 vs. DOI, DOC-treated group.