

令和5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)
精神活性物質の化学構造に基づく乱用危険性予測に関する研究(23KC1002)

総括研究報告書

精神活性物質の化学構造に基づく乱用危険性予測に関する研究

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評価方法を確立することは重要な課題となっている。一方、合成カンナビノイドおよびオピオイド化合物に加えて、幻覚作用を示す LSD 誘導体およびセロトニン受容体作用薬なども登場しており、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、セロトニン受容体作用薬の検出と作用強度を予測するための受容体発現細胞の樹立と薬物検出器の作製を実施した。同様に、iPS 細胞由来のヒト培養神経細胞を使用して危険ドラッグの細胞毒性評価を行い、樹立安定細胞株とヒト神経細胞との毒性発現の比較を行い、培養細胞使用の妥当性を検証した。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、コンピュータシミュレーションによる LSD の活性予測に関する検討も行った。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：細胞を利用した薬理作用及び物質検出法に関する研究】

本研究では、セロトニン受容体作用薬の薬理学的特性評価と検出および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有用性を検証した。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_{2A} 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_{2A}-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、評価薬物は強力なセロトニン 5HT_{2A} 受容体作用を示した。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_{2A}-GCaMP 細胞を培養した。チューブ内へ DOI 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。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：危険ドラッグ関連化合物の合成及びライブラリー構築に関する研究]

中枢に作用する麻薬や指定薬物、及び、その類縁体が危険ドラッグとして市中に流通している。法的に未規制な化合物の中にも毒性や中毒性を示すものはとても多い。置換基を変更することにより増え続ける未規制の化合物は大変危険であり、社会的な問題になっている。本研究ではこれらの精神活性化作用を有すると予想される様々な化合物のうち、特にフェンタニルと LSD に注目し、未規制なそれらの誘導体を化学合成し、ライブラリー化を進めている。合成した化合物については、共同研究者と協働し、薬理作用や毒性を検討している。すでにフェンタニル誘導体については 150 種類を超える化合物を化学合成し、ライブラリー化している。特に、フェンタニルに含有されるアミド構造に着目し、軸不斉を表出させた誘導体を安定な化合物として単離し、各エナンチオマーの薬理活性や毒性を共同研究者に検討していただいた。その結果、エナンチオマーの一方がオピオイド μ 受容体アゴニスト活性を示し、もう一方がアンタゴニスト活性を示すことがわかった。フェンタニル誘導体がオピオイド μ 受容体アンタゴニスト活性を示したのは初めての例であり、加えて、各エナンチオマーが受容体に対して互いに反対の生物活性を示すことは大変興味深い。LSD の誘導体については、化合物の物理化学的性質を調べつつ、誘導体の化学合成を進めている。初めに、LSD 誘導体の化学合成経路を精査し、最適化した。続いて LSD 誘導体の光安定性を調べ、光によって比較的容易に分解することがわかった。また、アミン化合物であることから、酸性塩形成による安定化が有効と考え、各種の酸との塩形成を検討した結果、酒石酸塩が最適とわかった。これらの知見を基に、置換基が異なる LSD 誘導体を合成し、薬理活性や毒性を共同研究者に検討していただいた。インドール部位の窒素の置換基の種類によって安定性が異なることがわかった。この部位の置換基は生体内で化学的、もしくは酵素的に脱離する可能性があり、LSD 誘導体はプロドラッグ化されている可能性が示唆された。

[研究-3：ヒト iPS 細胞より作成した機能的神経細胞を用いた危険ドラッグの有害作用の評価]

本研究では、安定したヒト由来のドパミン神経細胞を確保するために、iPS 細胞からの誘導または市販の細胞を活用し、再現性のある危険ドラッグ評価系の確立を目的とした。ヒト iPS 細胞株 (HPS2478) より、神経前駆細胞並びにドパミン神経の誘導を行なった。陽性対象として、市販の iCell ドパミン神経細胞 (FUJIFILM Cellular Dynamics) を使用した。ヒト iPS 細胞株は、StemXVivo Neural Progenitor Differentiation Kit (R&D Systems) のプロトコールに従い実践し、分化の培養 7 日目に神経前駆細胞のマーカーの一つである SOX-1 陽性を確認した。本細胞を用いたドパミン神経の誘導は、StemXVivo Human/Mouse Dopaminergic Neuron Differentiation Kit (R&D Systems, 販売中止) のプロトコールを再現し、ドパミン神経誘導 15 日目には、ドパミン神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) および神経マーカーである microtubule associated proteins 2 (MAP-2) の発現並びに神経細胞の自立発火を多点電極アレイ (MEA) 法で確認した。ヒト iPS 由来ドパミン神経および

iCell ドパミン神経細胞を用いて、覚醒剤 (methamphetamine)、合成カチノンとして 3-CMC 並びに dipentylone の神経毒性発現を解析した。その結果、methamphetamine、3-CMC 並びに dipentylone は添加 24 時間後に、ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞の細胞生存率を濃度依存的に低下させた。

[研究4：コンピュータシミュレーションを利用した薬物受容体活性予測]

本研究では、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ活性予測を行い、危険ドラッグの規制、特に包括指定の範囲を決めるデータを供することを目的とした。LSD 誘導体の包括指定を行うことを想定し、LSD 誘導体の包括範囲を考察する。現在までにすでに指定薬物あるいは麻薬原料になっている LSD 誘導体から包括指定の範囲の妥当性を検証した。現在までに麻薬、指定薬物あるいは麻薬原料に指定されている LSD 誘導体から包括指定の範囲をまとめた。LSD 誘導体の 2 部位 (R1、R4) に着目し包括的危険予測範囲の検証に利用するためのマトリックスを作成した。

結論：(1) 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-5HT_{2A}-GCaMP 細胞の樹立ならびに細胞と小型蛍光検出器での薬物検出が可能であることを確認した。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。(2) 本研究では、フェンタニル誘導体及び LSD 誘導体を化学合成し、標準品として提供できる化合物ライブラリー化することができた。合成した各種誘導体の構造活性相関研究により、オピオイド μ 受容体に対するフェンタニル誘導体の薬理作用が明らかになった。合成した 100 種を超える軸不斉異性体のうち、いくつかの化合物において一方がアゴニスト活性を示し、もう一方がアンタゴニスト活性を示すことから、それぞれが異なる結合様式でオピオイド μ 受容体に結合していることが示唆された。また、本研究により、LSD 誘導体の最適な合成経路が確立された。加えて、LSD 誘導体の光安定性及び、酒石酸塩形成による安定化が明らかになった。さらに、本研究より、最近、多く流通している未規制の LSD 誘導体には化学的安定性が低いものがあり、体内に吸収された後に分解して LSD が生成する、いわゆるプロドラッグである可能性が示唆された。(3) ヒト iPS 由来ドパミン神経および市販のヒトドパミン神経細胞を用いて、覚醒剤である methamphetamine および危険ドラッグである合成カチノンの神経細胞毒性について検討し、いずれも濃度依存的に細胞毒性を発現することが明らかとなった。これまでの危険ドラッグの神経毒性の解析においては、マウスの胎児由来初代培養神経細胞や培養細胞株を用いる場合が多い。しかし、ヒトを想定した毒性発現の可能性の検討や動物愛護の観点から、ヒト由来の iPS 細胞から誘導した機能的神経細胞を用いることで、ヒトを反映した薬物特性の一端を収集可能になることが期待できる。(4) 包括指定を視野に入れて、LSD 誘導体の R1、R4 のバリエーションによって規制誘導体の見込み範囲のマトリックスを作成した。活性未知の誘導体のマトリックスを作成するために、QSAR によって活性予測を行うにあたり、活性が既知の類縁体のデータが必要である。文献、実験等より活性既知のデータの収集が重要である。

本研究成果から、危険ドラッグであるセロトニン受容体作用薬について、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。また、活性未知の誘導体のマトリックスを作成するために、

QSAR によって活性予測を行うにあたり、活性が既知の類縁体のデータが必要である。文献、実験等より活性既知のデータの収集が重要である。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。本研究より得られるデータを利用して、危険ドラッグの包括的危険予測のために誘導体のマトリックス作成の精度を上げていく予定である。

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
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 室長
栗原正明 湘南医療大学 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。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評価方法を確立することは重要な課題となっている。

一方、合成カンナビノイドおよびオピオイド化合物に加えて、幻覚作用を示す LSD 誘導体およびセロトニン受容体作用薬なども登場しており、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。

同様に、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 5HT_{2A} 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-5HT_{2A}-GCaMP 細胞を構築した。近年の流通が問題となっている催幻覚作用を有す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。

危険ドラッグとして流通する麻薬類似物質の中樞神経作用や報酬効果などは、動物を用いた行動薬理的な解析方法によって評価が可能となっている。一方で、ヒトに対する危険ドラッグの薬理(有害)作用の評価方法についてはまだ確立していない。特に、多数の薬物を一斉に評価する必要がある場合、ヒト由来の機能的培養細胞を用いた薬物スクリーニング法は、薬理作用や毒性の強度比較を同一条件下で迅速に実施することが可能である。そこで、本研究では、ヒト由来 iPS 細胞よりドパミン神経を誘導し、市販の樹立されたヒト由来ドパミン神経細胞と比較しながら、細胞の機能的応答または毒性発現を指標とする危険ドラッグの新しい有害作用評価方法の検討をする。

B. 各研究の目的、方法、結果

[研究-1: 細胞を利用した薬理作用及び物質検出法に関する研究]

船田正彦

湘南医療大学 薬学部 教授

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_{2A} 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_{2A}-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、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用活性化に基づく蛍光発光が確認された。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_{2A}-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。同様に、小型蛍光検出器の検出結果は、大型の据え置き式蛍光プレートリーダーでの結果と一致した。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-HT₂ 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-HT₂ 受容体、特に、5-HT_{2A} 受容体の

関与が示唆された。

[研究-2: 危険ドラッグ関連化合物の合成及びライブラリー構築に関する研究]

高橋秀依

東京理科大学 薬学部 教授

本研究では、精神活性化作用を有するフェンタニル、LSD の誘導体を化学合成し、ライブラリー化することを目的とした。

フェンタニル誘導体について、その構造中のアシル部、及びアリアル部に関して網羅的な化学合成を行い、合計で 150 種余の化合物を作製し、化合物ライブラリー化した。十分な立体障害をもつフェンタニル誘導体には軸不斉が安定に存在し、その多くは室温で単離可能である。これらフェンタニル誘導体を研究代表者に供与し、生物活性を検討していただいた。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ているが、軸不斉を有するいくつかの化合物については、(+) -エナンチオマーがオピオイド μ 受容体アンタゴニスト活性を、(-)-エナンチオマーがアゴニスト活性を示すことを明らかにした。最も活性の高い化合物はオピオイド μ 受容体アンタゴニストであるナロキソンよりも高活性であることがわかった。さらに、これらの(+) -エナンチオマー、及び、(-)-エナンチオマーの ECD スペクトルを測定し、計算化学によって導かれた ECD スペクトルと比較することにより絶対配置を明らかにした。すなわち、アゴニスト活性を示すエナンチオマーは aR であり、アゴニスト活性を示すエナンチオマーは aS と決定された。一方のエナンチオマーがオピオイド μ 受容体アゴニスト活性を示し、もう一方がアンタゴニスト活性を示すという結果は大変興味深く、計算化学を用いてオピオイド μ 受容体とのドッキングスタディを行い、それぞれのエナンチオマーの結合様式が異なることを示唆する結果を得た。

また、LSD の誘導体については、インド

ール部の窒素をアシル化した誘導体の化学合成経路を確立した。この合成経路により、アシル基の異なる 3 種の LSD 誘導体を合成することができた。合成にあたって、LSD の光安定性が低いことを明らかにした。また、最終生成物である N-アシル化誘導体について、各種の酸との塩形成を検討した結果、酒石酸塩が最適とわかった。N-アシル化した LSD 誘導体は、化学的安定性がやや低いこともわかった。合成した LSD 誘導体を共同研究者に供与した。

以上のような化学合成した化合物については、化合物ごとに NMR、IR、MS を測定し、データベースを作成した。立体異性体を有する化合物については、ジアステレオマーやエナンチオマーの薬理活性及び毒性が異なることが予想されるが、それらの効率よい分析法は確立されていない。そのため、キラルカラムを用いたキラル HPLC の分離条件について精査し、ジアステレオマーの分離・単離及びエナンチオマーの分離・単離を検討し、IR 測定、MS (HRMS) 測定とともにデータベース化を進め、化合物ライブラリーを拡充した。

[研究-3: ヒト iPS 細胞より作成した機能的神経細胞を用いた危険ドラッグの有害作用の評価]

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 室長

本研究では、安定したヒト由来のドパミン神経細胞を確保するために、iPS 細胞からの誘導または市販の細胞を活用し、再現性のある危険ドラッグ評価系の確立を目的とした。ヒト iPS 細胞株 (HPS2478) より、神経前駆細胞並びにドパミン神経の誘導を行なった。陽性対象として、市販の iCell ドパミン神経細胞 (FUJIFILM Cellular Dynamics) を使用した。ヒト iPS 細胞株は、StemXVivo Neural Progenitor Differentiation Kit (R&D Systems) のプロトコルに従い実践し、分化の培養 7 日

目に神経前駆細胞のマーカーの一つである SOX-1 陽性を確認した。本細胞を用いたドパミン神経の誘導は、StemXVivo Human/Mouse Dopaminergic Neuron Differentiation Kit (R&D Systems, 販売中止) のプロトコルを再現し、ドパミン神経誘導 15 日目には、ドパミン神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) および神経マーカーである microtubule associated proteins 2 (MAP-2) の発現並びに神経細胞の自立発火を多点電極アレイ (MEA) 法で確認した。ヒト iPS 由来ドパミン神経および iCell ドパミン神経細胞を用いて、覚醒剤 (methamphetamine)、合成カチノンとして 3-CMC 並びに dipentylone の神経毒性発現を解析した。その結果、methamphetamine、3-CMC 並びに dipentylone は添加 24 時間後に、ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞の細胞生存率を濃度依存的に低下させた

[研究-4: コンピュータシミュレーションを利用した薬物受容体活性予測]

栗原正明

湘南医療大学 薬学部 教授

本研究では、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ活性予測を行い、危険ドラッグの規制、特に包括指定の範囲を決めるデータを供することを目的とした。LSD 誘導体の包括指定を行うことを想定し、LSD 誘導体の包括範囲を考察する。現在までにすでに指定薬物あるいは麻薬原料になっている LSD 誘導体から包括指定の範囲の妥当性を検証した。現在までに麻薬、指定薬物あるいは麻薬原料に指定されている LSD 誘導体から包括指定の範囲をまとめた。

LSD 誘導体の 2 部位 (R1, R4) に着目し包括的危険予測範囲の検証に利用するためのマトリックスを作成した。

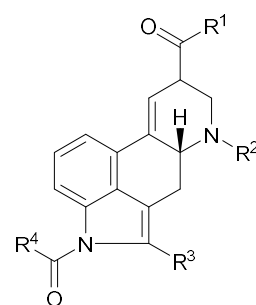


Fig A LSD 誘導体

C. 考 察

1. 細胞を利用した薬理作用及び物質検出法に関する研究

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 5HT_{2A} 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-5HT_{2A}-GCaMP 細胞を構築した。セロトニン受容体作用薬により、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用活性化に基づく蛍光発光が確認された。行動薬理学解析では、セロトニン受容体作用薬は Head-twitch response (HTR) を誘発した。この HTR の発現はセロトニン 5-HT₂ 受容体の関与が示唆された。以上の結果から、受容体発現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。一方、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、セロトニン受容体作用薬の検出用細胞の CHO-5HT_{2A}-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、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. 危険ドラッグ関連化合物の合成及びライブラリー構築に関する研究

本研究により合成された軸不斉を有するフェンタニル誘導体は、オピオイド μ 受容体に対して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した。現在の法規制においては、全ての立体異性体について一様に規制されているが、今後、立体化学を考慮すべきかもしれない。また、このように、立体異性体に配慮した化合物ライブラリーを作製し、供与することにより、より正確な生物活性及び毒性の検討を行えると考える。さらに、分析法については、NMR や質量分析 (MS)、IR について化合物ライブラリーのデータベースが拡充されており、今後、違法薬物鑑定に役立つと考える。LSD 誘導体については、インドール部位の置換基の種類によって安定性が異なることがわかった。生体内で化学的、もしくは酵素的にアシル基が脱離する可能性があり、市中に流通しているN-アシル化 LSD 誘導体はプロドラッグ化を意図して合成されている可能性が示唆された。

3. ヒト iPS 細胞より作成した機能的神経細胞を用いた危険ドラッグの有害作用の評価

本研究では、ヒト iPS 細胞よりドパミン神経細胞の誘導を試み、市販のヒトドパミン神経細胞と機能を比較しながら、危険ドラッグの新しい評価系の基礎検討を行なった。ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞は、神経毒性を誘発することが知られている覚醒剤 (methamphetamine)、さらには毒性が未知の薬物である合成カチノンとして 3-CMC 並びに dipentylone を処理することで神経毒性を誘発することが確認できた。

本結果から、ヒト細胞株からのドパミン神経に対する依存性薬物の毒性評価が可能となり、引き続き毒性発現メカニズムを解析していくことで、マウスの胎児より採取する初代培養神経細胞の代替法として活用できると考えられる。依存性薬物の中でも methamphetamine や合成カチノン系化合物の標的タンパク質となるドパミントランスポーター (DAT) や vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) に対する影響やドパミン分泌への影響を検討することで、動物とヒトとのギャップを補う評価系の確立につながるものと考えられる。

4. コンピュータシミュレーションを利用した薬物受容体活性予測

LSD 誘導体の R^2 、 R^3 はバリエーションが少なく、 R^1 、 R^4 のバリエーションによって範囲を指定することが重要であると考えられる。ただ、QSAR によって活性予測を行うにあたり、活性が既知の類縁体のデータが必要である。文献等より活性既知のデータの収集が重要である。

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-5 HT_{2A}-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。受容体発現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。また、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。

化合物ライブラリーについては、フェンタ

ニル誘導体及び、LSD 誘導体の合成を行った。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 150 種を超え、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の軸不斉異性体のうち、絶対配置 aS のエナンチオマーがオピオイド μ 受容体拮抗薬であることは、今後、フェンタニルの薬理活性や毒性発現を明らかにするうえで非常に興味深く、今後のこの分野の発展に重要な情報となる。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、微量分析のための活用が期待される。

本研究では、ヒト iPS 由来ドパミン神経および市販の iCell ドパミン神経細胞を用いて、覚醒剤 (methamphetamine)、合成カチノンとして 3-CMC 並びに dipentylone の神経毒性発現を解析した。評価薬物として用いた methamphetamine、3-CMC 並びに dipentylone は添加 24 時間後に、濃度依存的に神経細胞毒性を示すことから、ヒトでの乱用により健康被害を示す危険性が示唆された。本解析データは、有害作用の推測に利用できる可能性が示唆された。

包括指定を視野に入れて、LSD 誘導体の R¹、R⁴ のバリエーションによって規制誘導体の見込み範囲のマトリックスを作成した。(Table 1) 活性未知の誘導体のマトリックスを作成するために、QSAR によって活性予測を行うにあたり、活性が既知の類縁体のデータが必要である。文献、実験等より活性既知のデータの収集が重要である。次年度の課題としたい。

本研究成果から、危険ドラッグであるセロトニン受容体作用薬について、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。また、活性未知の誘導体のマトリックスを作成するために、QSAR によって活性予測を行うにあたり、活性が既知の類縁体のデータが必要である。文献、実験等より活性既知のデータの収集が重要である。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。本研究より得られるデータを利用して、危険ドラッグの包括的危険予測のために誘導体のマトリックス作成の精度を上げていく予定である。

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：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) Nakamura, Mari; Hojo, Motoki; Kawai, Ayaka; Ikushima, Kiyomi; Nagasawa, Akemichi; Takahashi, Hideyo; Makino, Kosho; Suzuki, Toshinari; Suzuki, Jin; Inomata, Akiko. An application of the magnetometer detection system to Crl:CD1 (ICR) mice for head twitch response induced

- by hallucinogenic 5-HT_{2A} agonists. *Fundamental Toxicological Sciences*, 2023, 10 (5) 189-197.
- 3) 2) Chiba, Arisa; Tanaka, Ryoko; Hotta, Mayuno; Nakamura, Kayo; Makino, Kosho; Tabata, Hidetsugu; Oshitari, Tetsuta; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Stereochemistry of N-Acyl-5H-dibenzo[b,d]azepin-7(6H)-ones. *Molecules*, 28 (12) 4734. DOI: 10.3390/molecules28124734
- 4) 3) Nakagawa, Yoshio ; Suzuki, Jin; Suzuki, Toshinari; Takahashi, Hideyo; Makino, Kosho; Ono, Yasushi; Sakamoto, Miho; Inomata, Akiko. Cytotoxic effects of psychoactive isobutyrylfentanyl and its halogenated derivatives on isolated rat hepatocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 2023, 43 (9) 1379-1392. DOI: 10.1002/jat.4472
- 5) 4) Funaki, Kaoru; Tabata, Hidetsugu; Nakazato, Yusuke; Takahashi, Yuka; Tasaka, Tomohiko; Takahashi, Hideyo; Natsugari, Hideaki; Oshitari, Tetsuta. Atropodistereoselective 5N-acylation of 1,5-benzodiazepin-2-ones with (S)-2-phenylpropanoyl and (S)-2-phenylbutanoyl Chlorides. *Journal of Organic Chemistry*, 2022, 87 (22), 15289-15300.
- 6) 5) Tanaka, Ryoko; Nabae, Ayana; Yamane, Koki; Makino, Kosho; Tabata, Hidetsugu; Oshitari, Tetsuta; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Atropisomeric properties of N-alkyl/aryl 5H-dibenz[b,f]azepines. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2022, 70, (8) 573-579.
- 7) 6) Tanaka, Ryoko; Makino, Kosho; Tabata, Hidetsugu; Oshitari, Tetsuta; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Axial chirality and affinity at the GABAA receptor of triazolobenzodiazepines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2022, 64, 116758.
- 8) 8) Tanaka, Ryoko; Makino, Kosho; Tabata, Hidetsugu; Oshitari, Tetsuta; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Atropisomeric properties of 9-methyl-1,4-benzodiazepin-2-ones. *Synthesis* 2021, 53 (24), 4682-4688.
- 9) 9) Takuya Namba, Mayuno Hotta, Hidetsugu Tabata, Kosho Makino, Tetsuta Oshitari, Hideaki Natsugari, Hideyo Takahashi. Atropisomeric Properties of N-acyl/N-sulfonyl 5H-dibenzo[b,d]azepin-7(6H)-ones. *Journal of Organic Chemistry*, 2021, 86 (11), 7563-7578.
- 10) 10) Kanase, Yuki; Makino, Kosho; Takashi Yoshinaga; Tabata, Hidetsugu; Oshitari, Tetsuta, Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Conformational properties and M1 antimuscarinic activity of 4-substituted pirenzepine/telenzepine analogues. *HETEROCYCLES*, 2020, 101, 273-283.
- 11) Moriya S, Funaki K, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.: Synthesis and properties of PNA containing a dicationic nucleobase based on N4-benzoylated cytosine.: *Bioorg Med Chem Lett*. 2023 May 15;88:129287.
- 12) Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.: Bis(nitrato-κO)(1,4,8,11-tetra-aza-cyclo-tetra-decane-κ4 N)zinc(II) methanol monosolvate.: *IUCrdata*. 2022 Aug 31;7(Pt 8):x220854.
- 13) Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T: PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA: *Peptide Science* 2021, 2022, 111-112
2. 学会発表
- 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) 富山健一, 船田正彦: 新規合成オピオイド

- ド isotonitazene の薬理学的特性の解析, 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 13-15 日.
- 3) 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)
 - 4) 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.
 - 5) 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)
 - 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構造活性相関」日本薬学会第 143 年会 (札幌、2023 年 3 月)
 - 7) 大環状ポリアミン-亜鉛錯体の単結晶 X 線結晶構造解析：市丸 嘉、加藤 紘一、小池 透、黒崎 博雅、栗原 正明：日本薬学会第 143 年会 (2023/03)
 - 8) 市丸嘉、加藤紘一、栗原正明、黒崎博雅：アントラセンを導入した Bis(2-picoly)amine 誘導体-亜鉛錯体の DNA 光切断活性：第 67 回日本薬学会関東支部大会 (2023/9/16, 東京)
 - 9) Shun-suke Moriya, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Strand invasion by

- PNA containing preQ1: 第 50 回国際核酸化学シンポジウム (2023/11/1-3) 宮崎
- 10) Shun-suke Moriya, Mai Kiyosue, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Properties of peptide nucleic acid containing n4 -bis(aminomethyl)-benzoylated cytosine for enhanced DNA binding: 第 60 回ペプチド討論会 (2023/11/8-10) 滋賀

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、富澤宰、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