

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10702

研究課題名 (和文) 新規合成オピオイド薬物の代謝様式の解明および主要代謝物の薬理活性の評価

研究課題名 (英文) Study on the metabolism of new synthetic opioids and evaluation of the pharmacological effects of their metabolites

研究代表者

金森 達之 (KANAMORI, Tatsuyuki)

科学警察研究所・附属鑑定所・鑑定官

研究者番号：40356192

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,600,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究では, (1)新規合成オピオイドの代謝様式の解明, 及び(2)合成オピオイド類及びそれらの代謝物の薬理活性の解明, の2つのテーマについて研究を行った。

(1)では, ヒト肝細胞を用いた実験により, 新規合成オピオイドであるフラニルフェンタニルの代謝様式について明らかにした。得られた知見は, この薬物の摂取証明において, 有効に活用されるものと期待される。

(2)では, 市販のセルバースキットを用いてフェンタニル類及びそれらの代謝物並びにニタゼン類のオピオイド受容体賦活化活性を測定し, 構造活性相関に関する知見を得た。本成果は, 合成オピオイド類による中毒原因を探る上で, 有効に活用されるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたフラニルフェンタニルの代謝に関する知見は, 当該薬物の摂取証明において有効に活用されると期待される。また, 本研究で確立した代謝物の合成方法は, 学術的に有用な情報を与えるものである。一方, 本研究により得られた新規合成オピオイド及びその代謝物の構造活性相関に関する知見は, 合成オピオイドによる中毒原因の解明等に有効に活用されるものと期待される。

研究成果の概要 (英文) : In this study, the following two researches had been carried out: (1) study on the metabolism of new synthetic opioids, and (2) study on the pharmacological activity of new synthetic opioids and their metabolites.

(1) The metabolic pathway of new synthetic opioid furanylfentanyl was clarified by the experiment using fresh human hepatocytes.

(2) The agonistic activity of new synthetic opioids and their metabolites at opioid receptor had been determined by using cell-based assay system, and the structure-activity relationship of these compounds was clarified. The results will be useful for investigating the death caused by overdose of new synthetic opioids.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オピオイド 代謝 肝細胞 オピオイド受容体 アゴニスト

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始する数年前(2014年頃)より、米国を中心に“オピオイド薬物”の乱用が急速に拡大し、それに伴い多数の中毒死者が発生し、“opioid overdose crisis”と呼ばれるほどの大きな社会問題となっていた。そのような情勢の中、我が国においても、オピオイド薬物の乱用が拡大することが懸念されていた。

オピオイド薬物とは、体内のオピオイド受容体に結合し、鎮痛や陶酔感などの薬理作用をもたらす薬物の総称である。代表的なものとして、植物のケシから得られるモルヒネや、モルヒネを加工して得られるヘロイン、完全な化学合成品(合成オピオイド)であり、強力な鎮痛作用を有するフェンタニルなどが挙げられるが(図1)、これらのうち、特にフェンタニルやその誘導体を中心とした合成オピオイドの流行が大きな問題となっていた。乱用されるフェンタニル誘導体は、法規制を逃れるためにフェンタニルの構造の一部を改変したものであるが、このような違法薬物については、薬物自体の薬理作用の強さが不明であったり、また、出回っている製品に含まれる薬物の量がまちまちであったりすることが、過剰摂取を引き起こし、多くの中毒者を生む要因とされてきた。

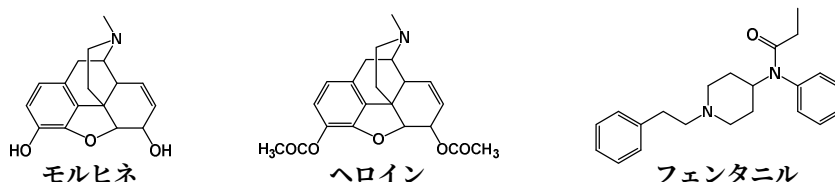


図1 各種オピオイドの化学構造

一方、薬物の薬理活性や毒性について議論する場合、薬物本体のみではなく、その代謝物にも目を向ける必要がある。一般に、薬物を体内に摂取すると、主に肝臓で化学反応を受け、様々な代謝物を生成する。代謝物は、元の薬物とは異なった化学構造を有しており、薬理作用が失われたり、減弱したりする場合もあれば、逆に元の薬物よりも強力な活性を有する場合もある(活性代謝物)。従って、薬物の薬理活性を評価する場合、その主要代謝物の薬理活性について把握しておくことが極めて重要である。しかしながら、新たに出現する合成オピオイドの代謝物の薬理活性については、ほとんど未知といってよいのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 新たに出現する合成オピオイド類の代謝様式の解明、及び(2) 合成オピオイド類及びそれらの代謝物の薬理活性の解明、を目的とする。合成オピオイド類の代謝様式を解明することにより、それらの薬物について、より有効な使用(摂取)証明法を開発することが可能となる。また、合成オピオイド類やそれらの代謝物の構造活性相関についての知見を得ることで、より危険な薬物の推定が可能となり、啓蒙活動等を通して危険な薬物の摂取回避につながるものと期待される。また、実際に合成オピオイドによる中毒事故が発生した際に、その中毒原因の推定において薬理活性データが有効に活用されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 新規合成オピオイド類の代謝様式の解明

① フラニルフェンタニルの代謝様式の解明

フラニルフェンタニル(図2)は、フェンタニルのN-プロピオニル基をN-(2-フロイル)基に置換した化合物で、2015年にアメリカの乱用薬物市場で初めて確認された、比較的新しいフェンタニル誘導体である。フラニルフェンタニルの代謝については、既にいくつか報告されていたが、化学合成した標準品による代謝物の完全な同定は行われていなかった。そこで、本研究では、培養ヒト肝細胞を用い、改めてフラニルフェンタニルの代謝について調べた。

フェニックスバイオ社より市販されている新鮮ヒト肝細胞(PXB-cells®)にフラニルフェンタニル(研究代表者が合成したもの)を添加して培養し、得られた培養液について適宜前処理を行い、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)を行った。得られたデータを基に代謝物の化学構造を推定し、さらに、推定された代謝物を化学的に合成して分析データを比較し、完全な同定を行った。

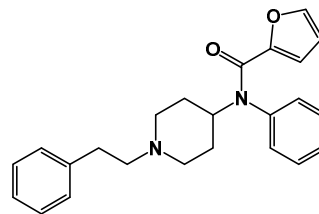


図2 フラニルフェンタニルの化学構造

(2) 合成オピオイド類及びそれらの代謝物の薬理活性の解明

① フェンタニル類の合成

フェンタニル類の構造活性相関について調べるため、N-アシル基について5種類(アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、メトキシアセチル)、N-フェニル基について4種類(フッ素置換なし、あるいは2位、3位、4位のいずれかにフッ素が結合したもの)の構造を選定し、これらを組み合わせた合計20種類の化合物を合成した。合成経路を図3に示す。

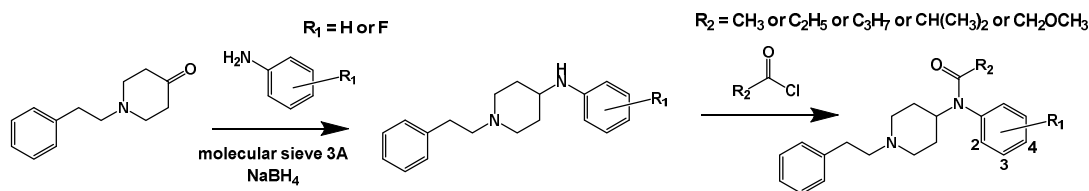


図3 フェンタニル誘導体の合成経路

② ニタゼン類の合成

ベンゾイミダゾール系合成オピオイドに分類されるニタゼン類は、1950年代に欧州の化学メーカーにより開発された、非常に強力な合成オピオイドである。近年、いくつかのニタゼン類が乱用薬物市場に出現し、乱用の拡大が懸念されている。今回、ニタゼン類の活性について調べるため、*O*-アルキル基について4種類（メチル、エチル、プロピル、イソプロピル）、ニトロ基の結合位置について2種類（5位もしくは6位）を選定し、これらを組み合わせた合計8種類の化合物を合成した。合成経路を図4に示す。

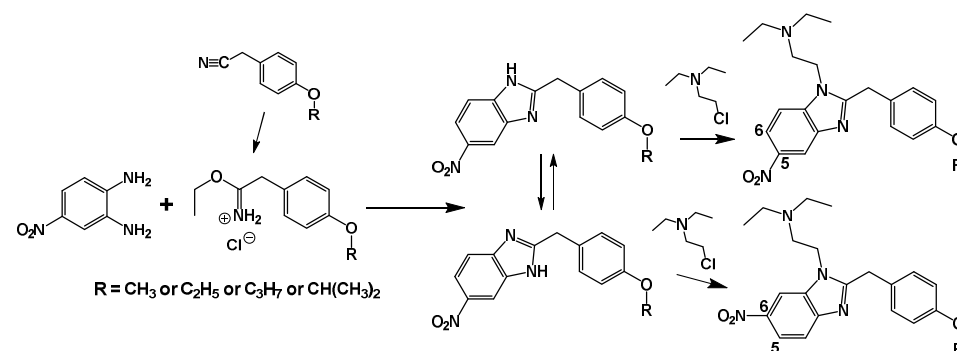


図4 ニタゼン類の合成経路

③ 本研究で合成したフェンタニル類及びニタゼン類の薬理活性の測定

薬理活性の指標とするため、合成した各化合物のオピオイド μ 受容体に対する賦活化活性（アゴニスト活性）を、細胞ベースの測定キット（cAMP Hunter® eXpress Kit）を用いて測定した。このキットは、オピオイド μ 受容体を表面に発現した細胞（CHO-K1細胞）に被験物質を作用させた後、細胞内の cAMP 濃度を測定することにより、被験物質のオピオイド μ 受容体に対するアゴニスト活性を評価できるものである。アッセイは、原則として、キットに付属のプロトコルに従って行った。ただし、プレートはハーフエリアタイプの 96 ウェルの白色プレートを使用し、全ての試薬の使用量を通常の 96 ウェルプレートの場合の半量とした。ハーフエリア 96 ウェルプレートを使用することで、操作性を変えることなくデータポイント数を増やすことができ、高価な試薬の効率的な使用が可能であった。

④ フェンタニル類及びそれらの代謝物の薬理活性の測定

5種類のフェンタニル類（フェンタニル、アセチルフェンタニル、ブチルフェンタニル、テトラヒドロフラニルフェンタニル及びフラニルフェンタニル、図5（a））及びそれらの代謝物（図5（b））計35化合物のオピオイド μ 、 δ 及び κ 受容体に対するアゴニスト活性を前項と同様に測定した。各化合物の標準品は、本研究及び以前の研究において研究代表者が合成したものを用了。

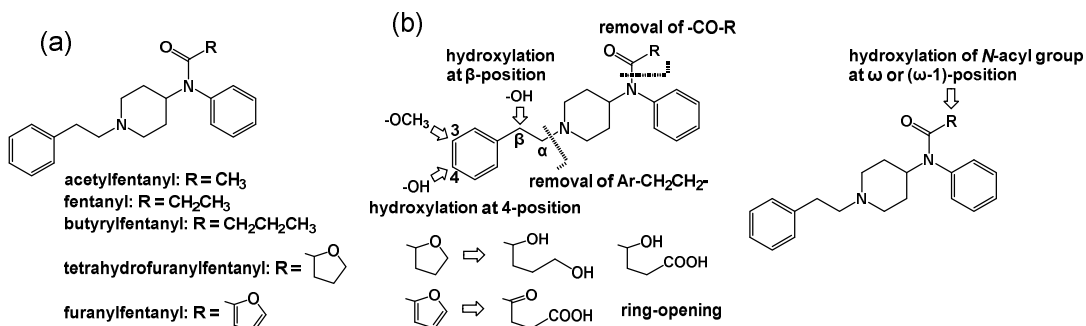


図5 (a)活性測定に用いたフェンタニル誘導体の化学構造；(b)主に代謝を受ける部位

4. 研究成果

(1) 新規合成オピオイド類の代謝様式の解明

フラニルフェンタニルと共に培養したヒト肝細胞の培養液を分析した結果、フラニルフェンタニルの代謝物として、4-ヒドロキシ体、 β -ヒドロキシ体、4-ヒドロキシ-3-メトキシ体及び開環カルボン酸体の存在が推定された。そこで、これらの代謝物の標準品を化学合成してデータを比較し、確実に同定した。これまでの海外の研究機関による報告では、フラニルフェンタニルの代謝物として、ジヒドロジオール体（上記開環カルボン酸体と同一分子量）が生成すると推定されていたが、本研究により、フラニルフェンタニルからジヒドロジオール体が生成することはなく、開環カルボン酸体が生成することが初めて確認された（図 6）。

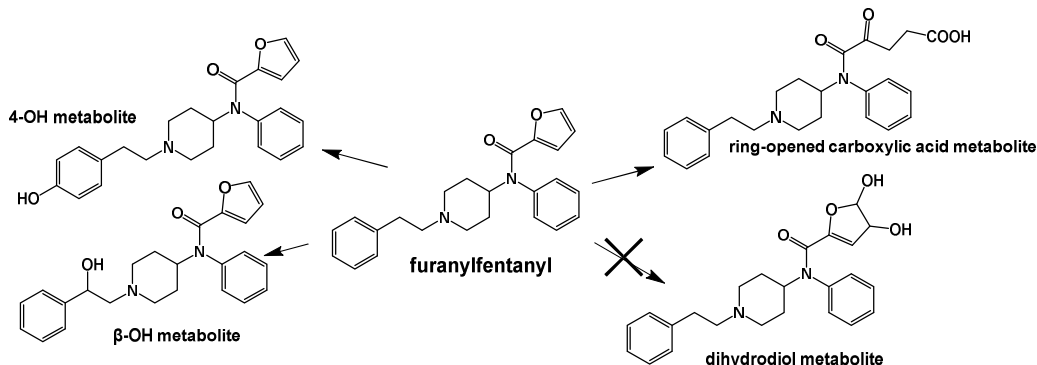


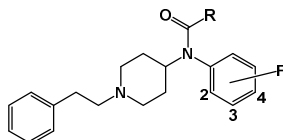
図 6 本研究で明らかとなったフラニルフェンタニルの主要代謝経路

(2) 合成オピオイド類及びそれらの代謝物の薬理活性の解明

① 本研究で合成したフェンタニル類及びニタゼン類の薬理活性の測定

合成したフェンタニル類 20 化合物のオピオイド μ 受容体に対するアゴニスト活性を表 1 に示す。

表 1 フェンタニル類のオピオイド μ 受容体に対するアゴニスト活性 (EC_{50} , nM)



	アセチル フェンタニル	フェンタニル	ブチル フェンタニル	イソブチル フェンタニル	メトキシアセチル フェンタニル
F \ R	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ OCH ₃
—	15	0.35	2.0	1.6	2.6
2-F	3.0	0.16	0.42	0.28	0.36
3-F	51	2.0	2.8	3.7	7.8
4-F	19	0.51	1.9	1.5	2.4

まず、置換基 R に着目すると、N-フェニル基におけるフッ素の結合状態が同じ化合物同士で比較した場合、いずれも R がエチル基の場合（フェンタニルに相当）に EC_{50} が最も小さく、すなわち活性が強いことが明らかとなった。また、R がメチル基の場合、活性が最も弱く、その他の 3 種については中間の活性を示した。一方、N-フェニル基上のフッ素置換の有無及び置換フッ素の位置に着目すると、同じ R 基の化合物同士で比較した場合、2 位にフッ素が結合した化合物が最も強い活性を示し、逆に、3 位にフッ素が結合した化合物は最も活性が弱かった。フッ素置換のない化合物及び 4 位にフッ素が結合した化合物は中間の活性を示した。最も活性の強い 2-フルオロフェンタニル (0.16 nM) と最も活性の弱い 3-フルオロアセチルフェンタニル (51 nM) では、約 300 倍の活性の違いが認められた。

本研究の結果から、フェンタニル類のうち、N-プロピオニル基を有するものや、N-フェニル基の 2 位にフッ素が結合したものは相対的に強い活性を有することが明らかとなり、薬物中毒の発生に特に注意が必要であることが示唆された。

次に、合成したニタゼン類 8 化合物のオピオイド μ 受容体に対するアゴニスト活性を表 2 に示す。

今回合成した化合物の中では、エトニタゼンが最も高い活性を示した (0.22 nM)。一方、ニトロ基の位置が異なる異性体 (6-NO₂ 体, イソ-ニタゼン類) は、対応するニタゼン類 (5-NO₂ 体) に比べ、大幅に活性が減弱した (十分の一以下)。イソ-ニタゼン類の活性に関する詳細な報告は本研究が初めてである。

表2 ニタゼン類のオピオイドμ受容体に対するアゴニスト活性 (EC₅₀, nM)

NO ₂ \ R	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
5-NO ₂	メトニタゼン	エトニタゼン	プロトニタゼン	イソトニタゼン
	1.7	0.22	0.84	0.59
6-NO ₂	イソ-メトニタゼン	イソ-エトニタゼン	イソ-プロトニタゼン	イソ-イソトニタゼン
	59	4.8	12	6.4

② フェンタニル類及びそれらの代謝物の薬理活性の測定

各種フェンタニル類及び代謝物のオピオイドμ受容体に対するアゴニスト活性の概要を図7に示す。図中の数値は、EC₅₀値の範囲を示す。また、NAは100 nMでも活性が認められなかったことを示す。

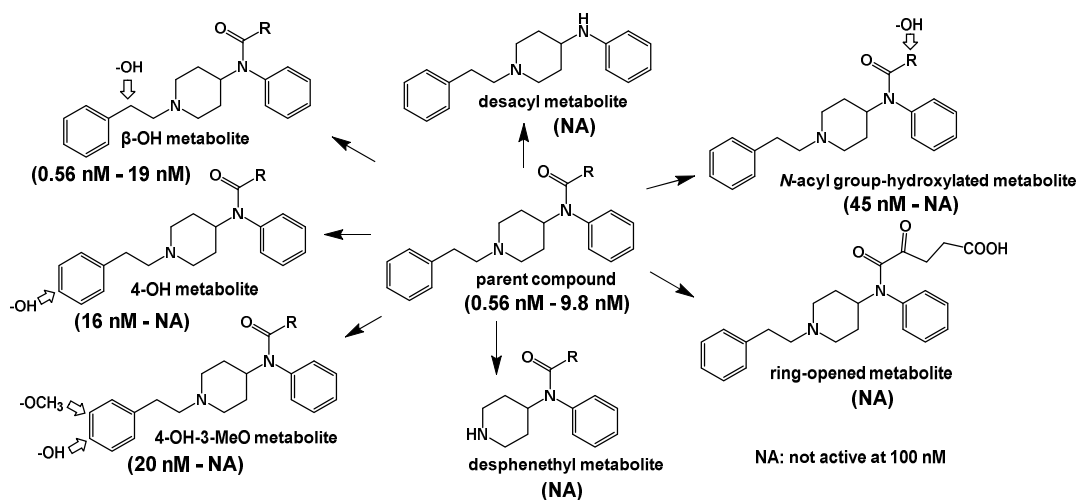


図7 フェンタニル類及びそれらの代謝物のオピオイドμ受容体に対するアゴニスト活性 (EC₅₀, nM)

フェンタニル類の親化合物については、いずれも活性が認められたが (0.56 nM - 9.8 nM)、代謝物については、多くの場合、活性が大幅に減弱した。特に、フェニルエチル基やN-アシル基が脱離したり、N-アシル基が代謝を受けて極性基が導入されると活性が著しく低下した。一方、β-ヒドロキシ体については、例外的に親化合物と遜色ない活性を有していた。ただ、これまでの様々な研究報告から、フェンタニル類摂取後の体内でのβ-ヒドロキシ体の生成量は多くないものと考えられることから、β-ヒドロキシ体の中毒への寄与は大きくないものと推定された。

一方、いずれの親化合物及び代謝物も、オピオイドδ及びκ受容体に対して明確なアゴニスト活性を示さなかった。

(3) 結論

本研究では、(1)新規合成オピオイドの代謝様式の解明、及び(2)合成オピオイド類及びそれらの代謝物の薬理活性(毒性)の解明、の2つのテーマについて、研究を行った。

(1)については、新鮮ヒト肝細胞を用いた研究により、新規フェンタニル誘導体であるフラニルフェンタニルの代謝様式について明らかにした。得られた知見は、フラニルフェンタニルの摂取証明において、有効に活用されることが期待される。また、海外で以前に報告されたフラニルフェンタニル代謝物の構造が誤っている可能性のあることを指摘し、化学合成した標準品により、新規代謝物を確実に同定したことは、学術的に重要な成果であった。

(2)については、市販のオピオイド受容体アゴニスト活性測定キットを用いたアッセイの最適化を行い、様々な化合物のオピオイド受容体に対するアゴニスト活性を再現よく測定する方法を確立した。最適化したアッセイにより、フェンタニル類及びそれらの代謝物並びにニタゼン類の活性を測定し、いくつかの構造活性相関に関する知見を得た。本研究で得られた知見は、合成オピオイド類による中毒原因を探る上で、有効に活用されるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanamori Tatsuyuki, Okada Yuki, Segawa Hiroki, Yamamuro Tadashi, Kuwayama Kenji, Tsujikawa Kenji, Iwata Yuko T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Agonistic activity of fentanyl analogs and their metabolites on opioid receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 156～162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-021-00602-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

1. 著者名 Kanamori Tatsuyuki, Okada Yuki, Segawa Hiroki, Yamamuro Tadashi, Kuwayama Kenji, Tsujikawa Kenji, Togawa-Iwata Yuko	4. 巻 39
2. 論文標題 Detection and confirmation of the ring-opened carboxylic acid metabolite of a new synthetic opioid furanylfentanyl	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 114～122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-020-00546-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Kanamori Tatsuyuki, Okada Yuki, Segawa Hiroki, Yamamuro Tadashi, Kuwayama Kenji, Tsujikawa Kenji, Iwata Yuko Togawa	4. 巻 44
2. 論文標題 Evaluation of Agonistic Activity of Fluorinated and Nonfluorinated Fentanyl Analogs on μ -Opioid Receptor Using a Cell-Based Assay System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 159～161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Kanamori Tatsuyuki, Okada Yuki, Segawa Hiroki, Yamamuro Tadashi, Kuwayama Kenji, Tsujikawa Kenji, Iwata Yuko T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Analysis of highly potent synthetic opioid nitazene analogs and their positional isomers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Testing and Analysis	6. 最初と最後の頁 449～457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dta.3415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 金森達之, 岡田侑己, 瀬川尋貴, 山室匡史, 桑山健次, 辻川健治, 岩田祐子
2. 発表標題 各種フェンタニル系薬物の代謝物のオピオイド μ 受容体に対するアゴニスト活性の評価
3. 学会等名 日本法中毒学会第40年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金森達之, 岡田侑己, 瀬川尋貴, 山室匡史, 桑山健次, 辻川健治, 岩田祐子
2. 発表標題 セルベースアッセイによるフルオロ-フェンタニル類異性体のオピオイド受容体活性化能の評価
3. 学会等名 日本法中毒学会第39年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuyuki Kanamori, Yuki Okada, Hiroki Segawa, Tadashi Yamamuro, Kenji Kuwayama, Kenji Tsujikawa, Yuko T Iwata
2. 発表標題 Metabolism of furanylfentanyl in fresh human hepatocytes: Detection and confirmation of furan ring-opened carboxylic acid metabolite
3. 学会等名 AAFS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuyuki Kanamori, Yuki Okada, Hiroki Segawa, Tadashi Yamamuro, Kenji Kuwayama, Kenji Tsujikawa, Yuko T Iwata
2. 発表標題 Analysis of highly potent synthetic opioid nitazene analogs and their positional isomers
3. 学会等名 PITTCN2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------