

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2015

課題番号：15H06628

研究課題名(和文)危険ドラッグ関連死の病態と薬物代謝に関する研究

研究課題名(英文)Study on the pathogenesis and drug metabolism of designer drug-related deaths

研究代表者

前田 秀将 (MAEDA, Hideyuki)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60407963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：危険ドラッグの一つ25B-NBOMeの服用後、過高熱、横紋筋融解症を伴うserotonin症候群が誘発され死亡した第一例の解剖と薬物分析に関する報告を行った。そこで、ラットに5ng/kg～10mg/kgの25B-NBOMeを腹腔投与したが、過高熱も横紋筋融解症も再現できなかった。しかし、Zebrafishに投与すると、横紋筋融解症を確認できたので、今後、その分子機構を解明する予定である。

研究成果の概要(英文)：We reported on the first lethal case of 25B-NBOMe, a law-evading (dangerous) drug, which presented with symptoms of serotonin syndrome including hyperthermia and rhabdomyolysis. Accordingly, we administered 25B-NBOMe at 5ng/kg～10mg/kg i.p. in rats, but could not reproduce the syndrome. However, we could reproduce rhabdomyolysis in zebrafish. Therefore, we planned to clarify the mechanism underlying the rhabdomyolysis.

研究分野：法医学

キーワード：危険ドラッグ 横紋筋融解症 セロトニン症候群

### 1. 研究開始当初の背景

MDMA、methamphetamine 等の違法薬物に加えて、最近、危険ドラッグの中毒例が急増している。危険ドラッグのひとつである 25B-NBOMe・25I-NBOMe を主成分としたもの服用後、過高熱、横紋筋融解症が誘発され死亡した事例の解剖と薬物分析を行った。2013 年、N-methoxybenzyl (NBOMe) 誘導体 2-(4-Bromo-NBOMe) (25B-NBOMe), 2-(4-Iodo-NBOMe) (25I-NBOMe) 等を米国は取り締まり対象とした。25B・25I-NBOMe 関連の解剖報告は 2 例あり、いずれも外因死であった。薬物服用直後から過高熱に陥り、純粋に 25B・25I-NBOMe 中毒による死亡と確認された過去に報告例のない事例を解剖した。肝・腎障害の血液所見、横紋筋融解組織所見に加え、心筋過収縮像、肺鬱血水腫より急性心不全と推定し、腎の myoglobin 染色等の検査を進め、尿細管壊死より急性腎不全と推定した。

Serotonin 症候群は、抗鬱剤 Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) や MDMA による serotonin 増加により誘発され、併用で重症化する。serotonin 5-HT<sub>2A</sub> 受容体刺激作用が強い 25B・25I-NBOMe は本症候群を起こしやすいと思われるが、その証拠はなく、動物実験が待たれる。一方、25B・25I-NBOMe と SSRI 等の serotonin 作動薬との相互作用より serotonin 症候群が惹起される可能性もある。自験例では、死亡までの臨床経過が詳細に記録され、経時的に採取された血中・尿中の 25B・25I-NBOMe と serotonin の濃度が測定できる。そのため、薬物致死濃度と代謝動態を知り、血中 serotonin 濃度測定による serotonin 症候群の診断基準を確立し、病態との関連性を解明できると期待される。

Serotonin 症候群には、頻脈、高血圧、過高熱、筋強剛、代謝性アシドーシス、横紋筋融解症が頻発する。鑑別すべき悪性高熱症で

は、骨格筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>放出 channel (Ryanodine Receptor, RyR) の遺伝子変異を背景に RyR の Ca<sup>2+</sup>過剰放出より筋過収縮、代謝性 acidosis、過高熱が誘発される。また、心不全では RyR の過リン酸化を背景に小胞体の Ca<sup>2+</sup>過剰放出より致死性不整脈が起こりやすい。私達は、methamphetamine による過高熱は、交感神経活性化・骨格筋 RyR の Ca<sup>2+</sup>過剰放出による過収縮によることを見出した (Eur J Pharmacol. 1998;363:107; J Pharmacol Exp Ther.1993;267:1538)。これらの知見より、RyR や serotonin 関連分子の発現量やリン酸化、serotonin 関連分子・遺伝子に異常がある人では、危険ドラッグにより、組織 serotonin、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の過上昇により serotonin 症候群、横紋筋融解症、突然死が惹起されやすい可能性がある。

危険ドラッグによる死亡例に対し、その死因、生体内で起こる作用について検討することは重要な研究課題である。

### 2. 研究の目的

serotonin 過剰による serotonin 症候群、骨格筋 Ca<sup>2+</sup>過剰による横紋筋融解症が発症の有無を検証し、臨床経過と薬物濃度測定値を比較する。この結果に基づきラットに 25B・25I-NBOMe を投与し、経時的に採取した試料の測定値より致死濃度を推定し、測定法を確立する。死亡事例の serotonin 関連分子を調べ、病態への寄与を調べる。さらに、serotonin 濃度を上昇させる可能性のある抗鬱剤や中枢興奮剤との相互作用が病態を増悪するか検討する。

### 3. 研究の方法

ラットに 25B・25I-NBOMe を投与し、経時的に採取した血液、尿、臓器の薬物・代謝物濃度を測定して、組織・血中 serotonin 定量が serotonin 症候群の診断に役立つか調べる。一方、Ca<sup>2+</sup>過剰や stress の指標となる心筋・骨格筋 Ca<sup>2+</sup>channel のリン酸化を調べ、培養細

胞に 25B・25I-NBOMe を作用させ、Ca<sup>2+</sup> 過剰放出を確認する。また、本症例の serotonin 関連分子の遺伝子変異を検討する。さらに、25B・25I-NBOMe と、serotonin 濃度を上昇させうる抗鬱剤 Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI)、中枢興奮剤 MDMA、methamphetamine の相互作用が病態を増悪する可能性を調べる。

#### (1) ラット投与量の決定

中毒症例に関する既報では、尿中 25-NBOMe 及び類似体の尿中濃度は 2~8 ng/mL で血中濃度の 10 倍程度であることから、25-NBOMe 類似体の中毒量を血中 0.5 ng/mL、尿中 5 ng/mL 程度と想定する。ヒト methamphetamine (MAH) 血中致死域は 10 µg/mL 以上であることから、全身投与による致死量は 10mg/Kg 程度と推定される。一方、ラットの MAH の LD<sub>90</sub> は 100 mg/kg であり、ヒトの推定致死量の 10 倍程度である。致死濃度は中毒濃度の 10 倍、ラットでヒトの 10 倍と仮定し、MAH の結果から類推すると、ラットの 25-NBOMe 類似体の致死濃度は、血中 50ng/mL = 0.05 µg/mL であり、体重 1Kg 当たり 0.05mg、体重 250g のラットでは、12.5 µg/ラット (BW=250g) 程度と推定されるが、25B・25I-NBOMe の動物実験に関する報告はない。そして、ヒトの 25-NBOMe 類似体測定例では、尿中濃縮と急激な減少から、代謝物が死に寄与する可能性があり、致死濃度は尿中濃度を基に推定すべきかもしれない。そしてラットの中毒量・致死量を推定し、その量の 25B, 25I-NBOMe (輸入) をラットに投与して、体温、心電図、血中 creatine kinase 値、生存曲線を観察して、病態との関連を知り、ラットの中毒量、致死量を推定する。

#### (2) 致死濃度の決定

サーモクロン SL タイプ温度計をラット

の腹腔内に挿入し、体温を記録する系、動物用心電図モニターを装着して、心電図を記録する系を確立する。ラットに、これまでの実験で推定された致死量、及びその前後の濃度の 25B・25I-NBOMe を投与して、随時、心電図検査、体温測定を施行し、生存状況を確認する。n を十分増やして Kaplan Myer 曲線を描き、致死濃度を推定する。死亡後は速やかに解剖して、死因を推定し、臓器を採取して、重量を測定および、通常組織検査に加えて、横紋筋融解症 (随伴する腎不全)・心筋梗塞の検出のため myoglobin 免疫染色を行い、肺重量、担鉄 macrophage (鉄染色) より心不全を推定する。また、血液生化学検査により、横紋筋融解症 (CK)、腎不全 (BUN)、心不全 (NT-prpBNP)、炎症 (CRP) 等について推定する。

死亡後は速やかに解剖して、死因を推定し、臓器を採取して、重量を測定および、通常組織検査に加えて、横紋筋融解症 (随伴する腎不全)・心筋梗塞の検出のため myoglobin 免疫染色を行い、肺重量、担鉄 macrophage (鉄染色) より心不全を推定する。また、血液生化学検査により、横紋筋融解症 (CK)、腎不全 (BUN)、心不全 (NT-prpBNP)、炎症 (CRP) 等について推定する。

#### (3) Serotonin 症候群、横紋筋融解症の診断と分子機構の推定

ラットに中毒量の 25・25I-NBOMe を投与して、血中濃度のピーク時に安楽死させ、血液、尿、脳、心臓、骨格筋を採取し、LC-MS/MS を用いて原薬と主要代謝物を測定する。また、HPLC を用いて、serotonin を測定し、western blot 法により、血液、臓器中の serotonin 受容体・transporter を定量して、serotonin 症候群診断の有効性を検討する。

血中 CK-MB, CK-MM の測定より心筋障害、

横紋筋融解について検討する。肝障害、腎障害を、ALT/AST、BUNにより推定する。小胞体 Ca<sup>2+</sup>放出 channel (Ryanodine Receptor) は、adrenalin 受容体刺激・cAMP 依存性 kinase (PKA)活性化により Serine 2908 が、Ca<sup>2+</sup>、calmodulin 依存性 kinase (CaMKII) 活性化により Ser2914 がリン酸化され、リン酸化特異抗体を用いた western blotting で検出できる。一般に、stress により PKA が、細胞内 Ca<sup>2+</sup>過剰により CaMKII が活性化される。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup>過剰は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>依存性 phosphatase である calcineurin を脱リン酸化させて、細胞死を促し、Ca<sup>2+</sup>依存性 protease である calpain を活性化し、細胞骨格蛋白 fodrin を分解する結果、細胞膜を破綻させる。CaMKII リン酸化、calcineurin 脱リン酸化、fodrin 分解を western blot 解析することにより、ラットの心筋や骨格筋の細胞内 Ca<sup>2+</sup>過剰や細胞死について検討する。

血中・臓器 (心筋、骨格筋) serotonin 過剰が確認できた場合、serotonin 受容体拮抗剤をラットに投与した後、25・25I-NBOMe を投与して、過高熱、心筋障害、横紋筋融解、心電図異常に対する影響を調べる。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup>過剰が明らかになった場合、RyR 阻害剤 dantrolene 投与後、ラットに 25-NBOMe、25I-NBOMe を投与して、過高熱、心筋障害、横紋筋融解、心電図異常に対する影響を調べる。

#### (4) 薬物相互作用の検討

25-NBOMe または 25I-NBOMe と、抗鬱剤 SSRI である fluvoxamine、中枢興奮剤 MDMA の相互作用により、過高熱、心筋障害、横紋筋融解症、不整脈、そして突然死が惹起される可能性を調べる。血中・組織中の serotonin 値、serotonin 関連

分子を定量し、serotonin 症候群につき検討する。

(5) 研究が当初の計画通り進まなかった場合の対応

予想外の結果が出た場合、速やかに更なる文献的考察をして修正し、実験を遂行する。具体的にはラットの薬剤投与の場合、もしラットが予定投与量においても死亡しなかった場合は薬剤投与量を 10 ~ 100 倍に上げ投与する。随時体温等の生理学的データを取り、安楽死後の組織変化を観察する。最少予定投与量において死亡した場合は、さらに投与量を下げ、前述のとおり観察し、修正する。

#### 4. 研究成果

コントロール群として溶媒 (生食) 投与、セロトニン症候群モデル群として 5-HT およびクロリギリン (モノアミン酸化酵素阻害薬) を対象として同時に作成した。適切投与量を決定するために 5ng/kg ~ 10mg/kg まで濃度を振って投与したところ死亡ないし高熱を発症するラットはなかった。しかし、25B・25I-NBOMe 投与によってラットの行動異常 (凶暴性等) が観察されたものがあった。また、ここで投与方法及び物質溶解方法について、文献的考察も含め、再度修正する必要があると考える。別種の危険ドラッグ (MDMB-CHMICA) によりテールカフにより血圧を継時的に測定したモデルでは投与直後に同様な行動異常があり、血圧の上昇及び脈拍が上昇し、数分で血圧の正常化及び除脈が認められた。これは 25B・25I-NBOMe 投与モデルでも同様な反応が起こっている可能性がある。血圧上昇に伴う代償作用による脈拍の低下が考えられるが今後さらなる分析が必要である。また、Zebrafish に投与すると、横紋筋融解症を確認できたので、今後、その分子機構を解明する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

前田秀将, 花尻瑠璃, 内山菜穂子, 小林正宗, 栗岩ふみ, 永嶋瑛利香, 原修一, 吉田謙一, 合成カンナビノイド成分を含む危険ドラッグによる急死例, 第84回日本法医学学会学術関東地方会 (2015, 10.24 東京)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 秀将 (MAEDA, Hideyuki)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60407963

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: