

令和元年6月24日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05274

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた危険ドラッグの網羅的病態解析に関する研究

研究課題名(英文) Systematic analyses on the pathogenesis of neuro-psychoactive substances using zebrafish

研究代表者

吉田 謙一 (Yoshida, Ken-ichi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：40166947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,690,000円

研究成果の概要(和文)：Cathinone系薬物25B-NBOMeは、ゼブラフィッシュ(Zf)の骨格筋にセロトニン2A受容体依存性に横紋筋融解症を誘発した。他にない動物モデルとしての有効性を示した。合成性カンナビノイド(CB)系薬物であるMDMB-CHMICAをラットに投与すると、CB1受容体依存性に徐脈、血圧上昇を認めた。Zf用の画像解析ソフトを利用して、MDMB-CHMICA投与後、catalepsy様無動化の後、刺激により“転げまわり”運動を誘発した。Zfに投与したが、行動異常を再現できなかった。Zfの明暗交代刺激反応を観察する系を確立し、行動異常、突然死を惹起する別の2種の合成CBについて実験を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成cannabinoid (CB)系やcathinone系等の危険ドラッグは、多数の類似体が出現し、異常行動による事故や突然死を誘発し、深刻な社会的な問題を生じる。各々の薬物の薬理作用をげっ歯類動物で検証するには、多くの動物、多くの条件について検討しなければならず、現実には検証不可能である。本研究を通して、多数の動物個体につき、同時に多数の条件につき、短期間に危険ドラッグの行動異常、横紋筋融解症、死亡率に対する効果を検証できるゼブラフィッシュを用いたスクリーニング系の確立が達成できた。今後、新たに出現するであろう危険ドラッグの致死性、薬理作用、病態を速やかに検証できる点に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：A synthetic cathinone 25B-NBOMe induced rhabdomyolysis in zebrafish (Zf) skeletal muscle in serotonin 2A-receptor-dependent manner. This is a unique animal model of rhabdomyolysis.

A synthetic cannabinoid (CB) drug MDMB-CHMICA induced transient bradycardia and hypertension in rats. MDMB-CHMICA also triggered catalepsy-like immobilization, followed by thrashing behavior, in CB1-dependent manner. MDMB-CHMICA did not reproduce the abnormal behavior. To recapitulate stress, we have tested tapping and lighting in Zf. Afterwards, we have undertaken experiments on two other synthetic CB drugs.

研究分野：法医学

キーワード：危険ドラッグ 合成カンナビノイド 薬物スクリーニング ゼブラフィッシュ 毒性 行動異常 横紋筋融解症 突然死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグの中でカンナビノイド (CB) と構造が類似した化合物が次々に合成され、幻覚や異常行動から危険運転や突然死を惹起し社会問題化されている。本研究の前段階として合成 CB 系薬物の 1 つである MDMB-CHIMICA をラットに投与し、その生理学的変化 ( 血圧、脈拍、体温 )、血液生化学的検査、組織学的検査および行動を観察した。また CB 受容体 (CB1 および CB2) のアンタゴニストを投与し同様に観察した。その結果、MDMB-CHIMICA 投与後、顕著な除脈が認められた。これらは CB1 レセプターアンタゴニストが CB2 レセプターアンタゴニストより強く抑制していることを示す。行動観察において投与後約 5 分間はカタレプシー様に無動となり、その後小刺激によって四肢伸展しながら転げまわるなどの異常行動が観察された。これらの行動異常のメカニズムを分析することによって薬剤の危険性、また、複数薬剤の相互・相乗作用について分析することと、未知の薬剤のスクリーニングシステムの確立を目指す。

## 2. 研究の目的

MDMB-CHIMICA をラットに投与することによって血圧・脈拍等の生理学的変化、また、行動異常を観察し可視的に測定することができた。そこで、安価で小さいながら、生体で横紋筋組織異常を観察でき、同時・多数・迅速な薬毒物検索が可能なゼブラフィッシュ (ZF) を用いて筋組織異常の他、生理学的変化、行動異常を観察し分析する。また、未知の薬剤におけるスクリーニングシステムの構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

SD ラット：6 週齢ラットに 1% セボフルランで麻酔をかけ薬剤を腹腔内投与。投与前、投与直後、5 分おきに 30 分まで血圧、脈拍を測定。また、独自で制作した観察箱に入れ上方から行動観察をビデオカメラで動画撮影し分析した。また、ZF でスクリーニング後、その薬剤をラットに投与し血液生化学検査及び生体サンプルを分析する。

ゼブラフィッシュ：野生型 ZF を交配し、受精卵を入手。28°C にセットしたインキュベーターで孵化させ、生後 4 日目に 96 穴プラスチックプレートに各 1 匹ずつ ZF の稚魚を入れる。コントロールの他、薬剤溶媒および濃度を振った薬剤を投与し、30 分馴化させたのち、ダニオビジョン® (行動解析装置) にセットし、光刺激または打撃刺激を加え観察する。

## 4. 研究成果

初年度は SD ラットに合成性カンナビノイド (CB) 系薬物である MDMB-CHIMICA を投与し、その生理学的変化 ( 血圧、脈拍、体温 )、血液生化学的検査、組織学的検査を行い観察した。また、ラットにおいては薬剤投与後約 5 分間カタレプシー様の状態となり無動となるが小刺激を与えると“ころげまわる”異常行動をとることが観察された。これを可視化し、カンナビノイドのアンタゴニスト CB1 および CB2 を用いその行動異常への影響を調べた。MDMB-CHIMICA は CB1 レセプターに優位に働いていることが分かった。これについて論文作成した。また、ゼブラフィッシュにおいては法医学実務において横紋筋融解が発症し死亡した事例を経験し、その時使用していた 25B-NBOMe を ZF に投与したところ横紋筋の融解を観察することができた。これにおいても論文報告をしている。

また、横紋筋融解を起こすと思われる危険ドラッグにおいて薬剤濃度によって ZF の行動変化が観察された。また光刺激を加えることで薬剤の各濃度において行動に顕著な変化を認めることができた。横紋筋融解においては ZF を用い危険ドラッグ成分 25B-NBOMe にて横

紋筋融解を観察できたがラットにおいては観察できなかった。現在その行動とメカニズムについて引き続き検討中である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Maeda H, Nagashima E, Hayashi Y, Kikura-Hanajiri R, Yoshida K. MDMB-CHMICA induces thrashing behavior, bradycardia, and slow pressor response in a cannabinoid receptor-1 (CB1)- and CB2-dependent manner in conscious rats. *Forensic toxicol.* 2018; 36: 313-319. (査読あり)
2. Maeda H, Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Nagashima E, Yoshida K. AB-CHMINACA-induced sudden death from non-cardiogenic pulmonary edema: A case report. *Clin toxicol*, 2017; 14: 1-3. doi: 10.1080/15563650.2017.1340648. (査読あり)
3. Kawahara G, Maeda H, Kikura-Hanajiri R, Yoshida K, Hayashi Y. The psychoactive drug 25B-NBOME recapitulates rhabdomyolysis in zebrafish larvae. *Forensic toxicol.* 2017; 35(2):369-375 doi: 10.1007/s11419-017-0366-9. Epub 2017 Apr 18. (査読あり)

### 〔学会発表〕(計 10 件)

1. 蓮見昭洋、前田秀将、吉田謙一他、ゼブラフィッシュモデルによるハロペリドール誘導型カタレプシーの検証及び、カンナビジオール介入による行動への影響 第 87 回日本法医学会学術関東地方集会 2018.11 (東京)
2. 川原玄理 前田秀将、吉田謙一、林由起子他、麻薬成分 25D-NBOMe を用いた横紋筋融解症ゼブラフィッシュモデル 第 181 回東京医科大学医学会総会ポスター発表 2018.6 (東京)
3. Yoshida KI, Maeda H, et. al., A new psychoactive designer drug 2-(4-Bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-N-Benzyl-substituted phenethylamine (25B-NBOME) induces rhabdomyolysis in zebrafish: A new mode for rhabdomyolysis and serotonin syndrome, 10th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM) 2017.9 (ドイツ)
4. Yoshida K, Maeda H, et. al., A case of fatal intoxication due to the new designer drug 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-(2-methoxybenzyl)ethanamine (25B-NBOME), 10th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM) 2017.9 (ドイツ)
5. 前田秀将、永嶋瑛利香、吉田謙一他合成カンナビノイド系薬物 MDMB-CHMICA は、ラットに徐脈・昇圧作用と行動異常を惹起する、日本法中毒学会 第 36 年会 2017.05 (東京)
6. 吉田謙一、前田秀将他 25B-NBOME はゼブラフィッシュに横紋筋融解症を惹起する, 日本法中毒学会 第 36 年会 2017.05 (東京)
7. 川原玄理、前田秀将、吉田謙一他 麻薬成分 25B-NBOME はゼブラフィッシュに横紋筋融解症を惹起する, 日本筋学会第 3 回学術集会 2017.08 (東京)
8. 川原玄理、前田秀将、吉田謙一他 25B-NBOME 投与による横紋筋融解症モデルフィッシュ, 第 179 回東京医科大学医学会総会 2017.06 (東京)
9. Maeda H, Yoshida K et. al., Cannabinoid-induced Bradycardia in Rats Is Mediated by CB1

Cannabinoid Receptors 第 178 回東京医科大学医学会総会 2016.11 (東京)

10. 永嶋瑛利香、前田秀将、吉田謙一他カンナビノイド系危険ドラッグ(MDMB-CHMICA)に誘導される毒性・病態に関する研究 第 85 回日本法医学会学術関東地方集会 2016.10 (神奈川)

〔図書〕(計 1 件)

1. 吉田謙一、前田秀将 INTENSIVIST 2017: 9 (3) : 638-640 (特集:中毒). 分著

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 川原 玄理

ローマ字氏名: Genri Kawahara

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40743331

研究分担者氏名：林 由起子  
ローマ字氏名：Yukiko Hayashi  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：主任教授  
研究者番号（8桁）：50238135

研究分担者氏名：原 修一  
ローマ字氏名：Shuichi Hara  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：70208651

研究分担者氏名：前田 秀将  
ローマ字氏名：Hideyuki Maeda  
所属研究機関名：東京医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：60407963

研究分担者氏名：花尻 瑠理  
ローマ字氏名：Ruri Hanajiri  
所属研究機関名：国立医薬品食品衛生研究所  
部局名：生薬部  
職名：室長  
研究者番号（8桁）：10224916

## (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。