

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K19703

研究課題名（和文）薬物を検出し難い合成カンナビノイド系薬物中毒の病態解析に関する研究

研究課題名（英文）Analytical research on pathogenesis of undetectable synthetic cannabinoids

研究代表者

吉田 謙一（Yoshida, Ken-ichi）

東京医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40166947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：高スループット行動解析装置（Danio-vision）を用いて、危険ドラッグ等を投与した後、ゼブラフィッシュ（Zf）の行動を同時・多数・経時的に記録・解析し、死亡率を推定できる実験系を確立した。これを用いて、大麻（CB）成分の一つカンナビジオール（CBD）、及び、興奮性薬物カフェインを投与した後、明暗刺激を反復し、行動、及び、生存率に対する影響を観察した。本研究で確立したZfの実験系が、未知の物質の不安、学習行動、運動障害の評価、そして、致死濃度の予測に、迅速性、効率性、簡便性及び再現性の観点から有用であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物の行動、生存率に対する研究は、げっ歯類を用いて行われてきた。しかし、再現性と統計的有意性の確認のため、多数の動物を殺さなければならなかった。ハイスループット行動解析装置は、ゼブラフィッシュの行動や生存率に対する薬物の効果や毒性を、短期間に多数・同時に再現性よく記録・分析できることを示した。今後、法医学分野から、中毒学・病態生理学に関する基礎研究を発信できる強力な武器となりうる。

研究成果の概要（英文）：Using high-throughput analyzing system (Danio-vision), we have established the animal experiment system that enables us to simultaneous-multi-temporal record and analysis of zebrafish behaviors encompassing anxiety, excitement, habituation, and acclimatization, as well as activity and survival. We have confirmed the usefulness of the system in the analysis of behavior and survival with respect to rapidity, efficacy, simplicity and reproducibility.

研究分野：法医学

キーワード：薬物中毒 ゼブラフィッシュ 合成カンナビノイド カフェイン 行動薬理学 ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグは、法規制を逃れるため、次々に新たな誘導体が合成され、その薬理作用、毒性と病態が分からないまま、アンダーグラウンドで流通しているため、急死する事例が続いていた。

本研究を始めた時期、危険ドラッグ流行の最盛期は過ぎていたが、代表研究者は、複数の危険ドラッグによる急死例を法医解剖する機会に恵まれ、症例報告を 2 つほど発表していた。しかし、薬理作用、病態、毒性の実態がよく知られていないので、動物実験を行う必要があった。

ゼブラフィッシュ (Zf) は、ラットやマウスより、多くの点で利点があり、げっ歯類に代わるモデル動物として注目されてきていた。既に、向精神薬等の薬物やアルコールの作用を解析するのに、Zf を利用した研究の論文が増加してきていた。しかしながら、Zf が危険ドラッグに関する研究に使用されたことはなかった。

2. 研究の目的

危険ドラッグ中毒の病態を解析するのに、ゼブラフィッシュ (Zf) の高スループット行動解析装置 (Danio-vision) を用いた実験系を確立することを目指した。

3. 研究の方法

危険ドラッグ等の向精神薬を投与した後、個々のウェルに入れたゼブラフィッシュ (Zf) 幼魚の行動を高スループット行動解析装置 (Danio-vision) を用いて、同時・多数・経時的に記録・解析できる実験系の確立を目指して、様々な実験条件を試した。また、死亡率の推定、心拍数の測定を試みた。

Zf 幼魚は、暗い環境を好み、明るい環境では不安を感じるといわれている。そのような Zf を様々な時間、消灯、点灯を繰り返し、水泳距離 (行動) を経時的に記録・分析した。さらに、Zf を様々な濃度の薬物に暴露した上で、行動を記録・解析し、明暗反復の行動に対する影響を記録・解析した。その後、薬物のない水で 24 時間飼育した後、再度、薬物に暴露した後、行動を記録・分析した。

これとは別に、薬物暴露後の生存率や形態を実態顕微鏡下に観察し、記録した。

4. 研究成果

幻覚作用のある危険ドラッグ *N*-Benzyl-substituted 2C class phenethylamines (NBOMes) による致死横紋筋融解症事例を解剖した。そこで、Zf を NBOMes に暴露して、横紋筋融解症を再現し、その病態にセロトニン 5-HT_{2A} 受容体が寄与することを解明した (Kawahara G ら, 2020)。

次に、合成カンナビノイド (sCB) の一種 AB-CHMICA による急死事例では、薬物代謝が迅速で、死体資料からの親物質検出に難儀したという、代謝物を認めた。という、解剖所見として、肺の鬱血・水腫・出血しか認めず、急性心不全か呼吸不全の寄与を推定したにとどまった。この経験を基に、まず、ラットの腹腔内に AB-CHMICA を投与して代謝物変化を調べた。その結果、ラットでは、ヒト急死例における迅速な代謝と臓器移行の知見は確認できなかった。

さらに、Zf 行動解析装置を利用して、AB-CHMICA による異常行動と急死の機序を解明する予定であった。しかし、改正された薬事法による規制から、薬物の入手が困難となったため、研究の続行が困難となった。そこで、研究対象となる代替薬を探した。そして、大麻 (CB) 成分の一つであるが、入手可能なカンナビジオール (CBD) に注目した。

カンナビジオール (CBD) を Zf に投与した後、光刺激のある“明期”、ない“暗期”を交互に反

復した。明暗転換時の行動変化は、ストレス・不安レベルを反映し、明暗変換と暗明変換で異なり、有用な行動指標とされる。CBD による”ストレス負荷”の後、薬物を除去し、投与 24 時間の”離脱後”、同じ明暗刺激に暴露した。活動量は、投与後、濃度依存的に減少したが、離脱後には、高濃度で活動量が増加した。明暗刺激が進むにつれ活動量が減少する“馴化”は、CBD 低濃度では、投与後・離脱後ともに増強した。高濃度暴露では、馴化はしないで活動量が低下した。離脱後には、高濃度ほど馴化が低下し、高活動量状態を維持した (Hasumi ら、2020)。

明暗転換時の行動変化は、ストレス・不安レベルを反映する行動指標とされているが、CBD を用いた本研究で、そのことが裏付けられた。さらに、これらの現象の病態生理的意義を理解するには、今後、ストレス指標とされるコルチゾールの測定、ストレス顆粒と呼ばれる Zf の体内構造物の変化を観察すること、加えて、興奮作用のある覚醒剤やコカイン、鎮静作用のあるベンゾジアゼピン等の作用を観察する必要がある。

ハロペリドールをはじめとする定型抗精神病薬は、ドーパミン D2 作動性ニューロン障害による薬剤性パーキンソン病等の錐体外路系運動障害が問題視されてきた。CBD は、ハロペリドールによる運動障害から Zf を回復させたことから、定型抗精神病薬による薬剤性パーキンソン病等の治療に利用できる可能性が示された (Hasumi ら、2023)。

カフェインは、大量摂取すると突然死することがあるが、機序は不明であった。そこで、Zf にカフェインを投与して、生存率と行動を観察した。

カフェインは、容量依存性に徐脈と死を誘発したが、処置 4 時間後にカフェインを除去すれば、24 時間後の生存率は改善された。Zf の致死性徐脈に対するカフェイン濃度は、死亡症例の血中濃度の 2~5 倍程度と近かった (Maeda ら、2020)。この結果から、本実験系が、未知の物質の致死濃度の予測に有効であることが示された。また、Zf の徐脈は、抗精神病薬が QT 延長作用から致死性不整脈を惹起する現象のスクリーニングに使えることが知られている。今後、薬物の催不整脈作用のスクリーニングに利用できる可能性がある。

さらに、カフェイン存在下、5 回連続、各々 15 分の明暗刺激に幼魚を暴露し、水泳距離分析により、暗転時の行動増加と明転時の行動減少、各々における下向き、上向きのピークが、不安行動を反映している可能性を明らかにした。この結果から、本実験系が、未知の物質の不安や学習行動の評価に有用であることが示された (Maeda ら、2021)。

血中 microRNA (miRNA) は、21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA であり、尿的 mRNA に結合して不安定化し、蛋白翻訳を抑制する。そのことを通して、発生、細胞増殖・分化、細胞死、代謝等、多様な生命現象を制御する。いっぽう、多様な疾患で増加あるいは減少すること、そして、(生体・死体) 血中で安定性が高いことから、疾患マーカーとなりうることから注目されている。従来の研究により、心不全、心肥大、心筋梗塞に関連した miRNA が多数知られている。また、私達のこれまでの研究で、Zf が高濃度カフェイン投与後に致死性徐脈から死亡することを見出している。

そこで、カフェインによる Zf の急死に寄与する miRNA を同定することによって、急死に寄与する病態を明らかにすることを計画し、準備を進めていた。しかしながら、実務上の新型コロナウイルス感染症対策に時間を費やした上、microRNA 解析に関する知識習得から実験計画を策定するのに、時間がかかってしまった。その上、実験の実施者の所属機関が変わるなどの環境の変化から、それ以上、実験を進めることができなくなってしまった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Maeda H, Hasumi A, Yoshida K	4. 巻 39.2
2. 論文標題 Caffeine-induced bradycardia, death, and anxiety-like behavior in zebrafish larvae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 427-436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-021-00577-8	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 Hasumi A, Maeda H, Yoshida K	4. 巻 15(10)
2. 論文標題 Analyzing cannabinoid-induced abnormal behavior in a zebrafish model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0236606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0236606.	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 Maeda H, Nagashima E, Hayashi K, Kikura-Hanajiri R, Yoshida K	4. 巻 36
2. 論文標題 MDMB-CHMICA induces thrashing behavior, bradycardia, and slow pressor response in a cannabinoid receptor-1 (CB1)- and CB2-dependent manner in conscious rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forensic toxicology	6. 最初と最後の頁 313-319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11419-018-405-110	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 Maeda Hideyuki, Fukushima Noritoshi, Hasumi Akihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Standardized Method for the Assessment of Behavioral Responses of Zebrafish Larvae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 884 ~ 884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9080884	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田秀将 蓮見昭洋 吉田謙一
2. 発表標題 A method in protocol for the routine assessment of behavioral observation using zebrafish larvae
3. 学会等名 第105回日本法医学会学術全国集会(福岡, 緊急事態宣言のため誌上発表)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蓮見昭洋、前田秀将、吉田謙一
2. 発表標題 大麻成分であるカンナビノイドによるゼブラフィッシュでの反復性光刺激への反応
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蓮見昭洋 前田秀将 清水輝美 吉田謙一
2. 発表標題 The duplication of haloperidol-induced catalepsy in zebrafish
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓮見昭洋 前田秀将 吉田謙一
2. 発表標題 Cannabidiol(CBD)による反復性光刺激反応への影響
3. 学会等名 第88回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓮見昭洋 前田秀将、吉田謙一他
2. 発表標題 ,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
3. 学会等名 第87回日本法医学会学術関東地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川原玄理 前田秀将、吉田謙一他
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第181回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2018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
研究分担者	花尻 瑠理 (木倉瑠理) (Hanajiri Ruri) (10224916)	国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・室長 (82601)	
研究分担者	川原 玄理 (Kawahra Genri) (40743331)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	
研究分担者	林 由起子 (Hayashi Yukiko) (50238135)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	前田 秀将 (Maeda Hideyuki) (60407963)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	

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