

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10121

研究課題名(和文) 病理組織学的手法を用いた刺激性薬物乱用のスクリーニング検査の開発

研究課題名(英文) Histological analysis of stimulant drug abuse using Immunofluorescence.

研究代表者

武市 敏明 (Takeichi, Toshiaki)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90460360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1)覚せい剤事例において、脳の線条体の側坐核におけるVGLUTのシグナルの増加及び同部位におけるCalbindinと一致したVGLUTの増加を認めた。(2)さらに、脳の視床の束傍核におけるVGLUTのシグナルの増加を認めた。この部のVGLUTはGLS陽性神経細胞とシナプスを形成していることが考えられた。(3)一方、覚せい剤とは作用機序の異なる大麻事例では、視床のVGLUTの変化を認めなかった。結果(1)、(2)より、少量の覚せい剤を反復投与した動物実験と同様な変化を実際のヒトの試料を用いて検出可能であることを明らかとした。結果(3)より、神経終末の差異をヒトの事例で明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに行ってきた実験動物を用いた研究では、行動解析に差を認めるものの神経障害を引き起こさない程度の少量の覚せい剤を反復投与した動物の線条体において、VGLUTの増加が特徴的であった。本研究は、その基礎実験を元にしたトランスレーショナル・リサーチであり、実際の覚せい剤事例の線条体の側坐核におけるVGLUTの増加を明らかにした。それだけでなく、側坐核への投影元である視床の束傍核のVGLUTも増加していることを観察した。本研究は、単に実験動物の結果をヒトへ外挿が可能であるというだけでなく、組織検査から薬物使用のスクリーニング検査への可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The methamphetamine users increased the signal area of VGLUT in the nucleus accumbens of the striatum and parafascicular nucleus of the thalamus. However, cannabis users did not change the signal area of VGLUT in the thalamus. We found that changes similar to those in animal models repeatedly administered small doses of methamphetamine can be detected using actual case of the methamphetamine users.

研究分野：法医学

キーワード：覚せい剤 線条体 視床 VGLUT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

刺激性薬物、特に覚せい剤の濫用は世界的な社会問題である。日本においても、平成23年から平成27年の覚せい剤に関連する検挙人数は、平成29年の警察白書の統計資料によると11,000人前後と高い水準にあり、依然として社会的関心が高い問題である。

法医学解剖では、覚せい剤中毒死例の診断には血中の覚せい剤濃度が参考にされる。さらに、覚せい剤中毒死と診断された事例の病理組織学的解析では、脳の線条体において細胞障害時に増加を示すグリア細胞の反応が増加する。それだけでなく、同部位におけるドーパミン作動性神経のマーカー蛋白質であるドーパミントランスポーターが減少する。この様に覚せい剤の血中濃度が高い覚せい剤中毒死例においては、線条体の神経細胞障害が引き起こされていることは明らかである。この様に乱用薬物の中で、ドーパミン作動性神経の刺激性を有する覚せい剤の中毒死という極端な事例については多数報告されている。しかしながら、軽度の事例についての報告はほとんど見あたらない。

一方、近年ある種の電子タバコでは、フレーバーキッドとしてプロピレングリコールを基剤とした製品が市販されている。この電子タバコは、200 °C程度に加熱したコイルで上記基剤に溶解した香料を吸引する器具である。この製品は、大麻が合法の国において大麻吸引用の機器でもあることから、日本においても容易に模倣されるものと考えられる。さらに、この電子タバコの加熱コイルの温度は、覚せい剤を初めとした刺激性薬物の沸点に近く、薬物吸入用に転用可能であり、実査に摘発されている。このような背景から、刺激性薬物のライトユーザー(軽度の薬物中毒)の増加が懸念される。

さらに刺激性薬物の乱用は、覚せい剤だけでなく分子の骨格が覚せい剤とほぼ同じとする化学物質で、側鎖に若干の変更を加えたデザイナーズドラッグいわゆる危険ドラッグについて、その乱用が近年の問題として注目されている。しかしながら、その1つ1つについて神経毒性を検索することは重要な研究であるが、膨大な時間と労力が必要となる。

我々は、刺激性薬物である覚せい剤のメタンフェタミンを線条体のドーパミン作動性神経の減少を認めない程度の少量をラットへ5日間投与し、軽度の覚せい剤中毒のモデル動物とした。このモデル動物についての行動解析及び脳の線条体についての免疫組織化学的解析を行った。その結果、動物の異所行動量の増加を認めた。さらに、同一個体の線条体におけるVGLUTが増加しており、行動量の変化にVGLUTの増加が関与している可能性を示した。動物実験の成果より線条体のVGLUTの変化を測定することにより、明らかな神経細胞障害を引き起こさない程度、すなわち覚せい剤刺激性薬物の軽度の薬物中毒事例についてのスクリーニング検査のマーカーとして利用可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

覚せい剤だけでなく、危険ドラッグの刺激性薬物としての主な作用であると考えられるドーパミン作動性神経からのドーパミンの放出促進作用は、覚せい剤の投与と同様に線条体のグルタミン酸作動性神経終末の活性化を引き起こすことを予想させる。そこで、この様に間接的に変化が引き起こされることが予想される蛋白をターゲットにすることで、各薬物のドーパミン

作動性神経への作用機序の差異や、神経細胞毒性の強弱に影響されずに、刺激性薬物の乱用が検出できることが期待できる。本研究は、刺激性乱用薬物の1つである覚せい剤を用いた動物実験の成果から、同様な変化を実際のヒトの試料でも検出可能であることを明らかにし、ヒトへ応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

この研究では、動物実験の成果を元に、実際のヒトの試料を用いてVesicular glutamate transporter (VGLUT) の発現に変化を認められるかを解析する。具体的には、グルタミン酸作動性神経の神経終末に発現しているVGLUT及びグルタミン酸作動性神経の神経細胞マーカーのGlutaminase (GLS)、ドーパミン作動性神経の神経細胞マーカーのTyrosine hydroxylase (TH)、GABA作動性神経の神経細胞マーカーのGlutamate decarboxylase (GAD)、中型有棘神経細胞の神経細胞マーカーのCalbindinに対する抗体を用いて、多重免疫蛍光抗体法を用いて脳の視床と線条体における発現を観察する。

#### (1) 脳組織の採取

死後経過時間が48時間以内の事例を対象とした。血液中より覚せい剤を検出した事例を覚せい剤群、その他の急死事例をコントロール群とした。

#### (2) 多重免疫蛍光抗体法

ホルマリン固定された脳より、視床及び線条体を切り出し、パラフィン包埋ブロックを作成する。視床については、正中中心核と束傍核が入っているように切り出した。厚さ5  $\mu\text{m}$ の組織切片を作製し、多重免疫蛍光抗体染色を行う。ヒト組織を用いた蛍光抗体法では、細胞質内のリポフスチン顆粒の自家蛍光がアーチファクトとして問題になるため、TrueBlack® Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotium) を反応させてリポフスチンの自家蛍光を抑制する。その後、1次抗体として、VGLUT及び各神経細胞マーカーに対する抗体を反応させ、その後蛍光色素を結合させた2次抗体を反応させた。ホルマリン固定した組織では、アルデヒドとアミンとの反応により自家蛍光が生じる。そのため可視化には、近赤外フィルターを用いたオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス) によりデジタル画像として撮影した。

#### (3) 画像解析

撮影した画像は、BZ-X Analyzerを用いて、それぞれの蛍光面積 (Pixel) を計測した。また、各神経細胞マーカーの蛍光部位からマスクを設定し、VGLUTの蛍光面積を計測することで、神経細胞マーカー陽性の神経細胞にシナプスを形成しているVGLUTとした。これらのデータは、統計ソフトウェアのGraphPad Prism8 (エムデーエフ) により統計解析を行った。

#### (4) 倫理審査

本研究は、杏林大学医学部倫理委員会及び金沢大学医学倫理審査委員会において承認された。

#### 4. 研究成果

(1) VGLUTは、覚せい剤群の線条体の側坐核においてその染色面積がコントロール群よりも190%増加していた。さらに、Calbindinのマスク画像と一致したVGLUTも約2倍に増加しており、覚せい剤群では、側坐核の中型有棘神経細胞にグルタミン酸作動性神経の神経終末のシナプスが増加していることが観察された。

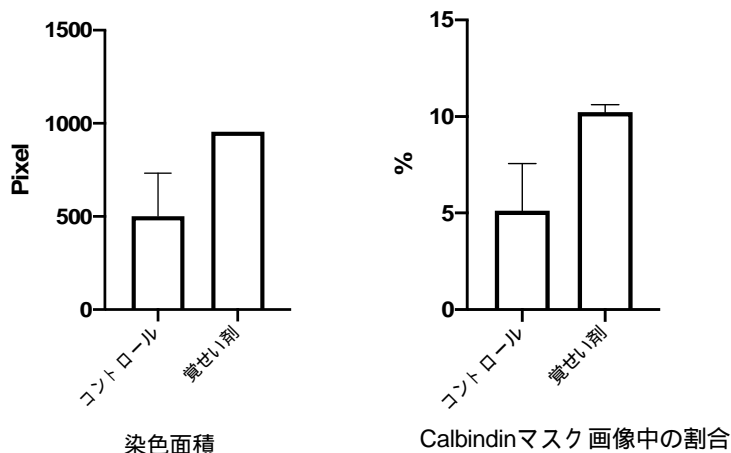


図1. 線条体側坐核のVGLUT染色結果

(2) 視床の束傍核におけるVGLUTの染色面積は、コントロール群よりも覚せい剤群で239%と明らかに増加していた。この部のVGLUTは、GLS陽性細胞と一致または接地していることが多く観察された。

これらの結果から、束傍核のグルタミン酸作動性神経細胞へのグルタミン酸作動性神経シナプスの増加が考えられた。さらに、線条体には視床から神経軸索が投射されており、側坐核へは、視床の束傍核から多くの神経繊維が投射していることから、束傍核からの側坐核へのグルタミン酸作動神経出力の増加が考えられた。

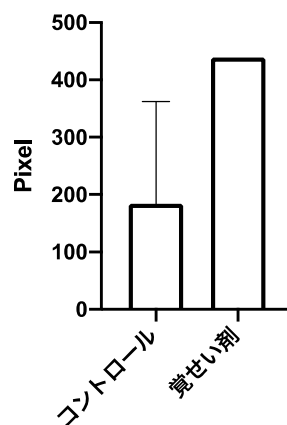


図2. 束傍核のVGLUT染色面積

一方、(3)大麻事例における視床のVGLUTは、コントロール群と同程度であり異なる作用機序の薬物では、神経終末の変化に違いがあることが明らかとなった。

上記の結果より、当初の見積もりよりも対象事例が少なく、統計解析までの解析ができなかったものの、少量の覚せい剤を反復投与した動物実験と同様な変化を、実際のヒトの試料においても検出可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takeichi Toshiaki, Hori Osamu, Hattori Tsuyoshi, Kiryu Kyoka, Zuka Masahiko, Kitamura Osamu  | 4. 巻<br>703             |
| 2. 論文標題<br>Pre-administration of low-dose methamphetamine enhances movement and neural activity after high-dose methamphetamine administration in the striatum | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>119 ~ 124 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neulet.2019.03.023  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>武市敏明, 桐生京佳, 山田真嗣, 吉田昌記, 高篠智, 高橋かすみ, 北村修. |
| 2. 発表標題<br>急性心筋梗塞事例を用いた心臓組織における脱リン酸化Connexin43の検討   |
| 3. 学会等名<br>第104次 日本法医学会学術全国集会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|--|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 塚 正彦<br><br>(zuka masahiko)<br><br>(00272956)  | 金沢大学・医学系・教授<br><br><br><br>(13301)  |    |
| 研究分担者 | 北村 修<br><br>(kitamura osamu)<br><br>(70266609) | 杏林大学・医学部・教授<br><br><br><br>(32610)  |    |
| 研究分担者 | 桐生 京佳<br><br>(kiryyu kyouka)<br><br>(60555051) | 杏林大学・医学部・准教授<br><br><br><br>(32610) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|