

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390217

研究課題名（和文） 覚醒剤濫用の法医病理学的診断を目指した薬物依存モデル動物による酸化ストレスの解析

研究課題名（英文） Investigations on methamphetamine-neurotoxicity by using an animal model

研究代表者

北村 修 (KITAMURA OSAMU)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70266609

研究成果の概要（和文）：この研究では、覚醒剤の自己投与動物モデルにより、薬物摂取行動が増加することが一酸化窒素産生の過程と関連することが明らかとなり、酸化ストレスに関連した覚醒剤神経毒性との関連が示唆された。さらに、覚醒剤少量投与により、小胞体ストレスが誘導されることが明らかになり、この現象が大量投与によって引き起こされる神経毒性に対して抑制的効果を持つことが示唆された。以上の動物モデル及び少量投与による研究は、覚醒剤濫用者の法医病理学的診断の向上に有用と考える。

研究成果の概要（英文）：This study suggests that, in consideration of the neurotoxic effects of methamphetamine (METH) due to oxidative stress, pharmacological intervention on NO synthase may help reduce the monoamine-depleting and apoptosis-inducing effects of methamphetamine and that pretreatment with low-dose METH may be protective against METH neurotoxicity in the midbrain, leading to the suppression of oxidative stress and apoptotic mechanisms, in part via ER stress-related pathways. In the point of view of forensic pathology, an animal model of escalation drug intake and pretraetment of low-dose METH prior to neurotoxic-dose administration could be useful to investigate the mechanisms involved in neurotoxicity of human METH abusers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医病理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 覚醒剤濫用は酸化ストレスによる中枢神経系の障害（神経毒性）を与えるが、こ

のメカニズムの解析による法医病理学的診断は確立されておらず、この点に注目した研究は国内外でも少ないのが現状である。

申請者らは、酸化ストレスに関連する病態に着目し、剖検例脳の解析から、線状体におけるドーパミン作動性神経の障害、同部のグリア細胞の増加及び海馬における熱ショックタンパク質の発現等を明らかにした。

(2) 大量のメタンフェタミン (METH) 投与された動物では、タンパク質及び核酸の過酸化障害、アポトーシス等の所見を認めるが、ヒトの覚醒剤濫用例の所見と一致しない点がある。これは、ヒトの覚醒剤濫用は、薬物依存の特徴である、薬物の使用が少量から徐々に増加した後、大量摂取するとう、動物実験と異なる薬物摂取行動によると考える。

(3) 研究代表者らは、長時間の METH 自己投与による覚醒剤依存のモデル動物を作製し、他の薬物依存の研究に応用してきた。さらに、この動物モデルにより、酸化ストレスと関連する一酸化窒素代謝が覚醒剤依存に関与することを示唆するデータを得た。また、薬物依存にはサイトカイン、小胞体ストレスが関連しているという報告がある。したがって、薬物依存のメカニズムは、覚醒剤による神経毒性に影響を与えると考える。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、覚醒剤濫用による酸化ストレスを主体とした酸化ストレス、小胞体ストレス、神経細胞障害及びグリア細胞の反応について、検討を行った。

(2) 以上の研究から、薬物依存動物モデル等の少量投与を用いて、覚醒剤濫用の中でタンパク質の障害及び遺伝子発現がどのような病態を反映しているかを解析し、法医学病理学的診断のマーカーとすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

(1) 覚醒剤自己投与における一酸化窒素合成の関与

①自己投与 (図1) によるエスカレーション  
頸静脈にカテーテルを留置したラットを覚醒剤を自己投与させ、1時間/日・摂取 (ShA) 群と6時間/日・摂取 (LgA) 群とに分類した。

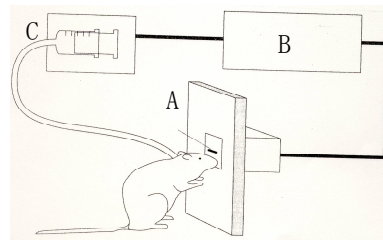


図1. 薬物自己投与 レバーを押すと (A)、コンピューターが作動して (B)、ポンプによりラットへ薬物が投与される (C)。

### ②一酸化窒素合成酵素阻害剤の投与

ShA と LgA とをそれぞれ半分づつのグループに分けて、一方には一酸化窒素合成酵素阻害薬 (L-NAME) を最初の4日間投与し (ShA+L-NAME または LgA+L-NAME)、L-NAME を投与しない群と共に (ShA+saline または LgA+saline)、21日間自己投与のセッションを行った。

(2) 少量 METH 投与による覚醒剤神経毒性への影響

#### ①METH 前投与による小胞体ストレスの誘導

0.5-10mg/kg の METH を5日間投与したラットについて、脳を採取した。

ウェスタンブロッティング法、リアルタイム PCR 法により小胞体ストレス蛋白質である Glucose-Regulated Protein 78 (GRP78)、CHOP、小胞体ストレス関連遺伝子 ATF4、酸化ストレスマーカーの Superoxide dismutase-1 (SOD1)、ドーパミン作動性神経終末のマーカーの TH、グリア細胞のマーカーの GFAP の変化について解析した。

#### ②小胞体ストレスの誘導による神経毒性への影響

前記①の結果により、1mg/kg の METH が GRP78 を誘導することが明らかとなった。

1mg/kg の METH または生食水を5日間投与し、最終投与の1日後に大量投与 (10mg/kg ×4/日) を行い、翌日脳を採取した。

ウェスタンブロッティング法により小胞体ストレス蛋白質である GRP78、CHOP、酸化ストレスマーカーの SOD1、TH、GFAP、アポトーシス関連蛋白質の Bcl-2、Bcl-x の変化について解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 覚醒剤自己投与における一酸化窒素合成の関与

##### ①自己投与によるエスカレーション

LgA 群ではセッション開始から数日後より薬物摂取回数が有意に増加し、いわゆるエスカレーションを示したが、ShA 群では明らかなレバー押し回数の変化は認められなかった (図2)。

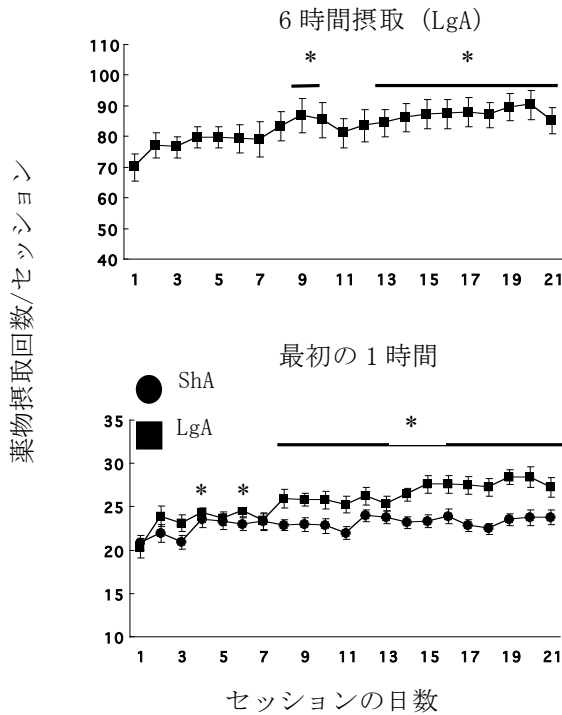


図2. 自己投与によるエスカレーション

##### ②一酸化窒素合成酵素阻害剤の投与による薬物摂取行動への影響

上記の動物モデルに対して、L-NAME を投与したところ、LgA+saline 群では、最初の1時間において、4日目、6日目と8日目以降にエスカレーションが出現したが、LgA+saline 群では、16日目以降にエスカレーションを示した (図3)。

また、6時間摂取においても、LgA+saline 群では、最初の1時間において、9日目、10日目と13日目以降にエスカレーションが出現したが、LgA+saline 群では、19日目以降にエスカレーションを示した (図4)。

一方 ShA 群については、L-NAME を投与したところ、一時薬物摂取行動の減少傾向を認めた。

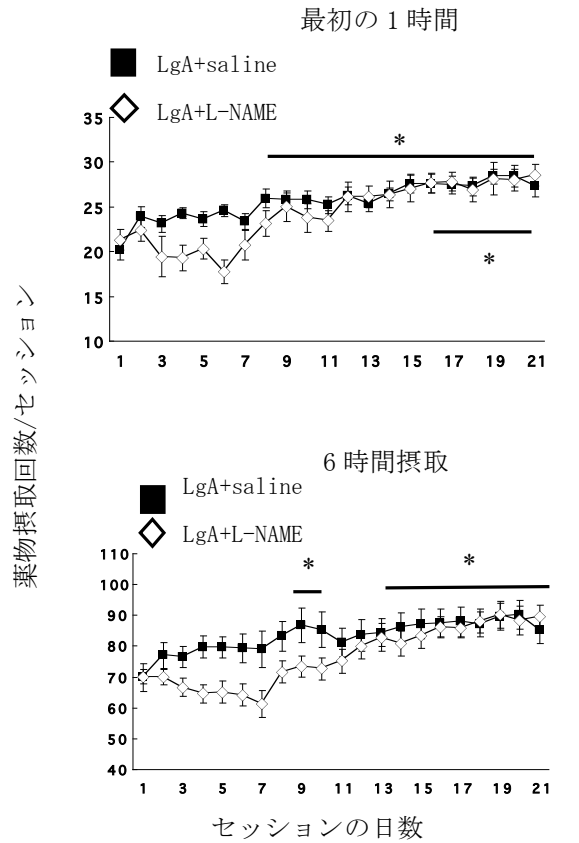


図3. 一酸化窒素合成酵素阻害剤の投与による長時間薬物摂取群への影響

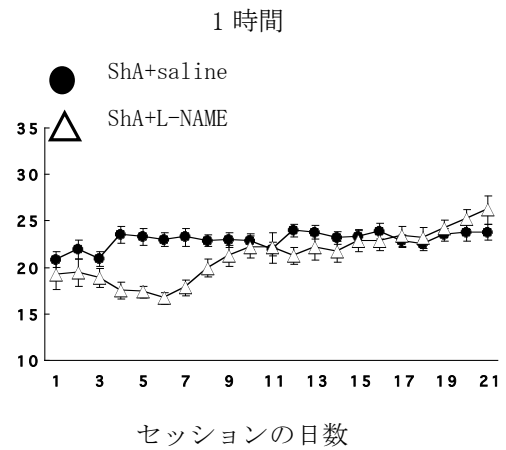


図4. 一酸化窒素合成酵素阻害剤の投与による短時間薬物摂取群への影響

一酸化窒素合成酵素抑制剤の投与により、薬物摂取行動の減少が認められた。従って、酸化ストレスと関連する一酸化窒素代謝が覚醒剤依存に関与することを明らかになった。

(2) 少量 METH 投与による覚醒剤神経毒性への影響

①METH 前投与による小胞体ストレスの誘導  
0.5-10mg/kg の METH を 5 日間投与したラットについて、1mg/kg 投与群における GRP78 の蛋白質及び mRNA 上昇、0.5 及び 1mg/kg 投与群における ATF4mRNA 上昇を認めた。しかし、TH 減少、GFAP の増加等の神経細胞障害を示す所見は認めなかった。

②小胞体ストレスの誘導による神経毒性への影響

生食水前投与群では、GRP78 には有意な変化を認めず、CHOP の上昇、TH 減少、GFAP の増加等アポトーシス関連蛋白質の Bax の上昇等が認められ、TH 減少、GFAP の増加等の神経細胞障害が認められた。SOD1 は、3 日目に上昇した。

METH 前投与群では、GRP78 の上昇を認めるが、CHOP は変化を示さず、TH 及び GFAP の変化を認めなかった。また Bcl-2 の上昇を認め、SOD1 は、生食水前投与群より早期の増加を示した。

③実験結果による考察

METH 少量投与により、神経毒性を引き起こすことなく、小胞体ストレスを誘導することが明らかとなった。小胞体ストレスの誘導は、薬物依存のメカニズムと関連していると考えられている。この実験の結果より、METH 前投与群では、細胞障害を抑制する機能を持つ小胞体ストレス蛋白質はさらに増加し、抗酸化酵素が誘導され、アポトーシスの経路については抑制的であることが認められた。さらに、神経細胞障害やグリア細胞の反応は認められなかった。一方、生食水投与群では、アポトーシスを促進する小胞体ストレス蛋白質が増加し、酸化障害及びアポトーシスの経路が活性化され、神経細胞障害やグリア細胞の反応が認められた。少量の METH 投与後に大量投与することは、覚醒剤濫用者の服用パターンをある程度再現していると考えられる。この実験で、小胞体ストレスのマーカーが上昇することは、覚醒剤による酸化ストレスに基づく神経細胞障害及びグリア細胞の反応に関与すると考えられ、法医病理学的診断への応用が期待される。

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 1 件)

①Takeichi T, Wang EL, Kitamura O. The effect of low-dose methamphetamine pretreatment on endoplasmic reticulum stress and methamphetamine neurotoxicity in the rat midbrain. *Legal Medicine*, 査読有, 14, 2012, 69-77. DOI; 10.1016/j.legalmed.2011.2.004

[学会発表] (計 4 件)

①武市 敏明、少量覚醒剤前投与による小胞体ストレス蛋白質の誘導及び多量覚醒剤投与による神経毒性への影響、第 95 次日本法医学会学術全国集会、2011 年 6 月 17 日、コラッセふくしま (福島市)

②武市 敏明、メタンフェタミンの少量慢性投与ラットの中脳における小胞体ストレスへの影響、第 32 回日本法医学会学術中部地方集会、2010 年 10 月 23 日、富山県民会館 (富山県)

③武市 敏明、メタンフェタミン慢性投与によるラットの中脳における小胞体ストレスへの影響、第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 4 日、神戸国際展示場 (兵庫県)

④武市 敏明、メタンフェタミン反復投与ラットの黒質・線状体における小胞体ストレスに対する影響、第 94 次日本法医学会学術全国集会、2010 年 6 月 25 日、タワーホール船堀 (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 修 (KITAMURA OSAMU)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70266609

(2) 研究分担者

王 璐 (OH RO)  
金沢医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60555051  
武市 敏明 (TAKEICHI TOSHIKI)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90460360