

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860098

研究課題名(和文) アルコール依存症モデルマウスを用いたアルコール離脱症状発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of alcohol withdrawal symptom with ethanol-injected mouse model

研究代表者

石橋 拓也 (ISHIBASHI, Takuya)

城西国際大学・薬学部・助手

研究者番号：20555825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： アルコール依存症は世界的な疾患である。その治療の基本は飲酒の中断(断酒)であるが、断酒によって生じる離脱症状が治療の妨げになる。本研究ではアルコールの離脱症状の発症メカニズムを解明することが目的である。アルコールの離脱症状を評価できる動物モデルの確立を目指し、マウスにエタノールを長期投与し、行動を観察した。行動薬理試験により、離脱症状である不安様症状やうつ様症状などの離脱症状が観察できた。

研究成果の概要(英文)： Alcoholism is the common disorder. Although the medical treatment of alcoholism is to stop drinking an alcohol beverage, alcohol withdrawal symptom disrupt it. The purpose of this research is investigation of the mechanism of alcohol withdrawal symptom. In order to construct an animal model in which the symptom of alcoholism is assessed, we injected ethanol solution into mice chronically and observed the alcohol withdrawal behavior. Alcohol withdrawal behavior such as anxiety and depression was observed with several behavior test.

研究分野：衛生化学

キーワード：アルコール依存症 離脱症状

### 1. 研究開始当初の背景

アルコール依存症は世界的な問題である。アルコール依存症の主要な症状はアルコールを強迫的に要求する精神依存、アルコールに対する感受性の低下に伴い陶酔感が得られにくくなる耐性、アルコール摂取をやめたときに生じる離脱症状がある。アルコール依存症の治療はアルコールの摂取を止める断酒が基本である。しかし、アルコール依存症患者がアルコール摂取を急激に止めるとうつや不安、いらいらなどの離脱症状が生じ、患者はこれら不快な症状を紛らわせるために飲酒してしまい、これがアルコール依存症の治療の妨げになると考えられる。そのため、アルコール依存症の離脱症状を抑制する療法の確立がアルコール依存症の治療に役立つと考えられる。アルコールは GABA<sub>A</sub> 受容体に作用すると考えられており、アルコールを長期摂取した動物の脳内で GABA<sub>A</sub> 受容体の量が変化することが報告されている。また、エタノールの離脱時のラットの不安状態がヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A により緩和されることが報告されている<sup>(1)</sup>。このことから遺伝子の塩基配列によらないエピジェネティックな発現制御とアルコールの離脱症状発現の関係を解明することにより、エピジェネティックな遺伝子発現制御のしくみがアルコール依存症を治療する新たな治療の標的となることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はアルコールの離脱症状の発症機構を明らかにすることである。アルコールは GABA<sub>A</sub> 受容体に作用することとアルコールを長期摂取した動物の脳内で GABA<sub>A</sub> 受容体を構成するタンパク質が量的に変化することが知られている。アルコールを長期的に摂取した動物の脳内で GABA<sub>A</sub> 受容体による抑制作用が減弱することが中枢神経を過剰に興奮させ、アルコールが体内から消失した時に離脱症状を生じる要因となるのではないかと仮説を立てた。

そこでアルコールをマウスに長期投与し、アルコール依存症の離脱症状の評価モデルを作製した上で、GABA<sub>A</sub> 受容体のアゴニストを投与し、離脱症状への影響を検討した。

### 3. 研究の方法

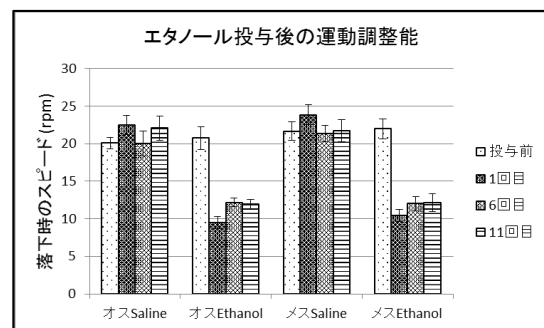
D. F. Werner らの報告<sup>(2)</sup>を参考に C57BL/6J マウスにエタノール (Ethanol) 2 g/kg/day または比較対象として生理食塩水 (Saline) を 11 日間腹腔内投与し、アルコール離脱症状を評価する動物モデルを作製した。エタノール長期投与によるエタノールに対する感受性の低下をエタノールの運動抑制作用と体温低下作用を指標に検討し、離脱症状を行

動薬理試験により評価した。運動抑制作用をロータールッド試験で、不安様症状を明暗箱試験で、うつ様症状を Tail Suspension Test (TST) や Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT) により検討した。

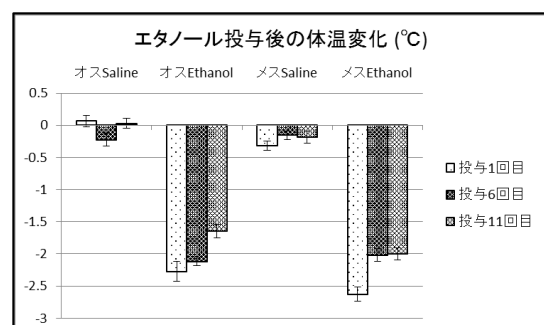
### 4. 研究成果

#### (1) アルコール依存症モデル動物の耐性現象の評価

アルコール依存症モデルとしての有用性を確かめるためにアルコール依存症の耐性現象を確認した。アルコールの作用として運動機能の抑制作用と体温低下作用がある。運動機能抑制作用をロータールッド試験により評価した。加速するロッドにマウスを載せ、マウスがロッドに載っていられなくなり落下した時のスピードを運動調整能として評価した。オスマたはメスの C57BL/6J マウスにエタノール 2 g/kg を投与すると投与前に比べてロータールッドに載っていられるスピードが低くなった。オスマウスはエタノール投与 1 回目に比べて 6 回目と 11 回目にエタノール投与後にロータールッドに載っていられるスピードが上昇した。このことから、オスマウスでエタノールによる運動抑制作用が投与を繰り返すことで減弱し、耐性が見られた。

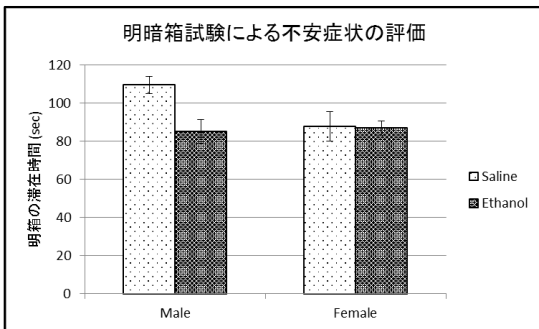


また、エタノール投与前後の直腸体温を測定し、エタノール投与による体温低下作用を評価した。オスマウスとメスマウスはともにエタノール 2 g/kg を投与された後に体温の低下が見られた。エタノールによる体温の低下作用は 1 回目の投与に比べ 6 回目と 11 回目に減弱した。体温低下作用においてもアルコールの作用の減弱 (耐性) が見られた。

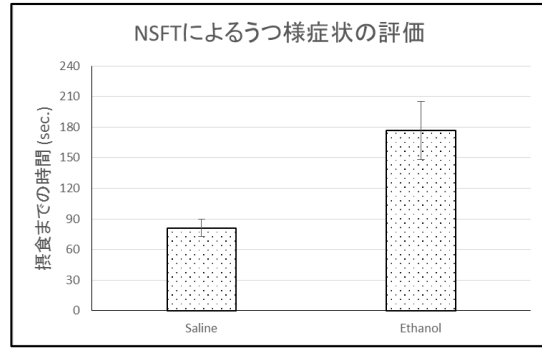
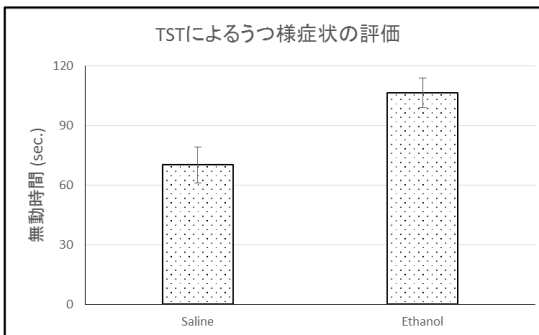


## (2) アルコール離脱症状の評価

アルコール依存症の離脱症状に不安症状がある。11日間エタノールを投与したマウスはエタノール投与後の不安状態を明暗箱試験により評価した。マウスは夜行性で明るい場所に不安を感じる性質があるが、エタノールを投与したオスマウスにおいて明るい箱での滞在時間が減少したことから離脱症状の不安が現れたと考えられる。これらの結果から本研究で C57BL/6J オスマウスにエタノール 2 g/kg/day を 11 日間投与し、アルコール依存症の離脱症状の発症メカニズムを調べるモデルとして用いることにした。



アルコール依存症の離脱症状にうつがある。上記の動物モデルにうつ症状が生じるかを TST と NSFT により、解析した。TST はマウスが尻尾からつりさげられた状態で逃避しようとするモチベーションを利用した試験であり、逃避行動をしない無動時間をうつ状態の指標とする。NSFT はマウスの食餌に対するモチベーションを利用した試験であり、一晚絶食したマウスをエサの入ったケージに入れ、摂食するまでの時間を指標とする。エタノール 2 g/kg を 11 日間投与し、1 週間後のマウスは生理食塩水投与マウスと比較し、TST における無動時間の延長、NSFT における摂食までの時間の延長が見られた。このことから本研究のモデルマウスにより、エタノール離脱によるうつ様症状を評価できることが示唆された。



このように作製したアルコール依存症の動物モデルにおいてアルコールの離脱症状である不安様症状やうつ様症状を評価できた。これを基にアルコールの離脱症状発症に GABA<sub>A</sub> 受容体が関与しているかを解析するために GABA<sub>A</sub> 受容体に作用する薬物を投与し、薬理的に GABA<sub>A</sub> 受容体の作用を活性化し、離脱症状に及ぼす影響を評価する方針である。

1 サブユニットを含む GABA<sub>A</sub> 受容体のアゴニストであるゾルピデムを投与し、4 時間後に明暗箱試験を行い、不安状態に与える影響を検討した。アゴニスト投与の 4 時間後にアゴニストを投与されたマウスの不安が抑制される傾向が見られた。この結果に関して期間終了後も再現性と有意差の確認を行う。

## (3) 今後の研究の展開

アルコール依存症モデル動物の不安様症状がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤トリコスタチン A により緩和されることからアルコールを長期摂取した動物の脳内で遺伝子のエピジェネティックな発現制御と不安などの離脱症状が関係していると予想される。アルコール依存症の離脱症状に関わる受容体を明らかにし、そのタンパク質をコードしている遺伝子のヒストンのアセチル化状態を解析することにより、アルコールの離脱症状が発症した動物の脳内で起きているエピジェネティックな遺伝子発現制御のしくみが明らかになると期待される。

## <引用文献>

- (1) S.C. Pandey et al.  
Brain Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Alcoholism  
J. Neurosci. (2008) vol.28, P.3729-3737
- (2) D. F. Werner et al.  
Alcohol-induced tolerance and physical dependence in mice with ethanol insensitive 1 GABA<sub>A</sub> receptors  
Alcohol Clin. Exp. Res., (2009) vol.33, P.289-299.

## 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)

〔学会発表〕(計 1 件)

河合洋 田中知佳 小平夏実 石橋拓也  
光本篤史「イミプラミン長期投与による薬効  
発現の日内変動」日本薬学会 第 134 年会  
2014 年 3 月 28 日 熊本大学 (熊本県熊本市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

石橋 拓也 ( ISHIBASHI , Takuya )

城西国際大学・薬学部・助手

研究者番号 : 20555825