

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590674
 研究課題名（和文） 覚醒剤関連死の法医病理学的診断の精度向上を目指して：高体温症及び血管障害の解析
 研究課題名（英文） Detection of hyperthermia and vascular damages induced by methamphetamine in forensic autopsy cases
 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：

覚醒剤中毒の法医病理学的診断の精度向上を目指して、重篤な合併症である高体温症と血管障害の解析を行った。高体温症の診断と経時的変化には、熱に対して発現する熱ショック蛋白質を脳の海馬領域において観察することが有用と考える。また、アストロサイトにおけるS100-Bの発現も補助的な指標となる可能性がある。また、覚醒剤中毒例において、障害因子と血管新生の発現が認められることがあり、血管障害の評価が可能であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、依然として大きな社会問題である。我々は、覚醒剤濫用の法医病理学的診断を目的とした、免疫組織化学的染色（immunohistochemistry: IHC）及び分子生物学的手法による解析を行っている。

覚醒剤中毒死例の剖検脳（線条体）におけるドーパミン作動性終末マーカーストアポトーシスの観察を行ったところ、IHCによるドーパミン作動性終末マーカーストアポトーシスの障害が覚醒

剤濫用の診断に有用であることを示した（Kitamura O, et al., *Int J Legal Med*, 121, 163-168）。また、覚醒剤の神経毒性の評価のために、グリア細胞の変化について、検討を行ったが、ミクログリアが有意に増加していることが明らかとなった。

(2) 以前の研究では、「高体温症」による横紋筋障害の指標として、腎臓におけるミオグロビンの検出が有用であったが、中枢神経系

における「高体温症」のメカニズムを解析することにより、覚醒剤中毒死の診断の精度をより高めることが期待される。「高体温症」における様々なメカニズムが提唱されているが、それらの中で、サイトカインの関与を示唆することが報告されている。このようなサイトカインの発現は、IHCによる法医病理学的解析が可能であると考えられる。さらに、覚醒剤を投与され、「高体温症」を発症した動物の脳において、IHCにより熱ショック蛋白質(72-kD Heat Shock Protein、HSP72)が発現していることが報告され、「高体温症」に対する反応と考えられ、覚醒剤中毒死までの過程を反映できると期待される。

また、S100Bは、神経変性疾患、頭部外傷等の中樞神経の障害において、アストロサイトに発現する。また、脳血管閉塞の破綻のマーカーとも考えられており、これまでに脳血管閉塞の破綻は高体温症の発現に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

(3) 覚醒剤濫用による脳血管障害及び冠動脈障害も、致命的病態として重要である。しかし、覚醒剤による血管障害のメカニズムは、不明である。脳出血及び心筋虚血例を含む覚醒剤濫用者について、様々な病態による血管障害の際に発現する metalloproteinase (MMP)、障害に対する防御作用及び反応性の血管新生のマーカーとなる vascular endothelial growth factor (VEGF)をIHCにより観察することが有用である可能性がある。

2. 研究の目的

(1) この研究では、覚醒剤中毒死と覚醒剤濫用による脳血管及び冠動脈障害による病態(脳出血、虚血性心筋障害等)、または覚醒剤中毒死の過程において、重篤な病態である高体温症による死亡を含めた「覚醒剤関連死」の法病理学的解析による診断へと発展させることを目的としている。この研究では、剖検時に採取し、ホルマリン固定することが常である脳及び心臓における解析で有用である、免疫組織化学的染色を利用する。

(2) 「高体温症」の解析については、濫用者の中樞神経系における、

①発症に関与すると考えられるサイトカインである、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)

②さらに「高体温症」に対して反応性に発現する、熱ショック蛋白質(HSP72)について、IHCにより発現のパターンを解析する。

(3) これまでの研究で、覚醒剤中毒死例の線条体におけるグリア細胞の形態学的変化を明らかにしてきた。そこで、アストロサイトの増殖は認められなかったが、機能的変化を観察するために、S100Bの発現を観察する。

(4) 「脳血管及び冠動脈の障害」の解析については、

①障害に関与するMMP-2、MMP-9、

②障害に対する防御作用及び反応性の血管新生のマーカーとなるVEGFの発現を観察する。

以上の研究により、覚醒剤中毒死及び覚醒剤濫用による中神経系及び循環系障害の法医病理学的診断への応用を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) 症例と脳の部位

覚醒剤中毒死12例、及び対照者13例のホルマリン固定された脳より線状体(側坐核、被殻及び尾状核)、海馬、前頭葉等の各々の部位について、パラフィン包埋ブロックを作製し、厚さ6 μ mの組織切片を作製する。

(2) サイトカイン及び熱ショックタンパク質のIHC

脱パラした組織切片は、一次抗体の抗IL-1 β 抗体、抗IL-6抗体、抗HSP27抗体及び抗HSP72抗体と反応させる。ダコENVISIONシステム、またはダコCSA IIシステムにより、2次抗体との反応及び発色を行う。さらに、サイトカイン及び熱ショック蛋白質の局在(神経細胞かグリア細胞か)を観察するために、抗Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)抗体(アストロサイト染色)、抗human Glucose Transporter-5抗体(ミクログリア染色)を一次抗体として、アルカリフォスファターゼ標識された二次抗体を用いて二重染色を行う。また、切片は、HE染色や髄鞘染色を行う。

(3) S100BのIHC

脱パラした組織切片は、一次抗体の抗S100B抗体と反応させる。ダコENVISIONシステ

ムにより、2次抗体との反応及び発色を行う。さらに、抗GFAP抗体によりアストロサイトの染色を行う。

(4) MMP及びVEGFのIHC

脱パラした組織切片は、一次抗体として、抗MMP-2抗体、抗MMP-9抗体、抗VEGF抗体と反応させる。ダコ ENVISIONシステム、またはダコCSA IIシステムにより、2次抗体との反応及び発色を行う。また、切片はHE染色及び弾性線維・膠原線維染色を行う。

(5) データの解析

以上の実験から、覚醒剤中毒死（高体温症例）におけるサイトカイン及び熱ショック蛋白質の発現の増加及び特徴的なパターン（局在等）を明らかにする。また、覚醒剤濫用者におけるMMP-2、MMP-9、VEGFの発現の増加及び特徴的なパターン（局在等）を明らかにする。また、グリア細胞におけるS100Bについては、統計的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 線条体、大脳皮質におけるInterleukin 6、Interleukin 11、HSP27、HSP72の発現

サイトカインについては、神経細胞及びグリア細胞に陽性像が認められたが、覚醒剤中毒群と対照群との間において、明らかな有意差は認められなかった。

HSPについては、覚醒剤濫用者の群において、一部の神経細胞に陽性像が認められた。

以上の結果より、HSPが神経細胞の保護的な役割を果たしていること、または高体温症への反応のいずれかによる可能性がある。したがって、覚醒剤濫用者の病態を示唆する所見として、法医病理学的診断へ寄与すると考える。

サイトカインの発現は、IHCにより覚醒剤中毒群と対照群との間に明らかな有意差を認めなかった。本研究では、覚醒剤で死亡した症例のみを対象としている。サイトカインは致死的なメカニズムより、依存に関連している可能性が考えられる。

(2) アストロサイトにおけるS100Bの発現

S100Bの発現は、アストロサイトに認められた（写真1）。S100B発現細胞の数は、両群において統計的有意差はなかったが、覚醒剤

中毒死例群に増加傾向が認められた（側坐核：覚醒剤中毒死例群（METH）：1.142 ± 0.525, 対照群（control）：0.585 ± 0.183, Mann-Whitney $U = 72.5$, $p = 0.7648$; 被殻：METH: 2.950 ± 1.915, control: 2.725 ± 1.874, Mann-Whitney $U = 55.0$, $p = 0.3408$; 尾状核：METH 1.725 ± 1.124, control 1.875 ± 1.152, Mann-Whitney $U = 67.0$, $p = 0.7728$ ）。今後は、覚醒剤による高体温症における、S100Bと脳血管関門との関連を探索することにより、高体温症の法医病理学的診断に発展できる可能性がある。

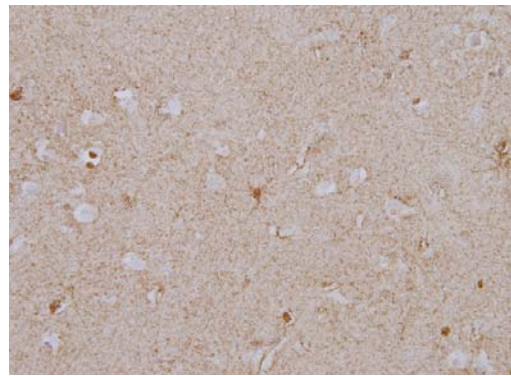


写真 1. S100B 陽性アストロサイト

(3) 海馬における 72 kD 熱ショックタンパク質(HSP72)発現

これまでの研究で、覚醒剤中毒死例群におけるHSP72の発現を明らかにしたが、さらに海馬においてその分布を詳細に検討した。その結果、上衣細胞及び微小血管におけるHSP72発現が明らかであったが、神経細胞には明らかな陽性像を認めなかった（写真2.A-D）

動物実験では、高体温症が8時間以上持続した場合に神経細胞のHSP72発現が認められることから、以上の所見は、上衣細胞及び微小血管におけるHSP72発現は、高体温が発症したこと、または高体温発症から8時間以内に死亡したことを示唆する可能性がある。したがって、覚醒剤中毒死例による高体温症の法医病理学的診断の精度向上に寄与すると考える。

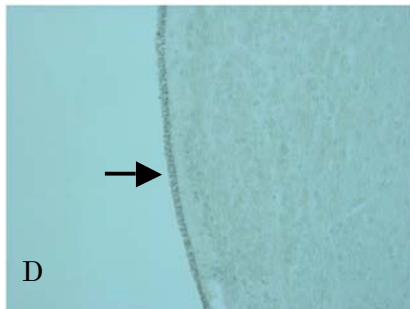
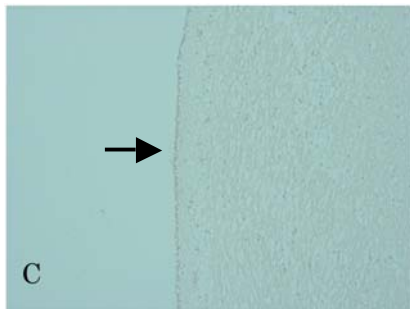
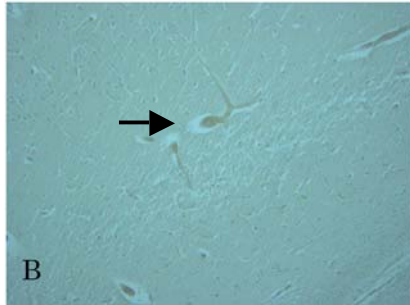
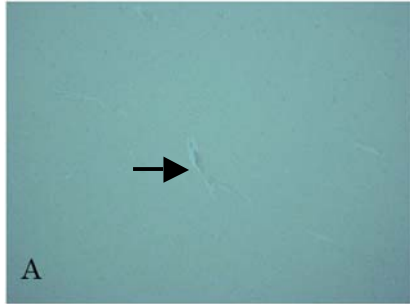


写真 2. 海馬における HSP72 の発現

対照群の海馬では、小血管の HSP72 陽性像は認められないが(A：矢印)、覚醒剤中毒死例では発現が認められる(B：矢印)。

対照群の海馬では、上衣細胞の HSP72 陽性像は認められないが(C：矢印)、覚醒剤中毒死例では発現が認められる(D：矢印)。

(4) 血管における MMP 及び VEGF

脳及び心臓の冠動脈について、MMP 及び VEGF を染色したところ、一部の覚醒剤中毒例において陽性像が観察された。これらの発現が、どのような意義を持つかについては、さらに両者に関わる因子を検討する必要があると考える。

(5) 総括

覚醒剤中毒における法医病理学的診断の向上を目的として、免疫組織学的染色を用いて高体温症と血管障害の評価を行った。

以上のようなアプローチで、覚醒剤による障害を診断する試みは、国内外を通じても報告されていない。今後は、さらなるマーカーを検討すること、分子生物学的及び生化学的解析を検討することにより、より精度の高い覚醒剤中毒による障害が診断できることを目標としたい。

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)

- ① Osamu Kitamura, Detection of methamphetamine neurotoxicity in forensic autopsy cases, Legal Medicine, 印刷中、査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① Osamu Kitamura, Detection of methamphetamine neurotoxicity in forensic autopsy cases, 7th International Symposium Advanced in Legal Medicine, 平成 20 年 9 月 4 日、大阪市公会堂

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

武市 敏明 (TAKEICHI TOSHIAKI)
金沢医科大学・医学部・助手
研究者番号：90460360

(3) 連携研究者

高篠 智 (TAKASHINO SATOSHI)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：50365201