

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790466  
 研究課題名（和文）  
 神経細胞障害と細胞ストレスに着目した覚醒剤少量投与による実験動物モデルの解析  
 研究課題名（英文） Neuron damages and cellular stress in last treated with low dose methamphetamine-treated rats.  
 研究代表者  
 武市 敏明（TAKEICHI TOSHIAKI）  
 金沢医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90460360

## 研究成果の概要（和文）：

覚醒剤の少量反復投与により、神経細胞障害や酸化ストレスといった覚醒剤の多量投与により引き起こされる反応の有意な変化が観察されず、小胞体ストレスのマーカーである GRP78 (抗 KDEL 抗体) が有意に増加するこれまでの覚醒剤投与モデル動物とは異なる病態を示す実験動物モデルを作成した。

このモデル動物を解析することにより、覚醒剤濫用における病態解明に有用な情報を得ることが出来ると考えられ、現在解析中である。

## 研究成果の概要（英文）：

This study examined the effect of repeated administration of methamphetamine (METH) on endoplasmic reticulum stress (ERS) in the dopaminergic neurons of rats. Lower doses of METH (0.5 and 1.0 mg/kg/day for 5d) increased GRP78 (KDEL), one of ERS markers, although superoxide dismutase-1, but no GRP78, was increased at higher doses (5 and 10 mg/kg/day for 5d). Further studies on ERS in METH-treated rats could contribute the understanding of the pathophysiology of METH-induced neuronal damages.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学

キーワード：法医病理学

## 1. 研究開始当初の背景

覚醒剤濫用は世界的な社会問題であるが、覚醒剤濫用に対する法医病理学的診断法ははまだ確立されているとはいえない状況である。

覚醒剤の Methamphetamine (METH) は、ドーパミン作動性神経に作用してさまざまな症状を引き起こすが、メカニズムの一つとして、ドーパミン作動性神経の障害が知られている。

動物実験では、METH の高容量単回投与により、アポトーシスがドーパミン作動性神経に引き起こされていることが示されている。一方、ヒトにおける覚醒剤の使用では、低容量の摂取を繰り返すことでさらに依存を強めていき、遂に精神病を発症することとなる。これは、動物実験で行われている高容量単回投与とは異なった条件である。

しかしながら、覚醒剤中毒例のヒト剖検脳についても、ドーパミン作動性神経の障害が示されている。

## 2. 研究の目的

前記のことから、よりヒトの覚醒剤濫用者の使用状況に近い薬物投与の方法による動物モデルを作成し、その脳を解析することにより、より実際に近い状況での覚醒剤中毒の法医病理学的診断のための基本的情報を得ることを目的としている。

以上の目的のためこの研究では、小胞体ストレスおよび酸化障害に着目して、Western blotting によるタンパク質の定量、免疫化学的染色法を用い、METH を反復投与した Rat の脳の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料の作成

#### ①実験動物への薬物投与

動物は、9週齢の Wistar 系雄性 Rat を用いた。十分に環境に慣らした後に METH (0.5 mg/kg/day, 1.0 mg/kg/day, 5.0 mg/kg/day, 10 mg/kg/day) を 5 日間連続投与し、最終投与 1 日後に脳の採取を行った。

#### ②タンパク質解析用の試料作製

上記①にて採取された脳は中脳を中心とした部位を分画分取し、直ちに液体窒素にて凍結し、タンパク質抽出まで -80°C にて保存した。

タンパク質の抽出は、プロテアーゼインヒビターを添加した RIPA buffer を用いて行った。まず、脳を液体窒素を用いて凍結粉碎し、これに組織 1mg あたり 40 $\mu$ L の RIPA buffer

を添加し、ミキサーにて混和した。これを、4°C で 10 分間インキュベートした後、15,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清をタンパク質溶液として回収した。

#### ③免疫化学的染色法用試料作成

前記①の要領にて METH を投与された動物に CO<sub>2</sub> を吸入させ、4% Paraformaldehyde にて灌流固定し、さらに 4% Paraformaldehyde にて 4°C で 1 晩後固定をおこなった。その後、定法に従ってパラフィン包埋ブロックを作成した。パラフィンブロックは、厚さ 5 $\mu$ m にて薄切し、パラフィン薄切切片を作成した。

## (2) 解析

### ①Western blotting によるタンパク質の定量解析

タンパク質は、アクリルアミド電気泳動の後、Western blotting を行った。

1 次抗体として、小胞体ストレス時に増加するシャペロンタンパク質である glucose-regulated proteins 78 (Grp78) を認識する抗 KDEL 抗体、ドーパミン神経のマーカーである抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体、アストロサイトのマーカーである抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、酸化障害の指標として、抗 Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) 抗体と反応させ、2 次抗体に HRP を標識した抗 Mouse-IgG 抗体、抗 Rabbit-IgG 抗体と反応させた。反応後の Membrane に、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を反応させ、これによる化学発光を LAS-4000 により測定した。

### ②免疫化学的染色

上記(1)の③において作成されたパラフィン薄切切片は、脱パラフィン・親水化後、一次抗体として、抗 KDEL 抗体、抗 TH 抗体、抗 GFAP 抗体と反応させた。2 次抗体との反応および発色は、ダコ ENVISION システムを用いて行った。

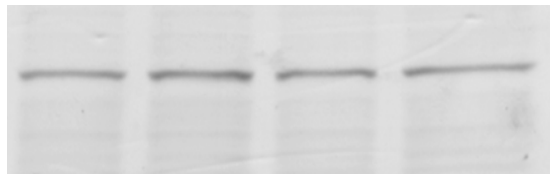
## 4. 研究成果

### (1)Western blotting の結果

#### ①GRP78(KDEL)

0.5 mg/kg/day にて 5 日間投与した 0.5 mg 群では、有意な変化を認めなかった。1.0 mg/kg/day にて 5 日間投与した 1 mg 群では、有意な増加 (163.5 $\pm$ 61.5% p value 0.03) を認めた。5.0 mg/kg/day にて 5 日間投与した 5 mg 群では、有意な変化を認めなかった。

10 mg/kg/day にて5日間投与した10 mg 群では、有意な変化を認めなかった。Fig.1



Control 1 mg 群 5 mg 群 10 mg 群

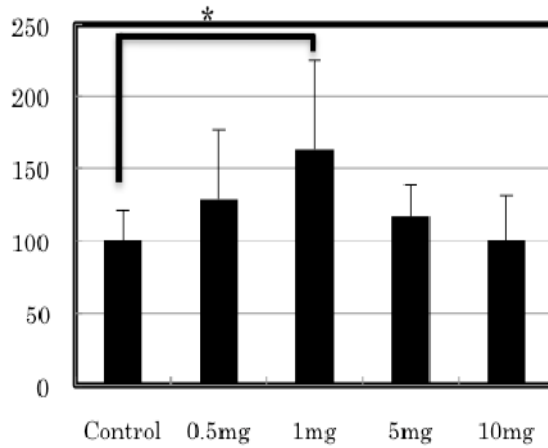


Fig.1 GRP78 (KDEL)

## ②SOD1

さらに、酸化ストレスの指標として、抗SOD1抗体の結果、0.5 mg 群では、有意な変化を認めなかった。1 mg 群では、有意な変化を認めなかった。5 mg 群および10 mg 群では、有意な増加(5 mg 群:270.7±109.9 p value 0.02、10 mg 群:293.4±113.0 p value 0.01)を認めた。Fig.2

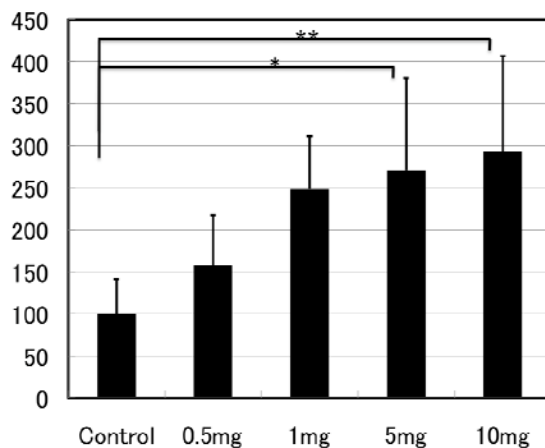


Fig.2 SOD1

## ③TH

ドーパミン神経の METH における神経障害の指標としてドーパミン神経のマーカーである TH を定量した結果、0.5 mg 群、1 mg 群、5 mg 群、10 mg 群の各群において有意な変化は認めなかった。Fig.3

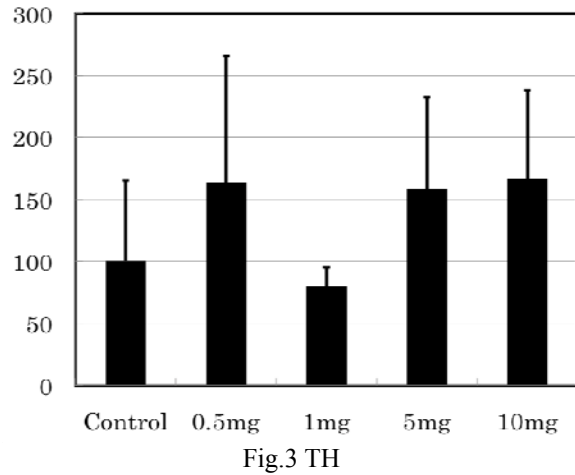


Fig.3 TH

## ④GFAP

アストロサイトの活性化のマーカーとして、GFAP を定量したところ、各群において有意な変化は認めなかった。

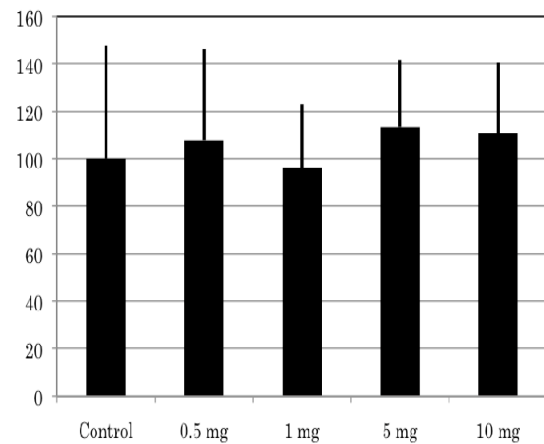
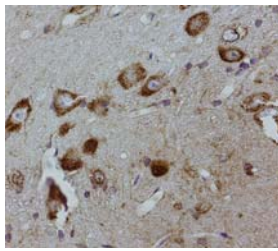


Fig.4 GFAP

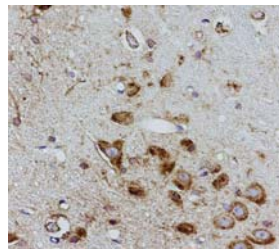
## (2)免疫組織化学的解析

### ①KDEL

DAB 発色による観察では、明らかな変化を認めなかった。



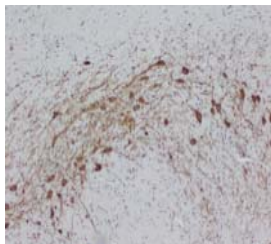
Control



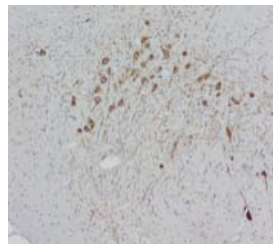
1 mg 群

### ②TH

抗 TH 抗体を用いた観察では、1 mg 群において、ドーパミン神経の神経軸索の減少が観察された。



Control



1 mg 群

### ③GFAP

各群において、明らかな変化を認めなかった。



Control



1 mg 群

### (3)まとめ

(1)の①の結果より、METH を 1 mg/kg/day で5日間投与することで、小胞体ストレスが有意に増加することが見いだされた。

この METH の投与量では、酸化ストレスの指標である SOD1 の増加は認められず、アストロサイトの活性化のマーカーとして評価した GFAP の量も変化を認めなかった。

しかし、これよりも投与量が多くなると、小胞体ストレスの増加は観察されなくなり、代わりに酸化ストレスの有意な増加が観察された。

酸化ストレスに有意な変化が認められない METH 投与による小胞体ストレスが増加するモデルは、現在のところ報告がなされていないようであり、この研究において初めて得られた成果である。

しかし、このモデル動物の中脳黒質におけるドーパミン神経細胞を抗 TH 抗体による免疫組織化学的観察では、ドーパミン神経細胞の神経軸索の減少が観察されるが、同部位の Western blotting による TH タンパク質の定量では、有意な変化は認められなかった。

この組織像とタンパク質量との結果の乖離については、タンパク質の細胞内局在の変化などが考えられるが、現時点においては不明である。今後、共焦点レーザー顕微鏡などを利用し、詳細に検討する予定である。

### 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0件)

[学会発表] (計0件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

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