

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21207

研究課題名(和文) ラットによる間歇型一酸化炭素中毒の病態解明及び治療の究明

研究課題名(英文) The pathogenesis study in rats with delayed carbon monoxide encephalopathy

研究代表者

越智 紳一郎(Ochi, Shinichiro)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40568911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを意識障害を起こすまで一酸化炭素(CO)に暴露した後、3週間認知機能低下を受動回避試験により確認し、間歇型CO中毒モデルラットを作成した。免疫染色では、CO群で、ミクログリアとSOX2陽性神経細胞の細胞数が減少傾向にあること、ミクログリアの形態異常を確認した。またアストロサイトの細胞数が増加傾向にあることを認めた。更に海馬組織を単細胞懸濁液に分散し、セルソーターで分離し・定量的に解析したところ、CO群で有意にミクログリアの減少を認めた。これらことから、間歇型CO中毒の認知機能障害はグリア細胞の異常を介して海馬の成体細胞神経新生に影響を及ぼすことが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rats were exposed to carbon monoxide (CO) until they lost consciousness. Behavioral effects on learning and memory function were measured by the passive-avoidance test until 3 weeks. The latencies were significantly shorter in the CO models. Immunohistochemical analyses revealed cell numbers in SOX2 positive cells and microglia tended to decrease CO models less than controls in the dentate gyrus. Especially, a lot of morphologically abnormal microglia was found. On the other hand, astrocytes tends to increase CO models more than controls in the dentate gyrus. Flow cytometry analyses revealed that the cell numbers of microglia were significantly reduced in CO models. These results suggested that delayed CO encephalopathy may occur the abnormalities in glial cells such as microglia and astrocytes, and reduce neural precursor cells. Thus, the impairment of neural precursor cells via abnormalities of glial cells may be affected in the mechanism of delayed neuronal injury.

研究分野：精神医学

キーワード：間歇型一酸化炭素中毒 ミクログリア アストロサイト 神経幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(carbon monoxide、以下 CO)は無色、無味、無臭、非刺激性でありながら、極めて毒性の強い気体である。本邦では年間2000人以上がCO中毒により死亡しており、我が国の薬毒物死の半数以上と最も多く、死亡には至らずとも、その10~20倍の患者発生があると推定されている。なお、CO中毒による死亡者の80~90%が自殺によるものである。そのため、本邦ではCO中毒は社会的にも重要な問題でもある。

また急性CO中毒のうち、10~30%で遅延性神経細胞障害(間歇型CO中毒)が起こる。これは急性期の昏睡状態から、精神神経医学的に無症状の時期が約2週間から4週間ほど続いた後、健忘、失見当、計算力低下などの認知機能低下をはじめとした精神神経症状が突然発症するものであり、遅発性脳症などとも呼ばれる。(図1)



間歇型CO中毒の発症原因は未だに不明である。したがって予防方法は確立されておらず、治療として高圧酸素療法が提唱されているが、有効性には疑問があり、作用機序も明らかでない。

これらのことから、間歇型CO中毒の病態の究明及び有効な治療法の確立が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究は、間歇型CO中毒モデル動物を作成して、特に成体海馬神経細胞新生やグリア細胞の関与の可能性に着目し、組織学的変化や遺伝子発現変化を精密に検討することで、その原因を明らかにし、更には明らかにされた原因に基づく治療法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

雄性Wistarラット(6週齢)を用い、COを曝露する。先行研究に基づき、000ppm 40min+3000ppm 20min 意識障害を起こすまで曝露した。なお、時間内に意識障害を起こさない場合は更に10000ppmの濃度で意識障害を起こすまで曝露した。

その後3週間認知機能低下を受動回避試験により確認し、間歇型CO中毒モデルラットを作成した。

CO曝露3週間後に灌流固定を行い、海馬歯状回を含む凍結切片を作成する。続いて、アストロサイトやミクログリアや神経幹細胞などの各細胞特異的な抗体を用いて免疫染

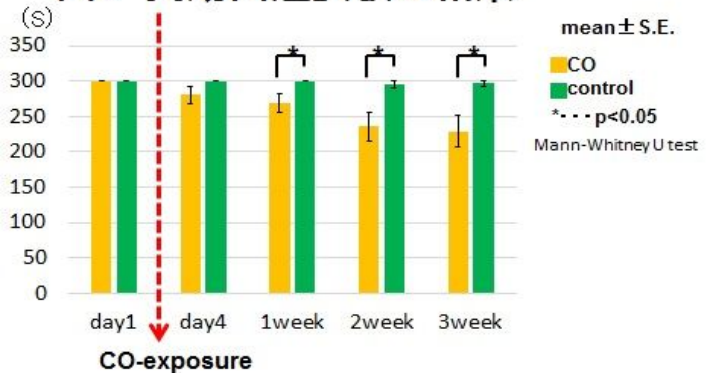
色を行う。これらを対照群と比較することにより、CO曝露がアストロサイト・ミクログリアの活性化や増殖、及び神経幹細胞の増殖や生存に及ぼす作用を組織学的にも検討した。

さらにCO曝露3週間後の海馬組織を、分散キットを用いて単細胞懸濁液に分散し、各細胞特異的の抗体を用いてセルソーターによりミクログリアを分離する。この分離された細胞を用いて、その変化を定量的に解析することで、グリア細胞の活性化や生体海馬細胞新生との関連を検討した。

### 4. 研究成果

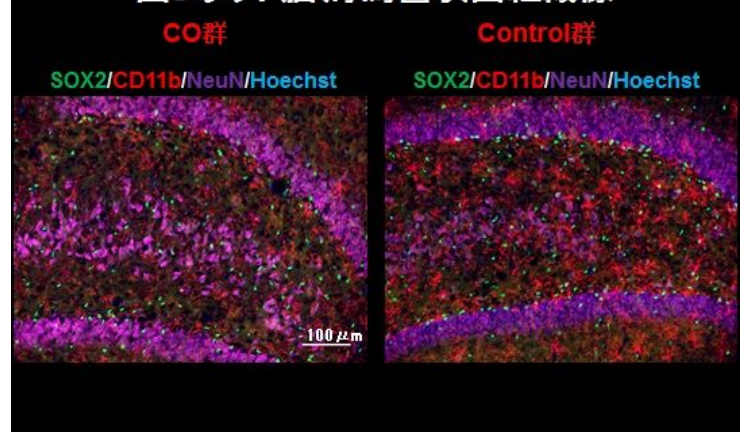
3週間認知機能低下を受動回避試験により確認したところ、図2に示したようにCO曝露群は有意にコントロールより潜時の低下を認め、間歇型CO中毒モデルラットを作成できたと考えた。

図2 受動回避試験の結果

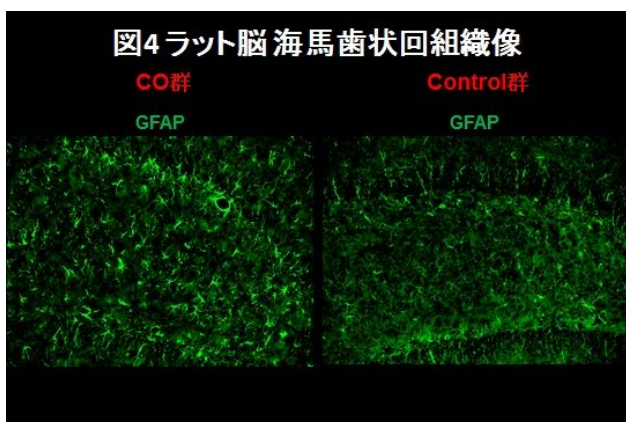


組織化学的染色では、図3に示したようにCO群で、Control群と比較して、ミクログリアの形態異常及び細胞数が減少傾向にあり、またSOX2陽性神経細胞の細胞数も減少傾向にあることから神経幹細胞が減少している可能性があることも認められた。

図3 ラット脳海馬歯状回組織像

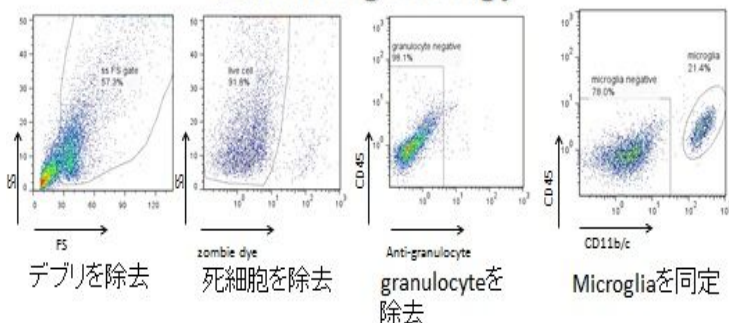


また図 4 に示したように CO 群が Control 群に比べアストロサイトの細胞数が増加傾向にあることを認めた。



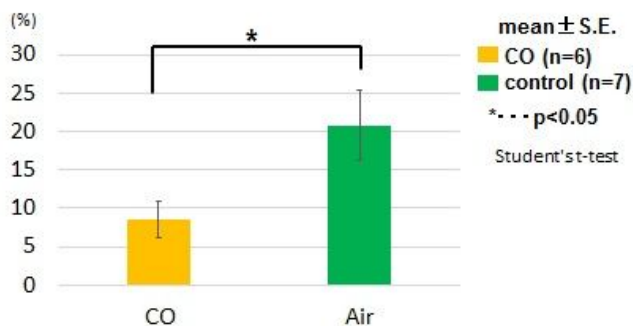
更に海馬組織を単細胞懸濁液に分散し、セルソーターで分離し、図 5 に示した gating strategy で定量的に解析した。

図5 Gating strategy



その結果、図 6 に示したようにソーティングによる定量解析の結果、CO 群で有意にミクログリアの減少を認めた。

図6 ラット脳海馬ミクログリア細胞数



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 2 件)

1. 発表者名：越智紳一郎

発表標題：間歇型一酸化炭素中毒はグリア細胞の異常を介して海馬の成体細胞神経新生に影響を及ぼす

学会等名：第 5 回サイコグリア研究会

発表年：2018 年

2. 発表者名：越智紳一郎

発表標題：Neurogenesis in adult hippocampus is affected in rats with delayed carbon monoxide encephalopathy via glial cells

学会等名：Neuroscience 2018

発表年：2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 紳一郎 (Ochi, Shinichiro)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40568911

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

上野 修一 (Ueno ,Shuichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80232768

伊賀 淳一 (Iga ,Jun-ichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70363140

西原 佑 (Nishihara ,Tasuku)

愛媛大学，医学部附属病院，助教

研究者番号：50568912