

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08889

研究課題名(和文)一酸化炭素中毒の病態解明と水素ガス吸入による新規治療法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the pathophysiology of carbon monoxide poisoning and establishment of a novel treatment by hydrogen inhalation

研究代表者

藤田 基 (Fujita, Motoki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50380001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラット一酸化炭素(CO)中毒モデルにおいて、CO曝露早期からオリゴデンドロサイトへの酸化ストレス傷害および細胞傷害、アポトーシスが生じていた。さらに14日後にいったん収まった酸化ストレス傷害および細胞傷害、アポトーシスの再増悪を認めた。100%酸素吸入療法によるオリゴデンドロサイトの酸化ストレス傷害およびアポトーシスの抑制効果は限定的であり、また14日後におけるオリゴデンドロサイトのアポトーシス抑制効果は明らかでなかった。一方、2%水素+98%酸素吸入療法を行うと、オリゴデンドロサイトの酸化ストレス傷害およびアポトーシスは1日後の急性期だけでなく、14日後にも抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により間歇型一酸化炭素中毒を含む一酸化炭素中毒の病態にオリゴデンドロサイトへの酸化ストレス傷害とそれに伴うアポトーシスが大きく関与していることが判明した。これはオリゴデンドロサイトが一酸化炭素中毒における治療ターゲットとなりうることを示唆している。また、一酸化炭素中毒発生早期からの水素ガス吸入により、オリゴデンドロサイトへの酸化ストレス傷害とそれに伴うアポトーシスが抑制されたことにより、水素ガス吸入療法が一酸化炭素中毒の新たな治療法となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In a rat carbon monoxide (CO) poisoning model, oxidative stress injury, cytotoxicity, and apoptosis occurred to oligodendrocyte from the early stage of CO exposure. After 14 days, re-exacerbation of oxidative stress injury, cytotoxicity, and apoptosis were observed. The protective effect of oligodendrocyte on oxidative stress injury and apoptosis by 100% oxygen inhalation therapy was limited, and the protective effect of oligodendrocyte on apoptosis after 14 days was not clear. On the other hand, when 2% hydrogen + 98% oxygen inhalation therapy was performed, oxidative stress injury and apoptosis of oligodendrocytes were suppressed not only in the acute phase after 1 day but also after 14 days.

研究分野：救急医学

キーワード：一酸化炭素中毒 間歇型 オリゴデンドロサイト 水素 アポトーシス 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素 (Carbon monoxide, CO) 中毒は、全米では年間 50,000 例ほど発生しており、我が国においては CO 中毒による死亡は年間約 2500 例とされている。その原因は事故だけでなく若年～壮年層の自殺によるものも多く、社会的、経済的損失も大きいと考えられる。また、生存例においても急性期症状が改善した後に、約 10%で認知機能障害等を呈する間歇型 CO 中毒を発症し、その 1/4～1/2 の患者は予後不良とされている (Choi et al, Arch Neurol 1983;40:433-5)。

CO 中毒では、CO により多核白血球が活性化され、活性化白血球による酸化ストレスによりミエリン塩基性タンパク (MBP) が変性し、自己免疫反応によりミエリン鞘が破壊されることが報告されている (Am J Respir Crit Care Med 2006;174:1239-48, N Engl J Med 2009;360:1217-25)。その過程でミエリン鞘を形成する細胞であるオリゴデンドロサイトが壊死またはアポトーシスに陥ることが予測されるが、それを確認した報告はなく、ここに間歇型 CO 中毒の病態解明のカギがあると考えられる。

間歇型 CO 中毒の予防として、急性期に高気圧酸素 (Hyperbaric oxygen, HBO) 治療が行われているが、ランダム化試験での結果は一定しておらず、臨床的には明確なコンセンサスが得られていない (Cochrane Database Syst Rev. 2011;4:CD002041)。そのため、急性 CO 中毒における新規の治療法の開発が望まれている。

水素は強力な活性酸素種であるヒドロキシラジカルの選択的消去剤であり、多くの疾患で抗炎症作用・抗アポトーシス作用を持つことが報告されている (Oxid Med Cell Longev 2012; 2012: 353152)。現在、院外心停止蘇生後患者に対する水素吸入療法の安全性と有効性の検討がすでに開始されており (UMIN000012381)、治療ターゲットとして CO 中毒と同じ『脳』に焦点を当てた研究も始まりつつある。

また、日本光電工業株式会社がベッドサイドで使用可能な新規の水素ガス発生機を開発しており、これを用いれば、酸素の配管さえあれば患者に直ちに水素酸素混合ガスを投与開始することができる。そのため、CO 中毒患者において CO 曝露早期から生じる酸化ストレスに対し、早期からの介入が可能であり、早期の治療効果発現が予想される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット CO 中毒モデルにおいて軸索の髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトに注目してその病態を解明するとともに、一酸化炭素曝露後に水素ガス吸入療法を導入し、その効果をオリゴデンドロサイトにおける酸化ストレス抑制効果及び脳保護効果を明らかにすることである。また、水素ガス吸入療法と従来の酸素吸入療法の効果を比較することにより、水素ガス吸入療法の有用性を示し、一酸化炭素中毒における水素ガス吸入療法の確立を行う。

## 3. 研究の方法

Sprague-Dawley (SD) ラット (BW: 300-400 g) を用いて、CO 中毒モデルを作成した。ラット CO 中毒モデルは、過去の報告 (Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:13660-13665) と同様のモデルを用いた。すなわち、ラットをドラフトチャンバー内に設置したアクリルボックスの中で 1000 ppm の CO に 40 分曝露後、3000 ppm の CO に 20 分間曝露し、CO 中毒を生じさせた。

ラットはその後、室内気で 24 時間管理する Control 群 (n = 6)、100%酸素で 24 時間管理する O2 群 (n = 6)、2%水素+98%酸素で管理する H2 群 (n = 6) の 3 群に分けた。また CO に曝露しない Sham 群 (n = 6) も作成した。2%水素+98%酸素は日本光電社製の水素ガス発生装置を用いた。

CO 曝露終了 24 時間後、3、5、7、14 日後にそれぞれ、麻酔後に脳脊髄液を採取し、脱血して血清を保存、冷生食及び 4%ホルマリン液で灌流固定後、脳組織を取り出し組織観察用の切片を作成した。

脳組織は切片作成後、細胞傷害のマーカーである High Mobility Group Box1 (HMGB1)、酸化ストレスマーカーであるマロン酸アルデヒド (MDA)、cleaved caspase-3 (アポトーシスのマーカー) および CC-1 (オリゴデンドロサイトのマーカー) を用いて免疫染色を行い、オリゴデンドロサイトの酸化ストレスおよびアポトーシスの評価を行った。また、脳脊髄液および血清中の HMGB1、MDA の測定を ELISA キットを用いて行った。

データは平均値±標準偏差で示した。経時的なデータの解析は二元配置分散分析で行い、その後の検定には bonferroni 補正を用いた。統計解析は IBM SPSS Statistics for Windows version 22 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 脳梁部のオリゴデンドロサイトにおける HMGB1 の発現

CO 中毒作成 1 日後に Control 群の脳梁部のオリゴデンドロサイトにおいて、細胞質への HMGB1 の発現を認めた (図 1A)。CO 中毒作成 3、5、7 日後の脳では、1 日後に比べ細胞質に HMGB1 を発

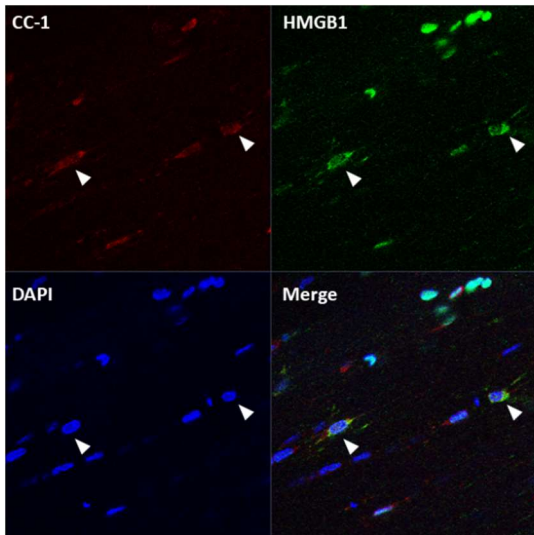


図1A. オリゴデンドロサイトにおける細胞ダメージの評価。Control群Day1の脳梁部。CC-1:オリゴデンドロサイトのマーカー、HMGB1:細胞傷害マーカー、DAPI:細胞核のマーカー。

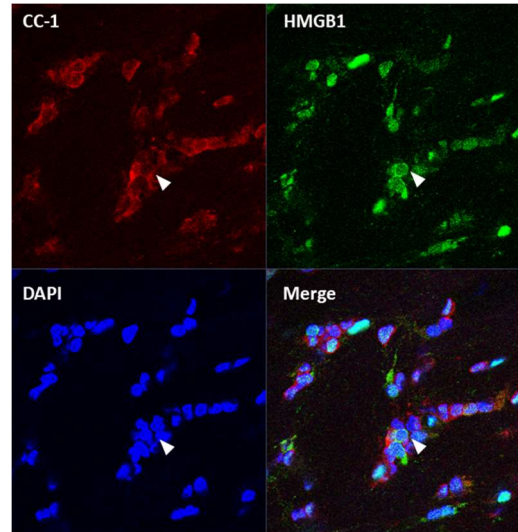


図1B. オリゴデンドロサイトにおける細胞ダメージの評価。Control群Day14の脳梁部。CC-1:オリゴデンドロサイトのマーカー、HMGB1:細胞傷害マーカー、DAPI:細胞核のマーカー。

現した細胞は減少したが、14日後には細胞質にHMGB1を発現したオリゴデンドロサイトは増加した。細胞質へのHMGB1の発現は細胞傷害を示すことから、CO中毒においてCO曝露1日後の急性期および、14日後の亜急性期にオリゴデンドロサイトの傷害が生じていることが示唆された。

## (2) 脳梁部のオリゴデンドロサイトにおける酸化ストレス傷害の評価

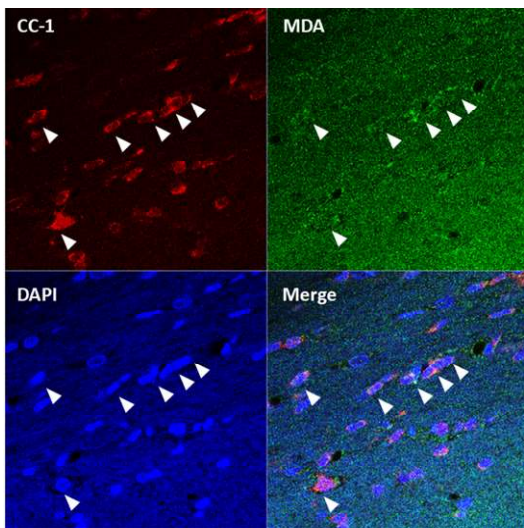


図2.オリゴデンドロサイトにおける酸化ストレスの評価。Control群Day1の脳梁部。CC-1:オリゴデンドロサイトのマーカー、MDA:酸化ストレスマーカー、DAPI:細胞核のマーカー。

図2にControl群の脳梁部のオリゴデンドロサイトと脂質過酸化物質であるマロン酸アルデヒド(MDA)の共染色の結果を示す。オリゴデンドロサイトに一致してMDAの発現を認めた。脳梁部でのMDAの多くはオリゴデンドロサイトに発現していたことから、脳梁部でのMDAをジアミノベンチジン(DAB)で発色させ、脳梁部におけるMDA陽性細胞数を計測した。

図3に各群におけるMDAの発現、および図4に脳梁部におけるMDA陽性細胞数を示す。COに曝露された群(Control、O2、H2群)では、Sham群と比較して有意にMDA陽性細胞数の上昇を認めた( $P < 0.01$ , 図4)。

Control群において、3、5、7日後のMDA陽性細胞数は1日後に比べ有意に減少しており、また14日後は1日後よりも有意にMDA陽性細胞数の上昇を認めた( $P < 0.01$ )。

O2群において、1日後のMDA陽性細胞数はControl群に比べ有意に減少した( $P < 0.01$ , 図4)。3日後はControl群と有意差はなく、5日後はControl群に比べ有意に上昇を認めた( $P < 0.05$ )。7日後はControl群と有意差は認めなかったが、14日後はControl群に比べ有意に減少を認めた( $P < 0.01$ )。H2群では、1、3、7、14日後でMDA陽性細胞数はControl群に比べ有意に減少を認め( $P < 0.01$ )、1、3、5、7、14日後でO2群に比べ有意に減少を認めた( $P < 0.01$ )。

以上の結果から、CO中毒のオリゴデンドロサイトにおける酸化ストレス傷害は、CO曝露1日後には生じており、その後やや改善する

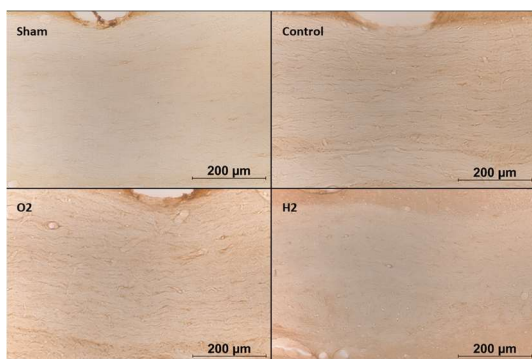


図3. 脳梁部におけるMDA陽性細胞の発現。各群Day1の脳切片を示す。

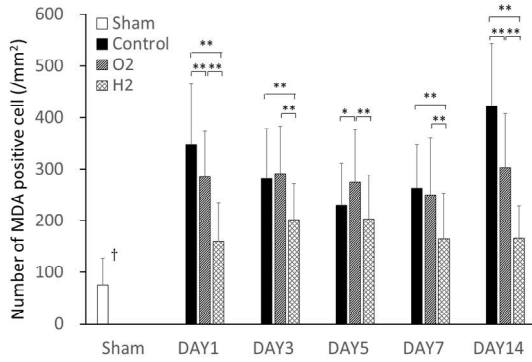


図4. 各群における脳梁部におけるMDA陽性細胞数。†  $P < 0.01$  vs other groups. \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$ .

も、14日後に再増悪することが判明した。また酸化ストレス傷害は酸素投与により軽度改善を認めるが、水素ガスを加えるとCO曝露1日後だけでなく、Control群で増悪を認めた14日後にも、より酸化ストレス傷害抑制効果があることが判明した。

### アポトーシスの評価

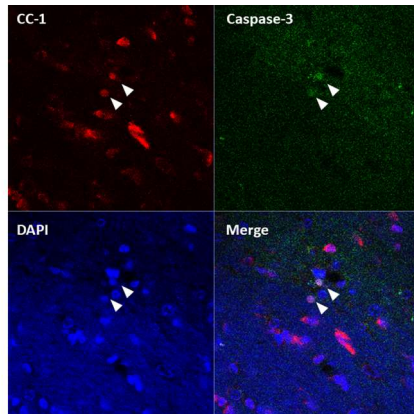


図5. オリゴデンドロサイトにおけるアポトーシスの評価。Control群 Day1の脳梁部。CC-1:オリゴデンドロサイトのマーカー、Caspase-3: cleaved caspase-3、アポトーシスのマーカー、DAPI:細胞核のマーカー。

### (3) 脳梁部のオリゴデンドロサイトにおける

図5にControl群の脳梁部のオリゴデンドロサイトとアポトーシスのマーカーであるcleaved caspase-3 (caspase-3)の共染色の結果を示す。オリゴデンドロサイトに一致してcaspase-3の発現を認め、脳梁部でのcaspase-3の多くはオリゴデンドロサイトに発現していたことから、脳梁部におけるcaspase-3陽性細胞数を計測した。

図6に各群におけるcaspase-3の発現、および図7に脳梁部におけるcaspase-3陽性細胞数を示す。COに曝露された群(Control、O2、H2群)では、Sham群と比較して有意にcaspase-3陽性細胞数の上昇を認めた( $P < 0.01$ 、図7)。

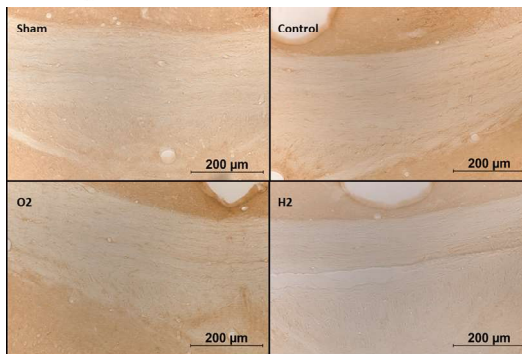


図6. 脳梁部におけるCleaved Caspase-3陽性細胞の発現。各群Day1の脳切片を示す。

Control群において、3、5、7日後のcaspase-3陽性細胞数は1日後に比べ有意に減少しており( $P < 0.01$ )、また14日後は再増加を認め、1日後と有意差を認めなかった。

O2群において、1日後のcaspase-3陽性細胞数はControl群に比べ有意に減少した( $P < 0.01$ 、図4)。3、5日後はControl群と有意差はなく、7日後はControl群に比べ有意に上昇を認めた( $P < 0.05$ )。O2群でも14日後は再増加を認め、Control群と有意差を認めなかった。

H2群では、1日後および14日後でcaspase-3陽性細胞数はControl群に比べ有意に減少を認め( $P < 0.01$ )、1、7、14日後でO2群に比べ有意に減少を認めた( $P < 0.01$ )。

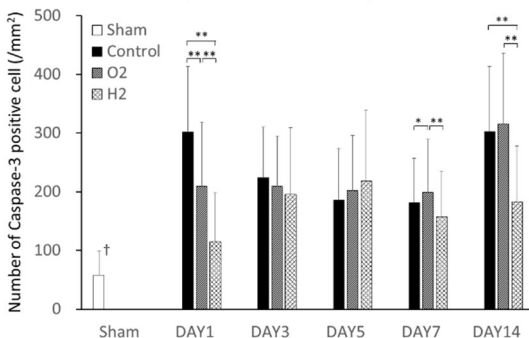


図7. 各群における脳梁部におけるCleaved Caspase-3陽性細胞数。†  $P < 0.01$  vs other groups. \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$ .

以上の結果から、CO中毒のオリゴデンドロサイトにおけるアポトーシスは、CO曝露1日後には生じており、その後やや改善するも、14日後に再増悪することが判明した。また酸素投与によりオリゴデンドロサイトのアポトーシスは軽度改善を認めるが、水素ガスを加えるとCO曝露1日後だけでなく、Control群で増悪を認めた14日後にも、よりアポトーシス抑制効果があることが判明した。

### (4) 血清および脳脊髄液中のMDAおよびHMGB1の定量

血清および脳脊髄液中のMDAおよびHMGB1をそれぞれ図8および図9に示す。Control群の血清MDAはCO曝露1日後および14日後に高い傾向にあった(図8A)。14日後において、O2群

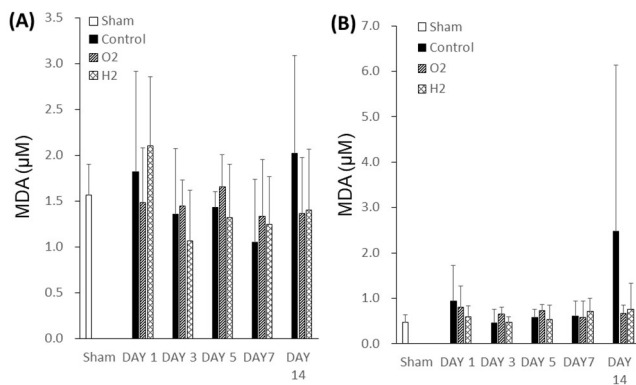


図8. 血清(A)および脳脊髄液(B)中のMDA濃度

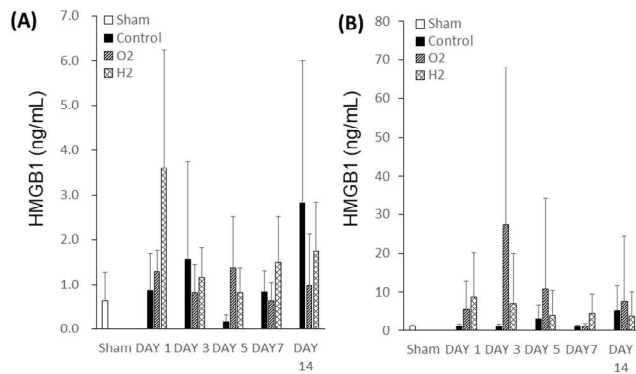


図9. 血清(A)および脳脊髄液(B)中のHMGB1濃度

と H2 群の血清 MDA は Control 群に比べ低い傾向にあった (図 8A)。Control 群の脳脊髄液中の MDA も血清 MDA と同様に CO 曝露 1 日後および 14 日後に高い傾向にあった (図 8B)。14 日後において、O2 群と H2 群の髄液中 MDA は Control 群に比べ低い傾向にあった (図 8B)。

Control 群の血清 HMGB1 は CO 曝露 14 日後に高い傾向にあった (図 9A)。1 日後において H2 群の血清 HMGB1 は Control 群に比べ高い傾向にあった (図 9A)。また 14 日後において、O2 群と H2 群の血清 HMGB1 は Control 群に比べ低い傾向にあった (図 9A)。Control 群の脳脊髄液中の HMGB1 も血清 HMGB1 と同様に CO 曝露 14 日後に高い傾向にあった (図 9B)。14 日後において、H2 群の髄液中 HMGB1 は Control 群に比べ低い傾向にあった (図 9B)。O2 群において、3 日後、5 日後の脳脊髄液 HMGB1 は、Control 群および H2 群に比べ高い傾向にあった。

## (5) 結果のまとめ

今回の研究の結果、ラット CO 中毒モデルにおいて、CO 曝露早期からオリゴデンドロサイトへの酸化ストレス傷害および細胞傷害、アポトーシスが生じていた。さらに 14 日後にいったん収まった酸化ストレス傷害および細胞傷害、アポトーシスの再増悪を認めた。この事象は、間歇型 CO 中毒の病態に深く関与していることが示唆された。また、100%酸素吸入療法によるオリゴデンドロサイトの酸化ストレス傷害およびアポトーシスの抑制効果は限定的であり、また 14 日後におけるオリゴデンドロサイトのアポトーシス抑制効果は明らかでなかった。一方、2%水素+98%酸素吸入療法を行うと、オリゴデンドロサイトの酸化ストレス傷害およびアポトーシスは 1 日後の急性期だけでなく、14 日後にも抑制されていた。これは水素ガスの酸化ストレス抑制効果により、オリゴデンドロサイトのアポトーシスが抑制されたと考えられた。以上の結果より、水素ガス吸入療法が間歇型 CO 中毒を含む、CO 中毒急性期の新たな治療法となりうることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鶴田 良介  (Tsuruta Ryosuke)  (30263768)	山口大学・大学院医学系研究科・教授    (15501)	
研究分担者	小田 泰崇  (Oda Yasutaka)  (40397998)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授    (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------