

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590681
 研究課題名（和文） 一酸化炭素中毒による脳内活性酸素生成機序に関する研究
 研究課題名（英文） Study on the mechanism of hydroxyl radical generation in the brain due to carbon monoxide poisoning

研究代表者
 原 修一（HARA SHUICHI）
 東京医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70208651

研究成果の概要：

一酸化炭素中毒時には、活性酸素種の中で最も毒性の強いヒドロキシルラジカルの生成が脳内で増加するため、これが一酸化炭素中毒による脳障害に関与することが推察されている。本研究において、一酸化炭素中毒時には、脳内の細胞外アスコルビン酸が増加し、これが遊離鉄と反応してヒドロキシルラジカル生成の増加の機序の一つであることが示唆され、通常は脳内で抗酸化剤としての役割を担うと考えられているアスコルビン酸が、一酸化炭素中毒時には、プロオキシダントとしての作用を発揮することが示された。このようなアスコルビン酸の作用は、デヒドロアスコルビン酸を腹腔内投与して脳内の細胞外アスコルビン酸を増加させたモデルでも再現されたことにより裏付けられたことから、in vitro では古くから知られていたアスコルビン酸のプロオキシダントとしての作用が、ある条件下では in vivo においても発現しうることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：一酸化炭素、ヒドロキシルラジカル、アスコルビン酸、遊離鉄、ラット線条体

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)中毒は、化学物質による中毒の中で最も発生頻度が高く、酸素供給を阻害する CO ヘモグロビン(CO₂Hb) の血中濃度が、臨床の場や法医学領域での CO 中毒の決定的な指標となっている。しかし、CO 中毒死が最も疑われたにもかかわらず死体の血中 CO₂Hb 濃度が CO 中毒死とするほど高値で

はなく、剖検によっても死因の特定が困難であった死亡例も少なくない（向井ら、法医学の実際と研究、41:207, 1998）。Ernst & Zibrak (New Engl. J. Med. 339:1603, 1998) は、CO の毒性には、CO₂Hb 生成による低酸素に加え、free の CO 自体が低酸素以外の何らかの作用を有し、それが CO 毒性に重要な役割を演じる可能性を示唆している。近年、

ヘムの代謝過程で生成される内因性のCOが一酸化窒素(NO)と同様に guanylyl cyclase を活性化するなど神経伝達物質あるいは修飾物質としての生理作用を有し(Snyder ら、Brain Res. Rev. 26:167, 1998)、外因性COがこれを疑似することが報告されている(Steiner ら、Am. J. Physiol. 277:R499, 1999)。このように、CO それ自体が種々の生理作用を有することから上述のような事例においては、低酸素に加え、それ以外のCOの作用がその毒性が関与しているのかもしれない、その毒性機序を探索することが死因の究明に必須であると考えられた。

CO中毒では、主に脳の損傷が顕著であることから、著者らは、COの脳に対する作用について検討し、CO中毒ラットの線条体において、活性酸素の中でも最も毒性の強い hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)の生成が著明に促進されることを見出した(Hara ら、Brain Res. 1016: 281, 2004)。 $\cdot\text{OH}$ は、低酸素性低酸素の条件下でも生成はするが、その生成量は、CO中毒の場合よりも著明に少ない(未発表)。このような活性酸素の増加は、神経細胞損傷に直接つながる重要な因子であり、その生成機序の解明はCO毒性を理解するうえで必須であると考えられた。このCOによる $\cdot\text{OH}$ 生成には、電位依存性 Na^+ チャンネルを介する Na^+ の流入(Hara ら、Brain Res. 1016:281, 2004)および細胞内 Ca^{2+} の上昇(第88次日本法医学会総会)が必要であるが、dopamine系、glutamate系(Hara ら、Brain Res. 1016:281, 2004)およびNO系は直接関与しないことが示唆されている(Hara ら、Toxicology 239:136, 2007)。

Chen ら(PNAS 104:8749, 2007)は、抗酸化物質であるアスコルビン酸(AA)を非経口投与すると細胞外AAがプロオキシダントとして作用して活性酸素生成が促進されるが、これは、血中では観察されなかったことを報告した。このようなAAのプロオキシダント作用は、in vitroにおいて鉄や銅のような金属の存在下でよく知られていた。著者らは、ラットを用いて行った予備的な実験で、鉄のキレート剤である deferoxamine (DFO)がCO中毒による $\cdot\text{OH}$ 生成を強く抑制することを見出しており、CO中毒の脳では、細胞外AAがプロオキシダントとして作用し、鉄イオンと相互作用することにより活性酸素の生成を促進することが予想された。これまでこのような観点からの研究はほとんどなされておらず、COの毒性機序を明らかにするだけでなく、in vivoにおける新たな毒性発現機序の探索につながるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CO中毒のラット線条体の内因性AAに対する作用と $\cdot\text{OH}$ 生成に対

するDFOの効果について検討した後、DAAの末梢投与後のラット線条体細胞外AAの変動と $\cdot\text{OH}$ 生成の変動、 $\cdot\text{OH}$ 生成に対する deferoxamine の効果を検討して、脳内AAおよび遊離鉄の関与の有無を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)実験動物：

Sprague-Dawley 系雄性ラット(体重235~265g)を購入して使用した。

(2)マイクロダイアリシス：

ペントバルビタール麻酔下で、ラットの頭部を脳定位固定器に固定し、ガイドカニューレを植込み、約1週間の回復期間の後にマイクロダイアリシス用透析プローブを線条体に刺入して(プローブ先端の座標；0.2 mm AP, 3.0 mm L, 6.5 mm DV) (Paxinos & Watson, 1998)、modified Ringer solution (147 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2)を2 μ /minで灌流した。

(3) $\cdot\text{OH}$ の定量：

すでに報告している方法(Hara ら、Brain Res. 1016:281, 2004)に従い、上述の灌流液に5 mM サリチル酸Naを添加して、灌流液中のサリチル酸と $\cdot\text{OH}$ との反応物である2,3-および2,5-dihydroxy- benzoic acid (2,3-および2,5-DHBA)を、化学電気検出器付高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)を用い、以下の条件で定量した。分離カラム：Eicompac SC-ODS(2.1 x 150 mm)、移動相：EDTA \cdot 2Na (5 mg/L)および2% methanolを含む0.1 M リン酸バッファー (pH6.0)、流速：230 μ L/min、温度：25 $^{\circ}$ C、電極：グラフィイト(Eicom WE-3G)、電圧：+ 0.5 V、参照電極：Ag/AgCl。

(4)細胞外AAの定量：

HPLC-ECDを用い、以下の分析条件で定量した。分離カラム：Eicompac AC-GEL(2.0 x 150 mm)、移動相：EDTA \cdot 2Na (5 mg/L)、hexadecyltrimethylammonium bromide (300 mg/L)および30% methanolを含む0.1 M リン酸バッファー (pH6.0)、流速：120 μ L/min、温度：25 $^{\circ}$ C、電極：グラフィイト(Eicom WE-3G)、電圧：+ 0.45 V、参照電極：Ag/AgCl。

(5)細胞外遊離鉄の定量：

2つの測定法を用いた。1つは、Nilsson ら(Free Rad. Res. 36:677, 2002)の鉄キレート剤 bathophenanthroline disulphonate (BPS)を用いた比色法(測定波長：535 nm)。もう1つは、原子吸光度計による測定法。なお、

後者による測定は、島津製作所に委託した。

(6) CO の曝露 :

従来と同様に(Hara ら, Arch. Toxicol. 76:596, 2002)、高純度 CO ガスを空気と混合して CO 濃度を 3000 ppm に調整し、ラットを入れたチャンパー内に導入する方法で曝露実験を行なった。なお、チャンパー内の CO 濃度は、CO 測定器で常時モニターした。

(7)試薬 : 和光純薬、ナカライテスク、同仁および Sigma-Aldrich から購入した。Dehydroascorbate (DAA)、AA および AA・Na は、注射用生理食塩水(大塚)に懸濁あるいは溶解し、直ちに腹腔内あるいは線条体に投与した。AA oxidase (AAO)は、上述の生理食塩水に溶解して透析チューブに入れ、4 mM リン酸バッファー (pH7.4) を用いて 3 で 5 時間透析し、リン酸バッファーを上述の生理食塩水に交換してさらに 5 時間透析した後、線条体に投与した。また、AAO 活性に依存することを明らかにするために透析後の AAO を 50 で 48 時間加温して不活性化した AAO を対照とした。DFO は、1 mM を灌流液に溶解して実験中投与した。

8) 統計学的解析 : 2 群の場合は、Student's *t*-test を、3 群以上の場合は、One-way analysis of variance の後 Dunnett test あるいは Bonferroni test を用いた。

4 . 研究成果

1) CO 曝露によるラット線条体・OH 生成に対する AA 腹腔内投与の影響 :

AA (500 mg/kg, i.p.)は、それ自体・OH 生成を促進し、また、CO 曝露による・OH 生成を相加的に増加させた (図 1)。

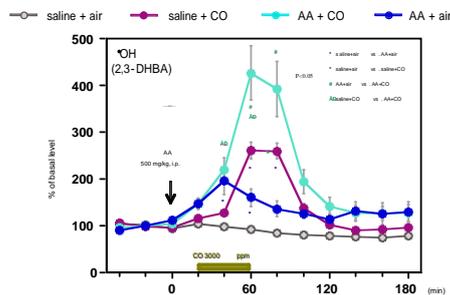


図 1

2) ラット線条体の細胞外 AA 濃度に対する CO 曝露の影響 :

CO 曝露により AA 濃度は、上昇したが、その変動パターンは、・OH 生成のそれと必

ずしも一致しなかった (図 2)。

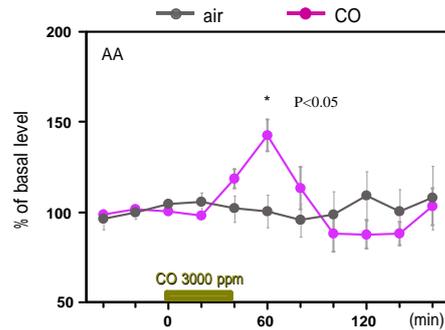


図 2

3) CO 曝露によるラット線条体・OH 生成に対する AAO 投与の効果 :

線条体に AAO (14.6 mUnit/rat)を投与すると、CO 曝露によるラット線条体・OH 生成は完全に抑制されたが、不活性化 AAO 投与では、ほとんど影響を受けなかった(図 3)。

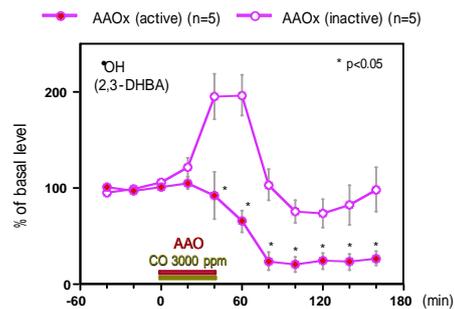


図 3

4) CO 曝露によるラット線条体・OH 生成に対する DFO 投与の効果 :

DFO (1 mM)の投与により、basal の・OH 生成は有意に減少した(図 4)。

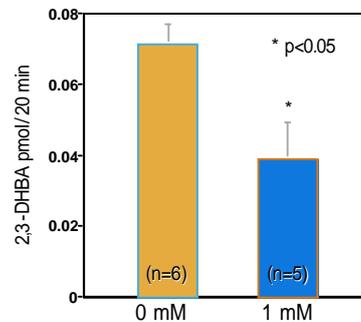


図 4

この実験条件下で、CO 曝露によるラット線条体・OH 生成は、完全に抑制された(図 5)。

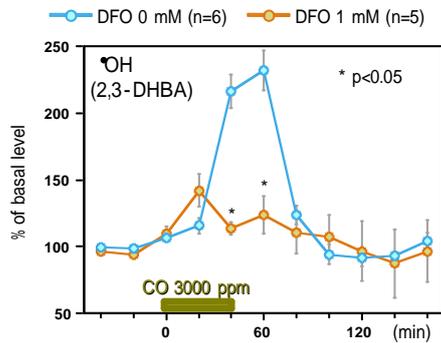


図 5

5) CO 曝露の細胞外遊離鉄への影響：

鉄キレート剤 BPS を用いた方法では、 Fe^{2+} 0 ~ 0.1 μM の濃度でも検量線は直線であったが、0.04 μM 以下では再現性が低かった。線条体の basal の細胞外 Fe^{2+} は、ブランク値 (0 μM) より大きかったが、0.04 μM 以下であり、CO 曝露によってもそれ以上には上昇しなかった。そのため、原子吸光法を用いて測定を試みたが、コンタミを完全には排除することができず、CO 曝露の影響について結果を得るには至らなかった。

6) DAA 腹腔内投与後のラット線条体細胞外 AA の変動：

DAA 腹腔内投与後ラット線条体細胞外 AA は、用量に依存して増加した(図 6)。

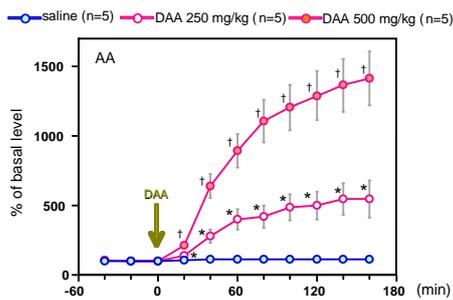


図 6

また、・OH 生成の指標である 2,3-および 2,5-DHBA も増加した (図 7)。

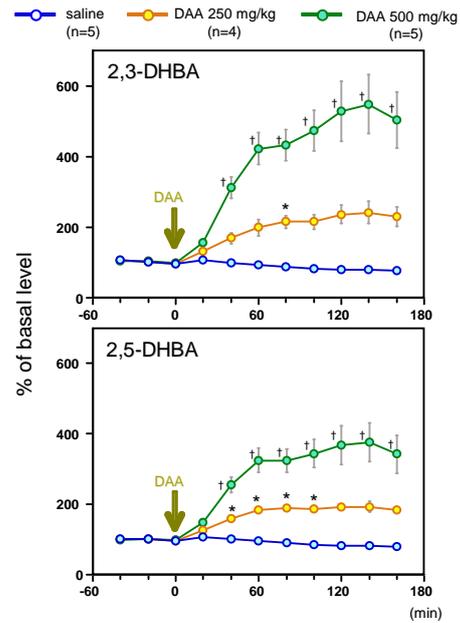


図 7

7) DAA 投与による 2,3-および 2,5-DHBA 増加に対する AAO 投与の効果：

DAA 投与による 2,3-および 2,5-DHBA 増加は、線条体に AAO (14.6 mUnit/rat) を投与することにより完全に抑制されたが、不活性化した AAO には、そのような抑制効果はまったく認められなかった(図 8)。

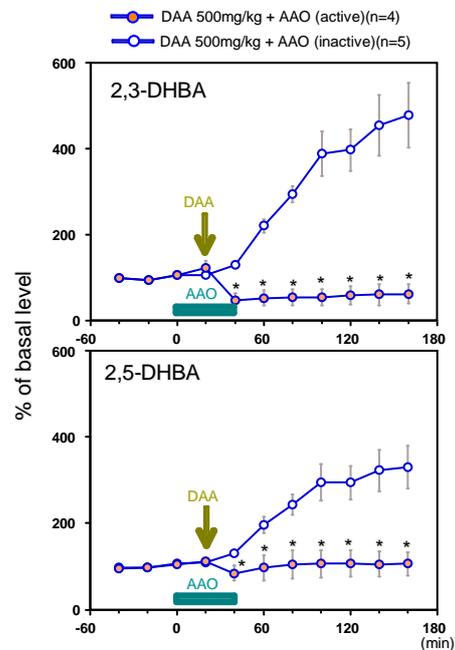


図 8

一方、basal の 2,3- DHBA 生成は、不活性

化 AAO 投与によっても抑制されたが、その抑制効果は活性のある AAO よりも有意に弱かった(図 9)。これに対し、2,5-DHBA 生成は、活性の有無にかかわらず若干抑制された(図 9)。

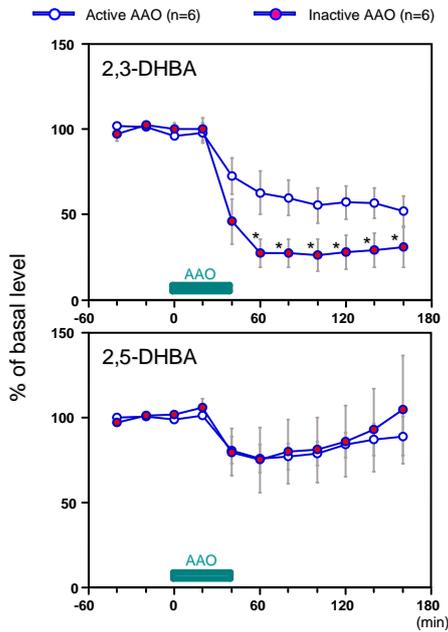


図 9

8) AA・Na の線条体内投与後の 2,3-および 2,5-DHBA の変動：

AA・Na の線条体への投与は、用量依存的に 2,3-および 2,5-DHBA を増加させた(図 10)。

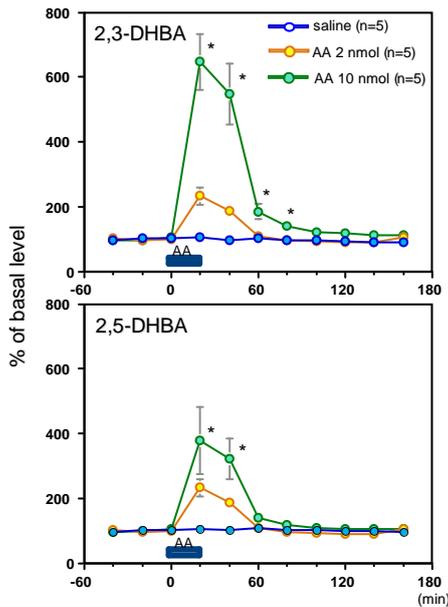


図 10

9) DAA による 2,3-および 2,5-DHBA 増加に対する DFO の効果：

DFO (1 mM)の投与により、図 4 と同様に basal の 2,3-DHBA は有意に減少し、2,5-DHBA はさらに顕著に減少した(図 11)。

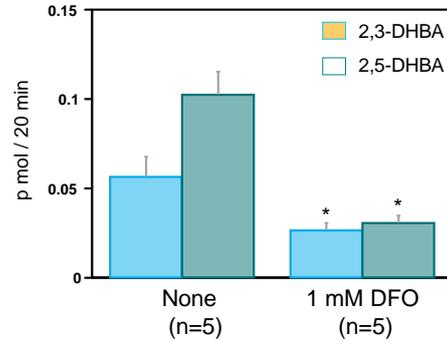


図 11

DFO 投与は、DAA による 2,3-および 2,5-DHBA 増加を非常に強くに抑制したが、それらの増加を完全に消失させるには至らなかった(図 12)。

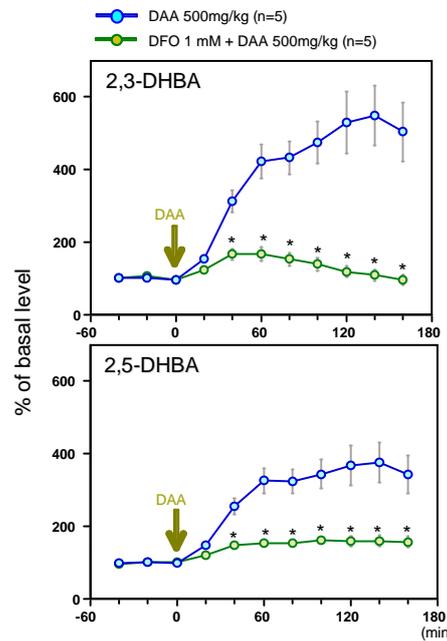


図 12

10) まとめ：

ビタミン C として知られ、抗酸化剤である AA は、in vitro 実験においてはプロオキシダントとして働き、活性酸素生成を促進することが知られている。本研究におけるラットの CO 中毒モデルでは、線条体の細胞外 AA の

増加し、AA 腹腔内投与の・OH 生成の相加作用を考え合わせると、細胞外 AA 増加が CO による・OH 生成に関与することが推察された。しかし、AA の変動は、必ずしも・OH の変動と一致しなかった。しかし、AAO 投与により AA を減少させると CO による・OH 生成は完全に消失したことから、上述の仮説が強く支持された。そのため、CO による・OH 生成には、AA だけでなく金属など他の因子の関与が予想された。そこで、鉄キレート剤 DFO と投与したところ、CO 曝露による・OH 生成が完全に抑制されたことから、AA はプロオキシダントとして作用し、鉄のような金属と相互作用して・OH 生成に関与することが示唆された。そのため、CO 曝露では、細胞外遊離鉄も増加するのではないかと考えてその測定を試みたが、濃度が非常に低いためにこの仮説を確かめるには至らなかった。しかしながら、DAA の腹腔内投与、あるいは AA の脳内への直接投与によって脳の細胞外 AA を増加させた場合においてもその濃度に依存して・OH 生成が促進され、AAO 投与および DFO 投与により抑制されることから、抗酸化剤である AA は、in vivo の脳において細胞外の濃度が上昇するとプロオキシダントとして作用し、金属の存在下で（おそらくは Fenton 反応を加速することにより）・OH 生成を促進することが示唆された。

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) Hara S, Mizukami H, Kuriwa F, Endo T. Hydroxyl radical generation dependent on extracellular ascorbate in rat striatum, as determined by microdialysis, Toxicology 258 巻 10-16 頁 (2009) 査読有

[学会発表](計 2 件)

1) 原 修一, 向井敏二, 水上 創, 栗岩ふみ, 遠藤任彦, 一酸化炭素曝露によるラット線条体のヒドロキシルラジカル生成におけるアスコルビン酸および鉄の関与、第 92 次日本法医学会総会、2008 年 4 月 23 日～25 日、長崎

2) 原 修一, 向井敏二, 水上 創, 栗岩ふみ, 遠藤任彦, ラット線条体における細胞外アスコルビン酸に依存したヒドロキシルラジカル生成：マイクロダイアリシスによる検討、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日～19 日、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 修一 (HARA SHUICHI)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：70208651

(2)研究分担者

(3)連携研究者

