

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15518

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) Investigation of pathophysiology and treatment of the delayed carbon monoxide encephalopathy in rat model

研究代表者

越智 紳一郎(Ochi, Shinichiro)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40568911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳の海馬組織は成人でも神経細胞新生が起こることが報告されており、本研究では間歇型一酸化炭素(以下CO)中毒が、その成体海馬神経細胞新生に与える影響を検討した。COを投与し、3週間後、認知機能が低下したラットの脳組織で、神経前駆細胞と考えられる細胞が有意に減少していること、また、海馬の各グリア細胞の数を確認し、ミクログリアなどが有意な減少していることを確認した。加えて、ラットの海馬組織を取り出し遺伝子発現を調べたところ、神経の栄養に関連した因子の遺伝子の発現の有意な減少も確認した。これらのことから、間歇型CO中毒の病態生理において、成体海馬神経細胞新生が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化炭素(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り、我が国の薬毒物死の原因の中では最多となっている。なお、CO中毒による死亡者の大半が自殺によるものであるため、CO中毒は社会的にも重要な問題でもあり、有効な治療法の確立が望まれる。しかし、数週間後、突然認知機能低下などで発症する間歇型CO中毒は、その病態生理など依然不明である。今回、間歇型CO中毒の認知機能低下の病態生理において、成体海馬神経細胞新生の関与および神経栄養因子に対する影響を示すことができた。今後これらの結果を元に間歇型CO中毒による認知機能低下の予防や治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO) poisoning has acute and delayed stages. Delayed CO poisoning, a few weeks after recovery from the acute stage, causes neuropsychiatric symptoms such as cognitive impairment, and its pathophysiology and treatment remain unclear. Adult neurogenesis is occurred in the dentate gyrus (DG) of hippocampus, and plays important roles in the cognitive function. We investigated the effects of CO exposure on the DG in this rat model. Model rats showed significant cognitive impairment 7 days after CO exposure. Immunohistochemistry showed that compared to the control, cell numbers of neural precursor cells in the DG and cell numbers of microglia in the hippocampus were significantly less 21 days after CO exposure. Furthermore, mRNA expression of neurotrophic factors, which are neurogenic factors in neurogenesis, was significantly decreased in the hippocampus. Dysregulated adult neurogenesis and glial changes in delayed CO poisoning were associated with delayed cognitive impairment.

研究分野：精神神経科学

キーワード：間歇型一酸化炭素中毒 成体海馬神経細胞新生 ミクログリア 神経栄養因子 認知機能

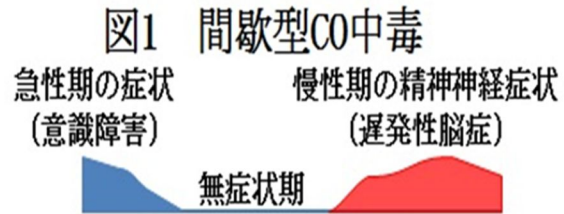
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、1000ppm の濃度で 40min 曝露の後 3000ppm の濃度で 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(DG)を含む凍結切片を作成した。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やミクログリアの変化、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、各細胞特異的な抗体を用いてセルソーターによりミクログリアを分離した。この分離された細胞を用いて、その変化を定量的に解析した。

さらに、CO 曝露 3 週間後の海馬組織から RNA を抽出し、これらの結果を基に得られたグリア細胞や生体海馬細胞新生との関連のある遺伝子の発現の変化をリアルタイム PCR によって検討した。

4. 研究成果

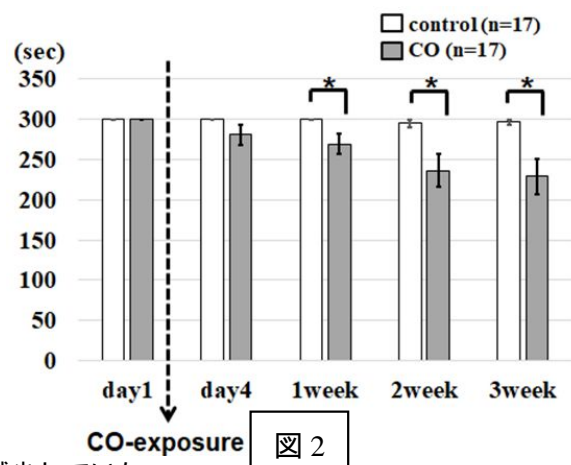
3 週間認知機能低下を受動回避試験により確認したところ、図 2 に示したように CO 曝露群は有意にコントロールより潜時の低下を認め、間歇型 CO 中毒モデルラットを作成できたと考えた。

組織化学的染色では、図 3、図 4 に示したように CO 群で、Control 群と比較して、DG 領域では、神経幹細胞/前駆細胞に発現する SOX2/BLBP/GFAP 陽性細胞が CO 群で有意に減少していたことを確認した。

また、ミクログリアに発現する CD11b 陽性細胞が CO 群で低下することも確認した。

そのため、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、ミクログリアの数を定量的に解析した結果、図 5、図 6 に示したようにミクログリアの数が CO 群で有意に減少していた。

これらの海馬組織での遺伝子発現をリアルタイム PCR によって確認したところ、図 7 に示したように神経細胞栄養因子である Fgf2 遺伝子や Gdnf 遺伝子も CO 群で有意に発現が低下していることを確認した。一方で、同様の神経細胞栄養因子である Bdnf 遺伝子は有意差を認めなかった。



これらの結果から CO は少なくとも 3 週間の長期間に渡って、神経幹細胞やグリア細胞に障害を与え、神経栄養因子の発現も減少させている。これらのことは間歇型 CO 中毒が認知機能障害をきたす原因の一つとして関与している可能性が考えられた。

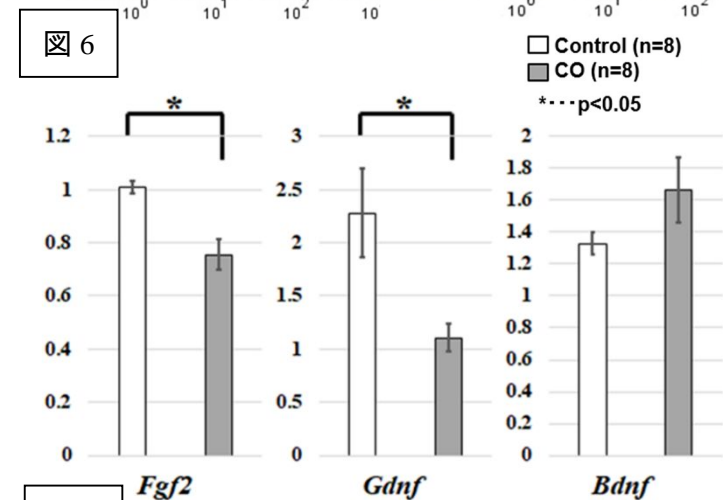
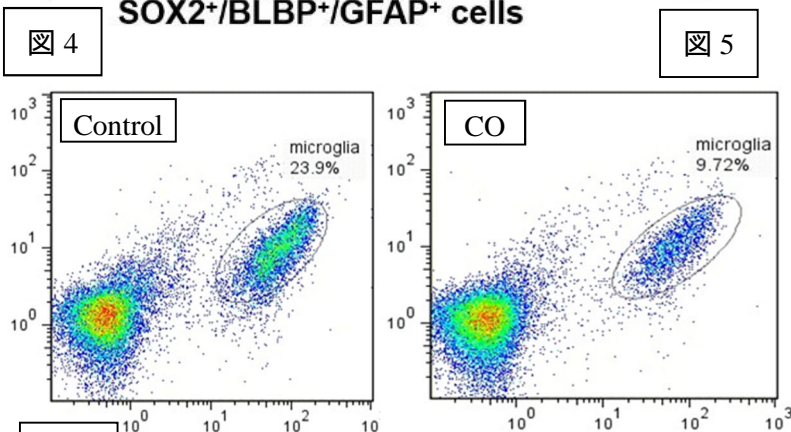
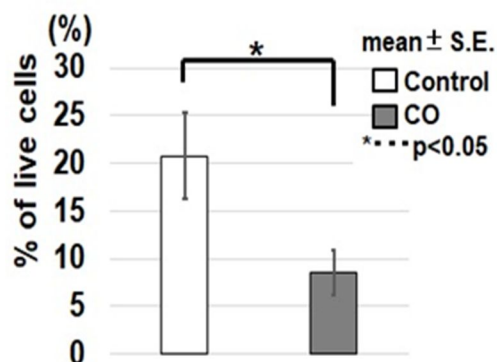
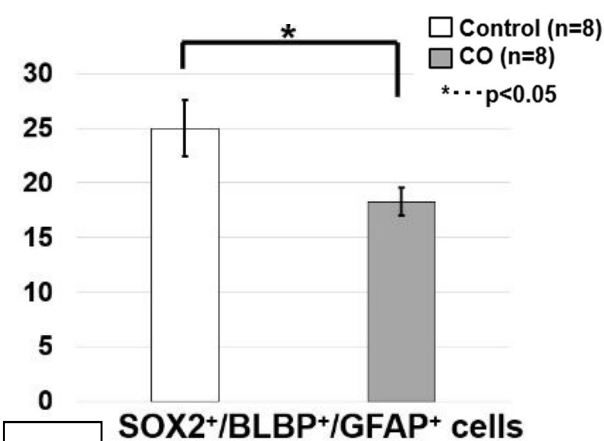
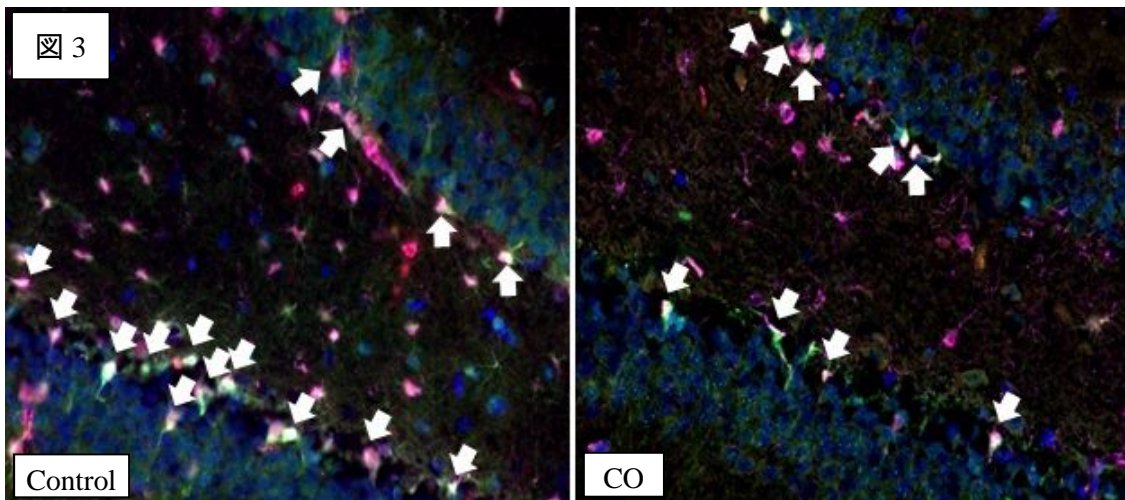


図 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ochi Shinichiro, Sekiya Keisuke, Abe Naoki, Funahashi Yu, Kumon Hiroshi, Yoshino Yuta, Nishihara Tasuku, Boku Shuken, Iga Jun-ichi, Ueno Shu-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Neural precursor cells are decreased in the hippocampus of the delayed carbon monoxide encephalopathy rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85860-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinichiro Ochi
2. 発表標題 Neurogenesis in adult hippocampus is affected in rats with delayed carbon monoxide encephalopathy via glial cells
3. 学会等名 Neuroscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越智 紳一郎
2. 発表標題 間歇型一酸化炭素中毒が海馬のグリア細胞及び成体細胞神経新生に与える影響の検討
3. 学会等名 サイコグリア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Ochi
2. 発表標題 Neurogenesis in the adult hippocampus is affected via glial cells in the rat model of delayed carbon monoxide encephalopathy
3. 学会等名 Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------