

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590874

研究課題名(和文) 二酸化炭素中毒での中枢性の呼吸障害に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The basic study of central respiratory disturbances caused by carbon dioxide poisoning

研究代表者

田中 敏子 (TANAKA, Toshiko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：80141745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：10%以上の高濃度二酸化炭素の吸入による病態を幼弱ラットと成熟ラットで比較した。二酸化炭素30%で幼弱ラットの生存時間はより長く、海馬CA1の好酸性化率はより上昇した。次に呼吸中枢とされる延髄腹側中央部の遺伝子発現をマイクロアレイとリアルタイムPCRで調べた。高濃度二酸化炭素によってノルアドレナリンおよびセロトニンに特異的に関連する遺伝子の発現増加は明らかにはならなかったが、MAPKシグナルパスウェイやサイトカインのシグナルパスウェイとの関連が報告されている最初期遺伝子の発現増加が認められた。これらの発現増加は、低酸素では認められず、高濃度二酸化炭素による呼吸抑制と関連する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The pathological effects of carbon dioxide (CO₂) inhalation were studied at the concentration of more than 10% between infant rats and adult rats. The survival time and the incidence of eosinophilic pyramidal cells in the hippocampus CA1 of infant rats at 30% CO₂ became greater than those in adult rats. The mainstream of respiratory nervous system has been reported to lie in the middle ventral area of medulla oblongata. The mRNA expression in this area was examined by the use of microarray and real-time PCR in the next step. The expressions of genes correlated with norepinephrine and serotonin did not change significantly, but the expressions of some immediate-early genes which related to MAPK signaling pathway or cytokine pathway were enhanced significantly. These expressions were not increased by the hypoxia only. The respiratory disturbances might possibly relate to these expressions induced by CO₂ at the concentration of more than 10%.

研究分野：法医病理

キーワード：二酸化炭素中毒 延髄 呼吸中枢 mRNA マイクロアレイ リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素は概ね 10%以下では呼吸を促進させ、10%を超えると逆に呼吸障害を生じる。二酸化炭素中毒の病態において呼吸障害は最も重要なものであるが、その病態や機序は十分に解明されていない。

乳幼児突然死症候群 (SIDS) は乳幼児に一定の割合で発生し、その原因が種々検討されている。脳幹の呼吸中枢の未熟性のために生理的な睡眠時の無呼吸状態から覚醒せずに死亡するという説が有力であるが、明確な結論には至っていない。さらに、高齢者では二酸化炭素に対する呼吸反応が低下することが報告されているが、その機序は解明されていない。

二酸化炭素吸入によって生じる呼吸反応に関与する経路については、縫線核を中心としたセロトニン経路、延髄腹外側野から外側旁巨大細胞核へのネットワーク、青斑核を中心としたノルアドレナリン経路や延髄の後台形核など脳幹の領域が実験的に検討・報告されている。しかしながら、これらの報告は二酸化炭素 10%以下での実験であり、10%を超える高濃度二酸化炭素の吸入下の報告は見いだせない。

2. 研究の目的

この研究では、まず高濃度二酸化炭素吸入下の呼吸反応を年齢で比較する。次に呼吸と関連する中枢の遺伝子発現の様態を調べる。二酸化炭素中毒の機序解明にとって有用なアプローチになると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 呼吸障害に対する加齢の検討

Wistar 雄の幼弱ラット (生後 7 日から 14

日, Infant) と成熟ラット (体重 400 g から 500 g, Adult) を麻酔した後、容量約 2 リットルの暴露容器に入れ、空気動圧センサーを用いて呼吸運動を記録した。20% ~ 40% の二酸化炭素 (CO₂) (酸素 21%, 窒素バランス) 混合ガスを吸入させ、24 時間後まで呼吸運動をポリグラフで測定し、呼吸が停止する時間を生存時間とした。次に幼弱ラットと成熟ラットを 40% CO₂ (酸素 21%, 窒素バランス) に 3 時間暴露した CO₂ 群と大気に暴露した対照群 (CO₂ 0%, 酸素 21%, 窒素バランス) に分け、脳切片を HE 染色した。海馬 CA1 領域に分布する錐体細胞は虚血に脆弱であることから、CA1 の好酸性化細胞および壊死細胞数の正常細胞数に対する出現率を算出し、それぞれ好酸性化率および壊死率とした。統計上、群間の危険率 5%未満を有意差あり、10%未満を有意差の傾向があるとした。

(2) マイクロアレイによる延髄の遺伝子発現

延髄は呼吸調節の中枢として知られる。マウスはラットに比べて脳摘出が比較的短時間で済むために mRNA の分解を招きにくいこと、マウスを用いた文献がより充実していること、二酸化炭素に対する反応性が両者で類似していたことなどの理由から本実験ではマウスを用いて実験を行い、延髄中央部での mRNA の発現を以下のマイクロアレイ法で網羅的に測定した。

ddy 雄成熟マウス (11 週, 体重約 40g) を麻酔後、暴露容器に入れ、高濃度二酸化炭素 (二酸化炭素 30% 酸素 21% 窒素バランス) 混合ガスを 3 時間吸入させて CO₂-3hr 群とした。同様に大気を吸入させた対照群 (酸素 21%, 窒素バランス), 二酸化炭素 30%環境下に相当する低酸素 (酸素 14.7% (21% × 0.7), 窒

素バランス)を3時間吸入させた Hypoxia-3hr 群, さらに遺伝子発現までの所要時間を考慮して高濃度二酸化炭素を8時間吸入させた CO₂-8hr 群に分けた。ガス吸入終了後, すみやかに断頭し脳を摘出した。第4脳室下延髄中央部を冷却下で分割・採取・秤量し, ただちに液体窒素で凍結しアッセイまで-80℃で保存した。これらの試料を冷却下で震盪ホモジナイズ後, QIA shredder および RNeasy Mini Kit (ともに QIAGEN) を用いて mRNA を抽出し, DNase 処理およびエタノール沈澱操作を加えて精製し, アレイを含む試薬(Agilent, 1色法対応 In-situ オリゴ DNA マイクロアレイキット, 4×44K フォーマット)を用いた定法に従いマイクロアレイを行った。バイオアナライザー(Agilent, RNA ナノキット)でマイクロアレイ前およびラベル化前後に RNA の性能を確認した。得られたアレイデータを GeneSpring (Digital Biology, Ver.12.6.1) を用いて解析し, Fold Change (FC) 2 以上で群間の危険率 5%未満の遺伝子を解析の対象とした。

(3) リアルタイム PCR による定量

前年度に得られた変動が顕著なターゲット遺伝子を Real time PCR を用いて定量し, 変動の有意差を確認した。ターゲット遺伝子として転写調節因子 FOS, FosB, JUN, JunB, ATF3 およびサイトカインおよび免疫関連遺伝子 Ccl2, CD14, 成長因子 Cyr61, アポトーシス関連因子 Nr4a1 の定量を行った。変動が少ない ATP5b を内在性コントロール(内部標準)とした。TaqMan™ プローブおよび StepOne Plus Software を用いて Real time PCR を行い, ターゲット遺伝子の Threshold cycle (Ct 値) を算出した。それぞれのターゲ

ット遺伝子の Ct を ATP5b の Ct で除した値を Ct とした。0hr 群(対照群)の Ct を基準として検定した。

4. 研究成果

(1) 呼吸障害に対する加齢の検討

生存時間は CO₂ 20%では24時間まで生存した幼弱ラットは4匹中4匹, 成熟ラットは3匹中1匹であり, 24時間までしか生存時間を観察しなかったこともあってか生存時間の統計的有意差は群間に認められなかった。CO₂ 30%では幼弱ラットの生存時間は成熟ラットより有意に長かった。40%での生存時間は統計的に有意差が認められなかった(図1)。

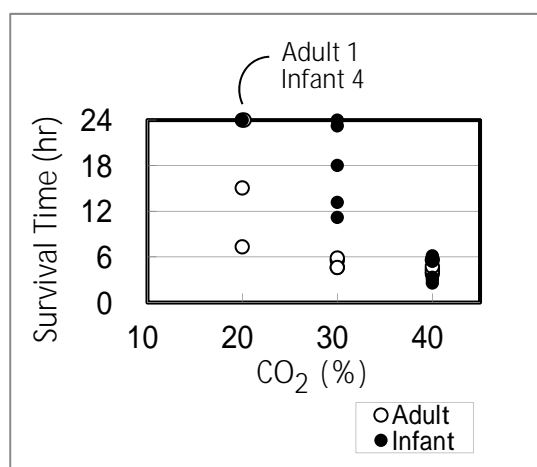


図1 CO₂ 濃度と生存時間

次に海馬 CA1 の錐体細胞をみると, 対照群の好酸性化率と壊死率は成熟ラットのほうが幼弱ラットよりも有意に高かった。CO₂ 吸入による影響を調べると成熟ラットでは CO₂ 群の錐体細胞の好酸性化率は対照群と差はなかったが, 壊死率は高い傾向を示した。一方, 幼弱ラットでは CO₂ 群の好酸性化率は対照群よりも有意に高く, 壊死率は対照群よりも

高い傾向を示した。すなはち、海馬 CA1 の錐体細胞は、高濃度 CO₂ によって好酸性化が幼弱ラットでより出現し、壊死は成熟ラットと幼弱ラットとも出現傾向が認められた。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現

Hypoxia-3hr 群の変動はわずかであった。一方、CO₂-3hr 群では前初期遺伝子を含む転写遺伝子の発現増加がみられ、CO₂-8hr 群で発現遺伝子はさらに増加した。また CO₂ 群の発現増加遺伝子は MAPK シグナルパスウェイやサイトカイン類のシグナルパスウェイなどの関連が示唆された。ノルアドレナリンおよびセロトニンに特異的に関連する遺伝子の発現増加は明らかにならなかった。

(3) リアルタイム PCR による定量

ターゲット遺伝子の発現量が増せば Ct は減少することから、Ct の減少は発現量の増加を示し、Ct の増加は発現量の減少を示す。マイクロアレイの結果より FOS, FosB, JUN, JunB, ATF3, Ccl2, Cyr61, Nr4a1 をターゲット遺伝子とした。Hypoxia 群ではこれらの遺伝子の Ct に有意な変動は認められなかった。一方、CO₂ 群では、転写調節因子のうち ATF3 の Ct は 0hr 群 (対照群) に比べて CO₂-3hr 群および CO₂-8hr 群で有意に減少し (図 2)、FOS, FosB, JUN, JunB の Ct は CO₂-8hr 群で有意に減少した。また Ccl2, Cyr61, Nr4a1 の Ct は CO₂-3hr 群および CO₂-8hr 群で有意に減少し、CD14 の Ct は CO₂-8hr 群で有意に減少した。これらの Ct はいずれも同時間帯の Hypoxia 群よりも有意に低値であった。

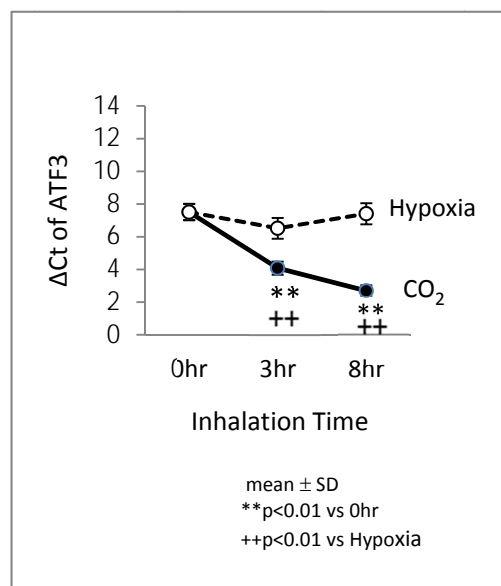


図 2 ATF3 の発現

以上の結果をまとめると、幼弱ラットは成熟ラットに比べて高濃度二酸化炭素暴露下の生存時間は延長し、海馬 CA1 の好酸性化率が高かった。第 4 脳室下延髄中央部において高濃度二酸化炭素の吸入によるノルアドレナリンおよびセロトニンに特異的に関連する遺伝子の発現増加は明らかにはならなかった。一方、最初期遺伝子などの発現増加を引き起こした。これらは、MAPK シグナルパスウェイやサイトカイン類のシグナルパスウェイなどとの関連が報告されており、高濃度二酸化炭素の吸入によって生じる呼吸抑制と関連する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

田中敏子, 笠井謙多郎, 佐藤寛晃, 高濃度二酸化炭素による海馬障害における加齢の影響, 第 63 回日本法医学会九州地方集会, 2013 年 10 月 18 日, 九州大学病院地区コラボ・ス

テーション , 福岡

田中敏子, 笠井謙多郎, 佐藤寛晃, 高濃度
二酸化炭素吸入による延髄の遺伝子発現の検
討, 第 99 次日本法医学会学術全国集会, 2015
年 06 月 11 日, 高知市文化プラザかるぼーと,
高知

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 敏子 (TANAKA Toshiko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 80141745

(2) 研究分担者

佐藤 寛晃 (SATO Hiroaki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 50441845