Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Lipid peroxidation in the rat brain after co inhalation is temperature dependent

工藤, 利彩

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2002-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2434
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002434

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【７５】

氏　名・（本　籍）　工藤　利彩（京都府）

博士の専攻分野の名称　　博　士　（医学）

学　位　記　番　号　　博い第１３９７号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　　平成１４年３月３１日

【学位論文題目】

LIPID PEROXIDATION IN THE RAT BRAIN AFTER CO-INHALATION IS TEMPERATURE DEPENDENT

（一酸化炭素曝露によるラット脳の脂質過酸化は
温度に依存する）

審　査　委　員

主査　教授　上野　易弘

教授　久野　高義　　教授　中村　俊一

1. はじめに

一酸化炭素（CO）中毒は、臨床上、虚血性心疾患と誤診されることや、中毒恢復後に遅発性脳神経細胞死を引き起こすことがあるなど、法医学実務上、CO 中毒死における既往の心疾患寄与程度の評価や遅発死例の診断が困難である。また、CO 中毒は先進国において最も発生頻度の高い中毒原因物質であるにも関らず、その病態に関する基礎研究は極めて少数である。

今回われわれは、CO 中毒による脳障害と脂質過酸化の関連性を明らかにするため、CO 吸入ラットを用い、生体膜脂質であるコレステロールの過酸化物（Ch-OOH, 7α-OOH と 7β-OOH）およびコレステロール酸化物の oxysterol（7α-OH、7β-OH、7-keto）を指標として、1）CO 中毒における脂質過酸化に対する温度の影響、2）低酸素状態と CO 中毒における脂質過酸化の差異について比較検討した。

2. 方法

試薬：同定用標品 5α-hydroperoxycholest-6-en-3β-ol（5α-OOH）、7α-hydroperoxycholest-5-en-3β-ol（7α-OOH）、7β-hydroperoxy-cholest-5-en-3β-ol（7β-OOH）および内部標準物質（IS）の 5α-hydroperoxy-β-sitosterol はすべて我々が合成した。 cholest-5-ene-3β、7α-diol(7α-OH)、cholest-5-ene-3β、7β-diol(7β-OH)、3β-hydroxycholest-5-en-7-one(7-keto) および oxysterol 定量用内部標準物質の β-sitosterol は Steraloids 製、コレステロールは Sigma 製、ルミノール、チトクロム C（ウマ心筋製）、および BHT は和光純薬製を用いた。

対象および方法：雄性 Wistar 系ラットを用い、全身麻酔下で人工呼吸器に接続し、対照群は N_2O(67%)－O_2(33%) 麻酔を吸入させた。CO 群は CO（1005ppm)を 1.5 時間吸入させた後（吸入中、血中一酸化炭素ヘモグロビン濃度が 50%であることを確認)、純酸素を 30 分吸入させ、48 時間後に断頭した。温度依存性については CO 吸入を体温 32℃、37℃、39℃で行い比較した。低酸素（hypoxia）群については、低酸素（10%O_2）を 1.5 時間吸入後、純酸素を 30 分吸入させ覚醒させた。

脳 約 100mg から Folch 法により粗脂質を抽出し、Sep-Pak (-NH_2) によりコレステロール分画を精製した。化学発光検出器付 高速液体クロマトグラフィー（HPLC-CL）を用いて Ch-OOH を、HPLC-UV を用いて oxysterol を測定した。カラムは Inertsil ODS-2（150×4.0mm）移動相にはアセトニトリル：メタノール：水（46：45：9）を用い、7α-OH、7β-OH およびコレステロールは 210nm で検出し、7-keto は 245nm にて検出した。

3. 結果

HPLC-CL を用いて脳の各試料の 7α-OOH と 7β-OOH の濃度を比較した。対照群の 7α-OOH (1.30 nmol/g) は 7β-OOH (4.55 nmol/g) よりも低い値を示した。これは、7α-OOH が 7β-OOH へ異性化しているためと考えられる。Hypoxia 群の 7α-OOH と 7β-OOH の濃度はいずれも、対照群と CO37℃に比べ低い値を示した。また、CO 群については、CO32℃の 7α-OOH（0.56 nmol/g）と 7β-OOH（2.00 nmol/g）はいずれも CO37℃と CO39℃における 7α-OOH と 7β-OOH よりも低い値を示した。

次に、HPLC-UV を用いて oxysterol の濃度を検討した。対照群の 7-keto（39.0 nmol/g）は 7β-OH（11.2 nmol/g）の 3.5 倍の濃度で検出され、いずれもコレステロール過酸化物（Ch-OOH, 7α-OOH と 7β-OOH）よりはるかに高い値を示した。Hypoxia 群の 7-keto は対照群と CO37℃に比べ有意に低い値を示した。また、CO 群を温度別に比較したところ、7-keto は CO32℃（34.3 nmol/g）が CO39℃の（88.2 nmol/g）より有意に低い値を示した。さらに、7β-OH については、CO32℃（10.9 nmol/g）は CO37℃（26.3 nmol/g）と CO39℃の（43.9 nmol/g）のいずれに対しても有意に低い値を示した。

4. 考察

これまでは、CO 中毒による細胞障害は一酸化炭素ヘモグロビン（COHb）形成に起因する低酸素（hypoxia）によるものとされてきた。

CO 中毒による細胞障害のうち、CO 中毒患者の頭部 CT スキャン所見における淡蒼球領域の両側性低吸収域病変（両側性淡蒼球壊死）が有名であり、遅発性脳神経障害によるものと考えられている。この CO による遅発性脳神経障害は、循環不全、CO の直接的毒性、低酸素状態のいずれかもしくはこれらの相互作用によるものとされているが、いずれが本質的要因であるかは明らかでない。したがって、これらの要因を特定することは病態解明上重要である。

一方、外傷後の脳の細胞障害や虚血再灌流障害に、活性酸素種（ROS）の生成やその結果起こる脂質過酸化などの酸化ストレスが関与していることが知られている。また、動物モデルにおいては CO 吸入により ROS が生成することが知られている。

外傷や虚血による脳障害に対しては、臨床上も動物モデルにおいても低体温療法が障害抑制効果を持つ。CO 中毒は火災発生時や入浴中など高温環境下で起こることが多いことより、CO による神経障害作用を高温が増悪するか否か、治療において低体温療法が有効か否かについて強い関心が持たれている。

今回の研究により、1）CO 中毒時の脳における脂質過酸化は体温に依存していること、2）低酸素状態では脂質過酸化が抑制されたのに対し、CO 曝露後は脂質過酸化の亢進がみられ、異なる傾向を示すことが明らかとなった。

CO32℃では、過酸化脂質であるコレステロール酸化物(Ch-OOH, 7α-OOH と 7β-OOH) と oxysterol（7β-OH と 7-keto）のいずれも、CO37℃と CO39℃に比べ有意に低い値を示した。これは、低体温療法が CO 中毒による脳神経細胞障害の治療法として応用可能であることを示している。

また、Hypoxia 群の過酸化脂質が対照群に比べ有意に低いのは、低酸素後の再酸素化により抗酸化酵素が誘導され、過酸化が抑制されるためと考えられる。これに対して、CO 中毒時の過酸化脂質は対照群に比べ上昇した。これらの結果は、CO 中毒による脳障害は COHb の増加に伴う低酸素状態によるものではなく、むしろ CO の直接的な毒性によるものであることを示唆している。

本研究は、従来からの「CO 中毒による細胞障害＝低酸素障害」説では説明できない CO による脳障害機序を明らかにすると共に、CO 中毒による脳障害に対する低体温療法のような、臨床応用可能な治療法の開発につながり得る知見を示したと考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1399号	氏　名	工藤利彩
論文題目	Lipid peroxidation in the rat brain after CO−inhalation is temperature dependent 一酸化炭素曝露によるラット脳の脂質過酸化は温度に依存する。		
審査委員	主　査　上野易弘 副　査　久野高義 副　査　中村俊一		
審査終了日	平成 14年 1 月31 日		

（要旨は1，000字〜2，000字程度）

一酸化炭素（CO）は、先進国において最も発生頻度の高い中毒原因物質であり、法医学では事故や自殺の死因として、又、臨床医学上も中毒恢復後に遅発性脳障害の後遺症を残し問題となる。しかし、その病態に関する基礎研究は極めて少ない。

本研究では、一酸化炭素中毒による脳障害と脂質過酸化との関連性を明らかにする爲、一酸化炭素吸入ラットを用い、生体膜脂質であるコレステロールの過酸化物（Ch−OOH、7α −OOH と7β −OOH）及び同酸化物の oxysterol（7α −OH、7β −OH、7−keto）を指標として、1）一酸化炭素中毒における脂質過酸化に対する温度の影響、2）低酸素状態と一酸化炭素中毒における脂質過酸化の差異　について比較検討した。

Wistar 系雄性ラットを用い、全身麻酔下で人工呼吸器に接続し、対照群は笑気（67%）−酸素（33%）麻酔を吸入させた。一酸化炭素群は一酸化炭素（1005 ppm）を1.5時間吸入させた後（吸入中、血中一酸化炭素ヘモグロビン濃度が50%であることを確認）、純酸素を30分吸入させ、48時間後に断頭した。温度依存性については、一酸化炭素吸入を体温32℃、37℃、39℃で行い比較した。低酸素（hypoxia）群は10%酸素を1.5時間吸入後、純酸素を30分吸入させて覚醒させた。

脳約100mg から Folch 法により粗脂質を抽出し、Sep−Pak(−NH_2) によりコレステロール分画を精製した。化学発光検出器付高速液体クロマトグラフィー（HPLC−CL）を用いて Ch−OOH を、HPLC−UV を用いて oxysterol を測定した。

脳の各試料の7α −OOH と7β −OOH の濃度を比較した所、対照群の7α −OOH（1.30nmol/g）は7β −OOH（4.55nmol/g）よりも低い値を示した。これは、7α −OOH が7β −OOH へ異性化しているためと考えられた。低酸素群の7α −OOH と7β −OOH の濃度は何れも、対照群と CO37℃群に比べ低い値を示した。又、CO 群については、CO32℃の7α −OOH（0.56 nmol/g）と7β −OOH（2.00 nmol/g）共に、CO37℃と CO39℃における7α −OOH と7β −OOH よりも低い値を示した。

次に、oxysterol の濃度を検討した所、対照群の7−keto（39.0 nmol/g）は7β −OH（11.2 nmol/g）の3.5倍の濃度で検出され、何れもコレステロール過酸化物

（Ch−OOH、7α −OOH と7β −OOH）より遙かに高い値を示した。低酸素群の7−keto は対照群・CO37℃の両者に比べ有意に低い値を示した。又、CO 群を温度別に比較した所、7−keto は CO32℃（34.3 nmol/g）が CO39℃（88.2 nmol/g）より有意に低い値を示した。更に、7β −OH は、CO32℃（10.9 nmol/g）は CO37℃（26.3 nmol/g）と CO39℃（43.9 nmol/g）の何れに対しても有意に低い値を示した。

本研究により、1）一酸化炭素中毒時の脳における脂質過酸化は体温に依存していること、2）低酸素状態では脂質過酸化が抑制されたのに対し、一酸化炭素曝露後は脂質過酸化の亢進が見られ、異なる傾向を示すことが明らかとなった。

先ず、CO32℃では、過酸化脂質であるコレステロール過酸化物（Ch−OOH, 7α −OOH と7β −OOH）と oxysterol（7β −OH と7−keto）の何れも、CO37℃と CO39℃に比べ有意に低い値を示したが、これは、低体温療法が一酸化炭素中毒による脳神経細胞障害に対する治療法としての応用可能性を有することを示唆している。

次に、低酸素群の過酸化脂質が対照群に比べ有意に低いのは、低酸素後の再酸素化により抗酸化酵素が誘導され、過酸化が抑制されるためと考えられる。これに対して、一酸化炭素中毒時の過酸化脂質は対照群に比べて上昇した。これらの結果は、一酸化炭素中毒による脳障害は COHb の増加に伴う低酸素状態によるものではなく、むしろ一酸化炭素の直接的な毒性によるものであることを示唆している。

本研究は一酸化炭素曝露によるラット脳の脂質過酸化と温度との関連並びに一酸化炭素中毒と低酸素障害との差異について、コレステロール過酸化物及び酸化物の量的変化の点から研究したものであるが、一酸化炭素中毒による脳脂質過酸化が温度に依存すること、並びに、一酸化炭素中毒による脳障害が低酸素障害とは異なる機序で生じることを示したものであり、一酸化炭素中毒による細胞障害と脂質過酸化との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。