
原 著

一酸化炭素を曝露したラットにおける 高次脳機能障害の評価

渡 辺 智

防衛医科大学校防衛医学研究センター

異常環境衛生研究部門

(主任：相澤義房教授)

Evaluation of Higher Brain Dysfunction in Carbon Monoxide Exposed Rats

Satoru WATANABE

Division of Environmental Medicine,

National Defense Medical College Research Institute

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

高濃度一酸化炭素 (CO) 曝露後、数日から数週間後に見当識障害、記憶力低下などを主症状とする「遅発性神経障害」に進展することがある。この病態を解明するためには、適切なモデル動物の作成と障害評価の方法を確立する必要がある。今回我々は、ラットに CO を曝露してモデル動物の作成を試み、Morris 水迷路試験を行って高次脳機能障害を評価した。7 週齢 Wister rat (オス) に 3,000ppm CO を 60 分間曝露した。曝露翌日から Morris 水迷路試験を行った。ゴールの場所を毎日ランダムに変え、1 日に 2 トライアル実施し、最初のトライアルでゴールに達した後、20 秒後に 2 回目のトライアルを実施した (matching-to-place task)。試験は 1 週間に連続 3 日間行い 4 週間継続した。曝露後 2 週間は、1 回目のトライアルにおけるゴール到達時間が CO 曝露群に遅延して見られたが、曝露後 3 週目以降には差が見られなくなった。2 回目のトライアルにおけるゴール到達時間は、曝露後 2 週間ではコントロール群と比べて差が見られなかったが、曝露後 3 週からは有意差がみられない ($p = 0.0686$) ものの曝露群で遅延する傾向が示唆された。これらの所見は、CO 曝露後 2 週間は急性期症状としての学習障害、曝露後 3 週以降では遅発性神経障害としての記憶力低下を示唆するものと考えられる。CO 曝露後の高次

Reprint requests to: Satoru WATANABE
Division of Environmental Medicine
National Defense Medical College
Research Institute
3-2 Namiki,
Tokorozawa, 359-0042 Japan

別刷請求先：〒 359-0042 埼玉県所沢市並木 3-2
防衛医科大学校防衛医学研究センター異常環境衛生
研究部門 渡 辺 智

脳機能障害を評価するには Morris 水迷路試験の内 matching-to-place task が有用である可能性がある。

キーワード：一酸化炭素中毒, 遅発性神経障害, Morris 水迷路試験

緒 言

約 1,000 ppm の一酸化炭素 (CO) に 1 時間程度曝露されると、頭痛、吐気、労作時の呼吸困難や虚脱、錯乱状態といったいわゆる急性 CO 中毒の症状を呈する。また、CO の濃度が 3,000 ~ 4,000 ppm となると意識不明、昏睡に陥り、4,500 ppm 以上では死亡すると言われている¹⁾。一方、CO 中毒の異なる病型として、遅発性 CO 中毒 (delayed neurological deterioration) という病態がある。これは、急性 CO 中毒の症状が一旦完全に消失し全治したかにみえた後、数日~数週 (通常 14 ~ 21 日程度) で精神神経症状の悪化をきたすものである。集中力の低下、学習能力の低下、痴呆、パーキンソン様症候群 (振戦、硬直、体位反射異常)、せん妄、抑うつなどの症状を呈し、特に高気圧酸素療法 (HBO) 未実施患者に多く発症すると言われている²⁾。

この病態の機序については、いまだ多くが不明である。機序の解明には、適切なモデル動物の作成と障害評価の方法を確立する必要がある。今回我々は、ラットに CO を曝露してモデル動物の作成を試み、Morris 水迷路試験を行って高次脳機能障害を評価した。

材料と方法

1. 動物

7 週齢 Wistar ラット (オス) を通常の方法で飼育。

2. 動物の事前遊泳

CO 曝露後の行動評価 (Morris 水迷路試験) を実施するにあたり、試験開始後における個体によるばらつきおよび水や遊泳への不慣れを軽減する目的で、上記で飼育したラットに事前遊泳を実施

した。方法は、CO 曝露直前の連続する 3 日間、毎日同じ位置からスタートさせ、ゴールを設定しない 60 秒間の自由遊泳をさせた。

3. 動物への CO 曝露

事前遊泳後のラット 6 匹を、ステンレス製チャンバーを使用して、CO 含有空気 [CO 濃度 3,000 ppm : サイサン (株)] で 60 分間の曝露を実施した。

4. 行動評価

行動評価は、Morris 水迷路試験にて実施した。ラットは、6 匹ずつ CO 曝露群とコントロール群の 2 群に分けた。遊泳用プールは、直径 147cm で灰色、塩化ビニール製のものを使用した。プール周囲には、ついたて、曝露用タンク、窓などがあり、目印の代用とした。プールにゴールとして高さ 30cm、直径 12cm のプラスチック製の透明なプラットホームを留置し、プラットホームの 2cm 上まで水で満たして水面から見えないようにした (図 1)。水温は、約 20 °C で実施した。

水中にプラットホームが存在していることを記憶させるトレーニングは実施せず、CO 曝露翌日からすぐに試験 (ゴール到達時間の計測) を開始した。試験は 1 日 2 トライアル (トライアル 1 およびトライアル 2) を 1 セットとし、各トライアルの間隔は 20 秒とした。スタート位置は任意の場所とし、ゴールの場所はセット毎にランダムに変えた (matching-to-place task)。試験は 1 週間に連続 3 日間行い、4 週間継続した (図 2)。

結 果

3,000 ppm 60 分の CO 曝露で、活動性の低下は見られるものの、意識消失したラットはなかった。トライアル開始直後は、両群ともに壁の外側へ

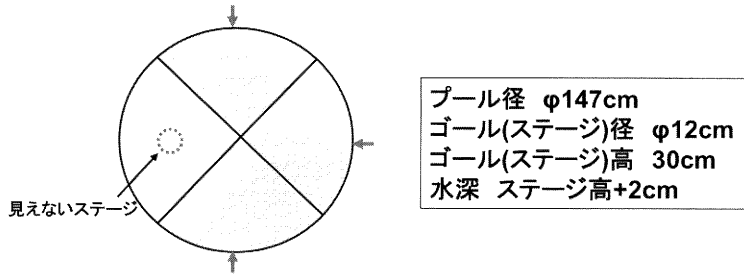


図1 Morris 水迷路試験使用機材

使用した機材は、直径147cmのプールにゴールとして透明な高さ30cmのプラスチック製のプラットフォームを留置し、プラットフォームの2cm上まで水で満たした。

day 1-3, 8-10, 15-17, 22-24(週3日×4週間)

matching-to-place task

- ・1日2トライアル(トライアル1およびトライアル2)実施
- ゴール区画以外任意の場所からスタート
- 各トライアルの間隔は20秒
- ・ゴール(ステージ)は、毎日違う場所
- ・ゴール到達時間を計測

トライアル1は、ゴールの探し方の記憶を反映

→学習能力を反映

トライアル2は、20秒前のトライアル1のゴールの場所の記憶を反映

→空間認識の短期記憶を反映

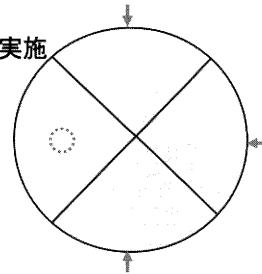
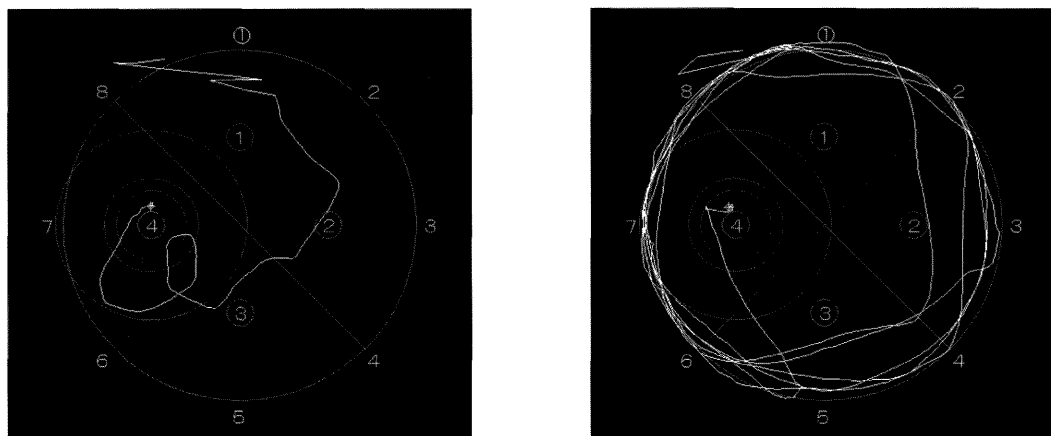


図2 Morris 水迷路試験プロトコール

CO曝露後1-3日目、8-10日目、15-17日目、22-24日目(週3日×4週間)は、matching-to-place taskとして、1日2トライアル(トライアル1およびトライアル2)をゴール区画以外任意の場所からスタートさせ、各トライアルの間隔は20秒とした。ゴール(ステージ)は、毎日違う場所に設置した。そして、ゴール到達時間を計測した。トライアル1はゴールの探し方の記憶を反映することより学習能力の評価、トライアル2は20秒前のトライアル1のゴールの場所の記憶を反映することより空間認識の短期記憶を評価していると考えられる。

の脱出を試みるため、壁に沿って何周か遊泳した。トライアルを重ねると、壁の外側への脱出が不可能であることを学習し、中央部への遊泳をするこ

とで偶然にプラットフォームに到達するようになった。そして、次第にプラットフォームの存在を学習して最初からプラットフォームを探索する行動を示



対照群

CO曝露群

図3 CO曝露後15日目(迷路試験7セット目におけるトライアル1)の1例

対照群ではプラットホームを探す方法を習得しており速やかにゴールに到達しているのに対し、CO曝露群ではプラットホームを探す方法を習得していないため、トライアル開始時と同様に壁の周囲を回るのみであった。しかし、このような顕著な所見を示すCO曝露群は、6匹中2匹であった。

すようになった。

図3にCO曝露後15日目(迷路試験7セット目におけるトライアル1)の1例を示す。対照群ではプラットホームを探す方法を習得しており速やかにゴールに到達しているのに対し、CO曝露群ではプラットホームを探す方法を習得していないため、トライアル開始時と同様に壁の周囲を回るのみであった。しかし、このような顕著な所見を示すCO曝露群は、6匹中2匹であった。

図4に学習能力を反映すると考えられる「トライアル1」を集計した結果を示す。CO曝露1-2週後の学習能力は、CO曝露群で有意に障害されていた。 $(p < 0.02)$ しかし、CO曝露3-4週後の学習能力は両群間で有意差がなかった。

図5に記銘力を反映すると考えられる「トライアル2」を集計した結果を示す。CO曝露後初期(2週以内)の記銘力は両群に有意差は認めないが、3-4週後ではCO曝露群で低下する傾向が示唆された。 $(p = 0.0689)$

考 察

以前 Thom, S. R らは、Wistar ラットに対し 1,000 ppm 40 分および 3,000 ppm 20 の計 60 分の CO 曝露を実施すると意識が消失し、その後の 8 方向迷路試験において学習能力に低下を認めると報告をしている³⁾。本実験を実施する前に、上記条件にて CO 曝露を行ったが、曝露後の意識消失は認めなかった。また、水迷路試験のうち標準的な probe 法⁴⁾においても両群間の差を認めなかった。そこで、曝露条件を 3,000 ppm の一定曝露で検討したところ、60-70 分の間に死亡する個体が出現したため、より強化した条件として 3,000 ppm 60 分曝露を設定し水迷路試験(標準的な probe 法)を実施したが、両群間の差を認めなかった。標準的な probe 法では、タスクが単純なため両群間の差を認めない可能性を考慮して、今回タスクがより煩雑な matching-to-place task⁵⁾を採用した。

今回のタスクでは、学習能力を反映すると考え

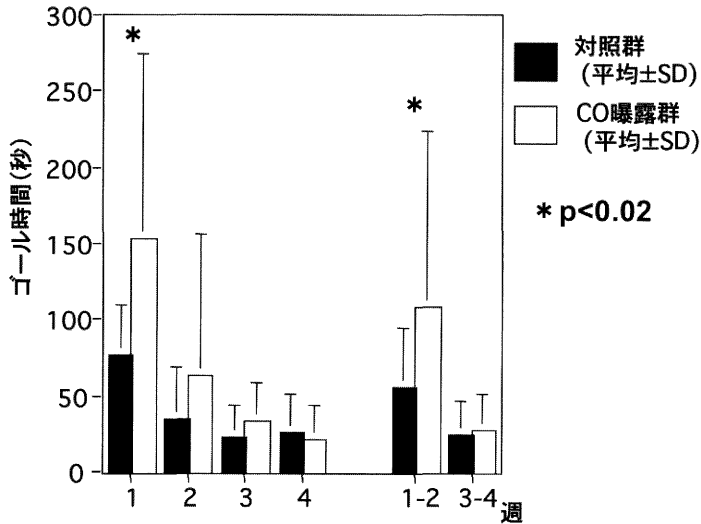


図4 トライアル1：学習能力の検討

CO 曝露 1-2 週後の学習能力は、CO 曝露群で有意に障害されていた。(p < 0.02) この障害は曝露直後に生じていることより、急性 CO 中毒としての障害と考えられる。しかし、CO 曝露 3-4 週後の学習能力は両群間で有意差がなかったことより、急性 CO 中毒の障害から回復したものと考えられる。

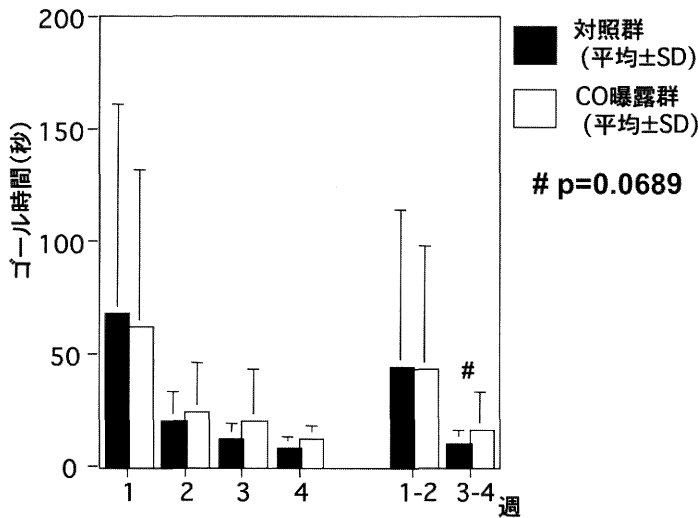


図5 トライアル2：記憶力の検討

CO 曝露後初期 (2 週以内) の短期記憶は両群に有意差は認めないが、3-4 週後では CO 曝露群で低下する傾向が示唆された。(p = 0.0689) この所見は、CO 曝露から時間が経過してから出現していることより遅発性神経障害の徴候の可能性はある。

られる「トライアル 1」において、CO 曝露群で有意にゴール到達時間の遅延を認めた。この所見は、CO 曝露後初期に認めたため、急性 CO 中毒の所見と考えられる。そして、記銘力を反映すると考えられる「トライアル 2」において、CO 曝露群でゴール到達時間遅延の傾向が示唆された。この所見は、CO 曝露後時間が経過してからの出現であったため、遅発性神経障害の可能性があると考えられる。

今回の CO 曝露では意識消失を確認できなかったが、遅発性神経障害の動物モデルを作成するためには、意識消失が見られるさらに厳しい曝露にする必要があると考えている。3,000 ppm 曝露において、60 分までは全個体の意識は清明であり、60-70 分という狭い範囲にその条件があると考えられるので、意識消失を確認できたらただちに曝露を中止して、死亡しないようにする必要がある。しかし、現在の実験装置では、運転を停止してからタンクのハッチを開放できるまでに約 10 分は要している。そのため、タンク内の換気を行っている間に死亡してしまい、意識消失の状態で生存させるのは困難である。したがって、曝露から直ちに開放できるような装置を検討しなければならない。

障害評価の方法としては、Morris 水迷路試験のうち matching-to-place task が有用と考える。今回の実験では、水中にプラットホームが存在していることを記憶させるトレーニングは実施しなかったことが、実験初期は個体間におけるばらつきが大きくなった一因と考えている。また、対照群の中においても、明らかに学習能力が低いと思われる個体いたので、より正確な評価をするためにはあらかじめ学習能力の低い個体を除外した上で、CO 曝露前に個体間のばらつきが生じないようにトレーニングをする必要があると考えられる。

結 論

3,000 ppm 60 分の CO 曝露後 2 週間は急性期症状としての学習障害を認め、曝露後 3 週間以降では遅発性神経障害としての記銘力低下を示唆する所見が得られたが、遅発性神経障害の動物モデルを完成させるためには CO 曝露条件を強化する必要がある、その障害評価の方法は Morris 水迷路試験のうち matching-to-place task が有用である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接ご指導、御校閲をいただきました防衛医科大学校分子生体制御学講座、四ノ宮成祥教授、松尾洋孝先生、同校解剖学講座、小林靖教授、防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門、鈴木信哉教授に謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) Ernst A and Zibrak JD: Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med* 339: 1603 - 1608, 1998.
- 2) Weaver LK, Hopkins RO, Chan KJ, Churchill S, Elliot CG, Clemmer TP, Orme JF, Thomas FO and Morris AH: Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med* 347: 1057 - 1067, 2002.
- 3) Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, Zhang J and Gimotty P: Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated. *Proc Natl Acad Sci* 101: 13660 - 13665, 2004.
- 4) Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP and O'Keefe J: Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681 - 683, 1982.
- 5) Harker KT and Wishaw IQ: Impaired spatial performance in rats with retrosplenial lesions: importance of the spatial problem and the rat strain in identifying lesion effects in a swimming pool. *J Clin Neurosci* 22: 1155 - 1164, 2002.

(平成 21 年 9 月 30 日受付)