

化学検出システム (NO-501、インターメディカル、名古屋、日本) により、電気化学反応 $\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 4\text{H}^+ + 3\text{e}^-$ によって生じる電流を検出した。加電圧は 500mV に設定した。各々の電極は、実験の終わりに、インヴィトロでキャリブレーションを行った。手短に述べると、電極と、その参照電極を、リン酸バッファ-生食 (PBS; 定常流 100micro ml/min) 内におき、ベース電流が安定した後、安定した NO ドナーとして働く S-nitroso-N-acetyl-dl-penicillamine (SNAP, $0, 1 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{M}$) / PBS で、PBS を置換した。

ステンレスのマイクロインジェクションニードル (外径 450micro m、内径 100micro m) を、NO 電極先端部より 1mm 上方にステンレスのマイクロインジェクションニードル先端が位置するように NO 電極に固定し、NO 電極を延髄孤束核尾側部に電極先端部が位置するように挿入した (Bregma より 10mm 尾側、0.5mm 外側、9.9mm 頭がい骨表面下、26 度の角度) [23]。

横隔膜神経活動測定

電氣的干渉や技術的な理由により、NO 電流と横隔膜神経活動の同時測定は断念し、NO 測定のラットと同条件で、横隔膜神経活動を記録した。マイクロインジェクションと同側の横隔膜神経 (C4) をラット背側部より明らかにし、二極の白金電極を神経にフックさせた。神経活動は、フィルタリング (300-3000Hz) され、時定数 100ms でインテグレートされた。

L-NMMA マイクロインジェクションテスト

マイクロインジェクションは、ハミルトン製のマイクロインジェクションシリンドルをインジェクションニードルに接続して行った。L-NMMA (50nmol, 30nl リン酸緩衝液加リンゲル液 (pH 7.4)) は、マイクロインジェクションポンプ (CMA-100, CMA、ストックホルム、スウェーデン) を使用して、30 秒間でマイクロインジェクションされた。

炭酸ガス一定下の低酸素ガス負荷テスト

吸入気酸素濃度 10% を 3 分間負荷した。

ドキサブラム負荷テスト

塩酸ドキサブラム (DOX, 2mg/kg, 500micro-l 生食) を 1 分間かけて静注した。

実験プロトコル

無侵襲ラット (n = 26) と CBD ラット (n = 13) は、

それぞれ 2 つの群に分けられた。一つは、NO 測定の群 (intact n = 16; CBD n = 8) で、一つは、横隔膜神経活動測定の群 (intact n = 10; CBD n = 5) である。

NO 測定

NO 測定群ラット中、無侵襲ラット (n = 16) は、さらにランダムにコントロール (vehicle インジェクション n = 8) と L-NMMA マイクロインジェクション群 (n = 8) に分けられた。NO 電極挿入後、7-8 時間、NO 電流が安定するまでに必要であった。コントロールラットと CBD ラットは、vehicle マイクロインジェクションで、低酸素ガス負荷テストと、ドキサブラムインフュージョンテストが行われた。L-NMMA マイクロインジェクション群ラットでは、L-NMMA マイクロインジェクションで、低酸素ガス負荷テストと、ドキサブラムインフュージョンテストが行われた。それぞれのトライアルは、50-60 分間の間隔を空けて行われた。低酸素ガス負荷後、低酸素からの速やかな回復を目的に吸入器酸素濃度 50% の高濃度酸素ガスを 5 分間ラットに与えた。

横隔膜神経活動測定

無侵襲ラット (n = 10)、CBD ラット (n = 5) にたいして、NO 測定のかわりに横隔膜神経活動測定を行った。コントロールとして、無侵襲ラット 5 匹を無作為に選び、vehicle マイクロインジェクションを行った。CBD ラット 5 匹に対しても vehicle マイクロインジェクションがおこなわれた。無侵襲ラット残り 5 匹に対しては、L-NMMA マイクロインジェクションが行われた。そして、マイクロインジェクション士ともに、低酸素ガス負荷及びドキサブラムインフュージョンが、NO 測定プロトコルと同様の方法で行われた。

組織学的検討

用いたすべてのラットは、電極並びにマイクロインジェクションニードルの挿入位置を確認するために、実験終了後、高用量のウレタンを投与後、速やかに脳を取り出し、10%ホルマリン内に保存し、翌日に 30% ショ糖液内に移した。その後 2-3 日後、50micro m の凍結切片を作り、挿入位置の確認を行った。

結果

NO 電極のインヴィトロキャリブレーション

今回用いた NO 電極の一つは、NO ドナーである SNAP の濃度増加 (0M より $11 \times 10^{-6} \text{M}$) に伴い、電極から得られる電流は約 45pA 増加した。その SNAP 濃度と NO

電流との関係は、1次関係にあり、その回帰直線は、 $\text{NO currente (pA)} = -5.89 \times 10^{-3} + 4.47 \times 10^{-5} \times \text{SNAP concentration (M)}$ ($R^2 = 0.991$)であった。これまでの報告では、この電極では、1.5pAより305pAの間では、SNAP濃度の増加に伴い、直線的に増加することがいわれており⁴⁾、今回のキャリブレーションでもそれと同様の結果が得られた。このように、各電極について、SNAP濃度とNO電流との関係式をもとめ、それより、実験で得られたNO電流値をSNAP濃度に変換し、評価した。

血圧と動脈血酸素分圧

低酸素暴露により、血圧は一時的な増加の後、徐々に減少した。血圧の低下の程度は、各々のラットによって変動した。(室内気 158 ± 8 mmHg、低酸素時 80 ± 11 mmHg)

キサプラム投与により、血圧は上昇した。(投与前 168 ± 2 mmHg、投与後 201 ± 6 mmHg)

低酸素負荷時の動脈血酸素分圧は、約 40 ± 3 mmHg低下した。一方、二酸化炭素分圧は、実験を通して変化を示さなかった。

頸動脈体刺激による横隔膜神経活動

コントロールラットでは、横隔膜神経活動は、vehicle投与によっては変化しなかった。低酸素により、横隔膜神経活動および換気回数は増加した($f_{\text{phr}} \times f$ $273.4 \pm 28.0\%$, f_{phr} $127.6 \pm 25.5\%$, f $109.8 \pm 19.5\%$)。L-NMMAも、室内気換気では、横隔膜神経活動に変化を与えなかったが、vehicleに比較して、低酸素換気反応は減弱した($f_{\text{phr}} \times f$ $129.4 \pm 44.9\%$, f_{phr} $71.1 \pm 13.9\%$, f $33.0 \pm 18.5\%$)。CBDラットにおいては、低酸素負荷において、換気回数がむしろコントロールに比較して減少した($f_{\text{phr}} \times f$ $-51.6 \pm 8.4\%$, f_{phr} $-1.13 \pm 10.8\%$, f $-52.0 \pm 4.20\%$)。

ドキサプラム投与による横隔膜神経活動の変化であるが、コントロールラットでは、ドキサプラムは、 f_{phr} 、 f 共に増加させた($f_{\text{phr}} \times f$ $198.7 \pm 29.8\%$, f_{phr} $94.0 \pm 20.2\%$, f $70.7 \pm 23.0\%$)。ドキサプラムの効果は、5分から10分持続した。L-NMMAマイクロインジェクションにより、ドキサプラムの横隔膜神経活動に対する増強効果は減弱された($f_{\text{phr}} \times f$ $66.7 \pm 6.4\%$, f_{phr} $51.7 \pm 3.3\%$, f $22.1 \pm 16.0\%$)。L-NMMAは、vehicleと比較して、 $f_{\text{phr}} \times f$ の増加を有意に減弱させた($f_{\text{phr}} \times f$ $P < 0.05$; unpaired t-test)。CBDラットでは、ドキサプラムは横隔膜神経活動をわずかにしか変化させなかった($f_{\text{phr}} \times f$ $0.52 \pm 2.4\%$, f_{phr} $1.3 \pm 0.93\%$, f $-0.83 \pm 1.6\%$)。この変化もコントロールと比較して有意に小さかった。

低酸素中のNO電流

NO電極挿入直後、NO電流は上昇したが、次第に減少し、7なし8時間後、安定した。室内換気下においてのNO電流の変動は、2pAより小さいものであった。生食を静注してもNO電流は、影響を受けなかった。また、vehicleを弧束核内にマイクロインジェクションしてもNO電流は変化しなかった。L-NMMAマイクロインジェクションも、室内換気下においては、多くのケースでNO電流に変化させなかったが、一部のラットでは、わずかに電流が減少した(有意差なし、paired t-test)。

低酸素負荷時の弧束核内のNO電流の変化であるが、コントロールラットでは、低酸素負荷とともに速やかに増加し、低酸素負荷中、NO電流は増加した状態が持続し、低酸素終了とともに速やかにベース電流のレベルまで復した(低酸素1分 $1.05 \times 10^{-4} \pm 0.22 \times 10^{-4}$ M 2分 $1.07 \times 10^{-4} \pm 0.30 \times 10^{-4}$ M 3分 $0.99 \times 10^{-4} \pm 0.24 \times 10^{-4}$ M)。L-NMMAマイクロインジェクションラットにおいても、コントロールラットと同様の電流の変化を示した(低酸素1分 $0.24 \times 10^{-4} \pm 0.03 \times 10^{-4}$ M 2分 $0.15 \times 10^{-4} \pm 0.04 \times 10^{-4}$ M 3分 $0.13 \times 10^{-4} \pm 0.05 \times 10^{-4}$ M)。しかし、低酸素時のNO電流の増加の程度は、コントロールに比べて有意に低かった($P < 0.01$, two-way ANOVA)。CBDラットでは、低酸素負荷中も電流の変化は認められなかった(one-way ANOVA: 低酸素1分 $0.09 \times 10^{-4} \pm 0.05 \times 10^{-4}$ M 2分 $0.01 \times 10^{-4} \pm 0.07 \times 10^{-4}$ M 3分 $0.05 \times 10^{-4} \pm 0.07 \times 10^{-4}$ M)。

ドキサプラム投与中のNO電流

コントロールラットでは、NO電流は、ドキサプラム投与によってSNAP濃度に変換すると $1.14 \times 10^{-4} \pm 0.31 \times 10^{-4}$ M増加した。これに対して、L-NMMAラットでは、 $0.19 \times 10^{-4} \pm 0.06 \times 10^{-4}$ Mしか、ドキサプラム投与によって増加しなかった。この増加は、コントロールに比べて、有意に小さかった($P < 0.01$ unpaired t-test)。CBDラットでは、ドキサプラム投与により、 $0.06 \times 10^{-4} \pm 0.03 \times 10^{-4}$ Mと変化しなかった($P < 0.01$ unpaired t-test)。

考察

NOの動態を直接観察することは、NOの極めて酸化されやすく、結果、極めて短い半減期を有するという性質のため、難しい^{21,5)}。そのため、これまでNOを直接 *in vivo* では、測定されることはなかった。我々の以前の研究においても、NO生成の指標として、NOが産生される際とともに産生されるシトルリンを、マイクロダイアリシス

法を用いて測定した³⁾。確かに、脳内においては、シトルリンはNOの合成酵素によってのみしか産生されないため、その変化はNOの変化を反映するものといえる^{3,4)}。しかしながら、それはあくまでも間接的な測定であり、しかもNOの持続的な変動を測定するのは、マイクロダイアリシス法によって測定するのであるなら、不可能である。

Amperometric microelectrode methodは、NOの持続的な変化をとらえることが可能である⁵⁾。しかしながら、大部分のNO電極は機械的ストレスに対して極めて弱い弱であり、生体内で測定するために利用するには難しかった。今回用いたNO電極は、白金/イリジウムの合金で構成されているため、機械的ストレスに強く、生体内での測定を可能とした⁶⁾。したがって、今回我々は、この電極を用いて低酸素負荷時のNOの動態を持続的にモニタリングしてみた。

*In vitro*では、このNO電極は、NO以外の物質の影響を防ぐため、ニトロセルロースで被覆されており、実際、アセチルコリン、グルタミン酸などでは変化せず、加えて、pHの変化にも影響されず、NOのみを検知することが証明されている⁷⁾。ただ、はたして*in vivo*でも同様にNOのみの変化を測定しているかが問題となる。したがって、今回の実験では、NO電極で得られるNO電流に対して、NO合成酵素阻害剤であるL-NMMAの効果を検討した。結果、低酸素負荷または、ドキサプラム投与によって増加した、NO電流は、L-NMMAによって抑制された。L-NMMAは、*In vitro*において、このNO電極に影響を与えないことが知られており、今回実験で得られた、L-NMMAのNO電流の抑制効果は、このNO電極でえられる電流の変化は、NOの変化を反映しているものであることを示している。われわれは、これまでの実験で、末梢の化学受容体の刺激により延髄孤束核でグルタミン酸の遊離と関連してNOが生成されることを示してきた⁸⁾。孤束核内でのコントロールラットとCBDラットとの間の違いは、末梢の化学受容体の刺激の存在の有無と関連した、グルタミン酸とNOの有無である。今回の実験で、電極で検知した電流は、CBDラットにおいては、低酸素およびドキサプラム投与では、変化しなかった。この結果はまた、脳局所におけるpHやNOやグルタミン酸以外の物質が、その電極に影響していないことを示すものである。これらのことより、今回使用した電極が検知する電流の変化は、局所のNO濃度を示しているものと考えている。

電極のセンシング部位は長さ2mmと、孤束核内のみのNOを測定するためには少し長いように思われる。今回の結果から、孤側核周囲からの影響を除外することはでき

ない。ただ、孤側核より外側に離れた場所で、低酸素負荷を行って見たが、電流の増加は見られていなかったことはのべておく（今回はデータは示さず）。

今回の実験においては、コントロールラットでは、NO電流は、低酸素負荷開始とともにすぐに上昇し、低酸素負荷中は、高いレベルで維持され、負荷終了とともに電流は徐々に下がり、ベースレベルまで戻った。低酸素負荷中に増加したNO濃度は、SNAP濃度にして、約 1×10^{-11} M程度であった。 1×10^{-11} M SNAPは、 1.3×10^{-10} MのNOを放出するといわれている⁹⁾ので、今回の低酸素負荷中増加したNO濃度は、 1.3×10^{-10} Mであり、それだけのNOが低酸素負荷開始とともに生成されていると考えられる。今回のこの結果と、以前我々が行ったシトルリンをNOの指標にして測定した結果を比較するのは、麻酔下と覚醒無拘束という実験条件が大きく違うため、難しいかもしれないが、前回の実験で低酸素負荷時、シトルリンが増加し、低酸素負荷中増加が維持されていた¹⁰⁾ことと今回の実験結果は非常に類似した結果であった。しかも、前回実験時のシトルリンの濃度から類推される低酸素負荷中のNO濃度も、 $1 \sim 6 \times 10^{-10}$ Mとこれもまた非常に似通った結果であった。

末梢の化学受容体を刺激するため、今回の実験ではドキサプラムを使用した。ドキサプラム投与においても、NO電流は増加した。ドキサプラムは、末梢の化学受容体刺激薬であり、中枢効果は過度の量を使用した場合にみられる¹¹⁾。今回用いた、CBDラットでは、2mg/kgのドキサプラムでは横隔膜神経活動を増加させなかった¹²⁾ので、ドキサプラムによるNO電流の変化は、末梢の化学受容体刺激により起こったものと考えられた。

孤束核内のNOは、血圧や交感神経活動の調節にも寄与しているものといわれている¹³⁾。今回の研究では、低酸素負荷およびドキサプラム投与中の血圧変動には違いがあったけれども、NOは同様に生成されていた。それゆえ、今回測定されたNO電流の変化は血圧変化とは関係ないものと思われる。

今回の実験では、低酸素負荷により起こる末梢の化学受容体興奮により生成されるNOが低酸素換気反応増加に寄与していることを示唆するものである。これまでに我々は、次のように推察してきた⁸⁾。低酸素血症が末梢の化学受容体により感知され、その化学受容体の興奮により、延髄孤束核尾側部でグルタミン酸が増加する。リリースされたグルタミン酸は、換気の増加を引き起こすと同時に、グルタミン酸NMDA受容体の活性化し、NOの生成を促す。そのNOは、グルタミン酸のリリースを促進させ、低酸素換気増加をさらに高める。今回は、この低酸素換気

応答に関与するNOの動態をさらに明らかにした。NOは、低酸素負荷とともに速やかに増加し、低酸素負荷中を通して、ほぼ同じレベルを保った。低酸素負荷後NOは、低酸素負荷前のレベルに徐々に低下した。低酸素中、横隔膜神経や換気は、化学受容体の興奮が同じ程度であっても、徐々に増加し、そして増加したレベルで維持される。そしえ、その化学受容体からの刺激が、低酸素負荷後無くなると、横隔膜神経活動や換気は徐々に低下してくる。この現象は、afterdischarge、memory、potentiationとさばざまにいられている¹⁵⁾¹⁶⁾。このメカニズムは、末梢の化学受容体からの情報を、中枢でモディファイしているものと考えられているものの、証明されていない。今回の、横隔膜神経の活動の動態は、低酸素中のNOの変化と類似していた。NOは、グルタミン酸のリリースを促進させることにより、低酸素中の換気の安定化にきよしているものと考えられる。

今回の我々の実験は、低酸素換気応答に関与するNOの動態をNO電極を用いて、持続的に測定した。低酸素中、NOは、持続して上昇しており、これは、末梢の化学受容体の関与が示唆された。

文献

- 1) SPYER KM: Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. J. Physiol.(Lond.) 1994; 474: 1-19.
- 2) Mizusawa A, Ogawa H, Kikuchi Y, et al *in vivo* release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. J. Physiol.(Lond.) 1994; 478: 55-66.
- 3) VINCENT SR: Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. Prog. Neurobiol.1994; 42: 129-160.
- 4) Ogawa H, Mizusawa A, Kikuchi Y, et al: Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarii of rat during hypoxia. J. Physiol. (Lond.) 1995; 486: 495-504.
- 5) Archer S: Measurement of nitric oxide in biological models. FASEB J. 1993; 7: 349-360.
- 6) Luo D, Knezevich S, VINCENT SR: N-Methyl-D-aspartate-induced nitric oxide release: an *in vivo* microdialysis study. Neurosci. 1993; 57: 897-900.
- 7) Shibuki K: An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. Neurosci. Res. 1990; 9: 69-76.
- 8) Ichimori K, Ishida M, Fukahori H, et al: Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode. Rev. Sci. Inst. 1994; 65: 2714-2718.
- 9) Pasqualotto BA, HOPE BT, VINCENT SR: Citrulline in the rat brain: immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase. Neurosci. Lett. 1991; 128: 155-160.
- 10) Arnt-Ramos LR, O'brien WE, Vincent SR: Immunohistochemical localization of argininosuccinate synthetase in the rat brain in relation to nitric oxide synthase-containing neurons. Neurosci. 1992; 51: 773-789.
- 11) Mitchel RA, Herbert DA: Potencies of doxapram and hypoxia in stimulating carotid-body. Anesthesiology 1975; 42: 559-566.
- 12) Sapru HN, Krieger AJ: Carotid and Aortic chemoreceptor function in the rat. J. Appl. Physiol. 1977; 42: 344-8.
- 13) Nishino T, Mokashi A, LAHIRI S: Stimulation of carotid chemoreceptors and ventilation by doxapram in the cat. J. Appl. Physiol. 1982; 52: 1261-1265.
- 14) Harada S, Tokunaga S, Momohara M, et al: Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. Circ. Res. 1993; 72: 511-516.
- 15) Eldridge FL, Millhorn DE: Oscillation, gating, and memory in the respiratory control system. In Handbook of Physiology, section 3, The Respiratory System, vol.2, Control of Breathing, American Physiological Society, Bethesda, MD, USA 1986; 93-114..
- 16) Lahiri S: Physiologic responses: peripheral chemoreflex. In the Lung, vol.2, Raven Press, New York, USA 1991; 1333-1340..

呼吸不全治療に関する分子生物学的研究

鈴木 陽一 清水 孝彦 小泉 健一 白澤 卓二*

はじめに

慢性呼吸不全症では、種々の換気不全により末梢臓器が慢性の低酸素状態に暴露されている。本プロジェクトでは、この組織低酸素状態を改善させる方法の一つとして、組織への酸素運搬を担うヘモグロビン分子の酸素親和性に着目している。赤血球中で4量体 ($\alpha_2\beta_2$) を形成しアロステリック効果を持つヘモグロビンは脊椎動物の進化の過程において様々な分子進化をとげたと考えられている。例えば、ワニは長時間の水中滞在が可能であるが、これはワニヘモグロビンに認められる重炭酸に対するアロステリック効果が末梢組織での効率よい酸素供給に貢献していることによると考察されている¹⁾。また一方でヒトにおいて報告されている様々な酸素親和性異常ヘモグロビン症の中で、酸素解離曲線が左方移動する異常ヘモグロビン症は多血症等の臨床症状を認めることが多いのに対し、右方移動を有する異常ヘモグロビン症は無症状ないしチアノーゼを伴う貧血を呈する傾向が認められた。これらの所見は、右方移動を伴うヘモグロビン症が生物学的には機能獲得型の変異である可能性を示唆する。右方移動を示す異常ヘモグロビン症で β グロビン遺伝子に変異を有するPresbyterian型ヘモグロビン症^{2) 3)}は、4量体中心部に配向する β 108 Asn がLysに変異することにより、ヘモグロビン中心溝へClを囲い、脱酸素状態で安定化するようになる^{4) 5)}。またこの変異によってBohr効果は保たれるため、大腸菌⁶⁾、トランスジェニック動物⁷⁾ によるリコンビナントヘモグロビン生産や人工血液⁸⁾ の分野においてもPresbyterian型変異の導入が既に検討されている。今回我々は、遺伝子工学的、胚工学的的手法を用いてPresbyterian型ヘモグロビン症のモ

デルマウスを作製する事に成功した。作製されたヘモグロビン遺伝子改変マウスが産生するヘモグロビン分子の検証、及び生体に及ぼす影響についての検討を報告する。

方法

昨年作製したキメラマウスをC57Black/6マウスに戻し交配し、PCR増幅およびサザン解析によって、変異グロビン遺伝子が胚細胞染色体に移行したマウスを同定した。この変異ヘテロマウス同士の交配からホモマウスが誕生した。

Presbyterian型ヘモグロビン分子の検証

転写レベルで β グロビンmRNAの1塩基置換を確認する為、変異導入マウス骨髓細胞からRNAを精製し、変異導入部を挟んだ β Majorグロビン遺伝子Exon2上のセンスプライマー、Exon3上のアンチセンスプライマーでRT-PCRを行った。RT-PCR増幅産物をクローニングしDNA塩基配列を決定した。翻訳レベルでPresbyterian型変異導入を確認するために以下の実験を行った。野生型、ヘテロ型、ホモ型マウス赤血球溶解液に対し、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーを行いヘモグロビンを単離した。Presbyterian型 β グロビン (β^{Pres}) を野生型 β グロビン (β^{Wt}) と比較する為、逆相高速液体クロマトグラフィーを行い β グロビンを単離した。Presbyterian型 β グロビンの変異導入の解析はLysyl endopeptidase消化物の質量分析にて行った。

Presbyterian型変異の造血への影響の検討

生後10週の野生型、ヘテロ型、ホモ型マウスをそれぞれ3匹ずつ末梢血球測定した。末梢血液塗抹標本はライト・ギムザ染色し鏡検した。骨髓内での造血への影響を調べるために、マウス大腿骨由来の骨髓細胞塗抹標本をライト・ギムザ染色し観察した。組織への影響の検討生後10週の野生型、ヘテロ型、ホモ型マウスそれぞれ3匹ずつを解剖した。肉眼的形態観察に加え、心臓、肝臓、脾臓をパラフィン固定、包埋し、切片をHE染色した。

東京都老人総合研究所分子遺伝学部門

* 「呼吸不全」調査研究班 研究協力者

結果

Presbyterian 型ヘモグロビン分子の検証

RT-PCRではヘテロ型、ホモ型マウスとも野生型と同様のスプライスが行われており、DNAシーケンシングから β グロビンmRNAに1塩基置換が導入されている事が確認された(未発表データ)。Presbyterian型ヘモグロビン蛋白を確認、分離するために行ったイオン交換クロマトグラフィーでは、ホモマウスヘモグロビンはワイルドマウスヘモグロビンより溶出時間が速く、帯電性が変化したことを示唆した(図1左中段)。分離精製した変異ヘモグロビンの逆相クロマトグラフィーでは、 β グロビン単体が分離された。ホモマウス β グロビンは野生型マウス β グロビンより速く溶出した(図1右中段)。これはヘモグロビン4量体のうち α グロビンではなく β グロビ

ンの帯電性が変化したことを示す。またヘテロマウスでは野生型 β グロビンとPresbyterian型 β グロビンの発現量が7対3の割合であった(図1右下段)。Presbyterian型変異において新たにLysが生じる事を利用し、逆相クロマトグラフィーにより分離精製したホモマウス β グロビンに、Lys(K)のC末端側を特異的に認識するLysyl endopeptidaseを加えた。野生型マウスで認められる1つのピーク(図2上段、矢印： β 96-120 理論分子量2823.4、実測分子量2823.0)が2つに分かれることが確認できた(図2下段、矢印)。この2つのピークを分取しそれぞれ質量解析したところ、 β 108 Lys残基を含むペプチド断片(β 96-108)の実測分子量は1537.8であり、理論分子量1537.8と一致した。これらの結果からPresbyterian型ヘモグロビンの変異をmRNA、蛋白質レベルで確認できた。

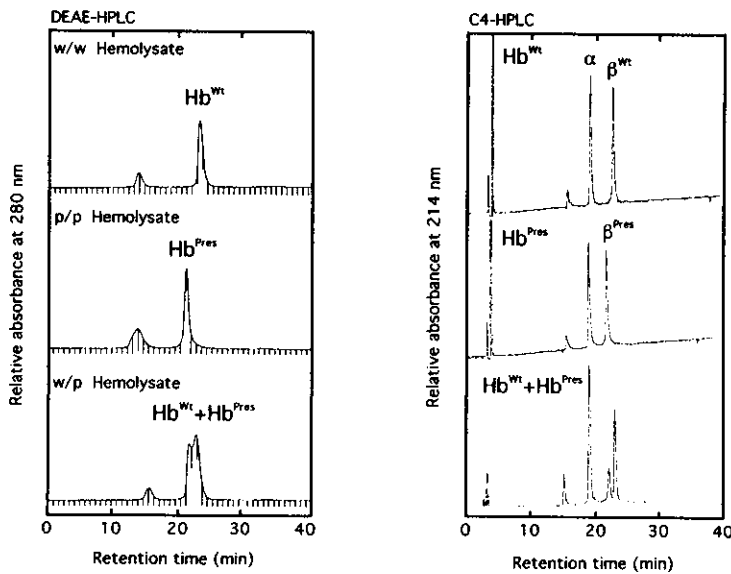


図1 ヘモグロビン、および β グロビンの精製

左図、野生型マウス(上段)、Presbyterian変異導入ホモマウス(中段)、およびPresbyterian変異導入ヘテロマウス(下段)赤血球溶解液のDEAE高速液体クロマトグラフィー。ホモマウスヘモグロビンは野生型ヘモグロビンよりも速く溶出した。

右図、野生型マウス(上段)、Presbyterian変異導入ホモマウス(中段)、およびPresbyterian変異導入ヘテロマウス(下段)ヘモグロビンの逆相高速液体クロマトグラフィー。Presbyterian変異導入 β グロビンは野生型 β グロビンよりも溶出時間が短くなった。

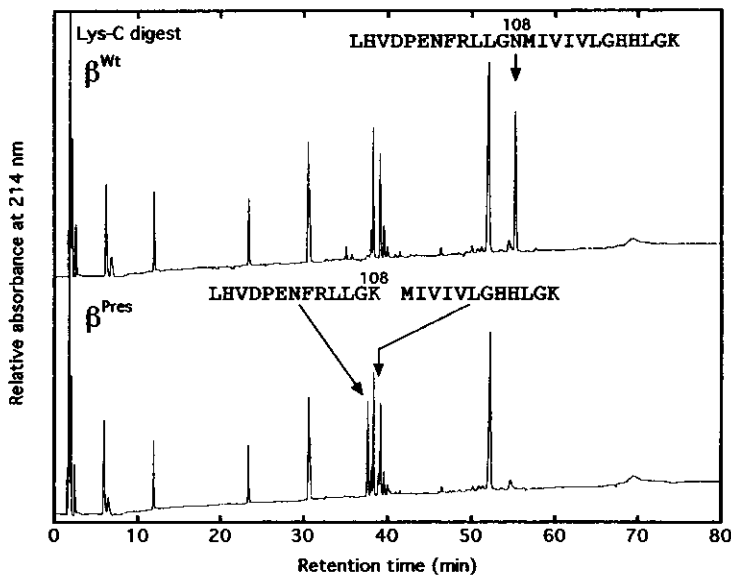


図2 β グロビン Lysyl endopeptidase 消化物の逆相高速液体クロマトグラフィー

上段、野生型 β グロビンの消化物中には96番目のロイシン残基から120番目のリジン残基までのペプチド断片(理論分子量:2823.4、実測値:2823.0)が同定された。

下段、Presbyterian変異導入 β グロビンの消化物中には野生型 β グロビンの消化物中にない、96番目のロイシン残基から108番目のリジン残基までのペプチド断片(理論分子量:1537.8、実測値:1537.8)と109番目のメチオニン残基から120番目のリジン残基までのペプチド断片(理論分子量:1316.8、実測値:1316.7)が同定された。

Presbyterian 型変異の造血への影響

ヘテロ型、ホモ型マウスはともにほぼ正常の発育を示し、生殖能力も有した。末梢血球測定ではヘテロマウスは野生型マウスと差異を認めなかったものの、ホモマウスは小球性低色素性貧血を認めた (Table)。末梢血液像ではヘテロマウスは野生型マウス (図3A) と差異を認めなかったが、ホモマウスは赤血球の大小不同、多染性、破碎赤血球を認めた (図3C)。またホモマウスの骨髓像 (図3D) は野生型マウス (図3B) と比較すると、細胞数の増加、特に赤芽球系の増加が著明であった。ホモマウスは小球性低色素性貧血、間接ビリルビン正常 (n = 1にて参考値) ではあるが、破碎赤血球増加、髄内髄外 (図4D) 造血の亢進、他疾患が否定的であることから溶血性貧血を呈していると考えた。

組織像

ヘテロマウスの組織重量は野生型マウスと差を認めなかったが、ホモマウスは著明な脾腫がみられ、野生型の約2.7倍となった。ホモマウスの脾臓組織では、白色髄の形態は保たれているものの、赤色髄の比率が著明に増加していた (図4 A 野生型, B ヘテロ型, C ホモ型)。ホモマウス赤色髄では細胞数の増加がみられ、特に赤芽球系の増加が著明であった (図4 D 野生型, E ホモ型)。これは髄外造血が亢進していることを示唆した。またホモマウス赤色髄には鉄沈着が認められ (図4F)、赤血球の崩壊の亢進を示唆した。心臓、肝臓についてはヘテロマウス、ホモマウスともに野生型マウスとの差を認めなかった (未発表データ)。

Table : CBC of Hb^{presbyterian} Mice

Genotype	Wild (Hb ^{w^t} /Hb ^{w^t})	Hetero (Hb ^{pres} /Hb ^{w^t})	Homo (Hb ^{pres} /Hb ^{pres})
RBC ($\times 10^6$)	9.90 \pm 0.58	9.62 \pm 0.56	8.11 \pm 0.41 *
Hb (g/dl)	14.7 \pm 1.0	13.6 \pm 0.6	10.0 \pm 0.5 *
Ht (%)	57.2 \pm 4.4	51.7 \pm 4.2	37.6 \pm 1.1 *
MCV (μ 3)	57.3 \pm 1.15	53.7 \pm 4.73	46.7 \pm 1.53 *
MCH (pg)	15.0 \pm 0.0	14.3 \pm 0.58	12.0 \pm 0.0 *
MCHC (%)	25.7 \pm 0.58	26.3 \pm 1.15	26.7 \pm 1.15
WBC ($\times 10^3$)	2.067 \pm 0.737	2.167 \pm 0.814	4.5 \pm 2.6
Plt ($\times 10^3$)	72.6 \pm 28.2	66.2 \pm 9.8	116.1 \pm 11.9

* Statistically significant (p < 0.05, student's t-test)

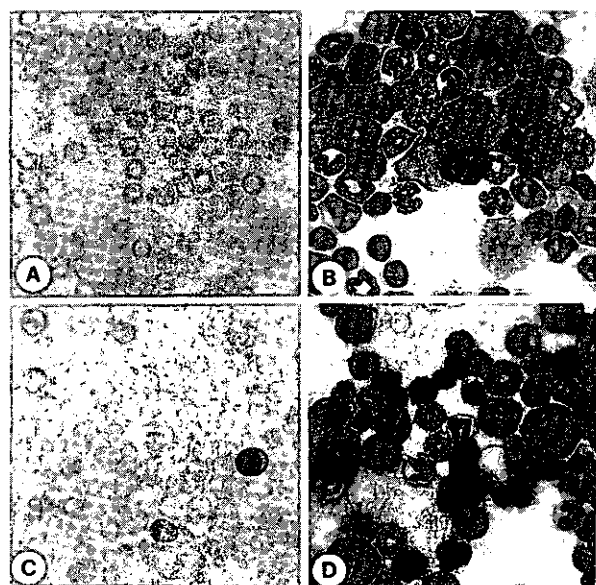


図3 Presbyterian 型変異導入ホモマウスの末梢血像および骨髓像

野生型マウス (A)、Presbyterian 変異導入ホモマウス (C) の末梢血像 (ライト・ギムザ染色)。ホモマウスの末梢血には赤血球の大小不同、多染性、破碎像が認められた。(250倍) 野生型マウス (B)、Presbyterian 変異導入ホモマウス (D) の骨髓像 (ライト・ギムザ染色)。ホモマウスの骨髓像で赤芽球系細胞の増加を認めた。Megaloblastも認められた。(250倍)

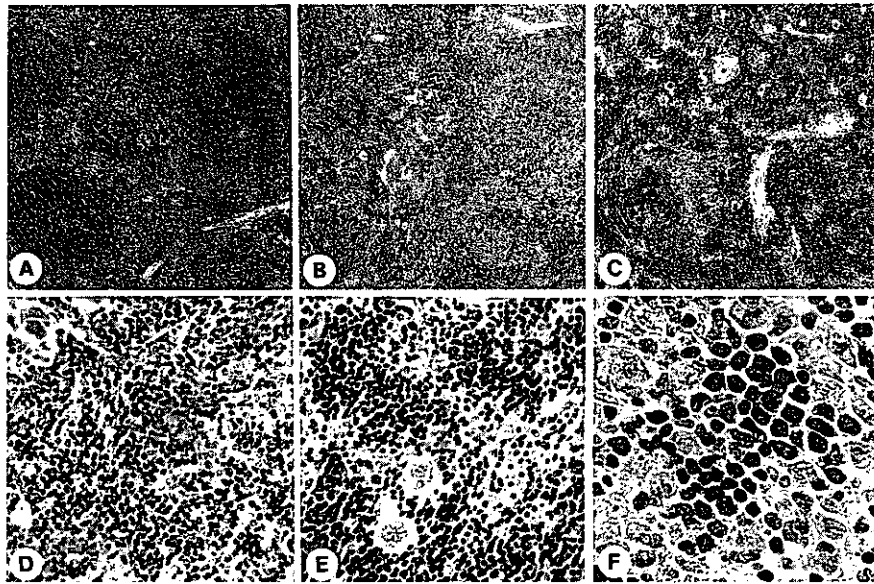


図4 Presbyterian 変異導入ホモマウスの脾臓組織像

(HE染色) 野生型マウス (A), Presbyterian 変異導入ヘテロマウス (B), Presbyterian 変異導入ホモマウス (C) の脾臓組織像 (25倍)。ホモマウスは、白色髄の形態は保たれているものの、赤色髄の比率が著明に増加していた。また Presbyterian 変異導入ホモマウスの赤色髄像 (E, 100倍) は、野生型マウス (D) に比べ、特に赤芽球系を中心とした造血系細胞の増加が著明に認められた。Presbyterian 変異導入ホモマウスの赤色髄には鉄沈着が観察された (F, 250倍)。

考察

今回、Presbyterian 型 Hb モデルマウスのヘモグロビン分子に関して、分子レベルの確認を行った。ホモマウスからは 100% 変異 Hb ($\alpha\beta^{\text{Pres}}\text{Hb}$)₂ を分離できたが、ヘテロマウスでは $\alpha\beta^{\text{Wt}}/\alpha\beta^{\text{Pres}}$ というハイブリッドタイプが認められなかった。ヒトの Presbyterian 型 Hb 症をはじめとする異常ヘモグロビン症も大多数がヘテロであるため理論的にはハイブリッドタイプのヘモグロビンも作られると予想されるが、いずれもクロマトグラフィーでは ($\alpha\beta^{\text{Wt}}\text{Hb}$)₂ 以外に ($\alpha\beta^{\text{Mutant}}\text{Hb}$)₂ のピークしか確認されない。 $\alpha\beta^{\text{Wt}}/\alpha\beta^{\text{Pres}}$ というハイブリッドタイプは 2 量体どうしの親和性が低いことも考えられるが、グロビン単体からの 4 量体再構築も今後の検討課題である。またヘテロマウスでは β^{Wt} と β^{Pres} の蛋白発現量の比率が 7:3 を呈し、ヒトの Presbyterian 型 Hb 症報告と同様の結果を呈示した。我々の現在のマウスが染色体遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を残していることが β^{Pres} の転写、翻訳に影響しているという考えは否定できないが、ヒト症例報告も同様であることから、 β^{Pres} グロビ

ン単体あるいは 2 量体 $\alpha\beta^{\text{Pres}}$ 、4 量体としての蛋白の安定性に影響がでる可能性が示唆された。またホモマウスが予想外に溶血性貧血を呈し髄内、髄外造血亢進していたことは、他のヘモグロビン異常症のメカニズムを考える上でも興味深い。赤血球内でヘモグロビンが全て ($\alpha\beta^{\text{Pres}}\text{Hb}$)₂ になったときに、凝集し、赤血球の変形能を低下させている可能性もあり今後の検討が必要である。今後さらに、右方移動による組織酸素供給量増大及び組織呼吸への効果を検討する為に、酸素解離曲線および Bohr 効果、Cl⁻等の因子の影響について調べる必要がある。また *in vivo* で、右方移動による機能獲得がどの程度認められるかを検討するために、急性、慢性の低酸素負荷を行い、循環動態、組織酸素分圧、組織代謝産物の変化を検討する。また運動負荷を行い Anaerobic threshold を指標とすることにより、Presbyterian 型変異導入によるマウスの運動耐性が亢進しうるかどうかが検討したい。これまでの異常ヘモグロビン症の研究は試験管内で酸素解離特性の変化を主に解析していた。これらの試験管内データの多くは、大腸菌で作製したリコンビナントヘモグロビン蛋白を生化学的に解析したものである。それに対し

本プロジェクトの基本戦略は、変異ヘモグロビンを遺伝子工学的に導入されたマウスを作製し、それらの遺伝子変異が生体に及ぼす影響、特に組織への酸素輸送効率に関して生理学的に検討しようとするものである。したがってこの作製された変異マウスの解析が、大腸菌やトランスジュニク動物由来のリコンビナントヘモグロビンさらには人工血液の実用化に向けた基礎データを提供し、慢性呼吸不全患者の造血幹細胞への遺伝子治療の可能性を探る基礎データに展開することを視野に入れている。

参考文献

- 1) Komiyama NH, Miyazaki G, Tame J, et al: Transplanting a unique allosteric effect from crocodile into human haemoglobin. *Nature* 1995; 373: 244-246.
- 2) Moo PW, Wolff JA, Simon G, et al: Hemoglobin Presbyterian: beta 108 (G10) asparagine leads to lysine, A hemoglobin variant with low oxygen affinity. *Febs Lett* 1978; 92: 53-56.
- 3) Horst J, OheneR, Kleihauer, et al: DNA restriction mapping identifies the chromosome carrying the mutant Hb Presbyterian β -globin gene. *Human Genet* 1983; 64: 263-266.
- 4) Villegas A, Wilson TB, Chen SS, et al: Haemoglobin Presbyterian [beta 108 (G10) Asn \rightarrow Lys] in a Spanish family. *Acta Haematol* 1986; 76: 161-163.
- 5) Schnee J, Aulehla SC, Eigel A, et al: Hb D Los Angeles (D-Punjab) and Hb Presbyterian: analysis of the defect at the DNA level. *Human Genet* 1990; 84: 365-367.
- 6) Harano K, Harano T, Shibata S, et al: Hemoglobin Presbyterian [beta 108 (G10) Asn \rightarrow Lys] found in Japan. *Acta haematol* 1986; 76: 161-163.
- 7) O'Donnell JK, Birch P, Parsons CT, et al: Influence of the chemical nature of side chain at beta 108 of hemoglobin A on the modulation of the oxygen affinity by chloride ions. Low oxygen affinity variants of human hemoglobin expressed in transgenic pigs: hemoglobins Presbyterian and Yoshizuka. *J Biol Chem* 1994; 269: 27692-27699.
- 8) Tsai CH, Shen TJ, Ho NT, et al: Effects of substitutions of lysine and aspartic acid for asparagine at beta 108 and of tryptophan for valine at alpha 96 on the structural and functional properties of human normal adult hemoglobin: roles of alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 2 subunit interfaces in the cooperative oxygenation process. *Biochemistry* 1999; 38: 8751-8761.
- 9) Gottfried DS, Manjula BN, Malavalli A, et al: Probing the diphosphoglycerate binding pocket of HbA and Hemoglobin Presbyterian (beta 108Asn \rightarrow Lys). *Biochemistry* 1999; 38: 11307-11315.
- 10) Looker D, Abbott BD, Kozart P, et al: A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 1992; 356: 258-260.
- 11) Kroeger KS, Kundrot CE: Structure of a hemoglobin-based blood substitute: insights into the function of allosteric proteins. *Structure* 1997; 5: 227-237.

遺伝子操作マウスの呼吸機能

本間 生夫¹⁾ 岩瀬みち子¹⁾ 泉崎 雅彦^{1) 3)} 坂井 泰²⁾
木村 弘³⁾ 栗山 喬之^{3) *}

はじめに

遺伝子ノックアウトマウス或いは遺伝子を導入したマウスは、疾患のモデル動物となるばかりではなく、有効な治療法を開発する為に必要な動物である。これら遺伝子操作マウスの生理機能を測定し、目的の機能の欠損、移行を調べることが重要であるが、動物が小さいことから生理機能を正確に測定することに困難が伴い進展が遅れている。このようなマウスの呼吸機能、血液ガス、組織代謝の測定を確立することでモデルマウスの呼吸器分野への応用に寄与することができる。

我々は上位脳による呼吸調節について中枢ヒスタミンの呼吸への影響を中心に研究を進めてきた。マウス用body plethysmographを作成し、測定した呼吸パラメーターの解析から高体温時に内因性の中枢ヒスタミンが覚醒マウスの呼吸数を増加させることを示した¹⁾。今回は、これを更に進めてヒスタミンH1レセプターノックアウト(H1KO)マウス²⁾の呼吸を調べることによって前回の薬理学的手法による結果を確かめる。

次に末梢レベルで肺胞低換気症を改善するためのモデル動物が白澤らにより開発されている³⁾。これは、Presbyterianヘモグロビン症で発見された遺伝子変異を導入した変異ヘモグロビンマウスである。Presbyterianヘモグロビン症は、酸素解離曲線が右方移動していることが知られており、これを応用することによって組織低酸素が改善される可能性が考えられる。今回は、この変異ヘモグロビンマウスの性質を調べる手始めとして、正常マウスの低酸素負荷時の血中酸素分圧、組織酸素分圧、組織代謝の測定を試みた。

対象と方法

1. 呼吸機能の測定

Vijayaraghavanの方法に基づき、double chamber plethysmograph及び解析システムを作製した⁴⁾。Head chamber及びbody chamberよりそれぞれ呼吸曲線を記録し、コンピュータを使い各パラメーターを検討した。呼吸数(frequency)、一回換気量(V_T)、吸気時間(T_I)はhead chamberより得られた波形から連続する10個の波を平均し、決定した。なお、 V_T は体重10gあたりのBTPS量に換算した。 V_T とfrequencyから分時換気量(V_E)を求めた。統計学的検討にはtwo-way repeated measure ANOVAを用い、 $P < 0.05$ をもって有意とした。

2. ヒスタミン H1 レセプターノックアウトマウス

合計14匹のC57BL/6雄性マウスを使用した。H1KO群($n = 7$)、対照としてlittermateの野生群($n = 7$)を使用した。Body plethysmographにマウスを装着したのち、Animal Blanket Controller(ATB-1100、Nihon Kohden)により体温を37-38℃及び39℃に保持した。5%、7%、9%の CO_2 ガス濃度をもつ $CO_2 + O_2$ 混合ガスを吸入をさせ、各種呼吸パラメーターを測定した。

3. 急性低酸素負荷による呼吸、血液ガスの変化

ネブタール麻酔したC57BL/6雄性マウスを使用した。左総頸動脈、左大腿筋に酸素電極を挿入、左大腿動脈にカニューレを挿入した後body boxに装着させた。Head chamberより呼吸曲線を描記、 PO_2 モニター(ユニークメディカル社製)を介して動脈酸素分圧(PaO_2)及び組織酸素分圧($P_{tissue} O_2$)を、また圧トランスデューサー及び血圧用アンプ(日本電気三栄)を介して大腿動脈圧(BP)を同時記録した。室内気、低酸素ガス(O_2 、10-11%)を吸入させそれぞれのデータを連続記録した。

4. 慢性低酸素負荷による組織アデノシン、ATPの変化

アクリル樹脂で作成されたチャンバーと低酸素発生装

1) 昭和大学第二生理

2) 昭和大学医療短大作業療法

3) 千葉大学呼吸器内科

* 「呼吸不全」調査研究班 主任研究者

置（帝人社製）とを接続しO₂約10%の環境を作った。この中に飼育箱を入れ、24時間飼育したC57BL/6 雄性マウスと室内気下で飼育したマウスとを実験に用いた。

エーテルで軽麻酔したマウスを頸椎脱臼後、直ちに心臓穿刺し、採血により脱血させ、心筋、大腿筋を摘出した。0.1M phosphate bufferにてリンス後、液体窒素にて急速冷凍した。後日解凍した標本は、citric phosphate buffer (CP-Buffer) 中でミンス後、homogenizeし、遠心分離 (5,000 rpm) した後、上清をサンプルとして使用した。CP-buffer、内部標準として α , β -methylene adenosine 5'-diphosphate を添加、サンプルを加えた後、誘導化試薬として 2-Chloroacetaldehyde を添加、80 °C で 40 分 incubate し、氷冷により反応を停止後、蛍光検出器付き HPLC により測定した。

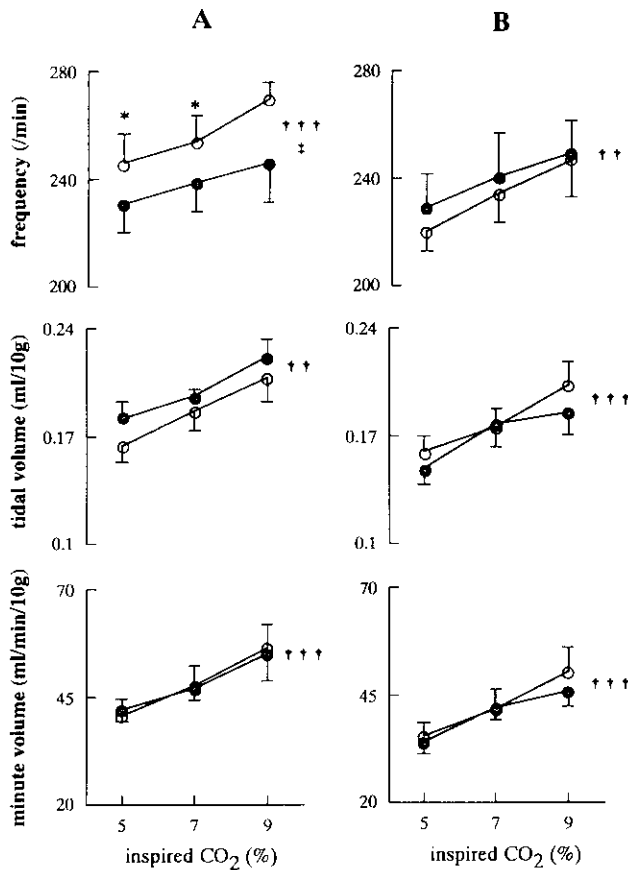


Fig. 1. 37-38°C (黒丸) と 39°C (白丸) において吸入CO₂ (5, 7, 9%) に対する frequency (上段)、V_T (中段)、T_E (下段) の変化を比較した。野生型マウスは A に H1KO マウスは、B に示す。吸入CO₂ に対する主効果の有意確率は、†† p < 0.01 ††† p < 0.001 で示し、体温に対する主効果の有意確率は、‡ p < 0.05 で表した。

結果

1. ヒスタミン H1 レセプターノックアウトマウス

Fig. 1 は、野生型と H1KO マウスにおける frequency、V_T、T_E の体温による影響を示す。いずれも FICO₂ の増大に伴い増加した。体温上昇によって野生型は、frequency が上昇したが (p < 0.05)、H1KO マウスではこの上昇が認められなかった。体温上昇は、V_T、T_E に対して野生型、H1KO マウス共有な影響を与えなかった。

Fig. 2 は、両群における T_I、T_E に対する体温の影響を示している。野生型では T_I において異なる体温間での交互作用が認められた。しかし H1KO マウスでは T_I に体温間の違いが認められない。T_E は野生型では、両体温間で有意な差が認められた (p < 0.05) が、H1KO マウスでは認められなかった。

2. 急性低酸素負荷による実験

Fig. 3-A は、急性低酸素負荷による PaO₂ と呼吸流量の変化を示している。11% O₂ 吸入により、呼吸流量が増大し、総頸動脈より測定した PaO₂ が減少しているのが

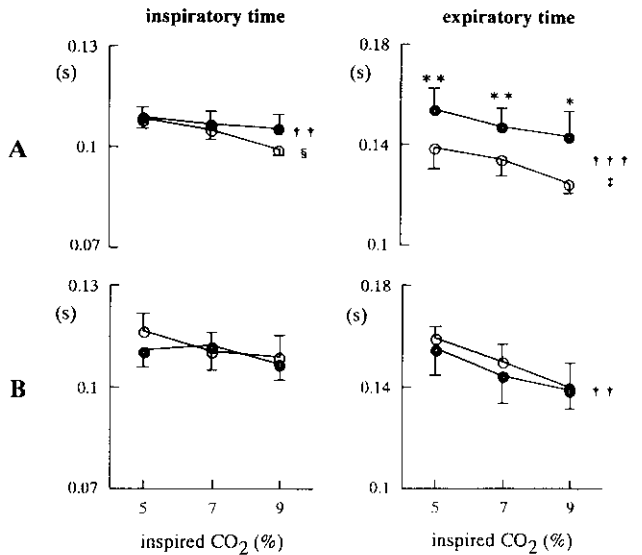


Fig. 2 37-38°C (黒丸) と 39°C (白丸) において吸入CO₂ (5, 7, 9%) に対する T_I (左) と T_E (右) の変化を比較した。

A は、野生型マウス、B は、H1KO マウスである。吸入CO₂ に対する主効果の有意確率 ††† p < 0.001 †† p < 0.01 † p < 0.05。体温に対する主効果の有意確率 ‡ p < 0.05。吸入CO₂ と体温との交互作用の有意確率、§ p < 0.05。各CO₂ における37-38°C と39°C の検定; paired t test * p < 0.05 ** p < 0.01.

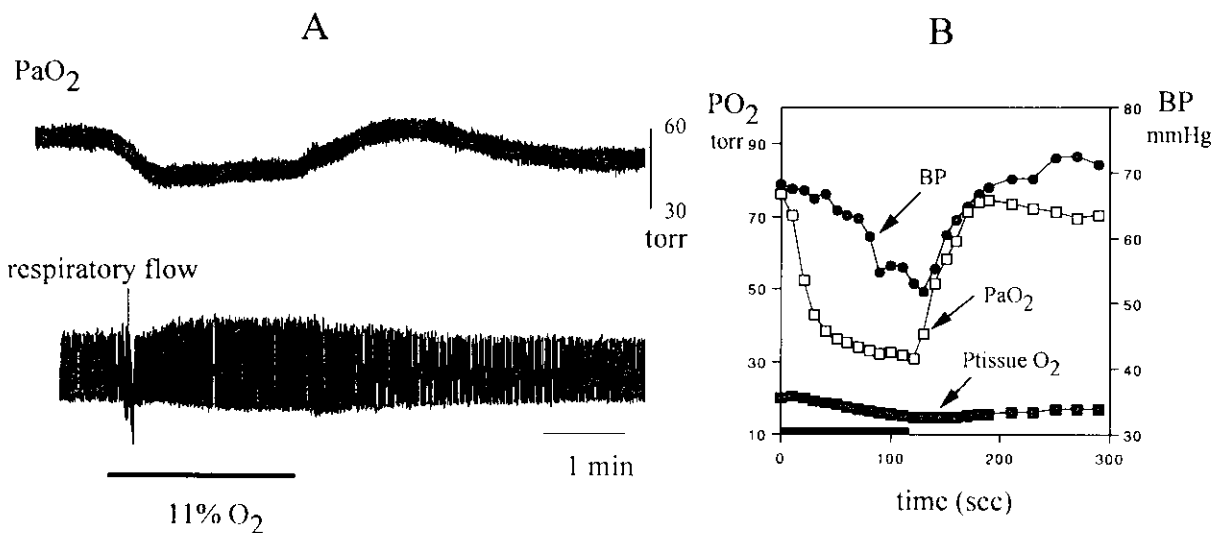


Fig. 3 正常マウスにおける急性低酸素負荷の影響
 A : 11% O₂ 吸入 (下線) による PaO₂ と呼吸流量の変化を示す。
 B : 11% O₂ 吸入 (2 min) による PaO₂、PtissueO₂、血圧 (BP) の時間経過の一例を示す。

認められた。室内気への切り替えにより回復するが PaO₂ は、一過性に増大した。

Fig. 3-Bは、PaO₂、PtissueO₂、血圧 (BP) の時間経過を示している。2分間の低酸素による PaO₂ と PtissueO₂ への影響が観察され、血圧変化を同時に記録することによって循環への影響を調べた。

3. 慢性低酸素負荷による実験

室内気群 (n = 3)、低酸素群 (n = 3) の心筋、骨格筋においてアデノシン、ATP含量が測定された。アデノシンは、骨格筋に比べ心筋に含量が多く、ATPは骨格筋に多く含

まれていた。心筋のアデノシン量は室内気群が 29.1 ± 3.6 nmol/g wet tissue、低酸素群は 20.7 ± 1.3 nmol/g wet tissue であり、骨格筋のアデノシン量は室内気群が 6.9 ± 0.2 nmol/g wet tissue に対し低酸素群は 3.6 ± 0.4 nmol/g wet tissue であった。骨格筋での低酸素群における減少は有意 (p < 0.01) であった。ATP量は、室内気群と低酸素群の心筋が、それぞれ 0.55 ± 0.057、0.89 ± 0.070 nmol/g wet tissue であり骨格筋が 4.0 ± 0.17、6.2 ± 0.14 nmol/g wet tissue とどちらも有意な増加であった (p < 0.05、p < 0.001)。(Fig. 4)

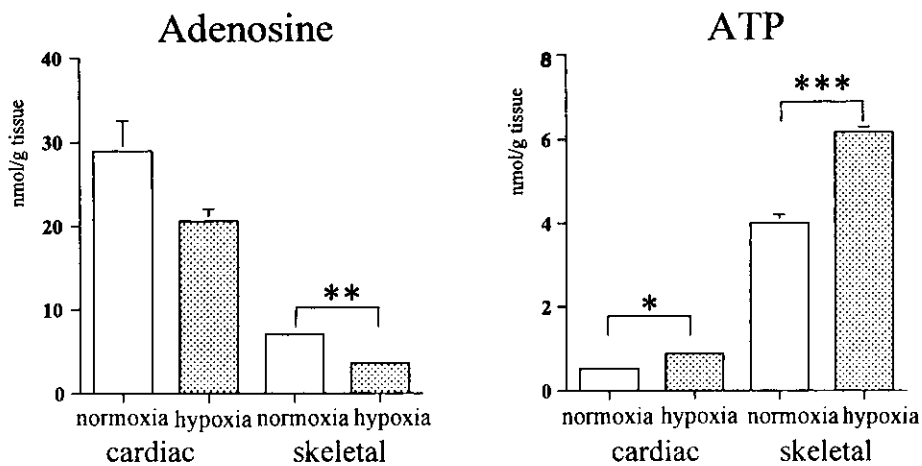


Fig. 4 10% O₂ 飼育 24 時間後のマウス (白カラム) と室内気吸入マウス (ドットカラム) の組織アデノシン、ATP 含量。
 Paired t test * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001。

考察・結論

今回、H1KOマウスにおいて覚醒状態で体温を上昇させても呼吸数の増大が認められず T_{1} 、 T_{E} の変化も認められなかった。これは、 α -FMH投与後、高体温時の呼吸数が減少するという前報告した結果と一致する¹⁾。 α -FMHは、ヒスタミン合成酵素histidine decarboxylaseを阻害し、中枢性ヒスタミンをほぼ完全に枯渇させる作用があるので²⁾、これらの結果は中枢性ヒスタミンの高体温における呼吸数増加作用を強く示唆する。中枢性ヒスタミンニューロンの細胞体は後部視床下部の結節乳頭核に局限して存在し³⁾、その軸索は嗅球から脊髄に至る広い範囲に軸索を送り出している⁴⁾。また、睡眠覚醒、体温調節、情動、食欲飲水、学習などに関わる⁵⁾とされているが、その詳細には未だ不明な点が多い。中枢性ヒスタミンが、体温降下作用を持つこと⁶⁾、体温調節において、気道からの熱放散が重要であることを考えると呼吸との関係は十分に予想される。H1KOマウスが高体温下で呼吸数増加を示さなかったことは、視床下部にのみ細胞体をもつヒスタミンニューロン系が、体温調節と呼吸の連関にかかわることを示している。これはまた上位脳による呼吸調節と中枢性ヒスタミンのかかわりを示唆する。上位脳が関与すると思われる呼吸不全に対し、遺伝子操作マウスを含めて、覚醒マウスを用いた生理学的手法を用いたアプローチは、種々の克服すべき困難はあるものの、有用であると考えられる。

一方、マウスの血液ガス、組織酸素のモニターについては、殆ど報告がなく、遺伝子操作マウスの生理機能の解明が求められている現状では、この方法の確立が有用であろう。一般に酸素電極法により血管内、組織内の PO_2 を測定する方法、採血し血ガスメーターにより測定する方法があるが、小動物であるため麻酔深度、採血法を一定に保つことが困難である。今回は酸素電極を用いて連続的に PO_2 をモニターし、動脈と組織の PO_2 の変化を示した。この方法は、body plethysmograph、血圧モニターと併用することができ呼吸パターンや循環の変化を同時に調べられる点が急性実験に有利である。しかしその絶対値については疑問が残っており麻酔深度をコントロールできるシステムを導入するなどこれからの工夫が必要である。低酸素ガス吸入後1分以内では、 PaO_2 と $P_{tissue}O_2$ が下降するが血圧は維持されている。Presbyterianヘモグロビンマウスでは組織での酸素遊離が容易になることから低酸素負荷時、肺でのガス交換への影響が少なければ、 PaO_2 と $P_{tissue}O_2$ の経時変化を減少させることが可能であると推定される。

アデノシンは、循環呼吸調節に影響し、組織低酸素によってATPの需要が供給を上回った時にAMPの分解により産生され、組織低酸素のマーカーとされる⁷⁾。ヒトで低酸素により血漿中のアデノシン濃度が上昇することが報告されている⁸⁾。今回は心筋と骨格筋組織中のアデノシンを測定したところ低酸素負荷群は、アデノシン含量低下とATP含量の増加が観察された。この意味するところは現在不明であり、今後血漿中の含量との比較、ADP、AMP、creatin phosphate等との関係を調べることで組織低酸素を調べ、変異ヘモグロビンマウスの生理機能の解明へ繋げたいと考える。

参考文献

- 1) 泉崎雅彦、岩瀬みち子、木村弘、他：中枢性ヒスタミンによる呼吸変化。厚生省呼吸不全調査研究班平成10年度研究報告書 1999；117-121.
- 2) Inoue I, Yanai K, Kitamura D, et al: Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93 (23):13316-20.
- 3) 白澤卓二、小泉健一、鈴木陽一：呼吸不全治療に関する分子生物学的研究。厚生省呼吸不全調査研究班平成10年度研究報告書 1999；123-129.
- 4) Tijayaraghavan R, Schaper M, Thompson R, et al: Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. Arch Toxicol 1993;67 (7):478-90.
- 5) Maeyama K, Watanabe T, Taguchi Y, Yamatodani A, et al: Effect of alpha-fluoromethylhistidine, a suicide inhibitor of histidine decarboxylase, on histamine levels in mouse tissues. Biochem Pharmacol 1982;31 (14):2367-70.
- 6) Inagaki N, Toda K, Taniuchi I, et al: An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. Exp Brain Res 1990;80 (2):374-80.
- 7) Inagaki N, Yamatodani A, Ando-Yamamoto M, et al: Organization of histaminergic fibers in the rat brain. J Comp Neurol 1988;273 (3):283-300.
- 8) Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, et al: Histaminergic transmission in the mammalian

- brain. *Physiol Rev* 1991 Jan ; 71 (1) : 1-51.
- 9) Chen Z, Sugimoto Y, Kamei C : Effects of intracerebroventricular injection of histamine and its related compounds on rectal temperature in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995 ; 17 (10) : 669-75.
- 10) Saito H, Nishimura M, Shinano H, et al : Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 1014-1018.

肺胞低換気症候群の新しい薬理的治療法開発のための 基礎的検討：

コリン作動性神経回路網活性化による呼吸出力増強効果

岡田 泰昌^{1)*} 桑名 俊一²⁾ 岩波 将輝³⁾ Zibin Chen⁴⁾

はじめに

原発性肺胞低換気症候群をはじめとするいわゆる肺胞低換気症候群においては、呼吸リズムは保たれているもののCO₂換気応答の減弱あるいは欠如を伴う慢性的な低換気を示すことが病態の特徴であり、著者らは脳幹部特に延髄腹側表層部における中枢化学受容機構の機能異常がその病因であると考えている¹⁾。したがって肺胞低換気症候群に対する薬物療法においては中枢化学受容機構の機能回復、機能活性化をもたらすものが有用と考えられる。今回、中枢化学受容機構の機能増強を目的とした薬理的治療法を開発するにあたり、中枢化学受容についての細胞ならびに神経伝達物質レベルでの理解に基づいた理論的な開発戦略を採用した。中枢化学受容機構についてはCO₂リセプター細胞の同定も含め、これまで細胞レベルではその機構の詳細は不明であったが、昨年度著者らは延髄腹側最表層部の小型細胞がCO₂リセプター細胞としての要件を満たしていることを報告し、その結果に基づき中枢化学受容機構の新しい細胞構築モデルを提唱した²⁾。さらに従来^{3,4)}の諸報告^{3,4)}も合わせて考察した結果、アセチルコリン (ACh) がCO₂リセプター細胞から介在細胞への情報伝達を担う神経伝達物質であろうと考えられた (図1)。そこで延髄内コリン作動性神経回路網を活性化させることが肺胞低換気症候群の治療となり得ると考え、以下の検討を行った。(1) CO₂リセプター細胞と考えられる延髄腹側表層の小型細胞が実際にACh産

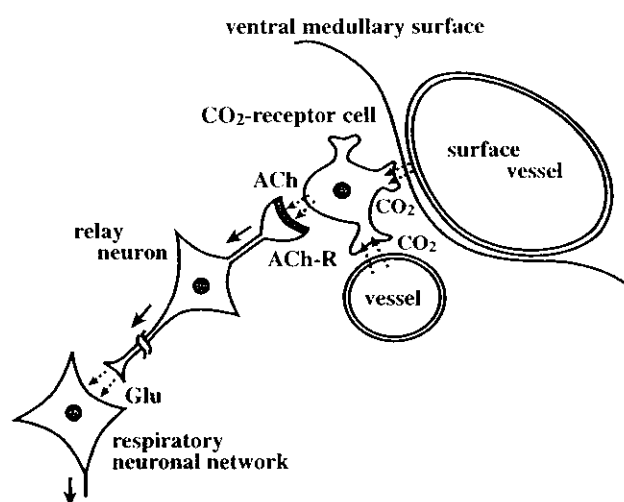


図1 延髄腹側表面における中枢化学受容機構の細胞構築 (モデル)。

延髄の表面血管に近接してCO₂リセプター細胞が存在し、同細胞は血管内より拡散してくるCO₂レベルを感知し、そのレベルに応じて介在細胞に対しアセチルコリンを分泌する。介在細胞は延髄腹側表層に伸ばした樹状突起先端のアセチルコリン受容体 (ACh-R) を介してその情報を深部にある呼吸神経回路網へ伝える。

生能を有するか否かについて同細胞におけるACh合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の有無を免疫組織染色法により解析した。

(2) CO₂リセプター細胞よりも下流側の中枢化学受容機構を活性化させるため、CO₂リセプター細胞からの情報を受ける介在細胞が有するACh受容体を刺激し、その際の呼吸増強効果を検討した。この際ムスカリン性ACh受容体刺激に伴う副交感神経系の副作用発現を避けるため、ニコチン性ACh受容体 (nACh-R) 刺激を行い、呼吸出力並びに延髄神経細胞に対する効果を検討した。(3) 脳

- 1) 慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター内科
- 2) 帝京大学医学部生理
- 3) 慈恵医大微生物第一
- 4) ノースカロライナ大学チャペルヒル校細胞分子生理

* 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

幹部の内因性ACh作用を増強することはCO₂換気応答を増強することになると予想されるため、各種コリンエステラーゼ阻害剤についてCO₂換気応答に及ぼす効果を検討した。特に近年、アルツハイマー病治療薬として注目されつつある新型のコリンエステラーゼ阻害剤についても検討を行った。

対象と方法

(1) ChAT免疫組織染色

成熟ラットを対象とした(n=3)。ラットを無麻酔、無拘束状態で静かな暗箱中に8時間以上保った後、その箱内で10%CO₂を3時間吸入させた。CO₂吸入の後、直ちに過量のペントバルビタール麻酔で安楽死させて脳幹を摘出し、以下の二重免疫組織染色を実施した。CO₂で活性化された細胞を同定するためその細胞核のc-fos免疫組織染色を行い、また同時にChAT含有細胞を同定するため細胞質ChAT免疫組織染色を行った。そして細胞核c-fos及び細胞質ChATの両方が陽性を示す細胞を顕微鏡下で探索した。

(2) ニコチンによる呼吸出力増強作用

摘出脳幹脊髄標本を用いた*in vitro*実験及び成熟ラットを用いた*in vivo*実験を行った。*in vitro*実験では新生ラット(0~4日齢、n=40)より脳幹-脊髄を摘出し、小型記録用チェンバー内に固定し酸素化人工脳脊髄液(aCSF; CO₂=5%)で連続灌流を行った⁹⁾。脊髄C4前根より呼

吸出力をモニターしつつ、aCSFに混ぜた各種濃度のニコチンによる呼吸増強効果を観察した。さらにこの*in vitro*標本においてホールセルパッチ記録法⁹⁾を適用して中枢性呼吸調節機構に対するニコチンの作用機序を延髄神経細胞レベルで解析した。また頸動脈洞神経・迷走神経切断、クロラロスウレタン麻酔、人工呼吸下の*in vivo*成熟ラット(n=3)において横隔神経活動を記録し、ニコチン静注による呼吸増強効果を観察した。

(3) コリンエステラーゼ阻害剤によるCO₂換気応答増強作用

新生ラット*in vitro*摘出脳幹脊髄標本(n=6)を用いてネオスティグミンによるCO₂換気応答増強作用について灌流液CO₂濃度を2%から8%へ変化させた際の呼吸出力を解析して検討した。また成熟ラット*in vivo*標本(n=4)を用いてエゼリン(=フィズステイグミン)および新型のコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジル(エーザイ製)によるCO₂換気応答増強作用について吸入気CO₂濃度を0%から2%、5%あるいは8%へ変化させた際の横隔神経活動の増強度を解析して検討を行った。

結果

(1) ChAT免疫組織染色解析

ラット延髄腹側表面の軟膜直下に小血管を取り囲むように配列したc-fos陽性で即ちCO₂興奮性を示し、かつ細胞質ChAT陽性の小型細胞を見出した(図2)。

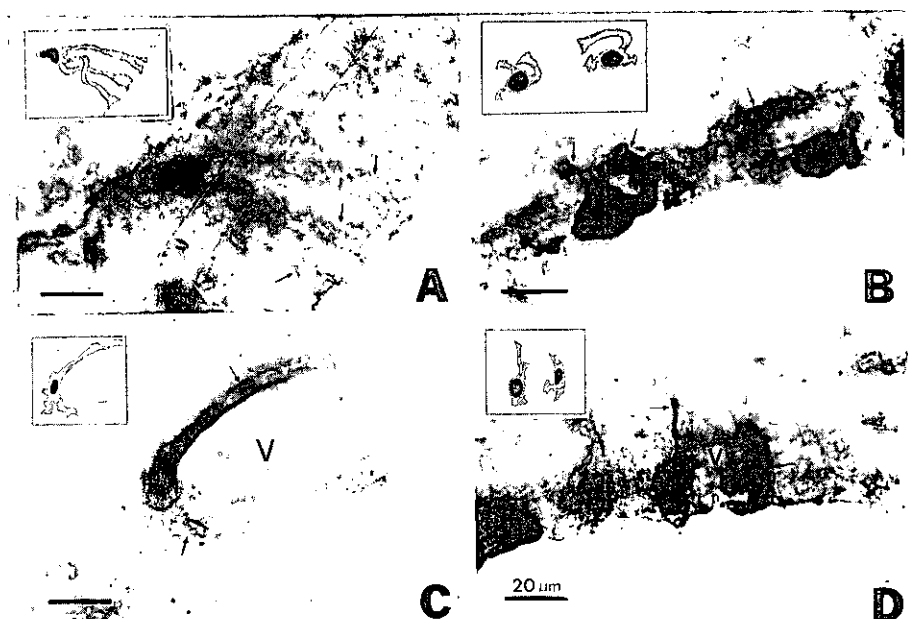


図2 CO₂で誘導された細胞核c-fos及び細胞質コリンアセチルトランスフェラーゼの二重免疫組織染色で陽性を示した延髄腹側表層部の小型細胞。

この小型細胞は短い突起を有しており、しばしば血管を取り囲むように配列している(特にパネルC,D)。

(2) ニコチンによる呼吸出力増強作用

in vitro 実験では灌流液中のニコチンが $0.01 \mu\text{M}$ 以下の濃度では呼吸出力に対する作用を認めなかった。 0.1 から $10 \mu\text{M}$ の範囲では濃度依存性に呼吸出力が増強した (図3)。 $10 \mu\text{M}$ では一部の例で、 $100 \mu\text{M}$ では全例において呼吸出力に痙攣様の緊張性興奮を認めた。 ホールセル記録では $10 \mu\text{M}$ のニコチンにより呼吸数増加とともに CO_2 興奮性を示す延髄腹側の呼吸性神経細胞の活性化 (脱分極、バースト発火頻度増加、EPSP増加) を認めた (図4)。 また介在細胞と考えられる呼吸非同期性 CO_2 興奮性細胞もニコチンにより CO_2 によると同様の興奮 (脱分極、発火頻度

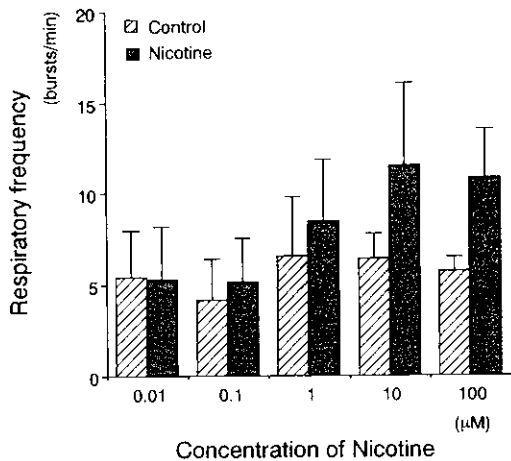


図3 ニコチンによる呼吸出力増強効果 (摘出脳幹脊髓標本での検討)。

ニコチンは $0.1 \mu\text{M}$ から $10 \mu\text{M}$ の濃度では濃度依存性に呼吸出力 (呼吸数) 増加を示した。

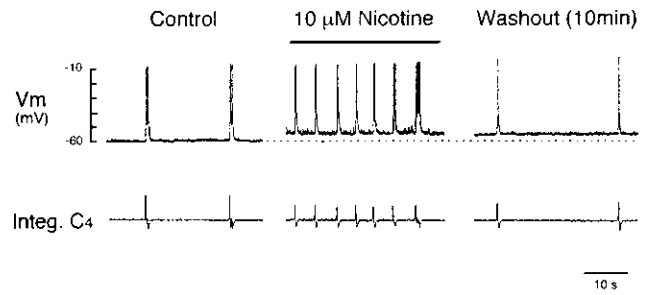
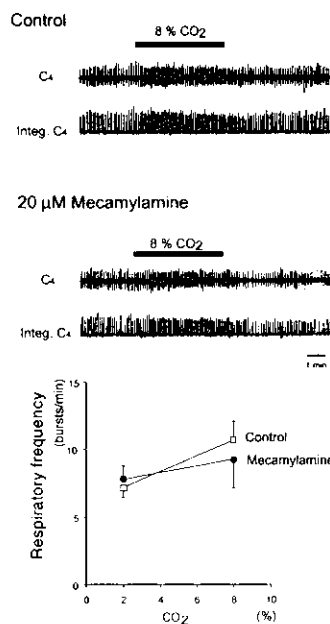


図4 吸息性神経細胞に対するニコチンの影響 (ホールセル記録法による解析)。

$10 \mu\text{M}$ のニコチンにより呼吸数増加とともに、脱分極、バースト発火頻度増加、EPSP増加を認めた。

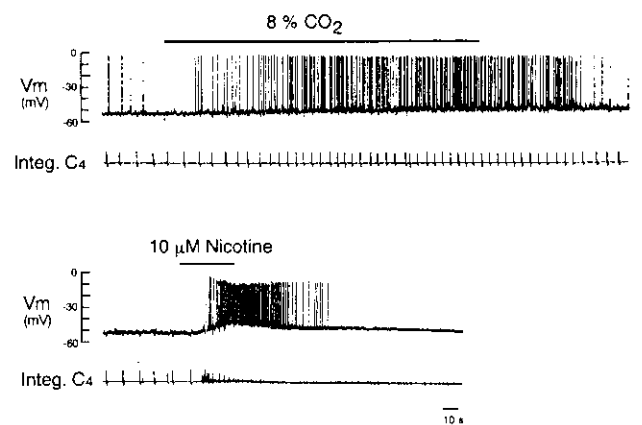


図5 呼吸非同期性 CO_2 興奮性細胞に対するニコチンの作用。

ニコチンにより CO_2 によると同様の興奮 (脱分極、発火頻度増加) を認めた。

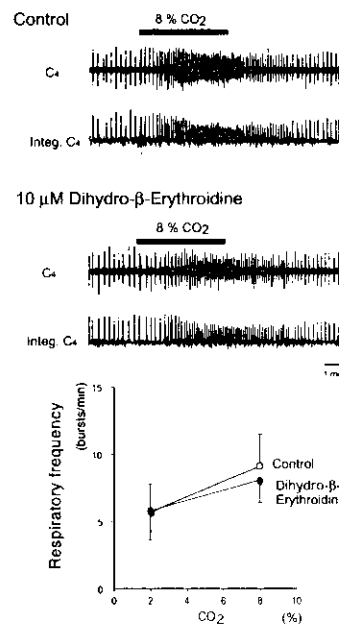


図6 ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストの CO_2 換気応答に対する効果。

CO_2 換気応答は、ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストであるメカミラミン及びデヒドロ- β -エリスロイジンによって部分的に抑制されたが、完全には抑制されなかった。

度増加)を示した(図5)。一方、nACh-Rアンタゴニストであるメカミラミン及びディハイドロ- β -エリスロイデンによってCO₂換気応答は部分的に抑制されたが、完全には消失しなかった(図6)。また成熟*in vivo*ラットにニコチンの静脈内投与を行ったところ、用量依存性に横隔神経出力の増強を認めた。ただし高用量では静注直後に呼吸出力が増強する前数秒間の一過性呼吸出力消失が観察された(図7)。

(3) コリンエステラーゼ阻害剤によるCO₂換気応答増強作用

新生ラット*in vitro*摘出脳幹脊髓標本において0.1 μ MのネオスティグミンはCO₂換気応答を増強させた(図8)。また成熟ラット*in vivo*標本においてエゼリン(図9)およびドネベジルはともに用量依存性にCO₂換気応答の増強を惹起した(図10)。

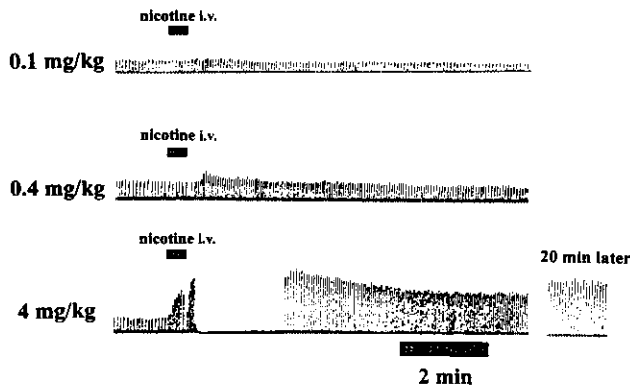


図7 成熟*in vivo*ラットにおけるニコチン静脈内投与の効果。ニコチンにより用量依存性に横隔神経出力の増強を認めた。高用量では静注直後一過性に呼吸出力が停止したが、その後著しく増強した呼吸出力が再出現した。

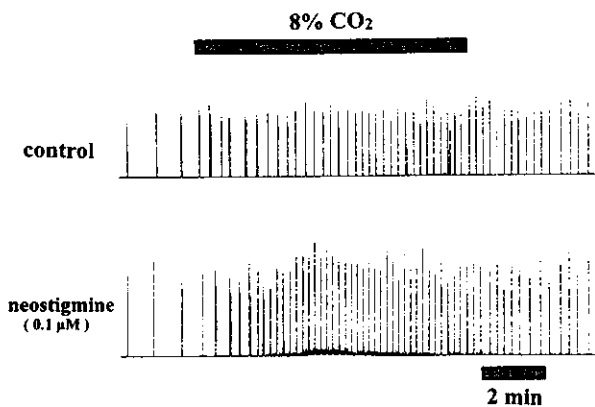


図8 ネオスティグミンによるCO₂換気応答増強作用(摘出脳幹脊髓標本における解析)。0.1 μ MのネオスティグミンはCO₂換気応答を増強させた。

考察・結論

本研究におけるChATとc-fosの二重免疫組織染色の結果より延髄腹側の最表層部にはCO₂興奮性と同時にACh産生能を有する細胞が存在することが初めて確認された。この結果は中枢化学受容機構に関する著者らの細胞構築モデル(図1)の妥当性及び同モデルにおいてCO₂リセプター細胞から介在細胞へ情報を伝える神経伝達物質はAChであることを示すものと考えられた。またnACh-RアンタゴニストはCO₂反応性を抑制したもののその効果が部分的であったことは、nACh-Rは中枢化学受容に参与しているが中枢化学受容にはnACh-Rを介さない機構も存在することを示すものと考えられた。

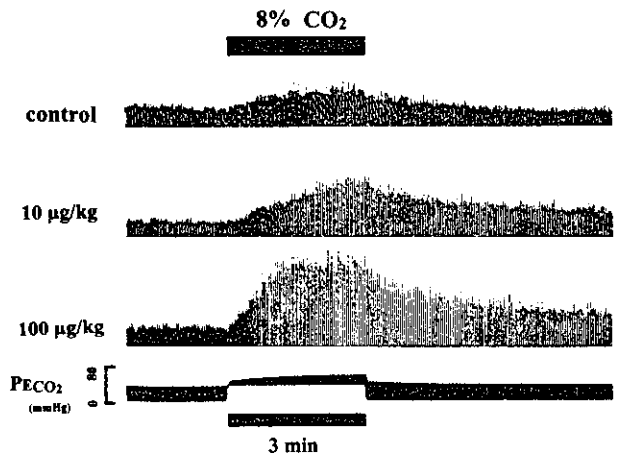


図9 エゼリンによるCO₂換気応答増強作用(成熟*in vivo*ラットにおける解析)。エゼリンは用量依存性にCO₂換気応答を増強させた。

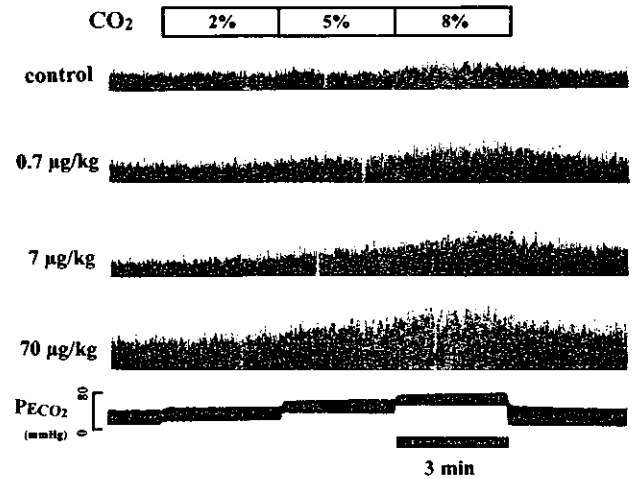


図10 ドネベジルによるCO₂換気応答増強作用(成熟*in vivo*ラットにおける解析)。ドネベジルは用量依存性にCO₂換気応答を増強させた。

著者らの中枢化学受容機構モデルに基づけば、肺胞低換気症候群の治療即ち中枢化学受容機構の薬理的活性化のためには、nACh-R アゴニストは検討すべき重要な薬剤であると考えられる。nACh-R アゴニストであるニコチン自体は古くより知られた薬剤であり、従来 *in vivo* 実験で呼吸器系への作用も検討され呼吸刺激作用を有することは知られていたが、高用量の急速投与に伴う呼吸出力の減弱、停止も報告されており¹⁰⁾ 今日まで呼吸刺激薬として肺胞低換気症候群の治療へ応用しようという発想はなかった。本研究の結果より、急速投与を避けかつ比較的低用量を用いるならば、nACh-R アゴニストは延髄呼吸神経細胞およびCO₂ 興奮性神経細胞の活性化により呼吸増強を惹起するため、肺胞低換気症候群の治療薬剤となりうると考えられた。今後、正常動物、低換気モデル動物を用いた慢性実験によるニコチンの有用性、より安全な投与方法についての検討が必要と考えられる。またより副作用の少ないnACh-R アゴニストの開発も望まれる。

一方、コリンエステラーゼ阻害剤についても以前より呼吸刺激作用を有するとの報告はあったが⁸⁾、むしろ麻酔時や高用量投与時や有機リン酸系農薬中毒時等で見られる呼吸抑制作用が警戒されたためか、今日まで肺胞低換気症候群の治療へ応用しようとの発想はなかった。またこれまでコリンエステラーゼ阻害剤がCO₂ 換気応答を増強したとの報告はなかった。本研究では中枢化学受容機構についての理論的検討よりの予想に基づいて実験を行い、コリンエステラーゼ阻害剤がCO₂ 換気応答を増強することを初めて示した。最近、アルツハイマー病治療剤として開発されたコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジルは高齢者に長期間用いても安全であることが確認されているが¹⁰⁾、本研究においてドネペジルはCO₂ 換気応答も増強することが示された。ドネペジルについては今後動物実験でのCO₂ 換気応答に対する慢性効果、モデル動物における有用性の検討が必要であるが、同剤は将来、原発性肺胞低換気症候群、各種肺胞低換気症候群の治療薬剤となる可能性を持つ有望な薬剤であると期待される。

参考文献

- 1) 岡田泰昌：原発性肺胞低換気症候群の新しい治療法開発を目指した基礎的検討：中枢呼吸化学受容機構におけるCO₂ 受容細胞メカニズムの解析。厚生省特定疾患呼吸不全調査研究班平成10年度研究報告書1999；153-159。
- 2) Dev NB, Loeschcke HH：A cholinergic

- mechanism involved in the respiratory chemosensitivity of the medulla oblongata in the cat. *Pflugers Arch* 1979；379：29-36.
- 3) Fukuda Y, Loeschcke HH：A cholinergic mechanism involved in the neuronal excitation by H⁺ in the respiratory chemosensitive structures of the ventral medulla oblongata of rats *in vitro*. *Pflugers Arch* 1979；379：125-135.
- 4) Sasaki M, Yamaya M, Hida W, Nakamura M, Sasaki T, Sasaki H, Takishima T：Effect of hypercapnia on ventilatory response to intravenous nicotine administration in anesthetized dogs. *Respir Physiol* 1989；78：177-186.
- 5) Okada Y, Kawai A, Mueckenhoff K, Scheid P：Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *Respir Physiol* 1998；111：55-63.
- 6) Kuwana S, Okada Y, Natsui T：Effects of extracellular calcium and magnesium on central respiratory control in the brainstem-spinal cord of neonatal rat. *Brain Res* 1998；786：194-204.
- 7) Domaye A：On the action of nicotine upon respiration with particular response to its blockade by hexamethonium. *Jpn J Pharmacol* 1955；5：1-10.
- 8) Weinstock M, Roll D, Zilberman Y：An analysis of the respiratory stimulant effect of physostigmine and neostigmine in the conscious rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1981；8：151-158.
- 9) Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M：Central respiratory depression induced by acetylcholinesterase inhibition：involvement of anaesthesia. *Eur J Pharmacol* 1987；142：207-213.
- 10) Rogers SL, Friedhoff LT：Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease：an interim analysis of the results of a US multicenter open label extension study. *Eur Neuropsychopharmacol* 1998；8：67-75.

慢性呼吸器疾患における呼吸困難の言語

巽 浩一郎¹⁾ 西村 正治²⁾** Joseph Green³⁾ 猪狩 英俊¹⁾
田辺 信宏¹⁾ 岡田 修¹⁾ 木村 弘¹⁾ 栗山 喬之¹⁾*
福原 俊一³⁾** 本間 生夫⁴⁾**

要旨

呼吸困難感は異なる知覚の集合体と考えられ、呼吸器疾患の病態により呼吸困難の言語にはある程度特徴があることが認められている。そこで、本研究の目的は、呼吸困難感の感覚と臨床的・病態生理学的診断との間に何らかの結びつきがあるのかどうかを検討することである。対象は、(1)慢性閉塞性肺疾患(COPD) 38例、(2)特発性間質性肺炎(Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) 18例、(3)慢性肺血管障害(Pulmonary hypertension; PH) 30例、である。方法は、第三者による面接アンケート方式にて、日常生活の中で最も苦しいと感ずる時、または呼吸が異常と感ずる時に、どのような表現を用いますか?の質問を36表現のそれぞれに関して、4段階に分けて解答を得た。同じclusterの表現が並ばないように質問項目をランダムに配置した。結果として、COPD・IPF・PH症例は、呼吸が早くて苦しい(Rapid)という呼吸困難感を多かれ少なかれ共通の感覚として持ち、さらに疾患により異なる呼吸困難感を感じていることが示唆された。さらに、COPD症例は、increased work/effortという、閉塞性障害を克服して活動範囲を保とうとする時に感じると考えられる、ある程度疾患特異的な言語を持っていると考えられた。また、IPF症例は、病態生理学的異常を反映すると考えられるShallow・Gaspingという疾患特異的な言語を有していると考えられた。PH症例は、COPD症例と類似の呼吸困難感を有しているようでもあるが、Air hunger・Unsatisfied inspirationの感覚は弱く、COPD症例との相違は、Increased work/

effortという感覚が乏しい点であると考えられた。

はじめに

呼吸困難感は、慢性呼吸器疾患の患者が苦痛に感じることが予想される症状の一つであり、HRQoLを障害する大きな因子と考えられる。その呼吸困難感を患者が語る時、さまざまな言語が用いられる^{1)~3)}。すなわち、呼吸困難感とは異なる知覚の集合体といえる。しかし、呼吸困難感の研究は、主にその強さを問題にしてきた。例えば、慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD)の運動時の呼吸困難感に関しては、VAS scale・Borg scaleなどを用いた研究が広く行われている⁴⁾。

一方、呼吸困難の言語に関する研究は、諸外国では10年前くらいから散見される。ここでは、呼吸器疾患の病態により呼吸困難の言語にはある程度特徴があることが認められている。日本においては、これに関する研究は、北海道大学第一内科のグループによる、酸素吸入による呼吸困難感の変化に関するもののみである⁵⁾。そこで、本研究の目的は、呼吸困難感の感覚と臨床的・病態生理学的診断との間に何らかの結びつきがあるのかどうかを検討することである。日本語は、英語圏の言語とは大きく異なるため、諸外国の結果がそのまま日本に適用できるとは限らないと考えられる。

対象と方法

対象は、(1)慢性閉塞性肺疾患(COPD) 38例、(2)特発性間質性肺炎(Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) 18例、(3)慢性肺血管障害(Pulmonary hypertension; PH) 30例、である。COPDは、一秒率が55%以下の中等症以上の進展した症例のみを選別した。IPFは、拘束性換気障害(%VCが80%以下)を呈した症例のみを選別した。PHには、原発性肺高血圧症(PPH)・膠原病に合併した肺高血圧症・慢性肺血拴塞症を含んでいる。対象症例の肺機能検査所見を表1に示す。

1) 千葉大学医学部 呼吸器内科
2) 北海道大学医学部 第一内科
3) 東京大学大学院医学系研究科 国際交流室
4) 昭和大学医学部 第二生理
* 「呼吸不全」調査研究班 主任研究者
** 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者