

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08869

研究課題名(和文) 生体分子を指標とした熱中症発症・予防機序の解析

研究課題名(英文) Effects of pre-heat exposure intake of electrolyte drinks in the rat.

研究代表者

那谷 雅之(NATA, Masayuki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70241627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：熱中症は、高サイトカイン血症に基づく全身性炎症反応に加え、熱暴露による熱の直接的な影響により生じる各臓器の傷害が考えられている。熱中症モデルラット及び電解質飲料摂取モデルを用いて、間脳及び脳幹におけるHeat Shock Protein関連遺伝子の発現動態及び血清中の生理活性物質を確認した。本研究では、熱暴露によりHSP関連遺伝子や炎症性サイトカインに変動を認め、電解質飲料摂取によりその変動の一部が抑制された。電解質飲料を事前摂取することで、熱暴露に基づく生体へのストレス強度が低減され、熱耐性を上げる効果が生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In heatstroke, various organs can be damaged directly by heat exposure, and systemic inflammatory responses can also occur through the development of hypercytokinemia. The purpose of the present study was to elucidate how intake of an electrolyte drink before heat exposure modulates heat exposure-induced damage in a rat model. The results showed that mRNA relating with heat shock protein and cytokine was changed with heat exposure, and intake of an electrolyte drink prior to heat exposure suppressed the changes. These findings suggest that intake of an electrolyte drink before heat exposure reduces the intensity of heat stress to the body, thereby improving heat tolerance.

研究分野：法医学

キーワード：熱中症 電解質飲料 サイトカイン 脳 ラット

### 1. 研究開始当初の背景

熱中症発症のメカニズムは、生体が熱曝露を受けた際に、熱作用に対して熱放散を行うために体表の血流が増加し、相対的に腸管の血流が不足することで腸管粘膜の透過性が亢進し、血中に腸内細菌が流入することで高サイトカイン血症が生じて全身性炎症反応を起こすことに加えて、熱作用そのものによる直接的な諸臓器の傷害とが、相加・相乗的に働いて生じるものと考えられている。また、熱中症の予防には、水分とともに塩分及び糖質を摂取することが肝要であると考えられているが、その分子レベルでの機序や効果に関しては十分に明らかにはなっていない。このために、研究代表者らは、動物モデルを用いて、諸臓器に対する熱曝露の及ぼす直接的な影響を解明するとともに、塩分や糖質の摂取時の熱曝露に対する影響を明らかにするために、以下の実験を企図し既に遂行した。

#### A. 熱曝露による諸臓器への直接的な影響の解明

熱曝露により諸臓器へ傷害を与える機構を明らかにするために、熱中症モデルラットを用いて、諸臓器の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、熱曝露による過度の体温上昇により、肝臓で Heat Shock 70kDa Protein 4 (Hspa4) の遺伝子発現が増加し、脳幹では、Hspa4 の遺伝子発現が増加するとともに B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl2) / BCL2-Associated X Protein (Bax) 比の低下を認め、さらに、心臓では、Hspa4 の遺伝子発現が増加し、それに加えて Interleukin 6 (IL-6) 及び Natriuretic Peptide B (Nppb) の遺伝子発現も増加することが示され、動物モデルにおいて熱曝露により諸臓器に傷害が引き起こされることを明らかにした。

#### B. 熱曝露における電解質飲料の循環動態への効果

電解質飲料の摂取が熱曝露による循環動態の変化に与える影響を明らかにするために、ラットに電解質飲料を事前に摂取させて心臓の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、Hspa4 の遺伝子発現の増加が抑制され、さらに IL-6 及び Nppb の遺伝子発現の増加も抑制され、電解質飲料を事前に摂取することで、熱への耐性が生じて心負荷が抑制されることが示された。

このように、研究代表者らは熱中症における病態生理について幾許かの知見を得ているものの、より詳細かつ直接的な病態生理の知見を得るために、熱曝露による中枢神経系への影響、全身性の生理活性物質の検討等の更なる基礎的研究や、これらの成果を活用するための病態生理学的研究が必要であると考え、本研究課題を提案した。

### 2. 研究の目的

高温環境下での死亡例においては、比較的短時間で死亡した場合、その判断は難しくなる。我々は、熱曝露による諸臓器での遺伝子発現の変化を指標とした一連の研究に取り組み、熱作用による直接的な各種臓器への影響を解明した。また、電解質飲料の事前摂取により生体に熱耐性が生じうる可能性を示すことができた。

しかし、これら遺伝子転写産物量の変動とタンパク質発現の相関に関してはまだ検討が為されていない。そこで、Luminex テクノロジーを駆使して、これらのタンパク質発現を網羅的に解析すれば、熱曝露及び電解質飲料の事前摂取が影響を与える細胞内シグナル伝達経路を特定することができる。さらに、生体機構への影響も明らかにできることから、法医実務のみならず、熱中症予防対策の向上のためにもその応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究は、熱中症モデルラットを対象に、分子生物学的検討や生理活性物質の網羅的解析を用いて、熱中症発症時の遺伝子・生理活性物質動態を検索・解明し、さらに、電解質飲料投与モデルを用いて、比較検討を行い、最終的には、Key Player となる蛋白質を同定・指標とする「熱中症におけるその病態解明と防止法」の確立を目的としており、その方法は動物実験による基礎的研究に基づいたものである。具体的には、熱中症モデルラットの病態を解析することにより、Key player となる蛋白質を見出す。その結果に基づいて、電解質飲料摂取モデルにおいて候補となった蛋白質を解析し、最終的には熱中症の予防つまり「熱中症の防止法」を確立することが最終目的である。

### 4. 研究成果

熱中症モデルラット及び電解質飲料摂取モデルにおいて、間脳及び脳幹における熱中症関連遺伝子の発現動態を調査した。具体的には、ラットに 1 週間電解質飲料あるいは水を摂取させ、CO2 インキュベーター (内部温度 37.0 ± 5, 湿度 100%) を使用して 90 分間加温あるいは体温維持のため保温マット上で 90 分間放置した後、採取した間脳及び脳幹における Heat Shock Protein 等の遺伝子発現量を定量的 PCR 法を用いて検討を行った。

Table 1. 間脳における各遺伝子の mRNA の測定結果

Name of the genes	Means ± SE				P value		
	WN	WH	SN	SH	H	S	H*S
<i>Fox</i>	1.12 ± 0.11	4.06 ± 0.27	0.60 ± 0.10	2.52 ± 0.29	<0.0001**	<0.0001**	0.0299*
<i>Hspa4</i>	0.99 ± 0.07	458.24 ± 45.88	0.66 ± 0.14	325.46 ± 34.75	<0.0001**	0.0288*	0.0295*
<i>Hspa1b</i>	0.93 ± 0.23	76.67 ± 14.43	3.07 ± 2.12	63.41 ± 18.21	<0.0001**	N.S.	N.S.
<i>Hsp41</i>	1.09 ± 0.14	23.42 ± 2.32	0.58 ± 0.08	17.23 ± 1.13	<0.0001**	0.0114*	0.0298*

左側は各遺伝子の mRNA 発現量の相対値、右側は二元配置分散分析法による検定結果を示す。

WH: 水摂取, 熱曝露群 H: 熱曝露による主効果 \*: 有意水準 5%未満で有意差あり  
WN: 水摂取, 非熱曝露群 S: "En" の事前摂取による主効果 \*\*: 有意水準 0.1%未満で有意差あり  
SH: "En" 摂取, 熱曝露群 H\*S: 熱曝露と "En" の事前摂取による交互作用 N.S.: 有意水準 5%未満で有意差なし

その結果、間脳では、Fos, Hspa1a, Hspa1b 及び Hspb1 の発現量は、熱曝露で有意に増加し、Fos, Hspa1a 及び Hspb1 では、熱曝露と電解質飲料事前摂取との間で交互作用を認め、熱曝露による増加は電解質飲料の事前摂取によって有意に抑制された。(Table 1)

Table 2. 脳幹における各遺伝子の mRNA の測定結果

Name of the genes	Means ± SE				P value		
	WN	WH	SN	SH	H	S	IPS
Fos	0.96 ± 0.12	3.77 ± 0.35	0.96 ± 0.07	2.93 ± 0.26	<0.0001**	N.S.	N.S.
Hspa1a	0.95 ± 0.07	597.73 ± 66.00	0.94 ± 0.06	511.20 ± 29.57	<0.0001**	N.S.	N.S.
Hspa1b	1.06 ± 0.13	141.59 ± 43.55	1.02 ± 0.09	116.64 ± 27.27	<0.0001**	N.S.	N.S.
Hspb1	1.06 ± 0.17	10.99 ± 1.40	0.82 ± 0.10	8.86 ± 0.46	<0.0001**	N.S.	N.S.

左側は各遺伝子の mRNA 発現量の相対値、右側は二元配置分散分析法による検定結果を示す。

WH: 水摂取, 熱曝露群 H: 熱曝露による主効果 \*\*: 有意水準 0.1%未満で有意差あり

WN: 水摂取, 非熱曝露群 S: "En" の事前摂取による主効果 N.S.: 有意水準 5%未満で有意差なし

SH: "En" 摂取, 熱曝露群 HPS: 熱曝露と "En" の事前摂取による交互作用

SN: "En" 摂取, 非熱曝露群

一方、脳幹では、Fos, Hspa1a, Hspa1b 及び Hspb1 の発現量は、熱曝露で有意に増加したが、熱曝露と電解質飲料事前摂取との間で交互作用は認められなかった。(Table 2)

中枢神経系においては、IEGs の発現が神経活動の指標として汎用されており、IEGs の一つである Fos は、転写調節因子として炎症性サイトカインの抑制等の生体機能の調節に働く。また、Hspa1a 及び Hspa1b (HSP70) は細胞修復を司ることで細胞保護に働き、Hspb1 (HSP25) は凝集していないタンパクに結合することによりタンパク凝集を抑制する。間脳及び脳幹において、熱曝露により Fos の発現量が増加し、さらに Hspa1a, Hspa1b 及び Hspb1 の各発現量も増加したことから、熱曝露によって生じた熱ストレスは間脳及び脳幹にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

間脳においては、Fos, Hspa1a 及び Hspb1 には熱曝露と電解質飲料の事前摂取との間で交互作用が認められ、各遺伝子の発現の増加は電解質飲料の事前摂取により抑制された。Fos, Hspa1a 及び Hspb1 発現の増加が抑制されたことから、電解質飲料の事前摂取によって熱ストレスが緩和されたことが示唆された。

一方、脳幹においては、Fos, Hspa1a, Hspa1b 及び Hspb1 の発現量は熱曝露により増加したものの、熱曝露と電解質飲料の事前摂取との間に交互作用を認めなかった。つまり、生命維持に関わる重要な中枢である脳幹では電解質飲料の事前摂取の影響が顕れにくいことが示唆された。

ついで、熱曝露による全身性の病態生理を明らかにするため、熱中症モデルラットを用いて血清中の各種サイトカインの変動について検討を行った。その結果、熱曝露群は、非熱曝露群と比較して、IL-1, IL-2, IL-6, IL-17A, IL-18, Fractalkine, IP-10, Leptin, TNF 及び VEGF で有意に上昇し、LIX 及び RANTES で有意に減少していた。また、熱曝露群では、非熱曝露群と比較して、IL-6, IL-18,

Table 3. Serum levels (pg/mL) of cytokines

Signal Transducers (pg/mL)	Control	Alcohol	p-value	Fold Change
IL-1α	8.04 ± 1.46	11.6 ± 2.81	0.264	1.44
<b>IL-1β</b>	308 ± 16.6	665 ± 109	<b>0.005*</b>	<b>2.16**</b>
IL-2	18.3 ± 1.46	27.0 ± 1.97	<b>0.004*</b>	1.48
IL-3	13.1 ± 0.71	19.9 ± 2.82	<b>0.028*</b>	1.52
<b>IL-4</b>	10.5 ± 0.94	22.5 ± 3.82	<b>0.007*</b>	<b>2.14**</b>
IL-5	17.6 ± 1.26	32.9 ± 5.01	<b>0.009*</b>	1.87
IL-6	21.4 ± 1.53	33.1 ± 6.33	0.079	1.55
IL-10	69.5 ± 4.54	65.7 ± 13.4	0.781	0.95
IL-12 (p40)	364 ± 26.4	266 ± 35.1	<b>0.045*</b>	0.73
<b>IL-12 (p70)</b>	208 ± 9.54	448 ± 83.0	<b>0.010*</b>	<b>2.15**</b>
<b>IL-13</b>	479 ± 32.4	1230 ± 311	<b>0.024*</b>	<b>2.57**</b>
IL-17	71.5 ± 9.04	79.2 ± 13.6	0.638	1.11
Eotaxin	1856 ± 70.1	2092 ± 169	0.199	1.13
G-CSF	110 ± 3.69	105 ± 9.44	0.630	0.95
GM-CSF	182 ± 8.33	206 ± 26.4	0.374	1.13
INF-γ	29.5 ± 2.36	43.5 ± 6.92	0.064	1.47
KC	62.6 ± 5.48	84.3 ± 10.3	0.079	1.35
MCP-1	158 ± 13.1	272 ± 37.3	<b>0.011*</b>	1.72
MIP-1α	20.9 ± 0.79	29.2 ± 4.27	0.064	1.40
MIP-1β	35.2 ± 1.96	61.3 ± 10.3	<b>0.021*</b>	1.74
RANTES	29.0 ± 2.13	27.5 ± 2.43	0.648	0.95
TNFα	276 ± 11.0	490 ± 76.3	<b>0.012*</b>	1.78

Data are presented as median ± standard error.

\* Significant p-value; \*\* Over 2-fold change.

Fractalkine 及び VEGF においては、2 倍以上に上昇していた。(Table 3)

高温環境下では透過性の亢進した腸管からエンドトキシンが流入し、熱中症を進行させるが、エンドトキシンによって発現される活性の主体は IL-1 及び TNF であり、そのことと合致する結果が得られた。また、IL-6, IL-18, Fractalkine 及び VEGF が熱ストレスにより最も強く誘導されており、このことは熱中症を進行させるエンドトキシンの流入による全身性の炎症反応が生じていることが示唆されるものであった。熱曝露により有意に上昇していた IL-2, IL-17A, IP-10 及び Leptin は、いずれも炎症反応に関与するサイトカイン/ケモカインであり、これらのことも熱ストレスにより全身性に炎症反応が生じていることを示唆するものであった。LIX 及び RANTES には熱曝露により有意な減少が認められたが、LIX の減少は LPS によるチロシンキナーゼを介した CXCR1 や CXCR2 発現の抑制を示唆するものであり、RANTES の減少は、RANTES は炎症の重篤度と逆相関を示す指標となると考えられており、本研究における熱中症モデルラットが、熱ストレスにより重篤な状態となり致死的な状態に陥っている可能性が示唆された。

さらに、電解質飲料の事前摂取が熱中症に対して与える影響をより詳細に明らかにするため、電解質飲料摂取モデルを用いて各種サイトカインの変動について検討を行った。

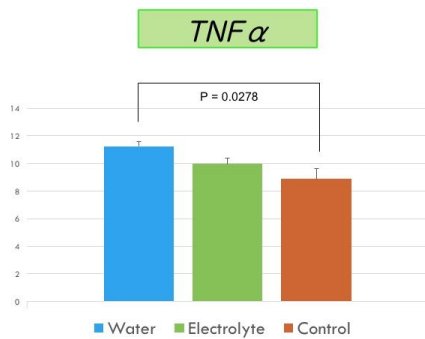


図1 血清中 TNF 濃度

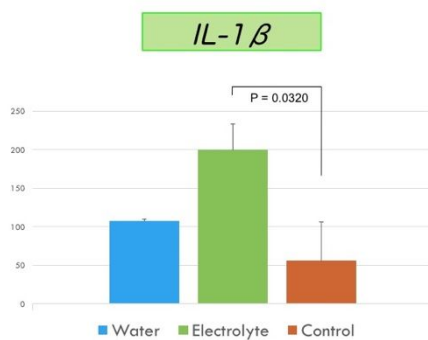


図2 血清中 IL-1 濃度

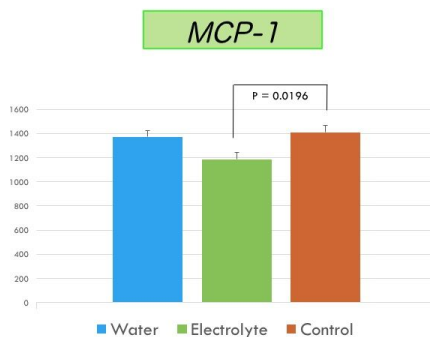


図3 血清中 MCP-1 濃度

その結果、電解質飲料の事前摂取により、TNF の上昇が抑制され、さらに、IL-1 の上昇と MCP-1 の低下が認められた。このことから、熱ストレスにより生じる細胞死に陥る過程に抑制が生じている可能性が示唆された。(図1～図3)

以上のことから、電解質飲料を事前摂取することで、熱曝露に基づく生体へのストレス強度が低減され、熱耐性を上げる効果が生じることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

小澤周二、中川泰久、那谷雅之．熱曝露による各種サイトカインへの影響に関する検討．第 101 次日本法医学会学術全国集会．2017

小澤周二、中川泰久、那谷雅之．熱曝露による各種サイトカインへの影響と電解質飲料の及ぼす効果についての検討．第 39 回日本法医学会学術中部地方集会．2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.medic.mie-.ac.jp/forens\\_med\\_sci/](http://www.medic.mie-.ac.jp/forens_med_sci/)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

那谷 雅之 (NATA, Masayuki)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70241627

(2)研究分担者

小澤 周二 (KOZAWA, Shuji)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20379944