

平成21年 5月 15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590671

研究課題名（和文）高温曝露時（熱中症）における脳・心臓の急性反応の形態学的・分子生物学的検索

研究課題名（英文）Molecular biological analysis of the effect of high core body temperature on heart and brainstem in rats.

研究代表者 那谷 雅之（Nata Masayuki）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70241627

研究成果の概要：高温多湿環境下ラットの心筋及び脳幹における遺伝子発現量を定量した。心筋では直腸温上昇と共に HSP70 発現量は増加する一方で、42℃～44℃上昇間に Bcl-2/Bax は減少、β-MHC は増加した。脳幹では、直腸温上昇に伴い HSP70 は増加する一方で、iNOS は低下した。Bcl-2/Bax は 37℃から 42℃までは明らかな変化を示さなかったが、42℃～44℃間では有意に低下した。過度の体温上昇は心臓・脳幹の形態学的・機能的障害を引き起こす可能性を示唆していると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：熱中症、心臓、脳幹、遺伝子発現、HSP-70、iNOS、Bcl-2/Bax

## 1. 研究開始当初の背景

近年、熱中症の予防が啓蒙されているが、夏期には熱中症患者が多発しており、なかには死亡例もある。熱中症発症のメカニズムとしては、熱放散のために体表の血管が拡張し、体表への血流が増加する結果、逆に内臓、特に腸管の血流が低下することにより腸管粘膜が虚血状態となり透過性が亢進し、腸内細菌のエンドトキシンが血流に流入して引き起こされる高サイトカイン血症に基づく全身性炎症反応が考えられている。一方、法医学実務においては、高温環境下で死亡しているものについては死因決定を目

的として法医解剖が行われる場合が多いが、比較的短時間で死亡したと考えられるケースもしばしばあり、高温暴露による死亡のすべてが前述したようなメカニズムで生じたとは考えにくく、死因の判定に苦慮することが少なくない。Inoue et al.は、脂肪肝が正常肝と比較して熱に対して脆弱であることを、熱中症モデルラットを作製し分子生物学的に証明しているが、このような主要臓器の熱に対する影響は高温暴露によって短時間で死亡した事例では腸管粘膜障害に起因する全身性炎症反応というメカニズム以上に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

熱中症に対する法医学的診断として Heat Shock Protein (HSP) 等のストレス蛋白を高温曝露の証明とする試みもあるが、これらの蛋白は高温曝露以外にも発現し、その評価は困難である。高温曝露時における各臓器の反応が法医学的に重要であり、熱がどの臓器にどの程度影響を及ぼし、その結果どの臓器が直接死亡に関与しているのかが熱中症の法医病理学的病態解明の第一と考える。我々が行っている高温曝露モデルラットを用いた研究の中で直腸温が 44°C になると突然徐脈となり心停止する現象を見いだした。そこで、本研究では、この現象が熱の心臓に対する直接作用なのか脳幹循環中枢を介した抑制効果なのか、他の機序によるものかを検討することを含めた、熱に対する脳および心臓の急性反応を形態学的・分子生物学的に検索し、高温曝露時（熱中症）の死亡に至る機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 高温曝露モデルラットの作成

Wistar 系雄ラット（10 週齢、体重 300～320g）の腹腔内にペントバルビタールを投与し（50mg/kg）十分に麻酔をかけ、直腸内に深部体温測定用のプローブを挿入した。続いて、一定温度に設定した保温マット上で直腸温を 37°C に調整し、その後内部の温度を 45°C、湿度を 90%以上 に調整し十分に換気した木箱に入れた。木箱に入れた時点から経時的に直腸温を測定し（BP-508、生体情報モニタ、オムロンコーリン）、直腸温がそれぞれ 40°C（n=4）、42°C（n=4）、44°C（n=5）に達した時点で取り出し、腹腔内にペントバルビタールを過剰投与し（1ml）安楽死させ、心停止後直ちに心臓及び脳幹を摘出した。さらに左心室自由壁筋を 2mm 角の大きさの細片に切断し、脳幹を細切し、RNAlater（Applied Biosystems）に浸け一晩冷蔵庫（4°C）で攪拌し、その後実験に使用するまで -80°C に凍結保存した。なお、コントロール（n=4）として保温マットで直腸温を 37°C に調整後直ちにペントバルビタールで過剰麻酔し安楽死させ、同様に処理したラットの左室自由壁筋及び脳幹を使用した。本実験は、三重大学生命科学支援センター動物実験審査等委員会の承認を得たものである。

### (2) RNA の抽出および cDNA 合成

凍結保存した左室自由壁筋及び脳幹の細片を Micro Smash™（MS-100、TOMY）でさらに破碎し、Quick gene 800（FUJIFILM）で付属のプロトコールに従って total RNA を抽出した。次に、Revertra Ace- $\alpha$ -™（TOYOBO）で付属のプロトコールに従って first strand cDNA を合成した。

### (3) 定量的 PCR

(2) で得られた cDNA を用いて、左室自由壁筋及び脳幹の両者において、ストレスタンパクの一種である heat shock protein (HSP) 70、アポトーシス関連遺伝子である Bcl-2 および Bax、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、左室自由壁筋においては、心臓筋の構造タンパクである  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) および  $\beta$ -MHC、 $\alpha$ -skeletal actin の各 mRNA 発現量の変化をも検索するため、ABI PRISM® 7700 Sequence Detector（Applied Biosystems）を用いて、Real-time PCR 法による定量的 PCR を行った。内部標準遺伝子として、哺乳類組織で発現する housekeeping gene の一つである  $\beta$ -actin を用い、発現量比較の対照として、コントロール群の 1 匹を使用した。

Real-time PCR 反応系は、SYBR® GREEN PCR Master Mix（Applied Biosystems）10 $\mu$ l、各 Primer 0.5 $\mu$ M で最終容量を 20 $\mu$ l とした。反応条件は 95°C 15 秒、60°C 1 分で 45 サイクル行った。

### (4) 分析

統計処理は、Tukey-Kramer's 法を用いて有意水準 5% 未満を有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) 直腸温

直腸温が 40°C、42°C、44°C に達した時間はそれぞれ、27.5 $\pm$ 6.4 分、32.5 $\pm$ 6.4 分、48 $\pm$ 5.4 分であった。

### (2) 左室自由心筋における mRNA の発現

HSP70 mRNA の発現量は、統計学的有意差は認められなかったものの直腸温の上昇と共に著明に増加しており、44°C では 37°C の約 7 万倍の発現を示した（ $p=0.1733$ ）。Bcl-2 mRNA/Bax mRNA は、37°C から 42°C までは明らかな変化を示さなかったが、42°C から 44°C の間で有意に低下した（ $p=0.0440$ ）。なお、iNOS mRNA については、直腸温と発現量の間には明らかな関連は認めなかった（ $p=0.7738$ ）。

$\beta$ -MHC mRNA の発現量は 37°C、40°C では特に変化は見られなかったが、42°C でわずかに増加傾向にあり、44°C で有意に増加していた（ $p=0.0281$ ）。一方、 $\alpha$ -MHC mRNA の発現量は 37°C から 42°C では特に変化を示さなかったが、44°C で増加傾向を示した（ $p=0.0811$ ）。しかし、 $\alpha$ -skeletal actin mRNA の発現量は直腸温との間に明らかな関連を示さなかった（ $p=0.2095$ ）。

### (3) 脳幹における mRNA 発現

HSP70 mRNA の発現量は、直腸温の上昇に伴い増加しており、特に 42°C から 44°C の間では有意に増加した（ $P=0.0004$ ）。Bcl-2 mRNA/Bax mRNA の発現量比は 37°C から 42°C の間までは明らかな変化を示さなかったが、42°C から 44°C の間では有意に低下した（ $P=0.0141$ ）。また iNOS mRNA の発現量は、37°C から 42°C までは上昇傾向にあったが、

42°Cから44°Cの間で有意に低下していた ( $P = 0.0293$ )。

#### (4) HSP70 mRNA 発現量に関する考察

HSP70は様々なストレスによって発現するストレス蛋白の代表的なものであり、ストレス蛋白遺伝子の発現はストレスの強度に比例して亢進する。HSP70をはじめとするストレス蛋白は、当初細胞における蛋白合成障害を修正するシャペロンとしての機能が知られていたが、現在ではその他に、アポトーシスの抑制や炎症反応の抑制といった機能が知られている。高体温による循環器系への影響としては、血圧の上昇や頻脈などがあり、その際心臓には直接的な熱の曝露に加え、代謝は亢進し虚血状態が引き起こされ、今回の結果のように左室自由心筋の HSP70 mRNA 発現が促進されたと考えられる。また、高体温によって、中枢神経系では血流減少・高温に因る細胞傷害等が起こり、脳浮腫・微小出血・頭痛・めまい・意識障害等をみる。その際、脳幹には直接的な熱の曝露に加え、代謝は亢進し虚血状態が引き起こされ、今回の結果のように脳幹の HSP70 mRNA 発現が促進されたと考えられる。長時間の高体温曝露は熱中症を惹起するが、「研究開始当初の背景」で述べたように熱中症は高サイトカイン血症による全身性炎症反応とされており、心臓における HSP70 mRNA 発現量が体温上昇に比例して増加していることは、熱中症に由来する一連のストレスに対する反応とも考えられる。いずれにせよ、本実験における体温上昇に伴う心臓及び脳幹における HSP70 mRNA 発現量の増加は様々なストレスに対する細胞保護作用と考えてよいだろう。

#### (5) Bcl-2, Bax 及び iNOS 発現に関する考察

熱ストレスに応答して、細胞は細胞周期を停止して修復にあたるか、又は、アポトーシスを誘導して障害を受けた細胞を除去する。熱ストレスに応答して活性化されるキナーゼとして、MAPK ファミリーのサブファミリーである cJun N-terminal Kinase (JNK)がある。熱ストレスは JNK 経路からミトコンドリア経路を介してアポトーシスを誘導し、HSP70等のストレス蛋白によってアポトーシスの誘導が制御されていることが知られている。Bcl-2 および Bax は Bcl-2 ファミリーに含まれるアポトーシス関連蛋白として代表的なものであり、アポトーシスシグナル入力によるミトコンドリアを介したカスパーファミリーカスケードの活性化というアポトーシス誘導経路において、Bcl-2 ファミリーはカスパーファミリーの活性化を制御する。ミトコンドリアを介してアポトーシスを誘導する経路において Bcl-2 はアポトーシス誘導を抑制し、Bax はアポトーシス誘導を促進する。

#### ①左室自由心筋

左室自由心筋では Bcl-2 mRNA/Bax mRNA は 37°Cから 42°Cの間は特に変化がないにもかかわらず、42°Cから 44°Cの間で急激に低下していることは、42°Cから 44°Cの間でアポトーシスが誘導されやすい状態に陥っていると考えられ、高度に発現した HSP70 の細胞保護機能が破綻した可能性が示唆される。一方、炎症時に上昇する tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や interleukin (IL) -1 といった炎症性サイトカインはアポトーシスと同時に iNOS を誘導するとされているが、今回の実験では iNOS は特に変化を示さなかった。このことについては正確な理由は不明であるが、実験時間が比較的短時間であったので高体温による炎症反応が明らかでなく iNOS がまだ誘導されていなかった可能性が考えられる。

#### ②脳幹

脳幹では Bcl-2 mRNA/Bax mRNA の発現量比は 37°Cから 42°Cの間までは明らかな変化を示さなかったが、42°Cから 44°Cの間では有意に低下していることは、42°Cから 44°Cの間でアポトーシスが誘導されやすい状態に陥っていると考えられ、高度に発現した HSP70 の細胞保護機能が破綻した可能性が示唆される。中枢神経系において、外傷や炎症および虚血状態などが生じると、iNOS が誘導されることが知られている。iNOS により産生される NO はフリーラジカルとして組織障害性が指摘されている。一方で、血管拡張作用により微小循環を改善し、臓器保護的に働くとする一面があり、虚血時における iNOS の発現が、内因性の神経保護作用として虚血に対する耐性を高めるという報告もあり、侵襲時における iNOS の役割については様々な議論がある。著しい高温多湿な環境下では、熱放散のために末梢血管の拡張が起こり、さらに脱水・循環血流量減少の状態となった結果、相対的・絶対的循環障害が起こる。炎症時に上昇する tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  や interleukin(IL)-1 などの炎症性サイトカインはアポトーシスと同時に iNOS を誘導するとされているが、今回の実験のように短時間で急激に高体温を来たした場合には、全身的な炎症反応より循環動態の破綻が先行している可能性がある。循環不全による虚血の結果、iNOS により産生される NO が微小循環を改善し、臓器保護的に働くという立場に立てば、42°Cから 44°Cの間での iNOS の有意の低下は高温曝露に対する脳幹の細胞機能の低下および保護機能の破綻に関連する可能性が考えられる。

#### (5) 左室自由心筋における MHC および $\beta$ -MHC、 $\alpha$ -skeletal actin mRNA 発現に関する考察

MHC は、心血管系における主要な収縮蛋白系の一つであり、V1、V2、V3 という3つのアイソフォームを形成する。すなわち、こ

れら3つのアイソフォームはそれぞれ $\alpha$ -MHC・ $\beta$ -MHCの2つの遺伝子でコードされており、V1が $\alpha\alpha$ 、V2が $\alpha\beta$ 、V3が $\beta\beta$ で構成されている。ところが、これらのアイソフォームは心臓の状態によって変化することが知られており、 $\alpha$ -MHC/ $\beta$ -MHC mRNAの発現量の変化は、各種ストレスにおける心臓の状態を反映していると考えられている。特に $\beta$ -MHCは幼弱化ミオシンや胎児型ミオシンといわれており、その特徴として収縮力は低いがエネルギー効率が良く、高血圧、虚血性変化、心肥大といった心筋に何らかの障害を生じた際に発現量が上昇する。今回の実験では、 $\beta$ -MHC mRNAは42°Cから44°Cの間で明らかに増加しており、Bcl-2 mRNA/Bax mRNAの変化を考慮すれば、熱によるアポトーシス誘導、心筋虚血、圧負荷といった形態学および機能的な心筋細胞障害が生じていることを示唆していると考えられる。なお、 $\alpha$ -MHC mRNAは体温上昇で明らかな変化を示さなかったが、生後 $\alpha$ -MHC mRNAは $\beta$ -MHC mRNAに干渉されないことが解っている。また、 $\alpha$ -skeletal actin mRNAは、圧負荷による心肥大では発現は増加するが、容量負荷による心肥大では発現量は変化しないとされており、今回の実験モデルにおける心筋障害は $\alpha$ -skeletal actin mRNAの発現量が増加しないような変化である可能性が考えられる。Bcl-2 mRNA/Bax mRNAおよび $\beta$ -MHC mRNAの発現量の変化より、作業心筋において42°Cから44°Cで心筋細胞障害が生じていると考えられたが、この結果は熱により特殊心筋にも直接および間接的障害が生じる可能性を示唆している。すなわち、特殊心筋に今回の実験で見られたような障害が生じれば不整脈や心停止を生じる可能性は十分考えられ、高体温における短時間での死亡のメカニズムの1つである可能性が示唆された。

本研究の結果は過度の体温上昇が直接的もしくは間接的に心筋の形態学的・機能的障害及び脳幹の障害を引き起こす可能性を示唆している。左室自由心筋では42°Cから44°Cで心筋細胞障害が生じていると考えられ、脳幹でも同様に42°Cから44°Cに熱ストレスに対する耐性の限界がある可能性が示唆された。著しい高温・虚血によって、心臓作業心筋だけでなく特殊心筋に障害が生じれば、不整脈や心停止を生じる可能性が考えられ、脳幹障害が生じれば、意識障害、呼吸や循環動態の破綻などが生じ、いずれも高体温における短時間での死亡のメカニズムであるかもしれない。本研究の結果は高体温による死亡のメカニズム解明に大きく寄与するものと考えられる。

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4件)

1. Hanagama M, Inoue H, Kamiya M, Shinone K, Nata M. Gene expression on liver toxicity induced by administration of haloperidol in rats with severe fatty liver. *Leg Med.* 10. 2008. 26-30. 査読有り。
2. Inoue H, Hanagama M, Kamiya M, Shinone K, Nata M. Experimental pulmonary fat embolism induced by injection of triolein in rats. *Leg Med.* 10. 2008. 26-30. 査読有り。
3. 森定基裕、井上裕匡、神谷宗親、篠根光太郎、那谷雅之。高温暴露に基づく高体温の脳幹への影響。法医学の実際と研究。51. 2008. 99-103. 査読有り。
4. 神谷宗親、井上裕匡、篠根光太郎、花釜正和、那谷雅之。高温暴露に基づく高体温の心臓への影響。法医学の実際と研究。50. 2007. 153-157. 査読有り。

[学会発表] (計5件)

1. Hanagama M, Inoue H, Kamiya M, Shinone K, Nata M. Gene expression on liver toxicity induced by administration of haloperidol in rats with severe fatty liver. 7<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Legal Medicine. 2008.9.9. 大阪中央公会堂。
2. Inoue H, Nata M, Shinone K, Ito M, Ikeda N. Pulmonary fat embolization as a diagnostic finding for heat exposure. 7<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Legal Medicine. 2008.9.7. 大阪中央公会堂。
3. 森定基裕、井上裕匡、花釜正和、神谷宗親、篠根光太郎、那谷雅之。高温暴露に基づく高体温の脳幹への影響。第29回日本法医学会中部地方会。2007年10月27日。名古屋市立大学医学部(名古屋市)。
4. 神谷宗親、井上裕匡、花釜正和、篠根光太郎、那谷雅之。高温暴露に基づく高体温の心臓への影響。第8回日本法医学会北日本地方会。2007年10月5日。長稜会館(仙台市)。
5. 井上裕匡、花釜正和、篠根光太郎、那谷雅之、池田典昭。熱中症診断における肺塞栓の意義。第91次日本法医学会総会。2007年5月17日。秋田ビューホテル(秋田市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那谷 雅之 (Nata Masayuki)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70241627

(2) 研究分担者

井上 裕匡 (Inoue Hiromasa)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：50363338

(3) 連携研究者