

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09048

研究課題名(和文) ラット熱中症モデルにおけるNアセチルシステインと水素吸入による新規治療法の開発

研究課題名(英文) The Development of Novel Treatments Using N-Acetylcysteine and Hydrogen Inhalation in a Rat Heatstroke Model

研究代表者

中原 貴志 (Nakahara, Takashi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10560956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット熱中症モデルで、Nアセチルシステイン(NAC)およびNAC+水素ガス(H<sub>2</sub>)吸入の効果を検討した。NACは乳酸アシドーシスによるアシデミアを有意に抑制し、平均動脈圧の低下を抑制した。また、NACは、ASTおよびHMGB1を有意に抑制した一方で、ALTやsICMA-1の抑制効果は限定的であった。組織傷害の評価ではNACは肝および肺傷害を有意に増加させていた。水素ガスの併用は、肺傷害を抑制したが、肝傷害は抑制しなかった。NACは炎症性マーカーや乳酸アシドーシスを抑制し、平均動脈圧の低下を抑制する効果を示した。また水素の併用効果により、全身性炎症反応の抑制効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Nアセチルシステイン(NAC)はラット熱中症モデルにおいて局所組織の保護作用を示さなかったが、全身性炎症反応を抑制し、平均動脈圧を改善する効果があることが示された。また水素の併用効果により、全身炎症の抑制効果が示唆された。以上の結果から、NACは局所の傷害を抑制する効果より全身性の炎症反応の抑制効果のほうが高く、また水素ガス併用によりその抑制効果を増強できる可能性が示された。NACおよび水素ガス併用は臓器障害が生じる前の全身性炎症反応が生じる時期において熱中症の有効な治療法となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of N-acetylcysteine (NAC) and NAC plus hydrogen gas (H<sub>2</sub>) inhalation in a rat heatstroke model. NAC significantly suppressed acidemia caused by lactic acidosis and prevented the decrease in mean arterial pressure. Additionally, NAC significantly inhibited AST and HMGB1 levels, although its effect on ALT and sICMA-1 was limited. In terms of tissue damage, NAC significantly increased liver and lung injury. The combination of hydrogen gas inhibited lung tissue damage but did not prevent liver injury. NAC demonstrated the ability to suppress inflammatory markers and lactic acidosis while preventing a decrease in mean arterial pressure. The combined use of hydrogen gas suggested an additional effect in suppressing systemic inflammation.

研究分野：emergency medicine

キーワード：熱中症 水素吸入療法 Nアセチルシステイン

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の進行に伴い、熱中症の発症リスクは年々高まっている。その中で、熱中症は高齢者で重症となることが多いとされているが、2013年の我が国における熱中症による入院者数は35,571人のうち死亡例は550人であり、その14%は65歳未満であったと報告されている。この結果から、重症熱中症による死亡は若年～壮年層にも認められており、社会的・経済的損失も大きいと考えられる。

我々の研究室では、熱中症の病態において過剰なフリーラジカル産生による酸化ストレス傷害が臓器障害の原因であることを示したが、現在の熱中症の臨床における治療は、上昇した体温を下げることで臓器障害に対する対症療法しか存在せず、新たな治療法の確立が求められている。

ラットの熱中症モデルを用いた先行研究では、熱中症発症後の水素ガス吸入により臓器障害が改善することを確認しており、水素ガス吸入療法が熱中症の有効な治療法になりうると考えている。しかしながら、その治療効果は限定的であり、さらにその効果を増強させる必要もある。

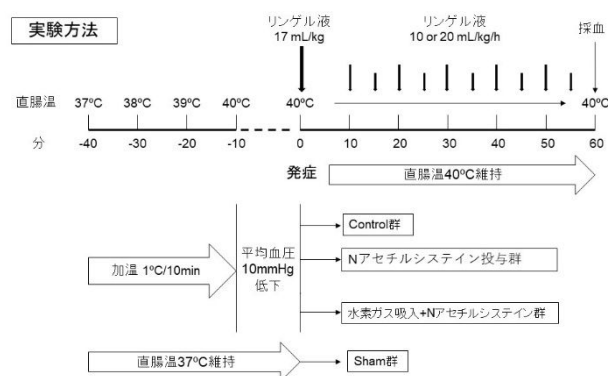
N アセチルシステインはアセトアミノフェン中毒の治療薬として臨床応用されているとともに、グルタチオンの前駆体でもあり、抗酸化ストレス作用があることが知られている。動物実験レベルでは、N アセチルシステインが複数のモデルにおいて酸化ストレスを抑制し、肝障害を抑制することが報告されている。

熱中症における臓器保護効果は明らかでないが、すでに臨床使用されている薬剤であり、効果が確認できればすぐにでも熱中症の臨床に応用できる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット熱中症モデルにおいて酸化ストレス傷害により臓器障害が生じる病態に注目し、その病態をN アセチルシステインで抑制することが可能かを解明するとともに、N アセチルシステインと水素ガス吸入療法の併用により酸化ストレス抑制効果及び臓器保護効果が増強するかを明らかにし、熱中症における新規治療法の確立を行う。

## 3. 研究の方法



Sprague-Dawley ラット雄(350-450g)を用いて、下記の報告と同様の方法で熱中症を作成した(図1)。ラットを全身麻酔下に気管挿管後人工呼吸管理とし、大腿動静脈にカニューレーションを行い、持続動脈圧測定および採血、静脈投与ルートとした。ヒートパッド、加温灯を用いて1°C/10分速度で直腸温が40°Cに到達するまで加温後、平均血圧が10mmHg低下した時を熱中症の発症とした。

図1. ラット熱中症モデル実験フローチャート

熱中症を発症させない Sham 群、熱中症のみの Control 群、熱中症発症後 N アセチルシステイン(200mg/kg 腹腔内投与)を投与する NAC 群、熱中症発症後 N アセチルシステイン(200mg/kg 腹腔内投与)を投与し水素ガスを投与する NAC+H<sub>2</sub> 群の4群に分け、検討を行った。

N アセチルシステインは熱中症発症直後に腹腔内に投与し、水素ガスは2%の濃度で熱中症発症直後から1時間投与を行った。熱中症発症1時間後に血液を採取し、遠心分離後血清を保存した。ラットは採血後に、冷生食及びフォルマリン液で灌流固定後、肝臓および肺を取り出し組織観察用の切片を

作成した。

保存した血清を用いて、肝逸脱酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、炎症のマーカーである soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) および High-mobility group box 1 (HMGB1)、酸化ストレスマーカーである malondialdehyde (MDA)、ニトロチロシン (N-tyr)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を測定し N アセチルシステインの保護効果を検討した。

肝臓および肺組織の切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、臓器損傷を評価した。

データは平均値±標準偏差または標準誤差で示した。各群の比較は、一元配置分散分析で行い、経時的なデータの解析は二元配置分散分析で行った。その後の検定には Bonferroni 補正を用いた。統計解析は IBM SPSS Statistics for Windows version 22 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラットの熱中症モデルにおける平均動脈圧の推移及び動脈血ガス分析の結果について

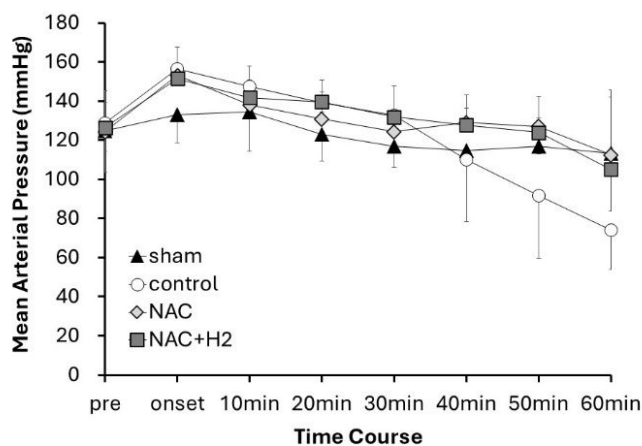


図2. 経過中の平均動脈圧の推移

ラット熱中症モデルにおける経過中の平均動脈圧の推移を図 2 に示す。Control 群において、Sham 群と比べ熱中症発症 50 分後より平均動脈圧の低下を認めた。NAC 群および NAC+H2 群では平均動脈圧の低下は認めなかった。

図 3 に熱中症作成前と熱中症発症 60 分後の動脈血ガス分析の結果を示す。熱中症発症前の動脈血ガス分析において、pH、PaO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、乳酸値はいずれの群も有意差は認めなかった。熱中

症発症 60 分後において、熱中症を作成した 3 群 (Control 群  $7.22 \pm 0.07$ 、NAC 群  $7.32 \pm 0.06$ 、NAC+H2 群  $7.31 \pm 0.06$ ) の pH は Sham 群 ( $7.47 \pm 0.03$ ) に比べ、有意に低下を認めた ( $P < 0.01$ 、図 3A)。NAC 群と NAC+H2 群の pH は Control 群に比べ、高い傾向にあった。熱中症発症 60 分後の PaO<sub>2</sub> は 4 群間で有意差は認めなかった (図 3B)。熱中症発症 60 分後の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> は、熱中症を作成した 3 群 (Control 群  $12.7 \pm 5.9$  mmol/L、NAC 群  $18.5 \pm 3.0$  mmol/L、NAC+H2 群  $18.1 \pm 4.3$  mmol/L) において Sham 群 ( $28.1 \pm 1.0$  mmol/L) に比べ、有意に低下を認めた ( $P < 0.01$ 、図 3C)。NAC 群と NAC+H2 群の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> は Control 群に比べ、高い傾向にあった。熱中症発症 60 分後の Control 群の乳酸値 ( $8.2 \pm 4.0$  mmol/L) は、Sham 群 ( $0.9 \pm 0.2$  mmol/L) に比べ有意に高値であった ( $P < 0.01$ 、図 3D)。NAC 群 ( $3.7 \pm 1.3$  mmol/L) と NAC+H2 群 ( $3.5 \pm 3.2$  mmol/L) の乳酸値は Control 群に比べ有意に低値

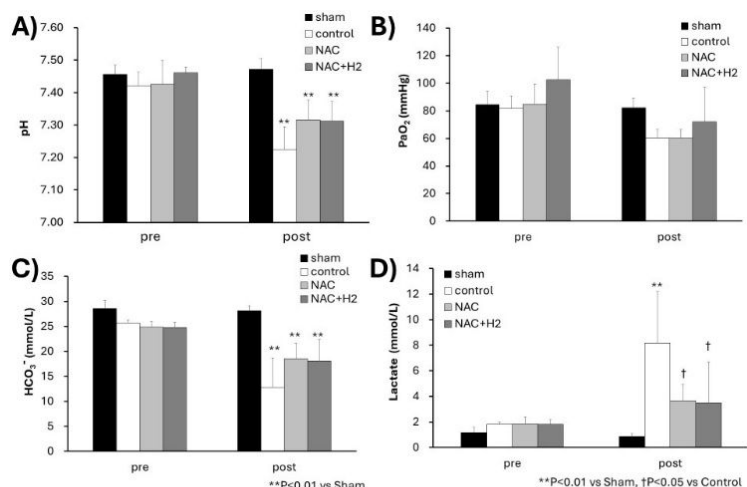


図3. 熱中症作成前および発症60分後のpH (A)、PaO<sub>2</sub> (B)、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (C)、乳酸値 (D)

であった(それぞれ  $P < 0.05$ , 図 3D)。

ラット熱中症モデルにおいて、N アセチルシステインは乳酸アシドーシスによるアシデミアを有意に抑制し、平均動脈圧の低下を抑制した。この効果は水素ガスの併用により増強はされなかった。

## (2)ラットの熱中症モデルにおける血清バイオマーカーの結果について

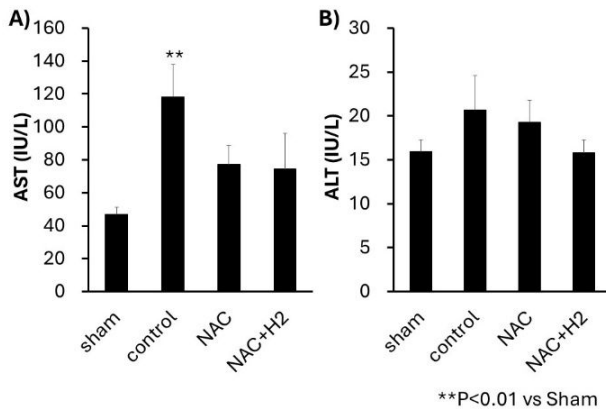


図4. 熱中症ラットのAST (A)およびALT (B)

(19 ± 6 IU/L)の ALT は Control 群と同等であったが、NAC+H2 群(15 ± 4 IU/L)の ALT は Control 群に比べ低い傾向にあった(図 4B)。

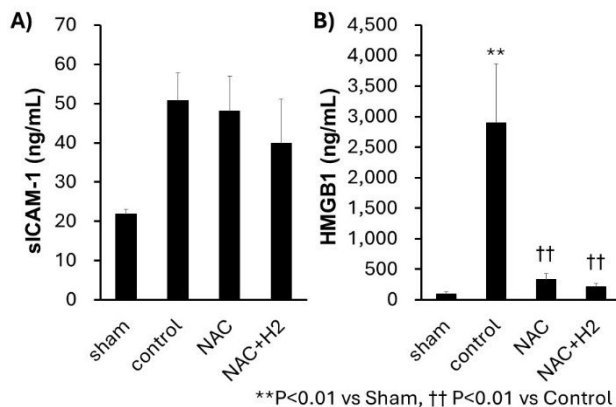


図5. 熱中症ラットのsICAM-1 (A)およびHMGB1 (B)

Control 群(2902 ± 2366 ng/mL)は、Sham 群(101 ± 77 ng/mL)に比べ有意に高値であった( $P < 0.01$ , 図 5B)。NAC 群(332 ± 236 ng/mL)と NAC+H2 群(219 ± 117 ng/mL)の HMGB1 は Control 群に比べ有意に低値であった(それぞれ  $P < 0.01$ , 図 5B)。

熱中症モデルにおける酸化ストレスマーカーである MDA、N-tyr、8-OHdG を図 6 に示す。いずれの

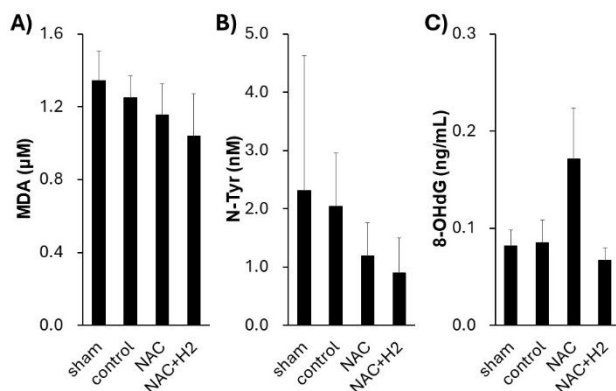


図6. 熱中症ラットのMDA (A), N-tyr (B), 8-OHdG (C)

ラットの熱中症モデルにおける肝逸脱酵素の AST と ALT を図 4 に示す。熱中症発症 60 分後の Control 群の AST (118 ± 48 IU/L) は、Sham 群(47 ± 11 IU/L)に比べ、有意に高値であった( $P < 0.01$ , 図 4A)。NAC 群(77 ± 28 IU/L)と NAC+H2 群(75 ± 53 IU/L)の AST は Control 群に比べ有意に低値であった(それぞれ  $P < 0.01$ , 図 4A)。

熱中症発症 60 分後の Control 群の ALT (21 ± 10 IU/L)は、Sham 群(16 ± 3 IU/L)に比べ、高い傾向にあった(図 4B)。NAC 群

炎症性マーカーである sICAM-1 と HMGB1 を図 5 に示す。血管内皮細胞傷害を示す sICAM-1 について、Control 群(51 ± 17 ng/mL)は Sham 群(22 ± 3 ng/mL)に比べ、高い傾向にあった(図 5A)。NAC 群(48 ± 21 ng/mL)の sICAM-1 は Control 群と同等であったが、NAC+H2 群(40 ± 28 ng/mL)の sICAM-1 は Control 群に比べ低い傾向にあった(図 5A)。

細胞傷害時に放出されるダメージ関連分子パターンである HMGB1 に関して、

Control 群(2902 ± 2366 ng/mL)は、Sham 群(101 ± 77 ng/mL)に比べ有意に高値であった( $P < 0.01$ , 図 5B)。NAC 群(332 ± 236 ng/mL)と NAC+H2 群(219 ± 117 ng/mL)の HMGB1 は Control 群に比べ有意に低値であった(それぞれ  $P < 0.01$ , 図 5B)。

ラット熱中症モデルにおいて、N アセチルシステインは、AST および炎症マーカーの HMGB1 を有意に抑制した一方で、肝臓特異性の高い ALT や血管内皮傷害マーカーの sICAM-1 の抑制効果は限定的であった。AST 抑制が明らかであることから、筋肉への傷害の抑制や、それに伴う HMGB1 の放出抑制効果が考えられた。水素ガスの併用

により、ALT、sICAM-1、HMGB1 の抑制増強の傾向は認められたが、有意ではなかった。

### (3) ラット熱中症モデルにおける肝臓および肺の組織傷害について

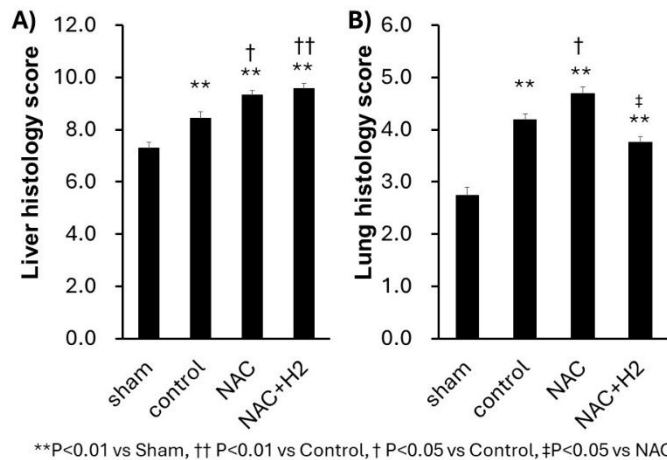


図7. 熱中症ラットの肝臓(A)及び肺(B)の組織傷害

ラット熱中症モデルにおける肝臓および肺の組織傷害をそれぞれ liver histology score、lung histology score を用いて評価した(図 7)。Control 群の liver histology score ( $8.4 \pm 4.0$ ) は、Sham 群 ( $7.3 \pm 3.4$ ) に比べ有意に増加していた ( $P < 0.01$ 、図 7A)。NAC 群 ( $9.3 \pm 2.5$ )、NAC+H2 群 ( $9.6 \pm 2.8$ ) の liver histology score は Control 群と比べ有意に増加していた ( $P < 0.05$  vs NAC 群、 $P < 0.01$  vs NAC+H2 群、図 7A)。

Lung histology score に関して、Control 群 ( $4.2 \pm 1.7$ ) は、Sham 群 ( $2.7 \pm 2.3$ ) に比べ有意に増加していた ( $P < 0.01$ 、図 7B)。NAC 群 ( $4.7 \pm 1.9$ ) の lung histology score は Control 群と比べ有意に増加していた ( $P < 0.05$ 、図 7B)。NAC+H2 群 ( $3.8 \pm 1.8$ ) の lung histology score は、NAC 群に比べ有意に低下していた ( $P < 0.05$ 、図 7B)。

ラット熱中症モデルにおいて、N アセチルシステインは肝臓および肺の組織傷害を有意に増加させていた。水素ガス吸入は、肺の組織傷害を抑制したが、肝臓の組織傷害は抑制しなかった。

### (4) 総括

N アセチルシステインはラット熱中症モデルにおいて、肝臓および肺の組織傷害の抑制効果は示さなかったが、炎症性マーカーや乳酸アシドーシスを抑制し、平均動脈圧の低下を抑制した。N アセチルシステインは局所組織の保護作用は認めなかったが、全身性の炎症反応を抑制し、全身状態を改善する効果があることが示された。炎症の抑制に関しては水素ガスの併用効果の可能性が示唆された。N アセチルシステインおよび水素ガス併用療法は、熱中症において臓器障害が生じる前の全身性炎症反応が生じる時期において有効な治療法となる可能性が示唆された。

### < 引用文献 >

日本救急医学会. 熱中症診療ガイドライン 2015. 東京: 医学書院; 2015.

Todani M, Fujita M, Tsuruta R, et al. Moderate hypothermia suppressed excessive generation of superoxide anion radical and inflammatory reactions in blood and liver in heatstroke: laboratory study in rats. Free Radic Res. 2010;44:462-72.

Eshrati R, Jafari M, Gudarzi S, et al. Comparison of ameliorative effects of Taraxacum syriacum and N-acetylcysteine against acetaminophen-induced oxidative stress in rat liver and kidney. J Biochem. 2021;169:337-350.

Peerapanyasut W, Kobroob A, Palee S, et al. Activation of Sirtuin 3 and Maintenance of Mitochondrial Integrity by N-Acetylcysteine Protects Against Bisphenol A-Induced Kidney and Liver Toxicity in Rats. Int J Mol Sci. 2019;20:267.

Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2019;26:11427-11437.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 基  (Fujita Motoki)  (50380001)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授    (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関