

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590853

研究課題名(和文)高温暴露時の心臓への熱による直接的傷害の機序解明

研究課題名(英文)The mechanism of myocardial injury from heat exposure

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：心疾患は熱中症発症のリスクファクターの一つとされているが、そのメカニズムについては詳細な報告はない。そこで、心筋梗塞モデルラットに熱暴露を行い、心疾患と熱暴露の関係について検討した。本研究では健常心と比較して、心疾患(心筋梗塞)がある場合には、熱暴露直後から心臓の傷害を示す指標の上昇がみられ、熱暴露による心臓への直接的な傷害があったことを示している。また、熱暴露後でも、数時間にわたり心筋傷害や心筋虚血などの形で心負荷が継続する可能性が示唆された。これらのことから、心疾患がある場合には、健常心より熱暴露に対してより脆弱であり、熱暴露における熱中症発症・増悪リスクを高めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cardiac disease is the one of the risk factor of onset of heat stroke. However, its detailed mechanisms have yet to be revealed. Therefore, We exposed heat to myocardial infarction rats, and investigated the relationship between cardiac disease and heat exposure. In this investigation, it revealed immediately direct injury to myocardium from heat exposure. And also, it revealed possibilities that after heat exposure, heart strain from myocardial injury and myocardial ischemia are continued. In the case of cardiac disease, it is sensitive to heat exposure, and associated with a great risk of onset and exacerbation of heat stroke.

研究分野：法医学

キーワード：熱中症 心疾患 心筋梗塞 心筋傷害 低酸素 虚血

1. 研究開始当初の背景

(1) 夏季を中心として熱中症が疑われる事例があるが、法医解剖において特異的な所見に乏しいために、死因判断に苦慮することが多い。

(2) 当分野においてこれまで、熱暴露を行ったラットの臓器について分子病態学的検索を行った結果、心負荷が生じることが見出された。

2. 研究の目的

心疾患は日本人の死因の第二位を占めており、熱中症発症のリスクファクターの1つとされているが、その詳細な報告に乏しい。そこで心筋梗塞モデルラットに熱暴露を行い心疾患と熱暴露の関係を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および手術

8週齢のWistar系雄ラットをイソフルラン濃度 1.9%にて吸引麻酔導入、喉頭気管挿管(14G サーフロ-)の後、小動物用ベンチレーター(SAR-1000)を装着した。

術部除毛消毒後開胸し、心臓を露出。左心耳先端を目印とし、9mm 縫合針付き 5-0 ナイロン糸で左冠状動脈前下行枝を多重結紮した(心筋梗塞モデル; M 群、n=30)。結紮後、心臓を胸腔内、正常位に戻しアスピレーターで胸腔陰圧を形成し、縫合した。

Sham (S 群、n=30) として、開閉胸のみで冠状動脈未結紮群を作成した。術後、7 日間通常飼育した後、熱暴露を行った。

(2) 熱暴露について

9 週齢時、S および M 群について、ペントバルビタール腹腔内投与(50mg/kg)後、各 5 群(各 n=6)に分けた。

SおよびM群のうちわけ

	Non-Heat	Heat (After the heat exposure of 37°C 90min.)			
		0hr	2hr	4hr	8hr
S 群	SN	SH0	SH2	SH4	SH8
M 群	MN	MH0	MH2	MH4	MH8

各n=6

熱暴露は温度 37.0 ± 0.5、酸素 21.0%および二酸化炭素 0.04%に調整したマルチガスインキュベーター (APMW-36、ASTEC) 内で 90 分を行った。

熱暴露を行わない SN 群および MN 群については麻酔導入 90 分後、SH (0-8) 群および MH (0-8) 群については熱暴露終了後、室温に静置し、熱暴露の直後、2 時間、4 時間および 8 時間後に断頭し、流出血液および心臓を採取。血液は血清分離。心臓は冠状動脈結紮部位より約 1 mm 直下で横断し、上部を組織検索用にホルマリン固定、下部の左心室自由壁を分離し細片化したものを RNAlater (Applied Biosystems) で一昼夜攪拌・震とうし、-80 で凍結保存した。

(3) 心筋梗塞部位の評価

M 群の冠状動脈結紮手術における心筋梗塞の程度および S 群の心筋への侵襲性の有無を評価するために、心横断面組織標本に HE 染色を行い、心横断面積に対する梗塞部位の比率を画像処理ソフトウェア Image J ver.1.48 を用いて計測した。

(4) mRNA 発現量定量

心筋から Total RNA を抽出、cDNA を合成して以下の遺伝子について Real time PCR 法による mRNA 定量を行った。

Natriuretic peptide type B (Nppb)

Troponin T2, cardiac (Tnnt2)

Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (Hif1a)

内部標準には *actin beta* を用い、S 群は SN 群、また M 群は MN 群を対照群とし、内 1 匹を基準に相対定量を行った。

(5) 血清タンパク測定

血清中の脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP45) を ELISA 法および心筋トロポニン T (cTnT) を ECLIA 法にて定量した。

(6) 統計処理

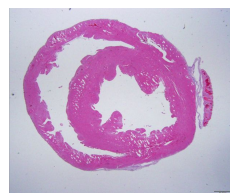
S または M 群における心筋梗塞部位の評価は Tukey 's test を用いて多重比較した。また、mRNA 定量および血清タンパク測定において熱暴露に対する影響を判断するため、SN 群 v.s. SH 群および MN 群 v.s. MH 群で Welch's *t* test を行った。加えて、熱暴露後の時間経過と心筋梗塞の影響を判断するため、各 SH または MH (0-8) 群から、基準となる SN または MN 群の平均値を差し引き、二元配置分散分析の後、Tukey 's test で精査した。

4. 研究成果

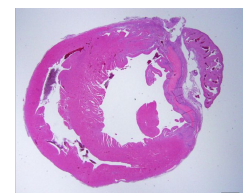
(1) 結果

心筋梗塞部位の評価

M 群のみに前壁-側壁にかけて心筋壊死像を認めた。



S 群の心横断面 (HE, ×12.5)



M 群の心横断面 (HE, ×12.5)

心横断面積に対する心筋梗塞の比率

	N	H0	H2	H4	H8
S 群	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
M 群	25.8±1.6	29.3±2.3	30.0±2.0	27.5±3.5	28.8±2.7

Mean(%)±SE. Statistically analyzed by tukey's test

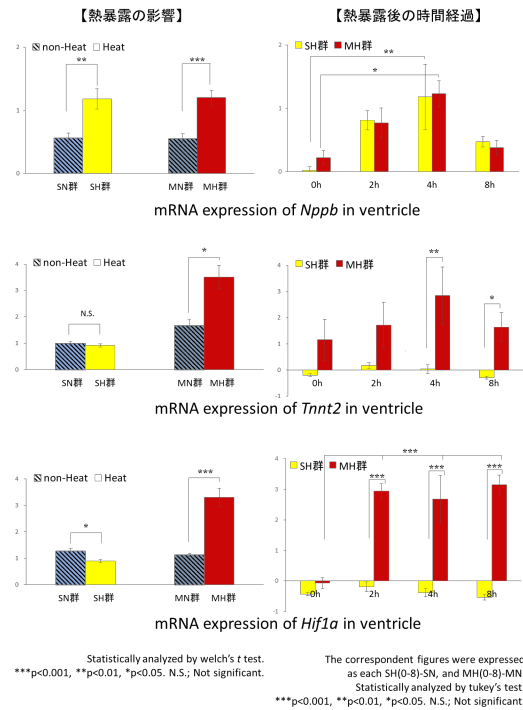
S または M 群における各群間の心筋梗塞比に有意差を認めなかったことから S または M

各群間の手術におけるモデルの均一性が保たれていると考えられた。

mRNA 発現定量

遺伝子	主効果		交互作用
	時間	心筋梗塞	時間 * 心筋梗塞
<i>Nppb</i>	< 0.001	N.S.	N.S.
<i>Tnnt2</i>	N.S.	< 0.001	N.S.
<i>Hif1a</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

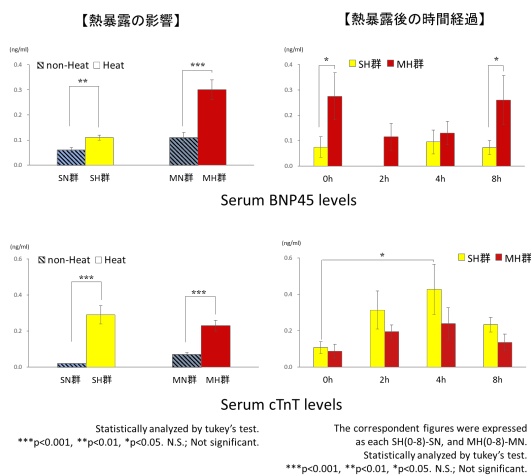
Statistically analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). N.S.; Not significant.



血清タンパク定量

タンパク	主効果		交互作用
	時間	心筋梗塞	時間 * 心筋梗塞
BNP45	N.S.	0.004	N.S.
cTnT	0.045	N.S.	N.S.

Statistically analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). N.S.; Not significant.



(2) 考察

BNP は左室に存在し、左室拡張末期圧や容

量負荷などの際、血中に放出される。BNP は心負荷を反映するため、臨床でも重要視されている。BNP の遺伝子は *Nppb* として知られている。*Nppb* は熱暴露後、SH および MH 群ともに 4 時間で増加のピークを迎えたが、BNP は MH 群で熱暴露直後および 8 時間後の有意な増加を示した。この実験結果より、心負荷は熱暴露中だけにとどまらず、暴露後もしばらく継続すると考えられる。

cTnT も BNP 同様の心マーカーとして、主に心筋傷害・壊死を反映し、心筋傷害後、数時間で増加することから心筋梗塞の診断に用いられている。cTnT の遺伝子は *Tnnt2* である。*Tnnt2* は熱暴露で MH 群のみ増加し、SH 群では有意な増加を認めなかった。さらに SH 群と MH 群を比較すると、MH 群は熱暴露後 4、8 時間で有意に増加した。一方、cTnT は SH 群の 4 時間で有意な増加を認めており、遺伝子発現とタンパクレベルでのデータ解離が生じている。cTnT は約 94% がトロポニン複合体の形で、心筋原線維構造タンパクの一部を構成し、残り約 6% は細胞質に可溶性成分として存在するため、SH 群での cTnT の増加は、熱暴露による心筋傷害で可溶性成分が先に溶出した可能性が考えられる。しかしながら、M 群は熱暴露以前からの心筋梗塞によって、可溶性成分がすでに消費されているため、SH 群のような急激で有意な増加を認めず、緩やかな増加を示したと考えられる。これを裏付けるように、心筋梗塞の経過過程での cTnT の増加は、2 峰性を示す事が知られている。

Hif1a は Hypoxia-inducible factor (HIF) の遺伝子であり低酸素によって誘導され、エリスロポエチンをはじめ、多様な生理応答にかかわる遺伝子発現を変化させる上流因子である。実験結果より、MH 群では熱暴露 2 時間後から持続的に上昇していることから、熱暴露後、比較的時間が経過しても、低酸素状態が継続されている可能性がある。これは、熱暴露時の体温上昇を抑えるために、体表面血流量の増加に伴い、臓器虚血が生じている上に、心筋梗塞による正常心筋の相対的減少による心臓への酸素供給量の極端な減少のため、熱暴露時のみならず、熱暴露後もしばらく心臓へダメージが継続しているためであると考えられる。

本実験より、健康心と比較して、心疾患などの基礎疾患を伴う場合、熱暴露による影響は、熱の直接的な心臓へのダメージだけにとどまらず、熱暴露後でも、数時間にわたり、心筋傷害や心筋虚血などの形で心負荷が継続する可能性が示唆された。よって、疾患心は熱暴露における熱中症発症・増悪リスクを高めていると考えられる。さらに新たな知見として、健康心でも疾患心でも熱暴露により cTnT の上昇が認められたことから、高温環境下において死亡したと疑われる事例において、死因を判断するうえで有用な検査の 1 つになるのかもしれない。しかしながら、心疾患においても cTnT は上昇することから、熱

暴露単独での上昇を証明するには、潜在的な心疾患との鑑別も重要となる。

(3) 結語

熱暴露から心負荷が生じる事が証明された。さらに疾患心では熱暴露後も心負荷が持続するため、健常心よりも熱暴露に対して、より脆弱である可能性があり、熱中症の発症・増悪リスクを高めていると考える。本研究は、心疾患患者における熱中症への注意喚起および予防の観点においても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0件)

[学会発表](計1件)

中川 泰久 心疾患は高温暴露に対して脆弱か？(心筋梗塞モデルラットを用いた高温暴露の分子病態学的検討)
第99次日本法医学会学術全国集会 平成27年6月12日 高知市文化プラザ かるぼーと(高知県・高知市)

[図書](計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

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

(4) 研究協力者

中川 泰久(NAKAGAWA, Yasuhisa)