

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462769

研究課題名(和文) 重度熱中症における中枢神経障害の発症機構の解明と新規予防・治療法の開発

研究課題名(英文) brain damage after heat stroke in mice

研究代表者

土肥 謙二 (Dohi, Kenji)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：20301509

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)：本検討の目的は熱中症モデルにおけるneuroinflammationの病態のメカニズムを明らかにすることであった。まず本研究ではいまだ確立されていなかったマウスの熱中症モデルを開発し、生理学的評価、血液学的評価、ミネラル補充の効果について明らかにした。さらに現在は酸化ストレスの評価や水素水を用いた新規治療法の開発に向けた検討を行っている。また、熱中症モデルにおいては腸管のダメージが組織学的に強かったことから重症熱中症モデルにおけるneuroinflammationと脳-腸管によるsystemic inflammationとの関係について再検討している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was to clarify the pathophysiology of neuroinflammation in mice heat stroke model. We developed mice heat stroke model which was not established. We also clarified the beneficial effect of the mineral supplement in heat stroke. The evaluation of the oxidative stress in heat stroke and the development of the new treatment using the hydrogen water is undergoing. We also found that heat stress cause intestinal tract damage. Basis of these results, we will clarify the relations with neuroinflammation and systemic inflammation in heat stroke.

研究分野：救急医学

キーワード：熱中症 水素水 モデル マウス

### 1. 研究開始当初の背景

様々な疾患に活性酸素や一酸化窒素 (NO) などのフリーラジカルが関与していることがわかってきた。脳卒中、心筋梗塞などの急性疾患、糖尿病やメタボリックシンドロームをはじめとする慢性疾患、さらには悪性腫瘍や加齢に関しても、その病態における中心的役割を演じていると考えられている。近年では医療従事者のみならず一般の人々も活性酸素や抗酸化作用などについて非常に注目している。脳障害においては、脳低温療法さらにはフリーラジカル消去剤が既に臨床応用されており、今後さらにフリーラジカルが治療のターゲットとしては注目されている。重度熱中症の病態は複雑であり、近年の分子生物学の進歩によってかなりの病態のメカニズムが解明されてきた。しかし、その一方で中枢神経障害を伴う重度の熱中症は予後が極めて悪く、医療技術の進歩にもかかわらず、いまだ救命が困難な疾患の一つである<sup>1)</sup>。このような重度熱中症の急性期病態にはサイトカインによる急性炎症、酸化ストレスやフリーラジカルが強く関与していると考えられている。近年の高齢化や急速な地球的環境変化により熱中症は社会的にも大きく注目されている<sup>2)</sup>。我々は本邦における熱中症患者と中枢神経障害について日本救急医学会が行ったHeat Stroke 2010 を通じて報告してきた。近年、重度熱中症による脳傷害にもサイトカインストームだけではなく、フリーラジカルが関与していると考えられている。しかし、その一方でフリーラジカルを直接的に捕らえることが非常に難しく、酸化ストレスマーカーについてもいまだその詳細な動態は不明である。そのために臨床的データのみならず基礎実験においても直接的なフリーラジカルの発生や消去能を見た研究は非常に少なかった。今まで我々の研究グループでは世界で初めて脂質過酸化に關与するアルコキシラジカルを生体試料で直接的に計測するex vivo ESR 法を開

発した。さらに本手法でフリーラジカルのモニタリングを行い実際に臨床応用している。その結果によって脳低温療法やフリーラジカル消去剤 (エダラボン) の臨床におけるフリーラジカル抑制効果について報告してきた。さらには実験的頭部外傷モデルを用いて頭部外傷後におけるフリーラジカル産生系として classical activated microglia における NOX 2 (gp91) を介したスーパーオキシドラジカル (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) が極めて重要な役割を持っていることを突き止めた<sup>7)</sup>。さらには米国のワシントン大学 (Seattle, U.S.A) 抗加齢学講座と神経炎症における血液脳関門の役割について共同研究を行っている<sup>8)</sup>。血液脳関門のin vitro モデルでは世界的に有名な施設であり、本研究代表者も同大学客員准教授として定期的に共同研究を行っている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は重度熱中症における重症脳障害の発症機構について検討すること。さらに水素水を用いた新規治療法の重度熱中症における重症脳障害の治療効果について検討し、臨床応用への足掛かりとする基礎的検討を行うことである。本研究ではまず、マウス実験的熱中症モデルを作製し、重度熱中症における重症脳障害の脳組織における酸化ストレスと抗酸化能の計測、さらにはcytokines (IL-1α, IL-1β, IL-6, and TNF) 産生について検討する。また、さらにはフリーラジカル制御作用を持つ水素水を投与し同様の研究を行い、重度熱中症における重症脳障害における水素水投与によるフリーラジカル制御を用いた新規治療法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

マウス熱中症モデルの作成とミネラル投与の効果。

【方法】雄性成熟マウス (約30g) に埋め込み型体温計挿入し継続的に体温測定 (5分間隔) をおこなった。暑熱曝露3時間前から飲水制限を実施し脱水状態とした。まずは一般的な病態

としての比較を行った。水飲水群 [ (n=7) 脱水負荷後、暑熱曝露直後に水を30ml/kgを経口投与 ]、経口補水液飲水群 [ (n=7) 脱水負荷後、暑熱曝露直後に経口補水液を30ml/kgを経口投与 ] の2群に分け、暑熱曝露(41 , 60分, 相対湿度 $80 \pm 10\%$ )をおこなった。深部体温変化(曝露時最高体温・曝露後最低体温)・正常体温復帰時間について比較・検討した。次に、別の水飲水群(n=11)、経口補水液飲水群(n=11)について同様の暑熱曝露をおこない、曝露前・直後・6時間後に採血をおこない、WBC, Hb, HCT, Pltについて比較・検討をおこなった。

#### 4 . 研究成果

暑熱曝露時最高体温( $40.9 \pm 0.40$  ,  $40.3 \pm 0.40$  ,  $p 0.25$ )、曝露後最低体温( $31.3 \pm 1.04$  ,  $32.9 \pm 1.09$  ,  $p 0.63$ )で有意差は認めなかった。しかし、経口補水液飲水群では水飲水群と比較して正常体温復帰時間が有意に短縮した( $961 \pm 138$ 分,  $422 \pm 142$ 分,  $p < 0.026$ )。血液検査では経口補水液飲水群で水飲水群と比較して暑熱曝露6時間後のHb値( $13.7 \pm 0.38$ g/dl,  $12.7 \pm 0.24$ g/dl,  $p 0.029$ )の有意な低下を認めた。また、組織学的検討では熱中症モデルにおいて著明な腸管の浮腫と炎症を認めた。

本検討から経口補水液飲水は通常の水の飲水と比較して暑熱曝露中、曝露後の深部体温に影響は及ぼさないが、正常体温までの復帰時間を有意に短縮させた。また、経口補水液飲水群では暑熱曝露6時間後のHb値が有意に低下した。経口補水液飲水は水と比較して小腸からの吸収率が高いことが報告されており、この吸収率の違いが視床下部の循環不全を改善させ正常体温復帰時間短縮に寄与した可能性が考えられた。

これらの結果については現在、現在論文投稿中である。これらのデータをもとに水素水の飲水についての研究を現在行っている。特に熱中症モデルの重症度と神経損傷さらに

neuroinflammationとの関係性をより明らかにする必要があり、今後も継続的に同研究を進めていく予定である。一方で中等症の熱中症モデルについての作成方法は確立し、安定しており現在投稿準備中である。また、熱中症が腸管に与える影響は組織学的にも強かった。今年度以降はさらに重症熱中症モデルを作成してneuroinflammationと脳 - 腸管循環によるsystemic inflammationとの関係、さらには水素水の効果や抗炎症および抗酸化作用についても脳 - 腸管循環に着目して再検討している。本研究は機能水によって熱中症の予防が可能かについての検討であり、地球温暖化あるいは高齢化に伴う熱中症患者の増大が予測される中、極めて重要な課題であり、今後も積極的に研究の継続を行っていく。

水素水の脳保護作用については脳卒中、頭部外傷、脊髄損傷、神経変性疾患など様々な中枢神経疾患において脳保護効果が証明されている。我々は以前の研究で頭部外傷における水素水の脳保護作用について報告している。外傷性脳損傷に関する水素の有用性もいくつか報告がある。Jiらは水素ガス吸入による水素供与によってラット頭部外傷モデルにおいてBBB透過性を守り外傷後の脳浮腫を制御すること。その結果脳損傷を抑制することを報告した。また、同報告ではH水素ガス吸入によって外傷後の脳におけるantioxidant enzymeであるsuperoxide dismutase 活性 (SOD活性)とcatalase 活性(CAT活性)の減少が抑制されること、MDAや8-iso-PGF2の産生を抑制することを報告した。Eckermannらはラットを用いた右前頭葉切除による外科的外傷モデルにおいて水素ガス吸入が術後の脳浮腫を抑制し、術後の神経行動異常を改善することを報告した。その一方で、本報告では脳における脂質過酸化や酸化ストレス物質の産生については抑制されなかった。我々は2014年に水素水が外傷性脳損傷の急性期障害や外傷後

のアルツハイマー症候群の発症を予防する機能水としての役割を持つかについて報告した。外傷 2 4 時間前から水素水飲水の神経損傷抑制効果するかについて 2 0 1 4 年に報告した。水素水飲水群では外傷後 Day1, Day3 の脳浮腫が制御された。水素水飲水群では損傷後における海馬と皮質における tau expression、AT8、A $\beta$ 50 の発現が制御された。さらに水素水飲水群では astrocyte や microglia の活性化が制御された。また、水素水飲水群では頭部外傷によって誘引される遺伝子、特に oxidation/carbohydrate metabolism, cytokine release, leukocyte or cell migration, cytokine transport, ATP and nucleotide binding に関与する遺伝子の発現が抑制された。我々は頭部外傷後の Neuroinflammation と水素水飲水の関与についても検討している。水素水飲水が損傷脳におけるサイトカインやケモカイン産生に影響すること、HIF-1、MMP9、cyclophilin A 産生を制御すること、その一方で APP, A $\beta$ -40, A $\beta$ -42 の産生には影響しなかった。さらに水素と ATP 産生について調査している。その結果、水素は basal respiration, reserve capacity、そして non-mitochondrial respiration を増加させる一方で好氣的 A T P 産生は増加させないと報告した。このように molecular hydrogen の神経損傷抑制効果が単なる free radical scavenger としての単純な作用のみによらないことが証明された。

本検討の結果に基づいた継続的な検討で熱中症による脳症においても水素水が neuroinflammation を抑制することが期待される。

#### 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 2 件 )

Miyamoto K, Ohtaki H, Takayasu H, Maeda A, Sasaki J, Honda K, Dohi K, Hayashi M. Oral rehydration solution increases SGLT1 and improves dehydration in a mouse heatstroke model. Critical Care Medicine: January 2018 - Volume 46 - Issue 1 - p 252  
doi:10.1097/01.ccm.0000528551.63676.f8. ( 査読有 )

Dohi K, Satoh K, Miyamoto K, Momma S, Fukuda K, Higuchi R, Ohtaki H, Banks WA. Molecular hydrogen in the treatment of acute and chronic neurological conditions: mechanisms of protection and routes of administration. J Clin Biochem Nutr. 2017 Jul;61(1):1-5. doi: 10.3164/jcbn.16-87. ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

宮本和幸, 大滝博和, 高安弘美, 前田敦雄, 佐々木純, 本田一穂, 土肥謙二, 林宗貴. マウス熱中症モデルにおける経口補水液 (OS-1) の有用性について第45回日本集中治療医学会学術集会、2018.2月21日-23日

土肥謙二、脳蘇生神経保護療法の開発を目指して ~ 基礎から臨床的検討、そして未来へ。第64回昭和大学 学士会. 2018.

宮本和幸, 大滝博和, 高安弘美, 前田敦雄, 佐々木純, 本田一穂, 林宗貴, 土肥謙二. PACAP38の外傷性脳損傷抑制効果と抗酸化能向上作用について 第70回日本酸化ストレス学会学術集會 つくば国際会議場 (つくば)

会期: 2017年6月28日-29日

土肥 謙二、大滝 博和、佐藤 和恵、本田 一穂、塩田 清二<sup>3</sup>、有賀 徹、Banks Williams. 神経救急疾患における

抗酸化ストレス療法（予防から急性期治療、そして慢性期高次脳機能障害の予防へ向けて）第69回日本酸化ストレス学会  
学術集会。2016年8月30日 - 31日

〔図書〕(計1件)

Kenji Dohi et al. springer. Pathology  
and Prevention of Secondary Brain  
Injury for Neurocritical Care  
Physicians.2019, in press

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土肥 謙二 (Dohi, Kenji)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：20301509

(2)研究分担者

大滝 博和 (Ohtaki, Hirokazu)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：20349062

(3)研究分担者

小川 武希 (Ogawa, Takeki)

慈恵大学・医学部・教授

研究者番号：90119769

(4)研究分担者

宮本 和幸 (Miyamoto, Kazuyuki)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：80555087