

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19270

研究課題名(和文) 熱中症による横紋筋融解症発症モデルを用いた脂質過酸化に伴う腎機能障害

研究課題名(英文) Acute kidney injury with lipid peroxidation using the rodent models in rhabdomyolysis caused by heatstroke

研究代表者

奈良 明奈 (NARA, Akina)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：50722576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋融解症の発症にミオグロビンによる脂質過酸化反応に伴う腎障害が寄与していることが知られている。本研究はラットにグリセロールを筋肉内投与した1,3時間後の腎機能及び腎組織内変化について検討を行った。その結果、腎機能は投与1時間後で有意に低下し、腎組織においてもミオグロビンによる尿細管閉塞が確認された。また、投与1時間後より炎症性サイトカインの発現上昇を認め、脂質酸化損傷マーカーは3時間後より発現上昇を認めた。以上の結果より、ミオグロビンによる脂質過酸化反応は、それが要因となって腎障害を引き起こすというよりは、既に発生している腎障害の悪化を促している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the short-term effects of both lipid peroxidation and inflammatory responses on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (AKI). Rhabdomyolysis was induced by glycerol in saline into the rats. Time-dependent increases in serum biochemical parameters were observed 1 hour after glycerol injection. In kidneys, glycerol injection resulted in histopathological changes. We found an increases in lipid peroxidation-mediated oxidative and nitrosative stress within a few hours after glycerol injection and a release of pro-inflammatory cytokines. Our findings suggest that pro-inflammatory cytokine-mediated inflammatory response might lead to rhabdomyolysis-induced AKI during the very first few hours after glycerol injection, and lipid peroxidation-mediated oxidant injury could promote the development of associated pathophysiological processes.

研究分野：法医学

キーワード：横紋筋融解症 腎機能障害 グリセロール 脂質過酸化 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

法医学領域において、熱中症により横紋筋融解症に伴う多臓器不全を来して死亡した剖検例では、肉眼所見として直腸内温度上昇や諸臓器の脱水傾向、死体血中のミオグロビン値上昇、組織学的所見として筋組織壊死像等が認められることがあるが、急死の解剖所見以外の特徴的所見に乏しいことも多く、死因確定には組織学的・生化学的検査結果に頼らざるを得ない。このため、剖検試料を基に、より確実な死因特定の補助となり得る分子の発見や簡便な法医学的診断基準の確立が求められている。

一方、横紋筋融解症の発症に脂質過酸化による細胞障害が寄与していることが知られているが、細胞内での脂質過酸化の可視化や脂質過酸化に寄与する脂肪酸の検出を行った研究報告は少なく、脂質過酸化がどの程度進行した段階で細胞障害に至るのか、或は細胞内小器官のどこに存在する脂質が特異的に過酸化反応を起こし、それが細胞障害を来して最終的に腎不全に至るかに関して明確な検証がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、横紋筋融解症発症ラットモデルを用い、細胞内脂質過酸化を可視化し脂肪酸の検出を行うことで、脂質過酸化に伴う腎機能障害について詳細に解明し、熱中症発症による横紋筋融解症発症と脂質過酸化による腎機能障害との関連性についても検討することで、熱中症により死亡した剖検例での法医学的診断の補助手段になり得る可能性を探索した。

具体的には、

- (1) 横紋筋融解症病態ラットモデルを作製し、実際に横紋筋融解症に伴う脂質過酸化が腎機能障害を来しているか否かについて、分子生物学的手法を用いて検討する。
- (2) 細胞膜を構成するリン脂質中の脂肪酸の組成について、GC/MS 及び LC-MS/MS 分析により検出及び定量し、細胞障害に寄与する脂肪酸及び脂質の特定を行う。
- (3) 熱中症病態ラットモデルを作製し、横紋筋融解症発症の有無、脂質過酸化の程度や腎機能障害について評価する。

(1)-(3)の検討を基に、熱中症による横紋筋融解症発症に伴う脂質過酸化に関連した腎機能障害機構の一端を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

・実験動物として、雄の 7 週齢の SD ラットを供した。

- (1) 横紋筋融解症発症モデルの作製：生理食

塩水に溶かした 50%グリセロール 10mg/kg を後肢筋肉内に単回投与し、対照群は同量の生理食塩水を投与し、投与 1 及び 3 時間後の血液、尿、腎臓をそれぞれ採取した。

- (2) 腎機能障害の評価：各々の群における腎臓及び尿の色調を観察した。また、血清中の Blood urea nitrogen(BUN), Creatinine(CRE), Creatine phosphokinase(CPK), Lactate dehydrogenase(LDH) 値を測定した。
- (3) 腎実質内の病理組織学的評価：各々の群において、腎組織切片を Hematoxylin and eosin(HE) 染色並びに抗ミオグロビン抗体によるミオグロビン染色を行った。
- (4) ウェスタンブロッティング：各々の群の腎実質をホモジネートし、サンプルを Laemmli サンプルバッファーに溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後 PVDF 膜に転写し、以下に示した抗体を用いて目的タンパク質を検出した。

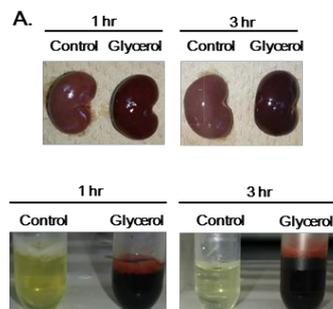
脂質過酸化反応：脂質過酸化損傷マーカーの N^ε-(Hexanoyl) Lysine(HEL)、4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 及び Nitrotyrosine (NT)を用いた。

炎症反応：Inducible nitric oxide synthase (iNOS)、炎症性サイトカインの Interleukin-6(IL-6) 及び Tumor necrosis factor- (TNF-)を用いた。

- (5) Nitric oxide (NO) 産生の評価：各々の群について、腎ホモジネートを遠心後に得られた上清を、市販の NO₂⁻/NO₃⁻ アッセイキットを用いて、マイクロプレートリーダーにて吸光度(波長 540nm)測定した。

4. 研究成果

- (1) グリセロールを投与すると、投与 1 時間後より腎臓及び尿の色調に著明な変化が認められ、腎機能(BUN、CRE、CPK、LDH)は有意に低下し、3 時間後では 1 時間後よりも更に有意な低下が確認された(図 1)。



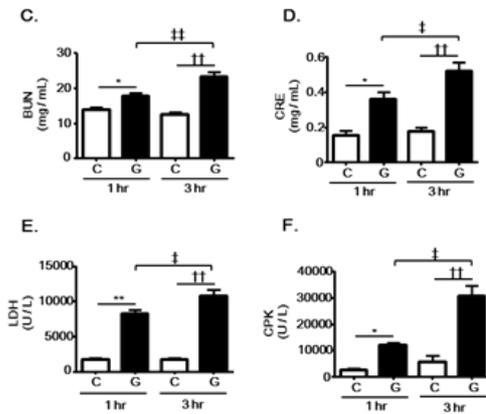


図 1 グリセロール投与群と対照群における腎臓(A)及び尿(B)の色調変化と腎機能障害の評価(C: BUN、D: CRE、E: CPK、F: LDH)

【考察 1】

一般に、動物を用いた横紋筋融解症発症モデルの多くが、グリセロール投与 24 時間以上経過後の腎機能低下を示しており、投与短時間内での腎機能低下に関する報告は少ない。本研究では、グリセロール投与 1 時間後より腎臓及び尿の色調に著しい変化が認められ、腎機能についても投与 1 時間後に有意な低下が認められた。そのため、グリセロール投与短時間後の腎実質内での病理組織学的変化について検討を行うこととした。

(2) 腎実質内における病理組織学的変化の観察を行った結果、グリセロール投与後 1 時間より尿管細胞壊死やヒアリン円柱の形成が認められ、またミオグロビン円柱も確認された。これらは投与 3 時間後で 1 時間後よりも更に広範囲にわたって観察された(図 2)。

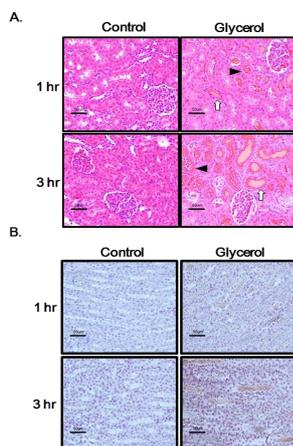


図 2 腎組織による HE 染色(A)及びミオグロビン染色(B) (白矢印: ヒアリン円柱、黒矢印: 尿管細胞壊死)

(3) 腎実質内での脂質過酸化反応について、HEL、4-HNE、NT はグリセロール投与 1 時間後

では対照群と比較し有意な変化は認められず、3 時間後においてその発現が有意に上昇した(図 3)。

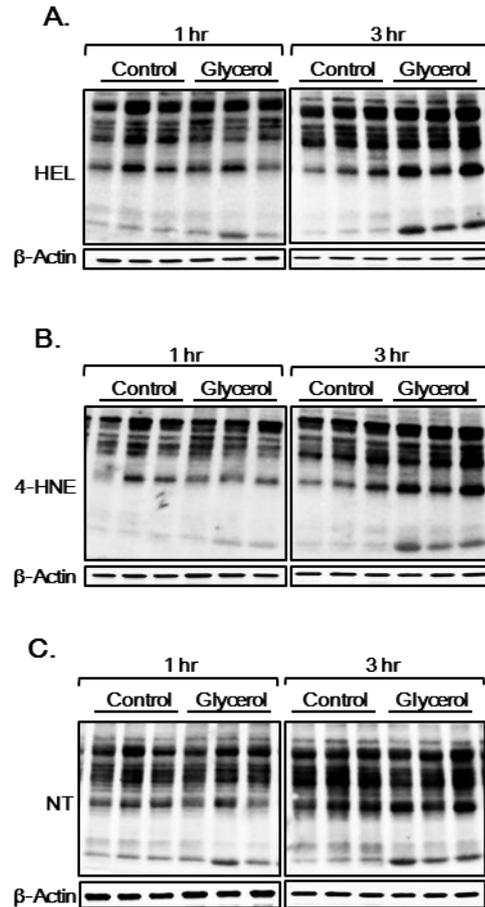


図 3 腎組織における脂質過酸化反応の評価 (A: HEL、B: 4-HNE、C: NT)

【考察 2】

当初の研究目的であった脂肪酸の組成についてその検出を試みる予定としていたが、脂質過酸化がグリセロール投与 1 時間後では著しい変化が認められないにも関わらず、腎機能低下並びに尿の色調変化、更には腎実質内の顕著な病理組織学的変化が認められたことから、その原因について詳細な検討を行うこととした。

過去の研究では、炎症性サイトカイン放出に伴う炎症反応がグリセロール投与後の腎機能障害に寄与していることが報告されている。そこで、本研究において炎症性サイトカインの放出とそれに伴う炎症反応について検討を行った。

(4) 腎実質内の NO 産生、iNOS、IL-6 及び TNF- α は、グリセロール投与 1 時間後より認められたが、3 時間後については 1 時間後と比して有意な変化は認められなかった。

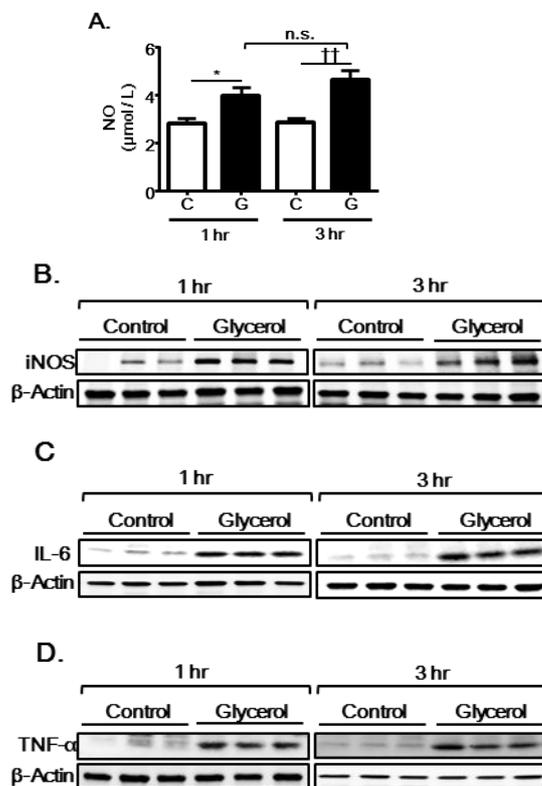


図4 腎組織におけるNO産生及び炎症反応の評価 (A:NO産生、B:iNOS、C:IL-6、D:TNF-α)

【考察3】

グリセロール投与後比較的短時間で腎機能が低下する要因は、主に炎症性サイトカインの放出に伴う炎症反応が直接的に寄与している可能性が考えられた。

【まとめ】

本研究では、グリセロール短時間投与による横紋筋融解症発症ラットモデルにおいて、脂質過酸化反応は、横紋筋融解症に伴う腎機能障害の直接的起因というよりはむしろ既に炎症反応により生じた病態の悪化を促す因子である可能性が示唆された。

本研究結果は、当初の研究目的とは異なるものとなったが、横紋筋融解症発症動物モデルにおける脂質過酸化に伴う腎機能障害に関する新しい見解が得られたとして、国際学術雑誌へ報告するに至った(5.〔雑誌論文〕)。

今後の展望としては、熱中症発症ラットモデルを作製し、熱中症発生と横紋筋融解症発症に伴う腎機能障害との因果関係について更なる検討を行う必要があると考える。

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 5 件)

Nara A, Yajima D, Nagasawa S, Abe H, Hoshioka Y, Iwase H. Evaluations of lipid peroxidation and inflammation in short-term glycerol-induced acute kidney injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016; 43: 1080-6. 査読有. doi: 10.1111/1440-1681.12633.

Nagasawa S, Katagiri N, Nara A, Chiba F, Kubo Y, Torimitsu S, Yajima D, Akutsu M, Iwase H. Postmortem redistribution mechanism of donepezil in the rat. *Forensic Sci Int*. 2016; 266: 1-7. 査読有. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.04.017.

Nara A, Nagai H, Yamaguchi R, Makino Y, Chiba F, Yoshida K, Yajima D, Iwase H. An unusual autopsy case of lethal hypothermia exacerbated by body lice-induced severe anemia. *Int J Legal Med*. 2016; 130: 765-9. 査読有. doi: 10.1007/s00414-015-1266-3.

Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Ogura S, Sonobe T, Inagaki T, Fujii Y, Yamaguchi R, Wingenfeld L, Umetani K, Shimosawa T, Yoshida K, Uemura K, Pearson JT, Shirai M. Pulmonary Macrophages Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction via 3AR/iNOS Pathway in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *PLoS One*. 2015; 10: e0131923. 査読有. doi:10.1371/journal.pone.0131923.

Ishihara K, Yajima D, Abe H, Nagasawa S, Nara A, Iwase H. The study of forensic toxicology should not be neglected in Japanese universities. *Drug Discov Ther*. 2015; 9: 144-6. 査読有. doi: 10.5582/ddt.2015.01029.

〔学会発表〕(計 6 件)

星岡 佑美, 安部 寛子, 副島 美貴子, 矢島 大介, 永澤 明佳, 奈良 明奈, 岩瀬博太郎. ノルマルヘキサンを吸引し死亡した一剖検例. 日本法中毒学会第 35 年会. 2016 年 7 月 1 日. 大阪産業創造館(大阪府・大阪市).

奈良 明奈, 矢島 大介, 永澤 明佳, 安部 寛子, 岩瀬 博太郎. 横紋筋融解症発症モデルを用いた脂質過酸化に伴う腎機能障害の検討. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 29 日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

高倉 彩華, 田中 直子, 安部 寛子, 前橋 恭子, 船越 丈司, 佐々木 千寿子, 奈良 明奈, 奥田 勝博, 岩瀬 博太郎,

岩楯 公晴, 上村 公一, 栗原 克由, 清水 恵子, 木下 博之. 香川大学における薬毒物分析の現状と中毒統計調査に向けた薬物スクリーニングメソッド構築の取組み. 第 32 回日本法医学会学術中・四国地方集会. 2015 年 10 月 30 日. 岡山大学 (岡山県・岡山市).

安部 寛子, 前橋 恭子, 船越 丈司, 佐々木 千寿子, 奈良 明奈, 奥田 勝博, 高倉 彩華, 田中 直子, 岩楯 公晴, 上村 公一, 栗原 克由, 清水 恵子, 木下 博之, 岩瀬 博太郎. 法医解剖における中毒統計調査に向けた薬物スクリーニングメソッド構築の取組み(3). 第 84 回日本法医学会学術関東地方集会. 2015 年 10 月 24 日. 日本歯科大学生命歯学部(東京都・千代田区).

本村 あゆみ, 安部 寛子, 星岡 佑美, 奈良 明奈, 永澤 明佳, 矢島 大介, 岩瀬 博太郎. 3 年間の千葉大学法医解剖における危険ドラッグ関連事例の検討. 第 37 回日本中毒学会総会・学術集会. 2015 年 7 月 17 日. 和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市).

榎野 陽介, 安部 寛子, 矢島 大介, 本村 あゆみ, 稲生 宏泰, 井ノ上 鴻太郎, 奈良 明奈, 坂 幹樹, 山口 るつ子, 千葉 文子, 岩瀬 博太郎. 危険ドラッグその現況と対策 複数種の合成カチノン及び 3MeO-PCP 摂取により死亡したと考えられる一剖検例. 第 37 回日本中毒学会総会・学術集. 2015 年 7 月 17 日. 和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

奈良 明奈 (NARA, Akina)
東北医科薬科大学・医学部・助教
研究者番号: 50722576

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし