

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007－2008
 課題番号：19592100
 研究課題名（和文） 高温環境下での血管内皮細胞傷害進展因子—高グルコース濃度の影響
 研究課題名（英文） Endothelial injury induce by hyperthermia- Effect of hyperglycemic condition
 研究代表者
 木下 浩作（KINOSHITA KOSAKU）
 日本大学・医学部・准教授
 研究者番号：90260968

研究成果の概要：

敗血症から多臓器不全への進展には神経内分泌免疫系の破綻と全身性血管内皮傷害の関与が示唆される。体温が上昇した環境での高血糖が血管内皮細胞に与える影響についての検討はない。本研究結果から高温・高糖環境が血管内皮細胞における炎症性物質（炎症性サイトカイン：IL-6）産生を増加させることが明になった。この反応はエンドトキシン存在下で促進される。従って、高体温患者にみられる高血糖は、血管内皮細胞からの IL-6 産生などの炎症反応を増大させ、二次性組織傷害を悪化させ、多臓器不全進展の危険因子となり得ると考えられた。高体温の敗血症患者では、早期からの血糖管理と体温管理が重要な管理項目と考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：救急医学

科研ひの分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：高温

(2) 高血糖

(3) サイトカイン

(4) 血管内皮細胞 (5) lipopolysaccharide

1. 研究開始当初の背景

都市部でのヒートアイランド現象に伴い、高温環境が生体に及ぼす影響を解析し治療法を確立することは急務であると考えられる。特に熱中症は、多臓器不全に進展することが知られているが、未だ高温環境により臓器不全に至る病態は明らかでない。集中治療が必要な患者は、高血糖や人工呼吸器関連肺炎・誤嚥性肺炎（Crit Care Med 2003; 31:2544 - 2551）などを合併することがあるが、高温環

境下での高血糖や感染性合併症が血管内皮に及ぼす影響を検討した報告はない。研究代表者らは、外傷性脳挫傷モデルを用いた実験系で、一過性高血糖暴露により、脳組織挫傷部の好中球浸潤の増加をきたし、損傷組織面積が拡大することを明らかにした（J Neurotrauma 2002 Jun;19(6):681-92）。さらに、血管内皮細胞を 200-400mg/dl の 24 時間の高糖環境で培養した場合、糖濃度 200mg/dl の培地に比べ、300-400mg/dl 培地で血管内皮細胞からの interleukin (IL)-8 (pg/mL) の産生は有意 ($p < 0.01$) に上昇し、

lipopolysaccharide (LPS) 存在下で増強 ($p < 0.001$) されることを報告 (Acta Neurochir Suppl. 96:419-21, 2006) した。そこで研究者らは、熱中症患者が臓器不全に至る一因として、単に高温暴露だけでなく、高温環境下の高血糖と感染性合併症が血管内皮傷害を増強させ、多臓器不全進展に関与しているのではないかとの作業仮説を立てた。

2. 研究の目的

慢性高血糖 (糖尿病) モデルでは、血管内皮細胞傷害や虚血再灌流後の白血球の接着や組織浸潤が増加し組織傷害に関与し、血管内皮細胞での nitric oxide 合成低下や接着分子の発現、炎症性サイトカイン産生増加と血中サイトカインの増加などが報告されている。血管内皮細胞上での接着因子の発現は、in vitro において LPS などによって増強されるが、高温環境下での高い糖濃度が血管内皮細胞に及ぼす影響に付いての検討はない。本研究では、高温 (38.5°C)・高糖環境で血管内皮細胞を培養 (糖濃度 300mg/dL の培地) し、感染時に増加する LPS を作用し、短期間の高糖・高温環境で培養された血管内皮細胞から産生される IL-6 および同 mRNA 発現を観察する。最終的には、熱中症患者の高温・高血糖環境下における血管内皮細胞損傷形態を検索し、熱中症患者の多臓器不全進展に至る因子として、高血糖が関係していることを明らかにする。

3. 研究の方法

1) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養および培養液の調製

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vascular endothelial cells, 以下 HUVECs) を 10% ウシ胎児血清を含んだ EBM2 メディウム中に二酸化炭素 5% を含む加湿環境下 37°C、38.5°C で培養する。細胞は約 70~80% confluent になるまで培養を続け、その後継代培養する。

HUVECs の IL-6 産生に対して、培養液のグルコース濃度自体がおよぼす影響または、高グルコース濃度に伴う高浸透圧がおよぼす影響を検討するために、本実験では HUVECs (5×10^5 cells/well, 各 $n=7$ wells) を 48 時間培養した後に、培養液をグルコースおよびマンニトールにより浸透圧を調製した Medium-199 を使用する。Medium-199 はグルコース 5.5mM (以下 NG 群)、グルコース 16.5mM (以下 HG 群)、およびグルコース 5.5mM にマンニトール 11mM を加えてグルコース濃度 16.5mM と同様の浸透圧を再現した群 (以下 HO 群) の 3 群に調製する。それぞれの培養液はさらに LPS

(1 μ g/ml) を含むもの、含まないものそれぞれ 2 群に分けて調製し、計 6 群の培養液中で 37°C、38.5°C で HUVECs を 5, 12, 24 時間培養する。

38.5°C で HUVECs を 24 時間培養し形態学的な viability は、37°C と差異のないことを確認している。

2) 培養上清 IL-6 値測定

37°C、38.5°C で 5, 12, もしくは 24 時間の培養の後、培養液の上清を採取し、氷点下 80°C で測定まで保存する。上清中の IL-6 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定する。

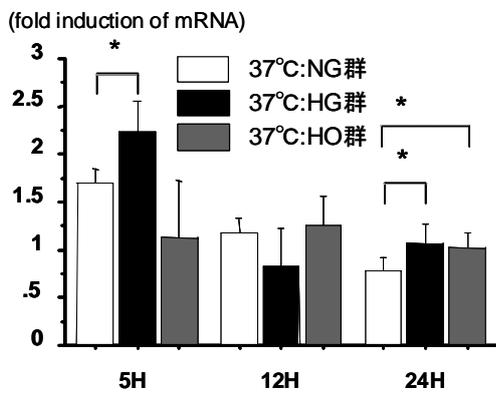
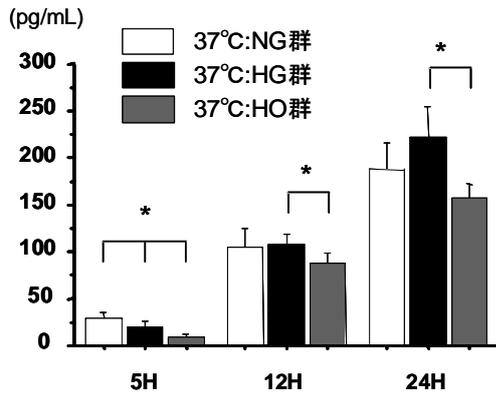
3) HUVECs の IL-6 mRNA 測定

37°C、38.5°C で 5, 12, もしくは 24 時間の培養の後、細胞から total RNA の抽出し Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて TaqMan® real-time RT-PCR を行う。キャリブレーターサンプル (LPS 非刺激下にグルコース濃度 5.5mM に調製した Medium-199 中で 5 時間培養したもの) のターゲット遺伝子発現量を 1 とし、各検体の mRNA 発現を相対定量する。

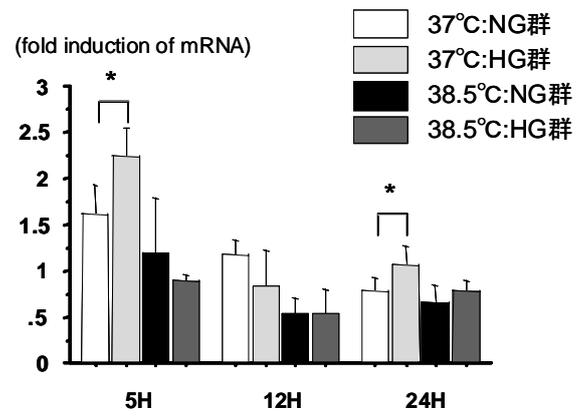
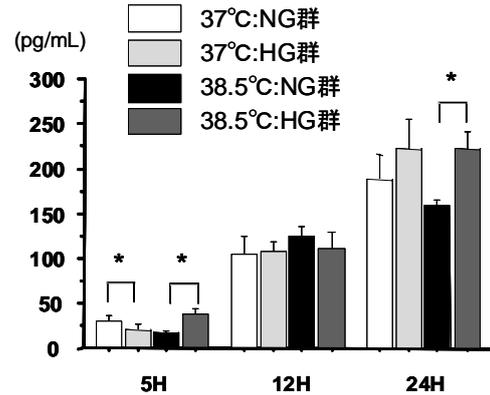
4. 研究成果

高糖環境での IL-6 産生は、培養温度 37°C、38.5°C いずれの環境でも有意に亢進した。しかも、38.5°C での高糖環境での培養は、37°C に比べて有意に IL-6 産生が亢進した。本研究結果は、高温・高糖環境が血管内皮細胞における IL-6 産生を増加させる一因であることを示している。この反応は LPS 存在下で促進される。従って、熱中症患者にみられる高血糖は、血管内皮細胞からの IL-6 産生などの炎症反応を増大させ、二次性組織傷害を悪化させ、多臓器不全進展の危険因子となり得ると考えられた。熱中症に合併する高血糖や肺炎などの感染性合併症は、傷害組織内の好中球集積を助長し、熱中症患者の多臓器不全進展の一因となっていることが明らかにできるものと考えられる。今後、地球規模での異常気象と高温化、高齢化社会を向かえ、重症の熱中症患者の増加が推定される。本研究結果から、熱中症患者での高血糖は、多臓器不全進展の危険因子として重要であり、短期間の高血糖も厳格に管理する必要性を明らかにすることの社会的意義は大きいと考える。

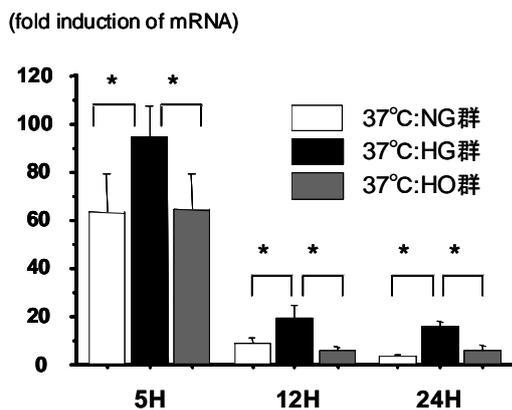
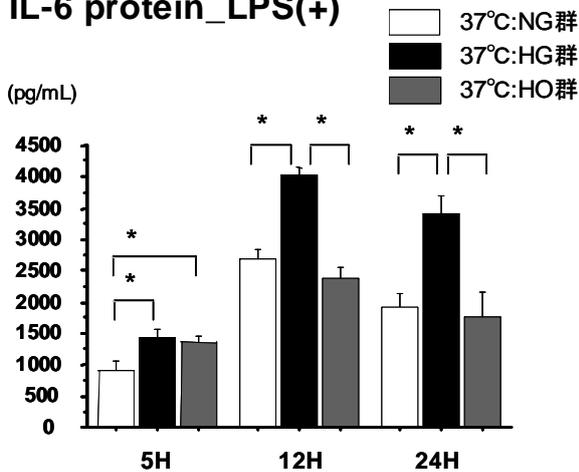
IL-6 protein_LPS(-)



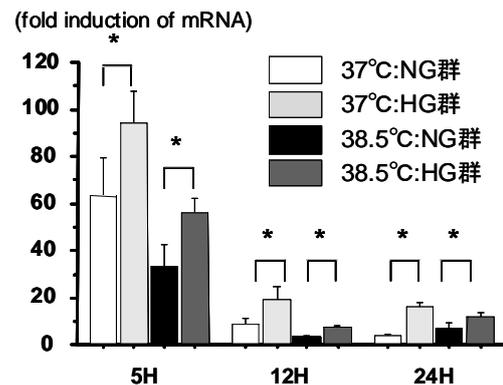
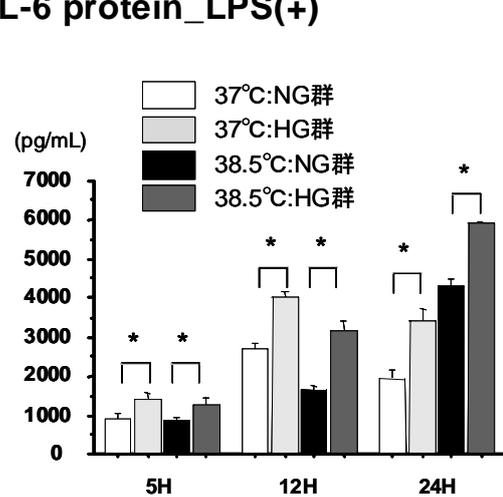
IL-6 protein_LPS(-)



IL-6 protein_LPS(+)



IL-6 protein_LPS(+)



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)

[学会発表] (計4件)

1. Kinoshita K, Sakurai A, Mukoyama T, Noda A, Kogawa R, Yamaguchi J, Azuhata T, Utagawa A, Moriya T, Tanjoh K: Hyperthermia accelerates the production of Lipopolysaccharide (LPS) induced cytokine production from endothelial cells in a hyperglycemic condition. 37th Critical care congress Hawaii, Honolulu 2008. 2. 2-6
2. 雅楽川 聡、木下浩作、野田彰浩、櫻井淳、丹正勝久: 高温環境下の炎症性サイトカイン発現に対する高糖環境制御の重要性 第36回日本救急医学会総会 2008. 10. 13-10. 15 札幌
3. Kinoshita K, Sakurai A, Mukoyama T, Noda A, Kogawa R, Yamaguchi J, Azuhata T, Utagawa A, Moriya T, Tanjoh K: Hyperthermia inhibits cytokine production by endothelial cells. 38th Critical care congress (Nashville, Tennessee) 2009. 1. 31-2. 04
4. 雅楽川 聡、木下浩作、野田彰浩、櫻井淳、丹正勝久: 高温下における炎症性サイトカイン発現からみた高糖環境制御の重要性第36回日本集中治療医学会学術集会 2009. 2. 26-28. 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 浩作 (KINOSHITA KOSAKU)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 90260968

(2) 研究分担者

雅楽川 聡 (UTAGAWA AKIRA)

日本大学・医学部・助手

研究者番号: 70328730

(3) 連携研究者

なし