

熱暴露における電解質飲料の循環動態への効果

The effect of electrolyte beverage on circulatory system during heat exposure

那谷雅之¹⁾ 萬濃春花¹⁾ 中川泰久¹⁾ 平光正典²⁾

井上孝司²⁾ 片桐孝夫²⁾ 井上裕匡¹⁾

Masayuki Nata¹⁾ Haruka Manno¹⁾ Yasuhisa Nakagawa¹⁾

Masanori Hiramitsu²⁾ Takashi Inoue²⁾ Takao Katagiri²⁾ Hiromasa Inoue¹⁾

キーワード

熱中症、電解質飲料、心負荷、予防、遺伝子発現

1. はじめに

近年、世界的な気温上昇により夏期に熱中症患者が急増し、それによる死亡者も急増している。熱中症は、高体温による直接的な臓器障害に加え、体熱放散のために表在血管が拡張することにより相対的に臓器血流が低下し、それによって引き起こされた腸管粘膜の透過性亢進による腸内細菌エンドトキシンの血管内流入や腸内細菌そのものの血管内への流入に惹起される高サイトカイン血症、敗血症といった全身炎症性反応症候群の一種と考えられている [1]。

熱中症は、古典的熱中症 (Classical Heatstroke) と労作性熱中症 (Exertional Heatstroke) に分類できる。古典的熱中症は、高温に対する適応能力の低い高齢者や乳幼児に好発し、一方で労作性熱中症は運動選手や労働者など若年・壮年者に多く、いずれも死亡率は高い。

当教室は、これまで熱中症の法医診断法を開発し法医実務への貢献をすると同時に、熱中症を病態生理学的に検討し各臓器の高体温による影響を解明してきた [2-4]。そこで、今回ポッカコーポレーション中央研究所との共同研究により、夏期の熱中症予防を目的としてスポーツ飲料の熱中症における影響

を分子病態学的に検討すべく、事前にスポーツ飲料を摂取させたラットに熱を暴露し、その循環動態への影響の評価として左心室心筋に発現する各種遺伝子の定量を行った。

2. 材料と方法

1) 熱暴露について

9週齢Wistar系雄ラット(約270g、日本クレア)を2群に分け、スポーツ飲料群として実験前1週間スポーツ飲料を自由摂取させた群(P群)と、コントロール群として実験前1週間メンブレンで濾過した水道水を自由摂取させた群(W群)とした。1週間スポーツ飲料(P群)および水(W群)を摂取させたラットについて各群をさらに2群に分け、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔後に内部温度37°Cに調整した木箱に入れ直腸温が42.5°Cに達するまで熱暴露した群(H群)と、麻酔後に保温マット上で体温低下を防止したのみで1時間放置した群(N群)とした。PH群(n=13)およびWH群(n=8)については熱暴露終了後、PN群(n=11)、WN群(n=7)については麻酔導入1時間後、ペントバルビタールを腹腔内に過量投与し安楽死させ、心臓摘出・左心室心筋分離し細片化後RNAlater (Applied Biosystems) で

1) 三重大学大学院医学系研究科法医科学分野 Department of Forensic Medicine and Sciences, Mie University Graduate School of Medicine

2) 株式会社ポッカコーポレーション 中央研究所 Research and Development Department, Pokka Corporation

1 晩浸透攪拌し、実験に使用するまで-80°Cで凍結保存した。

2) mRNA 発現量定量

左心室心筋の細片数個 (約 30 mg) を MicroSmash™ (MS-100, TOMY) で粉碎し、プロトコールに従って QuickGene 800 (FUJIFILM) で total RNA を抽出した。抽出した total RNA から Revertra Ace-α™ (TOYOBO) を用いてプロトコールに従い complement DNA (cDNA) を作成した。STEP ONE Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、cDNA を鋳型として定量的 PCR 法により以下の 7 遺伝子について、内部標準として β-actin として WN 群の 1 匹を基準とした mRNA 発現量の半定量を行った。

1 : 炎症性サイトカイン

Interleukin (IL) -1β

IL-6

Tumor Necrosis Factor (TNF) -α

2 : その他の遺伝子

Heat shock protein (HSP) 70

Vascular endothelial cell growth factor (VEGF)

Transforming growth factor (TGF) -β

Natriuretic peptide precursor B (Nppb)

Primer は Table 1 に示す。なお、Primer は Primer 3 version 0.4.0 で設計した。PCR 反応系は、SYBR®GREEN Realtime PCR Master Mix-Plus™ (TOYOBO) 5 μL、各 Primer 0.5 μM で最終容量 10 μL とした。

反応条件は 95°C 15 秒、60°C 1 分で 45 サイクル行った。

3) 統計処理

統計処理は二元配置分散分析法で行い、有意水準 5% 未満を有意とした。

なお、本実験は三重大学生命科学研究支援センター動物実験審査等委員会で審査・承認されたものである (承認番号 22-60)。

3. 結果 (Table 2)

1) 炎症性サイトカイン

IL-1β: 熱暴露単独で発現量は有意に低下し、スポーツ飲料を摂取することで低下は有意に抑制された。

IL-6: 熱暴露単独によって発現量は有意に増加し、スポーツ飲料を摂取することでその増加は有意に抑制された。

TNF-α: 各群間で明らかな変化が見られなかった。

2) その他の遺伝子

HSP70: 熱暴露によって発現量は増加し、スポーツ飲料摂取でその増加は有意に抑制された。

VEGF: 熱暴露単独では発現量が増加傾向にあるが、スポーツ飲料摂取後は熱暴露によって有意に低下する。

TGF-β: スポーツ飲料摂取によって発現量は有意に抑制される。一方、熱暴露によって発現量は有意に低下するが、スポーツ飲料摂取によってこの低下は抑制され、ほとんど変化は見られない。

Table 1

Primer sequence of 7 genes

IL-1β	F: CGGAAATTGAATGGGACGAT	R: CTGAAGGGTGTTCCTCAAAAACCTTGA
IL-6	F: GCCCTTCAGGAACAGCTATG	R: TGAAGTAGGGAAGGCAGTGG
TNF-α	F: CTCCCAGAAAAGCAAGCAAC	R: TGAAGTAGGGAAGGCAGTGG
HSP70	F: GTTGCAITGTTCTTTGCGTTTA	R: GGTGGCAGTGCTGAGGTGTT
VEGF	F: GTCCTGTGTGCCCTAATGC	R: ACGCACTCCAGGGCTTCA
TGF-β	F: TCCCCTCCGAAAGTAAGTACAGT	R: CCTTAGACTCGGGTACGGAAA
Nppb	F: GACGGGCTGAGGTTGTTTTA	R: ACTGTGGCAAGTTTGTGCTG

Table 2

The results of mRNA expression of 7 genes

Name of the genes	Means ± SE				P value		
	WN	WH	PN	PH	H	P	H*P
IL-1β	1.95 ± 0.15	0.82 ± 0.14	1.36 ± 0.13	0.91 ± 0.12	< 0.0001	NS	0.0231
IL-6	1.14 ± 4.33	24.20 ± 3.75	9.68 ± 3.53	6.73 ± 2.94	0.0101	NS	0.0013
TNF-α	0.87 ± 0.19	0.75 ± 0.19	0.77 ± 0.15	0.85 ± 0.14	NS	NS	NS
HSP70	0.75 ± 205.85	1797.04 ± 162.73	2.00 ± 162.73	987.45 ± 132.87	< 0.0001	0.0228	0.0224
VEGF	1.66 ± 0.31	2.33 ± 0.29	3.75 ± 0.25	1.97 ± 0.23	NS	0.0035	< 0.0001
TGF-β	0.93 ± 0.08	0.41 ± 0.07	0.14 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.0011	< 0.0001	0.0004
Nppb	1.01 ± 0.17	2.12 ± 0.16	0.67 ± 0.14	1.11 ± 0.14	< 0.0001	0.0002	0.0417

NS: not significant.

Nppb: スポーツ飲料摂取によって発現量は有意に低下し、熱暴露による増加はスポーツ飲料摂取によって有意に抑制された。

4. 考 察

HSP70 は生体がストレスを受けた際に生体を保護する目的で発現する蛋白であり、今回の実験では熱暴露による HSP70 発現がスポーツ飲料によって抑制されたことは、①スポーツ飲料摂取によって熱への耐性が生じたか、②スポーツ飲料摂取によって HSP70 発現そのものが抑制された可能性が考えられる。しかし、HSP70 発現量がスポーツ飲料摂取によって低下しているにもかかわらず、熱暴露による炎症性サイトカインである IL-1βおよび IL-6 発現量はスポーツ飲料摂取によって抑制されているということは、生体において事前のスポーツ飲料摂取によって熱への耐性が生じていたと考えるのが妥当であろう。熱中症は全身性炎症であることから、事前のスポーツ飲料摂取は熱中症予防に効果があることは十分考えられる。

Brain Natriuretic Peptide (BNP) は心室で産生され心不全の指標として用いられ、Nppb は BNP をコードしている遺伝子である。すなわち、Nppb 発現量の増減は血中 BNP 量の増減を意味していると考えられる。今回の実験では、Nppb 発現量はスポーツ飲料摂取単独で有意に低下しており、スポーツ飲料摂取は熱暴露前より心負荷を軽減する効果があるのかもしれない。これは、心臓における「スポーツ飲料摂取による熱への耐性」を意味するのであろうか。さらに熱暴露によってスポーツ飲料摂取による Nppb 抑制効果は顕著となり、スポーツ飲料摂取によって

熱暴露時の心負荷の軽減が生じているのであろう。VEGF も BNP 同様に心不全状態で上昇するとの報告があり、スポーツ飲料摂取後の熱暴露によって VEGF は低下していることは BNP 同様に心負荷の軽減を示唆していると考えられる [5]。一方、TGF-β低下は心不全状態において心筋の線維化を促進しているとの報告がある [6]。今回の実験では、スポーツ飲料の摂取なく熱暴露を受けた場合に TGF-βは低下するが、事前のスポーツ飲料摂取によって TGF-β低下は起こらなかった。Nppb、VEGF の結果からスポーツ飲料の摂取なく熱暴露を受けた場合には事前にスポーツ飲料を摂取した場合に比較して心負荷が強くなる可能性があり、TGF-β低下は心機能低下を促進する可能性が示唆される。逆に、事前のスポーツ飲料摂取は心負荷に対しリモデリング抑制などの心筋保護効果があるのではないだろうか。

事前のスポーツ飲料の摂取によって生じるであろう生体の変化は大きくないはずである。逆に生体に影響の大きい飲料は市販されないと考えられる。そのようなスポーツ飲料であるにもかかわらず、今回の実験では事前の摂取によって熱に対する耐性を強化する効果や熱暴露時の心負荷の抑制効果が分子病態学的に示唆された。今後は、さらに実験条件を検討し、より実際の熱中症に近いモデルを作成し、スポーツ飲料の熱中症対策における効果を検討していく必要がある。

文 献

- 1) Leon L. R. and Helwig B. G. Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. J Appl Physiol, 109: 1980-8 (2010)

- 2) Inoue H. et al. Pulmonary fat embolization as a diagnostic finding for heat exposure. *Legal Med*, 11: 1-3 (2009)
- 3) 神谷宗親、他：高温暴露に基づく高体温の心臓への影響. *法医学の実際と研究*, 50 : 153-157 (2007)
- 4) 森定基裕、他：高温暴露に基づく高体温の脳幹への影響. *法医学の実際と研究*, 51 : 99-103 (2008)
- 5) Martínez-Sales V, et al. Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Dis Markers*, 31: 75-82 (2011)
- 6) Edgley A. J., Krum H. and Kelly D. J.. Targeting Fibrosis for the Treatment of Heart Failure: A Role for Transforming Growth Factor- β . *Cardiovasc Ther.* doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00228.x.