

## 暑熱ストレスによる実験動物の生化学的ならびに組織学的変化

浅沼 信治<sup>1)</sup>・佐藤 勝紀<sup>2)</sup>・安藤 満<sup>3)</sup>・川原 一祐<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>(財)日本農村医学研究所・<sup>2)</sup>岡山大学・<sup>3)</sup>富山国際大学・<sup>4)</sup>松本歯科大学

### はじめに

恒温動物の中でも特に育種により高い生産能力を発揮するように選抜された家畜や家禽は暑熱ストレスに敏感で、夏季の猛暑の際は多数の動物が衰弱症状を示し、場合によっては高体温症のため死亡する。このため現在の状況のままでは、ヒートアイランド現象と地球温暖化の進行に伴う暑熱のため畜産や家禽被害も大きくなることが予想されている。気候変化に適応した畜産や家禽の育種や新たな飼育形態への取り組みは、今後一段と重要性を増すと考えられる。

本研究では夏季の暑熱が家畜・家禽類にどのような健康障害を及ぼすかについて明らかにするために、実験動物を用い猛暑に相当する暑熱暴露を行い、暑熱下における生体への影響について検討した。

暑熱の生体機能への影響観点からは、肝臓における酸素ラジカルの生成が注目される。酸素ラジカルは生体内脂質と反応し脂質過酸化反応を引き起こすと考えられ、生体膜の変性を引き起こす一方、生体高分子と反応するため酵素活性への影響も顕著と考えられる。

酸素ラジカルに対する生体の重要な防御系の中で、ラジカルスカベンジャー系酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼとカタラーゼは主要な防御系をなしている。グルタチオンペルオキシダーゼには非セレン型とセレン型グルタチオンペルオキシダーゼが存在する。酸素ラジカル暴露に対して誘導されるセレングルタチオンペルオキシダーゼは特に重要と考えられるが、その活性には種差が大きく、ラットは高い活性を示すがモルモットには活性が見られない。ヒトの活性はモルモットとラットの活性の中間に位置するため、ヒトは酸素ラジカルに対して比較的脆弱と考えられる。

グルタチオンペルオキシダーゼ活性の違いが酸素ラジカルによる生化学的毒性に影響を及ぼすと予想されるため、モルモットとラットを用いて暑熱ストレスによる生体の生化学的影響に関する実験を行った。

### 材料および方法

使用動物：SPF仕様の5週齢Fischer系ラットおよびHartley系雄モルモットを用い、25℃群（対照群）、30℃群、32℃群、35℃群の実験群を設定した。

温熱環境条件：温熱負荷実験には室温をそれぞれ25±0.5℃（25℃群）、30±0.5℃（30℃群）、32

±0.5℃（32℃群）、35±0.5℃（35℃群）に設定したセミクリーン状態の飼育室を用い実験した。実験条件は湿度40±10%、風速15cm/sec、換気回数15~20回/hr、明暗各12時間周期（照明時間午前7時~午後7時）に制御した。温熱負荷は25℃室で2週間の検疫飼育の後、7週齢時に1週間の連続温熱負荷を加えた。また、高齢・老齢ラットについては25℃で飼育後、52週、68週、100週を経過した後、耐性に配慮し暑熱ストレスに3日から1週間暴露した。

### 試料の処理

各試料は次のような方法で処理を行った。肝臓のミトコンドリア、ミクロゾーム、細胞質は以下に述べる方法を用い調整した。肝臓は冷却した0.9%の生理食塩水で完全に洗浄脱血し、9倍容の0.15M塩化カリウム、10mM HEPES緩衝液を加え、ポッター・エルベッヘム型ガラステフロンホモゲナイザーを用い、ホモゲナイズした。ホモジネートは300gで10分間遠心した。上清を7,000gで10分間遠心した。沈殿を0.15M塩化カリウム、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）に再溶解し、再度7,000gで10分間遠心しミトコンドリア分画を得た。最初の7,000gの上清を105,000gで60分間遠心し、ミクロゾーム分画を得た。上清の細胞質を分取し沈殿は再度0.15M塩化カリウム、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）で洗浄した。洗浄したミトコンドリアとミクロゾームは、0.15M塩化カリウム、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）に溶解した。ホモジネート、ミトコンドリア、ミクロゾーム、細胞質は液体窒素下で急速冷凍し、-80℃で保存した。

チトクロムP450濃度は一酸化炭素結合の差スペクトルを利用する常法に従い測定した。蛋白質の測定は、γ-グロブリンをスタンダードとし、クマシーブルー染色法で測定した。チオバルビツール酸反応生成物（TBARS）は酸性条件下におけるチオバルビツール酸との反応を利用する常法に従い測定した。肝臓の細胞質のグルタチオン濃度は、酸化型と還元型を分け常法に従い測定した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は12.5%アクリルアミドゲルを用い測定した。電気泳動後の蛋白はクマシーブリリアントブルーで染色した。

還元型チトクロムCの酸化活性測定と酸化型チトクロムCの還元活性測定はUV-240分光光度計を用い、550nmの吸光度変化を記録し測定した。アミノピリンN脱メチル化酵素活性は5'-AMP添

加により NADPH のミクロゾームピロリン酸酸化酵素による分解を抑え、ホルムアルデヒド生成により測定した。

細胞質のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は共役反応を利用し測定した。細胞質スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、細胞質グルタチオンS-トランスフェラーゼ (転移酵素)、カタラーゼは、50  $\mu$ g 蛋白/ml 相当の肝細胞質を用い測定した。酵素活性は UV-240 分光光度計を用い、吸光度変化を記録し測定した。

組織学的に検討するため解剖後、各臓器を 10% ホルマリンで固定、パラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H・E 染色) を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。検索した臓器・組織は、肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、胸腺、骨髄、消化管 (胃、十二指腸)、膵臓、副腎、甲状腺、精巣、大脳、脳橋、延髄、小脳などである。

また、細胞の微細構造への影響を観察するため、燐酸緩衝液下 1% グルタルアルデヒドおよび 1% オスミック酸の二重固定を行い、アルコール系系統脱水後、ケトール包埋の試料をマイクロトームで細切片化し、電子顕微鏡 (JEX-1200EX II 型 日本電子製) を用いて観察した。

統計解析には F-テストと t-テストを実施した。統計的有意差検定を行い、有意差のある数値は、\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$  で表した。

## 結果

図 1 に、ラット肝臓について脂質過酸化反応生成物の指標であるチオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の濃度変化を示した。25°C および穏やかな温熱条件である 30°C 群では肝臓ホモジネート中 TBARS 濃度は 2 週間の間、経時的にほとんど変化しなかった。それに対し 35°C の暑熱ストレス下では脂質過酸化物の生成が急増した。暑熱暴露後 2 日目から増加し、1 週間まで直線的に増加し、2 週間にはピークに達していた。

暑熱ストレスにより急性期の脂質過酸化物生成が明確になったため、比較的長期にわたる暑熱ストレスへの暴露について調べた。図 2 に示すよう、穏やかな温熱条件である 30°C と 32°C の温熱暴露下においては 6 週間まで肝臓ホモジネート中の脂質過酸化物の生成は経時的に増加しなかった。一方、35°C 暑熱ストレス下では急性期に引き続き 6 週間までの比較的長期にわたり脂質過酸化物生成のピークが持続していた。

ラットで肝臓の脂質過酸化反応の促進が得られたため、ラットの暑熱ストレスと並行してモルモットに暑熱ストレスを加え、両種の過酸化反応の違いについて検討した。図 3 に示すように、ラットおよびモルモットの両種とも穏やかな温熱条件である 30°C において、肝臓ホモジネート中の脂質過酸化物の生成が経時的に増加する傾向があった。

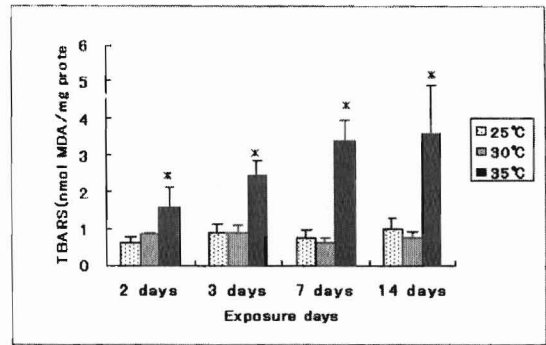


図 1 異なる暑熱温度と暴露期間におけるラット肝臓の脂質過酸化物生成量の変化

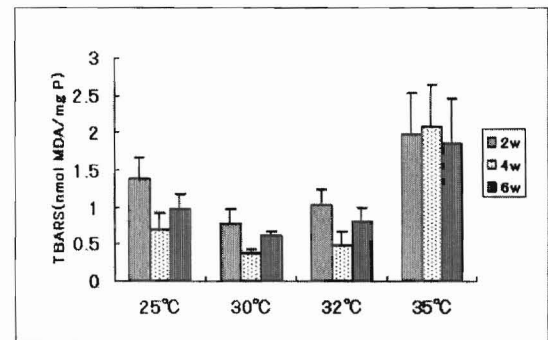


図 2 暑熱暴露によるラット肝臓における脂質過酸化物生成量の変化

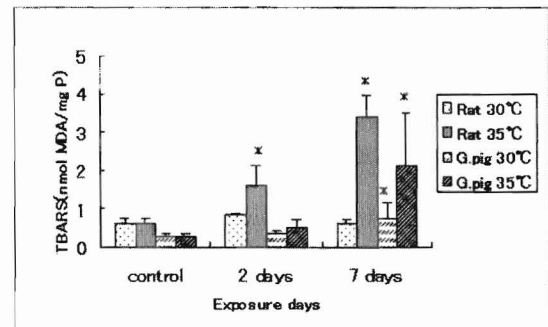


図 3 ラットおよびモルモット肝臓の脂質過酸化物生成量の変化

また 35°C の暑熱ストレス下ではラットおよびモルモットの両種とも暑熱暴露 2 日目に増加がみられ、1 週間目には 25°C のコントロール群に比べ顕著に増加していた。

図 4、図 5 に示すように、ミトコンドリアやミクロゾームといった肝臓細胞内小器官の脂質過酸化物生成は 7 週齢の若齢ラットでは暑熱による影響を受けていなかったが、52 週齢、68 週齢、100 週齢の高齢・老齢ラットでは著しく誘導されていた。

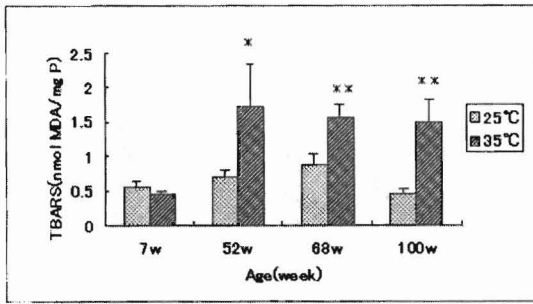


図4 異なる週齢のラット肝臓のミトコンドリアにおける過酸化生成量の変化

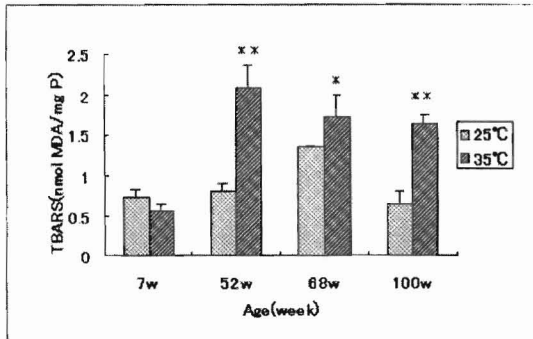


図5 異なる週齢のラット肝臓のミクロゾームにおける過酸化生成量の変化

腎臓における脂質過酸化は肝臓の場合と同様に若齢ラットでは暑熱環境による影響を受けていなかったが、高齢・老齢ラットでは著しく誘導されていた。心臓と脳では若齢、老齢いずれも暑熱環境による影響を受けていなかった。血清コルチコステロン濃度は暑熱ストレスにより軽度の影響がみられた。

ラットおよびモルモットにおいて、暑熱ストレスの暴露による内臓核心温の上昇を伴う高体温症は酸素ラジカルを生成し、脂質過酸化反応を促進することが明らかとなった。細胞の脂質過酸化の促進は細胞の生化学的変化と連動していた。

図6に示すように、若齢ラットにおいては肝臓の細胞質のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は環境温度の上昇により誘導された。暑熱ストレス下で誘導される肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は4週間に及ぶ長期の暑熱暴露中、環境温度に比例した誘導が起こっていた。一方さらに長期に及ぶ6週間の温熱負荷の継続下においては、環境温度に比例した直線の誘導は観察されなかった。

図7に示すように、通常の飼育環境条件においてラット肝臓細胞質グルタチオンペルオキシダーゼ活性は加齢に伴って著しく増大した。

その一方、高齢・老齢ラットの肝臓グルタチオ

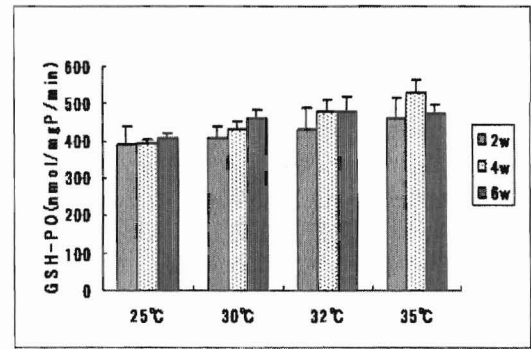


図6 異なる温度と暴露期間でのラット肝臓におけるグルタチオンペルオキシダーゼ活性の変化

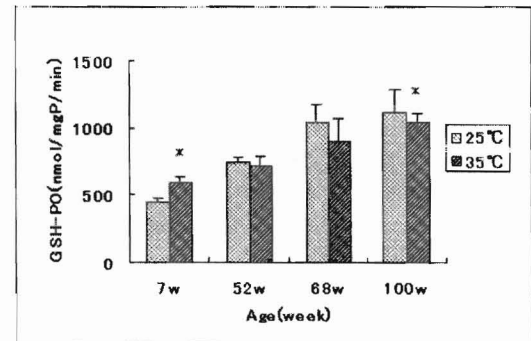


図7 異なる週齢のラット肝臓におけるグルタチオンペルオキシダーゼ活性の変化

ンペルオキシダーゼ活性は暑熱ストレスによりわずかに減少した。図には示していないが、若齢ラットにおいては肝臓細胞質のグルタチオントランスフェラーゼ活性も長期の暑熱暴露中わずかに誘導されていた。

図8に示すように、若齢ラットにおいて肝臓のカターゼ活性は暑熱ストレスによる著しい影響を受けていなかった。しかし通常的环境条件におけるカターゼ活性は動物の加齢に伴って減少した。高齢・老齢ラットにおいては肝臓と腎臓のカターゼ活性は暑熱ストレスにより著しく減少していた。一方、心臓、腎臓、脳のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は若齢、高齢・老齢のいずれのラットにおいても暑熱による影響を受けていなかった。

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性も暑熱ストレスによる変化は見られなかった。また抗酸化成分で抗酸化酵素の補酵素である還元型グルタチオン (GSH) や酸化型グルタチオン (GSSG) はこの実験における暑熱環境下では変化しなかった。

若齢ラットにおける肝臓の細胞質 SOD 活性は対照群において  $13.2 \pm 0.5$  unit/mg protein、暑熱暴露 (35°C) 群  $12.9 \pm 1.5$  unit/mg protein であった。還元型グルタチオンは対照群において  $5.50 \pm 0.31 \mu$

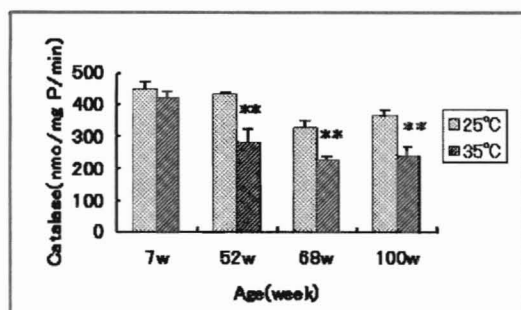


図8 週齢の異なるラット肝臓におけるカタラーゼ活性の比較

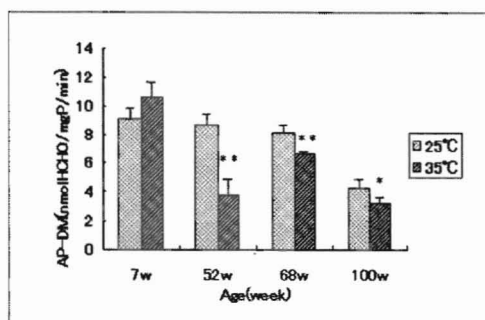


図9 異なる週齢のラット肝臓ミクロゾームでのアミノピリン脱メチル化酵素活性の比較

mol/g liver、暑熱環境への暴露後  $5.41 \pm 0.44 \mu\text{mol/g liver}$ 、一方、酸化グルタチオン (GSSG) は対照群において  $0.26 \pm 0.021 \mu\text{mol/g liver}$ 、暑熱環境への暴露後  $0.24 \pm 0.029 \mu\text{mol/g liver}$  であり、顕著な変化は見られなかった。

高齢・老齢ラットにおける肝細胞の小胞体は暑熱環境下で変形することが観察されたため、ミクロゾームの電子伝達系酵素についても検討した。図9に示すように、アミノピリン脱メチル化酵素 (AM-DM) は加齢につれて活性の低下が見られたが、週齢の高いラットにおいては暑熱ストレスにより、さらに活性が低下した。

図10に示すように、肝臓ミクロゾームのペルオキシダーゼである TMPD ペルオキシダーゼ活性は加齢につれて活性の低下が見られる一方、52週齢、68週齢、100週齢のラットにおいては暑熱ストレスにより、さらなる活性の低下が見られた。

チトクロム P450 リダクターゼ活性も高体温症において著しく減少していた。一方、若齢ラットにおいてミクロゾームの電子伝達系は暑熱暴露による影響を受けていなかった。

チトクロム C オキシダーゼ、チトクロム C リダクターゼといった肝臓ミトコンドリアの電子伝達系は若齢ラットにおいて急性の高体温症による影響を受けていなかった。しかし、高齢・老齢のラットでは暑熱ストレスによりチトクロム C オキシダーゼ、チトクロム C リダクターゼは同時に阻害されていた。

暑熱ストレスによる熱ショック反応を検出するために、ラットの肝細胞と好中球 (PMN) を単離し、 $^{35}\text{S}$  メチオニンで標識して電気泳動 (SDS PAGE) で分析した。その結果、70-kDa タンパク質と一致するタンパク質バンドの合成が誘導されており、単離した肝細胞と PMN において 70-kDa の熱ショックタンパク質が暑熱ストレスによって強く誘導・発現していた。

#### 組織学的変化

組織学的にみると、受動性高体温症はラットおよびモルモットの臓器・組織に対して大きな変化を引き起こした。また、高齢・老齢ラットでの暑

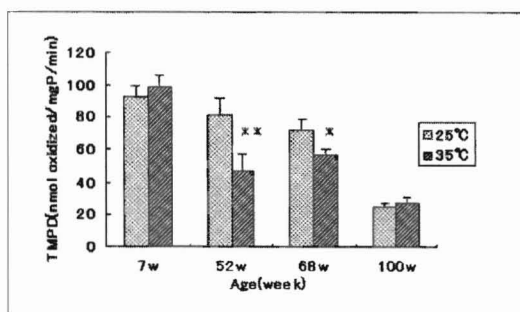


図10 異なる週齢のラット肝臓ミクロゾームでのTMPD ペルオキシダーゼ活性の比較

熱暴露による諸臓器の組織学的変化と細胞内微細構造の変化は若齢ラットより深刻であった。

肝臓についてみると、若齢動物においては  $35^\circ\text{C}$  の暑熱暴露群では全例に肝静脈と小葉下静脈の周辺にある肝細胞に膨化や萎縮がみられた。電子顕微鏡による観察では細胞内において脂肪顆粒が増える一方、変形したマイクロ小体が顕著であった。細胞内呼吸の中心器官であるミトコンドリアの変形が観察され、脂肪顆粒や脂溶性化合物の代謝を行う小胞体が増加していた。肝小葉構造や門脈系には特異的所見は見られなかった。比較的穏やかな暑熱暴露である  $32^\circ\text{C}$ 、28日間 (4週) の実験群から、栄養門脈血流としては遠位である肝静脈と小葉下静脈の周辺にある肝細胞の膨化や萎縮、細胞内小器官の変化がみられ、より高温への暴露によりその変化が顕著になった。変化の見られる部位は血液と直接物質交換がある部分であるため、暑熱暴露により門脈血が流れる類洞が拡張し、そのため血流速度が減衰し渦流を形成したり、旺盛な発汗により血液の粘性が増加したと考えられる。そのため鬱熱効果が促進されミトコンドリアやペルオキシダーゼに存在する脂肪酸化酵素の活性が変化した結果と考えられた。

高齢動物の肝においては肝小葉の周辺部分から中間部分にかけて、肝細胞に空胞変性が増加していた。この空胞変性や膨化は電子顕微鏡観察によって脂肪顆粒とリポフスチンの沈着による脂肪変

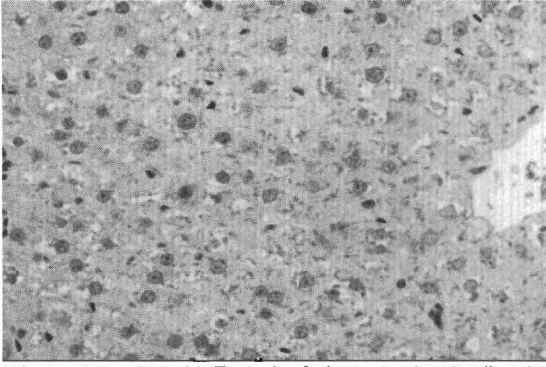


図 11 ラットの対照区 (25°C) における肝臓の組織標本 (H-E 染色 100 倍)

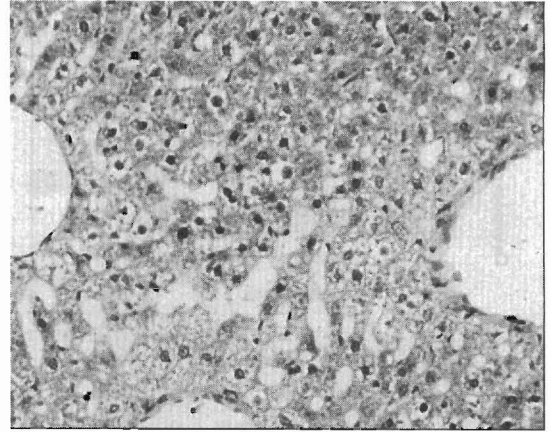


図 14 モルモットの暑熱暴露 (35°C) 下での肝臓の組織標本 (H-E 染色 100 倍)  
肝細胞の膨化と萎縮が顕著

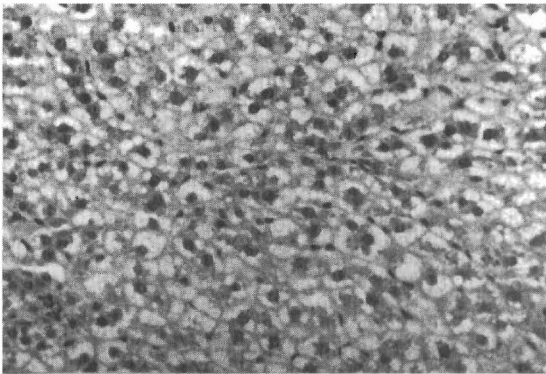


図 12 ラットの暑熱暴露 (35°C) 下の肝臓の組織標本 (H-E 染色 100 倍)  
肝細胞の膨化と萎縮が顕著

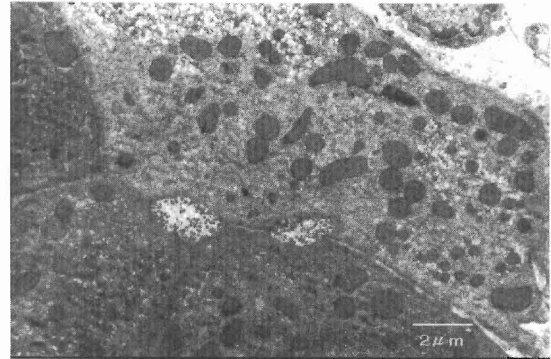


図 15 モルモットの暑熱暴露 (35°C) 下での肝細胞の電子顕微鏡写真 (4,000 倍)  
ミトコンドリアの不揃い、滑面小胞体の膨化、脂肪顆粒の増加などが見られる。

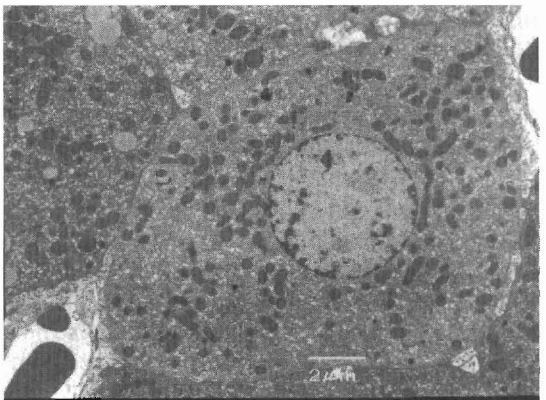


図 13 ラットの暑熱暴露 (35°C) 下での肝細胞の電子顕微鏡写真 (3,000 倍)  
ミトコンドリアの不揃い、滑面小胞体の膨化、脂肪顆粒の増加などが見られる。

性やミトコンドリアの膨化、滑面小胞体の膨化などが原因であることが明らかになった。類洞では、その幅が不規則に狭くなったり拡大したりしており、ディッセ腔も広がって絨毛が短くなった部分が認められた。胆管系については肝小葉の周辺部分で細胆管の微絨毛にばらつきが観察された。ラットには胆汁濃度の調節機能を持つ胆のうが解剖学的に存在しないため、胆汁分泌の調節は本来的な肝細胞と肝細胞の接着面に存在する微細胆管で対応し、外環境の変化に順応できる。一方、モルモットの微細胆管ではその順応力は弱く、微細胆管の微絨毛に変化が強くみられた。静脈系の拡張は肝小葉下静脈および肝静脈に顕著に見られた。これら静脈に近接した肝細胞は膨化している傾向があり、電子顕微鏡の観察では滑面小胞体の増加と拡大がみられ、細胞内に脂肪顆粒の増加とミトコンドリアの変形が起こっていた。肝小葉のクッパー細胞の多くはリポフスチンを含む黄褐色の顆



粒の食食像が増加していた。

腎臓は肝臓に比べて、暑熱暴露による組織化学的変化の現われる時期がやや遅れる傾向があった。暑熱暴露により腎臓の葉間静脈、弓状静脈には拡張している傾向がみられ、毛細血管の拡張は中程度であった。尿路では糸球体に特異はなく、暑熱暴露に伴い尿細管上皮に軽度な浮腫と尿細管内腔、特に遠位尿細管内に円柱状および不整形のタンパク様物質の貯留が散見された。これも高温負荷の程度に応じて増加がみられた。

心臓は高温の負荷により冠状静脈に拡張の傾向があり、毛細血管にも軽度ながら同様に拡張がみられ、鬱血像が散見された。高齢動物の心臓では対照群に比較して萎縮傾向がやや増加した。冠状静脈の拡張と筋層深部の毛細血管に鬱血が出現し、周囲の心筋細胞はヘマトキシリン-エオジン濃染性の萎縮がみられ、微細な空胞変性があった。さらに暑熱負荷によりほぼ全例で鬱血像と周囲の心筋細胞に大型の空胞を含む変性が認められた。

肺は気道末梢部の肺胞に拡張の傾向がみられ、小気腫の形成がみられた。肺門に近い周辺の気管支の肺野には浮腫が散見された。肺動脈および肺胞の毛細血管には特異的変化はみられなかった。気腫形成や浮腫などの所見は暑熱ストレスに依存性があり、35℃、42日間(6週)の暴露群に多数認められた。高齢動物の肺では暑熱ストレスのため鬱血傾向が増強していた。これら暴露群の肺動脈、肺胞毛細血管、肺静脈などはいずれも拡張して肺野全体としての滞血量が増加していた。このため含氧量は相対的に減少していた。肺野の末梢部にみられる気腫は対照群よりも拡大していた。肺門部から中心部にかけては逆に鬱血と浸出性の無気肺形成がみられ、肺胞腔へ上皮細胞の脱落が認められた。気管および気管支には対照群に比べて顕著な変化はみられなかった。

## 考察

非常に高い気温は死亡率や疾病を増加させているため、地球温暖化やヒートアイランド現象の加速により、熱ストレスが人間や動物の健康に影響を及ぼすかどうかについて評価することが必要である。

また、極端な熱ストレスが人間の健康に重大な生理的・生化学的影響を及ぼすので、人間と動物において暑熱環境によって引き起こされた受動的な高体温症による生化学的影響について研究することが重要である。

ラットでは肝臓細胞質のグルタチオンペルオキシダーゼ活性が暑熱暴露により強く誘導された。ラットの肝臓ではセレン型グルタチオンペルオキシダーゼ活性が主要なグルタチオンペルオキシダーゼ活性を占めているが、暑熱ストレスはセレン型グルタチオンペルオキシダーゼ活性を強く誘導

していた。

モルモットの肝臓ではセレン型グルタチオンペルオキシダーゼの活性はなく、非セレン型グルタチオンペルオキシダーゼ活性は高体温症の状態にあっても誘導されなかった。

人間の肝臓でのセレン型グルタチオンペルオキシダーゼ活性はラットと比較すると非常に低い。したがって、暑熱ストレスや熱波による人や動物への生体影響を比較検討するとき、動物の種により生化学的適応に差があることを重要な因子として考えておく必要がある。

若齢ラットにおいて、肝臓の脂質過酸化は環境温度の上昇により誘導されていた。肝臓の脂質過酸化は短期の暑熱暴露のみではなく、長期の暑熱暴露によっても増大していた。老齢ラットにおいて、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、カタラーゼといった酸素ラジカルに対する防御系酵素は暑熱環境により減少するため、肝臓の脂質過酸化が著しく誘導されたものと考えられる。ラットを35℃に暴露すると、肝臓の脂質過酸化が著しく促進される一方で、脂質過酸化物の生成は32℃の暑熱暴露では影響を受けなかった。

このように肝臓での脂質過酸化反応の誘導は高体温症における非常に敏感な生化学的指標であった。肝臓の脂質過酸化物の生成は暑熱ストレスに起因する受動的な高体温症に依存して増大した。

高体温症によって、若齢のラット肝臓でのグルタチオンペルオキシダーゼ活性が顕著に誘導され酸素ラジカルに対する防御系が作用したため、ミトコンドリアやミクロゾームなどの細胞内小器官の脂質過酸化は影響を受けなかった。他方、モルモットの肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は誘導されなかったため、暑熱ストレスにより著しい脂質過酸化反応がミトコンドリアとミクロゾームにおいて観察された。ミトコンドリアとミクロゾームの顕著な脂質過酸化反応は抗酸化試薬(BHT)を反応混合物に加えてもなお観察された。これは暑熱ストレスにより細胞内で脂質過酸化物が常在する状況にあることを意味している。

生体膜の中の脂質過酸化が細胞の酸化還元状態、細胞内小器官およびいくつかの膜結合酵素を障害すると報告されている。モルモットでは、高体温症においてチトクロムC酸化酵素やチトクロムC還元酵素などの肝臓のミトコンドリアの電子伝達系酵素の活性は同時に抑制された。しかしながら、高体温症でチトクロムP450モノオキシゲナーゼ活性などのミクロゾーム電子伝達系酵素には深刻な影響は及ぼさなかった。このことから脂質過酸化によりミクロゾームの電子伝達系酵素活性に影響を及ぼすほどの膜の攪乱は未だ起こっていないと考えられた。

哺乳類の細胞の中では熱のショック反応は細胞

質 SOD を誘導することが知られている。この実験では細胞質 SOD の誘導は高体温症では観測されなかった。また、カタラーゼやグルタチオントランスフェラーゼなどの酸素ラジカルを防護する他の酵素も影響されなかった。このことから生体でのラジカル生成の急増に対してはグルタチオンペルオキシダーゼの誘導は第一義的の重要性を持っていることを示している。

暑熱はラットおよびモルモットの肝臓において脂質過酸化を顕著に誘発したため、熱ストレスは人間と動物への健康に悪影響を及ぼす可能性があると考えられる。暑熱暴露は腎臓や心臓、脳などの他の器官には脂質過酸化の生成増加を引き起こさなかったことから、肝臓が暑熱ストレスの標的臓器の可能性があるため、熱ストレスによる肝臓の生化学的機能への影響について、今後、詳細な研究が必要である。

熱ショック反応は多種の生物において熱ショックタンパクの生成反応を活性化させることが認められている。熱ショックタンパクは暑熱ストレスにより合成する蛋白質の立体構造形成が不安定化することを防ぐ分子シャペロンとしての機能を持っている。モルモットとラットでは主に誘導される熱ショックタンパクに差があり、モルモットでは暑熱ストレスにより、核とミトコンドリアで 90-kDa の熱ショックタンパクの明らかな誘導が認められた。一方、ラットにおいても単離された細胞において 70-kDa の熱ショックタンパクの合成促進が観察された。両種において暑熱ストレスによる細胞機能の変調に対して、分子シャペロン機能を示す防御系が活性化したと考えられる。両種において誘導される熱ショックタンパクが異なることはその分子シャペロン機能の解析とともに今後に残された興味ある課題と考えられる。

本研究により、高体温症による生体機能の障害に対して抗酸化系酵素の誘導や熱ショックタンパク質の誘導など、様々の生化学的損傷から生体を防御する機構が発現することが明らかになった。

高体温症は肝臓においていくつかの重大な組織学的な変化を引き起こし、細胞構造に損傷を与え、肝臓の静脈周囲の細胞の中で肥大と空胞変性を引き起こしていた。

暑熱ストレスに対する生体の適応としては馴化による体温の熱放散の努力が認められる。しかし適応性が低下していると考えられる高齢・老齢期ラットでは顕著に暑熱ストレスの影響があらわれた。35°C の暑熱環境下では、暴露期間が長くなるほど病理学的な諸変化が増強していた。臓器・組織における最も顕著な変化は静脈系の拡張であった。心筋の空胞変性ととも肝臓、腎臓、心臓、肺および骨髄などに鬱血の傾向が認められた。

肝臓では各小葉の中間帯から中心静脈周辺帯にかけて、肝細胞に空胞変性がみられ、電子顕微鏡

による観察によれば、脂肪顆粒の増生、滑面小胞体の拡張やミトコンドリアの膨化などが認められた。特に脂肪顆粒ではそのサイズや電子密度に差が大きく、その原因として暑熱ストレスによる過酸化脂質の増加が考えられた。また、ラットとモルモットでは胆のうのバリアーの有無により、肝細胞の微細胆管に形態的な差異がみられることも反映していると考えられた。

腎臓の鬱血は副腎皮質の萎縮と呼応して、アルドステロン分泌の低下と遠位尿細管からの再吸収不全などによる電解質平衡の乱れを起こす可能性が考えられる。

心筋細胞の空胞変性は、肺の静脈拡張や鬱血の負荷の結果と考えられるが、再生能がみられない心筋細胞であることから重要な変化ととらえる必要がある。

細網内皮系では、骨髄、脾臓などにみられる赤芽球増生は造血機能の低下への反応と考えられる。またリンパ系におけるリンパ球の分布密度の減少は当然免疫能の減弱に繋がると予想される。

神経系では暑熱負荷群とともに大脳静脈系や毛細血管に拡張がみられ、第三脳室とその脈絡叢に浮腫性の変化があらわれていた。また、延髄の神経細胞に空胞変性ならびに星状グリア細胞の分布減少がみられた。ラットの生理学的実験において延髄の加熱により頻呼吸、皮膚血管の拡張や除脈などがあらわれることから、これらの変化は暑熱ストレスによる反応と考えられる。

暑熱暴露後の変化については 3 日目から変化などがあらわれはじめ、7 日目において顕著となった。連続した暑熱 (35°C) 暴露実験から、生体の適応特に馴化適応の範囲として、7 日間の暴露がほぼ限界であることを示している。

高齢ラットについての病理組織学的な検討では加齢性的変化と暑熱ストレスの変化が重複して認められた。組織学的変化としては対照群動物を含め、各群の臓器および組織には萎縮と腫瘍の発生が認められた。

萎縮性的変化は消化管の粘膜、膵臓の外分泌腺、腎臓の皮質、副腎皮質の球状帯、生殖器 (精巣) および各所のリンパ装置などにみられた。更に脂肪やリポフスチンの沈着が広い範囲にわたって認められた。

高齢ラットの腫瘍の発生については全例の精巣に間質細胞腫が存在し、種による特異性病変と考えられた。これらの変化は加齢による影響と考えられ、暑熱暴露群において特に顕著な増加は認められなかった。連続的な暑熱環境下では暴露量に依存して全身性の静脈系拡張がみられた。神経系では大脳第三脳室の拡大と脈絡叢上皮や脳橋の髄鞘に空胞変性が出現していた。暑熱暴露により松果体は萎縮が強く、電子顕微鏡による観察でも、松果体細胞の分泌顆粒 (メラトニン) が著しく減

少していた。分泌顆粒の減少は睡眠の質への重要な影響を示唆しており、猛暑下の不眠等への影響が予想される。また、暑熱暴露により延髄の神経細胞に空胞変性がみられた。空胞変性を示す神経細胞の周辺では星状グリア細胞の減少がみられた。

加齢による組織学的変化である萎縮が暑熱暴露により増強する傾向が認められたが、このことは高齢に伴う暑熱ストレスによる生化学的障害の増強と一致する結果として注目される。一連の組織学的変化は生化学的変化や疫学的事例とほぼ一致した結果を示しており、熱ストレスが高齢動物や高齢者に重大なリスクとして反映することを示している。

## 要 約

暑熱環境が生体の生化学的変化に及ぼす影響について検討した。暑熱影響を生化学的観点からみると、肝臓における酸素ラジカルの生成が注目される。酸素ラジカルによる生体高分子との反応による脂質過酸化は生体膜や酵素の変性に結びつくため重要な障害反応と考えられるためである。ラット肝臓の脂質過酸化反応生成物の指標であるチオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の濃度変化をみると、30°Cでは変化がなかった生成も、35°Cの暑熱負荷では急激に増加した。ラットとモルモットを比較すると、モルモットは30°Cにおいても若干の増加が認められ、35°Cでは顕著な増加が認められた。モルモットは暑熱への耐性が弱く暑熱負荷の長期的な実験は困難であった。

肝臓細胞内小器官の脂質過酸化は若齢では影響を受けていなかったが、高齢・老齢ラットのミトコンドリア、ミクロゾームでは脂質過酸化が著しく誘導されていた。ラットでは肝臓の細胞質グルタチオンペルオキシダーゼは高体温症で強く誘導されたが、モルモットでは誘導がみられなかった。肝臓カタラーゼ活性は若齢のラットでは暑熱ストレスによる影響を受けていなかったが、高齢・老齢ラットは肝臓、腎臓のいずれの臓器においても減少していた。高齢・老齢ラットにおける肝細胞の小胞体は暑熱ストレスにより変形していたため、ミクロゾームの電子伝達系酵素のアミノピリン脱メチル化酵素やTMPDペルオキシダーゼ活性について検討した。その結果、加齢につれていずれの酵素も活性の低下がみられ、週齢の高いラットでは暑熱暴露によりさらに活性が低下した。

暑熱ストレスにより合成する蛋白質の立体構造形成が不安定化することを防ぐ分子シャペロンとしての機能を示す熱ショックタンパク誘導にはモルモットとラットで種差があり、モルモットでは核とミトコンドリアで90-kDaの熱ショックタンパクの誘導が認められ、ラットの単離細胞においては70-kDaの熱ショックタンパクの合成促進が観察された。両種において暑熱ストレスによる細

胞機能の変調に対して、分子シャペロン機能を示す防御系が活性化したと考えられる。

実験動物に暑熱ストレスを加え、臓器・組織を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察した結果、肝臓、腎臓、心臓、呼吸器系、内分泌系、免疫系などにおいて、暑熱ストレスにより組織的变化が認められた。特徴的な組織的变化は肝臓の静脈周辺細胞の空胞変性、脂質過酸化物に起因するとみられる脂肪顆粒の貯留、鬱血などであった。さらに動物の加齢により暑熱ストレスの影響が増強し、適応性が低下していると考えられる老齢期ラットでは顕著に暑熱ストレスの影響があらわれた。35°Cの暑熱環境下では、暴露期間が長くなるほど病理組織学的な諸変化が増強していた。臓器・組織における最も顕著な変化は静脈系の拡張であった。心筋の空胞変性ととも、肝臓、腎臓、心臓、肺および骨髄などに鬱血の傾向が認められた。

この研究により、暑熱ストレスが組織学的変化を伴う生体組織の障害を引き起こすことが判明した。暑熱ストレスの増大は生体諸機能の低下している高齢者や高齢の動物に対し深刻な影響を及ぼすと予想される。

## 謝 辞

本論文の執筆にあたり、御指導を賜りました国立環境研究所主任研究員 山元昭二博士に心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Mitsuru Ando, Kazuko Katagiri, Syoji Yamamoto, Shinji Asanuma, Makoto Usuda, Ichisuke Kawahara, Kunimitsu Wakamatsu (1994) Effect of hyperthermia on glutathione peroxidase and lipid peroxidative damage in liver. *Journal of Thermal Biology*, 19, 177-185.
- 2) Mitsuru Ando, Kazuko Katagiri, Syoji Yamamoto, Kunimitsu Wakamatsu, Ichisuke Kawahara, Shinji Asanuma, Makoto Usuda, Kiichiro Sasaki (1997) Age-related effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal mono-oxygenase in rat liver. *Environmental Health Perspectives*, 105, 726-733.
- 3) Mitsuru Ando, Natsuko Kobayashi, Ichisuke Kawahara, Shinji Asanuma, C. K. Liang (1998) Impacts of heat stress on hyper-thermic disorders and heat stroke. *Global Environmental Research*, 2, 111-120
- 4) 安藤 満、山元昭二、浅沼信治(2003) 温暖化による熱ストレスと熱中症. *地球環境* 8, 211-219
- 5) 安藤 満、山元昭二、浅沼信治 (2004) 地球温暖化と熱中症 *日本生気象学会誌* 41, 45-49
- 6) Shinji Asanuma, Chaoke Liang, Mitsuru Ando (2007) Impact Assessment of Heat Stress on Population Health in Japan and China. *Global Environmental Research*, 11, 39-44