

ニッポンハム食の未来財団 平成 28 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	アナフィラキシー低血圧時における交感神経制御機構の解明
フリガナ	タニダ マモル
代表者名	谷田 守
所属機関（機関名） （役職名）	金沢医科大学 医学部 生理学Ⅱ講座 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	<p>発表論文</p> <p>1, <b>Tanida M</b>, et al., Anaphylactic hypotension causes renal and adrenal sympathoexcitation and c-fos inductions in the hypothalamus and medulla oblongata (revise 中)</p> <p>学会発表</p> <p>1, <b>Tanida M</b>, Zhang T, Shibamoto T, Renal sympathetic response to hemorrhagic shock in anesthetized mice. 国際ショック学会（東京, 2016 年 10 月）</p> <p>2, <b>Tanida M</b>, Shibamoto T, Biphasic response of renal sympathetic nerve to hemorrhagic shock in anesthetized mice. アメリカショック学会（Florida, フォトローダーデール, 2017 年 6 月；演題登録及び演題受理済み）</p>

### 研究結果要約

食物や食品添加物によるアナフィラキシーや食物アレルギーにおいては、抗原暴露から 30 分程度でアナフィラキシーが惹起され、低血圧や呼吸困難など重篤な状態へ発症することが多い為、迅速に対応できる治療法の開発が急務である。

本研究では、アナフィラキシー低血圧時に変化する交感神経調節メカニズムを解析するためにラットとマウスを用いた電気生理学的解析を行った。麻酔下ラットでは交感神経腎臓枝、副腎枝、脾臓枝、腰椎枝が促進したが、肝臓枝及び褐色脂肪枝は変化がなかった。麻酔下マウスでは、交感神経腎臓枝がアナフィラキシー初期に減少してその後増大する二相性の反応を示した。また、ラットではなく、マウスでアナフィラキシー低血圧に起こる腎臓交感神経活動増大作用が圧受容器切除で消失した。従って、ラットとマウスではアナフィラキシー低血圧時に起こる交感神経活動の反応と調節経路に相違が観察された。さらに遺伝子組換えマウスを用いた検討を行った結果、感覚刺激に関与する TRP チャンネルではなく、肥満細胞での脱顆粒がアナフィラキシー低血圧による交感神経制御に

関与することが示唆された。

## 研究目的

食物や食品添加物によるアナフィラキシーや食物アレルギーにおいては、抗原暴露から 30 分程度でアナフィラキシーが惹起され、重篤な状態へ発症することが多い為、迅速に対応できる治療法の開発が急務である 1)。

交感神経を含む自律神経系は循環、代謝、体温等のホメオスタシス維持と防衛反応に関与する神経系で、我々は、ラットにアナフィラキシーを惹起すると、腎臓と腰椎を支配する交感神経系が興奮することを報告している 2),3)。従って、アナフィラキシー低血圧を回復させる為には、交感神経系を活性化させ、末梢の血管収縮と心拍数増大に伴う循環血液量増大を促し、血圧を回復させることが有効である。

交感神経系の調節機構として、脳・延髄の神経核（弧束核・延髄腹外側部）を經由する圧受容器反射が存在し、アナフィラキシー低血圧が惹起された際に、肥満細胞由来のサイトカインが圧受容器・感覚神経を刺激する可能性が考えられる。又、イオンチャネル型受容体である **transient receptor potential protein (TRPV)** 受容体が感覚神経で同定されており、TRPV を介する交感神経系調節経路がアナフィラキシー低血圧の回復過程で重要な役割を持つ可能性も考えられる。しかしながら、アナフィラキシー低血圧に伴う交感神経制御機構に圧受容器反射経路や感覚神経での分子伝達経路が関与するか否かについてはよくわかっていない。そこで本研究では、アナフィラキシー低血圧における交感神経系制御機構を明確にして、食物によるアナフィラキシー低血圧の予防・治療法の開発に応用することを目的とした。

## 研究計画及び研究手法

アナフィラキシー低血圧における交感神経系の調節機構における中枢・末梢制御機構を明確にする。具体的には以下の 1 – 3 までの 3 点について生理学的及び神経解剖学的に検討して、アナフィラキシー低血圧特異的な自律神経反応か否かについて出血性低血圧に関する実験も行った。

### 1、アナフィラキシー低血圧時の交感神経活動の臓器特異性

これまで研究代表者が確立した電気生理学手法で麻酔下ラットとマウスの自律神経応答を解析する 2),3),4)。アナフィラキシーは、卵白アルブミン感作のラットやマウスで惹起させる。麻酔下における自律神経活動は、血圧調節に関与する腎臓交感神経、脂肪分解に関与する白色脂肪交感神経と血糖調節に関与する肝臓交感神経と副腎交感神経、免疫機能に関与する脾臓交感神経、熱産生に関与する褐色脂肪交感神経について、遠心性活動を直接計測する。抗原の静脈内投与後の自律神経応答

を 60 分間観察する。

## **2、アナフィラキシー低血圧時の交感神経調節機構における圧受容器の役割**

外科的に圧受容器を切除した頸動脈洞神経切除マウス及びラットを作成し、アナフィラキシー時の血圧及び交感神経系の変化をコントロールマウス及びラットと比較する。また圧受容器反射に関するラット延髄の神経核の活動を c-fos 染色による免疫組織化学法を用いて解析した。

## **3、アナフィラキシー低血圧時の交感神経調節機構における肥満細胞と感覚神経分子経路の役割**

アナフィラキシー時の循環及び自律神経応答における肥満細胞の役割を明確にするために、肥満細胞欠損ラット(Ws/Ws ラット)と肥満細胞欠損マウス(W/W<sup>v</sup> マウス)でアナフィラキシーを惹起させ、循環及び交感神経応答をコントロール動物と比較する。また、感覚神経 TRPV 受容体の役割を明確にするために、TRPV 阻害剤である capsaizepine の投与効果を検討するとともに、TRPV1 欠損マウス及び TRPV4 欠損マウスでアナフィラキシーを惹起させ、循環及び交感神経応答をコントロール動物と比較する。

## **4、出血性低血圧時における交感神経調節機構との比較 (計画から外れて実施)**

出血性低血圧時では、交感神経系の防御機構がはたらき、動物実験において、ラット腎臓交感神経活動が増大した後に減少することが分かっている<sup>5)</sup>。本研究では、アナフィラキシー低血圧時における交感神経活動反応の特異性を検討すると共に、マウスを用いて出血性低血圧時における交感神経制御機構を解析した。

具体的には、麻酔下でマウス腎臓交感神経活動を計測して出血性低血圧を惹起させた(平均血圧を約 50mmHg ; 10 分間維持)。また圧受容器反射や迷走神経求心路の役割を検討する為に頸動脈洞神経切除マウス及び迷走神経切除マウスを作製した。さらに TRPV 受容体の役割を検討する為に TRPV1 アンタゴニストである capsaizepine の静脈投与や TRPV1 欠損マウス及び TRPV4 欠損マウスでの解析を行った。

## **結果と考察**

### **【結果】**

#### **1、アナフィラキシー低血圧時の交感神経活動の臓器特異性**

麻酔下において、卵白アルブミンで感作したラットに抗原を投与してアナフィラキシー低血圧を惹起すると、腎臓、白色脂肪、副腎及び脾臓交感神経活動が増大した。一方で、肝臓及び褐色脂肪を支配する交感神経活動はアナフィラキシー低血圧時でも変化しなかった。さらに、マウスにおい

てアナフィラキシー低血圧を惹起すると、抗原投与直後から投与後 1 分まで血圧上昇とともに腎臓交感神経活動の抑制反応が観察され、その後、4 分より血圧は低下した。また腎臓交感神経活動は 15 分に投与前置に復した後、進行性に増大するという二相性の反応を示した。また心拍数は抗原投与直後から増大した。

## 2、アナフィラキシー低血圧時の交感神経調節機構における圧受容器の役割

麻酔下ラットにおいては、アナフィラキシー低血圧による腎臓及び副腎交感神経活動増大反応は頸動脈洞神経切除ラットにおいても観察された。一方、麻酔下マウスでは、アナフィラキシー低血圧後の腎臓交感神経活動及び心拍数増大反応が頸動脈洞神経切除により消失した。一方、アナフィラキシーによる腎臓交感神経活動反応は迷走神経切除では残存していた。ラットにおける延髄の神経核（弧束核、吻側腹外側野）での c-fos 陽性細胞数はコントロールラットに比べてアナフィラキシーショックラットで増大した。

## 3、アナフィラキシー低血圧時の交感神経調節機構における肥満細胞と感覚神経分子経路の役割

アナフィラキシー低血圧による二相性の腎臓交感神経活動反応及び心拍数反応は機械受容器である TRPV1 チャンネルの阻害剤 (capsazepine) を静脈内に前投与しても残存していた。さらに、TRPV1 欠損マウス及び TRPV4 欠損マウスでアナフィラキシーを惹起しても、同様に腎臓交感神経活動反応及び心拍数反応は残存していた。一方、血圧の変化にはすべての群で有意な差異は認められなかった。

肥満細胞の役割を検討する為に、Ws/Ws ラット及び W/W<sup>v</sup> マウスを用いた。麻酔下 Ws/Ws ラットでアナフィラキシーを惹起させると、血圧低下が減弱したが、腎臓交感神経反応は残存していた。一方、麻酔下 W/W<sup>v</sup> マウスでアナフィラキシーを惹起させると、血圧上昇後の低下反応が減弱し、アナフィラキシー初期におこる血圧上昇時の腎臓交感神経抑制反応が消失した。またアナフィラキシー後の頻脈反応も消失した。

## 4、出血性低血圧時における交感神経調節機構との比較

出血性低血圧を引き起こすと、出血直後に腎臓交感神経活動は増大し、その後、有意に低下する二相性の反応を示した。また心拍数も有意に低下した。この腎臓交感神経活動及び心拍数抑制反応は迷走神経切除や capsazepine 静脈内前投与によって消失した。さらに、TRPV1 欠損マウスにおいても、出血性低血圧後に起こる腎臓交感神経活動及び心拍数抑制作用が消失した。さらに出血直後の腎臓交感神経活動増大作用は迷走神経切除と動脈圧受容器切除によって消失した。

## 【考察】

ラットとマウスにおけるアナフィラキシー低血圧時の交感神経活動を検討した結果、動物種差が検出された。ラットでは、増大反応のみであったが、マウスでは二相性の反応が見られた。さらに、ラットでの交感神経反応は、臓器特異性が検出された。内臓を支配する交感神経は主に血管運動を支配すると共に、肝臓では糖代謝、褐色脂肪では熱産生に関与している。これらの機能については、低血圧時に交感神経活動が変化しない可能性が示唆された。これらの実験は全て麻酔下での検討であったため、麻酔による影響が考えられる。今後は覚醒下での検討を行う必要がある。

動物種差がみられたことから、交感神経調節機構についても相違が検出された。ラットでは圧受容器反射が関与しなかったが、マウスでは関与した。しかしながら、マウス腎臓交感神経や心拍数反応には、迷走神経求心路や機械受容器である TRPV1 チャンネルは関与しなかった。このことから、ラット及びマウスのアナフィラキシー低血圧時の交感神経制御機構は異なり、マウスでは特に圧受容器反射を介していることが示唆された。しかしながら、それらの血圧への影響は少ないものと考えられる。

また、アナフィラキシー低血圧時における交感神経調節での肥満細胞の役割についてもラットとマウスで異なる結果をえた。ラットの腎臓交感神経反応には肥満細胞が関与しなかったが、マウスの腎臓交感神経及び心拍数反応に肥満細胞が関与することがわかった。マウスアナフィラキシーでの詳細なメカニズムについて検討できなかったが、肥満細胞での脱顆粒後に血中に放出されるサイトカイン（ヒスタミン、プロスタグランジン、インターロイキン）が交感神経調節に関与している可能性も考えられる。このことを示唆するように我々の先行研究でヒスタミンを脳室内に投与すると腎臓交感神経活動が増大することを確認している<sup>6)</sup>。

マウス出血性低血圧における腎臓交感神経活動反応について検討した結果、出血直後の腎臓交感神経活動増大作用は動脈圧受容器反射を介している一方で、出血ショック時の腎臓交感神経活動抑制反応は求心性迷走神経系の TRPV1 チャンネルを介していることが示唆された。今後は中枢神経系の脳内機構をアナフィラキシー低血圧と比較する必要がある。

## 今後の研究活動について

- 1, 覚醒下での交感神経活動計測を確立して、麻酔下での反応と比較する。
- 2, マウスアナフィラキシー低血圧時における交感神経制御機構を明確にする為に、内臓を支配する自律神経求心路の役割について検討する。消化器、肝臓、脾臓などの求心路の神経活動を計測して、変化が起こるか検討する。
- 3, マウスアナフィラキシー低血圧時における交感神経制御機構を明確にする為に、肥満細胞からのサイトカインの役割を明確にする。

4, アナフィラキシー低血圧時の脳内制御機構について、視床下部及び延髄の神経核の役割を明確にする。

#### 【今後の活動】

自律神経調節機構の解析を専門としているため、脳内の交感神経調節機構について検討を進める予定である。また、生理学以外の分野を専門とする研究者と交流をはかりつつ、分子生物学的方法や神経解剖学的方法を導入して研究を進める予定である。

#### 参考文献

- 1) Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Bock SA, et al., Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2005 115:584-91.
- 2) Sun L, Tanida M, Wang M, Kuda Y, Kurata Y, Shibamoto T. Effects of anesthetics on the renal sympathetic response to anaphylactic hypotension in rats. *PLoS One*. 2014 Nov 25;9(11):e113945.
- 3) Song J, Tanida M, Shibamoto T, Zhang T, Wang M, Kuda Y, Kurata Y. The Role of Lumbar Sympathetic Nerves in Regulation of Blood Flow to Skeletal Muscle during Anaphylactic Hypotension in Anesthetized Rats. *PLoS One*. 2016 Mar 21;11(3):e0150882.
- 4) Tanida M, Yamamoto N, Morgan DA, Kurata Y, Shibamoto T, Rahmouni K. Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *J Neurosci*. 2015 Jan 14;35(2):474-84.
- 5) Victor RG, Thorén P, Morgan DA, Mark AL. Differential control of adrenal and renal sympathetic nerve activity during hemorrhagic hypotension in rats. *Circ Res*. 1989 Apr;64(4):686-94. *Circ Res*. 64:686-94. 1989
- 6) Tanida M, Kaneko H, Shen J, Nagai K. Involvement of the histaminergic system in renal sympathetic and cardiovascular responses to leptin and ghrelin. *Neurosci Lett*. 2007 Feb 8;413(1):88-92.

以上