

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25460325  
研究課題名(和文) アナパイレキシア(能動的な低体温)の神経機構

研究課題名(英文) Neural mechanisms of anapyrexia

## 研究代表者

大坂 寿雅 (OSAKA, Toshimasa)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 基礎栄養研究部・研究員

研究者番号：30152101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウレタン・クロラロース麻酔の非動化人工呼吸器下のラットにおいて延髄の傍錐体路領域にGABAを微量注入すると熱放散の指標である尾部皮膚温度が上昇し、深部体温の代表である結腸温度が低下した。GABA受容体拮抗薬であるピククリンはこの部位に両側性に投与しておく、それ自体では熱放散系への影響はなかったが、ブドウ糖利用阻害薬の全身性投与、低酸素刺激、視床下部の外側視索前野にグルタミン酸を注入して誘起される熱放散の増加と深部体温の低下反応が阻止された。したがって、この部位におけるGABAによる皮膚交感神経プレモーターニューロンの抑制が上記の各状況時の低体温反応において重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Unilateral microinjection of GABA into the rostral parapyramidal region (PPy) of the medulla oblongata elicited a prompt increase in tail skin temperature (Ts) and decreases in the body core temperature, and oxygen consumption rate in urethane-chloralose-anesthetized, neuromuscularly blocked, artificially ventilated rats. Next, when the GABA receptor blocker bicuculline methiodide (BMI) was microinjected bilaterally into the PPy, no direct effect on Ts was seen. However, pretreatment of the PPy with BMI, but not vehicle saline, greatly attenuated the hypothermic responses evoked by hypoxic (10%O<sub>2</sub>-90%N<sub>2</sub>, 5 min) ventilation, by bilateral microinjections of glutamate into the lateral preoptic area, or by systemic administration of 2-deoxy-d-glucose, an inhibitor of glucose utilization. The results suggest that hypothermia induced by above mentioned situations was mediated, at least in part, by the activation of GABA receptors in the PPy.

研究分野：生理学

キーワード：体温調節 延髄傍錐体路領域 GABA 皮膚交感神経系プレモーターニューロン

### 1. 研究開始当初の背景

アナパイレキシア (anapyrexia) とは熱放散促進と熱産生抑制とにより能動的に体温が低いレベルに調節される生理反応であり、能動的体温上昇である発熱とは正反対の現象である。低酸素環境はアナパイレキシアをおこす典型的な刺激であることが知られ、低酸素環境下では低体温になることが生存に有利であることが多くの動物種で認められている。その理由は、体温が低下するとヘモグロビンの酸素親和性が高まるので肺でより多くの酸素と結合して運搬できることと、その一方で、組織での酸素要求量が低下するからである。そこで、低酸素環境下では能動的に体温低下がおきるように動物は適応進化してきた。自律性調節機能が不十分な新生児動物などでは求冷行動によって体温低下がおきることも報告されている。

アナパイレキシアは主に脳によって調節されており、様々な神経伝達物質の関与が報告されている。最近、私はウレタン・クロラロース麻酔下で筋弛緩剤により非動化したラットにおいて人工呼吸器の給気を通常大気から一時的に 10%酸素 90%窒素の混合ガスにすることにより熱放散促進と熱産生抑制をともなった低体温反応が再現性良く誘起されることを見いだした。これは、麻酔下動物で低酸素刺激によって熱放散促進がおきることを示した初めての報告である。

この反応は頸動脈小体の化学受容器からの求心性神経を介しており、視床下部正中視索前核での 1 アドレナリン受容体の活性化と一酸化窒素放出が重要である。さらに、この部位から外側視索前野へのグルタミン酸作動性投射が熱放散促進を引き起こすことも明らかにしている。しかしながら、上記の研究を含めてアナパイレキシアの神経機構についての報告は散見されるものの、その全体像は明らかではない。

また、酸素不足は生体が低エネルギー状態

になることを意味するが、燃焼素である糖や脂質の不足も生体が低エネルギー状態になることから、これらの状況でもアナパイレキシアがおきる。しかしながら、燃焼素不足によるアナパイレキシアの機構と低酸素によるアナパイレキシアとの機構の異同は明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究では体温調節中枢である視床下部視索前野および体温調節の上行および下行神経回路において低酸素刺激および糖や脂肪酸をエネルギーとして利用されることを阻害した時のアナパイレキシアをおこす脳および自律神経機構を解明し、これらの異同を明らかにすることを目的とした。特に、延髄の傍錐体路領域に存在する皮膚交感神経系プレモーターニューロンへの GABA の関与を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

Wistar 系雄ラットを 2-3%イソフルレン麻酔下に大腿静脈にカニューレを挿入し、ウレタン 550 mg/kg クロラロース 55mg/kg の静脈麻酔に切り替えた。気管カニューレ挿入後に脳定位固定装置に取り付け、人工呼吸器に接続し、筋弛緩薬である d-ツボクラリン 0.5 mg を静脈内投与して非動化した。麻酔レベルと非動化の維持のために、最初の麻酔から約 90 分後からウレタン 80-100 mg/kg/hr クロラロース 8-10mg/kg/hr d-ツボクラリン 0.5-0.6mg/kg/hr を静脈内に持続注入した。

熱産生の指標である酸素消費率(または二酸化炭素産生率)、深部体温の指標として結腸温度、皮膚温度の代表として尾皮膚温を経時的に測定した。また、四肢より心電図を導出し心拍数を測定し、麻酔深度の指標ならびに交感神経系の活動指標の一つとした。保温ヒーターに一定の大きさの電流を流すことにより結腸温度をおおよそ 37 度に保った。

低酸素刺激として 10%酸素 90%窒素の混合

ガスを人工呼吸器の給気に5分間接続した後、正常大気に給気を戻した。脳内への薬物投与には先端径が30  $\mu\text{m}$  程度の三連ガラスピペットを用いて圧吐出法により10-100 nlの微量注入を行った。薬物は300 mM GABA, 100 または200  $\mu\text{M}$  bicuculline methiodide, 50 mM グルタミン酸ナトリウムおよび生理食塩水を用いた。実験終了時には薬物注入部位に色素である2%アルシアン青溶液を注入し、頸動脈から10%ホルマリンを灌流して脳を固定し、脳の凍結切片を作製することにより薬物注入部位を組織学的に検証した。

ブドウ糖利用阻害薬として2-デオキシ-D-ブドウ糖(2DG)を250 mg/mlの濃度で1 ml/kgの用量で90秒かけて静脈内投与した。対照としては同量の生理食塩水を投与した。一匹のラットに90-120分間隔で3-4回繰り返し投与した。2DGに対する反応への前脳の関与を明らかにするためには除脳を行った。外耳道中心より4 mm 吻側の頭蓋骨をドリルで削り、マイクロマニピュレータに取り付けたナイフを脳内に垂直に下ろして切断した。切断の位置と確実さは実験終了時に脳を取り出し、脳腹側面の傷跡を視認した。2DGに対する反応への延髄の傍錐体路領域のGABA受容機構の関与を明らかにするためのbicuculline注入実験は低酸素刺激実験と同一の方法を用いた。

脂肪酸利用阻害薬として2-メルカプトアセテート(MA)を濃度1.2 Mの水溶液を用量1 ml/kgで約90秒かけて静脈内投与した。反応への腹部迷走神経の関与を明らかにするためにラットを脳定位固定装置に取り付ける前に腹部を正中切開し、胃と肝臓を動物の右脇腹に動かして、食道上にある左右の腹部迷走神経を実体顕微鏡下に視認して両側とも切断した。その後、内臓は元の位置に戻し、筋層と皮膚は縫合した。無髄感覚神経線維の関与を明らかにするためにカプサイシン脱感作を行った場合には3%イソフルレン麻酔

下にカプサイシンを15, 30, 60 mg/kgと量を増やしながらか3日連続で皮下投与した。MAの効果は4-7日後に調べた。前脳の関与を明らかにするための除脳実験は2DG実験の時と同様に行った後に、前脳部分は吸引除去した。

#### 4. 研究成果

吻側延髄の傍錐体路領域でのGABAが低酸素や糖代謝抑制時の低体温反応を媒介している可能性を示唆する以下の成果を得た。

吻側延髄の傍錐体路領域にGABAを微量注入すると熱放散の指標である尾部皮膚温度が上昇し、酸素消費量および心拍数は減少し、結腸温度は低下した。効果が最も大きかったのは正中の淡蒼縫線核領域だったが、左右1.5 mm幅で錐体路背側領域に広く有効部位があった。この結果はこれらの部位に常時皮膚血管収縮を促している皮膚交感神経プレモーター細胞が存在するという既報の知見と一致する。なお、これらの部位に同量の生理食塩水を注入しても反応はなかった。

次にGABA受容体拮抗薬であるbicucullineをこのGABAに反応して低体温を誘起する部位に注入する実験を行った。淡蒼縫線核領域にbicucullineを注入したところ、予想外にも、皮膚温度上昇と低体温反応が熱産生反応および頻脈反応と共におきた。熱産生反応はこの部位にある褐色脂肪組織を支配している交感神経プレモーター細胞を興奮させた結果と考えられる。GABAとその拮抗薬の投与で共に皮膚温度上昇がおきたことは、この部位でGABAが常時皮膚血管収縮に働いている系とGABAにより皮膚血管拡張に働いている系の両方が存在することが示唆された。

一方、傍錐体路領域にbicucullineを注入したところ皮膚温度上昇や低体温反応は起こらず、小さな熱産生反応が記録された。この結果から、この部位の皮膚交感神経プレモーター細胞には常時GABAは放出されていないことが示唆された。しかし、この部位にあらかじめ両側性にbicucullineを注入して

おくと、それ自体では熱放散系への影響はなかったが、低酸素刺激によって誘起される熱放散の増加と深部体温の低下反応が阻止された。同じ部位に同量の生理食塩水を前投与しても低酸素に対する反応には影響しなかった。これらの結果から低酸素刺激は傍錐体路領域の皮膚交感神経プレモーター細胞を GABA により抑制することによって低体温を誘起すると考えられた。

低酸素による低体温反応は視床下部の外側視索前野のグルタミン酸を介して、下行路が延髄の皮膚血管プレモーター細胞に達していると推定されている。そこで、上記の推定が正しければ外側視索前野にグルタミン酸注入して誘起される熱放散の増加と深部体温の低下反応も傍錐体路領域に bicuculline 前投与によって阻止されることが予想された。実験によるとこの予想と一致する結果が得られた。したがって、低酸素刺激時の皮膚血管拡張による低体温反応誘起に、視床下部の外側視索前野のグルタミン酸感受性部位から延髄の傍錐体路領域の皮膚交感神経プレモーター領域への GABA 作動性投射（単シナプス性か多シナプス性かは不明であるが）が重要であることが明らかとなった。

2DG を静脈内投与すると皮膚温度上昇と深部体温低下がおきた。なお、この時にガス交換率も低下したことからエネルギー代謝において糖利用が抑制されたことが確認された。除脳によってこの反応は影響を受けなかったことから前脳は関与せず下位脳幹で反応は統合されていると考えられた。2DG に対する反応も傍錐体路領域に bicuculline 前投与によって阻止されたので低酸素に対する反応と同様に皮膚交感神経プレモーター細胞の GABA 抑制が反応を媒介していることが明らかになった。

MA を静脈内投与すると皮膚温度上昇と深部体温低下がおきた。なお、この時にガス交

換率は上昇したことからエネルギー代謝において脂質利用が抑制されたことが確認された。ラットを一晩絶食させると MA による熱放散の促進反応は、絶食しない場合に比べて、有意に低下した。空腹時には熱放散を抑制する機構が働いていることが示唆された。迷走神経を横隔膜下で切断しておいたラットでは MA による低体温反応はおきなかった。無髄の一次感覚神経の機能障害を起こすカプサイシン脱感作処置をしたラットでも MA による低体温反応はおきなかった。中脳より吻側部を吸引除去したラットでも MA による低体温反応はおきなかった。MA による低体温反応は迷走神経求心性繊維を介していること、前脳の関与が必要であることが明らかになった。

#### 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 3 件)

Osaka T. Hypothermia induced by inhibition of fatty acid metabolism in anesthetized rats: contributions of the forebrain and vagal afferents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2017 29:1-9. 査読有 doi: 10.1139/cjpp-2016-0195.

Osaka T. 2-Deoxy-D-glucose-induced hypothermia in anesthetized rats: Lack of forebrain contribution and critical involvement of the rostral raphe/parapyramidal regions of the medulla oblongata. *Brain Research Bulletin*, 116:73-80, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.06.008.

Osaka T. Hypoxia-induced hypothermia mediated by GABA in the rostral parapyramidal area of the medulla oblongata. *Neuroscience*, 267: 46-56, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.035.

[学会発表](計 4 件)

大坂寿雅 2 デオキシブドウ糖による低体温誘起の脳機構 第 42 回自律神経生理研究会, 2014.12.6, 日本光電工業株式会社 本社 (東京都・新宿区)

Osaka T. "Neural mechanisms of hypoxia-induced hypothermia" in the

symposium on "Preoptic circuits in thermoregulatory control" 5th International Symposium on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation: 2014.9.8: Skukuza, (South Africa).

Osaka T Hypoxia-induced hypothermia mediated by the GABAergic transmission in the rostral ventromedial medulla in anesthetized rats. The 91st annual meeting of the Japan Physiological Society, 2014.3.18, Kagoshima, (Japan).

大坂寿雅 低酸素刺激によって誘起される低体温反応の脳機構 第9回環境生理学プレコンgres, 2014.3.15, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大坂 寿雅 (OSAKA, Toshimasa)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所・基礎栄養研究部・研究員

研究者番号：30152101