

学位論文要旨

氏名 小川 顕史



論文題目

「内因性副交感神経刺激性/動脈硬化促進性ペプチド、サリューシン β のヒト血漿中における生理的変動」

指導教授承認印

七里真義



「内因性の副交感神経調節および動脈硬化促進ペプチド、サリューシン β のヒト血漿中における生理的変動」

氏名 小川 顕史

(以下要旨本文)

【はじめに】

近年、生活習慣病の悪化を惹起する原因として、自律神経系の乱調が一因であるとした議論が活発に行われている。その中でも、とりわけ糖尿病慢性合併症の一つである自律神経障害は、起立性低血圧や不整脈、排尿障害など糖尿病患者の生活の質に大きく関わっている。しかしながら糖尿病性自律神経障害における簡便なスクリーニング検査は皆無であり、これは低侵襲かつ短時間に施行可能な検査法が存在しないことが一因と考えられる。筆者はこの条件を満たす物質としてサリューシン β に着目した。

サリューシン β は、*in silico*構造解析法によって始めて同定に成功した生理活性ペプチドであり、ユニークな血行動態制御作用を示す。ラットにサリューシン β を経静脈的に投与すると、急激な血圧低下と同時に心拍数も著明に低下させる。また、これらの作用は硫酸アトロピンの前投与によって抑制されることから、動物実験の段階でサリューシン β は副交感神経系の刺激を介して血行動態を制御するペプチドであるという可能性が示唆されていたが、ヒトにおける自律神経との関わりは未解明であった。しかし、最近になりサリューシン β を特異的に計測できる ELISA 法が確立され、ヒトにおける血中濃度の測定が可能になった。既知の自律神経測定法から得られた自律神経強度と、サリューシン β の血漿中濃度を併せて分析することで、サリューシン β と副交感神経活動度との間に生じる相互関係を解明できると考えられたため、本研究を立案した。

【試験参加者】

50 人の健常人 (年齢 24~54 歳、平均年齢 28 歳、男性 38 人) を対象とした。

【サリューシン β 測定】

採取された血液サンプルを酸性化したのちに遠心分離し、上清を固相抽出 C18 カートリッジに移した。溶出物に 70%アセトニトリル及び NP-40 を混和し、有機溶媒を蒸発させて得られた抽出物を対してサリューシン β の C 末端配列を認識するポリクローナルウサギ抗血清と、N 末端配列を認識するポリクローナルニワトリ抗血清を用いてサンドイッチ ELISA を行った。

【自律神経測定】

確立された自律神経機能測定法のひとつである、心拍変動測定法を用いた。心拍変動測定は携帯型心電計によって連続した R 波の間隔を分析する。R-R 間隔の変動を周波数に変換し、高周波成分 (0.15~0.4Hz, HF) と低周波成分 (0.04~0.15Hz, LF) を計算した。連続して隣接する RR 間隔の差の 2 乗の平均値の平方根 (RMSSD) は時間領域の測定法として使用し、HF 及 RMSSD を副交感神経強度の指標、LF/HF を交感神経強度の指標として使用した。

【試験手順】

50名の健常者に対して、① 睡眠、覚醒を含む夜間（6名）、② バルサルバ法前後（11名）、③ 排尿の前後（11名）、④ 自由行動下（22名）における血漿中サリューシン β をそれぞれ継続的に採取し、血中濃度を測定した。

① 夜間(睡眠、覚醒)におけるサリューシン β の変化

心電計を午後6時に装着して初回の採血を施行後、午後11時から翌朝6時までを睡眠時間に設定し、睡眠中を含む午後11時、翌午前3時、6時、7時、8時にそれぞれ血液を採取した。

② バルサルバ法におけるサリューシン β の変化

適切な副交感神経刺激の入力確認のため、パルスオキシメーターを装着して脈拍数を記録した。安静によってパルスオキシメーターの数値が安定したことを確認した後に血液を採取し、バルサルバ法を行うように指示した。バルサルバ法の5、10、20、30、40、50分後に血液を採取した。

③ 排尿行動におけるサリューシン β の変化

蓄尿から排尿に至る過程に、副交感神経刺激の入力が必要になる。午前9時に集合後、完全に排尿するように指示した。その後、飲水を促し午後12時に最初の血液採取を施行後に再び排尿させ、排尿後の15、30、60分に採血を行った。

④ 日常活動におけるサリューシン β の変化

心電計を22人の参加者に午前9時に装着し、飲食、排泄、活動、休息といった行動はすべて強制せずに参加者の一任とし、行動の記録を分単位で記載させた。午前10時に初回の採血を終えた後、約2時間毎に血液を採取した。午後6時に5回目の採血を完了した後、携帯型心電計を装着したまま帰宅させ、翌朝の午前9時に最後の血液を採取した。

【結果】

① 夜間(睡眠、覚醒)におけるサリューシン β の変化

血漿中サリューシン β 濃度は夜間帯に低値を示した後、起床後に上昇する日内変動を示した。同時に測定した副交感神経機能の指標であるHF、RMSSDとは逆位相の関係を呈した。

② バルサルバ法におけるサリューシン β の変化

試験参加者6人における脈拍数は、バルサルバ法の直後に有意に低下した。この結果からバルサルバ法は適切に施行されたと考え、併せて採取した血漿中サリューシン β 濃度を解析した。血漿中サリューシン β 濃度は前値 4.3 ± 0.2 nmol/lであったが、バルサルバ法直後より減少し始め、30分後に最小値 3.2 ± 0.4 nmol/lを記録した ($p < 0.05$)。

③ 排尿行為におけるサリューシン β の変化

血漿中サリューシン β は排尿前には 5.0 ± 0.2 nmol/lであったが、15分後に 4.1 ± 0.3 nmol/lまで低下し、($p < 0.05$)、その後上昇に転じることはなく60分後まで維持された。

④ 日常活動におけるサリューシン β の変化

22人の参加者から得られた合計132点の血漿中サリューシン β 濃度は、心拍数($r=0.12$, $P=0.1550$)やLF/HF ($r=0.11$, $P=0.20$)とは相関せず、HF ($r=-0.27$, $P=0.0018$) および RMSSD ($r=-0.19$, $P=0.0292$) とそれぞれ有意な負の相関を認めた。

【考察】

本研究は、新規生理活性物質サリューシン β がヒトにおける副交感神経のバイオマーカーになるかを検討したものである。

まず初めに、明らかな交感神経、副交感神経の切り替わりが観察できる睡眠、覚醒行動を伴った夜間のサリューシン β 濃度の推移を検討した。その結果、サリューシン β 濃度は睡眠中に低下し、覚醒のタイミングで上昇するという反応を示し、心拍変動測定から得られた副交感神経強度と逆位相の関係を認めた。これはサリューシン β が内因性の副交感神経刺激因子として両者の間に順の関係があるとする筆者の仮説とは真逆であったために、本検討の結果は自律神経のバランスとは異なる、例えば日内変動などの影響を強く受けてしまったためではないかと予測した。

次に、日内変動の影響を受けない、かつ短時間で施行可能な検討を二つ立案した。一つ目は意図的に強力な副交感神経刺激を得られるバルサルバ法を用いた検討、二つ目はバルサルバ法に比して効果は弱い、日常生活にありふれた副交感神経刺激行為である排尿行動を選択した。これらの二つの検討は明確に副交感神経刺激の入力があるという前提から携帯型心電計は装着せずに施行したが、サリューシン β は副交感神経刺激の直後から緩徐に低下し始めた。これらの結果からも副交感神経強度と血漿中サリューシン β 濃度の間には負の関係があるということが決定づけられ、さらに動物実験の如く急激かつ一過性の変化ではなく、ヒトの血漿中では緩徐に変動する物質である可能性も示唆された。

最後に、意図的な刺激を極力排除した日常生活下における血漿中サリューシン β 濃度も副交感神経指標の指標である HF、RMSSD と有意な負の相関を認め、脈拍や交感神経の指標である LF/HF とは相関を認めなかった。

本研究すべての結果から、血漿中サリューシン β 濃度は副交感神経強度と有意に逆相関することが明らかになったが、サリューシン β が副交感神経そのものを刺激するという仮説に準じた説明を行うためには、二つの矛盾の解消が必要になった。一つ目は、動物実験の結果とは逆に血漿中サリューシン β 濃度が上昇した際に副交感神経強度の指標が低下したことである。これは、内因性のサリューシン β が分泌されて副交感神経強度を至適領域まで上昇させた後、それ以上に上昇しない様に分泌を低下、または停止させて維持しようとする、すなわち negative feedback 調節の結果ではないかと推察した。二つ目の矛盾は、ラットにサリューシン β を静脈注射すると強力かつ極短時間に副交感神経刺激反応を呈した後に速やかに解除されるのに対して、本研究の結果では緩徐に反応し、収束にも時間がかかったことである。ヒトにおけるペプチドホルモンには結合体と遊離体がそれぞれその割合を変更させながら生理活性の調節を行っているものがある。サリューシン β がこのような特徴を有していたとするならば、動物に注射した遊離体は急激な生理活性を来した直後に血漿中のタンパクに結合して生理活性を失ったために一過性の反応に留まったのではないかと推察した。

最後に、本研究においてサリューシン β は内因性の副交感神経刺激因子として、血液検査によって得られる初めての自律神経バランスのバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。しかしながら、本研究におけるサリューシン β は恐らく生理活性を有しない結合体を含む「総サリューシン β 濃度」である可能性が高い。現在、negative feedback 仮説および遊離体、結合体仮説を証明するため、遊離体サリューシン β の測定系の開発に着手している。