

アナフィラキシー低血圧による交感神経促進機構の 全容解明と治療法への応用

金沢医科大学医学部生理学Ⅱ講座・准教授 谷田 守

■ 緒 言

アナフィラキシーは、免疫グロブリン E(IgE) に依存した過敏反応が多く、食物、薬品、麻酔薬等の物質に対して反応する。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⁾。特に卵アレルギーの原因分子である卵白アルブミンによるアナフィラキシーは低血圧や呼吸困難を起こし、我々の先行研究においても、卵白アルブミンで感作させたラットに抗原を投与すると、アナフィラキシー低血圧が惹起され、交感神経活動が増大される²⁾。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ことがわかっているが、その仕組みを制御する脳内機序については未だよくわかっていない。

自律神経系の調節機構として、①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ていること、②アナフィラキシーによって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こと、以上の 2 点に関する経路が考えられる。そこで本研究では、自律神経系制御機構の解明を基盤にして、卵白アルブミン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。

■ 方 法

(実験動物)

Wister 系雄ラット(280-320g、体重)又は ICR 系雄マウス(35-40g、体重)を用いて実験を行った。肥満細胞の役割の解析については、肥満細胞欠損雄ラットを用いて実験を行った。食餌及び飲水は自由摂取させて、卵白アルブミンの皮下投与で感作を行った^{2,3)}。感作後 2 週間に抗原(卵白アルブミン)を静脈内投与してアナフィラキシーを惹起させた。全ての実験は金沢医科大学動物実験委員会での承認を得て行った(実験承認番号; 2017-18)。

(電気生理学実験)

ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下で直腸温をモニターし、サーモスタット・コントローラにより直腸温が $36.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ になるように保った。右の大腿部を切開し、動脈圧測定用カニューレ又は薬物投与用カニューレを大腿動脈又は大腿静脈へそれぞれ挿入した。遠心性交感神経活動腎臓枝(RSNA)又は副腎枝(Adrenal SNA)の同定及び計測の為に後腹膜を切開した。また、遠心性交感神経活動肝臓枝(Liver SNA)、腰椎枝(Lumbar SNA)又は胃枝(Gastric-SNA)を測定するために、正中切開した。さらに遠心性交感神経活動褐色脂肪枝(BAT-SNA)を測定するために、肩甲骨間を切開した。それぞれの神経束を実体顕微鏡下で同定した。遠心性神経活動を計測する為に、神経の末梢側又は中枢側をそれぞれ外科的にカットして、剥離した神経をアルミ線双極電極にのせ、電気的絶縁のためシリコンジェルでコーティングした。

得られた電気信号は、アンプで増幅し、ウインドウ・ディスクリミネーターを通してパルスカウンターで時間当たりのパルス数を算出して、波形とともにコンピューターに記録した。また動脈圧の信号も記録して、心拍数算出を行う為に、これらの信号を Power-Lab(model 4sp, AD instruments)を用いて解析を行った。

(免疫組織化学染色実験)

Wister 系雄ラットでアナフィラキシーを惹起させた 60 分後に、心臓から生理食塩水と 4% パラホルムアルデヒド溶液による還流固定を行い、脳をサンプリングした。凍結切片を作製して、動脈圧受容器反射部位である弧束核(NTS)と延髄吻側腹外側野(RVLM)における c-fos 抗体による陽性細胞を染色してカウントした。また RVLM におけるカテコラミン神経細胞について、TH(tyrosine hydroxylase)抗体による陽性細胞を染色して、c-fos 陽性細胞との二重染色を行った。

(統計解析)

神経活動、血圧、組織データはすべて平均値 $\pm$ S.E.M で表記して、有意差は $P<0.05$ とした。解析ソフトはカレイダグラフ 4.0 を用いた。

■ 結 果

結果 1、アナフィラキシー時交感神経活動反応における動物種差と臓器特異性反応

ラットへの抗原静脈内投与によってアナフィラキシーを惹起させると、低血圧と RSNA の増大反応が観察された(図 1)。またマウスへの抗原静脈内投与によってアナフィラキシーが惹起されると、ラットの反応とは異なって、抗原投与直後に血圧が上昇して、RSNA が減少した。その後血圧と RSNA は回復しながら、アナフィラキシー後期に血圧低下と RSNA 増大反応が惹起され、血圧と RSNA の二相性反応が観察された(図 2)。

さらに、アナフィラキシーショック時の交感神経反応の臓器特異性を検討する為に、ラットでは、Adrenal SNA、Liver SNA、Gastric SNA、BAT-SNA に及ぼすアナフィラキシー効果を解析した。その結果、Adrenal SNA と Gastric SNA は増大反応が観察されたが、Liver SNA と BAT-SNA は変化しなかった(図 2)。一方、マウスでは RSNA の二相性反応とは異なり、Liver SNA、Lumbar SNA、BAT-SNA は、抗原投与後一過性に増大反応が観察された(図 2)。

結果 2、アナフィラキシーによる交感神経反応における動脈圧受容器反射の役割の解析

アナフィラキシー時の交感神経反応における動脈圧受容器の役割を検討するために、動脈圧受容器反射に関与する脳・延髄の神経核の活動がアナフィラキシー時に変化するか c-fos 陽性細胞を染色する免疫組織化学染色実験で解析した。その結果、ラットでのアナフィラキシー低血圧を惹起すると、延髄の NTS と RVLM における c-fos 陽性細胞数が増大した(図 3、4)。さらに、RVLM における c-fos 陽性細胞はカテコラミンニューロンとの共局在が観察された。一方で、動脈圧受容器を切除した SAD ラットを作製して、麻酔下アナフィラキシー低血圧時におこる交感神経活動反応が変化するか解析した結果、SAD ラットにおいても RSNA 増大反応が観察された(図 5)。

結果 3、アナフィラキシーによる交感神経反応における肥満細胞の役割の解析

肥満細胞の役割を解析するために、肥満細胞欠損ラットでアナフィラキシー時の交感神経活動が変化するか解析した。その結果、血圧低下の遅延が観察されたが、RSNA 反応はコントロールラットと同様に増大した(図 6)。

■ 考 察

本研究では、アナフィラキシー時の交感神経反応を制御する仕組みを明らかにする為に、①交感神経反応の動物種差と臓器特異性、②動脈圧受容器反射の関与、③肥満細胞の役割、以上の 3 点について解析を行った。その結果、(A)ラットとマウスの交感神経反応の相違、ラット及びマウスにおける交感神経反応の臓器特異性が存在すること、(B)麻酔下でのラット交感神経促進反応には、延髄の循環調節部位は反応するが、動脈圧受容器や肥満細胞は関与しないこと、以上のことが本研究により新たにわかった。

(A)交感神経反応の動物種差と臓器特異性

アナフィラキシー時の交感神経反応の動物種差については、先行研究から血圧反応がラットとマウスで相違しており、特にマウスでは心拍出量の増大と減少によって血圧が変化することが分かっている³⁾。従って、RSNA は循環血液量に影響を受けることから、マウスの RSNA 二相性反応は、循環血液量に依存している反応の可能性があり、今後更なる解析を行う必要性がある。

アナフィラキシー時の交感神経反応の臓器特異性については、ラットとマウスいずれにおいても観察された。ラットでは循環調節に関与する副腎枝と腎臓枝と胃動脈血管運動を調節する胃枝で促進反応が観察された⁴⁾。いずれの交感神経も動脈圧受容器反射が観察されることから(データ未発表)、循環調節時に反応する神経のみがアナフィラキシー時に反応することがわかった。一方、マウスでは、腰椎枝、褐色脂肪枝、肝臓枝、いずれもアナフィラキシー時には促進効果のみが観察された。従って、二相性反応を示す腎臓枝は、他の臓器とは異なり、血圧や循環血液量反応の影響を受ける可能性が高いが、さらなる解析が必要である。

(B)動脈圧受容器と肥満細胞の役割

麻酔下ラットを用いて、動脈圧受容器反射や肥満細胞の役割を解析した。動脈圧受容器を切除し

てもアナフィラキシーによる RSNA 増大反応は残存していたことから、動脈圧受容器反射は麻酔下ラットの交感神経促進反応には関与しない可能性が示唆された。しかしながら延髄に存在している部位で、心臓・血管運動に関与する交感神経プレモーターニューロンを含んでいる RVLM や NTS での c-fos 陽性細胞がアナフィラキシーによって増えることから、動脈圧受容器反射経路以外の経路(内臓迷走神経求心路、体液性ホルモン作用経路など)が延髄の RVLM や NTS に影響している可能性が考えられ、今後更なる解析が必要となる。

アナフィラキシー時の交感神経促進反応における肥満細胞の役割を解析した血管、肥満細胞欠損ラットにおいてもアナフィラキシー時に RSNA 促進反応が観察された。このことから、ラットでは肥満細胞の脱顆粒反応に伴って放出される化学物質が交感神経に影響していないことが示唆された。今後は、マウスでの解析や肥満細胞のみならず、好塩基球の役割についても解析を行う必要がある。

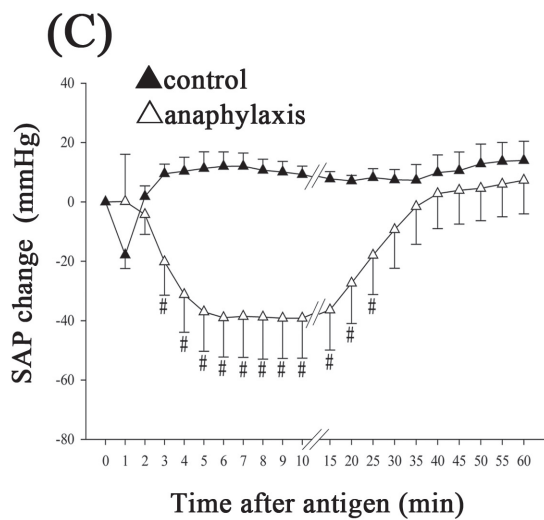
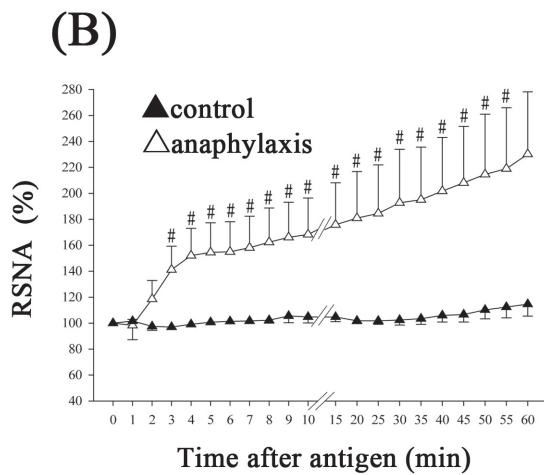
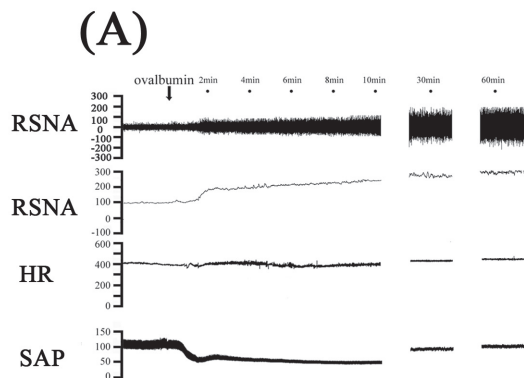
■ 要 約

本研究では、アナフィラキシー時の交感神経促進反応の作用機構を解析する目的で、動物種差と臓器特異性のみならず、動脈圧受容器と肥満細胞の機能に着目して実験を行った。その結果、①ラットとマウスの交感神経反応が相違すること、②ラットとマウスいずれにおいても交感神経反応の臓器特異性が存在すること、③麻酔下ラットの交感神経促進反応には、動脈圧受容器反射は関与しないが、延髄のプレモーターニューロンは活性化されること、④麻酔下ラットの交感神経促進反応には、肥満細胞は関与しないこと、以上について新たな知見を得た。今後は、詳細な脳内機序の解析や肥満細胞以外の細胞の役割などについて着目して更なる解析を行う予定である。

■ 文 献

- 1, Sampson HA1, 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, Song J, Tanida M, Shibamoto T, et al., 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. Soh
- 3, Wang M, Shibamoto T, Tanida M, et al., Mouse anaphylactic shock is caused by reduced cardiac output, but not by systemic vasodilatation or pulmonary vasoconstriction, via PAF and histamine.
Life Sci. 2014 Oct 29 ; 116 (2) : 98-105. shibamoto
- 4, Tanida M, Zhang T, Sun L, et al., Anaphylactic hypotension causes renal and adrenal sympathoexcitation and induces c-fos in the hypothalamus and medulla oblongata.
Exp Physiol. 2018 : 790-806.Tanida M

ラット



マウス

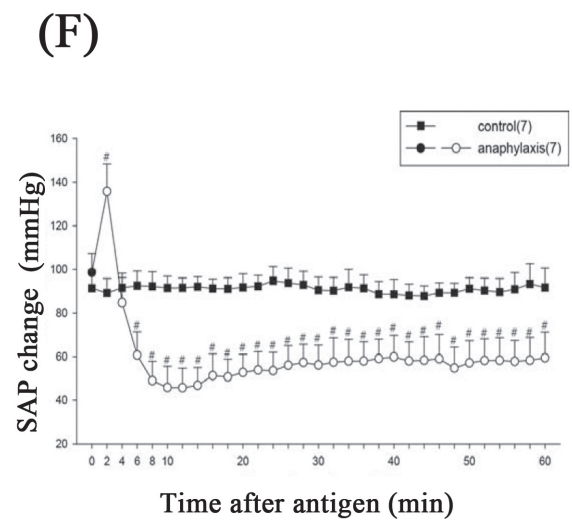
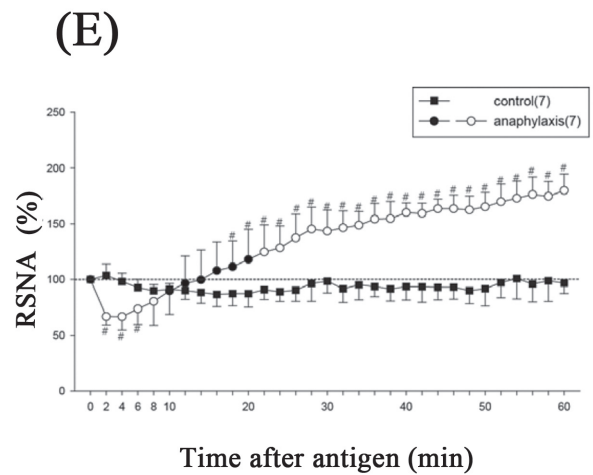
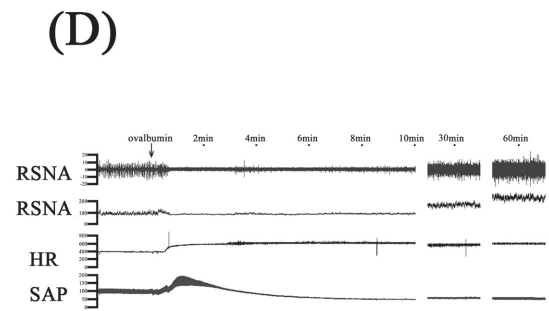
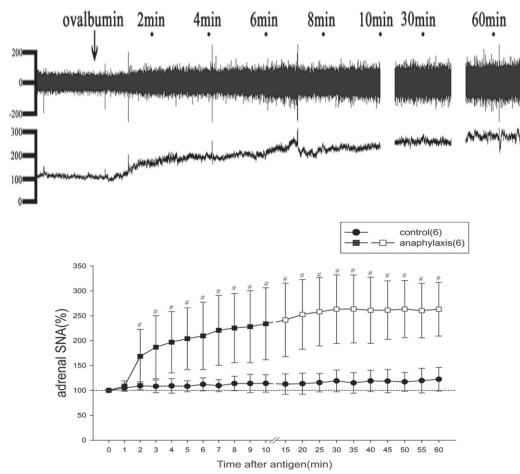


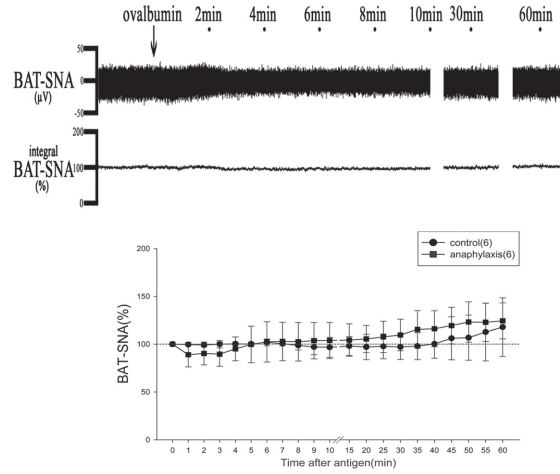
図1 アナフィラキシー時の交感神経腎臓枝及び血圧反応の動物種差
 ラットにおける RSNA(A, B) と血圧 (SAP, C) 反応と、マウスにおける RSNA(D, E) と血圧 (SAP, F) 反応。# ; v.s. control グループ, $P < 0.05$

ラット

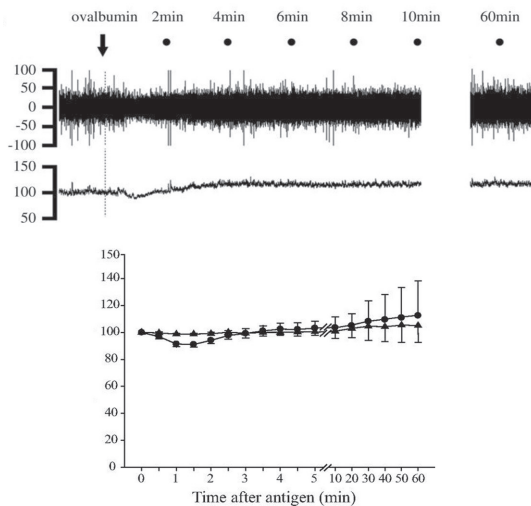
(A) Adrenal SNA



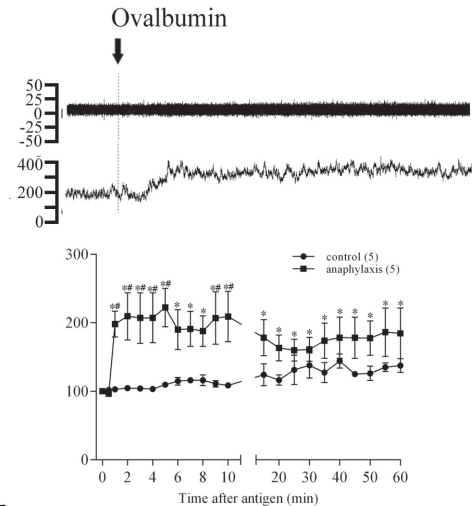
(C) BAT SNA



(B) Liver SNA

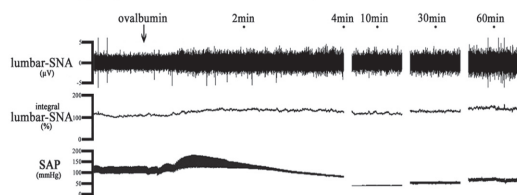


(D) Gastric SNA

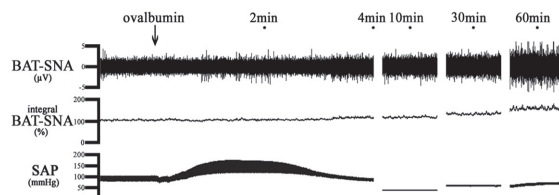


マウス

(E) Lumbar SNA



(G) BAT SNA



(F) Liver SNA

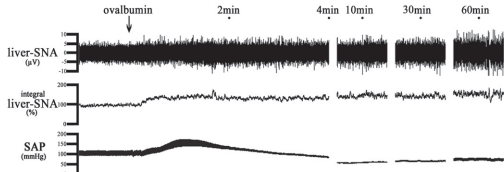


図2 アナフィラキシー時の交感神経反応における臓器特異性
ラットにおける adrenal SNA(A)、Liver SNA(B)、BAT-SNA(C)、Gastric SNA(D) 反応と、マウスにおける Lumbar SNA(E)、Liver SNA(F)、BAT-SNA(G)、反応。
; v.s. control グループ, $P < 0.05$

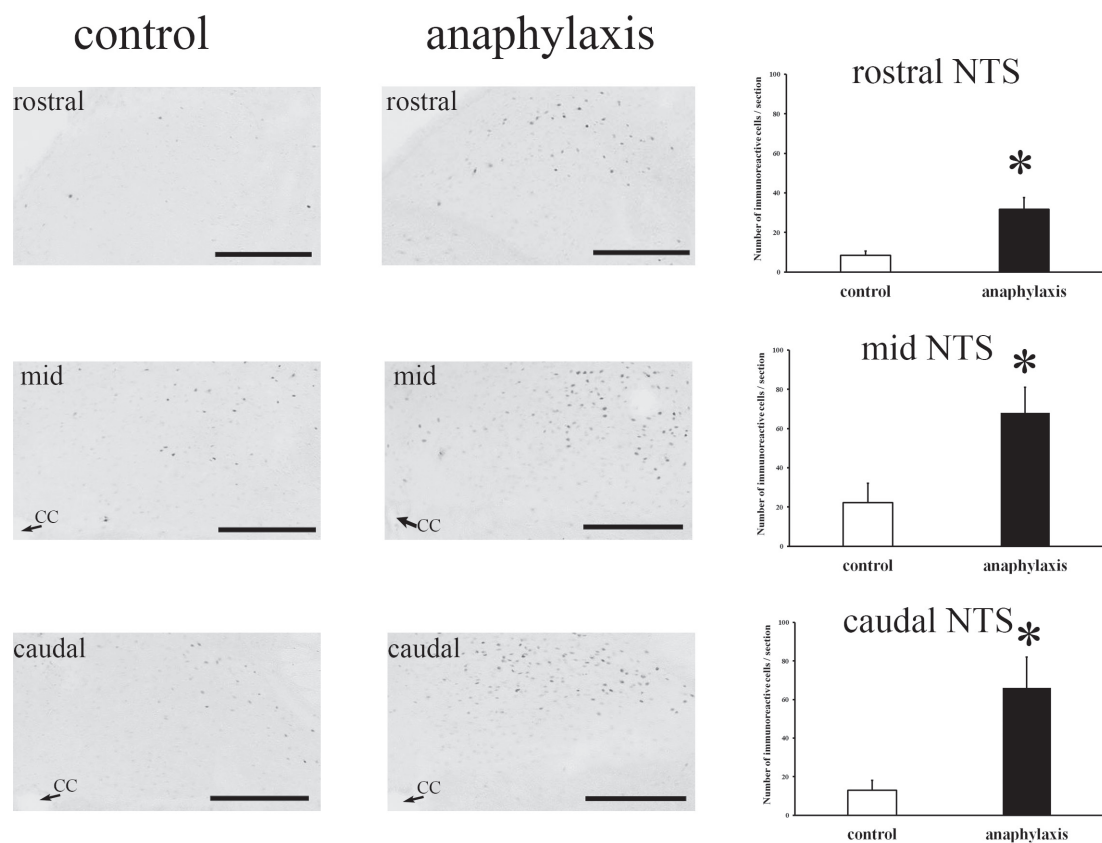


図3 アナフィラキシー時の麻酔下ラットの延髄孤束核 (NTS) における c-fos 発現。
 rostral NTS ; 吻側部、mid NTS ; 中間部、caudal NTS ; 尾側部、CC ; central canal、スケール ; 50 μ m、
 * ; v.s. control グループ、 $P < 0.05$

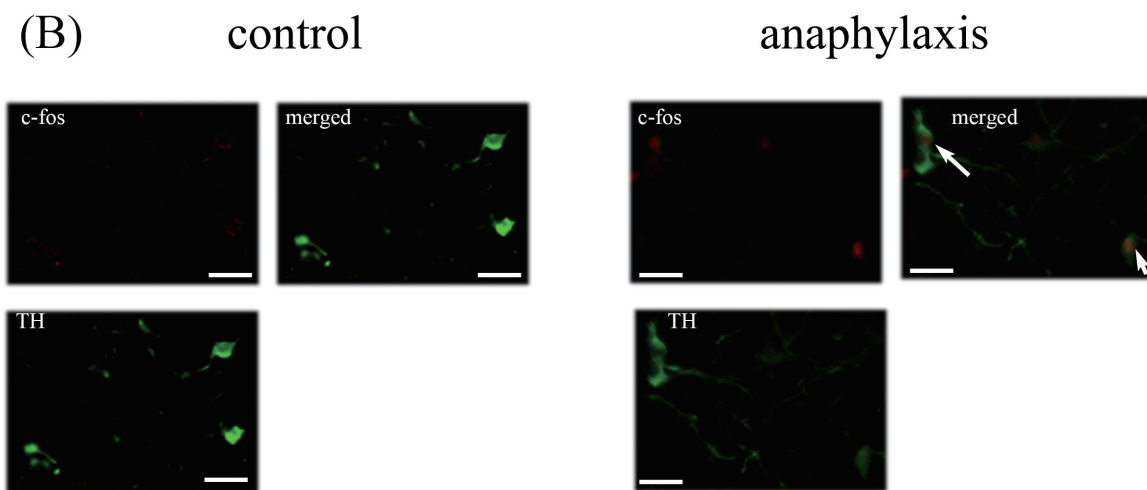
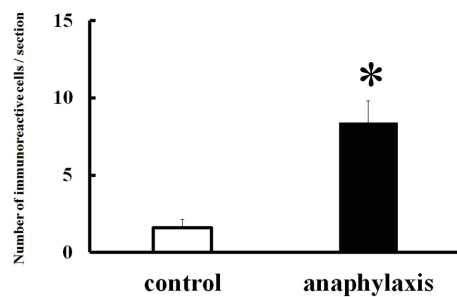
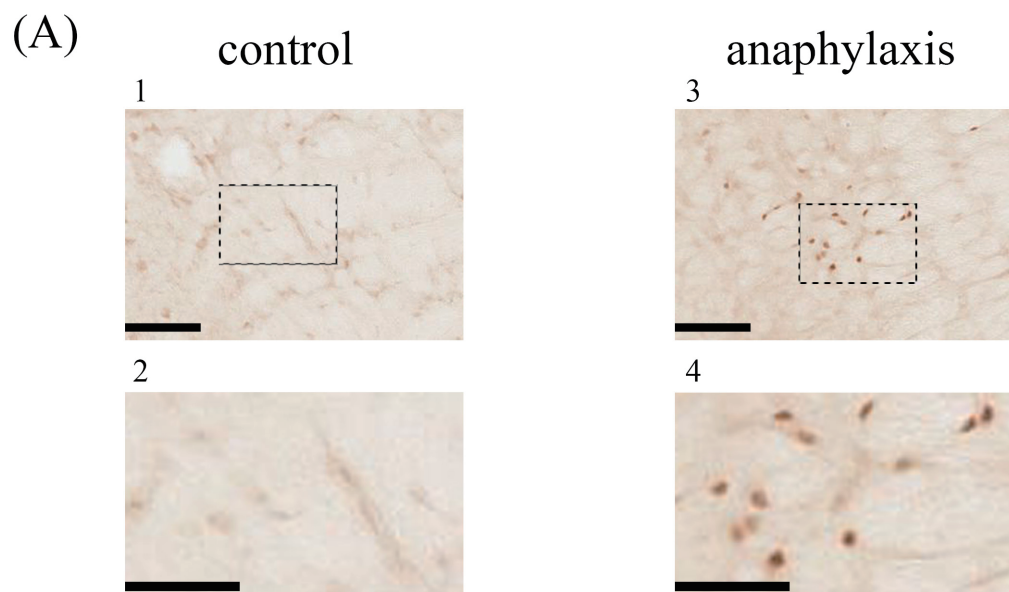


Fig. 5 Tanida M, et al.

図4 アナフィラキシー時の麻醉下ラットの延髄吻側腹外側野 (RVLM) における c-fos 発現。
 コントロールグループ (control) とアナフィラキシーグループ (anaphylaxis) における RVLM の c-fos
 陽性細胞発現 (A) とカテコラミンニューロンの局在 (B) への効果。
 スケール ; 50 μ m、白矢印 ; 共局在ニューロン、* ; v.s. control グループ, $P < 0.05$

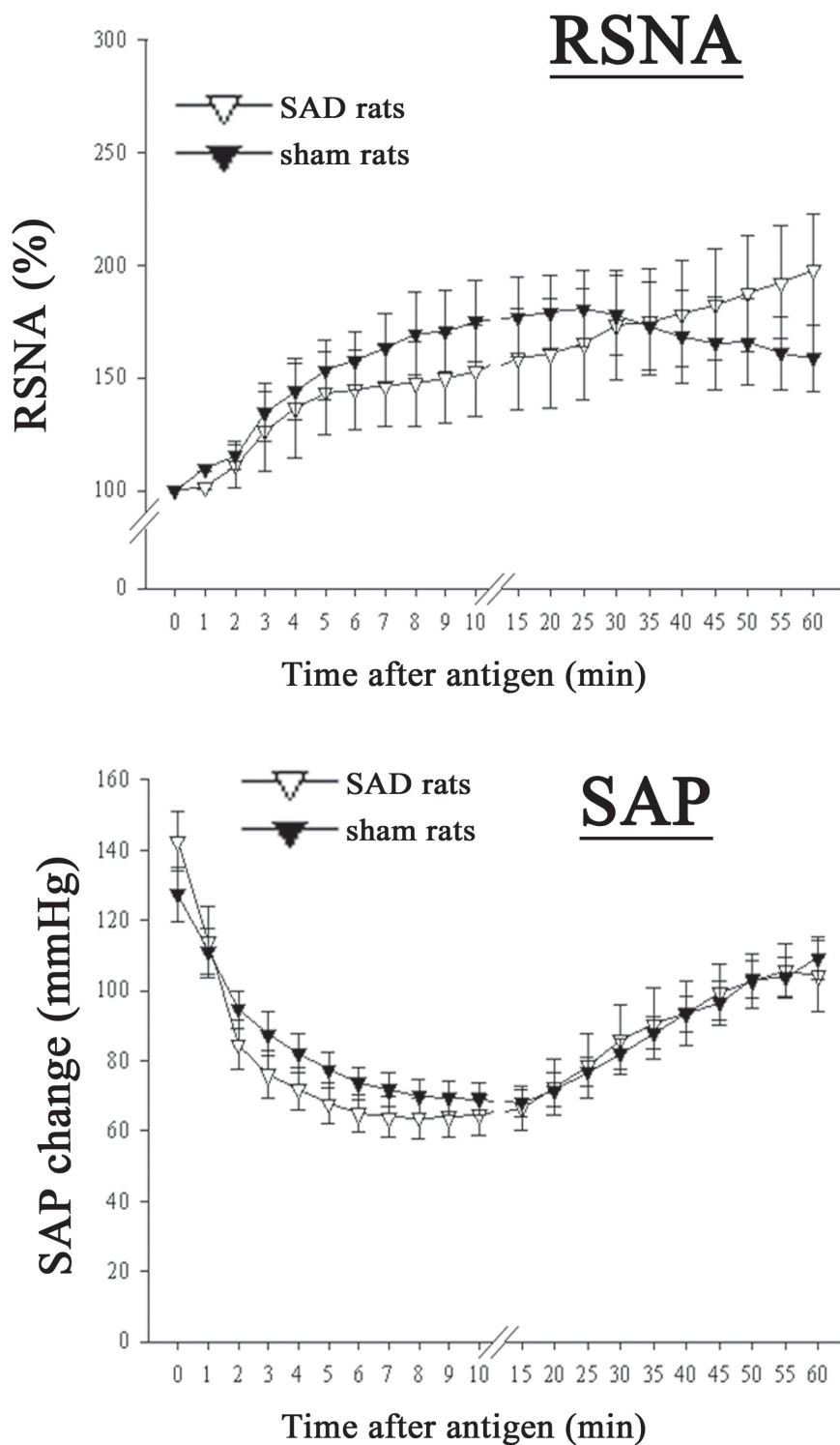


図5 麻酔下ラットでのアナフィラキシーによる低血圧と交感神経促進における動脈圧受容器の役割。コントロールグループ (control rats) と動脈圧受容器切除グループ (SAD rats) におけるアナフィラキシー時の RSNA 及び SAP 反応。

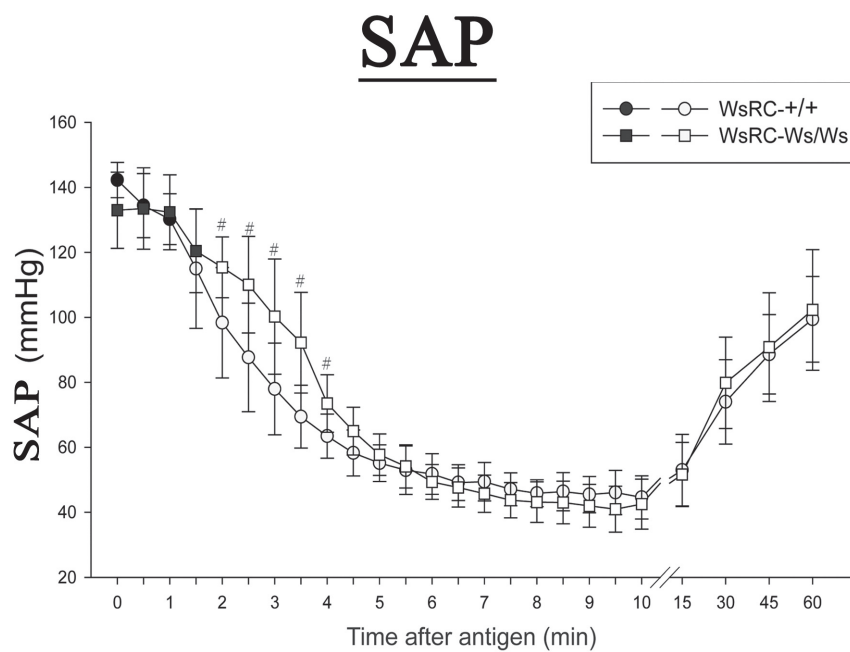
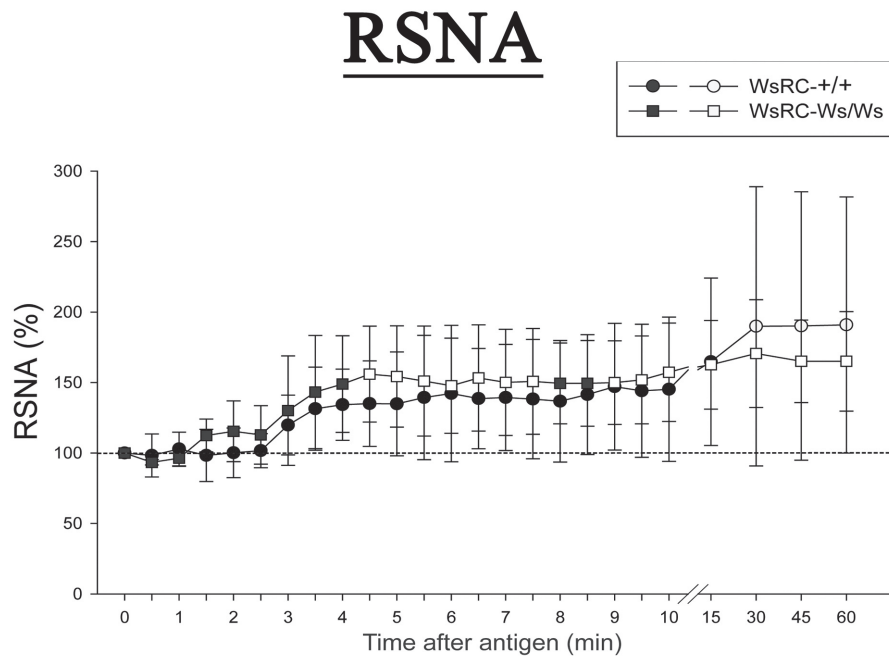


図6 麻酔下ラットでのアナフィラキシーによる低血圧と交感神経促進における肥満細胞の役割。コントロールグループ (WsRC-+/+) と肥満細胞欠損グループ (WsRC-Ws/Ws) におけるアナフィラキシー時の RSNA 及び SAP 反応。# ; v.s. コントロールグループ, $P < 0.05$