

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462839

研究課題名(和文) アナフィラキシーショックにおける脳循環の統合的研究

研究課題名(英文) Systematic study on brain circulation during anaphylactic shock

研究代表者

芝本 利重 (SHIBAMOTO, Toshishige)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90178921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アナフィラキシーショックでの脳血管の病態は不明である。本研究では卵白アルブミンで感作したラットに抗原を静脈内投与してアナフィラキシー低血圧を惹起させて1)脳血管透過性亢進、2)脳浮腫の存在、3)脳血流の自己調節、について実験的に解明した。その結果、Evans blue色素の脳血管外漏出は増加せず、脳血管の蛋白に対する透過性は亢進しなかった。また、脳浮腫はMRI検査と脳水分量測定により検出されなかった。さらに、脳血流量は血圧低下とともに低下し、自己調節は発現しなかった。以上より、ラットアナフィラキシー低血圧では脳の血管透過性亢進と浮腫は発生せず、脳血流量の自己調節はみられないことが示された。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of brain circulation during anaphylactic shock remains unclear. By using the anaphylactic shock model in which an intravenous injection of the ovalbumin antigen caused systemic hypotension in anesthetized sensitized rats, we clarified the occurrence of 1) increased cerebral vascular permeability, 2) cerebral edema, and 3) cerebral blood flow autoregulation. We found that cerebral vascular permeability did not increase during anaphylactic hypotension, as evaluated by the Evans blue dye method. Brain edema did not develop when anaphylactic hypotension occurred, as evaluated by the magnetic resonance method and the brain water measurement. Finally, cerebral blood flow decreased in parallel with a decrease in blood pressure, indicating the absence of cerebral blood flow autoregulation. In conclusion, either increased brain vascular permeability, brain edema, or cerebral blood flow autoregulation is not observed during anaphylactic hypotension in anesthetized rats.

研究分野：生理学

キーワード：brain circulation anaphylactic shock rat autoregulation brain blood flow vascular permeability brain MRI edema

## 1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシーショックは時として致死となる緊急性を要する救急医学領域の疾患である。その免疫学的機序解明は進んでいるが、血行動態的機序はなお不明な点がある。特に、アナフィラキシーショック時の脳循環、脳微小循環については不明で、米国を中心とした国際会議 (Sampson et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report-Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:391-7.)でも脳病変の解明を重要な課題として挙げている。

ヒトには体血圧が上昇あるいは低下と変化しても、脳の血流は一定に保たれる生理的な生体防御機構である血流の自己調節 (autoregulation) が存在する。一方、敗血症性ショックでは脳血流の autoregulation が破綻することが報告されている (Rosengarten et al. Autoregulative function in the brain in an endotoxic rat shock model. *Inflamm Res.* 2008;57:542-6.)。しかし、アナフィラキシーショックでその検討はない。

また、アナフィラキシーショック時には全身の多くの血管の透過性亢進が見られ、浮腫が生じる。しかしながら、アナフィラキシー時の血管透過性亢進による脳浮腫発生の有無を調べた実験的検討は無い。

アナフィラキシーは肥満細胞が放出する化学伝達物質による病態であり、近年、肥満細胞の血液関門の破綻や脳神経細胞障害への関与が注目されている (Lindsberg et al. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cerebr Blood Flow Metab* 2010;30:689-702.)。しかしながら、アナフィラキシーショック時に脳血管透過性が亢進するか検討した報告は見られない。

## 2. 研究の目的

アナフィラキシーショックにおける脳血管の病態は不明である。本研究の目的はラットのアナフィラキシーショックで脳循環動態について次の3点を放射線医学的、生理学的、分子生物学的に検討する。さらに本症の特徴の鮮明化のために、出血性ショックと血管拡張剤性ショックと比較する。

- (1) 脳浮腫の存在
- (2) 脳血管の収縮弛緩病態の解明：脳血流の

autoregulation の作動性

(3) 脳組織の前初期遺伝子群発現と脳微小血管透過性の関連

## 3. 研究の方法

ラットアナフィラキシーモデルの作成：本研究では麻酔下ラットのアナフィラキシーモデルを用いた。その作成方法は体重 400-500 g の雄性 Sprague-Dawley rat (Japan SLC) に 1mg 卵白アルブミン (0.5mL) を完全 Freund's アジュバント (0.5mL) と混合して皮下注射により投与する。2 週間後に、抗原卵白アルブミン 0.6mg を静脈内投与してアナフィラキシー低血圧を惹起する。

### (1) 脳浮腫の存在：

Pentobarbital 麻酔下ラットにおいて卵白アルブミンを抗原としたアナフィラキシーショックモデル (アナフィラキシー群、n=7) で脳浮腫の有無を喉頭浮腫の有無とともに核磁気共鳴映像法 (MRI) をもちいて、同程度の低血圧を惹起する血管拡張剤 sodium nitroprusside (SNP) 3mg/kg 皮下投与したラット (SNP 群、n=7) と比較検討した。測定は右大腿動脈から大動脈圧を連続的に測定した。また、抗原あるいは生理食塩水は左大腿静脈より投与した。

さらに、アナフィラキシー群 (n=5)、SNP 群 (n=5)、無処置対照群 (n=5) の 3 群において抗原投与後 70 分に脳を摘出して、オープンにて 100、24 時間乾燥させて、脳の湿乾重量比を測定することにより脳水分量を求めて脳浮腫の有無を検討した。

また、アナフィラキシー群 (n=3) と SNP 群 (n=3) において抗原投与後 70 分の脳組織をかん流固定後に摘出し、特に視床下部に注目して toluidine blue 染色法により肥満細胞を同定して、その数と脱顆粒の状態を組織学的方法により検討した。

### (2) 脳血管の収縮弛緩病態の解明：脳血流の autoregulation の作動性：

アナフィラキシーショック時の脳血流の動態を麻酔下ラットにおいて内頸動脈血流量と脳組織血流量を測定し、同程度の血圧低下を起こす出血性ショックと比較検討した。実験は麻酔、自発呼吸下に右大腿動脈から体血圧を測定した。脳外を灌流する左外頸動脈を結紮後、超音波血流計により左総頸動脈血流量を測定して内頸動脈血流量とした。頭頂部からドップラー組織血流計で脳組織血流量を測定した。

次の 2 実験群で検討した；

アナフィラキシーショック群 (n=7)：ovalbumin (1mg) 皮下投与 2 週後に抗原 (0.6mg) を静注してアナフィラキシー低血圧を惹起した。その後、1 時間観察した。

出血性ショック群 (n=7)：脱血により血圧をアナフィラキシーショック群と同様に

低下させた。

(3) 脳組織の前初期遺伝子群発現と脳微小血管透過性の関連：アナフィラキシーショック時の脳血管透過性の変化と脳組織の活性化の関連を麻酔下ラットアナフィラキシーモデルにおいて検討した。

アナフィラキシーショック時の脳内神経細胞の賦活状態の検討：

急性に発現する脳内前初期遺伝子群の c-fos を検討した。ペントバルビタール麻酔下に卵白アルブミン抗原感作ラットとコントロールの非感作ラットに抗原を投与し、60分後に灌流固定を行い、脳をサンプリングした。免疫組織化学染色法で視床下部と延髄に存在する神経核の c-fos 陽性細胞数の発現量について、感作ラットとコントロールの非感作ラットで比較した。

アナフィラキシーショック時の脳血管透過性の検討：

ペントバルビタール麻酔下に卵白アルブミン抗原感作ラットとコントロールの非感作ラットにおいて大腿動脈から血圧を連続測定し、脳微小血管の血管透過性を Evans blue (EB) 色素 (3%; 100mg/kg) を静脈内投与後に卵白アルブミン抗原 0.6mg を静脈内投与しアナフィラキシー低血圧を惹起した。抗原投与 10 分後に左室より生理食塩水をポンプで大動脈内に注入し、EB 色素を洗い出した後に脳を摘出した。脳重量を測定後、50%トリクロロ酢酸液を加えて、脳組織をホモジナイズする。遠心分離 (12000 回転/分、20 分) し、上清 120  $\mu$ L を 96well にいれ、分光光度計 (620 nm) を用いて測定し、組織の湿重量 1 mg あたりの EB 量を検量線から求めた。血管外に漏出した脳組織中 EB 量を抗原感作ラットと非感作ラットとで比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脳浮腫の有無の検討：

アナフィラキシー群と SNP 群において平均動脈圧は抗原または SNP の投与後 10 分には 35mmHg まで同様に減少し、低血圧が発生できた。MRI ではアナフィラキシー群では抗原投与後 13 分には喉頭に血管性浮腫の検知ができる T2 緩和時間 (T2RT) の上昇と T2 強調画像で高信号が認められたが、SNP 群では喉頭に信号の変化は認めなかった。HE 染色による組織学的検査でも、アナフィラキシー群では喉頭蓋に浮腫が認められ、喉頭の上皮から軟骨までの長さはアナフィラキシー群 (310  $\pm$  56  $\mu$ m) で SNP 群 (151  $\pm$  37  $\mu$ m) に比して有意に大きかった。一方、脳の MRI 像はいずれの群でも T2RT または細胞傷害性浮腫に敏感な指標である水の見かけの拡散係数に有意な変化は認めなかった。

脳水分量は、非低血圧状態のコントロール群 (77.2  $\pm$  0.2%) と比較して、アナフィラキシー群 (77.1  $\pm$  0.3%) と SNP 群 (77.2  $\pm$  0.3%) のいずれも有意な差を認めなかった。

また、脳組織中の肥満細胞の検討では、肥満細胞は視床下部の正中隆起部に認められたがアナフィラキシー群と SNP 群でその数に有意差はなく、脱顆粒像も認めなかった。

以上の成績から、ラットアナフィラキシー低血圧時には喉頭で浮腫性変化が早期より発生するが、脳では浮腫は生じないことが示唆された。また、本研究のラットアナフィラキシーモデルでは視床下部の肥満細胞はアナフィラキシー低血圧が生じる状態でも脱顆粒などの反応がみられないことが明らかとなった。

##### (2) 脳血管の収縮弛緩病態の解明：脳血流の autoregulation の作動性：

アナフィラキシー群ならびに出血群ともに血圧低下の開始から 1 分後には同様に体血圧は 69mmHg 前後に低下し、10 分には最低値 37mmHg 前後に達した。その後、徐々に回復し 60 分には 81mmHg 前後となった。アナフィラキシー群では内頸動脈血流量は血圧とともに低下し、20 分には 16% と最低になり、その後 60 分には 40% に回復した。一方、脳組織血流量は血圧とともに低下し、25 分には 54% の最低値に達し、60 分には 62% に回復した。出血群では内頸動脈血流量と脳組織血流量の変化はアナフィラキシー群と同様であった。以上の成績よりアナフィラキシー低血圧時の脳血流の低下は同様の出血性低血圧と比べて差異は認められず、血圧が低下しても脳血流量は保たれるという脳血流の autoregulation はみられないことが示唆された。

##### (3) 脳組織の前初期遺伝子群発現と脳微小血管透過性の関連

アナフィラキシーショック時の脳内神経細胞の賦活状態の検討：

アナフィラキシー群では視床下部の室傍核における c-fos 陽性細胞数が非感作コントロール群と比較して増大していた。また、延髄では孤束核における c-fos 陽性細胞数がアナフィラキシー群で増大していた。

これらの神経核は循環系の交感神経調節に関与しているので、アナフィラキシーショックにおける交感神経系の関与が示唆された。

アナフィラキシーショック時の脳血管透過性の検討：

脳組織中 EB 量はアナフィラキシー低血圧を呈した感作ラット (2.05  $\pm$  0.34 (SD)  $\mu$ g/g brain weight) も低血圧のない非感作ラット

( $2.78 \pm 0.26 \mu\text{g/g brain weight}$ )と同様で脳血管透過性は亢進しなかった。

総括として、アナフィラキシーショックでの脳血管の病態は不明である。本研究では卵白アルブミンで感作したラットに抗原を静脈内投与してアナフィラキシー低血圧を惹起させて1)脳血管透過性亢進、2)脳浮腫の存在、3)脳血流の自己調節、について実験的に解明した。その結果、Evans blue色素の脳血管外漏出は増加せず、脳血管の蛋白に対する透過性は亢進しなかった。また、脳浮腫はMRI検査と脳水分量測定により検出されなかった。さらに、脳血流量は血圧低下とともに低下し、自己調節は発現しなかった。以上より、ラットアナフィラキシー低血圧では脳の血管透過性亢進と浮腫は発生せず、脳血流量の自己調節はみられないことが示された。

#### 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2件)

Toyota I, Tanida M, Shibamoto T, Wang M, Kurata Y, Tonami H. MRI reveals edema in larynx (but not brain) during anaphylactic hypotension in anesthetized rats. Allergy Asthma Immunol Res. 2013;5(6):389-96. 査読有

Zhang W, Shibamoto T, Tanida M, Wang M, Sun L, Kurata Y. Rat hepatic and splanchnic vascular responses to anaphylactic shock, compared with hemorrhagic or vasodilator-induced shock. In Vivo. 2013 Jul-Aug;27(4):485-93. 査読有

[学会発表](計2件)

Shibamoto T, Wang M, Kuda Y, Tanida M, Kurata Y. Brain blood flow during anaphylactic hypotension in anesthetized rats. 第93回日本生理学会大会. 2016年3月24日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

豊田一郎、芝本利重、谷田 守、王 墨飛、倉田康孝、利波久雄. アナフィラキシーショック時に脳浮腫はみられるか? -ラットMRIでの検討-. 第23回日本病態生理学会大会. 2013年8月3日, 慈恵会医科大学(東京都港区).

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

芝本 利重(SHIBAMOTO, Toshishige)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90178921

##### (2)研究分担者

倉田 康孝(KURATA, Yasutaka)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00267725

利波 久雄(TONAMI, Hisao)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70139773