

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09445

研究課題名(和文)非侵襲的サーモグラフィを用いたアナフィラキシーショック二相性反応の発生機序解明

研究課題名(英文) Application of noninvasive thermography to detect the biphasic anaphylaxis in the rat

研究代表者

芝本 利重 (SHIBAMOTO, Toshishige)

金沢医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90178921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アナフィラキシーには二相性反応があり、初期症状回復後の待機時間の長さやステロイドの予防効果の有無が臨床的課題である。その解決には動物実験モデルの確立が求められている。今回、二相性反応の検出に体表温度低下を非侵襲的にとらえるサーモグラフィの応用を試みた。その結果、卵白アルブミン抗原投与による初期反応では、体表温度は血圧と深部温度の低下とともに低下し、アナフィラキシーの指標となることが示された。しかし、二相性の後期の体温低下は抗原感作方法あるいは抗原投与時を昼夜で変えても出現しなかった。以上より、卵白アルブミンを抗原とするラットアナフィラキシーでは二相性反応が生じないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、感作に抗原性を高めるアジュバントの有無に関わらず、抗原として卵白アルブミンを用いたアナフィラキシーで二相性反応が惹起できなかった。このことは今後のラットのアナフィラキシー二相性モデル確立には卵白アルブミン以外の抗原で感作すべきことが明らかになった点では学術的価値がある。また、ラットアナフィラキシーにおいてサーモグラフィによる体表温度低下がアナフィラキシーの指標になることが示された。このことは、アナフィラキシーの評価が血圧や直腸温の侵襲的測定をせずに、サーモグラフィ法により非侵襲的にできることから、本法は今後のラットを用いたアナフィラキシーの幅広い研究への応用が期待でき、学術的に価値がある。

研究成果の概要(英文)：We have shown that anaphylaxis-induced hypothermia can be detected by non-invasive measurement of surface body temperature (T_{surf}) with the thermography in awake Sprague-Dawley rats. This is evidence by the finding that T_{surf} transiently decreased in parallel with core body temperature (T_{core}) during anaphylactic hypotension in awake SD rat. However, biphasic anaphylaxis, which was evaluated by the second decreases in T_{core} or T_{surf} , could not be observed during 24 hours following the first antigen-induced hypothermia in the rats sensitized with ovalbumin mixed with or without the complete Freund's adjuvant. In addition, biphasic anaphylaxis was not observed when the antigen was administered at day or night. In conclusion, biphasic anaphylaxis is not produced in the male SD rat sensitized with ovalbumin antigen.

研究分野：医学生理学

キーワード：アナフィラキシー二相性反応 卵白アルブミン抗原 ラット サーモグラフィ 体温低下 血圧低下

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシー患者で症状と所見が改善した後、20%までの患者に1~72時間後、多くは4~22時間後に、再び同様あるいは他のアナフィラキシー症状が出現する二相性反応がある。そのため、病状回復後も4~6時間の観察が推奨されている[1]。しかし、患者の長時間拘束の必要性に疑問視もある。一方、その二相性反応の発生機序は不明であり、解明されれば、発生予測と予防処置も可能になり、医療従事者並びに患者に大きな福音となる。

2. 研究の目的

(1)覚醒ラットにおいてアナフィラキシー低血圧の発生と評価を非侵襲的に体表温度低下でとらえるサーモグラフィ実験システムの確立を目的とする。さらに、アナフィラキシー時に放出される1)サイトカインの網羅的解析と2)化学伝達物質の解析、並びにそれらの二相性反応との関連を解明する。

(2)覚醒ラットにおいてアナフィラキシー二相性反応が発現する実験モデルを確立する。さらに1)二相性反応の予防薬として使用されているがその効果が未確定のステロイド投与効果ならびに2)標的サイトカインの最終作用物質のひとつであるNF- κ Bの阻害効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 雄性SDラットを用いて実験2週間前に抗原である卵白アルミンの皮下投与により感作した。その2週間後の実験前日に麻酔下に体圧測定と抗原投与のためのカテーテルを右大腿動静脈に挿入した。また、深部体温測定の温度センサーのNano-tag[®]を腹腔内に留置した。アナフィラキシー低血圧は既報のごとく[2]、覚醒下に抗原の卵白アルブミンを感作ラットに静脈内投与して惹起して、30秒毎にサーモグラフィカメラ(F50,日本アビオニクス社)により体表温度を深部温度とともに測定した。血圧はシーベルを介して測定した。体表温度は最大値を採用した。それぞれの項目を抗原投与後60分間観察した。

サイトカインの測定

抗原投与後、6分から24時間まで12種のサイトカイン(IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ)の血漿濃度をBio-Plex Rat Cytokine Th1/Th2 12Plex kit (Bio-Rad Laboratories)を用いて測定した。

化学伝達物質の検討

ラットアナフィラキシー時の血圧低下と体温低下の機序を解明するために肥満細胞から放出される化学伝達物質の役割を検討した。すなわち、ヒスタミンH1受容体、ヒスタミンH2受容体、血小板活性化因子受容体、プロスタグランジンD2受容体のそれぞれの拮抗物質を抗原投与の10分前に静脈内投与して、抗原投与による血圧低下と体温低下に対する抑制作用を調べた。

(2) アナフィラキシー二相性反応の検討では、抗原投与後24時間にわたって無拘束下に深部温度あるいは体表温度を測定した。深部温度測定はNano-tag[®]を実験1週間前に腹腔内留置して測定した。1)体温の日内変動を考慮して、昼のみならず夜に抗原を投与する実験も行った。さらに、2)抗原感作は()卵白アルブミン(1mg)とComplete Freund's adjuvantのミセル化液を皮下1回投与、()adjuvantなしの5倍量の抗原(5mg)の6回の皮下投与の二通りで行った。アナフィラキシーはカテーテル留置をしない非侵襲的状态で抗原の尾静脈内投与により惹起した。さらに、以下の2実験を計画した。1)ステロイド投与実験はメチルプレドニゾロン(30mg/kg, iv)をアナフィラキシー初期反応発現後の0.5, 1, 1.5時間後に投与し、後期反応出現への影響を検討する。2)NF- κ B実験はその阻害剤であるBay11-7082(5mg/kg, i.v.)をアナフィラキシー初期反応発現後の1時間に投与して検討する。

4. 研究成果

(1) 感作ラットでは卵白アルブミン抗原の静脈内投与により体血圧は115mmHgから7分後に53mmHgに低下した。体表温度と深部温度は、それぞれ35分と30分に1.6と1.9低下した。その後、それぞれのパラメータは回復傾向を示した。以上より、ラット覚醒時アナフィラキシー低血圧時に体表温度は深部温度とともに低下することが明らかになった。

化学伝達物質の役割：血小板活性化因子とヒスタミンH1受容体の阻害が血圧と体温の低下を他の受容体拮抗物質に比べて大きく抑制した。さらに、これら2受容体の同時阻害は抗原投与による血圧低下を消失させたが、体温低下は抑制されるも残存した。これらの成績から、ラットアナフィラキシー時の血圧低下には血小板活性化因子とヒスタミンによるが、体温低下にはそれ以外の化学伝達物質の関与が必要であることが明らかになった。

サイトカインの動態：有意に検出されたIL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α のピーク値は

抗原投与後早期の 1 時間と 2 時間にみられた。臨床では二相性反応は抗原暴露 6 時間以降に生ずるため、二相性発現にこれらのサイトカインの直積的な関与は少ないことが明らかになった。

(2) アナフィラキシー二相性反応の検討

日内変動を考慮した昼夜の抗原投与の検討：

はじめに、ラット休息期の時間帯である午前中 7 時 42 分に抗原を尾静脈内に投与した。深部温度と体表温度は抗原投与前値のそれぞれ 37.0 ± 0.4 と 35.4 ± 1.0 から抗原投与後 67 分に最低値である 34.9 ± 1.2 と 34.0 ± 1.4 に低下し、投与後 2 時間 30 分頃には投与前値に復した。その後、体温は抗原投与 24 時間後まで日内変動に従った変動しか観察されず、さらなる体温低下は見られなかった。

次に、ラットの活動時間帯の夜間、実験室消灯後の午後 9 時 8 分に抗原を尾静脈内に投与した。Nano-tag により測定した深部温度は抗原投与前の 36.9 ± 0.2 から低下し、投与後 57 分には最低値 36.3 ± 0.2 に達し、以後、回復傾向を示した。しかしながら、その後 24 時間には感作しない対照群の温度変化と比較しても有意の体温低下はみられなかった。以上より、本アナフィラキシーモデルでは日内変動を考慮して抗原投与時間を変更しても二相性反応は生じないことが明らかになった。

感作方法を変更した検討：

前述のラットアナフィラキシー実験モデルでは抗原性を増強させるために adjuvant として Complete Freund's adjuvant を抗原とミセル化して感作していた。この方法では前述のように二相性反応は生じなかった。そこで、adjuvant なしの 5 倍量の抗原 (5mg) の 6 回の皮下投与で抗原感作を行った。その結果、抗原に adjuvant を加えた従来の方法で感作したラットのアナフィラキシーによる体表温度低下が 1.5 に対して、adjuvant なしの検討では 0.6 と反応は弱い傾向にあるものの、アナフィラキシーによる体温低下反応は惹起することができた。しかしながら、課題の二相性反応は、初期のアナフィラキシー反応による体温低下の後、24 時間にわたって観察するも、さらなる温度低下は認められず、二相性反応は惹起できなかった。この結果より、抗原感作方法を変えても本ラットアナフィラキシーモデルでは二相性反応が生じないことが明らかになった。

なお、当初計画していた 1)ステロイド投与実験と 2)NF-kB の実験は二相性反応モデルを作成できなかったため施行できなかった。

以上より、ラットのアナフィラキシーの二相性反応は抗原として卵白アルミンを用いたアナフィラキシーでは生じないことが明らかになった。

<引用文献>

1. Pourmand A, Robinson C, Syed W, Mazer-Amirshahi M. Biphasic anaphylaxis: A review of the literature and implications for emergency management. *Am. J. Emerg. Med.* 36, 2018, 1480-1485.
2. Zhang W, Shibamoto T, Cui S, Takano H, Kurata Y. 7-nitroindazole, but not L-NAME or aminoguanidine, attenuates anaphylactic hypotension in conscious rats. *Shock* 31, 2009, 201-206.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tao Zhang, Toshishige Shibamoto, Mamoru Tanida, Makoto Taniguchi, Yuhichi Kuda, Wei Yang, Yasutaka Kurata	4. 巻 15(11)
2. 論文標題 Angiotensin-2 is released during anaphylactic hypotension in anesthetized and unanesthetized rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0242026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242026. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝本利重、谷田守、九田裕一、津元国親、倉田康孝
2. 発表標題 ラットアナフィラキシー低血圧時の体温低下についての検討
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芝本利重、九田裕一、谷田 守、津元国親、倉田康孝
2. 発表標題 覚醒ラットにおけるアナフィラキシー低血圧時の体表温度の変化
3. 学会等名 第66回 日本中部生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝本利重、九田裕一、谷田 守、津元国親、倉田康孝
2. 発表標題 サーモグラフィーを用いてラットアナフィラキシー時の体温低下を検出する試み
3. 学会等名 第47回 自律神経生理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝本利重, 谷田 守
2. 発表標題 覚醒ラットにおけるアナフィラキシー二相性反応についての検討
3. 学会等名 第36回日本Shock学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芝本利重, 谷田 守, 九田裕一, 津元国親, 倉田康孝
2. 発表標題 ラットにおけるアナフィラキシー二相性反応の検討
3. 学会等名 第31回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷田 守 (TANIDA Mamoru) (70512309)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------