

## 〔速報〕

## 感作モルモットにおける条件づけによるアナフィラキシー反応

国立精神・神経センター精神保健研究所心身医学研究部

岡田宏基<sup>1)</sup> 永田頌史<sup>2)</sup> 石川俊男 吾郷晋浩

卵白アルブミン(OA)による吸入感作モルモットを用いて臭いによるアナフィラキシー反応の条件づけを試みた。7日間の吸入感作1カ月後に6匹ずつC(条件づけ)群とU(非条件づけ)群に分けた。C群には条件刺激として硫黄臭のあるdimethylsulfide(DMS)をOAとともに、U群にはOAのみを吸入させた。この4日後にC群には生理食塩水(生食)のみ、U群にはDMSのみを吸入させ両群でOA、DMSの総吸入量を等しくした。この組み合わせを1セッションとし、週に1回ずつ7週繰り返した。最後のセッション後に両群ともDMS、生食及びOAをそれぞれ単独で吸入させて採血し血漿ヒスタミンを測定した。その結果、DMSの単独吸入時のヒスタミン値(ヒ値)はC群で $47.5 \pm 9.7$ , U群で $25.7 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$ であった。C群の生食吸入時のヒ値は $32.9 \pm 4.7$ , OA吸入時は $59.0 \pm 9.2 \text{ ng/ml}$ であった。DMS単独吸入後の血漿ヒ値はC群ではU群より有意( $p < 0.05$ )に高かった。これらのことは、条件刺激(DMS吸入)が抗原刺激なしにヒスタミン遊離を引き起こすことを示唆し、肥満細胞-神経系の連関を示唆する成績である。

**Key words:** anaphylaxis — conditioning — histamine — inhalation — odor

## 緒言

気管支喘息の病態に心理的因子、なかでも条件づけが関与している例があることは古くより広く知られており、1886年にMacKenzie<sup>1)</sup>はバラに過敏な夫人が造花のバラを見て鼻炎症状に引き続いて喘息発作を引き起こした例を報告している。このような事例はほかにも数多く報告され臨床的にも少なからずみられるが、そのメカニズムは近年まで明らかにされていなかった。実験的に免疫反応の条件づけに初めて成功したのはAderら<sup>2)</sup>で、彼らはcyclophosphamide(無条件刺激: unconditioned stimulus-US)による免疫抑制作用がサッカリン(条件刺激: conditioned stimulus-CS)で条件づけられることを報告している。一方、Bienenstockら<sup>3)</sup>は、アレルギー反応の引き金となる粘膜肥満

細胞と迷走神経の知覚神経末端に密接な連絡があることを組織化学的、電顕的に明らかにし、さらにMacQueenら<sup>4)</sup>は音と光による条件刺激によってラットの粘膜細胞特異酵素(rat mast cell protease II; RMCP II)が遊離することを報告した。すなわち、中枢神経系と肥満細胞との間に解剖学的・機能的な結びつきがあることを示したわけである。今回我々は気管支喘息により近い動物モデルである蛋白アルブミン(OA)で吸入感作したモルモットを用いて臭いによる条件づけを試みた。

## 材料と方法

3週齢のHartley系雄モルモット12匹(体重200~270g)を1%OA(非条件刺激-US)を1日1回5分間連続7日間吸入させることによって感作した。吸入感作1カ月後に全部のモルモットがOA吸入で気道反応を誘発できることを確認した上で6匹ずつ2群に分け、条件づけ群(C群)と非条件づけ群(U群)とした。臭い刺激(条件刺激-CS)には硫黄臭のあるdimethylsulfide(DMS)(0.2% in saline solution—DMS液)を用いた。条件づけのためにC群にはOAとDMS液とを同時に各個体が発作をきたすまで吸入

1) 現: 香川医科大学医学部附属病院総合診療部

2) 現: 産業医科大学産業生態科学研究所精神保健学教室

Received: July 30, 1992

Accepted: October 7, 1992

**Abbreviations:** BAS bovine serum albumin; CS conditioned stimulus; DMS dimethylsulfide; OA ovalbumin; US unconditioned stimulus

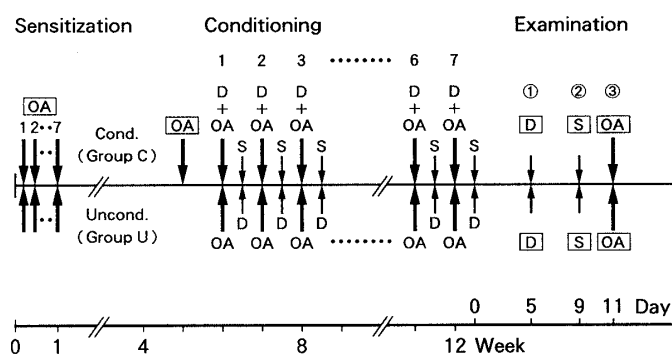


Fig. 1. Schedule of experiment. OA, ovalbumin; D, dimethylsulfoxide; S, saline; Cond., conditioned group; Uncond., unconditioned group.

させたが、臭いを持続させるために OA (2mg/ml) と DMS 液を同量ずつ 2 分ごとにネブライザーに追加したので吸入液の OA の濃度は 1mg/ml となった。発作の判定は観察により、呼吸延長、眼球チアノーゼをきたした時点で吸入箱から取り出した。吸入時間は 6～8 分であった。なお眼球チアノーゼは組織スペクトル分析装置 (住友 TS-200) で、酸化ヘモグロビン量 (Iso<sub>2</sub>) が 15% 以上低下すれば肉眼的に確認できるし、Iso<sub>2</sub> は呼吸抵抗と相関することを確認している<sup>5)</sup>。U 群は OA (1mg/ml) のみを同様に発作をきたすまで吸入させた。これらの条件づけは 7 日ごとに繰り返した。また、DMS の気道に及ぼす非特異的影響や取扱いによる影響を C 群と U 群とで同等にするために、それぞれの条件づけから 4 日後に C 群には生理食塩水を、U 群には DMS 液のみをそれぞれ 6 分間吸入させた。この組合せを計 7 回繰り返した (Fig. 1)。条件づけの期間中飼育条件は一定とし、飼料と水は自由に与えた。また、条件づけもほぼ一定の時刻 (午後 0 時～午後 2 時) に行った。最後の OA なしの吸入から 5 日後、9 日後及び 11 日後に両群ともにそれぞれ DMS 溶液、生理食塩水及び OA を吸入させて、いずれも吸入 10 分後にエーテル麻酔下で EDTA 採血し、血漿を過塩素酸で除蛋白した後に上清のヒスタミン値を測定した。ヒスタミンの測定は栄研のヒスタミン測定キットを用いて RIA 法にて行った。卵白アルブミンに対する抗体価は 24 時間 PCA 法にて測定した。検定は群内は paired t-test, 群間の比較は unpaired t-test を用いた。

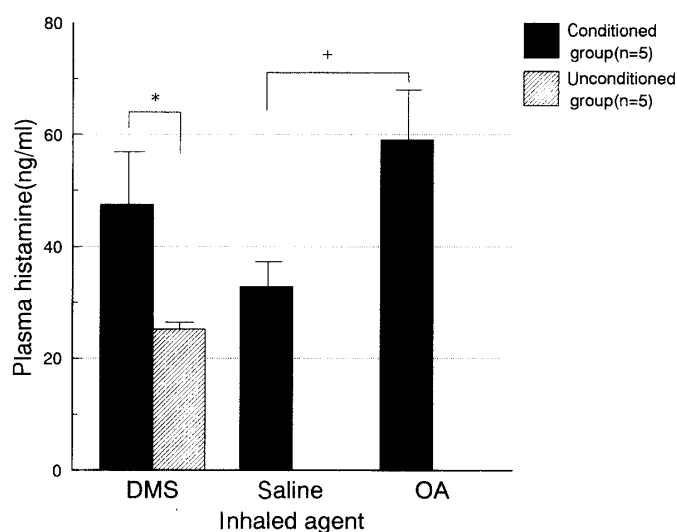


Fig. 2. Plasma histamine levels after conditional and unconditional stimuli.

DMS, dimethylsulfoxide; OA, ovalbumin. Data are expressed as mean ± SE. \* $p < 0.05$  by unpaired t-test, + $p < 0.05$  by paired t-test.

## 結 果

C 群の 1 匹は生理食塩水吸入後の採血時に機械的溶血をきたしたため、解析には残り 5 匹の値を用いた。C 群において DMS, 生理食塩水及び OA 吸入時の血漿ヒスタミン値 (平均 ± SE) はそれぞれ、 $47.5 \pm 9.7$ ,  $32.9 \pm 4.7$  及び  $59.0 \pm 9.2$  (ng/ml) であった。paired t-test の p 値は、DMS 吸入時と生理食塩水吸入時とが 0.186, 生理食塩水吸入時と OA 吸入時とが 0.010, DMS 吸入時と OA 吸入時とが 0.363 であった。すなわち生理食塩水吸入時と OA 吸入時とでのみ 5% 水準で有意差がみられた。なお、DMS 単独吸入時には動き回る、飛び跳ねるなど落ち着きのない行動がみられたが、明らかな呼吸困難発作はなく呼吸数の増加がみられたのみであった。

U 群は DMS 吸入時の採血で 1 匹が機械的溶血をし、残りの 5 匹のうち生理食塩水及び OA 吸入時のヒスタミン値が測定感度以上になるものがあり、paired t-test を行うには匹数が不足したので解析には用い得なかった。そこで C 群にとってのみ条件刺激である DMS 吸入時のヒスタミン値を C 群と U 群とで群間比較を行った。U 群の DMS 吸入時のヒスタミン値は  $25.2 \pm 1.2$  (ng/ml) で、これは C 群のそれと比べて有意 ( $p < 0.05$ ) に低値であった (Fig. 2)。

PCA 抗体価は C 群が  $6.67 \pm 0.47 \log_2$  倍、U 群が

6.83±0.37log<sub>2</sub>倍で、両群間に有意差は認められなかった。

## 考 察

免疫反応の条件づけに関しては、1975年に Ader ら<sup>2)</sup> がサッカリン（経口投与）と cyclophosphamide（腹腔内投与）とを組合せてリンパ球の免疫抑制作用が条件づけられることを示し、この方法は“conditioned taste aversion”と称されてその後幾つかの条件刺激と種々の免疫反応のパラメーターとの組み合わせが検討されている。しかしながら1型アレルギー反応に関してのものは少ない。

I型アレルギー反応に関しては、Russell ら<sup>6)</sup>、Peeke ら<sup>7)</sup>は仔ウシ血清アルブミン（BSA）を complete Freund's adjuvant と混和しモルモットの footpad に皮下注射して感作し、BSA 液を鼻に浸す方法で血中ヒスタミン値が上昇することを観察している。我々も当初 BSA の代わりに OA を用いて同様の方法にて感作を行った。しかし、この実験では OA 吸入によっても明らかな呼吸困難、チアノーゼ、Iso<sub>2</sub>の低下をきたすような呼吸困難発作はみられず、また OA 吸入時の血中ヒスタミン値も有意の増加が観察されず、喘息のモデルにはならないと判断した。そこで今回は OA で吸入感作を行い、しかも条件づけの際も各個体が明らかに呼気の延長、チアノーゼを伴う呼吸困難発作をきたすまで吸入を続ける方法をとった。

今回得られた結果をみると、DMS を単独吸入させた時の血漿ヒスタミン値は C 群は U 群に比べて有意に高値であった。条件づけの過程で C 群は DMS を OA と共に吸入させ、U 群は DMS を単独で吸入させており、この結果 C 群では DMS の臭い刺激と呼吸困難発作に伴う身体反応と情動反応が中枢神経系で結びつき、臭い刺激のみで、条件づけによるヒスタミンの遊離が起こったものと推測される。ヒトの場合、喘息症状の条件づけが成立するためには、予期不安、恐怖などの情動反応を伴うことが多い。モルモットの場合、DMS 吸入時の落ち着きのない行動は一種の不安の表現と推測される。この行動は多少の個体差はみられるが条件づけの数回目以降全部のモルモットにみられており、DMS の臭いが呼吸困難発作を予期させた可能性がある。したがってモルモットの条件づけにもアナフィラキシー反応に伴う情動反応が必要であるのかも

しれない。この点については抗不安薬や不安を強くする薬物などを用いてさらに検討する必要がある。

抗原投与時や条件刺激時の血漿ヒスタミン値は Russell ら<sup>6)</sup>や Peeke ら<sup>7)</sup>の値と同程度であるが、生理食塩水吸入時の値はネンブタール麻酔下で採血した時の値<sup>8)</sup>（10～20ng/ml）よりやや高値であり、実験操作の過程で上昇した可能性がある。

条件づけによって上昇した血漿ヒスタミンがどの細胞に由来するかという点についてはまだ十分に明らかではない。しかし Bienenstock<sup>3)</sup>や MacQueen ら<sup>4)</sup>の研究によって、肥満細胞と神経終末とが形態学的かつ機能的に連絡があることが明らかにされていることや、両側の頸部迷走神経の電気刺激によって血漿ヒスタミン値が有意に上昇することから<sup>8)</sup>、DMS の臭いが大脳新皮質の嗅覚領及び大脳辺縁系に至り情動反応を引き起こして、視床下部から迷走神経の遠心路を経て末梢臓器に至り、そこで起こった反応が知覚神経末端の神経ペプチド類の遊離を起こして肥満細胞からヒスタミンが遊離した可能性がある。このことを確認するためには条件づけの成立した個体で迷走神経を物理的ないし化学的に遮断して臭いの吸入を行うなどの操作が必要であり、現在検討中である。

本研究の一部は文部省科学研究費一般C（課題番号02670353）の援助で行われた。

## 文 献

- 1) MacKenzie, J.N.: The production of “rose asthma” by an artificial rose. *Am. J. Med. Sci.* 91, 45-57, 1886.
- 2) Ader, R. and Cohen, N.: Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* 37, 333-340, 1975.
- 3) Bienenstock, J., Tomioka, M., Matsuda, H., Stead, R.H., Quinonez, G., et al.: The role of mast cells in inflammatory process: Evidence for nerve/mast cell interactions. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 82, 238-243, 1987.
- 4) MacQueen, G., Marshall, J., Perdue, M., Siegel, S. and Bienenstock, J.: Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* 243, 83-85, 1989.
- 5) 吾郷晋浩, 永田頌史, 石川俊男, 町沢理子, 汐田まどか: 内科領域における心身症の基礎的ならび

- に臨床的研究. 厚生省精神・神経疾患研究委託費：心身症の診断および治療予後に関する研究. 平成元年度研究報告書, pp.9-25, 1990.
- 6) Russel, M., Dark, K.A., Cummins, R.W., Ellman, G. and Callaway, E., et al.: Learned histamine release. *Science* 225, 733-734, 1984.
- 7) Peeke, H.V.S., Ellman, G., Dark, K., Salfi, M. and Reus, V.I.: Cortisol and behaviorally conditioned histamine release. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496, 583-587, 1987.
- 8) 永田頌史：ストレスと免疫・アレルギー. 自律神経 28, 338-343, 1991.

## CLASSICAL CONDITIONING OF ANAPHYLAXIS IN SENSITIZED GUINEA PIGS

Hiroki Okada, Shoji Nagata, Toshio Ishikawa and Yukihiro Ago

*Division of Psychosomatic Research, National Center of Neurology and Psychiatry*

An attempt of classical conditioning of anaphylaxis by odor was carried out, using actively sensitized guinea pigs with an inhalation of ovalbumin (OA). One month after sensitization, animals were divided into the conditioned group; group C, and the unconditioned group; group U, consisted of 6 animals, respectively. Dimethylsulfide (DMS: sulfur odor), was inhaled in group C as a conditioned stimulus with OA which is an unconditioned stimulus, while only OA was inhaled in group U. Four days after these procedures, saline was inhaled in group C and DMS was solely inhaled in group U in order to equalize the total inhaled dose of OA and DMS in both groups. These sessions were repeated once a week for seven weeks. After final sessions, all animals were inhaled DMS, saline and OA separately, and blood samples were drawn after each inhalation to measure plasma histamine levels. After an inhalation of DMS only, plasma histamine levels of group C and U were  $47.5 \pm 9.7$  and  $25.7 \pm 1.2$  ng/ml, respectively. In group C, plasma histamine levels were  $32.9 \pm 4.7$  at the inhalation of saline and  $59.0 \pm 9.2$  ng/ml at OA inhalation. Plasma histamine level after an inhalation of DMS only was significantly higher in group C than that in group U ( $p < 0.05$ ). These results suggest that the conditional stimulus (DMS inhalation) may induce histamine release in the absence of any antigenic stimulus and support the evidence for mast cell-neuron interaction.

---