

主論文の要旨

Aqueous fraction of *Sauropus androgynus* might be responsible for bronchiolitis obliterans

〔 *Sauropus androgynus* の水溶性分画は閉塞性細気管支炎の発症に関与している可能性がある 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

橋本 泉

【背景及び目的】

閉塞性細気管支炎 (BO) は稀であるが致死性の疾患で、膠原病や B 細胞性悪性腫瘍、臓器移植後などさまざまな病態に合併することが知られている。呼吸細気管支を主座とする炎症により、末梢気道の不可逆的な線維化を伴う閉塞を来すが、その病態機序は明らかでない。1996年に台湾で、*Sauropus androgynus* (SA) の摂取による BO (SA-BO) の大量発症が報告された。SA は東南アジア原産の灌木で、その葉の粉末がダイエット食品として紹介されたことによるが、2003年に日本でも 9 症例の報告があり、我々も母娘発症の 2 症例を経験した。BO の炎症過程では、細気管支周囲のリンパ球やマクロファージの浸潤と、気道の不可逆的な線維化による粘膜下層と上皮の破壊が特徴的にみられる。サイトカインやケモカイン、血管増殖因子のような多くのメディエーターが、BO の進行に重要な役割を果たしているとの報告が多数あり、台湾の SA-BO 大量発症例では、健常者に比べて血清中の TNF- α が有意に高値であったと報告されている。

我々は、SA-BO の発症機序に TNF- α が重要な役割を果たしているという仮説を基に、SA に含有される BO 発症の原因物質の同定を試みるとともに、SA が気道細胞や炎症細胞に及ぼす影響を解析した。

【材料および方法】

実際に SA-BO 患者が摂取していた SA 乾燥粉末をジメチルスルホキシドに溶解した後、吸着膜フィルターで微生物やエンドトキシンの混入を排除して SA 溶液を作製した。また、溶媒抽出法により、SA を 4 つの分画に細分化した (Fig. 1)。最初にヘキササンで溶解抽出を行い、乾燥させたものを SA1、ヘキササンに溶解しなかった残渣を、同様にアセトン、メタノール、水の順に溶解抽出し、それぞれ SA2、SA3、SA4 とした。対照には我が国で広く安全に使用されている漢方薬である葛根湯を使用した。

細胞は、ヒト急性単球性白血病細胞株 (THP-1)、マウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7)、ヒト肺胞上皮細胞株 (A549)、マウス内皮細胞株 (MS1) 及びヒト末梢血単球、ヒト肺胞マクロファージを使用し SA あるいは SA の分画を添加して細胞培養を行い 24 時間後の培養上清中のサイトカイン/ケモカイン濃度を、ELISA 法により測定した。SA の細胞障害性は、MTT アッセイおよびアネキシン V と PI (プロピジウムイオゾド) の二重染色によるフローサイトメトリー分析を用いて解析した。

またマウスの異種気管移植片 BOS (BO syndrome) モデルを使用して SA の生体での作用を解析した。すなわち、BALB/c マウスから採取した気管片を C57BL/6 マウスの後頸部の皮下に移植して一定期間後に取り出し、内腔の閉塞性変化を組織学的に評価した。レシピエントマウス C57BL/6 に移植の 14 日前から SA4 を連日腹腔内に投与し、気管移植片に与える影響を検討した。気管内腔の閉塞率は、解析ソフト (Image J) を用いて算出した。データは平均と標準誤差で表記し、2 群間の比較はマンホイットニーの U 検定で評価し、多重比較はボンフェローニ法による補正を行い、P 値 0.05 未満を統計学的に有意と判定した。

【結果】

SA は、ヒト肺胞マクロファージ (Fig. 2a) および単球性白血病細胞株 (Fig. 2b) からの TNF α 産生を対照と比べて有意に増強した。溶媒抽出法による SA の分画の内、水溶性分画 (SA4) が、他の分画と比べてマクロファージからの TNF α 産生を有意に増強した (Fig. 3)。さらに SA4 はマクロファージから、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP-10)、インターロイキン 8 (IL-8)、CCL22 (MDC)、VEGF の産生を誘導した。また、SA4 は内皮細胞株 (MS1) の増生を有意に抑制したが、肺胞上皮細胞株 (A549) では抑制しなかった (Fig. 5A)。内皮細胞株に対する SA4 の増殖抑制効果は用量依存的であった (Fig. 5B)。また、SA4 は対照に比べて内皮細胞のアポトーシスを有意に高い頻度で誘導した (Fig. 5C, D)。

マウスの異種気管移植片 B0 モデルにおいて SA4 を投与すると移植後 14 日で対照群に比べて有意に内腔の線維化が増強していた (Fig. 6)。

健常被験者由来の末梢血単球からの SA4 刺激による TNF α の産生には、明らかな個体差が認められ、2 名の SA-B0 患者由来の末梢血単球では SA4 刺激による TNF α の産生は高値を示した (Fig. 7)。

【考察】

本研究において、我々は SA の水溶性分画が単球系細胞から TNF α を含む炎症性メディエーターの産生を誘導することを示した。この結果は SA-B0 の発症機序に SA の水溶性分画により誘導されたメディエーターが重要な役割を果たしている可能性を示唆している。さらに本研究では SA の水溶性分画が内皮細胞のアポトーシスを誘導することが示された。これは SA-B0 の病理で観察される閉塞性動脈症 (線維筋性内膜硬化症) の成立に関与している可能性が考えられる。

これまで、SA を動物に投与して実験的に B0 を発症させ得た報告はない。そこで我々は、マウスの移植 BOS モデルを用いて、SA の水溶性分画が B0 所見を増強することを証明した。一方、SA を摂取していた人が必ずしも皆 B0 を発症するわけではなく、我々の研究でも、SA によりヒト末梢血単球から産生される TNF α の量には個体差があることが示された。また SA が主にダイエット目的で摂取されていたこともあるが、SA-B0 の報告症例はほとんどが女性である。これらの事実からは、SA-B0 の発症には、慢性炎症の背景や遺伝子的素因、性別など他の発症因子が関与していると推測される。今後、SA に対する反応性における個体差の正確な機序を解明する必要がある。

本研究には、いくつかの限界がある。第一に、我々は SA の水溶性分画が最も重要な分画であることを示したが、SA-B0 の原因物質を特定することはできていない。この分画は重金属とその塩化物を含んでおり、我々が使用した SA 粉末は、カドミウムが相対的に豊富であることが判明しているため、カドミウムと SA-B0 発症との関連を明らかにすることが、今後の課題の一つである。また、本研究では、SA により誘導された様々な炎症性メディエーターが、生体内で細気管支の閉塞を導く機序も不明のままである。今後の研究では、マウスモデルでの炎症性メディエーターと B0 発症の機序解明に加えてヒトの移植後合併 BOS における炎症性因子の役割も解析したいと考えている。

【結語】

SA の水溶性分画は、マクロファージの炎症、内皮細胞のアポトーシス、マウスの BOS モデルにおける気管支閉塞の増強を誘導する。この分画が、未知の因子とともに SA-B0 の発症に関与していると推測される。