

和漢薬による免疫の賦活化に関する研究

－自然免疫系刺激およびタバコ煙によるマウス気道炎症モデルの確立と漢方方剤の影響－

申請代表者	田中 宏幸	岐阜薬科大学・機能分子学大講座・薬理学研究室	准教授
所外共同研究者	樋口 純一	岐阜薬科大学・機能分子学大講座・薬理学研究室	修士2年
〃	升田 雄士	岐阜薬科大学・機能分子学大講座・薬理学研究室	修士1年
所内共同研究者	櫻井 宏明	病態制御部門 病態生化学分野	准教授

ウイルス様刺激による気道炎症に及ぼす麻黄湯の影響

■背景・目的

麻黄湯は、4種類の生薬からなる漢方で、抗ウイルス作用や解熱作用を有し、ウイルス感染、風邪などの呼吸器疾患の治療薬として広く用いられているが、その作用機序については不明な点が多い。

上気道および下気道におけるウイルス感染では、気道上皮細胞を標的細胞とした後、細胞内で複製および増殖が生じ、その後、二本鎖 RNA が細胞内あるいは一部細胞外に放出され、複数の toll 様受容体 (toll-like receptors: TLRs) を介して宿主に認識され、生体防御反応が誘導されると考えられている¹⁾。一方、近年、合成二本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) が TLR3 やその他の核酸認識受容体を介し I 型 IFN の産生を誘導することが明らかとなった²⁾。

そこで、本研究では poly (I:C) を吸入麻酔下にてマウスの気管内に注入し、その後に認められる気道炎症の経時的な変化および poly (I:C) の用量反応について検討したところ、投与 24-48 時間後に炎症性細胞数のピークが認められ、その気道炎症は poly (I:C) の用量に依存した反応であることを明らかにした (成績略)。また、ほぼ同様の気道炎症が他の TLRs 刺激によっても観察されることも確認した (成績略)。そこで、poly (I:C) による気道炎症に及ぼす麻黄湯の影響を検討した。

■結果・考察

(1) 実験材料および方法

6 週齢雄性 BALB/c マウスを日本 SLC 株式会社 (浜松) より購入し、7 週齢まで予備飼育した後、実験に用いた。動物は、温度 22 ± 1 °C、湿度 60 ± 5 % の恒温飼育室で、自由給水下に固形飼料 (ラボ MR ストック, 日本農産, 横浜) を用いて飼育した。Poly (I:C) 投与は Wakahara et al. の方法³⁾ に従って行った。すなわち、halothane にてマウスを吸入麻酔したのちに、PBS に溶解した poly (I:C) 0.1 ml を、各実験プロトコールに示すスケジュールの通り気管内に投与した。麻黄湯 (ツムラ) は CMC-Na 溶液に懸濁した後、7 日間連日経口投与し、poly (I:C) 投与日は poly (I:C) 投与 1 時間前に経口投与した (Fig. 1)。Poly (I:C) 投与 24 時間後に、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) の採取を Tanaka et al の方法⁴⁾ に従って行った。

Experimental protocol

Animals: 8 weeks old male BALB/c mice

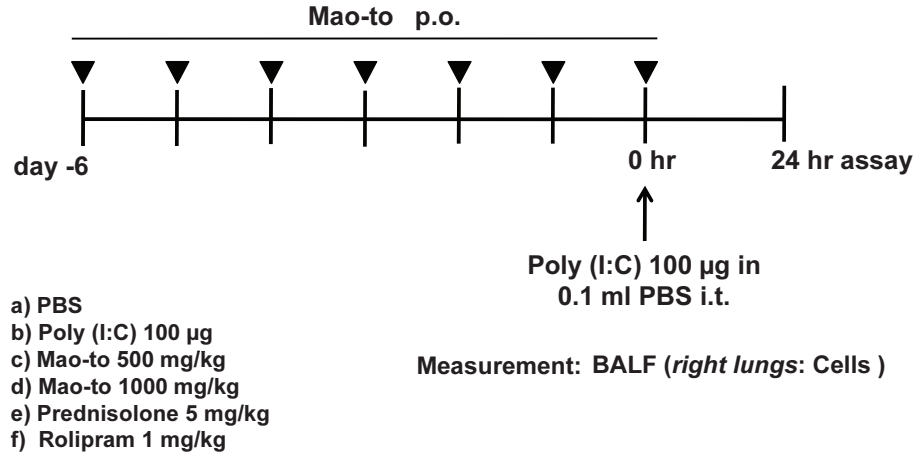


Fig. 1 Experimental protocol for poly (I:C)-induced airway inflammation in mice. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; i.t., intratracheal injection; PBS, phosphate-buffered saline; p.o., per. os; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid.

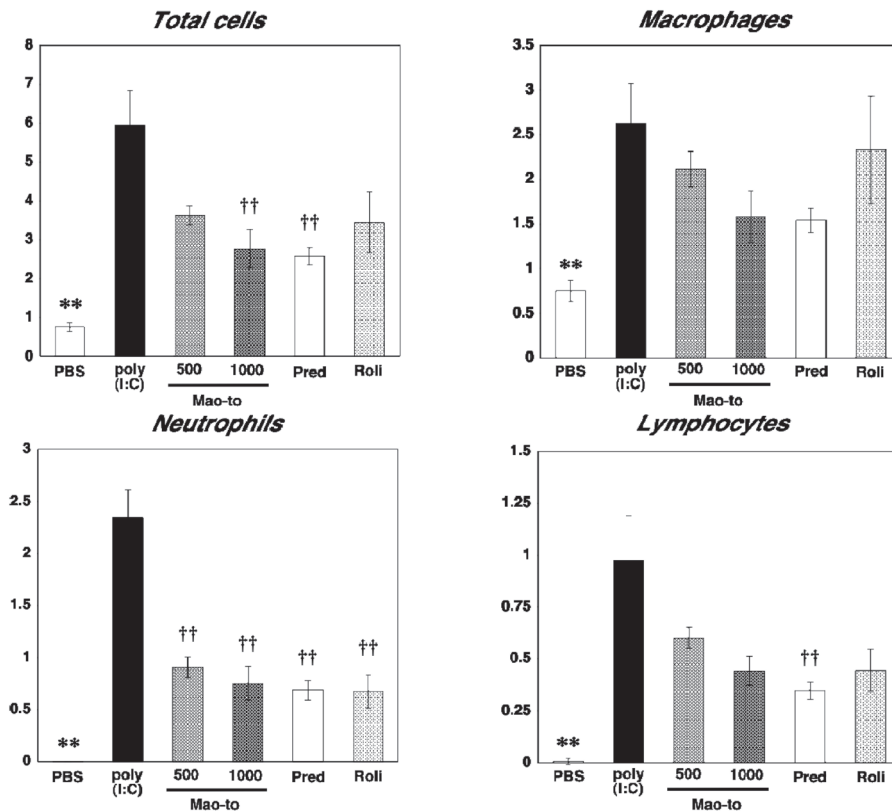


Fig. 2 Effect of Mao-to on polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C))-induced leukocyte infiltrates in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 24 hours after the intratracheal instillation in BALB/c mice. Mao-to was administered orally 1 hours before poly (I:C) instillation. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 6 mice. PBS, phosphate-buffered saline; Pred, Prednisolone; Roli, rolipram. ** $p < 0.01$, (vs poly (I:C): Student's *t*-test or Mann-Whitney's *U*-test). †† $p < 0.01$ (vs poly (I:C): Dunnett's multiple comparison test).

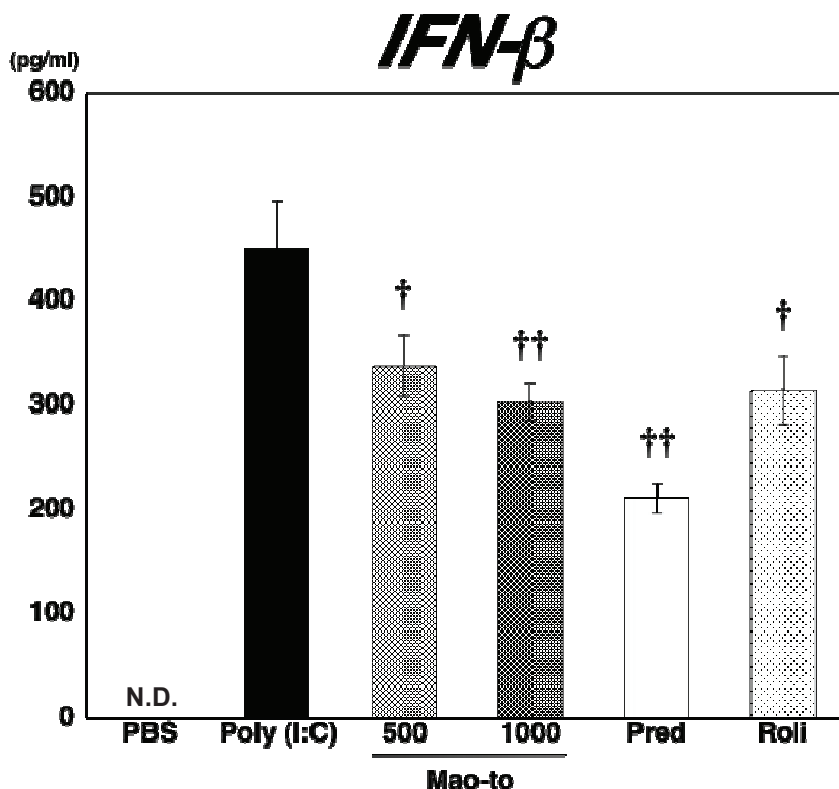


Fig. 3 Effect of Mao-to on IFN- β production in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after poly (I:C) challenge in BALB/c mice. Mao-to was administered orally 7 times as shown in Fig. 1. Twenty-four hours after the challenge, bronchoalveolar lavage was carried out, and cytokines in BALF were measured. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 6 mice. PBS, phosphate-buffered saline; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; Pred, Prednisolone; Roli, rolipram. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ (vs poly (I:C); Dunnett's multiple comparison test).

(2) 結果

1) BALF 中の炎症性細胞数

PBS 投与群に比し poly (I:C) 投与群では、BALF 中総細胞数、マクロファージ数、好中球数、およびリンパ球数の有意な増加が認められた。これに対し、麻黄湯は poly (I:C) による BALF 中総細胞数および好中球数の増加を用量依存的かつ有意に抑制した (Fig. 2)。

2) BALF 中の IFN- β 産生量

PBS 投与群に比し poly (I:C) 投与群では、BALF 中 IFN- β 産生量の有意な増加が観察された。これに対し、麻黄湯は poly (I:C) による BALF 中 IFN- β 産生量の増加を用量依存的かつ有意に抑制した (Fig. 3)。

(3) 考察

本研究では、二本鎖 RNA 誘発マウス気道炎症に及ぼす麻黄湯の影響を検討した。その結果、麻黄湯は poly (I:C) 投与によるマウス気道炎症を用量依存的かつ有意に抑制した。作用機序の詳細については今後の検討課題であるが、本実験成績より麻黄湯は I 型 IFN である IFN- β あるいは他の炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、poly (I:C) 誘発好中球性気道炎症を抑制する可能性が示唆された。一方、薬効評価と平行して、poly (I:C) の認識受容体を明らかにするため、TLR3 や

melanoma-differentiation associated gene 5 (MDA-5) 遺伝子欠損マウスを用いて検討を行ったところ、いずれのマウスにおいても poly (I:C) 誘発による BALF 中炎症性細胞の浸潤は野生型マウスとほぼ同程度であった(成績略)ことから、少なくとも本モデルにおける poly (I:C) 誘発気道炎症にはこれらの受容体以外の認識機構が関与している可能性が示唆された。今後、麻黄湯の抑制機序を解明する上で、まず、本モデルの poly (I:C) による気道炎症のメカニズムを明らかにするとともに、他の TLRs 刺激による気道炎症に及ぼす麻黄湯の影響を検討することにより、ウイルス刺激による炎症に対する麻黄湯の特異性を検討していく必要がある。

タバコ煙によるマウス気道炎症モデルの確立

■背景・目的

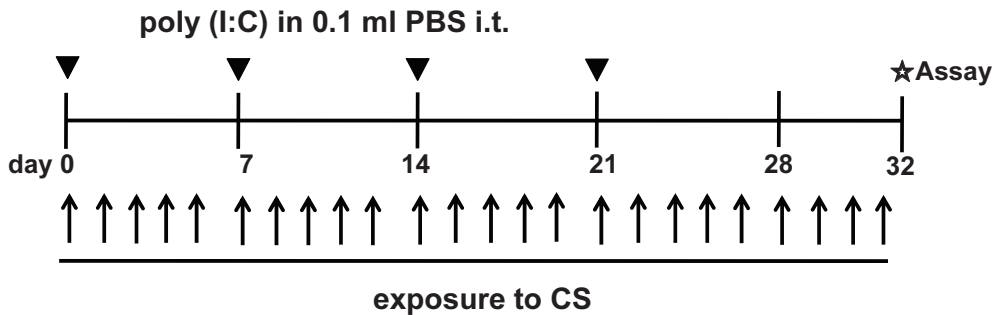
慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) とは、日本呼吸器学会 COPD ガイドラインにおいて、「タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じた肺の炎症性疾患である。呼吸機能検査で正常に復すことのない気流閉塞を示す。気流閉塞は末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に作用することにより起こり、進行性である。臨床的には徐々に生じる体動時の呼吸困難や慢性の咳、痰を特徴とする。」⁵⁾と定義された呼吸器疾患である。

COPD は、臨床像が数十年を経て顕在化する疾患であり、また臨床は多種多様な遺伝的素因を持つ人々の集合であるため、その病因や病態を詳細に解析することは非常に困難である。そのため、臨床病態を反映した動物モデルを用いることは、治療方法の確立および病態の解明に有用である。COPD 病態モデルの中で、最も一般的でかつ臨床的な影響を反映しているとされるのがタバコ煙曝露誘発マウス COPD モデルである。これは、マウスに約 6 ヶ月に亘ってタバコ煙を曝露させるモデルであり、ヒトの COPD に近い病態として、肺気腫、末梢気道のリモデリングおよび肺高血圧症が引き起こされる⁶⁾。しかし、このモデルの問題点として、長期に亘るタバコ煙曝露が必要であること、タバコ煙曝露装置を必要とし、大量のタバコなど費用がかかること、またその病態が緩和であることなどが問題点として挙げられる⁶⁾。

そこで本研究では、マウスを用いた実験系により、既報の COPD モデルに比し短期間の COPD モデルの確立を試みた。まず、臨床的な影響を反映しているとされるタバコ煙曝露による実験系において、合成二本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) を用い、ウイルス感染様刺激を加えることにより、より短期間のタバコ煙曝露誘発マウス COPD モデルの確立を試みた。また、本モデルが臨床病態を反映しているか明らかにする目的で、現在、種々の COPD 病態モデルに対して有効性が報告されている代表的な PDE4 阻害薬である rolipram ならびに有効性がないと報告されている prednisolone を用い、その影響を評価した。

Experimental protocol

Animals: 7 weeks old male C57BL/6 mice



Experimental groups

- a) Air
- b) Air + poly (I:C) 10 μ g
- c) Air + poly (I:C) 25 μ g
- d) Air + poly (I:C) 50 μ g
- e) 4% CS
- f) 4% CS + poly (I:C) 10 μ g
- g) 4% CS + poly (I:C) 25 μ g
- h) 4% CS + poly (I:C) 50 μ g

★ Measurement: BALF (right lungs: Cells)
Histological analysis (left lungs)

Fig. 4 Experimental protocol for cigarette smoke (CS)-induced airway inflammation in mice
BALF, bronchoalveolar lavage fluid; i.t. intratracheal injection; PBS, phosphate-buffered saline;
poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid.

■結果・考察

(1) 実験材料および方法

1) 実験動物および試薬

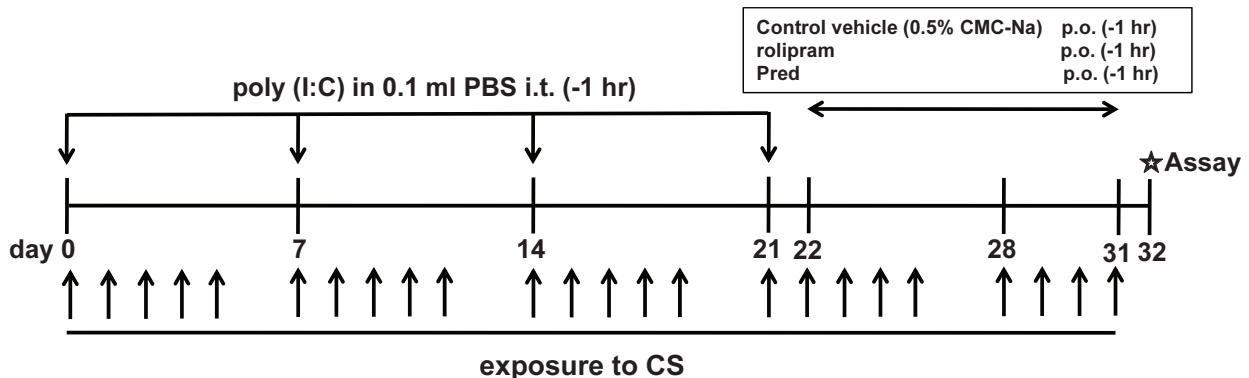
6週齢雄性 C57BL/6 マウスを日本 SLC 株式会社 (浜松) より購入し、7週齢まで予備飼育した後、実験に用いた。動物は、温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ の恒温飼育室で、自由給水下に固形飼料 (ラボ MR ストック、日本農産、横浜) を用いて飼育した。Poly (I:C) (InvivoGen, San Diego, CA, USA)、Diff Quik 染色液 (シスメックス、兵庫)、Peace (タール 28 mg, ニコチン 2.3 mg, 日本たばこ産業株式会社、東京)、rolipram (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および prednisolone 21-acetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、それぞれ市販品を購入した。なお、poly (I:C) は PBS に溶解した後に、detoxi gel endotoxin removing gel (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) を用いてエンドトキシンを除去した。

2) Poly (I:C) の投与ならびにタバコ煙曝露

Poly (I:C) 投与は Wakahara et al. の方法³⁾に従って行った。すなわち、halothane にてマウスを吸入麻酔したのちに、PBS に溶解した poly (I:C) を day 0, day 7, day 14 および day 21 にタバコ煙曝露の1時間前に気管内投与した。また、タバコ煙曝露は、喫煙曝露装置 INH06-CIGR01A (M・I・P・S, 大阪) から発生させたタバコ主流煙を曝露した。すなわち、4%タバコ主流煙を5週間、週5日間の割合で30分間マウスに全身曝露した (Fig. 4)。Rolipram の薬効評価の検討では、Fig. 1 と

Experimental protocol

Animals: 7 weeks old male C57BL/6 mice



Experimental groups

- Air
- 4% CS
- 4% CS + 0.1 mg/kg rolipram
- 4% CS + 1.0 mg/kg rolipram
- 4% CS + 5.0 mg/kg Pred
- 4% CS + poly (I:C) 50 μ g
- 4% CS + poly (I:C) 50 μ g + 0.1 mg/kg rolipram
- 4% CS + poly (I:C) 50 μ g + 1.0 mg/kg rolipram
- 4% CS + poly (I:C) 50 μ g + 5.0 mg/kg Pred

★ Measurement: BALF (right lungs: Cells)
Histological analysis (left lungs)

Fig. 5 Experimental protocol for cigarette smoke (CS)-induced airway inflammation in mice
BALF, bronchoalveolar lavage fluid; i.t. intratracheal injection; PBS, phosphate-buffered saline; p.o., per os; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; Pred, prednisolone 21-acetate.

同様のスケジュールで poly (I:C) の気管内投与ならびにタバコ煙曝露を行った (Fig. 5)。

3) 薬物投与

Rolipram は、投与量として 0.1 および 1.0mg/kg となるように、0.5% CMC-Na 溶液に懸濁して調整した。対照薬として用いた prednisolone は 5.0mg/kg となるように 0.5% CMC-Na 溶液で懸濁した。Rolipram および prednisolone は、それぞれ day22 から day31 まで連日経口投与した。タバコ煙曝露日には、タバコ煙曝露の 1 時間前に経口投与した (Fig.5)。

4) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取

左肺を結紮し、右肺から BALF の採取を Tanaka et al. の方法⁴⁾に従って行った。すなわち、pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.) にて麻酔したのちに、装着した気管カニューレを介して 0.1% BSA, 0.05 mM EDTA-2Na 含有 Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含 PBS (-) 液 (以下, PBS 溶液) 0.5 ml を気道内に注入し、その後、吸引する操作を 4 回繰り返して洗浄した。この洗浄を 3 回行い、BALF を採取した。採取した BALF は直ちに 4 $^{\circ}$ C で 80 \times g, 10 分間遠心し、上清は -30 $^{\circ}$ C にて凍結保存した。得られた細胞は 0.5 ml の PBS 溶液に浮遊させ、この細胞浮遊液 50 μ l に 150 μ l の Turk 液を加えて染色し、BALF 中の総白血球数を顕微鏡下に測定した。次いで、Cytospin II (Shandon, Cheshire, England) を用いて、室温にて 15 \times g で 4 分間遠心し、塗沫標本を作製した。この標本を Diff Quik 染色し、マクロファージ、好中球、好酸球およびリンパ球を顕微鏡下に 300 個カウ

トした。得られた成績は、BALF中に存在する総細胞数として表した。

5) 病理組織学的解析ならびに組織評価

・組織切片の作製

BALF採取後、左肺を摘出し10%中性ホルマリン緩衝液にて固定した。その後、パラフィン処理し、薄切切片を作製してhematoxylin & eosin (H.E.)染色を行った。なお、組織切片の作製は、ボゾリサーチセンター(つくば研究所、茨城)に依頼した。

・平均肺胞径の評価

平均肺胞径(mean linear intercepts: MLI)の評価は、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-9000(キーエンス、大阪)を用いて測定した。すなわち、コンピュータ画面上にH.E.染色した肺切片組織像を取り込み、画面上に2本の長さ L_T の対角線を重ね、肺胞壁と対角線の交点の数 I_w を計測し、 $2L_T/I_w$ としてMLIを求めた。1標本あたり10ヶ所以上計測し、平均値を算出した。最後に、各マウスの平均値から群の平均値を算出した。

6) 統計学的解析

成績は、平均値±標準誤差で示した。独立2標本間の有意差検定は、F検定により分散の均一性を検定し、等分散の場合はStudent's *t*-testを、不等分散の場合はMann-Whitney's *U*-testを用いて行った。危険率は5%未満をもって有意差ありとした。

多群間の有意差検定は、Bartlett法により等分散性の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合はnon-parametric型Dunnnettの多重比較検定により平均値の比較を行った。有意差が認められなかった場合はparametric型Dunnnettの多重比較検定により平均値の比較を行った。危険率は5%未満をもって有意差ありとした。

(2) 結果

1) タバコ煙曝露誘発マウスCOPDモデルに対するpoly(I:C)併用投与の検討

・BALF中の炎症性細胞数

空気曝露群に比しタバコ煙曝露群では、BALF中総白血球数、マクロファージ数および好中球数の有意な増加が認められた。また、空気曝露およびタバコ煙曝露にpoly(I:C)を併用投与した群において、poly(I:C)の用量に依存したBALF中総白血球数、マクロファージ数、好中球数およびリンパ球数の増加が認められ、特にタバコ煙曝露にpoly(I:C)50 μ gを併用投与した群において、有意なBALF中総白血球数、マクロファージ数、好中球数およびリンパ球数の増加が認められた(Fig. 6)。

・病理組織学的検討および組織評価

空気曝露群に比しタバコ煙曝露群では、有意なMLIの増加が認められた。また、空気曝露およびタバコ煙曝露にpoly(I:C)を併用投与した群において、poly(I:C)の用量に依存したMLIの有意な増加が認められ、特にタバコ煙曝露にpoly(I:C)50 μ gを併用投与した群において、顕著なMLIの増加が認められた(Fig. 7)。

Number of leukocytes in BALF

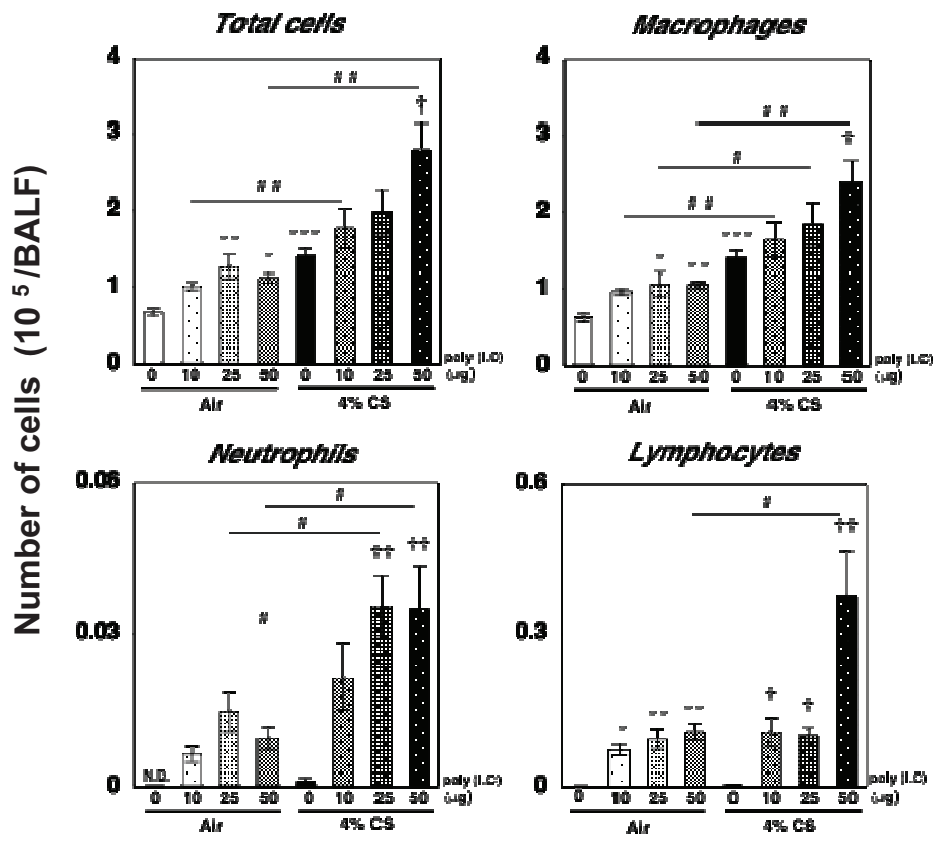


Fig. 6 Number of leukocytes accumulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 24 hours after cigarette smoke (CS) exposure of C57BL/6 mice. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 8-9 mice. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; CS, cigarette smoke; N.D., not detected; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid. *** $p < 0.001$ (vs Air: Student's *t*-test, Mann-Whitney's *U*-test or Dunnett's multiple comparison test) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ (vs 4% CS : Dunnett's multiple comparison test) # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (vs poly (I:C) : Student's *t*-test or Mann-Whitney's *U*-test)

Histological analysis

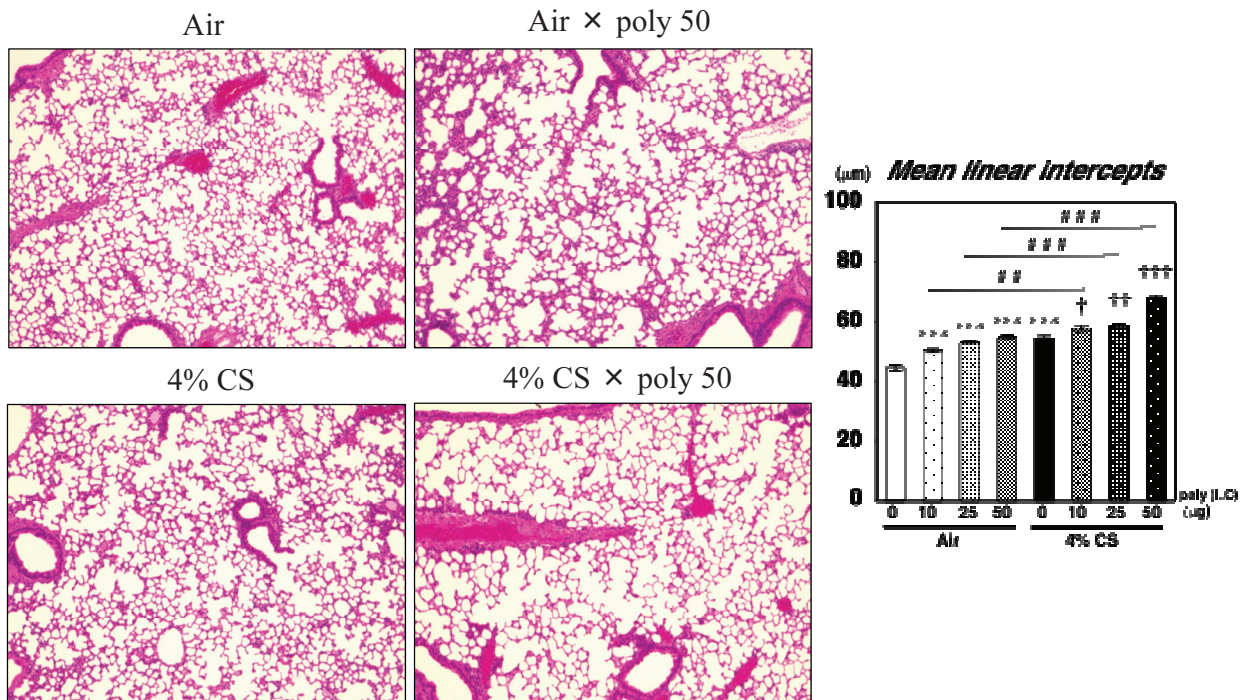


Fig. 7 Histological analysis for mean linear intercepts 24 hours after cigarette smoke (CS) exposure of C57BL/6 mice. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 6-8 mice. CS, cigarette smoke; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs Air: Student's *t*-test, Mann-Whitney's *U*-test or Dunnett's multiple comparison test) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ (vs 4% CS : Dunnett's multiple comparison test) ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (vs poly (I:C) : Student's *t*-test or Mann-Whitney's *U*-test)

Number of leukocytes in BALF

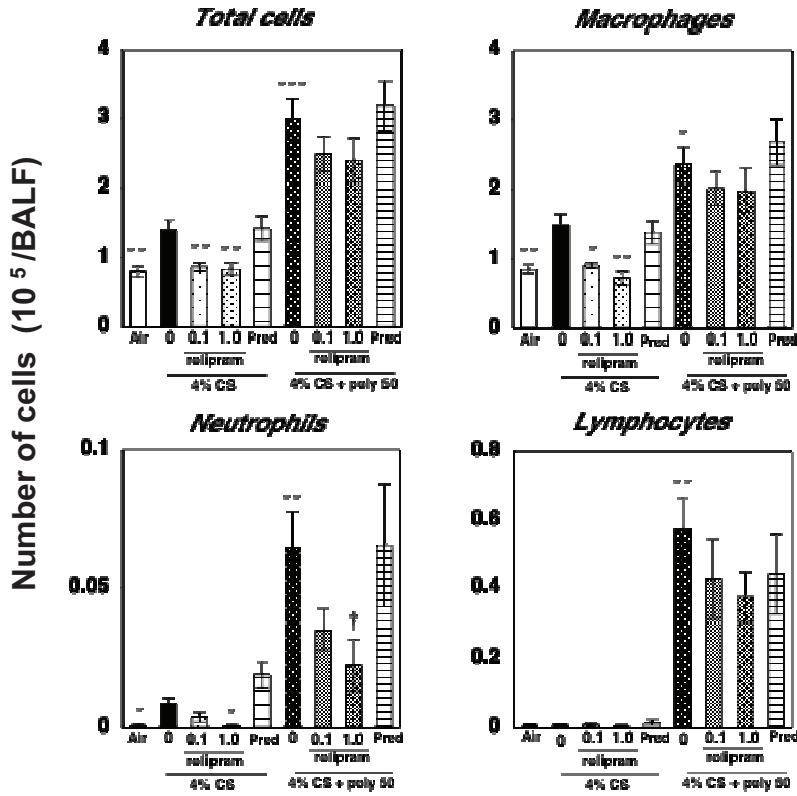


Fig. 8 Number of leukocytes accumulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 24 hours after cigarette smoke (CS) exposure of C57BL/6 mice. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 5-7 mice. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; CS, cigarette smoke; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; Pred, prednisolone 21-acetate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs 4% CS: Student's *t*-test, Mann-Whitney's *U*-test or Dunnett's multiple comparison test) † $p < 0.05$ (vs 4% CS \times poly 50: Dunnett's multiple comparison test)

Histological analysis

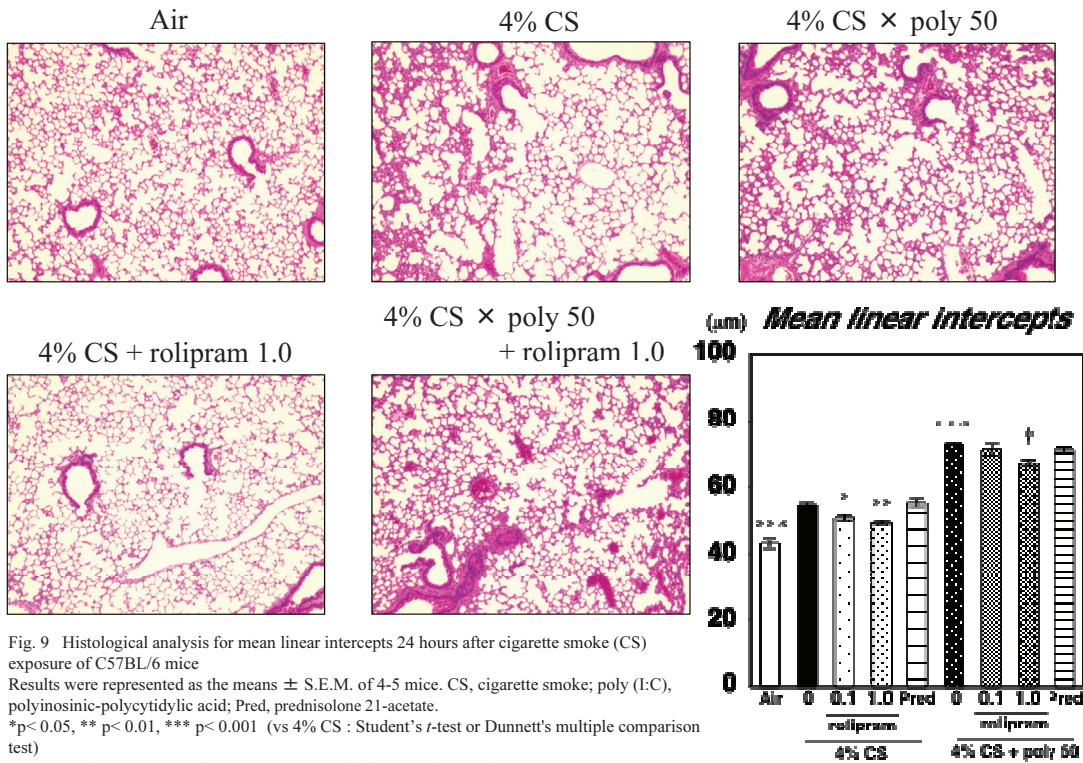


Fig. 9 Histological analysis for mean linear intercepts 24 hours after cigarette smoke (CS) exposure of C57BL/6 mice. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 4-5 mice. CS, cigarette smoke; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; Pred, prednisolone 21-acetate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs 4% CS: Student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test) †† $p < 0.01$ (vs 4% CS \times poly 50: Dunnett's multiple comparison test)

2) タバコ煙曝露誘発マウス COPD モデルに対する poly (I:C) 併用投与における PDE4 阻害薬の影響 ・BALF 中の炎症性細胞数

空気曝露群に比しタバコ煙曝露群では、BALF 中総白血球数、マクロファージ数および好中球数の有意な増加が認められた。また、タバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与した群において、BALF 中総白血球数、マクロファージ数、好中球数およびリンパ球数の有意な増加が認められた。これに対し rolipram は、タバコ煙曝露による BALF 中総白血球数、マクロファージ数および好中球数の増加を用量依存的かつ有意に抑制した。また、タバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与した群においては、BALF 中好中球数の増加を用量依存的かつ有意に抑制した。一方、prednisolone はタバコ煙曝露あるいはタバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与した際の BALF 中炎症性細胞数の増加に対し影響を及ぼさなかった (Fig. 8)。

・病理組織学的検討および組織評価

空気曝露群に比しタバコ煙曝露群では、MLI の有意な増加が認められ、またタバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与した群において、タバコ煙曝露群に比し MLI の有意な増加が認められた。これに対し rolipram は、タバコ煙曝露およびタバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与した群において、MLI の増加を用量依存的かつ有意に抑制した。一方、prednisolone はタバコ煙曝露あるいはタバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与した際の MLI の増加に影響を及ぼさなかった (Fig. 9)。

(3) 考察

本研究では、タバコ煙曝露誘発マウス COPD モデルにおけるウイルス感染の影響を明らかにするため、タバコ煙曝露誘発マウス COPD モデルに poly (I:C) を投与し、その意義を検討した。その結果、タバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与することにより、タバコ煙曝露により生じた気道炎症の増悪および肺胞の破壊の増大が認められ、また、タバコ煙曝露に poly (I:C) を先行投与することによってもタバコ煙曝露により生じた気道炎症の増悪および肺胞の破壊の増大が認められた (成績略)。次いで、本モデルが臨床病態を反映したモデルであるか否かを明らかにするため、COPD 病態モデルにおいて有効性が報告されている PDE4 阻害薬である rolipram ならびに COPD 病態に影響を及ぼさないことが知られているコルチコステロイドを用いて、本モデルに及ぼす影響を検討した。その結果 rolipram は、タバコ煙曝露ならびにタバコ煙曝露に poly (I:C) を併用投与したことにより生ずる COPD 様病態の形成を用量依存的に抑制したが、prednisolone は本 COPD 様病態の形成に影響を及ぼさなかった。以上の成績より、本モデルは臨床病態を反映したモデルであり、COPD 病態の早期形成にウイルス感染が関与すること可能性が推察された。

今後、本モデルを用いて臨床において COPD 治療に用いられることのある漢方薬の薬効評価を行い、作用機序の解明などに役立てていきたい。

■参考文献

- 1.Kawai T, Akira S.The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.Nat Immunol 2010;11:373-84.
- 2.Kawai T, Akira S.Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling.Ann N Y Acad Sci 2008;1143:1-20.
- 3.Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. Eur J Pharmacol 2008; 578: 87-96.
- 4.Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S, Komai M, Nagao K, Takahashi Y, Nagai H. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. Inflamm. Res. 2001; 50: 616-624.
5. 社団法人日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第3版作成委員会 . 「COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン第3版」. メディカルレビュー社 . 2009.
- 6.Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; 295: 1-15.