



Effects of suplatast tosilate on cytokine profile of bronchoalveolar cells in allergic inflammation of the lung

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松本, 一彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1662

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 385号	学位授与年月日	平成16年 2月20日
氏 名	松 本 一 彦		
論文題目	Effects of suplatast tosilate on cytokine profile of bronchoalveolar cells in allergic inflammation of the lung (肺のアレルギー性炎症におけるトシル酸スプラタストの気管支肺胞細胞中のサイトカインプロファイルに与える影響)		

博士 (医学) 松 本 一 彦

論文題目

Effects of suplatast tosilate on cytokine profile of bronchoalveolar cells in allergic inflammation of the lung

(肺のアレルギー性炎症におけるトシル酸スプラタストの気管支肺胞細胞中のサイトカインプロファイルに与える影響)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

気管支喘息は気道の慢性炎症であり、その炎症のメカニズムはIL-4, IL-5などのサイトカインを発現する Th2 タイプの CD4 陽性のヘルパーT細胞が優位な免疫反応である。

一方、種々のジメチルスルホニウム化合物の免疫薬理学的検討により見出された、トシル酸スプラタスト(以下IPD)は *in vitro* においてTh2 サイトカイン(IL-4, IL-5)を選択的に抑制し、その結果好酸球や IgE 産生を抑える薬であり、新しい作用機序を持った抗アレルギー剤として喘息の治療に使われている。しかしながら、IPDのサイトカイン産生に及ぼす影響についての *in vivo* における研究は数少ない。この研究では Brown Norway (以下 BN) ラットの気管支喘息モデルを用い、IPD の気管支粘膜への好酸球浸潤と、気管支肺胞洗浄(以下 BAL)細胞中のサイトカイン mRNA発現の影響について検討した。

〔材料ならびに方法〕

卵白アルブミン(以下 OA)にて能動的に感作した BNラット(8週齢,雄)にIPD50mg/kg を15日間連続で腹腔内投与し、15日目に OA を吸入暴露させて気道炎症を惹起し気管支喘息モデルを作った。対照群には生理食塩水1ml/kg を同様に投与し、以下について検討をおこなった。

1) BAL細胞中の細胞分画測定

抗原吸入48時間後にHank's 緩衝液(以下HBSS)でBAL を施行し、得られた BAL液を4℃, 200xG で10分間遠心し、BAL細胞を採取した。BAL細胞を1mlの HBSS で再浮遊させ、細胞遠心法としてサイトスピン法を用い、4℃, 25xGで5分間遠心し、メイーギムザ染色にてスライド標本を作製した。染色標本は400倍率の光学顕微鏡下で各標本とも300個以上の細胞を数え、細胞分画の算定をした。

2) 組織学的検討

BAL後の肺組織を10%ホルマリン固定後パラフィン包埋して組織切片を作成した。核染色のために組織切片をヘマトキシリン-エオジン(HE)液で染色した後、組織切片の顕微鏡写真に NIHイメージを適応してデジタル画像処理をし、気管支粘膜下に浸潤する好酸球数を測定した。

3) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によるサイトカインの測定

チオシアン酸グアニジン-フェノールクロロホルム(AGPC)法によって、抗原吸入24時間後の BAL 細胞より RNA を抽出し、逆転写酵素とランダムヘキサマーでcDNAを合成した。逆転写反応は70℃, 5分で実施した。

GenBank ファイルよりラットのIL-4, IL-5, IFN- γ および β -actinの cDNA の塩基配列をもとにプライマーを設計、合成した。

各サイトカイン特異的プライマーと Taq DNA合成酵素により cDNAの一部を増幅した。PCR反応は熱変性95°C, 1分、伸長反応72°C, 2分、サイクル数は26~40で実施した。

PCR 生成物は6% アガロースゲル電気泳動により特異的フラグメントを検出し、デンシトグラフィソフトウェアを用いて電気泳動像のデジタル画像から各サイトカインの mRNA を半定量的に測定した。

【結果】

- 1) IPD投与によりBAL細胞中の総細胞数は生食投与群に比較して有意に減少した(73.0×10^5 個 vs 18.8×10^5 個: $P < 0.01$)。BAL細胞中の好酸球数も同様にIPD投与により有意に減少した(48.9×10^5 個 vs 7.8×10^5 個: $P < 0.01$)。
- 2) 気管支粘膜下組織中の好酸球はIPD投与により 7.1×10^2 個/ mm^2 から 2.8×10^2 個/ mm^2 へと有意($P < 0.01$)に減少した。
- 3) IPD投与によりIL-4, IL-5のmRNAの発現は、生食投与群に比べ有意($P < 0.05$)に抑制された(IL-4/ β -actin: 1.32 vs 0.33, IL-5/ β -actin: 0.59 vs 0.31)。一方、IFN- γ の発現は両群で有意な変化が認められなかった(IFN- γ / β -actin: 0.63 vs 0.80)。

【考察および結論】

本モデルにおいてIPDはTh2サイトカインであるIL-4, IL-5の発現を抑制し、好酸球の産生を抑える一方Th1サイトカインであるIFN- γ へは影響を及ぼさなかった。

以上よりIPDは肺局所におけるTh2サイトカイン産生を選択的に阻害することによって気管支喘息におけるアレルギー性気道炎症を抑制することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

気管支喘息は気道の慢性炎症であり、そのメカニズムにはIL-4, IL-5などのサイトカインを発現するTh2細胞による免疫反応が関与しているといわれている。一方、種々のジメチルスルホニウム化合物の免疫薬理学的検討により見出されたトシル酸スプラタスト(IPD)は*in vitro*においてIL-4, IL-5の産生を選択的に抑制し、その結果好酸球やIgE産生を抑制する作用を有しており、新規作用メカニズムを有した抗アレルギー剤として喘息の治療に使われている。しかしながら、IPDのサイトカイン産生に及ぼす影響について、*in vivo*における研究は数少ない。そこで、申請者はラット気管支喘息モデルを用い、IPDの気管支粘膜への好酸球浸潤と、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞におけるサイトカインmRNA発現への影響について検討した。

以下の方法を用いた。

卵白アルブミン(OA)にて能動的に感作したBrown Norway(BN)ラットにIPD 50mg/kgを15日間連続で腹腔内投与し、15日目にOAを吸入暴露させて気道炎症を惹起し気管支喘息モデルを作った。対照群には生理食塩水 1 ml/kg を同様に投与し、以下について検討をおこなった。

抗原吸入48時間後にHank's 緩衝液でBALを施行し、BALFの細胞分画を算出した。

BAL後の肺組織を10%ホルマリン固定後パラフィン包埋して組織切片を作成し、気管支粘膜下

に浸潤する好酸球数を測定した。

抗原吸入24時間後のBALFの細胞におけるIL-4、IL-5、IFN- γ mRNAの発現をRT-PCR法にて半定量的に測定した。

得られた結果は以下の通りである。

- 1) IPD投与によりBALFの総細胞数および好酸球数は生食投与群に比較して有意に減少した。
- 2) 気管支粘膜下組織中の好酸球はIPD投与により有意に減少した。
- 3) IPD投与によりIL-4、IL-5のmRNAの発現は、生食投与群に比べ有意に抑制されたが、IFN- γ の発現は両群で有意な変化が認められなかった。

審査委員会では、IPDが *in vivo* において肺局所におけるIL-4、IL-5の発現を選択的に阻害することを明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) スプラタストのIL-4、IL-5の産生抑制のメカニズムについて
- 2) スプラタストの薬物動態について
- 3) BNラットについて
- 4) 喘息モデルについて
- 5) 卵白アルブミンによる喘息モデルを用いた理由について
- 6) スプラタストの臨床成績について
- 7) スプラタストの投与量の根拠について
- 8) スプラタストによるBALFの細胞数の減少のメカニズムについて
- 9) スプラタストのケモカイン産生抑制について
- 10) スプラタストの吸入薬としての可能性について
- 11) Th2細胞の抑制と効果について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梅村和夫	
	副査	大橋京一	副査 橋爪秀夫