

4. 補中益気湯による肺障害抑制効果の検討

A. 研究目的

補中益気湯による難治性肺疾患に対する治療または予防の可能性について動物疾患モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

喫煙暴露肺傷害モデル、ブレオマイシン (BLM) 誘発性肺傷害モデル、LPS惹起性肺傷害モデルを用いて補中益気湯による、肺傷害の抑制効果を検討した。

1. 喫煙暴露肺傷害モデル

タバコ煙暴露によるproinflammatory cytokine産生に対する補中益気湯の効果について、Wister rat (4-5週齢) 雄性を用いて検討した。補中益気湯の原末を1g/kg (ヒトの投与量の約7倍) の投与量となるように1%エキス原末混合飼料として調整した。タバコ暴露モデルとして、ハイライト2本分のタバコ煙を1日2時間かけて受動喫煙、週3日、3週間継続施行した。補中益気湯を、タバコ暴露と同時に混餌投与開始し7週間継続投与した。タバコ煙3週間暴露終了後、喫煙暴露を中止、4週間後にBALを施行。BALF中のTNF- α をELISAで測定した。

2. ブレオマイシン (BLM) 誘発性肺傷害モデル

補中益気湯による肺の線維化進展抑制の可能性についてブレオマイシン (BLM) 誘発性肺傷害モデルを用

いて検討した。補中益気湯の投与方法は、喫煙暴露肺傷害モデルと同様とした。C57BL/6 Cr Slc mouse (3週齢) 雌性を使用し、通常餌群と補中益気湯混餌群に分けて8週間飼育した (BLM投与後も補中益気湯は継続投与した)。BLMモデルの作成は、BLM 2mg/kg/50 μ lをDay 0に気管内投与することにより行った。

Day 7にBALおよび肺組織からTRIzolでtotal RNAを抽出した。Day 35に肺組織のHE染色、ハイドロキシプロリン量の検討を行った。BLM-Day 7のBAL後の肺組織からtotal RNAを抽出し、IFN- γ , IL-4, IL-5 mRNA発現量をRT-PCR法 (38 cycles) で検討した。PCR産物は3% agarose gelに泳動し、デンシトメーターで半定量化後、 β -actin (internal control) で補正し、さらにControl群での発現量が1となるように補正した。

3. LPS惹起性肺傷害モデル

補中益気湯による急性肺障害進展抑制の可能性についてLPS惹起性肺傷害モデルを用いて検討した。補中益気湯の投与方法は、喫煙暴露肺傷害モデルと同様とした。BALB/c mouse (3週齢) 雌性を通常餌群とTJ-41混餌群に分けて8週間飼育 (LPS投与後もTJ-41の投与継続した)。急性肺障害モデルの作成はLPS 100 μ g/kg/60 μ lを点鼻投与により施行した。LPS投与24~120時間後にBAL、採血、肺組織を採

取し、BALFの細胞数と分画、組織所見をHE染色で検討、血清中KC (IL-8)濃度をELISA法で測定した。

C. 研究結果

1. 喫煙暴露肺傷害モデル

補中益気湯により、タバコ暴露によるBALF中のTNF- α の産生増加が抑制された (図1)。

2. プレオマイシン (BLM) 誘発性肺傷害モデル

8週後の体重増加量は補中益気湯混餌群と通常餌群で差は認めなかった。しかし、補中益気湯は、BLM投与による体重減少を抑制する傾向を認めた (図2)。

BLM-Day 7におけるBALF中の好中球数は補中益気湯により抑制傾向を認めた (図3)。また、補中益気湯により胞隔の炎症細胞浸潤および線維化の抑制傾向を認めた (図4)。

補中益気湯投与によりBLM-Day 35のヒドロキシプロリン量は有意に減少した (図5)。

補中益気湯によりBLM-Day 7のIFN- γ の発現は増加傾向、IL-5は減少傾向を認めた (図6)。補中益気湯によりBLM-Day 7のIL-5 / IFN- γ mRNA ratio は有意に減少した (図7)。

3. LPS惹起性肺傷害モデル

補中益気湯によりBALF中の総細胞数 (72h後), 好中球数 (72h後), マクロファージ数 (120h後) が有意に減少した (図8)。また、補中益気湯により胞隔および肺胞への炎症細胞浸潤

の抑制傾向を認めた (図9)。

補中益気湯により、LPS投与24時間後の血清中のKC (IL-8) 濃度の上昇が有意に抑制された (図10)。

D. 考察

1. 喫煙暴露肺傷害モデル

喫煙は体重減少や気道炎症を惹起する。補中益気湯はCOPD患者に対して、体重増加作用や免疫調整作用を有するが、機序は不明である。喫煙暴露肺傷害モデルを用いた本研究では、補中益気湯が肺胞領域の炎症を抑制しうる可能性が示唆された。

2. プレオマイシン (BLM) 誘発性肺傷害モデル

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)の肺線維化亢進には、Th2にshiftしたTh1/Th2 cytokine imbalanceが関与していると考えられている。本研究により、補中益気湯はTh2にshiftしたTh1/Th2 cytokine imbalanceを是正することによりBLMによる肺の線維化を軽減する可能性が示唆された。

3. LPS惹起性肺傷害モデル

急性肺障害は予後不良の病態であるが、Proinflammatory Cytokineの産生は、その病態に関与していると考えられる。補中益気湯はマウスのInfluenza Virus感染モデルにおいて、BALF中のIL-1 α , IL-6, GM-CSFを低下させ、生存率を改善することが報告されている (Antiviral Research 1999; 44:103-111)。本研究の結果は、補中

益気湯は、Proinflammatory Cytokineの産生を抑制することによりLPSによる急性肺障害を軽減する可能性を示唆している。

E. 結論

補中益気湯投与により、喫煙、BLM、LPSによる肺障害における炎症機序を軽減することにより、肺障害の軽減に寄与しうる可能性が示唆された。

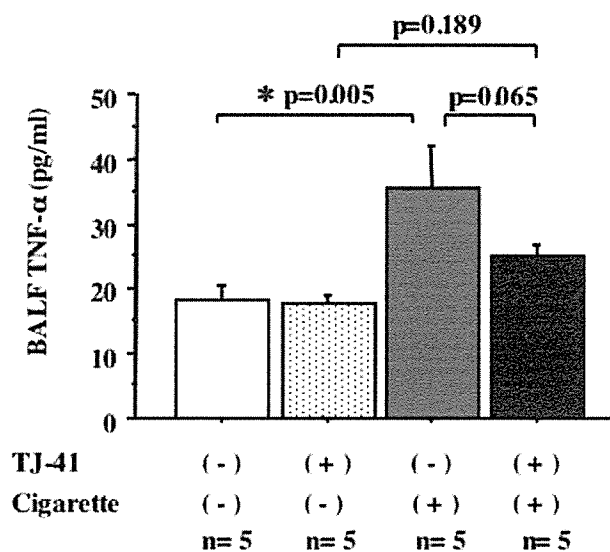


図1. 喫煙暴露肺傷害モデルにおけるBALFのTNF- α 濃度

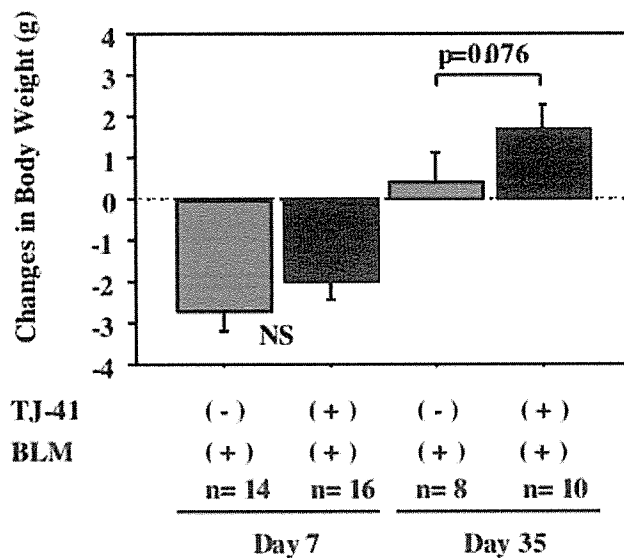


図2. 補中益気湯のBLM投与による体重変化に及ぼす影響 (TJ-41 : 補中益気湯)

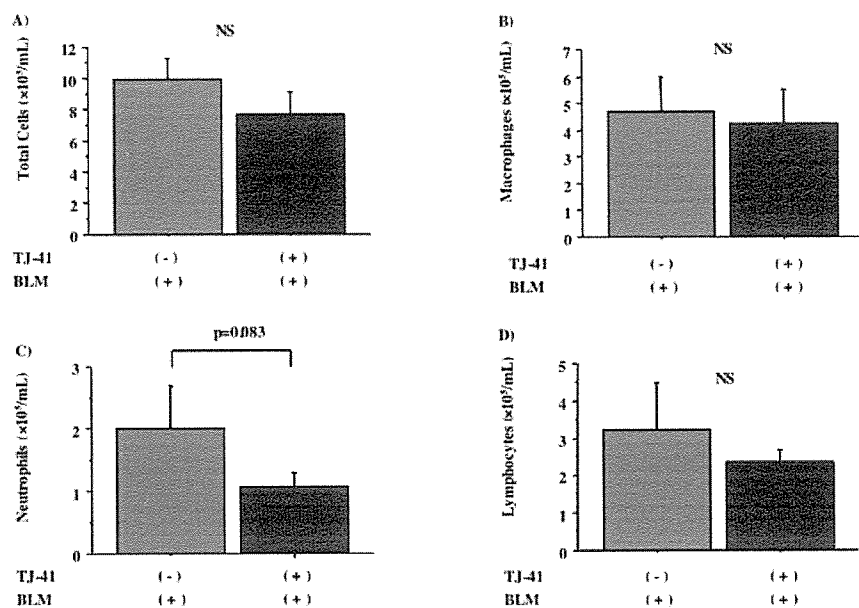


図3. ブレオマイシン (BLM) 誘発性肺傷害モデルDay 7のBALF所見

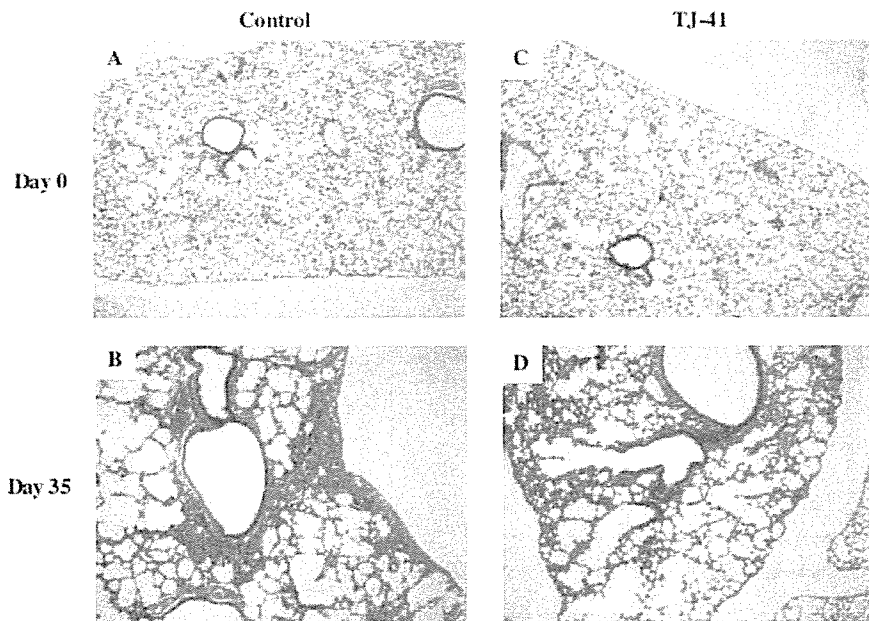


図4. BLM誘発性肺傷害モデルの組織所見 (HE染色 x 100)

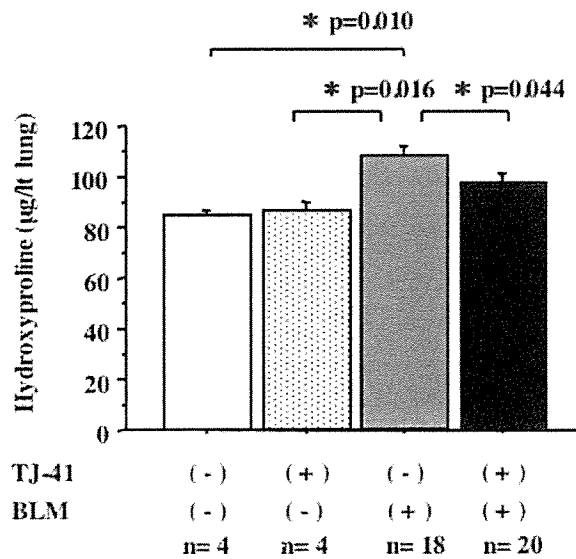


図5. BLM誘発性肺傷害モデルDay 35のヒドロキシプロリン量

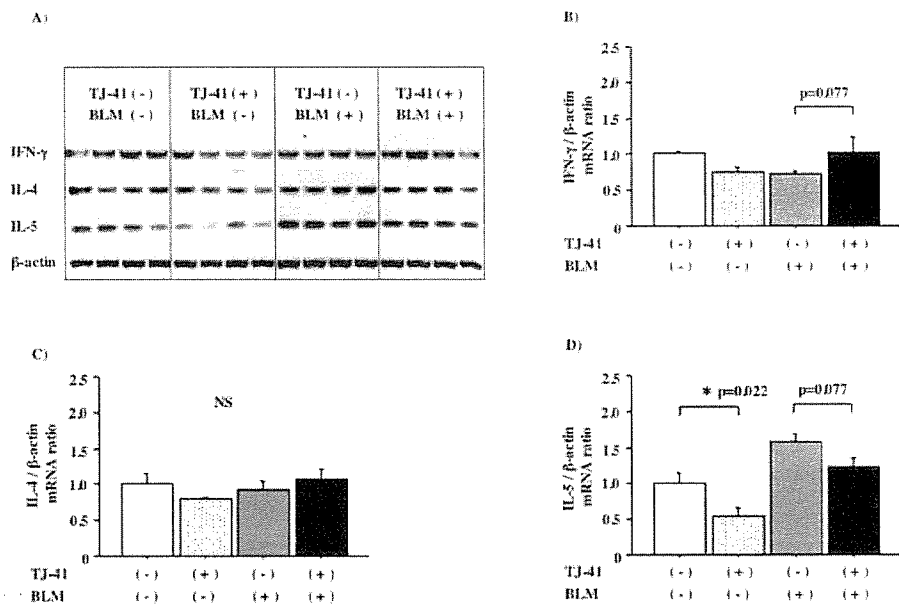


図6. BLM誘発性肺傷害モデルDay 7の肺組織IL-4、IL-5、IFN- γ mRNA発現

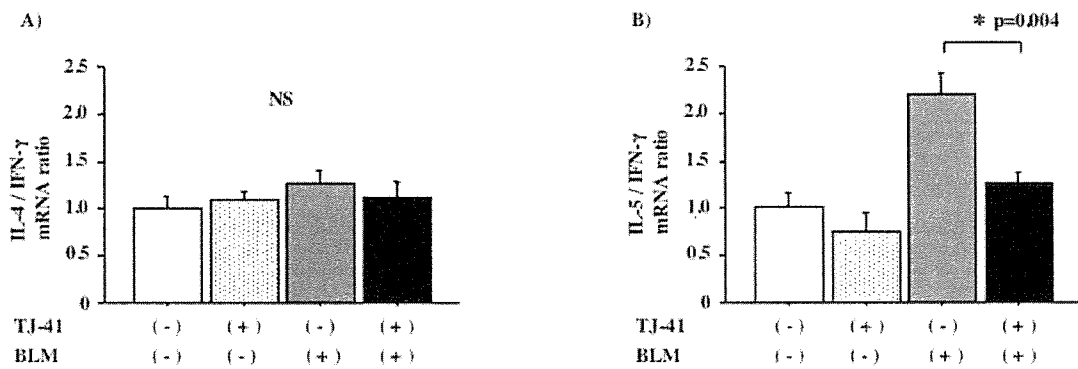


図7. BLM誘発性肺傷害モデルDay 7の肺組織IL-5 / IFN- γ mRNA比 (Th1 / Th2 cytokine imbalance)

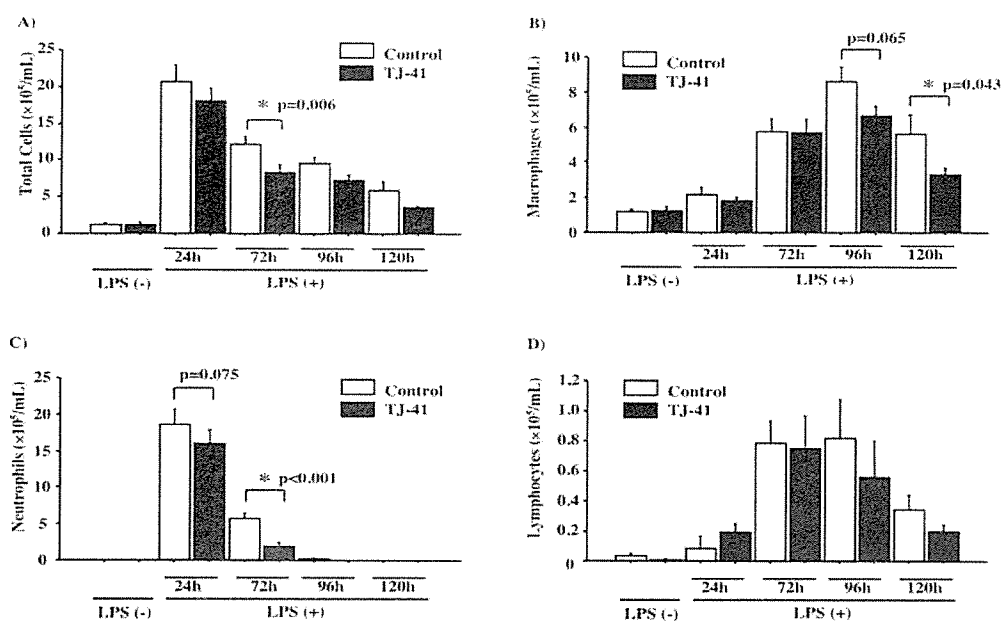


図8. LPS惹起性肺傷害モデルのBALF所見

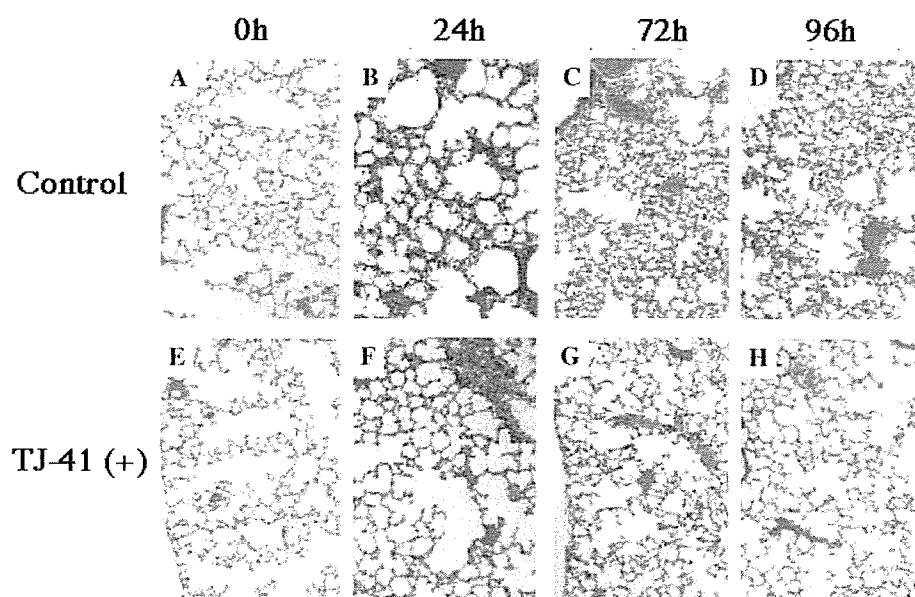


図9. LPS惹起性肺傷害モデルの組織所見 (HE染色 x 100)

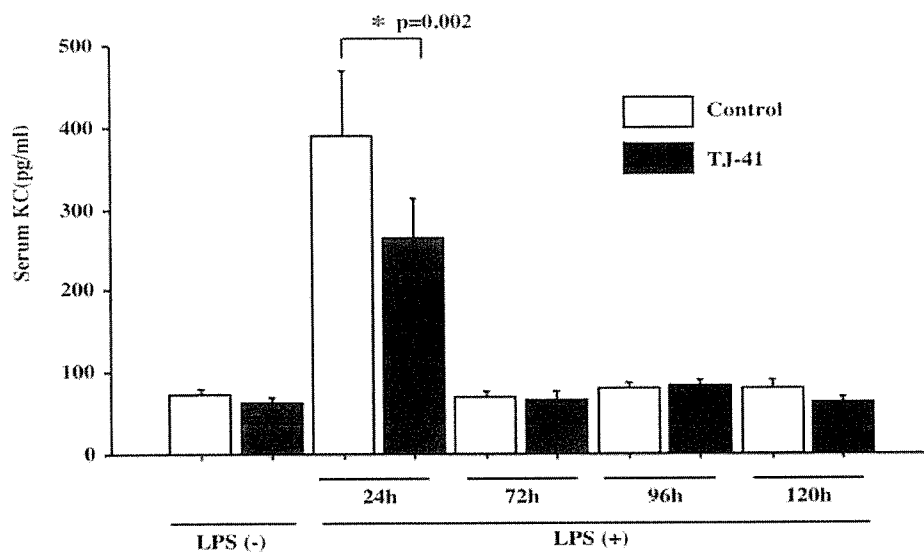


図10. LPS惹起性肺傷害モデルの血清KC (IL-8) 濃度

5. タバコ暴露ラットに対する補中益気湯の効果

A. 研究目的

1. 補中益気湯をタバコ暴露前から投与し、さらにタバコ暴露量を以前の検討よりも増量して、体重、BALF中のTNF- α 値を測定すること。
2. 以前我々が報告したタバコ暴露後の体重減少に喫煙が影響していることを証明するため、ラットの血清中、尿中コチニン濃度を測定すること。
3. タバコ暴露が血清中活性型グレリン濃度に与える影響を見ること。

B. 研究方法

1. 補中益気湯の前投与による検討(図1)

Wistar rat (4週齢) 雄性を用いて検討した。補中益気湯餌はツムラ社の補中益気湯(TJ-41)の原末を用いて1g/kg (ヒトの投与量の約7倍)の投与量となるように1%エキス原末混合飼料を作成した。A,B群それぞれ5匹に分けて、A群に通常餌を、B群にはTJ-41餌を4週間投与して、その後タバコ暴露を加えた。タバコ暴露は、ハイライト1本分のタバコ主流煙を1日30分かけて、週5日、5週間継続して受動喫煙させた。毎週体重測定を行った。タバコ暴露終了後にBALを施行し、BALF中のTNF- α をELISAで測定した。さらにはBALF中肺胞マクロファージからのTNF- α 産生を*in vitro*で測定した。用いた培養液はRPMI1640で、測定方法については①

BALFを1時間培養し付着細胞を肺胞マクロファージとして使用し、②上清を除去し、PBS1mlで1回洗浄、③LPS群はRPMI 500 μ L+LPS1 μ L/mLで刺激、④18時間後にサンプリング、⑤上清中のTNF- α をELISA kitで測定した。

2. 補中益気湯の同時投与による検討(図2)

Wistar rat (6週齢) 雄性を用いて検討した。A,B,C群それぞれ5匹に分けて(途中死亡したラットがいたためA,C群は4匹ずつになった)、A,B群には通常餌を、C群には上述と同様に作成したTJ-41餌を合計7週間投与した。B,C群には開始日より上述と同様のタバコ暴露を3週間行った。毎週体重測定を行った。タバコ暴露が終了した3週後に尿中と血清中コチニン濃度を測定した。7週後に血清中活性型グレリン濃度を測定した。またBALを施行し、血清とBALF中のTNF- α 値をELISAで測定した。

C. 研究結果

1. 補中益気湯の前投与による検討

A,B群における合計9週間の体重増加量は差を認めなかった。(図3)。タバコ暴露を行った5週間における体重増加も同様に差を認めなかった。また、BALF細胞分画はいずれもAB群で差は認められなかった(図4)。マ

クロファージ培養上清中TNF- α 濃度はLPS刺激後に著明な上昇を認めたが、AB間で差は認められなかった。

以上より、補中益気湯の前投与による検討では、補中益気湯前投与後のタバコ曝露において、2群間でラットの体重増加、BALF細胞分画、TNF- α 値に明らかな差は認められなかった。

2. 補中益気湯の同時投与による検討

タバコ曝露を行った3週間における体重増加は、B、C群ではA群と比べ有意に体重増加が抑制されていたが、B、C群間には補中群でやや多い傾向はあるものの有意差は認められなかった

(図5)。3週間のタバコ曝露終了後に尿中、血清中コチニン濃度を測定したところ、タバコ曝露を行っていたB、C群はA群と比べ明らかにコチニン濃度が上昇していた(図6)。タバコ曝露終了4週間後における体重増加は、B、C群ではA群と比べ有意に体重が増加していた。B、C群間ではC群の方がやや増加量が多い傾向があるものの、有意差は認められなかった(図7)。以前著者らが報告した、タバコ曝露量を週3日、2週間の低曝露にして行った同様の検討においては、タバコ曝露終了4週間後における体重増加は、B、C群ではA群に比べ有意に体重が増加し、さらにC群はB群と比べ有意に体重が増加していた。

血清中の活性型グレリン濃度は、タバコ曝露のB、C群ではA群と比べ有

意に上昇していたが、B、C群間で差は認められなかった(図8)。BALF細胞分画は、タバコ曝露のB、C群ではA群と比べ、総細胞数、マクロファージの減少を認めた。一方C群では他群に比べリンパ球の減少、好中球の増加を認めた(図9)。BALF中TNF- α 濃度はタバコ曝露のB、C群でより低い傾向を認めたが、B、C群間で差は見られなかった。血清値では全ての群でカットオフ値未満だった(図10A)。マクロファージ培養上清中のTNF- α 濃度は、LPS刺激を加えるとC群では有意に増加した(図10B)。

以上より、補中益気湯の同時投与による検討では、タバコ曝露群では尿中、血清中コチニン濃度が有意に上昇し、またタバコ曝露群では血清中グレリン濃度が有意に上昇していた。補中益気湯投与群は通常餌投与群と比べ、体重増加が有意差はないものの多い傾向がみられ、また、BALF好中球分画が多い傾向を認めた。

D. 考察

当科でのこれまでの検討では、ラットでタバコ曝露後に体重が減少することを報告してきたが、コチニン濃度を測定することでタバコ曝露が体重減少に関与していることが証明できた。また、タバコ曝露群では血清中グレリン濃度が上昇していたが、タバコ曝露により体重が減少し、代償的にグレリン濃度が上昇している可能性があると思われる。しかし補

中益気湯による相加効果は得られなかった。

今回の検討では、補中益気湯の体重増加効果、TNF- α 濃度の抑制効果は認められなかったが、以前の検討と比較すると今回タバコ曝露量が2.5倍と多いことが原因の一つと考えた。タバコ曝露群ではBALF中総細胞数および肺胞マクロファージの減少を認めたが、これらはタバコ曝露量が強すぎたためかもしれない。また、補

中益気湯投与群ではBALF中の好中球増加を認め、またTNF- α の低下傾向を示したが、この意味については今後検討したい。

E. 結論

タバコ曝露後の体重減少に対する補中益気湯の効果は、タバコ曝露の程度により影響を受ける可能性が示唆された。

補中益気湯の前投与による検討のプロトコール

4週齢のWistar rat(オス,約70g) 2群(各n=5)

A. タバコ曝露・通常餌投与群 B. タバコ曝露・補中益気湯(TJ-41)投与群

- 1) 開始日よりA群には通常餌、B群には補中益気湯(TJ-41)餌を投与した。
- 2) 毎週体重測定を行った。
(体重：毎週の平均体重、体重増加 Δ BW：1週間の平均体重増加量)
- 3) 開始日より4週後から両群にタバコ5本/週で5週間(total25本)の主流煙喫煙曝露を行った。
- 4) 9週目にBALを行い、血清とBALF中のTNF- α 濃度を測定した。

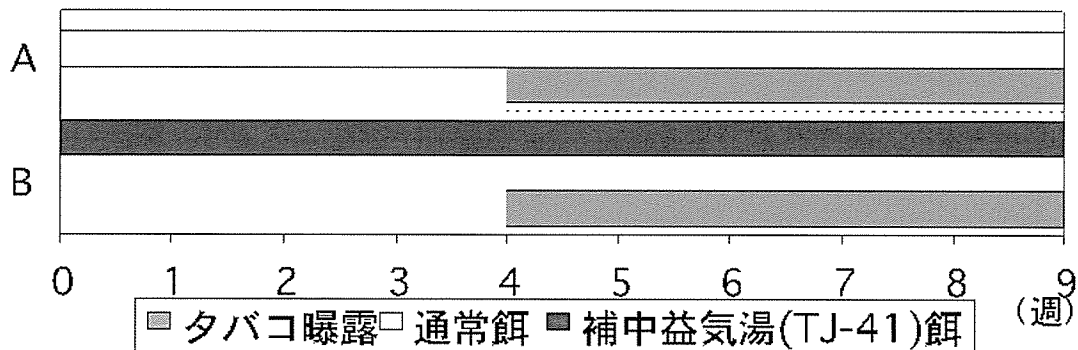


図1. 補中益気湯の前投与による検討のプロトコール

補中益気湯の同時投与による検討のプロトコール

6週齢のWistar rat (オス, 約130g) 3群(A・C群 n=4, B群 n=5)

A. タバコ非曝露・通常餌投与群, B. タバコ曝露・通常餌投与群, C. タバコ曝露・補中益気湯(TJ-41)餌投与群

- 1) 開始日よりA・B群に通常餌、C群に補中益気湯(TJ-41)餌を投与した。
- 2) 開始日よりB・C群ではタバコ5本/週で3週間(total15本)主流煙の喫煙曝露を行った。
- 3) 毎週体重測定を行った。(体重変化: 毎週の体重、体重増加 Δ BW: 前週からの体重増加量)
- 4) 3週後に尿中と血清中コチニン濃度を測定し、この時点でタバコ曝露は中止した。
- 5) 7週後に血清中活性型グレリン濃度を測定した。
- 6) 7週後にBALを行い、血清とBALF中のTNF- α 値を測定した。

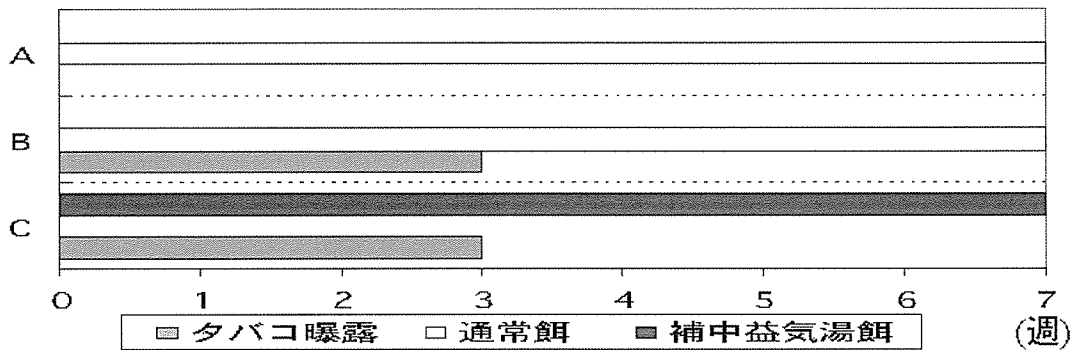


図2. 補中益気湯の同時投与による検討のプロトコール

補中益気湯前投与の検討における9週間の体重変化

— A. タバコ曝露, 通常餌, n=5

— B. タバコ曝露, TJ-41餌, n=5

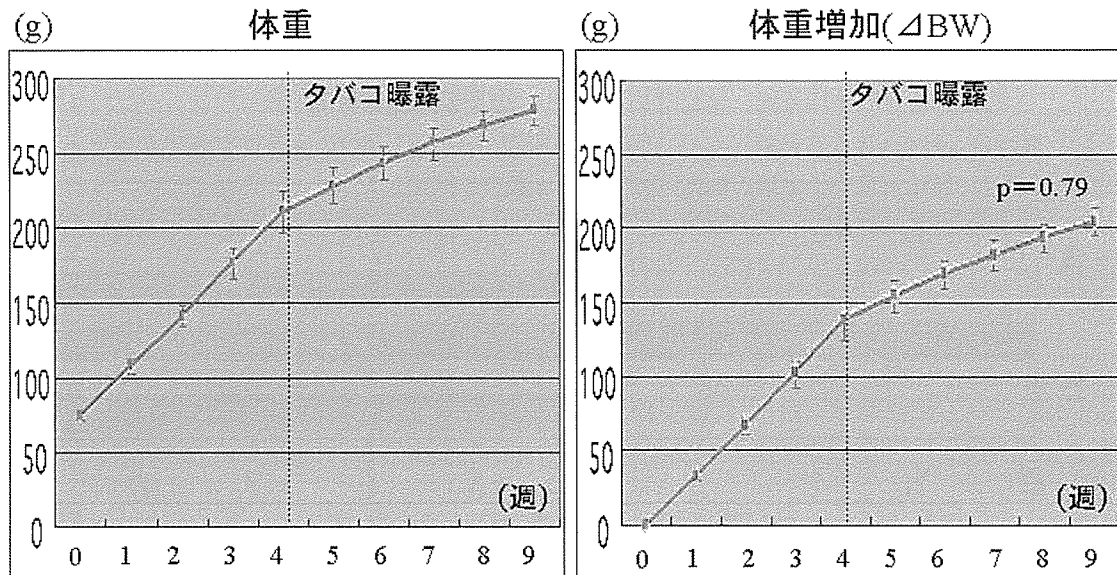


図3. 補中益気湯前投与の検討における9週間の体重変化

補中益気湯前投与の検討におけるBALF細胞分画

A. タバコ曝露,通常餌、 n=5
B. タバコ曝露,TJ-41餌、 n=5

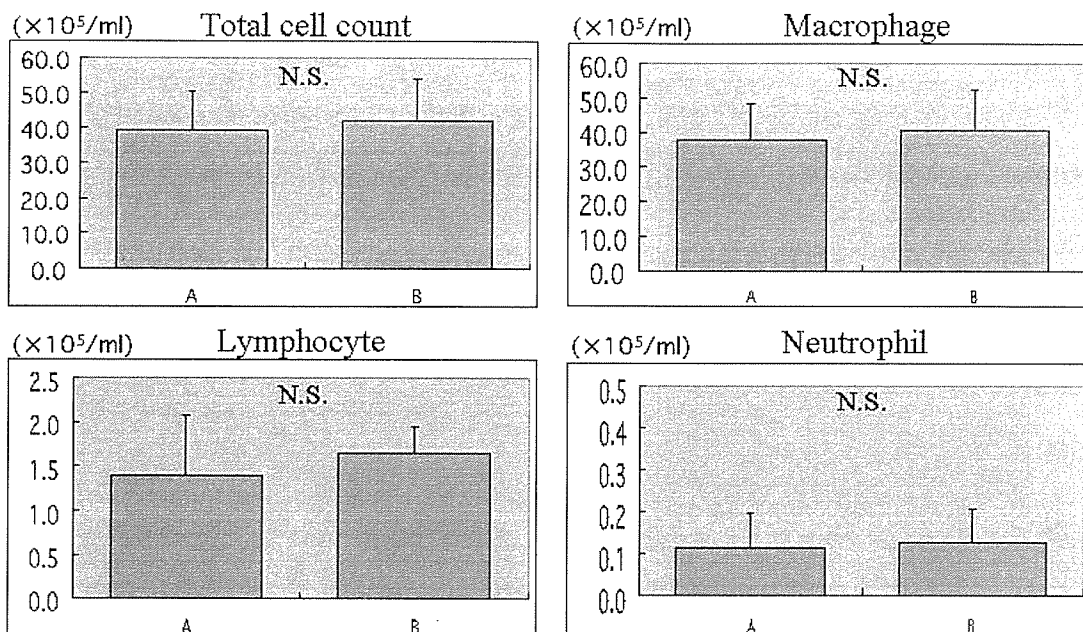


図4. 補中益気湯前投与の検討におけるBALF細胞分画

補中益気湯同時投与の検討におけるタバコ曝露3週間の体重変化

— A. タバコ非曝露,通常餌、 n=4
— B. タバコ曝露,通常餌、 n=5
— C. タバコ曝露,TJ-41餌、 n=4

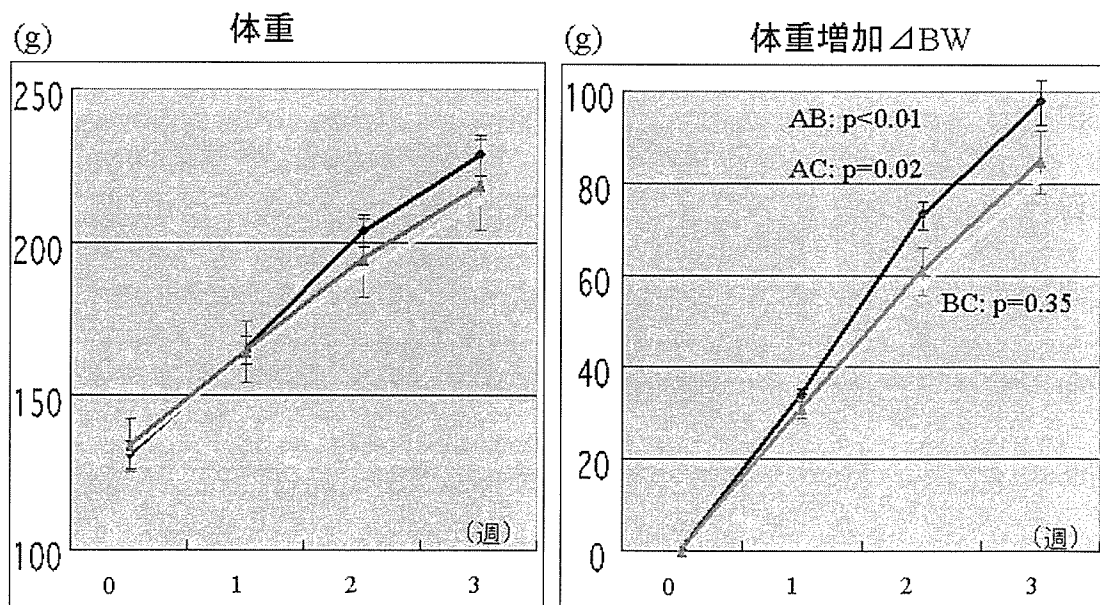
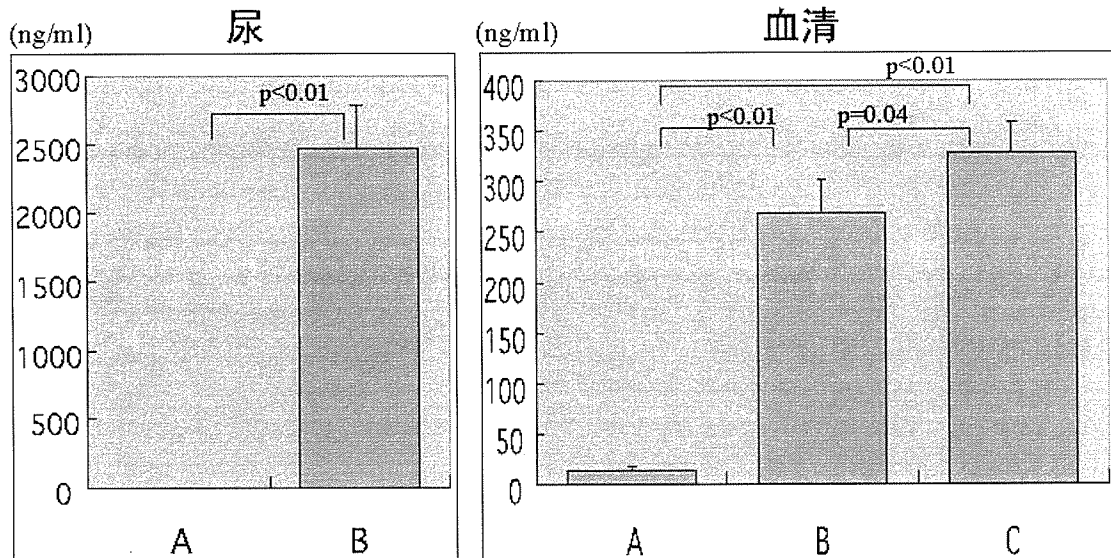


図5. 補中益気湯同時投与の検討におけるタバコ曝露3週間の体重変化

3週間のタバコ曝露終了後における尿中、血清中コチニン濃度



A. タバコ非曝露,通常餌, n=4 B. タバコ曝露,通常餌, n=5 C. タバコ曝露,TJ-41餌, n=4

図6. 3週間のタバコ曝露終了後における尿中、血清中コチニン濃度

補中益気湯同時投与の検討における
タバコ曝露終了後4週間の体重変化

— A. タバコ非曝露,通常餌, n=4
— B. タバコ曝露,通常餌, n=5
— C. タバコ曝露,TJ-41餌, n=4

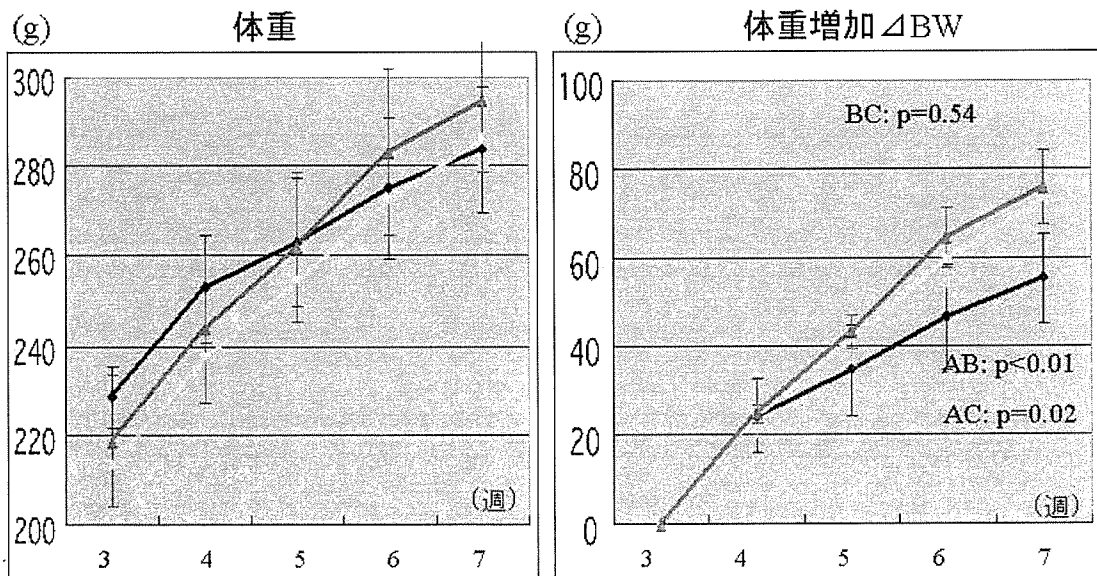
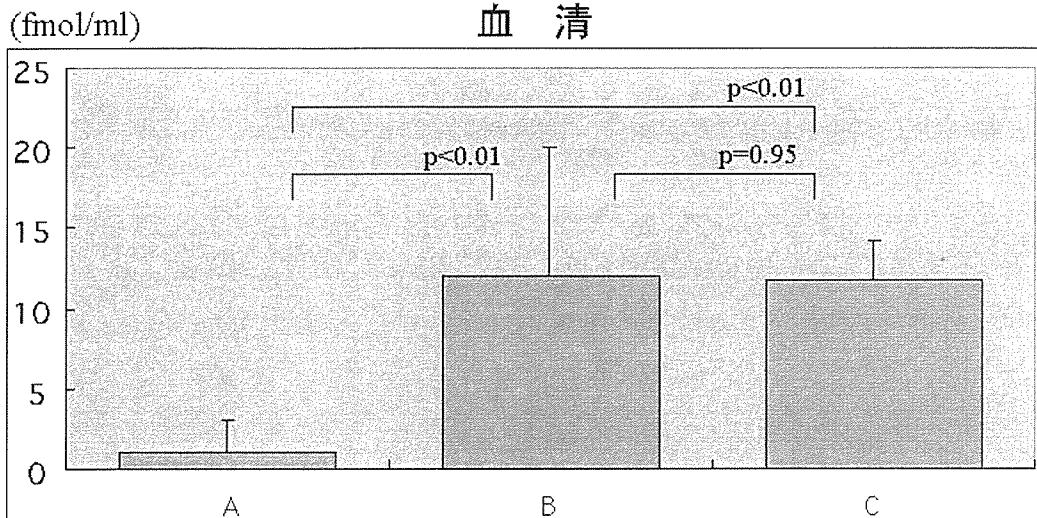


図7. 補中益気湯同時投与の検討におけるタバコ曝露終了後4週間の体重変化

タバコ曝露終了4週間における 血清中の活性型グレリン濃度



A. タバコ非曝露, 通常餌, n=4 B. タバコ曝露, 通常餌, n=4 C. タバコ曝露, TJ-41 餌, n=4

図8. タバコ曝露終了4週間における血清中の活性型グレリン濃度

補中益気湯同時投与の検討に おけるBALF細胞分画

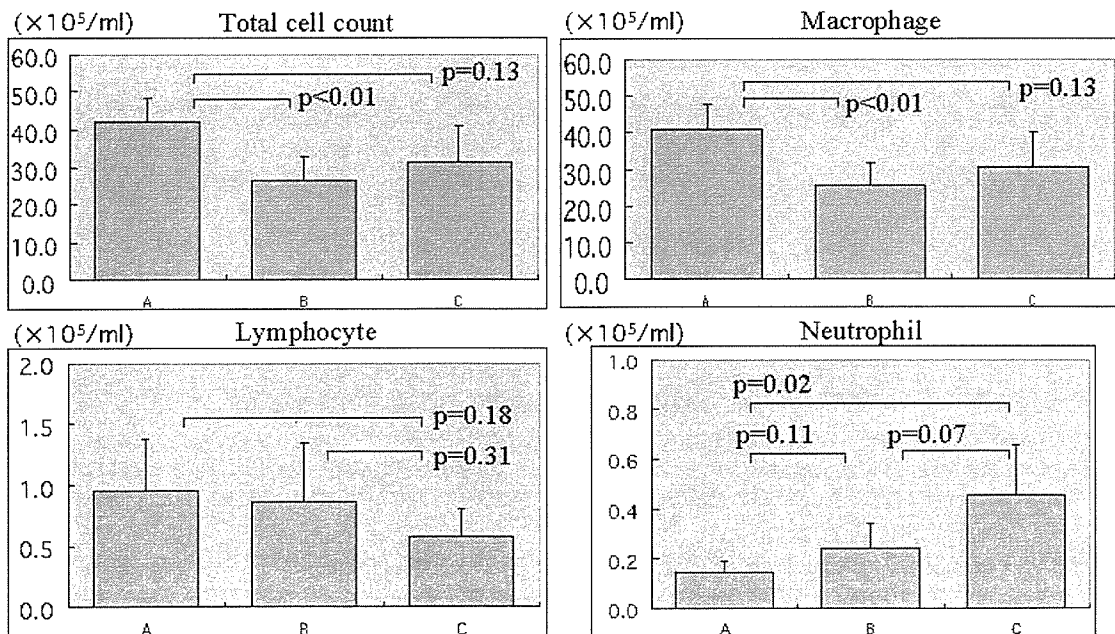
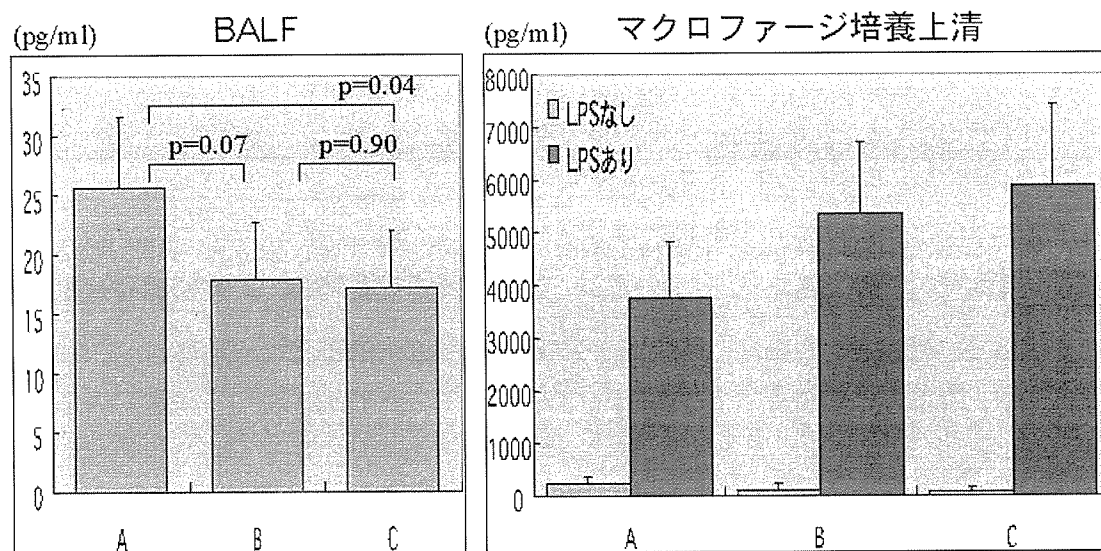


図9. 補中益気湯同時投与の検討におけるBALF細胞分画

補中益気湯同時投与の検討におけるBALF中TNF- α 濃度
およびマクロファージ培養上清中TNF- α 濃度



A. タバコ非曝露,通常餌, n=4 B. タバコ曝露,通常餌, n=5 C. タバコ曝露,TJ41餌, n=4

図10. 補中益気湯同時投与の検討におけるBALF中TNF- α 濃度およびマクロファージ培養上清中TNF- α 濃度

6. ライノウイルスの培養気道上皮感染に対する補中益気湯の影響

A. 研究目的

ライノウイルスは風邪の主因であり、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)の急性増悪を引き起こす。従って、ライノウイルス感染をコントロールすることができれば、炎症性呼吸器疾患の増悪を予防することができる。ライノウイルスの主要型(RV14)は、ICAM-1を感染受容体とし、酸性エンドゾームを通過してウイルスRNAを細胞内に移行させる。一方、補中益気湯は、消化機能・免疫機能を増強する漢方薬で、COPD患者の感冒罹患回数を減少させ体重増加をもたらすことが報告されている。しかし、ライノウイルスの感染・伝播機構に対する補中益気湯の効果を解析した研究は報告されていない。そこで今回、我々は、ライノウイルス(RV14)の培養気道上皮感染メカニズムに対する補中益気湯の効果を検討した。

B. 研究方法

1) 培養気道上皮へのライノウイルス感染: 14型ライノウイルス(RV14)と培養ヒト気道上皮細胞を用いた。コラーゲン・コート処理した丸底硝子チューブにHTE cellsを 5×10^5 にて培養し、 10^5 TCID₅₀U/mLのRV14を33°Cにて1時間回転培養しながら感染させる。

2) 補中益気湯: 10mg/mLとして

DMSOに溶解し、遠心後その上清を 10^4 希釈にて使用した。対象群に対しても、溶媒(DMSO)は同様の濃度で処理されている。

3) ウイルス収量: 培養気道上皮に補中益気湯(10mg/mL 溶液上清 10^4 希釈)または対照溶液を処理し3日後、RV14を 10^5 TCID₅₀U/mLにて感染させた。その後の培養気道上皮からのウイルス放出を補中益気湯処理群と対象群について経時的に調べた。またウイルス放出抑制効果に関して、補中益気湯の用量依存性(10mg/mL 溶液上清 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 希釈)を調べた。

4) 感染メカニズムに対する効果の検討: RV14は、ICAM-1を感染受容体とし、酸性エンドゾームを通過してウイルスRNAを細胞内に移行させる。さらにウイルス感染細胞からの炎症性サイトカインの産生により、近傍の細胞においてICAM-1(RV14感染受容体)発現が誘導されさらなるウイルス感染の伝播が起こると考えられている。こうした感染メカニズムに対する補中益気湯の効果を評価するために、補中益気湯処理ヒト培養気道上皮におけるICAM-1(RV14感染受容体)の発現と酸性エンドゾーム(RV14感染に重要)の経時変化を検討した。またRV14感染による炎症性サイトカイン発現(IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α : ICAM-1発現促進)に対し、補中益気湯の前処理がどのような効

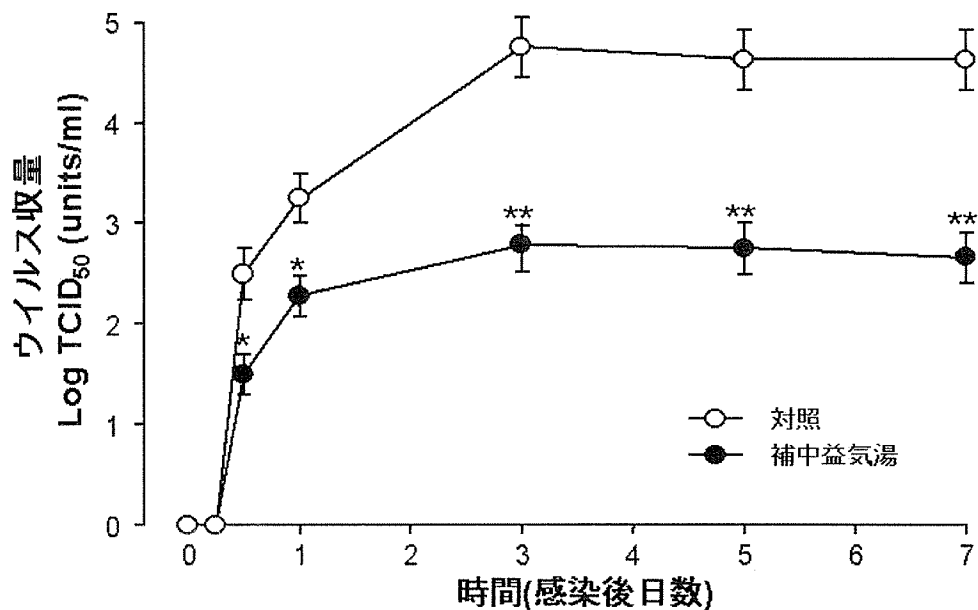
果をもたらすか検討した。

C. 研究結果

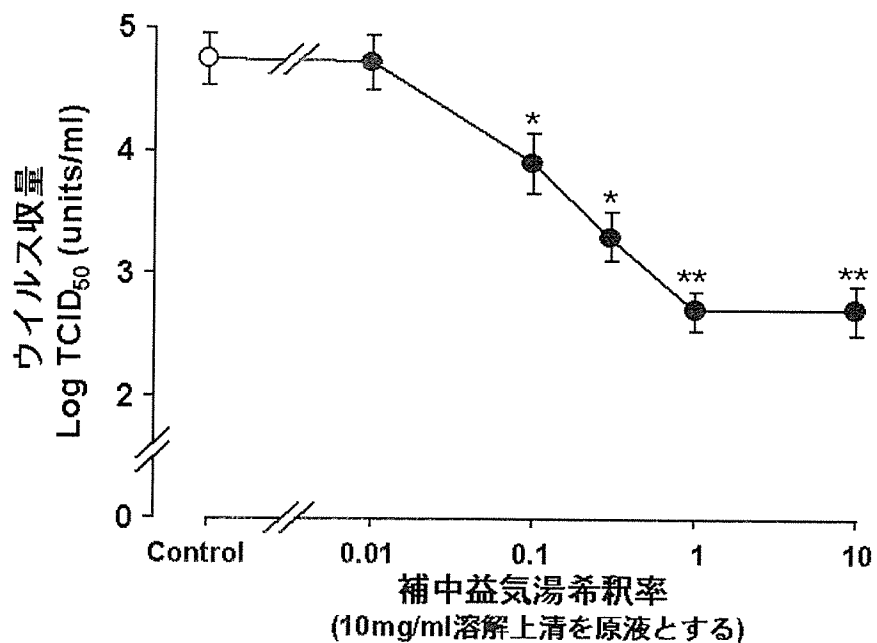
RV14 感染させた培養ヒト気道上皮細胞からのウイルス放出は感染後 3 日目に最大となるが、補中益気湯の前処理により、その放出量が 100 分の 1 近くに抑制された(図 1)。この抑制効果は容量依存性を示し、10mg/mL 溶液上清 10^{-4} 希釈の濃度において最大効果に達した(図 2)。補中益気湯の処理により、RV14 感染受容体である ICAM-1 発現量は有意に抑制され

(mRNA は 40%程に、可溶型 ICAM-1 蛋白は 70%程に抑制：図 3)、RV14 感染経路に重要な酸性エンドゾームの数は時間依存的に減少した(刺激 5 分後において、酸性エンドゾーム由来蛍光強度は 60%程に抑制された：図 5)。さらに補中益気湯の前処理により、RV14 感染後の炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α)の発現量も有意に抑制された(感染 3 日目において IL-1 β 、IL-6、TNF α は対照群の 60%程、IL-8 は対照群の 90%程：図 4)。

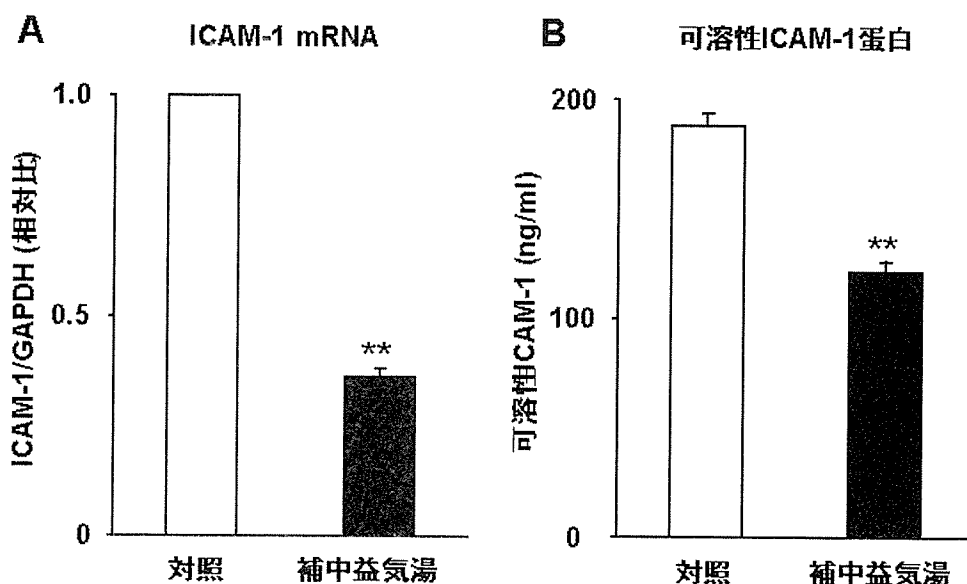
感染ヒト培養気道上皮からのRV14-
ウイルス収量に対する補中益気湯の効果



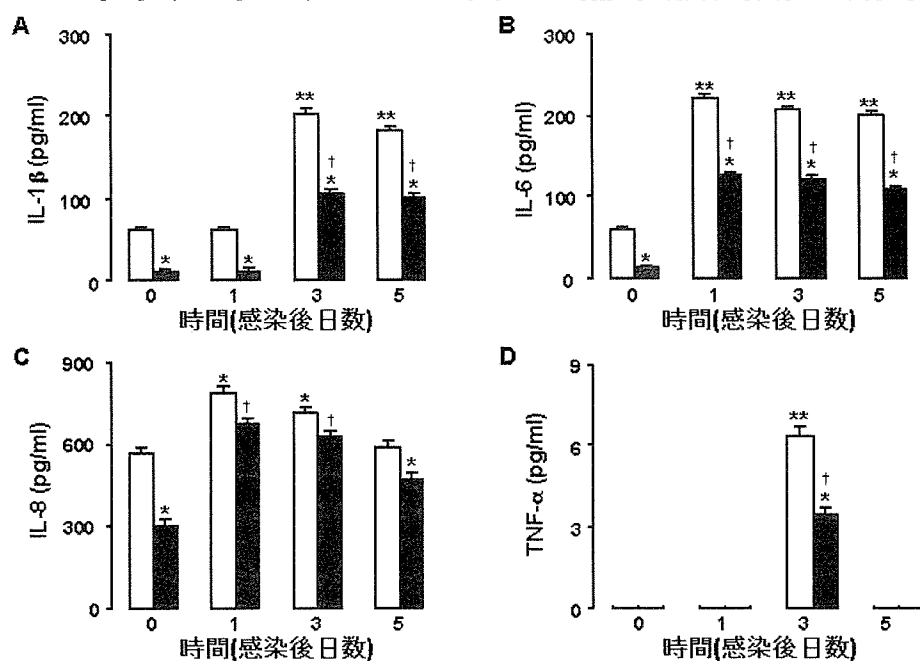
補中益気湯によるRV14-ウイルス 収量抑制効果の用量依存性



補中益気湯によるヒト培養気道上皮 でのICAM-1の発現に対する効果



ヒト培養気道上皮のRV14感染後炎症性サイトカイン産生に対する補中液気湯の効果



ヒト培養気道上皮内の酸性エンドソームに対する補中液気湯の効果

