

| | |
|---------|--|
| | なかがわ さ おり |
| 氏 名 | 中 川 沙 織 |
| 学 位 | 博 士 (医学) |
| 学位記番号 | 新大院博(医)第57号 |
| 学位授与の日付 | 平成17年 3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 博士論文名 | Specific Inhibitory Action of Anisodamine against a Staphylococcal Superantigenic Toxin, Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1), Leading to Down-Regulation of Cytokine Production and Blocking of TSST-1 Toxicity in Mice (アニソダミンが示す抗スーパー抗原毒素作用: サイトカイン産生の特異的な抑制とマウスでの延命効果) |
| 論文審査委員 | 主査 教授 安 保 徹 副査 教授 山 本 達 男 副査 教授 藤 井 雅 寛 |

博士論文の要旨

【目的】

スーパー抗原毒素は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含む黄色ブドウ球菌や一部のレンサ球菌が産生する毒素である。黄色ブドウ球菌（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含む）が産生する代表的な毒素は toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) と呼ばれている。抗原提示細胞の class II MHC 分子と T 細胞の T cell receptor に結合することで、特定 V β T 細胞の異常増殖と過剰サイトカイン産生を引き起こす。代表的な疾患は毒素性ショック (toxic shock syndrome、TSS) で、壊死、ショック、多臓器不全などを伴う。新生児の場合には、新生児 TSS 様発疹症候群 (NTED) と関連する。我々は、生薬アニソダミンの抗スーパー抗原毒素作用について研究を行った。

【材料と方法】

1) 細胞の分離法

ヒト末梢血より比重遠心法にて末梢血単核球を得た。単球はプラスチック吸着細胞として分離した。T 細胞は、ナイロンウール法、ロゼット形成法、そして磁気ビーズ法で分離した。

2) サイトカイン産生の誘導と測定法

末梢血単核球、T 細胞、そして単球に TSST-1 を加え、培養後、上清中のサイトカインを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。阻害薬としてアニソダミン、アトロピン、スコポラミン、アスピリンを添加した。

3) NF- κ B 測定法

THP-1 細胞を TSST-1 で刺激後、細胞より核を抽出し、p65 抗体を用いた ELISA 法で

NF- κ B を定量した。

4) サイトカイン転写レベルの測定

末梢血単核球を TSST-1 で刺激し、サイトカイン mRNA 発現量を RT-PCR 法とリアルタイム PCR 法で測定した。

5) TCRV β 細胞の測定法

末梢血単核球を TSST-1 で刺激し、蛍光標識した V β 2, CD3 抗体を用いたフローサイトメトリーによって V β 2細胞を解析した。

6) 動物実験

TSST-1 に感受性を示すガラクトサミン処理マウスの系で、アニソダミンによる延命効果を判定した。またマウス血サイトカイン量を ELISA 法で測定した。

【結果および考察】

1) サイトカイン産生の抑制

ヒト末梢血単核球を TSST-1 で刺激すると、炎症性サイトカインである IL-2、IFN- γ 、TNF- α が高いレベルで、抗炎症性サイトカインである IL-10 が低いレベルで産生された。この系にトロパン型アルカロイドやアスピリンを添加したところ、アニソダミンがもっとも強く抑制作用を示した。抑制は、IL-10 よりも炎症性サイトカインで顕著であった。

2) アニソダミンの作用メカニズム

アニソダミンによる阻害作用は、分離 T 細胞と単球に別々に作用させた場合にも、末梢血単核球の場合と同様に観察された。またサイトカイン mRNA 発現量を測定した結果、阻害が転写レベルで起きていることが分かった。さらに、TSST-1 刺激による NF- κ B の活性化がアニソダミンによって阻害されたことから、アニソダミンの作用点は NF- κ B 活性化より上流であることが分かった。なお、アニソダミンによる転写レベルでの阻害作用も、IL-10 よりも炎症性サイトカインで顕著であった。このようなサイトカイン産生の阻害とは対照的に、TSST-1 刺激による V β 2T 細胞の増殖はアニソダミンでは阻害されなかった。アニソダミンは T 細胞増殖を阻害せず、サイトカイン産生を抑制する特徴が明らかになった。

3) 動物実験

ガラクトサミン処理マウスに TSST-1 を投与し、アニソダミンによる延命効果を判定したところ、50 mg/kg 投与で延命効果が有意に認められた。さらにマウス血中サイトカイン量を調べたところ、アニソダミン投与群で有意に減少していた。アニソダミンが血中サイトカインの上昇を抑制して延命効果を示したと考えられた。

【結論】

中国生薬アニソダミンが抗スーパー抗原毒素作用を示すことが明らかになった。この作用は、抗スーパー抗原毒素による T 細胞増殖の阻害によるものではなく、T 細胞からの炎症性サイトカイン産生の抑制によるものであった。抑制の作用点は NF- κ B 活性化（転写レベル）より上流で行われていて、抑制は IL-10 よりも炎症性サイトカインで顕著であった。このようなアニソダミンの抗スーパー抗原毒素作用は、マウスでの延命効果として *in vivo* でも確認することができた。アニソダミンは、スーパー抗原毒素疾患に対する治療薬として有用であり、臨床使用を検討する価値があると考えられた。

審査結果の要旨

黄色ブドウ球菌（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含む）が産生するスーパー抗原毒素 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) とは、抗原提示細胞の class II MHC 分子と T 細胞の T cell receptor に結合することで、特定 V β T 細胞の異常増殖と過剰サイトカイン産生を引き起こす。代表的な疾患は毒素性ショック症候群 (toxic shock syndrome、TSS) で、壊死、ショック、多臓器不全などを伴う。申請者は本研究で、中国生薬アニソダミンが抗スーパー抗原毒素作用を示すことを明らかにした。アニソダミンは、抗原提示細胞と T 細胞の双方を抑制していたが、その作用点は NF- κ B の活性化段階あるいはその上流で、転写レベルでサイトカイン（特に炎症性サイトカイン）の産生を強く抑制した。なお、T 細胞の異常増殖に対する作用は顕著ではなかった。マウスモデルでは、アニソダミンの抗スーパー抗原毒素作用を血清サイトカイン抑制効果そして延命効果として確認した。以上、本研究はアニソダミンの抗スーパー抗原毒素作用を解明し、治療薬としての可能性を示した点に学位論文としての価値を認める。