

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10528

研究課題名（和文）スズラン毒（convallatoxin）の凝固機能に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of convallatoxin, the primary cardiac glycoside in lily of the valley, on blood coagulation

研究代表者

粕田 承吾（Kasuda, Shogo）

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70434941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：スズラン毒（コンバラトキシン）が凝固異常症を引き起こす機序の一端を解明した。コンバラトキシンは、血管内皮細胞に傷害性を有し、濃度依存性に組織因子（tissue factor:TF）の発現を促進させることを明らかにした。また、全血中のExtracellular vesicle-associated tissue factor (EV-TF)がコンバラトキシン添加により増加することを示し、この作用は、コンバラトキシン刺激により血液中の単球が、MAPK経路を介してTFを産生していることによるものであることを示した。コンバラトキシンによるTF産生促進が凝集亢進を引き起こすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スズラン毒の主成分はコンバラトキシンと呼ばれる強心配糖体である。中毒時には、主に心不全症状を呈するが、凝固異常症を引き起こすことも経験的に知られていた。しかし、現在までその機序はまったく不明であった。今回の研究で、コンバラトキシンが組織因子の発現を増大させることが明らかとなった。血管内皮細胞および単球という生体内の主要な組織因子発現細胞のいずれにもコンバラトキシンが作用し、組織因子を産生させるということは、全身で凝固亢進状態を引き起こす可能性を示唆する。これらの知見は、今後のスズラン中毒の治療戦略の一助となり得るものである。

研究成果の概要（英文）：We have elucidated part of the mechanism by which convallatoxin, a lily of the valley poison, causes coagulation disorders. First, we showed that convallatoxin is toxic to vascular endothelial cells. We then demonstrated that it promotes the expression of tissue factor (TF) in a concentration-dependent manner. We also showed that the addition of convallatoxin increased extracellular vesicle-associated tissue factor (EV-TF) in whole blood. This is because monocytes in the blood produce TF via the MAPK pathway in response to stimulation by convallatoxin. It was thought that the promotion of TF production by convallatoxin causes increased coagulation.

研究分野：Forensic medicine

キーワード：スズラン コンバラトキシン 組織因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スズラン (*Convallaria majalis*) は、観賞用として古くから世界各地で栽培されている。しかしその愛らしい外観とは裏腹に、全草に毒成分を有し、山菜と誤認した結果の食中毒や花瓶の水を飲んだペットの死亡事例などが報告されている。スズラン毒の主成分は convallatoxin (CNT) と呼ばれる強心配糖体の一種である。摂取した場合、嘔吐、頭痛、眩暈、心不全、血圧低下、心臓麻痺などの症状を起こし、重症の場合は死に至る。一方、CNT による中毒では血液凝固異常症を呈することが経験的に知られているが、その機序は現在までのところ、まったく不明であった。

### 2. 研究の目的

中毒事例は相次ぐものの、死亡にまで至る事例は稀であり、医学界において CNT の血液凝固に対する影響はほとんど顧みて来られなかった。しかし、自然毒の作用機序を明らかにすることは法中毒学的に極めて重要な課題である。本研究の目的は CNT の血液凝固系に対する影響とその作用機序をすることであり、さらに中毒治療の一助となる知見を提供することである。特に今回は、外因系凝固経路のイニシエーターである、組織因子 (tissue factor: TF) に注目した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管内皮細胞に対する検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を培養し、CNT (最終濃度 50 および 100 nM) を添加しインキュベートすることにより、

HUVECs の形態変化を位相差顕微鏡で観察し、生存率を WST-8 assay で計測した。

HUVECs における TF の発現をリアルタイム PCR および共焦点レーザー顕微鏡で検討した。

#### (2) 単球に対する検討

クエン酸にて抗凝固した全血に CNT (最終濃度 50 および 100 nM) を添加しインキュベート後に、血漿中の Extracellular vesicle-associated tissue factor (EV-TF) を測定した。

同様に処理した全血を用いて、Rotation thromboelastometry (ROTEM) を施行し、CNT の全血における凝固能への影響を検討した。

上記全血から得られた血漿を用いて、ELISA 法にて thrombin-antithrombin complex (TAT) を測定した。

さらに、ヒト単球系 cell line である THP-1 細胞を培養し、同様に CNT を添加したのちに

TF の発現をリアルタイム PCR および EV-TF を測定することにより検討した。

さらに、CNT の TF 産生経路を同定する単に、MAPK 経路の阻害剤である PD98059 を用いて、Western blot 法にて MAPK のリン酸化を検討した。

#### (3) 血小板に対する検討

ヒト全血に CNT (最終濃度 50 および 100 nM) を添加しインキュベート後に、多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を遠心分離にて調整し、比濁法により各種アゴニスト (ADP およびコラーゲン) による血小板凝集能を測定した。

### 4. 研究成果

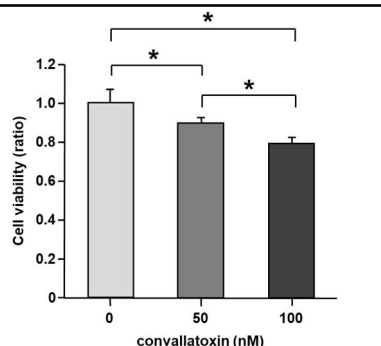
#### (1) 血管内皮細胞に対する影響

CNT は濃度依存性に HUVECs を培養皿から剥離させることが位相差顕微鏡を用いることにより観察された。また、WST-8 assay による検討で CNT は HUVECs の生存率を低下させることが示された (付図 1)。以上のことから、CNT は血管内皮細胞に対して毒性を持つことが明らかとなった。

CNT は濃度依存性に HUVECs における TF の mRNA 産生を増加させた (付図 2)。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察で、CNT 添加により HUVECs 上の TF 発現が増大していることが示された。

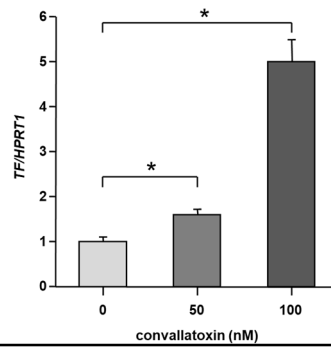
付図 1. HUVECs の生存率 (WST-8 assay)。

CNT の濃度依存性に HUVECs の生存率が低下する。



付図2. CNT による TF-mRNA 誘導.

CNT の濃度依存性に TF の mRNA 発現が  
増加する.



(2)単球に対する影響

血漿中の EV-TF は CNT 濃度依存性に増加した (付図3)。

ROTEM において、CNT は全血の凝固を亢進させることが示された。

血漿中の TAT は CNT 添加により増加した。

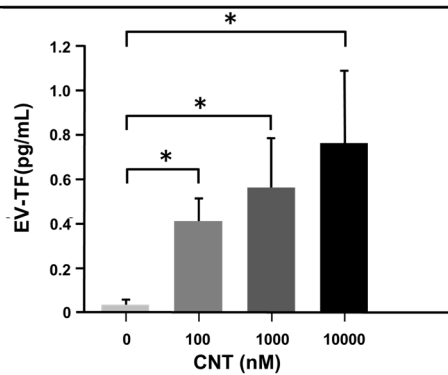
THP-1 に CNT を添加することにより、TF の mRNA は増大した。

THP-1 に CNT を添加することにより、MAPK 経路のリン酸化が確認された (付図4)。また、CNT 添加前に、MAPK 経路の阻害剤 (PD98059 ; PD) で処理することにより TF の mRNA 発現が抑制された。

これに一致して、THP-1 培養上清中の EV-TF は CNT 投与により増加したが、この効果は PD 前処理によって打ち消された (付図5)。

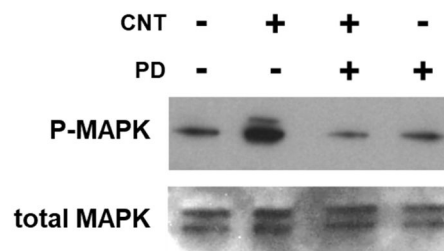
付図3. 全血中の EV-TF

CNT の濃度依存性に全血中の  
EV-TF 量が増加する.

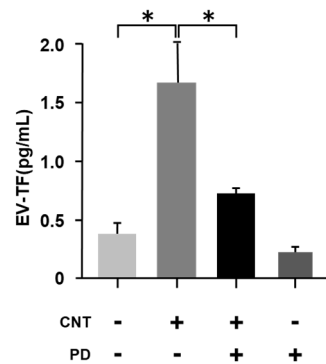


付図4. THP-1 の MAPK リン酸化

CNT により THP-1 の MAPK が  
リン酸化されている。PD 前  
処理により MAPK のリン酸化  
は抑制されている。



付図 5. THP-1 培養上清中の EV-TF  
CNT により培養上清中の EV-TF は  
増加しているが、PD により EV-TF  
の増加は抑制されている。



### (3) 血小板に対する影響

アゴニストとして ADP およびコラーゲンをを用いた。いずれも一次凝集を惹起させる程度の低濃度による刺激を与えた。PBS を添加しただけのコントロール PRP と比較して、CNT 添加 PRP では二次凝集まで惹起され、CNT による血小板凝集亢進作用が認められた。

### (4) まとめ

以上の結果から、CNT は外因系凝固経路のイニシエーターである TF の発現を、血管内皮細胞および単球の双方で増大させることが明らかとなった。TF 発現により凝固反応が亢進していることが示唆された。血小板凝集能亢進作用も認められたが、その作用機序は今後の検討課題である。血小板凝集亢進作用および TF 発現促進作用の共同作用により、凝固異常症を引き起こすものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto Mami, Tatsumi Kohei, Takabayashi Yoko, Sakata Asuka, Yuui Katsuya, Terazawa Ikuko, Kudo Risa, Kasuda Shogo	4. 巻 34
2. 論文標題 Involvement of monocyte-derived extracellular vesicle-associated tissue factor activity in convallatoxin-induced hypercoagulability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Coagulation & Fibrinolysis	6. 最初と最後の頁 184 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MBC.0000000000001211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Mami, Tatsumi Kohei, Yuui Katsuya, Terazawa Ikuko, Kudo Risa, Kasuda Shogo	4. 巻 7
2. 論文標題 Convallatoxin, the primary cardiac glycoside in lily of the valley ( <i>Convallaria majalis</i> ), induces tissue factor expression in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary medicine and science	6. 最初と最後の頁 2440 ~ 2444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/vms3.614.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本真未, 辰巳公平, 高林葉子, 坂田飛鳥, 川崎亮平, 勇井克也, 工藤利彩, 粕田承吾
2. 発表標題 スズラン毒(convallatoxin)による単球での組織因子誘導効果
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本真未, 粕田承吾, 辰巳公平, 勇井克也, 工藤利彩.
2. 発表標題 血管内皮細胞における組織因子発現増加を介したスズラン毒(コンバラトキシン)の凝固促進作用
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	勇井 克也  (Yuui Katsuya)  (50783875)	奈良県立医科大学・医学部・助教    (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------