

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。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

Tajima S, Bando M, Yamasawa H, Ohno S, Moriyama H, Takada T, Suzuki E, Gejyo F, Sugiyama Y. Preventive effect of hochu-ekki-to on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in BALB/c mice. *Lung* 2006; 184: 318-323.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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。

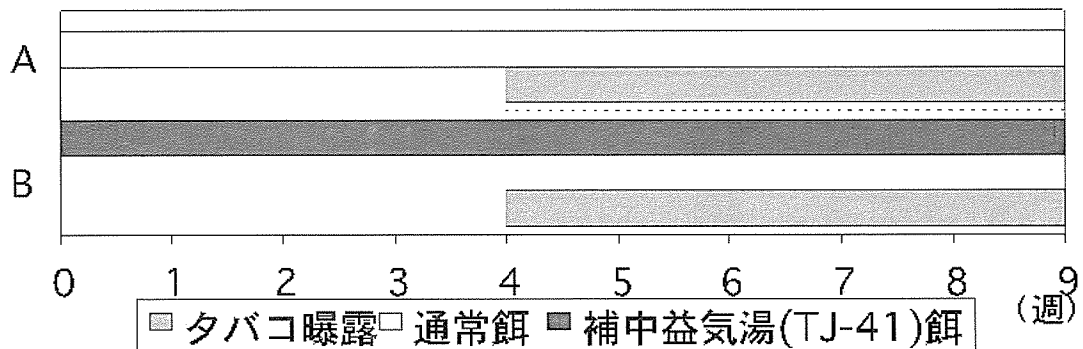


図1. 補中益気湯の前投与による検討のプロトコール

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。

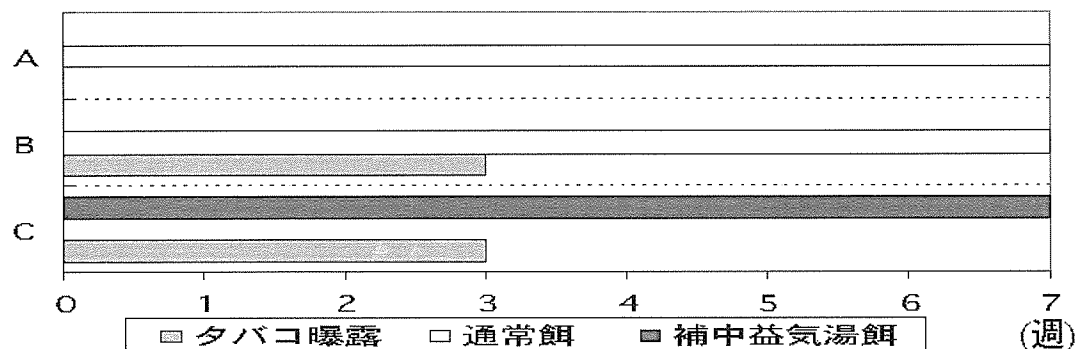


図2. 補中益気湯の同時投与による検討のプロトコール

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

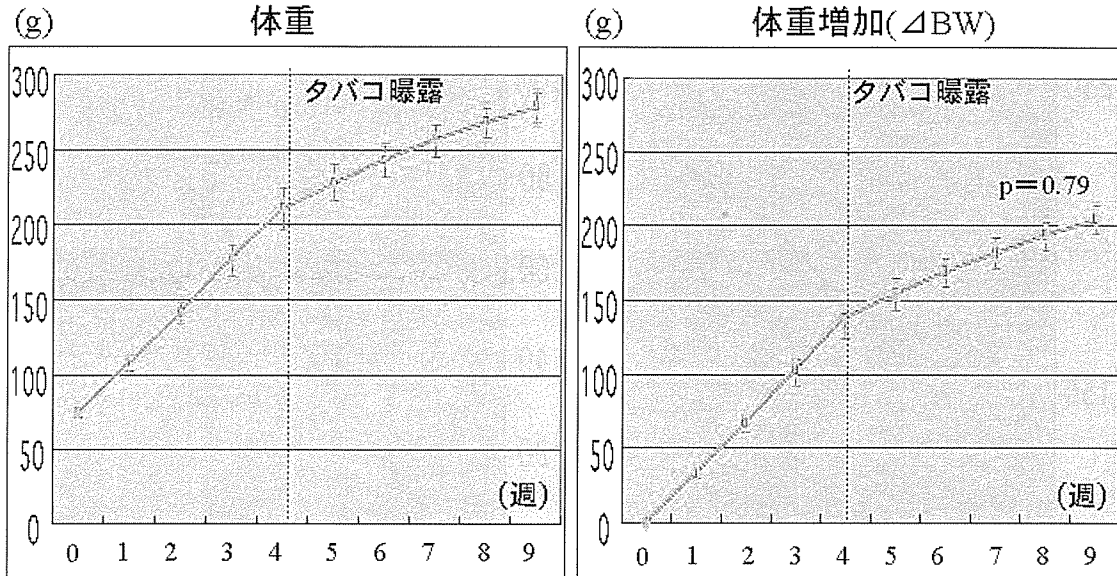


図3. 補中益気湯前投与の検討における9週間の体重変化

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

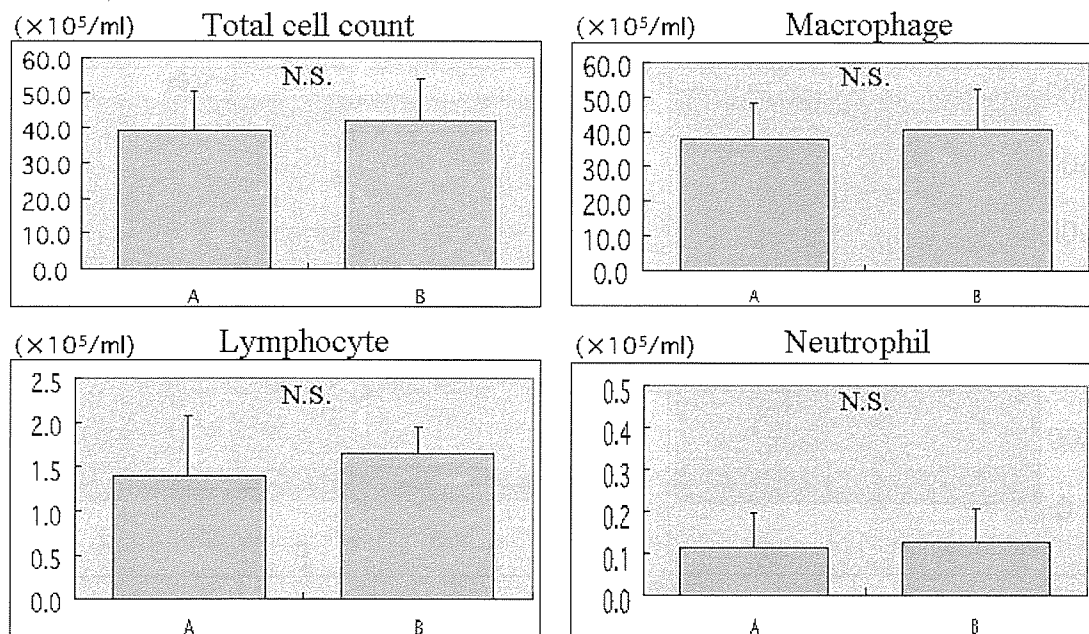


図4. 補中益気湯前投与の検討におけるBALF細胞分画

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

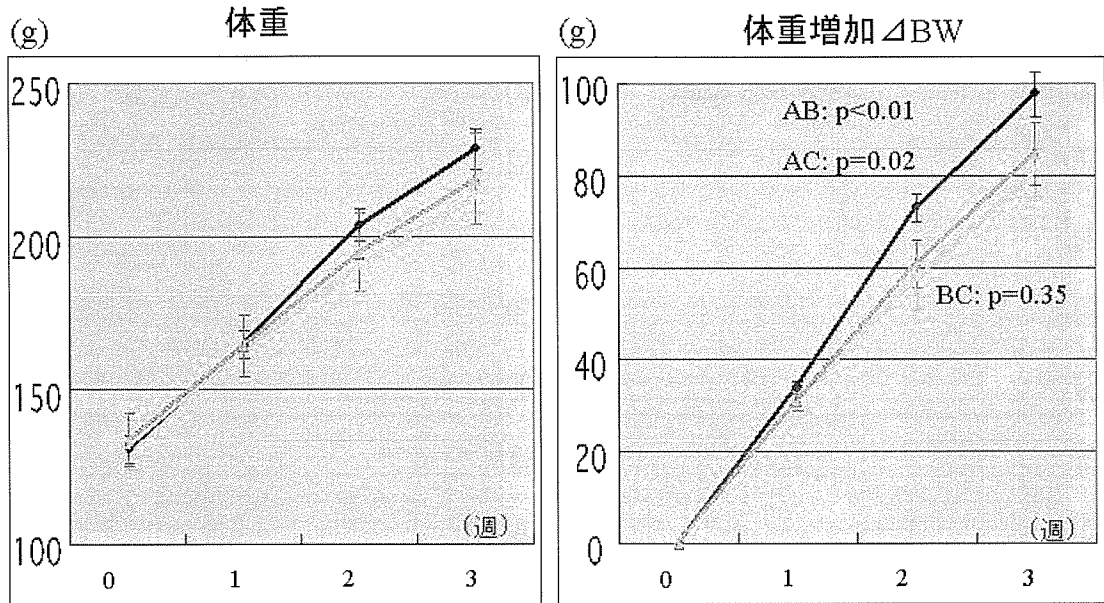
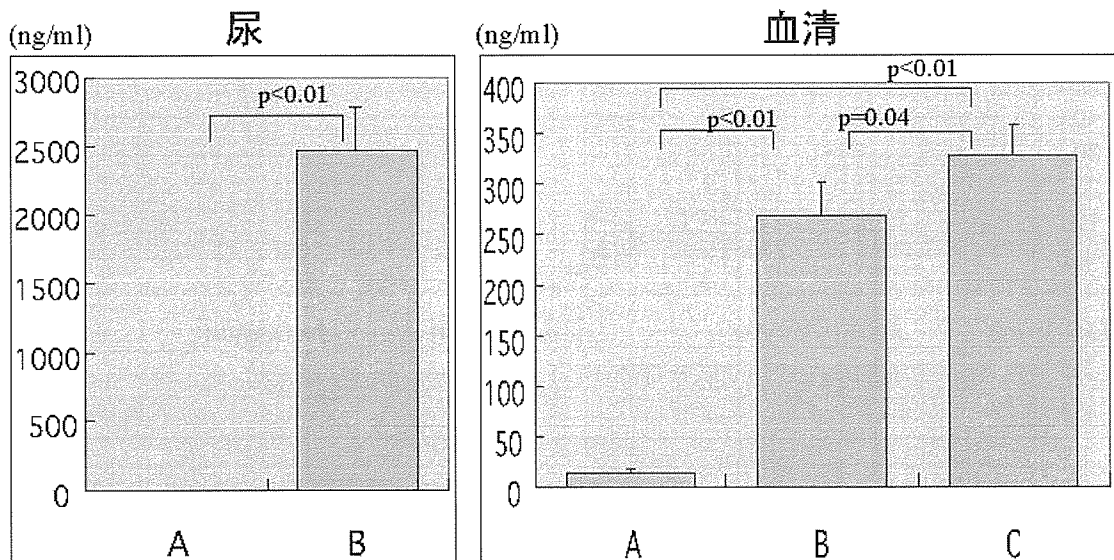


図5. 補中益気湯同時投与の検討におけるタバコ曝露3週間の体重変化

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

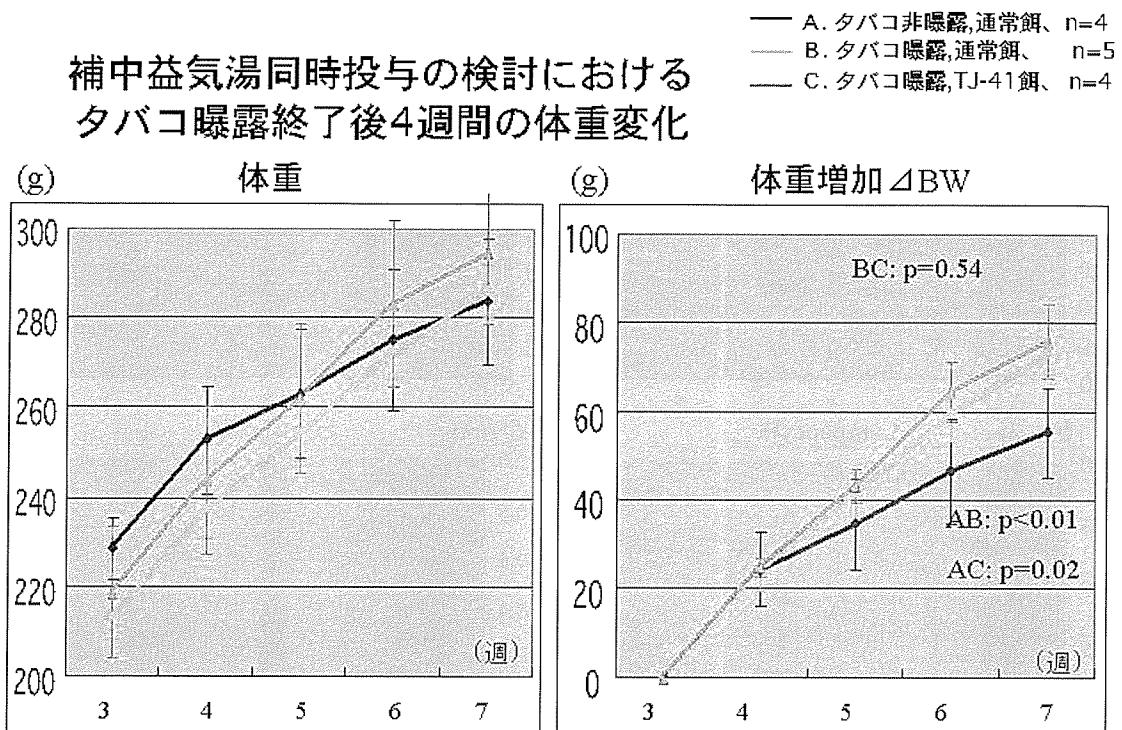
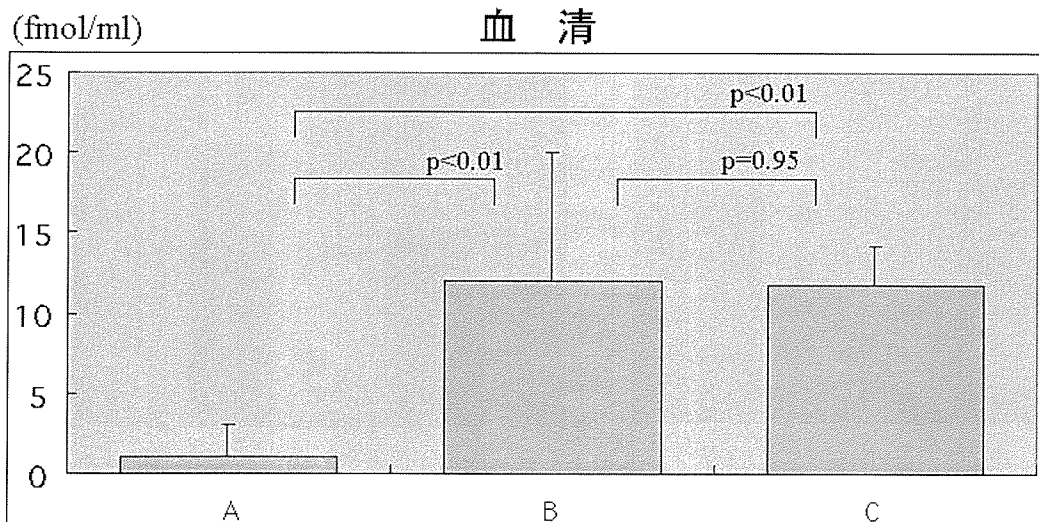


図7. 補中益気湯同時投与の検討におけるタバコ曝露終了後4週間の体重変化

タバコ曝露終了4週後における 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週後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

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

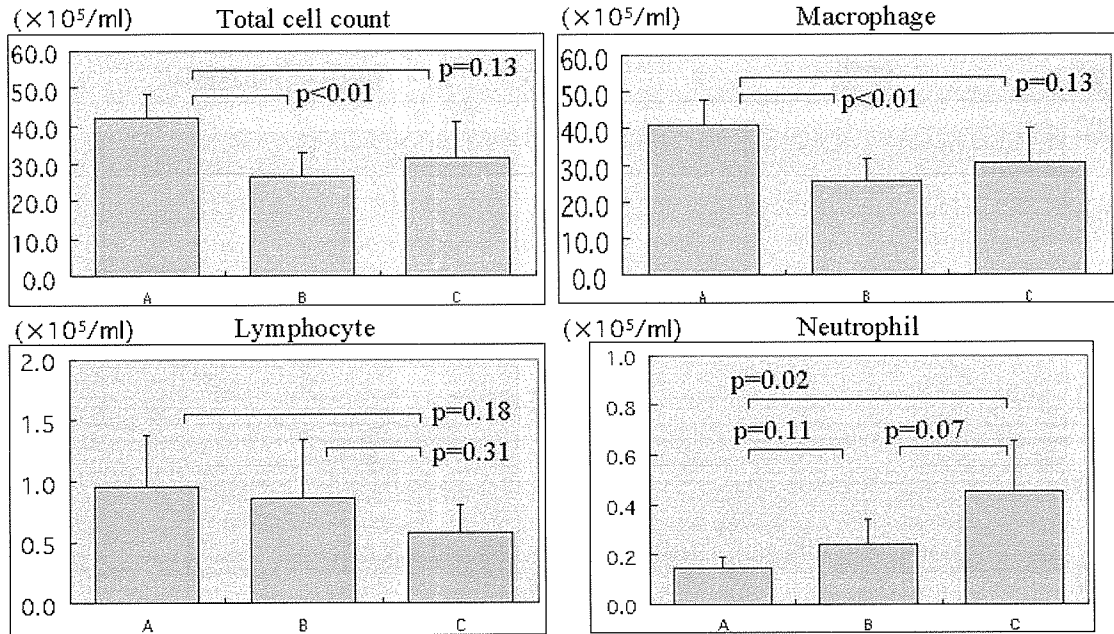
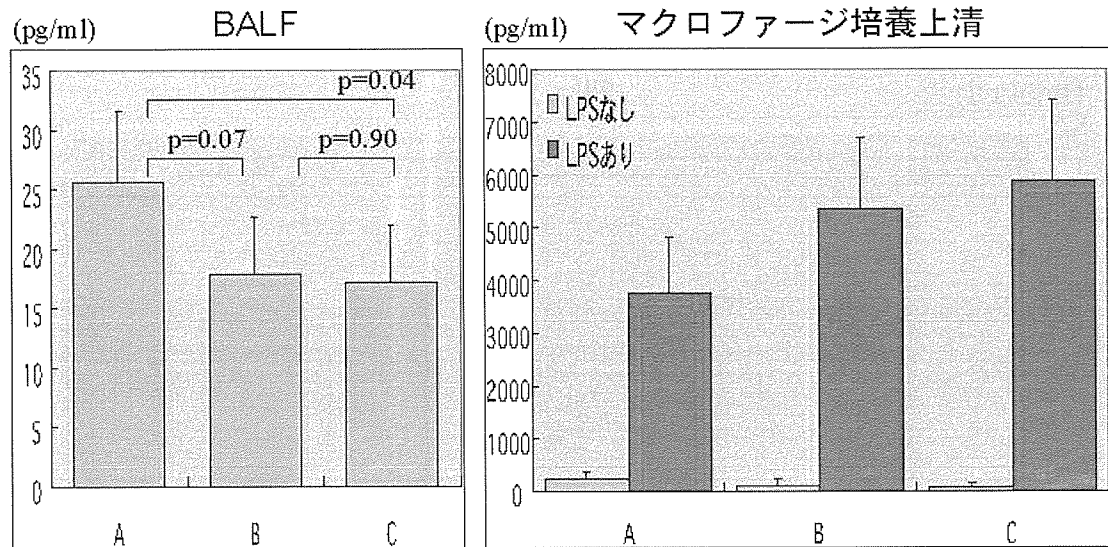


図9. 補中益気湯同時投与の検討におけるBALF細胞分画

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,TJ-41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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

喫煙曝露マウスモデルに対する補中益気湯の効果

分担研究者 永井 厚志
研究協力者 青柴 和徹、周 方
東京女子医科大学 第一内科

研究要旨

補中益気湯のCOPDに対する有用性の機序を検討するために、8週齢雄DBA/2マウスに週5日間、2週間継続して喫煙または空気のみ曝露を行なった。喫煙および空気曝露マウスを2群に分け、実験群には補中益気湯を1%混餌した飼料、コントロール群には通常飼料を投与した。2週間後に採血、気管支肺胞洗浄（BAL）および肺組織の採取を行なった。実験期間終了後の体重増加量は4群間に有意差はなかった。血清中のレプチン濃度は喫煙群で増加したが、補中益気湯飼料群ではその増加量が少なかった（ $p < 0.05$ ）。また血清レプチン濃度と最終体重との間には負の相関関係がみられた（ $r = 0.69$ 、 $p < 0.01$ ）。血清中のアディポネクチン濃度については4群間に差はなかった。BAL液の細胞数については喫煙曝露により好中球数が増加したが、補中益気湯飼料群と通常飼料群との間に有意差はみられなかった。またBAL液中や肺組織ホモジェネート中のTNF α 濃度については4群間で有意差はなかった。以上の結果からは、補中益気湯は喫煙による肺の炎症を抑制しないが、血清レプチン濃度の増加を抑制する可能性が考えられた。

A. 研究目的

補中益気湯が COPD 患者の炎症や栄養状態を改善するかを検討するために、マウスを用いた動物実験を行った。すなわち補中益気湯の経口投与が、2週間の喫煙曝露によるマウスの炎症反応や栄養状態の変化に影響を与えるについて検討した。

B. 研究方法

8週齢の雄DBA/2マウスに週5日間、2週間継続して喫煙または空気のみ曝露を行った。すなわち喫煙群ではマウスを喫煙チャンバー（27 x 27 x 15 cm）内に入れ、一日5本のタバコ（Piece®；タール含有量24 mg、ニコチン含有量 24mg）の主流煙を120分間吸入させた。空気吸入群には喫煙チャンバー内で空気のみを吸入させた。喫煙群と空気群をそれぞれ2群に

分け、通常飼料または補中益気湯を1%濃度に混餌した飼料を摂食させた（各動物群 n = 6）。毎日の喫煙または空気吸入前に体重を測定した。実験最終日に喫煙または空気吸入を行った直後にマウスにペントバルビタール腹腔内注射による深麻酔を施し、下大静脈から採血後、開胸して右肺を液体窒素を用いて凍結・保存した後に気管内に22Gのサーフローを挿入して0.5 mlのPBSを用いて左肺の気管支肺胞洗浄（BAL）を行った。回収した血液サンプルについては血清成分を分離後、レプチンおよびアディポネクチン濃度をELISAキットを用いて測定した。BAL液については細胞遠沈後、メイ・ギムザ染色を行い細胞分画を判定し、上清成分についてはELISAキットを用いてTNF α 濃度を測定した。また肺組織をホモジェネートした後にTNF α 濃度を測定した。すべてのデータはmeans \pm SEMとして表示し、ANOVA法およびPost-hoc testとしてTurkey-Kramer法を用いて統計学的推定を行った。p値が0.05未満の時に統計学的に有意差ありと判定した。

C & D. 研究結果と考察

2週間の実験期間後の体重増加量は4群間に有意差はなかった。血清中のレプチン濃度は喫煙により増加したが、補中益気湯飼料群ではその増加量が少なかった（ $p < 0.05$ ）（図1）。血清レプチン濃度と最終体重との間に

は負の相関関係がみられた（ $r = 0.69$ 、 $p < 0.01$ ）（図2）。血清中のアディポネクチン濃度については4群間に有意差はなかった。BAL液の細胞数については喫煙曝露により好中球数が増加したが、補中益気湯飼料群と通常飼料群との間に差はみられなかった。またBAL液中や肺組織ホモジェネート中のTNF α 濃度については4群間で有意差はなかった。以上の結果からは、補中益気湯は喫煙による肺の炎症を抑制しないが、血清レプチン濃度の増加を抑制する可能性が考えられた。

COPD患者においては、急性増悪期の血清レプチン濃度の増加が負のエネルギーバランスと相関すると報告されていることから、補中益気湯の使用が急性増悪期のエネルギーバランスの悪化に防御的に作用する可能性が示された。

E. 結論

喫煙曝露マウスを用いた基礎実験から、補中益気湯は喫煙によるレプチン濃度の増加を抑制する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

Tsuiji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in pulmonary emphysema patients. Am J Respir Crit Care Med 174:

886-893, 2006

Ishikawa T, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Macrophage-colony stimulating factor aggravates rather than regenerates emphysematous lungs in mice. *Respiration* 73:538-545, 2006.

Yagi O, Aoshiba K, Nagai A. Activation of nuclear factor-kB in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 73:610-616, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

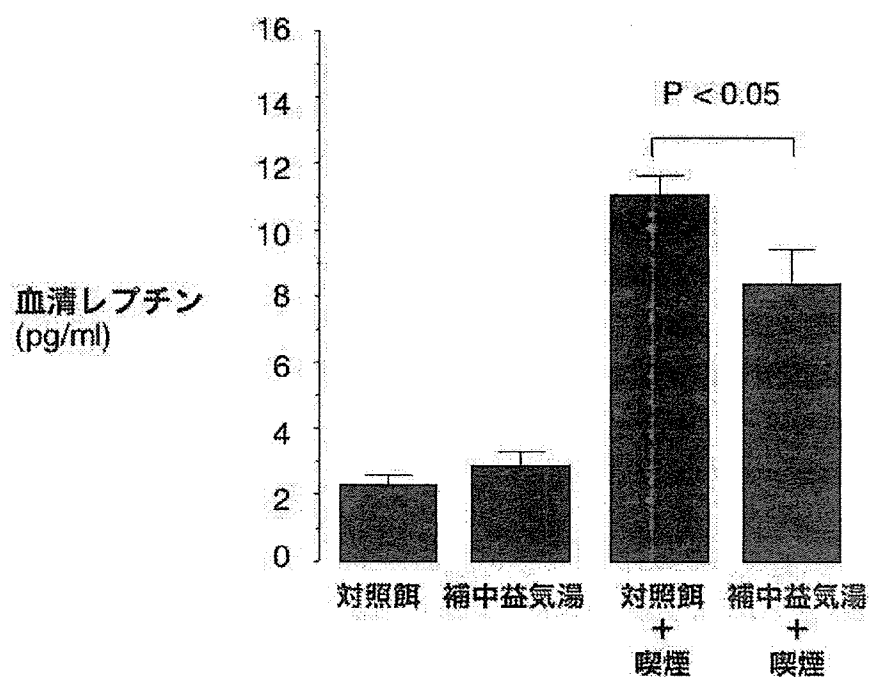


図1. 血清レプチン値

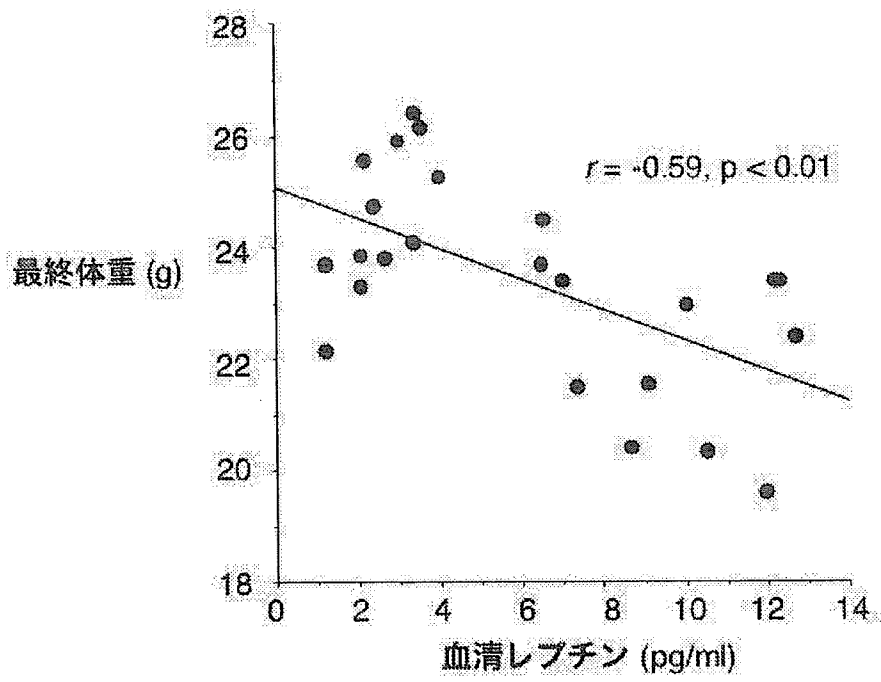


図2. 血清レプチンと体重の関係

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

補中益気湯構成成分の抗ウイルス効果に関する研究

分担研究者 中山 勝敏 東北大学老年呼吸器内科
研究協力者 山谷 睦雄 東北大学老年呼吸器内科
岩崎 鋼 東北大学先進漢方内科

研究要旨

ライノウイルス感染は風邪の主因であり、慢性閉塞性肺疾患の急性増悪を引き起こす。昨年我々は培養気道上皮を用いて、補中益気湯が感染受容体発現抑制や酸性エンドゾーム修飾を介して、ライノウイルス感染を有意に抑制することを示した。今回、補中益気湯の定量規格成分中のどの成分が培養気道上皮のライノウイルス感染予防に重要であるのかを検討した。3次元 HPLC を用いた解析により、補中益気湯の定量規格成分中で最も多い成分は、ヘスペルジン（陳皮のポリフェノール）、グリチルリチン（甘草のサポニン）でほぼ同量であった。In vitro の実験系において、ヘスペルジン、グリチルリチンおよび補中益気湯の抗ウイルス効果を比較検討した（補中益気湯は含有ヘスペルジン量にて換算）。その結果、ヘスペルジンには抗ウイルス効果は認められなかったが、グリチルリチンは補中益気湯と同様の抗ウイルス効果を示した。しかし、その効果は補中益気湯には及ばなかった。補中益気湯全体の抗ウイルス効果は、グリチルリチンと他の構成成分との相乗あるいは相加効果によりに発現すると考えられた。

A. 研究目的

ライノウイルスは風邪の主因であり、慢性閉塞性肺疾患の急性増悪を引き起こす。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、10種の生薬（黄耆、甘草、陳皮、人參、当歸、柴胡、蒼朮、升麻、生姜、大棗）を含む。昨年我々は、培養気道上皮を用いて、補中益気湯が、感染受容体発現抑制や酸性エン

ドゾーム修飾を介して、ライノウイルス感染を有意に抑制することを示した（*British Journal Pharmacology, in press*）。しかし、補中益気湯には多くの構成成分が含まれ、日本薬局方によれば、その定量規格は、1日エキス分量当たり、ヘスペルジン：16-48mg、グリチルリチン：12-36mg、サイコサポニン：0.6-2.4mg を含むとされている。今回、補中益気湯中の定量規格

成分中どの成分が培養気道上皮のライノウイルス感染予防に重要であるのかを検討した。

B. 研究方法

1) 補中益気湯の成分解析：補中益気湯に含まれる主成分（ヘスペルジン、グリチルリチン、サイコサポニン b2）量を 3 次元 HPLC にて解析した。また、常用量（2.5g）の補中益気湯を内服した場合の血中の成分量を検討した。

2) 補中益気湯およびその成分の抗ウイルス効果の検討：補中益気湯、ヘスペルジン、グリチルリチンは 10mg/mL にて DMSO に溶解し、遠心後その上清を希釈にて使用した。これら薬剤を培養気道上皮細胞に対して処理し、3 日後、ライノウイルス主要型（RV14）を 10^5 TCID₅₀U/mL にて感染させた。さらにその後 3 日間の培養気道上皮からのウイルス放出を調べた。

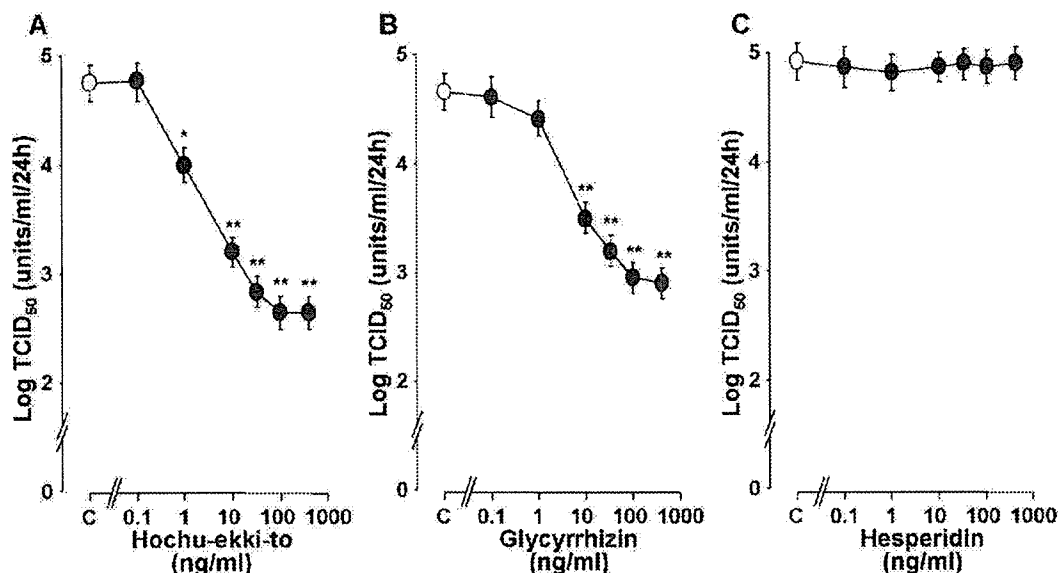
C. 研究結果

1) 補中益気湯成分解析：3 次元 HPLC を用いた解析により、補中益気湯の定量規格成分中で最も多い成分は、ヘスペルジン（陳皮のポリフェノール）、グリチルリチン（甘草のサポニン）でほぼ同量であった。補中益気湯常用量（2.5 g）を内服した場合、ヘスペルジンとグリチルリチン血中濃度は 100–200ng/mL と計算された。

2) 補中益気湯、ヘスペルジン、グリチルリチンの抗ウイルス効果の検討：

補中益気湯は容量依存的に抗ウイルス効果を示し、ヘスペルジン換算 100ng/mL 濃度にてウイルス収量を約 100 分の 1 に抑制した。グリチルリチンも同様に、100ng/mL 濃度において最大効果に達し、ウイルス収量を約 60 分の 1 に抑制した。しかし、補中益気湯の効果には及ばなかった。ヘスペルジンには抗ウイルス効果は認められなかった（図 1）

補中益気湯、グリチルリチン、ヘスペルジンの抗ウイルス効果 (補中益気湯は含有ヘスペルジン量にて換算している)



E. 結論

In vitro の実験系において、補中益気湯の主成分ヘスペルジン、グリチルリチンの抗ウイルス効果を検討し、補中益気湯の抗ウイルス効果と比較した（補中益気湯は含有ヘスペルジン量にて換算した）。ヘスペルジンには抗ウイルス効果は認められなかったが、グリチルリチンは補中益気湯と同様の抗ウイルス効果を示した。しかし、その効果は補中益気湯には及ばなかった。補中益気湯全体の抗ウイルス効果は、グリチルリチンと他の構成成分との相乗あるいは相加効果によりに発現すると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

Yamaya M, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Suzuki T, Asada M, Yoshida M, Seki T, Iwasaki K, Nishimura H, Nakayama K. Hochu-ekki-to inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells. *Br J Pharmacol* (in press).

Yasuda H, Nakayama K, Yamaya M. Carbocysteine therapy in elderly with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 1793-1794.

Nakayama K, Kikuchi A, Yasuda H, Ebihara S, Sasaki T, Ebihara T, Yamaya M. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and the decline in lung

function in Japanese male subjects. *Thorax* 2006; 61: 921.

Yamaya M, Suzuki T, Ishizawa K, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Kubo H, Nakayama K, Nishimura H, Sekizawa K. COPD and Macrolide. *JMAJ* 2006; 49: 158-166.

Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Yamada M, Asada M, Yoshida M, Suzuki T, Sasaki H. Carbocisteine inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial

cells. *Eur Respir J* 2006; 28: 1-8.

Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Tomita N, Yoshida M, Sasaki H. Carbocisteine reduces frequency of common colds and exacerbations in COPD patients. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 378-80.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

補中益気湯による抗炎症作用の薬理学的特性

分担研究者 磯濱 洋一郎
熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物活性学分野

研究要旨

COPD の治療に一定の効果を示す補中益気湯 (TJ-41) の効果には、一部、抗炎症作用が関わっていると考えられるが、これを明確に示す報告は今までになされていない。本研究では、グルココルチコイド dexamethasone (DEX) を対照薬に、in vivo および in vitro の実験系により TJ-41 および TJ-41 に含有される glycyrrhizin (GL) の抗炎症作用を薬理学的に調べた。

TJ-41 は、SO₂ ガス曝露により作成したラットの気管支炎に対し、DEX および GL と同様に、BALF 中の白血球数およびタンパク質量の増加を抑制し、抗炎症作用を有することが確認された。肺上皮細胞株 A549 細胞に IL-8 プロモーター導入したルシフェラーゼアッセイでも、TJ-41 および GL は DEX と同様に TNF- α による本プロモーターの活性化を著明に抑制した。すなわち、これら両薬物は DEX 同様に、転写因子 NF- κ B を抑制すると考えられた。しかし、TJ-41 および GL の作用はグルココルチコイド受容体 (GR) 阻害薬 RU-486 で阻害されず、これらの薬物の抗炎症作用が GR 非依存的な機序に基づくと推定された。さらに、PPAR の関与を想定し、PPAR- α および PPAR- γ の作用薬および阻害薬を用いて検討したが、TJ-41 および GL はこれらの受容体にも作用していないと考えられた。

以上の成績より、TJ-41 およびその構成成分である GL には NF- κ B 抑制作用に基づく抗炎症作用があることが示され、またその機序は、従来知られている GR および PPAR とは異なる未知の機序が関わっていることが推定された。

A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（以下 COPD）の病態形成において、炎症すなわち炎症性サイトカイン類の産生亢進や好中球の活性化の重要性は明らかで

あり、従って、COPD の薬物療法を考える上でも、抗炎症作用は大きな意味を持つ。一方、本研究班のこれまでの研究により、補中益気湯 (TJ-41) には臨床上、COPD に対する一

定の治療効果が見込めることが分か
ってきた。TJ-41 は COPD 患者血清中
の H-CRP および TNF- α 量を低下さ
せるなど、その作用の一部には、抗
炎症作用が存在すると推定されるが、
本法剤の抗炎症作用に関する詳細な
薬理学的検討は行われていない。

そこで我々は、まず、SO₂ ガス曝露
により作成したラットの亜急性気管
支炎モデルを用いて、TJ-41 が気道炎
症に対する抑制作用をもつか否かにつ
いて調べた。次に、TJ-41 の抗炎症
作用の機序を考えるために、種々の in
vitro 試験系を用いて、TJ-41 の効果
を調べた。

なお、本研究では、TJ-41 の構成生
薬の一つであり、本法剤の抗炎症作
用を担う可能性があると考えられる
glycyrrhizin についても同様に検討し、
既存の抗炎症薬である dexamethasone
(DEX) を対症薬として実験を行った。

B. 研究方法

1) ラット亜急性気管支炎モデルの作 成および薬物の投与

当研究室が所有する SO₂ ガス曝露
装置 (美和製作所製) を用いて、Wistar
系雄性ラット (6 週齢, 九動株式会社)
に SO₂ ガスを 1 日 2 時間、3 週間曝露
し、亜急性気管支炎を惹起した。SO₂
ガスの濃度は、第 1 週目を 300 ppm、
第 2 週目を 300-500 ppm および第 3
週目を 500 ppm とした。薬物は、第
1 日目より毎日 1 回、SO₂ ガス曝露の

直前に投与した。補中益気湯は、25
mg/ml または 250 mg/ml の懸濁液とし
て調製し、0.1 または 1 g/kg となるよ
うに、ゾンデを通じて胃内投与した。
一方、dexamethasone および glycyrrhizin
は皮下投与とした。

2) 気管支肺胞洗浄および成分の生 化学的分析

最終日の SO₂ ガス曝露終了後、気
管カニューレを介して肺洗浄を行った。
10 ml の生理食塩水の注入、回収
を二回繰り返し、その回収液 (BALF)
を遠心 (450 xg, 10 min) により沈渣
と上清に分離した。沈渣中の総細胞
球数を計測し、細胞成分はさらにギ
ムザ染色を施し、マクロファージ、
好中球、好酸球およびリンパ球の構
成比を顕微鏡下の計測により求めた。
また、BALF 上清は、総タンパク質、
phosphatidylcholine および fucose 濃度
の測定に供し、それぞれ下記の方法
により測定した。

総タンパク質

総タンパク質濃度の測定には、
Bio-Rad 社プロテインアッセイ試薬を
用いて、BSA を標準物質とした検量
線により定量化した。

Phosphatidylcholine

Phosphatidylcholine 濃度は、BALF
上清を試料としてアクアオートカイ
ノス PL (カイノス社) を用いて測定
した。標準物質としては、本キット
に含まれる標準 phosphatidylcholine を

用いた。

Fucose

Fucose 濃度は、BALF 上清を試料として Gibbons 法により測定した。標準物質としては、fucose (Wako 社) を用いた。

細胞株および培養法

In vitro 試験には、理研細胞バンクより入手したヒト肺上皮腺癌細胞株 A549 細胞を用いた。A549 細胞は 10% ウシ胎仔血清および抗生物質 (penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100 mg/ml) を添加した DMEM 用いて、5% CO₂, 37°C に保った CO₂ インキュベーター内で培養した。

レポーター遺伝子

IL-8 プロモーターのレポーター遺伝子は、A549 細胞より調整したゲノム DNA を鋳型として上流 (5'-GATTGGCTGGCTTATCTTCACC-3') および下流 (5'-TTGTCCTAGAAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC-3') のプライマーを用いた PCR 法によって -339 ~ +21 の 361 base 長をクローニングし、ルシフェラーゼ Vector の上流に組み込んだ。

細胞内への遺伝子導入及びプロモーター活性の測定

細胞への DNA の導入には HilyMax (同仁化学) を用い、導入効率のバラつきを補正するために、細胞へのレポーター遺伝子の導入時に pHRG-

TK vector (Promega) を同時に導入した。DNA を導入した細胞は 24 時間後に薬物を含む DMEM に培養液を交換し、さらに 6 時間培養して、ルシフェラーゼアッセイに供した。

ルシフェラーゼアッセイは薬物存在下に培養した細胞の可溶化液を試料として、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行い、ルシフェラーゼの発光をルミノメーター (Lumat LB9507, EG&G Berthold 社) にて測定した。

蛍光免疫染色

試料とする細胞は、ファイブロンクチンでコートした 35-mm glass bottom dish を用いて培養した。細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定、0.5% Triton X-100-PBS 処理により細胞膜透過標本とした。これを、常法により、3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl-phenanthridinium diiodide (PI) (Sigma) を用いて核染色するとともに、抗 p65 抗体 (Santa Cruz) および FITC で標識した抗ウサギ抗体を用いた免疫染色によって p65 を染色した。標本は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus) を用いて、488 nm および 543 nm の励起光を照射し蛍光観察した。

iNOS mRNA 量の測定

iNOS mRNA は real-time PCR 法により測定した。各ラットの左肺実質

を抽出し、逆転写の後に iTaq SYBER Green Supermix with ROX (Bio-Rad) を用いて、iNOS mRNA および内部標準として GAPDH の real-time PCR を行った。

C. 研究結果

1) SO₂ ガス曝露ラットにおける補中益気湯の抗炎症作用

Fig. 1 に示すように、SO₂ ガス曝露により、BALF 中には著明な総白血球数の増加すなわち浸潤が認められ、明

らかな気道炎症を生じていた。ギムザ染色を施し、細胞の組成を確認したが、好中球の浸潤が著明であり、またリンパ球およびマクロファージも増加していたが、好酸球は殆ど認められず、臨床上の気管支炎と類似の病態であることが確認された。これに対し、dexamethasone (以下、DEX) (0.1 mg/kg, sc), glycyrrhizin (以下、GL) および補中益気湯 (以下 TJ-41) を投与群では、BALF 中の総細胞数が有意 ($p < 0.05$) に減少した (Fig. 1)。

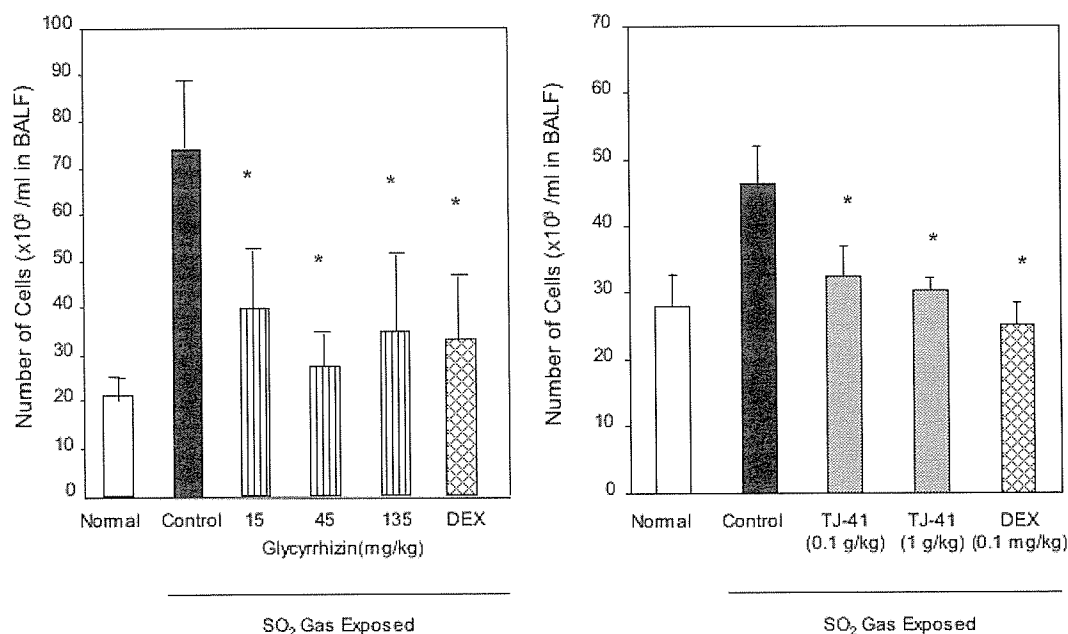


Fig. 1. Effects of Glycyrrhizin, TJ-41 and Dexamethasone on Cell Number in BALF from SO₂-exposed Rat Lungs

BALF 中への白血球の浸潤とよく相関して、SO₂ガス曝露による BALF 中のタンパク質濃度の上昇が生じた (Fig. 2). タンパク質の組成については検討しなかったが、血管透過性の亢

進に伴うアルブミン等血清成分の浸潤によると考えられる. この BALF タンパク質量の増加に対しても、DEX, GL および TJ-41 は抑制することが分かった (Fig. 2).

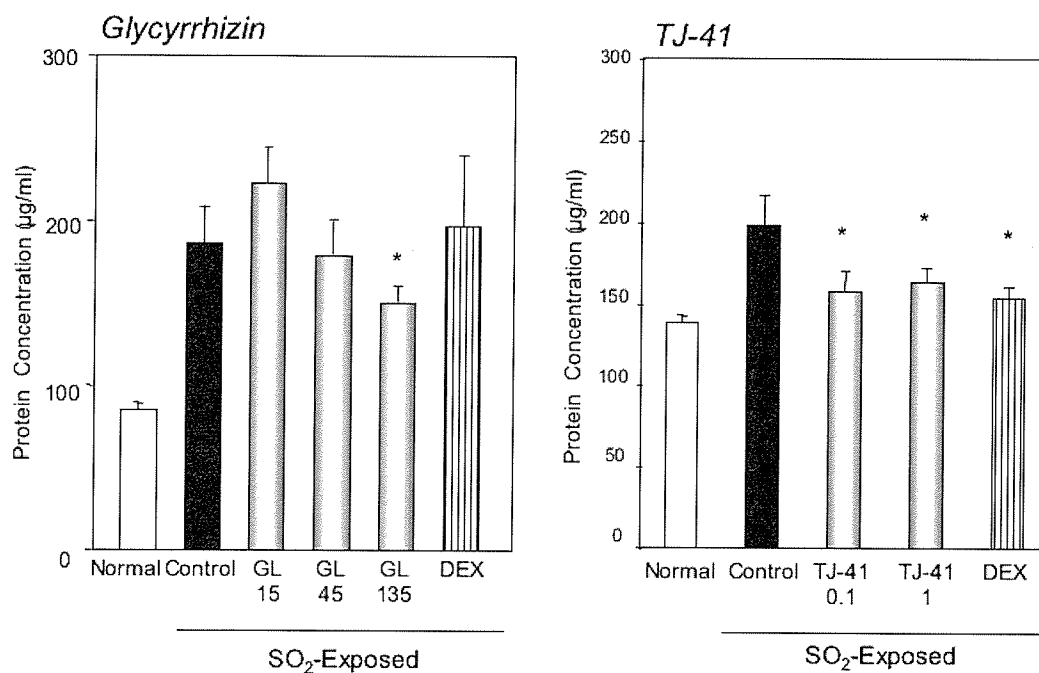


Fig. 2. Effects of GL, DEX and TJ-41 on Protein Content in BALF from SO₂ Gas-exposed Rats

一方、肺サーファクタント分泌の指標である phosphatidylcholine (PC) 量も SO₂ガス曝露によって著明に増加したが、今回用いた薬物はいずれも PC

量には影響せず (Fig. 3)、サーファクタント分泌に対する著明な作用はないと考えられた.

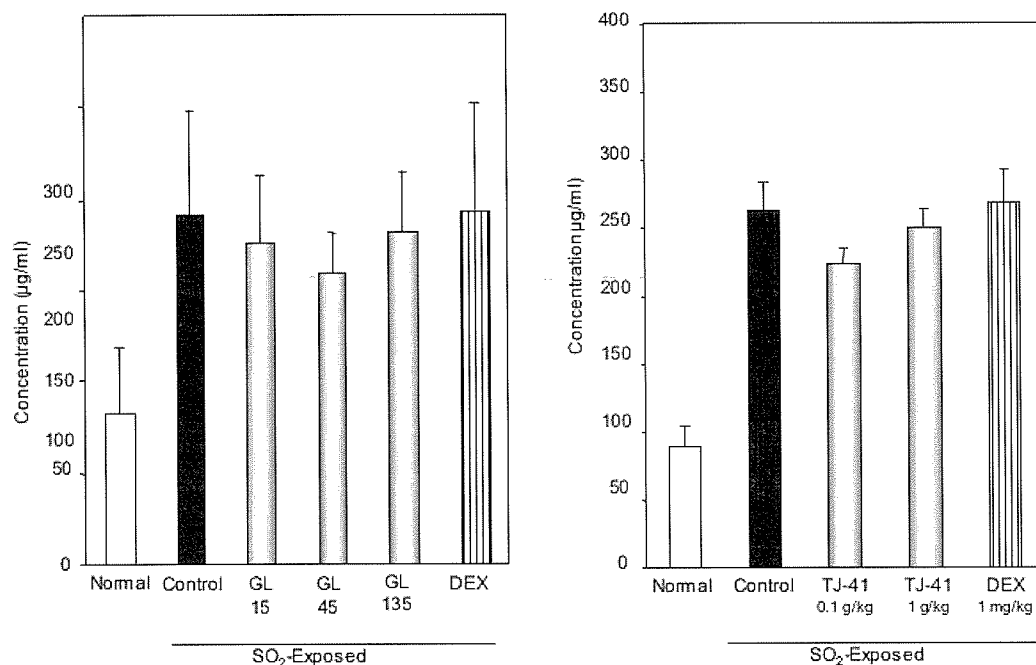


Fig. 3. Effects of GL, TJ-41 and DEX on Phosphatidylcholine Contents in BALF from SO₂-gas Exposed Rat Lungs

さらに、粘液分泌の指標として fucose 量も測定した。SO₂ ガス曝露群では、正常ラットに比べ fucose 量の有意な増加が認められたが、BALF 中には不溶性の痰が多く認められ (Fig. 4)、これらをガーゼにて濾別したために、

その変化は予想した結果よりも小さかった。各薬物も、SO₂ ガスによる fucose 量の増加を抑制する傾向にはあったが、統計学的に有意な低下を示したのは高用量 (135 mg/kg) の GL だけであった (Fig. 4)。