

Fig. 4. Effects of GL, TJ-41 and DEX on Fucose Contents in BALF from SO₂-gas Exposed Rat Lungs

これらの結果より、SO₂ ガス曝露により惹起した気管支炎に対して、TJ-41 は DEX および GL と同様に抗炎症作用を示すことが明らかとなった。DEX 投与群では、臨床的な副作用と良く一致して、著明な体重増加の抑制と胸腺の萎縮が認められた。しかし、TJ-41 および GL ではこれらの副作用は認められず、両薬物による抗炎症作用の機序が、グルココルチコイドとは異なることが推定された。

2) In vitro 試験による補中益気湯および GL の抗炎症作用機序に関する解析

2-1) GL, TJ-41 および DEX の IL-8 プロモーター活性に対する作用

DEX を始めとするグルココルチコイド類は、転写因子 NF-κB および AP-1 等の抑制を通じて、IL-8 等のサイトカイン類の産生を抑制することで抗炎症作用を現すことが知られている。そこで、TJ-41 および GL がグルココルチコイド様の NF-κB 抑制作用をもつか否かについて、NF-κB 依存性の IL-8 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより調べた。

肺上皮細胞の細胞株である A549 細胞に IL-8 プロモーターを組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を一過性に導入し、これを TNF- α で刺激すると、Fig. 5 に示すように、プロモーター活性は亢進された。これに対し、DEX は

TNF- α による活性化亢進を著明に抑制したが、GL および TJ-41 でも DEX と同様に有意な ($p < 0.05$) IL-8 プロモーター活性化抑制作用が認められた (Fig. 5)。

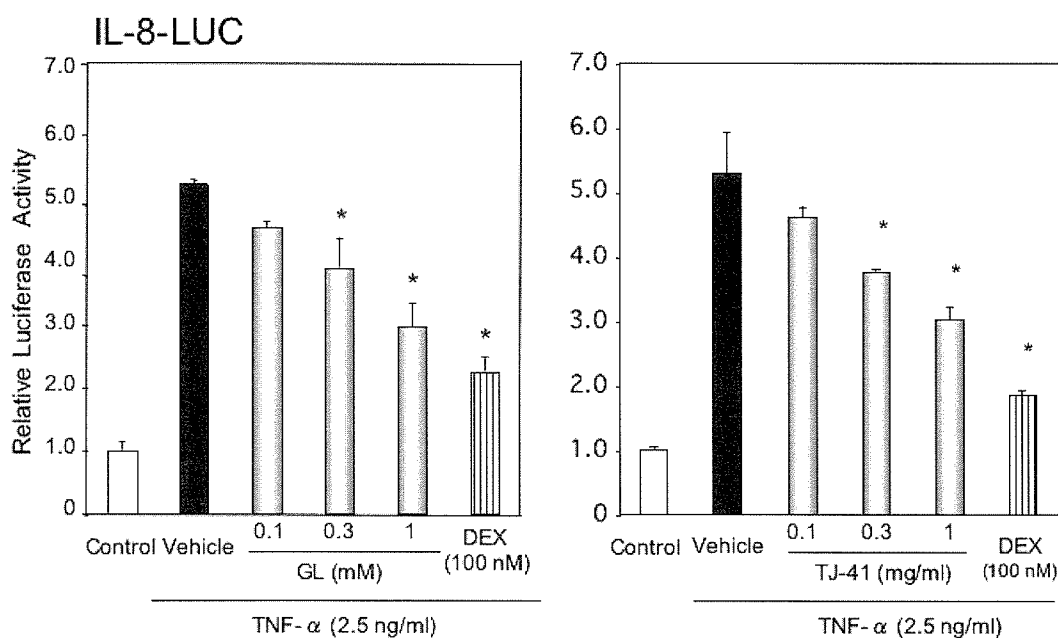


Fig. 5 Transrepression by GL, TJ-41 and DEX on TNF- α -induced IL-8 Promoter Activation in A549 Cells

DEX による IL-8 プロモーター活性抑制作用はグルココルチコイド受容体 (GR) を介して生じると考えられる。しかし、GL および TJ-41 が DEX と同様に GR を活性化するか否かについては不明である。そこで、GR 阻害

薬である RU486 存在下に同様の実験を行った。RU-486 は DEX の作用を有意に消失させたが、GL および TJ-41 による抑制作用には著明な影響を与えなかった (Fig. 6)。すなわち、興味深いことに、GL および TJ-41 は GR

非依存的に TNF- α による IL-8 プロモーターの活性化を抑制すると考えられた。

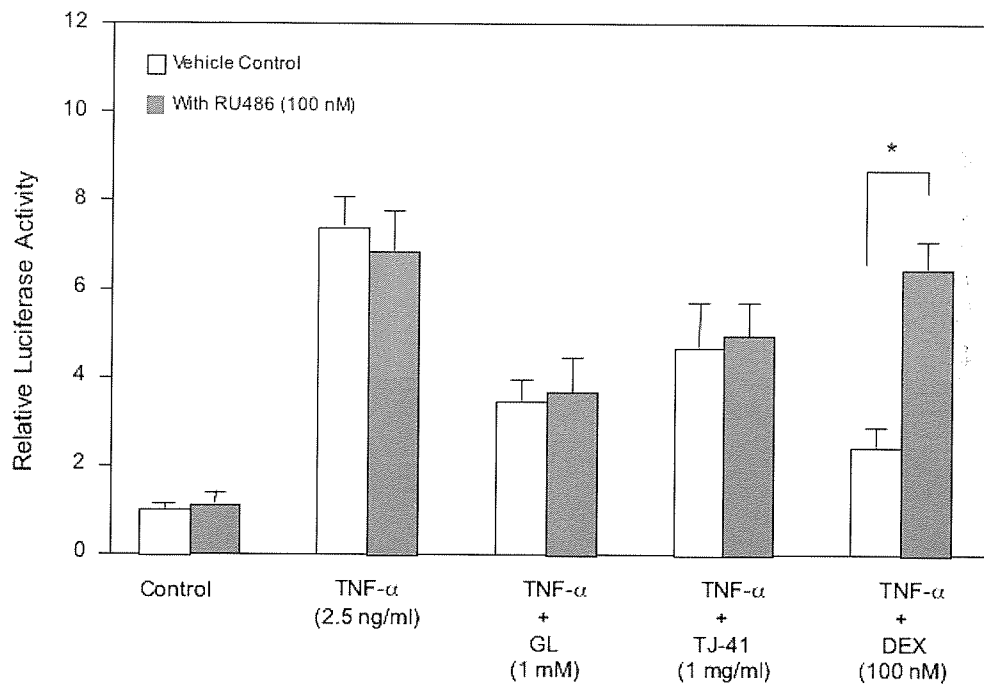


Fig. 6. GL and TJ-41 Decrease IL-8 Promoter Activity Not through Glucocorticoid Receptor

2-2) GL による転写調節作用の特性

GL および TJ-41 による IL-8 プロモーター活性化抑制作用について、さらに分子薬理的に追究した。まず、GL の作用について記述する。

GL の IL-8 プロモーター活性化の抑制作用が NF- κ B の抑制であることを確

認するために、IL-8 プロモーターの代わりに NF- κ B 特異的配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ p κ B-Luc を用いて、同様の実験をおこなった。その結果、GL は濃度依存的に TNF- α により惹起した転写亢進を阻害し (Fig. 7),

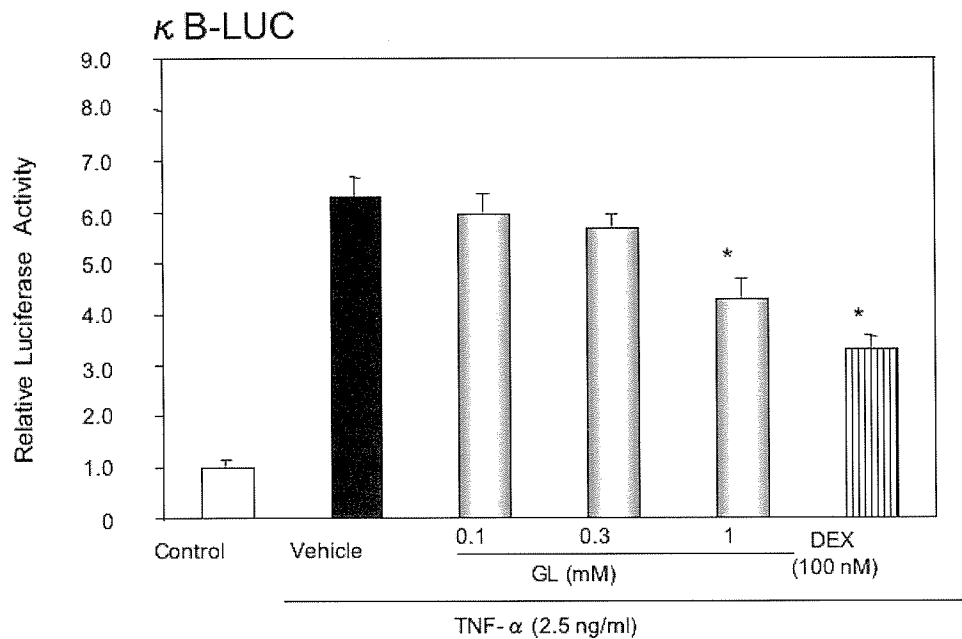


Fig. 7. Transrepression by GL and DEX on TNF- α -induced NF-kappa B Promoter Activation in A549 Cells

GL に NF- κ B 抑制作用があることが確認された。また、内因性の IL-8 mRNA の発現量に対する GL および DEX の作用を real-time PCR 法により測定したが、前述のルシフェラーゼアッセイの結果とよく相関して、IL-8

mRNA 量は、TNF- α によって増加し、この増加は DEX および GL によって阻害された (Fig. 8)。従って、GL は DEX と同様に NF- κ B を阻害し、IL-8 の mRNA 発現を転写レベルで抑制することが考えられた。

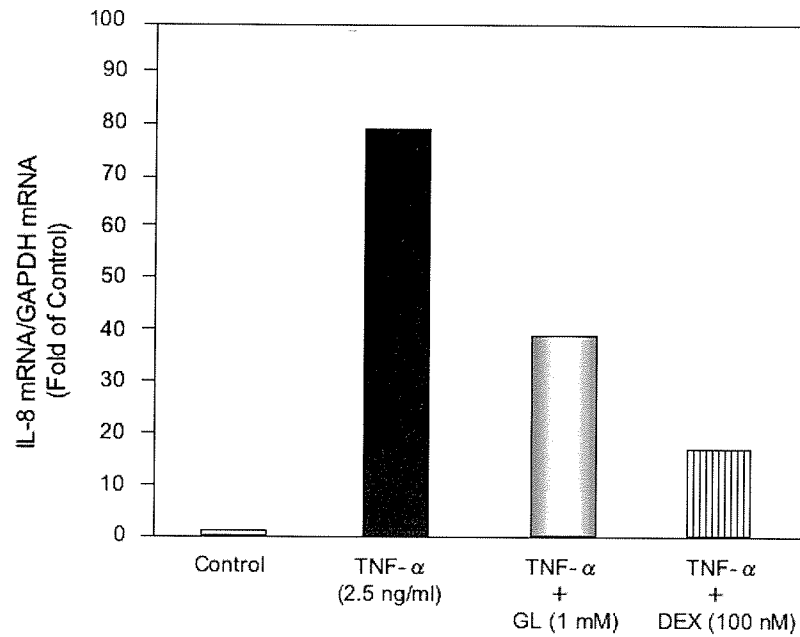


Fig. 8 Effects of GL and DEX on TNF-alpha-induced IL-8 mRNA Expression in A549 Cells

一般に、DEXによるNF- κ Bの阻害は、p50およびp65の核移行の阻害ではなく、核内で生じていると考えられている。しかし、GLによる抑制作用にはTNF- α 受容体およびその下流シグナルの抑制が関わっている可能性も考えられる。そこで、DEXおよび

GLのp65の核移行に対する作用を調べた。その結果、GLはDEXと同様に、TNF- α によるp65の核移行に影響せず (Fig. 9)、GLはGRを介さないものの、DEXと同様に核内でNF- κ B活性を阻害すると推定された。

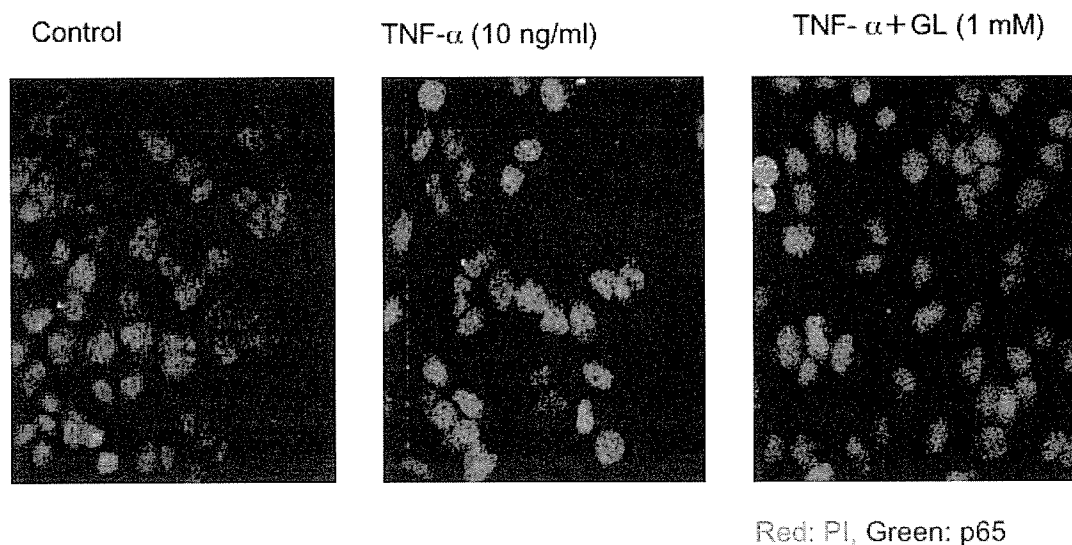


Fig. 9. Effect of GL on Nuclear Localization of NF-kB p65 in A549 Cells

2-3) GL および TJ-41 による転写調節作用への PPAR の関与

上述の GR 阻害薬を用いた阻害実験により，GL および TJ-41 による IL-8 プロモーター活性の抑制は，GR 非依存的であることが判明した．近年，GR 以外に抗炎症作用を持つ核内受容体として PPAR が注目を集めている．そこで，PPAR- α および PPAR- γ の作用薬および阻害薬を用いて，GL および TJ-41 の作用に PPAR が関わる可能性について調べた．

PPAR- α ・PPAR- γ の選択的阻害薬として，MK886・GW9662 を用い，TNF- α で惹起した IL-8 プロモーター

の活性化に対する GL および DEX の抑制作用に対する各阻害薬の効果を判定した．なお，両 PPAR 阻害薬の濃度は既報の文献中で用いられている最高濃度に設定した．その結果，Fig. 10 に示すように，MK886 および GW9662 はいずれも GL および DEX による IL-8 プロモーターの活性化抑制に影響しなかった．一方，PPAR- α 作用薬である Wy14643 による IL-8 プロモーター活性に対する作用も調べたが，Wy14643 は，DEX, GL および TJ-41 とは異なり，TNF- α により惹起した IL-8 プロモーターの活性化を抑制しなかった (Fig.11)．

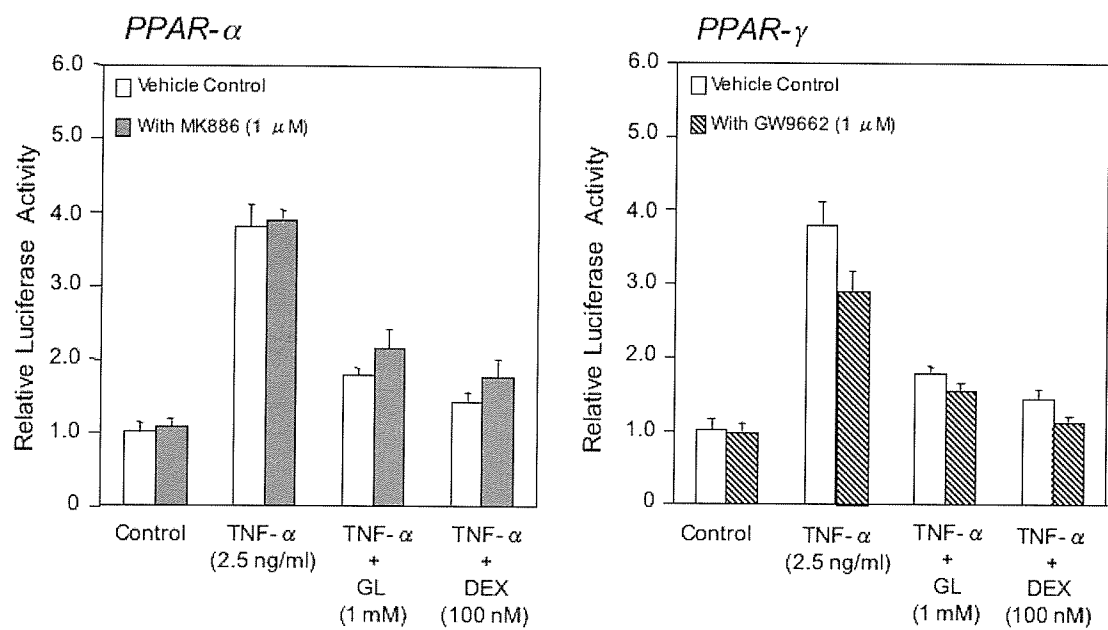


Fig. 10. GL Decreases IL-8 Promoter Activity Not through PPAR- α and PPAR γ

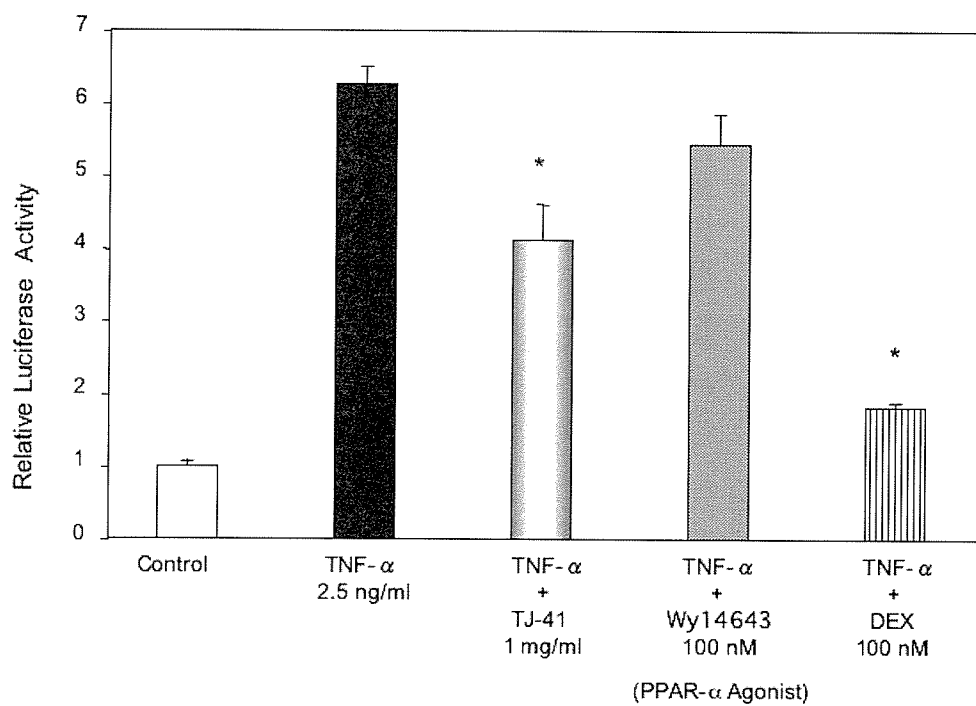


Fig. 11. Wy14,643, a PPAR-alpha Agonist, Does not Decrease IL-8 Promoter Activity in A549 Cells

さらに、GL および TJ-41 が PPARs リガンド様作用をもつか否かを判定するために、PPAR 感受性と報告されている iNOS の mRNA 発現に対する作用を調べた。A549 細胞を cytokine mix (TNF- α , IL-1 β および INF- γ) で刺激し iNOS の発現を誘導し、iNOS の mRNA は real-time PCR 法により検出した。本実験系では、PPAR 作用薬の

うち、PPAR- γ 作用薬である 15d-PGJ₂ だけが iNOS の発現を抑制し、PPAR- α 作用薬である Wy14643 には、著明な作用は認められなかった (Fig. 12)。一方、DEX, GL および TJ-41 については、DEX および GL で強い抑制作用を認めたが、TJ-41 では iNOS の誘導を抑制できなかった (Fig. 12)。

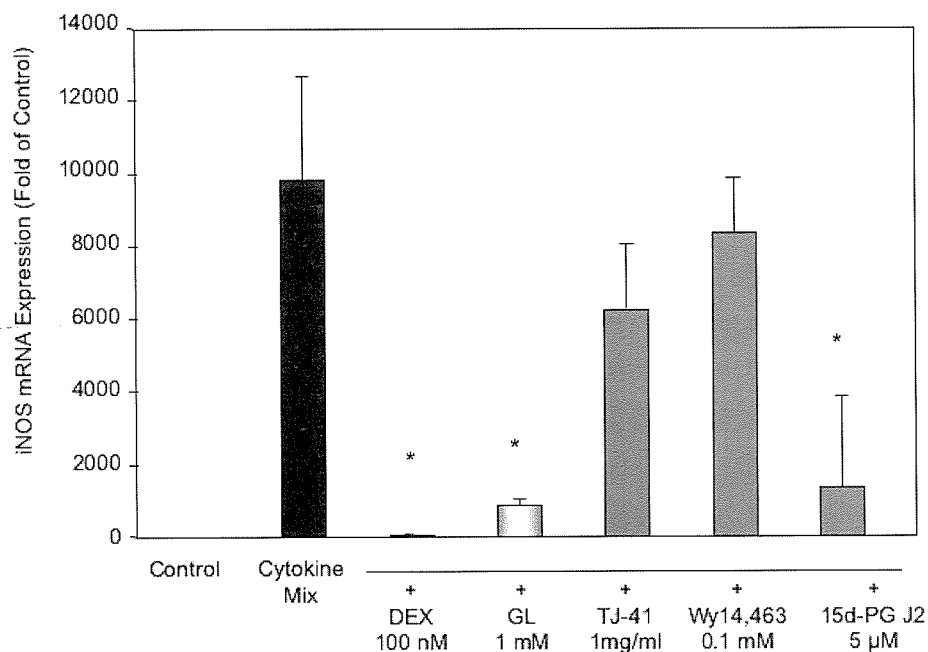


Fig. 12. Effects of Various Anti-inflammatory Reagents on iNOS mRNA Expression in A549 Cells

D. 考察

TJ-41 は临床上 COPD の病態に一定の治療効果を示すと考えられ、それには抗炎症作用が関わっている可能性が考えられる。また、TJ-41 は抗炎症作用の示されている GL を主成分とする甘草をその構成生薬として含んでおり、そのことも TJ-41 に抗炎症作用がある可能性を示唆している。しかし、TJ-41 の抗炎症作用を明確に示す薬理的な成績はこれまでにない。そこで本研究では、まず TJ-41 の抗炎症作用の有無を明確にすることを目的としたが、複数のデータが TJ-41 に抗炎症作用があることを示した。

第 1 に、SO₂ ガス曝露により作成したラット気管支炎モデルにおいて、TJ-41 は BALF 中の白血球およびタンパク質量の増加を著明に抑制した。また、*in vitro* での IL-8 プロモーター活性を指標に調べた IL-8 産生についても TJ-41 は著明に抑制した。これらの成績は、TJ-41 の気道炎症抑制作用を *in vivo* および *in vitro* の両実験系で示すものであり、白血球、特に好中球の活性化に関わる IL-8 の産生抑制が少なくとも一部関わっている可能性を示している。

これらの作用は、対象のために調べたグルココルチコイド DEX の作用と類似していた。しかしながら、*in vivo* での TJ-41 の連日投与では、DEX 投与群で生じた体重の増加抑制や胸腺

の萎縮は認められず（データは示さず）、TJ-41 にグルココルチコイド様物質すなわち GR のリガンドが含まれている可能性は低いと考えられた。このことを支持するように、*in vitro* の実験でも TJ-41 による IL-8 プロモーター活性の抑制は GR 阻害薬の影響を受けなかった (Fig. 6)。

一方、本研究では、GL も DEX と同様の *in vivo* での抗炎症作用および *in vitro* での IL-8 プロモーター活性化抑制作用をもつことが分かった。しかし、TJ-41 と GL の作用は完全には一致しなかった。例えば、cytokine mix により惹起した iNOS mRNA の発現亢進では、GL は明確な抑制作用を示したが、TJ-41 には著明な作用はなかった。また、データは示さないが、グルココルチコイド感受性の MMTV プロモーターを用いた実験で、GL は DEX による転写活性化を著明に亢進したのに対し、TJ-41 には同様の DEX の transactivation 亢進作用は認められなかった。従って、TJ-41 による抗炎症作用は GL だけに依存するのではなく、他の成分が関わっていることが示唆されたが、この点については、TJ-41 の構成生薬から甘草を除いた方剤を用いた実験など、さらに検証する必要がある。

最後に、TJ-41 の抗炎症作用の機序として PPAR- α および PPAR- γ の可能性を推定し、*in vitro* での実験によ

りこれを検証したが、IL-8 プロモーター抑制および iNOS mRNA 発現において TJ-41 の作用は両 PPARs のアゴニストとも一致しなかった。従って、本方剤の抗炎症作用の機序としては上述の GR に加え PPAR の関与も否定された。

E. 結論

以上の成績より、TJ-41 グルココルチコイド様の抗炎症作用および炎症性サイトカイン IL-8 産生抑制作用をもつものの、その機序は GR および PPAR のどちらにも依存しないと考えられた。これらの結果は、TJ-41 の COPD に対する治療効果を薬理学的に裏付けるとともに、抗炎症作用に繋がる GR および PPAR 以外の機序を考える上で、興味深い材料であることを示している。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu W, Singh IS, Isohama Y, Miyata T, Kim KC. Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF-kappaB activation via EGFR

transactivation in a lung epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 291, L407-16 (2006).

Nomura J, Horie I, Seto M, Nagai K, Hisatsune A, Miyata T, Isohama Y. All-trans retinoic acid increases expression of aquaporin-5 and plasma membrane water permeability via transactivation of Sp1 in mouse lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 351, 1048-53 (2006).

Nomura J, Hisatsune A, Miyata T, Isohama Y. The role of CpG methylation in cell type-specific expression of the aquaporin-5 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 in press.

Nagai K, Watanabe M, Mayumi Seto, Hisatsune A, Miyata T, Isohama Y Nitric Oxide decreases cell surface expression of aquaporin-5 and membrane water permeability in lung epithelial cells *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

補中益気湯の THP-1 細胞のサイトカイン分泌に及ぼす影響

分担研究者 瀬山 邦明

研究協力者 小池,建吾、秋吉 妙子、関谷 充晃、福地 義之助

研究要旨

COPD の慢性炎症には、好中球やマクロファージ等の炎症細胞が深く関係すると考えられており、本研究では特にマクロファージに注目し、補中益気湯がマクロファージに及ぼす影響を検討した。マクロファージとしては、急性単球性白血病患児末梢血より樹立され、単球としての性状を保有する事が確認されている THP-1 細胞を用いた。In vitro で補中益気湯は、THP-1 細胞の VEGE 及び MMP-9 の産生量には目立った影響は与えなかったが、濃度依存性に THP-1 細胞の細胞増殖を促進し、炎症性サイトカインの産生を抑制した。そして、Cigarette Smoke Extract (CSE) の細胞障害作用を軽減し、細胞死を抑制した可能性があると考えられる。COPD 患者では、炎症性メディエーターの産生が増加していると報告されており、補中益気湯は COPD の増悪を抑える補助薬になる可能性があると考えられる。

A. 研究目的

慢性閉塞性疾患(COPD)の国際的ガイドラインである GOLD(Global Initiative for Chronic Obstructive Lung disease)では、「COPD は予防と治療が可能な疾患であり、個々の患者の重症度を規定しうる、重大な全身への影響を伴う。肺病変は完全には可逆的ではない気流制限を特徴とする。この気流制限は通常進行性で、有害な粒子またはガスに対する肺の異常反応を伴う。」と定義されている。2005 年の世界死因では第 4 位となり、

COPD 罹患率の高さや医療経済における負担の大きさから世界的に研究が進められている。日本における COPD 患者数は 22 万人(1996 年厚生省調査)とされていたが、Fukuchi らの大規模疫学研究(NICE Study)では、日本全国の患者数は約 530 万人と推定された (Fukuchi Y ,et al. *Respirology*. 2004 ;9:458-65)。肺病変に対する治療薬としては、主に気管支拡張薬等の吸入薬が推奨されているが (Tashikin DP, et al: *Chest* 125:249-259, 2004)、COPD の全身への影響として

現れる体重減少や栄養障害に対しての薬物治療のエビデンスは今のところ確立されていない。

補中益気湯は、約 750 年の歴史をもつ漢方薬で、中国のみならず、日本を含む近隣諸国でも幅広く使用され、食欲不振の改善や体力増強に効果を示す薬として知られている (Makoto M, et al: *Gendai toyo igaku* 1995; 16: 501-507)。補中益気湯投与により少数例ではあるが COPD 患者の急性増悪の頻度や感冒罹患率が減少した報告があり (篠塚成順ら: 呼吸不全に関する調査研究班 2006 抄録集:27.)、補中益気湯は COPD の栄養状態・免疫機能を改善して、患者の QOL や生命予後の改善に寄与する可能性があると考えられる。補中益気湯の作用機序としては、抗ウイルス効果や栄養状態改善や全身性の炎症の改善等が推定されており、特に免疫に対する効果が注目されている。

COPD の慢性炎症には、好中球やマクロファージ等の炎症細胞が深く関係すると考えられており (Barnes PJ, Hansel TT. *Lancet*; 364(9438): 985, 2004)、本研究では特にマクロファージに注目し、補中益気湯がマクロファージに及ぼす影響を検討した。マクロファージとしては、急性単球性白血病患児末梢血より樹立され、単球としての性状を保有する事が確認されている THP-1 細胞 (Tsuchiya S, et al.: *Int. J. Cancer* 1980; 26: 171-176.) を用いた。

B. 研究方法

1. 補中益気湯液の調整

補中益気湯は(株)ツムラのエキス製剤 TJ-41 を 10%ウシ胎児血清加 RPMI-1640 に 1mg/ml の濃度で懸濁し、35 度、3 時間インキュベーションを行って溶解を確認後、フィルター濾過滅菌 (0.45 μ m ポアサイズフィルター) を行った。対照培養液として、10%ウシ胎児血清加 RPMI-1640 に 35 度、3 時間インキュベーションし、上記の補中益気湯液(1mg/ml)と混合し、0, 10, 50, 100, 500 μ g/ml の濃度に希釈して使用した (片岡哲郎:補中益気湯によるマクロファージ活性化. 癌と化学療法 1989;16:1490-3)。

2. Cigarette Smoke Extract (CSE) の調整

フィルターなしの Pieace® (29 mg of tar and 2.5 mg of nicotine per cigarette; Japan Tobacco Inc, Tokyo, Japan) をたばこ煙発生装置 (model SIS-CS SG200) を用いて、20%のタバコ煙を作成し、10%ウシ胎児血清加 RPMI-1640(30ml) 中に誘導して 5 分間 bubbling (約 Pieace®1.5 本消費) させた。その後、フィルター濾過滅菌 (0.45 μ m ポアサイズフィルター) を行い、10%ウシ胎児血清加 RPMI-1640 と混合させて 0, 10, 20, 30, 40%の濃度に希釈して使用した。

3. 細胞培養と培養上清中のサイトカ

培養用プレートに 5×10^5 /well ずつ分注し、0, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ の補中益気湯液濃度で培養を開始し、24, 48, 72 時間毎に培養上清を回収した。細胞培養は、各条件を triplicate で行った。生細胞数はトリパンプルーを用いて計測した。培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL10, TNF α) や VEGF 及び MMP-9 をマルチプレックスサスペンションアレイにより測定した。

CSE 添加による THP-1 細胞への影響は、培養液中に 0, 10, 20, 30, 40% となるよう CSE を添加して 24, 48, 72 時間毎の生細胞数を計測した。さらに、

CSE20% 添加条件において補中益気湯の効果をも 0, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えて培養し、補中益気湯の CSE に対する効果を検討した。

C. 研究結果

補中益気湯の THP-1 細胞増殖の影響

補中益気湯の THP-1 細胞増殖の影響を図 1 に示した。24 時間後には培養開始時の 2 倍近くに増殖し、補中益気湯添加の有無によらず細胞数は変化がなかった。しかし、48 時間、72 時間と時間が経過するにつれて補中益気湯の添加濃度に依存して細胞増殖が促進された結果となった。

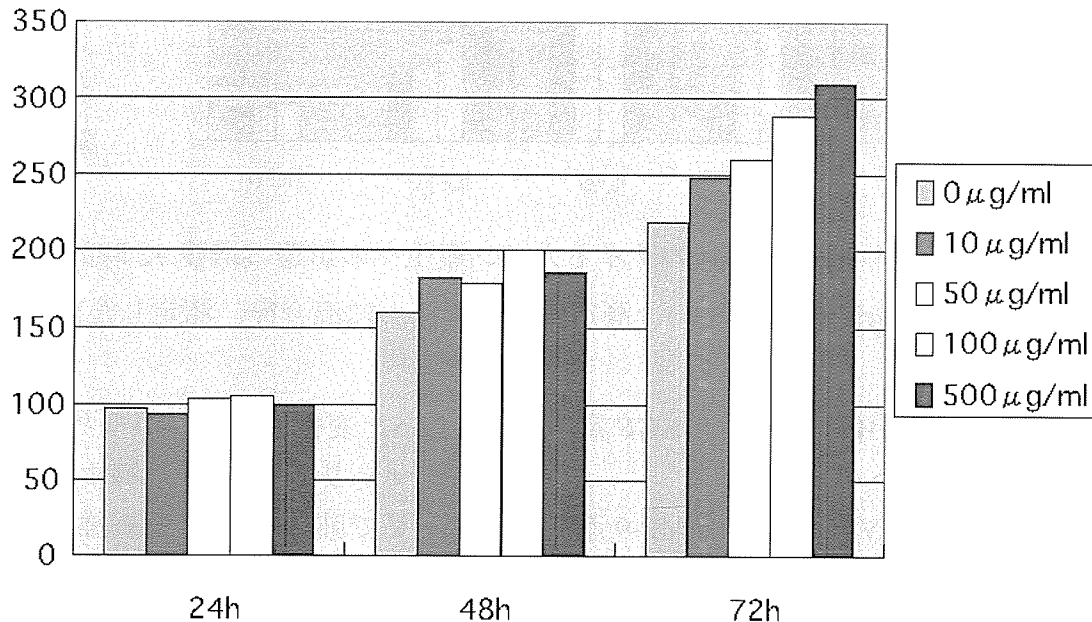


図 1. 補中益気湯の THP-1 細胞増殖への影響 (各培養条件は triplicate で行い、測定は上清を 1 つに混合後、測定した)

2. 補中益気湯の THP-1 細胞のサイトカイン産生への影響

補中益気湯の THP-1 細胞のサイトカイン産生への影響を図 2 に示した。無刺激でのサイトカイン分泌を見ると、IL-1 β は他と比べると産生量は少

なく、IL-8 は産生量が多かった。補中益気湯の濃度が増えるにつれて IL-6, 8, 10 の産生量が抑えられる傾向を認めた。TNF α も顕著ではないが、補中益気湯の濃度が増加するにつれて、産生量が抑えられる傾向であった。

(濃度単位 : pg/ml)

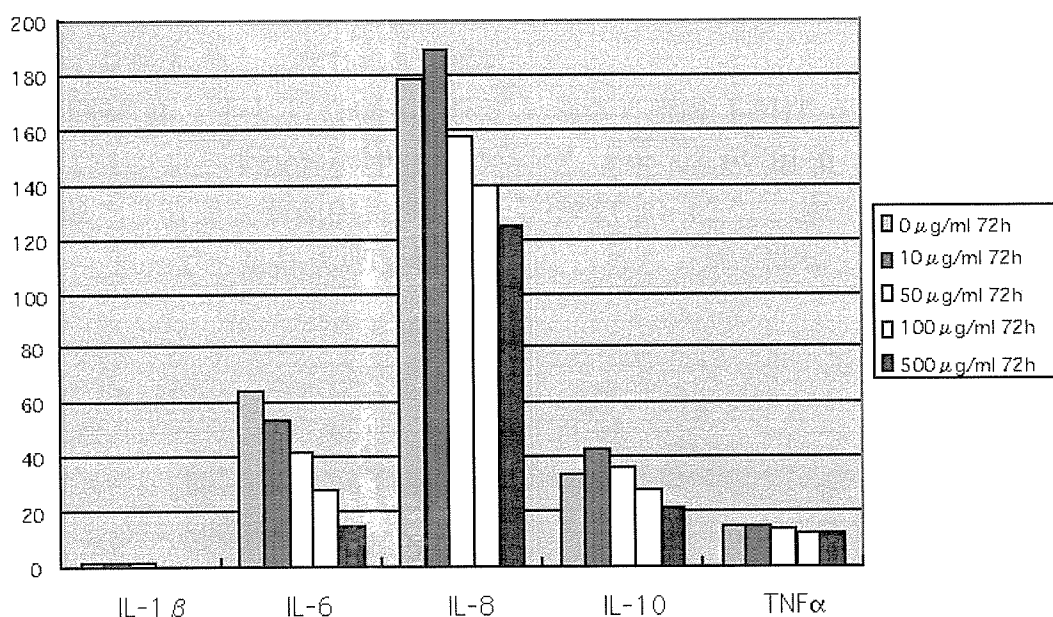


図 2. 補中益気湯の THP-1 細胞のサイトカイン産生への影響 (培養 72 時間後)

(各培養条件は triplicate で行い、測定は上清を 1 つに混合後、測定した)

補中益気湯の THP-1 細胞の VEGF 及び MMP-9 産生への影響

補中益気湯の VEGF 及び MMP-9 産生への影響を図 3 に示した。脈管形成の重大な調節因子である VEGF は補中益気湯の濃度が増加しても産生量

に目立った変化は認めなかった。また、細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼで肺の気腫化や繊維化に関わると推測されている MMP-9 も同様に産生量に目立った変化は認めなかった。

(濃度単位 : pg/ml)

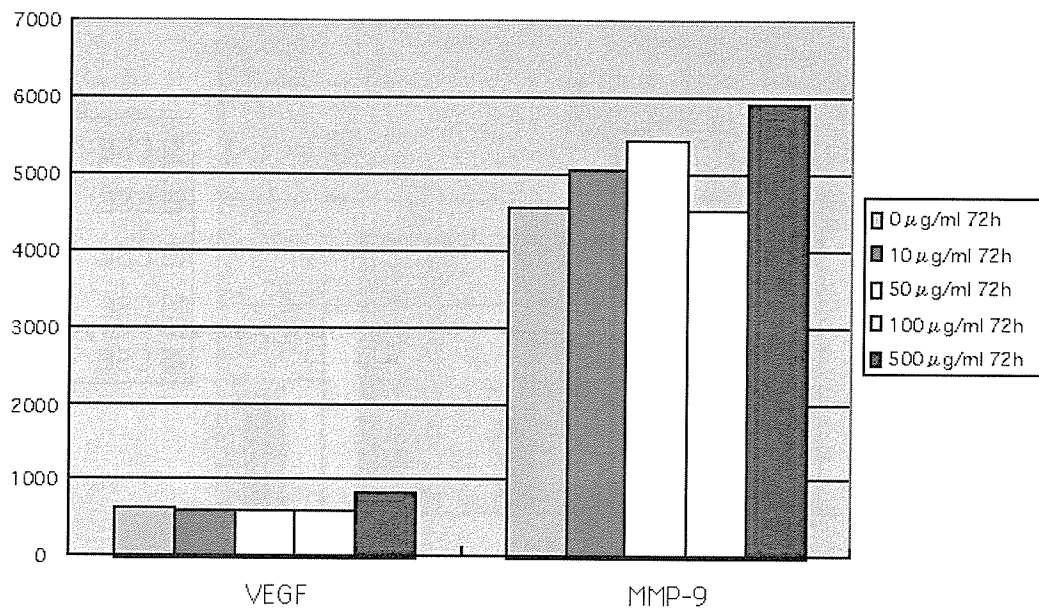


図 3. 補中益気湯の THP-1 細胞の VEGF 及び MMP-9 産生への影響

CSE の THP-1 細胞の増殖への影響

CSE の THP-1 細胞の増殖への影響を図 4 に示した。CSE の濃度が増すにつれて、細胞増殖は抑制された。トリパンプルーで生細胞数をカウントした際に、CSE 濃度 30, 40%では 24 時間の時点で死滅する細胞が目立ち、また

培養を 48、72 時間と継続しても細胞増殖が認められないため、この濃度の CSE は THP-1 細胞にとって細胞毒性を発揮すると考えられた。従って、CSE 添加後のサイトカインや VEGF, MMP-9 の測定には CSE 濃度 10, 20%を用いて検討することとした。

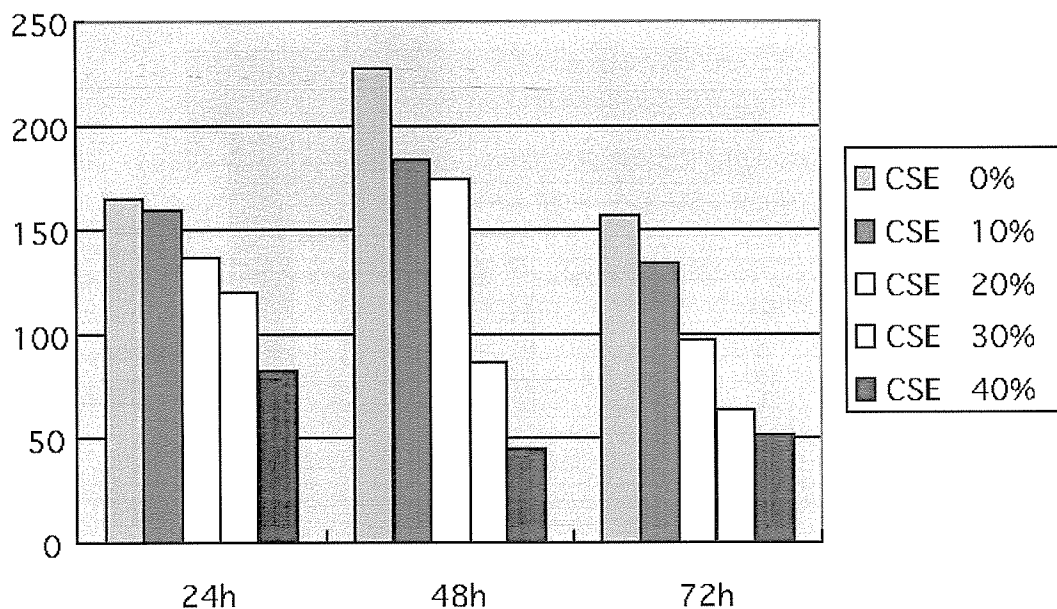


図 4. CSE の THP-1 細胞の増殖への影響

補中益気湯と CSE を同時に作用させた際の THP-1 細胞の増殖

補中益気湯+20%CSE での生細胞数の変化を図 5 に示した。20%CSE 添加により、細胞増殖は抑えられる傾向であったが、補中益気湯の濃度が増すに連れて細胞の増殖は促進された。ト

リパンプルーで細胞を観察した際も補中益気湯の濃度が増すに連れて死滅する細胞は減少していた。500 μ g/ml の補中益気湯を添加したものは、CSE20%を加えたにも関わらずメEDIUMのみの状態より細胞数が多かった。

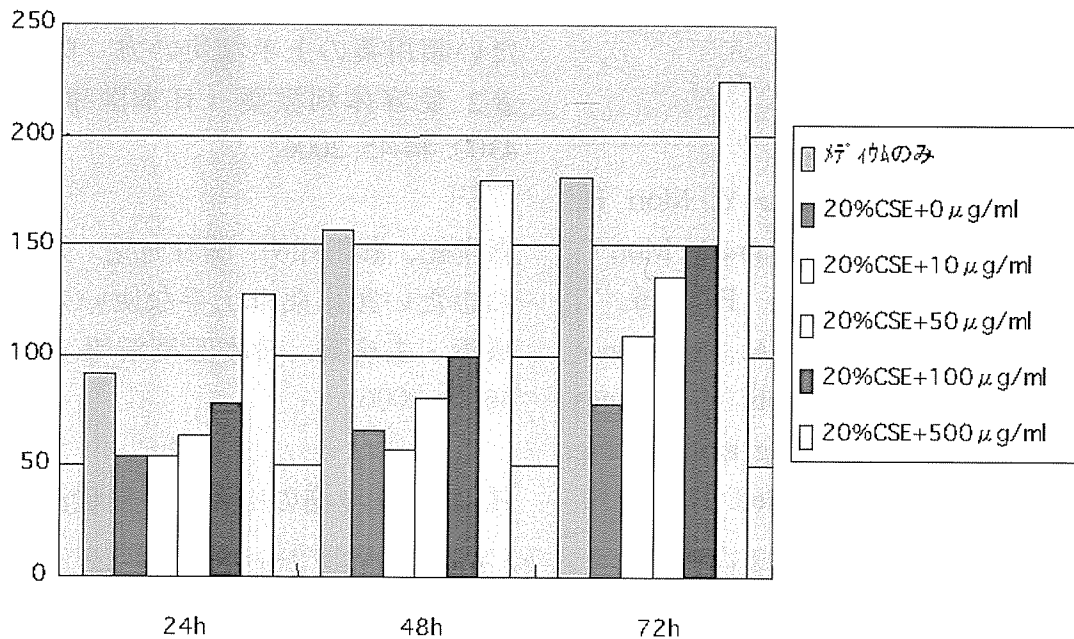


図 5. 補中益気湯+20%CSE を同時に作用させた際の THP-1 細胞の増殖

D. 考察

In vitro で補中益気湯は、THP-1 細胞の VEGE 及び MMP-9 の産生量には目立った影響は与えなかったが、濃度依存性に THP-1 細胞の細胞増殖を促進し、炎症性サイトカインの産生を抑制した。そして、CSE の細胞障害作用を軽減し、細胞死を抑制した可能性があると考えられる。COPD 患者では、炎症性メディエーターの産生が増加していると報告されており（室繁朗. 分子呼吸病 2004; 8: 34-39）、補中益気湯は COPD の増悪を抑える補助薬になる可能性があると考えられる。

現在 CSE 添加後のサイトカイン濃度を測定中である。今回の結果と比較する事で、補中益気湯の THP-1 細胞に

対する効果をさらに評価する事が期待できる。

また、実際に in vivo においても補中益気湯が本研究と同様に細胞を保護するような作用を起こしているかどうかは今後の課題である。

現在、補中益気湯以外に、様々な漢方薬が COPD の治療に使用されている（Tatsumi K, Ito T. Progress in Medicine 2005; 25: 122-126）。漢方薬の作用機序は解明されていない事が多く、全身性疾患である COPD の薬物治療の進歩のためにも、現代西洋医学とは異なる作用機序を有する漢方薬のエビデンスの確立は重要である。

F. 健康危険情報

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

Sato T, Seyama K, Sato Y, Mori H, Souma S, Akiyoshi T, Kodama Y, Mori T, Goto S, Takahashi K, Fukuchi Y, Maruyama N, Ishigami A. Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. Am J Respir Crit Care Med. 2006 ;174: 530-7.

長岡鉄太郎、瀬山邦明. 知っておきたい頻用薬の上手な使い方 吸入式 β 2 受容体刺激薬. 日本医事新報. 4300: 44-45, 2006

森貴紀、瀬山邦明, 関谷充晃. 知っておきたい頻用薬の上手な使い方 鎮咳薬・去痰薬. 日本医事新報. 4296: 46-48, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

低酸素曝露ラットに対する補中益気湯投与の効果

分担研究者 巽 浩一郎
研究協力者 篠塚 成順

研究要旨

COPD は低酸素血症、栄養障害、全身性炎症病態を特徴としている。また、急性増悪の際には、さらに低酸素血症の程度の悪化が見られる。そこで、急性低酸素曝露の栄養障害、全身性の炎症に及ぼす作用を検討し、補中益気湯がそれらを予防可能かどうかについて、ラット低酸素モデルにて検討した。急性増悪を念頭におき、低酸素曝露期間を 7 日間とした。補中益気湯をあらかじめ投与しておいた場合、体重の低下が抑制され、また TNF- α 産生が抑制された。補中益気湯は、急性の低酸素ストレスに対して防衛的に作用すると考えられた。

A. 研究目的

COPD は重症例では (1) 低酸素血症 (2) 栄養障害 (3) 全身性の炎症性病態を呈する。漢方補剤の一つである補中益気湯は、現代医学の薬剤では代替のできない、栄養状態・炎症病態を改善しうる薬剤として用いられている。COPD に対する補中益気湯の臨床的有用性を裏付けるため、特に急性増悪に対する予防効果を期待して、ラット慢性低酸素モデルに対して、補中益気湯投与の栄養状態・炎症病態に及ぼす影響に関して検討した。

B. 研究方法

雄 SPF-SD ラット (4 週齢) を用い、酸素濃度は 10% とし各群 n=6 とした。

まず (A、B 群) について行い、続いて (C、D 群)、次に (E、F 群) の順に実験を行った。いずれも室内気にて 7 日間飼育したのち、低酸素曝露とした。それぞれの飼料を A~E 群は飼育開始時より投与開始とし、F 群は室内気下では通常餌とし、低酸素曝露と同時に補中益気湯混餌を投与開始した。実験期間は (A、B 群) は計 28 日、(C、D 群)、(E、F 群) は計 14 日間である。

昨年度の研究報告では補中益気湯溶解液を 1 日 1 回投与としたが、血中濃度維持や胃管挿入のストレス、手技的要因を除外する観点から、今回は補中益気湯混餌末 (0.1% ヒト：5.0g/日相当) を作成し自由摂取とした。

A：低酸素曝露（21日）＋通常餌（28日）

B：低酸素曝露（21日）＋補中益気湯混餌（28日）

C：低酸素曝露（7日）＋通常餌（14日）

D：低酸素曝露（7日）＋補中益気湯混餌（14日）

E：低酸素曝露（7日）＋通常餌（14日）

F：低酸素曝露（7日）＋通常餌（7日）＋補中益気湯混餌（7日）

いずれの群も観察期間後、ジェチルエーテル吸入麻酔下にて腹大動脈より21G針にて血液採取した。血液検査項目として、栄養指標（プレアルブミン、アルブミン、総蛋白、アディポネクチン）と炎症指標（TNF- α 、高感度CRP、IL-6）を測定した。

C. 研究結果

(A、B群)では低酸素曝露21日後での体重増加量に関しては有意差を認めなかったが、低酸素曝露開始～3日目までにかけては体重増加量（減少量）に有意差が示された(図1)。21日後の血液データではTNF- α の低下傾向(44.2 \pm 23.0 vs 15.6 \pm 6.4)を認めた。プレアルブミン他の項目については有意差を認めなかった。高感度CRPに関してはいずれの群も感度以下であり、この実験系での反応性は極めて低いものと考えられた。続いて低酸素曝露7日間での検討を行った。(C、D群)での比較から補中益気湯投与によりTNF- α が有意に抑制された(表1)。プレアルブミンを含め他の値には有意差を認めなかった。更に補中益気湯前投与の効果を検討するため(E、F群)の実験を行ったところ、この群間ではTNF- α に有意差を認めなかった(表1)。