

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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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イン、増殖因子、MMP-9 の測定

10%ウシ胎児血清加 RPMI-1640 培地 (5%の CO<sub>2</sub> フラン器 37°C) で培養している THP-1 細胞を、24well の組

織培養用プレートに 5×10<sup>5</sup>/well ずつ分注し、0, 10, 50, 100, 500  $\mu$  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ブ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 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL10, TNF $\alpha$ ) 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。されに、CSE20%添加条件において補中益気湯の効果を 0, 10, 50, 100, 500  $\mu$  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

### 1. 補中益気湯の THP-1 細胞増殖への影響

補中益気湯の THP-1 細胞増殖への影響を図 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無かった。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。

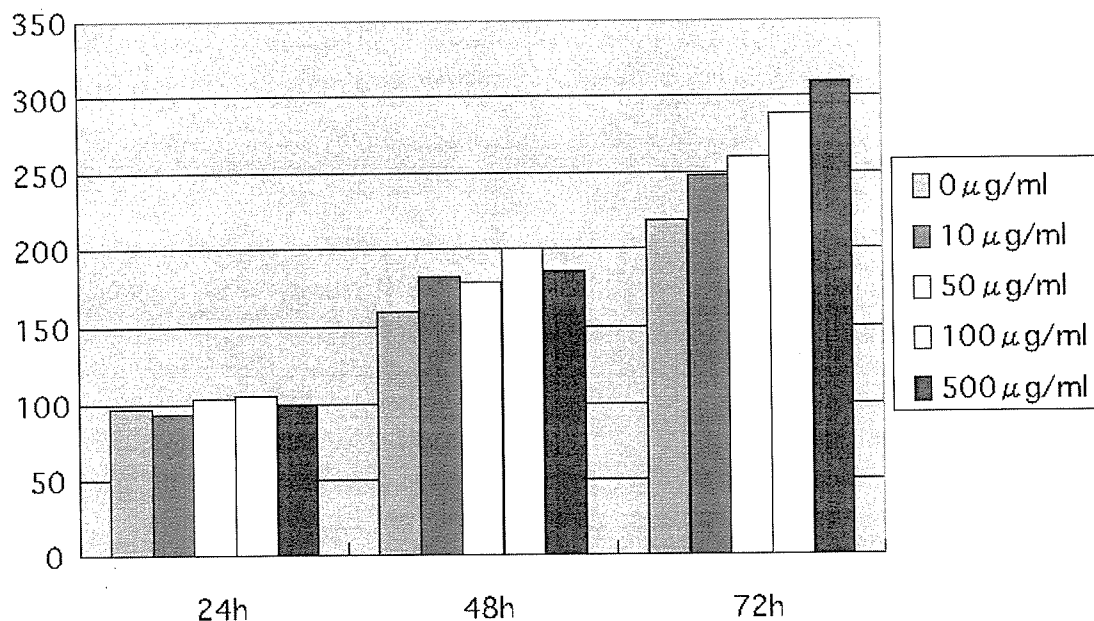


図 1. 補中益気湯の THP-1 細胞増殖への影響（各培養条件は triplicate で行い、測定は上清を 1 つに混合後、測定した）

## 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 $\beta$  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 $\alpha$  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)

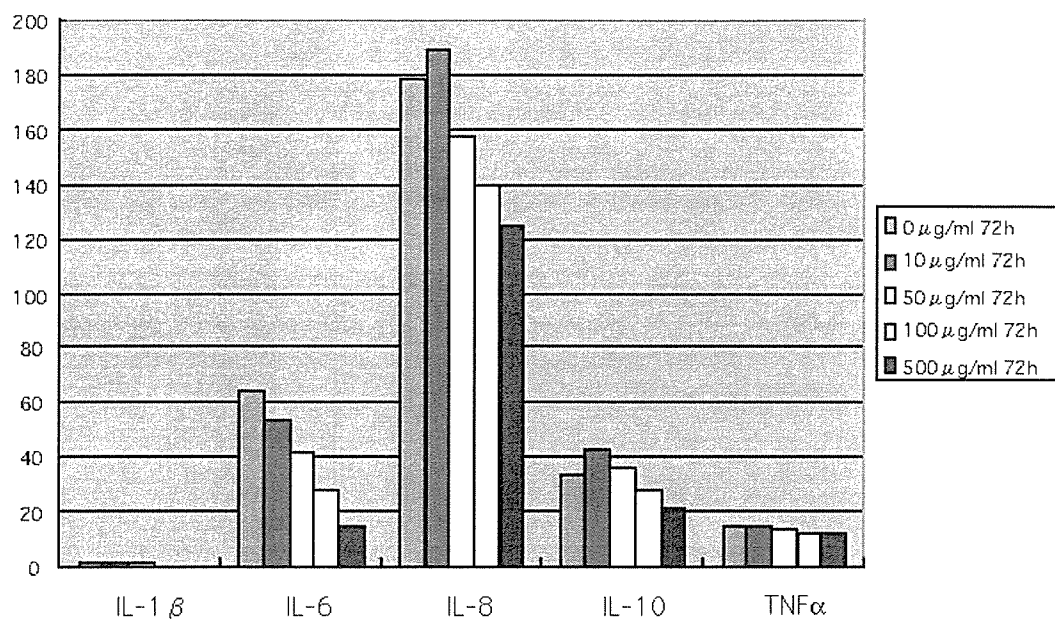


図 2. 補中益気湯の THP-1 細胞のサイトカイン産生への影響 (培養 72 時間後)  
(各培養条件は triplicate で行い、測定は上清を 1 つに混合後、測定した)

### 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。

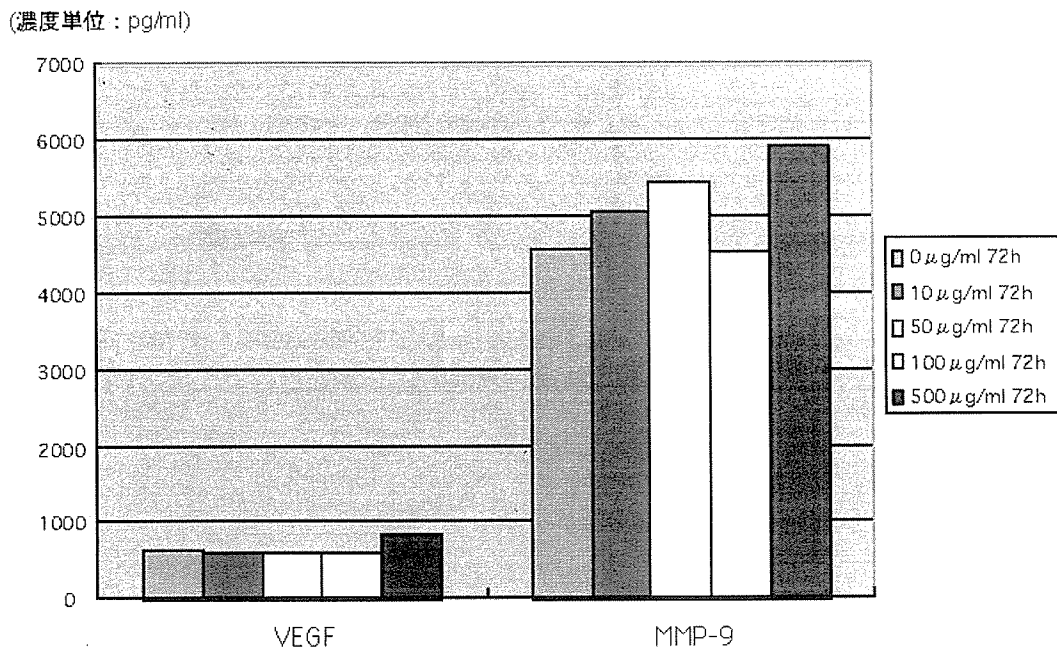


図 3. 補中益気湯の THP-1 細胞の VEGF 及び MMP-9 産生への影響

#### 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。

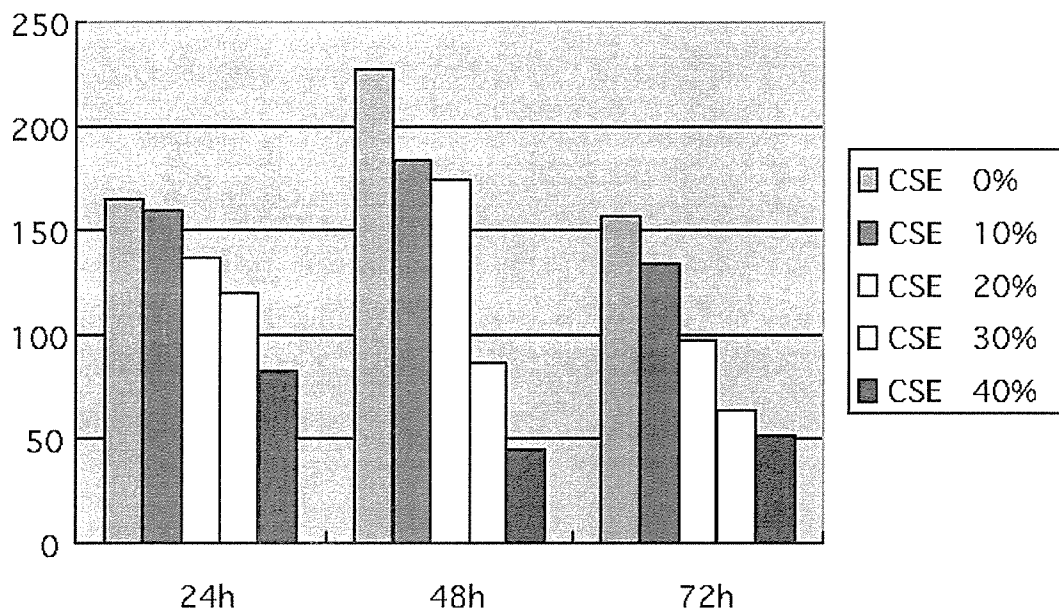


図 4. CSE の THP-1 細胞の増殖への影響

**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。トリパンブ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  $\mu$ 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ディウムのみ状態より細胞数が多かった。

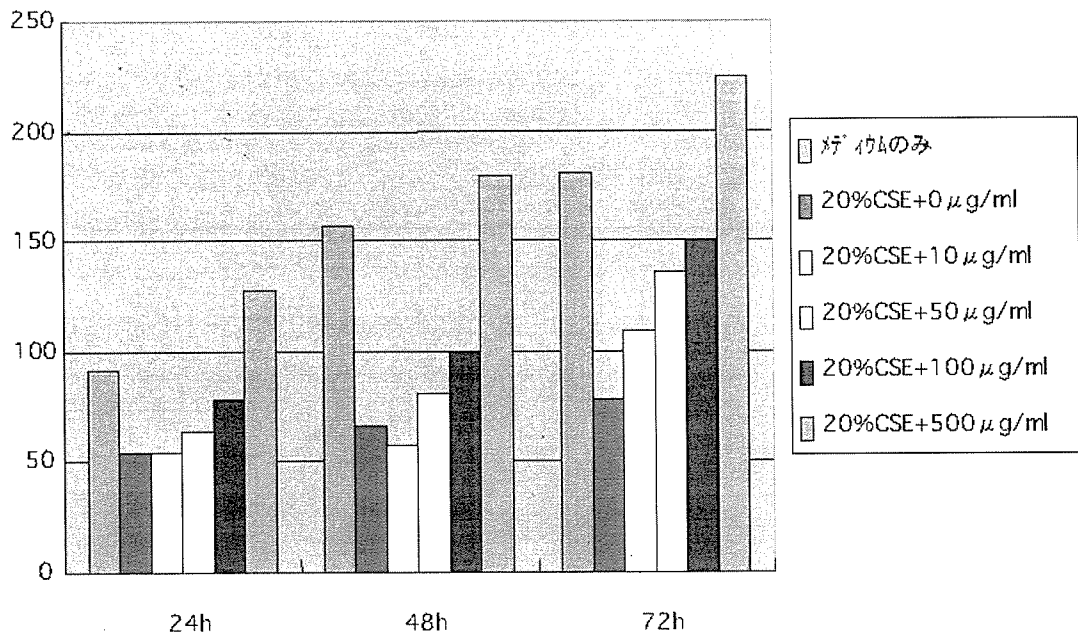


図 5. 補中益気湯+20%CSE を同時に作用させた際の THP-1 細胞の増殖

#### 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。

## 10. ラット慢性低酸素モデルにおける補中益気湯の効果

### A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（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である。COPD に対する補中益気湯の臨床的有用性を裏付けるため、慢性低酸素曝露による低栄養状態に対して、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、補中益気湯を低酸素曝露（10%酸素）と同時に開始した。以下の 4 群に分類した。

- A：低酸素曝露 蒸留水投与
- B：低酸素曝露 補中益気湯投与
- C：室内気 蒸留水投与
- D：室内気 補中益気湯投与

補中益気湯は、ツムラ補中益気湯原末を蒸留水にて 100mg/kg/ml に調整。1 日 1 回、ゾンデによる経口投与を施行した。蒸留水群もゾンデによる経口投与を施行した。補中益気湯は、3 週間連日投与した。全例、体重測定を行いながら、A、C 群は蒸留水を投与、B および D 群は補中益気湯 1000mg/kg を投与した。観察期間後、ジェチルエーテル吸入麻酔下に下大

動脈より 21G 針で血液採取を行った。また、RNA 抽出目的に腓腹筋採取を施行した。

さらに、雄 SPF-SD ラット（4 週齢）を用い、補中益気湯を低酸素曝露（10%酸素）の 1 週間前から開始した群を作成した。以下の 2 群に分類した。

- A'：低酸素曝露 蒸留水投与
- B'：低酸素曝露 補中益気湯投与

補中益気湯、蒸留水投与は、前記のとおり施行し、測定項目も同一にした。

血液検査項目として、栄養指標（アディポネクチン、総蛋白、アルブミン、プレアルブミン）と炎症指標（TNF- $\alpha$ 、高感度 CRP、IL-6）を測定した。

### C. 研究結果

補中益気湯を低酸素曝露と同時に開始した群では、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～7 日目にかけては体重増加量（減少量）に有意差が示された（図 1）。補中益気湯を低酸素曝露の 1 週間前から開始した群では、体重減少の抑制を認めた（図 2）。

補中益気湯を低酸素曝露 1 週間前から開始した群では、TNF- $\alpha$  の有意な低下（図 3）と、プレアルブミン値の有意な上昇を認めた（図 4）。

#### D. 考案

全身性炎症の指標である TNF- $\alpha$  は直接または代謝亢進を介して栄養障害の原因となりうる。補中益気湯は、TNF- $\alpha$  産生を抑制することで抗炎症作用を発揮し、栄養障害の進行も抑制する作用機序が推測された。これらの結果から補中益気湯には急性期および慢性期の低酸素ストレス

に対する予防効果が推測される。また、あらかじめ投与することで、より効果が期待できうると考えられる。臨床的には COPD 急性増悪時のストレスの軽減効果が推測される。

#### E. 結論

慢性低酸素状態において、補中益気湯は、栄養障害および全身性炎症を改善しうる可能性が示唆された。

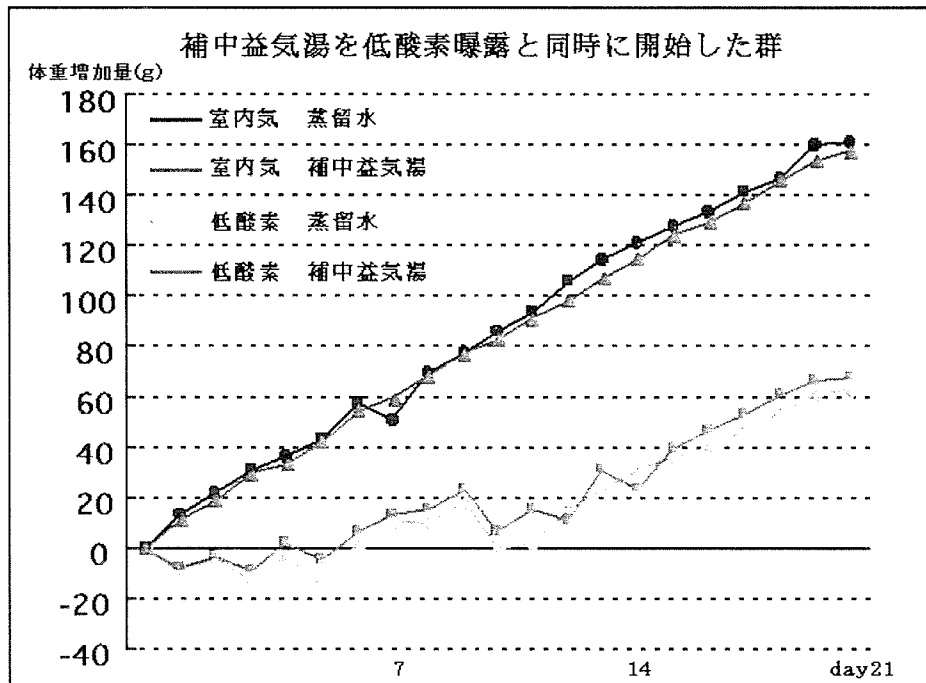


図 1. 補中益気湯を低酸素曝露と同時に開始した群における体重増加量



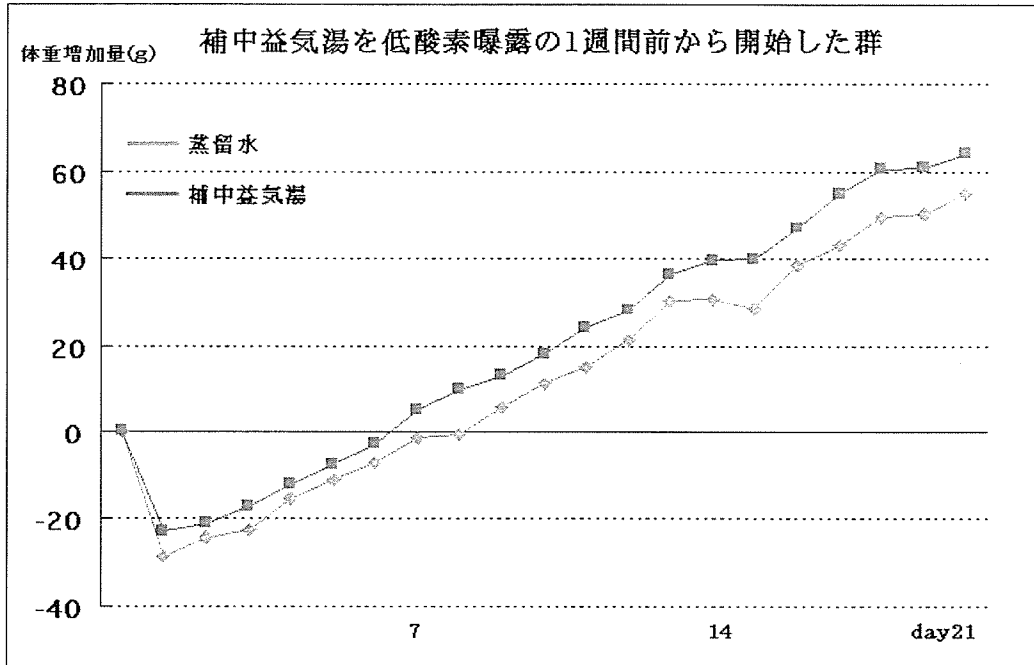


図 2. 補中益気湯を低酸素曝露の1週間前から開始した群における体重増加量

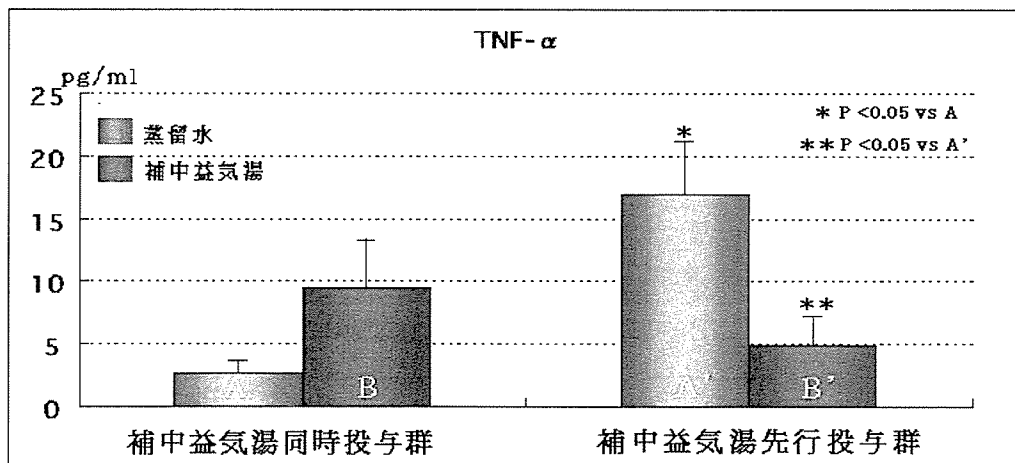


図 3. 補中益気湯投与による血中 TNF- $\alpha$  値への影響

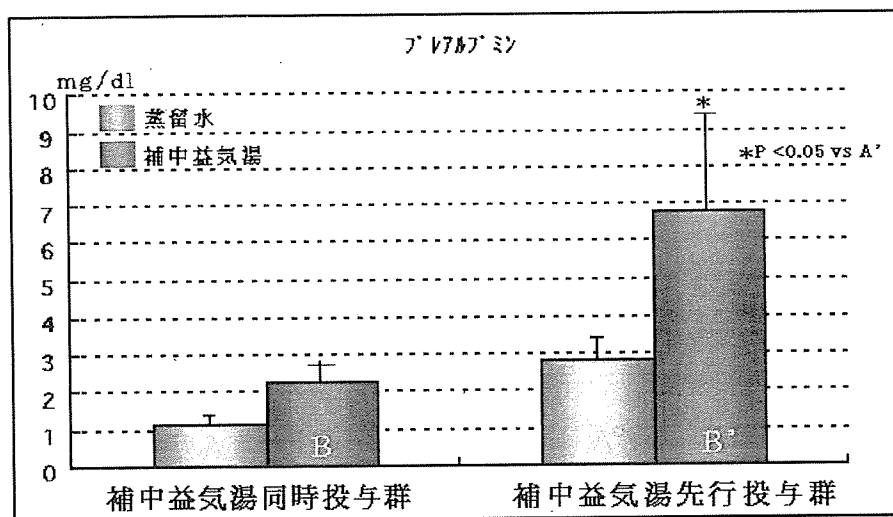


図 4. 補中益気湯投与による血中プレアルブミン値への影響

## 11. 低酸素曝露ラットに対する補中益気湯投与の効果

### 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、ジエ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- $\alpha$ 、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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  に有意差を認めなかった (表 1)。

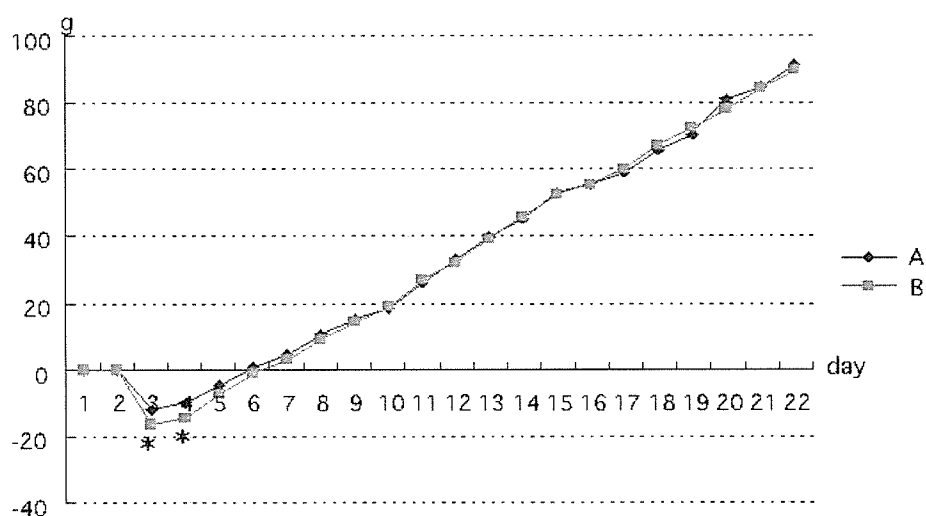


図 1. 低酸素曝露開始日からの平均体重変化

表 1. 各群の血清 TNF- $\alpha$  およびアラブミン値

| A                       | B               | C               | D              | E               | F               |
|-------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 血清TNF- $\alpha$ (pg/ml) |                 |                 |                |                 |                 |
| 44.2 $\pm$ 23.1         | 15.61 $\pm$ 6.4 | 51.4 $\pm$ 14.6 | 16.9 $\pm$ 9.2 | 27.0 $\pm$ 12.5 | 25.1 $\pm$ 12.6 |
| 血清アラブミン (mg/dl)         |                 |                 |                |                 |                 |
| 3.6 $\pm$ 0.6           | 2.9 $\pm$ 0.8   | 2.7 $\pm$ 0.6   | 2.5 $\pm$ 0.3  | 1.4 $\pm$ 0.5   | 2.0 $\pm$ 0.3   |

A, B 群は低酸素曝露 21 日間. 他の群は低酸素曝露 7 日間. 各群とも n = 6

#### D. 考案

全身性炎症の指標である TNF- $\alpha$  は直接または代謝亢進を介して栄養障害の原因となりうる。補中益気湯は TNF- $\alpha$  産生を抑制する事で抗炎症作用を発揮し、栄養障害の進行も抑制する作用機序が考えられる。

今回の実験では低酸素曝露 21 日後の体重差は認められなかったが低酸素曝露 3 日目までは補中益気湯投与群で体重減少が抑制される傾向が示された。低酸素曝露期間を 7 日間としたところ、TNF- $\alpha$  産生が補中益気湯投与群で有意に抑制された。また低酸素曝露と同時に補中益気湯を投与した際には TNF- $\alpha$  産生の抑制に有

意差を認めなかった。これらの結果から、補中益気湯をあらかじめ投与することにより急性のストレスに対して効果的と考えられた。臨床的には急性増悪時のストレス軽減効果が推測される。

また、本実験では高感度 CRP は全ての系において感度以下であり低酸素曝露による反応は低いものと推測される。

#### E. 結論

補中益気湯は TNF- $\alpha$  産生を抑制することで、低酸素曝露に伴う急性ストレス反応を緩和する作用が推測される。

## F. 研究発表

### 論文発表

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.

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).

Shinozuka N, Tatsumi K, Nakamura A, Terada J, Kuriyama T. A traditional herbal medicine, Hochuekkito, improves systemic inflammation in patients with COPD. *J Am Geriatr Soc* 2007, 55: 313-314.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## Ⅱ 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

| 執筆者氏名                                | 論文題名   | 雑誌名（年：巻：頁）                                    |
|--------------------------------------|--|---|
| Tajima S,<br>Sugiyama Y,<br>et al.   | Preventive effect of hochu-ekki-to on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in BALB/c mice. | Lung<br>2006; 184: 318-323.                   |
| Yamaya M,<br>Nakayama K,<br>et al.   | Hochu-ekki-to inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells.                    | <i>Br J Pharmacol</i><br>(in press).          |
| Shinozuka N,<br>Tatsumi K,<br>et al. | A traditional herbal medicine, Hochuekkito, improves systemic inflammation in patients with COPD.  | <i>J Am Geriatr Soc</i><br>2007; 55: 313-314. |



### Ⅲ 研究成果の刊行物・別冊

## Preventive Effect of Hochu-ekki-to on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in BALB/c Mice

Shunji Tajima · Masashi Bando · Hideaki Yamasawa ·  
Shoji Ohno · Hiroshi Moriyama · Toshinori Takada ·  
Eiichi Suzuki · Fumitake Gejyo · Yukihiko Sugiyama

Accepted: 15 May 2006  
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

**Abstract** This study was designed to investigate the effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese herbal medicine, on the development of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) in mice. ALI was induced in female BALB/c mice by the intranasal administration of 0.1 mg/kg LPS. The mice were divided into a group receiving normal feed and another group receiving feed mixed with TJ-41 at a dose of 1 g/kg/day for 8 weeks before LPS challenge. In the bronchoalveolar lavage fluid, the preadministration of TJ-41 caused significant reduction in the absolute number of total cells, neutrophils, and macrophages. The preadministration of TJ-41 significantly inhibited increases in the serum level of keratinocyte chemoattractant (KC), which is a murine chemotaxin for neutrophils that corresponds to human interleukin-8, with respect to its concentration at 24 h after LPS challenge. Furthermore, the histopathologic findings indicated that alveolitis with leukocyte infiltration in the alveolar space was less severe in the TJ-41-treated mice than in the control mice. These findings indicated

that the preadministration of TJ-41 could show an inhibitory effect on ALI in this experimental murine system associated with the suppression of chemokine production.

**Keywords** Acute lung injury · Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor · Hochu-ekki-to · Keratinocyte chemoattractant · Lipopolysaccharide

### Introduction

Acute lung injury (ALI) and its severest form, acute respiratory distress syndrome (ARDS), are frequent complications in critically ill patients and are also responsible for significant morbidity and mortality [16]. An initiating event (e.g., sepsis, shock, trauma, multiple transfusions, pancreatitis) leads to the activation of an acute inflammatory response on a systemic level. One of the earliest manifestations is the activation of the pulmonary endothelium and macrophages (alveolar and interstitial), the upregulation of adhesion molecules, and the production of cytokines and chemokines that induce a massive sequestration of neutrophils within the pulmonary microvasculature. These cells transmigrate across the endothelium and epithelium into the alveolar space and then release a variety of cytotoxic and proinflammatory compounds, including proteolytic enzymes, reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species, cationic proteins, lipid mediators, and additional inflammatory cytokines [6]. This phenomenon thereafter perpetuates a vicious cycle by recruiting additional inflammatory cells that in turn produce more cytotoxic mediators, ultimately leading to the occurrence of profound injury to the

---

S. Tajima · M. Bando · H. Yamasawa · S. Ohno · Y. Sugiyama  
Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Jichi  
Medical School, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke,  
Tochigi 329-0498, Japan

S. Tajima (✉) · H. Moriyama · T. Takada · E. Suzuki ·  
F. Gejyo  
Division of Respiratory Medicine, Graduate School of  
Medical and Dental Sciences, Niigata University,  
1-757 Asahimachi-dori, Niigata, 951-8510, Japan  
E-mail: tajimash@med.niigata-u.ac.jp

alveolocapillary membrane and respiratory failure. However, aside from the use of activated protein C in the subset of ALI/ARDS patients with sepsis [2], specific therapies are lacking, and the cascade of events leading to ALI and ARDS, once initiated, is much less amenable to specific treatment modalities. Therefore, new preventive measures against ALI/ARDS are eagerly awaited.

The herbal medicine known in Japan as Hochu-ekki-to (TJ-41) is known elsewhere by its Chinese name, bu-zhong-yi-qi-tang. TJ-41 is composed of ten species of medicinal plants and is used for chronic diseases or weakness after illness. Recent studies have shown that TJ-41 has been widely used to treat patients with certain immune-related diseases. TJ-41 suppresses the development of collagen-induced arthritis, redistributes the population of lymphocytes in lymph nodes and blood, and inhibits interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) secretion in mice with collagen-induced arthritis [4]. The administration of TJ-41 decreased bronchoalveolar lavage fluid (BALF) concentrations of IL-1 $\alpha$ , IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) but not of TNF $\alpha$  or interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), and it was found to increase the survival rate after influenza virus infection in mice [9]. Moreover, TJ-41 contains *Glycyrrhizae radix*, a flavonoid that has been shown to inhibit human neutrophil NADPH oxidase and impair neutrophil response [12, 14]. Wang et al. [15] reported that ROS produced by NADPH oxidase activation in neutrophils plays a major role in mediating sepsis-induced ALI, and the NADPH oxidase inhibitor attenuates sepsis-induced lung injury in guinea pigs. These findings suggest that TJ-41 may suppress ROS and proinflammatory cytokine production. In this article we investigate the suppressive effect of TJ-41 on the development of lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI in mice.

## Materials and Methods

### Preparation of TJ-41

TJ-41 was authenticated and provided by Tsumura Co., Ltd. (Tokyo, Japan). The crude drug composition of TJ-41 is given in Table 1. The mixture of crude drugs was extracted with 600 ml of water at 100°C for 1 h. The decoction was filtered and then lyophilized to obtain a powdered extract. The yield of the extract is also noted in Table 1. The doses of 0.15, 0.74, and 1.47 g/kg body weight were roughly equivalent to 1, 5, and 10 times the daily human dose, respectively.

**Table 1** Crude drug composition of Hochu-ekki-to

| Crude drug                          | Composition (g) | Yield (g) |
|-------------------------------------|-----------------|-----------|
| <i>Astragali radix</i>              | 4.0             | 8.84      |
| <i>Atractylodis lanceae rhizoma</i> | 4.0             |           |
| <i>Ginseng radix</i>                | 4.0             |           |
| <i>Angelicae radix</i>              | 3.0             |           |
| <i>Bupleuri radix</i>               | 2.0             |           |
| <i>Zizyphi fructus</i>              | 2.0             |           |
| <i>Aurantii nobilis pericarpium</i> | 2.0             |           |
| <i>Glycyrrhizae radix</i>           | 1.5             |           |
| <i>Cimicifugae rhizoma</i>          | 1.0             |           |
| <i>Zingiberis rhizoma</i>           | 0.5             |           |

### Animals and Drug Administration

Female BALB/c mice, 3 weeks of age, were obtained from Japan SLC (Tochigi, Japan) and housed in the animal facility of the Jichi Medical School. All animal experiments were conducted in accordance with the principles stated in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 86-23, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1985). The dose of TJ-41 was adjusted to 1 g/kg body weight/day by mixing it with normal feed. The mice then either consumed normal feed (Control) or feed mixed with TJ-41 from 8 weeks before LPS challenge until the end of the study.

### LPS-Induced ALI Model

After the mice were anesthetized by the intraperitoneal administration of 0.2 ml of 10% pentobarbital sodium solution (Abbott Laboratories, North Chicago, IL), 0.1 mg/kg LPS in 0.06 ml of saline was administered intranasally as previously described [13]. BALF was sampled at each time point, according to a standard protocol [7]. Briefly, the trachea was cannulated with a polyethylene tube, and then the lungs were lavaged four times with 0.7 ml of sterile phosphate-buffered saline. Total cell counts were determined from BALF using a hemocytometer. Blood samples were also obtained from the right atrium at each time point. After centrifugation at 3000g for 10 min at 4°C, the serum was frozen and stored at –80°C until it was assayed.

### Assays for Cytokines and Lipid Hydroperoxide

The serum levels of keratinocyte chemoattractant (KC) and GM-CSF were determined by a sandwich enzyme immunoassay using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc.,

Minneapolis, MN, and Biosource International Inc., Camarillo, CA, respectively) according to the manufacturers' instructions. The concentrations of lipid hydroperoxide (LPO) in BALF and serum were measured as an indicator of oxidative stress using the Lipid Hydroperoxide Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

#### Morphologic Evaluation

Histopathologic evaluation was performed on animals that were not subjected to BAL. Thereafter, both lungs were removed and inflated with 10% formaldehyde neutral buffer solution, and longitudinal tissue sections were stained with hematoxylin & eosin.

#### Statistical Analysis

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Multiple comparisons were carried out by the Fisher protected least-significant-differences method followed by the *post hoc* test. Differences between two variables were assessed with the Mann-Whitney *U* test.  $p < 0.05$  was considered significant.

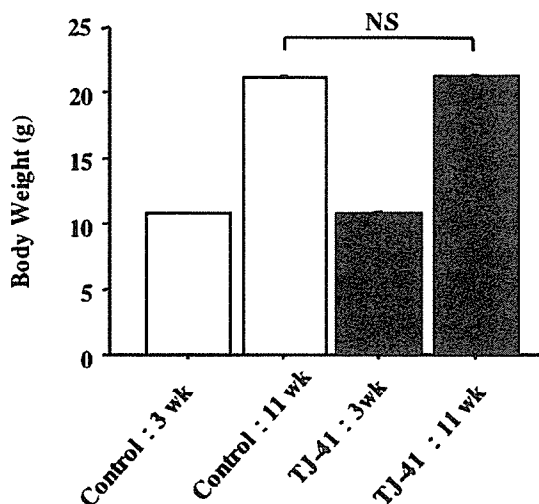
#### Results

##### Effects of TJ-41 on Changes in Body Weight in BALB/c Mice

The results demonstrated no effect on body weight by TJ-41. As shown in Figure 1, no significant weight gain or loss was observed in mice that consumed feed mixed with TJ-41 for 8 weeks (TJ-41: 11wk) compared with those that consumed normal feed for 8 weeks (Control: 11wk) ( $p = 0.890$ ; Control:  $21.1 \pm 0.2$  g vs. TJ-41:  $21.2 \pm 0.2$  g).

##### Effects of TJ-41 on BALF Cell Analysis

The effect of TJ-41 on lung inflammation in BALB/c mice was examined using an LPS-induced ALI model, which has been extensively characterized. A total of 1g/kg/day of TJ-41 was administered for 8 weeks, and then LPS was instilled intranasally. The number of total cells in BALF in TJ-41-treated mice at 72 h after LPS challenge significantly decreased compared with those in untreated mice [ $p = 0.006$ ; Control:  $(12.2 \pm 1.1) \times 10^5/\text{ml}$  vs. TJ-41:  $(8.4 \pm 1.0) \times 10^5/\text{ml}$ ] (Fig. 2A). Similarly, the preadministration of TJ-41 caused a significant reduction in the neutrophils in BALF at 72 h



**Fig. 1** Effects of TJ-41 on changes in body weight. There was no significant weight gain or loss in the mice that received feed mixed with TJ-41 for 8 weeks (TJ-41: 11wk) compared with mice that received ordinary feed for 8 weeks (Control: 11wk). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 25$ – $27$  in each group)

after LPS challenge [ $p < 0.001$ ; Control:  $(5.7 \pm 0.8) \times 10^5/\text{ml}$  vs. TJ-41:  $(2.0 \pm 0.4) \times 10^5/\text{ml}$ ] (Fig. 2B). At 120 h after LPS challenge, the preadministration of TJ-41 caused a significant reduction in the macrophages in BALF [ $p = 0.043$ ; Control:  $(5.6 \pm 1.1) \times 10^5/\text{ml}$  vs. TJ-41:  $(3.4 \pm 0.3) \times 10^5/\text{ml}$ ] (Fig. 2C); however, no difference was seen in the lymphocytes in BALF in TJ-41-treated mice compared with those in untreated mice (Fig. 2D).

##### Effects of TJ-41 on the Amount of Lipid Hydroperoxide in BALF and Serum

Although reports have demonstrated that TJ-41 suppresses ROS [12, 14], the results of our study did not demonstrate an inhibitory effect on ROS by TJ-41. The serum levels of LPO in TJ-41-treated mice at 72 h after LPS challenge did not differ from those in untreated mice ( $p = 0.903$ ; Control:  $3.34 \pm 0.29$  nmol/ml vs. TJ-41:  $3.28 \pm 0.18$  nmol/ml). Similar to serum, no difference was observed in the BALF levels of LPO in TJ-41-treated mice compared with those in untreated mice at 72 h after LPS challenge ( $p = 0.706$ ; Control:  $1.16 \pm 0.26$  nmol/ml vs. TJ-41:  $1.08 \pm 0.25$  nmol/ml).

##### Effects of TJ-41 on KC and GM-CSF Concentration in Serum

The serum levels of KC, which is a murine chemotaxin for neutrophils that corresponds to human IL-8,