

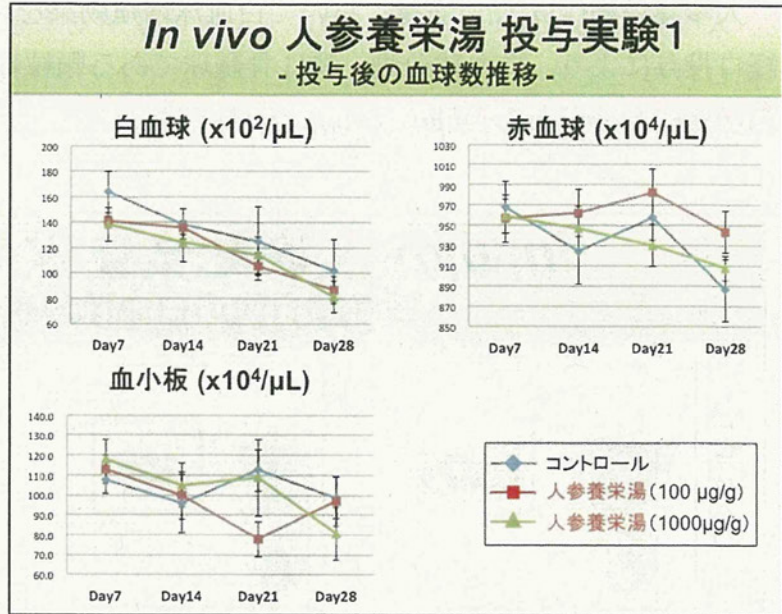




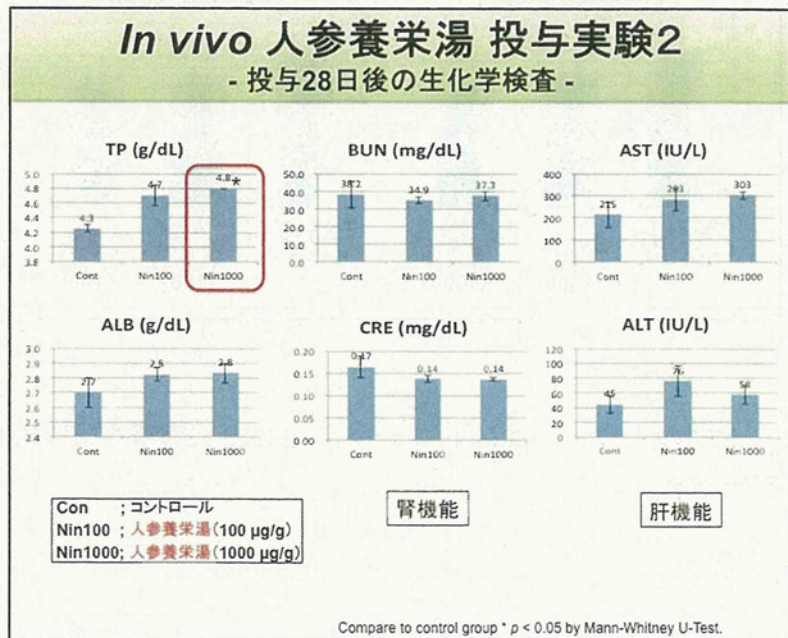
## In vivo 人參養榮湯投与実験

In vitro 培養における人參養榮湯の白血球増殖効果を in vivo で検証するため、人參養榮湯を成体マウスへ連日経口投与(低用量 100  $\mu\text{g/g}$  BW、高用量 1000  $\mu\text{g/g}$  BW)し、1週間おきに採血して血液細胞数を解析した。

右図に示すように、コントロールに比し、人參養榮湯投与群での白血球増殖効果は認められなかった。赤血球に対しては、人參養榮湯低用量投与群では増殖傾向が認められたが、統計的有意差は認められず、高用量投与群でも変化が認められなかった。また、血小板に対しては、特に変化が認められなかった。

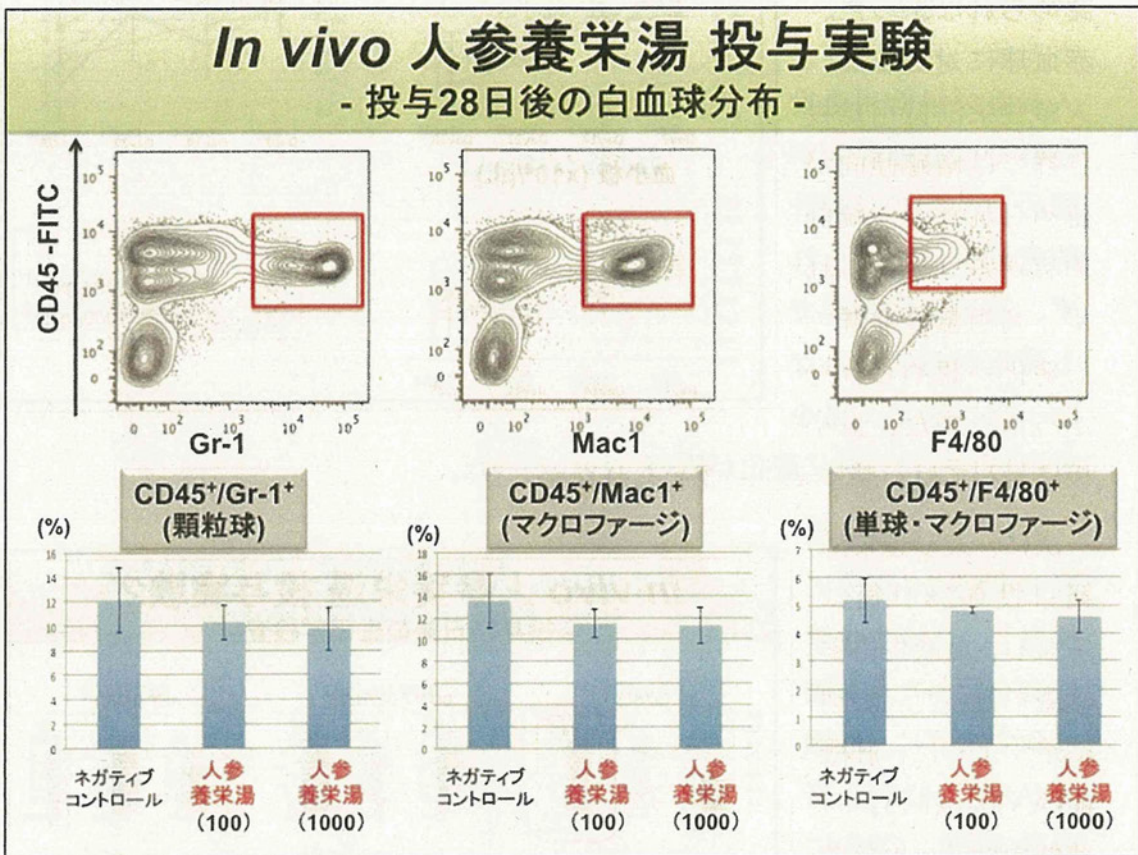


次に、人參養榮湯経口投与28日後に採血し、血液生化学検査を行った。右図に示すように、肝機能(AST、ALT)、腎機能(BUN、CRE)に関しては、コントロール・低用量群・高用量群において顕著な差は認められなかった。一方、TP (総タンパク)は高用



量群で高値であり、統計学的有意差を認めた。しかしながら、ALB(アルブミン)では差を認めず、人参養栄湯高用量投与群では、ガンマグロブリンが高値になっている可能性が示唆された。

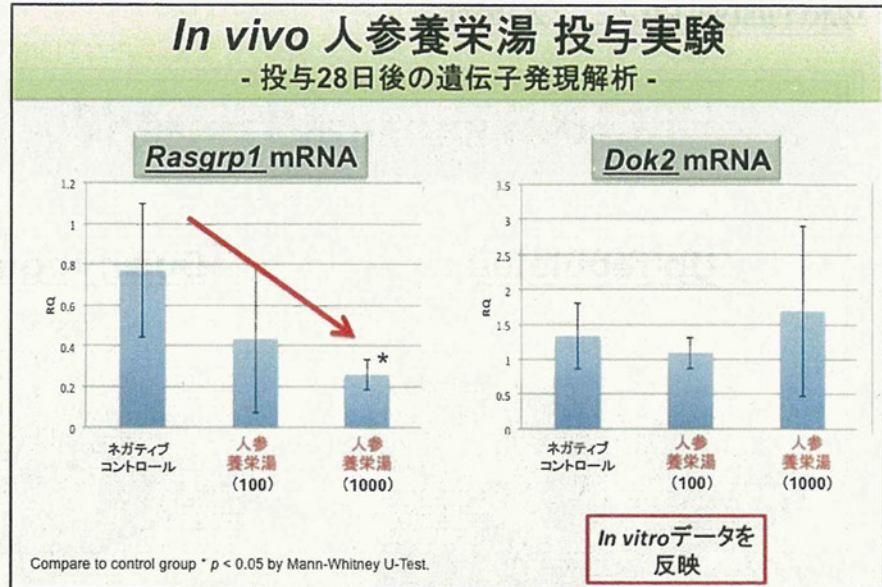
人参養栄湯は*in vitro*培養において白血球増殖効果を認めた事より、人参養栄湯経口投与により、白血球分画、特に骨髓球である顆粒球・マクロファージ・単球の増殖に影響があるかFlow cytometry法で検討した。



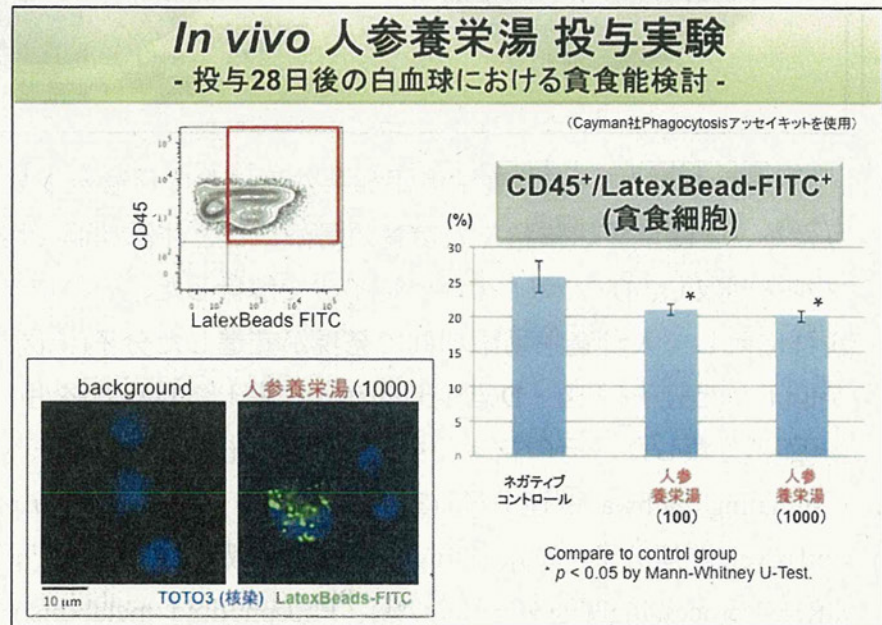
上図のように、コントロールに比して人参養栄湯経口投与群は顕著な差を認めなかった。

マウス骨髄単核球細胞の人参養栄湯添加*in vitro*培養では、*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子の発現低下が認められた。そこで、人参養栄湯経口投与マウスより骨髄細胞を採取し、*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子の発現をreal-time PCR法で検討した。

*In vitro*データに一致し、*Rasgrp1*遺伝子はその発現低下が認められたが、*Dok2*遺伝子では認められなかった。

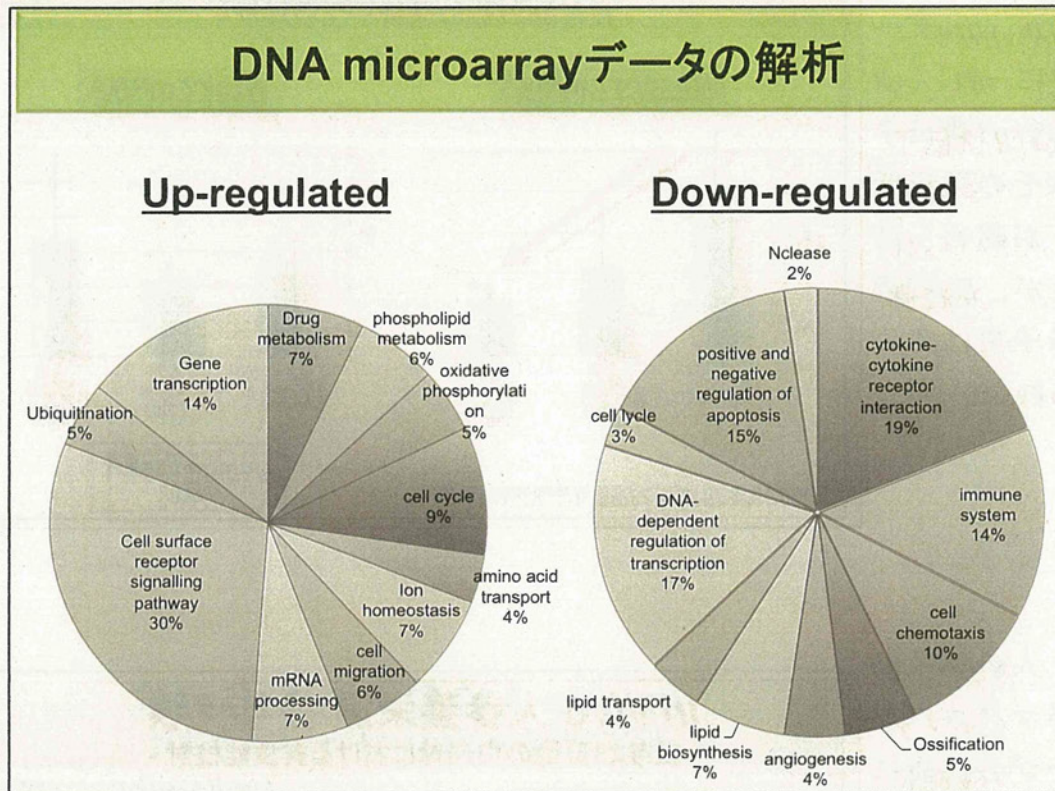


人参養栄湯がマクロファージの機能に影響を与えるか検討するため、人参養栄湯経口投与マウスより骨髄単核球細胞を採取し、マクロファージの貪食能を評価した。右図のように、非投与群に比し、貪食能低下が認められた。



平成24年度

DNA microarrayデータの解析

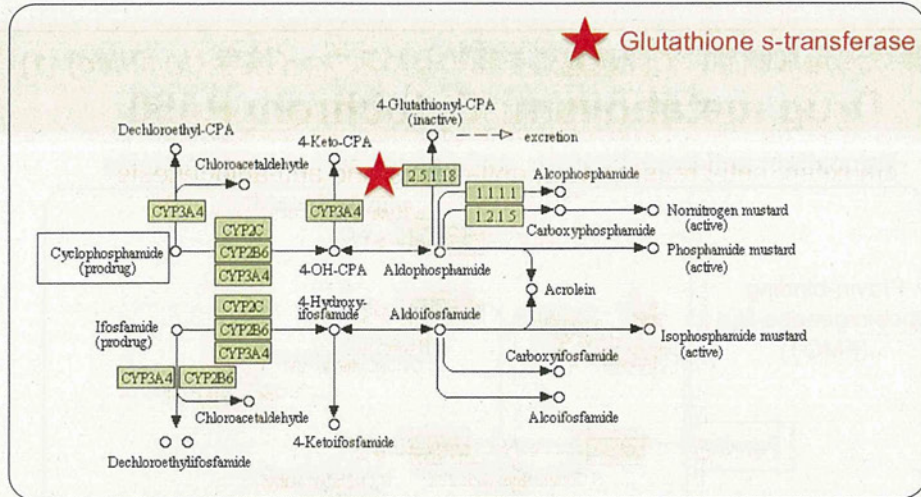


昨年度において、人参養栄湯添加条件下における遺伝子発現の網羅的解析を行うため、骨髄単核球細胞を人参養栄湯添加群と非添加群で培養し、11日目にサンプルを回収し、DNAマイクロアレイ法で解析した。その結果を元に、コントロール群に対して人参養栄湯添加群で発現が亢進した分子(上図・Up-regulated)、発現が低下した分子(上図・Down-regulated)に関してDAVIDを用いて(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)分類した。その結果、発現亢進分子(Up-regulated)は、Cell surface receptor signalling pathway関連分子 (30%)をはじめ、Gene transcription関連分子 (14%)、Cell cycle関連分子 (9%)、Drug metabolism関連分子・Ion homeostasis関連分子・mRNA processing関連分子 (各7%)、Phospholipid metabolism関連分子・Cell migration関連分子 (各6%)等が含まれた。発現低下分子(Down-regulated)は、Cytokine-cytokine receptor interaction関連分子 (19%)をはじめ、DNA-dependent regulation of transcription関連分子 (17%)、Positive and negative regulation of apoptosis関連分子 (15%)、Immune system関連分子 (14%)、Cell chemotaxis関連分子 (10%)、L



人參養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (in silico) (2)  
**Drug metabolism: Cytochrom P450**

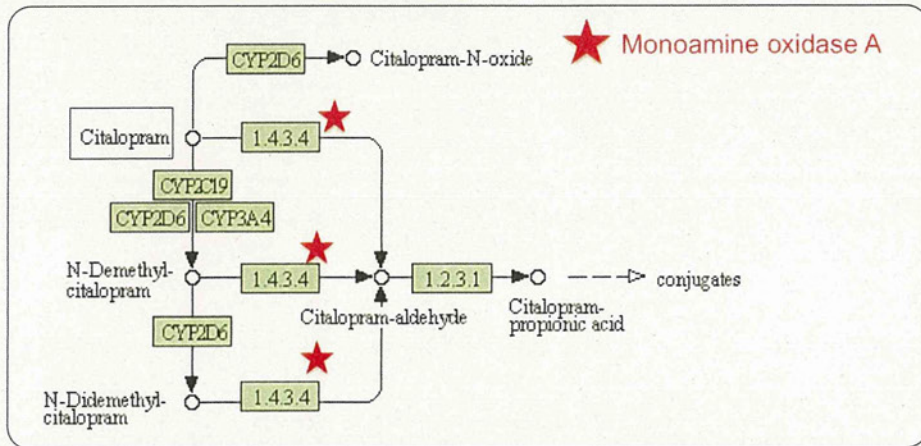
Cyclophosphamide: anti-cancer and treat autoimmune diseases



Glutathione is involved in cancer development and chemotherapeutic resistance.

人參養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (in silico) (3)  
**Drug metabolism: Cytochrom P450**

Citalopram: anti-depression drug



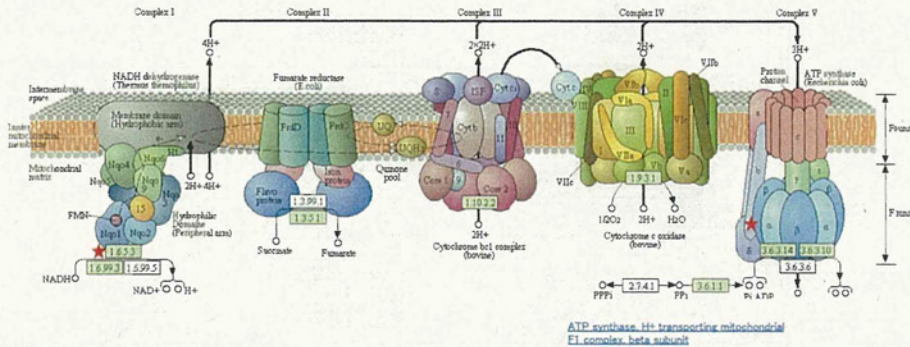
Monoamine oxidase A catalyzes the oxidative deamination of biogenic and xenobiotic amines and has important functions in the metabolism of neuroactive and vasoactive amines in the central nervous system and peripheral tissues.



人參養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (*in silico*) (4)

## Oxidative phosphorylation

The metabolic pathway in which the mitochondria in cells reform ATP, energy source for cells.

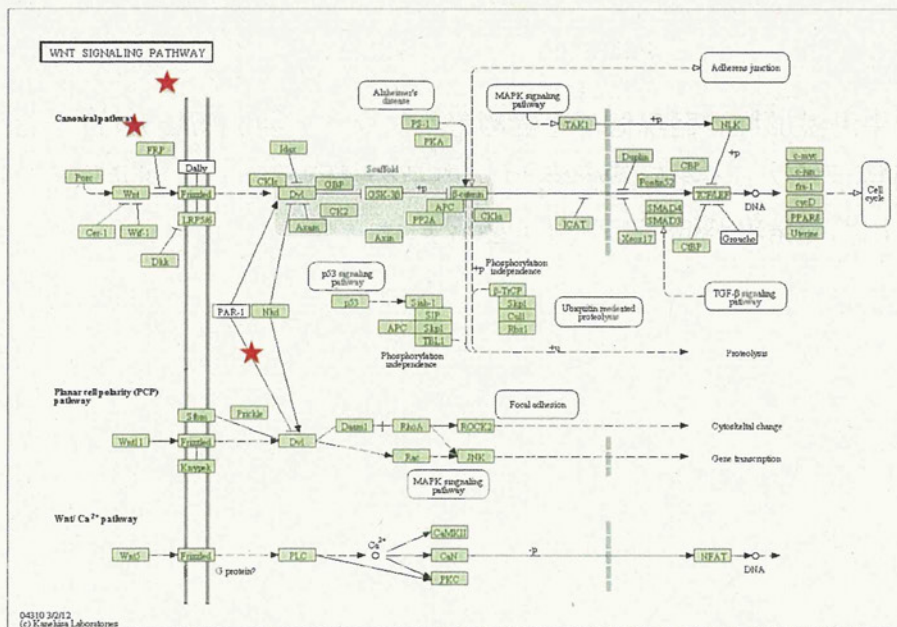


★ NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4

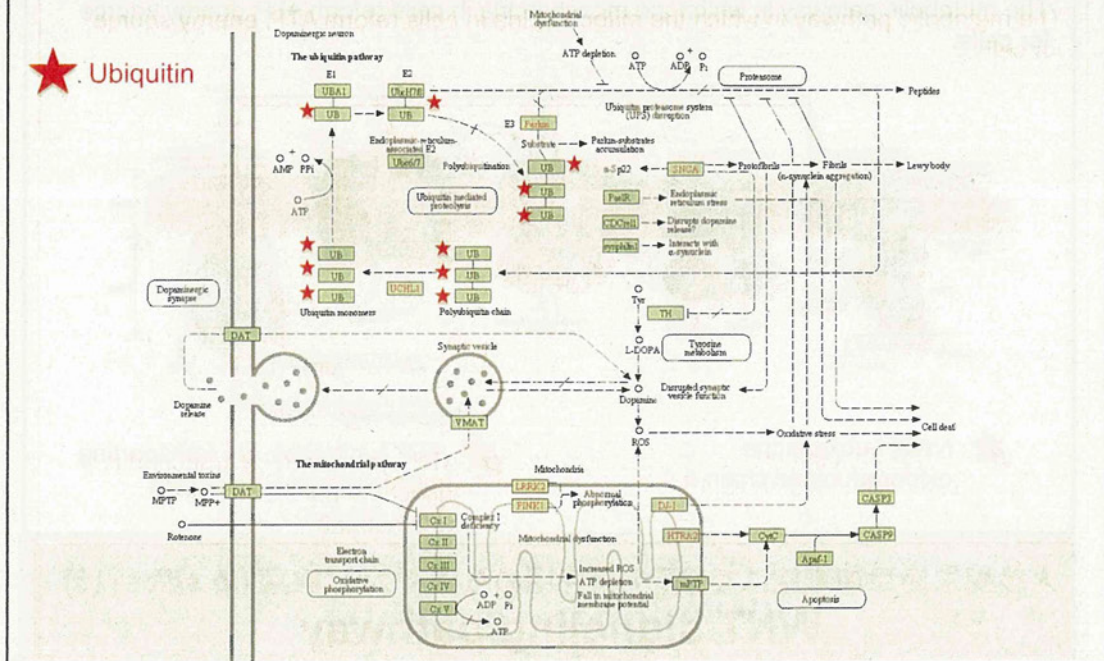
★ ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit

人參養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (*in silico*) (5)

## WNT signaling pathway



# 人参養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (*in silico*) (6) Ubiquitination



人参養榮湯添加群で発現低下を認めるパスウェイの*in silico*解析を行った。代表的な関与パスウェイを以下6つ示す。赤色の星印はマイクロアレイ解析にて人参養榮湯添加で発現が低下した分子を示す。