

Title	黄耆の有効性に関する研究：日本脳炎ウイルスの感染に対する効果を指標として
Author(s)	梶村, 計志
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155592">https://doi.org/10.11501/3155592</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

乙 766 /

# 黄耆の有効性に関する研究

—日本脳炎ウィルスの感染に対する効果を指標として—

梶 村 計 志

黄耆の有効性に関する研究  
-日本脳炎ウィルスの感染に対する効果を指標として-

梶 村 計 志

# 目次

緒論	1
本論	
第一章 日本脳炎ウイルス (JEV) の感染に対する生体防御効果	
-腹腔内投与による効果-	
第一節 JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果	4
第二節 JEVの感染に対する生体防御効果の作用機序	9
第三節 小括	19
第二章 JEVの感染に対する生体防御効果	
-経口投与による効果-	
第一節 JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果	20
第二節 JEVの感染に対する生体防御効果の作用機序	23
第三節 マウスの腹腔内細胞の機能を賦活化させる物質	30
第四節 小括	37
第三章 IgM抗体産生能に及ぼす効果	
第一節 マウスの抗DNP-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果	38
第二節 加齢マウスの抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果	45
第三節 抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の効果	49
第四節 加齢マウスの抗体産生能を賦活化させる物質	54
第五節 小括	61
総括	62
結論	64

謝 辞..... 65

引用文献..... 66

## 緒 論

急速な高齢化社会を迎えつつある現在、疾病に対する抵抗力を増進し、健康な生活を維持するための手段のひとつとして生薬に対する関心が高まりをみせている。西洋薬（合成薬）は、薬理作用が強く、作用ベクトルの方向が一定である。従って、ある場合には、病態を速やかに治癒に導く。しかし、ときには、その強い薬理作用が副作用となり、生体に重篤な影響を及ぼす。これに対し生薬は、マイルドな薬理作用しか示さないが、生体の恒常性に逆うことがないため、副作用がほとんどないことが知られている。このような生薬の特徴は、西洋医学が進歩するに従って、むしろ評価が高まり、生薬の価値が見直されるひとつの要因となっている（1）。

一方、市場に流通している医薬品のうち、合成薬は許認可されるまでに、薬事法で定められた複数のPhaseをクリアーしてきている。従って、薬理作用や作用機序について詳細な検討が行われている。しかし、生薬の有効性を解明するのは、容易ではなく、有効性に関する科学的見地からの知見は、質、量ともに合成薬と比較して不十分である。近年、生薬の需要が急激に増加している現状を考慮すると、有効性に関する検討を行うことが急務であると考えられる。生薬の有効性を解明することが容易ではない理由として以下のような事が指摘される。

- 1：生薬は、多数の成分からなる複合体であり、それらが複雑に連携しあって、効果を及ぼしているため、作用の解析が容易ではない。
- 2：時には同じ生薬が临床上において逆の作用を示すことや、生理機能が低下した状態ではじめて作用が発現する生薬も認められることから、薬効を評価することが容易ではない。
- 3：作用がマイルドであるため、通常の投与量で効果を確認するのが難しい。
- 4：生薬の品質が産地、収穫年度等で異なるため、一定の力価を持った、生薬を恒常的に研究材料として、取り扱うことが難しい。

おうぎ

本研究で採り上げる黄耆（*Astragali Radix*）は、漢方の要薬として、現在でも重要かつ汎用されている生薬のひとつであるが、第13改正日本薬局方では、マメ科植物である「*Astragalus mongoholicus* BUNGE又は*Astragalus membranaceus* BUNGE

の根である」と規定されている (2)。含有成分として、 $\gamma$ -Aminobutyric acid (3)、L-Canavanine (4) などのアミノ酸、Calycosin, Formononetinなどのイソフラボノイド類 (5、6)、Astragalosideなどのサポニン類 (7-10)、Linolic acid などの脂肪酸(11)、葉酸(12)および精油 (13) などが報告されているが、薬効との詳細な関係は明らかではない。

黄耆は、後漢の時代に作成された中国最古の薬物書である「神農本草経」で上薬として収載されている (14)。上薬は「君であり、養命をつかさどり、無毒で、多服久服しても人を傷めることはない、軽身益気、不老延年を望むものはこれを用いる」とされている。また、明の時代に作成された中国の薬物書を代表する名著と言われる「本草綱目 (Chinese materia medica)」を著した李時珍は、「耆には長の意義がある。黄耆は色が黄で補薬の長」つまり、黄色い色をした最上の補薬と言う意味から黄耆という名称がついたと記している (15)。補薬とは、体力が衰えた病人等に用い、病態に直接働きかけるのではなく、生体が本来保持している、病態に対する抵抗力を高めることを目的とする薬物であるとされている (16)。従って、黄耆は、抵抗力、すなわち生体防御能を賦活化させる効果を有している可能性が推測できる。しかし、その科学的証明はなされていない。

近年、生体防御系をはじめとする生体機能を賦活化させる薬物が生物学的応答修飾剤 (Biological response modifier: BRM) と称され、癌治療等の分野で、新しい治療薬として注目を集めている (17)。その中には、インターフェロンやサイトカインなどの生体内物質やKrestin (PSK) やLentinanなどの天然物由来成分が含まれている。

以上の様な観点から、本研究では、黄耆が生体防御系を賦活化させる効果を有していることを証明することを目的として、生体内で増殖する異物であるウィルスに着目し、日本脳炎ウィルス (Japanese encephalitis virus : JEV) の感染に対する防御効果を指標として以下の検討を行った。

第一章では、JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果と作用機序について、マウスを用い、腹腔内投与による実験系により検討した。

生薬類は、種々の疾病に対する予防および治療薬として汎用されているが、ほとんどが経口的に投与されている。本研究で取り上げる黄耆も例外ではなく、漢方では主に、煎剤として経口的に服用されている。そこで第二章では、JEVの感染に対する黄

者の経口投与による防御効果と作用機序について検討した。また本章では併せて、複数成分がその効果を有していることを示すため、黄耆中に含まれているJEVの感染に対し生体防御効果を示す物質の検索を試みた。

ウイルスの感染に対する生体防御機構として種々のものが考えられているが、JEVなどViremia（ウイルス血症）をおこすタイプのウイルスに対しては、IgM, IgGなどの中和抗体による防御が特に有効であると考えられている（18-20）。そこで、第三章では、マウスのIgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討した。IgM抗体は、異物の侵入後、比較的早期に産生されることや、微量の異物抗原に対しても産生されやすいことから、異物の侵入に対する初期生体防御系に重要な役割を果たしていることが知られている（21）。また本章では併せて、複数成分の存在を明らかにするため、黄耆中に含まれている経口投与でマウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質の分画を試みた。



# 本 論

## 第一章 日本脳炎ウィルスの感染に対する生体防御効果

### -腹腔内投与による効果-

## 第一節 JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果

### 1:緒言

本章では、日本脳炎ウィルス (Japanese encephalitis virus: JEV) の感染に対する生体防御効果について、マウスを用い、腹腔内投与による実験系を設定して検討した。

JEVは、直径約40~50nmの外被膜 (エンベロープ) を有するRNA型の球状ウィルスであり、外被膜の表面に、血球凝集抗原と考えられるスパイク様構造を有している(22)。化学成分は、タンパク質30~35%、RNA 7%、脂質55~60%で、RNAの分子量は $2 \times 10^6$  daltonである。また、感染可能な宿主域は、ヒト、ウマ、ウシ、イヌ、トリ、マウスなど、きわめて広い範囲におよんでいる(23)。

本節では、JEVを接種したマウスの生存率に及ぼす効果を指標として、腹腔内投与による生体防御効果について検討した。また、生薬は産地や収穫時期 (ロット) の違いにより品質が異なることが報告されていることから(24-26)、本節では、ロットが異なる4種類の黄耆について検討を行い、JEVの感染に対する生体防御効果を指標とした品質についても考察した。

## 2: 材料および実験方法

### 細胞

BHK-21細胞, L-929細胞およびVero細胞は、すべて大阪府立公衆衛生研究所で継代、維持している株を使用した。

### 化合物

牛血清アルブミン (BSA FractionV) は、Sigma社 (ST. Louis, アメリカ) から購入した。Eagle基本培地は、日研生物医学研究所 (大阪) から購入した。他の試薬はすべて、和光純薬工業製、関東化学 (東京) 製、米山薬品工業 (大阪) 製、Sigma

社製または片山化学製の特級を用いた。また、実験に使用した水は、すべて脱イオン蒸留水を使用した。

## JEV

JEV は、上羽 昇博士（大阪府立公衆衛生研究所）から分与された株（JaTH-160 strain）を使用した。JEV（凍結保存株）は、乳飲みマウス（ddY strain）の脳内で6回にわたり継代した後、常法により10%乳剤とした。JEVの力価を、Plaque assay法（27）により測定したところ、 $1 \times 10^7$ PFU/mlであった。

## マウス

ICR系（雄）マウスを日本チャールズリバー（横浜）から購入した。マウスは、7日間にわたり大阪府立公衆衛生研究所 動物舎内で予備飼育した後（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）、実験に使用した。なお、実験には、5週齢のマウス（体重：25～30g）を使用した。

## 試料

4種類の黄耆（日本薬局方品、平成4年大阪市場品）（Fig.1-1）を三国株式会社（大阪）から購入し、実験に使用した。各試料の産地および外観的特徴は、以下のとおりである。

試料A: 中国山西省（Shanhsi）産、 $1.3 \sim 0.7 \times 20\text{cm}$ 、直根

試料B: 中国河北省（Hope）産、 $1.2 \sim 0.7 \times 18\text{cm}$ 、直根

試料C: 中国陝西省（Hsiahsi）産、 $0.8 \sim 0.6 \times 12\text{cm}$ 、直根

試料D: 北海道（Hokkaido）産、 $0.2 \sim 0.6 \times 15\text{cm}$ 、分枝の多い短根

## 黄耆エキス（AE）の調製方法

AEの調製は、Fig.1-2に示す方法に従って行った。すなわち、粉砕した試料（100g）に蒸留水（1000ml）を加え、水浴中（ $80^\circ\text{C}$ ）で2時間抽出した。抽出液をろ過した後、ろ液を $40^\circ\text{C}$ で約1/5容量になるまで減圧濃縮した。つぎに、濃縮液をメタノール中（2000ml）に滴下し、沈殿を生じさせた。沈殿を採取し、蒸留水（100ml）に再溶解した後、3日間、流水透析（Spectrum透析チューブ Cut-off: 3500使用）を行った。そして、透析内液を凍結乾燥したものをAEとして以下の実験に使用した。各試料からのエキス抽出率は、以下のとおりである。

試料A: 3.82%，試料B: 2.86%，試料C: 2.74%，試料D: 5.86%

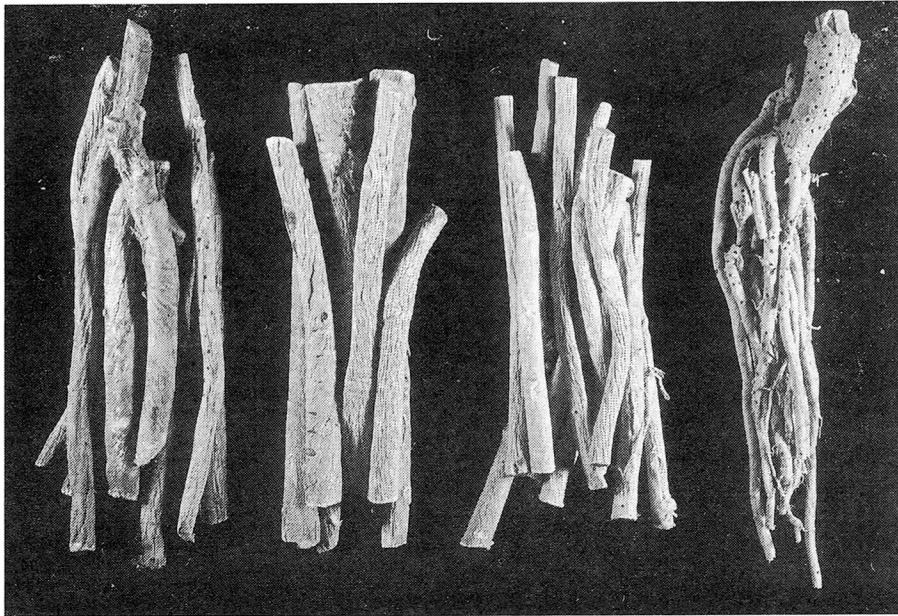


Fig.1-1 Samples

Astragali Radix (100g)

- extracted with hot water ( 80°C, 2hr, 1000ml)
- concentrated to one-fifth its original quantity
- precipitated with MeOH (2000ml)
- dialysis against water (3d.)

Astragali Radix extract (AE)

Fig.1-2 Preparation of Astragali Radix Extract (AE)

#### JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果

JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果は、Fig.1-3に示す方法に従って検討した。各AEをPBS (pH7.0) に溶解した液 (30mg/ml) をツベルクリン用注射筒を用い、マウスの腹腔内に投与した (6mg/マウス)。Control群のマウスには、PBSを投与した。AEを投与した翌日、0.28%のBSAを含むTris-HCl緩衝液 (pH7.4) で希釈したJEV (約10PFU) をマウスの腹腔内に接種し、以後21日間にわたりマウスの生存率の変動を観察した。なお、本実験では、1群あたり、20匹のマウスを使用した。また、実験期間中、マウスには飼料 (オリエンタル酵母社製、Laboratory chow MF) および水を自由に摂取させた。

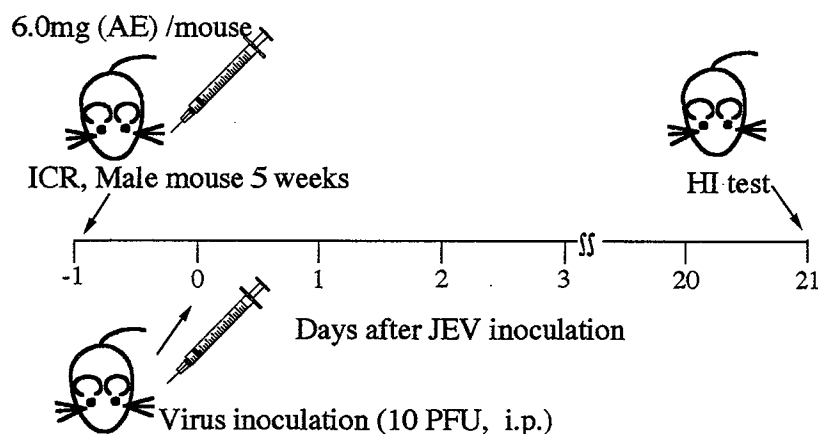


Fig.1-3 Schematic Schedule for Experiment

### 統計

各AE投与群およびControl群のマウスの生存率について、Logrank法 (28) を用い、生存検定を行った。なお、本実験では、 $p < 0.05$ 以下のレベルを有意差ありと判定した。

## 3 : 結果

### マウスの生存率に及ぼすAEの効果

各AEをマウスに投与した翌日、JEVをマウスの腹腔内に接種 (10PFU)し、以後21日間にわたり生存率の変動を観察した(Fig.1-4)。なお、AEの投与量は、3種類の培養細胞 (BHK-21, L-929, Vero) に対する毒性試験の結果に基づいて設定した

(6mg/マウス)。Control群では、JEV接種後、7日目から16日目にかけて生存率の急激な低下が認められた。しかし、各AEを投与した群ではいずれも、生存率の急激な低下は確認されず、すべてのAEにJEVを接種してから21日後におけるマウスの生存率をControl群と比較して有意に高める効果が確認された (試料A:  $p < 0.01$ , 試料B:  $p < 0.05$ , 試料C:  $p < 0.05$ , 試料D:  $p < 0.01$ )。しかし、AEの違いにより、マウスの生存率に及ぼす効果に差が認められた。すなわち、試料AまたはDのエキスを投与した群では、JEVを接種してから、21日後の生存率が80%以上であったが、試料BまたはCのエキスを投与した群では、60%程度の生存率であった。各AE投与群の間で生存検定を行ったところ、試料Dエキス投与群と試料Cエキス投与群の間に有意な差が確認された ( $p < 0.05$ )。

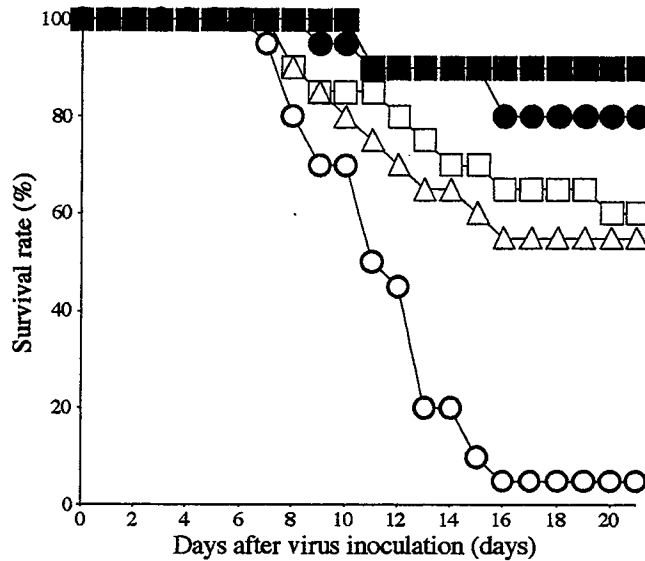


Fig.1-4 Effect of AE on Survival Rate in Mice  
 ○, Control group; ●, the group injected with sample A extract;  
 □, sample B extract; △, sample C extract; ■, sample D extract

#### 4：考察

産地が異なる4種類の黄耆を試料として用い、JEVの感染に対する生体防御効果について検討したところ、すべての試料に有意な生体防御効果が確認された。しかし、試料により生体防御に及ぼす定量的効果に差が認められた。

黄耆は一般に、径の太いものほど良品とされている。本邦で使用されている黄耆のうち、大部分を輸入している中国では、径の太さにより等級を定め、黄耆の選別を行っている（15、29）。また、第13改正日本薬局方では根径の太さによる規格（0.7-2.0cm）が設定されている（2）。JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果と根径の太さの関係について検討したところ、実験に使用した4種類の黄耆の中で、最も径が細い、北海道産の黄耆（試料D）がJEVの感染に対し、最も高い生体防御効果を示し、生体防御効果と根径の太さの間に相関関係を確認することはできなかった。根径の太さと品質の関係については、姉帯（30）および高橋（31）らも、根径の太さが異なる黄耆の $\gamma$ -Aminobutyric acid、イソフラボノイド、プタノールエキスなど、黄耆の理化学的品質評価の指標成分の含量を測定し、相関関係が認められないことから「太い黄耆ほど良品である。」という従来之选品基準に疑問を投げかけている。本節における結果も上記の報告と同様、従来から行われている、根径の太さによる選品だけでは黄耆の品質を正しく評価できないことを示すものである。

## 第二節 JEVの感染に対する生体防御効果の作用機序

### 1：緒言

近年、生薬や漢方エキス製剤がウィルスの感染に対して生体防御効果を示すことが明らかにされているが、その作用は、ウィルスに対する直接的な効果ではなく、宿主の生体防御能を高めることによる、いわば間接的な作用によるものであると考えられている。たとえば、四逆湯は、単純ヘルペスウィルス（Herpes simplex viruses Type1）の感染に対し、CD8<sup>+</sup>Tcellを活性化させることにより、生体防御効果を示すことや（32）、桂枝二越婢湯が、インフルエンザウィルス（Influenza virus）の感染に対し、インターフェロンの産生など種々の生体防御機構を活性化させることにより、抗ウィルス効果を示すことが報告されている（33）。また、Nagaiらは、小青竜湯がIgAおよびIgG抗体産生能を賦活化させることによりインフルエンザウィルス（Influenza virus A/PR/8/34）の感染に対して防御効果を示すことを明らかにしている（34）。さらに、薬用人参（Panax ginseng）は、抗体産生能増強効果、マクロファージの食食能亢進作用、TNF産生増強効果、網内系食食能亢進作用およびNK細胞賦活化効果など生体防御系に対して種々の賦活化効果を示すが（35-40）、JEVの感染に対しても生体防御効果を示すことが報告されている（41）。

第一節における検討から、黄耆は、JEVの感染に対して腹腔内投与により、生体防御効果を示すことが明らかとなった。本節では、JEVの感染に対する防御効果の作用機序について検討した。

### 2：実験方法

#### 化合物

Hemagglutination inhibition (HI) 抗原は、デンカ生研（大阪）から購入した。Superoxide dismutase (SOD) , Lucigenin, BSA, ZymosanおよびEgg albumine は、Sigma社から購入した。牛胎児血清 (FBS) 、牛血清、RPMI-1640培地およびEagle基本培地は、日研生物医学研究所（大阪）から購入した。蛍光ラテックスビーズ（粒径0.75  $\mu m$ ）は、フナコシ株式会社（東京）から購入した。May-Gruenwald およびGiemsa溶液は、関東化学から購入した。また、赤血球凝集抑制試験に使用する赤血球は、ニワトリの1日ピナの血液から調製した。他の試薬はすべて、和光純薬

工業製、関東化学製、米山薬品工業製または片山化学製の特級を用いた。また実験に使用した水は、すべて脱イオン蒸留水を用いた。

#### Cultureプレート、シャーレ

赤血球凝集抑制試験で使用する96穴Cultureプレートおよびシャーレ (60×15mm)は、Becton Dickinson 社製 (New Jersey, U.S.A.) のものを使用した。

#### 試料エキス (AE)

第一節における実験で使用した4種類の黄耆のうち、JEVの感染に対して最も高い生体防御効果を示した試料D (北海道産) から抽出したAEを実験に使用した。

#### JEV、マウス

第一節と同じものを使用した。

#### AEの*in vitro*における抗JEV効果

Kimuraらの方法 (27) に従って*in vitro*における抗JEV効果を検討した。すなわち、0.28%のBSAを含むTris-HCl緩衝液で希釈したJEV ( $1 \times 10^6$ PFU/ml)とPBSで希釈したAE(30mg/ml)の等容量を混合し、37°Cで1時間放置した。その後、混合溶液をBHK-21細胞に接種し、37°C (5%CO<sub>2</sub>, Eagle基本培地)で48時間培養した後、BHK-21細胞上に形成されるPlaque数を指標とし、AEの抗JEV効果を検討した。なお、実験には、1群あたり4枚のシャーレ (60×15mm)を使用した。

#### 赤血球凝集抑制試験法 (HI試験)

HI抗体価を赤血球凝集抑制試験により測定した (42)。96穴のCultureプレートに1%Egg albuminを含むホウ酸緩衝溶液 (pH9.0) で希釈したHI抗原と、アセトン処理したマウスの血清をPBSで希釈した液を加えて混和し、4°Cで15時間放置した。混合溶液に、ニワトリの1日ビナの赤血球を加え、赤血球の凝集を指標として、HI抗体価を測定した。なお、赤血球の凝集を阻止した最大の血清希釈倍率をHI抗体価とした。また、実験は、それぞれ2連で行い、その平均値で抗体価を示した。

#### マウスの腹腔内細胞 (Peritoneal exudate cell: PEC) 数の測定

PEC数の測定は、Robertらの方法に準じて行った (43)。すなわち、マウスを断頭により放血致死させた後、腹腔内に4°Cに冷却した0.1%BSAを含むPBS溶液 (20ml)を注射筒 (テルモシリンジSS20ES, 注射針: テルモカテラン針23G×60) を

用いて注入した。マウスの腹部を1分間、マッサージした後、腹腔内液を回収し、Burker-Turkの血球計測盤を用い、細胞数を測定した。なお、実験には、1群3匹のマウスを使用した。

#### PECのCell populationの検討

PECのCell populationは、May-Giemsa染色法により検討した(44)。PECを牛血清中に浮遊させた後( $2 \times 10^6$  cell/ml)、スライドガラス上に塗抹した。塗抹した細胞をMay-Gruenwald溶液で2分間染色し、蒸留水で洗浄後、PBSで希釈したGiemsa溶液( $\times 50$ )で再度、20分間染色した。蒸留水で再度洗浄後、光学顕微鏡(OLYMPUS社製, BX50,  $\times 600$ 倍)で観察し、細胞質および核の染色状態から細胞の種類を検討した。

#### PECの活性酸素産生能の測定

PECの活性酸素産生能は、Lucigeninと活性酸素の反応により生じる化学発光を測定することにより検討した。1群3匹のマウスから得られたPECをプールし、実験に使用した。3%のBSAを含むRPMI-1640培地を用いて調製したPEC溶液( $4 \times 10^5$ 個/ml) 1ml中にLucigenin溶液(5mM)  $5 \mu\text{l}$ を添加した。20°Cの恒温層中で10分間放置した後、Zymosan溶液(10mg/ml)  $10 \mu\text{l}$ を添加し、Lucigeninと活性酸素が反応して生じる化学発光を140分間にわたり、液体シンチレーションカウンター

(Hewlett Packard社製, HP2000 TRI-CARB)で測定した。なお、本実験における化学発光がスーパーオキシドによるものであることを、SODを用いた検討により確認した。

#### 腹腔マクロファージの精製

マクロファージの精製は、付着法により行った(45)。1群3匹のマウスの腹腔内から得られたPECをプールし、実験に使用した。RPMI-1640培地を用いて調製したPEC溶液をポリスチレン製のシャーレ(60mm $\times$ 15mm)に分注し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>)内に1時間静置した。RPMI-1640培地と浮遊細胞を吸引除去した後、PBS溶液でシャーレを洗浄した。2.5mM EDTA/PBS溶液を添加し、20分間氷冷した後、パストゥールピペットでフラッシュし、付着細胞をはく離させた。はく離させた細胞をPBSで洗浄した後、実験に使用した。

#### PECおよび腹腔マクロファージの貪食能の測定



貪食能の測定は、蛍光ラテックスビーズを用いる方法により行った(46)。10%のFBSを含むRPMI-1640培地を用いて調製した蛍光ラテックスビーズ懸濁液(200倍希釈)1.5ml中に同培地を用いて調製した細胞浮遊液( $1 \times 10^6$ 個/ml)0.4mlを加え、37°Cの恒温層中で振とうしながら、3時間放置した。細胞をPBS溶液で3回洗浄した後、2.5%ホルムアルデヒド/PBS溶液500  $\mu$ lで細胞を固定し、フローサイトメトリー(Becton Dickinson社製, FACScan, Consort30)を用いて、細胞の蛍光ビーズ貪食能を測定した。

### 統計

本節における実験の結果は、Student's t検定を用いて解析した。なお、本実験では、 $p < 0.05$ 以下のレベルを有意差ありと判断した。

## 3 : 結果

### AEの*in vitro*における抗JEV効果

Plaque assay法により*in vitro*におけるAEの抗JEV効果について検討した(Table1-1)。AE処理群とControl群の間にPlaque数の有意な差は確認されず、AEにJEVを直接的に不活化させる効果は確認できなかった。

Table1-1 Antiviral Effect of AE *in vitro*

Sample	PFU( $10^6$ /ml)
Control	1.63 $\pm$ 0.34
Astragalus	2.08 $\pm$ 0.41

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 4 dishes.

### JEVを接種してから21日後に生存しているマウスのHI抗体価

Fig.1-4の実験において、JEVを接種してから21日後に生存していたマウスのHI抗体価を測定した。Control群およびAE投与群の生存しているすべてのマウスに、抗体価の上昇は認められなかった(Fig.1-5)。

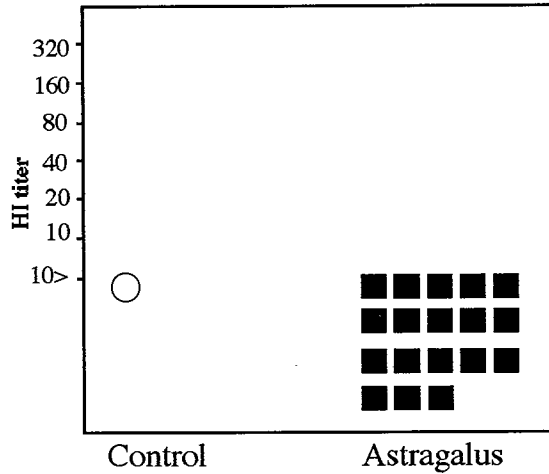


Fig.1-5 HI Antibody Titer in Mice that Survived 21d after JEV Inoculation

○, Control group; ■, the group injected with AE

JEV接種後の血中ウイルス量とHI抗体価の変動

マウスにJEVを接種した後（10PFU/マウス）、経日的な血中ウイルス量とHI抗体価の変動について検討した（Fig.1-6）。JEVを接種した翌日には、すべてのマウスの血中にJEVが認められ、3日後には、HI抗体価の上昇が確認された。

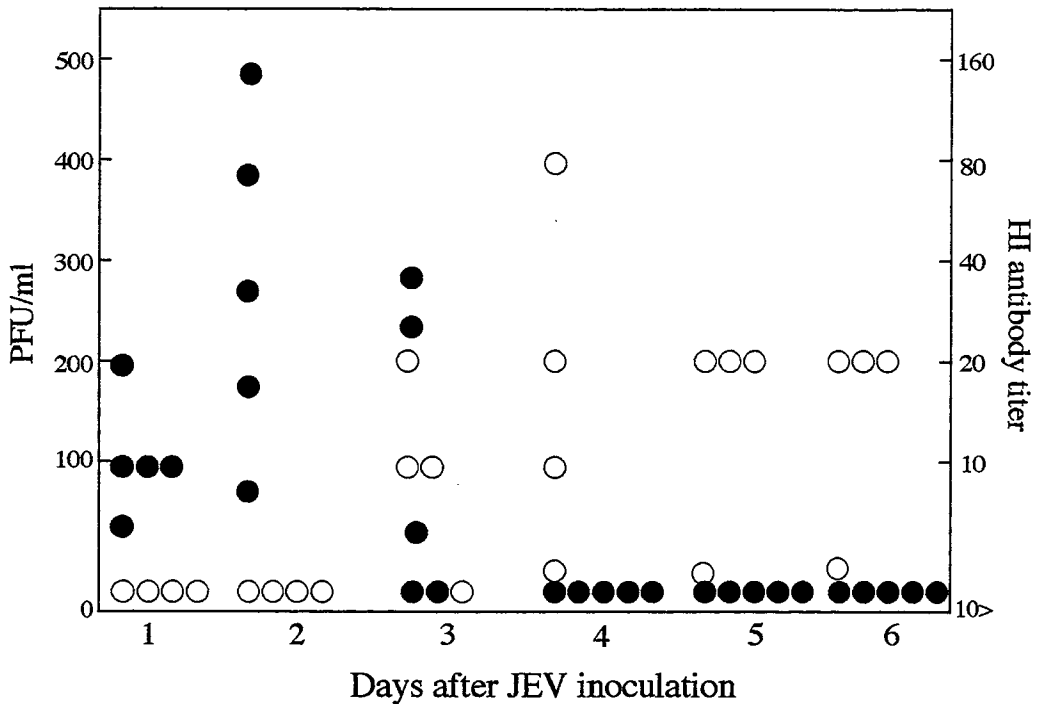


Fig.1-6 JEV Titer and HI Antibody Titer in Mouse

●, JEV titer in mouse; ○, HI antibody titer in mouse

## PEC数の増加に及ぼすAEの効果

マウスのPEC数の増加に及ぼすAEの効果について検討した (Fig.1-7)。AEを投与したマウスのPEC数は、PBSを投与したControl群のマウスと比較して有意に増加していた ( $p < 0.001$ )。また、AEの投与量について検討したところ、用量依存的にPEC数の増加に効果を及ぼすことが明らかとなった。(Fig.1-8)。しかし、12.0mg投与群では、AEを投与した後、マウスの体重が極端に減少するなど、明らかに毒性が認められた。

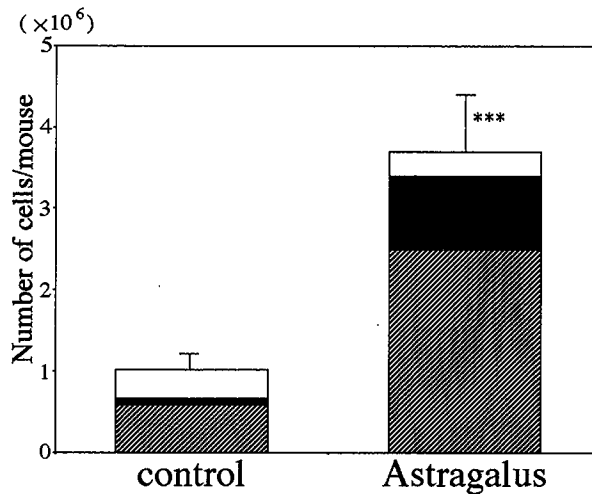


Fig.1-7 Effect of AE on PEC Number  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 mice.  
Significantly different from control value at  $p < 0.001$ (\*\*\*).

▨ : Macrophage, ■ : Neutrophil, □ : Others

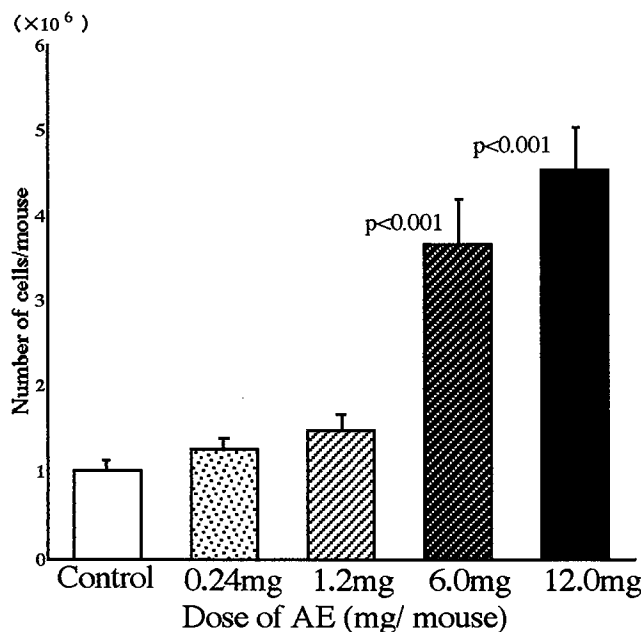


Fig.1-8 Effect of Various Doses of AE on PEC Number  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice.

## PECのCell population

AEを投与したマウスの腹腔内に観察されるPECのCell populationについて検討した (Fig.1-7)。AEを投与したマウスのPECは、好中球およびマクロファージの割合がControlと比較して高かったが、好酸球、好塩基球、リンパ球および肥満細胞は、ほとんど確認することができなかった (Fig.1-9)。

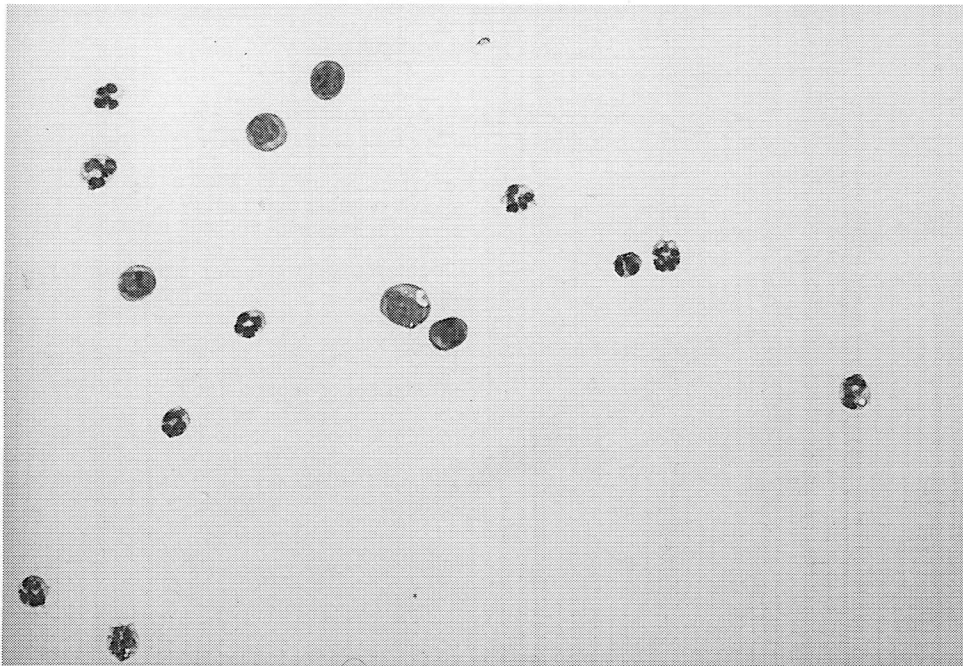


Fig.1-9 Peritoneal Exudate Cell

## 活性酸素産生能に及ぼすAEの効果

AEを投与したマウスから得られたPECの活性酸素産生能について検討した。AEを投与したマウスから得られたPECは、Control群のマウスから得られた細胞と比較して、高い活性酸素産生能を示し、またSODによる処理を行ったところ、その活性は完全に消失した (Fig.1-10)。

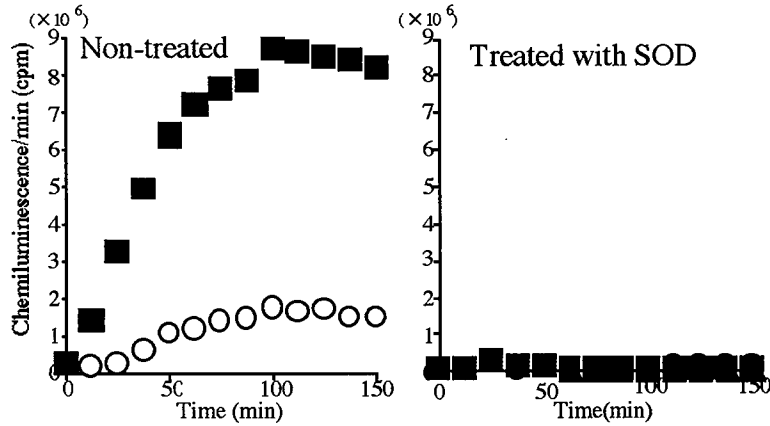


Fig.1-10 Effect of AE on Active Oxygen Production  
 ○, The cell obtained from mice treated with PBS;  
 ■, The cell obtained from mice injected with AE

PECおよび腹腔マクロファージの貪食能に及ぼすAEの効果

AEを投与したマウスから得られたPECおよび腹腔マクロファージの貪食能について検討した。AEを投与したマウスから得られたPECは、Control群のマウスから得られたPECと比較して、貪食能が有意に増強していた (Table1-2) (Fig.1-11)。

また、PECから腹腔マクロファージを精製し、貪食能を比較したところ、AEを投与したマウスから得られたマクロファージは、Controlと比較して若干高い貪食能を示した (Table1-2) (Fig.1-12)。

なお、フローサイトメトリーのサイトグラム (前方散乱、側方散乱) で顆粒球領域をゲーティングし、AEを投与したマウスから得られた細胞とControl群のマウスから得られた細胞の貪食能を比較したが、両者の間に有意な差は確認できなかった。

Table1-2 Percentage of Phagocytic Cell

	Phagocytosis(%)	
	PEC	Macrophage <sup>a)</sup>
Control	51.0 ± 2.5	81.5 ± 10.8
Astragalus	76.7 ± 1.4***	89.8 ± 7.8

\*\*\*: Significantly different from control value at p<0.001

a) PEC are adsorbed on a surface of polystyrene

All values represent the mean ± S.E.(n=3)

AE was injected intraperitoneally in mice

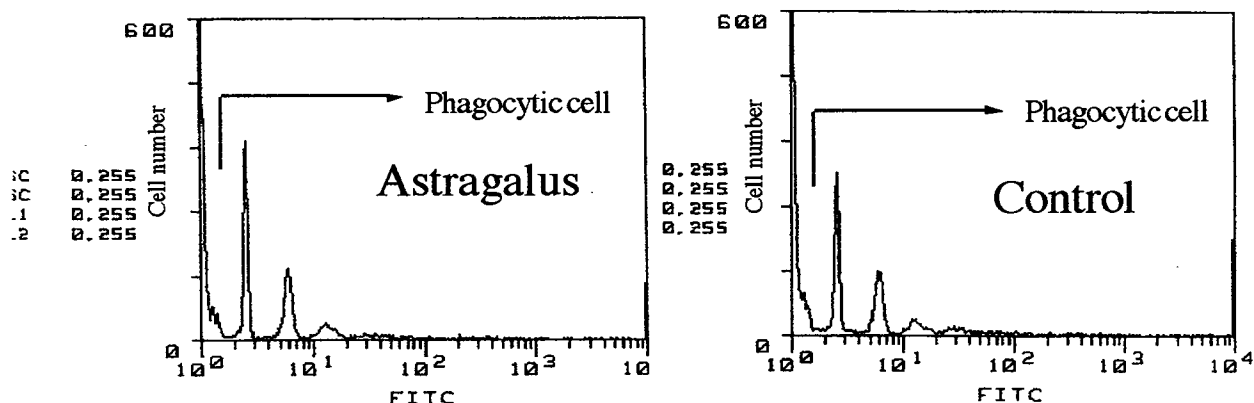


Fig.1-11 Histogram of Phagocytosis in PEC

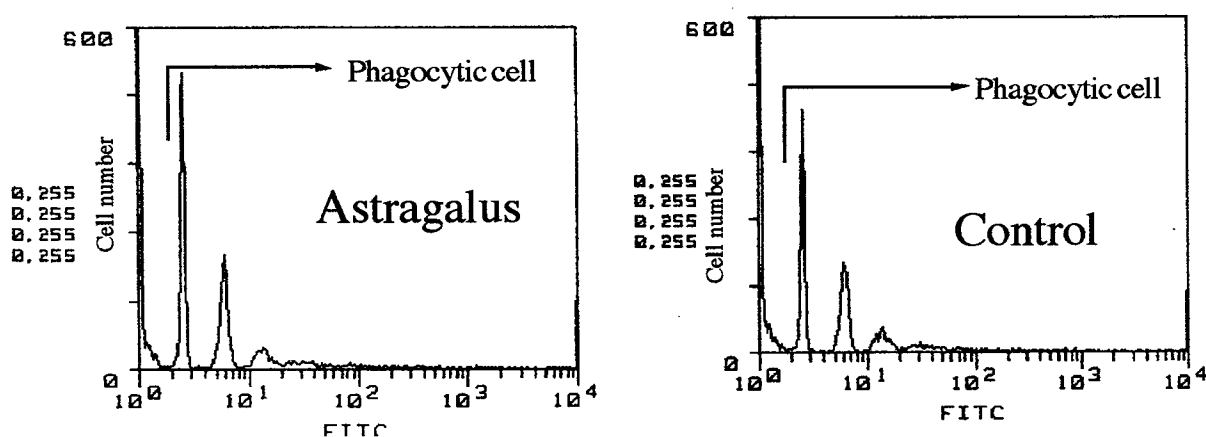


Fig.1-12 Histogram of Phagocytosis in Macrophage

#### 4 : 考察

第一節における検討から、黄耆は、JEVの感染に対して腹腔内投与により、有意な生体防御効果を示すことが明らかとなったので、本節では、防御効果の作用機序について検討した。まず、AEの直接的な抗JEV効果について検討したが、JEVを直接的に不活化させる効果は確認できなかった。そこでつぎに、JEVを接種してから21日後に生存しているマウスの抗体価をHI試験により測定した。HI試験は、IgG、IgMおよびIgAの画分に存在する、赤血球凝集阻止抗体（HI抗体）を測定する方法で、抗原に対する特異性が高いことから、従来よりウイルスに対する血中抗体検査法のひとつとして広く用いられている方法である。しかし、JEVを接種してから21日後に生存しているすべてのマウスに抗体価の上昇は、認められなかった。ここで、マウスにJEVを接

種した時の経日的な血中ウィルス量と抗体価の変動について検討したところ、JEVを接種した翌日には、血中にウィルスが観察され、3日後には抗体価の上昇が認められることが確認された。

生体に侵入した異物に対しては、時間的な間隙がおこらないように、多くの生体防御因子が連続的に働くことが知られているが(47)、JEVなどViremia(ウィルス血症)をおこすタイプのウィルスの感染に対する防御は、中和抗体によるものが主であると考えられている(18-20)。しかし、これらの結果から、JEVの感染に対する黄耆の腹腔内投与による生体防御効果には、中和抗体以外の防御因子が主に関与している可能性が示唆された。

マクロファージや好中球などの食細胞は、貪食作用を示すことから、異物の侵入に対する初期防御に重要な役割を果たしていることが知られている。本実験では、マウスの腹腔内にJEVを接種していることから、JEVの感染に対する生体防御効果には、マクロファージや好中球などのPECが関与しているのではないかと考え、次に、PECの機能に及ぼすAEの効果について検討した。

AEを投与した群のマウスのPEC数は、Control群のマウスと比較して、有意に増加していた。PECのCell populationについて検討したところ、マクロファージと好中球が高い割合を占めた。AEを投与することにより、これらの食細胞が腹腔内に誘導されてくることが推測された。また、AEを投与したマウスから得られたPECは、Control群のマウスから得られた細胞と比較して、高い活性酸素産生能を示した。活性酸素は、マクロファージや好中球の活性化の指標であり(48)、殺菌効果を示すことから、細菌やウィルスなどの侵入に対する初期防御に有効な役割をはたしていることが知られている(49、50)。さらに、AEを投与した群のマウスから得られたPECは、Control群のマウスから得られたPECと比較して有意な貪食能を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、JEVの感染に対する黄耆の腹腔内投与による生体防御効果には中和抗体以外の防御因子が主に働いており、マクロファージや好中球などの食細胞が関与している可能性が明らかとなった。

補体系が活性化されて生じる、補体第5成分および第3成分由来の因子は、マクロファージや好中球などの走化性および貪食能を高めることが知られている(51)。補

体系を活性化させる物質として種々のものが明らかにされているが (51)、黄耆の熱水抽出エキスもまた、腹腔内投与によりマウスの補体第二経路を活性化することが Wangらにより報告されている (52)。本節における実験で、AEを投与したマウスにPEC数の増加およびPECの貪食能の増強が認められたのは、補体第二経路の活性化を介した機序による可能性が高いものと考えられる。

### 第三節 小括

本章では、JEVの感染に対する黄耆の腹腔内投与による生体防御効果と作用機序について検討し、以下の結論を得た。

- 1：黄耆の腹腔内投与は、JEVの感染に対して有意な生体防御効果を示すことが明らかとなった。しかし、産地等の違いにより防御効果に量的な差が認められた。
- 2：JEVの感染に対する黄耆の生体防御作用の機序として、中和抗体以外の防御因子が主に働いており、マクロファージや好中球などの食細胞系が関与している可能性が明らかとなった。



## 第二章 JEVの感染に対する生体防御効果

### -経口投与による効果-

#### 第一節 JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果

##### 1: 緒言

第一章における検討から、黄耆は、JEVの感染に対して腹腔内投与により、生体防御効果を示すことが明らかとなった。現在、生薬類は、一部の外用剤に配合されているものを除いてほとんどが、経口的に服用されている。本研究で取り上げる黄耆も例外ではなく、漢方では主に、煎剤として適用されている。

本節では、JEVを接種したマウスの生存率に及ぼす効果を指標として、経口投与による生体防御効果について検討した。

##### 2: 材料および実験方法

###### 化合物、JEV、マウス

第一章と同じものを用いた。

###### 試料エキス(AE)

第一章 第二節と同じもの（試料Dから抽出）を用いた。

###### JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果

JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果は、Fig.2-1に示す方法に従って検討した。AEをPBS (pH7.0) に溶解 (12mg/ml) した液を5日間にわたり、毎日1回、胃ゾンデを用い、マウスに経口投与した (0.1ml/マウス×5日)。Control群のマウスには、PBSのみを投与した。AEおよびPBSを最終投与した翌日、0.28%のBSAを含むTris-HCl緩衝液 (pH7.4) で希釈したJEV (約10PFU) をツベルクリン用注射筒 (テルモシリンジSB26G×1/2) を用い、マウスの腹腔内に接種し、以後25日間にわたりマウスの生存率の変動を観察した。なお、本実験では、1群あたり、20匹のマウスを使用した。また実験中、マウスには飼料および水を自由に摂取させた。

###### 統計

マウスの生存率について、Cox-Mantel法 (28) を用い、生存検定を行った。なお、本実験では、 $p < 0.05$ 以下のレベルを有意差ありと判断した。

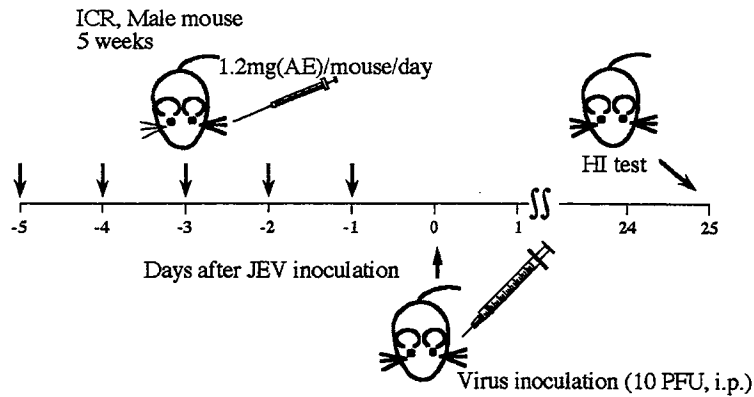


Fig.2-1 Schematic Schedule for Experiment

### 3 : 結果

#### マウスの生存率に及ぼす効果

AEを5日間にわたり、マウスに経口投与した翌日、JEVを腹腔内に接種し(10PFU/マウス)、以後、25日間にわたり生存率の変動を観察した。JEV接種後、8日目から、生存率の低下が観察された (Fig.2-2)。JEVを接種してから25日後のControl群の生存率は20%であった。これに対し、AEを投与した群の生存率は、30%であった。マウスの平均生存日数は、Control群より、AEを投与した群の方が長かった (Table2-1)。また、Cox-Mantel法により、生存検定を行ったところ、AE投与群とControl群の間に有意な差 ( $p < 0.05$ )が確認され、JEVの感染に対し、AEが経口投与でも有意な生体防御効果を示すことが明らかとなった。

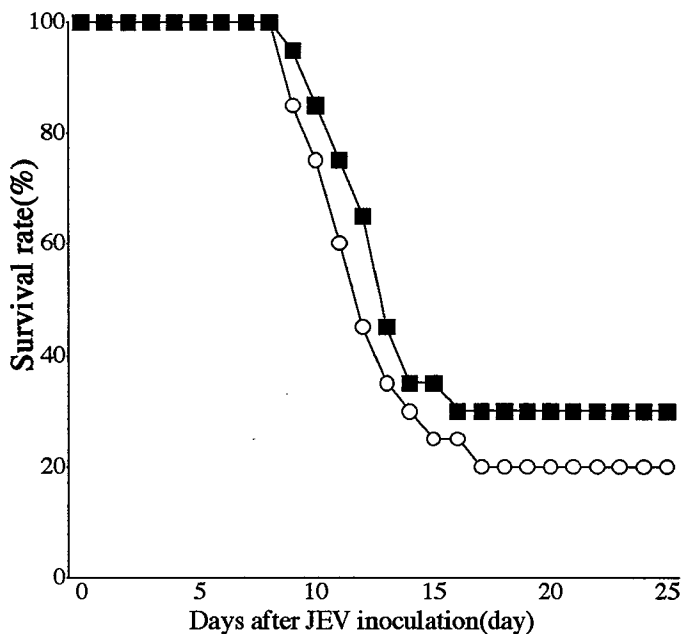


Fig.2-2 Effect of AE on Survival Rate in Mice

○, Control group; ■, the group administered AE

Table 2-1 Protective effect of AE against JEV Infection

	No. of mice	MSD(d) <sup>a)</sup>	Survival rate(%) <sup>b)</sup>
Control	20	>12.8	20
Astragalus*	20	>14.2	30

a) Mean survival days during the 25-d experimental period.

b) Survival rate at 25 d after JEV inoculation.

Significantly different from control value at  $p < 0.05$ (\*),

#### 4：考察

第一章における検討から、黄耆はJEVの感染に対してウィルス接種前に腹腔内投与することにより生体防御効果を示すことが明らかとなった。さらに、本章、第一節における検討から、黄耆は経口投与でもJEVの感染に対して有意な予防効果を示すことが明らかとなった。

生薬や漢方エキス製剤がウィルスの感染に対し、予防的な投与により防御効果を示すことが明らかにされている。たとえば、漢方で黄耆と同じ様に用いられている薬用人参 (Panax ginseng) は、JEV (Jath-160 strain) の感染に対してウィルス接種前の投与により、生体防御効果を示すことが報告されている (41)。また、インフルエンザウィルス (A/osaka/5/70(H3) strain) の感染に対して麻黄附子細辛湯は、初期の感染防御能を高めることにより予防的な生体防御効果を示すことが明らかにされている (53、54)。さらに、当帰は、生体防御系を賦活化させる種々の効果を示すことが報告されているが (55-57)、JEV (Jath-160 strain) の感染に対して予防効果を示すことが明らかにされている (58)。

第一章および本節における結果とこれらの報告は、マイルドな作用を持つ黄耆をはじめとする生薬および漢方エキス製剤がウィルスの感染に対する予防薬として臨床的に適用できる可能性を示すものである。

## 第二節 JEVの感染に対する生体防御効果の作用機序

### 1：緒論

第一章における検討から、JEVの感染に対する黄耆の腹腔内投与による、生体防御効果には、抗体産生機構が活性化される前に働く、食細胞系などの非特異的な因子が主に関与している可能性が示された。本章第一節における検討から、JEVの感染に対する生体防御効果が経口投与でも認められた。一般に薬物を経口的に投与した場合、生体内で消化および吸収を受けるため、腹腔内投与した場合とは異なるメカニズムが関与している可能性が考えられる。本節では、JEVの感染に対する黄耆の経口投与による生体防御効果の作用機序について検討した。

### 2：実験方法

実験は、すべて第一章第二節と同様の方法で行った。

### 3：結果

#### JEVを接種してから25日後に生存しているマウスのHI抗体価

Fig.2-1の実験において、JEVを接種してから25日後に生存しているマウスのHI抗体価を測定した（Fig.2-3）。Control群では、すべてのマウスに抗体価の上昇が認められた。これに対し、AEを投与した群のほとんどのマウス（6匹中5匹）は、抗体価が上昇していなかった。

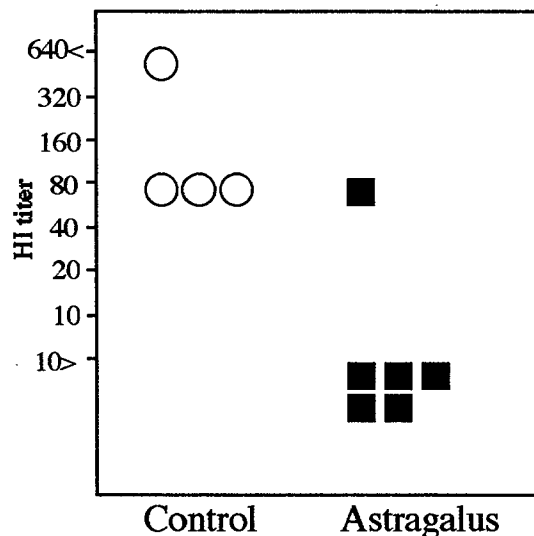


Fig.2-3 HI Antibody Titer in Mice that Survived 25 d after JEV Inoculation

○, Control group; ■, the group administered AE

## JEV接種後3日後、7日後のマウスのHI抗体価

Fig.2-1に示す方法に従ってAEまたはPBSを投与したマウスにJEVを接種し、3日後、7日後にHI抗体価を測定した (Table2-2)。JEVを接種してから3日後に抗体価の上昇が認められたマウスの割合は、Control群では90%であった。これに対し、AEを投与した群では30%であった。フィッシャーの直接確率法により検定を行ったところ、Control群とAE投与群の間に有意な差が確認された ( $p<0.01$ )。

**Table 2-2 Rate of HI Antibody-Positive Mice on the 3 rd and 7 th Days after JEV Inoculation**

	No. of mice	Days after JEV inoculation	
		3 th(%) <sup>a)</sup>	7 th(%) <sup>a)</sup>
Control	10	90	90
Astragalus	10	30**	60

a) Rate of antibody titer-positive mice. AE was administered once a day for 5 d, and the next day, JEV was inoculated.  
Control group was treated with PBS  
Significantly different from control value at  $p<0.01$ (\*\*)

## PEC数に及ぼすAEの効果

Fig.2-1に示す方法に従ってAEまたはPBSを投与したマウスのPEC数を測定したところ、AEを投与した群のマウスのPEC数は、Control群のマウスと比較して有意に増加していた。 ( $p<0.001$ ) (Fig.2-4)。

## PECのCell population

AEを投与したマウスから得られたPECのCell populationについて検討したところ、マクロファージの割合が非常に高かった (Fig.2-4)。好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球および肥満細胞は、ほとんど確認することができなかった(Fig.2-5)。

## 活性酸素産生能に及ぼすAEの効果

Fig.2-1に示す方法に従ってAEまたはPBSを投与したマウスから得られたPECの活性酸素産生能を測定した (Fig.2-6)。AEを投与したマウスから得られたPECは、Control群のマウスから得られたPECと比較して、高い活性酸素産生能を示した。また、SODによる処理を行ったところ、これらの活性は、完全に消失した。

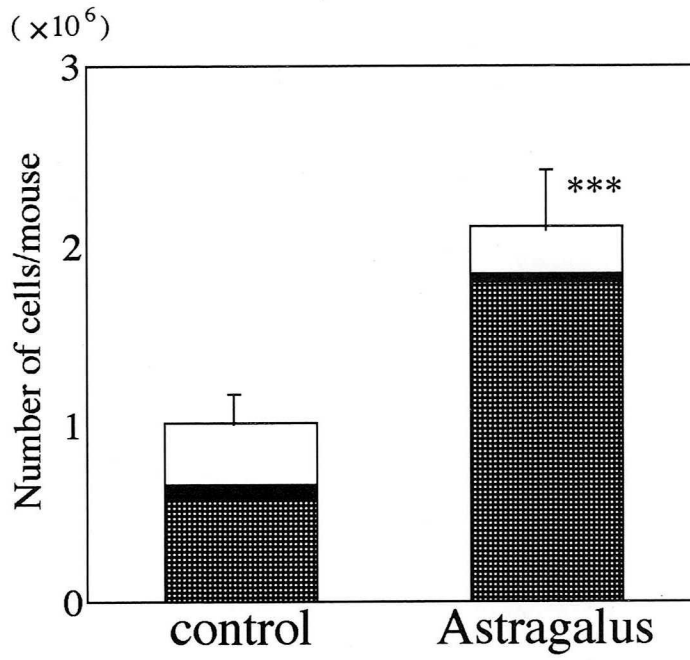


Fig.2-4 Effect of AE on PEC Number  
 Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 mice. Significantly different from control value at  $p < 0.001$ (\*\*\*).  
 ■ : Macrophage, ■ : Neutrophil, □ : Others

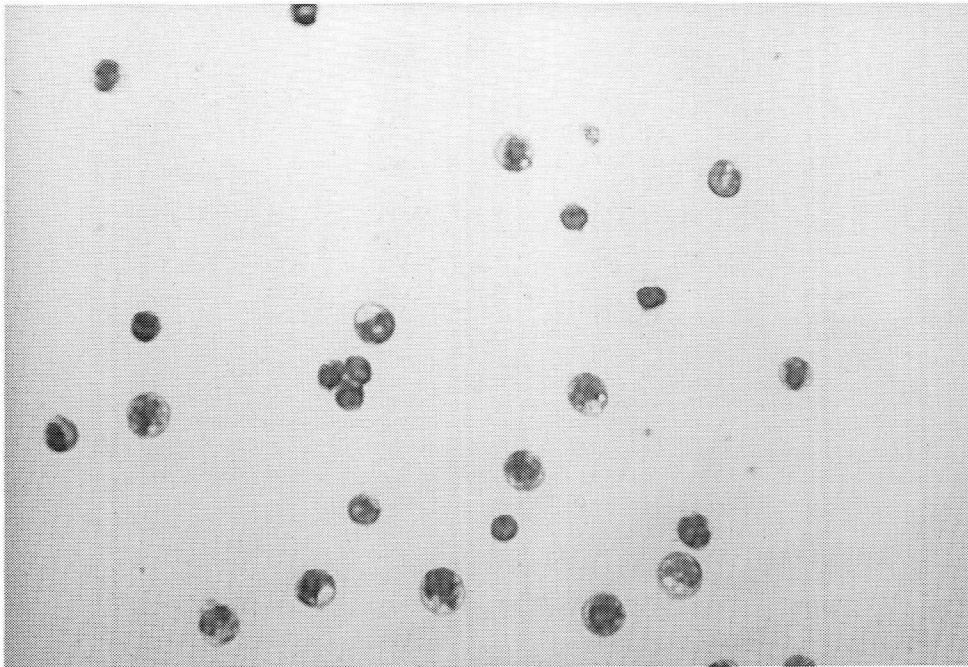


Fig.2-5 Peritoneal exudate cell

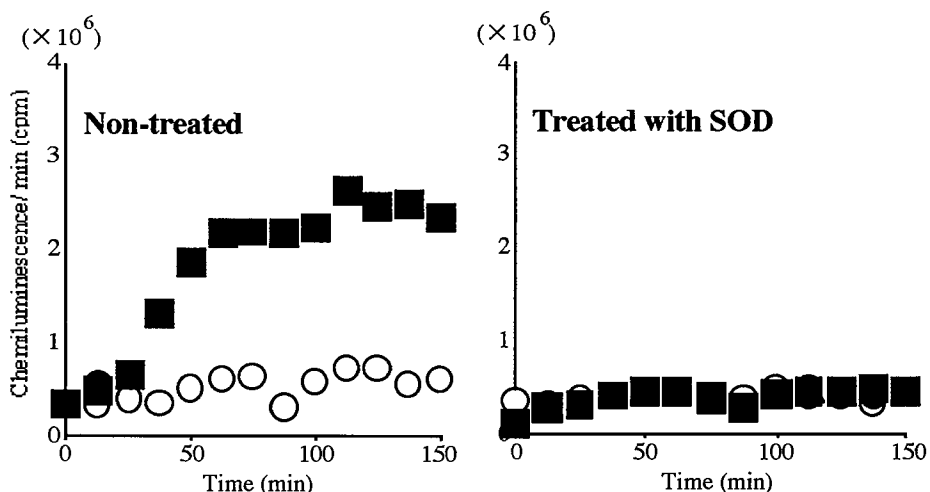


Fig.2-6 Effect of AE on Active Oxygen Production

○, The cell obtained from mice treated with PBS;

■, The cell obtained from mice administered AE

#### PECおよび腹腔マクロファージの食食能に及ぼすAEの効果

PECおよび腹腔マクロファージの食食能に及ぼすAEの効果について検討した。AEを投与したマウスから得られたPECは、Control群のマウスから得られたPECと比較して、食食能が有意に増強していた( $p < 0.001$ ) (Table 2-3) (Fig. 2-7)。

また、Control群およびAE投与群のマウスから得られたPECからマクロファージを精製し、食食能を比較したところ、AEを投与した群のマウスから得られたマクロファージは、Controlと比較して有意な食食能を示した (Table 2-3) (Fig. 2-8)。

Table 2-3 Percentage of Phagocytic Cell

	Phagocytosis(%)	
	PEC	Macrophage <sup>a)</sup>
Control	49.0 ± 6.1	75.5 ± 3.8
Astragalus	91.9 ± 3.3**	93.0 ± 3.7*

\*\* , \*: Significantly different from control value at  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$

a) PEC are adsorbed on a surface of polystyrene

All values represent the mean ± S.E. (n=3)

AE was administered to the mice

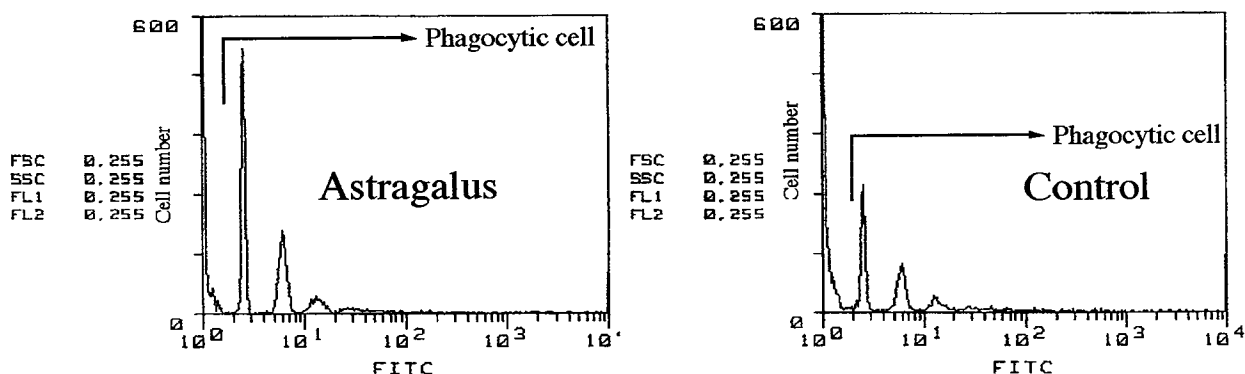


Fig.2-7 Histogram of Phagocytosis in PEC

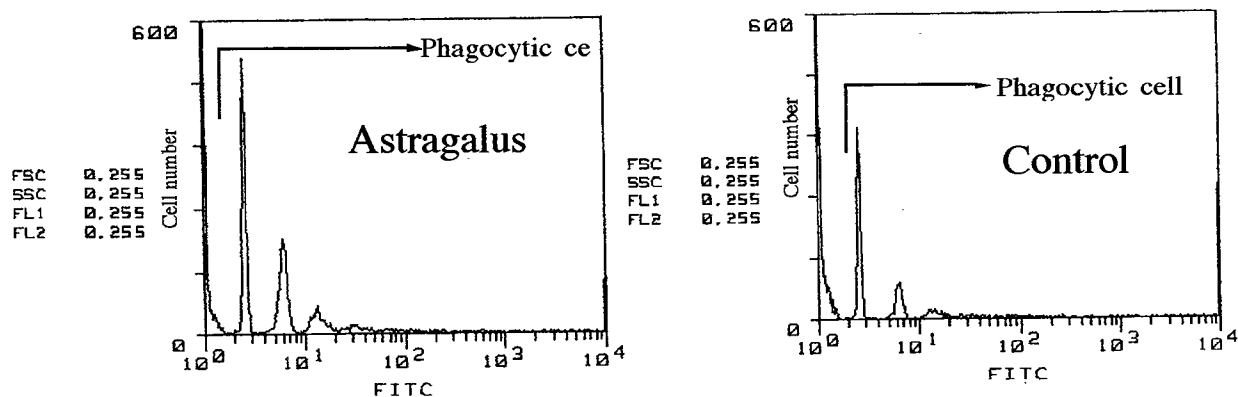


Fig.2-8 Histogram of Phagocytosis in Macrophage

#### 4 : 考察

本章第一節における検討から、JEVの感染に対して黄耆は、経口投与により生体防御効果を示すことが明らかとなった。本節では、その作用機序について検討した。JEVを接種してから25日後に生存しているマウスのHI抗体価を測定したところ、Control群では生存しているすべてのマウスに抗体価の上昇が認められた。これに対し、AEを投与した群では、抗体価が上昇していないマウスが多数存在した。この傾向は、JEVを接種してから早い時期でも同様であった。すなわち、JEVを接種してから3日後に抗体価の上昇が認められたマウスの割合は、Control群では90%であったが、AEを投与した群では30%であった。

JEVの感染に対する防御機構として、中和抗体によるものが特に有効であると考え



られているが（18-20）、これら結果から、黄耆の経口投与による生体防御効果には、腹腔内投与の場合と同様、中和抗体以外の生体防御因子も関与しているのではないかと考えた。本節における実験では腹腔内にウィルスを接種していることから、腹腔内食細胞系に着目し、次に、腹腔内食細胞の機能に及ぼす黄耆の効果について検討した。AEを投与した群のマウスではControl群のマウスと比較してPEC数の有意な増加が認められ、PECのCell populationについて検討したところ、マクロファージが大部分を占めた。また、これらのマクロファージは、活性化したマクロファージの形態を有しており（59）、Control群のマウスから得られた細胞と比較して、活性酸素産生能および貪食能が有意に増強していた。このように、黄耆は、腹腔マクロファージの数的な増加に効果を示すとともに、その機能をも活性化することが明らかとなった。

以上の結果から、JEVの感染に対する黄耆の経口投与による生体防御効果には、非特異的なメカニズムが働いており、マクロファージなどの食細胞が主に関与している可能性が明らかとなった。

第一章における検討から、JEVの感染に対する黄耆の腹腔内投与による生体防御効果には、感染の初期における非特異的なメカニズムが関与している可能性が明らかとなった。一般に、薬物を経口的に投与した場合、生体内で消化および吸収を受けるため、腹腔内に投与した場合とは異なるメカニズムが働いている可能性も考えられる。しかし、本節における検討から、経口投与による防御効果についても同様の非特異的な因子が関与している可能性が明らかとなった。Yonekuraらは、*Listeria monocytogenes*の感染に対する人参養菜湯の防御効果の作用機序について検討し、感染初期のメカニズムによるものであり、マクロファージが重要な役割をはたしていることを報告している（60）。また、Irinodaらは、インフルエンザウィルス

（Influenza A virus）の感染に対する、シイタケ（*Lentinus edodes*）から精製された多糖であるLentinanの防御効果の作用機序について検討し、活性酸素産生能など同じく感染の初期に働くメカニズムが関与していることを明らかにしている（61）。

ウィルスや細菌は、宿主の体内に侵入した後短時間に対数的に増殖する可能性がある。第一章および本章で使用したJEV（Jath-160 strain）も、生体に侵入した後15~18hrで、末梢リンパ節においてViremia（ウィルス血症）をおこし、一次増殖を

開始することが明らかにされている(62)。第一章および本章における結果と上記の報告から、ウイルスなど宿主の体内で対数的に増殖する可能性がある異物の侵入に対しては、侵入直後における防御が特に有効であることが考えられる。

第一章および本章における結果から、JEVの感染に対する生体防御として、非特異的なメカニズムが関与している可能性が明らかとなった。異物の侵入に対し、宿主はこれを排除するための生体防御反応を示し、その機構には、非特異的機構と特異的機構の2種類があることが知られている。非特異的な防御は、自然抵抗性とも呼ばれ、侵入した異物の種類を問わず、すべての異物を排除するための機構であり、生体防御の最前線を担っている。一方、特異的な防御は、獲得免疫とも呼ばれ、侵入した異物を特異的に排除する機構である。通常、生体防御機構を考えるうえでは、免疫系を中心とした特異的な機構が強調されている。しかし近年、特異的な機構とともに、非特異的な機構の重要性が指摘されており(63)、貪食細胞の欠損が広範な細菌感染を起こすことや(64)、特に老人においては、生体防御系のなかで相対的に非特異的な部分の占める割合が高まってくることも明らかにされている(65)。

本研究における結果は、ウイルスの感染に対しても、従来から強調されてきた免疫系を中心とする特異的な防御機構とともに、感染の初期に発動する食細胞系などの非特異的な機構も同様に重要であることを示すものと考えられる。また、この非特異的な生体防御因子には、細胞性と液性の二種類の因子が存在するが(66)、黄耆はこの中のマクロファージなどの細胞性因子および活性酸素などの液性因子の両方に対し賦活化効果を示すことが本研究から明らかとなった。

### 第三節 マウスの腹腔内細胞の機能を賦活化させる物質

#### 1：緒論

本章第一節および第二節における検討から、JEVの感染に対して黄耆は経口投与により生体防御効果を示すこと、その防御効果にはマクロファージなどのPECの活性化が関与している可能性が明らかとなった。本節では、マウスのPEC数の増加に及ぼす効果を指標として、黄耆中に含まれている活性物質の分画を行った。また併せて、分画した物質の構成要素、分子量などについても検討した。

#### 2：実験方法

##### 化合物

単糖の標準品およびガスクロマトグラフィー (GC) の内標準物質として使用した、Galacturonic acid (GalA), Glucose (Glc), Rhamnose (Rha), Ribose (Rib), Fucose (Fuc), Arabinose (Ara), Xylose (Xyl), Mannose (Man), Galactose (Gla) および 2-Deoxy-D-glucose は、すべて、フナコシ (東京) から購入した。β-Glucan および *m*-Hydroxybiphenyl は Sigma 社から購入した。Inulin と Dextran は和光純薬工業製のものを使用した。他の試薬はすべて、和光純薬工業製、関東化学製、米山薬品工業製または片山化学製の特級を用いた。また実験に使用した水はすべて脱イオン蒸留水を用いた。

##### 試料エキス (AE)

第一節および第二節と同じもの (試料Dから抽出) を用いた。

##### 分画方法

分画は、Fig.2-9に示すセタブロン沈殿法 (67) により行った。すなわち、AE (10g) を蒸留水 (300ml) に溶解し、等容量の8%臭化セチルトリメチルアンモニウム溶液を加えた後、室温で20時間放置した。生じた沈殿を10%塩化ナトリウム溶液 (100ml) に再溶解し、0.1%酢酸カリウムを含む、3倍量のメタノールを加え、再び、沈殿を生じさせた。沈殿は、水に再溶解した後、流水透析 (Spectrum透析チューブ Cut-off:3500使用) を3日間行い、内液を凍結乾燥し、強酸性多糖画分 (F-1) を得た。

セタブロンを加えることにより生じた沈殿を除いた上清には、1%ホウ酸溶液

(500ml) を加え、2N塩化ナトリウム溶液でpHを8.8に調整した後、生じた沈殿を分取した。この沈殿は、2%酢酸により弱酸性とした後、10%塩化ナトリウムに再溶解(100ml)し、酢酸カリウムとともに3倍量のメタノールを加え、沈殿物を得た。この沈殿物を流水透析および凍結乾燥し、弱酸性多糖画分 (F-2) を得た。

ホウ酸の存在下でも沈殿を生じなかった上清の部分は、pHを4.4に調整した後、メタノール添加、透析および凍結乾燥など、F-1およびF-2を分画した方法と同様の方法で操作し、中性多糖画分 (F-3) を得た。

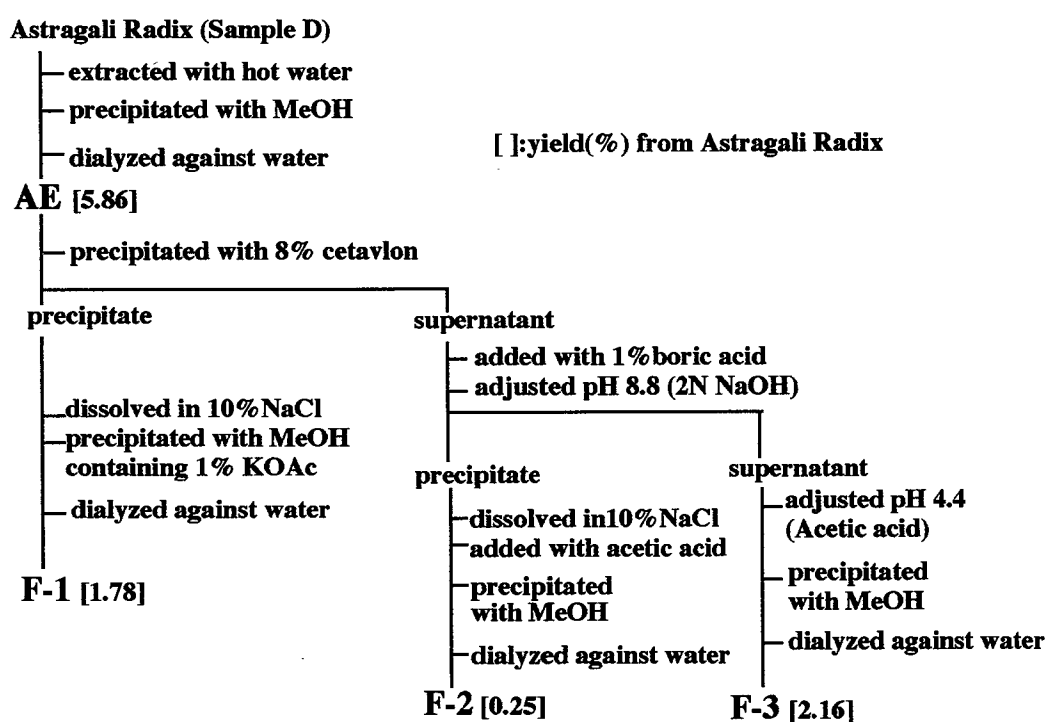


Fig.2-9 Fractionation of *Astragali Radix*

## マウス

第一節および第二節と同じICR系マウス (5週齢、雄) を実験に使用した。

### マウスのPEC数に及ぼす効果

Fig.2-1に示す方法に従って各黄耆分画物 (AE, F-1, F-2およびF-3) を投与したマウスのPEC数を測定した。PEC数の測定は、第一章で記載した方法に従って行った。また、実験には1群3匹のマウスを使用した。

## 化学分析

中性糖の含量は、Glcを標準としてフェノール硫酸法 (68) により測定した。タンパク質の含量は、BSAを標準として、Lowry法 (69) により測定した。ウロン酸含量は、GalAを標準として、*m*-Hydroxybiphenyl法 (70) により測定した。

構成糖の同定およびモル比の検討は、以下のように行った。Sampleを、2Nのトリフルオロ酢酸中で加水分解した後 (100℃、4時間、減圧)、Trevelyanらの方法

(71) に従って薄層クロマトグラフィー (展開溶媒 ; 酢酸エチル : ピリジン : 酢酸 : 水 = 5 : 5 : 1 : 3、発色試薬 ; アセトン硝酸銀試薬、薄層板 ; メルク社製TLCプレート Kieselgel 60 Art.5721 20×20cm) を行い、Rf値を糖の標準品と比較することにより構成糖を同定した。また、構成糖のモル比は、前記の加水分解物を水素化ホウ酸ナトリウムで還元後、Schiffmannらの方法(72)に従ってアセチル化し、アルジトールアセテート誘導体とした後、ガスクロマトグラフィー (GC) により分析を行うことにより検討した。GCの測定条件は、以下のとおりである。

装置 : Hewlett Packard 5890 II、

検出器 : Flame Ionization Detector (FID) 検出器、

カラム : DB-23(0.25mm I.D.×30m, 0.5 μm, J&W Scientific, CA., USA)、

キャリアガス : Helium (1.2ml/min) 、

メイクアップガス : Nitrogen (70ml/min)

カラムオープン温度 : Programmed from 180 to 250℃ at 2℃/min、

注入口温度 : 250℃、検出器温度 : 280℃、

注入量 : 2 μl、

内標準物質 : 2-Deoxy-D-glucose

## 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

Sample (1mg) を0.1N NaCl (1ml) に溶解し、0.50 μmのフィルター (ADVANTEC DISMIC) でろ過した後、HPLCにより分析を行った。HPLCの測定条件は、以下のとおりである。

装置 : Hewlett Packard 1100 series

検出器 : 示差屈折検出器 (昭和電工社製、東京) 、

カラム : Shodex GF-510HQ (7.8×250mm, 昭和電工) およびGF-310HQ (

7.8×250mm, 昭和電工) を連結した。

カラム温度：50℃、

移動相：0.1M NaCl、

流速：0.5ml/min、

注入量：10  $\mu$  l

また、検出したピークの分子量は、デキストラン（昭和電工社製、分子量；5, 10, 20, 50, 100, 200 and 400×10<sup>3</sup>）を用いて作成した検量線から算出した。

### 統計

本節における実験の結果は、Student's t検定を用いて解析した。なお、本実験では、p<0.05以下のレベルを有意差ありと判断した。

## 3：結果

### 黄耆エキス (AE) の中性糖およびタンパク質含量

AEに含まれている中性糖およびタンパク質の含量について検討したところ、高い中性糖含量を示すことが明らかとなった（87.6% as Glc）。タンパク質の含量は中性糖と比較して極めて低かった（4.5% as BSA）。

### マウスのPEC数の増加に及ぼす黄耆分画物の効果

マウスのPEC数の増加に及ぼす黄耆分画物（F-1, F-2およびF-3）の効果について検討したところ、多くの画分が活性を示したが、その中で強酸性多糖画分

（F-1）がマウスのPEC数を増加させる最も高い効果を示した。しかし、AEと比較して各分画物の活性はいずれも低かった（Table2-4）。

### F-1の投与量に関する検討

PEC数の増加に及ぼすF-1, F-2およびF-3の効果について検討したところ、強酸性多糖画分（F-1）が最も高い効果を示した。そこで次に、F-1の投与量に関する検討を行った。F-1をそれぞれ、0.1, 0.2, 0.4, 0.8mg投与した各群のマウスのPEC数について検討したところ、明確なDose-Responseは認められなかったが、0.4mg投与群のマウスのPEC数が最も増加していた（Table2-5）。

Table 2-4 Effect of Astragali Polysaccharide Fraction on PEC Number in Mice by Oral Administration

Sample	Property	Yield (%)	Dose (mg/mouse)	PEC number ( $\times 10^6$ )
Control	-	-	-	1.40 $\pm$ 0.18
AE	-	5.9	1.2	2.08 $\pm$ 0.24*
F-1	Strongly acidic	1.8	0.4	1.83 $\pm$ 0.15
F-2	Weakly acidic	0.3	0.1	1.28 $\pm$ 0.14
F-3	Neutral	2.2	0.4	1.67 $\pm$ 0.17

\*: Significantly different from control value at  $p < 0.05$

All values represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 mice

yield(%) from Astragali Radix

Table 2-5 Effect of Astragali Strongly Acidic Polysaccharide Fraction on PEC Number in Mice

Sample	Property	Dose (mg/mouse)	PEC number ( $\times 10^6$ )
Control	-	-	1.03 $\pm$ 0.15
F-1	Strongly acidic	0.8	1.45 $\pm$ 0.11
F-1	Strongly acidic	0.4	1.62 $\pm$ 0.27*
F-1	Strongly acidic	0.2	1.55 $\pm$ 0.10
F-1	Strongly acidic	0.1	1.27 $\pm$ 0.14

\*: Significantly different from control value at  $p < 0.05$

All values represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 mice

### F-1の化学的性状

F-1の化学的性状について検討した結果をFig.2-10に示す。F-1中に含まれている中性糖、タンパク質およびウロン酸含量について検討したところ、82.5%の中性糖、16.3%のタンパク質、9.2%のウロン酸を含有していた。構成糖について検討したところ、Glcの割合が高かった。また、HPLCゲル濾過クロマトグラフィーによりF-1を分析したところ、2本のメインピークが確認された。これら2本のピークの分子量をデキストランを標準として測定したところ、約9000と約300000であった。

Fig. 2-10 Chemical Properties of Strongly Acidic Polysaccharide Fraction (F-1) in Astragali Radix

Molecular weight of main peaks on HPLC	9000, 300000
Total protein (as BSA)	16.3%
Total carbohydrate (as Glucose)	82.5%
Total uroic acid (as Galacturonic acid)	9.2%
Component sugars (mol.ratio)	
Rhamnose	5
Ribose	2
Fucose	1
Arabinose	12
Xylose	3
Mannose	4
Galactose	7
Glucose	100

#### マウスのPEC数に及ぼす多糖類の効果

マウスのPEC数の増加に及ぼすAEおよび各種多糖類 (Inulin, Dextran,  $\beta$ -Glucan) の腹腔内投与および経口投与による効果について検討した (Table 2-6)。腹腔内投与では、AEおよびInulinに有意な効果が確認された ( $\beta$ -Glucanは検討せず)。しかし、経口投与で有意な効果が認められたのは、AEだけであった。

Table 2-6 Effect of Various Compound on PEC Number in Mice

	PEC number ( $\times 10^6$ )	
	Intraperitoneal injection <sup>a)</sup>	Oral administration <sup>b)</sup>
Control	1.35 $\pm$ 0.1	1.06 $\pm$ 0.2
AE	3.75 $\pm$ 0.3***	1.78 $\pm$ 0.1*
Inulin	4.40 $\pm$ 0.4***	1.07 $\pm$ 0.1
Dextran	1.67 $\pm$ 0.2	1.05 $\pm$ 0.2
$\beta$ -Glucan	-	1.13 $\pm$ 0.2

\*,\*\*\*:Significantly different from control value at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$

All values represent the mean  $\pm$  S.E. of 3 mice

a) Respective compound were injected (6mg/mouse) in mice.

b) Respective compound were administered (1.2mg/mouse) to mice once a day for 5d.



#### 4：考察

本節では、黄耆中に含まれているマウスのPEC数を経口投与で増加させる物質の検索を試みた。黄耆の粗抽出物であるAEの化学組成について検討したところ、中性糖の含量が高かったため、多糖類の分画法であるセタブロン沈殿法(67)を用いて、AEの分画を行った。マウスのPEC数の増加に及ぼす各黄耆分画物の効果について検討したところ、AEと比較して各分画物の活性はいずれも低かった。これは、黄耆中にマウスのPEC数を経口投与で増加させる物質が複数存在することを窺わせるもので、それらの物質がPEC数の増加に相加的あるいは相乗的に作用していることを示唆するものである。

従来、生薬中に含まれている高分子化合物は生薬の薬効にとって重要な物質とは考えられておらず、生理活性成分についての検討は低分子化合物に関するものがほとんどであった。しかし近年、生薬や漢方エキス製剤中に含まれている多糖や糖タンパク質などの高分子化合物が種々の生理活性を示すことが明らかにされてきており(73-77)、その重要性が注目され始めている(78)。本節における実験で分画されたマウスのPEC数を経口投与で最も大きく増加させた画分、F-1も、メタノール沈殿や透析などの手法により分画されていることや、中性糖が多く含まれていたことから、多糖または糖タンパク質である可能性が高いものと考えられる。

マウスのPEC数の増加に及ぼす各種多糖類(AE, Inulin, Dextran,  $\beta$ -Glucan)の効果について検討したところ、腹腔内投与ではAEおよびInulinに有意な効果が認められたが、経口投与で有意な効果が確認されたのはAEだけであった。

種々の生体防御因子を賦活化させる多糖として、シイタケから精製されたレンチナンが報告されている(79, 80)。レンチナンは、経口投与では賦活化効果が認められないことが明らかにされているが、この原因として、分子量が約100万と巨大であるため、そのままの形状では吸収されず、生体内で消化を受けた際、活性が消失してしまうことが推測されている。本節における検討で、Inulinや $\beta$ -Glucanなどに経口投与で活性が認められなかった原因も、レンチナンと同様である可能性が考えられる。これに対してAEは、経口投与でも活性が認められた。黄耆中に含まれているマウスのPEC数の増加に経口投与で効果を及ぼす物質は、そのまま吸収され効果を示す比較的分子量の多糖であるか、あるいは消化を受けても活性が消失しない物質であ

ることが考えられる。

#### 第四節 小括

本章では、JEVの感染に対する黄耆の経口投与による生体防御効果と作用機序および活性物質について検討し、以下の結論を得た。

- 1：黄耆の経口投与は、JEVの感染に対して有意な生体防御効果を示すことが明らかとなった。
- 2：JEVの感染に対する黄耆の生体防御効果には、非特異的な防御因子であるマクロファージの活性化が関与している可能性が明らかとなった。
- 3：黄耆中の経口投与でマウスのPEC数を増加させる物質の検索を試みたところ、強酸性多糖画分（F-1）を含む複数の画分が活性を示すことが明らかとなった。
- 4：F-1の中性糖、タンパク質およびウロン酸含量について検討したところ、82.5%の中性糖、16.3%のタンパク質、9.2%のウロン酸を含有していることが明らかとなった。また、構成糖について検討したところ、Glucoseの割合が非常に高かった。

## 第三章 IgM抗体産生能に及ぼす効果

### 第一節 マウスの抗DNP-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果

#### 1：緒言

ウィルスの感染に対する防御機構として種々のものが考えられているが、JEVなど Viremia (ウィルス血症)をおこすタイプのウィルスに対しては、中和抗体による防御が特に有効であると考えられている(18-20)。しかし、第一章および第二章における検討から、JEVに対する防御機構として、食細胞系を中心とする非特異的な機構による防御が中和抗体による防御と同様に有効である可能性が示され、黄耆は、これら食細胞系を活性化させる効果を有していることが明らかとなった。

本章では、従来からJEVの感染に対する防御として有効であると考えられている抗体産生に及ぼす黄耆の効果について検討した。抗体は体液性免疫をつかさどる防御因子であり、H鎖 (heavy chain) と呼ばれているポリペプチド部分の一次構造の違いにより、IgG, IgM, IgA, IgE, IgDの5つのクラスに大別されている。本章ではこのうち、IgM抗体に着目し、マウスのIgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討した。IgM抗体は、分子量185,000のサブユニット5つから成る分子量約90万の免疫グロブリンで、血管内にのみ存在する。また、異物が侵入した後比較的早期に産生されることや、微量の異物抗原に対しても産生されやすいことから、異物の侵入に対する初期段階の生体防御系における重要な防御因子のひとつであることが知られている(21)。

本節では、抗DNP-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について、10, 36, 60週齢のマウスを用いて検討した。

#### 2：実験方法

##### 化合物

PBSおよびBSA(Fraction V)は、第一章および第二章で用いたものと同じものを使用した。o-Phenylenediamine (O-PDA)、N-ε-DNP-L-Lysine HCl 2H<sub>2</sub>Oは、Sigma社から購入した。塩化シアヌルは、和光純薬工業から購入した。2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムは、東京化成から購入した。Lipopolysaccharide

(LPS: *E.coli* 026:B6) は、Difco社 (Mich. アメリカ)から購入した。Dextran T2000 (MW~2,000,000)は、Pharmacia Biotech社から購入した。Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgM (HPRA) はZymed社 (CA, アメリカ) 製のものを使用した。他の試薬はすべて、和光純薬工業製、関東化学製、米山薬品工業製、Sigma社製または片山化学製の特級を用いた。また実験に使用した水は、すべて超純水を使用した。

### 試料エキス (AE)

第一章第二節と同じもの (試料Dから抽出) を使用した。

### Culture プレート

*in vitro*の実験で使用する24穴のCultureプレートは、岩城硝子株式会社 (東京) から購入した。エンザイムイムノアッセイ (ELISA) で使用する96穴のプレートは、Dynatech社 (VA, アメリカ) 製のものを使用した。

### 抗原

DNP-LPSおよびDNP-dextranは、塩化シアヌルを用いる方法により、作製した (81)。DNP-BSAは、Eisenらの方法により作製した (82)。

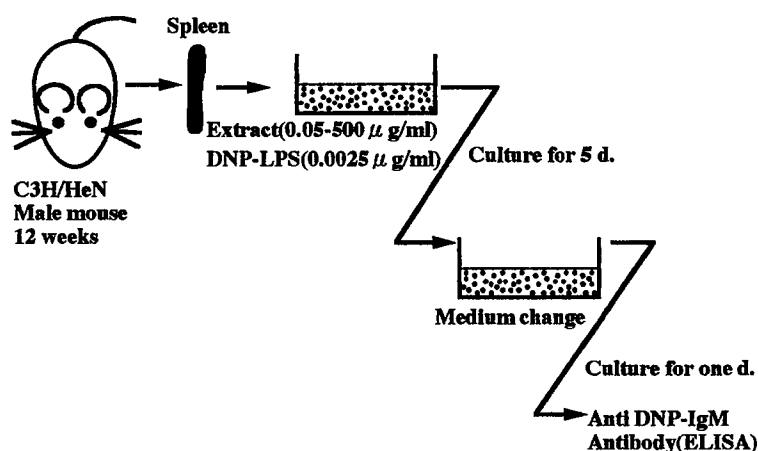
### マウス

C3H/HeN系 (雌) マウスを日本SLC (浜松) から購入した。マウスは、少なくとも7日間、大阪府立公衆衛生研究所 動物舎内で予備飼育した後、実験に使用した。なお、実験には、10, 36, 60週齢のマウスを使用した。

### IgM抗体産生能に及ぼす*in vitro*における効果

*in vitro*における効果は、Fig.3-1に示す方法に従って検討した。マウスの脾臓細胞溶液は、Takagiらの方法 (83) に準じて調製した。すなわち、8~10匹のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュ (100mesh) を用いて処理し、Eagle基本培地中で脾臓単細胞プール液とした。細胞をEagle基本培地で3回洗浄した後、RPMI-1640培地に再懸濁させ、脾臓細胞浮遊液を調製した ( $1 \times 10^7$ 個/ml)。24穴のcultureプレートに脾臓細胞浮遊液1ml、AEをRPMI-1640培地により段階的に希釈した液 (0.1-1000  $\mu$ g/ml) 1mlおよびDNP-LPS (最終濃度0.0025  $\mu$ g/ml) を加えて混和し、CO<sub>2</sub>インキュベーター (タバイエスペック社製、BNA-111) で4日間培養した (37°C、5%CO<sub>2</sub>)。培養上清を新しいRPMI-1640培地 (1ml) と交換し、さらに1

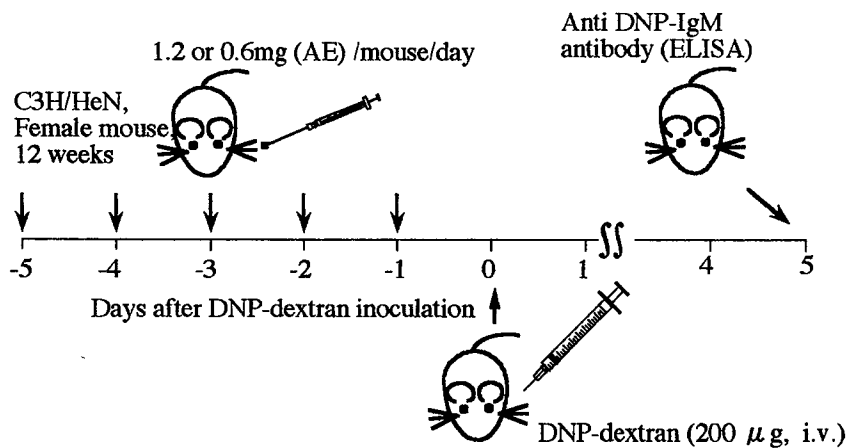
日間、同様の条件で培養した後、培地中に産生される抗DNP-IgM抗体量をELISAにより、cultureプレートの培養穴毎に測定した。なお、黄耆のIgM抗体産生能に及ぼす効果は、AEを添加しなかった培養穴の培地中に産生される抗体量をControlとした時の比率 (% of control) で示した。



**Fig.3-1 Schematic Schedule for Experiment *in vitro***

IgM抗体産生能に及ぼす*in vivo*における効果

*in vivo*における効果は、Fig.3-2に示す方法に従って検討した。AEをPBS (pH7.0) に溶解 (12mg/mlまたは6mg/ml) した液を5日間にわたり、毎日1回、胃ゾンデを用い、マウスに経口投与した (0.1ml/マウス×5日)。Control群のマウスには、PBSを投与した。AEを最終投与した翌日、マウスの尾静脈からDNP-dextran (200 μg) を静注し、抗原刺激を行った。抗原刺激を行った5日後、マウスを断頭により絞殺し、血清中の抗DNP-IgM抗体量をELISAにより測定した。なお、本実験では、1群あたり、5匹のマウスを使用した。



**Fig.3-2 Schematic Schedule for Experiment *in vivo***

## ELISA

ELISAは、以下のとおりに行った。96穴のマイクロプレートにCorting緩衝溶液 (2.93mg:NaHCO<sub>3</sub>, 2.53mg:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaN<sub>3</sub>0.2mg/ml)で希釈したDNP-BSA (2μg/ml)100μlを添加し、36°Cで90分間インキュベートした (タバイエスペック社製、BNA-111)。Microplate washer (ICN titertec社製、M96) を用い、0.5%Tween20を含むPBSでマイクロプレートの各ウェルを10回洗浄した後、Sample溶液100μlを添加した。その後、マイクロプレートを4°Cで24時間放置し、Sample中の抗DNP-IgM抗体をウェルに吸着させた。PBS-Tweenでウェルを再度洗浄した後、HPRA溶液 (×2000 diluted in PBS) 100μlを添加し、36°Cで60分間インキュベートした。ウェルをPBS-Tweenで再度洗浄した後、基質溶液 (5mg: O-PDA5mg, 3.05ml:0.1Mクエン酸, 3.2ml:0.2MNaHPO<sub>4</sub>, 6.25ml:35%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100μlを添加し、暗黒下、室温で30分間反応させた。その後、2N硫酸100μlで反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Tosh 製 MPR-A4) を用い、ウェル毎に吸光度を測定した (測定波長: 490nm)。また、実験は、それぞれ2連で行い、その平均値で示した。

## 統計

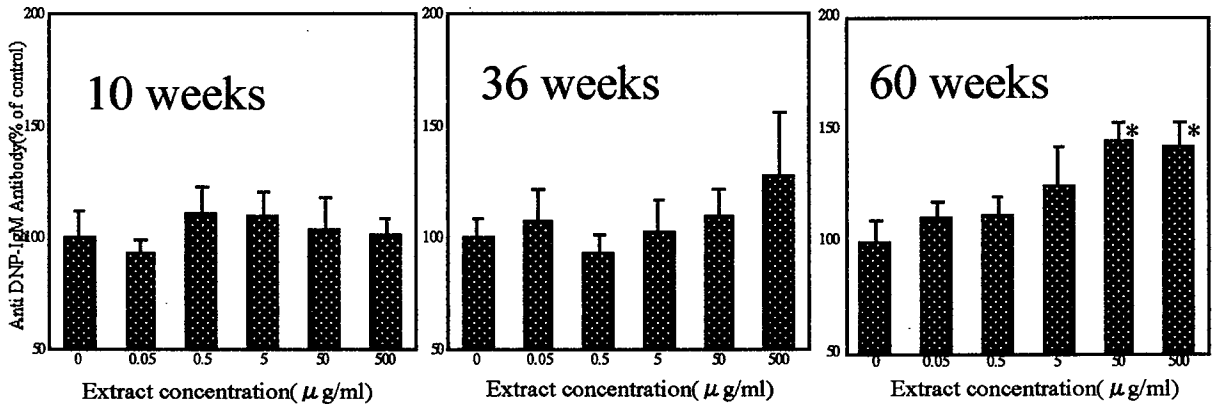
本節における実験の結果は、一元配置の分散分析法 (One-factor ANOVA)を用いて検定した。一元配置の分散分析において、有意な差が認められた場合、多重比較検定 (FisherのPLSA法) を行い各群間の危険率を算出した。なお、本実験では、 $p < 0.05$ 以下のレベルを有意差ありと判断した。

## 3 : 結果

### in vitroにおける効果

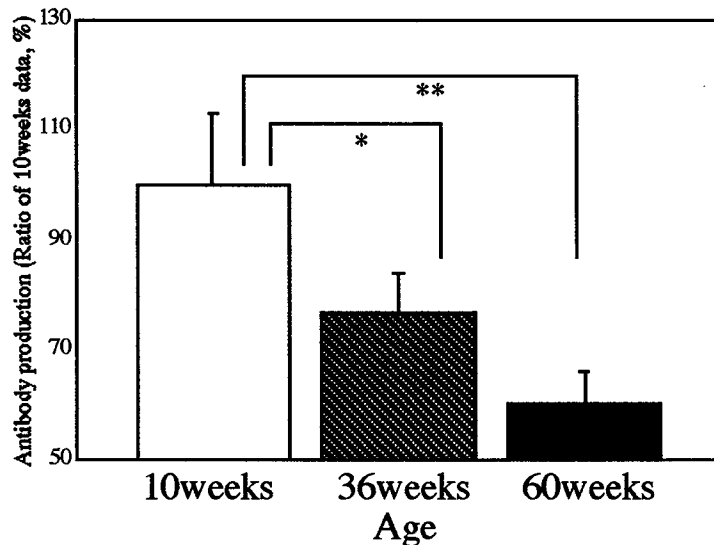
10、36および60週齢のマウスの抗DNP-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の*in vitro*における効果について検討した (Fig.3-3)。10週齢のマウスでは、Controlに対する比率で93.3~110.9%程度であり、抗体産生能の賦活化効果は、ほとんど確認できなかった。しかし、36週齢のマウスに対してはAge-matched controlとの比較で若干の賦活化効果が認められ、60週齢のマウスでは、有意な賦活化効果を示すことが明らかとなった。

また、*in vitro*におけるIgM抗体産生能を比較したところ、36および60週齢のマウスの抗体産生能は10週齢のマウスと比較してそれぞれ70および60%程度に有意に衰退していた (Fig.3-4)。



**Fig. 3-3 Effect of AE on Antibody Production in Various Aged Mouse *in vitro***

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (N=3)  
Significantly different from control value at  $p < 0.05$  (\*)



**Fig.3-4. IgM Antibody Production in Mice at 10, 36 and 60 weeks of Age *in vitro***

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (N=3)  
Significantly different value at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*).

in vivoにおける効果

*in vitro*で確認された効果が*in vivo*の実験系でも認められるか否かについて検討した。まず、*in vivo*における10、36および60週齢のマウスの抗DNP-IgM抗体産生能を比較したところ、36および60週齢のマウスでは10週齢のマウスと比較してそれぞれ70および60%程度に有意に衰退していた (Fig.3-5)。

黄耆は、*in vitro*の場合と同様、10週齢のマウスの抗体産生能にはほとんど賦活化効果を示さなかったが、36週齢および60週齢のマウスの衰退している抗体産生能に対してはAge-matched controlとの比較で有意な賦活化効果を示すことが明らかとなった (Fig.3-6)。また、これらの効果は、加齢により衰退している36週齢および60週齢のマウスのIgM抗体産生能を10週齢のマウスとほぼ同じレベルまで賦活化させるものであった。

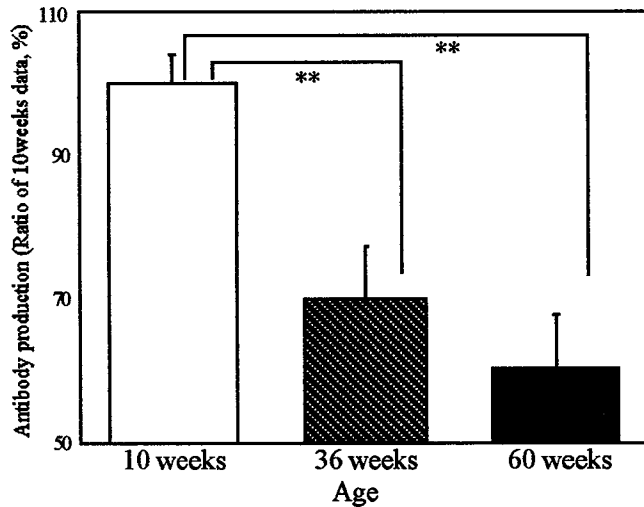


Fig.3-5. IgM Antibody Production in Mice at 10, 36 and 60 weeks of Age *in vivo*

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice.

\*\* : Significantly different value at  $p < 0.01$ .

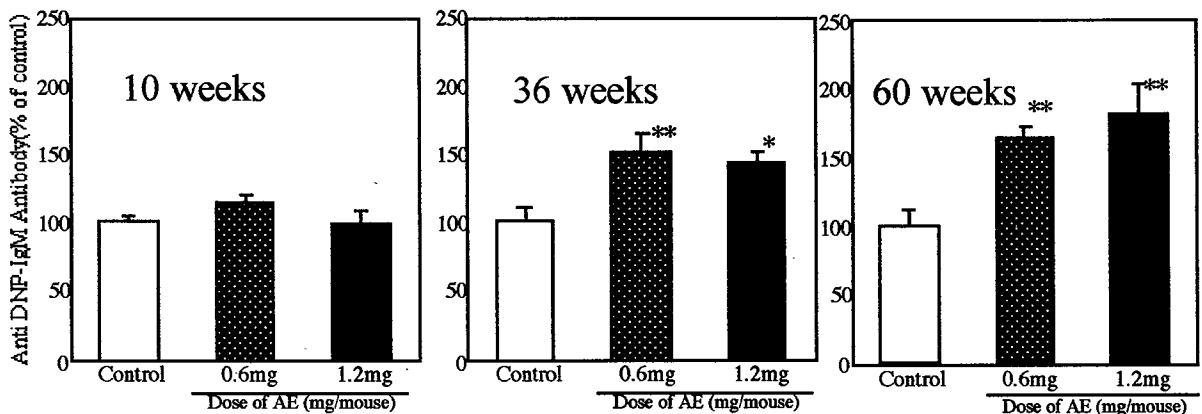


Fig.3-6 Effect of Astragali Radix Extract(AE) on IgM Antibody Production in Mice of Various Ages  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice.

Significantly different from control value at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*)



#### 4：考察

本節における検討から、黄耆は、若年期のマウス（10週齢）の抗DNP-IgM抗体産生能にはほとんど賦活化効果を示さず、加齢により衰退していると考えられる加齢マウス（36および60週齢）のIgM抗体産生能を賦活化させる効果を示すことが明らかとなった。漢方では患者の体質的な特徴を虚実（虚証、実証）など「証」として捉え、証により投与する薬物を選定している。黄耆は、虚実の分類では虚証の患者に対し、補薬として適用されている（84）。虚証とは「人の正気が虚した状態、すなわち、生命力、病気に対する抵抗力が不足し、生理機能が減退した状態」とされている

（85）。これに対し実証は、「人体に邪気が充実している状態、すなわち体内の生命力、抵抗力が盛んな状態」とされている（86）。生体が有している生理機能は加齢に伴い衰退していくことが知られているが、漢方では加齢に伴い生理機能が低下した老人を虚証として位置づけている（87）。本節における結果は、虚証の患者に対する黄耆の有効性の一片を指し示すとともに漢方における適用方法の妥当性を示す根拠のひとつになるものと考えられる。

現在、加齢により生体防御能が低下する現象やそのメカニズムについては数多くの報告が存在するが（88-95）、加齢に伴い衰退している防御能を賦活化させる試みはほとんど行われていない。また、生薬が若年期のマウスの抗体産生能を賦活化させるという報告は存在するが（96-99）、それらのほとんどが*in vitro*や腹腔内投与による成績であり、経口投与による効果を検討したものはきわめて少ない。生薬類のほとんどが経口的に服用されていることや、*in vitro*や腹腔内投与による成績が経口投与での成績と必ずしも整合性を示さない場合も認められることから、経口投与による検討が不可欠であると考えられる。本節における結果から、黄耆は、加齢により衰退しているマウスの抗DNP-IgM抗体産生能を経口投与により賦活化させる効果を示すことが明らかとなった。

10週齢のマウスと比較して、36および60週齢のマウスの抗体産生能は有意に低下していた。本章における実験で使用した抗原（DNP-LPS, DNP-dextran）は胸腺非依存性抗原である。従って、得られた結果は主に加齢に伴うB細胞の機能低下を示しているものと考えられる。加齢に伴うB細胞の機能の変化として、B細胞から抗体産生細胞への分化能の低下などが報告されている（88、89）。

## 第二節 加齢マウスの抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果

### 1：緒言

本章第一節における検討から、黄耆は加齢により衰退しているマウスの抗DNP-IgM抗体産生能を賦活化させる効果を示すことが明らかとなった。

本節では、第一節で明らかとなった加齢マウスに対する黄耆の効果がJEVの感染に対しても示されることを証明するため、加齢マウスの抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討した。

### 2：実験方法

#### 化合物、JEV、Cultureプレート、シャーレ

すべて、第一章および第二章と同じものを使用した。

#### 試料エキス (AE)

第一章第二節と同じもの（試料Dから抽出）を使用した。

#### マウス

第一節と同じC3H/HeN系（雌）マウスを使用した。なお、実験には、10及び82週齢のマウスを使用した。

#### 抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果

Fig.3-2に示す方法に準じて検討した。すなわち、AEをPBS (pH7.0) に溶解 (12mg/ml) した液を5日間にわたり、毎日1回、胃ゾンデを用い、マウスに経口投与した (0.1ml/マウス×5日)。Control群のマウスには、PBSを投与した。AEを最終投与した翌日、マウスの尾静脈からJEV(1000PFU)を接種し、3日後、5日後および7日後にマウスを断頭により絞殺し、血清中の抗JEV-IgM抗体量をELISAにより測定した。なお、本実験では、1群あたり5匹のマウスを使用した。

#### ELISA

ELISAは、第一節の方法に準じて行った。なお、固相用抗原として、ホルマリンで不活化した精製JEVワクチン（大阪大学微生物研究所製、中山株）をCorting緩衝溶液で10倍希釈したものをを用いた。

#### マウス血清の抗JEV効果

Plaque assay法 (26) によりマウス血清の抗JEV効果について検討した。すなわ

ち、0.28%のBSAを含むTris-HCl緩衝液で希釈したJEV ( $2.5 \times 10^6$ PFU/ml)とPBSで80倍に希釈したマウス血清の等容量を混合し、37°Cで1時間放置した。その後、混合溶液をBHK-21細胞に接種し、37°C (5%CO<sub>2</sub>, Eagle基本培地)で72時間培養した後、BHK-21細胞上に形成されるPlaque数を指標とし、マウス血清のJEV不活化効果を検討した。なお、本実験では、1群あたり、5匹のマウスを使用した。

#### JEVの感染に対する加齢及び若年マウスの生体防御能に関する検討

加齢マウス (82週齢) および若年マウス (10週齢) の尾静脈からJEV (1000PFU) を接種し、生存率の変動を20日間にわたり観察した。なお、本実験では、1群あたり、10匹のマウスを使用した。

#### 統計

本節における実験の結果は、Student's t検定を用いて解析した。なお、本実験では、 $p < 0.05$ 以下のレベルを有意差ありと判断した。

### 3 : 結果

#### 加齢マウスの抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果

加齢マウスの抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討した (Fig.3-7)。JEVを接種してから3日後の時点で比較した時、AEを投与したマウスの抗体価はControlに対する比率で140.9%に上昇していた ( $p < 0.01$ )。また、JEVを接種してから5日後、7日後の時点でも、AEを投与したマウスの抗体価はControlと比較して高かった。

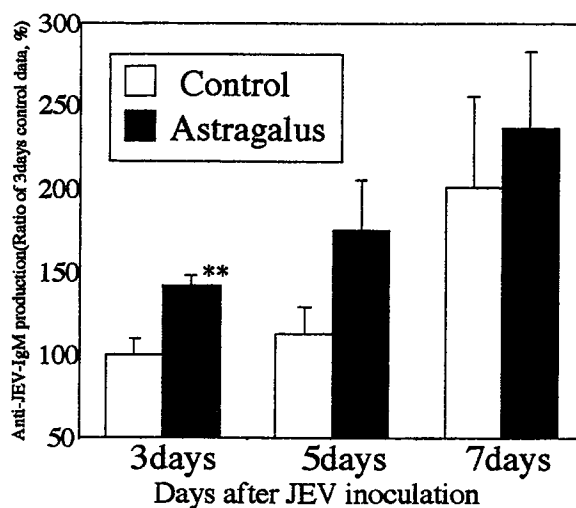


Fig. 3-7 Effect of Astragalus Radix on Anti-JEV-IgM-titer in mouse serum  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice  
Significantly different from control value at  $p < 0.01$ (\*\*)

### 黄耆を投与したマウスから得られた血清の抗JEV効果

Fig.3-2に示す方法に従ってAEを投与したマウスにJEV(1000PFU/マウス)を接種し、5日後に血清のJEV不活化効果について検討したところ、AEを投与したマウスから得られた血清はControl群のマウスから得られた血清と比較して高い効果を示した(Table3-1)。

Table 3-1 AntiJEV Effect of Serum in Aged mouse

Inactivation of JEV (%)	
Control	20.3 ± 9.7
Astragalus	33.6 ± 16.9

Each value represents the mean ± S.E. of 5 mouse

### JEVの感染に対する加齢及び若年マウスの生体防御能に関する検討

加齢マウス(82週齢)および若年マウス(10週齢)の尾静脈からJEVを接種し、生存率の変動を20日間にわたり観察した。加齢マウス群では、JEV接種後8日目から生存率の低下が観察され、16日目までに全マウスが死亡した(Fig.3-8)。これに対し、若年マウス群ではJEVを接種してから20日後の生存率が60%であった。

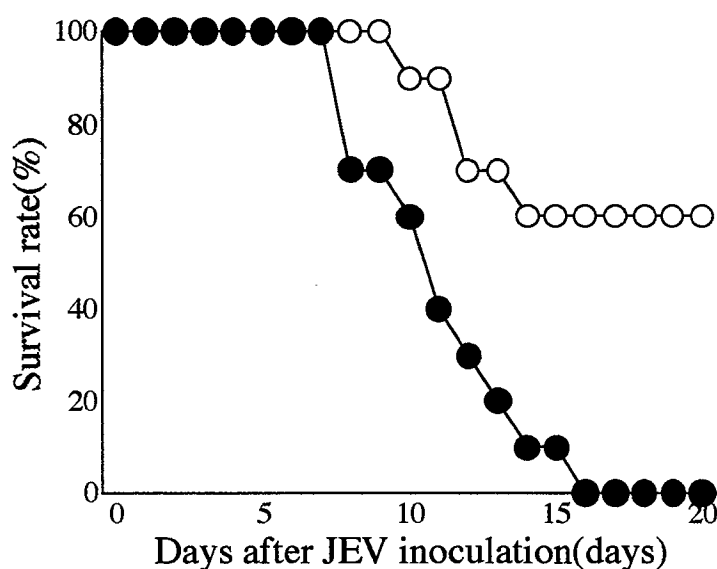


Fig.3-8 Defensive Ability in Mice against JEV Infection

○:10weeks, ●:82weeks

#### 4：考察

本節における検討から黄耆は、JEVの感染に対し、抗JEV-IgM抗体産生能の賦活化効果を示すことが明らかとなった。ウィルスの感染に対してIgM抗体は血中においてウィルスと結合し、その感染力を失わせる中和抗体として働くことが知られている。黄耆を投与したマウスから得られた血清のJEV不活化効果がControl群のマウスから得られた血清と比較して高いことが明らかとなったが、これには血中の抗JEV抗体による中和反応が関与していることが考えられる。

免疫応答能をはじめとする生体防御能は加齢に伴い衰退していくことが知られている。高齢化とともに、感染症の死因に占める割合が大きくなることが明らかにされているが(100)、それらの原因には生体防御能の衰退が密接に関与していることが推測されている(101)。本章第一節における検討でも若年マウス(10週齢)と比較して、加齢マウス(36、60週齢)ではIgM抗体産生能の有意な衰退が認められた。また、本節における検討でもJEVの感染に対する防御能が加齢マウス(82週齢)では、若年マウス(10週齢)と比較して、顕著に弱体化していることが示された。

本節における検討から、第一節で明らかとなった加齢マウスの抗DNP-IgM抗体産生能に対する黄耆の賦活化効果がJEVの感染に対しても示されることが確認され、その賦活化はJEVの感染に対する防御効果の増強をもたらすことが明らかとなった。

第二章(Table.2-2)における検討では、JEVを接種してから3日後に抗体価の上昇が認められたマウスの割合は、Control群では90%、AEを投与した群では30%であった。しかし、本節における検討では、JEVを接種してから3日後の時点で、Control群、AE投与群ともすべてのマウスに抗体価の上昇が確認された。この差の原因として、JEVを接種する経路の違いによるものが考えられる。すなわち、第二章における検討では、JEVをマウスの腹腔内に接種しているため、特にAEを投与したマウスでは、活性化された腹腔内食細胞系によりJEVが不活化され、抗体価の上昇が認められなかったことが推測される。これに対し、本節における検討では、尾静脈からJEVを接種しているため、抗体産生機構が働き、マウスの抗体価が上昇したものと考えられる。

### 第三節 抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の効果

#### 1：緒言

B細胞は、骨髄から発生する幹細胞由来の細胞であり、抗原刺激を受けると抗体産生細胞へと分化し、抗体を産生することが知られている。一般に、循環リンパ球の5~15%がB細胞であるが、抗原刺激を受けると二次リンパ器官である脾臓などに留まり、B細胞領域にあるリンパ小節（濾胞）の胚の中心で増殖する。

本章第一節における結果から、黄耆は、若年期のマウス（10週齢）の抗DNP-IgM抗体産生能にはほとんど賦活化効果を示さないが、加齢により衰退している抗DNP-IgM抗体産生能を賦活化させる効果を示すことが明らかとなった。本節では、若年および加齢マウスの脾臓中の抗DNP-IgM抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の効果について、*in vitro*および*in vivo*の実験系により検討した。

#### 2：実験方法

##### 化合物

Agaroseは、Sigma社製のものを使用した。モルモット血清およびヒツジ赤血球は、日研生物医学研究所製のものを使用した。PBS、O-PDA、HPRAは、第一節と同じものを使用した。他の試薬はすべて、和光純薬工業製、関東化学製、米山薬品工業製、Sigma社製または片山化学製の特級を用いた。また実験に使用した水は、すべて超純水を使用した。

##### 培地、Cultureプレート、抗原

第一節と同じものを使用した。

##### マウス

第一節と同じC3H/HeN系（雌）マウスを日本SLC（浜松）から購入した。なお、実験には、10および56週齢のマウスを使用した。

##### 試料エキス (AE)

第一章第二節と同様のもの（試料Dから抽出）を使用した。

##### *in vitro*における効果

本章、第一節に記載した方法により調製したマウスの脾臓細胞を、DNP-LPS（最終濃度0.0025  $\mu\text{g/ml}$ ）およびAE希釈溶液とともに、37°C、5%のCO<sub>2</sub>存在下で4日間培

養し、各培養穴毎に抗DNP-IgM抗体産生細胞数を測定した。

### in vivoにおける効果

Fig.3-2の方法によりマウスにAEを投与し(1.2mg/マウス×5日)、最終投与した翌日、抗原刺激(DNP-dextran: 200  $\mu$ g)を行った。そして4日後に脾臓を摘出し、脾臓中の抗DNP-IgM抗体産生細胞数を個体毎に測定した。なお、実験には、一群5匹のマウスを使用した。

### 抗DNP-IgM抗体産生細胞数の測定

JerneらのSlide MethodによるPlaque Forming Cell assay (PFC) (102)のスライド法変法に準じて行った。すなわち、*in vitro*の実験では、脾臓細胞を培養穴毎に0.5mlのRPMI-1640培地に再浮遊させ、その0.1mlを0.45% Agaroseの0.4mlに加え、さらに、Rittenbergらの方法(103)で調製した10%のTrinitrophenyl化ヒツジ赤血球の50  $\mu$  lを加えて、スライドグラス上にゲル化させた後、37°Cで75分間静置した。20倍希釈したモルモット血清を加え、さらに60分間静置した後、形成されるPFCの数を肉眼で計測し、抗DNP-IgM抗体産生細胞数とした。また、*in vivo*の実験では、個体毎に脾臓細胞浮遊液を調製し、同様に操作し、形成されるPFCの数を計測し、抗DNP-IgM抗体産生細胞数とした。

### 統計

第一節で記載した方法により行った。

## 3 : 結果

### in vitroにおける効果

10および56週齢のマウスの培養脾臓細胞中の抗DNP-IgM抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の効果について検討した(Fig3-9)。マウスの脾臓細胞(10<sup>6</sup>個)あたりの抗体産生細胞数を10週齢と56週齢で比較すると、56週齢のマウスは10週齢のマウスと比較して70%程度であった。黄耆は、10週齢のマウスの抗体産生細胞数の増加にはほとんど効果を示さなかったが、56週齢のマウスの抗体産生細胞数の増加に有意な効果を示した。培養穴中に添加するエキス濃度の比較では50  $\mu$ g/mlで添加した培養穴中における抗体産生細胞数が最も増加していた。

LPSは10週齢のマウスの培養脾臓細胞の抗体産生細胞数を増加させる著しい効果を

示した。しかし、56週齢のマウスに対してはその効果が減弱した。一方、黄耆は、10週齢のマウスより56週齢のマウスの抗体産生細胞数の増加に及ぼす効果の方が強かった。

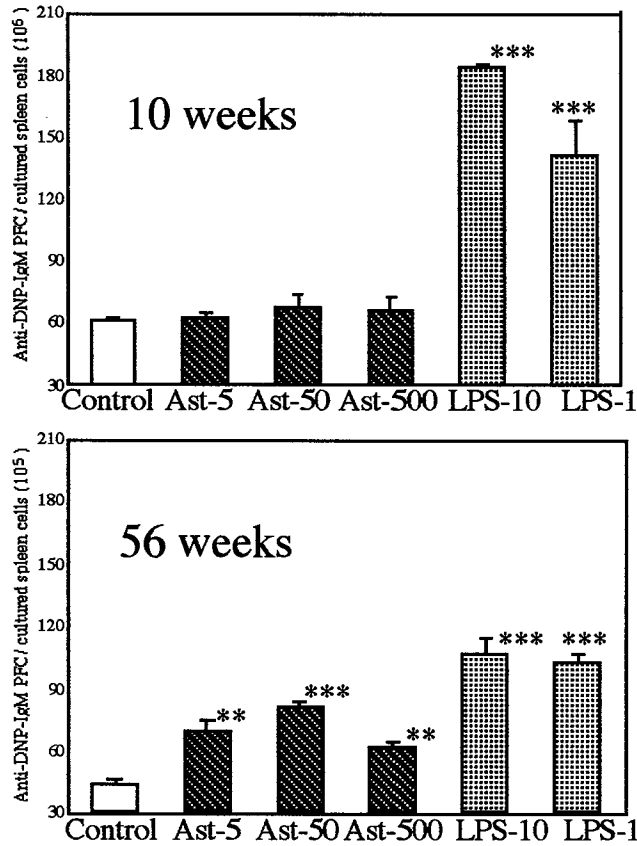


Fig.3-9 Effect of Astragali Radix on anti-DNP-IgM PFC in Cultured Spleen Cells.

Dose of AE; Ast-5: 5  $\mu$ g/ml, Ast-50: 50  $\mu$ g/ml, Ast-500: 500  $\mu$ g/ml .

Dose of LPS; LPS-1: 1  $\mu$ g/ml, LPS-10: 10  $\mu$ g/ml.

\*\*, \*\*\*: Significantly different from control value, at  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ .

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (N=3)

### in vivoにおける効果

10および56週齢のマウスの脾臓の抗DNP-IgM抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の*in vivo*における効果について検討した (Fig3-10)。マウスの脾臓細胞 (10<sup>6</sup>個)あたりの抗体産生細胞数を10週齢と56週齢で比較すると、56週齢のマウスは10週齢と比較して80%程度であった。

黄耆は、10週齢のマウスの抗体産生細胞数の増加にはほとんど効果を示さなかったが、56週齢のマウスの抗体産生細胞数の増加に有意な効果を示した。



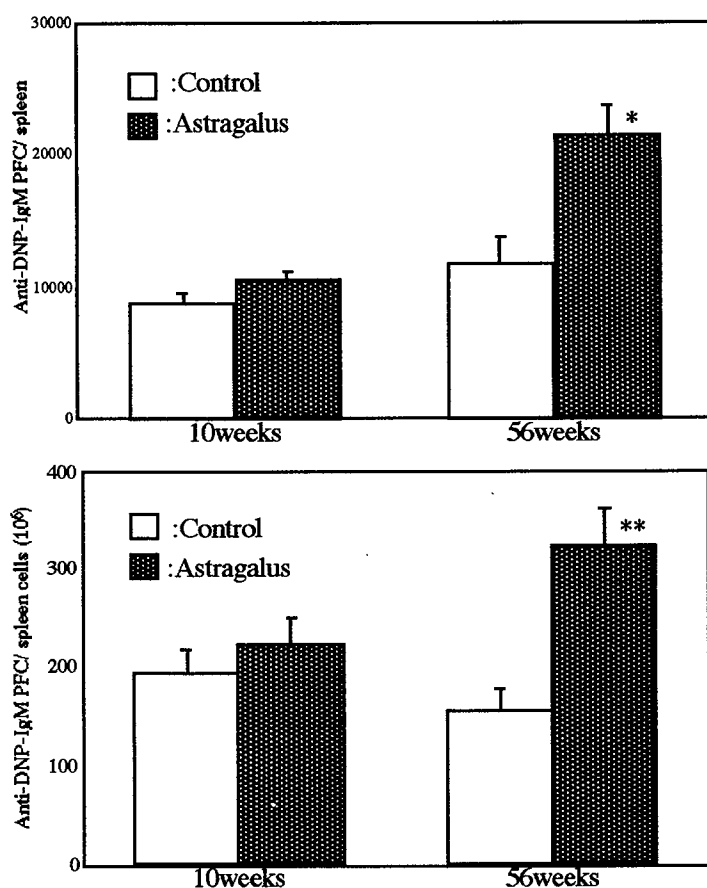


Fig.3-10 Effect of Astragali Radix Extract on anti-DNP-IgM PFC in Spleen Cells.  
 Each Column is the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice Significantly different from age-matched control value at  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*)

#### 4：考察

黄耆は、加齢マウスの培養脾臓細胞および脾臓中の抗体産生細胞数を有意に増加させる効果を示すことが明らかとなった。Yamadaらはマウスの脾臓リンパ球に対する黄耆の熱水抽出エキスの幼若化効果について検討し、マイトジェニックな活性を示すことを報告している(104)。また、黄耆をその構成生薬とする十全大補湯は、脾臓中のB細胞を特異的に増殖させる効果を示すことが明らかにされている(105)。本節における結果とこれらの報告は、黄耆が加齢マウスの脾臓中のB細胞が抗体産生細胞へと増殖および分化する過程に対して賦活化効果を有していることを示唆するものであり、第一節において加齢マウスのIgM抗体産生能を増強させた要因のひとつとして抗体産生細胞数の増加が関与していることが考えられる。

*in vitro*および*in vivo*で抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の効果について検討し

たところ、Age-matched controlとの比較で10週齢のマウスより56週齢のマウスに対する効果の方が強かった。これは、抗体産生細胞数の増加に対する宿主側の反応の違いによるものであると考えられる。生体には行き過ぎた生体反応を制御する調節機構が備わっていることが知られているが、黄耆エキスを投与した10週齢のマウスでは抗体産生細胞数の増加を抑制する何らかの因子が56週齢のマウスより強く働いた可能性がある。

黄耆をその構成生薬とする十全大補湯は、若年期のマウスを用いた検討により、B細胞を特異的に増殖させるが(105)、抗原刺激前の投与では抗体産生細胞数の増加には賦活化効果を及ぼさないことが報告されている(106、107)。また、先にも記述したように、黄耆は若年マウスの脾臓細胞に対してマイトジェニックな効果を示すことが明らかにされている(104)。これらの報告と本節における結果は、黄耆エキスを投与した10週齢のマウスでは脾臓中のB細胞の増殖が促進されるが、抗体産生細胞への分化が制御され、結果として抗体産生細胞数がControlと比較して有意に増加しなかったことを示唆するものである。

リポ多糖(LPS)は、グラム陰性菌の表面にある外膜の主要構成成分のひとつで、B細胞のマイトジェン作用、マクロファージ活性化作用、補体第二経路の活性化作用、アジュバンド活性化作用など生体防御系に種々の活性を示すことが明らかにされている(108)。本節における検討でもLPSは、10週齢のマウスの脾臓中のB細胞の抗体産生細胞数の増加に対し、著しい効果を示した。しかし、56週齢のマウスの脾臓細胞に対してはその効果が減弱した。一方、黄耆はLPSとは逆の効果を示した。すなわち、抗体産生細胞数の増加に及ぼす効果は、10週齢のマウスより56週齢のマウスに対する方が高かった。各種生薬の免疫系に及ぼす賦活化効果は、生薬へのLPSのContaminationによるものであるという知見も存在するが(109)、本節における結果から、本研究で用いられている黄耆エキス(AE)の効果は、混在しているLPSによるものでないことが明らかとなった。

## 第四節 加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質

### 1：緒言

第一節における検討から、黄耆は、加齢により衰退しているマウスのIgM抗体産生能を経口投与により賦活化させる効果を示すことが明らかとなった。本節では、黄耆中に含まれている経口投与で加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質の検索を試みた。また併せて、分画物の構成要素や分子量などについても検討した。

### 2：実験方法

#### 化合物

PBS、O-PDA、HPRA、GalA、Glc、Rha、Rib、Fuc、Ara、Xyl、Man、Gla、2-Deoxy-D-glucose、*m*-Hydroxybiphenyl、トリフルオロ酢酸は、第二章 第三節と同じものを使用した。他の試薬はすべて、和光純薬工業製、関東化学製、米山薬品工業製、Sigma社製または片山化学製の特級を用いた。また、実験に使用した水は、すべて超純水を使用した。

#### 培地およびCulture プレート、抗原

第一節と同じものを使用した。

#### 試料エキス (AE)

第一章第二節と同じもの（試料Dから抽出）を使用した。

#### マウス

C3H/HeN系（雌）マウスを日本SLC（浜松）から購入した。なお、実験には、30週齢のマウスを使用した。

#### 分画方法

黄耆の抽出および分画は、Fig.3-11に示す方法に従って行った。第一章第一節に示す方法により黄耆からAEを調製した。AEは、第二章第三節に示すセタプロン沈殿法（67）によりさらにF-1、F-2およびF-3に分画された。セタプロン沈殿法により分画されたフラクションの中で最も活性が高かったF-1はイオン交換クロマトグラフィーによりさらに、F-4、F-5およびF-6に分画された。イオン交換クロマトグラフィーにより分画されたフラクションの中で最も活性が高かったF-4はゲルろ過クロマトグラフィーによりF-7とF-8に分画された。Fig.3-11にそれぞれのフラクションの黄耆か

らの抽出率を示す。

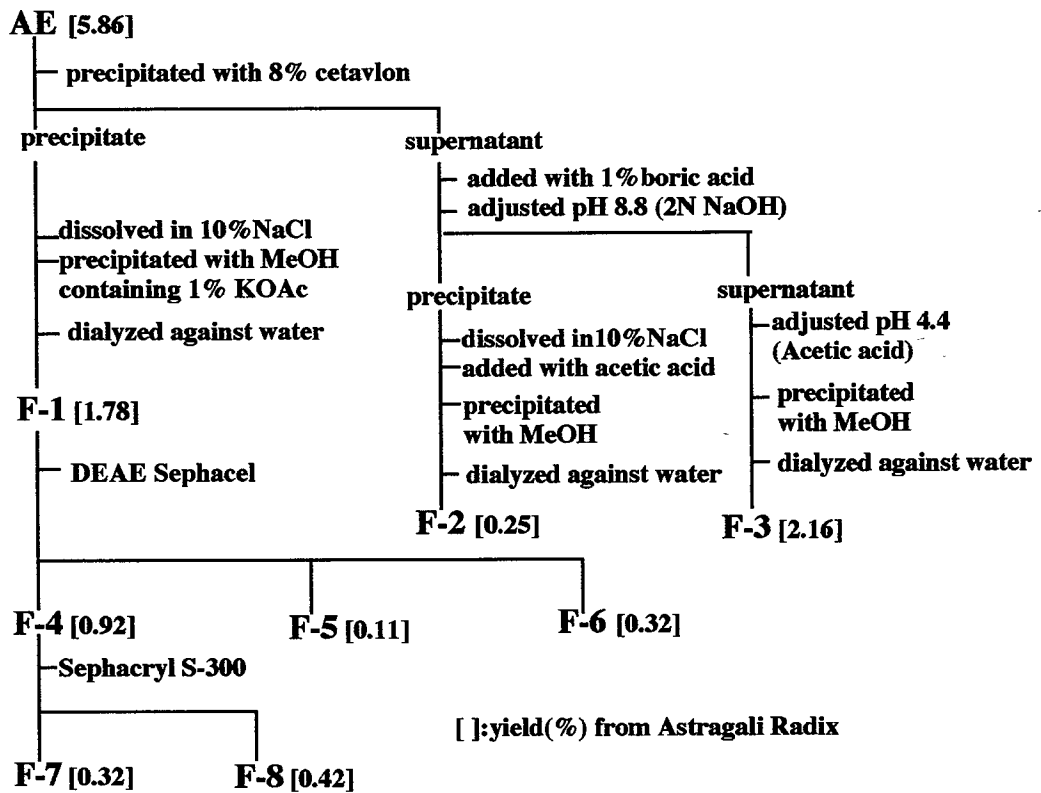


Fig.3-11. Separation of Polysaccharide Fraction of *Astragali Radix*

### イオン交換クロマトグラフィー

F-1は、0.02N Tris-HCl緩衝液 (pH7.0) に溶解した後、同緩衝液で平衡化された、DEAE-Sephadex (Pharmacia Biotech社製、スウェーデン) (7×35cm) を充てんしたカラムにより分画された。溶出は、同緩衝液を用い、グラジエント法 (0-0.8N: NaCl) により行った。また、フラクションの分画は、25mlずつ行い、フェノール硫酸法 (68) およびLowry法 (69) により分析した。

### ゲルろ過クロマトグラフィー

F-4は、0.01Nリン酸緩衝液 (pH7.2) に溶解した後、同緩衝液で平衡化された、Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech) (2.6×60cm) を充てんしたカラムにより分画された。溶出は、同緩衝液を用いて行った。また、フラクションの分画は、10mlずつ行い、フェノール硫酸法 (68) により分析した。

### in vivoにおけるIgM抗体産生能に及ぼす効果、ELISA、化学分析、統計

本章第一節および第二章で記載した方法により行った。

### 3 : 結果

#### 加齢マウスの抗体産生能を賦活化させる物質

加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質の検索を行った。AEは、セタブロン沈殿法により、3つのフラクションに分画された (F-1, F-2およびF-3)。強酸性画分であるF-1は、AEと同等の抗体産生能賦活化効果を示した (Fig. 3-12)。F-2 (弱酸性画分) およびF-3 (中性画分) にはほとんど賦活化効果が確認できなかった。F-1は、DEAE-Sephadexを用いたイオン交換クロマトグラフィーによりさらに3つのフラクションに分画された (F-4, F-5およびF-6) (Fig.3-13)。そのうち、F-4は、特に抗体産生能を賦活化させる有意な効果を示した。F-5およびF-6にも有意な賦活化効果が確認されたが、F-4と比べてその効果は低かった (Fig.3-14)。F-4は、Sephacryl S-300を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによりさらにF-7とF-8に分画された (Fig.3-15)。F-7とF-8はともに、加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる有意な効果を示した (Fig.3-16)。

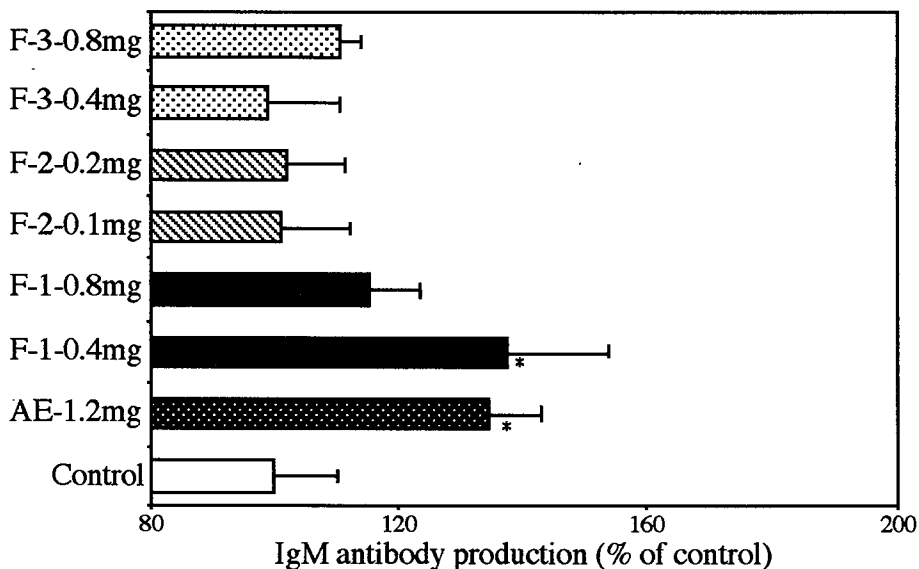
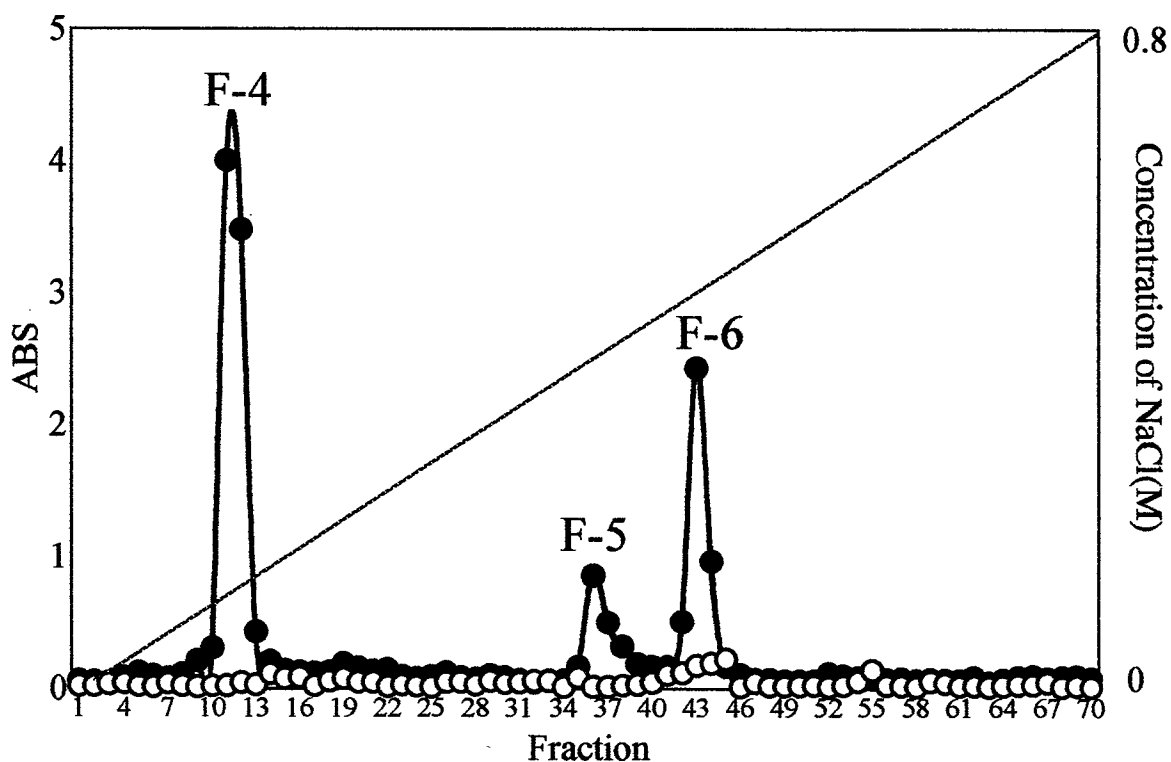


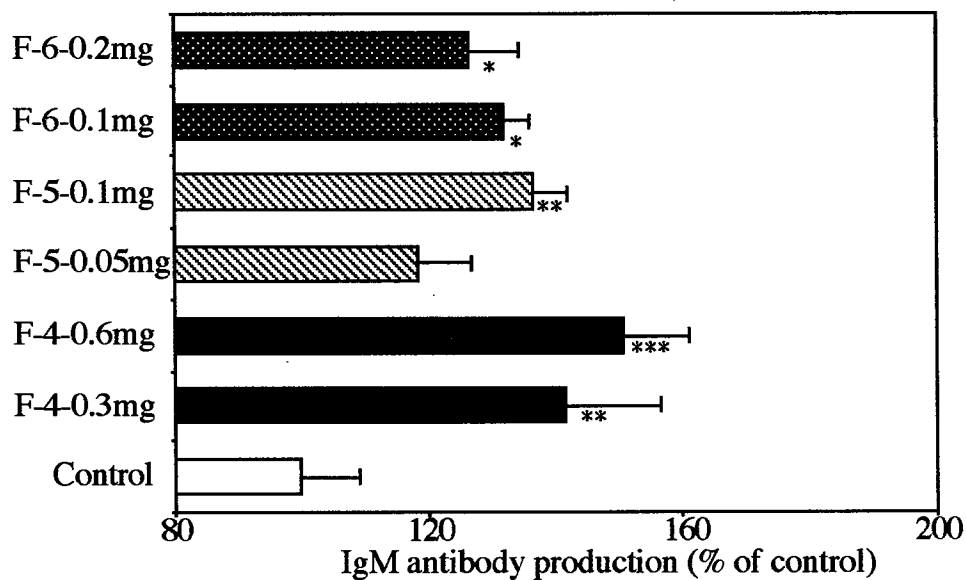
Fig.3-12 Effect of Astragali Radix Fraction on Antibody Production  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice.  
Significantly different from control value at  $p < 0.05$ (\*)



**Fig.3-13 Chromatogram of F-1 on a DEAE-Sephacel Column**

Each fraction was monitored by the phenol-sulfuric acid method(●) and Lowry method(○).

Fraction numbers 10-13, 35-38 and 42-45 were collected, dialyzed, lyophilized and designated as F-4, F-5 and F-6, respectively.



**Fig.3-14 Effect of Astragali Radix Fraction on Antibody Production**  
 Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice. Significantly different from control value at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

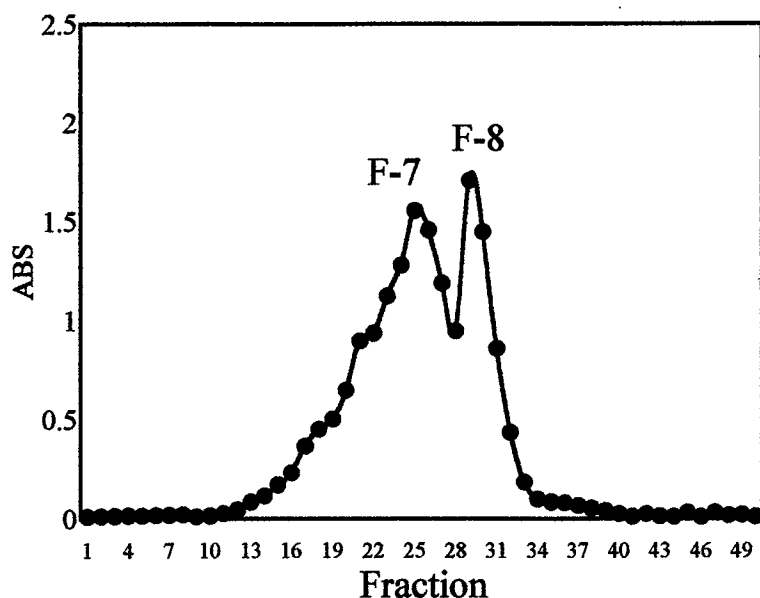


Fig.3-15. Elution Profile of F-4 on Gel Permeation Chromatography  
 Each fraction was monitored by the phenol-sulfuric acid method.(●)  
 Fraction numbers 22-28 and 29-34 were collected, dialyzed,  
 lyophilized and designated as F-7 and F-8, respectively.

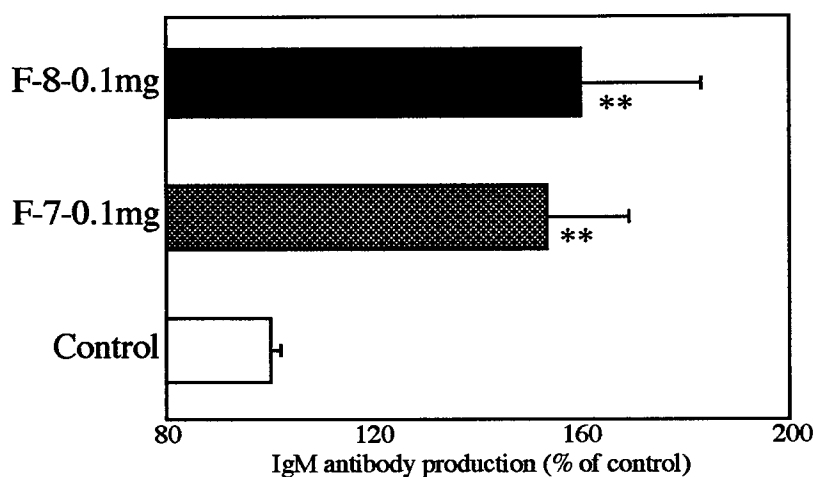


Fig.3-16 Effect of Astragali Radix Fraction on Antibody Production  
 Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 mice.  
 Significantly different from control value at  $p < 0.01$ (\*\*)

### F-7およびF-8の化学的性状

F-7およびF-8の化学的性状をFig.3-17に示す。F-7およびF-8はそれぞれ、Glcとして89.3%および95.5%の中性糖、GalAとして7.2%および7.5%のウロン酸を含有していた。F-7およびF-8にタンパク質は含有されていなかった。また、HPLCゲルろ過クロマトグラフィーにより分析を行ったところ、F-7、F-8とも単一のピークを示した (Fig.3-18)。デキストランを標準として分子量を測定したところ、F-7が約

22000、F-8が約12000であった。さらに、F-7およびF-8の構成糖について検討したところ、Glcの割合が非常に高く、Rha、Rib、Fuc、Ara、Xyl、Man、はほとんど確認できなかった (Fig.3-19)。

Fig. 3-17 Chemical Properties of F-7 and F-8

	F-7	F-8
Molecular weight	22000	12000
Total protein (as BSA)	N.D.	N.D.
Total carbohydrate (as glucose)	89.3%	95.5%
Total uroic acid (as galacturonic acid)	7.2%	7.5%
Component sugars (mol. ratio)		
Rhamnose	2	N.D.
Ribose	2	N.D.
Fucose	1	1
Arabinose	2	N.D.
Xylose	6	2
Mannose	2	N.D.
Galactose	3	N.D.
Glucose	100	100

N.D.:Not detected

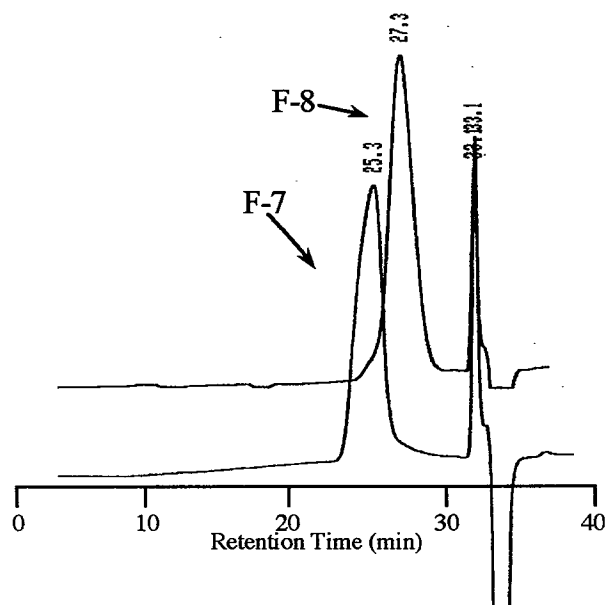


Fig.3-18. Gel Permeation HPLC Chromatogram of F-7 and F-8  
 F-8 and F-9 were applied to columns of Asahipak GF-510HQ and 310HQ in a series.  
 A mobile phase of 0.1 M NaCl was used at a flow rate of 0.5 ml. The peak at 33.1 min  
 was represented as the solvent.



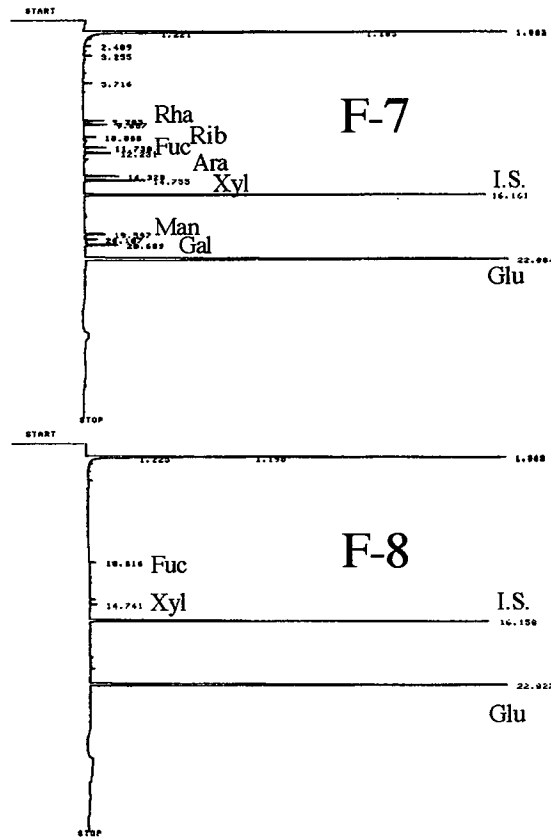


Fig.3-19 GC Chromatogram of Component Sugars in F-7 and F-8

Rha, rhamnose; Rib, ribose; Fuc, fucose; Ara, arabinose; Xyl, xylose; Man, mannose; Gal, galactose; Glu, glucose; I.S., internal standard (2-deoxy-D-glucose).

#### 4：考察

本節では、黄耆に含まれている加齢マウスのIgM抗体産生能を経口投与で賦活化させる物質の検索を試みた。強酸性多糖画分であるF-1は、イオン交換クロマトグラフィーによりF-4, F-5およびF-6に分画された。各分画物の効果について検討したところ、すべての画分に有意な賦活化効果が確認された。これは、黄耆には、加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質が複数存在することを窺わせるものであり、それらの物質が相互的に作用していると推測される。

黄耆から加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる、HPLCゲルろ過クロマトグラフィーで単一のピークを示す2種類の多糖（F-7およびF-8）を分画した。F-7およびF-8の構成糖について検討したところ、Glcが非常に高い割合を占めた。F-7およびF-8はグルカンを主成分とする多糖であり、このグルカン鎖の部分が加齢マウスのIgM抗体産生能の賦活化に関与している可能性が示唆された。

免疫系を賦活化させるグルカン鎖を有している多糖が、シイタケ（79、80）、ブ

クリヨウ (110)、カワラタケ (111)、霊芝 (112) や冬虫夏草 (113) などから分画されている。この中には既に、癌に対する免疫療法薬として臨床的に応用されているものもある。しかし、これらの多糖は水に難溶性であることやカワラタケ由来の多糖以外は、経口投与では効果が認められないことが明らかとなっている (114)。生薬類のほとんどが煎剤として経口的に服用されている事実を考えると、古来から経験的に用いられてきた生薬の有効成分は、水に溶解し、経口投与で効果を示す物質であると考えられる。本節において、黄耆から分画された加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質であるF-7およびF-8は経口投与で効果を示し、かつ水に可溶性の多糖であった。

また、生薬の生物活性に及ぼす効果を検討した研究で、人間に投与する量の何十倍もの量を体重比で動物に投与している事例も認められるが、本実験におけるAEおよび各分画物の投与量は3.3~40mg/kgであり、実際に人間に投与する量に換算しても妥当な投与量であると考えられる。

## 第五節 小括

本章では、マウスのIgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討し、以下の結論を得た。

- 1 : 黄耆は、若年期のマウスの抗DNP-IgM抗体産生能には、賦活化効果を示さず、加齢により衰退している抗DNP-IgM抗体産生能を賦活化させる効果を示すことが明らかとなった。
- 2 : 黄耆を投与したマウスでは、JEVの感染に対して特異的なIgM抗体産生能の賦活化が認められ、その賦活化はJEVに対する防御効果の増強をもたらすことが明らかとなった。
- 3 : 黄耆は、加齢マウスの脾臓中の抗体産生細胞数を増加させる有意な効果を示すことが明らかとなった。
- 4 : 黄耆に含まれている加齢マウスの抗体産生能を賦活化させる物質の検索を試み、2種類 (F-7およびF-8) の多糖を主成分とする分画を得た。
- 5 : F-7およびF-8の分子量は、約12000 (F-8) と約22000 (F-7) であり、その構成糖としては、Glucoseの割合が非常に高かった。

## 総括

生薬の有効性を解明するのは、容易ではなく、有効性に関する科学的見地からの知見は、質、量ともに合成薬と比較して不十分である。

本研究では、中国の古い薬物書で、また漢方医学における経験則に基づいた適用方法で、生体防御系を賦活化させる効果を示すことが推測される生薬「黄耆」を採り上げ、日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) の感染に対する生体防御効果を指標とした有効性について検討を行った。

第一章では、JEVの感染に対する黄耆の腹腔内投与による生体防御効果と作用機序についてマウスを用い検討した。その結果、黄耆はJEVの感染に対して有意な生体防御効果を示し、その防御には感染の初期における非特異的な防御因子である好中球やマクロファージの走化性、活性酸素産生能および貪食能などの活性化が関与している可能性が明らかとなった。

第二章では、JEVの感染に対する経口投与による防御効果とその作用機序について検討した。その結果、黄耆は、JEVの感染に対して経口投与でも有意な生体防御効果を示すこと、その防御効果には腹腔内投与の場合と同様、マクロファージの貪食能および活性酸素産生能などの活性化が関与している可能性が明らかとなった。また本章では併せて、黄耆中に含まれている経口投与で腹腔内細胞の機能を賦活化させる物質の検索を試み、Glucoseを主構成糖とする強酸性多糖画分を含む複数の画分が効果を示すことを明らかにした。

第一章および第二章における結果は、ウイルスの感染に対する宿主の生体防御として、従来から有効であると考えられてきた免疫系を中心とする特異的な機構とともに、感染の初期に発動する非特異的な機構も同様に重要であることを指し示すものであり、黄耆は食細胞系などの非特異的な機構に対して、賦活化効果を示すことが本研究から明らかとなった。

第三章では、生体にとって重要な特異的防御機構のひとつであり、JEVなどウイルス血症 (Viremia)をおこすタイプのウイルスの感染に対する生体防御として特に有効であると考えられている、抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討した。抗体は体液性免疫をつかさどる防御因子のひとつであり、IgG, IgM, IgA, IgE, IgDの5つのクラスが存在することが知られている。本研究ではこのうち、異物の侵入後比較的早

期に産生されることや微量の異物抗原に対しても産生されやすいことが知られているIgM抗体に着目し、まず、第一節では、抗DNP-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について10, 36, 60週齢のマウスを用いて検討した。黄耆は、若年期のマウス（10週齢）のIgM抗体産生能にはほとんど賦活化効果を示さなかったが、加齢マウス（36および60週齢）の衰退している抗体産生能に対して、Age-matched controlとの比較で有意な賦活化効果を*in vitro*および*in vivo*で示すことが明らかとなった。また、この*in vivo*で確認された効果は、36週齢および60週齢のマウスの衰退しているIgM抗体産生能を10週齢のマウスとほぼ同じレベルにまで賦活化させるものであった。第二節では、第一節で明らかとなった加齢マウスに対する黄耆の効果がJEVの感染に対しても示されることを証明するため、加齢マウスの抗JEV-IgM抗体産生能に及ぼす黄耆の効果について検討した。その結果、黄耆を投与したマウスではJEVに特異的なIgM抗体産生の賦活化が認められ、その賦活化はJEVの感染に対する防御効果の増強をもたらすことが確認された。また、第三節では、加齢マウスの脾臓中の抗体産生細胞数の増加に及ぼす黄耆の効果について検討し、抗体産生細胞数を増加させる有意な効果を示すことを明らかにした。さらに第四節では、黄耆中に含まれている経口投与で加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質の分画をセタブロン沈殿法、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーなどを組み合わせて試み、HPLCゲルろ過クロマトグラフィーで単一のピークを示す2種類の多糖画分（F-7およびF-8）を分画した。F-7およびF-8の構成要素について検討したところ、中性糖が大部分であり、その中でもGlucoseが高い割合を占めたことから、その主成分はグルカンであることが推測された。また、F-7およびF-8の分子量を測定したところ、約12000（F-8）と約22000（F-7）であった。

加齢により生体防御系の機能が低下する現象やそのメカニズムについては数多くの報告が存在するが（88-95）、加齢に伴い衰退している防御能を賦活化させる試みはほとんど行われていない。経口投与で加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる物質を黄耆から分画し、その化学的性状を明らかにし、さらにJEVの感染に対する生体防御効果を指標として漢薬「黄耆」の有効性を証明したのは、本研究が初めてである。本研究における成果は、古来から経験則に基づいて使用されてきた黄耆の有効性を科学的見地から示すひとつの大きな知見になるものと考えられる。

## 結 論

中国の古い薬物書により、生体防御系を賦活化させる効果を有していることが推測される生薬、「黄耆」の有効性について日本脳炎ウィルスの感染に対する防御効果を指標として検討し、以下の知見を得た。

- 1：黄耆は、日本脳炎ウィルスの感染に対して腹腔内投与により、有意な生体防御効果を示した。また、その作用機序について検討したところ、マクロファージや好中球の貪食能、活性酸素産生能などの活性化が関与している可能性が明らかとなった。
- 2：黄耆は、日本脳炎ウィルスの感染に対して経口投与により、有意な生体防御効果を示した。また、その作用には、腹腔内投与の場合と同様、非特異的な防御因子であるマクロファージの貪食能、活性酸素産生能の活性化が関与している可能性が明らかとなった。
- 3：黄耆には、経口投与でマウスの腹腔内細胞数を増加させるGlucoseを主構成糖とする多糖成分が含まれていた。
- 4：黄耆は、若年マウスのIgM抗体産生能に対しては賦活化効果を示さなかったが、加齢マウスに対しては有意な賦活化効果を示すことが明らかとなった。
- 5：黄耆を投与したマウスでは、JEVの感染に対して、特異的な抗JEV-IgM抗体産生能の賦活化が認められ、その賦活化はJEVの感染に対する防御効果の増強をもたらすことが明らかとなった。
- 6：黄耆は、加齢マウスの抗体産生細胞数を有意に増加させる効果を示すことが明らかとなった。
- 7：黄耆から加齢マウスのIgM抗体産生能を賦活化させる2種類の多糖画分を分画した。それらの多糖は、Glucoseを主構成糖とし、分子量は、約12000と約22000であった。

## 謝 辞

本論文の作成にあたり、終始親切な御指導、御鞭撻を賜りました  
大阪大学薬学部 教授 西原 力 先生に謹んでお礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、有益な御助言と御指導をいただきました、  
大阪大学薬学部 助教授 米田該典 先生、大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員  
高木康博 博士、同元病理課長 上羽 昇博士、同副部長 横山 浩博士、同主任研  
究員 木村朝昭博士に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に際しまして御協力、御指示いただきました大阪府立公衆衛  
生研究所 薬事指導部 山下治夫 部長、同 香月英男 元部長、同 土井 進 元部長、  
同 田中凉一元部長をはじめ部員の方々に対して感謝致します。

## 引用文献

1. J.C. Cyong, *Proc. Satellite meeting of the 10th International Congress of Pharmacology*, p.55(1987).
2. 第13改正日本薬局方解説書、p.D-129、廣川書店、東京、1996.
3. H. Hikino, S. Funayama, K. Endo, *Planta Med.*, **30**, 297(1976).
4. 磯貝彰、村越重雄、鈴木昭憲、田村三郎、*農化*、**47**, 449, (1973).
5. A. Subarnas, Y. Oshima, H. Hilino, *Phytochem.*, **30**, 2777(1991).
6. 高井 誠、斉藤 保、柴田承二、日本薬学会第100年会講演要旨集、p214(1980).
7. I. Kitagawa, H. K.Wang, A. Takagi, M. Fuchida, I. Miura, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 689(1983).
8. I. Kitagawa, H.K. Wang, M. Saito, A. Takagi, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 698(1983).
9. I. Kitagawa, H.K. Wang, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 709 (1983).
10. I. Kitagawa, H.K. Wang, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 716 (1983).
11. 溝口貫一、*生薬*、**18**, 73(1964).
12. 渡辺 武、*薬学雑誌*、**73**, 419(1953).
13. M. Miyazawa, H. Kameoka, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3153(1987).
14. 原田正敏、*漢方薬物治療学*、p.33、廣川書店、東京、1984
15. 大阪生薬協会生薬懇話会編、*生薬の選品と評価*、大阪生薬協会、p.16、1993.
16. 稲木一元、*薬事新報*、1548, 776(1989).
17. 塚原 茂、*Biotherapy*, **9**, 1216(1995).
18. 宮崎利夫、鈴木益子、*免疫学*、朝倉書店、東京、p.70, 1992
19. 森 良一、熊野祐司、*薬局*、**39**, 687(1987).
20. 大谷 明、*ファルマシア*、**34**, 684(1998).
21. 大沢利昭、小山次郎、奥田研雨、矢田純一、*免疫学辞典*、東京化学同人、東京、p.6, 1993

22. 森 良一、天児和暢、戸田新細菌学、南山堂、東京、p.740, 1993
23. 藤野恒三郎、秦 藤樹、近藤雅臣、衛生微生物学、講談社、東京、p.271, 1979
24. M. Terauchi, H. Kanamori, M. Nobuso, I. Sakamoto, S. Yahara, T. Nohara, H. Kphda, *Nat.Med.*, 49, 133(1995).
25. A. Itoh, K. Sasaki, H. Mizukami, H. Ohashi, T. Sakura, N. Hiraoka, *Nat.Med.*, 51, 50(1997).
26. X.B. Li, K. Komatsu, S. Yamaji, A. Takano, T. Namba, *Nat.Med.*, 51, 148(1997).
27. T. Kimura, K. Iwai, N. Ueba, *Biken J.*, 16, 57(1973).
28. 小立 淳、統計リファレンス、南光堂、東京、p-78, 1992
29. 朱 径和、中国葯材商品学、人民衛生出版社、北京、9-200, 1990
30. 姉帯正樹、桂 英二、加藤芳伸、山岸 喬、*Nat. Med.*, 48, 244(1994).
31. 高橋奈穂子、安田一郎、瀬戸隆子、浜野朋子、高野伊知郎、秋山和幸、鈴木幸子、福田達男、田中 博、飯田 修、東京衛研年報、40, 84(1989).
32. K. Ikemoto, T. Utsunomiya, A. Ball, M. Kobayashi, R.B. Pollard, F. Suzuki, *Experintia*, 50, 456(1994).
33. M.A. Ball, T. Utsunomiya, K. Ikemoto, M. Kobayashi, R.B. Pollard, F. *Experintia*, 50, 775(1994).
34. T. Nagai, M. Urata, H. Yamada, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 18, 193(1996).
35. S. Gupta, S.S. Agarwal, L.B. Epstein, G. Fernandes, R.A. Good, *Clinical Res.*, 28, 504(1980).
36. A.Mita, R. Shida, N. Kasai, J. Shoji, *Biomedicine*, 31, 223(1979).
37. H.W. Yeung, Proc.3rd International Ginseng Symp., p.245(1980).
38. Y.S. Kim, K.S. Kang, S.I. Kim, *Arch.Pharm.Res.*, 13, 330(1990).
39. S. Morisawa, T.Shin, Y. Mizoguchi, Y. Sakagami, Proc.5th International Ginseng Symp., p.270(1988).
40. V.K. Singh, S.S. Agarwal, B.W. Gupta, *Planta Med*, 50, 462(1984).



41. 米沢司郎、加藤智雄、上羽 昇、木曾良明、村松 了、日本生薬学会第35回年会  
(新潟)要旨集、p.150(1988).
42. D.H. Clarke, J. Casalus, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 11, 561(1958).
43. Robert C.A., *Methods Enzymol.*, 113, 449-493 (1986).
44. 金井正光、臨床検査法提要、金原出版、東京、p.282, 1993
45. 徳永 徹、吉田 彪、赤川清子、マクロファージ実験マニュアル、  
講談社サイエンティフィック、東京、p.17、1992
46. J.A. Steinkamp, J.S. Wilson, G.C. Saunders, C.C. Stewart, *Science*, 218,  
64(1982).、
47. 野本亀久雄、*Fragrance J.*, 23, 7(1995)
48. M.S. Cohen, *J.Immunol.*, 127, 1007(1981).
49. I. Fridovich, *Science*, 201, 875(1978).
50. M.L. Karnovsky, J.A. Badwey, *J. Clin. Chem. Biochem.*, 21, 545(1983).
51. 宮崎利夫、鈴木益子、免疫学、朝倉書店、東京、p.58, 1992
52. J. Wang, H. Ito, K. Shimura, *Japan. J. Pharmacol.*, 51, 432(1989).
53. 高木康博、前田章子、上羽 昇、東奈津美、山村博彦、布浦由樹、  
和漢医薬学雑誌, 13, 330(1996).
54. 東奈津美、前田文明、山村博彦、布浦由樹、高木康博、前田章子、  
上羽 昇、和漢医薬学雑誌, 13, 444(1996).
55. Y. Kojima, Y. Kumazawa, N. Shibukawa, K. Otsuka, K. Mizunoe,  
Proc.Symp., *WAKAN-YAKU*, 13, 101(1980).
56. Y. Kumazawa, K. Mizunoe, Y. Otsuka, *Immunol.*, 47, 75(1982).
57. H. Yamada, H. Kiyohara, J.C.Cyong, Y. Kojima, Y. Kumazawa, Y. Otsuka,  
*Planta Med.*, 50, 163(1984).
58. 高木康博、油田悟志、上羽 昇、山崎勝弘、米沢司郎、加藤智雄、  
日本生薬学会第37回年会(千葉)要旨集、p.51(1990).
59. 徳永 徹、マクロファージ、講談社、東京、p.66、1989
60. K. Yonekura, T. Kawakita, Y. Saito, A. Suzuki, K. Nomoto,  
*Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 14, 165(1992).

61. K. Irinoda, K. N. Masihi, G. Chihara, Y. Kaneko, T. Katori,  
*Int. J. Immunopharmac.*, 14, 971(1992).
62. N.K. Suri, K. Banerjee, *Acta. Virol.*, 39, 143(1995).
63. 野本亀久雄、*Biol. Industry*, 8, 783(1991).
64. 笹月健彦、*免疫生物学*、南江堂、東京、p.465, 1995.
65. 広川勝晃、*感染・炎症・免疫*、18, 181(1988).
66. 荒井澄夫、*久留米医学雑誌*、49, 509(1986).
67. Q.P. Gao, H. Kiyohara, J.C. Cyong, H. Yamada, *Planta Medica*, 55,  
9(1989).
68. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith,  
*Anal. Chem.*, 28, 350(1956).
69. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*,  
193, 265(1951).
70. N. Blumenkrantz, G. A. Hansen, *Anal. Biochem.*, 54, 484(1973).
71. W.E. Trevelyan, D.P. Procter, J.S. Harrison, *Nature*, 166, 444(1950).
72. E. Schiffmann, *J.I. Gallin, Curr. Top. Cell Reg.*, 15, 203(1979).
73. Y. Yamaoka, T. Kawakita, M. Kaneko, K. Nomoto, *Biol. Pharm. Bull.*,  
19, 936(1996).
74. R. Gonda, M. Tomoda, N. Shimizu, N. Ohara, H. Takagi, S. Hoshino,  
*Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1549(1994).
75. Y. Yamaoka, T. Kawakita, M. Kaneko, K. Nomoto, *Biol. Pharm. Bull.*,  
18, 846(1995).
76. K. Ingolgsdottir, K. Jurcic, B. Fischer, H. Wagner, *Planta Med.*, 60,  
527(1994).
77. H. Kiyohara, H. Yamada, *Carbohydrate Polymers*, 25, 177(1994).
78. 杉山 清、村越弘章、渡辺桂子、塩崎哲也、*和漢医薬学雑誌*、11, 458(1994).
79. G. Chihara, J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukuoka, *Cancer.Res.*, 30,  
2776(1978).

80. G. Chihara, *In Immunothrapeutic Prospects of Infectious Diseases*, Springer, Berlin, p.7, 1990
81. 幅 誠二、浜岡利之、免疫実験操作法B、日本免疫学会編、p.1129、1974
82. H.N.Eisen, M.E. Carsten, S. Belman, *J. Immunol.*, **73**, 296(1954).
83. Y. Takagi, S. Aburada, T. Otake, N. Ikegami, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 375(1987).
84. 奥田拓男、天然薬物事典、廣川書店、東京、p.398、1985
85. 奥田拓男、天然薬物事典、廣川書店、東京、p.115、1985
86. 奥田拓男、天然薬物事典、廣川書店、東京、p.191、1985
87. 谿 忠人、現代医療と漢方薬、医薬ジャーナル、大阪、p231、1991
88. S. Kishimoto, S. Tomino, K. Inomata, S. Kotegawa, T. Saito, M. Kuroki, H. Mitsuya, S. Hisamitsu, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **25**, 1(1982).
89. D.L. Ennist, K.H. Jones, R.L. Pierre, R.L. Whisler, *J. Immunol.*, **136**, 99(1986).
90. R.A. Miller, *J. Immunol.*, **132**, 63(1984).
91. T. Hosokawa, B. Cinader, *Ann. Immunol.*, **134D**, 293(1983).
92. X.H. Yang, J. Stedra, J. Cerny, *J. Immunol.*, **152**, 2214(1994).
93. A.V. Pisciotta, D.W. Westing, C. Deprey, B. Walsh, *Nature*, **215**, 193(1967).
94. J.F. Delfraissy, P. Galanaud, J. Dormont, C. Wallen, *Clin. Exp. Immunol.*, **39**, 208(1980).
95. S.G. Pahwa, R.N. Pahwa, R.A. Good, *J. Clin. Invest.*, **67**, 1094(1981).
96. K.S. Zhao, C.Mancini, G. Doria, *Immunopharmacol.*, **20**, 225(1990).
97. K.S. Song, S.M. Cho, J.H. Lee, H.M. Kim, S.B. Han, K.S. Ko, I.D. Yoo, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2105(1995).
98. T. Kawakita, A. Yamada, Y. Kumazawa, K. Nomoto, *J. Immunopharmacol.*, **8**, 561(1986).
99. A. Mita, *Biomedicine*, **31**, 223(1979).
100. 嶋田裕之、日本臨床、**39**, 603(1981).

101. T. Makinodan, S.J. James, T. Inamizu, M.P. Chang, *Gerontology*, 30, 279(1984).
102. N. K. Jerne, A.A. Nordin, *Science*, 140, 405(1963).
103. M.B. Rittenberg, K.L. Pratt, *Proc. Soc. Biol.*, 132, 575(1969).
104. H. Yamada, H. Kiyohara, N. Takemoto, J.F. Zhao, H. Kawamura, Y. Komatsu, J.C. Cyong, M. Aburada, E. Hosoya, *Planta Med.*, 58, 166(1992).
105. 武元則人、丸山博文、川村秀樹、小松靖弘、油田正樹、細谷英吉、炎症、 9, 137(1989).
106. 小松靖弘、武元則人、丸山博文、土屋博司、油田正樹、細谷英吉、篠原精一、浜田 一炎症、 6, 405(1986).
107. 大塚恭男、熊谷 朗、高木博司、最新の漢方薬理、*Excepta Medica*、東京、 p.333, 1988
108. 大沢利昭、小山次郎、奥田研雨、矢田純一、免疫学辞典、東京化学同人、東京、 p.534, 1993
109. 寺脇 潔、小栗加奈子、能勢充彦、荻原幸夫、和漢医薬学雑誌、 13, 398 (1996).
110. G.Chihara, J.Hamuro, Y.Maeda, Y.Arai, F.Fukuoka, *Nature*, 225, 943(1970).
111. S.Tsukagoshi, Host defense against cancer and its potentiation, p365, Univ. of Tokyo Press(1975).
112. 宮崎利夫 現代東洋医学、 4, 61(1983).
113. H. Yamada, N.Kawaguchi, T. Ohmori, Y. Takeshita, S.Taneyra, T. Miyazaki, *Carbohydr. Res.*, 125, 107(1984).
114. 山田陽城、現代東洋医学、 17, 89(1986).

