

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書


— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日 中 医 学 協 会

理 事 長 中 島 章 殿

1999年 3月 12日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 山田陽城 

所 属 機 関 (社) 北里研究所 職 名 理事

所 在 地 〒 108-8642 東京都港区白金5-9-1 電 話 03-5791-6174

招 へ い 研 究 者 氏 名 馬 百平

所 属 機 関 北京放射医学研究所 職 名 助理研究員

研 究 テ ー マ 和漢生薬エキス中の低分子性腸管免疫調節物質の解明

2. 日 本 滞 在 日 程

馬 百平 氏は平成10年9月24日に来日し、翌日より研究を開始した。これまで順調に研究が進行しており、本課題での研究の完了にはさらに1年を要するため、馬 百平氏は2年間北里研究所・東洋医学総合研究所において研究を行う予定になっている。平成11年4月1日からは、北里研究所より経済的なサポートを受けて研究を続行する予定である。また、得られた研究成果については、貴協会からの助成による研究成果も含めて馬 氏の帰国前に日本国内で開催される関連学会にて発表、学術誌に投稿する予定である。

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：和漢生薬エキス中の低分子性腸管免疫調節物質の解明

研究者氏名：馬 百平

中国での所属・役職：北京放射医学研究所・助理研究員

招聘者氏名・所属・役職：山田陽城 (社) 北里研究所・理事

### 要旨

漢方薬の構成生薬の熱水エキスについて腸管免疫調節活性の検討を行った結果、TI-147が活性を有していることが明らかとなった。TI-147の熱水抽出エキスのEtOHやMeOHを用いた分画、ゲルろ過および疎水性クロマトグラフィーによりTI-147中には粗多糖画分に分画される高分子性の腸管免疫調節物質と低分子性活性物質が含まれることが示唆された。また、TI-147からの直接のMeOH抽出による低分子性活性物質の分画についても検討し、活性物質がMeOH可溶性の比較的高極性物質として分画できることを明らかとした。

### KEY WORDS

腸管免疫調節活性、パイエル板、漢方薬、構成生薬、活性物質

### 研究報告

【目的】漢方薬の煎液や市販エキス製剤は経口的に投与されることから、漢方薬中の薬効成分は消化管より吸収され、生体内機構に直接作用すると考えられる。一方、消化管にはパイエル板等の腸管免疫系が存在している。腸管免疫系は近年その詳細が明らかにされてきた生体内機構で、腸管内での細菌感染に対する防御バリアーの形成や食物アレルギーに代表される免疫寛容の調節に関与している<sup>1)</sup>。また、腸管上皮やパイエル板中のT細胞は、腸管上皮から鼻粘膜等の他の粘膜組織に移行し(ホーミング)、これらの粘膜系の制御を行うことも明らかとなっている。さらに腸管上のT細胞は、Interleukin-6 (IL-6)やTumor necrosis factor (TNF)などのサイトカインを産生し、粘膜局所のみならず全身免疫系や造血系などの生体内機構を調節すると考えられている。これらのことから、漢方薬中の薬効成分が腸管免疫系を介して間接的に作用する可能性が考えられる。著者らはこれまでに重要漢方処方の一つである十全大補湯が腸管パイエル板中のT細胞を活性化し、骨髄細胞の増殖促進因子としての機能を有するIL-6や顆粒球-マクロファージコロニー産生促進因子(GM-CSF)などのサイトカイン産生を促進させる作用を有することを明らかとした<sup>2)</sup>。このことから、漢方薬の構成生薬中に腸管免疫系を調節する薬効発現物質が含まれている可能性が考えられ、本研究で検討を行った。

【方法】腸管免疫調節活性の測定：以下のように招聘者の研究グループで確立した方法にもとづいて測定した<sup>2)</sup>。

#### 1) パイエル板細胞の調製

雌性C3H/HeJマウス(7~8週令)を脊髄脱臼後、眼科用ハサミを用いて消化管よりパイエル板を切り出した。このパイエル板を氷冷した5%牛血清アルブミン(BSA)含有ハンクス培地にとり、これをステンレスメッシュ(200 mesh)上で3~5mLのディスプレイ

ダブル注射器のゴムラバー付き内筒を用いてすりつぶすことによりパイエル板細胞を遊離させた後、3~5mLのディスポーザブル注射器を用いて50mLファルコンチューブに本液を採取した。さらに、Vortexミキサーを用いて攪拌することにより完全に分散させ、ステンレスメッシュ(200 mesh)で濾過後、遠心分離を行った(1200rpm, 4℃, 5min)。培地をデカンテーションすることによりパイエル板細胞を得た。本細胞について5% BSA含有ハンクス培地(10mL)を用いて2回同様の操作を繰り返すことにより細胞を洗浄後、5% ウシ胎児血清(FBS)含有RPMI-1640培地を用いて $2\sim 3 \times 10^6$  cell/mLのパイエル板細胞懸濁液を調製した。本懸濁液(180 $\mu$ L/well)を96穴マイクロタイタープレートに分注後、サンプル溶液(0~1000 $\mu$ g/mL, 20 $\mu$ L)を加えて5% CO<sub>2</sub>インキュベーター(37℃)にて5日間培養した。

## 2) マウス骨髄細胞の調製と培養

雌性C3H/HeJマウスを脊髄脱臼後、大腿骨を摘出した。両骨頭を眼科用ハサミで除去後、3~5mLのディスポーザブル注射器を用いて5% BSA含有ハンクス培地により骨髄細胞を50mLファルコンチューブに押し出し採取した。本液をVortexミキサーを用いて攪拌することにより骨髄細胞を分散させ、ステンレスメッシュ(200 mesh)で濾過した後、遠心分離を行った(1200rpm, 4℃, 5min)。デカンテーション後、5% BSA含有ハンクス培地を用いて細胞を洗浄後、得られた骨髄細胞を5% FBS含有RPMI-1640培地(10mL)を用いて懸濁した。細胞集塊が残る時は上記の方法により濾過した。得られた細胞浮遊液を $2.5 \times 10^5$  cell/mLに調製し、骨髄細胞懸濁液とした。96穴マイクロタイタープレートに1)で得たパイエル板細胞培養上清(50 $\mu$ L/well)、5% FBS含有RPMI-1640培地もしくは25% ウマ血清(50 $\mu$ L/well)を加え、本溶液中に上記のように調製した骨髄細胞懸濁液(100 $\mu$ L/well)を加えて5% CO<sub>2</sub>下37℃で5~6日間培養した。

## 3) 骨髄細胞数の計測

2)で培養した骨髄細胞を含む96穴マイクロタイタープレートにAlamar Blue溶液(20 $\mu$ L/well, Biosource社)を添加後、プレートミキサーで5分間攪拌し、37℃、5% CO<sub>2</sub>下、数時間インキュベーションした。この溶液について蛍光プレートリーダー(大日本製薬製)を用いて励起波長544nm、測定波長590nmで蛍光強度を測定し、増殖した骨髄細胞数を計測した。またサンプルのかわりとして精製水もしくは5%メタノールを用いてパイエル板を培養したものをコントロールとし、コントロールによる骨髄細胞数に対するサンプルによる骨髄細胞数の増殖率を腸管免疫調節活性とした。

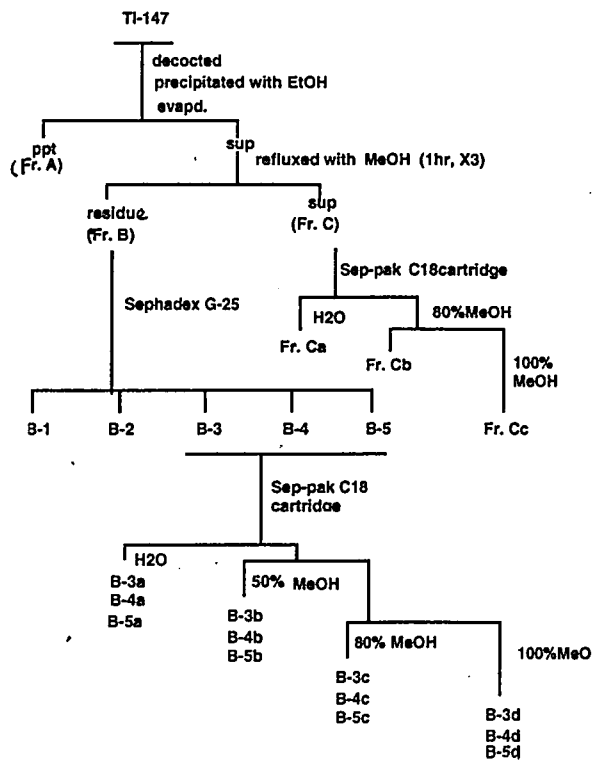
## 【結果】

### 1 和漢生薬の熱水抽出エキスからの腸管免疫調節物質の分画

漢方薬の構成生薬のうち数種の熱水抽出エキスについて腸管免疫調節活性の検討を行った結果、TI-147に高い活性が認められたことから、本生薬中に低分子性の腸管免疫調節物質が含まれている可能性について検討を行った。

TI-147の熱水抽出エキスについてEtOH沈殿、MeOHでの還流および透析を行うことにより粗多糖画分(Fr. A)、MeOH不溶性-EtOH沈殿上清画分(Fr. B)、MeOH可溶性画分(Fr. C)を得た(Scheme 1)。さらにFr. BについてはSephadex G-25を用いたゲルろ過により分画し、分子量の大きさに従いB-1~B-5までの5画分を得た(Scheme 1)。これらの画分について腸管免疫調節活性を検討した結果、Fr. AとともにB-3、B-4およびB-5に強い活性が認められたが(Fig. 1)、他の画分は不活性であった。B-3~B-4には低分子性の活性物質が

含まれていることが推定されたことから、次にB-3~B-4についてSep-pak C<sub>18</sub>カートリッジを用いた疎水性クロマトグラフィーにより分画することを試みた。その結果、未吸着画分(B-3a~B-5a)、50% MeOH溶出画分(B-3b~B-5b)、80% MeOH溶出画分(B-3c~B-5c)および100% MeOH溶出画分(B-3d~B-5d)を得た(Scheme 1)。これらの画分について腸管免疫調節活性を検討した結果、100% MeOH溶出画分のみが高い活性を示し、活性強度はB-5d>B-4d>B-3dであった(Fig. 2)。B-3d~B-5dは低分子物質であることが推定されたことから、これらの画分をTLCを用いて比較検討した(Silica gel, CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 20 : 1)。その結果、これらの画分中には共通してRf値0.01, 0.11, 0.38付近に展開されるスポットが観察され、活性画分中には有機溶媒で展開可能な低分子性の活性物質が含まれることが示唆された。



Scheme 1 TI-147からの腸管免疫調節物質の分画

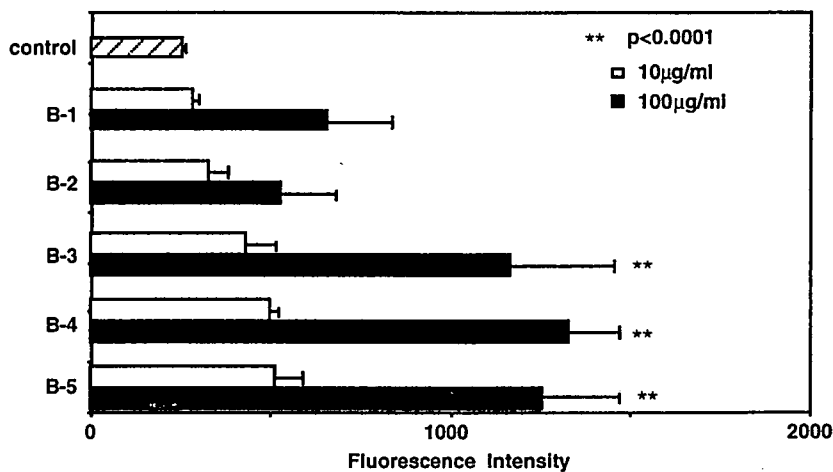


Fig. 1 TI-147の分画画分の腸管免疫調節活性

## 2 TI-147からの腸管免疫調節物質の分画法の改良

前述のようにTI-147には低分子性の腸管免疫調節物質が含まれていることが示唆された。前法では熱水抽出エキスからの検討を行っているため、構造解析に十分な量の活性物質を精製することが煩雑であると考えられた。そこで次にMeOH抽出法を用いた分画法について検討した。TI-147をソックスレー抽出器を用いてMeOHにより抽出後、MeOHエキスについてethyl ether、CHCl<sub>3</sub>、AcOEt次いでn-BuOHを用いて順次分配し、各分画画分を得た(Scheme 2)。これらの画分について腸管免疫調節活性を測定したが、いずれの

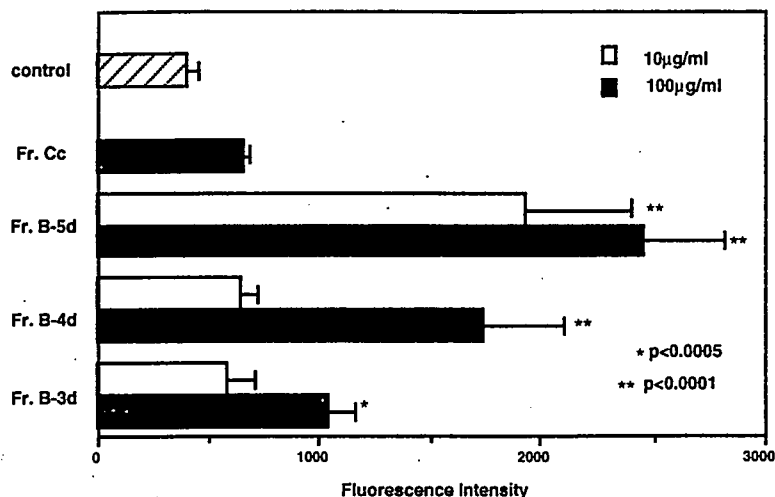
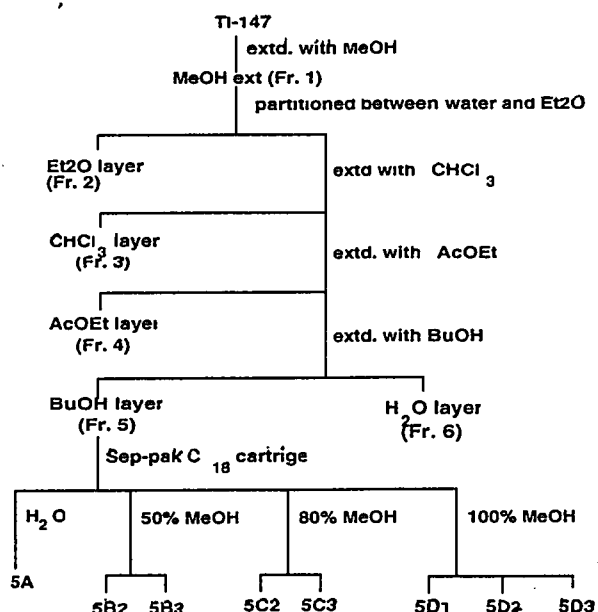


Fig. 2 TI-147より得られた低分子画分の腸管免疫調節活性

画分も活性は認められなかった。これらの画分のうち比較的収量が高く、前述の活性物質が分画されると考えられる高極性画分[n-BuOH (Fr. 5)画分]についてSep-pak C<sub>18</sub>カートリッジを用いてさらに分画した。Fr. 5をSep-pak C<sub>18</sub>カートリッジに添加後、未吸着画分を水を用いて溶出させ、さらに吸着画分を50%, 80%次いで100% MeOHにて溶出させた。この際、各MeOH液での溶出においてカートリッジ上で数種のバンドが観察されたことから、各バンドごとに分取し(Scheme 2)、各画分について活性を測定した。その結果、100% MeOH溶出画分のFr. 5D3に最も強い活性が観察され、5D1と5D2も活性を有していた(Fig. 3)。さらにTI-147をMeOHを用いて還流抽出した場合においても同様の結果が得られ、以上のことから、TI-147中の低分子性腸管免疫調節活性物質はMeOHにより抽出可能であることが示された。



Scheme 2 TI-147からの直接MeOH抽出法による活性成分の分画

【考察】今回、和漢生薬の一つであるTI-147中のパイエル板を介した腸管免疫調節物質の検索を行った結果、TI-147中には高分子性の腸管免疫調節物質とともに低分子性の活性物質がいずれも含まれていることが明らかとなった。これまでTI-147に腸管免疫調節活性を有する低分子化合物が含まれていることは報告されていない。またTI-147に含まれる代表的な既知化合物について活性の検討を行った結果、いずれの化合物も活性を示さず、特異な活性物質が含まれていることが推定された。現在TI-147について大量に分

画を行い、活性物質の精製を行っている。

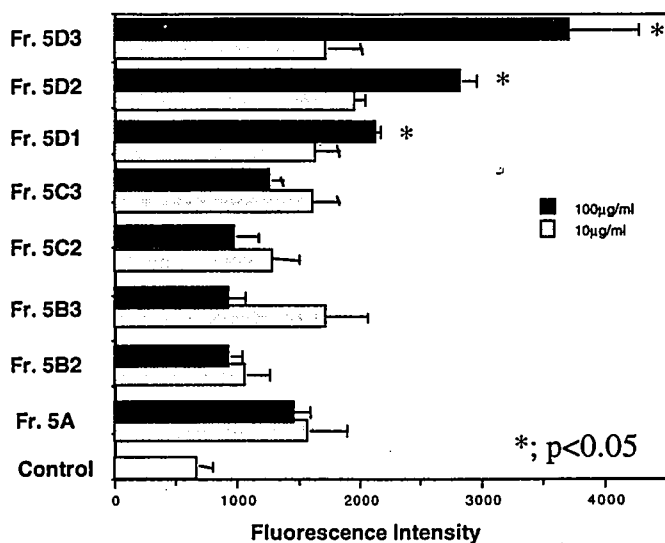


Fig. 3 TI-147から直接MeOH還流により得られた分画画分の腸管免疫調節活性

【参考文献】

- 1) P.L. Ogura, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (Eds.), Mucosal Immunology, Academic Press, New York (1999).
- 2) T. Hong, T. Matsumoto, H. Kiyohara and H. Yamada: Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-Taiho-To, Phytomedicine, 5, 353-360 (1998).