

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006? 2008

課題番号：18590660

研究課題名 (和文) 漢方薬の粘膜免疫賦活作用に関する基礎研究

研究課題名 (英文) Basic research on mucosal immune system enhancing activity of Kampo medicines

研究代表者

松本 司 (MATSUMOTO TSUKASA)

いわき明星大学・薬学部・准教授

研究者番号：00173906

研究成果の概要： 分泌型 IgA の低下に代表される粘膜免疫機能の低下が、高齢者における易感染性の一因と考えられている。抗原特異的分泌型 IgA 抗体産生に対する補中益気湯の作用について検討を行った。その結果、補中益気湯エキスは本 IgA 抗体の産生を増強する作用を有することが明かとなった。分泌型 IgA 抗体は、粘膜における最も重要な防御因子の一つであることから、分泌型 IgA 産生促進作用が補中益気湯の臨床における薬効に関与する可能性を示唆した。さらに、その機序として補中益気湯エキスの腸上皮細胞およびパイエル板細胞に対する調節作用が関与する可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・内科一般 (含心身医学)

キーワード： 漢方薬、粘膜免疫、IgA、補中益気湯

1. 研究開始当初の背景

(1) 各種感染症に対する生体防御の観点から漢方薬の有用性が注目されている。漢方薬を服用している患者は、「風邪を引きにくくなる」、「風邪の症状が軽い」、「回復が早い」などの粘膜免疫系の賦活作用を連想させるような効果が臨床的に観察されているが、作用機序をはじめとする粘膜免疫賦活作用の

詳細については明らかではなかった。

(2) 経口的に用いられる漢方薬のエキス中に含まれる薬効成分が生体と最初に相互作用する場が腸管であることから、臨床的に観察される漢方薬の薬効の一部は、腸管粘膜免疫系への作用を介する可能性も推定される。しかしながら、その詳細については明らかでは

ない。分泌型 IgA 抗体は粘膜における最も重要な防御因子の一つであることから、粘膜における抗原特異的 IgA 抗体産生に対する補中益気湯エキスの影響について検討を行った。

2. 研究の目的

分泌型 IgA 抗体は粘膜における最も重要な防御因子の一つである。そこで本研究では特に分泌型 IgA 抗体産生の調節作用に絞って漢方薬の作用について検討すると共に、その機序について細胞・分子レベルで解析し、臨床的に観察される漢方薬の有効性を科学的に理解するための基礎的な知見を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ポリ乳酸・グリコール酸共重合体を基材として作製した OVA 内包微粒子を経口投与後した後にマウスの腸洗液および鼻腔洗液を調製し、抗原特異的分泌型 IgA を ELISA 法により測定した。

(2) 補中益気湯エキスを投与したマウスのパリエル板細胞より mRNA を抽出し、その遺伝子発現をマイクロアレイ法により解析した。

(3) 補中益気湯エキスを投与したマウスのパリエル板細胞および末梢血リンパ球のポピュレーションをフローサイトメトリーにより解析した。

(4) 結腸上皮細胞株 MCE301 細胞を補中益気湯エキスで刺激し、サイトカイン産生をプロテインアレイにより検討した。

4. 研究成果

分泌型 IgA 抗体は病原細菌の産生する毒素の中和作用や、異種抗原やウイルス、病原細菌の侵入の抑制作用を有し、粘膜における最も重要な防御因子の一つであることが知られている。そこで、抗原特異的分泌型 IgA 抗体産生に対する補中益気湯の影響について検討を行った。その結果、OVA 内包微粒子の経口投与により腸管および鼻腔において抗 OVA IgA 抗体の産生が観察され、補中益気湯エキスの投与は本 IgA 抗体の産生を増強した。補中益気湯エキスの作用機序の解析を目的として、補中益気湯エキス投与後のパリエル板細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイに

より解析を行った結果、数種の遺伝子の発現に変化が観察された。その中で、L-セレクチン遺伝子の発現増加に注目し、フローサイトメータにより解析を行った結果、補中益気湯によりその発現が促進されることを確認した。L-セレクチンは peripheral node addressin (PNAd) と相互作用することが知られ、粘膜組織、特に鼻腔や上気道へのリンパ球のホーミングの観点からその重要性が指摘されている。補中益気湯エキスの投与により L-セレクチンの発現増加が観察されたことから、補中益気湯エキスによる IgA 抗体の産生促進作用、特に免疫部位である腸管から離れた鼻腔などの上気道粘膜組織における抗体産生促進作用には補中益気湯エキスのリンパ球ホーミングに対する調節作用の関与が示唆された。分泌型 IgA の低下に代表される粘膜免疫機能の低下が、高齢者における易感染性の一因と考えられていることから、今回明らかとなった補中益気湯の分泌型 IgA 産生促進作用が臨床における本処方の薬効に關与する可能性が示唆された。

次に、補中益気湯の各種免疫調節作用発現における腸上皮細胞の役割を明らかとする目的で、結腸上皮細胞株 MCE301 細胞を用い、腸上皮細胞のサイトカイン類発現に及ぼす作用について検討した結果、補中益気湯エキスおよびその多糖成分は腸上皮細胞からの G-CSF 産生を促進する作用を有することが示された。G-CSF は、好中球の増殖およびその活性化作用を介して各種感染症に対する抵抗性を増強するとともに、制御性 T 細胞の誘導や NKT 細胞の機能調節作用を有することから、補中益気湯の免疫調節作用の一部には、多糖成分による腸上皮細胞からの G-CSF 産生促進作用が關与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

Matsumoto T, Moriya M, Kiyohara H, Tabuchi Y, Yamada H. Hochuekkito, a Kampo (Traditional Japanese Herbal) Medicine, and its Polysaccharide Portion Stimulate G-CSF Secretion from Intestinal Epithelial Cells. Evid. Based Complement. Alternat. Med. ; in press (doi: 10.1093/ecam/nen007). (査読有り)

Matsumoto T, Noguchi M, Hayashi O,

Makino K, Yamada H. Hochuekkito, a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, enhances mucosal IgA antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* ; in press (doi: 10.1093/ecam/nem166). (査読有り)

Matsumoto T, Hosono-Nishiyama K, Yamada H. A pectic polysaccharide isolated from the roots of *Bupleurum falcatum* L. stimulates the tyrosine phosphorylation of lipid rafts of murine B cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2008, 31:931-934. (査読有り)

Matsumoto T, Moriya M, Sukurai MH, Kiyohara H, Tabuchi Y, Yamada H. Stimulatory effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L., on G-CSF secretion from intestinal epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 2008, 8:581-588. (査読有り)

Kiyohara H, Matsuzaki T, Matsumoto T, Nagai T, Yamada H, "Elucidation of structures and functions through Peyer's patches of responsible carbohydrate chains in intestinal immune system modulating polysaccharides from Japanese medicinal herbs", *YAKUGAKU ZASSHI* 2008, 128, 709-716. (Review)

Inngjerdingen KT, Patel T, Chen X, Kenne L, Allen S, Morris GA, Harding SE, Matsumoto T, Diallo D, Yamada H, Michaelsen TE, Inngjerdingen M, Paulsen BS. Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology* 2007; 17:1299-1310. (査読有り)

Hayasaki T, Matsumoto T, Nishimura Y, Tabuchi Y, Obinata M, Hanawa T, Yamada H. Effects of hangeshashinto on butyrate-induced cell death in murine colonic epithelial cell. *J. Trad. Med.* 2007; 24:81-86. (査読有り)

Inngjerdingen KT, Kiyohara H, Matsumoto T, Petersen D, Michaelsen TE, Diallo D, Inngjerdingen M, Yamada H, Paulsen BS. An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Phytochemistry.* 2007;68:1046-1058. (査読有り)

Matsumoto T, Hayasaki T, Nishimura Y, Nakamura M, Takeda T, Tabuchi Y, Obinata M, Hanawa T, Yamada H. Butyrate Induces Necrotic Cell Death in Murine Colonic Epithelial Cell MCE301. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29, 2041-2045. (査読有り)

Kiyohara H, Matsumoto T, Nagai T, Kim S-J, Yamada H. The presence of human natural antibodies against pharmacologically active pectic polysaccharides from herbal medicines. *Phytomedicine.* 2006; 13, 494-500. (査読有り)

Nergard CS, Kiyohara H, Reynolds JC, Thomas-Oates JE, Matsumoto T, Yamada H, Patel T, Petersen D, Michaelsen TE, Diallo D, Paulsen BS. Structures and Structure-Activity Relationships of Three Mitogenic and Complement Fixing Pectic Arabinogalactans from the Malian Antiulcer Plants *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Biomacromolecules.* 2006;7: 71-79. (査読有り)

Matsumoto T, Hosono-Nishiyama K, Yamada H. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Med.* 2006;72:276-278. (査読有り)

Hosono-Nishiyama K, Matsumoto T, Kiyohara H, Nishizawa A, Atsumi T, Yamada H. Suppression of Fas-mediated apoptosis of keratinocyte cells by chikusetsusaponins isolated from the roots of *Panax japonicus* C.A. Meyer. *Planta Med.* 2006;72:193-198. (査読有り)

Matsumoto T, Hayasaki T, Nishimura Y, Nakamura M, Takeda T, Tabuchi Y, Obinata M, Hanawa T, Yamada H, "Butyrate induces necrotic cell death in murine colonic epithelial cell MCE 301", *Biol. Pharm. Bull.*, 29(10): 2041-2045 (2006). (査読有り)

Kiyohara H, Nagai T, Munakata K, Nonaka K, Kim SJ, Yamada H, "Stimulating effect of Japanese herbal (Kampo) medicine, Hochuekkito on upper respiratory mucosal immune system", *eCAM*, 3(4): 459-467 (2006). (査読有り)

[学会発表](計38件)

関谷路子, 清原寛章, 松本 司, 山田陽城: 補中益気湯の腸上皮細胞に対する免疫調節作用成分の解析, 日本薬学会第129年会(京都)2009/3/26-28(3.27)

関谷路子, 清原寛章, 松本 司, 矢部武士, 山田陽城: 感染制御効果を有する漢方方剤「補中益気湯」の粘膜免疫調節作用成分の解析, 北里大学微生物アカデミーAKPS学術集会, 東京, 2008/12/13

Yamada H: Preventive Effects of Kampo Medicines on Infectious Diseases and Neural Diseases, 4th International Niigata Symposium on Diet and Health "Integrative functions of diet in anti-aging and cancer prevention", Niigata (Japan), 2008/11/29-30

清原寛章: 和漢薬の多糖研究で何か見えてくるか?, 第17回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 福岡, 2008/11/13-14

松本 司, 細野加奈子, 川口基一郎, 山田陽城: 柴胡のペクチン bupleuran 2IIc の刺激によるB細胞からのIL-10産生促進とその機序の解明, 第25回和漢医薬学会学術大会, 大阪, 2008/8/30-31(発表30日)

清原寛章, 芦刈和男, 山田陽城: メシマコブ子実由来のパイエル板免疫機能調節多糖の解析, 第25回和漢医薬学会学術大会, 大阪, 2008/8/30-31(発表30日)

山田陽城: 薬学における漢方医薬学教育, 特別シンポジウム 新世代の医学・薬学における和漢医薬学教育, 第25回和漢医薬学会学術大会, 大阪, 2008/8/30-31(発表31日)

Yamada H: Structural Diversity and Immunomodulating Activity of Plant Bioactive Polysaccharides for Health Care, International Carbohydrate Symposium 2008, Oslo (Norway), 2008/7/27-8/1(発表29日)

Yamada H: Current discovery research and most promising avenues, including anti-trypanosomal screens of Kitasato natural products, The 13th International Congress on Infectious Diseases, Kuala Lumpur (Malaysia), 2008/6/19-22(発表22日)

Yamada H: Recent Studies on Structure and Intestinal Immunity Modulating Activities of Pectins and Pectic Polysaccharides from Medicinal Herbs, Pectin and Pectinase 2008 Symposium, Wageningen (The Netherlands), 2008/4/21-23(発表22日)

清原寛章, 松崎敏明, 山田陽城: 知母由来のパイエル板免疫機能調節グルコマンナの活性発現糖鎖の解析, 日本薬学会第128年会, 横浜, 2008/3/26-28

山田陽城(会長講演) 粘膜免疫系を介した和漢薬の作用メカニズム 第7回日本臨床中医薬学会(東京)2007.12.8(12.8)

Yamada H(招待講演) New strategy for elucidation of action mechanism and active ingredients of Kampo medicines 14th International Congress of Oriental Medicine(台湾)2007.12.1-4(12.2)

山田陽城(特別講演) 腸管免疫と和漢薬 第2回食品薬学シンポジウム(静岡)2007.10.18-19(10.19)

松本 司, 山田 陽城: 腸管免疫系に対する漢方薬の調節作用 第24回和漢医薬学会大会, シンポジウム2 和漢薬と生体防御(富山)2007.9.8-9(9.8)

清原寛章, 松崎敏明, 山田陽城: 知母由来のパイエル板免疫機能調節グルコマンナの活性発現糖鎖の解析 (poster) 日本薬学会第128年会(横浜)2008.3.26-28(3.26)

松本 司, 守屋美千代, 田淵圭章, 山田陽城: 柴胡のペクチン bupleuran 2IIc による腸上皮細胞からのG-CSF産生促進とその機序の解明 (poster) 第24回和漢医薬学会大会(富山)2007.9.8-9(9.8)

清原寛章, 松崎敏明, 松本 司, 山田陽城: 知母の腸管パイエル板免疫機能調節多糖の解析 (poster) 第24回和漢医薬学会大会(富山)2007.9.8-9(9.8)

清原寛章, 松崎敏明, 松本 司, 山田陽城: 天然植物素材からの新規パイエル板免疫機能調節多糖の探索 日本応用糖質科学会平成19年度大会(第56回)(神奈川)2007.8.29-31(8.29)

Matsumoto T, Moriya M, Kiyohara H,

- Tabuchi Y, Obinata M, Yamada H Hochuekkito, a Japanese herbal medicine, enhances G-CSF secretion of colonic epithelial cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI2007), Tokyo, 2007.7.9-12 (7.10)
- 21 Kiyohara H, Matsuzaki T, Matsumoto T, Nagai T, Yamada H Active carbohydrate structures and functions of the modulating polysaccharides on immunocompetent cells in Peyer's patches from plant origin 13th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI2007), Tokyo, 2007.7.9-12 (7.10)
- 22 清原寛章, 松本 司, 永井隆之, 山田陽城: 粘膜免疫系調節への応用を志向した漢方薬の腸管免疫系に対する作用と作用成分の解析, シンポジウム「21世紀の漢方薬研究を探る - 伝統薬から新しい治療戦略創出へのアプローチ」, 日本薬学会第127年会, 富山市, 2007/3/28-30
- 23 松崎敏明, 清原寛章, 松本 司, 山田陽城: 和漢薬由来の腸管パイエル板免疫機能調節多糖の活性発現糖鎖と作用の解析, 大学院生シンポジウム「糖鎖関連分子による細胞機能の制御とその応用」, 日本薬学会第127年会, 富山, 2007/3/28-30
- 24 守屋美千代, 松本 司, 清原寛章, 田淵圭章, 帯刀益夫, 山田陽城: 腸上皮細胞からのサイトカイン産生におよぼす補中益気湯の作用, 日本薬学会第127年会, 富山市, 2007/3/28-30
- 25 松本 司: 漢方基礎研究と臨床の視点から「腸上皮細胞株を用いた和漢薬の薬効発現機序の解析」, 第6回腸管機能と免疫研究会学術集会, 東京, 2007.1.27.
- 26 山田陽城: 漢方薬の免疫系, 内分泌系, 神経系に対する薬理作用の解析, 第6回日本臨床中医薬学会, 東京, 2006/11/25
- 27 松本 司, 清原寛章, 山田陽城: 腸管免疫系に対する漢方薬の作用, 第16回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 札幌市, 2006/11/16-17 (17日)
- 28 山田陽城: 和漢薬の粘膜免疫系を介した抗感染作用メカニズムの解析, 北里大学21世紀COEプログラム・富山大学21世紀COEプログラム ジョイント・シンポジウム, 東京, 2006.11.9.
- 29 清原寛章, 松崎敏明, 松本 司, 山田陽城: 食物繊維的糖へのパイエル板免疫機能調節作用賦与のための糖鎖構造情報に関する基盤研究, 日本食品免疫学会第2回学術大会, 東京, 2006. 10. 23-24 (23日)
- 30 山田陽城: 代替医療と東洋医学 - 科学的解明による evidence を求めて -, 第2回北里大学農医連携シンポジウム, 東京, 2006/10/13
- 31 清原寛章, 野中一樹, 永井隆之, 松本 司, 山田陽城: 補中益気湯の上気道粘膜免疫系作用成分の解析, 日本生薬学会第53回年会, 埼玉県・大宮, 2006/9/29-30 (29日)
- 32 山田陽城: 和漢薬由来多糖の構造と薬理活性, 北陸大学学術フロンティア・サテライトミーティング, 滋賀県大津市, 2006/9/13-14 (13日) (特別講演)
- 33 清原寛章: 和漢薬からの腸管パイエル板免疫機能調節多糖の探索とその活性発現糖鎖構造の解明, 北陸大学学術フロンティア・サテライトミーティング, 滋賀県大津市, 2006. 9/13-14 (13日) (一般講演)
- 34 守屋美千代, 松本 司, 清原寛章, 田淵圭章, 帯刀益夫, 山田陽城: 補中益気湯の腸上皮細胞を介した薬効発現メカニズムの解明, 第23回和漢医薬学会大会, 岐阜市, 2006/8/26-27 (26日)
- 35 松崎敏明, 清原寛章, 松本 司, 永井隆之, 山田陽城: 炙甘草の腸管免疫調節多糖の構造と作用の解析, 第23回和漢医薬学会大会, 岐阜市, 2006/8/26-27
- 36 松崎敏明, 清原寛章, 松本 司, 永井隆之, 山田陽城: 炙甘草の腸管免疫調節多糖の構造と作用の解析, 第23回和漢医薬学会大会, 岐阜市, 2006/8/26-27
- 37 野口昌朗, 松本 司, 清原寛章, 牧野公子, 花輪壽彦, 山田陽城: 粘膜免疫応答に及ぼす補中益気湯エキス作用, 第23回和漢医薬学会大会, 岐阜市, 2006/8/26-27 (27日)
- 38 H. Yamada: Structure and mechanism of action of plant cell wall polysaccharides having immunomodulating activity, Gordon Research Conference, Maine (U.S.A.), 2006/7/31- 8/3 (3日) (招待講演)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 司 (MATSUMOTO TSUKASA)

いわき明星大学・薬学部・准教授

研究者番号：00173906

(2)連携研究者

山田 陽城 (YAMADA HARUKI)

北里大学・北里生命科学研究所・教授

研究者番号：60096691

清原 寛章 (KIYOHARA HIROAKI)

北里大学・北里生命科学研究所・准教授

研究者番号：70161601