

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07474

研究課題名(和文) 消化管の免疫制御・抗炎症に最適な補中益気湯の生薬構成の探索

研究課題名(英文) Suitable combination of crude drugs in Hochuekkito for immune control and anti-inflammatory of the gastrointestinal tract

研究代表者

遠藤 真理 (ENDO, MARI)

北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員

研究者番号：60296829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Tリンパ球依存性の全身炎症には晋耆-蒼朮配合剤が、小腸粘膜炎症には晋耆-白朮配合剤が有効であることを明らかにした。また、白朮配合剤の晋耆を黄耆に変更してもその作用は変化しなかった。白朮配合剤の小腸粘膜炎症改善はアポトーシス誘導カスケードでのシグナル伝達経路の介入により起こっていると仮定し、本研究ではデス受容体としてのFas、TNF及びTNFスーパーファミリーの受容体、これらの活性化調節に關与する抑制性アダプター分子の観点からの作用機序と有効成分を解析した。その結果、白朮配合剤の小腸炎症改善作用の機序の一部にデス受容体の下流に位置するcaspase3経路の抑制が關与している可能性が想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補中益気湯の構成生薬中の耆は綿黄耆と晋黄耆、朮は白朮と蒼朮に置き換え可能で、臨床では組み合わせが異なる4種が同種の薬効を示す同名処方として取り扱われている。下気道粘膜免疫系の賦活化は蒼朮のみが有効であることが報告されており、消化器系の不調には古典や漢方医学的診断により白朮が優先使用されるもののその根拠となる基礎医学的な実証はなされていなかった。本研究成果は、白朮と蒼朮配合剤に適する病態の特徴とその作用機序および活性成分の一部の解明に至ったことで、臨床での病態ごとに異なる適切な配合剤を使い分けるための科学的根拠を提示することにつながり、患者の治療効果が増加することに寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We clarified hedysari radix and atracylodes lanceae rhizoma combined Hochuekkito ameliorate T lymphocyte dependent systemic inflammation and hedysari radix and atracylodes rhizoma combined Hochuekkito ameliorate intestinal mucosal inflammation. The effects of hedysari radix and atracylodes rhizoma combined Hochuekkito is same as formulation with hedysari radix replaced by astragalus radix. Anti-inflammatory action of atracylodes rhizoma combined Hochuekkito for intestinal mucosal inflammation may depend on inhibition of apoptosis through increasing regulatory adaptor molecules in villous caspase 3 cascade.

研究分野：漢方医学

キーワード：構成生薬の配合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補中益気湯処方には 10 種の植物性生薬から構成されているが、これらのうち 2 種の生薬（蒼朮と白朮、及び黄耆と晋耆）を入れ替えた 4 種の処方が薬事法で規定されており、漢方専門医においては患者の病態によりこれらの 4 種の処方が選択されて投薬されている。しかしながら、これらの 4 種の処方の厳密な臨床的な使い分けや科学的根拠はほとんど明らかとされてきていない。これまでに、補中益気湯は黄耆-蒼朮配合剤としての医療用エキス製剤を用いた比較臨床試験より、免疫賦活化効果として、免疫低下病態患者での MRSA 気道保菌、MRSA 尿症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者の呼吸器感染症罹患に対する予防・治療効果、並びに抗炎症効果として、抗がん剤投与による腸管粘膜炎症に基づく食欲不振、COPD 患者の全身慢性炎症病態に対する改善効果やアトピー性皮膚炎に対する改善効果といった、免疫増強と免疫制御の両面的な臨床効果を有することが示されてきている（日本東洋医学会・臨床試験構造抄録）。本背景から補中益気湯製剤は現代医療において使用頻度の高い漢方製剤の一つとなっているが〔厚生労働省平成 24-26 年度薬事工業生産動態統計〕一方、実際の臨床では黄耆-白朮配合剤、黄耆-蒼朮配合剤、晋耆-蒼朮配合剤や晋耆-白朮配合剤からなる煎剤並びに医療用エキス製剤が混在して使用され、専門医以外の医療現場ではあたかもこれらの異なる配合剤が同じ漢方薬として取り扱われている。これまでに本研究代表者が属する北里大学・東洋医学総合研究所・研究部門では黄耆-蒼朮配合剤としての黄耆-蒼朮配合剤の医療用漢方エキス製剤が加齢マウスに対する上気道粘膜免疫系賦活化作用および抗がん剤投与で惹起される小腸粘膜炎症に対する改善作用を示すことを明らかとし、本配合剤の呼吸器感染症罹患予防や抗がん剤での消化管粘膜炎症改善などの臨床効果の科学的根拠やメカニズムの一端を提示することに成功した〔eCAM, 3, 459-467 (2006) ; Trad. Kampo Med., 2, 81-88 (2015)〕。さらに最近、免疫抑制剤で処置したマウスの下気道粘膜免疫系に対する賦活化作用の比較解析から、蒼朮配合剤（黄耆-蒼朮及び晋耆-蒼朮配合剤）のみが肺粘膜免疫系に対する賦活化作用を示し、白朮配合剤（黄耆-白朮及び晋耆-白朮配合剤）は無効であることを見出した（第 34 回和漢医薬学会学術大会、2017）。以上の結果は、補中益気湯の蒼朮配合剤の作用のみを明らかにしたもので、漢方医学的診断や古典においては本処方の白朮配合剤が消化管の不調に有効性を示すと考えられているものの、本配合剤に適する病態はいかなるものであるかという疑問点にぶつかる。この解明は白朮配合剤の適切な臨床応用に極めて重要であることは明らかである。

2. 研究の目的

本研究では、T リンパ球介在性の小腸粘膜炎症モデルマウスを用い、補中益気湯の白朮配合剤（黄耆-白朮及び晋耆-白朮配合剤）と蒼朮配合剤（黄耆-蒼朮及び晋耆-蒼朮配合剤）の小腸粘膜障害改善作用を比較解析し、その作用の異同について明らかとするとともに、活性成分の観点から両配合剤の作用の違いを明らかとすることを目的とした。これまでに補中益気湯処方については多数の基礎研究が多く研究者により行われ、一部の免疫薬理作用や作用発現メカニズムについての報告はなされてはいるが、いずれの研究においても白朮と蒼朮配合剤の作用の違いをも含めた研究はまったく行われていない。臨床で投薬される薬剤の作用の違いが科学的に明確でない事態はいわば異常な状況であると思われる。さらに、これまでに蒼朮配合剤中の呼吸器粘膜免疫調節作用の発現成分の解析研究を行ってきており、蒼朮配合剤の作用は水溶性の中鎖オリゴ糖類、高分子多糖成分群並びに脂溶性低分子群の組み合わせ効果により発現すること（eCAM, 2011:492691 (2011) Epub; 日本生薬学会第 62 回年会要旨集、2015）中鎖オリゴ糖

類や高分子多糖成分群は吸収上皮からは吸収されず、小腸のリンパ濾胞装置であるパイエル板中の免疫細胞への調節作用を介するものであることを示唆してきている。本研究で用いた T リンパ球介在性の小腸粘膜炎症モデルマウスでは、抗 CD3 抗体の投与による T リンパ球の活性化に伴う小腸上皮細胞への攻撃型免疫系発動を対象としている。このため、補中益気湯処方への作用は、1) 小腸上皮細胞への直接作用、2) 腸管粘膜固有層のリンパ球やマクロファージなどへの直接作用に加え、3) パイエル板からの制御性リンパ球などの腸管への供給促進による間接作用、が関与すると想定される。補中益気湯の白朮配合剤は、その投与によりリンパ球を腸管に帰巢させる作用が蒼朮配合剤より強い可能性があることから、直接作用に加え、パイエル板リンパ球の小腸粘膜固有層への帰巢促進作用を介して発現させている可能性が考えられることから本メカニズムでの作用発現機構を検討した。また、作用成分の解析を行った。

3. 研究の方法

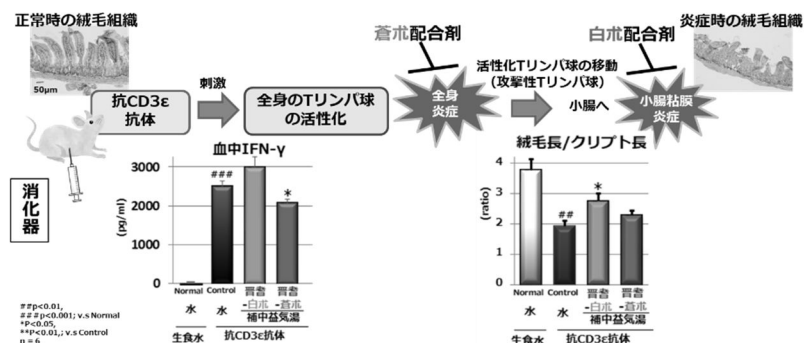
BALB/c マウス (雌性、7 週齢) マウスに抗 CD3 抗体 (50 µg / マウス) を単回で腹腔内投与することにより T リンパ球介在性小腸粘膜障害モデルマウスを作成した。本モデルマウスに抗 CD3 抗体投与 4 日 ~ 1 週間前 (予防的投与) から水 (Control 群) もしくは 4 種の補中益気湯エキス (1.5 g/kg、呼吸器粘膜免疫系に対する賦活化作用が認められた用量) を連日経口投与し、抗体投与 4 及び 24 時間後に採血、24 時間後に小腸 (空腸部位) を回収し実験に供した。活性成分の探索においては、各配合剤から分画した脂溶性低分子画分、オリゴ糖画分または主要活性成分を経口投与した。空腸組織について HE 染色及び Tunnel 染色を行い、絨毛長や陰窩厚の変化、粘膜筋層への細胞浸潤、アポトーシス細胞数についての比較解析を行った。また小腸組織での免疫関連因子群のトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

小腸粘膜炎症に対する白朮及び蒼朮配合剤の抗炎症作用の比較

北里大・東洋医学総合研究所の診療部の漢方専門医は通常補中益気湯の晋耆-白朮配合剤による治療を行っていることから、まず晋耆-白朮配合剤と晋耆-蒼朮配合剤の有効性の比較検討を行った。小腸粘膜炎症マーカーとして病理組織学的に小腸の絨毛長/クリプト長比とアポトーシス陽性細胞数を評価した結果、晋耆-白朮配合剤投与群では Control 群と比べ、絨毛長/クリプト長比の改善およびアポトーシス陽性細胞数の低下が有意に認められ、小腸粘膜炎症の改善が起こったと判断された。一方、晋耆-蒼朮配合剤ではこれらの改善効果は認められなかった。これに対し、抗 CD3 抗体投与では全身炎症として血中の炎症性サイトカイン量 (TNF- 及び IL-6) の顕著な増加が観察されるが、晋耆-白朮配合剤投与群では炎症性サイトカインの抑制効果は弱く、晋耆-蒼朮配合剤の投与で有意な TNF- 、 IL-6 の減少が認められた。

以上の結果から、小腸粘膜炎症改善作用を示す処方では白朮配合剤のみで、これまでの漢方医学での暗黙知が真実であることが確認された。

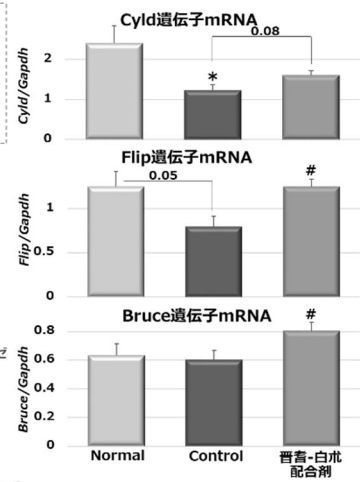
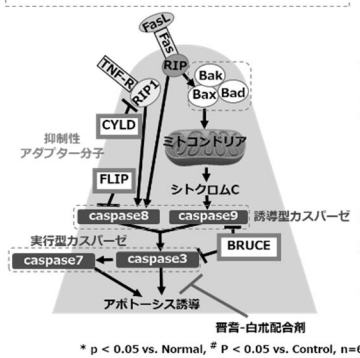


晋耆-白朮配合剤の

小腸粘膜炎症改善作用の作用メカニズムの解析と黄耆の配合意義の解析

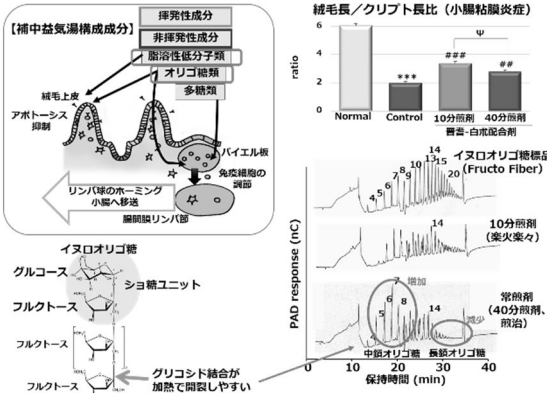
抗 CD3 抗体による小腸粘膜炎症には Fas-FasL による小腸上皮細胞のアポトーシスの関与が明らかになっていることから、アポトーシスカスケードでの抑制性のアダプター分子類に焦点を当て検討を行った。その結果、抗 CD3 抗体投与 12 時間後の小腸組織において caspase 類に対する抑制性アダプター分子の CYLD、FILP および BRUCE 遺伝子の mRNA 発現量が有意に増加し 24 時間後の小腸組織では cytochrome c 放出の抑制に關与する CDKN2A の有意な増加が觀察された。さらに、白朮配合剤での晋耆と黄耆の配合による作用の相違についても検討を行った結果、小腸粘膜炎症の改善作用では大きな相違は無かった。

Fas受容体などの下流にあるアポトーシス促進分子 (Bak, Bax, Bad)、アポトーシスに不可欠な誘導型 (8, 9) や実行型 (7, 3) の caspase 遺伝子mRNA発現は、晋耆-白朮配合剤により抑制されなかった。



作用成分の解析

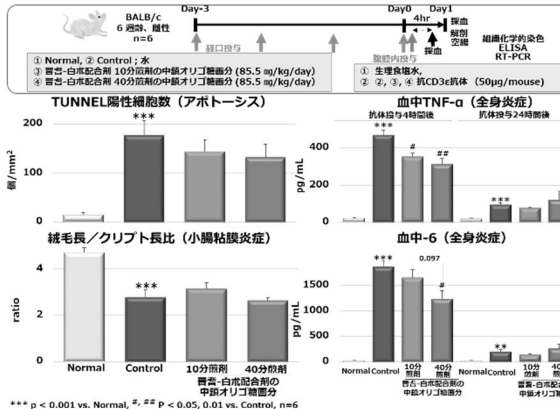
煎出時間延長による晋耆-白朮配合剤のオリゴ糖鎖長分布の変化



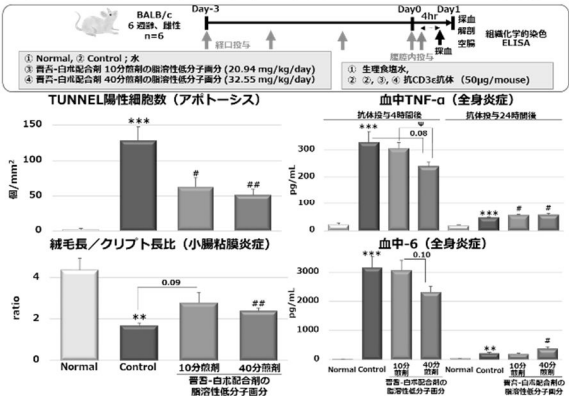
小腸粘膜炎症に対する白朮配合剤の改善作用は小腸上皮細胞を標的とした作用であることから、作用成分としては脂溶性低分子成分やオリゴ糖の関与が想定された。白朮配合補中益気湯に含有のイヌロオリゴ糖は煎出時間の延長で部分的にグリコシド結合が切断されることから、抗 CD3 抗体誘発小腸粘膜炎症に対する改善作用を煎出時間 10 分間および 40 分間で調製した白朮配合剤煎剤エキスで比較した結果、いずれの煎剤エキスも絨毛長/クリプト長比やアポトーシスを改善した。

これらの煎剤エキスから脂溶性低分子画分としての BuOH 可溶性画分とオリゴ糖画分を調製し、作用を比較した結果、小腸粘膜炎症改善作用は BuOH 可溶性画分のみに認められたが全身炎症改善作用はオリゴ糖画分のみに觀察された。

晋耆-白朮配合剤の中鎖オリゴ糖の小腸粘膜炎症・全身炎症に対する作用



晋耆-白朮配合剤の脂溶性低分子成分の小腸粘膜炎症・全身炎症に対する作用



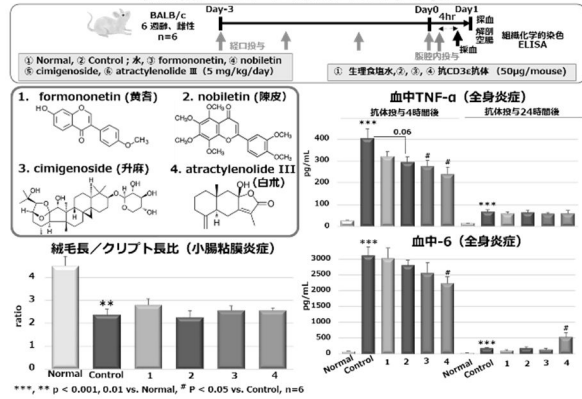
*** p < 0.001 vs. Normal, #, ## P < 0.05, 0.01 vs. Control, n=6

補中益気湯の含有脂溶性低分子成分 4 種 (formononetin、nobiletin、cimigenoside および atractylenolide III) について小腸粘膜炎症改善作用を評価したが、これらの成分に改善作用は見いだせなかった。

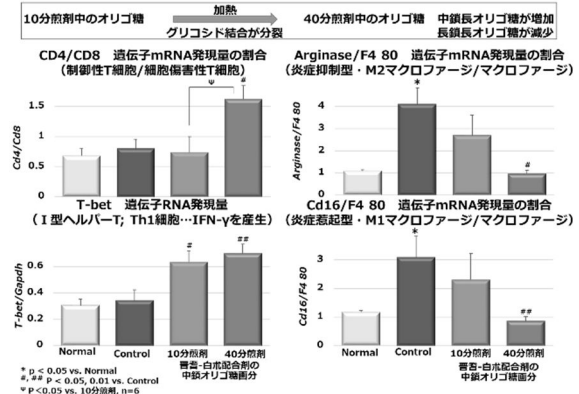
一方、10 および 40 分煎剤エキスから得たオリゴ糖画分投与マウスの小腸組織の解析から、10 分煎剤から得たオリゴ糖投与マウスで CD4/CD8 比が著明に上昇し、小腸組織での免疫微小環境の変化が起こっている可能性が推定された。また、10 および 40 分煎剤のオリゴ糖の鎖長分布の比較から、40 分煎剤では重合度 10 までの中鎖長オリゴ糖の割合が顕著に増加していることが明らかとなった。

以上の結果から、作用メカニズムには脂溶性低分子成分によるアポトーシスカスケードでの抑制アダプター分子の発現増強が関与することが強く示唆されたが、作用成分の特定には至らなかった。さらに、白朮配合補中益気湯の作用発現には白朮由来のイヌロオリゴ糖も関与することが推定され、その鎖長分布のコントロールが煎剤エキスの作用強度に影響を及ぼす可能性が考えられた。

晋膏-白朮配合剤の主要脂溶性低分子成分の 小腸粘膜炎症・全身炎症に対する作用



晋膏-白朮配合剤の中鎖長オリゴ糖の免疫微小環境に対する作用



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤真理、歌川詩織、清原寛章、小田口 浩、花輪壽彦
2. 発表標題 抗CD3抗体投与モデルマウスの免疫応答に対する白朮配合補中益気湯の晋耆・黄耆配合剤の作用の比較検討
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 歌川詩織、遠藤真理、小田口 浩、花輪壽彦、清原寛章
2. 発表標題 補中益気湯晋耆-白朮配合剤の小腸粘膜炎症に対する改善作用の機序の解明
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 歌川詩織、遠藤真理、清原寛章
2. 発表標題 Tリンパ球介在性全身及び小腸粘膜炎症モデルマウスを用いた漢方方剤「補中益気湯」の有効性の検討
3. 学会等名 第32回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤真理、歌川詩織、清原寛章、及川哲郎、小田口 浩、花輪壽彦
2. 発表標題 補中益気湯のT細胞依存性全身炎症及び小腸粘膜炎に対する改善作用 白朮または蒼朮配合剤の比較
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 歌川詩織、遠藤真理、清原寛章
2. 発表標題 Tリンパ球介在性全身及び小腸粘膜炎症モデルマウスを用いた漢方方剤「補中益気湯」の有効性の検討
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤真理
2. 発表標題 晋耆-白朮配合補中益気湯のTリンパ球介在性全身炎症及び小腸粘膜炎症モデルマウスに対する改善作用の検討
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	清原 寛章 (Kiyohara hiroaki) (70161601)	北里大学・感染制御科学府・教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------