

黄連解毒湯の免疫学的作用
およびその作用機序に関する研究

2007年

三 浦 尚 子

本論文では以下のような略名を用いた。

ANOVA	:	analysis of variance
cAMP	:	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
cGMP	:	cyclic guanosine 3',5'-monophosphate
CHX	:	cycloheximide
COX	:	cyclooxygenase
c.p.m.	:	count per minute
DEAE	:	diethylaminoethyl
DEX	:	dexamethasone
DNA	:	deoxyribonucleic acid
E/T	:	Effector/Target
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
EIA	:	enzyme immunoassay
EP	:	PGE2 receptor
FasL	:	Fas ligand
FBS	:	fetal bovine serum
FITC	:	fluorescein isothiocyanate
G ptotein	:	guanosine triphosphate-binding protein
H&E	:	Hematoxylin and Eosin
IEL	:	intraepithelial lymphocyte
IFN	:	interferon
IL	:	interleukin
IND	:	indomethacin
iNOS	:	indusible nitric oxide synthase
KGF	:	keratinocyte growth factor
LDH	:	lactate dehydrogenase
L-NMA	:	N ⁶ -monomethyl - L-arginine
LPMC	:	lamina proria mononuclear cells
LPS	:	lipopolysaccharide
MACS	:	magnetic cell sorting
MB	:	methylene blue
MLNC	:	mesenteric lymph node cells
mRNA	:	messenger ribonucleic acid
NO	:	nitric oxide
NOS	:	NO synthase

NOx	:	nitrate/nitrite (NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻)
NSAID	:	non-steroidal antiinflammatory drug
NT	:	non-treated
OGT	:	Orengedokuto
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	:	phosphate-buffered saline
PGE2	:	prostaglandin E2
PPL	:	Peyer's patch lymphocytes
RNA	:	ribonucleic acid
SD	:	standard deviation
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
SE	:	standard error
sGC	:	soluble guanylate cyclase
SPL	:	splenocytes
SST	:	Sanoshashinto
TCR	:	T cell receptor
TGF	:	transforming growth factor
TNF	:	tumor necrosis factor
TUNEL	:	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated doxy-uridine triphosphate nick-end labeling
VSMC	:	vascular smooth muscle cells

論文中の初出で括弧内に略名を示し、以後は略名を使用した。ただし、cAMP、CHX、CR、DEX、G protein、IND、KGF、LPMC、MB、MLNC、NT、OGT、PPL、SPL、SST、TGF、VSMC については図、テーブルにおいてのみ使用した。

目次

第一章 緒言

- 第1節 黄連解毒湯とは 1
- 第2節 研究内容概説 3

第二章 インドメタシン誘発小腸潰瘍に対する作用について

- 第1節 緒言 5
- 第2節 インドメタシン誘発個体死に対する黄連解毒湯の作用
の検討 7
- 第3節 腸傷害と下血に対する黄連解毒湯の作用 9
- 第4節 小腸粘膜の PGE2 に対する黄連解毒湯の作用 12
- 第5節 粘膜固有層の COX-2 の発現に対する作用 14
- 第6節 粘膜固有単核球からのサイトカイン産生などに対する
作用 17
- 第7節 黄連解毒湯中の有効成分の検索 18
- 第8節 考察 19

第三章 抗 CD3 抗体誘発小腸障害に対する作用の検討

- 第1節 緒言 24
- 第2節 抗 CD3 抗体誘発小腸障害の誘導 26
- 第3節 抗 CD3 抗体投与により誘導される小腸上皮細胞のアポ
トーシスにおける Fas/FasL 系の関与 29
- 第4節 抗 CD3 抗体投与で誘導される各種リンパ球の Fas/FasL
系を介したキラー活性 30
- 第5節 抗 CD3 抗体投与後の IEL, SPL の細胞表面抗原の発現の
変化 33
- 第6節 抗 CD3 抗体投与により誘導される小腸上皮細胞のアポ
トーシスにおける胸腺由来 T 細胞の関与 35
- 第7節 リンパ球移入によるヌードマウスの小腸上皮細胞アポ
トーシスの再構成 37
- 第8節 黄連解毒湯の作用の検討 39
- 第9節 考察 40

第四章 免疫担当細胞の副腎皮質ホルモン誘発アポトーシスに対す る作用の検討

第1節	緒言	44
第2節	マイクロアッセイ法の確立	46
第3節	黄連解毒湯による dexamethazone 誘発胸腺細胞アポトーシス阻害作用	47
第4節	オウレンのアポトーシス抑制作用物質の検索	49
第5節	DNA 断片化以外の手法によるオウレンのアポトーシス阻害作用の検索	51
第6節	抗癌剤誘発アポトーシスに対する作用	52
第7節	考察	53
第五章 各種細胞からの一酸化窒素産生に対する作用の検討		
第1節	緒言	56
第2節	LPS 刺激による RAW264 細胞からの NO 産生誘導に対する作用	58
第3節	RAW264 細胞の iNOS 遺伝子の転写に対する作用	60
第4節	サイトカイン刺激による McA-RH7777 細胞からの NO 産生誘導に対する作用	61
第5節	McA-RH7777 細胞の iNOS 遺伝子の転写に対する作用	64
第6節	血管平滑筋細胞からの iNOS 遺伝子の転写に対するオウゴンの作用	65
第7節	血管平滑筋細胞の細胞質 iNOS タンパク量に対するオウゴンの作用	66
第8節	血管平滑筋細胞の cGMP に対するオウゴンの作用	67
第9節	考察	68
第六章 総括		
		72
謝辞		76
実験の部		
第二章の実験		
1)	漢方方剤、試薬	77
2)	動物の処置	77
3)	形態学的検討	77
4)	便潜血と血中 NO/NO ₂ の定量	78
5)	小腸 PGE2 レベルと <i>ex vivo</i> での COX 阻害	78

6)	細胞の調整と培養	78
7)	統計解析	79
第三章の実験		
8)	動物と抗体	79
9)	病理標本の検索	79
10)	Fas を介したキラー活性の測定	80
11)	MACS による T 細胞および T 細胞の分離	81
12)	リンパ球移入実験	81
13)	黄連解毒湯の投与	81
14)	統計解析	82
第四章の実験		
15)	漢方方剤、生薬エキス、成分の調整と試薬	82
16)	細胞培養	82
17)	アポトーシスの誘導と DNA fragmentation の定量	83
18)	細胞生存率の測定	83
19)	DNA ゲル電気泳動	83
20)	電子顕微鏡による形態観察	84
第五章の実験		
21)	細胞の分離と培養	84
22)	漢方方剤と生薬エキスの調整	84
23)	NO 産生と細胞生存率の測定	84
24)	ノーザンブロット解析	85
25)	SDS-PAGE とウェスタンブロット解析	85
26)	免疫組織染色	85
27)	cGMP の測定	86
28)	統計解析	86
引用文献		87
主論文目録		104

第一章 緒言

第1節 黄連解毒湯とは

黄連解毒湯は全身の炎症と充血を伴う諸症状を治す漢方の基本処方である。古来より、体力がありのぼせ気味でいららする傾向の患者の、咯血・吐血・下血・脳溢血・高血圧・心悸亢進・ノイローゼ・皮膚掻痒症・胃炎等に用いられる。その効能効果は長年の臨床経験により、古典や各種の漢方解説書をもとに設定された。1976年に本格的に医療用漢方製剤が薬価収載され医療保険診療で用いられるようになったが、その前後から本処方に対しては様々な現代科学的検討が加えられている。前臨床試験、臨床試験を経て認可された薬剤ではないが、高血圧症や脳血管障害に対する大規模な二重盲検による再評価試験がすでに実施され、その効果が認められている¹⁾。

その一方で本処方の薬理作用や機序には未だ不明な点が多い。特に近年の疾患・病態の理解には個体としての病理・生理はもちろんだが、細胞レベル・分子レベル・遺伝子レベルでの理解が進んでいる。それに合わせ薬剤の薬効についても個体としての薬理作用を十分に説明しうる細胞レベル・分子レベル・遺伝子レベルでの理解が不可欠となる。いくつかの漢方処方についても細胞レベル・分子レベル・遺伝子レベルでの薬効解析が進みつつあるが、多成分系であることや経口摂取する漢方処方の特性により、なかなか理解が進んでいないのが現状である。例えば多成分であるがゆえに、そのうちの単一成分では処方としての薬理作用を十分に説明できるほどの薬効を持たないことがしばしばある。あるいは *in vitro* の試験で作用の認められたものでも *in vivo* での経口摂取では期待された薬効が認められないなどの問題もしばしば出現する。本処方についてもそれらの理解は未だ不十分であるといわざるを得ないのが現状である。

そこで本論文では、黄連解毒湯を *in vivo* 投与したときの薬効と細胞レベルでの作用機序を検討し、細胞特異性・成分特異性の見地より多様な免疫学的恒常性の維持という点について検証を行った。

Table 1 Constituent herbs of Ogrengedokuto

Constituent Herbs	Ratio	Latin	Main plant's name (Latin)	English Common Names
Oren	2	Coptidis Rhizome	Coptis japonica Makino	Japanese golden thread
Obaku	1.5	Phellodendri Cortex	Phellodendron amurense Ruprecht	Amur Cork tree
Ogon	3	Scutellariae Radix	Scutellaria baicalensis Georgi	Baikal Scull cap
Sanshishi	2	Gardeniae Fructus	Gardenia jasminoides Ellis	Cape-jasmine



Figure 1. Photographs of Constituent herbs of Ogrengedokuto

第2節 研究内容概説

本論文の第二章では黄連解毒湯の下部消化管への作用を明らかにする目的で、non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)潰瘍モデルであるインドメタシン誘発小腸障害に対する黄連解毒湯の作用について検討した。その結果、黄連解毒湯はインドメタシンによる個体死・潰瘍の発生・小腸粘膜 prostaglandin E2 (PGE2) の減少を抑制し、作用機序として粘膜の cyclooxygenase-2 (COX-2) の増加と interleukin 10 (IL-10) 産生の増加を介していることを明らかにした。IL-10 は粘膜の免疫学的恒常性維持におけるキー物質であり、この知見は非常に重要であると思われた。

第三章では免疫系の異常活性化による小腸障害モデルとして抗 CD3 抗体誘発小腸上皮アポトーシス (CD3 は T 細胞レセプターを構成する膜抗原鎖の 1 つ) についてその誘発メカニズムを検討した。その結果、本小腸障害モデルでは二相性の小腸上皮アポトーシスが誘導され、第一相では胸腺依存性小腸上皮間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte: IEL) の Fas Ligand (FasL) を介したキラー活性が、第二相では IEL のほか全身性のリンパ球の FasL を介したキラー活性が関与していることが認められた。この結果は小腸において障害を受けた上皮細胞を除去するための合理的で巧みなシステムが存在することを示している。本モデルを用い黄連解毒湯の作用を検討したが顕著な活性は認められず、このような T 細胞上の T cell receptor を直接刺激するような特異性が高いキラー活性誘導系に対しては有効でない可能性を示した。

第四章ではストレス誘発免疫低下に対する黄連解毒湯の作用を解明する目的で、ストレス物質の 1 つであるグルココルチコイド誘発胸腺細胞のアポトーシスに対する黄連解毒湯の作用を検討した。その結果、黄連解毒湯は dexamethasone 誘発胸腺細胞アポトーシスを抑制し、その作用は構成生薬であるオウレン、オウバクおよびそれらの成分である berberine にも認められた。これらは dexamethasone 誘発アポトーシスだけでなく、抗癌剤である etoposide, camptothecin 誘発アポトーシスに対しても認められた。すなわち黄連解毒湯は様々な *de novo* 合成を伴うアポトーシスを抑制することを明らかにした。

第五章では各種炎症時に誘導されまた血液循環調節作用が知られる一酸化窒素 (nitric oxide: NO) に着目し、黄連解毒湯が各種細胞からの NO 産生に対する効果を検討した。その結果、黄連解毒湯はマクロファージを lipopolysaccharide (LPS) 刺激し誘導される NO 産生を抑制し、また肝癌細胞をサイトカイン刺激したときの NO 産生も抑制する一方で、血管平滑筋の inducible NO synthase (iNOS) を誘導した。このように黄連解毒湯はマクロファージ系細胞と肝癌細胞で NO 産生を抑制し抗炎症的に作用する一方で、血管平滑筋細胞が

らの NO 産生を誘導して血管弛緩反応を示すことで虚血状態を改善する可能性が示され、細胞特異的な作用を明らかにした。

第六章では本論文および黄連解毒湯に関するその他の論文等の結果より、黄連解毒湯の作用の本質は多様な免疫学的反応の恒常性の維持であるとの仮説に立ち、下部消化管に対する黄連解毒湯の作用を様々な視点から考察し本仮説の検証を行った。また最後に、黄連解毒湯の薬効薬理作用とその古典的薬能について現代科学的な解釈を試みた。

第二章 インドメタシン誘発小腸潰瘍に対する作用について

第1節 緒言

近年、下部消化管粘膜障害はその重要性が再認識されてきている。潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患と総称される疾患群は、粘膜組織の潰瘍を伴う難治性の疾患である²⁾。日本での罹患率は近年急激に増加しており、たとえば潰瘍性大腸炎は平成14年には全国で約8万人の患者がおり、さらに毎年約5千人ずつ増加しているといわれ、またクローン病は平成16年に約2万3千人であり、毎年1,500人前後増加している。その多くが原因不明であるが、遺伝的因子と環境因子が複雑に絡み合って免疫系の異常反応が起こっていると考えられている。治療法としては外科的措置のほか、内科的措置として栄養療法、5-アミノサリチル酸製剤・ステロイド剤・免疫抑制剤といった薬物療法や、近年では抗 tumor necrosis factor (TNF) 抗体などの免疫療法も試みられている。しかしその効果は一時的であったり、重篤な副作用を発現したりするなど、未だ問題点が多い。

一方で非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID) と呼ばれる薬物群の副作用として消化管潰瘍が問題視されている³⁻⁹⁾。近年NSAIDを連用しているリウマチ患者の60~70%にクローン病に良く似た小腸潰瘍を生じることがわかってきた。NSAIDはcyclooxygenase (COX)を阻害し、prostaglandin E2 (PGE2)の産生を抑制する¹⁰⁾。COXには2つのアイソザイムが存在し (COX-1、COX-2)、胃腸潰瘍発生にはCOX-1阻害が悪化要因になると考えられ、COX-2の選択的阻害剤が開発されてきた。その結果胃潰瘍についてはある一定の予防効果を得られているが、近年発達してきたカプセル内視鏡やダブルバルーン内視鏡などの技術により、COX-2選択的阻害剤によっても長期投与などによる小腸潰瘍の発生を完全には抑制できていないことがわかってきた³⁾。このことは日本全国で約70万人いるといわれる慢性関節リウマチ患者をはじめとするNSAID服用患者にとって、小腸潰瘍をいかに抑えるかが治療のポイントの1つとなっていることを意味している。

小腸粘膜の恒常性の維持にはPGE2とinterleukin-10 (IL-10)がキーマediatorとなっている¹⁰⁻¹⁵⁾。PGE2は炎症時だけでなく、IL-10の生合成など様々なmediatorを介し胃腸粘膜の恒常性を維持し、食物抗原への免疫反応などを制御している。近年PGE2のレセプターについても詳細に解析され、PGE2の免疫学的意義の重要性が再認識されている¹⁶⁻¹⁸⁾。一方、先に述べたインドメタシンなどのNSAIDで誘発される腸炎では、消化管内に存在する各種抗原への免疫学的な寛容構築システムが崩壊しているとの報告がある¹⁹⁾。このように胃腸

粘膜の PGE2 をコントロールすることにより、潰瘍の発生や消化管免疫バランスの崩壊を抑制できる可能性がある。

ところで漢方処方の一つである黄連解毒湯は胃潰瘍や胃炎や下血に用いられる処方である。黄連解毒湯は実験動物で dextran sulfate sodium 誘発大腸炎モデルや trinitrobenzene sulphonic acid 誘発大腸炎モデルでも潰瘍を抑制することが報告されている²⁰⁻²²⁾。しかし小腸潰瘍に対する作用については報告がない。そこで NSAID の一つであるインドメタシン誘発小腸潰瘍モデルに対する黄連解毒湯の作用とそのメカニズムについて検討した。

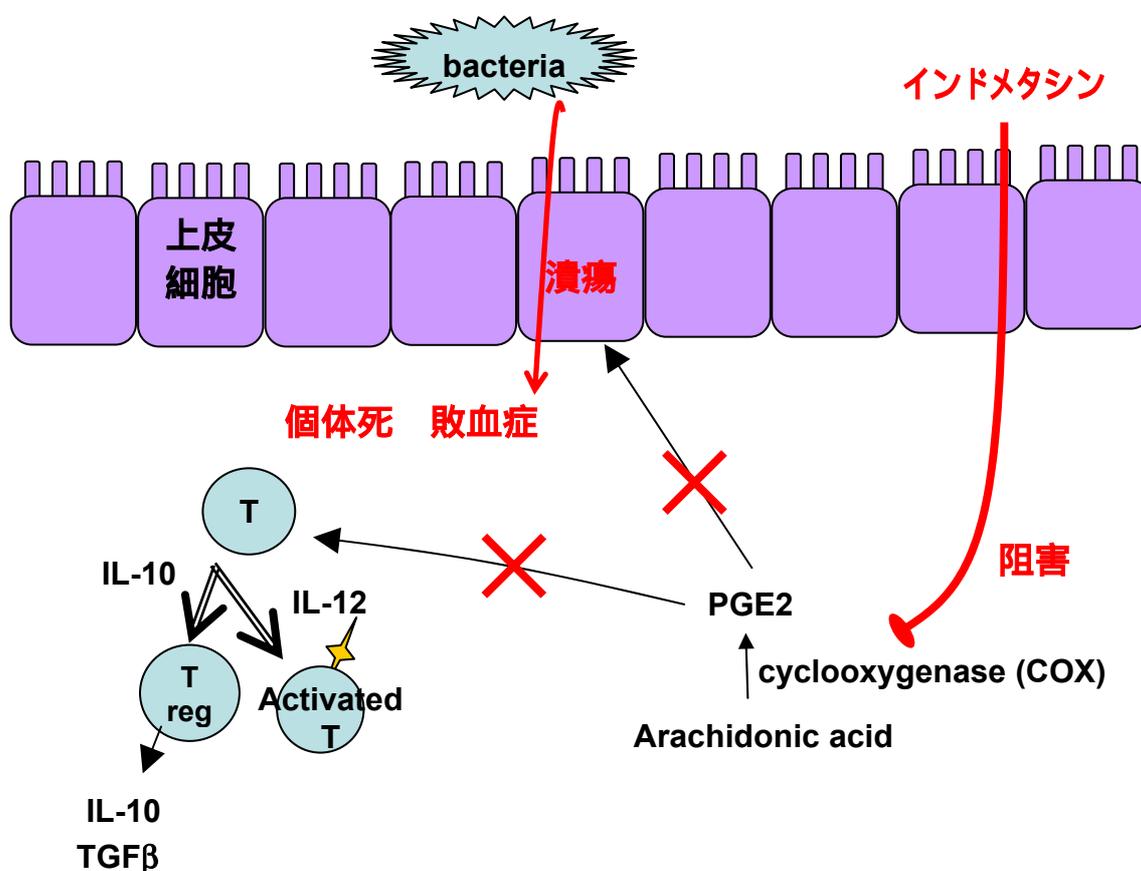


Figure 2-1. The hypothetical mechanisms of indomethacin-induced enteropathy TGF, transforming growth factor.

第2節 インドメタシン誘発個体死に対する黄連解毒湯の作用の検討

20 mg /kg のインドメタシンをマウスに1日1回、2日間、計2回皮下投与したところ、敗血症により死に至った。このとき黄連解毒湯の2% 混餌投与(2.8 g /kg に相当)で本モデルでの個体死を抑制でき、その後1ヶ月以上にわたり生存し続けた(Figure 2-2)。この黄連解毒湯の作用は投与量依存的に観察された。また、黄連解毒湯の投与期間を様々に変更しその作用を検討したところ、インドメタシンでの潰瘍発生の初期のみ投与した場合(day0-3)も試験全期間投与(day0-7)と同じように個体死を抑制することができた(Figure 2-3; 0.5%、1% 混餌でそれぞれ0.7 g /kg、1.5 g /kg)。また、インドメタシン投与前に黄連解毒湯を投与した場合も一部ながら個体死を抑制することができた(day7の黄連解毒湯非投与コントロールが70%致死率なのに対し30%致死率)。一方、

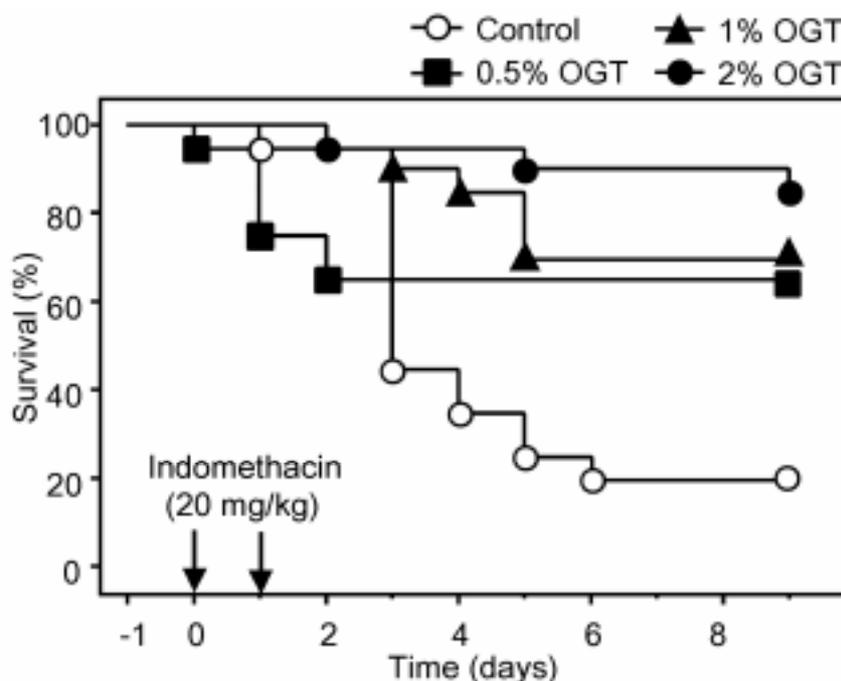


Figure 2-2. Effect of Oregedokuto (OGT) on indomethacin-mediated lethality. Animal survival was assessed after 2 injections of indomethacin (20 mg /kg), 24 hour apart, as described in Materials and Methods. OGT was administered by admixture in the diet during the examination period from the first injection of indomethacin (n = 20). OGT was administered in the food because it is an orally active drug, and intragastric administration has been found to be highly stressful, especially when mice are subjected to the first indomethacin injection. Survival curves were drawn using the Kaplan-Meier method. Statistically significant differences between the 2% OGT group and the control group identified by log-rank test ($P < 0.0001$).

インドメタシンによる潰瘍発生後期である day3-7 の期間に投与した場合には、黄連解毒湯は個体死を抑制できなかった。このことから、黄連解毒湯はインドメタシンによる初期の傷害発生について、抑制または阻害するものと考えられた。よって以降の実験では傷害発生初期(48-54 時間後まで)を中心に検討した。

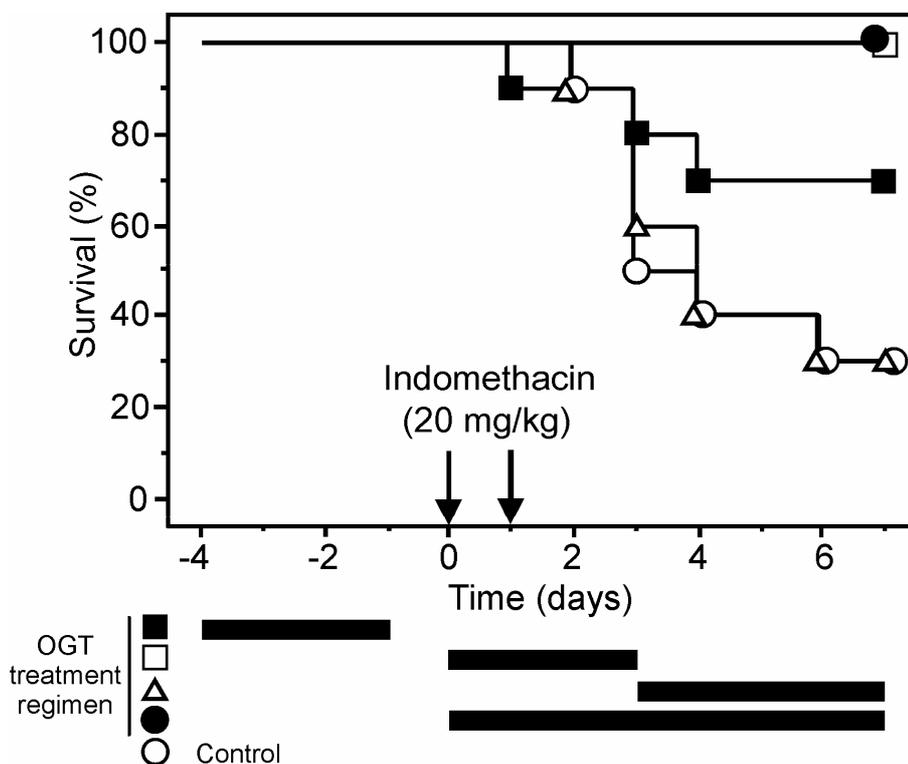


Figure 2-3. Survival in groups of mice under various OGT administration protocols. Mice were treated with varying regimens (pretreatment, co-treatment, and post-treatment) of 2 % OGT as shown. Two doses of indomethacin (20 mg /kg) were injected 24 hours apart as described in Materials and Methods (n = 10). Survival curves were drawn using the Kaplan-Meier method.

第3節 腸傷害と下血に対する黄連解毒湯の作用

次いで小腸潰瘍の病理学的検討を行った。インドメタシンを投与すると小腸に場合によっては筋層やさらにその下層にまで達するパンチであけた穴のような潰瘍が形成された (Figure 2-4)。残った絨毛も先端が傷害されているものがほとんどであった。個体によっては潰瘍が完全に貫通したり癒着したりしていた。黄連解毒湯の投与によりこれらのインドメタシンで誘発される小腸傷害が抑制され、潰瘍数、潰瘍面積が減少し、潰瘍悪性度が軽減していた (Figure 2-5)。貫通した潰瘍や腸の癒着も黄連解毒湯で改善していた。さらに盲腸内容物中の出血量はインドメタシンで著明に増加していたが、黄連解毒湯の投与で有意に抑制された (Figure 2-6)。またインドメタシンで血中の窒素酸化物 (nitrate/nitrite; NOx)濃度は増加し全身に炎症反応が誘起されていることが示唆されたが、黄連解毒湯で血中 NOx 濃度も減少していた (Figure 2-7)。

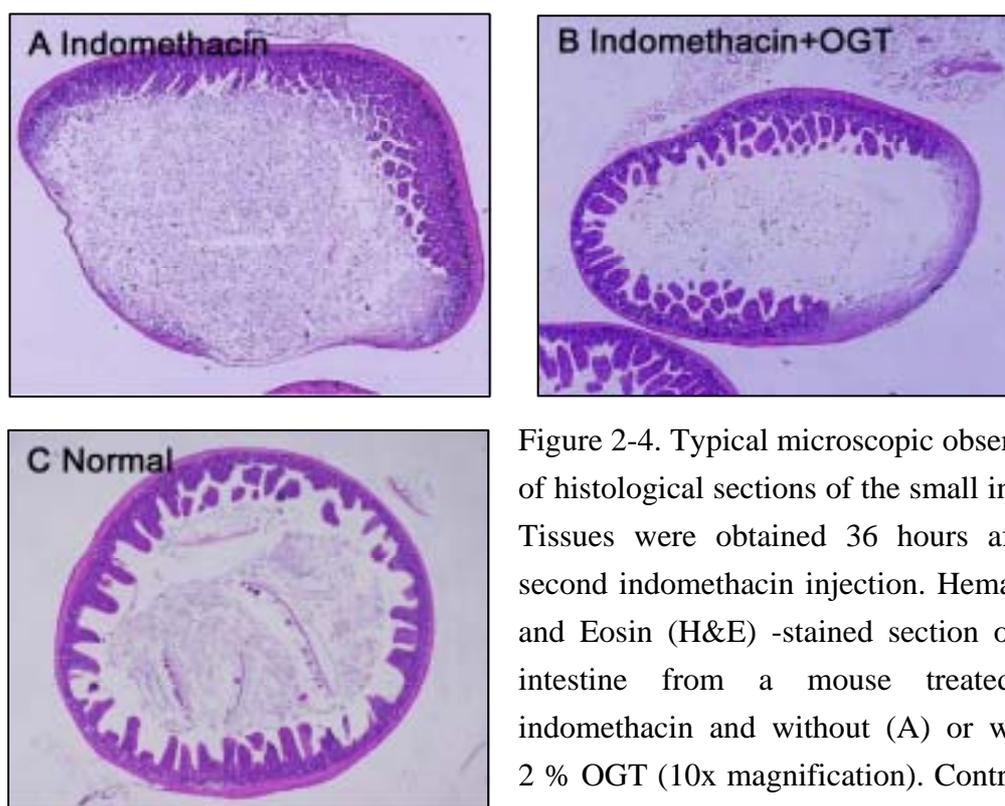


Figure 2-4. Typical microscopic observations of histological sections of the small intestine. Tissues were obtained 36 hours after the second indomethacin injection. Hematoxylin and Eosin (H&E) -stained section of small intestine from a mouse treated with indomethacin and without (A) or with (B) 2 % OGT (10x magnification). Control mice had atypical large and deep ulcerations. In the OGT-treated mice, tissue damage was milder and the muscularis propria was thicker than that in control mice. (C) Small intestine of a naive mouse which did not have any noticeable lesions.

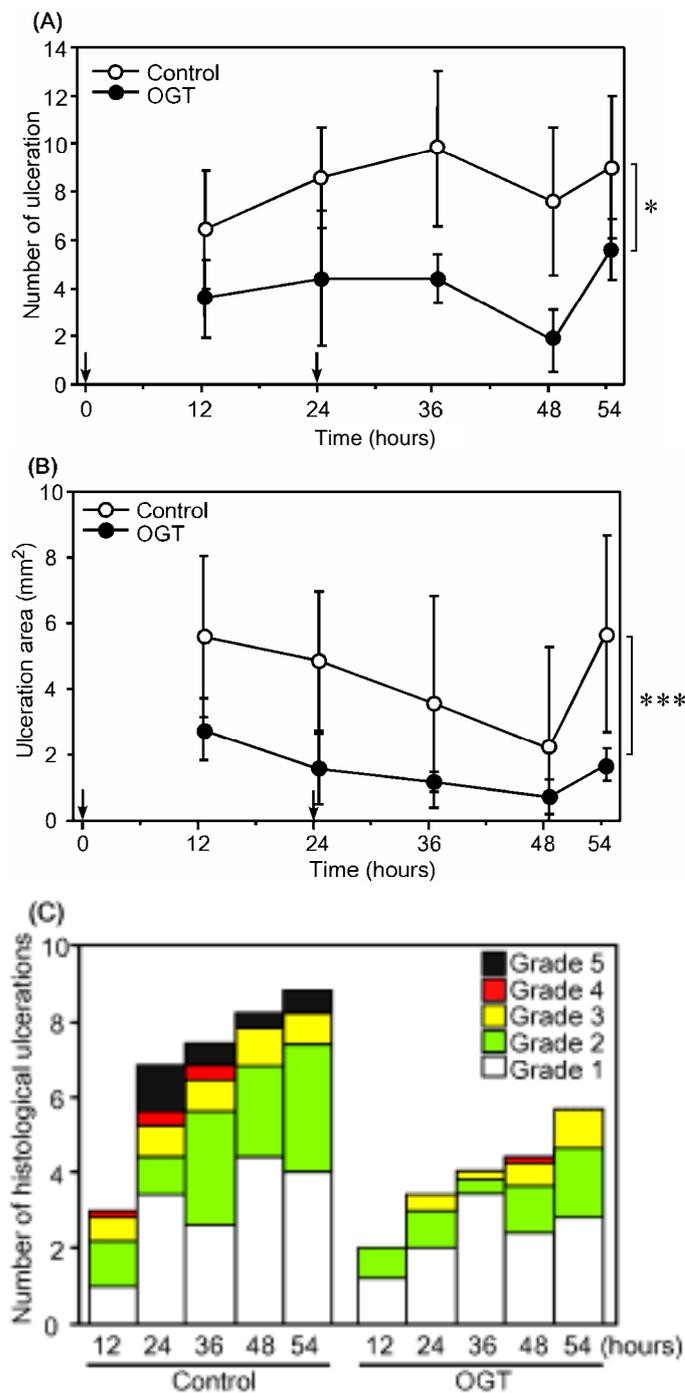


Figure 2-5. Effect of OGT on indomethacin-induced intestinal lesions. Indomethacin was injected to mice at 0 and 24 hours (arrows in graphs). Mice were killed 12, 24, 36, 48, or 54 hours after the first indomethacin injection. Morphological changes at hour 54 were almost the same as at hour 60 after the first indomethacin injection in Figure 2-4. The number (A) and areas (B) of ulceration in formalin-fixed tissues were calculated macroscopically. 2 % OGT significantly reduced the number and the sum of ulceration areas ($P < 0.05$, 0.0005 respectively). The mean \pm standard error (SE) is presented. C, the injury was calculated. Formalin-fixed intestine samples were stained with H&E and histologically visible ulcers between the pylorus and ileocecum were counted. Data for each grade shows the respective mean values for each group ($n = 5$). Two-way analysis of variance (ANOVA) with treatment and time as factors followed by Scheffe's post hoc analysis were used.

The intestinal damage was scored as follows: 1) disruption of the epithelial cells lining the villous tip; 2) disruption of the lamina propria; 3) depletion of lamina propria cells and denudation of muscularis mucosae; 4) damage localized to the submucosa; 5) damage localized to the muscularis mucosae and thinning or perforation of the intestinal wall.

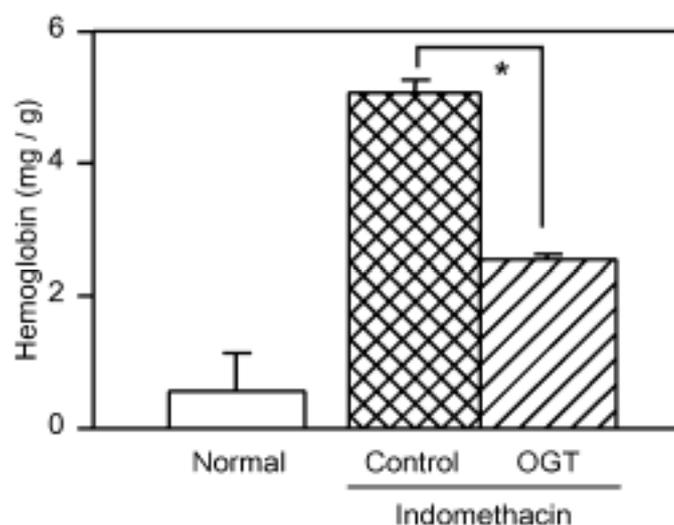


Figure 2-6. Effect of 2 % OGT on fecal hemoglobin in cecum. Whole stools in cecum were obtained from mice 48 hours after the first indomethacin injection. As a negative control, hemoglobin concentrations in stools from naive mice (normal group in the figure) were quantified. Data are expressed as mean \pm SE (n = 6). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. *Significant difference from control, P<0.05.

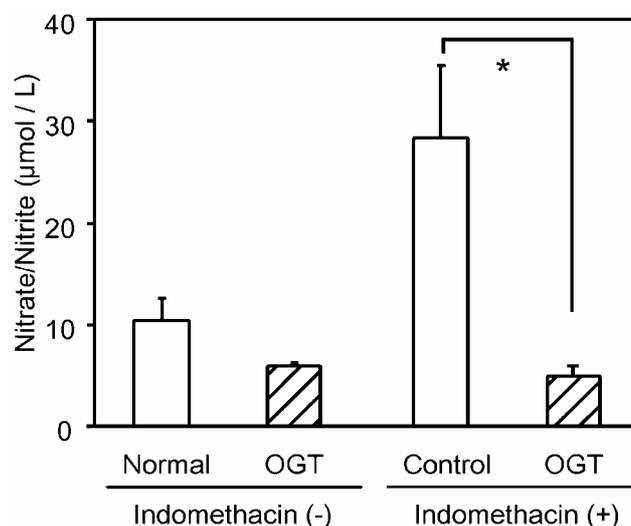


Figure 2-7. Effect of 2 % OGT on serum $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (NO_x) concentrations. Serum samples were obtained from mice 48 hours after the first indomethacin-injection. Indomethacin-untreated serum samples were obtained from mice that were re-fed for 48 hours after a 24-hour fast. Data are expressed as mean \pm SE (n = 6). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. *Significant difference from control, P<0.05.

第4節 小腸粘膜の PGE2 に対する黄連解毒湯の作用

PGE2 は COX により生合成され(Figure 2-8)、胃腸の恒常性維持の制御を担っている¹¹⁾。インドメタシン 2 回投与 24 時間後の粘膜と筋層の PGE2 量は無処置マウスに比べ顕著に減少していた (Table 2-1)。PGE2 の減少を経時的に検索したものを Figure 2-9 に示した。黄連解毒湯を投与すると、粘膜の PGE2 の減少を有意に抑制していた (Figure 2-9)。

さらに黄連解毒湯がインドメタシンの作用を阻害しているのではなく直接的に腸粘膜に作用していることを検討するため、インドメタシンを投与せずに黄連解毒湯のみをマウスに投与した。その結果、黄連解毒湯にはそれ自身で腸粘膜の PGE2 量を増加させる活性があることがわかった (Figure 8)。このとき、絨毛の短縮や陰窩の肥厚、潰瘍、炎症性細胞の浸潤などの変化は認められなかった (data not shown)。

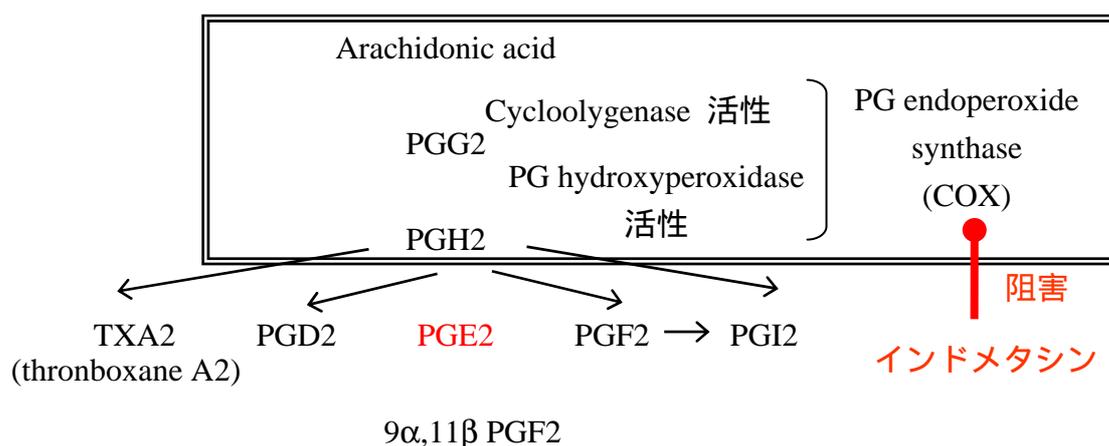


Figure 2-8. Biosynthesis of PGE2⁴³⁾

Table 2-1. Change of PGE2 levels in small intestine induced by 2 injections of indomethacin (20 mg /kg).

Treatment	mucosa ng /100 mg tissue	muscularis propria ng /100 mg tissue
None (n = 5)	35.5 ± 7.3	117.9 ± 31.4
Indomethacin (n = 5)	4.23 ± 0.96 #	14.9 ± 2.0 #

Small intestines were obtained 24 hours after the second indomethacin injection.
#P<0.05 vs. non-treated group.

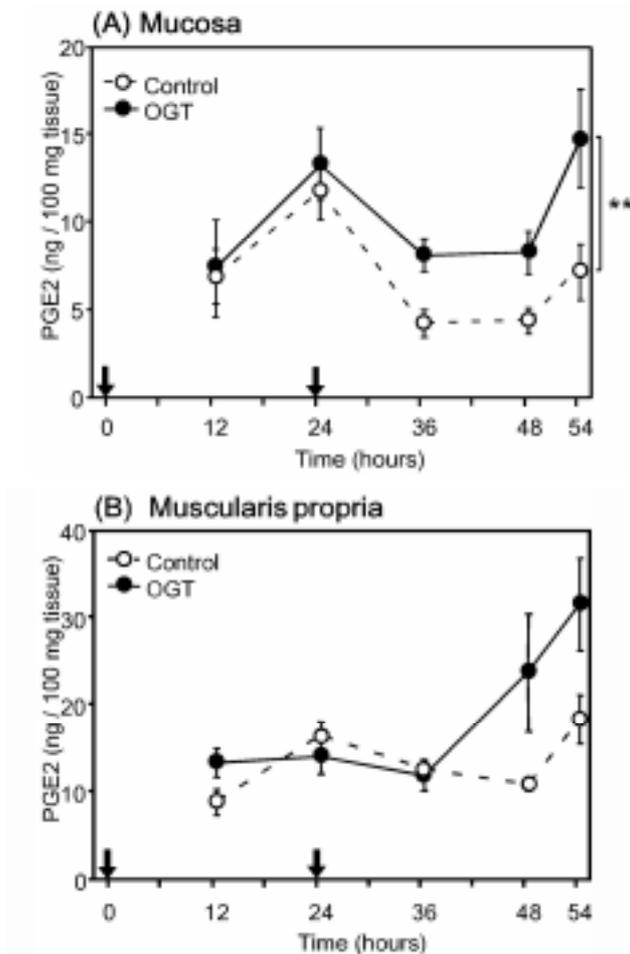


Figure 2-9. Effect of OGT on PGE2 levels in the intestinal mucosa (A) and muscularis propria (B) in indomethacin-injected mice. Indomethacin was injected at hour 0 and 24 (arrows in graphs). Mice were killed 12, 24, 36, 48, or 54 hours after the first indomethacin-injection. Mucosal PGE2 levels in the 2 % OGT-administered group differed significantly from the control group (** $P < 0.005$). $n = 5$ for each group except for the control group at 54 hours ($n = 4$). Data represent mean \pm SE. Two-way ANOVA with treatment and time as factors followed by Scheffe's post hoc analysis were used.

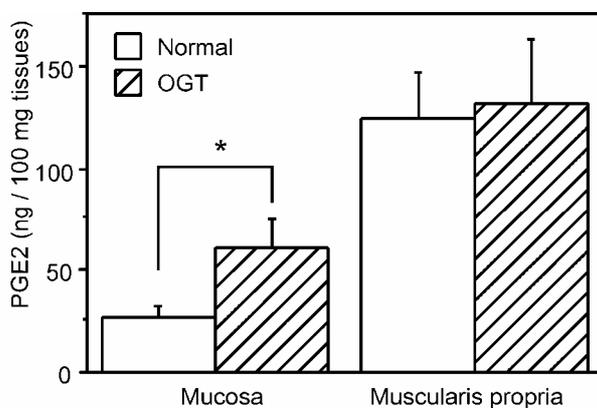
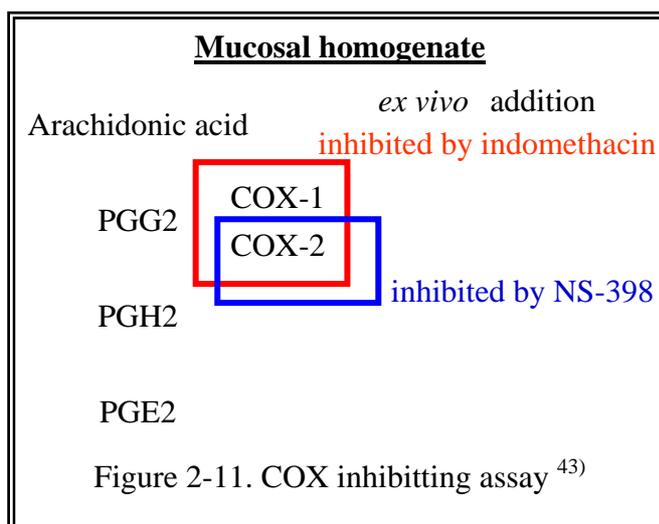


Figure 2-10. Effect of OGT on PGE2 levels in the intestinal mucosa of mice not treated with indomethacin. Intestinal tissue samples taken from mice were fasted for 24 hours and then re-fed the 2 % OGT-containing or normal diet for 48 hours without indomethacin-injection. PGE2 levels were significantly increased by OGT alone ($*P < 0.05$ vs. control). Data represent mean \pm SE ($n = 5$) from 1 of 3 replications. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test.

第5節 粘膜固有層の COX-2 の発現に対する作用

PGE2 は COX-1、COX-2 から生合成される (Figure 2-11)。そこで Figure 2-10 に認められた黄連解毒湯による粘膜 PGE2 の増加がどちらの COX に由来するのかを確認するため、黄連解毒湯投与・非投与の腸粘膜ホモジネートの PGE2 測定系に COX のアイソザイム特異的または非特異的阻害剤を *ex vivo* で添加し、生成される PGE2 量の増減を検討した (Figure 2-11)。

本章で用いている PGE2 測定系では腸摘出時に存在した PGE2 のほか、そのときに存在した PGE2 の前駆体、すなわちアラキドン酸、PGG2、PGH2 を、腸に存在する COX によって *ex vivo* で PGE2 に転換し測定する。すなわちこれまで測定してきた PGE2 量は PGE2 そのものとそのとき存在した前駆体類の両方の量をあわせたものである。この PGE2 測定系は複雑であるが、PGE2 は腸摘出などの操作の過程でアラキドン酸から素早く生成されてしまうため、PGE2 と前駆体類をあわせた量を PGE2 生成能とみなしてその高低を評価してきた。この PGE2 測定系は腸内に存在する COX をそのまま用いている。そこでこの反応系に COX アイソザイム特異的な阻害剤を添加することにより、腸摘出時点での PGE2 はそのまま測定される一方でプレカーサー類から PGE2 への生成が阻害され、その腸に存在する COX が COX-1 優位なのか COX-2 優位なのかを知ることができる。



インドメタシンは COX-1/COX-2 両方のインヒビターで、これを測定系に添加すると黄連解毒湯の投与により増加したはずの PGE2 量が減少していた (Figure 2-12)。COX-2 の選択的阻害剤である NS-398 を添加してもインドメタシン同様に PGE2 が減少しており、アラキドン酸から PGE2 への転換が阻害されたと想像された。すなわち、黄連解毒湯の投与により COX-2 が誘導された可能性が示された。

このように COX-2 が黄連解毒湯の投与で誘導された可能性があるため、小腸組織内の COX-2 陽性細胞について検討した。COX-2 陽性細胞は小腸粘膜固有層に存在していたが、インドメタシンの投与により陽性細胞数は減少した (Figure 2-13、2-14)。黄連解毒湯を投与するとインドメタシン投与 12 時間後の COX-2

陽性細胞数の減少を有意に抑制することができた。

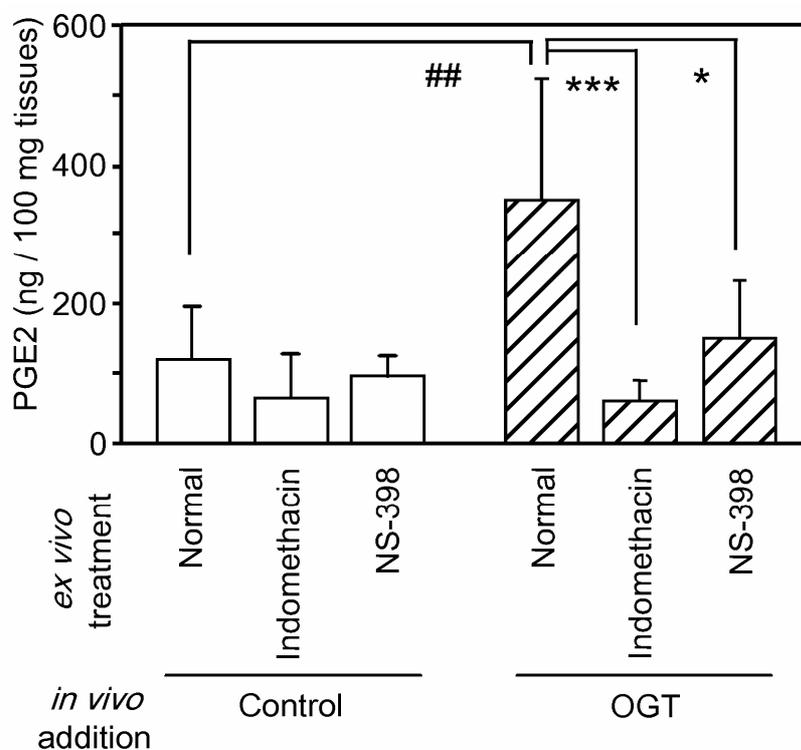


Figure 2-12. Influence of COX inhibition on PGE2 production in tissue homogenates of the intestinal mucosa. Mice were fasted for 24 hours and then re-fed the 2 % OGT-containing or normal diet for 48 hours without indomethacin-injection. PGE2 levels were significantly increased by OGT but when indomethacin or NS-398 was mixed with the tissue homogenate, it was inhibited significantly. Data represent mean \pm SE (n = 6). Two-way ANOVA followed by Scheffe's post hoc analysis were used. ##P<0.005 vs. the reaction mixture without COX inhibitor obtained from normal mice, *P<0.05, ***<0.0005 vs. the reaction mixture without COX inhibitor obtained from OGT-treated mice.

Figure 2-13. Localization of COX-2 expressing cells. Positive cells were stained brown immunohistochemically. COX-2 expressing cells (arrow) of the small intestine obtained from naive mice were mainly seen in lamina propria. In accordance with previous studies²³⁾ COX-1 expressing cells were found throughout the small intestine, rarely in the villus, diffusely in the lamina propria, and ubiquitously in intestinal smooth muscle (data not shown). Original magnification; 100x.

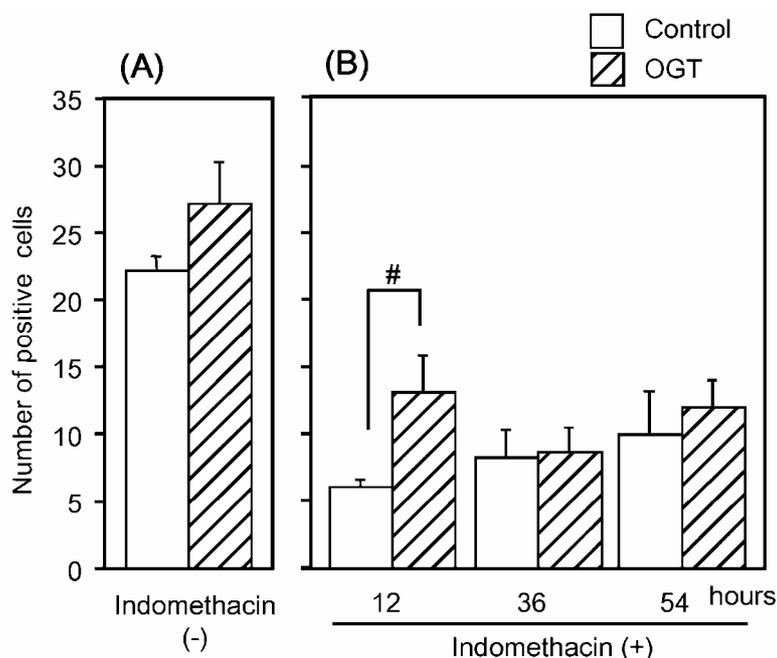
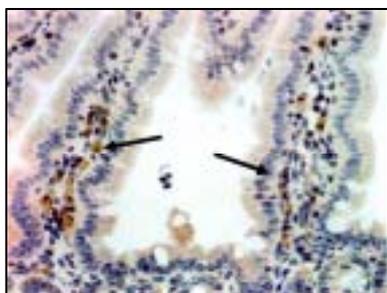
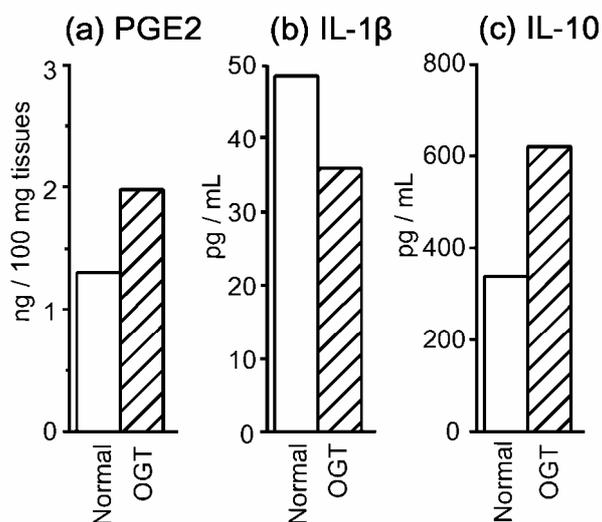


Figure 2-14. OGT prevented the degradation of COX-2 expressing cells in the lamina propria by indomethacin. Indomethacin was injected to mice at hour 0 and 24. Tissues from mice killed 12, 36, or 54 hours after the first indomethacin-injection were used for immunostaining of COX-2. COX-2 expressing cells were counted in 5 random high-power fields per mouse (200x magnification). Indomethacin treatment decreased the number of COX-2 expressing cells in LPMC. 2 % OGT administration significantly inhibited the decrease in the number of COX-2 expressing cells as compared with the control group at 12 hours after indomethacin-treatment. Data represent mean \pm SE (n = 5). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. #P<0.05 vs. control mice at 12 hours after indomethacin treatment.

第6節 粘膜固有単核球からのサイトカイン産生などに対する作用

次いで黄連解毒湯が小腸粘膜固有層単核球からの PGE2 産生及びサイトカイン産生に与える影響を検討した。粘膜固有層は PGE2 産生の主な場となっており、その結果粘膜免疫の恒常性維持のキーサイトカインである IL-10 産生を誘導するといわれる^{14, 15, 23, 24})。インドメタシンの投与により、PGE2 産生と IL-10 産生が低下し、逆に IL-1 の産生が増加した。黄連解毒湯はこれらの変化を抑制した (Figure 2-15B)。また、インドメタシンを投与しないときでも黄連解毒湯は PGE2 産生と IL-10 産生を増加し、IL-1 の産生を抑制していた (Figure 2-15A) ことから、黄連解毒湯の作用はインドメタシンの作用を阻害した結果ではないと推察された。

(A) Indomethacin (-)



(B) Indomethacin (+)

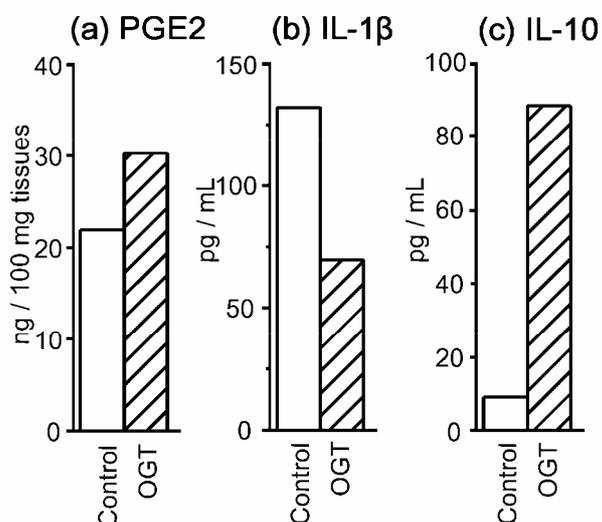


Figure 2-15. 2 % OGT modulated immunological properties in lamina propria mononuclear cells (LPMC). (A) Mice were fasted for 24 hours and then re-fed the OGT-containing or normal diet for 48 hours without indomethacin-injection.

Percoll-fractionated LPMC were cultured for 24 hours without OGT or any stimuli. Cells were collected from 3 mice, and the data represent 1 of 2 replications. (B) Small intestines were obtained from mice 48 hours after the first injection of indomethacin. Semi-purified LPMC (the filtrate from a glass wool column without Percoll fractionation) were collected from 3 mice and cultured for 24 hours without OGT or any stimuli. Data represent 1 of 2 replications. Differences in the levels of mediators between (A) and (B) were due to differences in cell preparation procedures.

第7節 黄連解毒湯中の有効成分の検索

最後に黄連解毒湯中の有効成分の検索を行った。黄連解毒湯はオウレン、オウバク、オウゴン、サンシシの4つの構成生薬よりなる。20 mg /kg のインドメタシンをマウスに1日1回、2日間、計2回皮下投与で誘発される個体死に対し、これらの生薬を各2%混餌投与した。その結果、オウレン、オウバク、オウゴンに個体死抑制作用が認められた (Table 2-2)。また、主な含有成分の一つである berberine (オウレン、オウバクに含有) を0.07%混餌投与でも同様に個体死を抑制できた (インドメタシン投与コントロールで生存率0%に対し、40%; n = 10)。

Table 2-2. The effect of the constituent herbs on survival rate

Constituent herbs (2 % in diet)	Survival rate at day 9 (%) (n = 10)
Normal (none)	40
Oren	90
Obaku	70
Ogon	60
Sanshishi	30

第 8 節 考察

本章では NSAID 誘発腸炎に対する黄連解毒湯の効果を検討した。黄連解毒湯はインドメタシンで誘発される腸炎を抑制するのみならず、個体死をも抑制することができた (Figure 2-2)。インドメタシン 20 mg /kg を 1 日 1 回 2 日投与することにより腸に出血性の病変を誘導し、小腸粘膜の PGE2 量を減少させ、9 日目には 80 % のマウスが死んでいた。多くの薬剤が本モデルと類似のモデルで効果があると報告されているが、そのほとんどがよりマイルドで致死率も軽度なモデルでの検討である^{16, 25-30)}。知る限りにおいて本章と同じシビアなモデルで黄連解毒湯と同様の効果が認められたのは glucagon-like peptide 2 のみである³¹⁾。

小腸 PGE2 量に対する黄連解毒湯の効果を検討したところ、黄連解毒湯はインドメタシン投与の有無に関わらず粘膜 PGE2 量を増加し粘膜固有層単核球からの PGE2 産生を増加した (Figure 2-9, 2-10, 2-15)。これらの事実は以下の現象を十分に説明できる。すなわち、(1)黄連解毒湯は前投与や同時投与では効果があったが後投与では効果がなかった (Figure 2-3)。(2)黄連解毒湯は経時的な潰瘍の悪化を抑制する可能性がある (Figure 2-5C)。(3)インドメタシンによる PGE2 減少からの回復を早めている可能性がある (Figure 2-9A)。インドメタシンの投与により PGE2 量は極端に減少し、黄連解毒湯で回復できる PGE2 量はわずかな量である。しかし、そのわずかな量で粘膜傷害を抑制できる可能性がある。すなわち Bertrandらの報告によると³²⁾3 mg /kg のインドメタシン投与では潰瘍は発生しないが、腸粘膜の PGE2 は通常約 34 ng /100 mg tissue のところ 14 ng /100 mg tissue まで減少している。ところがインドメタシンを高用量(10 mg /kg 以上)投与すると潰瘍が発生し、このときの粘膜 PGE2 は 11 ng /100 mg tissue 以下であった。つまり 11 ng /100 mg tissue では潰瘍が発生し、14 ng /100 mg tissue では潰瘍は発生せず、その差はわずかであった。本章での系と彼らの系では動物の種類 (マウスとラット) や PGE2 測定法が異なるためこの点についてはさらに検討が必要であるが、本章では黄連解毒湯はインドメタシン投与時の 2 倍の PGE2 量まで回復させていることから、十分に粘膜保護的に作用できるのではないかと考えられる。さらに黄連解毒湯は粘膜固有層単核球からの IL-10 産生も増加させ、IL-1 を減少させた (Figure 2-15)。IL-10 は小腸粘膜においては抗炎症的に作用し免疫学的恒常性維持作用を持ち、例えば IL-10 欠損マウスは炎症性腸疾患様の症状を示すことが知られている³³⁾。Newberryらによれば PGE2 は炎症性サイトカインの阻害や T 細胞の活性化を抑制するなどの機序により、T 細胞系の反応を抑制する方向へ導く可能性があるという^{14, 24)}。黄連解毒湯はそれゆえ PGE2 を介し T 細胞系の反応を制御している可能性がある。

本章では黄連解毒湯が粘膜固有層の COX-2 陽性細胞の減少を抑制することにより粘膜 PGE2 の減少を抑制できた。黄連解毒湯が COX-2 陽性細胞の減少を抑制した機序として次の仮説が考えられる。(1) インドメタシンによる COX-2 陽性細胞のアポトーシスを黄連解毒湯が直接抑制した可能性がある。インドメタシンがいくつかの細胞でアポトーシスを誘導し細胞増殖を阻害することが知られている^{34, 35)}。また第四章で述べるが、黄連解毒湯は dexamethasone 誘発胸腺細胞アポトーシスを抑制した。よって、黄連解毒湯がインドメタシン誘発アポトーシスにも抑制作用を示すのかもしれない。(2) 黄連解毒湯が COX-2 陽性細胞の粘膜固有層への遊走を誘導している可能性がある。黄連解毒湯はインドメタシン非投与でも粘膜 PGE2 量を有意に増加し、粘膜固有層の COX-2 陽性細胞数を増加させる傾向にあった (Figure 2-10、2-14)。食物や腸内細菌などの消化管内容物は粘膜固有層の樹状細胞の分布に影響を与えることはよく知られている。樹状細胞は樹状突起を消化管内に曝して消化管内の抗原を直接認識したり、M 細胞に取り込まれ提示された抗原を間接的に認識したりする^{36, 37)}。それゆえ黄連解毒湯やその代謝物が樹状細胞により認識され、粘膜固有層単核球の分布に影響を与えている可能性がある。さらに、黄連解毒湯とその含有成分は細菌の増殖やエンテロトキシン産生に影響を与えることが知られている^{38, 39)}。黄連解毒湯により腸内細菌群が変化し、その結果粘膜固有層の COX-2 陽性細胞が遊走された可能性がある。(3) 黄連解毒湯が直接的あるいは間接的に COX-2 messenger ribonucleic acid (mRNA) や COX-2 タンパクを誘導している可能性がある。しかしこの根拠は今のところ不明である。いずれにせよこれらの仮説については更なる詳細な検討が必要である。

一方、COX-2 陽性細胞数に有意差が認められたのはインドメタシン投与 12 時間後であったが、粘膜 PGE2 量の差として明らかに黄連解毒湯の効果が認められたのはインドメタシン投与 36 時間以降だった (Figure 2-9, 2-14)。この矛盾点の理由は不明である。インドメタシン投与 12 時間後というタイミングは消化管内にインドメタシンが相当量残存していると考えられるため、粘膜 PGE2 量としては反映されていないのかもしれない。また、実は COX-2 陽性細胞の数と PGE2 量増加には直接的な関係がない可能性がある。例えば COX-2 陽性細胞数ではなく、細胞 1 個あたりの発現量の増加や活性の増加によるのかもしれない。もしくは、PGE2 の分解の抑制も可能性としては考えられるであろう。いずれにせよこの点は今後の検討課題である。

ところで、黄連解毒湯は azoxymethane 誘発マウス異常腺窩の生成を顕著に抑制することが知られている⁴⁰⁾。これは黄連解毒湯の主な成分のひとつ、berberine の COX-2 活性阻害作用・COX-2 転写阻害作用によるものであらうと考えられる⁴⁰⁻⁴²⁾。COX-2 は大腸の癌化においては決定的因子であり、COX-2 阻害剤

は臨床でも実験モデルでも大腸癌に対し有効である。さらに、黄連解毒湯は trinitrobenzene sulphonic acid 誘発大腸炎モデルでの血中 PGE2 量を抑制することが知られている²²⁾。これらの知見は黄連解毒湯が NSAID 様の因子となりうることを示している。しかし本章で示したように、黄連解毒湯は NSAID 誘発小腸潰瘍を悪化せず、逆に小腸潰瘍治癒効果が認められ、また粘膜 PGE2 の産生を増加した。この矛盾の理由は不明だが、次のように考えることもできる。すなわち、悪性化の過程 (colorectal adenomatous polyps や carcinoma) や悪性の炎症 (trinitrobenzene sulphonic acid 誘発大腸炎) で、大腸癌や炎症での顕著な COX-2 発現と PGE2 産生が認められるのは上皮系の細胞である。このような条件では黄連解毒湯とその成分は上皮細胞に直接作用し COX-2 阻害作用を示すのではないだろうか。一方、黄連解毒湯の COX-2 誘導と PGE2 産生増加作用は上皮細胞の下の粘膜固有層に局限した作用である可能性がある。通常、腸粘膜では粘膜固有層が PGE2 産生の主な場であるとされる²⁴⁾。本章でも粘膜固有層単核球からの PGE2 産生を検討したが、このとき上皮細胞はほとんど除去されていた (data not shown)。このように細胞のタイプが異なるために黄連解毒湯の反応が違ってくるのかもしれない。さらに、黄連解毒湯中に含まれる異なる成分がそれぞれのタイプの細胞にそれぞれ異なる作用を示すことも考えられる。このように異なるタイプの細胞 (上皮系と白血球系) が存在する小腸粘膜の免疫状態によって、黄連解毒湯が PGE2 産生に関して逆の作用を示すということが、PGE2 産生のコントロールには有利なのではないだろうか。

近年、PG 類の受容体が多数構造決定され、PGE2 にも 4 種のレセプター (EP1 ~ 4) が見つかっている⁴³⁾。それぞれのシグナル伝達系の解析により異なった経路を持つことがわかっており、またノックアウトマウスの解析などにより病態や疾患との関連も明らかとなりつつある (Table 2-3)。例えば先のパラグラフで azoxymethane 誘発マウス異常腺窩に黄連解毒湯が抑制効果を示したことを述べたが⁴⁰⁾、azoxymethane 誘発マウス異常腺窩では EP1 を介したシグナルにより病変が誘導されるといわれている⁴⁴⁾。一方インドメタシン誘発小腸潰瘍には EP3、EP4 が関与しているとの報告がある¹⁶⁻¹⁸⁾。本研究では受容体に関する検討は行っていないが、これまで述べたように黄連解毒湯により増加する PGE2 量が少量であっても潰瘍発生抑制効果を示すことや、黄連解毒湯が細胞特異的に逆の作用を示す可能性があるということから、本章で認められた作用は潰瘍抑制に関与する細胞特異的な受容体を介して発現している可能性もある。この点は今後の検討課題である。

以上のように、黄連解毒湯が PGE2 量を制御することによりインドメタシン誘発小腸潰瘍を抑制することが明らかとなった (Figure 2-16) が、黄連解毒湯にはそのほかにも腸炎抑制に有利な作用が知られている。まず、インドメタシン

誘発腸炎発症時にはバクテリアの侵襲が主な病因の一つであり^{45, 46)}、黄連解毒湯とその主な成分である berberine には抗菌作用が知られている^{38, 39)}。2番目に、NOx もまた腸炎発症の主な病因の一つであり、iNOS はインドメタシン誘発小腸潰瘍での微小循環傷害の発現に密接に関与している^{29, 30, 47, 48)}。本章でも黄連解毒湯が血清 NOx 濃度を抑制したが、第五章で述べるように黄連解毒湯は LPS 刺激マクロファージ系細胞の iNOS の誘導を抑制する。3番目に黄連解毒湯には微小循環への作用が知られており、それが黄連解毒湯の抗腸炎作用機序の1つなのかもしれない⁴⁹⁾。これは第五章で述べる血管平滑筋細胞からの iNOS の誘導を介している可能性もある。4番目に、腸炎発症時には各種炎症反応が誘導されているが、黄連解毒湯には抗ラット耳介浮腫作用などの抗炎症作用があることが知られている⁵⁰⁻⁵³⁾。これらの複合的作用により、黄連解毒湯はインドメタシン誘発小腸潰瘍を抑制しているのではないだろうか。

Table 2-3. PGE2 receptors⁴³⁾

Receptor	affinity	共役 G protein	Effector	Signal transduction
EP1	E2>I2>E1>F2	不明	Ca ²⁺ channel	Ca ²⁺
EP2	E2=E1>>F2=D2	Gs	adenylate cyclase	cAMP
EP3	E2=E1>I2>F2			
EP3α		Gi	adenylate cyclase	cAMP
EP3β		Gi	adenylate cyclase	inositol triphosphate/Ca ²⁺
EP3γ		Gi/Gs	phospholipase C / adenylate cyclase	inositol triphosphate/Ca ²⁺
EP4	E2=E1>I2>F2	Gs	adenylate cyclase	cAMP

cAMP; cyclic adenosine 3',5'-monophosphate

G protein; guanosine triphosphate-binding protein

Gi, Gs; G protein サブファミリー

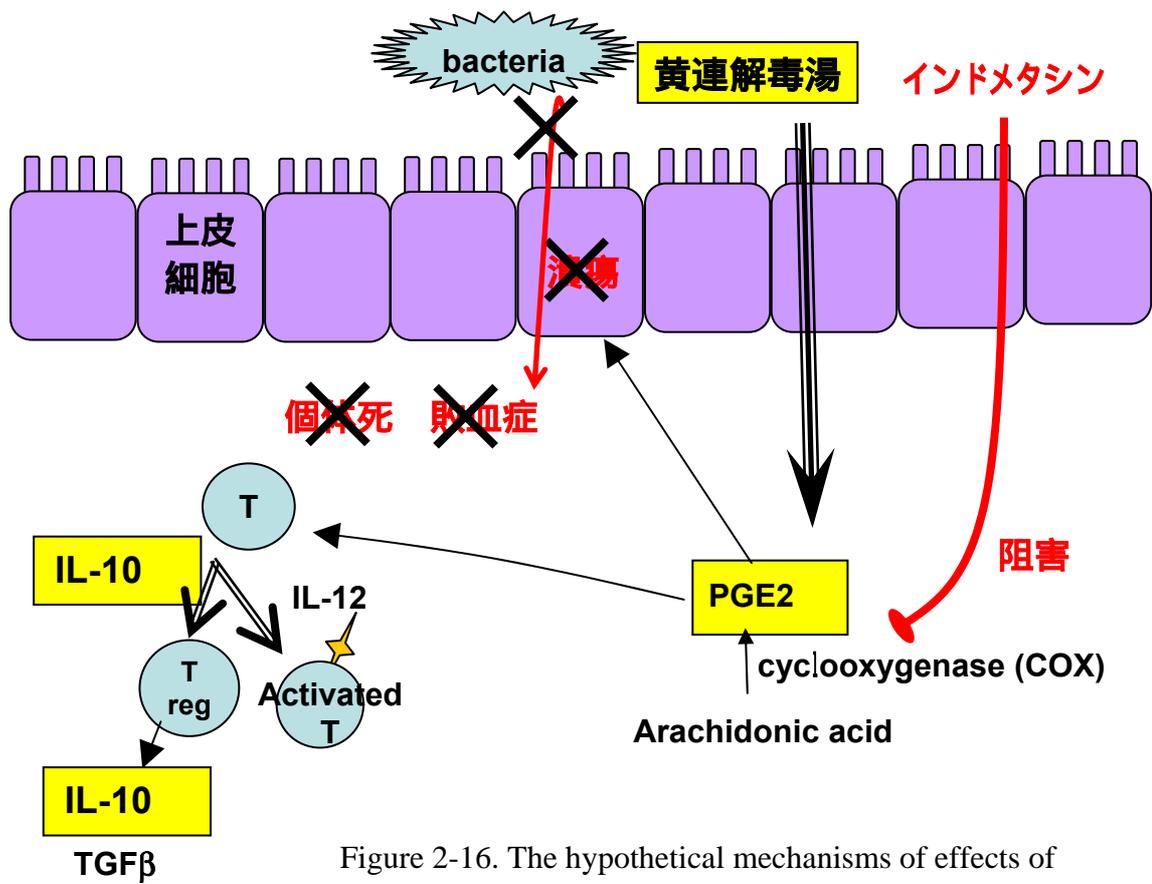


Figure 2-16. The hypothetical mechanisms of effects of Orengedokuto on indomethacin-induced enteropathy

第三章 抗 CD3 抗体誘発小腸障害に対する作用の検討

第 1 節 緒言

前項の小腸潰瘍モデルはいわば直接的に粘膜を傷害するモデルである。それに対し、臨床における小腸障害は全身性、あるいは小腸における免疫異常などを伴うことも多い。そのなかで、活性化した T 細胞は免疫反応の制御と実行の両面で作用している。小腸での実行機能としては腸内細菌の侵襲から守るといった重要な機能があるが、その一方で小腸上皮細胞のアポトーシスの増加による絨毛の短縮などの組織障害を引き起こす。実際、クローン病や潰瘍性大腸炎、セリアック病などの腸炎で T 細胞の異常活性化が起こっているとの報告がある⁵⁴⁻⁵⁶⁾。活性化 T 細胞はいくつかの機序を介してキラー活性を示すが、なかでも Fas/Fas Ligand (FasL) を介した機序は直接的な傷害という意味で重要である。既報では潰瘍性大腸炎^{57, 58)} やセリアック病⁵⁹⁻⁶³⁾ などの腸炎で全身性、もしくは粘膜リンパ球の FasL の発現増加が確認されている。いくつかの小腸障害の動物モデルでも同様に、Fas/FasL を介したキラー活性が腸炎発症に関与していると報告されている⁶⁴⁻⁶⁸⁾。

しかし、どのような機序の免疫学的反応が小腸障害発症にかかわっているかについては、様々な細胞による様々な反応が複雑に関与しているために、いまだ不明な点が多い。例えば消化管免疫系には主に 4 つに分類されるリンパ球、腸上皮間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte; IEL)、粘膜固有層リンパ球、パイエル板リンパ球 (Peyer's patch lymphocytes; PPL)、腸間膜リンパ球 (mesenteric lymph node cells; MLNC) が存在する⁶⁹⁾。腸の組織はこれら消化管免疫系と全身性のリンパ球の交差する場であり、異なるタイプの T 細胞の相互作用が消化管免疫の保持に重要であろう。例えば炎症状態では、末梢のリンパ球が組織に浸潤することはさらに障害を悪化させる可能性がある。

本章では *in vivo* の小腸障害モデルで異なるタイプの T 細胞系の関与について検討した。T 細胞の活性化は、T 細胞の抗原レセプターを構成する CD3 分子の鎖の抗体である抗 CD3 抗体 (145-2C11) の腹腔内投与により誘導し、様々な消化管内容物(食物、消化酵素、腸内細菌など)と抗体との直接的な相互作用を避けた。そして抗 CD3 抗体で誘導される小腸障害に Fas が関与しているかどうか明らかにするため、Fas 欠損マウスでの障害誘導の有無を検討しさらに抗体投与後の Fas を介したキラー活性について検討した。さらに胸腺依存性 T 細胞の関与を明らかにするためヌードマウスでの障害誘導の有無を検討し、IEL と脾臓細胞 (splenocyte; SPL) の移入実験を実施しこれらリンパ球の関与を調べた。最後に本モデルにける黄連解毒湯の作用を検討した。

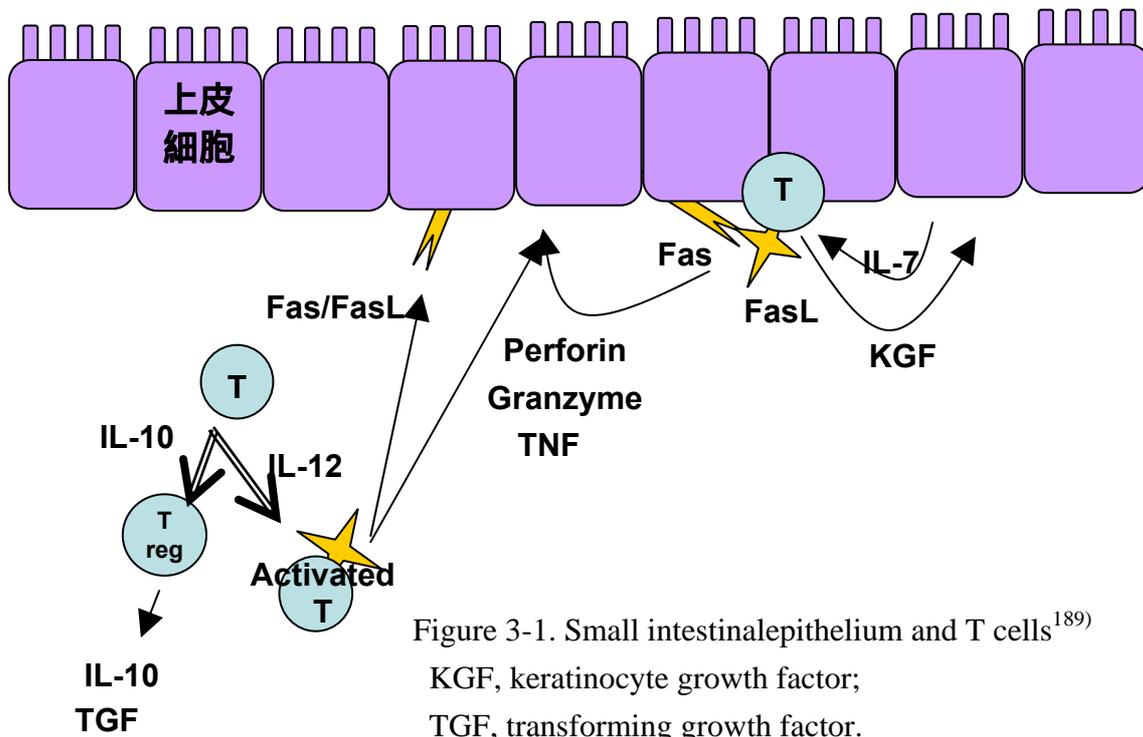


Table 3-1. 細胞死の特徴

アポトーシス	ネクローシス
生理的恒常性で制御	非生理的障害
均一で密なクロマチン凝集	不定型なクロマチン凝集
DNA ラダー形成	DNA スメアー
<i>de novo</i> 合成を伴う	<i>de novo</i> 合成を伴わない
特異酵素によりシグナル伝達	酵素反応系が変化・不活化
細胞収縮・アポトーシス小体形成	細胞膨潤・溶解
膜構造は崩れない	膜構造消失
リソソームに変化なし	リソソーム流出
ホスファチジルコリンが death シグナル	非特異的溶解流出が death シグナル
炎症反応ない	強い炎症反応誘導

第2節 抗CD3抗体誘発小腸障害の誘導

T細胞特異的に活性化を誘導するため抗CD3抗体(12.5 μg /mouse)をC3H/HeNマウスに腹腔内投与したところ、H&E染色により小腸上皮にアポトーシスが観察された。ここで大変興味深いことに、小腸上皮のアポトーシスは部位特異的・時間特異的に二相性に発現することが観察された(Figure 3-2 ~ 3-4)。まず、抗CD3抗体を腹腔内投与すると、小腸絨毛先端を中心にアポトーシスが投与2時間後から出現し4時間後をピークとしたのち18時間後まで漸減し、3日目には観察されなくなった(Figure 3-3B, D, G, 3A)。陰窩の上皮細胞のアポトーシスは抗体投与後少しずつ増加し、24時間後まで漸次増加したのち2日目、3日目と減少し、4日目には観察されなくなった(Figure 3-3C, E, H, 3B)。

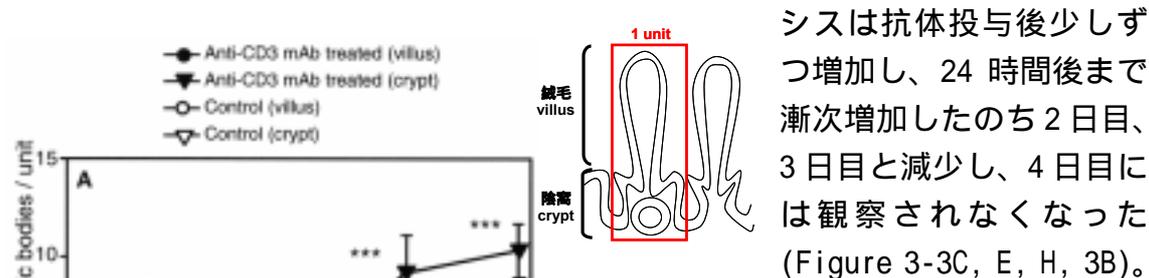


Figure 3-2. Time-course (A) and dose dependency (B, C) of anti-CD3-induced apoptosis in the jejunum of C3H/HeN mice. Control mice received saline alone. Data represent the means \pm standard deviation (SD) of apoptosis per villus/crypt unit. A, The antibody was administered intraperitoneally at a dose of 12.5 μ g /mouse (number of mice = 6-7). Apoptotic cells with condensing /fragmenting nuclei appeared in the small intestine biphasically. ### P<0.0005 versus the control group (villus) and * P<0.05; *** P<0.0005 versus the control group (crypt) at each time. B, 4 hours after, and C, 24 hours after antibody injection (number of mice = 5). Apoptotic cells with condensing /fragmenting nuclei arose dose -dependently in the villus at 4 hours (B) and in the crypt at 24 hours (C).

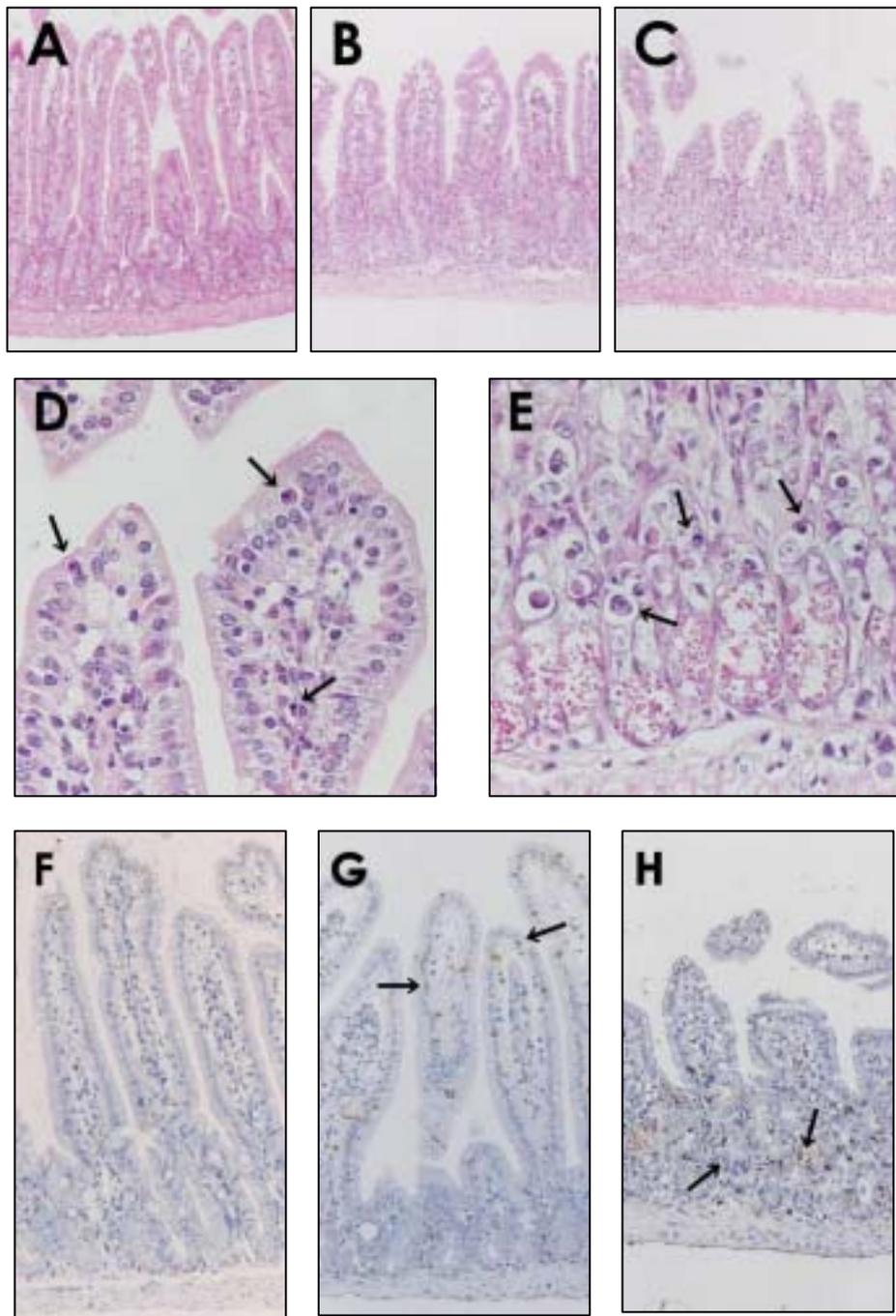


Figure 3-3. Histological sections of the jejunum of C3H/HeN mice. Anti-CD3 was administered at a dose of 12.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. A-E, H&E staining. F-H, TUNEL assay. A and F, control mice receiving saline alone. B, D and G, 4 hours after the antibody injection. C, D and G, 24 hours after the antibody injection. Control mice have few apoptotic cells (A and F). Many apoptotic cells (arrow) are seen in the villus at 4 hours (D and G) and in the crypt at 24 hours (E and H) after anti-CD3 injection. Original magnification: A-C, 25x; D and E, 132x; F-H, 50x

これらの二相性のアポトーシス像は、H&E 染色のほか terminal deoxy - nucleotidyl transferase-mediated deoxy-uridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL)法、電子顕微鏡像でも確認できた (Figure 3-3G, H, 3-4)。ただし、より早期のアポトーシス像を検出できる TUNEL 法では抗体投与 2 時間後から 24 時間後にかけて粘膜固有層にも陽性細胞を認めた (Figure 3-3G, H)。アポトーシス像以外の変化としては、抗体投与 4 時間後から絨毛の短縮と陰窩の肥厚が起ころいはじめ (Figure 3-3B)、24 時間後には明らかに絨毛 1 本あたりの上皮細胞数が減少し絨毛の短縮と陰窩の肥厚が顕著であった (Figure 3-3C)。マクロファージなどの浸潤は 2 日目には粘膜固有層に認められたが 4 日目にはほとんど観察されず、比較的マイルドな障害であるといえた (data not shown)。また、これら二相性のアポトーシスは投与量依存的に観察された。即ち抗体投与 4 時間後の絨毛のアポトーシスは抗 CD3 抗体 12.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 以上の投与量で最大値を示し、24 時間後の陰窩のアポトーシスは 6.3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 以上の投与量で最大値を示した (Figure 3-2B, C)。よって以後の全ての実験は 12.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量で実施した。また、コントロールのハムスター IgG1 を投与しても小腸上皮細胞には顕著な変化は認めなかった (data not shown)。

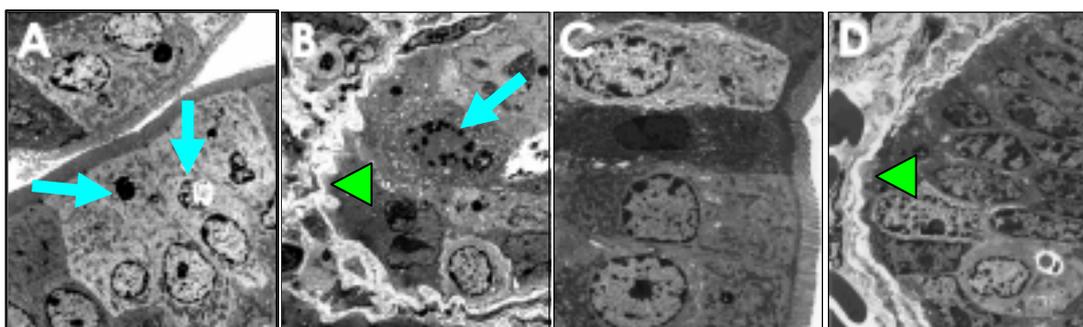


Figure 3-4. Electron microscopic findings after anti-CD3 injection. A, Condensed and fragmented nuclei (arrow) are seen in ciliated villous epithelial cells 4 hours after anti-CD3 injection. The cytoplasm shows little change at this time. Neither apoptotic nor damaged lymphocyte infiltrates are observed. Little apoptosis occurs in IEL (data not shown). B, Condensed and fragmented nuclei (blue arrow) and expanded mitochondria are seen in one crypt epithelial cell 24 hours after anti-CD3 injection. The other crypt epithelial cells do not have typical condensed and/or fragmented nuclei, but nuclei are beginning to show damage. Neither apoptotic nor damaged lymphocyte infiltrates are present. The green arrow head indicates basal membrane. Little apoptosis occurs in lamina propria lymphocytes (data not shown). C, villus in naive mice and, D, crypt in naive mice. Naive mice have little apoptosis either in the villus or the crypt. Original magnification: x50,000.

第3節 抗 CD3 抗体投与により誘導される小腸上皮細胞のアポトーシスにおける Fas/FasL 系の関与

小腸上皮細胞は恒常的に Fas を発現する一方で^{64, 70}、*in vitro*で抗 CD3 抗体刺激した IEL は Fas を介したキラー活性を持つことが知られている⁷¹。そこで、今回小腸絨毛に観察された二相性のアポトーシスの誘導に Fas/FasL が関与しているかどうかを検討した。まず、*in vivo*で Fas の欠損した系統である MRL-*lpr/lpr* を用いた。Fas が正常に発現しているコントロールマウス MRL-+/+ では C3H/HeN と同様に二相性のアポトーシスが観察されたが、MRL-*lpr/lpr* ではどちらの相のアポトーシスも顕著に減少していた (Figure 3-5)。このことから、どちらの相のアポトーシスにも Fas/FasL 系が関与していることが示唆された。

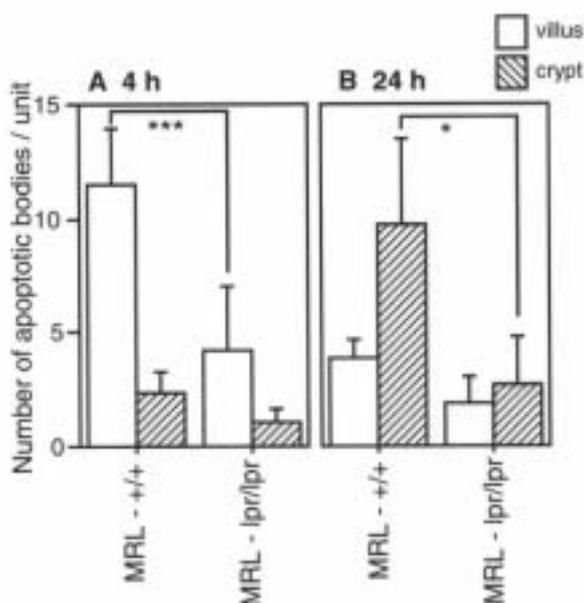


Figure 3-5. Differences in the number of apoptotic cells in MRL-+/+ and MRL-*lpr/lpr* mice after anti-CD3 (12.5 μ g/mouse) administered intraperitoneally. Apoptotic bodies with clearly fragmented and/or condensed nuclei, the most classical and definitive feature of apoptosis, were counted as described in the “Histology” section in Materials and Methods. Data represent the means \pm SD of apoptotic cells per villus/crypt unit 4 hours (A) and 24 hours (B) after antibody administration (number of mice = 3-5). The number of apoptotic bodies in mice administered saline instead of anti-CD3 was below 1.5 for both strains. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0005$ versus the control group.

第4節 抗 CD3 抗体投与で誘導される各種リンパ球の Fas/FasL 系を介したキラー活性

前節のようにこの小腸アポトーシスには Fas/FasL 系が関与していたことから、次にリンパ球の Fas/FasL を介したキラー活性を検討した。抗 CD3 抗体を *in vivo* で投与すると、前節で述べた IEL のほかにも様々なタイプの T 細胞が活性化される (Figure 3-6)。そこで、IEL、PPL、MLNC、SPL のなかで主にどのリンパ球の Fas/FasL が本小腸障害に関与しているのかを明らかにするため、各リンパ球の *ex vivo* でのキラー活性を測定した。

はじめに抗 CD3 抗体をマウスに投与せず、Effector/Target (E/T) 細胞比が 1:20 で無刺激条件下に培養したとき、IEL と SPL に弱いながらも恒常的な Fas を介したキラー活性が認められ、その活性は IEL のほうが強かった (Figure 5A)。MLNC、PPL には恒常的なキラー活性はほとんど認められなかった。*In vitro* で抗 CD3 抗体刺激すると、IEL と SPL にはキラー活性が強く誘導されたが MLNC、PPL はわずかにキラー活性が誘導されただけであった (Figure 3-7B)。これは Linらの報告と一致した⁷²⁾。

次いで、抗 CD3 抗体を *in vivo* で投与したマウスから抗体投与後の様々な時間経過後に各リンパ球を調整し、*ex vivo* でのキラー活性を検討した (Figure 5C)。このとき *in vitro* での抗 CD3 刺激はせず、あくまで *in vivo* での抗 CD3 抗体投与とした。その結果、*in vitro* での抗 CD3 抗体刺激時と同様に、IEL と SPL に特に強いキラー活性が誘導された。大変興味深いことに、IEL のキラー活性は抗体投与直後 (0.5 時間) から素早く活性が誘導され 2-4 時間後にピークに達した後、ゆっくりと 4-8 時間後にかけて減少していた。ピーク時のキラー活性の強さは、*in vitro* で IEL を刺激したときと同様の強さであった。一方 SPL は IEL よりもゆっくりとキラー活性が誘導され、抗体投与 4-8 時間後にピークとなった後、減少していた。ピーク時のキラー活性の強さは *in vitro* で SPL を刺激したときと同程度まで誘導された。また、やはり *in vitro* での刺激時と同じように、*in vivo* での投与においても IEL のほうがキラー活性は強く誘導された (IEL が約 60% に対し SPL は約 40%; Figure 3-7B, C)。ちなみに抗体投与 24 時間後のマウスからはキラー活性を測定するのに十分な量の IEL が調整できなかった。これは恐らくリンパ球自身が活性化誘導アポトーシスに陥るからであろうと思われた。

このように、IEL と SPL は異なるタイミングで異なる強さのキラー活性が誘導されており、第一相には主に IEL が、第二相には SPL など全身を循環しているリンパ球が関与している可能性が示唆された。

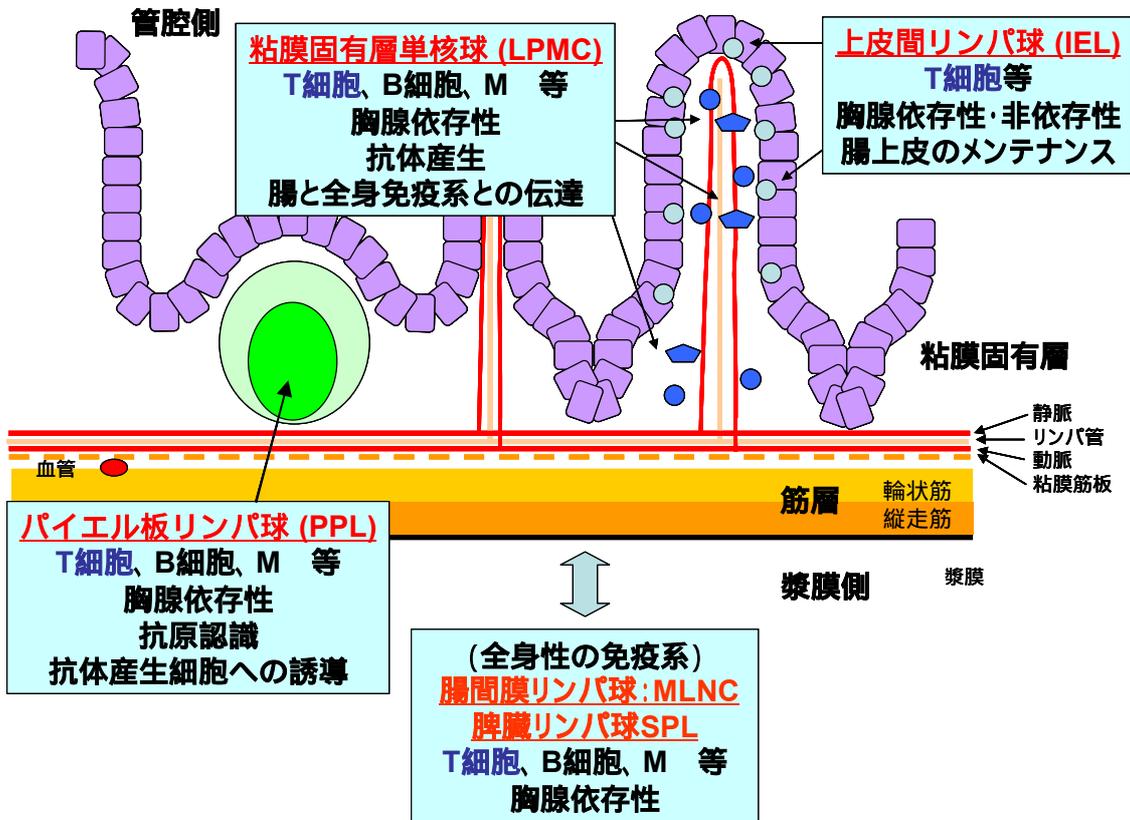


Figure 3-6. Gut-associated lymphoid tissues^{2, 188, 189)}

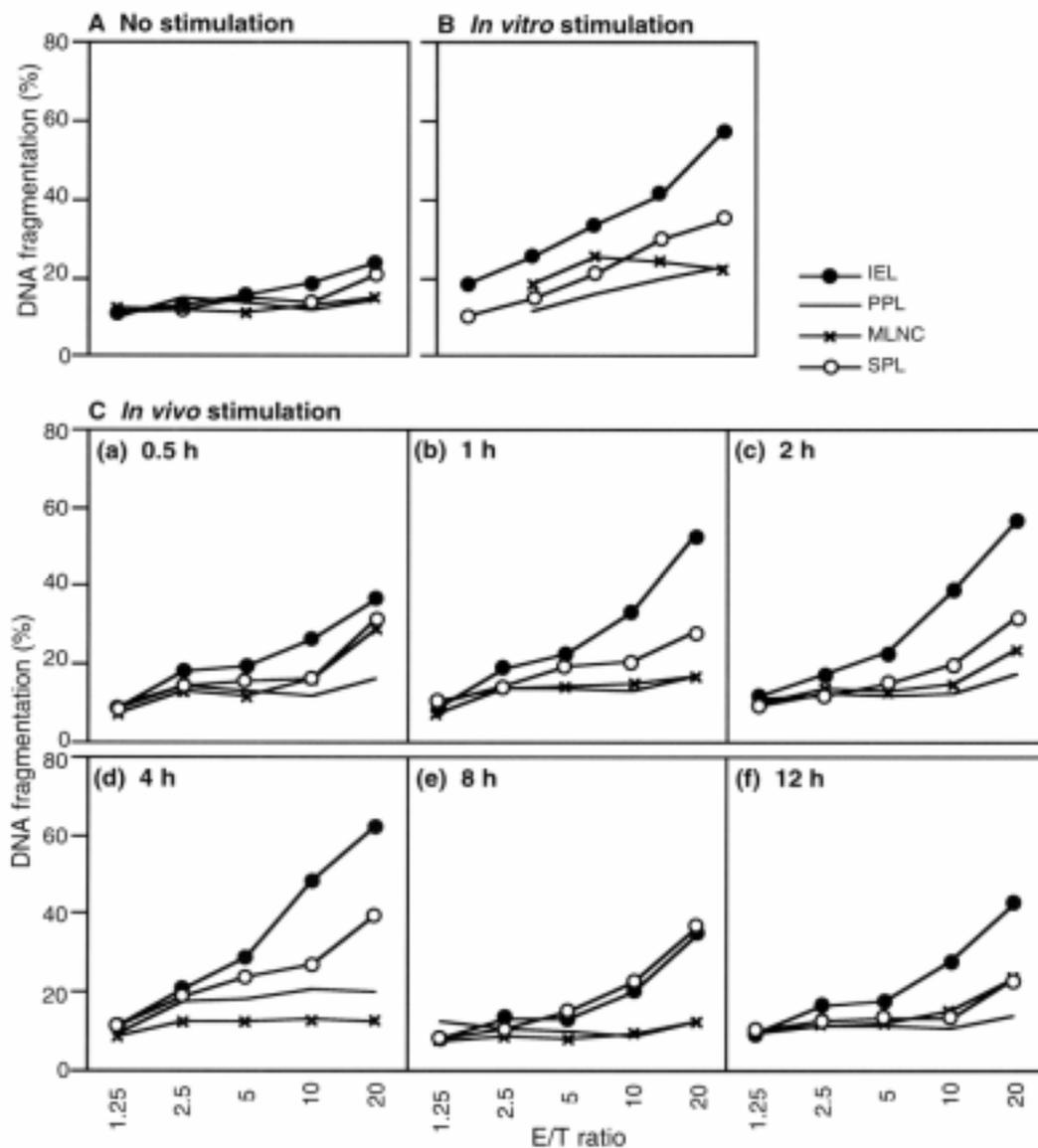


Figure 3-7. Fas-mediated killer activity of lymphocytes. Lymphocytes isolated from naive C3H/HeN mice were cultured in the absence (A) or presence (B) of plate-bound anti-CD3 antibody. C, Lymphocytes isolated from anti-CD3-injected C3H/HeN mice at different times after treatment were cultured in the absence of anti-CD3 antibody. Lymphocytes were pooled from three mice and a representative experiment of two performed is shown. The percentage of DNA fragmentation of Jurkat cells was measured and calculated as described in the “Fas-mediated cytotoxicity assay” section in Materials and Methods.

第5節 抗 CD3 抗体投与後の IEL, SPL の細胞表面抗原の発現の変化

以上のように本小腸障害では IEL と SPL の関与が示唆されたので、このときの細胞表面抗原の発現量の変化を検討した (Figure 3-8)。IEL の FasL は予想どおりに抗体を投与しない無刺激状態でも恒常的に発現しており、抗 CD3 抗体を *in vivo* 投与すると陽性細胞数は増加し、24 時間後には通常レベルまで戻っていた。一方 SPL では抗体を投与しない無刺激状態では FasL をほとんど発現しておらず、抗 CD3 抗体投与により 4 時間後には FasL の発現が誘導され、それが 24 時間後まで継続していた。

いわゆる活性化マーカーの 1 つである細胞表面の CD69 分子 (注; CD とは細胞表面抗原または抗原エピトープの国際分類番号で、Cluster of Differentiation の頭文字より名づけられた) は、IEL および SPL のどちらにおいても抗体投与 4 時間後には陽性細胞数の増加と細胞 1 個あたりの CD69 分子の発現量が増加し、24 時間後には回復傾向にあった。このことから抗 CD3 抗体の腹腔内投与により素早く一時的な T 細胞の活性化が起こったものと考えられた。

細胞表面上の CD3 分子は CD69 分子とは逆に、IEL および SPL のどちらも抗 CD3 抗体の投与 4 時間後には CD3 陽性細胞数の減少と細胞 1 個あたりの CD3 分子の発現量の低下が認められた。これは既報のように刺激により CD3 分子が細胞質内に取り込まれ、時に分解されたからであろうと考えられた⁷³⁻⁷⁵⁾。これらの変化は IEL、SPL のどちらにおいても 24 時間後には回復傾向にあった。

さらに、リンパ球自身が発現する Fas を解析したところ、IEL は抗 CD3 抗体投与後 4 時間後、SPL は抗 CD3 抗体投与 24 時間後に陽性細胞数が増加しており、それぞれのタイミングにおいていわゆる活性化細胞死がリンパ球自身に誘導されているものと考えられた。

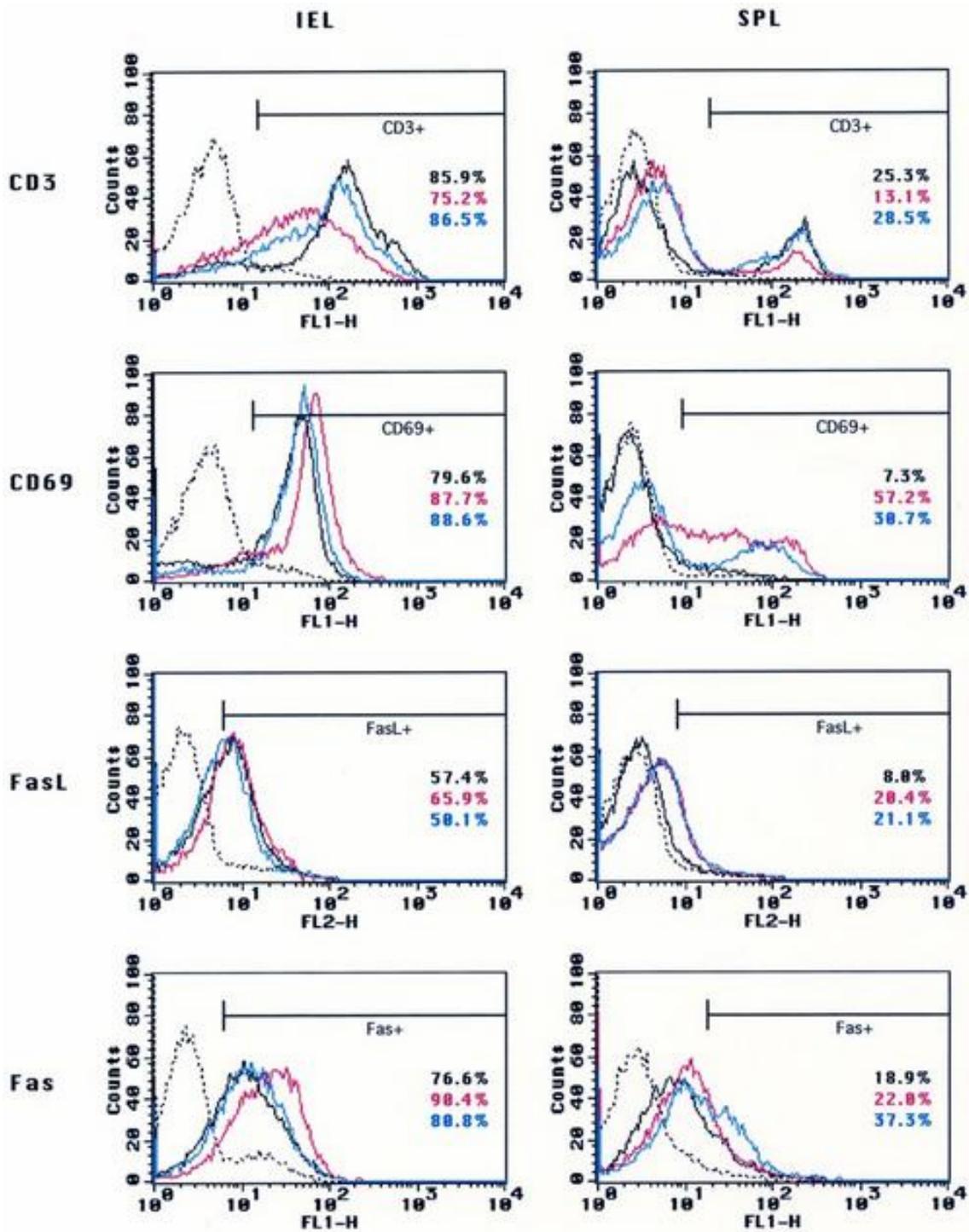


Figure 3-8. Expression of CD3, CD69, FasL and Fas on IEL and SPL. Lymphocytes were isolated from naive (black line) or anti-CD3-treated C3H/HeN mice 4 (red line) and 24 (blue line) hours after the injection and pooled from three mice. A representative experiment of the three performed is shown. The dotted line represents the isotype control. Numbers indicate the percentages of positive cells.

第6節 抗 CD3 抗体投与により誘導される小腸上皮細胞のアポトーシスにおける胸腺由来 T 細胞の関与

前節までに、この小腸アポトーシスには IEL と SPL の関与が示唆された。IEL には胸腺由来 T 細胞のほかに相当量の胸腺非依存性の T 細胞が存在する。また SPL に存在する T 細胞は主に胸腺由来である。そこで、第一相に関与しているのは IEL のうち胸腺由来 T 細胞か、それとも胸腺非依存性 T 細胞なのか、また第二相は本当に胸腺由来 T 細胞が関与しているのかどうかを検討した。

コントロールとして使用した BALB/c マウスは C3H/HeN と同様に小腸に二相性のアポトーシスを誘導した。それに対して胸腺の欠損している BALB/c *nu/nu* マウスに抗 CD3 抗体を *in vivo* 投与したところ、第一相、第二相ともにほぼ通常の BALB/c マウスと同程度までアポトーシス細胞数が減少していた (Figure 3-9)。以上より、第一相、第二相ともに胸腺依存性 T 細胞が関与していることが明らかとなった。

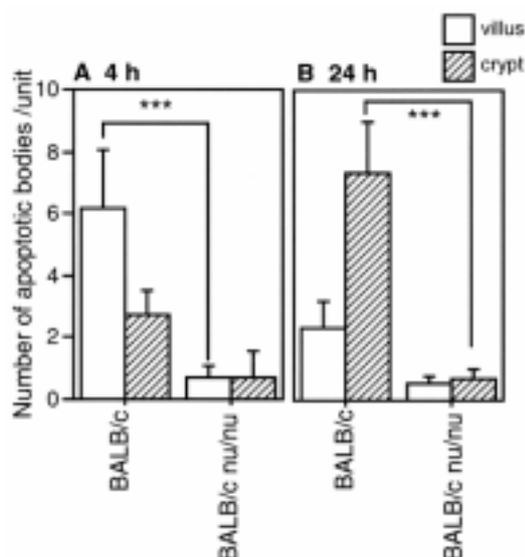


Figure 3-9. Differences between the number of apoptotic cells in BALB/c and BALB/c *nu/nu* mice after intraperitoneal anti-CD3 (12.5 μg /mouse) administration. Apoptotic bodies with clearly fragmented and/or condensed nuclei, the most classical and definitive feature of apoptosis, were counted as described in Materials and Methods. Data represent the means \pm SD of apoptotic cells per villus/crypt unit 4 hours (A) and 24 hours (B) after antibody administration (number of mice = 4). The number of apoptotic bodies in mice administered with saline instead of anti-CD3 was below 1.5 for both strains. The experiment was repeated 3 times with similar results. *** $P < 0.0005$.

ここで、先ほど述べたように SPL はそのほとんどが胸腺依存性の $\alpha\beta$ 型 T cell receptor (TCR) を発現する T 細胞 (T) である一方、IEL には胸腺依存性の $\alpha\beta$ T 細胞 (IEL) と非依存性 T 細胞 (主に $\gamma\delta$ 型 T cell receptor を発現する IEL) が存在する。そこでこれら両 IEL をそれぞれ調整し、Fas を介したキラー活性を測定した。その結果これら両 IEL のうち、 $\alpha\beta$ IEL のほうが Fas を介したキラー活性が高く (Figure 3-10)、胸腺由来の IEL の関与をさらに支持する結果となった。

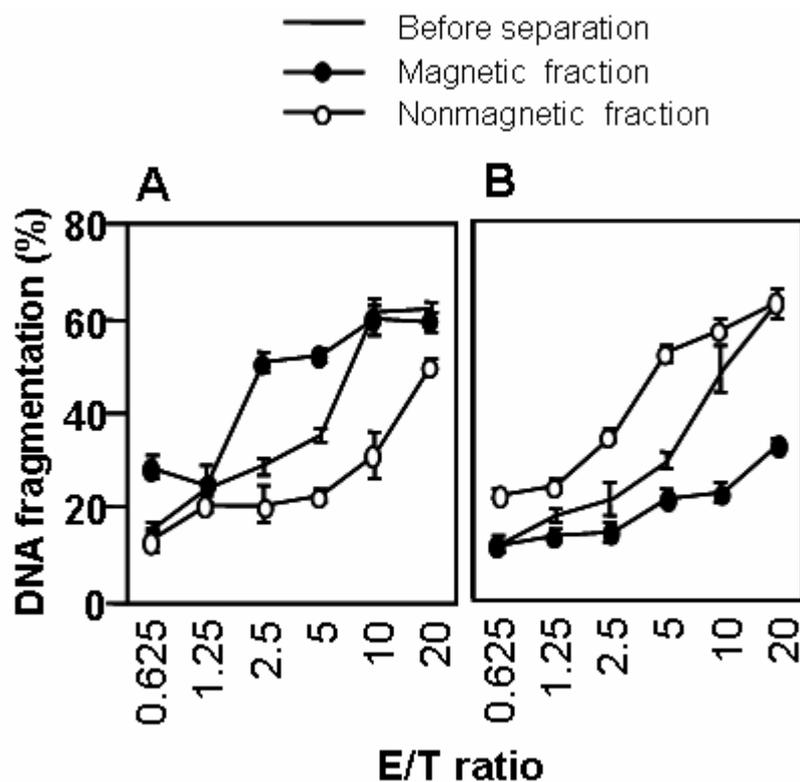


Figure 3-10. Fas-mediated killer activity of IEL subsets. The pooled IEL isolated from three mice, were further enriched based on the expression of TCR subclass using a magnetic cell sorting (MACS) system. [^3H]-labeled Jurkat cells were cocultured with effector cells in anti-CD3 mAb (7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-coated 96-well plates. A; The cells were enriched using anti-TCR β . The percentage of the TCR β^+ cells in the pooled IEL before separation, the magnetic fraction and nonmagnetic fraction were respectively 69.3, 96.4 and 29.1 %. B; The cells were enriched using anti- $\gamma\delta$ TCR. The percentage of the $\gamma\delta$ TCR $^+$ cells in the pooled IEL before separation, the magnetic fraction and nonmagnetic fraction were respectively 22.1, 92.0 and 2.3 %. Data represent the means \pm SD of triplicate cultures. A representative result of two independent experiments is shown.

第7節 リンパ球移入によるヌードマウスの小腸上皮細胞アポトーシスの再構成

第2節から6節まで述べてきた結果より、抗CD3抗体投与により誘発される小腸アポトーシスの誘導機序については次のような仮説が考えられた。すなわち、抗CD3抗体投与4時間後をピークとする第一相の絨毛先端のアポトーシスは胸腺由来 IEL が Fas/FasL を介して誘導し、一方、抗体投与24時間後まで漸増する陰窩のアポトーシスは全身性の胸腺由来 T 細胞が Fas/FasL を介し誘導している、というものである。

この仮説を検証するため、両相のアポトーシスとも誘導されなかったヌードマウスに通常のマウスの IEL、SPL を移入したとき、それぞれの相のアポトーシスが再構築されるかどうかを検討した (Figure 3-11-1)。まず Experiment 1 として、通常の BALB/c マウスの SPL または IEL を BALB/c nu/nu に移入した翌日、抗CD3抗体を腹腔内投与した。その結果、SPL を移入したときには抗CD3抗体投与4時間後の第一相の絨毛先端のアポトーシスは観察されず、24時間後の第二相の陰窩のアポトーシスだけが観察された。IEL を移入したときは予想では第一相の絨毛先端のアポトーシスのみ観察されると考えていたが、抗CD3抗体投与4時間後の第一相の絨毛先端、第二相の陰窩の両相のアポトーシスともに観察されなかった。

IEL は微小循環を小腸の絨毛先端まで移動し定着することで、はじめて上皮細胞にアポトーシスを誘導できるものと考えられる。既報では移入した IEL が小腸に定着するまでに数週間以上かかるとの報告がある^{76, 77)}。実際著者らも移入細胞を propium iodide で蛍光染色し移入翌日に小腸に侵入してきた細胞を観察できるかどうか試みたが、小腸にはほとんど蛍光染色細胞は観察できなかった (data not shown)。そこで実験2では IEL を移入し5週間後に抗CD3抗体を投与した (Figure 3-11-2)。その結果、今度は抗体投与4時間後の第一相の絨毛のアポトーシスのみならず、投与24時間後の第二相のアポトーシスもまた誘導された。これらのことから、第一相の抗CD3抗体投与4時間後の小腸絨毛先端のアポトーシスは IEL の Fas/FasL 系を介したキラー活性により誘導され、第二相の投与24時間後の陰窩のアポトーシスは IEL および全身性のリンパ球の両方の Fas/FasL を介したキラー活性により誘導されていることが明らかとなった。

ここで IEL と SPL の両リンパ球を移入し抗CD3抗体を投与したとき、大変興味深いことに IEL と SPL を抗体投与前日に連続して投与した Experiment 1 の場合には、本来 SPL 単独移入では観察された第二相 (抗体投与24時間後) の陰窩のアポトーシスが有意に抑制された。IEL と SPL の同時移入によるこの様な現象は、IEL の移入から SPL の移入・抗CD3抗体投与までの間隔が5週間ある

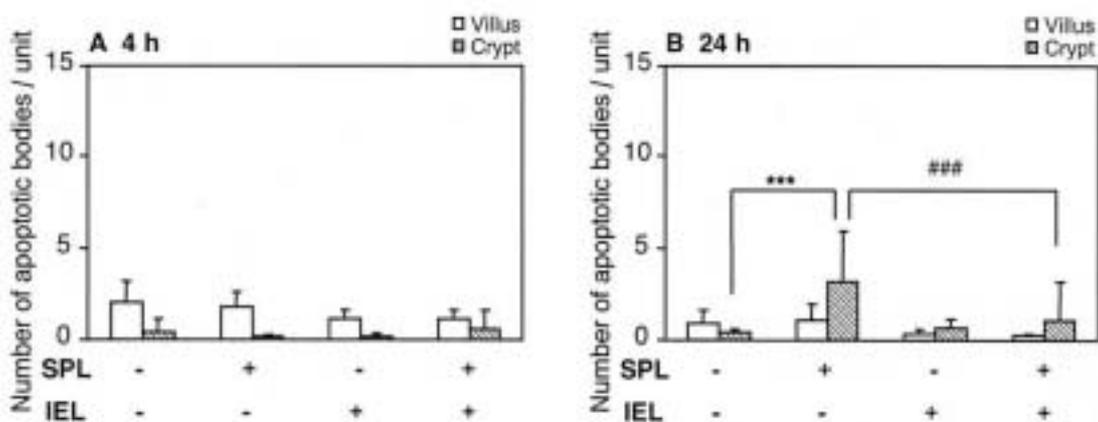
Experiment 2 では観察されず、逆に両相ともに IEL または SPL の単独移入時よりもアポトーシス細胞数が増加し、相加的に作用している可能性が示された。

なお、抗 CD3 抗体の腹腔内投与をせずに IEL または SPL または IEL と SPL を同時移入したとき、これらリンパ球の移入のみでは有意に明確な小腸のアポトーシスなどの異常は認められなかった (data not shown)。

第 8 節 黄連解毒湯の作用

この小腸障害モデルを用い、小腸上皮のアポトーシスに対する黄連解毒湯の作用を検討した。しかし、絨毛または陰窩のアポトーシスいずれに対しても、黄連解毒湯の経口投与では顕著な抑制作用を認めなかった。

Experiment 1



Experiment 2

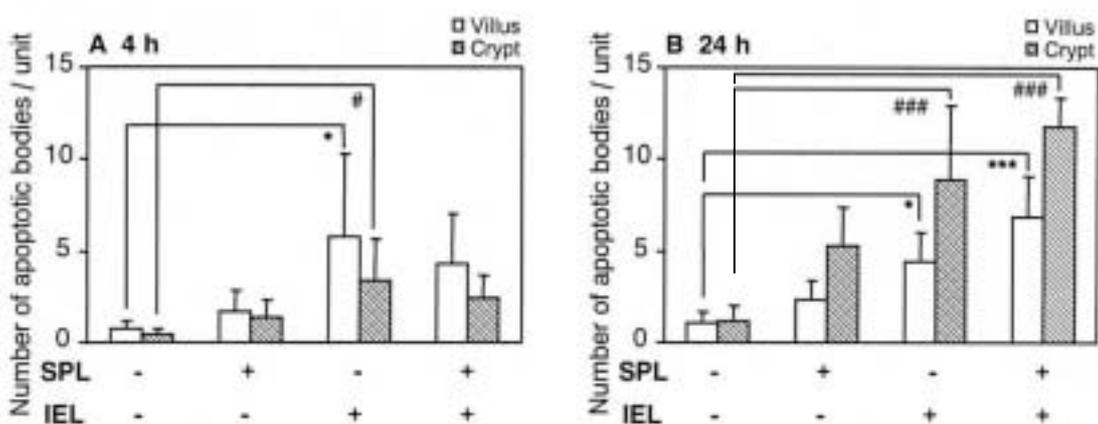


Figure 3-11. Adoptive transfer of BALB/c IEL and SPL into BALB/c *nu/nu* mice.

Experiment 1, naive nude mice were respectively or serially injected with SPL (5×10^7), and IEL (1×10^7). The day after the transfer, anti-CD3 was administered at a dose of 12.5 μg /mouse. The number of apoptotic cells 4 hours (A) and 24 hours (B) after antibody administration is shown (number of mice = 5-13). The experiment was repeated twice with similar results. When SPL and/or IEL were transferred into the mice without anti-CD3 administration, the number of apoptotic bodies was below 1.5 for all graft groups. Data represent means \pm SD per villus/crypt unit. *** $P < 0.0005$, versus non-transferred in crypt; ### $P < 0.0005$ versus SPL transferred alone in crypt.

Experiment 2, IEL (1×10^7) from 6 to 11-week-old-BALB/c mice were transferred to BALB/c *nu/nu* mice of the same age. After 5 weeks, saline or SPL (5×10^7) was transferred to the IEL-grafted or naive BALB/c *nu/nu* mice, and on the next day anti-CD3 was administered at a dose of 12.5 μg /mouse. The number of apoptotic cells 4 hours (A) and 24 hours (B) after antibody administration is shown (number of mice = 5-6). When SPL and/or IEL without anti-CD3 administration were transferred to the mice, the number of apoptotic bodies was below 1.5 for all graft groups. Data represent means \pm SD per villus/crypt unit. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.0005$ versus non-transferred in the villus; # $P < 0.05$ and ### $P < 0.0005$ versus non-transferred in the crypt.

第9節 考察

本章では次のことが明らかとなった。すなわち、(1)抗 CD3 抗体の投与により小腸上皮に異なる場所に異なるタイミングで出現する二相性のアポトーシスが誘導された。(2)両相のアポトーシスとも Fas/FasL 系を介していた。(3)抗 CD3 抗体の投与は IEL の Fas 依存性のキラー活性を素早く誘導し、次いで SPL の Fas 依存性のキラー活性を誘導した。(4)両相のアポトーシスとも胸腺依存性 T 細胞が関与していた。(5)胸腺のあるマウスより得た SPL を胸腺のないヌードマウスに移入したとき、抗 CD3 抗体投与 24 時間後の第二相の小腸陰窩のアポトーシスのみが再現された。(6)同様に IEL を移入した時、移入 5 週間後に抗 CD3 抗体を投与すると小腸絨毛および陰窩の両相にアポトーシスが再現された。(7) IEL と SPL の二重移入では、それぞれの単独移入時の小腸アポトーシスの誘導に対して阻害的、または相加的に作用する可能性が示された。(8)本小腸アポトーシスに対して、黄連解毒湯は顕著な抑制活性を示さなかった。

抗 CD3 抗体の投与により誘導される小腸のアポトーシスの病理変化について、このほかにもいくつかの報告がある⁷⁸⁻⁸⁰⁾。Merger らは抗 CD3 抗体によって TNF、perforin などによるアポトーシスを含むいくつかのキラー活性誘導系を介して障害が誘導されることを示している⁸¹⁾。本論文では彼らに似たプロトコールを利用し小腸障害を誘導したが、彼らとはいくつかの相違点が認められた。まず、今回は抗 CD3 抗体の投与により部位特異的、経時的に変動する二相性のアポトーシスが観察されたが、彼らはそのことに言及していない。また今回は T 細胞刺激により誘導された Fas/FasL を介したキラー活性が主に小腸アポトーシスに関与していると考えられたが、Merger らは Fas/FasL 系の欠損したマウスでもアポトーシスは減少しなかったことを報告している。この矛盾は抗体投与量や投与経路の違いによる可能性がある。様々な研究で使用されている抗 CD3 抗体は高容量 (50 - 400 μg /mouse) を静脈内投与しているのに対し⁷⁸⁻⁸¹⁾、本論文では 12.5 μg /mouse を腹腔内投与しアポトーシス誘導機序を検討した。この投与量と投与経路で十分に最大値の小腸アポトーシスが誘導されていたが、より高容量の抗 CD3 抗体を投与したときに比べ小腸組織障害は軽度であり、回復も素早かった。さらに既報と異なり本論文では、抗 CD3 抗体投与後 24 時間後まで血清中に TNF の分泌を認められなかった (検出限界 50 pg /mL)。これらのことから低容量での弱い T 細胞刺激条件においては、Fas/FasL 系を介した T 細胞依存アポトーシスが小腸上皮細胞障害の主体であるが、高容量では様々な免疫反応が活性化される結果、より複雑で長期化する悪性の腸炎が誘導される可能性が示唆された。なかでも Merger らが報告している Fas/FasL 系以外の細胞傷害系、例えば perforin 等は⁸¹⁾、本論文における小腸上皮細胞のアポトーシス

にも関与している可能性は高い。なぜなら Figure 3-5 の Fas 欠損マウス (*lpr/lpr*) を用いた場合でも小腸アポトーシスは完全には抑制されておらず、この場合のアポトーシスは perforin などにより誘導されている可能性がある。

本論文では *lpr/lpr* マウスでの検討に加え、各種リンパ球の Fas を介したキラー活性についても検討した。抗 CD3 抗体を投与後のマウスより得たリンパ球は、IEL と SPL が異なるタイミングでキラー活性の上昇が認められ、それゆえ、異なるタイミングと異なる部位でのアポトーシスの誘導に関与しているものと考えられた。ヌードマウスではこれらのアポトーシスが完全に抑制されたことから、胸腺依存性の T 細胞の関与が疑われた。IEL には胸腺依存性 T 細胞 (IEL) と非依存性 T 細胞 (IEL) が存在する。実際、これら両 IEL のうち、

IEL のほうが Fas を介したキラー活性が高かった (Figure 3-10)。一方 SPL はそのほとんどが胸腺依存性 T 細胞 (T) である。これらの事実もまた本論文の結果を支持するものであった。以上より著者らは抗 CD3 抗体で誘導される第一相の絨毛先端のアポトーシスは胸腺依存性の IEL の関与によるものであり、第二相の陰窩のアポトーシスは胸腺依存性の全身性のリンパ球の関与によるものであると仮説を立てた。

この仮説はしかし、ヌードマウスへの各リンパ球の移入実験によって一部のみが確認できた。すなわち、SPL の移入では確かに予想通り第二相の陰窩のアポトーシスのみが再現されたが、IEL の移入では予想と異なり第一相の絨毛先端のみならず第二相の陰窩のアポトーシスもまた誘導された (Figure 3-11 Experiment 2)。さらに、ヌードマウスに IEL を単独移入した時、絨毛先端のアポトーシスは抗体投与 4 時間後だけでなくさらに 24 時間後まで相当数観察され、通常の BALB/c マウスに抗 CD3 抗体を投与した時の、4 時間後をピークとして一時的に出現し 24 時間後にはほぼ消失するという絨毛先端のアポトーシスの出現の仕方とは異なる挙動を示した (Figure 3-11 Experiment 2)。この矛盾は更なる検討が必要であるが、次のように考えることもできる。すなわち、胸腺のある通常のマウスでは急に大量の絨毛先端のアポトーシスが誘導された結果 24 時間後までに絨毛の短縮などが観察されることから、アポトーシス細胞が素早く除去される機序が存在するのではないかということである。その一方でヌードマウスではそのような除去機能が不十分である可能性がある。実際、ヌードマウスに IEL と SPL を同時移入した時、通常のヌードマウスよりも絨毛が長い傾向が認められたが (data not shown)、これは上皮細胞の除去機能異常によるのかもしれない。

ところで IEL と SPL の両リンパ球を同じ日に連続して投与した場合に、本来 SPL 単独移入では観察された第二相 (抗体投与 24 時間後) の陰窩のアポトーシスが有意に抑制された (Figure 3-11 Experiment 1)。この現象もまた更なる

解析が必要であるが、次のような理由によるのかもしれない。すなわち、移入 IEL は第 7 節の結果でも述べたように、移入翌日にはまだ小腸に定着しておらず、脾臓をはじめとする末梢循環中に相当数存在するものと考えられる。IEL は恒常的に FasL を発現してキラー活性を持つため、SPL (Figure 3-7A, C, 3-8 のように抗 CD3 抗体投与により Fas 分子を誘導) と同日に連続して投与し、さらにそこに IEL が小腸上皮間に定着する前のタイミングで抗 CD3 抗体を投与したことにより、移入 IEL が末梢循環中で移入 SPL にキラー活性を発揮し、SPL が小腸陰窩で効果的にアポトーシスを誘導できなかった可能性がある。対照的にこの現象は、IEL の移入から SPL 移入・抗 CD3 抗体投与までの間隔が 5 週間置いている Figure 3-11 Experiment 2 では観察されず、逆に両相ともに IEL または SPL の単独移入時よりもアポトーシス細胞数が増加し、移入した IEL と SPL が効果的かつ相加的に小腸アポトーシス作用を示している可能性が示された。

本論文では抗 CD3 抗体投与後の二相性のアポトーシスについて第一相は IEL が、第二相は IEL と SPL が関与する、というようにアポトーシスを誘発させる側から機序を検討しその解釈を行ったが、誘導される小腸上皮側からも機序解明と解釈をすることができる。小腸上皮の 78.9 % で Fas 分子が発現しているとされるが、その発現量は絨毛先端から陰窩にかけて一様でないことが知られている⁶⁴⁾。さらに、絨毛と陰窩では上皮細胞の cell cycle が異なっており細胞死への感受性が異なることが知られている。例えば虚血再還流による P-53 依存性の細胞死は陰窩よりも絨毛先端のほうが感受性は高いと報告されている⁸²⁾。IEL 単独の移入でも絨毛先端および陰窩にアポトーシスを誘導することが可能であったことから、本論文で認められた第二相は IEL と SPL の両方が関与していると解釈するのではなく、IEL の Fas を介したキラー活性に対しての小腸絨毛・陰窩の感受性が異なるからだと考えることもできる。しかし、Figure 3-11 の移入実験の結果から SPL も十分に陰窩のアポトーシス誘導に寄与していることが窺われ、本論文の解釈に矛盾はないものと考えられた。

最後に、この小腸アポトーシスを T 細胞の以上活性化による小腸障害モデルのひとつとして捉え、本モデルに対して黄連解毒湯を経口投与しその効果を検討したが、顕著な変化を認めなかった。この小腸アポトーシスは抗 CD3 抗体を用いて T 細胞上に発現する T cell receptor を直接刺激するきわめて特異性が高いキラー活性誘導系といえる。黄連解毒湯はこのような T 細胞特異的なキラー活性誘導に対しては有効でない可能性が示された。

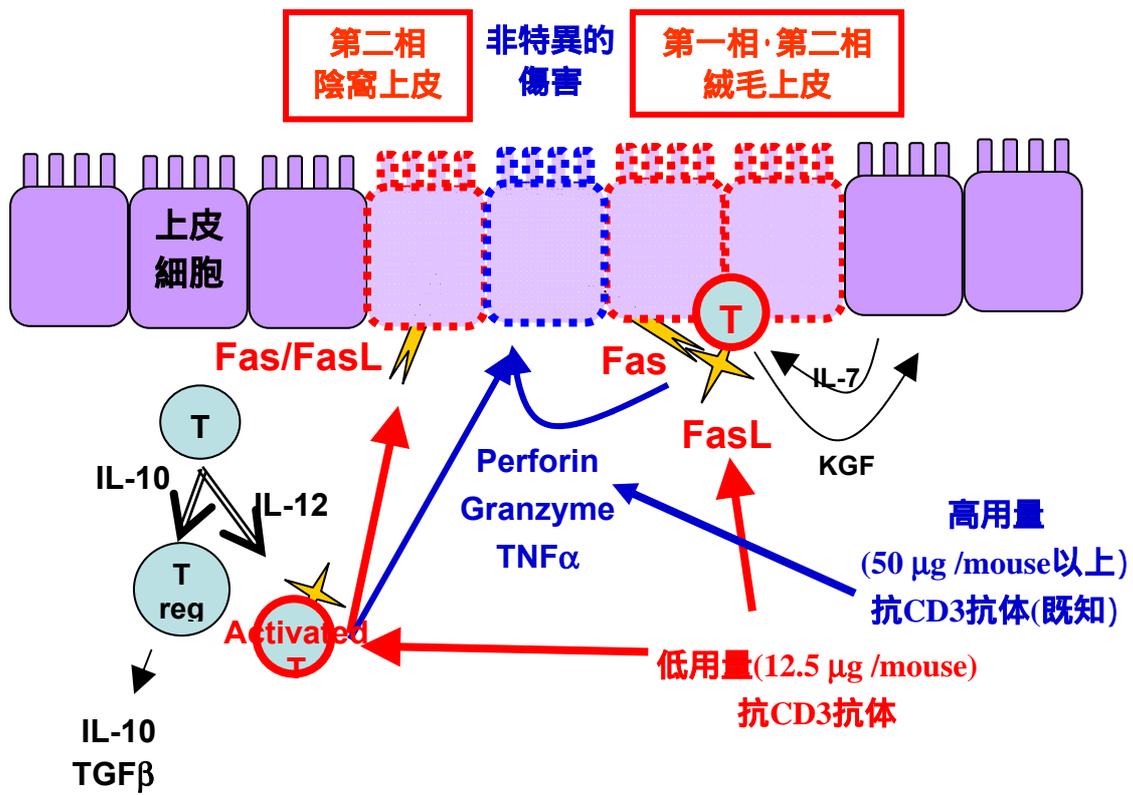


Figure 3-12. The hypothetical mechanism of anti-CD3 induced enteropathy

第四章 免疫担当細胞の副腎皮質ホルモン誘発アポトーシスに対する作用の検討

第1節 緒言

現代社会では特にストレスが疾患発症・悪化の要因のひとつである。生体にはさまざまな抗ストレス反応があるが、過剰なストレス反応や持続的なストレス反応は時により生体防衛的というよりむしろ生体傷害的に作用することがある。たとえば抗ストレス反応物質の1つである副腎皮質ホルモン、グルココルチコイドはさまざまな急性炎症を抑制する一方で、過剰分泌や持続的分泌により本来必要な免疫機能までも抑制する。そのようなグルココルチコイドの作用の1つに、胸腺細胞のアポトーシス誘導作用がある。胸腺は未熟 T 細胞が全身で機能する成熟 T 細胞へ誘導される場であり (Figure 4-1)、アポトーシスに対する感受性が高い。それは自己反応性の T 細胞を除外するという点で非常にリーズナブルだが、その半面、本来成熟化し機能を果たすべき T 細胞が異常な刺激によってアポトーシスで失われるという危険性も併せ持つ。たとえばストレス時に多量に誘導されるグルココルチコイドによる胸腺細胞の過剰なアポトーシス誘導は、感染防御など全身の免疫機能の低下を招く可能性がある。このような胸腺細胞のアポトーシスを抑制するような薬物には抗ストレス作用が期待される。

アポトーシスは様々な生理現象において基本的役割を果たしており、様々な生理的・病理的刺激により様々な細胞に誘導される⁸³⁻⁸⁶⁾。どんな組織内においてもアポトーシスの誘導は厳密に制御されており、細胞死を誘導するメカニズムは特定の組織特異的なシグナルによってのみ干渉される。アポトーシス誘導系の特異的阻害剤を検索することによって副次的に、細胞特異的、あるいは組織特異的なアポトーシス制御機序、あるいは組織の恒常性維持におけるアポトーシスの生理的法則をも明らかにできるであろう。

一方、植物はシグナル伝達系や細胞代謝経路に影響を与える豊富な生理活性物質を含んでいる。植物由来成分のいくつかにはアポトーシスに対し影響を与えることが知られている。例えば quercetin は K562、Molt-4、Raji、MCAS 癌細胞などにアポトーシスを誘導し⁸⁷⁾、また camptothecin と taxol は多くの癌細胞にアポトーシスを誘導し抗癌作用を示し⁸⁸⁻⁹⁰⁾、protein kinase の阻害剤である genistein は様々な細胞のアポトーシスを誘導したり阻害したりし⁹⁰⁻⁹⁵⁾、baicalin はいくつかの肝癌細胞系や HIV 感染させた T リンパ球にアポトーシスを誘導する一方で正常な肝細胞やリンパ球の生存率には影響を与えない^{96, 97)}。また植物中の一次・二次代謝産物は、相乗的で広範なスペクトルを持つ抗酸化

物質として機能している可能性がある⁹⁸⁾。酸化ストレスはアポトーシス誘導物質としてだけでなく、アポトーシスのシグナル転写系の細胞内伝達物質としても重要である^{99, 100)}。それゆえ、植物由来代謝物質はアポトーシス阻害能を持つ可能性がある。植物資源中に存在する物質がアポトーシスに影響を与えるかどうかを明らかにすることはアポトーシスの分子メカニズムの解明の一助になるものと考えられる。

これまでに *in vitro* の肝細胞アポトーシス試験系を作成して 200 ~ 300 種類の植物抽出エキスと漢方方剤の作用が検討され、インチンコウ (*Artemisia capillaries spica*) とその成分に肝細胞のアポトーシス阻害作用が認められている¹⁰¹⁾。

そこで本章では断片化 deoxyribonucleic acid (DNA) 量を測定する *in vitro* のアポトーシス試験系を胸腺細胞に応用できるように改良し、この試験系を用いて様々な漢方方剤についてグルココルチコイドで誘発される胸腺細胞のアポトーシスおよび抗癌剤で誘発される胸腺細胞のアポトーシスに対する阻害作用を検討した。

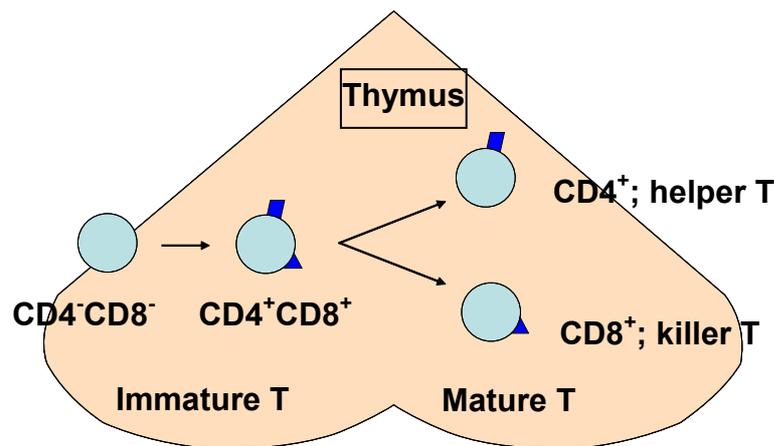


Figure 4-1. T cell differentiation in thymus¹⁸⁷⁾

第2節 マイクロアッセイ法の確立

合成グルココルチコイドである dexamethasone を *in vitro* で処理すると、胸腺細胞は典型的な DNA ラダーを形成する。DNA ラダーはアポトーシス誘導の確実な証拠である。今回、断片化 DNA 量を蛍光色素 3,5-diaminobenzoic acid dihydrochloride を用いて測定することでアポトーシスを定量できた。このマイクロアッセイ法は基本的には断片化 DNA 量を測定する diphenylamine を用いた手法と同じであり、あらかじめ試験系として定量性、再現性に問題がないことを確認した (data not shown)¹⁰²⁻¹⁰⁴。本アッセイ系を用い dexamethasone で誘導されるマウスの胸腺細胞のアポトーシスを検討したところ、dexamethasone は濃度依存的、経時的にアポトーシスを誘導し (Figure 4-2)、 5×10^{-9} M の濃度でプラトーに達した。用時調整した胸腺細胞を 10^{-7} M の dexamethasone で処理すると、処理開始 3 時間後からアポトーシスが誘導され始め、18 時間後には断片化 DNA は 92.4 % に達した。無処理の胸腺細胞をそのまま 18 時間培養した時の断片化 DNA は 24.1 % であった。

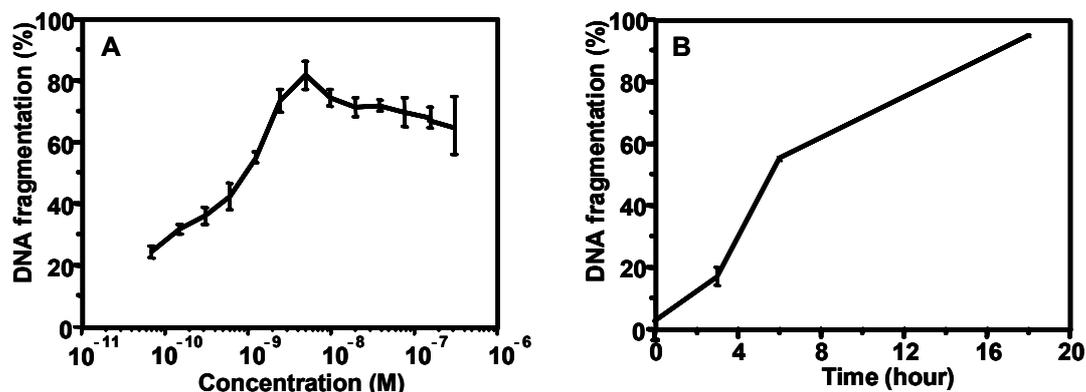


Figure 4-2. DNA fragmentation induced by DEX in thymocytes. (A) Concentration dependency of dexamethasone (DEX)-induced DNA fragmentation. Cells were incubated for 18 hours in the presence of various concentrations of DEX. DNA fragmentation was measured as described in Materials and Methods. Values represent means \pm SD ($n = 3$). The data shown are representative of three independent experiments with similar results. (B) Time course of DEX-induced DNA fragmentation. Cells were treated for various times with 10^{-7} M DEX. DNA fragmentation was measured as in Materials and Methods. Values represent means \pm SD ($n = 3$). The data shown are representative of three independent experiments.

第3節 黄連解毒湯による dexamethasone 誘発胸腺細胞アポトーシス阻害作用

この試験系を用いて dexamethasone で誘導される胸腺細胞に対し 126 種の漢方方剤 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) がどのように作用するかどうかを検索した。その結果、黄連解毒湯、三黄瀉心湯に濃度依存的なアポトーシス阻害作用が認められた (Figure 4-3)。他の方剤は細胞死に対し阻害作用が弱いかないかのどちらかであった (data not shown)。次いで 200 種以上の生薬抽出エキス (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) について同様に阻害作用を検索したところ、黄連解毒湯および三黄瀉心湯の構成生薬の 1 つであるオウレンに濃度依存的な阻害作用を認めた (Figure 4-3)。その作用は 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でプラトーに達した。これらのことから、黄連解毒湯および三黄瀉心湯の胸腺細胞アポトーシス阻害作用はその構成生薬であるオウレンに由来するものである可能性が示された。

次いでオウレンによる胸腺細胞のアポトーシス阻害活性を断片化 DNA の定量だけでなく他の方法でも確認した。まずアガロースゲル電気泳動により dexamethasone 添加培養後の胸腺細胞から抽出した DNA の断片化を確認したが、オウレン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した場合には断片化 DNA のラダーパターン形成は抑制された (Figure 4-4)。

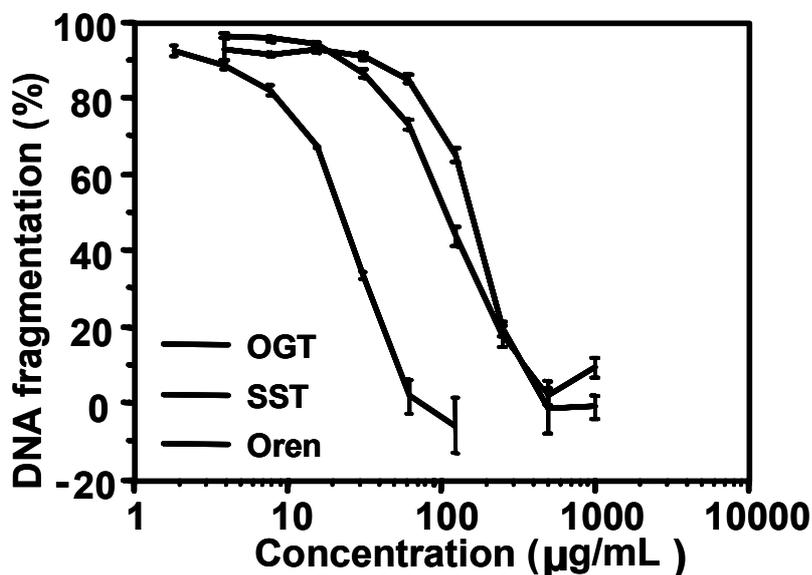


Figure 4-3. Concentration dependent inhibition of DEX-induced DNA fragmentation by OGT, Sannoshasinto (SST) and Oren extract. Cells were treated for 18 hours with 10^{-7} M DEX in the presence of various concentrations of each Kampo medicine and Oren extract. DNA fragmentation was measured as described in Materials and Methods. Values represent means \pm SD ($n = 6$). The data shown are representative of two (OGT or SST) or five (Oren extract) independent experiments.

さらにオウレンの dexamethasone 誘発胸腺細胞アポトーシス阻害作用を電子顕微鏡下で形態学的に検索した (Figure 4-5)。Dexamethasone で処理すると 6 時間後には典型的なアポトーシス像、即ち細胞サイズの縮小と核の濃縮が起っていた。オウレンを同時に処置すると、これらのアポトーシス像は観察されず正常な細胞が観察された。



Figure 4-4. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from Oren-treated /untreated thymocytes. Cells were treated for 6 hours with 10^{-7} M DEX in the presence of $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ of the Oren extract. 3×10^6 cells were digested with RNA Ribonuclease (RNase) A and proteinase K as in Materials and Methods and the crude DNA mixtures were electrophoresed on a 2 % agarose gel.

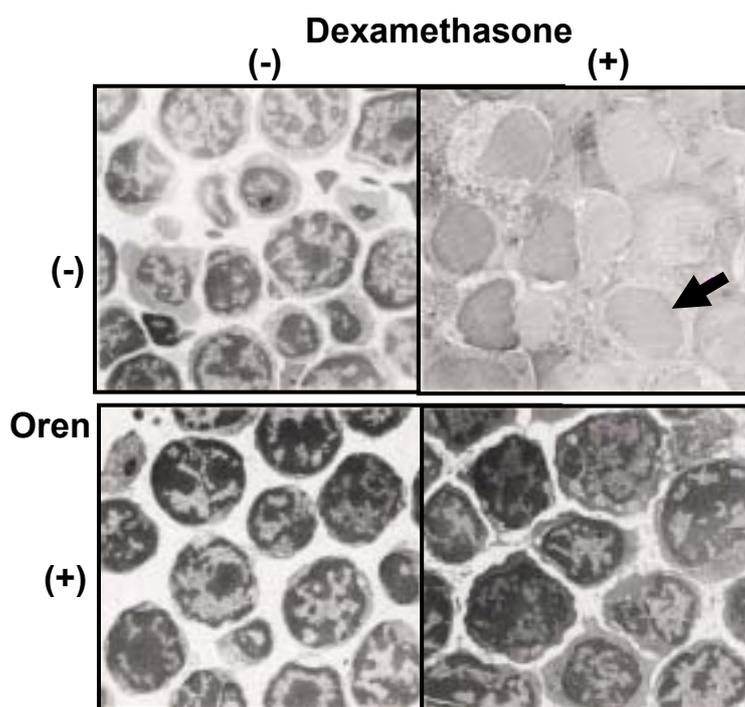


Figure 4-5. Morphological examination of Oren-treated thymocytes by electron microscopy. Cells were incubated for 6 hour in control cultures (A) in the presence of 10^{-7} M DEX (B), $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ of Oren (C), or 10^{-7} M DEX and $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ of Oren (D). Apoptotic cells (an arrow in B) were characterized by chromatin condensation (Original magnification: x 4,000).

第4節 オウレンのアポトーシス抑制作用物質の検索

次に、オウレンのアポトーシス抑制作用物質の検索を行った。オウレンは berberine をはじめとする benzodioxolo-benzoquinolizine 系のアルカロイドを多量に含むことで知られる。そこでこれら成分による dexamethasone 誘発アポトーシス抑制作用を検討した。その結果、berberine は濃度依存的にアポトーシス阻害作用を示した (Figure 4-6)。他に類似構造のアルカロイドとして columbamine、palmatine、epiberberine、groenlandicine、jateorrhizine、magnoflorine についてもアポトーシス阻害活性を検討したところ、オウレンに含まれていることが知られる columbamine、palmatine、epiberberine、groenlandicine、jateorrhizine にはアポトーシス阻害活性が認められ、オウレンには含まれていない magnoflorine (aporphin 系アルカロイド) にはアポトーシス阻害活性が認められなかった (Figure 4-7)。以上より、オウレンの dexamethasone 誘発アポトーシス阻害活性は berberine とその類似化合物によるものである可能性が示された。

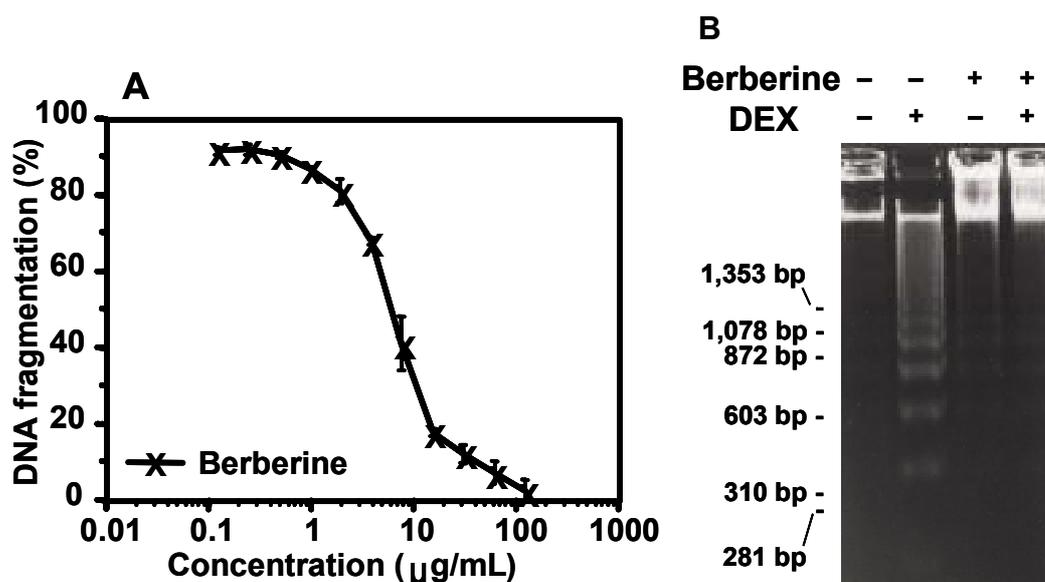


Figure 4-6. Inhibition of DEX-induced DNA fragmentation by berberine. (A) Cells were treated for 24 hours with 10^{-7} M DEX in the presence of various concentrations of berberine. DNA fragmentation was measured as described in Materials and Methods. Values represent means \pm SD ($n = 6$). The data shown are representative of two independent experiments with similar results. (B) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from berberine-treated/untreated thymocytes. Cells were treated for 6 hours with 10^{-7} M DEX in the absence or presence of 20 μ g /mL of berberine. DNA electrophoresis was performed as described in Fig. 4-4.

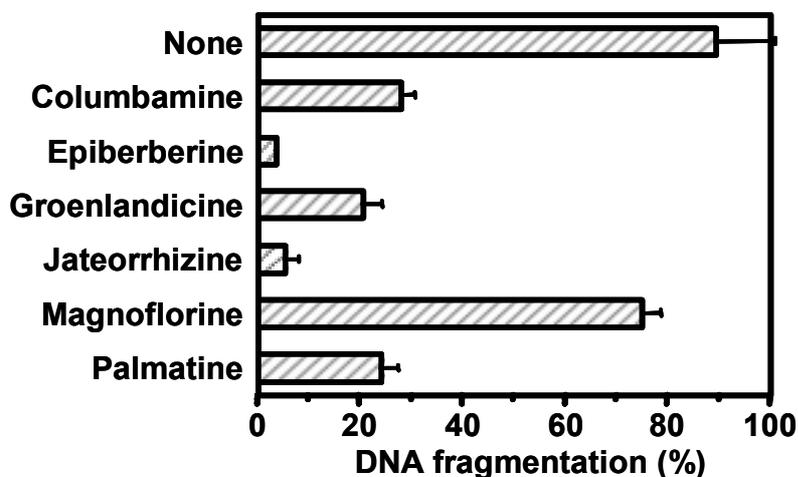


Figure 4-7. Effects of various ingredients isolated from Oren on DEX-induced DNA fragmentation in thymocytes. Cells were incubated for 16 hours in the presence of 10^{-7} M DEX and $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ each ingredient and assayed for DNA fragmentation as described in Materials and Methods. Values represent means \pm SD ($n = 6$).

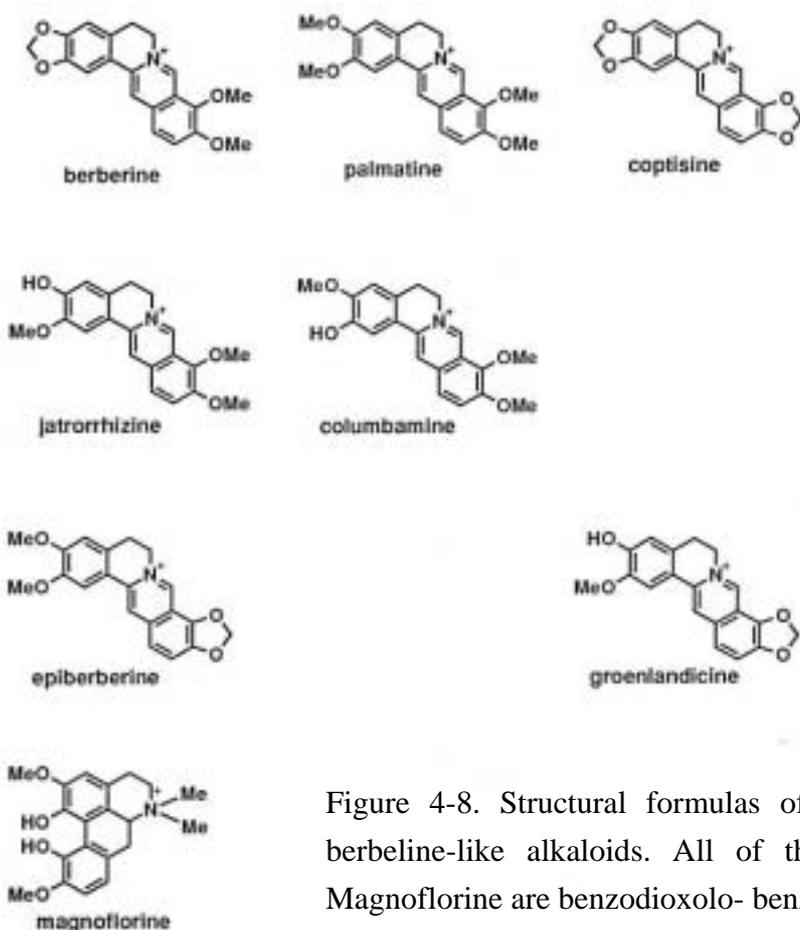


Figure 4-8. Structural formulas of berberine and berbeline-like alkaloids. All of them except for Magnoflorine are benzodioxolo- benzoquinolizine.

第5節 DNA断片化以外の手法によるオウレンのアポトーシス阻害作用の検索

前節まで観察されたオウレンの作用は、アポトーシス誘発早期のDNAの断片化と核の濃縮によって検出してきたが、それ以外にもアポトーシス誘発後期には細胞膜機能の低下や最終的には細胞膜構造の傷害など、様々な過程が含まれる。そこでDNA断片化と核の濃縮以外の手法でオウレンの作用を検討した。その結果、生細胞によるトリパンプルー染色液の細胞外排出機能や、死細胞から培養液中に放出される lactate dehydrogenase (LDH)量に対してもオウレンの dexamethasone 誘発アポトーシス(培養24時間)抑制作用が認められた(Table 4-1)。トリパンプルー排出機能とLDH放出のそれぞれから求めた生存率には違いがあるが、これはそれぞれの測定方法の感度による違いと、測定原理の違いによりそれぞれ測定時点で残存する細胞膜機能、または膜構造が反映されるからであると考えられた。また、オウレンの作用と同様に *de novo* タンパク合成阻害剤である cycloheximide にも dexamethasone で誘発される細胞膜機能の低下と細胞膜構造傷害の阻害作用が認められた。以上より、オウレンはアポトーシスの過程の早期のDNA断片化と核の濃縮のみならず、後期の細胞膜機能低下と細胞膜構造の傷害に対しても阻害作用を示すことが明らかとなった。

Table 4-1. Effects of Oren extract on viability: LDH release and trypan blue exclusion test

Treatment	Viability (%)	
	LDH	Trypan blue
None	38.9 ± 15.9	9.6 ± 8.3
CHX 12.5 ng/mL	88.1 ± 1.8	69.0 ± 12.3
Oren 50 µg/mL	102.8 ± 1.4	45.8 ± 9.6

Thymocytes were seeded at a density of 6×10^6 cells/mL in 96-well microplates and incubated with 10^{-7} M DEX in the presence or absence of Oren or cycloheximide (CHX) at concentrations indicated in the table. LDH release and trypan blue exclusion were determined at 24 hour as described in Materials and Methods. The Oren extract and CHX, a well-known inhibitor of thymocyte apoptosis showed suppressive activity on the DEX-induced loss of viability. Data are means \pm SD (n = 3).

第6節 抗癌剤誘発アポトーシスに対する作用

最後に、抗癌剤誘発胸腺細胞アポトーシスに対する berberine の作用を検討した。Etoposide と camptothecin は DNA トポイソメラーゼを阻害することによりアポトーシスを誘導する。これら薬剤を 10^{-5} M で処理し胸腺細胞にアポトーシスを誘導した。そこに黄連解毒湯、オウレン、berberine を同時に添加したとき、etoposide または camptothecin で誘発される胸腺細胞のアポトーシスを抑制した (Table 4-2)。

Table 4-2. Effects of OGT, Oren extract, and berberine on anticancer-drug-induced apoptosis

Treatment		DNA fragmentation (%)	
		Etoposide	Camptothecin
None		81.8 ± 3.1	82.6 ± 1.4
CHX	12.5 ng /mL	31.8 ± 2.5	30.0 ± 1.2
OGT	100 µg /mL	56.0 ± 4.3	57.8 ± 2.0
Oren	100 µg /mL	43.6 ± 2.7	44.1 ± 4.5
Berberine	100 µg /mL	38.6 ± 8.3	52.5 ± 8.2

Thymocytes were incubated for 18 hours with 10^{-5} M etoposide or 10^{-5} M camptothecin in the presence or absence of OGT, Oren extract, berberine, or CHX at concentrations indicated in the table. DNA fragmentation was measured as described in Materials and Methods. Data are means ± SD (n = 6). CHX was used for comparison.

第7節 考察

植物成分中からアポトーシス抑制物質を探し出すためには、多量のサンプルを測定できる簡便な測定系が必要である。自然に増殖している細胞では^[3H]thymidine とハーベスト装置を用いた DNA 断片定量マイクロアッセイ系がある¹⁰¹⁾。一方通常では増殖しない細胞では^[3H]thymidine を用いた手法は用いることができないため、本章では異なるマイクロアッセイ系を提案した。即ち、96 穴プレートを用いた標準的な DNA 断片化測定法に改良を加え、diphenylamine による簡易 DNA 定量をより感度の高い蛍光色素 3,5-diamino benzoic acid dihydrochloride に変更した。本手法は他の標準的 DNA 断片化測定法と同様の結果を得ることができた。

これまでにいくつかのアポトーシス試験系各種漢方処方と生薬エキスの阻害作用を検討した。例えば肝細胞・Morris 肝癌細胞の TGF- β 1 誘発アポトーシス、様々な臓器由来細胞の Fas 誘発アポトーシスである¹⁰¹⁾。そして本章では改良したこの手法を用いて胸腺細胞の glucocorticoid・抗癌剤誘発アポトーシスについて検討した。マウス胸腺細胞の dexamethasone 誘発アポトーシスではオウレンとオウレンを含む漢方処方にアポトーシス抑制作用が認められた。オウレンによる抗アポトーシス作用はこの胸腺細胞アポトーシスに限定され、肝細胞やいくつかの肝癌細胞、ヒトの前ミエローマ白血病細胞 HL-60 のアポトーシス誘発モデルでは作用がないか、あっても弱い作用しか認めなかった (data not shown)。同様の細胞特異性・系特異性は他の生薬エキスでも認められ、例えばインチンコウエキスは Morris 肝癌細胞 McA-RH8994 細胞やラット肝細胞、いくつかの肝癌細胞株では強い抗アポトーシス活性を持つが¹⁰¹⁾、マウス胸腺細胞やいくつかのヒトの T 細胞株、HL-60 細胞などではそのような活性を示さなかった (data not shown)。アポトーシス誘導シグナル伝達系には様々な多様性が知られており¹⁰⁵⁾、ある特定の生薬エキスのアポトーシス阻害作用には細胞特異性があるものと考えられる。

本章で抗アポトーシス作用の認められた berberine はメギ科やキンポウゲ科の多くの植物中に含まれる benzodioxolo - benzoquinolizine 系のアルカロイドで、何世紀もの間ヨーロッパやアジアで胃腸炎や下痢に用いられてきた。抗分泌作用や抗炎症作用、抗菌作用、抗癌作用など多彩な薬理的・生物学的活性が知られている^{38, 106-116)}。Berberine はいくつかの癌細胞で細胞傷害活性を示し、また HL-60 ではアポトーシスを誘導する^{117, 118)}。これらの報告とは逆に本章では berberine は dexamethasone、etoposide、camptothecin で誘発した胸腺細胞のアポトーシスを阻害した。Berberine 系アルカロイドがアポトーシスを抑制するという知見は知る限りにおいて本報告が初めてである。

ある種の抗癌剤は癌細胞 DNA との相互作用によりアポトーシスを誘導する。Berberine は DNA に強固な結合をすることが知られており、berberine の抗癌作用や抗菌作用は DNA との相互作用によるのではないかと考えられている¹¹⁹⁻¹²²⁾。事実、Kuo らは HL-60 に berberine でアポトーシスを誘導したとき、DNA に近いところに berberine が存在することを見出した¹¹⁸⁾。しかし、彼らはまた berberine 系アルカロイドの1つである palmatine は DNA に強固に結合するにもかかわらず、berberine と異なり HL-60 にアポトーシスを誘導しないことを報告している。本章では berberine も palmatine もその他の berberine 系アルカロイドも、構造の異なる magnoflorine を除いて、berberine 同様の抗アポトーシス作用を示した。これらのことから、berberine の DNA との結合は致死的な場合だけではなく、その他の細胞内での過程が berberine の細胞毒性や細胞保護作用を誘導しているのであろう。

Berberine はまた S180 癌細胞や 9L ラットグリオーマ細胞の DNA 合成、ribonucleic acid (RNA)合成、タンパク合成を阻害することが報告されている^{112, 117)}。一方、berberine 同様に cycloheximide や Actinomycin D などの高分子合成阻害剤が胸腺細胞のアポトーシスを阻害することから、このアポトーシス誘導系ではある種の『キラー分子』の生合成が細胞死誘導機序に存在することがわかる^{123, 124)}。そのことから、berberine の抗アポトーシス活性にはタンパク合成阻害活性が関与している可能性がある。ただしアポトーシス誘導時の *de novo* 合成にはある種の規則が存在することがわかっている。例えば、cycloheximide は同じ細胞でも刺激剤に対する反応の違いによってアポトーシスを誘導するか阻害するかが異なる¹²⁵⁻¹²⁷⁾。タンパク合成阻害剤 puromycin は胸腺細胞にアポトーシスを誘発し、cycloheximide は同じくタンパク合成阻害剤であるが puromycin 誘発胸腺細胞アポトーシスを抑制する¹²⁸⁾。また、本章には示さなかったが、高分子阻害剤ではアポトーシスを抑制できないような T 細胞株でも、berberine はアポトーシス抑制作用を示した(data not shown)。

アポトーシス阻害作用が即ち生存細胞の増加ではないという点には注意が必要である。Lock らは HeLa 細胞で bcl-2 を発現させると etoposide で誘発されるアポトーシスを抑制するが、コロニー形成アッセイで測定する限り生存率は増加していなかったと報告している¹²⁹⁾。本章では dexamethasone 誘発アポトーシスの阻害についてはいくつかの手法で確認したが、残存した胸腺細胞の機能については未確認である。今後は berberine のアポトーシスへの効果を明らかにするだけでなく、胸腺細胞の機能を検討することが薬物の薬効についての理解をさらに深めることになるであろう。

生薬エキスは多数の成分を含んでおり、その生物活性はたいてい単純ではない。本章でも、多くの berberine 系アルカロイドが dexamethasone 誘発アポト

ーシスを阻害した。その活性強度は成分ごとに異なり、構造活性相関による、より強いアポトーシス阻害活性を持つ分子の発見にもつなげる情報である。胸腺細胞に対し抗アポトーシス作用を示すことは免疫制御活性を持つ可能性を示しており、ひいては免疫学的な疾患の治療にも役立つ可能性がある。Berberineのアポトーシス抑制作用機序、特に berberine がターゲットとする分子を解明することは非常に重要であり、今後の検討課題である。

第五章 各種細胞からの一酸化窒素産生に対する作用の検討

第1節 緒言

炎症反応において、一酸化窒素 (NO) はさまざまな酵素反応を抑制し細胞の呼吸や DNA 合成も含めた機能を低下させる¹³⁰⁻¹³²⁾。急性炎症を抑制するという意味において NO によるこれらの作用は生体防衛的である一方、NO の過剰産生あるいは持続的産生は周囲の細胞へダメージを与えたり本来必要な細胞の機能を低下させたりする結果となる。例えばウイルス性肝炎などではクッパー細胞や浸出細胞が多くのサイトカインや活性酸素、NO ラジカルを産生し、肝細胞もまた interferon (IFN) や IL-1、TNF などの炎症性サイトカインの刺激により NO を産生する¹³³⁻¹³⁷⁾。過剰に産生された NO は発癌性を持つ N-nitroso 化合物や DNA の脱アミノ化を惹き起こし発癌へと導く¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾。それゆえ慢性的な NO 産生の増加は慢性ウイルス性肝炎や肝硬変によって肝機能を低下させ肝癌発症リスクを増加させる可能性がある¹⁴¹⁻¹⁴³⁾。ゆえに炎症時に肝細胞や肝癌細胞、マクロファージから産生される NO を効果的に阻害することにより、細胞成分がダメージを受けたり肝細胞が癌化したりするのを防ぐことが可能であろう。

また一方で NO は多機能メディエーターであり神経伝達や非特異的免疫防御、血管拡張などの重要な生理機能を担っている¹⁴⁴⁾。血管系において NO はもともと endothelium-derived relaxing factor として同定され、脈拍と末梢血流の基本的なコントロールを行っている^{145, 146)}。血管内皮細胞由来の NO は血管平滑筋を弛緩させ、血小板接着・凝集を抑制させる。血管平滑筋は血管内皮細胞由来の NO だけでなく、L-arginine から酵素反応で産生される NO にも反応する¹⁴⁷⁾。Charpie らは脈拍の制御において血管平滑筋由来の NO はオートクリンとして作用していると報告している¹⁴⁸⁾。NO のこれらの作用は可溶性の soluble guanylate cyclase (sGC) の活性化を介して細胞内 cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) の増加を誘導している可能性がある¹⁴⁵⁾。

このように多様な薬理作用を持つ NO の産生をコントロールすることは疾患治療の有効な手段の 1 つである。そこでまず本章では、マウスのマクロファージ細胞株とラットの肝細胞を用いて *in vitro* での NO 産生モデル実験系を作成した。これらの細胞はそれぞれ LPS、または TNF と IL-1 の共刺激により NO を産生した。ここに漢方処方に加え NO 産生を阻害するかどうか検討した結果、129 処方のうち黄連解毒湯に最も強い NO 産生誘導阻害作用を認めた。そこで、黄連解毒湯の NO 産生阻害作用とその作用機序を検討した。

次いで本章では血管平滑筋からの NO 産生促進作用をもつ生薬エキスについて、その誘導機序について検討した。血管平滑筋からの NO 産生促進作用の強かった

生薬エキスは、黄連解毒湯の構成生薬の一つであるオウゴンと、ほかにニンジン (Ginseng Radix)、オウギ (Astragali Radix) であった¹⁴⁹⁾。そこでこれらのエキスの NO 産生誘導機序について検討した。

Table 5-1. NO synthase (NOS) isozyme¹⁵⁰⁾

	神経型 NOS nNOS NOS-I	内皮型 NOS eNOS NOS-III	誘導型 NOS iNOS NOS-II
分子量	160kDa	135kDa	130kDa
細胞内局在	細胞質・膜	細胞膜	細胞質
組織分布	神経細胞・骨格筋 ・気道・胃上皮など	内皮細胞・神経細胞	全ての細胞
活性制御	Ca ²⁺ /カルモデュリン	Ca ²⁺ /カルモデュリン	転写誘導
4次構造	2量体	多量体	2量体
脂質修飾	なし	ミリストイル化 ・パルミトイル化	なし

第2節 LPS 刺激による RAW264 細胞からの NO 産生誘導に対する作用

マウスのマクロファージ系細胞 RAW264 を 48 時間 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LPS で刺激培養すると NO が産生された。129 処方の漢方方剤 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を同時に添加したとき、黄連解毒湯、三黄瀉心湯、柴胡桂枝乾姜湯に NO 産生阻害作用が認められた (Figure 5-1)。WST-1 アッセイで確認した限りはこれらの処方には特に細胞毒性は認められなかった (data not shown)。これら 3 処方のうち黄連解毒湯に最も強い NO 産生阻害作用が認められたことから、その構成生薬についても NO 産生抑制作用を検討した。その結果、オウゴンとオウレン、およびそれぞれの主な成分である baicalin、berberine に NO 産生阻害作用が認められた (Figure 5-2)。

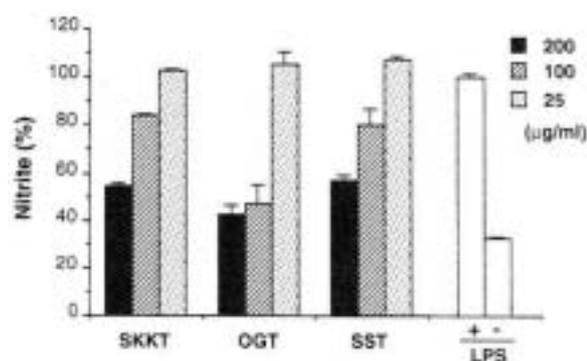


Figure 5-1. Inhibitory effects of Kampo medicines on LPS-induced nitric oxide production from RAW264 cells. Dose-dependent inhibition by Orengekuto (OGT), Sanoshasinto (SST), Saikokeishikankyoto (SKKT) on NO production is demonstrated. All data represent means \pm SE for triplicate determination. Open columns indicate nitrite of conditioned medium in the culture with (+) or without (-) LPS. Nitrite in the culture treated with LPS in the absence of added samples was set at 100 % and the relative ratio of nitrite is indicated as % that of the LPS-stimulated culture. Nitrite in the culture media after treatment with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (shaded columns), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hatched columns) or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (stippled columns) is shown.

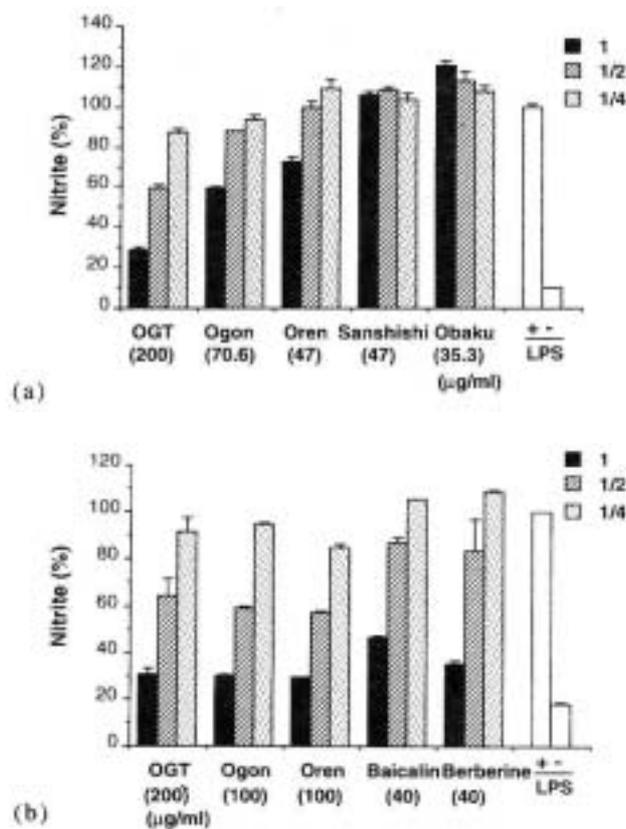


Figure 5-2. Inhibition by OGT, its constituent herbal extracts and some ingredients on LPS-stimulated NO production from RAW264 cells. (a) Doses of each herbal extract in 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OGT are indicated in parentheses in demonstrated by the shaded columns. Results obtained at 1/2 and 1/4 doses are demonstrated by hatched and stippled columns, respectively. Open columns indicate nitrite of conditioned medium in the culture with (+) without (-) LPS. Nitrite in the culture treated with LPS alone was set at 100 % and relative ratio of notrite is indicated as % of the LPS-stimulated culture. All data represent means \pm SE for triplicate determinations. (b) Shaded columns show nitrite in the culture treated with the reagents at doses indicated in the parentheses. Nitrite obtained at 1/2 and 1/4 doses is demonstrated by hatched and stippled columns, respectively. All data represent means \pm SE for triplicate determinations.

第3節 RAW264 細胞の iNOS 遺伝子の転写に対する作用

以上のように黄連解毒湯、オウレン、オウゴンに LPS 刺激による RAW264 細胞からの NO 産生阻害作用が認められたことから、NO 合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) の 1 つである inducible NOS (iNOS) 遺伝子の転写に対するこれら漢方処方および生薬エキスの作用を検討した。即ち、³²P ラベルした iNOS cDNA をプローブとし、ノーザンブロット分析で RAW264 での iNOS mRNA の発現を検討した (Figure 5-3)。無刺激条件で RAW264 を培養した時 iNOS mRNA はわずかに発現していたが、LPS 存在下で 48 時間培養すると細胞内の iNOS mRNA の発現が顕著に増加した。さらに黄連解毒湯を同時に添加すると iNOS mRNA の誘導が抑制された。オウゴンも同様に iNOS mRNA の転写を抑制した。オウレンは前節では NO 量で測定した NO 産生阻害作用が認められたが、iNOS mRNA の誘導には影響しなかった。また、黄連解毒湯の構成生薬の残りの二つの生薬、オウバクとサンシシも iNOS mRNA の誘導には影響しなかった。

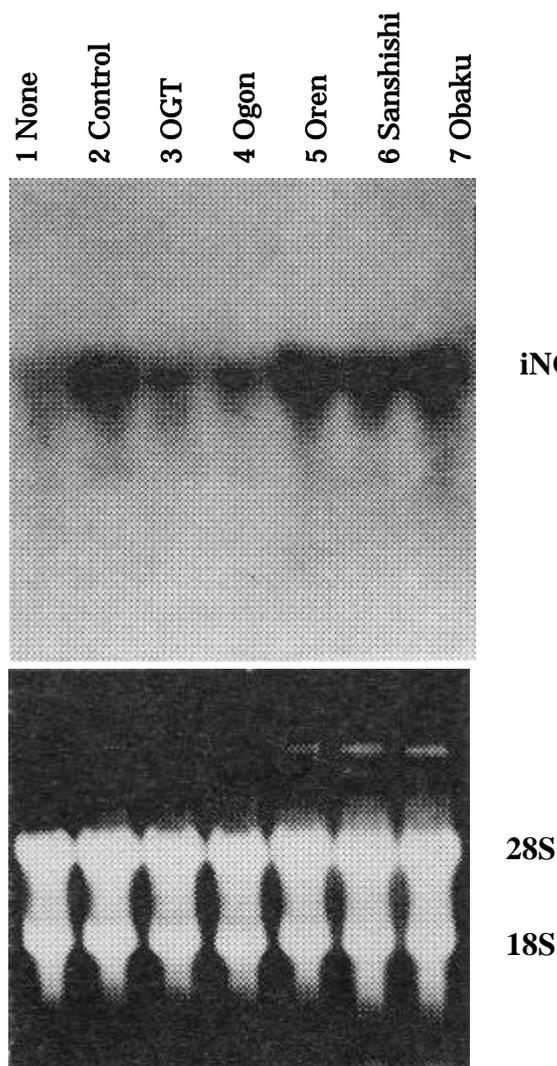


Figure 5-3. Northern blot analysis showing effects of OGT and its constituent herbs on iNOS mRNA expression in RAW264 cells. RNAs were isolated from cells after 48 hour treatment. Northern blot hybridization was performed as described in Materials and Methods. An autoradiograph of Northern blot analysis appears on the upper panel. A photograph of the ethidium bromide-stained gel prior to transfer of RNAs to the nylon membrane appears at the bottom of the figure to demonstrate even loading and positions of ribosomal RNAs. Lane 1 represents non treated cultured cell. Cells in lane 2-7 were treated with LPS to stimulate NO production. OGT and herbal extracts were added at the same doses indicated in Figure 5-2 (a).

第4節 サイトカイン刺激による McA-RH7777 細胞からの NO 産生誘導に対する作用

次いで肝癌細胞 McA-RH7777 に対する作用を検討した。McA-RH7777 は無刺激培養、または、TNF または IL-1 の単独処理では NO 産生量はわずかであったが、TNF と IL-1 を共に処理すると NO を産生した (Figure 5-4)。129 処方の漢方方剤 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を同時に添加したとき、15 処方に NO 産生阻害作用が認められ、さらにそれらの処方についてはより低濃度 (200、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) での作用を検討した (Figure 5-5)。その結果、黄連解毒湯に最も強い NO 産生阻害作用が認められた。黄連解毒湯をはじめ 15 処方とも、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度での WST-1 アッセイで確認した限りはこれらの処方には特に細胞毒性は認められなかった (data not shown)。また、黄連解毒湯の構成生薬のうちオウレンに同様の NO 産生阻害作用が認められ、その主成分である berberine に濃度依存的な NO 産生阻害作用が認められた (Figure 5-6)。黄連解毒湯の構成生薬のうち NO 産生阻害作用の認められなかったオウゴンの主成分である baicaline, baicalein には、予想通り NO 産生阻害作用は認められなかった。

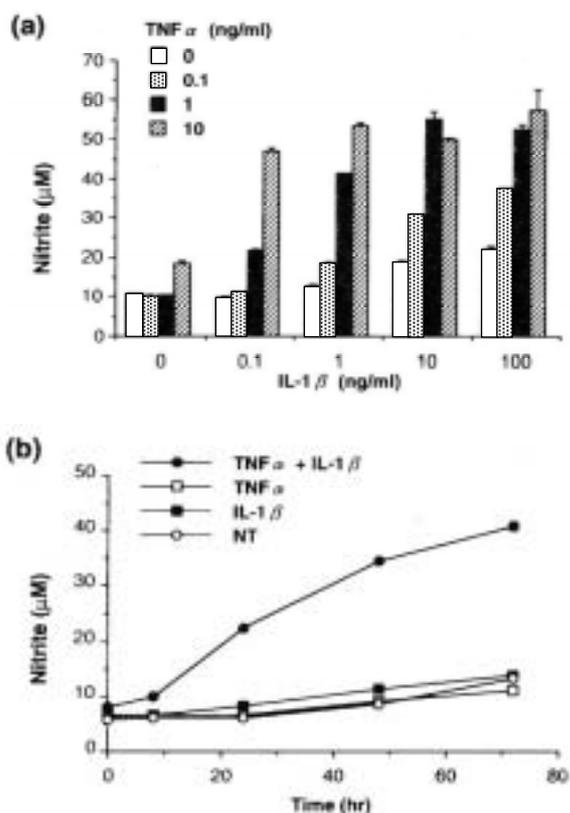


Figure 5-4. Cytokine induced NO production in rat hepatoma McA-RH7777 cells.

(a) Cells were incubated for 48 hours in the presence of varying concentrations of TNF α and/or IL-1 β , and accumulated nitrite in the medium was measured. Synergistic effects by these cytokines on the NO production were demonstrated.

(b) Cells were incubated for varying times in the presence of 1 ng /mL of TNF α and/or 1 ng /mL of IL-1 β . Increased NO production in a time-dependent manner was observed when the cells were stimulated with both cytokines. Cells treated with either of TNF α (1 ng /mL) or IL-1 β (1 ng /mL) did not increase NO production beyond that of non-treated (NT) cells.

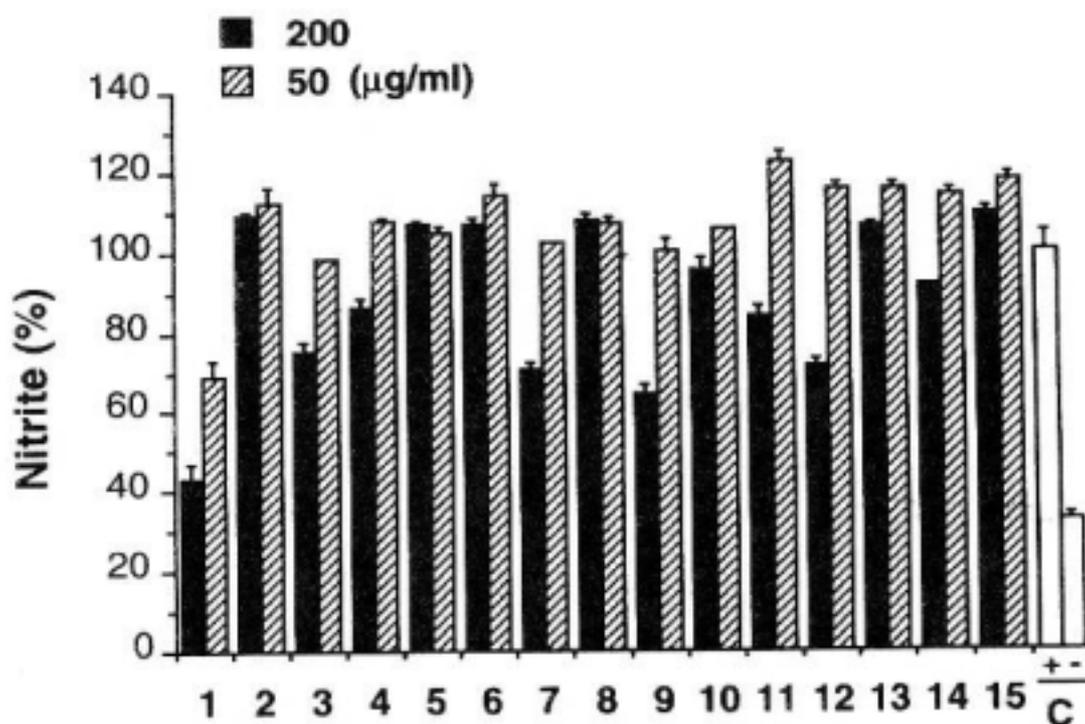


Figure 5-5. Inhibitory effects of Kampo medicines on cytokine-induced NO production in McA-RH7777 cells. Cells were incubated for 48 hours at 37 °C in the medium containing 10 % FBS in the presence of 1 ng /mL of TNF α and IL-1 β . NO was quantified as described in Materials and Methods. All data represent means \pm SE for triplicate determination. Open columns indicate nitrite of the conditioned medium in the culture with (+) without (-) cytokines. Nitrite in the culture treated with cytokines in the absence of added samples was set at 100 % and the relative ratio of nitrite is indicated as % NO of the cytokine-stimulated culture. Nitrite in the culture media after treatment with 200 μ g /mL (shaded columns) or 50 μ g /mL (hatched columns) of samples is demonstrated. 1, OGT; 2, Maoto; 3, Mokuboito; 4, Ryokeyjutsukanto; 5, Keishikashakuyakuto; 6, Tokakujokito; 7, Chojokito; 8, Keishininjinto; 9, Daiokanzoto; 10, Jidabokuippo; 11, Daikenchuto; 12, sanoshasinto; 13, Ryokyojutukanto; 14, Orento; 15, Inchinkoto.

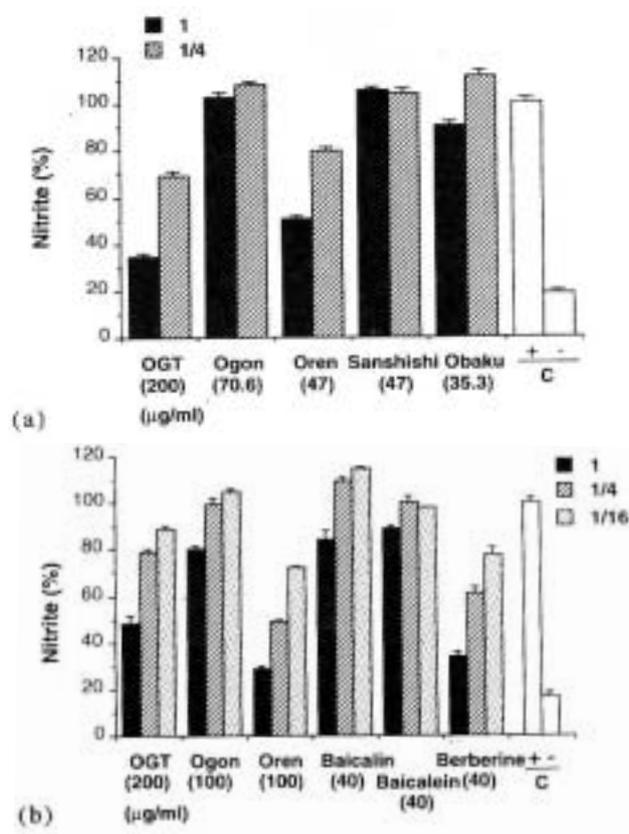


Figure 5-6. Inhibition by OGT, its constituent herbs and some ingredients on cytokine-induced NO production.

(a) Doses of each constituent herb in 200 µg /mL OGT are indicated in parentheses. Nitrite in the culture is demonstrated by the shaded columns. Results obtained at 1/4 doses are shown by hatched columns. Open columns indicate nitrite of conditioned medium in the culture with (+) or without (-) cytokines. Nitrite in the culture treated with cytokines in the absence of added samples was set at 100 % and the relative ratio of nitrite is indicated as % nitrite of the cytokine-stimulated culture. All data represent means ± SE for triplicate determinations.

(b) Shaded columns exhibit nitrite in the culture treated with substances at the doses indicated in the parentheses. Nitrite produced by treatment with 1/4 and 1/16 doses is demonstrated by hatched and stippled columns, respectively. All data represent means ± SE for triplicate determinations.

第5節 McA-RH7777 細胞の iNOS 遺伝子の転写に対する作用

第3節と同様にノーザンブロット分析で RAW264 での iNOS mRNA の発現を検討した (Figure 5-7)。無刺激条件で McA-RH7777 を培養した時 iNOS mRNA はほとんど検出されなかったが、TNF と IL-1 の共培養下で 48 時間培養すると細胞内の iNOS mRNA の発現が顕著に増加した。さらに黄連解毒湯を同時に添加すると iNOS mRNA の誘導が抑制された。生薬エキスでは RAW264 と異なりオウレンに iNOS mRNA の転写抑制作用が認められ、NO 産生量に影響しなかったオウゴンには iNOS mRNA 誘導抑制作用もまた認められなかった。また、黄連解毒湯の構成生薬の残りの二つの生薬、オウバクとサンシシも RAW264 同様 iNOS mRNA の誘導には影響しなかった。

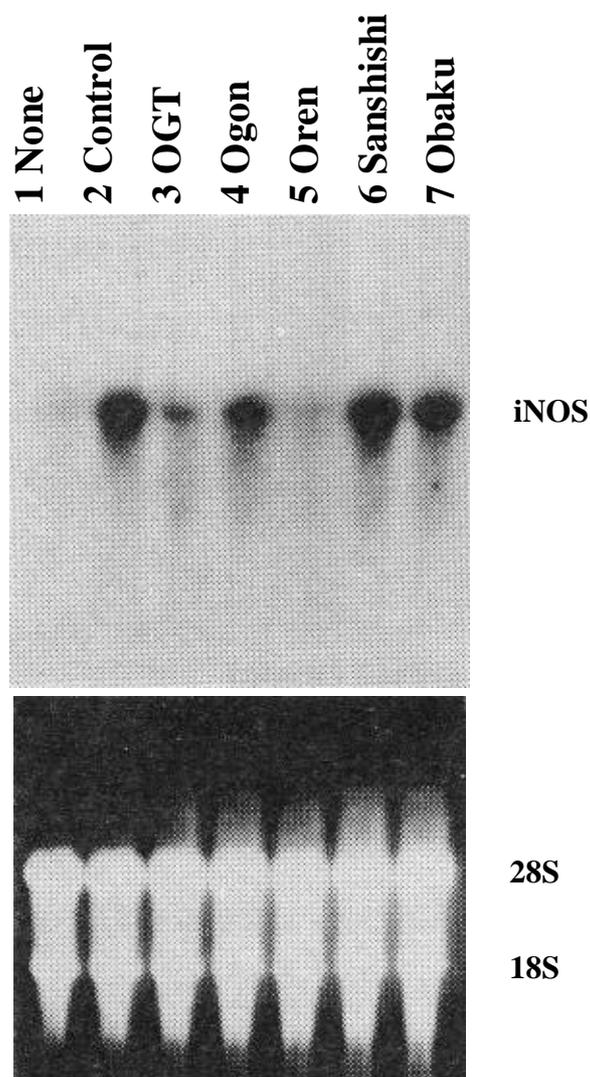


Figure 5-7. Northern blot analysis showing effects of OGT and its constituent herbs on iNOS mRNA expression in McA-RH7777 cells. RNAs isolated from cells after 48 hour treatment were separated by electrophoresis following Northern blot hybridization as same as Figure 5-3. An autoradiograph of Northern blot analysis showing the expression of iNOS mRNA appears on the upper panel. A photograph of the ethidium bromide-stained gel appears at the bottom of the figure. Lane 1 represents non treated cultured cell. Cells in lane 2-7 were treated with TNF α and IL-1 β to stimulate NO production. OGT and herbal extracts were added at the same doses indicated in Figure 5-6 (a).

第6節 血管平滑筋細胞からの iNOS 遺伝子の転写に対するオウゴンの作用

以上のように黄連解毒湯には LPS 刺激による RAW264 からの NO 産生とサイトカイン刺激による McA-7777 からの NO 産生を阻害する作用が認められた。次いで本節では逆に、血管平滑筋細胞からの NO 産生誘導作用について検討した。ラット血管平滑筋細胞の NO 産生誘導作用について、黄連解毒湯の構成生薬の1つであるオウゴンのほか、ニンジン、オウギに NO 産生誘導作用があることがすでに知られている¹⁴⁹⁾。そこでこれら生薬エキスによる iNOS 遺伝子の転写に対する作用を検討した。無刺激条件ではラット血管平滑筋では iNOS はほとんど発現していなかったが、オウゴン、ニンジン、オウギを加え 24 時間培養すると iNOS mRNA の発現が顕著に増加した (Figure 5-8)。

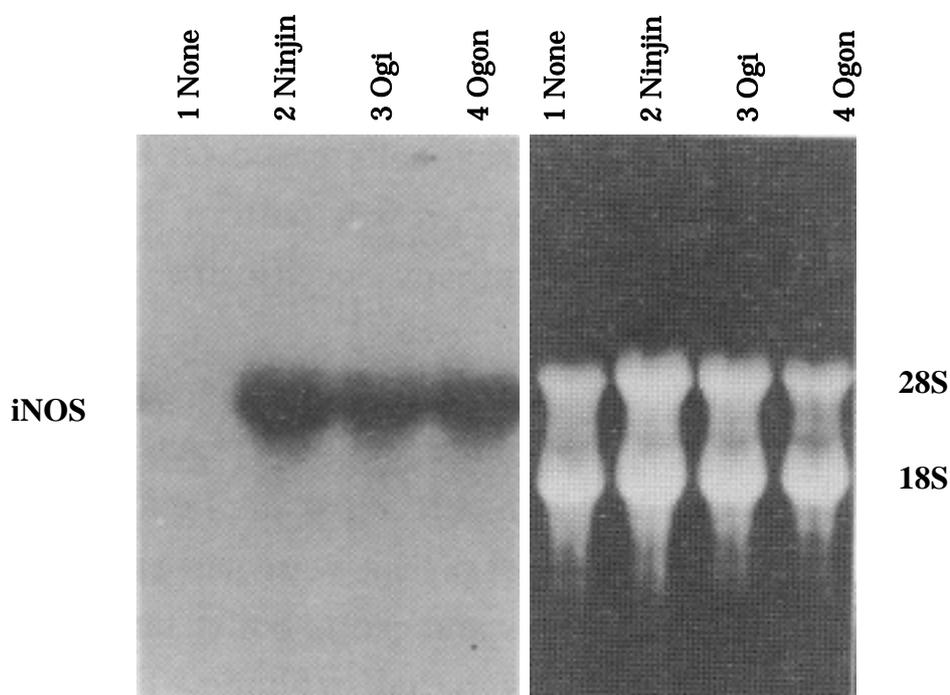
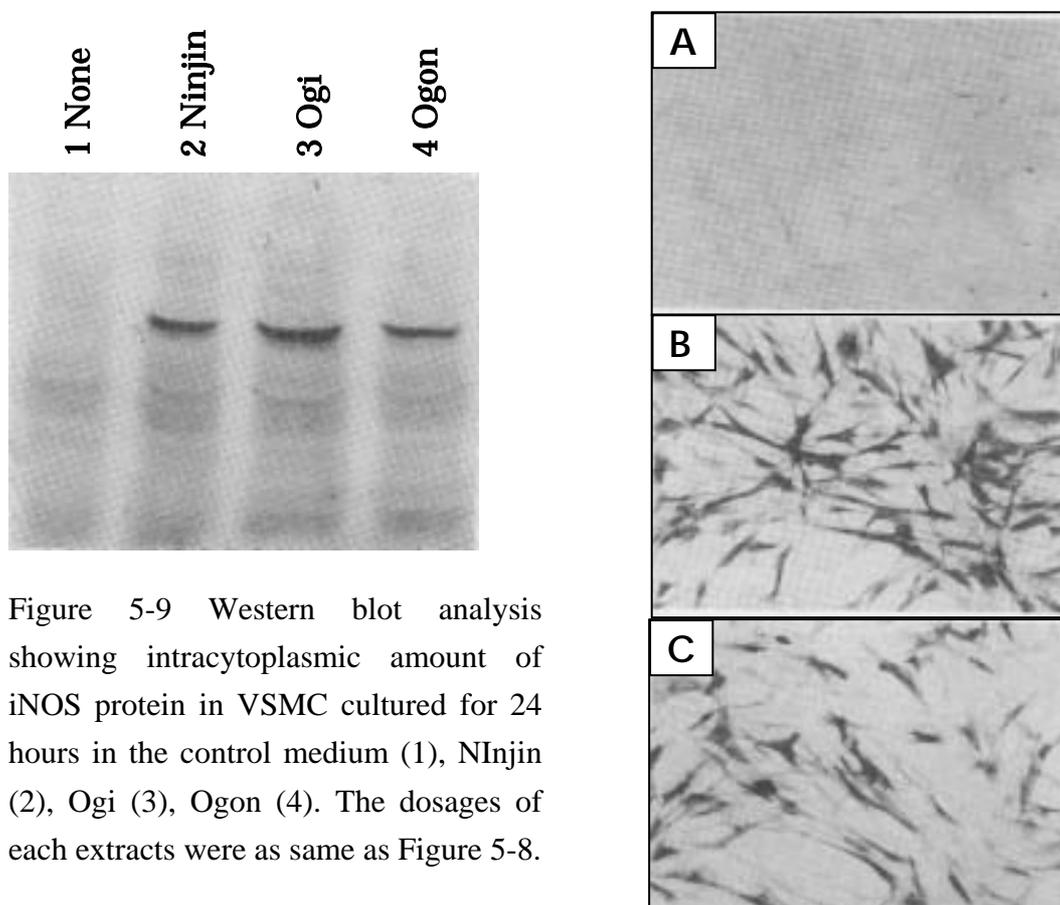


Figure 5-8. Northern blot analysis showing the effects of aqueous extracts of herbs on iNOS mRNA in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC). Ten μg total RNAs isolated from cells cultured for 24 hour in control medium (1), or presence of extracts of Ginseng Radix (2, Ninjin), Astragali Radix (3, Ogi) or Scutellaria Radix (4, Ogon) were separated by electrophoresis following Northern blot hybridization as same as Figure 5-3. An autoradiograph of Northern blot analysis showing the expression of iNOS mRNA appears on the left panel and a photograph of the ethidium bromide-stained gel appears on the right. The dosages of each extract as follows were previously shown to be effective on the induction of NO synthesis in VSMC¹⁴⁹⁾; Ninjin, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Ogi, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Ogon, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

第7節 血管平滑筋細胞の細胞質 iNOS タンパク量に対するオウゴンの作用

次いでマウスマクロファージの iNOS タンパクに対するモノクローナル抗体を用いて、ラット血管平滑筋細胞における iNOS タンパクの発現について検討した。ウェスタンブロット解析の結果、無刺激のラット血管平滑筋細胞では iNOS タンパクはほとんど発現していなかったが、ニンジン、オウギの添加により iNOS タンパクが明らかに発現していた (Figure 5-9)。このことは血管平滑筋細胞を免疫染色しても同様に確認することができた (Figure 5-10)。



第 8 節 血管平滑筋細胞の cGMP に対するオウゴンの作用

最後に血管平滑筋細胞内の cGMP に対する作用を検討した。無刺激での cGMP は 10^4 細胞あたり 3 fmol 以下の発現量であったが、オウゴン、ニンジン、オウギを処理すると、24 時間後に濃度依存的に細胞内 cGMP の増加を認めた (Figure 5-11)。NOS と可溶性 guanylate cyclase それぞれの阻害剤である N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMA) と methylene blue をこのとき同時に添加すると、生薬エキスにより増加した細胞内 cGMP の増加が抑制された (Figure 5-12)。以上より、これらの生薬エキスによる cGMP の増加には NO-可溶性 guanylate cyclase のシグナル伝達が関与していることが確認できた。

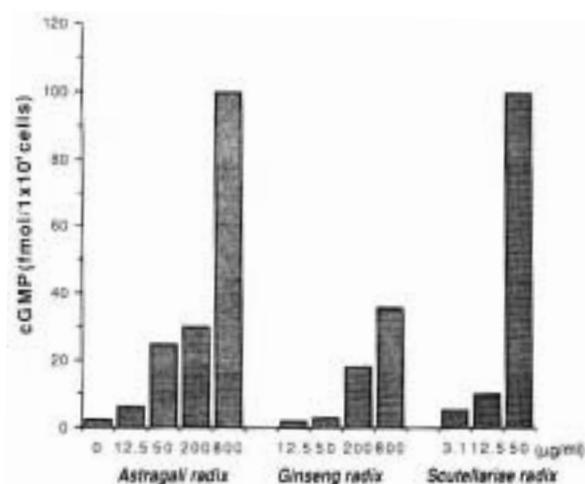
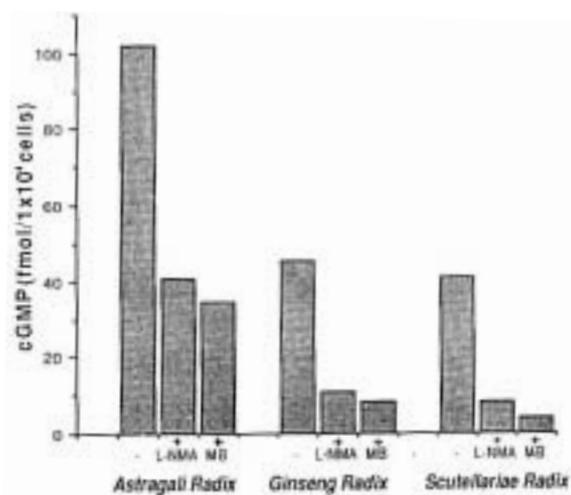


Figure 5-11. Measurement of cGMP in VSMC cultured for 24 hours in the absence (Ccontrol) or presence of extracts of *Scutellariae radix* (Ogon), *Ginseng radix* (Ninjin) or *Astragali radix* (Ogi). Intracytoplasmic cGMP was expressed in femtomoles per 10^4 cells. Data shown were representative of three independent experiments, which gave similar results. Values represent means of two samples with duplicate measurements.

Figure 5-12 Effects of L-NMA and methylene blue (MB) on cGMP production in VSMC induced by extracts of *Scutellariae radix* (Ogon), *Ginseng radix* (Ninjin) or *Astragali radix* (Ogi). Increase in intracellular cGMP induced by herbal extracts was markedly reduced by the simultaneous incubation with 1 mM L-NMA or 5 μ M MB. Intracytoplasmic cGMP was expressed in femtomoles per 10^4 cells. Data shown were representative of three independent experiments, which gave similar results. Values represent means of two samples with duplicate measurements.



第3節 考察

(1) RAW264、McA-777 細胞に対する NO 産生阻害作用について

NO は神経伝達、非特異的免疫防御など様々な重要な生理機能を担う多機能メディエーターである^{144, 145)}。NO は NOS の 3 つの isozyme (iNOS、eNOS、nNOS) によって L-arginine から生合成される^{151, 152)}。はじめ iNOS はマクロファージを LPS と IFN で刺激したとき誘導される分子として同定されたが、今では様々な細胞で誘導されることが知られる。肝細胞もまた TNF、IL-1、IFN などのサイトカイン刺激によって iNOS を誘導する¹³⁴⁻¹³⁷⁾。それゆえ、慢性肝炎ではクッパー細胞などの炎症性の細胞だけでなくサイトカインで刺激された肝細胞からも大量の NO が産生される^{134-136, 143, 153)}。

炎症性の肝疾患における NO の役割についてはいまだ様々な議論がある。NO は LPS により誘導される肝障害では細胞保護的に作用するという報告がある。例えば Harbrecht らは *Corynebacterium Parvum* 感受性のマウスでは NOS の競合的阻害剤は LPS 誘発肝障害を悪化させると報告している¹⁵⁴⁾。しかし大量の NO 誘導は炎症性肝疾患における癌化など、肝障害の悪化要因になるといわれる¹⁴¹⁻¹⁴³⁾。NO は細胞の呼吸や DNA 合成などに関わる酵素を阻害することで細胞機能を低下させる^{130, 131)}。NO 産生の増加はまた敗血症では血圧低下という重篤な結果を惹き起こしている可能性がある¹⁵³⁾。あるいは肝障害が肝硬変のステージに入ると循環しているエンドトキシン濃度が高まりさらに NO 産生が増加すると言われる¹⁴³⁾。また iNOS 欠損マウスを用いた検討によって、LPS による個体死は iNOS から産生される NO によるものであることがわかった^{155, 156)}。

慢性感染症や炎症では様々な癌化のリスクファクターが存在すると考えられている¹⁵⁷⁾。炎症性の細胞からは HO ラジカルや H₂O₂ などの活性酸素が産生されるが、それら分子は炎症細胞内で DNA や組織障害、変異、DNA 鎖の断裂や染色体の異常などの癌化の過程に関与する¹⁵⁸⁾。NO だけではなく、NO 由来物質、例えば ONOO⁻、NO₂ などの活性型窒素化合物もまた炎症や癌化で重要な役割を果たしている^{138-142, 159, 160)}。NO と活性酸素陰イオンは炎症組織で素早く ONOO⁻イオンに変化する¹⁶⁰⁾。ONOO⁻は酸化能が高く DNA 塩基を修飾して組織障害を誘導し、その結果、細胞の増殖と変異を誘導する可能性がある¹⁵⁹⁾。Liu らは肝での N-ニトロソ化合物、あるいは NO、またはその両方が生成することで肝細胞が癌化する原因となることを報告している^{141, 142)}。そのほかにも NO 産生を阻害することは癌化を抑制することになることを示唆する報告がある¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾。それゆえ炎症を起こした肝組織で誘導性 NO 産生を効果的に抑制することは、肝炎治療に役立つ肝細胞の癌化を予防することになると考えられる。

本章ではマウスマクロファージ細胞株とラット肝癌細胞株での *in vitro* での NO 産生誘導モデルを用いた。これらのモデルではそれぞれ LPS や TNF /IL-1 などの炎症性の刺激により NO を産生し、この系を用いて漢方処方での NO 産生阻害作用を検討した。非毒性濃度で LPS 刺激によるマクロファージからの NO 産生阻害作用、および TNF /IL-1 刺激による肝細胞からの NO 産生阻害作用を最も強く示したのは黄連解毒湯であった。

黄連解毒湯の構成生薬のうち、オウレンとオウバクに NO 産生阻害活性が認められたが、オウレンとオウゴンによる阻害作用機序は異なるものと考えられる。オウゴンは主に LPS 刺激時の RAW264 に作用し、オウレンはサイトカイン刺激時の肝細胞に主に作用した。このように黄連解毒湯では異なる細胞で異なる刺激により誘導される NO 産生をそれぞれ異なる生薬が作用しているということを示している。阻害剤を複合的に使用したとき単一の阻害剤などよりも相加的、もしくは相乗的な効果が期待される。漢方方剤のような数種の生薬の複合剤では単一薬物よりも効果的に NO 産生を阻害し肝炎での細胞傷害や肝癌への進行を抑制できるものと考えられる。

オウレンとオウゴンは炎症状態や消化器疾患に用いる漢方処方に含まれる。本章の結果から、オウレンとオウゴンの組み合わせは炎症状態における NO 産生を効果的に阻害する薬物として有用であろう。オウレンとオウゴンの主成分である berberine、baicalin、baicalein はある程度の NO 産生阻害活性を示したが、含有量から勘案しこれらだけでは黄連解毒湯の阻害活性を説明できないことから、これら以外の成分の関与も考えられる。漢方処方や生薬は多くの成分を含んでいるためその効果は複雑で 1 つの成分の作用では説明できないことが多い。また本章では黄連解毒湯が iNOS 遺伝子の転写を阻害することを示したが、その分子メカニズムなどは不明であり今後の検討課題である。

(2) 血管平滑筋細胞からの NO 産生誘導について

NO は血管平滑筋細胞の可溶性 guanylate cyclase の活性化やその生成物である cGMP の増加を通じ、血圧や局所血流のコントロールを担う重要な分子である¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾。オウゴン、ニンジン、オウギの各生薬エキスは血管平滑筋細胞の NO 産生を誘導することが知られている¹⁴⁹⁾。本章ではさらに血管平滑筋の iNOS 遺伝子の転写を誘導した結果、胞質内の iNOS タンパク量を増加させることがわかった。NO 産生の増加に伴い細胞内の cGMP も蓄積され、これら生薬エキスは血管平滑筋細胞の NO-可溶性 guanylate cyclase-cGMP のシグナル伝達に関与していることがわかった。

NO は 3 種の NOS によって L-arginine の terminal guanido-nitrogen から生合

成される (Table 5-1)。nNOS は神経細胞などに存在し神経伝達物質としての作用を持ち、eNOS は血管内皮細胞でホルモンや血流のずり応力ストレスにより少量の NO を産生して内皮依存型の血管拡張を担っている¹⁵⁰⁾。いくつかの生薬エキスで血管内皮細胞由来の NO 産生を活性化することで血管拡張作用が発現する可能性が報告されている^{161, 162)}。iNOS は本章で示したように無刺激ではほとんど発現していないが、マクロファージや血管平滑筋細胞をサイトカインやバクテリアのエンドトキシンで刺激すると誘導される¹⁴⁶⁾。iNOS は長期間に大量の NO を産生する場合に重要で、血管平滑筋細胞での iNOS により顕著に産生される NO は敗血症を含むいくつかの疾患の原因となっている可能性がある。これらの疾患では多量の NO 産生の結果新血管系の機能障害が起こる^{163, 164)}。少なくとも敗血症における血圧低下は、エンドトキシンや TNF、IL-1 により誘導される血管平滑筋細胞の iNOS 由来の NO 生合成がその一部に関与していると考えられている^{163, 164)}。よってこれら生薬エキスの有用性をきちんと考えるには、本章のように生薬エキスが血管平滑筋細胞由来の NO 産生を誘導することが、果たして心血管生理を増悪せず、有効であるか無害であることが基本的に必要であろう。

その点について以上述べたような悪性の作用のほか、NO は抗動脈硬化作用を持つとされる¹⁴⁵⁾。すなわち血小板接着・凝集、活性酸素陰イオンの産生、白血球接着、血管平滑筋細胞の増殖などを阻害する。Hogg らは NO が LDL の酸化を阻害して抗酸化剤として作用することを見出した¹⁶⁵⁾。NO 前駆体である L-arginine を経口投与すると高コレステロールウサギの動脈硬化を抑制しバルーンカテーテルによる傷害後の初めの過形成の発現を抑制した^{166, 167)}。よって NO は動脈硬化による傷害を抑制する可能性がある。

以上の点を考慮したとき、生薬エキスにより血管平滑筋からの NO 産生は IL-1 や LPS により誘導される量に比べ非常に微量である。よってこの場合の血管平滑筋細胞由来の NO が病的に作用するとは考え難く、おそらく局所血流改善や動脈硬化抑制作用が認められる可能性が考えられる。実際、オウゴン含有処方の一つである大柴胡湯に高コレステロールウサギの動脈硬化抑制作用が認められている^{168, 169)}。以上より、黄連解毒湯で報告されている血管拡張作用や血小板接着・凝集抑制作用、抗アテローム動脈硬化作用などは、NO による血管平滑筋細胞内の cGMP の増加による可能性がある^{1, 170, 171)}。いずれにせよこれら血管平滑筋細胞からの NO 産生誘導についてはさらに生理的、病的な解析が必要である。

これら生薬エキス中のどの成分が血管平滑筋細胞からの NO 産生誘導作用を示すのかについては本章では示していない。生薬エキスは多くの成分を含み、その解析は困難である。先に示した LPS 刺激時の RAW264 からの NO 産生抑制作用などはオウゴン中の baicalein などにその作用が認められた。オウゴンはこの

ように NO 生合成誘導と阻害の両方の作用を持っていた。今回データは示していないが、血管平滑筋細胞からの NO 産生誘導作用はオウゴン中に含まれるある種の多糖類が関与している可能性がある (data not shown)。血管平滑筋細胞からの NO 産生を誘導する成分の検索と薬理学的作用との関連、あるいはこれら生薬エキスの *in vivo* での心血管系の NO-可溶性 guanylate cyclase-cGMP シグナル伝達に対する作用については今後の検討課題である。

(3) 黄連解毒湯の NO 産生調節作用について

以上のように黄連解毒湯がマクロファージや肝細胞からの NO 産生を抑制することは、肝炎など炎症状態における NO 産生を抑制し、過剰な炎症反応の遷延・慢性化を防ぐ可能性が示された。一方、黄連解毒湯の構成生薬の 1 つオウゴンは血管平滑筋細胞からの NO 産生を増加させ、血管内において血小板凝集抑制やリンパ球の接着抑制、血管平滑筋細胞の過剰増殖抑制などに作用し、局所血流改善や動脈硬化の予防効果を示すと考えられる。すなわち、黄連解毒湯には抗炎症作用のほか、微小循環改善作用や動脈硬化予防作用がある可能性が示唆された。

第六章 総括

黄連解毒湯は全身の炎症と充血を伴う諸症状に対する漢方処方である。その薬理作用や機序には未だ不明な点が多い。本論文では黄連解毒湯を *in vivo* で投与したときの薬効とその作用機序、あるいは *ex vivo*, *in vitro* での細胞レベルでの各種作用機序を検討した。その結果、黄連解毒湯には多様であるが細胞特異的・成分特異的な免疫学的反応が誘導され、生体の恒常性維持に役立っているものと考えられた。結果は以下のように総括される。

1. 近年、副作用が問題となっている NSAID の 1 つであるインドメタシン誘発小腸潰瘍モデルに対する黄連解毒湯の作用と、そのメカニズムについて検討した。インドメタシンにより誘発される個体死・小腸潰瘍の発生・血中 NOx 濃度の増加を黄連解毒湯は抑制した。さらに黄連解毒湯は、インドメタシンによる小腸粘膜 PGE2 量の低下・小腸粘膜固有層の COX-2⁺細胞数の減少・小腸粘膜固有層単核球からの PGE2 産生及び IL-10 産生の低下を抑制した。これらの作用はインドメタシンを投与しない場合でも認められ、インドメタシンによる障害誘導を阻害した結果ではないと推察された。このように黄連解毒湯は粘膜保護のキー物質、PGE2 の産生を局所で増加し、また粘膜免疫を制御する IL-10 の産生も増加させることから、粘膜局所での免疫調整作用を持つものと推察された。以上より、黄連解毒湯は炎症性腸疾患の治療や NSAID 服用患者の副作用軽減に対し有用である可能性が示された。
2. 前項の小腸潰瘍モデルは直接的に粘膜を傷害するモデルであるが、各種腸炎では T 細胞の異常活性化を伴うことも多い。T 細胞特異的活性化を誘導する抗 CD3 抗体投与により間接的に小腸障害が誘導されるモデルの作用機序を解析し、本モデルに対する黄連解毒湯の作用を検討した。抗体投与数時間で誘導される小腸上皮のアポトーシスは第一相の絨毛上皮細胞、第二相の陰窩上皮細胞と部位特異的・時間特異的に二相性に出現した。ヌードマウス（胸腺依存性 T 細胞の欠損）・*lpr* マウス（アポトーシス誘導分子 Fas の欠損）での検討、リンパ球のキラー活性と細胞表面抗原の検討、ヌードマウスに対するリンパ球移入実験から、第一相には粘膜上皮間リンパ球の FasL を介したキラー活性が関与し、第二相にはそれに加え全身性のリンパ球の FasL を介したキラー活性が関与している可能性が示された。以上より、小腸上皮が外襲を受けた際にまず粘膜上皮間リンパ球が絨毛先端から異常上皮を処理し、次いで全身性のリンパ球が加わり比較的侵襲の遅い陰窩を処理するシステムの存在が示唆された。この小腸障害モデルでは、絨毛上皮または陰窩上

皮のアポトーシスいずれに対しても、黄連解毒湯には顕著な抑制作用を認めなかった。本モデルはT細胞を直接刺激するきわめて特異性が高いキラー活性誘導系で、このような障害に対して黄連解毒湯は有効でない可能性が示された。

3. ストレス反応により分泌されるグルココルチコイドは胸腺細胞のアポトーシス誘導作用があるが、胸腺は未熟T細胞が成熟T細胞へ誘導される場であり、胸腺細胞の過剰なアポトーシス誘導は免疫機能の低下を招く。そこで胸腺細胞のアポトーシスに対する黄連解毒湯の作用について検討した。デキサメタゾンを *in vitro* で処理し誘導されるアポトーシスは、黄連解毒湯の同時処理により抑制された。この作用は黄連解毒湯の構成生薬オウレン・オウバクとそれらの主な含有成分の1つ、ベルベリン及び類似アルカロイドに認められた。以上より、黄連解毒湯がグルココルチコイドによる免疫抑制状態に有用である可能性が示された。
4. NO は様々な酵素反応を抑制し細胞機能を低下させ急性炎症を抑制し、また血圧・血流調整をする一方、必要な細胞機能を低下させたり、周囲の細胞へダメージを与えたりする。そこで各種細胞のNO産生に対する黄連解毒湯の作用を検討した。LPS刺激マクロファージ系細胞RAW264からのNO産生に対し、黄連解毒湯、その構成生薬であるオウレン・オウゴン、それら生薬の主成分ベルベリン・バイカリンは抑制した。TNF と IL-1 の共刺激による肝細胞McA-RH777からのNO産生に対し、黄連解毒湯、オウレン、オウレンの主成分ベルベリンは抑制した。一方、血管平滑筋細胞のNO産生は黄連解毒湯の構成生薬であるオウゴンにより誘導された。以上のように黄連解毒湯およびその構成生薬・成分には細胞特異的・成分特異的なNO産生調節作用が認められ、黄連解毒湯には過剰な炎症反応の遷延・慢性化を防ぐほか微小循環改善作用や動脈硬化予防作用がある可能性が示唆された。

以上のように、黄連解毒湯には様々な免疫学的作用が認められ、その作用は細胞・部位・メカニズム・成分特異的であった。特に消化管は、経口摂取された黄連解毒湯が相当量存在しうる「場」である一方、今回黄連解毒湯の作用が認められた粘膜固有層単核球、T細胞、マクロファージ系細胞などの消化管粘膜免疫系と呼ばれる細胞群や微小循環の血管平滑筋細胞などが多数存在する「場」である。腸炎発症時にはこれら様々な細胞の反応が関与している。そのなかには上皮のメンテナンスを担当するT細胞系のアポトーシスや、上皮細胞やマクロファージ系細胞からの過剰なNO産生による傷害、微小循環虚血なども含まれ

ていると考えらる。今回直接的に消化管の細胞では検討していないが、黄連解毒湯には T 細胞アポトーシス抑制作用や NO 産生抑制作用、血管平滑筋からの iNOS 誘導作用が認められたことから、これらを含む様々な細胞に対し複合的に作用することで消化管障害に対し有用性を示す可能性が示された (Figure 6)。さらに、黄連解毒湯の効能・効果には消化管局所の障害改善のほか、全身の炎症状態・循環の改善作用があるとされる。これらの作用は、全身の免疫系と消化管粘膜免疫系の相互作用の存在や、門脈血や小腸絨毛微小循環などの消化管血流が全身の血流に与える影響を考え合わせると、黄連解毒湯による消化管への作用から説明できる可能性がある。以上、本研究では黄連解毒湯の作用と作用メカニズムについて免疫学的見地より解析し、その作用の本質は多様な免疫学的反応の恒常性の維持である可能性を示した。

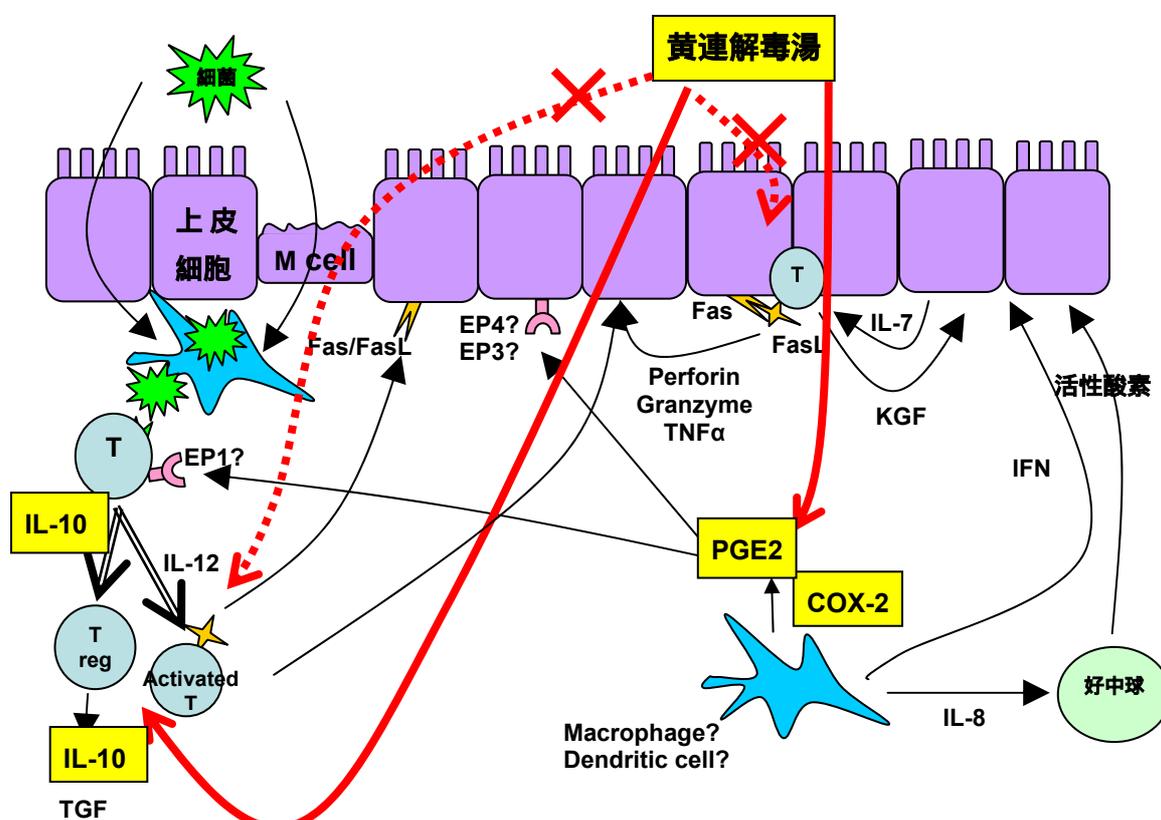


Figure 6. The hypothetical mechanisms of effects of Orengedokuto on gastrointestinal tract^{2, 43, 188-190}
EP, PGE2 receptor.

最後に、本処方の薬効の漢方医学的考察を試みたい。この数年の医学部における漢方医学教育の充実により、これまで用いられてきたような西洋医学的な理解による漢方処方の使用だけではなく、漢方医学理論や中医学理論に基づい

た処方理解が必要とされてきている。その背景には漢方処方の副作用に対する理解が深まり、副作用回避の手段の1つとしてそれらの理論を利用することが広まりつつあることが挙げられる。漢方医学理論のほとんどは科学的証明がなされていないが、臨床上の注意や適応患者選択のコツとして重視されている。黄連解毒湯の場合には効能効果に『比較的体力があり、のぼせ気味で、いろいろな傾向のあるもの』と挙げられているほか、参考として『使用目標=証：体力中等度もしくはそれ以上の人で、のぼせ気味で顔面紅潮し、精神不安、不眠、イライラなどの精神神経症状を訴える場合に用いる。』との記載がある。一方で本処方の最初の出典である紀元300年ごろに成立した『肘後備急方』では、より単純に『嘔吐が激しく胸がむかつき精神不穏状態となつて眠ることができないものに用いる』とある¹⁷²⁾。その後、様々な臨床経験や解釈が加えられ、現在のような用いられ方をするようになったと思われる。現代の漢方医学理論、中医学理論での分類では三焦の実熱、特に血熱・湿熱に対し用いる処方である¹⁷³⁾。本論文では敗血症により個体死に至るインドメタシン腸炎に黄連解毒湯が有効であったが、敗血症の症状はまさに血熱に相当すると考えられる。またアポトーシスやNO産生は各種炎症時にも誘導される現象で、そのような炎症・免疫反応に対し黄連解毒湯が有効であったということは、漢方医学理論で実熱や湿熱といった場合にはこれらの免疫学的反応を伴っている可能性があるということであろう。黄連解毒湯は構成生薬も4種と比較的単純であり、またその効能の漢方医学的理解も比較的たやすい。一方、同様の血熱に用いられる漢方処方として、三黄瀉心湯がある。三黄瀉心湯もまた、黄連解毒湯と同様に胸腺細胞のアポトーシスを抑制し、現代科学的にも類似の薬剤である可能性が示された。しかし漢方医学的にはオウバクを含む黄連解毒湯は下焦を含む三焦の実熱を治し、一方でダイオウを含む三黄瀉心湯は上焦と中焦の実熱を治すとされる¹⁷³⁾。ダイオウは瀉下剤であり、その大腸への作用が逆に下焦の実熱には無効であるとされる理由ではないかと考えられる。また、黄連解毒湯の構成生薬であるオウレンとオウゴンを含む半夏瀉心湯は上焦の熱証と下焦の冷えによる調胃不和に用いられ、冷えに対処するショウキョウを含む。黄連解毒湯との大きな違いは下焦に冷えがある場合に用いるのが半夏瀉心湯であり、下焦にも実熱がある場合が黄連解毒湯であるということである¹⁷³⁾。これらの黄連解毒湯類似の漢方方剤が、黄連解毒湯で有効であったインドメタシン誘発小腸潰瘍に果たして有効かどうかは漢方医学理論の理解と副作用の防止につながると思われ、今後の検討課題である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の発表の機会を賜り、また本論文作成に際し直接の御指導と御鞭撻、御校閲を賜りました、千葉大学大学院薬学研究院教授・矢野眞吾博士、同教授・上野光一博士、同教授・北田光一博士、同教授・斉藤和季博士、同教授・堀江利治博士に深謝致します。

また、本研究に際し御懇篤なる御督励、御助言および御協力を賜りました慶應義塾大学医学部助教授・渡邊賢治博士、同講師・石毛敦博士、日本大学医学部教授・山本樹生博士、同助教授・早川智博士、明治薬科大学客員教授・小松靖弘博士、日本薬科大学教授・雨谷栄博士、銀座東京クリニック院長・福田一典医師、なかがわ漢方堂薬局薬剤師・玉木理恵氏に深く感謝の意を表します。

さらに、本研究の機会を与えられ、御指導、御激励を賜りました株式会社ツムラ 研究開発本部長・佐々木博博士、中央研究所長・竹田秀一博士、薬理研究部部長・加瀬義夫博士に深甚の謝意を表します。最後に、本研究の実施にあたり共同研究者として幾多の有益な御助言、御討論、御協力を頂きました山本雅浩博士、福武昌人博士、大嶽信弘博士、植木俊之氏、木戸敏孝博士をはじめとする株式会社ツムラの皆様に心より感謝し御礼申し上げます。

実験の部

第二章の実験

1) 漢方方剤、試薬

漢方方剤・ツムラ黄連解毒湯 (TJ-15) エキス粉末は (株) ツムラにより 4 つの生薬 (オウレン 2.0、オウバク 1.5、オウゴン 3.0、サンシシ 2.0) の混合物を熱水抽出しスプレードライして調整された。インドメタシンおよび特に記載のない試薬は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より特級試薬を購入した。

2) 動物の処置

7 週令の雌性 BALB/c マウス (Charles River Japan Inc., Kanazawa, Japan) は室温 23 ± 2 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、12 時間の明暗サイクルの specific pathogen-free (SPF) 環境で水および粉末飼料 (AIN-93M, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) を自由摂取させ飼育した。腸炎は Boushey らの方法に準じ誘導した³¹⁾。即ち、24 時間絶食した後再給餌し、以後餌は自由摂取させた。再給餌開始 1 時間後に 1 度目の 20 mg/kg のインドメタシンを皮下投与、さらにその 24 時間後に 2 度目の 20 mg/kg のインドメタシンを皮下投与した。黄連解毒湯は前報同様に 0.5、1、2 % の濃度で再給餌開始時から投与した⁴⁰⁾。全ての動物実験は日本学術会議の定める動物実験の健康と使用に関するガイドラインに沿って作成された (株) ツムラのガイドラインに則り実施された。

3) 形態学的検討

小腸全体を取り出し内腔を氷冷した生理食塩水で丁寧に洗浄後、縦に切り開き、ろ紙上に広げさらにろ紙で挟んで 15% 中性ホルマリン (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) で固定した。実体顕微鏡下で潰瘍の数を数え潰瘍領域を Image Processor for Analytic Pathology software (Sumika Technoservice Co., Hyogo, Japan) を用いてトレースして総潰瘍面積を求めた。

その後、固定した小腸はパラフィン包埋し病理切片を作成して Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色に供した。潰瘍のダメージは次のようにスコア化した。即ち、

- 1) 絨毛に沿った上皮細胞の傷害
- 2) 粘膜固有層の傷害
- 3) 粘膜固有層の欠落と筋層の裸出
- 4) 粘膜下に達する傷害
- 5) 筋層の傷害や小腸壁が薄くなる、もしくは穴の形成

免疫染色にはポリクローナル抗 COX-2 抗体 (Alexis Biochemicals, San Diego,

CA)、Histomouse-Prus kit (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA) または Histofine Mouse Stain kit (Nichirei Co., Tokyo, Japan) を用い streptavidin-biotin complex 法で diaminobenzidine (Nichirei Co.) にて染色した後、hematoxylin で染色した。

4) 便潜血と血中 NO_x の定量

便潜血測定には盲腸内容物を用い、Biochemical Analyzer TBA-40FR (Toshiba Lab Medical Co. Ltd. Inc., Tokyo, Japan) にてオキシヘモグロビン量を測定した。血清 NO_x 濃度はキット (Cayman Chemical Company) を用いて測定した。

5) 小腸 PGE₂ レベルと *ex vivo* での COX 阻害

小腸 PGE₂ レベルは Tesner、Futaki らの方法に準じ測定した^{23, 174)}。即ち、摘出した小腸の腸間膜と脂肪を脱脂綿で丁寧に除去後、内腔を氷冷した生理食塩水で洗浄して縦に切り開いた。粘膜層はへらで筋層から剥がし取り、全体を丁寧に混ぜた後使用した。筋層ははさみで細かく切り刻み、全体を丁寧によく混ぜた後使用した。これらを Tyrode 液 (Sigma Chemical Co.) 中で 37 5 分処理してアラキドン酸を PGE₂ に変換した後 30 秒ホモジナイズし、10,000rpm で 4 15 分間遠心した。上清中の PGE₂ 量を enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) にて測定した。

黄連解毒湯により増加した PGE₂ がどちらの COX によるものか検討する為に、この *ex vivo* の反応系を利用した。即ち、Tyrode 液でのインキュベーション時に 1×10^{-6} M の COX インヒビター、indomethacin、NS-398 を添加し、これらにより阻害されずに生成した PGE₂ 量を測定した。

6) 細胞の調整と培養

粘膜固有層単核球は Newberry、Taguchi らの方法に準じ調整、培養した^{14, 24, 175)}。即ち、小腸断片を RPMI1640 培地中で 37 30 分処理し上澄みを捨て、残った断片を 120 unit /mL の collagenase S-1 (Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan) , 10 % fetal bovine serum (FBS: ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH)を含む RPMI1640 培地中で 37 75 分処理し粘膜固有層単核球を分離した。次いでガラスウールカラムを通したものを『粗精製粘膜固有層単核球』とし、インドメタシン処理後の粘膜固有層単核球の培養にこれを用いた。さらに粗精製粘膜固有層単核球を 75 % / 40 % Percoll (Amersham Biociences Corp., Piscataway, NJ) にて分画したものを『精製粘膜固有層単核球』とし、インドメタシン処理なく調整した粘膜固有層単核球の培養にはこれを用いた。調整後の細胞は trypan blue (Life Technologies Inc., Rockville, MD) で染色し 70 %以上の生存率であることを確認し、調整開始から

10 時間以内に培養に供した。

粘膜固有層単核球は 2.5×10^6 cells/mL で培養用の RPMI1640 培地 (2 mM Glutamax I; L-alanyl-L-glutamine; Life Technologies Inc.、10 mM HEPES; N-2-hydroxyl -ethylpiperazine-N'-2-Ethane sulfonic acid、1mM sodium pyruvate、50 U /mL penicillin、50 μ g /mL streptomycin、50 mg /mL gentamicin; Life Technologies Inc.、50 μ M mercaptoethanol、10 % FBS、0.5 % normal mouse serum) にて培養した。培養上清は解析まで -80 で保存し、PGE2 は EIA kit (Cayman Chemical Company)、サイトカイン類は Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) にて測定した。

7) 統計解析

本研究では数値は平均 \pm 標準誤差で表示し、危険率 5 % 以下を有意と判定した。生存曲線は Kaplan-Meier 法にて作成し、log-rank test でコントロール群と 2 % 黄連解毒湯投与群の間の有意差を検定した。その他の実験における群間の有意差は two-way analysis of variance (ANOVA; Scheffe's post hoc test)、または Mann-Whitney U test を用い検定した。以上の解析は StatView Version 5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) にて行った。

第三章の実験

8) 動物と抗体

オスの C3H/HeN, MRL-+/+, MRL-lpr/lpr (Japan SLC Inc., Shizuoka Japan)、BALB/c, BALB/c-nu/nu (Japan Charles River Laboratory, Yokohama, Japan) の各マウスは SPF 環境下で飼育し 9-10 週令で実験に使用した。全ての動物実験は第二章の実験と同様に日本学術会議の定める動物実験の健康と使用に関するガイドラインに沿って作成された(株)ツムラのガイドラインに則とり実施された。*In vivo* 投与にはハムスター抗マウス CD3 ϵ モノクローナル抗体 (145-2C11) とコントロールのハムスター-IgG1 を使用し、フローサイトメトリーには fluorescein isothiocyanate (FITC) 化した抗 CD3 抗体(145-2C11)、抗 CD69 抗体(H1.2F3)、抗 Fas 抗体(Jo2)、コントロールハムスター-IgG1 、IgG1 、IgG2 、R-Phycoerythrin (PE) 化した抗 FasL 抗体(MFL3)、コントロールハムスター-IgG1 を使用した(すべての抗体類は BD Biosciences, San Jose, CA より入手)。

9) 病理標本の検索

抗 CD3 抗体は 100 μ L /mouse になるよう生理食塩水で希釈しマウスに単回、腹腔内投与した。小腸は 15% 中性ホルマリンで固定しパラフィン包埋後の病理

組織切片を H&E 染色した。アポトーシス細胞の数は既報^{81, 82, 176, 177)}を一部変更して計測した。即ち 400 倍の光学顕微鏡下で、核が濃縮したり断片化したりしている一般的で明確なアポトーシス像を示す細胞を観察した。マウス 1 匹当たり、絨毛 1 本または陰窩 1 個を 1 ユニットとして 3 ユニット/視野×7 視野、計 21 ユニットに存在するアポトーシス細胞数を計測し、それぞれ絨毛 1 本あたり、または陰窩 1 個あたりのアポトーシス細胞数を求めた。この検出法は完全に断片化してしまった細胞の破片や早期のアポトーシス細胞については検出できないため、アポトーシスを誘導された細胞数を完全に反映できているとは言えないが、少なくともアポトーシス誘導の経時的な変化や局在の変化を定量的に検出するには十分であると考えられた。この定量法で検出したアポトーシス細胞が実際に DNA のニックを伴っていることを確認するために、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) アッセイ (*In situ* apoptosis detection kit, Intergen Company, NY) で定性的に検出した。TUNEL 法は Pitchard らにより擬陽性が出やすいと言われているので¹⁷⁸⁾、小腸上皮細胞のアポトーシス細胞の定量には使用せずあくまでも H&E の結果を定性的に確認するために使用した。電子顕微鏡像は 2 % glutaraldehyde で固定し通常の方法で検索した。

10) Fas を介したキラー活性の測定

抗 CD3 抗体投与後の動物より各種リンパ球を調整し、Fas を介したキラー活性を測定した。IEL, SPL, MLNC, PPL は Taguchi らの方法に従い調整した¹⁷⁵⁾。Fas を介したキラー活性は、Lin らの方法を一部改変して Fas 陽性のヒト細胞株 Jurkat 細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) を用いて測定した⁷²⁾。この測定法ではマウスの FasL、ヒトの FasL のどちらも同程度に Fas を介して Jurkat 細胞にキラー活性を示す性質を利用している¹⁷⁹⁾。何もコーティングしていない、もしくは 7.4 μg /mL の抗 CD3 抗体で予めコーティングした平底 96 ウェルプレートで、調整したリンパ球と [³H]thymidine でラベルした Jurkat 細胞 (2x10⁴ /ウェル) を様々な Effector/Target (E/T) 比で 18 時間共培養した。培養後、細胞を溶解して diethylaminoethyl (DEAE) 化ガラスフィルターと普通のガラスフィルターを重ねてハーベストした。この方法では DEAE 化フィルターは断片化 DNA をトラップでき、通常のガラスフィルターは傷害されていない染色体をトラップできる¹⁰¹⁾。DNA 断片化率は次の計算式で求めた (c.p.m.; count per minute)。

$$\% \text{ DNA fragmentation} = \frac{\text{(c.p.m. DEAE filter)}}{\text{(c.p.m. DEAE filter + c.p.m. glass filter)}} \times 100$$

細胞表面抗原はフローサイトメトリー (FACScan, BD Biosciences) で測定し、データは Macintosh CELLQuest program (BD Biosciences) により計算した。

1 1) MACS による T 細胞および T 細胞の分離

T 細胞と T 細胞の分離には既報に従い MACS システム (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた¹⁸⁰⁾。即ちまず上述のように調整した IEL に FITC-抗 TCR または TCR 抗体を $2.5 \mu\text{g}/10^7 \text{ cells}$ で処理した後、抗 FITC マイクロビーズ (Miltenyl Biotec) で処理した。次いで MACS システムの磁場分離カラムを通し、ラベルされた細胞をトラップさせてネガティブ細胞を得た。さらにカラムを磁場から離れた後に得た細胞をポジティブ細胞とした。得られた各フラクションの細胞純度はフローサイトメトリー (FACScan, BD Bioscience, San Jose, CA) で測定し、Macintosh CELLQuest (BD Bioscience) で解析を行った。

1 2) リンパ球移入実験

実験 1 ; 9-10 週令の BALB/c から調整した SPL(5×10^7) または IEL(1×10^7) を尾静脈より BALB/c-nu/nu マウスに移入した翌日、抗 CD3 抗体を腹腔内投与した。SPL と IEL の同時移入には、はじめ SPL を尾静脈より移入儀、続けて IEL を尾静脈より移入した。抗 CD3 抗体を投与し 4、または 24 時間後のマウスより小腸を摘出し、H&E 染色に供した。

実験 2 ; 6-11 週令の BALB/c マウスより調整した IEL(1×10^7) を BALB/c nu/nu マウスに尾静脈より移入した。その 5 週間後、抗 CD3 抗体を腹腔内投与しその 4 または 24 時間後の小腸について H&E 染色した。SPL と IEL の同時移入には、抗 CD3 抗体を投与する 24 時間前に調整した SPL(5×10^7) を尾静脈より移入した。

1 3) 黄連解毒湯の投与

黄連解毒湯エキス顆粒は第二章と同様に (株) ツムラにより調整された。黄連解毒湯単回投与の実験では、18 時間の絶食後、注射用水 (大塚製薬) で懸濁した黄連解毒湯 $0.5 \text{ g}/\text{kg}$ をゾンデにより強制経口投与しその 2 時間以内に抗 CD3 抗体 $100 \mu\text{g}/\text{mouse}$ を腹腔内投与、その 2、8、24 時間後の小腸を摘出した。黄連解毒湯の連続投与の影響を確認するためには 2 種の実験系を試みた。即ち、黄連解毒湯のゾンデによる強制経口投与では、注射用水 (大塚製薬) または生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁した黄連解毒湯 $1 \text{ g}/\text{kg}$ を 1 日 1 回、4 日間投与した。3 日目の黄連解毒湯投与より絶食し、その 2 時間後に $12.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の抗 CD3 抗体を腹腔内投与し、その 24 時間後に小腸を摘出した。黄連解毒湯の混餌

投与では、コントロール飼料 AIN-93M (オリエンタルバイオサービス) に 2% で黄連解毒湯を混合し、全実験期間中、自由摂取させた。黄連解毒湯の投与開始より 8 または 9 日目に 12.5 - 20 μg /mouse の抗 CD3 抗体を腹腔内投与し、その 4、24 時間後に小腸を摘出した。

1 4) 統計解析

統計解析は StatView version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて Scheffe's ANOVA にて評価し、危険率 5 % 以下を有意とした。

第四章の実験

1 5) 漢方方剤、生薬エキス、成分の調整と試薬

各種漢方方剤エキス粉末は第二章の黄連解毒湯と同様に、ツムラ漢方製剤エキス顆粒 (医療用) と同じ割合で各生薬を配合したものから (株) ツムラにより調整された。各種生薬エキスは日本薬局方生薬を漢方方剤エキスと同様に熱水抽出後、凍結乾燥したものを注射用水 (大塚製薬) で溶解後 -80 に保管し、用時溶解して使用した。オウレン含有成分 columbamine, palmatine, epiberberine, groenlandicine, jateorrhizine, magnoflorine は (株) ツムラにてオウレンから単離精製し NMR などにより同定し、berberine chloride, dexamethasone, sodium dodecyl sulfate (SDS) は Wako chemicals (Osaka, Japan) より購入した。3,5-diaminobenzoic acid dihydrochloride (DABA) は Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan) から、FBS およびトリパンブルーは Gibco-BRL (Gaithersburg, MD) から、また [^3H]thymidine は Amersham Japan (Tokyo, Japan) から購入した。そのほかの試薬は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より購入した。

1 6) 細胞培養

胸腺細胞は 3 ~ 6 週令の雄性 C3H/HeN マウス (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) より調整した。10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μg /mL streptomycin sulfate 含有 RPMI1640 に懸濁し 75 μm のメッシュを通した胸腺細胞は 24 ウェル、6 ウェルプレート (Nunclon, Denmark)、または 96 ウェルプレート (Coster, Cambridge, MA)、または 100 mm 組織培養プレート (Corning, NY) に播種し、37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 で培養した。漢方方剤や生薬エキスは RPMI1640 培地に溶解し、本アッセイは不溶物の影響をほとんど受けないと考えられるのでフィルターなど通さずそのまま使用した。動物の飼育と処置はすべて第二章と同様に (株) ツムラのガイドラインに則り実施された。

17) アポトーシスの誘導と DNA fragmentation の定量

胸腺細胞の DNA fragmentation は著者らが開発した新しい手法により測定した。即ち、調整した胸腺細胞を 96 ウェルプレートに 6×10^6 cells /mL の濃度で播種した後、dexamethasone, etoposide, camptothecin (それぞれ 10^{-7} M, 10^{-5} M, 10^{-5} M) と漢方方剤など目的のサンプルを処置し 6~24 時間培養した。その後、細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA, 5 % Triton X-100) を 1/10 量加えアポトーシスが誘導された細胞膜の弱い細胞のみ溶解し、アポトーシスを起こさず残った細胞 (この溶解液では細胞膜が溶解されない) は 750 g, 4 で 16 時間遠心して沈殿させ、そこに formaldehyde を終濃度 10 % になるように添加した。1~3 時間静置し内容物をプレートに固定し、プレートを静かに傾けて上清を除去した後で、バットに貯めた蒸留水中にゆっくりプレートを沈め、さらにバットから出してプレートを傾けて上清を除去、という操作を数回繰り返してプレートを洗浄した。さらに 0.4 g /mL の蛍光色素 3,5-diaminobenzoic acid dihydrochloride を各 100 μ l ずつ添加し 55 で 2 時間処置した。これはプレートに固定されて残った DNA を酸で加熱加水分解し purine 塩基の外れた deoxyribose sugar と 3,5-diaminobenzoic acid dihydrochloride を反応させ、蛍光物質を生じさせる^{181, 182}。生じた蛍光を励起波長 400 nm、測定波長 500 nm で Titertek Fluoroscan (Labsystems, Hersinki, Finland) を用いて測定した。DNA 断片化率はアポトーシス誘導剤無添加の培養細胞の DNA 蛍光強度を total DNA amount とし、以下のように算出した。

% DNA fragmentation

$$= \frac{(\text{total DNA amount} - \text{DNA amount in the experimental wells})}{(\text{total DNA amount})} \times 100$$

18) 細胞生存率の測定

細胞生存率はトリパンブルーで染色し非染色率を求めた。細胞膜の変性は培養液中へ放出された LDH の活性を LDH-Cytotoxic Test (Wako Chemicals) で測定した。無処置の細胞培養液中の LDH を 100 %、無処置の培養細胞に 1 % Triton X-100 をウェルに添加して細胞を溶解 (これはアポトーシス誘導の有無にかかわらず細胞膜が破壊される) したときの全 LDH を 0 % として各サンプルを添加したときの培養液中の LDH を求めた。

19) DNA ゲル電気泳動

DNA アガロースゲル電気泳動のためには 3×10^6 の細胞を遠心し、沈殿に 20 μ g /mL RNase A 液 (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 M EDTA, 0.5 % SDS) で懸濁し 37

で1時間インキュベートした。その後100 µg /mLになるよう proteinase K を添加37 °C で16時間インキュベートし、次いで50 °C で3時間処置してDNAの不活化とディネーチャーを行った。最後に0.5 µg /mL の ethidium bromide 入りの2% アガロースゲル電気泳動を行い紫外線照射により可視化した。

2 0) 電子顕微鏡による形態観察

電子顕微鏡による観察のため、細胞を2% glutaldehyde 入りの0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) で固定し、さらに1% osmium tetroxide 入りの同 buffer で追固定した後で epoxy resin、Quetol-812 (Nisshin EM Co. Ltd., Tokyo) で包埋した。その超薄切片を uranyl acetate と lead citrate で染色し JEM-200CX (JEOL Co. Ltd., Tokyo, Japan) で観察した。

第五章の実験

2 1) 細胞の分離と培養

マウスのマクロファージ系細胞 RAW264 は Riken Cell Bank より入手した。細胞を RPMI1640 培地 (5% FBS, 100 u /mL penicillin, 100 µg /mL streptomycin 含有 phenol-red free) に 3×10^5 cells /mL で播種し5% CO₂ 37 °C で4時間前培養した後、1 µg /mL の LPS (E. coli 0111:B4, DIFCO) で刺激し NO を産生させた。

ラットの肝ガン細胞 McA-RH7777 は American Tissue Culture Collection より入手し、同培地で 1×10^5 cells /mL で播種し20時間前培養した後、1 ng /mL の TNF- α (マウスリコンビナント, GIBCO BRL) と1 ng /mL の IL-1 (マウスリコンビナント, Sigma) で刺激し NO を産生させた。

血管平滑筋細胞は前報のとおり¹⁴⁹⁾200~300 g の雄性 SD ラットの胸部大動脈より単離した。細胞は10% FBS, 100 u /mL penicillin, 100 µg /mL streptomycin 含有 RPMI1640 で培養し、trypsin-EDTA (Sigma) で細胞を剥がして10~20代まで継代培養した。平滑筋細胞は "hill and valley" 形状の増殖パターンを示し、抗-SMC-actin モノクローナル抗体で染色することで見分けた。細胞は 6×10^5 cells /mL の濃度で48ウェルプレート (cGMP 解析用) または6ウェルプレート (RNA 調整用) で24時間培養後、被検試薬を添加し24時間培養した。

2 2) 漢方方剤と生薬エキスの調整

漢方方剤エキス、生薬エキスは第二章、第四章と同様に調整した。

2 3) NO 産生と細胞生存率の測定

NO は不安定で直接定量が困難なため、その酸化物である NO₂⁻ を Griess 試薬

で定量した。即ち、培養上清と同量の Griess 試薬 (1 % sulfanilamide, 0.1 % N-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride in 5 % H₃PO₄) をすばやく混和し、10 分間室温で反応後の 540 nm の吸光度を ELISA reader (Titertek) で測定した。新鮮培養液をブランクとし、培養液で希釈した NaNO₂ で標準曲線を作成し NO₂⁻ 濃度を求めた。細胞生存率は WST-1 アッセイ (Dojin) で求め、漢方方剤、生薬エキスは細胞毒性のない濃度で実験した。

2 4) ノーザンプロット解析

培養細胞から guanidinium thiocyanate 法をもとに ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を抽出した。ノーザンプロット解析は Sambrook¹⁸³⁾らの方法に準じ行った。即ち、各 10 μg の total RNA を変性後、1 % agarose-formaldehyde ゲルで電気泳動した。泳動後のゲルは ethidium bromide で染色し紫外線照射して ribosomal RNA の位置を確認した。次いで泳動した RNA を Hybond-N ナイロンメンブレン (Amersham Life Science) に転写し UV 照射により固定した。各メンブレンは既報¹⁸⁴⁾に従い ³²P ラベルした iNOS cDNA プローブでハイブリダイズした。ラット血管平滑筋の NOS はマウスマクロファージ iNOS と 92 % のホモロジーがあることが知られているため¹⁸⁵⁾、ラット血管平滑筋細胞についても同じプローブを用いた。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを洗浄して -70 °C で X 線フィルム (Kodak ZAR-5) に感光させた。

2 5) SDS- polyacrylamide gel electrophoresis とウェスタンプロット解析

SDS- polyacrylamide gel electrophoresis は既報¹⁸⁶⁾に従い実施した。即ち、2x10⁵ cells /lane の細胞溶解液を 8 % ポリアクリルアミドスラブゲルで泳動した。泳動後のタンパクはニトロセルロースメンブレンに転写し、マウスマクロファージ iNOS のモノクローナル抗体 (Transduction Lab., Lexington, KY) で検出した。

2 6) 免疫組織染色

チャンバーガラススライド (Nunc Inc., Naperville, IL) でサブコンフルエントまで培養した血管平滑筋細胞に各エキスを添加し 24 時間培養した。次いで 4 % paraformaldehyde 含有 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) で細胞を固定し、100 % methanol 中で内因性の peroxidase 活性を除外した状態で 0.3 % の hydrogen peroxide で処理した後、0.3 % Triton-X100 で固定細胞の浸透性を上げさらに 10 % ヤギ血清で処置して非特異的な染色を予防した。次いで 10 μg /mL の抗 iNOS モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) で反応させた後、phosphate-buffered saline (PBS) で数回洗浄して、次いでビオチン化ウマ抗マウス IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) で反応させた。さらに PBS で洗

った後、ストレプトアビジン化 horseradish ペルオキシダーゼ(Vector Laboratories Inc.)で 30 分処置した。特異的に結合した抗体を Peroxidase substrate kit(Vector Laboratories Inc.)で発色させた。

2 7) cGMP の測定

細胞の培養上清を除去後、6 % trichloroacetic acid で dish から素早く剥がし採り、細胞を 5 秒超音波にかけた後 4 2000 g で 15 分遠心してタンパク質を沈殿させた。上清は混入している trichloroacetic acid を除去するために 5 倍量の H₂O 平衡化 diethylether で 4 回抽出した。細胞質内の cGMP は 10⁴ 個の細胞あたり femtomol の単位でしか発現していなかったため、それぞれのサンプルの cGMP 量は感度を上げるためにアセチル化して cGMP EIA kit(Amersham Life Science, Tokyo, Japan) で測定した。

2 8) 統計解析

結果は平均値 ± 標準偏差で表示し、コントロール群との有意差判定は Student's paired t-test を用いて危険率 p<0.05 を有意とした。

引用文献

1. 荒川 規矩男、猿田 亮男、阿部 圭志、飯村 攻、石井 當男、荻原 俊男、日和田 邦男、柘山 幸志郎、藤島 正敏、水野 康、菊池 長徳、高折 修二: TJ-15 ツムラ黄連解毒湯の高血圧随伴症状に対する二重盲検比較試験. 臨床と研究;80:354-372 (2003)
2. 日比 紀文: 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 難治性疾患克服対策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班 研究報告書 平成 16 年度研究報告書, (2005)
3. Maiden, L.; Thjodleifsson, B.; Theodors, A.; Gonzalez, J.; Bjarnason, I.: A quantitative analysis of NSAID-induced small bowel pathology by capsule enteroscopy. *Gastroenterology*;128:1172-1178 (2005)
4. Davies, N.M.; Saleh, J.Y.; Skjodt, N.M.: Detection and prevention of NSAID-induced enteropathy. *J Pharm Pharm Sci*;3:137-155 (2000)
5. Bjarnason, I.; Hayllar, J.; MacPherson, A.J.; Russell, A.S.: Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology*;104:1832-1847 (1993)
6. Kaufmann, H.J.; Taubin, H.L.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med*;107:513-516 (1987)
7. Wilson, R.G.; Smith, A.N.; Macintyre, I.M.: Complications of diverticular disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs: a prospective study. *Br J Surg*;77:1103-1104 (1990)
8. Corder, A.: Steroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and serious septic complications of diverticular disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*;295:1238 (1987)
9. Finkelstein, J.A.; Jamieson, C.G.: An association between anti-inflammatory medication and internal pelvic fistulas. *Dis Colon Rectum*;30:168-170 (1987)
10. Rocca, B.; FitzGerald, G.A.: Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol*;2:603-630 (2002)
11. Harris, S.G.; Padilla, J.; Koumas, L.; Ray, D.; Phipps, R.P.: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*;23:144-150 (2002)
12. Tsutsumi, S.; Haruna, R.; Tomisato, W.; Takano, T.; Hoshino, T.; Tsuchiya, T.; Mizushima, T.: Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci*;47:84-89 (2002)
13. Halter, F.; Reinhart, W.H.; Koelz, H.R.; Meyrat, P.; Lentze, M.J.; Muller, O.: 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 stimulates growth and maturation of rat gastric and small-intestinal mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl*;92:178-183 (1984)

14. Newberry, R.D.; Stenson, W.F.; Lorenz, R.G.: Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nat. Med.*;5:900-906 (1999)
15. Monteleone, G.; Parrello, T.; Monteleone, I.; Tammaro, S.; Luzzza, F.; Pallone, F.: Interferon-gamma (IFN-gamma) and prostaglandin E2 (PGE2) regulate differently IL-12 production in human intestinal lamina propria mononuclear cells (LPMC). *Clin Exp Immunol*;117:469-475 (1999)
16. Kunikata, T.; Tanaka, A.; Miyazawa, T.; Kato, S.; Takeuchi, K.: 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 inhibits indomethacin-induced small intestinal lesions through EP3 and EP4 receptors. *Dig Dis Sci*;47:894-904 (2002)
17. Kunikata, T.; Araki, H.; Takeeda, M.; Kato, S.; Takeuchi, K.: Prostaglandin E prevents indomethacin-induced gastric and intestinal damage through different EP receptor subtypes. *J Physiol Paris*;95:157-163 (2001)
18. Kabashima, K.; Saji, T.; Murata, T.; Nagamachi, M.; Matsuoka, T.; Segi, E.; Tsuboi, K.; Sugimoto, Y.; Kobayashi, T.; Miyachi, Y.; Ichikawa, A.; Narumiya, S.: The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest*;109:883-893 (2002)
19. Louis, E.; Franchimont, D.; Deprez, M.; Lamproye, A.; Schaaf, N.; Mahieu, P.; Belaiche, J.: Decrease in systemic tolerance to fed ovalbumin in indomethacin-treated mice. *Int Arch Allergy Immunol*;109:21-26 (1996)
20. Hong, T.; Jin, G.; Kobayashi, T.; Song, Q.; Cyong, J.: Effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) on the murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Traditional Med*;17:66-72 (2000)
21. Hong, T.; Jin, G.; Cyong, J.: Effect of components of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) on the murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Traditional Med*;17:173-179 (2000)
22. Zhou, H.; Mineshita, S.: The effect of Oren-gedoku-to on experimental colitis in rats. *J Pharm Pharmacol*;51:1065-1074 (1999)
23. Tessner, T.G.; Cohn, S.M.; Schloemann, S.; Stenson, W.F.: Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. *Gastroenterology*;115:874-882 (1998)
24. Newberry, R.D.; McDonough, J.S.; Stenson, W.F.; Lorenz, R.G.: Spontaneous and continuous cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production by stromal cells in the murine small intestine lamina propria: directing the tone of the intestinal immune response. *J Immunol*;166:4465-4472 (2001)
25. Kunikata, T.; Miyazawa, T.; Kanatsu, K.; Kato, S.; Takeuchi, K.: Protective

- effect of thiaton, an antispasmodic drug, against indomethacin-induced intestinal damage in rats. *Jpn J Pharmacol*;88:45-54 (2002)
26. Jeffers, M.; McDonald, W.F.; Chillakuru, R.A.; Yang, M.; Nakase, H.; Deegler, L.L.; Sylander, E.D.; Rittman, B.; Bendele, A.; Sartor, R.B.; Lichenstein, H.S.: A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology*;123:1151-1162 (2002)
 27. Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Umeda, M.; Takeuchi, K.: Protective effect of lafutidine against indomethacin-induced intestinal ulceration in rats: relation to capsaicin-sensitive sensory neurons. *Digestion*;61:39-46 (2000)
 28. Han, D.S.; Li, F.; Holt, L.; Connolly, K.; Hubert, M.; Miceli, R.; Okoye, Z.; Santiago, G.; Windle, K.; Wong, E.; Sartor, R.B.: Keratinocyte growth factor-2 (FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*;279:G1011-1022 (2000)
 29. Konaka, A.; Nishijima, M.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Kato, S.; Takeuchi, K.: Nitric oxide, superoxide radicals and mast cells in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *J Physiol Pharmacol*; 50:25-38 (1999)
 30. Konaka, A.; Kato, S.; Tanaka, A.; Kunikata, T.; Korolkiewicz, R.; Takeuchi, K.: Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res*;40: 517-524 (1999)
 31. Boushey, R.P.; Yusta, B.; Drucker, D.J.: Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis. *Am J Physiol*;277:E937-947 (1999)
 32. Bertrand, V.; Guimbaud, R.; Tulliez, M.; Mauprivez, C.; Sogni, P.; Couturier, D.; Giroud, J.P.; Chaussade, S.; Chauvelot-Moachon, L.: Increase in tumor necrosis factor-alpha production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine. *Br J Pharmacol*;124:1385-1394 (1998)
 33. Berg, D.J.; Zhang, J.; Weinstock, J.V.; Ismail, H.F.; Earle, K.A.; Alila, H.; Pamukcu, R.; Moore, S.; Lynch, R.G.: Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology*;123:1527-1542 (2002)
 34. Huang, R.H.; Chai, J.; Tarnawski, A.S.: Identification of specific genes and pathways involved in NSAIDs-induced apoptosis of human colon cancer cells. *World J Gastroenterol*;12:6446-6452 (2006)
 35. Tsutsumi, S.; Gotoh, T.; Tomisato, W.; Mima, S.; Hoshino, T.; Hwang, H.J.; Takenaka, H.; Tsuchiya, T.; Mori, M.; Mizushima, T.: Endoplasmic reticulum

- stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ*;11:1009-1016 (2004)
36. Rescigno, M.; Urbano, M.; Valzasina, B.; Francolini, M.; Rotta, G.; Bonasio, R.; Granucci, F.; Kraehenbuhl, J.P.; Ricciardi-Castagnoli, P.: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*;2:361-367 (2001)
 37. Kraehenbuhl, J.P.; Neutra, M.R.: Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*;16:301-332 (2000)
 38. Amin, A.H.; Subbaiah, T.V.; Abbasi, K.M.: Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can J Microbiol*;15:1067-1076 (1969)
 39. Yoshimura-Mishima, M.; Akamatsu, H.; Adachi, Y.: Suppressive effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) on the production of superantigen by staphylococcus aureus. *Jpn Pharmacol Ther*;30:225-230 (2002)
 40. Fukutake, M.; Miura, N.; Yamamoto, M.; Fukuda, K.; Iijima, O.; Ishikawa, H.; Kubo, M.; Okada, M.; Komatsu, Y.; Sasaki, H.; Wakabayashi, K.; Ishige, A.; Amagaya, S.: Suppressive effect of the herbal medicine Oren-gedoku-to on cyclooxygenase-2 activity and azoxymethane-induced aberrant crypt foci development in rats. *Cancer Lett*;157:9-14 (2000)
 41. Fukutake, M.; Yokota, S.; Kawamura, H.; Iizuka, A.; Amagaya, S.; Fukuda, K.; Komatsu, Y.: Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and Scutellariae Radix on azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colon. *Biol Pharm Bull*;21:814-817 (1998)
 42. Fukuda, K.; Hibiya, Y.; Mutoh, M.; Koshiji, M.; Akao, S.; Fujiwara, H.: Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol*;66:227-233 (1999)
 43. 室田 誠、山本 尚三: プロスタグランジン研究の新展開. 現代化学・増刊 38; 東京化学同人 (2001)
 44. Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S. Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: *Cancer Resarch*;59:5093-5096 (1999)
 45. Soderholm, J.D.; Olaison, G.; Peterson, K.H.; Franzen, L.E.; Lindmark, T.; Wiren, M.; Tagesson, C.; Sjodahl, R.: Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*;50:307-313 (2002)
 46. Zuccato, E.; Bertolo, C.; Colombo, L.; Mussini, E.: Indomethacin-induced enteropathy: effect of the drug regimen on intestinal permeability in rats. *Agents*

- Actions;Spec No:C18-21 (1992)
47. Parasher, G.; Frenklakh, L.; Goodman; Siddiqui, T.; Nandi, J.; Levine, R.A.: Nitric oxide inhibitors ameliorate indomethacin-induced enteropathy in rats. *Dig Dis Sci*;46:2536-2541 (2001)
 48. Whittle, B.J.; Laszlo, F.; Evans, S.M.; Moncada, S.: Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. *Br J Pharmacol*;116:2286-2290 (1995)
 49. Itoh, T.; Terasawa, K.; Morimoto, Y.; Tosa, H.; Yu, Z.H.: Effects of Oren-gedoku-to on the microcirculation of bulbar conjunctiva in normal subjects. *J Traditional Med*;6:193-200 (1989)
 50. Tatsumi, T.; Terasawa, M.; Tega, E.; Hayakawa, Y.; Terasawa, K.; Saiki, I.: Immunopharmacological properties of Oren-gedoku-to (a Kampo medicine, Huang-Lian-Jie-Du-Tang) on contract hypersensitivity reaction in mice. *J Traditional Med*;19:21-27 (2002)
 51. Nagaki, Y.; Hayasaka, S.; Kadoi, C.; Matsumoto, M.; Nakamura, N.; Hayasaka, Y.: Effects of Oren-gedoku-to and Senkanmeimoku-to, traditional herbal medicines, on the experimental elevation of aqueous flare in pigmented rabbits. *Am J Chin Med*;29:141-147 (2001)
 52. Wang, L.M.; Yamamoto, T.; Wang, X.X.; Yang, L.; Koike, Y.; Shiba, K.; Mineshita, S.: Effects of oren-gedoku-to and unsei-in, Chinese traditional medicines, on interleukin-8 and superoxide dismutase in rats. *J Pharm Pharmacol*;49:102-104 (1997)
 53. Wang, L.M.; Mineshita, S.: Preventive effects of unsei-in and oren-gedoku-to, Chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J Pharm Pharmacol*;48:327-331 (1996)
 54. Fiocchi, C.: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*;115:182-205. (1998)
 55. Radford-Smith, G.: Ulcerative colitis: an immunological disease? *Baillieres Clin. Gastroenterol.*;11:35-52. (1997)
 56. Schuppan, D.: Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*;119:234-242 (2000)
 57. Ueyama, H.; Kiyohara, T.; Sawada, N.; Isozaki, K.; Kitamura, S.; Kondo, S.; Miyagawa, J.; Kanayama, S.; Shinomura, Y.; Ishikawa, H.; Ohtani, T.; Nezu, R.; Nagata, S.; Matsuzawa, Y.: High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut*;43:48-55. (1998)
 58. Suzuki, A.; Sugimura, K.; Ohtsuka, K.; Hasegawa, K.; Suzuki, K.; Ishizuka, K.;

- Mochizuki, T.; Honma, T.; Narisawa, R.; Asakura, H.: Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO+ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*;35:1278-1283. (2000)
59. Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Parroni, R.; D'Alo, S.; Pistoia, M.A.; Doglioni, C.; Cifone, M.G.; Corazza, G.R.: Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD). *Clin Exp Immunol*;120:235-240. (2000)
60. Di Sabatino, A.; Ciccocioppo, R.; D'Alo, S.; Parroni, R.; Millimaggi, D.; Cifone, M.G.; Corazza, G.R.: Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*;49:380-386. (2001)
61. Di Sabatino, A.; D'Alo, S.; Millimaggi, D.; Ciccocioppo, R.; Parroni, R.; Sciarra, G.; Cifone, M.G.; Corazza, G.R.: Apoptosis and peripheral blood lymphocyte depletion in coeliac disease. *Immunology*;103:435-440. (2001)
62. Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Parroni, R.; Muzi, P.; D'Alo, S.; Ventura, T.; Pistoia, M.A.; Cifone, M.G.; Corazza, G.R.: Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *Am J Clin Pathol*;115:494-503. (2001)
63. Ciccocioppo, R.; D'Alo, S.; Di Sabatino, A.; Parroni, R.; Rossi, M.; Doglioni, C.; Cifone, M.G.; Corazza, G.R.: Mechanisms of villous atrophy in autoimmune enteropathy and coeliac disease. *Clin Exp Immunol*;128:88-93. (2002)
64. Sakai, T.; Kimura, Y.; Inagaki-Ohara, K.; Kusugami, K.; Lynch, D.H.; Yoshikai, Y.: Fas-mediated cytotoxicity by intestinal intraepithelial lymphocytes during acute graft-versus-host disease in mice. *Gastroenterology*;113:168-174. (1997)
65. Bonhagen, K.; Thoma, S.; Bland, P.; Bregenholt, S.; Rudolphi, A.; Claesson, M.H.; Reimann, J.: Cytotoxic reactivity of gut lamina propria CD4+ alpha beta T cells in SCID mice with colitis. *Eur. J. Immunol.*;26:3074-3083. (1996)
66. Miwa, K.; Hashimoto, H.; Yatomi, T.; Nakamura, N.; Nagata, S.; Suda, T.: Therapeutic effect of an anti-Fas ligand mAb on lethal graft-versus-host disease. *Int Immunol*;11:925-931. (1999)
67. Kataoka, Y.; Iwasaki, T.; Kuroiwa, T.; Seto, Y.; Iwata, N.; Hashimoto, N.; Ogata, A.; Hamano, T.; Kakishita, E.: The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immunology*;103: 310-318. (2001)
68. Arnold, D.; Wasem, C.; Juillard, P.; Graber, P.; Cima, I.; Frutschi, C.; Herren, S.; Jakob, S.; Alouani, S.; Mueller, C.; Chvatchko, Y.; Brunner, T.: IL-18-independent cytotoxic T lymphocyte activation and IFN-gamma production during experimental acute graft-versus-host disease. *Int Immunol*;

- 14:503-511. (2002)
69. Mowat, A.M.; Vinley, J.L. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. Rev.*;156:145-166 (1997)
 70. Yukawa, M.; Iizuka, M.; Horie, Y.; Yoneyama, K.; Shirasaka, T.; Itou, H.; Komatsu, M.; Fukushima, T.; Watanabe, S.: Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis*;17:70-76. (2002)
 71. Inagaki-Ohara, K.; Nishimura, H.; Sakai, T.; Lynch, D.H.; Yoshikai, Y.: Potential for involvement of Fas antigen Fas ligand interaction in apoptosis of epithelial cells by intraepithelial lymphocytes in murine small intestine. *Lab. Invest.*;77:421-429 (1997)
 72. Lin, T.S.; Brunner, T.; Tietz, B.; Madsen, J.; Bonfoco, E.; Reaves, M.; Huflejt, M.; Green, D.R.: Fas ligand-mediated killing by intestinal intraepithelial lymphocytes - participation in intestinal graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.*;101:570-577 (1998)
 73. Ellenhorn, J.D.; Hirsch, R.; Schreiber, H.; Bluestone, J.A.: In vivo administration of anti-CD3 prevents malignant progressor tumor growth. *Science*;242:569-571. (1988)
 74. Hirsch, R.; Eckhaus, M.; Auchincloss, H., Jr.; Sachs, D.H.; Bluestone, J.A.: Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. I. Immunosuppression of transplantation responses. *J Immunol*;140:3766-3772. (1988)
 75. Hirsch, R.; Gress, R.E.; Pluznik, D.H.; Eckhaus, M.; Bluestone, J.A.: Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. II. In vivo activation of T cells. *J Immunol*;142:737-743. (1989)
 76. Poussier, P.; Edouard, P.; Lee, C.; Binnie, M.; Julius, M.: Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. *J. Exp. Med.*;176:187-199. (1992)
 77. Suzuki, S.; Sugahara, S.; Shimizu, T.; Tada, T.; Minagawa, M.; Maruyama, S.; Watanabe, H.; Saito, H.; Ishikawa, H.; Hatakeyama, K.; Abo, T.: Low level of mixing of partner cells seen in extrathymic T cells in the liver and intestine of parabiotic mice: its biological implication. *Eur J Immunol*;28:3719-3729. (1998)
 78. Ferran, C.; Dy, M.; Sheehan, K.; Merite, S.; Schreiber, R.; Landais, P.; Grau, G.; Bluestone, J.; Bach, J.F.; Chatenoud, L.: Inter-mouse strain differences in the *in vivo* anti-CD3 induced cytokine release. *Clin. Exp. Immunol.*;86:537-543.

- (1991)
79. Ferran, C.; Dy, M.; Sheehan, K.; Schreiber, R.; Grau, G.; Bluestone, J.; Bach, J.F.; Chatenoud, L.: Cascade modulation by anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody of interferon-gamma, interleukin-3 and interleukin-6 release after triggering of the CD3/T cell receptor activation pathway. *Eur. J. Immunol.*;21:2349-2353. (1991)
 80. Yaguchi, K.; Kayaba, S.; Soga, H.; Yamagishi, M.; Tamura, A.; Kasahara, S.; Ohara, S.; Satoh, J.; Oka, Y.; Toyota, T.; Itoh, T.: DNA fragmentation and detachment of enterocytes induced by anti-CD3 mAb-activated intraepithelial lymphocytes. *Cell Tissue Res*;315:71-84 (2004)
 81. Merger, M.; Viney, J.L.; Borojevic, R.; Steele-Norwood, D.; Zhou, P.; Clark, D.A.; Riddell, R.; Maric, R.; Podack, E.R.; Croitoru, K.: Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor alpha in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Gut*;51:155-163. (2002)
 82. Coopersmith, C.M., O'Donnell, D., Gordon, J. I.: *Am. J. Physiol.*;276:G677 (1999)
 83. Thompson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*;267:1456-1462 (1995)
 84. Wyllie, A.H.: Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer*;67:205-208 (1993)
 85. Tenniswood, M.P.; Guenette, R.S.; Lakins, J.; Mooibroek, M.; Wong, P.; Welsh, J.E.: Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Rev*;11:197-220 (1992)
 86. Ellis, R.E.; Yuan, J.Y.; Horvitz, H.R.: Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*;7:663-698 (1991)
 87. Wei, Y.Q.; Zhao, X.; Kariya, Y.; Fukata, H.; Teshigawara, K.; Uchida, A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res*;54:4952-4957 (1994)
 88. Tanizawa, A.; Fujimori, A.; Fujimori, Y.; Pommier, Y.: Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst*;86:836-842 (1994)
 89. Bhalla, K.; Ibrado, A.M.; Tourkina, E.; Tang, C.; Mahoney, M.E.; Huang, Y.: Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia*;7:563-568 (1993)
 90. Liu, Y.; Bhalla, K.; Hill, C.; Priest, D.G.: Evidence for involvement of tyrosine

- phosphorylation in taxol-induced apoptosis in a human ovarian tumor cell line. *Biochem Pharmacol*;48:1265-1272 (1994)
91. Azuma, Y.; Onishi, Y.; Sato, Y.; Kizaki, H.: Induction of mouse thymocyte apoptosis by inhibitors of tyrosine kinases is associated with dephosphorylation of nuclear proteins. *Cell Immunol*;152:271-278 (1993)
 92. Gorczyca, W.; Gong, J.; Ardelt, B.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z.: The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res*;53:3186-3192 (1993)
 93. Babich, H.; Borenfreund, E.; Stern, A.: Comparative cytotoxicities of selected minor dietary non-nutrients with chemopreventive properties. *Cancer Lett*;73:127-133 (1993)
 94. Anel, A.; Buferne, M.; Boyer, C.; Schmitt-Verhulst, A.M.; Golstein, P.: T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol*;24:2469-2476 (1994)
 95. Migita, K.; Eguchi, K.; Kawabe, Y.; Nagataki, S.: Tyrosine phosphorylation participates in peripheral T-cell activation and programmed cell death in vivo. *Immunology*;85:550-555 (1995)
 96. Yano, H.; Mizoguchi, A.; Fukuda, K.; Haramaki, M.; Ogasawara, S.; Momosaki, S.; Kojiro, M.: The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res*;54:448-454 (1994)
 97. Wu, X.; Akatsu, H.; Okada, H.: Apoptosis of HIV-infected cells following treatment with Sho-Saiko-to and its components. *Jpn J Med Sci Biol*;48:79-87 (1995)
 98. Greenspan, H.C.; Aruoma, O.I.: Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunol Today*;15:209-213 (1994)
 99. Buttke, T.M.; Sandstrom, P.A.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*;15:7-10 (1994)
 100. Slater, A.F.; Nobel, C.S.; Orrenius, S.: The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*;1271:59-62 (1995)
 101. Yamamoto, M.; Ogawa, K.; Morita, M.; Fukuda, K.; Komatsu, Y.: The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *Hepatology*;23:552-559. (1996)
 102. Wyllie, A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with

- endogenous endonuclease activation. *Nature*;284:555-556 (1980)
103. Kuwakado, K.; Kubota, M.; Hirota, H.; Adachi, S.; Matsubara, K.; Kasai, Y.; Akiyama, Y.; Mikawa, H.: Aphidicolin potentiates apoptosis induced by arabinosyl nucleosides in human myeloid leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol*;46:1909-1916 (1993)
 104. McConkey, D.J.; Nicotera, P.; Hartzell, P.; Bellomo, G.; Wyllie, A.H.; Orrenius, S.: Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch Biochem Biophys*;269:365-370 (1989)
 105. Evans, V.G.: Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int*;17:461-476 (1993)
 106. Swabb, E.A.; Tai, Y.H.; Jordan, L.: Reversal of cholera toxin-induced secretion in rat ileum by luminal berberine. *Am J Physiol*;241:G248-252 (1981)
 107. Sack, R.B.; Froehlich, J.L.: Berberine inhibits intestinal secretory response of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins. *Infect Immun*;35:471-475 (1982)
 108. Tai, Y.H.; Feser, J.F.; Marnane, W.G.; Desjeux, J.F.: Antisecretory effects of berberine in rat ileum. *Am J Physiol*;241:G253-258 (1981)
 109. Zhu, B.; Ahrens, F.: Antisecretory effects of berberine with morphine, clonidine, L-phenylephrine, yohimbine or neostigmine in pig jejunum. *Eur J Pharmacol*;96:11-19 (1983)
 110. Zhu, B.; Ahrens, F.A.: Effect of berberine on intestinal secretion mediated by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in jejunum of pigs. *Am J Vet Res*;43:1594-1598 (1982)
 111. Fujimura, H., Sawada, T., Goto, M.: [Screening test of anti-inflammatory action on the constituents of crude-drugs and plants]. *Yakugaku Zasshi*;90:782-783 (1970)
 112. Creasey, W.A.: Biochemical effects of berberine. *Biochem Pharmacol*;28:1081-1084 (1979)
 113. Bhakuni, D., Jain, S.: Protoberberine alkaloids. Academic Press, (1986)
 114. Hahn, F.E., Ciak, J.: Berberine. Springer, (1975)
 115. Ghosh, A.K.; Bhattacharyya, F.K.; Ghosh, D.K.: *Leishmania donovani*: amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp Parasitol*;60:404-413 (1985)
 116. Suffness, M., Cordell, G. A.: Antitumor alkaloids. Academic Press, (1985)
 117. Chen, K.T.; Hao, D.M.; Liu, Z.X.; Chen, Y.C.; You, Z.S.: Effect of berberine alone or in combination with argon ion laser treatment on 9L rat glioma cell line.

- Chin Med J (Engl);107:808-812 (1994)
118. Kuo, C.L.; Chou, C.C.; Yung, B.Y.: Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Lett*;93:193-200 (1995)
 119. Davidson, M.W.; Lopp, I.; Alexander, S.; Wilson, W.D.: The interaction of plant alkaloids with DNA. II. Berberinium chloride. *Nucleic Acids Res*;4:2697-2712 (1977)
 120. Maiti, M.; Chaudhuri, K.: Interaction of berberine chloride with naturally occurring deoxyribonucleic acids. *Indian J Biochem Biophys*;18:245-250 (1981)
 121. Debnath, D.; Kumar, G.S.; Nandi, R.; Maiti, M.: Interaction of berberine chloride with deoxyribonucleic acids: evidence for base and sequence specificity. *Indian J Biochem Biophys*;26:201-208 (1989)
 122. Cushman, M.; Dekow, F.W.; Jacobsen, L.B.: Conformations, DNA binding parameters, and antileukemic activity of certain cytotoxic protoberberine alkaloids. *J Med Chem*;22:331-333 (1979)
 123. King, L.B.; Ashwell, J.D.: Signaling for death of lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*;5:368-373 (1993)
 124. Migliorati, G.; Nicoletti, I.; Pagliacci, M.C.; D'Adamio, L.; Riccardi, C.: Interleukin-4 protects double-negative and CD4 single-positive thymocytes from dexamethasone-induced apoptosis. *Blood*;81:1352-1358 (1993)
 125. Waring, P.: DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J Biol Chem*;265:14476-14480 (1990)
 126. Nieto, M.A.; Gonzalez, A.; Gambon, F.; Diaz-Espada, F.; Lopez-Rivas, A.: Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*;88:341-344 (1992)
 127. Martin, S.J.: Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol*;3: 141-144 (1993)
 128. Chow, S.C.; Peters, I.; Orrenius, S.: Reevaluation of the role of de novo protein synthesis in rat thymocyte apoptosis. *Exp Cell Res*;216:149-159 (1995)
 129. Lock, R.B.; Stribinskiene, L.: Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res*;56:4006-4012 (1996)
 130. Billiar, T.R.; Curran, R.D.; Stuehr, D.J.; West, M.A.; Bentz, B.G.; Simmons, R.L.: An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med*;169:1467-1472 (1989)

131. Kurose, I.; Kato, S.; Ishii, H.; Fukumura, D.; Miura, S.; Suematsu, M.; Tsuchiya, M.: Nitric oxide mediates lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial function in cultured hepatocytes and isolated perfused liver. *Hepatology*;18:380-388 (1993)
132. Kurose, I.; Miura, S.; Fukumura, D.; Yonei, Y.; Saito, H.; Tada, S.; Suematsu, M.; Tsuchiya, M.: Nitric oxide mediates Kupffer cell-induced reduction of mitochondrial energization in hepatoma cells: a comparison with oxidative burst. *Cancer Res*;53:2676-2682 (1993)
133. Buttery, L.D.; Evans, T.J.; Springall, D.R.; Carpenter, A.; Cohen, J.; Polak, J.M.: Immunochemical localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats. *Lab Invest*;71:755-764 (1994)
134. Wood, E.R.; Berger, H., Jr.; Sherman, P.A.; Lapetina, E.G.: Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*;191:767-774 (1993)
135. Curran, R.D.; Billiar, T.R.; Stuehr, D.J.; Hofmann, K.; Simmons, R.L.: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med*;170:1769-1774 (1989)
136. Nussler, A.K.; Di Silvio, M.; Billiar, T.R.; Hoffman, R.A.; Geller, D.A.; Selby, R.; Madariaga, J.; Simmons, R.L.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med*;176:261-264 (1992)
137. Geller, D.A.; Nussler, A.K.; Di Silvio, M.; Lowenstein, C.J.; Shapiro, R.A.; Wang, S.C.; Simmons, R.L.; Billiar, T.R.: Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*;90:522-526 (1993)
138. Wink, D.A.; Kasprzak, K.S.; Maragos, C.M.; Elespuru, R.K.; Misra, M.; Dunams, T.M.; Cebula, T.A.; Koch, W.H.; Andrews, A.W.; Allen, J.S.; et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*;254:1001-1003 (1991)
139. Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C.L.; Penman, B.W.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R.: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*;89:3030-3034 (1992)
140. Ohshima, H.; Bartsch, H.: Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*;305:253-264 (1994)
141. Liu, R.H.; Jacob, J.R.; Hotchkiss, J.H.; Tennant, B.C.: Synthesis of nitric oxide

- and nitrosamine by immortalized woodchuck hepatocytes. *Carcinogenesis*; 14:1609-1613 (1993)
142. Liu, R.H.; Jacob, J.R.; Hotchkiss, J.H.; Cote, P.J.; Gerin, J.L.; Tennant, B.C.: Woodchuck hepatitis virus surface antigen induces nitric oxide synthesis in hepatocytes: possible role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*; 15:2875-2877 (1994)
143. Guarner, C.; Soriano, G.; Tomas, A.; Bulbena, O.; Novella, M.T.; Balanzo, J.; Vilardell, F.; Mourelle, M.; Moncada, S.: Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*;18:1139-1143 (1993)
144. Nathan, C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*; 6:3051-3064 (1992)
145. Ignarro, L.J.: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J*; 3:31-36 (1989)
146. Knowles, R.G.; Moncada, S.: Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci*;17:399-402 (1992)
147. Schini, V.B.; Vanhoutte, P.M.: L-arginine evokes both endothelium-dependent and -independent relaxations in L-arginine-depleted aortas of the rat. *Circ Res*; 68:209-216 (1991)
148. Charpie, J.R.; Webb, R.C.: Vascular myocyte-derived nitric oxide is an autocrine that limits vasoconstriction. *Biochem Biophys Res Commun*;194: 763-768 (1993)
149. Fukuda, K., Ogata, T., Kido, T., Ueki, T., Yamamoto, M., Endo, T.: Induction of nitric oxide production from vasocular smooth muscle cells by aqueous extracts of crude drugs. *J Traditional Med*;11:100-105 (1994)
150. 平田 結喜緒: NO のすべて. 別冊・医学の歩み; 医歯薬出版株式会社 (1997)
151. Marletta, M.A.: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*; 268:12231-12234 (1993)
152. Knowles, R.G.; Moncada, S.: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*; 298 (Pt 2):249-258 (1994)
153. Moncada, S.; Higgs, E.A.: Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J*;9:1319-1330 (1995)
154. Harbrecht, B.G.; Billiar, T.R.; Stadler, J.; Demetris, A.J.; Ochoa, J.B.; Curran, R.D.; Simmons, R.L.: Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med*;20:1568-1574 (1992)

155. Wei, X.Q.; Charles, I.G.; Smith, A.; Ure, J.; Feng, G.J.; Huang, F.P.; Xu, D.; Muller, W.; Moncada, S.; Liew, F.Y.: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*;375:408-411 (1995)
156. MacMicking, J.D.; Nathan, C.; Hom, G.; Chartrain, N.; Fletcher, D.S.; Trumbauer, M.; Stevens, K.; Xie, Q.W.; Sokol, K.; Hutchinson, N.; et al.: Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*;81:641-650 (1995)
157. Ames, B.N.; Gold, L.S.; Willett, W.C.: The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*;92:5258-5265 (1995)
158. Cerutti, P.A.: Prooxidant states and tumor promotion. *Science*;227:375-381 (1985)
159. Yermilov, V.; Rubio, J.; Becchi, M.; Friesen, M.D.; Pignatelli, B.; Ohshima, H.: Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxy nitrite in vitro. *Carcinogenesis*;16:2045-2050 (1995)
160. Kolb, H.; Kolb-Bachofen, V.: Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today*;13:157-160 (1992)
161. Teng, C.M.; Yu, S.M.; Chen, C.C.; Huang, Y.L.; Huang, T.F.: EDRF-release and Ca⁺⁺-channel blockade by magnolol, an antiplatelet agent isolated from Chinese herb *Magnolia officinalis*, in rat thoracic aorta. *Life Sci*;47:1153-1161 (1990)
162. Kamata, K.; Iizuka, T.; Nagai, M.; Kasuya, Y.: Endothelium-dependent vasodilator effects of the extract from *Salviae Miltiorrhizae radix*. A study on the identification of lithospermic acid B in the extracts. *Gen Pharmacol*;24:977-981 (1993)
163. Kilbourn, R.G.; Gross, S.S.; Jubran, A.; Adams, J.; Griffith, O.W.; Levi, R.; Lodato, R.F. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*;87:3629-3632 (1990)
164. Kilbourn, R.G.; Gross, S.S.; Lodato, R.F.; Adams, J.; Levi, R.; Miller, L.L.; Lachman, L.B.; Griffith, O.W.: Inhibition of interleukin-1-alpha-induced nitric oxide synthase in vascular smooth muscle and full reversal of interleukin-1-alpha-induced hypotension by N omega-amino-L-arginine. *J Natl Cancer Inst*;84:1008-1016 (1992)
165. Hogg, N.; Kalyanaraman, B.; Joseph, J.; Struck, A.; Parthasarathy, S.: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*;334:170-174 (1993)

166. Cooke, J.P.; Singer, A.H.; Tsao, P.; Zera, P.; Rowan, R.A.; Billingham, M.E.: Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*;90:1168-1172 (1992)
167. McNamara, D.B.; Bedi, B.; Aurora, H.; Tena, L.; Ignarro, L.J.; Kadowitz, P.J.; Akers, D.L.: L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun*;193:291-296 (1993)
168. Iizuka, A.; Iijima, O.T.; Yoshie, F.; Makino, B.; Amagaya, S.; Komatsu, Y.; Kondo, K.; Matsumoto, A.; Itakura, H.: Inhibitory effects of Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang) on the progression of atherosclerotic lesions in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J Ethnopharmacol*;63:209-218 (1998)
169. Yoshie, F.; Iizuka, A.; Komatsu, Y.; Matsumoto, A.; Itakura, H.; Kondo, K.: Effects of Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang) on plasma lipids and atherosclerotic lesions in female heterozygous heritable Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Pharmacol Res*;50:223-230 (2004)
170. Haranaka, R., Hasegawa, R., Kosoto, H., Owada, S., Hirama, N., Hanawa, T., Iimura, F., Nakagawa, S.: Antiatherosclerotic effect of traditional Chinese medicines (Ba-Wei-Di-Huang-Wan, Chai-Hu-Jia-Long-Gu-Mu-Li-Tang, Da-Chai-Hu-Tang, Huang-Lian-Jie-Du-Tang) in experimental animals. *J Traditional Med*;3 (1986)
171. 矢野 眞吾: 2.心筋と血管 4 高血圧. 代謝・臨時増刊 漢方薬; 29:198-205 (1992)
172. 寺沢 捷年: 重要処方解説(16) 黄連解毒湯. 漢方医学講座(日本短波放送放送内容集);43:13-20 (1988)
173. 森 雄材: 図説 漢方処方の構成と適用. 医歯薬出版株式会社 (1985)
174. Futaki, N.; Hamasaka, Y.; Arai, I.; Higuchi, S.; Otomo, S.: A new test for evaluating nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: inhibition of prostaglandin E2 production in minced intestinal tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*;316:114-123 (1992)
175. Taguchi, T.; McGhee, J.R.; Coffman, R.L.; Beagley, K.W.; Eldridge, J.H.; Takatsu, K.; Kiyono, H.: Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that secrete IFN-gamma and IL-5. *J. Immunol.*;145:68-77. (1990)
176. Tsuzuki, T., Yoshikai, Y., Ito, M., Mori, N., Ohbayashi, M., Asai, J.: Kinetics of intestinal intraepithelial lymphocytes during acute graft-versus-host disease in mice. *Eur. J. Immunol.*;24:709-715 (1994)

177. Okudela, K.; Ito, T.; Mitsui, H.; Hayashi, H.; Udaka, N.; Kanisawa, M.; Kitamura, H.: The role of p53 in bleomycin-induced DNA damage in the lung. A comparative study with the small intestine. *Am. J. Physiol.*;155:1341-1351 (1999)
178. Pritchard, D.M.; Watson, A.J.: Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. *Pharmacol. Ther.*;72:149-169. (1996)
179. Ramsdell, F.; Seaman, M.S.; Miller, R.E.; Tough, T.W.; Alderson, M.R.; Lynch, D.H.: gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur. J. Immunol.*;24:928-933. (1994)
180. Zan, H.; Cerutti, A.; Dramitinos, P.; Schaffer, A.; Casali, P.: CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *J. Immunol.*;161:5217-5225. (1998)
181. Hinegardner, R.T.: An improved fluorometric assay for DNA. *Anal Biochem*; 39:197-201 (1971)
182. Kissane, J.M.; Robins, E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J Biol Chem*;233:184-188 (1958)
183. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Cold Spring Harbor laboratory Press, (1989)
184. Koide, M.; Kawahara, Y.; Nakayama, I.; Tsuda, T.; Yokoyama, M.: Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*;268:24959-24966 (1993)
185. Nunokawa, Y.; Ishida, N.; Tanaka, S.: Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*;191:89-94 (1993)
186. Fukuda, K.; Xie, R.L.; Chiu, J.F.: Bidirectional morphological changes induced by dexamethasone in Morris hepatoma cell lines McA-RH7777 and McA-RH8994: independence of fibronectin and its receptor. *Exp Cell Res*;195:207-213 (1991)
187. Ritter, A.M.; Crispe, I.N.: 胸腺 T 細胞の分化・成熟と自己・非自己識別能の獲得. 最新医学の焦点. 南江堂 (1993)
188. 高添 正和: 臨床医のための炎症性腸疾患のすべて 潰瘍性大腸炎、クローン病の最新治療戦略. 株式会社メジカルビュー社 (2002)

189. 清野 宏、石川 博通、名倉 宏: 粘膜免疫 腸は免疫の司令塔. 株式会社中山書店 (2001)
190. Morteau, O.: COX-2: promoting tolerance. Nat Med; 5(8): 867-868 (1999)

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Fukuda K.; Kido T.; Miura N.; Yamamoto M.; Komatsu Y.: Increase in nitric oxide synthase and cyclic GMP in vascular smooth muscle cells by treatment with aqueous extracts of Astragali Radix, Ginseng Radix and Scutellariae Radix. *J. Traditional Medicines* 12(1), 38-44 (1995)
2. Suzuki R.; Kido T.; Miura N.; Yamamoto M.; Komatsu Y.; Fukuda K.: Inhibitory effects of herbal medicines on nitric oxide production in macrophage and hepatoma cell lines induced by inflammatory stimuli. *J. Traditional Medicines* 13(2), 165-172 (1996)
3. Miura N.; Yamamoto M.; Ueki T.; Kitani .T; Fukuda K.; Komatsu Y.: Inhibition of thymocyte apoptosis by berberine. *Biochem. Pharmacol.* 53(9), 1315-1322 (1997)
4. Miura N.; Yamamoto M.; Fukutake M.; Ohtake N.; Iizuka S.; Ishige A.; Sasaki H.; Fukuda K.; Yamamoto T.; Hayakawa S.: Anti-CD3 induces bi-phasic apoptosis in murine intestinal epithelial cells: possible involvement of the Fas/Fas ligand system in different T cell compartments. *Int. Immunol.* 17(5), 513-522 (2005)
5. Miura N.; Fukutake M.; Yamamoto M.; Ohtake N.; Iizuka S.; Imamura S.; Tsuchiya N.; Ishimatsu M.; Nakamura Y.; Ishige A.; Watanabe K.; Kase Y.; Takeda S.: An herbal medicine Orengedokuto prevents indomethacin-induced enteropathy. *Biol. Pharm. Bull.* 30(3), 495-501 (2007)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	矢野眞吾
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	上野光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	北田光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	斉藤和季
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	堀江利治