

論文の内容の要旨

論文題目 Protective effects of Inula flower on immune hepatic injury
and diabetes in mice

-- Active ingredient and its mechanism of action --

旋覆花のマウス免疫学的肝障害と糖尿病に対する保護作用

-- 活性成分およびその作用機序 --

氏名 宋 清華

緒言

Th1 および Th2 細胞のサイトカイン産生のパターンは両細胞の機能的相違と相関し、互いの反応を調節している。Th1 細胞は主に IFN- γ および IL-12 を産生し、遅延型過敏症に代表される細胞免疫を誘導する。一方、Th2 細胞は主に IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 及び IL-13 を産生し、B 細胞の活性化とクラススイッチにより IgE および IgG1 など抗体産生を補助し、液性免疫を誘導する。さらに Th1 細胞のサイトカインは液性免疫を抑制し、Th2 細胞のサイトカインは細胞性免疫を抑制し、生体内ではサイトカインネットワークによって互いに制御し合いバランスを保っている。

肝障害の原因の一つは Th1/Th2 のバランスの失調が関与している。内毒素によって、マクロファージが刺激され、活性化され、Th1 系のサイトカインを過剰産生し、肝を損傷し、肝炎又は肝硬変を引き起こす。Th1 系のサイトカインの IL-10 の投与、または抗 IFN- γ 抗体の投与で、Th2 系のサイトカインの IFN- γ を除去することによって、致死的内毒素ショックを予防できることから、免疫学的肝障害は Th1 優位な免疫疾患であることと考えられている。一方、STZ 誘発糖尿病マウスや糖尿病自然発症する NOD マウスのサイトカイン産生能は Th1 優位である。サイトカインまたは抗サイトカイン抗体の投与によって、Th1 あるいは Th2 細胞の活性化を修飾すると、病気の発症及び促進が Th1 細胞の活性化と平行してみられ、Th2 細胞の活性

化により抑制が起こる。免疫学的肝障害、免疫学的糖尿病などの疾患では Th1/Th2 のバランスの乱れにより、Th1 型の反応が優位になると考えられる。

漢方薬はアジアで数千年以上も使われている。漢方医薬では独特な治療原則に基づいて疾病を治療するが、その科学的根拠は十分でなく、アジアの伝統医薬に留まっている。医療進歩のためにも、漢方医学の進歩のためにも、漢方薬を科学的立場より再検討する必要がある。

本論文に使われる漢方薬の旋覆花はキク科のオグルマ(*Inula Britannica*)などの頭花で、漢方として鎮咳、去痰、利尿、健胃作用を目的として利用される。伝統的には肝障害や糖尿病に使用する記載は一つもない。頻用生薬でもないことから、基礎の研究は極少ない。同様に旋覆花の成分の taraxasteryl acetate も今までに研究の報告は数少ない。

本論文は漢方薬の中、新たな免疫学的肝障害や免疫学的糖尿病に有効な作用物質を探ることを試した。漢方薬の新しい応用の可能性を探るために、古典で記載していない作用を検討した。

第一章 肝障害マウスに対する旋覆花と taraxasteryl acetate の保護作用

In vitro の肝細胞障害モデルを用い、三百以上の生薬をスクリーニングし、旋覆花の肝障害保護作用を見いだした。さらにその有効成分を精製したところ、抗肝障害の活性成分は taraxasteryl acetate であることを確認した。

旋覆花の熱水エキスをマウスに一週間連続経口投与した。LPS 投与した 8 時間後、旋覆花の高投与量群ではマウスの生存率が一番高かった。さらに旋覆花の腹腔投与の影響を検討した。旋覆花の 4mg/マウスの投与量で 3 日前一回腹腔投与、または 3 日前と前日の 2 回投与した群の生存率は最も高かった。旋覆花は経口投与より、腹腔投与の方は肝障害保護作用が強かった。旋覆花の活性物質は腸管からの吸収が悪いか、または代謝されやすいなどの可能性が考えられた。さらに、旋覆花の肝保護作用の活性成分の単離を試みた。旋覆花をの各分画分の活性を検討したところ、活性の本体として taraxasteryl acetate を得た。Taraxasteryl acetate は肝障害マウスの生存率を増加した。肝障害マウスの生化学指標を検討したところ、旋覆花の 4mg/マウスの 3 日前と前日の 2 回腹腔投与では、肝障害マウスの血清トランスアミナーゼの増加を抑制する傾向、taraxasteryl acetate 投与では有意に抑制した。

LPS/ *P. acnes* に誘導された肝障害マウスの IFN- γ ⁺IL-4⁻ 産生細胞の増加、IFN- γ ⁻IL-4⁺ 産生細胞の減少及び IFN- γ ⁺IL-4⁻/IFN- γ ⁻IL-4⁺ の比の増加が観察された。この肝障害マウスは Th1 優位なモデルと示唆された。旋覆花は IFN- γ ⁺IL-4⁻/IFN- γ ⁻IL-4⁺ の比、taraxasteryl acetate は IFN- γ ⁺IL-4⁻ 産生細胞の割合、IFN- γ ⁺IL-4⁻/IFN- γ ⁻IL-4⁺ の比を抑制した。旋覆花は Th1/Th2 のバランスを正常化することにより肝障害保護作用を明らかにされ、旋覆花の肝障害保護作用の活性物質の一つであることが示唆された。

動物の中にも Th1 優位または Th2 優位なものがある。旋覆花と taraxasteryl acetate は Th1/Th2 のバランスに影響することができることから、Th1 または Th2 に対する特異性を検

討するために、Th1 優位とされる C57BL/6 マウスと Th2 優位とされる BALB/c マウスが用いられた。旋覆花は BALB/c マウスに対する影響が弱かったが、C57BL/6 マウスに対する影響が強かった。異なる Th 優位なマウスに対し、旋覆花の作用に特異性があることが示された。

Th の分化はマクロファージに産生されるサイトカインによる調整することが知られている。In vitro でマクロファージのサイトカインの産生能に対する旋覆花の影響を検討した。旋覆花はマクロファージの IL-12 の産生を抑制することと、高濃度で IL-10 の産生を促進することが観察された。Taraxasteryl acetate は肝障害マウスの脾臓細胞の IL-12 の産生能を抑制した。旋覆花はマクロファージの IL-10 産生の促進、IL-12 産生の抑制により、Th1 の優位性を低下し、肝障害を保護することが示唆された。Taraxasteryl acetate は旋覆花と同様に IL-12 産生の抑制により、Th1/Th2 のバランスを正常化した。組織学的検索を行ったところ、肝障害群では肝細胞は腫大し、リンパ球が浸潤し、広範囲に巣状壊死が見られた。Taraxasteryl acetate はこれらの変化を抑制した。IFN- γ と IL-12 は炎症性サイトカイン、T 細胞やマクロファージの組織への浸潤を促進し、肝細胞のネクロシスを引き起こす役割を演じることが知られている。Taraxasteryl acetate の肝組織の保護作用はこれらの炎症性サイトカインの抑制作用に関係していることが考えられた。

第二章 糖尿病マウスに対する旋覆花と taraxasteryl acetate の保護作用

免疫学的肝障害と免疫学的糖尿病と同様に Th1 優位な疾患と考えられる。旋覆花は Th1 を抑制することから、免疫学的糖尿病も改善することも予想される。そこで、streptozotocin に誘導される免疫学的糖尿病マウスを用い、旋覆花と taraxasteryl acetate の影響を検討した。旋覆花と taraxasteryl acetate は糖尿病マウスの血糖値を抑制した。旋覆花と taraxasteryl acetate は糖尿病保護作用を確認された。

組織検索を行ったところ、旋覆花の膵臓組織の膵島炎や β 細胞の破壊を抑制することがみられた。Taraxasteryl acetate は血清ではだけでなく、膵臓組織のインスリンの減少も抑制し、さらに STZ 誘導糖尿病マウスの膵臓 GAD65 陽性細胞の減少を抑制することが観察された。インスリンは血糖を調整する最も重要なホルモンで、GAD65 は β 細胞の破壊の初期には中心的な役割を果たしていることから、インスリンおよび GAD65 に対する影響は taraxasteryl acetate の糖尿病保護作用の直接原因の一部であると考えられた。肝障害障害実験と同様の考えに基づいて、Th 分化に対する影響をも検討した。旋覆花は糖尿病マウスの脾臓細胞からの IFN- γ /IL-4 産生能の比、さらに、糖尿病マウスの CD4⁺ 細胞の IFN- γ 産生細胞の割合を低下した。Taraxasteryl acetate も CD4⁺ 細胞の IFN- γ 産生細胞の割合の増加、IFN- γ /IL-4 産生細胞の比を低下した。肝障害保護作用と同様に旋覆花と taraxasteryl acetate は糖尿病マウスの Th1 の優位性を抑制することにより、免疫学的糖尿病の病態を改善することが示さ

れた。また、他のサイトカインの産生についても検討した。Taraxasteryl acetate は TNF- α 産生の抑制傾向、IL-10 産生の促進作用、TNF- α /IL-10 の比の減少、さらに IL-12 産生の減少が観察された。TNF- α 、IL-10、IL-12 は糖尿病の発症や糖尿病の進行に重要な役割を果たしていることはよく知られている。TNF- α /IL-10 の比も糖尿病には重要な意味を持っていると指摘されている。肝障害保護作用と同様に糖尿病保護作用も旋覆花と taraxasteryl acetate の Th1 サイトカインの産生を抑制し、Th2 サイトカインの産生を促進することによることと示唆された。

結語

免疫学的肝障害、免疫学的糖尿病では Th1 型の反応が優位になる病態である。しかし、旋覆花やその成分で Th1/Th2 バランスの調節をすることは知られていない。第一章で、旋覆花とその成分の taraxasteryl acetate は Th1/Th2 を調整することにより免疫学的肝障害保護作用を明らかにされた。この作用機序はマクロファージの IL-10 産生の促進、IL-12 産生の抑制による Th1/Th2 の比を抑制、即ち、Th1/Th2 のバランスに影響することと考えられた。第二章で、肝障害と同様な発病機序である免疫学的糖尿病に対する旋覆花と taraxasteryl acetate の影響も検討した。旋覆花と taraxasteryl acetate は糖尿病マウスの血糖値を低下させた。その作用機序としては肝障害マウスへの保護作用と同様に Th1/Th2 を調整することによるものと示された。さらに、taraxasteryl acetate は膵臓組織への保護作用が見られた。

旋覆花及びその成分の taraxasteryl acetate はマクロファージのサイトカインの産生を調整することによる Th1/Th2 のバランスに影響し、免疫疾患を保護することが考えられた。同様な発病メカニズムの他の免疫疾患の治療にも応用できる可能性があると期待された。