

Maharishi Amrit Kalash 4および5のマウスの 非特異的免疫機能に及ぼす影響

杉浦春雄*, 西田弘之*, 井奈波良一**,
正村一人**, 小川真奈**, 岩田弘敏**

* 岐阜薬科大学保健体育学研究室

** 岐阜大学医学部衛生学教室

Effects of Maharishi Amrit Kalash 4 and 5 on non-specific
immune functions in mice

Haruo Sugiura*, Hiroyuki Nishida*, Ryoichi Inaba**,
Kazuhito Masamura**, Shinna Ogawa** and Hirotoishi Iwata**

* Department of Health and Physical Education,
Gifu Pharmaceutical University

** Department of Hygiene, Gifu University School of Medicine

Abstract: The present study was carried out to examine the effects of Maharishi Amrit Kalash 4 (MAK-4) and 5 (MAK-5) on non-specific immunological mechanisms in mice. Mice aged 4 weeks were divided into 3 groups: a no treatment group (control), MAK-4 treated group (MAK-4 group) and MAK-5 treated group (MAK-5 group). The MAK-4 and MAK-5 were given p.o. at a dose of 50 mg/kg per day for 8 weeks.

The following results were obtained:

1. MAK-4 and MAK-5 did not affect the body weight gain and food consumption of the mice.
2. The acid phosphatase (APH) and lactate dehydrogenase (LDH) activities of peritoneal macrophages (M ϕ) in the MAK-4 and MAK-5 groups increased significantly compared to the control group.
3. Concanavalin A (Con A) induced cell proliferation in the spleen was high in the MAK-4 and MAK-5 groups.

These results suggested that MAK-4 and MAK-5 has a stimulatory effect on M ϕ because of the increases in the APH and LDH activities in the peritoneal M ϕ of mice. MAK-4 and MAK-5 also intensified the T-cell function represented by Con A-induced splenocyte proliferation.

Key Words: Maharishi Amrit Kalash (マハリシ・アムリット・カラシ), macrophage (マクロファージ), acid phosphatase (酸性ホスファターゼ), lactate dehydrogenase (乳酸脱水素酵素), splenocyte proliferation (脾細胞増殖), mice (マウス).

緒 言

マハリシ・アムリットカラシ(Maharishi Amrit Kalash: MAK, MAK-4 およびMAK-5)は、古代インドを源とする伝統医学であるアーユルヴェーダのラサヤナ(薬草)の中で最も著名な生薬である^{1,2)}。これらは種々の薬草の混合物であり、独特の診断基準に基づき処方され、古くから幅広く治療に活用されている³⁾。

MAKの薬理作用に関してこれまでに、MAK-4 およびMAK-5 がDMBAに

よって誘発された乳癌の発生を抑制することやコラーゲンやエピネフリンによって引き起こされた血小板の凝集を抑制すること、*in vitro*でラット肝ミクロゾーム画分の脂質の過酸化作用を抑制することなどが明らかにされている⁴⁻⁷⁾。また、免疫機能に及ぼす作用として、マウス網内系における貪食能の亢進⁸⁾、腹腔マクロファージ(M ϕ)のスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)産生能の増強⁹⁾およびマイトジェンに対する脾細胞増殖能の増強¹⁰⁾など比較的短期間投与(10日～20日)による作用について報告されており、これらの報告は、MAKが生体防御機能の促進に有効であることを示唆している。

そこで、本研究では生体防御機構の中で、特に初期免疫において重要な役割を演じるM ϕ およびM ϕ からの抗原情報によって活性化されるT細胞の機能に及ぼすMAK-4およびMAK-5の8週間投与の影響について検討した。

実験材料および方法

1. 実験動物

ICR系雄性マウス(3週齢:10～12g)を日本SLCから購入した。動物は室温22±1℃、湿度60±5%、午前8時から午後8時までを明期とする人工照明の動物室で飼育した。飼料(CE-2:日本クレア)および水は自由摂取とした。動物は1週間の予備飼育の後、実験に供した。

2. 薬物

インド産のマハリシ・アムリット・カラシ・ハーバル・プリザーブ・アムリット(Maharishi Amrit Kalash 4: MAK-4)およびマハリシ・アムリット・カラシ・ハーバル・パウダー・アムリット(Maharishi Amrit Kalash 5: MAK-5)を用いた。MAK-4の成分は、indian gallnut, indian gooseberry, dried catkins, indian pennywort, nutgrass, white sandalwood, evelyulus alsinoides, embella, aloewood, licorice, cardamom, cinnamon, cyperus, tumeric, honey,

raw sugar, ghee (clarified butter)である⁴⁾。MAK-5の成分は、gymnema aurentiacum, black musale, heart-leaved moonseed, sphaeranthus indicus, butterfly pea, licorice, vanda spatulatum, elephant creeper, indian wild pepperである⁵⁾。

3. MAK-4 およびMAK-5 の投与

マウス(4週齢)の平均体重がほぼ均等になるようMAK-4投与群(N=10)、MAK-5投与群(N=10)および非処置群(対照群：N=10)の3群に区分した。MAK-4およびMAK-5の投与は、それぞれ50mg/kgを精製水に懸濁し、1日1回、週5日、8週間にわたって経口投与した。対照群はマウスの体重10g当り0.1mlの精製水を上記と同様に経口投与した。これら8週間の投与ののち、最終投与から72時間後に種々の検討に供した。

本実験でのMAK-4およびMAK-5の投与量は、Sharmaら^{4,5)}の用いたヒト摂取量の1,200mg/日に準じて、マウスの体重に換算し、その2倍量を用いた。

4. 測定項目

マウス腹腔Mφの機能およびマウス脾細胞の免疫学的機能に及ぼすMAK-4およびMAK-5の影響

8週間の経口投与を終了してから72時間後に、各群6匹のマウスを用いて、エーテル麻酔下に断頭致死して、腹腔浸出細胞(PECs)を採取し、腹腔Mφの酸性ホスファターゼ(APH)活性および乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定した。さらに、別の各群4匹ずつのマウスを用いて、エーテル麻酔下に頸椎脱臼致死し、脾臓を摘出してCon A に対する脾細胞の増殖反応性を測定した。

5. 測定方法

(1) PECsの採取および腹腔Mφの単離

マウスをエーテル麻酔下で断頭致死し、充分脱血した後、腹腔内にハンクス液(日水製薬)の5 mlを注射した。5分間、腹部をマッサージ後、PECsを採取した。このPECs浮遊液中のMφを付着法¹¹⁾により単離した。すなわち、採取したPECs浮遊液を遠心(1,000rpm: 5分間)し、その沈渣を10%牛胎児血清(FCS: Bioproducts)含有RPMI 1640培養液(日水製薬) 2 mlに浮遊させ、プラスチックシャーレ(Corning)に分注し、37°Cで120分間、5% CO₂ インキュベーター中に静置した。その後、非付着細胞を37°Cのハンクス液で洗浄除去し、付着性細胞をMφとした。付着したMφはラバーポリスマンを用いて浮遊細胞とした。細胞数は、トリパンブルー色素排除法¹²⁾による生細胞数および死細胞数の算定を行った。本実験で用いた生細胞は98%以上であった。

(2) 腹腔MφのAPH活性およびLDH活性の測定

腹腔MφをRPMI 1640培養液を用いて 1.5×10^5 cells/mlに調整し、その1.0mlを1,000rpmで5分間遠心し、沈渣に0.1% triton X-100(ナカライタスク)の1.0mlを加えてMφを溶解した。この溶解液をAPH活性およびLDH活性の測定用試料液とした。APH活性は、p-ニトロフェニルリン酸基質法(acid phosphatase Test Wako: 和光純薬)により、LDH活性は、乳酸基質・ジアホラーゼ法(Lactate Dehydrogenase C II-Test Wako: 和光純薬)により測定した。APH活性の成績は腹腔Mφ 1.5×10^4 cellsあたりの国際単位(IU)で、また、LDH活性は腹腔Mφ 1.0×10^4 cellsあたりのIUでそれぞれ示した。

(3) Con A による脾細胞増殖反応の測定

マウスをエーテル麻酔下に頸椎脱臼致死させて、無菌的に脾臓を摘出した。ハンクス液(日水製薬)中で、スリガラス付組織切片用スライドガラス2枚のスリガラス部分の間に脾臓をはさみ、軽く圧迫して細胞を押し出し、脾細胞浮遊液とした。遠心洗浄後、脾細胞を10% FCS含有RPMI 1640培

養液で 4×10^6 cells/mlに調整し、その50 μ lを培養用96穴平底マイクロプレート (Corning)に加え、さらにRPMI 1640培養液で10 μ g/mlに調整したCon Aの25 μ lを添加した後、37°C、5% CO₂インキュベーター中で72時間培養した。細胞増殖の測定は、Mosmann¹³⁾に従って、3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)法により行った。すなわち、培養終了の6時間前にリン酸緩衝生理的食塩水(phosphate-buffered saline: PBS(-))で調整した0.5% MTT溶液を各wellに10 μ lを加え、培養終了後、0.04N HCl-イソプロパノール溶液150 μ lを加えた。細胞の溶解を確認し、マイクロプレートリーダー(Corona Electric MTP-120)により570nmにおける吸光度を測定した。

実験はtriplicateにより行い、成績は対照群の脾細胞増殖能を100%として比較した。

6. 統計学的処理

本研究において得られた数値は、平均値±標準誤差で示した。有意差の検定はStudentまたはWelchのt-testにて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 体重および食餌摂取量について

Table 1 に体重およびマウス1匹1週間当りの食餌摂取量を示す。体重および食餌摂取量は3群ともに同様な値を示し、有意差は認められなかった。

2. 腹腔M ϕ のAPH活性およびLDH活性について

Fig. 1 に腹腔M ϕ のAPH活性およびLDH活性についての成績を示す。腹腔M ϕ のAPH活性およびLDH活性では、対照群と比較して、MAK-4投与群およびMAK-5投与群でそれぞれ高い値を示し、有意差が認められた。

Table 1 Effects of MAK-4 and MAK-5 on body weight and food consumed by mice.

Group	N	Body weight (g)		Food consumed (g/week/mouse)
		Age		
		4 weeks	12 weeks	
Control	10	18.9 ± 0.3	38.8 ± 0.7	38.0 ± 0.3
MAK-4	10	18.8 ± 0.4	39.2 ± 0.9	37.4 ± 0.8
MAK-5	10	18.4 ± 0.4	38.0 ± 0.7	37.7 ± 0.5

The MAK-4 and MAK-5 were given p.o. at a dose of 50 mg/kg for 8 weeks starting at 4 weeks of age.

Each value represents the mean ± SE.

MAK-4 : Maharishi Amrit Kalash 4, MAK-5 : Maharishi Amrit Kalash 5, N: Number of mice used.

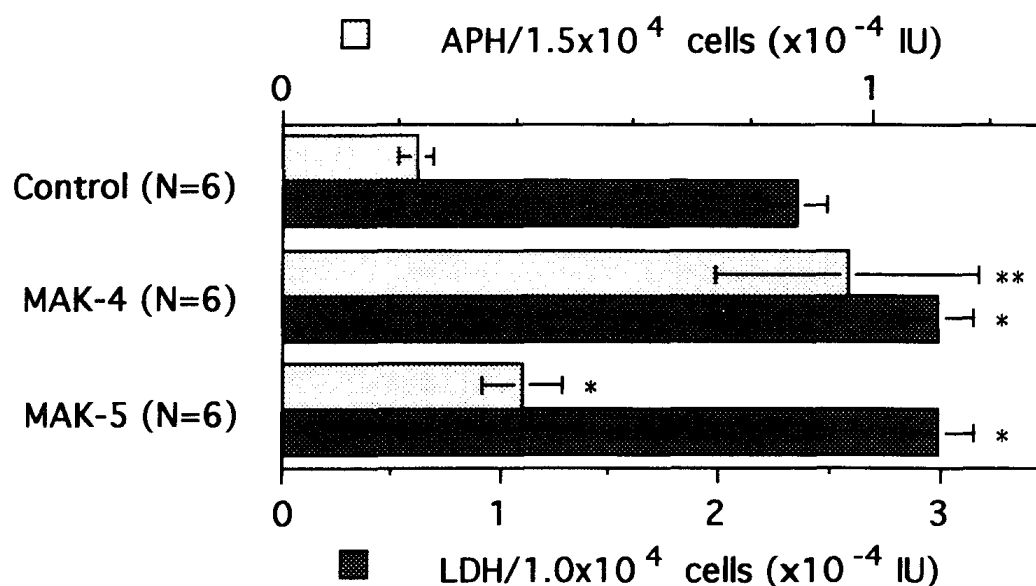


Fig. 1 Effects of MAK-4 and MAK-5 on acid phosphatase (APH) and lactate dehydrogenase (LDH) activities of peritoneal macrophages in mice.

The MAK-4 and MAK-5 were given p.o. at a dose of 50 mg/kg for 8 weeks starting at 4 weeks of age.

Each column and horizontal bar represents the mean ± SE.

Statistically significant difference from the control at *p<0.05 and **p<0.01, respectively.

MAK-4: Maharishi Amrit Kalash 4, MAK-5: Maharishi Amrit Kalash 5, N: Number of mice used.

3. Con A刺激に対する脾細胞の増殖反応性について

Fig. 2 にCon A 刺激に対する脾細胞の増殖反応性についての成績を示す。Con A 刺激に対する脾細胞の増殖反応性では、MAK-4 投与群およびMAK-5 投与群がそれぞれ対照群に比し有意に高値を示した。

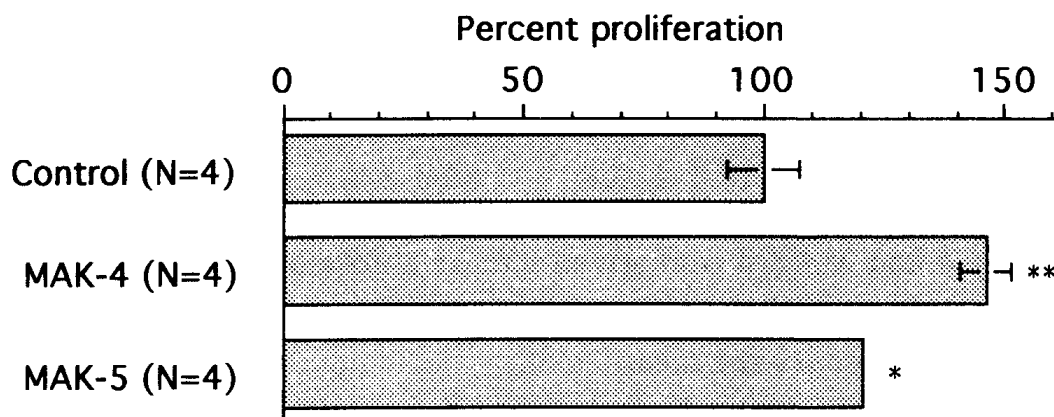


Fig. 2 Effects of MAK-4 and MAK-5 on proliferation of splenocytes induced by Con A in mice.

The MAK-4 and MAK-5 were given p.o. at a dose of 50 mg/kg for 8 weeks starting at 4 weeks of age.

Each column and horizontal bar represents the mean \pm SE.

Statistically significant difference from the control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively.

MAK-4: Maharishi Amrit Kalash 4, MAK-5: Maharishi Amrit Kalash 5, N: Number of mice used.

考 察

Maharishi Amrit Kalash(MAK-4 およびMAK-5)は、マハリシ・アーユルヴェーダのラサーヤナ(薬草)の中で最も著名な薬草混合物であり、アーユルヴェーダ医学の中で予防および治療薬として用いられ、その作用効果について種々検討されている^{1,2,14-16}。しかし、MAK-4 およびMAK-5 の生体への影響について免疫学的に明らかにされているものは少ない^{8,9}。そこで、本研究ではマウス非特異的免疫機能であるM ϕ の機能およびT細胞の機能に及ぼすMAK-4 およびMAK-5 の影響について検討した。

MAK-4 およびMAK-5 を8週間経口投与した結果、実験終了時のマウスの

体重および食餌摂取量は、3群間に差異は認められなかった。これらの結果から、本実験で用いたMAK-4およびMAK-5の投与量ならびに投与期間ではマウスの体重や食餌摂取量に著明な影響を及ぼさないものと考えられる。

まず初めに、マウス腹腔Mφの機能に及ぼすMAK-4およびMAK-5の影響について検討するために、Mφが貪食した異物の分解能力の指標となる、MφのLysosome酵素のAPH活性および細胞質酵素の一つであるLDH活性を測定した。その結果、APH活性とLDH活性ともに対照群と比較して、MAK-4投与群およびMAK-5投与群で有意に増加がみられた。特に、APH活性では、対照群に比しMAK投与群が約1.8倍～4倍の上昇を示した。Mφは活性化に伴って、その形態、運動性、酵素活性、代謝活性、殺菌作用などの種々の活性が増強することが知られている¹⁷⁻²¹⁾。本研究結果は、MAK-4およびMAK-5にはMφを活性化する作用を有していることを示唆するものである。このことから、MAK-4およびMAK-5がMφの代謝活性に及ぼす作用機序を考察すると、MAK-4およびMAK-5はMφの酵素活性の増強を介してMφを活性化すると考えられる。しかし、Mφの活性化は、異なるシグナルによりtriggerをひかれるいくつかの反応の連続したカスケードから成り立っており²²⁾、MAKがMφの他の分化ステップに影響を及ぼしている可能性も考えられるので、今後、さらなる詳細な検討が必要である。

次に、細胞性免疫機能の指標の一つとして、Con A に対する脾細胞の増殖反応性について検討した。その結果、対照群と比較してMAK-4投与群およびMAK-5投与群で約1.2倍～1.5倍の上昇を示し、有意差が認められた。Dileepanら¹⁰⁾は、ラットを用いてMAK-5の50mg/kgを20日間経口投与した結果、PHAに対する脾細胞の増殖反応性が亢進したと報告している。また、著者ら⁹⁾は、マウスにMAK-4とMAK-5の50mg/kgおよび100mg/kgをそれぞれ10日間、連日経口投与を行った場合、Con A に対する脾細胞の増殖反応が増大したとし、本研究と同様な結果を示している。本実験で用いたマイトジェンはT細胞マイ

トジェンであり、したがって、MAK-4 および MAK-5 投与によりT細胞の機能が亢進することを示唆している。

以上のように、MAK-4 およびMAK-5 はマウス腹腔Mφの酵素活性の亢進によるMφの活性化作用を有し、また、Con A 刺激により脾細胞の増殖反応性の増強もみられることから、MAK-4 およびMAK-5 は非特異的免疫機能を増強することが示唆された。

ま と め

MAK-4 およびMAK-5 のマウス非特異的免疫機能に及ぼす影響について検討した。

実験動物には生後4週齢のICR系、雄性マウスを用いた。MAK-4 投与群、MAK-5 投与群および非処置群(対照群)の3群に区分し、MAK-4 およびMAK-5 は精製水に懸濁し、1日1回、50mg/kgを週5日、8週間にわたって経口投与した。

結果は、次のようであった。

- 1) 実験終了時のマウスの体重および食餌摂取量については、3群間で差異はみられなかった。
- 2) 腹腔MφのAPH活性およびLDH活性については、対照群と比較して、MAK-4 投与群およびMAK-5 投与群でそれぞれ高値を示し、有意差が認められた。
- 3) Con A に対する脾細胞の増殖反応性については、対照群と比較して、MAK-4 投与群およびMAK-5 投与群でそれぞれ有意に高い値を示した。

以上の結果から、MAK-4およびMAK-5の投与はマウスの非特異的免疫機能を増強し、生体防御機能の促進に有用であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、実験にご協力頂いた、岐阜薬科大学教養演習（平成4年度）保健体育学コースの受講学生、植田嘉文氏、志賀正綱氏、中村伸昭氏、

吉村公男氏に深謝致します。

文 献

- 1) シャルマ, H. M. (日本マハリシ・アーユルヴェーダ医学協会訳): 心理, 生理を統合する自然医学の最新の研究, マハリシ・アーユルヴェーダ研究, **3**, 1-11(1993).
- 2) Sharma, H. M., Triguna, B. D. and Chopra, D.: Maharishi ayur-veda: Modern insights into ancient medicine, *JAMA*, **265**, 2633-2637 (1991).
- 3) アタバーレ, V. B.(稲村晃江訳): アーユルヴェーダ, pp. 1-38, 平河出版, 東京(1987).
- 4) Sharma, H. M., Dwivedi, C., Satter, B. C., Gudehithlu, K. P., Abou-Issa, H., Malarkey, W. and Tejwani, G. A.: Antineoplastic properties of Maharishi-4 against DMBA-induced mammary tumors in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **35**, 767-773 (1989).
- 5) Sharma, H. M., Dwivedi, C., Satter, B. C. and Abou-Issa, H.: Antineoplastic properties of Maharishi Amrit Kalash, an Ayurvedic food supplement, against, 7, 12-dimethylbenz (A) anthracene-induced mammary tumors in rats, *J. Res. Ed. Ind. Med.*, **3**, 1-8 (1991).
- 6) Sharma, H. M., Feng, Y. and Panganamala, R. V.: Maharishi Amrit Kalash (MAK) prevents human platelet aggregation, *Clin. Ter. Cardiovasc.*, **8**, 227-230 (1989).
- 7) Dwivedi, C., Sharma, H. M., Dobrowski, S. and Engineer, F. N.: Inhibitory effects of Maharishi 4 and Maharishi 5 on microsomal lipid peroxidation, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **39**, 649-652 (1991).
- 8) 杉浦春雄, 西田弘之, 井奈波良一, 前野浩子, 岩田弘敏: Maharihi Amrit Kakash 4およびMaharihi Amrit Kalash 5のマウス貪食能に及ぼす影響, 岐阜薬科大学教養科紀要, **5**, 43-53 (1993).
- 9) Inaba, R., Sugiura, H. and Iwata, H.: Immunomodulatory effects of Maharishi Amrit Kalash 4 and 5 in mice, *Jpn. J. Hyg.* (印刷中)
- 10) Dileepan, K. N., Patel, V., Sharma, H. M. and Stechschulte, D. J.: Priming of splenic lymphocytes after ingestion of an ayurvedic herbal food supplement: Evidence for an immunomodulatory effect, *Biochemi. Arch.*, **6**, 267-274 (1990).
- 11) 日本生化学会編: 新生化学実験講座12, 分子免疫学 I, 免疫細胞サイトカイン, pp. 49-50, 東京化学同人, 東京 (1989).
- 12) Barbara, B. M. and Stanley, M. S. (今井勝行, 川口進, 原田孝之共訳): 細胞免

疫実験操作法, pp. 15-16, 理工学社, 東京 (1982).

- 13) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 14) Niwa, Y.: Effect of Maharishi 4 and Maharishi 5 on inflammatory mediators -with special reference to their free radical scavenging effect, *Indian J. Clin. Practice*, **1**, 23-27 (1991).
- 15) Patel, V. K., Wang, J., Shen, R. N., Sharma, H. M. and Brahmī, Z.: Reduction of metastases of lewis lung carcinoma by an ayurvedic food supplement in mice, *Nutrition Res.*, **12**, 51-61 (1992).
- 16) Prasad, K. N., Edwards-P. J., Kentroti, S., Brodie, C. and Vernadakis, A.: Ayurvedic (science of life) agents induce differentiation in murine neuroblastoma cells in culture, *Neuropharmacol.*, **31**, 599-607 (1992).
- 17) Ryan, J. L., Glode, L. M. and Rosenstreich, D. L.: Lack of responsiveness of C3H/HeJ macrophages to lipopolysaccharide: The cellular basis of LPS-stimulated metabolism, *J. Immunol.*, **122**, 932-935 (1979).
- 18) Pantalone, R. and Page, R. C.: Enzyme production and secretion by lymphokine-activated macrophages, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **21**, 343-357 (1979).
- 19) 中野昌康: マクロファージが産生する活性物質, *日本臨床*, **47**, 526-533 (1989).
- 20) 徳永徹: マクロファージ, pp.66-67, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1991).
- 21) 村松繁, 井戸基治, 宇野賀津子, 稲葉カヨ, 清水敏: マクロファージの抗腫瘍性と個体発生, *医学のあゆみ*, **126**, 52-54 (1983).
- 22) 日本細菌学会教育委員会編: マクロファージの機能と機能測定法, pp.41-43, 菜根出版, 東京 (1985).