

Maharishi Amrit Kalash 4 および Maharishi Amrit Kalash 5 の Maus 貪食能に及ぼす影響

杉浦春雄^{*}，西田弘之^{*}，井奈波良一^{**}，前野浩子^{**}，岩田弘敏^{**}

緒言

疾病に対する抵抗性を増進し、健康な生活を維持するための方策を検討することは、高齢化が急速に進行しているわが国において重要な課題である。今日、健康な生活を維持するために、西洋医学に加えて伝統医学の幅広い活用の呼びかけをしている¹⁾。こうした中で、古代インドを源とする伝統医学のひとつにアーユルヴェーダがあり、この医学では、健康長寿を目的に日々の適度な運動とともに種々の植物を混合して作られた機能性食品「ラサヤナ」の使用を勧めている。「マハリシ・アムリット・カラシ」もそのひとつであり、独得の診断基準に基づき処方され古くから幅広く治療に用いられている。しかし、その有効性については長い歴史による経験的な知識に依存している部分が多く、薬理的に作用機序が明らかにされているものは少ないのが現状である²⁻⁵⁾。

そこで、本研究では、異物侵入に対するマハリシ・アムリット・カラシ4 (M-4) およびマハリシ・アムリット・カラシ5 (M-5) の生体防御作用を検討した。生体防御作用の中でも特に初期免疫の中の異物貪食に対するM-4 およびM-5 の作用を検討した。生体防御機能ならびに免疫機能の指標としてはまず、生体に侵入した異物の貪食排除機能を評価するために、*in vivo* でマウスのカ

* 岐阜薬科大学保健体育学教室

** Department of Health and Physical Education, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502, Japan

** 岐阜大学医学部衛生学教室

** Department of Hygiene, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

ーボンクリアランス能を測定した。さらに、単離マクロファージ(M ϕ)を用いて、その機能を評価した。すなわち、侵入した異物としての病原微生物などを障害すると考えられるスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)の産生能ならびに貪食した異物の分解能力の指標として lysosome 酵素を測定し、M-4 およびM-5 がマウス貪食能にどのように影響を及ぼすのか検討した。

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

インド産のハーバル・プリザーブ・アムリット(Maharishi Amrit Kalash 4 : M-4)およびハーバル・パウダー・アムリット(Maharishi Amrit Kalash 5 : M-5)を用いた^{5,6)}。M-4 およびM-5 はそれぞれ精製水を用いて懸濁し、経口投与した。

3. M-4 およびM-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M-4投与群(M-4群: N=20)、M-5投与群(M-5群: N=20)および非処置群(対照群: N=20)の3群に区分した。M-4 およびM-5 の投与は、それぞれ50mg/kgを1日1回、週5日、7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7週間の投与ののち、最終投与から48時間後に剖検し種々の検討を行った。

4. 測定項目

〈実験1〉

マウス網内系の貪食機能に及ぼす影響

1群10匹のマウスを用いて、7週間のM-4 およびM-5 投与終了後、体重を

測定し、ついでカーボンクリアランスによる網内系貪食能を測定した。測定終了後、マウスをエーテル麻酔下で断頭致死させ、肝臓重量および脾臓重量を測定した。

〈実験2〉

マウス腹腔Mφの免疫学的機能に及ぼす影響

1群10匹のマウスを用いて、7週間のM-4およびM-5投与終了後、マウスをエーテル麻酔下で断頭致死させ、腹腔浸出細胞液(PECs)を採取し、腹腔Mφの O_2^- 産生能、acid phosphatase (APH) 活性、 β -glucuronidase (GLU) 活性および lactate dehydrogenase (LDH) 活性を測定した。

5. 測定方法

(1)マウスのカーボンクリアランス能ならびに肝臓および脾臓に取り込まれたカーボン量の測定

Biozziらの⁷⁾方法に準じてカーボンクリアランス能を測定し、マウスの網内系の貪食能の指標とした。すなわち、エーテル麻酔下でマウス尾静脈内にカーボン浮遊液(Perikan Drawing ink 17 Black 3 ml、生理的食塩水 4 ml、3%gelatin 4 mlの混合液)を体重10g当り0.1ml宛注射し、5および10分後に眼窩静脈叢からヘパリン処理のヘマトクリット毛細管を用いて25 μ lの血液を採血した。ただちに2 mlの0.1% Na_2CO_3 溶液に希釈溶血させ、分光光度計(日立100-10型)により、波長675nmで吸光度を測定した。カーボンクリアランス値は次式から血中カーボン半減期($t_{1/2}$, min)、貪食指数(K)および補正貪食指数(α)を求め、カーボン貪食能の指標とした。

$$t_{1/2}, \text{ min} = (t_{10} - t_5) \cdot OD_{t_5} / 2 / (OD_{t_5} - OD_{t_{10}})$$

$$K = (\log OD_{t_5} - \log OD_{t_{10}}) / (t_{10} - t_5)$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \cdot Pc / Po$$

ただし、 t_5 : 5分, t_{10} : 10分, OD_{t_5} : 5分後の吸光度, $OD_{t_{10}}$: 10分後の吸光度, Pc : 体重, Po : 肝臓と脾臓の湿重量の和である。

カーボン浮遊液静注の60分後にエーテル麻酔下でマウスを断頭致死させ、肝臓と脾臓を摘出し、両臓器のカーボン量を Fisher らの方法⁸⁾で測定した。すなわち、摘出した肝臓と脾臓の湿重量を測定した後、10% KOH含有70% EtOH 1 mlと2%アラビアゴム 2 mlの混合液で、37°C12時間溶解後、蒸留水で10mlに希釈した。この溶解液を分光光度計により、800nmで吸光度を測定し、肝臓および脾臓のそれぞれ100mg当りのOD値を算出し、この値を肝臓および脾臓に取り込まれたカーボン量とした。

(2) 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させ、十分に脱血した後、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。細胞数は、Türk氏液(Nacalai Tesque)を用いて測定した⁹⁾。このPECs浮遊液中の腹腔Mφを付着法¹⁰⁾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、その沈査を10%牛胎児血清(FCS: Bioproducts)含有RPMI1640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。

(3) O₂⁻産生の測定

ニトロブルーテトラゾリウム(NBT: Nacalai Tesque)還元法¹⁰⁾により腹腔MφのO₂⁻産生能を測定した。すなわち、RPMI 1640培養液を用いて腹腔Mφを2.7 × 10⁶ cells/mlに調製し、その0.1mlを培養用96穴平底マイクロプレート(Corning)に加え、37°Cで120分間、5%CO₂インキュベーター中に静置した。非付着細胞をRPMI 1640培養液で洗浄除去し、4 mg/mlのNBT溶液0.1mlを加えた。ついで、RPMI 1640培養液で0.3 μg/mlに調整したPhorbol 12-Myristat 13-Acetate (PMA: Sigma Chemical)の0.1mlを添加した後、37°C、5%CO₂インキュベーター中で30分間培養した。培養液を除去し、70%EtOHで固定洗浄の後、2N KOH および dimethyl sulfoxide (DMSO)のそれぞれ0.1mlを加えて細胞を溶解し、マイクロプレートリーダー(Corona Electric: MTP-120)により630nmに

おける吸光度を測定した。この吸光度値をもって産生 O_2^- 量とした。

(4) 腹腔M ϕ のAPH活性、GLU活性およびLDH活性の測定

腹腔M ϕ をRPMI 1640培養液を用いて 2.5×10^6 cells/mlに調製し、その3.0mlを1,000rpmで5分間遠心し、沈渣に0.1% triton X-100 (Nacalai Tesque)の3.0mlを加えてM ϕ を溶解した。この溶解液をAPH活性、GLU活性およびLDH活性の試料液とした。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)により測定した。GLU活性は β -glucuronidase測定キット(Sigma Chemical)、また、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M ϕ 2.5×10^5 cellsあたりの国際単位(IU)で、GLU活性は腹腔M ϕ 5.0×10^5 cellsあたりのIUで、また、LDH活性は腹腔M ϕ 1.2×10^5 cellsあたりのIUでそれぞれ示した。

6. 統計学的処理

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

結 果

〈実験1〉

M-4 およびM-5のマウス網内系貪食能に及ぼす影響

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匹の1週間当りの食餌摂取量を示す。体重は3群間ともに同様な値を示し有意差は認められなかった。また、食餌摂取量も3群間に差異は認められなかった。

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

Group	Body weight (g)		Food consumed (g/week/mouse)
	4 weeks	Age 11 weeks	
Control	18.1 \pm 0.2	41.2 \pm 0.8	38.8 \pm 0.4
M-4	18.2 \pm 0.2	41.8 \pm 0.6	37.6 \pm 0.5
M-5	18.2 \pm 0.2	40.9 \pm 0.5	37.4 \pm 0.4

Each value represents the mean \pm SE of 20 mice.

M-4: Maharishi Amrit Kalash 4, M-5: Maharishi Amrit Kalash 5.

Table 2 Effects of M-4 and M-5 on the phagocytic index of the reticulo-endothelial system in mice.

Group	Liver weight (mg/g body weight)	Spleen weight	Clearance-rate of carbon (t 1/2, min)	Phagocytic index (k)	Corrected phagocytic index (α)
Control	53.16 ±1.00	3.44 ±0.15	10.15 ±0.90	0.025 ±0.003	8.19 ±0.59
M-4	53.33 ±0.95	4.41* ±0.37	7.21** ±0.43	0.039** ±0.003	10.16* ±0.47
M-5	51.14 ±0.65	3.70 ±0.31	7.92* ±0.47	0.034** ±0.002	10.00* ±0.41

Each value represents the mean ± SE of 10 mice.

M-4: Maharishi Amrit Kalash 4, M-5: Maharishi Amrit Kalash 5.

Statistical significance from the control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively.

2. 網内系の貪食能について

Table 2 にカーボンクリアランス能の成績を示す。

カーボンクリアランス能の血中カーボン半減時間 $t_{1/2}$ は対照群が約10分であったのに比し、M-4とM-5の両群は約7分であり、有意なカーボンクリアランスの亢進がみられた。貪食指数 k 値および補正貪食指数 α 値は、対照群に比して、M-4群、M-5群ともに有意に高値を示した。M-4とM-5の臓器重量に及ぼす影響をみると、M-4のみに相対脾臓重量を有意に増加させた。一方、相対肝臓重量は3群ともに同様な値を示し、有意差は認められなかった。

この場合の肝臓および脾臓に取り込まれたカーボン量をTable 3に示す。肝臓のカーボン取り込み量は、対照群に比しM-4群およびM-5群ともに有意に高値を示した。一方、脾臓のカーボン取り込み量は、各群間で、ほとんど差異は認められなかった。

Table 3 Effects of M-4 and M-5 on hepatic and splenic uptake of carbon in mice given an injection of carbon

Group	Content of carbon (O.D. $\times 10^3$ /100 mg tissue)	
	Liver	Spleen
Control	580.7 ± 10.8	836.7 ± 50.5
M-4	870.6 ± 31.6***	799.6 ± 56.5
M-5	1003.5 ± 71.4***	759.9 ± 71.9

Each value represents the mean ± SE of 10 mice.

M-4: Maharishi Amrit Kalash 4, M-5: Maharishi Amrit Kalash 5.

Statistical significance from the control at *** $p < 0.001$.

〈実験2〉

M-4 およびM-5 の腹腔Mφの免疫学的機能に及ぼす影響

1. 腹腔MφのO₂⁻産生能について

Fig. 1 に腹腔MφのO₂⁻産生能についての成績を示す。対照群に比しM-5群は有意に高値を示したが、M-4群は対照群に比し、有意差は認められなかった。

2. 腹腔MφのAPH活性、GLU活性およびLDH活性について

Table 4 に腹腔MφのAPH活性、GLU活性およびLDH活性の成績を示す。APH活性は対照群に比し、M-4群が有意に高値を示したが、M-5群は対照群と同様な値を示し有意差は認められなかった。また、GLU活性とLDH活性は対照群に比し、M-4群およびM-5群ともに有意に高値を示した。

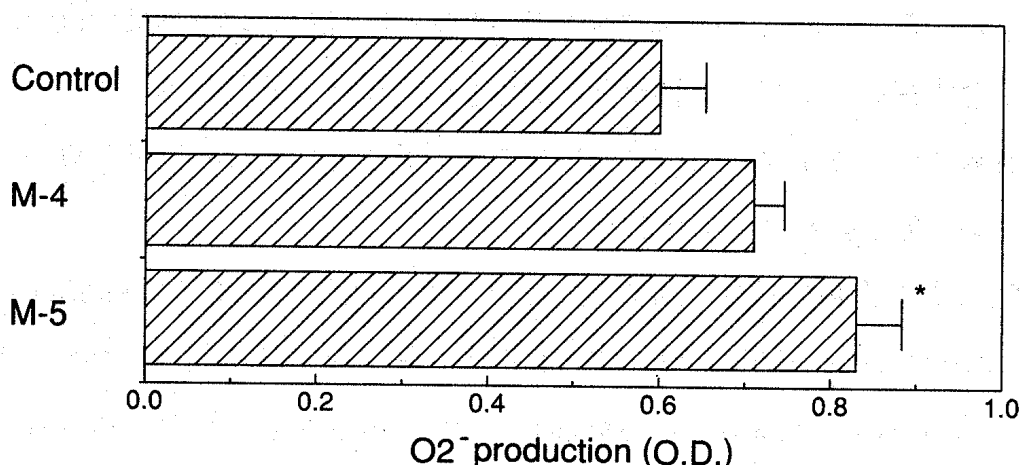


Fig. 1 Effects of M-4 and M-5 on superoxide anion (O₂⁻) production of peritoneal macrophages in mice.

Each column and horizontal bar represents the mean ± SE of 10 mice.

M-4 : Maharishi Amrit Kalash 4, M-5 : Maharishi Amrit Kalash 5.

Statistical significance from the control at *p<0.05.

Table 4 Effects of M-4 and M-5 on acid phosphatase (APH), β-glucuronidase (GLU) and lactate dehydrogenase (LDH) activities of peritoneal macrophages in mice.

Group	APH/2.5×10 ⁵ cells (×10 ⁻⁴ IU)	GLU/5.0×10 ⁵ cells (×10 ⁻¹ IU)	LDH/1.2×10 ⁵ cells (×10 ⁻⁴ IU)
Control	5.7 ± 0.3	2.5 ± 0.1	76.7 ± 1.2
M-4	6.7 ± 0.1*	3.4 ± 0.1***	103.1 ± 2.8***
M-5	5.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1***	102.6 ± 1.6***

Each value represents the mean ± SE of 10 mice.

M-4 : Maharishi Amrit Kalash 4, M-5 : Maharishi Amrit Kalash 5.

Statistical significance from the control at *p<0.05 and ***p<0.001, respectively.

考 察

機能性食品であるM-4およびM-5の生体への影響について薬理的に検討されているものは少ない²⁻⁵⁾。これまでにDwivediら⁴⁾はM-4およびM-5が *in vitro*でラット肝ミクロゾーム画分の過酸化作用を抑制することを、また、免疫機能に及ぼす影響については、M-5がPHAに対するマウス脾細胞の増殖反応を増強することを報告している²⁾。しかし、M-4およびM-5の貪食能など非特異的免疫機能に及ぼす影響について詳細に検討されたものはみあたらない。そこで、本研究ではM-4およびM-5のマウス貪食能に及ぼす影響について検討した。

実験終了時の3群間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。このことは本実験で用いたM-4とM-5の投与量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。

本研究では、まずM-4およびM-5の網内系機能に及ぼす影響をカーボニックリアランス能を指標として検討を行った。

網内系での異物の貪食・排除は、主として貪食細胞である肝kupffer cell (M ϕ)、単球および組織球などによる¹²⁾ものとされ、血中に注入されたカーボン粒子は、網内系の主要臓器である肝臓で約90%、脾臓で約10%取り込まれ、これら臓器におけるカーボン粒子の取り込みは主に固定型M ϕ によるものである⁷⁾ことが明らかにされている。カーボニックリアランスの $t_{1/2}$ はM-4およびM-5のそれぞれの投与群で有意な短縮が認められた。この結果は、M-4およびM-5にはM ϕ 機能の活性化作用があることを示唆している。そこで、M-4およびM-5投与によるカーボニックリアランスを亢進させる作用が個々のM ϕ の貪食能を亢進させた結果によるものなのか、あるいはM ϕ の数を増加させたことによるものなのかを明らかにする目的で、カーボニックリアランス値の評価をk値および α 値にて検討した。その結果、M-4およびM-5はk値および α 値の両値とも有意に増加させた。すなわち、M-4およびM-5は固定型のM ϕ を直接活性化し、その結果 $t_{1/2}$ を短縮したものと考えられる。また、この時のM-4およびM-5群の肝臓におけるカーボン粒子の取り込み量は、対照群より有意に

高値を示したが、脾臓への取り込みは、3群間に差異は認められなかった。これらのことからM-4およびM-5は、肝臓における固定型Mφを賦活し、その結果としてカーボクリアランスを促進するものと思われる。

細菌リポ多糖(LPS)などのMφ活性化物質は *in vitro*でMφを刺激し、Lysosome酵素や細胞質酵素の活性^{13,14)}を増強することによって生化学的にMφを活性化する。その結果としてMφの貪食能^{15,16)}や生理活性物質の分泌能^{17,18)}などの活性が増強するといわれている。そこで、Mφの活性化の指標としてM-4およびM-5の腹腔MφのO₂⁻産生能、Lysosome酵素のAPH活性、GLU活性および細胞質酵素の一つであるLDH活性に及ぼす影響を検討した。その結果、M-4群のO₂⁻産生能は対照群に比し、亢進傾向を示した。また、M-5群のO₂⁻産生能は有意な亢進が認められた。さらに、Lysosome酵素のAPH活性、GLU活性および細胞質酵素のLDH活性をみると、対照群に比し、M-5群のAPH活性を除いてこれらの酵素活性すべてに有意な亢進がみられた。これらの結果からM-4およびM-5のMφの代謝活性に及ぼす作用機構を考察すると、M-4およびM-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、その結果、遊離型Mφの機能を亢進すると思われる。

以上の結果から、M-4およびM-5はマウス腹腔Mφの異物処理機能を高めることから、感染等に対する抵抗性が亢進する可能性が考えられる。また、マウス腹腔MφのO₂⁻産生能の向上やLysosome酵素活性の亢進によるMφの活性化作用を有することが示唆された。

まとめ

M-4およびM-5のマウス貪食能に及ぼす影響を検討した。

実験動物は生後4週齢のICR系雄マウスを用い、M-4投与群(M-4群)、M-5投与群(M-5群)および非処置群(対照群)の3群に区分した。M-4およびM-5は精製水に懸濁し、1日1回、50mg/kgを週5日、7週間にわたって経口投与した。

その結果、次のようであった。

- 1) 実験終了時のマウスの体重は3群間に差異は認められなかった。食餌摂取量も体重と同様、3群間に差異は認められなかった。
- 2) カーボンのクリアランスにおける血中カーボン半減期($t_{1/2}$)、貪食指数(k)および補正貪食指数(α)はそれぞれ対照群に比して、M-4群およびM-5群が有意な高値を示し、カーボンのクリアランス能の亢進が認められた。この場合の肝臓に取り込まれたカーボン量は、M-4群およびM-5群ともに対照群に比し、有意に高値を示した。
- 3) 腹腔M ϕ の O_2^- 産生能は対照群に比し、M-4群は高値傾向を示した。一方、M-5群は有意に高い値を示した。
- 4) 腹腔M ϕ のAPH活性は対照群に比し、M-4群のみに有意に高値を示した。GLU活性およびLDH活性は対照群に比し、M-4群およびM-5群ともに有意に高い値を示した。

以上の結果から、M-4およびM-5はマウス網内系の貪食機能を高め、M ϕ の O_2^- 産生能の向上やLysosome酵素活性の亢進によるM ϕ の活性化作用を有することが示唆された。

文献

- 1) Zaman, H. : The South-East Asia region. In : Bannerman RH, ed., Traditional Med., Geneva, Switzerland : World Health Organization, 231-239 (1974).
- 2) Dileen. 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, Biochem. Arch., 6, 267-274 (1990).
- 3) Niwa, Y. : Effect of Maharishi 4 and Maharishi 5 on inflammatory mediators—with special reference to their free radical scavenging effect, Indian J. Clin. Prac., 1, 23-27 (1991).
- 4) 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).
- 5) Sharma, H. M., Dwivedi, C., Statter, B. C., Gudehithlu, K. P., Abou-Issa, H., Malarkey, W. and Tejawani, G. A. : Antineoplastic properties of Maharishi - 4 against DMBA-induced mammary tumors, in rats, Pharmacol. Biochem. Behav., 35, 767-773 (1989).

- 6) Sharma, H. M., Dwivedi, C., Statter, 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).
- 7) Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B. N. : Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system II, *Br. J. Exp. Pathol.*, 34, 441 - 457 (1953).
- 8) Fisher, S., Wendy, B. R. and Shorey, C. D. : Studies on the mechanism of increased splenic particle uptake in mice after the injection of some finely divided agents, *J. Path. Bact.*, 96, 463-471 (1968).
- 9) 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, p. 13-14, 理工学社, 東京 (1982).
- 10) 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, p. 49-50, 東京化学同人, 東京 (1989).
- 11) Miyagawa, N., Okamoto, Y. and Nakano, H. : Effect of C-reactive peritoneal macrophages, *Microbiol. Immunol.*, 32, 721-731 (1988).
- 12) 栗屋和彦 : 網内系とマクロファージ, 系統発生からみた網内系, *医学のあゆみ*, 111, 107-113 (1979).
- 13) Pantalone, R., Page, R. C. : Enzyme production and secretion by lymphokine-activated macrophages, *J. Reticuloendothel. Soc.*, 21, 343-357 (1979).
- 14) 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, *J. Immunol.*, 122, 932-935 (1979).
- 15) 中野昌康 : マクロファージの産生する活性物質, *日本臨床*, 47, 526-533 (1989).
- 16) 徳永徹 : マクロファージ, p. 66-67, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1991).
- 17) 松村繁, 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).
- 18) 中野昌康 : 食細胞とリンパ球の免疫への関わり, *Medicina*, 29, 1964-1971 (1992).