マウス発育期の運動および 黄耆(*Astragalus membranaceus*)の免疫機能に及ぼす影響

杉 浦 春 雄*¹, 西 田 弘 之*², 井奈波 良 一*¹,
岩 田 弘 敏*¹

*¹岐阜大学医学部衛生学教室, *²岐阜薬科大学保健体育学教室

Effects of Exercise in the Growing Stage in Mice and of *Astragalus membranaceus* on Immune Functions

Haruo Sugiura*¹, Hiroyuki Nishida*², Ryoichi Inaba*¹
and Hirotoshi Iwata*¹

*¹ Department of Hygiene, Gifu University School of Medicine, Gifu

*² Department of Health and Physical Education, Gifu Pharmaceutical University, Gifu

A study was carried out to examine the effects of forced running exercise in the growing stage in male ICR mice and of *Astragalus membranaceus* (As) on their immune functions. The mice were divided at 4 weeks of age into 4 groups. The first group of mice received forced running exercise (E-group), the second group was given As (As-group), the third group received the forced running exercise and was given As (E+As-group) and the fourth group was a control receiving no treatment. The exercise received was forced running at 15 m/min on a flat floor without any slope for 60min a day. The mice of groups E and E+As were exercised 5 times a week for 12 weeks. The mice of groups As and E+As were given As p. o. at 200 mg/kg per day (5 days/week) for 12 weeks.

The results obtained were as follows:

1. After 12 weeks of forced running exercise, the weight of the anterior tibialis muscle and succinate dehydrogenase activity in the anterior tibialis muscle increased significantly in groups E and E+As compared with the control group. Thymus weight showed a tendency to increase in groups E and E+As as compared with the control group.
2. The potentiation of the phagocytic function of the reticuloendothelial system examined by the carbon clearance method was seen in groups E, As and E+As.
3. Superoxide anion production of peritoneal macrophages significantly increased in groups As and E+As, but not in group E.
4. The acid phosphatase activity of peritoneal macrophages in groups E, As and E+As significantly increased compared with the control group.
5. Interleukin 1 production by macrophages remained in all groups.
6. The proliferation of splenocytes induced by Con A in groups E, As and E+As significantly increased compared with the control group.

These results suggested that forced running exercise in the growing stage in mice and the administration of As enhanced immune functions and that they might also intensify the functioning of the host defense system.

Key words : Forced running exercise, *Astragalus membranaceus*, Phagocytosis,
Macrophage, Interleukin-1, Splenocyte proliferation
強制走運動, 黄耆, 食作用, マクロファージ, インターロイキン-1,
脾細胞増殖

緒 言

積極的に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手段を検討することは、高齢化の進む日本社会において非常に重要な課題である。その1つとして身体運動推進の必要性が指摘されている。

適度な運動は体力を高め、健康の保持増進に寄与する事はよく知られており、呼吸循環器系機能や内分泌代謝系機能向上などの運動の効果については種々の報告^{1~4)}がある。最近では防御機能、すなわち疾病予防に重要な働きを示す免疫機能への身体運動の影響も注目されるようになってきた^{5, 6)}。

免疫機能に及ぼす運動の影響は、細胞性免疫^{5, 7)}および液性免疫^{8, 9)}の両面から検討されてきているが、その影響については必ずしも一定した成績は得られていない。また、その作用機序に関しても、不明な点が多い。

一方、健康維持および生体防御機能の向上を期待して、種々の和漢薬が用いられている^{10, 11)}。また、動物実験においても基礎代謝機能や生体防御機能を促進する和漢薬についての検討が行なわれている^{12, 13)}。

黄耆(*Astragalus membranaceus* Bunge)はマメ科、オウギ属に分類され、古くから止汗、利尿、血圧低下および強壮剤として虚弱体質、栄養不良の改善を目的に用いられてきた¹⁴⁾。黄耆の薬理作用の1つに血圧低下作用があることから、黄耆の循環器系に対する影響が検討^{15, 16)}されているが、免疫機能に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。

そこで、本研究では、マウス発育期の運動、黄耆およびこの両者の併用の免疫機能に及ぼす影響を検討した。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、*in vivo*でマウスのカ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(O_2^-)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酵素のacid phosphatase活性を測定した。さらに、侵入異物に対する免疫成立の過程でT細胞の活性化に重要な役割を演じるマクロファージのインターロイキン1 (IL-1)の産生能を測定した。ついで、マクロファージからの抗原情報およびIL-1によって活性化されるT細胞の機能の指標の1つとしてConcanavalin A (Con A)に対する脾細胞の反応性を測定した。

実験材料および方法

1. 実験動物

ICR系雄性3週齢マウス(10~12g)を日本SLCから購入した。動物は、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度60%、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、1週間の予備飼育の後、実験に供した。

2. 薬物

中国産の黄耆(*Astragalus membranaceus* Bunge)を70%メタノールを用いて抽出し、蒸発乾固したものをメタノールエキス(As)とした。Asは精製水を用いて懸濁し、経口投与に用いた。

3. マウスの運動負荷および黄耆の投与

マウス(4週齢)は、いずれの実験においても体重がほぼ均等になるよう次の4群に区分した。

すなわち、強制走運動群(E群)、非強制走運動+黄耆投与群(As群)、強制走運動+黄耆投与群(E+As群)および非処置群(対照群)である。強制走運動はマウス用トレッドミル(竹井機器製作所・針山改良型)を用いて、毎分15mの速度で1日1時間(午後6時~7時)とし、週5日、12週間行った。黄耆の投与は、Asの200 mg/kgを1日1回、週5日、実験期間を通じ、強制走運動を負荷した場合は負荷終了1時間以内に、また、負荷しない場合は負荷の場合とはほぼ同時刻に経口投与した。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。これらの12週間の処置ののち、最終処置から48時間後に種々の検討に供した。

4. 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¹⁷⁾の方法に準じてカーボンクリアランス能を測定し、マウス網内系の貪食能の指標とした。すなわち、エーテル麻酔下にマウス尾静脈内にカーボン浮遊液(Perikan Drawing INK 17 Black 3ml, 生理的食塩水4ml, 3% gelatin 4mlの混合液)を体重10g当り0.1mlを注射し、5および10分後に眼窩静脈叢からヘパリン処理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2ml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($t_{1/2}$, 分)、貪食指数(K)および補正貪食指数(α)を求め、 $t_{1/2}$ および α 値をカーボン貪食能の指標とした。

$$t_{1/2} = (t_2 - t_1) / (1/2) \text{OD}t_1 / (\text{OD}t_1 - \text{OD}t_2)$$

$$K = (\log \text{OD}t_1 - \log \text{OD}t_2) / (t_2 - t_1)$$

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

ただし, t_1 , 5分, t_2 , 10分, $\text{OD}t_1$, 5分後の吸光度, $\text{OD}t_2$, 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15分後にエーテル麻酔下にマウスを断頭致死し, 肝臓と脾臓を摘出し, 両臓器のカーボン量をFisherら¹⁸⁾の方法で測定した。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 1mlと2%アラビアゴム2mlの混合液で, 37℃, 12時間溶解後, 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) 前脛骨筋のコハク酸脱水素酵素(SDH)活性の測定

右下肢の前脛骨筋全体をマウスの致死後可及的早急に摘出して, 脂肪および結合組織を除去し, 直ちにアセトン・ドライアイスにより凍結し, 測定まで-80℃で保存した。筋試料は, 氷冷した0.03M phosphate buffer (pH 7.4)でホモジナイズし, 2,000rpmで10分間遠心し, 上清を酵素活性測定に用いた。本酵素活性の測定は, Coopersteinら¹⁹⁾の方法に従って行った。すなわち, 25℃に保温した分光光度計のセルに筋ホモジネート液40μlと0.5Mのコハク酸ナトリウム溶液0.1mlを加えよく混和した。2分後に0.03Mのシアン化ナトリウム溶液の0.1mlと0.1mMチトクロームC溶液の2.8mlを加え素早く攪拌し, これをO-timeとして550nmの吸光度の減少を3分間記録した。また, 測定試料中のタンパク質の定量は, 牛血清アルブミンを標準物質として, Lowryら²⁰⁾の方法により行った。SDH活性値は次式より求め, 成績はタンパク質(mg)あたりの比活性とした。

$$\text{SDH activity} = (\Delta A) / 1.96 \times 10^4 \text{ (mole/min)}$$

ただし, ΔA , 1分間あたりの吸光度の減少率である。

(3) 腹腔浸出細胞液(PECs)の採取および腹腔マクロファージ(Mφ)の単離

マウスをエーテル麻酔下に断頭致死して十分に脱血した後, 腹腔内にリン酸緩衝生理的食塩水(phosphate-buffered saline, PBS(-))の5mlを注射した。5分間, 腹部をマッサージ後, PECs浮遊液を採取した。細胞数は, Türk氏液(Nacalai Tesque, Inc.)を用いて測定した²¹⁾。このPECs浮遊液中の腹腔Mφを付着法²²⁾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, Inc.)

含有RPMI1640培養液(日水製薬株式会社)2mlに浮遊させ, プラスチックシャーレに分注し, 37℃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37℃のPBS(-)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。

(4) スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)産生の測定

ニトロブルーテトラゾリウム(NBT, Nacalai Tesque, Inc.)還元法²³⁾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 8.2×10^5 cells/mlに調整し, その0.2mlを培養用96穴平底マイクロプレート(Corning)に加え, さらに4 mg/mlのNBT溶液0.1mlを加えた。ついで, RPMI1640培養液で0.3μg/mlに調整したPhorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma Chemical Company)の15μlを添加した後, 37℃, 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%エタノールで固定洗浄の後, 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O₂⁻量とした。

(5) 腹腔Mφのacid phosphatase活性の測定

腹腔MφをRPMI 1640培養液を用いて 8.2×10^5 cells/mlに調整し, その0.8mlを1,000rpmで5分間遠心し, 沈渣に0.1% triton X-100 (Nacalai Tesque, Inc.)の1.0mlを加えてMφを溶解した。この溶解液をacid phosphatase活性測定の試料液とした。

acid phosphatase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, 成績は腹腔Mφ 6.5×10^4 cellsあたりのacid phosphatase活性をBessey-Lowry Unitで示した。

(6) マウス腹腔Mφのインターロイキン1(IL-1)産生能の測定

腹腔Mφを10μg/mlのLipopolysaccharide (LPS, Difco Laboratories, USA)を含むRPMI1640培養液で 1.2×10^6 cells/mlに調整した。この細胞浮遊液1mlを培養用24穴マイクロプレート(Corning)に分注し, 24時間培養した。培養終了後, 培養上清を回収し, 1,000rpmで5分間遠心して上清中のIL-1活性の測定まで-40℃にて保存した。IL-1活性の測定は, マウス胸腺細胞を用いたCo-stimulation アッセイ^{24, 25)}により行った。すなわち, 4週齢のC3H/HeJマウス(日本SLC)から摘出した胸腺を用い, 2%FCS含有イーグルMEM培養液(日水製薬株式会社)中で常法に従って細胞浮遊液を調整した。同培

養液で1,000rpm, 5分間の遠心洗浄を2回行った後, 胸腺細胞を10%FCS含有RPMI1640培養液で 2.1×10^7 cells/mlに調整した。その50 μ lを培養用96穴平底マイクロプレートに加え, 被検培養上清100 μ lを添加した。これにRPMI 1640培養液で12 μ g/mlに調製したConcanavalin A (Con A, Pharmacia Fine Chemicals)または培養液の50 μ lを添加し72時間培養した。細胞増殖の測定は, Mosmann²⁶⁾に従って, 3-(4,5-dimethylthiazol-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により630nmにおける吸光度を測定した。

実験はtriplicateにより行い, 刺激係数 (Stimulation Index, S.I.)を下式により算出した。

$$S.I. = \frac{\text{Con A刺激細胞の平均吸光度}}{\text{Con A非刺激細胞の平均吸光度}}$$

(7) 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, 脾臓を摘出した。ハンクス液(日水製薬株式会社)中ですりガラス付組織切片用スライドガラス2枚のすり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RPMI1640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に加えた。さらに, RPMI1640培養液で12 μ g/mlに調整したCon Aの25 μ lを添加した後, 37℃, 5%CO₂インキュベーター中で72時間培養した。前述のごとく, MTT法²⁶⁾により脾細胞増殖を測定した。Con A非添加に対する添加のS.I.を算出し, このS.I.値をもって脾細胞増殖能とした。実験はtriplicateで行った。

5. 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。有意差の検定は一元配置分散分析後, Scheffeの多重比較法を用いて行い, $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

実験A: マウス網内系食能および筋SDH活性に及ぼす強制走運動および黄耆の影響

1群12匹のマウスを用い, 12週間の強制走運動およびAsの投与終了後, 体重を測定し, ついでカーボンクリアランスにより網内系食能を測定した。測定終了後, マウスをエーテル麻酔下に断頭致死し, 前脛骨筋重量, 胸腺重量, 肝臓重量, 脾臓重量および前脛骨筋のSDH活性を測定した。

1. 体重, 前脛骨筋重量および胸腺重量について

Table 1に体重, 体重に対する相対前脛骨筋重量および相対胸腺重量を示す。体重は, 4群ともに同様な値を示し有意差は認められなかった。前脛骨筋重量はE群およびE+As群が, 対照群と比較して有意に高値を示し, またE群はAs群に対しても有意に高値を示した。胸腺重量は, 対照群と比較してE群およびE+As群は24~37%の増加を示したが, 有意差は認められなかった。また, E群とE+As群の胸腺重量はAs群に比して高い傾向を示した。対照群とAs群の胸腺重量にはほとんど差異は認められなかった。

2. 前脛骨筋のSDH活性について

Table 2に前脛骨筋のSDH活性値を示す。E群およびE+As群のSDH活性は対照群およびAs群に比し有意に高値を示した。対照群とAs群の間には, 差異は認められなかった。

Table 1 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on body, muscle and thymus weight in mice.

Group	Body weight (g)		Weight of the anterior tibialis muscle (mg/g body wt.)	Thymus weight (mg/g body wt.)
	Age			
	4 weeks	16 weeks		
Control	24.3±0.4	44.5±0.7	1.25±0.05	0.45±0.04
E	24.9±0.4	44.3±1.2	1.69±0.04 ^{a**} _c	0.56±0.05
As	24.6±0.5	43.9±0.6	1.47±0.04	0.44±0.07
E+As	24.9±0.4	44.4±1.5	1.52±0.03 ^{a**}	0.62±0.06

Each value represents the mean±SE of 12 mice.

a, Significant difference from Control. c, Significant difference from group As.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

3. 網内系食能について

Table 3 に体重に対する相対肝臓重量, 相対脾臓重量およびカーボンクリアランス能の成績を示す。肝臓重量は対照群と比較して E 群および As 群が有意に高い値を示した。また, E 群と As 群は E+As 群に対しても有意に高値を示した。脾臓重量は対照群および E+As 群に比し E 群は有意に高値を示し, As 群は高い傾向を示した。

カーボンクリアランス能の $t_{1/2}$ は, 対照群が約 13 分であったのに比し, E 群, As 群および E+As 群の各群は 8~10 分の範囲にあり, 有意なカーボンクリアランスの亢進がみられた。これらの 3 群間には有意差は認められなかった。補正食食指数 α 値は, E+As 群が対照群, E 群および As 群のいずれに対しても有意に高値を示した。

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 4 に示す。肝臓のカーボン取り込み量は, 対照群に比し E 群, As 群および E+As 群ではいずれも高い傾向を示した。脾臓のカーボンの取り込み量は, 各群間で, ほとんど差異は認められなかった。

Table 2 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on muscle succinate dehydrogenase activity in mice.

Group	SDH activity (μ mole/min/mg protein)
Control	1.31 $\pm$ 0.13
E	2.23 $\pm$ 0.09 ^{a*}
As	1.91 $\pm$ 0.13
E+As	2.55 $\pm$ 0.28 ^{a**}

Each value represents the mean $\pm$ SE of 12 mice.

a, Significant difference from Control.

c, Significant difference from group As.

* P<0.05, ** P<0.01

E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

実験 B : マウス腹腔 M ϕ および脾細胞の種々の免疫学的機能に及ぼす強制走運動および黄耆の影響

1 群 13~15 匹のマウスを用い, 12 週間の強制走運動および As の投与終了後, 1 群 4~5 匹のマウスをエーテル麻酔下に断頭致死して, PECs を採取し, 腹腔 M ϕ の O₂-産生能および acid phosphatase 活性を測定した。さらに別の 4~5 匹のマウスは同様に腹腔 M ϕ を採取し, IL-1 産生能を測定した。残りの 4~5 匹は頸椎脱臼致死し, 脾臓を摘出して脾細胞の Con A に対する反応性を測定した。また, すべてのマウスについて体重および前脛骨筋の SDH 活性を測定した。

1. 体重と前脛骨筋の SDH 活性について

Table 5 にマウスの体重と前脛骨筋の SDH 活性値を示す。体重は前述の実験と同様に, 4 群間に有意差は認められなかった。前脛骨筋の SDH 活性についても同様に, 強制走運動を負荷した E 群および E+As 群は対照群に比して有意に高値を示した。対照群と As 群との間には, 差異は認められなかった。

Table 4 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on the uptake of carbon in liver and spleen of carbon-injected mice.

Group	Content of carbon (O.D. $\times 10^3$ /100 mg tissue)	
	Liver	Spleen
Control	542.5 $\pm$ 21.2	1021.7 $\pm$ 47.4
E	669.4 $\pm$ 24.4	897.3 $\pm$ 51.2
As	673.8 $\pm$ 47.4	1101.7 $\pm$ 78.8
E+As	645.0 $\pm$ 45.8	1121.7 $\pm$ 36.1

Each value represents the mean $\pm$ SE of 12 mice.

E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

Table 3 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* 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)	Corrected phagocytic index (α)
Control	50.54 $\pm$ 1.36	2.83 $\pm$ 0.11	13.08 $\pm$ 0.83	7.68 $\pm$ 0.42
E	56.1 $\pm$ 1.90 ^{a**}	3.95 $\pm$ 0.40 ^{a**}	9.23 $\pm$ 0.67 ^{a**}	8.36 $\pm$ 0.44
As	54.5 $\pm$ 0.81 ^{a**}	3.18 $\pm$ 0.32	9.66 $\pm$ 0.53 ^{a**}	8.79 $\pm$ 0.39
E+As	48.0 $\pm$ 0.98	2.81 $\pm$ 0.12	8.87 $\pm$ 0.81 ^{a**}	10.65 $\pm$ 0.51 ^{a**}

Each value represents the mean $\pm$ SE of 12 mice.

a, Significant difference from Control. b, Significant difference from group E.

c, Significant difference from group As. d, Significant difference from group E+As.

* P<0.05, ** P<0.01 E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

Table 5 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on body weight and muscle succinate dehydrogenase activity in mice.

Group	N	Body weight (g)		SDH activity (μ mole/min/mg protein)
		Age		
		4 weeks	16 weeks	
Control	15	22.7 $\pm$ 0.2	43.2 $\pm$ 0.8	1.56 $\pm$ 0.14
E	13	22.3 $\pm$ 0.3	43.4 $\pm$ 1.0	2.76 $\pm$ 0.33 ^{a*}
As	14	22.7 $\pm$ 0.3	42.4 $\pm$ 0.6	1.73 $\pm$ 0.20
E+ As	13	22.0 $\pm$ 0.2	43.3 $\pm$ 1.5	2.73 $\pm$ 0.27 ^{a*}

Each value represents the mean $\pm$ SE. a, Significant difference from Control.

* $P < 0.05$ E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

N, Number of mice used.

2. 腹腔M ϕ のO₂⁻産生能およびacid phosphatase活性について

Fig. 1に腹腔M ϕ のO₂⁻産生能についての成績を示す。As群およびE+As群のO₂⁻産生は対照群およびE群に比して著明に高値を示した。対照群とE群にはほとんど差異はみられなかった。

Fig. 2に腹腔M ϕ のacid phosphatase活性についての成績を示す。E群、As群およびE+As群はいずれも対照群に比べ有意に高値を示した。また、E群およびAs群はE+As群に対しても有意に高値を示した。

3. 腹腔M ϕ のIL-1産生能について

Table 6に腹腔M ϕ のIL-1産生能についての成績を示す。4群間のIL-1産生能にはほとんど差異はみられなかった。

4. 脾細胞のCon Aに対する増殖反応性について

Table 7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。対照群のS.I.値が2.17であるの

に対して、E群、As群およびE+As群はそれぞれ4.87、4.00および6.20であり、2~3倍の有意な高値を示した。また、E群およびE+As群はAs群に対しても有意に高値を示し、さらにE+As群はE群に対しても有意に高値を示した。この場合のCon A非刺激の値は対照群およびAs群に比して、E群およびE+As群で明らかに高値を示した。

考 察

本研究ではマウス発育期の運動および黄耆投与の免疫機能に及ぼす影響を検討した。

実験終了時のマウスの体重は各群間ではほとんど差は認められなかった。一方、強制走運動を負荷したE群とE+As群では対照群に比して体重に対する相対胸腺重量の増加傾向がみられた。また、E群では相対肝および脾臓重量の増加がみられた。E+As群で相対肝および脾臓重量の増加がみられなかった理由については不明であるが、これらの成績は概して強制走運動によって体重に

Fig. 1 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on superoxide anion production of peritoneal macrophages in mice. Each column and horizontal bar represent the mean $\pm$ SE.

a, Significant difference from Control.

b, Significant difference from group E. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

N, Number of mice used.

Fig. 2 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on acid phosphatase activity of peritoneal macrophages in mice.
Each column and horizontal bar represent the mean $\pm$ SE.
a, Significant difference from Control.
d, Significant difference from group E + As. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.
N, Number of mice used.

Table 6 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on interleukin-1 production of peritoneal macrophages in mice.

Group	N	Absorbance (570 nm)		Stimulation Index
		Con A		
		(-)	(+)	
Control	5	0.209±0.020	0.295±0.030	1.44±0.18
E	4	0.229±0.010	0.287±0.020	1.28±0.16
As	5	0.226±0.007	0.327±0.001	1.45±0.05
E+As	4	0.228±0.007	0.309±0.010	1.36±0.05

Each value represents the mean $\pm$ SE. N, Number of mice used.
E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.

Table 7 Effects of forced running exercise and *Astragalus membranaceus* on proliferation of splenocytes induced by Con A in mice.

Group	N	Absorbance (570 nm)		Stimulation Index
		Con A		
		(-)	(+)	
Control	5	0.039±0.002	0.085±0.005	2.17±0.08
E	5	0.124±0.006 ^{a**} _{c**}	0.599±0.021 ^{a**} _{c**}	4.87±0.14 ^{a**} _{c**}
As	4	0.045±0.001 ^{a*}	0.182±0.013 ^{a*}	4.00±0.24 ^{a**}
E+As	4	0.106±0.005 ^{a**} _{c**}	0.656±0.023 ^{a**} _{c**}	6.20±0.19 ^{a**} _{c**}

Each value represents the mean $\pm$ SE. a, Significant difference from Control.
b, Significant difference from group E. c, Significant difference from group As.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ E, Forced running exercise; As, *Astragalus membranaceus* extract.
N, Number of mice used.

対する相対臓器重量が増加したことを示している。これらのことは、走運動トレーニングを行った場合、消費エネルギー量が増大して体脂肪量が減少²⁷⁾し、体重に占める組織、器官の比率が増大²⁸⁾する結果と考えられる。

運動負荷の反復によって筋肥大が起こる²⁹⁻³¹⁾ことは、よく知られている。本研究における成績でも12週間のト

レーニング後では、対照群と比較して、E群とE+As群で筋重量の有意な増加が認められた。また、持久性トレーニングにより骨格筋の酸化的代謝機能は亢進する^{32, 33)}とされており、Holloszy³⁴⁾はラットに長期間トレッドミル走を行わせることによって、ミトコンドリア内に存在するTCA関連酵素が有意に増加するとしている。本

研究における成績でも、実験AおよびBのいずれの検討においてもE群とE+As群の前脛骨筋のSDH活性は対照群に比して有意に増加し、酸化エネルギー供給系機能が亢進したものと考えられる。

運動によって筋がトレーニング効果を得るために必要な運動の要素には、運動の強度、持続時間および頻度がある。その1つである強度は、一般に70% $\dot{V}O_2\text{max}$ 以上が必要であるとされている^{35, 36)}。本研究における強制走運動の結果、筋重量、SDH活性の増加がみられたことは、本研究における強制走運動がトレーニング効果をもたらすのに適切な70% $\dot{V}O_2\text{max}$ 以上の負荷であり、適度な運動であったことを示している。

本研究では、まず網内系機能に及ぼす運動および黄者の影響をカーボנקリアランス能を指標として検討した。

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)、単球および組織球による³⁷⁾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¹⁷⁾ことが明らかにされている。カーボנקリアランスの $t_{1/2}$ はE群、As群およびE+As群で有意な短縮が認められた。また、 α 値では、対照群と比較してE群、As群で高い傾向にあり、E+As群で明らかに高値を示した。網内系の異物貪食作用強度は、E+As群>As群 $\geq$ E群 $\geq$ 対照群の順であり、E+As群の網内系の貪食機能亢進は運動負荷および黄者投与の相乗効果と考えられる。この場合のE群、As群およびE+As群の3群の肝臓におけるカーボン粒子の取り込み量は、対照群に比して高い傾向がみられた。一方、脾臓での取り込みは、4群間に差異は認められなかった。丁³⁸⁾は黄者がM ϕ の機能を促進するとしている。したがって、運動および黄者は肝臓における固定型M ϕ を賦活し、その結果カーボנקリアランスを促進するものと思われる。しかし、運動および黄者の併用による肝臓のカーボン粒子の取り込み量の増加についてはその相乗効果はみられなかった。

次に、マウスの腹腔M ϕ の O_2^- 産生能、acid phosphatase活性およびIL-1産生能ならびにCon Aに対する脾細胞の増殖反応性に及ぼす運動と黄者の影響について検討した。

M ϕ は活性化に伴い、その形態が変化し、酵素活性、代謝活性、分泌活性、殺菌作用などが亢進³⁹⁾する。M ϕ が活性化されると活性酸素の産生能も上昇がみられる。PMA刺激による腹腔M ϕ の O_2^- は対照群と比較して、As群とE+As群で、1.3~1.6倍の有意な増加がみられた。

しかし、E群ではほとんど増加はみられなかった。これらの成績は、黄者は腹腔M ϕ の活性酸素産生を促進するが、運動は促進しないことを示唆している。一方、腹腔M ϕ のacid phosphatase活性は、E群、As群およびE+As群のいずれも対照群と比較して明らかに高値を示した。このことから運動および黄者は遊離型の腹腔M ϕ の異物処理機能を亢進すると考えられる。この場合、運動および黄者投与との相乗効果はみられなかった。

M ϕ の産生する免疫調節因子の一つにIL-1がある。IL-1の産生が運動によって上昇するとの報告^{40, 41)}があるが、本研究ではそれを支持する成績は得られなかった。また、As投与によってもその促進はみられなかった。

免疫機能に及ぼす運動の影響を検討する場合、マイトジェンに対するリンパ球の幼若化反応がその指標の1つとして用いられている^{42~48)}。喜多尾ら⁴⁵⁾は女子スポーツ選手のリンパ球のPHAに対する幼若化能を³H-Thymidineの取り込みを指標として測定し、スポーツ選手では非鍛練者に比してその幼若化能が高いことを報告している。また、森口ら⁴³⁾は若齢および老齢ラットに4週間の水泳運動を負荷した場合、PHAおよびCon Aに対する脾細胞の幼若化反応が増大するとしている。一方、押田ら⁴⁶⁾は50% $\dot{V}O_2\text{max}$ の自転車エルゴメーターによる急性運動負荷直後の末梢血リンパ球のPHAに対する増殖反応性をethidium bromide 蛍光法によって検討し、その反応性が低下すると報告している。しかし、本研究におけるE群のCon Aに対する脾細胞増殖反応性は、対照群に比して顕著な上昇がみられた。したがって、一過性の運動負荷と異なり長期継続運動は、脾細胞増殖反応を亢進すると思われる。

黄者については慢性気管炎、慢性肝炎患者および健康者のマイトジェンによるリンパ球の幼若化反応を促進するとの報告がある³⁸⁾。本研究においてもAs群の脾細胞のCon Aによる増殖反応に亢進がみられ、また、E+As群は、E群およびAs群よりも顕著な亢進がみられ、運動および黄者との相乗効果が観察された。

以上のように、長期継続運動の実施および黄者投与はM ϕ の異物処理機能を高め、感染等に対する抵抗性が亢進すると考えられた。また、Con Aで刺激した脾細胞の増殖能を増強する。これらの成績は運動および黄者が免疫機能を賦活することを示唆する。さらに、運動と黄者はマウスの免疫機能を相乗的に増強するものと思われる。

今回は黄者の投与量を200 mg/kg/dayとしたが、種々の用量についても今後検討する必要がある。

ま と め

マウス発育期の運動および黄耆 (*Astragalus membranaceus*) の免疫機能に及ぼす影響を検討した。

実験動物には生後4週齢のICR系雄性マウスを用いた。強制走運動群(E群)、非強制走運動+黄耆投与群(As群)、強制走運動+黄耆投与群(E+As群)および非処置群(対照群)の4群に区別し、運動負荷は、毎分15mの速度で1日1時間、週5日12週間にわたってトレッドミル走行を実施した。黄耆は、70%メタノールエキスをを用い、1日1回200mg/kgを週5日、運動負荷と同期間経口投与した。

1) 実験終了時のマウスの体重は4群間に差異は認められなかった。前脛骨筋の湿重量とSDH活性値は強制走運動を負荷したE群、E+As群が対照群よりも有意に高値を示した。胸腺重量はE群とE+As群で対照群と比較して増加傾向がみられた。

2) カーボンクリアランスにおける血中カーボン半減期はE群、As群およびE+As群でそれぞれ短縮が認められた。補正食食指数は、対照群に比しE群とAs群で高い傾向を示した。一方、E+As群は有意な高値を示し、運動と黄耆との相乗効果がみられた。

この場合の肝臓に取り込まれたカーボン量はE群、As群およびE+As群で高い傾向がみられたが、脾臓では4群間に差異は認められなかった。

3) 腹腔MφのO₂⁻産生能はAs群とE+As群で亢進がみられたが、運動のみのE群では亢進はみられなかった。また、腹腔Mφのacid phosphatase活性はE群、As群およびE+As群でいずれも高い活性を示した。

4) 腹腔MφのIL-1産生能は、4群間で著明な差異は認められなかった。

5) Con Aに対する脾細胞の増殖反応性は対照群に比しE群、As群およびE+As群で2～3倍の高値を示した。また、運動と黄耆との相乗効果がみられた。

以上のように、マウス発育期の運動および黄耆の投与は免疫機能を増強し、生体防御機構の促進に有用であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、黄耆を提供していただきました岐阜薬科大学生薬学教室の飯沼宗和助教授に心より感謝致します。また、本稿を投稿するにあたり、貴重な御助言を賜りました岐阜薬科大学薬理学教室の森裕志講師に深謝致します。

文 献

- 1) Wenger, H.A. and Bell, G.J.: Interactions of intensity, frequency and duration of exercise training in altering cardiorespiratory fitness, *Sports Med.*, **3**, 346-356 (1986).
- 2) Gaesser, G.A. and Rich, R.G.: Effects of high- and low-intensity exercise training capacity and blood lipids, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **16**, 269-274 (1984).
- 3) Craing, B.W., Hammons, G.T., Garthwaite, S.M., Jarret, L. and Holloszy, J.O.: Adaptations of fat cells to exercise: Response to glucose uptake and oxidation to insulin, *J. Appl. Physiol.*, **51**, 1500-1506 (1981).
- 4) King, P.S., Dalsky, D.P., Staten, H.A., Clutter, W.E., Houten, D.R. and Holloszy, J.O.: Insulin action and secretion in endurance trained and untrained human, *J. Appl. Physiol.*, **63**, 2247-2252 (1987).
- 5) 喜多尾浩代, 松田光生, 河野一郎, 芳賀修光, 福島秀夫: 習慣的な運動が免疫機能に及ぼす影響, *体力科学*, **36**, 217-220 (1987).
- 6) Tomasi, T.B., Trudeau, F.B., Czerwinski, O. and Erredge, S.: Immune parameters in athletes before and after strenuous exercise, *J. Clin. Immunol.*, **2**, 173-178 (1982).
- 7) Simon, H.B.: The immunology of exercise, *J. Am. Med. Assoc.*, **252**, 2735-2738 (1984).
- 8) 杉浦春雄, 西田弘之, 中神勝: 実験動物の免疫応答に及ぼす運動の影響, *日本体育学会第38回大会号B*, 828 (1987).
- 9) Kumae, T., Sugawara, K., Machida, K. and Shimaoka, A.: Changes in serum immunoglobulin levels and neutrophilic phagocytosis after exercise, *Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med.*, **36**, 61-67 (1987).
- 10) Ushio, Y. and Abe, H.: The effects of saikosaponin on macrophage functions and lymphocyte proliferation, *Planta Med.*, **57**, 511-514 (1991).
- 11) 斉藤紀子, 合地研吾, 松田重三, 木下忠俊, 安部英: 小柴胡湯長期投与が健康人の免疫機能に及ぼす影響, 第6回和漢医薬学会大会要旨集, 25 (1989).
- 12) 杉浦春雄, 西田弘之, 水野瑞夫, 飯沼宗和, 小西宏明: エゾウコギ投与がマウス骨格筋酸化系酵素活性に及ぼす影響, *岐阜薬科大学紀要*, **38**, 38-48 (1989).

- 13) 飯沼宗和, 田中稔幸, 榊原則夫, 水野瑞夫, 松田秀秋, 塩本秀己, 久保道徳: マウス網内系の食能に及ぼす淫羊藿の影響, 薬学雑誌, **110**, 179-185 (1990).
- 14) 木村雄四郎: 日本市場の黄耆について, 和漢薬, **246**, 1-3 (1973).
- 15) 高木敬次郎: 和漢薬物学, p.71, 南山堂, 東京(1982).
- 16) 神戸中医学研究会編: 漢薬の臨床応用, p.308-311, 医歯薬出版, 東京(1979).
- 17) Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B. N.: Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system II, Br. J. Exp. Pathol., **34**, 441-457 (1953).
- 18) 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).
- 19) Cooperstein, S.J., Lazarow, A. and Kurfess, N.J.: A micro spectrophotometric method for the determination of succinic dehydrogenase, J. Biol. Chem., **186**, 129-139 (1950).
- 20) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).
- 21) 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).
- 22) 日本生化学会編: 新生化学実験講座12, 分子免疫学 I, サイトカイン, p.49-50, 東京化学同人, 東京(1989).
- 23) Miyagawa, N., Okamoto, Y. and Nakano, H.: Effect of C-reactive peritoneal macrophages, Microbiol. Immunol., **32**, 721-731 (1988).
- 24) Monte, S.M. and Joost, J.O.: Bidirectional amplification of macrophage-lymphocyte interactions: Enhanced lymphocyte activation factor production by activated adherent mouse peritoneal cells, J. Immunol., **118**, 77-83 (1977).
- 25) Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Okikawa, S. and Yadomae, T.: Changes of biological activities of (1→3)- β -D-glucan from *Grifola frondosa* upon molecular weight reduction by heat treatment, Chem. Pharm. Bull., **38**, 477-481 (1990).
- 26) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods, **65**, 55-63 (1983).
- 27) Oscai, L.B. and Holloszy, J.O.: Effect of weight changes produced by exercise, food intake, or overeating on body composition, J. Clin. Invest., **48**, 2124-2128 (1969).
- 28) 上田伸男: 運動による細胞性免疫能の変化—食餌たんぱく質レベルの影響—, 宮城学院大学生生活科学研究報告, **20**, 14-22 (1988).
- 29) Walker, G.M.: The effect of exercise on skeletal muscle, Comp. Biochem. Physiol., **19**, 791-797 (1960).
- 30) 菊池邦雄: 筋トレーニングの組織学的研究—静的筋トレーニングと動的筋トレーニングの骨格筋線維に及ぼす影響の比較—, 体育学研究, **16**, 67-74 (1971).
- 31) 西田弘之, 林正利, 楯博, 松井寿夫: 運動負荷がマウスの骨および筋発育に及ぼす影響, 独協医学会雑誌, **3**, 163-172 (1988).
- 32) Hearn, G.R. and Wainio, W.W.: Succinic dehydrogenase activity of the heart and skeletal muscle of exercised rats, Am. J. Physiol., **185**, 348-350 (1956).
- 33) Andrew, C.G., Edward, L.F. and Merola, A.J.: Enzyme adaptations in rat skeletal muscle after two intensities of treadmill training, Med. Sci. Sports Exerc., **14**, 461-466 (1982).
- 34) Holloszy, J.O.: Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle, J. Biol. Chem., **242**, 2278-2282 (1967).
- 35) 勝田茂: ラット骨格筋線維の活動性肥大に関する電子顕微鏡的研究, 体力科学, **23**, 67-76 (1974).
- 36) 久保栄一郎, 猪飼道夫: スポーツ医学, p.265-269, 体育の科学社, 東京(1964).
- 37) 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).
- 38) 丁宗鉄: 免疫と漢方, p.6-15, 谷口書店, 東京(1988).
- 39) 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).
- 40) Lewicki, R., Tchorzewski, H., Majewska, E., Nowak, Z. and Baj, Z.: Effect of maximal physical exercise on T-lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL 1) and interleukin 2 (IL 2) production in vitro, Int. J. Sports Med., **9**, 114-117 (1988).
- 41) Harvey, B.S.: Exercise and infection, Physician

- Sportsmed., **15**, 135-141 (1987).
- 42) Soppi, E., Varjo, P., Eskola, J. and Laitinen, L.A.: Effect of strenuous physical stress on circulating lymphocyte number and function before and after training, J. Clin. Lab. Immunol., **8**, 43-46 (1982).
- 43) 森口覚, 栢下淳, 岡田悟, 酒井徹, 岸野泰雄: 加齢にともなう細胞性免疫能の低下に対する栄養及び運動の効果, 体力研究, **75**, 144-151 (1990).
- 44) Hoffman-Goetz, L., Keir, R., Thorne, R., Houston, M.E. and Young, C.: Chronic exercise stress in mice depresses splenic T lymphocyte mitogenesis in vitro, Clin. Exp. Immunol., **66**, 551-557 (1986).
- 45) 喜多尾浩代, 松田光生, 河野一郎, 芳賀修光, 福島秀夫, 小西智子: 鍛錬者における摂取エネルギー制限による減量の免疫機能に及ぼす影響, 体力科学, **38**, 95-104 (1989).
- 46) 押田芳治, 山之内国男, 早水サヨ子, 蛭田秀一, 佐藤祐造: 運動トレーニングと免疫能(第1報)—非鍛錬者に対する急性運動負荷の影響—, 体力科学, **36**, 72-77 (1987).
- 47) 河野一郎: 免疫・血液, 最新医学, **43**, 2155-2158 (1988).
- 48) 松尾和彦, 柳田巖, 広橋伸之, 原昭典, 横山三男: 運動トレーニングと免疫能, 臨床スポーツ医学, **7**, 1335-1340 (1990).
- (受付 1992年4月13日 受理 1992年10月7日)