薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (3) 179-185 (1990)

マウス網内系の食食能に及ぼす淫羊藿の影響

飯沼宗和,^{*,a} 田中稔幸,^a 榎原則夫,^a 水野瑞夫,^a
松田秀秋,^b 塩本秀己,^b 久保道德^b
岐阜薬科大学,^a 近畿大学薬学部^b

Phagocytic Activity of Leaves of *Epimedium* Species on Mouse Reticuloendothelial System

Munekazu IINUMA,^{*,a} Toshiyuki TANAKA,^a Norio SAKAKIBARA,^a
Mizuo MIZUNO,^a Hideaki MATSUDA,^b Hidemi SHIOMOTO,^b
and Michinori KUBO^b

Department of Pharmacognosy, Gifu Pharmaceutical University,^a 6-1
Mitahora-higashi 5-6-1, Gifu 502, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kinki University,^b 3-4-1 Kowakae,
Higashiosaka, Osaka 577, Japan

(Received October 11, 1989)

Effects of a 70% methanolic extract (E-S) from the dried leaves of *Epimedium sagittatum* on a phagocytic activity of reticuloendothelial system were studied by the carbon clearance method in mice. The clearance-rate of carbon significantly increased 1 h after the oral administration of E-S (200 or 500 mg/kg, one time/d for 5d). E-S activated the phagocytosis of carbon by Kupffer cells in the liver. Icariin and epimedin C isolated from E-S also activated the phagocytosis.

These results suggest that E-S promotes the phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice and has a stimulatory effect on macrophage.

Keywords—*Epimedium sagittatum*; carbon clearance; reticuloendothelial system; macrophage; icariin; epimedin C

淫羊藿 (*Epimedium* 属植物の乾燥葉) は古来、強壯、強精薬としてインポテンツ、不妊、リウマチの治療、虚弱体質や易感染体質の改善を目標に用いられていた。本報では、淫羊藿の本来の薬能と思われる生体防御機構に及ぼす影響については未だ報告がないことから、その有効性をマウス網内系の食食能に及ぼす影響にて検討した。

本 論

1. 生理活性試験のための被験体の調製

生理活性試験のための試料は Table I に示した *Epimedium* 属植物を基源とする 6 種の淫羊藿の 70% メタノールエキス (E-S) を被験体に供した。また、E-S を既報¹⁾ に準じて分画し、得た分画部 (P-1, P-2 及び P-3) 及び icariin, epimedin C 及び epimedoside E を被験体に供した。

2. マウス食食能に及ぼす影響

1) 淫羊藿 70% メタノールエキス マウスに淫羊藿 70% メタノールエキスを 5 日間連続経口投与し、その最終投与 1 時間後にカーボンクリアランスを行い、その結果は Table II に示した。マウスにカーボン浮遊液を注入したとき、対照群の血中カーボン半減消失時間 ($t_{1/2}$, 分) は 11—14 分であった。各種淫羊藿 70% メタノールエキスのなかで E-S 200, 500 mg/kg 投与群には $t_{1/2}$ を有意に短縮させる作用が認められたが、他の淫羊藿エキスにはその作用が認められなかった。対照薬に用いた zymosan 50 mg/kg 投与群にもその作用が認められなかった。

また、マウス貪食能に及ぼす E-S の影響を K , α 値で評価し、その結果は Table III に示した。E-S 500 mg/kg をマウスに 5 日間連続経口投与すると、対照群の K 値 0.0195 ± 0.0014 , α 値 7.92 ± 0.40 がそれぞれ 0.0246 ± 0.0013 , 9.47 ± 0.32 まで有意に増加した。しかし、E-S は相対肝臓、脾臓重量に有意な影響を及ぼさなかった。Zymosan 50 mg/kg 投与群にも K , α 値を有意に増加させる作用が認められた。

2) E-S の分画部 マウス貪食能に及ぼす E-S から得た分画部の影響をカーボンクリアランス法で

TABLE I. Experimental Materials

Scientific name	Location
<i>Epimedium sagittatum</i> (E-S)	China
<i>E. cremeum</i> (E-C)	Japan
<i>E. grandiflorum</i> var. <i>thunbergianum</i> (E-G)	Japan
<i>E. diphyllum</i> (E-D)	Japan
<i>E. trifoliatobinatum</i> (E-T)	Japan
<i>E. brevicornum</i> (E-B)	China

E. sagittatum and *E. brevicornum* were donated by Prof. Da-wen Shi in Shanghai Medicinal University.

TABLE II. Effects of 70% Methanolic Extracts from the Leaves of Various *Epimedium* Species on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Clearance-rate of carbon ($t_{1/2}$, min)
Control ^{a)}		<i>p.o.</i>	15	13.7 ± 1.2
<i>E. sagittatum</i> (E-S)	200	<i>p.o.</i>	15	$10.5 \pm 0.6^b)$
	500	<i>p.o.</i>	15	$9.2 \pm 0.4^c)$
Control		<i>p.o.</i>	15	12.8 ± 1.0
<i>E. brevicornum</i> (E-B)	200	<i>p.o.</i>	15	10.5 ± 0.6
	500	<i>p.o.</i>	15	12.1 ± 0.6
<i>E. cremeum</i> (E-C)	200	<i>p.o.</i>	15	10.8 ± 0.4
	500	<i>p.o.</i>	15	12.0 ± 0.9
<i>E. trifoliatobinatum</i> (E-T)	200	<i>p.o.</i>	15	11.0 ± 0.6
	500	<i>p.o.</i>	15	10.9 ± 0.5
Control		<i>p.o.</i>	15	11.3 ± 0.7
<i>E. grandiflorum</i> var. <i>thunbergianum</i> (E-G)	200	<i>p.o.</i>	15	11.4 ± 0.6
	500	<i>p.o.</i>	15	11.3 ± 0.6
<i>E. diphyllum</i> (E-D)	200	<i>p.o.</i>	15	12.2 ± 0.7
	500	<i>p.o.</i>	15	10.7 ± 0.6

Carbon clearance test was performed 1 h after the oral administrations of test substances (one time/d for 5 d). Each value represents the mean $\pm$ S.E. a) Control was administered water alone. b) Significantly different from the control group, $p < 0.05$. c) Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

TABLE III. Effects of 70% Methanolic Extract from the Leaves of *E. sagittatum* (E-S) and Zymosan on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	% body weight		Phagocytic index (K)	Corrected phagocytic index (α)
				Liver	Spleen		
Control ^{a)}		<i>p.o.</i>	15	4.85 ± 0.14	0.44 ± 0.03	0.0195 ± 0.0014	7.92 ± 0.40
E-S	50	<i>p.o.</i>	13	4.67 ± 0.09	0.40 ± 0.02	0.0219 ± 0.0018	8.70 ± 0.37
	200	<i>p.o.</i>	13	4.72 ± 0.16	0.42 ± 0.02	0.0221 ± 0.0014	8.95 ± 0.30
	500	<i>p.o.</i>	13	4.70 ± 0.16	0.43 ± 0.03	$0.0246 \pm 0.0013^c)$	$9.47 \pm 0.32^d)$
	500	<i>p.o.</i>	13	4.70 ± 0.16	0.43 ± 0.03	$0.0246 \pm 0.0013^c)$	$9.47 \pm 0.32^d)$
Control ^{b)}		<i>i.p.</i>	15	5.33 ± 0.10	0.32 ± 0.01	0.0199 ± 0.0012	4.78 ± 0.13
Zymosan	50	<i>i.p.</i>	15	5.14 ± 0.12	0.30 ± 0.01	$0.0244 \pm 0.0007^d)$	$5.53 \pm 0.12^d)$

Carbon clearance test was performed 1 h after the administration of E-S (one time/d for 5 d) or 2 d after the administration of zymosan (one time/d). Each value represents the mean $\pm$ S.E. a) Control was administered water alone. b) Control was administered saline alone. c) Significantly different from the control group, $p < 0.05$. d) Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

TABLE IV. Effects of Various Fractions Containing Flavonoid Components from 70% Methanolic Extract from *E. sagittatum* (E-S) on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Clearance-rate of carbon ($t_{1/2}$, min)
Control ^{a)}		<i>p.o.</i>	15	13.7 ± 0.6
P-1	200	<i>p.o.</i>	15	12.5 ± 0.8
P-2	200	<i>p.o.</i>	15	11.0 ± 0.5 ^{b)}
P-3	200	<i>p.o.</i>	15	13.3 ± 0.7

Carbon clearance test was performed 1 h after the oral administrations of test substances (one time/d for 5 d). Each value represents the mean ± S.E. a) Control was administered water alone. b) Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

TABLE V. Effects of Flavonoid Components Isolated from 70% Methanolic Extract from *E. sagittatum* (E-S) on Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Clearance-rate of carbon ($t_{1/2}$, min)
Control ^{a)}		<i>p.o.</i>	19	17.2 ± 1.3
Icariin	50	<i>p.o.</i>	15	15.4 ± 0.8
Icariin	200	<i>p.o.</i>	15	13.2 ± 0.6 ^{b)}
Epimedin C	20	<i>p.o.</i>	15	13.7 ± 0.9 ^{b)}
Epimodoside E	40	<i>p.o.</i>	15	14.5 ± 0.7

Carbon clearance test was performed 1 h after the oral administrations of test substances (one time/d for 5 d). Each value represents the mean ± S.E. a) Control was administered water alone. b) Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

検討し、その結果は Table IV に示した。P-2 200 mg/kg 投与群には $t_{1/2}$ を有意に短縮させる作用が認められたが、P-1 及び -3 にはその作用が認められなかった。

3) **Icariin, Epimedin C 及び Epimodoside E** マウス貪食能に及ぼす P-2 から得た icariin, epimedin C 及び epimodoside E の影響をカーボンクリアランス法で検討し、その結果は Table V に示した。Icariin 100 mg/kg 及び epimedin C 20 mg/kg 投与群にはマウス貪食能を有意に亢進させる作用が認められた。

2. 肝臓、脾臓、肺臓に取り込まれるカーボン粒子の光顕的観察

肝臓 注入されたカーボンは肝臓ではクッパー細胞及び血中の遊離マクロファージに取り込まれ鏡検下に黒点として観察された (Fig. 1)。また、肝臓中の黒点は時間の経過 (10—30 分後) に伴って増加した。

脾臓 脾臓では注入されたカーボンは白髄類リンパ組織が赤髄に移行する marginal zone のマクロファージに取り込まれ、鏡検下に黒点として観察され、肝臓と同様に時間の経過に伴って増加した (Fig. 2)。

Fig. 1. Liver of Mouse Given a Carbon Suspension i.v. and Sacrificed 10 min Later

Carbon particles were evenly distributed in all the Kupffer cells. (H.E. stain; $\times 80$)

Fig. 2. Spleen of Mouse Given a Carbon Suspension i.v. and Sacrificed 10 min Later

Carbon particles were internalized by macrophages of marginal zones between white pulp and red pulp in the spleen. (H.E. stain; $\times 80$)

Fig. 3. Effect of 70% Methanolic Extract from the Leaves of *E. sagittatum* (E-S) on Hepatic Uptake of Carbon in Mice Given an Injection of Carbon

—●—, control; —■—, E-S 200 mg/kg; —▲—, E-S 500 mg/kg.

Carbon suspensions were injected 1 h after the oral administration of E-S (one time/d for 5 d) and carbon contents of the liver were measured 10, 20 or 30 min after the injection. Control was orally administered water alone. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 15 mice. a) Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

肺臓 肺臓ではほとんどカーボンの黒点は観察されなかった (成績は省略).

3. 肝臓, 脾臓に取り込まれるカーボン量に及ぼす E-S の影響

肝臓 Fig. 3 に示したごとく, 対照群の肝臓に取り込まれたカーボン量は時間の経過に伴って増加した. E-S 200, 500 mg/kg 投与群にはカーボン注入 10 分後の肝臓においてカーボンの取り込みを有意に亢進させる作用が認められた.

脾臓 脾臓で取り込まれたカーボン量も肝臓と同様に時間の経過に伴って, Fig. 4 のごとく増加した. カーボン注入 10–30 分後の脾臓において E-S 投与群にはカーボンの取り込みを亢進させる傾向が認められたが, 有意なものではなかった.

4. 腹腔浸出細胞数及びそのライソゾーム酵素活性に及ぼす E-S の影響

E-S を 5 日間連続経口投与あるいは zymosan 50 mg/kg を腹腔内投与した時の腹腔浸出細胞数及び acid phosphatase 活性を測定し, 対照群の腹腔浸出細胞数及び酵素活性を 100% としたときの被験体処置時の値を求めた. その結果, E-S 投与群にはその数及び acid phosphatase 活性を増加させる作用が認められなかった. Zymosan 投与群にはその数及び酵素活性を著しく増加させる作用が認められた (成績は省略).

5. 腹腔マクロファージのラテックス粒子貪食に及ぼす E-S の影響

Table VI に腹腔マクロファージ 1 個が貪食したラテックス粒子数及び対照群のラテックス粒子数を貪食率 100% としたときの被験体処置時の増加率を示した. E-S 処置群には腹腔マクロファージのラテックス貪食を増加させる作用が認められなかった.

Fig. 4. Effect of 70% Methanolic Extract from the Leaves of *E. sagittatum* (E-S) on Splenic Uptake of Carbon in Mice Given an Injection of Carbon

—●—, control; —■—, E-S 200 mg/kg; —▲—, E-S 500 mg/kg.

Carbon suspensions were injected 1 h after the oral administration of E-S (one time/d for 5 d) and carbon contents of the spleen were measured 10, 20 or 30 min after the injection. Control was orally administered water alone. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 15 mice.

TABLE VI. Effects of 70% Methanolic Extract from the Leaves of *E. sagittatum* (E-S) on Phagocytosis of Latex by Peritoneal Macrophage

Treatment	Concentration (μ g/ml)	No. of phagocytosed latex	% of activity
Control		9.7 $\pm$ 1.2	100
E-S	25	10.4 $\pm$ 0.6	107
	50	11.8 $\pm$ 0.8	122
	100	9.0 $\pm$ 0.7	93

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 experiments.

考 察

網内系機能には①感染防御作用, ②異物の貪食及び排除作用, ③血清蛋白の生成及び分泌作用, ④蛋白質, 脂質及び糖質代謝作用, ⑤抗腫瘍免疫, 抗感染免疫などの免疫応答機能などがある. 網内系に特異的な異物の貪食,

排除作用はマクロファージと称される遊走性の食食細胞である肝 Kupffer cell, 単球及び組織球が異物食食に主要な働きを持つ。²⁾

本研究では古来, 淫羊藿が虚弱体質及び易感染体質の改善作用を目的に用いられていることから, 網内系機能を賦活する作用が推察されるので, マウス網内系の異物食食に及ぼす影響をカーボンクリアランス法で検討し, 淫羊藿の薬効の裏付けを行うとともに, 有効成分の単離の指標としての薬理作用を見出すための検討を行った。

カーボンクリアランス法による網内系機能検査において *Epimedium sagittatum* を基源とする淫羊藿エキス (E-S) 投与群には血中カーボン半減消失時間を短縮する作用が認められたが, その他 5 種の淫羊藿エキスにはその作用が見い出せなかった。

そこで, この食食活性を指標に E-S 中の有効成分を検索したところ, フラボノイド成分を含有する P-2 と称した分画部にマウス食食能亢進作用が認められた。さらに, マウス食食能を指標に有効成分を検索した。なお, 実験動物への被験体の投与量は E-S 中の含有量^{1,3)}を指標に設定した。その結果, P-2 から単離した icariin, epimedin C, epimedoside E にその活性を認めた。しかし, 各種淫羊藿エキス中のこれらのフラボノイド含量³⁾とマウス食食能亢進作用との間に相関関係が得られないことから, 他の有効成分の存在が推察されるが, その詳細は現在不明である。

次に, E-S の作用機序の検討を行った。血中に注入されたカーボン粒子は, 主に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, 肺臓にはほとんど取り込まれないといわれており,⁴⁾ 今回の光顕的観察と一致した。また, 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マクロファージによるものである。そこで, E-S によるカーボンクリアランス亢進作用は固定型マクロファージを質的に亢進させたのか, あるいは量的に亢進させたのかを明らかにする目的で, カーボンクリアランスを行い, 食食能を K, α 値で評価した。その結果, E-S の 5 日間投与は相対肝, 脾重量に影響を与えずに, K, α 値を有意に増加させた。すなわち, E-S は固定型マクロファージを質的に賦活させ, その結果, カーボンクリアランスが亢進されたものと思われる。

次に, そのカーボン粒子がいずれの臓器において取り込まれたのか明らかにするために, カーボン浮遊液注入後, 経時的に肝臓, 脾臓を摘出し, 取り込まれたカーボン量を測定した。その結果, E-S は肝臓におけるカーボン粒子の取り込みを亢進させた。

一方, 遊離型マクロファージに及ぼす E-S の影響については, 腹腔浸出細胞数, そのライソゾーム酵素活性, 腹腔マクロファージのラテックス食食を指標に検討したが, E-S はこれらの試験法において遊離型マクロファージを賦活させる活性が見い出されなかった。

以上のことから, *Epimedium sagittatum* を基源とする淫羊藿は, マウス網内系のマクロファージ食食能を質的に活性化し, 網内系の食食機能を亢進させると考えられる。これらの結果は淫羊藿が古来, 虚弱体質や易感染体質の改善薬に用いられたことを裏付ける一結果であろう。しかし, *E. sagittatum* 以外の植物を基源とする淫羊藿に有効性が見い出されなかった点については, 有効成分の含量あるいは他の有効成分の存在などの観点から再検討の必要があろう。

実 験 の 部

1. 実験材料 1) 淫羊藿 70% メタノールエキス——本研究に用いた 6 種の淫羊藿は Table I に示したごとくで, 各種淫羊藿を細切後, 10 倍量の 70% メタノールで 80°C, 2 時間, 2 回抽出, ろ過し, ろ液のメタノールを減圧下で留去し, さらに凍結乾燥して得たエキスを被験体に供した。

2) 分画及びフラボンの単離——既報^{1,3)}に示した方法で E-S を分画した。すなわち, エキス (30 g) を酢酸エチル, 次いで *n*-ブタノールで分配した。*n*-ブタノール層はシリカゲル (展開溶媒: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}=65:35:10$) に付し, 初期のフラクションから P-3 (2.5 g), 中期より P-2 (3.8 g) 及び後期フラクションから P-1 (5.2 g) をそれぞれ得た。さらに液体クロマトグラフィーを用いて icariin, epimedin C, epimedoside E を単離し, 被験体に供した。

2. 試薬 Perikan Drawing Ink 17 Black (Perikan AG), Bacto-Latex (Difco Lab.) を用いた。また, 対照薬として zymosan (Sigma Chemical) を用いた。

3. 実験動物 体重 20—25 g の Kwl: ICR 系雌性マウスを用いた。飼育環境は温度 $23\pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 50—60%, 12 時間明/12 時間暗のサイクルの飼育室で, 市販の固形飼料 (CE-2, 日本クレア) を用い, 自由に水を摂

取させ、購入後実験に供するまで1週間予備飼育した。

4. マウス食食能の測定 マウス食食能は Freedman⁵⁾ の方法に準じたカーボンクリアランス法で行った。マウスの尾静脈にカーボン浮遊液 (Perikan Drawing Ink 17 Black 3 ml, 生理食塩水 4 ml, 3% gelatin 4 ml の混液) 0.1 ml/10 g を注射し, 4, 8, 12 分後に眼窩からヘパリン処置ヘマトクリット毛細管を用いて 25 μ l の血液を採血し, ただちに 2 ml の 0.1% Na₂CO₃ 溶液に希釈溶血させ, 分光光度計 (日立 200-10 型) により, 波長 675 nm で吸光度を測定した。また, 12 分後採血群は断頭後, 肝臓, 脾臓を摘出し, 湿重量を測定した。カーボンクリアランス値は次式から血中カーボン半減消失時間 ($t_{1/2}$, 分), 食食指数 (K) 及び訂正食食指数 (α) で求め, これらの値を被験体のカーボン食食能とした。なお, 被験体 (水に懸濁) はカーボン浮遊液静注 4 日前から 1 日 1 回連日 5 回経口投与 (最終投与はカーボン浮遊液静注 1 時間前) した。また, 対照薬に zymosan (生理食塩水に懸濁) 50 mg/kg を用い, カーボン浮遊液静注 2 日前に 1 回腹腔内投与した。

$$\text{血中カーボン半減消失時間 } (t_{1/2}, \text{ 分}) = (t_2 - t_1) / (1/2) \text{OD}t_1 / (\text{OD}t_1 - \text{OD}t_2)$$

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

$$\text{訂正食食指数 } (\alpha) = \sqrt[3]{K \cdot P_c / P_o}$$

ただし, t_1 : 4 分, t_2 : 8 分あるいは 12 分, $\text{OD}t_1$: 4 分後の吸光度, $\text{OD}t_2$: 8 分あるいは 12 分後の吸光度, P_c : 全体重, P_o : 肝臓, 脾臓の湿重量である。

5. 肝臓, 脾臓, 肺臓に取り込まれたカーボンの光顕的観察 4 の方法で被験体及びカーボン浮遊液を投与し, カーボン浮遊液静注 10, 20, 30 分後にマウスを断頭致死させ, 肝臓, 脾臓, 肺臓を摘出し, 10% formalin で固定後包埋し, さらにヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った後, 光顕的にカーボンの取り込みを観察した。

6. 肝臓, 脾臓に取り込まれたカーボン量の測定 4 の方法で被験体及びカーボン浮遊液を投与し, カーボン浮遊液静注 10, 20, 30 分後にマウスを断頭致死させ, 肝臓, 脾臓を摘出し, 肝臓, 脾臓に取り込まれたカーボン量を Fisher ら⁶⁾ の方法で測定した。すなわち, 肝臓あるいは脾臓を 10% KOH-70% EtOH 1 ml と 2% アラビアゴム 2 ml の混液で, 37°C, 12 時間溶解後, 水で 10 ml に調整した。この調整液を分光光度計により, 800 nm で吸光度を測定し, 肝臓及び脾臓に取り込まれたカーボン量を肝臓及び脾臓 100 mg 当たりの OD 値で示した。

7. 腹腔浸出細胞液中の細胞数及びそのライソゾーム酵素活性の測定 被験体及び zymosan を 4 に記した方法で投与したマウスの腹腔内にヘパリン加生理食塩水を 3 ml 投与し, 一定時間マウスの腹部をマッサージ後, 断頭致死させて腹腔浸出細胞液を採取した。採取した細胞液中の細胞数及びライソゾーム酵素活性を測定した。ライソゾーム酵素活性は細胞数を 1×10^6 個に調整後, 0.1% triton X-100 で処置し, その上清をライソゾーム酵素活性測定の試料とした。ライソゾーム酵素活性は, acid phosphatase 活性を *p*-ニトロフェニルリン酸法 (和光純薬 Acid Phospha β -Test, Wako) により測定した。腹腔浸出細胞数とライソゾーム酵素活性に及ぼす被験体の影響は対照群の細胞数及びライソゾーム酵素活性を 100% とした時の割合で示した。

8. 腹腔マクロファージのラテックス食食率の測定 10% ウン胎児血清 Eagle medium (heparin 5 U/ml を同時添加) 3 ml をマウス腹腔内に投与し, 一定時間マウスの腹部をマッサージ後, 断頭致死させて腹腔浸出細胞液を採取した。遠心分離 (1000 rpm, 10 分間) 後, 上清を除き, 10% ウン胎児血清含有 Eagle medium を加え, 培地内の細胞数を 2×10^6 個/ml に調整した。調整液 1 ml ずつをカバーグラスを入れた Falcon dish に分注し, 自動調節 CO₂ 培養器 (37°C, air 95%, CO₂ 5%) で 4 時間培養後, 同培地で洗浄し, さらに同培地で 24 時間培養した。上澄液を除き, 被験体含有培地を加えて 24 時間培養した。培養液の上澄液を除いた後, 培地 0.9 ml と Bacto-Latex (2×10^8 個/ml) 0.1 ml の混液を加えて 30 分間培養した。Falcon dish からマクロファージの付着したカバーグラスを取り出してスライドグラス上に載せ, 50 個のマクロファージが食食したラテックス数を鏡検下でカウントし, 平均値をラテックス食食数とした。被験体のラテックス食食活性化率は対照群のラテックス食食数を 100% とした時の割合で示した。なお, 被験体は 5% dimethylsulfoxide 生理食塩水に溶解し, メンブランフィルター (pore size 0.4 μ m) を通過したものを被験液とした。

9. 統計学的処理 実験結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表し, 有意差検定には Student's *t*-test を適用した。

引用文献

- 1) M. Mizuno, M. Iinuma, T. Tanaka, N. Sakakibara, S. Hanioka, X. Liu, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3487 (1988).

- 2) 栗屋和彦, 医学のあゆみ, **111**, 107 (1976).
- 3) M. Mizuno, M. Iinuma, T. Tanaka, S. Iwashita, N. Sakakibara, X. Liu, D. Shi, H. Muessel, *Asian J. Pl. Sci.*, **1**, 1 (1989).
- 4) G. Biozzi, B. Benacerraf, B. N. Halpern, *Br. J. Exptl. Pathol.*, **34**, 441 (1953).
- 5) a) H. H. Freedman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **88**, 99 (1960); b) 新田敏正, 奥村晴一, 中野昌康, 細菌, **32**, 691 (1977).
- 6) S. Fisher, W. B. Riley, C. D. Shorey, *J. Path. Bacto.*, **96**, 463 (1968).