

小柴胡湯のマウスリンパ球刺激作用
—漢方薬の薬物添加リンパ球刺激試験に関連して—

大嶽 信弘 渡辺 賢治

<原 著>

小柴胡湯のマウスリンパ球刺激作用 —漢方薬の薬物添加リンパ球刺激試験に関連して—

大嶽 信弘 渡辺 賢治

要 旨：薬物性肝障害の診断に頻用されるリンパ球刺激試験(DLST)に、漢方薬の持つマイトジェン活性が及ぼす影響を小柴胡湯とマウスリンパ球を用いて検討した。小柴胡湯は *in vitro* でマイトジェン活性を示し、これには主に甘草が寄与していた。小柴胡湯を投与したマウスの肝臓リンパ球では CD 3⁺ 細胞のポピュレーションと IL-2, IL-4, IFN- γ の産生が増加し、脾臓リンパ球でもサイトカイン産生の変化が認められた。脾臓リンパ球の各種マイトジェン (Concanavalin A, 抗 CD 3 抗体, lipopolysaccharide) による、もしくは漢方薬(小柴胡湯, 桂枝茯苓丸, 麻黄附子細辛湯)による幼若化反応は、小柴胡湯摂取群においてより増強されていた。小柴胡湯が *in vitro*, *in vivo* の双方で示すマイトジェン活性が漢方薬の DLST に抗原特異的でない影響を与える可能性が考えられた。

索引用語： 薬物性肝障害 薬物刺激リンパ球刺激試験(DLST) 漢方薬 小柴胡湯
マイトジェン活性

緒 言

本邦では薬物性肝障害の診断方法として、容易に実施できるため、薬物に対するリンパ球刺激試験 drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST) を重視した診断基準が汎用されているが、明らかに薬物による肝障害であると考えられるのに DLST が陽性とならない例が多数報告されている。この診断基準は漢方薬服用患者の副作用発症時における原因薬剤の判定にも多用されているが、多くの漢方薬およびその構成生薬に、*in vitro* アッセイにおけるポリクロナルなリンパ球幼若化(マイトジェン)活性が認められており¹⁻³⁾、漢方薬による DLST 偽陽性のために診断に苦慮した自己免疫性疾患の症例も報告されている⁴⁾。漢方薬を用いた DLST による陽性結果が特異的なリンパ球刺激を反映しているものかどうか疑問である場合も少なくなく、萬谷ら^{5,6)}は、漢方薬による肝障害の頻度や臨床像を正しく検討するためには正確な診断に基づく漢方薬の肝障害報告を集積していく必要性を報告している。最近、宇野ら⁷⁾は漢方薬非服用の健常者の末梢血リンパ球においても、小柴胡湯が DLST

陽性および白血球遊走阻止試験(LMIT)陽性を示し、その陽性率の高さが試験に供試する検体の調製法によって大きく左右されることを報告している。

漢方薬の DLST について問題を引き起こす可能性のある因子として、漢方薬の投与が生体の免疫系を賦活する可能性を持っていることが示唆されている。主に動物実験ではあるが、漢方薬の経口投与によってリンパ球のポピュレーション、サイトカイン産生能、NK 活性あるいはリンパ球増殖反応などの変化が多数報告されており⁸⁻¹⁰⁾、このため、同一の個体において漢方薬の投与後に現れるようになったリンパ球の反応性の変化が、抗原特異的な感作によるものではなく、免疫系のオーバーオールな活性化による可能性も考えられるからである。しかしながら、このような免疫系の活性化について、DLST との関係で検討を加えた報告はない。

我々は、遺伝的背景が均一と考えられる純系のマウスを用い、免疫調節作用が報告され^{8,11)}慢性肝炎治療薬として代表的な漢方薬である小柴胡湯について、*in vitro* におけるマウスリンパ球に対するマイトジェン活性、および小柴胡湯を経口投与したマウスの脾・肝リンパ球のマイトジェン活性を含む免疫薬理学的影響を検討したので、その結果に考察を加えて報告する。

材料および方法

薬物調製

1. 漢方薬エキス末の調製

DLST に供した薬物の調製は試験当日に行った。小柴胡湯、桂枝茯苓丸および麻黄附子細辛湯の各々の漢方薬は株式会社ツムラの賦形剤(ラクトース)を含まないエキス原末を用いた。各薬物の調製は各々 0.5 g のエキス原末(小柴胡湯: lot no. 240009020, 桂枝茯苓丸: lot no. 230025030, 麻黄附子細辛湯: lot no.

2990127010) を 5 ml の注射用精製水(大塚薬品)に加熱懸濁した後, 10% 非働化ウシ胎児血清(FBS)(大日本製薬)添加の RPMI-1640(Gibco BRL)(10% FBS/RPMI-1640 medium)で, 小柴胡湯は 50 または 62.5 倍希釈, 桂枝茯苓丸および麻黄附子細辛湯は 50 倍希釈し, 各々の溶液は 3000 rpm, 10 分間遠心後, さらに 0.45 μ m のミリポアフィルター(ミクロン膜)で濾過して不溶物を除去した澄明な溶液を 1% penicillin/spreptomycin, 10 mM HEPES, 50 μ M 2 ME, 2 mM L-glutamine および 10% FBS を含む RPMI-1640 medium(培養液)で希釈して用いた。

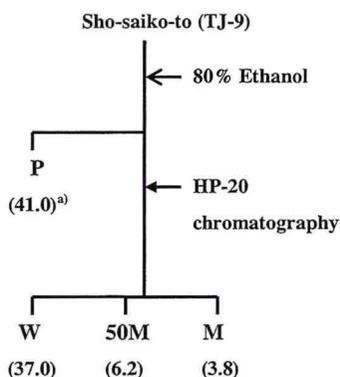
小柴胡湯の DLST における被検濃度は 10, 20, 40, 80 μ g/ml, または 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml を用い, 桂枝茯苓丸および麻黄附子細辛湯は 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml の濃度を用いた。

Table 1 に表記されている小柴胡湯の構成生薬, および分画画分の各エキス粉末は, 以下に述べる方法で作成した。すなわち構成生薬は, 柴胡, 半夏, 黄芩, 大棗, 甘草および生姜の熱水抽出エキスは漢方製剤エキス原末の調製法に準じて作成し, 不溶物を除去した澄明な溶液を被検濃度が 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml になるように調製した。分画画分は Fig. 1 に示した方法にて作成し, 不溶物を除去した澄明な各画分溶液の被

Table 1 Composition of Sho-saiko-to^{a)}

| Constituent herbs | Content (g) |
|-----------------------------|-------------|
| Bupleuri Radex (Saiko) | 7.0 |
| Pinnelliae Tuber (Hange) | 5.0 |
| Scutellariae Radix (Ohgon) | 3.0 |
| Zizyphi Fructus (Taiso) | 3.0 |
| Ginseng Radix (Ninjin) | 3.0 |
| Glycyrrhizae Radix (Kanzo) | 2.0 |
| Zingiberis Rhizoma (Shoyko) | 1.0 |

^{a)}: Indicated amounts of herbs were mixed and extracted with boil water to give 4.5 g Sho-saiko-to extract.

Major ingredients in the fractions of TJ-9^{b)}

| Fractions | Ingredients |
|-----------|--|
| P | polysaccharides, proteins |
| W | oligosaccharides, peptides |
| 50M | baicalin, liquiritin wogonin-7-O-glucuronoside |
| M | baicalin, liquiritin wogonin-7-O-glucuronoside glycyrrhizin, saikosaponin b2 |

Fig. 1 The spray-dried extracted powder of Sho-saiko-to (TJ-9) was dissolved in water, and ethanol was added to a final concentration of 80%. After centrifugation, the precipitate was evaporated to dryness (P fraction). The supernatant was dried, and then redissolved in water. The extract was chromatographed on HP-20 and eluted with water (W fraction), 50% methanol (50 M fraction), 100% methanol (M fraction). The eluents were lyophilized or evaporated to dryness. ^{a)}: Yield of P, W, 50% M and M fractions were expressed as % in TJ-9 dried powder. ^{b)}: Major ingredients of each fraction of TJ-9. The component of each fraction was analyzed by high performance liquid chromatography.

検濃度は収率を基準にして調製した。Fig. 1 に表したように、収率が 3.8% の M および 6.2% の 50 M は 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、また収率が 37.0% の W と 41.3% の P は 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各 4 濃度を用いた。

2. マイトジェン物質の調製

マイトジェン物質の調製は DLST 試験の当日に行った。Concanavalin A (Con A) および lipopolysaccharide (LPS) は SIGMA の製品を用い、マウス抗 CD 3 抗体は BD PharMingen の製品を用いた。マイトジェンは、注射用精製水と培養液で順次希釈し Con A は 62.5, 125, 250, 500 ng/ml 、抗 CD 3 抗体と LPS は 12.5, 25, 50, 100 ng/ml の被検濃度を用いた。

動物および漢方薬の投与

試験には、SPF 環境にて 1 ケージに 3 または 4 匹で飼育した 5 週令雄性の BALB/c マウス (日本チャールズリバー) を用いた。小柴胡湯は MF 飼料に 0.5 w/w % になるよう調製した混合飼料 (オリエンタルバイオサービス) としてマウスに 8 週間自由摂取させた。対照群として混合飼料と同時に調製した MF 飼料のみをマウスに 8 週間自由摂取させた。

リンパ球の解析とリンパ球幼若化試験

1. 組織の摘出

20 IU/ml のヘパリンナトリウム (吉富製薬) と 8.35 mg/ml のネプトール (大日本製薬) の混合液を 0.25 ml/head 静脈内投与し、腹大動脈を切開して放血致死させた後、脾臓および全肝臓を摘出した。

2. 脾臓リンパ球の調製

脾臓は細切し、70 μm のナイロンメッシュ上で潰し、5% FBS/RPMI-1640 medium に懸濁した後、遠心 (300 g, 5 min, 4°C) して得られた沈殿を ACK lysing buffer (NH_4Cl : 8.29 g, KHCO_3 : 1.0 g, Na_2EDTA : 37.2 mg/l , pH 7.2) にて溶血させ、細胞を 5% FBS/RPMI-1640 medium で 2 回洗浄した後、培養液に 2×10^6 cells/ml になるよう調製した。

3. 肝単核球の調製

安保らの方法¹²⁾ を若干の変更して行った。すなわち細切し、100 μm のナイロンメッシュ上で潰した肝臓を 10 mM HEPES を含む 2% FBS/RPMI-1640 (肝用 medium) に懸濁した後、遠心 (1200 rpm, 10 min, 4°C) して得られた沈殿を 100 IU/ml のヘパリンナトリウムおよび 35% percoll (Pharmacia) を含む肝用 medium に再浮遊させ、遠心 (2000 rpm, 15 min, 4°C) して沈殿させた。ACK lysing buffer で溶

血させ、培養液で 2 回洗浄した後、 2×10^6 cells/ml になるよう懸濁した。

4. 細胞集団の解析

細胞の表面抗体標識に用いた試薬は全て BD PharMingen の製品を使用した。細胞 (4×10^5) は $\text{Fc}\gamma\text{R}$ への抗体の非特異的な結合を予防するため、あらかじめマウス抗 CD 16/32 抗体で処理した後、PE-標識マウス抗 CD 19 抗体と FITC 標識マウス抗 CD 3 抗体、または PE-標識マウス抗 CD 11b 抗体と FITC-標識マウス抗 DX 5 抗体を冷暗所で 30 分間反応させ、2% FBS 含 phosphate buffer saline (PBS) で 2 回洗浄した。染色した細胞は FACScan (Becton Dickinson) を用いて分析し、データ処理は Cell Quest (Becton Dickinson) にて行った。

5. リンパ球のサイトカイン産生および測定

脾細胞および肝単核球は 96 ウェルフラットプレートに 1 ウェルあたり 2×10^5 cells になるよう播種し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス抗 CD 3 抗体 (145-2C11) 添加または非添加で 37°C, 5%- CO_2 インキュベーター内にて培養し、24 時間後の上清中の IL-2, IL-4 および IFN- γ のレベルを ELISA で測定した。各サイトカインの測定は BD PharMingen の OptEIA™ Mouse IL-2 Set, OptEIA™ Mouse IL-4 Set および OptEIA™ Mouse IFN- γ Set を用いた。

6. リンパ球刺激試験 (DLST)

5 と同様に播種した脾細胞を 37°C, 5%- CO_2 インキュベーターで 3 日間培養した後、 ^3H -thymidine を 18.5 kBq/well 加え、さらに 18 時間培養した後、Cell harvester (SKATRON) で培養リンパ球を glass filter に回収し、 ^3H -thymidine の細胞内取り込み量 (cpm) をシンチレーションカウンター (Beta Plate, Pharmacia Co.) で測定した。(3 ウェルの薬剤添加群の ^3H -thymidine 取り込み値の平均) / (3 ウェルの薬剤非添加群の ^3H -thymidine 取り込み値の平均) を刺激指数 (stimulation index : S.I.) とした。

統計学的解析

全てのデータは平均値 \pm 標準偏差として表示した。各群間の統計学的な解析は Unpaired student's t-test を用い、全ての試験において、危険率が 0.05 以下 ($p < 0.05$) を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 薬物刺激リンパ球刺激試験 (DLST) における小柴胡湯の *in vitro* での作用

まず、漢方薬を投与していない正常マウスの脾細胞

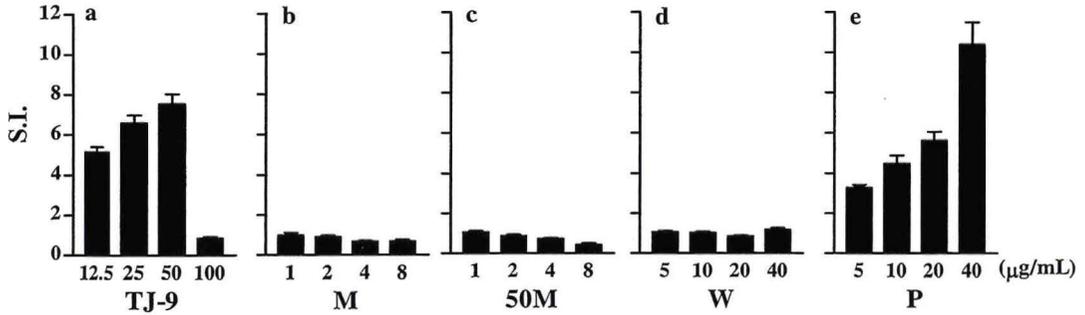


Fig. 2 Mitogenic activity of Sho-saiko-to (TJ-9) or it's fraction in murine splenocytes. Splenocytes were prepared as described in Materials and Methods. ^3H -thymidine incorporation was measured during the final 18 h of a 3 day incubation of splenocytes with various concentrations of TJ-9 or fractions. The results were expressed as mean \pm SEM of six determinations, which were calculated as follows : Stimulation Index (S.I.) = (mean cpm in 3 wells of each agent-treated group) / (mean of cpm in 3 wells of non (vehicle)-treated group).

の *in vitro* 培養系に、小柴胡湯、その分画画分および構成生薬を添加して DLST を行った。小柴胡湯は 12.5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで濃度依存的に S.I. 値を上昇させ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では最高値 (SI : 7.56) となり、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では非刺激以下のレベルまで低下した (Fig. 2)。TJ-9 分画画分のうち、S.I. を上昇させたのは P 画分 (最高値 SI : 10.37) のみであり、M 画分や 50 M 画分は抑制作用を示した (Fig. 2)。TJ-9 を構成する各生薬に対する DLST を行ったところ、2.5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の生薬エキス刺激において、甘草は最も大きく S.I. 値を上昇させた。また、柴胡も S.I. 値を濃度依存的に上昇させ、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 3.65 の S.I. 値を示した。黄芩は 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 4 前後の S.I. 値を示したが、それ以上の濃度では逆に S.I. 値を低下させた。半夏、大棗、人參、生姜は S.I. 値に顕著な影響を及ぼさなかった (Fig. 3)。

2. リンパ球細胞集団に及ぼす小柴胡湯摂取の影響

in vivo における TJ-9 のリンパ球への影響を検討するため、小柴胡湯を 8 週間連続摂取したマウス (以下 SST)、および非摂取のマウス (以下 Control) の脾細胞および肝単核球中の免疫担当細胞 (T 細胞, B 細胞, NK 細胞および単球) の比率を測定した。回収された脾細胞数は SST で $11.5 \pm 0.3 \times 10^7/\text{mice}$, Control では $11.0 \pm 0.2 \times 10^7/\text{mice}$ であり、一方、肝単核球数は SST で $2.55 \pm 0.20 \times 10^6/\text{mice}$, Control で $2.03 \pm 0.16 \times 10^6/\text{mice}$ であり、小柴胡湯による有意な影響はみられなかった。肝単核球のポピュレーションにおいて、DX $5^+\text{CD}11\text{b}^{\text{dull}+}$ cells (NK 細胞) およ

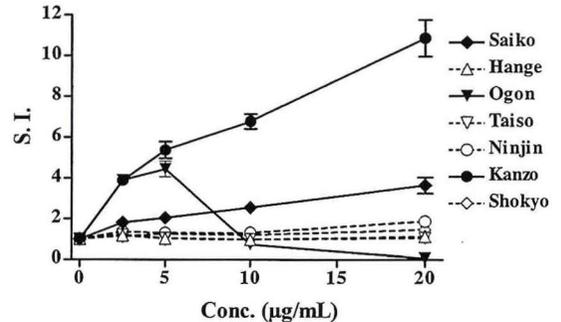


Fig. 3 Mitogenic activity of composite herb extracts of TJ-9 in splenocytes. Splenocytes were prepared as described in Materials and Methods. ^3H -thymidine incorporation was measured during the final 18 h of a 3 day incubation of splenocytes with various concentrations of herb extracts. The results were expressed as mean \pm SEM of six determinations, which were calculated as follows : Stimulation Index (S.I.) = (mean cpm in 3 wells of each herb extract-treated group) / (mean of cpm in 3 wells of non (vehicle)-treated group).

び DX $5^+\text{CD}11\text{b}^{\text{bright}+}$ cells (マクロファージ細胞) には群間の差は認められなかったが、SST の $\text{CD}3^+$ cells (T, NKT 細胞) は $46.5 \pm 1.8\%$ と、Control の $34.0 \pm 1.0\%$ に比較して有意に増加した。一方、脾細胞においては T 細胞等の細胞集団に群間の差はなかった (Table 2)。

Table 2 Effect of orally administered Sho-saiko-to (SST) on population in splenocytes (SPL) and hepatic mononuclear cells (HMNC)

| SPL | CD 3 ⁺ (%) | CD 19 ⁺ (%) | DX 5 ⁺ CD 11b ^{dim} (%) | DX 5 ⁻ CD 11b ^{bright} (%) |
|---------|------------------------|------------------------|---|--|
| Control | 32.7±0.7 ^{a)} | 54.6±0.5 | 3.7±0.1 | 1.1±0.1 |
| SST | 33.0±0.7 | 53.7±0.5 | 3.8±0.2 | 1.1±0.1 |

| HMNC | CD 3 ⁺ (%) | CD 19 ⁺ (%) | DX 5 ⁺ CD 11b ^{dim} (%) | DX 5 ⁻ CD 11b ^{bright} (%) |
|---------|-------------------------|------------------------|---|--|
| Control | 34.0±1.0 | 31.1±0.9 | 10.9±0.7 | 10.5±0.5 |
| SST | 46.5±1.8 ^{***} | 24.6±2.8 | 10.1±0.5 | 8.9±1.0 |

^{a)} : mean±SEM of 6 determinations^{***} : p<0.001 compared with control group**Table 3** Effect of orally administered Sho-saiko-to (SST) on cytokine productions in anti-CD 3 monoclonal antibody stimulated splenocytes (SPL) and hepatic mononuclear cells (HMNC)

| SPL | IL-2 (ng/ml) | IL-4 (ng/ml) | IFN- γ (ng/ml) |
|---------|--------------------------|--------------|-----------------------|
| Control | 0.98±0.05 | 0.09±0.01 | 2.04±0.29 |
| SST | 1.36±0.05 ^{***} | 0.12±0.01 | 2.96±0.18* |

| HMNC | IL-2 (ng/ml) | IL-4 (ng/ml) | IFN- γ (ng/ml) |
|---------|--------------------------|--------------|-----------------------|
| Control | 0.46±0.12 | 0.27±0.07 | 1.41±0.30 |
| SST | 0.93±0.19 ^{***} | 1.43±0.54* | 3.56±0.68* |

^{a)} : mean±SEM of 6 determinations^{***} : p<0.05, 0.001 compared with control group

3. リンパ球のサイトカイン産生に及ぼす小柴胡湯摂取の影響

SST および Control の脾細胞および肝単核球のサイトカイン産生能を測定した。リンパ球細胞集団の解析により、小柴胡湯は T 細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられたため、リンパ球を T 細胞マイトジェンである抗 CD 3 抗体 (145-2C11) で刺激し、培養 24 時間後の上清中に産生された IL-2、IL-4 および IFN- γ のレベルを測定した。肝単核球において、SST は IL-2、IL-4 および IFN- γ のレベルを Control のそれらに比較して有意に上昇させ、また、脾細胞においても、SST は IL-2 および IFN- γ のレベルを Control のそれらに比較して有意に上昇させた (Table 3)。抗 CD 3 抗体非刺激の脾細胞および肝単核球のサイトカインレベルは SST および Control 共

に測定限界以下であった。

4. 各種マイトジェンに対するリンパ球の反応性に小柴胡湯摂取が与える影響

経口摂取された漢方薬がリンパ球の各種マイトジェンへの反応性に及ぼす影響を検討するため、SST および Control の脾細胞に各種マイトジェン (Con A, 抗 CD 3 抗体, LPS) を添加し、それぞれの ³H-thymidine の取込みを比較検討した。これらのマイトジェンを optimal な用量で用いた場合には、それらの S.I. 値に影響を与えなかったが、suboptimal な用量で用いた場合には、SST はマイトジェンによる S.I. 値を増強した。すなわち、B 細胞マイトジェンである LPS 刺激において、SST は LPS の 25 ng/ml 濃度以上で S.I. 値は Control のそれらに比較して上昇し、100 ng/ml 濃度ではその上昇は有意なものであった (Fig.

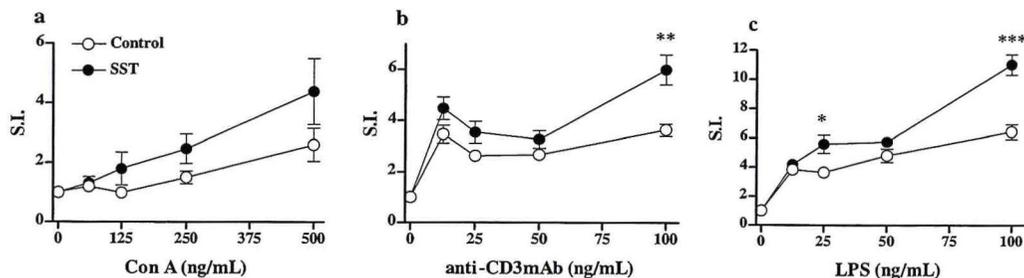


Fig. 4 The effect of oral TJ-9 administration on mitogenic response induced by various mitogenes. Mice were provided with normal diet (Control) or 0.5% Sho-saiko-to contained diet (SST) ad libitum for 8 weeks, and splenocytes were prepared as described in Materials and Methods. ^3H -thymidine incorporation was measured during the final 18 h of a 3 day incubation of splenocytes with various concentrations of mitogenes. The results were expressed as mean \pm SEM of six determinations, which were calculated as follows : Stimulation Index (S.I.) = (mean cpm in 3 wells of each mitogen-treated group) / (mean of cpm in 3 wells of non (vehicle)-treated group). Con A : concanavalin A, anti-CD 3 mAb ; anti-CD 3 monoclonal antibody, LPS ; lipopolysaccharide. *,**,*** ; $p < 0.05, 0.01, 0.001$, significantly from Control group.

Table 4 Composition of Keishi-bukuryo-gann (TJ-25)^{a)} or Mao-bushi-saishin-to (TJ-127)^{b)}

| Constituent herbs of TJ-25 | Content (g) | Constituent herbs of TJ-127 | Content (g) |
|---------------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|
| Cinnamomi Cortex (Keihi) | 3.0 | Ephedrae Herba (Mao) | 4.0 |
| Paeoniae Radix (Shakuyaku) | 3.0 | Asiasari Radix (Saishin) | 3.0 |
| Persicae Semen (Tounin) | 3.0 | Aconiti Tuber (heat-processed Bushi) | 1.0 |
| Hoelen (Bukuryo) | 3.0 | | |
| Moutan Radicis Cortex (Botanpi) | 3.0 | | |

^{a)} : Indicated amounts of herbs were mixed and extracted with boiled water to give 1.75 g Keishi-bukuryo-gann extract. ^{b)} : Indicated amounts of herbs were mixed and extracted with boiled water to give 1.5 g Mao-bushi-saishin-to extract.

4-c). また、T細胞マイトジェンである抗CD3抗体およびCon A刺激においても、12.5 ng/ml以上あるいは125 ng/ml以上の濃度でSSTのS.I.値はLPS刺激同様にControlのS.I.値より高く、100 ng/mlの抗CD3抗体刺激ではその上昇は有意なものであった (Fig. 4-a, b).

5. 漢方薬のDLSTに及ぼす小柴胡湯摂取の影響

小柴胡湯を摂取したマウスのリンパ球の、in vitroで添加された漢方薬に対する反応性を検討した。すなわち、SSTあるいはControlの脾細胞培養系に対して、摂取した漢方薬である小柴胡湯 (TJ-9)、Table 4に表すように小柴胡湯とは構成生薬が全く重複しない桂枝茯苓丸 (TJ-25) および麻黄附子細辛湯 (TJ-127) を添加し細胞の増殖を検討した。Controlの脾細胞に

対して、TJ-25、TJ-127もTJ-9同様増殖刺激活性を示した。20 $\mu\text{g/ml}$ 以上のTJ-9を添加した場合、SSTのリンパ球は軽度ではあるがControlのリンパ球より高いS.I.値を示し、20 $\mu\text{g/ml}$ ではその差は有意であった (Fig. 5-a)。TJ-25を添加した場合には、50 $\mu\text{g/ml}$ でやはりSSTがControlに対して有意に高いS.I.値を示したが、その他の濃度では特に影響を与えなかった (Fig. 5-b)。TJ-127刺激はTJ-9、TJ-25に較べて高いマイトジェン活性を示し、25~200 $\mu\text{g/ml}$ で濃度依存的にS.I.値を上昇させた。SSTのS.I.値はすべての濃度でControlのS.I.値に比較して有意に高値となり、200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では2倍近い高値に達した (Fig. 5-c)。

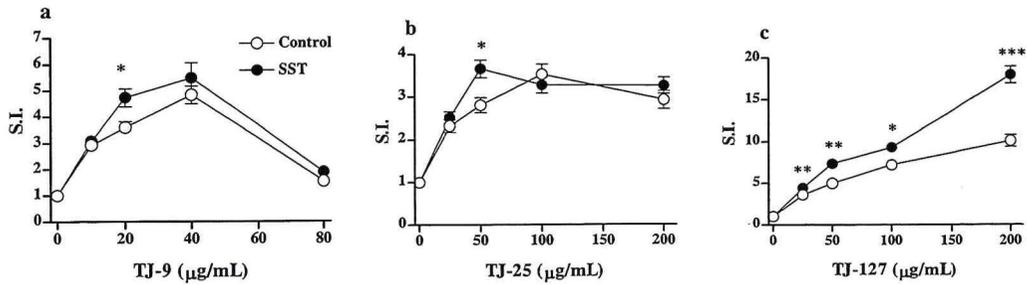


Fig. 5 The effect of oral TJ-9 administration on mitogenic response induced by various Kampo-medicines. Mice were provided with normal diet (Control) or 0.5% Sho-saiko-to contained diet (SST) ad libitum for 8 weeks, and splenocytes were prepared as described in Materials and Methods. ^3H -thymidine incorporation was measured during the final 18 h of a 3 day incubation of splenocytes with various concentrations of Kampo-medicines. The results were expressed as mean \pm SEM of six determinations, which were calculated as follows: Stimulation Index (S.I.) = (mean cpm in 3 wells of each Kampo-medicine-treated group)/(mean of cpm in 3 wells of non (vehicle)-treated group). TJ-9; Sho-saiko-to, TJ-25; Keishi-bukuryo-gann, TJ-127; Mao-bushi-saishin-to. *,**,***,****; $p < 0.05, 0.01, 0.001$, significantly from Control group.

考 察

我々はまず、小柴胡湯に暴露されていない無処置 BALB/c マウスの脾細胞を用い、小柴胡湯の DLST を実施した。漢方薬あるいは生薬エキスの水溶液中の不溶物は凝集素として強いリンパ球刺激活性あるいは細胞毒性を示すので(宇野ら⁷)、および未発表データ)、添加する漢方薬および生薬エキス水溶液は遠心とフィルトレーションによって不溶物を除去し、澄明な溶液としてから用いた。TJ-9 は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で最も強いマイトジェン活性を示し、その 2 倍の濃度では逆に著しくマイトジェン活性を抑制したが、このような小柴胡湯のベルシェイブ型の作用はヒト末梢血リンパ球を用いた池本ら¹³)の研究でも報告されている。Fig. 2 に示したように、小柴胡湯にはリンパ球増殖を活性化する分画 P と逆に活性化を抑制する分画 M、50 M が共に含まれているので、これらの相反する作用をもつ成分のバランスによって複雑な作用を示すのかもしれない。構成生薬のうちでは甘草、柴胡に強いリンパ球刺激能を認めたが、これはマウスの脾細胞を用いた Matsuura¹⁴)、Oka¹⁵) および Yamada¹⁶) らの報告、ヒト末梢血リンパ球を用いた Tachibana らの報告¹⁷) と一致している。甘草では多糖類画分がマイトジェン活性成分として¹⁶)、また、柴胡からは B 細胞マイトジェンとして lignin 様の高分子が同定されている¹⁸) が、今回強いマイトジェン活性を示した P 分画には多糖類や蛋白などの高分子が多く含まれてお

り、小柴胡湯に含まれるマイトジェンが高分子を主体としている可能性が考えられる。活性の強さと配合比からすると小柴胡湯の *in vitro* でのリンパ球幼若化活性は主に甘草によると推定される。甘草は保険適用が認められている漢方処方の 70% 以上の処方に配合されていることから、多くの漢方薬の DLST 試験においてこれらの生薬のマイトジェン活性が影響を及ぼす可能性がある。

一方、主に動物実験ではあるが、漢方薬には種々の免疫調節作用が知られている。抗癌・抗腫瘍作用が報告されている十全大補湯は C57BL/6 マウスの肝単核球中の NKT 細胞のポピュレーションを増加させ¹⁹)、また補中益湯はマウスの免疫応答を Th 1 タイプに誘導²⁰⁻²³) する。また、当帰芍薬散はマウスの免疫応答を Th 2 タイプに誘導させることが報告されている²⁴)。我々は小柴胡湯の自由飲水投与が、肝単核球の IL-6 産生や LPS 惹起肺障害に対してマウスの系統によって全く異なる影響を与えることを既に報告している^{25,26})。本試験においても、混餌によって自由摂取された小柴胡湯は BALB/c マウスの肝単核球の CD 3 陽性細胞 (T, NKT 細胞) のポピュレーションと抗 CD 3 抗体刺激時のサイトカイン産生能に影響を及ぼし、脾細胞についてはポピュレーションこそ変化させなかったものの、サイトカイン産生能を亢進させた。このとき、脾臓リンパ球に比べて肝臓のリンパ球の動きの方がより顕著であったが、これには二つの可

能性が原因として考えられる。まず、肝臓には、特異抗原によらずに活性化されるNK細胞やNKT細胞が他の臓器リンパ球より著しく多く、類洞には $\alpha\beta$ T細胞より多彩な抗原を認識する $\gamma\delta$ T細胞も豊富に存在することが報告されている¹²⁾。このような構成細胞の相違が、漢方薬成分に対する反応性の違いを引き起こしている可能性が考えられる。次に、経口投与された薬物は腸管吸収され門脈によって運ばれてまず肝臓に達するため、肝臓の免疫細胞は、末梢の免疫細胞に比べて、肝臓で代謝排泄されて末梢血にまで循環しないような漢方薬成分にも暴露される可能性が高い。実際、山田ら²⁷⁾は、柴胡に含まれるペクチン性多糖(経口投与でマクロファージ活性化作用を示す)が、末梢血中には検出されないものの、消化管により吸収されて肝臓にまで達することをELISAによる測定法を用いて明らかにしている。

本研究では小柴胡湯を経口摂取したマウスの脾細胞をマイトジェン物質(Con A, 抗CD3抗体, LPS)で刺激することにより高い幼若化反応を示すことが認められた。刺激剤として小柴胡湯およびマイトジェン活性を有する漢方薬、桂枝茯苓丸、麻黄附子細辛湯を用いた場合には、小柴胡湯、桂枝茯苓丸においてはその増強作用は顕著ではないものの、いずれも非摂取群より低濃度でピーク値に達し、麻黄附子細辛湯においては全濃度において非摂取群に対して有意なS.I.値の上昇を認め、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では小柴胡湯摂取群、非摂取群のS.I.値の比は1.8倍に達した。このことは、漢方薬を用いたDLST試験においては、単にin vitroで添加した漢方薬の有するマイトジェン活性だけではなく、漢方薬服用によってリンパ球の反応性自体が高まっている可能性にも留意しておく必要を示唆している。これに関して萬谷らの報告²⁸⁾は興味深い。すなわち、漢方薬を投与した患者においては、麻黄を用いたDLST試験で非服用者より高い陽性率を示すが、麻黄を含まない漢方薬を服用した患者でも同様の現象が見られた。この点について、原報では、麻黄を含有しない漢方薬にも麻黄にも含まれる共通成分によってリンパ球が感作された可能性が考察されているが、もうひとつの可能性として、漢方薬服用によってリンパ球の活性化が起りやすくなっていたために、ポリクロナル・マイトジェンである麻黄の刺激によってより高いS.I.値が漢方薬服用者で得られたとも考えられる。

in vitroでもin vivoでも作用を示すような多様な免疫調節物質を含む上に、経口剤であるために、それ

らの成分の多くがそのままの形で血中に移行しないことが知られている漢方薬については、DLSTの適用と結果の解釈には十分な注意が求められるように思われる。漢方薬の副作用については、間質性肺炎や低カリウム血症などがよく知られているが、漢方薬の普及に伴い、最近では漢方薬によると思われる薬物性肝障害なども報告が増えつつある。また、健康食品や民間薬などによる肝障害などの健康被害も増加の一途を辿っている。これらの食品や薬物にも多様な免疫調節物質が含まれていると推定され、上述の漢方薬のDLSTと同様の問題が起こる可能性が考えられる。薬物性肝障害の確実な診断と原因物質の究明のためには、DLSTの感度の向上や手順の標準化とともに、これらのDLST試験において偽陽性の発生が報告されたり、推定されたりする薬物(β ラクタム系抗生剤やメトトレキセートなどにも偽陽性の報告がある)に適応可能なようにDLSTを改良したり、あるいは全く新しい診断方法を開発する必要がある。これは非常に難しい課題ではあるが、たとえば、人工胃液や腸内細菌、代謝酵素などによって漢方薬や食品を処理して、実際に体内に存在すると思われる成分に変換する技術と、活性化リンパ球をマスとしてではなくより精密なポピュレーションとして、あるいは単一細胞レベルで、同定できるフローサイトメトリー技術を組み合わせれば、現在の技術の延長線上でも、DLSTの精度を高めることは可能であろう。また、現在、実験的にはMHCに捕捉されている抗原peptideを溶出させて単離同定することなども可能になっていることから、患者が反応する抗原そのものを患者のリンパ球から直接単離同定するといったような診断法も将来的には実現されるかもしれない。いずれにせよ、そのためには、これらの食品や薬物に含まれる免疫調節成分の特性を詳細に解明することが今後ますます重要と考えられる。

結 語

マウスの脾細胞を用いた検討で、小柴胡湯に含まれるポリクロナル・マイトジェンがそれ自身薬物添加リンパ球刺激試験(DLST)に非抗原特異的な反応を惹起するだけでなく、小柴胡湯の投与によって免疫系が賦活化されリンパ球が易刺激性を獲得することによっても、小柴胡湯を用いたDLSTの結果に非抗原特異的な影響を与える可能性が示唆された。

文 献

- 1) 難波恒雄, 沢 和子, 橋本泰徳, 他 : 免疫調節を有する薬物の開発研究 I. 伝統医学においてアレルギー疾患に用いられる生薬のリンパ球に対する幼若化活性について. 和漢医薬誌 6 : 32-39, 1989
- 2) 山田陽城, 清原寛章, 趙 吉福, 他 : 十全大補湯の免疫調節活性に対する構成生薬の影響. 和漢医薬誌 7 : 288-289, 1990
- 3) 熊沢義雄, 中鶴陽子, 西村千昭, 他 : 苦参から T-mitogenic lectin の分離. 和漢医薬誌 1 : 182-183, 1984
- 4) 萬谷直樹, 小暮敏明, 貝沼茂三郎, 他 : 漢方薬に対するリンパ球幼若化試験偽陽性のため診断に苦慮した自己免疫疾患の2例. 肝臓 42 : 460-464, 2001
- 5) 萬谷直樹, 小暮敏明, 貝沼茂三郎, 他 : 漢方薬による肝障害報告の再検討ーリンパ球幼若化試験偽陽性の問題と関連してー. 肝臓 43 : 282-287, 2002
- 6) Mantani N, Kogure T, Sakai S, et al : Incidence and clinical features of liver injury related to Kampo (Japanese herbal) medicine in 2,496 cases between 1979 and 1999 : problems of the lymphocyte transformation test as a diagnostic method. *Phytomedicine* 9 : 280-287, 2002
- 7) 宇野勝次, 阿部 学, 高中宏一郎 : 小柴胡湯のヒトリンパ球に対する免疫薬理作用ー薬剤添加リンパ球刺激試験と白血球遊走阻止試験における小柴胡湯の抗原調製の検討ー. 医療薬学 27 : 307-316, 2001
- 8) Borchers AT, Sakai S, Henderson GL, et al : Shosaiko-to and other Kampo (Japanese herbal) medicines : a review of their immunomodulatory activities. *J Ethnopharmacol* 73 : 1-13, 2000
- 9) Kaneko M, Kawakita T, Yamaoka Y, et al : Development of susceptibility to oral tolerance infection in infant mice administered a herbal drug, Hochu-ekki-to (Bu-Zhong Qi-Tang). *Int Immunopharmacol* 1 : 219-227, 2001
- 10) Ikeda Y, Iizuka A, Amagaya S, et al : Anti-type I allergic mechanisms of Mao-bushisaishin-to in mice. *Jpn J Pharmacol* 82 : 29-30, 2000
- 11) Yamashiki M, Nishimura A, Huang XX, et al : Effect of the Japanese herbal medicine "Sho-saiko-to" (TJ-9) on interleukin-12 production in patients with HCV-positive liver cirrhosis. *Dev Immunol* 7 : 17-22, 1999
- 12) 山際 訓, 安保 徹 : 胆肝腺構成細胞の分離培養法とその応用 : 肝臓. 胆肝腺 35 : 879-887, 1997
- 13) 池本吉博, 溝口靖紘, 新井孝之, 他 : 小柴胡湯および大柴胡等の in vitro における抗体産生に及ぼす影響. 和漢医薬誌 1 : 235-242, 1984
- 14) Mutsumura K, Kawakita T, Nakai S, et al : Role of B-lymphocytes in the immunopharmacological effects of a traditional Chinese medicine, Xiao-chai-hu-tang (shosaiko-to). *Int J Immunopharmacol* 15 : 237-243, 1993
- 15) Oka H, Ohno N, Iwanaga S, et al : Characterization of mitogenic substances in the hot water extracts of Bupleuri Radix. *Biol Pharm Bull* 18 : 757-765, 1995
- 16) Yamada H, Kiyohara H, Takemoto N, et al : Mitogenic and complement activating activities of the herbal components of juzen-taiho-to. *Planta Med* 58 : 166-170, 1992
- 17) Tachibana Y, Kawanishi K : Mitogenic activities in the protein fractions of crude drugs. *Planta Med* 58 : 250-254, 1992
- 18) Izumi S, Ohno N, Kawakita T, et al : Wide range of molecular weight distribution of mitogenic substance(s) in the hot water extract of a Chinese herbal medicine, Bupleurum chinese. *Biol Pharm Bull* 20 : 759-764, 1997
- 19) Matumoto T, Sakurai MH, Kiyohara H, et al : Orally administered decoction of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacology* 46 : 149-161, 2000
- 20) Ishimitu R, Nishimura H, Kawauchi H, et al : Dichotomous effect of a traditional Japanese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang on allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol* 1 : 857-865, 2001
- 21) Yamaoka T, Kawakita T, Nomoto K : Protective effect of a traditional Japanese medi-

- cine Hoch-ekki-to (Chinese name : Bu-zhong-yi-qi-tang), on the susceptibility against *Listeria monocytogenes* in infant mice. *Int Immunopharmacol* 1 : 1669–1677, 2001
- 22) Li T, Tamada K, Abe K, et al : The restoration of the antitumor T cell response from stress-induced suppression using a traditional Chinese herbal medicine Hochu-ekki-to (TJ-41 : Bu-Zhong Yi-Qi-Tang). *Immunopharmacology* 43 : 11–21, 1999
- 23) Nakada T, Watanebe K, Matsumoto T, et al : Effect of orally administered Hochu-ekki-to, a Japanese herbal medicine, on contact hypersensitivity caused by repeated application of antigen. *Int J Immunopharmacol* 2 : 901–911, 2002
- 24) 早川 智, 千島史尚, 幾石尚美, 他 : 習慣性流産に対する漢方薬の治療効果に関する実験的研究 ; TH 1/TH 2 の視点より. 産婦人科漢方研究のあゆみ 16 : 80–83, 1999
- 25) Ohtake N, Suzuki R, Daikuhara H, et al : Modulation of lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine Sho-saiko-to. *Int J Immunopharmacol* 22 : 419–430, 2000
- 26) Ohtake N, Nakai Y, Yamamoto M, et al : The herbal medicine Shosaiko-to exerts different modulating effects on lung local immune responses among mouse strains. *Int Immunopharmacol* 2 : 357–366, 2002
- 27) 山田陽城 : 漢方薬の薬効の基礎研究による解明 *Prog. Med.* 15, 2630–2642, 1995
- 28) 萬谷直樹, 松田浩巳, 田原英一, 他 : 漢方薬に対するリンパ球幼若化試験の信頼性に関する予備研究. *日本東洋医学誌* 51 : 1093–1099, 2001

The immunostimulatory effects of a traditional herbal (Kampo) medicine, Sho-saiko-to in mice : A possible influence on drug-induced lymphocyte stimulation test

Nobuhiro OHTAKE, Kenji WATANABE

We evaluated the effects of Kampo-medicines (Sho-saiko-to, Keishi-bukuryo-gann and Mao-bushi-saishin-to), or various mitogens (concanavalin A, anti-CD 3 monoclonal antibody and lipopolysaccharide) on drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST). BALB/c mice were administered orally with Sho-saiko-to (SST) or vehicle (Control). In Control splenocytes, Sho-saiko-to showed mitogenic activity, and the constituent herb Kanzo had the strongest activity. In SST splenocytes, cytokine production by anti-CD 3 and mitogenic response by all mitogenes and medicines were enhanced. Some modulations in immune response were found also in SST hepatic mononuclear cells. The immunostimulatory activity of Sho-saiko-to, as a polyclonal mitogen in vitro and as an immunopotentiator in vivo, may confuse the diagnosis for side effects of Kampo-medicines using DLST.

Department of Oriental Medicine, Keio University School of Medicine (Tokyo)