

肝類洞内皮細胞の血小板活性化因子及びインターロイキン 1 産生に 及ぼす麻黄附子細辛湯の影響

溝口 靖紘,^{a)}市川 裕三,^{a)}河田 則文,^{a)}小林 絢三,^{a)}森沢 成司^{b)}

^{a)}大阪市立大学医学部第三内科学教室, ^{b)}大阪市立大学医学部第一生化学教室

Effects of Mao-bushi-saishin-to on the synthesis of platelet activating factor (PAF) and interleukin-1 (IL-1) in isolated mouse hepatic sinusoidal endothelial cells

Yasuhiro MIZOGUCHI,^{a)} Yuzo ICHIKAWA,^{a)} Norifumi KAWADA,^{a)} Kenzo KOBAYASHI^{a)} and Seiji MORISAWA^{b)}

^{a)}The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School

^{b)}The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

(Received January 23, 1990. Accepted March 23, 1990.)

Abstract

The effect of Mao-bushi-saishin-to (Ma-Huang-Fu-Zi-Xi-Xin-Tang) on the synthesis of platelet activating factor (PAF) and interleukin-1 (IL-1) in isolated hepatic sinusoidal endothelial cells of mice was studied. Mao-bushi-saishin-to inhibits the calcium ionophore A23187-induced synthesis of PAF and lipopolysaccharide-induced IL-1 synthesis in mice hepatic sinusoidal endothelial cells. Mao-bushi-saishin-to also inhibits the spontaneous synthesis of IL-1 in mice hepatic sinusoidal endothelial cells. These results indicate that Mao-bushi-saishin-to inhibits the synthesis of PAF and IL-1 in isolated mice hepatic sinusoidal endothelial cells.

Key words hepatic sinusoidal endothelial cell, platelet activating factor (PAF), interleukin 1 (IL1), Mao-bushi-saishin-to (Maô-busi-saisin-tô).

Abbreviations CaI, calcium ionophore; Con A, concanavalin A; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GBS, Gey's balanced salt solution; HBSS, Hanks' balanced salt solution; HEPES, *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-etane-sulfonic acid; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; NK, natural killer; PAF, platelet activating factor; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; ³H-TdR, tritiated thymidine; Mao-bushi-saishin-to (Ma-Huang-Fu-Zi-Xi-Xin-Tang), 麻黄附子細辛湯.

緒 言

最近, 血管内皮細胞よりインターロイキン (IL) 1 が産生されることが報告され¹⁾, 肝類洞内皮細胞からも IL1 が産生され, 肝局所の免疫および炎症反応に役割を果たしていると考えられる。

一方, 血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) は最初血小板を活性化する因子として報告されたが²⁾, 最近では多方面の機能を有する chemical mediator として注目をあびている³⁾。例え

ば, PAF はアラキドン酸カスケード系のうちロイコトリエン B₄ 産生を誘導して炎症反応の増進に関与するばかりでなく⁴⁾, natural killer (NK) 活性や IL1 産生増強を介して免疫反応の modulator として作用することが明らかにされている⁵⁾。

さて, 気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患の治療に繁用される処方に麻黄附子細辛湯があり⁶⁻⁸⁾, その薬理作用としては好塩基球からの histamine release の抑制, basophilic leukemia cells の lipoygenase の活性抑制⁹⁾ および I 型, IV 型アレルギー反応抑制等¹⁰⁾ が報告されている。以

*〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
1-5-7, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

上のように麻黄附子細辛湯は抗炎症および抗アレルギー作用を有することが明らかにされている。

著者らも麻黄附子細辛湯のもつ抗炎症作用に注目して、これまでに麻黄附子細辛湯が免疫学的に誘導した肝細胞障害を著明に改善することを報告した。¹¹⁾

以上のような観点から著者らは麻黄附子細辛湯の肝細胞障害の改善作用を肝の局所において解析するため、肝類洞内皮細胞の産生するサイトカイン、特に今回は炎症反応に関与すると考えられる PAF および IL1 産生に対して麻黄附子細辛湯の及ぼす影響について検討した。

材料と方法

(1) 材料：マウスは BALB/c マウス (6 週齢) を用い、クレア社から購入した。マウス肝類洞内皮細胞を分離する際に用いた pronase E は Merck 社から、collagenase type IV は和光純薬から、HEPES (*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) は Sigma 社から、metrizamide (2-(3-acetamido-5-*N*-methylacetamide-2,4,6-triiodobenzamido)-2-deoxy-D-glucose) は Sigma 社から、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) disodium salt は和光純薬からそれぞれ購入した。Calcium ionophore (CaI) A23187 は Sigma 社から、lipopolysaccharide (LPS) は *Salmonella enteritidis* 由来のもので Difco 社から購入した。Tritiated thymidine (³H-TdR) は NEN 社から購入した。Tyrode 液は Tyrode 粉末 (Sigma 社) 9.78/l, L-serine 2.1 g/l, セラチン 1 g/l, ホウ酸 1.237 g/l および重曹 1.0 g/l を蒸留水に加え、pH 7.3 に調整した。なお、麻黄附子細辛湯エキスは小太郎漢方製薬株式会社より提供され、麻黄、細辛、炮附子を重量比 4 : 3 : 1 に混合し、約 10 倍量の水にて加熱抽出し、冷却濾過、減圧濃縮、凍結乾燥して得たものである。エキス収率は、使用した生薬重量の 15% であった。また、PAF 標準品としては小野薬品工業株式会社より供与された ONO-6002 を用いた。

(2) 肝類洞内皮細胞の分離：6 週齢の BALB/c マウスの腹腔内にペントバルビタール 1 mg を注入して麻酔後開腹して門脈を露出し、カテーテルを挿入した。このカテーテルからまず Ca⁺⁺-free HEPES 加 HBSS (Hanks' balanced salt solution) 溶液 10 ml を流し、続いて 0.05% collagenase を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 10 ml, 0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 10 ml を

それぞれ流速 3 ml/min で流した。灌流後、肝臓を摘出して眼科用バサミで細切し、0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 50 ml 中に入れて 37℃ で 20 分間、振盪、消化した。未消化物をガーゼで濾過したのち遠心 (400 g, 10 min, 4℃) により cell debris を取り除いた。得られた cell pellet を 5 ml の GBS (Gey's balanced salt solution) 溶液に浮遊させ、30% の metrizamide 溶液 7 ml と混合して、遠心 (1400 g, 15 min, 4℃) した。最上相の肝非実質細胞相をとり、洗浄後、HBSS 溶液で 1×10^6 cells/100 ml に調整した。この細胞浮遊液から Knook ら¹²⁾ の方法に準じて、SRP6Y 型エルトリエータ・ロータ (日立工機製) を用いて肝類洞内皮細胞を分離した。なお、この細胞浮遊液を電顕で検討すると 92% は肝類洞内皮細胞であった。

(3) マウス肝類洞内皮細胞からの PAF 産生誘導と PAF 抽出：上述のようにして調製した肝類洞内皮細胞を HBSS 溶液で 2 回洗浄し、Tyrode 液に浮遊させ 1×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液に既報¹³⁾のごとく $1 \mu\text{g/ml}$ の CaI A23187 を加えて一定時間培養した。培養終了後、直ちに氷冷した 2.5 倍容のメタノールと 1.5 倍容の蒸留水を加えて反応を停止させた。超音波処理で細胞を破壊した後、3,000 rpm ($1,500 \times g$) で 10 分間遠心して上清を採取した。この上清より Pinckard ら¹⁴⁾の方法に準じて PAF を抽出した。すなわち、上清に 0.95 倍容のクロロホルムと 0.8 倍容の蒸留水を加えて激しく振盪し、3,000 rpm ($1,500 \times g$) で 10 分間遠心した後、クロロホルム層を採取した。このクロロホルム層を窒素ガス存在下で蒸発乾固した後、100 μl のエタノールを加えて溶解し PAF 活性測定の試料とした。

(4) PAF 産生に及ぼす麻黄附子細辛湯の影響：肝類洞内皮細胞 (1×10^6 cells/ml) に各種濃度の麻黄附子細辛湯を添加して一定時間培養した。培養後、CaI A23187 ($1 \mu\text{g/ml}$) を加えて既報¹³⁾のごとく 20 分間培養した後、上述の方法により PAF を抽出し、試料中の PAF 活性を測定した。

(5) PAF 活性の測定：PAF 活性はモルモット洗浄血小板の凝集を用いたバイオアッセイにより行った。PAF 標準品としては ONO-6002 を使用した。Benveniste ら¹⁵⁾の方法に準じてモルモット洗浄血小板を調製し、その 500 μl に PAF 標準品または PAF 活性測定試料をそれぞれ 5 μl 添加し、凝集計 (Lumi Aggregation Module Model 1010 : Payton Associate) を用いて最大凝集率を測定した。各種濃度の PAF 標準品の最大凝集率より標準曲線を作

成し、これをもとに試料中の PAF 濃度を決定した。PAF 活性測定に当たっては adenosine diphosphate および thromboxane A₂ による凝集を除外するために creatine phosphate, creatine phosphokinase および indomethacin 存在下で測定を行った。

(6) マウス肝類洞内皮細胞からの IL1 産生：上述のようにして調製した肝類洞内皮細胞を HBSS 溶液を用いて 2 回洗浄し、10%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 溶液で 5×10^5 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液を 1 ml ずつプラスチックプレート (Falcon 3047) に注入し、10 μ g/ml の LPS を添加して 18 時間培養した。反応停止後、遠心 (400 g, 10 min, 4 °C) して、その上清を回収し、IL1 測定用のサンプルとした¹⁶⁾。サンプルは測定まで -80 °C に凍結保存した。

(7) IL1 産生に及ぼす麻黄附子細辛湯の影響：肝類洞内皮細胞 (5×10^5 cells/ml) に各種濃度の麻黄附子細辛湯を添加して、一定時間培養した。培養後、LPS を加えて、さらに 18 時間培養し、上清中の IL1 活性を測定した。なお、麻黄附子細辛湯の濃度が 1000 μ g/ml 以下では細胞生存率には影響を及ぼさなかった。

(8) IL1 の測定：IL1 は Simon ら¹⁷⁾ の方法に準じて測定した。すなわち、C₃H/HeJ マウスの胸腺細胞を摘出し、5%ウシ胎児血清および 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI 1640 培養液で 5×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を調製した。この浮遊液を 100 μ l ずつ 96 穴プレート (Falcon 3047) に注入し、concanavalin A (Con A) を最終濃度 0.75 μ g/ml となるように添加し、さらに、LPS 刺激肝類洞内皮細胞培養上清液を 100 μ l ずつプレートに添加し、37 °C, 5% CO₂ の条件下で 44 時間培養した。培養後、0.5 μ Ci/10 μ l の ³H-TdR を添加し、さらに 24 時間培養し、培養後 cell harvester を用いてフィルター上に細胞を集め、細胞への ³H-TdR のとり込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。なお、コントロールとしてサンプルの代わりに medium を添加した。

(9) 統計学的検討：実験データはすべて mean $\pm$ S.E.M. であらわし、有意差検定は Student's *t* test にて行った。

結 果

1. 肝類洞内皮細胞の PAF 産生に及ぼす麻黄附子細辛湯の影響

肝類洞内皮細胞 (1×10^6 cells/ml) に各種濃度の麻黄附子細辛湯を添加し、30 分間培養した。培養後 1 μ g/ml の CaI A23187 を添加して、さらに 20 分間培養して PAF 産生量を検討した。その結果、Fig. 1 に示すように肝類洞内皮細胞の PAF 産生量は麻黄附子細辛湯の濃度依存性に低下し、10 μ g/ml 以上の濃度の麻黄附子細辛湯添加で、非添加群に比して有意に低値を示した ($p < 0.01$, $n = 5$)。

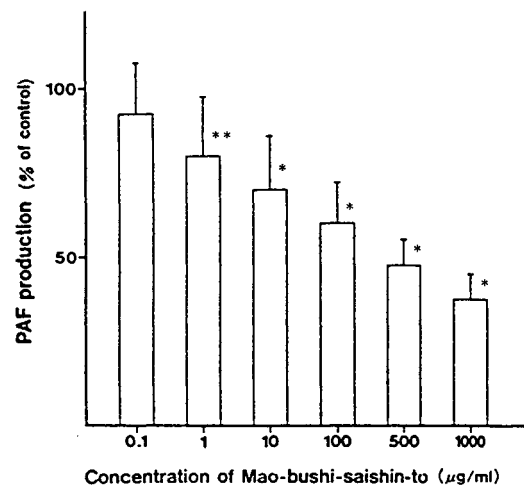


Fig. 1 Effect of Mao-bushi-saishin-to on the production of PAF from sinusoidal endothelial cells.

* $p < 0.01$ (compared with control), ** $p < 0.05$ (compared with control).

次に、肝類洞内皮細胞に 100 μ g/ml の麻黄附子細辛湯を添加し、経時的に培養し、その後に 1 μ g/ml の CaI A23187 を添加して PAF 産生量を検討した。その結果、Fig. 2 に示すように麻黄附子細辛湯 (100 μ g/ml) を添加して 30 分間培養し、その後に CaI A23187 を添加した時が最も PAF 産生量は低下し、麻黄附子細辛湯添加 0 分培養群 (0.77 ± 0.04 pmole/ 1×10^6 cells, $100.0 \pm 5.2\%$) に比して 0.40 ± 0.11 pmole/ 1×10^6 cells と 0 分培養群の $52.3 \pm 14.8\%$ にまで低下した ($p < 0.01$, $n = 5$)。

なお、肝類洞内皮細胞に麻黄附子細辛湯のみを添加し、30 分間培養後 PAF 産生を誘導したが、PAF は検出されなかった。

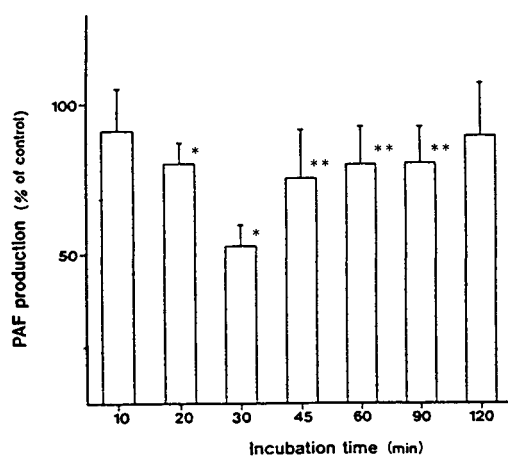


Fig. 2 Effect of Mao-bushi-saishin-to on the production of PAF from sinusoidal endothelial cells.

* $p < 0.01$ (compared with control), ** $p < 0.05$ (compared with control).

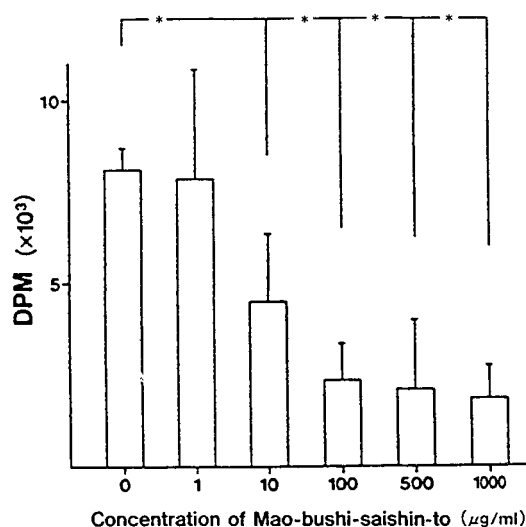


Fig. 3 Effect of Mao-bushi-saishin-to on the production of interleukin 1 from sinusoidal endothelial cells.

* $p < 0.01$ (compared with control).

2. 肝類洞内皮細胞の IL1 産生に及ぼす麻黄附子細辛湯の影響

肝類洞内皮細胞 (5×10^5 cells/ml) に各種濃度

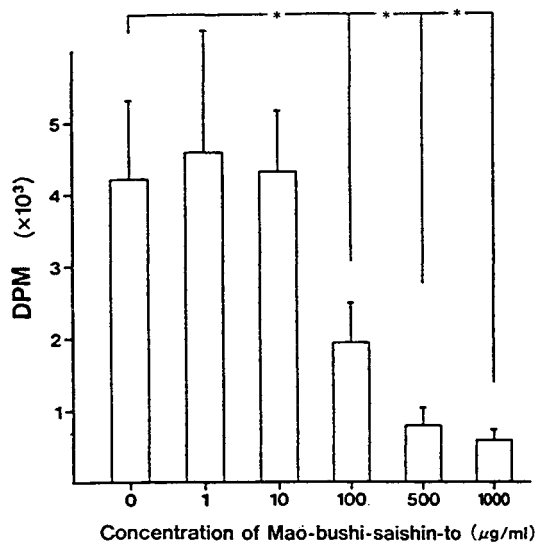


Fig. 4 Effect of Mao-bushi-saishin-to on the production of interleukin 1 from sinusoidal endothelial cells.

* $p < 0.01$ (compared with control).

の麻黄附子細辛湯を添加し、30分間培養した。培養後 $10 \mu\text{g/ml}$ の LPS を添加して、さらに18時間培養して IL1 産生量を検討した。その結果、Fig. 3 に示すように肝類洞内皮細胞の IL1 産生量は濃度依存性に低下し、麻黄附子細辛湯 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度以上で有意に低下した ($p < 0.01$, $n=5$)。

次に、肝類洞内皮細胞 (5×10^5 cell/ml) に各種濃度の麻黄附子細辛湯の添加し、24時間培養して IL1 産生量を検討した。その結果、Fig. 4 に示すように肝類洞内皮細胞の IL1 は LPS 非添加でも誘導され、麻黄附子細辛湯 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、その IL1 誘導は有意に抑制された ($p < 0.01$, $n=5$)。

考 察

著者らは嫌気性グラム陽性菌である *Propionibacterium acnes* 加熱死菌を動物に静注して、7日後に微量の LPS を追加静注すると、ほとんどの動物は広範な肝細胞壊死を伴って24時間以内に死亡することを見出した¹⁸⁾。この実験モデルを用いて肝浸潤マクロファージから IL1 および PAF が産生されること、^{13,16)} また肝浸潤マクロファージから IL1 の産生を抑制すると肝細胞障害が著明に改善すること、¹⁹⁾ PAF レセプターの拮抗剤である ONO-6240 を投与すると同様に肝細胞障害が改善することを認め

た。²⁰⁾

一方、麻黄附子細辛湯は麻黄、細辛および炮附子の三種の生薬から構成される漢方方剤であり、抗アレルギー作用を有することから、感冒、気管支炎およびアレルギー性鼻炎に用いられている。その薬理作用としては主として抗アレルギーの面から検討されている。例えば、丹羽⁹⁾は麻黄附子細辛湯がホヤ抗原喘息患者好塩基球のホヤ抗原添加 histamine release および Con A-induced histamine release を有意に抑制し、basophilic leukemia cells の lip-oxygenase 活性を軽度低下することを報告している。また、麻黄附子細辛湯は I 型アレルギーであるラットの PCA 反応、IV 型アレルギーであるマウスの接触皮膚過敏反応を抑制することも知られている。¹⁰⁾しかし、麻黄附子細辛湯が肝細胞障害に対しどのような作用を示すかについてはほとんど知られていない。

一方、著者らは麻黄附子細辛湯の抗炎症作用に注目して、麻黄附子細辛湯が免疫学的に誘導した肝細胞障害を著明に改善することを報告した。¹¹⁾そこで、著者らは麻黄附子細辛湯の肝細胞障害抑制機序を解析するため、肝局所の免疫反応や炎症反応を含めたネットワークに大きく関与していると考えられている肝類洞内皮細胞からの chemical mediator, 特に PAF および IL1 の産生について、麻黄附子細辛湯のおよぼす影響について検討した。その結果、麻黄附子細辛湯は肝類洞内皮細胞に作用して PAF および IL1 の産生を抑制した。なお、麻黄附子細辛湯の肝類洞内皮細胞からの PAF 産生に対する抑制作用は今回の *in vitro* の実験系では肝類洞内皮細胞と麻黄附子細辛湯を30分間培養した時が最も強かった。この理由としては今後詳細な検討が必要であるが、麻黄附子細辛湯に含まれる活性成分が30分以上培養すると不活化されるのかもしれない。また、今回の実験系はすべて *in vitro* のため、今後は *in vivo* の実験系において麻黄附子細辛湯の肝細胞障害抑制作用について検討する必要があると考える。

いずれにしても、肝類洞内皮細胞は種々のカスケード系に作用してネットワークの調節に重要な役割をしているといわれており、麻黄附子細辛湯がこの肝類洞内皮細胞に作用して、細胞からの PAF および IL1 の産生を抑制することは、麻黄附子細辛湯の肝細胞障害抑制作用を解析する上にも、また、肝細胞障害の病態を解析する上にも、新しい知見を提供するものと考えられる。

結 論

麻黄附子細辛湯は肝類洞内皮細胞からの PAF および IL1 の産生を抑制した。

文 献

- 1) Libby, P., Ordovas, J.M., Auger, K.R., Robbins, A.H., Birinyi, L.K. and Dinarello, C.A.: Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin 1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **124**, 179-185, 1986.
- 2) Benveniste, J., Henson, P.M. and Cochrane, C.G.: Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelet: The role of IgE, basophils and platelet activating factor. *J. Exp. Med.* **136**, 1356-1377, 1972.
- 3) 井上圭三: 炎症と血小板活性化因子. 代謝 **23**, 891-899, 1986.
- 4) Lin, A.H., Morton, D.R. and Gorman, R.R.: Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **70**, 1058-1065, 1982.
- 5) Braquet, P. and Rola-Pleszczynski, M.: Platelet activating factor and cellular immune responses. *Immunology Today* **8**, 345-352, 1987.
- 6) 矢数道明: アレルギー性鼻炎の東洋医学的研究. 日本東洋医学会誌 **16**, 25-30, 1965.
- 7) 山本 徹: アレルギー性鼻炎の漢方製剤による治療. 漢方研究 **10**, 316-325, 1983.
- 8) 江田昭英, 西依 健, 永井博弼, 松浦直資, 土屋博司: 和漢薬の抗アレルギー作用—I型およびIV型アレルギー反応に対する作用. 日薬理誌 **80**, 31-41, 1980.
- 9) 丹羽勲負: 麻黄附子細辛湯エキスの薬理作用機序—特に抗アレルギー作用および抗酸化作用についての検討. 皮膚紀要 **82**, 193-209, 1987.
- 10) 日笠 稔, 夏秋 優, 大坪義和, 日笠久美, 新家莊平: 麻黄附子細辛湯の抗アレルギー作用. 基礎と臨床 **22**, 1743-1746, 1988.
- 11) 阪上吉秀, 溝口靖紘, 申 東桓, 小林絢三, 森沢成司: 麻黄附子細辛湯エキスの肝細胞障害抑制作用. 第5回和漢医薬学会大会要旨集, 1988, p. 65.
- 12) Knook, D.L. and Sleyster, E.C.H.: Separation of Kupfer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp. Cell Res.* **99**, 444-449, 1976.
- 13) 市川裕三, 溝口靖紘, 河田則文, 森沢成司, 山本祐夫: 肝類洞内皮細胞の血小板活性化因子産生に及ぼす小柴胡湯の影響. 和漢医薬学会誌 **6**, 182-187, 1989.
- 14) Pinckard, R.N., Farr, R.S. and Hanahan, D.J.: Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J. Immunol.* **123**, 1847-1857, 1979.
- 15) Camussi, G., Mencia-Huerta, J.M. and Benveniste, J.:

- Release of platelet-activating factor and histamine. I. Effect of immune complexes, complement and neutrophils on human and rabbit mastocyte and basophils. *Immunology* **33**, 523-534, 1977.
- 16) Mizoguchi, Y., Kawada, N., Ichikawa, Y., Tanabe, I., Mizuno, M., Tomekawa, K., Hasegawa, I., Morisawa, S. and Yamamoto, S. : Effect of Sho-saiko-to on interleukin 1 production by hepatic sinusoidal endothelial cells. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **6**, 172-176, 1989.
- 17) Simon, P.L. and Willoughby, W.F. : The role of subcellular factor in pulmonary immune function : Physicochemical characterization of two distinct species of lymphocyte activating factor produced by rabbit alveolar macrophages. *J. Immunol.* **126**, 1534-1541, 1981.
- 18) Tsutsui, H., Mizoguchi, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S. : Studies on experimentally - induced acute hepatic failure : Possible involvement of activated liver adherent cells. In "Cells of the hepatic sinusoid" (Eds. by Kirn, A., Knook, D.L. and Wisse, E.), Kupffer Cell Foundation, The Netherlands, pp. 307-314, 1986.
- 19) Ohkura, Y., Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Kobayashi, K., Yamamoto, S., Morisawa, S., Takeda, S. and Aburada, M. : Inhibitory effect of TJN-101 (+)-(6S, 7S,R-Biar)-5,6,7,8-tetrahydro-1,2,3,12-tetramethoxy-6,7-dimethyl-10,11-methylenedioxy-6-dibenzo(a,c)cyclooctenol) on immunologically induced liver injuries. *Jpn. J. Pharmacol.* **44**, 179-185, 1987.
- 20) 申 東桓, 武田 弘, 近藤洋子, 森沢成司, 阪上吉秀, 関 守一, 溝口靖弘, 小林絢三, 山本祐夫 : 実験的急性肝不全の誘導における platelet activating factor (PAF) 関与の可能性. *日消誌* **84**, 2221, 1987.