

マウス脾細胞のインターロイキン 6 産生に及ぼす小柴胡湯の影響

長谷川 格^{a)} 溝口 靖紘,^{a)} 筒井ひろ子^{a)} 市川 裕三^{a)}
河田 則文^{a)} 森澤 成司^{b)} 山本 祐夫^{c)}

^{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, ^{c)}大阪社会医療センター

Effects of Sho-saiko-to on interleukin 6 synthesis from mouse spleen cells

Itaru HASEGAWA,^{a)} Yasuhiro MIZOGUCHI,^{a)} Hiroko TSUTSUI,^{a)} Yuzo ICHIKAWA,^{a)}
Norifumi KAWADA,^{a)} Seiji MORISAWA^{c)} and Sukeo YAMAMOTO^{b)}

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

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

^{c)}The Osaka Socio-Medical Center Hospital

(Received February 15, 1990. Accepted April 18, 1990.)

Abstract

When mouse spleen cells were stimulated with concanavalin A, interleukin 6 was synthesized from spleen cells. This interleukin synthesis increased from spleen cells stimulated with concanavalin A and Sho-saiko-to simultaneously. This result suggests that Sho-saiko-to is related with immunoreaction.

Key words interleukin 6, Sho-saiko-to (Syô-saiko-tô).

Abbreviations BCDF, B cell differentiation factor; BCGF, B cell growth factor; BSF, B cell stimulating factor; Con A, concanavalin A; HBSS, Hanks' balanced salt solution; IL, interleukin; LAK, lymphokine activated killer; NK, natural killer; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

緒 言

最近, 小柴胡湯による慢性肝炎患者への治療が試みられるようになり, HBe 抗原陽性慢性肝炎患者の多施設間 open study の検討において, 小柴胡湯の有効性が認められている。¹⁾ また, 小柴胡湯の免疫賦活作用を利用して, 小柴胡湯による肝硬変患者の肝癌発症予防の試みも始まっている。²⁾ 一方, 著者らは小柴胡湯の薬理作用として免疫反応の賦活作用があることを報告した。すなわち, 小柴胡湯はまず単球-マクロファージ系細胞を活性化し,³⁾ インターロイキン (IL)-1 産生の増強,⁴⁾ Tリンパ球による IL-2 産生の増強,⁵⁾ IL-3 感受性の増強,⁶⁾ Bリンパ球の抗体産生細胞への誘導による抗体産生増強を認めた。⁷⁾

今回は B細胞を最終的に抗体産生に誘導する IL-

6 について, 小柴胡湯の IL-6 産生に及ぼす影響について, マウス脾細胞を用いて検討した。

材料と方法

(1) マウス脾細胞の IL-6 誘導方法: BALB/c マウス (6 週齢, 雄, クレア社から購入) の脾を摘出し, 細切した。これを Hanks' balanced salt solution (HBSS) に浮遊, 二重ガーゼで濾過したのち, Ficoll-Conray 重層遠心法を用いて, 単核細胞分画を分離した。これを 7.5% ウシ胎児血清, 100 U/ml ペニシリン及び 100 µg/ml のストレプトマイシンを含む RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 に浮遊させ, 細胞濃度を 1×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液 1 ml を 24 穴の plate (Falcon 3047) に入れ 1 µg/ml の concanavalin (Con) A (Sigma 社) を添加し, 37°C で 48 時間培養した。

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

培養後、遠心 (400 g, 10 min, 4 °C) して、その上清を回収し、IL-6 測定用のサンプルとした。サンプルは測定まで -80 °C で保存した。なお、IL-6 の誘導に対する小柴胡湯の及ぼす影響について検討する場合は、Con A と同時に小柴胡湯 (最終濃度 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、同様の方法で上清を採取した。また、脾細胞を Con A 非添加で小柴胡湯 (最終濃度 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 単独添加で培養し、同様の方法で上清を採取した。

(2) IL-6 の測定方法: マウスの plasmacytoma の cell line の一種で IL-6 dependent cell line である B9 細胞 (Dr. McNamara, Yale Univ. より贈与⁸⁾) を 7.5% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 で 1×10^5 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液 100 μl を 96 穴 plate (Costar 3599) に入れ、上述の IL-6 測定用サンプル 100 μl を添加し、37 °C で 44 時間培養した。培養後、³H-thymidine を 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ に加え、さらに 4 時間培養後、細胞の酸不溶性分画への取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した⁸⁾。なお、IL-6 の活性は IL-2 あるいは IL-6 に用いられているのと同様の方法で half maximum を 1 単位として計算した⁹⁾。また、小柴胡湯は株式会社ツムラより供与され、その調整は既報³⁾ に準じて行なった。

結 果

1. マウス脾細胞の IL-6 誘導能

BALB/c マウスの脾細胞 (1×10^6 cell/ml) に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A を添加して 37 °C で 48 時間培養した。この培養上清を B9 細胞浮遊液 (1×10^5 cells/ml) に添加して IL-6 活性を測定した。その結果、Fig. 1 に示すように Con A 非添加のコントロール群に比して、Con A 添加群では著明に IL-6 が誘導できた ($n=10$, $p<0.01$)。

2. マウス脾細胞の IL-6 誘導能に及ぼす小柴胡湯の影響

BALB/c マウスの脾細胞 (1×10^6 cells/ml) に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A と同時に種々の濃度の小柴胡湯を添加して同様の方法で上清を採取し、その上清の IL-6 活性を測定した。その結果、Fig. 2 に示すように小柴胡湯非添加のコントロール群に比して、小柴胡湯添加群で IL-6 の誘導ができ、特に 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の小柴胡湯添加群で有意に増加した ($n=10$, $p<0.01$)。

なお、BALB/c マウスの脾細胞浮遊液に Con A 非添加で種々の濃度の小柴胡湯を添加しても、Fig.

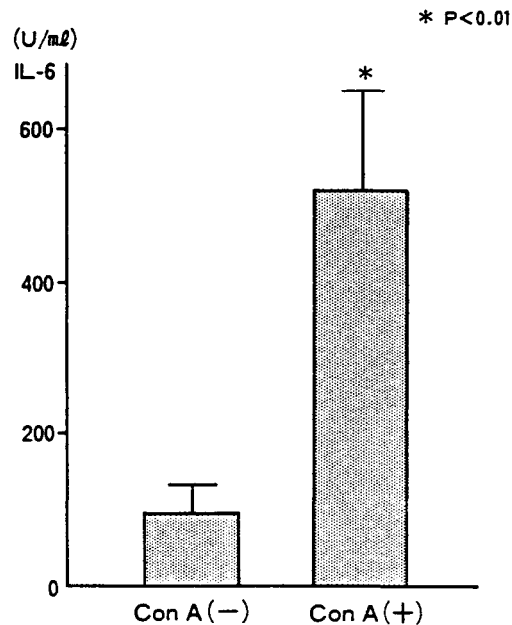


Fig. 1 Interleukin 6 production from mouse spleen cells stimulated with concanavalin A ($n=10$).

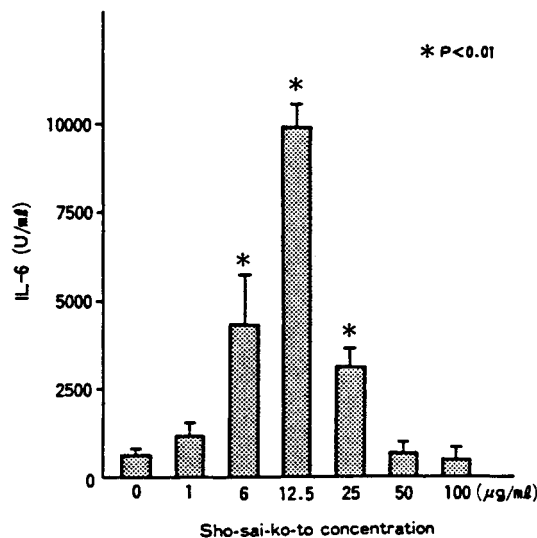


Fig. 2 Effect of Sho-sai-ko-to on the production of interleukin 6 from mouse spleen cells stimulated with concanavalin A ($n=10$).

3 に示すように IL-6 の誘導はできなかった ($n=10$)。

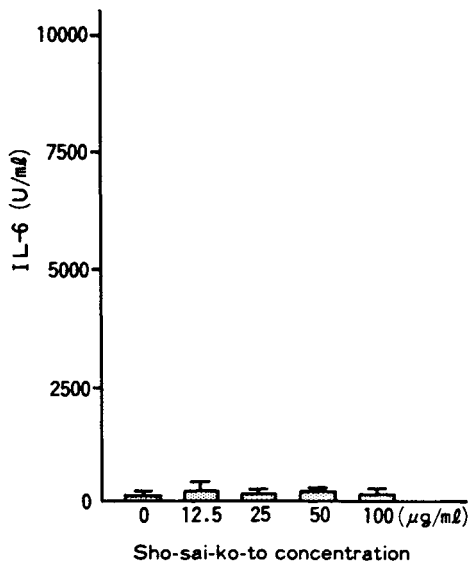


Fig. 3 Effect of Sho-sai-ko-to on the production of interleukin 6 from mouse spleen cells stimulated without concanavalin A (n=10).

考 察

免疫応答は抗原提示細胞（単球，マクロファージ系細胞）及びT，B細胞などの間で複雑な共同作用を経て発現する。その間の情報伝達はそれらの細胞が相互に直接接触して行なわれる場合と，一方では細胞からいろいろな chemical mediator が産生分泌され，その調節が行なわれる場合がある。後者は，まずマクロファージが抗原で刺激を受けると種々の活性因子を産生し，その結果，抗体産生の誘導，特異的キラーT細胞の誘導，natural killer (NK) 細胞活性の増強，lymphokine activated killer (LAK) 細胞の活性化，インターフェロン γ 産生の増強などが生じる。

さて，B細胞に抗体産生を誘導し得る因子として，1つは抗原で刺激されたB細胞に増殖を誘導し得る B cell growth factor (BCGF)，他の1つは増殖したB細胞に抗体産生を誘導する B cell differentiation factor (BCDF) がある¹⁰⁾。また，抗体産生に関与する3つのサイトカインが同定された。すなわち，休止状態のB細胞を活性化させる B cell stimulating factor (BSF)-1/IL-4，活性化されたB細胞に増殖を誘導する BCGF-II/IL-5，最終的に抗体産生細胞に誘導する BSF-2/IL-6 と名付けられ

た¹¹⁾。この中で IL-6 は活性化B細胞から抗体産生細胞への分化誘導，IL-2 レセプターの誘導，IL-2 産生誘導，キラーT細胞分化誘導など，最近，注目を浴びている^{12,13)}。

さて，小柴胡湯は柴胡，半夏，黄芩，大棗，人參，甘草および生姜が含まれているが，小柴胡湯の免疫賦活作用に注目して，各種肝疾患の治療に用いられている。例えば，HBe 抗原陽性慢性肝炎患者の多施設間 open study の検討において，有意に seroconversion 症例，seronegative 症例および HBe 抗原の低下症例が増加することが認められた¹⁾。また，最近では同じく小柴胡湯の免疫賦活作用を利用して，肝硬変患者の肝癌発生予防の試みも始まっている²⁾。

そこで，著者らは小柴胡湯の免疫賦活作用を解析するため，まず *in vitro* の系を用いて検討した。その結果，小柴胡湯にマクロファージ活性化作用³⁾，IL-1 産生の増強作用⁴⁾，Tリンパ球による IL-2 産生の増強作用⁵⁾，IL-3 に対する感受性の増強作用⁶⁾，さらにB細胞の抗体産生細胞への誘導促進作用⁷⁾，すなわち免疫賦活作用を認めた。今回は体液性免疫の中で最終的に抗体産生を誘導する IL-6 について，小柴胡湯の及ぼす影響について検討した。その結果，小柴胡湯はマウス脾細胞の Con A 刺激による IL-6 産生を有意に増強した。しかし，小柴胡湯単独刺激による脾細胞の IL-6 の誘導は認められなかった。なお，小柴胡湯の有効性は小柴胡湯の濃度によってかなり異なり，12.5 μ g/ml の小柴胡湯によって，最も強く IL-6 が誘導された。一方，小柴胡湯による IL-1，IL-2 の産生及び抗体産生は 200~400 μ g/ml の濃度で強く誘導された^{4,5,7)}。しかし，小柴胡湯の NK 細胞活性に及ぼす影響は 0.1 μ g/ml で最も強く活性された¹⁴⁾。したがって，小柴胡湯の至適濃度は effector cell により異なる可能性がある。

さて，著者らはウイルス性肝炎において末梢血単核細胞からの IL-1 および IL-2 の産生が低下していること，また，これらの IL-1，IL-2 の産生の低下がウイルス排除を困難にしている可能性を報告した¹⁵⁾。したがって，小柴胡湯の IL-1⁴⁾，IL-2⁵⁾ の産生増強，IL-3 の感受性の増強⁶⁾，IL-4 の産生増強（未発表データ）および前述した IL-6 の産生増強作用はウイルス性肝炎におけるウイルス排除に有効に作用する可能性がある。また，波田ら¹⁶⁾も慢性肝障害における肝グダ域へのリンパ球の浸潤が強いほど生検肝組織培養上清中の IL-6 が高値を示す傾向を認めている。すなわち，ウイルスの排除に IL-6 が高いほど有効である可能性を示唆している。

以上の結果より、小柴胡湯には *in vitro* の系において免疫賦活作用があることが再確認できた。

しかし、著者らは小柴胡湯が免疫学的な肝細胞障害モデルを *in vivo* で抑制することより、小柴胡湯に免疫調節作用があることを報告した。¹⁷⁾

したがって今後は小柴胡湯の免疫反応に及ぼす影響について *in vivo* の系で検討していく必要がある。

結 論

小柴胡湯は Con-A 刺激によるマウス脾細胞からの IL-6 の産生を増強した。

文 献

- 1) 藤原研司, 岡 博: 慢性肝炎の治療—漢方薬, 臨床医 12, 1150-1155, 1986.
- 2) Oka, H., Yamamoto, S., Kanno, T., Kuroki, T., Mizoguchi, Y., Kobayashi, K., Nakao, M., Harihara, S., Marumo, T., Kobayashi, Y. and Monna, T.: Controlled prospective evaluation of Sho-saiko-to in prevention of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis of the liver. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 6, 40-44, 1989.
- 3) 池本吉博, 溝口靖紘, 新井孝之, 山本祐夫, 森澤成司: 小柴胡湯および大柴胡湯の *in vitro* における抗体産生に及ぼす影響, 和漢医薬学会誌 1, 235-242, 1984.
- 4) Morisawa, S., Mizoguchi, Y. and Yamamoto, S.: Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on antibody responses *in vitro*. In "Recent Advances in Traditional Medicine in East Asia," Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Geneva, Tokyo, pp. 106-110, 1985.
- 5) 溝口靖紘, 柴田悠喜: 抗腫瘍免疫機構に及ぼす小柴胡湯の影響, 漢方医学 11 (4), 19-26, 1989.
- 6) 溝口靖紘, 申 東桓: マウスにおけるインターロイキン 3 の産生及び応答能に及ぼす小柴胡湯の影響, 漢方医学 13 (3), 83-86, 1989.
- 7) Mizoguchi, Y., Tsutsui, H., Sakagami, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. In "New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis. II. Chronic Hepatitis," Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, pp. 304-310, 1987.
- 8) Aarden, L.A., Groot, E.R., Schaap, O.L. and Landsdorp, P.M.: Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 17 1411-1416, 1987.
- 9) Nau, G.J., Moldwin, R.L., Lancki, D.W., Kim, D.K. and Fitch, F.W.: Inhibition of IL-2-driven proliferation of murine T lymphocyte clones by supraoptimal levels of immobilized anti-T cell receptor monoclonal antibody. *J. Immunol.* 139, 114-122, 1987.
- 10) Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T. and Paul, W.E.: Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* 155, 914-923, 1982.
- 11) Kishimoto, T., Yoshizaki, K., Kimoto, M., Okada, M., Kuritani, T., Shimizu, K., Nakagawa, T., Nakagawa, N., Miki, Y., Kishi, H., Fukunaga, K., Yoshikubo, T. and Taga, T.: B cell growth and differentiation factors and mechanism of B cell activation. *Immunol. Rev.* 78, 97-118, 1984.
- 12) Hirano, T., Teranishi, T., Lin, B. and Onoue, K.: Human helper T cell factors. IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on *Staphylococcus aureus* Cowan I-stimulated B cells. *J. Immunol.* 133, 798-802, 1984.
- 13) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunazawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. and Kishimoto, T.: Complementary DNA for novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76, 1986.
- 14) 溝口靖紘, 藤信裕美子, 小林絢三, 山本祐夫, 森澤成司: Natural killer (NK) 細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響, 和漢医薬学会誌 3, 184-189, 1986.
- 15) 溝口靖紘: 肝疾患におけるインターロイキンと免疫担当細胞の相互作用, "肝疾患研究の進歩 I," メディカルレビュー社, 大阪, pp. 296-311, 1984.
- 16) 波田寿一, 中西憲司, 善本知広, 広瀬 智, 中岡尋子, 下村壮治, 広崎彰孝, 藤倉美貴男, 山元哲雄, 安室芳樹, 東野一彌: 慢性肝疾患患者の血中, 肝組織培養上清中の BSF-2/IL-6 の検討, 肝臓 30, 706-707, 1989.
- 17) 溝口靖紘, 申東桓, 河田則文, 水野真弓, 小林絢三, 森澤成司, 山本祐夫: 実験的アレルギー性肝炎モデルに対する小柴胡湯の及ぼす影響について, 日臨免誌, 印刷中.