

漢方方剤の薬理活性研究 (第3報¹⁾) 葛根湯の免疫応答に及ぼす影響

松田 秀秋*, 森浦 俊次, 久保 道德

近畿大学薬学部薬用植物学研究室

Pharmacological study on Kampo-hozai. III. Effect of Kakkon-to on immune responses

Hideaki MATSUDA*, Toshitsugu MORIURA and Michinori KUBO

Department of Medicinal Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

(Received January 16, 1990. Accepted May 1, 1990.)

Abstract

Effects of Kampo-hozai, Kakkon-to (Ge-Gen-Tang) on immune responses were investigated in various mouse experimental models. Kakkon-to at an oral dose of 1000 mg/kg promoted a phagocytic activity of reticuloendothelial system by the carbon clearance method and activated the phagocytosis of carbon by Kupffer cells in the liver and macrophages ($M\phi$) in the spleen. When given twice orally immediately before and 16 hr after the application, Kakkon-to at a dose of 1000 mg/kg did not show an inhibitory effect on the ear swelling induced contact dermatitis caused by picryl chloride (PC-CD) while it exhibited a significant inhibitory effect on the foot pad swelling induced sheep red blood cell delayed type hypersensitivity (SRBC-DTH). Kakkon-to inhibited the immunosuppression with the freeze-dried ascites of Ehrlich carcinoma-bearing mice containing immunosuppressive substances (EC-sup) in PC-CD and SRBC-DTH induced mice. However, Kakkon-to was inactive in the suppression of a T cell mitogenic response (concanavalin A) and a B cell mitogenic response (lipopolysaccharide) in intact, SRBC-sensitized mice and SRBC-DTH-induced mice. These results suggested that Kakkon-to may promote the phagocytic activity of $M\phi$ and the interaction of $M\phi$ -T cell.

Key words Kakkon-to (Kakkon-tô), Ge-Gen-Tang, immune response, phagocytosis, macrophage, contact dermatitis caused by picryl chloride, sheep red blood cell delayed type hypersensitivity, mitogenic response.

Abbreviations K, phagocytic index; α , corrected phagocytic index; $M\phi$, macrophage; SRBC, sheep red blood cell; SRBC-DTH, sheep red blood cell delayed type hypersensitivity; PC-CD, contact dermatitis caused by picryl chloride; EC-sup, dried ascites of Ehrlich carcinoma-bearing mice; Con. A, concanavalin A; LPS, lipopolysaccharide; Kakkon-to (Ge-Gen-Tang), 葛根湯.

緒 言

漢方は人類の長年の臨床体験が集積してできあがったものだけに、各種疾病に対応する漢方方剤がある。漢方方剤の有効性及び作用機序の解明は医科

学の進歩に伴って、これらの研究手法を利用して解明することが可能となり、漢方方剤及びその配剤生薬の薬理学あるいは生化学的研究が数多く報告されている。しかし、効果判定のほとんどは新薬の開発手段に用いられた手法を漢方に置き換えて実験、評価されたものがほとんどであり、元来臨床的に有効

*〒577 東大阪市小若江3-4-1
3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577, Japan

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for
WAKAN-YAKU 7, 35-45, 1990

であっても、薬理学的に有効性を見い出せないものもある。これは漢方の科学的解明の上から重大な問題である。

漢方方剤の有効性を薬理学的に証明するためには、処方、臨床の体験を参考にしなければならないが、傷寒論・金匱要略理論をそのまま動物実験で再現することは非常に困難である。著者らは可能な限り漢方原典に立脚した動物実験を導入し、また、その有効性は実験動物の全身的な観察から評価し、「瘀血」、「胸脇苦満」と思われる所見が見られるラットを作成し、駆瘀血方剤及びその配剤生薬の有効性を見出し^{2,3)}、前報^{1,4)}においては実験的腎炎の尿蛋白排泄に対する猪苓湯の効果、大黃蘆虫丸エキスを投与による慢性炎症への影響を報告した。

本報では、漢方方剤の薬理活性研究の一環として、診断即治療法を範疇論的に記述した『傷寒論』⁵⁾に収載され、「太陽病」と称される初期感染病態に用いられる葛根湯を題材に用いた。葛根湯は感冒、中耳炎、肩凝りなどの初期感染に応用される代表的な漢方方剤であるにもかかわらず、その薬理活性はほとんど明らかにされておらず、志賀ら⁶⁾がアルサス型及び遅延型アレルギー反応に対する作用を報告しているのみである。そこで、本研究では葛根湯の主薬効と思われる初期感染病態に対する効果を初期免疫から細胞性免疫までの免疫応答に及ぼす影響にて検討した。

材料と方法

1. 被験薬物及び被験液の調整

被験薬物として葛根湯 (Kakkon-to) を用いた。この熱水抽出エキス原末は株式会社ツムラから提供 (Lot. No. 41004900) されたもので、実験動物に投与する際には 100, 500 あるいは 1000 mg/kg をマウス体重 10 g 当たり 0.2 ml の用量の水に懸濁して経口投与した。また、試薬あるいは陽性対照薬として perikan drawing ink 17 black (Perikan AG), λ -carrageenan (東京化成), concanavalin A (Con. A) 及び zymosan (Sigma Chemical), prednisolone (Merck), picryl chloride (ナカライテスク), 新鮮羊赤血球 (SRBC, 大阪大学微生物研究所) 及び lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 由来, 三光純薬) を用いた。

2. 実験動物

実験動物は市販 (清水実験材料株式会社) の Slc: ICR 系雌性及び雄性マウス (16–18 g) 及び Slc: Balb/c 系雌性マウス (18–20 g) 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。

3. Carbon clearance

1) Intact 動物での測定: マウス貪食能は carbon clearance 法⁷⁾で行った。ICR 系雄性マウスの尾静脈に carbon 懸濁液 (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, 5, 10, 15 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 μl の血液を採血し, ただちに 2 ml の 0.1% Na_2CO_3 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, 15 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。Carbon clearance 値は次式から血中 carbon 半減消失時間 ($t_{1/2}$, 分), 貪食指数 (K) 及び訂正貪食指数 (α) で求め, これらの値を被験体の carbon 貪食能とした。なお, 被験体は carbon 懸濁液静注 2 日前から 1 日 1 回連続 3 回経口投与 (最終経口投与は carbon 懸濁液静注 1 時間前) した⁸⁾。陽性対照薬の zymosan 50 mg/kg (生理食塩水に懸濁) は carbon 懸濁液静注 2 日前に 1 回腹腔内投与した。

血中 carbon 半減消失時間 ($t_{1/2}$, 分)

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

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

訂正貪食指数 (α) = $\sqrt[3]{K \cdot \text{Pc} / \text{Po}}$

ただし, t_1 : 5 分, t_2 : 10 分あるいは 15 分, $\text{OD}t_1$: 5 分後の吸光度, $\text{OD}t_2$: 10 分あるいは 15 分後の吸光度, Pc: 全体重, Po: 肝臓, 脾臓の湿重量である。

2) Carrageenan 処置マウスでの測定: 被験体を ICR 系雄性マウスに経口投与 1 時間後に carrageenan (生理食塩水に溶解) 50 mg/kg を腹腔内投与し, さらに, 2 日間被験体を経口投与し, その最終投与 1 時間後に carbon clearance を行い, 1) の方法でマウス貪食能を測定した。

3) Carbon 注入後の肝臓, 脾臓及び肺臓に取り込まれた carbon の光顕的観察: 1) の実験終了直後 (carbon 静注 15 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, 薄切後 hematoxylin-eosin 染色を行い, 光顕的に carbon の取り込みを観察した。

4) 肝臓及び脾臓に取り込まれた carbon 量の測定: 1) の方法で被験体を連日経口投与し, その最

終投与1時間後に carbon 懸濁液を静注し, 0.5, 1, 2, 24時間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 carbon 量を Fisher ら⁹⁾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% gum arabic 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, 肝臓あるいは脾臓に取り込まれた carbon 量を肝臓あるいは脾臓 100 mg 当たりの OD 値で示した。

5) 生存率: 1) の方法で被験体を ICR 系雄性マウスに 3日間連日経口投与し, その最終投与1時間後に高濃度 (carbon 濃度は 1) に記した濃度の 1.5 倍) の carbon 懸濁液を静注し, 24時間後の生存率を求めた。また, 死亡したマウスは, その直後に肺臓を摘出し, 3) の方法で肺臓に取り込まれた carbon を光顕的に観察した。

6) 直腸温: 1) の方法で被験体を ICR 系雄性マウスに 3日間連日経口投与し, その最終投与1時間後に carbon 懸濁液を静注し, 1, 2, 3時間後まで直腸温を体温計 (互換型サーミスタ温度計 Type A 600, 宝工業) にて測定した。

7) 肝臓及び脾臓の組織血流量: 1) の方法で被験体を連日経口投与し, その最終投与1時間後に carbon 懸濁液を静注し, 0.5, 1, 1.5時間後まで経時的に肝臓及び脾臓の組織血流量を測定した。また, intact 動物に被験体を経口投与し, それらの組織血流量を測定した。なお, 組織血流量の測定は pentobarbital 45 mg/kg, *i.p.* 麻酔 5 分後に, 水素クリアランス法¹⁰⁾で測定した。すなわち, マウスを固定し, 腹部を切開して肝臓あるいは脾臓に白金電極を刺入した。一方, 不関電極を皮膚に固定し, 両者とも amplifier (MT 技研) を介して記録計へ接続した。基準線が安定後, 水素ガスを吸入させ, 水素ガス濃度半減期 ($T_{1/2}$) を算出し, さらに, $T_{1/2}$ は下記の式に代入して組織血流量をもとめた。

$$\text{血流量 (ml/min/100 g tissue)} = 0.693/T_{1/2} \text{ (min)} \times 100$$

4. 塩化ピクリル誘発接触性皮膚炎 (PC-CD)

1) Intact 動物: Asherson & Ptak の方法¹¹⁾に従って行った。すなわち, ICR 系雌性マウスの腹部を剪毛し, 7% picryl chloride/ethanol 溶液 0.1 ml を塗布して感作した。7日後に 1% picryl chloride/olive oil 溶液 0.02 ml 宛を両耳朶に塗布して接触性皮膚炎を誘発した。24時間後に充分な腫脹率が得られたマウスを選別し, 3日後から再度, 感作, 誘発を繰り返した。誘発前及び誘発24時間後の耳朶

の厚さから腫脹率を求めた。なお, 被験体は PC-CD 誘発直前及び16時間後の 2 回経口投与した。また, 24時間後の腫脹率測定直後にマウスを断頭致死させ, 胸腺及び脾臓を摘出し, 湿重量を測定し, 体重比重量%を求めた。陽性対照薬には prednisolone (生理食塩水に懸濁) を用い, 誘発16時間後に 1 回皮下投与した。

2) Ehrlich carcinoma 担ガンマウスの腹水上清乾燥物 (EC-sup) 処置動物: ICR 系雌性マウスの腹腔内に Ehrlich carcinoma をマウス当たり 5×10^6 個移植し, 10日後に腹水を採取し, 5°C, 3000 rpm, 10分間遠心分離して得た上清の凍結乾燥物 (EC-sup) を細胞性免疫抑制物質として以下の実験に供した。¹²⁾ EC-sup をマウス当たり 25 mg, PC-CD 誘発の24時間前に腹腔内投与し, 1) と同様の方法で実験を行った。なお, 被験体は, i) 誘発の直前及び16時間後に経口投与する群と, ii) 誘発前3日間1日1回経口投与する群で検討した。

5. 羊赤血球誘発遅延型マウス足蹠浮腫反応 (SRBC-DTH)

1) Intact 動物: ICR 系雌性マウスに新鮮羊赤血球 1×10^8 個/匹を背部皮下注射して感作した。その4日後に同量の新鮮羊赤血球を右後肢足蹠皮内に注射して SRBC-DTH を誘発させ, 誘発24時間後の右後肢足蹠の腫脹率は左右の足の厚さを dial-gauge thickness で測定しその差から求めた。¹³⁾ また, 測定後ただちに胸腺及び脾臓を摘出し, それらの湿重量を測定し, 体重比重量%を求めた。被験体は誘発直前及び16時間後に経口投与した。陽性対照薬の prednisolone (生理食塩水に懸濁) は誘発16時間後に 1 回皮下投与した。

また, マウスに SRBC 1×10^8 個を尾静脈内注射して, 過剰抗原感作を行い, その16日後に 1) に記した方法で再感作し, その4日後に SRBC-DTH を誘発させた。なお, 被験体の効果は, i) 過剰抗原感作の直前に 1 回経口投与する群と, ii) 過剰抗原感作日から 1 日 1 回 4 日間経口投与する群で検討した。

2) EC-sup 処置動物: SRBC-DTH 誘発の16時間前に 4・2) に記した EC-sup をマウス当たり 25 mg を腹腔内投与し, 1) と同様の方法で実験を行った。なお, 被験体は誘発の直前及び16時間後に経口投与した。

6. マウス胸腺及び脾臓細胞の分裂促進剤による幼若化反応

1) Intact 動物: Balb/c 系雌性マウスから得た胸腺及び脾臓細胞を, RPMI-1640 培地中にて $1 \times$

10⁶ cells/well に調整し、分裂促進剤として Con. A (1.5 µg/well) あるいは LPS (20 µg/well) を加え、CO₂ インキュベーター内で 37°C、48 時間培養した。これに ³H-thymidine (0.5 µCi/well) を加え、さらに 24 時間培養した後、細胞内に取り込まれた ³H-thymidine 量を液体シンチレーションカウンターにて測定し、幼若化反応の指標とした。なお、被験体は培養前 3 日間 1 日 1 回経口投与した。

2) SRBC 感作動物: Balb/c 系雌性マウスに SRBC を 1 匹当たり 1 × 10⁸ 個背部皮下注射して感作し、その 4 日後に 1) と同様の方法で実験を行った。なお、被験体は培養前 3 日間 1 日 1 回経口投与した。

3) SRBC-DTH 誘発動物: Balb/c 系雌性マウスに、SRBC をマウス当たり 1 × 10⁸ 個、背部皮下注射して感作し、4 日後に同量の SRBC を右後肢足蹠皮内に注射して SRBC-DTH を誘発させ、1) と同様の方法で実験を行った。なお、被験体は培養

前 3 日間 1 日 1 回経口投与した。

7. 統計学的処理

実験結果は平均値 ± 標準誤差で表し、有意差検定は Student's *t*-test を用いた。

結 果

1. マウス食食能に及ぼす影響

1) Intact 動物:

i) Carbon clearance 値

Table I に示したごとく、マウスに carbon 懸濁液を注入した時、対照群の血中 carbon 半減消失時間は 11.50 ± 0.67 分であった。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させる作用が認められた。Zymosan 50 mg/kg 投与群にも血中 carbon 半減消失時間を有意に短縮させる作用が認められた。

また、carbon clearance 終了直後に肝臓、脾臓

Table I Effects of Kakkon-to and zymosan on phagocytic activity of reticuloendothelial system in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Half time (t _{1/2} , min) ^{a)}
Control ^{b)}		<i>p.o.</i>	10	11.50 ± 0.67
Kakkon-to	100	<i>p.o.</i>	10	11.23 ± 0.85
	500	<i>p.o.</i>	10	10.25 ± 0.78
	1000	<i>p.o.</i>	10	9.96 ± 0.37 ^{d)}
Control ^{c)}		<i>i.p.</i>	10	12.03 ± 0.42
Zymosan	50	<i>i.p.</i>	10	9.59 ± 0.57 ^{e)}

Carbon clearance test was performed 1 hr after the oral administrations of test substance (one time/day for 3 days) or 2 days after the intraperitoneal administration of zymosan (one time/day). ^{a)}Each value represents the mean ± S.E. ^{b)}Control was orally administered water alone. ^{c)}Control was intraperitoneally administered saline alone. ^{d)}Significantly different from the control group, *p* < 0.05. ^{e)}Significantly different from the control group, *p* < 0.01.

Table II Effects of Kakkon-to 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) ^{a)}
				Liver	Spleen		
Control ^{b)}		<i>p.o.</i>	15	5.62 ± 0.12	0.62 ± 0.05	0.027 ± 0.002	4.81 ± 0.18
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	13	5.68 ± 0.08	0.59 ± 0.08	0.032 ± 0.004	5.02 ± 0.11
	1000	<i>p.o.</i>	13	5.70 ± 0.16	0.52 ± 0.03	0.035 ± 0.002 ^{d)}	5.25 ± 0.14 ^{d)}
Control ^{c)}		<i>i.p.</i>	15	5.33 ± 0.10	0.52 ± 0.01	0.022 ± 0.001	4.78 ± 0.13
Zymosan	50	<i>i.p.</i>	15	5.14 ± 0.12	0.50 ± 0.01	0.034 ± 0.001 ^{e)}	5.53 ± 0.12 ^{e)}

Carbon clearance test was performed 1 hr after the oral administration of test substance (one time/day for 3 days) or 2 days after the intraperitoneal administration of zymosan (one time/day). ^{a)}Each value represents the mean ± S.E. ^{b)}Control was orally administered water alone. ^{c)}Control was intraperitoneally administered saline alone. ^{d)}Significantly different from the control group, *p* < 0.05. ^{e)}Significantly different from the control group, *p* < 0.01.

重量を測定し、carbon clearance 値を食食指数 (K), 訂正食食指数 (α) で求め、被験体の有効性を評価した。その結果は Table II に示したごとく、Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には K, α 値を有意に増加させる作用が認められたが、相対肝臓、脾臓重量に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。

ii) 肝臓、脾臓及び肺臓に取り込まれた carbon の光顕的観察

肝臓: Fig. 1 に示したごとく、carbon 注入30分後の肝臓を光顕的に観察すると、注入された carbon は、肝臓では Kupffer 細胞及び血中の遊離 M ϕ に取り込まれ、鏡検下に黒点として観察され

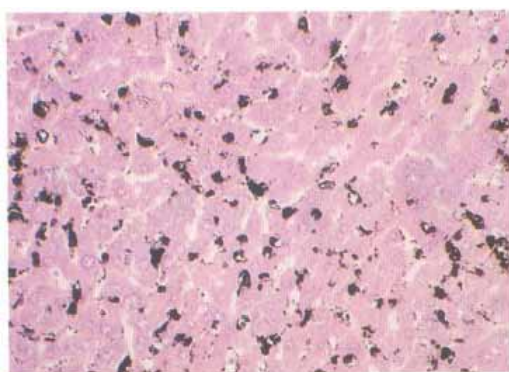


Fig. 1 Liver given an injection of carbon suspension (HE, $\times 200$).

Liver was removed 30 min after the injection of carbon suspension.

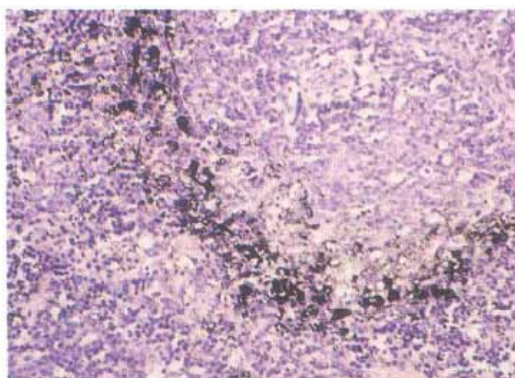


Fig. 2 Spleen given an injection of carbon suspension (HE, $\times 200$).

Spleen was removed 30 min after the injection of carbon suspension.

た。

脾臓: 脾臓では注入された carbon は白髄類リンパ組織が赤髄に移行する marginal zone の M ϕ に取り込まれ、鏡検下に黒点として観察された (Fig. 2)。

肺臓: 肺臓ではほとんど carbon の黒点は観察されなかった (成績は省略)。

iii) 肝臓及び脾臓に取り込まれた carbon 量

肝臓: Fig. 3 に示したごとく、肝臓では30分後において最も多くの carbon が取り込まれ、以後若干減少したが、1—24時間後はほぼ同じ水準の carbon 量であった。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には carbon 注入30, 120分後において carbon の取り込みを有意に促進させる作用が認められた。

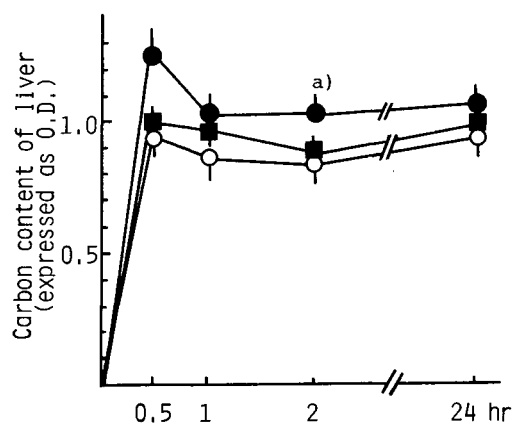


Fig. 3 Effect of Kakkon-to on hepatic uptake of carbon in mice given an injection of carbon suspension.

—○—; Control, —■—; Kakkon-to 500 mg/kg *p.o.*, —●—; Kakkon-to 1000 mg/kg *p.o.* Livers were removed 0.5, 1, 2 and 24 hr after the injection of carbon suspension, and the carbon content of liver was measured. Test substance was orally administered 1 hr before the injection of carbon suspension. Control was orally administered water alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 12 mice. ^a) Significantly different from the control group, $p < 0.05$.

脾臓: Fig. 4 に示したごとく、脾臓における carbon の取り込みは24時間後に最大になった。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には carbon 注入1, 2時間後において carbon の取り込みを有意に促進させる作用が認められた。

生存率: マウスに高濃度の carbon 懸濁液を静注すると、対照群 ($n=12$) は24時間後に50%のマウ

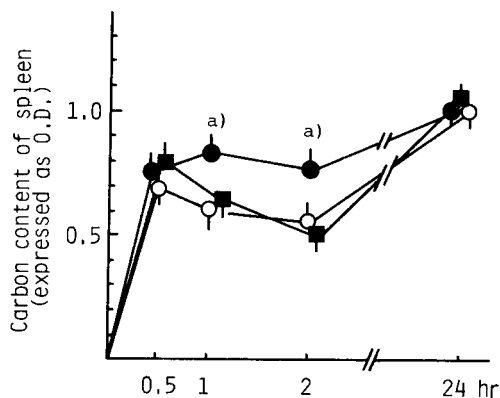


Fig. 4 Effect of Kakkon-to on splenic uptake of carbon in mice given an injection of carbon suspension.

—○— ; Control, —■— ; Kakkon-to 500 mg/kg *p.o.*, —●— ; Kakkon-to 1000 mg/kg *p.o.* Spleens were removed 0.5, 1, 2 and 24 hr after the injection of carbon suspension, and the carbon content of the spleen was measured. Test substance was orally administered 1 hr before the injection of carbon suspension. Control was orally administered water alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 12 mice. ^aSignificantly different from the control group, $p < 0.05$.

スが死亡した。Kakkon-to 500, 1000 mg/kg 投与群 ($n=12$) には死亡例が観察されなかった (成績は省略)。また、死亡した対照群の肺臓の病理組織像を光顕的に観察すると、Fig. 5 に示したごとく、多数の carbon 粒子が肺臓組織中に観察された。

直腸温：Fig. 6 に示したごとく、マウスに carbon 懸濁液を静注すると、対照群の直腸温は 1 時間後まで急激に減少し、3 時間後においても低下した状態が持続した。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には carbon 懸濁液の静注による直腸温の低下を抑制する作用が認められた。なお、Kakkon-to 1000 mg/kg を intact 動物に投与したが、その投与 3 時間後までの観察では直腸温に影響を及ぼさなかった (成績は省略)。

肝臓及び脾臓の組織血流量：Fig. 7 に示したごとく、マウスに carbon 懸濁液を静注すると、対照群の肝臓及び脾臓の組織血流量は 30 分後まで急激に減少したが、以後回復する傾向を示した。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には carbon 静注 30 分後の肝臓において組織血流量の減少を有意に抑制する作用が認められ、脾臓においてはその傾向が認められたが有意ではなかった。なお、Kakkon-to 500, 1000

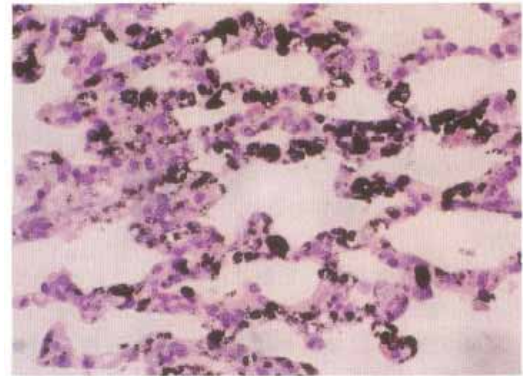


Fig. 5 Lung given an injection of carbon suspension (HE, $\times 200$).

Lung was removed 24 hr after the injection of carbon suspension.

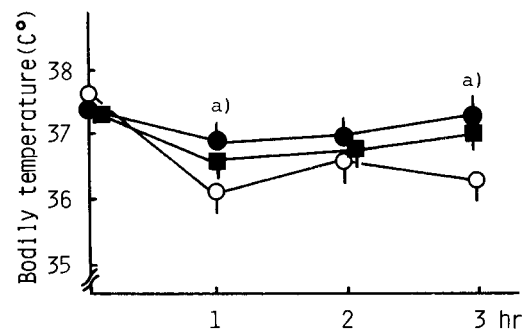


Fig. 6 Effect of Kakkon-to on bodily temperature in carbon suspension injected mice.

Test substance was orally administered 3 times for 3 days, and carbon suspension was intravascularly injected 1 hr after the final administration. Bodily temperature was measured 1, 2 and 3 hr after the injection of carbon suspension. Control was orally administered water alone. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 10 mice. ^aSignificantly different from the control group, $p < 0.05$.

mg/kg 投与は intact マウスの肝臓及び脾臓の組織血流量に影響を及ぼさなかった (成績は省略)。

2) Carrageenan 処置動物

その結果は Table III に示したごとく、マウスに carrageenan 50 mg/kg を処置すると、その K, α 値は intact マウスの値に比して減少した。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には K 値の減少を有意に、 α 値の減少を抑制する傾向が認められた。

2. PC-CD に及ぼす影響

1) Intact 動物：Kakkon-to 500, 1000 mg/kg

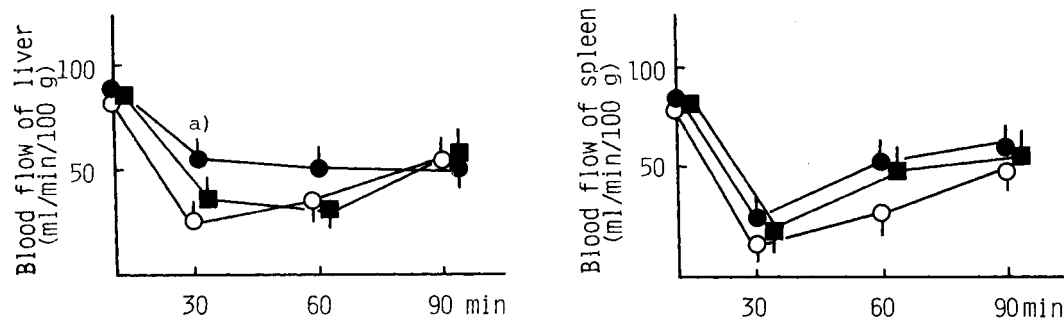


Fig. 7 Effect of Kakkon-to on tissue blood flow of liver and spleen in carbon suspension injected mice.

—○—: Control, —■—: Kakkon-to 500 mg/kg *p.o.*, —●—: Kakkon-to 1000 mg/kg *p.o.* Test substance was orally administered 3 times for 3 days, and carbon suspension was intravascularly injected 1 hr after the final administration. Blood flow was measured 30, 60 and 90 min after the injection of carbon suspension. Control was orally administered water alone. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 10 mice. ^aSignificantly different from the control group, $p < 0.05$.

Table III Effect of Kakkon-to on phagocytic activity of reticuloendothelial system in carrageenan-treated mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Phagocytic index (K)	Corrected phagocytic index (α) ^a
Intact		<i>p.o.</i>	15	0.055 $\pm$ 0.009	4.28 $\pm$ 0.34
Control ^b		<i>p.o.</i>	15	0.029 $\pm$ 0.006	3.98 $\pm$ 0.56
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	13	0.034 $\pm$ 0.009	4.03 $\pm$ 0.47
	1000	<i>p.o.</i>	13	0.052 $\pm$ 0.012 ^c	4.10 $\pm$ 0.45

Carbon clearance test was performed 2 days after the injection of carrageenan (50 mg/kg, *i.p.*). Test substance was orally administered daily for 3 days before the carbon clearance test. ^aEach value represents the mean $\pm$ S.E. ^bControl was orally administered water alone. ^cSignificantly different from the control group, $p < 0.05$.

投与はPC-CDによる腫脹、胸腺及び脾臓重量に影響を及ぼさなかった。Prednisolone 20 mg/kg 投与群にはPC-CDによる腫脹を有意に抑制する作用が認められた(成績は省略)。

2) EC-sup 処置動物: その結果は Table IV に示したごとく、EC-sup 無処置マウスにPC-CDを誘発させると、95.5 $\pm$ 8.3%の腫脹率が認められたが、EC-sup 処置マウスではPC-CDに対する反応性が抑制され、その腫脹率は43.5 $\pm$ 4.8%であった。PC-CD誘発前にKakkon-to 1000 mg/kgを1回投与した群にはEC-supによるPC-CD反応の低下を有意に抑制する作用が認められ、PC-CD誘発3日前から3回経口投与するとその効果が増大した。また、胸腺及び脾臓の体重比重量%はEC-sup処置によって増大したが、Kakkon-to投与群にはそれら

の増大を抑制する作用が認められなかった。

3. SRBC-DTH に及ぼす影響

1) Intact 動物: その結果は Table V に示したごとく、Kakkon-to 500, 1000 mg/kg 投与群にはSRBC-DTHを有意に抑制する作用が認められたが、胸腺及び脾臓重量には影響を及ぼさなかった。陽性対照薬のprednisolone 20 mg/kg 投与群にはSRBC-DTHによる腫脹、胸腺、脾臓重量を有意に抑制する作用が認められた。

また、Table VIに示したごとく、SRBCの過剰抗原感作によるサプレッサーモデルでは明らかな免疫寛容が観察され、SRBC-DTHの反応性が低下した。Kakkon-to 1000 mg/kgを誘発前1回あるいは誘発日から1日1回4日間経口投与した群にはSRBC-DTHの反応性を回復させる傾向が認められ

Table IV Effect of Kakkon-to on picryl chloride-induced contact dermatitis in the freeze-dried ascites of Ehrlich carcinoma-bearing mice containing immunosuppressive substances (EC-sup) treated mice.

Treatment ^{a)} (Single)	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Ear swelling %	Organ weight (% body weight) ^{c)}	
					Thymus	Spleen
Intact		<i>p.o.</i>	10	95.5±8.3	0.17±0.04	0.59±0.06
Control ^{d)}		<i>p.o.</i>	10	43.5±4.8	0.33±0.05	0.84±0.05
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	10	55.3±5.3	0.28±0.06	0.85±0.05
	1000	<i>p.o.</i>	10	82.0±7.3 ^{e)}	0.31±0.07	0.85±0.05

Treatment ^{b)} (Multiple)	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Ear swelling %	Organ weight (% body weight) ^{c)}	
					Thymus	Spleen
Intact		<i>p.o.</i>	10	97.5±9.5	0.17±0.06	0.59±0.05
Control ^{d)}		<i>p.o.</i>	10	56.3±5.3	0.29±0.05	0.80±0.06
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	10	70.0±5.3	0.25±0.04	0.74±0.06
	1000	<i>p.o.</i>	10	91.0±7.0 ^{e)}	0.26±0.05	0.75±0.06

^{a)}Single treatment; Test substance was orally administered immediately before and 16 hr after the application and ear swelling percentage was measured 24 hr after the application, and EC-sup was intraperitoneally administered 24 hr before the application. ^{b)}Multiple treatment; Test substance was orally administered daily for 3 days before the application, and EC-sup was intraperitoneally administered 24 hr before the application. ^{c)}Each value represents the mean±S.E. ^{d)}Control was orally administered water alone. ^{e)}Significantly different from the control group, $p < 0.05$. ^{f)}Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

Table V Effects of Kakkon-to and prednisolone on sheep red blood cell-induced delayed type hypersensitivity (SRBC-DTH) in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Foot pad swelling %	Organ weight (% body weight) ^{a)}	
					Thymus	Spleen
Control ^{b)}		<i>p.o.</i>	10	40.0±3.5	0.32±0.03	0.64±0.03
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	10	27.9±1.8 ^{d)}	0.36±0.03	0.64±0.09
	1000	<i>p.o.</i>	10	19.4±2.2 ^{e)}	0.29±0.04	0.58±0.06
Control ^{c)}		<i>s.c.</i>	10	45.0±6.0	0.35±0.03	0.62±0.04
Prednisolone	20	<i>s.c.</i>	10	8.1±2.2 ^{e)}	0.17±0.02 ^{e)}	0.48±0.03 ^{e)}

Test substance was orally administered immediately before and 16 hr after the application and foot pad swelling percentage was measured 24 hr after the application. Prednisolone was subcutaneously administered 16 hr after the application. ^{a)}Each value represents the mean±S.E. ^{b)}Control was orally administered water alone. ^{c)}Control was subcutaneously administered saline alone. ^{d)}Significantly different from the control group, $p < 0.05$. ^{e)}Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

た。

2) EC-sup 処置動物：その結果は Table VII に示したごとく、EC-sup 無処置マウスに SRBC-DTH を誘発させると、39.0±4.1%の腫脹率が認められたが、EC-sup 処置マウスでは SRBC-DTH に対する反応性が抑制され、その腫脹率は 8.4±2.8%であった。Kakkon-to 1000 mg/kg 投与群には EC-sup による SRBC-DTH 反応の低下を抑制する傾向が認められたが有意ではなかった。また、胸

腺及び脾臓の体重比重量%には影響を及ぼさなかった。

4. 幼若化反応に及ぼす影響

1) Intact 動物：正常マウス胸腺及び脾臓細胞の Con. A 及び LPS による幼若化反応に及ぼす影響を検討したが、Kakkon-to はそれらの幼若化反応に影響を及ぼさなかった(成績は省略)。

2) SRBC 感作動物：SRBC 感作マウス胸腺及び脾臓細胞の Con. A 及び LPS による幼若化反応

Table VI Effects of Kakkon-to on sheep red blood cell (SRBC) induced delayed type hypersensitivity (SRBC-DTH) in SRBC-priming mice.

Treatment ^{a)} (Single)	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Foot pad swelling %	Organ weight(%, body weight) ^{c)}	
					Thymus	Spleen
Intact		<i>p.o.</i>	10	23.1±1.8	0.26±0.02	0.63±0.05
Control ^{d)}		<i>p.o.</i>	10	6.8±1.9	0.28±0.02	0.66±0.06
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	10	8.1±1.7	0.32±0.04	0.69±0.06
	1000	<i>p.o.</i>	10	11.1±2.2	0.26±0.02	0.76±0.07

Treatment ^{b)} (Multiple)	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Foot pad swelling %	Organ weight(%, body weight) ^{c)}	
					Thymus	Spleen
Intact		<i>p.o.</i>	10	28.5±2.7	0.15±0.03	0.67±0.05
Control ^{d)}		<i>p.o.</i>	10	6.6±1.2	0.27±0.04	0.72±0.02
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	10	9.0±1.1	0.22±0.02	0.60±0.04
	1000	<i>p.o.</i>	10	12.5±2.3	0.25±0.03	0.63±0.02

^{a)}Single treatment; Test substance was orally administered immediately before the first application (SRBC 1×10^9 cells priming). ^{b)}Multiple treatment; Test substance was orally administered daily 4 times from the day injected the SRBC 1×10^9 cells priming. ^{c)}Each value represents the mean±S.E. ^{d)}Control was orally administered water alone.

Table VII Effects of Kakkon-to on sheep red blood cell-induced delayed type hypersensitivity in the freeze-dried ascites of Ehrlich carcinoma-bearing mice containing immunosuppressive substances (EC-sup) treated mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	No. of mice	Foot pad swelling %	Organ weight (%, body weight) ^{a)}	
					Thymus	Spleen
Intact		<i>p.o.</i>	10	39.0±4.1	0.32±0.03	0.61±0.03
Control ^{b)}		<i>p.o.</i>	10	8.4±2.8	0.28±0.05	0.59±0.02
Kakkon-to	500	<i>p.o.</i>	10	12.6±4.0	0.23±0.04	0.62±0.02
	1000	<i>p.o.</i>	10	16.8±4.4	0.28±0.02	0.63±0.02

Test substance was orally administered immediately before and 16 hr after the application and foot pad swelling percentage was measured 24 hr after the application. EC-sup was injected intraperitoneally 24 hr before the application. ^{a)}Each value represents the mean±S.E. ^{b)}Control was orally administered water alone.

に及ぼす影響を検討したが、Kakkon-to はそれらの幼若化反応に影響を及ぼさなかった（成績は省略）。

3) SRBC-DTH 誘発動物：SRBC-DTH 誘発マウス胸腺及び脾臓細胞の Con. A 及び LPS による幼若化反応に及ぼす影響を検討したが、Kakkon-to はそれらの幼若化反応に影響を及ぼさなかった（成績は省略）。

考 察

葛根湯は古来、漢方用法で「太陽病」と称される病態に用いられる重要な漢方方剤である。『傷寒

論』⁵⁾では「太陽病」を感染症による発病状態を自覚症状としてとらえ、「脈が浮で、頭と項が強ばり痛んで悪寒がする」と記している。太陽病の症状は現代医学的に解釈すると初期感染病態といえ、本研究では葛根湯の薬効を解明する目的で、種々の免疫学的実験モデルを用いて免疫応答に及ぼす影響を検討した。

まず、葛根湯熱水抽出エキス (Kakkon-to) による初期感染への影響を検討した。生体に異物が侵入すると、Mφ、白血球が異物貪食する。これが、初期感染に対する生体の防御システムの開始である。今回は Mφ の異物貪食に及ぼす影響を carbon clearance 法にて検討した。実験的にはマウスに異

物として carbon 懸濁液を静注し、血中からの半減消失時間を指標に異物貪食能を測定した。Kakkon-to をマウスに 3 日間前投与し、carbon clearance を行ったところ、血中 carbon 半減消失時間が有意に短縮された。

さらに、Kakkon-to の貪食能亢進作用は貪食細胞の機能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、carbon clearance 試験時に肝臓、脾臓の体重比重量%を測定し、carbon clearance 値は貪食指数 (K) 及び訂正貪食指数 (α) で表し、Kakkon-to の作用機序を検討した。その結果、Kakkon-to は 3 日間連日経口投与で肝臓、脾臓重量に影響を与えずに K、 α 値を共に増加させる作用を示した。また、血中に注入された carbon 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いる¹⁴⁾。そこで、肝臓、脾臓、肺臓における carbon 粒子の取り込みに及ぼす Kakkon-to の影響を検討したところ、注入された carbon 粒子は肝臓では主に肝 Kupffer cell に貪食され、脾臓では白髄類リンパ組織が赤髄に移行する marginal zone の M ϕ に貪食されていた。しかし、肺臓ではほとんど carbon 粒子の取り込みは観察されなかった。Kakkon-to は肝臓において carbon 注入 30-120 分後に carbon の取り込みを促進し、脾臓では carbon 注入 60-120 分後に carbon 粒子の取り込みを促進した。Carbon clearance は carbon の注入 5, 10, 15 分後に採血することから、Kakkon-to による carbon clearance 亢進作用は肝臓での carbon の取り込みが質的に促進されたことによるものと思われる。

さらに、Kakkon-to の網内系の貪食機能亢進作用を検討する目的で、carrageenan 処置マウスを用いて carbon clearance を行った。Carrageenan は藻類から分離された多糖体で、網内系に対しては M ϕ を遊離、固定型を問わず障害するが、白血球にはほとんど影響を及ぼさないといわれている¹⁵⁾。Kakkon-to を carrageenan の腹腔内投与 3 日前から 3 回経口投与すると、carrageenan による血中 carbon 半減消失時間の延長が抑制され、Kakkon-to に carrageenan による M ϕ の障害を防護する作用が認められた。

さらに、carbon clearance に及ぼす Kakkon-to の影響をより明らかにする目的で、carbon 静注後に誘発される種々の生体反応に及ぼす影響を検討した。Carbon を静注すると、直腸温及び肝臓、脾臓の組織血流量が低下した。また、静注する car-

bon 量を増加させると、24 時間後には半数のマウスが死亡し、それらマウスの肺臓には、低濃度の carbon を静注したときには観察されなかった carbon 粒子が多数観察された。一方、Kakkon-to の前投与によってこれらの所見は抑制された。これは Kakkon-to 投与によって、carbon の主貪食臓器である肝臓、脾臓において、carbon の取り込みが亢進された結果によるものと思われる。

また、投与量については、葛根湯は『傷寒論』⁵⁾によると、指示された用量は 3 回分であり、1 日に 3 回という指示ではなく、発汗するまで数回服用せよとあるので 1 日の投与全量が多くなる。しかし、今回は実験動物に 1 日 1 回しか投与しないことから、500, 1000 mg/kg という高用量を用いた。この投与量では、得られた成績は高濃度水抽出エキスの非特異的な反応によるのではないかと考えられるので、同用量の乳糖を用いて網内系機能に及ぼす影響を検討した。しかし、乳糖 1000 mg/kg 投与群にはまったく網内系機能を亢進させる作用が認められなかった (成績は省略)。

さらに、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の他に、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。一方、漢方医学においては、感染直後の激しい自覚症状が現れる太陽病の時期に葛根湯が適用される。すなわち、抗原が侵入すれば、まず、非特異的免疫能亢進が起こり、さらに病状が改善されなければ特異的免疫能が亢進されてくる。この特異的免疫能亢進が起こってくる時期を、漢方医学では「少陽病」と称し小柴胡湯が常用される。

そこで、漢方医学の「少陽病」の時期に相当すると思われる特異的免疫能、特に細胞性免疫にどのような影響を及ぼすかについて検討した。まず、遅延型アレルギーの反応性を指標に検討したところ、Kakkon-to は遅延型アレルギー反応の effector phase に投与することによって SRBC-DTH を抑制したが、PC-CD には無効であった。PC-CD は、picryl chloride がハプテンとなって皮膚表層の蛋白質を変成させ、この塩化ピクリル結合変成蛋白質が表皮基底層の Langerhans 細胞 (固定 M ϕ) に抗原として認識されることによって感作が成立する。これに対して、SRBC-DTH は羊赤血球が直接、異種蛋白質として遊離 M ϕ によって抗原認識され感作が成立する。Kakkon-to の作用がこの両者の発症メカニズムの差異によって反応性に差異が認められたことから、固定及び遊離 M ϕ に対す

る作用に違いがあることが示唆されたが、その詳細は現在不明である。さらに、Kakkon-toは過剰抗原感作により誘導されるサブプレッサー T細胞による免疫寛容を解除する傾向を示した。これはKakkon-toがMφの活性化を介してサブプレッサー T細胞の抑制作用を示したのか、あるいは単なるリンパ球機能抑制作用によるものであるのかという2つの作用機序が考えられる。そこで、Kakkon-toのリンパ球機能抑制作用の有無を胸腺及び脾臓細胞の分裂促進剤による幼若化反応に及ぼす影響を指標に検討したが抑制作用は認められなかった。今回の実験では体液性因子を考慮に入れていないので断定はできないが、Kakkon-toは前者の可能性があらうと思われる。

担ガン動物の細胞性免疫能は正常動物に比して低下するといわれている¹¹⁾。担ガン動物ではMφもT細胞もB細胞も数と機能からは正常にみえるが、Mφ-T細胞のinteractionのプロセスが担ガン動物では阻止されているといわれている¹¹⁾。その阻害物質は担ガン動物の腹水中に存在しているので、Ehrlich 担ガンマウス腹水上清凍結乾燥物を処置したマウスにおける遅延型アレルギー反応に及ぼすKakkon-toの影響を検討した。その結果、Kakkon-toは細胞性免疫能の反応性を回復させていた。これはおそらく、低下した細胞性免疫能に対して、葛根湯が活性の低下したMφの異物食食能の活性化あるいはMφの食食能の低下を抑制することによって、リンパ球の反応性を回復させたのではないかと思われる。

以上を総括すると、葛根湯はMφの異物食食能を活性化することにより、初期感染状態での異物排除能を亢進させるとともに、活性化Mφを介して細胞性免疫に影響を及ぼすと考えられる。すなわち、葛根湯は主にMφに関与し、細胞性免疫系には直接関与していないように思われ、葛根湯が初期感染病態＝太陽病の範疇で作用する漢方方剤であることが示唆された。今後、太陽病の次に誘発されてくる「少陽病」に応用される小柴胡湯の免疫応答に及ぼす薬理活性スペクトルと葛根湯のそれを比較すれば、さらに漢方医学的に興味ある結果が得られるものと思われる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご援助頂いた榎ツムラに深謝致します。

文 献

- 1) 松田秀秋, 塩本秀己, 久保道徳: 漢方方剤の薬理活性研究 (第2報) 大黃廬虫丸エキスを投与による慢性炎症への影響. 和漢医薬学会誌 **6**, 165-171, 1989.
- 2) 久保道徳, 松田秀秋, 長尾孝治, 谿 忠人, 難波健輔, 有地 滋: 桂枝茯苓丸の全身状態の修復作用. 和漢薬シンポジウム **16**, 171-182, 1983.
- 3) 久保道徳: 駆瘀血剤に含まれる生薬とその薬理. 治療学 **10** (Suppl.), 69-74, 1983.
- 4) 久保道徳, 吉川正人, 森浦俊次, 松田秀秋: 漢方方剤の薬理活性研究 (第1報) 実験的腎炎の尿蛋白排泄に対する猪苓湯の効果. 和漢医薬学会誌 **6**, 115-121, 1989.
- 5) 張 仲景: “傷寒論,” 趙開美本, 卷3, 8-9丁, 1599.
- 6) 志賀 隆, 小松靖弘, 細谷英吉: 葛根湯のアルサス型および遅延型アレルギー反応に対する作用. 和漢医薬学会誌 **5**, 41-45, 1988.
- 7) Weir D.M. (ed.), Stuart, A.E., Habesham, J.A. and Davidson, A.E.: Phagocytes in vitro. “In Handbook of Experimental Immunology,” Blackwell Scientific Publications, Oxford, Vol. 2, p. 19, 1973.
- 8) 松田秀秋, 長谷川敏代, 久保道徳: 薬用人参の薬理学的研究 (第7報) 紅参の感染防御作用. その1. マウス網内系の食食活性化作用. 薬誌 **105**, 948-954, 1985.
- 9) Fisher, S., Riley, W.B. 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.
- 10) Aukland, K., Bower, B.F. and Berliner, R.W.: Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circulation Research* **14**, 164-187, 1964.
- 11) Asherson, G.L. and Ptak, W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse I. Active sensitization and passive transfer. *Immunology* **15**, 405-416, 1968.
- 12) 石田名香雄: 担癌動物に見られる免疫抑制の実験. 薬誌 **105**, 91-108, 1985.
- 13) Kettman, J.R.: Modulation of the acquisition and expression of immunity by tilorone: I. Delayed-type hypersensitivity responses. *Immunopharmacology* **1**, 21-28, 1978.
- 14) Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B.N.: Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system. II: A study of the kinetics of the granulopoietic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity. *Br. J. Exptl. Pathol.* **34**, 441-457, 1953.
- 15) 菅原 勇, 石坂重昭, 稲沢正士: 食品添加物の免疫学—カラゲニンを中心に. 医学のあゆみ **127**, 267-274, 1983.