

マウス Kupffer 細胞の prostaglandin E₂ 産生に及ぼす小柴胡湯の影響

河田 則文,^{a)} 申 東桓,^{a)} 筒井ひろ子,^{a)} 溝口 靖紘,^{*a)} 小林 絢三,^{a)}
近藤 洋子,^{b)} 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

Effect of Sho-saiko-to on production of prostaglandin E₂ by mouse Kupffer cells

Norifumi KAWADA,^{a)} Toukan SHIN,^{a)} Hiroko TSUTSUI,^{a)} Yasuhira MIZOGUCHI,^{*a)} Kenzo KOBAYASHI,^{a)}
Hiroko KONDOU,^{b)} Seiji MORISAWA,^{b)} and Sukeo YAMAMOTO^{c)}

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

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

^{c)}Osaka Socio-Medical Center Hospital

(Received March 6, 1989. Accepted July 30, 1989.)

Abstract

The effect of Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) on prostaglandin (PG) E₂ production by liver macrophages, Kupffer cells, stimulated with calcium ionophore A23187 or zymosan A, was studied. Kupffer cells released a small amount of PGE₂ spontaneously, but, when they were cultured with Sho-saiko-to, production increased. In addition, Kupffer cells released a large amount of PGE₂ under stimulation with calcium ionophore A23187 or zymosan A, and production of PGE₂ was significantly promoted when they were treated with Sho-saiko-to. These results suggested that Sho-saiko-to enhances synthesis of PGE₂ by mouse Kupffer cells in an *in vitro* experimental system.

Key words Sho-saiko-to (Syô-saiko-tô), Kupffer cell, prostaglandin E₂.

Abbreviations FCS, fetal calf serum; HBSS, Hanks' balanced salt solution; PRMI, Roswell Park Memorial Institute; Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

緒 言

小柴胡湯は広く肝疾患治療薬として用いられており,¹⁾ その作用機序としては免疫調節作用や抗炎症作用などが想定されている。すなわち, マクロファージの活性化と interleukin 1 産生の増強,²⁾ Tリンパ球による interleukin 2 産生の増強,³⁾ Bリンパ球による抗体産生の促進,⁴⁾ さらに natural killer 細胞活性の増強⁵⁾ 等を介して免疫作用を調節する一方, グルココルチコイド作用を増強させたり, あるいは, アラキドン酸カスケードに影響を及ぼす⁶⁾ ことで抗炎症的に作用する可能性が示唆されている。しかしながら, 小柴胡湯が肝局所細胞に対していかなる作

用を及ぼすかについては検討されていない。今回著者らは, マウスから Kupffer 細胞を分離し, Kupffer 細胞から産生遊離する prostaglandin E₂ (以下, PGE₂) 量に及ぼす小柴胡湯の影響について *in vitro* の実験系で検討した。

材料と方法

1. 材料

小柴胡湯は小柴胡湯エキス原末 (ツムラ) を既報のようにして調製した^{2,4,5)} ものをを用いた。Collagenase (type 1, 和光純薬), pronase E (Merck 社), HEPES (Sigma 社), calcium ionophore A23187 (以下, A23187, Sigma 社), zymosan A

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

(以下, zymosan, Sigma 社), PGE_2 標準品 (和光純薬), 抗 PGE_2 抗体 (Pasteur 社), ^3H - PGE_2 (NEN 社) はそれぞれ購入した。エタノールおよびリン酸は特級のものを, アセトニトリルは高速クロマトグラフィー用のものを和光純薬から購入した。

2. 動物

6週齢の BALB/c マウスを日本クレア社から購入して実験に用いた。

3. 実験方法

(1) マウス Kupffer 細胞の分離: Munthe-Kaas らの方法⁷⁾ に準じてマウスから Kupffer 細胞を分離した。略記すると, マウスをペントバルビタール麻酔下に開腹後, 門脈にカニューレを挿入し, Ca^{2+} -free の HBSS 10 ml を流して肝臓から血液を洗い流した。ついで灌流液を 0.05% collagenase を含む HBSS にかえて 10 ml 灌流し, さらに 0.2% pronase を含む HBSS で灌流した。灌流後, 肝臓を摘出して細切し, 0.2% pronase を含む HBSS 中で 37.0°C , 20 分間振盪して肝実質細胞を消化した。ガーゼ濾過により未消化物を取り除いたのち, 400 g, 10 分間の遠心を 4 回繰り返して細胞を HBSS 溶液にて洗浄した。この細胞を 20% FCS 含有 Eagle MEM に浮遊させて plastic dish にて 37°C , 24 時間培養し, 培養後 plastic dish に付着性の細胞のみを採取した。こうして得られた Kupffer 細胞を洗浄後 10% FCS 含有 RPMI 1640 で 1×10^6 cells/ml に調整し実験に用いた。なお, このようにして得られた細胞の生存率は 95% 以上であった。

(2) Kupffer 細胞の小柴胡湯処理方法: 上述の Kupffer 細胞浮遊液に 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ の小柴胡湯を添加して 24 時間培養し, この培養上清中に含まれる PGE_2 量を測定した。また, 小柴胡湯添加 24 時間後に, 今度は小柴胡湯を含まない培養液と交換して培養を開始した Kupffer 細胞を小柴胡湯処理 Kupffer 細胞とし, その後, 直ちにこの細胞を A23187 (1 $\mu\text{g/ml}$) あるいは zymosan (1 mg/ml) で刺激を加えた場合に産生される PGE_2 量を小柴胡湯非処理 Kupffer 細胞と比較した。

(3) PGE_2 の定量方法: 培養は全て培養液の 4 倍量に相当する冷エタノール (-20°C) を加えることで停止させた。これを polypropylene tube に移し, 遠心 (2000 g, 4°C , 15 分) によって除蛋白し, 上清をとって蒸発濃縮し, 40% メタノールに溶解させて, reversed phase-high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) にかけた。RP-HPLC

は移動相をアセトニトリル: 水: リン酸 = 37.5: 62.5: 0.1 として流速 0.8 ml/min で流し, 分析カラム (Develosil ODS 5k, 野村化学) 溶出液を波長 195 nm の吸光度でモニターし, あらかじめ調べておいた標準品の PGE_2 のリテンションタイムとリテンションタイムが一致するフラクションを分取した。これを再び濃縮し, サンプル中の PGE_2 量を radioimmunoassay にて定量した。

(4) 統計学的検討: 実験データはすべて mean $\pm$ S.E.M. で表した。分散分析法を用いて 5% 以下の危険率で有意差が認められた場合に, Student's *t*-test を行なった。

結 果

1. Kupffer 細胞の PGE_2 産生におよぼす小柴胡湯の影響

Kupffer 細胞を培養し, 24 時間後にその培養上清中に含まれる PGE_2 量を小柴胡湯添加群と非添加群について比較した。小柴胡湯非添加群の PGE_2 量は 894 ± 295 pg/ml であった。一方, 小柴胡湯を 0.1, 1, 10, 100 及び 500 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合の PGE_2 量は, それぞれ, 1220 ± 103 , 992 ± 98.5 , 1765 ± 166 , 2350 ± 346 及び 2662 ± 313 pg/ml と変動した。すなわち, 小柴胡湯 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加群および 500 $\mu\text{g/ml}$ 添加群においては Kupffer 細胞培養上清中 PGE_2 量が有意に上昇した ($p < 0.01$, Fig. 1)。

2. A23187 あるいは zymosan による PGE_2 産生誘導

A23187 および zymosan はともに macrophage 等に作用して PGE_2 の産生を増強することが知られている。そこで, Kupffer 細胞にこれらの stimulant を与えて 24 時間培養した場合にも PGE_2 の産生が増強されるかどうかについて検討し, さらに Kupffer 細胞を小柴胡湯で処理した場合についても検討した。まず, Kupffer 細胞を A23187 で刺激すると PGE_2 産生量は 1263 ± 125 pg/ml となり, これは非刺激群の 887 ± 168 pg/ml と比較して上昇した。さらに, 小柴胡湯で処理した Kupffer 細胞では, 小柴胡湯 100 $\mu\text{g/ml}$ および 500 $\mu\text{g/ml}$ 処理により PGE_2 産生量はそれぞれ 4135 ± 570 pg/ml, 5838 ± 453 pg/ml と小柴胡湯非処理群と比較して有意に増加した ($p < 0.01$, Fig. 2)。一方, Kupffer 細胞を zymosan で刺激すると PGE_2 の産生量は 6202 ± 633 pg/ml と著明に増加した。さらに, 小柴胡湯で処理した Kupffer 細胞では, 小柴胡湯 100

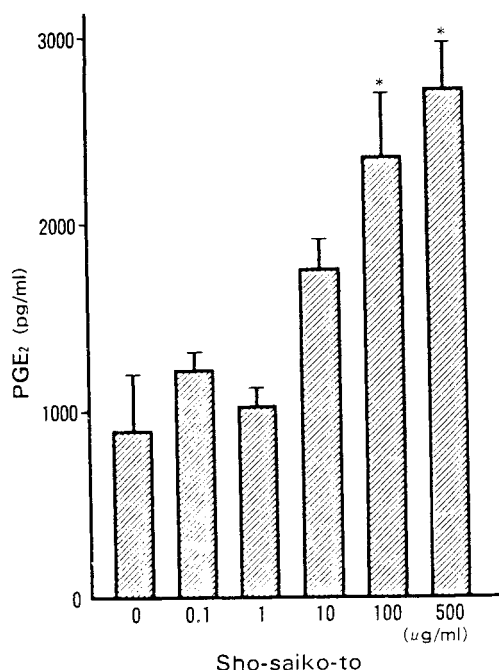


Fig. 1 Effect of Sho-saiko-to on PGE₂ production by mouse Kupffer cells without stimulation.

Mean ± S.E.M. of 5 experiments. * : $p < 0.05$.

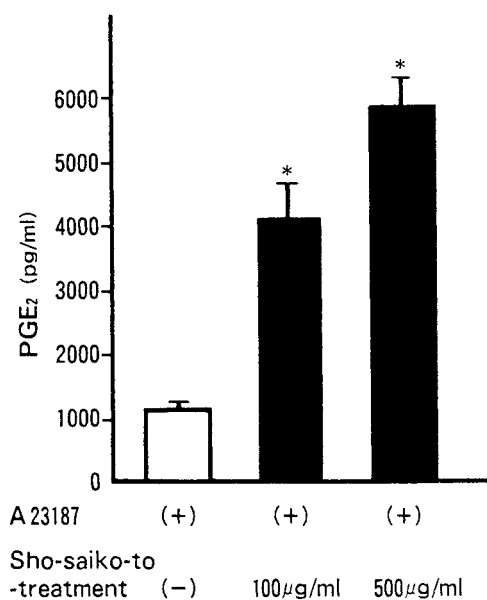


Fig. 2 Effect of Sho-saiko-to treatment on PGE₂ production stimulated with A23187.

Mean ± S.E.M. of 5 experiments. * : $p < 0.01$.

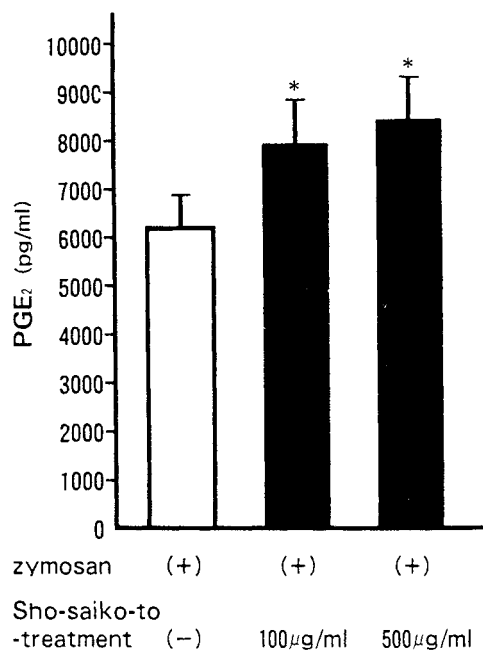


Fig. 3 Effect of Sho-saiko-to treatment on PGE₂ production stimulated with zymosan.

Mean ± S.E.M. of 5 experiments. * : $p < 0.05$.

μg/ml および 500 μg/ml 処理により PGE₂ 産生量がそれぞれ 7935 ± 699 pg/ml, 8359 ± 894 pg/ml と小柴胡湯非処理群と比較して有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 3)。

なお、培養後の Kupffer 細胞の生存率は、小柴胡湯添加群、非添加群ともに90%以上であった。

考 察

小柴胡湯が免疫調節作用を持つことは広く認められている。すなわち、macrophage を活性化させて、その抗腫瘍活性を増強すること²⁾、T lymphocyte に作用してその colony 形成を増強したり、interleukin 2 産生を増強すること³⁾、lymphokine activated killer 細胞活性を増強すること⁸⁾、B lymphocyte に作用してその抗体産生を促進すること⁴⁾、さらに natural killer 細胞活性を増強すること⁵⁾ が報告されている。

ところで、免疫応答を考えるうえで、個々の細胞のみならず、細胞間相互作用を考えることは重要である。たとえば、macrophage が抗原刺激などを受けると interleukin 1 産生を介して lymphocyte を活性化し、以下の免疫応答を正に導く⁹⁾ と同時に、PGE₂ を産生して免疫反応全般に負の feed-back を

かけることが知られている¹⁰⁾。また、活性化をうけた helper T lymphocyte は macrophage activating factor の産生を介して macrophage を活性化するが¹¹⁾、この macrophage activating factor は macrophage からの PGE₂ 産生を増強する¹²⁾。このように、免疫応答は正と負のバランスのうえに成り立っており、この両者について検討する必要があるものと思われる。

PG は arachidonic acid が cyclooxygenase の作用により代謝されて生成する多彩な生理活性を持つ物質の一群で、なかでも PGE₂ の作用に関する解析が進み、微血管拡張作用をもち炎症病変の形成に関与する¹⁴⁾。一方、種々の細胞からの interleukin 1 や interleukin 2 産生を抑制したり、helper T lymphocyte 活性を抑制することで、免疫抑制的な作用をあわせ持つことが知られている¹¹⁾。この PG 産生細胞は macrophage 系細胞が主体であり、肝臓においては Kupffer 細胞が生合成することが報告されている¹⁵⁾。

Kupffer 細胞は肝固着の網内系細胞であり、血管内皮細胞、pit 細胞および伊東細胞とともに肝類洞壁を構成する細胞である。食能をもつことから門脈血中の異物の除去を行なうといった重要な役割を果たし、さらに、Ia 抗原が陽性であることから、antigen presenting cell としての機能を持つことや、interleukin 1 を産生するなど肝局所免疫を考えると位置付けは大きい。したがって、肝疾患治療薬がこの Kupffer 細胞機能を如何に修飾するかを検討することは大きな課題である。

以上のような見地から、今回著者らは Kupffer 細胞の PGE₂ 産生に及ぼす小柴胡湯の効果について検討した。その結果、小柴胡湯は Kupffer 細胞から spontaneous に放出される PGE₂ 量を増加させること (Fig. 1)、小柴胡湯で処理した Kupffer 細胞から刺激下に遊離する PGE₂ 量は著明に増加すること (Fig. 2, Fig. 3) が明らかとなった。この結果は、先に述べたことから、Kupffer 細胞が小柴胡湯により活性化を受けたための feed-back 機構の一端である可能性がある。あるいは、小柴胡湯にはマウス Kupffer 細胞の phospholipase A₂ あるいは cyclooxygenase 活性を増強する作用があるのかもしれない。小柴胡湯の phospholipase A₂ に対する作用については既に著者らはむしろ抑制的に作用する可能性を報告したが⁶⁾、この時の検討では、動物として Hartley 系雄性モルモットを用いたこと、さらに、使用した細胞はモルモットに marcol 52 を注入して採取した macrophage であり、活性化を

受けた状態であったことなど、こういった動物種差や細胞の状態により小柴胡湯の効果が相違する可能性が考えられる。

いずれにせよ、肝局所免疫反応を調節する可能性がある Kupffer 細胞の PGE₂ 産生を小柴胡湯が増強することが *in vitro* の実験系で明らかとなった。

結 論

小柴胡湯がマウス Kupffer 細胞の PGE₂ 産生を増強する傾向を *in vitro* の実験系で認めた。

文 献

- 1) 山内 浩, 石井裕正: B 型慢性肝炎に対する漢方製剤長期投与の臨床効果. 和漢医薬学会誌 4, 376-377, 1987.
- 2) 北村瑞穂, 溝口靖紘, 山本祐夫, 柴田悠喜, 森沢成司: 小柴胡湯の抗腫瘍作用について. 和漢医薬学会誌 2, 32-38, 1985.
- 3) 松田重三, 合地研吾, 斎藤紀子, 風間睦美, 安部 英: T cell colony 形成能に及ぼす小柴胡湯の影響に関する検討—第 2 報. 和漢医薬学会誌 2, 632-633, 1985.
- 4) 池本吉博, 溝口靖紘, 新井孝之, 山本祐夫, 森沢成司: 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.
- 5) 溝口靖紘, 藤信裕美子, 小林絢三, 山本祐夫, 森沢成司: 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, 184-188, 1986.
- 6) 大倉靖史, 阪上吉秀, 溝口靖紘, 小林絢三, 山本祐夫, 竹田茂文, 油田正樹, 森沢成司: マクロファージにおけるアラキドン酸代謝に及ぼす小柴胡湯の影響. 和漢医薬学会誌 3, 396-397, 1986.
- 7) Munthe-Kaas A.C., Berg, T., Seglen, P.O. and Seljelid, R.: Mass isolation and culture of rat Kupffer cells. *J. Exp. Med.* 141, 1-10, 1975.
- 8) 溝口靖紘, 阪上吉秀, 山本祐夫: Lymphokine activated killer (LAK) cell 活性に及ぼす小柴胡湯の影響. アレルギー 35, 1119-1121, 1986.
- 9) Mizel, S.B.: Interleukin 1 and T cell activation. *Immunological Rev.* 63, 51-55, 1982.
- 10) Goodwin, J.S. and Webb, D.R.: Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 15, 106-122, 1980.
- 11) Schultz, R.M. and Kleinschmidt, W.J.: Functional identity between murine γ -interferon and macrophage activating factor. *Nature* 305, 239-241, 1983.
- 12) Hamilton, T.A., Rigsbee, J.E., Scott, W.A. and Adams, D.O.: γ -Interferon enhances the secretion of arachidonic acid metabolites from murine peritoneal macrophages stimulated with phorbol diesters. *J. Immunol.* 134, 2631-2636, 1985.
- 13) Samuelsson, B., Granstrom, E., Green, K., Hamberg, M. and Hammarstrom, S.: Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 669-695, 1975.

- 14) Bower, G.J., MacVittie, T.J. and Hirsh, E.F. : Prostanoid production by lipopolysaccharide-stimulated Kupffer cells. *J. Surg. Res.* **38**, 501-508, 1985.
- 15) Jones, E.A. and Summerfield, J.A. : Kupffer Cells. "The Liver : Biology and Pathology," 2nd Ed, Chap. 37, Raven Press, Ltd., New York, pp. 683-704, 1988.