

小柴胡湯の *in vitro* における末梢血単核細胞での IL-6 産生に及ぼす影響三木 俊治,*^{a)}三木 善次,^{b)}山本 昌弘^{a)}^{a)}日本生命済生会附属日生病院第三内科, ^{b)}三木医院Effect of Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) on the production of IL-6 by peripheral blood mononuclear cells *in vitro*Shunji MIKI,*^{a)} Yoshitsugu MIKI^{b)} and Masahiro YAMAMOTO^{a)}^{a)}The Third Department of Internal Medicine, Nissei Hospital, ^{b)}Miki Clinic

(Received May 25, 1990. Accepted August 1, 1990.)

Abstract

When human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured with Sho-saiko-to *in vitro*, the production of interleukin-6 (IL-6) by PBMC was dose-dependently increased. It has been demonstrated that IL-6 is absolutely required for antibody production by B cells and induces IL-2 receptor expression in a certain T cell line or thymocytes. From the result, IL-6 might be involved in actions of Sho-saiko-to.

Key words Sho-saiko-to (Syô-saiko-tô), interleukin-6, peripheral blood mononuclear cells.

Abbreviations RPMI, Roswell Park Memorial Institute; Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

緒 言

小柴胡湯は、既に多くの研究者により種々の免疫賦活作用を含む多くの薬理作用を有することが知られている。特に HBe 抗原陽性の慢性活動性肝炎患者の治療において、e 抗原陽性から e 抗体陽性への seroconversion の誘導に有用であるとされている。この機序として、小柴胡湯の生体免疫系への作用が注目されており、小柴胡湯が直接マクロファージおよびリンパ球系に作用して interleukin 1 産生増加、抗体産生増加作用のあることが、報告されている^{1,2)}。一方、interleukin 6 (IL-6) は、活性化 B 細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する因子として報告されている³⁾。我々は、小柴胡湯の免疫系への作用の一部が、IL-6 を介して行なわれているのではないかと推察し、両者の関係をヒト末梢血単核細胞を用いて調べた結果、*in vitro* において小柴胡湯がヒト末梢血単核細胞の IL-6 産生を有意に増加させることを認めためたので、ここに報告する。

材料と方法

(1) ヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) の分離: 健常者 5 人より得たヘパリン加静脈血より Ficoll-Hypaque の比重遠心法により分離した。

(2) PBMC の IL-6 産生能に対する小柴胡湯の影響: 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI 1640 培養液に、 2×10^6 cells/ml で浮遊した PBMC に、25~400 μ g/ml の濃度の小柴胡湯懸濁液〔(株)ツムラ社製乾燥エキス粉末を 10% FCS を含む RPMI 1640 培養液で 37°C 30 分間加温して溶解後 Nuclear Filter (0.45 μ m, ADVANTEC・TOYO 製) を通したものを〕を添加し、total 1 ml とし、24 well 培養プレート (Becton Dickinson 社製) 上に、5% CO₂ 大気下 37°C で 48 時間培養し、その上清を IL-6 サンプルとして使用した。また positive control として、小柴胡湯の代わりに、PHA (0.1% (V/V), Difco 社製)⁴⁾ を加えた培養上清中の IL-6

*〒550 大阪市西区立売堀6-3-8
6-3-8 Itachibori, Nishi-ku, Osaka 550, Japan

活性も測定した。

(3) **IL-6 活性測定**: IL-6 依存性マウスハイブリドーマクローン MH60, BSF-2 (大阪大学細胞工学センター岸本忠三教授より供与された) を用いた細胞増殖反応により施行した。IL-6 を含まない RPMI 培地で 3 回以上洗浄 ($150 \times g$, 5 分間) した MH60, BSF-2 を倍々希釈したりコンビナント IL-6 および検体とともに、 5×10^4 cells/ml の細胞濃度に懸濁し、96 well 平底プレート ($200 \mu\text{l}$ /well) にて 48 時間、5% CO_2 下、 37°C で培養し、培養終了 6 時間前に ^3H チミジン $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ を加える。培養終了後、セルハーベスターを用いてフィルター上に細胞を集め、風乾後液体シンチレーションカウンターを用いて ^3H の比放射活性を測定し、リコンビナント IL-6 による標準曲線から、検体の IL-6 活性を算出した⁵⁾。また、未知の因子の存在あるいは、他のサイトカインとの相乗効果による MH60, BSF-2 の増殖誘導の可能性を除外するため、培養上清中に goat anti IL-6 serum (Dr. Poole, National Biological Standards Board, WHO より供与された) を加えることにより、濃度依存的に MH 60, BSF-2 の増殖が阻害されることを確認した。

結 果

PBMC 培養液中に種々の濃度の小柴胡湯と、PHA [0.1% (v/v)] を添加培養した時産生されてくる IL-6 活性を測定した結果を、Fig. 1 に示す。

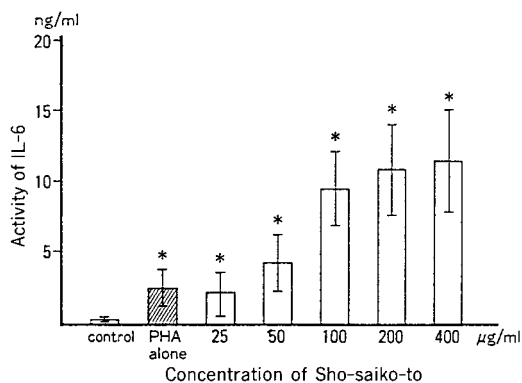


Fig. 1 Effect of Sho-saiko-to on the production of IL-6 by peripheral blood mononuclear cells ($n=5$) *in vitro*.

*Each value represents the mean \pm S.D.

* $p < 0.001$ vs. control

PBMC 単独で培養した培養上清中には、 152 ± 74 pg/ml と、低量の IL-6 が検出されたが、小柴胡湯添加により、濃度依存的に IL-6 活性の増加が確認され、その値は PBMC 単独培養時に比べ有意 ($p < 0.001$) に高かった。PHA [0.1% (v/v)] を加えた PBMC 培養上清中の IL-6 活性は、 2.4 ± 1.3 ng/ml であり、小柴胡湯 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加時と、ほぼ同程度であった。

考 察

IL-6 は、PHA 刺激あるいは、抗原刺激された末梢単核球培養上清中に存在し、EBV で形質転換された B 細胞株 SKW6-CL4 細胞に作用して IgM 産生を誘導したり、PWM と T 細胞で活性化された B 細胞に作用して、その細胞増殖には影響されずに、Ig 産生を誘導することが報告されている³⁾。また、T 細胞に対しては、マイトゲン刺激を受けた T 細胞に IL-2 産生を誘導すること、キラー T 細胞の分化を誘導する実験結果も得られている^{6, 8)}。これら、抗体産生や、キラー T 細胞の分化誘導作用は、小柴胡湯の免疫賦活作用と類似するものである^{1, 2)}。小柴胡湯が PBMC の IL-6 産生能を増加させた今回の結果は、小柴胡湯の多彩な免疫系作用の一部に、IL-6 が関与しているであろうことを示唆している。IL-6 は、肝細胞に作用して急性期蛋白の合成を誘導する⁹⁾。一方、小柴胡湯は、抗炎症作用をもち、¹⁰⁾ ステロイドとの併用にてステロイド必要量の減少を期待できる¹¹⁾。ステロイドは、IL-6 の産生を抑制する物質として知られている¹²⁾。このように、IL-6 の作用が、報告されている小柴胡湯の作用と、対立することもあるが、その違いも、小柴胡湯が下垂体-副腎皮質系に対し、促進的に働き、内因性ステロイドの増加が期待できることによって¹³⁾、一部は説明できるかもしれない。しかし、小柴胡湯が、ある場面においては、IL-6 の産生を抑制する可能性も否定できず、今後は多方面から、小柴胡湯の諸作用と、IL-6 の関係が検討されることを期待したい。

結 論

ヒト末梢血から分離したリンパ球に富む単核細胞に、*in vitro* で小柴胡湯を加えて培養すると、培養上清中の IL-6 活性が著明に増加した。小柴胡湯が単核細胞の IL-6 産生を増加させたと考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 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) Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* **167**, 332-344, 1988.
- 4) Nakajima, K., Martinez-Maza, O., Hirano, T., Breen, E.C., Nishanian, P.G., Salazar-Gonzalez, J.F., Fahey, J. L. and Kishimoto, T.: Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN- β_2) production by HIV. *J. Immunol.* **142**, 531-536, 1989.
- 5) Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.: Establishment of an interleukin 6/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* **18**, 951-956, 1988.
- 6) Noma, T., Mizuta, T., Rosen, A., Hirano, T., Kishimoto, T. and Honjo, T.: Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B lymphotropic lymphokines. *Immunol. Lett.* **15**, 249-253, 1987.
- 7) Lotz, M., Jirik, F., Kabouridis, R., Tsoukas, C., Hirano, T., Kishimoto, T. and Carson, D.A.: BSF-2/IL-6 is a co-stimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 1253-1258, 1988.
- 8) Takai, Y., Wong, G.G., Clark, S.C., Burakoff, S.J. and Herrmann, S.H.: B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **140**, 508-512, 1988.
- 9) Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T. and Heinrich, P.C.: Induction of rat acute phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur. J. Immunol.* **18**, 717-721, 1988.
- 10) 有地 滋: 柴胡およびサイコサポニンの研究(2)サイコサポニンの抗炎症作用の機序について, 近大医誌 **4**, 73-78, 1979.
- 11) 太田康幸, 谷口嘉康, 加藤壽一: Saikosaponin の Glucocorticoid 作用増強の機序について, 和漢医薬学会誌 **3**, 231-234, 1986.
- 12) Helgott, D.C., May, L.T., Sthoeger, Z., Tamm, I. and Sehgal, P.B.: Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of β_2 interferon by human fibroblasts. *J. Exp. Med.* **166**, 1300-1309, 1987.
- 13) 加藤壽一: サイコサポニン-d のグルココルチコイド作用増強効果及びその作用機序に関する研究, 愛媛医学 **6**, 225-236, 1987.