

ヒト末梢血単核細胞のインターロイキン 4 および インターロイキン 6 産生に及ぼすゴモシン A 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)}
木岡 清英,^{a)} 森沢 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 gomisin A on interleukin 4 and 6 production from human peripheral blood mononuclear cells

Itaru HASEGAWA,^{a)} Yasuhiro MIZOGUCHI,^{a)} Hiroko TSUTSUI,^{a)} Yuzo ICHIKAWA,^{a)} Norifumi KAWADA,^{a)}
Kiyohide KIOKA,^{a)} 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)}The Osaka Socio-Medical Center Hospital

(Received August 9, 1990. Accepted December 8, 1990.)

Abstract

When human peripheral blood mononuclear cells were stimulated with concanavalin (Con) A, interleukin 6 production increased significantly, while interleukin 4 production did not increase. However, these interleukin 4 and 6 productions increased, when the mononuclear cells were stimulated with Con A and gomisin A simultaneously. These results suggested that gomisin A affects immunoreactions.

Key words interleukin 4, interleukin 6, gomisin A.

Abbreviations BCGF, B cell growth factor; BSF, B cell stimulating factor; Con A, concanavalin A; FCS, fetal calf serum; IL, interleukin; LAK, lymphokine activated killer; LPS, lipopolysaccharide; NK, natural killer; *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; RPMI, Roswell Park Memorial Institute.

緒 言

著者らは先にグラム陽性嫌気性菌である *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 加熱死菌をマウスやラットに静注し, 7 日後に微量のグラム陰性菌由来の内毒素, lipopolysaccharide (LPS) を静注すると, ほとんどの動物は広範な肝細胞壊死を起こして死亡することを観察した¹⁾。またこの肝細胞障害は *P. acnes* 加熱死菌によって肝に集積し, priming を受けた肝マクロファージが, LPS によって活性化され, インターロイキン (IL) 1 や肝細胞障害因子を産生するために誘導されることを実験的に示した。^{2, 4)}

一方, 五味子から抽出精製されたリグナン化合物であるゴモシン A は四塩化炭素⁵⁾, D-ガラクトサミン⁵⁾, dl-エチオニン⁶⁾ そしてオロトン酸誘発実験的肝障害モデル⁷⁾ に対して血清トランスアミナーゼの漏出を, 組織学的には肝細胞の変性, 壊死, それに伴う炎症反応を著明に抑制することが観察されている。⁸⁾

そこで, 著者らはこのような急性肝不全モデルを用いてゴモシン A の作用を検討し, ゴモシン A がこの肝不全モデルを著明に改善することを認めた。⁹⁻¹¹⁾

すなわち, *P. acnes* 加熱死菌静注 7 日後に LPS を静注する際に, ゴモシン A を経口的に投与すると, マウスの生存率が著しく改善され, 肝の組織学的変化も軽減された。

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

このような *P. acnes* の肝細胞障害防御作用を解析するため、著者らはゴミシンAの免疫反応に及ぼす影響について検討している。¹²⁾

今回はB細胞を最終的に抗体産生に誘導すると考えられているインターロイキン (IL) 4 および IL6 について、ゴミシンAのIL4およびIL6産生に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

(1) ヒト末梢血単核細胞のIL4およびIL6誘導

方法：健康ヒト末梢血をヘパリン加で採取して、Ficoll-Conray 重層遠心法で単核細胞を分離した。この単核細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS), 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 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 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。培養後、遠心 (400 g, 10 min, 4°C) して、その上清を回収し、IL4 および IL6 を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、IL4 および IL6 の誘導に対するゴミシンAの及ぼす影響について検討する場合は、Con A と同時にゴミシンA (6 ~ 100 µg/ml) を添加し、同様の方法で上清を採取した。また、末梢血単核細胞を Con A 非添加でゴミシンAと共に培養し、同様の方法で上清を採取した。

(2) IL4 の測定方法：前述の上清中の IL4 濃度を IL4 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 測定用キット (Quantikine human IL4 immunoassay, R & D Systems, Minneapolis) を用いて測定した。すなわち、抗ヒト IL4 モノクローナル抗体でコーティングした 96 穴 ELISA 用プレートに IL4 標準液及び検体をそれぞれ、200 µl ずつ各穴に注入して、室温で、2 時間反応させた。ついで、洗浄液で各穴を 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IL4 ポリクローナル抗体溶液を 200 µl ずつ各穴に注入し、室温で 2 時間反応させた。反応後、洗浄液で各穴を 3 回洗浄し、基質 (tetramethylbenzidine) 溶液 200 µl を各穴に注入し、室温で 20 分間反応させスペクトロフォトメーター (EAR 400AT, SLT 社製, Austria) で、450 nm の吸光度を測定した。標準液の吸光度から標準曲線を作成し、検体中の IL4 濃度を算出した。

(3) IL6 の測定方法：マウスの plasmacytoma の cell line の一種で IL6 dependent cell line である B9 細胞 (Dr. McNamara, Yale Univ. より贈与)¹³⁾ を 7.5% FCS を含む RPMI 1640 で 1×10^5 cells/ml に調整した細胞浮遊液 100 µl を 96 穴 (Costar 3599) に入れ、上述の IL6 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 µCi/ml 加え、さらに 4 時間培養後、細胞の酸不溶性分画への取込を液体シンチレーションカウンターで測定した。¹³⁾ なお、IL6 の活性は IL2 に用いられているのと同様の方法で half maximum を一単位として計算した。¹⁴⁾

また、ゴミシンAは株式会社ツムラより供与され、その調製は既報¹⁵⁾に準じて行った。

(4) 統計学的検討：実験結果は mean ± S.D. であらわし、統計処理は Student's *t*-test を適用した。

結 果

1. ヒト末梢血単核細胞のIL4産生に及ぼすゴミシンAの影響

健康ヒト末梢血単核細胞 (1×10^6 cells/ml) に Con A 添加または非添加で 37°C で 48 時間培養し、培養上清中の IL4 濃度を測定した。

その結果、Con A 非添加群では 47.2 ± 5.7 U/ml、Con A 添加群では 8.4 ± 34.7 U/ml で有意差を認めなかった ($n=5$ persons, Fig. 1)。しかし、ヒト末梢血単核細胞に Con A と同時に 12.5, 25 および 50 µg/ml のゴミシンAを添加して培養すると、IL4 の産生量はそれぞれ 84.2 ± 38.6 U/ml, 89.8 ± 38.4 U/ml, 283.8 ± 37.4 U/ml で、ゴミシンA非添加群

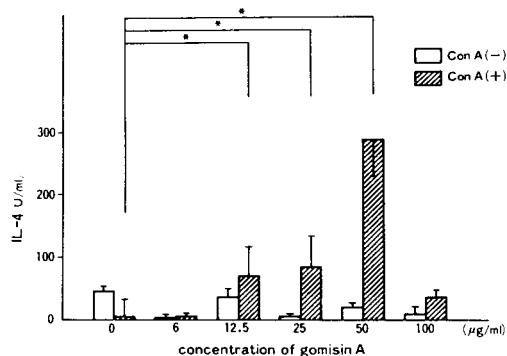


Fig. 1 The effect of gomisin A on the production of interleukin 4 from human peripheral blood mononuclear cells.

All values were mean ± S.D. of 5 persons.

* $p < 0.01$.

に比して有意に増加した ($p < 0.01$, $n = 5$ persons, Fig. 1)。

一方, Con A 非添加で末梢血単核細胞にゴモシン A を添加しても IL4 産生の増強は認められなかった ($n = 5$ persons, Fig. 1)。

2. ヒト末梢血単核細胞の IL6 産生に及ぼすゴモシン A の影響

ヒト末梢血単核細胞 (1×10^6 cells/ml) に $1 \mu\text{g/ml}$ 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 IL6 活性を測定した。

その結果, Con A 非添加群では 288 ± 130 U/ml に比して, Con A 添加群では 1642 ± 184 U/ml で, 有意に IL6 の産生が増強した ($p < 0.01$, $n = 5$ persons, Fig. 2)。

また, ヒト末梢血単核細胞に $1 \mu\text{g/ml}$ の Con A と同時に種々の濃度のゴモシン A を添加して同様の方法で上清を採取し, その上清中の IL6 活性を測定すると, Fig. 2 に示すように, ゴモシン A 非添加群に比して, ゴモシン A 添加群で IL6 の誘導が著明に認められた。すなわち, 12.5, 25 および $50 \mu\text{g/ml}$ のゴモシン A 添加群では IL6 産生量は 5940 ± 384 U/ml, 6210 ± 474 U/ml, 3182 ± 124 U/ml で, ゴモシン A 非添加群に比し IL6 の産生量は有意に増加した ($p < 0.01$, $n = 5$ persons, Fig. 2)。

なお, ヒト末梢血単核細胞に Con A 非添加で種々の濃度のゴモシン A を添加しても, IL6 の誘導はゴモシン A 非添加群と差を認めなかった ($n = 5$ persons, Fig. 2)。

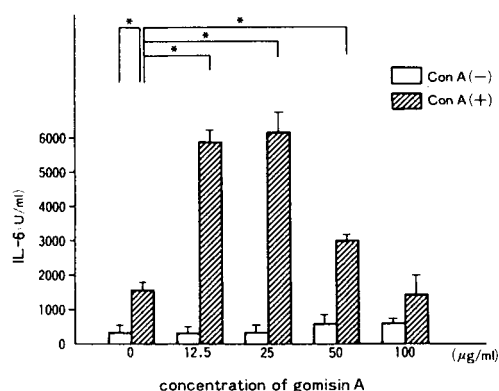


Fig. 2 The effect of gomisins A on the production of interleukin 6 from human peripheral blood mononuclear cells.

All values were mean $\pm$ S.D. of 5 persons.

* $p < 0.01$.

考 察

B細胞に抗体産生を誘導し得る因子として, 休止状態のB細胞を活性化させる B cell stimulating factor (BSF)-1/IL4,¹⁶⁾ 活性化されたB細胞に増殖を誘導する B cell growth factor (BCGF)-II/IL5, 最終的に抗体産生細胞に誘導する BSF-2/IL6 とがある。¹⁷⁾

この中で IL4 は抗原あるいは抗 IgM 抗体存在下で活性化されたB細胞の DNA 合成を誘導し増殖を促進させる。また, 静止期のB細胞にも直接的に働き, I_a 抗原の発現を高めるとともに, IgG₁, IgE の産生促進と, IgG₃, IgG_{2b} の産生を抑制することが知られている。¹⁸⁾ また IL6 は活性化B細胞から抗体産生細胞への分化誘導以外に, IL2 レセプターの誘導, IL2 産生誘導, キラー T 細胞分化誘導などがわかり, 両因子とも注目を浴びている。^{19, 20)}

さて, 著者らが確立した急性肝不全モデルは病態においてヒトの劇症肝炎とは異なるが, 肝障害の重篤な点で類似しており, 劇症肝炎の治療法の研究に有用であると考えられる。

著者らはすでに五味子より抽出精製されたゴモシン A が, 著者らが確立した急性肝不全の誘導抑制に極めて有効であり, 急性肝不全誘導時またはその直後に投与すると著明な生存率の改善をもたらし, 肝における組織学的変化も著しく軽減することを報告した。⁹⁻¹¹⁾

また, ゴモシン A は現在非 A 非 B 型慢性肝炎患者に対し, phase III の検討がなされている。しかしながらゴモシン A の詳細な薬理作用については不明である。

そこで, 著者らはゴモシン A の薬理作用を検討するため, 主として急性肝不全モデルを用いて検討してきた。今回はゴモシン A の免疫反応に及ぼす影響について検討するため, IL4 および IL6 について, *in vitro* の系を用いて検討した。その結果, ゴモシン A はヒト末梢血単核細胞の Con A 刺激による IL4 および IL6 産生を有意に増強した。しかし, ゴモシン A 単独でヒト末梢血単核細胞を刺激しても IL4 および IL6 産生に影響を与えなかった。なお, ゴモシン A のサイトカインを誘導する濃度は, サイトカインの種類により異なっていた。一方, 小柴胡湯においても IL1, IL2 の産生及び抗体産生は $200 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ の濃度で強く誘導され, NK 細胞活性には $0.1 \mu\text{g/ml}$ で最も強く誘導された。²¹⁻²⁴⁾ 従って, ゴモシン A も effector cell によって, その作

用濃度は異なる可能性が考えられる。

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IL1およびIL2の産生が低下していること、また、これらのIL1、IL2の産生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。²⁵⁾ 今回の実験結果でゴミシンAはCon A刺激によるヒト末梢血単核細胞のIL4およびIL6産生を増強することを示唆した。

また、著者らは既にゴミシンAがIL2産生を増強することを認めているので（未発表データ）、ゴミシンAは抗体産生系を増強する可能性がある。

なお、現在ウイルス性肝炎、特にB型慢性肝炎においてはseroconversion（HBe抗原が陽性から陰性になり、HBe抗体が陽性になること）あるいはseronegative（HBe抗原が陽性から陰性になること）現象を治療の目標にしている。従って、ゴミシンAはウイルス性肝炎、特にB型慢性肝炎に有効に作用する可能性を示唆する。

今後はゴミシンAの免疫反応に及ぼす影響についてin vivoの系でも検討していく必要がある。

結 論

ゴミシンAはCon A刺激によるヒト末梢血単核細胞のIL4およびIL6の産生を増強した。

文 献

- 1) 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 A. Kirn, D.L. Knook and E. Wisse), Kupffer Cell Foundation, The Netherlands, pp. 307-314, 1986.
- 2) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 関 守一, 山本祐夫, 原 久子, 巽 陽一, 門奈丈之, 森沢成司: 急性肝不全実験モデルによる肝細胞障害の検討(1)肝内粘着性細胞による肝細胞障害の誘導について, 日消誌 82, 603-609, 1985.
- 3) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 宮島慶治, 山本祐夫, 原 久子, 門奈丈之, 森沢成司: 急性肝不全実験モデルによる肝細胞障害の研究. II 脾細胞, 末梢血単核細胞および腹水滲出細胞の機能変化, 日消誌 82, 1520-1526, 1985.
- 4) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 加藤寛子, 福井美智留, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 山本祐夫, 森沢成司: 急性肝不全実験モデルによる肝細胞障害の検討. III 脾細胞の抗体産生能について, 消化器と免疫 14, 157-160, 1985.
- 5) 前田信也, 須藤和彦, 宮本吉昌, 竹田茂文, 新保真澄, 油田正樹, 池谷幸信, 田口平八郎, 原田正敏: 五味子薬

理学研究 (第2報), 五味子成分の薬物性肝障害に対する作用, 薬誌 102, 579-588, 1982.

- 6) 竹田茂文, 前村俊一, 須藤和彦, 加瀬義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 布野秀二, 新井祐一, 油田正樹, 細谷英吉: 実験的肝障害および肝薬物代謝酵素系に及ぼす五味子リグナン成分 gomisin A の作用, 日薬理誌 87, 169-187, 1986.
- 7) Maeda, S., Takeda, S., Miyamoto, Y., Aburada, M. and Harada, M.: Effects of gomisin A on liver functions in hepatotoxic chemicals-treated rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 38, 347-353, 1985.
- 8) 竹田茂文, 加瀬義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 長谷川雅之, 関口祐子, 立木朱美, 布野秀二, 油田正樹, 細谷英吉: 四塩化炭素誘発慢性肝障害ラットにおける肝線維化ならびに肝部分切除後の肝再生におよぼす五味子リグナン成分 TJN-101 の作用, 日薬理誌 90, 51-65, 1987.
- 9) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 小林絢三, 山本祐夫, 森沢成司, 大倉靖史: 実験的急性肝障害に対する gomisin A の防御作用, 日消誌 84, 670-674, 1987.
- 10) 大倉靖史, 溝口靖紘, 筒井ひろ子, 阪上吉秀, 宮島慶治, 山本祐夫, 竹田茂文, 油田正樹, 森沢成司: 急性肝不全マウスの生存率に及ぼす gomisin A の影響, 消化器と免疫 17, 111-114, 1986.
- 11) 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.
- 12) 溝口靖紘, 河田則文, 久保井広志, 小林絢三, 森沢成司, 山本祐夫: 実験的急性肝障害に対する gomisin A の防御作用—肝マクロファージのインターロイキン1およびtumor necrosis factor (TNF) 産生に及ぼす影響, 和漢医薬学会誌 6, 135-140, 1989.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. and Kobayashi, H.: The constituents of *Schizandra chinensis* Baili. I. Isolation and structure determination of five new lignans, Gomisin A, B, C, F and the absolute structure of shizandrin. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 1383-1394, 1979.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Lee, F. : Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that express B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell and mast cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2061-2065, 1986.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Morisawa, S., Mizoguchi, Y. and Yamamoto, S. : Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on antibody responses in vitro. Recent Advances in Traditional Medicine in East Asia, Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Genova, Tokyo, pp. 106-110, 1985.
- 22) 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.
- 23) 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. New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis. II. Chronic Hepatitis. Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, pp. 304-310, 1987.
- 24) 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**, 184-189, 1986.
- 25) 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.