

種々の週齢マウスの一次免疫応答能に及ぼす 麻黄附子細辛湯の効果

高木 康博,*^{a)} 前田 章子^{a)} 上羽 昇^{a)} 東 奈津美^{b)} 山村 博彦^{b)} 布浦 山樹^{b)}

^{a)}大阪府立公衆衛生研究所, ^{b)}小太郎漢方製薬株式会社

Effect of Mao-bushi-saishin-to on the primary antibody response in mice of different ages

Yasuhiro TAKAGI,*^{a)} Akiko MAEDA,^{a)} Noboru UEBA,^{a)} Natsumi HIGASHI,^{b)}
Hirohiko YAMAMURA^{b)} and Yoshiki NUNOURA^{b)}

^{a)}Osaka Prefectural Institute of Public Health, ^{b)}Kotaro Pharmaceutical Co.Ltd.

(Received November 27, 1995. Accepted February 15, 1996.)

Abstract

Mao-bushi saishin-to, which has long been used for treatment of common colds, is believed to activate immunological hypofunction particularly in the elderly, but the mechanisms involved not been examined. To clarify the activating effect of Mao-bushi-saishin-to on immunological function, its effect on primary antibody production in mice of various ages was investigated in *in vitro* and *in vivo* systems. In 10-week-old mice, Mao-bushi-saishin-to increased the number of antibody-producing cells (anti-IgM producing plaque forming cells, PFC) to levels about 120-150 % of those in the-matched control group in both systems, while it increased the cell count in the 52-to 104-week-old mice to levels 200-300 % of those in the control group. These results suggest that Mao-bushi-saishin-to markedly increases the reduced activity to produce antibodies in the elderly and activates the immune response.

Key words Mao-bushi-saishin-to, anti-IgM antibody response, mouse, senescence, primary antibody response.

緒 言

生体の免疫応答能は加齢とともに次第に低下してゆくことはよく知られている¹⁾。また高齢化とともに感染症、特に呼吸器系疾患が増加し、高齢者の死因の一つに肺炎が大きな比重を占めていることも報告されている²⁾。これらの原因には生体の免疫機能の衰退が密接に関与していることが示されている³⁾。

麻黄附子細辛湯は古くから感冒様疾患に用いられる処方方で、特に高齢者の感冒に良好な成績を示すことが数多く報告されている^{4, 6)}。これらは麻黄附子細辛湯が、低下した高齢期の免疫応答能を賦活化することによるものと考え

えられる。しかしながら、この点を詳細に解析した報告は極めて少ない。

そこで本実験は、麻黄附子細辛湯が種々の週齢のマウスのIgM抗体産生能にどのような効果を及ぼすかを、*in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて検討した。

材料と方法

(1) 麻黄附子細辛湯：麻黄附子細辛湯として次のようにして調製したエキスをを用いた。すなわち麻黄 (Ephedrae Herba, 大阪市場品)、炮附子 (Aconiti Tuber, 大阪市場品)、細辛 (Asiasari Radix, 大阪市場品) を細切して重量比4:1:3の割合で混合し、10倍量の脱イオン

*〒537 大阪市東成区中道1-3-69
1-3 69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan

水を加えて、約100°Cで1時間還流抽出した。抽出液を100メッシュの篩で濾過後、凍結乾燥して麻黄附子細辛湯エキスを調製した。エキス収率は約15%であった。

(2) 実験動物：実験には5週齢～104週齢(2年齢)のC3H/HeN(Cr-j)系雌マウスを用いた。

(3) 抗原：*in vitro*の実験では抗原として胸腺非依存性抗原のdinitrophenylated lipopolysaccharide (DNP-LPS)を、また*in vivo*の実験ではdinitrophenylated dextran (DNP-dextran)を用いた。

(4) IgM抗体産生に及ぼす効果の検討：

1) *in vitro*実験系を用いた検討：各週齢時の実験とも5～7匹のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュ(100 mesh)を通して脾臓の単細胞プール液(1×10^7 /ml in RPMI-1640 medium)を調製した。麻黄附子細辛湯はRPMI-1640培養液(日研生物医学研究所製)で懸濁して15分間超音波抽出した後、濾過滅菌した濾液を段階希釈して実験に供した。脾臓細胞の培養は、24穴培養プレートに上記脾臓細胞プール液の1 ml、麻黄附子細辛湯希釈液の1 ml、およびDNP-LPS(最終濃度0.0025 μ g/ml)を加えて混和し37°C、5% CO₂存在下で5日間培養した。5日後に各培養穴毎の抗DNP-IgM抗体産生細胞数を算定した。個々の実験は3～4回繰り返して行った。

2) *in vivo*実験系を用いた検討：各週齢時の実験とも、麻黄附子細辛湯を脱イオン水に懸濁して5 mg/mlと50 mg/mlの投与液を調製した。0.5 mg投与群(0.5 mg群)には5 mg/ml液を、体重25 g当たり0.1 ml(0.5 mg, 20 mg/kg)経口投与した。また5 mg投与群(5 mg群)には50 mg/ml液を体重25 g当たり0.1 ml(5 mg, 200 mg/kg)経口投与した。これらの投与は1日1回、週5回、2週間合計10回胃ゾンデを用いて行った。対照群には同量の脱イオン水を同様の方法で経口投与した。最終投与の翌日、尾静脈よりDNP-dextranの200 μ gを静注して抗原刺激した。抗原刺激の5日後に脾臓を摘出し、脾臓中の抗DNP-IgM抗体産生細胞数を個体毎に算定した。各週齢時の実験とも1群6～8匹のマウスを用い、2～4回繰り返して実験を行った。

(5) 抗体産生細胞数の測定：Jerneら⁷⁾およびMishellら⁸⁾のSlide Methodによるplaque forming cell (PFC) assayの方法を用いた。すなわち*in vitro*の実験では培養穴毎に培養脾臓細胞を0.5 mlのRPMI-1640培養液に再浮遊させ、その0.1 mlを0.5% agaroseの0.4 mlに加え、さらに10% trinitrophenyl 化ヒツジ赤血球の50 μ lを加えてゲル化させた後、37°Cの5% 補体液に45分間浸漬して、現れる溶血斑の数を算定し、抗DNP-IgM抗体の産性能を調べた。また*in vivo*の実験では個体毎に脾臓細胞浮遊液を調製したのち、同様にし

て溶血斑を形成する細胞数を算定して抗DNP-IgM抗体の産性能を調べた。

(6) 統計処理：実験結果の統計学的有意性の検討にはStudent's *t* Testを用いた。

結 果

1. *in vitro*実験系の成績

Fig. 1に培養脾臓細胞中に観察された抗DNP-IgM抗体産生細胞数(PFC数)の成績を示した。麻黄附子細辛湯を添加していない培養穴中(0.0 μ g/ml)のPFC数を種々の週齢で比較すると、5週齢から12週齢までは週齢が進むとともにPFC数も増加した。しかしその後24週齢から104週齢まで、加齢とともに、抗体産生細胞数は次第に減少した。一方、麻黄附子細辛湯を加えた培養穴中のPFC数は、いずれの週齢でも濃度依存的に増加し、50 μ g/mlで最も多いPFC数が観察された。しかし500 μ g/mlにおけるPFC数は50 μ g/mlに比べて減少していた。また50 μ g/mlにおけるPFC数を各週齢と比較してみると、104週齢を除いて、いずれの週齢でもほぼ同数のPFC数が観察された。各実験週齢ごとに0.0 μ g/mlの濃度の培養穴中のPFC数を100とした比で、各々の濃度の培養穴中のPFC数を表した成績をFig. 2に示した。最も多いPFC数が観察された50 μ g/mlの濃度におけるPFC数の比を各実験週齢で比較すると、24週齢、52週齢では0.0 μ g/mlのPFC数の200%程度であったが、78週齢、および104週齢ではそれぞれ290%、280%に増加していた。

2. *in vivo*実験系の成績

抗原刺激5日後の脾臓中に観察されたIgM抗体産生細胞数(PFC数)を脾臓細胞 10^6 個当たりで表した成績をFig. 3に示した。対照群(0.0 mg投与群)の抗体産生細胞数は5週齢から52週齢まで徐々に増加したが、78週齢では低下していた。麻黄附子細辛湯を投与すると、いずれの週齢においてもIgM抗体産生細胞数が増加しており、その程度は週齢によって異なっていた。10週齢では、5 mg投与群、0.5 mg投与群とも対照群の120%程度の増加であったが、5週齢および24週齢以後では150%を越える増加が観察された。Fig. 4に各実験週齢毎に対照群(0.0 mg投与群)のPFC数を100とした比で表した麻黄附子細辛湯投与群の成績を示した。10週齢時に観察された120%程度のPFC数の増加は、24週齢以後になると、0.5 mg投与群では、160～180%程度に増加していた。また5 mg投与群ではさらに高い190～230%の増加が観察され、週齢が高くなるほど効果が大きくなる傾向が観察された。一方、5週齢でも対照群の150～

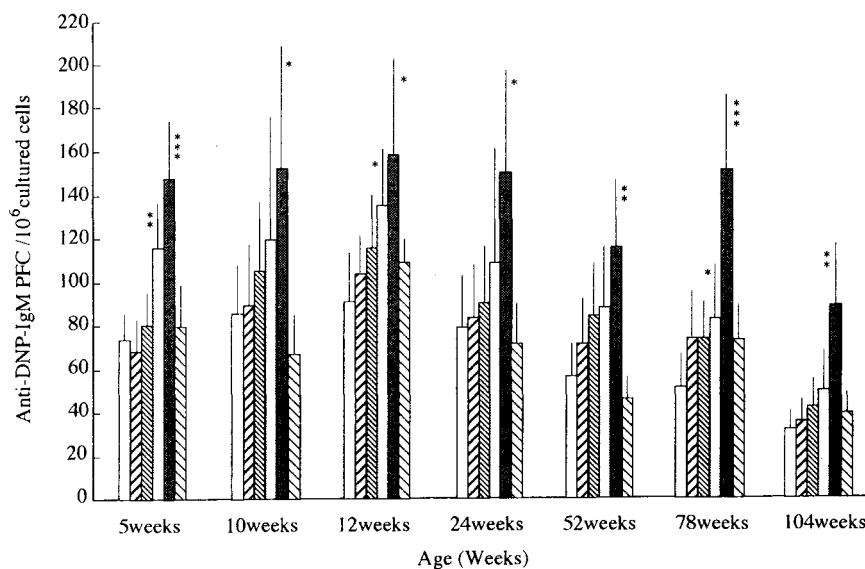


Fig. 1 Effect of Mao bushi-saishin-to (MBST) on anti-DNP-IgM PFC in cultured spleen cells from C3H/HeN mice of different ages. Each value is the mean $\pm$ S.D. of 3-4 independent experiments, each using a pool of 5-7 mice. In the statistical analyses performed using a Student's *t* test $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p > 0.05$ where no symbols are used. Concentration of MBST in culture medium: | | ; 0.0 μ g/ml, $\diagup$; 0.05 μ g/ml, $\boxtimes$; 0.5 μ g/ml, $\equiv$; 5.0 μ g/ml, $\boxdot$; 50 μ g/ml, $\boxminus$; 500 μ g/ml

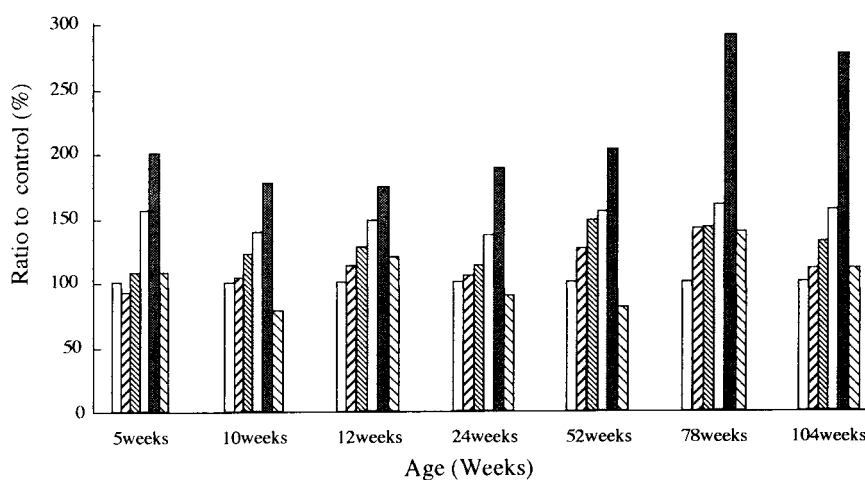


Fig. 2 Ratio of IgM PFC in culture wells containing various concentrations of MBST to control well IgM PFC (0.0 μ g/ml). Concentration of MBST in culture medium: | | ; 0.0 μ g/ml, $\diagup$; 0.05 μ g/ml, $\boxtimes$; 0.5 μ g/ml, $\equiv$; 5.0 μ g/ml, $\boxdot$; 50 μ g/ml, $\boxminus$; 500 μ g/ml

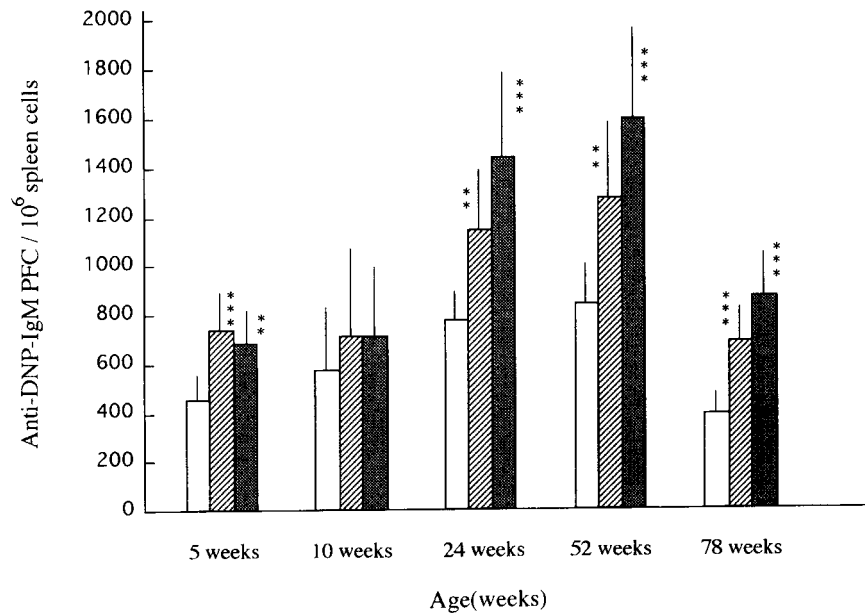


Fig. 3 Effect of Mao bushi-saishin to (MBST) on anti-DNP-IgM PFC in spleen cells. MBST was orally administered to C3H/HeN mice of different ages at doses of 0.0 mg, 0.5 mg and 5.0 mg/mouse.

Each value is the mean $\pm$ S.D. of 2-4 independent experiments, each using 6-8 mice. In the statistical analyses, performed using a Student's *t* test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p > 0.05$ where no symbols are used. Dose of MBST: [] : 0.0 mg, [] : 0.5 mg, [] : 5.0 mg

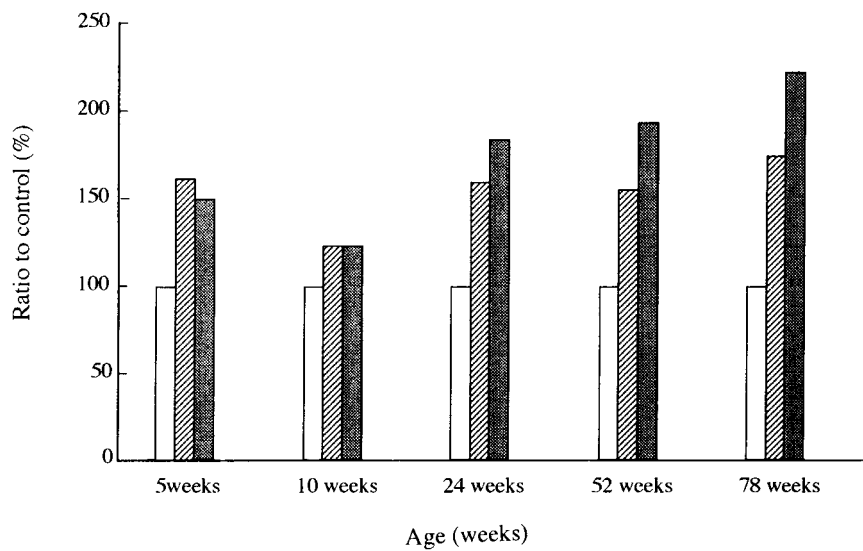


Fig. 4 Ratio of IgM PFC in MBST-administered mice of different ages to that in control mice (0.0 mg).

Dose of MBST: [] : 0.0 mg, [] : 0.5 mg, [] : 5.0 mg

160%に増加していた。

考 察

高齢期になると各種の疾病に罹患しやすくなることがよく知られており、これには免疫機能の低下が深く関わっていることが推察されている。麻黄附子細辛湯は古くから感冒様疾患によく用いられており、高齢者の感冒に特に良好な成績を示すことが報告されている。^{4,6)}これらは麻黄附子細辛湯が、低下した高齢期の免疫応答能を賦活化することによるものと考えられるが、その作用機序の詳細についての解析は十分ではなかった。

本実験は、麻黄附子細辛湯が一次免疫応答能に及ぼす効果を、マウスのほぼ全生涯にわたって解析することを目的とした。対照群についてみると *in vitro* の成績は成熟期 (10~12 週齢) 以後加齢とともに PFC 数が次第に減少したことから、抗体産生能が加齢に伴い衰退してゆくことが観察された。これらの培養液中に麻黄附子細辛湯を添加すると、PFC 数はすべての実験週齢において濃度依存的に増加し、50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で最も多かった。さらに濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ の PFC 数を実験週齢間で比較してみると、高齢期 (52~78 週齢)、老齢期 (78~104 週齢) の PFC 数はほぼ成熟期 (10~12 週齢) と同じ程度にまで増加していた。さらに 0.0 $\mu\text{g/ml}$ における PFC 数に対する比は、週齢が高くなるとともに高くなっていた。これらのことは、*in vitro* 系において、麻黄附子細辛湯には、種々の年齢の衰退した免疫応答能を、成熟期 (10~12 週齢) の程度にまで回復させる作用があることを示唆するものと考えられた。

一方、*in vivo* では対照群の PFC 数は 5 週齢から 52 週齢まで徐々に増加し、78 週齢で成熟期 (10~12 週齢) より低下した。これらのマウスに麻黄附子細辛湯を経口投与すると、いずれの週齢においても PFC 数が増加しており、麻黄附子細辛湯は経口投与によってもマウスの抗体産生能を高めることが示された。また対照群の PFC 数に対する比で増加の程度を比較すると、10 週齢以後、週齢の高い群ほど顕著な増加が認められた。これらのことから、麻黄附子細辛湯は抗体産生能の低下の程度が大きい週齢になるほど、その効果が顕著に現れる方剤であると考えられた。

本実験で用いた抗原は、*in vivo*、*in vitro* の両実験ともに胸腺非依存性抗原であることから、得られた成績は加齢にともなう B 細胞の機能低下、ならびに加齢により衰退した B 細胞機能に及ぼす麻黄附子細辛湯の効果を表しているものと考えられる。B 細胞機能の加齢に伴う機能変化としては、B 細胞の抗原に対する特異的抗体

産性能が低下すること^{9,10)}さらに B 細胞の分裂増殖能には大きな変化はみられないが、B 細胞から抗体産生細胞への分裂能が低下していることなどが報告されている。^{11,12)}本実験で得られた成績から麻黄附子細辛湯はこのような B 細胞の高齢期における機能低下を賦活化しているものと推察される。また高齢マウスでは B 細胞中の特異的抗体反応をコードする遺伝子の分子配列に変化が見られる可能性も示されていること¹³⁾から、一次免疫応答能における本方剤の作用機序を詳細に解析すること、ならびに加齢に伴い低下する T 細胞の機能にはいかなる効果を及ぼすかなどを解き明かすことがさらに必要なものと考えられる。

結 論

古くから感冒に用いられる麻黄附子細辛湯は、特に高齢者の低下した免疫機能を活性化する作用を持つと考えられるが、詳細な解析はなされていない。この麻黄附子細辛湯の免疫機能賦活化の効果を実験的に解析するために、種々の週齢のマウスの一次抗体産生反応に麻黄附子細辛湯がいかなる効果を及ぼすかを *in vitro* および *in vivo* の実験系で検討した。いずれの実験系における成績も、10~12 週齢で見られた効果よりも、52~104 週齢で見られた効果の方が著明に高かった。これらの成績から麻黄附子細辛湯は高齢期の低下した抗体産性能を著しく高め、免疫応答能の賦活化に顕著な効果をもつことが明らかとなった。

References

- 1) Makinodan, T. and Petterson, W. J.: Growth and senescence of the primary antibody formation potential of the spleen. *J. Immunol.* **93**, 886-896, 1964.
- 2) Shimada, H.: Iwayuru rohsuishi no bunseki: *Nippon Rinsho* **39**, 603-609, 1981.
嶋田裕之: いわゆる老衰死の分析. 日本臨床 **39**, 603-609, 1981.
- 3) Makinodan, T., James, S. J., Inamizu, T. and Chang, M. P.: Immunologic basis for susceptibility to infection in the aged. *Gerontology* **30**, 279-289, 1984.
- 4) Yamada, T., et al.: Kampoigaku [I]. *Nihon Kampoigaku Kenkyusho*, p. 208, 1978.
山田光胤ほか: 漢方医学 [I]. 日本漢方医学研究所, p. 208, 1978.
- 5) Koh, K. and Tsutani, K.: Clinical Effect of Maobushisaishin to Extracts on Common Cold Syndrome. (in Japanese) *Jpn. Pharmacol. Ther.* **13**, 381-388, 1985.
- 6) Kaji, M., Kashiwagi, S., Hayashida, K., Shinguu, T., Ishii, K. and Kaji, M.: Koureisha no kambou oyobi kikanshien ni taisuru Maobushisaishin to ekisu kapuseru no kouka. *Jpn. J. Clin. and Exp. Med.* **69**, 3278-3284, 1992.
加地正郎, 柏本征三郎, 林田一男, 新宮世三, 石井浩三, 加地正英: 高齢者の感冒および気管支炎に対する麻黄附子細辛湯エキスカプセルの

- 効果. 臨床と研究 **69**, 3278-3284, 1992.
- 7) Jerne, N. K. and Nordin, A. A. : Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* **140**, 405, 1963.
- 8) Mishell, R. I. and Dutton, R. W. : Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.* **126**, 423, 1967.
- 9) Delfraissy, J. F., Galanaud, P., Dormont, J. and Wallen, C. : Age-related impairment of the in vitro antibody response in the human. *Clin. Exp. Immunol.* **39**, 208-214, 1980.
- 10) Pahwa, S. G., Pahwa, R. N. and Good, R. A. : Decreased in vitro humoral immune responses in aged humans. *J. Clin. Invest.* **67**, 1094-1102, 1981.
- 11) Kishimoto, S., Tomino, S., Inomata, K., Kotegawa, S., Saito, T., Kuroki, M., Mitsuya, H. and Hisamitsu, S. : Age related decrease in frequencies of B-cell precursors and specific helper T cells involved in the IgG anti-tetanus toxoid antibody production in human. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **25**, 1-10, 1982.
- 12) Ennist, D. L., Jones, K. H., St. Pierre, R. L., Whisler, R. L. : Functional analysis of the immunosenescence of the human B cell system : dissociation of normal activation and proliferation from impaired terminal differentiation into IgM immunoglobulin-secreting cells. *J. Immunol.* **136**, 99-105, 1986.
- 13) Yang, X. H., Stedra, J., Cerny, J. : Repertoire Diversity of Antibody Response to Bacterial Antigens in Aged Mice. *J. Immunol.* **152**, 2214-2221, 1994.