

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

池本 吉博,^{a)} 溝口 靖紘,^{*a)} 新井 孝之,^{a)}
山本 祐夫,^{a)} 森沢 成司,^{b)}

大阪市立大学医学部第三内科学教室 ^{a)}
同 生化学第一教室 ^{b)}

Effects of Syôsaiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang) and Daisaiko-tô (Da-Chai-Hu-Tang) on antibody response in vitro

Yoshihiro IKEMOTO,^{a)} Yasuhiro MIZOGUCHI,^{*a)} Takayuki ARAI,^{a)}
Sukeo YAMAMOTO^{a)} and Seiji MORISAWA^{b)}

*The Third Department of Internal Medicine,
Osaka City University Medical School ^{a)}
The First Department of Biochemistry,
Osaka City University Medical School ^{b)}
(Received July 9, 1984)*

Abstract

When human peripheral blood mononuclear cells were cultured with Syôsaiko-tô or Daisaiko-tô in vitro, anti-TNP-SRBC antibody response and DNA synthesis were induced significantly. The polyclonal antibody response and DNA synthesis in human peripheral blood mononuclear cells induced by the stimulation with pokeweed mitogen (PWN) were also augmented by Syôsaiko-tô as well as Daisaiko-tô. These increased responses were presumed to attribute to the activation of macrophages at least partially, because the induction or the augmentation of antibody response and DNA synthesis by Syôsaiko-tô and Daisaiko-tô were demonstrated by adding the culture supernatant from the macrophages cultured with Syôsaiko-tô or Daisaiko-tô to the mononuclear cell cultures. Furthermore, the culture fluid prepared from the macrophages cultured with Syôsaiko-tô or Daisaiko-tô were shown to contain a T cell-activating factor.

These results suggest that Syôsaiko-tô and Daisaiko-tô may have a enhancing effect on antibody response and this may be due to macrophage activation at least partially.

Keywords Syôsaiko-tô, Daisaiko-tô, plaque forming cell, DNA synthesis

Abbreviations ADCC ; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,
PBS ; phosphate buffered saline, PFC ; plaque forming cell, PWM ; pokeweed mitogen,
SRBC ; sheep red blood cell, TNP ; trinitrophenyl, Daisaiko-tô (Da-Chai-Hu-Tang) ;
大柴胡湯, Syôsaiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang) ; 小柴胡湯

緒 言

最近, 小柴胡湯および大柴胡湯による肝障害の治

療が試みられるようになり, 柴胡に含まれるサイコ
サポニンの有効性と薬理作用がかなり詳細に検討さ
れている¹⁻⁶⁾。著者らも, ラット肝から調製した分離肝
細胞を前もって小柴胡湯または大柴胡湯で処理する

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

と、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)反応細胞培養上清または活性化マクロファージ (Mφ) 培養上清による肝細胞障害が有意に軽減することを認めた。また、柴胡の有効成分とされているサイコサポニン、とくにサイコサポニン_{b₁}に肝細胞障害を抑制する作用があることも示した。⁸⁾

しかし、これらの研究はほとんど肝細胞に対する柴胡またはサイコサポニンの作用を検討したものであり、小柴胡湯や大柴胡湯が生体の免疫応答にどのような影響を与えるかについて解析した研究はみられない。そこで、著者らは正常ヒト末梢血から単核細胞を分離し、それに小柴胡湯または大柴胡湯を加えて抗体産生やリンパ球の増殖を検討するとともに pokeweed mitogen (PWM) で刺激することによって誘導されるDNA合成の促進と抗体の産生に、小柴胡湯および大柴胡湯がどのような影響を与えるかを解析した。

材料と方法

1. 小柴胡湯エキス原末の調製法

柴胡 (日本産, *Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae), *Bupleuri Radix*) 7.0g, 半夏 (中国産, *Pinellia ternate* Breitenbach (Araceae), *Pinelliae Tuber*) 5.0g, 黄芩 (中国天津産, *Scutellaria baicalensis* Georgi (Labiatae), *Scutellariae Radix*) 3.0g, 大棗 (中国山東産, *Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* REHD (Rhamnaceae), *Zizyphi Fructus*) 3.0g, 人參 (韓国産, *Panax ginseng* C.A.Meyer (Araliaceae), *Ginseng Radix*) 3.0g, 甘草 (中国東北産, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (Leguminosae), *Glycyrrhizae Radix*) 2.0g, 生姜 (中国雲南産, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), *Zingiberis Rhizoma*) 1.0gの割合で混合した生薬に約10倍量の水を加え、100℃にて90分間加熱抽出した後濾過し、減圧濃縮した後粉霧乾燥し、黄かっ色の粉末を約10%の収率で得た。なお、小柴胡湯エキス原末は株式会社津村順天堂より供与された。

2. 大柴胡湯エキス原末の調製法

柴胡 (日本産, *Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae), *Bupleuri Radix*) 6.0g, 半夏 (中国湖北産, *Pinellia ternate* Breitenbach (Araceae), *Pinelliae Tuber*) 4.0g, 黄芩 (中国天津産, *Scutellaria baicalensis* Georgi (Labiatae), *Scutellariae Radix*) 3.0g, 大棗 (中国山東産, *Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* REHD. (Rhamnaceae), *Zizyphi Fructus*) 3.0g, 芍薬 (中国四川産, *Paeonia lactiflora* Pallas (Paeoniaceae), *Paeoniae Radix*) 3.0g, 枳実 (日本産ウンシュウミカン, *Citrus Unshiu Markorich* (Rutaceae), *Aurantii Fructus Immaturus*) 2.0g, 生姜 (中国雲南産, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), *Zingiberis Rhizoma*) 1.0g, 大黃 (中国甘肅産, *Rheum palmatum* L. (Polygonaceae), *Rhei Rhizoma*) 1.0gの割合で混合した生薬に、約10倍量の水を加え、100℃にて90分間加熱抽出した後濾過し、減圧濃縮した後粉霧乾燥し、黄かっ色の粉末を約10%の収率で得た。なお、大柴胡湯エキス原末は株式会社津村順天堂より供与された。

1. 正常ヒト末梢血単核細胞浮遊液の調製
正常ヒト末梢血をヘパリン加で採取し、Ficoll-Conray重層遠心法によって単核細胞を分離した。これを10%非働化ウシ胎児血清を含むイーグルMEM液で2回洗浄した後、同じ培養液で 2×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を作製して実験に用いた。

2. Trinitrophenyl (TNP) 化したヒト赤血球調製

ヒト赤血球 (日本生物材料センター製) をphosphate buffered saline (PBS, pH7.4) で2回洗浄した後、Rittenbergらの方法⁹⁾に準じてTNP化した。反応後、赤血球をPBSで3回洗浄し、 7.5×10^8 cells/mlとなるようにイーグルMEM液を加えて赤血球浮遊液を作製した (以下TNP-SRBCと略す)。

3. 抗TNP-SRBCに対する抗体産生細胞の計測

前述のようにして調製した正常ヒト末梢血単核細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) を1mlずつ培養ビンに分注し、各種濃度の小柴胡湯、大柴胡湯、またはPWM (50μg/ml, Difco社製) を添加して72時間培養した。培養は5%CO₂を含む湿潤空気を通じながら37℃に保温した細胞培養装置内で行なった。培養後、細胞を遠心によって回収し、10%ウシ胎児血清を含むイーグルMEM液で2回洗浄した後、細胞濃度を 2×10^6 cells/mlとなるように調整した。ついで、その0.1mlに等量のTNP-SRBC (7.5×10^8 cells/ml) を加え、Jerneの方法¹⁰⁾に準じて抗TNP-SRBC抗体産生細胞 (抗TNP-SRBC・PFC) を計測した。すなわち、小柴胡湯、大柴胡湯、またはPWM添加で72時間培養したヒト末梢血単核細胞にTNP-SRBCを加え、これをイーグルMEM液で作製した1.8%の寒天液3mlと混和し、1.4%の寒天をした平板プラスチックシャーレ (直径9cm)

に重層した。37℃で1時間培養した後、イーグルMEM液で30倍に希釈したモルモット血清1.5mlを補体源として加え、さらに1時間培養後1%グルタルアルデヒドを加えて固定し、出現したプラーク数を数えて抗TNP-SRBC・PFC数とした。

4. ヒト末梢血単核細胞のDNA合成の検討

ヒト末梢血単核細胞浮遊液 (1×10^6 cells/ml) に各種濃度の小柴胡湯、大柴胡湯またはPWM (50 μ g/ml) を添加して前記と同様にして48時間培養した。培養後、 3 H-サイミジン (比活性, 5 Ci/mmol) を1 μ Ci/ml加え、さらに24時間培養した後、 3 H-サイミジンの酸不溶性分画へのとりこみを液体シンチレーションカウンターで測定した。

PWMによるリンパ球のDNA合成に対する小柴胡湯または大柴胡湯の影響を検討する場合は、ヒト末梢血単核細胞をPWMで刺激する際に、各種濃度の小柴胡湯または大柴胡湯を添加して細胞を培養し、以下上述と同様の実験を行ない、小柴胡湯または大柴胡湯非添加群との異同を検討した。

5. 小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清の抗体産生およびリンパ球DNA合成に及ぼす影響の検討

正常モルモットの腹腔内に、20mlの滅菌したmarcol 52を注入し、4日後にハンクス液で腹腔を灌流して腹腔渗出M ϕ を採取した。この渗出液からmarcol 52を含む油層を除去した後、低温遠心によって細胞を集め、ハンクス液で2回洗浄遠心をくりかえして細胞ペレットを回収した。この細胞ペレットにペニシリン (100units/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含むイーグルMEM液を加えて 5×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を作製した。これに種々の濃度の小柴胡湯または大柴胡湯を添加し、48時間培養後、細胞培養上清を遠心によって分離した。

この細胞培養上清0.1mlをヒト末梢血単核細胞浮遊液に添加し、前述と同様にして抗TNP-SRBC抗体産生細胞数とリンパ球のDNA合成を測定した。対照としては、腹腔渗出M ϕ に小柴胡湯または大柴胡湯を添加することなく同様に培養し、その培養上清を単核細胞に加えて、抗TNP-SRBC抗体産生細胞数とDNA合成を測定した。

6. 小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清のPWM刺激ヒト単核細胞における抗体産生およびリンパ球DNA合成に対する影響

正常モルモット腹腔渗出M ϕ に前述のごとく種々の濃度の小柴胡湯または大柴胡湯を添加して48時間培養し、培養上清を分離した。この細胞培養上清0.1

mlをヒト末梢血単核細胞浮遊液に添加し、同時にPWM (50 μ g/ml) を加えて、前述と同様にして抗TNP-SRBC抗体産生細胞数とリンパ球のDNA合成を測定した。対照としては、M ϕ に小柴胡湯または大柴胡湯を添加することなく同様に培養し、その培養上清をPWMとともに単核細胞に加えて、抗TNP-SRBC抗体産生細胞数とリンパ球のDNA合成を測定した。

7. 小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清のSephadex G-75カラムクロマトグラフィーによる分画と各分画の抗体産生に対する影響

小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清をSephadex G-75 (5 $\times$ 150cm) にかけてゲル濾過を行ない蛋白質を分画した。溶出には生理的食塩水を含むリン酸緩衝液を用い、溶出各分画の280nmの吸光度を測定して蛋白溶出曲線を作製し、6つの部分に分け、各分画をダイアフィルターで濃縮して実験に供した。すなわち、各分画0.1mlをヒト末梢血単核細胞浮遊液に添加し、同時にPWMを添加して前述と同様にして抗TNP-SRBC抗体産生細胞数を測定した。

8. 小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清中のT細胞活性化因子の検討

正常ヒト末梢血をヘパリン加で採取し、Ficoll-Conray重層遠心法によって単核細胞を分離した。これをイーグルMEM液に懸濁して 5×10^6 cells/mlの細胞浮遊液とし、5%のSRBC (V/V) を加えて混和し、T細胞とE-ロゼットを形成させた。このようなE-ロゼット形成細胞を再びFicoll-Conray重層遠心法によって分離し、Tris-NH₄ClでSRBCを溶血させてT細胞に富む細胞分画を回収した後、イーグルMEM液を加えて 2×10^6 cells/mlの細胞浮遊液を作製した。ついで、細胞浮遊液をペトリ皿に注ぎ、37℃で1時間静置して粘着性細胞を除いた。このようなT細胞に富む細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) 0.5mlに、小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清0.1mlを加え、さらにCon A (5 μ g/ml) を添加して37℃で72時間培養した。培養後、 3 H-サイミジン1 μ Ciを加えてさらに24時間培養し、放射活性の酸不溶性分画へのとりこみを液体シンチレーションカウンターで測定した。対照としては、M ϕ 培養上清非添加で同様の実験を行なった。

結 果

1. 小柴胡湯または大柴胡湯による抗TNP-SRBC抗体の誘導

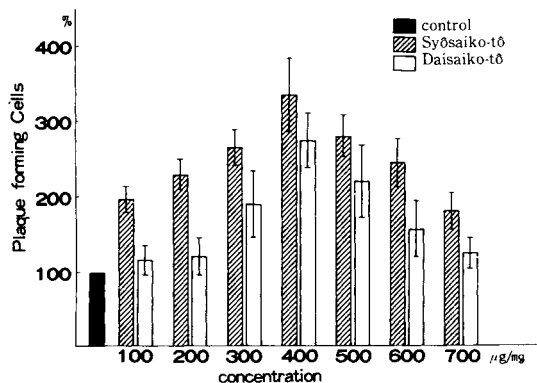


Fig. 1 Syōsaiko-tō and Daisaiko-tō induced plaque forming cells (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and antibody formation was calculated by comparing augmented anti-TNP-SRBC plaque forming cells in experimental group with that in the control group.

正常ヒト末梢血から調製した単核細胞浮遊液に各種濃度の小柴胡湯または大柴胡湯を添加して72時間培養し、抗TNP-SRBC・PFC数をJerneらの方法に準じて測定した。その結果、Fig. 1に示すように、非添加群のPFC数を100%とすると、400μg/mlの小柴胡湯または大柴胡湯を添加した場合には、抗TNP-SRBC・PFC数はそれぞれ336.4±49.1%または275.0±36.8%になり、いずれも有意に上

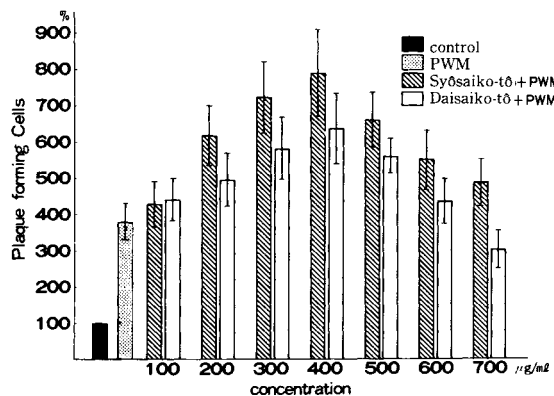


Fig. 2 Effects of Syōsaiko-tō and Daisaiko-tō on PWM-induced plaque forming cells (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding PWM and Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and antibody formation was calculated by comparing augmented anti-TNP-SRBC plaque forming cells in experimental group with that in the control group.

昇した。このことは小柴胡湯および大柴胡湯に polyclonalな抗体産生を誘導する活性があることを示している。

2. PWM刺激による抗TNP-SRBC抗体産生の誘導に及ぼす小柴胡湯および大柴胡湯の影響

ヒト末梢血から調製した単核細胞浮遊液に PWM (50μg/ml)を加えて72時間培養し、Jerneらの方法に準じて抗TNP-SRBC・PFCの形成を測定すると、 10^6 個の viable cell 当り、 649 ± 121 個 (n=10) のPFCが誘導された。次にPWM添加と同時に、種々の濃度の小柴胡湯または大柴胡湯を単核細胞浮遊液に加え、同様にして抗TNP-SRBC・PFCの誘導を検討すると、Fig. 2に示すように、非添加群 (100%) に比して、400μg/mlの小柴胡湯または大柴胡湯を添加した場合、抗体産生細胞数はそれぞれ $790.9 \pm 121.5\%$ または $638.4 \pm 97.1\%$ となり、いずれも著明に抗体産生が増幅された。

3. 小柴胡湯または大柴胡湯によるリンパ球増殖の検討

ヒト末梢血単核細胞浮遊液に各種濃度の小柴胡湯または大柴胡湯を添加し、72時間培養後、 ^3H -サイミジンを加えてさらに24時間培養した。その後、酸不溶性分画への放射活性のとりこみを測定すると、Fig. 3に示すように、400μg/mlの小柴胡湯または大柴胡湯を添加した場合、非添加群 (100%) のそれぞれ $168.1 \pm 23.5\%$ および $172.5 \pm 28.3\%$ となり、この濃度でDNA合成は最高値を示した。

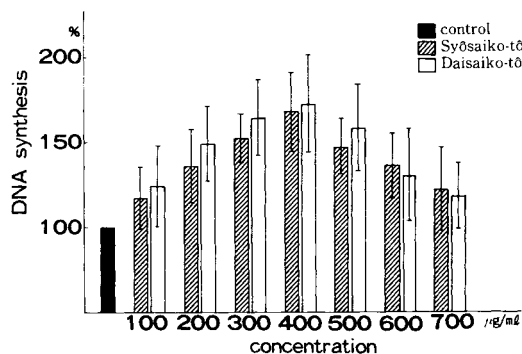


Fig. 3 Syōsaiko-tō and Daisaiko-tō induced lymphocyte transformation (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and DNA synthesis was calculated by comparing augmented uptake of [^3H]-thymidine into cells in experimental group with that in the control group.

4. PWM刺激リンパ球のDNA合成に及ぼす小柴胡湯および大柴胡湯の影響

ヒト末梢血単核細胞浮遊液にPWM (50 μ g/ml)を添加し、72時間培養後、 3 H-サイミジンを加えてさらに24時間培養を続けると、PWM刺激によってDNA合成が有意に上昇することが確認された。すなわち、PWM非刺激群に比してPWM刺激時には 3 H-サイミジンの酸不溶性分画へのとりこみは7.9倍に増加した。次にPWM刺激によるDNA合成の誘導に対する小柴胡湯または大柴胡湯の影響を検討するため、PWM添加と同時に、これらを単核細胞浮遊液に加えてDNA合成の誘導を比較した。その結果、非添加群 (100%) に比して、400 μ g/mlの小柴胡湯または大柴胡湯を添加すると、 3 H-サイミジンのとりこみはそれぞれ1109.6 $\pm$ 51.9%または1029.7 $\pm$ 36.4%となり、いずれもPWMによるリンパ球の増殖を増幅する可能性が示唆された (Fig. 4)。

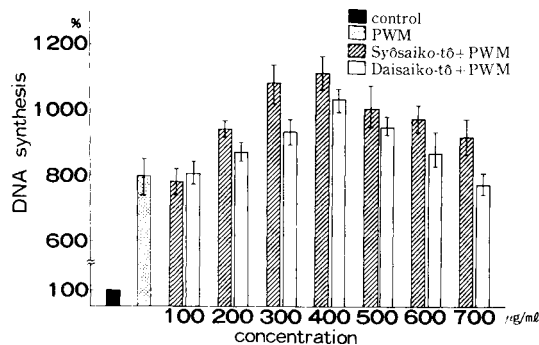


Fig. 4 Effects of Syōsaiko-tō and Daisaiko-tō on PWM-induced lymphocyte transformation (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding PWM and Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and DNA synthesis was calculated by comparing augmented uptake of [3 H]-thymidine into cells in experimental group with that in the control group.

5. PWM刺激によって誘導される抗体産生およびDNA合成に及ぼす小柴胡湯または大柴胡湯処理Mφ培養上清の影響

小柴胡湯または大柴胡湯による抗体産生およびリンパ球増殖の増幅機構を検討するため、小柴胡湯または大柴胡湯で前処理したモルモット腹腔渗出Mφの培養上清を、PWMと同時にヒト単核細胞浮遊液に加え、前述と同様にして抗TNP-SRBC・PFCと 3 H-サイミジンのとりこみを測定した。その結果、Fig. 5に示すように、400 μ g/mlの小柴胡湯また

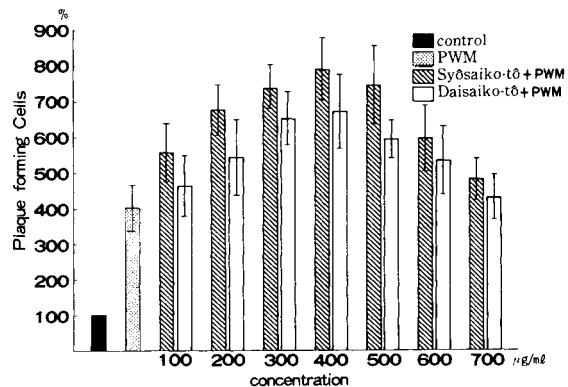


Fig. 5 Effects of the culture supernatant of Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō treated macrophages on PWM-induced plaque forming cells (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without PWM and Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and antibody formation was calculated by comparing augmented anti-TNP-SRBC plaque forming cells in experimental group with that in the control group.

は大柴胡湯で処理したMφの培養上清をPWMと同時にヒト単核細胞浮遊液に加えると、抗TNP-SRBC・PFCの誘導は、非処理Mφの培養上清を添加した場合 (100%) に比して、それぞれ790.2 $\pm$ 89.7%および673.6 $\pm$ 104.2%となり、いずれも著明に上昇した。また、 3 H-サイミジンと酸不溶性分画

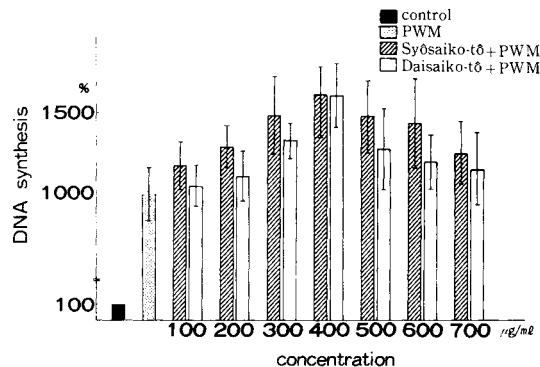


Fig. 6 Effects of the culture supernatant of Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō treated macrophages on PWM-induced lymphocyte transformation (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding PWM and Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and DNA synthesis was calculated by comparing augmented uptake of [3 H]-thymidine into cells in experimental group with that in the control group.

へのとりこみも、 $400\mu\text{g/ml}$ の小柴胡湯または大柴胡湯で処理した $M\phi$ 培養上清の添加によって、非添加群 (100%) に比しそれぞれ $1615.4 \pm 174.8\%$ または $1608.2 \pm 201.1\%$ となった (Fig. 6)。

6. 小柴胡湯および大柴胡湯処理 $M\phi$ のPWM非刺激単核細胞における抗体産生およびDNA合成に及ぼす影響

小柴胡湯または大柴胡湯で処理した $M\phi$ の培養上清をPWMを添加することなく、ヒト単核細胞浮遊液に加え、前項と同様にして、抗TNP-SRBC・PFCおよび ^3H -サイミジンのとりこみを測定した。その結果、Fig. 7, 8に示すように、これらの処理を行なった $M\phi$ の培養上清は、抗体産生も、リンパ球の増殖をも増強することが認められた。

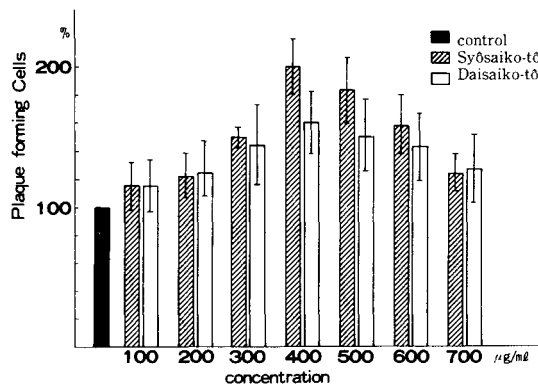


Fig. 7 Effects of the culture supernatant of Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō treated macrophages on plaque forming cells (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and antibody formation was calculated by comparing augmented anti-TNP-SRBC plaque forming cells in experimental group with that in the control group.

7. 小柴胡湯処理 $M\phi$ 培養上清の分画と各分画の抗体産生に及ぼす影響

小柴胡湯 ($400\mu\text{g/ml}$) をモルモット腹腔滲出 $M\phi$ に添加して48時間培養し、培養上清をSephadex G-75カラムで分画した。その結果、Fig. 9に示すような蛋白溶出曲線が得られたので、Fig. 9に示すように6つの分画にわけた。これらの各分画をダイアフィルターで濃縮してカラムにかけた最初の容量に調製し、PWM刺激ヒト末梢血単核細胞浮遊液に加えて前述と同様にして抗TNP-SRBC・PFC

Cの誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、第5分画を添加した際に抗体産生細胞の誘導は、非添加

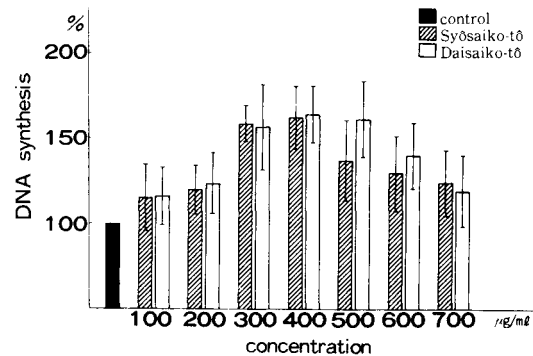


Fig. 8 Effects of the culture supernatant of Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō treated macrophages on lymphocyte transformation (n=10).

As control, exactly the same experiments were performed without adding Syōsaiko-tō or Daisaiko-tō and DNA synthesis was calculated by comparing augmented uptake of (^3H)-thymidine into cells in experimental group with that in the control group.

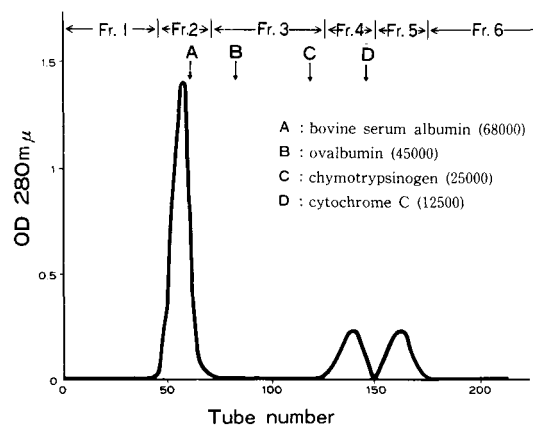


Fig. 9 Gel filtration of culture supernatant of Syōsaiko-tō treated macrophages on Sephadex G-75 column chromatography.

The eluate was monitored by absorbancy at 280nm. The elution profile shown in Fig. 9 was obtained and six fractions were collected separately and each fraction was condensed to the original volume by ultrafiltration.

群(100%)に比し $180.7 \pm 15.1\%$ となり最高となった。このことは小柴胡湯との混合培養によってM ϕ から抗体産生を増強する可溶性因子が産生されることを示唆している。

8. 小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清中に存在するT細胞活性化因子

ヒト末梢血単核細胞からE-ロゼット形成T細胞を分離し、さらに、粘着性細胞を除去してから、Con Aで刺激してT細胞の増殖を ^3H -サイミジンの酸不溶性分画へのとりこみでリンパ球幼若化反応で検討した。その際、Con A添加と同時に、前項で述べたようにして作製した小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清をSephadex G-75カラムにかけてゲル濾過を行い蛋白質を分画し、溶出各分画の280nmの吸光度から6つの部分に分け、各分画を加えて、それらの影響を検討した。なお、対照としては小柴胡湯または大柴胡湯で処理しないM ϕ の培養上清を同様に分画してCon Aを単核細胞浮遊液に加える際に添加した。その結果、小柴胡湯または大柴胡湯処理M ϕ 培養上清の第5分画を添加すると、Con A刺激に対する単核細胞は対照群(100%)に比して、それぞれ $445.7 \pm 35.6\%$ および $394.7 \pm 26.2\%$ となり、第5分画を添加する場合その応答性が最も強く増幅された。このことは、小柴胡湯または大柴胡湯による抗体産生やリンパ球増殖の少くとも一部は、M ϕ からのT細胞活性化因子の産生亢進によることを示唆している。

考 察

最近、慢性活動性肝炎の治療に小柴胡湯や大柴胡湯が用いられるようになり、その有効性、有効成分および薬理作用が種々の角度から検討されている。著者らはさきに、免疫学的に誘導したin vitroの肝細胞障害実験系を用いて、小柴胡湯や大柴胡湯が肝細胞を保護する可能性があることを示唆した⁷⁾。また、その有効成分の一つがサイコサポニン、とくにサイコサポニンb₁であることも実験的に示した。しかしながら、これらの和漢薬が生体の免疫系に対してどのような影響を与えるかについてはほとんど明らかにされていない。最近慢性活動性肝炎の転帰を決定する重要な因子として、HBウィルス由来の各種抗原とそれらに対する抗体が検討され、とくに、HBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのsero-conversionが重要視されている。

このような背景に立って、著者らは小柴胡湯および大柴胡湯の抗体産生への影響をin vitroの実験系

で検討した。その結果、小柴胡湯および大柴胡湯にはpolyclonalな抗体産生を誘導する成分が含まれていることを明らかにし、また、リンパ球の増殖を促進することも認めた。さらに、抗体産生実験のモデルとして頻繁に使用されているPWMによるpolyclonalな抗体産生が、小柴胡湯または大柴胡湯によって増幅されることを認めた。しかも、その有効性は濃度によってかなり異なり、 $400\mu\text{g/ml}$ の小柴胡湯または大柴胡湯によって、最も強く抗体産生が誘導された。有地らは血清トランスアミナーゼ値を指標としてD-ガラクトサミンによる肝障害を検討し、サイコサポニンが肝障害を強く抑制することを示しているが、D-ガラクトサミンを投与する2時間前にサイコサポニンが肝臓内に投与した場合には 2mg/kg の方が、 20mg/kg のサイコサポニンを投与した場合より有効であると報告している。したがって、小柴胡湯、大柴胡湯の作用には一定の有効濃度があると考えられる。

なお、種々の物質による抗体産生増強の機構は多様であると考えられるが、小柴胡湯や大柴胡湯による抗体産生の増強は単にこれらの和漢薬がpolyclonalな抗体を産生するだけではなく、抗体産生に関与する細胞に一定の影響を与えることが示唆される。なぜなら、PWMとこれらの和漢薬を併用した場合の抗体産生は相加的以上の増強を示すからである。その機構を明らかにするため、小柴胡湯や大柴胡湯で処理したM ϕ の培養上清を分離し、小柴胡湯または大柴胡湯によるpolyclonalな抗体産生およびPWMによる抗体産生の誘導に及ぼす影響を解析した。その結果、これらの和漢薬で処理したM ϕ 培養上清には抗体産生を増強する物質が含まれることが明らかになり、その活性因子は比較的低分子の物質と推測された。この活性因子はヒト単核細胞から分離したT細胞のCon A刺激に対する応答を増強させるので、T細胞活性化因子(インターロイキン-1)である可能性が高い。しかし、その同定は今後の問題であり、さらに詳細に活性化因子の性質を検討しなければならない。

小柴胡湯には柴胡のほか、半夏、黄芩、大棗、人参および生姜が含まれており、また、大柴胡湯には柴胡、半夏、黄芩、大棗、生姜のほか、枳実、大黄および芍薬の成分が含まれている。これらのうち、柴胡に含まれるサイコサポニンには抗炎症作用²⁾、抗アレルギー作用³⁾、生体膜保護作用¹⁾などあることが報告されており、また、D-ガラクトサミン肝障害を抑制することも示されている⁴⁾。

本研究において示した小柴胡湯および大柴胡湯の

免疫系に対する作用の有効成分は不明であり、また、本実験はあくまで *in vitro* の実験系によるものである。従って、今後は有効成分の同定とともに、*in vivo* におけるこれらの和漢薬の免疫応答に対する影響を検討しなければならない。

ま と め

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* で小柴胡湯または大柴胡湯を加えて培養すると、TNP 化したヒツジ赤血球に対する抗体産生が誘導された。また、単核細胞を pokeweed mitogen (PWM) で刺激する際に、同時に小柴胡湯または大柴胡湯を添加すると、PWM 単独刺激の場合より抗体産生細胞の形成が有意に増加した。リンパ球の DNA 合成も小柴胡湯または大柴胡湯によって促進され、PWM 刺激によるリンパ球の DNA 合成もこれらによって増強された。さらに、小柴胡湯または大柴胡湯を加えて培養したマクロファージの培養上清を単核細胞浮遊液に添加すると、抗体産生の誘導および DNA 合成が観察され、PWM による抗体産生の誘導および DNA 合成も増強された。これらのマクロファージ培養上清を分画して検討すると、T 細胞の活性化を増強する因子の存在が認められた。

以上の結果から、小柴胡湯および大柴胡湯には免疫応答を増幅する作用があり、その少くとも一部は抗原提供細胞であるマクロファージへの作用を介して発現するものと推測された。

この論文の要旨は第17回和漢薬シンポジウムにて発表した。

文 献

- 1) Abe, H., Sakaguchi, M., Konishi, H., Tani, T. and Arichi, S.: The effects of Saikosaponins on biological membranes. I. The relationship between the structures of Saikosaponins and hemolytic activity. *Planta Medica* **34**, 160-166, 1978
- 2) 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
- 3) 有地 滋, 久保道徳, 小松一夫, 戸田静男: 柴胡剤およびサイコ中のサポニンと肝炎. 和漢薬シンポジウム **10**, 103-108, 1977
- 4) 有地 滋, 小西啓悦, 阿部博子: Saikosaponin の作用機序の解析. I. D-galactosamine 肝障害に対する Saikosaponin の作用. 肝臓 **19**, 430-435, 1978
- 5) 阿部博子, 戸田静男, 大井久代, 久保道徳, 有地 滋: D-galactosamine に対するサイコサポニンの作用. 和漢薬シンポジウム **11**, 7-10, 1978
- 6) 山本昌弘, 植村泰三, 中間 慧, 上宮正直, 笠山宗正, 岸田泰弘, 山内圭子, 小牟田清, 熊谷 朗: 柴胡剤による慢性肝炎の治療に関する基礎的臨床研究. 第16回和漢薬シンポジウム講演集 P104, 1982
- 7) 溝口靖紘, 沢井寛子, 筒井ひろ子, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 門奈丈之, 山本祐夫, 森沢成司: 免疫学的肝細胞障害に対する小柴胡湯の障害抑制作用. 肝胆臓 **6**, 947-951, 1983
- 8) 溝口靖紘, 沢井寛子, 筒井ひろ子, 池本吉博, 新井孝之, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 門奈丈之, 山本祐夫, 森沢成司: 免疫学的肝細胞障害に対するサイコサポニンの防禦作用. 肝臓 **25**, 40-46, 1984
- 9) Rittenberg, M.B. and Pratt, K.L.: Antitrinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of Balb/c mice to soluble and particulate immunogen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 575-581, 1969
- 10) Jerne, N.K. and Nordin, A.A.: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* **140**, 405-406, 1963