

柴胡の *in vitro* における抗体産生と mitogen 刺激によって誘導されるリンパ球幼若化に及ぼす影響

溝口 靖紘,*^{a)} 筒井ひろ子,^{a)} 山本 祐夫,^{a)} 森沢 成司^{b)}

^{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生化学第一教室

Effects of Saiko (Chai-Hu) on antibody response and mitogen-induced lymphocyte transformation *in vitro*

Yasuhiro MIZOGUCHI,*^{a)} Hiroko TSUTSUI^{a)} Sukeo YAMAMOTO^{a)}
and Seiji MORISAWA^{b)}

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

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

(Received March 4, 1985)

Abstract

Saiko (Chai-Hu) extract from *Bupleurum falcatum* L. caused a significant increase in antibody responses which was induced in human peripheral blood mononuclear cells by stimulation with pokeweed mitogen (PWM). This enhancing effect of Saiko on antibody response was attributable at least partially to the production of interleukin-1 from monocyte-macrophages, because a higher IL-1 activity was detected in the culture supernatant of Saiko-treated monocyte-macrophages. On the other hand, Saiko exhibited a striking inhibitory effects on the lymphocyte transformation in which human peripheral blood mononuclear cells were activated by mitogen such as PHA, PWM or Con A. The production of prostaglandin from Saiko-treated macrophages was presumed to participate in this inhibition at least partially, because indomethacin recovered the inhibition significantly.

Key words Saiko (Chai-Hu), plaque forming cell, DNA synthesis

Abbreviations ADCC ; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, BCDF ; B cell differentiation factor, BCGF ; B cell growth factor, Con A ; concanavalin A, EDTA ; ethylenediamine tetraacetate, FCS ; fetal calf serum, IL-1 ; interleukin-1, IL-2 ; interleukin-2, LPS ; lipopolysaccharide, PBS ; phosphate buffered saline, PHA ; phytohemagglutinin, PWM ; pokeweed mitogen, SRBC ; sheep red blood cell, TNP ; trinitrophenyl, Saiko (Chai-Hu) ; 柴胡

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。¹⁻⁸⁾ 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

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

ると, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 反応細胞培養上清による *in vitro* の肝細胞障害が有意に軽減することを認めた⁹⁾。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 b_1 に肝細胞障害を抑制する作用があることも示した。¹⁰⁾

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, 柴胡が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, pokeweed mitogen (PWM) 刺激ヒト末梢血単核細胞のポリクローナルな抗体産生と, 種々の mitogen 刺激によって誘導されるリンパ球幼若化反応に柴胡がどのような影響を与えるかについて解析した。

材料と方法

1. 柴胡エキス原末の調製

柴胡, *Bupleurum falcatum* Linne (Umbelliferae) *Bupleuri Radix* (韓国産) に約 10 倍量の蒸留水を加え, 100℃で 10 分間加熱して抽出した。この抽出液を濾過した後減圧濃縮し, 粉霧乾燥によって淡褐色の粉末を得た。収率は約 85 %であった。この柴胡エキス原末は株式会社津村順天堂より供与された。

2. 抗体産生の測定

正常ヒト末梢血をヘパリン添加で採取し, Ficoll-Conray 比重遠心法によって単核細胞を分離した。この細胞を 10 % ウシ胎児血清 (FCS) を含む Eagle MEM で洗浄した後, 同じ溶液に懸濁して, 細胞濃度を 2×10^6 cells/ml となるように調整した。この細胞浮遊液に 50 μ g/ml の PWM (P-L, Biochemicals 社製) と各種濃度の柴胡原末を加え, 72 時間培養した後, 再び細胞濃度を 2×10^6 cells/ml となるように調整した。この細胞浮遊液に含まれる抗体産生細胞の数は, Rittenberg らの方法¹¹⁾ に準じて trinitrophenyl 化したヒツジ赤血球 (TNP-SRBC) を用いる溶血ブランク法で測定した。すなわち, 細胞浮遊液に同量の TNP-SRBC 浮遊液 (7.5×10^8 cells/ml) を混和し, Eagle MEM に 1.8 % となるように溶解した寒天 (Difco laboratories 社製) をしいた平板プラスチックシャーレ (直径 9 cm, 栄研器材製) に重層して, 37℃で 1 時間培養した。ついで, Eagle MEM で 10 倍希釈したモルモット血清 (日本生物材料センター製) 1.5 ml を補体源として加え, さらに 1 時間培

養した。培養後, 1 % グルタルアルデヒド (和光純薬社製) を添加して細胞を固定し, 出現した溶血ブランク数を数えて抗 TNP-SRBC 抗体産生細胞数とした。

3. mitogen 刺激によるリンパ球幼若化の測定

前項のようにして作製したヒト末梢血単核細胞浮遊液に, phytohemagglutinin-P (PHA, Difco 社製) 10 μ g/ml, PWM 50 μ g/ml または concanavalin A (Con A, Sigma 社製) 10 μ g/ml を加えて, それぞれ 48 時間, 48 時間, 72 時間培養した。ついで, 1 μ Ci の 3 H thymidine (比活性 5 Ci/mmol) を添加してさらに 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。

4. 末梢血単球の分離

末梢血単球の分離は熊谷らの方法¹²⁾ に準じて行なった。すなわち, 健康ヒトの末梢血 20 ml をヘパリン添加で採取し, Ficoll-Conray 比重遠心法によって単球を含む単核細胞を分離した。これらの細胞を FCS 10 % を含む Eagle MEM で洗浄した後, 同じ培養液で希釈して $2 \sim 3 \times 10^6$ cells/ml の細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液 4 ml を前もって FCS でコートしたプラスチックシャーレ (直径 6 cm, Falcon 社製) に注ぎ, 37℃で 60 分間, CO₂ 細胞培養器中で培養し, 非粘着性細胞を培養液とともに静かに除いた。ついで, シャーレに前述の Eagle MEM 5 ml を静かに注ぎ, ゆるやかに攪拌洗浄して培養上清を除去し, この操作を数回くりかえして非粘着性細胞を除いた。その後, シャーレに粘着した細胞に冷却した 0.2 % ethylenediamine tetraacetate (EDTA) および 5 % FCS を含む phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 5 ml を加えて攪拌振盪し, 4℃で 15 分間静置後細胞を遠心によって集めた。この細胞ペレットに, 上記の Eagle MEM を加え, 2×10^6 cells/ml となるように希釈して, 単球に富む細胞浮遊液として実験に供した。

5. interleukin-1 (IL-1) 活性の測定

上述のようにして得た単球に富む細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) に各種濃度の柴胡を加え, 37℃で 48 時間, CO₂ 細胞培養器中で培養した。柴胡処理単球培養上清中に含まれる IL-1 は thymocyte proliferation assay¹³⁾ により測定した。まず, C₃H/HeJ マウス胸腺を摘出し, これを歯科用ピンセットを用いて RPMI 1640 中で小切片とした後, 針付注射器で 2 ~ 3 回静かに出し入れをくり返し細胞浮遊液を作製した。細胞を遠心にて洗浄した後, 5×10^{-5} M の 2-mercaptoethanol (和光純薬製)

を含む5% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊し、細胞濃度を 2×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液に種々の割合に柴胡処理単球培養上清を加え、さらに $2 \mu\text{g/ml}$ の PHA を添加して48時間培養した後、 $1 \mu\text{Ci/ml}$ の ^3H -thymidine を添加してさらに24時間培養した。その後、 ^3H -thymidine の酸不溶性分画へのとりこみを前項と同様にして測定した。

結 果

1. 柴胡の抗体産生に及ぼす影響

健常ヒト末梢血単核細胞浮遊液に PWM ($50 \mu\text{g/ml}$) と各種濃度の柴胡を加えて細胞濃度を 2×10^6 cells/ml とし、 37°C で72時間培養後、TNP-SRBC に対する抗体産生細胞数を plaque assay¹⁴⁾ によって測定した。その結果、Fig. 1 に示すように 10^6 viable cells 当りのプラーク数は、PWM 非添加群では 293 ± 11 個 ($100.0 \pm 3.6\%$) であり、PWM 添加群では 477 ± 7 個 ($162.7 \pm 2.4\%$) であ

った。PWM と同時に $100 \mu\text{g/ml}$ の柴胡を添加した群では 865 ± 10 個 ($295.1 \pm 3.4\%$) となり、柴胡の添加によって PWM による polyclonal な抗体産生の誘導は有意に増強された。

2. 柴胡処理単球培養上清の抗体産生に及ぼす影響

健常ヒト末梢血単核細胞浮遊液に PWM ($50 \mu\text{g/ml}$) とともに10%となるように柴胡処理単球培養上清を加え、細胞濃度を 2×10^6 cells/ml に調整した後、 37°C で72時間培養し、TNP-SRBC に対する抗体産生細胞数を plaque assay によって測定した。その結果、Fig. 2 に示すように、PWM 非添加群のプラーク数 ($100.0 \pm 9.2\%$) に比して、PWM 添加群では $153.2 \pm 21.2\%$ となったが、PWM と同時に、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ または $200 \mu\text{g/ml}$ の柴胡で前処理した単球培養上清を10%となるように添加した群では、TNP-SRBC に対するプラーク形成細胞数はそれぞれ $204.1 \pm 18.2\%$ 、 $188.6 \pm 12.2\%$ および $185.2 \pm 21.8\%$ となり、いずれも有意に

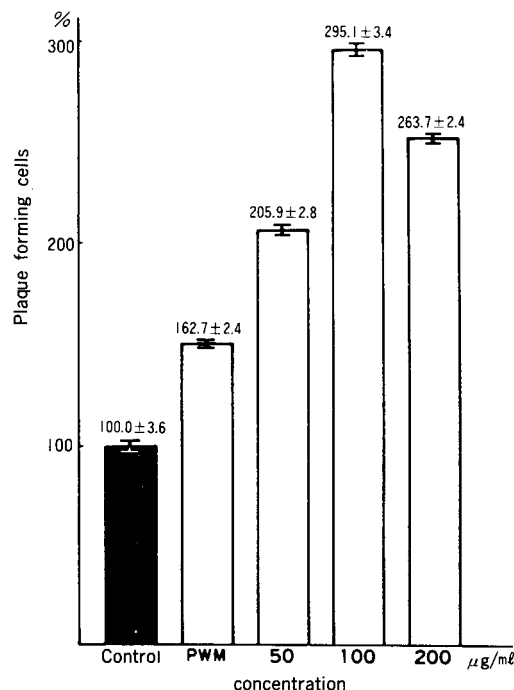


Fig. 1 Effects of Saiko on PWM-induced plaque forming cells ($n=10$).

Antibody formation was determined by the augmented anti-TNP-SRBC plaque forming cells.

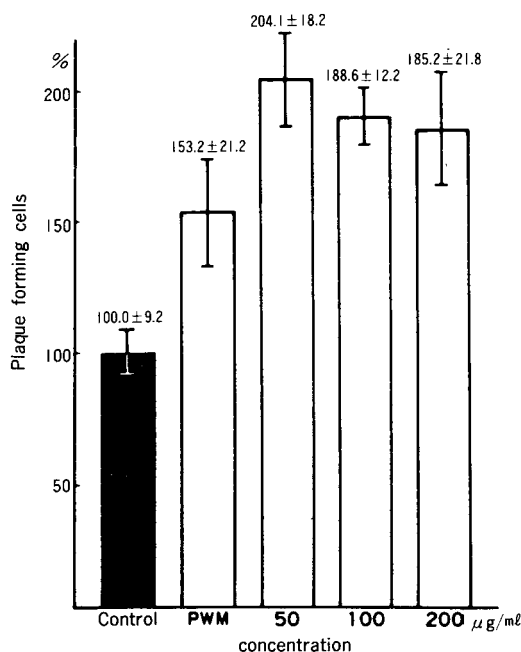


Fig. 2 Effects of culture supernatants of monocytes treated with Saiko on PWM-induced plaque forming cells ($n=10$).

Antibody formation was determined by the augmented anti-TNP-SRBC plaque forming cells.

抗体産生細胞の誘導が増強された。このことは、柴胡処理単球より抗体産生を増強する何らかの物質が分泌されることを示唆した。

3. 柴胡処理単球培養上清中に含まれる IL-1 活性の測定

C₃H/HeJ マウスの胸腺細胞を PHA で刺激する際に同時に柴胡処理単球培養上清を添加して、その中に含まれる IL-1 活性を thymocyte proliferation assay¹³⁾ で測定した。その結果、Fig. 3 に示すように、胸腺細胞浮遊液に 2 μ g/ml の PHA とともに 50 μ g/ml の柴胡で処理した単球培養上清を 10 % となるように添加すると、PHA のみを添加した対照群 100.0 ± 5.4 % (781 ± 41 cpm) と比較して、 235.0 ± 12.0 % となり、著明な IL-1 活性が検出された。

4. mitogen による末梢血単核細胞活性化に及ぼす柴胡の影響

各種の mitogen とともに各種濃度の柴胡を健常ヒト末梢血単核細胞浮遊液に添加して、リンパ球活性化に及ぼす影響を ³H-thymidine のとりこみを指標として検討した。その結果、Fig. 4 に示すように、PHA 非添加群の ³H-thymidine の酸不溶性分画へのとりこみは 1105 ± 209 cpm であったが、PHA (10 μ g/ml) の添加によって 45100 ± 4961 cpm に上昇した。しかし、PHA とともに柴胡を添加すると、その添加濃度に応じて ³H-thymidine のとりこみは低下し、柴胡非添加群 (100.0 ± 11.0 %) に比

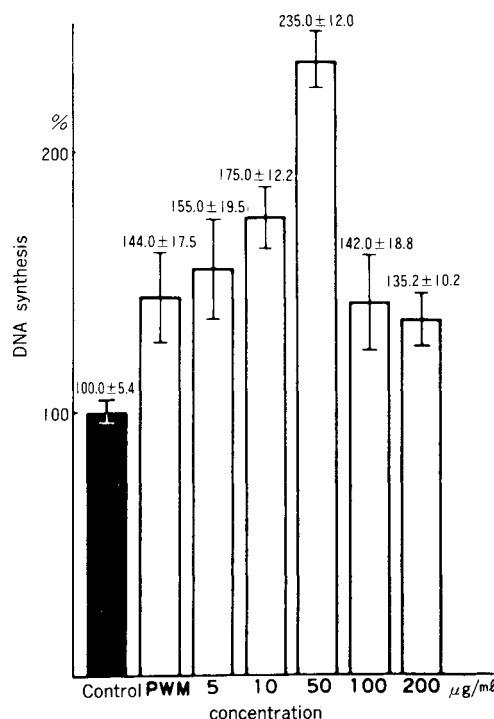


Fig. 3 Effects of the culture supernatant of monocytes treated with Saiko on DNA synthesis in PHA-stimulated thymocytes ($n=10$).

DNA synthesis was estimated by measuring the uptake of ³H-thymidine in thymocytes.

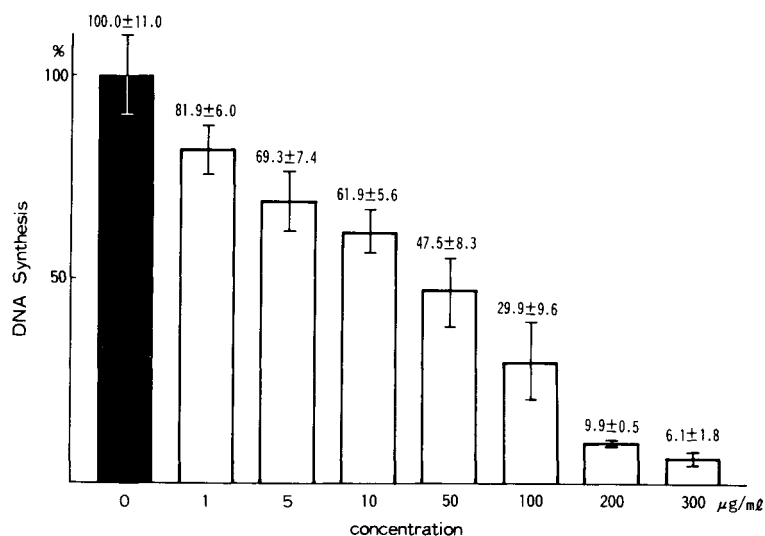


Fig. 4 Effects of Saiko on PHA-stimulated mononuclear cells ($n=10$).

Blastogenesis was estimated by measuring the uptake of ³H-thymidine in cells.

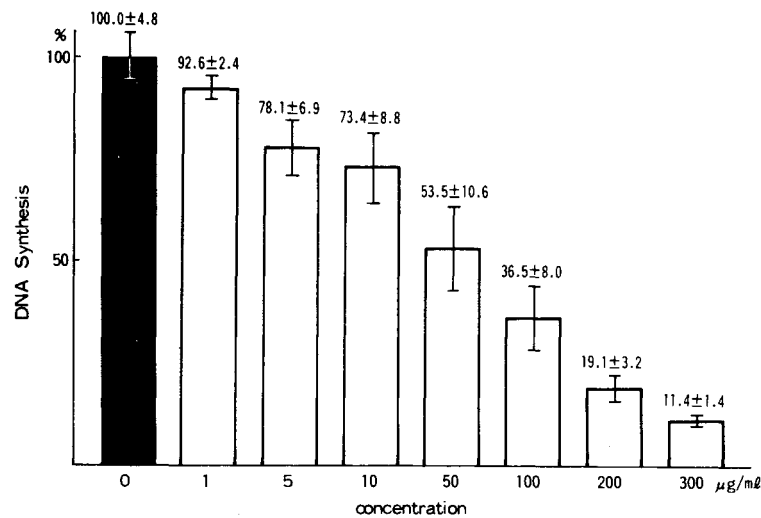


Fig. 5 Effects of Saiko on PWM-stimulated mononuclear cells (n=10).
Blastogenesis was estimated by measuring the uptake of ^3H -thymidine in cells.

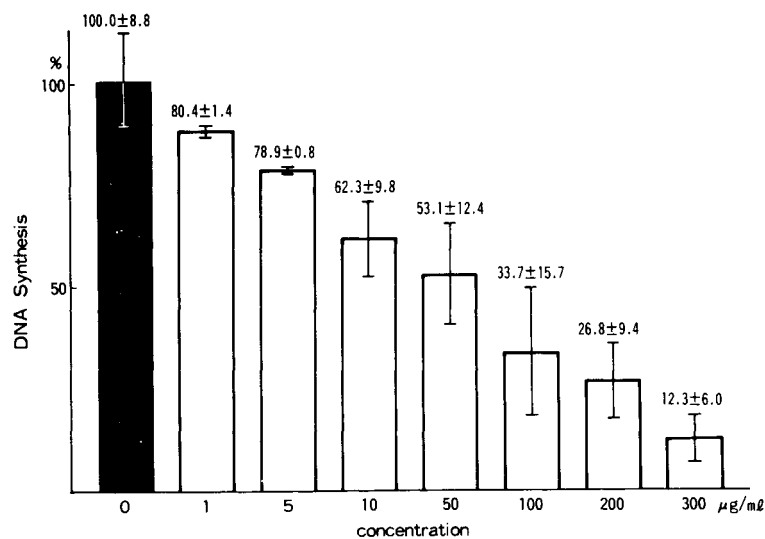


Fig. 6 Effects of Saiko on Con A-stimulated mononuclear cells (n=10).
Blastogenesis was estimated by measuring the uptake of ^3H -thymidine in cells.

して、300 $\mu\text{g/ml}$ の柴胡を添加した場合には ^3H -thymidine のとりこみが $6.1 \pm 1.8\%$ に著明に低下した。PWM 刺激によって誘導されるリンパ球幼若化も、柴胡によって著しく低下し、Fig. 5 に示すように、PWM 単独刺激群の ^3H -thymidine のとりこみ ($100.0 \pm 4.8\%$) に比して、300 $\mu\text{g/ml}$ の柴胡を PWM とともに添加した群では $11.4 \pm 1.4\%$ となった。同様の結果は Con A 刺激の場合においても認められ、Fig. 6 に示すように、Con A 刺激によ

るリンパ球の幼若化は柴胡によって著明に抑制された。

5. 柴胡の mitogen 刺激リンパ球活性化抑制に対する indomethacin の影響

健常ヒト末梢血単核細胞に PHA (10 $\mu\text{g/ml}$) を添加して 48 時間培養し、ついで、 ^3H -thymidine を加えて 24 時間培養すると、 ^3H -thymidine の酸不溶性分画へのとりこみは PHA 非添加群の約 40 倍に上昇した。しかし、PHA とともに柴胡 (100

$\mu\text{g/ml}$) を添加すると, ^3H -thymidine のとりこみは PHA 単独刺激時の $30.6 \pm 6.4\%$ となり, 著明に抑制された。しかし, Fig. 7 に示すように PHA ($10 \mu\text{g/ml}$), 柴胡 ($100 \mu\text{g/ml}$) と同時に indomethacin (10^{-5}M) を添加すると, ^3H -thymidine のとりこみは $43.5 \pm 4.7\%$ となり, 柴胡によるリンパ球幼若化反応の抑制が有意に軽減された。このことは, 柴胡によるリンパ球幼若化反応の抑制の少なくとも一部に prostaglandin の産生が関与することを示唆した。

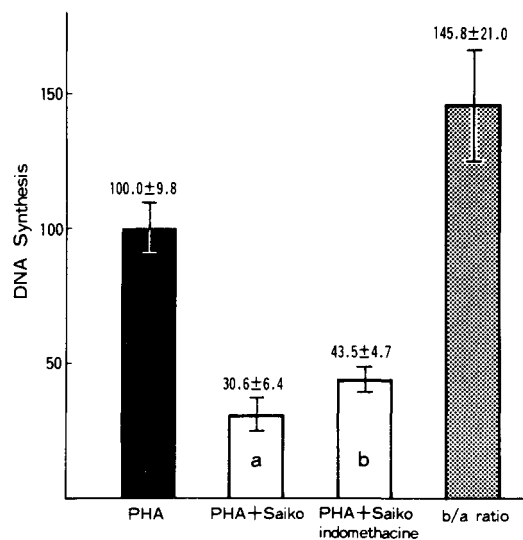


Fig. 7 Effects of Saiko and indomethacin on PHA-stimulated mononuclear cells ($n=10$). Blastogenesis was estimated by measuring the uptake of ^3H -thymidine in cells.

考 察

最近, 慢性活動性肝炎の治療に柴胡剤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。¹⁻⁸⁾ 著者らはさきに, ADCC や macrophage-mediated cytotoxicity による *in vitro* の肝細胞障害が柴胡によって軽減されることを実験的に示し, 柴胡に肝細胞を保護する作用がある可能性を示唆した。¹⁵⁾ また, 柴胡の成分であるサイコサポニン, とくにサイコサポニン b_1 に同様の作用があることを報告した。¹⁰⁾ しかし, 柴胡の免疫系に対する作用についてはほとんど不明である。

最近, 慢性活動性肝炎の転帰を推測する指標として, HB ウィルス由来の各種抗原やそれらに対する抗体が検討され, HB ウィルス抗原に対する細胞性免疫がウィルスの排除に重要な役割を示す可能性が示唆されている。また, HBe 抗原の陰性化と HBe 抗体の出現, すなわち, seroconversion が慢性 HB ウィルス性肝炎の良好な予後を示唆する指標であることも強調されている。従って慢性肝炎の治療に対する柴胡の有効性は, 肝細胞の保護作用ばかりでなく, 免疫系への柴胡の作用からも検討されねばならないと考えられる。

本研究で示したように, 柴胡は抗体産生実験のモデルとして頻繁に用いられている PWM によるポリクローナルな抗体の産生を有意に増強することが示唆された。このことは柴胡が HB ウィルス抗原に対する抗体の産生を増強する可能性があることを示した。柴胡の抗体産生増強作用の機構を検討するため, 著者らは, 柴胡で処理した末梢血単球の培養上清の抗体産生に及ぼす影響を検討し, 培養上清に含まれている IL-1 活性を測定した。その結果, 柴胡処理単球培養上清中には抗体産生を増強する物質があることが示された。柴胡処理単球培養上清中には柴胡そのものも含まれているので, 柴胡自身の抗体産生増強能も現われていることは否定できないが, 有意に高い IL-1 活性を検出したことは, 柴胡が単球-マクロファージ系細胞に作用して, IL-1 の産生を増強することを示唆するものである。

一般に, マクロファージや単球を lipopoly-saccharide (LPS) で刺激すると IL-1 が分泌されることが知られている。^{16,17)} この IL-1 は動物種を越えて T 細胞に作用し, interleukin-2 (IL-2) の産生を誘導する。¹⁸⁻²⁰⁾ また, IL-1 は T 細胞からの B cell growth factor (BCGF) や B cell differentiation factor (BCDF) の産生をも増強すると推測されている。²¹⁾ PWM は T 細胞依存性に B 細胞を活性化するが, Rosenberg ら²²⁾ はこの T 細胞および B 細胞の活性化に IL-1 が関与することを示唆している。

一方, PHA, PWM または Con A 等の mitogen 刺激によって誘導される細胞性免疫に柴胡がどのような影響を与えるかについて検討した。その結果, 柴胡は mitogen 刺激によるリンパ球幼若化反応の誘導を著明に抑制することを認めた。しかし, 柴胡と indomethacin を単核細胞に添加し, mitogen で刺激すると, リンパ球幼若化反応の抑制は軽減された。すなわち柴胡のリンパ球幼若化反応抑制作用は単球-マクロファージ系細胞からの prostaglandin の産生を促進することによると推測された。

以上により、柴胡は単球-マクロファージ系細胞に作用して、一方では IL-1 の産生増強を介して抗体産生を増強し、他方では prostaglandin 産生を介して mitogen によるリンパ球幼若化反応を抑制することが示唆された。

この論文の要旨は第1回和漢医薬学会にて発表した。

文 献

- 1) Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y.: Structure and actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. I. Anti-inflammatory action of saikosaponins. *Arzneim. Forsch.* **25**, 1021-1023, 1975
- 2) Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y.: Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneim. Forsch.* **25**, 1240-1243, 1975
- 3) 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
- 4) 有地 滋, 久保道徳, 小松一夫, 戸田静男: 柴胡割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
- 5) 有地 滋, 小西啓悦, 阿部博子: Saikosaponin の作用機作の解析. I. D-galactosamine 肝障害に対する Saikosaponin の作用. *肝臓* **19**, 430-435, 1978
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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: 柴胡割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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Rittenberg, M. B. and Pratt, K. L.: Anti-trinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of Balb/c mice to soluble and particulate immunogen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **132**, 575-581, 1969
- 12) 熊谷勝男, 伊藤恭吾, 多田正人, 日沼州司: 再度, マクロファージの純粋分離法に関して, 医学のあゆみ **110**, 611-614, 1979
- 13) Simon, P. L. and Willoughby, W. F.: The roll of Simon, P. L. and Willoughby, W. F.: The roll of sub-cellular factors in pulmonary immune function: species of lymphocyte-activating factor produced by rabbit alveolar macrophages. *J. Immunol.* **126**, 1534-1541, 1981
- 14) Jerne, N. K. and Nordin, A. A.: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* **140**, 405, 1963
- 15) 溝口靖紘, 筒井ひろ子, 宮島慶治, 山本祐夫, 北村瑞穂, 児玉千枝, 森沢成司: 免疫学的に誘導した肝細胞障害に対する柴胡の抑制作用, 和漢医薬学会誌 **2**, 27-31, 1985
- 16) Unanue, E. R.: The regulation of lymphocyte functions by macrophage. *Immunol. Rev.* **40**, 227-255, 1978
- 17) Mizel, S. B. and Ben Zvi, A.: Studies on the role of lymphocyte - activating factor (Interleukin 1) in antigen-induced lymphnode lymphocyte proliferation. *Cell Immunol.* **54**, 382-389, 1980
- 18) Calderon, J., Kiely, J. M., Lefko, J.L. and Unanue, E. R.: The modulation of lymphocyte function by molecules secreted by macrophages. I. Description and partial biochemical analysis. *J. Exp. Med.* **142**, 151-164, 1975
- 19) Farrar, J. J., Koopman, W. J. and Fuller-Bonar, J.: Identification and partial purification of two synergistically acting helper mediators in human mixed lymphocyte culture supernatants. *J. Immunol.* **119**, 47-54, 1977
- 20) Koopman, W. J., Farrar, J. J. and Fuller-Bonar, J.: Evidence for the identification of lymphocyte activating factor as the adherent cell-derived mediator responsible for enhanced antibody synthesis by nude mouse spleen cells. *Cell. Immunol.* **35**, 92-98, 1978
- 21) 中野昌康: インターロイキンを介しての細胞間相互作用, 臨床免疫 **15**, 129-136, 1983
- 22) Rosenberg, S. A. and Liposky, F. E.: The role of monocytes in pokeweed mitogen-stimulated human B cell activation: Separate requirements for intact monocytes and a soluble monocyte factor. *J. Immunol.* **126**, 1341-1345, 1981