

Natural Killer (NK) 細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響

溝口 靖紘,*^{a)} 藤信裕美子,^{a)} 小林 絢三,^{a)} 山本 祐夫,^{b)} 森沢 成司^{c)}^{a)}大阪市立大学医学部第三内科学教室, ^{b)}大阪社会医療センター^{c)}大阪市立大学医学部第一生化学教室The effects of Xiao-Chai-Hu-Tang (Syô-saiko-tô) on
natural killer (NK) cell activityYasuhiro MIZOGUCHI,*^{a)} Yumiko FUJINOBU,^{a)} Kenzo KOBAYASHI,^{a)}
Sukeo YAMAMOTO^{b)} and Seiji MORISAWA^{c)}^{a)}Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School^{b)}Osaka Socio Medical Center Hospital^{c)}First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

(Received October 21, 1986. Accepted November, 27, 1986.)

Abstract

The effects of Xiao-Chai-Hu-Tang (Syô-saiko-tô) on natural killer (NK) cell activity in normal human peripheral blood mononuclear cells were studied. As a result, when more than 0.1 μ g/ml of Xiao-Chai-Hu-Tang was added to the normal human peripheral blood mononuclear cells, NK cell activity significantly increased. This suggests that when Xiao-Chai-Hu-Tang is administered to patients with malignant tumors, an increase in NK cell activity may occur and affect tumor cells.

Key words Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang), NK cell**Abbreviations** E/T, Effector/Target; FCS, fetal calf serum; LAK, lymphokine activating killer; NK, natural killer; $m\phi$, macrophage; Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯

緒 言

最近, マクロファージ ($m\phi$) が effector 細胞として腫瘍細胞障害性を示すことが明らかになり, 種々の実験系で研究が進められている。すなわち, 抗体の存在下でマウスの腹腔 $m\phi$ が腫瘍細胞を破壊することが示され,¹⁾ 一方, 抗体非存在下でも, 活性化 $m\phi$ が特異的または非特異的に腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかにされている。このような $m\phi$ の抗腫瘍性は “armed” $m\phi$, 活性化 $m\phi$ ま

たは “angry” $m\phi$ などと呼ばれている。²⁾ 著者らは小柴胡湯, Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang) が *in vivo* および *in vitro* の実験系において $m\phi$ に作用して抗腫瘍性を示すことを報告した。^{3,4)} また, 小柴胡湯の抗腫瘍性の機序は cell-to-cell contact によるものと, 活性化 $m\phi$ から遊離する可溶性因子の両方があることを示唆した。^{3,5)}

一方, 抗腫瘍性を示す effector 細胞に NK 細胞がある。この細胞は1975年 Kiessling,⁶⁾ Herberman⁷⁾ によりはじめて報告され, 腫瘍細胞に対して細胞障害作用を有することで注目をあびている。

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

細胞障害作用を有することで注目をあびている。

そこで、著者らは健康ヒト末梢血単核細胞のNK細胞活性に小柴胡湯がどのような影響をおよぼすかについて検討した。

材料と方法

(1) 小柴胡湯エキス原末の調製法：柴胡〔日本栽培品、*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae), *Bupleuri Radix*] 7.0 g, 半夏〔中国産、*Pinellia ternate* BREITENBACH (Araceae), *Pinelliae Tuber*] 5.0 g, 黄芩〔中国産、*Scutellaria baicalensis* GEORGI (Labiales), *Scutellariae Radix*] 3.0 g, 大棗〔中国山東省産、*Zizyphus jujuba* MILLER var. *inermis* REHD. (Rhamnaceae), *Zizyphi Fructus*] 3.0 g, 人參〔韓国産、*Panax ginseng* C.A. MEYER (Araliaceae), *Ginseng Radix*] 3.0 g, 甘草〔中国東北産、*Glycyrrhiza uralensis* FISCH. (Leguminosae), *Glycyrrhizae Radix*] 2.0 g, 生姜〔中国雲南省産、*Zingiber officinale* ROSCOE (Zingiberaceae), *Zingiberis Rhizoma*] 1.0 g 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) Target cells および Effector cells：Target cells としてヒトNK細胞に対して感受性の高い cell line である K-562 (津村薬理研究所より供与された) を用いた。K562 は非働化した 5% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI 1640 中で継代培養し、使用前に必ず前培養をおこなった。Effector cells として、健康ヒト末梢血をヘパリン添加で採取し、Ficoll-Conray 液 (比重 1.077) に重層し、400 g, 30分間遠心し、境界に浮遊する単核細胞を取り出し分離した。この細胞を 10% FCS を含む RPMI 1640 で 3 回洗浄した後、同じ溶液に懸濁して、細胞濃度を 2.5×10^6 cells/ml となるように調整した。

(3) ^3H -thymidine のとりこみによる NK 細胞活性の測定法：前述の effector 細胞を 10% FCS 含有 RPMI 1640 で 2.5×10^6 cells/ml に調整した。次に小柴胡湯を同培養液で希釈し、最終濃度が 0.1, 0.5, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、37℃, 5% CO_2 を含む湿潤空気を通じながら細胞培養装置内で培養した。培養後、同培養液で 3 回洗浄し、effector 細胞を 10% FCS を含む RPMI 1640 で 2.5×10^6 cells/0.5 ml となるように調整した。

一方、NK 細胞活性測定前に前培養した K562 細胞

を 1 回 5% FCS を含む RPMI 1640 で洗浄し、 $2.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ cells/ml となるように調整した。そして、上記の effector 細胞に 0.5 ml 添加し、37℃でさらに 24 時間培養した。なお、Effector/Target (E/T) ratio は 10:1, 50:1 および 100:1 について検討した。ついで、1 μCi の ^3H -thymidine (比活性 5 Ci/ml) 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。NK 細胞の活性値は次の式より求めた。

NK 細胞活性値 =

$$\frac{\text{effector cells 添加群 K-562 細胞の } ^3\text{H-thymidine uptake}}{\text{K-562 細胞の } ^3\text{H-thymidine uptake}} \times 100(\%)$$

また、小柴胡湯による NK 細胞の活性値は次の式より求めた。

NK 細胞活性値 =

$$\frac{\text{小柴胡湯添加群 K-562 細胞の } ^3\text{H-thymidine uptake}}{\text{小柴胡湯非添加群 K-562 細胞の } ^3\text{H-thymidine uptake}} \times 100(\%)$$

なお、この場合 effector 細胞が ^3H -thymidine をとりこむ可能性があるので K-562 細胞を熱処理して検討した。すなわち、K-562 細胞を 80℃で 5 分間処理し、E/T 比が 50:1 となるように調整し、同様の方法で検討した。

(4) trypan blue dye exclusion test による viability の測定法： ^3H -thymidine のとりこみと、target cell の killing が相関するかについて検討するため、trypan blue dye exclusion test で viability を測定した。

effector 細胞 (2.5×10^6 cells/ml) に各種濃度の小柴胡湯を添加して、5% CO_2 を含む湿潤空気を通じながら 37℃で細胞培養装置内で培養した。培養後、10% FCS を含む RPMI 1640 で 3 回洗浄し、E/T 比が 50:1 となるように K-562 細胞を添加し、37℃でさらに 24 時間培養した。培養後 trypan blue dye exclusion test にて生死細胞を顕微鏡で数え、生存率を求めた。

結 果

1. 小柴胡湯のNK細胞活性におよぼす影響 (^3H -thymidine のとりこみによる)

Target cell である K-562 細胞に effector 細胞を E/T 比が 10:1, 50:1 そして 100:1 になるように添加して、 ^3H -thymidine のとりこみを測定すると Fig. 1 に示すように effector 細胞非添加群に比し、E/T 比が 50:1 の時に最も有意に ^3H -thymidine のとりこみが低下した。すなわち、E/T 比

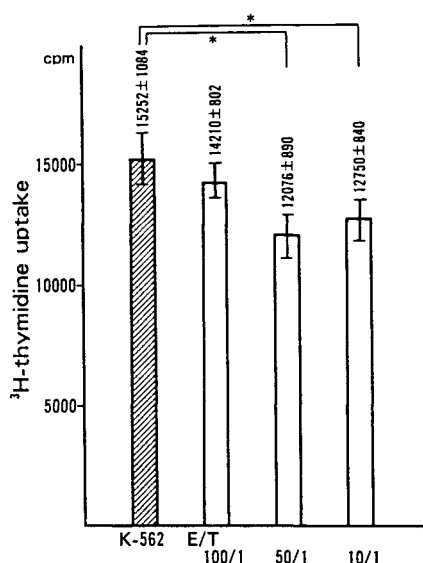


Fig. 1 Effects of effector cell/target cell (E/T) ratio on NK cell activity (n=6). * $p < 0.01$
Cytotoxicity was estimated by the decreased uptake of [³H]-thymidine in cells.

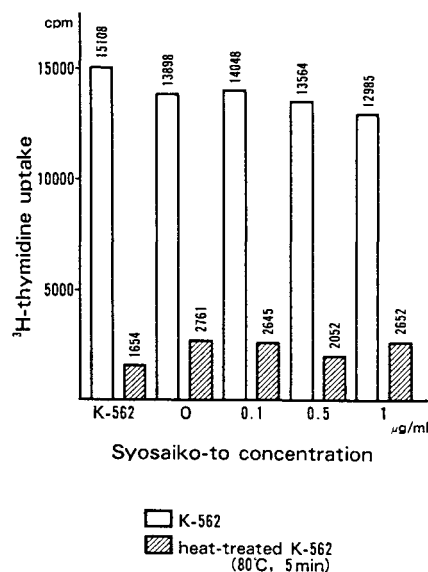


Fig. 3 Effects of heat-treated K-562 cells and non-treated K-562 cells on uptake of [³H]-thymidine in cells.

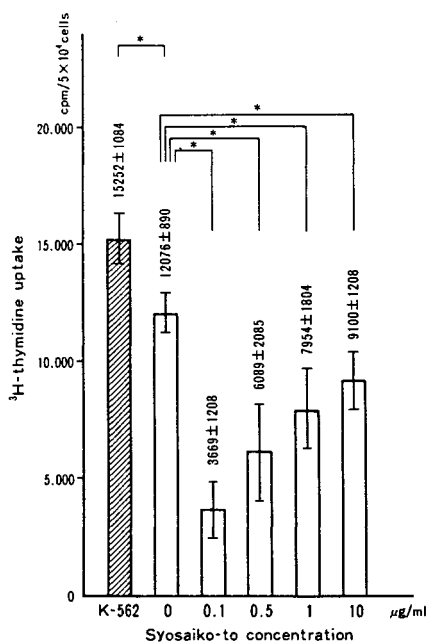


Fig. 2 Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on NK cell activity (n=10). * $p < 0.01$
Cytotoxicity was estimated by the decreased uptake of [³H]-thymidine in cells.

が50：1の時に最も強くNK細胞活性が誘導されることが示唆されたので、以後の実験はE/T比が50：1となるように調整して行った。

そこで、健常ヒト末梢血単核細胞のNK細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響について検討した。小柴胡湯を0.1, 0.5, 1および10 µg/mlでeffector細胞を前処理すると、³H-thymidineのとりこみは著明に低下し、特に0.1 µg/mlの小柴胡湯で前処理すると、小柴胡湯非添加群(12076 ± 890 cpm)に比し、3669 ± 1208 cpmで有意のとりこみの低下が認められた(Fig. 2)。

なお、effector細胞が³H-thymidineをとりこむ可能性もあるのでK-562細胞を80℃で5分間処理し、同様の方法で検討した。その結果、Fig. 3に示すようにeffector細胞の³H-thymidineのとりこみにはほとんど影響を与えなかった。

2. 小柴胡湯のNK細胞活性におよぼす影響 (trypan blue dye exclusion test による)

Target cellであるK-562細胞にeffector細胞を添加し、E/T比が50：1となるように調整し、trypan blue dye exclusion testでK-562細胞のviabilityを検討した。その結果、Fig. 4に示すようにeffector細胞非添加群(95.6 ± 4.8%)に比し、effector細胞添加群では72.4 ± 12.6%で有意にvia-

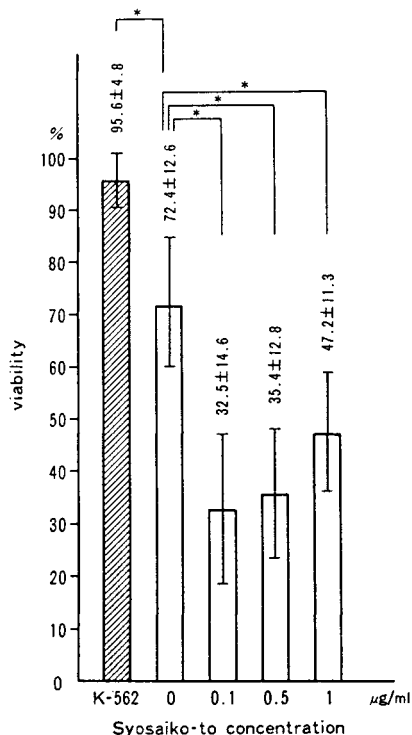


Fig. 4 Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on NK cell activity (n=10). * $p < 0.01$. Viability of K-562 cells was estimated by trypan blue dye exclusion test.

bility が低下した。

また、小柴胡湯処理 effector 細胞の K-562 細胞に対する viability を検討すると、小柴胡湯 0.1, 0.5, 1 µg/ml の濃度で処理した時、viability は小柴胡湯非処理群 (72.4 ± 12.6 %) に比し、32.5 ± 14.6%, 35.4 ± 12.8% そして 47.2 ± 11.3% で有意に低下した。

すなわち、³H-thymidine のとりこみと viability は互いに相関関係があることが示唆された。

考 察

NK 細胞は感作をうけたことがないヒトやマウスのリンパ組織に見出され、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して細胞障害性を示すことが認められている。ヒトの NK 細胞は形態学的には比較的大型で顆粒に富む細胞質をもったリンパ球で、Large granular lymphocyte に属する⁸⁾。最近、ヒト末梢血

単球と反応する単クローン性抗体 OKMI がヒト NK 細胞と弱いながら反応するため、組織中の NK 細胞が酵素抗体法等で検討されている⁹⁾。

しかし、ヒトの NK 細胞に特異的な表面マーカーがない現状では、NK 細胞の機能をみるためには NK 細胞に感受性の高い標的細胞に対する細胞障害活性をもって NK 細胞活性としている。NK 感受性細胞として一般的に用いられているのはヒト慢性白血病患者由来 K-562 細胞、T リンパ芽球様細胞株 MOLT-4 などである。

一方、NK 細胞の生体内における役割に関してはなお不明の点が多い。

臨床的には NK 細胞が関与している疾患として悪性腫瘍、ウイルス感染症、持続ウイルス感染により発症すると考えられている自己免疫疾患および免疫不全症などがある。

例えば悪性腫瘍においては NK 活性の低下が認められ、免疫賦活剤により NK 細胞活性を高めようとする試みがある。また、免疫不全症の中には NK 細胞活性の低下もみられる¹⁰⁾。全身性エリテマトーデスでは NK 細胞活性の低下が報告されており^{11,12)} 病因との関係で興味もたれている。さらに、最近インターフェロンに対する NK 細胞活性の反応性をしらべ治療に応用しようとする報告も出はじめている。

さて、著者らは小柴胡湯に抗腫瘍性活性があることに注目し、*in vivo* および *in vitro* の実験系を用いて小柴胡湯の macrophage-mediated cytotoxicity^{3,4)} lymphokine activating killer (LAK) 細胞活性¹³⁾ に対する有効性をすでに報告した。

そこで本研究では小柴胡湯の NK 細胞活性におよぼす影響について検討した。その結果、小柴胡湯には健常ヒト末梢血単核細胞の NK 細胞を有意に増強させることが示唆された。

しかも、その有効性は 0.1 µg/ml より高濃度になると NK 活性はむしろ低下傾向を示した。すなわち、小柴胡湯の作用には一定の有効濃度があると考えられる。このことは小柴胡湯の polyclonal な抗体産生の誘導にも一定の有効濃度があることが認められ、すでに報告した¹⁴⁾。また、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を肝臓内に投与した場合には 2 mg/kg の方が、20 mg/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¹⁵⁾。

なお、NK細胞活性測定は一般的には、NK感受性細胞をあらかじめ ^{51}Cr で標識しておき、健常あるいは患者末梢血リンパ球と一定時間混合して培養し、NK細胞によって障害された標識細胞から上清中に放出される ^{51}Cr の放射活性を測定してNK細胞活性を検討している。¹⁶⁾

本研究では小柴胡湯で処理した effector 細胞と target cell を混合培養し、24時間後に ^3H -thymidine を添加し、細胞のとりこみで測定した。この方法を用いた理由としてはNK細胞の細胞障害機序を解析するためである。すなわち、 ^3H -thymidine のとりこみと killing 活性が相関することと、同時に細胞培養上清を採取し、その培養上清中の cytotoxic factor を分析し、NK細胞の細胞障害機序を chemical mediator のレベルで解析するためである。事実、初期培養上清中にはNK細胞から産生分泌されると考えられる cytotoxic factor が検出でき、現在この因子を同定している。すなわち、この方法を用いるとNK細胞の細胞障害機序が chemical mediator のレベルで解析できる。この因子に関しては次回に報告する予定である。

いずれにしても小柴胡湯がヒト末梢血単核細胞のNK細胞活性を増強することが示唆されたことは、小柴胡湯にはウィルス感染細胞の破壊作用、抗腫瘍作用があることが期待し得る。

なお、小柴胡湯のNK細胞活性の増強作用はNK細胞に対する直接作用である可能性と、IL-1産生、IL-2産生およびインターフェロン誘導を介しての可能性も考えられる。今後さらに詳細な検討が必要と考える。

結 論

健常ヒト末梢血単核細胞のNK細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響について検討した。

その結果、小柴胡湯はNK細胞活性を増強した。

文 献

- 1) Bennett, B., Old, L.J. and Boyse, E.A.: The phagocytosis of tumor cells *in vitro*. *Transplantation* 2, 183-202, 1964
- 2) Fink, M.A.: "The macrophage in neoplasia" (Ed. by Fink, M.A.), Academic press, 1976
- 3) 柴田悠喜, 姉崎 健, 名倉弘明, 藤井喜一郎, 溝口靖紘: 小柴胡湯の抗腫瘍作用について, 第43回日本癌学会総会記事, p. 173, 1984
- 4) 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
- 5) 溝口靖紘, 田村恭子, 筒井ひろ子, 志波 孝, 東森俊博, 大西文明, 門奈丈之, 山本祐夫, 中井賢治, 大谷周造, 森沢成司: 活性化マウス腹腔浸出細胞の腹水肝癌細胞(MH134)に対する細胞障害性, 肝臓 21, 562-566, 1980
- 6) Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5, 112-117, 1975
- 7) Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, D.H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16, 216-229, 1975
- 8) Timonen, T., Ranki, A., Saksela, E. and Häyry, P.: Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterization of the effector cells. *Cell. Immunol.* 48, 121-132, 1979
- 9) Breard, J., Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., and Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 124, 1943-1948, 1980
- 10) Koren, H., Amos, B. and Buckley, R.: Natural killing in immunodeficient patients. *J. Immunol.* 120, 796-799, 1978
- 11) Oshimi, K., Sumiya, M., Gonda, N., Kano, S. and Takaku, F.: Natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2, 1023, 1979
- 12) Goto, M., Tanimoto, K. and Horiuchi, Y.: Natural cell mediated cytotoxicity in systemic lupus erythematosus. Suppression by anti-lymphocyte antibody. *Arthritis Rheum.* 23, 1274-1281, 1980
- 13) 溝口靖紘, 阪上吉秀, 山本祐夫: lymphokine activating killer (LAK) cell 活性に及ぼす小柴胡湯の影響, アレルギー 35, 1119-1121, 1986
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 狩野庄吾: NK細胞活性, 臨床免疫 13, 361-365, 1981