

金銭草の研究 (I)
免疫応答に及ぼす影響について

范 紀勞*, 真弓 久則, 姫野 国祐, 徳田 倫章, 野本亀久雄

九州大学生体防御医学研究所免疫学部門

Studies on *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. I.
Effect of the drug on immune responses

Ji-Lao FAN, Hisanori MAYUMI, Kunisuke HIMENO, Noriaki TOKUDA and Kikuo NOMOTO

Department of Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

(Received April 30, 1987. Accepted July 2, 1987.)

Abstract

The effects of *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. (LhM) on immune responses were examined in murine system. The effects with such treatment were ; i) the reduction in cell number and weight in the thymus, the increase in cell number and weight in the spleen, ii) the suppression of a T cell mitogenic response (PHA) and a B cell mitogenic response (LPS), iii) the prolongation of survival of tumor allografts. This drug seems to exert influence on the immune system, presumably through enhancing the emigration of thymocytes to peripheral lymphoid systems.

Key words *Lysimachia hemsleyana* MAXIM., C3H/He, immune response, mitogenic responses, skin graft, allo-tumor graft

Abbreviations AKR, AKR/J ; B6, C57BL/6 ; C3H, C3H/He ; Con A, concanavalin A, i.p., intraperitoneal ; LhM, *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. ; LPS, lipopolysaccharide ; MHC, major histocompatibility complex ; MST, mean survival time ; PFC, plaque-forming cell ; PHA, phytohemagglutinin ; p.o., per os ; SRBC, sheep red blood cell

緒 言

金銭草 (*Lysimachia hemsleyana* MAXIM.) は主として利尿作用をもつ漢方薬として臨床的に使用されているが、尿路結石を胆道系の疾患にも有効とされている。また、リンパ組織の萎縮作用とともに免疫抑制効果を示すことも示唆されているが^{1,2)} その作用機構は明らかではない。著者らは金銭草の免疫系に対する作用を解明するため、その抽出物をマウスに投与して種々の免疫学的指標に及ぼす影響を観察した。

材料と方法

I 実験材料

中国産の金銭草を北京市の漢方薬局から購入して実験に供した。金銭草は細切して10倍量の水を加え、100℃で約1時間加熱抽出した。抽出後、4枚重ねの滅菌ガーゼで濾過し、減圧濃縮後、さらに40℃以下で1晩減圧して乾燥させて水性エキスを得た。エキスの収量は15.8%であった。

このように調製した金銭草のエキスを phosphate-buffered saline (PBS) に溶解し、煮沸滅菌後マウスに1500 mg/kg 経口 (p.o.) (1日2回) あるいは150 mg/kg 腹腔内 (i.p.) 投与した。

*〒812 福岡市東区馬出3-1-1
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

II 実験動物

生後 8-12 週齢の C3H/He (C3H, H-2^K), C57BL/6 (B6, H-2^b) および AKR/J (AKR, H-2^k) マウスを静岡実験動物研究所から購入して用いた。

III 実験方法

1. リンパ球幼若化反応

(1) 培養液: RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) 10% Nu-Serum (Collaborative Research, Inc., Lexington, MA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin および 4×10^{-5} M 2-mercaptoethanol を添加したものを、細胞培養液として使用した。

(2) 細胞浮遊液の調製: マウスから脾臓を無菌的に摘出し、2枚のスライドガラス間で軽く圧迫して細胞を浮遊させた後、2枚重ねのガーゼで濾過し、2回 Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄した。ついで、この脾細胞に上述の培養液を加えて細胞濃度が 4×10^6 /ml となるように調整した。

(3) 培養: mitogens の濃度は concanavalin A (Con A, Difco) 10 µg/ml, lipopolysaccharide (LPS, Difco) 100 µg/ml, phytohemagglutinin (PHA, Difco) 10 µg/ml とした。マイクロプレート (corning, 25860) に調整した脾細胞浮遊液 100 µl/well を入れ、次に mitogen 液 100 µl/well を添加した。培養は CO₂ 細胞培養装置を用い、5% CO₂ を含む高湿度の空気を通じながら 48 時間行った。なお、リンパ球の幼若化反応は培養終了 6 時間前に ³H-チミジン (50 µCi/ml) を 20 µl/well 添加し、その取込み量を液体シンチレーションカウンターで測定して算定した。

2. 遅延型足蹠反応 (delayed footpad reaction, DFR) と溶血ブランク形成細胞 (plaque forming-cell, PFC) の測定

PBS を用いて調整した 10% ヒツジ赤血球 (sheep red blood cell, SRBC) 浮遊液 0.2 ml を complete Freund's adjuvant (CFA) 0.2 ml に混じて、C3H マウスの皮下に注射し、5 日後に惹起注射として 10% SRBC 浮遊液 50 µl を右足蹠に注射した。対象としては左足蹠に PBS を注射した。24 時間後の腫脹を測定し、左右差によって足蹠反応を推定した。

PFC の測定には、足蹠反応測定後、48 時間目に脾細胞を 5×10^6 /ml に調製して用いた。PFC 測定は Cunningham と Szenberg⁴⁾ のプラーク法に基づいて行った。すなわち、28% SRBC 1 ml と 2 ml の被検細胞浮遊液と 0.5 ml のウサギ補体を十分に混合し、直径 13 mm 厚さ 0.1 mm 円型チェンバーに注入後、37°C で 30-60 分間培養した後、顕微鏡下に溶

血斑の数を測定した。

3. 皮膚移植

皮膚移植は前報³⁾に従って行った。すなわち、AKR または B6 の軀幹部から 1 × 1 cm の皮膚全層片を採取し、C3H の右背部に作成した 1 × 1 cm の皮膚欠損部に絹糸で縫合した。移植部はガーゼと伸縮性絆創膏で被覆し、移植後 7 日目にテープを除去し生着片を観察して mean survival time (MST) を求めた。

4. 腫瘍移植

前報³⁾のように行った。B6 由来の EL-4 lymphoma 細胞を 1×10^7 個右側腹部の皮下に接種し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。

結 果

1. 胸腺と脾の重さおよび細胞数に及ぼす影響

C3H マウスに金銭草抽出エキス (150 mg/ml) を 1 回腹腔内投与し、経時的に胸腺と脾の重量および細胞数を測定した。その結果、Fig. 1 および Fig. 2 に示すように、投与後 1 日目から胸腺の重量と細胞数の減少が見られたが、2 日目から脾の重量と細胞数は逆に増加しはじめ、4 日目で最大となり、5 日目でも対照群に比して有意に高値を示した。胸腺の細胞数は対照群に比較して、1 日目と 2 日目に対照群の 1/3 に、3 日目には 1/8 に減少した ($p < 0.01$)。脾細胞数は 4 日目に対照群の約 2 倍に増加した ($p < 0.01$)。

2. Con A, PHA, LPS 刺激によるリンパ球幼若化反応

金銭草エキス (150 mg/kg) を C3H マウスに 3 日ごとに 4 回腹腔内投与し、最終投与後 2 日目に脾細胞を採取した。金銭草投与群では、PHA と LPS 刺激によるリンパ球幼若化反応は非投与の対照群に比し、明らかな低下を示した (Table I)。しかし、Con A 刺激に対する反応性は、無投与群と比較して有意な低下を示さなかった。

3. SRBC に対する遅延型足蹠反応と抗体産性に及ぼす影響

金銭草エキスを C3H マウスに 2 日ごとに 2 回腹腔内投与するかまたは 7 日間連続経口投与して、遅延型足蹠反応および PFC 誘導に対する影響を検討した。その結果、Table II に示すように、以上の 2 つの投与方法によっては、遅延型足蹠反応も PFC の誘導も影響を受けず、金銭草エキス非投与対照群との間に有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。

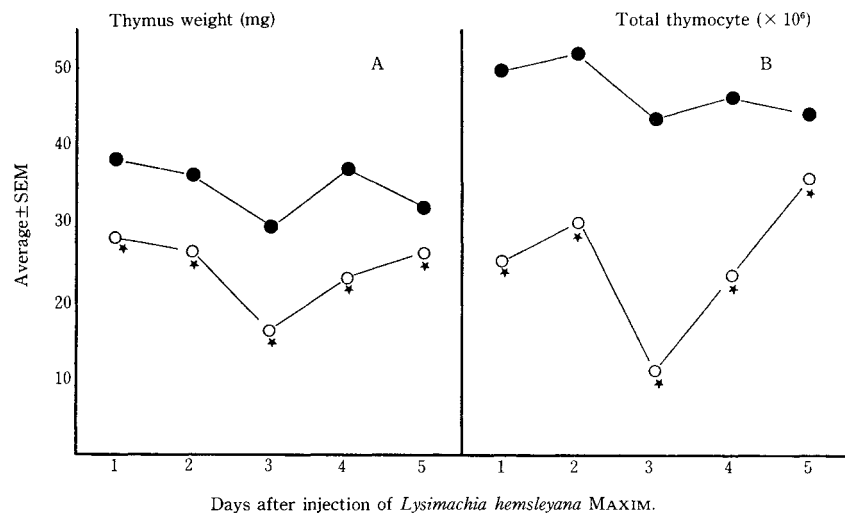


Fig. 1 Effect of an intraperitoneal injection of *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. (150 mg/kg) on the weight (A) and cell number (B) of the thymus in C3H/He mice.

Values represent mean of 4 mice in each group. ★ $p < 0.01$ compared with nontreated group. Nontreated mice (●), LhM-treated mice (○).

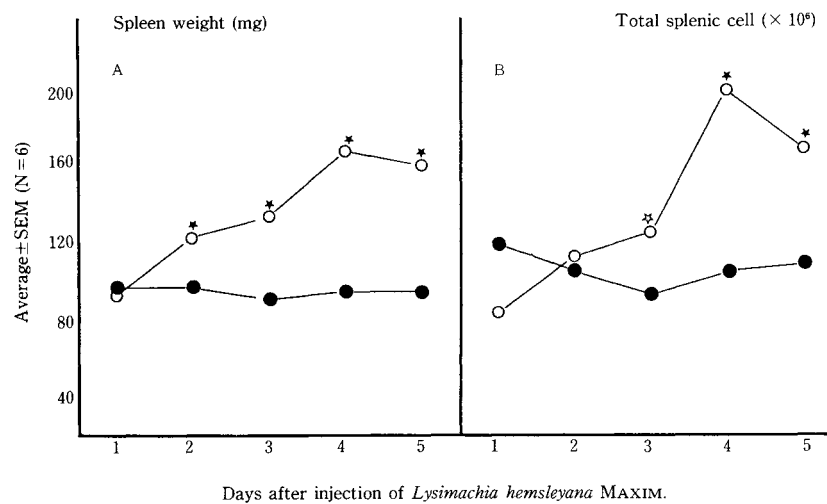


Fig. 2 Effect of an intraperitoneal injection of *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. (150 mg/kg) on the weight (A) and cell number (B) of the spleen in C3H/He mice.

Values represent mean of 4 mice in each group. ★ $p < 0.01$ compared with nontreated group. ☆ $p < 0.05$ compared with nontreated group. Nontreated mice (●), LhM-treated mice (○).

Table I Proliferative responses to Con A, PHA or LPS after treatment with *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. (LhM).

Exp	Mitogen response (net CPM $\times 10^3$) ^a							
	medium		Con A		PHA		LPS	
	nontreated	LhM	nontreated	LhM	nontreated	LhM	nontreated	LhM
1	4.0 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 1.3	342.5 $\pm$ 116.8	347.1 $\pm$ 129.5 ^b	474.5 $\pm$ 55.5	112.1 $\pm$ 52.5 ^c	74.7 $\pm$ 14.7	26.8 $\pm$ 3.9 ^c
2	2.4 $\pm$ 1.2	1.8 $\pm$ 0.8	50.3 $\pm$ 33.8	46.5 $\pm$ 39.4 ^b	21.7 $\pm$ 5.3	15.5 $\pm$ 7.0 ^d	11.8 $\pm$ 6.6	3.9 $\pm$ 2.8 ^c
3	3.0 $\pm$ 1.5	2.2 $\pm$ 0.4	ND ^e	ND	21.5 $\pm$ 5.7	4.8 $\pm$ 1.7 ^c	7.0 $\pm$ 1.7	5.8 $\pm$ 1.2 ^d

a) The data are shown 3–6 separate mice in each group for mitogen stimulation. Values represent mean $\pm$ SEM of 6 cultures.

b) Not significant compared with nontreated mice.

c) $p < 0.001$ compared with nontreated mice.

d) $p < 0.05$ compared with nontreated mice.

e) Not determined.

Table II Delayed footpad reaction and plaque-forming cell in C3H/He mice treated with *Lysimachia hemsleyana* MAXIM.

Group	Treatment	No. of mice	DFR	PFC
1	—	5	7.7 $\pm$ 0.8	120.2 $\pm$ 53.1
2	<i>p.o.</i> ^a	5	7.4 $\pm$ 0.3 ^b	111.2 $\pm$ 35.4 ^b
3	<i>i.p.</i> ^c	5	7.2 $\pm$ 1.2 ^b	81.6 $\pm$ 42.1 ^b

a) *Per os*.

b) Not significant compared with Group 1.

c) Intraperitoneal.

Table III Skin graft survival in C3H/He mice after treatment with *Lysimachia hemsleyana* MAXIM.

Group	Recipient	Donor	Treatment	No. of mice	Skin graft survival	MST $\pm$ SD (days)
1	C3H	B6	—	10	8, 9, 9, 10, 10, 10, 10, 10, 11, 11	9.8 $\pm$ 0.9
2	"	AKR	—	10	9, 9, 10, 10, 10, 10, 11, 11, 12, 13	10.5 $\pm$ 1.3
3	"	B6	<i>p.o.</i> ^a	12	10, 10, 10, 10, 10, 11, 11, 11, 12, 13, 16	11.3 $\pm$ 1.8 ^b
4	"	B6	<i>i.p.</i> ^c	12	9, 9, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 11, 11, 11	10.2 $\pm$ 0.9 ^b
5	"	AKR	<i>i.p.</i>	10	10, 10, 10, 10, 10, 10, 12, 12, 12, 13	10.9 $\pm$ 1.2 ^b

a) *Per os*.

b) Not significant compared with group 1, 2.

c) Intraperitoneal.

4. 皮膚移植

金銭草エキスをC3Hマウスに2日ごとに2回腹腔内投与するかまたは金銭草を7日間連続投与した後、B6またはAKRの皮膚片を移植した。移植後も金銭草を7日間連続腹腔内あるいは経口投与したが、このような処置によってもB6由来およびAKR由来の皮膚移植片の生着延長効果は認められなかった (Table III)。

5. 腫瘍移植

金銭草エキスをC3Hマウスに2日ごとに2回腹腔内に投与するかまたは連日経口投与し、4日後にB6由来のEL-4を移植した。移植後も金銭草エキスを3週間連続腹腔内に投与するかまたは経口投与した。その結果、Fig. 3に示すように、非投与群では、腫瘍は20日までに完全に拒絶されたが、経口投与群では、7日目から20日目までは腫瘍は非投与群

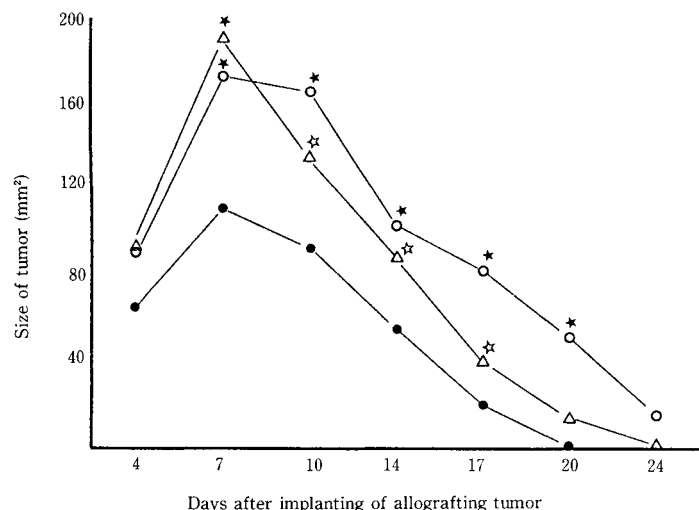


Fig. 3 Effect of *Lysimachia hemsleyana* MAXIM. on the growth of tumor allografts.

Values represent mean $\pm$ SD of 5 mice in each group. $\star p < 0.01$ compared with nontreated group. $\star p < 0.05$ compared with nontreated group. Nontreated group (●), p.o.-treated group (○), i.p.-treated group (△).

に比して有意の増大 ($p < 0.01$) が認められた。しかしながら、27日までに完全に拒絶された。腹腔内投与群では、17日までは有意の増大 ($p < 0.05$) が認められたが、24日までに完全に拒絶された。

考察と結論

本実験に用いた金銭草は中国の楊子江流域で産する植物であり、その抽出物には ketone 類, glycoside 類, tannin, lipid, アミノ酸および sterol 類などの成分が含まれるとされている⁵⁾。多くの成分を含有する漢方薬の作用機序を明らかにすることはきわめて困難であるが、今回の実験から明らかなように、経口または腹腔内投与による金銭草の免疫系への影響の1つとして胸腺内細胞数の減少があげられる。これは胸腺細胞に対する直接的な細胞障害作用によるものではなく、胸腺細胞の末梢への動員促進によることが示唆された。また、金銭草は PHA と LPS による脾細胞のリンパ球幼若化反応を著明に抑制した。さらに移植された同種腫瘍の生着延長効果が認められた。

しかしながら、移植皮膚片の生着延長効果は主要組織適合抗原複合遺伝子 (major histocompatibility complex, MHC) が一致した組みあわせにおい

ても、一致しない群においても認められなかった。姚らは¹⁾ 金銭草水煎剤をサイクロホスファミドと併用した場合には、移植皮膚片の著明な生着延長効果が認められ、金銭草水煎剤単独投与でも有意の生着延長効果が認められると報告している。著者らの実験系では、金銭草のエキスをを用いたが、姚らは伝統的な金銭草50%水煎剤を使用しており、さらに姚らは非純系マウスを使用したため研究結果は一致しなかったのではないかと考えている。各種の免疫抑制処置によっても皮膚移植においては生着延長が他の組織あるいは臓器移植に比して困難である。これは皮膚上皮には他の組織や臓器に比して MHC のクラス II 抗原を豊富に保有した上皮系細胞、ことにランゲルハンス細胞が存在し、これらが拒絶反応の対象抗原となりやすいためとされている。

姚らは¹⁾ 金銭草水煎剤の生体防御系に及ぼす影響として、抗体産生能の低下およびロゼット形成等の細胞性免疫の抑制効果が認められるが、マクロファージや好中球等の貪食細胞系の機能は逆に亢進させると報告している。本実験において、C3H マウス脾細胞の PHA または LPS 刺激に対する応答は金銭草エキスによって著明に抑制されるにもかかわらず、Con A に対する応答は抑制されないことが観察された。PHA と Con A はいずれも T 細胞を分裂

させるレクチンである。しかしながら、全てのT細胞のサブセットが同程度にこの2種のT細胞mitogenに反応するとは限らず、特にCon Aは未熟型のT細胞も分裂増殖させるがPHAはその効果が弱いとされている。^{6,7)}以上のことより金銭草は胸腺から未熟型のT細胞を脾を含めた末梢へ動員させ、結果として細胞性免疫を低下させるものと思われる。LPSはB細胞mitogenとして知られているが、金銭草のLPSに対する反応抑制が金銭草のB細胞に対する直接効果であるのか、またT細胞抑制の結果であるのかは明らかではない。すなわちT細胞はB細胞の増殖、分化を促進するBCGF (B cell growth factor) やBCDF (B cell differentiation factor) を産生することが知られており、B細胞の抑制はその結果かもしれない。今回の実験により、金銭草エキスは金銭草水煎剤と同様に細胞性免疫、体液性免疫の両者に対して抑制効果があることが明らかとなった。

金銭草は副作用も少なく、臓器移植あるいは自己免疫病に対する免疫抑制剤として有用と思われるが、他の薬剤との併用療法などの投与方法、および金銭草の有効成分の系統がさらに必要と思われる。

謝 辞

本研究に際し、金銭草を漢方薬局より購入並びに送付していただいた中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所免疫室主任姚楚錚先生および金銭草水抽出エキスを調製していただいた鐘紡漢方研究所堀場聖子氏に深謝する。

文 献

- 1) 姚 楚錚, 李 烽, 劉 月蘭, 張 知徳, 王 金萬, 蔡 保健, 劉 玉英, 程 建華, 趙 森林: 金銭草对免疫反应的影响 I. 免疫抑制作用. 中国医学科学院学报 3, 123-126, 1981
- 2) 姚 楚錚, 張 知徳, 劉 月蘭, 程 建華, 劉 玉英, 趙 森林: 金銭草对免疫反应的影响 II. 淋巴组织耗损. 中国医学科学院学报 4, 286-289, 1982
- 3) Fan, J-L., Mayumi, H., Tokuda, N., Himeno, K. and Nomoto, K.: Drug-induced tolerance to allografts in mice. XI. Tolerance induction using F₁ (donor X recipient) spleen cells as a tolerogen. *Transplant. Proc.* 19, 3513-3519, 1987
- 4) Cunningham, A. J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14, 599-601, 1968
- 5) “全国中草药汇编 (上册),” 人民卫生出版社, 北京, pp. 538-540, 1975
- 6) Reinherz, E. L.: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4061-4065, 1975
- 7) Fauci, A. S. and Dale, D. C.: The effect of *in vivo* hydrocortisone on subpopulation of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 53, 240-246, 1974