

葛根湯のアルサス型および遅延型アレルギー反応に対する作用

志賀 隆*, 小松 靖弘, 細谷 英吉

津村薬理研究所免疫薬理研究室

Effect of Kakkon-tô on the active Arthus reaction and the delayed type hypersensitivity in mice

Takashi SHIGA*, Yasuhiro KOMATSU and Eikichi HOSOYA

Tsumura Research Institute for Pharmacology

(Received December 4, 1987. Accepted February 8, 1988.)

Abstract

Anti-allergic activity of Kakkon-tô (Ge-Gen-Tang, TJ-1, Japanese herbal medicine) was assessed by the delayed type hypersensitivity (DTH), the active Arthus reaction and the anti-sheep red blood cell (SRBC) antibody formation in mice. When TJ-1 (2 g/kg/day) was orally given to mice for 7 consecutive days prior to SRBC immunization, it suppressed the DTH and the anti-SRBC antibody formation. The active Arthus reaction induced with SRBC in mice was also suppressed by the administration of TJ-1 (2 g/kg/day) for 19 days and/or 12 days before the antigen injection for the elicitation of the allergic reaction. However, TJ-1 did not show any inhibitory action against the DTH when it was given to mice at the elicitation and after the immunization. In the case of the antibody formation, it also did not inhibit hemolytic plaque forming cell (HPFC) induction when it was administered after the immunization. The DTH suppression by TJ-1 was eliminated by cyclophosphamide injection 1 day before immunization. On the other hand, TJ-1 augmented concanavalin A-induced immunosuppression against the DTH reaction and HPFC induction in mice. These results suggest that TJ-1 shows antiallergic activities in suppressing DTH, Arthus reaction and SRBC antibody formation which would be caused by the activation of T suppressor cells.

Key words Arthus reaction, Con A, DTH, immune response, Kakkon-tô

Abbreviations Con A, concanavalin A ; DTH, delayed type hypersensitivity ; HPFC, hemolytic plaque forming cell ; SRBC, sheep red blood cell ; Kakkon-tô (Ge-Gen-Tang), 葛根湯

緒 言

葛根湯は感冒、リウマチ、神経痛、蕁麻疹などの初期炎症時に古くから用いられてきた。

最近、中川¹⁾は環状型膿疱性乾癬に葛根湯を用いて良い治療成績が得られたことを報告しており、この効果は本剤の抗炎症、抗アレルギー作用によるものではないかと推察している。

また、久保²⁾は初期免疫機能である網内系マクロ

ファージの食食機能を葛根湯が增強して感染に対する防御効果を增強することを報告している。しかし、葛根湯の免疫、アレルギー反応に対する作用を始めとして、その生物活性に関する基礎研究報告は少ない。

そこで今回、葛根湯エキス末の免疫、アレルギーに対する作用をマウスを用いて検討したので報告する。III型アレルギー反応モデルとしてはアルサス反応を、IV型アレルギー反応のモデルとしてはヒツジ赤血球による遅延型反応を用いた。抗体産生系に対

*〒 300-11 茨城県稲敷郡阿見町吉原 3586
Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-11, Japan

する作用は脾臓細胞のIgM抗体産生能を溶血斑反応を用いて検討した。

材料と方法

1. 実験材料

実験動物は雌性BALB/cマウス(6-7週齢, 日本チャールスリバー)を用いた。葛根湯(TJ-1)は葛根(8g), 麻黄(4g), 大棗(4g), 桂枝(3g), 芍薬(3g), 甘草(2g), 生姜(1g)の7種の生薬から成る漢方薬で, 熱水抽出後, スプレードライして得られるエキスパウダーである。この1gを5mlの蒸留水に懸濁させて1日1回マウス用経口ゾンデで投与した。Concanavalin A(Con A, シグマ), cyclophosphamide(塩野義製薬)は生理食塩液に溶解して用いた。抗原は市販のヒツジ赤血球(SRBC, 日本生物材料センター)を生理食塩液で3回洗浄後, 用時, 血球計算盤を用いて赤血球数を調整して用いた。

2. 実験方法

(1)遅延型アレルギー(DTH)反応: マウスに 2×10^5 個のSRBCを尾静脈内に投与して感作した。その後, 4日目に 10^8 個のSRBCを左足蹠に皮下投与して反応を惹起させ, 24時間目に見られる浮腫をダイヤルシクネスゲージ(尾崎製作所)で測定し, 反応惹起前の値と比較して浮腫率を求めた。

(2)アルサス型アレルギー反応: 安倍ら³⁾の方法に従い, 反応惹起前の19日と5日に 5×10^8 個のSRBCを静脈内に投与して感作した。アルサス型反応は左足蹠に 2×10^8 個のSRBCを皮下投与して惹起させ, 3時間後の浮腫を測定した。

(3)脾細胞の抗SRBC IgM抗体産生系: 2×10^8 個のSRBCを静脈内に投与して感作後, 4日目に脾臓を摘出して, 200メッシュのステンレス製金網で脾細胞浮遊液を調整した。この脾細胞浮遊液をモット補体とSRBCとともにCunningham⁴⁾チェンバー内にいれ, 37°Cで1時間放置後, 見られる溶血斑(HPFC)を抗SRBC IgM抗体産生細胞として数えた。

(4)統計処理: 有意差検定は2群間の比較にはStudentのt検定を, 3群以上はDunnettの有意差検定をそれぞれ用いた。

結 果

1. DTH反応に対する作用

TJ-1(1および2g/kg)を種々の条件で経口投

与してDTH反応に対する作用を調べた。TJ-1を感作1週間前より連続経口投与した場合, 1g/kg投与群では対照群に比して約36%, 2g/kg投与群でも同様に約36%の有意な抑制(Fig. 1)を示した。TJ-1を感作直後より投与した群および反応惹起時より2日間投与した群では反応には影響が認められなかった。また, TJ-1の感作前1週間連続経口投与群でのDTH反応抑制作用はcyclophosphamide(100 mg/kg i.p.)を感作前日に投与した場合には消失した。

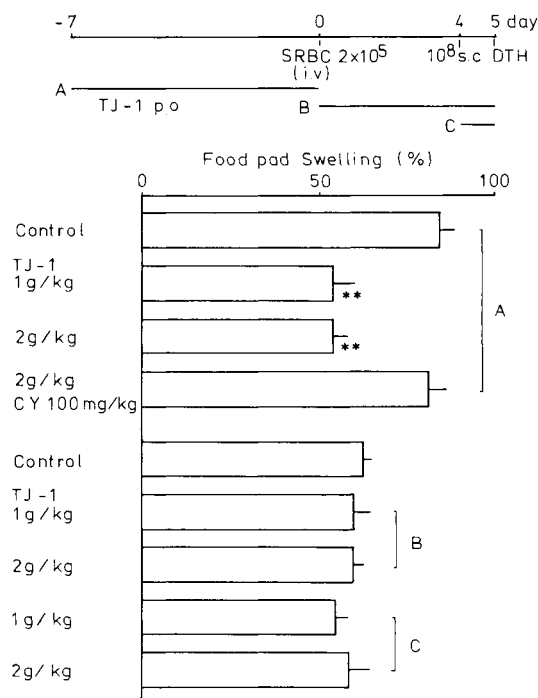


Fig. 1 Effect of TJ-1 on the delayed type hypersensitivity in mice.

TJ-1 (1g, 2g/kg) was given orally to BALB/c female mice for indicated days. A: for 7 days p.o. before immunization, B: for 6 days p.o. after immunization, C: for 2 days p.o. before and after elicitation, CY: cyclophosphamide (100 mg/kg, i.p.) was given to mice 24 hr before immunization with SRBC. ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 10$.

2. アルサス型アレルギー反応に対する作用

TJ-1を二次免疫の7日前より12日間連続経口投与した場合, 1g/kg投与群では抑制傾向がみられるにすぎなかったが, 2g/kg投与群では約30%の有意な抑制が認められた。また, TJ-1の2g/kgを一次感作直後より19日間連続投与した群でも有意

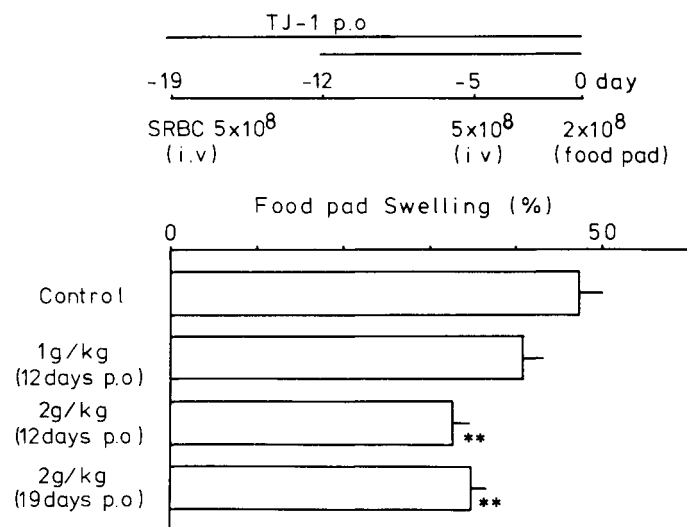


Fig. 2 Effect of TJ-1 on the active Arthus reaction in mice.

Protocol of the procedure is shown in the upper part. Each column indicates the mean $\pm$ S.E. ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 10$.

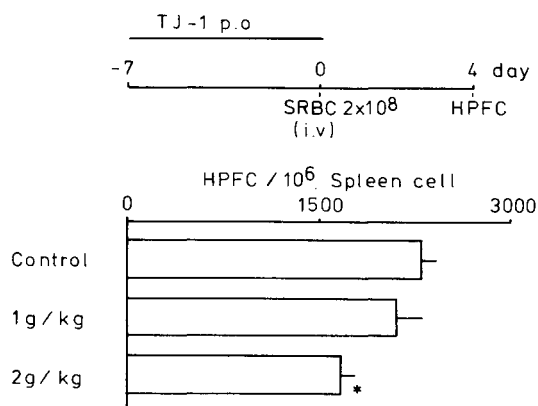


Fig. 3 Effect of TJ-1 on the anti-SRBC response.

TJ-1 (1g, 2g/kg) was given orally to BALB/c female mice for 7 days before immunization with SRBC. * $p < 0.05$ vs. control, $n = 10$.

に反応を抑制した (Fig. 2)。

3. 抗 SRBC IgM 抗体産生系に対する作用

Fig. 3 は TJ-1 を感作前 1 週間経口投与した際の HPFC を示したものである。TJ-1 の 1 g/kg 投与群では抑制傾向がみられるにすぎなかったが、2 g/kg 投与群では約 22% の有意な抑制が認められた。

4. Con A の免疫抑制作用に対する影響

TJ-1 の DTH 反応抑制作用は cyclophosphamide で消失することより抑制性 T (Ts) 細胞の関与が考えられるので、Ts 細胞を誘導すると言われる

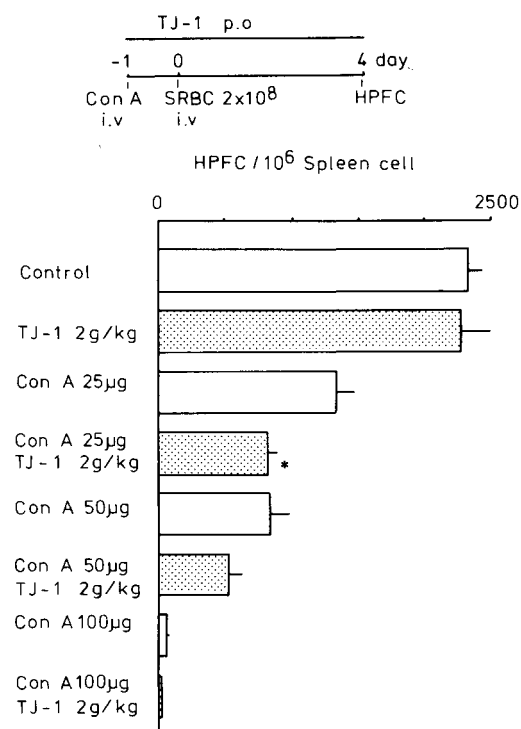


Fig. 4 Augmentation of Con A-induced immunosuppression by TJ-1.

TJ-1 was given orally for 6 days. Con A (25–100 μg/body) was administered i.v. 24 hr before immunization. Each column indicates the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. * $p < 0.05$ vs. Con A 25 μg.

Con A⁵⁾を用いてサプレッサー活性の誘導に対する影響について検討した。Fig. 4はCon Aを感作前日に25–100 $\mu\text{g}/\text{body}$ を静注した際のHPFCを示したもので、Con Aの用量に依存して反応の抑制が認められた。これに対してTJ-1をCon A投与日から6日間経口投与するとCon Aの抑制作用

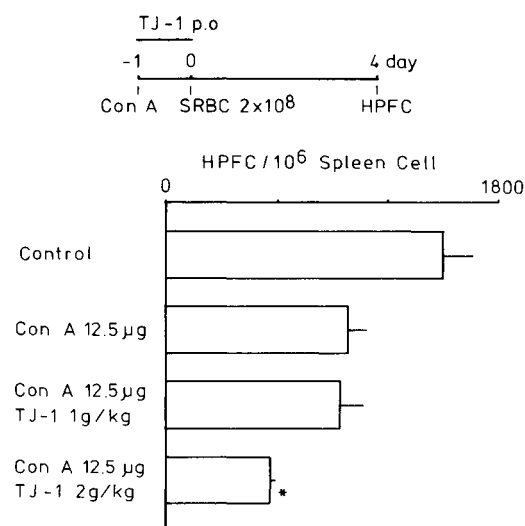


Fig. 5 Augmentation of Con A-induced immunosuppression by TJ-1.

TJ-1 was given orally for 2 days. Con A (12.5 $\mu\text{g}/\text{body}$) was given i.v. 1 day before immunization. * $p < 0.05$, $n = 10$.

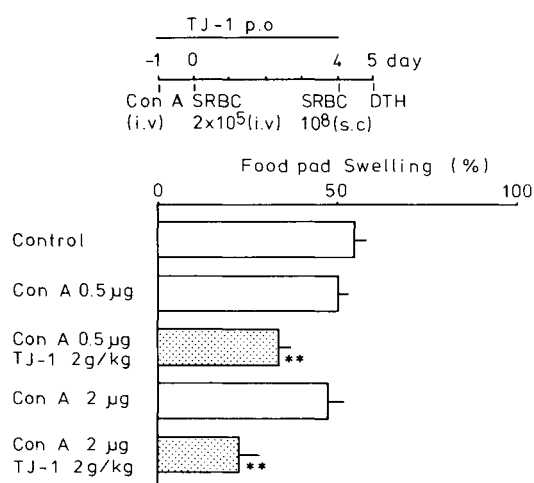


Fig. 6 Augmentation of Con A-induced suppression of the delayed type hypersensitivity by TJ-1.

TJ-1 was given orally for 6 days. Each column indicates the mean $\pm$ S.E. ** $p < 0.01$, $n = 7$.

を増強した。Fig. 5はFig. 4と同様の実験系で抗SRBC IgM抗体産生系に対する作用を示したものである。TJ-1をCon A投与時と感作時の2日間投与した場合、TJ-1の2g/kg投与群で有意な抑制作用の増強が認められた。Fig. 6はDTH反応に対する検討で、Con Aは感作前日に静注した。Con Aの投与量はDTH反応に影響しない低用量(0.5–2 $\mu\text{g}/\text{body}$)を用いた。TJ-1はCon A投与日から6日間経口投与した。TJ-1の2g/kg投与群はCon AのDTH反応抑制作用を増強した。

考 察

今回、葛根湯(TJ-1)の抗アレルギー作用についてマウスの遅延型アレルギー反応、アルサス型アレルギー反応を用いて検討し、TJ-1に抗アレルギー効果のあることが明らかになった。

薬剤のDTH反応に対する作用は感作誘導段階(induction phase)と効果発現段階(effector phase)に作用するものと大別されるが、この反応にはT細胞及び抗原提示細胞(antigen presenting cell)の共同作業が重要であることが知られている。SRBCを抗原として用いたDTH反応は大量のSRBCで感作するとTs細胞が誘導され反応が抑制⁶⁾されるので、今回の実験はTs細胞の影響が少ない条件である 2×10^5 個と低用量のSRBCを用いた。TJ-1のDTH反応(Fig. 1)及び抗SRBC IgM抗体産生系(Fig. 3)の抑制作用はTJ-1の投与時期の検討実験で感作後に投与しても作用は認められないことより、TJ-1の作用はinduction phaseに参与していることが示唆された。そして、TJ-1のDTH反応抑制作用は、Ts細胞を抑制すると言われるcyclophosphamideを感作前日に投与すると反応は消失した。この反応消失はTJ-1の抗アレルギー効果にTs細胞が重要な役割を果していることを示唆するものである。そこで、Ts細胞を誘導すると言われるCon Aを用いてサプレッサー活性への影響について検討した。Badgerら⁷⁾はマウスにCon Aを静注すると抗SRBC IgM抗体産生系が抑制され、非ステロイド性の抗炎症薬であるindomethacinやmeclofenamic acidなどがこの反応を増強することを報告している。また、Smithら⁸⁾はCon Aで誘導される抑制性細胞はThy 1⁺, Lyt 2⁺のTs細胞であることを報告している。TJ-1を単独で感作後に投与しても作用は認められなかったが、TJ-1をCon A投与日から6日間投与するとCon AによるHPFC抑制作用は増強(Fig. 4)し

た。また、Smithら⁸⁾はCon Aが誘導するTs細胞はCon A投与後24—48時間がピークであることを報告しているので、TJ-1をCon A投与と同時に2日間投与してその影響を調べた。その結果、TJ-1の2 g/kg投与群は有意にHPFCを抑制した (Fig. 5)。また、Con AはDTH反応を抑制することも報告⁹⁾されており、TJ-1とCon A併用時のDTH反応についても検討した。Con Aの濃度はDTH反応にあまり影響しない低用量を用いた。TJ-1をCon A投与時より6日間投与するとCon AのDTH反応抑制作用は増強された (Fig. 6)。

以上の結果より、TJ-1の抗アレルギー作用並びに免疫抑制作用はTJ-1が感作時 (induction phase) に作用して、Ts細胞を活性化することが考えられる。しかし、TJ-1がSmithら⁸⁾が報告しているCon Aで誘導されるThy 1⁺, Lyt 2⁺のTs細胞出現を促すのか、またはBadgerら⁷⁾が示したP.G.産生抑制作用による反応増強なのか、あるいはTs細胞が作ると言われる抑制性ファクター (SIRS)¹⁰⁻¹²⁾を増強するのか否かについては、今後の研究が必要である。興味あることにはTJ-1は免疫複合体による組織傷害反応を起こすアルサス型モデルに対して、TJ-1を12—19日間連続投与した場合、弱いながら抑制を認めた (Fig. 2)。このモデルで安倍ら³⁾はハイドロコチゾンを大量に投与しても最大反応を50%抑制することができなかったことを報告しており、TJ-1がこのモデルで約30%の抑制を示したことは、アレルギー疾患に対しての臨床的応用の可能性が考えられる。また、これらの疾患の病変やその進展にリンパ球機能、特にTs細胞機能の関与が示唆されており、今後この方面の研究が期待される。

結 論

TJ-1 (2 g/kg) の連続経口投与により、マウスにおける抗体産生系の抑制、アルサス型アレルギー反応の抑制およびDTH反応抑制が認められた。な

お、このTJ-1の反応抑制作用はcyclophosphamideで消失し、一方、TJ-1はCon Aによる免疫抑制作用を増強することよりTJ-1の抗アレルギー作用の発現にはTs細胞が関与することが示唆される。

文 献

- 1) 中川昌次郎：葛根湯が奏効した環状型膿疱性乾癬の一例。漢方医学 11, 27, 1987
- 2) 久保道徳：漢方は排せつの医学。からだの科学 129, 98, 1986
- 3) 安倍千之、但野美保子、吉田真理子、塩川優一：免疫複合体性炎症モデル。炎症 1, 739, 1981
- 4) Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology* 14, 599, 1968
- 5) Egan, H.S., Reeder, W.J. and Ekstedt, R.D.: Effect of concanavalin A *in vivo* in suppressing the antibody response in mice. *J. Immunol.* 122, 63, 1974
- 6) Mackaness, G.B., LaGrangl, P.H., Miller, T.E. and Ishibashi, T.: Feed back inhibition of specifically sensitized lymphocytes. *J. Exp. Med.* 139, 543, 1974
- 7) Badger, A. M., Griswold, D. E. and Walz, D. T.: Augmentation of concanavalin A-induced immunosuppression by indomethacin. *Immunopharmacology* 4, 149, 1982
- 8) Smith, S. R., Umland, S., Terminelli, C. and Watnick, A.S.: A study of the mechanism of con A-induced immunosuppression *in vivo*. *Cell. Immunol.* 87, 147, 1984
- 9) Leon, M.A. and Schwartz, H.J.: Inhibition of delayed hypersensitivity to tuberculin by concanavalin A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 735, 1969
- 10) Rich, R.R. and Pierce, C.W.: Biological expressions of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 137, 649, 1973
- 11) Aune, T.M. and Pierce, C.W.: Activation of a suppressor T-cell pathway by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3808, 1982
- 12) Schnaper, H.W., Aune, T.M. and Pierce, C.W.: Suppressor T cell activation by human leukocyte interferon. *J. Immunol.* 131, 2301, 1983