

肝類洞内皮細胞の血小板活性化因子産生に及ぼす小柴胡湯の影響

市川 裕三^{a)} 溝口 靖紘^{a)} 河田 則文^{a)} 森沢 成司^{b)} 山本 祐夫^{c)}

^{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第一生化学教室, ^{c)}大阪社会医療センター

Effects of Sho-saiko-to on platelet-activating factor (PAF) synthesis from mouse hepatic sinusoidal endothelial cells

Yuzo ICHIKAWA^{a)} Yasuhiro MIZOGUCHI^{a)} Norifumi KAWADA^{a)}

Seiji MORISAWA^{b)} and Sukeo YAMAMOTO^{c)}

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

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

^{c)}The Osaka Socio-Medical Center Hospital

(Received July 13, 1989. Accepted December 21, 1989.)

Abstract

When mouse sinusoidal endothelial cells were stimulated with calcium ionophore A23187, platelet-activating factor (PAF) was synthesized from hepatic sinusoidal endothelial cells. This PAF synthesis increased from hepatic sinusoidal endothelial cells stimulated with calcium ionophore A23187 after preincubation with Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) for 20 minutes. These results suggest that Sho-saiko-to may regulate homeostasis in the liver through PAF production from hepatic sinusoidal endothelial cells as PAF involved in interleukin and arachidonic acid cascade.

Key words hepatic sinusoidal endothelial cell, platelet-activating factor (PAF), Sho-saiko-to (Syō-saiko-to).

Abbreviations CaI, calcium ionophore ; GBS, Gey's balanced salt solution ; HB, hepatitis B type ; HBSS, Hanks' balanced salt solution ; HEPES, *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid ; IL, interleukin ; LAK, lymphokine activated killer ; LT, leukotriene ; NK, natural killer ; PAF, platelet-activating factor ; PG, prostaglandin ; PWM, pokeweed mitogen ; Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

緒 言

肝類洞内皮細胞 (hepatic sinusoidal endothelial cell) は類洞壁細胞の1つとしてDisse腔を介して肝細胞索を類洞から隔て類洞腔の全周を取りまいている¹⁾。

最近, 血管内皮細胞からインターロイキン (IL) 1が産生されることから, 肝類洞内皮細胞からもIL1が産生され, 肝局所の免疫反応に肝類洞内皮細胞が一定の役割を果たしていると考えられる。また, 肝類洞内皮細胞からはアラキドン酸を基質と

して生合成されるプロスタグランディン (PG) が産生されることも報告されている²⁾。したがって, 肝類洞内皮細胞は免疫反応に関与するILカスケードおよび炎症反応に関与するアラキドン酸カスケードの両ネットワークに関与していると考えられる。

一方, 血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) は最初血小板を活性化する因子として記載されたが³⁾, 最近ではchemical mediatorとして注目をあびている⁴⁾。例えば, PAFはロイコトリエン (LT) B₄産生を誘導して⁵⁾, アラキドン酸カスケードに関与するとともに, IL1産生増強やnatural killer (NK) 活性増強などを介して免疫反応

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

にも関与している⁷⁾。

さて、慢性肝炎の治療に小柴胡湯がよく用いられているが、その薬理作用としてはマクロファージの活性化⁸⁾、IL1 産生の増強⁹⁾、Tリンパ球の IL2 産生の増強、Bリンパ球による抗体産生の促進¹¹⁾、さらには NK 細胞活性¹²⁾ や lymphokine activated killer (LAK) 細胞活性の増強等が知られている。また、小柴胡湯には抗炎症作用として、リポコルチン(様物質)の産生誘導や LT 産生の抑制を介してアラキドン酸カスケードに関与している¹⁴⁾。すなわち、小柴胡湯は IL カスケードを介して免疫反応に、アラキドン酸カスケードを介して炎症反応に関与して肝の局所における種々の反応系を調節している可能性が考えられる。

以上のような観点から著者らは小柴胡湯の肝における調節作用の機序を解析するため、今回は IL カスケードおよびアラキドン酸カスケードに関与し、肝類洞内皮細胞から産生される PAF について、小柴胡湯のおよぼす影響について検討した。

材料と方法

1. 材料

マウスは BALB/c マウス(6 週齢雄)を用い、クレア社から購入した。マウス肝類洞内皮細胞を分離する際に用いた pronase E は Merck 社から、collagenase type IV は和光純薬から、HEPES (*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) は Sigma 社から、metrizamide (2-[3-acetamido-5-*N*-methylacetamido-2, 4, 6-triiodobenzamido]-2-deoxy-D-glucose) は Sigma 社から、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) disodium salt は和光純薬からそれぞれ購入した。Calcium ionophore (CaI) A23187 および tyrode 液は Sigma 社から購入した。

なお、小柴胡湯は株式会社ツムラより供与された。また、PAF 標準品としては小野薬品工業より供与された ONO-6002 を使用した。

2. 方法

(1) 肝類洞内皮細胞の分離: 6 週齢の BALB/c マウスの腹腔内にペントバルビタール 1 mg を注入して麻酔後、開腹して門脈を露出し、カテーテルを挿入した。このカテーテルからまず Ca^{++} -free HEPES 加 HBSS (Hanks' balanced salt solution) 溶液 10 ml を流し、続いて 0.05% collagenase を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 10 ml, 0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 10 ml

をそれぞれ流速 3 ml/min で流した。灌流後、肝臓を摘出して眼科用バサミで細切し、0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 50 ml 中に入れて 37°C で 20 分間、振盪、消化した。未消化物をガーゼで濾過したのち、遠心 (400×*g*, 10 min, 4°C) により cell debris を取り除いた。得られた cell pellet を 5 ml の GBS (Gey's balanced salt solution) 溶液に浮遊させ、30% の metrizamide 溶液 7 ml と混合して、遠心 (1400×*g*, 15 min, 4°C) した。最上相の肝非実質細胞相をとり、洗浄後、HBSS 溶液で 1×10^6 cells/100 ml に調整した。この細胞浮遊液から Knock ら¹⁵⁾の方法に準じて、SRP6Y 型エルトリエータロータ(日立工機製)を用いて肝類洞内皮細胞を分離した。なお、この方法を用いると 95% 以上の肝類洞内皮細胞が採取できた。

(2) マウス肝類洞内皮細胞からの PAF 産生誘導と PAF 抽出: 上述のようにして調製した肝類洞内皮細胞を HBSS 溶液で 2 回洗浄し、tyrode 液に浮遊させ 1×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液に種々の濃度の CaI A23187 を加えて一定時間 (0~60 min) 培養した。培養終了後、ただちに氷冷した 2.5 倍容のメタノールと 1.5 倍容の蒸留水を加えて反応を停止させた。超音波処理で細胞を破壊した後、3000 rpm (1500×*g*) で 10 分間遠心して上清を採取した。この上清より Pinckard らの方法に準じて PAF を抽出した¹⁶⁾。すなわち、上清に 0.95 倍容のクロロホルムと 0.8 倍容の蒸留水を加えて激しく振盪し、3000 rpm (1500×*g*) で 10 分間遠心した後、クロロホルム層を採取した。このクロロホルム層を窒素ガス存在下で蒸溜乾固した後、100 μ l のエタノールを加えて溶解し PAF 活性測定を試料とした。

(3) PAF 産生に及ぼす小柴胡湯の影響: 肝類洞内皮細胞 (1×10^6 cells/ml) に各種濃度の小柴胡湯 (10~1000 μ g/ml) を添加して一定時間 (0~90 分) 培養した。培養後、CaI A23187 (1 μ g/ml) を加えて 20 分間培養した後、上述の方法により PAF を抽出し、試料中の PAF 活性を測定した。

(4) PAF 活性の測定: PAF 活性はモルモット洗浄血小板の凝集をもちいたバイオアッセイにより行なった。PAF 標準品としては ONO-6002 を使用した。Benveniste らの方法に準じてモルモット洗浄血小板を調製し、その 500 μ l に PAF 標準品または PAF 活性測定試料をそれぞれ 5 μ l 添加し、凝集計 (Lumi Aggregation Module Model 1010: Payton Associate) を用いて最大凝集率を測定した¹⁷⁾。各種

濃度の PAF 標準品の最大凝集率より標準曲線を作成し、これをもとに試料中の PAF 濃度を決定した。PAF 活性測定に当たっては adenosine diphosphate および thromboxane A_2 による凝集を除外するために creatine phosphate, creatine phosphokinase および indomethacin 存在下で測定を行った。

(5) 統計学的検討：実験データの統計処理は F-test を用いて行なった。

結 果

1. 肝類洞内皮細胞の PAF 産生

肝類洞内皮細胞 (1×10^6 cells/ml) に各種濃度の CaI A23187 を添加し、20 分間培養し PAF 産生を誘導した。その結果、Fig. 1 に示すように肝類洞内皮細胞の PAF 産生量は濃度依存性に増加し、 $1 \mu\text{g/ml}$ の CaI A23187 を添加した時の PAF 産生量は 0.61 ± 0.07 pmole/ 1×10^6 cells であった (各群, $n = 5$)。この結果より、以後の実験は $1 \mu\text{g/ml}$ の CaI A23187 を用いて実験に供した。

次に肝類洞内皮細胞に $1 \mu\text{g/ml}$ の CaI A23187 を添加し、経時的に PAF 産生量を検討した。その結果、Fig. 2 に示すように、肝類洞内皮細胞の PAF 産生量は 20 分で最も高く、 0.63 ± 0.11 pmole/ 1×10^6 cells であった (各群, $n = 5$)。したがって、以

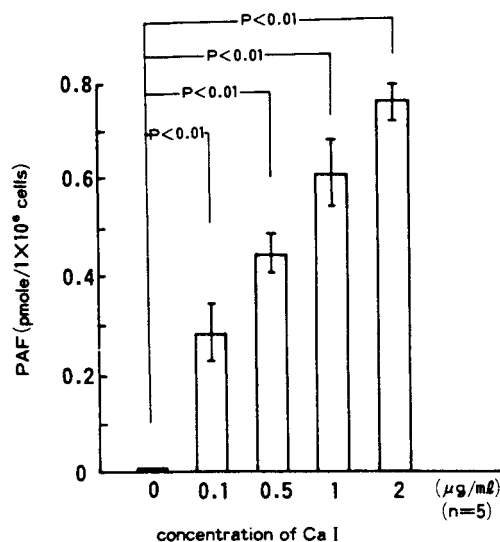


Fig. 1 PAF synthesis by hepatic sinusoidal endothelium stimulated with CaI A23187.

後の実験は肝類洞内皮細胞の培養時間を20分とした。

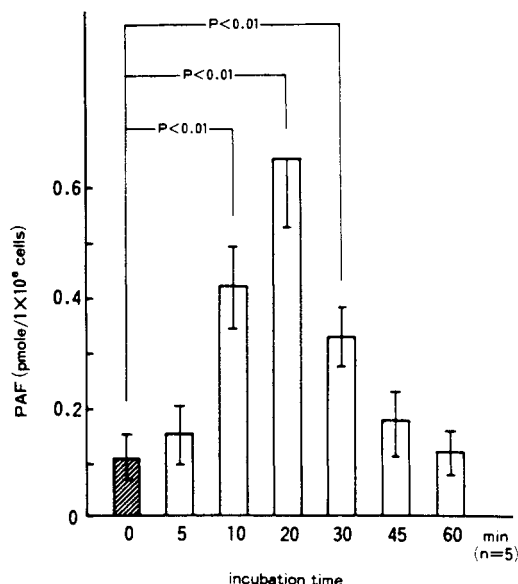


Fig. 2 Kinetics of PAF synthesis by hepatic sinusoidal endothelium stimulated with CaI A23187.

2. 肝類洞内皮細胞の PAF 産生に及ぼす小柴胡湯の影響

肝類洞内皮細胞 (1×10^6 cells/ml) に各種濃度の小柴胡湯を添加し、20 分間培養した。培養後 $1 \mu\text{g/ml}$ の CaI A23187 を添加して、さらに 20 分間培養して PAF 産生量を検討した。その結果、Fig. 3 に示すように肝類洞内皮細胞の PAF 産生量は小柴胡湯の濃度依存的に増加し、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の小柴胡湯添加で、非添加群に比して有意に高値を示した ($p < 0.01$, $n = 5$)。

次に、肝類洞内皮細胞に $500 \mu\text{g/ml}$ の小柴胡湯を添加し、経時的に培養し、その後に $1 \mu\text{g/ml}$ の CaI A23187 を添加して PAF 産生量を検討した。その結果、Fig. 4 に示すように小柴胡湯 ($500 \mu\text{g/ml}$) を添加して 20 分間培養し、その後に CaI A23187 を添加した時が最も PAF 産生量は増加し、小柴胡湯添加 0 分培養群 (0.77 ± 0.4 pmole/ 1×10^6 cells) に比して 1.12 ± 0.16 pmole/ 1×10^6 cells) に増加した ($p < 0.01$, $n = 5$)。

なお、肝類洞内皮細胞に小柴胡湯のみを添加し、20 分間培養後 PAF 産生を検討したが、PAF は誘

導されなかった。

考 察

PAF は最初血小板を活性化する因子として記載され⁴⁾、1980年に 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine であることが明らかにされた。¹⁸⁾ PAF は生体膜が種々の刺激を受けるとホスホリパーゼ A₂ の作用によりアラキドン酸とリゾ PAF に遊離する。このリゾ PAF はアセチルトランスフェラーゼにより PAF となり再びアセチルヒドラーゼによりリゾ PAF となる。このリゾ PAF はアラキドン酸とともにアシルトランスフェラーゼにより PAF の前駆体となる。その後、PAF は多形核白血球やマクロファージ、血管内皮細胞など生体の種々の細胞から産生されることや¹⁹⁾ PAF が血小板活性化作用のみでなく、血管透過性の亢進²⁰⁾、好中球およびマクロファージ活性化²¹⁾ などの作用を有し、炎症反応の誘導にかかわる chemical mediator である可能性が示唆されつつある⁵⁾。また、PAF はアラキドン酸カスケードにも関与し、LTB₄ 産生を誘導する⁶⁾。さらに PAF は免疫反応系にも関与し、IL1 産生増強等を介して、免疫反応系の modulator として作用する可能性も示唆されている⁷⁾。

ところで、肝類洞内皮細胞は Kupffer 細胞、伊東細胞および pit 細胞とともに肝類洞壁を構成し、他の肝細胞とは形態学的、細胞化学的さらには生化学的な面などから区別されている。その中で肝類洞内皮細胞は endotoxin 等により活性化され様々な物質を放出する。この細胞が IL1 を産生することから、肝局所の免疫反応にも一定の役割を果たしていると考えられる。さらに、肝類洞内皮細胞からは PG が産生されることが報告されている³⁾。すなわち、肝類洞内皮細胞は IL1 に代表される IL カスケードと、PG および LT に代表されるアラキドン酸カスケードの相互作用を調節して、肝局所での免疫反応や炎症反応を含めたネットワークに大きく関与している可能性が十分に考えられる。当然、肝疾患に対する治療薬が肝類洞内皮細胞に及ぼす影響を及ぼすかについては今後の焦点となるであろう。

さて、小柴胡湯は柴胡、半夏、黄芩、大棗、人參、甘草および生姜が含まれているが、最近、小柴胡湯による慢性肝炎患者への治療が試みられるようになり、HBe 抗原陽性慢性肝炎患者の多施設間 open study の検討において、その有効性が報告されている²²⁾。また、肝硬変患者より年間 7% の肝癌患者が発症することより、小柴胡湯による肝硬変患者の肝癌発症予防の試みもはじまっている²³⁾。

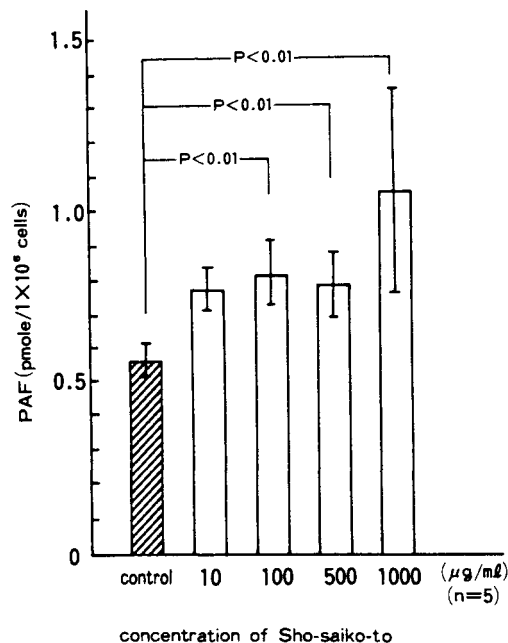


Fig. 3 Effects of Sho-saiko-to on PAF synthesis by hepatic sinusoidal endothelial cells stimulated with Cal A23187.

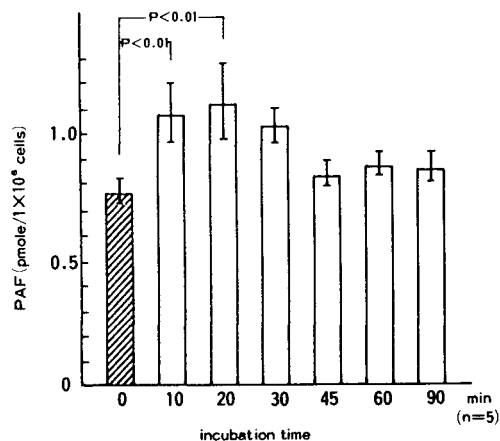


Fig. 4 Kinetics of PAF synthesis by hepatic sinusoidal endothelial cells stimulated with Cal A23187 after preincubation with Sho-saiko-to for 20 minutes.

以上のような観点から著者らは肝疾患に対する治療薬が肝類洞内皮細胞にどのような影響を及ぼすかについて検討しているが、今回肝類洞内皮細胞の PAF 産生に対する小柴胡湯の影響について検討した。なお、PAF 誘導に対しては最も PAF 誘導能の高い CaI A23187 を用いた。²⁴⁾ その結果、小柴胡湯は肝類洞内皮細胞の CaI A23187 刺激による PAF 産生を増加させた。

小柴胡湯はすでにマクロファージを活性化して IL1 の産生を増強し、その結果 IL カスケードを活性化して免疫賦活作用を有することが知られている。今回、著者らの実験結果より、小柴胡湯は肝類洞内皮細胞に作用して、IL カスケードを高める PAF の産生を高め、間接的に免疫反応を高めることが示唆された。すなわち、肝類洞内皮細胞は細胞自身が産生する chemical mediator により免疫反応や炎症反応のネットワークを調節しているが、小柴胡湯は一定の条件下では肝類洞内皮細胞からの chemical mediator の産生を高めることにより、種々のネットワークの調節をしている可能性が示唆された。

なお、今回著者らが報告した小柴胡湯の *in vitro* における添加量は 100~1000 $\mu\text{g/ml}$ と高濃度であった。しかし、著者らが既に発表したマクロファージの活性化⁸⁾、マクロファージからの IL1 産生誘導能⁹⁾、pokeweed mitogen (PWM) による抗体産生誘導能¹¹⁾ における小柴胡湯の至適濃度は 100~500 $\mu\text{g/ml}$ であった。したがって、今回著者らが報告した *in vitro* の実験系における小柴胡湯の濃度は問題ないと考えられる。

また、今回 PAF 産生に対し、CaI A23187 を用いているので小柴胡湯と Ca イオンとの関係が問題となる。すでに、PAF 産生に Ca イオンが関与すると報告されているので、この点に関しては小柴胡湯と CaI A23187 の interaction、小柴胡湯の細胞内 Ca イオンに及ぼす影響等を含めて詳細な検討が必要であろう。

いずれにしても、今回の著者らの実験結果から、小柴胡湯は肝類洞内皮細胞に作用して PAF 産生を高めることが示唆された。このことは小柴胡湯が直接マクロファージを活性化して IL1 の産生を高めるとともに、間接的に PAF を介して免疫系に作用する経路をもつことが示唆された。

今後、肝細胞障害の病態を検討する上で肝類洞内皮細胞を含めた肝類洞壁細胞の解析が必要と考えられる。

文 献

- 1) 織田正也, 塚田信廣, 小松弘一, 上屋雅春: 肝類洞壁細胞の形態と機能. 肝胆臓 **10**, 181-198, 1985.
- 2) Libby, P., Ordovas, J.M., Auger, K.R., Robbins, A.H., Birinyi, L.K. and Dinarello, C.A.: Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **124**, 179-185, 1986.
- 3) Shaw, R.G., Johnson, A.R., Schulz, W.W., Zahlten, R.N. and Combes, B.: Sinusoidal endothelial cells from normal guinea pig liver: Isolation, culture and characterization. *Hepatology* **4**, 591-602, 1984.
- 4) Benveniste, J., Henson, P.M. and Cochrane, C.G.: Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelet. The role of IgE, basophils and platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* **136**, 1356-1377, 1972.
- 5) 井上圭三: 炎症と血小板活性化因子. 代謝 **23**, 891-899, 1986.
- 6) Lin, A.H., Morton, D.R. and Gorman, R.R.: Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **70**, 1058-1065, 1982.
- 7) Braquet, P. and Rola-Pleszczynski, M.: Platelet-activating factor and cellular immune responses. *Immunology Today* **8**, 345-352, 1987.
- 8) 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.
- 9) Morisawa, S., Mizoguchi, Y. and Yamamoto, S.: Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on antibody responses *in vitro*. Recent Advances in Traditional Medicine in East Asia. Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Geneva, Tokyo, pp. 106-110, 1985.
- 10) 溝口靖紘, 柴田悠喜: 抗腫瘍免疫機構に及ぼす小柴胡湯の影響. 漢方医学 **11** (4), 19-26, 1987.
- 11) Mizoguchi, Y., Tsutsui, H., Sakagami, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. "New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis," II Chronic Hepatitis, Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, pp. 304-310, 1987.
- 12) 溝口靖紘, 藤信裕美子, 小林陶三, 山本祐夫, 森沢成司: Natural Killer (NK) 細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響. 和漢医薬学会誌 **4**, 124-129, 1987.
- 13) 溝口靖紘, 大倉靖史, 宮島慶治, 山本祐夫: Lymphokine activated 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) Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Okura, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Effects of Sho-saiko-to on the metabolism of arachidonic acid. "Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicine" (Eds. by E. Hosoya and Y. Yamamura), Excerpta

- Medica, Amsterdam, Princeton, Geneva, Tokyo, pp. 396-404, 1986.
- 15) Knock, D.L. and Sleyster E.C.H.: Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation *Exp. Cell Res.* **99**, 444-449, 1976.
- 16) Pinckard, R.N., Farr, R.S. and Hanahan, D.J.: Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J. Immunol.* **123**, 1847-1857, 1979.
- 17) Camussi, G. and Mencia-Huerta, J.M. and Benveniste, J.: Release of platelet-activating factor and histamine. I. Effect of immune complexes, complement and neutrophils on human and rabbit mastocyte and basophils. *Immunology* **33**, 523-534, 1977.
- 18) Hanahan, D.J., Demopoulos, C.A., Liehr, J. and Pinckard, R.N.: Identification of platelet-activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J. Biol. Chem.* **255**, 5514-5516, 1980.
- 19) Lynch, J.M. and Henson, P.M.: The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *J. Immunol.* **137**, 2653-2661, 1986.
- 20) Humphrey, D.M., McManus, L.M., Satouchi, K., Hanahan, D.J. and Pinckard, R.N.: Vasoactive properties of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and analogues. *Lab. Invest.* **46**, 422-427, 1982.
- 21) Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferribni, K.S., McManus, L.M. and Hanahan, D.J.: Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *J. Immunol.* **127**, 1250-1255, 1981.
- 22) 溝口靖紘, 阪上吉秀, 黒木哲夫, 小林絢三, 大倉靖史, 森沢成司: HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する小柴胡湯の効果とその作用機序について, 近畿臓腑研究会論文集, 協和企画通信, 東京, pp. 72-78, 1987.
- 23) 山本祐夫, 岡 博子, 溝口靖紘, 小林絢三: 肝硬変からの肝細胞癌発症予防の無作為対照試験による試み, 日内会誌 **78**, 284, 1989.
- 24) Camussi, G., Aglietta, M., Malavasi, F., Tetta, C., Piacibello, W., Sanavio, F. and Bussolino, F.: The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J. Immunol.* **131**, 2397-2403, 1983.