

小柴胡湯の Kupffer 細胞質エストラジオール・レセプター量に及ぼす影響

溝口 靖紘,^{a)}市川 裕三,^{a)}河田 則文,^{a)}白石 一郎,^{a)}
小林 絢三,^{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

Effect of Sho-saio-to on estradiol receptors in the cytosol of
hepatic sinusoidal endothelial cells

Yasuhiro MIZOGUCHI,^{a)} Yuzo ICHIKAWA,^{a)} Norifumi KAWADA,^{a)} Kenzo KOBAYASHI,^{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 19, 1990. Accepted November 9, 1990.)

Abstract

We studied whether there are estradiol receptors in the cytosol of rat Kupffer cells or not, and if so, the effect of Sho-saiko-to on the level of estradiol receptors in the cytosol of these cells. As a result, we found that estradiol receptors were present in the cytosol of Kupffer cells from rats. Moreover, when these cells were incubated with Sho-saiko-to, the level of cytosol estradiol receptors increased. These results suggest that Sho-saiko-to acts on Kupffer cells by increasing the level of estradiol receptors, thereby affecting immune reactions in the liver.

Key words Kupffer cell, estradiol receptor, Sho-saiko-to (Syô-saiko-tô).

Abbreviations EIA, enzyme immunoassay; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GBS, Gey's balanced salt solution; HBSS, Hanks' balanced salt solution; HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; IL, interleukin; LAK, lymphokine activated killer; NK, natural killer; PAF, platelet activating factor; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; TNF, tumor necrosis factor; Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

結 言

無症候性B型肝炎ウイルスキャリア患者のHBe抗原抗体系による検討では、HBe抗体陽性者はHBe抗原陽性者よりも有意にエストラジオールにより抗体産生は増加し、HBe抗体陽性者は健常ヒトにより近い体液性免疫反応を示す¹⁾。また、単核細胞のエストラジオール・レセプター量は、無症候性HBVキャリアおよびB型慢性肝炎患者では、健常ヒトに比し有意に低下している²⁾。すなわち、HBV

キャリア患者においては免疫反応と単核細胞サイトゾールエストラジオール・レセプター量との間に密接な関係があることを示唆する。

一方、小柴胡湯は肝疾患患者において血清トランスアミナーゼ値を低下させることや、B型慢性肝炎患者においてseroconversion率を上昇させることにより、慢性肝疾患治療薬として広く使用されている³⁾。また、肝硬変患者より年間約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始まっている⁴⁾。その薬理作用としてはマクロファージの活性化⁵⁾、IL 1産生の増

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

強⁶⁾、Tリンパ球のIL 2産生の増強⁷⁾、Bリンパ球による抗体産生の促進⁸⁾、さらにはnatural killer (NK) 細胞活性⁹⁾や、lymphokine activated killer (LAK) 細胞活性の増強¹⁰⁾等が知られている。

さて、Kupffer細胞は肝固有の網内系細胞であり、肝類洞内皮細胞、pit細胞および伊東細胞とともに肝類洞壁を構成する細胞である。食食能をもつことから門脈血中の異物の除去を行なうといった重要な役割を果たし、さらにIa抗原が陽性であることから、antigen presenting cellとしての機能を持つことや、¹¹⁾interleukin (IL) 1を産生する¹²⁾など肝局所免疫を考えるうえでの位置付けは大きい。従って、肝疾患治療薬がこのKupffer細胞機能を如何に修飾するかを検討することは大きな課題である。

以上のような観点から著者は小柴胡湯の免疫賦活作用の解明の一端として、Kupffer細胞を用いて細胞質エストラジオール・レセプターに及ぼす影響について検討した。

材料と方法

(1) 材料

ラットはWistar系雄性ラット(200~250 g)を用い、クレア社から購入した。ラット肝Kupffer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-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid)はSigma社から、metrizamide (2-[3-acetamido-5-*N'*-methylacetamide-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。細胞の培養には20%のウシ胎児血清、100 μ g/mlのstreptomycinおよび100 U/mlのpenicillinを含むRoswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640を用いた。

なお、小柴胡湯は株式会社ツムラより供与された。その調製方法は既報⁵⁾の方法に準じた。

(2) ラット Kupffer 細胞の調製

正常Wistar系雄性ラット(約200 g)の門脈にカテーテルを挿入し、Ca²⁺-free HEPES加HBSS (Hanks' balanced salt solution) 100 mlを流した。続いて0.05% collagenaseおよび0.1% pronase Eを含むHEPES加HBSS各100 mlを順次流した。灌流後、肝臓を摘出し、0.05% pronase Eを含んだHEPES加HBSS 100 ml中で、37 $^{\circ}$ C、20分間振

盪培養し、消化した。その後、得られた細胞浮遊液を遠心(400 $\times$ g, 10 min.)で2回洗浄後、そのcell pelletを5 mlのHBSSに浮遊させ30% metrizamide溶液7 mlと混合し重層遠心(1400 $\times$ g, 10 min)した。最上相の肝非実質細胞相をとり、洗浄後20% fetal calf serum (FCS)含有RPMI 1640に浮遊させ、プラスチックシャーレ (FALCON 3003)に注入し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。プラスチックシャーレに付着した細胞をKupffer細胞とし5% FCSを含むRPMI 1640に浮遊させて、 2×10^6 cells/mlに調整して実験に供した。

小柴胡湯のKupffer細胞質エストラジオール・レセプターに及ぼす影響を検討する場合は、Kupffer細胞浮遊液に各種濃度の小柴胡湯を添加し、5% CO₂, 37 $^{\circ}$ Cにて18時間培養し、上述と同様の方法を用いて細胞浮遊液を調製した。

3. Kupffer 細胞質エストラジオール受容体の定量

前述のようにして分離したKupffer細胞をTEMG buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM EDTA-Na₂, 2 mM β mercaptoethanol, 10% glycerol, pH 7.4)中に 2×10^7 cells/mlとなるように浮遊させ、超音波ソニケーターを用いて細胞を破壊した。ついで、この溶液を105,000 Gで60分間超遠心後、その上清を採取して、Kupffer細胞内溶液とし、細胞質中のエストラジオール受容体を抗エストラジオール・レセプターモノクローナル抗体を用いたenzyme immunoassay (EIA)キット (ER-EIA kit, ダイナボット社製)を用いて定量した。すなわち、被検細胞質溶液100 μ lとpolystyrene beads上に固定された抗エストラジオール・レセプター抗体(第1抗体)を18時間4 $^{\circ}$ Cで培養し、その後beadsを蒸留水を洗浄後、peroxidaseで標識された抗エストラジオール・レセプター抗体(第2抗体)を含有する溶液200 μ lを加えて37 $^{\circ}$ C、1時間培養した。その後、再びbeadsを蒸留水で洗浄し、peroxidase活性測定用オルトフェニレンジアミン溶液300 μ lを添加して室温で30分間放置して発色させた。さらに、1N HCl 1 mlを加えて酵素反応を停止させた後に、492 nmの吸光度を測定して発色させた。既知の濃度のエストラジオール受容体溶液を用いて作製した標準曲線より検体中のエストラジオール受容体量を定量した。

4. 統計学的検討

実験データはmean $\pm$ SEであらわし、統計処理はStudent's t testを用いて行なった。

結 果

1. Kupffer 細胞質エストラジオール・レセプター量の検討

Kupffer 細胞の細胞質に含まれるエストラジオール・レセプター量を抗エストラジオール・レセプターモノクローナル抗体を用いる EIA キットを用いて定量した。その結果, Kupffer 細胞の細胞質エストラジオール・レセプター量は Kupffer 細胞濃度依存性に増加し, 1×10^7 cells/ml の Kupffer 細胞当り, 5.56 ± 0.86 fmol で 5×10^6 cells/ml の Kupffer 細胞のエストラジオール・レセプター量に比し有意に増加した (Fig. 1, $p < 0.01$ $n=5$)。したがって, 以後の実験は 1×10^7 cells/ml の Kupffer 細胞を使用した。

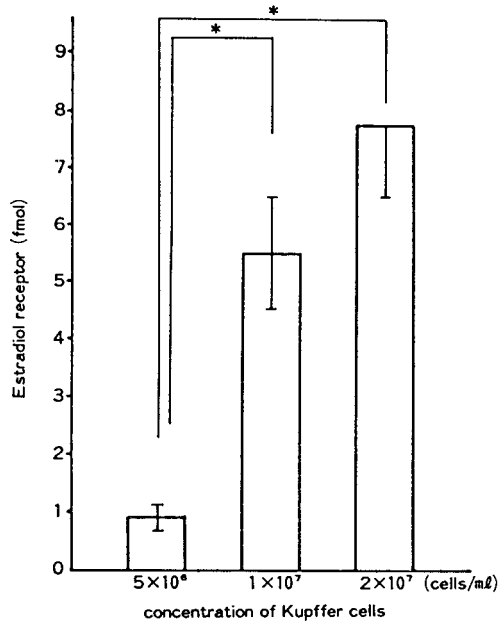


Fig. 1 Estradiol receptors in the cytosol by various plating densities of Kupffer cells ($n=5$).
* $p < 0.01$

2. Kupffer 細胞の細胞質エストラジオール・レセプター量に及ぼす小柴胡湯の影響

ラット Kupffer 細胞 (1×10^7 cells/ml) に 50~300 $\mu\text{g/ml}$ の小柴胡湯を添加し, 18時間培養し, 細胞質中に含まれるエストラジオール・レセプター量を測定した。その結果, Fig. 2 に示すように小柴胡湯非添加で培養した Kupffer 細胞の細胞質エストラジオール・レセプター量は 5.48 ± 0.76

fmol であった。しかし, 小柴胡湯 50, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ を添加して培養した Kupffer 細胞の細胞質エストラジオール・レセプター量はそれぞれ 6.23 ± 1.38 , 10.38 ± 0.73 , 12.18 ± 2.86 fmol で, 小柴胡湯添加によりエストラジオール・レセプター量は濃度依存性に増加した ($n=5$)。特に, 100 および 300 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の小柴胡湯添加群は小柴胡湯非添加群に比し有意に増加した ($p < 0.01$, $n=5$)。

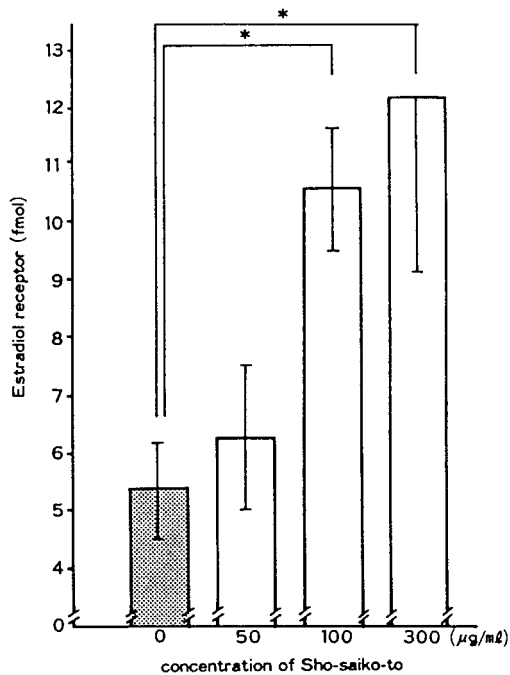


Fig. 2 Effects of Sho-saiko-to on estradiol receptors in the cytosol of Kupffer cells ($n=5$).
* $p < 0.01$

考 察

各種免疫応答には性差が認められ, ヒトおよび哺乳動物の血清免疫グロブリンは雄より雌の方が高く,¹³⁾ 抗原刺激に対する抗体産生も雄より雌の方が強いとされている。¹⁴⁾ また, 自己免疫疾患は一般に女性に頻度が高く, 性的成熟期に発症頻度が高い。これらの事実は, 性ホルモンが生体の免疫系に影響を与えている可能性を示唆する。実際, HBV 感染宿主のウイルス排除能および免疫応答の誘導にも性差が認められ, B 型慢性肝炎および肝硬変患者についてウイルスマーカーおよび自己抗体を検討すると, HBs 抗原の検出率は男性において高く, 自己抗体

は女性に高率に検出される¹⁵⁾。これらの性差を支配する機序は明らかではないが、遺伝的な因子^{16,17)}と共に液性因子が関与する可能性があり、特に性ホルモンは肝疾患患者の抗体産生能に一定の影響を与えると推測される。

一方、小柴胡湯はマクロファージに作用してIL1産生を増強し⁶⁾、抗体産生系⁸⁾、細胞性免疫系に免疫賦活作用として働くとともに、同時にマクロファージからリポコルチンを誘導してホスホリパーゼA₂活性を抑制し、その結果、ロイコトリエン、プロスタグランジン産生の抑制を介して抗炎症作用として働くことを著者らはすでに報告した³⁾。また、今回の成績から小柴胡湯は肝局所において重要な役割を果たすKupffer細胞の細胞質エストラジオール・レセプターを増加させる作用があることが判明した。すなわち、小柴胡湯は直接effector cellに作用して免疫賦活作用を発揮すると同時に、間接的にKupffer細胞に作用してエストラジオール・レセプター量を増加させて免疫賦活作用を発揮することが判明した。その結果、ウイルス排除能を高めると考えられる。

従って、小柴胡湯がHBVキャリア患者のウイルス排除能を高めるのに有用であると考ええる。

結 論

小柴胡湯はKupffer細胞の細胞質エストラジオール・レセプター量を増加させた。

文 献

- Mizoguchi, Y., Ikemoto, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Studies on the effect of estrogen to the antibody response in asymptomatic HB virus carrier. *Hepato-gastroenterol.* **3**, 109-112, 1985.
- Mizoguchi, Y., Takeda, H., Kobayashi, K., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Impairment in the response of peripheral blood mononuclear cells from asymptomatic hepatitis B virus carriers to estradiol. *Jpn. J. Med.* **27**, 183-186, 1988.
- Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Okura, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Effects of Sho-saiko-to (TJ-9) in hepatitis patients and on the metabolism of arachidonic acid. In "Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbs) Medicines" (Eds. by E. Hosoya and Y. Yamamura). Excerpta Medica, Tokyo, pp. 396-404, 1988.
- Oka, H., Yamamoto, S., Kanno, T., Kuroki, T., Mizoguchi, Y., Kobayashi, K., Nakao, M., Harihara, S., Marumo, T., Kobayashi, Y. and Monna, T.: Controlled prospective evaluation of Sho-saiko-to in prevention of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis of the liver. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **6**, 40-44, 1989.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mizoguchi, Y., Tsutsui, H., Sakagami, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Effect of Xiao-Chai-Hu-Tang on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. In "New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis II Chronic Hepatitis", Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, pp. 304-310, 1987.
- 溝口靖紘, 藤信裕美子, 小林純三, 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.
- 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**, 119-1121, 1986.
- Ramadori, G., Dienes, H.P., Burger, R., Meuer, S., Rieder, H. and Meyer zum Büschenfelde, K.H.: Expression of Ia antigen on guinea pig Kupffer cells. Studies with monoclonal antibodies. *J. Hepatol.* **2**, 208-217, 1986.
- Nolan, J.P.: Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury. *Hepatology* **1**, 458-465, 1981.
- Butteworth, M., McClellan, B. and Allansmith, M.: Influence of sex on immunoglobulin levels. *Nature* **214**, 1224-1225, 1967.
- Terres, G., Morrisson, S.L. and Habicht, G.S.: A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **127**, 664-667, 1968.
- 松尾幹雄: HBe 抗原陽性の慢性肝炎における HBe 抗原・抗体系の推移に関する臨床的検討. 肝臓 **26**, 819-829, 1985.
- Amsbaugh, D.F., Hansen, C.T., Prescott, B., Stashak, P.W., Barthold, D.R. and Baker, P.J.: Genetic control of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice. I. Evidence that an X-linked gene plays a decisive role in determining responsiveness. *J. Exp. Med.* **136**, 931-949, 1972.
- Grundbacher, F.: Human X chromosome carries quantitative genes for immunoglobulin M. *Science* **176**, 311-312, 1972.