

ヒト末梢血好中球の細胞内遊離カルシウムイオン濃度に及ぼす
サイコサポニン a, b₁, b₂, d の影響溝口 靖紘,*^{a)}長谷川 格^{a)}市川 裕三^{a)}森沢 成司^{b)}^{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Effects of saikosaponin a, b₁, b₂ and d on the increase of Ca⁺⁺ concentration
in human peripheral blood neutrophilsYasuhiro MIZOGUCHI,*^{a)} Itaru HASEGAWA^{a)} Yuzo ICHIKAWA^{a)} and Seiji MORISAWA^{b)}^{a)}The Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School^{b)}The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

(Received September 4, 1991. Accepted November 1, 1991.)

Abstract

We examined the effects of saikosaponins on intracellular Ca⁺⁺ concentration in human peripheral blood neutrophils. As a result, it was found that saikosaponins, especially saikosaponin a, d and b₁, increased intracellular Ca⁺⁺ concentration in human peripheral blood neutrophils in a dose dependent manner. In contrast, saikosaponin b₂ increased slightly intracellular Ca⁺⁺ concentration.

These results suggest that saikosaponins may affect the function by control of intracellular Ca⁺⁺ concentration and thereby may affect inflammatory reactions.

Key words サイコサポニン, 細胞内 Ca⁺⁺, 好中球.**Abbreviations** Ca⁺⁺, calcium ion; EGTA, glycolether diamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; HBSS, Hanks' balanced salt solution; PBS, phosphate buffered saline.

緒 言

柴胡の有効成分の一つであるサイコサポニンは抗炎症作用を有することが知られている。¹⁻⁴⁾ そのため、柴胡及びサイコサポニンは肝疾患に対し用いられ、良好な成績が報告されている。⁵⁾ 特に、柴胡を含む小柴胡湯は血清トランスアミナーゼ値を低下させることや、B型慢性肝疾患患者において seroconversion 率を上昇させることより、ウイルス性慢性肝疾患治療薬として広く使用されている。⁶⁾ また、肝硬変から約 7-8% の肝細胞癌患者が発症することより、同じく柴胡を含む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。⁷⁾ しかし、サイコサポニンがどのような機序で細胞を活性化するかについて細胞内情報伝達機構の点から検討された報告は殆ど見あたらない。

今回、著者らはサイコサポニンの調節機序の解明の一端として、ヒト末梢血好中球を用いて細胞内情報伝達機構の点から、サイコサポニンの細胞内遊離カルシウムイオン (Ca⁺⁺) 濃度に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

(1) 材料: Fura-2 AM は同仁化学より購入した。なお、サイコサポニン a, b₁, b₂ 及び d は株式会社ツムラより供与され、その調製方法は既報^{8,9)}の方法に準じた。

(2) ヒト末梢血好中球の分離方法: 健常ヒト肘静脈よりヘパリン加静脈血 20 ml を採取し、Ficoll-Conray 重層遠心法により好中球を分離した。得ら

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

れた好中球を Hanks' balanced salt solution (HBSS) を用いて 2 回洗浄した後、5% ウシ胎児血清 (FCS) を含む Ca^{++} free phosphate buffered saline (PBS) を加え、 2×10^6 cells/ml となるように調整して、実験に供した。

(3) 細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の測定方法：前述の好中球浮遊液に Fura-2 AM $2 \mu\text{M}$ を添加し、 37°C で 30 分間培養した。培養後、細胞を Ca^{++} free PBS で 2 回洗浄し、5% FCS および 1 mM の Ca^{++} 含有 PBS 溶液に再浮遊させて 1×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液に各種濃度のサイコサポニン a, b_1 , b_2 または d を添加し、最大の反応が得られた後に、10% Triton X を $30 \mu\text{l}$ および 1 M の glycoether diamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) を $30 \mu\text{l}$ 順次添加した。上記経過中に励起波長 340 nm および 360 nm、蛍光波長 510 nm における蛍光強度を蛍光光度計 (Hitachi Fluorescence Spectrophotometer, F-2000) を用いて測定した。励起波長 340 nm における蛍光強度と励起波長 380 nm における蛍光強度の比をもとに細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を算出した。

(4) 統計学的検討：すべての実験結果は mean \pm S.E. であらわし、有意差検定は Student's *t*-test を用いた。

結 果

1. サイコサポニンの好中球細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす影響

ヒト末梢血好中球に種々のサイコサポニンを添加し、細胞内 Ca^{++} を測定すると、サイコサポニン a, b_1 , b_2 および d とともに細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は経時的に有意に増加し、1 分後にプラトーに達した。なお、Fig. 1 はサイコサポニン a を $10 \mu\text{g/ml}$ ヒト末梢血好中球に添加し、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を経時的に測定したものである。

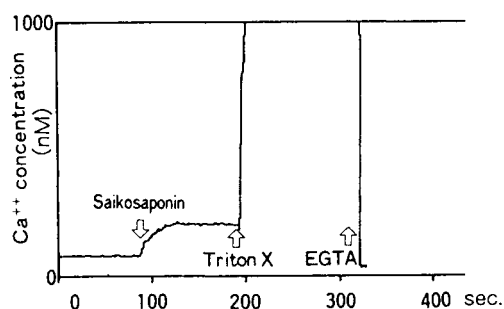


Fig. 1 Increase of intracellular Ca^{++} concentration in human peripheral blood neutrophils induced by saikosaponin a ($10 \mu\text{g/ml}$).

2. サイコサポニン a, b_1 , b_2 及び d の末梢血好中球の細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす影響

好中球細胞浮遊液に Fura-2 AM を取り込ませた後における、サイコサポニン a 添加前の末梢血好中球遊離 Ca^{++} 濃度は $1.86 \pm 6.4 \text{ nM}$ であった ($n = 5$)。しかし、サイコサポニン a をヒト末梢血好中球に添加し 1 分後の細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を測定すると、サイコサポニン a の濃度が 1, 5, $10 \mu\text{g/ml}$ の時において、それぞれ 14.7 ± 8.2 , 58.2 ± 15.1 , $130.0 \pm 11.0 \text{ nM}$ でサイコサポニン a 非添加群 ($2.34 \pm 8.4 \text{ nM}$) に比して有意に増加した ($p < 0.01$, 各群 $n = 5$)。次に、Fura-2 AM 処理末梢血好中球に各種濃度のサイコサポニン b_1 を添加または非添加で 1 分間培養した。培養後、経時的に細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を測定した。その結果、サイコサポニン b_1 添加 1 分後で細胞内 Ca^{++} 濃度は最高になり、Fig. 3 に示すようにサイコサポニン b_1 を $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度を好中球に添加するとサイコサポニン b_1 非添加群に比して有意に細胞内 Ca^{++} 濃度は増加した ($p < 0.01$, 各群 $n = 5$)。同じく、サイコサポニン b_2 およびサイコサポニン d においても Fig. 4 および Fig. 5 に示すようにサイコサポニン a, サイコサポニン b_1

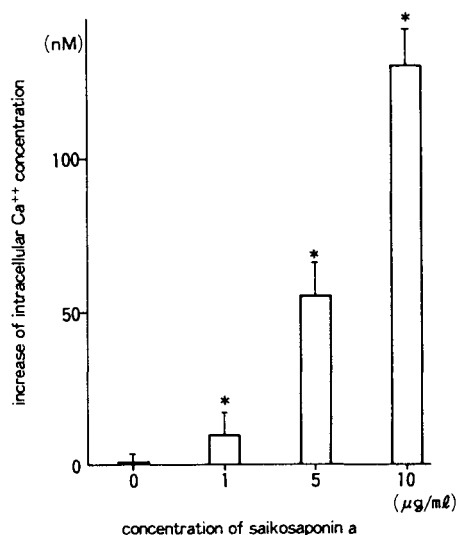


Fig. 2 Effect of saikosaponin a on intracellular Ca^{++} concentration in human peripheral blood neutrophils. * $p < 0.01$.

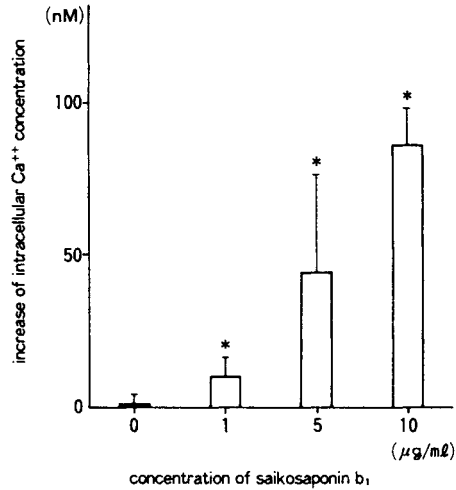


Fig. 3 Effect of saikosaponin b_1 on intracellular Ca^{++} concentration in human peripheral blood neutrophils. * $p < 0.01$.

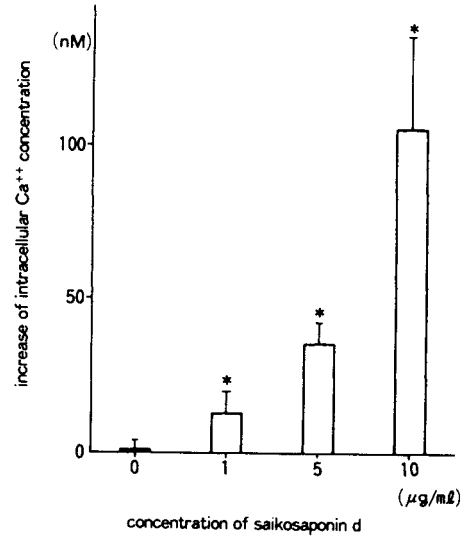


Fig. 5 Effect of saikosaponin d on intracellular Ca^{++} concentration in human peripheral blood neutrophils. * $p < 0.01$.

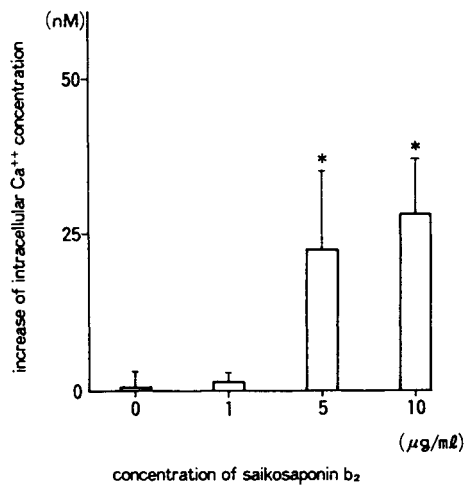


Fig. 4 Effect of saikosaponin b_2 on intracellular Ca^{++} concentration in human peripheral blood neutrophils. * $p < 0.01$.

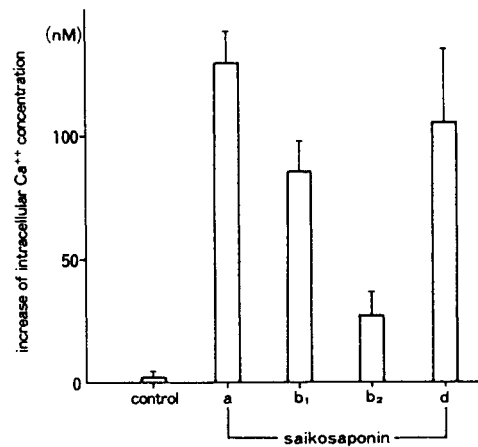


Fig. 6 Effect of $10 \mu\text{g/ml}$ of saikosaponins on intracellular Ca^{++} concentration in human peripheral blood neutrophils.

と同様に濃度依存的に細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を増加させた。しかし、サイコサポニン b_2 の細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす活性は最も弱かった。すなわち、好中球の Ca^{++} 濃度に及ぼすサイコサポニンの活性はサイコサポニンの種類により異なり、Fig. 6 に示すようにサイコサポニン a が最も強く、ついでサ

イコサポニン d 、サイコサポニン b_1 およびサイコサポニン b_2 の順であった。

なお、好中球にサイコサポニン a , b_1 , b_2 または d を $10 \mu\text{g/ml}$ 添加し、反応終了後の viability を trypan blue dye exclusion test で検討すると 90 % 以上であった。

考 察

柴胡の有効成分の1つであるサイコサポニンには脂質代謝に対する作用や¹⁰⁾、抗炎症作用¹⁻⁴⁾、ステロイド代謝に及ぼす作用¹¹⁾を含む多彩な作用をする。さらに、サイコサポニンは免疫賦活作用を有することも報告されている。例えば、サイコサポニンはマクロファージの走化性促進作用や食能亢進作用およびマクロファージの細胞骨格に対する作用を有し、マクロファージを活性化することが知られている¹²⁾。さらに、サイコサポニンは抗体産生促進作用を有することも知られている¹³⁾。

一方、サイコサポニンはD-ガラクトサミンで誘導される肝障害¹⁴⁾、あるいは α -naphthylisothiocyanateによる胆管や肝細胞障害¹⁵⁾を軽減することが認められている。また、有地らは、Arthus反応がサイコサポニン b_1 または b_2 で抑制されること、およびサイコサポニン b_1 と c を多く含む混合物がD-ガラクトサミンによる肝細胞障害を軽減することを示している¹⁶⁾。さらに、抗アレルギー作用もサイコサポニン b_1 または b_2 の方が a や d よりも強いことが示唆されている⁵⁾。このような背景因子を基にしてサイコサポニンは臨床的にも用いられ、柴胡を含む小柴胡湯が慢性肝炎の治療において良好な成果を示すことが報告されている。特に、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⁶⁾。また、最近では肝硬変患者より年間約7-8%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⁷⁾。しかし、柴胡を含む柴胡桂枝湯が細胞内 Ca^{++} に影響を及ぼす報告¹⁷⁾ 以外に、サイコサポニンの作用機序について細胞内セカンドメッセンジャーの点から検討した報告はほとんど見あたらない。そこで今回著者らは、サイコサポニンの作用機序を細胞内のレベルで検討する端緒として、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす各種サイコサポニン分画の影響について検討した。その結果、各種サイコサポニン分画はヒト末梢血好中球の細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を有意に増加させた。なお、今回の実験では細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を Hitachi Fluorescence Spectrophotometer, F-2000 を用いて一定濃度の細胞数全体について測定した。そのため、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は徐々に一定期間をかけて増加した。しかし、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を各細胞一つ一つを倒立型蛍光顕微鏡上で高感度ビデオカメラで測定すると、その上昇は一過性であった(データは未

発表)。この傾向はヒト末梢血好中球ばかりではなく、単球-マクロファージ系細胞、Kupffer細胞、類洞内皮細胞を検討しても認められた。何故一定濃度の細胞数全体を Hitachi, F-2000 を用いて測定すると徐々に増加し、各細胞一つ一つを高感度ビデオカメラを用いて測定すると一過性に増加するかは今のところ詳細は不明である。その原因に細胞がサイコサポニンに対して反応する時に時間的差異をもって反応するためかもしれない。しかし、サイコサポニンが細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を増加させることはまちがいないと考える。

さて、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の上昇は phospholipase A_2 や protein kinase C などの活性化を誘導し、細胞内反応系のカスケードにおける初期段階において非常に重要な役割を演じることが示されている¹⁸⁾。また、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の上昇は microfilament の収縮を誘導し細胞形態にも影響を及ぼすことが示唆されている¹⁹⁾。従って、ヒト末梢血好中球の機能に細胞内遊離 Ca^{++} が重要な役割を演じていると同時に、サイコサポニンは細胞内遊離 Ca^{++} の濃度を介して好中球に影響を及ぼすことが示唆された。サイコサポニンの Ca^{++} 濃度上昇機序については今回の実験結果からでは明かでは無いが、著者らは先にサイコサポニンが細胞膜の保護作用を有することを報告しており²⁰⁾、今回観察されたサイコサポニンの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の上昇作用に関しても、サイコサポニンが細胞膜に対して何らかの安定化作用を有する可能性が示唆される。いずれにせよ、サイコサポニンが細胞内 Ca^{++} 濃度を増加させるという今回の結果は、サイコサポニンの作用機序を解析する上に細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の検討が重要であることを示唆した。

結 論

サイコサポニンはヒト末梢血好中球の細胞内 Ca^{++} 濃度を増加させた。また、その活性の強さはサイコサポニン $a > d \geq b_1 > b_2$ の順であった。

文 献

- 1) Abe, H., Sakaguchi, M., Konishi, H., Tani, T. and Arichi, S.: The effects of Saikosaponins on biological membranes. I. The relationship between the structures of Saikosaponins and hemolytic activity. *Planta Medica* **34**, 160-166, 1978.
- 2) 有地 滋: 柴胡およびサイコサポニンの研究。(2) サイコサポニンの抗炎症作用の機序について。近大医誌 **4**, 73-

- 78, 1979.
- 3) 山本昌弘, 山村雄一, 熊谷 朗: 柴胡サポニンの抗炎症作用および代謝作用. 第4回和漢薬シンポジウム記録, 41-47, 1970.
- 4) 林 良明, 山本昌弘, 牧野英一, 板谷喬起, 鈴木 豊, 大島仁士, 熊谷 朗: Saikosaponinsの構造と抗炎症及び代謝作用. 第6回和漢薬シンポジウム記録, 72-76, 1972.
- 5) 山本昌弘, 植村泰三, 中間 慧, 上宮正直, 田中敏郎, 源誠二郎: 漢方方剤構成生薬の実験的肝胆障害に対する作用と慢性肝炎患者における柴胡剤長期投与の効果. 和漢医薬学会誌 2, 386-397, 1985.
- 6) Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Okura, Y., Yamamoto, S. and Morisaw 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.
- 7) 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.
- 8) Sakuma, S. and Motomura, H.: Purification of saikosaponins a, c and d. Application of large-scale reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 400, 293-295, 1987.
- 9) Oshio, H. and Matsumoto, N.: Quantitative analysis of saikosaponins by high performance liquid chromatography. *J. Takeda Res. Lab.* 44, 240-246, 1985.
- 10) Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y.: Structure and action of saikosaponins isolated from *Buplerum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneim. Forsch.* 25, 1240-1243, 1975.
- 11) Hiai, S., Yokoyama, H., Nagasawa, T. and Oura, H.: Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by saikosaponin of *Bupleuri radix*. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 475-500, 1981.
- 12) 牛尾由美子, 小西啓悦, 渋谷智宣, 片田圭子, 阿部博子: サイコサポニンの細胞骨格に対する作用—マクロファージ活性化との関連について—. 和漢医薬学会誌 5, 476-477, 1988.
- 13) 甲野裕之, 太原充子, 山口典夫, 小田島満夫: 免疫反応に対するサイコサポニンの作用. 和漢医薬学会誌 2, 194-195, 1985.
- 14) 有地 滋, 小西啓悦, 阿部博子: Saikosaponinの作用機作の解析. LD-galactosamine 肝障害に対する Saikosaponin の作用. 肝臓 19, 430-435, 1978.
- 15) 山本昌弘, 植村泰三, 中間 慧, 上宮正直, 笠山宗正, 岸田泰弘, 山内圭子, 小牟田靖, 熊谷 朗: 柴胡剤による慢性肝炎の治療に関する基礎的臨床研究. 和漢薬シンポジウム講演要旨集, p 104, 1982.
- 16) 阿部博子, 戸田静夫, 大井久代: D-galactosamine に対するサイコサポニンの作用. 第11回和漢薬シンポジウム記録, 7-10, 1978.
- 17) Sugaya, A., Tsuda, T., Yasuda, K., Sugaya, E. and Onozuka, M.: Effect of Chinese herbal medicine "Saiko-Keishi-To" on intracellular calcium and protein behavior during pentylenetetrazole-induced bursting activity in snail neurons. *Planta Medica* 41, 1-6, 1985.
- 18) Pickett, W. C. Jesse, R. L. and Cohen, P.: Initiation of phospholipase A₂ activity in human platelet by calcium ionophore A23187, *Biochim. Biophys. Acta* 486, 209-213, 1977.
- 19) Kakiuchi, S. and Sobue, K.: Control of cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding protein. *TIBS* 8, 59-63, 1983.
- 20) 溝口靖紘, 沢井寛子, 筒井ひろ子, 池本吉博, 新井孝之, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 門奈丈之, 山本祐夫, 森沢成司: 免疫学的肝細胞障害に対するサイコサポニンの防禦作用. 肝臓 25, 40-46, 1984.