

GVHR モデルマウスに対する漢方方剤の作用

飯島 宏治,*^{a)} 丁 宗鉄^{a)} 石ヶ坪良明^{b)}

^{a)}北里研究所附属東洋医学総合研究所, ^{b)}横浜市立大学第一内科

Effects of Kampo medicines on murine graft-versus-host reaction

Koji IJIMA,*^{a)} Jong-Chol CYONG^{a)} and Yoshiaki ISHIGATSUBO^{b)}

^{a)}*Oriental Medicine Research Center of the Kitasato Institute*

^{b)}*The First Department Internal Medicine, Yokohama City University School of Medicine*

(Received November 16, 1992. Accepted April 2, 1993.)

Abstract

Effects of Kampo medicines on murine graft-versus-host reaction (GVHR) were investigated.

Subjective manifestations such as loss of hair and gloss of hair of mice were significantly reduced by oral administration of Kampo medicines. The value of circulating immune complexes (CICs) induced by GVHR was decreased on the Kampo medicine group. No significant differences between the control and Kampo medicine treated groups was observed in urine protein level. Serum levels of interleukin-6 (IL-6) was increased in both the Keishi-ninjin-to-treated group and Kami-shimotsu-to-treated group.

These results suggested that Kampo medicines have the activity to modulate the clinical course of GVHR induced by the transplantation.

Key words GVHR, CICs, IL-6, 漢方方剤.

Abbreviations BDF₁, (C57BL/6×DBA/2) F₁; CICs, circulating immune complexes; GVHR, graft-versus-host reaction; IL-6, interleukin-6; MHC, major histocompatibility complex.

緒 言

宿主に移植されたTリンパ球が宿主の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) の抗原性の違いにより生じる反応を一般に移植片対宿主反応 (graft vs. host reaction; GVHR) と呼んでいる。GVHRは臓器移植に対して問題となっている。GVHRが生じると、宿主に様々な免疫異常が見られる。ヒトGVHRでは、移植後100日以内に発生する急性GVHRと、それ以降に発生する慢性GVHRを生じ、後者は自己免疫疾患と類似した臨床像を呈することが知られている。一方我々は、これらの病態に対し漢方方剤が一

定の効果を示すことを臨床報告してきた²⁾。今回、実験的GVHRモデルをマウスにおいて作成し、その病態に対する種々の漢方方剤の影響について検討を行ったので報告する。

材料と方法

(1) **GVHRモデルの作成**: Rolinkら¹⁾の方法に順じ、GVHRモデルを作成した。すなわち雌性(C57BL/6×DBA/2) F₁ (BDF₁) マウス4週齢に、親系マウスである雌性C57BL/6マウス6週齢の脾細胞懸濁液の静脈内投与を行った(4×10⁷ cells/mouse)。6日おきにこの投与を3回行い、急性GVHRモデルを作成した。また急性GVHRモデ

*〒108 東京都港区白金5-9-1
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

ルと同様に、BDF₁ マウスに親系マウスである雌性 DBA/2 マウス 7 週齢の脾細胞懸濁液の静脈内投与を行った (4×10^7 cells/mouse)。この投与を 3 回行い、慢性 GVHR モデルを作成した。またマウスは 1 群各 10 匹として実験に用いた。

(2) 漢方方剤の調製および投与方法：人參養榮湯、当歸芍薬散、四逆散、十全大補湯、帰脾湯および桂枝人參湯はそれぞれ市販の漢方エキス製剤（株式会社ツムラ）を購入し、成人 1 日量を 300 ml の蒸留水に溶解し、1 回目の脾細胞投与 1 週間前より自然給水させた。また柴胡四物湯および加味四物湯は常法に準じて生薬を煎じ、1 回目の脾細胞投与 1 週間前より自然給水させた。また Control には蒸留水を同様に自然給水させた。

(3) 尿タンパク量、血中免疫複合体量および血中 IL-6 量の測定：尿タンパク量の測定には Pretest (和光純薬) を用い、血中免疫複合体量は anti-mouse C3 ELISA で、マウス血中 IL-6 量は MURINE IL-6 ELISA KIT (ENDOGEN Inc., Massachusetts, USA) を用いて測定した。

結 果

1. GVHR モデルに対する人參養榮湯および柴胡四物湯の影響

急性 GVHR モデルにおいて、C57BL/6 マウスの脾細胞 3 回目の投与後 16 日目に脾臓の重量を測定した結果、マウスの体重に変化は観察されなかったが、人參養榮湯および柴胡四物湯投与により脾臓重量の増加抑制傾向が観察された (Control: 195 ± 53 mg, 人參養榮湯: 149 ± 39 mg, 柴胡四物湯: 161 ± 58 mg)。しかし統計的に有意な差は認められなかった。次に、慢性 GVHR モデルについて、人參養榮湯および柴胡四物湯の作用について検討を行った。DBA/2 マウスの脾細胞 3 回目の投与後 16 日目に、Control と比較し人參養榮湯および柴胡四物湯では脱毛抑制作用が観察された (Fig. 1)。

2. GVHR モデルに対する当歸芍薬散、四逆散、十全大補湯、帰脾湯、桂枝人參湯および加味四物湯の影響

尿タンパク量、血中免疫複合体量および血中 IL-6 量を指標とし、急性 GVHR モデルに対する当歸芍薬散、四逆散、十全大補湯、帰脾湯、桂枝人參湯および加味四物湯の作用について検討を行った。尿タンパク量においては Control と比較し、いずれの漢方方剤投与群でも改善は認められなかった (Fig.

2)。一方、血中免疫複合体量の変化は、Control では 2 回目の脾細胞の投与後、徐々に増加していったが、当歸芍薬散、帰脾湯および桂枝人參湯投与群では増加抑制傾向が観察された (50 日目の平均 optical density, Control: 0.220, 当歸芍薬散: 0.33×10^{-3} , 帰脾湯: 4.38×10^{-3} , 桂枝人參湯: 0.00, Fig. 3)。また漢方方剤投与後 44 日目に血中 IL-6 を測定した結果、Control と比較し桂枝人參湯および加味四物湯投与群では、血中 IL-6 量の増加傾向が観

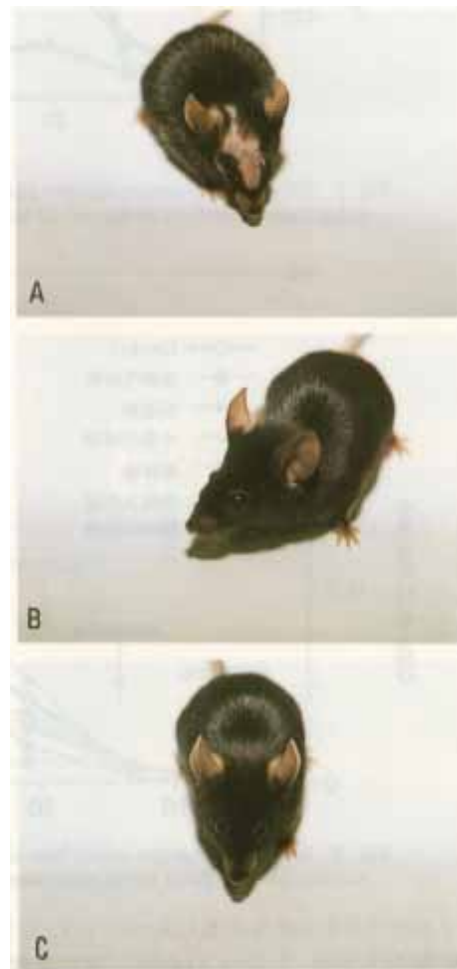


Fig. 1 Effects of Kampo medicines against loss of hair and gloss of hair on chronic GVHR.
A : Control, B : Ninjin-yoei-to treated mouse,
C : Saiko-shimotsu-to treated mouse.

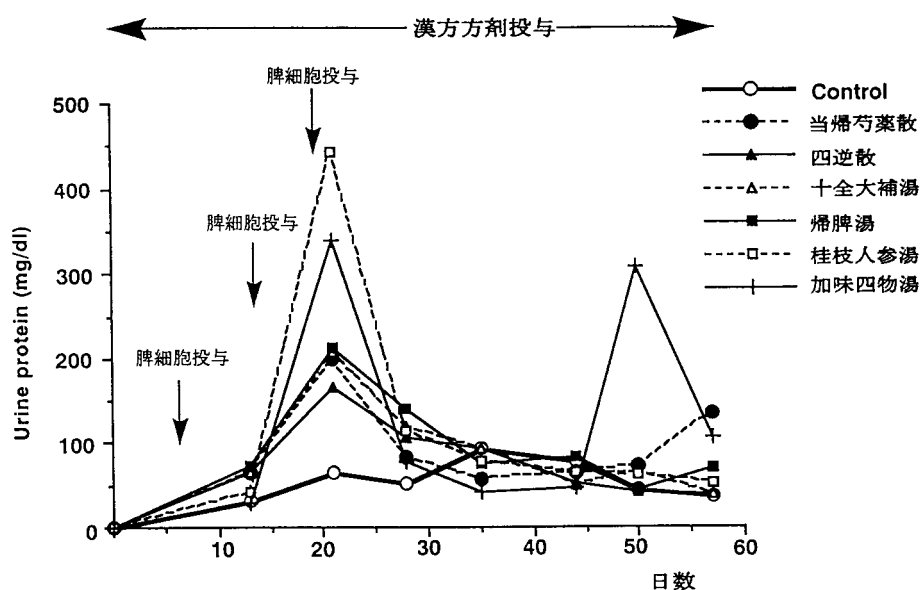


Fig. 2 Effects of Kampo medicines against the level of urine protein on murine GVHR. Each value expresses the average of 10 mice.

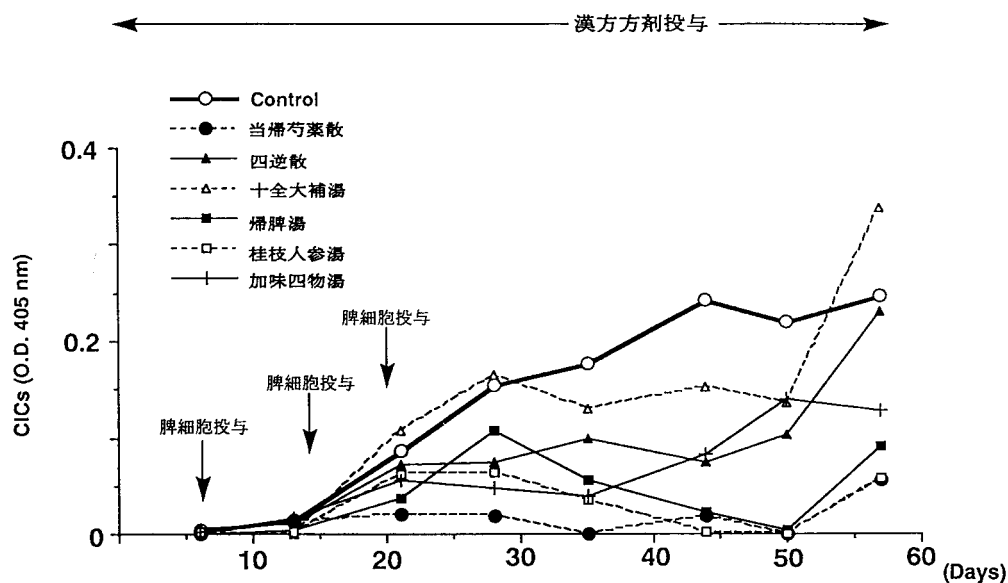


Fig. 3 Effects of Kampo medicines against the value of circulating immune complexes on murine GVHR. Each value expresses the average of 10 mice.

察された (平均±標準誤差 Control: 2.2 ± 1.1 pg/ml, 桂枝人参湯: 7.1 ± 4.2 pg/ml, 加味四物湯: 4.7 ± 2.7 pg/ml, Fig. 4)。しかしいずれも統計的に有意な差は認められなかった。さらに病理学的検討で、Controlでは脾臓においてリンパ系細胞の増生が観察されたのに対し、当帰芍薬散、帰脾湯および桂枝人参湯投与群ではリンパ系細胞の増生が軽度、

あるいは欠如しているのが観察された (Fig. 5)。腎臓においても Control では糸球体腎炎が認められたのに対し、当帰芍薬散、帰脾湯および桂枝人参湯投与群では、比較的軽度であることが観察された。また Control の脾臓重量と比較し、帰脾湯および桂枝人参湯投与群では、有意な増加抑制作用が認められた (Table 1)。

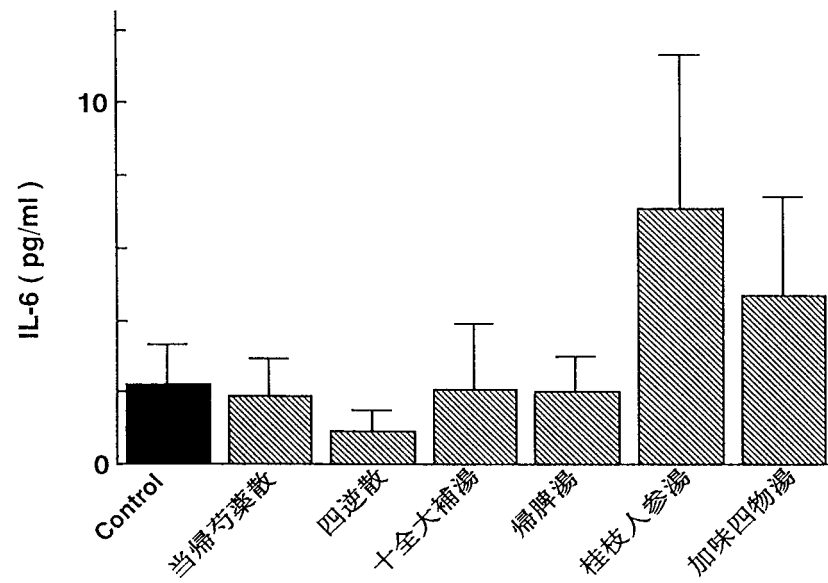


Fig. 4 Effects of Kampo medicines against serum levels of IL-6 in the circulation on murine GVHR. Each value expresses the mean $\pm$ S.E. (n=10)

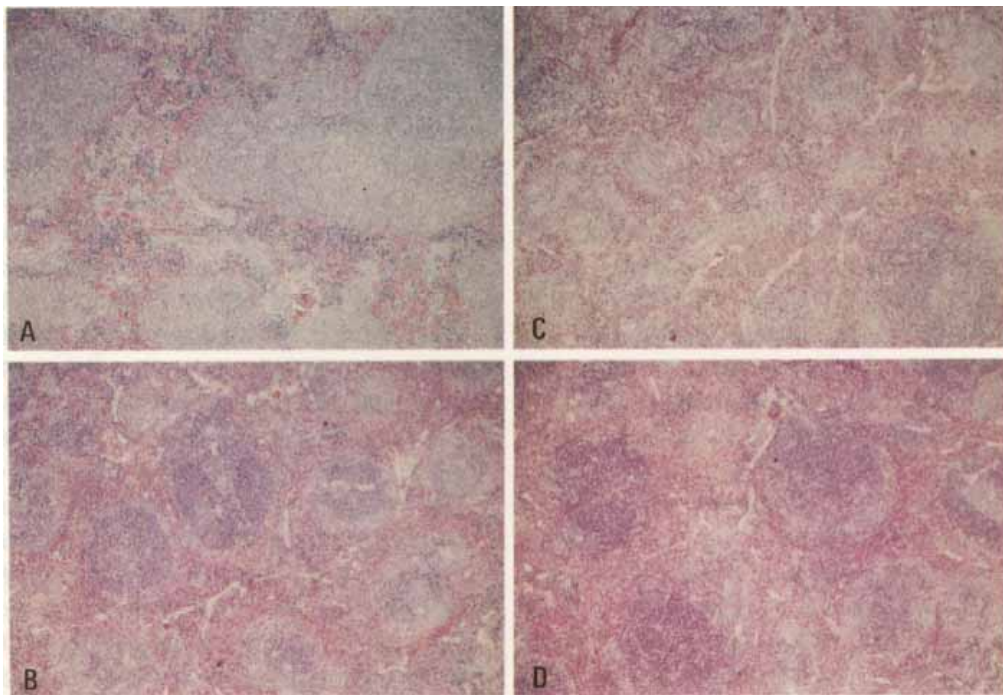


Fig. 5 Microscopic appearance of spleen on acute GVHR.
 A : Control, B : Toki-shakuyaku-san treated mouse, C : Kihi-to treated mouse, D : Keishi-ninjin-to treated mouse
 Haematoxylin-eosin stain ($\times 40$)

Table 1 Effects of Kampo medicines against spleen weight on acute GVHR.

Kampo medicines	Spleen weight (mg)
Control	138±33
当帰芍薬散	89±7
四逆散	115±21
十全大補湯	188±49
帰脾湯	74±6*
桂枝人参湯	68±5*
加味四物湯	90±7

Significant difference from the control Each value expresses the mean±S.E. * $p < 0.05$

考 察

臓器移植は欧米を中心として近年急速に普及しており、わが国でも、今後新たな治療法として期待されつつある。臓器移植に伴う合併症として、種々の感染症やGVHRなどが認められるが、前者は抗生物質や抗ウイルス剤の使用により、その予後の向上が期待される。しかしながら、GVHRはその発症機序が明かたされておらず、臓器移植における大きな問題となっている。GVHRが生じると、宿主に様々な免疫異常が見られる。ヒトGVHRでは移植後100日以内に発生する急性GVHRと、それ以降に発生する慢性GVHRを生じ、後者は自己免疫疾患と類似した臨床像を呈することが知られている。一方、我々はこれらの病態に対し漢方方剤が一定の効果を示すことを報告しており²⁾、GVHRあるいは自己免疫疾患の治療薬剤としての可能性が期待される。また移植片対宿主反応を生じる条件として、以下が挙げられる。1) Tリンパ球のドナーとそのレシピエントとの間には組織適合性抗原に違いがある。2) 移入されたTリンパ球はレシピエントの抗原性を認識して免疫応答を起こす能力がある。3) レシピエントは移入されたリンパ球に対して免疫応答を示さず、これを拒絶することはない。現在、GVHRのモデルとしては親系マウスのリンパ球を、そのF₁マウスに移植することによって生じることが知られており、移植されたTリンパ球がレシピエントF₁マウスの移植抗原を認識することにより誘導される⁴⁻⁶⁾。今回、実験的GVHRモデルマウスを作成し、その自己免疫疾患様病態に対する漢方方剤の影響について検討を行った。

急性GVHRモデルに対する人參養榮湯および柴胡四物湯の作用について検討を行った結果、GVHRにより生じる脾臓重量の増加がControlで観

察されたのに対し、人參養榮湯および柴胡四物湯投与群では抑制傾向が認められた。また、慢性GVHRモデルについても検討した結果、Controlでは自己免疫疾患モデルマウスで認められる脱毛が観察されたのに対し、人參養榮湯および柴胡四物湯投与群では認められず、これらの漢方方剤によるGVHR病態の抑制が示唆された。臨床においても人參養榮湯および柴胡四物湯は、骨髄移植におけるGVHRに有効であることが認められており²⁾、その報告を支持する成績であろうと考えられる。また、このモデルを用いることによって漢方方剤の新たな薬理的作用の解明が可能であると考えられた。

次に尿タンパク量、血中免疫複合体量および血中IL-6量を指標とし、急性GVHRモデルに対する当帰芍薬散、四逆散、十全大補湯、帰脾湯、桂枝人参湯および加味四物湯の作用について検討を行った。尿タンパク量においてはいずれの漢方方剤投与群でも改善は認められなかった。一方、血中免疫複合体量の変化は、Controlでは2回目の脾細胞投与後に増加を示したが、当帰芍薬散、帰脾湯および桂枝人参湯投与群では増加抑制作用が観察され、免疫複合体沈着による組織への障害を抑制することが示唆された。実際、病理学的検討においても、尿タンパク量の結果と相反し、Controlでは脾臓においてリンパ系細胞の増生が、また腎臓においても糸球体腎炎が認められたのに対し³⁾、当帰芍薬散、帰脾湯および桂枝人参湯投与群ではこれらの病態の改善が認められた。更に、帰脾湯および桂枝人参湯投与群において、有意な脾臓増加抑制作用が認められ、GVHRによって生じた自己免疫疾患様病態がこれらの漢方方剤投与によって改善されることが示唆された。

また血中IL-6量の検討で、Controlと比較し桂枝人参湯および加味四物湯投与群では、増加傾向が観察された。臨床例におけるIL-6動態の検討例はいまだ少なく、測定結果の臨床的意義を明確に位置づけるに至っていない。しかしながら基礎的研究において、IL-6は抗体産生系のみならず、種々の免疫系や肝臓に作用して生体防御に関与し、また細胞や組織の分化や機能発現に関与していることが明かとされつつある⁷⁾。桂枝人参湯投与による血中IL-6量の増加作用がどのような作用機序によるものかは明かとされていないが、血中免疫複合体量の増加抑制作用および病理的検討から考え、桂枝人参湯投与によるIL-6量の増加が、これらの免疫系を介して、GVHRによる自己免疫疾患様病態の改善に関与することが示唆された。しかしながら、IL-6量に変化を及ぼさなかった当帰芍薬散および帰脾湯に

においても血中免疫複合体量の増加抑制作用および病理的改善が認められたことより、別の作用機序も推定でき、更なる検討が必要であると考えられた。

以上のことより、実験的 GVHR モデルにおける自己免疫疾患様病態に対し、種々の漢方方剤が改善効果を示すことが明かとなり、これらの治療薬としての可能性が示された。今後更に基礎的にも臨床的にも検討されることが期待される。

謝 辞

病理標本の作製と病理所見について有益な御指導を賜りました北里研究所、森口良三博士に深謝いたします。また漢方エキス製剤を供与して頂いた株式会社ツムラに感謝致します。

文 献

- 1) Rolink, A.G., Radasziewicz, T., Pals, S.T., Walter, G. J., van der Meer and Gleichmann, E.: Allosuppressor and allohelper T cells in acute and chronic graft-vs.-host disease. I. Alloreactive suppressor cells rather than killer T cell appear to be the decisive effector cells in lethal graft-vs.-host disease. *J. Exp. Med.* **155**, 1501-1522, 1982.
- 2) 丁宗鉄, 荒木葉子, 岡本真一郎: 漢方薬を併用した臓器移植例. 第9回和漢医薬学会大会要旨集, 134, 1992.
- 3) Bruijn, J.A., *et al.*: Animal model of human disease. Murine chronic graft-versus-host disease as a model for lupus nephritis. *Am. J. Pathol.* **130**, 639-641, 1988.
- 4) Gleichmann, E and Gleichmann, H.: disease caused by reactions of T lymphocytes to incompatible structures of the major histocompatibility complex. I. Autoimmune hemolytic anemia. *Eur. J. Immunol.* **6**, 899-906, 1976.
- 5) Gleichmann, E., Pals, S.T., Rolink, A.G., Radasziewicz, T. and Gleichmann, H.: Graft-versus-host reactions: clue to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases. *Immunol. Today* **5**, 324-332, 1984.
- 6) Rolink, A.G. and Gleichmann, E.: Allosuppressor- and allohelper-T cells in acute and chronic graft-vs.-host (GVH) disease. III. Different Lyt subsets of donor T cells induce different pathological syndrome. *J. Exp. Med.* **158**, 546-558, 1983.
- 7) 堀井康弘, 平野俊夫: インターロイキン 6 (IL-6). 日本臨床 (増刊: 血液 尿化学検査 免疫学的検査), **601**, 818-821, 1990.