

老化促進モデルマウス (senescence accelerated mice) における免疫異常に対する八味地黄丸の作用

稲垣 宏之,*^{a)}鈴木 達夫,^{a)}川喜多卓也^{b)}

^{a)}社団法人北里研究所, 北里研究所病院研究部バイオメディカルラボ, ^{b)}鐘紡株式会社漢方研究所

Effect of Ba-Wei-Di-Huang-Wan (Japanese name : Hachimi-jio-gan) on immunological functional disorders in senescence accelerated mice

Hiroyuki INAGAKI,*^{a)} Tatsuo SUZUKI,^{a)} Takuya KAWAKITA^{b)}

^{a)}Biomedical Lab. Division of Biomedical Research Kitasato Institute Hospital, The Kitasato Institute,

^{b)}Traditional Chinese Medicine Research Laboratories, Kanebo Ltd.

(Received March 20, 1998. Accepted June 19, 1998.)

Abstract

Senescence accelerated mice (SAM-P₁/TA) were treated with traditional Chinese medicines, Ba-Wei-Di-Huang-Wan (Japanese name : Hachimi-jio-gan) and Ren-Shen-Yang-Rong-Tang (Japanese name : Ninjin-yoei-to) per os (p.o.) 5 times per week from 12 weeks of age. In the Hachimi-jio-gan treated group, the grades of proteinuria were significantly reduced compared with the control group at 32 weeks of age. The proportion of CD3⁺ cells, especially CD3⁺ CD4⁺ cells, in the spleen increased in the control and Ninjin-yoei-to treated group at 37 weeks of age. Whereas such an increase in proportion of CD3⁺ cells was suppressed in the Hachimi-jio-gan treated group. The number of CD44⁺ T cells in the spleen was remarkably increased in the Hachimi-jio-gan and Ninjin-yoei-to treated group, compared with that in the control group at 37 weeks of age. Further, the amount of anti-single stranded DNA antibody significantly decreased in the Hachimi-jio-gan treated group compared with the control and Ninjin-yoei-to treated group at 32 weeks of age. Thus, chronic administration of Hachimi-jio-gan may be effective in the auto-antibody production and nephritis in caused by senescence relative immunoregulatory functional disorder by activation of T cells.

Key words senescence accelerated mice, Hachimi-jio-gan, auto antibody, protein uria, CD44.

Abbreviations SAM, senescence accelerated mice ; ss, single stranded ; ds, double stranded ; FCM, Flow cytometry.

緒 言

八味地黄丸は効能効果として、疲れやすく、四肢が冷えやすく、尿量減少または多尿で、ときに口渇がある次の諸症；下肢痛、腰痛、しびれ、老人のかすみ目、かゆみ、排尿困難、頻尿、むくみが記されており老化に伴う種々の疾患に広く用いられてきた処方である。しかしな

がら現在まで、その病態改善効果がいかなる作用機序によるものか明らかにされていない。老化に伴う種々の疾患の増加の原因として免疫系の機能低下による免疫異常が考えられる。免疫異常は感染症などの増加を招く一方自己免疫疾患として発現する場合もある。

SAM-P₁系マウスは京都大学結核胸部疾患研究所に導入された AKR/J 系マウスに由来する系統で約 20 週齢より老化の進行が促進し若齢より老化した外観を呈す

*〒108-8642 東京都港区白金5-9-1

5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan

る。また、遺伝的バックグラウンドが近く、比較的老化の遅い SAM-R 系マウスと比較して 40 % 寿命が短く、脾臓、皮膚などのアミロイド沈着を伴った全身性の炎症を特徴とする¹⁾。さらに、SAM-P₁ 系マウスは加齢に伴い自己抗体の産生が認められその発症機序は遺伝的自己免疫疾患の可能性が強く示唆されている²⁻⁴⁾。そこで本研究では老化促進モデルマウスとして報告されている SAM-P₁ 系マウスを用い、八味地黄丸の老化に伴う免疫異常に対する作用を検討した。

また、自己免疫疾患 SLE のモデルマウスである MRL/lpr マウスに対し、免疫薬理作用が報告されている人參養榮湯⁵⁾と比較しながら効果を検討した。

対象と方法

(1) 薬剤

八味地黄丸：ジオウ 5.0 g/サンシュユ 3.0 g/サンヤク 3.0 g/タクシャ 3.0 g/ブクリョウ 3.0 g/ボタンビ 3.0 g/ケイヒ 1.0 g/加工ブシ末 1.0 g 前記混合生薬より抽出(収率 24 % Lot. M18G)されたものを噴霧乾燥する事により鐘紡株式会社にて製造されたエキスを粉末を用いた。

人參養榮湯：ニンジン 3.0 g/トウキ 4.0 g/シャクヤク 2.0 g/ジオウ 4.0 g/ビャクジュツ 4.0 g/ブクリョウ 4.0 g/ケイヒ 2.5 g/オウギ 1.5 g/チンピ 2.0 g/オンジ 2.0 g/ゴミシ 1.0 g/カンゾウ 1.0 g 前記混合生薬より抽出(収率 22 % Lot. 10132)されたものを噴霧乾燥する事により鐘紡株式会社にて製造されたエキスを粉末を用いた。

(2) 動物：SPF SAM-P₁/TA, SAM-R₁/TA 雌マウスは京都大学結核胸部疾患研究所・竹田俊男博士よりご恵与いただき、北里研究所西館動物施設にて繁殖し実験に用いた。

(3) 投与群および投与期間：八味地黄丸、人參養榮湯はそれぞれ 1000 mg/kg/mouse 体重となるように滅菌蒸留水で溶解し、週 5 回胃ゾンデを用い強制経口投与した。対照としては滅菌蒸留水のみ薬剤投与量にあわせて投与した。薬剤の投与はマウス 12 週令より開始し、実験終了時まで継続した。

(4) 尿蛋白定量：マウス 32 週齢時に各マウスの尿を採取し、尿蛋白を Pretest 3A, WakoTM (和光純薬工業、大阪)により測定した。測定結果はスコア一化した。

(5) Flowcytometry (FCM) による脾細胞表面抗原の解析：37 週齢のマウス解剖時に脾臓から PercollTM (Pharmacia, Uppsala, Sweden)によりリンパ球を分離し、特異的モノクローナル抗体を用いた FCM 解析により細胞表面マーカーの発現を解析した。マウス抗原に対するモノクローナル抗体は、抗 CD3 (145-2C11), 抗 CD4

(RM4-4), 抗 CD8 (53-6.7), 抗 CD44 (IM7), 抗 CD45RB (16A) (Pharmingen, San Diego, USA)を用い FITC, PE の 2color 解析を行った。測定は EPICS EliteTM (Coulter Corp., Hialeah, USA)により行い、解析は EliteTM 解析ソフトウェアを用いた。

(6) 血清中自己抗体価測定：血清中抗 DNA 抗体は Nakai⁵⁾らにより報告されている ELISA 法により定量した。single stranded (ss) または double stranded (ds) DNA を固相化した 96 well マイクロプレートに、マウス血清を加え室温で 120 分間反応させた後、固相化 DNA と反応したマウス抗 DNA 抗体をアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG と反応させ、p-nitrophenyl-phosphate により発色させて吸光度 410 nm のマイクロプレートリーダーにて測定した。

結 果

1. 尿蛋白定量

各マウスの尿蛋白を測定した結果、マウス 22 週齢から対照群で尿蛋白の上昇が認められた。一方、八味地黄丸投与群では対照群と比較し尿蛋白量の増加抑制傾向が認められた。その後マウス 32 週齢時ににおいて対照群に比べ有意 ($p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test.) な増加抑制が認められた (Figure 1-A)。また人參養榮湯投与群では対照群と比較して有意な尿蛋白改善効果は認められなかったが、マウス 32 週齢時のスコアはすべての個体が 2 以下であり、改善傾向が認められた。

2. 血清中自己抗体価

マウス血清中自己抗体価はマウス 32 週齢で測定した。その結果、抗 ssDNA 抗体はマウス 32 週時から対照群で上昇傾向を認め、八味地黄丸投与群では対照群に比べ抗 ssDNA 抗体価の上昇が有為 ($p < 0.05$ by student's *t*-test) 抑制された。一方、抗 dsDNA 抗体は対照群、八味地黄丸投与群、人參養榮湯投与群いずれも認められなかった (Figure 1-B)。

3. FCM による脾細胞表面抗原の解析

マウス 37 週齢にて脾臓を摘出し、FCM による脾臓細胞表面抗原の解析を行った。はじめに、正常マウス対照群として SAM-R₁ 系 35 週齢雌マウスの脾細胞について T 細胞の比率を検討した。その結果、SAM-R₁ 系マウス脾細胞中の CD3 陽性 T 細胞は 43.5 ± 6.2 % であった。次に SAM-P₁ 系対照群のマウスについて検討したところ SAM-R₁ 系マウスと比較して CD3 陽性 T 細胞の比率増加が認められた。また CD4, CD8 発現率は CD4 陽性細胞の増加傾向が認められた。これに対し八味地黄丸投与群では、CD3 陽性細胞の比率改善と CD4 陽性細胞の

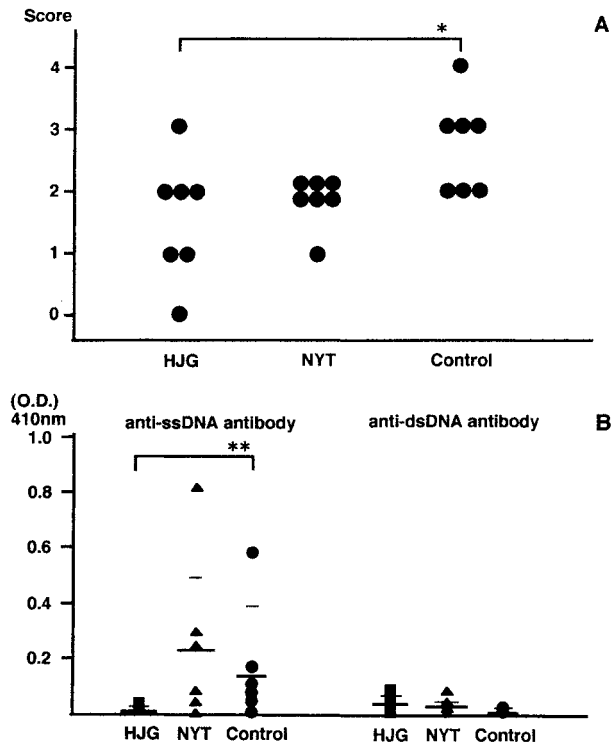


Fig. 1 Score of protein concentration in urine and antibody titer of anti single and double stranded DNA antibody.

SAM P₁/TA mice were orally administered with HJG, Hachimi-jio-gan (1000 mg/kg), NYT, Ninjin-yoei-to (1000 mg/kg) and Control (H₂O 200 μ l/mice) 5 times per week. Treatment was started at 12 weeks of age (A, B). Score of protein concentration in urine at 32 weeks of age was graded as follows; zero point (<10 mg/dl), one point (10-29 mg/dl), two points (30-99 mg/dl), three points (100-299 mg/dl), four points ($\geq$ 300 mg/dl) (A). *: Statistical significance between control group ($p < 0.05$ by Mann Whitney U-test). Anti-ssDNA and anti-dsDNA antibodies were measured by the ELISA method as described in the experimental procedures at 32 weeks of age (B). **: Statistical significance between control group ($p < 0.05$ by Student's *t*-test).

比率抑制が観察された (Table I)。次に抗 CD3, 抗 CD44 モノクローナル抗体を用い, 脾臓から得られたリンパ球集団について, その細胞表面上のマウス T 細胞活性化マーカー CD44 の発現を検討した。その結果 CD44 陽性活性化 T 細胞は対照群に比べ八味地黄丸投与群, 人參養榮湯投与群のいずれにおいても増加が観察された。CD45RB は主に末梢 B 細胞, T 細胞, 胸腺細胞に発現が強く認められる抗原であり,^{6,7)} 末梢 B 細胞は CD3 を発現しないことから CD3⁻CD45RB⁺ と考えられる。解析の結果, 八味地黄丸投与マウスでは対照群, 人參養榮湯投与群と比べ B 細胞の比率増加が認められた。

考 察

SAM マウスの老化に伴う疾患の代表として腎炎に着目し, 尿蛋白を指標として測定した結果, 八味地黄丸投与群では対照群と比較して尿中蛋白の有意な低下が認められた。また, 人參養榮湯投与群でも有意な差ではなかったが, 蛋白尿改善傾向が認められた。これらの結果から, SAM マウスの病態, 特に腎炎の発症に対する両処方の有効性が示唆された。抗 ssDNA 抗体は自己免疫疾患と関連性が深いことが知られている。^{8,9)} また明らかな自己免疫疾患がなくても老化により上昇することが報告されている。^{10,11)} 八味地黄丸は抗 ssDNA 抗体価の上昇を有意に抑制したのに対して, 人參養榮湯では全く抑制が認められなかった。我々は既に人參養榮湯が自己免疫疾患モデルマウスである MRL-Mp *lpr/lpr* マウスの腎炎等の病態改善に有効であることを報告⁵⁾ しているが, このマウスでの病態改善作用においても自己抗体の産生抑制作用は明らかでなく, 今回 SAM マウスで得られた結果と一致していた。両処方の自己抗体に対する作用の違いは病態改善作用の作用機序を異にすることを強く示唆し

Table I Changes of splenic T cell population in SAM mice.

Treatment ^a	Incidence (%)				
	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD44 ⁺	CD3 ⁺ CD45RB ⁺
Hachimi-jio-gan ^b	49.0	37.6	7.5	30.9	33.7
Ninjin-yoei-to	65.5	51.5	11.7	34.5	20.3
Control	65.4	52.6	9.8	23.3	25.7
SAM R ₁ /TA ^c	43.5 $\pm$ 6.2	34.1 $\pm$ 2.2	10.8 $\pm$ 2.1	22.5 $\pm$ 3.3	53.1 $\pm$ 3.5

^a: SAM P₁/TA mice were orally administered with Hachimi-jio-gan (1000 mg/kg), Ninjin-yoei-to (1000 mg/kg) and Control (H₂O 200 μ l/mice) 5 times per week. Treatment was started at 12 weeks of age.

^b: Splenic T cell subsets were analyzed by EPICS Elite™ Flow cytometer at 37 weeks of age. Each data shows results from pooled cells of seven mice.

^c: SAM R₁/TA were used for the experiments at 35 weeks of age. Data are means $\pm$ S.D. of three determinations.

た。自己抗体の産生は自己反応性 T 細胞による自己反応性 B 細胞の活性化が主要因として考えられる。^{12, 14)} 脾臓 T 細胞亜集団の検討では、SAM-P₁ 系マウスにおいては自己反応性 T 細胞の増殖によると推定される CD3 陽性細胞の増加が認められた。これに対して八味地黄丸投与群では T 細胞/B 細胞比率の正常化が観察された。この結果から、八味地黄丸は自己反応性 T 細胞の増殖抑制を介して自己抗体の産生を抑制していると推察された。一方、人蔘養榮湯は抗体産生系よりもむしろ細胞性免疫の面で自己反応性細胞を調節する働きを有していると考えられた。

膜貫通性糖蛋白 CD44 は白血球から上皮細胞、ランゲルハンス島細胞、腫瘍細胞など広範囲に発現が観察される接着分子である。またマウスリンパ球においては、メモリー T 細胞、抗原感作 T 細胞のマーカーとして報告されている。^{15, 16)} その機能は細胞-細胞間、細胞-細胞外基質間の接着、¹⁷⁾ 活性化 T 細胞のホーミング、¹⁸⁾ 細胞内情報伝達¹⁹⁾ などに関与する分子として注目されている。

CD3 陽性細胞中のマウス細胞活性化マーカー CD44 の発現を検討すると八味地黄丸、人蔘養榮湯投与群ともに増加傾向を示し、T 細胞はより活性化された状態であることが示唆された。八味地黄丸と人蔘養榮湯は作用機序を異にすると考えられるが、どちらも免疫抑制的作用ではなく免疫調節機能を有する T 細胞の活性化を介して SAM-P₁ 系マウスの病態進行とともに増加する Th2 細胞に apoptosis などの作用を発現していると推察された。SAM-P₁ 系マウスの Th1/Th2 バランスに対する八味地黄丸の作用については明らかにされておらず今後さらに詳細な検討を行う必要があると思われる。また、八味地黄丸には他に、内分泌、代謝系に対する調節作用も報告されており、併せて抗老化作用を発揮していると考えられた。

結 論

八味地黄丸は老化に伴う生体調節機能の衰えから起こる様々な症状に適応されているが、今回老化に伴う免疫系の調節機能異常について老化促進マウスを用いて検討した。その結果、八味地黄丸が詳細は不明であるが、T 細胞の活性化を介して老化に伴う免疫異常を正常化し、自己抗体の産生や腎炎の発症を抑制する可能性が示唆された。八味地黄丸には内分泌、代謝系に対する調節作用も報告されており、併せて抗老化作用を発揮すると思われる。

References

- 1) Takeda, T., *et al.* : A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Aging Dev.* **17**, 183-194, 1981.
- 2) Hosokawa, M., *et al.* : Management and design of the maintenance of SAM mouse strains : an animal model for accelerated senescence and age-associated disorders. *Exp. Gerontol.* **32**, 111-116, 1997.
- 3) Kitado, H., Higuchi, K. and Takeda, T. : Molecular genetic characterization of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains. *J. Gerontol.* **49**, B247-B254, 1994.
- 4) Takeda, T., Hosokawa, M. and Higuchi, K. : Senescence-accelerated mouse (SAM) : a novel murine model of senescence. *Exp. Gerontol.* **32**, 105-109, 1997.
- 5) Nakai, S., *et al.* : Treatment effect of a traditional Chinese medicine, Ren-Shen-Yang-Rong-Tang (Japanese name : Ninjin-Youei-To), on autoimmune MRL/MP-lpr/lpr mice. *Int. J. Immunopharmac.* **15**, 589-596, 1993.
- 6) Bottomly, K., Luqman, M., Greenbaum, L., Carding, S., West, J., Pasqualini, T., Murphy, D.B. : A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines. *Eur. J. Immunol.* **19** (4), 617-623, 1989.
- 7) Johnson, P., Greenbaum, L., Bottomly, K., Trowbridge, I.S. : Identification of the alternatively spliced exons of murine CD45 (T200) required for reactivity with B220 and other T200-restricted antibodies. *J. Exp. Med.* **169** (3), 1179-1184, 1989.
- 8) Pisetsky, D.S., McCarty, G.A. and Peters, D.V. : Mechanisms of auto antibody production in autoimmune MRL mice. *J. Exp. Med.* **152**, 1302-1310, 1980.
- 9) Laskin, C.A., Haddad, G. and Soloninka, C.A. : The regulatory role of NZB T lymphocytes in the production of anti-DNA antibodies in vitro. *J. Immunol.* **137**, 1867-1873, 1986.
- 10) Yoshioka, H., Yoshida, H., Usui, T., Sung, M., Ko, K., Takeuchi, E., Kita, T. and Sugiyama, T. : Spontaneous development of anti-collagen type II antibodies with NTA, and anti-DNA antibodies in senescence-accelerated mice. *Autoimmunity* **14**, 215-220, 1993.
- 11) Stone, O.J. : Auto antibodies in aging : an attempt to correct a weakening debridement mechanism. *Med. Hypotheses* **32**, 145-149, 1990.
- 12) Okada, T., Abe, M., Takiura, F., Hirose, S. and Shirai, T. : Distinct surface phenotypes of B cells responsible for spontaneous production of IgM and IgG anti-DNA antibodies in autoimmune-prone NZB×NZW F1 mice. *Autoimmunity* **7**, 109-120, 1990.
- 13) Kanno, K., Okada, T., Abe, M., Hirose, S. and Shirai, T. : Differential sensitivity to interleukins of CD5⁺ and CD5⁻ anti-DNA antibody-producing B cells in murine lupus. *Autoimmunity* **14**, 205-214, 1993.
- 14) Calvert, J.E., Duggan-Keen, M.F., Smith, S.W., Givan, A.L. and Bird, P. : The CD5⁺ B cell : a B cell lineage with a central role in autoimmune disease? *Autoimmunity* **1**, 223-240, 1988.
- 15) Budd, R.C., Cerottini, J.C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, C.T., Howe, R.C., and MacDonald, H.R. : Distinction of virgin and memory T lymphocytes ; stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.* **138**, 3120-3129, 1987.
- 16) MacDonald, H.R., Budd, R.C. and Cerottini, J.C. : Pgp-1 (Ly-24) as a marker of murine memory T lymphocytes. *Curr. Top. Immunol.* **159**, 97-109, 1990.
- 17) Jalkanen, S., Bargatze, R.F., Toyos, J. and Butcher, E.C. :

- Lymphocyte recognition of high endothelium : Antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **105**, 983-990, 1987.
- 18) Li, X.Y., Matsuzaki, G., Yoshikai, Y., Muramori, K. and Nomoto, K. : T cells expressing both L-selectin and CD44 molecules increase in number in peritoneal exudate cells and in vitro-stimulated spleen cells from mice immunized intraperitoneally with *Listeria monocytogenes*. *Immunology* **78**, 28-34, 1993.
- 19) Shimizu, Y., VanSeventer, G.A., Siraganian, R., Wahl, L. and Shaw, S. : Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.* **143**, 2457-2463, 1989.