

ウシ副腎皮質細胞におけるコルチコイド産生に対する 小青竜湯の影響

中道 昇,^{a)}小菅ナオ子^{b)}

^{a)}東京慈恵会医科大学薬理学講座第1, ^{b)}医療法人社団晴幸会エヌ・エスクリニック

Effects of Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang) on the corticoidogenesis in bovine adrenocortical cells

Noboru NAKAMICHI^{*a)} and Naoko KOSUGE^{b)}

^{a)}Department of Pharmacology I, The Jikei University School of Medicine,

^{b)}Medical Corporation SEIKOUKAI NS Clinic

(Received April 22, 1999. Accepted July 6, 1999.)

Abstract

We examined the effects of Sho-seiryu-to on the corticoidogenesis (CG) in primary cultured bovine adrenocortical cells. In order to evoke CGs, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) which mimics intracellular action of cAMP, or 30mM K⁺ which activates Ca²⁺ channel with a voltage-dependent manner were used as stimulants. Primary 72h-cultured cells were incubated with Sho-seiryu-to under the presence of the stimulants at 37°C for 1h. Both 100 pM and 1 nM ACTH-induced CGs increased at either low (10⁻⁶g/ml) or high (10⁻³g/ml) concentration of Sho-seiryu-to, but 30mM K⁺-induced CG was affected at neither of them. On the other hand, both 0.5 and 2mM db-cAMP-induced CG increased at high concentration of Sho-seiryu-to, but not at low. These results indicate that Sho-seiryu-to, influencing cAMP formation, enhances ACTH-induced CGs and that it stimulates, at a high concentration, the hormone production process beyond cAMP formation.

Key words Sho-seiryu-to, adrenal cortex, corticoid.

Abbreviations ACTH, adrenocorticotrophic hormone ; CG, corticoidogenesis ; db-cAMP, dibutyryl cyclic AMP ; KRBGA, Krebs-Ringer bicarbonate glucose albumin buffer.

緒 言

近年、鼻アレルギー等に対する小青竜湯の有効性が注目されている。また、小青竜湯は薬理学的基礎研究における in vitro の検討で、cyclic AMP (cAMP) の動態に影響を及ぼすとの報告¹⁾があり、これが抗アレルギー作用の機序の一つとして考えられている。一方、副腎皮質細胞におけるコルチコイド産生 (Corticoidogenesis :

CG) において、副腎皮質刺激ホルモン (Adrenocorticotrophic hormone : ACTH) のセカンドメッセンジャーとしては cAMP が有名である。しかし、cAMP のみならず Ca²⁺ の CG における重要性を示唆する報告もある²⁾。われわれは、これら cAMP や Ca²⁺ の細胞内動態に変化をもたらすことにより、CG に影響を及ぼす薬物についての報告^{3,4)}を行なっている。また、副腎皮質機能とアレルギー性疾患の間には密接な連関が推察されることから、抗ヒスタミン薬等のアレルギー性疾患に用いら

*〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8
3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

れる薬物が、直接的に副腎皮質細胞のCGに与える影響についても検討を行ないその結果を報告^{5,6)}している。

このような背景より、今回は副腎皮質細胞における種々分泌刺激により惹起されたCGに対する小青竜湯の影響をウシ副腎皮質細胞初代培養系を用いて検討した。

材料と方法

(1) 試薬：細胞採取のためCollagenaseはWorthington Biochemical社、Deoxyribonuclease I, dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP)はSIGMA社、Ham F-10はGIBCO社より購入した。ACTH (Fragment 1-24: コートロシン注)は第一製薬株式会社より購入した。その他の試薬はすべて特級試薬を用いた。

漢方方剤は、エキス原末5gを9g中に含有するツムラ小青竜湯エキス顆粒(TJ-19)を用いた。5gを生理的食塩水50mlに溶解後、遠心濾過し各々の実験に必要な濃度に希釈して使用した。実験濃度は、インキュベーションバッファ中(ml)の溶解遠心濾過前のエキス原末量(g)として表示(g/ml)した。

(2) 初代培養細胞：培養細胞は、従来より行なっているKrebs-Ringer bicarbonate glucose albumin buffer (KRBGA, pH=7.4)を緩衝液としたcollagenase-deoxyribonuclease I消化法によりウシ副腎皮質細胞を調製し、各種抗生物質(ゲンタマイシン: 50 μ g/ml, ペニシリン: 100U/mlおよびストレプトマイシン: 100 μ g (力価)/ml)を含む培養液(ウシ新生児血清: 10%, ウシ胎児血清: 5%, ウマ血清: 2.5%を含むHam-F10培地)を用いてコーニング社製24 well plate (2 cm²/well)に2 $\times$ 10⁵個/wellの細胞密度で播種した⁴⁾。KRBGAは125 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25.3 mM NaHCO₃, 0.2% グルコース, 10 μ M EGTA, 0.3% ウシ血製アルブミン (fraction V)を含有するものである。培養は、37°CでCO₂ (5%) インキュベーターにて行なった。

(3) インキュベーション方法・コルチコイド測定方法：小青竜湯の添加濃度は、10⁻³g/mlおよび10⁻⁶g/mlとした。ホルモン産生刺激としては、ACTH, db-cAMP, 高濃度K⁺ (高K⁺刺激)を用いた。用量はACTH, db-cAMPについては最大で各々1nM, 2mMとし、高K⁺刺激については30mMとした。これらの値は、本系において各々の最大の効果が得られる用量である。

高K⁺刺激は電位に依存したCa²⁺チャンネルを開口しCa²⁺流入をもたらし、db-cAMPは細胞内に移行しcAMPと同様の作用を発揮することにより、ともに本系においてCGを惹起すると考えられている。

反応性が最大となる培養開始72時間後の細胞を、0.5mM EGTAを含有するCa²⁺-free phosphate-buffered saline (pH=7.4)およびCa²⁺-free KRBGAで洗浄した後、KRBGAを用いて各種CG刺激、および検討薬物の存在下で全用量を1mlとし、37°Cにおいて1時間インキュベートした。産生されたコルチコイドはインキュベーション後のKRBGA中のものを硫酸蛍光法により、コルチゾールを標準ステロイドとして測定した⁷⁾。細胞数は、0.1%トリプシン含有Ca²⁺-free KRBGAにより、細胞をwell底より遊離させ細胞浮遊液としトリパンブルー染色後、血球計算板により生存細胞を計測した。

いずれの実験においても、コルチコイド量は細胞数10⁵個あたりの1時間の産生量として算出した (pmol/10⁵cells/h)。

(4) 統計処理：数値は、平均 $\pm$ 標準誤差(標本数: 3)で図示し、平均値の差について等分散のものに対してはt-testを、等分散でないものに対してはcochran-cox testを用いて検定し、Pが0.05未満を有意とした。

結 果

1. ACTHにより惹起されたCGに対する小青竜湯の影響

ACTHによるCGについての検討では、100pM, 1nMのACTHによるCGはいずれの場合も小青竜湯 (10⁻³g/mlないし10⁻⁶g/ml)によりいずれも有意に増加し、その増加率は20%前後であった(Fig. 1)。

2. db-cAMPにより惹起されたCGに対する小青竜湯の影響

0.5mMおよび2mMのdb-cAMPによるCGは、いずれの場合も低濃度(10⁻⁶g/ml)の小青竜湯では有意な変化は認められなかった。一方、高濃度(10⁻³g/ml)では、いずれの場合も有意な増加がみられた。増加率は0.5mMで約100%, また2mMでは約50%であり、後者のCG量はACTHで得られる最大反応時のものにほぼ一致した。(Fig. 2)。

3. 高K⁺刺激により惹起されたCGに対する小青竜湯の影響

30mM K⁺によるCGは、小青竜湯の濃度に関わりなく有意な変化は認められなかった(Fig. 3)。

なお、本実験系は初代培養系であるために反応性は使用する系により若干の差がみられるが、ホルモン産生刺激を全く添加しない場合のCG量は通常150~200 (pmol/10⁵cells/h)程度である。今回の実験においても、小青竜湯の有無に関わらず同程度のCGが認められた。

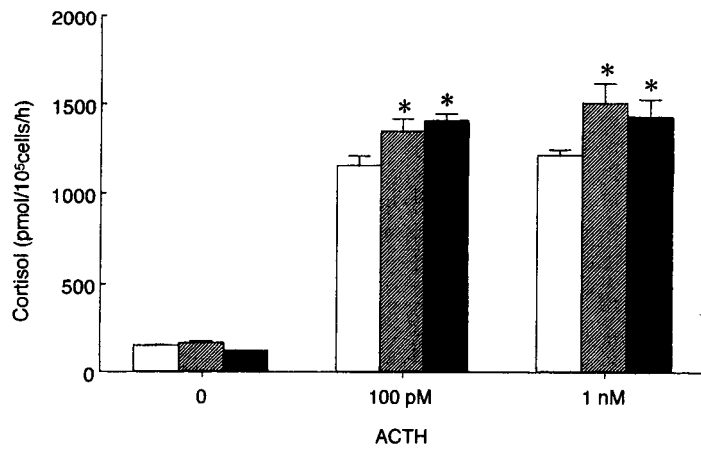


Fig. 1 Effect of Sho-seiryu-to on ACTH-induced corticoidogenesis in primary 72h-cultured bovine adrenocortical cells.

In the presence of 100pM or 1nM ACTH, cells were incubated with (▨; 10⁻⁶g/ml, ■; 10⁻³g/ml), or without (□) Sho-seiryu-to at 37°C for 1h. Values are means±S.E. (n=3). The significant differences are shown by * [*p*<0.05 vs control(□)]

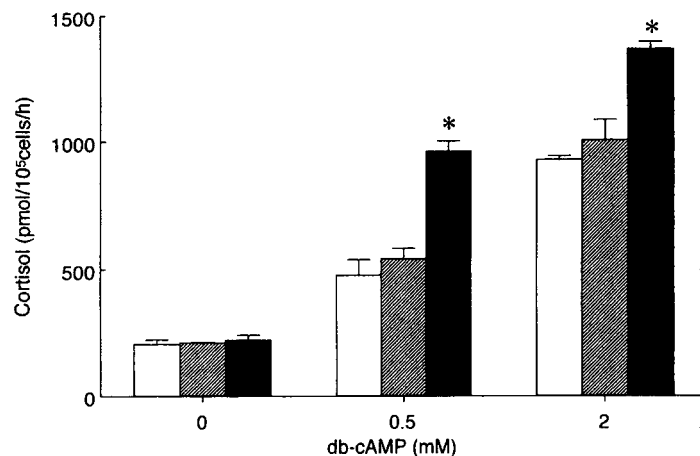


Fig. 2 Effect of Sho-seiryu-to on db-cAMP-induced corticoidogenesis in primary 72h-cultured bovine adrenocortical cells.

In the presence of 0.5 or 2mM db-cAMP, cells were incubated with (▨; 10⁻⁶g/ml, ■; 10⁻³g/ml), or without (□) Sho-seiryu-to at 37°C for 1h. Values are means±S.E. (n=3). The significant differences are shown by * [*p*<0.05 vs control(□)]

したがって、小青竜湯の添加により予想されるバッファーの物理化学的性状の変化は基礎的なホルモン産生能には影響を与えない程度のものであると判断できる。また、上記1~3のACTH, db-cAMP, 30mM K⁺の各群における小青竜湯を添加しないコントロール群のCG量は先の報告^{4, 6)}と大きな相違はなく、使用した初代培養細胞系の細胞活性は十分であったことを示している。

考 察

現在、小青竜湯はアレルギー性疾患に対して広く用いられ、通年性鼻アレルギーに対しては二重盲検比較試験によりその有効性が確認されている⁸⁾。また、in vitroの基礎的研究ではcAMPに対する影響が報告¹⁾されている。

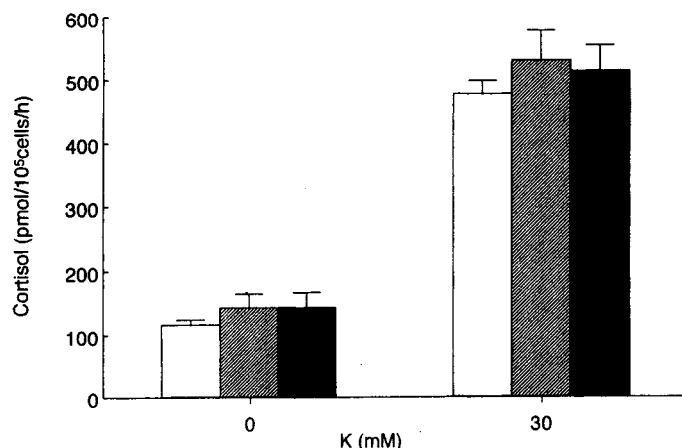


Fig. 3 Effect of Sho-seiryu-to on high K^+ -induced corticoidogenesis in primary 72h-cultured bovine adrenocortical cells. In the presence of 30mM K^+ , cells were incubated with (▨; 10^{-6} g/ml, ■; 10^{-3} g/ml), or without (□) Sho-seiryu-to at 37°C for 1h. Values are means $\pm$ S.E. (n=3).

一方、CGはACTHによる受容体に依存した Ca^{2+} チャンネルの開口により流入した細胞内 Ca^{2+} の増加、およびアデニル酸シクラーゼの活性亢進によるcAMPの増加により調節されていると考えられているが、ウシ副腎皮質細胞においては、細胞膜電位に依存した Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入に起因するCGも観察されている⁹⁾。したがって、小青竜湯のcAMPへの作用が副腎皮質細胞において生じた場合は、CGが何らかの影響を受ける可能性も考えられる。われわれは、既製抗アレルギー薬がCGに与える影響を報告^{5,6)}しているが、抗アレルギー作用について小青竜湯と既成抗アレルギー薬を比較した報告^{10,11)}も既になされている。

今回は、CGに対する小青竜湯の影響について、初代培養ウシ副腎皮質細胞を用いて検討した。

CGを惹起するために、生理的な刺激であるACTH、高 K^+ 刺激およびdb-cAMPを用いた。これらは、CGに影響を与える様々な薬物の検討において、従来より使用している標準的なCG刺激である。また、ホルモン測定に用いた硫酸蛍光法は古典的ではあるが、コルチゾールのみならずコルチコステロンも同時に評価できることから、細胞の産生するコルチコイドを全体的に評価する上で簡便ではあるが極めて有利な方法である。

本実験において、小青竜湯は濃度 (10^{-3} g/ml ないし 10^{-6} g/ml) に関わりなくACTHによるCGを促進した。しかし、ACTHが存在しない状態ではCGは認められなかった。このことから、この増強効果はACTHの受容体との結合の段階から、セカンドメッセンジャーとして産生されたcAMPや細胞内に増加した Ca^{2+} により、CG

の律速段階であるコレステロールの側鎖切断が促進されるまでの何れかの部位に対する促進的な作用に起因するものと推察できる。

また、db-cAMPによるCGに対しては、ACTHの場合とは異なり、小青竜湯は 10^{-3} g/mlの場合のみ有意に増強した。db-cAMPは細胞内においてcAMPの作用を模倣するものであり、cAMPと Ca^{2+} は複雑に関連してCGの律速段階を促進すると考えられている。したがって、小青竜湯は、セカンドメッセンジャー以後の過程に作用することによりCGを増強すると考えられ、この場合は 10^{-3} g/mlが必要であると推察される。このことは、反対に 10^{-6} g/mlの小青竜湯のACTHによるCG促進機序としては、上記の過程に対する影響は関与していないと考えられ、それ以前のACTHと受容体との相互作用からセカンドメッセンジャーの動員までの段階に対する作用であると推察される。

一方、 Ca^{2+} チャンネルに対する作用については高 K^+ 刺激によるCGに対しては全く影響を及ぼさなかったことから、電位に依存性した Ca^{2+} チャンネル開口、ならびにそれに続く Ca^{2+} が第一義的な役割を演じるホルモン産生過程に対しては影響を与えないと考えられる。このことは、小青竜湯は Ca^{2+} ではなくcAMPの動態に影響を与えCGを促進する可能性が推察される。

以上の結果は、小青竜湯は直接的にCGを惹起する作用はないが、 10^{-6} mg/mlにおいてはACTHの作用を受容体レベルからセカンドメッセンジャー動員までの何れかの段階で、また、 10^{-3} mg/mlではセカンドメッセンジャーであるcAMP以後の段階に対しても作用を及ぼ

しこれを増強することにより、CGを促進することが示唆された。

有効成分が明確でない漢方薬に対して、本実験のような *in vitro* の添加実験を行なうことが適当であるか否かについては議論のあるところである。しかし、実際に服用する製剤からCGを促進する成分（ないし成分の組合せ）が溶出しているという事実は、臨床における薬効において、これら副腎皮質細胞レベルの促進的な効果が参画している可能性も提示するものである。また、同時に薬効の解明に向かっての手掛かりの一つとなり得るものである。

結 論

小青竜湯の初代培養ウシ副腎皮質細胞におけるCGに対する影響を検討した。CGを惹起するためにACTH、電位に依存性 Ca^{2+} チャンネル開口する高 K^{+} 刺激および細胞内においてcAMPの作用を模倣するdb-cAMPを使用した。ACTH (100pM, 1nM) によるCGに対して小青竜湯は濃度 (10^{-3}g/ml ないし 10^{-6}g/ml) に関わりなくこれを促進した。しかし、ホルモン産生刺激が全く存在しない場合には、小青竜湯のみでCGは惹起されなかった。db-cAMP (0.5mM, 2 mM) によるCGに対しては、ACTHの場合とは異なり、小青竜湯は高濃度 (10^{-3}g/ml) の場合のみ有意に増強した。高 K^{+} (30 mM) 刺激によるCGに対しては、濃度の如何を問わず、小青竜湯は全く影響を及ぼさなかった。

以上の結果は、小青竜湯は副腎皮質細胞に対する直接的なCG惹起作用は有さないが、低濃度 (10^{-6}g/ml) ではACTHの作用を受容体からセカンドメッセンジャーまでのレベルで、また高濃度 (10^{-3}g/ml) ではセカンドメッセンジャーであるcAMPの動員以降の段階にも作用し、これを増強することによりCGを促進することが示された。

References

- 1) Sone, H., Shiga, T., Komatsu, Y. and Hosoya, E.: Mechanism of anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in lung tissue. *Kampo and Immuno-allergy* 2, 94-101, 1998.
- 2) Yanagibashi, K.: Calcium ion as "second messenger" in corticoidogenic action of ACTH. *Endocrinol Jpn* 26, 227-232, 1979.
- 3) Nakamichi, N., Takamura, M., Yamada K. and Kawamura, M.: Adrenergic drugs-induced corticoidogenesis in the primary cultured bovine adreal fascicula cells. *Jikeikai M J* 35, 119-126, 1988.
- 4) Nakamichi, N., Tou, S., Murakami, M., Yamada, K., Takamura, M. and Kawamura, M.: Effect of Ca^{2+} -channel antagonists on the corticoidogenesis in primary cultured bovine adrenocortical cells. *Folia Endocrinol* 68, 736-742, 1992.
- 5) Kosuge, N., Inoue, M. and Nakamichi, N.: the relationship between adrenocortical function and drugs for allergic diseases-effects on corticoidogenesis in primary cultured bovine adrenocortical cells. *The Journal of Medicine and Pharmaceutical Science* 34, 687-691, 1995.
- 6) Fujikawa, E., Kai, I., Kosuge, N., Inoue, M., Nakamichi, N. and Kawamura, M.: Effects of anti-allergic drugs on the corticoidogenesis in bovine adrenocortical cells. *Tokyo Jikeikai Medical Journal* 111, 637-644, 1996.
- 7) Silver, R.H., Bush, R.D. and Osplapas, R.: Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone. *Clin Chem* 4, 278-285, 1958.
- 8) Baba, S., Takasaka, T., Inaba, N., Satou, S., Suzuki, S. Endou, S., et al.: Double-blind clinical trial of Sho-seiryu-to (TJ-19) for perennial nasal allergy. *Practica Otologia* 88, 389-405, 1995.
- 9) Yanagibashi, K., Kawamura, M. and Hall, P.F.: Voltage-dependent Ca^{2+} channels are involved in regulation of steroid synthesis by bovine but not rat fasciculata cells. *Endocrinology* 126, 311-318, 1990.
- 10) Takeuchi, Y., Nishimura, Y., Yoshikawa, T., Kuriyama, J., Kimura, Y. and Saiga, T.: A comparison between Chinese blended medicine "SHOUSEIRYUTO", toranilast and ketotifenon the anti-allergic action in the guinea pig. *Allergy* 34, 387-393, 1985.
- 11) Takeuchi, Y., Nishimura, Y., Kuriyama, J., Saiga, T., Yokomuro, K. and Kimura, Y.: Kouenkiyuu, Kousankyu ni taisuru shouseiryutou no yakurikouka. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 3, 294-295, 1986.

竹内良夫, 西山葉子, 栗山純一, 雑賀寿和, 横室公三, 木村義民.: 好塩基球, 好酸球に対する小青竜湯の薬理効果. 和漢医薬学会誌 3, 294-295, 1986.