

マウス一次免疫応答における 麻黄附子細辛湯構成生薬の果たす役割

東 奈津美,*^{a,b} 高木 康博,^b 上羽 昇^b

^a)小太郎漢方製薬株式会社研究所, ^b)大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部病理課

Role of the component crude drugs of Mao-bushi-saishin-to on the primary immune response in mice

Natsumi HIGASHI,*^{a,b} Yasuhiro TAKAGI^b and Noboru UEBA^b

^a)Kotaro Pharmaceutical Co.Ltd. ^b)Osaka Prefectural Institute of Public Health

(Received July 25, 2000. Accepted February 1, 2001.)

Abstract

We previously reported that Mao-bushi-saishin-to (MBST) increases IgM antibody production in mice. MBST consists of 3 different crude drugs: Mao, Hobushi, and Saishin. In the present study, we respectively evaluated the effects of Mao, Hobushi, and Saishin on IgM antibody production. In addition, the effects of the following combinations of constituents were also evaluated: Mao+Hobushi, Mao+Saishin and Hobushi+Saishin.

Neither Mao alone nor Saishin alone increased IgM antibody production. However, Hobushi alone increased antibody production by 160 % *in vitro* and by 170-180 % *in vivo* compared to antibody production in the controls.

Although neither the combination of Mao+Hobushi nor Hobushi+Saishin increased antibody production, the combination of Mao+Saishin increased antibody production by 220 % *in vitro* and by 170-180 % *in vivo* compared to antibody production in the controls.

These findings suggest that the effects of MBST are regulated by the combination of potent effects of Hobushi and those of other constituents. In addition, potent effects are induced by the combination of Mao and Saishin.

Key words Mao-bushi-saishin-to (Ma-Huang-Fu-Zi-Xi-Xin-Tang) 麻黄附子細辛湯, Ephedrae Herba, Aconiti Tuber, Asiasari Radix, Anti-IgM antibody response, mouse.

緒 言

いくつかの生薬から構成されている漢方薬は、長い間に蓄積されてきた数多くの使用経験に基づいて用いられている。漢方薬の薬効に関しては、感染防御能や免疫応答能を高める作用についての報告がみられる。^{1,2)} これらの報告は、個々の生薬としての薬効評価または方剤としての薬効評価であり、それぞれの構成生薬が方剤の持つ

薬効に果たす役割についてを解析した報告は少ない。

麻黄附子細辛湯は、麻黄、炮附子、細辛の3種類の生薬から構成される漢方方剤である。この方剤は古くから感冒に用いられ、特に免疫機能の低下している高齢者や、成人においても虚弱体質であったり体力が減退している者の感冒に有用であるとされている。^{3,4)} これらのことは、麻黄附子細辛湯には低下した免疫機能を活性化させる作用が存在することを示しているものと考えられる。麻黄附子細辛湯および構成生薬それぞれの薬効については、

*〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69
大阪府立公衆衛生研究所 公衆衛生部病理課
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

抗アレルギー作用や抗炎症作用などの報告がほとんどであった。^{5,9)}我々は、これまでに麻黄附子細辛湯のIgM抗体産生に及ぼす効果を検討し、麻黄附子細辛湯にはマウスのIgM抗体産生を促進させる作用があることを明らかにしてきた。¹⁰⁾しかしながら、麻黄附子細辛湯を構成する3種類の生薬それぞれが、この効果にどのような役割を果たしているのかについては明らかではない。そこで、本研究では、これら構成生薬のIgM抗体産生に及ぼす作用を*in vitro*および*in vivo*の実験系を用いて検討した。さらに、3種類の構成生薬のうちの1種類を除いた二味複合生薬の作用を検討することによって、構成生薬の役割の解析を試みた。

材料と方法

(1) 麻黄附子細辛湯および構成生薬の調製：麻黄附子細辛湯は、麻黄 (Ephedrae Herba, 中国産, 大阪市場品), 炮附子 (Aconiti Tuber, 中国産, 大阪市場品), 細辛 (Asiasari Radix, 朝鮮産, 大阪市場品) をそれぞれ細切し重量比4:1:3の割合で混合し、次のような方法を用いて調製したエキスをを用いた。すなわち、生薬重量の約10倍量の脱イオン水を加えた後、約100°Cで1時間還流抽出した。抽出液を100メッシュの篩で濾過後、凍結乾燥して麻黄附子細辛湯を調製した。また、構成生薬の麻黄、炮附子、細辛については、それぞれの生薬を細切した後、同様の方法で調製した。構成生薬3種類のうちの2種類を組み合わせた二味複合生薬については、麻黄と炮附子の複合生薬では重量比4:1の割合で混合し、同様の方法で調製した。また炮附子と細辛の複合生薬では重量比1:3の割合で、麻黄と細辛の複合生薬では重量比4:3の割合で混合して、それぞれ同様の方法で調製した。いずれのエキスも収率は約15%であった。

(2) 実験動物：実験には10週齢～12週齢のC3H/HeN(Slc)系雌マウスを用いた。

(3) 抗原：*in vitro*の実験には、胸腺非依存性抗原のdinitrophenylated lipopolysaccharide (DNP-LPS)を用いた。DNP-LPSは、2,4-dinitrobenzenesulfonic acid sodium salt (DNBS; 東京化成工業製)に*E.coli* lipopolysaccharide (026:B6; Difco製)を結合させた。LPS 1分子あたりのDNP基数は49個であった。*in vivo*の実験には、胸腺非依存性抗原のdinitrophenylated dextran (DNP-dextran)を用いた。DNP-dextranは、DNBSにdextran T-2000 (生化学工業製)を結合させた。dextran 1分子あたりのDNP基数は279個であった。これらの抗原は、Habaら¹¹⁾の方法を用いて作製した。

(4) 実験方法：

1) *in vitro* 実験系：

脾臓細胞の調製：5～7匹のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュ (100 mesh) を通して脾臓の単細胞ブール液 (1×10^7 /ml in RPMI-1640 medium) を調製した。

被験液の調製：麻黄附子細辛湯、構成生薬、二味複合生薬をそれぞれRPMI-1640培養液 (日研生物医学研究所製) で懸濁し、以下の濃度になるように調製した。麻黄附子細辛湯の濃度は500 μ g/mlに調製した。構成生薬の濃度は、麻黄では250 μ g/mlに調製した。また炮附子では63 μ g/mlの濃度に、さらに細辛では190 μ g/mlの濃度にそれぞれ調製した。3種類の構成生薬のうちの1種類を除いた二味複合生薬の濃度は、麻黄と炮附子の複合生薬では313 μ g/mlの濃度に調製した。また炮附子と細辛の複合生薬では253 μ g/mlの濃度に、麻黄と細辛の複合生薬では440 μ g/mlの濃度にそれぞれ調製した。これらを濾過滅菌した後、段階希釈して細胞培養系の実験に用いた。

上記の構成生薬および二味複合生薬の濃度は、麻黄附子細辛湯500 μ g/mlの濃度を基にして、生薬の配合比率 (4:1:3) から換算した。

脾臓細胞の培養：脾臓細胞の培養は、24穴培養プレートに上記脾臓細胞ブール液の1 ml, 各懸濁液の1 ml, およびDNP-LPS (最終濃度0.0025 μ g/ml) を加えて混和し、37°C, 5% CO₂存在下で5日間培養した。5日後の培養上清中の抗DNP-IgM抗体産生量をELISA法を用いて、各培養穴毎に測定した。個々の実験は3～4回繰り返して行なった。

2) *in vivo* 実験系：

投与液の調製：①麻黄附子細辛湯の投与液は5 mg/mlの濃度となるように脱イオン水に懸濁した。②構成生薬の投与液は、麻黄では2.5 mg/mlの濃度に、炮附子では0.63 mg/mlの濃度に、細辛では1.9 mg/mlの濃度となるようにそれぞれ脱イオン水に懸濁した。③二味複合生薬の投与液は、麻黄と炮附子の複合生薬では3.13 mg/mlの濃度に、炮附子と細辛の複合生薬では2.5 mg/mlの濃度に、麻黄と細辛の複合生薬では4.4 mg/mlの濃度となるようにそれぞれ脱イオン水に懸濁した。これらの構成生薬および二味複合生薬の濃度は、麻黄附子細辛湯投与液の濃度 (5 mg/ml) を基にして生薬の配合比率から換算した。10倍濃度の実験の投与液は、①～③の投与液の10倍濃度を同様の方法で調製した。

投与量と投与方法：各調製液の1回の投与液量は、体重25 g当り0.1 mlとした。これらを1日1回、5日間胃ゾンデを用いて経口投与した。麻黄附子細辛湯の投与量はヒト成人1日投与量 (1.2 g/60 kg/day) から換算して、

20 mg/kg/dayとした。構成生薬については麻黄の投与量は10 mg/kg/dayとし、炮附子は2.5 mg/kg/dayとし、細辛は7.5 mg/kg/dayとした。二味複合生薬では麻黄と炮附子の複合生薬は12.5 mg/kg/dayとし、炮附子と細辛の複合生薬は10 mg/kg/dayとし、麻黄と細辛の複合生薬は17.5 mg/kg/dayとした。いずれの投与量も麻黄附子細辛湯の投与量20 mg/kg/dayを基にして生薬の配合比率から換算した。また、10倍濃度の実験はこれらの投与濃度の10倍濃度とした。対照群には同量の脱イオン水を同様の方法で経口投与した。

抗原刺激および採血：最終投与の翌日に、1匹あたり200 μ gのDNP-dextranを尾静脈より静注して抗原刺激した。抗原刺激の5日後に採血し、血清中の抗DNP-IgM抗体産生量をELISA法を用いて測定し、麻黄附子細辛湯、構成生薬および二味複合生薬がIgM抗体産生に及ぼす効果を調べた。それぞれの実験は、1群4～8匹のマウスを用い、2～3回繰り返して行った。

(5) ELISA法による抗体量の検出：96穴のマикроプレート (Dynatech製 Immulon 2) にDNP-BSA (2 μ g/ml) 100 μ lを入れ、37°C 90分インキュベートしてコートした。0.05% Tween20-PBSによる洗浄後、検体を100 μ l添加した。4°C下で約18時間静置した後、洗浄し、酵素標識抗体 (HRP-rabbit anti-mouse IgM : ZYMED製) を100 μ l添加し、37°C 60分インキュベートした。洗浄後、基質液100 μ lを添加し、遮光して室温で30分反応させた後、2N硫酸を100 μ l加えて反応停止した。マイクロプレートリーダー (Tosoh製; MPR-A4) を用いてOD値を測定した。OD値0.5を示す検体の希釈倍率を抗体量とした。

(6) 統計処理：実験成績の統計学的有意性の検討にはFisherのPLSA法を用いて行った。

結 果

1. in vitro 実験の成績

麻黄附子細辛湯のIgM抗体産生に及ぼす効果をFig. 1に示した。麻黄附子細辛湯の50 μ g/mlの濃度で0.0 μ l/mlの抗体量に比べ約60%の増加がみられた。

次にそれぞれの構成生薬のIgM抗体産生に及ぼす効果をFig. 2に示した。この図は0.0 μ l/mlの培養穴上清中の抗体産生量を100とした比で、構成生薬の各濃度の培養穴上清中の抗体産生量を表したものである。麻黄および細辛では、いずれの濃度においても抗体産生量の増加はみられなかった。炮附子では63 $\times$ 10⁻⁴ μ g/mlの濃度から63 $\times$ 10⁻¹ μ g/mlの濃度範囲で約20～60%の増加が認められた。

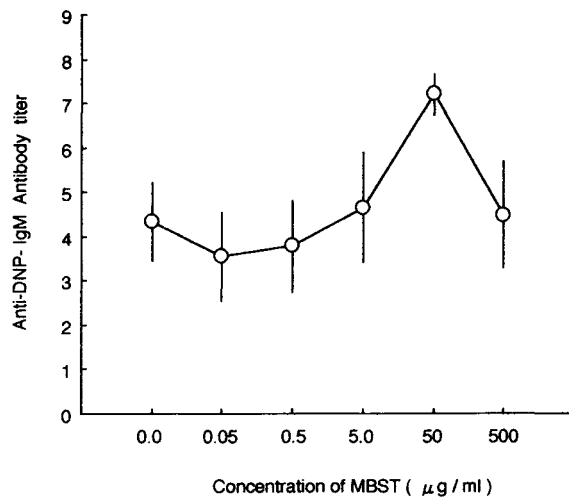


Fig. 1 Effect of Mao-bushi-saishin-to (MBST) on anti-DNP-IgM antibody production *in vitro*. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments.

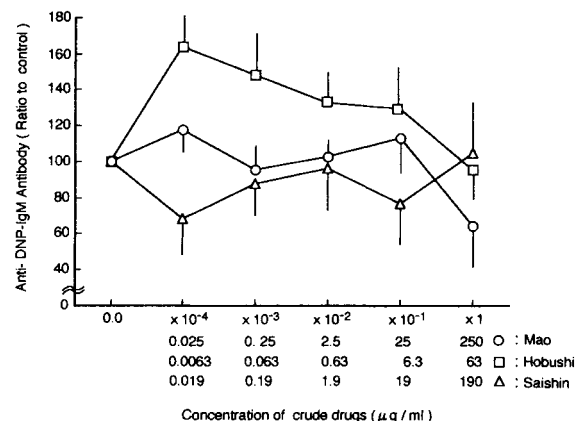


Fig. 2 Effect of component crude drugs in MBST on anti-DNP-IgM antibody production *in vitro*. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments.

構成生薬3種類のうちの1種類の生薬を除いた二味複合生薬の効果をFig. 3に示した。麻黄と炮附子の複合生薬 (M-B) では31 μ g/mlの濃度で約40%の増加がみられたが、炮附子と細辛の複合生薬 (B-S) ではいずれの濃度においても抗体産生量の増加はみられなかった。麻黄と細辛の複合生薬 (M-S) では44 μ g/mlの濃度で約120%の著しい増加が認められた。

2. in vivo 実験の成績

IgM抗体産生の推移を調べた実験; Fig. 4は脱イオン

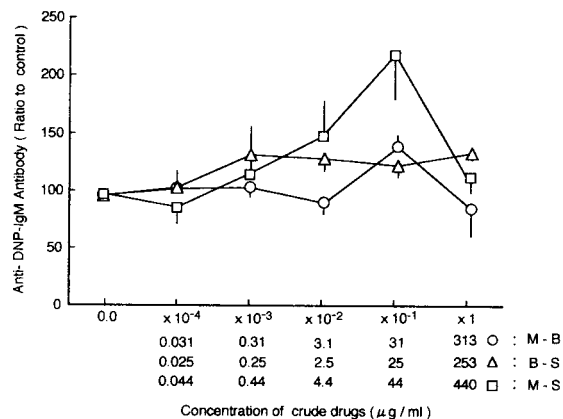


Fig. 3 Effect of combination crude drugs in MBST on anti-DNP-IgM antibody production *in vitro*. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments. M-B: combination of Mao and Hobushi, B-S: combination of Hobushi and Saishin, M-S: combination of Mao and Saishin

水をマウスに5日間経口投与し、抗原刺激後の血清中 IgM 抗体量の推移を示した。IgM 抗体量は、抗原刺激4日後から上昇しはじめ5~6日後で最も高い値を示し、その後減少した。そこで、以後の実験では抗原刺激5日後の血清中の IgM 抗体量を調べることとした。

単味生薬の効果を調べた実験；Fig. 5 は麻黄附子細辛湯および各構成生薬が、IgM 抗体産生に及ぼす効果を調べた成績である。麻黄附子細辛湯投与群では、20 mg/kg、200 mg/kg のいずれの投与量でも対照群 (0.0 mg 群) に比べ約 25 % の抗体産生量の増加がみられた。構成生薬の麻黄投与群では、10 mg/kg の投与量では増加はみら

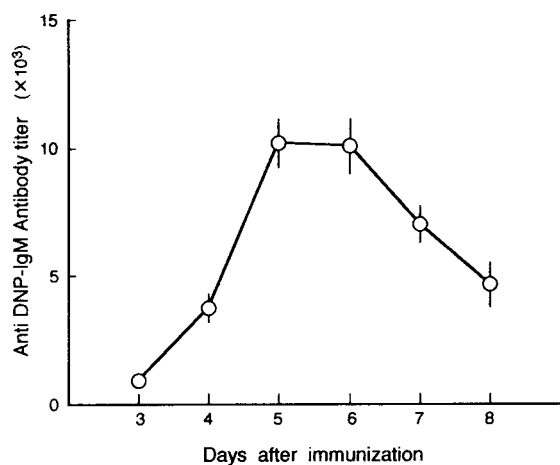


Fig. 4 Change of anti-DNP-IgM antibody titer in serum of mice after immunization with DNP-dextran. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 15 to 17 mice used in 3 independent experiments.

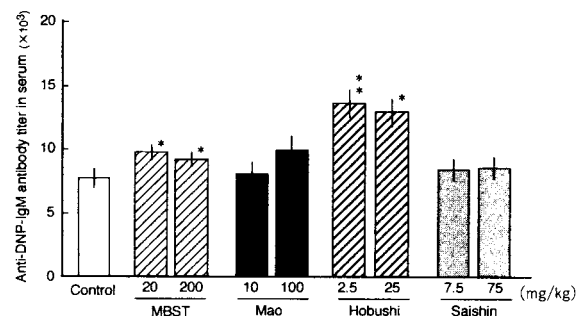


Fig. 5 Effect of MBST and its component crude drugs on anti-DNP-IgM antibody production in mice. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 10 to 20 mice used in 2 to 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the control.

れなかったが、100 mg/kg の投与量で対照群に比べ約 30 % の増加がみられた。細辛投与群では 7.5 mg/kg、75 mg/kg のいずれの投与量でも抗体産生量の増加はほとんどみられなかった。炮附子投与群では 2.5 mg/kg の投与量で約 80 % の、25 mg/kg の投与量では約 70 % の増加が認められた。

二味複合生薬の効果を調べた実験；Fig. 6 は二味複合生薬が IgM 抗体産生に及ぼす効果を調べた成績である。麻黄と炮附子の複合生薬 (M-B) 投与群および炮附子と細辛の複合生薬 (B-S) 投与群には IgM 抗体産生量の増加はほとんどみられなかった。しかし、麻黄と細辛の複合生薬 (M-S) 投与群では、17.5 mg/kg の投与量で対照群に比べ約 70 % の、175 mg/kg の投与量で約 80 % の抗体産生量の増加が認められた。

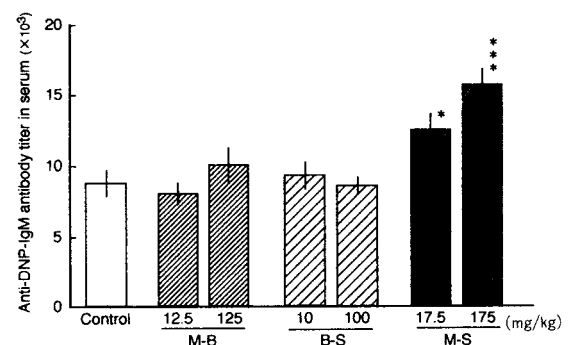


Fig. 6 Effect of combination crude drugs of MBST on anti-DNP-IgM antibody production in mice. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 8 to 12 mice used in 2 independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, significantly different from the control. M-B: combination of Mao and Hobushi, B-S: combination of Hobushi and Saishin, M-S: combination of Mao and Saishin

考 察

我々は、これまでに麻黄附子細辛湯にはマウスの IgM 抗体産生能を高める効果のあることを報告した。¹⁰⁾ 本実験では、麻黄附子細辛湯を構成する 3 種類の生薬の IgM 抗体産生に及ぼす効果を *in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて調べ、各構成生薬が麻黄附子細辛湯の効果にどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを試みた。

in vitro の実験系において、麻黄附子細辛湯は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で IgM 抗体産生を増加させたが、それ以外の濃度では抗体産生を高める効果はみられなかった。各構成生薬単独での成績では、炮附子は $63 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度から $63 \times 10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に至るまでの範囲で抗体産生が約 20~60 % 上昇していた。しかし、麻黄及び細辛はいずれの濃度においても IgM 抗体産生を高める効果はみられなかった。これらのことから炮附子には広い濃度範囲で IgM 抗体産生を高める効果があることが示された。次にこれらの効果が *in vivo* の実験系でもみられるのか否かを調べた。麻黄附子細辛湯投与群では、ヒト成人 1 日投与量に相当する量 (ヒト相当量) においても 10 倍量においても、いずれも対照群に比べ約 25 % の IgM 抗体産生の上昇がみられた。各構成生薬では、ヒト相当量で、炮附子投与群に对照群と比べて約 80 % の著しい上昇効果がみられた。しかし、麻黄投与群及び細辛投与群には抗体産生を高める効果はみられなかった。これらの生薬の 10 倍量を投与した成績では、麻黄投与群でも約 30 % の上昇が認められた。このことは投与量を増加すれば、麻黄単独でも IgM 抗体産生を上昇させる効果が期待できると考えられた。細辛投与群はいずれの投与量でも抗体産生の上昇がみられなかった。従って細辛単独では IgM 抗体産生を高める作用への関与が少ないものと考えられた。一方、炮附子ではヒト相当量においても 10 倍量においても抗体産生を著しく高めていた。従って、炮附子は生体内でも広い用量域で IgM 抗体産生を亢進させる効果を有していると考えられた。これらのことから、*in vivo* の実験系においても麻黄附子細辛湯の IgM 抗体産生を高める効果には炮附子が大きく関わっているものと考えられた。

以上、*in vitro* および *in vivo* の実験で同様の成績が得られたことから、麻黄附子細辛湯の IgM 抗体産生を高める効果には、炮附子が最も大きな役割を担っているものと考えられた。

次に、3 種類の構成生薬のうちの 2 種類の生薬を組み合わせた二味複合生薬の成績では、*in vitro* の実験系に

おいても、*in vivo* の実験系においても麻黄と細辛の二味複合生薬で著しい抗体産生の上昇が認められた。このことから麻黄と細辛には、単味では明らかな効果はみられないが、二味を複合すると抗体産生を増強する効果が現れることが示された。一方、単味で著しい効果を示していた炮附子は、他の 2 種類のいずれの生薬と組み合わせても、効果が減弱した。これらの成績から、2 種類以上の生薬を複合することは、組み合わせる生薬によって相乗または相加の効果を発揮したり、また単味における著しい効果を調整する働きも持つのではないかと考えられた。

以上の成績から、麻黄附子細辛湯の IgM 抗体産生に及ぼす効果には、構成生薬それぞれでは炮附子が最も大きな役割を果たしていること、二味複合生薬では麻黄と細辛の複合が大きな役割を果たしていることが示された。これらのことから、麻黄附子細辛湯が、単独では強い作用を持つ生薬と単独では効果を表さない生薬で構成されているのは、これら 3 種類の生薬の間で、単独では強い作用を持つ生薬の効果が調整される一方で、単独では効果を表さない生薬でも配合することにより元来持っている効果が引きだされてくるという、配合による生薬間の薬効調整がなされ、各構成生薬それぞれの効能が適切に発揮されるように組み合わせられているものと考えられた。

方剤は、数多くの治療経験から次第に形成されてきたものと考えられる。その方剤を構成する生薬それぞれが持つ効果は、生薬を配合することにより相互に調整されて、方剤の持つ効能が引きだされてくるものと考えられる。経験的に知られていたこれらのことは、今回の成績によって実験的に明らかにされたのではないかと考えられる。

本実験では、成熟期マウス (3 ヶ月齢) を用いて、IgM 抗体産生能を調べ、構成生薬が方剤の薬効に果たす役割を解析した。免疫応答能は、加齢とともに次第に低下してゆくことが知られている。従って、加齢に伴い低下する免疫応答能に対して、麻黄附子細辛湯の効果がどのように変遷するのか、ならびに各構成生薬の役割がどのように変化するのかを検討することが今後必要と考えられる。

References

- 1) Kurokawa, M., Imakita, M., Kumeda, C.A., Yukawa, T.A. and Shiraki, K. : Kakkon-to suppressed interleukin-1 α production responsive to interferon and alleviated influenza infection in mice. *J. Traditional Medicines* 13, 201-209, 1996.
- 2) Ikemoto, Y., Mizoguchi, Y., Arai, T., Yamamoto, S. and Moris-

- awa, S. : Effects of Syosaiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) and Daisaiko-to (Da-Chai-Hu-Tang) on antibody response in vitro. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **1**, 235-242, 1984.
- 3) Kaji, M., Kashiwagi, S., Hayashida, K., Shinguu, T., Ishii, K. and Kaji, M. : Koureisha no kanbou oyobi kikanshien ni taisuru Maobushisaishin-to ekisu kapuseru no kouka. *Jpn. J. Clin. and Exp. Med.* **69**, 3278-3284, 1992.
- 加地正郎, 柏木征三郎, 林田一男, 新宮世三, 石井浩三, 加地正英 : 高齢者の感冒および気管支炎に対する麻黄附子細辛湯エキスカプセルの効果. 臨床と研究 **69**, 3278-3284, 1992.
- 4) Yakazu, D. : Rinsyoooyo kamposyohokaisetsu.
矢数道明 : 臨床応用漢方処方解説.
- 5) Yamahara, J., Kimata, M., Sawada, T. and Fujimura, H. : Anti-allergic effect of Mao-busi-saisin-to and active principles of *Alisarum sieboldi*. *J. Med. pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **3**, 153-158, 1986.
- 6) Higasa, M., Natsuaki, M., Otsubo, Y., Higasa, K. and Shinka, S. : Anti-allergic effect of Mao-busi-saisin-to. *The Clinical Report* **22**, No.7, Apr. 1988.
- 7) Hikino, H., Konno, C., Takata, H. and Yamada, M. : Antiinflammatory principle of Ephedra Herbs. *Chem. Pharm. Bull.* **28**(10) 2900-2904, 1980.
- 8) Hikino, H., Konno, C., Takata, H., Yamada, Y., Yamada, C., Ohizumi, Y., Sugio, K. and Fujimura, H. : Antiinflammatory principles of Aconitum Roots. *J. Pharm. Dyn.* **3**, 514-525, 1980.
- 9) Kim, H.M. and Moon, Y.S. : Asiasari radix inhibits immunoglobulin E production on experimental models in vitro and in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **21**(3), 469-481, 1999.
- 10) Takagi, T., Maeda, A., Ueba, N., Higashi, N., Yamamura, H. and Nunoura, Y. : Effect of Mao-bushi-saishin-to on the primary antibody response in mice of different ages. *J. Traditional Medicines* **13**, 94-99, 1996.
- 11) Haba, S. and Hamaoka, T. : *Methods of immunological experiment.* **III**, 865-869, 1974.