漢方方剤の免疫応答に及ぼす影響

岩間裕子・雨谷 栄・荻原幸夫*

Effects of Kampo-Hōzai on the immune response
Hiroko Iwama・Sakae Amagaya・Yukio Ogiwara*

西洋医学の不得意とする肝炎などの慢性炎症疾患に用いられる漢方方剤は、古来より恒常性維持機構に作用して生体をコントロールしているといわれており、その一面として、免疫調節など免疫応答に関与している可能性が考えられる。

そこで、昔から慢性疾患によく用いられている方剤のなかから、柴胡剤として小柴胡湯、大柴胡湯、補中益気湯、瘀血剤として十全大補湯、当帰芍薬散を選び、これら方剤の免疫応答に及ぼす影響について検討した。

材料・方法

(1) 実験動物

10週齢の雄性 ICR マウスおよび 5～9 週齢の雌性 Balb/c マウスを用いた。

(2) 漢方方剤の調製

小柴胡湯（柴胡 7g, 半夏 5g, 生姜 4g, 黄芩 3g, 大棗 3g, 人参 3g, 甘草 2g）、大柴胡湯（柴胡 6g, 半夏 4g, 生姜 4g, 黄芩 3g, 芍薬 3g, 大棗 3g, 枳実 2g, 大黄 2g）、補中益気湯（人参 4g, 朮 4g, 黄耆 4g, 当帰 3g, 陳皮 2g, 大棗 2g, 柴胡 1g, 甘草 1.5g, 乾姜 0.5g, 升麻 0.5g）、十全大補湯（人参 2.5g, 黄耆 2.5g, 朮 3.5g, 茯苓 3.5g, 当帰 3.5g, 芍薬 3g, 川芎 3g, 桂枝 3g, 甘草 1g, 熟地黄 3.5g）、当帰芍薬散料（当帰 3g, 川芎 3g, 白朮 3g, 芍薬 6g, 茯苓 4g, 沢瀉 4g）に、水 700 ml を加え 400 ml まで加熱後滓を取り去り、300 ml まで濃縮した。これを凍結乾燥し、小柴胡湯 7.2g, 大柴胡湯 8.0g, 補中益気湯 7.9g, 十全大補湯 9.8g, 当帰芍薬散 7.6g を得た。マウスへの投与量は、体重換算比で計算し、ヒトの 1 倍量, 2 倍量, 10 倍量, 50 倍量に相当する量を 0.2 ml の水に溶解し、経口投与した。

(3) その他の被検化合物および被検液の調製

levamisole HCl (LMS), D-penicillamine (D-Pc), prednisolone (PN), cyclophosphamide (CY), および

carrageenan (Carr) を用いた。PN, CY および Carr は、生理食塩液に溶解または懸濁し、PN と CY は免疫する 1 日前から 3 日間皮下投与、Carr は免疫の 3 日前と 1 日前の 2 回腹腔内投与した。ほかは水に溶解し経口投与した。

(4) 抗原および免疫方法

抗原には、ヒツジの赤血球 (SRBC) および lipopolysaccharide (LPS) を用いた。SRBC は 0.15 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) で 3 回洗浄後、 $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調製し、その 0.2 ml を、LPS は Neter らの方法¹⁾ でアルカリ処理し、10 μg をマウスの尾静脈内に注射して免疫した。免疫後、4 日あるいは 5 日目に採血し、血清凝集素価 (HA 価) を、また脾臓を摘出し、hemolytic plaque forming cell (HPFC), および rosette forming cell (RFC) 数を測定した。

(5) 脾リンパ球浮遊液の調製と HPFC および RFC の測定

脾臓を摘出し、Eagle MEM 培地を用いて、ナイロンメッシュ上に細胞をほぐし、 $1 \times 10^7/\text{ml}$ の細胞浮遊液²⁾ を調整した。HPFC は Jerne らの直接法³⁾ に従って測定した。RFC は、0.4 ml のリンパ球浮遊液と 0.6 ml の $4 \times 10^7/\text{ml}$ SRBC を氷冷した試験管に加え、よく混和したのち、4°C で 1 夜放置し、5 個以上の SRBC と結合したリンパ球数を測定した。

(6) HA 価の測定

マウスの頸動脈から採血したのち、血清を分離して、56°C で 60 分間非働化した。血清 25 μl を PBS で倍數希釈したのち、25 μl の $2 \times 10^8/\text{ml}$ SRBC を加え混和した。これを 10°C で 18 時間静置したのち、凝集を観察した。HA 価は凝集を生じた血清の最高希釈倍數の逆數を 2 を底とする對數で示した⁴⁾。HA 価のうち 7 S 抗体価は、25 μl の非働化血清に同量の 0.2 M 2-mercaptoethanol を加え、37°C で 60 分間培養後、上述の方法で測定した⁵⁾。

結果と考察

柴胡剤の SRBC に対する免疫応答に及ぼす影響について検討した (表 1)。小柴胡湯は単独投与で、投与量に依存して全体的に抑制傾向がみられ、10 倍量で HPFC に、また 50 倍量で HA 価に有意差が認められた。大柴

* Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University 名古屋市立大学薬学部生薬学教室

表 1 effects of Saiko-Zai on immune response of ICR mice immunized with 1×10^8 SRBC

drug	(g/kg)	single administration				combined administration with prednisolone							
						PN 10 mg/kg				PN 30 mg/kg			
		HPFC	RFC	HA	7SHA	HPFC	RFC	HA	7SHA	HPFC	RFC	HA	7SHA
Shōsaiko-Tō	0.12	→	→	→	→								
	0.24	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	1.2	↓	→	→	→	↑	→	↑	↑	↑	↑	→	→
	6.0	→	→	↓	→								
Daisaiko-Tō	0.13	→	→	→	→								
	0.26	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	1.3	→	↑	↑	→	↑	→	↑	→	→	↑	→	→
	6.5	→	→	→	→								
Hochūekki-Tō	0.13	→	→	↑	↑								
	0.26	→	→	↓	→	↑	→	→	→	→	→	→	→
	1.3	→	→	→	→	↑	→	↑	↑	↑	↑	→	→
	6.5	→	→	↓	→								

Mice were immunized with 1×10^8 SRBC at day 0. Saiko-Zai was given p.o. for 6 (from -2 to 3) or 7 (from -2 to 4) days. Prednisolone was given s.c. for 3 consecutive days from -1 to 1 day. Hemolytic plaque forming cell (HPFC), rosette forming cell (RFC) and hemagglutinin (HA) titer were assayed at day 5. ↑ ↓ $P < 0.05$ vs Control or PN treated group.

表 2 effects of Oketsu-Zai on immune response of ICR mice immunized with 1×10^8 SRBC

drug	(g/kg)	single administration				combined administration with prednisolone							
						PN 10 mg/kg				PN 30 mg/kg			
		HPFC	RFC	HA	7SHA	HPFC	RFC	HA	7SHA	HPFC	RFC	HA	7SHA
Jūzendaiho-Tō	0.16	→	→	→	↑								
	0.32	→	→	↑	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	1.6	→	→	→	→	↑	↑	↑	↑	→	↑	→	→
	8.0	→	→	↑	↑								
Tōkishakuyaku-San	0.13	→	→	↑	↑								
	0.26	→	→	→	→	↑	→	↑	→	→	↑	→	→
	1.3	→	→	→	→	↑	→	↑	→	→	↑	→	→
	6.5	→	↑	→	→								

Mice were immunized with 1×10^8 SRBC at day 0. Oketsu-Zai was given p.o. for 6 (from -2 to 3) or 7 (from -2 to 4) days. Prednisolone was given s.c. for 3 consecutive days from -1 to 1 day. Hemolytic plaque forming cell (HPFC), rosette forming cell (RFC) and hemagglutinin titer were assayed at day 5. ↑ ↓ $P < 0.1$, ↑ ↓ $P < 0.05$ vs Control or PN treated group.

胡湯は、抑制傾向はまったく認められず、10倍量で RFC、HA 価に有意の増強作用が認められた。補中益気湯は HA 価において、1倍量で有意の増強作用、逆に50倍量では有意の抑制作用が認められた。しかし、PN 10 mg/kg、30 mg/kg との併用では3方剤ともに、10倍量で PN 投与による抑制を回復した。

瘀血剤について同様の検討を行った(表2)。十全大補湯、当帰芍薬散ともに、単独投与において HA 価に

有意の増強作用が認められた。また PN との併用においても、PN 投与による抑制を回復した。

つぎに方剤間の作用の違いを解明する目的で、T細胞非依存性抗原である LPS を用い、B細胞を障害する CY との併用について検討を行った(図1)。HPFC において、大柴胡湯、補中益気湯に有意の回復が認められた。HA 価においても大柴胡湯に有意の回復が認められた。このことから、大柴胡湯は直接 B細胞を活性化する

図1 effects of Kampō-Hōzai on the development of HPFC and 195 HA titer to LPS in Balb/c mice treated with Cyclophosphamide (10 mg/kg)

Mice were immunized with 10 μ g LPS at day 0. Kampō-Hōzai, Levamisole and D-Penicillamine were given p.o. for 6 consecutive days from -2 to 3 day. Cyclophosphamide was given s.c. for 3 consecutive days from -1 to 1 day. The HPFC and 195 HA titer were assayed at day 4. * $P < 0.05$ vs CY treated group. + $P < 0.01$ vs Control

図2 effects of Kampō-Hōzai on the development of HPFC and 195 HA titer to LPS in Balb/c mice treated with Carrageenan (0.05 mg/mouse)

Mice were immunized with 10 μ g LPS at day 0. Kampō-Hōzai, Levamisole and D-Penicillamine were given p.o. for 6 consecutive days from -2 to 3 day. Carrageenan was given i.p. on days -3 and -1. The HPFC and 195 HA titer were assayed at day 4. * $P < 0.05$ vs Carr treated group. + $P < 0.01$ vs Control

ことにより、免疫増強作用を示す可能性が考えられ、補中益気湯についても同様の可能性が示唆された。

つぎに方剤のマクロファージに及ぼす影響について検討するために、マクロファージを障害する Carr との併用を行った (図2)。HPFC において小柴胡湯に有意の回復が認められた。このことから、小柴胡湯はマクロファージを刺激することにより、間接的にB細胞を活性化している可能性が考えられた。また、補中益気湯にも回復傾向がみられ、小柴胡湯と大柴胡湯の作用をあわせてもつ可能性が示唆された。

文 献

- 1) Neter, E., Westphal, O., Gorzynski, E.A., Eichengerger, E.: J. Immunol. 76: 377, 1956.
- 2) Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Liacopoulos-Birot, M., Decreusefond, C., Bouthillier, Y.: Ann. Inst. Pasteur. 100(7) Supp.: 3, 1966.
- 3) Jerne, N.K., Nordin, A.A.: Science 140: 405, 1963.
- 4) Ceglowski, W.S., Friedman, H.: J. Immunol. 101: 594, 1968.
- 5) Walz, D.T., DiMartino, M.J., Misher, A.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 178: 223, 1971.