十全大補湯の免疫系に対する作用

——マウス・リンパ系細胞に対する十全大補湯のマイトジェン活性——

武元則人・丸山博文・川村秀樹・小松靖弘・油田正樹・細谷英吉*

Mitogenic activity of Juzentaihoto(TJ-48) on murine lymphoid cells The mitogenic activity of TJ-48 in murine lymphoid cells was examined to get a clue for the augmentation of antibody production by TJ-48.

Mitogenic activity of TJ-48 was detected in spleen cells, lymphonodus cells but not in thymocytes. The effect was abolished by pretreatment with anti-Ig antibody but not affected by pretreatment with anti-Thy 1.2 antibody. Coculture of spleen cells with TJ-48 resulted in increased number of sIgM-, sIgG- or sIgD-positive cells according to FACS analysis. The increase in mitosis by TJ-48 was abolished by the elimination of adherent cells and the readdition of adherent cells recovered the effect of TJ-48. These data indicate that TJ-48 is a B cell mitogen and the activity is T cell-independent and adherent cell-dependent. The mitogenic activity of TJ-48 may account for the augmentation of the immune response.

Norito Takemoto・Hirofumi Maruyama・Hideki Kawamura・

Yasuhiro Komatsu・Masaki Aburada・Eikichi Hosoya*

* Laboratory of Immunopharmacology, Tsumura Research Institute for Pharmacology

key words: Juzentaihoto, mitogenic activity, lymphoid cell, B cell, adherent cell

十全大補湯(TJ-48)は、主に、病後あるいは術後の体力低下、食欲不振時に使用されているが、近年、動物実験において、マイトマイシンCの抗腫瘍活性の増強とその副作用軽減効果が報告され¹⁾、癌患者における化学療法あるいは放射線治療時の補剤として試用されている。十全大補湯をはじめ、漢方薬剤が多くの医療機関で使用されるようになった現在においても、その薬効の機序が明確になっているものは少ない。

先に、筆者らは、十全大補湯に抗体産生増強作用があることを報告し²⁾、また、マクロファージ活性化に伴う貪食能亢進作用も報告した³⁾。今回、抗体産生増強作用の機序解明を目的として、主に脾臓細胞に対するマイトジェン活性を指標に検討したので報告する。

材料と方法

(1) 実験動物

6～8週齢雌性 BALB/c マウス、C3H/HeJ マウス(日本チャールス・リバー)、および4～6週齢雌性 BALB/c(nu/nu) マウス(静岡実験動物農協組合)を用いた。

(2) 材料

TJ-48は、熱水抽出後、スプレー・ドライして得られるエキスを粉末を、生理食塩水または RPMI 1640 に溶解し、0.45 μ m ミリポアフィルターにて、濾過滅菌後、実験に供した。比較対照として、lipopolysaccharide

(Difco, LPS)を用いた。培養液はすべて RPMI 1640 を用いた。3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(Sigma, MTT)は、PBS にて 5 mg/ml に調製した。細胞解析用標識抗体として FITC 標識抗マウス IgM 抗体(Cappel), FITC 標識抗マウス IgG 抗体(Cappel), FITC 標識抗マウス IgD 抗体(Nordic), FITC 標識抗マウス Thy 1.2 (Miles)を用いた。

(3) 細胞調製

① 脾臓、胸腺およびリンパ節を無菌的に摘出し、培養液中、200 メッシュのステンレス金網上にて細胞をほぐした後、ビペッティングにより単細胞浮遊液を調製した。遠心後、0.83%塩化アンモニウム溶液を用いて赤血球を溶血させた後、培養液にて3回洗浄した。細胞は10%ウシ胎仔血清(FBS, 56°C 30分加熱処理)および5×10⁻⁵M2-ME 加 RPMI 1640 培養液を用いて1well 当り2×10⁵となるように調整した。

② 付着性細胞の除去と回収⁴⁾

BALB/c マウス脾臓細胞1×10⁸を Sephadex G-10 カラムを通過させたあと、非付着性細胞を回収した。一方、1×10⁸/ml に調整した脾臓細胞を、プラスチックディッシュにて37°C 1時間培養したあと、非付着性細胞を除いた。付着性細胞は、0.5% EDTA, 5% FBS 加 PBS を加え、4°C 下15分放置したあと、回収、RPMI 1640にて洗浄後、実験に供した。

③ 抗 Thy 1.2 抗体、抗 Ig 抗体処理細胞の調製

1×10⁷の脾臓細胞を抗 Thy 1.2 抗体または抗 Ig 抗

* ツムラ薬理研究所免疫薬理部門

図1 mitogenic activity of Juzentaihoto (TJ-48) on spleen cells, lymphonodus cells and thymocytes

Cells were cultured with various concentrations of TJ-48 in 96 micro culture plate for 3 days. ^3H -TdR incorporation was measured during the last 4 hours of culture.

体 (Cedarane) を用いて、 4°C 下 1 時間反応させたあと、1,500 rpm 5 分間、遠心洗浄を行った。さらに、10 倍希釈したウサギ補体 (Sedarane) を加え、 37°C 5% CO_2 下 1 時間培養したのち、遠心洗浄を行い、最終細胞数 $2 \times 10^5/\text{well}$ に調製した。

(4) 細胞幼若化反応

① DNA 合成

2×10^6 cells/ml に調製した細胞浮遊液を、1 well (96 well 培養プレート、コースター) 当たり $100 \mu\text{l}$ ずつ分注後、試料 $20 \mu\text{l}$ および培養液を加えて、最終的に $200 \mu\text{l}$ とし、 37°C 5% CO_2 下、3 日間培養した。培養終了 4 時間前に $0.5 \mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidine (^3H -TdR) を加えた。Automatic cell harvester (Filtron) にて細胞を回収したのち、liquid scintillation counter (Beckman, LS 5800) にて放射活性を測定した。

② MTT assay³⁾

DNA 合成の場合と同様に 3 日間培養した。培養終了前、培養上清 $100 \mu\text{l}$ を除去したのち、MTT $20 \mu\text{l}$ を加え 6 時間培養後、10% SDS・0.01 N HCl $100 \mu\text{l}$ を加え、反応を停止させるとともに、生成された MTT formazan を溶解後、比色定量 (OD 540-690) を行った。

結果

(1) 脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞に対するマイトジェン活性

各細胞は、各濃度の TJ-48 を加え、3 日間培養した。TJ-48 は、50~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度において、脾臓細胞、リンパ節細胞に対して、用量依存的にマイトジェン活性

図2 proliferation of C3H/HeJ spleen cells by TJ-48 or LPS

Spleen cells were cultured with TJ-48 or LPS for 3 days in 96 micro culture plate. Proliferation was determined by MTT assay as described in "Materials and Methods". Resulted is represented as OD540-690.

図3 mitogenic activity of TJ-48 in spleen cells from BALB/c or BALB/c(nu/nu)

Spleen cells were cultured with TJ-48 for 3 days. Activity is represented as cpm of ^3H -TdR.

を示すが、胸腺細胞に対しては、まったく作用を示さなかった(図1)。

(2) C3H/HeJ マウス脾臓細胞に対するマイトジェン活性

C3H/HeJ マウス脾臓細胞に、TJ-48 または LPS を加え、3 日間培養したあと、MTT assay により細胞増殖能を検討した。TJ-48 は、100~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、マイトジェン活性を示した。なお、LPS (0.1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による反応は認められなかった(図2)。

(3) BALB/c(nu/nu)脾臓細胞に対する TJ-48 の作用

TJ-48 は、BALB/c(nu/nu)脾臓細胞に対して、BALB/c マウス脾臓細胞と同様に、50~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度において、用量依存的にマイトジェン活性を示した

表 1 FACS analysis of TJ-48-proliferated cells
Spleen cells were cultured with TJ-48(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or LPS(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. Cells were harvested and stained with each FITC-conjugated antibody. Stained cells were analyzed with FACS-420. Results are presented as mean $\pm$ SE in eight experiments.

group	percentage of positive cells			
	sIgM	sIgG	sIgD	Thy 1.2
control	43.0 $\pm$ 2.18	46.7 $\pm$ 2.62	38.5 $\pm$ 2.30	46.5 $\pm$ 4.20
TJ-48	59.0 $\pm$ 2.84	58.4 $\pm$ 4.20	50.9 $\pm$ 2.70	47.3 $\pm$ 4.95
LPS	69.7 $\pm$ 3.84	66.2 $\pm$ 4.99	30.7 $\pm$ 2.10	38.1 $\pm$ 3.95

(図 3).

(4) 抗 Thy 1.2 抗体, 抗 Ig 抗体処理細胞に対する TJ-48 の作用

抗 Thy 1.2 抗体, 抗 Ig 抗体および補体で処理した脾臓細胞を, TJ-48 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下, 3 日間培養したあと, ^3H -TdR の取込み量を測定した. 抗 Thy 1.2 抗体処理細胞では, TJ-48 による ^3H -TdR の取込み量は対照群と変わらないが(図 4a), 抗 Ig 抗体処理細胞では抗体量に依存して, TJ-48 による ^3H -TdR の取込み量の減少が観察された(図 4b).

(5) FACS による反応細胞の検索

BALB/c 脾臓細胞を, TJ-48(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下, 3 日間培養したあと, FITC-抗 sIgM, 抗 sIgG, 抗 sIgD, または抗 Thy 1.2 抗体を用いて FACS 解析を行った. TJ-48 処理により, LPS と同様に sIgM, sIgG 陽性細胞の増加が認められた. しかしながら, sIgD 陽性細胞は, LPS 存在下では減少するのに対し, TJ-48 存在下では, sIgD 陽性細胞の増加が観察された. しかし, TJ-48 は, Thy 1.2 陽性細胞に対して影響を与えないことも示された(表 1).

(6) TJ-48 によるマイトジェン活性と付着性細胞との関係

脾臓細胞または脾臓由来非付着性細胞を, 種々の濃度の TJ-48 とともに 3 日間培養したあと, ^3H -TdR の取込み量を指標にマイトジェン活性を検討した. 全脾臓細胞に対しては, TJ-48 添加により, ^3H -TdR の取込み量の増加が観察されたが, 非付着性細胞ではまったく認められなかった(図 5a), さらに, まったく反応を示さなかった非付着性細胞群に, 別途準備したプラスチックディッシュ付着性細胞を添加することによる再構成系について検討した. 付着性細胞を添加することにより, TJ-48 の活性がみられ, 5% の付着性細胞添加群にもっとも高い(70%)反応の回復が認められた(図 5b).

図 4 mitogenic activity of TJ-48 on anti Thy 1.2- or anti Ig-treated spleen cells

Spleen cells were treated with various concentrations of anti Thy 1.2 (a) or anti Ig (b) antibody and complement. After treatment, cells were cultured with (solid symbol) or without (open symbol) TJ-48 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. Activity is represented as cpm of ^3H -TdR.

図 5 necessity of adherent cells in TJ-48-induced proliferation in BALB/c spleen cells

a: Spleen cells were cultured with various concentrations of TJ-48 for 3 days. Activity is represented as cpm of ^3H -TdR. ●: whole spleen cells ○: non adherent cells

b: Adherent cells were added to non adherent cells at the indicated ratio (1 to 20%) and cells were cultured with TJ-48 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. Recovery is expressed as percentage of incorporation of ^3H -TdR.

考 察

先に, 筆者ら²⁾ は, マウスを用いた実験から TJ-48 を経口投与することにより, 脾臓中の抗体産生細胞数が増加することを報告し, TJ-48 の免疫増強剤あるいは免疫調節剤としての可能性を示唆した. 今回, TJ-48 の免疫応答に対する作用機序解明の手がかりを得ることを目的に, 主に脾臓細胞に対するマイトジェン活性について検

討した。

今回の実験結果では、TJ-48は、脾臓細胞およびリンパ節細胞に対して細胞増殖を誘起させるが、胸腺細胞に対しては作用を示さなかった(図1)。また、抗Ig抗体と補体で処理した細胞に対しては、その抗体量に依存してTJ-48の作用の減少が観察され(図4b)、さらに、TJ-48で処理した脾臓細胞ではsIgM, sIgG, sIgD陽性細胞が増加する(表1)ことなどから、TJ-48のマイトジェン活性はB細胞に特異的であることが示唆された。TJ-48のマイトジェン活性がLPSの混入による疑いも否定できないことから、LPS非感受性C3H/HeJマウス脾臓細胞を用いて検討した結果、TJ-48の作用が認められたことから(図2)、TJ-48のマイトジェン活性は、LPSの混入によるものではないと思われる。

また、このマイトジェン活性発現に関わるT細胞の関与については、BALB/c(nu/nu)脾臓細胞に対しても作用することや(図3)、抗Thy 1.2抗体と補体で処理した細胞においても反応が観察されることから(図4a)、T細胞非依存的な反応であると考えられる。さらに、この作用は、付着性細胞を除去することにより消失あるいは減弱することや、再構成することにより回復することから、TJ-48のマイトジェン活性発現には付着性細胞が不可欠であることが判明した(図5)。このように、TJ-48のB細胞マイトジェン作用は、主に付着性細胞(主にマクロファージ)に対する活性化作用に基づくものと考えられる。事実、伊藤ら^{6,7)}、および筆者らも、*in vivo*³⁾および*in vitro*(投稿中)において、TJ-48がマクロファージ機能を活性化することを証明している。TJ-48がマクロファージに対して種々の作用を示すことは、木岡ら⁸⁾の*in vitro*の実験において、TJ-48がLPSによるヒト末梢血粘着性細胞からのインターロイキン-1 β の産生を増強するとの報告からも支持される。

以上のような、TJ-48のマクロファージに対する作用、およびそれを介してのマイトジェン作用が抗体産生増強に寄与していることが推察される。

現在、TJ-48で活性化されたマクロファージにおける可溶性因子の関与、および*in vitro*抗体産生系でTJ-48の作用について検討中であり、また、TJ-48が免疫系に

種々の作用、特に賦活化作用を持っていると思われることから、制癌剤補剤、あるいは感染防御剤としての可能性もあり、基礎的な検討を加えている。漢方薬は、臨床においてなが年使用されてきたが、その作用機序が明確になっているものは少ない。筆者らは、漢方薬の特性を考慮した場合、多くの漢方薬が免疫系に対する作用を介して、その重要な薬効を発揮していると考え、それらについて重点的に検討している。今回の実験は、漢方薬がいかなる作用機序で生体に作用し、生体機能の調節を行っているかを探る第一歩になるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Aburada, M., Takeda, S., Ito, E., Nakamura, M., Hosoya, E.: Protective effect of Juzentaihoto, dried decoction of 10 chinese herbs mixture, upon the adverse effect of mitomycin C. J. Pharm. Dyn. 6: 1000-1004, 1983.
- 2) 小松靖弘, 武元則人, 丸山博文, 土屋博司, 油田正樹, 細谷英吉, 篠原精一, 浜田 一: 十全大補湯の免疫応答に及ぼす影響. 炎症 6: 405-408, 1986.
- 3) 丸山博文, 川村秀樹, 武元則人, 小松靖弘, 油田正樹, 細谷英吉: 漢方方剤の食細胞に及ぼす影響. 炎症 8: 65-66, 1988.
- 4) Iris, A.L., Robert, I.M.: Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10. J. Immunol. Methods 5: 239-247, 1974.
- 5) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983.
- 6) 志村圭志朗, 伊藤 均: 漢方方剤の補体活性化に対する作用とマクロファージに対する影響. 漢方医学 8(4): 13-17, 1984.
- 7) 伊藤 均, 志村圭志朗: 漢方方剤の抗腫瘍効果と細網内皮系活性に及ぼす影響. 漢方医学 8(5): 14-17, 1984.
- 8) 木岡清英, 溝口靖紘, 武田 弘, 申 東桓, 阪上吉秀, 小林絢三, 山本祐夫, 森沢成司: ヒト末梢血単核細胞のインターロイキン-1 β 産生能および抗体産生に及ぼす十全大補湯の影響. 和漢医薬学会誌 4: 332-333, 1987.