原著

当帰芍薬散によるマウス心臓移植片の 生着延長効果と免疫制御細胞の誘導

白土 裕之

帝京大学医学部外科学講座, 東京, 〒173-8605 板橋区加賀2-11-1

Tokishakuyakusan Induces Prolonged Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generates Regulatory Cells in Mice

Hiroyuki SHIRATO

Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

Abstract

Tokishakuyakusan is a Japanese herbal medicine which is extracts from six herbal materials. The author investigated the effects of oral administration of Tokishakuyakusan in a murine model of cardiac transplantation with fully mismatched allografts. CBA mice (H²^b) underwent transplantation of C 57 BL/6 (H²^b) hearts and received oral administration of Tokishakuyakusan from day 0 to day 7 after grafting. Untreated CBA mice rejected C 57 BL/6 cardiac grafts acutely (median survival time [MST], 7 days). Mice given 2 g/kg/day of Tokishakuyakusan accepted their grafts (MST, 60 days). However, each herbal material alone and 0.2, 0.02 g/kg/day of Tokishakuyakusan did not prolong the allografts survival. Splenocytes from Tokishakuyakusan-treated recipients showed alloproliferative hyporesponsiveness and down-regulation of IFN- γ in mixed leukocyte culture with C 57 BL/6 stimulators. Secondary CBA recipients (naive) given whole splenocytes from primary Tokishakuyakusan-treated CBA recipients with C 57 BL/6 cardiac allografts 30 days after grafting had prolonged survival of C 57 BL/6 hearts (MST, 100 days) compared to that in the secondary recipients with adoptive transfer of naive splenocytes (MST, 12 days). In flow cytometry experiment, the population of CD 4⁺ CD 25⁺ cells, CD 4⁺ FOXP 3⁺ cells and CD 25⁺ FOXP 3⁺ cells were increased in the spleens of Tokishakuyakusan-treated CBA recipients. Treatment with Tokishakuyakusan induced unresponsiveness to fully allogeneic cardiac allograft and generated regulatory cells. Traditional knowledge of Japanese herbal medicine may contribute to immunomodulation after modern transplantation surgery.

Key words : tokishakuyakusan, regulatory cells, murine cardiac transplantation, transplantation immunology, prolonged survival

要旨

組織適合抗原完全不一致マウスの心臓移植モデルを用いて、当帰芍薬散の同種異系臓器移植免疫に関する効果を検討した。C57BL/6 マウスの心臓を無処置の CBA レシピエントの腹部に移植すると、移植片は生存中間値 (MST) 7 日で拒絶された。当帰芍薬散を 2 g/kg/day で移植後 8 日間連日投与すると、MST は 60 日に延長した。混合白血球培養試験でアロ増殖反応性の低下と、その上清のインターフェロン- γ の産生低下がみられた。さらに、心臓移植後当帰芍薬散を投与した CBA レシピエントの脾細胞を、第二の CBA レシピエントに静脈投与し心臓移植すると MST は 100 日に延長した。このことから、免疫制御細胞が誘導されたことが判明した。そして、当帰芍薬散投与により、CD 4 陽性細胞中の CD 25 陽性、FOXP 3 陽性細胞と、CD 25 陽性細胞中の FOXP 3 細胞が増加した。当帰芍薬散は、心臓移植片の拒絶反応を抑制し、かつ免疫制御細胞を誘導した。

キーワード : 当帰芍薬散, 免疫制御細胞, マウス心臓移植, 移植免疫, 生着延長

緒言

近年、新規免疫抑制剤の導入等により、移植医療の成績は向上してきている。しかし、免疫抑制剤による非特異的な免疫抑制下では、患者は感染症や腫

瘍などに罹患する危険にさらされるだけでなく、免疫抑制剤そのものの副作用も大きな弊害となり、長期間投与することは好ましくない。従って、移植患者のさらなる QOL の向上のため、非特異的な免

疫抑制剤を投与されなくても、免疫が制御され拒絶が起こらない状態、すなわち、特異的な免疫寛容が成立することは移植患者の治療にとって究極の目標である。そのため、免疫寛容が誘導できる副作用の少ない薬剤を研究開発することは、現在の移植免疫についての課題である。

漢方薬は昔から現在まで長きにわたり中国、日本、韓国などアジア諸国でよく使用されている。その優れた臨床治療効果のため最近では次第に欧米でも使用されるようになってきた¹⁾²⁾。漢方薬は、現在臨床で使用されている多くの西洋薬のような単一成分を化学的に精製した合成品ではなく、複数の生薬を組み合わせて抽出され、非常に多数の複合成分から成り立っている。そして、生薬の配合で必ずしも相加的に作用するわけではなく、組み合わせによっては、更なる効果が生まれたり（相乗的）、効果が減弱したり、作用の変異に富む。また、漢方薬には副作用が少ないという特徴もあり、非常に使いやすく今後も西洋薬の限界を超える新しい薬効が見つかるものと期待されている。

われわれの研究グループでは既に、アンチロトンビンⅢ³⁾、シクロオキシゲナーゼ2阻害薬⁴⁾、サルボグレラート⁵⁾、ヒスタミンH2受容体拮抗薬⁶⁾などが、組織適合抗原完全不一致マウスの心臓移植モデルにおける心臓移植片の生着延長効果と免疫制御細胞の誘導に関与することを研究報告した。そこで西洋薬ではなく、漢方薬の中にも移植免疫に関与する可能性があるものがあるのではないかと考え、種々の漢方薬を検討し、今回は当帰芍薬散を選択した。当帰芍薬散は臨床で頻用される漢方薬の一つで、特に産婦人科領域で一般的によく処方されている。当帰芍薬散について、更年期症候群の治療⁷⁾や子宮内発育遅延の改善⁸⁾、鉄欠乏性貧血への有効性⁹⁾などの報告がみられるが、同種異系臓器移植免疫に関する研究報告はない。今回、組織適合抗原完全不一致マウスの心臓移植モデルを使って、当帰芍薬散の同種異系臓器移植免疫に関する効果を検討した。

材料と方法

1. 動物

CBA マウス（三協ラボサービス、東京）をレシピエントとし、C57BL/6 マウス（三協ラボサービス）をドナーとして用いた。この組み合わせでは、主要組織適合複合体（Major histocompatibility com-

plex : MHC）はそれぞれCBA-H 2^k, C57BL/6 -H 2^bで、完全不一致となる。動物は帝京大学医学部中央動物舎にて飼育され、飼育方法は帝京大学の動物飼育ガイドラインに従った。また、本研究は帝京大学動物実験の実施に関する倫理委員会の承認を得て、倫理委員会ガイドラインに従って行った。

2. マウスの心臓移植

マウスの心臓移植は既報の方法に従って行った¹⁰⁾。レシピエントとなるマウスの腹腔内で、移植心の上行大動脈とレシピエントの腹部大動脈、移植心の肺動脈とレシピエントの下大静脈を、手術用顕微鏡（トプコン、東京）を使用して10-0 ナイロン糸付縫合針（ベアーメディック、茨城）で端側吻合した。移植心を連日腹部の触診にて観察した。触診で心拍動の停止と判断したマウスは、麻酔下に開腹し直視下で心拍動の停止を確認して拒絶と判定した。心臓移植片は摘出して病理検体とした。

3. 使用漢方薬と生薬

使用薬剤は、当帰芍薬散および当帰芍薬散を構成する6種類の生薬（当帰、川芎、芍薬、蒼朮、茯苓、沢瀉）を用いた。当帰芍薬散はツムラ（東京）の医薬品製剤と同じ製造工程のものから、乳糖処理をする前段階の乾燥末を使用した。また、当帰芍薬散を構成する生薬は、ツムラの乾燥末医薬品当帰芍薬散を製造する生薬のストックから乾燥末として使用した。

4. マウスの処置

当帰芍薬散および当帰芍薬散を構成する6種類の生薬を、心臓移植手術当日から8日間連日、経口投与用金属管（Thomas Scientific, NJ, USA）を用いてレシピエントの胃内に投与した。投与量は、当帰芍薬散は2 g/kg/day, 0.2 g/kg/day, 0.02 g/kg/dayを投与し、当帰芍薬散を構成する6種類の生薬は、それぞれの生薬単独で2 g/kg/dayと、当帰芍薬散（2 g/kg/day）の構成割合に従った分量（当帰0.27 g/kg/day, 川芎0.27 g/kg/day, 芍薬0.36 g/kg/day, 蒼朮0.36 g/kg/day, 茯苓0.36 g/kg/day, 沢瀉0.36 g/kg/day）を投与した。

5. 組織染色

心臓移植後に当帰芍薬散を投与し200日間生着した心臓移植片を病理組織標本用に摘出して組織学的に調べた。摘出した心臓移植片を5%ホルマリンにて固定し、パラフィンにて包埋した。4 μmの切片

図1 当帰芍薬散経口投与による C57BL/6 移植心の CBA レシピエント内での生着延長効果

C57BL/6 マウスの心臓を CBA レシピエントの腹部に移植した。CBA レシピエントを当帰芍薬散投与群（投与量 2, 0.2, 0.02 g/kg/day）、蒸留水投与群、無処置群の 5 群に分けた。

** は、蒸留水投与群および無処置群と比較して、当帰芍薬散投与群（2 g/kg/day）に、 $P < 0.01$ の有意差を認める。MST: Median survival time

を作成し生食被覆スライドに載せ、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色を行った。また、慢性拒絶の特徴である心臓移植片の動脈内皮障害¹¹⁾¹²⁾の評価のため、Elastica van Gieson (EvG) 染色も行った。

6. 混合白血球培養試験

混合白血球培養試験 (Mixed leukocyte reaction: MLR)¹³⁾には、C57BL/6 マウスの心臓を移植して当帰芍薬散を投与していない CBA レシピエントと、C57BL/6 マウスの心臓を移植して当帰芍薬散を 8 日間投与した CBA レシピエントと、無処置の CBA マウスを用いた。心臓移植 14 日後の当帰芍薬散を投与していない CBA レシピエントおよび当帰芍薬散を投与した CBA レシピエントと、無処置の CBA マウスの脾臓を摘出し、脾細胞を採取した。これらの脾細胞を Responder とし、無処置の C57BL/6 マウスの脾細胞を Stimulator として用いた。Stimulator 細胞の増殖を止めるため、100 μ g/ml のマイトマイシン (MitomycinC: MMC, 協和発酵キリン, 東京) にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分処理した。Responder 細胞 (2.5×10^6 cells/ml) と Stimulator 細胞 (5×10^6 cells/ml) を 96 穴の組織培養皿 (イワキ, 東京) にて 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ のインキュベーター (CH-16M: 日立製作所,

東京) の中で 3 日間細胞培養した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA, Cell Proliferation Biotrak ELISA System version 2: Amersham Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, UK) を用いて細胞増殖を測定した。測定方法は、製造元の指示に従って行い、その発光を吸光度 630 nm で ELISA reader (ELx800, Universal Microplate Reader: Bio-Tek Instruments, VT, USA) を使用して測定した。

7. 酵素免疫測定法

MLR で 4 日間培養した上清を、ELISA¹⁴⁾を用いてインターロイキン (Interleukin: IL)-2, IL-4, IL-10, インターフェロン (Interferon: IFN)- γ を測定した。IL-2 の capture モノクローナル抗体は JES 6-1 A12, detection モノクローナル抗体は JES 6-5 H 4 で、共に Caltag Laboratories (CA, USA) の製品を用いた。IL-2 のスタンダードは PeproTech (London, UK) の製品を用いた。IL-4 の capture モノクローナル抗体は BVD-1 D11, detection モノクローナル抗体は BVD-24 G 2 で、共に Caltag Laboratories の製品を用いた。IL-4 のスタンダードは PeproTech の製品を用いた。IL-10 の capture モノクローナル抗

表1 当帰芍薬散を構成する生薬の経口投与による移植心生着延長効果

No.	投与薬 (2g/kg/day)	n	生着期間 (days)	MST (days)	P-value	
					vs. No.1	vs. No.2
1	無処置	5	6,7,7,8,8	7		<0.01
2	当帰芍薬散	5	37,50,60,72,>100	60	<0.01	
3	当帰	5	7,7,7,7,8	7	NS	<0.01
4	川芎	5	7,9,14,17,31	14	<0.05	<0.01
5	芍薬	5	8,10,12,15,49	12	<0.05	<0.05
6	蒼朮	4	6,6,10,11	8	NS	<0.05
7	茯苓	7	6,16,16,18,18,18,20	18	<0.05	<0.01
8	沢瀉	4	7,8,8,12	8	NS	<0.05

MST : Median survival time, P-value : Mann-Whitney U Test, NS : Not significant

表2 当帰芍薬散を構成する生薬の構成割合での経口投与による移植心生着延長効果

No.	投与薬	投与量 (g/kg/day)	n	生着期間 (days)	MST (days)	P-value	
						vs. No.1	vs. No.2
1	無処置		5	6,7,7,8,8	7		<0.01
2	当帰芍薬散	2.00	5	37,50,60,72,>100	60	<0.01	
3	当帰	0.27	3	7,8,8	8	NS	<0.05
4	川芎	0.27	3	7,7,26	7	NS	<0.05
5	芍薬	0.36	3	7,8,10	8	NS	<0.05
6	蒼朮	0.36	3	7,7,8	7	NS	<0.05
7	茯苓	0.36	3	7,11,25	11	NS	<0.05
8	沢瀉	0.36	3	6,11,14	11	NS	<0.05

MST : Median survival time, P-value : Mann-Whitney U Test, NS : Not significant

体は JES 5 - 2 A 5 , detection モノクローナル抗体は JES 5 -16E 3 で、スタンダードと同じく、BD Biosciences Pharmingen (CA, USA) の製品を用いた。IFN- γ の capture モノクローナル抗体の R 4 - 6 A 2 と、detection モノクローナル抗体の XMGL.2 は共に Caltag Laboratories の製品である。IFN- γ のスタンダードは PeproTech の製品を用いた。ELISA を行い、その発光を吸光度 405 nm で ELISA reader を使用して測定した。

8. 細胞移入実験

免疫制御細胞の存在を調べるために、細胞移入実験を行った。C57BL/6 マウスの心臓を移植して当帰芍薬散を投与し、心臓移植片を受け入れている CBA レシピエントと、無処置の CBA マウスから脾臓を摘出し、脾細胞を採取した。当帰芍薬散の影響を受けないように、また、免疫制御細胞が誘導されるまでの一定期間を設けるため、移植後 30 日経過した CBA レシピエントを選択した。5 × 10⁷ 個の脾細胞を無処置の CBA マウス (第二のレシピエント) に静脈投与し、同日 C57BL/6 マウスの心臓を移植した。

9. フローサイトメーター

C57BL/6 マウスの心臓を移植し、当帰芍薬散を投与していない CBA レシピエントと、当帰芍薬散を 8 日間投与した CBA レシピエントから、細胞移入実験と同様に術後 30 日経過した時点で脾臓を摘出して脾細胞を採取した。コントロールとして、無処置 CBA マウスから脾臓を摘出して脾細胞を採取した。それらの脾細胞を蛍光色素標識した抗体で染色した。抗体は、抗マウス CD 4 モノクローナル抗体 RM 4 - 5 (BD Biosciences Pharmingen)、抗マウス CD 25 モノクローナル抗体 PC 61 (BD Biosciences Pharmingen)、抗マウス FOXP 3 抗体 FJK-16s (eBioscience, CA, USA) 及びそれぞれの isotype controls を用いた。20 分氷上に置き、染色した後に、フローサイトメーター (BD FACS Calibur : BD Biosciences, CA, USA) で分析した。CD 4 陽性細胞中の CD 25 陽性細胞の比率、CD 4 陽性細胞中の FOXP 3 陽性細胞の比率および、CD 25 陽性細胞中の FOXP 3 陽性細胞の比率を解析し、各群間で比較した。

10. 統計検定

2 群間の検定は Graphpad Prism ソフト (Graphpad,

図2 病理組織像

A, B, C: HE 染色 (75倍)。D, E, F: EvG 染色 (75倍)。

A, D: 無処置の CBA マウスの心臓を無処置の CBA マウスに移植して、拒絶されることなく100日経過した心臓移植片。炎症細胞浸潤や冠動脈内膜肥厚はほとんどみられない。

B, E: C57BL/6 マウスの心臓を CBA マウスに移植して当帰芍薬散を投与し、拒絶されることなく200日経過した心臓移植片。C, F に比べて炎症細胞浸潤は軽度で、冠動脈内膜肥厚の程度もわずかである。

C, F: C57BL/6 マウスの心臓を無処置の CBA マウスに移植して拒絶された術後30日目の心臓移植片。他群に比べて炎症細胞浸潤や冠動脈内膜肥厚は高度である。

CA, USA) とエクセル統計2006 (社会情報サービス, 東京) を用いて Mann-Whitney U test で解析した。

結果

無処置の CBA レシピエントは、C57BL/6 マウスの心臓を生存中間値 (Median survival time: MST) 7日 で拒絶した。また蒸留水を経口投与した群でも、CBA レシピエントは、C57BL/6 マウスの心臓を MST 8日 で拒絶した。ところが、当帰芍薬散を 2 g/kg/day で投与した群では、MST は60日に延長した (図1)。当帰芍薬散を 0.2 g/kg/day, 0.02 g/kg/day で投与した群では、MST はいずれも 8日 であった (図1)。

当帰芍薬散を構成する 6 種類の生薬 (当帰, 川芎, 芍薬, 蒼朮, 茯苓, 沢瀉) のうち、どの生薬が有効かを調べるために、それぞれ 8 日間心臓移植後に投与した。まず、2 g/kg/day を一律に投与した。すると MST はそれぞれ当帰 (7日), 川芎 (14日), 芍薬 (12日), 蒼朮 (8日), 茯苓 (18日), 沢瀉 (8日) となり、いずれの生薬も当帰芍薬散と同等の心臓移植片生着延長効果は認められなかった (表1)。さらに、当帰芍薬散 (2 g/kg/day) の構成割合に従った分量で投与したが、MST はそれぞれ当帰 (8日), 川芎 (7日), 芍薬 (8日), 蒼朮 (7日), 茯苓 (11日), 沢瀉 (11日) となり、いずれの生薬

も当帰芍薬散と同等の心臓移植片生着延長効果は認められなかった (表2)。

当帰芍薬散の投与によって心臓移植片の生着延長がもたらされたが、200日間生着していた心臓移植片を摘出して組織学的に調べた。その組織像では、炎症細胞の浸潤は軽度で、冠動脈の内膜肥厚もわずかであった。(図2)。

当帰芍薬散の経口投与におけるマウス内での作用を調べるために、MLR と、その上清の ELISA を行った。その結果、当帰芍薬散投与群は非投与群に比べて細胞の増殖が抑制された (図3)。IFN- γ の産生は当帰芍薬散非投与群 0.34 $\mu\text{g/ml}$ に対して、当帰芍薬散投与群 0.19 $\mu\text{g/ml}$ と有意に抑制された (図4)。IL-2, IL-10 は、それぞれ当帰芍薬散非投与群 1.95 ng/ml, 1.30 ng/ml に対し、当帰芍薬散投与群は 1.51 ng/ml, 1.52 ng/ml で、いずれも有意差は認めなかった。また、IL-4 は当帰芍薬散非投与群、投与群ともに今回の測定限界値 (0.78 ng/ml) 以下であった。

当帰芍薬散を経口投与して移植片の生着が延長したが、その効果に免疫制御細胞が関与するのかを調べるために、細胞移入実験を行った。まず対照として、無処置の CBA マウスの脾細胞を静脈投与した無処置の CBA レシピエント (第二の CBA レシピエント) に C57BL/6 マウスの心臓を移植すると、

図3 混合白血球培養試験 (MLR) の結果

心臓移植14日後の当帰芍薬散を投与していないCBAレシピエントと、当帰芍薬散を投与したCBAレシピエントと、無処置のCBAマウスの脾細胞 (2.5×10^6 cells/ml) をResponder細胞として、無処置のC57BL/6マウスの脾細胞 (5×10^6 cells/ml) をStimulator細胞としてMLRをした。マウス1匹のResponder細胞あたり組織培養皿12穴の平均値をとり、同操作をそれぞれ3回繰り返し行い、3匹の平均値を計測した。

**は、当帰芍薬散非投与群と比較して、当帰芍薬散投与群の細胞の増殖が抑制され、 $P < 0.01$ の有意差を認める。

図4 MLR 上清のインターフェロン-γ産生量

MLR 培養液の上清のIFN-γの産生量を酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。マウス1匹あたり組織培養皿12穴の平均値をとり、同操作をそれぞれ3回繰り返し行い、3匹の平均値を計測した。

**は、当帰芍薬散非投与群と比較して、当帰芍薬散投与群に $P < 0.01$ の有意差を認める。

図5 C57BL/6の心移植後に当帰芍薬散を投与されたCBA脾細胞の移入による生着延長効果

C57BL/6マウスの心臓を移植して当帰芍薬散を投与し、心臓移植片を30日受け入れているCBAレシピエント、または無処置のCBAマウスの脾細胞（ 5×10^7 個）を、無処置のCBAマウス（第二のレシピエント）に静脈投与し、C57BL/6マウスの心臓を移植した。

**は、無処置群と比較して、 $P < 0.01$ の有意差を認める。

図6 CD4陽性細胞中のCD25陽性細胞の割合

C57BL/6の心臓を移植後30日目の当帰芍薬散を投与していないCBAレシピエントと、心臓移植後当帰芍薬散を投与したCBAレシピエントと、無処置のCBAマウスから脾細胞を採取し、抗CD4、CD25蛍光色素標識した抗体で染色して、FACS Caliburで分析した。CD4陽性細胞中のCD25陽性細胞の割合を示す。それぞれマウス3匹の平均値を計測した。左図のR2は心移植30日目の当帰芍薬散投与群の脾細胞中のCD4陽性細胞の割合、R3はR2中のCD25陽性細胞の割合を示す。

*は、当帰芍薬散非投与群と比較して $p < 0.05$ の有意差を認める。

MSTは12日で拒絶された。そこで、当帰芍薬散を投与され、C57BL/6マウスからの心臓移植片を30日受け入れているCBAレシピエントの脾細胞を、第二のCBAレシピエントへ静脈投与して、C57BL/

6マウスの心臓を移植すると、MSTは100日以上に延長した（図5）。この結果から、当帰芍薬散を経口投与されたCBAレシピエントに免疫制御細胞が誘導されたことが判明した。また、CD4陽性細胞、

図7 CD4陽性細胞中のFOXP3陽性細胞の割合

C57BL/6の心臓を移植後30日目の当帰芍薬散を投与していないCBAレシピエントと、心臓移植後当帰芍薬散を投与したCBAレシピエントと、無処置のCBAマウスから脾細胞を採取し、抗CD4、FOXP3蛍光色素標識した抗体で染色して、FACS Caliburで分析した。CD4陽性細胞中のFOXP3陽性細胞の割合を示す。それぞれマウス3匹の平均値を計測した。左図のR8は心移植30日目の当帰芍薬散投与群の脾細胞中のCD4陽性細胞の割合、R9はR8中のFOXP3陽性細胞の割合を示す。

*は、当帰芍薬散非投与群に比較して $p < 0.05$ の有意差を認める。

CD25陽性細胞、FOXP3陽性細胞の割合についてフローサイトメーターで分析すると、当帰芍薬散投与群では無処置群に比べて、CD4陽性細胞中のCD25陽性細胞(図6)、CD4陽性細胞中のFOXP3陽性細胞(図7)および、CD25陽性細胞中のFOXP3陽性細胞(図8)の比率が増加した。

考察及び結論

移植免疫学という現代西洋医学的分野のひとつから、漢方薬の有効性を確かめる実験を行った。着目した漢方薬は当帰芍薬散である。当帰芍薬散について、最近ではエストロゲン様効果による更年期症候群治療の可能性⁷⁾や子宮内発育遅延改善への関与の可能性⁸⁾、鉄欠乏性貧血に対する有効性⁹⁾などの実験的研究報告があり、免疫修飾に有効だとの報告¹⁵⁾¹⁶⁾も散見されるが、同種異系臓器移植免疫に関する研究報告はない。

まず、マウスの心臓移植モデルは手術用の顕微鏡を用いて行われる。ドナーの上行大動脈をレシピエントの腹部大動脈に、ドナーの肺動脈をレシピエントの下大静脈にそれぞれ10-0のナイロン糸で端側吻合する¹⁰⁾。ドナーの心臓がレシピエントの腹部に移植される異所性心臓移植である。血流はレシピエントの腹部大動脈から、ドナーの上行大動脈に流れ

込み、大動脈弁があるために左室には流入せず、冠状動脈から心臓を環流し、冠状静脈から右房に入る。そして右室から肺動脈に至り、そしてレシピエントの下大静脈に流れ込む。遺伝子が全く同じマウス(一卵性と同じ)ではレシピエントが生存しているかぎりドナーの心臓は拍動を続ける。一方でMHCが完全不一致であると通常7から8日で移植心は拒絶され、拍動を停止する⁵⁾⁶⁾。異所性心臓移植であるのでドナーの心臓が拒絶されてもレシピエントは生存する。移植心の拍動を毎日腹部の触診で調べ、停止したと判断したマウスは麻酔下に開腹し、直視下に心拍動の停止を確認した。そして停止した移植心を摘出し病理検体とした。生着期間は、移植されたマウスの数が膨大であれば正規分布をするが、通常の実験数では正規分布をしないため生存中間値(MST)をもって拒絶日とし、それぞれの群を比べた。

今回の実験ではレシピエントをCBA-H2^kとし、ドナーをC57BL/6-H2^bとした。MHCが完全に異なる組み合わせである。この組み合わせでは、拒絶のMSTは7日であった(図1)。サイクロスポリンやFK506などの強力な従来型の免疫抑制剤を連日投与すれば、CBAレシピエントにおけるC57BL/

図8 CD25陽性細胞中のFOXP3陽性細胞の割合

C57BL/6の心臓を移植後30日目の当帰芍薬散を投与していないCBAレシピエントと、心臓移植後当帰芍薬散を投与したCBAレシピエントと、無処置のCBAマウスから脾細胞を採取し、抗CD25、FOXP3蛍光色素標識した抗体で染色して、FACS Caliburで分析した。CD25陽性細胞中のFOXP3陽性細胞の割合を示す。それぞれマウス3匹の平均値を計測した。左図のR10は心移植30日目の当帰芍薬散投与群の脾細胞中のCD25陽性細胞の割合、R11はR10中のFOXP3陽性細胞の割合を示す。

*は、当帰芍薬散非投与群に比較して $p < 0.05$ の有意差を認める。

6の心臓移植片の生着期間が有意に延長する⁶⁾¹⁷⁾。この組み合わせに当帰芍薬散も有効かを調べた。投与量は2 g/kg/dayとして8日間、移植後より連日強制的に胃内まで経口投与用金属管を挿入して投与した。通常の成人投与量は7.5 g/dayであるから、通常投与量の十数倍となる。ラットにおいては当帰芍薬散経口投与の無毒性量は2 g/kg/day以上と推定されており¹⁸⁾、本実験でもこの投与量で薬剤の副作用で死亡したマウスは皆無であった。そして、MSTは60日に延長し、100日以上心臓を受け入れたマウスもあった(図1)。

当帰芍薬散は当帰、川芎、芍薬、蒼朮、茯苓、沢瀉からなる。どの薬剤が有効かを調べるために、それぞれの薬剤を2 g/kg/dayで8日間連日移植後より投与したが、当帰芍薬散と同じ結果は得られなかった(表1)。また、当帰芍薬散を構成する生薬の割合にしたがって、それぞれの生薬の分量を調節して投与したが、同様に当帰芍薬散と同じ結果は得られなかった(表2)。これにより、当帰芍薬散の6種類の生薬の中に特別な作用を示す単一の成分があると考えられるよりも、6種類の生薬のコンビネーションが大切ということが暗示された。これを明確にするためには一味抜きの当帰芍薬散を作成すれば

いいのであるが、今回はこの実験は行っていない。

当帰芍薬散を心臓移植後8日間投与されたマウスの脾細胞のMLRを行うと、アロ抗原に対する増殖が、当帰芍薬散非投与群の脾細胞と比較すると明らかに抑制されており(図3)、またELISAでIFN- γ の産生も明らかに減少していた(図4)。なんらかの免疫抑制作用が働いていることは明らかである。

当帰芍薬散によってRegulationが起きているかを調べるため、細胞移入実験を行った。移植片の拒絶が起こっていないレシピエントから細胞(通常は脾細胞)を取り出し、これを無処置のレシピエントに静脈注射して、ドナーの心臓を移植する。この移入した細胞のなかに免疫制御細胞があれば、拒絶日が8日前後から延長するはずである。そして予想した通り、C57BL/6の心臓を移植後に、当帰芍薬散を投与されたCBAレシピエントの脾細胞を移入された第二のCBAレシピエントは、C57BL/6の心臓を長期にわたって受け入れたのである(図5)。すなわち、当帰芍薬散の投与によって免疫制御細胞が誘導されたことが判明した。

また、免疫制御細胞の重要なひとつの分画はCD4陽性CD25陽性FOXP3陽性T細胞と考えられている。CD4陽性CD25陽性のフェノタイプを有す

る制御性T細胞は、臓器移植後の免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことが示唆されており¹⁹⁾²⁰⁾、FOXP3は制御性T細胞の分化と機能を決定するマスターコントロール遺伝子で、制御性T細胞に特異性が高いとされており、CD4陽性CD25陽性制御性T細胞の重要なマーカーとして知られている²¹⁾²²⁾。われわれの研究グループの実験モデルでもアンチロトンビンⅢ³⁾、シクロオキシゲナーゼ2阻害薬⁴⁾、サルボグレラート⁵⁾、ヒスタミンH2受容体拮抗薬⁶⁾はCD4陽性制御性細胞を誘導して組織適合抗原完全不一致マウス移植心の生着を延長することが判明し既に報告した。そこで、フローサイトメーターでCD4陽性細胞中のCD25陽性細胞、CD4陽性細胞中のFOXP3陽性細胞、CD25陽性細胞中のFOXP3陽性細胞の分画を調べると、当帰芍薬散投与群において増加していた(図6, 7, 8)。よって、この実験からも免疫制御細胞の関与が示唆される。

当帰芍薬散が移植片の拒絶抑制に有効であるならば、今日の西洋薬学的考え方では、当帰芍薬散の中から有効な薬剤を分離して、人工的に生成したいと考える。しかし、当帰芍薬散を構成するどの生薬も単独では当帰芍薬散と同じようには有効ではなかった。つまり、ひとつの有効な薬剤を見つけるということには今回の実験は結びつかない。当帰芍薬散の6味すべてが必要とは言えないが、少なくとも複数の生薬の組み合わせで今回の結果が得られたのである。長い歴史を通じ、膨大な人体実験を繰り返して得られた当帰芍薬散という漢方薬は、その中のある物質が大切と考えるよりも、当帰芍薬散という生薬の総和である漢方薬として効力をもつことが確認された。

謝辞 稿を終えるにあたり、帝京大学医学部外科宮澤幸久教授に感謝の意を表します。また、ご指導ご校閲頂きました帝京大学医学部外科新見正則准教授に深甚なる謝意を表します。さらに、終始多大なるご指導ご校閲を頂きました張琦先生、岩見大基先生に深謝いたします。そして、生薬を提供して頂きました慶應義塾大学医学部漢方医学センターの先生方に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 1) Complementary medicine is booming worldwide, *BMJ*, 313, 131-133, 1996
- 2) 崎山武志, 石野尚吾, 渡辺賢治, Plotnikoff GA, 許鳳浩, Froehlich C, Pflueger K, 柳澤紘: なぜ, 今, 日本漢方か 世界各国の医師が日本漢方を選ぶ理由と自国の事情あるいは普及, *日東医誌*, 59, 99-118, 2009
- 3) Aramaki O, Takayama T, Yokoyama T, Takano S, Akiyama Y, Shibutani S, Matsumoto K, Shimazu M, Kitajima M, Ikeda Y, Shirasugi N, Niimi M: High dose of antithrombin III Induces indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates regulatory cells. *Transplantation*, 75, 217-220, 2003
- 4) Yokoyama T, Aramaki O, Takayama T, Takano S, Zhang Q, Shimazu M, Kitajima M, Ikeda Y, Shirasugi N, Niimi M: Selective cyclooxygenase 2 inhibitor induces indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates CD 4 + regulatory cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130, 1167-1174, 2005
- 5) Akiyoshi T, Zhang Q, Inoue F, Aramaki O, Hatano M, Shimazu M, Kitajima M, Shirasugi N, and Niimi M: Induction of indefinite survival of fully mismatched cardiac allografts and generation of regulatory cells by sarpogrelate hydrochloride. *Transplantation*, 82, 1051-1059, 2006
- 6) Inoue F, Zhang Q, Akiyoshi T, Aramaki O, Iwami D, Matsumoto K, Kitagawa Y, Shirasugi N, and Niimi M: Prolongation of survival of fully allogeneic cardiac grafts and generation of regulatory cells by a histamine receptor 2 antagonist. *Transplantation*, 84, 1288-1297, 2007
- 7) Chung MH, Suzuki S, Nishihara T, and Hattori M: Estrogenic effects of a Kampo formula, Tokishakuyakusan, in parous ovariectomized rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 1145-1149, 2008
- 8) Takei H, Iizuka S, Yamamoto M, Takeda S, Yamamoto M, and Arishima K: The herbal medicine Tokishakuyakusan increases fetal blood glucose concentrations and growth hormone levels and improves intrauterine growth retardation induced by Nω-Nitro-L-arginine methyl ester. *J. Pharmacol. Sci.*, 104, 319-328, 2007
- 9) Akase T, Hihara E, Shimada T, Kojima K, Akase T, Tashiro S, and Aburada M: Efficacy of Tokishakuyakusan on the anemia in the iron-deficient pregnant rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1523-1528, 2007
- 10) Niimi M: The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: experience of 3000 operations by one surgeon. *J. Heart. Lung. Transplant.*, 20, 1123-1128, 2001
- 11) 古賀規貴, 小菅寿徳, 磯部光章: 移植拒絶心と免疫応答, *循環器*, 53, 288-293, 2003
- 12) Labarrere CA, Nelson DR, and Park JW: Pathologic markers of allograft arteriopathy: insight into the pathophysiology of cardiac allograft chronic rejection. *Curr. Opin. Cardiol.*, 16, 110-117, 2001
- 13) Akiyama Y, Shirasugi N, Uchida N, Matsumoto K, Kitajima M, Bashuda H, Yagita H, Okumura K, Aramaki O, and Niimi M: B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. *Transplantation*, 74, 732-738, 2002

- 14) Perros P, Weightman DR : Measurement of cell proliferation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. *Cell Prolif.*, 24, 517-523, 1991
- 15) 宋清華, 飯島宏治, 小林崇雄, 斎藤奈生子, 鳥居塚和生, 丁宗鐵 : 自己免疫疾患モデルマウスに対する当帰芍薬散の影響, *和漢医薬誌*, 14, 440-441, 1997
- 16) 早川智, 佐藤和雄 : 当帰芍薬散による Th 優位の誘導と $\gamma\delta$ T 細胞による allo 免疫応答の抑制, *産婦漢方研のあゆみ*, 15, 9-13, 1998
- 17) Yamada A, Murakami M, Iijima K, Yagita H, Okumura K, Komatsu S, and Uede T : Long-Term Acceptance of Major Histocompatibility Complex-Mismatched Cardiac Allograft Induced by a Low Dose of CTLA 4 IgM Plus FK506. *Microbiol. Immunol.*, 40, 513-518, 1996
- 18) 勝亦芳裕, 安田浩太郎, 植松正伸, 竹井久人, 前村俊一 : ツムラ当帰芍薬散 (TJ-23) のラットを用いた経口投与による生殖・発生毒性試験単一試験計画法, *薬理と治療*, 25, 1551-1564, 1997
- 19) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, and Ono M : Regulatory T cells and immune tolerance, *Cell*, 133, 775-787, 2008
- 20) Wood KJ, Sakaguchi S : Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 199-210, 2003
- 21) Fontenot JD, Gavin MA, and Rudensky AY : Foxp 3 programs the development and function of CD 4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 4, 330-336, 2003
- 22) 堀昌平 : 転写因子 Foxp 3 による制御性 T 細胞分化と機能の抑制, *実験医*, 25, 2839-2844, 2007