

難治性喘息の治療に関する研究

第 2 編

モルモット喘息モデルにおけるリンパ球 機能に対する柴朴湯の効果

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

岡 本 章 一

(平成 6 年 1 月 11 日受稿)

Key words : Saiboku-to, serum level, actively sensitized model, lymphocyte

緒 言

気管支喘息は、アトピー型と非アトピー型の 2 つの病型に大別されており、アトピー型喘息は小児喘息に代表され、IgE を介する I 型アレルギー反応により発症し、即時型気道反応が中心となる病態である。これに対し非アトピー型喘息、特に木村により提唱されている中高年発症型難治性喘息 (late onset intractable asthma, LOIA)¹⁾ の概念に代表される症例は、III 型および IV 型アレルギー反応を包含するいわゆる細胞反応型アレルギーが深く関与し、遅発型気道反応 (late asthmatic response, LAR) あるいは遅延型気道反応 (delayed asthmatic response, DeAR) がその難治化の中心を成す病態と考えられている。従って気管支喘息の治療には、かかる病態に応じた治療薬の選択が必要となる。

著者は第 1 編において漢方薬の柴朴湯がモルモットの細胞反応型アレルギーのうち特にリンパ球機能の抑制効果を介して LAR を抑制することを明らかにした。一方、気管支喘息患者における柴朴湯の臨床効果²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ は周知の如くであるが、その薬理作用機序として in vitro でのリンパ球機能に対する抑制効果を示すいくつかの報告⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾ がある。しかし漢方方剤は種々の成分から構成されており、その全成分が分析されているわけではない。さらにサイコサポニンのよ

うに、生体内でその構造式が変化すると同時にその薬理作用も変化する成分を含んでおり⁹⁾、柴朴湯の血中濃度及び in vivo と in vitro における効果の相関を表すことは困難である。そこで本編では細胞反応型アレルギーの要となるリンパ球機能への効果という観点から、柴朴湯を服用させたモルモットの血清を用いた in vitro でのリンパ球幼若化反応の抑制効果並びに柴朴湯抽出液添加によるリンパ球幼若化反応の抑制効果を測定し、in vitro と in vivo での効果の相関から、内服した柴朴湯の血中濃度を推測することを試みた。

対 象 と 方 法

(1) 能動感作モルモットの作製

約 200g の Hartley 系雄モルモットを用い、飯島らの方法¹⁰⁾ の変法にて感作した。すなわち、抗原として Pig Ascaris suum (1/10W/V, Greer Laboratories, USA) 0.1ml をアジュバントの水酸化アルミニウム 10mg とともに生理食塩水で溶解して 1.0ml とし、2 週間間隔で 3 回腹腔内に注射をすることにより感作を行った。

(2) 柴朴湯抽出液の作製

柴朴湯抽出液は、柴朴湯 20mg を RPMI 10ml で加熱溶解 (60℃, 1 時間) 後、遠沈して得た上清をミリポアフィルター (Millex HA 0.45µm) で濾過して作製した。得られた抽出液を RPMI で希釈して各種濃度の抽出液を作製した。なお

抽出液の濃度は最終濃度で表した。

(3) 柴朴湯投与モルモットの血清採取方法

岡山大学動物実験施設で順化飼育した無感作のモルモット24匹を、投与した柴朴湯の混合飼料の濃度で以下の5群に分けた。すなわちA群(n=3), B群(n=6), C群(n=6), D群(n=3)にそれぞれ0.25%, 0.5%, 1.25%, 5.0%の柴朴湯混合飼料を1週間投与し、コントロールとしてE群(n=6)には柴朴湯を混合していない飼料を1週間投与した。投与終了後心臓採血にて血清を採取し、リンパ球幼若化反応の測定まで-20℃で凍結保存した。

(4) リンパ球幼若化反応の測定法

感作モルモットから心内穿刺により20ml採血を行い、モルモット用のリンパ球比重分離液(日本抗体研究所)にて単核球層を分離採取し、RPMI 1640(GIBCO)にて2回洗浄後、10% fetal calf serum (FCS) 加 RPMI 1640にて 1×10^6 /mlに調整し浮遊液を作製した。かかる浮遊液を96 well tissue culture cluster (Coster) に100 μ lずつ triplicate にて分注し、それらの各 well に Ascaris 抗原液(感作用抗原液を RPMI 1640 にて50倍希釈)および対照として RPMI 1640 を50 μ lずつ添加後、柴朴湯抽出液もしくは得られた血清を50 μ lずつ添加して37℃のCO₂ incubator にて3日間培養した。培養後各 well に ³H-thymidine (³H-TdR) 0.2 μ Ci を添加し、24時間培養後細胞を回収し、液体シンチレーションカウンターにて³H-TdR の取り込み値(dpm)を測定した。(Fig. 1)なお抗原添加と非添加の平均 dpm 値の比が3.0以上である場合に抑制率の判定をし、抽出液添加では7例、血清添加では9例で抑制率を判定した。

(5) 抽出液および血清添加の薬理効果の判定と cytotoxicity の検討

血清添加での効果の評価は、E群の血清を添加した時の値の平均を基準値とし、抑制率(%) = [(基準値 - 各血清添加時の値) ÷ 基準値] × 100 により検討した。また抽出液添加での効果の評価は、抑制率(%) = [(薬剤無添加時の値 - 薬剤添加時の値) ÷ 薬剤無添加時の値] × 100 により検討した。さらに、抽出液および血清添加による単核球の viability を、trypan blue dye

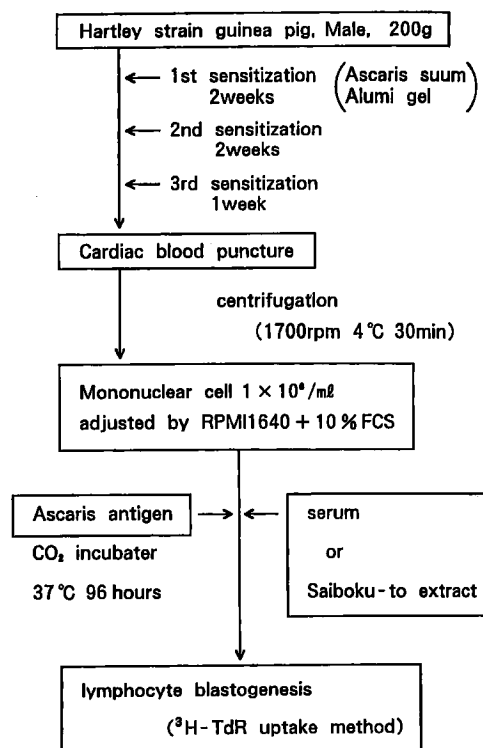


Fig. 1 Method for lymphocyte blastogenic response to ascaris antigen.

exclusion test および培養上清中の lactate dehydrogenase (LDH) 値の測定により検討した。その結果今回使用した薬剤には細胞の直接的な cytotoxicity のないことが確認された。

(6) 推計学的検定

得られた測定値は mean ± SD として表示し、その有意差検定は student's test を用い p value は p < 0.05 を有意差ありとした。

結 果

(1) 柴朴湯抽出液のリンパ球幼若化反応に及ぼす作用

1, 10, 100 及び 500 μ g/ml の最終濃度の柴朴湯エキスを添加した際のアスカリス抗原刺激によるリンパ球幼若化反応の抑制率は、Fig. 2 に示す如く濃度依存性に上昇し、明らかな柴朴湯の抑制効果が認められた (p < 0.01)。

(2) 柴朴湯を投与したモルモット血清のリンパ球幼若化反応に及ぼす影響

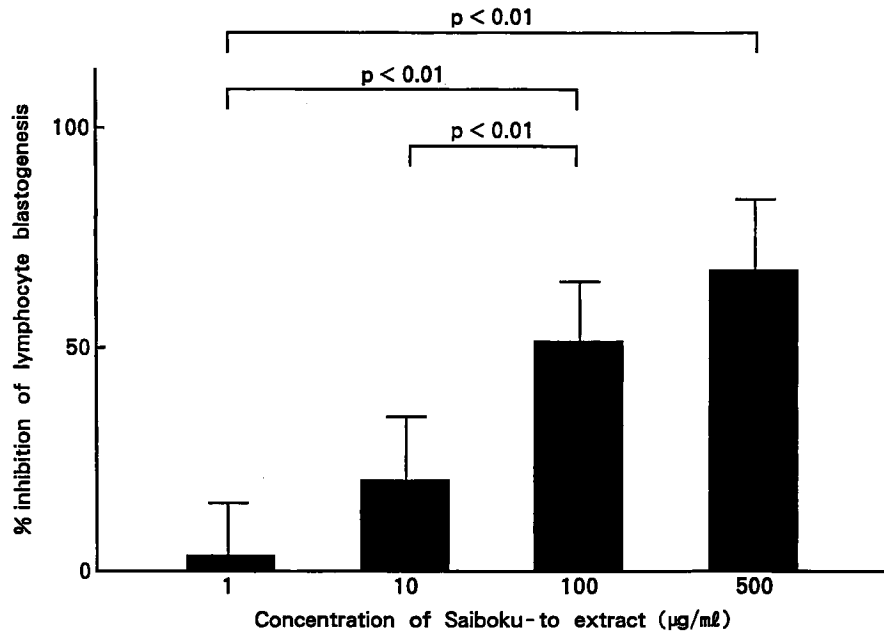


Fig. 2 Effect of the direct addition of extracts of Saiboku-to (TJ96) on lymphocyte blastogenic response to ascaris antigen.

①各群における柴朴湯投与量

飼料摂取量より求めた柴朴湯 1 日平均投与量は、A群、B群、C群及びD群でそれぞれ200, 508, 1300及び5230mg/kgであった。

②各群の血清を添加した際のリンパ球幼若化反応に及ぼす作用

対照のE群の血清を添加した際のリンパ球幼若化反応 (SI) の平均値を基準値とし、各群の血清添加時の SI 値の抑制率を求めると Fig. 3 の如く、A群が最も低く、次いでB群、C群及びD群の順に有意に高率となった。すなわち柴朴湯投与量の多いモルモットの血清ほど、リンパ球幼若化反応の抑制効果が著明であった。

(3)柴朴湯常用量服用時の血中濃度の予測

本薬剤のリンパ球機能抑制効果という観点から、以上の如き抽出液添加実験の成績と血清添加実験の成績とを対比する事により、ヒトでの柴朴湯常用量服用時の血中濃度を測定した。まず対数変換した柴朴湯一日投与量と血清を添加した際のリンパ球幼若化反応の抑制率との間には Fig. 4 の如き有意な正の相関 ($r=0.77$, $p<0.01$) が認められ、 $y=36.0986x_1-75.5129$ (y :

リンパ球幼若化反応抑制率, x_1 : 対数変換した柴朴湯投与量) の回帰直線が得られた。また同様に対数変換した抽出液濃度とリンパ球幼若化反応の抑制率との間にも Fig. 5 の如く有意な正の相関 ($r=0.99$, $p<0.01$) が認められ、 $y=25.5495x_2-0.7939$ (y : リンパ球幼若化反応抑制率, x_2 : 対数変換した柴朴湯抽出液最終濃度) の回帰直線が得られた。

そこで両群のリンパ球幼若化反応の抑制率を共通項として、これらの回帰直線から添加血清における柴朴湯投与量と添加した柴朴湯抽出液濃度の関係を表す関係式を求めた。まず血清添加実験における相関より、相関関係式 $y=36.0986x_1-75.5129$ (y : リンパ球幼若化反応抑制率, x_1 : 対数変換した柴朴湯投与量) が得られた。さらに抽出液添加実験では、血清添加実験と比較するため、添加した柴朴湯抽出液濃度すなわち最終濃度の 4 倍量とリンパ球幼若化反応抑制率との間の関係式を求め、相関関係式 $y=25.5495x_3-16.1762$ (y : リンパ球幼若化反応抑制率, x_3 : 対数変換した柴朴湯抽出液濃度) が得られた。これらの二式より柴朴湯投与量と抽出液濃

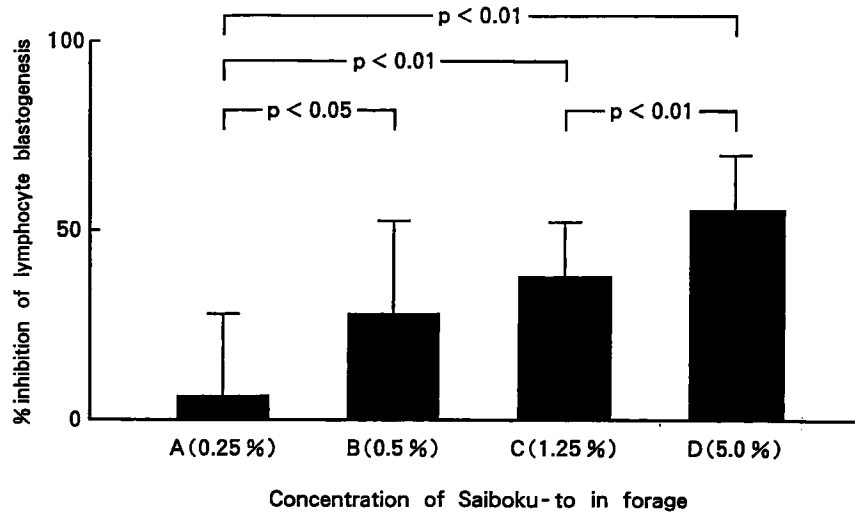


Fig. 3 Effect of serum obtained from guinea pigs orally treated with Saiboku-to (TJ96) on lymphocyte blastogenic response to ascaris antigen.

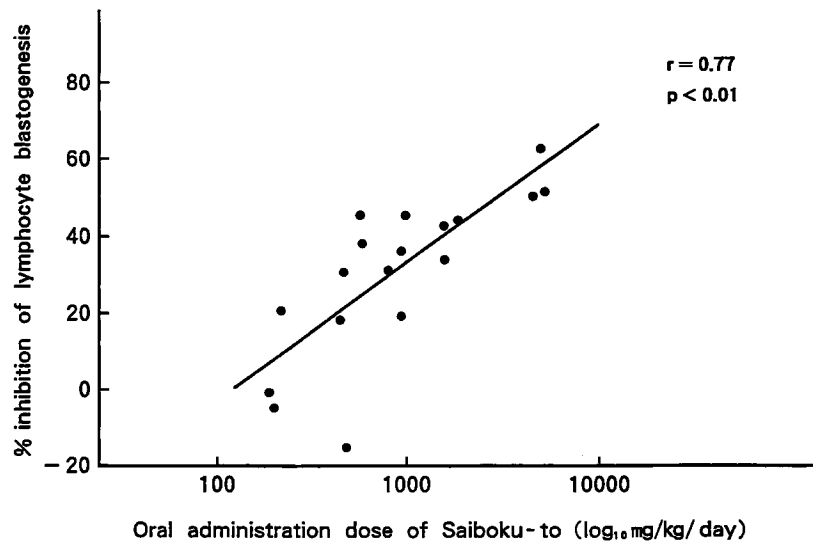


Fig. 4 Correlation between lymphocyte blastogenic response to ascaris antigen and serum obtained from guinea pigs orally treated with Saiboku-to (TJ96).

度の関係を表す関係式 $x_3 = 1.413x_1 - 2.322$ (x_3 : 対数変換した柴朴湯抽出液濃度, x_1 : 対数変換した柴朴湯投与量) が得られた。(Fig. 6)

かかる関係式は柴朴湯投与量とその際の血中濃度の関係を示唆する式と考えられる。そこでこの式をヒトに応用すると、まず柴朴湯のヒト常用量は成人で1日7.5gであるが、体重を50kg

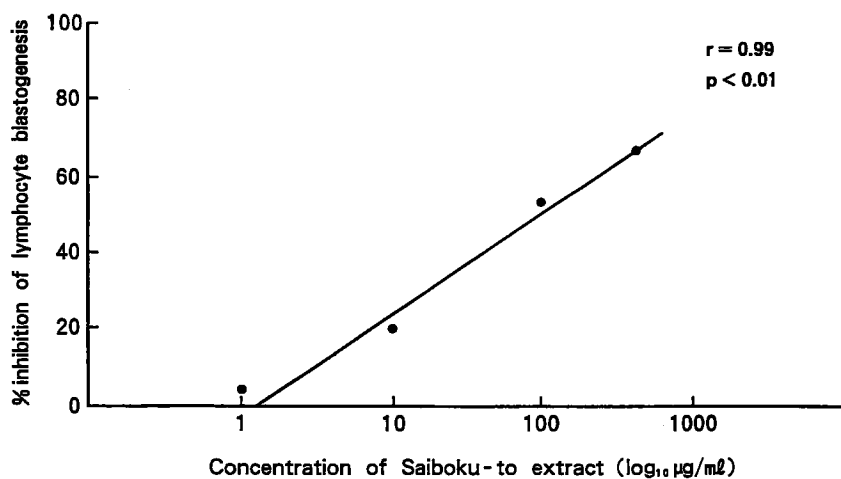


Fig. 5 Correlation between lymphocyte blastogenic response to ascaris antigen and extracts of Saiboku-to (TJ96).

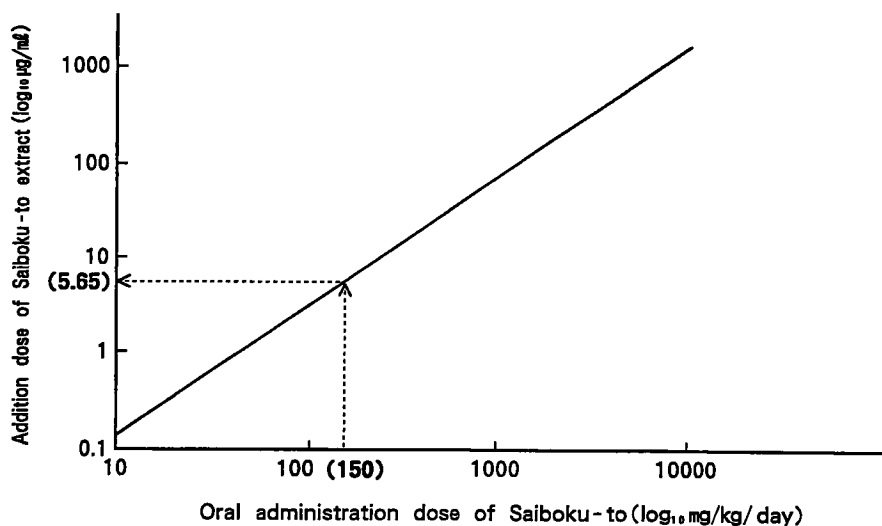


Fig. 6 Relation between extracts of Saiboku-to (TJ96) and serum obtained from guinea pigs orally treated with Saiboku-to (TJ96).

で考えると体重あたりの一日投与量は150mg/kg/dayである。この数値を今回得られた関係式に代入すると、同等のリンパ球幼若化反応を抑制するのに要する柴朴湯の抽出液濃度が得られる

(5.65µg/ml)。すなわちリンパ球機能抑制効果の観点からみるとヒトにおける柴朴湯常用量服用時の血中濃度は5.65µg/mlと推測された。

考 察

気管支喘息の治療薬は、近年解明されつつある複雑な病態に対応すべく数多くのアレルギー薬が開発されている。またそれにともない和漢薬もまた西洋医学的手法でその薬理作用が明らかにされつつあるが、和漢薬の特性の故にヒトでの血中薬物濃度の直接的な測定方法はいまだ不可能なようである。そこで本編は、第1編で明らかにした柴朴湯の薬理作用のうち最も重要と考えられるリンパ球機能の抑制効果を通じて、血清薬理学的手法を用いてヒトでの血中柴朴湯濃度の予測を試みた。その結果、柴朴湯はその製剤抽出液中にリンパ球機能を抑制する成分を含んでおり、また生体内で代謝された後の血清中の代謝産物にもリンパ球機能抑制作用のあることが確認された。かかる薬理作用の観点からみると、ヒトにおける柴朴湯常用量服用時の血中柴朴湯濃度は $5.65\mu\text{g/ml}$ と推測された。

気管支喘息病態におけるリンパ球の役割は、IgE抗体産生系におけるT細胞によるregulationのみならず¹¹⁾、好中球、好酸球、好塩基球などのeffector cellに対する種々のリンホカインを産生することにより、直接的あるいは間接的に関与しているものと考えられている。Dunnillら¹²⁾は喘息死の気道粘膜には好酸球と共にリンパ球の著しい浸潤が認められることを報告し、宮川ら¹³⁾は重症難治性喘息患者で抗原特異的なIL-2およびNCF産生能の亢進を報告している。最近有症期の気管支喘息患者のBALF中にIL-2をはじめとする種々のサイトカインが増加している報告¹⁴⁾や、動物モデルにおいてIL-2投与による気道反応の増強を認めた報告¹⁵⁾などからも気道反応に対するリンパ球の直接的な関与が示唆されている。さらにT細胞機能抑制剤であるcyclosporinAの気管支喘息に対する有効性¹⁶⁾¹⁷⁾や、動物モデルでのLARの抑制¹⁸⁾などが報告されており、気管支喘息特に難治性喘息の治療においてはリンパ球機能を抑制することが重要と思われる。

今回検討した柴朴湯の薬理作用に関しては、江田らがIV型アレルギーの抑制作用¹⁹⁾を報告したのを始め、これまでに様々な報告がなされて

いる。難治性喘息の治療薬として柴朴湯を考えた場合、細胞反応型アレルギーに対する抑制作用がその薬理作用として重要である。柴朴湯は10種類の生薬から構成されているが、その中でかかる抑制作用を示す成分として、柴胡に含まれるサイコサポニン、半夏に含まれるフェルラ酸、黄芩に含まれるバイカレン、甘草に含まれるグリチルリチン、厚朴に含まれるK-16Cなどが知られている。柴朴湯の薬理作用はこれらの様々な物質の相互作用によるものと考えられている。

柴朴湯がモルモット喘息モデルにおいてin vivoでのリンパ球機能抑制効果を示すことは第1編で報告したが、ヒトのリンパ球機能に対する抑制作用についてはin vitroでのいくつかの報告⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾がある。しかし柴朴湯は漢方方剤の特殊性のため、in vitroでの効果とin vivoでの効果の相関が不明瞭である。萩原はこの点について、漢方方剤を直接添加した場合と、一度体内の代謝系を通した場合では薬理作用が異なる可能性を示唆しており、その薬理作用の解明には血清薬理学的方法が有用であると述べている⁹⁾。そこで今回、血清薬理学的方法で柴朴湯のリンパ球に対する抑制効果を検討したところ、柴朴湯の代謝産物を含む血清には投与量に依存した抑制効果が認められ、ヒト常用量の柴朴湯服用時の柴朴湯血中濃度は $5.65\mu\text{g/ml}$ と推測された。

今回の実験は血清を用いた実験であったため、柴朴湯を投与して得られた血清のリンパ球幼若化反応の抑制効果が、柴朴湯の代謝産物単独の薬理効果であるのかそれとも代謝産物と血清中に生理的に含まれている成分の相互作用による薬理効果であるのかは不明である。またヒトとモルモットの種の差も考えられる。この点について考えてみると、江田⁵⁾により報告されたヒト末梢血単核球からのIL-2およびNCA産生抑制作用では、 $100\mu\text{g/ml}$ の濃度ではそれぞれ9.6%、8.2%の抑制率であり、強い抑制作用は認められていない。また中島らは $500\mu\text{g/ml}$ の柴朴湯添加で、ダニ抗原によるヒトリンパ球IgE-Fcレセプターの誘導を抑制し、リンパ球培養上清による好酸球の気道線毛運動傷害を抑制すると報告している⁶⁾⁷⁾。これらの報告ではいずれも今回推

定された血中濃度よりも高濃度での抑制効果を示しており、また柴朴湯抽出液添加実験で $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でのリンパ球幼若化反応の抑制率が52.28%であったことから、上述の実験とは測定系が異なるが、モルモットに比してヒトのリンパ球に及ぼす抑制効果は弱い可能性が考えられる。in vivoにおいて、モルモット喘息モデルでは1週間という短期間投与で効果を発現するのに対し、ヒトでは投与開始から効果発現まで数ヶ月が必要である。その理由として、ヒトでは弱いリンパ球機能抑制作用を長期間作用させることにより効果が発現する可能性が考えられた。一方、これら高濃度での抑制作用が報告されているのに対し、冠木ら⁸⁾は $30\mu\text{g}/\text{ml}$ という低濃度の柴朴湯添加でIL-2存在下でのリンパ球の反応性の誘導が抑制されることを報告し、その薬理作用点としてT細胞よりもむしろ抗原提示細胞に対する柴朴湯の抑制作用を想定しており、本剤の薬理作用を考える上で今後さらに各方面からの検討が必要と考えられた。

結 論

生体内での柴朴湯代謝産物のリンパ球機能に

及ぼす影響を明らかにし、その薬理作用を応用してヒト常用量での血中柴朴湯濃度を推測する目的で、血清薬理学的手法を用いてリンパ球幼若化反応に対する影響を検討した結果、以下の成績を得た。

- (1)柴朴湯抽出液の添加により、リンパ球幼若化反応は濃度依存性に抑制された ($p<0.01$)。
 - (2)飼料中の柴朴湯濃度が高いほど、その血清添加によるリンパ球幼若化反応は有意に抑制された ($p<0.01$)。
 - (3)それらの抑制率から柴朴湯投与量とその際の血清中濃度の関係を示唆する式が得られた。
- 以上より柴朴湯のリンパ球機能抑制効果は、in vitroのみならず in vivoでの代謝産物でも認められ、ヒトにおける常用量服用時の血中濃度は $5.65\mu\text{g}/\text{ml}$ と推測された。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表しますと共に、直接御指導御助言を頂きました高橋 清講師に深謝致します。

(なお、本論文の要旨は第5回日本アレルギー学会春季臨床大会において発表した。)

文 献

- 1) 木村郁郎：喘息の病型とその本質論 — 中高年発症型難治性喘息の独立性。日本胸部疾患学会雑誌 (1983) 21, 181—182。
- 2) 小林節雄, 笛木隆三, 野口英世, 田中一正, 川合 満, 倉沢卓也, 西山秀樹, 中島重徳, 吾郷晋浩, 長野 準, 井上 夫, 近藤寛治, 江頭洋祐, 山崎 力, 浅井貞宏, 下田照文, 渡辺 尚, 栃木崇男, 櫻田裕一：気管支喘息に対する柴朴湯エキス剤の長期投与効果の検討 — 多施設共同試験結果について —。和漢医薬学会誌 (1985) 2, 598—599。
- 3) 長野 準, 小林節雄, 中島重徳, 江頭洋祐：気管支喘息に対する柴朴湯の長期投与の検討 — 内科領域多施設 open trial による評価 —。呼吸 (1988) 7, 76—87。
- 4) 江頭洋祐：ステロイド依存性気管支喘息に対する、封筒法による柴朴湯投与群, 非投与群の2群比較臨床試験成績報告。漢方と免疫アレルギー (1990) 4, 128—144。
- 5) 江田良輔：難治性喘息の治療に関する研究。重症難治性喘息における柴朴湯の臨床的並びにIV型アレルギー反応に及ぼす影響。岡山医誌 (1990) 102, 1309—1322。
- 6) 中島重徳, 東田有智, 荏原順一, 中野直子, 須永 進：気管支喘息に対する柴朴湯的作用 — グニ抗原によるリンパ球 IgE-Fc 受容体誘導ならびに実験的 IAR, LAR に対する影響 —。漢方と免疫アレルギー (1990) 3, 157—165。
- 7) 山本高宏, 荏原順一, 黄 瑾, 桜田隆一, 浦上理恵, 毛利俊子, 瀬口光代, 倉知 大, 原口龍太, 中野直子, 大川健太郎, 中島重徳：アトピー性喘息患者リンパ球の特異的抗原刺激培養上清の好酸球の気道線毛運

- 動傷害性に対する作用への柴朴湯の影響. アレルギー (1992) **41**, 1033.
- 8) 冠木智之, 野間 剛, 川野 豊, 伊藤雅彦, 吉沢いづみ, 前田和一, 馬場 実: 気管支喘息小児の末梢血リンパ球における抗原特異的 Interleukin2反応性誘導に対する柴朴湯の処理効果. アレルギー (1990) **39**, 610—614.
 - 9) 荻原幸夫: 方剤としての漢方を考える. 漢方と免疫アレルギー (1992) **5**, 132—152.
 - 10) Iijima H, Ishii M, Yamauchi K, Chao C-L, Kimura K, Shimura S, Shindoh Y, Inoue H, Mue S and Takishima T: Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* (1987) **136**, 922—929.
 - 11) Takatsu K and Ishizaka K: Reaginic antibody formation in the mouse. VIII. Depression of the ongoing IgE antibody formation by suppressor T cells. *J Immunol* (1976) **117**, 1211—1218.
 - 12) Dunnill MS: The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol* (1960) **13**, 27—33.
 - 13) 宮川秀文, 難波一弘, 白石高昌, 名部 誠, 榎本 晃, 佐藤 恭, 武田 昌, 多田慎也, 高橋 清, 木村郁郎: 重症難治性喘息におけるⅣ型アレルギーの関与について — カンジダ抗原による IL-2産生能と好中球遊走能 —. アレルギー (1988) **37**, 12—18.
 - 14) Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC and Wasserman SI: Cytokines in symptomatic asthma airways. *J Allergy Clin Immunol* (1992) **89**, 958—967.
 - 15) Renzi PM, Sapienza S, Wasserman S, Du T, Olivenstein R, Wang NS and Martin JG: Effect of interleukin-2 on the airway response to antigen in the rat. *Am Rev Respir Dis* (1992) **146**, 163—169.
 - 16) Alexander A, Barnes NC and Kay AB: Cyclosporin A in chronic severe asthma. A double-blind, placebo-controlled trial. *Am Rev Respir Dis* (1991) **143**, A633.
 - 17) Nancy A, Finnerty MD and Timothy JS: Effect of cyclosporin on corticosteroid dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol* (1991) **87**, 297.
 - 18) 阿久津郁夫, 沼尾利郎, 本乗新司, 福田 健, 牧野莊平: モルモット実験モデルにおける遅発型喘息反応の発現と気道反応性亢進の cyclosporin Aによる抑制. アレルギー (1990) **39**, 483—487.
 - 19) 江田昭英, 西依 健, 永井博弼, 松浦直資, 土屋博司: 和漢薬の抗アレルギー作用 — I型及びⅣ型アレルギー反応に対する作用 —. 日薬理誌 (1982) **80**, 31—41.

Studies on the treatment of intractable asthma
Part 2. Effect of Saiboku-to on lymphocyte function
in the experimental asthma
using guinea pigs

Shoichi OKAMOTO

Second Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Saiboku-to is a useful drug in the treatment of intractable asthmatics. The most important action mechanism of Saiboku-to seems to be a suppression of lymphocyte activation. The relationship between the *in vitro* and *in vivo* effects is not clear because the metabolism of Kampo medicine is unknown. Therefore, in this study two *in vitro* experimental systems were compared to evaluate the pharmacological effect of Saiboku-to on the lymphocyte blastogenesis. The first system involved the addition of serum obtained from guinea pigs treated orally with Saiboku-to, while the second system involved the direct addition of the Saiboku-to extract to the medium.

Saiboku-to has a suppressive effect on lymphocyte blastogenesis and also the metabolite of Saiboku-to had a suppressive effect. According to the formula based on these data, the serum level of Saiboku-to on oral administration of the common dose was assumed to be $5.65\mu\text{g/ml}$ in bronchial asthmatics.

These findings suggest that Saiboku-to may have an inhibitory effect in the cell-mediated allergic reaction by lymphocyte activation *in vivo*.