

四逆散によるマウス移植心の 生着延長効果について

柳澤 貴子

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

A Japanese Herbal Medicine, Shigyakusan, Induces Prolonged Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allografts

Takako YANAGISAWA

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

Abstract

Background : Shigyakusan, a 4-component Japanese herbal medicine (Paeoniae radix, Aurantii fructus immaturus, Glycyrrhizae radix and Bupleuri radix), is used not only for cholecystitis and gastritis as an anti-inflammatory agent, but also for anxiety neurosis and insomnia as an anti-anxiety agent.

Methods : We investigated the effects of shigyakusan on alloimmune responses in fully MHC-mismatched murine cardiac allograft transplantation. CBA mice underwent transplantation of a C57BL/6 heart and received shigyakusan or one component of shigyakusan administered orally from the day of transplantation until 7 days afterward. Histologic studies, cytokine measurements, and flow cytometry assessments were performed.

Results : Untreated CBA recipients acutely rejected C57BL/6 cardiac grafts (median survival times [MST], 7 days). On the other hand, CBA transplant recipients given shigyakusan had significantly prolonged C57BL/6 allograft survival (MST, 22.5 days). MSTs for C57BL/6 transplant recipients given Paeoniae radix, Aurantii fructus immaturus, Glycyrrhizae radix and Bupleuri radix were 11, 9.5, 18.5 and 8 days, respectively. Additionally, flow cytometry studies showed that the percentage of CD25⁺Foxp3⁺ cell populations in CD4⁺ cells was increased in transplant recipients given shigyakusan.

Conclusion : Shigyakusan induced hyporesponsiveness to fully MHC-mismatched allogeneic cardiac allografts and may generate CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in our model.

Key words : shigyakusan, murine cardiac transplantation, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells, transplantation immunology.

要旨

背景：四逆散は芍薬、枳実、甘草、柴胡4つの生薬からなる漢方薬で胆嚢炎、胃炎、不安神経症や不眠症に対して効果を示す。

方法：主要組織適合抗原完全不一致マウス心臓移植モデルを使い四逆散の移植免疫効果を検討した。C57BL/6マウス心臓を移植されたCBAマウスに四逆散や各構成生薬を7日目まで投与し、移植心の病理評価やサイトカイン分析、フローサイトメーター分析を行った。

結果：無治療群CBAレシピエントはC57BL/6マウスの心臓を生存中間値(MST)7日で拒絶した。四逆散投与群のMSTは22.5日で生着延長効果を認め、各構成生薬(芍薬、枳実、甘草、柴胡)のMSTは11, 9.5, 18.5, 8日となった。フローサイトメトリーでは、四逆散投与群のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の比率が増加した。

結論：四逆散は主要組織適合抗原完全不一致マウス心臓移植片に対する拒絶反応を抑制し、免疫制御細胞の比率を増加させた。

キーワード：四逆散, マウス心臓移植, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞, 移植免疫

緒言

近年、抗体医薬の進歩により、移植医療の成績は向上してきている。しかし、非特異的な免疫抑制薬

と同様に、患者は感染症や悪性腫瘍等の副作用に罹患する危険にさらされており、免疫抑制薬そのものの副作用も大きな弊害となり、多量にかつ長期間投

与することは好ましくない。従って、臓器移植患者のさらなるQOLの向上のため、特異的、非特異的な免疫抑制薬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臓器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、現在の課題である。

漢方は、現代医療で治療が困難な疾患、症状に対応でき、西洋薬を超える可能性が期待されている。しかし、漢方薬の使用は中国、日本、韓国などアジア諸国に限定されていた。その大きな原因は、その安全性とエビデンス不足に依るものが大きかった。そのエビデンス不足打開のために、2009年に報告された術後腸閉塞に対する大建中湯の有用性の報告¹⁾や牛車腎気丸によるオキサリプラチン誘導性末梢神経障害の改善効果²⁾、桂枝茯苓丸の更年期のホットフラッシュ抑制効果³⁾等のような現代医薬を補完しうる臨床治療効果が報告され始めた。最近では、欧米でも補完代替医療(Complementary and Alternative Medicine)の範囲のみであるが、次第に使用されるようになり⁴⁾⁵⁾、海外における臨床試験も開始されている。漢方薬は現在の西洋薬と違い、単一成分で精製された合成品ではなく、複合成分で、複数の生薬を組み合わせた天然品である。薬理的にも西洋薬の単一作用ではなく複合作用である。それに加え、複合成分であるため作用機序を解明しづらいものの、作用はマイルドで副作用も少ないという特徴があり、今後さらに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。

そこで、われわれは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、今回は四逆散に注目した。四逆散は臨床で頻用される漢方薬の一つで、血行不良による腹痛や筋緊張の緩和効果のある芍薬、健胃作用や瀉下作用のある枳実、鎮痛、鎮静、解熱作用のある甘草、解熱、消炎、抗菌、抗ウイルス作用のある柴胡の4つの生薬で構成される。四逆散は、比較的体力がある方で、腹部の緊張、イライラ、抑うつ状態などの症状改善を目的に使用される⁶⁾⁷⁾。疾患に対しては、抗炎症作用⁸⁾と抗不安作用⁹⁾を期待して使用され、胃炎、過敏性大腸炎、鼻炎、気管支炎、胆嚢炎、胆石症の治療に用いられる¹⁰⁾。最近では、

四逆散の難治性疼痛に対する有効性や¹¹⁾、桂枝茯苓丸との併用による治療抵抗性冠攣縮性狭心症に対する有効性も報告され¹²⁾、本来の効果効能や適応疾患とは異なった作用を持つことが示唆されている。しかし、免疫抑制効果などの免疫関連の研究報告はほとんど無く、今回我々は主要組織適合抗原(Major histocompatibility complex: MHC, 以下MHC)完全不一致マウスの心臓移植モデルを用いて、四逆散の移植免疫に関する効果を基礎科学的解析によって検討した。

材料と方法

1. 動物

CBAマウス(8~12週齢, 三協, 東京)をレシピエントとし、C57BL/6マウス(8~12週齢, 三協)をドナーとして用いた。この組み合わせは、MHCはCBA(H2^k), C57BL/6(H2^b)であり、完全不一致となる。動物は帝京大学医学部中央動物舎で飼育され、飼育方法は帝京大学の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(帝医動13-023 平成25年11月7日)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¹³⁾。マウスの腹腔内で、ドナー心の上行大動脈とレシピエントの腹部大動脈、ドナー心の肺動脈とレシピエントの下大静脈を、マイクロスコープ(Topcon, 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, 東京)でそれぞれ端側吻合した(図1)。ドナー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. 生薬と漢方薬

使用薬剤は、四逆散および四逆散を構成する4種類の単独生薬(図2: 芍薬, 枳実, 甘草, 柴胡)のエキスをを用いた。四逆散エキスは株式会社ツムラの医療用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、四逆散を構成する単独生薬として、各単独生薬を煎じたエキスを使用した(以下、エキスを省略して、四逆散の基本薬名で記入する)。

4. マウスの処置

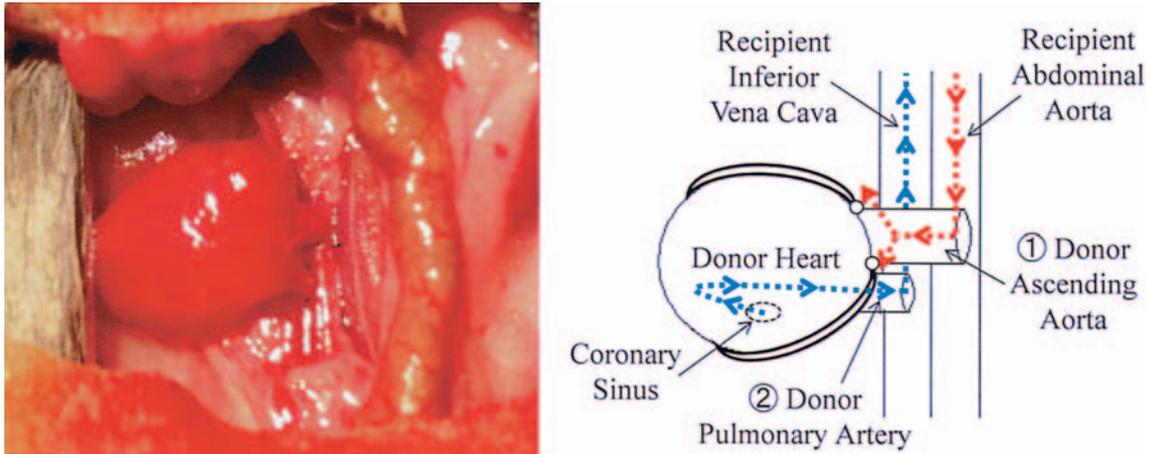


図1 異所性マウス心臓移植術

CBA レシピエントの腹部大動脈に C57BL/6 ドナー心臓の上行大動脈を吻合 (①) する。次に、CBA レシピエントの下大静脈に C57BL/6 ドナー心臓の肺動脈を吻合 (②) する。血流は CBA レシピエントの動脈から C57BL/6 ドナー心臓の上行大動脈に逆行性に流れ、その血液は冠動脈に流入し心筋を栄養する。冠動脈に流れた血液は冠静脈、冠静脈洞と経由し、右房の冠動脈洞口から排出される。排出された血液は右房、右室を経由し、肺動脈から CBA レシピエントの下大静脈へ回収される。以上の機序で両室が酸素化される。赤点線：動脈血の流れ、青点線：静脈血の流れ。



図2 四逆散の構成生薬

四逆散および四逆散を構成する4種類の生薬のエキスの水溶液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, Swedesboro, NJ, USA) を用いてレシピエントの胃内に経口投与した。四逆散と構成生薬の投与量は 2 g/kg/day とした。手術も投薬も行わなかった群を未手術群、手術を行い投薬を行わなかった群を無治療群、手術を行い投薬を行った群を治療群とした。

5. 組織染色

無治療群、四逆散投与群の移植後14日が経過したマウスの腹部から心臓移植片を摘出する。摘出した

心臓移植片を O.C.T. Compound Tissue-Tek (Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance, CA, U.S.A.) に入れ、-80℃で冷凍させ、4μm の切片を作成した。そして anti-CD4 (RM4-5; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) monoclonal antibody (mAb), anti-CD8 (53-6.7; BD Biosciences) mAb, anti-Foxp3 (kindly provided by Professor Kenjiro Matsuno¹⁴, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan) polyclonal antibody (pAb) で一次染色を行った。anti-CD4 mAb と anti-CD8 mAb に対して、アルカリフォスファターゼ (ALP) を付加された anti-Rat Ig 抗体 (二次抗体: 712-055-153;

Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) を, anti-Foxp3 pAb に対して, ALP を付加された anti-Rabbit Ig 抗体 (二次抗体: 712-055-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いて 2 次染色を行った。さらに, 心筋細胞膜の染色のために, type IV collagen pAb (LB1403, Cosmo Bio, Tokyo) を用いて一次染色を行い, ペルオキシターゼを付加された anti-Rabbit Ig 抗体 (二次抗体: 55693; Mitsubishi Chemical, Tokyo) を用いて 2 次染色を行った。

さらに, 無治療群, 四逆散投与群の移植後 14 日が経過したマウスの腹部から摘出された心臓移植片は 4 μ m の切片を作成した後に, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

6. 混合白血球培養試験

混合白血球培養試験¹⁵⁾ (Mixed leukocyte Reaction: MLR) には, ドナー心を移植した無治療の CBA レシピエント群と, 移植後に四逆散投与群 2 g/kg/day を 8 日間投与した CBA レシピエント群と, 未手術の CBA マウス (コントロール群) を用いた。心臓移植 14 日後に各群の CBA マウスの脾臓を摘出し, 脾細胞を採取し Responder とした。Stimulator には naïve C57BL/6 マウスを用いた。Stimulator 細胞は 100 μ g/ml のマイトマイシン (MMC: 協和発酵工業株式会社, 大阪) にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分処理した。Responder 細胞 (2.5 \times 10⁶/ml) と Stimulator 細胞 (5 \times 10⁶/ml) を 96 穴の組織培養皿 (イワキ株式会社, 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 4 日間細胞培養した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による酵素免疫測定法¹⁶⁾ (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA, Biotrak version 2, Amersham, Little Chalfont, UK) を用いて細胞増殖を測定した。測定方法は, 製造元の指示に従いサンドイッチ法で行い, その発光を吸光度 450 nm で ELISA reader (ELx 800, Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, 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, ELISA を用いて IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ を測定した。IL-2 の capture モノクローナル抗体は JES6-1A12, detection モノクローナル抗体は JES6-5H4 で, 共に Caltag Laboratories (Burlingame, 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-1D11, detection モノクローナル抗体は BVD-24G2 で, 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 モノクローナル抗体は JES5-2A5, detection モノクローナル抗体は JES5-16E3, スタンダードと同じく, BD Biosciences Pharmingen の製品を用いた。IFN- γ の capture モノクローナル抗体の R4-6A2 と, detection モノクローナル抗体の XMG1.2 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 (ELx 800) を使用して測定した。

8. フローサイトメーター

四逆散を投与した CBA レシピエントおよび無治療の CBA レシピエントから, 心臓移植後 14 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, 未手術 CBA マウスから脾臓を摘出して脾細胞を採取した。抗 CD4 モノクローナル抗体 (RM4-5; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) と抗 CD25 モノクローナル抗体 (PC61; BD Biosciences Pharmingen) を入れた後, PE Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set (Cat: 72-5775-40; Lot: E09292-1510; eBioscience) の Fixation/Permeabilization Diluent と Concentrate を 3:1 の割合で混ぜたものを 300 μ l/tube 入れ, 4 $^{\circ}$ C で 40 分間冷却した。蒸留水で 10 倍希釈した 10 \times Permeabilization で 2 回洗浄し, Goat Serum を 10 μ l/tube 入れ, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間冷却した後, 抗マウス Foxp3 抗体 (FJK-16s; eBioscience, San Diego, CA, USA) と IgG2a Isotype を入れた。再び 4 $^{\circ}$ C で 30 分間冷却し, 10 倍希釈した 10 \times Permeabilization で 2 回洗浄した。また, それぞれの isotype controls は以下のものを使用した (CD4: FITC Rat IgG2a, κ Isotype Control; BD Biosciences Pharmingen, CD25: APC Rat IgG1, λ Isotype Control; BD Biosciences Pharmingen, Foxp3: eBR2a; eBioscience)。染色した後は, フローサイトメーター (BD FACS Canto II; BD Biosciences, CA, USA, 以下 FACS) で分析し, CD4⁺細胞の中の CD25⁺Foxp3⁺細胞の比率を解析し, 各群間で比較した。

9. 統計検定

移植心生存率の 2 群間の検定は Mann-Whitney U 検定で解析した。混合白血球培養試験, サイトカイ

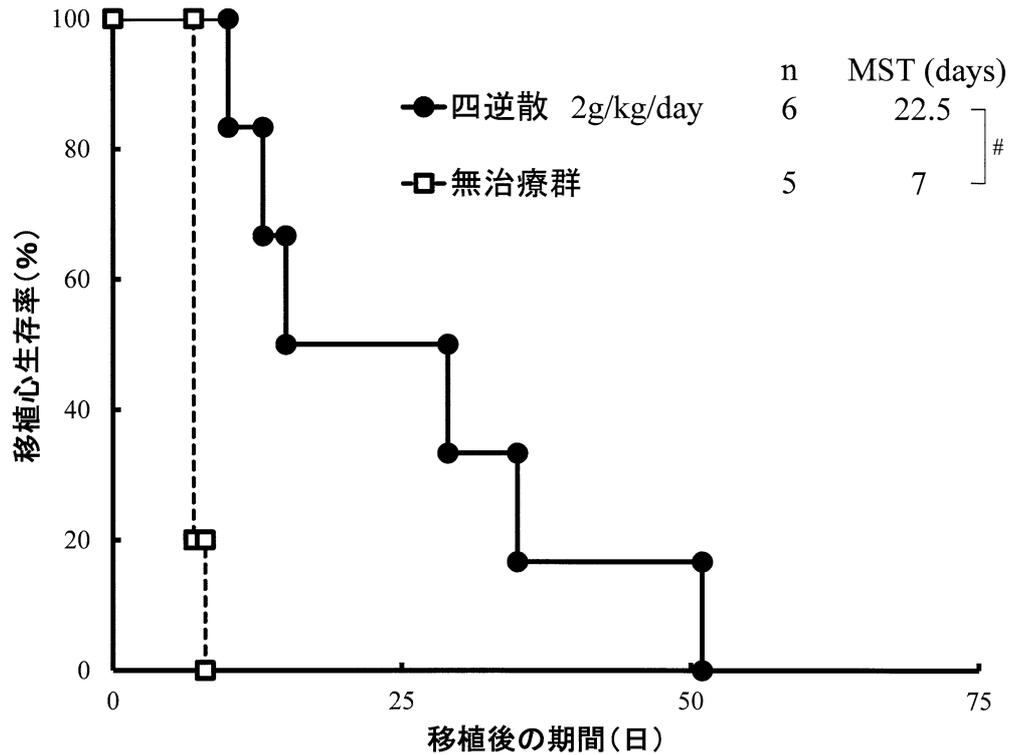


図3 四逆散の経口投与による C57BL/6 移植心の生存曲線

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 レシピエントを無治療群と四逆散投与群 (2.0 g/kg/day) に分け生着期間を測定した。# : P<0.01 (Mann-Whitney U 検定)

表1 四逆散を構成する生薬の単独投与による移植心生着日数

群	投与薬 (各 2 g/kg/day)	n	生着期間 (days)	MST (days)
1	無治療	5	7, 7, 7, 8, 8	7
2	四逆散	6	10, 13, 15, 29, 35, 51	22.5
3	芍薬	4	8, 10, 12, 15	11
4	枳実	5	8, 9, 10, 11	9.5
5	甘草	5	10, 17, 18, 18	18.5
6	柴胡	5	8, 8, 8, 8	8

MST : Median survival time (生存中間値)

ンの測定, そして FACS の 2 群間の検定は Unpaired student t test で解析した。P-value が 0.05 未満を有意水準とした。

結果

無治療 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], 以

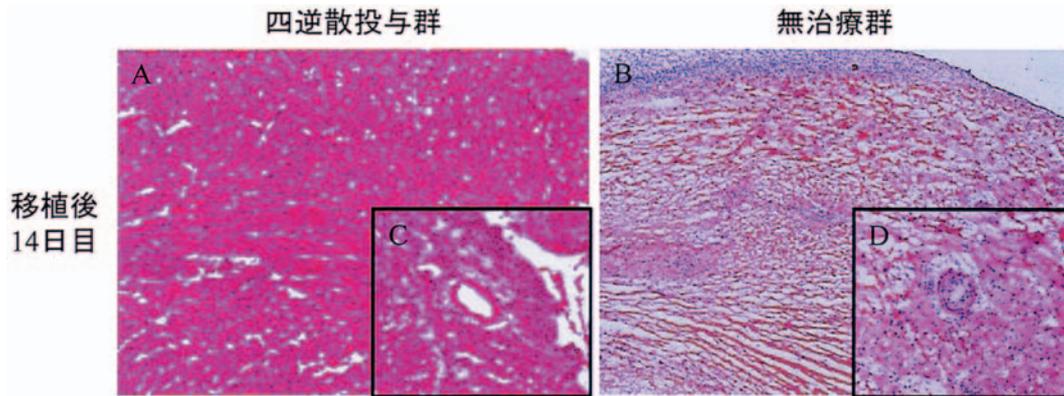


図4 四逆散投与群と無治療群の移植後14日目の移植心組織（ヘマトキシリン染色）
四逆散投与群と無治療群の移植後14日が経過したマウスの腹部から摘出された心臓移植片に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行った。A, B: 40倍, C, D: 60倍拡大。

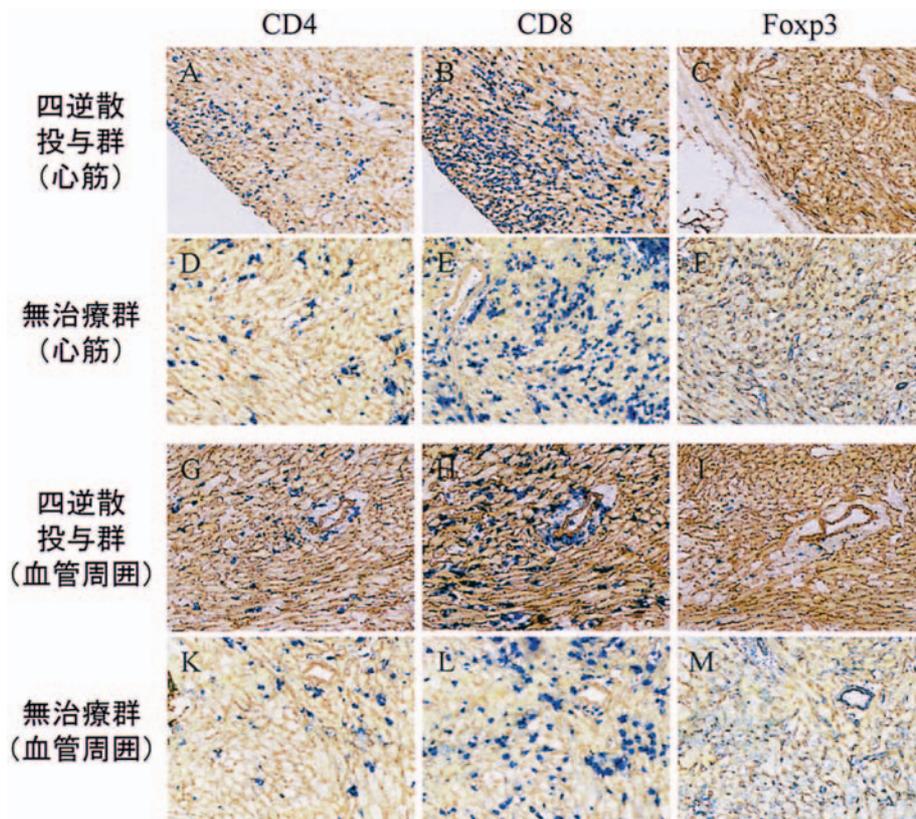


図5 四逆散投与群と無治療群の移植後14日目の移植心組織（免疫組織染色）
四逆散投与群と無治療群の移植後14日が経過したマウスの腹部から摘出された心臓移植片に対して免疫組織染色を行った。A-M: 40倍拡大。

下MST) 7日で拒絶した。ところが、四逆散を2g/kg/dayを投与した群では、MSTは22.5日であり、有意に生着延長を認めた(図3)。次に、四逆散を構成する4種類の生薬(芍薬、枳実、甘草、柴胡)の内、どの生薬が有効かを調べるためにそれぞれの生薬(2g/kg/day)を心臓移植から8日間投与した。するとMSTは芍薬11日、枳実9.5日、甘草18.5日、

柴胡8日となり、甘草が生着延長には最も有効であったが、四逆散投与群を越す結果は得られなかった(表1)。また、四逆散の投与で14日間生着した心臓移植片を摘出して免疫組織学的に調べた。その組織像は無治療群の移植片の組織に比べて、心筋へのリンパ球浸潤は軽度であり、心筋組織破壊も抑制されていた(図4A, B)。さらに、心筋内冠動脈

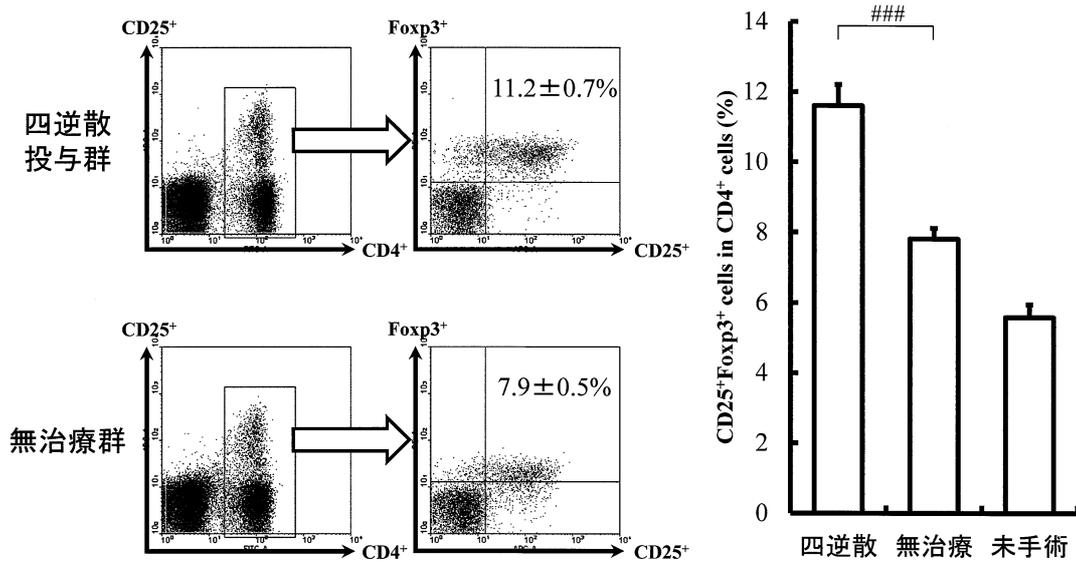


図6 脾臓内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の分析

心臓移植後14日目の四逆散投与群と無治療群の CBA レシピエントと、未手術の CBA マウスの脾臓細胞を採取し、CD4、CD25、Foxp3 に対する蛍光色素標識した抗体で染色し、FACS Canto II で分析した。左上図、下図はそれぞれ四逆散投与群と無治療群の心臓移植14日目の脾臓内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞割合 (11.6 ± 0.6%, 7.8 ± 0.4%) を示す。右図は四逆散投与群と無治療群の CBA レシピエントと未手術の CBA マウスの脾臓内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞割合の比較図を示す。

: P < 0.001 (Unpaired student t test)

は無治療群が内膜肥厚、炎症細胞浸潤が著明であるのに対して、四逆散投与群では冠動脈の内膜肥厚や炎症細胞浸潤が軽度であり、血管構造が保たれていた (図4C, D)。免疫組織染色では、無治療群と四逆散投与群において、CD8⁺細胞の浸潤に差は認められなかった (図5B, E, H, L) が、四逆散投与群では心筋組織内や冠動脈周囲の CD4⁺Foxp3⁺細胞が増加していた (図5A, C, D, F, G, I, K, M)。

次に、四逆散の投与による生着延長効果に免疫制御細胞 (regulatory T cell, 以下, Treg) が関与しているかを調べるために、脾臓内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の割合を調べた¹⁷⁾。四逆散投与群は無治療群に比べて、CD4⁺細胞中の CD25⁺Foxp3⁺細胞の比率が増加していた (図6)。

さらに四逆散の作用機序を調べるために、MLR と ELISA を行った。その結果、四逆散投与群は無治療群に比べてアロ反応性細胞分裂が抑制され (図7A)、IFN- γ の産生も抑制されていた (図7B)。また、IL-4 と IL-10 の産生は増加していた (図7C, D)。

考察および結論

臓器移植は生命維持に不可欠な臓器の働きが失わ

れた患者に対する究極の治療法として確立されている。新規免疫抑制薬の導入などにより、移植医療の成績は向上してきているが、免疫抑制薬による非特異的な免疫の抑制された状態では、患者は感染症や腫瘍などに罹患する危険にさらされている。従って、非特異的な免疫抑制薬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拒絶の治療の究極の目標である。

移植免疫寛容のメカニズムには、アナジー (anergy)、消去 (deletion)、免疫制御細胞 (regulatory cell) の誘導 (immune regulation)、無視 (ignorance) などがあるが¹⁸⁾、その中でも regulatory cell の誘導は最近特に注目されている¹⁹⁾。今まで数々の動物実験で集積された知見で、CD4⁺CD25⁺のフェノタイプを有する制御性 T 細胞 (regulatory T cell, 以下 Treg) 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た²⁰⁾。その Treg の核内抗原である 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あり、Treg に特異性が高いとされており、CD4⁺CD25⁺免疫制御性 T 細胞の重要なマーカーとして知られている。当研究グループの実験モデルでも、柴苓湯²¹⁾、茵陳五苓

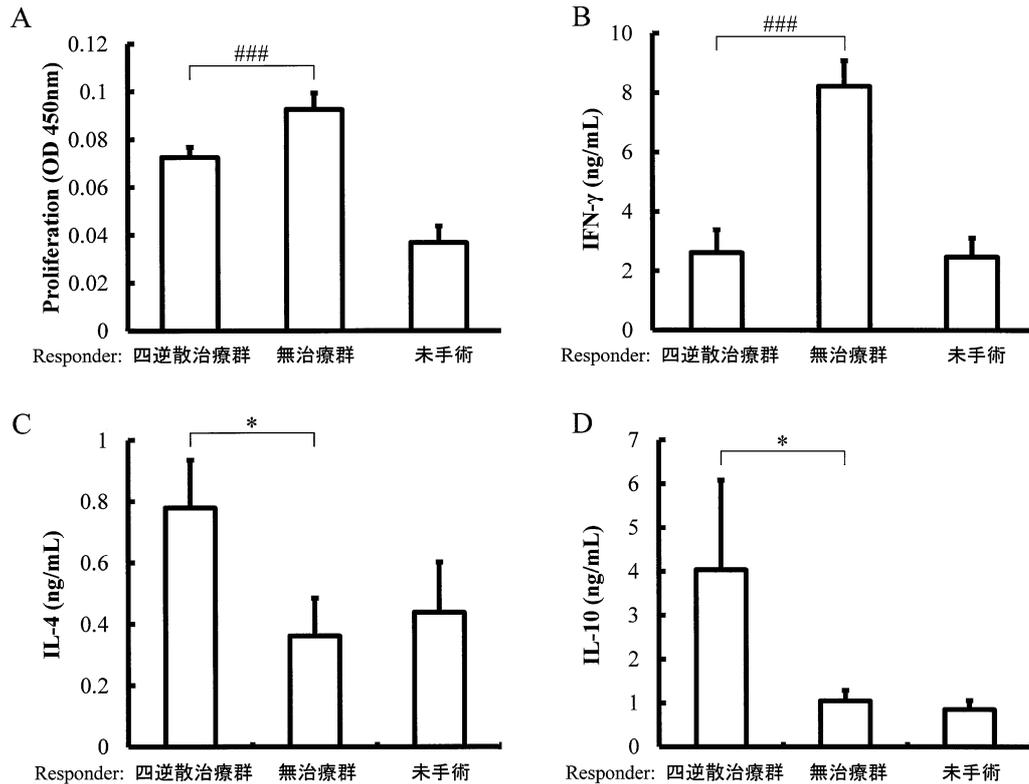


図7 混合白血球培養 (MLR) とサイトカイン定量

A: 心臓移植後14日後の四逆散投与群と無治療群のCBAレシピエントと未手術のCBAマウスの脾細胞 (2.5×10^6 cells/ml) を Responder Cells として, naïve C57BL/6の脾細胞 (5.0×10^6 cells/ml) を Stimulator Cells としてMLRを行った。

B-D: MLR培養液の上清のIL-4, IL-10, IFN- γ 産生を酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。*: $P < 0.05$, ###: $P < 0.001$ (Unpaired student t test)

散²², ursodeoxycholic acid²³, Danazol²⁴)の投与により $CD4^+CD25^+Foxp3^+Treg$ が誘導され, MHC完全不一致マウス移植心の生着が延長されることを報告した。特に, 抗BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) 抗体を用いた研究では, Tregの成熟にはIL-10が不可欠であり, TregがIL-10依存性であることも報告した²⁵)。今回, 同モデルを使って柴苓湯や茵陳五苓散と同じ漢方薬の1つである四逆散散の移植免疫に対する効果及びTregの誘導を検討した。四逆散を選んだ理由は, 当研究室は保険適応となっている148種の漢方薬をすべて調査し, 現在までに漢方薬と免疫制御細胞の誘導に関する報告を多く行っており, 今回は四逆散を用いた研究を行った。

CBAマウスに移植手術日から手術後7日目までの計8日間四逆散2g/kg/dayを経口投与した。MSTは22.5日となった。同時に, 四逆散0.2g/kg/dayを経口投与したCBAマウスも作成したが, 生着延長効果は認められず, 逆に四逆散20g/kg/dayは薬剤

溶解時に生薬等の沈殿物が多くなり, 各マウスへの投与量を一定にすることが困難であるという観点から行わなかった。このような背景と結果から, 四逆散2g/kg/dayはMHC完全不一致マウス移植心の生着を延長することが示唆された。

次に, 四逆散の移植心生着延長効果が, どの成分によるものかを検討した。4種類の生薬それぞれを単独投与した結果, 甘草(2g/kg/day)が若干の生着延長効果を示した(MST, 18日)(表1)が, 四逆散の結果を超えるものではなかった。また, 四逆散投与群の術後14日目の移植心病理組織標本(図4)では, 移植心に対する炎症細胞浸潤は軽度であり, 心筋組織破壊も軽度であった。免疫組織染色では, $CD8^+$ 細胞の浸潤に差は認められなかったが, 心筋内と血管周囲の $CD4^+Foxp3^+$ 細胞は増加していた(図4)。さらに, FACSにおいて四逆散投与群の14日目の脾臓内 $CD4^+$ 細胞中の $CD25^+Foxp3^+$ 細胞の比率が増加していた(図6)。MLR(図7A)と

ELISA (図7B-D)において、四逆散投与群ではアロ反応性細胞増殖が抑制され、IFN- γ の産生も抑制され、抗炎症サイトカインであるIL-10が増加していた。これらの結果より、四逆散は心移植後の拒絶反応を抑制し、免疫寛容の成立に重要な役割を果たすFoxp3⁺Tregを誘導することが推測できた。

臨床応用に向けての次の計画は、四逆散からTreg誘導に有効な成分を発見し、人工的に生成し使用することである。現在、我々は四逆散の構成生薬である甘草の抗炎症作用に着目し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて甘草の構成成分を分析中である。今後、構成成分単独の投与を行ない、移植免疫に対する効果を検討する予定である。このように、現在の科学技術と実験方法を用いて漢方薬の新しい薬理効果を発見する事は今日の臨床での治療展開に有益であり、今後の我々の医療にさらに大きな貢献を与えてくれると思われる。

謝辞 稿を終えるにあたり、ご指導ご校閲頂きました帝京大学医学部外科准教授新見正則先生に深甚なる謝意を表す。また、終始多大なるご指導ご校閲頂きました同研究室内山雅照先生、殷恩智先生に深謝の意を表す。また、薬理学講座助教松村暢子先生には組織染色に関する直接のご指導を頂いた。ここに感謝の意を表す。本研究の病理染色にあたり、直接のご指導とともに多くの有益なご助言を頂いた獨協医科大学解剖学マクロ講座教授松野健二郎先生、准教授上田祐司先生に厚く御礼を申し上げます。

利益相反(COI)に関して開示すべきものなし。

引用文献

- 1) Kono T, Kanematsu T, Kitajima M. Exodus of Kampo, traditional Japanese medicine, from the complementary and alternative medicines: is it time yet? *Surgery* 2009; 146: 837-840.
- 2) Kono T, Mamiya N, Chisato N, et al. Efficacy of gosha-jinkigan for peripheral neurotoxicity of oxaliplatin in patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 418-481.
- 3) Ushiroyama T, Ikeda A, Sakuma K, et al. Comparing the effects of estrogen and an herbal medicine on peripheral blood flow in post-menopausal women with hot flashes: hormone replacement therapy and gui-zhi-fu-ling-wan, a Kampo medicine. *Am J Chin Med* 2005; 33: 259-267.
- 4) Complementary medicine is booming worldwide. *BMJ* 1996; 313: 131.
- 5) 崎山武志, 石野尚吾, 渡辺賢治, 他. 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* 2009; 59: 99-118.
- 6) 松橋俊夫. 漢方精神医学入門. 金剛出版, 東京 1989. 87.
- 7) 西田慎二. うつ病・不安神経症. *治療* 2009; 91: 1768-1773.
- 8) Ohta Y, Kobatashi T, Hayashi T, et al. Preventive effect of Shigyaku-san on progression of acute gastric mucosal lesions induced by compound 48/80, a mast cell degranulator, in rat. *Phytother Res* 2006; 20: 256-262.
- 9) Tanaka M, Satou T, Koike K. Anxiolytic-like effect of Shigyakusan extract with low side effects in mice. *J Nat Med* 2013; 67: 862-866.
- 10) 久保田富也. 四逆散の経験. *漢方の臨床* 1984; 31: 565-571.
- 11) 今井美奈, 松本園子, 堤祐介, 他. 難治性疼痛に対する四逆散加味方の治療経験. *日東医誌* 2014; 65: 115-123.
- 12) 山崎武俊, 峯尚志, 土方康世. 西洋薬による症状コントロール困難な冠攣縮性狭心症に対して四逆散と桂枝茯苓丸の併用が有効であった2症例. *日東医誌* 2014; 65: 287-292.
- 13) Niimi M. The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: experience of 3000 operations by one surgeon. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 1123-1128.
- 14) Ueha S, Yoneyama H, Hontsu S, et al. CCR 7 mediates the migration of Foxp3⁺ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1230-1238.
- 15) Akiyama Y, Shirasugi N, Uchida N, et al. B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. *Transplantation* 2002; 74: 732-738.
- 16) Perros P, Weightman DR. Measurement of cell proliferation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. *Cell Prolif* 1991; 24: 517-523.
- 17) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336.
- 18) 添田英津子. 臓器移植ナーシング. 学研, 東京 2003. 66-70.
- 19) Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
- 20) Shimon S, Noriko S, Sayuri Y, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* 2001; 182: 18-32.
- 21) Zhang Q, Jin X, Uchiyama M, et al. Impact of sairei-to and its individual constituents on cardiac allograft survival. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 818-820.

- 22) Jin X, Uchiyama M, Zhang Q, et al. Inchingorei-san (TJ-117) and Artemisiae Capillaris Herba Induced Prolonged Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generated Regulatory Cells in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012 ; 2012 : 689-810.
- 23) Zhang Q, Nakaki T, Iwami D, et al. Induction of regulatory T cells and indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts by Ursodeoxycholic Acid in mice. *Transplantation* 2009 ; 88 : 1360-1370.
- 24) Uchiyama M, Jin X, Zhang Q, et al. Danazol Induces Prolonged Survival of Fully Allogeneic Cardiac Grafts and Maintains the Generation of Regulatory CD 4+ Cells in Mice. *Transpl Int* 2012 ; 25 : 357-365.
- 25) Uchiyama M, Jin X, Matsuda H, et al. An Agonistic Anti-BTLA mAb (3C10) Induced Generation of IL-10 Dependent Regulatory CD 4+ T Cells and Prolongation of Murine Cardiac Allograft. *Transplantation* 2014 ; 97 : 301-309.