

Immune-Mediated Cytotoxicity に対するグリチルリチンの作用

奈良県立医科大学第3内科学教室

豊原 眞久

EFFECTS OF GLYCYRRHIZIN ON IMMUNE-MEDIATED CYTOTOXICITY

MASAHISA TOYOHARA

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received April 17, 2000

Abstract: Intravenous administration of glycyrrhizin (GL) is known to decrease elevated plasma transaminase levels in patients with chronic viral hepatitis, in which immune-mediated cytotoxicity by cytotoxic T lymphocytes and tumor necrosis factor alpha (TNF α) is considered to play an important pathogenic role. However, immunological interpretation of the transaminase-lowering action by GL is not clear. Studies were made to elucidate this action immunologically by assessing the effects of GL on immune-mediated cytotoxicity using an antigen specific murine CD4⁺ T cell line, which exhibits cytotoxicity against antigen presenting cells (APCs) after stimulation with specific antigen, and two cell lines sensitive to TNF α , a murine fibroblast line and a human hepatoblastoma line. GL suppressed the cytotoxic activity of the T cells against APCs and also inhibited TNF α -induced cytotoxicity in both of these TNF α -sensitive cell lines in vitro. These results suggest that the decrease of elevated transaminase level by GL in patients with chronic viral hepatitis is mediated in part by inhibition of immune-mediated cytotoxicity against hepatocyte. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 157~168, 2000)

Key words: apoptosis, glycyrrhizin, cytotoxic T lymphocyte, Fas antigen, tumor necrosis factor alpha (TNF α)

緒 言

グリチルリチン(GL, Fig. 1)は、肝疾患の治療薬剤として現在臨床の場において広く使用され、慢性ウイルス性肝炎における、肝底護治療の一翼を担っている。特にGLの静脈内投与により、上昇したトランスアミナーゼ値が低下することはよく知られている¹⁻³⁾。このトランスアミナーゼ降下作用機序については、従来より、抗炎症作用⁴⁻⁶⁾、抗ウイルス作用^{7,8)}、ステロイド代謝酵素阻害による内因性グルココルチコイド作用の増強^{9,10)}、補体活性化抑制¹¹⁾などの薬理作用が考えられてきた。

しかし、慢性ウイルス性肝炎における肝細胞障害には免疫学的機構が考えられ細胞障害性Tリンパ球(CTL)による肝細胞のアポトーシス誘導が注目を集めてい

る¹²⁻¹⁵⁾。すなわち慢性ウイルス性肝炎患者の肝臓では、リンパ球浸潤の強い部位の肝細胞にFas抗原の発現が免疫組織学的に証明され^{12,13)}、浸潤Tリンパ球にはFasリガンド(FasL)の発現が観察されており¹⁴⁾、FasL-Fas interactionによる肝細胞のアポトーシス誘導が考えられている。さらに、このFasL-Fas interactionによる肝細胞障害のほかに、マクロファージやCTLの産生する強力なアポトーシス誘導性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF α)に対するレセプターI(TNFR)を肝細胞が発現していることも知られている^{16,17)}。このように、慢性ウイルス性肝炎の肝細胞障害が免疫学的機序によるにもかかわらず、GLの降トランスアミナーゼ作用を免疫学的に検討した報告はきわめて乏しく、肝細胞のアポトーシス誘導に及ぼすGLの作用については全く検討がなさ

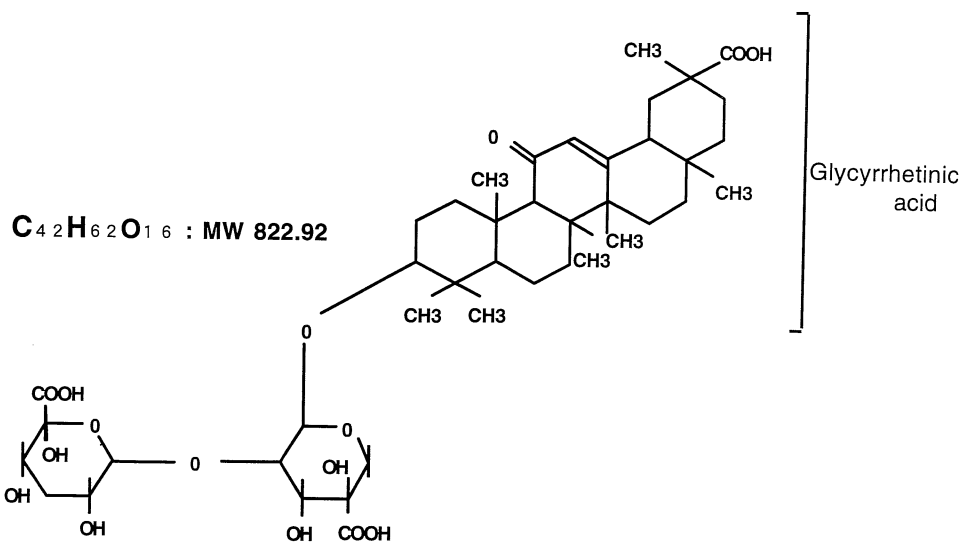


Fig. 1. Structure of Glycyrrhizin

れていなかった。そこで、本研究で、GLのトランスアミナーゼ降下作用を免疫学的見地から明らかにすべく、FasL-Fas系細胞障害モデルとしてマウスCD4⁺Tリンパ球細胞株およびFas陽性マウスBリンパ腫細胞株を用い、また、TNF α -TNFR系モデルとしてマウスTNF α およびマウスTNF α 感受性マウス線維芽細胞株あるいはヒトTNF α 感受性ヒト肝癌細胞株を用い、GLのアポトーシスに及ぼす影響について検討した。

材料と方法

細胞および抗原

エフェクターT細胞として鶏卵白アルブミン(OVA)に特異的な細胞障害活性を示すTh1型CD4⁺マウスT細胞株3DO54.8(I-A^d拘束性)¹⁸⁾、そのtargetとしてFas抗原陽性のBALB/cマウス由来Bリンパ腫細胞株A20-2J¹⁸⁾を使用した。抗原としては、3DO54.8細胞に認識されるOVA分子の第323番から339番の17個からなるアミノ酸をOVAペプチドとして人工合成して、最終濃度2 μ g/mlで使用した。このOVAペプチドが、APCによる抗原の取り込みやプロセッシングを受けずに3DO54.8細胞を活性化しIL-2産生や細胞障害活性を獲得させ得ることは確認されている¹⁹⁾。なお、紫外域波長274nmでの吸光度によるペプチドの濃度測定を容易にするため、OVAペプチドのC末端にはTyrを付加した。

マウスTNF α 感受性マウス線維芽細胞株としてL929細胞²⁰⁾を、ヒトTNF α 感受性ヒト肝癌細胞株とし

てHepG2細胞²¹⁾を使用した。L929細胞、HepG2細胞およびヒト肝癌細胞株PLC/PRF5細胞²²⁾は、いずれも理研細胞バンク(筑波)より入手した。

A20-2J細胞、3DO54.8細胞、PLC/PRF/5細胞は、2mmol/lグルタミン、10%ウシ胎仔血清(FCS)、100U/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地(ニッスイ、東京)で、HepG2細胞、L929細胞はグルタミン、FCS、ペニシリン、ストレプトマイシンを同様に添加したDulbeccoの修正イーグル培地(ライフテクノロジー社、東京)で培養した。

化学物質

GLは生薬テストグレードGL(ナカライテスク、京都)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解し、最終濃度0、2、20、200、800 μ g/mlで用いた。組み換えマウスおよびヒトTNF α はゼンザイム社(Cambridge, MA, USA)から購入し、アクチノマイシンD(ActD)はシグマ社(St Louis, MO, USA)から入手した。MTT(3-(4,5-dimethylthiazo 1-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)は、ナカライテスク(京都)より購入した。

⁵¹Cr遊離アッセイ

5 $\times 10^4$ 個の3DO54.8細胞と1 $\times 10^5$ 個の⁵¹Cr標識A20-2J細胞をGLおよびOVAペプチド抗原(最終濃度2 μ g/ml)の非存在下あるいは存在下で、10%FCSを含むRPMI1640培地0.2mlの入った96ウェルV底マイクロプレートにて培養後、培養液上清中に遊離する⁵¹Cr量を測定し、CD4⁺T cell-mediated cytotoxicityを評価した。すなわち、上清100 μ lあたりの放射能を4時間毎に

シンチレーションカウンターで測定し、細胞障害率を下式で算出した。

$$\text{細胞障害率(\%)} = [(A - B) / (C - B)] \times 100$$

式中、A, B, C は ^{51}Cr 標識 A20-2J 細胞からのそれぞれ実験の放射能放出量, 自然放射能放出量, 最大放射能放出量を表す。自然放出量は, OVA ペプチドおよび GL の両者非存在下で T 細胞と培養したときに A20-2J 細胞から放出される ^{51}Cr の量である。最大放出量は, 1 % TritonX-100 溶液で A20-2J 細胞を処理したときに放出される ^{51}Cr の量である。

DNA の ^3H チミジン標識化による DNA 断片化の測定

既報の方法に準じてファイバークラスフィルターを用い, A20-2J 標的細胞の DNA 断片化を測定した。すなわち, A20-2J 細胞を ^3H チミジン(185 kBq/ml)と 3 時間インキュベートし, 96 ウェル U 底マイクロプレートにて ^3H チミジン取り込み A20-2J 細胞(1×10^5)と 3DO 54.8 細胞(5×10^4)を GL および OVA ペプチドの存在下あるいは非存在下で培養した。12 時間の培養後, 細胞を低張処理し, 溶解した細胞をファイバークラスフィルターに採取した。無傷のクロマチンはフィルターに吸着するが, DNA 断片は通過する。結果は, 下式に従い特異的 DNA 断片化率(%)で表した。

$$(M - E) / M \times 100$$

式中, M は培地のみで培養した細胞における残存放射能, E は上記実験条件下で培養した細胞における残存放射能を表す。

DNA の抽出試料

OVA ペプチドの存在下, 10 % FCS を含む RPMI1640 培地 2 ml の入った 24 ウェルプレートで 1×10^6 個の A20-2J 細胞と 5×10^5 個の 3DO 54.8 細胞を 12 時間培養した後, 細胞を回収し DNA 抽出試料とした。

また, HepG2 細胞を 9.1 cm^2 シャーレに播種し(密度: 5.0×10^5 個/3 ml), semiconfluent になるまで 24 ~ 30 時間培養後, 新鮮培地に換え, ヒト TNF α (1 ng/mL) および ActD (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を, GL とともに加えた。この後 12 時間培養し, 付着性細胞および浮遊細胞の全細胞を回収し DNA 抽出試料とした。

DNA 抽出

DNA 抽出細胞試料は, 氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で 2 回洗浄したのち, 0.1 mol/l TrisHCl (pH 7.5), 10 mmol/l EDTA, 0.2 % TritonX-100 を含む低張溶液に細胞ペレットを再懸濁し, 氷上で 10 分間インキュベートした。この処理で溶解した細胞を 4°C , 15,000 g で 10 分間遠心した。得られた上清をフェノール, フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (24

/25/1, v/v/v) で順次処理し, 水相の NaCl 濃度を 150 mmol/l に調整したのち, 2 容のエタノールを加え -20°C に一晩静置した。遠心し沈殿したペレットを乾燥させ, 1 mmol/l EDTA を含む 10 mmol/l Tris-HCl 15 μl に溶解した。この DNA 溶液を 37°C で 20 μg RNase と 30 分間インキュベートし, 0.25 % ブロムフェノールブルー, 0.25 % キシレンシアール, 30 % グリセロールと混合し, 40 mmol/l Tris-acetate, 1 mmol/l EDTA (pH 8.0) を含む 2 % アガロースゲルで電気泳動を行った。次に, 紫外線で DNA が検出できるようにゲルを 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 臭化エチジウムで染色した。

トリパンブルー排出試験, MTT アッセイによる TNF α -mediated cytotoxicity の測定

L929 細胞を 9.1 cm^2 シャーレに播種し(密度: 5.0×10^5 個/3 ml), semiconfluent になるまで 24 ~ 30 時間培養したのち, 新鮮培地に換え, マウス TNF α (1 ng/mL) および ActD (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とともに GL を加えた。この後 16 時間インキュベートした後, トリパンブルー排出試験で生細胞数を測定した。また, 細胞障害の指標として培養上清中の LDH 値を測定した。

HepG2 細胞は, 24 ウェルプレートに播種し(密度: 1.0×10^5 個/2 ml), semiconfluent になるまで 18-24 時間培養したのち, 新鮮培地に換え, ヒト TNF α (0-100 ng/ml) を, ActD (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とともに GL を加えた。さらに 24 時間培養した後, 細胞生存率は MTT 法にて検討した。すなわち, MTT (最終濃度 0.5 mg/ml) を加え, さらに 3 時間培養の後, 培養液を除去し dimethyl sulfoxide 1 ml を加えプレート底面に析出した MTT ホルマザンを溶解させ, マイクロプレートリーダー (MTP 52, CoronaCo., 東京) で 540 nm の吸光度を測定した。また, 細胞障害の指標として培養上清中の LDH 値と AST 値を測定した。

統計解析

統計学的有意差は Student-t 検定で判定した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

成 績

^{51}Cr 標識細胞からの ^{51}Cr 自然放出に対する GL の影響

一部の細胞株では, GL が ^{51}Cr の自然放出に影響を及ぼすことから, まず, GL が A20-2J 細胞に直接作用しないことを確認するため, T 細胞の非存在下で ^{51}Cr 標識 A20-2J 細胞の ^{51}Cr 自然放出に対する GL の影響を検討した。GL は ^{51}Cr 標識 PLC/PRF/5 細胞からの ^{51}Cr 自然放出を抑制したが, ^{51}Cr 標識 A20-2J 細胞からの ^{51}Cr 自然放出には影響を及ぼさなかった (Fig. 2)。

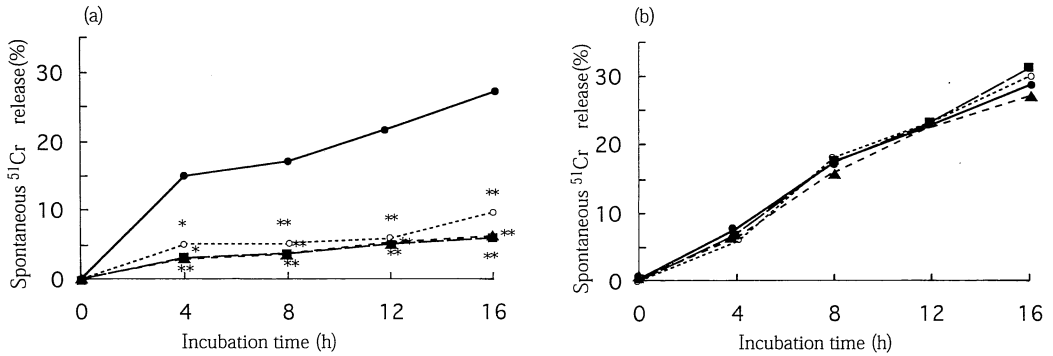


Fig. 2. Effects of glycyrrhizin (GL) on spontaneous ⁵¹Cr-release from the ⁵¹Cr-labeled cell lines (a) PLC/PRF/5 and (b) A20-2J in the absence of T cells. ⁵¹Cr-labeled cells, PLC/PRF/5 hepatoma cells and A20-2J cells, were cultured in the presence (2 µg/mL(—■—); 20 µg/mL(—▲—); 200 µg/mL(—○—)) or absence(—●—) of GL for the indicated periods. ⁵¹Cr release from cultures containing GL was compared with that of GL free cultures at individual incubation times. All determinations were made in triplicate and each data point represents the mean. The S. D. was less than 4.4%. *P<0.05 **P<0.01

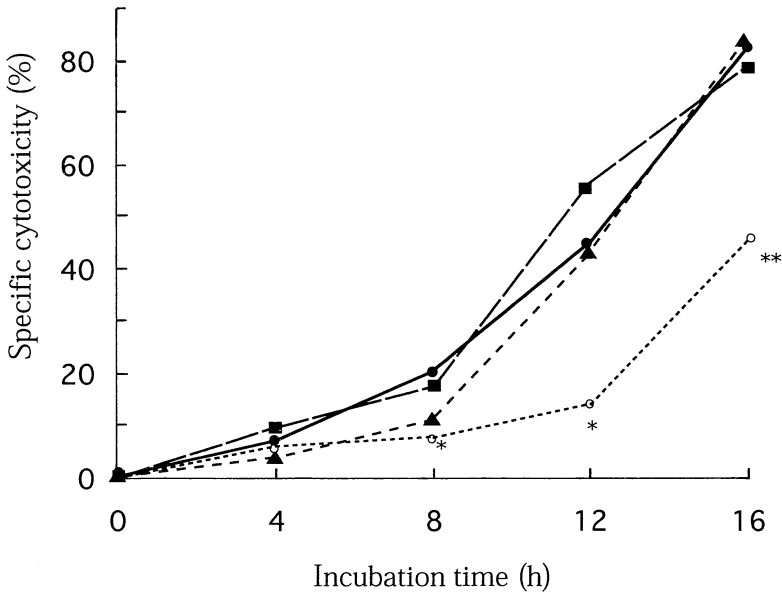


Fig. 3. Effects of glycyrrhizin (GL) on the kinetics of T cell-mediated cytotoxicity. 3DO 54.8 cells and ⁵¹Cr-labeled A20-2J cells were cocultured for indicated periods with chicken ovalbumin (OVA) peptide antigen in the presence of GL at concentrations of 0(—●—), 2(—■—), 20(—▲—) and 200 µg/mL(—○—). All determinations were made in triplicate and each data point represents the mean. The S. D. was less than 9.2%. Specific ⁵¹Cr release in cultures containing GL was compared with that in GL-free cultures at individual incubation times. *P<0.05 **P<0.01

T cell-mediated cytotoxicity に対する GL の影響

GL 非添加時には、8 時間後より、T 細胞の標的細胞 A20-2J に対する細胞障害活性が確認され、経時的にこの細胞障害性は増加し、16 時間培養後には 85% 近くに達した。GL を最終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ または $20 \mu\text{g/ml}$ となるように添加しても、T 細胞の細胞障害活性は影響を受けなかった。一方 GL の最終濃度を $200 \mu\text{g/ml}$ とすると、T 細胞の細胞障害活性は抑制され、培養 16 時間後では、GL 非添加時の約 60% の値を示した (Fig. 3)。

次に、この T 細胞の細胞障害活性を標的細胞 A20-2J の DNA の断片化を指標に検討した。特異抗原および APC の存在下で T 細胞は活性化し、APC に DNA 断片化をもたらした (Fig. 4 左)。また ^{51}Cr 遊離アッセイによる検討成績と同様に、GL 最終濃度 $2, 20 \mu\text{g/ml}$ では DNA の断片化は抑制されなかったが、 $200 \mu\text{g/ml}$ では抑制作用が確認された (Fig. 4 右)。

L929 細胞における TNF α -mediated cytotoxicity に及ぼす GL の影響

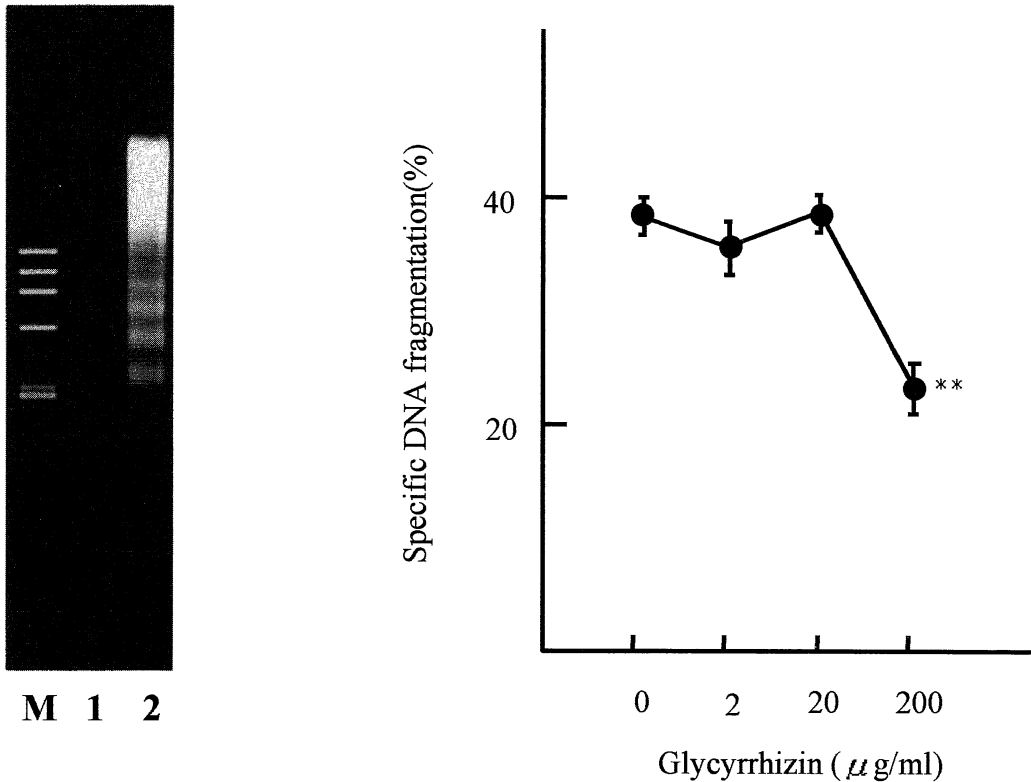


Fig. 4. DNA fragmentation of A20-2J target cells by 3DO 54.8 cells and its inhibition by glycyrrhizin (GL).

Left : One million A20-2J cells and 5×10^5 3DO 54.8 cells were cocultured for 12h in the absence (lane 1) or presence (lane 2) of chicken ovalbumin (OVA) peptide. Cells were harvested and the low molecular weight DNA fraction was electrophoresed. Lane M shows *Hae*-III-digested Φ X-174 DNA fragments as molecular markers.

Right : ^3H -thymidine-pulsed-A20-2J cells (1×10^5) and 3DO 54.8 cells (5×10^4) were cocultured with OVA peptide for 12h in the presence of the given concentrations of GL. Cells were hypotonically lysed and were harvested onto fiberglass filters ; DNA fragmentation was then measured. All determinations were made in triplicate and each data point represents the mean \pm S. D.. Specific DNA fragmentation of A20-2J cells cultured in the presence of GL was compared with that of A20-2J cells cultured in the absence of GL. ** $p < 0.01$

マウス線維芽細胞 L929 は、cyclohexamide などの蛋白合成阻害剤や ActD などの RNA 合成阻害剤の存在下において TNF α 感受性であることが知られている。L929 細胞を最終濃度 1 ng/ml の TNF α 存在下で 16 時間培養しても生存細胞数の減少は認めなかった。しかし、最終濃度 1 ng/ml の TNF α および最終濃度 0.5 μ g/ml の ActD の両者の存在下で培養すると、生存細胞数は TNF α および ActD のいずれも添加しない際の 33% に減少した (Fig. 5)。この際、2~200 μ g/ml の GL を同時に添加すると、生存細胞数は増加し、この効果は GL 濃度 2 μ g/ml から観察された。

つぎに、16 時間培養後の上清中 LDH 値を測定した。TNF α および ActD の両者を添加すると上清中 LDH

Table 1. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture supernatants of L929 cells treated with various agents

Agents	LDH activity (IU/L)
Medium alone	67.6 \pm 2.4
TNF α	65.0 \pm 1.2
TNF α +ActD	105.6 \pm 6.6
TNF α +ActD+GL (2 μ g/ml)	78.7 \pm 4.1*
TNF α +ActD+GL (200 μ g/ml)	75.6 \pm 1.8*

L929 cells, just before reaching confluence, were incubated for 16h in the presence of agents as indicated. Data are the mean \pm S.D. of the determinations for three separate cultures. The LDH activity of cultures containing GL was compared with that of GL-free cultures containing TNF α (1 ng/ml) and ActD (0.5 μ g/ml). *P<0.01

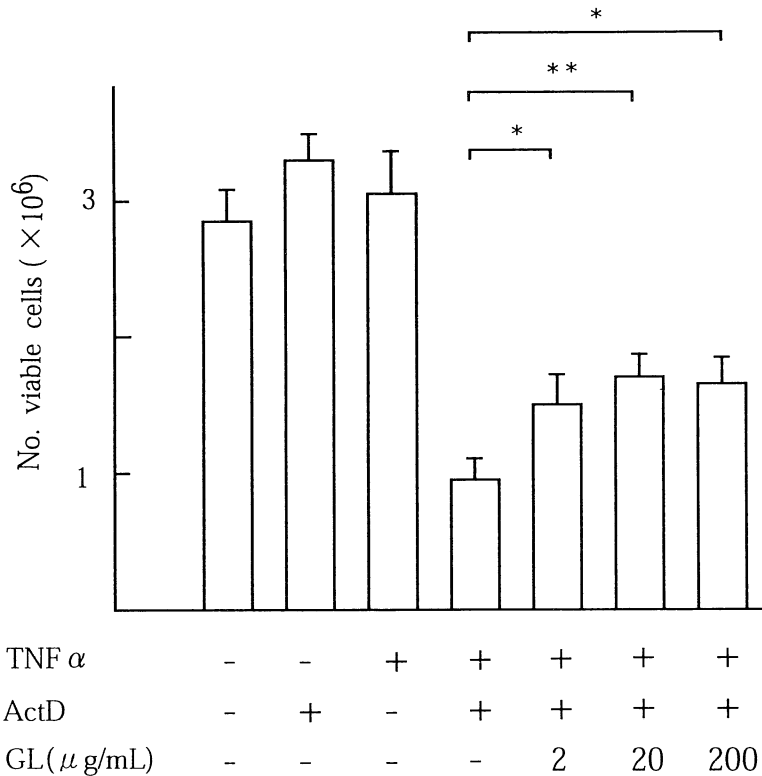


Fig. 5. Effects of GL on the viability of L929 cells after treatment with TNF α and ActD. TNF α -sensitive L929 cells (5×10^5) were cultured for 24-30h just before reaching confluence. After replenishment with fresh medium, they were treated with TNF α (1ng/mL) and ActD (0.5 μ g/mL) for 16h in the absence or presence of GL. The number of viable cell was quantificated by the trypan blue-exclusion test. All determinations were made in triplicate and each column represents the mean \pm S. D.. The number of viable cells in cultures containing GL together with TNF α and ActD was compared with that in GL-free cultures containing TNF α and ActD. *P<0.05 **P<0.01

値は上昇したが、GL添加によりLDHの培養液への逸脱は抑えられた(Table 1).

HepG2細胞におけるTNF α -mediated cytotoxicityに及ぼすGLの影響

ヒト肝癌細胞株HepG2のTNF α 感受性は、L929細胞と同様に、TNF α 単独では獲得されず、cyclohexamideなどの蛋白合成阻害剤やActDなどRNA合成阻害剤の存在下で獲得されることが知られている。HepG2細胞をActD(最終濃度0.5 μ g/ml)と種々の濃度のTNF α の存在下で24時間培養しMTT法にて、細胞生存率を検討した(Fig. 6)。TNF α 濃度依存性に細胞生存率は低下し、TNF α 濃度が1 ng/mlでは生存率33%、10 ng/ml以上ではほぼ全細胞が死滅した。そこでTNF α 濃度を1 ng/mlに固定し、細胞生存率に及ぼすGLの影響をみたところ、GL濃度依存性に細胞生存率は増加した(Fig. 7左)。24時間培養後の上清中LDH及びAST値を測定すると、TNF α およびActDの両者存在時には上清中LDH、AST値は上昇したが、GLの添加に

より両者の培養液への逸脱は有意に抑制された(Table 2).

Table 2. Aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture supernatants of HepG2 cells treated with various agents

Agents	AST (IU/L)	LDH (IU/L)
medium alone	12 \pm 1	47 \pm 3
TNF α	12 \pm 1	48 \pm 4
ActD	14 \pm 2	52 \pm 4
TNF α +ActD	48 \pm 4	156 \pm 7
TNF α +ActD+GL (20 g/ml)	24 \pm 3	104 \pm 3
TNF α +ActD+GL (200 g/ml)	22 \pm 3*	74 \pm 6*

HepG2 cells, just before reaching confluence, were incubated for 16h in the presence of agents as indicated. Data are the mean \pm S.D. of the determinations for three separate cultures. The AST and LDH activity of cultures containing GL was compared with that of GL-free cultures containing TNF α (1 ng/ml) and ActD (0.5 μ g/ml). *P<0.01

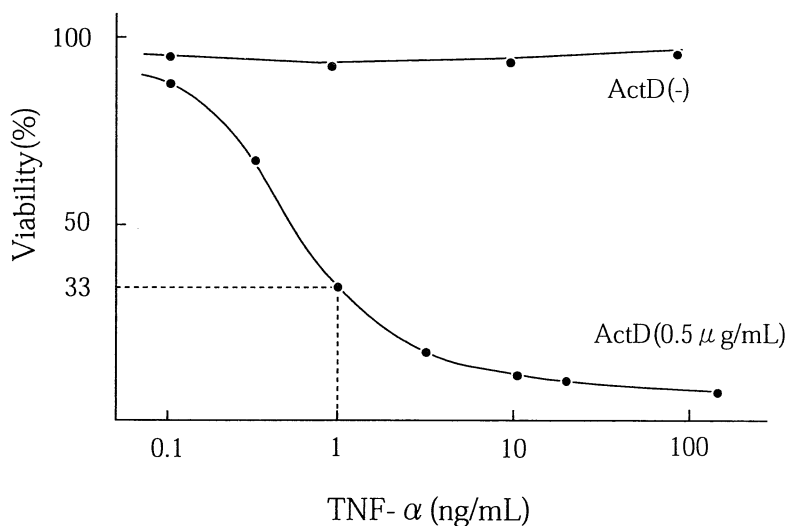


Fig. 6. Apoptotic cell death of HepG2 cells induced by TNF α .

HepG2 cells were seeded into 24-well culture plates at 2×10^5 cells/1.0 ml per well and cultured for 24h. They were replenished with fresh medium and incubated for another 24h with TNF α in the presence or absence of ActD (0.5 μ g/mL) and their viability was assessed by MTT assay. Percentage of survival, relative to survival of HepG2 cells cultured in medium alone, is plotted versus TNF α concentration on a logarithmic scale. ActD was used at a final concentration of 0.5 μ g/mL. All determinations were made in triplicate and each point represents the mean. Standard deviation of each point was less than 4.3%.

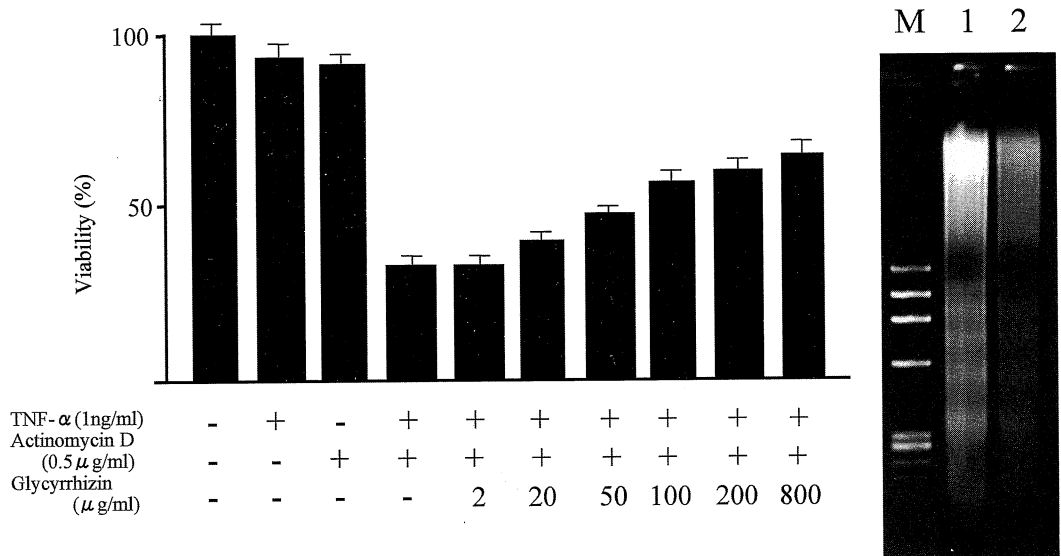


Fig. 7. Effects of GL on TNF α -mediated apoptosis of HepG2 cells

Left : HepG2 were incubated for 24h with 1 ng/mL of TNF α and 0.5 μ g/ml of ActD in the presence of various concentrations of glycyrrhizin, and their viability was assessed by MTT assay. Data are expressed as mean \pm S. D. of triplicated cultures. Right : A half million HepG2 cells were cultured in a 9.1 cm² dish with 1 ng/mL of TNF α and 0.5 μ g/mL of ActD in the absence (lane 1) or presence (lane 2) of GL. GL was used at a final concentration of 200 μ g/mL. After 12h culture, cells from each dish were collected and used for the detection of fragmented DNA. *Hae-III*-digested Φ X-174 DNA fragments were used as molecular markers (lane M).

考 察

古来より甘草根(*Glycyrrhiza radix*)は漢方薬として重用され、その甘草エキスはヨーロッパでは胃潰瘍の治療薬として使用されていた。GLは、甘草根に含まれる主たる化学成分で、当初はアレルギー性皮膚疾患に対して使用されていた。一方、慢性肝炎に対する使用は本症の原因である肝炎ウイルスが未だ発見されていなかった時期に、肝炎発現に何らかのアレルギー機序が働いているのではないかとの発想のもと、山本らが1958年に試験的に使用したことに端を発する²³⁾。その後、1977年、鈴木らにより二重盲検試験がなされ、GLの慢性ウイルス性肝炎に対する有効性が再確認された²⁴⁾。さらに20年以上を経た現在でも、GLの経静脈投与は、慢性ウイルス性肝炎の肝庇護治療の一翼を担っており、とりわけC型慢性肝炎に対するIFN療法の限界が明らかになった今日、その有用性は再び見直されている。

このようにGLは慢性ウイルス性肝炎における肝庇護治療剤として繁用されているにもかかわらず、そのトランスアミナーゼ降下の機序は必ずしも解明されていない

った。これまで、GLの降トランスアミナーゼ作用の機序として、ホスホリパーゼA2阻害作用⁶⁾、ステロイド代謝酵素阻害による内因性グルコルチコイド作用の増強^{9,10)}、補体活性化抑制¹¹⁾などの薬理作用が考えられていた。ところで、慢性ウイルス性肝炎の肝細胞障害は免疫学的機序によるものであることは今日疑いをいれない。すなわち、肝細胞死の機序として、FasLを発現したCTLによるFas陽性肝細胞のアポトーシス誘導、マクロファージやCTLの産生したTNF α によるTNF-R陽性肝細胞のアポトーシス誘導などが考えられている¹²⁻¹⁷⁾。このように、慢性ウイルス性肝炎の肝細胞死がアポトーシスによると考えられているにもかかわらず、GLのトランスアミナーゼ降下作用を免疫学的見地から検討した報告はこれまでほとんど無く、FasL-FasおよびTNF α -TNFRを介する肝細胞のアポトーシス誘導に及ぼすGLの影響についての検討にいたっては、全くなされていなかった。そこで、本研究では、Fas-FasL系細胞障害モデルとして、マウスCD4⁺Tリンパ細胞株およびFas陽性マウスBリンパ腫細胞株を用い、また、TNF α -TNFR系モデルとしてマウスおよびヒト

TNF α およびマウス TNF α 感受性マウス線維芽細胞株およびヒト TNF α 感受性ヒト肝癌細胞株を用いて、GLのアポトーシス誘導におよぼす影響を検討した。

慢性ウイルス性肝炎の肝細胞障害機構の主たるエフェクターはCTLであり、CTLはFasLを発現し、Fas陽性肝細胞にアポトーシスシグナルを誘導する¹²⁻¹⁵。一般にCTLの多くはCD8⁺ Tリンパ球であるが、著者は、本研究においてはCD4⁺ Tリンパ球を実験に供した。この理由は、CD8⁺ CTLの標的細胞に対する障害機構には、FasL-Fasによるアポトーシス誘導に加えてパーフォリンやグランザイムによる標的細胞障害機構が存在する^{25,26}のに対し、CD4⁺ CTLの標的細胞に対する障害機構は、FasL-Fasによるアポトーシス誘導が主で、パーフォリンやグランザイムによる機構はないからである。それゆえ、T cell-mediated cytotoxicityのうち、FasL-Fas系によるアポトーシス誘導におよぼすGLの影響を検討するためには、CD4⁺ CTLの使用が望ましいと考えた。本研究で使用したマウスCD4⁺ CTLは、抗原特異性が明らかで、特異的抗原がAPCにより提示された場合、FasLを発現しFas陽性細胞に対してアポトーシスを引き起こすことが知られている。そこで、Fas陽性のAPCを使用し、特異抗原刺激下でCD4⁺ Tリンパ球のAPCに対する細胞障害活性に及ぼすGLの影響を検討した。

特異抗原であるOVAペプチドの存在下にA20-2J細胞(APC/target)および3DO 54.8細胞(CD4⁺ CTL)を培養すると、Tリンパ球のAPCに対する細胞障害活性が誘導されることは以前より知られていた。著者は、この3DO 54.8細胞によるA20-2J細胞に対する障害活性が、核DNAの断片化をとまなうアポトーシスであることをまず確認した。その後、この実験系に最終濃度2~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のGLを添加し、CD4⁺ CTLによるFas陽性細胞のアポトーシス誘導にGLがいかなる影響をおよぼすかについて検討した。その結果、GL濃度2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではアポトーシス抑制効果は確認できなかったが、GL濃度200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではGL非添加時に比し培養16時間後の細胞障害性は約60%に抑制された。また、成績は示さないが、keyholelimpet hemocyanin(KLH)特異的BALB/cマウス由来CD4⁺ Tリンパ球株を、KLHおよびA20-2J細胞と共に培養した際に惹起される細胞障害活性も、2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGLでは抑制されなかったが、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGLでは非添加時の約50%に抑制された。すなわちGLは、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度においては、CD4⁺ T細胞の細胞障害活性を抑制すると考えられた。

ところで、著者は、CD4⁺ T細胞の細胞障害活性におよぼすGLの影響を⁵¹Cr遊離法にて検討するにあたって、

まず、⁵¹CrラベルしたA20-2J細胞に及ぼすGLの影響について調べ、GLがA20-2J細胞の⁵¹Crの自然遊離には影響しないことを確かめた。この理由はFig. 2に示すように、ヒト肝癌細胞株PLC/PRF/5などにおいては、GLが⁵¹CrラベルしたPLC/PRF/5細胞の⁵¹Crの自然遊離を抑制するからである。このGLによる⁵¹Cr自然遊離に対する抑制効果は、GL濃度2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれにおいてもほぼ等しく観察された。その他、著者は、ヒト肝細胞株Chang liver cellでも⁵¹Crの自然遊離がGLによって抑制される現象を観察している(未発表)。GLがこれらの細胞株で⁵¹Crの自然遊離を抑制する機序は不明であるが、著者は、GLが細胞膜に作用し、細胞膜の安定化をもたらす、細胞内に存在する物質の細胞外への漏出を抑えているのではないかと考えている。

さて、慢性ウイルス性肝炎患者において、血清中のTNF α 濃度の上昇²⁷や、肝細胞のTNFR発現の増加^{16,17}が報告されており、血中TNF α が肝細胞のTNFRに結合して肝細胞にアポトーシスを誘導する機構も考えられている。また、TNF α の主たる産生細胞はマクロファージやクッパー細胞であるが、CTLもTNF α を産生することが知られている^{25,26}。CTLの産生するTNF α 量はマクロファージやクッパー細胞に比し多くはないが、CTLは肝細胞に近接して存在するため、たとえ分泌されるTNF α 量が少量であっても、効率よく肝細胞のTNFRに結合し、肝細胞にアポトーシスを誘導することが可能である。このように、TNF α -mediated apoptosisも慢性ウイルス性肝炎における肝細胞障害機構のひとつとなっている。

そこで、著者は、TNF α -mediated apoptosisに対するGLの影響を検討した。この目的のために、マウスTNF α 感受性マウス線維芽細胞株L929、ヒトTNF α 感受性ヒト肝癌細胞株HepG2の2種を用いた。両細胞株は、蛋白合成阻害剤cyclohexamideやRNA合成阻害剤ActDの存在下で、TNF α によりアポトーシス誘導が可能であることが知られている。著者はまず、L929細胞におけるTNF α -mediated apoptosisに及ぼすGLの影響について検討した。L929細胞をマウスTNF α (1 ng/ml)およびActD(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)存在下に培養し、同時にGLを添加して16時間後の生存細胞数を測定したところ、GL添加により非添加時に比べ生存L929細胞数は増加した。さらに、培養液中のLDH値を測定すると、GL添加により細胞から培養液中へのLDH逸脱の抑制が観察され、これらの成績より、L929細胞のTNF α -mediated apoptosisがGLにより抑制されることが確認された。著者は、マウス線維芽細胞株L929につづいて、ヒト肝癌

細胞株 HepG2 において, $\text{TNF}\alpha$ および ActD で誘導されるアポトーシスにおよぼす GL の影響を検討した. GL 添加により HepG2 細胞生存率は GL 非添加時に比べ増加し, 培養液中の LDH および AST の逸脱は抑制された. ヒト肝癌細胞株 HepG2 の $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis も GL により抑制されることが確認された. GL による $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis の抑制は, L929 細胞では GL 濃度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上より, HepG2 細胞では $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上より観察された.

以上のように本研究で, 著者は, GL が T cell-mediated apoptosis と $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis に対し抑制的に作用することを明らかにし, T cell-mediated apoptosis の抑制には $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ の GL 濃度が, $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis の抑制には $2\text{--}20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の GL 濃度が必要であることを証明した. 今日, 慢性ウイルス性肝炎患者に静脈内投与される GL の常用量は, 1 回あたり $80\text{--}200 \text{mg}$ である. GL 80mg を健康者および肝炎患者に低速で静脈内投与した場合, 投与直後には $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の血中濃度に達するが, 投与 30 分後, 4 時間後, 24 時間後にはそれぞれ約 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下と血中濃度が急速に低下することが報告されている^{28,29}. また, GL 200mg の静脈内投与の血中濃度は, 投与 30 分後には $30\text{--}60 \mu\text{g}/\text{mL}$, 投与 6 時間後では $10\text{--}30 \mu\text{g}/\text{mL}$ であるとされる³⁰. 従って, GL を 80mg または 200mg で単回静脈内投与した場合, 全身末梢血液中の GL 濃度は, $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis を抑制し得る濃度以上に維持されることが考えられる. また, 繰り返し投与や, 高用量投与により, GL の有効血中濃度を一層長時間にわたり保つことも可能である. ところが, このような投与条件でも, T cell-mediated apoptosis を抑制するほどの高い GL 濃度は末梢血液中では長時間は得られず, GL の T cell-mediated apoptosis の抑制作用が全身レベルで発揮されることはないと考えられる. しかし一方で, GL をラットに静脈内投与し, その組織分布を観察した石田らの成績^{30,31}では GL は肝および皮膚に高濃度で分布することが報告されており, 肝臓および皮膚では GL の T cell-mediated apoptosis の抑制作用が発揮される可能性も考えられる.

なお, GL の組織分布特性に加えて, その代謝の特殊性も T 細胞の細胞障害活性の抑制に関与している可能性がある. GL は主に胆汁を通じて腸管に排泄され, 腸内細菌の β -glucuronidase により 2 分子のブドウ糖が除去されてグリチルレチン (GR) に代謝される. この GR には腸肝循環が証明^{30,31}されており, GL の代謝産物の GR が肝における immune-mediated cytotoxicity に影響してい

る可能性も推測される. GR の immune-mediated cytotoxicity に及ぼす影響については, 全く報告が無く, 今のところその詳細は不明といわざるを得ない. 著者は, この GR にも免疫調節作用があるのではないかと考えている. その理由として, まず, GL と GR の関係は, ちょうど胆汁酸代謝における抱合型胆汁酸と非抱合型胆汁酸の関係に類似しており, とくに基本構造としてステロイド骨格を有している点である. 教室では, 胆汁酸に免疫調節作用のあることを提唱してきた³²⁻³⁵が, その成績の中で, 非抱合型胆汁酸は抱合型胆汁酸にくらべ強い免疫調節作用のあることを明らかにしている. この関係が GL と GR においても成り立つとすれば, GR は GL と同じく免疫調節作用を有し, その作用は GL より強いと推定する. 第 2 に, GL の内服治療においても経静脈投与による治療に比べその効果は劣るもののトランスアミナーゼ降下作用が認められているにもかかわらず, 血液中に GL は検出されず, 一方, GR は, わずかに検出される³⁶. GR の免疫調節作用は向後検討すべき課題と考えている.

結 語

GL の immune-mediated cytotoxicity に及ぼす影響を実験的に検討した. T cell-mediated apoptosis にはマウス CD4^+ CTL の Fas 陽性マウス B リンパ腫細胞に対する細胞障害モデルを用い, また $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis にはマウス $\text{TNF}\alpha$ 感受性マウス線維芽細胞株およびヒト $\text{TNF}\alpha$ 感受性ヒト肝癌細胞株を用い, GL 添加の細胞障害活性に及ぼす影響を検討し, 以下の成績を得た.

1. GL は, $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において CD4^+ CTL の細胞障害活性を抑制した.
2. GL は, $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において $\text{TNF}\alpha$ -mediated apoptosis を抑制した.

これらの成績は, GL が immune-mediated cytotoxicity に対し抑制的に作用することを示しており, 慢性ウイルス性肝炎における GL 治療のトランスアミナーゼ改善作用に対し免疫学的根拠を与えるものである.

稿を終えるにあたり, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った恩師福井博教授に深甚なる謝意を表しますとともに, 御助言, 御校閲を賜った, 本学薬理学講座中嶋敏勝教授ならびに寄生虫学講座石坂重昭教授に深く感謝いたします. さらに本研究の遂行に当たり直接のご指導を賜りました吉川正英博士に感謝いたします. また終始, 御協力いただきました第 3 内科学教室諸兄に感謝いたします.

本研究の一部は, 1998 年 2 月アジア太平洋肝臓学会

(パース, オーストラリア), 1998年5月米国肝臓学会(ニューオーリンズ, 米国)および1998年11月第2回日本肝臓学会大会(金沢)において発表した。

文 献

- 1) Suzuki, H., Ohta, Y. and Takino, T. : Effects of glycyrrhizin on biochemical tests in patients with chronic hepatitis : Double blind trial. *Asian Med. J.* **26** : 423-438, 1983.
- 2) Fujisawa, K., Watanabe, Y. and Kimura, K. : Therapeutic approach to chronic active hepatitis with glycyrrhizin. *Asian Med. J.* **23** : 745-756, 1980.
- 3) Hayashi, J., Kashiwagi, S. and Noguchi, J. : Combination therapy of glycyrrhizin with drawal and human fibroblast interferon chronic hepatitis. *B. Clin. Ther.*, **11** : 161-169, 1989.
- 4) Finney, R. S. H. and Somers, G. F. : The anti-inflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **10** : 613-620, 1958.
- 5) Tangri, K. K., Seth, P. K. and Parmar, S. S. : Biochemical study of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of glycyrrhetic acid. *Biochem. Pharmacol.* **14** : 1277-1281, 1965.
- 6) Shiki, Y., Ishikawa, Y., Shirai, K., Saito, Y. and Yoshida, S. : Effect of glycyrrhizin on lysosomes labilization by phospholipase A 2. *Am. J. Chinese Med.* **14** : 131-137, 1986.
- 7) Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M. A., Pani, A. and Loddo, B. : Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature.* **281** : 689-690, 1979.
- 8) Ito, M., Sato, A. and Hirabayashi, K. : Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). *Antivir. Res.* **10** : 289-298, 1988.
- 9) Kumagai, A., Yano, S. and Otomo, M. : Study on the corticoid-like action of glycyrrhizin and the mechanism of its action. *Endocrinol. Jpn.* **4** : 17-27, 1957.
- 10) Tamura, Y., Nishikawa, T., Yamada, K., Yamamoto, M. and Kumagai, A. : Effects of glycyrrhetic acid and its derivatives on $\Delta 4$ -5 α - and 5 β -reductase in rat liver. *Drug Res.* **29** : 647-649, 1979.
- 11) 藤田禎三, 松下 操 : グリチルリチンの補体活性に及ぼす影響. ミノファーゲン 60周年記念誌, 熊谷郎, 石田名香雄, 鈴木 宏監修. アークメディア(株)出版(東京), p 96-98, 1999.
- 12) Hiramatsu, N., Hayashi, N., Katayama, K., Mochizuki, K., Kawanishi, Y., Kasahara, A., Fusamoto, H. and Kamada, T. : Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **19** : 1354-1359, 1994.
- 13) Okazaki, M., Hino, K., Fujii, K., Hanada, H., Nakanishi, Y., Kanazawa, S., Kobayashi, N. and Okita, K. : Immunohistochemical study of Fas antigen in liver of patients with chronic hepatitis and autoimmune liver disease. *Int. Hepatol. Commun.* **3** : 285-289, 1995.
- 14) Mita, E., Hayashi, N., Iio, S., Takehara, T., Hijioka, T., Kasahara, A., Fusamoto, H. and Kamada, T. : Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204** : 468-474, 1994.
- 15) Hayashi, N. : Apoptosis in liver disease. *Intern. Med.* **37** : 191-192, 1998.
- 16) Kallinowski, B., Haseroth, K., Marinos, G., Hanck, C., Stremmel, W., Theilmann, L., Singer, M. V., Rossol, S. : Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p 55 and p 75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin. Exp. Immunol.* **111** : 269-277, 1998.
- 17) Fang, J. W., Shen, W. W., Meager, A. and Lau, J. Y. : Activation of the tumor necrosis factor-alpha system in the liver in chronic hepatitis B virus infectin. *Am. J. Gastroenterol.* **91** : 748-753, 1996.
- 18) Watanabe, M., Wegmann, D. R., Ochi, A. and Hozumi, N. : Antigen presentation by a B-cell line transfected with cloned immunoglobulin heavy-and light-chain specific for a defined hapten. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 5247-5251, 1986.
- 19) Watanabe, M., Yoshikawa, M. and Hozumi, N. : Cytotoxic function of a cloned helper T cell line. *Immunol. Lett.* **15** : 133-138, 1987.

- 20) **Hennet, T., Richter, C. and Peterhans, E. :** Tumour necrosis factor α induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem. J.* **289** : 587-592, 1993.
- 21) **Hill, D. B., Schmidt, J., Shedlofsky, S. I., Cohen, D. A. and McClain, C. J. :** In vitro tumor necrosis factor cytotoxicity in Hep G2 liver cells. *Hepatology* **21** : 1114-1119, 1995.
- 22) **Alexander, J. J., Bey, E. and Geddlén, E. W. :** Establishment of a continuously growing cell line from a primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.* **50** : 2124-2128, 1976.
- 23) 山本佑夫, 前川義彦, 今村政弥: 抗アレルギー性アミノ酸製剤による肝炎の治療. *臨床内科小児科* **13** : 1-13, 1958.
- 24) 鈴木 宏, 太田康幸, 瀧野辰朗: 強力カミノファーゲンCの慢性肝炎に対する治療効果について 二重盲検法による検討. *医学のあゆみ* **102** : 562-578, 1977.
- 25) **Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. :** Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **14** : 207-232, 1996.
- 26) **Takayama, H., Kojima, H. and Shinohara, N. :** Cytotoxic T lymphocytes: The newly identified Fas (CD95)-mediated killing mechanism and a novel aspect of their biological functions. *Adv. Immunol.* **60** : 289-321, 1995.
- 27) **Nelson, D. R., Lim, H. L., Marousis, C. G., Fang, J. W., Davis, G. L., Shen, L., Urdea, M. S., Kolberg, J. A. and Lau, J. Y. :** Activation of tumor necrosis factor- α system in chronic hepatitis C virus infection. *Dig. Dis. Sci.* **42** : 2487-2489, 1997.
- 28) **Ishida, S., Sakiya, Y., Ichikawa, T., Taira, Z. and Awazu, S. :** Prediction of glycyrrhizin disposition in rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *Chem. Pharm. Bull.* **38** : 212-218, 1990.
- 29) 高橋美香子, 中野 哲, 武田 功, 熊田 卓, 杉山 恵一, 長田敏正, 桐山勢生, 豊田秀徳, 島田 眞, 佐守友実: C型慢性肝炎および肝硬変に対するグルチルリチン製剤投与時のグルチルリチンおよびグルチルレチン酸の血中動態について. *日本消化器病学会雑誌* **92** : 1929-1936, 1995.
- 30) **Ishida, S., Sakiya, Y., Ichikawa, T., Taira, Z. and Awazu, S. :** Prediction of glycyrrhizin disposition in rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *Chem. Pharm. Bull.* **38** : 212-218, 1990.
- 31) **Ishida, S., Sakiya, Y., Ichikawa, T., Taira, Z. and Awazu, S. :** Prediction of glycyrrhizin disposition in rat and man with liver failure by a physiologically based pharmacokinetic model. *J. Pharmacodyn.* **13** : 142-157, 1990.
- 32) **Yoshikawa, M., Tsujii, T., Matsumura, K., Yamao, J., Matsumura, Y., Kubo, R., Fukui, H. and Ishizaka, S. :** Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* **16** : 358-364, 1992.
- 33) **Yoshikawa, M., Matsui, Y., Ymemoto, N., Yamao, J., Kawamoto, H., Ishizaka, S., Fukui, H., Hozumi, N. and Tsujii, T. :** Effects of ursodeoxycholic acid on immunoglobulin and cytokine production and antigen presentation. In "Bile acid and Immunology" PA Berg, U Leuschner eds, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp 140-160, 1996.
- 34) 辻井 正, 吉川正英, 石坂重昭, 松村圭祐, 松為裕二: 平成6年度文部省科研報告書, pp 1-17, 1995.
- 35) 福井 博, 吉川正英, 山尾純一, 辻井 正: 原発性胆汁性肝硬変のウルソデオキシコール酸療法. 自己免疫性肝疾患-その病態と治療(西岡幹夫, 井上恭一編, 新興医学出版, 東京)p 187-191, 1996.
- 36) **Mizugaki, M., Itoh, K., Hayasaka, M., Ishiwato, S., Nozaki, S., Kagato, N., Hanadate, K. and Ishida, N. :** Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin and its aglycon, glycyrrhetic acid. *J. Immunoassay* **15** : 21-34, 1994.