

α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) による 実験的肝・胆管障害に及ぼす茵陳蒿湯の影響

竹田 茂文*, 飯塚 晃, 布野 秀二, 須藤 和彦
木内 典子, 吉田 千鶴, 油田 正樹, 細谷 英吉

津村薬理研究所

Effect of Chinese Prescription "Inchinko-to" on Experimental Hepatobiliary Injury Induced by α -Naphthylisothiocyanate

Shigefumi TAKEDA*, Akira IIZUKA, Shyuji FUNO, Kazuhiko SUDO,
Noriko KIUCHI, Chizu YOSHIDA, Masaki ABURADA, Eikichi HOSOYA

Tsumura Research Institute for Pharmacology

(Received June 29, 1984)

Abstract

Effect of Chinese prescription "Inchinko-to", which is frequently applied to the hepatobiliary diseases, on α -Naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced liver injury was investigated serum-biochemically and histopathologically.

Body weight loss, marked increases of serum-biochemical values (ALP, T-BIL, GOT, GPT) and histological findings, such as bile-duct proliferation, micro necrosis, individual cell atrophy, Glisson's capsule edema and inflammatory cell infiltration were observed 24 to 48 hr after oral administration of ANIT (45mg/kg). These various changes caused by ANIT were significantly reduced by Inchinko-to orally given at 2 hr before 24 hr after ANIT intoxication.

These findings suggest that Inchinko-to protects and/or remedies morphological and functional changes in the hepatobiliary system impaired with ANIT.

Keywords Inchinko-to, α -Naphthylisothiocyanate (ANIT), Hepatobiliary injury, Intrahepatic cholestasis, Chinese medicine.

Abbreviations ANIT ; α -Naphthylisothiocyanate, Inchinko-to (Yen-Chen-Hao-Tang) ; 茵陳蒿湯

緒 言

茵陳蒿湯は茵陳蒿、山梔子および大黃の3種の生薬から構成されており、漢方治療において黄疸、肝硬変症などの肝一胆道系の疾患に繁用されている方剤である。

茵陳蒿湯は臨床上カタル性黄疸に有効であり、¹⁾薬理学的にも胆汁分泌促進作用やOddi括約筋弛緩に由来する胆汁排出促進作用を有することが知られている。^{2,3)}また、d-galactosamine誘発の劇症型肝炎⁴⁾に対して予防効果を示すとの報告もある。

本研究では、代表的な胆汁うっ滞モデルである α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘発ラット

* 〒300-11 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586
3586 Yosiwara Ami-cho, Inashiki-gun, Ibaraki
300-11, Japan

肝・胆管障害に及ぼす茵陳蒿湯の影響を血清生化学値のおよび病理組織学的に検討したので報告する。

材料と方法

実験動物 6週令のSprague Dawley系雄性ラット（日本チャールス・リバー）を1週間の予備飼育後、実験に供した。

実験材料 茵陳蒿湯は茵陳蒿4、山梔子3、大黃1の混合生薬を10倍量の熱水で1時間抽出し、抽出液を減圧濃縮後、噴霧乾燥して得られたエキス粉末（収率1.25%）を用時蒸留水に溶解ないしは懸濁して用いた。

α -Naphthylisothiocyanate (ANIT: イーストマンコダック社) は投与容量が1 ml/kgとなるようオリーブ油に溶解し用いた。

実験方法 ANITは45mg/kgを単回経口投与し肝・胆管障害を誘発させた。茵陳蒿湯エキスはANIT投与前2時間目および投与後24時間目に1 g/kg宛経口投与した。茵陳蒿湯エキスの最終投与24時間後に断頭し、採血および肝摘出を行なった。

血清生化学的検査: 断頭により採取した血液を遠心分離（3000rpm, 10分間）し得られた血清について、アルカリホスファターゼ（ALP）、総ビリルビン（T-BIL）およびトランスアミナーゼ（GOT, GPT）の測定を自動生化学分析装置（SMAC-II, テクニコン社製）を用いて行なった。

病理組織学的検査: 断頭採血後直ちに摘出した肝臓は秤量後、常法によりホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン-エオジン重染色を施して、光学顕微鏡にて胆管の増生（bile-ducts proliferation）、肝の小壊死・のう胞性病変（micro necrosis）、肝細胞の単独萎縮（individual cell atrophy）、グリソン氏鞘の浮腫（Glisson's capsule edema）および炎症性細胞浸潤（Glisson's capsule inflammatory cell infiltration）、髄外造血（extramedullary hematopoiesis）および肝細胞の核分裂像（mitosis）を指標とした病理組織学的な検索を行なった。それぞれの病理所見について、病変の見られない標本を（-）、病変は程度に応じて軽度（+）、中等度（++）、強度（+++）に分類することにより組織学的に評価した。

統計処理: 体重、肝湿重量および血清生化学値について、平均値±標準誤差を算出した。その際、Smirnovoffの棄却検定を行なった。また、有意差検定はANIT障害群とANIT-茵陳蒿湯併用群との間でt-検定を実施した。

結 果

I. 体重に及ぼす作用

ANIT（45mg/kg）の経口投与により体重は24および48時間目において減少した。このANITによる体重減少は茵陳蒿湯エキスの併用により軽減された。なお、茵陳蒿湯エキスは単独ではVehicle投与群の体重曲線に著変を与えなかった。本結果をFig. 1に示す。

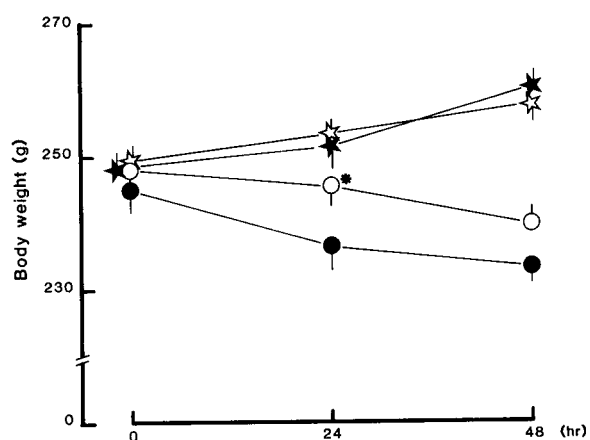


Fig.1 Effect of Inchinko-to on Body Weight in Rats Treated with ANIT

- ★—★ Vehicle (water 1ml/kg, *p.o.* ×2 and olive oil 1ml/kg, *p.o.*)-treated group (n: 10)
- ☆—☆ Inchinko-to (1g/kg, *p.o.* ×2)-treated group (n: 9)
- ANIT (45mg/kg, *p.o.*)-treated group (n: 10)
- Inchinko-to (1g/kg, *p.o.* ×2) and ANIT (45mg/kg, *p.o.*)-treated group (n: 10)

Data are expressed as the mean ± S.E.

*Statistical significance from the ANIT treated group at $p < 0.05$. (Student's *t*-test)

II. 肝湿重量に及ぼす作用

肝湿重量において、ANIT障害群、ANITと茵陳蒿湯エキスの併用群、茵陳蒿湯エキス投与群およびVehicle投与群との間に差異は認められなかった。

III. 血清生化学値に及ぼす作用

血清中のアルカリホスファターゼ（ALP）、総ビリルビン（T-BIL）およびトランスアミナーゼ（GOT, GPT）の各値はANIT（45mg/kg, *p.o.*）の

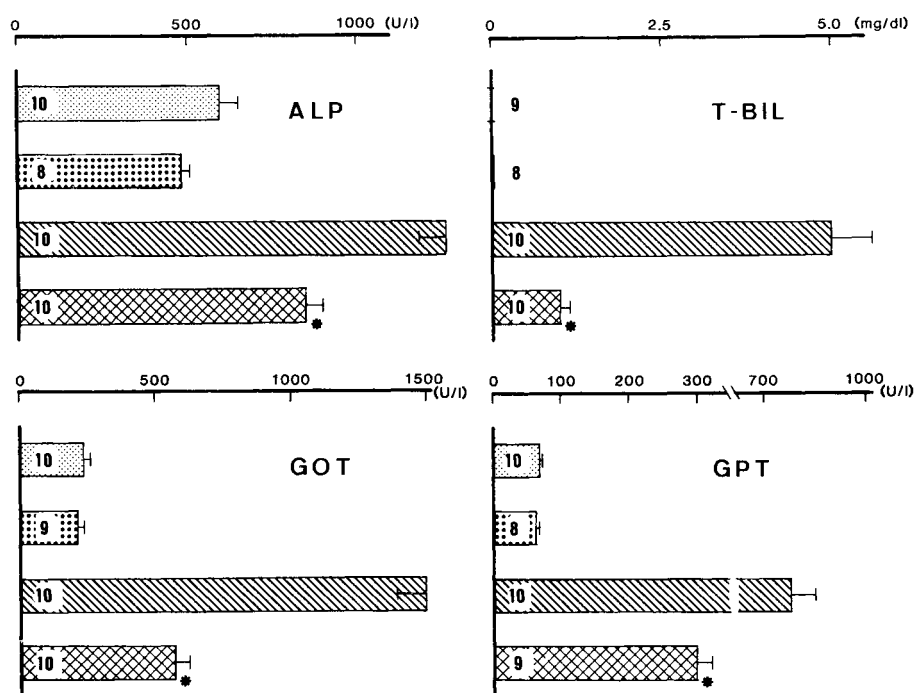


Fig.2 Effects of Inchinko-to on ALP, T-BIL, GOT and GPT in The Serum of ANIT-treated Rats

Vehicle (water 1ml/kg, *p.o.* $\times 2$ and olive oil 1ml/kg, *p.o.*)-treated group

Inchinko-to (1g/kg, *p.o.* $\times 2$)-treated group

ANIT (45mg/kg, *p.o.*)-treated group

Inchinko-to (1g/kg, *p.o.* $\times 2$) and ANIT (45mg/kg, *p.o.*)-treated group

Each column represents the mean $\pm$ S.E.

*Statistical significance from the ANIT treated group at $p < 0.001$. (Student's t-test)

Numbers in the columns indicate the number of animals.

Table I. Influences of Inchinko-to on Histopathological Changes in Rats Liver after ANIT Intoxication

Findings Treatment groups	Grade	Bile-duct proliferation				Micro necrosis				Individual cell atrophy				Glisson's capsule edema				Glisson's capsule cell infiltration				Extramedullary hepatopoiesis				Mitosis			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Vehicle	(n=10)	10				10				10				10				10				3	6	1		1	6	3	
Inchinko-to	(n=9)	9				7	2			8	1			9				9				2	7			8	1		
ANIT	(n=10)				10	4	2	4					10	3	7						10	4	6			8	2		
Inchinko-to + ANIT	(n=10)		2	8		9	1			2	8			6	4			3	2	5		4	5	1		6	2	2	

Grade sign: (--) No lesion, (+) Slight, (++) Moderate, (+++) Remarkable.

Each value represents the number of animals in each grade of histological findings.

投与後48時間で著しく増大するが、これらの変化はいずれも茵陳蒿湯エキスの併用により有意に抑制された。なお、茵陳蒿湯エキス自身は血清生化学値に著変を与えなかった。本結果をFig. 2に示す。

IV. 病理組織学的所見

Table I および Fig. 3~5 に示すように ANIT (45mg/kg, *p.o.*) の投与48時間後の肝組織像において、胆管増生、肝細胞の小壊死や萎縮、グリソン氏鞘の水腫および炎症性細胞浸潤などが観察されるが、これらの病理所見は茵陳蒿湯エキスの併用で軽減された。特に、肝細胞の小壊死およびグリソン氏鞘の水腫の抑制は顕著であった。



Fig. 3 Liver Morphology in Inchinko-to(1g/kg, *p.o.*×2)-Treated Rat

Any histological changes were not observed. Hematoxylin-eosin ×50



Fig. 4 Liver Morphology 48hr after ANIT (45 mg/kg, *p.o.*) Intoxication

Edema, inflammatory cell infiltration and bile-duct proliferation were found in the Glisson's capsule. Hematoxylin-eosin ×50

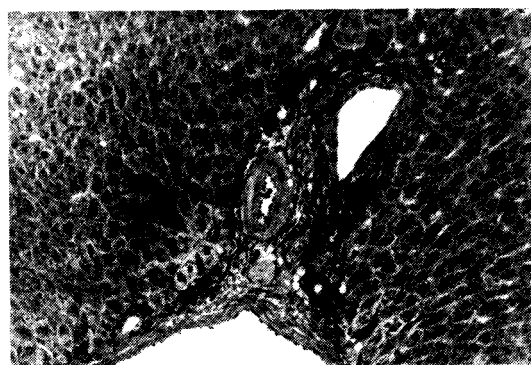


Fig. 5 Liver Morphology in Inchinko-to and ANIT-Treated Rat

Inchinko-to (1g/kg, *p.o.*) was given at 2hr before and 24hr after ANIT (45mg/kg, *p.o.*) intoxication.

Edema, inflammatory cell infiltration and bile-duct proliferation caused by ANIT were reduced. Hematoxylin-eosin ×50

考 察

茵陳蒿湯は、臨床上主として黄疸の治療に用いられ、薬理学的にも利胆作用^{2,3)}が認められている漢方方剤であり、胆汁うっ滞型肝障害に対する治療効果が期待される。本研究では、茵陳蒿湯の本効果を実験的に裏付けることを目的として、ラットのANIT誘発肝・胆管障害モデルを用いて検討した。

胆汁うっ滞は障害部位により肝外胆汁うっ滞と肝内胆汁うっ滞に大別される。これらの実験モデルとしては肝外胆管の障害には総胆管結紮を、肝内胆管の障害にはANITを用いるのが一般的である。

ANITは肝薬物代謝酵素により代謝を受けて活性物質となり、胆汁酸の合成、代謝および移送を障害して毛細胆管の障害、胆管上皮細胞の壊死、脱落を起こし、肝実質への胆汁うっ滞を惹起することが明らかにされている。⁵⁾

本研究に用いた障害誘発物質ANITは45mg/kgの単回経口投与とした。ANIT投与により体重の減少、血清生化学値(ALP, T-BIL, GOT, GPT)の顕著な増大ならびに種々の組織病変(胆管増生、肝細胞の壊死・萎縮、グリソン氏鞘の水腫・炎症性細胞浸潤など)が認められた。血清生化学値において、ALPは特に胆汁うっ滞時に活性が上昇する酵素で

あり、T-BILは黄疸を示唆し、トランスアミナーゼ (GOT, GPT) は細胞変性・壊死により上昇する。ANIT (45mg/kg, p.o.) により誘発される障害 (血清生化学的および病理組織学的異常) は投与後48時間で最大となり、以後漸時回復し、4日後ではほとんど自然治癒の状態に戻った。したがって、採血および肝摘出はANIT投与48時間後に実施した。

茵陳蒿湯はANIT投与前2時間目および投与後24時間目に1g/kg宛経口投与した。

茵陳蒿湯はANITにより引き起こされる体重減少、血清生化学値の増大および種々の組織学的変化を著明に抑制した。血清中ALPおよびT-BILの増大抑制は茵陳蒿湯がANITによる胆汁うっ滞を軽減したことを示唆し、病理所見におけるグリソン氏鞘の水腫の劇的な抑制および炎症性細胞の浸潤抑制は茵陳蒿湯が水分代謝を促進すると共に抗炎症作用を有することを示唆するものである。

以上の知見から、茵陳蒿湯がANITにより誘発される肝—胆道系の器質的および機能的変化に対して

予防的ないしは治療効果を有することが実験的に確かめられた。

文 献

- 1) 猪子吉人, 茵陳蒿の効驗, 東京医学会雑誌 4, 1279~1283, 1980
- 2) M.Kimura, The Cholekinetic Action of Component of Intinko and The Process to New Drug Design, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 10, 121-126, 1977
- 3) I.Okuno, A. Akahori, M.Kadowaki, Y.Nomura, K. Uchida and K.Takeda, Effects of Inchinko on Cholesterol and Bile Acid Metabolism in Rats, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 10, 143-147, 1977
- 4) N.Ihara and S.Arichi, Protective Effect of Oriental Crude Drugs and Kampo Medicament on A Fulminant Type of Galactosamine-induced Hepatitis, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 14, 45-55, 1981
- 5) Y.Fukumoto, K.Okita, T.Kodama, K.Noda, T.Harada, M.Mizuta and T.Takemoto, Studies of α -Naphthylisothiocyanate-Induced Hepatic Disturbance, *Hepato-Gastroenterol.* 27, 457-464, 1980