

## Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害に対する 黄連解毒湯エキス経口投与の影響

尾辻 和彦,\*<sup>a)</sup>太田 好次,<sup>a)</sup>篠原 力雄,<sup>b)</sup>石黒伊三雄<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>藤田保健衛生大学医学部生化学教室, <sup>b)</sup>藤田保健衛生大学衛生学部生化学教室

### Effect of oral administration of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract on gastric mucosal lesions in compound 48/80-treated rats

Kazuhiko OTSUJI,\*<sup>a)</sup>Yosiji OHTA,<sup>a)</sup>Rikio SHINOHARA<sup>b)</sup> and Isao ISHIGURO<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University

<sup>b)</sup>Department of Biochemistry, School of Health Sciences, Fujita Health University

(Received January 20, 1992. Accepted April 27, 1992.)

#### Abstract

The effect of oral administration of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) (OGT) extract on gastric mucosal lesions was examined in rats treated with compound 48/80 once daily for four successive days. In the compound 48/80-treated rats, gastric mucosal lesions occurred with an increase in mucosal lipid peroxide (LPO) level and decreases in mucosal superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GSH-px) activities. Mucosal xanthine oxidase (XOD) activity was increased by compound 48/80 treatment. The oral administration of OGT extract 30 min after compound 48/80 treatment prevented the development of gastric mucosal lesions. The increases of mucosal LPO level and XOD activity and the decreases of mucosal SOD, catalase, and GSH-px activities by compound 48/80 treatment were also prevented by this OGT extract administration. In addition, gastric mucosal XOD activity in compound 48/80-treated rats was inhibited by OGT extract *in vitro*. Serum LPO level was not changed at all by compound 48/80 treatment.

The present results indicate that OGT extract has a preventive effect on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions, and suggest that this preventive effect of OGT extract is due to the maintenance of a mucosal antioxidative system through its inhibitory action on stimulated superoxide anion production in a mucosal xanthine-XOD system.

**Key words** Oren-gedoku-to, compound 48/80, gastric mucosal lesions, lipid peroxidation, antioxidative system, xanthine-xanthine oxidase system.

**Abbreviations** DTNB, 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid); EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GSH-px, glutathione peroxidase; LPO, lipid peroxide; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; TBA, 2-thiobarbituric acid; XOD, xanthine oxidase; Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang), 黄連解毒湯.

#### 緒 言

最近, 急性胃粘膜障害の発症に活性酸素や過酸化

脂質の関与が示唆されている<sup>1,2)</sup>。Takeuchi ら<sup>3)</sup>は肥満細胞の脱顆粒薬である compound 48/80 をラットに投与し, その細胞から生理活性アミンであるセロトニンを遊離させると胃粘膜障害が発症することを

\*〒470-11 豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98  
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake,  
Aichi 470-11, Japan

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for  
WAKAN-YAKU 9, 101-109, 1992

認めている。また、Takemura ら<sup>4)</sup>、Takemura<sup>5)</sup> および Ueki ら<sup>6)</sup> は compound 48/80 惹起胃粘膜障害ラットにおいて、その組織の過酸化脂質 (LPO) レベルが上昇することを、また Takemura ら<sup>4)</sup> と Takemura<sup>5)</sup> はこの LPO レベルの上昇と胃粘膜障害が superoxide dismutase (SOD), catalase, アロプリノール、抗ラット好中球抗体などの投与で抑制され、しかも SOD と catalase の併用投与で一層強く抑制されることを示し、この胃粘膜障害の発症に活性酸素の関与することを示唆している。黄連解毒湯 (OGT) エキスは抗潰瘍作用を示すことが知られており、<sup>7,8)</sup> しかも最近、このエキシには  $O_2^-$  や  $\cdot OH$  の活性酸素を消去する作用のあることが認められている。<sup>9)</sup>

そこで、著者らは compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する OGT エキスの抑制効果を明らかにする目的で、compound 48/80 を 4 日間連続腹腔内投与したラットに OGT エキスを併用経口投与し、この漢方薬の胃粘膜障害に対する影響を潰瘍の面積、脂質過酸化、活性酸素の消去に関与する酵素の活性などを指標として調べた。

### 材料と方法

(1) 実験動物：日本エスエルシー (浜松) より購入し、オリエンタル酵母社製固形飼料で 1 週間飼育した 7 週齢 (体重：190~220 g) の雄性 Donryu 系ラットを実験に用いた。

(2) 試薬：OGT エキスは株式会社ツムラ (東京) より提供されたエキシ原末を用いた。Compound 48/80、牛血清アルブミンおよび牛赤血球 SOD はシグマ社製を、またその他の試薬は市販の試薬特級品を使用した。

(3) 実験方法：Compound 48/80 投与による胃粘膜障害の作製は、Takeuchi ら<sup>3)</sup> の方法に従って行った。即ち、胃粘膜障害は蒸留水に溶解した compound 48/80 (0.75 mg/kg 体重) をラットに 1 日 1 回、4 日間連続腹腔内投与して惹起させた。また、OGT エキシ末は蒸留水に懸濁し、体重 1 kg 当り 250 mg, 500 mg あるいは 1000 mg を compound 48/80 投与 30 分後に経口投与した。ラットは、これらの投与期間中絶食させ、水のみを自由摂取させた。なお、対照群には compound 48/80 溶液および OGT エキシ懸濁液と同量の蒸留水をそれぞれ腹腔内および経口投与した。ラットは、compound 48/80 の最終投与 24 時間後にエーテル麻酔下で下大静脈より血液を採取した後に屠殺した。胃粘膜障害の程度

(ulcer index) は、屠殺後直ちに 0.9% NaCl 10 ml を胃内に注入し、胃を摘出し、それを 10% ホルマリン液に 10 分間浸した後、大弯に沿って開き、腺胃部の出血斑を伴った潰瘍の面積 ( $mm^2$ ) を求め、その面積で表した。また、摘出した胃の粘膜はハサミで切り離し、得られた胃粘膜は LPO、非蛋白性 SH, SOD, catalase, glutathione peroxidase (GSH-px), xantine oxidase (XOD) および蛋白の測定に用いた。LPO および非蛋白性 SH の測定は、胃粘膜を冷 20 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液で 10% ホモジネートとした後、それぞれ Ohkawa ら<sup>10)</sup> のチオバルビツール酸 (TBA) 法および Seldak & Lindsay<sup>11)</sup> の 5,5-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) 法で行った。SOD, catalase および GSH-px の活性測定は、胃粘膜を冷 50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で 10% ホモジネートとし、そのホモジネートを 10,000×g、20 分間の遠心して得られた上清を 50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、24 時間透析後、それぞれ Oyanagui<sup>12)</sup> の XOD-NH<sub>2</sub>OH 法、Bergmeyer<sup>13)</sup> の方法、Hochstein & Utely<sup>14)</sup> の方法で行った。SOD 活性は、牛赤血球 SOD を標準物質として用い、37°C における胃粘膜試料の  $O_2^-$  消去活性に相当する牛赤血球 SOD の量として表した。Catalase と GSH-px 活性の測定は基質として  $H_2O_2$  を用いて行い、両酵素活性は 37°C において 1 分間に 1  $\mu$ mol の  $H_2O_2$  を分解する酵素量を 1 unit (U) として表した。また、XOD 活性の測定は、胃粘膜を冷 0.25 M シュクロースで 10% ホモジネートとし、そのホモジネートを 10,000×g で 20 分間遠心して得られた上清を 0.25 M シュクロースで 24 時間透析した後、Hashimoto<sup>15)</sup> の方法で行った。XOD 活性の測定は、基質としてキサンチンを用いて行い、その活性は 30°C で 1 分間に 1  $\mu$ mol の尿酸を生成する酵素量を 1 unit (U) として表した。蛋白の測定は Lowry ら<sup>16)</sup> の方法に従って行い、その標準物質には牛血清アルブミンを用いた。また、屠殺時に採取した血液から分離した血清は、LPO の測定に用いた。血清 LPO は、TBA を用いる八木ら<sup>17)</sup> の方法で測定し、血清と胃粘膜の LPO 量は、マロンジアルデヒド (MDA) の量として表した。なお、各群間での有意差検定は、Student's *t*-test を用いて行った。

### 結 果

1. Compound 48/80 投与ラットにおける胃粘膜の潰瘍面積 (ulcer index), LPO レベルおよび活

## 性酸素の消去に關与する酵素活性の経日的変動

Fig. 1に示すように, compound 48/80を1日1回, 4日間投与したラットでは胃粘膜は障害され,

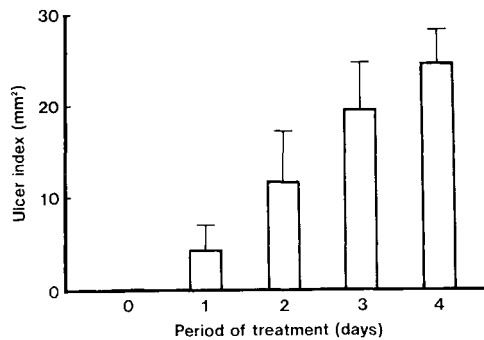


Fig. 1 Development of gastric mucosal lesions in rats treated with compound 48/80 over a 4 day period.

Total area of damaged gastric mucosa was determined macroscopically. Values are means  $\pm$  S.D. (n=5).

その ulcer index は経日的に増加した。また, 胃粘膜組織の LPO レベルは compound 48/80 投与1日目より有意に上昇し, しかもこの上昇は経日的に増した (Fig. 2-A)。胃粘膜組織の SOD 活性は, compound 48/80 投与2日目より低下し, 投与4日目では対照群の約65%であった (Fig. 2-B)。一方, 胃粘膜組織の GSH-px と catalase の活性は, それぞれ Fig. 2-Cおよび2-Dに示すように compound 48/80 投与1日目より低下し, しかも経日的な低下を示した。

## 2. Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害に対する OGT エキス投与の影響

Table Iに示すように, compound 48/80を1日1回, 4日間連続投与したラットの胃粘膜の ulcer index は  $49.7 \pm 12.9 \text{ mm}^2$  であったが, OGT エキスを 250 mg/kg, 500 mg/kg および 1000 mg/kg 併用投与した群の ulcer index は, それぞれ  $26.6 \pm 4.4 \text{ mm}^2$ ,  $16.3 \pm 9.2 \text{ mm}^2$  および  $17.1 \pm 3.5 \text{ mm}^2$  であった。このように 250 mg/kg の OGT エキス投与により compound 48/80 投与による胃粘膜障害の増悪化は抑制され, しかも 500 mg/kg の OGT エキス

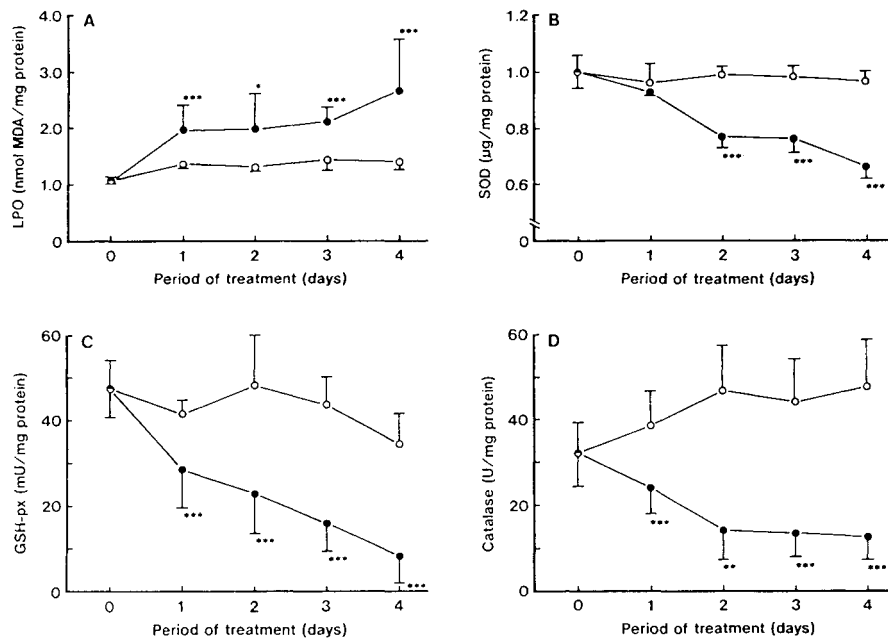


Fig. 2 Changes in gastric mucosal LPO (A) level and SOD (B), GSH-px (C), and catalase (D) activities in rats treated with and without compound 48/80 over a 4 day period.

Gastric mucosal LPO, SOD, GSH-px, and catalase were assayed as described in Materials and Methods. ●, compound 48/80-treated group; ○, untreated group (control). Values are means  $\pm$  S.D. (n=5). Vs corresponding control: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.02$ ; \*\*\*,  $p < 0.01$ .

Table I Effect of oral administration of OGT extract on gastric mucosal lesions in rats treated with compound 48/80.

| Treatment                       | n  | Ulcer index (mm <sup>2</sup> ) |
|---------------------------------|----|--------------------------------|
| Compound 48/80                  | 10 | 49.7±12.9                      |
| Compound 48/80+OGT (250 mg/kg)  | 6  | 26.6± 4.4*                     |
| Compound 48/80+OGT (500 mg/kg)  | 11 | 16.3± 9.2**                    |
| Compound 48/80+OGT (1000 mg/kg) | 4  | 17.1± 3.5**                    |

Values are means±S.D.

Vs compound 48/80: \*, $p<0.01$ ; \*\*, $p<0.001$ .

投与はその 250 mg/kg 投与よりも強い胃粘膜障害抑制効果を示したが、この抑制効果は 1000 mg/kg の OGT エキス投与の場合とはほぼ同等であった。Compound 48/80 単独投与群と OGT (500 mg/kg) 併用投与群の代表的な胃の像は、Fig. 3 に示すようであった。Compound 48/80 単独投与群の胃では、腺胃部に広範囲な出血斑を伴う潰瘍がみられた (Fig. 3-A)。それに対し、OGT 併用投与群の胃では明らかに潰瘍形成は抑制されていた (Fig. 3-B)。

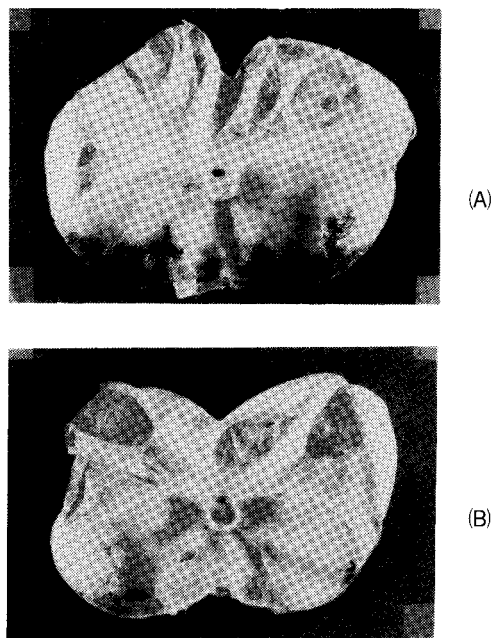


Fig. 3 Gross appearances of gastric mucosal lesions in rats treated with compound 48/80 alone (A) or with compound 48/80 plus OGT extract (B).

### 3. Comopund 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の LPO と非蛋白性 SH レベルに対する OGT エキス投与の影響

対照群と OGT 単独投与群の胃粘膜組織の LPO 量は、それぞれ  $1.51\pm0.22$  nmol MDA/mg protein および  $1.28\pm0.09$  nmol MDA/mg protein であるのに対し、compound 48/80 単独投与群では  $2.63\pm0.91$  nmol MDA/mg protein と、有意に上昇していた (Fig. 4-A)。それに対し、OGT 併用投与群の胃

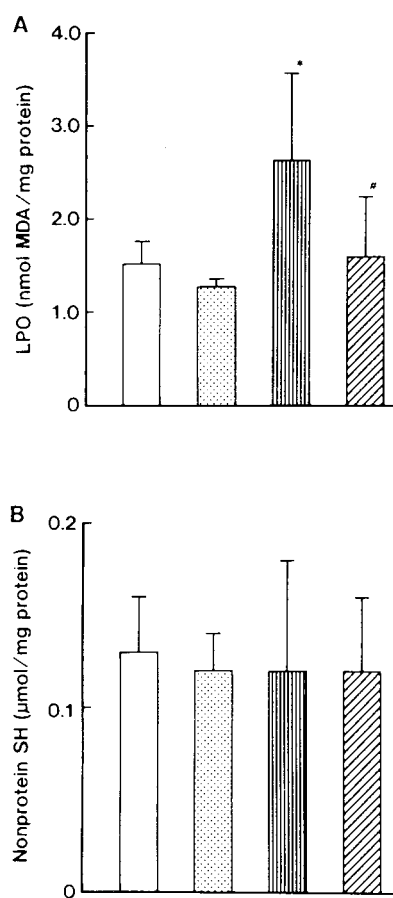


Fig. 4 Effect of oral administration of OGT extract on gastric mucosal LPO (A) and non-protein SH (B) levels in rats treated with compound 48/80.

Gastric mucosal LPO and nonprotein SH in rats treated with and without compound 48/80 and/or OGT extract were determined as described in Materials and Methods. Values are means ±S.D. (n=5). □, control; ▨, OGT; ▩, compound 48/80; ▤, compound 48/80+OGT. Vs control: \*, $p<0.02$ . Vs compound 48/80: #, $p<0.05$ .

粘膜組織のLPO量は $1.59 \pm 0.62$  nmol MDA/mg proteinと、ほぼ対照群のレベルであり、compound 48/80投与による胃粘膜組織のLPOレベルの上昇はOGTエキスイ投与により有意に抑制された (Fig. 4-A)。

Fig. 4-Bに示すように、胃粘膜組織の非蛋白性SH量に対照群、OGT単独投与群、compound 48/80単独投与群およびOGT併用投与群の間で差はなかった。

#### 4. Compound 48/80投与ラットの胃粘膜組織のSOD, catalase および GSH-px 活性に対する OGT エキスイ投与の影響

対照群とOGT単独投与群の胃粘膜組織のSOD活性はそれぞれ $0.98 \pm 0.19$   $\mu$ g/mg proteinおよび $0.97 \pm 0.09$   $\mu$ g/mg proteinであったが、compound 48/80単独投与群の本酵素活性は $0.66 \pm 0.04$   $\mu$ g/mg proteinで、有意な低下を示した (Table II)。一方、OGT併用投与群の胃粘膜組織のSOD活性は $0.94 \pm 0.06$   $\mu$ g/mg proteinと、ほぼ対照群のレベルにあり、compound 48/80投与による胃粘膜組織の本酵素活性の低下はOGT投与により抑制された (Table II)。

対照群とOGT単独投与群の胃粘膜組織のGSH-px活性はそれぞれ $34.4 \pm 7.5$  mU/mg proteinおよび $36.9 \pm 4.7$  mU/mg proteinであるのに対し、compound 48/80単独投与群の本酵素活性は $8.5 \pm 6.1$  mU/mg proteinと、対照群の約25%であった (Table II)。一方、OGT併用投与群の胃粘膜組織のGSH-px活性は $25.7 \pm 13.0$  mU/mg proteinと、対照群の約75%であり、compound 48/80投与による本酵素活性の低下はOGT投与により有意に抑制された (Table II)。

対照群とOGT単独群の胃粘膜組織でのcatalase活性はそれぞれ $4.73 \pm 1.16$  U/mg proteinおよび $4.26 \pm 0.82$  U/mg proteinであるのに対し、compound 48/80単独投与群の本酵素活性は $1.25 \pm 0.54$  U/mg proteinと、対照群の約25%であった (Table II)。一方、OGT併用投与群の胃粘膜組織のcatalase活性は $2.18 \pm 0.42$  U/mg proteinと、対照群の約46%であり、compound 48/80投与による本酵素活性の低下はOGT投与により有意に抑制された (Table II)。

#### 5. Compound 48/80投与ラットの胃粘膜組織のXOD 活性に対する OGT エキスイ投与の影響

対照群とOGT単独投与群の胃粘膜組織のXOD活性はそれぞれ $0.16 \pm 0.09$  mU/mg proteinおよび $0.15 \pm 0.05$  mU/mg proteinで、両群に差がないのに対し、compound 48/80単独投与群の本酵素活性は $0.47 \pm 0.22$  mU/mg proteinと、対照群の約3倍であった (Fig. 5)。一方、OGT併用投与群の胃粘膜組織のXOD活性は $0.20 \pm 0.06$  mU/mg proteinと、対照群の約1.5倍で、compound 48/80投与による本酵素活性の上昇は、OGT投与により有意に抑制された (Fig. 5)。

#### 6. In vitroにおける compound 48/80投与ラットの胃粘膜組織のXOD 活性に対する OGT エキスイの影響

Compound 48/80投与ラットの胃粘膜組織のXOD活性は、Table IIIに示すように、この酵素反応系へのOGTエキスイの添加により抑制された。即ち、本酵素活性はOGTエキスイ添加濃度が0.5 mg/mlでは約55%抑制され、またその濃度が1.0 mg/mlでは約64%抑制された。

Table II Effect of oral administration of OGT extract on gastric mucosal SOD, catalase, and GSH-px activities in rats treated with compound 48/80.

| Enzyme                       | Control         | OGT             | Compound 48/80       | Compound 48/80 + OGT      |
|------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------------|
| SOD<br>( $\mu$ g/mg protein) | $0.98 \pm 0.19$ | $0.97 \pm 0.09$ | $0.66 \pm 0.04^{**}$ | $0.94 \pm 0.06^{##}$      |
| Catalase<br>(U/mg protein)   | $4.73 \pm 1.16$ | $4.26 \pm 0.82$ | $1.25 \pm 0.54^*$    | $2.18 \pm 0.42^{\#}$      |
| GSH-px<br>(mU/mg protein)    | $34.4 \pm 7.5$  | $36.9 \pm 4.7$  | $8.5 \pm 6.1^{**}$   | $25.7 \pm 13.0^{**,\#\#}$ |

Values are means  $\pm$  S.D. (n=5).

Vs control: \*,  $p < 0.02$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Vs compound 48/80: #,  $p < 0.05$ ; ##,  $p < 0.02$ ; ###,  $p < 0.01$ .

Table III Effect of OGT extract on XOD activity in gastric mucosal tissues from compound 40/80-treated rats *in vitro*.

| Addition        | n | Activity (mU/mg protein) | Inhibition % |
|-----------------|---|--------------------------|--------------|
| None            | 5 | 0.69±0.14#               | 0            |
| OGT (0.5 mg/ml) | 5 | 0.31±0.13*               | 55           |
| OGT (1.0 mg/ml) | 5 | 0.25±0.12*               | 64           |

#Values are means±S.D.

Vs compound 48/80: \*,  $p < 0.001$ .

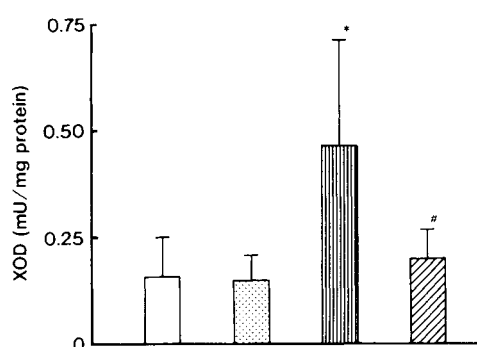


Fig. 5 Effect of oral administration of OGT extract on gastric mucosal XOD activity in rats treated with compound 48/80.

Gastric mucosal XOD activity in rats treated with and without compound 48/80 and/or OGT extract was assayed as described in Materials and Methods. Values are means±S.D. (n=5).

□, control; ▨, OGT; ▤, compound 48/80; ▧, compound 48/80+OGT. Vs control: \*,  $p < 0.02$ . Vs compound 48/80: #,  $p < 0.05$ .

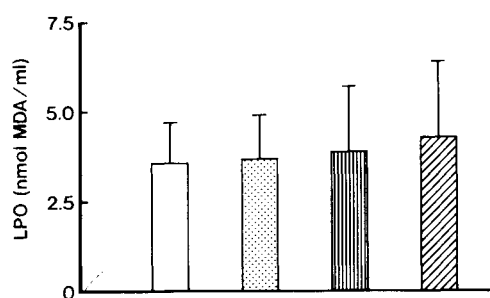


Fig. 6 Serum LPO level in rats treated with and without compound 48/80 and/or OGT extract.

Serum LPO in rats treated with and without compound 48/80 and/or OGT extract was determined as described in Materials and Methods. Values are means±S.D. (n=5). □, control; ▨, OGT; ▤, compound 48/80; ▧, compound 48/80+OGT.

## 7. Compound 48/80 投与ラット血清 LPO レベルに対する OGT エキス投与の影響

対照群, OGT 単独投与群, compound 48/80 単独投与群および OGT 併用投与群の血清 LPO レベルは Fig. 6 に示すようであり, このレベルには各群間で有意な差は認められなかった。

## 考 察

最近, Takeuchi ら<sup>3)</sup> は, 肥満細胞の脱顆粒薬である compound 48/80 を投与したラットで胃粘膜障害が惹起されることを示し, また Takemura ら<sup>4,5)</sup> は, この胃粘膜障害には脂質過酸化やキサンチン-XOD 系あるいは多核白血球由来の  $O_2^-$  などの活性酸素が関与することを示唆している。<sup>4,6)</sup> しかも, Takemura ら<sup>4,5)</sup> は compound 48/80 投与ラットにおいて, その投与後数分より数時間にわたり持続的に胃粘膜血流量が低下し, 投与後 24 時間では元のレベルにまで回復することを認め, この胃粘膜障害が虚血-再灌流障害と類似した機序で起きることを推測している。

OGT エキスは抗潰瘍作用を示すことが知られており, その抗潰瘍作用はこのエキ스가胃粘膜抵抗性を増強させ, 副次的 (二次的) に胃酸分泌を抑制することに基づいていると推察されている。<sup>7,8)</sup> また, 臨床的にも OGT エキスが表層性胃炎, 胃出血などに対して有効であることが報告されている。<sup>18,19)</sup> 最近, 吉川ら<sup>9)</sup> は electron spin resonance (ESR) を用いたスピントラッピング法により OGT エキスには  $O_2^-$  や  $\cdot OH$  の活性酸素を消去する作用のあることを明らかにしている。

そこで, 著者らは compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する OGT エキスの抑制効果を明らかにするために, compound 48/80 を 1 日 1 回, 4 日間連続投与ラットにおいて, 胃粘膜障害およびその障害時の胃粘膜組織の LPO レベルと活性酸素の消去に關与する酵素の活性の経日的な変動と共に, これら胃粘膜組織の XOD 活性の変動に対する OGT エキス経口投与の影響について調べた。また, Takeuchi ら<sup>3)</sup> はラットに compound 48/80 を投与すると, 肥満細胞から遊離されたセロトニンの血中レベルが投与後, 30 分で最高になることを報告しているため, 著者らは OGT エキスの compound 48/80 投与による肥満細胞からのセロトニンの遊離に及ぼす影響を除外するため, compound 48/80 投与後 30 分の時点でラットに OGT エキスを経口投与した。

Compound 48/80 を 4 日間連続腹腔内投与したラ

ットでは、経日的な胃粘膜障害の増悪化が明らかに認められた。更に、この障害された胃粘膜組織では、Takemura ら<sup>4)</sup>、Takemura<sup>5)</sup> および Ueki ら<sup>6)</sup> が報告しているように LPO レベルの上昇がみられ、しかもこの上昇が経日的に増すことが確認された。また、compound 48/80 投与ラットにおいて、障害された胃粘膜組織の活性酸素の消去に関与する SOD, catalase および GSH-px の活性変動を経日的に調べると、投与 1 日目に catalase と GSH-px の活性の低下が起き、また投与 2 日目に SOD 活性の低下が認められた。しかも、compound 48/80 投与により胃粘膜組織の XOD 活性の上昇がみられた。この XOD 活性の上昇は、前述したように、compound 48/80 投与により胃粘膜に微小循環障害が惹起された結果、その組織が虚血状態になったことによるものと思われる。これらの結果は、catalase や GSH-px は  $O_2^-$  によって失活することが知られており<sup>20, 21)</sup>、また Cu, Zn-SOD は  $H_2O_2$  によって失活し<sup>22)</sup>、しかもラット胃粘膜組織の SOD 活性の約半分は Cu, Zn-SOD に由来することが報告されている<sup>23)</sup> ので、compound 48/80 投与ラット胃粘膜組織ではまず過剰に生成する  $O_2^-$  によって  $H_2O_2$  消去系の酵素、catalase と GSH-px が失活し、 $H_2O_2$  が組織内に蓄積し、その結果、 $O_2^-$  消去系の酵素である Cu, Zn-SOD が失活したことを示唆している。従って、これらのことより、compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織では、キサンチン-XOD 系による  $O_2^-$  の生成が亢進し、その結果、SOD, catalase, GSH-px などの活性が低下したものと推察された。また、このことおよび Takemura ら<sup>4)</sup> や Takemura<sup>5)</sup> の XOD 阻害剤であるアロプリノールの投与で compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害が抑制されるとの報告から、キサンチン-XOD 系による  $O_2^-$  生成の亢進は compound 48/80 投与による胃粘膜障害の発症・進展に関与していることが強く示唆される。

一方、OGT 併用投与ラットでは、胃粘膜障害が明らかに抑制され、しかも胃粘膜組織の LPO レベルの上昇並びに SOD, catalase および GSH-px 活性の低下も抑制されていた。また、この OGT 併用投与群では胃粘膜組織の XOD 活性の上昇は抑制され、更に *in vitro* において OGT エキスは compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の XOD 活性を阻害することが認められた。従って、これらの結果から、OGT エキスはキサンチン-XOD 系による  $O_2^-$  の生成を XOD 活性を直接あるいは間接的に阻害することによって抑制していることが推察され

る。また、OGT エキスが  $O_2^-$  消去作用を有することおよび Takemura ら<sup>4)</sup> や Takemura<sup>5)</sup> が示唆しているキサンチン-XOD 系および多核白血球による  $O_2^-$  生成の亢進を考慮に入れると、OGT エキスによるこのキサンチン-XOD 系を介する  $O_2^-$  生成の抑制やキサンチン-XOD 系と共に多核白血球によって生成される  $O_2^-$  の消去が、このエキスの経口投与による compound 48/80 惹起胃粘膜障害の抑制に寄与していると思われる。また、胃粘膜組織は高濃度の非蛋白性 SH (主に還元型グルタチオン) を含有することが報告されている<sup>24)</sup> が、非蛋白性 SH が胃粘膜の恒常性の維持に果たす役割に関しては一定の見解が得られていない。<sup>25-28)</sup> 本実験の compound 48/80 投与ラットでは、胃粘膜組織の非蛋白性 SH レベルに変動がみられなかった。このことは、恐らくこの胃粘膜障害の発症・進展には主として SOD, catalase, GSH-px などの活性酸素の消去に関与する酵素の活性低下が寄与していることを示唆していると思われる。また、compound 48/80 投与で胃粘膜組織の GSH を基質とする GSH-px 活性は著しく低下したので、この活性低下によって GSH が利用されなくなる結果、その組織の非蛋白 SH レベルが変動しなかったのではないかと推察される。更に、compound 48/80 投与による胃粘膜障害の発症・進展が全身的な活性酸素による障害に基づいているか否かを明らかにする目的で、その指標となる血清 LPO レベルについて調べた。その結果、compound 48/80 投与による血清 LPO レベルの変動はみられなかった。このことより、compound 48/80 惹起胃粘膜障害は、この薬剤による全身的な活性酸素代謝の変動によるものでなく、胃粘膜部位での局所的な活性酸素代謝の変動によるものと考えられる。

従って、以上のことより、compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害に対する OGT エキス経口投与による抑制効果は、このエキスが活性酸素消去作用を示すことばかりでなく、compound 48/80 投与による胃粘膜組織の XOD 活性の上昇を抑制することにより、胃粘膜組織の LPO レベルの上昇と活性酸素の消去に関与する酵素である SOD, catalase, GSH-px などの活性低下を抑制することに基づいていると推察された。

しかし、OGT エキスは黄連、黄芩、黄柏、山梔子などから構成されているので、このエキスの compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する抑制が構成するどの生薬によるかは今後検討する必要がある。しかしながら、OGT の構成生薬である黄連は水浸拘束ストレスによる胃粘膜障害を抑制すること

が知られており<sup>29)</sup>、またこの胃粘膜障害の発症には活性酸素や LPO の関与が報告されている<sup>30)</sup>。従って、黄連に含まれている成分が compound 48/80 惹起胃粘膜障害の抑制に関与している可能性が考えられる。

## 結 論

Compound 48/80 を 1 日 1 回、4 日間投与したラットへの OGT エキスの経口投与は、惹起された胃粘膜障害を抑制したばかりでなく、その障害された胃粘膜組織でみられた LPO レベルの上昇並びに SOD, catalase および GSH-px などの酵素活性の低下を抑制した。また、この障害された胃粘膜組織で XOD 活性の上昇がみられたが、この活性上昇は OGT エキスの経口投与により抑制され、しかもこの上昇した本酵素活性は *in vitro* においても OGT エキスによって阻害された。これらの結果より、compound 48/80 惹起胃粘膜障害の発症・進展に胃粘膜組織のキサンチン-XOD 系における活性酸素生成の亢進が関与していると考えられた。また、この胃粘膜障害に対する OGT エキスの抑制作用は、このエキスが胃粘膜組織のキサンチン-XOD 系における  $O_2^-$  生成の亢進を抑制し、その組織の LPO レベルの上昇と SOD, catalase, GSH-px などの活性酸素の消去に関与する酵素の活性低下を抑制していることに基づいていると推察された。

## 文 献

- 1) Smith, S. M. and Kvietys, P. R. : Gastric ulcers : Role of oxygen radicals. *Critical. Care Med.* **16**, 892-898, 1988.
- 2) Stein, H. J., Esplugues, J., Whittle, B. J. R., Bauerfeind, P., Hinder, R. A. and Blum, A. L. : Direct cytotoxic effect of oxygen radicals on the gastric mucosa. *Surgery*. **106-2**, 318-324, 1989.
- 3) Takeuchi, K., Ohtsuki, H. and Okabe, S. : Pathogenesis of compound 48/80-induced gastric lesions in rats. *Dig. Diseases and Sciences*. **31**, 392-400, 1986.
- 4) Takemura, T., Yoshikawa, T., Yosida, N., Takano, H., Tasaki, N., Naito, Y., Ueda, S., Sugino, S. and Kondo, M. : Role of lipid peroxidation and oxygen radicals in compound 48/80-induced gastric mucosal injury in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **24 (Suppl. 162)**, 51-54, 1989.
- 5) Takemura, T. : Role of oxygen radicals derived from polymorphonuclear leukocytes in gastric mucosal injury in rats. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* **99 (1)**, 117-131, 1990.
- 6) Ueki, S., Seiki, M., Yoneta, T., Omata, T., Hori, Y., Ishikawa, M. and Tagashira, E. : Effect of Z-103 on compound 48/80-induced gastric lesions in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **24 (suppl. 162)**, 202-205, 1989.
- 7) 高橋英樹, 三浦 治, 伊藤敬三 : 数種漢方処方の胃機能に対する薬理学的研究 (第 1 報) エタノールおよびアスピリンによる胃粘膜関門の破綻に対する黄連解毒湯, 三黄瀉心湯, 安中散および大柴胡湯の作用. *日薬理誌* **89**, 299-306, 1987.
- 8) 高橋英樹, 今西勝江, 三浦 治, 岡岡栄三郎, 渡辺裕司 : 数種漢方処方の胃機能に対する薬理学的研究 (第 3 報) エタノールおよびアスピリンによる胃粘膜損傷の形成に対する黄連解毒湯, 三黄瀉心湯, 安中散および大柴胡湯の作用. *日薬理誌* **91**, 319-324, 1988.
- 9) 吉川敏一, 高橋周史, 内藤裕二, 谷川 徹, 上田茂信, 小山田裕一, 杉野 成, 近藤元治 : 漢方薬の活性酸素産生系に及ぼす影響. 電子スピン共鳴によるスピントラッピング法を用いての検討. *医学のあゆみ* **152**, 741-742, 1990.
- 10) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358, 1979.
- 11) Seldak, J. and Lindsay, R. H. : Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmans reagent. *Anal. Biochem.* **25**, 192-205, 1968.
- 12) Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142**, 290-296, 1984.
- 13) Bergmeyer, H. U. : Zur Messung von Katalase-Aktivitäten (Measurement of catalase activity). *Biochem. Z.* **327**, 255-258, 1955.
- 14) Hochstein, P. and Utely, H. : Hydrogen detoxication by glutathione peroxidase and catalase in rat liver homogenates. *Mol. Pharmacol.* **4**, 574-579, 1968.
- 15) Hashimoto, S. : A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal. Biochem.* **62**, 426-435, 1974.
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **103**, 265-275, 1951.
- 17) 八木国夫, 西垣都雄, 大浜宏文 : 血清チオバルビツール酸値測定法. *ビタミン* **37**, 105-112, 1968.
- 18) 水野修一 : 消化性潰瘍からの出血に対する黄連解毒湯での治験例. *漢方医学* **5 (11)**, 13-16, 1981.
- 19) 水野修一 : 消化性潰瘍からの出血に対する黄連解毒湯の治療効果. *日消病会誌* **79**, 1043, 1982.
- 20) Kono, Y. and Fridovich, I. : Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* **257**, 5751-5754, 1982.
- 21) Blum, J. and Fridovich, I. : Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 500-508, 1985.
- 22) Hodgson, E. K. and Fridovich, I. : The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide : Inactivation of the enzyme. *Biochemistry*. **14**, 5294-5299, 1975.



- 23) 北村賢文, 山岸茂樹, 荒川 明, 岸 克彦, 度会京子, 伊藤 圓, 篠原力雄: 胃粘膜病変における粘膜内SOD活性の変動. 臨床病理 **37** (9), 988-993, 1989.
- 24) Boyd, S. C., Sasame, S. C. and Boyd, M. R. : High concentration of glutathione in glandular stomach : possible implications for carcinogenesis. *Science*. 205, 1010-1012, 1979.
- 25) Boyd, S. C., Sasame, H. A. and Boyd, M. R. : Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethylmaleate given subcutaneously to rats. *Life Sciences*. 28 (26), 2987-2992, 1981.
- 26) Stein, H. J., Hinder, R. A. and Oosthuizen, M. M. J. : Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion : Protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery*. **108** (2), 467-474, 1990.
- 27) Shelly, C. Lu., Kuhlenkamp, J. Robert, A. and Kaplowitz, N. : Role of glutathione status in protection against ethanol-induced gastric lesions. *Pharmacology*. **38**, 57-60, 1989.
- 28) Robert, A., Eberle, D. and Kaplowitz, N. : Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. *Am. J. Physiol.* **247**, G296-G304, 1984.
- 29) 渡辺和夫, 渡辺裕司, 後藤義明: 実験胃潰瘍に対する和漢薬処方の効果. 第9回和漢薬シンポジウム, pp. 51-57, 1975.
- 30) Yoshikawa, T., Miyagawa, H., Yoshida, N., Sugino, S. and Kondo, M. : Increase in lipid peroxidation in rat gastric mucosal lesions induced by water-immersion restraint stress. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1**, 271-277, 1986.