

部分切除肝ラットにおける小柴胡湯の肝障害に及ぼす影響 (第1報)

— 酵素の変動および脂質代謝について —

福井 紀子,*^{a)} 米山 良樹^{b)}, 長谷川 律子^{b)}, 原中 瑠璃子^{b)}, 中川 滋木^{b)}, 森田 哲生^{c)}^{a)}千葉県立衛生短期大学, ^{b)}日本大学医学部生化学教室, ^{c)}福山大学薬学部生化学教室

Effects of Sho-saiko-to on the experimentally induced regenerating liver Part I: Changes of activities of several enzymes related to hepatic injury

Noriko FUKUI,*^{a)} Yoshiki YONEYAMA^{b)} Ritsuko HASEGAWA^{b)}
Ruriko HARANAKA^{b)} Shigeki NAKAGAWA^{b)} and Tetsuo MORITA^{c)}^{a)}Chiba College of Health Science^{b)}Department of Biochemistry, Nihon University School of Medicine^{c)}Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University

(Received March 9, 1992. Accepted September 2, 1992.)

Abstract

Sho-saiko-to has been widely used clinically in various types of hepatic diseases. In order to elucidate the effects of Sho-saiko-to on the hepatic regeneration after partial hepatectomy, this study was undertaken to investigate the enzyme activities in liver and plasma during hepatic regeneration. Sho-saiko-to (1000 mg/kg/day, TSUMURA) was administered orally through the drinking water 3 weeks before partial hepatectomy and continued this administration till sacrifice. Thereafter, the activities of enzymes are measured serially at 22, 28, 72 hrs and 8 days after partial hepatectomy. Moreover the lipid levels in serum and liver, and activity of hepatic triglyceride lipase (H-TGL) was measured. Serum GOT, GPT, OCT, LAP, γ -GTP levels increased markedly 22, 28 hrs after partial hepatectomy, and tended to decrease at 72 hrs and 8 days. These increments were significantly inhibited in the Sho-saiko-to group as compared to the control group. GOT, GPT, LDH and γ -GTP activities in the liver changed with time, and these changes were milder in the Sho-saiko-to group than in the control group. TG and PL levels in serum decreased significantly after partial hepatectomy, and were milder in the Sho-saiko-to group. TG, T-cho, PL levels in the liver increased after partial hepatectomy and no significant differences were observed between the Sho-saiko-to and control groups. H-TGL activities decreased after hepatectomy and these decrements were inhibited by the administration of Sho-saiko-to. These results suggest that Sho-saiko-to has the protective property against hepatic injury induced by partial hepatectomy, and the disorder of lipid metabolism after partial hepatectomy was improved by the administration of Sho-saiko-to.

Key words Sho-saiko-to (Syo-saiko-to), regenerating liver.**Abbreviation** Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

緒 言

肝の特長の一つに旺盛な再生能を有していることがある。すなわちラットの肝部分切除を行なうと切除率に従って肝組織の増殖が定量的に起こる。肝部分切除の方法は Higgins と Anderson¹⁾ が開発した左側葉 (37%) と中葉 (30%) の2つを摘出し、大体70%を切除する方法が一般的に用いられている。なおこの場合は残った3つの肝葉の組織が増殖して失われた2つの肝葉を補い、切除部分から肝臓が再生するのではないので残存肝葉の代償性肥大、増殖というべきであるが肝再生と呼称されている。肝部分切除後はほとんど即座に残存肝には一連の変化がみられる。例えば肝部分切除後10~20分という早い時期に肝細胞内の cyclic GMP の濃度が一過性に増加し、²⁾ 4時間目にはオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) が誘導される³⁾。静止状態 (G₀ 期) にあった細胞が G₁ 期に入ってゆき、さらに細胞分裂期 (M 期) に入るが、その機序には非常に多様な因子が関与していると思われる。すなわち、アラキドン酸カスケード、各種ホルモン、門脈因子や DNA 合成系に關与する種々の酵素などが生体内代謝系で複雑に關与していると考えられる。小柴胡湯は広く肝疾患治療薬として用いられており、⁴⁾ 抗炎症、⁵⁾ 抗ウイルス、⁶⁾ 免疫増強作用^{7,8)} などが報告されているが、肝機能障害抑制に対する作用機序はまだ解明されていない。そこで私たちは小柴胡湯の肝障害抑制機序を明らかにするため、肝の部分切除を行ない、肝障害に対する小柴胡湯の影響を第1報では細胞機能の面から検討した。また部分切除後にみられる一過性の脂肪肝に対する影響を調べるために脂質代謝についても検討し、若干の成績を得たので報告する。

材料と方法

動物はウイスター系雄性ラット (5週令, 約120g) 一群5~6匹を用いた。小柴胡湯は小柴胡湯エキス原末 (スプレードライ水抽出分画, ツムラ製) を用いた。投与方法は肝切除3週間前より飲料水に混ぜ経口投与 (1000 mg/kg/day) し、肝切除後も引き続き投与した。肝切除は Higgins & Anderson¹⁾ の方法でエーテル麻酔下で行なった。肝障害の目安となる酵素の測定は肝切除後22, 28, 72時間および8日目における血清中のグルタミンオキサロアセティックトランスアミナーゼ (GOT), グルタミンピルビクティックトランスアミナーゼ (GPT), ロイシ

ンアミノペプチターゼ (LAP), γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP), オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ (OCT) について行なった。また肝臓については9倍容量の0.25 M ショ糖液 (pH 7.4) でホモジナイズし、10,000×g 60分遠心の上清液を用い、前記時間における GOT, GPT, γ -GTP, ラクテートデヒドロゲナーゼ (LDH) について行なった。測定はいずれも Kit ((株) 和光純薬) を用いて行なった。脂質代謝関連物質については血清中のトリグリセリド (TG) (GPO-p-クロルフュノール発色法), リン脂質 (PL) (COD・POD-4-アミノアンチピリン法) を測定し、肝臓では肝組織を凍結乾燥し粉末にした後、クロロホルム:メタノール (2:1) にて抽出し、TG, 総コレステロール (T-cho) (COD-p-クロルフュノール発色法), PL を測定した。さらに肝性トリグリセリドリパーゼ (H-TGL) を La Rosa らの方法⁹⁾ で測定した。

なお、統計処理は Student's *t* 検定により行なった。

結 果

1. 血清中の各種酵素

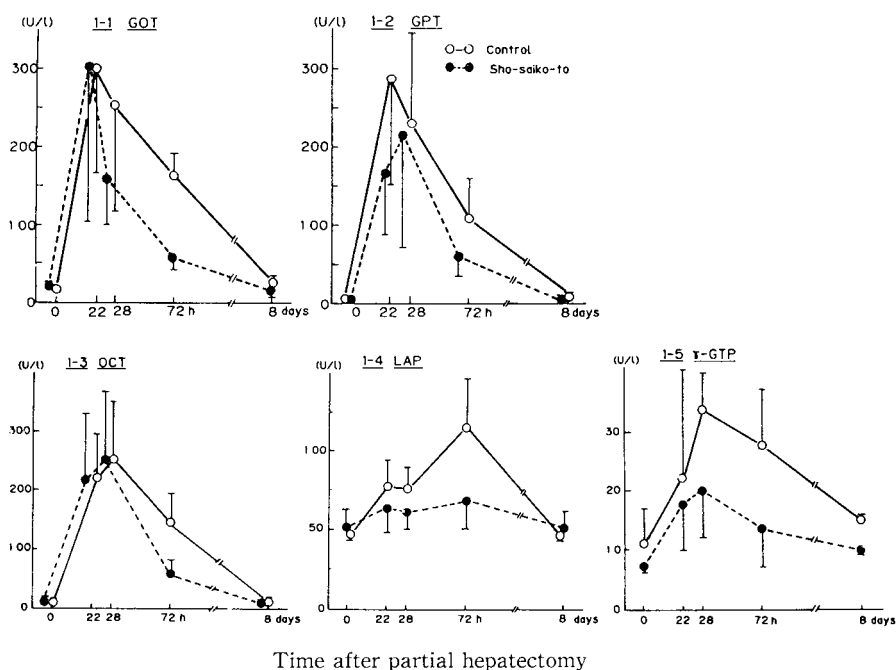
1) GOT 値の変動: 両群とも肝切除後22時間目で最高値を示し、28時間目には両群とも低値傾向がみられたが投与群の方が低い値を示した。さらに72時間目には投与群が有意に低値を示した。8日目には両群とも正常値に復した (Fig. 1-1)。

2) GPT 値の変動: 対照群では22時間目で最高値を示し28時間目では低値傾向がみられた。投与群では28時間目に最高値を示したが、対照群と比べると全期間中低値傾向を示した。72時間目には投与群が有意に低値を示した。8日目には両群とも正常値に復した (Fig. 1-2)。

3) OCT 値の変動: 両群とも22時間、28時間目には有意に増加し、72時間目には減少するが投与群の方が有意に減少した。8日目には両群とも正常値に復した (Fig. 1-3)。

4) LAP 値の変動: 対照群は22時間、28時間目には有意に増加しさらに72時間目で最高値を示したが8日目には正常値に復した。投与群ではいずれの時期においてもほとんど変動はみられなかった (Fig. 1-4)。

5) γ -GTP 値の変動: 0時間では投与群が対照群と比べると低値を示した。22時間目には両群とも有意に増加し28時間目には最高値を示すもののいずれの時期においても投与群の方が対照群に比べ

Fig. 1 GOT, GPT, OCT, LAP and γ -GTP activities in serum after partial hepatectomy.

ると有意に低値であった。72時間目には両群とも減少傾向がみられたが投与群が有意に低値を示した。8日目には両群とも低値を示すがこれは0時間よりも低値であった (Fig. 1-5)。

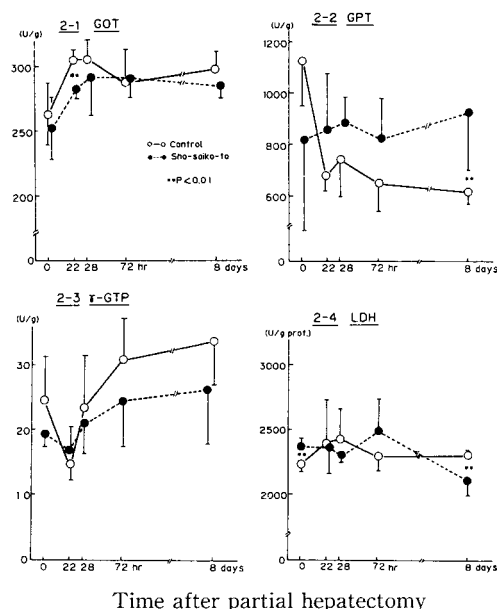
2. 肝臓の各酵素

1) GOT 値の変動: 両群とも 22, 28 時間目には高値を示したが, 投与群の方が上昇率は少なかった。また, 72 時間, 8 日目においては両群の差はあまりなかった (Fig. 2-1)。

2) GPT 値の変動: 0 時間において個体差があるものの対照群の方が高値を示した。22 時間目には対照群は 0 時間に比べると有意に低値を示し, 28 時間, 72 時間, 8 日目においてもそのまま低値であった。投与群では全期間においてほとんど変動がみられなかった (Fig. 2-2)。

3) γ -GTP 値の変動: 対照群では 22 時間目に 0 時間と比べると有意に低値を示すが 28 時間目には 0 時間値に復し, 72 時間, 8 日目には高値を示した。投与群でも同じようなパターンを示すものの変動の幅が対照群と比べると小さかった (Fig. 2-3)。

4) LDH 値の変動: 両群とも各時期において 0 時間との差があまりみられなかった (Fig. 2-4)。

Fig. 2 GOT, GPT, γ -GTP and LDH activities in liver after partial hepatectomy.

3. 脂質代謝関連物質

1. 血清中の物質

1) TG 値の変動：対照群は個体差はあるものの0時間では投与群に比べると高値を示した。22時間、28時間では両群とも0時間に比べると有意に低値を示したが72時間、8日目にはやや回復した。22時間から8日目までの各時間において両群の差はほとんどなかった (Fig. 3-1)。

2) リン脂質：両群とも術後22時間目では低値を示したが、8日目には0時間値に復した。両群の差は各時期においてほとんどみられなかった (Fig. 3-2)。

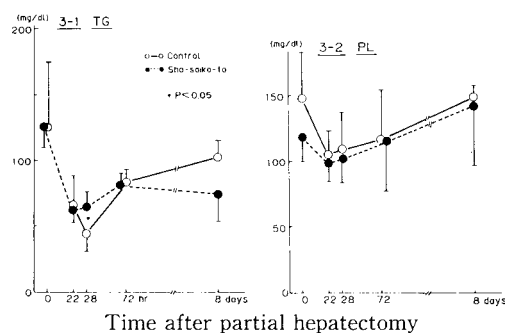


Fig. 3 TG and PL levels in serum after partial hepatectomy.

2. 肝臓中の物質

1) TGの変動：両群とも22時間目には0時間に比べ有意に高値を示すが、投与群の方が増加率は高かった。しかし8日目には両群とも0時間値に復した (Fig. 4-1)。

2) リン脂質：両群とも22時間目にはやや高値を示すものの両群とも全期間中の差はほとんどな

った (Fig. 4-2)。

3) T-choの変動：両群とも22時間、28時間には0時間値に比べ有意に高値を示したが、8日目には0時間値に復した。しかし全期間中両群の差はほとんどなかった (Fig. 4-3)。

3. H-TGL 活性の変動

対照群は22時間目には0時間に比べ有意に低下し、72時間目にはさらに低値を示すが8日目には22時間値にまで復した。投与群は22時間目には低値を示し、28時間、72時間目には有意に低値を示すが8日目には72時間目に比べやや増加するものの、0時間値に比べるとまだ有意に低値であった。全期間中投与群の方が0時間値との差は少なかった (Fig. 5)。

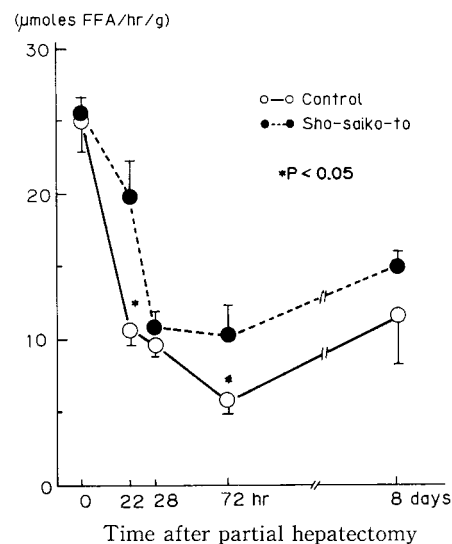


Fig. 5 H-TGL activities in liver after partial hepatectomy.

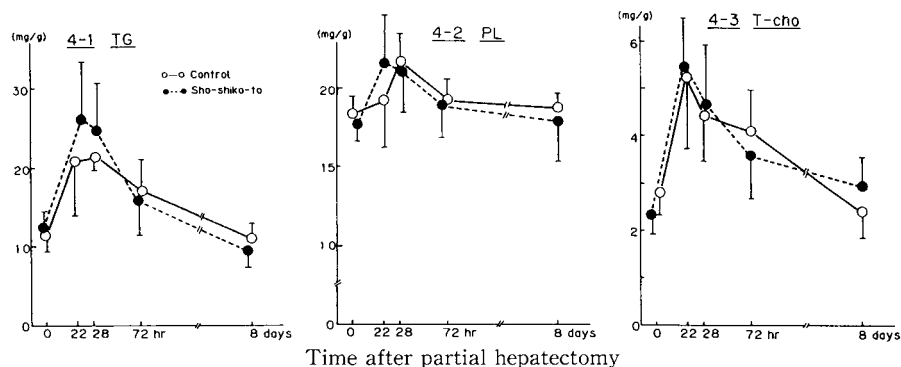


Fig. 4 TG, PL and T-cho levels in liver after partial hepatectomy.

考 察

肝障害をひき起こすには薬物として四塩化炭素、D-ガラクトサミン、アリアルアルコールおよびブロムベンゼンなどがある。いずれの薬物も多少は差があるものの肝小葉中心部や周辺部に変性壊死を生じ、減少した肝の細胞数が元の数に回復するので肝再生の現象を示すが肝修復過程は正常肝の部分切除後の肝細胞の再生、増殖とは異なると考えられている。細胞増殖の機構を調べるためにはほとんどの細胞が同調された(2報において細胞増殖におよぼす影響を報告)部分的切除後の再生肝を用いた方が適当であると思われるので、私たちは肝障害モデルとして部分切除肝を用いて肝障害に対する小柴胡湯の影響を検討した。再生肝手術後22時間、28時間、72時間および8日目の血中と肝臓の各種酵素を測定した。小柴胡湯に含まれるサポニン類は糖鎖を有し、腸管を通過すると8種類の変化体となる¹⁰⁾ので経口投与で用いた場合は腸管の状態などにより全実験を通して個体差がみられた。GOT、GPTは肝細胞壊死あるいは肝細胞膜透過性の亢進など肝障害の結果血中に出現する酵素であるが、Fig. 1-1, 1-2に示すように術後高値を示すのは肝部分切除のため糸で結紮した肝葉において切除後に残存した肝が虚血性壊死に陥ったものと推定され、肝再生により上昇したためではないと考えられる。しかしながら投与群の方が0時間値との差が少なく、小柴胡湯がその抗炎症作用などにより肝細胞障害を抑制していると思われる。胆道系酵素LAP、 γ -GTPについて調べたところ、LAPにおいては再生手術後いずれの時期においてもほとんど値はかわらなかったが(Fig. 1-4)、 γ -GTPにおいては投与群の方が有意に低値を示し(Fig. 1-5)、胆汁ウツ滞に対しても小柴胡湯は改善作用を有していることが推定される。しかし再生肝の γ -GTPのアイソザイムは成人型から胎児型に変化したとの報告¹¹⁾もあり、小柴胡湯がこのアイソザイムにどのような影響をおよぼしたかは今後の検討を要する。

肝臓の細胞内における酵素活性を測定することにより肝細胞機能障害の度合いを調べた。GOT、GPT、 γ -GTPはいずれの時期においても投与群の方が0時間値との差が少なく、前述と同じように小柴胡湯は肝細胞に対してもその機能を正常に保つように作用していることが分かった。肝の部分切除後には残存肝に一過性の脂肪肝がみられ¹²⁾肝における脂質代謝にも何らかの影響がおきたものと思われ

る。そこで私たちは再生過程における肝細胞の脂質代謝に対する小柴胡湯の作用を調べるため、血清および肝臓中のTG、リン脂質、さらに肝臓中のT-cho、H-TGLを測定した。血清中のTG、リン脂質は22時間、28時間目には顕著に減少し、とくにTGは8日目においても0時間値よりかなり低値を示すが、肝臓中のTG、リン脂質、T-choは22時間、28時間目にはむしろ0時間値より有意に高値を示した。しかし8日目にはそれぞれ0時間値に復した。いずれの時期においても個体差はあるものの小柴胡湯投与群の方が0時間値との差が少なかった(Fig. 3)。H-TGLは肝においてカイロミクロン水解に関与する酵素であるが、両群とも22時間目から有意に低値を示す。しかしこの酵素と肝臓中の脂質関連物質が逆相関の関係を示し、この結果からH-TGLの減少により臓器中にある脂質は分解される量が少なくなり、結果として肝臓の脂質が高値を示すのではないかと考えられる。文献的には手術などのストレス後は1時的に早期に血清中のTGが低下するとされておりこれは肝におけるVLDL-TG排泄障害によると考えられている。^{13, 14)}

したがって本実験の肝切除後のH-TGLの低下により誘導されるVLDL-TG排泄障害による血清TG低下、肝におけるTG蓄積は一般的傾向である。小柴胡湯投与群ではいずれの時期においても0時間との差が少なく、脂質代謝においても保護的に作用しているものと推測される。

文 献

- 1) Higgins, G. M. and Anderson, R. M. : Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**, 186-202, 1931.
- 2) Miura, Y., Iwai, H., Sakata, R., Ohtsuka, H., Elhanan, E., Kubota, K. and Fukui, N. : Involvement of cyclic GMP in the initial stage of hepatocytes proliferation, *J. Biochem.* **80**, 291-297, 1976.
- 3) Ebina, Y., Iwai, H., Fukui, N., Ohtsuka, H. and Miura, Y. : Prereplicative enzymatic changes in regenerating rat liver, *J. Biochem.* **77**, 641-645, 1975.
- 4) 岡 博, 藤原研司, 与芝 真 : 漢方治療の実際-慢性肝炎. 内科 **56**, 833-836, 1988.
- 5) 雨宮 栄 : 薬理, 化学からみた小柴胡湯のすべて(2) 抗炎症作用について, 現代東洋医学 **10**, 70-78, 1989.
- 6) 大倉靖史, 阪上吉秀, 溝口靖紘, 小林純三, 山本祐夫, 竹田茂文, 池田正樹, 森沢成司 : マクロファージにおけるアラキドン酸代謝に及ぼす小柴胡湯の影響, 和漢医 **3**, 396-397, 1986.
- 7) 池本吉博, 溝口靖紘, 新井孝之, 山本祐夫, 森沢成司 :

- 小柴胡湯および大柴胡湯の *in vitro* における抗体産生に及ぼす影響. 和漢医 **1**, 235-242, 1984.
- 8) 溝口靖紘, 藤信裕美子, 小林絢三, 山本祐夫, 森沢成司: Natural killer (NK) 細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響. 和漢医薬学会誌 **4**, 124-129, 1987.
- 9) LaRosa, J. C., Levy, R. I., Winomuller, H. G. and Fredrickson, D. S.: Comparison of the triglyceride lipase of liver, adipose tissue, and postheparin plasma. *J. Lipid Research* **13**, 356-363, 1972.
- 10) Shimizu, K., Amagaya, S., Ogiwara, Y.: Structural transformation of saikosaponins by gastric juice and intestinal flora. *J. Pharm. Dynamics*, **8**, 718-725, 1985.
- 11) Kottgen, E., Peutter, W. and Gerox, W.: Induction and 'Superinduction' of Sialylation of Membrane-Bound γ -Glutamyltransferase during Liver Regeneration. *Eur. J. Biochem.* **82**, 279-284, 1978.
- 12) 森 道夫, 横山道夫, 小野江為則: 脂肪肝発生過程の電顕的研究. *Japan. J. Clin. Electron Microscopy* **6**, 21-31, 1973.
- 13) Chait, A., Brunzell, J. D., Johnson, D. G., Benson, J. W., Werner, P., Palmer, J. P., Albers, J. J., Ensick, J. W. and Bierman, E. L.: Reduction of plasma triglyceride concentration by acute stress in man. *Metabolism* **28**, 553-561, 1979.
- 14) Robertson, R. R. and Smith, P. H.: Stress induced inhibition of triglyceride secretion in vivo and in sand rats (*Pharmomys obesus*). *Metabolism* **25**, 1583-1950, 1976.