

四塩化炭素肝障害における脂質過酸化とそれによぼす大柴胡湯の抑制効果

伊藤 浩行

近畿大学医学部第一病理

Lipid peroxidation in CCl_4 -induced liver injury and prophylactic effects of Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang)

Hiroyuki ITO

Department of Pathology, Kinki University School of Medicine

(Received November 16, 1992. Accepted December 16, 1992.)

Abstract

The prophylactic effects of Dai-saiko-to were examined in rat liver after repeated injection of CCl_4 . In Dai-saiko-to group (DS), serum GOP and GPT levels were lower than in SP diet without Dai-saiko-to group (SP). Morphological examination revealed such prophylactic effects of Dai-saiko-to, i.e., liver in the DS group showed mild hepatocyte damage as compared to those in the SP group. Moreover, TBA-RS and FMDA, marker of lipid peroxidation were lower in DS group than in SP group, indicating the protection of peroxidation of membrane phospholipid caused by free radicals. Na^+/K^+ -ATPase and 5'-nucleotidase activities, marker enzymes of plasma membrane, in the DS group were close to those in non-treated control group. Those results indicated the prophylactic effects of Dai-saiko-to against CCl_4 -induced liver injury by inhibition of lipid peroxidation of plasma membrane.

Key words Dai-saiko-to, liver, carbon tetrachloride, free radical, plasma membrane, lipid peroxidation.

Abbreviations Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang), 大柴胡湯; FMDA, Free malondialdehyde; GSH-Px, Glutathion peroxidase; HPLC, High performance liquid chromatography; ICDH, Isocitrate dehydrogenase; TBA-RS, Thiobarbituric acid-reactant substance.

緒 言

近年、肝細胞障害の治療に種々の柴胡剤が用いられており、その有効性が認められている。これらの柴胡剤のうち小柴胡湯に関しては、臨床的にも実験的にも数多くの研究がなされ、その作用機序も次第に明らかにされてきた。著者はすでに、ラットにおける四塩化炭素肝障害におよぼす小柴胡湯の影響を検討し、小柴胡湯はフリーラジカルによる細胞膜の脂質過酸化と、それに基づく膜関連酵素の異常を改善することにより、肝細胞障害を抑制することを明らかにした¹⁾。しかし、同じ柴胡剤である大柴胡湯に関しては、その有効性が推測されているにもかかわらず、

実験的研究は小柴胡湯に比べ著しく乏しく、且つそれらの結果にも相反する報告がみられる。そこで今回、大柴胡湯の肝細胞障害抑制作用を実験的に証明し、且つその作用機序の一端を明らかにするために、ラットに四塩化炭素による肝障害を作製し、それによぼす大柴胡湯の影響を検討した。

材料と方法

生後4カ月齢の雄性 Wistar-Kyoto ラット（体重 220~240 g）24 匹を用い、実験群 16 例には 50% 四塩化炭素（ CCl_4 ）（オリーブオイル溶液）0.2 ml/100 g 体重を週3回、2週間計6回、腹腔内に注射することにより肝障害を作製した。そのうち8例には大柴

*〒589 大阪府大阪狭山市大野東377-2
377-2 Ohno-higashi, Osaka-sayama, Osaka 589,
Japan

胡湯（大杉製薬製）を0.5%の割合で粉末飼育用飼料（船橋SP）に混じ、自由に摂取させ（DS群）、残り8例は大柴胡湯を含まないSP飼料を投与した（SP群）。残りの8例を対照群とし、オリーブオイルのみを投与し、SPで飼育した（control群）。実験期間を2週間とし、その前後で採血を行い血漿を分離し、SMACにて血液生化学分析を行った。実験終了後ネブタール麻酔下に脱血屠殺し直ちに肝臓を採取した。一部を形態学的検索に用いるため10%緩衝ホルマリンあるいは、3.5%グルタルアルデヒド-1%四酸化オスミウムで固定し、通常通り光顕的、電顕的に検索した。

残りの肝臓を2分し、一方を0.25 M -sucrose-10 mM Tris buffer (pH 7.5) 中でホモジネートした。1,000×G 10分遠心分離後の上清を更に10,000×G 15分間遠心分離を行い、ミトコンドリア分画を得た。その上清を105,000×Gで30分間遠心分離し、マイクロソーム分画を得た。いずれも同じbufferにsuspendした後、ミトコンドリア分画を用いて Isocitrate dehydrogenase (ICDH) 活性²⁾を、また、マイクロソーム分画を用いて Na^+/K^+ -ATPase,³⁾ 5'-nucleotidase⁴⁾ および Glutathion peroxidase (GSH-Px) 活性⁵⁾を測定した。残りの肝臓を0.1 M KCl-50 mM Tris buffer (pH 7.5) 中でホモジネートし、同様の遠心分離操作によりマイクロソーム分画を得た。過酸化脂質の一つである Thiobarbituric acid-reactant substance (TBA-RS) を Albrow らの方法⁶⁾に従って測定するとともに Esterbauer らの方法⁷⁾により材料を Fe-Ascorbic acid とともに incubate し、生成する Free malondialdehyde (FMDA) を HPLC により測定した。

結 果

1. 形態学的所見

Fig. 1は3群の光学顕微鏡所見を示している。Fig. 1Aにみられるように、対照群では小葉構造は良く保たれており、肝細胞にも変性等は認められない。CCl₄を投与した群（SP群）では、Fig. 1Bにみられるように、肝細胞の空胞変性や壊死がみられ、小葉構造は不明瞭となっているが、大柴胡湯を投与したDS群では、Fig. 1Cにみられるように、一部の肝細胞に変性や壊死が認められるものの、小葉の構造は比較的よく保たれていた。電子顕微鏡的に小葉中間帯の肝細胞の微細構造を検索すると、対照群（Fig. 2）に比べSP群（Fig. 3）では細胞膜の構造が失われる傾向にあり、細胞境界が不明瞭であった。

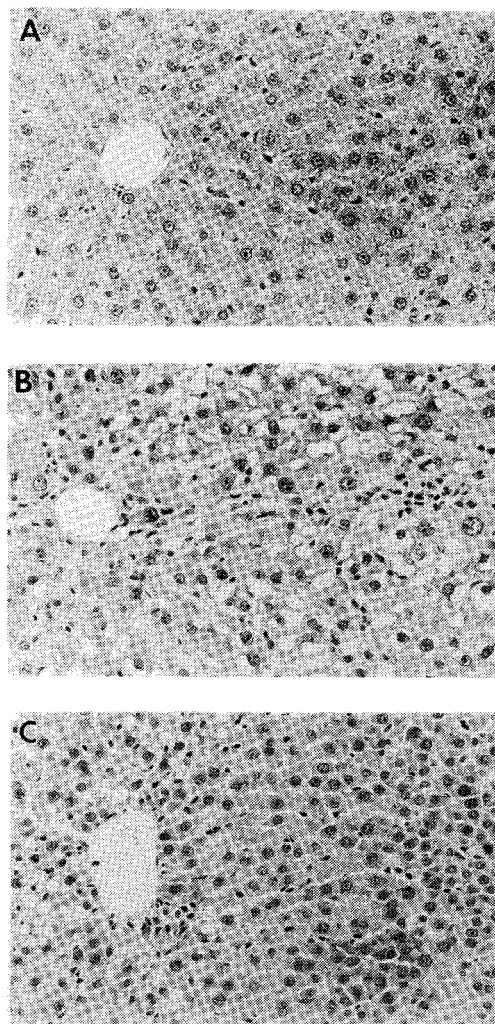


Fig. 1 Light microscopic findings of liver.
A: control group, B: SP group, C: DS group
(×120)

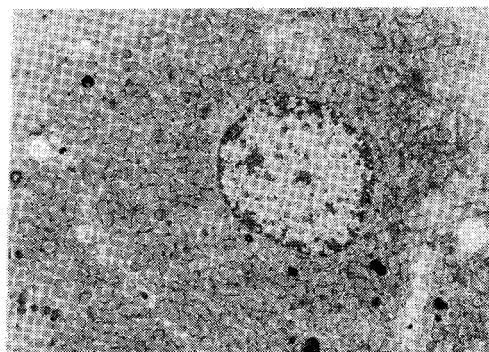


Fig. 2 Electron micrograph of hepatocyte of non-treated control group. (×8,400)

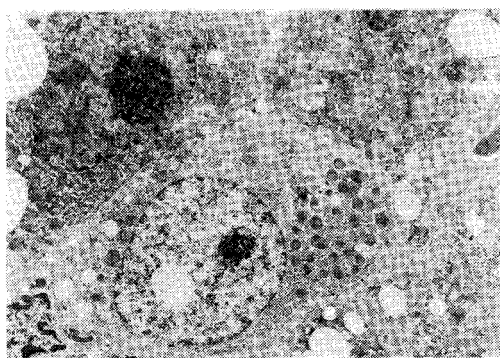


Fig. 3 Electron micrograph of hepatocyte of SP group. ($\times 8,400$)

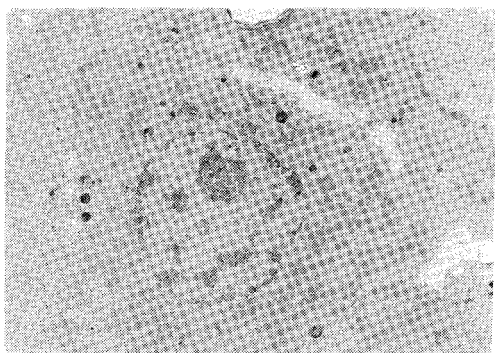


Fig. 4 Electron micrograph of hepatocyte of DS group. ($\times 8,400$)

また、核内及び細胞内に多数の空胞がみられ、ミトコンドリアの崩壊や小胞体の拡張などが著しく、細胞内微細構造が不明瞭であった。一方大柴胡湯投与群 (DS 群) では、Fig. 4 にみられるように、ミトコンドリアや小胞体の構造は比較的良好に保たれており、変性の程度は軽度であった。

2. 血液生化学

Table I は、肝機能に関する検査結果を示している。対照群に比べ CCl_4 投与群では、明らかな肝機能障害が認められた。大柴胡湯投与群でも、対照群に比べると GOT, GPT, アルカリフォスファターゼはいずれも上昇したが、大柴胡湯を投与していない SP 群にくらべるとこれらの値はいずれも有意に低値であり、肝機能障害の程度は明らかに軽度で、上記の形態学的所見を裏付けていた。

3. 脂質過酸化と細胞膜関連酵素

上記のような大柴胡湯による肝細胞障害抑制効果の機序を明らかにするために、肝細胞の膜の変化を

Table I Comparison of total protein, total bilirubin and liver related enzymes in rats.

	control	SP	DS
TP ¹⁾	7.20 $\pm$ 0.31	6.70 $\pm$ 0.35	7.50 $\pm$ 0.08*
TB ²⁾	0.064 $\pm$ 0.004	0.205 $\pm$ 0.053*	0.112 $\pm$ 0.016*
GOT ³⁾	124.8 $\pm$ 6.83	820.5 $\pm$ 263.6*	280.0 $\pm$ 58.8*
GPT ⁴⁾	38.0 $\pm$ 0.89	306.0 $\pm$ 100.0*	97.6 $\pm$ 25.8**
ALP ⁵⁾	332.0 $\pm$ 11.2	930.5 $\pm$ 153.0*	619.6 $\pm$ 42.6*

1) Total protein (mg/dl)

2) Total bilirubin (mg/dl)

3) Glutamic oxaloacetic transaminase (KU)

4) Glutamic pyruvic transaminase (KU)

5) Alkaline phosphatase (KAU)

Mean $\pm$ S.E.

Significant difference from control (*) and SP (*)

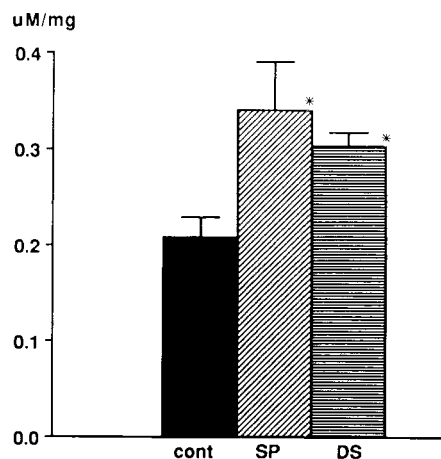


Fig. 5 TBA-RS in microsomal fraction. Significant difference from control (*) and from SP (*)

生化学的に検索した。Fig. 5 は過酸化脂質の一つの指標である TBA-RS の比較を示している。対照群に比べ、 CCl_4 を投与した群では、TBA-RS はいずれも高値を示したが、その中でも大柴胡湯投与群 (DS 群) は SP 群より低値であった (有意差なし)。また、*in vitro* において生成された過酸化脂質 (FMDA) は (Fig. 6)、 CCl_4 投与群ではいずれも高値を示したが、大柴胡湯投与群では SP 群より有意に低値であった。一方消去系の一つの指標である GSH-Px 活性は、予想に反して DS 群が最も低値であった (Fig. 7)。

このような膜脂質の過酸化が膜機能にどのように反

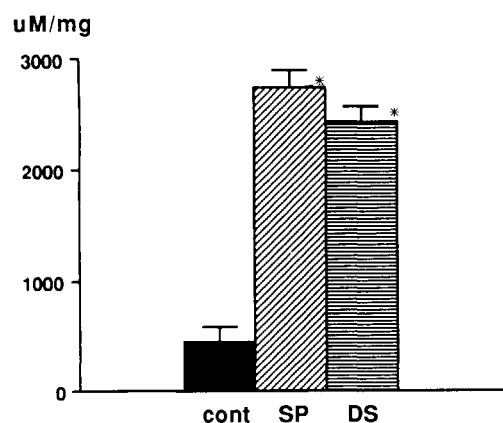


Fig. 6 FMDA by microsomal fraction.
Significant difference from control (*) and SP (*)

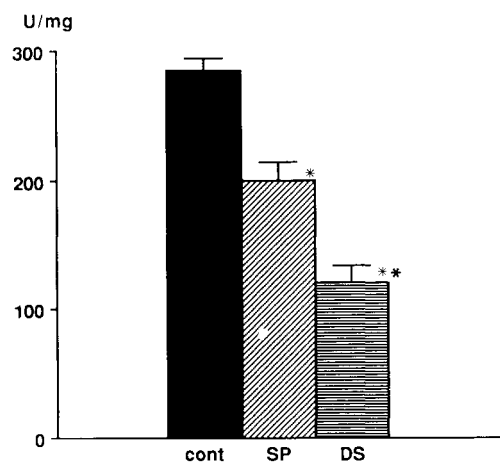


Fig. 7 GSH Px in microsomal fraction.
Significant difference from control (*) and SP (*)

映するかを調べるために、膜関連酵素である Na^+/K^+ -ATPase と $5'$ -nucleotidase 活性を、ミトコンドリアのマーカーである ICDH とともに、比較検討した。Fig. 8 にみられるように、ICDH 活性は 3 群の間で差がみられなかったが、Fig. 9, Fig. 10, にみられるように細胞膜のマーカーエンザイムの活性はいずれも DS 群がより対照群に近い値を示した。

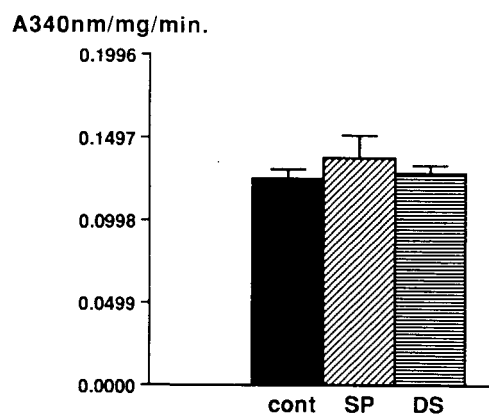


Fig. 8 ICDH in mitochondrial fraction.
Differences were not significant.

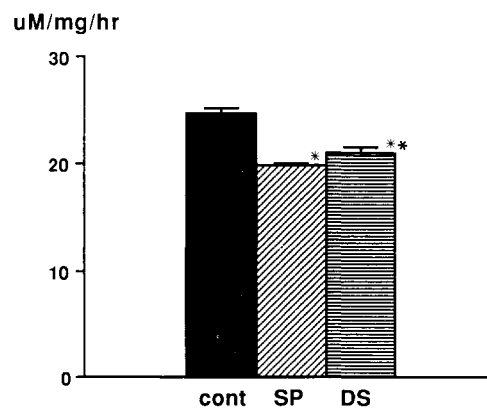


Fig. 9 Na^+/K^+ -ATPase activity in microsomal fraction.
Significant difference from control (*) and SP (*)

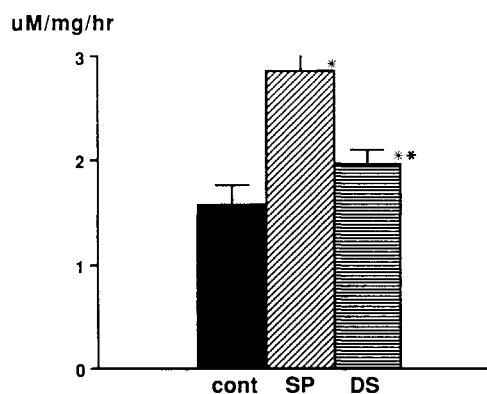


Fig. 10 $5'$ -nucleotidase in microsomal fraction.
Significant difference from control (*) and SP (*)

考 察

実験的肝障害に対する大柴胡湯の影響に関しては、これまで必ずしも一致した結果が得られていない。太田ら⁸⁾は、ラットに D-galactosamine あるいは CCl_4 を投与した急性実験において、大柴胡湯は前者による肝障害の予防には無効であるが、後者による肝障害に対しては抑制的に作用する事を報告している。また、山本ら⁹⁾は、肝障害に対する大柴胡湯予防効果を実験的 (α -naphthylisothiocyanate 肝障害) あるいは、臨床的 (慢性肝炎) に証明した。しかし、Amagaya ら¹⁰⁾は、ラットの CCl_4 肝障害に対して、小柴胡湯は有効であるが、大柴胡湯には抑制効果がみられないことを報告している。このような報告の不一致の原因は、主として、肝障害作製の方法の相違によるものと思われる。すなわち、これらの実験はいずれも肝障害作製後 24~48 時間の急性の肝障害を対象としたもので、障害の程度や病態が必ずしも同一でないことが考えられる。そこで、今回の実験では、2 週間にわたり、 CCl_4 を反復投与することにより肝障害を作製し、亜急性期の病態についての検索を行った。Table I より明らかなように、大柴胡湯投与群では一般状態も良好で、GOT, GPT の上昇も抑制され、その他の肝機能の指標もほとんどすべてが非投与群に比べると対照群に近い値を示しており、肝機能障害は明らかに軽度であった。すなわち、四塩化炭素による肝臓障害は大柴胡湯投与により明らかに抑制されることが実証された。また、これらの生化学的結果は、形態学的検索によっても裏付けられた。

このような大柴胡湯の肝障害抑制作用の機序に関してはまだ不明であるが、主成分の一つであるサイコサポニンに関しては、種々の薬理作用が知られている (山本ら、文献⁹⁾ 参照)。阿部ら¹¹⁾はサイコサポニンについて詳細な研究を行い、肝細胞障害に対する修復作用を明らかにし、その作用機序として、脂質過酸化の抑制や酵素異常の改善を明らかにした。また太田ら⁸⁾も、大柴胡湯による四塩化炭素肝障害抑制のメカニズムとして、脂質過酸化の抑制によることを報告している。 CCl_4 による肝細胞障害は、フリーラジカル (トリクロロメチル) による膜脂質の過酸化によることはよく知られており、 CCl_4 を投与した肝臓では、SOD や glutathione peroxidase 活性などラジカル消去系の低下がみられることも報告されている^{12, 13)}。従って、大柴胡湯による肝障害抑制効果もおそらく脂質過酸化の抑制によるも

のと推測される。そこで今回の実験では、脂質過酸化の指標として、*in vivo* における TBA-RS と *in vitro* における FMDA の産生が比較検討された。大柴胡湯投与群では、TBA-RS は低値を示す傾向がみられ (有意差なし)、また FMDA の産生は明らかに低値であり、脂質過酸化の抑制が認められた。特に、*in vitro* における FMDA の産生が低値であることは、大柴胡湯を投与されたラットの肝細胞では、ラジカル刺激による脂質過酸化が生じにくいことを示しており、重要な所見と考えられる。さらに細胞膜関連酵素である Na^+/K^+ -ATPase、および 5'-nucleotidase 活性を比較すると、いずれも大柴胡湯投与群は、無処置対照群に近い値を示した。このことは、細胞膜の機能が良く保持されていることを示しており、阿部らの膜障害修復作用説を裏付けている。しかし、今回の大柴胡湯投与群では消去系の一つである GSH-Px は予想に反して低値であった。前回、小柴胡湯投与群では、GSH-Px が高値を示した¹⁾ ことを考えると、大柴胡湯による肝細胞障害の抑制は、単にサイコサポニンによる膜障害の修復のみならず、大柴胡湯そのものに radical scavenger としての作用があることが推測される。これらの結果は大柴胡湯と小柴胡湯の効果の相違を考え合わせると非常に興味深く、今後両者の成分の相違などを含め詳細に検討する必要がある。

結 論

ラットに四塩化炭素を反復投与し、亜急性の肝障害に対する大柴胡湯の抑制効果を検討した。投与群では、GOT, GPT の上昇が抑制され、一般状態も良好で、肝機能障害は明らかに抑制された。形態学的にも、投与群では肝細胞障害が軽度であった。その作用機序として、投与群では膜脂質の過酸化が抑制されており、細胞膜の機能が良く保持されていることから、radical scavenger として作用している事が推測された。

謝 辞

本研究にあたり、大柴胡湯の供与をはじめ多大のご協力を頂きました大杉製薬株式会社に対し、深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 伊藤浩行：四塩化炭素肝障害における細胞膜の変化とそ

- れによぼす小柴胡湯の影響. 基礎と臨床 **24**, 701-704, 1990.
- 2) Bernt, E. and Bergmeyer, H.U.: Isocitrate Dehydrogenase. In "Methods of Enzymatic Analysis" (Ed. by H.U. Bergmeyer) Academic Press, New York, p 624, 1974.
- 3) Lamers, J.M.J. and Stinis, J.T.: An electrogenic Na/K antiporter in addition to the Ca pump in cardiac sarcolemma. *Biochem. Biophys. Acta.* **640**, 521-534, 1981.
- 4) Song, C.S. and Bodansky, O.: Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver. *J. Biol. Chem.* **242**, 694-699, 1967.
- 5) Whanger, P.D., Weswig, P.H., Schmitz, J.A. and Oldfield, J.E.: Effects of selenium and vitamin E on blood selenium levels, tissue glutathion peroxidase activities and white muscle disease in sheep fed purified hay diets. *J. Nutr.* **107**, 1298-1307, 1977.
- 6) Albro, P.W., Corbett, J.T. and Schroeder, J.L.: Application of the thiobarbiturate assay to the measurement of lipid peroxidation products in microsome. *J. Biochem. Biophys. Method.* **13**, 185-194, 1986.
- 7) Esterbauer, H., Lang, J., Zdravec, S. and Slater, T.F.: Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **105**, 319-328, 1984.
- 8) 太田好次, 佐々木恵美, 中村紀美, 石黒伊三雄, 永田 稔, 原田治良: 大柴胡湯エキスの経口投与による実験的肝障害改善作用. 和漢医薬学会誌 **2**, 424-433, 1985.
- 9) 山本昌弘, 植村泰三, 中間 慧, 土宮正直, 田中敏郎, 原誠二郎: 漢方方剂構成生薬の実験的肝胆障害に対する作用と慢性肝炎患者における柴胡剤長期投与の効果. 和漢医薬学会誌 **2**, 386-397, 1985.
- 10) Amagaya, S., Hayakawa M., Ogihara, Y. and Fujiwara, K.: Effects of Syo saiko-to and Dai-saiko-to on carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **5**, 129-136, 1988.
- 11) Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S. and Arichi, S.: Protective effects of Saikosaponin-d isolated from *Bupleurum falgatum* L. on CCl₄-induced liver injury in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **320**, 266-271, 1982.
- 12) Manno, M., Bertazzon, A., Burlina, A. and Galgigna, L.: Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mice. *Enzyme* **34**, 107-112, 1985.
- 13) 伊藤 正: ラット肝障害における内因性活性酸素消去系変動の及ぼす影響. 近畿大医誌 **17**, 175-190, 1992.