

四塩化炭素肝障害におけるフリーラジカルの産生と消去に及ぼす大柴胡湯の影響

伊藤 浩行*

近畿大学医学部第一病理学教室

Effects of Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang) on generation and elimination of free radical in CCl₄-induced hepatic injury

Hiroyuki ITO

Department of Pathology Kinki University School of Medicine

(Received March 8, 1993. Accepted May 31, 1993.)

Abstract

In order to clarify the prophylactic effects of Dai-saiko-to in CCl₄-induced liver injury, in situ detection of oxidative stress and scavenger activities were examined in rat liver. After nitro blue tetrazolium perfusion, injured, but not necrotic, hepatocytes exhibited the formazan deposition in their cytoplasm. Such formazan depositions were more intense and widely dispersed around centrilobular necrosis in the liver in the control group, whereas they were milder in the Dai-saiko-to treated group. On the other hand, superoxide dismutase (SOD) activities, both Mn-SOD in mitochondria and CuZn-SOD in cytoplasm, were higher in the Dai-saiko-to group as compared to those in the control group. Furthermore, Na/K-ATPase and Isocitrate dehydrogenase activities were also higher in the Dai-saiko-to group than in the control group, indicating the good preservation of plasma membrane and mitochondria.

These results indicate that Dai-saiko-to shows the prophylactic effects for CCl₄-induced liver injury through the prevention of oxidative stress, activation of SOD and thus subsequent lipid peroxidation.

Key words Dai-saiko-to, liver, free radical, Nitro blue tetrazolium, Superoxide dismutase.

Abbreviations ALP, Alkaline phosphatase; Dai-saiko-to, Da-Chai-Hu-Tang; GOT, Glutamic oxaloacetic transferase; GPT, Glutamic pyruvic transferase; GSH-Px, Glutathione peroxidase; ICDH, Isocitrate dehydrogenase; LDH, Lactate dehydrogenase; NBT, Nitro blue tetrazolium; SOD, Superoxide dismutase.

緒 言

四塩化炭素 (CCl₄) による肝障害は cytochrome P450 依存性酵素により CCl₄ より生じるトリクロロメチルラジカルによる生体膜の脂質過酸化に基づくことが知られている¹⁾。そしてこの様な脂質過酸化は、CCl₄ 投与後比較的速やかに生じること¹⁾、また小胞体膜がその主な標的であること²⁾などが知られている。このような CCl₄ による肝障害モデルに対して、小柴胡湯や大柴胡湯などの柴胡剤の予防効果が

種々検討されており、それらの有効性が報告されている。著者は既にラットの四塩化炭素肝障害モデルに対する小柴胡湯及び大柴胡湯の影響を検討し、これらの薬剤により肝障害は明らかに抑制されることを報告した^{3,4)}。そして、その作用機序として膜脂質過酸化の防止と、それによる膜関連酵素の異常（活性低下あるいは異常な上昇）の抑制による事を明らかにした。しかし、CCl₄ 投与によるラジカルの発生や、あるいはラジカル消去系に及ぼす影響に関しては、不明のまま残されていた。そこで今回、CCl₄ 投与による実験的肝障害モデルにおいて、ラジカルの発生

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

を組織化学的に証明すること、およびラジカルの代表的な消去系であるスーパーオキシドディスムターゼに及ぼす大柴胡湯の影響を検討することを目的として、非投与群との比較検討を行った。

材料と方法

生後4カ月の雄性 Wistar-Kyoto ラット (体重 220-240 g) 計 22 例を用いた。総頸静脈より無麻酔下で採血した後、実験群 11 例には大柴胡湯 (大杉製薬製) を 0.5% の割合で粉末飼育用飼料 (舟橋 SP) に混じて自由に摂取させた (大柴胡湯投与群)。残り 11 例は対照群として、大柴胡湯を含まない SP 飼料を投与した (大柴胡湯非投与群)。2 週間後、全例に 50% CCl₄ (オリーブオイル溶液) 0.2 ml/100 g 体重を 2 日間連続、腹腔内に投与した。最終投与 24 時間後に投与前と同様に採血した。

(1) ラジカル発生に関する形態学的検索：各群より無作為に 3 例ずつ選び、Mochida らの方法⁵⁾にしたがって、Nitro blue tetrazolium (NBT) の灌流を行った。すなわち、ネブタール麻酔下に開腹し、門脈内にカニューレを挿入した後、下大静脈を切断し放血しながら、肝臓を Tyrode 液で 5 分間灌流した。次いで 0.05% NBT を含む Tyrode 液を 5 分間灌流した後、4 mM の deferoxamine mesylate を含む Krebs-Henseleit 液で 2 分間灌流し、反応を停止した。再び Tyrode 液のみで 5 分間灌流し、未反応の NBT を除去した。流量はいずれも 15 ml/min とした。灌流終了後、肝臓を採取し、20% 緩衝ホルマリンで固定した。通常通り包埋、薄切後、ケルンエヒトローで核染を行い、光顕的に検索した。なお、形態学的検索には、別に CCl₄ を投与しない無処置対照群を 2 例用い、同様の灌流を行った。

(2) 生化学的検索：実験前後に採血した血液より血漿を分離し、Technicon SMAC III system にて血液生化学分析を行った。

実験終了後 (最終投与 24 時間後)、それぞれの群の 8 例を用い、ネブタール麻酔下に脱血屠殺した後、ただちに肝臓を採取した。0.25 M sucrose-10 mM Tris buffer (pH 7.5) 中でポッター型ホモジナイザーを用いて 10 往復することによりホモジナイズし、1,000×G 10 分、10,000×G 15 分および 105,000×G 30 分の遠心分離を行い、ミトコンドリア画分、ミクロゾーム画分及び可溶性画分を得た。ミトコンドリア画分を用いて Isocitrate dehydrogenase (ICDH) 活性⁶⁾を、ミクロゾーム画分を用いて Na/K-ATPase⁷⁾および 5'-nucleotidase 活性⁸⁾を測定するとともに、

Glutathion peroxidase (GSH-Px) 活性⁹⁾を測定した。また、ミトコンドリア画分及び可溶性画分を用いて、Superoxide dismutase (SOD) 活性 (Mn-SOD, CuZn-SOD)¹⁰⁾を測定した。酵素活性はいずれも蛋白量で補正した。

統計学的検討は Student' *t* test で行い、*p* < 0.05 を有意とした。

結 果

1. 形態学的所見

Nitro blue tetrazolium は親水性の黄色顆粒であるが、還元されると不溶性の青色の formazan に変化する。Fig. 1a に見られるように、大柴胡湯を投与していない群では、中心静脈を中心として著しい肝細胞の変性壊死がみられた。壊死巣の辺縁で正常肝細胞との境界域では、変性をともなった肝細胞の胞体内に一樣にホルマザンの青色顆粒が認められた。しかし、明かな壊死像を示す肝細胞内には殆ど認められなかった。大柴胡湯非投与群では、この様な顆

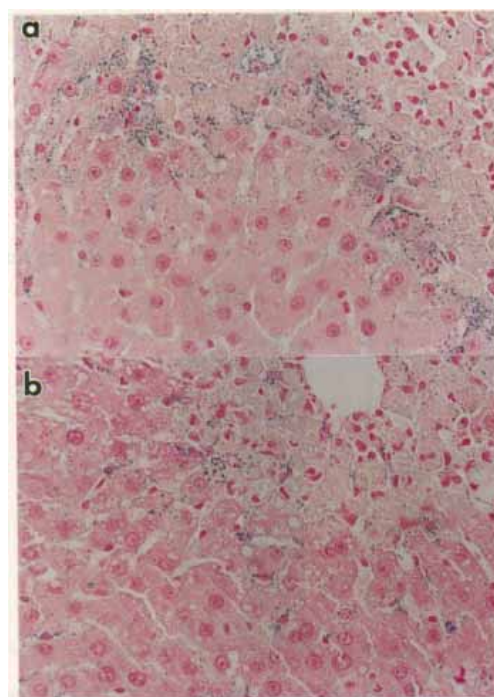


Fig. 1 Formazan deposition in the liver after CCl₄ administration (×150)
a: SP (rat group fed SP diet)
b: DS (rat group fed SP diet supplemented with Dai-saiko-to)

粒を有する細胞は広い範囲に分布しており、且つ個々の肝細胞内におけるホルマザンの密度も大であった。一方、大柴胡湯を投与した群では Fig. 1b に見られるように、中心静脈を中心に大柴胡湯非投与群と同様の変性壊死巣が認められたが、その範囲は大柴胡湯非投与群に比べると狭く、またホルマザンを有する細胞は少なく、細胞内の密度も低い傾向が認められた。CCl₄ を投与していない無処置対照群では、ホルマザンを有する細胞はわずかに数個散見されるのみであった。

実験的検討

2. 生化学的検査

Table I は肝機能検査の結果を示している。大柴胡湯非投与群でも大柴胡湯投与群でも CCl₄ 投与により著しい肝機能障害がみられ、GOT, GPT, LDH の上昇と ALP の低下が認められた。しかし大柴胡湯投与群ではその程度は軽率で GOT, GPT および LDH はいずれも大柴胡湯非投与群に比べ有意に低値であった。ALP は両群とも同様の変動を示し、両者の間に有意の差はみられなかった。

Fig. 2 はミトコンドリア及び細胞膜関連酵素の比

Table I Changes in liver-related enzymes before and after experiment.

	Before		After	
	SP	DS	SP	DS
GOT ¹⁾	136.6 ± 1.3	128.9 ± 4.3	1558.3 ± 61.7	1250.0 ± 82.8*
GPT ²⁾	38.9 ± 1.2	34.4 ± 1.7	417.9 ± 28.2	295.4 ± 24.4*
LDH ³⁾	176.6 ± 13.0	179.1 ± 16.0	414.7 ± 35.0	202.6 ± 14.0*
ALP ⁴⁾	254.9 ± 10.0	227.1 ± 11.0	166.3 ± 10.0	152.7 ± 7.6

n=11 in each group

Mean ± S.E., * Significant difference from SP ($p < 0.01$)

1) Glutamic oxaloacetic transaminase (KU)

2) Glutamic pyruvic transaminase (KU)

3) Lactic dehydrogenase (U/L)

4) Alkaline phosphatase (U/L)

Blood was collected before and after administration of Dai-saiko-to and CCl₄.

SP: rat group fed SP diet

DS: rat group fed SP diet supplemented with Dai-saiko-to

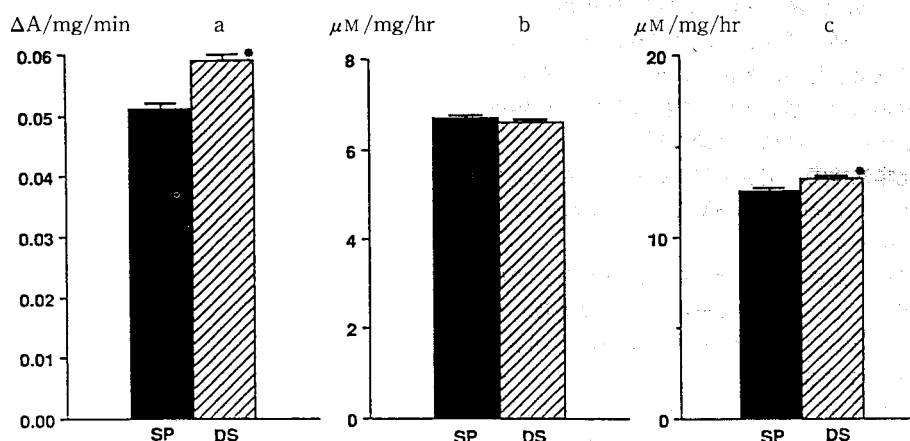


Fig. 2 Enzyme activities in mitochondria and cytosol fraction of liver after CCl₄ administration.

a: ICDH (mitochondria) b: 5'-nucleotidase (cytosol) c: Na/K-ATPase (cytosol)

Mean ± S.E., * Significant difference from SP ($p < 0.01$)

SP: rat group fed SP diet

DS: rat group fed SP diet supplemented with Dai-saiko-to

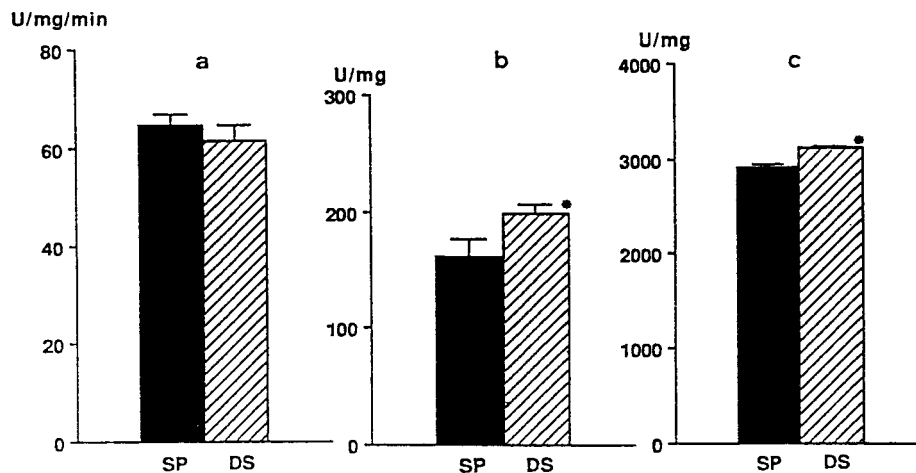


Fig. 3 GSH-Px and SOD activities in liver after CCl_4 administration.
 a: GSH-Px (cytosol) b: Mn-SOD (mitochondria) c: CuZn-SOD (cytosol)
 Mean ± S.E., * Significant difference from SP ($p < 0.01$)
 SP: rat group fed SP diet
 DS: rat group fed SP diet supplemented with Dai-saiko-to

較を示している。Fig. 2aに見られるように、ミトコンドリア画分における ICDH 活性は大柴胡湯非投与群に比べ大柴胡湯投与群で有意に高値であり、ミトコンドリアの機能がよく保持されていることが示唆された。Fig. 2b, c はいずれも膜関連酵素の活性を示している。5'-nucleotidase は両群とも同様の活性を示したが、Na/K-ATPase は大柴胡湯投与群で有意に高値であり、細胞膜あるいは小胞体膜の障害が少ないことが示唆された。

Fig. 3 はラジカル消去系に関する酵素の比較を示している。Fig. 3a に見られるように、GSH-Px は前報においては、大柴胡湯投与群が低値を示したが、今回の実験では差がみられなかった。Fig. 3b, c は、代表的な oxygen radical の scavenger である SOD 活性を示している。ミトコンドリア画分では SOD の殆どすべてが Mn-SOD であり、その活性は大柴胡湯投与群で有意に高値であった。また、可溶性画分では総 SOD 活性の約 86% が CuZn-SOD であり、ミトコンドリア画分と同様、大柴胡湯投与群は大柴胡湯非投与群に比べ有意に高値であった。なお、可溶性画分では総 SOD 活性も大柴胡湯投与群で有意に高値であった。

考 察

前回、亜急性の四塩化炭素肝障害に対する大柴胡湯の抑制効果を検討し、大柴胡湯には CCl_4 による

脂質過酸化を抑制することにより肝細胞障害を防止する作用がみられることを報告した。⁴⁾ 大柴胡湯における肝細胞障害抑制作用は、実験的研究のみならず、臨床的にも認められており、いくつかの報告がみられる。¹¹⁻¹⁴⁾ そして、その作用機序として、主成分のサイコサポニンによる脂質過酸化の抑制が考えられている。^{9, 15)} しかし、実際に肝臓におけるラジカル産生に対する大柴胡湯の影響を検索した報告はみられない。今回、 CCl_4 投与時にみられるラジカル産生を NBT を用いることにより直接組織学的に観察し、大柴胡湯の影響を検索した。この方法は酸化刺激の証明に極めて特異性が高く、且つ光顕レベルで容易に検索できることから、極めて有用な方法である。大柴胡湯を前投与した群と投与しない群では、産生されるホルマゼン、範囲においても密度においても、明らかに差がみられ、大柴胡湯投与群ではラジカル産生が抑制されていることが証明された。また、 CCl_4 による肝障害は小葉中心性に生じることが知られており、¹⁶⁾ 今回の実験でも、両群ともに小葉中心性の壊死巣が認められたが、その範囲や程度は大柴胡湯投与群で軽度であり、上述のホルマゼン産生の結果とよく一致している。一方、肝臓におけるラジカル消去系に関しては、 CCl_4 を投与した肝臓では SOD や GSH-Px などの酵素活性の低下がみられることが報告されている。^{17, 18)} 今回、このような消去系に対する大柴胡湯の影響を検討したところ、GSH-Px には差がみられなかったが、SOD 活性はミトコンド

リアにおいても可溶性画分においても大柴胡湯投与群が高値を示した。このことは、大柴胡湯投与群では消去系の活性低下が防止されていることを示しており、前述のラジカル産生の結果を裏づけている。しかし、このような SOD 活性における結果については、1) 大柴胡湯が直接 SOD 活性を上昇させること、あるいは 2) 大柴胡湯投与により肝細胞障害が抑制されたために SOD 活性が高く保持されていることの二つの可能性が考えられる。予備実験において CCl₄ を投与しない状態で大柴胡湯投与群と飼育食群を比較したところ、SOD 活性は大柴胡湯投与群で有意に高値であった。このことから、大柴胡湯は肝臓における SOD を活性化する作用を有していることが推測され、大柴胡湯投与群では GSH-Px が減少するにも関わらず、脂質過酸化が抑制されることの一因と考えられる。また、大柴胡湯そのものに radical scavenger としての作用があることも考えられるが、直接的な証明はなされていない。いずれにしても、今回の実験で認められた大柴胡湯投与群における SOD 活性の亢進、radical 産生の減少は、前報において示された *in vivo* における Thiobarbituric acid-reactant substance の減少や *in vitro* における Free malondialdehyde の産生の抑制など脂質過酸化の防止の結果を裏づけている。しかし、大柴胡湯には種々の成分が含まれており、今後有効成分の同定や作用機序の解明など、さらに詳細な研究が必要である。

結 論

四塩化炭素による実験的肝障害において、大柴胡湯は肝細胞における SOD 活性を高めることによりフリーラジカルを消去し、その結果脂質過酸化による肝細胞障害を抑制する。

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) Slater, T.F.: Biochemical studies on liver injury. Biochemical mechanism of liver injury. London, Academic Press, pp.1-44, 1978.
- 2) Lepage, R.N., Cheeseman, K.H., Osman, N. and Slater, T.F.: Lipid peroxidation in purified plasma membrane fractions of rat liver in relation to the hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Cell Biochem. Function* **6**, 87-99, 1988.
- 3) 伊藤浩行: 四塩化炭素肝傷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.
- 4) 伊藤浩行: 四塩化炭素肝傷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. 和漢医薬学会誌 **9**, 243-248, 1992.
- 5) Mochida, S., Masaki, N., Ohta, Y., Matsui, A., Ogata, I. and Fujiwara, K.: In situ detection of oxidative stress in rat hepatocytes. *J. Pathol.* **167**, 83-89, 1992.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Song, C.S. and Bodansky, O.: Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver. *J. Biol. Chem.* **242**, 694-699, 1967.
- 9) 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.
- 10) Oyanagui, Y.: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142**, 290-296, 1984.
- 11) 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.
- 12) 山本昌弘, 植村泰三, 中間 慧, 上宮正直, 田中俊郎, 原誠二郎: 漢方方剤構成生薬の実験的肝胆傷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.
- 13) 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.
- 14) Amagaya, S., Hayakawa, M., Ogihara, Y. and Fujiwara, K.: Effect of Syo-saiko-to and Dai-saiko-to on experimental hepatic fibrosis in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**, 137-145, 1988.
- 15) 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.
- 16) Terao, K.: Liver injuries induced by free radicals. *J. Toxicol. Pathol.* **2**, 11-18, 1989.
- 17) Manno, M., Bertazzon, A., Burlina, A. and Galgigna, L.: Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase

and glutathion peroxidase in mice, *Enzyme* **34**, 107-112, 1985.

- 18) 伊藤 正：ラット肝傷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.