

部分切除肝ラットに及ぼす小柴胡湯の影響 (第2報)

—細胞増殖に及ぼす影響について—

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 II: On the hepatic cell fissiparity

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 November 16, 1992. Accepted June 14, 1993.)

Abstract

In the present paper, the effects of Sho-saiko-to on the hepatic cell fissiparity during hepatic regeneration after partial hepatectomy, the enzymes related to the mitosis, tyrosine aminotransferase (TAT) and thymidinekinase (TK) and amounts of DNA in liver were measured. Sho-saiko-to (1000 mg/kg/day, TSUMURA) was administrated orally 3 weeks before partial hepatectomy and this administration was continued.

Activities of TK and TAT and amounts of DNA in the liver were measured time-coursely 22, 28, 72 hrs and 8 days after partial hepatectomy. Moreover the relationship between these levels and cell cycle during hepatic regeneration in the investigation was undertaken by flow cytofluorometric analysis. TK activities increased at 22 hrs in the control and Sho-saiko-to groups and the delayed maximum value was observed at 28 hrs after partial hepatectomy in the Sho-saiko-to group. The maximum value of TK activities in the control group was observed at 28 hrs, while the maximum values of these in the Sho-saiko-to group was shown at 72 hrs after partial hepatectomy. DNA content were significantly increased in the Sho-saiko-to group at 72 hrs after as compared with the control group. On the cytofluorometric analysis of hepatic cell cycle during hepatic regeneration, increased S phase at 0 hr and increased G₁ phase at 28, 72 hrs and 8 days were observed in the Sho-saiko-to group as compared with the control group.

These results suggest that Sho-saiko-to is involved in prolonging the G₁ phase in the cell cycle, and also increases DNA synthesis in hepatic regeneration after partial hepatectomy.

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

結 言

1 報において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を細胞機能の面から報告し

た。¹⁾ 本報告では細胞増殖におよぼす小柴胡湯の影響を調べるために、再生肝について細胞増殖の目安となる Tyrosine aminotransferase (TAT) 活性, Thymidinekinase (TK) 活性や DNA 量の測定を行なった。さらにセルソーターで再生肝を分析し、

*〒260 千葉市美浜区若葉2-10-1
2-10-1, Wakaba, Mihama-ku, Chiba 260, Japan

若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) 材料：動物はウイスター系雄性ラット（5週令，約120 g）5匹を一群として用いた。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，肝切除後もひき続き投与した。肝切除はHiggins & Anderson²⁾の方法でエーテル麻酔下に行なった。

(2) 方法：肝切除後22，28，72時間および8日目に動物を断頭にて犠牲にし，肝臓を摘出して実験に供した。なお肝切除後0時間目の肝は肝切除時のものを用いた。各時間における肝上清のTAT活性，TK活性の測定，細胞のDNA量の測定，さらにセルソーターによる分析を行なった。TAT活性の測定は4倍量の0.14 M KClを用いて肝をホモジナイズし，10,000×g 60分の遠心後の上清を用いてDiamondston³⁾の変法で測定した。TK活性の測定は0.2 M Tris-HCl bufferを用いて同様の処理をした上清を用いてBreitman⁴⁾の方法に準じて測定した。またDNA量は核におけるdeoxyriboseを測定することにより行なった。セルソーターはトリプシン消化法でサンプルを調製し，フローサイトメトリー⁵⁾により行なった。蛋白質量測定はProtein Assay Kit (Bio-Rad Lab. CA. U.S.A.)を用いて行なった。なお，肝部分切除後の細胞増殖は肝小葉の周辺帯の方が中心帯よりも増殖能が高いとの報告があり⁶⁾ 私達は肝切除後0時間を除き，肝部分切除後の肝小葉の周辺帯を検体として調製した。

統計処理はStudent's *t* 検定により行なった。

結 果

肝上清のTAT活性は両群とも22時間目には有意に上昇するが，小柴胡湯投与群ではそのまま増加を続け28時間目にピークを示したが対照群では28時間目には減少した (Fig. 1)。

TK活性は対照群では22時間目に増加がみられ28時間目にピークを示した。小柴胡湯投与群では22，28時間に活性が増すが，さらに増加が続き72時間目にピークを示した (Fig. 2)。

DNA量は両群とも22時間目には増加傾向を示し，28時間目までは両群ともあまり差はみられないが，72時間目には小柴胡湯投与群が有意に高値

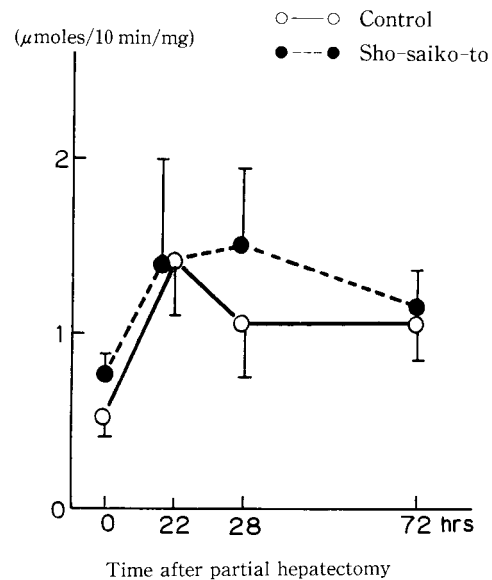


Fig. 1 TAT (Tyrosine aminotransferase) activities in liver after partial hepatectomy. (n=5, mean±S.D.)

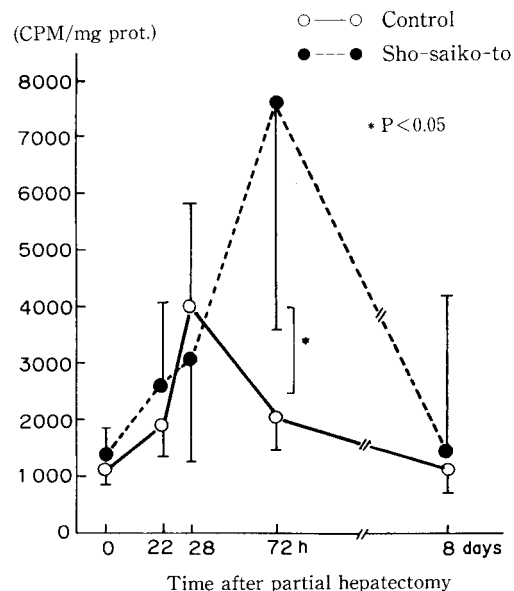


Fig. 2 TK (Thymidinekinase) activities in liver after partial hepatectomy. (n=5, mean±S.D.)

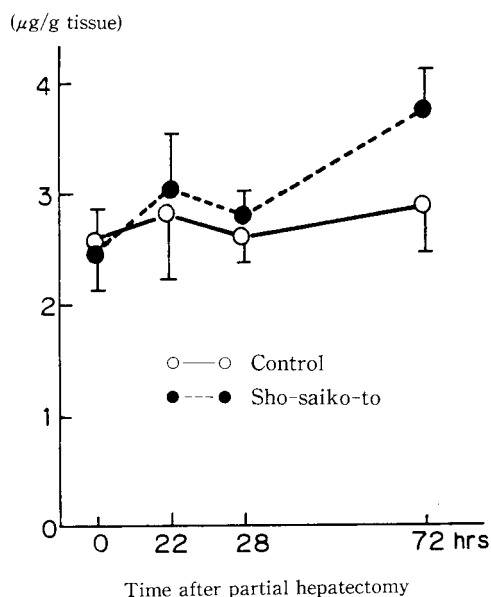


Fig. 3 DNA contents in liver after partial hepatectomy. (n=5, mean±S.D.)

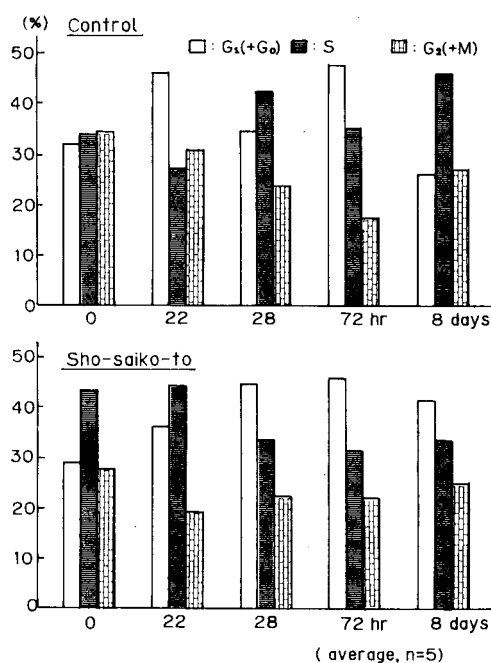


Fig. 4 Cytofluorometric analysis of hepatic cell cycle during hepatic regeneration.

を示した (Fig. 3)。

セルソーターによる分析では小柴胡湯投与群では0時間においてS期が一番多い比率を示し、22時間目もG₁期が少し増えるものの同じような傾向を示した。しかし28、72時間、8日目においてはG₁期が一番多い比率を示し、ついでS、G₂期と減少してきた。対照群では22時間目ではG₁期、28時間目にはS期が一番多かった (Fig. 4)。

考 察

小柴胡湯は広く肝疾患治療薬として用いられているが、肝細胞増殖に対する作用機序はまだ解明されていない。そこで私達は肝細胞増殖に対する小柴胡湯の影響を調べるために、ほとんどの細胞が同調されている再生肝を用いて検討した。ラット肝を部分切除すると週令や栄養状態などにより異なるが、約200gのラットではG₁期は15時間前後でS期に入り、約30時間後にはM期にはいるが、小さいラットでは時間が早まる。藤原らは小柴胡湯による肝再生促進効果の作用点を見るために肝オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 活性、肝プユトレシン量を測定し、小柴胡湯はG₁前期には作用しないと述べている⁷⁾。私達はG₁前期に誘導されるTAT活性を測定したところ対照群では22時間目にピークを示すが小柴胡湯投与群においては28時間目にピークを示し、このことはG₁前期が延長されていることを示唆している。また0時間において小柴胡湯投与群の方が有意に高値を示し、このことは対照群よりも投与群の方がG₁期の細胞が多いことを示している。そこで私達はG₁後期に誘導されるTK活性を測定した。一般にTK活性は肝切除後22時間目から誘導がおこるが⁸⁾、私達の実験でも対照群は22時間目にTK活性が増加し、28時間目にピークを示した。しかし小柴胡湯投与群では22時間目に増加をはじめものの72時間目にピークを示し、しかも対照群のピーク (28時間目) より有意に高値を示した (Fig. 2)。またDNA量を調べたところ肝切除72時間目には小柴胡湯投与群が有意に高値を示し、TK活性やDNA量の測定から小柴胡湯はG₁後期に作用し、しかも後期の時間を延長することが推定された。

さらにくわしく調べるためセルソーターでの分析を行なった。一般にラットは4週令以降では肝臓のDNA合成はほとんどみられなくなる⁹⁾。しかしラットの体重増加は約20週令まで続くという報告もある¹⁰⁾。私達のセルソーターによる分析では0時間にお

いて G_1 (+ G_0), S, G_2 期にある細胞は同程度の比率でみられ、このことから7週令のラット肝細胞はある程度は分裂を行なっているのではないと思われる。また0時間において小柴胡湯投与群はS期が一番高い比率を示しているが、これはTAGH溶液を投与した時と同じような現象ではないかと思われる。すなわち Lieberman ら¹¹⁾ はトリヨードチロニン (T_3), アミノ酸混液 (A), グルカゴン (G), ヘパリン (H) の混合液 (TAGH 溶液) をラットの尾静脈から注入すると肝臓にDNA合成がおこるが、DNA合成に引き続きおこる細胞分裂は認められないと報告している。私達の実験で3週間、小柴胡湯を投与したあとにS期が一番高い比率を示し、またTAT活性やTK活性も0時間において小柴胡湯投与群の方が若干高い値を示すのもTAGH溶液と同様な効果を示したのではないと思われる。22時間目には対照群では G_1 (+ G_0) 期が一番高い比率を示すが、これは肝を部分切除することにより修復機構が働いて細胞が G_0 期から G_1 期に転換したものと考えられる。また28時間目には対照群はS期が一番高い比率を示し、細胞分裂期 (M 期) に先駆けてDNA合成が行なわれていることを示している。しかし小柴胡湯投与群においては28, 72時間目にはまだ G_1 期が一番高い比率を示し、このことから小柴胡湯は G_1 後期に作用し、しかも G_1 期を延長する効果があることを示唆している。

しかし小柴胡湯が細胞のどの部分に影響を及ぼして G_1 期を延長するのかわかりず不明であり、例えば小柴胡湯は細胞膜の受容体に結合してアデニルシクラーゼの活性化をおくらせるのか、あるいは核の非ヒストン蛋白に結合してDNA合成の活性化をおくらせるのか、あるいは別のところに影響を及ぼすのかわかりず不明であり、今後さらに検討する必要があると思われる。

結 論

ラットの肝を部分切除し、再生肝をつくり小柴胡湯を投与して肝細胞増殖に対する影響を検討し、以下の結果を得た。

1. TAT 活性

小柴胡湯投与群では肝切除後28時間目は対照群と比し有意に差がみられ G_1 期を延長していることが推定された。

2. TK 活性

小柴胡湯投与群では72時間目に有意に活性が増加し、小柴胡湯投与群は G_1 後期に作用し、さらに

G_1 期が延長されていることが推定された。

3. DNA 量

小柴胡湯投与群では8日目には有意に増加し、細胞増殖を促進していると思われる。

4. セルソーター

小柴胡湯投与群では28, 72時間目にはまだ G_1 期が高い比率を示し、 G_1 期が延長されていることが推定された。

文 献

- 1) Fukui, N., Yoneyama, Y., Hasegawa, R., Haranaka, R. and Nakagawa, S.: Effects of Sho-saiko-to on the experimentally induced regenerating liver Part I: Changes of activities of several enzymes related to hepatic injury. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **9**, 151-156, 1992.
- 2) 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.
- 3) Diamondstone, T.I.: Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde. *Analy. Biochem.* **16**, 395-401, 1966.
- 4) Breitman, T.R.: The feedback inhibition of thymidine kinase. *Biochem. Biophys. Acta* **67**, 153-155, 1963.
- 5) Kimura, H., Urata, Y., Hosokawa, Y., Hattori, T., Pllicciari, C. and Fukuda, M.: A method of DNA histogram analysis by computer and its evaluation by simultaneous combination with 3H -thymidine autoradiography. *Bas. Appl. Histochem.* **27**, 163-176, 1983.
- 6) Futagami, R.: Investigation of sequential changes occurring in hepatic lobules during the regeneration process after partial hepatectomy in rats, with emphasis on changes of the vascular system. *Acta Hepatologica Japonica*, **33**, 127-137, 1992.
- 7) Fujiwara, K. and Oka, H.: Effects of Sho-saiko-to on the protection of hepatic function and acceleration of hepatic regeneration. *JAMA*, 12-13, April supplement, 1988.
- 8) Fukui, N.: Factors regulating thymidine kinase in regenerating liver. *J. Biochem.* **69**, 1075-1082, 1971.
- 9) Ferdinandus, J.A., Morris, H.P., Wever, G.: Behavior of opposing pathways of thymidine utilization in differentiating, regenerating, and neoplastic liver. *Cancer Res.*, **31**, 550-556, 1971.
- 10) Nagase, S. and Tanaka, H.: Data of the clinical biochemistry in experimental animals. Soft-Science Company, 1976, p. 74, Tokyo.
- 11) Short, J., Brown, R.F., Husakova, A., Gilbertson, J.R., Zemel, R. and Lieberman, I.: Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1757-1766, 1972.