

黄連解毒湯エキスの compound 48/80 惹起胃粘膜障害抑制作用

小林 隆^{a)} 尾辻 和彦^{b)} 太田 好次^{*a)} 永田 稔^{c)} 石黒伊三雄^{a)}

^{a)}藤田保健衛生大学医学部生化学教室, ^{b)}藤田保健衛生大学医学部内科学教室, ^{c)}藤田保健衛生大学病院薬剤部

Preventive action of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions

Takashi KOBAYASHI^{a)} Kazuhiko OTSUJI^{b)} Yoshiji OHTA^{*a)}
Minoru NAGATA^{c)} and Isao ISHIGURO^{a)}

^{a)}Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University

^{b)}Department of Internal Medicine, School of Medicine, Fujita Health University

^{c)}Department of Pharmacy, Fujita Health University Hospital

(Received October 19, 1993. Accepted January 6, 1994.)

Abstract

We attempted to clarify the preventive action of orally administered Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) (OGT) extract on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions in rats. When gastric mucosal lesions were checked in rats 30 min and 3 h after compound 48/80 injection, an apparent lesion was observed 30 min after the injection and the lesion became worse after 3 h. Increases in the content of lipid peroxide (LPO) and the activities of xanthine oxidase (XOD) and myeloperoxidase (MPO), an index of neutrophils, and a decrease in Se-glutathione peroxidase (Se-GSH-px) activity occurred in the gastric mucosal tissues of rats 30 min after the compound 48/80 injection. These changes were enhanced in the mucosal tissues of rats 3 h after the compound 48/80 injection. When OGT extract was orally administered to rats 30 min before or immediately after the compound 48/80 injection, a preventive effect on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions was found 3 h after the compound 48/80 injection, but not 30 min after the injection. In the gastric mucosa of rats treated orally with OGT extract 30 min after compound 48/80 injection, a significant prevention against lesions with increased LPO content and XOD and MPO activities and decreased Se-GSH-px activity was found 3 h after the compound 48/80 injection.

These results indicate that OGT extract administered orally before and after the appearance of compound 48/80-induced gastric mucosal lesions can prevent the development of the gastric mucosal lesion in rats and suggest that this preventive action of OGT extract is due to its inhibitory actions on stimulated mucosal oxygen radical production via XOD and infiltrated neutrophils and stimulated lipid peroxidation via oxygen radicals produced.

Key words Oren-gedoku-to, compound 48/80, gastric mucosal lesions (rat), lipid peroxidation, antioxidant enzymes, xanthine oxidase, myeloperoxidase.

Abbreviations GSH-px, glutathione peroxidase; LPO, lipid peroxide; MDA, malondialdehyde; MPO, myeloperoxidase; SOD, superoxide dismutase; XOD, xanthine oxidase; OGT, Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) 黄連解毒湯.

緒 言

黄連解毒湯 (OGT) エキスは、ヒトにおいて抗潰瘍作用を示すことが知られている。^{1,2)} しかも、このエキ스는スーパーオキシドアニオン (O_2^-) やハイドロキシルラジカル ($\cdot OH$) を消去すると共に、胃粘膜組織のフリーラジカル惹起脂質過酸化反応を阻害し、また胃粘膜組織の xanthine oxidase (XOD) 活性を阻害することが *in vitro* で認められている。³⁻⁵⁾

Compound 48/80 (肥満細胞の脱顆粒薬) を 1 回投与したラットでは、その投与後 30 分で胃粘膜障害の発症がみられ、投与 3 時間後で胃粘膜障害は最も悪化し、その後回復するが、投与後 24 時間では再び悪化することが認められている。⁶⁾ 著者ら⁶⁾ は、compound 48/80 を 1 回投与したラットにその投与 30 分後に OGT エキスを経口投与すると、投与後 24 時間の時点で胃粘膜障害と共に、胃粘膜組織における過酸化脂質 (LPO) 量の増加、過酸化水素 (H_2O_2) の消去に関与する catalase および H_2O_2 と脂質ハイドロパーオキシドの消去に関与する Se 含有 glutathione peroxidase (Se-GSH-px)⁷⁾ の両酵素の活性低下、並びに O_2^- と H_2O_2 の生成に関与する XOD の活性上昇が抑制されることを認め、この胃粘膜障害に対する OGT エキスの抑制効果がその活性酸素の生成抑制作用や活性酸素消去作用に基づいていることを推察している。しかし、compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間でみられる胃粘膜障害に活性酸素や LPO による酸化的障害が寄与しているか否かは明らかではなく、また compound 48/80 投与後 3 時間でみられる胃粘膜障害がその投与後 30 分における OGT エキスの経口投与によって抑制されるか否かに関しても不明である。更に、この compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対して OGT エキスがその経口投与によって予防効果を示すか否かに関しても明確にされていない。

そこで、compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する OGT エキスの抑制機序を明確にする目的で、著者らは compound 48/80 を 1 回投与したラットに、その投与 30 分後の胃粘膜障害の発症がみられる時点で OGT エキスを経口投与し、胃粘膜障害が最も悪化している compound 48/80 投与 3 時間後において、胃粘膜障害並びに胃粘膜組織の LPO レベルおよび活性酸素の消去と生成に関与する酵素の活性の変動に対する抑制効果を調べた。また、この compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する OGT エキスの経口投与による予防効果についても併せて検討し

た。

材料と方法

(1) 実験動物：日本エスエルシー社 (浜松) より購入し、オリエンタル酵母社 (東京) 製の固形飼料 MF で 1 週間飼育した 7 週齢の雄性 Wistar 系ラットを実験に用いた。

(2) 試薬：OGT エキスは、(株) ツムラ (東京) より供与されたエキス原末を用いた。また、compound 48/80、テトラメチルベンチジン、キサンチンおよび牛赤血球 superoxide dismutase (SOD) はシグマ社 (St. Louis, MO) 製を、酵母 glutathione reductase と牛乳 XOD はペーリンガー・マンハイム山之内社 (東京) 製を、2-チオバルビツール酸およびその他の試薬は和光純薬工業社 (大阪) 製を使用した。

(3) 実験方法：Compound 48/80 投与による胃粘膜障害の作製は、既報⁶⁾ に述べたように、蒸留水に溶解した compound 48/80 (0.75 mg/kg 体重) を 1 夜絶食させたラットに 1 回腹腔内投与して惹起させた。Compound 48/80 非投与群 (対照群) には、同量の蒸留水を腹腔内投与した。OGT エキスは蒸留水に懸濁し、ラットに体重 1 kg 当たり 500 mg を compound 48/80 投与前 30 分、投与直後および投与後 30 分の時点で経口投与した。その対照群には、同量の蒸留水を経口投与した。これらのラットは胃を摘出する compound 48/80 投与後 30 分あるいは 3 時間の時点までは絶食させ、水のみを自由摂取させた。胃の摘出はエーテル麻酔下において行った。

胃粘膜障害の程度の判定は次のように行った。即ち、胃の摘出時に胃内に 0.9 % NaCl を 10 ml 注入し、その後胃は摘出した。その胃は 10 % ホルマリン液に 10 分間浸した後、大弯に沿って開き、腺胃部の浮腫を調べると共に、その腺胃部で出血斑を伴う粘膜の障害部位の面積 (mm^2) を測定した。胃粘膜障害は浮腫と障害部位の面積から 0~VII のグレイドに分類し、このグレイド分類を用いて表した。グレイド 0 は浮腫および出血斑が認められない胃粘膜、グレイド I は浮腫のみが認められる胃粘膜、グレイド II は障害部位の面積が 1~10 mm^2 の胃粘膜、グレイド III は障害部位の面積が 11~20 mm^2 の胃粘膜、グレイド IV は障害部位の面積が 21~30 mm^2 の胃粘膜、グレイド V は障害部位の面積が 31~40 mm^2 の胃粘膜、グレイド VI は障害部位の面積が 41~50 mm^2 の胃粘膜、またグレイド VII は障害部位の面積が 51 mm^2 以上である胃粘膜とした。

胃粘膜は摘出した胃からハサミで切り離し、LPO, SOD, catalase, Se-GSH-px, myeloperoxidase (MPO) および XOD の測定に用いた。LPO の測定は、胃粘膜を冷 20 mM エチレンジアミン四酢酸溶液で 10 % ホモジネートとした後、Ohkawa ら⁸⁾ のチオバルビツール酸法で行った。その量は、マロンジアルデハイド (MDA) 量として表した。また、SOD, catalase, Se-GSH-px および MPO の活性測定は、それぞれ Oyanagui⁹⁾ の亜硝酸法、Bergmeyer¹⁰⁾ の方法、Hochstein & Utely¹¹⁾ の方法および Suzuki ら¹²⁾ の方法で行った。これらの測定の試料は、冷 50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で胃粘膜組織を 10 % ホモジネートとした後に遠心 (10,000×g, 20 分間) し、得られた上清を同緩衝液に対して 24 時間透析を行って調製した。SOD 活性は牛血清 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血清 SOD の量として表した。Catalase の活性は、37°C において 1 分間に 1 μ mole の H_2O_2 を分解する酵素量を 1 単位 (U) として表した。Se-GSH-px の活性は、37°C において H_2O_2 の分解に伴う還元型グルタチオンから酸化型グルタチオンへの変化を glutathione reductase を介する NADPH の酸化で調べ、1 分間に 1 μ mole の NADP⁺ を生成する酵素量を 1 単位 (U) として表した。MPO 活性は、37°C において 1 分間にテトラメチルベンチジンが酸化されて生ずる生成物の 655 nm における吸光度を 1.0 だけ増加させる酵素量を 1 単位 (U) として表した。XOD 活性の測定は Hashimoto¹³⁾ の方法で行い、キサンチンを基質として用いた。この測定での試料は、0.25 M シュクロースで胃粘膜組織を 10 % ホモジネートとした後に遠心 (10,000×g, 20 分) し、得られた上清を同溶液に対して 24 時間透析を行って調製した。本酵素の活性は、30°C, 1 分間に 1 μ mole の尿酸を生成する酵素量を 1 単位 (U) として表した。なお、胃粘膜組織の SOD, catalase, Se-GSH-px および MPO の活性は、組織 1 g 当りで表した。

各群間での胃粘膜障害の有意差の検定は、Mann-Whitney 検定法を用いて行い、危険率 5 % 以下を有意とした。また、LPO 量および SOD, catalase, Se-GSH-px, MPO, XOD 等の活性値は平均 $\pm$ S.D. で表し、これらの各群間での有意差の検定は Student's *t*-test を用いて行い、危険率 5 % 以下を有意とした。

結 果

1. Compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜障害の程度

1 回の compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害をその投与後 30 分と 3 時間において調べ、グレイド分類によって表すと、Fig. 1 に示す結果が得られた。Compound 48/80 投与後 30 分で胃粘膜障害が観察され、グレイド II の胃粘膜障害が最も多く、全体の 50 % を占めていた。また、compound 48/80 投与後 3 時間においては、グレイド IV~VII の胃粘膜障害が観察され、これらのグレイドの胃粘膜障害は全体の 80 % 以上を占めていた。

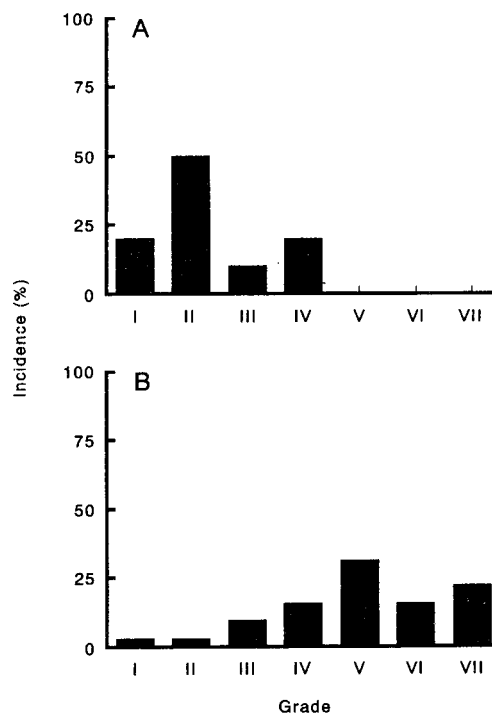


Fig. 1 Gastric mucosal lesions in rats 30 min (A) and 3 h (B) after compound 48/80 injection. The severity of gastric mucosal lesions was estimated according to the grade classification described in Materials and Methods. The number of rats used was 10.

Table I Gastric mucosal LPO level and SOD, catalase, Se-GSH-px, XOD, and MPO activities in rats 30 min and 3 h after compound 48/80 injection.

Component and enzyme	Time after compound 48/80 injection			
	30 min		3 h	
	Control	Compound 48/80	Control	Compound 48/80
LPO (nmol MDA/g tissue)	26.5±0.8 (6)	30.2±2.2 (7)**	28.6±4.6 (6)	47.5±10.3 (7)**
SOD (μg/g tissue)	14.0±3.4 (8)	13.7±2.7 (8)	14.5±3.9 (8)	13.9±2.0 (8)
Catalase (U/g tissue)	7.0±1.0 (8)	6.3±2.0 (8)	7.1±0.9 (8)	6.9±1.8 (8)
Se-GSH-px (U/g tissue)	330.5±19.5 (8)	269.0±30.5(10)***	322.3±6.8 (8)	143.3±6.6 (10)***
XOD (mU/g tissue)	3.30±1.0 (9)	4.67±1.33(10)*	3.67±1.67 (9)	12.0±3.0 (10)*
MPO (U/g tissue)	5.86±0.91 (5)	9.73±2.02 (6)**	5.4±0.78 (5)	14.27±6.84 (6)*

Means±S.D. with the number of animals in parentheses. Vs control : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$;
***, $p < 0.001$.

2. Compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜組織の LPO 量および活性酸素の消去と生成に関与する酵素の活性

Compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜組織の LPO 量および活性酸素の消去と生成に関与する酵素の活性を調べると, Table I に示す結果が得られた。Compound 48/80 投与後 30 分の胃粘膜組織では, LPO 量の有意な増加, H_2O_2 と脂質ヒドロパーオキシドの消去に関与する Se-GSH-px⁷⁾ の有意な活性低下, O_2^- と H_2O_2 の生成に関与する XOD の有意な活性上昇および好中球の指標で, HClO^- の生成に関与する MPO¹⁴⁾ の有意な活性上昇がみられたが, O_2^- の消去に関与する SOD と H_2O_2 の消去に関与する catalase の活性変動は認められなかった。Compound 48/80 投与後 3 時間の胃粘膜組織においては, その投与後 30 分においてみられた LPO 量の増加, Se-GSH-px 活性の低下および XOD と MPO 活性の上昇は更に高まっていたが, SOD と catalase 活性の変動は認められなかった。

3. Compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する OGT エキス経口投与の影響

Compound 48/80 投与前 30 分と投与直後に OGT エキスを経口投与すると, Fig. 2 に示すように, compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する有意な抑制効果は compound 48/80 投与後 30 分ではみられ

なかったが, compound 48/80 投与後 3 時間では認められた。また, 胃粘膜障害の発症がみられる compound 48/80 投与後 30 分に OGT エキスを経口投与し, compound 48/80 投与後 3 時間の時点で胃粘膜障害を調べると, Fig. 3 に示す結果が得られた。Compound 48/80 単独投与群では, グレード V~VII の胃粘膜障害が全体の約 90 % を占めていた。それに対し, OGT エキス併用投与群では, グレード I~III の胃粘膜障害が全体の約 80 % を占め, 胃粘膜障害は有意に抑制されていた。

4. Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の LPO レベルに及ぼす OGT エキス経口投与の影響

Compound 48/80 投与後 3 時間における胃粘膜組織の LPO レベルの増加は, その投与後 30 分における OGT エキスの経口投与で有意に抑制され, その量はほぼ対照群のレベルであった (Fig. 4)。また, OGT エキス単独投与群では, 胃粘膜組織の LPO レベルに変動は認められなかった (Fig. 4)。

5. Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の Se-GSH-px, XOD および MPO 活性に及ぼす OGT エキス経口投与の影響

Compound 48/80 投与後 3 時間における胃粘膜組織の Se-GSH-px 活性は対照群の 45 % であったが, この活性低下はその投与後 30 分における OGT エキスの経口投与によって有意に抑制され, その活性値は対照群の 64 % であった (Fig. 5A)。Com-

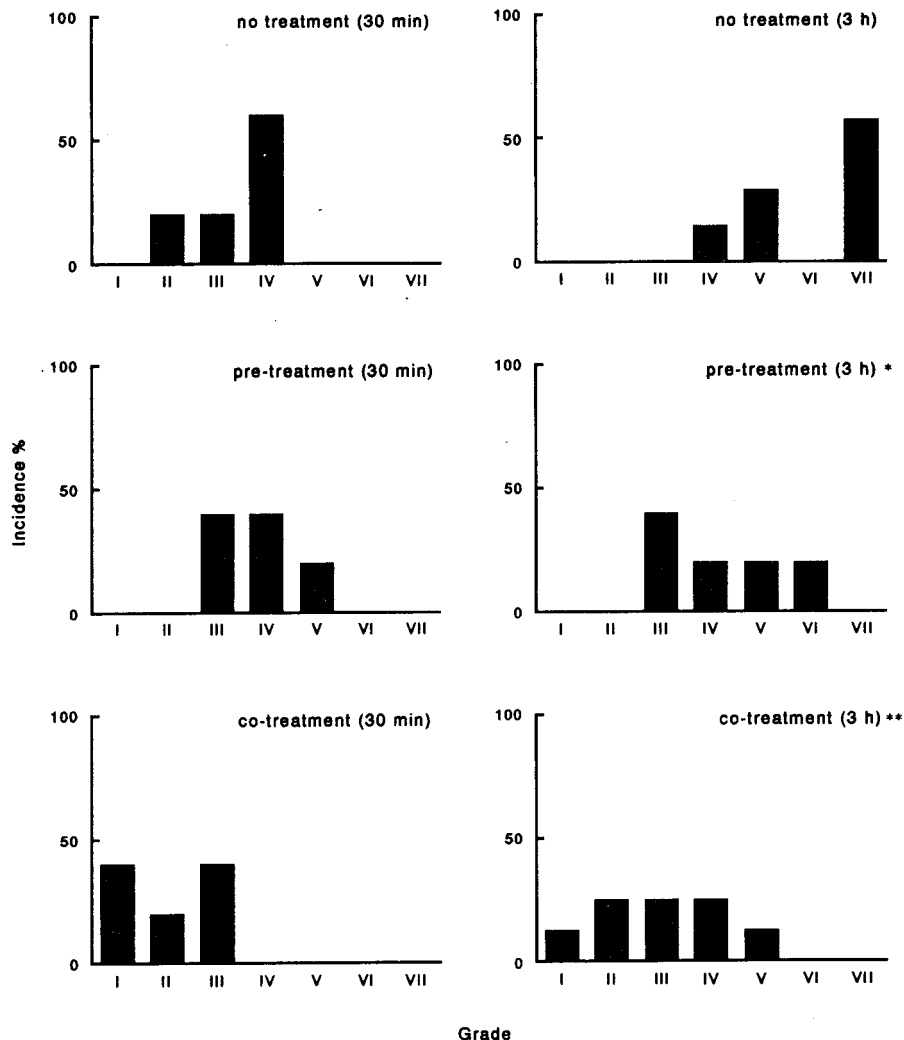


Fig. 2 Effect of pre- or co-oral administration of OGT extract on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions. OGT extract was administered to rats 30 min before or immediately after compound 48/80 injection. Gastric mucosal lesions were checked 30 min and 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. The number of rats used was 5-8. Vs no treatment (3 h) : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

pound 48/80 投与後3時間における胃粘膜組織のXOD活性は対照群の3.7倍であったが、この活性上昇はその投与後30分におけるOGTエキスの経口投与によって有意に抑制され、その活性値は対照群と同レベルであった (Fig. 5B)。Compound 48/80 投与後3時間における胃粘膜組織のMPO活性は対照群の2.8倍であったが、この活性上昇はその投与後30分におけるOGTエキスの経口投与によって有

意に抑制され、その活性値は対照群の1.45倍であった (Fig. 5C)。なお、OGTエキスの単独投与群では、胃粘膜組織のSe-GSH-px, XODおよびMPO活性の変動はみられなかった (Fig. 5A~C)。

6. *In vitro* における胃粘膜組織のMPO活性に対するOGTエキスの影響

Compound 48/80 投与後3時間の時点で摘出したラット胃粘膜組織を用い、その組織のMPO活性に

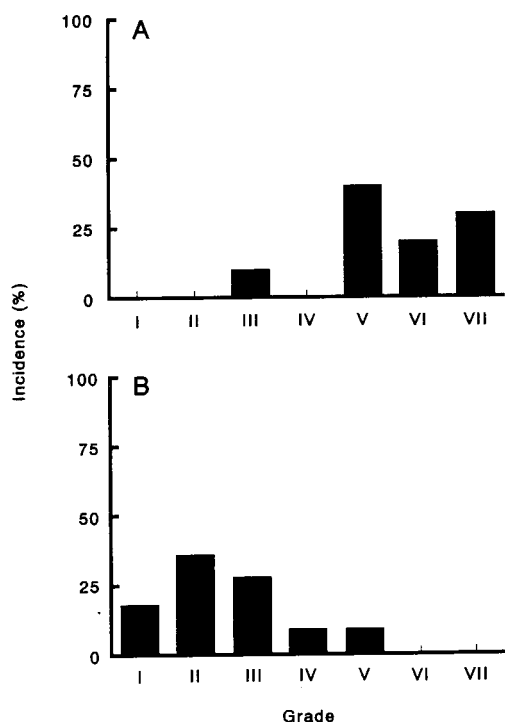


Fig. 3 Effect of post-oral administration of OGT extract on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions in rats. OGT extract was administered to rats 30 min after compound 48/80 injection. Gastric mucosal lesions were checked 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. A, compound 48/80-injected group; B, compound 48/80-injected and OGT-treated group. There was a significant difference between both groups ($p < 0.01$). The number of rats used in the two groups was 10 each.

対する OGT エキスの影響を調べると、Table II に示す結果が得られた。OGT エキスは $10 \mu\text{g/ml}$ の添加濃度において MPO 活性を 38.1 % 阻害した。また、このエキスの添加濃度を増すにつれて MPO 活性に対する阻害効果も増強したが、その阻害効果は $50 \mu\text{g/ml}$ の添加濃度でほぼプラトーとなった。

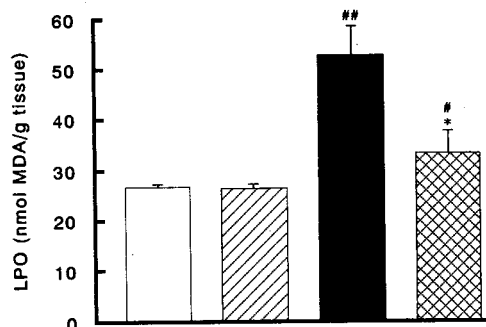


Fig. 4 Effect of post-oral administration of OGT extract on gastric mucosal LPO level in rats injected with compound 48/80. OGT extract was administered to rats 30 min after compound 48/80 injection. Gastric mucosal LPO was determined 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. □, control group; ▨, OGT-treated group; ■, compound 48/80-injected group; ▩, compound 48/80-injected and OGT-treated group. Each value is a mean $\pm$ S.D. ($n=5-10$). Vs control: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.001$. Vs compound 48/80: *, $p < 0.001$.

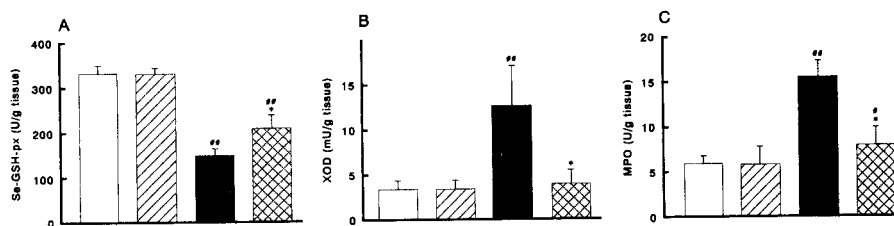


Fig. 5 Effect of post-oral administration of OGT extract on gastric mucosal Se-GSH-px, XOD, and MPO activities in rats injected with compound 48/80. OGT extract was administered to rats 30 min after compound 48/80 injection. Gastric mucosal Se-GSH-px, XOD, and MPO were assayed 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. □, control group; ▨, OGT-treated group; ■, compound 48/80-injected group; ▩, compound 48/80-injected and OGT-treated group. Each value is a mean $\pm$ S.D. ($n=5-10$). Vs control: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.001$, Vs compound 48/80: *, $p < 0.001$.

Table II Effect of OGT extract on MPO activity in gastric mucosal tissues from compound 48/80-treated rats.

Addition of OGT ($\mu\text{g/ml}$)	Activity (U/g tissue)	Inhibition %
None	14.7 $\pm$ 0.03	0
10	9.1 $\pm$ 0.03*	38.1
25	8.3 $\pm$ 0.04*	43.6
50	5.4 $\pm$ 0.03*	63.3
100	4.8 $\pm$ 0.02*	67.3

Gastric mucosal tissues were obtained from rats sacrificed 3 h after compound 48/80 injection and used for MPO assay as described in Materials and Methods. Values are means $\pm$ S.E. (n=3). Vs no addition : *, $p < 0.001$.

考 察

OGT エキスの compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する抑制機序を明確にする目的で、著者らは compound 48/80 を 1 回投与したラットに胃粘膜障害の発症前と発症後の時点で既報⁶⁾において投与効果がみられた量の OGT エキス (500 mg/kg 体重) を経口投与し、胃粘膜障害が最も悪化した時点においてこのエキスの胃粘膜障害抑制効果を調べた。

Compound 48/80 を 1 回投与したラットにおいて、既報⁶⁾で示したように、その投与後 30 分の時点で軽度の胃粘膜障害が認められ、その障害は投与後 3 時間においては悪化していた。この compound 48/80 投与後 30 分の時点での胃粘膜組織では、明らかな LPO 量の増加、 H_2O_2 と脂質ヒドロパーオキシサイドの消去酵素である Se-GSH-px⁷⁾ の活性低下および O_2^- と H_2O_2 の生成に与る XOD と好中球の指標で、 Cl^- の存在下で H_2O_2 を介して ClO^- の生成に与る MPO¹⁴⁾ の活性上昇が認められた。これらの結果から、compound 48/80 投与ラットにおける胃粘膜障害の発症には、その胃粘膜組織において活性化された XOD や浸潤した好中球中の活性化された NADPH 酸化酵素を介して生成される O_2^- 、 H_2O_2 などの活性酸素あるいはこれらの生成した活性酸素を介して生成される LPO が関与していると考えられる。また、この compound 48/80 投与の場合と類似した変化が虚血・再灌流障害時の胃粘膜組織で観察されている。^{15, 16)} しかも、Takemura ら¹⁷⁾ は、compound 48/80 投与ラットにおいて、その投与直後より胃粘膜血流量が減少し、一種の虚血・再灌流障害

が惹起されることを報告している。従って、このような compound 48/80 投与後早期でのラット胃粘膜組織における活性酸素代謝の変動は、虚血・再灌流障害が惹起されたことに基つくと推察される。また、compound 48/80 投与 3 時間後の胃粘膜組織では、LPO 量の増加、Se-GSH-px 活性の低下、XOD と MPO の活性上昇などの亢進がみられた。これらのことから、compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進展にも活性化された XOD や MPO を介して、また浸潤した好中球中の活性化された NADPH 酸化酵素を介して生成される活性酸素やその活性酸素に基づく脂質過酸化の亢進が関与していると考えられる。しかし、compound 48/80 投与後 30 分および 3 時間の時点では、胃粘膜組織の SOD や catalase 活性に変動は認められなかった。これらの結果は、compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織でみられる活性酸素や LPO の生成は活性酸素消去機能の低下にも依存しているが、それよりも活性酸素生成系の活性化に強く依存していることを示唆している。

一方、OGT エキスを compound 48/80 投与前あるいは投与直後に経口投与すると、compound 48/80 惹起胃粘膜障害は抑制され、OGT エキスはこの胃粘膜障害に対して予防効果を示すことが明らかとなった。しかも、この OGT エキスの compound 48/80 惹起胃粘膜障害に対する予防効果を胃粘膜障害の発症がみられる compound 48/80 投与後 30 分と胃粘膜障害が最も悪化しているその投与後 3 時間の時点⁶⁾で胃粘膜障害の程度を調べると、このエキスを胃粘膜障害を compound 48/80 投与後 30 分の時点では抑制しないが、compound 48/80 投与後 3 時間の時点では抑制していた。この結果は、OGT エキスが compound 48/80 惹起胃粘膜障害の発症よりもむしろ進展を抑制することを示している。また、胃粘膜障害の発症がみられる compound 48/80 投与 30 分後に経口投与したラットにおいて胃粘膜障害が最も悪化しているその投与後 3 時間の時点⁶⁾で胃粘膜障害の程度を調べると、その障害は明らかに抑制されていた。このことより、OGT エキスは compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進展をその発症後早期に投与されると抑制することが明確となり、前報⁶⁾でのこのエキスの compound 48/80 投与後 30 分での経口投与による胃粘膜障害抑制効果の結果が裏付けられた。なお、compound 48/80 投与による胃粘膜障害は肥満細胞から遊出するセロトニンによって惹起され、また同量の compound 48/80 を投与したラットの肥満細胞から遊出したセロトニンの血中レベルはその投与後 30 分で最も高くなることが報告され

ている¹⁸⁾。前述したように、本研究で compound 48/80 投与後 30 分での胃粘膜障害がその投与前と投与直後での OGT エキスの経口投与によって抑制されなかった。このことより、本研究での OGT エキスの経口投与は compound 48/80 の肥満細胞からのセロトニンの遊出作用に影響を与えていないと考えられる。

また、compound 48/80 投与後 30 分に OGT エキスを投与した実験では、compound 48/80 単独投与群でみられた胃粘膜組織の LPO 量の増加、Se-GSH-px 活性の低下および XOD と MPO 活性の上昇は OGT エキス併用投与群で明らかに抑制されていた。*In vitro* において OGT エキスは、 O_2^- や $\cdot OH$ を消去し、胃粘膜組織のフリーラジカル惹起脂質過酸化反応を阻害し、また胃粘膜組織の XOD 活性を阻害することが知られている。³⁻⁵⁾ 従って、compound 48/80 投与による胃粘膜組織の XOD 活性の上昇に対する OGT エキスの抑制は、このエキ스가本酵素活性を直接阻害していることによると推察される。Compound 48/80 投与による胃粘膜組織の Se-GSH-px 活性の低下に対する OGT エキスの抑制は、*in vitro* において Se-GSH-px は H_2O_2 や H_2O_2 と二価金属の Fe^{2+} などとの反応 (Fenton 反応)、遷移金属の Fe などの共在下での O_2^- と H_2O_2 との反応 (Haber-Weiss 反応) などで生じる $\cdot OH$ によって失活することが報告されている¹⁹⁾ ので、このエキ스가活性化された XOD や浸潤した好中球中の活性化された NADPH 酸化酵素を介して生成される O_2^- や $\cdot OH$ を消去し、これらの活性酸素による本酵素活性の失活を防ぐことに基づくと思われる。また、compound 48/80 投与による胃粘膜組織の MPO 活性の上昇に対する OGT エキスの抑制は、再灌流に伴う好中球の血管内皮への接着に XOD を介して生成される O_2^- が関与していると考えられている²⁰⁾ ので、このエキ스가 O_2^- 消去作用や XOD 阻害作用によって好中球の血管内皮への接着を防ぎ、その結果、好中球の胃粘膜組織内への浸潤を抑制していることに基づくと推察される。また、本研究において、OGT エキスは胃粘膜組織の MPO 活性を直接阻害することが明らかとなったので、この MPO 阻害作用も compound 48/80 投与による胃粘膜組織の MPO 活性の上昇に対する抑制に寄与していると考えられる。Compound 48/80 投与による胃粘膜組織の LPO 量の増加に対する OGT エキスの抑制は、このエキ스가活性化された XOD や浸潤した好中球中の活性化された NADPH 酸化酵素を介して生成される O_2^- を直接消去したり、生成した活性酸素に基

づく脂質過酸化の亢進を抑制したり、また活性化された XOD の活性を阻害したりすることによって考えられる。最近、MPO は好中球によって促進される脂質過酸化反応に関与していることが示唆されている²¹⁾ ので、OGT エキスは胃粘膜組織の MPO の関与する脂質過酸化反応をその MPO 阻害作用によって抑制していると考えられる。従って、この OGT エキスの脂質過酸化抑制作用も compound 48/80 投与による胃粘膜組織の LPO 量の増加の抑制に寄与している可能性が考えられる。このように、OGT エキスは compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害の進展を、胃粘膜組織において活性化された XOD や浸潤した好中球中の活性化された NADPH 酸化酵素を介して生成される O_2^- を消去したり、生成した活性酸素や MPO を介する脂質過酸化の亢進を抑制したり、また活性化された XOD の活性や浸潤した好中球の MPO の活性を阻害したりすることによって抑制していると考えられる。また、OGT エキス単独投与群では、胃粘膜組織の LPO レベルや Se-GSH-px, XOD, MPO などの酵素活性に変動はみられなかった。このことは、投与された OGT エキスが胃粘膜組織の活性酸素の消去系と生成系のバランスが崩れた状態においてのみ作用を発揮することを示唆していると思われる。

結 論

1 回の compound 48/80 投与ラットでの胃粘膜障害の発症・進展に、胃粘膜組織の活性化された XOD や浸潤した好中球中の活性化された NADPH 酸化酵素を介して生成される O_2^- , H_2O_2 などの活性酸素、これらの生成された活性酸素に基づく脂質過酸化の亢進および Se-GSH-px の活性低下が密接に関与していることが明らかとなった。また、compound 48/80 投与ラットにおいて、胃粘膜障害の進展は発症前および発症後の OGT エキス経口投与で明らかに抑制され、このエキ스는予防効果と治療効果の両方を示した。この OGT エキスの胃粘膜障害の進展に対する抑制は、投与されたこのエキ스가 compound 48/80 投与による胃粘膜組織の XOD 活性の上昇、脂質過酸化の亢進、Se-GSH-px の活性低下および胃粘膜組織への好中球の浸潤を抑制したことによると推察される。

文 献

- 1) 水野修一：消化性潰瘍からの出血に対する黄連解毒湯で

- の治療例. 漢方医学 5 (11), 13-16, 1981.
- 2) 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療効果. 日消病会誌 79, 1043, 1982.
- 3) 吉川敏一, 高橋周史, 内藤祐二, 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.
- 4) 小林 隆, 尾辻和彦, 太田好次, 永田 稔, 石黒伊三雄: *In vitro* ラット胃粘膜の脂質過酸化反応に対する黄連解毒湯エキスの抑制作用. 医学と生物学 126, 61-65, 1993.
- 5) Otsuji, K., Ohta, Y., Shinohara, R. and Ishiguro, I.: Effect of oral administration of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract gastric mucosal lesions in compound 48/80-treated rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 9, 101-109, 1992.
- 6) Otsuji, K., Kobayashi, T., Ohta, Y., Shinohara, R., Nagata, M. and Ishiguro, I.: Effect of the timing of oral administration of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract on its preventive action on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 9, 229-235, 1992.
- 7) Lawrence, R.A. and Burk, R. F.: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958, 1976.
- 8) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction *Anal. Biochem.* 95, 351-358, 1979.
- 9) Oyanagui, Y.: Re-evaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 142, 290-296, 1984.
- 10) Bergmeyer, H.U.: Zur Messung von Katalase-Activitäten. *Biochem. Z.* 327, 255-258, 1955.
- 11) Hochstein, P. and Utley, H.: Hydrogen peroxide detoxication by glutathione peroxidase and catalase in rat liver homogenates. *Mol. Pharmacol.* 4, 574-579, 1968.
- 12) Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T.: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345-352, 1983.
- 13) Hashimoto, S.: A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal. Biochem.* 62, 426-435, 1974.
- 14) Krawitz, J. E., Sharon, P. and Stenson, W.F.: Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350, 1984.
- 15) 鈴木雅之, 末松 誠, 三浦総一郎, 永田博司, 森下鉄夫, 織田正也, 土屋雅春: 急性胃粘膜病変形成時の活性酸素産生における xanthine oxidase 系および好中球の役割. 日消病会誌 85, 835-842, 1988.
- 16) Yoshikawa, T., Ueda, S., Naito, Y., Takahashi, S., Oyamada, H., Morita, Y., Yoneta, T. and Kondo, M.: Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Rad. Res. Commun.* 7, 3-6, 1989.
- 17) Takemura, T.: Role of oxygen radicals derived from polymorphonuclear leukocytes in gastric mucosal injury in rats. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* 99, 117-131, 1990.
- 18) Takeuchi, K., Ohtsuki, H. and Okabe, S.: Pathogenesis of compound 48/80-induced gastric lesions in rats. *Dig. Dis. Sci.* 31, 392-400, 1986.
- 19) Pigeolet, E., Corbister, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiles, C., Rase, M., Zachary, M.-D. and Remacle, J.: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 51, 283-297, 1990.
- 20) Granger, D.E., Benoit, J.N., Suzuki, M. and Grisham, M. B.: Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* 257, G683-G688, 1989.
- 21) Stelmaznska, T., Kukovetz, E., Egger, G. and Schaur, R.J.: Possible involvement of myeloperoxidase in lipid peroxidation. *Int. J. Biochem.* 24, 121-128, 1992.