

CCl₄ 肝障害に対する五苓散の作用

織田真智子*, 中西 由香, 唐 方, 阿部 博子

近畿大学東洋医学研究所・第I研究部門

The effects of Gorei-san against CCl₄ induced hepatic injury

Machiko ORITA*, Yuka NAKANISHI, Fang TANG, Hiroko ABE

The Institute of Oriental Medicine, Kinki University

(Received November 28, 1997. Accepted March 2, 1998.)

Abstract

The effects of Gorei-san on hepatic injury by CCl₄ were investigated. In the rats pretreated with Gorei-san for 7 days, the inhibition of hepatic injury by CCl₄ was observed. But in the rats pretreated with Gorei-san for 10 weeks (long term), hepatic injury was accelerated. The administration of Gorei-san for 10 weeks produced a marked increase of microsomal enzyme NADPH-cytochrome C. reductase activity, and a significant decrease of glucose-6-phosphatase activity. A 7 day-administration of Gorei-san also produced a slight increase of homogenate NADPH-cytochrome C. reductase activity. A 7 day-administration of Gorei-san and 10-week-administration of Gorei-san have different effects on hepatic injury by CCl₄.

Key words Gorei-san (五苓散), CCl₄-hepatic injury, hepatic enzyme activity.

緒 言

五苓散は漢方の利尿剤の代表的処方の一つで、生体内の水の分布を調節することにより、様々な病態を改善することを目的として投薬される。すなわち漢方医学では、種々の障害発症時に生体内の水代謝異常がもたらされ、この水の異常を五苓散などの利尿剤によって調節することが原疾患の治療に役立つと考えられている。

一方、西洋医学でも近年、生体内の水が病態の発生に付随して様々に変化することが報告されている。本研究で用いた CCl₄ 肝障害ラットで肝障害に伴って水代謝が変化することを報告している。¹⁻³⁾

今回、肝障害に伴って水代謝異常の認められる CCl₄ 実験肝障害に対する五苓散の作用について検討し、肝障害と利尿剤との関連性について考察を試みた。また五苓散の短期投与と長期投与とに分けて検討したところ興味ある結果が得られたので報告する。

材料と方法

(1) **五苓散**：構成生薬である沢瀉（中国・四川省産）、桂皮（中国・広西省産）・茯苓（中国・雲南省産）・猪苓（中国・江蘇省産）・西北蒼朮（中国・天津貿易商）の粉末を 1:1:1:1:1 の比率で混和し、水道水で懸濁したものを用いた。

(2) **実験動物**：日本 SLC 社より 8 w 齢 Wistar 系マウスを購入し、実験開始時までの 1 週間、基礎飼料 CE-2（日本クレア）と水道水を自由に摂取させた。飼育環境は室温 23°C±1°C、湿度 50%，飼育室照明 6:00-18:00 とした。

(3) **五苓散短期投与実験（実験 1）**：8 w 齢 Wistar 系マウスを 4 群に分け 1 群は対照群、2 群は五苓散 0.5 g/kg 投与群、3 群は五苓散 1.0 g/kg 投与群、4 群は五苓散 2.0 g/kg 投与群とし、各々 7 日間投与した。五苓散 1.0 g/kg 投与量はヒト 10 倍量に相当する。五苓散は、1 日 1 回強制経口投与し、対照群には水道水のみを投与し

*〒589-0014 大阪狭山市大野東377-2
377-2 Ohnohigashi, Osakasayamashi, Osaka 589-0014, Japan

た。7日目の最終投与後3時間目に CCl₄ ガスを20分間吸入させ、24時間目及び48時間目に血清 GOT, GPT 値の測定を行った。また、CCl₄ 投与24時間目のラットの一部(1群6匹)は、軽エーテル麻酔下で脱血屠殺し、肝組織所見の検索を行った。

(4) 組織学的所見及び血清学的所見：肝組織標本は肝臓摘出後15%ホルマリンで固定し、脱水、包埋、薄切し、ヘマトキシリン、エオジン染色をした後、光学顕微鏡にて観察した。血清 GOT, GPT 値は、和光純薬キットを用いて測定した。

(5) 五苓散短期投与の肝臓酵素活性の測定(実験2)：実験1と同様に7日間五苓散を各々の濃度で投与し、最終投与後絶食し、24時間目に軽エーテル麻酔下で肝臓を冷却生理食塩水にて還流した後、脱血屠殺し肝臓を摘出した。この肝臓のホモジネート液を作製し、各種酵素活性を測定した。また、このホモジネートよりミクロゾームを分離し、酵素活性の測定を行った。

(6) 肝ホモジネートの調製法：取り出した肝臓を0.25 M sucrose (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4) 中で細切し、洗浄後 Potter-Elvehjem 型ホモナイザーで25%ホモジネート液を作製した。得られたホモジネートの蛋白濃度を Lowry⁴⁾ 法で測定し、各種酵素活性測定用ホモジネートとして使用した。

(7) 各種酵素活性の測定法：G-6-Pase の活性は Swanson⁵⁾ の方法に従って活性の測定を行った。リン酸定量は Fiske-Subbarow 法を改良した Bartlett 法⁶⁾ により測定した。NADPH-cyt. C. reductase の活性は Williams⁷⁾ の方法で測定した。succinate-cyt. C. reductase の活性は King⁸⁾ の方法で測定した。5'-nucleotidase の活性は Wright⁹⁾ の方法に従って測定した。

(8) microsome の分離：(5)で作製した肝ホモジネートを10000 g, 20分間遠心後、この上清をさらに102000 g, 90分超遠心し、得られた沈澱を1.15% KCl で洗浄後蒸留水で希釈し、小胞体のマーカーエンザイムである NADPH-cyt. C. reductase と G-6-Pase の活性の測定を行った。

(9) 五苓散長期投与実験(実験3)：実験1と同様、8w 齢 Wistar ♂ラットを用い1群は対照群、2群は五苓散1.0 g/kg 投与群として1日1回10週間、強制経口投与し、最終投与後3時間目に CCl₄ ガスを吸入させ、24時間目及び48時間目に血清 GOT, GPT 値の測定を行った。また CCl₄ 投与24時間目のラットの一部(1群6匹)は軽エーテル麻酔下で脱血屠殺し、肝臓の組織所見の検索を行った。

(10) 五苓散長期投与の肝臓酵素活性の測定(実験4)：実験2と同様に五苓散1.0 g/kg を10週間投与した時の

肝ホモジネート及びホモジネートより分離したミクロゾーム分画において各種酵素活性を測定した。

(11) 統計処理：それぞれの実験において、実験群と対照群の間の測定値の差の有意差の検定は、Fisher の多群間検定及び Wilcoxon の2群間検定を用いた。

結 果

1. 五苓散短期投与実験(実験1)

五苓散1.0 g/kg 投与群では、CCl₄ 投与24時間後の血清 GOT, GPT 値はいずれも有意 ($p < 0.01$) に抑制された。2.0 g/kg 投与群では、血清 GOT 値のみ有意 ($p < 0.05$) の抑制が認められた。CCl₄ 48時間目の血清 GOT, GPT 値について0.5 g/kg 投与群の GPT 値のみ有意 ($p < 0.05$) の抑制が認められた (Fig. 1)。

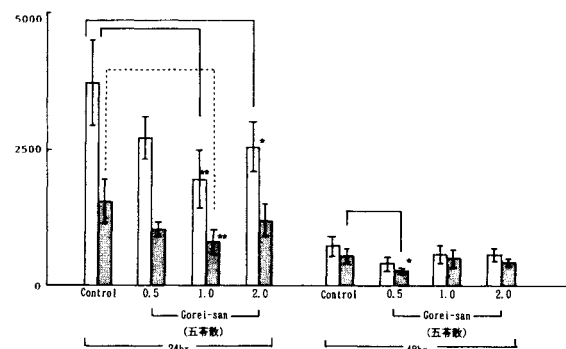


Fig. 1 Effects of Gorei-san on serum GOT and GPT levels on 24 and 48 hr. after inhalation of CCl₄. (Gorei-san 7-day administration)

Each value is the mean ± S.E.

Statistical analysis was performed using a Fisher's PLSD Test: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**)

□: GOT (U/L) ■: GPT (U/L)

2. 肝組織所見

対照群の CCl₄ 投与ラット肝臓の組織では、肝細胞内に脂肪滴の沈着が多数見られ、静脈を中心に求心性の壊死層が広がっているが (Fig. 3-B), 五苓散1.0 g/kg 投与群では、このような病変は軽度であった (Fig. 3-A)。

3. 五苓散短期投与の酵素活性(実験2)

各群共に、肝重量について変化は認められなかった。各種肝酵素活性値については五苓散1.0 mg/kg 投与群において、肝ホモジネート NADPH-cyt. C. reductase 活性の上昇と五苓散2.0 mg/kg 投与群で5'-nucleotidase 活性の低下が認められた (Table I)。

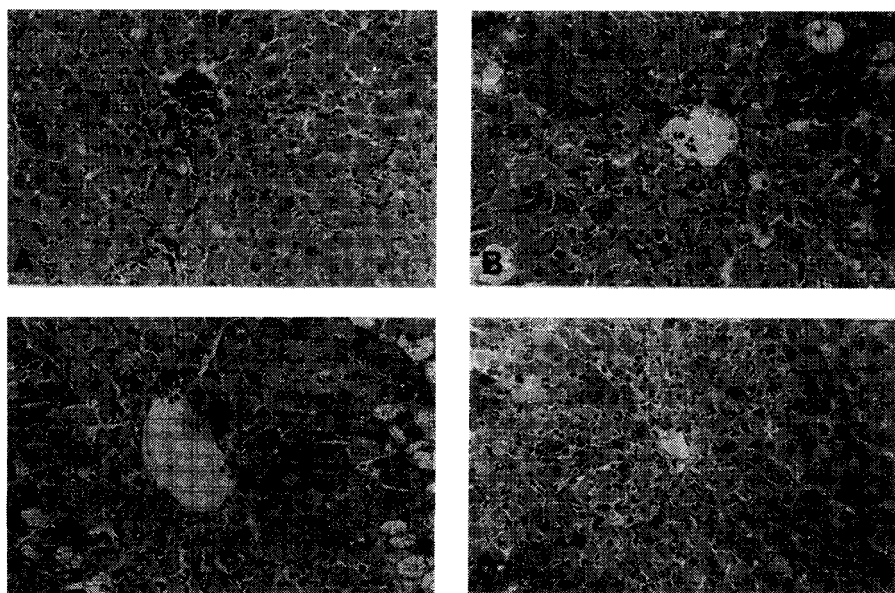


Fig. 3

- (A) Liver of a Gorei-san-pretreated (7-day) rat 24 hr. after CCl_4 administration. Less extensive necrosis is present. (Comparison to control group B) ($\times 200$)
- (B) Liver of a saline-pretreated (7-day) rat 24 hr. after CCl_4 administration ($\times 200$). Centrilobular necrosis and inflammatory infiltration are noted.
- (C) Liver of a Gorei-san-pretreated (10-week) rat 24 hr. after CCl_4 administration. Enhancement of injury was observed. Extensive necrosis was observed. (Comparison to control group D) ($\times 200$)
- (D) Liver of a saline-pretreated (10-week) rat 24 hr. after CCl_4 administration. ($\times 200$)

Table I Effects of Gorei-san on various enzyme activities in liver.
(7-day administration)

	Liver weight (g)/100 g Body weight	Protein content mg/g	Liver homogenate				Liver microsome	
			NADPH ¹⁾	G-6-P ²⁾	5' ²⁾	Suc ¹⁾	NADPH ¹⁾	G-6-P ²⁾
Control	2.78	147.0	26.91	2.756	1.462	52.28	157.78	8.282
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0.15	6.4	0.83	0.128	0.038	1.45	6.59	0.544
Gorei-san 0.5 g/kg	2.79	139.1	26.72	2.828	1.368	48.49	161.83	7.364
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0.07	7.9	0.90	0.118	0.059	0.97	4.07	0.388
Gorei-san 1.0 g/kg	2.91	140.0	30.41	2.812	1.358	55.60	169.88	7.946
	$\pm$	$\pm$	$\pm$ *	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0.13	4.0	0.89	0.084	0.048	2.20	6.46	0.322
Gorei-san 2.0 g/kg	2.89	144.0	28.11	2.603	1.275	55.64	165.90	7.358
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$ *	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0.01	5.4	1.01	0.080	0.043	0.72	4.69	0.134

All values are expressed as the mean $\pm$ S.E.* $p < 0.05$

1) Millimicromoles of cytochrome c reduced per min per mg protein

2) Micromoles of Pi per min per mg protein

4. 五苓散長期投与実験 (実験 3)

五苓散短期投与実験の結果と異なり、対照群に比べ五苓散投与群で GOT, GPT 値は上昇傾向を示し、 CCl_4 投

与 24 時間後の血清 GOT 値は有意 ($p < 0.05$) に増加した (Fig. 2)。

5. 肝組織所見

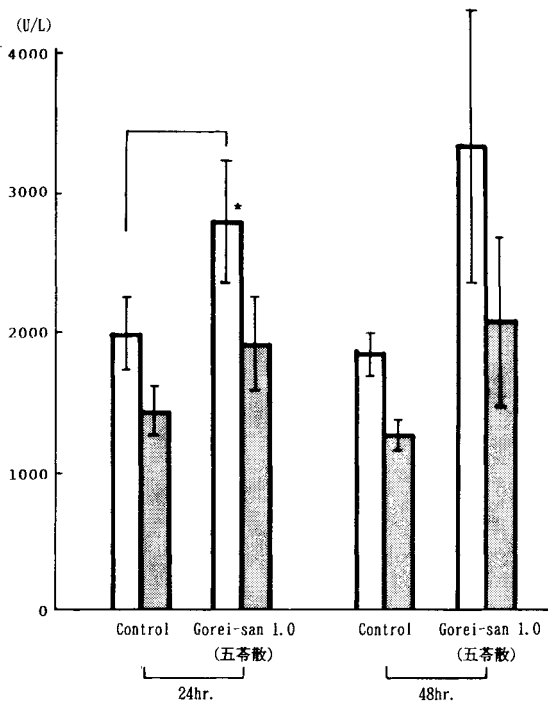


Fig. 2 Effects of Gorei-san on serum GOT and GPT levels on 24 and 48 hr. after inhalation of CCl₄. (Gorei-san 10-week administration)
Each value is the mean $\pm$ S.E. Statistical analysis was performed using a Fisher's PLSD Test: $p < 0.05$ (*)
□: GOT (U/L) ■: GPT (U/L)

対照群 CCl₄ 投与ラット肝臓の組織では、静脈を中心に求心性の壊死層が広がっているが (Fig. 3-D), 五苓散 1.0 g/kg 長期投与群では、さらに病変は重度であった (Fig. 3-C)。

6. 五苓散長期投与の酵素活性 (実験 4)

薬物代謝系の酵素である NADPH-cyt. C. reductase

活性が有意に上昇し、G-6-Pase の活性の低下が認められ、5'-nucleotidase 活性にも低下が認められた。またミクロゾーム分画では、NADPH-cyt. C. reductase 活性の亢進、G-6-Pase 活性の低下がさらに著明になった (Table II)。

考 察

五苓散は漢方処方中でも、利尿剤の代表的な処方であり、肝障害改善作用についての報告はないが、五苓散を 7 日間投与することにより、CCl₄ 肝障害の抑制が認められた。一方、五苓散を長期間投与することにより CCl₄ 肝障害は、逆に増悪するという興味深い結果が得られた。

CCl₄ 肝障害は、チトクローム P450 の酸化作用により生成した CCl₃ ラジカルが肝細胞膜の脂質に障害をもたらすことにより発生することはよく知られている。従って薬物代謝系酵素の活性が高ければ肝障害は悪化し、逆に活性が低下すれば、肝細胞膜に障害をもたらす CCl₃ ラジカルの生成が抑制され、肝障害は軽減されるものと考えられる。

当研究所では、様々な漢方処方及びその生薬成分の CCl₄ 肝障害抑制作用を見てきたが、障害抑制を示す薬物は、作用の強弱は有るものの、肝薬物代謝系酵素である NADPH-cyt. C. reductase 活性の低下が認められている^{11,12)}。従って五苓散長期投与による CCl₄ 肝障害悪化作用は、五苓散により肝薬物代謝系酵素の NADPH-cyt. C. reductase 活性が亢進すること起因するものと考えられる。しかし、五苓散短期投与群では、NADPH-cyt. C. reductase 活性は亢進する傾向にあるものの、CCl₄ 肝障害に対する抑制作用が認められたことは極めて興味深い結果である。このように、五苓散の投与期間の違いによって同一の病態モデル動物に対し、異なった作用を示

Table II Effects of Gorei-san on various enzyme activities in liver. (10-week administration)

	Liver weight (g)/100 g Body weight	Protein content mg/g	Liver homogenate				Liver microsome	
			NADPH ¹⁾	G-6-P ²⁾	5' ²⁾	Suc ¹⁾	NADPH ¹⁾	G-6-P ²⁾
Control	2.78	120.0	21.30	2.209	1.082	47.80	100.0	6.132
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0.11	5.6	2.18	0.168	0.091	8.15	8.7	0.934
Gorei-san 1.0 g/kg	3.16	122.0	23.48	1.903	0.970	53.82	110.5	4.821
	$\pm$ **	$\pm$	$\pm$ *	$\pm$ *	$\pm$ *	$\pm$	$\pm$ **	$\pm$ **
	0.16	5.6	2.00	0.079	0.082	6.26	7.4	0.773

All values are expressed as the mean $\pm$ S.E.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

1) Millimicromoles of cytochrome c reduced per min per mg protein

2) Micromoles of Pi per min per mg of protein

することが明らかとなったが、短期投与と長期投与で作用が異なることを考えると、漢方薬の投与期間に対しても十分な考慮が必要であると思われる。

五苓散は漢方の利尿剤の代表的処方の一つで、その薬理作用として、中枢性ホルモン分泌調節作用¹³⁾やPGI₂の産生亢進説^{14,15)}などが報告されているが、いずれにしても生体内の水の動態に変化を及ぼすことが推測される。臨床的にはこの利尿剤としての五苓散の作用は、西洋医学で常用される利尿剤とは異なり、生体内の水分のバランスを調節する作用のあることが知られている。その証拠に実験的に脱水状態と飽水状態の動物を作り、五苓散を与えると脱水状態のときは抗利尿作用を、飽水状態の時は利尿作用を示す¹⁰⁾ことが報告されている。西洋薬の利尿剤は、腎臓の尿細管に直接作用し、水の再吸収を抑制することにより、尿量を増加させ利尿作用を示すので、実験的に造った脱水状態の動物と飽水状態の動物のいずれにおいても利尿作用を示す。五苓散は生体のおかれている状態に合わせて、利尿作用または抗利尿作用という正反対の一見不可思議な作用を示すが、その作用機序については明らかにされていない。

我々は、この五苓散の生体内水の動態に及ぼす作用を解明するべく、病態発生時に生体内の水分布に異常をおこす実験モデルとしてCCl₄肝障害に着目し、CCl₄肝障害発生時の生体内の水の動きを経時的に観察した。その結果CCl₄投与後24時間の尿量は正常対照に比べて著しく増加し、ヘマトクリット値の上昇及び循環血漿量の減少が著しく、生体内の水の動態が急激に変化することを見出した。^{2,3)}現在、五苓散がこのような水の動態にどのような変化をもたらすかについて検討を行っているが、また結論を述べるまでは至っていない。しかし、肝臓の薬物代謝系の酵素活性を低下させることなく、CCl₄肝障害に対し抑制作用を示す五苓散（短期投与）の作用メカニズムとして、生体内の水の分布や吸収・排泄を調節することによって、肝臓そのものの病態に対して何らかの改善作用を及ぼす可能性は充分期待し得るとと思われる。

References

- 1) Orita, M., Nakanishi, Y., Tan, H., Abe, H.: Kampo no risuizai no sayôkaiseki. The 14th General Meeting of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, p.76, 1997 (Osaka).
織田真智子, 中西由香, 唐 方, 阿部博子: 漢方の利尿剤の作用解析, 第14回和漢医薬学会講演要旨集, p.76, 1997 (大阪).
- 2) Akiyama, K., Orita, M., Nakanishi, Y., Abe, H.: CCl₄ Kanshōgai ni taisuru risuizai (Gorei-san) no sayô-1-. The 10th General Meeting of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, p.71, 1993 (Toyama).
秋山一誠, 織田真智子, 中西由香, 阿部博子: CCl₄肝障害に対する利尿剤(五苓散)の作用-第1報-, 第10回和漢医薬学会講演要旨集, p.71, 1993 (富山).
- 3) Orita, M., Akiyama, K., Nakanishi, Y., Abe, H.: CCl₄ Kanshōgai ni taisuru risuizai (Gorei-san) no sayô-2-. The 10th General Meeting of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, p.72, 1993 (Toyama).
織田真智子, 秋山一誠, 中西由香, 阿部博子: CCl₄肝障害に対する利尿剤(五苓散)の作用-第2報-, 第10回和漢医薬学会講演要旨集, p.72, 1993 (富山).
- 4) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265, 1951.
- 5) Swanson, A.M.: "Method in Enzymology", ed. by Clowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press Inc., New York, 11, 541, 1955.
- 6) Bartlett, G.R.: Phosphorus Assay in Column chromatography. *J. Biol.Chem.* **234**, 466, 1959.
- 7) Williams, G.H., Kamin, H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome C reductase of liver. *J.Biol.Chem.* **237**, 584, 1962.
- 8) King, T.E.: "Method in Enzymology" ed. by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E., Academic Press Inc., New York, X, 216, 1967.
- 9) Wright, G.H.: Changes in plasma membrane enzyme activities during liver regeneration in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **470**, 368, 1977.
- 10) Tomokane, M. *et al.*: Nyôro katetel ni yori saishu shita nyôryô eno risuizai no eikyô to nyôchû no hôzai yurai seibun no bunseki. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**, 530-531, 1981.
友金幹祝, 他: 尿路カテーテルにより採取した尿量への利尿剤の影響と尿中の方剤由来成分の分析. 和漢医薬学会誌 **5**, 530-531, 1981.
- 11) Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arichi, S.: Studies on the mechanism of action of Saiko saponin. *WAKAN-YAKU* **13**, 28-32, 1980.
- 12) Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S., Arichi, S.: Protective Effect of Saikosaponin-d isolated from *Bupleurum falcatum* L. on CCl₄ induced liver injury in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **320**, 266-271, 1982.
- 13) Kozaki, T.: A therapeutic trial of Gorei-san for periodic adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and antidiuretic hormone discharge syndrome. *Japanese Journal of Oriental Medicine* **45** (4), 899-903, 1995.
- 14) Seki, M., Fujioka, M., Hatano, T., Ikeda, H.: Analysis of regulatory effects of Gorei-san on circulatory, Metabolic and diuretic function. *Japanese Journal of Oriental Medicine* **42** (3), 313-322, 1992.
- 15) Kuroda, T., Seki, M.: Effect of Sho-saiko-to and Gorei-san on the modulating mechanism of the sphincter of Oddi. An intraoperative cholangiomanometric study. *WAKAN-YAKU* **8**, 135-140, 1991.