

D-ガラクトサミン肝障害の進行に対する 黄連解毒湯エキスの抑制効果

太田 好次,^{a)} 金剛むつみ,^{b)} 林 高弘,^{c)} 稲垣 承二,^{c)} 岸川 輝彰^{b)}

^{a)} 藤田保健衛生大学医学部化学教室

^{b)} 藤田保健衛生大学医学部小児外科教室

^{c)} 藤田保健衛生大学病院薬剤部

Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract on the progression of D-galactosamine-induced liver injury

Yoshiji OHTA,^{a)} Mutsumi KONGO,^{b)} Takahiro HAYASHI,^{c)} Shoji INAGAKI^{c)} and Teruaki KISHIKAWA^{b)}

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

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

^{c)} Department of Pharmacy, Fujita Health University Hospital, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan.

(Received September 20, 2002. Accepted October 31, 2002.)

Abstract

We examined the preventive effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract (Tsumura TJ-15) on the progression of D-galactosamine (GAL)-induced liver injury in rats. In rats receiving a single intraperitoneal injection of GAL (500 mg/kg body weight), an apparent liver injury occurred 6 h after treatment and the liver injury progressed at 24 h, judging from the levels of serum liver cell damage markers such as aminotransferases, albumin, and triglyceride. Oral administration of TJ-15 (500 mg/kg body weight) to GAL-treated rats, which was conducted 6 h after hepatotoxin treatment, prevented liver injury progression observed at 24 h after hepatotoxin treatment. The hepatic concentrations of triglyceride and thiobarbituric acid reactive substances, an index of lipid peroxidation, and the hepatic activity of 5'-nucleotidase, a marker enzyme of plasma membranes, in GAL-treated rats increased 24 h, but not 6 h, after treatment. The hepatic activity of myeloperoxidase, an index of tissue neutrophil infiltration, in GAL-treated rats increased 6 h after treatment and this increase in activity was enhanced at 24 h. The post-oral administration of TJ-15 attenuated all these changes observed at 24 h after GAL treatment. These results indicate that TJ-15 exerts a preventive effect on the progression of GAL-induced liver injury in rats possibly through its inhibitory actions against lipid peroxidation, triglyceride accumulation, plasma membrane destruction, and neutrophil infiltration in the liver tissue.

Key words Oren-gedoku-to, D-galactosamine, liver injury (rat), triglyceride accumulation, lipid peroxidation, neutrophil infiltration.

Abbreviations ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; 5'-AMP, 5'-adenosine monophosphate; CCl₄, carbon tetrachloride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GAL, D-galactosamine; MDA, malondialdehyde; MPO, myeloperoxidase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

緒 言

黄連解毒湯は、症状が全身的に波及していない、消化器症状を伴う気分中焦の場合で、実証および熱証のヒト

における肝炎や肝機能障害の治療に用いられている^{1,2)}。

また、黄連解毒湯エキスは抗酸化作用、抗炎症作用などを示すことが知られている³⁻⁷⁾。

D-ガラクトサミン (GAL) 肝障害はヒトの肝炎と組織学的変化が類似しており⁸⁾、肝障害モデルとしてよ

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: yohta@fujita-hu.ac.jp

く用いられている。Lin ら⁹⁾は黄連解毒湯エキスがラットにおける四塩化炭素 (CCl₄) 肝障害に対しては予防・治療効果を示すが、GAL 肝障害に対しては予防・治療効果を示さないことを報告している。しかし、黄連解毒湯の構成生薬の黄芩や山梔子のラットへの前投与は GAL 肝障害予防効果を示し、また黄芩中に存在するバイカリン、バイカレイン、オウゴンなどをラットに前投与すると、それらは GAL 肝障害ばかりでなく CCl₄ 肝障害に対しても予防効果を示すことが知られている^{10,11)}。著者ら¹²⁾は CCl₄ 肝障害の発症時に黄連解毒湯エキス (ツムラ TJ-15) をラットに経口投与すると、肝障害の進行が抑制され、その抑制効果が TJ-15 の抗酸化作用と肝トリグリセリド蓄積抑制作用に基づくことを報告している。GAL 投与ラットでは、CCl₄ 投与の場合と同様に、肝障害の進行に伴って肝臓中の過酸化脂質、トリグリセリドなどの量の増加は亢進することが知られている¹³⁻¹⁶⁾。また、GAL 肝障害ラットでは肝内への好中球などの炎症細胞の浸潤がみられ、浸潤した活性化好中球によって産生される活性酸素が脂質過酸化に密接に関与し、肝細胞を障害することが示唆されている¹⁴⁾。

今回は、ラットの GAL 肝障害の進行に対する TJ-15 の抑制効果について、CCl₄ 肝障害の進行に対する抑制効果が認められた TJ-15 の投与量 (500 mg/kg 体重)¹²⁾ を用いて検討したので報告する。

材料と方法

(1) 実験動物：日本エルエスシー社 (浜松) より購入し、オリエンタル酵母社 (東京) 社製の固形飼料 MF で 1 週間飼育した 7 週齢の雄性 Wistar 系ラット (体重 200 g 前後) を実験に用いた。

(2) 試薬：TJ-15 は (株) ツムラ (東京) より供与された黄連 (2.0 g)、黄芩 (3.0 g)、黄柏 (1.5 g)、山梔子 (2.0 g) の構成生薬から調製されたエキス原末 (ヒト常用量 1.5 g/日) を用いた。GAL、5'-アデノシンーリン酸 (5'-AMP)、テトラメチルベンチジンおよびウシ血清アルブミンはシグマ社 (St. Louis, MO) 製を、2-チオバルビツール酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、無機リン標準液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) GAL 肝障害の作製と TJ-15 の投与方法：GAL 肝障害は、500 mg/kg 体重量の GAL を 1 ml の 0.9% NaCl に溶解し、その溶液の pH を 7.0 に調製してラットの腹腔内に投与して惹起させた。GAL 非投与ラットには同容量の 0.9% NaCl を腹腔内投与した。TJ-15 は蒸留水に懸濁し、体重 1 kg 当り 500 mg を GAL 投与 6 時間の

時点で経口投与した。TJ-15 非投与ラットには同容量の蒸留水を同時点で経口投与した。これらのラットは GAL 投与 6 と 24 時間後に体重測定を行い、その後エーテル麻酔下で下大静脈から血液を採取した後に屠殺した。なお、全てのラットは GAL 投与後から屠殺時までは絶食状態とし、水は自由摂取させた。また、本動物実験は藤田保健衛生大学実験動物取扱規定に従って行った。

(4) 測定試料の作製：屠殺時に採取した血液から遠心分離して得られた血清は肝障害に関する生化学的検査の測定に用いた。肝臓は屠殺後に直ちに冷 0.15 M KCl で門脈より注入して灌流し、血液を出来るだけ除去した後に摘出した。その摘出した肝臓は冷 0.15 M KCl で十分に洗浄し、水分をろ紙で拭った後、その湿重量を測定した。その後直ちに肝臓はドライアイスを用いて凍結した。このようにして得られた血清と肝臓は使用時まで -80°C で保存した。保存した肝臓の右葉の一部はテフロンホモゲナイザーを用い、冷 0.15 M KCl-1 mM EDTA で 10% ホモジネートを調製した。この肝ホモジネートは脂質過酸化の指標となるチオバルビツール酸反応物質 (TBARS)、トリグリセリドおよび 5'-ヌクレオチダーゼの測定に用いた。また、10% 肝ホモジネートは超音波破碎装置の Handy Sonic model UR-20 (トミー精工社製) を用いて氷上で 30 秒間、2 回超音波処理を行った。この超音波処理したホモジネートは 4°C で遠心 (10,000 × g, 20 分) し、得られた上清は微量透析装置 (Bio-Tec インターナショナル社製) を用い、100 倍量の冷 50 mM トリス-塩酸緩衝液に対して 1 時間透析した。この透析した上清は、好中球浸潤の指標となるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性¹⁷⁾ の測定に用いた。

(5) 血清酵素と成分の測定：肝障害と肝機能に関する生化学的検査としては血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルブミン、トリグリセリドなどを測定した。これらの測定は市販の測定キットを用いて行った。すなわち、ALT と AST は、イアトロザイム TA-LQ (ヤトロン社製) を用いて測定した。アルブミンとトリグリセリドは、それぞれ和光純薬工業社製のアルブミン-テストワコーおよびトリグリセリド C-テストワコーを用いて測定した。また、測定した血清 ALT と AST の活性は国際単位 (IU/ml) で表した。

(6) 肝酵素と成分の測定：肝 5'-ヌクレオチダーゼ活性は Wright ら¹⁸⁾ の方法で測定した。その酵素活性は、37°C、pH 7.5 で基質の 5'-AMP が加水分解された際に遊離する無機リンを Goldenberg & Fernandez¹⁹⁾ の方法で測定し、その量を無機リン標準液で作製した検量線から算出し、1 分間当りに 1 μmol の 5'-AMP を加水分

解する酵素量を1単位(U)として表した。肝MPO活性の測定は以下に述べる方法によって行った。すなわち、肝組織の透析試料はSchierwagenら²⁰⁾の方法に従い、その組織中のMPOの回収を高めるために、60°Cにおいて2時間加温した。また、この加温処理によって肝組織中のMPOの測定に影響を与えるカタラーゼは完全に失活することが明らかにされている²¹⁾。加温処理した肝組織試料中のMPO活性はSuzukiら²²⁾の方法で測定し、その活性は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青色生成物を波長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。肝TBARSは、反応液にEDTA(終濃度1mM)を添加した以外Ohkawaら²³⁾のチオバルビツール酸法に従って測定した。測定したTBARS量はマロンジアルデヒド(MDA)量として表した。肝トリグリセリドは、アセチルアセトン法に基づくトリグリセリドテストワコー(和光純薬工業社製)を用いて測定した。肝タンパクはLowryら²⁴⁾の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準タンパクとして用いて測定した。

(7) 統計処理: 各測定値は平均 $\pm$ S.D.で表し、各群間での有意差の検定は分散分析(ANOVA)のFisher's Protected Least Significant Difference法を用いて行った。統計学的有意差は危険率が5%以下とした。

結 果

1. GAL 投与ラットの肝重量に及ぼす TJ-15 後投与の影響

GAL 投与6時間後では肝重量にGAL 投与群と対照群の間で差は認められなかったが、24時間後ではGAL 投与群の肝重量は有意に増加した(Fig. 1A)。TJ-15(500 mg/kg 体重)をGAL 投与6時間後に経口投与すると、GAL 投与24時間後の増加した肝重量は有意に抑制された(Fig. 1A)。また、体重100 g当りの肝重量、すなわち、比肝重量にGAL 投与6時間後ではGAL 投与群と対照群の間で差はなかったが、24時間後ではGAL 投与群の比肝重量は有意に増加した(Fig. 1B)。このGAL 投与24時間後での比肝重量の増加はTJ-15後投与で有意に抑制された(Fig. 1B)。また、GAL 非投与群ラットへのTJ-15投与は、肝重量と比肝重量に影響を与えなかった(Fig. 1)。

2. GAL 投与ラットの肝障害に及ぼす TJ-15 後投与の影響

GAL 投与6時間ではGAL 投与群の血清ALTとAST活性は対照群よりも有意に高く、それぞれ対照群の2.5および2.0倍であった(Fig. 2AとB)。GAL 投与群の血

清ALTとAST活性はGAL 投与24時間後で更に増加し、それぞれ対照群の9.6および9.3倍であった(Fig. 2AとB)。TJ-15をGAL 投与6時間後に経口投与すると、GAL 投与24時間後での血清ALTとAST活性の増加は有意に抑制され、TJ-15併用投与群の血清ALTとAST活性はそれぞれ対照群の3.6および4.5倍であった(Fig. 2AとB)。GAL 投与群の血清アルブミン濃度はGAL 投与6時間後では変動しなかったが、24時間後では有意に減少した(Fig. 2C)。このGAL 投与24時間後での血清アルブミン濃度の減少はTJ-15後投与で有意に抑制され、TJ-15併用投与群の血清アルブミン濃度は対照群とほぼ同レベルであった(Fig. 2C)。GAL 投与群の血清トリグリセリド濃度はGAL 投与6時間後では変動しなかったが、24時間後では有意に増加した(Fig. 2D)。このGAL 投与24時間後での血清トリグリセリド濃度の増加はTJ-15後投与で有意に抑制され、TJ-15併用投与群の血清トリグリセリド濃度は対照群とほぼ同じであった(Fig. 2D)。GAL 非投与群ラットの血清ALTとAST活性お

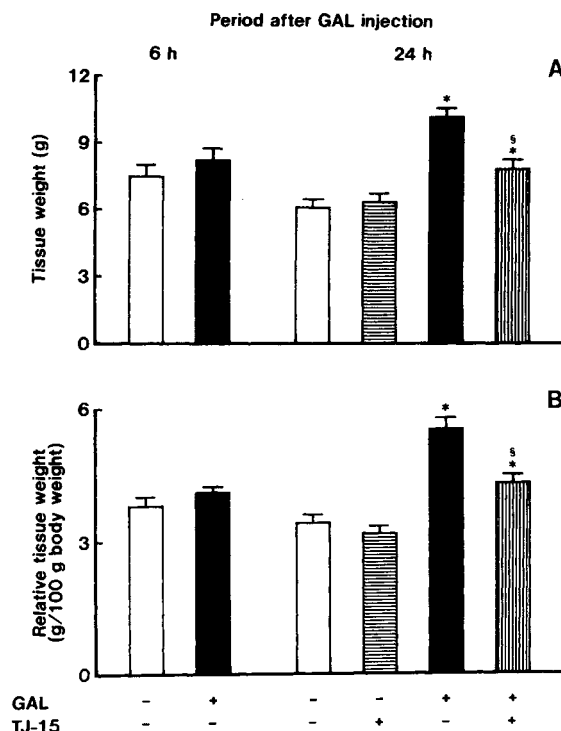


Fig. 1 Effect of post-TJ-15 administration on liver weight (A) and its relative weight (B) in rats treated with GAL. Rats received a single oral administration of TJ-15 (500 mg/kg body weight) 6 h after treatment with GAL (500 mg/kg body weight). The body weight and liver weight of each rat were measured 6 and 24 h after GAL treatment as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n = 6-7). *Significantly different from the corresponding control group without any treatment, $p < 0.05$. §Significantly different from the group treated with GAL alone, $p < 0.05$.

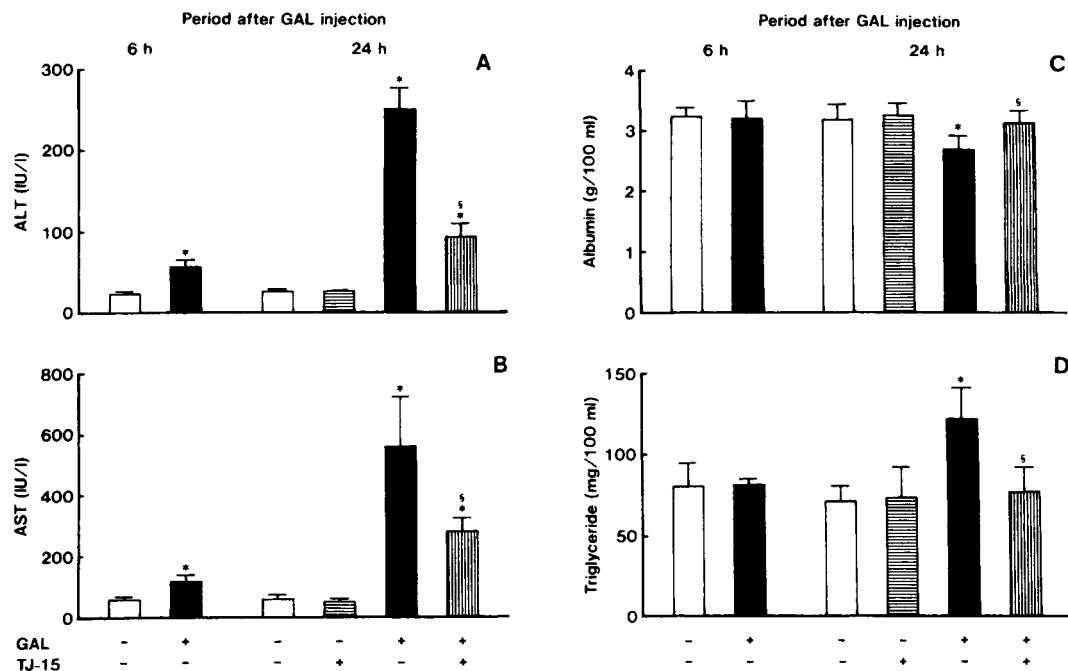


Fig. 2 Effect of post-TJ-15 administration on serum ALT (A) and AST (B) activities and albumin (C) and triglyceride (D) concentrations in rats treated with GAL. Rats received a single oral administration of TJ-15 (500 mg/kg body weight) 6 h after treatment with GAL (500 mg/kg body weight). Serum ALT, AST, albumin, and triglyceride of each rat were assayed 6 and 24 h after GAL treatment as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n = 6-7). *Significantly different from the corresponding control group without any treatment, $p < 0.05$. #Significantly different from the group treated with GAL alone, $p < 0.05$.

よびアルブミンとトリグリセリド濃度は TJ-15 投与によって変動しなかった (Fig. 2)。

3. GAL 投与ラットの肝トリグリセリド濃度に及ぼす TJ-15 後投与の影響

肝トリグリセリド濃度は GAL 投与 6 時間後では GAL 投与群と対照群の間で差は認められなかったが、投与 24 時間後では GAL 投与群のその濃度は対照群よりも有意に高く、対照群の 6.4 倍であった (Fig. 3)。TJ-15 を GAL 投与 6 時間後に経口投与すると、GAL 投与 24 時間後での肝トリグリセリド濃度の増加は有意に抑制され、TJ-15 併用投与群のその濃度は対照群の 1.5 倍であった (Fig. 3)。GAL 非投与群ラットへの TJ-15 投与は肝トリグリセリド濃度に影響を与えなかった (Fig. 3)。

4. GAL 投与ラットの肝 5'-ヌクレオチダーゼ活性に及ぼす TJ-15 後投与の影響

肝 5'-ヌクレオチダーゼ活性は GAL 投与 6 時間後では GAL 投与群と対照群の間で差がなかったが、投与 24 時間後では GAL 投与群のその活性は対照群よりも有意に低く、対照群の 32.7% であった (Fig. 4)。GAL 投与 6 時間後の TJ-15 投与は GAL 投与 24 時間後での肝 5'-ヌクレオチダーゼ活性の減少を有意に抑制し、TJ-15 併用投与群のその活性は対照群の 76.1% であった (Fig. 4)。

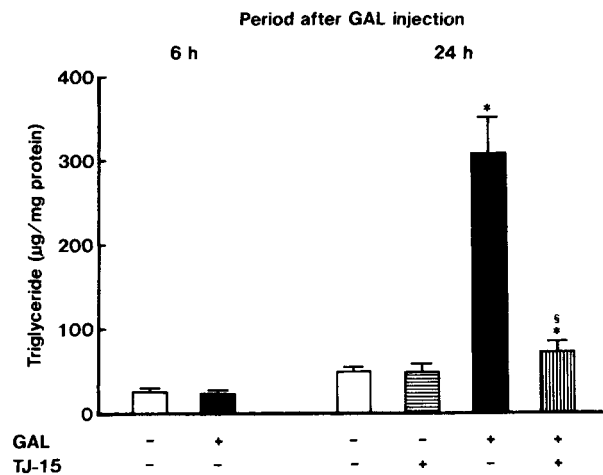


Fig. 3 Effect of post-TJ-15 administration on hepatic triglyceride concentration in rats treated with GAL. Rats received a single oral administration of TJ-15 (500 mg/kg body weight) 6 h after treatment with GAL (500 mg/kg body weight). Hepatic triglyceride of each rat was measured 6 and 24 h after GAL treatment as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n = 6-7). *Significantly different from the corresponding control group without any treatment, $p < 0.05$. #Significantly different from the group treated with GAL alone, $p < 0.05$.

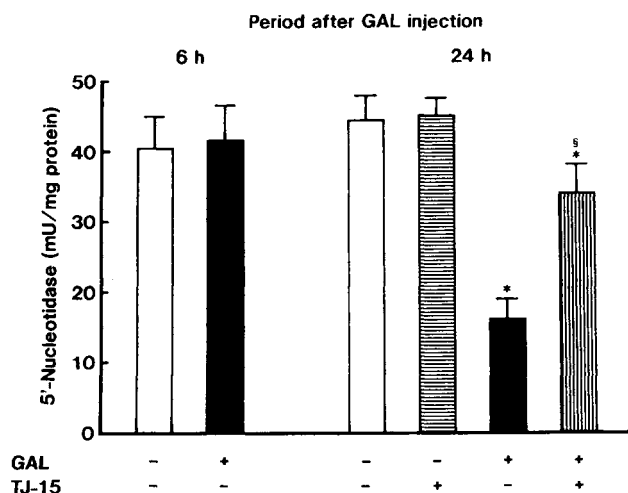


Fig. 4 Effect of post-TJ-15 administration on hepatic 5'-nucleotidase activity in rats treated with GAL. Rats received a single oral administration of TJ-15 (500 mg/kg body weight) 6 h after treatment with GAL (500 mg/kg body weight). Hepatic 5'-nucleotidase of each rat was assayed 6 and 24 h after GAL treatment as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n = 6-7). *Significantly different from the corresponding control group without any treatment, $p < 0.05$. [§]Significantly different from the group treated with GAL alone, $p < 0.05$.

GAL 非投与群ラットの肝 5'-ヌクレオチダーゼ活性は TJ-15 投与によって変動しなかった (Fig. 4)。

5. GAL 投与ラットの肝 MPO 活性と TBARS 濃度に基づき TJ-15 後投与の影響

GAL 投与 6 時間後で GAL 投与群の肝 MPO 活性は対照群よりも有意に高く、対照群の 1.7 倍であり、また投与 24 時間後では GAL 投与群のその活性は対照群の 4.9 倍のレベルにまで増加した (Fig. 5A)。GAL 投与 6 時間後での TJ-15 投与は GAL 投与 24 時間後での肝 MPO 活性の増加を有意に抑制し、TJ-15 併用投与群のその活性は対照群の 2.1 倍であった (Fig. 5A)。肝 TBARS 濃度は GAL 投与 6 時間後では GAL 投与群と対照群の間で差がなかったが、投与 24 時間後では GAL 投与群のその濃度は対照群よりも有意に高く、対照群の 1.9 倍であった (Fig. 5B)。GAL 投与 6 時間後の TJ-15 投与は GAL 投与 24 時間後での肝 TBARS 濃度の増加を有意に抑制し、TJ-15 併用投与群のその濃度は対照群の 1.2 倍であった (Fig. 5B)。GAL 非投与群ラットの肝 MPO 活性と TBARS 濃度は TJ-15 投与によって変動しなかった (Fig. 5)。

考 察

ラットの GAL 肝障害の進行に対する TJ-15 の抑制効果を明らかにする目的で、ラットに CCl₄ 肝障害の進行に対して抑制効果がみられたのと同量の TJ-15 (500 mg/kg

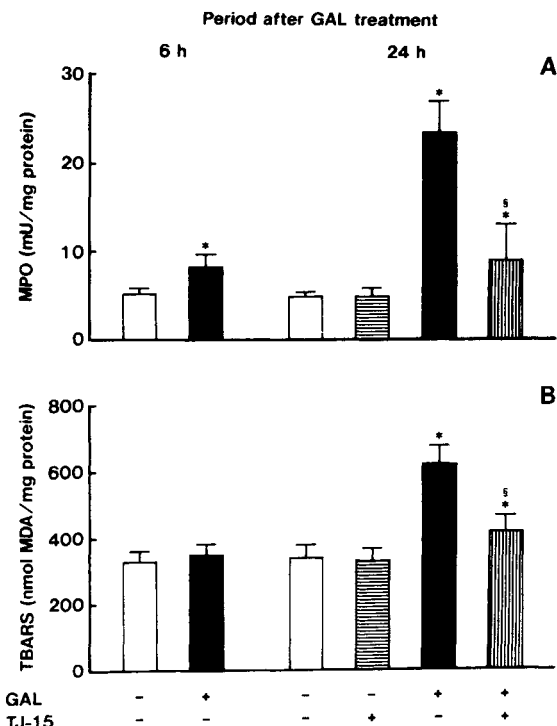


Fig. 5 Effect of post-TJ-15 administration on hepatic MPO activity (A) and TBARS concentration (B) in rats treated with GAL. Rats received a single oral administration of TJ-15 (500 mg/kg body weight) 6 h after treatment with GAL (500 mg/kg body weight). Hepatic MPO and TBARS of each rat were assayed 6 and 24 h after GAL treatment as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n = 6-7). *Significantly different from the corresponding control group without any treatment, $p < 0.05$. [§]Significantly different from the group treated with GAL alone, $p < 0.05$.

体重)¹²⁾ を GAL 投与 6 時間後の肝障害の発症が認められた時点で経口投与すると、血清生化学的所見から TJ-15 はその肝障害の進行を抑制することが明らかとなった。しかし、Lin ら⁹⁾ は GAL (188 mg/kg 体重) を腹腔内投与したラットにその投与 2, 6, 10 時間後の時点で黄連解毒湯エキス (300 mg/kg 体重) を経口投与すると、GAL 肝障害に対する予防・治療効果が認められないと報告している。伊原と有地¹⁰⁾ は黄連解毒湯の構成生薬の 1 つである山梔子のエキスを GAL 投与 24, 48 時間前の時点、GAL 投与 12, 24 時間前の時点あるいは GAL 投与 12 時間前と投与 3 時間後の時点でラットに経口投与すると、肝障害予防効果が認められるが、そのエキ스가 GAL 投与 3, 12 時間後の時点で経口投与された際には肝障害が増悪することを報告している。また、黄連解毒湯は清熱解毒作用を有しており、苦寒性の強い性質をもつ熱証に用いられるが、熱邪は陰液を消耗しやすいので、この漢方薬は弁証を間違えると症状を悪化させ、また副作用を惹起することが指摘されている²⁾。これらのこと

から、GAL 投与後におけるラットへの黄連解毒湯エキスの頻回投与は GAL 肝障害をむしろ悪化させることが考えられる。

本研究において、TJ-15 経口投与は GAL 投与ラットでの肝障害の進行に伴う肝重量の増加を抑制することが明らかとなった。GAL 投与ラットでは肝障害の進行に伴って肝へのトリグリセリドの蓄積は亢進することが示されている^{15,16)}。本研究では、GAL 肝障害の進行に伴う肝トリグリセリド濃度の著しい増加が認められたが、TJ-15 経口投与はその増加を抑制した。これらの結果から、GAL 肝障害の進行に伴う肝重量の増加の一因として肝へのトリグリセリドの蓄積の関与が考えられ、また GAL 肝障害の進行に伴う肝重量の増加に対する TJ-15 の抑制効果には、その漢方薬の肝へのトリグリセリドの蓄積に対する抑制作用が寄与していると推察される。著者ら¹²⁾は CCl₄ 投与ラットにおいても TJ-15 経口投与が肝障害の進行に伴う肝重量と肝トリグリセリド量の増加とともに抑制することを報告している。GAL 肝障害時における肝へのトリグリセリド蓄積は、肝でのリポタンパク質合成阻害、その合成阻害に基づく血中へのリポタンパク質の分泌障害、脂肪組織からの遊離脂肪酸動員の促進などによることが示唆されている^{15,25,26)}。従って、GAL 肝障害の進行に伴う肝へのトリグリセリドの蓄積に対する TJ-15 の抑制作用の機序に関しては、今後検討する必要がある。

GAL 肝障害の発症と進行は、肝細胞質膜障害と密接に関連していることが知られている²⁷⁾。本研究では、肝細胞膜マーカー酵素の 5'-ヌクレオチダーゼ活性は GAL 肝障害の進行に伴って減少したが、TJ-15 経口投与はこの減少を抑制した。これらの結果は、GAL 肝障害の進行に対する TJ-15 の抑制効果に、その漢方薬の肝細胞膜障害抑制作用が寄与していることを示唆している。

GAL 肝障害ラットでは、その障害の発症と進行に伴うエンドトキシン関与の肝への好中球浸潤が認められ、浸潤した活性化好中球が産生する活性酸素によって肝細胞は障害され、壊死することが示されている¹³⁾。本研究において、GAL 投与ラットの肝障害の発症と進行に伴う肝への好中球浸潤について好中球マーカー酵素の MPO 活性¹⁷⁾を用いて調べた結果、肝 MPO 活性は肝障害発症時に増加し、その増加は肝障害の進行に伴って亢進した。TJ-15 経口投与は、この肝障害の進行に伴う肝 MPO 活性の増加を抑制した。これらの結果より、TJ-15 は肝への好中球浸潤を阻害することにより GAL 肝障害の進行を抑制していることが示唆される。Hwang ら⁷⁾は、黄連解毒湯エキ스가ラット脳虚血一再灌流時の脳内への好中球浸潤を抑制することを認め、その抑制作

用が主にその構成生薬の黄芩によること、また黄芩中のバイカレインによることを示している。内山ら²⁸⁾は黄連解毒湯の構成生薬の 1 つである黄柏のエキ스가抗炎症作用を有し、白血球の遊走を阻害することを明らかにしている。これらのことから、本研究での GAL 肝障害の進行に伴う肝への好中球浸潤に対する TJ-15 の阻害には、その漢方薬中に存在する黄芩のバイカレインや黄柏の成分が関与している可能性が考えられる。

Hino ら¹⁴⁾は、GAL 投与ラットにおいて肝過酸化脂質濃度が肝障害発症時から増加し始め、肝障害の進行に伴って更に増加することを報告している。それに対し、Mourelle & Meza²⁹⁾は GAL 投与ラット肝の過酸化脂質濃度が肝障害発症前に著しく増加するが、その増加が肝障害の発症と進行に伴ってほとんど亢進しないことを報告している。本研究では、GAL 投与ラット肝の脂質過酸化の指標となる TBARS の濃度は肝障害の進行に伴って増加していた。TJ-15 経口投与は、この肝障害の進行に伴う肝 TBARS 濃度の増加を抑制することが明らかとなった。TJ-15 は抗酸化作用を有し、脂質過酸化を阻害することが報告されている³⁻⁵⁾。また、黄連解毒湯の構成生薬である黄連、黄柏、黄芩などのエキ스는脂質過酸化阻害作用を示すことが報告されている⁴⁾。これらのことから、GAL 投与ラットでの肝障害の進行に伴う肝 TBARS 濃度の増加に対する TJ-15 の抑制効果は、その漢方薬の構成生薬である黄連、黄柏、黄芩に存在する成分の抗酸化作用によると考えられる。GAL 投与ラット肝での過酸化脂質の生成に関しては、肝内に浸潤した活性化好中球によって産生される活性酸素が脂質過酸化に密接に関与していることが示唆されている¹⁴⁾。従って、GAL 肝障害の進行に伴う肝の脂質過酸化に対する TJ-15 の阻害効果に、上述した黄連解毒湯エキスの好中球浸潤抑制作用⁶⁾や黄柏の白血球遊走抑制作用²⁸⁾も関与していることが推察される。このような GAL 投与ラット肝での脂質過酸化に対する TJ-15 の阻害作用は、その漢方薬の GAL 肝障害の進行に対する抑制効果に寄与していると考えられる。

しかし、GAL 肝障害には、上述したような肝障害機序ばかりでなく、肝細胞内カルシウムの恒常性の破綻、肝タンパク質合成阻害なども関与していることが示唆されている^{13,30,31)}。従って、GAL 肝障害の進行に対する TJ-15 の抑制機序について、更に検討する必要がある。

結 論

ラットにおける GAL 肝障害の進行に対する TJ-15 の抑制効果を調べた結果、TJ-15 は肝障害発症後の 1 回の

経口投与で GAL 肝障害の進行を抑制することが明らかとなった。その TJ-15 の GAL 肝障害の進行に対する抑制効果は、その漢方薬の肝トリグリセリド蓄積抑制作用、肝細胞膜障害抑制作用、好中球浸潤阻害作用、脂質過酸化抑制作用などに基づくことが示唆された。

*〒470-1192 愛知県豊明市杏掛町田楽ヶ窪 1-98

藤田保健衛生大学医学部化学教室 太田好次

References

- 1) Itoh, T.: Application of Oren-gedoku-to to many illnesses in Japanese Oriental medicine. *Kampo Newest Ther.* **10**, 243-246, 2001.
- 2) Seki, M., Miyagawa, M. and Suzuki, H.: An attempt to stage the usual clinical course of hepatitis or hepatic damage from the viewpoint of traditional Chinese medicine, evaluating the corresponding Chinese herb medicines. *Jpn. J. Orient. Med.* **36**, 239-244, 1986.
- 3) Stefek, M. and Benes, L.: In vitro studies on the activity of Japanese Kampo herbal medicines Oren-gedoku-to (TJ-15) and Toki-shakuyaku-san (TJ-23) as scavengers of free radicals. *Drug Metab. Drug Interact.* **11**, 25-36, 1994.
- 4) Yokozawa, T., Dong, E., Liu, Z. W. and Oura, H.: Antiperoxidation activity of traditional Chinese prescriptions and their main crude drugs in vitro. *Nat. Med.* **51**, 92-97, 1997.
- 5) Hayashi, T., Ohta, Y., Inagaki, S. and Harada, N.: Inhibitory action of Oren-gedoku-to extract on enzymatic lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1165-1170, 2001.
- 6) Wang, L. M. and Mineshita, S.: Preventive effects of Unsei-in and Oren-gedoku-to, Chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 327-331, 1995.
- 7) Hwang, Y. S., Shin, C. Y., Huh, Y. and Ryu, J. H.: Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. *Life Sci.* **71**, 2105-2117, 2002.
- 8) Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K.: Experimental hepatitis induced by D-galatosamine. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 279-290, 1968.
- 9) Lin, S. C., Lin, C. C., Lu, F. J., Lin, Y. H. and Chen, C. H.: Protective and therapeutic effects of Huanglian-Jie-Du-Tang on hepatotoxin-induced liver injuries. *Am. J. Chin. Med.* **24**, 219-229, 1996.
- 10) Ihara, N. and Arichi, S.: Protective effect of Oriental crude drugs and Kampo medicament on a fulminant type of galatosamine-induced hepatitis. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **14**, 45-55, 1981.
- 11) Lin, C. C. and Shieh, D. E.: In vivo hepatoprotective effect of baicalin, baicalin and wogonin from *Scutellaria rivularis*. *Phytother. Res.* **10**, 651-654, 1996.
- 12) Ohta, Y., Sasaki, E., Nishida, K., Hayashi, T., Nagata, M. and Ishiguro, I.: Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract on progression of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Am. J. Chin. Med.* **25**, 57-68, 1997.
- 13) Seçkin, S., Koçak-Toker, N., Uysal, M. and Öz, B.: The role of lipid peroxidation and calcium in galatosamine induced toxicity in the rat liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **80**, 117-120, 1993.
- 14) Hino, Y., Kumashiro, R., Tanaka, M., Shimada, M., Harada, M., Yoshitake, M., Sata, M., Sugiyama, M., Haramaki, N. and Tanikawa, K.: Involvement of activated polymorphonuclear leukocytes in galatosamine-induced hepatic injury in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **16**, 27-36, 1994.
- 15) Koff, R. S., Gordon, G. and Sabesin, S. M.: D-Galatosamine hepatitis. I. Hepatocellular injury and fatty liver following a single dose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **137**, 696-701, 1971.
- 16) Sabesin, S. M. and Koff, R.: D-Galatosamine hepatotoxicity. IV. Further studies of the pathogenesis of fatty liver. *Exp. Mol. Pathol.* **24**, 424-434, 1976.
- 17) Krawisz, 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.
- 18) Wright, G. H.: Changes in plasma membrane enzyme activities during liver regeneration in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **470**, 368-381, 1977.
- 19) Goldenberg, H. and Frenandez, A.: Simplified method for the estimation of inorganic phosphate in body fluid. *Clin. Chem.* **12**, 871-882, 1966.
- 20) Schierwagen, C., Blyund-Fellenous, A.-C. and Lundberg, C.: Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase. *J. Pharmacol. Methods* **23**, 179-186, 1990.
- 21) Duval, D. L., Howard, D., McCalden, T. A. and Billings, R. E.: The determination of myeloperoxidase activity in liver. *Life Sci.* **47**, PL145-PL150, 1990.
- 22) Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T.: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* **132**, 345-353, 1983.
- 23) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **142**, 290-296, 1979.
- 24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. D. and Dandall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-273, 1951.
- 25) Koff, R. S., Fitts, J. J. and Sabesin, S. M.: D-Galatosamine hepatotoxicity. II. Mechanism of fatty liver production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**, 89-92, 1971.
- 26) Sabesin, S. M. and Ragland, J. B.: D-Galatosamine hepatotoxicity. V. Role of free fatty acids in the pathogenesis of fatty liver. *Exp. Mol. Pathol.* **29**, 82-91, 1978.
- 27) El-Modty, S., Scrutton, M. C., Serroni, A., Nicolini, C. and Farber, L.: Early, reversible plasma membrane injury in galatosamine-induced liver cell death. *Am. J. Pathol.* **79**, 579-595, 1975.
- 28) Uchiyama, T., Kamikawa, H. and Ogita, Z.: Anti-inflammatory effect of extract from *Phellodendri Cortex*. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU* **6**, 158-164, 1989.
- 29) Mourelle, M. and Meza, M. A.: Colchicine prevents D-galatosamine-induced hepatitis. *J. Hepatol.* **8**, 165-172, 1989.
- 30) Faber, J. L.: Calcium and the mechanisms of liver necrosis. *Prog. Liver Dis.* **7**, 347-360, 1982.
- 31) Aukarahanonta, T., Shinozuka, H. and Farber, E.: Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galatosamine. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **5**, 481-491, 1973.