

遊離肝細胞からのトランスアミナーゼ遊出に
及ぼすグリチルリチンの影響千葉大学医学部第二内科^{a)} 千葉大学医学部第一内科^{b)}
富山医科薬科大学^{c)}*志気 保子^{a)}・白井 厚治^{a)}・斎藤 康^{a)}
吉田 尚^{a)}・若新 政史^{b)}・熊谷 朗^{c)}Effect of Glycyrrhizin on the Release of Transaminases
from Isolated Rat HepatocytesYasuko SHIKI,^{a)} Kohji SHIRAI,^{a)} Yasushi SAITO,^{a)}
Sho YOSHIDA,^{a)} Masafumi WAKASHIN^{b)} and
Akira KUMAGAI^{c)}*The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University^{a)}**The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University^{b)}**Toyama Medical-Pharmaceutical University^{c)}*

(Received March 10, 1984)

To clarify the mechanism of the inhibitory effect of glycyrrhizin on the release of transaminases, the lysis of hepatocytes which was induced by an anti-cell membrane antibody and complements was investigated in isolated rat hepatocytes.

The release of glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases was increased by treatment of the specific anti-liver cell membrane antiserum (antibody) and complements. Exogenously added phospholipase A₂ also increased the release. Increase in endogenous phospholipase A₂ activity was observed in the hepatocytes treated with the antiserum and complements. Glycyrrhizin suppressed the increase in the release of transaminases induced by these treatments.

From these results, it was suggested that glycyrrhizin may inhibit phospholipase A₂ activity, resulting in the suppression of enhanced release of transaminases induced by immune complex.

Key words.....glycyrrhizin, clonic hepatitis, transaminase.

緒 言

甘草の主成分であるグリチルリチンは、さまざまな薬理効果¹⁻⁵⁾を有するところより、古くから漢方製剤として使用されている。今日、肝疾患、とくに慢性肝炎の治療に用いられ、血中トランスアミナーゼの改善効果が認められている⁶⁾。しかしながらグリチルリチンが肝機能を改善させる作用機序に関しては未だ充分には明らかにされていない。

私たちは遊離肝細胞から肝細胞膜抗体補体結合反応により、トランスアミナーゼを遊出させる実験系を確立し、この系においてグリチルリチンの作用を検討し

た。

実験材料および方法

材 料

実験動物は Wistar 系雄性ラット (高杉実験動物) を用いた。乾燥補体は阪大微生物研、1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine は日本商事⁷⁾製, phospholipase A₂ (Venom, 700 Units/mg protein) は Sigma 社製, グリチルリチン (グリチロン注 1 号, 40 mg/ml) はミノファージェン製薬製を使用した。また放射性 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]oleoyl-phosphatidylcholine は比放射能 48.0 mCi/mmole で、New England Nuclear

* 千葉市亥鼻 1 丁目 8 番 1 号
8-1, 1-chome, Inohana, Chiba, 280

より購入した。

遊離肝細胞の調製

Wistar系雄性ラット(体重200~250g)を用い、Berry-Friend⁹⁾の方法に準じた変法で調製した。ペントバルビタール麻酔下で開腹し、肝臓を門脈よりEGTAを含むCa²⁺-free Hanks'-HEPES緩衝液(pH 7.2) 400 mlで灌流後、0.05%コラゲナーゼ(Type I, Sigma)溶液に交換して再び10分間灌流を続けた。軟化した肝臓をDulbecco's Modified Eagle's medium (DME) 中に移し、軽く細切して細胞遊離し、汙過(48 mm, 60 & 150メッシュ)した。得られた細胞浮遊液は60×g, 1分間の遠心分離を3回繰り返して洗浄した。この遊離肝細胞をプラスチック製培養皿(35 mmφ, Corning)に5×10⁵個ずつseedし、10%ウシ胎児血清, 10⁻⁷Mインシュリンおよび10⁻⁶Mデキサメサゾンを含むDME中、95% O₂-5% CO₂気相下で培養を続けた。操作は全て無菌的に行った。また使用直前には再び新しい培養液に交換した。

抗ラット肝細胞膜ラビット抗血清の作製

ラット遊離肝細胞1×10⁸個をラビットの耳静脈より静注し、さらに7日後に同数の遊離肝細胞を追加免疫した。最終免疫7日後にラビットの全採血を行って抗血清を得た。この抗血清を正常ラットのリンパ球にて吸収操作を3回行い、他臓器との交叉反応性を二抗体蛍光法で観察した。この抗血清は肝細胞表面とのみ反応し、肝細胞質及び他臓器とは反応しないことを確認したので、抗肝細胞膜特異抗血清(抗血清)として⁹⁾以下の実験に用いた。

Phospholipase A₂活性の測定

¹⁴C標識したpalmitoyl-[¹⁴C]oleoyl-phosphatidylcholineを基質として、すでに報告した方法⁹⁾で測定した。

トランスアミナーゼ活性の測定

Reitman-Frankel¹⁰⁾の方法に基づいたWako S-TA test kitを用いて行った。

結 果

抗原抗体補体反応によるトランスアミナーゼの遊出
遊離肝細胞の培養液中に(A)抗血清, (B)補体, (C)抗血清および補体を添加し、経時的に培養液中のトランスアミナーゼ(GOT, GPT)活性を測定した。このときの抗血清量および補体量は125 μl および10 Uである(Fig. 1-a)。また同様に抗血清, 補体を添加して30分間インキュベートしたときの培養液中のGOT値をFig. 1-bに示した。抗血清, 補体のいずれも単独では

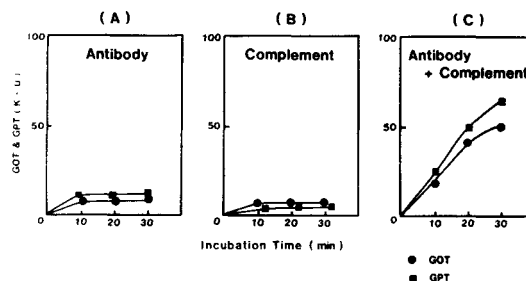


Fig. 1-a Effect of Various Treatments on the Release of GOT & GPT from Hepatocytes

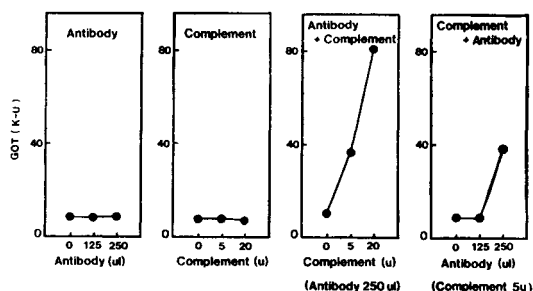


Fig. 1-b Effect of Various Treatments on the Release of GOT from Hepatocytes

肝細胞からのトランスアミナーゼ遊出はみられないが、両者の存在下では促進がみられ、しかもこのトランスアミナーゼの遊出は抗血清量と補体量に依存して増加した。

さらに抗血清と補体とともに250 μMグリチルリチンを同時に添加した場合、GOTの遊出の増加が有意に抑制された(Fig. 2)。

Phospholipase A₂によるトランスアミナーゼの遊出
細胞培養液中に精製されたPhospholipase A₂を添加し、培養液中のGOT値を測定した。GOT値は経時的に増加し、しかもPhospholipase A₂量に依存していることが示された(Fig. 3)。このように外来性Phospholipase A₂により引き起こされるGOTの遊出に対するグリチルリチンの効果を検討した。Fig. 4はPhospholipase A₂量0.1, 1.0, 10 U/mlで処理した

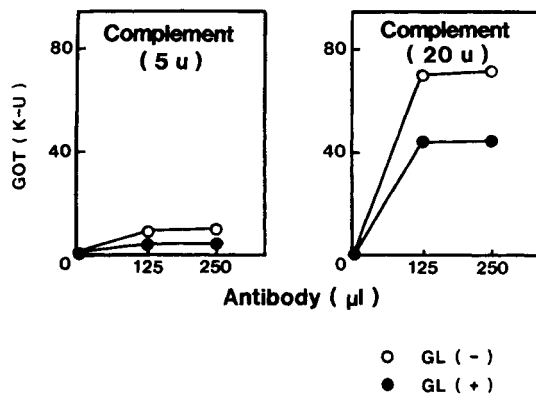


Fig. 2 Effect of Glycyrrhizin on the Release of GOT from Hepatocytes Induced by Antibody and Complement

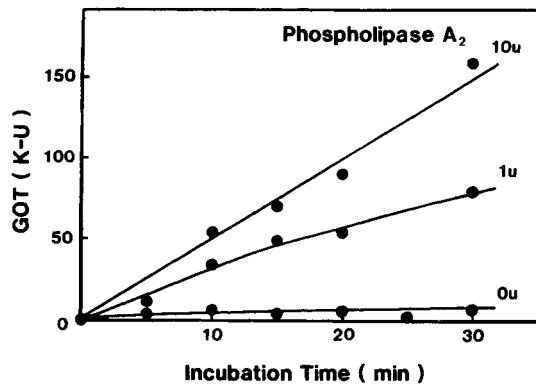


Fig. 3 Effect of Phospholipase A₂ on the Release of GOT from Hepatocytes

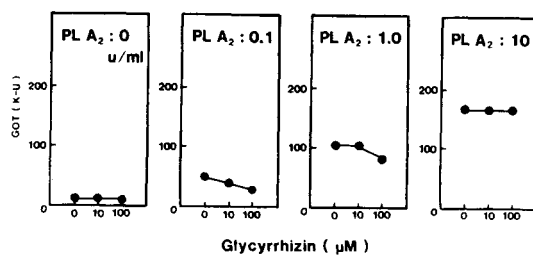


Fig. 4 Effect of Glycyrrhizin on the Release of GOT from Hepatocyte Induced by PLase A₂ Treatment

肝細胞にグリチルリチンを10 μMまたは100 μM添加した場合のGOT遊出量の変化である。少量のPhospholipase A₂ 処理により生ずるGOT遊出の上昇に対

Table I Phospholipase A₂ Activity in Hepatocyte Membrane

| Treatment | Phospholipase A ₂ (%) |
|-----------------------|----------------------------------|
| None | 100 |
| Antibody | 129 |
| Complement | 130 |
| Antibody + Complement | 207 |

して、グリチルリチンは低下作用を示した。

抗原抗体補体によるPhospholipase A₂ 活性の変化

抗体、補体による内因性Phospholipase A₂ の変化を観察するために、肝細胞を先と同様に抗血清、補体処理したのち、この細胞を集めて0.25 M ショ糖-10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でhomogenizeし、12,000×gで遠心分離した上清を酵素液としてPhospholipase A₂ 活性を測定した。Table I に示す如く、無処置の肝細胞に比べ、抗血清および補体の両者の存在下では約2倍の上昇がみられた。

考 察

肝細胞に抗血清および補体を作用させることによりトランスアミナーゼの遊出が観察されるが、このことは、肝細胞膜表面に形成した抗原-抗体 complex と補体との反応の結果として細胞膜のトランスアミナーゼ透過性が亢進したことを推測させる。

ところで生体膜は主として脂質から成る二重構造をもつが、膜が不安定化する原因の一つに、細胞膜を構成するリン脂質の水解をはじめとする構造の崩壊があげられ、Phospholipase A₂ の関与もその一つと考えられる。抗血清、補体処理した肝細胞においても、Phospholipase A₂ 活性の上昇がみられ、さらに外来性Phospholipase A₂ により、抗血清、補体処理した場合と同様のトランスアミナーゼ遊出が観察されたことから、上述の可能性が強く示唆される。

グリチルリチンは動脈壁のPhospholipase A₂ 活性に対して抑制的に作用し、膜の安定化効果を示すことはすでに報告した¹¹⁾。グリチルリチンが抗血清、補体によるトランスアミナーゼの遊出を有意に抑制したことは、肝細胞膜において抗原抗体補体結合反応により生ずるトランスアミナーゼ遊出の過程にはPhospholipase A₂ 活性が関与しており、このPhospholipase A₂ 活性の抑制を介して、膜の不安定化を防御する作用を示すことを示唆した。

さらにこの補体反応系は凝固系、線溶系、カリクレイン-キニン系などと密接に関連していると考えられ

ている¹²⁾。最近グリチルリチンはこの補体系を抑制するとの報告¹³⁾がみられ、今後はこれらの観点からも膜の不安定化を検討したい。

文 献

- 1) 熊谷 朗, 矢野三郎, 大友正明, 武内和之, 渡辺富久子: グリチルリチンの Steroid hormone 作用の本態に関する研究, 日本臨床, 15 (3) 147-155, 1957
- 2) Finney, R. S. H. and Somers, G. F.: The anti-inflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *J. pharm. Pharmacol.* 10, 613-620 1958
- 3) Yamamoto, M., Takeuchi, N., Kotani, S. and Kumagai, A.: Effect of glycyrrhizin and cortisone on cholesterol metabolism in the rat. *Endocrinol. Jps.* 17 (5) 339-348, 1970
- 4) Shibata, N.: Effect of glycyrrhizin on the experimental atherosclerosis in rabbit, especially on the antihypercholesteremic action. *Med. J. Osaka Univ.* 12, 297-313, 1962
- 5) 沖田極, 野田健一, 近藤信夫, 水田実: 肝疾患治療薬の作用に関する基礎的研究(I) Glycyrrhizin の D-galactosamine 肝障害に対する作用. 肝臓 16(9) 620-628, 1975
- 6) 鈴木宏, 大田康幸, 滝野辰郎, 平山千里, 清水直客, 麻生芳郎: 強力ネオミノファーゲンCの慢性肝炎に対する治療効果について—二重盲検法による検討. 医学のあゆみ 102: 562-578, 1977
- 7) Berry, M. N. and Friend, D. S.: High yield Preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural Study *J. Cell Biol.* 43, 506-520, 1969
- 8) Mori, T., Mori, Y., Ueda, S., Iesato, K., Yoshida, H., Wakashin, Y., Wakashin, M. and Okuda, K.: Experimental liver injury induced by anti-liver cell membrane antibody in rats. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 1982
- 9) 石川洋, 佐々木憲裕, 藤山葉子, 白井厚治, 斎藤康, 熊谷朗: 中膜平滑筋細胞およびマクロファ-

ジにおける Phospholipase A₁, Phospholipase A₂ 活性の性質について. 動脈硬化, 11(6) 1429-1435, 1984

- 10) Reitman, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56-63, 1957
- 11) 志気保子, 白井厚治, 斎藤康, 熊谷朗: 動脈壁リゾーム酵素に及ぼすグリチルリチンの影響. 動脈硬化, 11(4) 935-940, 1983
- 12) 近藤元治, 竹村周平: 補体活性化の生物学的効果とそのメカニズム—補体と凝固・線溶・キニン形成系の相互作用—, 日本臨床, 37(5) 124-129, 1979
- 13) 山内康平, 恒松徳五郎: 和漢薬グリチルリチンの動脈硬化症における抗補体作用および抗炎症作用 *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 15, 29-35, 1982

要 旨

甘草成分であるグリチルリチンの肝機能改善作用の機序を明らかにするため、抗原・抗体補体結合反応によって肝細胞を障害し、トランスアミナーゼの遊出を指標にグリチルリチンの作用機序を検討した。

遊離肝細胞を用い、抗ラット細胞膜ラビット抗血清(抗体)および補体を作用させて遊出するトランスアミナーゼ活性を測定した。抗体および補体の存在下でトランスアミナーゼ遊出が促進された。また外来性の Phospholipase A₂ によりトランスアミナーゼ遊出が観察されたので、抗体・補体処理した細胞の Phospholipase A₂ 活性を測定したところ、両者の存在下で約 2 倍に上昇した。

このような抗原抗体補体または Phospholipase A₂ によるトランスアミナーゼ遊出に対し、グリチルリチンは抑制作用を示した。動脈壁 Phospholipase A₂ に対してグリチルリチンが抑制的に作用することはすでに報告した。以上のことから、抗原抗体補体結合反応による肝細胞からのトランスアミナーゼ遊出には Phospholipase A₂ が関与し、グリチルリチンは Phospholipase A₂ 活性抑制による膜の安定化効果を有することが示唆された。