

利胆生薬(黄芩, 大黄, または黄芩・大黄含有方剤)の
形態薬理学的研究: 肝毛細胆管域の透過型電顕像および
Ruthenium red陽性 surface coatの所見

伊原 信夫,*^{a)} 布野 秀二^{b)}

関西医科大学病理学教室^{a)}

(株)ツムラ順天堂, ツムラ薬理研究所^{b)}

Morpho-pharmacological studies on oriental herbs : *Scutellariae*
Radix, *Rhei Rhyzoma*, *San'ô-syasin-tô* and *Dai-saiko-tô* acting
as choleretics. Ultrastructure of bile canaliculi with special
reference to the Ruthenium red-positive surface coat

Nobuo IHARA *^{a)} and Shuji FUNO^{b)}

Department of Pathology, Kansai Medical University ^{a)}

Tsumura Research Institute for Pharmacology, Tsumura Juntendo Co., Ltd. ^{b)}

(Received June 25, 1984)

Abstract

Time sequence studies were carried out on the ultrastructure of bile canaliculi with special reference to the Ruthenium red-positive surface coat presented by the ICR-rats following an oral administration of the decocted extract of a Chinese herb : *Ôgon* (*Huang-qin*), *Scutellaria baicalensis* Georgi (Shan-Dong-Shen, China) ; and *Daiô* (*Da-Huang*), *Rheum officinale* Baillon (Si-Chuan-Shen, China) ; and a prescribed herbal combination : "San'ô-syasin-tô" (*San-Huang-Xie-Xin-Tang*) (Tsumura Juntendo Co., Ltd.) and "Dai-saiko-tô" (*Da-Chai-Hu-Tang*) (Tsumura Juntendo Co., Ltd.) containing both *Scutellariae Radix* and *Rhei Rhyzoma*, which have been proven to share choleretic effects.

Common changes were found in the bile canaliculi and the pericanalicular region among each experimental group. These were a marked dilation, outbranchings and a conspicuous tortuosity of bile canaliculi, and an apparent reduction of microvilli, and proliferation of pericanalicular vesicles, some of which were open to the canalicular lumen. In addition, recovery of such changes was seen within 12 to 24 hours after the treatment.

The surface coat showed a transient and a site-specific disappearance exclusively in the bile canaliculi, but this change did not necessarily correspond to the dilation process of bile canaliculi, rather being observed coincidentally with a significant increase of the Golgi vacuoles and/or vesicles.

These time sequence changes suggest that the surface coat is intimately related to the dynamic activity of the Golgi apparatus.

Keywords 黄芩, 大黄, 三黄瀉心湯エキス方剤, 大柴胡湯エキス方剤, 利胆効果, 肝毛細胆管, surface coat

Abbreviations Bc ; bile canaliculus (-li), Rr ; Ruthenium red, Sc ; surface coat, Dai-saiko-tô (*Da-Chai-Hu-Tang*); 大柴胡湯, San'ô-syasin-tô (*San-Huang-Xie-Xin-Tang*) ; 三黄瀉心湯

緒 言

生薬または複合生薬(漢方方剤)の利胆効果の形態学的検定を行なうためには、単に胆汁分泌亢進ないし流量増加を形態学的に裏づけるばかりでなく、そのような機能亢進像が生理的範囲を大きく超えることなく、容易に原状に復することが可能かどうか、更に、全身的レベルの影響をみる意味で、肝を始めとする全身諸臓器の代謝(とくに脂質)の改善に有用かどうかなどの点を併せて検討する必要がある。本研究では、以上のような形態薬理学的検索の一環として、¹⁾利胆効果を有するとみられる生薬(黄芩、大黃)または方剤(三黄瀉心湯、大柴胡湯エキス原末)をラットに投与し、経時的に肝実質細胞毛細胆管域の単純透過型電顕像及び Ruthenium red (Rr) 陽性 Surface coat (Sc) の電顕像の観察を行なった。

材料と方法

実験動物 実験群、対照群共に、3～5か月齢のICR系白内障自然発症ラット(♂)を使用した。

生薬または方剤とその投与方法 黄芩, *Scutellaria baicalensis* Georgi (中国・山東省産) 及び大黃, *Rheum officinale* Baillon (中国・四川省産)(乾燥、刻み)は夫々50分間の水煎を行ない、1回につきヒトDosis 5g/50kgの10倍相当量の生薬含有煎汁を強制経口的に投与。三黄瀉心湯または大柴胡湯エキス原末(いずれもツムラ順天堂製)はヒトDosis 1g/50kg(三黄瀉心湯)、または2g/50kg(大柴胡湯)としてその10倍相当量を水溶・懸濁液として投与。対照動物には同量の5%ブドウ糖液を投与した(生薬は一般に、糖を含む各種の物質を含有するので、対照動物にはSalineではなく、低濃度のブドウ糖を投与することにしたが、われわれの実験条件ではこの処置による肝実質細胞毛細胆管域への影響は全くみられなかった)。投与回数は1回。但し、いずれの実験群についても投与前3時間は絶食とした。投与後、3、6、9、12、24時間目に屠殺し、検索に供した。各実験群の匹数は3～6匹である。

電顕的検索 単純透過型電顕像の観察には、5%グルタールアルデヒド-0.1mol磷酸緩衝液固定液による肝の灌流固定を行ない、その後は型のごとくEpok812樹脂包埋標本の作成を行なった。Scの検出はLuftらの方法によった^{1,2)}(Ruthenium redは

Sigma製)。但し、色素含有グルタールアルデヒド固定の段階には灌流固定法を適用した。

結 果

1) 対照肝のSc着染像

毛細胆管・絨毛表面膜、隣接細胞間及び類洞に面した細胞膜に鮮明な陽性像が見られた。Junctional complexはやや薄く着染する傾向があった(Fig. 1)。

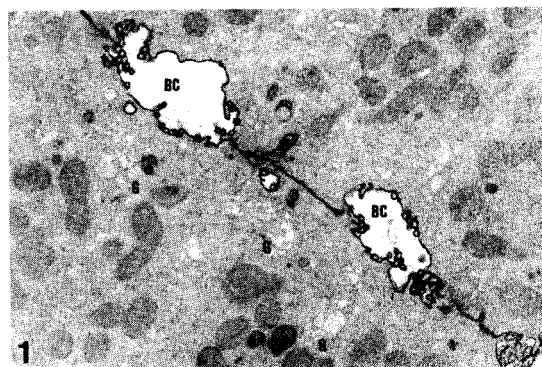


Fig. 1 The control liver stained with the Ruthenium red (Rr) for surface coat. $\times 10,400$. The canalicular region is shown in the parenchymal cells of the periportal zone. Rr positive surface coat is clearly visualized on the membrane surface of the canaliculi, of the microvilli and between the contiguous lateral cell membranes. These canaliculi tended to be relatively dilated, compared with the average luminal sizes of the control liver; accordingly, microvilli are not so crowded in those space. Abbreviations: BC: bile canaliculus, G: Golgi apparatus.

2) 黄芩投与群

Bile canaliculi (Bc) の拡大は投与後、6、9時間目において著明になった。本群の特徴の一つはGolgi装置の嚢状ないし胞状発育が比較的よいことであった。

Sc像はGolgi嚢胞ないし小胞の発育が著明な部域に接するBcでは着染不良化する傾向を示した(Fig. 2および3a)が、Golgi complexの発育があまり目立たない部域では、Bc拡大に係わらず、Scは多くの場合陽性であった。また、時にはBc周域における胞状ないし顆粒状のLysosome様小体にもSc着染像がみられ(Fig. 3b)、これはBcに合流する準備状態か、あるいは分枝状に発育したBcそのもの

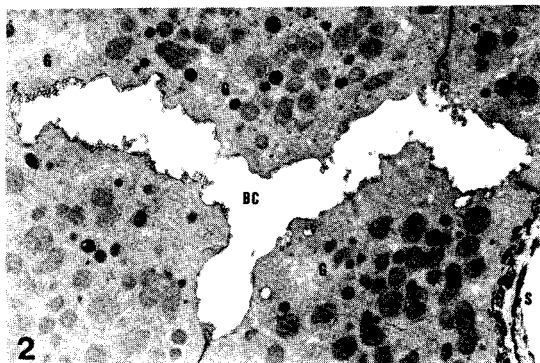


Fig. 2 The canalicular region of the liver cell 6 hours after administration of *Scutellariae Radix*. $\times 6,000$. This canaliculus is widely dilated and thus, Rr positive glycocalyx is relatively thin and discontinuous, whereas fairly good positivity is seen on the membrane surface between neighboring cells and on the sinusoidal surface. Golgi apparatus is fairly well developed. Abbreviation: S; sinusoid.

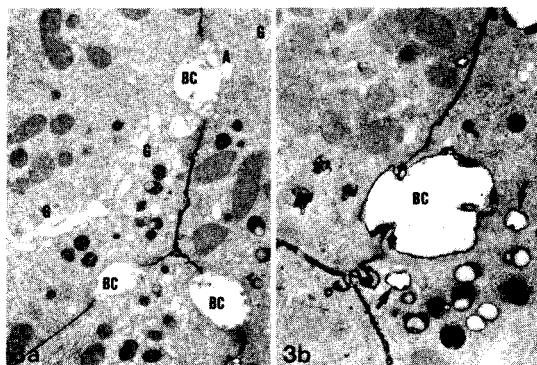


Fig. 3a The canalicular region 6 hours after administration of *Scutellariae Radix*. $\times 8,500$. Although the bile canaliculi are not markedly dilated in this section, Golgi apparatus (cisternae and vesicles) is remarkably developed, accounting for the almost complete absence of staining reaction. This tendency is well recognizable, compared with the finding of Fig. 3b.

Fig. 3b The canalicular region 6 hours after administration of *Scutellariae Radix*. $\times 10,200$. This canaliculus shows only a moderate dilatation in this cross section (thus, a relative decrease of microvilli is seen), in addition, substantial stainability for glycocalyx is preserved on the larger parts of the luminal membrane surface. On the internal surface of the vesicular structures (arrows) localized in the vicinity of the canaliculus, Rr positive reaction is also found.

を示すのではないかと推測された。

3) 大黄投与群

Bcの拡大傾向は黄芩投与群に比べてやや劣るようであったが、投与後6時間において明瞭であり、12時間目以降では回復する傾向がみられた。本群の特徴の一つは割合にしばしばBc腔内へのLysosome様構造物の排出像がみられることであった。

Sc像はBcの拡大に伴って消失するというような傾向はみられなかったが、他の群と同じようにGolgi嚢胞の発育が目立つ部域では、相対的に着染不良化する傾向がみられた (Fig. 4)。

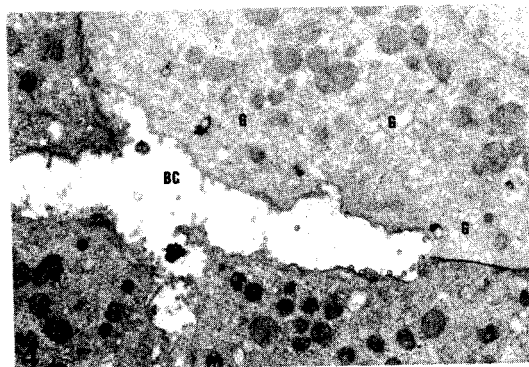


Fig. 4 The canalicular region 6 hours after administration of *Rhei Rhyzoma*. $\times 8,500$. The outer surface of the bile canaliculus, the lumen of which is markedly dilated, and of the microvilli show very poor stainability for glycocalyx, although the stainability is almost unchanged on the lateral membrane surface between the neighboring cells. At the same time, there is a marked development of Golgi cisternae and vesicles.

4) 三黄瀉心湯エキス投与群

Bcは投与後3時間目においてすでに明かな拡大がみられ、9時間目には最大となり、以後回復がみられた。Golgi嚢胞の発育は黄芩投与群の場合と同じく、著明であった。

Sc像はBcの拡大傾向に係わらず、陽性であったが、Golgi嚢胞の発育が極めて良好な部域では着染不良となる傾向がみられた。Sc陽性の輪状膜様ないし繊維様構造物のBc腔内への排出像もしばしば観察された。さらに、Golgi嚢胞より派生したとみられる小胞にもSc陽性像の出現がかなりの頻度で観察された (これらの小胞はGolgi嚢胞との位置的關係、近接毛細胆管腔の形状などから推して毛細胆管腔のOutpouchingsとは考え難いものであった)。

(Fig. 5)。

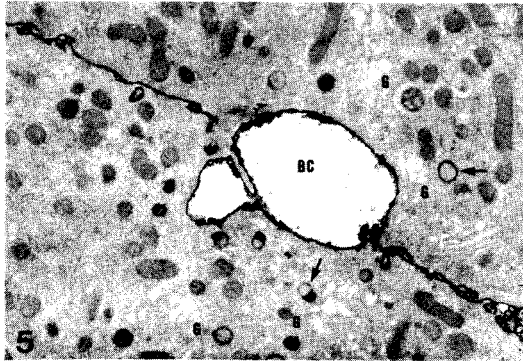


Fig. 5 The canalicular region 9 hours after administration of "San'ō-syasin-tō" extract. $\times 10,200$. Significant stainability is observed on the membrane surface of this canalculus, and at the same thme, Golgi apparatus are widely developed. In this respect, the presence of the Rr positive vesicular stuctures shown with arrows deserves notice ; it is difficult to determine whether they are always connected with the canalicular lumen, since they are all found adjacent to the Golgi apparatus. This picture rather strongly suggests that the process of membrane recycling or new membrane efflux for supplying surface coat materials is in action in this condition.

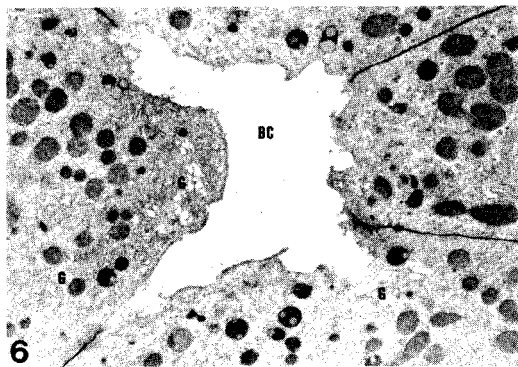


Fig. 6 The region of canalculus 9 hours after administration of "Dai-saiko-tō" extract. $\times 6,800$. Although marked Rr stainability is noted between the contiguous lateral cell membranes, that on the outer surface of the canalculus is almost negative. Note the Golgi apparatus with a wide development and surrounding the canalicular lumen.

5) 大柴胡湯エキス投与群

Bcはエキス投与後9時間目において、明らかな拡大を示したが、それ以後では回復する傾向がみられた。

Scの所見は他の群と同様であった。即ち、その着染状態はBcの拡大傾向と相応せず、むしろGolgi囊胞の発育を示す領域に近接するBcの部分の反応が不良となる傾向を示した (Fig. 6)。また、三黄瀉心湯エキス投与群の場合と同じく、Bc周辺の胞状構造のみならず、既に排出された膜様ないし繊維様構造物にもSc陽性像がみられた。

考 察

今回の研究では、利胆効果を有するとみられる単味生薬(水煎液)として、黄芩^{3,4)}、大黄⁵⁾を、さらに黄芩、大黄含有複合生薬製剤として、三黄瀉心湯および大柴胡湯エキス方剤原末を検索の対象としたが、これらの単味および複合生薬もまた、前回に報告した山梔子、ウ金、茵陳蒿湯の場合とはほぼ同様な形態薬理学的効果、すなわち、Bcの拡張像、微絨毛の相対的減少、向毛細胆管性のTransportの亢進像などの形態変化を与えることが明かになった。これらは明らかに毛細胆管経由の胆汁流量増加に相当する、可逆的、且つ生理的範囲における変化である。今回の実験では著者らは胆汁流量測定、胆汁成分分析などの生化学的検索を行っていないので、毛細胆管域の機能亢進像と構造的安定性が如何に両立し得るかについて特別な注意を払った。何故なら、Bcの拡大そのものは各種の胆汁鬱滞試薬を投与した場合にも見られるからである。しかし、諸報告の成績を見ると、このような場合は、大なり小なり、毛細胆管域ないし細胞レベルでの退行性変化、その他の病変を伴っていることが多い。例えば、Cytochalasin B投与のさいには^{6,7)}高度な毛細胆管腔の拡大像、微絨毛の完全消失像、さらにRr陽性物質の消失像などの変化が広域にわたってみられる(経門脈持続注入条件)。NorethandroneのようなCholestatic steroids⁸⁻¹⁰⁾を投与した場合にも微絨毛の完全消失を伴うようなBcが随所に出現すると報告されている。Phalloidin投与^{8,11)}の場合の毛細胆管周域の変化はCytochalasin Bの場合に比較してもっとはっきりしており、Pericanalicular microfilament networkの著しい増量をもたらすといわれる(但し、1~7日間にわたる連続的腹腔内投与の条件)。また、Miyaiらによれば¹²⁾Sodium tauroolithocholateのようなCholestasisを来す胆汁酸の類は、

Sodium taurocholateのようなCholeresisを来すものとは対照的に毛細胆管壁の特異な病理的变化(層状膜様突起物の形成)を引き起こすことが明かにされている。Alpha-naphthyl isothiocyanate (AN-IT)¹³⁾投与の場合にも、かなり初期から明瞭な病理像(小胆管上皮の変性と周囲炎症)が見られる。以上のような胆汁鬱滞試薬を与えた場合の変化は勿論、生理的範囲を大きく超えており、著者らの実験的条件下で単味または複合生薬を与えることによってもたらされる形態学的効果との間には明瞭な差異のあることが看取される。即ち、微絨毛の完全消失を来すほどのBcの変化は極めて少ないこと、Bc及びその周域の変化は明瞭であるが、かなりの変動域があり、同一時点の同一切片上において、色々な程度ないし反応過程にある変化が入りまじっている(Nemchauskýらの報告したSodium dehydrocholateの持続注入の成績によると、¹⁴⁾Bcの変化はかなり高度であり、利胆作用を有する薬剤でも作用時間や投与量によっては一様に高度な変化をもたらすことも有り得ると思われる。等者らが前回に報告した山梔子投与¹⁾の場合は一回投与条件でもやや高度であった)。同様な傾向は判定基準となった対照肝切片(または通常飼育摂食条件下で屠殺した動物からの正常肝切片)にも見られるもので、これらのさいにも小数ではあるが、明らかな開大を示すBcが散見された。このことは毛細胆管が各部域によって各々の生理的反応周期を備えていることを想定させる。結局、著者らの実験条件下で得られた超微形態像は或範囲の正常像から、毛細胆管域のTransport亢進像へ生理的範囲でShiftした結果を表現しているであろう。次に考察するRr陽性Scについても同様の見方が可能である。

毛細胆管膜内腔側表面のRr陽性の度合いは実質細胞と細胞の間及びSinusoid面の細胞膜外表面にScが顕著に着染している部域で判定されたが、対照肝においても小数ながら、殆ど陰性あるいはごく弱い陽性しか示さないBcがみられた。このようなBcの多くは比較的な開大傾向を示したが、断面上、必ずしもそうでないものも見られた。しかし、腔が狭くて絨毛がそれを満たすような毛細胆管は常にRr陽性であった。一方、生薬投与肝の所見は各実験群間で殆ど差異がなく、共通の変化を示した。即ち、前回に報告した山梔子の場合と違って、腔の開大を示す総ての毛細胆管のScがその時間帯において陰性化するのではなく、かなりの不揃いが見られるという点が特徴的であった。しかし、対照切片と比べてScの消失ないし顕著な減弱を示すBcの分布

は明かに高頻度であった。しかも、このSc物質陰性化の傾向と毛細胆管周域のGolgi complex(小胞を含む)の発育とは大略逆相関の関係にあることも明かになった(切片断面上の判定では小数の例外は見られたが)。さらに、Sc物質の一時的消失は微絨毛を含む毛細胆管表面膜にのみ限局して観察されるのであり、厳格な部位特異性があることを示した。また、この消失像は実験的胆汁鬱滞試薬投与後に見られるように一様ではなく、内腔拡大像と同じような反応周期性の存在を想定させるような所見を与えた。通常飼料飼育条件においても、Sc物質のreversibleな消長はみられるようであり、生薬有効成分の作用はかような生理学的動態をそのまま活発化する方向に発現しているのではないかとこの点が示唆された。このようなことから、毛細胆管膜面におけるSc物質はこの部分のvesicular Transport(reversed Pinocytosis)およびDiffusionなどによる移送機構に関与していると思われる。¹⁵⁾また、Sc反応は毛細胆管腔内に排出された膜様構造物などにもみられることから、Transportの亢進に伴ってSc物質がこのような排出物とともに質的に消費されてしまうことも考えられる。生薬(特に黄芩または三黄瀉心湯)投与肝には、Golgi囊胞に近いところに数個以上のRr陽性小胞の分布が観察されることがあり(Fig. 5)、これは恐らくGolgi→毛細胆管のMembrane recycling(またはNew membrane efflux)^{16, 17)}の亢進像を示しているのではないかと推定される。上述のように一旦消失したSc物質はこのようなProcessによって補充されている可能性も考慮される。

元来、Ruthenium redは酸性ムコ多糖一般の検出に用いられてきたのであるから、^{18, 19)}細胞膜表面に存在するSc(Glycocalyx, 糖衣)を分子レベルで検出するには特異性の点で問題がある。恐らくシアル酸を含む糖蛋白質¹⁸⁾(細胞表面とゆるやかに結合した遊離型の多糖類を含む?)を検出しているのであろう。即ち、Rrの反応は、毛細胆管表面膜を隈なく被覆している、あるSpectrumを有する一群の陽性物質の存在を証明していることになる。このことは細胞表面の糖分子が単にReceptor機能や細胞間の情報伝達ばかりでなく、表面全体を覆うことによってそれを保護する役割をも併せ持っていることを示唆している。この際、強調しなければならないことは、このような表面被覆物質が利胆生薬投与による一時的な減弱の後、速やかな原状復帰を示す点、しかもその動態がGolgi機能と相関しているという点である。以上の成績は全体治療に使用され得

る薬用複合物質としての有用性にいま一つの根拠を提供したことになる。

結 論

1) Bcの拡大像は黄芩、大黃投与群ともに、投与後6ないし9時間目に明瞭となった。三黄瀉心湯エキス及び大柴胡湯エキス投与群の場合も同様な傾向を示したが、三黄瀉心湯エキス群の方が著明であり、且つ長時間にわたって持続した。

2) Sc着染像とBc拡大像とは必ずしも一致しなかった。むしろ、周域のGolgi嚢胞の著明な発育がみられるBcにおいて着染不良化傾向がみられ、Sc物質の産生動態との関連が示唆された。

本論文の内容は第17回和漢薬シンポジウムにおいて発表された。

謝 辞

エキス方剂の利胆効果の形態薬理学的研究については、(株)ツムラ順天堂より多大の御援助を受けました。ここに深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 伊原信夫, 布野秀二: 利胆生薬または複合生薬(山梔子, ウ金, 茵陳蒿湯)の形態薬理学的検討. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **16**, 90-100, 1983
- 2) Luft, J.H.: Ruthenium red and violet. 1. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* **171**, 347-368, 1971
- 3) 熊崎平蔵: 漢薬(SCUTELLARIA)の薬理作用について 第1報: 黄芩Alcohol extract及び黄芩成分Baicalin並びにWogoninの胆汁排泄作用について. 岐阜医科大学紀要 **6**, 94-111, 1958
- 4) 熊崎平蔵: 漢薬黄芩の薬理作用について 第2報: Flavone化合物の胆汁排泄作用と化学構造との関係について. 岐阜医科大学紀要 **6**, 153-163, 1958
- 5) 藤村 一: ダイオウの薬理作用とその臨床的応用の可能性. 代謝 **10** (5月臨時増刊号, 和漢薬), 253-258, 1973
- 6) Phillips, M.J., Oda, M., Mak, E., Fisher, M.M. and Jeejeebhoy, K.N.: Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **69**, 48-58, 1975
- 7) Oda, M. and Phillips, M.J.: Bile canalicular membrane pathology in cytochalasin B-induced cholestasis. *Lab. Invest.* **37**, 350-356, 1977
- 8) 黒田博之, 今成晴代, 横井幸男, 渡辺純夫: 実験的胆汁うっ滞. 肝胆膵 **2**, 597-608, 1981
- 9) Schaffner, F., Popper, H. and Perez, V.: Changes in bile canaliculi produced by norethandrone: Electron microscopic study by human and rat liver. *J. Lab. & Clin. Med.* **56**, 623-629, 1960
- 10) Phillips, M.J., Oda, M. and Funatsu, K.: Evidence for microfilament involvement in norethandrone-induced intrahepatic cholestasis. *Am. J. Path.* **93**, 729-744, 1978
- 11) Dubin, M. Maurice, M., Feldmann, G. and Erlinger, S.: Phalloidin-induced cholestasis in the rat: Relation to changes in microfilaments. *Gastroenterology* **75**, 450-455, 1978
- 12) Miyai, K. Price, U.M. and Fisher, M.M.: Bile acid metabolism in Mammals. Ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chemodeoxycholic acids in the rat. *Lab. Invest.* **24**, 292-302, 1971
- 13) Desmet, V.J., Krstulovic, B. and van Damme, B.: Histochemical study of rat liver in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT) induced cholestasis. *Am. J. Path.* **52**, 401-421, 1968
- 14) Nemchausky, B.A., Layden, T.J. and Boyer, J.L.: Effects of chronic choleretic infusions of bile acids on the membrane of the bile canaliculus. A biochemical and morphologic study. *Lab. Invest.* **36**, 259-267, 1977
- 15) 織田正也, 船津和夫, 土屋雅春: 胆汁の排泄機能, 形態学の面から. 肝胆膵 **2** (5), 579-594, 1982
- 16) Farquhar, M.G.: Membrane recycling in secretory cells: Pathway to the Golgi complex. In "Membrane recycling: Ciba Foundation Symposium 92", Pitman, London, p157-183, 1982
- 17) Rindler, M.J., Ivanov, I.E., Rodriguez-Boulan, E.J. and Sabatini, D.D.: Biogenesis of epithelial cell plasma membranes. In "Membrane recycling: Ciba Foundation Symposium 92", Pitman, London, p184-208, 1982
- 18) Cook, G.M.W. and Stoddart, R.W.: Surface carbohydrate of the eukaryotic cell. (細胞表層の糖質と機能, 内海耕造監訳), 学会出版センター, 東京, p66-70 and p217-218, 1973
- 19) 平野 寛: 細胞表面の糖鎖と細胞認識, 細胞機能と構造: 江橋節夫, 山田英知, 織田敏次監編, 代謝 **14** (12), 臨時増刊号, 25-36, 1977