

大柴胡湯エキスの経口投与による実験的肝障害改善作用

太田 好次,*^{a)} 佐々木恵美,^{a)} 中村 紀美,^{a)} 石黒伊三雄^{a)}
永田 稔,^{b)} 原田 治良^{b)}

^{a)}藤田学園保健衛生大学医学部生化学教室, ^{b)}藤田学園保健衛生大学病院薬剤部

Improvement in experimentally induced liver injuries after oral
administration of Dai-saiko-tô (Da-Chai-Hu-Tang) extract

Yoshiji OHTA,*^{a)} Emi SASAKI,^{a)} Kimi NAKAMURA,^{a)} Isao ISHIGURO^{a)}
Minoru NAGATA^{b)} and Jiro HARATA^{b)}

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

^{b)}Department of Pharmacy, Fujita-Gakuen Health University Hospital

(Received August 23, 1985)

Abstract

We investigated the effect of a single oral administration of Dai-saiko-tô extract (1g/kg) on liver injuries experimentally induced by a single i.p. treatment of 500 mg/kg of D-galactosamine or 1 ml/kg of carbon tetrachloride (CCl₄) to male Wistar rats aged five weeks.

Oral administration of Dai-saiko-tô extract showed no significant improvement, judging by serum-biochemical and histopathological examinations, in D-galactosamine-induced liver injury. In the CCl₄-treated rats, it significantly repressed any increase in serum GOT and GPT levels and total bilirubin concentration, and also apparently improved liver cell necrosis caused by the CCl₄ treatment. In addition, the extract not only prevented any increase in hepatic lipid peroxide and triglyceride contents and any decrease in liver microsomal glucose-6-phosphatase activity and hepatic ascorbic acid and reduced glutathione contents in the CCl₄-treated rats, but even caused an increase in ascorbic acid and reduced glutathione contents in the liver of rats without CCl₄ treatment. Dai-saiko-tô extract also inhibited *in vitro* CCl₄-dependent lipid peroxidation in liver microsomes obtained from the control in a dose-dependent manner.

These findings suggest that oral administration of Dai-saiko-tô extract improves CCl₄-induced liver injury. This improvement is probably due to inhibition of CCl₄-induced hepatic lipid peroxidation, and an increase in hepatic ascorbic acid and reduced glutathione levels.

Key words Dai-saiko-tô extract, D-galactosamine, carbon tetrachloride, experimental liver injury, lipid peroxidation, antioxidant

Abbreviations Asc.A : ascorbic acid, GSH : reduced glutathione, D-Gal : D-galactosamine, G-6-Pase : glucose-6-phosphatase, MDA : malondialdehyde, Saline : physiological saline, α -Toc. : α -tocopherol, Vit. E : vitamin E, Dai-saiko-tô (Da-Chai-Hu-Tang) ; 大柴胡湯, Saiko-keisi-tô (Chai-Hu-Gui-Zhi-Tang) ; 柴胡桂枝湯, Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang) ; 小柴胡湯

緒 言

近年、種々の漢方製剤が臨床に用いられるようになり、小柴胡湯、大柴胡湯、柴胡桂枝湯などの柴胡剤も肝炎の治療薬として繁用されている。¹⁻⁵⁾そして、これらの柴胡剤の肝障害に対する作用に関して基礎的な研究も行われるようになった。最近、D-ガラクトサミン (D-Gal) 肝障害ラットに小柴胡湯^{6,7)}をはじめ大柴胡湯、柴胡桂枝湯⁶⁾のエキスを腹腔内に前投与すると、その肝障害は軽減されることが報告されている。また、これらの柴胡剤の主生薬である柴胡、そして特にその有効成分のサイコサポニン a 及び d は非経口投与で D-Gal や四塩化炭素 (CCl₄) 肝障害を抑制し、⁸⁻¹⁰⁾しかも CCl₄ 投与による肝組織の過酸化脂質の増加を抑える¹⁰⁾ことが示されている。

しかし、サイコサポニン a 及び d は経口投与では消化管内で代謝され、また、それらの代謝産物は肝に対して元のサイコサポニンとは異なる作用を示すことが萩原¹¹⁾及びその研究グループ^{12,13)}により示唆されている。しかも、漢方薬は経口投与でその薬効が確かめられ、種々の疾患の治療に今日まで用いられているので、柴胡剤の肝障害に対する作用の基礎的検討も経口投与で行われる必要がある。しかしながら、これまでに柴胡剤の肝障害に対する経口投与での改善作用に関して基礎的な検討は十分になされていない。したがって、著者らは実証の人に用いられている大柴胡湯のエキスを D-Gal と CCl₄ 肝障害ラットに経口投与し、そのエキスの肝障害改善作用を検索した。

材料と方法

(1)実験動物：静岡実験動物研究所より購入し、オリエンタル固形飼料 MF で飼育した 5 週齢の Wistar 系雄性ラットを実験に用いた。

(2)試薬：大柴胡湯エキスは津村順天堂 K.K. より提供されたエキス原末を、また D-Gal は Sigma 社の D-ガラクトサミン塩酸塩を用いた。Glucose-6-phosphate と glucose-6-phosphate dehydrogenase は Boehringer-Mannheim 社製を、NADP⁺ はオリエンタル酵母社製を、また標品の α -トコフェロール (α -Toc.)、CCl₄ 及びその他の試薬は和光純薬工業社製の試薬特級品を用いた。

(3)実験方法：D-Gal 及び CCl₄ 肝障害は、2 時間絶食後のラットに生理食塩水 (生食) で溶解した D-

Gal (500 mg/kg 体重) とオリーブ油で希釈した 50 % CCl₄ 溶液 (2 ml/kg 体重) をそれぞれ腹腔内に投与して惹起させた。また、それらの対照群にはそれぞれ同量の生食とオリーブ油を投与した。大柴胡湯エキスは生食 10 ml にその 1 g を懸濁し、体重 1 kg 当りその懸濁液 10 ml を D-Gal 又は CCl₄ 投与 2 時間後に胃ゾンデで経口投与し、また大柴胡湯非投与群には体重 1 kg 当り生食 10 ml を投与した。これらのラットは D-Gal 又は CCl₄ 投与 24 時間後に下行大静脈を切断し、血液を採取した後に屠殺した。

(4)試料の作製：摘出した肝臓は直ちに冷 0.15 M KCl で洗浄、秤量後に右葉 (中心部) の一部を組織学的観察のために切除し、また残りの肝臓はドライアイスで凍結して使用時まで -80℃ で保存した。その肝臓は冷 0.15 M KCl で 10 % ホモジネートとし、過酸化脂質、中性脂肪、アスコルビン酸 (Asc. A)、還元型グルタチオン (GSH)、ビタミン E (Vit.E) などの測定に用いた。また、そのホモジネートの一部は既報¹⁴⁾の遠心分画法によってミクロゾームを調整し、glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 及び CCl₄-依存性脂質過酸化活性の測定に用いた。採取した血液は血清に分離し、その血清について種々の生化学的検索を行った。

(5)生化学的検査：肝組織の過酸化脂質、中性脂肪、Asc.A、GSH、Vit.E 及びタンパクの測定は、それぞれ Ohkawa ら、¹⁵⁾Vishwanath & Joan、¹⁶⁾Omaye ら、¹⁷⁾Beutler ら、¹⁸⁾Tayler ら、¹⁹⁾及び Lowry ら²⁰⁾の方法に従って行った。肝ミクロゾームの G-6-Pase 活性の測定は Swanson²¹⁾の方法に従って行い、その活性は遊離する無機リン (Pi) を Goldenberg & Frenandez²²⁾の方法で測定し、1 分間に 1 μ mole の Pi を遊離する酵素量を 1 単位とした。CCl₄-依存性脂質過酸化活性は無処置ラット肝ミクロゾームを用い、Kornbrust & Mavis²³⁾の方法に準じて測定した。すなわち、1.0 mM KH₂PO₄、1.0 mM EDTA、NADPH-generating system (0.3 mM NADP⁺、2.0 mM glucose-6-phosphate 及び 0.2 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase)、10 μ l CCl₄、ミクロゾーム (1.0 mg タンパク) 及び 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) よりなる反応液 (全量 1.0 ml) を試験管に入れ、シリコン栓をして 37℃、振盪条件下で反応を行った。その活性は 2-チオバルビツール酸を用いる Buege & Aust²⁴⁾の方法によって生成したマロンジアルデヒド (MDA) を測定し、その生成量で表した。

血清中の GOT と GPT 活性の測定はイアトロザ

イム TA-L_q キット (ヤトロ) を用いて行い、それらの活性は Karmen 単位 (KU) で表した。また、血清中の中性脂肪、総ビリルビン、総タンパク、アルブミン及び過酸化脂質はそれぞれクリンテック TG-S キット (ヤトロ)、サンアッセイ T-BIL キット (三光純薬)、Biuret 法²⁵⁾、BCG 法²⁶⁾ 及び過酸化脂質測定キット (和光純薬) によって測定した。なお、肝組織及び血清の過酸化脂質は MDA 量として、また肝組織の Vit.E は α -Toc. 量として求めた。

(6) 病理組織学的観察: 摘出した肝臓の右葉の一部は、常法によりホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン-エオシン重染色を施し、光学顕微鏡にてその組織像を観察した。

なお、各群間における有意差は、Student's *t* test によって検定を行い、その危険率が 5% 以下を有意とした。

結 果

1. D-Gal 肝障害に対する大柴胡湯エキス経口投与による改善効果

Table I に示すように、D-Gal 投与により体重及び肝重量は有意に減少し、それらの重量はそれぞれ対照群の 91% 及び 76% であった。しかし、それらの減少は大柴胡湯エキス投与によって抑制されなかった。また、肝タンパク量は D-Gal と大柴胡湯エキスの単独投与では変動しないが、大柴胡湯エキスと D-Gal の併用投与により僅かであるが、有意に増加した (Table I)。

血清中の GOT 及び GPT 活性は、Table II に示すように D-Gal 投与によりそれぞれ対照群の 5 倍及び 17 倍に増加したが、それらの増加は大柴胡湯エキス投与により抑制されなかった。また、D-Gal

Table I Effect of Dai-saiko-tô administration on body weight, liver weight and hepatic protein content in control and D-galactosamine-treated rats.

	Control (5)	Dai-saiko-tô (5)	D-Gal (8)	D-Gal + Dai-saiko-tô (8)
Body weight (g)	147 ± 11	143 ± 10	133 ± 5 ^a	137 ± 8
Liver weight (g)	7.62 ± 0.96	7.35 ± 1.12	5.77 ± 0.32 ^b	5.98 ± 0.56 ^a
(g/100g B.W.)	5.17 ± 0.26	5.12 ± 0.43	4.34 ± 0.15 ^b	4.38 ± 0.40 ^a
Hepatic protein content (mg/g liver)	191 ± 9	198 ± 6	198 ± 12	208 ± 9 ^c

Values are means ± S.D. with the number of animals in parentheses.

^a Significantly different from the control ($p < 0.01$).

^b Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^c Significantly different from the control ($p < 0.05$).

Table II Effect of Dai-saiko-tô administration on contents of total protein, albumin and total bilirubin, and GOT and GPT activities in serum of control and D-galactosamine-treated rats.

	Control (5)	Dai-saiko-tô (5)	D-Gal (8)	D-Gal + Dai-saiko-tô (8)
Total protein (g/dl)	7.85 ± 0.36	7.82 ± 0.34	6.52 ± 0.15 ^a	6.83 ± 0.37 ^a
Albumin (g/dl)	4.21 ± 0.31	4.14 ± 0.20	3.75 ± 0.15 ^b	3.84 ± 0.33
Total bilirubin (mg/dl)	0.34 ± 0.10	0.34 ± 0.09	0.60 ± 0.15 ^b	0.46 ± 0.08 ^c
GOT (KU/l)	85 ± 14	8 ± 6	400 ± 214 ^c	363 ± 217 ^c
GPT (KU/l)	42 ± 6	34 ± 3	717 ± 413 ^d	700 ± 410 ^c

Values are means ± S.D. with the number of animals in parentheses.

^a Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^b Significantly different from the control ($p < 0.01$).

^c Significantly different from the control ($p < 0.05$).

^d Significantly different from the control ($p < 0.02$).

投与により血清中の総タンパクとアルブミン量の減少及び総ビリルビン量の増加がみられたが、それらの変動に対しても大柴胡湯エキスは有意な改善効果を示さなかった (Table II)。

更に、D-Gal 肝障害に対する大柴胡湯エキス経口投与による改善効果を病理組織学的観察によって調べた。その結果、D-Gal 投与により肝細胞は腫大し、好酸性となり、その細胞内に多数の好酸体が見られたが、大柴胡湯エキスはこれらの組織学的変化に対して明らかな抑制効果を示さなかった。

2. CCl₄ 肝障害に対する大柴胡湯エキス経口投与による改善効果

Table III に示すように、CCl₄ 及び大柴胡湯エキス投与により体重は変動しないが、肝重量は体重 100 g 当りで比較すると、CCl₄ 投与により若干であるが、有意に増加していた。肝タンパク量は対照群、大柴胡湯エキス単独投与群、CCl₄ 単独投与群及び CCl₄ と大柴胡湯エキスの併用投与群間で差がなかった (Table III)。

Table IV に示すように、血清中の GOT と GPT

活性及び総ビリルビン量は CCl₄ 投与によりそれぞれ対照群の 25 倍、19 倍及び 2 倍に増加したが、それらの増加は大柴胡湯エキス投与により有意に抑制された。また、血清中の総タンパク及びアルブミン量は CCl₄ 投与により減少したが、それらの減少は大柴胡湯エキス投与によって改善されなかった (Table IV)。

CCl₄ 障害肝では脂質過酸化の亢進や中性脂肪の蓄積が知られている²⁷⁾ ので、CCl₄ 投与による血清と肝の過酸化脂質と中性脂肪レベルの変動に対する大柴胡湯エキス経口投与の影響を調べ、Table V に示す結果が得られた。CCl₄ 投与により血清過酸化脂質レベルは変動しないが、肝過酸化脂質は有意な増加を示し、その量は対照群の 1.6 倍であった。その過酸化脂質の増加は大柴胡湯エキス投与により対照群のレベルにまで抑制された。血清中性脂肪は CCl₄ 投与により有意な減少を示し、その量は対照群の 66 % であったが、その減少は大柴胡湯エキス投与により抑制されなかった。一方、肝中性脂肪は CCl₄ 投与により対照群の 5.6 倍に増加したが、そ

Table III Effect of Dai-saiko-tô administration on body weight, liver weight and hepatic protein content in control and CCl₄-treated rats.

	Control	Dai-saiko-tô	CCl ₄	CCl ₄ + Dai-saiko-tô
Body weight (g)	139 ± 3	138 ± 6	131 ± 4	132 ± 6
Liver weight (g)	5.66 ± 0.13	6.63 ± 0.20	6.33 ± 0.40	6.44 ± 0.78
(g/100g B.W.)	4.06 ± 0.11	4.13 ± 0.11	4.82 ± 0.21 ^a	4.88 ± 0.41 ^b
Hepatic protein content (mg/g liver)	192 ± 10	202 ± 2	196 ± 6	189 ± 5

Values are means ± S.D. with five animals.

^a Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^b Significantly different from the control ($p < 0.01$).

Table IV Effect of Dai-saiko-tô administration on contents of total protein, albumin and total bilirubin, and GOT and GPT activities in serum of control and CCl₄-treated rats.

	Control	Dai-saiko-tô	CCl ₄	CCl ₄ + Dai-saiko-tô
Total protein (g/dl)	7.64 ± 0.20	7.14 ± 0.18	6.12 ± 0.50 ^a	6.32 ± 0.41 ^a
Albumin (g/dl)	4.95 ± 0.13	4.84 ± 0.03	4.37 ± 0.13 ^a	4.38 ± 0.17 ^b
Total bilirubin (mg/dl)	0.29 ± 0.05	0.24 ± 0.10	0.60 ± 0.12 ^b	0.40 ± 0.09 ^c
GOT (KU/l)	74 ± 8	71 ± 5	1874 ± 171 ^a	731 ± 217 ^{a,d}
GPT (KU/l)	40 ± 3	39 ± 2	759 ± 285 ^a	275 ± 115 ^{a,d}

Values are means ± S.D. with five animals.

^a Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^b Significantly different from the control ($p < 0.01$).

^c Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.05$).

^d Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.001$).

Table V Effect of Dai-saiko-tô administration on contents of serum and hepatic lipid peroxide and triglyceride in control and CCl₄-treated rats.

	Control	Dai-saiko-tô	CCl ₄	CCl ₄ + Dai-saiko-tô
Lipid peroxide				
Serum (nmol MDA/ml)	5.78±0.64	6.09±0.72	6.76±1.72	5.63±1.02
Liver (nmol MDA/g tissue)	95±16	99±9	148±14 ^a	110±15 ^b
Triglyceride				
Serum (mg/dl)	108±11	128±20	71±17 ^c	59±9 ^d
Liver (mg/g tissue)	5.8±0.4	5.7±0.4	32.4±6.4 ^e	20.2±5.2 ^{c,e}

Values are means±S.D. with five animals.

^a Significantly different from the control ($p < 0.01$).

^b Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.01$).

^c Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^d Significantly different from the control ($p < 0.02$).

^e Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.02$).

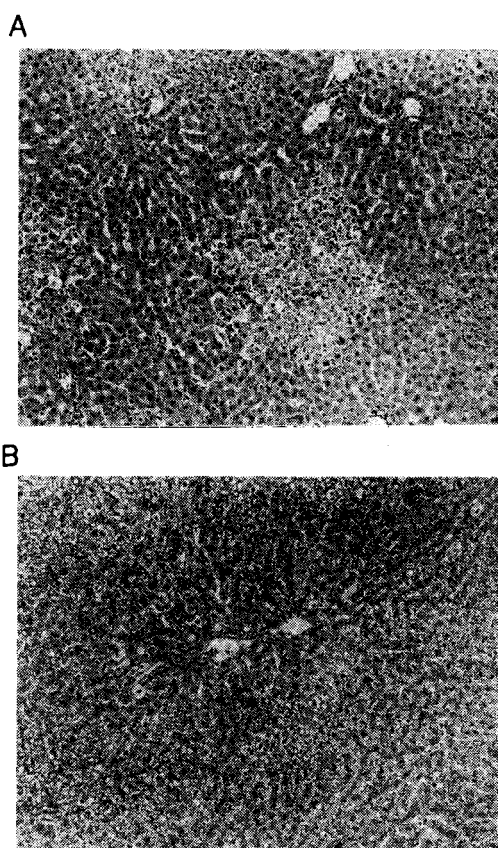


Fig. 1 Liver morphology in rats treated with CCl₄ (A) and with CCl₄ plus Dai-saiko-tô (B). Hematoxylin-eosin (×50).

の増加は大柴胡湯エキス投与により有意に抑制され、その中性脂肪量は対照群の3.5倍であった。

また、光学顕微鏡により肝組織像を調べると、CCl₄単独投与群では肝細胞の空胞化、腫大及び肝実質内の結節性壊死巣がみられたが、大柴胡湯エキス併用投与群では肝の腫大や肝実質内の結節性壊死巣はほとんど認められなかった (Fig. 1)。

3. 大柴胡湯エキスの脂質過酸化抑制作用

Table V に示したように、CCl₄投与による肝の過酸化脂質の増加が大柴胡湯エキス経口投与で抑制されたので、そのエキスの脂質過酸化抑制作用を明らかにするために、CCl₄投与による肝のVit.E、Asc.A及びGSHなどの抗酸化物質レベルの変動に対する大柴胡湯投与の影響を調べた。その結果はTable VIに示した。肝のVit.EレベルはCCl₄投与により対照群の1.6倍に増加し、またその増加は大柴胡湯エキス併用投与群においても認められたが、その量は対照群の1.4倍であった。肝のAsc.AレベルはCCl₄投与により減少し、その量は対照群の36%であったが、大柴胡湯エキス投与により対照群の68%まで回復した。しかも、肝のAsc.Aレベルは大柴胡湯エキス単独投与により対照群の1.2倍に増加した。また、肝のGSHレベルはCCl₄投与によりAsc.Aの場合と同様に減少し、その量は対照群の78%であった。そのGSHの減少は大柴胡湯エキス投与により抑制され、しかもその量は対照群の1.4倍であった。大柴胡湯エキス単独投与によっても肝GSHレベルは対照群の1.2倍に増加した。

また、CCl₄による脂質過酸化の亢進によって肝

Table VI Effect of Dai-saiko-tô administration on contents of liver vitamin E, ascorbic acid and reduced glutathione in control and CCl₄-treated rats.

	Control	Dai-saiko-tô	CCl ₄	CCl ₄ +Dai-saiko-tô
Vitamin E (μ g α -Toc./g liver)	11.5 $\pm$ 1.1	11.1 $\pm$ 0.3	18.6 $\pm$ 2.0 ^a	16.2 $\pm$ 2.6 ^b
Ascorbic acid (nmol/g liver)	450 $\pm$ 30	528 $\pm$ 32 ^c	162 $\pm$ 31 ^a	305 $\pm$ 19 ^{a,d}
Reduced glutathione (μ mol/g liver)	5.22 $\pm$ 0.17	6.39 $\pm$ 0.40 ^a	4.04 $\pm$ 0.87 ^e	7.18 $\pm$ 0.64 ^{a,f}

Values are means $\pm$ S.D. with five animals.

^a Significantly different from the control ($p < 0.001$).

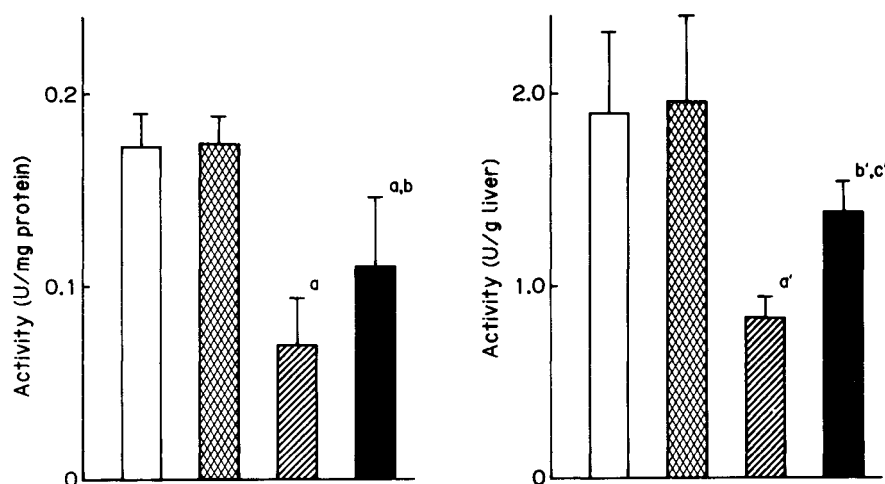
^b Significantly different from the control ($p < 0.02$).

^c Significantly different from the control ($p < 0.01$).

^d Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.01$).

^e Significantly different from the control ($p < 0.05$).

^f Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.001$).

Fig. 2 Effect of Dai-saiko-tô administration on liver microsomal glucose-6-phosphatase activity in control and CCl₄-treated rats.

Activity is represented as U/mg protein (left figure) and U/g liver (right figure). Values are means $\pm$ S.D. with five animals. Control; Dai-saiko-tô; CCl₄; CCl₄ + Dai-saiko-tô.

^a Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^b Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.02$).

^{a'} Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^{b'} Significantly different from the control ($p < 0.05$).

^{c'} Significantly different from the CCl₄ ($p < 0.001$).

ミクロゾームに局在する G-6-Pase の活性は減少することが知られている^{28,29)} ので、大柴胡湯エキスの CCl₄ 投与による肝ミクロゾームの G-6-Pase 活性の変動に対する経口投与の影響と肝ミクロゾームにおける *in vitro* の CCl₄-依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果を調べた。その結果、肝ミクロゾーム画分の G-6-Pase 活性は CCl₄ 投与によりタンパク 1 mg 当たりばかりでなく、肝組織 1 g 当たりにおいても対照群の約半分に減少したが、その活性の減

少は大柴胡湯エキス投与により有意に抑制された (Fig. 2)。一方、大柴胡湯エキスは肝ミクロゾームにおける *in vitro* の CCl₄-依存性脂質過酸化反応をその添加濃度の増加に伴って強く阻害し、50 μ g/ml の濃度で 44 % の阻害を示したが、その濃度付近でその阻害効果はほぼプラトーの状態であった (Fig. 3A)。また、大柴胡湯エキスはその脂質過酸化反応に対して反応初期より明らかな阻害作用を示した (Fig. 3B)。

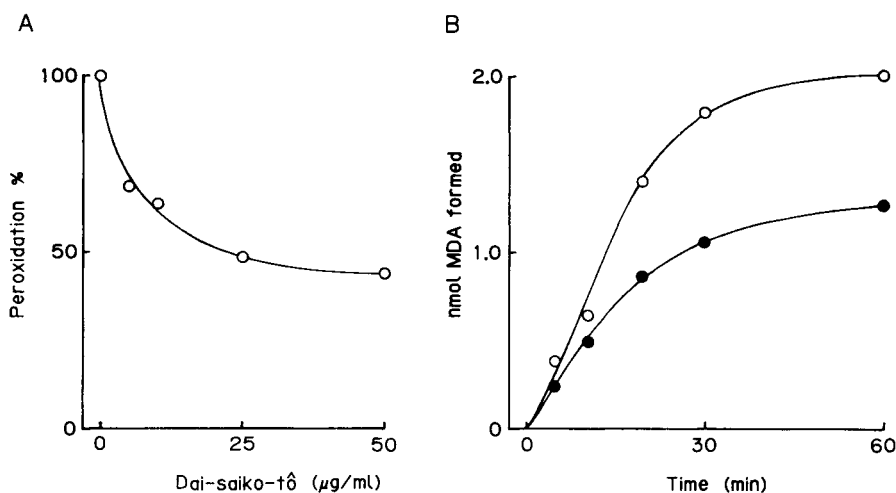


Fig. 3 Effect of Dai-saiko-to extract on *in vitro* CCl_4 -dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes as functions of its concentration (A) and reaction time (B).

A. The reaction mixtures with or without Dai-saiko-to extract in concentration indicated were incubated for 20 min. The amount of malondialdehyde (MDA) formed in the absence of Dai-saiko-to extract was 1.68 ± 0.02 nmol/20 min [mean $\pm$ S.D.] ($n=3$). B. The reaction mixtures were incubated in the presence or absence of $10 \mu\text{g/ml}$ of Dai-saiko-to extract. ○, without Dai-saiko-to; ●, with Dai-saiko-to. Each point represents the mean value from three determinations.

考 察

加藤ら⁶⁾はD-Gal (400 mg/kg 体重)を投与して肝障害を惹起したラットに、小柴胡湯をはじめ大柴胡湯及び柴胡桂枝湯の熱水抽出エキス末 (200 mg/kg 体重) 生食懸濁液の遠心上清をD-Gal投与2時間前に腹腔内へ投与し、それらのエキスの肝障害抑制効果をD-Gal投与24時間後に血清GPT活性を指標にして調べ、それらの柴胡剤がD-Gal肝障害に対して抑制効果を示すことを報告し、またその肝障害に対する小柴胡湯の抑制作用は副腎機能亢進によることを示唆している。しかし、D-Gal (500 mg/kg 体重)を投与したラットに大柴胡湯エキス末 (1 g/kg 体重) 生食懸濁液をD-Gal投与2時間後に経口投与し、そのエキスの肝障害改善作用をD-Gal投与24時間後に調べた本実験では大柴胡湯エキスは明らかなD-Gal肝障害改善効果を示さなかった。また、著者らは毎日体重1 kg 当り大柴胡湯エキス末1 gを粉末飼料に混ぜ、2週間前投与したラットに体重1 kg 当り300 mgあるいは800 mgのD-Galを投与して肝障害を惹起させ、その投与24時間後に大柴胡湯エキスの肝障害抑制効果を調べたが、大柴胡湯エキスは明らかなD-Gal肝

障害抑制効果を示さず (未発表)、大柴胡湯はD-Gal肝障害に対して経口投与では有効に作用しないことが示唆された。

D-Gal肝障害とは発生機序の異なる CCl_4 肝障害に対する大柴胡湯エキス経口投与の影響に関しては、 CCl_4 (1 ml/kg 体重)を投与して肝障害を惹起させたラットに、その投与2時間後に大柴胡湯エキス末 (1 g/kg 体重) 生食懸濁液を経口投与し、そのエキスの肝障害改善作用を CCl_4 投与24時間後に血清を用いた肝機能検査及び肝の病理組織学的観察によって調べた。その結果、大柴胡湯エキス経口投与により CCl_4 肝障害に伴う血清中のGOT及びGPT活性の上昇や総ビリルビン量の増加は抑制され、また肝細胞壊死の減少がみられ、大柴胡湯は CCl_4 肝障害に対しては経口投与で有効に作用することが明らかとなった。

小柴胡湯、大柴胡湯、柴胡桂枝湯などの柴胡剤の主生薬である柴胡に含まれるサイコサポニンaやdは非経口投与でD-Galや CCl_4 肝障害に対して予防効果や改善効果を示し、⁸⁻¹⁰⁾また CCl_4 投与による肝組織での過酸化脂質の増加を抑制し、¹⁰⁾しかも生体膜保護作用を有する³⁰⁾ことより、これらの柴胡剤の両実験的肝障害に対する抑制作用は柴胡中のサイコサポニンaやdの肝細胞膜保護作用に基づくことが

考えられている。しかし、荻野¹¹⁾やその研究グループ^{12,13)}はこれらのサイコサポニンを経口投与では消化管内で代謝され、生ずる代謝産物は元のサイコサポニンとは肝に対して異なる作用を示すことを示唆しており、また大柴胡湯エキスは経口投与ではD-Gal 肝障害に対して有効性を示さなかったので、大柴胡湯エキスの経口投与によるCCl₄肝障害の改善は柴胡中のサイコサポニンaやdそのものに基づく可能性は少ないように思われる。

CCl₄による肝障害の発生機序に関しては数多くの報告があるが、その機序の1つとして種々のオルガネラの膜における過酸化脂質生成促進作用がよく知られている。^{31,32)}すなわち、CCl₄は肝細胞内の小胞体（ミクロゾーム）においてNADPHを電子供与体とするチトクロームP-450とその還元酵素よりなる薬物代謝酵素系によって代謝されるが、その際にCCl₃・やCCl₃O₂・が生成する。それらのラジカルは小胞体を含む種々のオルガネラの膜を構成する脂質、特にリン脂質の不飽和脂肪酸に作用し、過剰な過酸化脂質の生成を引き起こす。その結果、肝細胞の膜機能が障害されてタンパク合成の障害が起き、また肝細胞内に中性脂肪が蓄積すると考えられている。

本CCl₄肝障害実験においても肝組織内に過酸化脂質の増加や中性脂肪の蓄積が認められたが、大柴胡湯エキスの経口投与で過酸化脂質の増加ばかりでなく、中性脂肪の蓄積も抑制され、大柴胡湯エキスには脂質過酸化抑制作用のあることが示唆された。そこで、CCl₄投与による肝のVit.E、Asc.A、GSHなどの抗酸化物質レベルの変動に対する大柴胡湯エキス経口投与の影響を調べると肝のVit.EレベルはCCl₄投与により増加するが、その増加に対しては、大柴胡湯エキスは明らかな効果を示さなかった。一方、肝のAsc.A及びGSHレベルはCCl₄投与により減少したが、その両化合物の減少は大柴胡湯エキス投与により明らかに抑制された。しかも、そのエキスの単独投与によって肝のAsc.A及びGSHの増量がみられたので、大柴胡湯エキスの脂質過酸化抑制作用の一部はこのようなAsc.AやGSHレベルを増加させる作用に基づくことが考えられる。また、CCl₄投与による肝ミクロゾームに局在するG-6-Paseの活性の減少は、CCl₄の代謝産物であるCCl₃・やCCl₃O₂・による脂質過酸化の亢進によってそのミクロゾーム膜が障害されることに基づくと考えられている。^{28,29)}本CCl₄投与実験においても肝ミクロゾーム画分のG-6-Pase活性は減少したが、その減少は大柴胡湯エキス経口投与で明らかに抑制され

た。このことから大柴胡湯エキスはCCl₄による脂質過酸化反応を抑制し、生体膜を保護する作用を有することが示唆された。

更に、肝ミクロゾームにおける*in vitro*のCCl₄一依存性脂質過酸化反応に対する大柴胡湯エキスの抑制作用を調べると、大柴胡湯エキスはその脂質過酸化反応を反応初期より、濃度依存的に阻害し、そのもの自身が脂質過酸化抑制作用を有することが明らかとなった。しかし、大柴胡湯は柴胡、半夏、黄芩、芍薬、大棗、枳実、生姜、大黄などの8種類の生薬で構成されているので、そのエキスの脂質過酸化抑制作用がこれらの生薬に含まれているどの成分に基づくかに関しては、今後検討する必要がある。しかしながら、戸田ら³³⁾は107種類の生薬のメタノールエキスについて抗酸化能を調べ、生姜、柴胡、大黄などには強い抗酸化能を有することを報告しているため、大柴胡湯エキスの脂質過酸化抑制作用はこれらの生薬に含まれている成分による可能性が考えられる。

したがって、これらのことより大柴胡湯エキス経口投与によるCCl₄肝障害の改善には、そのエキスの脂質過酸化抑制作用と共に肝組織内のAsc.AやGSHレベルを上昇させる作用が一部与っていることが推察される。

結 論

D-Gal及びCCl₄肝障害ラットに大柴胡湯エキスを経口投与して、大柴胡湯の両実験的肝障害に対する改善効果を血清生化学及び病理組織学的検索によって調べた結果、大柴胡湯エキスは経口投与でD-Gal肝障害に対して明瞭な作用を示さないが、CCl₄肝障害に対しては改善作用を有することが明らかとなった。また、大柴胡湯エキスは経口投与でCCl₄投与による肝組織での過酸化脂質と中性脂肪量の増加及びAsc.AとGSHの減少並びに肝ミクロゾームのG-6-Pase活性の低下を抑制し、しかも単独投与で肝組織のAsc.AやGSHレベルを上昇させ、更に肝ミクロゾームにおける*in vitro*のCCl₄一依存性脂質過酸化反応を阻害したので、大柴胡湯エキスの経口投与によるCCl₄肝障害改善作用はそのエキ스가CCl₄による脂質過酸化の亢進を抑制し、また肝組織内のAsc.AやGSHなどの抗酸化物質レベルを上昇させることに一部基づいていることが推察された。

謝 辞

本研究に御助力頂きました津村順天堂 K.K. に対して深甚の謝意を表します。また、肝組織像の観察をして下さいました藤田学園保健衛生大学医学部病理学教室の笠原正男助教授に対して深謝します。

文 献

- 1) 有地 滋：慢性肝炎に対する「ツムラ」小柴胡湯，「ツムラ」柴胡桂枝湯，「ツムラ」桂枝茯苓丸，「ツムラ」五苓散等の効果について，*薬物療法* **10**, 719-738, 1979
- 2) 水野修一：慢性肝炎の漢方療法—第一報—自験例の検討と文献的考察，*臨床と研究* **59**, 476-482, 1982
- 3) 水野修一，尾関恒雄，田岡賢雄：慢性肝炎の漢方療法—第二報—その東洋医学的弁証と治療効果について，*臨床と研究* **60**, 3047-3050, 1983
- 4) 山本昌弘，植村泰三，中間 慧，上宮正直，笠山宗正，岸田泰弘，山内圭子，子牟田清，熊谷 朗：柴胡剤による慢性肝炎の治療に関する基礎的臨床的研究，*Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **16**, 245-248, 1983
- 5) 中田敬吾，古江増裕，高嶽 博，山本宏志，細野一郎，坂口 弘：慢性肝障害の漢方治療，*日本東洋医学雑誌* **33**, 129-138, 1983
- 6) 加藤正秀，丸本正彦，林真知子，前田利男，林 栄一：柴胡剤の薬理学的研究（第6報）小柴胡湯のD-galactosamine 肝障害ラットに対する作用，*薬学雑誌* **104**, 798-804, 1984
- 7) 山本厚太，荒木伸一，小川和朗：D-galactosamine 肝障害に対する小柴胡湯の効果，*漢方医学* **9** (2), 13-19, 1985
- 8) 有地 滋，小西啓悦，阿部博子：Saikosaponin の作用機作の解析 I. D-galactosamine 肝障害に対する saikosaponin の作用，*肝臓* **19**, 430-435, 1978
- 9) Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arichi, S. and Odashima, S.: Pharmacological actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum*, *Planta Medica* **40**, 366-372, 1980
- 10) Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S. and 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
- 11) 荻原幸夫：漢方方剤の科学的解析(3)—小柴胡湯について—，*漢方医学* **8** (6), 12-17, 1984
- 12) Amagaya, S., Shimizu, K. and Ogihara, Y.: Monitoring of saikosaponins by gastric juice and intestinal flora, *J. Pharmacobio-Dyn.* **8**, s-52, 1985
- 13) 藤原研司，岡 裕爾，正木尚彦，太田裕彦，尾形逸郎，佐藤 讓，山田真知，高橋勝義，平田啓一，岡 博，織田敏次，清水孝次，雨谷 栄，荻原幸夫：生薬製剤による肝障害治療効果の固体差，*日本消化器病学会誌* **82**, 1079, 1985
- 14) Harata, J., Nagata, M., Ishiguro, I. and Ohta, Y.: Effect of 2-mercaptopropionylglycine on lipid peroxidation and drug oxidation in rat liver microsomes, *Biochemistry Int.* **8**, 49-59, 1984
- 15) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* **95**, 351-358, 1979
- 16) Vishwanath, M.S. and Joan, A.M.: The determination of triglyceride in plasma and tissues, *Clin. Chem.* **14**, 156-161, 1968
- 17) Omaye, S.T., Turnbull, J.D. and Saiberlich, H.E.: Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. In "Methods in Enzymology" (Ed. by D.B. McCormick and L.D. Wright), Academic Press Inc., New York, vol. 62, p 3-11, 1979
- 18) Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B.M.: Improved method for the determination of blood glutathione, *J. Lab. & Clin. Med.* **61**, 882-888, 1963
- 19) Taylor, S., Lamden, M. and Tappel, A.L.: Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis, *Lipids* **11**, 530-538, 1976
- 20) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951
- 21) Swanson, M.A.: Glucose-6-phosphatase from liver. In "Methods in Enzymology" (Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan), Academic Press Inc., New York, vol. 2, p 541-543, 1955
- 22) Goldenberg, H. and Frenades, A.: Simplified method for estimation of inorganic phosphorus in body fluid, *Clin. Chem.* **12**, 871-882, 1966
- 23) Kornbrust, D.J. and Mavis, R.D.: Microsomal lipid peroxidation. II. Stimulation by carbon tetrachloride, *Mol. Pharmacol.* **17**, 408-414, 1980
- 24) Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in Enzymology" (Ed. by S. Fleischer and L. Packer), Academic Press Inc., New York, vol. 52, p 302-310, 1978
- 25) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: Determination of serum protein by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766, 1949
- 26) Doumas, B. T., Watson, W.A. and Bigs, H.G.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green, *Clin. Chim. Acta* **31**, 87-96, 1971
- 27) Poli, G., Gravel, E., Albano, E. and Diazani, M.: Studies on fatty liver with isolated hepatocytes. II. The action of carbon tetrachloride on lipid peroxidation, protein, and triglyceride synthesis and secretion, *Exp. Mol. Pathol.* **30**, 116-127, 1979
- 28) Glende, E.A. Jr., Hruszkewycz, A.M. and Recknagel, R.O.: Critical role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose-6-phosphatase, *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2163-2170, 1976
- 29) Poli, G., Cheesemann, K., Slater, T.F. and Diazani, M.

- U. : The role of lipid peroxidation in CCl_4 -induced damage to liver microsomal enzymes : Comparative studies in vitro using microsomes and isolated liver cells. *Chem.-Biol. Interactions* **37**, 13-24, 1981
- 30) Abe, H., Sakaguchi, M., Anno, M. and Arichi, S. : Erythrocyte membrane stabilization by plant saponins and sapogenins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **316**, 262-265, 1981
- 31) Recknagel, R.O., Glende, E.A. Jr. and Hruszkewycz, A.M. : Chemical mechanism in carbon tetrachloride toxicity. In "Free Radical in Biology" (Ed. by W.A. Pryor), Academic Press Inc., New York, vol. III, p 97-132, 1977
- 32) Slater, T.F. : Activation of carbon tetrachloride : Chemical principles and biological significance. In "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer" (Ed. by D.C.H. McBrien and T.F. Slater), Academic Press Inc., London, p 243-274, 1982
- 33) 戸田静男, 谷沢久之, 有地 滋, 滝野吉雄 : 生薬メタノールエキスのリノール酸空気酸化抑制作用. *薬学雑誌* **104**, 394-397, 1984