

Lipopolysaccharide による糸球体内皮細胞障害に対する柴苓湯の効果

新田 孝作*, 内田 啓子, 筒井 貴朗, 大岡 弘之, 湯村 和子, 二瓶 宏

東京女子医科大学第4内科

Effect of Sairei-to on the lipopolysaccharide-induced glomerular endothelial cell injury

Kosaku NITTA*, Keiko UCHIDA, Takaaki TSUTSUI, Hiroyuki OZU,
Wako YUMURA and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine, Kidney Center, Tokyo Women's Medical College

(Received August 21, 1993. Accepted November 16, 1993.)

Abstract

Using cultured bovine glomerular endothelial cells (GEN), we investigated the effect of Sairei-to (TJ-114, Tsumura Co.) on lipopolysaccharide (LPS)-induced microvascular endothelial cell injury. Cell injury was estimated by cell detachment assay and lactate dehydrogenase (LDH) release. LPS induced GEN injury in a dose and time dependent manner. Ten micrograms of Sairei-to suppressed the GEN injury induced by 1 μ g/ml of LPS ($p < 0.05$). In addition, PCOOH concentrations in the supernatant of GEN incubated with 1 μ g/ml of LPS, and the PCOOH release was inhibited by 10 μ g/ml of Sairei-to. These results suggest that Sairei-to has protective effects against LPS-induced GEN injury and this effect might be due to the suppression of PCOOH release.

Key words Glomerular endothelial cells, Lipopolysaccharide, Sairei-to, Free radicals.

Abbreviations GEN, glomerular endothelial cells ; LPS, lipopolysaccharide ; LDH, lactate dehydrogenase.

緒 言

Lipopolysaccharide (LPS) などのエンドトキシンを介する内皮細胞障害は、ヒトの敗血症性ショックの病因として重要である。内皮細胞が障害されると、血管透過性が亢進し、血液成分が直接的に内皮下のコラーゲンに接することにより血栓を形成する。また、内皮細胞の剥離により炎症細胞や炎症性メディエーターが周囲組織に入り込み易くなる。この様にエンドトキシンによる内皮細胞障害はエンドトキシン・ショックの初期病変として重要である。

糸球体内皮細胞は糸球体毛細血管係蹄の内面を被覆する単層の細胞群で、基底膜様構造を介さず平滑筋細胞に類似するメサングウム細胞と隣接している。糸球体内皮細胞の障害は糸球体障害の trigger

になっている可能性がある。そこで、我々は培養ウシ糸球体内皮細胞を用いて、LPS による内皮細胞障害の *in vitro* モデルを確立し、漢方薬の一種である柴苓湯 (TJ-114, ツムラ) の効果を検討したので報告する。

材料と方法

(1) 糸球体内皮細胞の培養: 既報¹⁾のごとく、成牛の腎より単離した糸球体をコラーゲナーゼ処理して得た細胞浮遊液をゼラチン塗布した culture plate にまき、初代培養した。クロニング・シリンドーで目的とするクローンを選別し、第VIII因子関連抗原が陽性で、アセチル化 LDL の取り込みを認めた細胞を糸球体内皮細胞と同定した。5 U/ml ヘパリン, 2 ng/ml fibroblast growth factor (FGF), 15 %

*〒162 東京都新宿区河田町8-1
8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

fetal calf serum (FCS) および抗生剤を含む RPMI 1640 培地で培養した。2 日ごとに液交換をし、0.05 % トリプシンで継代した。実験には 3-9 代目までの細胞を用いた。

(2) **実験プロトコール**：糸球体内皮細胞を 6-well culture plate に confluent になるまで培養した。ついで、phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) で 3 回洗浄した。さらに、 10^{-9} から 10^{-5} g/ml の LPS および $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯を含む 15 % FCS 加 RPMI 1640 培地 (medium A) で 6, 12 および 24 時間インキュベートした。コントロールとして medium A あるいは LPS のみを含む medium A とインキュベートした。形態学的変化は位相差顕微鏡で観察した。

(3) **Cell detachment assay**：Cell detachment assay は Wall らの方法²⁾に従って行った。細胞を 5×10^5 個/well の割合で 12-well culture plate に培養した。上記のプロトコールでインキュベート後、0.25 % トリプシンで細胞浮遊液とし血算板で細胞数を算定した。

(4) **Lactate dehydrogenase (LDH) release**：既報³⁾のごとく、培養上清を UV rate 法 (東芝 80FR) で測定した。Maximal release は凍結融解を 3 回繰り返した際の値で、spontaneous release は medium A でインキュベートした際の値を示す。% LDH release は以下の式で求めた。

$$\frac{\text{LDH test-LDH spontaneous}}{\text{LDH max-LDH spontaneous}} \times 100\%$$

(5) **培養上清中の PCOOH 濃度の測定**：Miyazawa⁴⁾らの方法に準じて、培養上清中の PCOOH 濃度を high performance liquid chromatography (HPLC) で測定した。

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。有意差は ANOVA で検定し、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

結 果

柴苓湯の濃度依存性に関しては、基礎実験で $10 \mu\text{g/ml}$ が至適と考えられた。その理由として、 $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度では LPS を添加した糸球体内皮細胞の増殖性に影響を及ぼさず、 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では難溶性で、糸球体内皮細胞の生物活性を低下させたためである。Fig. 1 に $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯の非存在下 (a) および存在下 (b) での $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS と 12 時間インキュベートした場合の糸球体内皮細胞の位

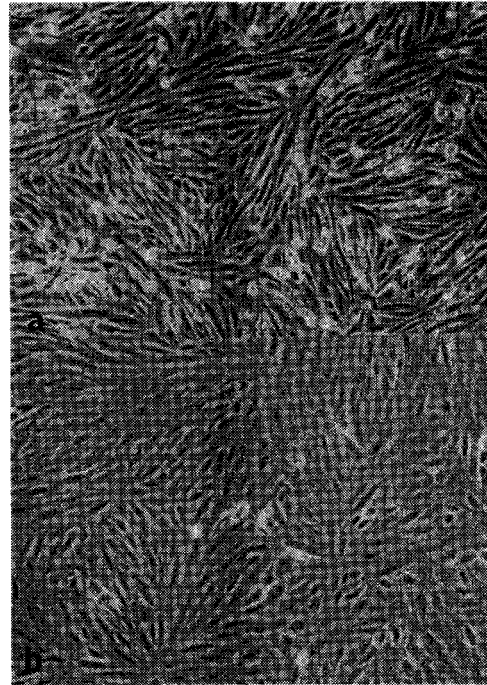


Fig. 1 Changes in morphology of bovine glomerular endothelial cells induced by $1 \mu\text{g/ml}$ of LPS without (a) or with $10 \mu\text{g/ml}$ of Sairei-to (b) $\times 200$.

Table I Effect of LPS and incubation time on bovine glomerular endothelial cell detachment. Each of the values were mean $\pm$ S.D. of three experiments. * $p < 0.05$ as compared to control (medium A only).

	CELL COUNT ($\times 10^5$)		
	INCUBATION TIME		
	6	12	24
CONTROL	5.1 ± 0.8	5.2 ± 0.3	5.0 ± 0.8
LPS 10^{-9} g/ml	5.0 ± 0.2	4.9 ± 0.6	$4.4 \pm 0.9^*$
LPS 10^{-7} g/ml	5.3 ± 0.6	$4.0 \pm 0.4^*$	$3.4 \pm 0.2^*$
LPS 10^{-5} g/ml	$4.2 \pm 0.4^*$	$3.1 \pm 0.2^*$	—

* $p < 0.05$ vs CONTROL

相差顕微鏡写真を示す。柴苓湯存在下においては、明らかに細胞の円形化や凝集が減少していた。

Cell detachment は LPS による大動脈内皮細胞障害を検討する上で、細胞融解より細胞毒性を示す鋭敏な指標と考えられている。Table I に示すように、糸球体内皮細胞の剥離による有意な細胞数の減少をきたす LPS の濃度と時間は、 10 ng/ml では 24

時間, $1 \mu\text{g/ml}$ では 12 時間および $100 \mu\text{g/ml}$ では 6 時間目からであった。

種々の濃度の LPS と 12 時間インキュベートした場合の糸球体内皮細胞剥離の割合を Fig. 2 に示す。柴苓湯非存在下では, LPS に対する糸球体内皮細胞の反応性は高く, $1 \mu\text{g/ml}$ でほぼプラトーに達した。また, $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯存在下で, LPS による糸球体内皮細胞の剥離予防効果は $1 \mu\text{g/ml}$ より認められた。さらに, $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS による細胞障害は $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯の共存下で 12 時間目より抑制された (Fig. 3)。

一方, medium A のみと 12 時間インキュベートした場合の培養上清中の PCOOH 濃度を 100 % とした場合, $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS 添加により有意に PCOOH 濃度は上昇した。さらに, $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯の共存下では, PCOOH 産生量は約 36 % 抑制された (Fig. 4)。

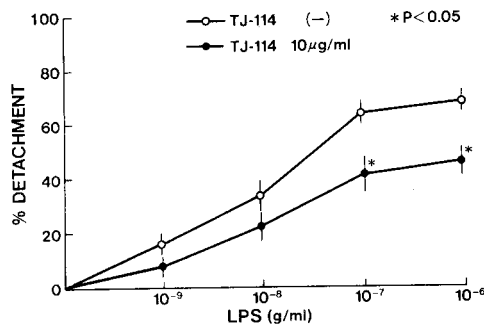


Fig. 2 Dose dependence of LPS-mediated bovine glomerular endothelial cell detachment with (—●—) or without (—○—) $10 \mu\text{g/ml}$ of Sairei-to.

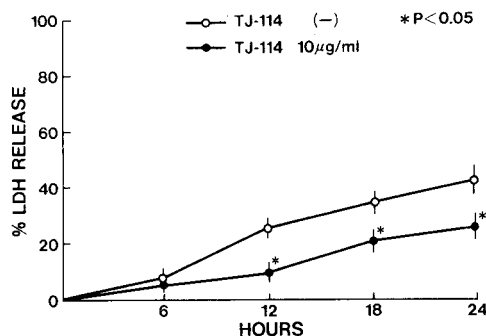


Fig. 3 Time course of $1 \mu\text{g/ml}$ LPS-mediated bovine glomerular endothelial cell injury estimated % LDH release with (—●—) or without (—○—) $10 \mu\text{g/ml}$ of Sairei-to.

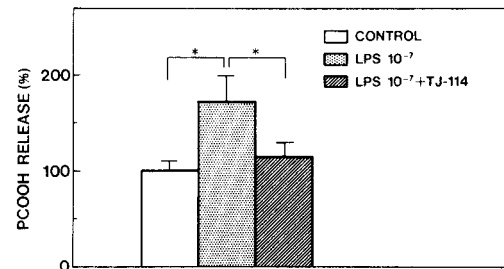


Fig. 4 Effect of $10 \mu\text{g/ml}$ Sairei-to on PCOOH release of bovine glomerular endothelial cells induced by $1 \mu\text{g/ml}$ of LPS.

考 察

Harlan ら⁵⁾ は, 初めて LPS による大動脈内皮細胞障害を報告した。その障害は濃度および時間依存性で, 細胞剥離に続く細胞融解が特徴であった。また, LPS による内皮細胞障害は低温 (4°C) で抑制されたが, インドメサシン, リドカイン, クロールプロマジン, メチルプレドニゾロン, プロテアーゼ阻害剤, カタラーゼ, superoxide dismutase など抑制されなかった。つまり, LPS による内皮細胞障害は補体非依存性で, 蛋白合成阻害剤, プロスタグランディン合成阻害剤, 活性酸素産生阻害剤などで阻止できなかったと報告した。

我々は, *in vitro* で LPS による微小血管内皮細胞障害を検討するため, 糸球体内皮細胞を用いた。糸球体内皮細胞は LPS に対する感受性が高く, $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS で 12 時間以上インキュベートした場合に, cell detachment assay でみた細胞障害は有意であった。また, $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯はこの糸球体内皮細胞の障害を有意に抑制した。さらに, $10 \mu\text{g/ml}$ の柴苓湯は LPS の活性酸素産生促進作用を抑制し, これが LPS による糸球体内皮細胞障害の抑制作用の一部を担っていると考えられた。大動脈内皮細胞に比し, 活性酸素による障害に感受性が高いことを示唆するものである。

和漢薬に活性酸素の産生を抑制する作用があることは既に報告されている⁶⁾。和漢薬の中には種々の物質が含まれている。このうちポリフェノール化合物であるタンニンには過酸化脂質生成抑制作用があることが報告されており, スカベンジャー作用を有することがわかっており, 一部はその作用によるものと考えられる⁷⁾。また, サイコサポニン-d にも強い活性酸素抑制作用があるとの報告もある⁸⁾。いずれに

しても、柴苓湯は種々の成分の合剤であり、それらの成分の相互作用によると考えられた。

結 論

柴苓湯は LPS による糸球体内皮細胞障害を阻止する。その効果の一部に柴苓湯による活性酸素の産生抑制作用が関与していると考えられた。

尚、本研究の一部は第 10 回和漢医薬学会（富山）で発表した。

文 献

- 1) 新田孝作, 内田啓子: ウシ腎糸球体内皮細胞の培養法. 血管と内皮, **3**, 78-80, 1993.
- 2) Wall, R.T., Harlan, J.M., Harker, L.A. *et al.*: Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro. *Thromb Res*, **18**, 113-118, 1980.
- 3) Nitta, K., Uchida, K., Tsutsui, T. *et al.*: Cyclosporin A induced glomerular endothelial cell injury in vitro. *Acta Pathol Jpn*, **43**, 367-371, 1993.
- 4) Miyazawa, T.: Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radical Biol Med*, **7**, 209-217, 1989.
- 5) Harlan, J.M., Laurence, M.D., Harker, A. *et al.*: Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest*, **48**, 269-274, 1983.
- 6) 青柳一正, 成田光陽: 活性酸素と腎障害: 和漢薬の効果. 和漢医薬学会誌, **4**, 215-220, 1987.
- 7) 木村善行, 奥田哲道: 抗酸化剤としての和漢薬. 日本臨床, **46**, 2286-2291, 1988.
- 8) 青柳一正, 成田光陽: 和漢薬と活性酸素. 腎と透析 (別冊), **26**, 25-29, 1989.