

α -Naphthylisothiocyanate 投与ラットの肝胆道障害の進行に伴う血清と肝臓中の脂質成分レベルの変動に対する柴胡桂枝湯と四逆散エキスの抑制効果

太田 好次*, 金剛むつみ, 西田 圭志, 佐々木恵美, 石黒伊三雄

藤田保健衛生大学医学部生化学教室

Preventive effects of Saiko-keishi-to and Shigyaku-san extracts on changes in levels of serum and liver lipid components with the progression of hepatobiliary injury in rats injected with α -naphthylisothiocyanate

Yoshiji OHTA*, Mutsumi KONGO, Keiji NISHIDA, Emi SASAKI and Isao ISHIGURO

Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University

(Received December 8, 1997. Accepted February 12, 1998.)

Abstract

We examined the preventive effects of Saiko-keishi-to (TJ-10) and Shigyaku-san (TJ-35) extracts on the changes in serum and liver lipid components with the progression of hepatobiliary injury in male Wistar rats (seven weeks old) with a single intraperitoneal injection of α -naphthylisothiocyanate (ANIT) (75 mg/kg body weight). Hepatobiliary injury occurred 24 h after ANIT injection and progressed at 48 h. At 24 h after ANIT injection, serum total cholesterol (T-Chol) and nonesterified fatty acid (NEFA) concentrations increased and liver cholesterol (Chol) content decreased. At 48 h after ANIT injection, further increases in serum T-Chol and NEFA concentrations and a further decrease in liver Chol content occurred with an increase in serum triglyceride (TG) concentration and a decrease in liver TG content. ANIT-injected rats orally received either TJ-10 (0.26, 1.3 or 2.6 g/kg body weight) or TJ-35 (0.15, 0.75 or 1.5 g/kg body weight) at 24 h after the injection. TJ-10 at a dose of 2.6 g/kg body weight prevented the increase of serum T-Chol concentration and the decrease of liver Chol content found at 48 h after ANIT injection, while TJ-35 dose-dependently prevented these changes. But, neither TJ-10 nor TJ-35 had any effect on the increases of serum NEFA and TG concentrations and the decrease of liver TG content found at 48 h after ANIT injection at any dose used. These results indicate that orally administered TJ-10 and TJ-35 can prevent the changes in serum and liver Chol levels with the progression of ANIT-induced hepatobiliary injury in rats and that the preventive effect due to TJ-35 is stronger than that due to TJ-10.

Key words α -naphthylisothiocyanate, hepatobiliary injury (rat), Saiko-keishi-to, Shigyaku-san, lipid components.

*〒470-1192 豊明市沓掛町田楽カ窪1-98

1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

緒 言

α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) 含有飼料を2日間経口投与したラットでは、血清中の総コレステロール (total cholesterol; T-Chol), 中性脂肪 (triglyceride; TG), 遊離脂肪酸 (nonesterified fatty acid; NEFA) などの脂質成分のレベルは上昇するが、柴胡に含まれているサイコサポニン a は ANIT と併用投与するとこれらの血清脂質レベルの上昇を抑制することが報告されている¹⁾。著者らも ANIT を1回腹腔内投与したラットにおいて、血清 T-Chol レベルが肝胆道障害の発症と進行に伴って上昇することを明らかにした²⁾。柴胡桂枝湯や四逆散は胆道疾患の治療に用いられている漢方薬である³⁾。著者らは柴胡桂枝湯エキス剤 (TJ-10) と四逆散エキス剤 (TJ-35) を ANIT 単回投与ラットに肝胆道障害発症後の時点で経口投与すると、両エキス剤が肝胆道障害の進行を抑制すると共に、その障害の進行に伴う血清 T-Chol レベルの上昇に対しても抑制効果を示すことを報告した²⁾。

そこで、著者らは柴胡桂枝湯と四逆散の ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う脂質代謝の変動に対する抑制効果を更に明らかにする目的で、ANIT 投与ラットに TJ-10 と TJ-35 を肝胆道障害発症後に経口投与し、その障害の進行に伴う血清 T-Chol 濃度の変動に対する抑制効果と共に、血清 TG と NEFA 濃度および肝 Chol と TG 量の変動に対する抑制効果について調べた。

材料と方法

(1) 実験動物：日本エスエルシー社 (浜松) より購入し、オリエンタル固形飼料 MF (オリエンタル酵母社製) 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：柴胡 (5.0 g), 黄芩 (2.0 g), 半夏 (4.0 g), 生姜 (1.0 g), 大棗 (2.0 g), 甘草 (2.0 g), 人參 (2.0 g), 桂皮 (2.0 g), 芍薬 (3.0 g) の9生薬で構成された柴胡桂枝湯エキス剤 (TJ-10; Lot. No. 260010020) と柴胡 (5.0 g), 芍薬 (4.0 g), 枳実 (2.0 g), 甘草 (1.5 g) の4生薬で構成された四逆散エキス剤 (TJ-35; Lot. No. 910 0359002 PO) は (株) ツムラより供与されたエキス原末を用いた。両エキスの収率はともに 16 % であった。ANIT は Sigma 社製 (St. Louis, MO, U.S.A.) を使用した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

(3) 実験方法：熊沢ら⁴⁾の方法に従い、15時間絶食させたラットにオリーブ油に溶解した ANIT (75 mg/kg

体重) を1回腹腔内投与して肝障害を惹起させた。その対照群には同量のオリーブ油を腹腔内投与した。これらのラットは ANIT 投与後 24 と 48 時間の時点で体重を測定し、エーテル麻酔下で屠殺した。また、TJ-10 と TJ-35 の投与量はそれぞれの成人1回投与量 (TJ-10 は 1.3 g, TJ-35 は 0.75 g) を基準として決定された。TJ-10 は体重 1 kg 当たり 0.26, 1.3 および 2.6 g を、また TJ-35 は体重 1 kg 当たり 0.15, 0.75 および 1.5 g を投与し、これらの投与量は成人の体重を 60 kg とすると、成人の 12, 60 および 120 倍の投与量に相当した。両エキス剤は蒸留水に懸濁し、それぞれ 15 時間絶食させたラットに ANIT 投与 24 時間後の時点で経口投与した。これらのラットは ANIT 投与 48 時間後に体重を測定し、エーテル麻酔下で屠殺した。なお、すべてのラットは屠殺前 15 時間は絶食状態とした。屠殺時に下大静脈より採取した血液より分離した血清は種々の生化学的検査に用いた。また、屠殺時において肝臓は冷 0.15 M KCl で十分に灌流し、血液を除去した後に摘出し、その湿重量を測定した。

肝胆道障害の生化学的検査としてはアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase; ALT), γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -glutamyl transpeptidase; γ -GTP), 総ビリルビン (total bilirubin; T-Bil), 総胆汁酸 (total bile acid; T-BA) などを測定した。これらの測定はすべて市販の測定キットを用いて行った。肝臓中の Chol と TG は、それぞれ α -フタルアルデヒド法⁵⁾ およびアセチルアセトン法⁶⁾ によって測定した。

各群の各測定値は平均 $\pm$ S.D. で表し、また各測定値の各群間での有意差の検定は ANOVA の Fisher-PLSD 法を用いて行い、危険率が 5 % 以下を有意とした。

結 果

1. ANIT 投与 24 と 48 時間後における体重と肝重量並びに血清 ALT と γ -GTP 活性および T-Bil と T-BA 濃度

ANIT 投与群と対照群の体重には ANIT 投与 24 と 48 時間後で有意な差はなかったが、肝重量には有意な差がみられ、投与 24 と 48 時間後での ANIT 投与群の肝重量はそれぞれ対照群の 1.6 および 1.2 倍であった (Fig. 1-A と B)。また、体重 100 g 当たりの肝重量 (相対肝重量) について調べても、ANIT 投与群の肝臓はその投与 24 と 48 時間後では対照群よりも有意に重かった (Fig. 1-C)。従って、肝臓中の測定した脂質成分の量は相対肝重量を用いて表した。また、ANIT 投与群の血清 ALT と γ -GTP 活性および T-Bil と T-BA 濃度はその投与 24

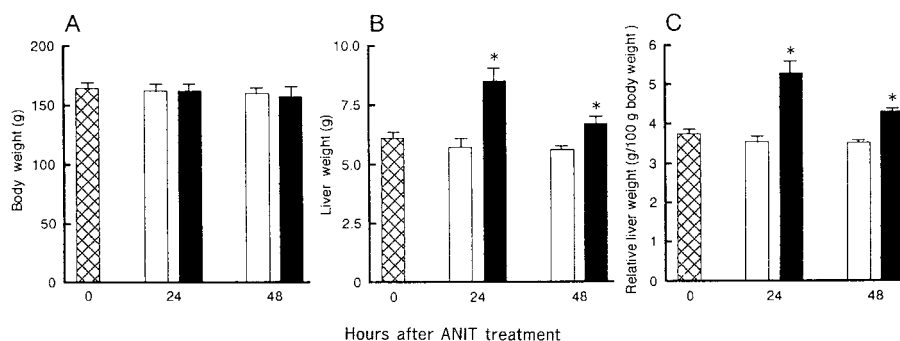


Fig. 1 Changes in body weight (A), liver weight (B), and relative liver weight (C) in rats following intraperitoneal injection of α -naphthylisothiocyanate (ANIT). Rats injected intraperitoneally with either ANIT (75 mg/kg body weight) dissolved in olive oil (closed bar) or olive oil alone (open bar) were weighed 24 and 48 h after the injection and then sacrificed. Untreated rats (crosshatched bar) were weighed and then sacrificed just before ANIT injection. Livers were removed and weighed. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10). *, $p < 0.05$ (vs. control rats).

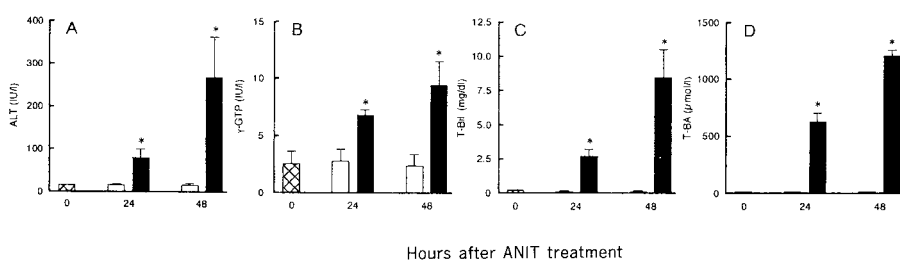


Fig. 2 Changes in alanine aminotransferase (ALT) (A) and γ -glutamyl transferase (γ -GTP) (B) activities and total bilirubin (T-Bil) (C) and total bile acid (T-BA) (D) concentrations in the serum of rats following intraperitoneal injection of α -naphthylisothiocyanate (ANIT). Rats injected intraperitoneally with either ANIT (75 mg/kg body weight) dissolved in olive oil (closed bar) or olive oil alone (open bar) were sacrificed 24 and 48 h after the injection. Serum ALT, γ -GTP, T-Bil, and T-BA were measured as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10). *, $p < 0.05$ (vs. control rats).

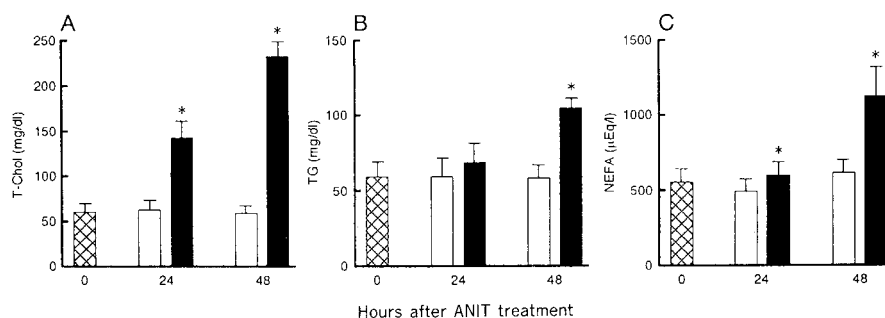


Fig. 3 Changes in total cholesterol (T-Chol) (A), triglyceride (TG) (B), and nonesterified fatty acid (NEFA) (C) concentrations in the serum of rats following intraperitoneal injection of α -naphthylisothiocyanate (ANIT). Rats injected intraperitoneally with either ANIT (75 mg/kg body weight) dissolved in olive oil (closed bar) or olive oil alone (open bar) were sacrificed 24 and 48 h after the injection. Untreated rats (crosshatched bar) were sacrificed just before ANIT injection. Serum T-Chol, TG, and NEFA were measured as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10). *, $p < 0.05$ (vs. control rats).

時間後で有意に上昇し、投与 48 時間後では更に上昇した (Fig. 2)。

2. ANIT 投与 24 と 48 時間後における血清 T-Chol, TG および NEFA 濃度並びに肝 Chol と TG 量

ANIT 投与群の血清 T-Chol と NEFA 濃度はその投与 24 と 48 時間後では有意に上昇し、投与 24 時間後ではそれぞれ対照群の 2.3 および 1.2 倍、投与 48 時間後ではそれぞれ対照群の 4.0 および 1.8 倍であった (Fig. 3-A

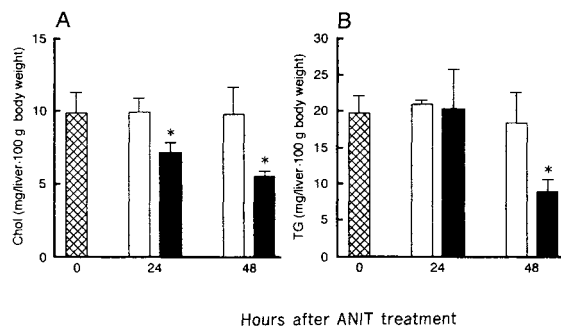


Fig. 4 Changes in cholesterol (Chol) (A) and triglyceride (TG) (B) contents in the liver of rats following intraperitoneal injection of α -naphthylisothiocyanate (ANIT). Rats injected intraperitoneally with either ANIT (75 mg/kg body weight) dissolved in olive oil (closed bar) or olive oil alone (open bar) were sacrificed 24 and 48 h after the injection. Untreated rats (crosshatched bar) were sacrificed just before ANIT injection. Liver Chol and TG were measured as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10). *, $p < 0.05$ (vs. control rats).

と C)。ANIT 投与群の血清 TG 濃度はその投与 48 時間後で有意に上昇し、対照群の 1.8 倍であった (Fig. 3-B)。ANIT 投与群の肝 Chol 量はその投与 24 と 48 時間後では有意に減少し、それぞれ対照群の 72 および 56 % であった (Fig. 4-A)。また、ANIT 投与群の肝 TG 量はその投与 48 時間後において有意に減少し、対照群の 48 % であった (Fig. 4-B)。

3. ANIT 投与による肝重量の変動に対する TJ-10 と TJ-35 経口投与の影響

ANIT 投与 48 時間後での肝重量の増加は投与 24 時間後に 0.26, 1.3 および 2.6 g/kg 体重の TJ-10 を ANIT 投与群に経口投与すると、1.3 と 2.6 g/kg 体重の投与量において有意に抑制された (Table I)。ANIT 投与 48 時間後での肝重量の増加は、投与 24 時間後に 0.15, 0.75 および 1.5 g/kg 体重の TJ-35 を ANIT 投与群に経口投与しても抑制されなかった (Table I)。また、ANIT 投与 48 時間後の相対肝重量の増加は 1.3 と 2.6 g/kg 体重の TJ-10 経口投与によって有意に抑制されたが、TJ-35 経口投与ではいずれの投与量においても抑制されなかった (Table I)。また、TJ-10 と TJ-35 単独投与群では、それらのエキス剤のいずれの投与量でも肝重量および相対肝重量に変動は認められなかった (Table I)。

4. ANIT 投与による血清 T-Chol, TG および NEFA 濃度の変動に対する TJ-10 と TJ-35 経口投与の影響

ANIT 投与 48 時間後での血清 T-Chol 濃度の上昇は ANIT 投与 24 時間後に 0.26, 1.3 および 2.6 g/kg 体重の TJ-10 を ANIT 投与群に経口投与すると、2.6 g/kg 体重の投与量において有意に抑制されたが、投与 48 時間後

Table I Effects of post-oral administrations of TJ-10 and TJ-35 on liver weight and its relative weight in rats injected intraperitoneally with α -naphthylisothiocyanate (ANIT).

	Liver weight (gram)	Relative liver weight (g/100 g body weight)
Control	7.71 $\pm$ 0.37	3.76 $\pm$ 0.27
TJ-10 (0.26 g/kg)	7.88 $\pm$ 0.38	3.79 $\pm$ 0.22
TJ-10 (1.3 g/kg)	7.59 $\pm$ 0.43	3.50 $\pm$ 0.15
TJ-10 (2.6 g/kg)	7.23 $\pm$ 0.51	3.50 $\pm$ 0.26
TJ-35 (0.15 g/kg)	8.26 $\pm$ 0.46	3.96 $\pm$ 0.20
TJ-35 (0.75 g/kg)	7.59 $\pm$ 0.43	3.81 $\pm$ 0.16
TJ-35 (1.5 g/kg)	8.23 $\pm$ 0.62	3.91 $\pm$ 0.25
ANIT	8.93 $\pm$ 0.43*	4.69 $\pm$ 0.21*
ANIT+TJ-10 (0.26 g/kg)	8.23 $\pm$ 0.75*	4.21 $\pm$ 0.33*
ANIT+TJ-10 (1.3 g/kg)	8.18 $\pm$ 0.43*#	4.13 $\pm$ 0.16*#
ANIT+TJ-10 (2.6 g/kg)	7.91 $\pm$ 0.52*#	3.98 $\pm$ 0.20*#
ANIT+TJ-35 (0.15 g/kg)	8.71 $\pm$ 0.48*	4.45 $\pm$ 0.15*
ANIT+TJ-35 (0.75 g/kg)	9.05 $\pm$ 0.47*	4.76 $\pm$ 0.28*
ANIT+TJ-35 (1.5 g/kg)	9.49 $\pm$ 0.48*	4.66 $\pm$ 0.18*

Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10). *, $p < 0.05$ (vs. control) ; #, $p < 0.05$ (vs. ANIT).

Table II Effects of post-oral administrations of TJ-10 and TJ-35 on concentrations of total cholesterol (T-Chol), triglyceride (TG), and nonesterified free fatty acid (NEFA) in the serum of rats injected intraperitoneally with α -naphthylisothiocyanate (ANIT).

	T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	NEFA (μ Eq/l)
Control	64.5 $\pm$ 9.1	58.5 $\pm$ 8.8	609 $\pm$ 91
TJ-10 (0.26 g/kg)	62.7 $\pm$ 8.0	62.3 $\pm$ 11.3	532 $\pm$ 97
TJ-10 (1.3 g/kg)	64.1 $\pm$ 5.5	55.5 $\pm$ 17.1	647 $\pm$ 64
TJ-10 (2.6 g/kg)	64.1 $\pm$ 3.9	57.0 $\pm$ 8.9	644 $\pm$ 84
TJ-35 (0.15 g/kg)	65.5 $\pm$ 8.5	63.9 $\pm$ 12.3	561 $\pm$ 49
TJ-35 (0.75 g/kg)	58.7 $\pm$ 5.9	58.0 $\pm$ 11.0	594 $\pm$ 61
TJ-35 (1.5 g/kg)	53.3 $\pm$ 5.7	60.6 $\pm$ 9.5	561 $\pm$ 86
ANIT	255.0 $\pm$ 18.3*	104.4 $\pm$ 6.9*	1120 $\pm$ 198*
ANIT+TJ-10 (0.26 g/kg)	241.6 $\pm$ 25.1*	98.0 $\pm$ 12.2*	1199 $\pm$ 170*
ANIT+TJ-10 (1.3 g/kg)	257.7 $\pm$ 36.2*	111.4 $\pm$ 25.0*	1124 $\pm$ 143*
ANIT+TJ-10 (2.6 g/kg)	220.0 $\pm$ 19.4*#	89.1 $\pm$ 14.8*	1238 $\pm$ 135*
ANIT+TJ-35 (0.15 g/kg)	232.3 $\pm$ 18.0*#	99.3 $\pm$ 18.3*	1281 $\pm$ 156*
ANIT+TJ-35 (0.75 g/kg)	214.3 $\pm$ 23.7*#	89.6 $\pm$ 18.0*	1103 $\pm$ 177*
ANIT+TJ-35 (1.5 g/kg)	187.6 $\pm$ 10.3*#	90.2 $\pm$ 14.0*	1297 $\pm$ 71*

Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10).*, $p < 0.05$ (vs. control) ; #, $p < 0.05$ (vs. ANIT).

Table III Effects of post-oral administrations of TJ-10 and TJ-35 on contents of cholesterol (Chol) and triglyceride (TG) in the liver of rats injected intraperitoneally with α -naphthylisothiocyanate (ANIT).

	Chol (mg/liver $\cdot$ 100 g body weight)	TG (mg/liver $\cdot$ 100 g body weight)
Control	9.8 $\pm$ 1.9	18.4 $\pm$ 4.2
TJ-10 (0.26 g/kg)	10.6 $\pm$ 2.0	19.9 $\pm$ 2.5
TJ-10 (1.3 g/kg)	10.5 $\pm$ 1.2	19.6 $\pm$ 6.8
TJ-10 (2.6 g/kg)	10.4 $\pm$ 1.9	19.5 $\pm$ 2.7
TJ-35 (0.15 g/kg)	9.7 $\pm$ 1.2	20.2 $\pm$ 4.1
TJ-35 (0.75 g/kg)	8.6 $\pm$ 1.2	16.5 $\pm$ 2.7
TJ-35 (1.5 g/kg)	10.7 $\pm$ 1.0	22.2 $\pm$ 4.4
ANIT	5.5 $\pm$ 0.4*	8.9 $\pm$ 1.7*
ANIT+TJ-10 (0.26 g/kg)	5.3 $\pm$ 0.9*	8.9 $\pm$ 2.6*
ANIT+TJ-10 (1.3 g/kg)	5.1 $\pm$ 0.7*	8.3 $\pm$ 1.3*
ANIT+TJ-10 (2.6 g/kg)	6.7 $\pm$ 0.8*#	9.1 $\pm$ 2.4*
ANIT+TJ-35 (0.15 g/kg)	5.9 $\pm$ 0.3*#	8.8 $\pm$ 2.1*
ANIT+TJ-35 (0.75 g/kg)	6.7 $\pm$ 0.8*#	8.4 $\pm$ 1.5*
ANIT+TJ-35 (1.5 g/kg)	7.1 $\pm$ 0.8*#	9.5 $\pm$ 1.8*

Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10).*, $p < 0.05$ (vs. control) ; #, $p < 0.05$ (vs. ANIT).

での血清 TG と NEFA 濃度の上昇はいずれの TJ-10 投与量においても抑制されなかった (Table II)。ANIT 投与 48 時間後での血清 T-Chol 濃度の上昇は投与 24 時間後に 0.15, 0.75 および 1.5 g/kg 体重の TJ-35 を ANIT 投与群に経口投与すると、いずれの投与量でも有意に抑制され、その抑制効果は濃度依存性であったが、投与 48 時間後での血清 TG と NEFA 濃度の上昇はいずれの

TJ-35 投与量においても抑制されなかった (Table II)。また、TJ-10 と TJ-35 単独投与群では、それらのエキス剤のいずれの投与量でも血清 T-Chol, TG および NEFA 濃度の変動は認められなかった (Table II)。

5. ANIT 投与による肝 Chol と TG 量の変動に対する TJ-10 と TJ-35 経口投与の影響

ANIT 投与 48 時間後での肝 Chol 量の減少は投与 24

時間後に ANIT 投与群に 0.26, 1.3 および 2.6 g/kg 体重の TJ-10 を経口投与すると, 2.6 g/kg 体重の投与量において有意に抑制されたが, 投与後 48 時間での肝 TG 量の減少はいずれの TJ-10 投与量においても抑制されなかった (Table III)。ANIT 投与 48 時間後での肝 Chol 量の減少は投与 24 時間後に 0.15, 0.75 および 1.5 g/kg 体重の TJ-35 を ANIT 投与群に経口投与すると, いずれの投与量においても有意に抑制され, その抑制効果は濃度依存性であったが, 投与 48 時間後での肝 TG 量の減少はいずれの TJ-35 投与量においても抑制されなかった (Table III)。また, TJ-10 と TJ-35 単独投与群では, それらのエキス剤のいずれの投与量でも肝 Chol と TG 量の変動は認められなかった (Table III)。

考 察

ANIT は肝薬物代謝酵素により代謝を受けて活性化物質となり, 胆汁酸の代謝を変化させたり, その輸送を障害して毛細胆管の障害, 胆管上皮細胞の壊死, 脱落を起こし, 肝実質細胞内に胆汁うっ滞を惹起することが示されている。^{7,9)} 本研究に用いた量の ANIT (75 mg/kg 体重) を 1 回腹腔内投与したラットでは, 投与 24 時間後で肝胆道障害が発症し, その障害は投与 48 時間後では明らかに進行していた。この ANIT 投与ラットにおける肝胆道障害の発症と進行は熊沢ら⁴⁾ の報告や既報²⁾ とよく一致していた。また, ANIT 惹起肝胆道障害時に血清中の T-Chol, TG, NEFA などのレベルは上昇することが明らかにされている。^{1,2)} 著者らも ANIT 単回投与ラットにおいて, 肝胆道障害の進行に伴う血清 T-Chol レベルの上昇は TJ-10 や TJ-35 の経口投与で抑制されることを報告している。²⁾

そこで, 著者らは ANIT 単回投与ラットにおいて, まず最初に肝胆道障害の発症と進行に伴う血清 T-Chol レベルと共に, 血清 TG と NEFA レベルの変動について調べた。その結果, この ANIT 惹起肝胆道障害の発症と進行に伴って血清 T-Chol 濃度ばかりでなく, 血清 NEFA 濃度が上昇し, またその障害の進行に伴って血清 TG 濃度も上昇することが明らかとなった。これらの結果は, 山本ら¹⁾ の ANIT 含有飼料 (40 mg/kg 体重/日) を 2 日間投与したラットにおける結果と一致していた。更に, この ANIT 惹起肝胆道障害の発症と進行に伴う肝臓中の Chol と TG 量の変動について調べると, 肝 Chol 量は障害の発症と進行に伴って減少し, また肝 TG 量は障害の進行に伴って減少した。これらの結果は, ANIT 惹起肝胆道障害の発症と進行に伴って脂質代謝が変動していることを示している。しかも, ANIT 惹起肝胆道障

害時における血清 T-Chol と TG 濃度の変動はそれぞれ肝 Chol および TG 量の変動とは逆の関係にあった。このことは, ANIT 単回投与ラットでは肝臓で生成された Chol は肝胆道障害が発症すると血液中に放出されやすくなり, またその放出は肝胆道障害の進行に伴って更に増し, また肝臓で生成された TG も肝胆道障害の進行に伴って血液中に放出されやすくなることを示唆している。ANIT 惹起肝胆道障害の発症と進行に伴って血清胆汁酸濃度は上昇することが知られている。^{2,7)} しかも, ANIT 惹起肝胆道障害時において肝臓中の胆汁酸量は著しく増加することが報告されている。⁹⁾ 胆汁酸は肝臓で Chol から生合成されるので, 上述した ANIT 惹起肝胆道障害の発症と進行に伴う肝 Chol 量の減少は血液中への Chol の放出促進ばかりでなく, 胆汁酸合成の亢進にも基づいている可能性が考えられる。また, 脂肪酸は肝臓での TG 生合成に用いられるので, ANIT 惹起肝胆道障害時における血清 NEFA 濃度の上昇は肝臓での TG 合成に利用される脂肪酸の不足を招いている可能性が考えられる。従って, 上述した ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う肝 TG 量の減少は TG の血液中への放出ばかりでなく, TG の生合成に利用される脂肪酸の不足によることが推察される。

次に, 著者らは ANIT 単回投与ラットにおいて, 投与 24 時間後の肝胆道障害が発症した時点で TJ-10 (0.26, 1.3 および 2.6 g/kg 体重) と TJ-35 (0.15, 0.75 および 1.5 g/kg 体重) をそれぞれ経口投与し, 両エキス剤の ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清 T-Chol 濃度と共に, 血清 TG と NEFA 濃度および肝 Chol と TG 量の変動に対する抑制効果について調べた。その結果, 既報²⁾ に示したと同様に, ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清 T-Chol 濃度の上昇は TJ-10 と TJ-35 の経口投与で抑制されたが, TJ-35 は濃度依存性の抑制効果を示したのに対し, TJ-10 は 2.6 g/kg 体重の高投与量においてのみ抑制効果を示した。また, ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う肝 Chol 量の減少は TJ-10 と TJ-35 の経口投与によって抑制されたが, 血清 T-Chol 濃度の場合と同様に, TJ-35 は濃度依存性の抑制効果を示したのに対し, TJ-10 は 2.6 g/kg 体重の高投与量においてのみ抑制効果を示した。これらの結果から, TJ-10 と TJ-35 は共に ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清と肝の Chol レベルの変動を抑制するが, その抑制効果は TJ-10 よりも TJ-35 の方が強いことが明らかとなった。既報²⁾ において, TJ-10 と TJ-35 は共に経口投与によって ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清 T-BA 濃度の上昇を抑制することが明らかにされている。従って, 両エキス剤は上述した ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴

う肝臓からの Chol の血液中への放出促進と肝臓での胆汁酸合成の亢進を阻害することによって、この肝胆道障害の進行に伴う血清と肝の Chol レベルの変動を抑制している可能性が推察される。しかしながら、この血清と肝の Chol レベルの変動に対する両エキス剤の抑制機序は現時点では明確でないで、更に検討しなければならない。一方、ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清 TG と NEFA 濃度の上昇および肝 TG 量の減少に対して、TJ-10 と TJ-35 は本研究に用いた量の経口投与では抑制効果を示さなかった。これらの結果から、TJ-10 と TJ-35 は経口投与によって ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清と肝の Chol レベルの変動を特異的に抑制することが示された。しかし、山本ら¹⁾は ANIT 含有飼料と柴胡に含まれるサイコサポニン a を 2 日間併用投与したラットでは、血清 T-Chol, TG, NEFA などのレベルの上昇は抑制されることを報告している。TJ-10 では柴胡が構成生薬の 1 つとなっているので、柴胡に含まれるサイコサポニン a の作用によって ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清 T-Chol 濃度の上昇ばかりでなく、血清 TG や NEFA 濃度の上昇も抑制されることが期待されたが、血清 TG や NEFA 濃度の上昇は抑制されなかった。従って、TJ-10 の ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清 T-Chol 濃度の上昇に対する抑制効果は柴胡に含まれるサイコサポニン a の作用に基づいていない可能性が考えられる。

また、本研究の ANIT 単回投与ラットにおいて、肝胆道障害時に肝重量と相対肝重量は増大することが認められた。これらの結果は Padova ら¹⁰⁾の報告と一致していた。この ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う肝重量と相対肝重量の増大は TJ-10 の経口投与では抑制されたが、TJ-35 の経口投与によって抑制されなかった。しかし、この TJ-10 の経口投与による ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う肝重量と相対肝重量の増大に対する抑制の機序は現時点では明らかでないで、更に検討する必要がある。

結 論

ANIT (75 mg/kg 体重) を 1 回腹腔内投与したラットにおいて、肝胆道障害の発症と進行に伴って血清-Chol

と NEFA 濃度の上昇および肝 Chol 量の増加がみられ、またその障害の進行に伴って血清 TG 濃度の上昇と肝 TG 量の減少が認められた。この ANIT 惹起肝胆道障害の発症後において TJ-10 と TJ-35 を経口投与すると、両エキス剤はその障害の進行に伴う血清と肝の Chol レベルの変動を抑制することが明らかになった。また、この ANIT 惹起肝胆道障害の進行に伴う血清と肝の Chol レベルの変動に対する抑制効果は TJ-10 よりも TJ-35 の方が強いことが示された。

References

- 1) Yamamoto, M., Uemura, T., Nakama, S., Uemiyu, M., Kasayama, S., Kishida, Y., Yamauchi, K., Komuta, K. and Kumagai, A.: Experimental and clinical studies of the treatment of chronic hepatitis with Bupleurum falcatum. *Proc. Symp. WAKAN - YAKU* **16**, 245-248, 1983.
- 2) Ohta, Y., Kongo, M., Nishida, K., Sasaki, E. and Ishiguro, I.: Preventive effects of Saiko-keishi-to and Shigyaku-san extracts on the progression of hepatobiliary injury induced by α -naphthylisothiocyanate. *J. Trad. Med.* **14**, 143-148, 1997.
- 3) Kikutani, T.: The treatment of biliary diseases by ethical Kampo drugs, applied to health insurance system. *J. Trad. Sino-Japanese Med.* **4** (1), 23-27, 1983.
- 4) Kumazawa, N., Ohta, S., Tu, S.-H., Kamogawa, A. and Shinoda, M.: Protective effects of various methanol extracts of crude drugs on experimental hepatic injury induced by α -naphthylisothiocyanate in rats. *Yakugaku Zasshi* **111**, 199-204, 1991.
- 5) Zlatkis, A. and Zak, R.G.: Study of a new cholesterol reagent. *Anal. Biochem.* **29**, 143-148, 1969.
- 6) Sardesai, V.M. and Manning, J.A.: The determination of triglycerides in plasma and tissues. *Clin. Chem.* **14**, 156-161, 1968.
- 7) Schaffner, F., Scharnbeck, H.H., Hutterer, F., Denk, H., Greim, H. A. and Popper, H.: Mechanism of cholestasis. VII. α -Naphthylisothiocyanate-induced jaundice. *Lab. Invest.* **28**, 321-331, 1973.
- 8) Fukumoto, Y., Okita, K., Kodama, T., Noda, K., Harada, T., Mizuta, M. and Takemoto, T.: Studies of α -naphthylisothiocyanate-induced hepatic disturbance. *Hepato-Gastroenterol.* **27**, 457-464, 1980.
- 9) Kossor, D.C., Meunier, P.C., Handler, J.A., Sozio, R. and Goldstein, R.S.: Temporal relationship of changes in hepatobiliary function and morphology in rats following α -naphthylisothiocyanate (ANIT) administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**, 108-114, 1993.
- 10) Padova, C.D., Padova, F.D., Tritapepe, R. and Stramentinoli, G.: S-Adenosyl-L-methionine protection against α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis in the rats. *Toxicol. Lett.* **29**, 131-136, 1985.