ブタ血清誘発ラット肝線維化モデルに対する小柴胡湯の抑制作用

松田　宗人,*[a] 小坂　昇,[a] 仲辻　俊二,[b] 粟田　則男[b]

鐘紡株式会社　[a]漢方研究所，[b]薬品開発第一研究所

The inhibitory effect of Sho-saiko-to on porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats

Muneto MATSUTA,*[a] Noboru KOSAKA,[a] Shunji NAKATSUJI,[b] Norio AWATA[b]

[a] *Traditional Chinese Medicine Research Laboratories,* [b] *New Drug R & D Laboratory, Kanebo Ltd.*

(*Received January 29, 1998. Accepted March 23, 1998.*)

Abstract

The effects of Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang, SHO) on porcine serum-induced hepatic fibrosis were investigated in rats. Porcine serum (0.5 ml/head) was intraperitoneally administered twice a week for 8 weeks. During the administration of porcine serum, rats were fed ad libitum the powdered diet containing SHO extract at 1.5 % or 4.5 %. In porcine serum-treated control group, plasma GOT and GPT levels were significantly increased, plasma prothrombin time was prolonged and hydroxyproline content in the liver was dramatically increased at the end of the experiment. These changes were significantly inhibited by SHO treatment. Histologically and morphometrically, hepatic fibrosis which appeared in control group was apparently ameliorated in SHO-treated groups. These results indicate that SHO inhibits porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats and may be useful in treatment of hepatic fibrosis in clinic.

Key words Sho-saiko-to, hepatic fibrosis, porcine serum, hydroxyproline.

Abbreviations SHO, Sho-saiko-to (小柴胡湯) ; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase ; GPT, glutamic pyruvic transaminase ; ALP, alkaline phosphatase ; TP, total protein ; A/G, albumin/globulin ratio ; PT, prothrombin time ; H.E., hematoxylin and eosin.

緒　言

我が国の慢性肝炎患者はおよそ120万人で,[1] このうちC型肝炎ウイルス（HCV）によるものが約80％を占めるといわれている。[2] HCV感染後の慢性化率は80％と極めて高く，さらに高率に肝硬変および肝癌へと進展すること，また発癌のリスクは肝の組織学的重症度，線維化の進行とともに高くなることが知られている。[3,4] このような背景から，慢性肝炎の治療は炎症と線維化を抑制して，病態の悪化すなわち肝硬変，肝癌への進展を遅らせることを主眼に実施されている。

C型慢性肝炎の治療薬としては現在インターフェロン製剤が最も有効であり，ウイルスの排除もしくは炎症を抑えることにより癌の発生を遅らせる可能性が示唆されている。[5] しかしながら，インターフェロンでウイルスが排除される著効例は約30～40％と少なく，無効例については他の治療法に頼らざるを得ないのが現状である。

小柴胡湯は二重盲検比較試験[6,7] においてトランスアミナーゼ低下作用が確認され，多くの慢性肝炎患者に使用されている漢方薬である。最近，本薬がC型慢性肝炎患者の血清線維化マーカーを改善することが報告さ

*〒534-8666 大阪市都島区友渕町 1-5-90
1-5-90, Tomobuchi-cho, Miyakojima-ku, Osaka 534-8666, Japan

れ,[8] また，伊東細胞の増殖を抑えて肝線維化を抑制することが示唆されており,[9] 肝癌発生抑制を視野に入れた慢性肝炎治療薬としての新たな期待が寄せられている。

今回著者らはラットの肝線維化モデルを用い，小柴胡湯の線維化に対する影響について検討し若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) **実験動物**：Wistar 系雄性ラット(7 週齢，160-180 g, 日本エスエルシー）を，恒温（24±1°C)，恒湿（55～60 %）の環境下で 1 週間以上予備飼育して 1 群 6～7 例で用いた。

(2) **薬物および投与方法**：ブタ血清（コスモ・バイオ）はラット 1 匹当たり 0.5 ml を週 2 回，8 週間腹腔内投与した。なお，normal 群にはブタ血清の代わりに生理食塩液（大塚製薬）を同様に腹腔内投与した。小柴胡湯エキス末（鐘紡）は通常の粉末飼料（CE-2, 日本クレア）中に 1.5 % および 4.5 % の割合で混合してブタ血清投与開始時より屠殺時まで自由に摂取させた。Control 群には小柴胡湯無添加粉末飼料を自由摂取させた。なお，小柴胡湯エキス末は，柴胡(7)，黄芩(3)，半夏(5)，生姜(1)，大棗(3)，人参(3)，甘草(2)を（　）内の構成比で水抽出（95～100°C）し，遠心濾過した抽出液を減圧濃縮後噴霧乾燥して収率約 22.5 % で得られたものを使用した。

(3) **血漿採取および肝臓摘出**：ブタ血清投与開始 4 および 8 週後（最終投与終了 2 日後）にエーテル麻酔下，腹部大動脈より全血採血し，血液生化学的検査用にはヘパリンナトリウム処理，血液凝固検査用には 3.2 % クエン酸ナトリウム溶液処理にて血漿を得た。肝臓を摘出し肉眼的観察および重量測定を行った後，一部を病理組織学的検査および hydroxyproline の定量に供した。

(4) **血液生化学的検査**：血漿中 GOT, GPT, アルカリフォスファターゼ(ALP)値，総タンパク(TP)，albumin 濃度および A/G は自動分析装置(7070，日立)を用いて，プロトロンビン時間（PT）は血液凝固自動測定装置（AMELUNG KC 10A, バクスター）を用いて測定した。

(5) **肝臓中 hydroxyproline の定量**：肝臓中 hydroxyproline はホモジナイズした肝を 6N HCl 存在下 115°C で 24 時間加水分解後，Nagatani らの方法[10]を用いて比色定量した。

(6) **病理組織学的検査**：肝組織を 10 % リン酸緩衝中性ホルマリンで固定後，常法に従いヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色およびアザン・マロリー染色標本を作製し，光学顕微鏡で観察した。

(7) **肝線維化率の計測**：各個体のアザン・マロリー染色標本から無作為に選択した 3 箇所(65 mm^2/標本領域)について，画像解析ソフト Mac SCOPE（三谷商事）により線維化率(%，青く染まった線維化領域の面積/観察した総面積×100)を求め，その平均値を各個体の線維化率とした。

(8) **統計処理**：実験データは平均値±標準誤差で示した。Normal 群と control 群の間の有意差は Student's t-test により，control 群と小柴胡湯投与群の間の有意差は一元配置分散分析の後 Dunnett's test により検定し，いずれも危険率 $p<0.05$ の場合を有意差ありとした。

結　　果

1．摂餌量および体重変化

ブタ血清投与開始 8 週後までの摂餌量は，各群間で明らかな差はなかった。体重に関しては，期間の後半に小柴胡湯 1.5 % 投与群で control 群に比べて有意な増加が認められたが，全体的に大きな差は認められなかった(Fig. 1)。

2．肝の肉眼的観察および肝重量

4 週後の肝臓の肉眼的観察では各群とも目立った変化

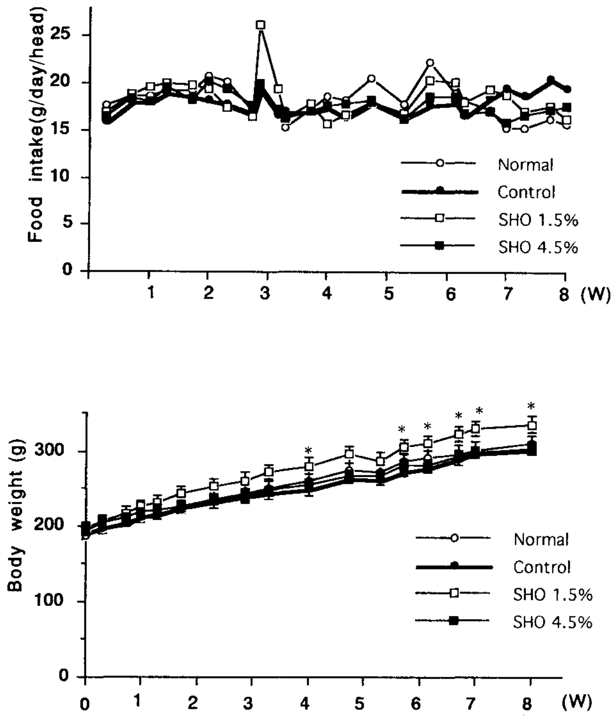

Fig. 1　Effects of Sho-saiko-to (SHO) on food intake and body weight in porcine serum-treated rats. Each value represents the mean±S.E. of 6-7 animals. *$p<0.05$, significantly different from the control (Dunnett's test).

Table I Effects of Sho-saiko-to (SHO) on liver weight, plasma total protein (TP) and albumin levels, A/G ratio and prothrombin time (PT) in porcine serum-treated rats.

Treatment	Liver weight (g/100 g b.w.)	TP (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	PT (sec)
Normal	3.31±0.09	6.27±0.08	4.03±0.08	1.82±0.06	13.75±0.09
Control	3.46±0.05##	6.58±0.10#	4.30±0.09#	1.90±0.04	14.20±0.07##
SHO 1.5 %	3.47±0.08	6.48±0.09	4.15±0.04	1.78±0.04	14.22±0.14
4.5 %	3.30±0.05	6.41±0.05	4.27±0.04	2.00±0.04	13.43±0.18**

Each value represents the mean±S.E. of 6-7 animals.
#$p<0.05$, ##$p<0.01$, significantly different from the normal (Student's t-test).
**$p<0.01$, significantly different from the control (Dunnett's test).

は認められず，肝重量も同様であった。

8週後のcontrol群の肝臓は腫大し，表面は微細顆粒状を呈した。小柴胡湯1.5%投与群の肝表面の状態はcontrol群と同様であったが，4.5%投与群では微細顆粒状の程度の軽減が認められた。肝の体重比重量はcontrol群でnormal群に比べて有意に増加した。小柴胡湯4.5%投与群では有意ではないがnormal群と同レベルまで減少した (Table I)。

3．血液生化学的検査

4週後の血漿GOT, GPTおよびALP値，TP, albumin, A/Gおよびプロトロンビン時間 (PT) には各群とも有意な変化は認められなかった（データは示していない)。

8週後の血漿中GOT, GPTおよびALP値はcontrol群で有意に上昇したが，小柴胡湯投与群では有意な上昇抑制が認められ，その作用は高用量投与群でより顕著であった (Fig. 2)。TPおよびalbumin濃度はcontrol群で有意な増加を示したが，小柴胡湯投与群ではcontrol群と比べて有意な差は見られなかった。A/Gはcontrol群および小柴胡湯投与群のいずれにおいてもnormal群

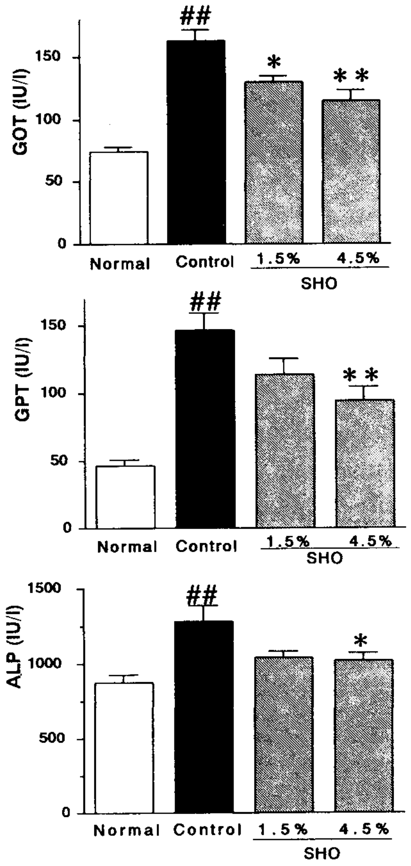

Fig. 2 Effects of Sho-saiko-to (SHO) on plasma GOT, GPT and ALP levels in porcine serum-treated rats. Each value represents the mean±S.E. of 6-7 animals. ##$p<0.01$, significantly different from the normal (Student's t-test). *$p<0.05$, **$p<0.01$, significantly different from the control (Dunnett's test).

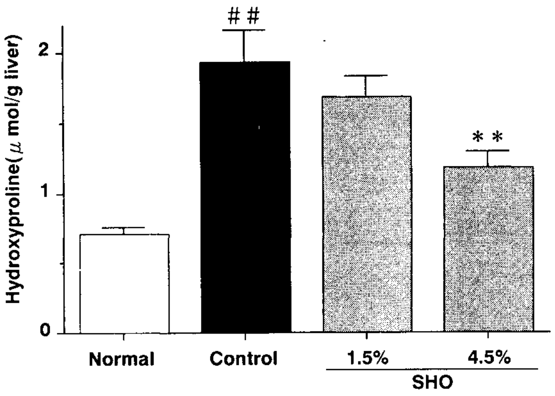

Fig. 3 Effect of Sho-saiko-to (SHO) on hepatic hydroxyproline content in porcine serum-treated rats. Each value represents the mean±S.E. of 6-7 animals. ##$p<0.01$, significantly different from the normal (Student's t-test). **$p<0.01$, significantly different from the control (Dunnett's test).

と差は認められなかった。PT に関しては，control 群で有意な延長が認められたが，小柴胡湯 4.5 % 投与群では有意な延長抑制が認められた（Table I）。

4．肝臓中 hydroxyproline 量

肝臓中 hydroxyproline 含量は 4 週後では各群とも著明な変化は認められなかった（データは示していない）。

8 週後では control 群で有意に増加したが，小柴胡湯投与群では減少作用が認められ，その作用は 4.5 % 投与群で有意であった（Fig. 3）。

5．病理組織学的検査

4 週後の control 群で門脈域および中心静脈域に肝細胞の軽度な変性・壊死および炎症反応が見られたが，病理組織学的に線維化を示す所見は観察されなかった。小柴胡湯 4.5 % 投与群では肝細胞の変性・壊死および炎症反応の領域は減少した（Fig. 4）。

8 週後の control 群では門脈域および中心静脈域に明らかな線維化が見られ，門脈や中心静脈間には膠原線維の架橋形成が見られた。また，これらの領域には肝細胞の軽度な変性・壊死および炎症反応も観察された。一方，小柴胡湯 4.5 % 投与群では線維化領域が明らかに減少

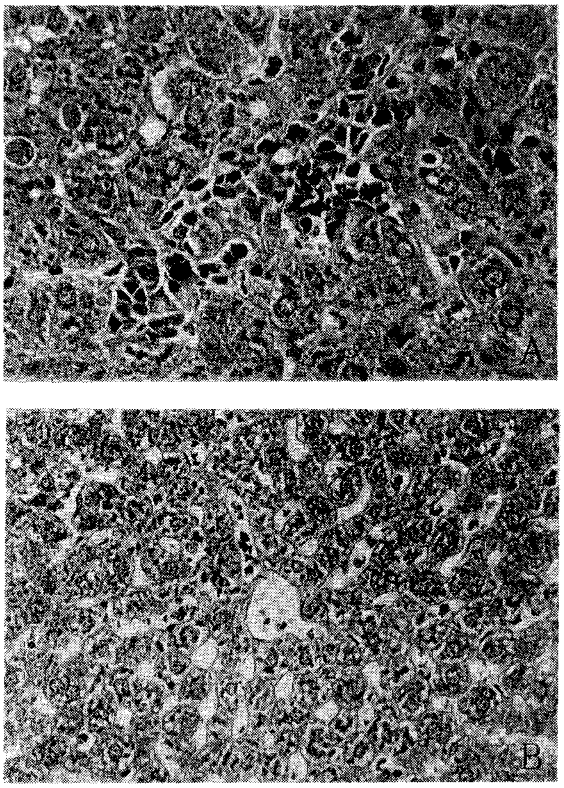

Fig. 4 Liver histopathology in porcine serum-treated rat for 4 weeks (H.E. stain).
A) Control (×557) B) Sho-saiko-to 4.5% (×371)

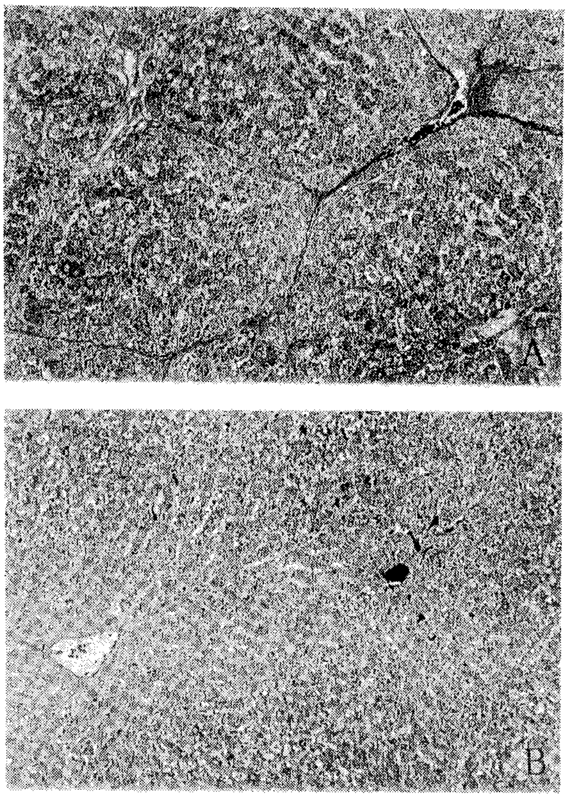

Fig. 5 Liver histopathology in porcine serum-treated rat for 8 weeks (Azan-mallory stain).
A) Control (×56) B) Sho-saiko-to 4.5% (×56)

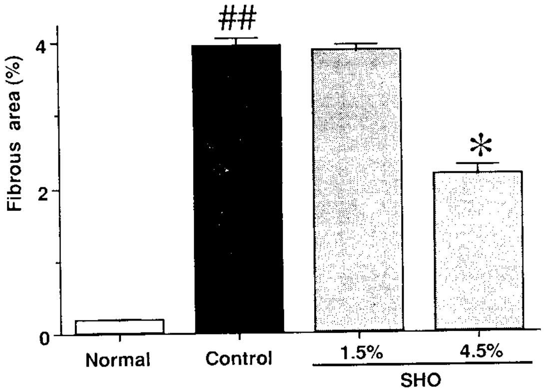

Fig. 6 Effect of Sho-saiko-to (SHO) on the degree of fibrous area in liver specimen of porcine serum-treated rats. Each value represents the mean±S.E. of 6-7 animals. ##$p<0.01$, significantly different from the normal (Student's t-test). *$p<0.05$, significantly different from the control (Dunnett's test).

し，肝細胞の変性・壊死もほとんど認められなかった(Fig. 5)。

6．肝線維化率

8週後のアザン・マロリー染色標本の画像解析により求めた肝線維化率は，control群で著明に上昇したが，小柴胡湯4.5％投与群では有意な低下が認められた(Fig. 6)。

考　　察

肝線維化の程度は慢性肝炎の病態進行すなわち肝硬変への進展度を予測する上で重要な指標であり，現在の医療現場では炎症と線維化を抑制することが慢性肝炎治療の最大の目的といわれている。肝の線維化は壊死肝細胞を貪食したクッパー細胞やその他の炎症細胞などが分泌する各種サイトカインにより，壊死巣内および近傍の伊東細胞が活性化されることでonsetされ，活性化伊東細胞が分裂･増殖するとともに筋線維芽細胞に形質転換し，コラーゲンをはじめ様々な細胞外マトリックスを産生することで起こると考えられている。[11)]

小柴胡湯は病理組織学的検査において本モデルによるラット肝細胞の傷害を抑え，かつ線維化領域を明らかに減少させた。このことは，血漿GOT, GPT値およびコラーゲンに特異的なアミノ酸であるhydroxyprolineの肝臓内含量が小柴胡湯投与群で低下したことと相関する。またcontrol群でみられたプロトロンビン時間(PT)の有意な延長が小柴胡湯投与群で回復したことも，本薬による肝機能障害の改善を示唆するものである。なお，今回の検討では通常の病理組織学的評価に加え，画像解析により線維化領域を数値化する組織計測学的評価を実施したことで，小柴胡湯の線維化抑制作用をより客観的に評価し得たと考えられる。

今回用いたブタ血清によるラット肝線維化モデルの発症機序については明らかにされていないが，本モデルは肝細胞の壊死・炎症をほとんど伴わずに線維化を来すといわれている。ちなみに，Amagayaら[12)]はブタ血清投与中の3ケ月間にわたり血清GPT値は有意な上昇を示さなかったと報告している。しかし，著者らの実験では8週間のブタ血清投与で血漿GOT, GPT値はnormal群の2～3倍にまで有意に上昇し，病理組織学的にも軽度の肝細胞壊死が観察された。この違いは週齢の差やブタ血清投与終了後採血までの時間の差によるものと考えられる。すなわち，著者らは7週齢から，一方Amagayaらは5週齢から実験を開始している。また，ブタ血清投与終了から採血までの時間に関しては，Amagayaらの場合は不明であるが，著者らは2日後であり，仮に両者に違いがあればそこで測定した血中トランスアミナーゼ(GOT, GPT)値にも差が生じるものと推察される。このことから，本モデルにおいてもある程度の肝細胞壊死や炎症がその引き金になり線維化が起こる可能性が考えられる。

小柴胡湯は二重盲検比較試験により慢性肝炎患者の血清トランスアミナーゼ値を有意に改善することが確認されているが，これは主として肝細胞保護作用や抗炎症作用に基づくものと考えられている。[6,7)]また最近では，小柴胡湯が伊東細胞の増殖を制御して肝線維化を抑制することも示唆されている。[9)]これらのことから，今回得られた小柴胡湯の肝線維化抑制作用には本薬の肝細胞傷害抑制作用と伊東細胞からのコラーゲン産生抑制作用の双方が関与しているものと推察され，慢性肝炎治療の目的に合致することが示唆された。しかし，その詳細については今後，線維化の各ステージにおける細胞・分子レベルでの解析など，さらに検討が必要と考えられる。

小柴胡湯は上述した薬理作用のほか，インターフェロン誘起作用[13)]やマクロファージ活性化作用，[14)] NK細胞誘導作用[15)]など，多くの免疫薬理学的作用を有している。このことから，小柴胡湯は慢性肝炎の治療において多面的に好影響を及ぼしていると考えられ，今回の結果から本薬の臨床的有用性がさらに強く示唆された。

結　　論

ラットにブタ血清を週2回8週間投与することにより肝線維化モデルを作製し，小柴胡湯の肝線維化に及ぼす影響について検討した。小柴胡湯4.5％混餌投与では，肝細胞傷害の指標である血中GOT, GPT値の上昇抑制，肝臓中hydroxyproline含量の増加抑制，肝の線維化領域の減少が認められた。小柴胡湯の肝線維化抑制作用は，本薬の抗炎症作用や伊東細胞の活性化抑制作用等に基づくと考えられるが，さらに詳細な検討を要する。

References

1) Tsuji, T.: Uirusu-kan-en-byoutai・chiryou no saisin no kangaekata. (辻孝夫編：ウイルス肝炎－病態･治療の最新の考え方－.) Nankoudou, Tokyo, pp.84, 1993.
2) 上村朝輝：Mansei-kan-en no bunrui ha? (慢性肝炎の分類は？). *J. Therapy* **79** (4), 1034-1036, 1997.
3) Omata, M.: C-gata-kan-en kara kangan made no rinsyou. (C型肝炎から肝癌までの臨床.) *Nihon-Iji-Shinpou* No.3711, 3-14, 1995.
4) Uemura, K., Kiyosawa, K.: Dynamism of the histological progression from hepatitis to the liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with viral hepatitis. *Clinic All-round* **45** (11), 2488-2492, 1996.

5) Shiratori, Y., Kato, N., Shiina, S., Omata M.: Interferon therapy for chronic hepatitis C in relation to the prophylaxis of hepatocellular carcinoma. *Pharma Medica* **13**(3), 81-84, 1995.

6) Hirayama, C., Okumura, M., Tanikawa, K., Yano, M., Mizuta, M., Ogawa, N.: A multicenter randomized controlled clinical trial of Shosaiko-to in chronic active hepatitis. *Gastroenterologia Japonica* **24**(6), 715-719, 1989.

7) Hirayama, C., Okumura, M., Tanikawa, K., Yano, M., Tsujii, T., Sato, S., Tuji, T., Ogawa, N.: A multicenter randomized controlled clinical trial of Shosaiko-to in chronic active hepatitis. Analysis of serum enzyme activities. *KAN・TAN・SUI* **25**(3), 551-558, 1992.

8) Sekizuka, E., Osio, C., Maruyama, K., Kurokawa, T., Hosoda, Y., Nagata, H., Morisita, T., Tatemichi, M., Yamauchi, H., Okazaki, I., Minamitani, H., Isii, H.: C-gata-mansei-kan-en ni okeru sho-saiko-to cyouki-touyo-ji no kakushu kan-senika maka no kentou. (C型慢性肝炎における小柴胡湯長期投与時の各種線維化マーカーの検討.) *Diagnosis and Treatment* **83**(3), 579-586, 1995.

9) 萱野孝三, 坂井田功, 内田耕一, 木村輝昭, 松村康博, 沖田　極: Sho-saiko-to ni yoru kan-senika yokusei-kikou no kaimei. (小柴胡湯による肝線維化抑制機構の解明) *Acta Hepatologica Japonica* **38**(2), 129, 1997.

10) Nagatani, Y., Muto, Y., Sato, H. and Iijima, M.: An improved method for the determination of hydroxyproline. *Yakugaku Zasshi* **106**(1), 41-46, 1986.

11) 円山英昭, 原　弘: Kan-senika to Itoh-saibou. (肝線維化と伊東細胞) *Pathol. Clinic. Med.* **13**(3), 367-374, 1995.

12) Amagaya, S., Hayakawa, M., Ogihara, Y. and Fujiwara, K.: Effect of Syo-saiko-to and Dai-saiko-to on experimental hepatic fibrosis in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**, 137-145, 1988.

13) Kawakita, T., Nakai, S., Kumazawa, Y., Miura, O., Yumioka, E. and Nomoto, K.: Induction of interferon after administration of a traditional Chinese medicine, Xiao-Chai-Hu-Tang (Shosaiko-to). *Int. J. Immunopharmac.* **12**(5), 515-521, 1990.

14) Kumazawa, Y., Takimoto, H., Miura, S., Nishimura, C., Yamada, A., Kawakita, T. and Nomoto, K.: Activation of murine peritoneal macrophages by intraperitoneal administration of a traditional Chinese herbal medicine, Xiao-Chai-Hu-Tang (Japanese name: Shosaiko-to). *Int. J. Immunopharmac.* **10**(4), 395-403, 1988.

15) Kaneko, M., Kawakita, T., Tauchi, Y., Saito, Y., Suzuki, A. and Nomoto, K.: Augmentation of NK activity after oral administration of a traditional Chinese medicine, Xiao-Chai-Hu-Tang (Shosaiko-to). *Immunopharmac. Immunotoxic.* **16**(1), 41-53, 1994.