原 著

マウス貪食能に及ぼす施灸刺激の影響 (第4報)

—肝障害における網内系機能の検討—

古屋 英治* 岡崎 雅子 坂本 浩二

要旨 CCl₄ およびエチオニン肝障害病態に及ぼす施灸刺激の影響を網内系機能の面から検索した。ddY, ICR 系雄性マウスを用い、ヒト期門穴相当部位へ施灸した。異物貪食能は carbon clearance 法により、腹腔滲出細胞(PEC)は lysosome 酵素活性を測定した。CCl₄ 15回投与では貪食活性は低下した。この障害に対し、10回施灸では α 値の改善、15回施灸では K 値の改善傾向、 α 値の低下傾向を示した。エチオニン 1 回投与では K 値の増加がみられ、これに対する 1 回施灸で K 値の低下傾向を示した。これらより急性期では明らかではないが、CCl₄ 15回投与による慢性期の肝障害に対して、適度な施灸刺激は生体のホメオスタシスに調整的に働いているものと考えられる。

I 諸 言

東洋医学の中で物理療法の主体をなす鍼灸療法は、特に慢性疾患に対して臨床上的適応範囲が広く、医療の中での貢献度は多大である。しかしながら、治療効果発現に関する解明はいまだ十分ではなく、特に病態生理的意義についての基礎的研究は極めて少い。

先に我々¹⁻³⁾は、施灸刺激の作用機序解明を目的として、正常動物を用いて単回および間歇的連続施灸で網内系機能賦活化傾向を認めたことを報告した。

今回は、マウスに実験的肝障害を作成し、肝障害と網内系との関連、さらに病態に及ぼす施灸刺激の影響を貪食能の面から carbon clearance 法

により検索し、加えて腹腔滲出細胞(PEC)の lysosome 酵素活性を測定した。

II 実験方法

1. 実験動物

実験開始時 5 週齢(体重 22~25g)の ddY 系および ICR 系雄性マウスを使用した。

2. 肝障害動物作成

四塩化炭素(CCl₄)肝障害は CCl₄ 0.04ml/body (20%の olive oil 混液として 0.2ml/body) を経口投与して作成した。エチオニン肝障害は DL-Ethionine (Sigma) 1g/kg を腹腔内投与して作成した。

実験 I では ddY 系マウスを用い CCl₄ 1 回投与した。実験 II では ddY 系マウスを用いエチオニン 1 回投与した。実験 III では ddY および ICR 系マウスを用い CCl₄ を週 3 回、5 週間で計 15 回投与した。

3. 施灸方法

施灸は前報¹⁾に準じ、左右のヒト期門穴相当部位に 2.5mg ずつ 6 個の艾柱を作り、各 3 壮施灸した。施灸に先だちマウス施灸部位の毛を刈り、同様処

*Eiji FURUYA 東京鍼灸整専門学校

共同研究者: Masako OKAZAKI, Koji SAKAMOTO 昭和大学医学部第一薬理学教室

Key Words: CCl₄, エチオニン, 貪食能, マクロファージ, 施灸刺激

図1 ddY 系マウスにおける CCl_4 回投与および1回施灸刺激の血清 transaminase に及ぼす影響。

図2 ddY 系マウスにおける CCl_4 回投与および1回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響。図は対照群に対する百分比で示した。

置を対照群についても行った。施灸刺激は肝障害作成に際し同時施灸し、実験 I, II では1回施灸、実験IIIでは週2回、5週間で10回施灸と週3回、5週間で15回施灸の2群を設けた。

4. カーボンクリアランス法

マウスを16時間絶食後、前報¹⁾と同様の方法で測定し、食食指数であるK値、訂正食食指数である α 値を求め、さらに肝臓、脾臓を摘出し、その重量を測定した。

5. 腹腔渗出細胞(PEC)のライソゾーム酵素活性測定法²⁾

PECは、ヘパリン加滅菌生理食塩水にて腹腔渗出液を採取し、それをPECとする。細胞数算定後、PECのライソゾーム酵素として acid-phosph

atase (acid-P)および β -glucuronidase(β -Gl)を測定した。ライソゾーム酵素活性測定値は、 $\text{PEC}10^6$ 個あたりの活性値として算出した。

6. 血清酵素測定法

マウスを16時間絶食後 pentobarbital-Na (ネンブタール) 麻酔下で腹部大静脈より採血し、血清分離後、Transaminase C-Test Wako(和光純薬)により血清 transaminase (GOT, GPT) を測定した。

すべての測定値は対照群に対して t 検定による有意差検定を行った。また施灸併用群については施灸刺激の効果を判定するために、 CCl_4 投与群およびエチオニン投与群に対して検定を行った。本文中では $P < 0.2$ の場合はすべて傾向と記した。

図3 ddY 系マウスにおけるエチオニン 1 回投与および 1 回施灸刺激の血清 transaminase に及ぼす影響。

図4 ddY 系マウスにおけるエチオニン 1 回投与および 1 回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響。

III 結 果

1. CCl₄ 1 回投与に及ぼす 1 回施灸刺激の影響

1) ddY 系マウスの血清 transaminase (GOT, GPT) に及ぼす影響。

CCl₄ 投与および施灸後 24hrs の血清 GOT, GPT を測定した。GOT, GPT 共に危険率 1% で対照群に比して有意に増加した(図 1)。

2) ddY 系マウスの食食活性に及ぼす影響

CCl₄ 投与および施灸後 24hrs の食食活性を測定したが、K 値, α 値, 肝・体重比(L/W), 脾・体重比(S/W) 共に有意な差は認められなかった(図 2)。

2. エチオニン 1 回投与に及ぼす 1 回施灸刺激の影響

1) ddY 系マウスの血清 transaminase (GOT, GPT) に及ぼす影響

エチオニン投与および施灸後 24hrs の血清 GOT, GPT を測定した。GOT, GPT 共に各群共有意な差は認められなかった(図 3)。

2) ddY 系マウスの食食活性に及ぼす影響

エチオニン投与および施灸後 24hrs の食食活性を測定した。エチオニン投与群では 1-4, 1-7 の K 値, 肝・体重比は共に有意に増加した。施灸併用群では 1-4, 1-7 の K 値で低下傾向を認めた(図 4)。

図5 ddY 系マウスにおける CCl₄ 15 回投与および10回施灸刺激の血清 transaminase に及ぼす影響。

図6 ddY 系マウスにおける CCl₄ 15 回投与および10回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響。

3. CCl₄15回投与に及ぼす施灸刺激の影響

1) ddY 系マウスの10回施灸刺激の血清 transaminase に及ぼす影響

CCl₄ 15回投与, 10回施灸刺激の血清 GOT, GPT を測定した。CCl₄ 投与群では GOT, GPT 共に対照群に比して有意に増加した(図5)。

2) ddY 系マウスの10回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響

CCl₄ 15回投与, 10回施灸刺激の食食活性を測定した。CCl₄ 投与群では 1-4, 1-7 の K 値, α 値共に対照群に比して有意に低下した。肝・体重比, 脾・体重比は共に対照群に比して有意に増加した。

施灸併用群では1-4のα値は CCl₄ 投与群に対して改善が認められた。脾・体重比は CCl₄ 投与群に対して低下した(図6)。

3) ICR 系マウスの10回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響

CCl₄ 15回投与, 10回施灸刺激の食食活性を測定した。CCl₄ 投与群では1-4のK値, 1-4, 1-7のα値は共に対照群に比して有意に低下, 1-7のK値も低下傾向を認めた。肝・体重比, 脾・体重比は共に対照群に比して有意に増加した。施灸併用群では脾・体重比は CCl₄ 投与群に対して低下, 肝・体重比は低下傾向を認めた(図7)。

図7 ICR 系マウスにおける CCl₄ 15回投与および10回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響。

図8 ICR 系マウスにおける CCl₄ 15回投与および15回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響。

Lysosomal enzyme activity of PEC

	numbers of PEC	acid-P/10 ⁶	β-G1/10 ⁶
CCl ₄	97.29	47.67	107.01
CCl ₄ + Moxi.	90.89	65.41	125.00
E	92.25	77.52	90.58
E + Moxi.	84.38	105.50	100.19

表1 ddY 系マウスにおける CCl₄, エチオニン 1 回投与および 1 回施灸刺激の腹腔滲出細胞(PEC)のライソゾーム酵素活性に及ぼす影響。PEC 数, PEC10⁶ 個あたりの acid phosphatase 活性, β-glucuronidase 活性をそれぞれ対照群に対する割合いで示した。

4) ICR 系マウスの15回施灸刺激の食食活性に及ぼす影響

CCl₄15回投与, 15回施灸刺激の食食活性を測定した。CCl₄投与群では1-7のK値, 1-4, 1-7の α 値は共に対照群に比して有意に低下した。肝・体重比は対照群に比して有意に増加, 脾・体重比も増加傾向を認めた。施灸併用群では肝・体重比はCCl₄投与群に比して有意に増加, 1-7のK値は改善傾向, 1-4の α 値は低下傾向を認めた(図8)。

4. 腹腔渗出細胞(PEC)の1回施灸刺激の影響

各群のPEC数, PEC10⁶個あたりのacid-P活性, PEC10⁶個あたりの β -G1活性を測定した。図には対照群に対する百分比で示したが, 各群とも有意な差は認められなかった(表1)。

IV 考 察

網内系とは食作用という機能の面から定義されたもので, Aschoff・清野による生体染色によって裏付けられた。網内系を構成する細胞には, 固定細胞としてリンパ節, 脾, 骨髄などの細網細胞, 樹枝状細胞, 血管洞やリンパ管洞の内皮細胞があり, これらの細胞が網内系組織の骨組みをなしている。さらにその骨組みの上にとどまって偽足を出しながら粗大物質の取り込みにあたるマクロファージが存在⁴⁾し, 特に肝のKupffer細胞はその代表的なものである。網内系最大の臓器である肝臓は, 構造上の特徴からも生体内に侵入した異物に対して最初のclearanceを示す部位であるが, 実験的肝障害動物における食食能についての報告は意外に少ない。

本実験では, マウスにおいて実験的肝障害病態を作成し, 肝障害と網内系との関連を追求し, さらに肝障害時における施灸刺激の異物食食能に及ぼす影響を検索した。CCl₄1回投与で肝障害の指標となる血清GOT, GPTは増加したが, 食食指数K値, 訂正食食指数 α 値は変化がなかった。CCl₄は肝細胞に対してcytotoxicな作用を有する代表的化合物としてよく知られており, 作用機序, 形態学的変化, 生化学的変化等に関する業績は極めて多い。CCl₄肝障害成立の機序は, 投与されたCCl₄が小胞体に存在するCyt. P-450によってフ

リーラジカルCCl₃・となり, これが膜のlipid peroxide形成を促進し, その結果, 細胞障害が起こる⁵⁾と考えられている。CCl₄1回投与では, 血清transaminaseの増加はみられたものの食食能への明らかな影響はなかったが, CCl₄週3度, 計15回投与では, ddY, ICR両系統マウス共に, 血清GOT, GPTの有意な増加と, K値, α 値の低下が認められた。これは週3度, 計15回のCCl₄投与では, 結果的にマウスに対し重度の肝障害をひき起こし, 肝内脂肪蓄積による類洞狭窄, 肝細胞腫脹等による肝血流障害性病変を招き⁶⁾, また肝血流量減少に伴うclearanceの低下, さらに肝細胞壊死に引き続き網内系機能低下⁷⁾を起こしたものと考えられる。この障害に対し施灸刺激を週2度, 計10回行ったところ, ddY系マウスではCCl₄による脾・体重比の増加が著明に低下し, また1-4の α 値の改善が認められた。ICR系マウスにおいてもCCl₄による肝・体重比, 脾・体重比の増加が, 施灸刺激により低下する傾向を示した。これは脾腫の改善に伴い網内系細胞機能を質的に活性化させ, 食食能の亢進を起こしたものと推察される。しかしながら, 施灸回数が増加が必ずしも相加的に作用するものではない³⁾ところから, 生体への適度な刺激量の重要性がうかがわれる。

マクロファージの機能には2つのSub group⁸⁾が考えられ, 異物食食作用の他に, 免疫応答の誘導や発現に際しての中心的な役割がある。本実験では食食作用を中心に検討したが, 食食細胞の機能は, しばしばそのライソゾーム酵素活性を測定する事により評価される。CCl₄, エチオニン1回投与およびそれに対する施灸刺激では, PECのライソゾーム酵素活性に著明な変化はみられなかったが, Reiner⁹⁾らはCornebacterium parvumの死菌を用いてラットから分離したKupffer細胞の機能を検討し, 末梢血Monocyteに比べ, Kupffer細胞のN-acetyl-glucosaminidase活性が高くなると報告している。CCl₄15回投与により食食能の低下がみられたことから, この実験群におけるPECおよびKupffer細胞のライソゾーム酵素活性の動態を検討する必要があると思われる。さらにWoon¹⁰⁾は, 鍼刺激の末梢循環に及ぼす効果について神経生理学的見地から報告しており, また当教室

では¹¹⁾、施灸刺激の血液凝固系に及ぼす影響を検索している。施灸刺激による血液循環動態への影響は、その作用機序解明において重要な位置を占めるものと思われる。

エチオニン1回投与では血清 GOT, GPT は共に著明な変化は認められなかったが、1-4, 1-7のK値および肝・体重比はそれぞれ有意に増加した。エチオニン¹²⁾は、メチオニンの analogue としてその代謝を阻害し、S-adenosyl-ethionine が蓄積し、ATP 不足による m-RNA 生成低下、さらに肝における蛋白の合成を阻害¹³⁾して脂肪肝が発現すると考えられている。山形¹⁴⁾らは、網内系機能を調節する因子のひとつに脂質をあげていることから、エチオニンの脂肪肝と何らかの関係があるのかもしれない。今回のエチオニン投与によるK値の上昇は、ひとつには肝・体重比の増加によることが考えられるが、その代謝機転からいっても自律神経系の関与も考えられる。しかしながら現在のところ、エチオニンによる網内系機能亢進作用の機序については明らかではない。施灸併用群ではK値の低下傾向を示したが、この現象がいかなる機序によるものかは今後の研究を待ちたい。

以上、マウス実験的肝障害において、急性肝障害では網内系機能は障害されないが、持続的な一定度の障害では網内系機能も低下する。これに対し、施灸刺激はこれら網内系機能異常に対して生体の恒常性維持機構として働き、生体機能を正常に保つための自然治癒力を微妙に調整しているものと考えられる。

引用文献

- 1) 古屋英治, 坂本秀治, 岡崎雅子ほか: マウス食能に及ぼす施灸刺激の影響(第1報)—1回施灸による経時的変動—, 全日本鍼灸学会雑誌 31(1);34~41. (1981)
- 2) 古屋英治, 岡崎雅子, 笠原多嘉子ほか: マウス食能に及ぼす施灸刺激の影響(第2報)—1回施灸による腹腔滲出細胞および腹腔マクロファージのライソゾーム酵素活性の動態—, 全日本鍼灸学会雑誌 32(2);1~8. (1982)
- 3) 岡崎雅子, 古屋英治, 松山陽太郎ほか: マウス食能に及ぼす施灸刺激の影響(第3報)—間歇的連続施灸刺激による検討—, 全日本鍼灸学会雑誌 32(2);9~16. (1982)
- 4) 栗屋和彦: 免疫の系統発生とマクロファージ, 代謝 14(11);1523. (1977)
- 5) M. S. Ilyas, F. A. de la Iglesia, and G. Feuer: The Effect of Phenobarbital and Carbon Tetrachloride on Fatty Acid Content and Composition of Phospholipids from Rat Liver., Toxicol. Appl. Pharmacol., 45;69. (1978)
- 6) 檜垣要: 中毒性障害肝における血液循環と病理組織学的変化との関係について, 肝臓 10(2);127. (1969)
- 7) 山本祐夫, 吉村良之介: 劇症肝炎とエンドトキシン, 最新医学 35(3);522. (1980)
- 8) 村松繁: M-ology 私論, 感染・炎症・免疫 5(6);283. (1975)
- 9) R. G. Reiner, A. R. Tanner, A. H. Keyhani et al.: A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury., Clin. exp. Immunol., 43;376. (1981)
- 10) Woon H. Wong, M. D., and David Brayton, M. D.: The physiology of Acupuncture: Effects of Acupuncture on Peripheral Circulation, Am. J. Acupuncture, 10(1);59. (1982)
- 11) 長野邦子, 笠原多嘉子, 坂本浩二ほか: マウス血液凝固線溶能に及ぼす1回施灸刺激の影響, 全日本鍼灸学会雑誌 32(1);14~19. (1982)
- 12) 落合信彦: マウスの肝脂質代謝におよぼすエチオニンの影響について, 札幌医誌 33(3);163. (1968)
- 13) David E. Berry and Marvin A. Friedman: Acute Effects Ethionine Stereoisomers on Hepatic RNA and Protein Synthesis in Swiss Mice, Cancer Biochem. Biophys. 1(1);245. (1976)
- 14) 山形敬一: 細網内皮系統の病態生理と臨床, 中山書店, 東京(1976), p.103.
(〒142 東京都品川区旗の台1-5-8
昭和大学医学部第一薬理学教室)

Effects of Moxibustion on Phagocytic Activity in Mice (report 4)

—Studies on reticuloendothelial system in liver injury—

Eiji Furuya

Tokyo Acupuncture, Moxibustion & Jusei College

Masako Okazaki, Koji Sakamoto.

Showa University, School of Medicine, Department of Pharmacology.

Effects of moxibustion on liver injury induced by CCl_4 and ethionine in mice were investigated in the reticuloendothelial system. The phagocytic activity was determined by the carbon clearance method and the activity of lysosomal enzyme (acid phosphatase and β -glucuronidase) in peritoneal exudate cells was measured.

Male ddY and ICR mice (5 weeks old) were used as experimental animals.

Liver injury was produced by the administration of carbon tetrachloride (CCl_4) in a dose of 0.04ml/body in olive oil, p. o., or single administration of ethionine in a dose 1g/kg, i. p.

15mg of moxa was divided into 6 cones and they were treated by each 3 cones on right and left LV-14.

We obtained the following results. After 15 times administration of CCl_4 (3 times a week), the rise of serum transaminase (GOT, GPT), the decrease of K index and α index which meant phagocytic activity and the increase in liver/body (L/B) and spleen/body (S/B) weight ratio were recognized. For CCl_4 induced liver injury, α index and S/B weight ratio were improved by 10 times moxibustion (2 times a week). After 15 times moxibustion (3 times a week), the tendency to increase in K index and to decrease of α index was seen and, at the same time, an increase in L/B weight ratio was seen.

On the other hand, an increase in K index was induced after single administration of ethionine and simultaneous single moxibustion showed the tendency to decrease of K index.

It was suggested that moxibustion play an important role to regulate the mechanism of reticuloendothelial system on CCl_4 or ethionine induced liver injury.