実験的アレルギー性肝炎モデルに対する 小柴胡湯の及ぼす影響

溝口 靖紘・申 東桓・河田 則文
小林 絢三・森沢 成司*・山本 祐夫**

Jpn. J. Clin. Immun., 13 (4) : 320~327, 1990.

**The protective effects of Sho-saiko-to in an experimental,
immunologically-induced allergic hepatic cell injury**

Yasuhiro Mizoguchi, Tohkan Shin, Norifumi Kawada,
Kenzo Kobayashi, Seiji Morisawa* and Sukeo Yamamoto**

The Third Department of Internal Medicine and

**The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School*

***The Osaka Socio-Medical Center Hospital*

【Summary】

When trinitrophenylated hepatocytes were intravenously injected into trinitrophenylated liver protein-sensitized guinea pigs through mesenteric vein, hepatic cell necrosis was seen to a large extent in all of the guinea pigs and the values of serum GOT and GPT increased to $1,067 \pm 265$ and 101 ± 24 U/l 24 hours later. However, when trinitrophenylated hepatocytes were injected into trinitrophenylated liver protein-sensitized guinea pigs which had been administered with Sho-saiko-to 30, 24 and 6 hours before, only spotty necrosis could be seen and massive hepatic cell necrosis was not seen in any of the guinea pig. In addition, the values of GOT and GPT remarkably improved.

These results suggested that Sho-saiko-to is effective for the immunologically-induced allergic hepatic cell injury model.

Key words : Sho-saiko-to,
allergic hepatic cell injury

【概 要】

免疫原性の強いトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムをハプテンとして、モルモット肝高分子蛋白分画

(LP1) をキャリアー蛋白としてモルモットをトリニトロフェニール (TNP) 化 LP1 で感作した。2 週間後に TNP 化 LP1 で感作したモルモットに TNP 化した肝細胞を腸間膜静脈よりチャレンジすることにより免疫学的肝障害を誘導した。この免疫学的肝障害モルモットの誘導に小柴胡湯がいかなる影響を及ぼすかについて検討した。その結果、小柴胡湯の投与により免疫学的肝障害モルモットの血清 GOT, GPT 値は著明に改善された。組織学的にも非投与群では focal necrosis から bridging necrosis が中間帯から中心帯領域に認められたが、小柴胡湯投与群では軽度の focal necrosis のみ認められた。

以上の結果より、小柴胡湯は本免疫学的肝障害モデルに有効であることが示唆された。

I. 緒 言

ウイルス性あるいは薬物性肝障害の機序に免疫学的作用が働いていることは周知の事実である。しかし、実際に免疫学的な肝障害モデルはいまだ成功していない。この問題について、実験モデルとして四塩化炭素¹⁾や D-ガラクトサミン²⁾のような肝臓毒素を用いた実験、あるいは Shwartzman 反応³⁾を用いた実験がある。しかし、これらの実験モデルの検討から免疫学的肝障害の病態の解析は不可能に近い。

そこで、著者らは免疫学的肝細胞障害モデルの開発を試み、免疫原性の強いトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) をハプテンとし、モルモット肝高分子蛋白分画 (LP1) をキャリアーとしてモルモットを感作し、2 週間後にトリニトロフェニール (TNP) 化肝細胞を腸間膜静脈よりチャレンジすることにより免疫学的肝障害モデルの作製に成功した⁴⁾。

一方、小柴胡湯には柴胡、半夏、黄芩、大棗、人參、甘草および生姜が含まれているが、最近、小柴胡湯による慢性肝炎患者への治療が試みられるようになり、HBe 抗原陽性慢性肝炎患者の多施設間 open study の検討において、その有効性が報告された⁵⁾。また、肝硬変患者より年間約 7% の肝癌患者が発症することより、小柴胡湯による肝硬変患者の肝癌発症予防の試みもはじまっている⁶⁾。また、薬理効果としては *in vitro* の系を用いてマクロファージの活性化⁷⁾、インターロイキン 1 産生の増強⁸⁾、T リンパ球によるインターロイキン 2 産生の増強⁹⁾、B リンパ球による抗体産生の促進¹⁰⁾、さらには抗腫瘍作用として重要な働きをするといわれている natural killer (NK) 細胞活性¹¹⁾や lymphokine activated killer (LAK) 細胞活性の増強¹²⁾など免疫賦活作用が示唆されている。さらに、小柴胡湯には抗炎症作用として、アラキドン酸カスケードを介して、phospholipase A₂ と拮抗するリポコルチン (様物質) の産生誘導、アラキドン酸代謝産物の 1 つであるロイコトリエン産生の抑制など

が知られている⁵⁾。

このように小柴胡湯には *in vitro* の系を用いて非常に詳細に解析されているにもかかわらず *in vivo* の系による免疫学的肝障害モデルを用いた解析は非常に少ない。その理由として、今まで免疫学的機序による肝障害モデルの開発が遅れていたためであろう。

そこで、著者らは上述の免疫学的な手法を用いて肝細胞障害を誘導し、このモデル動物を用いて、小柴胡湯がいかなる影響を及ぼすかについて *in vivo* で検討した。

II. 実験方法

1. モルモット LP1 の作製と TNP 化

体重 300~350 g の雄性モルモット (6 週齢、日本クレア社から購入) を開腹し、0.25 M sucrose を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて灌流後肝を摘出し、ホモジネートした。その後、2,500 rpm で 10 分遠心し、その上清を 19,600 g, 10 分遠心した。上清をさらに 156,500 g, 60 分遠心を行い、その後 Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィにより分画し、第 1 ピークを LP1 として得た。この分画を蒸留水で 1 晩透析し、さらに凍結乾燥し、LP1 分画とした。この LP1 分画 10 mg/ml と 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (TNBS, Sigma 社製) 1 mg/ml を PBS (phosphate buffered saline, pH 7.3) にて溶解し、37°C, 1 時間振盪培養して LP1 を TNP 化した。この溶液を Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィにより遊離 TNBS を除去して、TNP 化 LP1 分画を得た。なお、LP1 の分子量を約 50 万とすると、1 分子に対し、20 TNBS が結合していると計算された。

2. モルモットの TNP 化 LP1 による感作法

体重 300~350 g の雄性モルモットの後足に等量の Freund's complete adjuvant (FCA) を混合した 4 mg/ml の TNP 化 LP1 を 0.25 ml ずつ皮下に注射

して感作した。感作後2~4週後に実験に供した。

3. 分離肝細胞の調製とそのTNP化

Bellemannら¹³⁾の方法に準じて、モルモット肝を細切後0.5% collagenaseを含む Mg^{++} -free Hanks培養液内で37°C, 40分間振盪培養し、PBSで3回洗浄して、分離肝細胞を得た。この分離肝細胞をPBSで 1×10^7 個/mlに浮遊させ、20 mg/ml TNBSを含むPBSを加えて室温で10分間反応後、2回洗浄しPBSで再浮遊した。こうして得られたTNP化分離肝細胞は、チャレンジまで氷冷中に保存した。

4. アレルギー性肝障害の作製

TNP化LP1感作後2週以上経過したモルモットを清潔下に開腹した。腸間膜静脈より、TNP化分離肝細胞を 5×10^6 個注入後、閉腹した。24時間後開腹し、下大静脈より採血後、肝臓を摘出してホルマリン固定した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色により、組織学的検討を行った。なお、血清中のGOT, GPT, LDH(おのおのUV法)および γ -GTP(γ -グルタミル-CPA法)を自動分析器(日立H736型)にて測定した。

5. アレルギー性肝障害誘導における小柴胡湯の影響

TNP化LP1感作モルモットにTNP化分離肝細胞を腸間膜静脈に投与する前に小柴胡湯を投与した。投与方法は胃ゾンデを用いて経口的に投与した。投与

量は1回250 mg投与し、投与回数は、① TNP化分離肝細胞を投与する、30, 24, 6時間前の3回、計750 mg, ② 24, 6時間前の2回、計500 mg, ③ 6時間前の1回250 mgの3種類である。24時間後に肝を摘出して組織学的に、また血清中のGOT, GPT, LDHおよび γ -GTPを検討した。なお、小柴胡湯原末は株式会社ツムラより供与された。

III. 実験結果

1. アレルギー性肝障害の誘導

TNP化LP1感作モルモットにTNP化分離肝細胞を腸間膜静脈よりチャレンジすると、24時間後には著明な肝障害が誘導できた。すなわち、組織学的には肝は肉眼的にびまん性肝壊死巣がみられ、光顕的には門脈域を中心に多数の単球、リンパ球の浸潤が認められ、広範な実質細胞壊死が観察できた(図1)。また、肝機能検査ではGOT値 $1,067 \pm 265$ U/l, GPT値 101 ± 24 U/l, LDH値 $1,068 \pm 247$ U/lそして γ -GTP値は 10.6 ± 0.8 mIU/mlと著明に上昇した($n=5$, 図2, 3)。

しかし、TNPハプテン単独(図4)、あるいはLP1のみ(図5)では軽度の細胞浸潤がみられるのみであった。一方、TNP化LP1のチャレンジでは細胞浸潤と肝細胞壊死が軽度みられるのみであった。また、血清GOT, GPT値は軽度上昇するのみであった。

図1 Histological changes of liver from a guinea pig with immunologically-induced allergic hepatic cell injury (H-E stain, $\times 100$).

図 2 Effects of Sho-saiko-to on serum transaminase levels of a guinea pig with immunologically-induced allergic hepatic cell injury (each group, n=5).

*—** ; $p < 0.01$

図 3 Effects of Sho-saiko-to on serum LDH and γ-GTP levels of a guinea pig with immunologically-induced allergic hepatic cell injury (each group, n=5).

*—** ; $p < 0.01$

2. アレルギー性肝障害誘導における小柴胡湯の影響

TNP-LP 1 感作モルモットに TNP 化肝細胞を注入するときに、250 mg の小柴胡湯を 30, 24, 6 時間

前の 3 回、24, 6 時間前の 2 回、そして 6 時間前の 1 回それぞれ投与し、24 時間後に肝を摘出して組織学的に検討した。その結果、小柴胡湯の投与回数の増加につれ、肝細胞壊死の程度は軽減され、小柴胡湯を 3

図 4 Histological changes of liver from trinitrophenylated liver protein-sensitized guinea pig which was administered with liver protein (H-E stain, $\times 100$).

図 5 Histological changes of liver from trinitrophenylated liver protein-sensitized guinea pig which was administered with trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS) (H-E stain, $\times 100$).

回投与した群においては、図 6 に示すように肝細胞の壊死像はほとんど観察されなかった。また、肝機能検査においても、GOT は小柴胡湯 3 回投与群 ($n=5$) では 271 ± 141 U/l (非投与群に対して $p < 0.01$)、小柴胡湯 2 回投与群 ($n=5$) では 681 ± 45 U/l (非投与群に対して $p < 0.01$)、小柴胡湯 1 回投与群 ($n=5$) では 860 ± 125 U/l と改善された (図 2)。GPT においても、図 2 に示すように小柴胡湯投与群においては非投与群に比して低下がみられた。さらに、LDH, γ -GTP においても、図 3 に示すように有意に低下した

($p < 0.01$)。

IV. 考 察

ウイルス性あるいは薬物性肝障害の機序に免疫学的作用が働いていることは周知の事実である。とくに薬物性肝障害では、患者末梢血リンパ球を、肝特異抗原存在下に *in vitro* で起因薬物で刺激すると、リンパ球幼若化反応が誘導され、マクロファージ遊走阻止因子の産生が確認される¹⁴⁾。これらのことから、薬物をハプテンとして、肝特異抗原をキャリアーとして免疫原

図 6 Histological changes of liver from a guinea pig treated with Sho-saiko-to (H-E stain, ×100).

性が獲得され、肝を場としたアレルギー反応が出現するとされている¹⁵⁾。そして、このアレルギー反応は遅延型過敏反応が重要な役割を果たしていると考えられる。

しかし、実際に薬物のみの感作で肝障害はみられず、有用なモデル系は確立されていない。今回、著者らは臨床的に近い薬物アレルギー性肝炎のモデル系として、TNP をハプテンとして LP 1 と結合させて感作し、TNP 化肝細胞を腸間膜静脈より直接チャレンジすることにより肝障害を誘導し、薬物アレルギー性肝障害モデルを作製した。

ハプテンとしての TNP は、強い免疫原性をもつ物質として知られ、また、蛋白のリジン残基への易結合性から、これまで多くの免疫学的実験に用いられてきた。

腸間膜静脈よりのチャレンジにおいて、TNP 単独、あるいは LP 1 単独で肝障害は誘導されず、TNP 化 LP 1 あるいは TNP 化肝細胞で肝障害が誘導されてくることから、ハプテンとしての TNP とキャリアーとしての LP 1 が肝細胞障害を惹起していることは明らかである。

このような免疫反応が密接に関与しているモデル系を用いて小柴胡湯の肝組織像および血清トランスアミナーゼ値に及ぼす影響について検討した。その結果、TNP 化 LP 1 で感作したモルモットに TNP 化肝細胞を腸間膜静脈よりチャレンジすると、門脈域を中心に多数の単球およびリンパ球の浸潤および肝細胞壊死が認められた。しかし、小柴胡湯を投与すると、軽度

の細胞浸潤がみられるのみに改善された。また、血清トランスアミナーゼ値も小柴胡湯を投与することにより著明に軽快した。このように、小柴胡湯は免疫学的肝細胞障害モデルを *in vivo* で著明に改善した。なお、小柴胡湯の投与回数は多いほど、肝障害の抑制は著明であった。この理由として、小柴胡湯を経口投与したために有効成分の血中濃度の維持にある程度の投与回数が必要なのかもしれない。この問題に関しては今後、有効成分の同定と、有効成分の血中濃度を測定すれば解決できると考えている。

さて、小柴胡湯がすでに *in vivo* の系において実験的肝障害を抑制することを多くの研究者が報告している。たとえば、小川ら¹⁶⁾は D-ガラクトサミン肝障害において、肝細胞の類洞面と毛細胆管面の微絨毛の減少・消失、毛細胆管の拡張、細胞質内の脂肪滴蓄積、ミトコンドリア・小胞体など小器官の変化が小柴胡湯の投与により改善されること、また酵素学的にも肝細胞中の glucose-6-phosphatase や 5'-nucleotidase が低下することを報告している。また、四塩化炭素による慢性の肝障害時に小柴胡湯が肝線維化を抑制すること、porcin serum や dimethyl-nitrosamine による肝線維化においても小柴胡湯が肝の hydroxyproline 量を軽減させることが示唆されている^{17,18)}。

しかしながら、これらの大部分の実験方法は肝臓毒素を用いた実験系であり、これらの結果から、小柴胡湯がヒトの免疫学的肝障害の機序をいかなる作用で改善するかを解析することは不可能である。

今回の著者らが確立した免疫学的肝障害モデルを小

柴胡湯が改善したことは、免疫学的機序による肝障害も小柴胡湯は改善することを示唆した。今後、このモデル系を用いて小柴胡湯の作用機序について検討する予定である。

いずれにしても今回、小柴胡湯が免疫学的肝障害モデルモットを著明に改善したことは、今後の臨床における肝疾患の治療に新しい知見を与えるものと考えられる。

文 献

- 1) Richard, R.O. : Carbontetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev.*, 19 : 145~208, 1967.
- 2) Kattermann, R., Sirowej, H. : Liver injury and lipid metabolism sex difference in fatty liver induced by D-galactosamine. *Acta Hepato-gastroenterol.*, 26 : 112~121, 1979.
- 3) Mori, W., Aoki, N., Shiga, J. : Acute hepatic cell necrosis experimentally produced by viral agents in rabbits. *Am. J. Pathol.*, 103 : 31~38, 1981.
- 4) 溝口靖紘・申 東恒・阪上吉秀・他 : トリニトロフェニル基 (TNP) を起因とするアレルギー性肝炎の研究, 肝臓, 30 (Suppl) : 122, 1989 (抄録集).
- 5) Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Okura, Y. et al. : Effects of Sho-saiko-to (TJ-9) in hepatitis patients and on the metabolism of arachidonic acid. *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines*. Edited by Hosoya, E., Yamamura, Y., Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, 1988, pp. 396~404.
- 6) 山本祐夫・岡 博子・溝口靖紘・他 : 肝硬変からの肝細胞癌発症予防の無作為対照試験による試み, 日内会誌, 78 : 248, 1989 (抄録).
- 7) 池本吉博・溝口靖紘・新井考元・他 : 小柴胡湯および大柴胡湯の *in vitro* における抗体産生に及ぼす影響. 和漢医薬学会誌, 1 : 235~242, 1984.
- 8) Morisawa, S., Mizoguchi, Y., Yamamoto, S. : Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on antibody responses *in vitro*. *Recent Advances in Traditional Medicine in East Asia*. Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Geneva, Tokyo, 1985, pp. 106~110.
- 9) 溝口靖紘・柴田悠喜 : 抗腫瘍免疫機構に及ぼす小柴胡湯の影響. 漢方医学, 11(4) : 19~26, 1987.
- 10) Mizoguchi, Y., Tsutsui, H., Sakagami, Y. et al. : Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. *New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis. II Chronic Hepatitis*. Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton Hong Kong, Tokyo, Sydney, 1987, pp. 304~310.
- 11) 溝口靖紘・藤信裕美子・小林絢三・他 : Natural Killer (NK) 細胞活性に及ぼす小柴胡湯の影響. 和漢医薬学会誌, 4 : 124~129, 1987.
- 12) 溝口靖紘・大倉靖史・宮島慶治・他 : Lymphokine activated killer (LAK) cell 活性に及ぼす小柴胡湯の影響. アレルギー, 35 : 1119~1121, 1986.
- 13) Bellemann, P., Gebhardt, R., Mecke, D. : An improved method for the isolation of hepatocytes from liver slices. *Anal Biochem.*, 81 : 408~415, 1977.
- 14) 溝口靖紘・門奈丈之・山本祐夫 : 薬物アレルギー性肝障害の診断方法. 薬物性肝障害, 山本祐夫, 溝口靖紘, 中外医学社, 東京, 1980, pp. 43~53.
- 15) 溝口靖紘・川合弘毅・門奈丈之・他 : 薬剤アレルギー性肝炎の研究—薬剤 carrier に関する研究. 日消誌, 72 : 1419~1427, 1975.
- 16) Araki, N., Noda, T., Ogawa, K. : Cytochemical studies on the effect of intraperitoneal and oral administration of a traditional Chinese medicine (Sho-saiko-to) on the D-galactosamine-induced hepatic injury of rats. *Acta Histochem. Cytochem.*, 5 : 439~453, 1988.
- 17) 飯田吉隆・高梨日出雄・河村光則・他 : 四塩化

- 炭素肝障害に対する小柴胡湯の効果. 診断と治療, 75 : 2985~2987, 1987.
- 18) Amagaya, S., Hayakawa, M., Ogihara, Y. et al. : Effect of Sho-saiko-to and Dai-saiko-to on experimental hepatic fibrosis in rats. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU, 5 : 137~145, 1988.
-