小柴胡湯のマクロファージにおけるアラキドン酸代謝に及ぼす影響

大倉靖史・溝口靖紘・小林絢三^{*1)}、山本祐夫^{*2)}
渡辺正比古・竹田茂文・油田正樹^{*3)}、森沢成司^{*4)}

rapid communication

Effect of Syosaiko-to on the metabolism of arachidonic acid
When a macrophage was stimulated with fMet-Leu-Phe, arachidonic acid was released. The release of arachidonic acid was inhibited by the treatment of Syosaiko-to, dose-dependently. And the soluble fraction separated from macrophages that were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of Syosaiko-to inhibited the release of [^{14}C]-arachidonic acid resulting from the incubation with porcine pancreatic phospholipase A2 and α -palmitoyl- β -[^{14}C]-arachidonyl phosphatidylcholine. From these findings, it was suggested that Syosaiko-to had an inhibitory effect on arachidonic cascade and this effect was due to the induction of phospholipase A2 inhibitory protein.

Yasufumi Ohkura・Yasuhiro Mizoguchi・
Kenzo Kobayashi^{*1)}、Sukeo Yamamoto^{*2)}
Masahiko Watanabe・Shigefumi Takeda・
Masaki Aburada^{*3)}、Seiji Morisawa^{*4)}

key words: Syosaiko-to, arachidonic acid, phospholipase A2

最近、小柴胡湯がB型および非A非B型肝炎の治療に試みられるようになり、その有効性と薬理作用が詳細に検討されている¹⁾。しかし、小柴胡湯の肝細胞障害抑制の機序については、いまだ不明な点が多い。一方、肝細胞障害の発現にロイコトリエンが関与することが報告され注目を浴びている²⁾。一般に、グルコシルコルチコイドは、ホスホリパーゼA2活性を阻害するリボコルチンの産生を介して、アラキドン酸カスケードを抑制すると考えられている³⁾。サイコサポニンや小柴胡湯は、グルコシルコルチコイド様作用を有しており、小柴胡湯にも同様にリボコルチンの誘導作用が期待される。

そこで今回、小柴胡湯の肝障害抑制作用機序を解明する目的で、マクロファージ(M ϕ)におけるアラキドン酸代謝に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

Hartley 系雄性モルモットの腹腔内に、滅菌 Marcol

^{*1)} The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School 大阪市立大学医学部第三内科教室

^{*2)} The Osaka Socio Medical Center Hospital 大阪社会医療センター

^{*3)} Tsumura Research Institute for pharmacology 津村薬理研究所

^{*4)} The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School 大阪市立大学医学部第一生化学教室

図1 effect of Syosaiko-to on the release of arachidonic acid from macrophage

図2 effect of the soluble fraction separated from Syosaiko-to-treated macrophages on the activity of phospholipase A2 *in vitro*

52(Esso Oil Co.), 20 ml を注入し、4 日後に 200 ml の Hank's 液で腹腔内を灌流して腹腔浸出 M ϕ を採取した。この細胞を 1% のウシ血清アルブミン(BSA)を含む RPMI 1640 培養液にて 5×10^6 cells/ml となるように調整し、実験に供した。

(1) アラキドン酸遊離に及ぼす影響

上記方法で調製した M ϕ 浮遊液 1 ml に、dexamethasone (Dex) 1 $\mu\text{g/ml}$ またはツムラ小柴胡湯(TJ-9)を 10, 30, または 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加して、37°C で 6, 12, 18, 24, 36, または 48 時間培養した。この細胞を 1% BSA を含む Gey's buffer で洗浄後同溶液に再浮遊させ、[^{14}C]-アラキドン酸(比活性 59.6 mCi/mmol) 0.25 μCi を添加して、さらに 1 時間培養した。培養後、この細胞を 10 nM の fMet-Leu-Phe を添加して 37°C で 10 分間刺激して、遊離する [^{14}C]-アラキドン酸を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(2) ホスホリパーゼ A2 活性に及ぼす影響

Dex 1 $\mu\text{g/ml}$ または TJ-9 100 $\mu\text{g/ml}$ を添加して 24 時間培養した M ϕ を洗浄後、蒸留水を加えポリロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。このホモジネートを 16,000 rpm, 50 分間遠心分離した可溶性画分 10, 30, 100, または 300 $\mu\text{g/ml}$ (蛋白質量として) に、porcine pancreatic phospholipase A2 (Sigma)(0.05 μg) および α -palmitoyl- β -[^{14}C]-arachidonyl phosphatidylcholine (比活性 54.5 mCi/mmol)(2.5 nCi) を添加して、4°C で 5 分間培養した。培養後、遊離した [^{14}C]-アラキ

ドン酸を液体シンチレーションカウンタで測定した。

結 果

(1) アラキドン酸遊離に及ぼす影響

Mφ におけるアラキドン酸遊離に及ぼす TJ-9 の影響を、図 1 に示した。Mφ を f Met-Leu-Phe で刺激することにより、アラキドン酸が遊離される。これに対し、Dex で処理した Mφ においては、18時間処理で約25%の抑制が認められた。また、TJ-9 処理 Mφ においては、12時間処理よりアラキドン酸遊離の濃度依存的な抑制が認められた。このアラキドン酸の遊離抑制作用は、36時間処理によりもっとも著明に認められた。

(2) ホスホリパーゼ A2 活性に及ぼす影響

TJ-9 100 μg/ml で処理した Mφ より分離した可溶性画分のホスホリパーゼ A2 活性に及ぼす影響を、アラキドン酸の遊離を指標として検討した。

図 2 に示したように、TJ-9 処理 Mφ から分離した可溶性画分を添加することにより、ホスホリパーゼ A2 活性の抑制が認められた。この抑制作用は、10 μg/ml 処理で約 5%，30 μg/ml 処理で約10%，100 μg/ml 処理で約15%，300 μg/ml 処理で約20%と濃度依存的なものであった。

考 察

本実験結果より、TJ-9 が Mφ からのアラキドン酸の遊離を著明に抑制することが明らかとなった。グルココ

ルチコイドも著明なアラキドン酸遊離抑制作用を有し、その作用機序として、リポコルチンを介する反応が重視されている。このリポコルチンは、ホスホリパーゼ A2 活性を阻害し、アラキドン酸カスケードを抑制する²⁾。TJ-9 で処理した Mφ の可溶性画分を添加することによって、ホスホリパーゼ A2 活性が阻害されたことは、TJ-9 にグルココルチコイドと同様、リポコルチンまたはリポコルチン様蛋白質の誘導作用があることを示唆するものと考えられる。

以上より、TJ-9 の肝障害抑制作用の一部にホスホリパーゼ A2 活性を阻害する蛋白質を介するプロスタグランディン、ロイコトリエン系の生合成阻害作用が関与することが示唆された。

文 献

- 1) 溝口靖紘, 沢井寛子, 筒井ひろ子, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 門奈文之, 山本祐夫, 森沢成司: 免疫学的肝細胞障害に対する小柴胡湯の障害抑制作用. 肝胆脾 6(6): 947, 1983.
- 2) Keppler, D., Hagmann, S.R., Claudio, D. and Herbert, K.K.: The Relation of Leukotrienes to Liver Injury. Hepatology 5(5): 883, 1985.
- 3) Hirata, F., Schiffmann, E., Venkatasubramanian, K., Salomon, D. and Axelrod, J.: A Phospholipase A2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(5): 2533, 1980.