

肝傷害モデルマウスの肝機能に対する田七人參エキス及びその成分の作用

小松健一,* 田中寛子, 中川大輔, 川嶋恵子

Effect of Notoginseng Extracts and Its Components on Lipopolysaccharide and Galactosamine Mixture-induced Impaired Hepatic Function in Mice

Ken-ichi Komatsu,* Hiroko Tanaka, Daisuke Nakagawa, and Keiko Kawashima

Division of Pharmacology, Basic Pharmacy, Hokkaido Pharmaceutical University School of Pharmacy;
Katsuraoka 7-1, Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan.

(Received November 8, 2011; Accepted April 12, 2012; Published online April 26, 2012)

The protective effects of notoginseng against hepatic damage were investigated in mice. To prepare a model animal of hepatitis, a mixture of lipopolysaccharide and galactosamine (LPS/GalN) was administered intraperitoneally, leading to the impairment of hepatic function. Extracts of notoginseng or its components (ginsenoside Rb₁ and ginsenoside Rg₁) were orally administered 2 h before LPS/GalN injection. Eight hours after LPS/GalN injection, blood and liver tissue samples were collected. The levels of serum aspartate amino transferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon (IFN)- γ were measured using commercial assay kits. Histologic changes in the tissue samples were also observed after hematoxylin-eosin staining. LPS/GalN administration increased the serum levels of AST and ALT, and histologic changes were noted, indicating hepatic cell damage. Prior to the increase in ALT, the serum levels of TNF- α and IFN- γ were elevated after LPS/GalN injection. Pretreatment of the mice with either notoginseng extract or ginsenoside Rb₁ and Rg₁ attenuated the LPS/GalN-induced hepatic damage markedly. The protective effects of the components against hepatic damage appeared to be less potent than those of the crude extract and prescription of notoginseng. Notoginseng may be clinically useful in patients with hepatitis.

Key words—lipopolysaccharide and D-galactosamine; hepatitis; notoginseng; aspartate aminotransferase; galanine aminotransferase

はじめに

わが国には 100 人に 1–2 人の割合で慢性肝炎の患者、あるいは肝炎ウイルスのキャリアがいると推測されている。¹⁾ ウイルス性慢性肝炎は肝炎ウイルスの感染により肝臓に障害を起こす病気で、10–20 年後には肝硬変や肝臓がんに移行し易い。肝炎の治療には対症療法と原因療法がある。対症療法は AST、ALT 値を下げて肝炎を沈静化し、進行を遅らせるが、ウイルスを排除することはできない。原因療法はインターフェロン療法が主であるが、これに内服の抗ウイルス薬を併用すると高い効果が期待できる。²⁾ しかし、B 型慢性肝炎に対する有効率は 30–40% にすぎず、C 型慢性肝炎患者で、ウイルスが消失した著効例は 30% 程度である。ウイルスは完全に消失しないが ALT が持続的に改善する有効例も

15% 程度であり、まだまだ肝炎に対する薬物治療には限界がある。一方、わが国では慢性肝炎、肝硬変などに対して漢方治療が臨床の場で盛んに行われている。小柴胡湯は、抗炎症作用、免疫調節作用、感染防御能を高める薬理作用が知られ、事実、B 型慢性肝炎患者の ALT の改善やウイルスマーカーの改善が報告されている。^{3–5)} 一方では、肝炎には小柴胡湯という短絡的な使用が、間質性肺炎という副作用の出現を招いた。それでも、小柴胡湯を中心とする漢方療法が、肝炎治療の有力な手段であることに変わらない。しかし、漢方製剤は患者の症状によって細かく使い分ける必要があり、例えば、小柴胡湯は、慢性活動性肝炎でもあまり程度が進んでいない状態に適応であり、肝硬変に近い状態であれば、その証ではない。慢性肝炎に認められる虚証に対して補益剤の使用が最近増加している。本論文では、補剤の一種であり、中国でウイルス性肝炎に汎用されている片仔廣の主構成生薬である田七人參及びその

成分について肝炎に対する作用を検討した。慢性肝炎の動物モデルは、マウスに Lipopolysaccharide (LPS) と galactosamine (GalN) を同時に腹腔内投与して作製した。⁶⁾ 大量の GalN は単独でも肝障害を引き起こす。⁷⁾ しかし、LPS も GalN もそれぞれ単独では肝障害を惹起しない用量を同時にマウスに投与すると、広範囲にわたる致死的な出血壊死性の肝炎が引き起こされる。この肝炎モデルマウスを用いて、田七人參のサポニン分画が ALT, AST の上昇を抑制することが報告されている。⁸⁾ 本論文では、田七人參エキス及びその主要成分 (Rb₁, Rg₁) を用い、ALT, AST, TNF- α , IFN- γ を指標として、肝傷害に対する効果を調べた。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物 日本チャールス・リバー (神奈川県) より購入した 5 週齢 (26–31 g) の ICR 系雄性マウスを使用した。温度 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度 55 \pm 5%, 照明時間を 6:00–18:00 に設定された飼育室で水道水及び飼料 (MF, オリエンタル酵母, 東京) を自由に摂取させ、5–9 日間予備飼育した後、実験に用いた。

本実験は、北海道薬科大学実験動物センター運営委員会の承認を受け、北海道薬科大学動物実験指針に基づき実施した。

2. 肝機能障害モデルマウスの作製 Lipopolysaccharide (*Escherichia coli* O55:B5, List Biological Laboratories, USA) 3.5 μ g と galactosamine (GalN \cdot HCl, WAKO, 大阪) 70 mg を精製水 1 mL に溶解し、マウスに 10 mL/kg の用量で腹腔内投与して肝障害モデルマウスを作製した。肝障害の指標として、血清 TNF- α , IFN- γ 及び alanine aminotransferase (ALT) 含量を測定し、組織学的変化を調べた。

3. 田七人參

3-1. 凍結乾燥田七人參 田七人參 50 g に水 1 L を加え 1 時間で半量になるまで煎じ、煎液を 5 重のガーゼで濾過し、濾液を凍結乾燥して実験に使用するまで冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ C) に保存した。この凍結乾燥田七人參 1 g 中には Rb₁ 49.3 mg, Rg₁ 41.2 mg を含有する。この凍結乾燥田七人參 20 mg を精製水 1 mL に懸濁した (生薬換算 30 mg/1 mL)。この懸濁液を 10 mL/kg の用量でマウスに経口投与した。

3-2. 田七人參製剤 株式会社 活里より供与された市販の田七人參製剤を 10 mL/kg の用量でマウスに経口投与した。この田七人參製剤 10 mL 中には Rb₁ 10.6 mg, Rg₁ 8.6 mg を含有する。

3-3. 田七人參成分 (Rb₁ 及び Rg₁) 田七人參成分 Rb₁ 及び Rg₁ は田七人參末より、文献に従い単離・精製した。⁸⁾ Rb₁ 及び Rg₁ は精製水を用いてそれぞれ 0.1 μ mol/mL, 1 μ mol/mL, 10 μ mol/mL の 3 段階の濃度に溶解した。この溶液を 10 mL/kg の用量でマウスに経口投与した。

4. 実験手順 マウスに偽薬あるいは田七人參を経口投与した 2 時間後に、LPS/GalN 10 mL/kg を腹腔内投与し肝障害を誘発した。LPS/GalN 投与前 (0 時間) 及び投与 1, 3, 5, 7 時間後に尾静脈より経時的に採血し、8 時間後にエーテル麻酔下開腹し、腹部下大静脈より採血して、それぞれ血清サンプルを採取し、測定まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。最終採血後、肝臓の中葉部分を摘出し、組織染色を行った。

5. 生化学的測定 酵素やサイトカインの測定は、市販のアッセイキットを使用した。ALT 及び AST は、トランスアミナーゼ C II -テストワコー (WAKO, 大阪), TNF- α は mouse TNF-alpha ELISA kit (Bender MedSystems, Austria), IFN- γ は, mouse IFN-gamma ELISA kit (Bender MedSystems, Austria) を用いてそれぞれ測定した。

6. 組織学的方法 摘出した肝臓組織は 10% 中性緩衝ホルマリンに浸し固定した後、パラフィン包埋し、ミクロトームで薄切した。脱パラフィンした切片を Hematoxylin-Eosin (HE) で染色し、光学顕微鏡で観察した。

7. 統計学的処理 各データは平均値 \pm 標準誤差で示し、2 群比較には Student の *t* 検定を用い、3 群以上の比較には一元配置分散分析法 (ANOVA) で分析し、多重比較として Dunnett の検定を用い、危険率 5% 未満を有意とした。

実験結果

1. LPS/GalN 誘発肝傷害モデルマウスの生化学的パラメータ変動 生理的食塩水 (Normal 群) あるいは LPS/GalN (Control 群) 腹腔内投与後のマウス血清 TNF- α , IFN- γ , ALT 各含量の経時変化を Fig. 1 に示してある。測定時間内において、

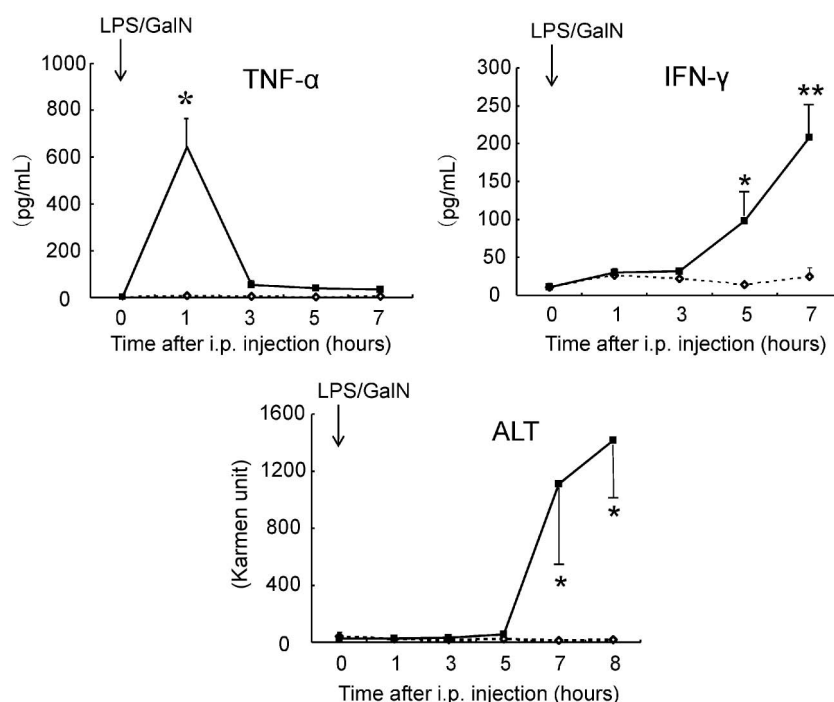


Fig. 1. Changes in Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , ALT in LPS/GalN-induced Hepatic Injured Mice

The LPS/GalN solution was intraperitoneally injected 2 h after water as a vehicle for extract or components of notoginseng. The blood samples were taken before and 1, 3, 5, 7 h after LPS/GalN injection. The hepatic tissue sample was removed 8 h after LPS/GalN injection. Blood sample for ALT was also taken just before the liver was removed. The data are expressed as means \pm S.E. of three observations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. normal.

Normal 群の血清 TNF- α は、3–10 pg/mL、血清 IFN- γ は 10–27 pg/mL、血清 ALT は、14–42 Karmen unit の範囲で推移し、大きな変動は認められなかった。一方、LPS/GalN を腹腔内投与した Control 群では、いずれのマーカーも著しく増加し、初めに TNF- α 、次に IFN- γ 、そして最後に ALT の順に増加した (Fig. 1)。TNF- α は、LPS/GalN 投与 1 時間後に有意な一過性の増加が観察され、IFN- γ は、LPS/GalN 投与 5 時間後から、ALT は、LPS/GalN 投与 7 時間後から有意な増加が観察された。

2. 肝傷害モデルマウスの血清 ALT 及び AST に対する田七製剤の作用 LPS/GalN 腹腔内投与 8 時間後には、肝傷害を示す ALT の有意な上昇が確認できたので、この条件での田七人参の作用を検討した。この実験では、血清 AST の測定も追加し、結果を Fig. 2 に示す。凍結乾燥田七人参 200 mg を精製水 10 mL に懸濁して、LPS/GalN 投与 2 時間前に 10 mL/kg の用量で経口投与すると、肝傷害による血清 ALT と AST の上昇はともに有意に抑制された。

市販の田七人参製剤を 10 mL/kg の用量で経口投

与しても、肝傷害による血清 ALT と AST の上昇の有意な抑制は認められなかった。しかし、投与量を倍量 (20 mL/kg) にすると、肝傷害による血清 ALT と AST の上昇はともに有意に抑制された。

3. LPS/GalN による血清 ALT 上昇に対する田七人参成分 (Rb₁ 及び Rg₁) の作用 肝傷害時の血清 ALT 上昇に対する田七人参成分 (Rb₁ 及び Rg₁) の作用を Fig. 3 に示す。Normal 群の血清 ALT 値の 21 Karmen unit に比較すると、LPS/GalN を腹腔内投与した 8 時間後では、1132 Karmen unit まで有意に増加した (Control 群)。その Control 群に対し、田七人参成分である Rb₁ は、1 及び 10 μ mol/kg の用量では効果が認められないものの、100 μ mol/kg の用量で経口投与すると ALT の上昇は、262 Karmen unit まで有意に抑制された。成分 Rg₁ は、10 μ mol/kg 及び 100 μ mol/kg の用量を経口投与すると、それぞれ 513, 449 Karmen unit まで ALT の上昇が抑制される傾向が認められた。したがって、LPS/GalN による血清 TNF- α と IFN- γ の上昇に対する Rb₁ と Rg₁ の効果の検討は、100 μ mol/kg 投与で行った (Fig. 3)。

4. LPS/GalN による血清 TNF- α と IFN- γ の上

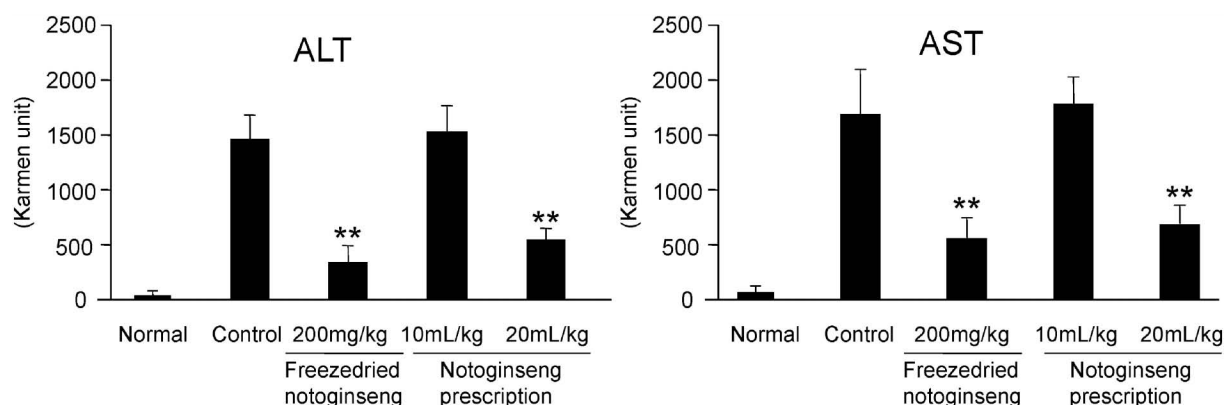


Fig. 2. Effects of Notoginseng on the Increased Serum Levels of ALT and AST Induced by LPS/GalN Injection in Mice

Freeze-dried notoginseng dissolved in water or notoginseng prescription was administered 2 h before LPS/GalN injection. Mice in the normal group were not received LPS/GalN injection. Mice in the control group were received LPS/GalN injection, but not treated with notoginseng. The data are expressed as means \pm S.E. of 10–12 observations. ** $p < 0.01$ vs. control.

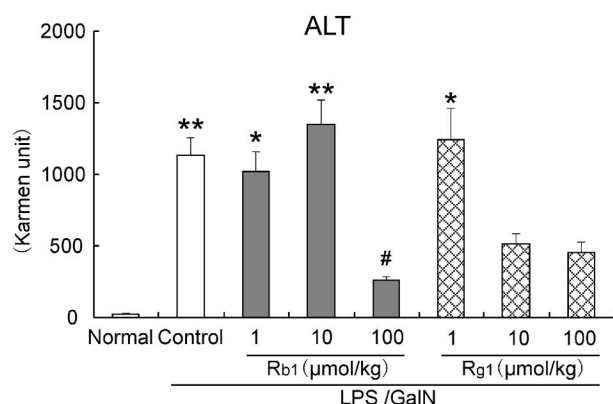


Fig. 3. Effects of a Component of Notoginseng, Rb₁ or Rg₁ on Serum ALT Increased by LPS/GalN Injection in Mice

The components of notoginseng, Rb₁ and Rg₁ were obtained from the roots of notoginseng. Rg₁ and Rb₁ were dissolved in water to be the concentration at 1, 10 and 100 μ mol/10 mL. Rg₁, Rb₁ or vehicle at 10 mL/kg was administered 2 h before LPS/GalN injection. The blood sample was taken 8 h after the injection. The data are expressed as means \pm S.E. of 10–12 observations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. normal, # $p < 0.05$ vs. control.

昇に対する Rb₁ 及び Rg₁ の作用 Figure 1 に示すように、血清 TNF- α は、LPS/GalN 投与 1 時間後に最大値に達する一過性の上昇を示し、血清 IFN- γ は、投与 5 時間後から有意な上昇を示している。したがって、田七人參の成分 Rb₁ と Rg₁ の効果を検討するために、血清 TNF- α は LPS/GalN 投与 1 時間後と 3 時間後の値を測定し、血清 IFN- γ は LPS/GalN 投与 5 時間後と 7 時間後の値を測定して、Fig. 4 に示し、図の左側に TNF- α 、右側に IFN- γ の結果を示す。LPS/GalN 腹腔内投与 1 時間後に、血清 TNF- α は 877 pg/mL まで有意に増加し、3 時間後には、158 pg/mL と Normal 群の値近傍に

向かって戻っていた。LPS/GalN 投与 2 時間前に田七人參成分 Rb₁ あるいは Rg₁ を経口投与していても、1 時間後に観察される血清 TNF- α 上昇は、有意には影響されなかった。むしろ、Rg₁ 前投与は、LPS/GalN 投与 1 時間後の血清 TNF- α を 1601 pg/mL へ有意な差は認められなかったものの、増加傾向がみられた。血清 IFN- γ は LPS/GalN 腹腔内投与 5 時間後では有意上昇を示さなかったが、投与 7 時間後では有意な増加を認めた。LPS/GalN 投与 2 時間前に田七人參成分 Rb₁ あるいは Rg₁ を経口投与すると、LPS/GalN 投与 5 時間後の血清 IFN- γ は、有意に影響されなかった。一方、投与 7 時間後に増加する IFN- γ は、Rb₁ あるいは Rg₁ 前投与によって有意に抑制された。

5. LPS/GalN 誘発肝傷害モデルマウスの組織学的所見 生理的食塩水 (Normal 群) あるいは LPS/GalN (Control 群) を腹腔内に投与して 8 時間後のマウス肝臓組織の HE 染色像を Fig. 5 に示す。また、LPS/GalN 腹腔内投与 2 時間前に凍結乾燥田七人參 200 mg/kg、市販の田七人參製剤 10 mL/kg、あるいは田七人參の成分 Rb₁ 又は Rg₁ をそれぞれ 100 μ mol/kg の用量で経口投与したマウスの肝臓組織の HE 染色像も併せて示す。HE 染色では、ヘマトキシリンによって核が青く染色され、エオジンによって細胞質や赤血球が赤く染色される。Normal の肝臓組織では、肝傷害を認める所見は得られなかったが、LPS/GalN 投与 8 時間後の Control 群の肝臓組織では、Normal 群と比較して細胞変性及び壊死が広範囲に確認され、肝細胞の脱落し

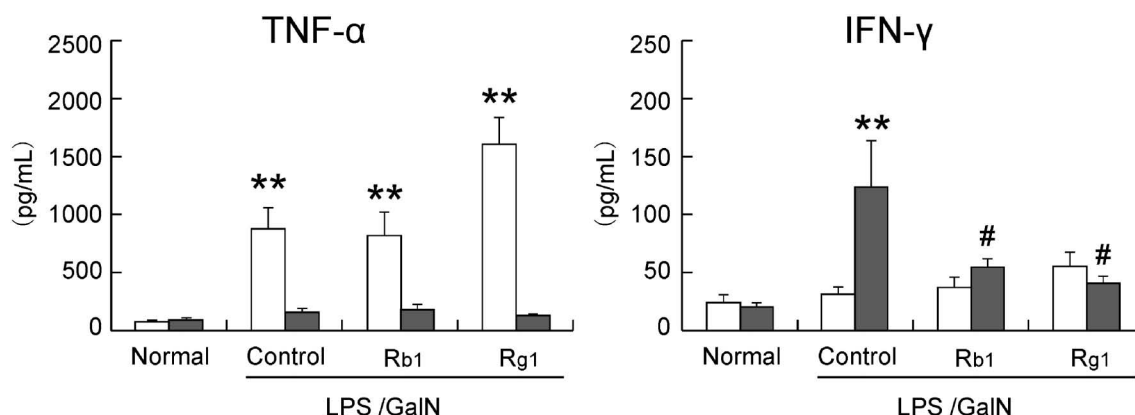


Fig. 4. Effects of a Component of Notoginseng, Rb₁ or Rg₁ on Serum TNF- α and IFN- γ Increased by LPS/GalN Injection in Mice

Experimental design is the same as shown in Fig. 3. The blood samples for TNF- α assay were taken 1 and 3 h after the injection, and those for IFN- γ assay were taken 5 and 7 h after the injection. In left panel, open and solid columns indicate TNF- α values obtained 1 and 3 h after LPS/GalN injection, respectively. In right panel, open and solid columns indicate IFN- γ values obtained 5 and 7 h after LPS/GalN injection, respectively. The data are expressed as means \pm S.E. of 10–12 observations. ** p <0.01 vs. normal, # p <0.05 vs. a corresponding value in control.

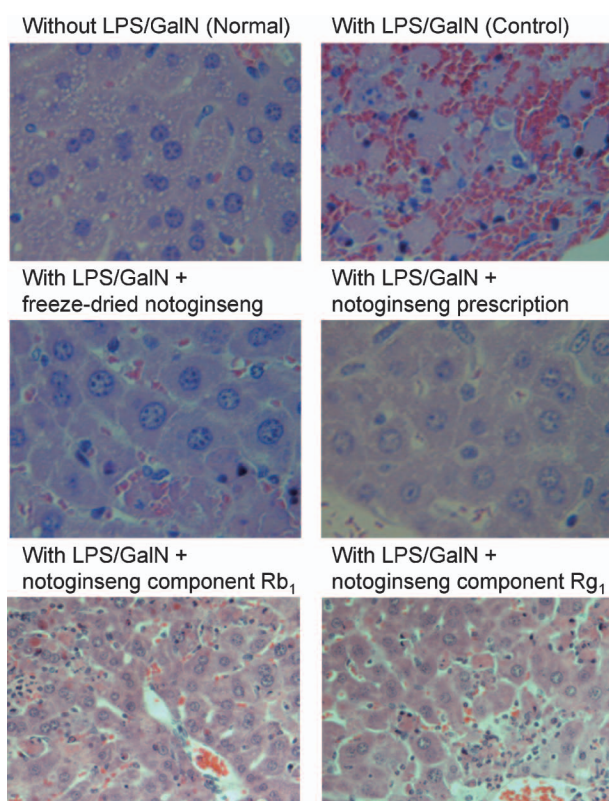


Fig. 5. Effects of Notoginseng and Its Components on Histological Changes in Mouse Liver Induced by LPS/GalN

The hepatic tissue sample was removed 8 h after LPS/GalN injection, and stained with hematoxylin-eosin (HE). The experimental protocols were the same as those indicated in Fig. 3. The doses are described in text. Magnification is $\times 400$.

たところに出血が認められ、肝傷害の所見が観察された (upper panels). 一方、LPS/GalN 投与 2 時間前に凍結乾燥田七人參あるいは市販の田七人參製

剤を経口投与しておく、LPS/GalN によって誘発される肝傷害の組織学的所見の軽減が認められた (middle panels). 田七人參の主要成分である Rg₁, Rb₁ の前投与も組織学的な肝傷害の程度は軽減するが、生薬あるいは田七人參製剤として投与するよりも成分として投与した方が、肝傷害抑制作用は弱くなることが示唆された (lower panels).

考 察

肝炎等、肝臓傷害のモデルはいくつか報告されているが、本論文で採用したモデルマウスはそれぞれ単独では肝傷害を起こさない用量の LPS と GalN を併用投与することにより作製した。LPS/GalN を投与すると、血清中では最初の 1 時間で TNF- α が一過性に増加し、つづいて投与 5 時間目前後から IFN- γ が増加して、最終的に投与 7 時間後くらいから ALT が急激に増加した (Fig. 1). LPS を認識したマクロファージは TNF- α やインターロイキンなど多くの炎症性サイトカインを産生する.^{9,10)} 例えば、IL-8 は好中球を遊走させ、好中球由来のエラスターゼや活性酸素種などが多量に放出され細胞を傷害する.¹¹⁾ IL-12 や IL-18 は、I 型ヘルパー T 細胞や NK 細胞を活性化し、IFN- γ を産生させて、細胞を傷害する.¹²⁾ 最終的に肝細胞傷害の結果として肝傷害のマーカーである血清 ALT が上昇する。本論文で用いた用量の LPS は単独で投与しても肝障害を引き起こさないの、併用した GalN が LPS による免疫担当細胞の活性化を増強するか、免疫担

当細胞が産生するサイトカインの作用を増強して、LPSによる肝傷害惹起作用を増幅して肝傷害を引き起こすと考えられている。⁶⁾ この肝傷害モデルマウスに田七人參製剤 20 mL/kg あるいは凍結乾燥田七人參 200mg/kg を経口投与すると、LPS/GalN 投与によって上昇するはずの血清 ALT、AST は有意に抑制された。この肝傷害軽減作用は田七人參中の主要成分である Rb₁ 及び Rg₁ の高用量 (100μmol/kg) 投与でも観察された。このことは田七人參の肝傷害を抑制する作用は、これら ginsenoside 類に由来するのかもしれない。ただし、Rb₁ 及び Rg₁ は、低用量では ALT 上昇を抑制しなかったこと、組織学的所見による効果が弱かったことを考慮すると、市販の田七人參製剤あるいは凍結乾燥田七人參に含まれる Rb₁ 及び Rg₁ 以外の成分も肝傷害抑制に直接あるいは間接的に係わっているのかもしれない。Rb₁ 及び Rg₁ は、LPS/GalN 投与初期の血清 TNF-α の一過性の上昇を抑制することなく、次に起こる血清 IFN-γ の増加を抑制した (Fig. 4)。IFN-γ は T 細胞、NK 細胞が産生し、この IFN-γ 産生はクッパー細胞が産生する IL-12、IL-18 によって活性化される。Rb₁ 及び Rg₁ は、TNF-α が放出されていても、T 細胞や NK 細胞に直接働いて IFN-γ 産生を抑制したか、クッパー細胞に働いて IL-12、IL-18 の産生を抑制することによって間接的に IFN-γ の産生を抑制したと推察される。したがって、市販の田七人參製剤あるいは凍結乾燥田七人參はマクロファージなどからの TNF-α 産生を抑制して、初期段階から肝細胞の炎症性反応を抑制するのに対して、Rb₁ 及び Rg₁ は、TNF-α 産生を全く抑制せず、IFN-γ 産生以降の段階から炎症性反応を抑制するので、結果としての肝傷害抑制強度にも差が認めれたと考察できる。以上の結果から、補剤の一種であり、中国でウイルス性肝炎に汎用されている片仔廣の主構成生薬である田七人參は、外因性

の刺激による炎症が原因となって発症する肝臓傷害の程度を軽減する可能性が示唆された。

REFERENCES

- 1) Wakita T., *J. Clin. Exp. Med.*, **229**, 53–58 (2009).
- 2) Shindo M., *J. Clin. Exp. Med.*, **229**, 17–22 (2009).
- 3) Hirayama C., Okumura M., Tanikawa K., Yano M., Mizuta M., Ogawa N., *Gastroenterol. Jpn.*, **24**, 715–719 (1989).
- 4) Akbar S. M., Yamamoto K., Abe M., Ninomiya T., Tanimoto K., Masumoto T., Michitaka K., Horiike N., Onji M., *Eur. J. Clin. Invest.*, **29**, 786–792 (1999).
- 5) Kakumu S., Yoshioka K., Wakita T., Ishikawa T., *Int. J. Immunopharmacol.*, **13**, 141–146 (1991).
- 6) Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 627–631 (2002).
- 7) Jonker A. M., Dijkhuis F. W., Hardonk M. J., Moerkerk P., Ten Kate J., Grond J., *Hepatology*, **19**, 775–781 (1994).
- 8) Yoshikawa M., Morikawa T., Kashima Y., Ninomiya K., Matsuda H., *J. Nat. Prod.*, **66**, 922–927 (2003).
- 9) Morikawa A., Sugiyama T., Kato Y., Koide N., Jiang G., Takahashi K., Tamada Y., Yokochi T., *Infect. Immun.*, **64**, 734–738 (1996).
- 10) Chen X., Cao J., Xu Q., *Inflamm. Res.*, **49**, 571–577 (2000).
- 11) Baggiolini M., Walz A., Kunkel S. L., *J. Clin. Invest.*, **84**, 1045–1049 (1989).
- 12) Okamura H., Kashiwamura S., Tsutsui H., Yoshimoto T., Nakanishi K., *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 259–264 (1998).