〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
100 (6) 607—610 (1980)

柴胡剤の薬理学的研究 (第 2 報¹⁾) 肝臓の機能および超微構造への影響

阿部博子, 安田裕紀子, 山田昌代, 小西啓悦, 有地 滋
近畿大学 東洋医学研究所²⁾

Pharmacological Studies on Prescription containing Bupleuri Radix. II. Effects on Function and Ultrastructure of Liver

HIROKO ABE, YUKIKO YASUDA, MASAYO YAMADA,
HIROYOSHI KONISHI and SHIGERU ARICHI

The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University²⁾

(Received October 12, 1979)

Changes in mitochondrial and microsomal enzyme activities and in hepatic ultrastructure were examined in rats treated with Dai-Saiko-Toh, Sho-Saiko-Toh or Saiko-Keishi-Toh. In liver homogenates of rats treated with Dai-Saiko-Toh, the activities of NADPH-cyt.c reductase and G-6-Pase were markedly decreased; a similar, but weaker trend was noted in rats treated with Sho-Saiko-Toh. Succinate-cyt.c reductase activity was also decreased in the rats treated with Dai-Saiko-Toh or Sho-Saiko-Toh. Electron-microscopy of liver tissue showed that mitochondria in the liver of rats treated with Dai-Saiko-Toh or Sho-Saiko-Toh were very small and that the volume density of mitochondria was also lower than in the control.

Keywords——Bupleuri Radix; NADPH-cyt.c reductase; G-6-Pase; 5'-nucleotidase; Dai-Saiko-Toh; Sho-Saiko-Toh; Saiko-Keishi-Toh

緒 言

大柴胡湯, 小柴胡湯を正常ラットに長期間投与すると, 副腎, 胸腺の重量および光学顕微鏡所見の変化が認められる¹⁾ が柴胡桂枝湯投与ラットでは全く変化が見られなかった. また肝臓では, それら 3 処方投与群のいずれにおいても, その重量や光学顕微鏡所見で著明な変化は見られなかった.¹⁾ しかし大柴胡湯, 小柴胡湯, 柴胡桂枝湯等の柴胡剤がしばしば肝炎の治療に用いられることから, 本論文ではこれらの柴胡剤が肝機能に及ぼす影響やその effective site などについて, 酵素学的, 電子顕微鏡学的に詳細な検討を行った.

実験材料並びに実験方法

1. **実験動物** Wistar 系雄性ラット (実験開始時体重 80—100 g, 実験終了時体重 180—200 g) を市販固形飼料で飼育し各実験当り 5 匹を用いた.

2. **煎液調製法** 前報¹⁾ と同様の方法で煎液の調製を行った.

3. **煎液の投与量および投与方法** 各煎液をラット体重 100 g 当り 1 ml, 1 日 1 回強制経口投与した. 投与量は成人 1 日投与量の 10 倍量に相当する. 投与期間は 1 週間に 6 回, 実投与日数 28 日間であった. 対照群には常水を煎液と同様の方法で与えた.

4. **肝ホモジネートの調製法** ラットをエーテル麻酔下で脱血 (頸部切断) し, 開腹の後, 肝臓を摘出した. 取り出した肝臓を 0.25 M sucrose (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4) 中で細切し, 洗浄後, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで 25% ホモジネートを作製した. 得られたホモジネートの蛋白濃度を Lowry 法³⁾ で測定し 20 mg protein/ml の濃度に 0.25 M sucrose 液で希釈し, これを酵素活性測定用ホモジネートとして使用した.

5. **酵素活性測定法** G-6-Pase——Swanson の方法⁴⁾ に従って酵素反応を行った. リン酸定量は Fiske-Sub-

1) 第 1 報: 阿部博子, 安田裕紀子, 小田島肅夫, 有地 滋, 薬誌, 100, 602 (1980).

2) Location: Sayama, Minamikawachi-gun, Osaka.

3) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

4) A.M. Swanson, "Method in Enzymology," Vol. 2, ed. by R.W. Estabrook and M.E. Pullman, Academic Press, New York and London, 1955, pp. 541—543.

barow 法を改良した Bartlett による方法⁵⁾で行った。

NADPH-cyt. c Reductase—Williams の方法⁶⁾で測定した。

Succinate-cyt. c Reductase—King の方法⁷⁾で測定した。

5'-Nucleotidase—Wright の方法⁸⁾に従って測定した。

6. 電子顕微鏡試料作製法 約 1 mm³ の肝組織を 3% glutaraldehyde 溶液 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) で固定後, 2% osmium tetroxide (0.1 M veronalacetate buffer, pH 7.4) で後固定しついでアルコール, プロピレンオキサイドで脱水し, Epon 包埋を行った。超薄切片は uranyl acetate, lead citrate で二重染色し電子顕微鏡で観察した。

7. ミトコンドリアの定量 電子顕微鏡像によるミトコンドリアの volume-density の測定は, Weibel らの方法⁹⁾に従った。最終拡大 12000 倍の写真を用い, 全細胞質に対する volume-density を % で求めた。表示した数値は各実験群につき, 少なくとも 50 区画の細胞質について測定した結果で, 平均値±標準誤差値で表した。

結 果

1. 煎液の肝臓酵素活性への作用

対照群ラットおよび大柴胡湯, 小柴胡湯, 柴胡桂枝湯投与群ラットの肝ホモジネートでの G-6-Pase, 5'-Nucleotidase, Succinate-cyt. c reductase, NADPH-cyt. c reductase 活性の結果は Table I に示されている。

対照群に比べて最も酵素活性の変動が著明であったのは大柴胡湯投与群で, 特に小胞体系酵素, G-6-Pase, NADPH-cyt. c reductase の活性の減少およびミトコンドリア酵素, succinate-cyt. c reductase の活性の減少が特徴的であった。小柴胡湯投与群では G-6-Pase 活性の減少を示すが, その減少率は大柴胡湯より弱く, NADPH-cyt. c reductase 活性もやや減少傾向を示すが, 大柴胡湯投与群より軽度であった。Succinate-cyt. c reductase の活性は大柴胡湯投与群同様, 著しい減少を示した。柴胡桂枝湯投与群では全ての酵素において変化は認められなかった。

2. 肝臓の電子顕微鏡学的所見

Fig. 1 は対照群ラット肝 (a), 大柴胡湯投与群ラット肝 (b) および小柴胡湯投与群ラット肝 (c) の電子顕微鏡像である。この写真からも明らかなように大柴胡湯投与群および小柴胡湯投与群のラット肝では, ミトコンドリアが小さく細胞質内の分布状態にやや偏り (一部分に群集していることが多い) が認められる。しかし, クリステラなどには特に変化は見られない。

TABLE I. Effects of Crude Extract of Prescription Containing Bupleuri Radix on Various Enzyme Activities in Liver

Prescription	Liver weight (g)	Protein content ¹	G-6-Pase ²	5'-Nucleotidase ²	Suc-cyt. c ³ reductase	NADPH-cyt. c ³ reductase
control	7.68±0.28	145.4±4.0	49.94±2.56	25.37±1.44	20.29±1.51	25.47±0.68
Dai-Saiko-Toh	7.53±0.24	154.8±4.0	35.45±2.17 ^{a)}	25.04±0.88	15.00±0.58 ^{b)}	18.07±2.66 ^{b)}
Sho-Saiko-Toh	7.35±0.37	135.5±9.7	40.75±3.26 ^{c)}	25.56±0.92	12.93±0.83 ^{a)}	19.47±1.71 ^{b)}
Saiko-Keishi-Toh	8.63±0.30	149.2±14.1	53.55±6.27	29.88±1.97	22.89±0.88	21.32±1.80

All values are expressed as the means±S.E.

¹mg of protein per g of liver weight.

²Micromoles of Pi per min per mg of protein.

³Millimicromoles of cytochrome c reduced per min per mg of protein.

a) Very significantly different from the value in control, $p<0.01$.

b) Significantly different from the value in control, $p<0.05$.

c) Different from the value in control, $p<0.1$.

5) G.R. Bartlett, *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).

6) G.H. William, Jr., H. Kamin, *J. Biol. Chem.*, **237**, 587 (1962).

7) T.E. King, "Method in Enzymology," Vol. 10 ed. by R.W. Estabrook and M.E. Pullman, Academic Press, New York and London, 1967, pp. 216—222.

8) G.H. Wright, *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 368 (1977).

9) E.R. Weibel, G.S. Kistler, Scherle, W.F., *J. Cell Biol.*, **30**, 23 (1966).

Fig. 1. Electron Micrographs of Liver Tissues of a Normal Rat (a), a Rat treated with Dai-Saiko-Toh (b) and a Rat with Sho-Saiko-Toh (c) ($\times 8000$)

In the liver tissues of rats treated with Dai-Saiko-Toh or Sho-Saiko-Toh, the size of mitochondria is very small (b) (c) and numerous glycogen particles are shown (b).

Fig. 2. High-magnification Electron Micrographs of Liver Tissues of a Normal Rat (a) and a Rat treated with Dai-Saiko-Toh (b) ($\times 12000$)

A well developed network of rough endoplasmic reticulum is observed in a section of normal rat liver. In the liver tissues of rats treated with Dai-Saiko-Toh, the rough endoplasmic reticulum is poorly developed.

また Fig. 2 に示されるように大柴胡湯投与ラット肝 (b) では、粗面小胞体の発達が対照 (a) に比べてやや低下しているのが特徴的であった。小柴胡湯投与群では特に変化は見られなかった。

柴胡桂枝湯投与群ではミトコンドリア、小胞体に変化は認められなかった。

核、ゴルジ装置、ライソゾームなどについては、いずれの煎液投与群でも変化は見られなかった。

3. ミトコンドリアの Volume Density

ミトコンドリアの大きさに変化の見られた大柴胡湯、小柴胡湯投与群ラットの肝臓について、ミトコンドリアが細胞質内でしめる容積を%で求め、対照群ラット肝との比較を行った。

対照群ラット肝のミトコンドリアの細胞質に対する volume density は $19.13 \pm 0.78\%$ であるのに対して大柴胡湯投与群ラット肝では、 $13.39 \pm 0.65\%$ で有意の減少を示した。また小柴胡湯投与群でも $15.80 \pm 0.56\%$ で同様の傾向を示した。

考 察

ラットに大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯を経口投与することによって肝重量、光学顕微鏡所見に変化は認められなかった¹⁾ が、肝小胞体、ミトコンドリア系酵素活性および電子顕微鏡所見では対照群との間に著明な差が

認められた。特にその変化は大柴胡湯において著しく、小柴胡湯ではやや弱いことが確認された。肝小胞体系酵素である G-6-Pase, NADPH-cyt. c reductase の活性は、柴胡の有効成分、サイコサポニン (特にサイコサポニン d, a) の投与によって著明に減少することが確認されている。¹⁰⁾ 大柴胡湯投与による G-6-Pase, NADPH-cyt. c reductase の活性減少はサイコサポニンによる作用と極めて良く類似している。しかしサイコサポニン投与の場合、ミトコンドリアには著明な変化は認められない¹⁰⁾ のに対して、大柴胡湯、小柴胡湯投与群ラットでは、succinate-cyt. c reductase の活性が減少し、また電子顕微鏡像においてもミトコンドリアが小さく、volume density も明らかに減少している。大柴胡湯、小柴胡湯投与による小胞体系酵素活性の変化は、これら処方中の柴胡による可能性が強いが、ミトコンドリアに対する作用は、柴胡以外の生薬によると推測される。

またサイコサポニン d あるいは a 投与によって、5'-nucleotidase の活性が著明に増加する¹⁰⁾ が、大柴胡湯や小柴胡湯では 5'-nucleotidase の活性に著明な変化の見られないことは極めて興味深い結果である。すなわち、肝臓に対するサイコサポニンの作用は、サイコサポニンだけを単独で投与する場合と、煎液として他の生薬成分と共に投与される場合とでは、その作用の仕方が異なっていると考えられる。しかし、このような作用の相異は煎液が経口投与で数週間の長期投与であるのに対して、サイコサポニン投与の実験は、腹腔内投与であるという投与方法、投与量、投与期間の違いによる可能性も考慮しなければならないであろう。

大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯の肝臓に対する作用力の強弱はそれぞれの煎液中に含まれるサイコサポニンの量、あるいはサイコサポニン a, b₁, b₂, c, d などの組成比によって大きく影響されることが考えられるが、有地らの報告¹¹⁾ によれば、これら3処方煎液中での柴胡 1g 当りのサイコサポニン量はほぼ同じであるが、各サイコサポニン組成比では、最も作用の強いサイコサポニン d の比が、大柴胡湯で 4.5%、小柴胡湯 3.9%、柴胡桂枝湯 2.8% となっており、煎液の作用力と良い一致を示しているように思われる。しかしサイコサポニン d や a は体内において b 群に変化する可能性も強く、煎液の作用力については、他生薬の薬効と共にさらに詳細な検討を要するであろう。

謝辞 本研究に御助力頂きました津村順天堂に感謝いたします。

10) H. Abe, T. Nagao, M. Yamada, S. Arichi, *Planta Medica*, In Application.

11) 有地 滋, 谿 忠人, 久保道徳, 近大医誌, 4, 59 (1979).