

令和元年8月30日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08941

研究課題名(和文) 閉塞性黄疸における柴苓湯の肝線維化抑制とアクアポリン発現からみたメカニズム解析

研究課題名(英文) The herbal medicines Inchinkoto and Saireito exert beneficial effects of reducing hepatic fibrosis in bile duct ligation rat liver

研究代表者

八木 実 (Yagi, Minoru)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：10251802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：総胆管結紮(BDL)モデルで漢方薬による肝線維化抑制効果をサイトカインとaquaporin(AQP)の変動で検討した。8週齢Wistar系雄性ラットを用いた。開腹(Sham)群、胆管結紮(NT)群、柴苓湯(SRT)投与群、茵陈蒿湯(ICKT)投与群、併用投与(SRT+ICKT)群を作成した。肝臓でNF- κ B遺伝子発現は、Sham群に比べNT群で有意な増加を認めたがICKT群と併用群で有意に低下した。AQP9はICKT群に比べ併用群で有意な発現増加を認めた。病理評価で線維化やNF- κ Bは併用群がNT群に比べ有意に少なかった。併用投与は肝線維化抑制効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症など不可逆的な胆汁鬱滞性肝障害に対して、自己肝生存期間を少しでも上昇させるための代替療法としてさらなる一手を検討した。茵陈蒿湯は術後早期から減黄のみならず、肝機能改善目的に用いられる。その中でも減黄不良例や黄疸再燃例に柴苓湯の併用が有効との報告がされているがその詳細は不明な点が多い。そこで実験的に柴苓湯投与例における肝線維化の抑制効果およびそのメカニズム、茵陈蒿湯との併用により更なる肝線維化抑制効果があるかを解明した。

研究成果の概要(英文)：Whether or not the administration of the Inchinkoto (ICKT) and Saireito (SRT) ameliorate hepatic fibrosis and injury in bile duct ligation (BDL) rats. Five groups of Wistar rats: sham surgery (Sham group), BDL only, BDL plus ICKT, BDL plus SRT and BDL plus ICKT and SRT. We subsequently investigated the levels of fibrosis and various clinical markers by measuring the following: NF- κ B, TGF- β 1 and TIMP-1 mRNA through a real-time PCR analysis; Masson trichrome (MT) staining to evaluate the degree of fibrosis; and staining of NF- κ B to evaluate inflammatory responses. The levels of NF- κ B mRNA in the ICKT and ICKT+SRT groups were significantly lower than in the NT group. The degree of MT staining in the ICKT-SRT group was significantly lower than in the NT group. The degree of NF- κ B staining in the ICKT-SRT group was significantly lower than in the NT group. ICKT and SRT results in synergic beneficial effects of reducing hepatic fibrosis through attenuating inflammatory responses.

研究分野：東洋医学

キーワード：胆道閉鎖症 茵陈蒿湯 アクアポリン 柴苓湯 胆汁鬱滞性肝障害 肝線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は肝門部空腸吻合術により黄疸消失が得られた後も肝病変が進行・増悪する症例は少なくない。これは肝内に残存する持続的炎症が主因と考えられ、我々はその増悪因子として活性酸素や radical の酸化ストレス過剰生産を報告してきた(Asakawa T, Yagi M, et al. *Pediatr Surg Int* 2009)。我々はこれまで胆管結紮モデルラットを用い、胆汁鬱滞性肝障害による酸化ストレスに対して抗酸化物質であるエピガロカテキンガレート投与し、転写因子の抑制、肝星細胞の活性化を抑制することにより肝線維化の抑制効果を認めた(Kobayashi H, Yagi M, et al. *Phytomedicine* 2010)。一方では、実際の臨床で胆道閉鎖症術後例に対する茵陳蒿湯の肝機能の改善、肝線維化抑制効果の検討も行い、その効果も報告してきた(Iinuma Y, Yagi M, et al. *J Pediatr Surg* 1607-1611 2003)。更に茵陳蒿湯の肝線維化抑制効果について胆管結紮モデルラットを用い検討し、肝線維化抑制、肝組織中 TGF- β 1 の低下より星細胞活性化の抑制(図2)ならびに肝組織中 TIMP-1 mRNA Real time PCR 測定から細胞外マトリックス分解酵素の抑制効果による可能性が高いことを報告してきた(Asakawa T, Yagi M, et al. *Pediatr Surg Int* 2012)。

実臨床では減黄不良例や黄疸再燃例に遭遇することが多い。その際利尿作用や内因性ステロイド作用を目的として柴苓湯を併用し有効である場合があるが、その作用機序には未解明な点が多い。今回、我々は柴苓湯の作用機序の解明に注目した。柴苓は小柴胡湯と五苓散の合方で、実臨床では小柴胡湯の適応症である熱性症状、および五苓散の適応症である水分代謝異常の病態を併せ持つ症例に対して幅広く応用されている。柴苓湯は、動物実験による基礎研究で内因性ステロイド分泌の増加作用や糸球体腎炎モデルラットにおけるメザンギウム細胞増殖と細胞外マトリックスの領域拡大抑制作用や線維化へと向かうサイトカインである TGF- β 1 や結合組織増殖因子の抑制作用、SOD 活性増加作用が報告されている。柴苓湯構成生薬の一つである小柴胡湯は、胆管結紮モデルでの細胞外マトリックスの領域拡大抑制や TIMP-1 mRNA の減少、TGF- β 1 の抑制効果が報告されている。しかしながら柴苓湯による肝臓に対する系統的な基礎研究成果は未だ報告されていないのが現状である。もう一つの構成生薬は五苓散である。五苓散の作用機序において近年アクアポリン(AQP)が注目されている。一般に肝組織中には、AQP1、AQP8、AQP9、AQP11 が存在しており、その中でも肝内胆管に存在する AQP1 は胆汁排出に関わるとされている。AQP1 はラットにおいて肝内胆管の細胆管上皮細胞の管腔側に発現が立証されており、セクレチンの刺激により管腔面に移動し胆管細胞の水透過性に関与し、胆嚢上皮細胞の管腔側、血管側にも発現し、胆嚢内の胆汁を濃縮に関与している。そこで AQP1 を介した柴苓湯による肝線維化の抑制効果、及びそのメカニズム、更には茵陳蒿湯との併用による更なる肝線維化抑制効果の増強があるのかも解明したい。

2. 研究の目的

胆道閉鎖症術後例では減黄されても肝内慢性炎症に伴う肝硬変症に移行する例が少なくない。茵陳蒿湯は術後早期から減黄のみならず、肝機能改善目的に用いられる。その中でも減黄不良例や黄疸再燃例に柴苓湯の併用が有効との報告がされているがその詳細は不明な点が多い。そこで実験的に柴苓湯投与例における肝線維化の抑制効果およびそのメカニズム、茵陳蒿湯との併用により更なる肝線維化抑制効果があるかを解明したい。分子生物学的に柴苓湯による肝組織及び血液内の TIMP-1 mRNA 及び AP-1 mRNA の発現の程度や変化、更には肝内胆管の細胆管上皮細胞における水チャネルであるアクアポリン 1 の発現の有無や程度も併せて検討しその作用機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

開腹モデル(Sham 群 n=8)、胆管結紮モデル(NT 群 n=12)、柴苓湯内服モデル(SRT 群 n=11)、茵陳蒿湯内服モデル(ICKT 群 n=9)、茵陳蒿湯と柴苓湯を併用内服モデル(SRT+ICKT 群 n=9)の群での比較検討を行った。胆管結紮を施行後 3 週間試薬の内服を経口ゾンデ法により行っている。

- (1) 血液検査において、肝機能の指標である AST, ALT, T-Bil, D-Bil の測定を行った。
- (2) RT-PCR にて肝臓内 NF- κ B, Jun, TGF- β 1, TIMP-1, AQP1, AQP8, AQP9, AQP11 を比較した。
- (3) 病理学的評価では「細胆管の増生」[線維化]、[炎症]、[NF- κ B]の4項目で評価した。[細胆管の増生] 0: 細胆管の増生がないもの、1: 細胆管の増生が門脈域に局限して見られるもの、2: 細胆管の増生が門脈域を超えてわずかに小葉内に及ぶもの、3: 細胆管の増生が門脈域から小葉内に広く及ぶもの、と区分した。[線維化] 線維化は Masson trichrome 染色にて評価した。0: 線維化がないもの、1: 門脈域の線維性拡大があるもの、2: 小葉内まで線維帯の伸展があるもの、3: 小葉構築の改変があるもの、と区分した。[炎症] 0: 炎症細胞の浸潤がほとんどないもの、1: 炎症細胞の浸潤が門脈域を主体にみられるが、interface hepatitis がないもの、2: interface hepatitis を伴うもの、3: 小葉内に広く炎症細胞の浸潤が見られるもの、と区分した。[NF- κ B] NF- κ B (CST, NF- κ B p65(D14E12)) を用いて免疫染色を行った。0: 発現がないもの、1: 1-10%の細胞に発現が見られるもの、2: 11-50%の細胞に発現が見られるもの、3: 51%以上の細胞に発現が見られるもの、と区分した。

4. 研究成果

- (1) 血液検査では、sham 群以外の 4 群は sham 群と比較して、全ての検査で増加を認めていた。NT 群と比較して AST は ICTK 群, SRT+ICKT 群で、ALT は SRT 群, ICTK 群, SRT+ICKT 群で有意に低下した。T-Bil, D-Bil に有意差は認められなかった。
- (2) RT-PCR では AP-1, TGF- β 1, PDGF, AQP1 は 5 群で差はなかった。NF- κ B, TIMP-1 は Sham 群と比較して NT 群が有意な発現増加を認め、AQP8, 9, 11 は有意な発現抑制を認めた。AQP9, 11 は NT 群と比較して ICTK 群と SRT+ICKT 群は有意な発現増加を認めた。NF- κ B は NT 群, SRT 群と比較して SRT+ICKT 群は有意な発現抑制を認めた。
- (3) 病理学的検査では、線維化(Fibrosis)は SRT+ICKT 群は NT 群, SRT 群と比較して有意に少なかった。NF- κ B は SRT+ICKT 群は NT 群, SRT 群, ICTK 群と比較して有意に少なかった。細胆管の増生(Bile ductular proliferation)や炎症(Inflammation)は Sham 群以外の 4 群に差はなかった。

本研究により茵陈蒿湯と柴苓湯併用は炎症性サイトカインを抑制し肝線維化の抑制効果をもたらすことが示された。肝細胞の洞様血管側の細胞膜に局在する AQP9 の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

橋詰直樹, 田中芳明, 深堀優, 石井信二, 七種伸行, 古賀義法, 東館成希, 升井大介, 坂本早季, 霧久土保利, 八木 実: 小児におけるプレバイオティクス・プロバイオティクスの活用日本静脈経腸栄養学会雑誌 33, 1111-1114 2018 査読なし

八木 実, 恵紙英昭, 橋詰直樹, 深堀 優: 小児外科領域における漢方治療(肛門周囲膿瘍, 慢性便秘) チャイルドヘルス 21, 20-23 2018 査読なし

Hashizume Naoki, Fukahori Suguru, Asagiri Kimio, Ishii Shinji, Saikusa Nobuyuki, Higashidate Naruki, Yoshida Motomu, Masui Daisuke, Sakamoto Saki, Tanaka Yoshiaki, Yagi Minoru, Yamashita Yushiro: The characteristics of salivary pepsin in patients with severe motor and intellectual disabilities Brain and Development 39 703-709 2017 査読あり

Obata Satoshi, Fukahori Suguru, Yagi Minoru, Suzuki Makoto, Ueno Shigeru, Ushijima Kosuke, Taguchi Tomoaki: Internal anal sphincter achalasia: data from a nationwide survey of allied disorders of Hirschsprung's disease in Japan Surgery Today 47 1429-1433 2017 査読あり

Yoshida Motomu, Asagiri Kimio, Fukahori Suguru, Tanaka Yoshiaki, Hashizume Naoki, Ishii, Shinji, Saikusa Nobuyuki, Higashidate Naruki, Masui Daisuke, Komatsuzaki Naoko, Nakahara Hiroto, Yagi Minoru, Yamashita Yushiro: The utility of a phase angle analysis in patients with severe motor and intellectual disabilities Brain and Development 39 557-563 2017 査読あり

Hashizume Naoki, Yagi Minoru, Ushijima Kosuke, Seki Yoshitaka, Fukahori Suguru, Muto Mitsuru, Matsufuji Hiroshi, Taguchi Tomoaki: Pharmacotherapy for pediatric chronic intestinal pseudo-obstruction: Nationwide survey in Japan Pediatrics International 59 467-472 2017 査読あり

Tanaka H, Fukahori S, Baba S, Ueno T, Sivakumar R, Yagi M, Asagiri K, Ishii S, Tanaka Y. Branched-Chain Amino Acid-Rich Supplements Containing Microelements Have Antioxidant Effects on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. JPEN J Parenter Enteral Nutr 40 519-528 2016 査読あり

八木 実, 河野美幸, 浅桐公男, 池田太郎, 岡田忠男, 金田 聡, 川島章子, 後藤由紀子, 高野周一, 安福正男, 和田 基 日本小児外科学会学術・先進医療検討委員会アンケート集計からみたわが国における新生児外科 20 年の変遷 日本周産期・新生児医学会雑誌 51 1496-1499 2016 査読なし

八木 実, 恵紙英昭, 橋詰直樹, 石井信二 小児における便秘と漢方 漢方と最新治療 25 33-37 2016 査読あり

八木 実, 恵紙英昭, 橋詰直樹, 石井信二 特集: がん治療に漢方を効果的に使う 小児がんと漢方薬 Mebio 33 91-94 2016 査読なし

八木 実, 恵紙英昭, 石井信二 小児外科疾患の漢方治療と EBM 小児科臨床 69 1764-1772 2016 査読なし

[学会発表](計 6 件)

Naoki Hashizume, Minoru Yagi, Ryusuke Shin, Jun Akiba, Naoki Sotogaku, Akihiro Nishi,

Hideaki Egami:The herbal medicines Inchinkoto and Saireito exert beneficial effects of reducing hepatic fibrosis in bile duct ligation rat liver; 31st International symposium on Pediatric Surgical Research 2018 年

橋詰 直樹:消化管疾患に対する漢方療法のコツ –消化管ひとつながり– 上部消化管疾患について 第55回日本小児外科学会学術集会(招待講演)2018年

Naoki Hashizume: The characteristics of oxidative stress activity in patients with biliary atresia; World congress of surgery 2017(国際学会)2017年

八木実:私の勤める漢方治療:胆道閉鎖症 Pediatric surgery joint mission 2017 2017年
Minoru Yagi: Twenty-year trends in neonatal surgery based on a nationwide Japanese surveillance program World summit on Pediatric 2016(国際学会)

Naoki Hashizume, Minoru Yagi: pharmacotherapy in patients with pediatric chronic intestinal pseudo-obstruction as viewed through a nationwide survey in japan Pediatric colorectal club 2016(国際学会)

〔図書〕(計1件)

Minoru Yagi, Kimio Asagiri, Suguru Fukahori: Choledochal cyst. In: Taguchi T, Iwanaka T, Okamatsu T, editors. Operative general surgery in neonates and infants. Springer 2016 p.283-288

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 橋詰 直樹

ローマ字氏名: (Naoki Hashizume)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部 助教

職名: 医師

研究者番号(8桁): 80569434

研究分担者氏名: 谷川 健

ローマ字氏名: (Ken Tanikawa)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部 助教

職名: 医師

研究者番号(8桁): 30289491

研究分担者氏名: 秋葉 純

ローマ字氏名: (Jun Akiba)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部 教授

職名: 医師

研究者番号(8桁): 00341305

研究分担者氏名: 恵紙 英昭

ローマ字氏名: (Hideaki Egami)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名：医学部 教授

職名：医師

研究者番号(8桁): 40248406

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。