

肝障害に対するグリシンの有効性に関する検討

—— *In Vivo* と細胞培養からの検討 ——

東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科

荒木 崇 小宮 佐和子 山内 眞義

(受付 平成 14 年 11 月 26 日)

PROTECTIVE EFFECTS OF GLYCINE AGAINST LIVER DAMAGE AND FIBROSIS

—— AN *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDY ——

Takashi ARAKI, Sawako KOMIYA, and Masayoshi YAMAUCHI

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

Stronger Neo-minophagen C (SNMC) has frequently been used to treat patients with chronic hepatitis C. One hundred milliliters of SNMC contains 200 mg of glycyrrhizin and 2000 mg of glycine. Although glycyrrhizin alone shows anti-inflammatory effects, the efficacy of SNMC against hepatic inflammation may be partially due to glycine. To clarify the effects of glycine in hepatitis and liver fibrosis, we studied the efficacy of glycine in galactosamine-treated rats, the HepG2 cell line, and the collagen-producing LI 90 cell line. In D-galactosamine-treated rats, glycine prevented liver injury biochemically and histologically. In glycine-treated rats plasma levels of aspartate aminotransferase (143 ± 54 IU/l) and alanineaminotransferase (65 ± 28 IU/l) were significantly lower than those in untreated rats (630 ± 274 and 335 ± 190 IU/l, respectively, both $p < 0.05$). Although treatment with glycine and glycyrrhizin prevented galactosamine-induced cytotoxicity in HepG2 cells more effectively than did glycine alone, this cytoprotective effect was additive. Cell culture analysis with LI90 showed that addition of glycyrrhizin significantly decreased synthesis of both type I and type III collagen in a concentration-dependent manner and that addition of glycine reduced production of type I and type III collagen in a nonconcentration-dependent manner. However, glycine reduced collagen production far less than did glycyrrhizin. In conclusion, glycine has cytoprotective and antifibrogenic effects in liver injury and might be used to treat patients with liver disease.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2003; 118: 91-9)

Key words: glycine, glycyrrhizin, D-galactosamine, hepG2, collagen

慢性C型肝炎の沈静化に対して汎用されている強力ネオミノファーゲンC 100 ml中にはグリチルリチン 200 mgの他にグリシン 2,000 mgが含まれている。グリチルリチンは単独で抗炎症効果を示すが、強力ネオミノファーゲンCの肝炎に対する効果には、一部グリシンが関与している可

能性がある。今回我々は肝障害に対するグリシンとグリチルリチンの有効性について、ガラクトサミン肝炎モデルとHepG2細胞株を用いて、また抗線維化作用についてはLI90細胞株を用いて検討した。ラットを用いたガラクトサミン肝炎モデルでは、生化学的にも組織学的にも肝障害を改善

させた。血清 aspartate aminotransferase (AST), 血清 alanine aminotransferase (ALT) はグリシン投与にて有意に改善した (143 ± 54 IU/1 vs 630 ± 274 IU/1 $p < 0.05$, 65 ± 28 IU/1 vs 335 ± 190 IU/1 $p < 0.05$)。HepG2 細胞による検討では, グリシンとグリチルリチンはそれぞれ単独投与により細胞障害活性を低下させ, さらにそれらの相加効果も認めた。LI90 細胞培養の検討から, I 型コラーゲンと III 型コラーゲンの産生はグリチルリチンでは濃度依存性に, グリシンでは弱いながらも濃度非依存性に認めた。以上の成績からグリシンは肝細胞保護作用とともに抗線維化作用も認め, 慢性肝炎の治療薬となる可能性が示唆された。

I. 結 言

肝疾患におけるアミノ酸投与の有用性については, 慢性肝不全による肝性脳症の治療と予防に分岐鎖アミノ酸の投与が有用であり, 臨床に應用されている¹⁾。しかし近年グリシンの cytoprotective effect が注目を集めている。ラット肝細胞培養実験では, 低酸素状態での肝細胞の壊死をグリシンが低下させることが報告されている²⁾。また肝移植において使用するドナー肝の保存液にグリシンを添加することで, 肝移植後の肝障害の発症を有意に低下させることも明らかにされた³⁾。さらに C 型慢性肝炎の沈静化に対して汎用されている強力ネオミノファーゲン C (stronger neo-minophagen C: SNMC) 100 ml 中には, グリチルリチン 200 mg のほかにグリシン 2,000 mg が含まれている。そこで今回われわれは, 肝障害に対するグリシンの有効性についてガラクトサミン肝炎モデルにて検討し, さらにヒト伊東細胞継代株でコラーゲンなどの細胞外基質を産生することが明らかにされている LI90 細胞株⁴⁾ を用いてグリシンの抗線維化作用について検討した。

II. 対象と方法

1. *in vivo* における検討

体重 140~160 g の Sprague-Dawley 系雄性ラット (三協ラボより購入) を用いた。購入後は東京慈恵会医科大学動物実験指針 (昭和 63 年) に従い, 空調設備のある飼育室にて約 1 週間飼育した。1 ケージあたりラット 5 匹とし, 温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,

湿度 $55 \pm 10\%$, 午後 7 時から午前 6 時まで消灯管理とした。飼育飼料は日本クレアの CE-2 を使用, 飲み水は水道水を使用した。ラットは約 6 時間絶食させたのち, コントロール群 5 匹とグリシン投与群 5 匹の 2 群に分けた。コントロール群にはグルコース (Sigma 社製) を 2 g/kg の割合で, グリシン投与群にはグリシン (味の素株式会社より供与) を 2 g/kg の割合でそれぞれ 0.3% カルボキシメチルセルロース (Sigma 社製) に溶解し, 計約 3 ml とし胃管チューブより経口投与した。D-ガラクトサミン (東京化製社製) は生理食塩水に溶解後 1N の NaOH にて pH を 6.8 に調合したものを使用した。グルコースまたはグリシンの経口投与 1 時間後にガラクトサミン 600 mg/kg の腹腔内投与を行った。ガラクトサミン投与 24 時間後にケタミン (三共社製) 20 mg とキシラジン (バイエル社製) 0.6 mg を皮下注射し麻酔下で開腹し, 下大静脈よりヘパリン加にて採血し, 肝臓を採取した。その後直ちに腹部大動脈切断, 横隔膜切開にて気胸とし安楽死とした。静脈血は遠心分離機で $1,200 \times g$, 10 分間遠心したのち血清を採取した。血清 Aspartate aminotransferase (AST), 血清 Alanine aminotransferase (ALT) 活性は AB-BOTT VISION パック (ダイナボット社製) にて測定した⁵⁾。

肝組織については 10% ホルマリン緩衝液で固定後パラフィン包埋し, $3 \mu\text{m}$ に薄切しヘマトキシリン-エオジン染色後, 光顕的に壊死, および好中球の浸潤の程度を検討した。浸潤好中球数は, 400 倍の観察で 20 視野における好中球数を各群で比較した。

2. HepG2 細胞株を用いた *in vitro* 検討

1) ガラクトサミンによる HepG2 細胞障害に対するグリシン, グリチルリチンの影響

HepG2 細胞 (理化学研究所 細胞開発銀行より入手) を fetal bovine serum (FBS) 0.5 ml に α -minimum essential medium (α MEM) 4.5 ml を加えた 10% FBS 培養液中で培養した⁶⁾。培養には直径 60 mm, 深さ 15 mm の dish (Corning 60 mm/Tissue Culture Dish Sterile 25010, Corning N.Y.) を使用し, 培養時間は 72 時間とした。トリプシン処理し細胞を剥離, α -MEM にて洗浄後上記培溶液中に分散させ 3.5×10^4 個/ $100 \mu\text{l}$ になる

ように調製した。96穴 microplate (Falcon 3072 Microplate 96, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) に1ウェルにつき100 μ l ずつ分注した。24時間培養後, subconfluent になったところで培養液を除去し, ガラクトサミンを最終濃度が25 mM となるように添加した⁷⁾。直後にグリシンとグリチルリチン(強力ミノファーゲン株式会社より供与)を単独または同時に最終濃度が0.0001 mM から10 mM まで7段階の濃度になるよう添加し培養し, さらに24時間培養後に培養上清をピペットで採取した。培養上清中のLDH活性(A)をCytotoxicity Detection Kit (Boehringer Mannheim, Germany)を用いて測定した。またsubconfluent になったところで1% Triton X-100を添加した群のLDH活性(H), 培養液のみを添加した群のLDH活性(L)を測定し, 細胞障害を次式により算出される上清中のLactate dehydrogenase (LDH) leakage により評価した⁸⁾。

$$\text{LDH leakage (\%)} = (A - L / H - L) \times 100$$

2) ガラクトサミンによるHepG2細胞障害に対するグリシン, グリチルリチンの細胞内グルタチオン (cellular glutathione: GSH) への影響

HepG2細胞をトリプシン処理した後FBS含有 α MEMの培養液中で培養した。前項で既述のように 3.5×10^4 個/100 μ l になるように調製し6穴microplate (Costar 3516 6 well cell culture, Corning Incorporated, NY) に1ウェルにつき5 ml ずつとなるよう分注した。24時間培養後, subconfluent になったところで培養液を除去し, α MEMに溶解したガラクトサミン25 mMを添加した。直後にグリシンとグリチルリチンを単独または同時に最終濃度が0.0001 mM から10 mM になるように添加した。24時間後に上清を取り除きトリプシン処理にて細胞を剥離した後, 遠心(1,500 \times g 5分)により回収した。細胞pelletは -4°C の生理食塩水中で遠心(1,500 \times g 5分)することにより洗浄した。得られた細胞pelletに氷冷1% Triton X-100を500 μ l添加し, ホモゲナイズ後14,000 \times g, 4°C で30分間遠心した。その上清についてGSHと蛋白濃度を測定し⁹⁾¹⁰⁾, 蛋白あたりのGSHを比較検討した。GSH測定には検体に9M perchloric acidを25 μ lで除蛋白後14,000 \times

g, 15分間遠心し上清を採取し, 5 M NaOHでpH 7.4に調製した。上清500 μ lあたりにつき, メタノールに溶解した0.1 M o-phthalaldehydeを50 μ lの割合で加えて攪拌したのち約15分間放置した。蛍光光度計で励起波長350 nm, 蛍光波長420 nmで蛍光量を測定した(蛍光光度計はShimadzu RF-5300PCを使用した)。蛍光量をスタンダードと比較しGSH濃度を定量し, 蛋白あたりのGSHについてcontrolを100%とした百分率で比較した。

3. LI90細胞株を用いたグリシンの抗線維化作用に関する *in vitro* の検討

LI-90(東北大学 村上一宏先生樹立)を6穴のmicroplate (Costar 3516 6well cell culture, 16.8 ml/well, Corning Incorporated, NY)で10% FBS含有 α MEMにて培養した。 1.0×10^4 個/wellのconfluentの状態とした後, 上清を取り除き, グリチルリチンとグリシンを単独または同時に最終濃度が0.1~10 mM となるように添加し無血清培地(イーグルMEM培地 ニッスイ 東京)下で48時間培養した。対照群としてグリチルリチンやグリシンを添加せず無血清培地下で48時間培養した。これらの上清を採取したのち, 氷冷1% Triton X-100を用い, 残った細胞を剥離し培養上清とともに回収し, ホモゲナイズ後14,000 \times g, 4°C で30分間の遠心上清を採取した。これを用いてI型コラーゲンとIII型コラーゲンを定量した。I型コラーゲンはRadioimmunoassay (RIA)キット(Orion Diagnostica社製, フィンランド)を用いてI型プロコラーゲンC末端プロペプチド(PICP)を, III型コラーゲンはリアグノストキット(ヘキスト社製)を用いてIII型プロコラーゲンN末端ペプチド(PIIP)をそれぞれのRIAで測定した。

4. 統計的検討

データは平均 \pm SEM(標準誤差)で表示した。有意差検定はStudent's *t* testによった。

III. 結 果

1. ラットを用いた *in vivo* 検討

血清AST活性(IU/l)は, コントロール群 630 ± 274 と比較してグリシン投与群では 143 ± 54 と有意に低かった($p < 0.05$) (Fig. 1)。同様に血清

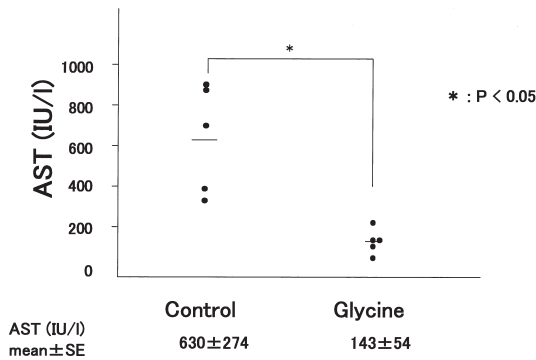


Fig. 1. Plasma levels of AST of the rats treated with glucose or glycine followed by D-galactosamine injection. Male Sprague-Dawley rats were used. A dose of 2 g/kg of glucose (control) or glycine were administered to rats intragastrically at 1 hour before D-galactosamine (600 mg/kg) injection intraperitoneally. Rats were sacrificed at 24 hours after D-galactosamine injection and the blood was collected to measure plasma AST. Plasma AST level was significantly lower in the glycine-treated group of rats than in those which were not treated with glycine.

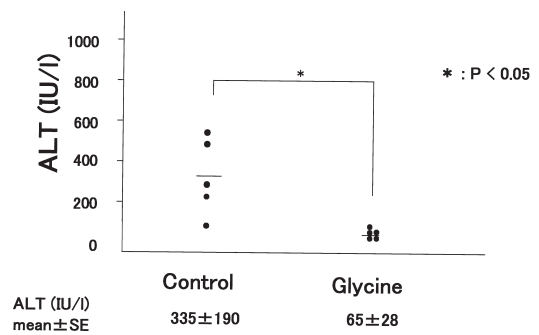


Fig. 2. Plasma levels of ALT treated with glucose or glycine followed by D-galactosamine injection. Male Sprague-Dawley rats were used. A dose of 2 g/kg of glucose (control) or glycine were administered to rats intragastrically at 1 hour before D-galactosamine (600 mg/kg) injection intraperitoneally. Rats were sacrificed at 24 hours after D-galactosamine injection and the blood was collected to measure plasma ALT. Plasma ALT level was significantly lower in the glycine-treated group of rats than in those which were not treated with glycine.

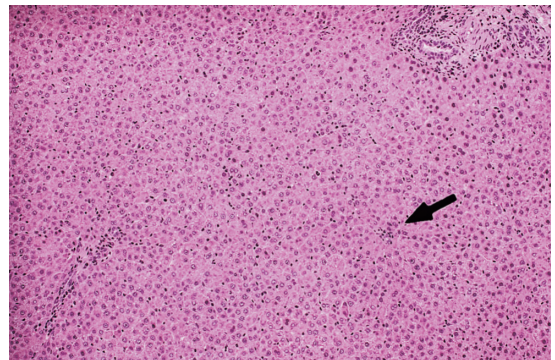
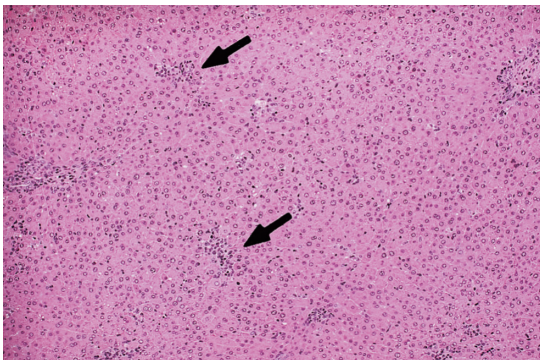


Fig. 3. Histologic examination of rat livers treated with glucose (left) or glycine (right) followed by D-galactosamine injection ($\times 200$). Dose of 2 g/kg of glucose (control) or glycine were administered to male Sprague-Dawley rats intragastrically at 1 hour before the intraperitoneal injection of D-galactosamine (600 mg/kg). Rats were sacrificed at 24 hours after D-galactosamine injection and the liver tissues were collected (Haematoxylin Eosin staining).

ALT 活性 (IU/l) は、コントロール群 335 ± 190 と比較してグリシン投与群では 65 ± 28 とコントロール群と比べて有意に低かった ($p < 0.05$) (Fig. 2). Fig. 3 に示すように肝組織における壊死巣は、コントロール群と比較して、グリシン投与群では明らかに少なかった。浸潤好中球数を各群で算定すると、コントロール群に比べてグリシン投与群

では有意に少なかった (Fig. 4).

2. HepG2 細胞株を用いた *in vitro* 検討

HepG2 細胞のガラクトサミン障害に対して、グリシンでは 0.01 mM 以上で、グリチルリチンでは 0.005 mM 以上で有意に細胞障害活性の低下を示した。グリシンとグリチルリチン併用群では 0.005 mM 以上で有意に細胞障害活性の低下を示した

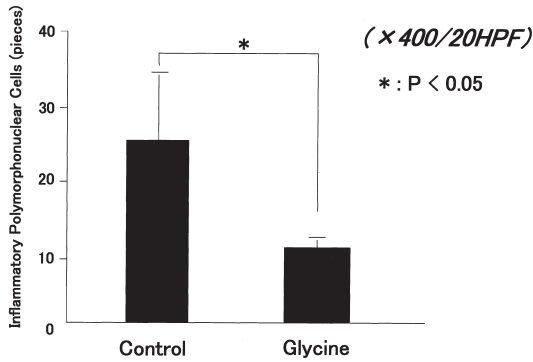


Fig. 4. The change of inflammatory polymorphonuclear cells of the liver treated with glucose or glycine followed by D-galactosamine injection. Dose of 2 g/kg of glucose (control) or glycine were administered to male Sprague-Dawley rats intragastrically at 1 hour before the intraperitoneal injection of D-galactosamine (600 mg/kg). Rats were sacrificed at 24 hours after D-galactosamine injection and the liver tissues were collected. Cell damage was evaluated histologically in parallel tissue sections stained with Hematoxylin-Eosin. Inflammatory polymorphonuclear cells were counted in 20 high power fields (400×) Inflammatory polymorphonuclear cells in the liver were lower in the glycine-treated group of rats than in those which were not treated with glycine.

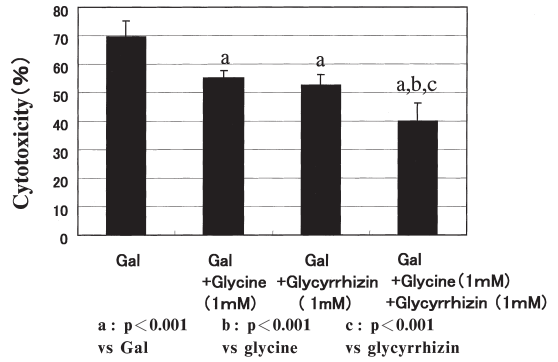


Fig. 6. The changes of cytotoxicity against HepG2 treated with 1 mM of glycine and/or 1 mM of glycyrrhizin after D-galactosamine injection. HepG2 cells ($3.5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$) at 70% confluence were exposed to 25 mM D-galactosamine (Gal), and were then immediately exposed to glycine and/or glycyrrhizin at various dose. After 24 h, the supernatant was collected to measure LDH leakage. Although the administration of glycine with glycyrrhizin prevented D-galactosamine-induced cytotoxicity of HepG2 cells, more effectively than glycine alone did, this cytoprotective effect was additive.

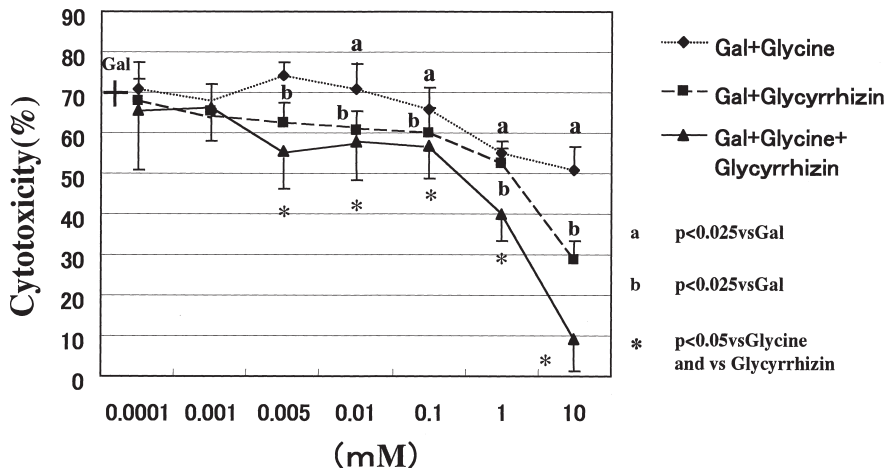


Fig. 5. The changes of cytotoxicity against HepG2 cells treated with glycine and/or glycyrrhizin after D-galactosamine injection at various concentration. HepG2 cells were plated in microtiter plates ($3.5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$). Liver cells at 70% confluence were exposed to 25 mM D-galactosamine (Gal), and were then immediately exposed to glycine and/or glycyrrhizin at various dose. After 24 h, the supernatant was collected to measure LDH leakage. The administration of glycine with glycyrrhizin prevented D-galactosamine-induced cytotoxicity of HepG2 cells, more effectively than glycine alone did.

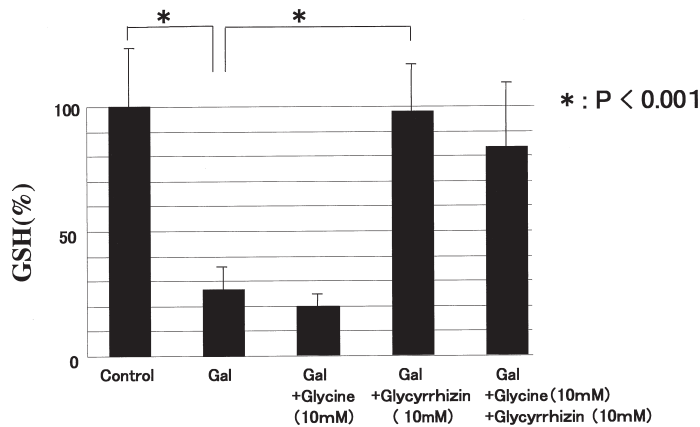


Fig. 7. The changes of GSH against HepG2 treated with glycine and/or glycyrrhizin after D-galactosamine injection.

HepG2 cells ($3.5 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$) were cultured until they reached at 70% confluence and removed conditioned culture medium as control. The cells were exposed to 25 mM D-galactosamine (Gal), and then immediately exposed to glycine and/or glycyrrhizin at various dose. After 24 h, the culture supernatant was removed and the cells were trypsinized and centrifuged. After washing with cold saline, resulting cell pellets were lysed with 1% Triton X-100. The assay method was mentioned in the M & M. GSH level was significantly higher in the glycyrrhizin treatment group than those which were not treated with glycyrrhizin.

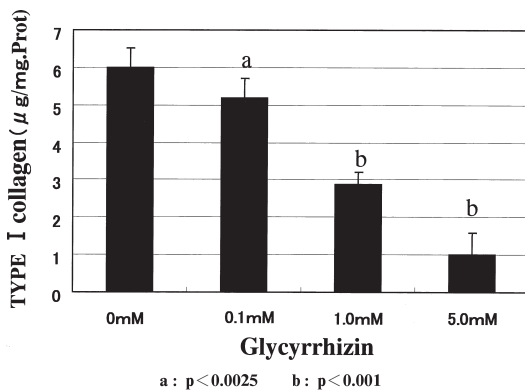


Fig. 8. The effect of glycyrrhizin on Type I collagen produced by LI90.

LI90 cells at confluent density, were exposed to 25 mM D-galactosamine, and were then immediately exposed to glycyrrhizin at various dose. After 48 h, the cells were collected and lysed with 1% Triton X-100. After centrifugation, the supernatant was collected to measure Type I collagen. Addition of glycyrrhizin decreased Type I collagen significantly in concentration dependent manner.

(Fig. 5). 1.0 mM 添加時の細胞障害活性を比較すると、グリシン添加群では $55.08 \pm 2.77\%$ 、グリチルリチン添加群では $52.42 \pm 3.82\%$ であるのに対し、グリシンとグリチルリチン併用群では $39.89 \pm$

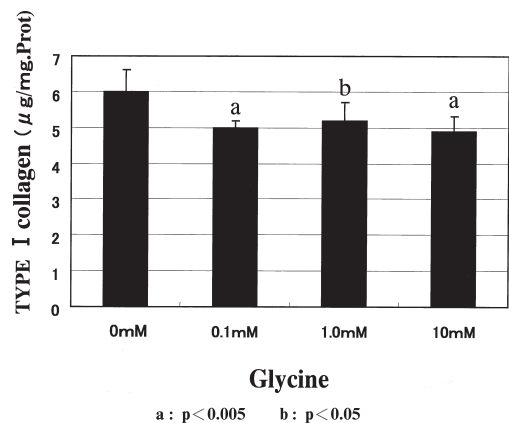


Fig. 9. The effect of glycine on Type I collagen produced by LI90.

The supernatant were prepared with the method as mentioned in the M & M and previous figure. Addition of glycine decreased Type I collagen significantly. However reduction induced by glycine was far less than by glycyrrhizin.

6.42% ($p < 0.001$) であり、グリシン、グリチルリチンの単独投与と比較して両剤併用は有意な低下を示した (Fig. 6)。

GSH はガラクトサミン投与でコントロールの約 30% に減少したが、グリチルリチン 10 mM 添加により GSH 減少は有意に抑制された ($p <$

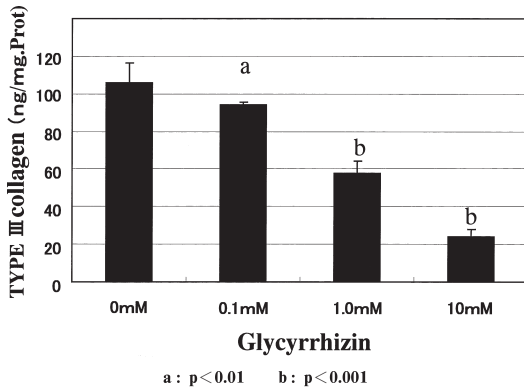


Fig. 10. The effect of glycyrrhizin on Type III collagen produced by LI90.

LI90 cells at confluent density, were exposed to 25 mM D-galactosamine, and were then immediately exposed to glycyrrhizin at various dose. After 48 h, the cells were collected and lyzed with 1% Triton X-100. After centrifugation, the supernatant was collected to measure Type III collagen. Addition of glycyrrhizin decreased Type III collagen significantly in concentration dependent manner.

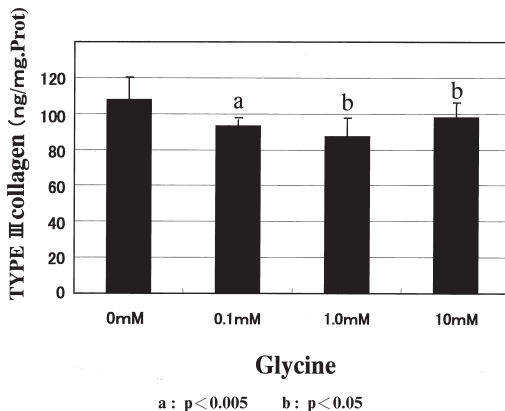


Fig. 11. The effect of glycine on Type III collagen produced by LI90.

The supernatant were prepared with the method as mentioned in the M & M and previous figure. Addition of glycine decreased Type III collagen significantly. However reduction induced by glycine was far less than by glycyrrhizin.

0.001). またグリチルリチン 10 mM とグリシン 10 mM の併用添加は、グリチルリチン 10 mM 添加に比較して GSH 量はほぼ同程度であった。さらにグリシン 10 mM の単独添加は GSH の減少を抑制できなかった (Fig. 7).

3. LI90 細胞株を用いたグリシンの抗線維化作用

Fig. 8 に示すように、I 型コラーゲンの産生はグリチルリチン添加にて濃度依存性に有意に低下した。一方、グリシン添加では、I 型コラーゲン産生は有意に低下したが、グリチルリチン添加とは異なり、0.1~10 mM で濃度依存性はみられなかった (Fig. 9)。III 型コラーゲン濃度についても、グリチルリチンとグリシンの添加による反応は I 型コラーゲンと同様の成績であった (Fig. 10, 11)。

IV. 考 察

本研究の成績から、グリシンは肝細胞障害抑制作用および弱いながらも抗線維化作用を有することが明らかとなった。

すでにグリシンは、虚血肝細胞障害²⁾、アルコール性肝障害¹¹⁾あるいはガラクトサミン肝障害¹²⁾に対して cytoprotective effect を示すことが明らかにされている。Nagatomi ら²⁾は、ラットの分離肝細胞を用い、虚血による肝細胞壊死がグリシン投与により改善したと報告している。この機序として、グリシンが肝細胞の chloride-channel を抑制し細胞障害につながる Cl⁻ の細胞内への流入を抑制するためとしている。また Iimuro ら¹¹⁾は塚本-French モデルにおいて慢性エタノール投与にグリシンを併用したところ門脈血中のエタノール濃度の減少を認めたことから、グリシンによる胃粘膜 alcohol dehydrogenase (ADH) 活性の誘導が主因と述べている。さらに Stachlewitz ら¹²⁾は、ガラクトサミン肝障害ラットに対して、グリシンを投与したところ肝障害が抑制されたとしている。この肝障害抑制の機序としてはグリシンが腸管から血中へのエンドトキシンの流入を抑制するためとしている。これらの報告から細胞障害の機序などの種によりその障害抑制のメカニズムも様々な様である。

ガラクトサミン肝障害は以前からヒトウィルス性肝炎類似の組織所見を呈することが知られているが、詳しい機序に関しては解明されていない¹³⁾¹⁴⁾。近年はサイトカインの研究が進み、ガラクトサミン投与によってクッパー細胞からの TNF- α の分泌が亢進するためではないかと考えられるようになってきている¹²⁾。

今回の我々の検討では *in vivo*, *in vitro* におい

て、ガラクトサミン肝障害をグリシンが抑制することが示された。さらにグリシンとグリチルリチンとの併用で肝障害抑制効果は相加効果を示した。

この成績から、慢性肝炎や肝硬変に対してトランスアミナーゼの低下を目的として繁用している SNMC は、グリチルリチンのみならず 10 倍も含まれているグリシンの薬理作用も少なからず寄与していることが考えられる。

一方 GSH は antioxidant や free radical scavenger として重要な役目を果たしており、活性酸素の除去に重要である¹⁵⁾¹⁶⁾。GSH については、*in vivo*, *in vitro* においてガラクトサミン投与または添加により減少することが知られている¹⁷⁾¹⁸⁾。今回の我々の *in vitro* における検討では、GSH はグリチルリチン添加により著明な減少抑制をみたが、グリシンでは変化を認めず、グリシンの cytoprotective 作用には GSH は関与しないことが示唆された。GSH 減少の主な原因は、酸化ストレスの負荷により GSH が酸化型グルタチオンに変化するためである。グリチルリチンには活性酸素の scavenger としての働きが示唆されており¹⁹⁾、この酸化ストレス軽減作用により GSH の減少を抑制できるのではないかと推測される。グリシンにはこのような抗酸化作用は明らかではなく、GSH 減少抑制にはつながらないのではないかと考えられる。

一方、ヒト伊東細胞培養株 (LI-90) での実験から、弱いながらもグリシンが抗線維化作用を有していることが明らかになった。グリシンには、四塩化炭素肝線維化モデルに対して、同時に慢性投与することにより、TGF β の低下、 α smooth muscle actin 陽性細胞の減少とともに肝線維化の抑制されることが最近報告されている²⁰⁾。機序としては gadolinium chloride と同様にクッパー細胞を不活化して、伊東細胞の活性化を抑制すると報告されている。しかしながら、今回われわれの成績では、グリシンのヒト伊東細胞に対する直接的なコラーゲン産生抑制作用を認めたことから、クッパー細胞を介さないグリシンの抗線維化作用の存在が示唆される。Wang ら²¹⁾ は、ラットに四塩化炭素とアルコールの同時慢性投与を行って作成した肝線維化モデルを用いて、SNMC (グ

リチルリチン+グリシン+システイン) の投与により肝線維化が抑制され、血清 ALT も有意に低下した成績を報告した。その中で、四塩化炭素とアルコール同時投与群では NF- κ B の標的遺伝子に対する binding activity が増強されるが、SNMC の投与が NF- κ B binding activity を低下させ、NF- κ B の活性の増強により誘導される種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞増殖因子の発現抑制し、肝細胞障害や肝線維化を抑えると述べている。SNMC に含有されるグリシンとグリチルリチンのいずれの成分がこのような作用をより強く有するのかを、今後成分別に検討する必要があると考えられる。

V. 結 語

ガラクトサミン肝障害ラットモデルおよび HepG2 細胞を用いたガラクトサミン肝細胞障害に対して、グリシンは肝障害を抑制し、グリチルリチンとの併用投与の有効性が示唆された。さらにグリシンには線維化抑制作用を有することが示唆され、慢性肝炎の治療薬となりうる可能性が考えられた。

本研究を行うにあたり、御指導、御校閲を賜った戸田剛太郎教授、御指導頂いた松浦知和先生に深く謝意を捧げるとともに当講座第 3 研究室の諸兄に心から感謝致します。またグリシンを供与して頂いた味の素株式会社惣中一郎氏、グリチルリチンを供与して頂いた強力ミノファーゲン株式会社に深謝致します。

本研究は第 86 回日本消化器病学会総会、第 3 回日本肝臓学会大会で発表した。

文 献

- 1) Fischer JE, Rosen HM, Ebeid AM, James JH, Keane JM, Soeters PB. The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery* 1976; 80: 77-91.
- 2) Nagatomi A, Sakaida I, Matsumura Y, Okita K. Cytoprotection by glycine against hypoxia induced injury in cultured hepatocytes. *Liver* 1997; 17: 57-62.
- 3) Butter G, Marsh DC, Lindell SL, Southard JH, Belzer FO. Amino acids to suppress reperfusion injury after liver preservation. *Transplant Proc* 1991; 23: 2378-9.
- 4) Murakami K, Abe T, Miyazawa M, Yamagu-

- chi M, Masuda T, Matsuura T, et al. Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Lab Invest* 1995; 72: 731-9.
- 5) Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem* 1974; 20: 1255.
 - 6) Neuman MG, Koren G, Tiribelli C. *In vitro* assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 932-41.
 - 7) Manuela G, Cameron RG, Shear NH, Bel-lentani S, Tiribelli C. Effect of tauroursodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on ethanol-induced cell injuries in the human HepG2 cell line. *Gastroenterology* 1995; 109: 555-63.
 - 8) Wu J, Danielsson A, Lindstrom P, Karlsson K, Sehlin J. Protective effects of calcium channel blockers on bromobenzene toxicity to isolated rat hepatocytes. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 590-600.
 - 9) Cohn VH, Lyle JA. Fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 1966; 14: 434-40.
 - 10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
 - 11) Iimuro Y, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Glycine prevents alcohol-induced liver injury by decreasing alcohol in the rat stomach. *Gastroenterology* 1996; 110: 1536-42.
 - 12) Stachlewits RT, Seabra V, Bradford B, Brad-ham CA, Rusyn I, Thurman RG. Glycine and uridine prevent d-galactosamine hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1999; 29: 737-45.
 - 13) Keppler D, Decker K. Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur J Biochem* 1969; 10: 219-25.
 - 14) Shinozuka H, Farber JL. D-galactosamine and acute liver cell injury. *Fed Proc* 1973; 32: 1516-26.
 - 15) Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems. Oxford: Clarendon; 1989. p. 87-187.
 - 16) Casisni AF, Maellaro E, Del Bello B, Comporti M. Lipid peroxidation and antioxidant systems in liver injury induced by glutathione depleting agents. Oxford: Pergamon; 1989. p. 55-61.
 - 17) Jian W, Hakan S, Kurt K, Ake D. Protective effect of S-adenosyl-methionine on bromobenzene and D-galactosamine-induced toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1996; 23: 359-65.
 - 18) Seckin S, Kocak-Token N, Uysal M, Oz B. The role of lipid peroxidation and calcium in galactosamine induced toxicity in the rat liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 80: 117-20.
 - 19) Nagai T, Egashira T, Yamanaka Y, Kohno M. The protective effect of glycyrrhizin against injury of the liver caused by ischemia-reperfusion. *Arch Environ Contam Toxicol* 1991; 20: 432-6.
 - 20) Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Rippe RA, Thurman RG. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: 200-7.
 - 21) Wang JY, Guo JS, Liu SL. Inhibitory effect of glycyrrhizin on NF- κ B binding activity in CCl₄-plus ethanol-induced liver cirrhosis in rats. *Liver* 1998; 18: 180-5.