

実験的ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の作用

阿部 博子*, 織田真智子, 小西 啓悦, 有地 滋

近畿大学東洋医学研究所

Effects of Sairei-tô on aminonucleoside nephrosis in the rats

Hiroko ABE*, Machiko ORITA, Hiroyoshi KONISHI and Shigeru ARICHI

*The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki-University**(Received January 10, 1986. Accepted February 13, 1986.)*

Abstract

The effects of Sairei-tô (Chai-Ling-Tang) on aminonucleoside nephrosis were studied in rats. Urine protein excretion in rats receiving aminonucleoside alone was significantly elevated on the 2nd day after the last injection of aminonucleoside, reached a peak on the 11th day and the remarkable urine protein excretion continued until the 20th day. In animals fed with diet containing 2.5 % Sairei-tô, the urinary protein was slightly reduced on the 11th day but significantly reduced on the 20th day in comparison with the control. Electron microscopically, the degree of abnormality in the glomerular epithelial cells such as loss or fusion of foot processes on the 20th day was significantly lower in the rats treated with Sairei-tô after aminonucleoside injection than in the rats treated with aminonucleoside alone. It is concluded that Sairei-tô has a preventive effect on proteinuria induced by aminonucleoside in the rats.

Key words nephrotic syndrome, puromycin aminonucleoside, Sairei-tô**Abbreviations** AN: puromycin aminonucleoside, Sairei-tô (Chai-Ling-Tang): 柴苓湯

緒 言

ネフローゼ症候群の治療に、小柴胡湯合五苓散（以下柴苓湯と略）をステロイド剤と併用すると、ステロイド剤の減量や離脱が容易となり、また寛解期に柴苓湯を投与し続けることによって再発の予防や再発頻度を低下させ得ることなどが臨床的に確認されている。¹⁻⁴⁾

柴苓湯の薬理作用としては、軽度の抗炎症作用⁵⁾、ステロイド増強作用⁶⁾、小柴胡湯には免疫系修飾作用⁶⁾のあることが報告されている。しかし、ネフ

ローゼ症候群の病態に対する作用の詳細やそのメカニズムについての基礎的検討は全くなされていない。

本研究では、puromycinのaminonucleosideによる実験的ネフローゼ症候群に対して柴苓湯がどのような作用を示すかについて検討を行った。

材料と方法

(1) 実験動物: 体重150g前後のWistar系雌性ラット(9週齢)を用いて、以下の実験を行った。

(2) 実験的ネフローゼ症候群の作製: 実験的ネフローゼ症候群はpuromycinのaminonucleoside

*〒589 大阪府南河内郡狭山町西山 380
Sayama, Osaka 589, Japan

(AN と略) を、10mg/kg、6 日間腹腔内投与することによって作製した。⁷⁾

(3) 飼料の作製と投与方法：柴苓湯は柴胡 (7.0 g)、猪苓 (3.0g)、沢瀉 (5.0g)、人参 (3.0g)、半夏 (5.0g)、茯苓 (3.0g)、桂枝 (2.0g)、大棗 (3.0g)、生姜 (1.0g) の混合生薬から得られた津村順天堂社製エキス原末 (2.5g) を日本クレア製 CE-2 の粉末飼料中に 0.5%、2.5%あるいは 5.0% となるように添加し、AN 投与終了後 2 日目から自由摂取させた。飼料摂取量からの換算では、エキス 0.5%含有飼料を摂取したラットの場合、1 匹、1 日当たりの漢方薬摂取量はほぼヒトの 10 倍量に相当する。また、柴苓湯が肝臓などにおける AN の代謝に影響を及ぼす可能性を考慮して、投与開始は AN 投与終了後 2 日目からとした。

(4) 尿蛋白量、血清コレステロール、血清蛋白量の測定：尿蛋白は AN 投与終了後 2 日目から、経口的に Kingsbury and Clark 法⁸⁾ で測定した。また、AN 投与終了後 13 日目、20 日目にそれぞれの群 (I；正常群、II；AN のみ投与の対照群、III；AN 投与後 0.5%柴苓湯投与群、IV；AN 投与後 2.5%柴苓湯投与群、V；AN 投与後 5.0%柴苓湯投与群) のラットを屠殺し、採取した血液の血清コレステロール、血清アルブミン、血清蛋白量を和光純薬工業社製キットを用いて測定した。

(5) 電顕的観察：AN 投与終了後 13 日目、20 日目のラット腎を摘出し、3%グルタルアルデヒド溶液 (0.1M リン酸緩衝液、pH7.4) および 1%オスミウム溶液で固定し、定法に従って脱水、包埋を行った。超薄切片はウラニルアセテート、クエン酸鉛で

二重染色し、Hitachi HS-9 で観察した。

結 果

1. 体重変化

AN 投与終了後の体重の増加率 (AN 投与終了時の体重に対する % で表示) を Table I に示した。AN を投与した対照群ラットおよび AN 投与後 0.5%の柴苓湯エキス含有飼料を投与したラットでは、AN 投与終了から 11 日目にやや体重の減少を示したが、柴苓湯 2.5%あるいは 5.0%を含む飼料を投与したラットでは、体重の減少は認められず、ほぼ正常ラットと同様の体重増加率を示した。

2. 尿中蛋白量の変化 (Fig. 1)

AN 投与終了後、普通飼料で飼育した対照ラットでは、AN 投与終了後 2 日目から尿中蛋白量が増加 (正常ラット尿蛋白； 2.1 ± 0.3 mg/day に対して対照ラット； 194 ± 12 mg/day) し始め、11 日～13 日目をピーク (11 日目； 466 ± 60 mg/day、13 日目； 408 ± 45 mg/day) として、約 20 日間は著大な尿蛋白の排泄が見られた。

柴苓湯を投与したいずれの群のラットでも、AN 投与終了の 9 日目迄は対照ラットと差は認められなかったが、柴苓湯 2.5%含有飼料を投与した群では、11 日目、13 日目、の尿蛋白の排泄量が 365 ± 54 mg/day、 320 ± 32 mg/day と、対照より低い傾向が見られ、20 日目の尿蛋白量の比較では、対照に比べて明らかに有意の減少 (対照ラット； 248 ± 39 mg/day、柴苓湯投与ラット； 115 ± 36 mg/day) ($p < 0.05$) が認められた。ところが、柴苓湯 0.5%ある

Table I Changes of body weight (%).

Days after last injection of PA	days									
	0	2	4	6	9	11	13	16	18	20
Normal	100	105.5 ± 1.1	107.7 ± 1.3	106.6 ± 1.5	104.8 ± 2.7	107.1 ± 2.1	108.1 ± 2.4	107.8 ± 0.1	109.2 ± 0.6	107.2 ± 0.1
Control	100	105.9 ± 0.6	108.6 ± 0.8	104.6 ± 1.8	100.9 ± 1.6	99.5 ± 2.5	101.8 ± 2.4	107.7 ± 3.8	108.5 ± 2.9	111.3 ± 3.4
Sairei-tô (0.5%)	100	106.2 ± 0.7	107.6 ± 1.0	106.1 ± 1.8	100.7 ± 2.0	98.3 ± 2.9	101.4 ± 2.8	103.9 ± 2.2	107.3 ± 1.7	108.1 ± 2.4
Sairei-tô (2.5%)	100	106.3 ± 0.4	108.6 ± 0.8	106.9 ± 2.9	100.2 ± 2.9	102.0 ± 2.4	106.2 ± 2.8	108.6 ± 2.5	110.5 ± 2.1	111.6 ± 2.9
Sairei-tô (5.0%)	100	106.6 ± 1.5	109.3 ± 0.8	106.5 ± 2.1	104.8 ± 2.7	107.1 ± 2.1	108.1 ± 2.4	107.8 ± 0.1	109.2 ± 0.6	107.2 ± 0.1

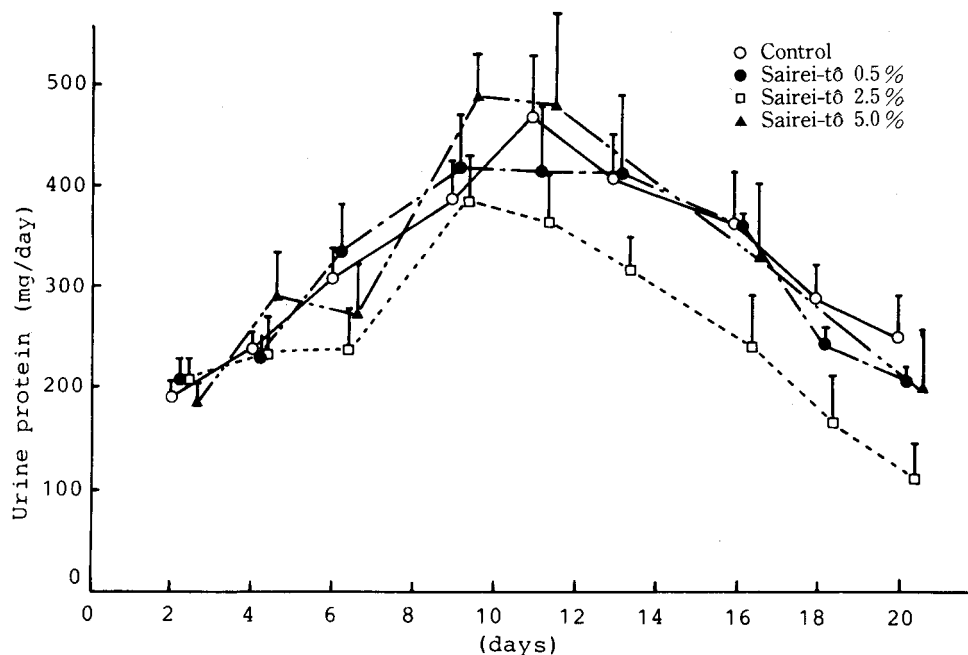


Fig. 1 Urinary protein excretion in rats.

All rats received a daily intraperitoneal injection of aminonucleoside for 6 days. Oral administrations of Sairei-tô and measurement of urinary protein were started 2 days after the last injection of aminonucleoside.

Table II Effects of Sairei-tô on serum cholesterol, total protein and albumin.

Days after last injection of PA	Cholesterol (mg/dl)		Total protein (g/dl)		Albumin (g/dl)	
	13	20	13	20	13	20
Normal	78.1±15.3	56.5±2.3	5.82±0.29	6.00±0.10	3.86±0.06	3.88±0.02
Control	363.5±25.3	165.7±18.8	4.71±0.25	6.28±0.15	3.03±0.07	3.82±0.08
Sairei-tô(0.5%)	386.7±27.0	150.1±1.6	4.99±0.19	6.36±0.13	2.95±0.07	3.76±0.04
Sairei-tô(2.5%)	357.2±43.8	114.6±26.6	5.44±0.33	6.33±0.18	3.04±0.14	3.89±0.09
Sairei-tô(5.0%)	378.1±52.8	146.1±23.2	4.01±0.63	6.53±0.16	3.01±0.13	3.78±0.03

いは5.0%含有飼料を投与した群では、いずれも有意の尿蛋白減少は認められなかった。

3. 血清学的所見 (Table II)

AN 投与終了後13日目の対照群ラットの血清コレステロール値は、正常ラットに比べて著明な増加を示した。柴苓湯を投与した各群のラットでも、対照群と同様、13日目には著しいコレステロールの増加を示し、柴苓湯による血清コレステロールの低下作用は認められなかった。ところが、20日目の血清コ

レステロール値では、対照群に比べて柴苓湯2.5%投与ラットで低下傾向が認められた。

AN 投与終了後13日目の対照群ラットの血清蛋白およびアルブミン値は、いずれも正常ラットに比べて低下を示すが、柴苓湯2.5%を投与したラットでは、総蛋白量の低下が抑制された。しかし、アルブミン値については改善効果は認められなかった。また、20日目の血清蛋白、アルブミン値は、対照群および柴苓湯投与群いずれも、ほぼ正常域に回復して

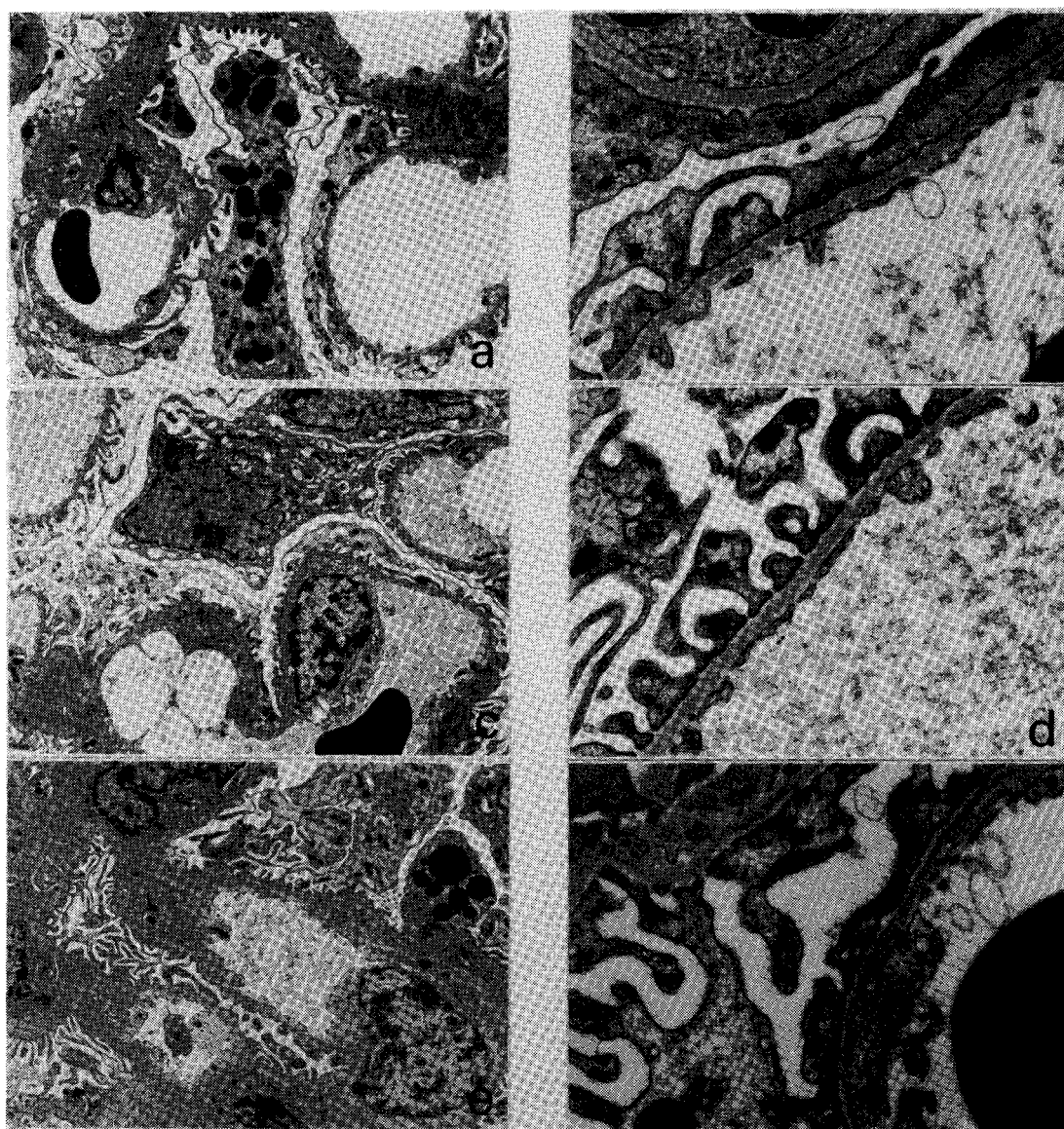


Fig. 2 Electron micrographs of glomerulus from an experimental rat.

(a) Glomerulus of normal rat ($\times 2600$), (b) higher magnification in a glomerulus of normal rat ($\times 15000$), (c) glomerulus of control rat on the 13th day after the last injection of aminonucleoside ($\times 2600$), (d) higher magnification in the same area as (c) ($\times 15000$), (e) glomerulus of the rat fed with a diet containing 0.5 % Sairei-tô ($\times 2600$), (f) glomerulus of the rat fed with a diet containing 2.5 % Sairei-tô ($\times 2600$), (g) glomerulus of the rat fed with a diet containing 5.0 % Sairei-tô ($\times 2600$).

おり、紫苓湯投与の影響は特に認められなかった。

4. 形態学的所見 (Fig. 2, Fig. 3)

AN 投与終了後13日目の対照ラット腎の電顕的観

察では、糸球体上皮細胞の足突起の腫大や癒合が認められ、糸球体基底膜の厚さや電子密度にも乱れが見られた。紫苓湯を投与したラットではいずれの群

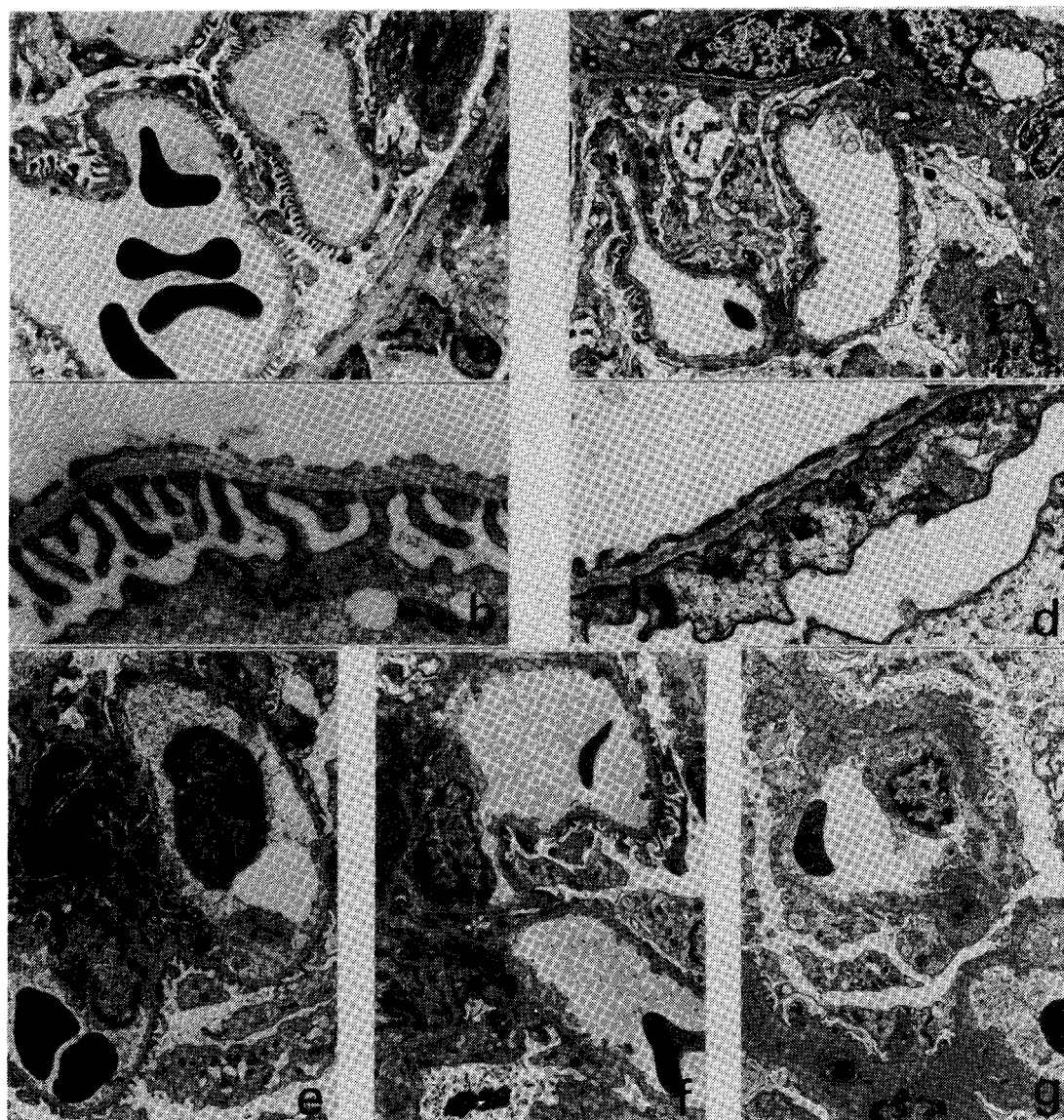


Fig. 3 Electron micrographs of glomerulus from an experimental rat on the 20th day after the last injection of aminonucleoside.

(a) Glomerulus of control rat ($\times 2600$), (b) higher magnification in a glomerulus of the same rat as (a) ($\times 15000$), (c) glomerulus of the rat fed with a diet containing 2.5 % Sairei-tô ($\times 2600$), (d) higher magnification in a glomerulus of the same rat as (c) ($\times 15000$), (e) glomerulus of the rat fed with a diet containing 5.0 % Sairei-tô ($\times 2600$), (f) higher magnification in a glomerulus of the same rat as (e) ($\times 15000$).

でも、ほぼ対照群ラット腎と同様の所見を示しており、柴苓湯投与による変化は見られなかった。ところが、20日目のラット腎の電顕所見の比較では、Fig. 3に見られるように、柴苓湯 2.5% 含有飼料を投与したラットで対照群より回復が早く、足突起の腫大や癒合が軽度であることが確認された。

考 察

ヒトのネフローゼ症候群の発症には、免疫系の関与が考えられており、また組織学的に minimal change を示す特発型のネフローゼはステロイド剤に対する反応性がよく、小児の場合には約90%がステロイド療法で寛解状態となることが報告⁹⁾されている。しかし、ステロイドを減量したり中止した場合、その40～50%は再発を繰り返し、頻回再発型となるため、現在なお、治療法の改善が求められている。

一方、筆者らは各種疾患のステロイド治療時に、漢方薬を併用することによってステロイド投与量の減量あるいは離脱を容易にし得ることを報告¹⁻³⁾しており、ネフローゼ症候群における柴苓湯とステロイド剤との併用については、統計的にも有効な臨床結果が認められている⁴⁾。

ステロイド剤の減量や離脱を容易にしたり、ネフローゼ症候群の再発を防止し得る柴苓湯の薬理作用としては、柴苓湯を構成する小柴胡湯の免疫系修飾作用や⁶⁾ 柴苓湯のみでは極めて弱い抗肉芽作用しか示さないが、dexamethasone と柴苓湯を併用すると、dexamethasone と抗肉芽作用が有意に増強されるというステロイド作用増強効果⁵⁾ などが重要であると思われる。しかし、本研究で用いた AN による実験的ネフローゼ症候群のモデルは、免疫系を介さず、またステロイド剤に対しても反応性を示さないことが報告されている¹⁰⁾ したがって、柴苓湯によるこの実験的ネフローゼの抑制効果は、免疫修飾作用やステロイド作用増強効果によるものではなく、腎糸球体あるいはその基底膜への直接作用によるものと思われる。

柴苓湯の腎糸球体に対する作用が、柴苓湯中のどの成分によるかについては十分に明らかにされていないが、柴胡の育効成分；サイコサポニンに同様の実験的ネフローゼ症候群に対する抑制作用が認められている¹¹⁾ ことから、柴苓湯による尿蛋白抑制作用は主としてそのエキス中のサイコサポニンによる可能性が強いように思われる。しかし、サイコサポニンでの実験では作用力価が濃度依存性に高くな

るのに対して、柴苓湯の投与では必ずしも濃度依存性ではないこと、またサイコサポニンの経口投与では、筋注に比べて著しく力価が低下し、柴苓湯中に含まれるサイコサポニン含有量を考慮した場合、柴苓湯の尿蛋白抑制作用がサイコサポニンのみによるとは考えられず、柴苓湯中に含有されるニンジンサポニンやグリチルリチンなど、サイコサポニンと同様、生体膜への作用^{12,13)} が推測される他のサポニン類の作用も考慮する必要があるであろう。さらに、柴苓湯を構成する五苓散には、利尿作用のあることが実験的に確認¹⁴⁾ されており、桂皮、沢瀉、茯苓、猪苓、白朮など、古来水分代謝に関与するとされるこれらの生薬の有効成分が、腎臓の各種細胞に特異的な作用を示す可能性も推測される。

また、漢方薬の薬物効果が必ずしも濃度に依存しないという特殊性は、本実験のみならず、免疫系への作用⁶⁾、肝障害抑制作用^{13,15)} についても同様に認められている。このような漢方薬の濃度と作用力価との関連性についての詳細は、ほとんど検討されていないが、漢方薬の薬理作用のメカニズムを解明する意味においても、極めて重要な問題点として考慮されるべきであろう。

柴苓湯の腎臓に対する作用のメカニズムについてはさらに詳細な検討を要するが、本研究結果によって臨床における柴苓湯のネフローゼに対する治療効果には、免疫系への作用⁶⁾、ステロイド作用増強効果⁵⁾ の他に、腎糸球体への直接作用も大きな役割を果たしていることが示唆された。

結 論

Puromycin aminonucleoside による実験的ネフローゼ症候群ラットに柴苓湯を投与した結果、尿蛋白排泄量の低下、血清コレステロールの上昇抑制、血清総蛋白の低下抑制傾向が認められた。また、電顕的にも糸球体上皮細胞の足突起の腫大や癒合が対照ラットより軽度であることが確認された。

文 献

- 1) 有地 滋, 阿部博子: 漢方薬によるグルココルチコステロイドの副作用の除去について, 薬物療法 12, 915-923, 1979
- 2) 阿部博子, 有地 滋: グルココルチコイド離脱時における漢方薬の使用, 臨床と研究 58, 2672-2676, 1981
- 3) 阿部博子: ネフローゼ症候群, 現代の診療 24, 1082-1086, 1982
- 4) 宮川三平, 望月 弘, 洪 伯良, 高橋 究, 太原博史,

- 村松康男, 羽島則夫, 白井信男: 小児ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の効果について. 和漢医薬学会誌 **1**, 78-79, 1984
- 5) 阿部博子, 小西裕紀子, 有地 滋: 柴胡剤の薬理学的研究 (第3報) ~糖質ステロイド剤の抗炎症作用に対する柴苓湯の影響~, 日薬理誌 **78**, 465-470, 1981
- 6) 池本吉博, 森沢成司, 溝口靖紘, 山本祐夫: 小柴胡湯および大柴胡湯の in vitro における抗体産生に及ぼす影響. 和漢医薬学会誌 **1**, 138-139, 1984
- 7) Frenk, S., Autonowicz, I., Craig, J.M. and Metcoff, J.: Experimental nephrotic induced in rats by aminonucleoside. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 424-427, 1955
- 8) Kingsbury, F.B. and Clark, C.P.: The rapid deferriment of albumin in urine. *J. Lab. Clin. Med.* **11**, 981-989, 1926
- 9) Report of ISKDC, *J. Pediatr.* **98**, 561-564, 1981
- 10) Fiegelson, E.B., Drake, J.W. and Recent, L.: Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 437-446, 1957
- 11) Abe, H., Orita, M., Konishi, H., Arichi, S. and Odashima, S.: Effects of saikosaponin-d on aminonucleoside nephrosis in rats. *European J. Pharmacol.*, in press, 1985
- 12) Abe, H., Sakaguchi, M., Anno, M. and Arichi S.: Erythrocyte membrane stabilization by plant saponins and sapogenins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **316**, 262-265, 1981
- 13) 阿部博子, 小田島肅夫: 生薬・和漢薬の薬理作用〜とくにその作用機序について〜. 診断と治療 **71**, 1311-1318, 1983
- 14) 丁 宗鉄, 佐野由枝, 大塚恭男: 五苓散の薬理作用. 和漢医薬学会誌 **2**, 110-111, 1985
- 15) 溝口靖弘, 沢井寛子, 筒井ひろ子, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 門奈丈之, 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. 肝胆臓 **6**, 947-951, 1983