

慢性腎不全ラットに対する温脾湯の効果 —腎不全惹起後の影響について—

鄭 平東, 横澤 隆子, 大浦 彦吉*

富山医科薬科大学和漢薬研究所臨床利用部門

Effect of Onpi-tô in adenine-induced chronic renal failure rats

Ping Dong ZHENG, Takako YOKOZAWA and Hikokichi OURA*

*Department of Applied Biochemistry, Research Institute for Wakan-Yaku,
Toyama Medical and Pharmaceutical University*

(Received March 31, 1986. Accepted May 1, 1986.)

Abstract

After renal failure was induced by administering adenine diet, Onpi-tô extract was administered to examine its effect. Three days of adenine administration in a group prior to 18 days of administration of the extract led to marked reductions in urea nitrogen, creatinine, methylguanidine, guanidinosuccinic acid in the serum, and improved hyperphosphatemia and hypocalcemia, suggesting improvement of uremic symptoms. These effects by the extract lowered in its intensity as the days of adenine prior to the longer length of the extract administration.

Key words chronic renal failure, Onpi-tô, urea nitrogen, creatinine, methylguanidine, guanidinosuccinic acid, rat

Abbreviations BUN, blood urea nitrogen ; DHOA, 2,8-dihydroxyadenine ; GAA, guanidinoacetic acid ; GSA, guanidinosuccinic acid ; MG, methylguanidine ; PTH, parathyroid hormone ; T₄, thyroxine ; Onpi-tô (Wen-Pi-Tang), 温脾湯

緒 言

慢性腎不全とは、腎の慢性的障害により、体液の恒常性維持ができなくなった状態をいう。腎臓の排泄機能が障害を受けるため、尿中排泄されるべき物質、体内での異常産生物質及び中間代謝産物が体内に蓄積し、水、電解質代謝、酸—塩基平衡などの失調及び糖、脂質、蛋白質、内分泌代謝異常を来とし、生体自身は中毒に似た症候群が現われ、尿毒症となり、患者の命が脅かされる。

近年、人工血液透析と腎移植技術の進歩により、

慢性腎不全の新しい治療方法が導入され、ある程度の効果を挙げているが、血液透析と腎移植は費用と日常生活の負担が極めて大きい。このために多くの慢性腎不全患者に対して、他のいかなる方法を用いればよいか緊急の問題となっている。患者の残存腎機能の保護、苦痛の軽減、延命など早急に解決すべき問題である。

現在、腎不全改善薬、治療薬のほとんどない現況では、尿毒症の改善に関する研究は極めて重要である。

著者らはアデニン投与による新しいタイプの慢性腎不全モデルラットの作製¹⁾、並びにこれらの腎不全

*〒930-01 富山市杉谷 2630
Sugitani, Toyama 930-01, Japan

ラットに温脾湯エキスを連日投与し、高窒素血症の改善、肝腎における尿素産生の抑制、グアニジノ化合物の低下あるいは消失、高リン酸血症の改善及び明らかな延命効果についてすでに報告した^{2,3)}さらに腎組織血流量の増加、血圧下降、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の一部抑制、プロスタグランジンEの増加等から、腎性高血圧、腎機能改善作用を示すことを明らかにした⁴⁾。またカルシトニンの低下、T₄、テストステロンの増加を認め、ホルモン異常の一部改善作用も報告した⁵⁾。

今回さらにあらかじめアデニンを投与し、腎不全を惹起させた後、温脾湯エキスを投与し、その効果を検討したので報告する。

材料と方法

(1) 動物：Wistar系雄性ラット（初体重130g前後）を用い、あらかじめ0.75%アデニン食を3日間（実験A）、6日間（実験B）、12日間（実験C）投与し、腎不全を惹起させた後に温脾湯エキスを投与した。

(2) 温脾湯エキスの調製法：温脾湯（大黃、*Rheum* sp., Rhei Rhizoma ‘中国産四川雅黄,’ 薬用人参, *Panax ginseng* C.A. MEYER, Ginseng Radix ‘韓国産錦山,’ 附子, *Aconitum japonicum* THUNB., Aconiti Japonici Tuber ‘中国産,’ 甘草, *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* REG. et HERD., Glycyrrhizae Radix ‘中国産西北西正,’ 乾姜, *Zingiber officinale* ROSC., Zingiberis Rhizoma

‘中国産’) エキスの調製法は前報²⁾同様、中国伝統煎出法によって調製し、濾液を凍結乾燥して褐色の粉末を約20%の収率で得た。

(3) 試料の投与方法：温脾湯エキスを水に溶解し、1.0 mg/mlの濃度に調製して、あらかじめ腎不全を惹起させたラットに飲水として投与した。投与量は飲水量から算出し、30~35 mg/rat/dayであった。対照群には水を与え、それぞれ18日目で断頭屠殺した。

(4) 分析方法：前報²⁾同様、血清中の尿素窒素(BUN)、カルシウム(Ca)、無機リン酸(P)は市販キットを用い、比色法で測定した。また血清中のグアニジノ化合物は高速液体クロマト装置（島津LC-5A型）を用い、ニンヒドリン発色による蛍光分析法で測定した。2,8-dihydroxyadenine (DHOA)はBendichら⁶⁾の方法に従い、腎組織中から2N-HClで抽出し、304 nmで定量した。なおBUN以外は温脾湯投与18日目で測定した。

結 果

1. 血清尿素窒素及びクレアチニン値に対する温脾湯の効果

血清尿素窒素値はFig. 1のごとく、実験Aでは対照群に比し、6日、12日、18日目でいずれも有意に低下し、特に12日、18日ではそれぞれ35%、39%の低下を認めた (Fig. 1-A)。実験Bでは対照群に比し、6日、12日、18日目でいずれも有意に低下し、特に18日目で温脾湯投与群は約27 mg/dlの低

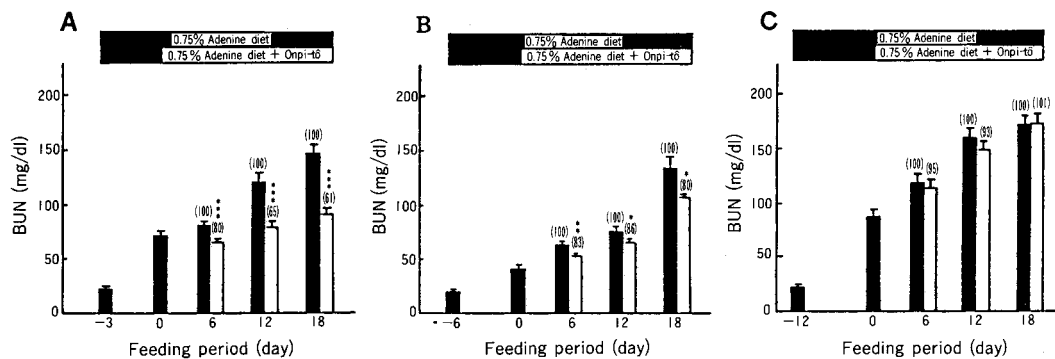


Fig. 1 Effect of Onpi-tô on urea nitrogen in the serum.

Values are means $\pm$ S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table I Effect of Onpi-tô on creatinine level in the serum.

	(mg/100 ml)	
	Control	Onpi-tô
A	2.64±0.08 (100)	2.40±0.11 (91)*
B	2.35±0.32 (100)	2.11±0.10 (90)
C	2.13±0.10 (100)	2.20±0.08 (103)

Values are means±S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.05$.

下量を認めた (Fig. 1-B)。しかし実験Cでは6日, 12日目ではわずかの低下傾向を示したが, 18日目では対照群とほとんど同じ値を示し, 変化しなかった。

血清クレアチニン値は Table I のごとく, 実験Aでは2.64 mg/dl から2.40 mg/dl と有意な低下を示したが, 実験Bでは10%低下したが, 有意差を認めなかった。実験Cでは対照値とほとんど同じ値を示した。

2. 血清中のグアニジノ化合物に対する温脾湯の効果

血清中のグアニジノ化合物の測定結果を Fig. 2 に示したが, 実験Aではメチルグアニジン (MG) は53%の著しい低下を認め, グアニジノコハク酸

(GSA) は31%の有意な低下を示した。実験BではMGは32%有意に低下し, GSAも22%の有意な低下を示したが, いずれもその低下作用は実験Aに比し著しくなかった。実験CではMGの変化が認められなかったが, GSAは13%の低下傾向を示した。しかしグアニジノ酢酸 (GAA) は実験A, B, Cいずれもわずかの上昇を認めたが, 特に実験Bにおいて19%の増加傾向を認めた。

3. 血清カルシウム及び無機リン酸に対する温脾湯の効果

Table II は血清中のCaとP値の測定値を示しているが, 実験AではCaが13%有意に上昇し, Pは19%有意な低下を示した。実験BではCaがわ

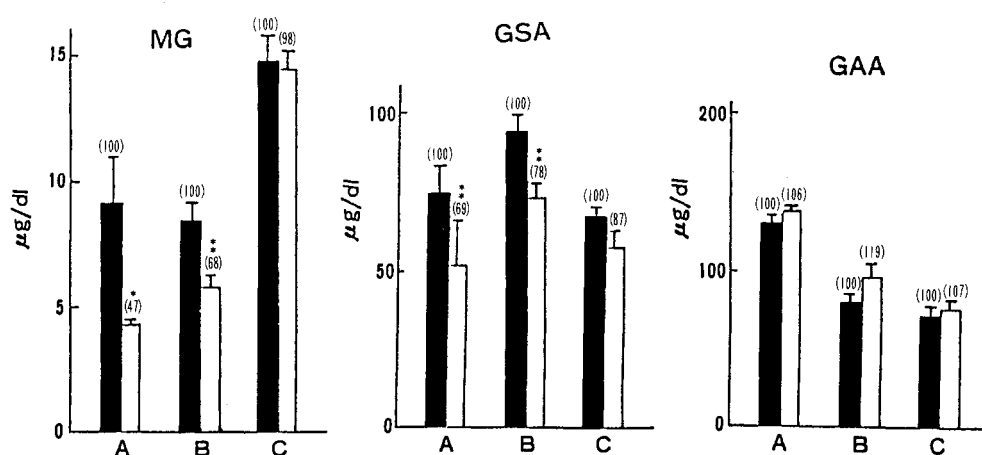


Fig. 2 Effect of Onpi-tô on levels of guanidino compounds in the serum.

MG, methylguanidine; GSA, guanidinosuccinic acid; GAA, guanidinoacetic acid.

Values are means±S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table II Effect of Onpi-tô on calcium and phosphate levels in the serum.

	A		B		C	
	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)
Control	6.86±0.18 (100)	14.57±0.72 (100)	5.52±0.23 (100)	17.60±0.96 (100)	8.14±0.16 (100)	13.73±0.41 (100)
Onpi-tô	7.74±0.15** (113)	11.78±0.45** (81)	5.82±0.16 (105)	15.30±0.66** (87)	7.18±0.20* (88)	14.02±0.24 (102)

Values are means±S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ずかに上昇し、Pは有意な低下を認めたが、実験CではCaが逆に低下したが、Pには変化を認めなかった。

4. 腎重量とDHOA量に対する温脾湯の効果

Table III に示したように、18日目の腎重量は実験Aではわずかの抑制傾向を示し、実験Bではあまり変動せず、実験Cでは逆に上昇傾向が観察された。一方、腎組織中のDHOA量はA、B群において腎当たりいずれも増加が観察され、この傾向はg組織当たりのDHOA量においても同様の結果を示した。しかし実験Cでは腎当たりでは変化を認めなかったが、g組織当たりでは低下した。

考 察

1969年 Giovannetti らは片腎摘出したイヌにMGの慢性投与実験を行ない、貧血、搔痒、末梢神経症状を含む多彩な尿毒症症状が現われ、ついには死亡することを報告し、病理組織学的には消化管の粘膜出血、神経軸索の変性、肺泡出血、心筋変性などを確認している。⁷⁾さらに1974年 Giovannetti らは両側腎摘出したイヌでMG含有透析液とMG freeの透析液による実験を行ない、前者に致死毒性作用のあることを示した。⁸⁾

その他、MGは唾液などの外分泌抑制、*in vitro*のATPase抑制作用、酸化的リン酸化抑制作用、血小板第III因子抑制作用、リンパ球DNA合成抑制、赤血球グロブリン合成の抑制などの作用が知られている。⁹⁾

GSAの毒性作用で最も明確なものは出血素因で、血小板第III因子の抑制によるものである。¹⁰⁾その他、溶血、¹¹⁾ Transketolase 活性抑制、¹²⁾ 血小板凝集能阻害作用¹³⁾などが挙げられている。

GAAは腎でグリシンとアルギニンから生合成され、腎障害の程度と相関し、腎機能が障害される

と、血中GAA値は低下することが報告されている。¹⁴⁾

著者らが開発した慢性腎不全モデルラットは、アデニン食で飼育し、投与日数によって簡便に軽度、中等度、重症度の腎不全ラットが得られ、高窒素血症並びにMG、GSAが次第に上昇することを報告した。¹⁾これらのモデルラットに対し、大黃、温脾湯とアデニンの同時投与により高窒素血症の改善、肝、腎組織中の尿素量の低下、MG、GSAの著明な低下あるいは消失、電解質代謝を改善する所見を報告した。^{15, 16, 2, 3)}

今回、大黃を用いて行なった実験¹⁷⁾と同様にアデニン食を3日あるいは6日前より投与開始し、あらかじめ腎不全を惹起させた後、温脾湯エキスを投与したところ、Fig. 1-A, Bに示すごとく温脾湯投与後6日、12日、18日いずれにおいても、血清尿素窒素値が低下することを明らかにした。しかしあらかじめアデニン食を12日間投与し、血液生化学的にも腎組織学的にもさらに高度の腎不全状態になった場合¹⁾には、血清尿素窒素の低下作用はもはや認められなかった (Fig. 1-C)。これらの結果は、先の大黃を用いた実験結果¹⁷⁾と極めて類似していた。

血清クレアチニン値 (Table I) は軽い腎不全を惹起させた後に温脾湯を投与した実験A (3日間前投与) において有意な低下を示し、実験B (6日間前投与) においてもわずかの低下作用を認め、実験Cでは作用は認められず、尿素窒素値に対する作用と平行していた。しかし先の大黃を用いた実験¹⁷⁾では、ほとんどクレアチニン低下作用は認められないことから、大黃と温脾湯のクレアチニンに対する作用に差異のあることが推定された。

これら血清尿素窒素、クレアチニン値の低下作用機序として、先に報告した尿中成分の検討から、^{18, 19)} 大黃で尿素は低下し、温脾湯で18日以上上昇するのに反し、クレアチニン排泄量は大黃ではほとんど変化

しなかった。これに対し、温脾湯では12日以後クレアチニン排泄量が増加する結果を得ている。したがって、血清尿素窒素、クレアチニン値の低下作用は、大黄では生体内での尿素、クレアチニン産生の抑制、窒素の再利用系の亢進が考えられ、温脾湯はこれら大黄の作用以外に、先に報告した腎組織血流量の増加などの作用⁴⁾により、尿素、クレアチニンの尿中排泄促進作用を示したものと考えられる。

グアニジノ化合物 (Fig. 2) についても3日及び6日間アデニンを投与した後、温脾湯を18日間投与した場合、実験A、BともにMG、GSAは有意に低下したが、アデニンを12日間投与し、血清尿素窒素値が約90 mg/dl以上となった時期より温脾湯エキスを投与した実験Cでは、もはやMG、GSAの低下作用は認められなかった。これらの実験結果は、先の大黃投与実験¹⁷⁾ CのMGの低下を除いて、極めて類似した結果を示している。GAAは先の大黃投与実験では、実験Bで低下し、実験Cで上昇したが¹⁷⁾ 今回、実験A、B、Cいずれも増加傾向を示した。

最近、アデニン投与ラットのMG尿中排泄量を測定した結果、投与日数の経過とともに著しく増加しているのに対し、温脾湯投与により著明に排泄量が低下していることを見出した (未発表データ)。したがって、血中MG値の低下はMG産生の低下によることが明らかとなった。

次に血清電解質、特にCa、Pを測定した結果、Table IIに示すごとくCa値は実験Aでは13%の有意な上昇、実験Bではほとんど変化なく、実験Cでは逆に12%の有意な低下を示し、またP値は実験Aでは19%、実験Bでは13%といずれも有意な低下を示したが、実験Cではほとんど変化を認めなかった。以上の実験結果から、血清Ca、P値に対する温脾湯の作用は血清尿素窒素、クレアチニン、グアニジノ化合物同様、アデニン投与による腎不全状態の進行とは逆にその効果が減弱する傾向が認められた。

先に報告した尿中排泄量の検討から、温脾湯はCa排泄量を12日以後有意に低下させ、P排泄量を12日以後増加させる結果を得ている¹⁹⁾ このことから、低Ca、高P血症改善作用は、尿中排泄量に一部起因しているものと考えられる。Ca、P代謝はPTH、カルシトニン、ビタミンD₃等が関与していることが知られており、この点について今後さらに詳細に検討したい。

腎重量並びに腎組織中のDHOA含量に対する温脾湯の影響はTable IIIに示すごとくである。腎重量に対する温脾湯の効果は、実験Aでわずかに抑制が認められ、実験Cでは逆に増加した。腎組織中のDHOA含量は実験A、Bで高く、実験Cでは逆に低下していた。したがって、腎に蓄積したDHOA量に依存して各種の改善作用が発現したものではな

Table III Effect of Onpi-tô on kidney weight and 2,8-dihydroxyadenine content in the kidneys.

		Kidneys		
		Weight (g)	2,8-DHOA (mg)	2,8-DHOA (mg/g tissue)
A	Control	5.73±0.27 (100)	70.65 (100)	12.33 (100)
	Onpi-tô	5.44±0.31 (95)	76.07 (108)	13.98 (113)
B	Control	5.71±0.32 (100)	73.28 (100)	12.83 (100)
	Onpi-tô	5.86±0.29 (103)	84.39 (115)	14.40 (112)
C	Control	6.05±0.32 (100)	82.89 (100)	13.70 (100)
	Onpi-tô	7.12±0.40 (118)	83.32 (101)	11.70 (85)

Values are means±S.E. or means of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value.

いことが明らかとなった。

以上より、実験Cを除いて実験A、Bの腎不全惹起後ラットにおいて、温脾湯は先のアデニン、温脾湯同時投与実験^{2,3)}と類似した尿毒症改善作用を有することが示された。

最近、慢性腎不全患者22例に大黃、温脾湯を投与し、BUN, MGの著明な低下作用、一部クレアチニン、GSA, Pの低下を認め、実験動物における結果と類似した成績を得た²⁰⁾。したがって、本実験で用いたアデニン誘発慢性腎不全ラットは、腎不全の疾患モデルとして有用であることが明らかとなった。

結 論

あらかじめアデニンを投与して腎不全を惹起させた後、温脾湯エキスを投与し、その効果を検討した。アデニンを3日間投与後、温脾湯を18日間投与した群の血清尿素窒素、クレアチニン、MG, GSA, Pが著しく低下し、Caが著しく上昇し、尿毒症症状の改善が示唆された。しかし温脾湯によるこれら血中成分に対する改善作用は温脾湯投与前のアデニン摂取日数の長いものほど、その効果は減弱した。

文 献

- 1) Yokozawa, T., Zheng, P.D., Oura, H. and Koizumi, F.: Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* **44**, 230-234, 1986
- 2) 大浦彦吉, 鄭 平東, 横澤隆子: アデニン誘発慢性腎不全ラットに対する漢方方剤温脾湯の効果について. 和漢医薬学会誌 **1**, 209-217, 1984
- 3) 大浦彦吉, 鄭 海泳, 鄭 平東, 横澤隆子, 若木邦彦, 小泉富美朝: 実験的腎不全ラットに対する温脾湯の長期投与による効果. 和漢医薬学会誌 **2**, 365-371, 1985
- 4) 鄭 平東, 横澤隆子, 大浦彦吉, 中田瑛浩: 慢性腎不全ラットの腎組織血流量, 血圧, 並びにホルモンに対する温脾湯の効果. 和漢医薬学会誌 **3**, 37-44, 1986
- 5) 鄭 平東, 横澤隆子, 大浦彦吉: 慢性腎不全ラットの腎外性ホルモンに対する温脾湯の効果. 和漢医薬学会誌 **3**, 65-70, 1986
- 6) Bendich, A., Brown, G.B., Philips, F.S. and Thiersch, J.B.: The direct oxidation of adenine *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **138**, 266-277, 1950
- 7) Giovannetti, S., Biagini, M., Balestri, P.L., Navalesi, R., Giagnoni, P., de Matteis, A., Ferro Milone, P. and Perfetti, C.: Uraemia-like syndrome in dogs chronically intoxicated with methylguanidine and creatinine. *Clin. Sci.* **36**, 445-452, 1969
- 8) Giovannetti, S. and Barsotti, G.: Dialysis of methylguanidine. *Kidney Int.* **6**, 177-183, 1974
- 9) 武内重五郎編: “腎不全,” 南江堂, 東京, p. 82, 1979
- 10) Horowitz, H. I., Cohen, B. D., Martinez, P. and Papayouan, M.F.: Defective ADP-induced platelet factor 3 activation in uremia. *Blood* **30**, 331-340, 1967
- 11) Giovannetti, S., Cioni, L., Balestri, P.L. and Biagini, M.: Evidence that guanidines and some related compounds cause haemolysis in chronic uraemia. *Clin. Sci.* **34**, 141-148, 1968
- 12) Lonergan, E.T., Semar, M., Sterzei, R.B., Treser, G., Needle, M.A., Voyles, L. and Lange, K.: Erythrocyte transketolase activity in dialyzed patients. *N. Engl. J. Med.* **284**, 1399-1403, 1971
- 13) Stein, I. M., Cohen, B. D. and Horowitz, H. I.: Guanidinosuccinic acid: The “X” factor in uremic bleeding? *Clin. Res.* **16**, 397, 1968
- 14) Tofuku, Y., Muramoto, H., Kuroda, M. and Takeda, R.: Impaired metabolism of guanidinoacetic acid in uremia. *Nephron* **41**, 174-178, 1985
- 15) Yokozawa, T., Zheng, P.D., Oura, H., Fukase, M., Koizumi, F. and Nishioka, I.: Effect of extract from rhei rhizoma on adenine-induced renal failure in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2762-2768, 1983
- 16) Yokozawa, T., Suzuki, N., Zheng, P.D., Oura, H. and Nishioka, I.: Effect of orally administered rhubarb extract in rats with chronic renal failure. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 4506-4513, 1984
- 17) Yokozawa, T., Suzuki, N., Okuda, I., Oura, H. and Nishioka, I.: Uremia-preventive effect of rhubarb extract in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **2**, 344-350, 1985
- 18) Yokozawa, T., Suzuki, N., Okuda, I., Oura, H. and Nishioka, I.: Changes in the urinary constituents in rats with chronic renal failure during oral administration of rhubarb extract. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 4508-4514, 1985
- 19) 鄭 平東, 横澤隆子, 大浦彦吉: 温脾湯治療慢性腎機能不全の実験研究. 上海中医雜誌 1984年第11期, 45-49
- 20) 三瀨忠道, 横澤隆子, 大浦彦吉, 寺澤捷年: 大黃並びに大黃含有漢方方剤による慢性腎不全の治療に関する研究 (第2報). 日本腎臓学会誌, 印刷中