

和漢薬方剤の抗腎炎効果に関する研究 (4)

ラットの puromycin aminonucleoside ネフローゼに対する柴苓湯の効果と
その作用機序としての活性酸素スカベンジャー上昇作用

服部 智久, 伊藤 幹雄, 鈴木 良雄*

名城大学薬学部薬理学教室

Studies on antinephritic effects of Japanese Kampo medicine in rats (4)

Effects of Sairei-to and the production of reactive oxygen species
scavengers in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats

Tomohisa HATTORI, Mikio ITO and Yoshio SUZUKI*

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Meijo University

(Received November 8, 1989. Accepted April 1, 1990.)

Abstract

In this study, we investigated the antinephritic effect and the production of reactive oxygen species scavengers of Sairei-to (Chai-Ling Tang) in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. Sairei-to (3.75 g/kg/day p.o.) markedly prevented the urinary protein excretion and the elevation of the plasma cholesterol content. In addition, Sairei-to was effective in inhibiting the histopathological parameters in glomeruli by light microscopic observation. In order to clarify one of the antinephritic mechanisms of Sairei-to, we measured the reactive oxygen species scavengers activity. Sairei-to enhanced the reactive oxygen species scavenger (SOD, catalase, glutathion peroxidase) in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. These results indicate that Sairei-to has a beneficial effect on puromycin aminonucleoside nephrosis in rats and the antinephritic action of Sairei-to may be due to the elevated production of scavengers of this agent.

Key words puromycin aminonucleoside nephrosis, reactive oxygen species scavenger, Sairei-to (Sairei-tō).

Abbreviations PAN, puromycin aminonucleoside; Sairei-to (Chai-Ling Tang), 柴苓湯.

緒 言

最近, 多くの医療施設においてヒトのネフローゼ症候群に対して柴苓湯(小柴胡湯合五苓散)が用いられ尿中蛋白排泄および再発再燃の減少が報告されてきている。しかしながらその作用機序についてはほとんど検討されていないのが現状であり明確な作用メカニズムの解明が必要となってきた。

先に我々は柴苓湯がヒトの急速進行性糸球体腎炎ならびに Goodpasture 症候群の実験モデルである

ラットの抗 GBM 腎炎¹⁾ならびに膜性腎症のモデルである加速型 passive Heymann 腎炎²⁾に対して有効であることを報告し, その作用メカニズムとして血小板凝集能の抑制作用³⁾ならびにステロイドホルモンの上昇作用⁴⁾が見出した。

一方, puromycin aminonucleoside (PAN) を用いて実験的ネフローゼが作成されさまざまな薬効評価が行われてきている。本研究では柴苓湯の PAN 腎症に対する効果を検討し, その作用機序のひとつとして腎内の活性酸素スカベンジャーに対する同薬物の効果を検討した。

*〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山15
Tenpaku-ku, Nagoya 468, Japan

材料と方法

(1) 実験動物：体重約 150 から 160 g の Sprague Dawley 系雄性 SPF ラット（H 本 SLC）を 1 群 10 匹として使用した。

(2) 被験薬物ならびに被験薬液の調製：被験薬物として柴苓湯エキス剤（ツムラ）を用いた。薬物を投与する際は柴苓湯エキス剤を 0.38, 1.5 および 3.75 g/kg（ヒトの 1 日当りの 5 倍量, 20 倍量と 50 倍量）を用いた。

(3) PAN 腎症の惹起と薬液の投与：体重 150 から 160 g のラットに PAN (Sigma) の 12 mg/kg を 1 日 1 回腹腔に投与することにより PAN 腎症を惹起した。PAN を投与した日から柴苓湯を 22 日間, 1 日 1 回経口投与した。また被験薬物の代りに同量の水道水を経口投与した対照群と無処理の正常群を設けた。

(4) 採尿, 採血および腎摘出：採尿は, 0, 8, 11, 15, および 19 日目に行った。ラットに 8 ml の水道水を強制投与した後ステンレス製代謝ケージに入れて絶食絶水で 24 時間尿を採取した。その後尿量を測定し 3,000 rpm で 15 分間冷却遠心し, その上清を被検尿として測定した。採血は 22 日目に行った。ラットをラットホルダーに入れて固定し, 尾を約 55℃ の温湯で加温した後, 1 ml のディスポーザブルツベルクリン注射器（ジャパンメディカルサブライ）を用いて尾静脈から 0.3 ml を採血した。得られた血液は 1675 mg の EDTA・2Na・2H₂O（片山化学）を注射用生理食塩水（大塚製薬）20 ml に溶解した溶液 25 μ l と混和し, これを遠心用チューブに取り, クボタマイクロ冷却遠心機（KR-1, 500）で 10 分間, 5,000 rpm で遠心し上清を取り被検血漿とした。また実験最終日に全採血後, 直ちに左腎摘出し病理組織標本に供した。

(5) 尿および血中の生化学的パラメーターの測定
尿中蛋白排泄量：尿中蛋白量は Kingsbury⁴⁾ の方法に従って測定した。蛋白量は 24 時間尿当りの mg として示した。

血中コレステロール量：血中コレステロール量⁵⁾ は総コレステロール定量試薬, Determiner TC5（協和メディックス）を用いて定量し血清あるいは血漿 1 dl 当りの mg として示した。

(6) 腎組織の光学顕微鏡的観察

Paraffin 切片の作製と染色：腎組織を冷 0.5 M Tris 塩酸緩衝 (pH 7.5) 漸強 alcohol 系列 (30 から 100%) で脱水, 固定を行いその後 benzen

溶解 paraffin 中に入れて包埋した。この paraffin 包埋した組織ブロックから大型ミクロトーム (YAMATO LS-113) により 2 から 3 μ m の切片を作製し, この切片について Masson trichrome 染色を施した。

組織学的評価：組織学的評価は以前に報告した方法に準じた⁶⁾。各組織標本中 50 個の糸球体について糸球体係蹄壁とボウマン囊との癒着（癒着）を有する糸球体の割合を百分率で算出した。

(7) 活性酸素スカベンジャーの測定：腎皮質部での測定には PAN 投与開始, 1, 3, 6, 11 日目の腎を摘出し, 検体とした。髓質を切除後, 皮質部についてテフロン加工したホモゲナイザーでホモジェネートし 3,000 rpm で遠心後上清を検体とした。スカベンジャーとしてスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 様活性⁷⁾, カタラーゼ⁸⁾, ならびにグルタチオンペルオキシダーゼ (G-PX)⁹⁾ 活性について測定し, タンパク mg 当りの U として示した。さらに 11 日目の腎を sieving technique¹⁰⁾ により糸球体と尿管・間質分画に分け, SOD 様活性について測定した。また, 11 日目の血清中の SOD についても検討した。SOD 値算出に当たって血清蛋白の干渉値を差し引いた後, U/ml で示した。

(8) 統計学的処理：実験結果の統計学的有意性は ANOVA によって検討した。

結 果

1. 体重, 健康状態および尿量に対する効果 (Table I)

対照群ラットでは正常群と比較して有意な体重の減少が認められたが, 柴苓湯 3.75 g/kg 投与群では対照群と比較して増加がみられた。また, 柴苓湯投与群では下痢などもなく, 毛並みの悪いラットはほとんど観察されなかった。また, 実験期間中尿量に関しても対照群と柴苓湯投与群との間に著しい変化は認められなかった。

2. 尿中蛋白排泄量に対する効果 (Fig. 1)

対照群では 8 日目から著明なタンパク尿がみられ, 11 日目には 327 mg/day とピークを示しその後, 19 日目まで約 200 mg/day の値を持続した。これに対して柴苓湯 0.38 g および 1.5 g/kg 投与群では 11 日目に約 40% の抑制作用が認められ, さらに, 3.75 g/kg 投与群では 8 日目に 85%, 11 日目に 45%, 15 日目に 73% ならびに 19 日目には 85% の著明な抑制が見られた。

Table I Effect of Chai-Ling-Tang on body weight in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Groups	Day 1	Day 5	Day 9	Day 18 (g)
Normal	193.4±9.0	226.7±13.7	241.8±14.1	272.6±19.5
Control	192.0±5.1	210.6±10.5	224.7±12.0 [#]	227.6±13.6 ^{###}
Chai-Ling-Tang				
0.38 g/kg	192.4±4.7	212.4± 5.0	230.5± 7.3	229.3±12.4
1.5 g/kg	193.8±9.5	213.6± 6.9	232.2± 8.4	238.8±12.5
3.75 g/kg	195.9±7.3	210.5± 7.9	234.1± 6.9	247.5±11.5 [*]

Numbers indicate mean±S.D. obtained from 10 rats.

^{*} shows a significant difference from the control at $p < 0.05$.

[#] and ^{###} show significant difference from the normal at $p < 0.05$ and 0.001 , respectively.

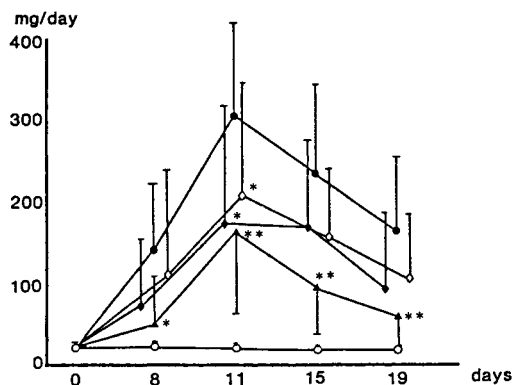


Fig. 1 Effect of Chai-Ling-Tang on urinary protein excretion in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

○-○, Normal; ●-●, Control; ◆-◆, Chai-Ling-Tang 0.38 g/kg; ◇-◇, Chai-Ling-Tang 1.5g/kg; ▲-▲, Chai-Ling-Tang 3.75 g/kg.

Numbers indicate the mean±S.D. obtained from 10 rats. * and ** show significant difference from the control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

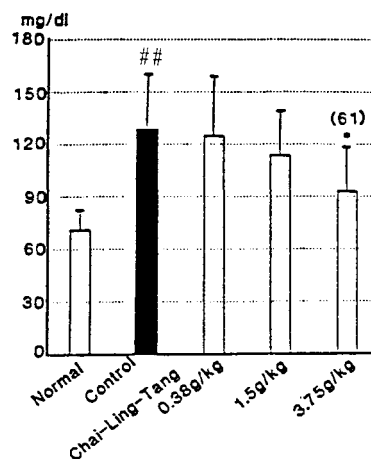


Fig. 2 Effect of Chai-Ling-Tang on serum cholesterol content in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Numbers indicate the mean±S.D. obtained from 10 rats. * shows a significant difference from the control at $p < 0.05$. Numbers in parentheses indicate a % inhibition to control. ^{##} shows a significant difference from the normal at $p < 0.01$.

3. 血漿コレステロール含量に対する効果 (Fig. 2)

コレステロール含量に対しては対照群は実験期間の終了日に 125 mg/dl 前後と正常群に比べて有意に増加していた。これに対して柴苓湯 3.75 g/kg 投与群では 61% の抑制が認められた。

4. 糸球体の病理組織学的なパラメーターに対する効果 (Fig. 3)

対照群では severe な癒着を有する糸球体は観察されなかったもののほぼ 30 % の糸球体に軽度な癒着が認められた。一方、柴苓湯 0.38 g/kg ならびに 1.5 g/kg 投与群では抑制傾向であったが 3.75 g/kg

投与群では 51% の抑制率を示し有意であった。また、データーには示していないが尿細管の間質障害に対しても同様に柴苓湯を投与した群では対照群と比べ軽度であった。

5. 活性酸素スカベンジャー活性に対する効果 (Fig. 4-7)

このモデルの発症と進展に活性酸素種の関与が示唆されていることから柴苓湯の作用機序の 1 つとして活性酸素を消去する酵素の活性について検討した。腎皮質の SOD 様活性 (Fig. 4) は対照群が 6 日目から 11 日目にかけて著しい低下を示した。一

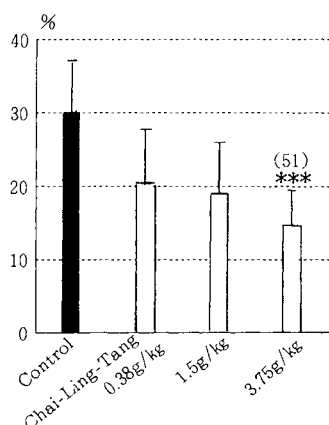


Fig. 3 Effect of Chai-Ling-Tang on mild adhesion of capillary walls to Bowman's capsule in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from 10 rats. *** shows a significant difference from the control at $p < 0.001$

方、柴苓湯投与群では6日目は増加傾向に留まったが11日目には、正常レベル近くまで有意に上昇していた。Catalase ならびに G-PX 活性 (Fig. 5) も対照群では減少傾向であったが、柴苓湯投与群では逆に正常レベル以上の上昇作用が観察された。さらに糸球体内の SOD 様活性 (Fig. 6) においては、対照群は皮質部の結果と同様、有意な低下が認められたが、柴苓湯投与群では、ほぼ正常レベルまでの有意な上昇がみられた。また、尿細管・間質分画 (Fig. 6) において対照群では低下傾向を示したが柴苓湯投与群では、同様に正常レベルまでの上昇がみられた。血清中 SOD 様活性 (Fig. 7) は正常群と対照群で同程度の値であり、柴苓湯投与群では対照群の約 2 倍の上昇がみられた。

ほぼ同時に投与した場合に著明な蛋白尿ならびに高脂血症の抑制と組織病理変化の改善が見られた。先に阿部ら¹¹⁾は PAN 腎症を用いて柴苓湯の効果を検討し、同様に蛋白尿の抑制と組織学的な改善を報

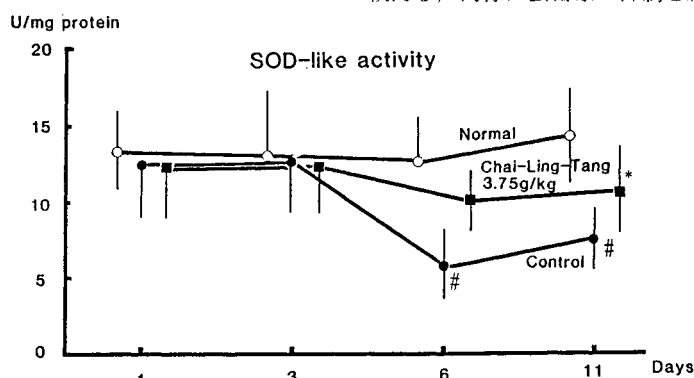


Fig. 4 Effect of Chai-Ling-Tang on intra-cortex SOD-like activity in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. from 10 rats. * shows a significant difference from the control at $p < 0.05$. # shows a significant difference from the normal at $p < 0.05$.

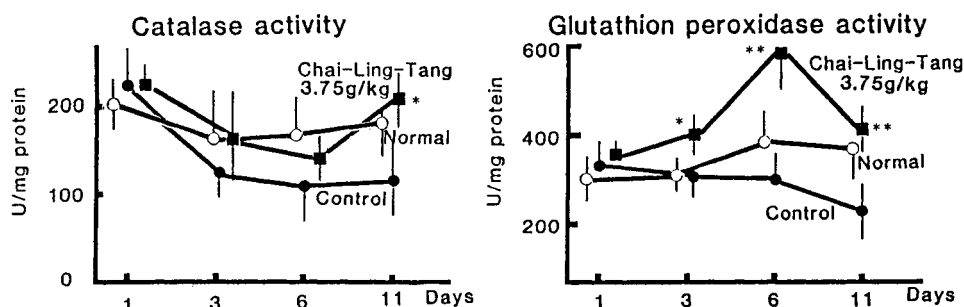


Fig. 5 Effect of Chai-Ling-Tang on intra-cortex catalase and glutathione peroxidase activity in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from the 8 rats. * and ** show significant difference from the control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

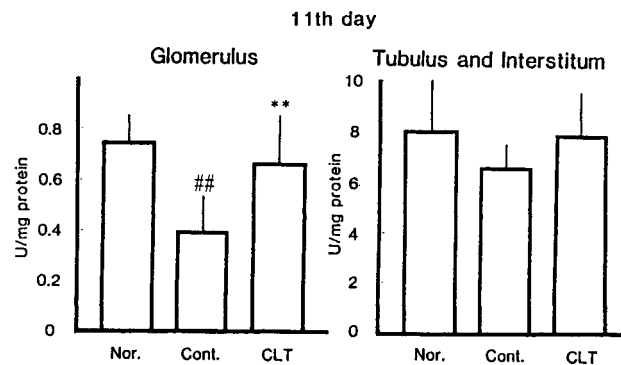


Fig. 6 Effect of Chai-Ling-Tang on intra-glomerular and tubular-interstitial SOD-like activity in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Nor.: Normal, Cont.: Control, CLT: Chai-Ling-Tang 3.75 g/kg. Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from 8 rats. ** shows a significant difference from the control at $p < 0.01$. ## shows a significant difference from the normal at $p < 0.01$.

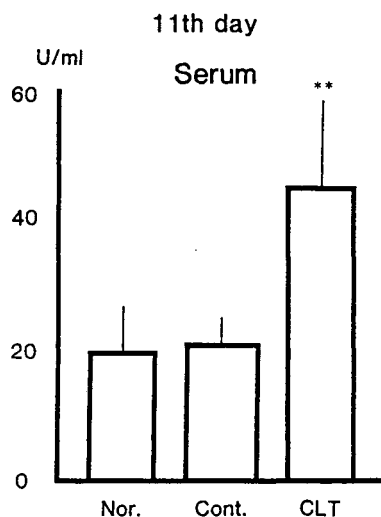


Fig. 7 Effect of Chai-Ling-Tang on serum SOD-like activity in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats.

Nor.: Normal, Cont.: Control, CLT: Chai-Ling-Tang 3.75 g/kg. Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from 5 rats. ** shows a significant difference from the control at $p < 0.01$.

考 察

今回の研究において柴苓湯をPAN腎症の惹起と告しておりその作用機序としてサイコサポニン-dによる生体膜保護作用が重要であると推測している

が、さらに詳しい作用メカニズムの解析はされていない。一方、PAN腎症の発症に活性酸素種の関与が報告されるようになり、^{12,13)}糸球体で産生された活性酸素が膜の構成成分である脂質二重層に作用して過酸化反応を引き起こす。このためミトコンドリアやリソゾームにも影響を与え組織障害を助長しているのではないかと考えられている。

一方、生体には酸素毒性に対する保護機構としてSOD, catalase ならびに G-PX が各組織に存在し、活性酸素による過剰反応を防御している。近年、これらの活性酸素スカベンジャーの製剤化への試みがなされ多くの研究施設で検討が加えられている。Diamondら¹³⁾はPAN腎症に対してSODを直接投与することにより尿中蛋白排泄量の抑制作用を認めたことを証明した。これらの知見を参考にして今回著者らは柴苓湯のPAN腎症に対する作用機序のひとつとして活性酸素スカベンジャー活性に対する効果について検討した。皮質部においては6日目および11日目の対照群ではこれら3つのスカベンジャーのうちSOD様活性のみが有意に低下し、catalaseあるいはG-PX低下傾向を示したが、逆に柴苓湯を投与した群では有意な上昇作用が認められた。

蛋白尿に導くPANのtargetが糸球体のみであるかどうかは現在のところ明らかではない。一方、正常ラットの糸球体内SOD活性は他の酵素群と比べ、低いことが証明されている¹⁴⁾。また、我々の結果

も同様に糸球体 SOD 様活性は皮質部の 1/30 であり尿管・間質分画と比べてかなり低い値であった。このように SOD 活性の少ない糸球体は、特に PAN による活性酸素の影響をうけやすいものと推測される。皮質部位での結果と同様に糸球体 SOD は腎炎対照群で約 40% の低下を示し、逆に柴苓湯では正常値レベルにまで上昇がみられた。この結果から我々は、PAN が糸球体、特に上皮細胞に入り込み *in situ* で活性酸素の過剰産生を引き起こすため、スカベンジャー酵素の産生自体が活性酸素により障害され産生と失活のバランスが崩れ、活性の低下が生じると推測している。これに対して柴苓湯を投与するとスカベンジャー、特に SOD の産生が上昇し、それが引き金となって catalase と G-PX の産生も誘導され、PAN による過剰な活性酸素の産生に対しても消去できうる量が保たれるのではないかと考えられる。また、今回の血中 SOD 様活性は正常群と対照群に差がなく、SOD 様活性の低下は腎組織中で生じていることが暗示され、さらに柴苓湯は血中 SOD 様活性を対照群のほぼ 2 倍に上昇させたことから腎組織で産生の亢進が生じていることが考えられる。

一方、青柳ら¹⁵⁾によれば、柴苓湯は *in vitro* の系で活性酸素スカベンジャー様の作用も有しており、柴苓湯により上皮細胞での活性酸素の過剰な産生が抑制される可能性も考えられる。

スカベンジャーの製剤化においてポリエチレングリコールでコートしたスカベンジャーを用いることによって血中半減期の延長には成功しているが細胞内の活性上昇には影響しないことから、柴苓湯の投与は、他の薬剤では困難な細胞内の活性酸素の消去が可能であり、生体の防御機構を亢進するという点で副作用も少ないと思われる。さらに、柴苓湯にはコルチコステロン分泌促進作用²⁾が認められているため活性酸素産生抑制以外の他のメカニズムも少なからず関与しており和漢薬の特徴であるものと思われる。

結 論

1) 柴苓湯の 3.75 g/kg は PAN 腎症における蛋白尿ならびに高脂血症を著明に抑制し、また、光顯的に糸球体係蹄壁とボウマン囊との癒着を抑制した。

2) 柴苓湯の 3.75 g/kg は腎症で低下した活性酸素スカベンジャーを上昇させた。

このことより柴苓湯はラットの PAN 腎症に対し

て有効であり、その作用機序として活性酸素スカベンジャー上昇作用が関与すると思われる。

文 献

- 1) 服部智久, 永松 正, 鈴木良雄: 和漢薬方剤の抗腎炎効果に関する研究 (1) ラットの抗 GBM 腎炎に対する柴苓湯の効果. 和漢医薬学会誌 5, 27-33, 1988.
- 2) 服部智久, 鈴木良雄: 和漢薬方剤の抗腎炎効果に関する研究 (3) ラットの加速型 passive Heymann 腎炎に対する柴苓湯の効果. 和漢医薬学会誌 6, 108-114, 1989.
- 3) 鈴木良雄, 服部智久: 柴苓湯の血小板凝集能抑制作用—ラットの抗 GBM 腎炎を中心に. 漢方医学 9, 17-20, 1989.
- 4) Kingsbury, F.B., Clark, C.P., Williams, G. and Post, A. L.: The rapid determination of albumin in urine. *J. Lab. Clin. Med.* 11, 981-989, 1926.
- 5) Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W. and Fu, P.C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470-475, 1974.
- 6) Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M. and Suzuki, Y.: Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanisms (1): Effects on original-type anti-GBM nephritis in rats and platelet aggregation. *Japan. J. Pharmacol.* 50, 477-488, 1989.
- 7) 大柳善彦: Establishment of nitrite-kit for SOD activity determination. 炎症 4, 63-73, 1984.
- 8) Beers, R.F.Jr. and Suer, I.W.: A spectro-photometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140, 1952.
- 9) Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: Studies on the glutathion and qualitation characterization of erythrocyte glutathion peroxydase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-169, 1967.
- 10) Friedrich, T., Peter, J.G., Sabine, K., Wilhm, S., Udo, H. and Polf, K.S.: Effect of thromboxane synthetase inhibitor in a model of membranous nephropathy. *Kidney Int.* 35, 76-83, 1989.
- 11) 阿部博子, 織田真知子, 小西啓悦, 有地 滋: 実験的ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の作用. 和漢医薬学会誌 3, 24-30, 1986.
- 12) Thakur, V., Walker, P.D. and Shah, S.V.: Evidence suggesting a role for hydroxy radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int.* 34, 494-499, 1988.
- 13) Diamond, J.R., Bonventre, J.V. and Karnovsky, M.J.: A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 29, 478-483, 1986.
- 14) 角野勝彦, 遠藤 仁: 腎における活性酸素関連酵素. 腎と透析 24, 21-26, 1989.
- 15) 青柳一正, 成田光陽: 活性酸素による腎障害と和漢薬. 第三回和漢薬(中薬)の医学薬学的研究に関する日中シンポジウム講演要旨集, pp. 152-167, 1988.