

NZB/WF₁ マウスに対するステロイド剤と漢方薬の併用効果

中西 由香, 織田真智子, 阿部 博子*

近畿大学東洋医学研究所第一研究部門

Combination therapy of steroid and Kampo medicine in NZB/WF₁ mice

Yuka NAKANISHI, Machiko ORITA and Hiroko ABE*

First Department, The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University

(Received June 4, 1990. Accepted September 20, 1990.)

Abstract

The efficacy of combination therapy of prednisolone and Kampo medicine on renal histology, proteinuria and survival were studied in comparison with controls treated with prednisolone alone. The combination of Sairei-to plus prednisolone was most effective in delaying renal lesion and increasing survival. The combination of Juzen-taiho-to plus prednisolone was also effective in increasing survival but not in delaying renal lesion.

Key words NZB/WF₁ mouse, steroid, Kampo medicine, Sairei-to (Sai-rei-tô), Juzen-taiho-to (Zyûzen-taiho-tô), Unsei-in.

Abbreviations Juzen-taiho-to (Shi-Quan-Da-Bu-Tang), 十全大補湯; Sairei-to (Chai-Ling-Tang), 柴苓湯; Unsei-in (Wen-Qing-Yin), 溫清飲.

緒 言

各種自己免疫疾患の治療には一般にステロイド剤が使用されているが、ステロイド剤のみでは必ずしも十分な治療効果は得られていない。一方、漢方薬には免疫調節作用やステロイド作用の増強効果を示すもの、また種々慢性疾患による体力低下を抑制する処方などがあり、実際の臨床ではこれらの漢方薬をステロイド剤と併用することによって様々な免疫疾患の治療効果をより高める工夫がされている。

本研究では、ヒト SLE 類似の自己免疫疾患動物モデルである NZB/WF₁ マウスにステロイド剤と十全大補湯、柴苓湯あるいは温清飲を投与し、生存率や腎臓の形態学的所見への効果を検討した。

材料と方法

(1) 実験動物：チャールス・リバー社より購入した 4 週齢の NZB/WF₁ (♀) マウスを用いて以下

の実験を行った。

(2) 飼料の作成と投与方法：十全大補湯は黄耆 (3g), 桂皮 (3g), 地黄 (3g), 芍薬 (3g), 川芎 (3g), 蒼朮 (3g), 当帰 (3g), 人參 (3g), 茯苓 (3g), 甘草 (1.5g), 柴苓湯は柴胡 (7g), 沢瀉 (5g), 半夏 (5g), 黄芩 (3g), 蒼朮 (3g), 大棗 (3g), 猪苓 (3g), 人參 (3g), 茯苓 (3g), 甘草 (2g), 桂皮 (2g), 生姜 (1g), 温清飲は地黄 (3g), 芍薬 (3g), 川芎 (3g), 当帰 (3g), 黄芩 (1.5g), 黄柏 (1.5g), 黄连 (1.5g), 山梔子 (1.5g) の混合生薬からそれぞれ得られたツムラ社製エキスを日本クレア製 CE-2 の粉末飼料に添加し、各マウスが 1 日ヒトの 10 倍および 30 倍の漢方薬摂取量となるように十全大補湯は 1.6%, 4.8%, 柴苓湯は 2.0%, 6.0%, 温清飲は 1.6%, 4.8% の濃度で混合した。

(3) 実験方法：NZB/WF₁ (♀) マウスを 8 群に分け、第 1 群～6 群には十全大補湯 1.6%, 4.8%, 柴苓湯 2.0%, 6.0%, 温清飲 1.6%, 4.8% をそれぞれ含有する飼料を与え、第 7, 8 群には普通飼料を

*〒589 大阪狭山市大野東 377-2
377-2, Ohno-higashi, Osakasayama-shi, Osaka 589,
Japan

与え自由摂取とした。また第1～7群にはプレドニゾロン (1.0 mg/kg) を、第8群は対照として生理食塩水を週2回筋肉内注射した。実験開始後各群の生存率を比較すると共に、体重の測定、エームス尿検査試験紙 (マイルス・三共株式会社製) を用いて尿蛋白の定性検査を行った。また実験開始から7.5カ月目に各群のマウスの腎臓を摘出し、その形態を観察した。

(4) 光学顕微鏡用試料の作製: 実験開始7.5カ月目のマウスから腎臓を摘出し、10%ホルマリン溶液で固定した。固定後定法に従って脱水、包埋し、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色あるいはPAM染色を行った。

(5) 電子顕微鏡用試料の作成: 摘出した腎臓を3%グルタルアルデヒド溶液 (0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.4) および1%オスミウム溶液 (ペロナール緩衝液, pH 7.4) で固定し、定法に従って脱水後エポン包埋した。超薄切片はウラニールアセテート、クエン酸鉛で二重染色し、Hitachi HS-9で観察した。

結 果

1. 体重の変化

対照群およびプレドニゾロン単独投与群マウスはいずれも実験開始後5カ月目までは一定の体重増加率を示したが、6カ月目からはむしろ体重は減少し始めた。ところがプレドニゾロンと十全大補湯併用群、柴苓湯併用群ではいずれの濃度でも7カ月目まで順調な体重増加を示した (Fig. 1, 2)。温清飲併

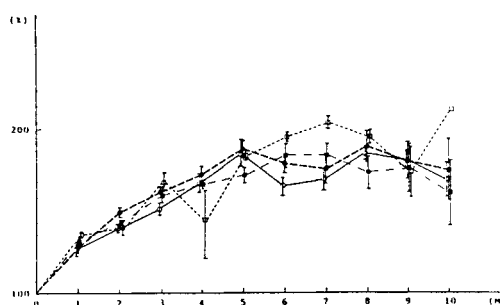


Fig. 1 Effect of treatment on body weight of NZB/WF₁ mice.

The change of body weight was represented in percentages which were calculated with the body weight at 4 weeks of age as 100%. ●, control; ○, prednisolone; ■, prednisolone and 1.6% Juzen-taiho-to; □, prednisolone and 4.8% Juzen-taiho-to.

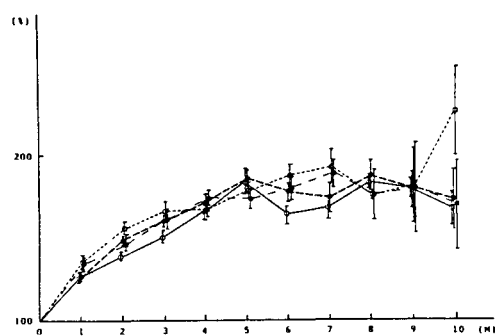


Fig. 2 Effect of treatment on body weight of NZB/WF₁ mice.

●, control; ○, prednisolone; ■, prednisolone and 2% Sairei-to; □, prednisolone and 6% Sairei-to.

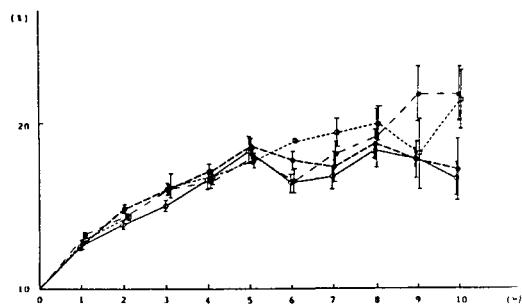


Fig. 3 Effect of treatment on body weight of NZB/WF₁ mice.

●, control; ○, prednisolone; ■, prednisolone and 1.6% Unsei-in; □, prednisolone and 4.8% Unsei-in.

用群でも高濃度投与群では7～8カ月目まで体重増加を示したが、低濃度投与群では対照、プレドニゾロン単独投与群と同様に6カ月目から体重の減少が認められた (Fig. 3)。

2. 生存率

各群間の差が最も著しい250日齢での生存率を比較すると、対照群及びプレドニゾロン単独投与群では66.7%, 81.8%であったのに対して (Fig. 4), 1.6%, 4.8%十全大補湯併用群 (Fig. 5), 2.0%, 6.0%柴苓湯併用群 (Fig. 6) ではいずれも100%の生存率を示した。しかし1.6%, 4.8%温清飲併用群では、50%, 83.3%であり、生存率の改善は認められなかった (Fig. 7)。また平均生存日数も対照群297.8日、プレドニゾロン単独投与群303.6日であったのに対して、1.6%, 4.8%十全大補湯併用群では、それぞれ、315.5日、311.7日、2.0%, 6.0%柴苓湯併用群で312.0日、320.7日といずれも延長

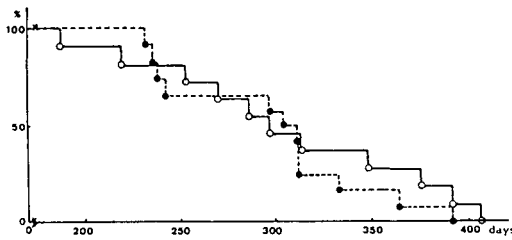


Fig. 4 Effect of treatment on survival rate of NZB/WF₁ mice.

Treatment with prednisolone was started at 4 weeks of age. ●, control ; ○, prednisolone.



Fig. 6 Effect of treatment on survival rate of NZB/WF₁ mice.

○, prednisolone ; ■, prednisolone and 2% Sairei-to ; □, prednisolone and 6% Sairei-to.

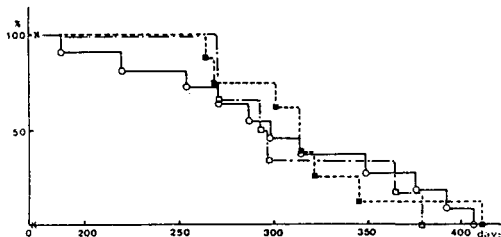


Fig. 5 Effect of treatment on survival rate of NZB/WF₁ mice.

Treatment with prednisolone and Kampo medicine was begun at 4 weeks of age. ○, prednisolone ; ■, prednisolone and 1.6% Juzen-taiho-to ; □, prednisolone and 4.8% Juzen-taiho-to.



Fig. 7 Effect of treatment on survival rate of NZB/WF₁ mice.

○, prednisolone ; ■, prednisolone and 1.6% Unsei-in ; □, prednisolone and 4.8% Unsei-in.

がみられたが、有意の差は認められなかった。また 1.6%, 4.8% 温清飲併用群では、297.0 日, 303.6 日で平均生存日数の延長は認められなかった。

3. 尿蛋白の出現率

対照群マウスでは実験開始から 4 カ月目までは全く尿蛋白は見られなかったが、6 カ月目には 20% に 30 mg/dl 以上の尿蛋白が検出されるようになり 7 カ月目には 60% に明らかな尿蛋白の出現が認められ

た。プレドニゾロン投与群でも同様に 4 カ月目までは全く尿蛋白は認められなかったが、5 カ月, 6 カ月, 7 カ月目にはそれぞれ 11.1%, 50%, 81.8% と対照群より尿蛋白の出現率が高かった。1.6%, 4.8% 十全大補湯併用群, 2.0%, 6% 柴苓湯併用群, 1.6%, 4.8% 温清飲併用群における 7 カ月目の尿蛋白出現率はそれぞれ 50%, 0%, 28.5%, 50%, 33.3%, 33.3% であった。

Table I Effects of Kampo medicine and prednisolone on renal tissue.

Treatment	Grade	I	II	III	IV
Control (n=8)		69 (43.1)	47 (29.4)	11 (6.9)	33 (20.6)
Prednisolone (P) (n=10)		125 (62.5)	51 (22.5)	18 (9.0)	6 (3.0)
P+Juzen-taiho-to (n=10)		44 (22.0)	119 (59.5)	16 (8.0)	21 (10.5)
P+Sairei-to (n=12)		162 (67.5)	67 (27.9)	10 (4.2)	1 (0.4)
P+Unsei-in (n=4)		46 (57.5)	31 (38.8)	3 (3.8)	0 (0)

Upper numbers represent count of glomerulus and the numbers in brackets represent percentage.

4. 腎臓の光顕的所見

実験開始後7.5カ月目のマウス腎糸球体の光顕所見をI：病変のみられないもの、II：軽い病変のみられるもの、III：硬化は進んでいないが明らかな病変のみられるもの、IV：硬化の進んだ病変あるいはend stageに近いものの4段階のgradeに分け、各検体から少なくとも20個、総数80~240個の糸球体のgradeを観察し、それぞれの数および%数をTable Iに示した。

対照群ではFig. 8aに示されるように硬化が進

行し、end stageに近い糸球体がかなり見られ、grade I, IIの初期変化を示す糸球体は72.5%であった。プレドニゾン単独投与群ではFig. 8bに見られるように硬化の軽度な所見を示すものが対照群に比べて多く、grade I, IIの軽度障害の糸球体の割合は88%であった。プレドニゾンと十全大補湯を併用したマウスでは、grade I, IIの腎所見を示すものが81.5%で、Fig. 8cに見られるような著明な糸球体変化を示すものも認められた。また柴苓湯とプレドニゾン併用群においては、プレドニゾ

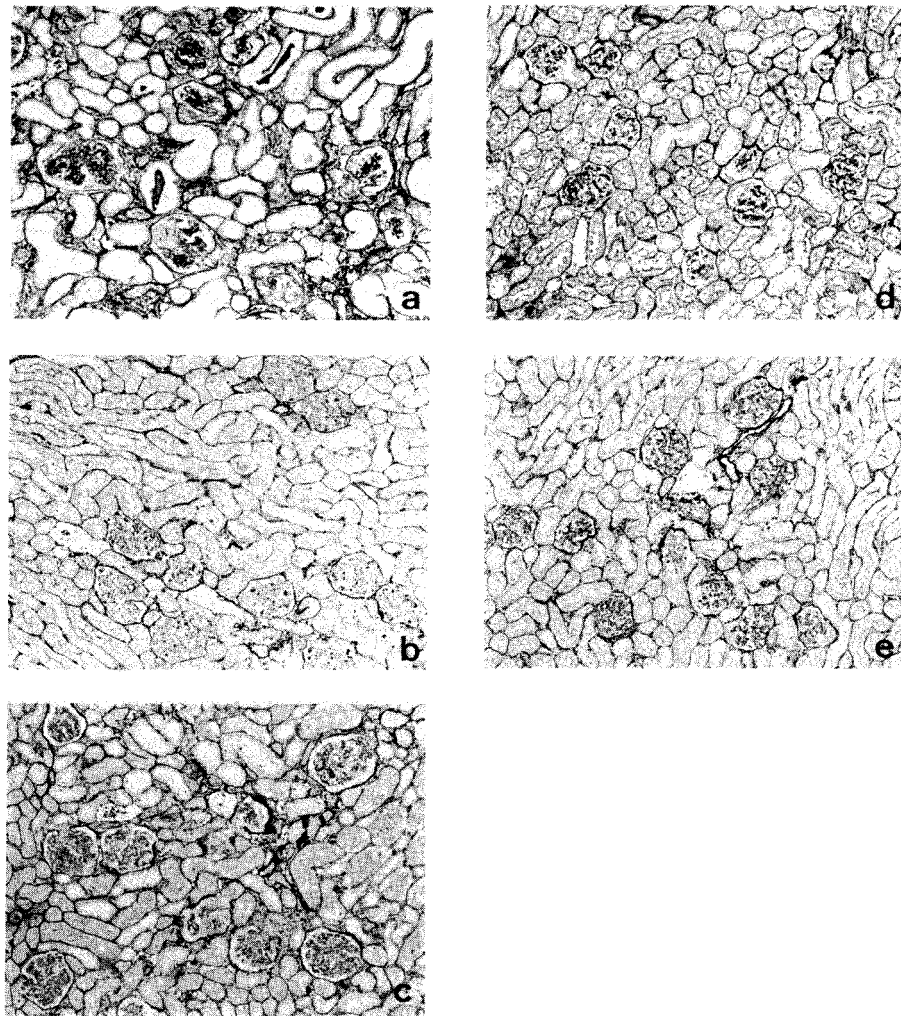


Fig. 8 Light micrographs of kidney sections.

a, control (no treatment) ; b, mice treated with prednisolone alone ; c, mice treated with prednisolone and Juzen-taiho-to ; d, mice treated with prednisolone and Sairei-to ; e, mice treated with prednisolone and Unsei-in. (PAM) ($\times 100$).

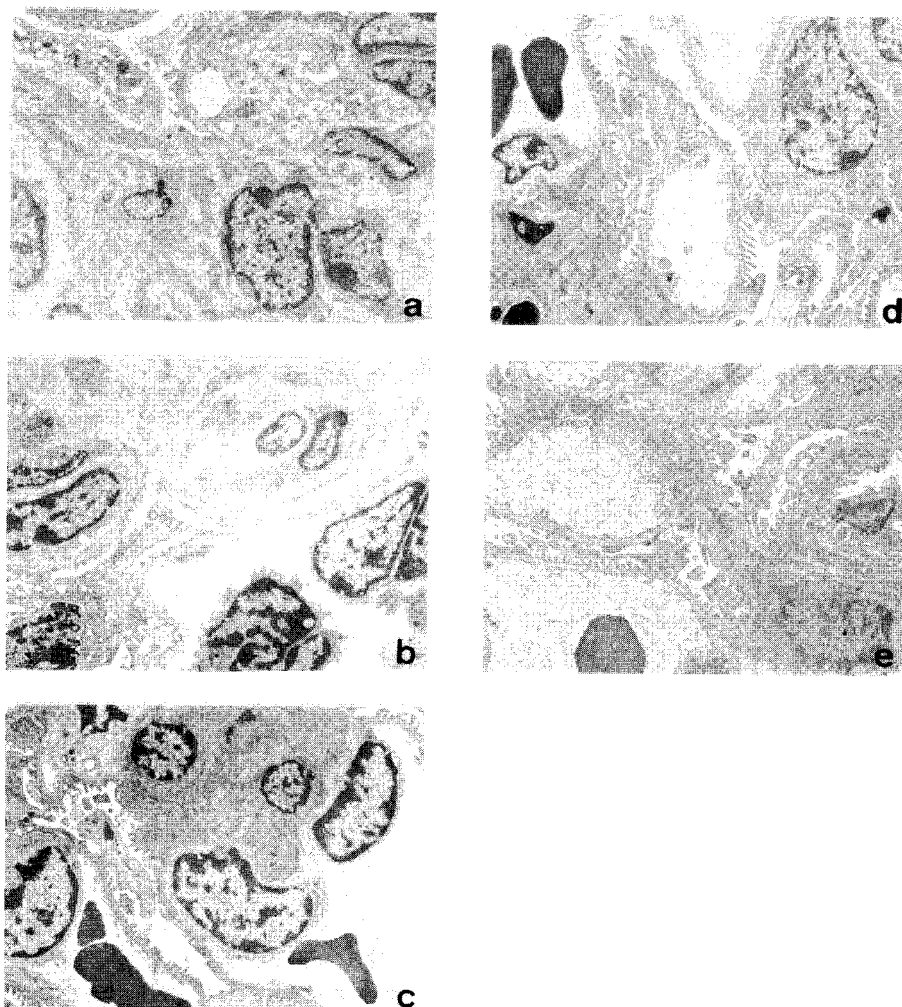


Fig. 9 Electron micrographs of kidney sections.

a, control (no treatment) ; b, mice treated with prednisolone alone ; c, mice treated with prednisolone and Juzen-taiho-to ; d, mice treated with prednisolone and Sairei-to ; e, mice treated with prednisolone and Unsei-in ($\times 3200$).

ン単独投与群に比べて grade I, II の所見を示す糸球体数は95.4%と明らかに多く、ほぼ正常な腎組織所見 (Fig. 8d) を示すマウスが多かった。温清飲併用群では生存マウス数は少なかったが、生存マウス4匹の中2匹がほぼ正常の腎所見を示し (Fig. 8e), grade I, II の糸球体数も96.3%と著しく高かった。

5. 腎臓の電顕的所見

対照群マウス腎糸球体部を電顕で観察すると、糸球体上皮細胞の足突起の形状の乱れが著しく、殆ど無構造の状態であり、基底膜の上皮細胞側には Fig. 9a に見られるような電子密度の高い物質の沈着が見られた。これに対してプレドニゾロン投与群

マウス腎では対照群に比べて基底膜における電子密度の高い物質の沈着は減少し、足突起の形態もかなり良く保存されているのが観察された (Fig. 9b)。プレドニゾロンと十全大補湯との併用ではプレドニゾロン単独投与群に比べて特に著しい糸球体像の改善は認められなかった (Fig. 9c)。ところがプレドニゾロンと柴苓湯併用群では Fig. 9d に見られるようにほぼ正常な糸球体を示す像が多く、プレドニゾロン単独投与よりかなり腎臓の電顕的所見も改善されていることが確認された。プレドニゾロンと温清飲の併用群でも残存しているマウスの腎糸球体は殆ど障害が認められず、ほぼ正常に近い状態を示した (Fig. 9e)。

考 察

ネフローゼ症候群の治療にステロイド剤と柴胡剤を併用するとステロイド剤のみによる治療よりかなり良好な治療結果の得られることは既に基礎および臨床的に確認されているが、¹⁻⁴⁾ その他の疾患、特に自己免疫系疾患におけるステロイド剤と漢方薬との併用効果については臨床報告のみで基礎的検討は全くなされていない。

自己免疫性腎炎のモデルとして開発された NZB/WF₁ マウスはヒトの SLE 腎炎にみられるような増殖性糸球体腎炎、膜性糸球体腎炎、ループス腎炎、硬化性糸球体腎炎などの病変を月齢に伴って呈する。一般にヒトの自己免疫疾患の治療にはステロイド剤が使用されるが、この NZB/WF₁ マウスの腎炎に対してもステロイド剤はかなり有効であることが見出されている。⁵⁾ 本研究結果はこの NZB/WF₁ マウスにステロイド剤と共に柴苓湯や十全大補湯などを併用するとステロイド剤のみ単独で治療するより更に生存日数は長くなり、特に柴苓湯を併用すると腎臓の組織所見にもかなりの改善が認められ、明らかに腎炎発症の時期が遅延するものと考えられる。

柴苓湯にはネフローゼ症候群⁶⁾ および抗 GBM 腎糸球体腎炎抑制効果⁷⁾ やステロイド作用の増強作用のあることが知られており、⁸⁾ 本研究におけるステロイド剤との併用効果もこれらの作用の総合的結果によるものと考えられるが、その作用機作の詳細については現在のところ明らかにはされていない。しかしこの NZB/WF₁ マウスの治療においてステロイド剤を増量しても必ずしも平均生存率は改善されないということを考慮すると、柴苓湯がステロイド剤とは異なる機作によって作用していることが推測され、この両薬物の併用の意義は極めて大きいと思われる。

十全大補湯は臨床的には重症疾患で体力が低下したり、ステロイド剤などをかなり長期に大量使用したことによって体力が低下しているような場合に用いる処方である。本研究におけるステロイド剤と十全大補湯の生存曲線 (Fig. 5) をみると、ステロイド剤単独投与群に比べて死亡開始の時期がかなり延長されている。しかしこの十全大補湯併用群マウスの腎臓の組織所見では特にステロイド剤単独投与マウスに比べて改善が認められていない。したがって十全大補湯による生存日数の延長は腎炎の抑制の結果というよりむしろ非特異的な抵抗力の増加などに

よってステロイド剤による体力の低下などを抑制することによる可能性が推測される。

一方、臨床でベーチェット病などに使用され、ステロイド剤との併用なども試みられている温清飲には本研究におけるステロイド剤との併用効果は認められず、柴苓湯、十全大補湯とは全く異なる経過を示していることは漢方薬の臨床使用目標を考える上で極めて興味ある結果と思われる。

十全大補湯、柴苓湯、温清飲の投与濃度についての検討では、柴苓湯の高濃度群で平均生存日数がやや高いが、十全大補湯、温清飲などでは特に濃度による変化は認められていない。一般に漢方薬の薬理作用の検討では濃度依存性の効果を得ることは難しく、^{9,10)} 濃度依存性が認められない理由も不明ではあるが、マウスとヒトの代謝の違いを考慮すると10倍量投与がほぼヒトの普通量であると考えられるので、現在臨床で使用されている量がほぼ有効性を示す適量であるものと推測される。

今後更に十全大補湯や柴苓湯がステロイド剤との併用によって平均生存日数や腎臓の組織所見の改善が認められる詳細なメカニズムについての解明を行う必要はあるが、本研究によって臨床での自己免疫疾患などにおけるステロイド剤と漢方薬との併用療法の有用性の一端が実験的に確認されたものと考えられる。

結 論

- 1) NZB/WF₁ マウスにステロイド剤と十全大補湯を投与するとステロイド単独投与に比べて平均生存日数はやや延長されたが、腎組織所見には著明な改善は認められなかった。
- 2) NZB/WF₁ マウスにステロイド剤と柴苓湯を投与するとステロイド単独投与に比べて平均生存日数はやや延長され、腎組織所見にも明らかな改善が認められた。
- 3) NZB/WF₁ マウスにステロイド剤と温清飲を併用しても平均生存日数の延長は全く認められなかった。

文 献

- 1) 有地 滋, 阿部博子: 漢方薬によるグルココルチコ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) 岡田敏夫, 山谷美和, 和田博義, 内野広巳: 小児ネフ

- ローゼ症候群に対する和漢薬治療の試み, 和漢医薬学会誌 **2**, 468-469, 1985.
- 4) 矢崎雄彦, 広瀬滋之: 小児ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の臨床効果, 和漢医薬学会誌 **4**, 203-206, 1987.
- 5) Casey, T.P.: Systemic lupus erythematosus in NZB×NZW hybrid mice treated with the corticosteroid drug bethamethasone. *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 390-399, 1968.
- 6) 阿部博子, 織田真智子, 小西啓悦: 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.
- 7) 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抗体腎炎に対する柴苓湯の効果, 和漢医薬学会誌 **5**, 27-33, 1988.
- 8) 阿部博子, 小西裕紀子, 有地 滋: 柴胡剤の薬理学的研究(3) 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.
- 9) 阿部博子, 小田島肅夫: 生薬, 和漢薬の薬理作用～とくにその作用機作について～, 診断と治療 **71**, 1311-1318, 1983.
- 10) 溝口靖紘, 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, 山本裕夫, 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.