

Puromycin aminonucleoside 腎症ラットにおける柴苓湯の効果に関する検討

頼岡 徳在*, ザヒド・ホセイン・ジョーダー, 小川 貴彦,
谷口 良彦, 平林 晃, 山木戸道郎

広島大学医学部第二内科学教室

A study of effectiveness of Sairei-to (Chai-Ling-Tang) on
puromycin aminonucleoside nephrotic rats

Noriaki YORIOKA*, Zahid Hossain JOARDER, Takahiko OGAWA, Yosihiko TANIGUCHI,
Akira HIRABAYASHI and Michio YAMAKIDO

The 2nd Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine

(Received June 25, 1990. Accepted October 30, 1990.)

Abstract

To evaluate the effectiveness of Sairei-to (Chai-Ling-Tang) and to elucidate its mechanism on puromycin aminonucleoside (PAN) nephrotic rats, a study was undertaken. Nephrotic rat model was made by injection of PAN 10 mg/100 g body weight (B.W.) intraperitoneally on day 0 in one group. The other two groups were administered orally 10 mg and 50 mg/100 g B.W. of Sairei-to (PAN+S · 10 and PAN+S · 50) daily for 8 days respectively after the injection of PAN. We also made another two groups of Normal (N) and Sairei to 50 mg/100 g B.W. (S · 50) to measure the serum and urinary superoxide dismutase (SOD)-like activities. Proteinuria and serum triglyceride levels were significantly reduced and a significant histo-morphological improvement was marked in Sairei-to-treated groups as compared to PAN-treated control group. The serum SOD-like activities were significantly improved in PAN+S · 50 group as compared to PAN group and also significantly increased in S · 50 group as compared to N group. However, the urinary SOD-like activities did not show any significant changes among PAN, PAN+S · 10 and PAN+S · 50 groups except the amount that found to be increased. From the above findings, Sairei-to has an antinephritic effect depending on the improvement of SOD-like activity.

Key words Sairei-to (Sairei-tō), puromycin aminonucleoside, nephrotic rat, proteinuria, superoxide dismutase, electron microscopy.

Abbreviations B.W., body weight; PAN, puromycin aminonucleoside; SOD, superoxide dismutase; Sairei-to (Chai-Ling-Tang), 柴苓湯.

緒 言

近年、腎疾患の治療薬として和漢薬の有用性が西洋医学の見地より注目されている。特に柴苓湯は内因性ステロイド分泌促進、ステロイド増強作用等^{1, 3)}により蛋白尿減少効果を有すると考えられ、日常臨床に応用され始めている。しかしながら、その有効性については未だ確立されたとは言えず、更にはそ

の効果発現機序についても十分には明らかにされていない。そこで今回我々は微量変化型ネフローゼ症候群のモデルであるラット puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症を用いて柴苓湯の有効性を明らかにするとともに活性酸素の面からその効果発現機序についても検討した。

*〒734 広島市南区霞1-2-3
1-2-3, Kasumi, Minamiku, Hiroshima 734, Japan

材料と方法

(1) 実験動物および実験方法：体重 180～200 g の Wistar 系雄ラットを用い、10 mg/100 g Body Weight (B.W.) の PAN を腹腔内に 1 回投与し、腎症を発症させた。そして、当教室の和田の報告⁴⁾のごとく蛋白尿がピークを呈する 8 日目まで PAN 投与日から 1 日 1 回カニューレで柴苓湯を経口投与した。柴苓湯はツムラ社より提供されたエキス剤であり、その投与量はヒトの 1 日投与量に相当する 10 mg/100 g B.W. (PAN+S・10群)、5 倍量に相当する 50 mg/100 g B.W. (PAN+S・50群)とした。対照として PAN のみ投与し、柴苓湯非投与のラット (PAN 群) を用いた。加えて 50 mg/100 g B.W. の柴苓湯のみを 8 日間連続投与した群 (S・50群) と全く無処理の正常群 (N群) を superoxide dismutase (SOD) 様活性測定のために設けた。なお、実験期間中ラット用固形飼料 (オリエンタル酵母社製) と水は自由に摂取させた。

(2) 採尿、採血方法：採尿可能な代謝ケージにラットを 1 匹ずつ入れて実験開始日、3 日目、6 日目、8 日目に 24 時間尿を採取した。尿量測定後 3000 rpm で 15 分間冷却遠心し、その上清を被検尿とした。採血は腹部大動脈に翼状針を穿刺、固定し、10 ml のディスポーザブル注射器にて 8 日目に行なった。冷却遠心機にて 3000 rpm、15 分間遠心し、上清を被検血清とした。

(3) 腎組織学的検索方法：採血終了後、腹部大動脈より生理的食塩水を注入し、両腎をまず洗浄した。ついで右腎門部を結紮し、左腎を 0.1 M 中性カコジル酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒド液にて灌流した。そして右腎を光学顕微鏡用に 10% 中性緩衝ホルマリン液に、左腎を電子顕微鏡用に 0.1 M 中性カコジル酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒド液にて固定した。その後光学顕微鏡用組織はアルコール系列で脱水、キシロールで透徹後パラフィン包埋し、切片を作製した。切片は PAS 染色し、鏡検観察に供した。電子顕微鏡用組織は固定後、0.1 M 中性カコジル酸緩衝液にて 3 回洗浄し、2% 四酸化オスミウムにて 4℃ 1 時間固定した。そしてアルコール系列、酸化プロピレンにて脱水し、酸化プロピレンとエポン 812 の 2:1 混合液、1:1 混合液に置換後、包埋、重合した。その後超薄切片を作製し、酢酸ウラン、クエン酸鉛にて二重染色を施し、H-7000 型電子顕微鏡 (日立製作所製) を用い加速電圧 75 KVp にて観察した。

(4) 尿、血液検索項目

尿中蛋白排泄量：Bradford の方法を改良したトネイン試薬を用いた方法⁵⁾により測定した。蛋白量は 24 時間尿当たりの mg として表示した。

血液生化学的検査：血中総蛋白量は TP 試薬・A (国際試薬 K.K.) を用いてビュレット法により、血中アルブミン量はクリニメイト Alb (第一化学 K.K.) を用いて BCG 法により測定した。単位は g/dl にて表示した。血中総コレステロール量は EA テスト T-CHO600 栄研 (栄研化学 K.K.) を、血中中性脂肪量は TG 試薬・A (国際試薬 K.K.) を用いて酵素法により測定した。BUN は BUN 試薬・A (国際試薬 K.K.) を用いて酵素法により測定し、血中クレアチニン量はサンテスト CRE-N (三光純薬 K.K.) を用いて Jaffe 変法により測定した。血中尿酸量はデタミナー UA-S755 (協和メディックス K.K.) を用いて酵素法により測定した。単位はいずれも mg/dl にて表示した。

血中、尿中 SOD 様活性：SOD-テストキット (和光純薬 K.K.) を用いた NBT 還元法にて測定した⁶⁾。尿中 SOD 様活性については 24 時間尿を phosphate buffered saline (pH 7.2) にて 24 時間透析後測定した。単位は血中については u/ml、尿中については u/day とした。

(5) 組織障害度：組織障害度は光学顕微鏡標本にて主としてメサングウム細胞、基質の増殖程度により軽度、中等度、高度に分類するとともにそれぞれを 1 点、2 点、3 点と点数化し、各群 500 個の糸球体について検討した。

(6) 統計学的処理：Student's *t* 検定および χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 尿中蛋白排泄量に対する効果

PAN 群、PAN+S・10群、PAN+S・50群の尿中蛋白排泄量の推移を Fig. 1 に示した。PAN+S・10群は PAN 群に比し経過中尿中蛋白排泄量が有意に低値であった。PAN+S・50群も 3 日目を除き PAN 群に比し有意に低値であった。そして 8 日目の尿中蛋白排泄量は PAN 群 678.9 ± 148.6 mg/day、PAN+S・10群 496.1 ± 84.7 mg/day、PAN+S・50群 339.0 ± 80.4 mg/day であり、PAN+S・10群は PAN 群に比し、PAN+S・50群は PAN 群、PAN+S・10群に比し有意に低値であった (Fig. 2)。

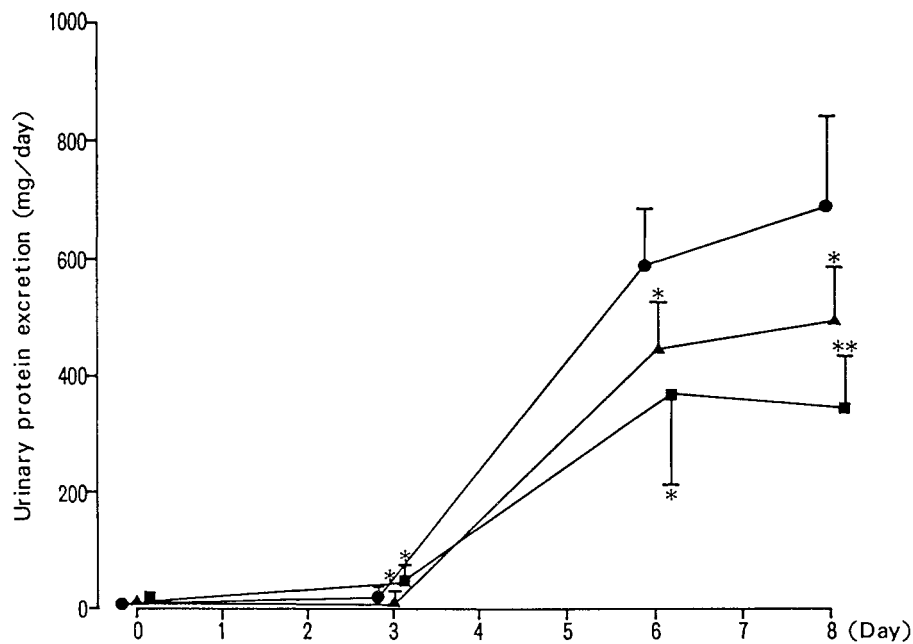


Fig. 1 Course of urinary protein excretion in PAN, PAN+S·10 and PAN+S·50 groups. PAN+S·10 and PAN+S·50 groups showed significantly reduced proteinuria.
 ●—● : puromycin aminonucleoside 10 mg/100 g B.W. (PAN).
 ▲—▲ : PAN+Sairei-to 10 mg/100 g B.W. (PAN+S·10).
 ■—■ : PAN+Sairei-to 50 mg/100 g B.W. (PAN+S·50).
 * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

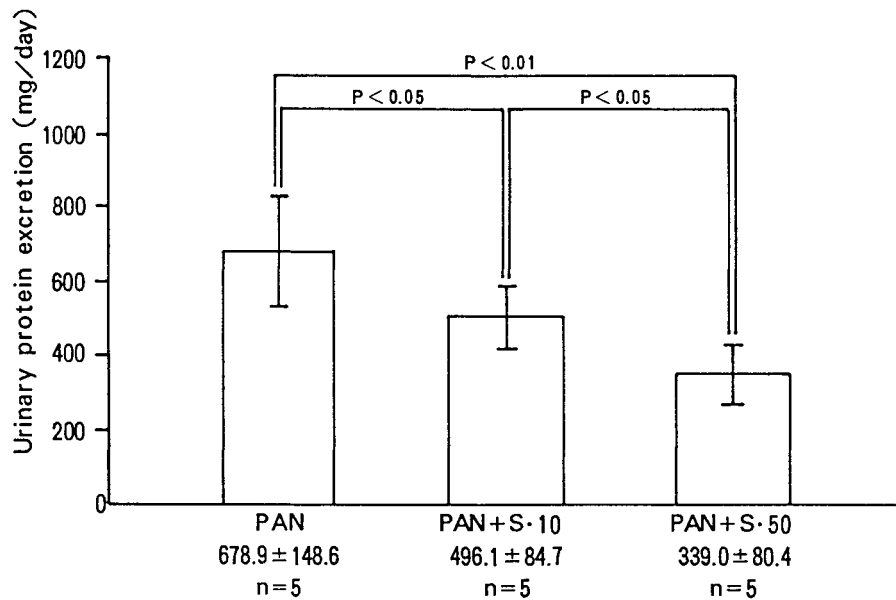


Fig. 2 Effect of Sairei-to (Chai-Ling-Tang) on urinary protein excretion in PAN rats on day 8. PAN+S·10 and PAN+S·50 groups showed significantly lower excretion as compared to PAN group.

2. 血液生化学的検査に対する効果

PAN 群, PAN+S・10群, PAN+S・50群との間に血中総蛋白, アルブミン, 総コレステロール, BUN, クレアチニン, 尿酸の有意差はみられなかったが, 中性脂肪は PAN 群 827.0 ± 262.3 mg/dl, PAN+S・10群 532.2 ± 104.5 mg/dl, PAN+S・50群 451.4 ± 154.3 mg/dl であり, PAN+S・10群, PAN+S・50群は PAN 群に比し有意の低値を示した (Table I)。

3. 血中, 尿中 SOD 様活性に対する効果

血中 SOD 様活性は N 群 16.0 ± 2.1 u/ml, PAN 群 10.4 ± 1.2 u/ml, PAN+S・10群 10.1 ± 2.2 u/ml, PAN+S・50群 15.4 ± 3.0 u/ml であり, PAN 群, PAN+S・10群は N 群, PAN+S・50群に比し有意に低値であった。なお N 群と PAN+S・50群の間には有意差はみられなかった。一方, S・50群の血中 SOD 様活性は 24.2 ± 5.4 u/ml であり, N 群に比し有意の高値を示した (Fig. 3)。

Table I Effect of Sairei-to on blood chemical findings on day 8.

Group	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	T. Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	UA (mg/dl)
PAN	4.66 ± 0.67	3.68 ± 0.59	361.4 ± 33.2	827.0 ± 262.3	54.4 ± 21.6	0.76 ± 0.13	2.3 ± 0.6
PAN+S・10	4.42 ± 0.28	3.24 ± 0.21	354.4 ± 17.5	$532.2 \pm 104.5^*$	44.0 ± 17.1	0.72 ± 0.11	2.4 ± 0.3
PAN+S・50	4.56 ± 0.27	3.60 ± 0.28	287.4 ± 93.1	$451.4 \pm 154.3^*$	40.0 ± 19.9	0.66 ± 0.15	2.7 ± 1.0

Serum triglyceride levels in PAN+S・10 and PAN+S・50 groups were significantly lower as compared to PAN group.
*: $p < 0.05$.

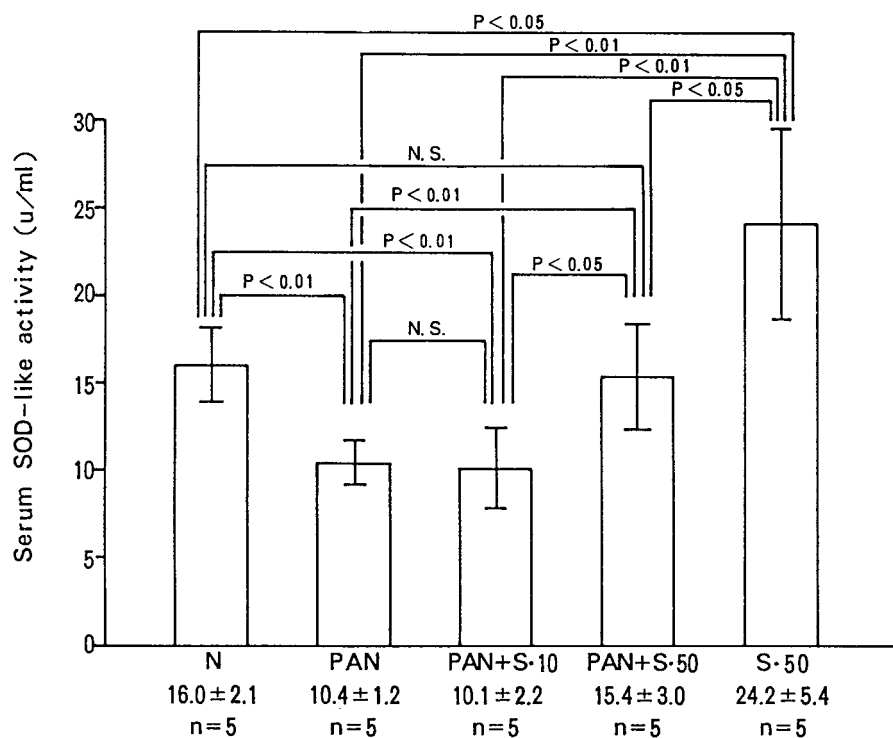


Fig. 3 Serum SOD-like activity in N, PAN, PAN+S・10, PAN+S・50 and S・50 groups on day 8.

PAN and PAN+S・10 groups showed significantly lower activity than N and PAN+S・50 groups. Moreover, S・50 group showed significantly higher activity than N group.

N: Normal, S・50: Sairei-to 50 mg/100 g B.W.

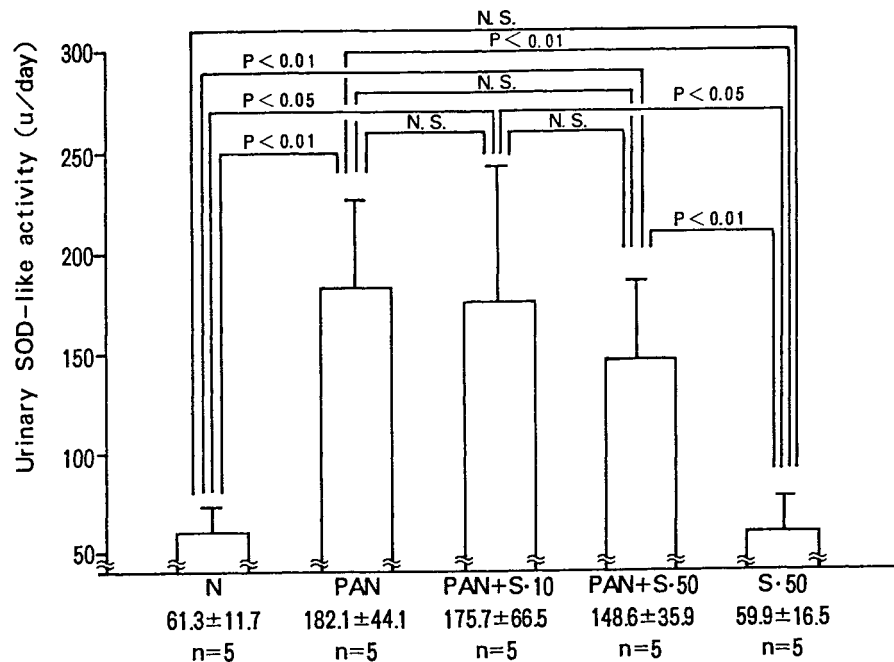


Fig. 4 Urinary SOD-like activity in N, PAN, PAN+S·10, PAN+S·50 and S·50 groups on day 8.

PAN, PAN+S·10 and PAN+S·50 groups showed significantly higher activity than N and S·50 groups. However, no significance among PAN, PAN+S·10 and PAN+S·50 groups was shown.

尿中SOD様活性はPAN群, PAN+S·10群, PAN+S·50群ともに8日目にはN群, S·50群に比し有意の高値を呈したが, PAN群, PAN+S·10群, PAN+S·50群の3群間においては有意差はみられなかった (Fig. 4)。

4. 組織学的変化に対する効果

光学顕微鏡によるPAN群, PAN+S·10群, PAN+S·50群の組織障害度別の糸球体数を Table II に示した。PAN+S·50群はPAN群, PAN+S·10群に比し, またPAN+S·10群はPAN群に比し組織障害度が有意に軽度であった (Table II)。

電子顕微鏡による検索ではPAN群では上皮細胞内に多数の巨大空胞がみられ, また足突起は融合し

Table II Effect of Sairei-to on histological grade in PAN rats on day 8.

Group	Grade	I	II	III	Total
PAN		240	208	52	500
PAN+S·10**		272	200	28	500
PAN+S·50***		417	80	3	500

PAN+S·10 and PAN+S·50 groups showed significant improvement as compared to PAN group.

*: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$.

ていた。一方, PAN+S·50群では上皮細胞の変化が改善していた (Fig. 5)。

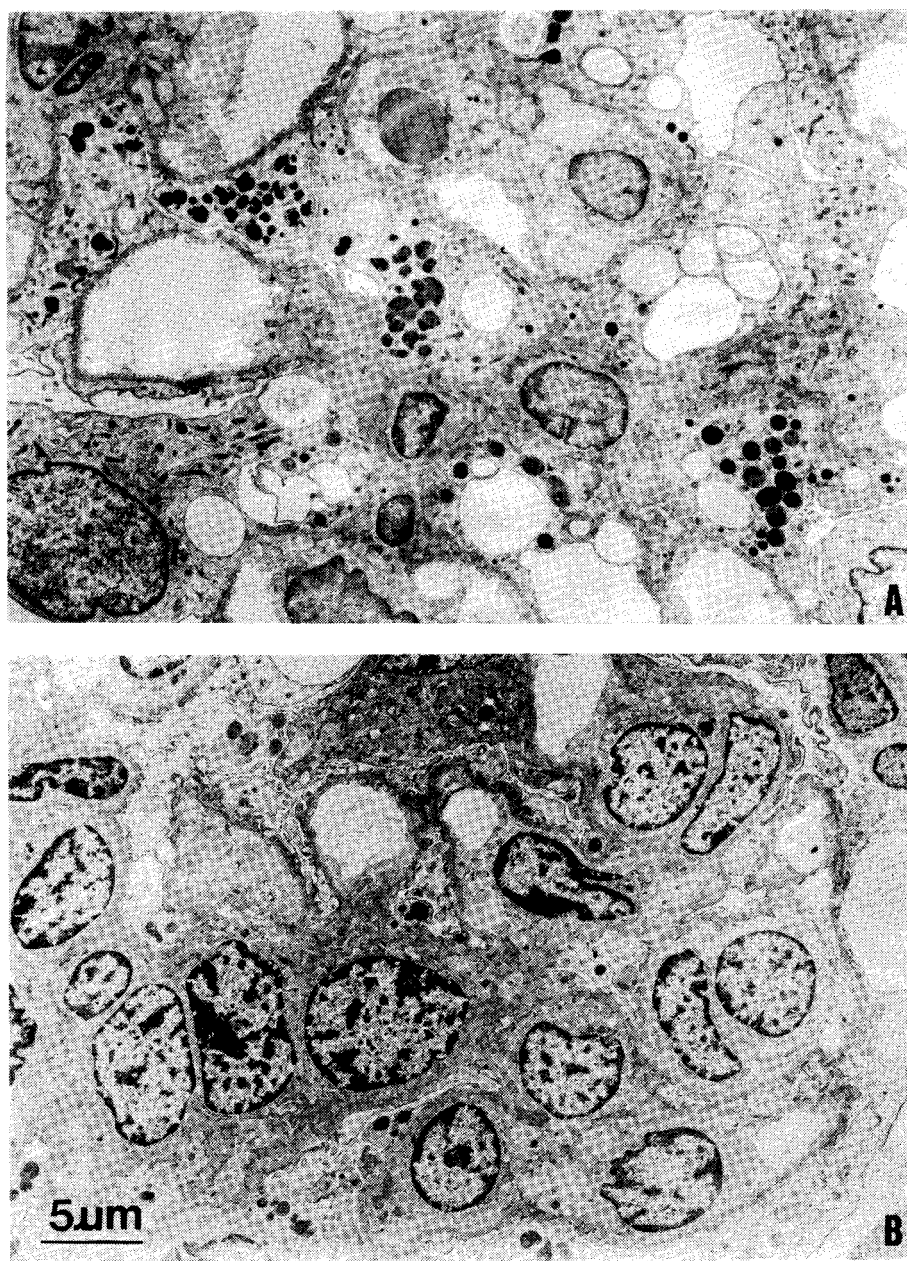


Fig. 5 Electron micrographs of glomerulus from (A) PAN group and (B) PAN+S·50 group.
Fusion of the foot processes, swelling and vacuolization were well-marked in PAN group.
A remarkable improvement was observed in PAN+S·50 group.

考 察

柴苓湯の蛋白尿減少効果を始めとする抗腎炎効果については阿部ら⁷⁻¹⁰⁾、伊藤ら^{11,12)}によるPAN腎症ラットを用いての報告がみられる。また鈴木ら¹³⁻¹⁷⁾はラット抗GBM腎炎において、さらに西川ら¹⁸⁾はループス腎炎における柴苓湯の効果を報告している。そしてその作用機序としては柴苓湯のステロイド増強作用、血小板凝集抑制作用、細胞保護作用も示唆されているが、未だ十分には解明されたとは言えない。そこで今回我々は柴苓湯の抗腎炎効果ならびにその作用機序を明らかにする目的にて微少変化型ネフローゼ症候群のモデルであり、かつその発症に活性酸素の関連が報告¹⁹⁾されているPAN腎症ラットに対し10 mg/100 g B.W., 50 mg/100 g B.W.の柴苓湯を連日投与した。その結果、柴苓湯投与量に応じて蛋白尿減少効果、血清学的、組織学的改善効果がみられた。そしてその効果発現機序について今回は活性酸素のスカベンジャーであるSODを血中、尿中SOD様活性を測定することにより検討した。血中SOD様活性はPAN群、PAN+S・10群ではN群、PAN+S・50群に比し有意に低値であった。血中SOD様活性低値の機序としては尿中への漏出もあるが、PAN群、PAN+S・10群、PAN+S・50群の3群間で尿中SOD様活性には有意差はみられなかった。更に柴苓湯のみを投与したS・50群ではN群に比し血中SOD様活性の有意の高値がみられたことより柴苓湯の抗腎炎効果の機序として我々はSOD様活性の産生亢進を推察している。産生亢進の部位については今回の検討では明らかではないが、服部ら²⁰⁾は柴苓湯により腎臓でのSOD様活性の産生亢進がみられたと報告している。腎炎の発症、進行増悪と活性酸素との関連については治療も含め最近注目されており²¹⁻²⁵⁾、いずれにせよ柴苓湯は1つには活性酸素を介して抗腎炎効果を発揮するものと示唆された。

柴苓湯の臨床効果については小児の微少変化型ネフローゼ症候群における再燃防止、ステロイド減少効果が報告されている²⁶⁻²⁸⁾。しかしながら、成人例での有効性についての報告は未だ少ない²⁹⁻³¹⁾。今後症例を重ねて検討する必要があると思われるが、今回の我々の成績からも従来の腎炎治療薬に加え使用すべき薬剤と考えられる。

結 論

PAN腎症ラットに柴苓湯を投与した結果、用量依存性に尿中蛋白排泄量、血中中性脂肪量の減少効果が示された。また、組織学的にも改善効果が認められた。更に、その作用機序としてSOD様活性の産生亢進が考えられた。

文 献

- 1) 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.
- 2) 阿部博子, 阪口真智子, 有地 滋: 柴胡剤の薬理学的研究 (第4報) —糖質ステロイド剤の抗炎症作用に対するサイコサポニンの影響—, 日薬理誌 **80**, 155-161, 1982.
- 3) 原中増穂子, 岡田奈緒子, 小曾戸洋, 大和田滋, 小林茂三郎: 副腎皮質ステロイド投与に及ぼす柴胡剤の影響—Collagen合成に関する検討—, 和漢医薬学会誌 **2**, 152-153, 1985.
- 4) 和田浩治: Aminonucleoside腎炎ラットに関する実験的研究, 広島大医誌 **35**, 843-880, 1987.
- 5) 勝田祐年: Coomassie Brilliant Blue G250を用いる尿蛋白定量法の検討, Biomedical J. **4**, 563-579, 1980.
- 6) 花田寿郎, 茂手木皓喜: 血清 (漿) スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 測定法の基礎的検討と臨床的意義, 臨床検査機器 試案 **8**, 629-635, 1985.
- 7) Abe, H., Orita, M., Konishi, H., Arichi, S. and Odashima, S.: Effects of Saikosaponin-d on aminonucleoside nephrosis in rats. *European J. Pharmacol.* **120**, 171-178, 1986.
- 8) 阿部博子, 織田真智子, 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.
- 9) 渋谷知宜, 阿部博子, 織田真智子, 小西啓悦, 牛尾由美子, 有地 滋: 実験的ネフローゼ症候群に対するサイコサポニンの作用 (第2報), 和漢医薬学会誌 **3**, 404-405, 1986.
- 10) 阿部博子: 実験的ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の作用, 漢方医学 **11**, 15-21, 1987.
- 11) 長田道夫, 小松康宏, 伊藤克己: 発症機序の異なる実験的ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の投与効果から推察するヒト腎症への有効性, 漢方医学 **13**, 107-117, 1989.
- 12) 伊藤克己, 長田道夫, 小松康宏, 甲能深雪, 他: 実験的ネフローゼ症候群に対する柴苓湯の作用—腎 in vivoでの“細胞保護作用”について—, 腎と透析 別冊, 60-66, 1989.
- 13) 服部智久, 鈴木良雄: 和漢薬方剤の抗腎炎作用に関する研究(1)—ラットの半月体タイプ抗GBM腎炎に対する柴苓湯の効果—, 和漢医薬学会誌 **3**, 410-411, 1986.
- 14) 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.

- 15) 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(2)—ラットの半月体タイプ抗GBM抗体腎炎に対する小柴胡湯の効果, 和漢医薬学会誌 **5**, 34-40, 1988.
- 16) 鈴木良雄: 柴苓湯と小柴胡湯の抗腎炎効果, 漢方医学 **12**, 16-22, 1988.
- 17) 鈴木良雄, 服部智久: 実験腎炎に対する和漢薬の効果, 腎と透析 別冊, 55-59, 1989.
- 18) 西川 恵, 佐藤孝子, 小俣正子, 佐中 孜, 杉野信博: 糸球体腎炎モデルに対する和漢薬の効果, 腎と透析 別冊, 43-49, 1989.
- 19) 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.
- 20) 服部智久, 伊藤幹雄, 鈴木良雄: 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, 和漢医薬学会誌 **7**, 12-17, 1990.
- 21) Lotan, D., Kaplan, B.S., Fong, J.S.C., Goodyer, P.R. and Chadarevian, J.P.: Reduction of protein excretion by dimethyl sulfoxide in rats with passive Heymann nephritis. *Kidney Int.* **25**, 778-788, 1984.
- 22) 青柳一正, 大場正二, 永瀬宗重: グアニジン化合物の合成機構について, 日本腎臓学会誌 **27**, 1034-1036, 1985.
- 23) 青柳一正, 成田光陽: 活性酸素と腎障害—和漢薬の効果一, *Pharma Medica* 増刊号, 24-28, 1988.
- 24) 青柳一正, 成田光陽: 各種和漢薬のメチルグアニジンの産生抑制作用, 和漢医薬学会誌 **5**, 294-295, 1988.
- 25) 青柳一正, 成田光陽: 和漢薬と活性酸素, 腎と透析 別冊, 25-29, 1989.
- 26) 岡田敏夫, 山谷美和, 和田博義, 内野広己: 小児ネフローゼ症候群にたいする和漢薬治療の試み, 和漢医薬学会誌 **2**, 468-471, 1985.
- 27) 矢崎雄彦, 廣川順子: 小児ネフローゼ症候群と漢方治療—使用症例を中心として—, 漢方医学 **10**, 20-23, 1986.
- 28) 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.
- 29) 西山敬介, 石井策史: 慢性腎炎の蛋白尿に対する柴苓湯の効果, *Pharma Medica* 増刊号, 8-13, 1988.
- 30) 鉄谷多美子: 腎炎における漢方治療の有効性と実際, 腎と透析 別冊, 74-81, 1989.
- 31) 木村健二郎: ネフローゼ症候群 (成人), 腎と透析 別冊, 87-91, 1989.