

実験的ネフローゼ症候群に対する複方丹参注射液の作用

葉 国驥, 織田真智子, 阿部 博子*

近畿大学東洋医学研究所・第1研究部門

Effects of *Salviae Miltiorrhizae* Complex on
experimental nephrosis

Ye GUOJI, Machiko ORITA and Hiroko ABE

The 1st Department, The Research Institute of Oriental Medicine Kinki University

(Received February 12, 1991. Accepted July 1, 1991.)

Abstract

The effects of injection of *Salviae Miltiorrhizae* Complex, which has been widely used in China to treat patients with various renal diseases, on aminonucleoside (AN)-induced nephrosis were examined. The rats were given an intravenous injection of AN and then treated three times per week with *Salviae Miltiorrhizae* Complex; 2.4 ml/kg/day, 0.8 ml/kg/day, 0.25 ml/kg/day for 28 days. In the rats given AN and saline, urinary protein excretion started to increase 3 days after an injection of AN, and a significant decrease of serum protein and increase of cholesterol were observed on the 14th day of the experiment. On the other hand, injections of *Salviae Miltiorrhizae* Complex resulted in a significant decrease of total urinary protein. The levels of serum protein, cholesterol and lipid peroxide were also improved, compared to the control rats treated with AN and saline. Further, electron microscopical examination of the glomeruli of rats treated with AN and saline revealed definite abnormalities of the epithelial cells, fusion of the foot process and the presence of vacuoles. The extent and the severity of lesions of the epithelial cells were significantly less in the rats treated with *Salviae Miltiorrhizae* Complex after injections of AN than in the controls treated with AN and saline. Additionally, it was also found that 3 day-injections of *Salviae Miltiorrhizae* Complex before an AN-injection did not show the inhibitory effect of urinary protein but 3 day-injections started simultaneously with an AN-injection and 3 day-injections after an AN-injection resulted in significant inhibition of urinary protein. Moreover, it was confirmed that *Salviae Miltiorrhizae* Complex has SOD-like activity *in vitro*.

Key words *Salviae Miltiorrhizae* Radix, nephrosis, proteinuria.

Abbreviations *Salviae Miltiorrhizae* Radix (Tanzin), 丹参; *Salviae Miltiorrhizae* Complex, 複方丹参.

緒 言

近年、中国では慢性腎障害の治療に活血化瘀剤とされている複方丹参注射液が用いられ、BUN, Crの減少効果など腎臓機能が改善されると共に病態悪化の遅延効果の得られることが報告されている^{1,2)}。

しかし、その作用機作など基礎的検討はほとんどなされていない。本研究では、Puromycin aminonucleoside (PA) によるラットの実験的ネフローゼ症候群に対して複方丹参注射液がどのような作用を示すかについて検討を行った。

*〒589 大阪府大阪狭山市大野東377-2
377-2 Ohnohigashi, Osaka-Sayama-shi, 589 Japan

材料と方法

(1) **試薬**：複方丹参注射液は、丹参と降香から生成された中国江蘇省国営常熱製薬工場製のものを使用した（複方丹参注射液 1 ml 中に丹参 1 g, 降香 1 g から得られたエキスを含み、臨床的には筋注での常用量は 0.08 ml/kg とされている）。

PA は streptomyces alboniyei より得られた抗生物質 Puromycin の誘導体で、Sigma chemical (ST. Louis) より購入した。

(2) **実験動物**：体重 150 g 前後の Wistar 系雌性ラット（9 週令）を湿度 $55 \pm 5\%$ 、温度 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の条件下で飼育し、日本クレア製固型飼料 CE-2 および水道水は自由に摂取させた。

(3) **実験的ネフローゼ症候群の作製および薬物の投与方法**

実験 1：実験的ネフローゼ症候群の動物モデルは PA を 50mg/kg, 1 回、静脈投与することによって作製した。AN 投与後、翌日から 1 週間に 3 回、0.25, 0.8 あるいは 2.4 ml/kg の複方丹参注射液を一群 8 匹として、それぞれ筋肉注射した。対照群には 1 ml/kg の生理食塩水を注射した。

実験 2：ラットを 4 群（1 群 12 匹）に分け、1 群は AN 投与 3 日前より 1 日 1 回、3 日間複方丹参注射液を 2.4 ml/kg 筋注にて投与した。2 群は AN 投与直後および翌日、翌々日の 3 日間複方丹参注射液を 2.4 ml/kg 筋注にて投与し、3 群は AN 投与 3 日目より 1 日 1 回、3 日間複方丹参注射液を 2.4 ml/kg 筋注にて投与した。4 群は対照群として AN のみを投与した。

(4) **尿蛋白量の測定**：尿蛋白は AN 投与 3 日目から、週 3 回 24 時間尿を採取し、遠沈（3000 rpm, 10 min）後、その上清 1 ml にスルホサリチル酸 3 ml を加えて、10 分間放置した。その後、吸光度計（660 nm）で吸光度を測定して、あらかじめ作製しておいた検量線から蛋白量を算出した。

(5) **血清コレステロール、血清アルブミンおよび総蛋白量、血清過酸化脂質の測定**：AN 投与後 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に各群のラットから採取した血液の血清コレステロール、血清アルブミン、血清総蛋白量、血清過酸化脂質を和光純薬工業社製キットを用いて測定した。

(6) **電顕的観察**：AN 投与後 14 日目のラット腎を摘出し、3% グルタルアルデヒド溶液（0.1 μ リン酸緩衝液, pH 7.4）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

型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。

(7) **SOD 様活性の測定**：複方丹参注射液の SOD 様活性は、McCord と Fridovich の方法³⁾に従って以下のように測定した。リン酸緩衝液 2.7 ml, チトクロム液（0.3 mM）0.1 ml, キサンチン液（1.5 mM）0.1 ml, キサンチンオキシダーゼ液 0.1 ml（反応後 3 ml）を 10 mm のセルに入れ混和した後、波長 550 nm における吸光度を測定し、この時の 1 分間の吸光度の変化と試料を添加した場合の変化から、阻害率を算出した。

(8) **統計学的検討**：実験データはすべて mean $\pm$ S.E. で表し、統計処理は t-検定を用いて行った。

結 果

1. 実験 1

1) 体重の変化

AN 投与後の体重の増加率は AN 投与前の体重に対する % として算出した。正常群のラットでは実験期間中、一定の体重増加を示し、実験終了時には（28 日目）約 27% の体重増加が見られた。AN を投与した対照群ラットおよび AN 投与後複方丹参注射液を投与したラットでは、AN 投与後 5 日目から 7 日目まで共に体重の著しい増加が認められた（Table I）。その後一時的に体重の減少を示したが、10 日目から体重は増加し始めた。ところが 2.4 ml/kg の複方丹参注射液投与群ラットでは、7 日目以後の体重減少が軽度であり、10 日目以後の体重増加率も対照群ラットより高く、実験終了時は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

AN 投与後、生食を注射した対照ラットでは、AN 投与後 3 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 3.5 ± 1.52 mg/day）し始め、14 日～16 日目をピーク（14 日目： 446 ± 16 mg/day, 16 日目： 413 ± 12 mg/day）として、約 1 ヶ月間は著名な尿蛋白の排泄が見られた（Fig. 1）。

AN 投与後、複方丹参注射液を投与した各群でも、AN 投与後 3 日目から尿中蛋白量は増加したが、複方丹参注射液を 2.4 ml/kg, 0.8 ml/kg, 0.25 ml/kg 投与した各群では、14 日目、16 日目の尿蛋白の排泄量が 320 ± 15 mg/day と 279 ± 21 mg/day, 401 ± 23 mg/day と 374 ± 8 mg/day, 419 ± 14 mg/day と 336 ± 24 mg/day と対照群に比べて有意の低下がみられ、複方丹参注射液 2.4 ml/kg 投与

Table I Changes of body weight (%).

Days after an injection of PA	0	1	3	5	8	10	12	15	17	19	22	24	26	29
Normal (Saline)	100	101.3 ± 0.50	104.8 ± 1.12	105.5 ± 1.39	108.7 ± 1.14	110.9 ± 1.29	113.9 ± 1.22	115.6 ± 1.13	117.2 ± 1.39	117.8 ± 1.43	119.1 ± 2.08	121.0 ± 1.98	123.5 ± 2.39	127.1 ± 1.89
Control (PA)	100	97.7 ± 0.33	102.7 ± 0.25	107.1 ± 0.41	110.9 ± 0.44	102.5 ± 0.21	108.1 ± 0.95	110.5 ± 1.06	111.5 ± 1.31	114.4 ± 1.20	116.6 ± 1.27	118.9 ± 1.27	120.0 ± 2.76	125.7 ± 1.60
PA+S.M.C. 0.25 ml/kg	100	96.9 ± 0.32	101.3 ± 1.02	105.6 ± 0.90	109.0 ± 1.08	106.8 ± 1.01	107.5 ± 1.93	109.3 ± 1.79	111.1 ± 2.02	113.5 ± 1.85	115.8 ± 1.74	117.1 ± 1.86	119.9 ± 2.51	123.1 ± 2.54
PA+S.M.C. 0.8 ml/kg	100	96.5 ± 0.54	100.8 ± 1.19	105.1 ± 0.59	108.2 ± 1.40	103.6 ± 1.51	104.2 ± 1.60	108.9 ± 1.22	111.0 ± 1.69	112.5 ± 1.74	115.7 ± 1.46	117.2 ± 1.30	121.6 ± 2.22	124.3 ± 1.76
PA+S.M.C. 2.4 ml/kg	100	97.9 ± 0.33	102.9 ± 0.25	106.0 ± 0.41	109.1 ± 0.44	105.2 ± 0.21	107.1 ± 0.95	111.4 ± 1.06	112.8 ± 1.31	115.2 ± 1.20	118.1 ± 1.27	122.1 ± 1.27	124.6 ± 2.76	127.6 ± 1.60

S.M.C.: Salviae Miltiorrhizae Complex.

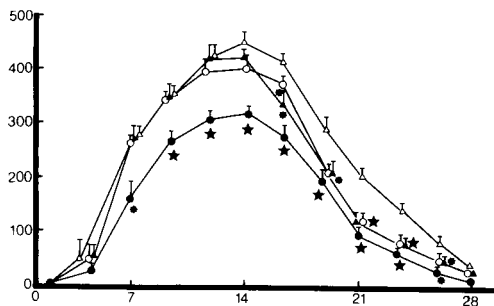


Fig. 1 Urinary protein excretion in rats.

All rats received an intravenous injection of AN. Intramuscular administrations of saline (control) (Δ) or Salviae Miltiorrhizae Complex ($\bullet$, 0.25 ml/kg/day; $\circ$, 0.8 ml/kg/day; $\bullet$, 2.4 ml/kg/day) were started one day after an AN-injection. Each point represents mean $\pm$ S.E.

* $p < 0.05$, $\star p < 0.005$; significantly different as compared to the control.

群では7日目から28日目までの20日間の尿蛋白量はいずれも対照群に比べて有意の減少を示した。複方丹参注射液を0.8 ml/kg および0.25 ml/kg 投与した群では16日目から有意の尿蛋白排泄抑制が見られたが、2.4 ml/kg 投与群に比べるとその効果は弱かった。

3) 血清学的所見

ANを投与したラットでは、AN投与後7日目から正常ラットに比べて、血清コレステロールの著大な増加、血清総蛋白およびアルブミン値の低下を示した。ところが、複方丹参注射液を2.4 ml/kg 投

与した群では対照群に比べて7日から28日目までの20日間いずれも対照群に比べて有意のコレステロール値の減少を示した。また複方丹参注射液を0.8 ml/kg および0.25 ml/kg 投与した群では、14日目の値においてのみ有意のコレステロール値減少が見られた。また複方丹参注射液2.4 ml/kgを投与した群ではいずれも対照群に比べて、14日目からアルブミン値の低下が有意に抑制され、21日目から総蛋白量の改善効果が認められた。低濃度の複方丹参注射液投与群でも同様にアルブミン、総蛋白の低下抑制傾向は認められたが、対照に比べて有意の効果が得られたのは28日目の総蛋白値においてのみであった (Table II)。

AN投与後7日目から28日目まで、血清過酸化脂質は正常に比べて著しい増加を示したが、0.8 ml/kgの複方丹参注射液を投与したラットでは、21日、28日目の血清過酸化脂質の上昇が抑制される傾向が認められ、2.4 ml/kg 投与ラットでは、7日、14日、21日、28日目いずれも有意の抑制が見られた (Table III)。

4) 形態学的所見

AN投与後14日目の対照ラット腎の電顕観察では、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。2.4 ml/kg、0.8 ml/kgの複方丹参注射液投与群ラットでは、糸球体上皮細胞の足突起の腫大や癒合が、対照群に比べて軽度であることが確認されたが、複方丹参注射液0.25 ml/kg 投与群ではほぼ対照群と同様の所見を示し、明らかな効果は認められなかった (Fig. 2)。

Table II Effect of Salviae Miltiorrhizae Complex on levels of cholesterol, total protein and albumin in the serum.

Days after an injection of PA	Cholesterol (mg/dl)				Total Protein (g/dl)				Albumin (g/dl)			
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
Normal (Saline)	51 ± 1.9	58.7 ± 2.5	53 ± 1.9	57 ± 3.6	6.60 ± 0.20	6.62 ± 0.10	6.69 ± 0.07	6.57 ± 0.11	4.54 ± 0.05	4.51 ± 0.05	4.41 ± 0.02	4.55 ± 0.05
Saline + S.M.C. 2.4 ml/kg	51 ± 3.6	54.7 ± 3.0	51 ± 1.4	54 ± 5.0	6.42 ± 0.28	6.44 ± 0.10	6.54 ± 0.07	6.47 ± 0.14	4.52 ± 0.08	4.54 ± 0.07	4.40 ± 0.03	4.54 ± 0.04
Control (PA)	283 ± 17.2	424 ± 18.8	422 ± 8.5	72 ± 6.0	5.61 ± 0.12	6.20 ± 0.10	6.38 ± 0.07	6.14 ± 0.08	3.87 ± 0.10	3.66 ± 0.07	4.10 ± 0.09	4.35 ± 0.06
PA + S.M.C. 0.25 ml/kg	246 ± 24.3	341** ± 19.0	107 ± 10.8	64 ± 6.0	5.67 ± 0.06	6.01 ± 0.08	6.33 ± 0.14	6.49* ± 0.07	3.74 ± 0.15	3.78 ± 0.01	4.14 ± 0.12	4.49 ± 0.04
PA + S.M.C. 0.8 ml/kg	226 ± 21.2	354* ± 24.3	119 ± 15.0	70 ± 9.4	5.39 ± 0.16	6.13 ± 0.10	6.70* ± 0.11	6.39* ± 0.05	3.55 ± 0.15	3.75 ± 0.07	4.16 ± 0.09	4.34 ± 0.03
PA + S.M.C. 2.4 ml/kg	152*** ± 36.0	263*** ± 21.8	81** ± 6.8	57 ± 6.3	5.39 ± 0.15	5.89 ± 0.07	6.75** ± 0.06	6.52*** ± 0.04	3.82 ± 0.12	3.87* ± 0.05	4.27 ± 0.06	4.54* ± 0.06

S.M.C.: Salviae Miltiorrhizae Complex. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.025$, ***: $p < 0.005$
Significantly different from the control value.

Table III Effect of Salviae Miltiorrhizae Complex on lipid peroxide levels in the serum.

Days after an injection of PA	MDA (n mol/ml)			
	7	14	21	28
Normal	1.86 ± 0.35	1.45 ± 0.18	1.44 ± 0.06	1.59 ± 0.09
Control (PA)	5.47 ± 0.53	7.47 ± 0.47	6.87 ± 0.41	2.80 ± 0.13
PA + S.M.C. 0.25 ml/kg	5.25 ± 0.71	6.71 ± 0.40	3.54 ± 0.35	2.08 ± 0.10
PA + S.M.C. 0.8 ml/kg	4.81 ± 0.53	6.85 ± 0.16	3.68 ± 0.39	2.16 ± 0.10
PA + S.M.C. 2.4 ml/kg	3.61 ± 0.35*	5.23 ± 0.45**	2.98 ± 0.30**	1.86 ± 0.09*

*; $p < 0.05$, **: $p < 0.015$ Significantly different from the control value.

2. 実験2

1) 尿蛋白量の変化

複方丹参注射液の投与方法の異なる各群の尿蛋白量を経時的に見ると、複方丹参注射液前投与群で尿蛋白排泄の抑制は認められなかったが、同時投与群、後投与群においては明らかに抑制効果が認められ、複方丹参注射液投与中止後もその作用が持続した (Fig. 3)。

2) 血清学的所見

血清コレステロール値については、複方丹参注射液前投与群に低下抑制効果は認められず、同時投与群および後投与群のみコレステロール上昇の有意な抑制効果が見られた。また複方丹参注射液投与群では対照群に比べて実験1と同様に総蛋白量およびアルブミン値の低下の抑制が見られた (Table IV)。

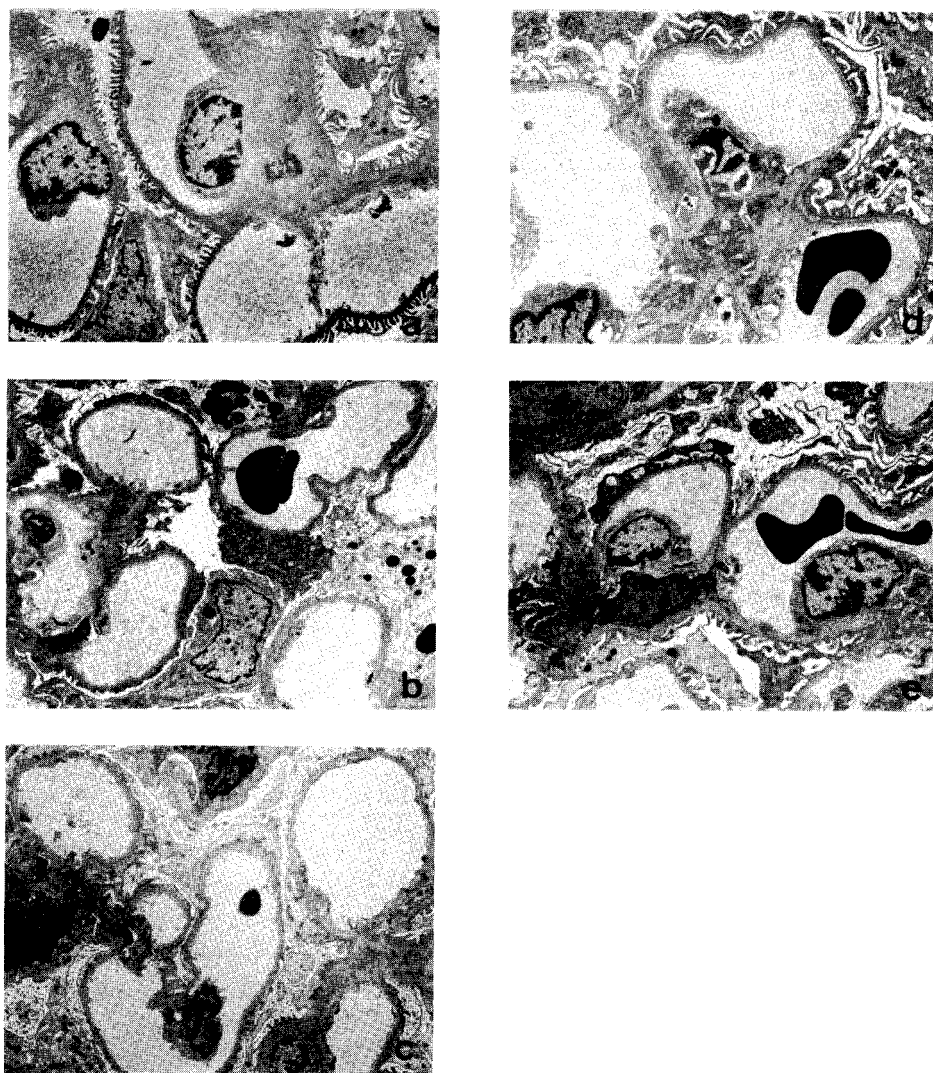


Fig. 2 Electron micrographs of glomerulus from an experimental rat on the 14 th experimental day.

(a) glomerulus of normal rat ($\times 2400$); (b) glomerulus of control rat treated with AN and saline ($\times 2400$); (c) glomerulus of the rat treated with 0.25 ml/kg/day of *Salviae Miltiorrhizae* Complex after an AN-injection ($\times 2400$); (d) glomerulus of the rat treated with 0.8 ml/kg/day of *Salviae Miltiorrhizae* Complex after an AN-injection ($\times 2400$); (e) glomerulus of the rat treated with 2.4 ml/kg/day of *Salviae Miltiorrhizae* Complex after an AN-injection ($\times 2400$).

3. 複方丹参注射液のSOD様活性

複方丹参注射液には明らかなSOD様活性が認められ、複方丹参注射液濃度が0.03 ml/3 ml (反応後総量) における阻害率は $43.1 \pm 0.78\%$ 、0.05 ml/3 ml で $67.6 \pm 2.55\%$ 、0.07 ml/3 ml で $79.6 \pm 0.42\%$ であった。

考 察

複方丹参注射液の主薬である丹参には血管拡張作用、腎血流量増加作用、血小板凝集作用、腎機能改善作用、尿毒症改善作用などのあることが臨床およ

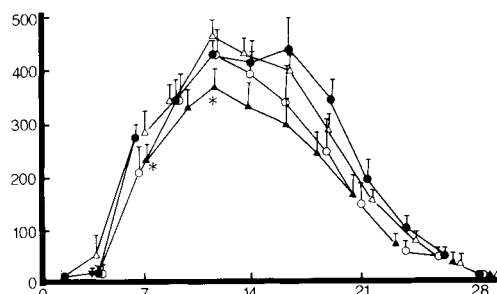


Fig. 3 Urinary protein excretion in rats.

All rats received an intravenous injection of AN. △, control; ●, Salviae Miltiorrhizae Complex was injected for 3 days before an AN-injection; ○, Salviae Miltiorrhizae Complex-injection was started simultaneously with an injection of AN and continued for 3 days; ▲, Salviae Miltiorrhizae Complex-injection was started from 3 days after an AN-injection and continued for 3 days.

* $p < 0.025$, significantly different as compared to the control.

Table IV Effect of Salviae Miltiorrhizae Complex on levels of cholesterol, total protein and albumin in the serum.

Days after an injection of PA	Cholesterol (mg/dl)				Total Protein (g/dl)				Albumin (g/dl)			
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
Cotrol (PA)	252 ± 12	421 ± 16	112 ± 4	86 ± 4	5.05 ± 0.09	6.21 ± 0.12	6.48 ± 0.08	6.55 ± 0.03	3.18 ± 0.10	4.09 ± 0.07	4.42 ± 0.07	4.41 ± 0.03
PA+S.M.C. (3days before inj. of PA)	284 ± 22	435 ± 22	118 ± 7	84 ± 13	5.05 ± 0.09	6.99*** ± 0.10	6.53 ± 0.09	6.53 ± 0.03	3.35 ± 0.05	4.21 ± 0.05	4.46 ± 0.07	4.47 ± 0.09
PA+S.M.C. (Simultaneously with inj. of PA)	228 ± 25	294*** ± 39	84*** ± 3	67*** ± 2	5.41*** ± 0.04	6.60* ± 0.12	6.50 ± 0.08	6.51 ± 0.05	3.37 ± 0.15	4.19 ± 0.06	4.43 ± 0.05	4.45 ± 0.06
PA+S.M.C. (3days after inj. of PA)	225 ± 24	298*** ± 24	100 ± 9	72* ± 3	5.13 ± 0.05	6.59** ± 0.05	6.50 ± 0.09	6.52 ± 0.06	3.34 ± 0.08	4.24 ± 0.04	4.48 ± 0.04	4.52 ± 0.06

S.M.C. : Salviae Miltiorrhizae Complex. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.025$, ***: $p < 0.005$
Significantly different from the control value.

び基礎的に報告されている。^{4, 6)} またこれらの作用は丹参の有効成分の一つである Magnesium lithospermate B (LSA) が PGE_2 の産生, 分泌を増加させることによってもたらされる可能性も指摘されている。

一方, AN 投与前後に superoxide dismutase や allopurinol を投与することによって, AN による尿蛋白排泄や糸球体の形態学的変化が軽減される事から, AN による腎糸球体の障害には free radical の発生が関与していることが報告されている。⁷⁾ また

胡天喜⁸⁾ は丹参に radical scavenger 作用のあることを報告しており, 本研究でも AN 投与後の血清の過酸化脂質値の増加が, 複方丹参注射液の投与によって明らかに抑制され, また複方丹参注射液は SOD 様活性を示すことも確認されている。従って複方丹参注射液による尿蛋白抑制効果は, free radical scavenger 作用など脂質過酸化の抑制効果による可能性が極めて大きいように思われる。現在はまだ, 複方丹参注射液の有効成分についての解析はなされておらず, 本研究で見られた脂質過酸化抑制作

用を示す物質が、尿毒症改善作用を示すLSAと同一であるか否か、また降香の作用などについては不明である。

今後更に、丹参および降香の成分分析やその作用機作の詳細について検討を加えてゆきたいと考えている。

結 論

Puromycin aminonucleosideによる実験的ネフローゼ症候群ラットに複方丹参注射液を投与した結果、尿蛋白排泄量の低下、血清コレステロールの上昇抑制、血清アルブミンおよび総蛋白量の低下抑制効果が認められ、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。更に、puromycin aminonucleosideの投与によって血清過酸化脂質は著しく増加するが、複方丹参注射液の投与はこの増加を明らかに抑制した。また、複方丹参注射液にはSOD様活性のあることが見出された。

文 献

- 1) 張 鏡人：丹参治療慢性腎機能不全48例臨床分析。上海中医雜誌，1981年第1期，17-18。
- 2) 張 天：慢性腎炎治療法則的探討。漸江中医藥，1979年5月号，151-154。
- 3) McCord, J.M., Fridovich, I.: Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055, 1969.
- 4) 中山医学院論：丹参。“漢藥の臨床応用”(神戸中医学研究会訳・編)，医歯薬出版，東京，pp.257-258, 1980。
- 5) 大浦彦吉：尿毒症に対する和漢薬（中薬）の改善作用とその機序（II）。第二回和漢薬（中薬）の医学薬学的研究に関する日中シンポジウム，pp.148-157, 1988。
- 6) 大浦彦吉：和漢薬の作用に関する生化学的研究。和漢医薬学会誌，**5**, 227-237, 1988。
- 7) Diamond JR, Bonventre JR, Karnovsky MJ.: A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*, **29**, 478-483, 1986。
- 8) 胡 天喜：用化学発光法検測丹参，紅藤，当帰，黄耆等中薬製剤の抗自由基作用。上海中医藥雜誌，**9**, 28-30, 1988。