

Deoxycorticosterone acetate (DOCA) 誘発高血圧ラットに 対する漢方薬：五苓散変方および柴苓湯の作用

前田 佳奈,* 織田真智子, 平野 治男, 東野 英明

近畿大学医学部薬理学教室

The effects of Kampo medicines (Gorei-san or Sairei-to) on DOCA-salt hypertension rat

Kana MAEDA,* Machiko ORITA, Haruo HIRANO, Hideaki HIGASHINO

Department of Pharmacology, Kinki University School of Medicine, 377-2 Onohigashi, Osakasayama, Osaka 589-8511, Japan.

(Received November 14, 2002. Accepted February 10, 2003.)

Abstract

Deoxycorticosterone acetate (DOCA) is an agent commonly used to induce hypertension in animals. Hypertension was induced by a tri-weekly subcutaneous DOCA injection of (15mg/kg) and 1%NaCl in drinking fluids in uninephrectomized rats. SD rats from Crea Co., Ltd. Japan which had not undergone the uninephrectomized operation were treated with DOCA and salt resulting in hypertension and renal injury. However, DOCA/salt could not induce hypertension in Wistar rats from SLC Co., Ltd. Japan without the uninephrectomized operation. Both strains of rats (SD and Wistar) were used in this research.

In this study, the effects of Gorei-san (Wu-Ling-San) analogue, Sairei-to (Chai-Ling-Tang) and furosemide on DOCA-salt hypertensive rats were examined. Systolic blood pressure measured by a tail cuff was lower after the chronic administration of Gorei-san analogue than in untreated DOCA-salt rats. In addition, the enlargement of the kidney in the Gorei-san group was significantly inhibited. Furthermore, the amount of abnormal urine protein detected in the DOCA control group decreased. The blood pressure significantly decreased in the furosemide treated rats, but the renal injury was exacerbated.

Under DOCA treatment, TBW(total body water) and CPV(circulating plasma volume) increased subsequent to renal sodium and water retention. In accordance to the increase in CPV, blood pressure rose in parallel. In the Gorei-san analogue group, TBW and CPV were lower. Gorei-san may inhibit hypertension in order to control the sodium retention and a subsequent volume expansion by means of plasma expansion and increased extra cellular fluid volume.

The present study demonstrated that consecutive treatment using Gorei-san was effective in DOCA hypertensive rats.

Key words DOCA, Gorei-san (Wu-Ling-San) 五苓散, Sairei-to (Chai-Ling-Tang) 柴苓湯.

Abbreviations CPV, circulating plasma volume; DOCA, deoxycorticosterone acetate; TBW, total body water.

緒 言

ラットに鉱質コルチコイドの deoxycorticosterone

acetate (DOCA) と食塩水を併用投与すると、腎性高血圧症を発症し、重篤な尿細管系の排泄機能不全、さらには腎硬化症を誘発させる¹⁻⁴⁾。この DOCA-salt ラットは重症の腎性高血圧モデル動物として、各種降圧・腎疾患

*To whom correspondence should be addressed. e-mail : maeda@med.kindai.ac.jp

改善薬の検定に繁用されている。DOCA-salt ラットにおける腎性高血圧の発症メカニズムとして、過剰に摂取されたナトリウムイオンと水が腎に貯留し、さらに DOCA を投与することによりナトリウムの貯留作用が増強され、循環障害をきたすためと考えられている。

漢方薬の「利尿剤」は西洋薬の「利尿剤」と比べ、利尿作用の点では著効は期待できないが、生体内の水の分布や代謝を調整する作用のあることがわかっている⁵⁻¹¹⁾。この点で、生体内の余剰の水を腎糸球体を通して体外に排泄する利尿剤とは異なっている。

今回、この DOCA-salt ラットを腎性高血圧モデル動物として用いるのではなく、生体内の水分布と水代謝異常モデルとみなし、漢方の利尿剤「五苓散」およびその関連処方「柴苓湯」を投与した時の作用を検討した。また同時に、西洋薬としての利尿薬との作用を比較する目的で、ループ利尿薬「フロセミド」の作用についてもあわせて検討し、興味ある結果が得られたので報告する。

実験方法

(1) 実験動物

7 週齢の SD 系雄性ラット (Jcl:SD, 日本クレア) および Wistar 系雄性ラット (Slc:Wistar, 日本エスエルシー) を、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ の飼育室で 1 週間予備飼育したのち実験に供した。水および飼料 (CE-2 (日本クレア)) は自由摂取させた。

(2) 使用薬物および薬物投与方法

①五苓散変方 (Gorei-san analogue; Wu-Ling-San analogue): 沢瀉 (Ze-Xie, *Alisma orientale* JUZEPCZUK, 中国・四川省産)・桂皮 (Gui-Pi, *Cinnamomum cassia* BLUME, 中国・広西省産)・茯苓 (Fu-Ling, *Poria cocos* WOLF, 中国・雲南省産)・猪苓 (Zhu-Ling, *Polyporus umbellatus* FRIES, 中国・江蘇省産)・白朮 (Bai-Zhu, *Atractylodes japonica* KOIDZUMI et. KITAMURA, 中国・吉林省産) の粉末 (日本粉末薬品 (株) 製) を 1:1:1:1:1 の比率で混和した (ヒト常用量 $4.0 \sim 7.0 \text{ g/日}$)。今回実験に用いた五苓散の生薬組成比は、現在臨床で用いられているものと異なるため、「五苓散変方」とした。

②柴苓湯 (Sairei-to; Chai-Ling-Tang): 柴胡 (Chai-Hu, *Bupleurum falcatum* LINNE, 中国・湖北省産) 7.0 g ・黄芩 (Huang-Qin, *Scutellaria baicalensis* GEORGI, 中国・河北省産) 3.0 g ・半夏 (Ban-Xia, *Pinellia ternata* BREITENBACH, 中国・甘粛省産) 5.0 g ・生姜 (Sheng-Jiang, *Zingiber officinale* ROSCOE, 中国・雲南省産) 1.0 g ・人參 (Ren-Shen, *Panax ginseng* C.A. MEYER, 中国・黒龍江省産) 3.0 g ・大棗 (Da-Zao, *Zizyphus jujuba*

MILLER var. *inermis* REHDER, 中国・河南省産) 3.0 g ・甘草 (Gan-Cao, *Glycyrrhiza uralensis* FISHER, 中国・内モンゴ省産) 2.0 g ・白朮 (Bai-Zhu, *Atractylodes japonica* KOIDZUMI et. KITAMURA, 中国・東北省産) 4.5 g ・茯苓 (Fu-Ling, *Poria cocos* WOLF, 中国・雲南省産) 4.5 g ・猪苓 (Zhu-Ling, *Polyporus umbellatus* FRIES, 中国・陝西省産) 4.5 g ・沢瀉 (Ze-Xie, *Alisma orientale* JUZEPCZUK, 中国・四川省産) 6.0 g ・桂皮 (Gui-Pi, *Cinnamomum cassia* BLUME, 中国・広東省産) 3.0 g を一括混和し、10 倍量の水を加えて 1 時間沸騰させて抽出し、乾燥エキスを粉末としたもの (収量 7.0 g (ヒト常用量/日): カネボウ (株) 製) を用いた。

③フロセミド (furosemide): フロセミド (Sigma, USA) の原末を用いた。

④Deoxycorticosterone acetate (DOCA): Deoxycorticosterone acetate (Sigma, USA) の原末を用いた。

⑤投与方法: 五苓散変方 (約 $2.4 \text{ g/kg} \cdot \text{rat/日}$) 及び柴苓湯 (約 $2.4 \text{ g/kg} \cdot \text{rat/日}$) は 4% の割合で、フロセミド (約 $120 \text{ mg/kg} \cdot \text{rat/日}$) は 0.2% の割合で基礎粉末飼料 CE-2 (日本クレア) に添加し、それぞれ実験動物に自由摂取させた。DOCA は生理食塩水中に懸濁分散させ、 15 mg/kg を週 3 回筋肉内注射により投与した。

(3) 実験方法

SD 系および Wistar 系ラットを各々 5 群にわけ、第 1 群は正常対照群 (5 匹)、第 2 群は DOCA 単独投与群 (9 匹)、第 3 群は DOCA・五苓散変方併用投与群 (9 匹)、第 4 群は DOCA・柴苓湯併用投与群 (9 匹)、第 5 群は DOCA・フロセミド併用投与群 (9 匹) とした。実験開始時より対照の第 1 と第 2 群については CE-2 粉末飼料を、他の群については各々の薬物含有飼料を実験終了時まで自由摂取させた。実験開始より 7 日間、各種飼料のみを与え、8 日目すなわち実験開始 2 週目より、第 2~5 群には DOCA を筋肉内に投与し、同時に飲料水として 1% 食塩水を自由摂取させ、第 1 群の正常対照群には DOCA の代わりに生理食塩水を同量投与し、飲料水として 1% 食塩水を自由摂取させた。実験開始 8 週目、すなわち DOCA 投与開始後 7 週目の最終日に軽エーテル麻酔下で脱血屠殺し、各種測定を行った。

(4) 測定項目および方法

実験開始時より週 1 回の頻度で、体重と血圧、心拍数の測定 (tail-cuff 法, UR-5000, ウェダ製作所) を行うと共に、個別代謝ケージにて 24 時間摂食量、飲水量、尿量を測定した。また、実験開始 7 週目の尿中蛋白量を Kingsbury-Clark 法で測定し、同時に生体内総水分量 (total body water, TBW)、循環血漿量 (circulating plasma volume, CPV) の測定を行った。ラット屠殺時

に、各臓器を速やかに摘出して湿重量を測定し、屠殺時の体重比(%)を算出した。

尿中蛋白量の測定 (Kingsbury Clark 法) : 被験尿 1.0 ml とスルホサリチル酸液 (3g/dl) 3.0 ml を混和し 10 分間放置後、分光光度計 (OD660 nm, U-2000 Spectrophotometer, 日立製作所) で測定し、基準液の値より蛋白量を算出した。

生体内総水分量 (TBW) の測定 : 重水 (D_2O) を 1.0 ml/100g BW 量腹腔内注射により投与し、投与後 90 分目の血漿中 D_2O 量を核磁気共鳴装置 (FT-NMR JNM-EX 270, 日本電子) で定量し、 D_2O の希釈率より以下の式でラット体重 100g あたりの TBW (ml) を求めた。

$$TBW \text{ (ml/100g BW)} = \frac{\frac{D_2O \text{ 投与量 (ml)}}{\text{血漿中 } D_2O \text{ 量 (\%)}} \times 100}{\text{ラット体重 (g)}} \times 100$$

循環血漿量 (CPV) の測定 : 0.2% エバンスブルー (EB) の生理食塩水溶液を体重 100g あたり 0.10ml を血管内投与し、投与 5 分後に採血して (抗凝固剤としてヘパリン添加)、分離した血漿中の EB 量を分光光度計 (OD620 nm, U-2000 Spectrophotometer, 日立製作所) で測定した。EB の希釈率より以下の式でラット体重 100g あたりの CPV (ml) を求めた。

$$CPV \text{ (ml/100g BW)} = \frac{\frac{EB \text{ 注射量 (ml)} \times \text{Standard OD}}{\text{Sample OD}}}{\text{ラット体重 (g)}} \times 100$$

(5) 統計処理方法

それぞれの実験において、実験群と対照群の間の有意差検定は、Fisher の多群間検定および Wilcoxon の 2 群間検定を用い、危険率を 5% 以下とした。

結 果

1. 被検動物の生存日数におよぼす五苓散変方、柴苓湯、フロセミドの作用

SD 系ラットの正常対照群では実験終了時まで全例生存していたが、DOCA 単独投与群では実験開始 5 週目と 6 週目に各々 1 匹ずつが著しい腹水貯留を起こして死亡し、実験終了時の生存率は 78% となった。DOCA・フロセミド併用投与群では実験開始 3, 4, 7 週目に各々 1 匹ずつが同様に著しい腹水貯留を起こして死亡し、実験終了時の生存率は 67% となった。しかし DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・柴苓湯併用投与群では死亡例を認めず、実験終了時まで全例生存した。

一方、Wistar 系ラットは、全例実験終了時まで生存した (Fig. 1)。

2. 体重変化

SD 系ラットにおいて、DOCA 投与開始早期よりフロセミド投与による体重減少が著しく、実験期間中を通して低値 ($p < 0.01$) を示した。DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・柴苓湯併用投与群では正常対照群との間に差を認めなかった。

一方、Wistar 系ラットにおいては、フロセミド投与による体重減少傾向がみられたが有意な差ではなかった (Fig. 2)。

なお、両系統ラットともに、実験期間中の 1 匹あたりの摂食量は、各群間に差を認めなかった。

3. 血圧変化

SD 系ラットにおける収縮期血圧は、実験開始 5 週目、すなわち DOCA 投与 4 週目より、DOCA 単独投与群で、正常対照群に比べ著明な上昇 ($p < 0.01$) が認められ実験終了時まで漸時上昇したが、DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・フロセミド併用投与群では、血圧の上昇が抑制 ($p < 0.01$) された。DOCA・柴苓湯併用投与群では、5 週目に有意な血圧上昇抑制が認められ

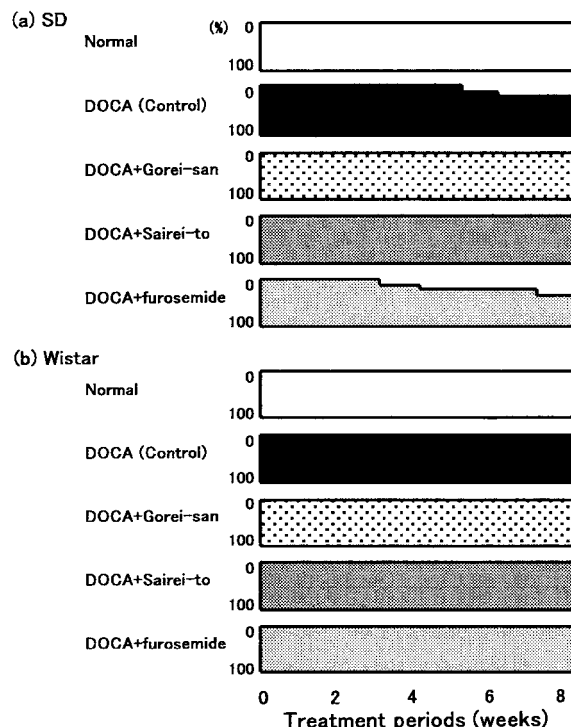


Fig. 1 Effects of the administration of normal, DOCA (control), DOCA + Gorei-san analogue, DOCA + Sairei-to or DOCA + furosemide on the survival ratio of SD rats (a) or Wistar rats (b) during experimental periods.

These represent the average of life-span after the start of experiment consisting of normal, control, Gorei-san, Sairei-to or furosemide.

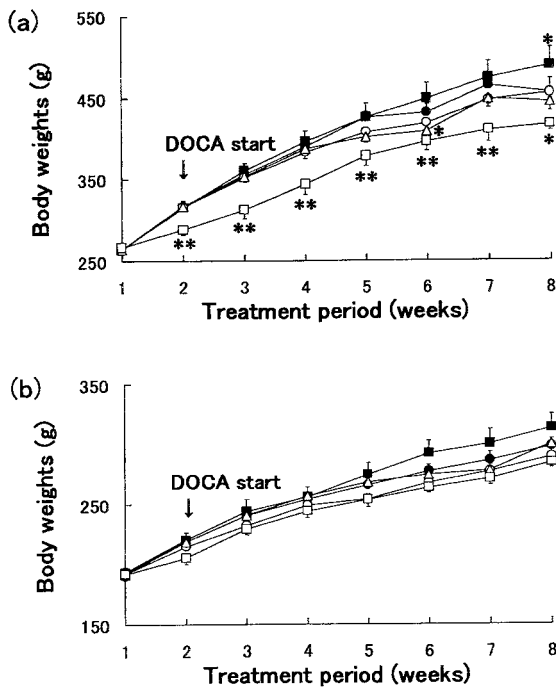


Fig. 2 Changes of body weights of SD rats (a) or Wistar rats (b) given with normal (■), DOCA (control, ●), DOCA + Gorei-san (○), DOCA + Sairei-to (△) or DOCA + furosemide (□). Values are mean $\pm$ S.E. * p <0.05, ** p <0.01: Significantly different from the control of SD rats.

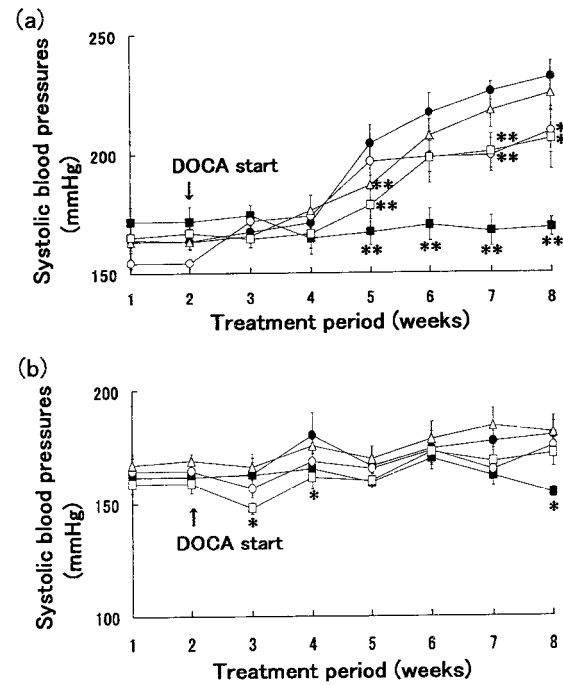


Fig. 3 Changes of systolic blood pressures of SD rats (a) or Wistar rats (b) given with normal (■), DOCA (control, ●), DOCA + Gorei-san (○), DOCA + Sairei-to (△) or DOCA + furosemide (□). Values are mean $\pm$ S.E. * p <0.05, ** p <0.01: Significantly different from the control of each rat group.

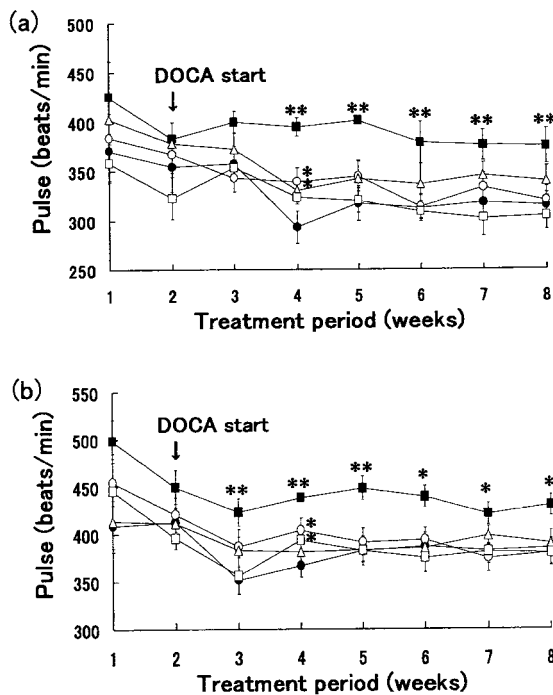


Fig. 4 Changes of pulse of SD rats (a) or Wistar rats (b) given with normal (■), DOCA (control, ●), DOCA + Gorei-san (○), DOCA + Sairei-to (△) or DOCA + furosemide (□). Values are mean $\pm$ S.E. * p <0.05, ** p <0.01: Significantly different from the control of each rat group.

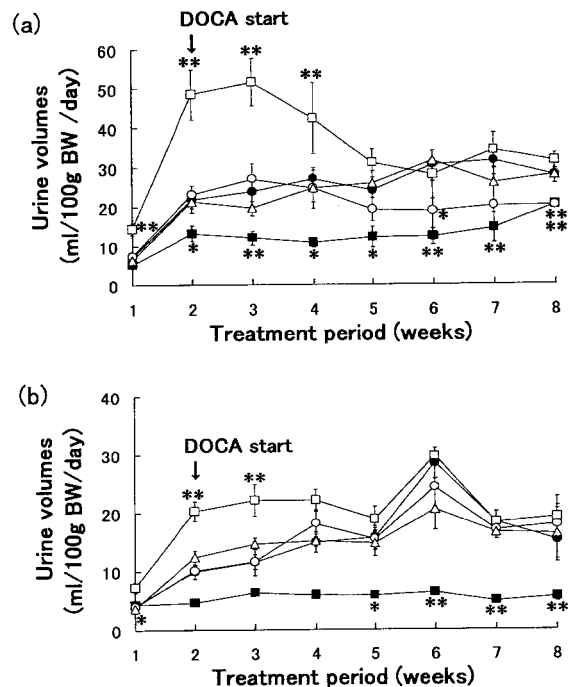


Fig. 5 Changes of urine volumes of SD rats (a) or Wistar rats (b) given with normal (■), DOCA (control, ●), DOCA + Gorei-san (○), DOCA + Sairei-to (△) or DOCA + furosemide (□). Values are mean $\pm$ S.E. * p <0.05, ** p <0.01: Significantly different from the control of each rat group.

たが、その後、抑制傾向は示すものの有意な差は得られなかった。食塩水のみを投与した正常対照群では実験開始時より終了時に至るまで血圧の変化はみられなかった。

一方、Wistar 系ラットにおいては、DOCA 投与後も血圧の上昇はみられず実験開始 3、4 週目に DOCA・フロセミド併用投与群で低下 ($p<0.05$) がみられたのみで、実験期間中をとおして各群間での血圧変化は緩徐であった (Fig. 3)。

4. 心拍数

SD 系ラットにおいては実験開始 4 週目より、心拍数は正常対照群に比べ DOCA 単独投与群で低値 ($p<0.01$) を示したが、DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・柴苓湯併用投与群において、心拍数の低下を抑制した ($p<0.05$)。

一方、Wistar 系ラットにおいても実験開始 3 週目より心拍数は正常対照群に比べ DOCA 単独投与群で低値 ($p<0.01$, $p<0.05$) を示したが、DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・フロセミド併用投与群において、心拍数の低下を抑制した ($p<0.05$) (Fig. 4)。

5. 尿量

ラット体重100gあたりの24時間の尿量は、SD 系および Wistar 系ラットいずれにおいても、DOCA 投与開始早期より実験期間中を通して、DOCA 単独投与群で、正常対照群に比べ著明な上昇 ($p<0.01$, $p<0.05$) が認められた。また、SD 系ラットでは実験開始 1 週目から 4 週目まで、Wistar 系ラットでは実験開始 2、3 週目に DOCA・フロセミド併用投与群で DOCA 単独投与群より高値 ($p<0.01$) であった。

SD 系ラットにおいてのみ、実験開始 6 週目に DOCA・五苓散変方併用投与群で、DOCA 単独投与群に比べ尿量の減少 ($p<0.05$) が認められた (Fig. 5)。

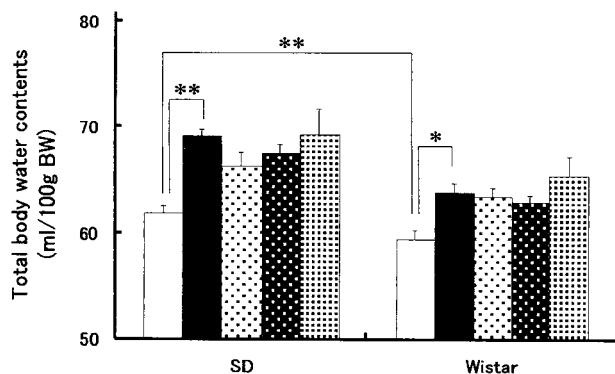


Fig. 6 Effects of normal (□), DOCA (control, ■), DOCA+Gorei-san (▨), DOCA+Sairei-to (▩) or DOCA+furosemide (▧) treatments on the total body water contents of SD or Wistar rats. Values are mean $\pm$ S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$: Significantly different from the normal group of each group.

なお、ラット体重100gあたりの24時間の飲水量は、尿量とほぼ同様の变化を示した。

6. 生体内総水分量 (TBW)

ラット体重100gあたりに占める正常時における TBW の値は、SD 系ラットで 61.9ml/100g BW, Wistar 系ラットで 59.4ml/100g BW と、Wistar 系ラットより SD 系ラットで高く ($p<0.01$), 系統の違いにより TBW の値が異なることが分かった。また、いずれの系統のラットにおいても DOCA 単独投与群では、正常対照群に比べ著明な TBW の増加が認められた。この時各々の正常対照群に比べ DOCA 単独投与群で増加した TBW 値は、SD 系ラットでは 7.2ml/100g BW ($p<0.01$), Wistar 系ラットでは 4.3ml/100g BW ($p<0.05$) となり、その増加率は SD 系ラットで大きかった。SD 系ラット, Wistar 系ラットのいずれにおいても、DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・柴苓湯併用投与群で TBW の増加の抑制傾向を示したが、DOCA・フロセミド併用投与群では DOCA 単独投与群よりもさらに増加傾向を示した (Fig. 6)。

7. 循環血漿量 (CPV)

ラット体重100gあたりに占める CPV の値は、SD 系および Wistar 系ラット共に DOCA 単独投与群では、正常対照群に比べ著明な増加が認められた。この時 DOCA 投与により SD 系ラットでは 0.9ml/100g BW ($p<0.01$), Wistar 系ラットでは 0.5 ml/100g BW ($p<0.05$) ずつ各々の正常対照群より CPV 値は増加したが、増加率は SD 系ラットで大きかった。また、SD 系ラットについては、DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・柴苓湯併用投与群では、DOCA による CPV の増加の抑制傾向を示し、フロセミド投与群では逆に増加傾向を示した。

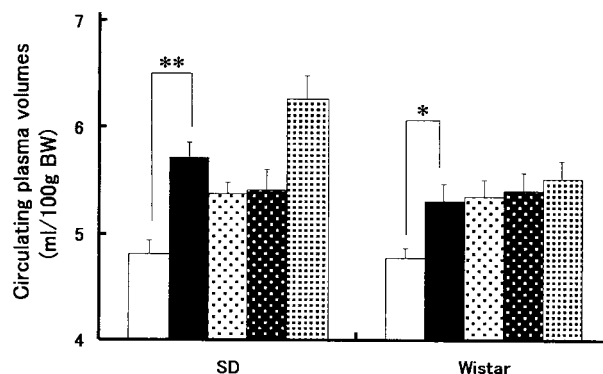


Fig. 7 Effects of normal (□), DOCA (control, ■), DOCA+Gorei-san (▨), DOCA+Sairei-to (▩) or DOCA+furosemide (▧) treatments on the circulating plasma volumes of SD or Wistar rats. Values are mean $\pm$ S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$: Significantly different from the normal group of each group.

Table I The % of wet weights of various organs in the groups of SD and Wistar rats.

Group		Brain (%)	Liver (%)	Kidney (%)	Heart (%)	Spleen (%)	Adrenal (%)	Thymus (%)
SD	Normal	0.383±0.023	3.254±0.059 ^b	0.300±0.013 ^b	0.254±0.012 ^b	0.182±0.011 ^b	0.0054±0.0002	0.054±0.012
	Control	0.373±0.004	3.751±0.130	0.603±0.042	0.356±0.014	0.284±0.014	0.0062±0.0005	0.058±0.005
	Gorei-san	0.379±0.011	3.419±0.087	0.513±0.028 ^a	0.341±0.009	0.237±0.013 ^a	0.0056±0.0003	0.078±0.013
	Sairei-to	0.400±0.012	3.548±0.094	0.557±0.015	0.357±0.012	0.283±0.022	0.0068±0.0004	0.062±0.011
	Furosemide	0.426±0.007	3.992±0.262	0.836±0.073 ^b	0.387±0.022	0.308±0.038	0.0082±0.0014 ^a	0.054±0.010
Wistar	Normal	0.518±0.013	3.074±0.092	0.329±0.005	0.256±0.006 ^b	0.189±0.006 ^b	0.0067±0.0003	0.078±0.004
	Control	0.546±0.009	3.336±0.030	0.392±0.012	0.318±0.007	0.282±0.008	0.0069±0.0005	0.084±0.005
	Gorei-san	0.586±0.013	3.241±0.119	0.427±0.014	0.315±0.004	0.292±0.008	0.0072±0.0003	0.079±0.002
	Sairei-to	0.568±0.012	3.335±0.053	0.408±0.015	0.315±0.006	0.274±0.009	0.0067±0.0002	0.103±0.009
	Furosemide	0.564±0.031	3.267±0.039	0.506±0.021 ^b	0.337±0.009	0.293±0.016	0.0074±0.0004	0.068±0.004

All values are expressed as the mean ± S.E. a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$: Significantly different from the control of each rat group.

一方、Wistar 系ラットについては DOCA・五苓散変方併用投与群、DOCA・柴苓湯併用投与群および DOCA・フロセミド併用投与群いずれにおいても、DOCA 投与による CPV の増加に対する抑制作用は全く認められなかった (Fig. 7)。

8. 臓器湿重量

SD 系ラットにおいて、DOCA 単独投与群で正常対照群に比べ、肝臓、腎臓、心臓、脾臓の湿重量 (体重比%) は増加した。中でも腎臓の湿重量 (%) は、DOCA 単独投与群で正常値の 0.300% に対して 0.603% にまで増加 ($p < 0.01$) したが、DOCA・五苓散変方併用投与群で DOCA 投与による増加を有意 ($p < 0.05$) に抑制した。一方、DOCA・フロセミド併用投与群では 0.836% と、DOCA 単独投与による増加よりさらに増大した ($p < 0.01$)。脾臓の湿重量 (%) は、DOCA 単独投与群で 0.182% を 0.284% にまで増加 ($p < 0.01$) したが、DOCA・五苓散変方併用投与群で DOCA 単独投与による増加を有意 ($p < 0.05$) に抑制した。また、DOCA・フロセミド併用投与群で、副腎の湿重量 (%) に有意 ($p < 0.05$) な増加がみられた。

一方、Wistar 系ラットにおいては、正常対照群に比べ、DOCA 単独投与群で心臓、脾臓の湿重量 (%) は増加 ($p < 0.01$) した。しかし、腎臓の湿重量は増加傾向が認められるものの有意な差は無く、DOCA・五苓散変方併用投与群および DOCA・柴苓湯併用投与群においても臓器湿重量の改善はみられなかった (Table I)。

9. 尿中蛋白量

SD 系ラットにおいて、ラット 1 匹あたりの 24 時間尿中蛋白量は、DOCA 単独投与群で正常対照群に比べ著明な増加 ($p < 0.01$) が認められた。DOCA・五苓散変方併用投与群では尿中蛋白量の増加が有意 ($p < 0.05$) に抑制されたが、DOCA・フロセミド併用投与群では逆に

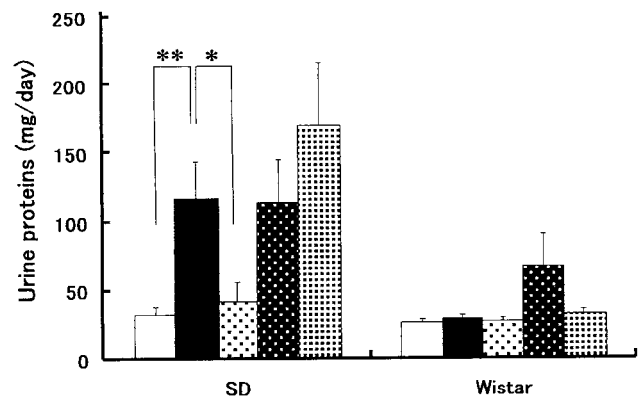


Fig. 8 Effects of normal (□), DOCA (control, ■), DOCA+Gorei-san (▤), DOCA+Sairei-to (▨) or DOCA + furosemide (▧) treatments on urine proteins of SD or Wistar rats. Values are mean ± S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from the control of SD rats.

さらに増加する傾向がみられた。

一方、Wistar 系ラットにおいては、正常対照群と DOCA 単独投与群の間に差は認められず、DOCA・柴苓湯併用投与群で増加傾向がみられたものの有意な差ではなかった (Fig. 8)。

考 察

漢方薬の有効性を基礎実験で評価する時、ヒト常用量と実験動物への投与量の設定の間で議論が生じやすいが、我々は通常、実験動物に対する投与量はヒト 10 倍量 (強制経口投与) を基準としている。今回は投与期間が長期にわたるため、投与方法を強制経口投与から自由摂取に切り替えた。予備実験において、自由摂取と強制経口投与の作用を比較したところ、同等の効果を期待する場合、自由摂取では強制経口投与の約 2 倍量の投与が必要であることがわかった。このため、今回の実験で用いた五苓

散と柴苓湯の投与量はヒト20倍量とした。即ち、柴苓湯エキスのヒト常用量は7.0g/日であるので、実験動物にはエキス剤2.4g/kg・rat/日量を飼料に混和し自由摂取させた。散剤としての五苓散のヒト常用量は出典によりまちまちで、2.0~8.0g/日と大きなひらきはあったが、柴苓湯と同様に2.4g/kg・rat/日の投与とした。

今回の実験では、日本クレア社のSD系ラットと日本エスエルシー社のWistar系ラットを用い、ラットの系統間によるDOCA-saltの感受性の違いを比較検討した。その結果、従来DOCA-salt腎性高血圧モデル動物の作製には①DOCA投与、②飲料水としてNaCl溶液を与えること、③片腎摘出の3条件を満たすことが必要とされていた¹²⁾が、SD系ラットを用いた場合、③の処置を行うことなくDOCA-salt高血圧を発症した。このことは、高血圧モデル作製のための実験手技が容易なこと、また、腎摘出手術による実験動物への侵襲が軽減できるという点で有用であると思われる。

漢方ではもともと、個人個人の遺伝的条件や薬物に対する反応性の違いを重要視し、「証」を定め投薬する処方を選択する。今回実験に用いたSD系ラットは、もともと生体内含水量が多い系統であるため、水毒の「証」とみなすことができる。これに対し、生体内水の調節機能をもつ利尿剤を投与したところ病態の改善がはかられた。実験動物の「証」を分別することは容易ではないが、今回の結果のように動物の系統によって病態の発症経過や薬物の治療成績が異なることより、漢方薬の有効性を基礎実験で検討する際には用いる実験動物の系統の選択に慎重な考慮が必要であると考えられる。

漢方薬の比検薬として利尿薬のプロセミドを用いたが、DOCA投与による血圧上昇は抑制したものの、DOCA単独投与群におけるTBWやCPVの増加をさらに増強させたり、実験期間中に死亡例が多発するなど、明らかな増悪作用を示した。この結果より、DOCA-salt高血圧ラットは、血圧上昇を抑制するだけでは病態の改善につながらず、生体内の水分量や水の分布状態を正常化することの方がより重要であると考えられた。

SD系ラットにおけるDOCA単独投与群とDOCA・プロセミド併用投与群の実験期間中の死亡原因としては、腎臓の腫脹、尿蛋白発現、腹水貯留などが顕著であることより、腎不全によるものと考えられる。一方、DOCA・五苓散変方併用投与群およびDOCA・柴苓湯併用投与群では、実験期間中の死亡例はなく、TBWあるいはCPVに対する正常化作用、尿中蛋白量の漏出抑制、腎組織の腫脹の改善などからその有効性が認められた。柴苓湯は五苓散と小柴胡湯の合剤であるにもかかわらず、生体内の水の分布や動態に及ぼす作用は五苓散変方には

及ばず、DOCA投与による血圧上昇の抑制作用もゆるやかであった。本モデル動物に対する五苓散と柴苓湯の作用の差は、単に散剤と煎剤という剤形の違いだけではなく、柴苓湯の中に含まれる五苓散以外の配剤生薬の作用や煎液中での有効成分の相互作用等も関係していると思われる。現在のところ個々の配剤生薬の作用や生薬間の相互作用については不明な点が多く、さらなる検討が必要である。

高血圧および脳卒中を遺伝的に自然発症する脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)は、Naの代謝異常によりTBWやCPVが対照の正常血圧ラット(WKY)に比べ有意に高値を示す。このSHRSPを生体内水分分布や代謝に異常をきたしている水毒モデルとみなし、五苓散変方を投与したところ、TBWとCPVは正常化した。血圧上昇抑制作用や脳卒中による死亡率の改善作用は顕著ではないことを前報⁹⁾で報告した。一方、SHRSPに食塩を負荷した場合、五苓散の投与により血圧上昇抑制作用および延命効果が得られたことを、上野ら^{13,14)}は報告している。これらの結果より五苓散の作用として、遺伝的な変化や、特定の臓器や器官の障害を直接的に抑制したり改善する作用は乏しく、食塩水負荷などにより一過性に異常をきたした生体内水の分布を正常化する働きにより、ひいては病態そのものを正常化に向かわせる作用のあることが推測される。

藤塚ら¹⁰⁾は、ラットにバルビツール酸誘導体を投与するとAVPの分泌亢進により乏尿状態を呈し、逆に、エタノール処理をするとAVP分泌低下により多尿になるが、柴苓湯の投与によりいずれの場合においても正常化作用が認められたと報告している。前回の我々の実験結果においても、五苓散は、SHRSPの尿中AVP値を低下させ、逆に血中心房性利尿ホルモン(ANP)を増加させた⁹⁾。また本実験のDOCA-saltラットにおいても、血漿AVP値が増加する^{15,16)}ことから、五苓散、柴苓湯のDOCA-saltラットに対する有効性は、視床下部-下垂体系に何らかの作用を及ぼし、AVPやANPなどのホルモン系の分泌をコントロールすることにより生理活性を変化させる可能性が示唆された。

一方、正常老齢ラットにおいて、五苓散単独投与で、CPVを増加させる⁹⁾など、局所において水の透過性を変化させる機構が関与している可能性も推測される。

以上の知見より、漢方の利尿剤はDOCA腎性高血圧モデル動物のように生体内水代謝異常を伴う疾患に対し、有効性が期待できるものと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、財団法人日本漢方医学研究所の研究助成金（平成12年度）によった。

*〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2
近畿大学医学部薬理学教室 前田佳奈

References

- 1) Hans, Selye., C.E. Hall and E.M. Rowley: Malignant hypertension produced by treatment with deoxycorticosterone acetate and sodium chloride. *Can. M. A. J* **49**, 88-92, 1943.
- 2) Tikkanen, I., Fyhrquist, F., Miettinen, A. and Tornroth, T.: Autologous immune complex nephritis and DOCA-NaCl load: a new model of hypertension. *Acta path microbiol scand Sect A* **88**, 241-250, 1980.
- 3) Schenk, J. and McNeill, J.H.: The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Meth* **27(3)**, 161-170, 1992.
- 4) Darrell, L.L., Joseph, R.H. and Carmen, H.L.: Role of the adrenal medullae in male and female DOCA-Salt hypertensive rats. *Hypertension* **31(part2)**, 403-408, 1998.
- 5) Tei, M., Sano, U. and Ootsuka, Y.: Gorei-san no yakuri sayou. *J Med Pharm Soc WAKAN-YAKU* **2**, 110-111, 1985.
- 6) Haranaka, R., et al.: The effects of Zhu-linj tang an experimental chronic renal failure. *Proc Symp WAKAN-YAKU* **16**, 183-187, 1983.
- 7) Hosono, H.: Risuiyaku oyobi rinsyo eno oyo toshite. *Japanese Journal of Oriental Medicine* **43(3)**, 372-386, 1993.
- 8) Orita, M., Nakanishi, Y., Tang, F., Hirano, H. and Abe, H.: The effects of Gorei-san on water distribution in the body.(long term administration of Gorei-san compared to short term administration). *Journal of Traditional Medicines* **16**, 32-37, 1999.
- 9) Orita, M., Maeda, K., Higashino, H., Hirano, H. and Yamamoto, Y.: The control effects of body water metabolism by Gorei-san analogue (Wu-Ling-San analogue) or Sairei-to(Chai-Ling-Tang) on stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Journal of Traditional Medicines* **17**, 157-164, 2000.
- 10) Fujitsuka, N. and Ishige, A.: Saireito no fusu kaizen sayou ni taisuru kiso kenkyuu. 漢方と最新治療 **9**, 321-325, 2000.
- 11) Ohnishi, N., Nagasawa, K. and Yokoyama, T.: The verification of regulatory effects of kampo formulations on body fluid using model mice. *Journal of Traditional Medicines* **17**, 131-136, 2000.
- 12) Melvin, J. F. and J. Robert, C: Effect of pyridoxine and tryptophan, alone and combined, on the development of deoxycorticosterone acetate induced hypertension in rats. *Pharmacol* **50**, 298-306, 1995.
- 13) Ueno, M. and Matsubara, T.: Preventive effects of some drugs on cerebral apoplexy in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) (Part VI)-long term oral administration of Gorei-san-. 富山薬研年報 **19**, 56-65, 1992.
- 14) Ueno, M. and Matsubara, T.: Preventive effects of some drugs on cerebral apoplexy in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) (Part VIII)-long term oral administration of Gorei-san excluding one of the component herbs-. 富山薬研年報 **20**, 38-45, 1993.
- 15) Haack, D., Mohring, J., Mohring, B., Petri, M. and Hackenthal, E.: Comparative study on development of corticosterone and DOCA hypertension in rats. *Am J Physiol* **233**, F403-411, 1977.
- 16) Nishimura, M., Ohtsuka, K., Sakamoto, M., Nanbu, A., Takahashi, H. and Yoshimura, M.: Roles of brain angiotensin II and c-type natriuretic peptide in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in rats. *J Hypertension* **16**, 1175-1185, 1998.