

実験的腎不全ラットに対する温脾湯の長期投与による効果

大浦 彦吉,^{*a)} 鄭 海泳,^{a)} 鄭 平東,^{a)} 横澤 隆子,^{a)}
若木 邦彦,^{b)} 小泉富美朝^{b)}

^{a)}富山医科薬科大学和漢薬研究所臨床利用部門

^{b)}富山医科薬科大学医学部病理学教室

Effect of Onpi-tô administered orally for a long term
on rats with chronic renal failure

Hikokichi OURA,^{*a)} Hae Young CHUNG,^{a)} Ping Dong ZHENG,^{a)} Takako YOKOZAWA,^{a)}
Kunihiko WAKAKI^{b)} and Fumitomo KOIZUMI^{b)}

^{a)}Department of Applied Biochemistry, Research Institute for Wakan-Yaku,
Toyama Medical and Pharmaceutical University

^{b)}Department of Pathology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received May 10, 1985)

Abstract

The influence of orally administered Onpi-tô (Wen-Pi-Tang) for 36 days was investigated in rats with chronic renal failure induced by an adenine diet. Improvement of hyperazotemia, hyperphosphatemia, and hypoalbuminemia was observed by the administration of Onpi-tô. The urea concentrations in the liver and kidney were also decreased after treatment, which indicates inhibiting the production of urea in their organs. In addition, a significant decrease in guanidino compound, methylguanidine, was observed in the serum and liver. These results are involved in the significant prolongation of survival rate. However, there was no significant difference between the control and Onpi-tô treated groups in histologic findings.

Key words experimental chronic renal failure rat, Onpi-tô, hyperazotemia, hyperphosphatemia, hypoalbuminemia, prolongation of survival rate

Abbreviations BUN; blood urea nitrogen, GAA; guanidinoacetic acid, GSA; guanidinosuccinic acid, MG; methylguanidine, Onpi-tô (Wen-Pi-Tang); 温脾湯

緒 言

先に著者らはアデニン誘発慢性腎不全ラットに対して、大黃並びに温脾湯を24日間投与すると、高窒素血症の改善、肝・腎における尿素産生の抑制、血中メチルグアニジン、グアニジノコハク酸の著明

な低下あるいは消失が見られ、電解質代謝も改善されることを報告した¹⁻³⁾。また、その際に温脾湯による血清尿素窒素、クレアチニン、肝尿素量、血中グアニジン化合物の低下は大黃単独投与量の約40%の大黃量で同程度に見られたので、これらの作用は大黃と大黃以外の温脾湯構成和漢薬(人參、甘草、乾姜、附子)による複合効果によるものと考えられ

*〒930-01 富山市杉谷2630
2630, Sugitani, Toyama 930-01, Japan

た。そこで、温脾湯に含まれる大黃以外の成分について検討したところ、人參、附子による肝、腎尿素量の低下、人參によるメチルグアニジンの低下及び人參、附子によるグアニジノコハク酸の低下などが明らかとなった。⁴⁾

本研究においては、腎不全ラットに対する温脾湯の長期投与による影響を検討し、とくにその延命効果、腎の組織学的変化並びに血中、臓器中の uremia に関連する成分について分析し、若干の知見を得たので以下報告する。

材料と方法

動物：Wistar 系雄ラット（初体重約 120 g）を用い、前報⁵⁾ 同様 0.75 % アデニン含有飼料で飼育した。

温脾湯エキスの調製法：前報³⁾ 同様中国伝統煎出法によって調製し、濾液を凍結乾燥して褐色の粉末を約 20 % の収率で得た。

試料の投与法：温脾湯エキスを水に溶解し、1.0 mg/ml の濃度に調整してアデニン投与と同時に最初から自由に飲水させた。投与量を飲水量から算出すると、25~30 mg/rat/day であった。対照群には水を与えた。

組織学的検索：腎組織の一部を 10 % 中性ホルマリンに固定、パラフィン包埋し、薄切切片をヘマトキシリン・エオジン染色、アザン染色などを行ない、光顕で観察した。

分析方法：血清中の尿素窒素、Ca、無機リン酸、アルブミンは市販キットを用い、肝・腎組織中の尿素量は Archibald 法⁶⁾ に従い、比色定量した。また

血清、臓器中のメチルグアニジン、グアニジノコハク酸、グアニジノ酢酸は高速液体クロマト装置（島津 LC-5A 型）を用い、ニンヒドリン発色による蛍光分析法で測定した。²⁾

結 果

腎不全ラットに対する温脾湯の延命効果並びに腎の組織学的所見

アデニン食と同時に温脾湯を投与し、生存率を測定した。その結果、Fig. 1 に示すように 38 日から 41 日目で斃死する例がみられ、50 % survival rate は対照群 52 日に比し温脾湯投与群は 61 日と明らかな延命効果が認められた。また対照群が 67 日で全部斃死するのに対し、温脾湯投与群では 33 % 生存し、71 日でも依然としてこれらラットは生存し続けていた。他方、温脾湯構成和漢薬の大黃投与群では、50 % survival rate が温脾湯投与群と同様であったが、71 日後における生存率は 7 % であった。

そこで 71 日まで生存したラット（温脾湯投与群）と 67 日の対照群ラットの腎組織を検討した。Table I のごとく対照群と温脾湯投与群の間に著しい差異を認めなかったが、温脾湯投与群では糸球体ボーマン腔の拡張、尿細管腔の囊胞化、尿細管基底膜の肥厚、尿細管上皮の硝子滴変性、間質の血管壁の空胞化等のわずかな緩和が観察された。しかし肝、脾、肺、骨髓、十二指腸、骨組織では著明な差異は認めなかった。

腎不全ラットに対する温脾湯の血清成分に及ぼす効果

Fig. 2 に示すように、対照群の血清尿素窒素

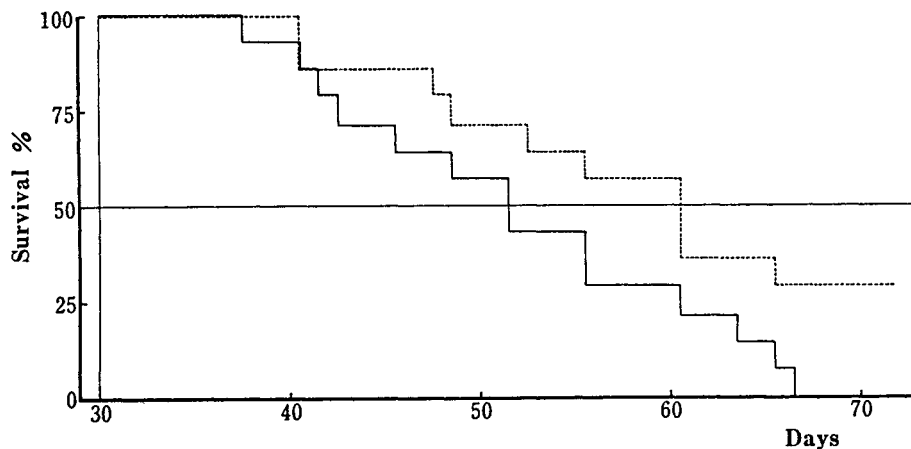


Fig. 1 Effect of Onpi-tô on survival rate. Fifteen rats were used in each group. — control group, Onpi-tô-treated group.

Table I Histological findings of the kidney in Onpi-tô treated rats.

	Histological changes of the kidney									
	Glomerulus		Tubulus				Interstitial			
	Atrophy	Dilatation of Bowman's space	Cystic dilatation	Thickening of basal membrane	Hyaline droplet degeneration	Crystal deposit	Cell-infiltration			
							Neutrophiles	Histiocytes	Giant cells	Fibroblasts
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Onpi-tô treated rats No.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

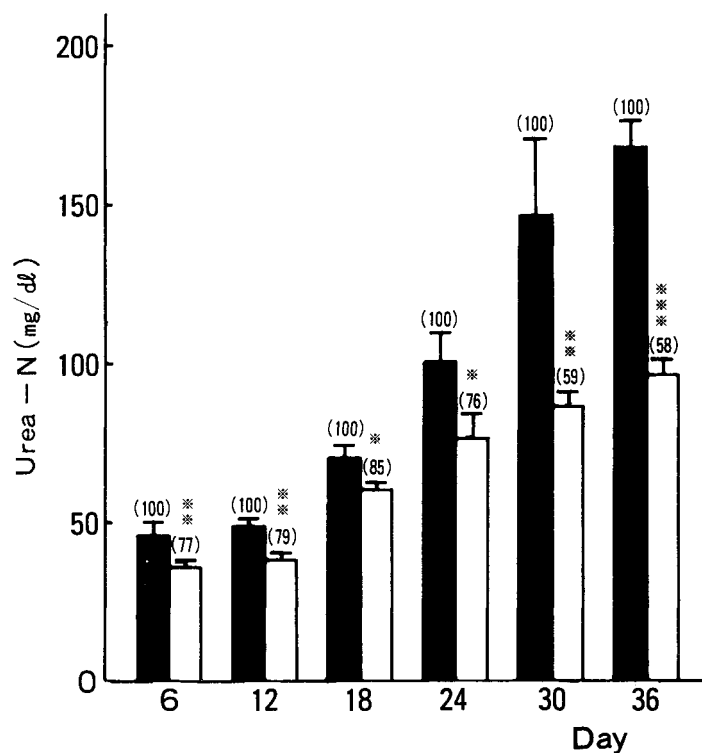


Fig. 2 Effect of Onpi-tô on urea nitrogen level in the serum.

Values are means $\pm$ S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

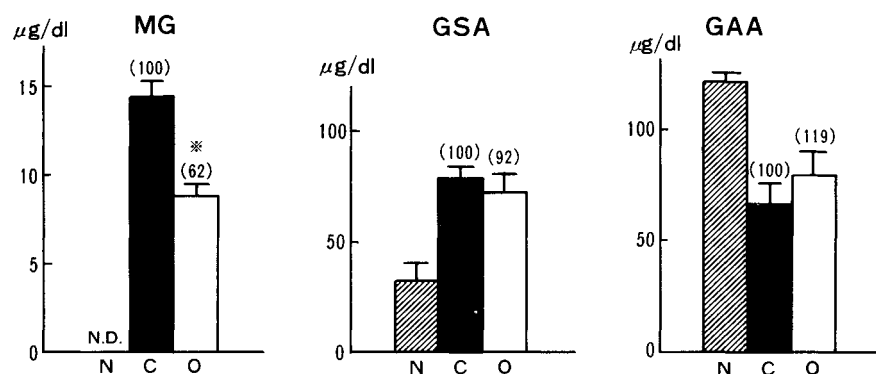


Fig. 3 Effect of Onpi-tô on guanidino compounds level in the serum.

MG, methylguanidine; GSA, guanidinosuccinic acid; GAA, guanidinoacetic acid. N, normal rat; C, CRF rat (control group); O, CRF rat (Onpi-tô-treated group). Values are means $\pm$ S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.01$. N.D., not detectable.

Table II Effect of Onpi-tô on calcium, phosphate, albumin levels in the serum.

Group	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Albumin (g/dl)
Normal rat	9.4 $\pm$ 0.1	9.9 $\pm$ 0.2	3.34 $\pm$ 0.06
CRF rat			
Control	7.7 $\pm$ 0.5 (100)	18.5 $\pm$ 1.0 (100)	2.70 $\pm$ 0.11 (100)
Onpi-tô	7.9 $\pm$ 0.3 (103)	13.4 $\pm$ 0.5** (72)	3.10 $\pm$ 0.09* (115)

Values are means $\pm$ S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

(BUN) レベルは飼育期間中、著しく上昇し、36日間飼育した時点で約 170 mg/dl の値を示した。これに対し、温脾湯投与群では 6 日目から対照群と比較して有意な低下を示し、30 日、36 日目では 41%、42% と著明な低下が観察された。特に 36 日目の温脾湯投与群の値は 24 日目の対照値に匹敵する値であった。一方、クレアチニン値は 36 日目で対照群 2.37 ± 0.21 mg/dl に対し、温脾湯投与群 2.19 ± 0.10 mg/dl とわずかの低下傾向を示した。

血中グアニジノ化合物の測定結果を Fig. 3 に示したが、温脾湯 36 日間投与によってメチルグアニジン (MG) が 38% 有意に低下した。腎で生合成さ

れるグアニジノ酢酸 (GAA) は上昇傾向を示し、腎機能の亢進が示唆された。しかしグアニジノコハク酸 (GSA) の量は温脾湯投与によっても対照群との間に有意差を認めなかった。

一方、アデニン誘発慢性腎不全ラットでは低 Ca、高リン酸、低アルブミン血症を呈することをすでに認めているが⁵⁾、温脾湯 36 日間投与により高リン酸血症、低アルブミン血症の改善を認める所見を得た。Table II に示すように、温脾湯群では無機リンが 28% 低下し、アルブミンは逆に 15% 上昇し、正常値に近い値に回復した。しかし Ca 値には変化を認めなかった。

Table III Effect of Onpi-tô on urea concentration in the liver and kidney.

Group	Liver urea (mg/tissue)	Kidney urea (mg/tissue)
Normal rat	2.98±0.18	2.71±0.17
CRF rat		
Control	10.90±1.23 (100)	24.49±3.12 (100)
Onpi-tô	5.76±0.33* (53)	13.78±1.18* (56)

Values are means±S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value. *Significantly different from the control value, $p<0.01$.

Table IV Effect of Onpi-tô on guanidino compounds level in the liver and kidney.

Tissue	Group	MG (μ g/tissue)	GSA (μ g/tissue)	GAA (μ g/tissue)
Liver	Control	3.83±0.93 (100)	17.04±3.99 (100)	77.34±18.45 (100)
	Onpi-tô	1.45±0.31* (38)	10.86±3.05 (64)	85.86±7.08 (111)
Kidney	Control	2.10±0.76 (100)	20.01±3.16 (100)	46.04±27.84 (100)
	Onpi-tô	1.00±0.47 (48)	12.85±2.87 (64)	49.97±13.30 (109)

MG, methylguanidine ; GSA, guanidinosuccinic acid ; GAA, guanidinoacetic acid.

Values are means±S.E. of 6 rats. Figures in parentheses are percentages of the control value.

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

腎不全ラットに対する温脾湯の肝、腎組織成分に及ぼす効果

肝、腎組織中の尿素量に対する温脾湯 36 日間投与後の効果は Table III に示す通りである。肝では 47%、腎では 44% と著明な減少が観察されたが、正常ラットと比較した場合、その値は肝で 1.9 倍、腎で 5.1 倍と依然として高値を示した。

臓器中のグアニジノ化合物の測定結果は Table IV に示す通りであり、肝では MG が 62 % の有意な低下を示し、GSA も低下傾向を示した。また GAA も上昇傾向にあった。腎においても肝と類似の結果が得られたが、MG, GSA, GAA いずれにつ

いても対照群との間に有意差を認めなかった。

考 察

前報¹⁻³⁾において大黃並びに温脾湯がいずれもアデニン誘発慢性腎不全状態の代謝改善作用を示すことを報告したが、これらの効果はいずれも 24 日間投与の実験結果であったので、今回延命効果を含めて長期投与の影響について検討した。

その結果、50 % 生存率で約 10 日間の延命効果が観察され、さらに対照群が全部斃死する 67 日目で温脾湯投与群は 33 % 生存し、71 日目でも依然とし

てこれらのラットは生存し続け、明らかな延命作用が認められた。

これらのラットの組織学的所見では対照群に比し温脾湯投与群では糸球体ボーマン腔の拡張、尿細管腔の嚢胞化、尿細管基底膜の肥厚、尿細管上皮の硝子滴変性および間質の血管壁の空胞化等にわずかな緩和が認められた。

次に対照群が38日から斃死する例がみられたので、その直前の36日目における血中、肝腎組織中の各成分の変化を検討した。その結果、前報³⁾の温脾湯25 mg/rat/day 24日間投与の実験結果と比較すると、BUN値は今回の実験で44%と有意に著明に低下し、前報の32%の低下率以上であった。同様に肝、腎組織中の尿素量は今回それぞれ47%、44%と顕著に減少し、前回の23%、28%より減少率が大きかった。しかし前回認められた血清クレアチニン値の低下作用(32%)は、今回わずかの低下傾向を示したにすぎなかった。

以上の結果から、温脾湯によるBUNの低下は肝、腎における尿素産生の抑制によるものと考えられるが、血清クレアチニンの有意な低下を認めなかった原因として、尿中排泄によるものか、あるいはクレアチニン産生によるものかは不明であり、今後の研究課題である。

血清電解質については無機リン酸の低下は前回の18%低下より長期投与によってさらに著明であり、28%の低下を観察したが、Ca量は前回同様、対照群に比しほとんど差異を認めなかった。

しかし血清アルブミン値は前回全く増加を認めなかったが(未発表データ)、今回15%有意に増加し、低アルブミン血症の改善が認められた。この機構については、今後さらに詳細に検討する予定である。

グアニジノ化合物、特にMGは前回同様、今回の実験でも血中で38%、肝で62%の有意な減少がみられ、腎でも52%の低下傾向を示し、温脾湯の中に強力なMG低下作用を示す成分が存在することを再確認した。他方、血清GSAは前回著明に低下したのに対し、今回ほとんど減少効果を認めなかった。しかし肝、腎組織中のGSAはいずれも36%の減少傾向を示し、MGの低下とは対称的であった。

以上の結果から、温脾湯のuremicな状態の代謝改善作用が明らかとなり、これらの作用が延命効果の背後に存在しているものと考えられる。

他方、著者らは臨床的に腎不全を示す患者に対し大黃並びに温脾湯を投与し、BUN、クレアチニン、

MG、無機リン、尿酸値の低下、並びに自覚症状の著しい改善を見た症例を報告した。⁷⁾さらに高血圧、動脈硬化を伴う腎不全患者に温脾湯を投与した場合も、BUN、クレアチニン、MG、GSAの低下、血清アルブミン値の上昇、A/G比の改善、クレアチニークリアランスの改善を認める症例があり、⁸⁾上述の実験動物における結果と類似した成績を得た。

近年、urea cycle異常に基づいて作られるuremic toxinと尿毒症の関係が注目され、特にMGが重視されている。すなわちMGは腎不全の進行とともにその合成が著しく増加し、血小板凝集抑制などを誘導することがCaharaneら⁹⁾により報告されている。またGSAもMGと同様、腎不全時の血液及び尿中で増加していることがCohenら¹⁰⁾によって指摘され、この物質が血小板機能障害、溶血作用、糖代謝障害及びリンパ球若年化反応阻害など、さまざまな毒性を有していることがHorowitzら¹¹⁾、Giovannettiら¹²⁾、Cohenら¹³⁾、Slavinら¹⁴⁾によって報告されている。本研究で示したように、温脾湯が腎不全時に増加するMG、更にはGSAの体内における蓄積を軽減したことは、興味ある事実である。

MG並びにGSAの生合成経路についてはすでにNatelsonら¹⁵⁾、三上ら¹⁶⁾により提唱され、MGはクレアチニンから、GSAは尿素から産生されることが報告されているが、温脾湯を用いた本実験結果より、クレアチニン値に有意な変化が見られないにもかかわらずMGが著しく低下した事実は、今後の解析を必要とする興味ある課題である。最近、永瀬ら¹⁷⁾はMG産生に活性酸素、特にhydroxyl radicalの関与を指摘している。このことから温脾湯がこれらradicalのscavenger作用を有しているかもしれないので、今後更に検討したい。

結 論

アデニン誘発慢性腎不全ラットに温脾湯を36日間経口投与し、高尿素血症、高リン酸血症、低アルブミン血症の改善、肝・腎における尿素産生の抑制、血中及び肝組織中のメチルグアニジン(MG)の有意な低下を認め、著しい延命効果を観察した。しかし腎の組織学的所見では対照群との間に著しい差異を認めなかった。

文 献

- 1) Yokozawa, T., Zheng, P.D., Oura, H., Fukase, M., Koizumi, F. and Nishioka, I.: Effect of extract from

- Rhei Rhizoma on adenine-induced renal failure in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2762-2768, 1983
- 2) Yokozawa, T., Suzuki, N., Zheng, P.D., Oura, H. and Nishioka, I.: Effect of orally administered rhubarb extract in rats with chronic renal failure. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 4506-4513, 1984
 - 3) 大浦彦吉, 鄭 平東, 横澤隆子: アデニン誘発慢性腎不全ラットに対する漢方方剤温脾湯の効果について. 和漢医薬学会誌 **1**, 209-217, 1984
 - 4) 大浦彦吉, 鄭 海泳, 横澤隆子: 実験的腎不全ラットに対する温脾湯構成和漢薬の効果. 和漢医薬学会誌 **2**, 351-356, 1985
 - 5) 大浦彦吉, 横澤隆子, 鄭 平東, 小泉富美朝: アデニン誘発慢性腎不全モデルラットの作製. 医学のあゆみ **130**, 729-730, 1984
 - 6) Archibald, R.M.: Colorimetric determination of urea. *J. Biol. Chem.* **157**, 507-518, 1945
 - 7) 三瀧忠道, 寺澤捷年, 横澤隆子, 大浦彦吉: 大黃並びに大黃含有漢方方剤による慢性腎不全の治療に関する研究 (第1報). 和漢医薬学会誌 **1**, 266-278, 1984
 - 8) 横澤隆子, 鈴木奈緒美, 鄭 平東, 奥田伊津子, 大浦彦吉, 三瀧忠道, 寺澤捷年: 大黃並びに大黃含有漢方方剤による慢性腎不全の改善作用. 日本臨床代謝学会記録 (印刷中)
 - 9) Caharane, S.F., Johnson, S.A., Monto, R.W. and Caldwell, M.J.: Acquired thrombocytopathy: Observations on the coagulation defect in uremia. *Am. J. Clin. Path.* **30**, 507-513, 1958
 - 10) Cohen, B.D., Stein, I.M. and Bonas, J.E.: Guanidinosuccinic aciduria in uremia. *Am. J. Med.* **45**, 63-68, 1968
 - 11) Horowitz, H.I., Stein, I.M., Cohen, B.D. and White, J.G.: Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. *Am. J. Med.* **49**, 336-345, 1970
 - 12) Giovannetti, S., Cioni, L., Balestri, P.L. and Biagini, M.: Evidence that guanidines and some related compounds cause haemolysis in chronic uraemia. *Clin. Sci.* **34**, 141-148, 1968
 - 13) Cohen, B.D., Handelsman, D.G. and Pai, B.N.: Toxicity arising from the urea cycle. *Kidney Int.* **7**, S-285-S-287, 1975
 - 14) Slavin, R.G. and Fitch, C.D.: Inhibition of lymphocyte transformation by guanidinosuccinic acid, a surplus metabolite in uremia. *Experientia* **27**, 1340-1341, 1971
 - 15) Natelson, S., Stein, I. and Bonas, J.E.: Improvements in the method of separation of guanidino organic acids by column chromatography. — Isolation and identification of guanidinosuccinic acid from human urine—. *Microchem. J.* **8**, 371-382, 1964
 - 16) Mikami, H., Orita, Y., Ando, A., Fujii, M., Kikuchi, T., Yoshihara, K., Okada, A. and Abe, H.: Metabolic pathway of guanidino compounds in chronic renal failure. In "Urea Cycle Diseases" (Ed. by A. Lowenthal, A. Mori. and B. Marescau), Plenum Publishing Corporation, New York and London, p 449-458, 1983
 - 17) 永瀬宗重, 青柳一正, 成田光陽, 東條静夫: 活性酸素による methylguanidine 産生, 特に hydroxyl radical の重要性について. 日腎誌 **27**, 1149-1159, 1985