

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

服部 智久, 永松 正, 鈴木 良雄*

名城大学薬学部薬理学教室

Studies on antinephritis effects of Japanese Kampo medicine (1)
Effect of Sairei-tô on anti-GBM antibody nephritis in rats

Tomohisa HATTORI, Tadashi NAGAMATSU and Yoshio SUZUKI*

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Meijo University

(Received November 27, 1987. Accepted March 7, 1988.)

Abstract

The antinephritic effects of Sairei-tô (Chai-Ling-Tang) on original (exp. 1) and crescentic-type (exp. 2) anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) nephritis in rats were investigated and the following results were obtained. In the exp. 1, urinary protein and blood urea nitrogen contents were significantly reduced by Sairei-tô 375 and 1,500 mg/kg. In light microscopic observation of renal glomeruli, Sairei-tô all dose groups had remarkable reduction against hypercellularity and adhesion of capillary walls to Bowman's capsule by day 13. In exp. 2, on urinary protein and plasma cholesterol, the amount tended to be reduced by Sairei-tô 1,500 mg/kg administration. In light microscopic observation of renal glomeruli, Sairei-tô 1,500 mg/kg administration significantly reduced adhesion of capillary walls to Bowman's capsule and tended to reduce crescentic formation and fibrinoid necrosis, and significantly reduced the index of glomerular lesions. However the index of glomerular lesions tended to be reduced by Sairei-tô 375 mg/kg administration. Therefore Sairei-tô had pronounced effects on histological parameters in glomeruli.

Key words anti-GBM nephritis, rats, Sairei-tô, urinary protein

Abbreviations anti-GBM nephritis, anti-glomerular basement membrane antibody nephritis; Sairei-tô (Chai-Ling-Tang), 柴苓湯

緒 言

柴苓湯は小柴胡湯と五苓散の合方エキス剤であり、病中病後の体力改善など広い適用範囲を持つ和漢薬である。最近ではさまざまな病態モデルに対する和漢薬の有効性が報告されるようになり、腎炎や肝炎さらには腫瘍といった難治性の疾患に対する検討が増えている。特に腎炎に関しては柴苓湯においても、小児ネフローゼ症候群¹⁾や糸球体腎炎²⁾に対してステロイド剤との併用により副作用の軽減ある

いはステロイド剤の作用増強といった有効性が報告されている。そこで今回我々は、急速進行性糸球体腎炎、Goodpasture 症候群の実験モデルと思われるラットの抗 GBM 抗体腎炎（以下抗 GBM 腎炎とする）の原型モデル（実験 1）と半月体モデル（実験 2）に対する柴苓湯の効果について検討した。

材料と方法

(1) 実験動物：体重約160から170 g の Sprague Dawley 系雄性 SPF ラット（静岡実験動物協同組

*〒468 名古屋市中天白区天白町八事裏山 15
Tenpaku-ku, Nagoya 468, Japan

合)を1群8匹として使用した。

(2) 被験薬物ならびに被験薬液の調製：被験薬物として柴苓湯エキス剤(ツムラ順天堂)を用いた。投与する場合は柴苓湯エキス剤を75, 375および1,500 mg/kg(ヒトの1日量, その5倍量と20倍量)の投与量になるように薬液を調製した。

(3) 抗 GBM 腎炎の惹起ならびに被験薬液の投与：原型モデル(実験1), 半月体モデル(実験2)共に体重160から170 gのラットに抗ラット糸球体基底膜ウサギ血清1 mlを尾静脈に注射し, 直ちに24時間尿を採取し後述の尿中蛋白排泄量を測定した。1群の動物数を8匹とし, 各群の平均蛋白排泄量がほぼ等しくなるように動物を分配した。実験2においては, その翌日ウサギ γ -globulin(シグマ社), 6.5 mgを注射用生理食塩水に溶解し, 同量のFreund's complete adjuvantとよく混和して調製したemulsionを両後肢足蹠皮内にわけて注射した。柴苓湯75, 375および1,500 mg/kgの各被験薬液を実験1では, 1日目より13日目まで, 実験2ではウサギ γ -globulin投与日から39日目まで1日1回経口投与した。また両実験には被験薬液の代りに同量の水道水を経口投与した対照群と無処置の正常群を設けた。

(4) 採尿, 採血および腎摘出：採尿は実験1では, 1日目と12日目に, 実験2では1, 10, 20, 30, 40日目にそれぞれ行った。ラットに水道水を8 ml/rat強制投与し, ステンレス製代謝ケージに入れて絶食下で24時間尿を採取した。その後尿量を測定し3,000 rpmで15分間冷却遠心し, その上清を被検尿として測定した。採血は実験1においては13日目, 実験2では10, 29, 40日目に行った。ラットをラットホルダーに入れて固定し, 尾を約55°Cの温湯で加温した後, 1 mlのディスポーザブルツベルクリン注射器(ジャパンメディカルサプライ)を用いて尾静脈から0.3 ml採血した。得られた血液は1.675 mgのEDTA $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H₂O(片山化学)を注射用生理食塩水(大塚製薬)20 mlに溶解した溶液25 μ lと混和し, これを遠心用チューブに取り, クボタマイクロ冷却遠心機(KR-1500)で10分間, 5,000 rpmで遠心し上清を取り被検血漿とした。また実験最終日に腎を摘出し, 直ちに左腎を病理組織標本に供した。

(5) 尿および血中の生化学的パラメーターの測定

尿中蛋白排泄量：尿中蛋白はKingsbury³⁾らの方法に従って測定し, 24時間尿当りのmgとして示した。

血中コレステロール量：血中コレステロール量⁴⁾

は総コレステロール定量試薬, Determiner TC5(協和メディックス)を用いて定量し, 血清あるいは血漿1 dl当りのmgとして示した。

血中尿素窒素量(urea nitrogen, UN)：血中UN⁵⁾はurease-indophenol法で測定し, 血清あるいは血漿1 dl当りのmgとして示した。

(6) 腎組織の光学顕微鏡的観察

Paraffin切片の作製と染色：腎組織を冷0.5 M Tris塩酸緩衝(pH 7.5)漸強alcohol系列(30から100%)で脱水, 固定を行い, その後benzen溶解paraffin中に入れて包埋した。このparaffin包埋した組織ブロックから大型ミクロトーム(YA-MATO LS-113)により2から3 μ mの切片を作製し, この切片についてhematoxylin-eosin, periodic acid Schiff, Masson trichrome染色を施した。

組織学的評価：光学顕微鏡により, 実験1では各組織標本中10個の血管極を含む糸球体について核の数を数えた。また, 係蹄壁とBowman嚢との癒着(以下癒着と略記)に関して病変の程度を各組織標本中50個の糸球体についてmildには1点, moderateには2点, severeには3点を与え, 各評点に相当する糸球体を n_1 , n_2 および n_3 とし, 下記の式に従って病理組織学的なパラメーター指数を算出した。実験2についても, 各組織標本中50個の糸球体について半月体形成, 癒着及びfibrinoid壊死の3つの病理組織学的なパラメーターの出現率と病変の程度の割合を算出し, 同様に下記の式に従って半月体形成指数(C.I), 癒着指数(A.I)およびfibrinoid壊死指数(F.I)を算出した。

$$C.I, A.I, F.I = 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3$$

さらに観察した3項目について次式に従って数量化し個々の糸球体の障害指数として算出した。

$$\text{糸球体障害指数} = \frac{(3 \times C.I) + (2 \times A.I) + (1 \times F.I)}{(3 + 2 + 1) \times 50}$$

(7) 統計学的処理：実験結果の統計学的有意性はStudent's *t*-testによって検討した。

結 果

1. 尿中蛋白排泄量に対する効果

実験1：Fig. 1aに示すように, 尿中蛋白排泄量は対照群が12日目に185.7 mg/dayの高値を示したのに対して, 柴苓湯の375, 1,500 mg投与群がそれぞれ32%, 37%の抑制率で有意に抑制した。

実験2：Fig. 1bに示すように, 1日目に220 mg/

Fig. 1a

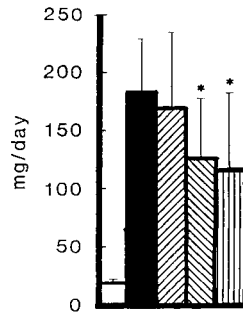


Fig. 1b

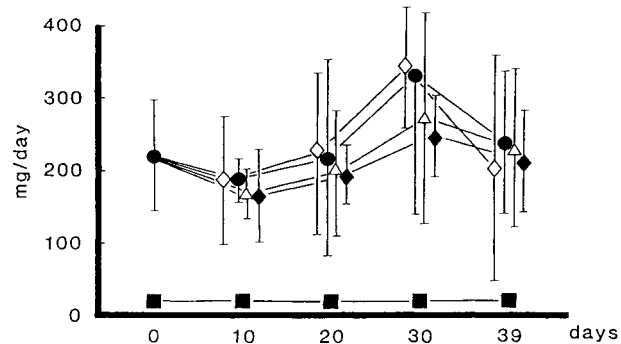


Fig. 1a Effects of Sairei-tô on urinary protein content in original-type anti-GBM nephritis in rats.

Sairei-tô was given daily p.o. from the day after injection of the anti-GBM serum (1st day) to the 13th day. Each column denotes the mean $\pm$ S.D. of 8 rats. $\square$ shows normal group. $\blacksquare$ shows control group. hatched shows Sairei-tô 75 mg/kg group. vertical lines shows Sairei-tô 375 mg/kg group. ||||| shows Sairei-tô 1,500 mg/kg group. * : Significant difference from control group, $p < 0.05$.

Fig. 1b Effects of Sairei-tô on urinary protein content in crescentic-type anti-GBM nephritis in rats.

Sairei-tô was given daily p.o. from the day after injection of the anti-GBM serum (1st day) to the 39th day. Each plot denotes the mean $\pm$ S.D. of 8 rats. $\blacksquare$ shows normal group. $\bullet$ shows control group. $\diamond$ shows Sairei-tô 75 mg/kg group. $\triangle$ shows Sairei-tô 375 mg/kg group. $\blacklozenge$ shows Sairei-tô 1,500 mg/kg group.

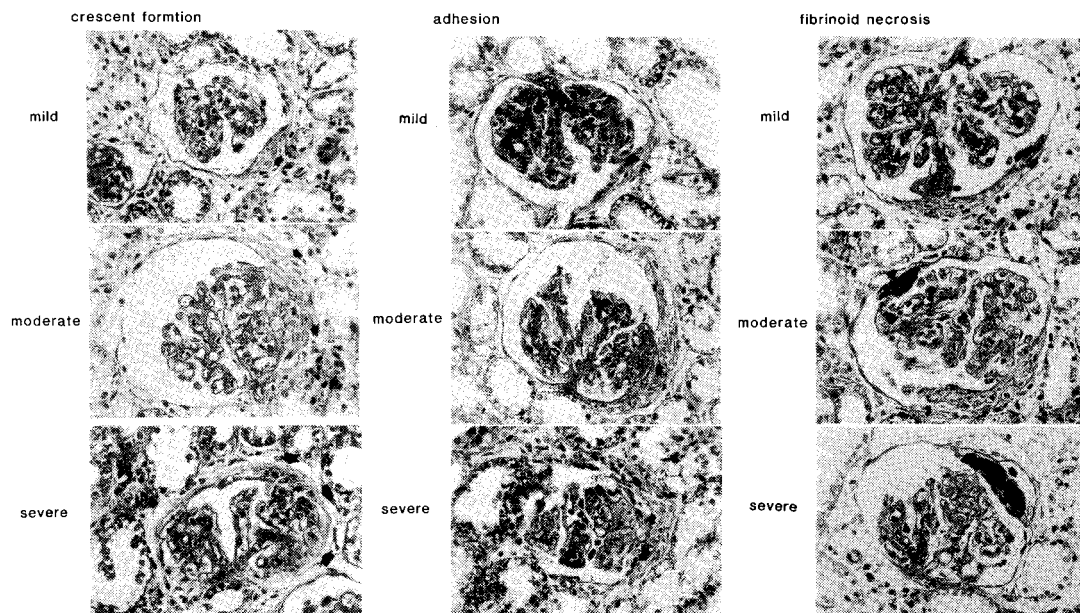


Fig. 2 Typical alteration in the glomeruli on anti-GBM nephritis in rats (MT stain $\times 400$).
Allows represent each typical glomerular alteration.

Table I Effects of Sairei-tô on urea nitrogen content in original and crescentic-type anti-GBM nephritis in rats.

Exp. 1					
	Normal	Control	75 mg/kg	Sairei-tô 375 mg/kg	1,500 mg/kg
Day 13	12.2±1.2	34.3±6.1	23.8±2.5*	26.9±6.2**	25.5±3.4** (mg/dl)
Exp. 2					
	Normal	Control	75 mg/kg	Sairei-tô 375 mg/kg	1,500 mg/kg
Day 10	11.3±1.0	18.0±1.9	14.7±1.3	14.8±2.9	16.9±2.4
Day 29	15.7±1.7	17.0±2.4	15.7±2.1	14.1±2.4	18.1±0.9
Day 40	13.0±1.7	14.5±1.8	14.7±2.9	13.1±1.7	13.8±2.4 (mg/dl)

Results show the mean±S.D. of 8 rats. * and ** ; Significant difference from control group, $p < 0.05$ and 0.01 .

Table II Effects of Sairei-tô on plasma cholesterol content in original and crescentic-type anti-GBM nephritis in rats.

Exp. 1					
	Normal	Control	75 mg/kg	Sairei-tô 375 mg/kg	1,500 mg/kg
Day 13	67.2±8.3	269.9±77.2	204.0±63.8	187.6±75.6*	218.7±66.7 (mg/dl)
Exp. 2					
	Normal	Control	75 mg/kg	Sairei-tô 375 mg/kg	1,500 mg/kg
Day 10	69.1±8.7	247.1±16.2	222.4±86.6	215.4±58.6	169.8±40.0
Day 29	61.7±11.0	197.5±73.0	197.0±93.0	191.7±120.0	215.4±36.7
Day 40	64.0±9.5	205.4±59.9	189.7±100.3	194.8±75.2	159.5±30.8 (mg/dl)

Results show the mean±S.D. of 8 rats. * ; Significant difference from control group, $p < 0.05$.

day を示し 30 日目に 328 mg/day とピークに達しその後減少した。これに対して柴苓湯 375, 1,500 mg/kg 投与群は有意な抑制効果は認められなかったが、実験期間を通して抑制傾向を示した。

2. 血漿コレステロール含量ならびに尿素窒素量に対する効果

実験 1 ; Table II に見られるように、13 日目血漿コレステロール量は対照群に比較して柴苓湯 375 mg/kg 投与群が抑制率 40% の有意な抑制を示し、また 1,500 mg/kg 投与群も抑制傾向が認められた。さらに尿素窒素量 (Table I) に関しても対照群が 34.3 mg/dl と有意な亢進が見られた。これに対し柴苓湯投与群はすべての群で約 25 mg/dl と著しい効果が見られた。

実験 2 ; 柴苓湯 1,500 mg 投与群における血漿コレステロール量は 40 日目までに 40% の抑制傾向を示した。しかし尿素窒素量に関しては著しい効果が認められなかった。

3. 組織学的な効果

Fig. 2 に半月体、癒着およびフィブリノイド壊死の評価における典型的な例を示した。

実験 1 ; Fig. 3a に示すように、13 日目の光顕観察において対照群の糸球体は癒着と富核が観察され、特に富核に関しては遊走細胞が増加していた。柴苓湯投与群は糸球体内の癒着ならびに富核の 40% から 70% までの著しい抑制が認められた。

実験 2 ; Fig. 3b に見られるように、40 日目の光顕観察において対照群の糸球体での半月体形成、癒

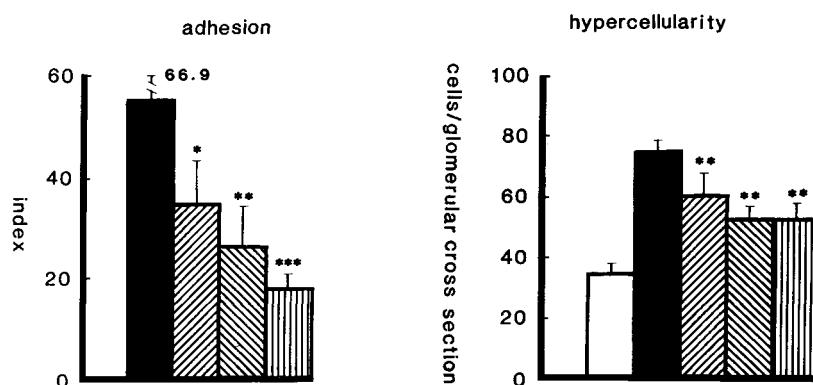


Fig. 3a Effects of Sairei-tô on adhesion of capillary walls to Bowman's capsules and hypercellularity in original type anti-GBM nephritis in rats.

Each column denotes the mean $\pm$ S.D. of 8 rats. $\square$ shows normal group. $\blacksquare$ shows control group. ▨ shows Sairei-tô 75 mg/kg group. ▩ shows Sairei-tô 375 mg/kg group. ▤ shows Sairei-tô 1,500 mg/kg group. *, ** and ***: Significant difference from control group, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001.

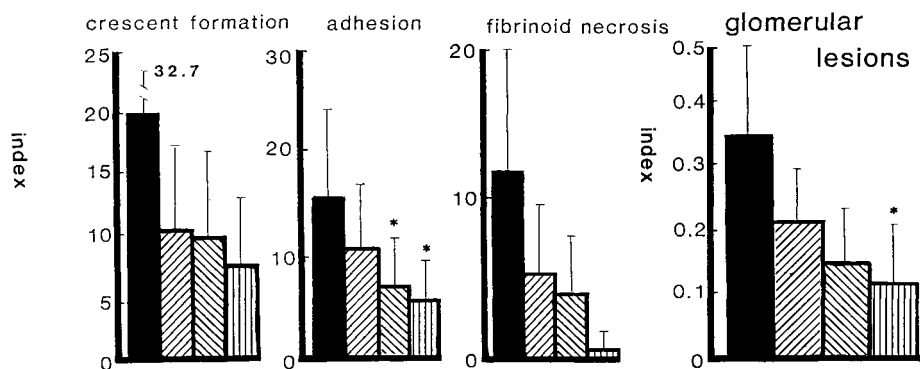


Fig. 3b Effects of Sairei-tô on the index of glomerular histopathological parameters and index of glomerular lesions in crescentic-type anti-GBM nephritis in rats.

Each column denotes the mean $\pm$ S.D. of 8 rats. $\blacksquare$ shows control group. ▨ shows Sairei-tô 75 mg/kg group. ▩ shows Sairei-tô 375 mg/kg group. ▤ shows Sairei-tô 1,500 mg/kg group. *: Significant difference from control group, $p < 0.05$.

着、フィブリノイド壊死の指数はそれぞれ20.4, 17.0, 11.1であった。これに対して柴苓湯375, 1,500 mg/kg 投与群は癒着指数を約60%程度有意に抑制し、半月体形成、フィブリノイド壊死についても抑制傾向を示した。またこれら3つの指数により総合的に算出した糸球体障害指数についても柴苓湯1,500 mg/kg 投与群が67%の有意な抑制を示した。

考 察

当教室では約15年前から本格的に糸球体腎炎の病態モデルの研究⁶⁻⁷⁾や今までヒトの腎炎に経験的に用いられた薬物の腎炎モデルに対する評価⁸⁻⁹⁾をはじめ、薬理作用から考えて抗腎炎効果が期待される新化合物等々について研究し、日腎誌を中心に報告してきた。¹⁰⁻¹⁴⁾

一方最近では、糸球体腎炎²⁾、ネフローゼ症候群¹⁾の治療に和漢薬方剤が用いられ、その有効性ならびに有効成分が種々な方面から検討されてきている。そこで今回我々は柴苓湯について抗 GBM 腎炎の2つのタイプについての有効性を検討した。抗 GBM 腎炎原型モデルは、抗血清の1回静注のみによって惹起されるものであり、増殖性で mild な腎炎が発症し、尿中タンパク量は20日間程持続するがその後ゆっくりと正常レベルにまで回復するタイプである。これに対し半月体タイプは、ウサギ γ -globulin の皮内注射により抗 GBM 腎炎第2相の自己抗体形成反応を亢進させ、原型モデルに比べて immuno complex の沈着や糸球体内血液凝固亢進、フィブリノイド変性などが促進し、持続的なタンパク尿や著明な半月体形成を伴う進行性のモデルである。

今回の実験で柴苓湯は抗 GBM 腎炎原型モデルに対して著しい有効性を示し、さらに半月体モデルに対しても組織学的な改善効果が認められた。柴苓湯の抗腎炎効果は、少なくともその一部は柴苓湯に含まれる柴胡¹⁵⁾および人參¹⁶⁾が副腎皮質細胞の ACTH 感受性を変化させたり ACTH の分泌を増加させることによるステロイド様の抗炎症作用が考えられる。すなわち柴胡、人參、甘草に含まれる saikosaponin ならびに ginsenoside は、ステロイドと構造上類似しているトリテルペン誘導体を主軸としていることに由来していると思われる。つまりこれら生薬成分がリポモジュリン様の物質を生成しアラキドン酸カスケードに作用して、このモデルの発症と進展に関与すると思われるプロスタノイド産生を抑制することにより、有効性を発揮したとも考えられる。さらにこのステロイド様作用は、臨床上の糸球体腎炎やネフローゼ症候群に対して柴苓湯とステロイド剤の併用を行うと、ステロイド剤の使用量を減量しても同等の効果が現われるという報告^{1,2)}によっても裏付けられるであろう。

一方、糸球体腎炎においては血小板系¹⁷⁾および血液凝固系¹⁸⁾の異常に関する報告が数多く見られ、血小板がその凝固反応やケミカルメディエーターの放出を介してこの疾患の発症進展に関与していると考えられており、抗凝固剤ならびに血小板凝集能抑制剤に有効性が認められている。今回使用した柴苓湯には、血小板の凝集能を抑制する作用が報告されている人參¹⁹⁾、生姜²⁰⁾などが含まれている。そこで我々は正常ラットに柴苓湯を投与し経日的な血小板の凝集能を測定したところ、3日目から抑制傾向が見られ10日目には対照群に比べ有意な抑制を示すデータを得た(未発表)。したがって柴苓湯には

血小板凝集能に対し抑制作用があると思われる。

また今回の実験で対照群に比べて体重の増加傾向が認められ、体調の向上等も考えられる。

以上のように柴苓湯の抗腎炎効果は、含有生薬によるステロイド様作用、抗血小板作用、さらには細胞膜保護²¹⁾、免疫調節²²⁾および腎血流増加作用(未発表)等が総合的に効果を発揮するものと思われる今後の検討が期待される。

結 論

1) 抗 GBM 腎炎原型モデル(実験1)において柴苓湯375および1,500 mg/kg 投与群は尿中タンパク排泄を対照群に比べて有意に抑制し組織学的障害にも著明な抑制が認められた。

2) 抗 GBM 腎炎半月体モデル(実験2)においても1,500 mg/kg 投与群が尿中タンパク排泄に対して抑制傾向を示し組織障害も抑制した。

これらのことより柴苓湯はラットの抗 GBM 腎炎に対して有効であり臨床評価が期待できる。

文 献

- 1) 広瀬滋之：小児ネフローゼ症候群(初発例)の漢方治療に関する検討。和漢医薬学会誌2, 210-211, 1985
- 2) 鉄谷多美子, 安永幸二郎, 有地 滋：糸球体腎炎に対する薬剤の効果(第5報) - Total saikosaponin, total ginsenosaponin の蛋白尿抑制効果一。和漢医薬学会誌2, 208-209, 1985
- 3) Kingsbury, F.B., Clark, C.P., Williams, G. and Post, A. L.: The rapid determination of albumin in urine. *J. Lab. Clin. Med.* 11, 981-989, 1926
- 4) Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W. and Fu, P.C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470-475, 1974
- 5) Searcy, R.L. and Cox, F.M.: A modified technique for ultramicro estimation of urea nitrogen. *Clin. Chem. Acta* 8, 810-812, 1963
- 6) 鈴木良雄：腎炎のモデル。日本薬学会ファルマシアレビュー13, 93-103, 1984
- 7) 鈴木良雄：“新薬開発のための薬効スクリーニング法 I,” 清水書院, pp. 136-154, 1984
- 8) 鈴木良雄, 伊藤幹雄, 小川陽一郎, 永松 正：実験的腎炎ラットに関する研究(第6報)改良型馬杉腎炎に対する Sodium chondroitin sulfate およびその他の薬物の抗腎炎効果。日薬理誌75, 585-599, 1979
- 9) 鈴木良雄, 小川陽一郎, 伊藤幹雄, 永松 正：実験的腎炎ラットに関する研究(第8報)改良型馬杉腎炎における腎の病理組織変化とステロイド剤の作用。応用薬理 19, 247-257, 1980
- 10) 鈴木良雄, 伊藤幹雄：Dipyridamole の抗腎炎作用に関

- する研究(1)ラットの抗 GBM 腎炎に対する dipyridamole の効果. 日腎誌 23, 322-332, 1981
- 11) 鈴木良雄, 伊藤幹雄, 齊藤直人: ラットのネフローゼタイプならびに半月体タイプ抗 GBM 腎炎に対する trimetazidine (Vastarel F) の効果. 日腎誌 27, 209-219, 1985
- 12) Suzuki, Y., Ito, M. and Saito, N.: Studies on mechanisms of antinephritic action of SA-446, an angiotensin I converting enzyme inhibitor (1) A comparison with action of Spironolactone, Kallidinogenase and Saralacin. *Japan J. Pharmacol.* 42, 465-475, 1986
- 13) Nagamatsu, T. and Suzuki, Y.: Effect of prostaglandin E₁ and dipyridamole on disposal of colloidal carbon via glomerular mesangial channels. *Japan J. Pharmacol.* 45, 1-6, 1987
- 14) Suzuki, Y., Tsukusi, Y., Ito, M. and Nagamatsu, T.: Antinephritic effect of Y-19018, a thromboxane A₂ synthetase inhibitor, on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Japan J. Pharmacol.* 45, 177-185, 1987
- 15) 原中瑠璃子, 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
- 16) 谷澤久之, 沼野秀美, 小谷 功, 滝野吉雄, 林 輝明, 有地 滋: 薬用人参のサポニンに関する研究 (第 1 報) 酢酸コルチゾンによるラット副腎および胸腺萎縮ならびに血清 K⁺ 濃度低下に対する抑制作用. 薬誌 101, 1981
- 17) Parbtani, A. and Cameron, J.S.: Platelet and plasma serotonin concentrations in glomerulonephritis I. *Thromb. Res.* 15, 109-125, 1979
- 18) Vassali, P.O. and McCluskey, R.T.: The pathogenic role of the coagulation process in rabbit Masugi nephritis. *Amer. J. Path.* 45, 633-677, 1964
- 19) Matsuda, H., Kubo, M., Tani, T., Arichi, S. and Kitagawa, I.: Pharmacological study on *Panax ginseng* C.A. MEYER V. Effects of red ginseng on the experimental disseminated intravascular coagulation (4). *Shoyakugaku-Zasshi* 39, 123-125, 1985
- 20) 末川 守, 湯浅和典, 磯野正真, 曾根秀子, 池谷幸信, 細谷英吉: 生姜に関する薬理学的研究 (第 IV 報) (6) - Shogaol のアラキドン酸代謝に対する作用. 日薬理誌 88, 263-269, 1986
- 21) Abe, H., Sakaguchi, M., Anni, M. and Arichi, S.: Erythrocyte membrane stabilization by plant saponins and sapogenins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316, 262-265, 1981
- 22) 溝口靖弘, 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, 山本祐夫, 森沢成司: 免疫学的肝細胞障害に対する症の障害抑制作用. 肝胆臓 6, 947-951, 1983