

和漢薬方剤の抗腎炎効果に関する研究 (3) ラットの加速型 passive Heymann 腎炎に対する柴苓湯の効果

服部 智久, 鈴木 良雄*

名城大学薬学部薬理学教室

Studies on antinephritic effects of Japanese Kampo Medicine in rats (3) Effects of Sairei-to on accelerated passive Heymann nephritis in rats

Tomohisa HATTORI and Yoshio SUZUKI

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Meijo University

(Received July 5, 1989. Accepted October 4, 1989.)

Abstract

The present study was made to investigate the anti-nephritic effects of Sairei-to on accelerated passive Heymann nephritis in rats. Sairei-to (3.75 g/kg) prevented the urinary protein excretion on the 25th day and 35th day. In addition, Sairei-to (0.38 and 3.75 g/kg) was effective in inhibiting histopathological parameters (GBM thickening and spike formation). In order to clarify the mechanisms of Sairei-to on this model, we measured the serum corticosterone level. Sairei-to treatment group (3.75 g/kg) showed significantly higher level of it than that of the control group. These results indicate that Sairei-to has a beneficial effect and mechanism of it may be partly due to the corticosterone releasing action on accelerated passive Heymann nephritis in rats.

Key words accelerated passive Heymann nephritis, corticosterone, Sairei-to (Sairei-tô).

Abbreviation Sairei-to (Chai-Ling-Tang), 柴苓湯.

緒 言

最近, 和漢薬方剤ならびにその主要成分における病態モデルを用いた研究が種々な角度から検討されてきているが, 和漢薬方剤のなかでも柴苓湯は腎疾患に対する応用が最も期待されている。阿部ら¹⁾は柴苓湯がピューロマイシンアミノヌクレオシドネフローゼに対して尿中タンパク排泄をはじめ, 組織学的にも有効であることを電顕により検討している。また, 先に著者らはヒトの急速進行性糸球体腎炎のモデルであるラットの抗 glomerular basement membrane (GBM) 腎炎に対して柴苓湯が有効であることを報告した²⁾。

一方, 著者らはヒトの膜性腎症のモデルである passive Heymann 腎炎の発症をより確実にし, また, 重篤な腎炎状態の継続を目的として改良した加

速型 passive Heymann 腎炎モデルを開発し種々の薬物評価を行ってきた³⁾。そこで今回はこのモデルに対する柴苓湯の効果について検討し, さらにその作用機序の1つとして血清コルチコステロンの測定を行った。

材料と方法

(1) **実験動物**: 体重約 200 から 210 g の Sprague Dawley 系雄性 SPF ラット (日本 SLC) 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) を用いた。薬物を投与する際は柴苓湯エキス剤を 0.38 および 3.75 g/kg (ヒトの 1 日当りの 5 倍量と 50 倍量) さらにデキサメサゾン 0.3 mg/kg (東洋醸造) ならびにコルチコステロン 10 mg/kg (シグマ) を用いた。

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

(3) 加速型 passive Heymann 腎炎の惹起と薬液の投与：体重 200 から 210 g のラットにウサギ γ -globulin (シグマ社) 6.5 mg を注射用生理食塩水 0.25 ml 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。その翌日から Feenstra らの方法⁴⁾ に準じて作成した抗 Fx1A ウサギ血清 0.75 ml を 2 日間にかけて尾静脈に注射することにより腎炎を惹起した。抗血清を静注した日から柴苓湯、デキサメサゾンおよびコルチコステロンを 43 日間、1 日 1 回経口投与した。また被験薬物の代りに同量の水道水を経口投与した対照群と無処理の正常群を設けた。

(4) 採尿、採血および腎摘出：採尿は、5、15、25、および 35 日目に行った。ラットに 8 ml の水道水を強制投与した後ステンレス製代謝ケージに入れて絶食絶水で 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 12、26、43 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 1675 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-1,500) で 10 分間、5,000 rpm で遠心し上清を取り被検血漿とした。また実験最終日に全採血後、直ちに左腎摘出し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 Kingsbury⁵⁾ 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⁶⁾ 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 UN⁷⁾ 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) 血漿コルチコステロンの測定：コルチコステロンの測定は Zenker⁸⁾ の方法に準じて行った。AM 9:00 から AM 10:00 の間にラットを断頭して得られた血清を被験血清とした。

(7) 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) で希釈した alcohol (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ーム (YAMATO LS-113) により 2 から 3 μ m の切片を作製し、その切片について periodic acid methenamine 銀染色を施した。

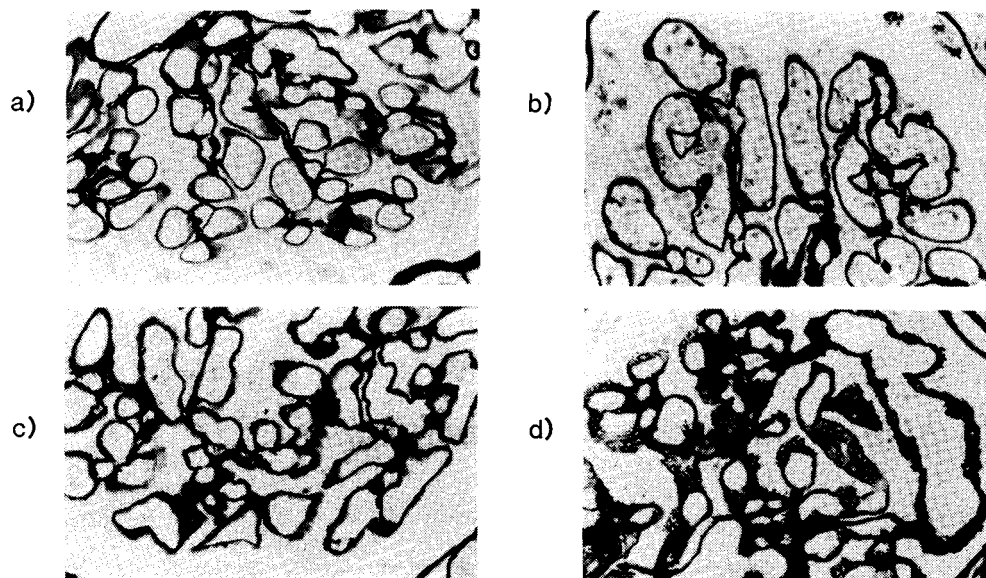


Fig. 1 Typical histopathological changes (spike formation and GBM thickening).
a) Normal glomeruli, b) Mild change, c) Moderate change, d) Severe change.

組織学的評価：組織学的評価は以前に報告した方法に準じた⁹⁾。各組織標本中50個の糸球体について基底膜の肥厚とスパイクの形成の2つの病理組織学的なパラメーターの病変の程度の割合を算出した。また、それぞれの病変の程度について Fig. 1 で示されている典型例を基本として mild には 1 点, moderate には 2 点, severe には 3 点を与え、各評価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指数, すなわち肥厚指数 (H.I) およびスパイク形成指数 (S.I) を算出した。

$$H.I, S.I = 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3$$

なお、組織の評価はすべて Blind 方式、すなわち各標本切片のナンバーリングが分からないようにカバーをかけ任意に選んだ後 2 人で行った。

(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. 飼育中の体重, 健康状態および尿量に対する効果

図表は省略したが、対照群ラットにおいて正常群と比較して有意な体重の減少が認められたが、柴苓湯投与群では対照群と比較して増加傾向がみられた。また、下痢などにより著しく体力の減少するラットはほとんど観察されなかった。また、実験期間中尿量に関しても対照群と柴苓湯投与群の間に著しい変化は認められなかった。

2. 尿中蛋白排泄量に対する効果 (Fig. 2)

対照群では15日目から著明なタンパク尿がみられ、その後、35日目まで約 200 mg/day の値を持続した。これに対して柴苓湯 0.38 g および 3.75 g/kg 投与群では25日目に約70%の抑制作用が認められ、さらに、35日目にも3.75 g/kg 投与群において30%の抑制が認められた。

3. 血漿コレステロール含量 (Table I) ならびに尿素窒素量 (Table II) に対する効果

コレステロール含量に対しては対照群は実験期間

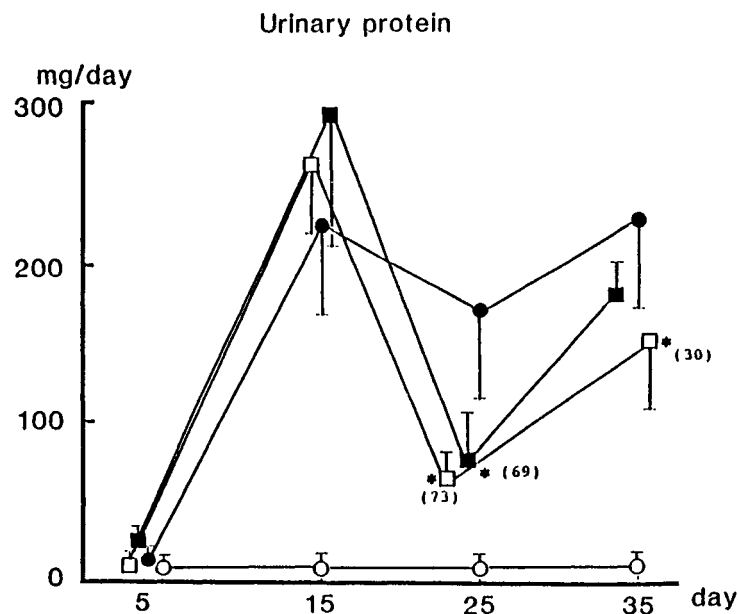


Fig. 2 Effect of Sairei-to on urinary protein excretion in accelerated passive Heymann nephritis in rats.

Test drug was given daily *p.o.* from the next day of intradermal injection of rabbit γ -globulin in FCA into the hind foot pads (1st day) to the 40th day. ○-○: Normal group, ●-●: Control group, □-□: Sairei-to 0.38 g/kg group, ■-■: Sairei-to 3.75 g/kg group. *: indicates a significant difference from the control at $p < 0.05$.

を通して 80–90 mg/dl 前後と正常群に比べて有意に増加した。これに対して柴苓湯投与群では抑制傾向が認められたものの統計学的な有意性は認められなかった。また、同様に尿素窒素量においても対照群と比較して抑制傾向を示した。

4. 糸球体の病理組織学的なパラメーターに対する効果 (Table III)

対照群ではほぼ100%の糸球体に糸球体基底膜の肥厚とスパイク形成が認められ、その index も 40.0 ± 2.8 および 35.4 ± 1.8 と高値を示した。一方、柴苓湯 0.38 g/kg 投与群では index が、それぞれ16.5%ならびに20.0%抑制されていた。また、3.75 g/kg 投与群では11.0%ならびに13.0%の抑制が認められた。

5. 血清コルチコステロンレベルに対する効果 (Fig. 3a)

このモデルにおける作用機序の1つとして柴苓湯の血清コルチコステロンレベル上昇作用について検討した。正常群が実験期間を通して約 $0.4 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して対照群では15日目以降にはほぼ0に近い値となり35日目には回復傾向を示した。しかしながら柴苓湯 (3.75 g/kg) を投与した群では15日目に70%、25日目に62%、35日目には64%の増加が認められた。また、データには示していないが正常ラットに柴苓湯を投与した場合でも血清コルチコステロンレベルの上昇が認められた。

6. コルチコステロンならびにデキサメサゾンの加速型 passive Heymann 腎炎に対する効果 (Fig.

Table I Effect of Sairei-to on plasma cholesterol contents in accelerated passive Heymann nephritis in rats. (mg/dl)

Groups	12	26	43 Days
Normal	57.3 ± 6.3	58.9 ± 12.8	52.5 ± 5.4
Control	$86.8 \pm 15.9^{*#}$	$98.3 \pm 39.1^{\#}$	$83.2 \pm 19.2^{*#}$
0.38 g/kg/day <i>p.o.</i>	81.0 ± 15.2	78.5 ± 12.5	75.0 ± 14.3
3.75 g/kg/day <i>p.o.</i>	78.7 ± 10.4	102.8 ± 39.6	79.4 ± 6.4

Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from 8 rats.

and ## show a significant difference from the normal at $p < 0.05$ and 0.01, respectively.

Table II Effect of Sairei-to on plasma urea nitrogen contents in accelerated passive Heymann nephritis in rats. (mg/dl)

Groups	12	26	43 Days
Normal	17.8 ± 2.7	13.2 ± 8.4	10.6 ± 3.2
Control	18.2 ± 5.5	18.4 ± 4.6	11.9 ± 3.3
0.38 g/kg/day <i>p.o.</i>	17.6 ± 3.1	17.2 ± 1.7	10.6 ± 0.6
3.75 g/kg/day <i>p.o.</i>	16.6 ± 0.7	15.6 ± 1.2	10.6 ± 1.2

Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from 8 rats.

Table III Effect of Sairei-to on glomerular histopathological parameters in accelerated passive Heymann nephritis in rats. (Index)

Groups	Basement membrane thickening	Spike formation
Control	40.0 ± 2.8	35.4 ± 1.8
0.38 g/kg/day <i>p.o.</i>	$33.4 \pm 5.8^{*}$ (16.5)	$28.4 \pm 7.2^{*}$ (20.0)
3.75 g/kg/day <i>p.o.</i>	$35.6 \pm 5.1^{*}$ (11.0)	$30.4 \pm 2.3^{**}$ (13.0)

Numbers indicate the mean $\pm$ S.D. obtained from 8 rats.

*and ** show a significant difference from the control at $p < 0.05$ and 0.01, respectively.

Numbers in parenthesis indicate a % inhibition to control.

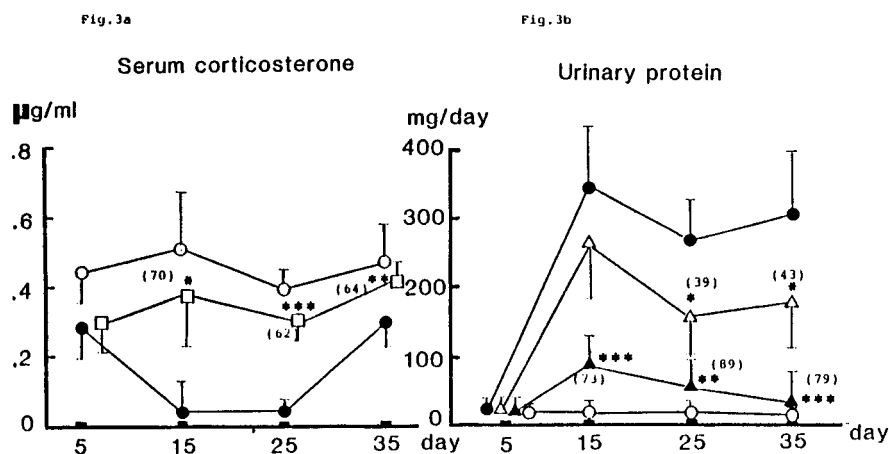


Fig. 3a Effect of Sairei-to on serum corticosterone level in accelerated passive Heymann nephritis in rats.

○-○: Normal group, ●-●: Control group, □-□: Sairei-to 3.75 g/kg group.

Fig. 3b Effects of corticosterone and dexamethazone on urinary protein excretion in accelerated passive Heymann nephritis in rats.

○-○: Normal group, ●-●: Control group, △-△: corticosterone 10 mg/kg group, ▲-▲: dexamethasone 0.3 mg/kg group. *, ** and *** indicate a significant difference from the control at $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 , respectively. Numbers in parenthesis indicate a % inhibition or stimulation to control. $\% = (C - T) \times 100 / (C - N)$. For other references, see the legend to Fig. 1.

3b)

実際に上昇した血清コルチコステロンレベルが抗腎炎効果を引き起こしているか否かを検討するため柴苓湯を投与した場合に上昇するコルチコステロンとほぼ同等の血中レベルを示すコルチコステロン量 (10 mg/kg) を与えた場合の効果と既知のステロイド剤 (デキサメサゾン 0.3 mg/kg) の効果について検討した。コルチコステロン 10 mg/kg を投与した群では25日目から有意に尿中蛋白排泄を抑制 (39%) がみられ、さらに35日目でも43%の抑制が認められた。さらにデキサメサゾン 0.3 g/kg においては実験期間中著明な (70%–90%) 抑制作用が認められた。また、データには示していないが組織病理学的にもこれらふたつの薬物は基底膜の肥厚ならびにスパイク形成に対する改善が見られた。

考 察

ヒトの膜性腎症の実験モデルである加速型 passive Heymann 腎炎は高度な蛋白尿、高脂血症、さらに組織学的には GBM のび慢性の肥厚ならびにスパイク形成が認められる³⁾。また、その発症機序としては抗 Fx1A 血清静注により、GBM の上皮側および上皮細胞表面に存在する糖蛋白 gp330 に対す

る *in situ* 免疫複合体形成に起因することが知られている⁹⁾。さらにウサギ γ グロブリンの投与により GBM に結合した抗 Fx1A 抗体に対する自己抗体の産生が増強され、さらに *in situ* 免疫複合体形成が生じ GBM の透過性の亢進、size および charge バリアの障害を引き起こす。また、抗 GBM 腎炎と異なり炎症細胞の関与は少なく、免疫複合体形成による補体の活性化がこの腎炎の発症と進展に大きな役割を演じている。我々は臨床的に腎炎治療に用いられている薬物についての評価を行ってきたが、このモデルに対しては免疫抑制剤のアザチオプリンやステロイド剤などに有効性が見出されているのみである³⁾。

今回の実験において加速型 passive Heymann 腎炎に対して柴苓湯は尿中蛋白排泄量ならびに組織学的にも GBM の肥厚やスパイクの形成を抑制した。また、腎炎によって低下したコルチコステロンを正常値に近い値にまで増加させた。柴苓湯のコルチコステロン分泌促進作用についての詳しい作用機序については不明であるが柴苓湯が脳層あるいは、ある種のサイトカインを介して^{11, 13)} コルチコステロンを分泌させているのではないかと考えられる。また、分泌増加作用の活性中心は柴胡ならびに甘草にあることを著者らは先に報告した¹⁰⁾。

一方、今回の実験においてステロイド剤のデキサメサゾンが著明な蛋白排泄抑制効果を示した。また、ステロイド作用ではデキサメサゾンよりはかなり劣るコルチコステロンも同様に蛋白排泄抑制作用が認められた。デキサメサゾンなどのステロイド剤は免疫系に抑制的に働くが、今回の実験における著明な蛋白抑制効果もこの免疫抑制作用が関与していると思われる。

コルチコステロンが腎組織に存在するレセプターに結合して phospholipase A₂ の阻害蛋白を産生することは以前に報告されている¹⁴⁾。一方、passive Heymann 腎炎においてもプロスタノイド産生による血行動態の低下が報告されており¹⁵⁾ プロスタノイドが腎炎の発症と進展に一部関与すると考えられる。したがって柴苓湯により生じたコルチコステロンの分泌上昇が、腎内の特異的蛋白を産生して血行動態の低下を改善している可能性が暗示される。

腎炎ラットにおけるコルチコステロンの低下の原因は血中蛋白に結合したコルチコステロンが尿中へ排泄されてしまうためか、あるいは抗 GBM 腎炎で見られるようなアルドステロンへの転換が亢進したためではないかと考えられる。先に著者らはコルチコステロンの産生阻害剤、メチラポンをこのモデルに投与するとパラメーターの悪化を認め（データ未発表）、また、抗 GBM 腎炎においても同様に蛋白尿をはじめとする生化学的パラメーターならびに組織学的パラメーターに対して悪化することを報告した¹⁰⁾。これらの知見はコルチコステロンが生体のホルモンとして腎炎によって崩れた恒常性を保つ役割を演じていることを示唆している。柴苓湯は、その恒常性の低下に対して、これらのホルモンの放出を亢進しているかもしれない。

最近、Heymann 腎炎は活性酸素の関与が大きな役割を演じていると報告されてきており¹⁶⁾ 補体活性化後の上皮細胞障害メカニズムについての研究が行われている¹⁷⁾。著者らも最近、柴胡を中心とした処方剤が活性酸素のスカベンジャーである SOD やグルタチオンペルオキシターゼの活性を亢進するという結果を得ている（データ未発表）。したがって柴苓湯の有効性にはコルチコステロン以外にも他の作用機序が存在する可能性があり現在検討中である。

結 論

1) 柴苓湯の 3.75 g/kg は加速型 passive Heymann 腎炎における蛋白尿を抑制し、また組織

学的病変である基底膜の肥厚やスパイク形成を抑制した。

2) 柴苓湯の 3.75 g/kg は腎炎で低下したコルチコステロンを上昇させた。

3) コルチコステロン 10 mg/kg は蛋白尿を抑制した。また、ステロイド剤のデキサメサゾンも著明に抑制した。

このことより柴苓湯はラットの加速型 passive Heymann 腎炎に対して有効であり臨床効果が期待できる。

文 献

- 1) 阿部博子, 織田真知子, 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, 1980.
- 2) 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 腎炎に対する柴苓湯の効果, 和漢医薬学会誌 **5**, 27-33, 1988.
- 3) Ito, M., Aono, Y., Suzuki, A., Nagamatsu, T., and Suzuki, Y.: Accelerated passive Heymann nephritis in rats as experimental model for membranous glomerulonephritis and effects of azathioprine and prednisolone on the nephritis. *Japan. J. Pharmacol.* **49**, 101-110, 1989.
- 4) Feenstra, K., Lee, R.V.D., Greben, H.A., Arends, A. and Hoedemaeker, Ph. J.: Experimental glomerulonephritis in the rats induced by antibodies directed against tubular antigens. I Influence of medication with prednisolone and azathioprine. A histological and immunohistological study at the light microscopic and the ultrastructural level. *Lab. Invest.* **32**, 243-250, 1975.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Searcy, R.L. and Cox, F.M.: A modified technique for ultramicro estimation of urea nitrogen. *Clin. Chem. Acta* **8**, 810-812, 1963.
- 8) Zenker, N. and Bernstein, D.E.: The estimation of small amount of corticosterone in rats plasma. *J. Biol. Chem.* **231**, 695-701, 1958.
- 9) Kerjaschki, D., Miettinen, A. and Farquhar, M.G.: Initial in the formation of immune deposits in passive heyman nephritis. *J. Exp. Med.* **166**, 109-128, 1987.
- 10) Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M. and Suzuki, Y.: Studies on anti-nephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicines, and its mechanisms (2) Effect on the release of corticosterone from adrenal glands. *Japan. J. Pharmacol.* **51**, 117-124.
- 11) 加藤寿一, 谷口嘉康, 壇上賢次, 太田康幸: サイコサボ

- ニンによるグルココルチコイド作用増強の機序について、
漢方と免疫アレルギー 1, 10-23.
- 12) Torres-aleman, I., Barasoain, I., Borrell, J. and Guaza, C. : Immune activation and psychoneurogenic stress modulate corticosterone-releasing effects of lymphokines and ACTH. *Am. J. Physiol.* **255**, 839-845, 1988.
 - 13) Nakamura, H., Motoyoshi, S. and Kadokawa, T. : Anti-inflammatory action of interleukin 1 through the pituitary-adrenal axis in rats. *European J. Pharmacol.* **151**, 67-73, 1988.
 - 14) Wallner, B.P., Mattaliano, R., Hession, C., Richard, L. C., Richerd, T., Sinclair, L.K., Foeller, C., Chow, E.P., Browning, J.L., Ramachandraw, K.L. and Pepimsky, B. : Cloning and express of human lipocortin, a phospholipase A₂ inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* **320**, 77-81, 1986.
 - 15) Thaiss, F., Germenn, P.J., Kahf, S., Schoeppe, W.H., Helmchen, U. and Stahl, R.K. : Effect of thromboxane synthesis inhibition in a model of membranous nephropathy. *Kid. In.* **35**, 76-83, 1989.
 - 16) Shah, S.V. : Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in passive Heyman nephritis in rats. *Am. J. Physiol.* **245**, 337-344, 1988.
 - 17) Ouigg, R.J., Cybulsky, A.V., Jacobs, J.B. and Salant, D. J. : Anti - Fx1A produces complement - dependent cytotoxicity of glomerular epithelial cells. *Kid. In.* **34**, 43-52, 1988.