

和漢薬方剤の抗腎炎効果に関する研究 (5)

ラットのダウノマイシン腎症に対する新処方剤, TJ-8014 (小柴胡湯去生姜加黄連茯苓) の効果

服部 智久, 伊藤 幹雄, 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 (5)

Effects of TJ-8014 on daunomycin-induced nephropathy in rats

Tomohisa HATTORI, Mikio ITO and Yoshio SUZUKI

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Meijo University

(Received March 15, 1990. Accepted July 12, 1990.)

Abstract

The present study was made to investigate the effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine on daunomycin-induced nephropathy in rats. TJ-8014 at 100 mg/kg/day *p.o.* prevented the urinary protein excretion by about 40% during the experimental periods. TJ-8014 at 50 and 500 mg/kg *p.o.* also inhibited it on the 30th and/or 40th day. Moreover, TJ-8014 (100 mg/kg/day *p.o.*) and prednisolone (3 mg/kg/day *p.o.*) inhibited the elevation of urinary *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. TJ-8014 at 100 mg/kg *p.o.* inhibited the elevation of plasma cholesterol content at the 44th day, while TJ-8014 at 50, 500 mg/kg *p.o.* and prednisolone failed to inhibit it. Light microscopic study on the 44th day indicated that TJ-8014 at 100 and 500 mg/kg/day *p.o.* suppressed the histopathological changes such as adhesion, decrease in nuclei, vacuolus and fibrosis in glomeruli. These results indicate that TJ-8014 at 100 mg/kg/day *p.o.* has a beneficial effect on daunomycin-induced nephropathy in rats. The mechanisms of action of this medicine should be carried out in future.

Key words daunomycin nephropathy, TJ-8014, Japanese herbal medicine.

緒 言

ダウノマイシンは anthracycline 系の抗生物質の 1 つで, 悪性腫瘍の化学療法剤として用いられているが, ラットに単回, 静脈投与することにより, 初期にはネフローゼを呈し, その後, 巣状糸球体硬化症 (focal glomerular sclerosis) が認められ, 徐々に腎不全へと移行するため, 最近, 腎不全の実験モデルとして用いられている¹⁾

一方, 我々はすでに和漢薬方剤, 柴苓湯²⁻⁴⁾ 小柴胡湯⁵⁾ ならびに小柴胡湯に茯苓と黄連を加え生姜を取り除いた新処方剤, TJ-8014 (小柴胡湯去生姜加黄連茯苓) がラットの抗 GBM 腎炎, 加速型 passive Heymann 腎炎ならびに puromycin amino-

nucleoside ネフローゼに対して有効であることを証明してきた^{6,9)}

そこで今回, ネフローゼから腎不全に至る実験モデルであるダウノマイシン腎症に対する TJ-8014 の効果についてプレドニゾロンと比較検討した。

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 20 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 TJ-8014 (ツムラから供与): サイコ(7), ハンゲ(5), ニンジン(3), オウゴン(3), タイ

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

ソウ(3), カンゾウ(2), ブクリョウ(3), オウレン(1)からなるエキス剤ならびにプレドニゾロン (Sigma) を用いた。薬物を投与する際は TJ-8014 エクス剤は 50, 100 および 500 mg/kg (ヒト 1 日量の 1/2 倍, 1 倍および 5 倍量に相当する), プレドニゾロンは 3 mg/kg を用いた。

3. ダウノマイシン腎症の惹起と薬液の投与

体重 200 から 210 g のラットにダウノマイシン (和光純薬) の 12 mg/kg を 1 回静脈投与することにより腎症を惹起させた。ダウノマイシンを投与した日から TJ-8014 ならびにプレドニゾロンを 45 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, 10, 20, 30 および 40 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た。

採血は 22 日目に行った。すなわちラットをラットホルダーに入れて固定し, 尾を約 45°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ブライ) 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・2Na・2H₂O (片山化学) を注射用生理食塩水 (大塚製薬) の 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: 尿中蛋白量は Kingsbury¹¹⁾ の方法に従って測定した。蛋白量は 24 時間尿当りの mg として示した。N-acetyl- β -D-glucosaminidase 活性は Hasebe の法¹²⁾ に従い, mU/day で示した。

血漿コレステロール量: 血中コレステロール量¹³⁾ は総コレステロール定量試薬, Determiner TC5 (協和メディックス) を用いて定量し血漿 1 dl 当りの mg として示した。

血漿尿素窒素量: 血漿尿素含量 (UN) は urease-indophenol 法で測定し, 血漿 1 ml 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 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マイクローム (YAMATO 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 Masson trichrome 染色を施した。

組織学的評価: すべての組織学的評価は観察者には判らないように Blind 方式で行った。また, 組織評価法は次のように行った。

癒着: 糸球体係蹄壁とポウマン囊との癒着を有する糸球体数 (n) を観察した糸球体数で割り, 百分率で示した。

核数: 糸球体で血管極を有するもののみを 10 個選りその核数を数えた。

空胞化: 空胞化は糸球体毛細管の 2 倍以上のものと定め, 1 つの糸球体中 1-2 個のものに 1 点, 3-4 個のものに 2 点, 5 個以上のものに 3 点の点数を与えその個数を掛け総加算した。これを index として示した。

線維化: 糸球体の半分以下が線維化しているものに 1 点, ほぼ半分が線維化しているものに 2 点, 半分以上が線維化しているものに 3 点を与え空胞化と同様な方法で処理した。

図ならびに表などに記載された () の抑制率は $(C-T) \times 100 / (C-N)$ [N: Normal, C: Control, T: Test drug] で算出した。

8. 統計学的処理

実験結果の統計学的有意性は ANOVA によって検討し, $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 一般臨床所見

図表には示さなかったが, 対照群ラットでは正常群と比較して体重の伸びの減少が認められた。TJ-8014 投与群では対照群と比較して統計学的な有意差はみられなかった。また, TJ-8014 投与群では, 下痢などもなく, 死亡するラットは観察されなかった。また, 実験期間中, 尿量に対しても対照群と TJ-8014 投与群との間に有意差は認められなかった。

2. 尿中蛋白排泄量に対する効果 (Fig. 1)

対照群では 10 日目から 100 mg/day 前後の蛋白尿がみられ, その後, 経日的に増加が認められた。これに対して TJ-8014 の 100 mg/kg 投与では 20, 30 ならびに 40 日目に約 40% の抑制がみられた。さらに

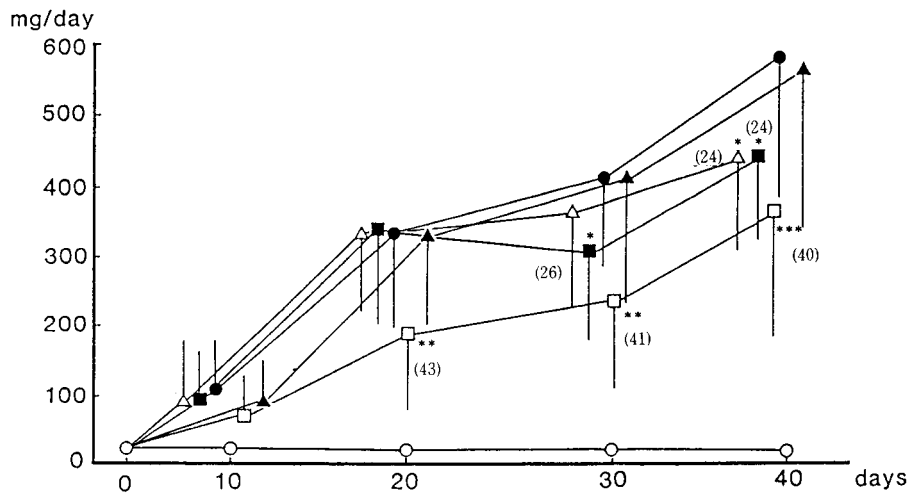


Fig. 1 Effects of TJ-8014 and prednisolone on urinary protein excretion in daunomycin-induced nephropathy in rats.

○—○, Normal ; ●—●, Control ; ■—■, TJ-8014 50 mg/kg ; □—□, TJ-8014 100 mg/kg ; △—△, TJ-8014 500 mg/kg ; ▲—▲, prednisolone 3 mg/kg. Numbers indicate mean ± S.D. from 20 rats. *, ** and *** show significant difference from the control at $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 , respectively. () : inhibitory rate.

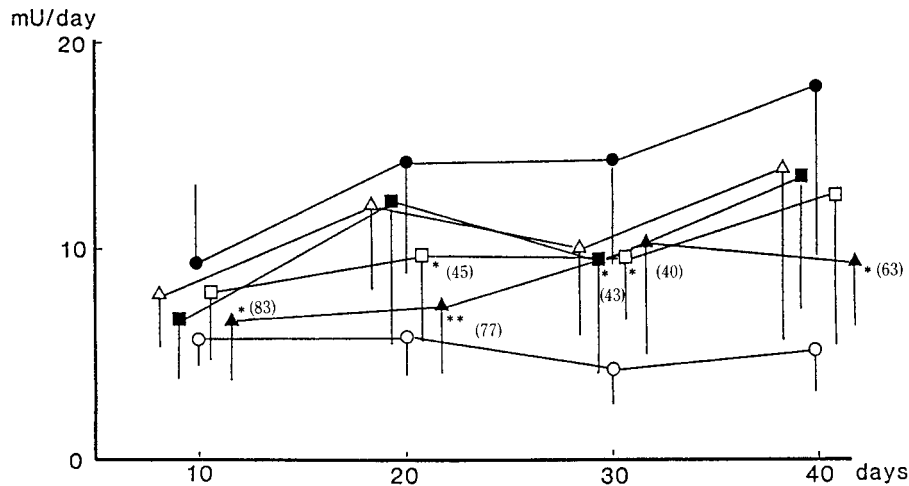


Fig. 2 Effects of TJ-8014 and prednisolone on *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in daunomycin-induced nephropathy.

○—○, Normal ; ●—●, Control ; ■—■, TJ-8014 50 mg/kg ; □—□, TJ-8014 100 mg/kg ; △—△, TJ-8014 500 mg/kg ; ▲—▲, prednisolone 3 mg/kg. Numbers indicate mean ± S.D. from 20 rats. * and ** show significant difference from the control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively. () : inhibitory rate.

50 mg/kg ならびに 500 mg/kg では 30 日目ならびに 40 日目に約 25% の抑制が認められた。しかしながら、プレドニゾロンの 3 mg/kg は無効であった。

3. 尿中 *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase 活性に対する効果 (Fig. 2)

対照群では正常群と比較して実験期間中高値を示

した。一方、TJ-8014 の 100 mg ならびにプレドニゾロンの 3 mg/kg では 40-80% の著明な抑制がみられた。

4. 血漿コレステロール含量に対する効果 (Fig. 3)

コレステロール含量に対しては対照群は実験期間

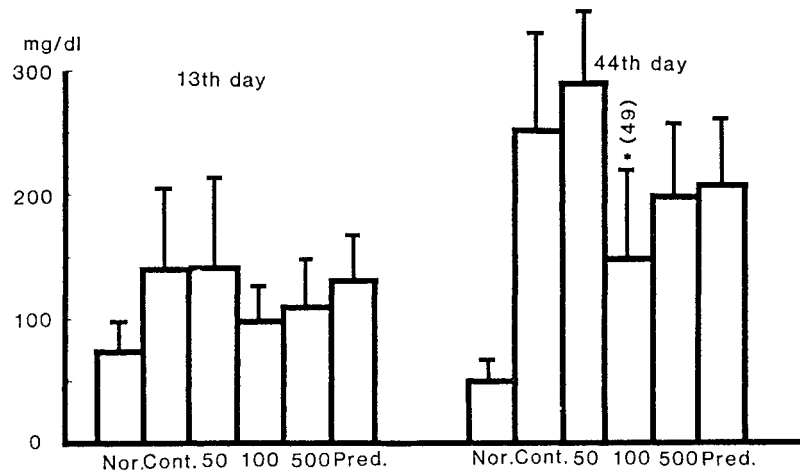


Fig. 3 Effects of TJ-8014 and prednisolone on plasma cholesterol content in daunomycin-induced nephropathy.

Nor., Normal; Cont., Control; 50, TJ 50 mg/kg; 100, TJ 100 mg/kg; 500, TJ 500 mg/kg; Pred., prednisolone 3 mg/kg. Numbers indicate mean \pm S.D. from 20 rats. * shows a significant difference from the control at $p < 0.05$. () : inhibitory rate.

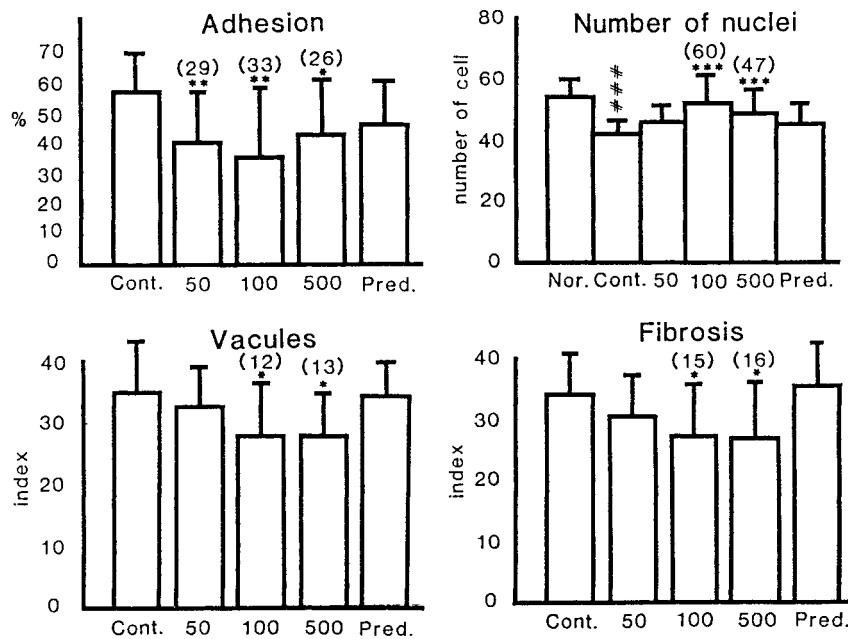


Fig. 4 Effects of TJ-8014 and prednisolone on histopathological changes in daunomycin-induced nephropathy in rats.

Nor., Normal; Cont., Control; 50, TJ 50 mg/kg; 100, TJ 100 mg/kg; 500, TJ 500 mg/kg; Pred., prednisolone 3 mg/kg. Numbers indicate mean \pm S.D. from 20 rats. ### shows a significant difference from the normal at $p < 0.001$. *, ** and *** show significant difference from the control at $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively. () : inhibitory rate.

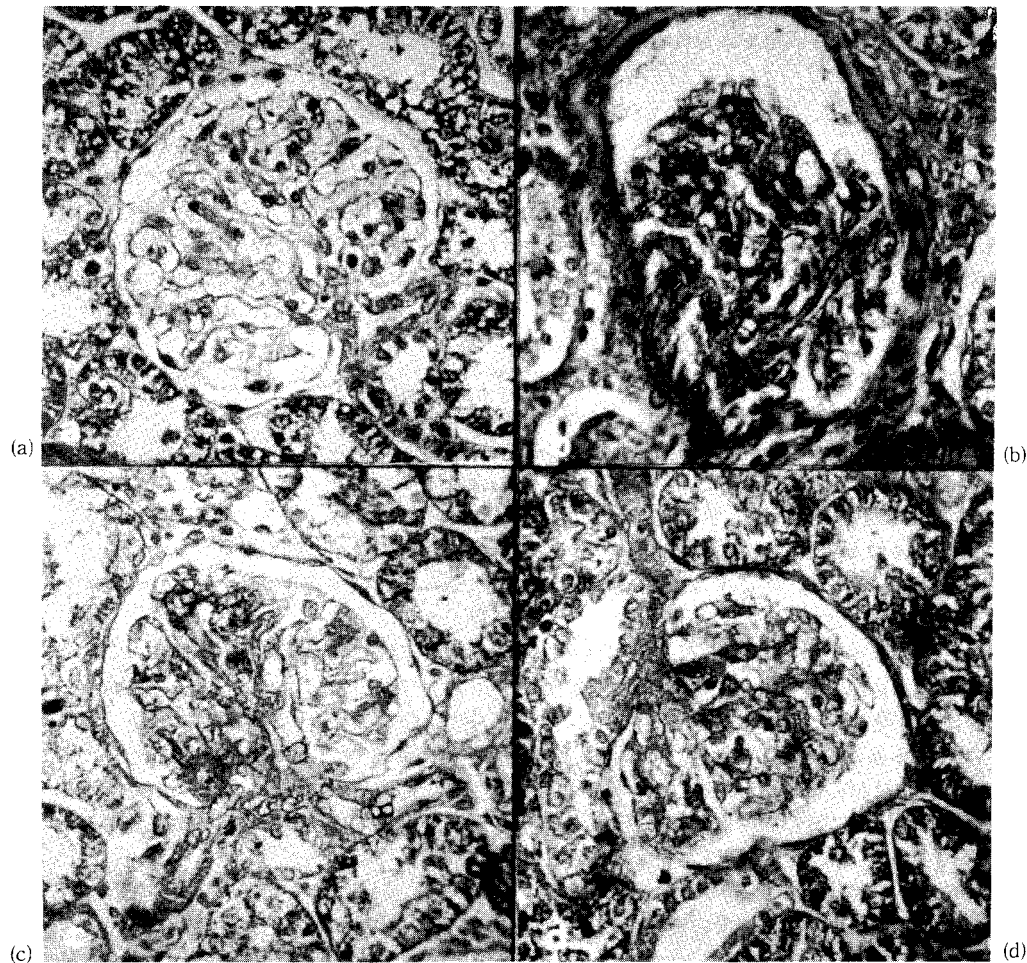


Fig. 5 Light micrographs of glomeruli from rats of the normal group (a) : control group (b) : group given TJ-8014, 100 mg/kg/day, *p.o.* (c) : group given TJ 8014, 500 mg/kg/day, *p.o.* (d).

の終了日 (44日) に 275 mg/dl と正常群に比べて有意な増加がみられた。これに対して TJ-8014 の 100 mg/kg では 49% の抑制が認められた。一方、プレドニゾロンの 3 mg/kg は単に抑制傾向を示すに留まった。

5. 血漿 UN 量に対する効果

対照群における 13 日目の血漿 UN 量では正常群と比較して著しい変化が見られなかった。また、薬物による効果も同様に認められなかった (データ未発表)。さらに 44 日目には、対照群では 20.3 ± 5.8 mg/dl と正常群 (11.7 ± 1.2 mg/dl) と比べ、有意 ($p < 0.01$ vs. normal group) な高値がみられた。これに対して、TJ-8014 投与群では抑制傾向が認められた (TJ-8014 50 mg-投与群; $18.6 \pm$

4.6 mg/dl, 100 mg-投与群; 17.3 ± 4.5 mg/dl, 500 mg-投与群; 19.4 ± 4.9 mg/dl)。一方、プレドニゾロン投与群では 21.9 ± 4.1 mg/dl と効果がみられなかった。

6. 糸球体の病理組織学的なパラメーターに対する効果 (Fig. 4)

対照群では糸球体の 55% に係蹄壁とポウマン囊との癒着が認められた。さらに糸球体の核数は減少し、空胞化、線維化が 98% の糸球体に認められた。Fig. 5 の b にはその典型的な組織像を示した。一方、TJ-8014 (100 mg/kg) は、癒着を約 30% 抑制し、また、100 ならびに 500 mg/kg では 50-60% の核数の低下を抑制した。また、空胞化や線維化についてもわずかに改善した (Fig. 5 の c と b)。し

かしながら、プレドニゾロン 3 mg/kg では糸球体の組織学的改善効果がまったくみられなかった。

考 察

今回の研究において、ダウノマイシン 12 mg/kg の処置されたラットでは著しい尿中蛋白排泄と高脂血症がみられ、ダウノマイシン投与後45日目の糸球体組織像は癒着、空胞化ならびに線維化が著しく、核数は減少し糸球体としての機能を失っているものが観察された。また、実験結果には示していないが尿細管傷害が著しく、それは尿中 NAG 活性の高値なラットにおいて特に認められた。一方、TJ-8014 の 100 mg/kg/day 投与により実験期間を通して尿中蛋白排泄が抑制され、50 mg ならびに 500 mg/kg 投与群でも実験期間の後期に抑制がみられた。さらに TJ-8014 投与群では組織学的にも病態の進行の遅延が観察された。プレドニゾロンは尿中 NAG 活性を抑制したにとどまった。

一方、ダウノマイシン腎症に対する TJ-8014 の有効性は 100 mg/kg 投与群において特に著明であり、用量依存反応を得ることができなかった。今回の実験結果における非用量反応についての原因は不明である。しかしながら和漢薬を用いた *in vitro* ならびに *in vivo* の研究において用量反応を有しない場合を数多く見かける。さらに先に阿部らの puromycin aminonucleoside 腎症を用いた実験では同様に柴胡剤である柴苓湯が尿中蛋白排泄を抑制したにもかかわらず、用量依存性を有しなかったことを認めている¹⁴⁾。これらの知見から、和漢薬方剤が多く成分を有しているため、その疾患に対して有効性を生じる成分の最適な血中濃度を得られる用量が suitable dose として存在し、さらに用量を増すことによって有効成分以外の成分の干渉作用が生じることが推測される。したがって、和漢薬方剤における有効用量には、生体側と多くの成分による薬効とのバランスが存在し、それが常に密接に関わっているものと思われる。

TJ-8014 のダウノマイシン腎症に対する有効性に関する詳細な作用機序については不明である。ダウノマイシンの構造はキノン体を主軸としており、これが生体の酵素系によって処理される際に活性酸素を放出し、抗菌、抗癌作用を発揮することが明らかにされている¹⁵⁾。この現象は正常組織内でも生じ、特に腎組織内での活性酸素の過剰産生により腎障害などを引き起こすことが知られている¹⁶⁾。一方、我々は TJ-8014 が正常ラットならびにビューロマイシ

ンアミノヌクレオシド腎症ラットのスカベンジャー活性を上昇させることを認めている（データ未発表）。したがって、TJ-8014 はダウノマイシンによるラジカル産生を消去することによりダウノマイシン腎症の進展を抑制したものと思われる。

TJ-8014 にはコルチコステロン分泌促進作用⁸⁾ も認められているが、今回プレドニゾロン（3 mg/kg）が無効であったことから TJ-8014 のダウノマイシン腎症に対する効果にコルチコステロン分泌促進作用の関与は少ないものと思われる。

結 論

1) TJ-8014 の 100 mg/kg *p.o.* では実験期間を通してこのモデルにおける蛋白尿の抑制がみられた。さらに 50 mg ならびに 500 mg/kg *p.o.* でも実験後期に蛋白尿の抑制が見られた。

2) TJ-8014 の 100 mg/kg *p.o.* は高脂血症を抑制した。

3) TJ-8014 は組織学的病変を抑制した。

4) プレドニゾロン（3 mg/kg/day *p.o.*）は尿中 NAG 活性についてのみ有効であった。

したがって TJ-8014 の 100 mg/kg *p.o.* 投与はラットのダウノマイシン腎症に対して有効であり今後、作用機序について検討する必要がある。

文 献

- 1) 清水 潔, 柴田昌雄: *Daunomycin rats* に関する研究, 日腎誌 4, 345-351, 1989.
- 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) 服部智久, 鈴木良雄: 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, 和漢医薬学会誌 6, 108-114, 1989.
- 4) 鈴木良雄, 服部智久: 柴苓湯の血小板凝集能抑制作用—ラットの抗 GBM 腎炎を中心に, 漢方医学 9, 17-20, 1989.
- 5) 服部智久, 鈴木良雄: 和漢薬方剤の抗腎炎効果に関する研究(4)ラットの puromycin aminonucleoside 腎症に対する柴苓湯の効果と作用機序としてのスカベンジャー上昇作用, 和漢医薬学会誌 7, 12-17, 1990.
- 6) 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(2)ラットの半月体タイプ抗 GBM 腎炎に対する小柴胡湯の効果, 和漢医薬学会誌 5, 34-40, 1988.
- 7) Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M. and Suzuki, Y.: Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanisms (1): Effects on original-type anti-GBM nephritis in rats and platelet aggregation. *Japan. J. Pharmacol.* 50, 477-

- 485, 1989.
- 8) Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M. and Suzuki, Y. : Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanisms (2) : Effects on the release of corticosterone from adrenal glands. *Japan. J. Pharmacol.* **51**, 117-124, 1989.
- 9) Hattori, T., Ito, M., Nagamatsu, T. and Suzuki, Y. : Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine (3) : Effects on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Japan. J. Pharmacol.* **52**, 131-140, 1990.
- 10) Hattori, T., Ito, M., Nagamatsu, T. and Suzuki, Y. : Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine and its mechanisms (4) : Effects on accelerated passive Heymann nephritis in rats. *Japan. J. Pharmacol.*, in press.
- 11) 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.
- 12) Hasebe, K. : Biochemical studies on synovial fluid. (1) Mucopolysaccharase activity in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Fukushima J. Med. Sci.* **15**, 35-44, 1968.
- 13) 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.
- 14) Searcy, R.L. and Cox, F.M. : A modified technique for ultramicro estimation of urea nitrogen. *Clin. Chem. Acta* **8**, 819-820, 1963.
- 15) Tsutsui, T., Umeda, M., Maizumi, H. and Saito, M. : Comparison of mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations in cultured mouse cells by potent mutagens. *Gann* **68**, 609-617, 1977.
- 16) Sternberg, S.S. : Cross-striated fibrils and other ultrastructural alteration in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis. *Lab. Invest.* **23**, 39-51, 1970.