

和漢薬方剤の利水作用に関する薬理学的研究 その薬理学スクリーニングの応用と評価

馮 奕斌,^{a,d)} 永松 正,^{b)} 鈴木 良雄,^{*b)} 河田 哲也,^{a)}
馮 奕剛,^{c)} 小林 清一,^{d)} 小池 隆夫,^{a)}

^{a)}北海道大学医学部第二内科講座, ^{b)}名城大学薬学部薬理学教室,
^{c)}北海道大学歯学部歯科薬理学講座, ^{d)}北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科

Pharmacological studies on the diuretic action of Wakan-yaku formulations: The application and evaluation of its pharmacological screening

Yibin FENG,^{a,d)} Tadashi NAGAMATSU,^{b)} Yoshio SUZUKI,^{*b)} Tetsuya KAWATA,^{a)}
Yigang FENG,^{c)} Seiichi KOBAYASHI,^{d)} Takao KOIKE^{a)}

^{a)}Department of Medicine II, Hokkaido University School of Medicine, ^{b)}Department of Pharmacology, Faculty of Health-Care Pharmacy, Meijio University, ^{c)}Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Hokkaido University, ^{d)}Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology, Hokkaido University

(Received September 7, 1999. Accepted April 6, 2000.)

Abstract

According to clinical observation, three Wakan-yaku formulations: Hoki-kenchu-to (Bu-Qi-Jian-Zhong-Tang, TJS-210); Hochu-jisitsu-to (Bu-Zhong-Zhi-Si-Tang, TJS-213); Boi-to (Fang-Ji-Tang, TJS-217) could be beneficial in patients with edema disorder such as chronic renal disease, cirrhosis and congestive heart failure. So far, no experimental study has been done for these formulations. Briefly, we put the main focus on their diuretic activity. Normal rats and various pathological models were used for analysis. The present investigation has documented that the three formulations, TJS-210, TJS-213 and TJS-217 possess diuretic activity in normal rats and diseased models. Especially, TJS-210, TJS-213 and TJS-217 showed diuretic activity in normal rats. All formulations except TJS-213 significantly increased urine volume in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrosis. The diuretic activity of all formulations in hepatic damage model by CCl₄ were presented, two of which, TJS-210 and TJS-217, also tend to decrease serum GPT and GOT levels. Although the diuretic action of all formulations in the nephritic rats with anti-GBM nephritis was not evident, TJS-210 significantly decreased serum urea nitrogen levels. These results confirmed that all formulations have significant diuretic effect, which is dependent on the proper dose and the pathophysiology of the edematous disorders. That is, an effective match of optimal dose (no dose-dependent fashion) and pathophysiologic state is essential in order to exert diuretic action of the four formulations. These findings were thought to be important approaches for screening and studying pharmacodynamics of traditional medicine.

Key words diuretic activity, Wakan-yaku formulations, optimal dose, normal rats, disease models, shou (zheng), pharmacological screening.

Abbreviations Anti-GBM, Anti-glomerular basement membrane; BUN, Blood urea nitrogen; Boi-to (Fang-Ji-Tang), 防己湯; Cr, Creatinine; CCr, Creatinine clearance; GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, Glutamic pyruvic transaminase; Hoki-kenchu-to (Bu-Qi-Jian-Zhong-Tang), 補氣建中湯; Hochu-jisitsu-to (Bu-Zhong-Zhi-Shi-Tang), 補中治湿湯.

緒 言

これまでに、数多くの単味漢方薬の化学的、薬理学的特性が明らかになっている。また、『傷寒論』や『金匱要略』の方剤の薬理に関しても基礎ならびに臨床の研究対象となり、漢方方剤の作用についての理解は深まったが、これらの方剤は症候への対応という点で臨床のニーズに十分に應えるには至っていない。一方、中国では『普濟方』に記されている六万以上の方剤の他にも、数多くの漢方方剤が使用されているが薬理学的研究は未だ不十分であると言わざるをえない。それゆえ、それらの方剤の効果を薬理学的に研究することにより、西洋医学では対応できない多くの疾患に対するより有効な薬方を見出す可能性が秘められている。

補氣建中湯¹⁾、補中治湿湯²⁾、防己湯³⁾は慢性腎炎、ネフローゼ、肝不全、心不全による浮腫や腹水などに対して、臨床的に有効であるとされる。腎臓、肝臓および心臓は東洋医学においても西洋医学と同様に生体内の水分の分布と排泄に重要な役割を果たしていると考えられている。こうした臓器の機能障害によりもたらされる浮腫や腹水に対しては、利尿効果を期待して漢方薬が使用されることも多い。われわれはこうした和漢薬方剤のうち4方剤の利尿作用を実験的に証明し報告した⁴⁾。今回はさらに、この中の3方剤の利尿作用の発現の至適用量、ならびに病態におけるその作用特性の相違を検討するために、正常ラットおよび各種病態モデルを用いてその作用を薬理学的手法により比較検討したので報告する。

材料と方法

(1) 使用漢方方剤：補氣建中湯(TJS-210)、補中治湿湯(TJS-213)と防己湯(TJS-217)の乾燥エキスは株式会社ツムラ(東京)より提供を受けた。それぞれの生薬構成をTable Iに示した。方剤はすべてTable Iの各種用量で10 ml/kgの投与量になるように精製水に溶解した。

(2) 実験動物：7週齢の体重約200 gのWistar系雄性ラット(日本クレア、東京)と6週齢の体重約170 gのSprague-Dawley系雄性ラット(日本クレア、東京)に

実験開始までの1週間、固型飼料(MM-3株式会社船橋農場、千葉)と水道水を自由に摂取させ、1群5匹として実験に使用した。飼育環境は実験期間中恒温(22±2°C)、恒湿(55±5%)、照明時間6:00-18:00とした。

(3) 利尿試験：ラットを自由飲水下で18時間絶食し、Table Iの用量あるいはその一部の用量で被検方剤をそれぞれ一回経口投与し、対照群には精製水のみを投与した。その後、1匹ずつステンレス製代謝ケージに入れ、5時間尿を採取した。また、採尿終了後直ちにether麻酔下で腹部大動脈より採血し、3000 rpmで15分間遠心分離して、血清を得た。尿量、尿中と血中の電解質(Na⁺, K⁺)、creatinine (Cr), creatinine clearance (CCr)を測定した。

(4) 急性腎不全ラット：Wistar系ラットにHgCl₂ 1 mg/kg(和光純薬、大阪)を背部皮下に投与し^{5,6)}30時間後に(3)の方法で利尿試験を行い、採血後に左腎を摘出した。腎は後述のごとく処理し、光学顕微鏡にて組織を観察して腎障害の程度を確認した。

(5) ネフローゼラット：Sprague-Dawley系ラットにPuromycin aminonucleoside 100 mg/kg (Sigma, MO, USA)を腹腔内投与し^{7,8)}7日目に精製水8 mlを経口投与した後、絶食、絶水下に24時間尿を採取し、尿蛋白を測定した。各群の平均尿中蛋白排泄量(protein mg/24 hr urine)がほぼ等しくなるように動物を1群5匹に分配した(対照群: 342±30, TJS-210: 345±20, TJS-213: 345±40, TJS-217: 340±20)。11日目に(3)の方法で利尿試験を行い、腎の組織標本を作成し、組織の観察を行った。

(6) オリジナル抗GBM腎炎ラット：Suzuki *et al.*の方法⁹⁾に準じて行った。Sprague-Dawley系ラットの尾静脈にウサギ抗ラットGBM血清0.75 ml/ラットを注射し、直ちに(5)と同様の方法で24時間尿を採取し、各群の平均尿蛋白排泄量(protein mg/24 hr urine)がほぼ等しくなるように動物を1群5匹に分配した(対照群: 272±50, TJS-210: 275±56)。その後(3)の方法で利尿試験を行い、(5)と同様に病理組織標本を作成し、腎組織の観察を行った。

(7) 急性肝障害ラット：Wistar系ラットに10% CCl₄ olive油溶液(和光純薬、大阪)を1 ml/kgで腹腔

内投与し、¹⁰⁾ (3)の方法で利尿試験を行なった。また、Wistar系ラットに10% CCl₄ olive油溶液を3ml/kgで腹腔内投与し、重篤急性肝不全を惹起し、54時間後に(3)の方法で利尿試験を行なった。いずれも採血後に肝臓を摘出して、後述のごとく病理組織の作成を行い肝障害の程度を光学顕微鏡で確認した。

(8) 測定

1) 尿および血清電解質：Na⁺およびK⁺は自動蛍光光度計(480 Corning, CIBA CORNING DIAGNOSTICS, 東京)により測定した。

2) 尿および血清Cr：酵素法により、試薬キットCRE-EN カイノス(株式会社カイノス, 東京)と吸光度計(Shimadzu UV-160A, 京都)を用いて測定した。

3) クレアチニンクリアランス(CCr)：次の式で求めた。

$$CCr = \frac{U_x + V_x}{P_x}$$

U_x: Crの尿中濃度, V_x: 単位時間あたりの尿量,
P_x: 血中濃度。

4) 尿蛋白量: Kingsbury *et al.*の方法¹¹⁾に準じ、吸光度計(Shimadzu UV-160A)を用いて測定した。

5) Blood urea nitrogen (BUN), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) および glutamic pyruvic transaminase (GPT): 酵素法により, BUNは試薬キットBUN カイノス(株式会社カイノス, 東京)を, GOTおよびGPTはTA-LN カイノス(株式会社カイノス, 東京)を用いて定量した。

6) 腎臓および肝臓の組織切片の作製, 染色: 摘出腎臓および肝臓をphosphate buffered 10% formalinで24時間固定し、水洗後漸強alcohol系列中に入れ完全に脱水した。その後、benzeneおよび溶融paraffin中に入れparaffinを浸透させた後包埋した。Paraffinブロックから滑走式マイクロームによって、3μmの厚さの切片を作製し、これにヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡(オリンパスBOH-D型, オリンパス, 東京)で観察した。

(9) 統計処理: 各実験の測定値と結果は平均±標準誤差として示し、また有意差の検定は、ANOVA Duncan multiple range test および Nonparametric statisticsで行い、いずれも危険率 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結 果

1. 正常ラットに対する利尿作用 (Fig. 1, Table II)

正常ラットにおいて、各種の用量(125, 250, 500,

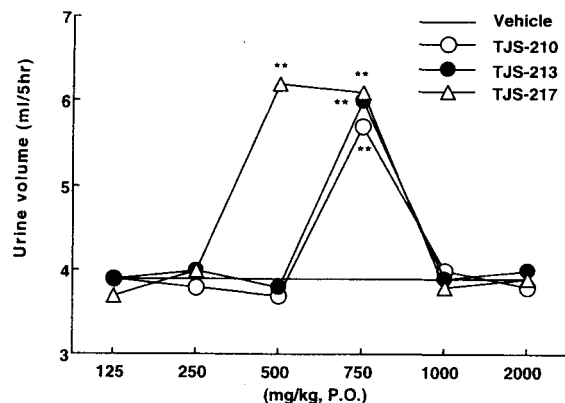


Fig. 1 Effect of three Kampo formulations on urine volume in normal rats.

Each value expresses the mean±S.E. obtained from 5 rats (S.E. is not shown for sake of visibility). Significant difference from control: ** $p < 0.01$. Wistar rats were used in this experiment.

750, 1000, 2000 mg/kg)を用いて、被検方剤の利尿効果をスクリーニングした。Fig. 1に示すごとく、3方剤に500~750 mg/kgの投与量で著明な利尿効果を認めたが、それ以上に用量を増加しても利尿効果および尿中電解質の増加は認められなかった。750 mg/kgのTJS-210, TJS-217および500 mg/kgのTJS-213投与群で対照群と比較して尿量、尿中のNa⁺, K⁺, およびNa⁺/K⁺比の有意な増加が認められた (Table II)。

2. 急性腎不全ラットに対する利尿作用

HgCl₂で惹起した急性腎不全のラットを用いて、各種の用量で3方剤の利尿作用を検討した。データは示さないが、いずれの方剤にも利尿作用は認められなかった。

3. ネフローゼモデルに対する利尿作用 (Table III)

Puromycin処置後7日目で尿中タンパク排泄量が300 mg/day以上を示すネフローゼラットにおいて各種の用量で利尿作用についてスクリーニングした。Puromycin処置後11日目において750 mg/kgのTJS-210あるいはTJS-217を投与した場合に尿量、Na⁺の尿中排泄と尿中のNa⁺/K⁺比は有意に増加した。しかしTJS-213については尿量の増加傾向にとどまった。データは示していないが、タンパク尿に対していずれの方剤も影響を示さなかった。

4. オリジナル抗GBM腎炎ラットに対する利尿作用 (Table IV)

抗GBM血清の静脈注射により腎炎を惹起後、直ちに被検方剤を各種用量で投与したが、3方剤とも利尿作用を示さなかった。しかし、TJS-210の500 mg/kg投与群では対照群と比較し、血中尿素窒素濃度の有意な減少を

Table I Composition of Kampo formulations and its experimental dose (extract).

Kampo formulations	Relative dose of each Simple drug (g)	Human dose (mg/kg/day)	Rat dose (mg/kg/day)
補気建中湯 TJS-210	Atractylodis Rhizoma (白朮)「局方」 Hoelen (茯苓)「局方」 Aurantii Nobilis Pericarpium (陳皮)「局方」 Ginseng Radix (人參)「局方」 Scutellariae Radix (黃芩)「局方」 Magnolia Cortex (厚朴)「局方」 Alisma Rhizoma (沢瀉)「局方」 Ophiopogonis Tuber (麦門冬)「局方」 Atractylodis Lancea Rhizoma (蒼朮)「局方」	3.0 3.0 2.5 3.0 2.0 2.0 2.0 2.0 2.5	100 125, 250, 500, 750, 1000, 2000
補中治湿湯 TJS-213	Atractylodis Rhizoma (白朮)「局方」 Hoelen (茯苓)「局方」 Aurantii Nobilis Pericarpium (陳皮)「局方」 Atractylodis Lancea Rhizoma (蒼朮)「局方」 Ginseng Radix (人參)「局方」 Scutellariae Radix (黃芩)「局方」 Magnolia Cortex (厚朴)「局方」 Akebiae Caulis (木通)「局方」 Ophiopogonis Tuber (麦門冬)「局方」 Cimicifugae Rhizoma (升麻)「局方」 Angelicae Radix (当歸)「局方」	4.0 3.0 3.0 3.0 4.0 2.0 2.0 3.0 3.0 0.3 3.0	145 125, 250, 500, 750, 1000, 2000
防己湯 TJS-217	Sinomeni Claulis Et Rhizoma (防己)「局方」 Mori Cortex (桑白皮)「局方」 Hoelen (茯苓)「局方」 Preilla Herba (紫蘇葉)「局方」 Saussureae Radix (木香)「局方」	4.0 2.0 8.0 1.0 1.0	35 125, 250, 500, 750, 1000, 2000

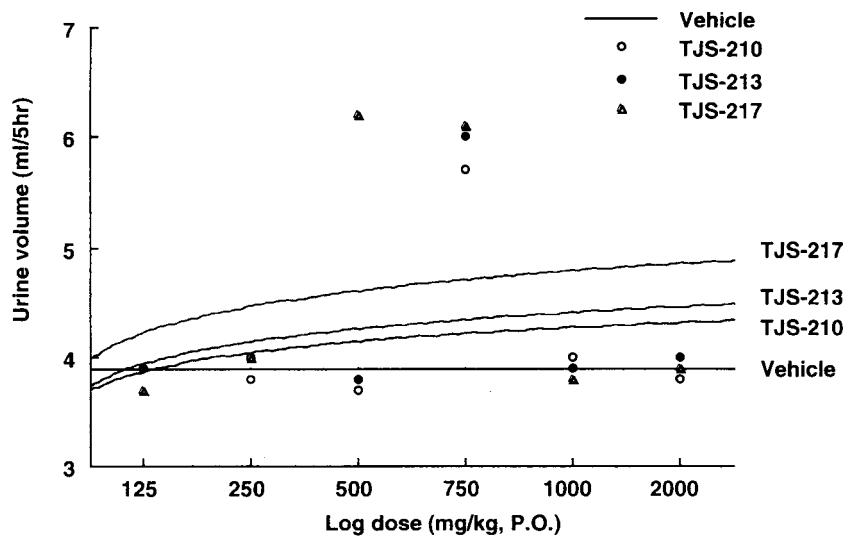


Fig. 2 Dose response curve for diuretic action of three Kampo formulations in normal rats. They do not display typical "S" shape, reflecting one characteristic of Kampo formulations which is non dose-dependent fashion, but optimal dose-reaction to diuretic action.

Table II Effect of three Kampo formulations on the urine volume, electrolytes and Ccr in normal rats.

Drugs	Dose (mg/kg, P.O.)	Urine volume (ml/5 hr)	Na ⁺ (mEq/5 hr)	K ⁺ (mEq/5 hr)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio)	Ccr (ml/min)
Control	Vehicle	3.7±0.7	0.20±0.08	0.16±0.02	1.25±0.48	0.79±0.10
TJS-210	750	5.4±0.5**	0.34±0.10*	0.22±0.08*	1.44±0.48	0.83±0.04
TJS-213	750	5.8±1.0**	0.49±0.08*	0.22±0.01*	2.23±0.49*	0.80±0.09
TJS-217	500	6.4±0.5**	0.40±0.16*	0.23±0.06*	1.79±0.78*	0.68±0.16
	750	5.6±0.2**	0.44±0.05*	0.32±0.02*	1.34±0.11	0.67±0.09

Each value represents the mean±S.E. obtained from 5 rats.

Significant difference from the control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table III Effect of three Kampo formulations on the urine volume, electrolytes and urinary protein in glomeruli of PAN in rats on 11th day.

Drugs	Dose (mg/kg, P.O.)	Urine volume (ml/5 hr)	Na ⁺ (mEq/5 hr)	K ⁺ (mEq/5 hr)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio)	Urinary protein (mg/5hr)
Normal	Vehicle	6.0±0.8	0.45±0.06	0.36±0.06	1.18±0.20	2.1±0.15
Control	Vehicle	6.8±0.8	0.44±0.10	0.60±0.12	0.75±0.20	58.6±21.5
TJS-210	750	8.9±0.6**	0.69±0.09**	0.57±0.19	1.29±0.31**	56.7±16.7
TJS-213	750	7.6±1.0	0.44±0.14	0.63±0.15	0.69±0.19	62.8±25.5
TJS-217	750	8.1±0.9**	0.60±0.12*	0.57±0.12	1.05±0.13*	58.0±13.3

Each value represents the mean±S.E. obtained from 5 rats.

Significant difference from the control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table IV Effect of three Kampo formulations on the urine volume, electrolytes and BUN levels in original-type anti-GBM nephritis in rats.

Drugs	Dose (mg/kg, P.O.)	Urine volume (ml/5 hr)	Na ⁺ (mEq/5 hr)	K ⁺ (mEq/5 hr)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio)	BUN (mg/dl)
Normal	Vehicle	3.1±1.2	0.26±0.14	0.39±0.13	0.66±0.13	7.9±0.3
Control	Vehicle	4.9±2.7	0.15±0.13	0.43±0.14	0.33±0.20	16.3±2.7
TJS-210	500	3.3±1.4	0.10±0.07	0.42±0.17	0.24±0.12	12.7±1.4**

Each value represents the mean±S.E. obtained from 5 rats.

Significant difference from the control: ** $p < 0.01$.

認めた。

5. 急性肝障害モデルに対する利尿作用 (Table V, Table VI)

この病態モデルにおいては、まず 10 % CCl₄ olive 油溶液 1 ml/kg 投与直後に、それぞれの和漢薬方剤を投与した。3 方剤とも 750 mg/kg で有意な尿量と尿中の Na⁺, K⁺ の増加を認めた。しかし、いずれの方剤も血中の GOT, GPT の値に影響を及ぼさなかった (Table

VI)。さらに、10 % CCl₄ olive 油溶液 3 ml/kg でより重度な急性肝障害を惹起した。CCl₄ 投与後 3 日目に TJS-210 および TJS-217 をそれぞれ 750 mg/kg で投与した。これらの方剤を投与された群は対照群と比較し、軽度肝障害ラットの場合と同様に尿量と尿中への Na⁺, K⁺ 排泄の有意な増加を、また、GOT, GPT の減少傾向を示した (Table VII)。

Table V Effect of three Kampo formulations on the urine volume, electrolytes and serum GOT, GPT in 1ml/kg CCl₄ (10 % olive oil)-induced acute hepatic damage in rats.

Drugs	Dose (mg/kg, P.O.)	Urine volume (ml/5hr)	Na ⁺ (mEq/5 hr)	K ⁺ (mEq/5 hr)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Normal	Vehicle	4.8±0.1	0.26±0.05	0.19±0.03	1.34±0.34	106.2±15.2	25.5±2.1
Control	Vehicle	5.3±0.6	0.35±0.19	0.19±0.02	1.93±0.37	497.3±93.8	135.0±48.5
TJS-210	750	7.6±0.9**	0.49±0.11*	0.19±0.04	2.85±1.36	530.8±180.5	131.1±49.2
TJS-213	750	7.9±2.0**	0.76±0.24**	0.35±0.03**	2.11±0.42	440.1±125.9	117.7±32.8
TJS-217	750	6.9±0.3**	0.56±0.15**	0.35±0.05**	1.53±0.46	490.8±111.3	135.3±16.5

Each value represents the mean±S.E. obtained from 5 rats.

Significant difference from the control : **p*<0.05, ***p*<0.01.

Table VI Effect of three Kampo formulations on the urine volume, electrolytes and serum GOT, GPT in 3 ml/kg CCl₄ (10 % olive oil)-induced acute hepatic damage in rats.

Drugs	Dose (mg/kg, P.O.)	Urine volume (ml/5hr)	Na ⁺ (mEq/5 hr)	K ⁺ (mEq/5 hr)	Na ⁺ /K ⁺ (ratio)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Normal	Vehicle	3.4±0.1	0.11±0.04	0.36±0.03	0.32±0.12	74.6±5.8	27.9±2.0
Control	Vehicle	3.9±1.7	0.15±0.03	0.32±0.06	0.50±0.13	767.9±379.1	285.1±139.1
TJS-210	750	6.5±2.0*	0.27±0.11**	0.63±0.13**	0.45±0.24	458.4±294.4	199.4±134.0
TJS-217	750	6.4±0.7**	0.26±0.09**	0.53±0.08**	0.49±0.19	456.0±347.9	165.3±176.8

Each value represents the mean±S.E. obtained from 5 rats.

Significant difference from the control : **p*<0.05, ***p*<0.01.

Table VII Pharmacological actions of each simple drug from four Kampo formulations in this study.

Simple drugs of component	Diuretic activity	Other pharmacological activities*
AR	+12)	Antiulears, hepatoprotection, hypoglycemic effects.
H	+13,14)	Antinephritic, hepatoprotective and anti-tumor effects.
ANP	—	Antiulears, antiinflammatory and antiallergic effects.
GiR	—	Stimulate to hemopoietic function, free radical scavenging effects.
SR	—	Hepatoprotection, antiinflammatory and antiallergic effects.
MaC	—	antiulears, muscle relaxation, central inhibitory effects.
AlR	+12,15)	Hypolipemic, lipotropic effects.
OT	—	Immunosuppressive and hypoglycemic effects.
ALR	—	Hypoglycemic, antitumor effects.
AC	+12,13)	Antimicrobial effect.
CR	—	Antipyretic, antiinflammatory, analgesic and hepatoprotective effects.
AnR	—	Increase coronary flow, inhibition of platelet aggregation.
SCR	—	Analgesic, antiinflammatory, antiallergic and antineoplastic effects.
MC	+16)	Cathartic, hypotensive, hypoglycemic effects.
PH	—	Antimicrobial, antipyretic and sedative effects.
SaR	—	Spasmolytic, antimicrobial effects.

*Pharmacological activities were summarized and based on Nihon Yakkyokuho Shoyaku Sosoku.

Abbreviations: Atractylodis Rhizoma, 白朮, AR; Hoelen, 茯苓, H; Aurantii Nobilis, Pericarpium, 陳皮, ANP; Ginseng Radix, 人參, GiR; Scutellariae Radix, 黃芩, SR; Magnolia Cortex, 厚朴, MaC; Alisma Rhizoma, 沢瀉, AlR; Ophiopogonis Tuber, 麦門冬, OT; Atractylodis Lancea Rhizoma, 蒼朮, ALR; Akebiae Caulis, 木通, AC; Cimicifugae Rhizoma, 升麻, CR; Angelicae Radix, 當歸, AnR; Sinomeni Caulis et Rhizoma, 防己, SCR; Mori Cortex, 桑白皮, MC; Perilla Herba, 紫蘇葉, PH; Saussureae Radix, 木香, SaR.

考 察

本研究では3種の和漢薬方剤の未だ十分に解明されていない利尿作用を薬理学的に検証するために、正常ラット、各種病態モデルを用いて、幅広い用量にて、その薬効を比較検討した。まず、正常ラットにおいて、Table I に示されている各種用量で、被検方剤の利尿作用をスクリーニングし、それぞれの有効用量を見出した。そして、これをもとにして、各方剤の利尿活性、尿中および血中のパラメーターを検討した。さらに、病態モデルにおいても、同様な方法で検討を行った。今回の実験系では3和漢薬方剤のすべてに利尿効果を証明したと同時に、その利尿作用が剤量（用量）のみならず病態により変化することが明らかになった。

漢方薬の作用は一般的に微弱であり、連続投与や長期投与により初めてその効果が現れることが多い。それゆえ、これらの方剤が単回投与により利尿作用を示し、その程度は投与量に比較して著者らの当初の予想より大きなものであった。すなわち、通常漢方方剤の乾燥エキスは1日当りグラム単位で臨床に用いられている。小動物で薬物の効果を検討する場合成人の1日量をその動物のキログラム体重当たりの投与量として実験に用いる。それゆえ、今回の実験でも投与量で1000 mg/kg以上の用量で効果が見られるのではないかと予想した。しかし、3方剤とも750 mg/kgの用量で利尿作用を発現した。この用量は西洋薬を用いたラットでの薬理学的実験における投与量と比較するとかなり多いが、しかしながらミリグラムという通常の実験に用いるオーダーであった。また、利尿活性の検討にあたって、漢方エキス剤に含まれる無機塩や重金属イオンの影響は無視できないと考えられたが、正常ラットを用いた実験において利尿活性を示さなければ、たとえ高用量であっても尿中への電解質の排泄増加や血中電解質濃度に対する影響は認められなかった。今回の病態モデルを用いた実験において対照群には精製水のみを投与した。図表では示さないが、ネフローゼモデルにおいて至適用量より高用量を投与したが単回投与では尿量や尿中の電解質濃度の増加は認められなかった（TJS-217 1000 mg/kg 群：尿量 3.7 ml, Na^+ 排泄量 0.10 mEq/5 hr；対照群：尿量 3.7 ml, Na^+ 排泄量 0.15 mEq/5 hr）。同様に血中の Na^+ や K^+ 濃度にも影響しなかった。佐藤らは各種生薬エタノールエキス中の重金属イオンを定量し、各エキス 4.5 mg 中に含有される金属イオン量は $1 \mu\text{g}$ 未満で、利尿活性に影響すると思われる水銀イオンについては $0.1 \mu\text{g}$ 未満であると報告している。¹²⁾ 漢方エキス剤とエタノールエキスに含まれ

る重金属量を単純には比較できないが、今回の投与された各方剤中には約 $3.3 \mu\text{g}$ の水銀イオンが含有されることになる。今回の実験ではどれだけの水銀イオンが尿細管に移行して Na^+K^+ -ATPase を阻害したかは明らかではないが、各方剤の利尿活性への影響はほとんど無視できるものとする。¹²⁾ しかし、今回の結果は単回投与実験であるので連続投与実験を行う場合には vehicle には漢方エキスを灰化したものを溶解して用いる必要があるのかもしれない。

病態選択的利尿活性として、3方剤の利尿効果は興味深いことに正常ラットおよび各種病態モデル間において異なっていた。例えば、補中治湿湯（TJS-213）は腎不全モデル、ネフローゼモデルならびに腎炎モデルにおいて利尿効果を示さなかったが、正常ラットと肝不全ラットに対しては、利尿効果を示した（Table II, III, IV, V, VI）。また、これらの方剤は病態により複合作用を示した。例えば、補気建中湯（TJS-210）は肝不全モデルと腎炎モデルに対して、それぞれ GOT, GPT の減少傾向と血中尿素窒素濃度の有意な減少をもたらした（Table V, VI）。これは漢方方剤による病態選択活性を反映し、複合方剤の作用特徴である「方証相対」に関連するものと考えられる。Table VII に示すごとく、3方剤とも利尿作用以外の様々な薬理活性を持つ単味薬を含んでおり、とくに抗腎炎作用、抗潰瘍作用、免疫調節作用、抗蛋白尿作用および抗高脂血作用、肝臓保護作用などを有する。これらの方剤は補気薬（人參、白朮）、行気薬（陳皮、厚朴）、燥湿薬（黄芩、蒼朮）、利尿薬（茯苓、防己、木通、沢瀉）などを組み合わせて出来上がっており、それぞれの利尿作用は薬理学的に利尿作用が示されている単味の漢方薬（Table VII）によるものと考えられる。しかし、いずれもその利尿作用は弱いか、利尿傾向を示すのみである。¹³⁻¹⁷⁾ それゆえ、今回の実験で認められた各方剤の明確な利尿作用は方剤に配合された他の漢方成分がその発現に寄与している可能性がある。また、腎機能障害モデルとして、腎不全モデル（尿細管障害）、ネフローゼモデル（糸球体基底膜の微小変化）と抗 GBM 腎炎モデル（糸球体における炎症性変化）の3種類を用いたが、各方剤の利尿活性の発現における差異はその利尿薬の作用点（糸球体、尿細管）の違いによるものと考えられる。すなわち、これらの方剤は尿細管障害がほとんど認められないネフローゼモデル¹⁸⁾では利尿活性が認められ、尿細管障害が主で糸球体障害が認められない急性腎不全モデルでは利尿活性は認められず、これらの方剤の作用点が尿細管であることが示唆された。しかしながら、糸球体障害が主である抗 GBM 腎炎モデル（疾患が長期に及ぶと尿細管障害が出現する）¹⁹⁾で利尿効果は認められなかつ

た。佐藤らは利水作用を有する生薬エキスの腎臓の $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 活性に対する阻害作用について検討し、蒼朮と白朮に強い阻害活性があることを見いだしている。¹²⁾ 腎臓での水やイオンの再吸収は尿細管でおこなわれ、尿細管に $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ が高密度に分布することが知られている。それゆえ、彼らの結果は今回の補気建中湯 (TJS-210) と補中治湿湯 (TJS-213) の作用点が尿細管であるという示唆と一致する。しかし、防己湯 (TJS-217) には蒼朮や白朮は含有されておらず、作用点についてはさらに追究する必要がある。

漢方医学において、医師が漢方薬を処方するときの重要な point が二つある。一つは漢方薬の投与量であり、もう一つは「証」(漢方医学の基本概念に基づいた病態認識方法と診断手段)である。今回の研究はこの二つの point を踏まえて動物実験を行ったものといえる。複合作用や病態選択活性は漢方薬の作用原理として西洋医学にはみられない特徴の一つである。²⁰⁾ 漢方薬において用量依存性はないということは臨床において認められている。²¹⁾ 今回の正常ラットを用いた研究において3方剤の利水活性に用量依存性はなく、適切量(用量選択活性)にて最大効果が出現するということが示された (Fig. 1, 2)。また、データは示さなかったがネフローゼモデルにおいては500, 750, 1000 mg/kgの補気建中湯 (TJS-210) の投与により各用量で同程度の利水作用が認められ、それ以上の用量では利水活性はなかった。これに対して、Frosemideに代表される high ceiling 利尿薬は、広い用量にわたり、用量依存的な作用を示し、その用量作用関係は病態でシフトするものの、用量依存性は常に存在している。²²⁾

最後に、本研究の薬理学的スクリーニングによるアプローチは漢方薬の新たな効能の開発にも繋がるものと考えられる。3方剤の臨床応用の経験から、その利水作用に着目し、正常ラットで用量をスクリーニング後、さらに、病態選択活性および用量選択活性を生かして、その効果の発現を評価する方法である。漢方医学は数千年の歴史と臨床実践に支えられてきたため、経験則を重要視しすぎる側面がある。今回、著者らが用いた手法を用いて、その薬効評価を行うことにより、未だ究明されていない多くの漢方方剤の臨床応用の道を広げるものと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は株式会社ツムラからの助成金によっておこなわれたものである。

References

- 1) Yamada, T.: Kanpo shohou ouyou no jissai (漢方処方応用の実例). 4th Edition. Hoki-kencyu-to Nannzanndo (南山堂) Tokyo, pp.325-326, 1981 (in Japanese).
- 2) Yakazu, D.: Kanpo kousei youhou kaisetsu (漢方後世要方解説). 6th Edition. Ido no nihonsha (医道の日本社) Kanagawa, pp.74, 1980 (in Japanese).
- 3) Fujidaira, K., Yamada, T.: Jitsuyo Kanpo shohoshu (実用漢方処方集) Yakuji Jihosha (薬事時報社) Tokyo, pp.380, 1980 (in Japanese).
- 4) Feng, Y., Nagamatsu, T., Suzuki, Y., Kawada, T., Koike, T.: The diuretic effects of Wakan-yaku prescription on normal and various pathologic models. *Journal of Traditional Medicines* **13**, 484-485, 1996 (in Japanese).
- 5) Baehler, R. W., Kotchen, T. A., Burke, J. A., Galla, J. H., Bhatena, D.: Considerations on the pathophysiology of mercuric chloride-induced acute renal failure. *J. Lab. Clin. Med.* **90**, 330-340, 1977.
- 6) Yanagisawa, H.: HgCl₂-induced acute renal failure and its pathophysiology. *Nippon Eiseigaku Zasshi* **52**, 618-623, 1998 (in Japanese).
- 7) Frenk, S., Antonowicz, I., Craig, J. M., Metcalf, J.: Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesion and body electrolyte composition. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **89**, 424-428, 1955.
- 8) Ryan, G. B., Karnovsky, M. J.: An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* **8**, 219-232, 1975.
- 9) Suzuki, Y., Kohara, U., and Ito, M.: Pharmacological studies on experimental nephritic rats (3). Changes in the connective tissue components of renal cortex in the modified type of Masugi's nephritis. *Japan. J. Pharmacol.* **28**, 269-276, 1978.
- 10) Hjelle, J. J., Grubbs, J. H., Beer, D. G., Peterson, D. R.: Time course of the carbon tetrachloride-induced decrease in mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **67**, 159-165, 1983.
- 11) Kingsbury, F. B., Clark, C. P., Williams, G., Post, A. L.: The rapid determination of albumin in urine. *J. Lab. Clin. Med.* **11**, 981-989, 1926.
- 12) Satoh, K., Yasuda, I., Nagai F., Ushiyama, K., Akiyama, K., Kano, I.: The effects of crude drugs using diuretic on horse kidney ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-adenosine triphosphate. *Yakugaku Zasshi* **111**, 138-145, 1991 (in Japanese).
- 13) Tsurumi, K., Taki, K., Ichioka, H., Esaki, S., Sakai, S., Sawazaki, S.: On the diuretic action of crude drugs (II) Alcohol extracts. *Gifu Ikadaigaku Kiyo* **11**, 138-142, 1963 (in Japanese).
- 14) Tsurumi, K., Taki, K., Ichioka, H., Esaki, S., Sakai, S., Sawazaki, S.: On the diuretic action of crude drugs (I) Aqueous extracts. *Gifu Ikadaigaku Kiyo* **11**, 129-137, 1963 (in Japanese).
- 15) Tanaka, S., Akira, T., Tabata, M.: Pharmacological analysis of the traditional Chinese prescription "Goreisan-ryo". *Yakugaku Zasshi* **104**, 601-606, 1984 (in Japanese).
- 16) Hikino, H., Iwakawa, T., Oshima, Y., Nishikawa, K., Murata, T.: Diuretic principles of *Alisma plantago-aquaticia* var. *orientale* Rhizomaes. *Shoyakugaku Zasshi*, **36**, 150-153, 1982 (in Japanese).
- 17) Yamatake, Y., Shibata, M., Nagai, M.: Pharmacological studies on root bark of mulberry tree. *Jpn. J. Pharmacol.* **26**, 461-469, 1976.
- 18) Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M., Suzuki, Y.: The possible roles of hyperlipidemia and mononuclear cells in glomeruli in

- puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **70**, 25-33, 1996.
- 19) Nagao, T., Nagamatsu, T., Suzuki, Y.: Effect of DP-1904, a thromboxane A2 synthase inhibitor, administered from the autologous phase on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **68**, 137-144, 1995.
- 20) Kimura, M.: The mechanism of pathophysiological activity selected by Kampo formulations. *Metabolism and disease* **29**, 9-35, 1992 (in Japanese).
- 21) Cyong, J. C.: Try to solve a problem of Kampo by pharmacologic approach (漢方医学の薬理学的解明の試み). In "The 6th Hakada symposium: Kampo and Immunoallergy (1)" (Ed. by Hakada symposium committee), Medical Tribune, Tokyo, pp.164-179, 1988.
- 22) Feng, Y., Nagamatsu, T., Suzuki, Y.: The diuretic effects of antagonist of adenosin A1 receptor in rats with various pathologic models. *Japan. J. Nephrol* **35**, 570, 1993 (in Japanese).