

単離灌流腎を用いたラット腎に対する五苓散の 薬理効果に関する実験的検討

赤瀬 朋秀,*^{a)}真崎 義彦^{b)} 加賀谷 肇^{c)} 遠藤 忠雄^{d)} 田代 眞一^{e)} 島田 慈彦^{a)}

^{a)}北里大学病院 薬剤部, ^{b)}北里大学医学部 実験動物, ^{c)}恩賜財団 済生会横浜市南部病院 薬剤部
^{d)}北里大学医学部 泌尿器科学, ^{e)}昭和薬科大学 病態科学

Effect of Gorei-san (Wu-Ling-San) on cold preservation/reperfusion injury in rat kidney studied with isolated perfusion of rat kidney (IPRK) apparatus

Tomohide AKASE,*^{a)} Yoshihiko MASAKI^{b)} Hajime KAGAYA^{c)} Tadao ENDOU^{d)}
Shin-ichi TASHIRO^{e)} Shigehiko SHIMADA^{a)}

^{a)}Department of Pharmacy Kitasato University Hospital, ^{b)}Department of Laboratory Animal Science,
Kitasato University School of Medicine, ^{c)}Department of Pharmacy Saiseikai Yokohama-shi Nambu Hospital,
^{d)}Department of Urology Kitasato University School of Medicine, ^{e)}Department of Clinical and
Biomedical Sciences Showa Pharmaceutical University

(Received May 18, 2000. Accepted August 17, 2000.)

Abstract

Pharmacological actions of “Gorei-san” extract granule on rat’s isolated kidney were studied. “Gorei-san” extract granule was administered in advance at oral dose of 40 mg/kg to rats and their kidney was isolated and preserved only in EC solution. Such isolated kidney was designated as a control, which was then compared with a sample of rat’s kidney preserved with EC solution to which water-soluble component of “Gorei-san” extract granule was added and kept for 24 hours. The comparison resulted in to histological change or significant difference in urinary potassium value. Further, since there was found no variation or difference in sodium elimination between the control and the sample, it was thought that no cell-protecting action was expected in “Gorei-san”. Although “Gorei-san” treated rats showed slightly decreased urinary output when compared with that observed at perfusion, their urination was stable and creatinine clearance was also more stable than control rats.

In rats used in the experiment to which “Gorei-san” was orally administered at a dose of 40 mg/kg, no potassium loss was prevented. But those orally administered at a dose of 100 mg/kg showed a tendency to prevent potassium loss and to increase urinary output. From the above findings, it was likely that water-soluble component of “Gorei-san” extract granule failed to protect organs but kept creatinine clearance stable, and rats administered in advance at an oral dose of 100 mg/kg showed urinary output and urinary potassium value capable of retaining renal function to some extent.

Key words Isotonic perfusion kidney, Euro-Collins solution, Gorei-san (Wu-Ling-San).

Abbreviations EC solution, Euro-Collins solution ; Gorei-san(Wu-Ling-San), 五苓散.

結 言

臓器移植においては脳死による移植法案が制定されたが、いまだに提供が少なく脳死腎移植においても死体腎あるいは生体腎に頼らざるを得ない状況である。死体腎においては、死戦期の腎障害をいかに軽減するかが重要な問題であり、保存腎の状態次第で移植後の腎機能発現に大きな影響を及ぼす。これまで死戦期を軽減するために多くの化学物質が用いられているが、反面、薬剤による腎障害が課題になっている。そこで古来より副作用が少ないとされている漢方薬から、利尿作用を有する生薬を含んでおり、ループ利尿薬などと比較しカリウムの喪失が少ない五苓散に注目した。今回は、五苓散エキス顆粒をラットに投与し、腎を摘出し24時間単純冷却保存後、単離灌流腎を用いて薬理作用およびその効果について検討したので報告する。

実験材料と方法

- (1) **実験動物**：実験には Sprague-Dowley (SD) 雄性ラット 350 g から 380 g を 26 匹用いた。
- (2) **実験群の設定**：実験群は 2 群とし、コントロール群 ($n=6$) は生理食塩水 1 mL を経口投与後、摘出した腎を Euro-Collins 液 (吉富製薬：以下 EC 液とする) で 24 時間保存した。五苓散投与群 ($n=6$) は、医療用五苓散エキス顆粒原末 (ツムラ：以下五苓散エキス顆粒とする) を経口投与後、摘出した腎を五苓散エキス顆粒を添加した EC 液で 24 時間保存した。
- (3) **実験方法**：コントロール群は、麻酔前に生理食塩水 1 mL を経口投与し、五苓散投与群は麻酔前に、原中ら¹⁾の方法により五苓散エキス顆粒 40 mg/kg を設定し、体重あたり 1 mL になるよう生理食塩水で調製し経口投与した。両群とも 1 時間後にペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg を腹腔内に投与し、麻酔後腹部を正中切開し、右尿管にポリエチレンチューブ (SP-10：夏目製作所) を挿入した。次に腹部静脈よりヘパリン 1 mL を注入し、上腸管膜動脈遠位部より右腎動脈に向けて 20 G エラスター (Johnson-Johnson: Italy) を挿入し固定した。挿入後直ちにエラスターから 4°C に冷却した EC 液で腎を洗流し摘出、コントロール群は EC 液を入れた保存瓶で 24 時間浸漬保存とした。また、五苓散投与群は腎血流増加効果をみるために EC 液に五苓散エキス顆粒 55 mg/dL 添加した EC 液を入れた保存瓶で 24 時間浸漬保存とした。
- (4) **単離腎灌流法**：TN 式臓器灌流装置 (夏目製作所) を

用いて単離腎の灌流を行った。単離腎灌流時の灌流液は Nishitsutsuji-Uwo ら²⁾ が考案した Krebs-Henseleit 液 (NaCl: 0.90 %, KCl: 1.15 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.22 %, KH_2PO_4 : 2.11 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3.82 %, NaHCO_3 : 1.30 %, Glucose: 5.00 %, Bovine Albumin: 7.50 %, Heparin: 2000 IU/150 dL を混合し、pH: 7.4, Osm: 285 mOsm/kg に調整) を応用した。また、クレアチニンクリアランスおよび尿細管からのナトリウム排泄率 (以下、FENa) を算出するために Krebs-Henseleit 液にクレアチニン 3 % を添加した。また、灌流時には混合ガス (O_2 : $\text{CO}_2=95:5$) をチャンバー内に毎分 500 mL/min で流入させながら灌流を行った。その時の灌流液内の平均酸素分圧は 500 mmHg に調節した。単離腎の灌流圧は圧トランスジューサー (NEC 三栄) を介してポリグラフ (NEC 三栄) によって記録し、灌流圧は平均 100 mmHg になるよう調節した。

(5) **測定項目と検定**：腎灌流時間は 90 分間とし 30 分間隔で腎灌流量と尿量を測定した。その一部を採取し、生化学自動分析器 (オリンパス AU600) にて腎灌流液および尿中のナトリウム、カリウム、クレアチニンを測定した。測定結果から尿細管からのナトリウム排泄率 (以下 FENa) およびクレアチニンクリアランス (以下 Ccr) を算出した。

(6) **五苓散エキス顆粒のカリウム喪失抑制に関する検討**：ナトリウムおよびカリウム値に影響を及ぼす五苓散エキス顆粒の経口至適投与量を検討するために、渡部ら¹³⁾の方法により五苓散エキス顆粒を 100 mg/kg 経口投与した群 ($n=6$) を設定し、上記の実験方法を用いてさらに検討した。

(7) **保存腎の病理組織学的検討**：上記の実験方法で、別のラット 8 匹を用い、腎を摘出後、コントロール群 ($n=4$)、五苓散投与群 ($n=4$) に分け、24 時間単純冷却保存後、単離腎灌流を行わないで腎組織の一部を採集し、10 % ホルマリンで固定した。固定後切片として hematoxylin and eosin (HE) で染色し光学顕微鏡下で病理学的検査を行った。

(8) **統計解析**：統計解析は Wilcoxon test により、 $p < 0.05$ にて有意差ありと判定した。また、尿量および尿中カリウム値に関しては、分散分析および多重性を考慮して 0 から 30 分値との差について対応のある t -検定を実施した。なお、結果は mean $\pm$ S.D. で表した。

結 果

1. 腎灌流量の推移 (Fig. 1)

コントロール群の灌流量は 30 分後で 3.4 ± 1.5 mL/

min, 60 分後には 4.8 ± 2.1 mL/min と増加したが, 灌流 90 分後は 4.4 ± 1.2 mL/min とわずかに減少した。一方, 五苓散投与群では, 灌流 30 分後は, 3.3 ± 0.9 mL/min とコントロール群と同等であり, 灌流 60 分後もほとんど変化なく 3.2 ± 1.1 mL/min であった。灌流 90 分後は 3.0 ± 2.0 mL/min とわずかに減少した。灌流 60 および 90 分後においてコントロール群と比較した結果, 五苓散投与群は有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

2. 尿排泄量の推移 (Fig. 2)

コントロール群は灌流 30 分後で 0.08 ± 0.05 mL/min となり, その後急激に増加し 60 分後で 0.18 ± 0.09 mL/

min となり, 90 分後でも 0.18 ± 0.09 mL/min と同量であった。五苓散投与群は灌流 30 分後で 0.30 ± 0.19 mL/min でコントロール群と比較して有意差が認められた ($p < 0.05$)。しかし, 60 分後にはわずかに減少し 0.25 ± 0.13 mL/min, 90 分後も 0.25 ± 0.13 mL/min と同量で, コントロール群よりわずかに多かったが有意差は認められなかった。

3. Ccr の推移 (Fig. 3)

コントロール群は, 灌流 30 分後において 0.09 ± 0.04 mL/min となり, 60 分後では 0.17 ± 0.04 mL/min, 90 分後では 0.18 ± 0.01 mL/min となり, 若干の増加傾向で

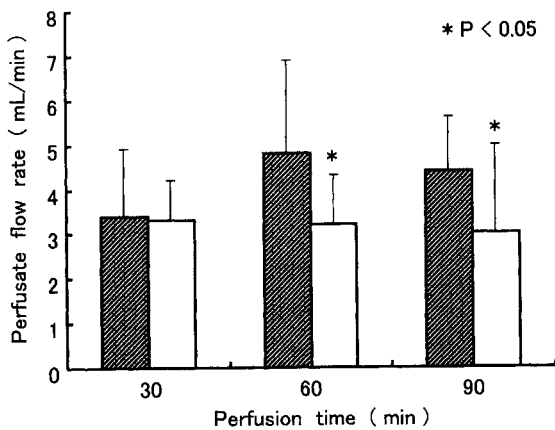


Fig. 1 Perfusate flow rate at various time. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=6).
 ■ Control group □ Gorei-san add group

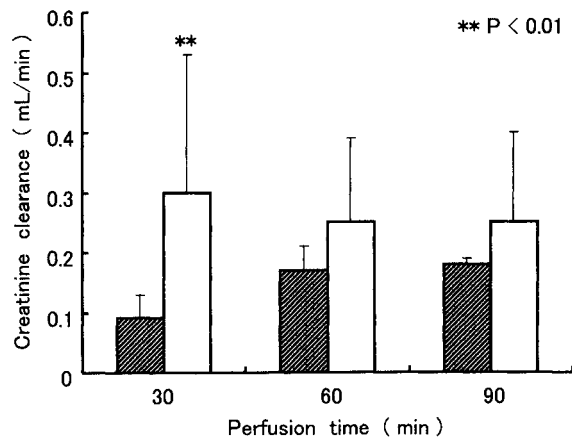


Fig. 3 Creatinine clearance of various time. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=6).
 ■ Control group □ Gorei-san add group

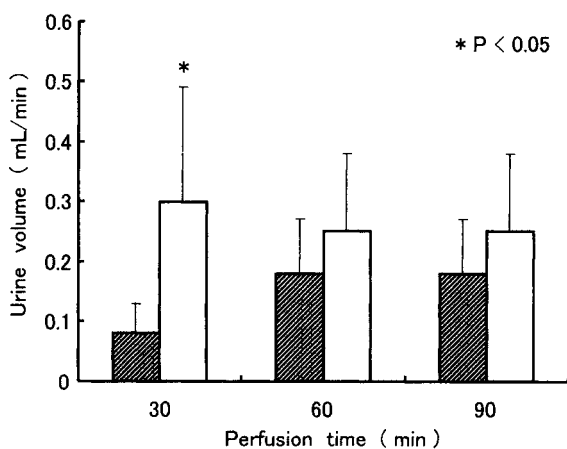


Fig. 2 Changes of urine volume after perfusion. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=6).
 ■ Control group □ Gorei-san add group

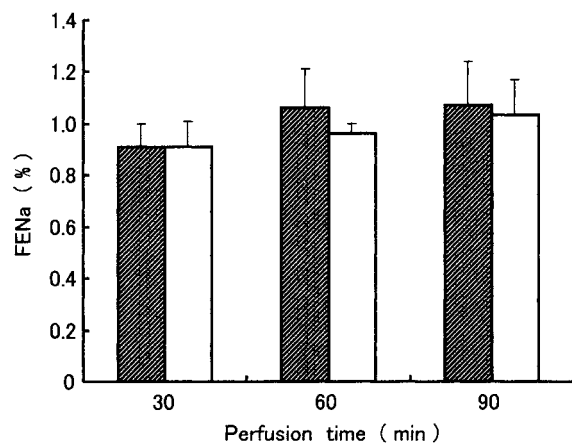


Fig. 4 Changes of FENa after perfusion. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=6).
 ■ Control group □ Gorei-san add group

あった。五苓散投与群では灌流30分後に 0.30 ± 0.23 mL/min となり、コントロール群と比較して有意差が認められた ($p < 0.01$)。また、灌流60分後は 0.25 ± 0.14 mL/min, 90分後では 0.25 ± 0.15 mL/min となりコントロール群と比較して有意差は見られなかった。

4. FENa の推移 (Fig. 4)

コントロール群は灌流30分後で $0.91 \pm 0.09\%$ となり、その後は上昇傾向を示し、60分後で $1.06 \pm 0.15\%$, 90分後には $1.07 \pm 0.17\%$ と若干の上昇傾向がみられた。五苓散投与群は灌流30分後で $0.91 \pm 0.10\%$ となりコントロール群と同等であり有意差は見られなかった。しかし、60分後において $0.96 \pm 0.04\%$, 90分後に $1.03 \pm 0.14\%$ と上昇傾向が見られたものの、コントロール群と比較するとわずかに低値であった。しかしながら、60および90分後において両群間に有意差は認められなかった。

5. 尿中カリウム値の推移 (Fig. 5)

コントロール群においては、灌流30分後の尿中カリウム値は 21.7 ± 10.5 mEq/L から急激に減少し、60分後では 8.20 ± 1.30 mEq/L, 90分後では 7.10 ± 0.90 mEq/L であった。一方、五苓散投与群においてもコントロール群と同様な傾向で、灌流30分後で 20.5 ± 8.1 mEq/L, 以下急激に減少し60分後では 8.20 ± 1.30 mEq/L, 90分後では 7.90 ± 0.7 mEq/L となり、コントロール群との差は認められなかった。

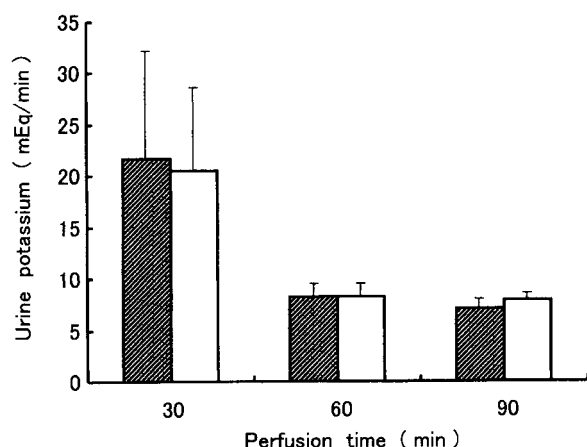


Fig. 5 Changes of urine potassium after perfusion. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=6).
 ■ Control group □ Gorei-san add group

6. 保存腎の病理組織学的検討 (Fig. 6)

Fig. 6 (左) はコントロール群、Fig. 6 (右) は五苓散投与群で24時間保存腎の病理組織像を示す。

その結果、コントロール群のEC液で保存した腎の糸球体は変化が見られないものの、尿細管上皮細胞の腫大、基底膜の剥離、腔胞変性がみられた。また、五苓散投与群においても同様に尿細管上皮細胞の腫大、基底膜の剥離などがみられた。保存腎の組織像は両群とも差は認められなかった。

7. 五苓散エキス顆粒 100 mg/kg 投与による検討

五苓散エキス顆粒を 100 mg/kg に増量し経口投与して薬理的検討を行った。その結果、Fig. 7 に示すとおり、尿量は、30分後で 0.53 ± 0.32 mL/min, 60分後では 0.75 ± 0.35 mL/min, 90分後で 0.86 ± 0.30 mL/min と増

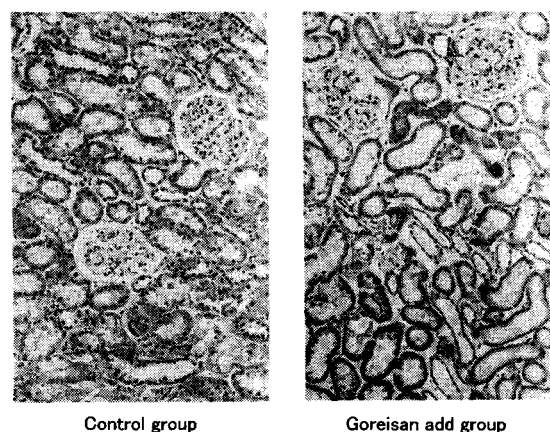


Fig. 6 Light photomicrograph of rat kidney preserved in control group (left) and Gorei-san add group (right) for 24 hr ($\times 5000$).

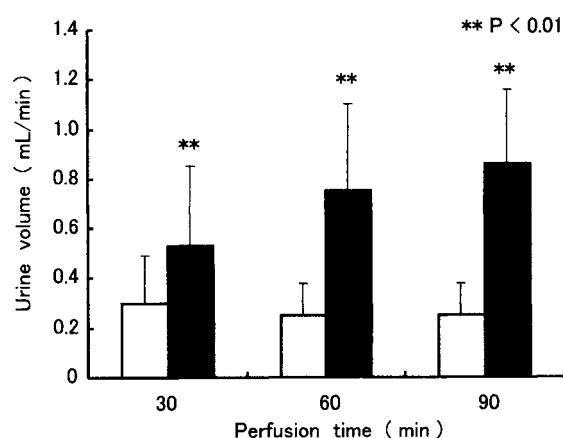


Fig. 7 Changes of urine volume after perfusion. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=4).
 □ Gorei-san 40 mg/kg group ■ Gorei-san 100 mg/kg group

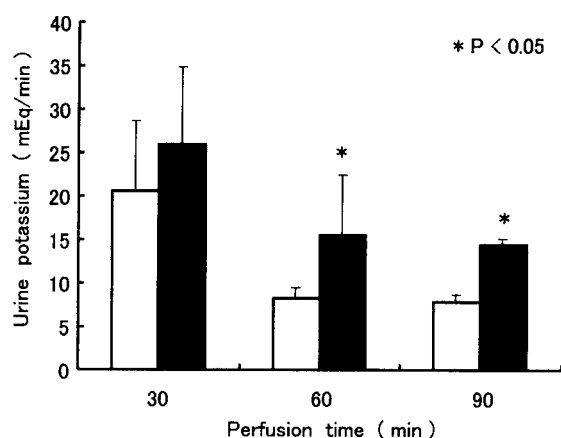


Fig. 8 Changes of urine potassium after perfusion. Mean values $\pm$ S.D. are shown (n=4).
 □ Gorei-san 40 mg/kg group
 ■ Gorei-san 100 mg/kg group

加傾向を示した。五苓散エキス顆粒 40 mg/kg を経口投与した群と比較して尿量をさらに増加させる傾向がみられ、24 群の間には有意差が認められた ($p < 0.05$)。

尿中カリウム値は、Fig. 8 に示すとおり、30 分後で 25.9 ± 9.0 mEq/L、60 分後で 15.5 ± 6.9 mEq/L、90 分後で 14.4 ± 0.80 mEq/L と徐々に減少した。しかしながら、五苓散エキス顆粒 40 mg/kg を経口投与した群と比較するとカリウムの喪失を抑制する傾向を示し、2 群の間には有意差が認められた ($p < 0.05$)。

考 察

元来漢方薬は、身体の調和を行い疾病を治療するものと考えられてきた。そのため経口投与が原則とされ、臓器および細胞単位の検討は行われていたものの十分な効果はでていなかったように考えられる。現在も皮膚科領域において漢方薬を配合した軟膏剤³⁾や小児科における直腸投与^{4,5)}などが行われており、ある程度の有効性は認められるが、全身作用に関して経口投与との比較を詳細に検討した知見は存在していない。一方、臨床において五苓散は、腎炎、ネフローゼ、尿毒症、頭痛、乗り物酔い⁶⁾などに繁用されており、さらに最近では周期性 ACTH・ADH 分泌過剰症⁷⁾、尿路結石症⁸⁾、産褥期の浮腫⁹⁾、向精神薬による口渴¹⁰⁾などの多彩な病態に対する効果も報告されている。

今回の実験では、五苓散エキス顆粒の経口投与および EC 液に溶解した五苓散エキス顆粒水溶性成分によって 24 時間の負荷をかけた臓器における薬理作用と、EC 液

中の既知成分との相加作用を検討した。一般に、死体腎の組織障害は、ドナーの心停止前から既に始まっていることが知られている。即ち、死戦期において繰り返される局所的な循環不全、および大量に投与される各種薬剤の影響により、臓器へ与える影響は極めて大きいと考えられる。特に腎臓においてはこれらの影響が大きく、阻血時間および冷温阻血時間の延長や、特に薬剤による組織の損傷は著しい。また、摘出後の再灌流障害などにより尿細管にかなりの損傷を与え、移植後これらの要因で尿が出ないこともある。また、死戦期における利尿剤投与時期の検討や臓器を保護する保存液の開発が望まれている。これまでも EC 液に様々な薬剤を添加した場合の効果が検討されてきたが、漢方薬成分を添加した報告はこれまでほとんど見当たらない。EC 液への薬剤添加は摘出臓器に対する直接作用を意味することになり、経口投与を原則とする漢方薬には適さない可能性も否定できない。したがって、EC 液に添加した五苓散エキス顆粒水溶性成分の臓器に対する薬理作用に関しては、今後さらに検討を重ねる必要があると考えられた。

しかしながら、漢方薬を構成する多くの成分が生体に対して調整的に作用することは漢方薬の薬理作用の特徴であり、完成された方剤としての作用も期待できる可能性もある。特に即効性があり、水分の調節作用^{11,12)}がある五苓散エキス顆粒に注目して腎の保存効果の試みでは、EC 液で保存した腎と比較しても組織学的には変化がなく、尿中カリウム値においても有意な差は見られなかった。また、FENa に関して差が見られなかったことから尿細管の細胞を保護する作用はないものと考えられた。しかしながら尿量においては灌流時から時間の経過とともにわずかに低下しているものの安定した排尿が観察され、Ccr においてもコントロール群と比較して安定していた。さらに尿中カリウムの推移に関しては、五苓散エキス顆粒 40 mg/kg を経口投与した場合カリウムの喪失を防ぐことはできなかった。しかしながら、投与量を 100 mg/kg に増量すると、渡部ら¹³⁾の報告のとおりカリウムの喪失を防ぐ作用がみられ尿量も増加した。したがって、至適投与量の検討も重要であり、この単離腎灌流は薬剤の至適量を算出することが可能であることから今後の検討が必要である。田代¹⁴⁾はヒトにおける検討で、五苓散の薬理作用を脱水状態では抗利尿、水分過剰状態では利尿を示す水分調節作用を有する薬物であると報告している。したがって、本実験においても利尿の調節作用を示した可能性があることが示唆された。また、織田ら¹⁵⁾はラットにおいて CCl₄ による肝障害に伴う水代謝を改善させると報告しており、死戦期における五苓散エキス顆粒の投与は、その利尿効果により薬剤が与え

る損傷を最小限にとどめる可能性も期待できると考えられた。また、投与量によってはカリウムの喪失をある程度は防ぐことが可能であり、臓器移植分野でも五苓散エキス顆粒の有用性を示唆することも考えられた。

本実験より、死戦期における五苓散エキス顆粒の経口投与は、腎に対する保護作用を示唆する結果となった。今後は、長時間の阻血の加わった腎における効果や長時間の保存について、さらに追及する必要があると考えられた。さらに、田中ら¹⁶⁾は五苓散の利尿作用は投与3~4時間で最大になると報告しており、投与時期の検討も課題であると考えられた。

本実験を行うにあたり、五苓散エキス顆粒原末を提供してくださった株式会社ツムラに感謝申し上げます。

References

- 1) Haranaka, R., Watabe, S., Kohashi, R., *et al.* : The Effect of the Chinese Herb Diuretics (Goreisan, Choreito, Saireito) in Growing Rats: Part I. *WAKAN-YAKU* **14**, 105-110, 1981.
- 2) Nishitsutsuji-Uwo, J.M., Ross, B.D., Krebs, H.A. : Metabolic activities of isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.* **103**, 852-856, 1967.
- 3) Suzuki, T., Kanou, K., Matsumoto, Y. : Kanpouseizai niokeru zaikai no kentou -Unsei-in nankou no shisaku to atopy sei hifuen kanji heno shiyoukeiken- (漢方製剤における剤形の検討 第6報-温清軟膏の試作とアトピー性皮膚炎患児への使用経験). *THE JOURNAL OF PRACTICAL PHARMACY* **44**, 1725-1729, 1993. (in Japanese)
- 4) Kawakami, S., Furuki, Y., Kubota, T. : Emesis Index wo mochiita seitozai toshiten Kanpou ekisu zayaku no kouka kentou (Emesis Index をもちいた制吐剤としての漢方エキス坐薬の効果検討). *Recent progress of KAMPO MEDICINE in obstetrics and gynecology* **XVI**, 89-92, 1999. (in Japanese)
- 5) Maeda, M., Satou, M., Ohashi, A. : Gorei-san zayaku no chousei to rinshouhoukoku (五苓散坐薬の調製と臨床報告). *WAKAN-YAKU* **6**, 352-353, 1989. (in Japanese)
- 6) Yakazu, K. : Gorei-san saikin no rinshouhoukoku (五苓散 最近の臨床報告). *JOURNAL OF JAPANESE SOCIETY OF HOSPITAL PHARMACISTS* **30**, 725-726, 1994. (in Japanese)
- 7) Kozaki, T. : A Therapeutic Trial of Gorei-San (Wu-Ling-San) for Periodic Adreno-Corticotrophic Hormone (ACTH) and Antidiuretic Hormone Discharge Syndrome. *Japanese Journal of Oriental Medicine* **45**, 899-903, 1995.
- 8) Koide, T. : Effect of Kampou medicine on urinary stone formation. *KIDNEY AND DIALYSIS* **45**, 351-355, 1998.
- 9) Horikawa, M., Ichihara, K., Tsuchiya, K., *et al.* : Sanjokuki no fushu ni taisuru Tsumura Gorei-san no shiyoukeiken (産褥期の浮腫に対するツムラ五苓散の使用経験). *Recent progress of KAMPO MEDICINE in obstetrics and gynecology* **XV**, 95-97, 1998. (in Japanese)
- 10) Okamoto, K., Okamoto, Y., Takahashi, E. : Effect of Gorei-san, Bakumondo-to on Thirst and Dry Mouth due to Psychotropic Drugs. *Japanese Journal of Oriental Medicine* **45**, 579-586, 1995.
- 11) Tei, M., Sano, Y., Otsuka, Y. : Gorei-san no yakurisayou (五苓散の薬理作用). *WAKAN-YAKU* **2**, 110-111, 1985. (in Japanese)
- 12) Tomogane, K., Ogawa, M., Juda, T., *et al.* : The "Diuretic" activity of oriental herbal drugs, Goreisan and Salreito, and the screening of active components among the urinary fractions collected by urethral catheter. *WAKAN-YAKU* **5**, 530-531, 1988.
- 13) Watabe, S., Haranaka, R., Kohashi, R., *et al.* : The effect of the Chinese Herb Diuretics (Goreisan, Choreito, Saireito) In Growing Rats: Part II. *WAKAN-YAKU* **14**, 111-116, 1981.
- 14) Tashiro, S., Tomogane, K., Ogawa, M. : Nyouro catheter ni yoru nyouryou no renzokusokutei to sono Kanpou yakurigaku yakubutsudoutai heno ouyou (尿路カテーテルによる尿量の連続測定と、その漢方薬理学・薬物動態への応用). *WAKAN-YAKU* **5**, 528-529, 1988. (in Japanese)
- 15) Orita, M., Nakanishi, Y., Tang, F., Abe, H. : The effects of Gorei-san against CCl₄ induced hepatic injury. *Journal of Traditional Medicines* **15**, 78-82, 1998.
- 16) Tanaka, S., Akira, T., Tabata, M. : Pharmaceutical Analysis of the Traditional Chinese Prescription "Goreisan-ryo". *YAKU-GAKU ZASSHI* **104**, 601-606, 1984.