

## 173. 七物降下湯の慢性腎臓病への治療効果と機序の解明

藤本 誠

Key words : 七物降下湯, 漢方, 慢性腎臓病, 高血圧, CIC-5

富山大学附属病院 和漢診療科

### 緒 言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) とは, ①明らかな腎機能障害が存在する, ②GFR < 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> である, ①, ② のいずれか, または両方が3か月以上持続する状態と定義されている。CKDの原因疾患としては糖尿病性腎症, 慢性腎炎, 腎硬化症などがある。CKDの罹患率は先進諸国では増加の一途を辿っている。CKD患者の予後は, 腎機能障害や尿蛋白の程度が大きいほど悪く, 腎障害自体の悪化によるよりはむしろ, 脳心血管疾患の合併によることが明らかとなっている。腎機能の経過観察や回復を目指す治療は重要であるが, 生活習慣病の管理と脳心血管疾患の早期発見・治療が重要である。高血圧は約4,000万人が罹患しており, CKDの原因疾患として最も多く, 腎硬化症や虚血性腎症は今度増加すると予想される。従って, 高血圧の予防・早期発見・治療はCKD治療において最も重要である。

漢方方剤・七物降下湯は, 本邦では高血圧に伴う随伴症状 (のぼせ, 肩こり, 耳鳴, 頭重) に対して保険診療下で処方することが可能である。本処方はいままで, 食塩誘発性高血圧ラットを用いた実験において腎保護作用を呈することや<sup>1)</sup>, 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットを用いた実験において有意な降圧効果を呈することが報告されたが<sup>2)</sup>, その機序については解明されてはいなかった。本研究は, 七物降下湯の慢性腎臓病, 特に腎硬化症の進行抑制効果の有無とその機序を解明することを目的に, 自然発症高血圧モデルラットを用いて行われた。

### 方 法

7種類の生薬 (芍薬・当帰・黄耆・地黄・川芎・釣藤鈎・黄柏) をそれぞれ栃本天海堂社より購入した。芍薬 : 当帰 : 黄耆 : 地黄 : 川芎 : 釣藤鈎 : 黄柏 = 4 : 4 : 3 : 3 : 3 : 3 : 2 の比率で混合し<sup>3)</sup>, 全生薬量 100 g に 500 mL の水道水を加え, 50 分間加熱還流を行い, 煎液を濾過後, 凍結乾燥により動物実験に使用する漢方エキスを作製した。

8週齢の雄性の自然発症高血圧ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) を 24 匹購入し, 2週間の適応飼育の後, 実験飼育で摂取する薬剤に応じて無作為に4群に分け, 実験飼育を8週間 (18週齢まで) 行った。本実験ではangiotensin receptor blockerであるtelmisartanを陽性対照薬とした。①コントロール群 (SHR-Control), ②高濃度 (0.45 g/kg/day) 七物降下湯群 (SHR-HD-SKT), ③低濃度 (0.15 mg/kg/day) 七物降下湯群 (SHR-LD-SKT) ④テルミサルタン (0.01g/kg/day) 群 (SHR-Telmi), また, SHRラットの対照ラットとしてWister-Kyoto (WKY) ラットをWKY群として飼育した (n=6/group)。薬剤投与群にはCarboxymethyl Cellulose Sodium Saltで溶解した試験薬を胃管より強制投与し, コントロール群およびWKY群にはCarboxymethyl Cellulose Sodium Saltのみを投与した。全飼育群には普通飼料を投与し, 試験飼育期間中の各群の摂取量を測定した。血圧は全ラットについて2週間毎に測定し, 試験飼育開始4週目と8週目に代謝ケージを用いて一日蓄尿サンプルを採取した。試験飼育終了後にPentobarbital Sodium Saltを腹腔内投与して深麻酔下で安楽死させ, 血液サンプルと両腎を採取した。摘出腎からは速やかに腎皮質組織を採取し, 測定までの期間, -80℃で保管した。

採取した血液サンプルより, アルブミン, blood urea nitrogen (BUN), クレアチニン値を, 尿サンプルより一日アルブミン量, クレアチニンを測定し, クレアチニンクリアランスを計算した。

ウエスタンブロット法により、糸球体スリット膜の構成蛋白である nephrin と podocin の発現量と、近位尿細管におけるアルブミン再吸収に関与する蛋白である cubilin, megalin と近位尿細管細胞のエンドソーム内の酸性化に関与する蛋白である CIC-5 の発現量をそれぞれ評価した。

## 結 果

実験期間中に飼料摂取量は各群の間で有意差は観察されず、実験飼育終了時点での各 SHR 群間の体重と体重あたりの腎重量には有意差は観察されなかった。両七物降下湯投与群とテルミサルタン群は試験飼育開始6週目以降、コントロール群よりも有意に血圧が低下し、テルミサルタン群と各七物降下湯投与群との間には有意差は観察されなかった (Fig. 1).

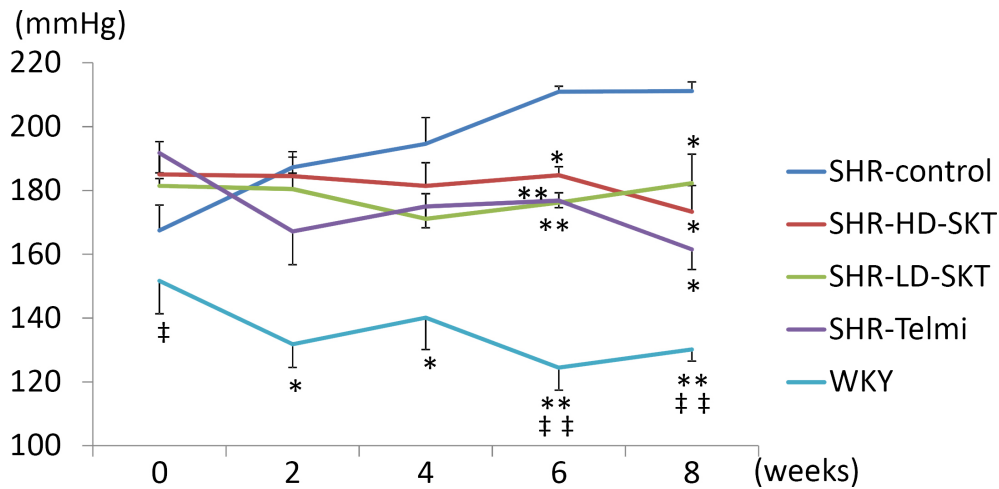


Fig. 1. Systolic blood pressure.

Effect of SKT on the systolic blood pressure (SBP) in all groups. Blood pressure was measured using a tail-cuff method, and the line graph depicts longitudinal measurements of the SBP. SHR-control : control group, SHR-HD-SKT : high dose-shichimotsukokato group, SHR-LD-SKT : low dose-shichimotsukokato group, SHR-Telmi : telmisartan group. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. (n = 6). Statistically significant differences are indicated as \*P < 0.05 versus SHR-control, \*\*P < 0.01 versus SHR-control, †P < 0.05 versus SHR-Telmi, ††P < 0.01 versus SHR-Telmi. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer tests.

試験飼育8週時点の一日尿量, 尿中ナトリウム量, 血清アルブミン値, BUN値, 血清クレアチニン値, クレアチニンクリアランスは各SHR群間では有意差は観察されなかった (Table 1).

Table 1. The effect shichimotsukokato on urine output and renal function parameters

| Group       | Urine output<br>(mL/day/kg BW) | s-Alb<br>(g/dL) | BUN<br>(mg/dL)          | s-Cr<br>(mg/dL)            | Ccr<br>(mL/min/kg BW)  | u-Na <sup>+</sup> V<br>(mEq/day/kg BW) |
|-------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|--|
| SHR-control | 31.3 ± 2.9                     | 2.1 ± 0.03      | 21.2 ± 1.5              | 0.527 ± 0.054              | 3.3 ± 0.3 <sup>†</sup> | 45.5 ± 3.0                             |
| SHR-HD-SKT  | 30.5 ± 2.5                     | 2.0 ± 0.04      | 23.9 ± 2.5 <sup>†</sup> | 0.492 ± 0.034 <sup>†</sup> | 2.9 ± 0.2              | 42.4 ± 3.8                             |
| SHR-LD-SKT  | 30.7 ± 2.4                     | 2.1 ± 0.07      | 19.0 ± 1.3              | 0.503 ± 0.020 <sup>†</sup> | 3.2 ± 0.3 <sup>†</sup> | 42.7 ± 4.1                             |
| SHR-Telmi   | 34.5 ± 3.2                     | 2.2 ± 0.01      | 20.1 ± 1.3              | 0.560 ± 0.021              | 2.7 ± 0.3              | 36.4 ± 3.4                             |
| WKY         | 26.9 ± 1.9                     | 2.2 ± 0.02      | 15.8 ± 0.6              | 0.653 ± 0.025              | 2.0 ± 0.1              | 38.1 ± 1.9                             |

Measurements on levels of urine output, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (s-Cr), creatinine clearance (Ccr) and urinary excretion of sodium (u-Na<sup>+</sup> V) of every groups. Urine output, Ccr, and u-Na<sup>+</sup> V values are expressed per kg BW. BW indicates body weight. Values represent mean ± S.E.M. (n = 6). <sup>†</sup>P < 0.05 versus WKY group. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer tests.

尿中アルブミン量は試験飼育開始4週後, 8週後の何れにおいても, 薬剤投与群はコントロール群よりも有意に低値を示したが, 薬剤投与群の間では有意差は観察されなかった (Fig. 2).

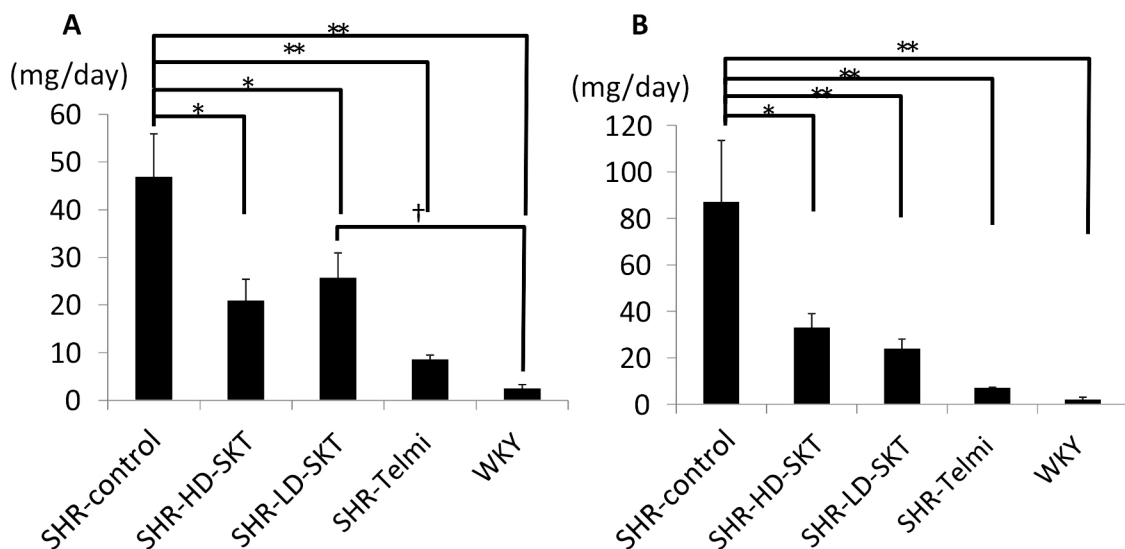


Fig. 2. Effect of SKT on the urinary albumin excretion.

Effect of SKT on the urinary albumin excretion after experimental treatment of 4 weeks (A) and 8 weeks (B). Values are expresses as mean ± S.E.M. (n = 6). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 versus SHR-control group, <sup>†</sup>P < 0.05 versus WKY group. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer tests.

糸球体スリット膜の構成蛋白である nephrin と podocin は腎障害の進行に伴い蛋白発現量が低下するが, 今回の実験週齢ではコントロール群と WKY 群との間では有意差は観察されなかった. しかし podocin については, 両七物降下湯群はいずれもコントロール群より有意に高い蛋白発現量を示した (Fig. 3).

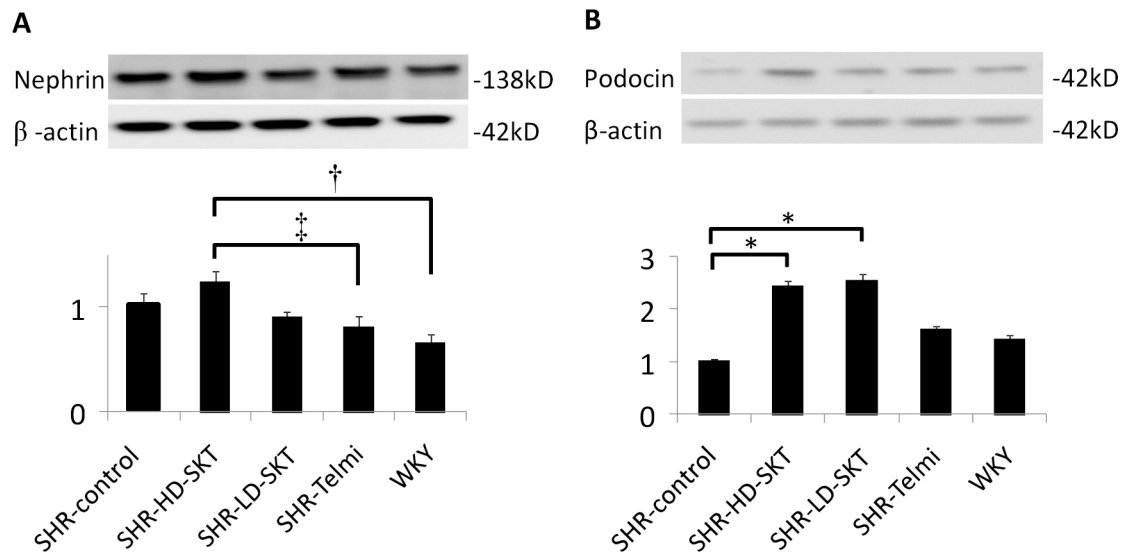


Fig. 3. Relative protein abundance of nephrin and podocin.

Graphical representation of the relative protein abundance of (A) nephrin and (B) podocin normalized to  $\beta$ -actin, in the kidney cortex. Data represent mean  $\pm$  S.E.M (n = 6). \*P < 0.05 versus SHR-control group. †P < 0.05 versus WKY group. ‡P < 0.05 versus SHR-telmi group. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer tests.

近位尿細管細胞表面に発現している cubilin と megalin の蛋白発現量は、コントロール群と WKY 群との間では有意差は観察されなかったが、cubilin については七物降下湯群においてコントロール群よりも有意に発現が亢進していた (Fig. 4).

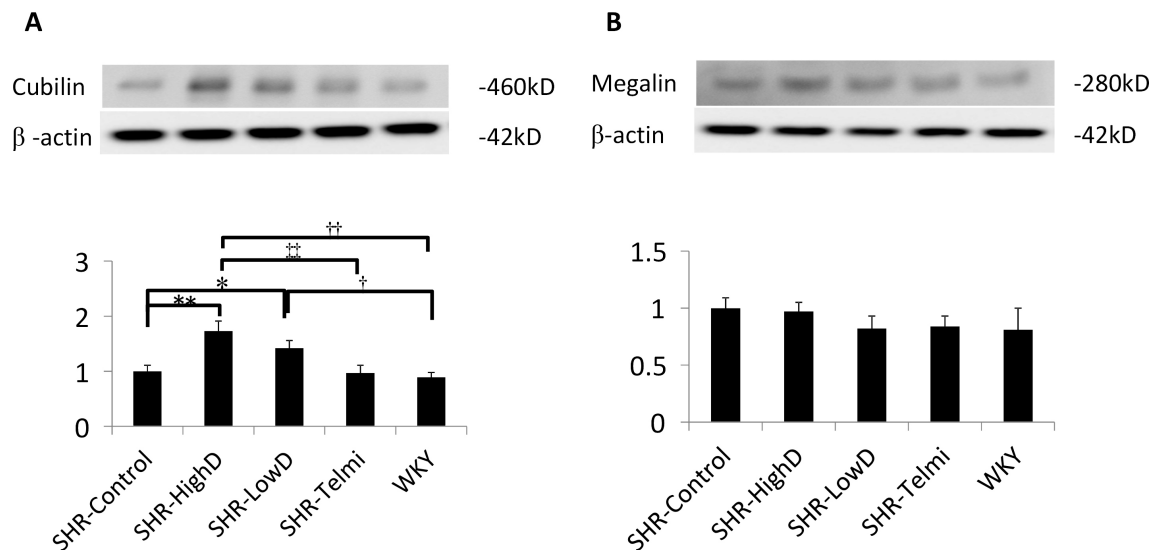


Fig. 4. Relative protein abundance of cubilin and megalin in the kidney cortex.

Graphical representation of the relative protein abundance of (A) cubilin and (B) megalin normalized to  $\beta$ -actin, in the kidney cortex. Data represent mean  $\pm$  S.E.M (n = 6). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 versus SHR-control group, ‡‡P < 0.01 versus SHR-Telmi group, †P < 0.05, ††P < 0.01 versus WKY group. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer tests.

CIC-5 蛋白の発現において、コントロール群は WKY 群よりも有意に低値であった。薬剤投与群はいずれもコントロール群よりも有意に高い発現量を示し、テルミサルタン群は各七物降下湯群よりも有意に高い発現量を示した (Fig. 5).

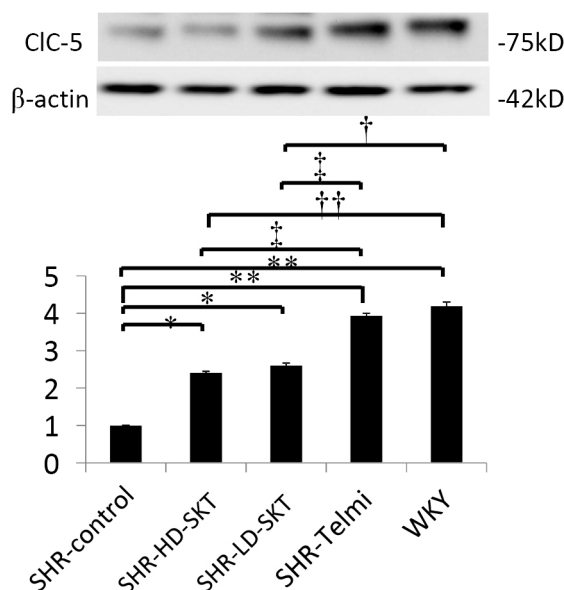


Fig. 5. Relative protein abundance of CIC-5 in the kidney cortex.

Graphical representation of the relative protein abundance of CIC-5 normalized to  $\beta$ -actin, in the kidney cortex. Data represent mean  $\pm$  S.E.M (n = 6). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 versus SHR-control group, †P < 0.05 versus SHR-telmi group, ††P < 0.01 versus WKY group. One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer tests.

## 考 察

七物降下湯は、近位尿細管細胞における CIC-5 の発現低下を阻害することにより尿中アルブミン排泄量を低下させたと考えられた。七物降下湯の投与によって、糸球体スリット膜蛋白である nephrin および、近位尿細管細胞におけるアルブミン再吸収に関与する蛋白である cubilin の蛋白発現がテルミサルタンよりも有意に高値となったことから、七物降下湯は nephrin と Cubilin の発現低下を防ぐというテルミサルタンとは異なる効果を発揮する可能性がある。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、富山大学和漢医薬学総合研究所臨床科学部門漢方診断学分野の木村真梨、富山大学大学院医学薬学研究部和漢診療学講座の馬 躍、渡り英俊および嶋田 豊である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Hiwara, N., Uehara, Y., Takada, S., Kawabata, Y., Ohshima, N., Nagata, T., Ishimitsu, T., Gomi, T., Goto, A., Ikeda, T., Yagi, S. & Omata, S. : Antihypertensive property and renal protection by shichimotsu-koka-to extract in salt-induced hypertension in Dahl strain rats. *Am. J. Chin. Med.*, **22** : 51-62, 1994.
- 2) Higuchi, Y., Ono, K., Sekita, S., Onodera, H., Mitsumori, K., Nara, Y. & Satake, M. : Preventive effects of Shichimotsu-koka-to on renal lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **21** : 914-918, 1998.
- 3) Bai, F., Makino, T., Ono, T. & Mizukami, H. : Anti-hypertensive effects of shichimotsukokato in 5/6 nephrectomized Wistar rats mediated by the DDAH-ADMA-NO pathway. *J. Nat. Med.*, **66** : 583-590, 2012.