

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月30日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590172

研究課題名（和文）慢性腎臓病における全身血管障害と保護薬物の探索

研究課題名（英文）Systemic vascular disorders in chronic kidney disease and screening for protective drugs

研究代表者

小野 孝彦 (ONO TAKAHIKO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・客員教授

研究者番号：60243028

研究成果の概要（和文）：

ラットに6分の5腎摘手術を行い、慢性腎臓病に伴う高血圧モデルを作成した。七物降下湯の投与により、血圧の上昇、血清中NO濃度の低下と asymmetric dimethylarginine (ADMA)の増加、腎組織中の dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)-2 発現量の低下を、それぞれ有意に改善した。七物降下湯は腎臓における DDAH/ADMA/NO 代謝経路を促進することにより、腎血管を弛緩させ、降圧作用を示すものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated effects of shichimotsukokato (SKT) on renal hypertension in rats subjected to a 5/6 nephrectomy (Nx). SKT significantly counteracted the increase in systolic blood pressure and plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, and the decrease in plasma NO levels and renal dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)-2 levels. It is considered that SKT reduced blood pressure mediated by the DDAH/ADMA/NO pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

腎臓は老廃物の排泄を行うとともに体液の恒常性を保つのが主な機能である。また腎臓はレニンを放出して血圧の調節に関与し、エリスロポエチンの産生により造血を刺激する。慢性腎不全とはこれらの腎機能が徐々

に破綻し、生態の恒常性が維持できなくなった状態である。それにより体内の老廃物を排出することができなくなるため、食事制限や運動制限が課されるようになり、さらに病状が進行すると最終的には人工透析療法や腎移植が必要となる。現在、約29万人もの患者が、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症などの

様々な病状の悪化により人工透析療法を受けており、それによる時間的、経済的な負荷などを伴う QOL の著しい低下とともに、約 1 兆 2 千億円の医療費の負担が問題となっている。また腎機能の低下は軽度の頃から、心筋梗塞、脳卒中など心血管疾患の大きな危険因子であることが知られており、合併症を併発または、合併症により死亡するリスクが非常に高くなることから、近年では慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease, CKD) として注目され、早期に発見・治療することが非常に重要とされている。しかし現在、CKD に対する薬物療法としては、ACE 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬、利尿薬、カルシウム拮抗剤による降圧や、抗血小板薬を用いた腎血流の改善など、腎負荷の軽減や腎保護を目的とした維持療法が施されることが主で、根本的な治療には至っていない。

そのような難治性の慢性疾患に対して、漢方医学を用いた治療法が評価されつつある。漢方医学は、陰陽二元論に基づいた中国伝統医学を起源とする医学であり、患者個人の病態や体質を独自の理論で診断し、それを元に生体の種々のバランスを調えることで、患者自身が持つ自然治癒力を高め、内的な悪化要因を解消して疾病を改善すると言われている。

これまでの予備的検討の成果として、著者は漢方処方のひとつである七物降下湯が非糖尿病性かつ非肥満の CKD 患者において ARB との併用により有用性を示すことを臨床的に報告し、また、動物実験でも七物降下湯が不可逆進行型ラット腎炎モデルに有効であることを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究ではラットに 6 分の 5 腎摘を行うことにより慢性的腎機能障害を惹起し糸球体硬化の進行する系を用いて、アンジオテンシン受容体拮抗薬テルミサルタンを対照薬とした七物降下湯の CKD に対する作用機序の解明を目指した研究を行い、その臨床における有用性を明らかにするための基礎実験を行った。その際、全身的な血管障害の目安として非対称ジメチルアルギニン (ADMA) の蓄積とともに NO の機能不全について着目して実験を行った。

3. 研究の方法

七物降下湯 (SKT) は、芍薬 (4 g)、当帰 (4 g)、黄耆 (3 g)、地黄 (3 g)、川芎 (3 g)、釣藤鈎 (3 g)、黄柏 (2 g) からなる処方 (ヒト 1 日量) である。本研究で使用した SKT は、それらの生薬 (計 22 g) を 30 分間 450 ml の水で沸騰させ、得られた煎

液を凍結乾燥することにより得られた乾燥エキスを使用した。得られたエキス量は使用した生薬量の 34.1% であった。この調製方法によって得られたエキスのヒト 1 日量は 7.5 g であることから、体重を 50 kg と換算して七物降下湯エキス 0.15 g/kg とした。得られた乾燥エキス中の rhynchophylline と isorhynchophylline の含量は、それぞれ 0.0412% (w/w) と 0.0155% (w/w) であった。

体重 180~200g の雄性 Wistar/ST ラットに 5/6 腎摘手術 (Nx) を施した。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与することで麻酔したラットの片腎 2/3 を摘出し、その 5 日後にもう一方の片腎を全摘した。Sham 手術をしたラットは、腎臓摘出以外の同一の処置を施した。Nx ラットは、ランダムに以下の 4 つの群 ($n = 6\sim 7$) に分けられた。ロサルタン投与群 (10 mg/kg/日のロサルタン、ヒトの一日投与量の約 10 倍に対応する用量) を受けた。SKT 投与群は、SKT を 0.75 または 1.5 g のエキス/kg/日 (ヒトの投与量の 5 または 10 倍に対応) の量で投与した。すべてのサンプルは、粉末状の食餌に加えることにより投与した。Sham 群および対照 (control) 群には、サンプルの代わりにデンプンを投与した。食物摂取量は、平均 21.4g/ラット/日で、各群になかった。投与は、12 週のエンドポイントまで連続して行った。血液サンプルは Nx の後 1、3、6 と 9 週に尾静脈から採取した。また、収縮期血圧 (SBP) は、尾部においてカフ法により測定した。SBP の変動を回避するために、すべての測定は午後 1 時と午後 5 時の間に行い、各ラットにおいて少なくとも 5 回の測定を 5 分間隔で行い、その平均を SBP とした。

サクリファイスの前に、24 時間尿を代謝ケージで採取した。その後、ラットは CO₂ を用いて屠殺し、下大静脈から全血を得てヘパリンで被覆したチューブに入れて血漿を得た。また、腎皮質組織からウェスタンブロット法と組織学的分析のためのホモジネートを調製した。

血液尿素窒素 (BUN) とクレアチニンはそれぞれ市販のキットで測定した。また ADMA の血漿レベルは、ELISA キットを使用して測定した。血漿 NO_x (NO の安定代謝物) の測定は硝酸還元酵素とグリーンス試薬 (1% スルファニルアミド、5% リン酸、0.1% N-1-ナフチル-エチレンジアミン) により測定した。

腎皮質をスクロース入り HEPES 緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズし、得られたタンパク質溶液を DDAH2 に対する抗体を用いた Western blot 法により解析した。内部標準として β -actin を使用した。

4. 研究成果

5/6 腎摘手術をすることにより、一時的に体重の減少が見られたが、その後は Sham 群と同様の体重の増加を示した。また、七物降下湯やロサルタンの投与群と control 群との間に差はなかった。

5/6 腎摘手術をすることにより、収縮期血圧は上昇した。七物降下湯の投与によりその値は有意に ($p < 0.05$) 抑制されていたが、用量依存性は認められなかった。ロサルタン群では、顕著に血圧が低下していた (図 1)。

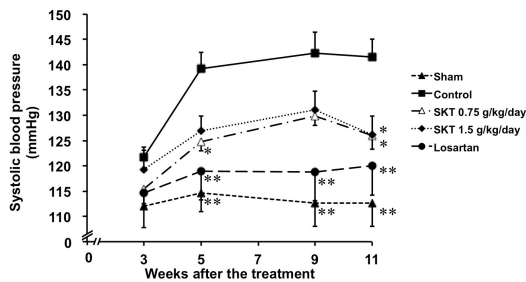


図 1 5/6 腎摘ラットにおける血圧の変化
データは平均±標準誤差で示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control by the Bonferroni / Dunnett's multiple t -test.

血清中の 5/6 腎摘手術をすることにより、血清中の BUN は顕著に増加したが、七物降下湯の投与により差は認められなかった。ロサルタン群では、9 週目、12 週目において血清中の BUN 濃度の増加傾向が認められ、12 週目においては七物降下湯 0.75 g/kg 投与群との間で有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。また、クレアチニン濃度についてはすべての群で有意な差は認められなかった。

Sham 群と比較して、5/6 腎摘後 12 週目の control 群における血清中 ADMA 濃度は、有意に増加し、七物降下湯の投与によって用量依存的に有意な ($p < 0.05$) 減少が認められた (図 2)。一方、血清中 NO 濃度は、Sham 群と比較して control 群において有意に低下し、七物降下湯の投与によって用量依存的に有意な ($p < 0.05$) 増加が認められた。

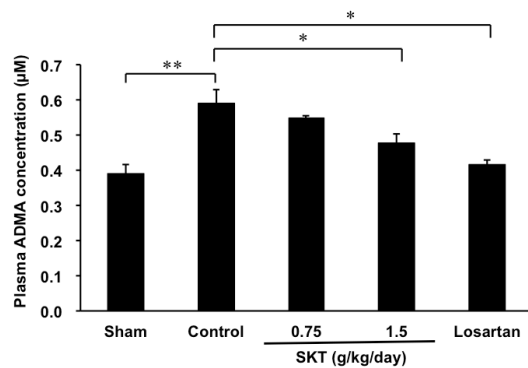


図 2 5/6 腎摘ラットにおける血漿中 ADMA 濃度
データは平均±標準誤差で示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control by the Bonferroni / Dunnett's multiple t -test.

24 時間尿を採取し、1 日尿タンパク質排泄量を測定した。Control 群における尿中タンパク質量は、8 週目以降、Sham 群と比較して有意に増加したが、七物降下湯およびロサルタン投与群との間で有意な差は認められなかった。また、12 週目の尿中クレアチニン濃度と尿量および血清中のクレアチニン濃度から、クレアチニンクリアランスを算出したところ、すべての群の間に有意な差は認められなかった。また、尿中 NAG 濃度もすべての群で有意な差は認められなかった。

5/6 腎摘手術後 12 週目の腎臓を摘出し、periodic acid-Schiff (PAS) 染色による病理組織学的評価を行った。Sham 群と比較して control 群では糸球体におけるメサンギウム細胞数およびメサンギウム領域の増加と、糸球体の硬化が認められたが、その病変の程度はマイルドなものであった。糸球体の硬化度を 5 段階のスコア化し、その平均値により評価したところ、Sham 群と比較して control 群のスコアは有意に高いものであったが、薬物投与によるスコアの差は認められなかった。

5/6 腎摘手術後 12 週目の腎臓を摘出し、皮質ホモジネート中の DDAH2 発現量を Western blot 法により解析した。Sham 群と比較して、control 群では有意 ($p < 0.01$) にその発現量が低下していたが、七物降下湯によりその発現量が有意 ($p < 0.05$) に回復させ、ロサルタン投与群でも有意 ($p < 0.01$) に発現量が増加していた (図 3)。

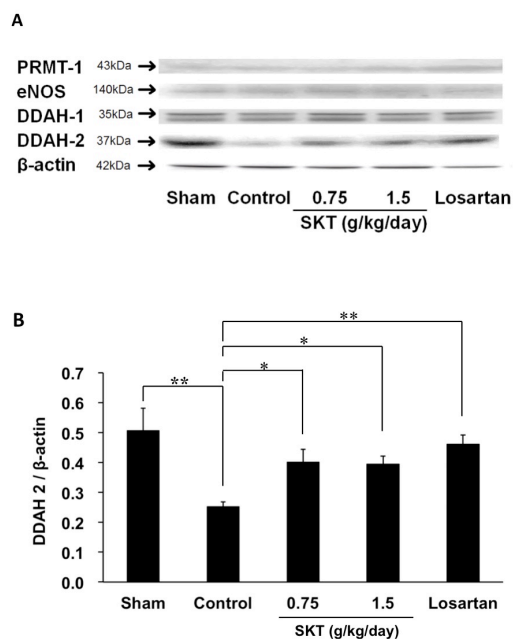


図 3 5/6 腎摘ラット腎臓における DDAH2 発現量
データは平均±標準誤差で示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control by the Bonferroni / Dunnett's multiple t -test.

本研究では、漢方処方のひとつである七物降下湯のCKDに対する作用機序の解明を目的として、ラット5/6腎摘モデルを用いて検討した。今回の実験では、5/6腎摘手術後12週目にラットをサクリファイスしたが、血清及び尿における腎機能の生化学的所見、腎臓における病理組織学的所見において、末期の慢性腎不全症状には至らず、末期腎不全へと進行する途中の段階での評価を行っていることとなった。七物降下湯は、5/6腎摘によって誘導された血圧の上昇を有意に改善し、その降圧作用が確認された。Control群では、血清中のADMA濃度の増加とNO代謝物濃度の低下が認められ、それらは七物降下湯の投与により有意に回復していたことから、七物降下湯の降圧作用の作用機序として、内因性のNO合成酵素阻害物質であるADMAの産生を抑制し、NOの産生を誘導したことにより血管を弛緩させたことが推測された。DDAHはADMAを分解してNOの原料となるL-citrullineを産生する酵素であり、生体内におけるNO産生を制御している酵素であるが、5/6腎摘により腎臓におけるDDAH2の発現量は有意に低下し、血清中のADMA濃度の増加の背景にDDAH2の減少が関与していることが推測され、その発現量の低下は七物降下湯の投与により有意な回復が認められた。このことから、七物降下湯は腎臓におけるDDAH2/ADMA/NO代謝経路を促進することにより、腎血管を弛緩させ、降圧作用を示すものと考えられた。一方、アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)であるロサルタンでも、七物降下湯と同様に、腎臓におけるDDAH2発現を増加させ、血清中のADMA濃度を減少させていたが、血液中のNO代謝物濃度には変化が認められなかった。ARBは全身における血圧の低下とは別に、輸出細動脈を弛緩させることにより糸球体濾過圧が低下させ、さらに全身の血管系におけるレニン・アンジオテンシン系を抑制することにより、腎臓と血管系の保護効果をもたらすとされる。ただし、糸球体過圧を低下させ過ぎると、結果として腎機能の悪化をきたすことになり、その点では諸刃の刃の側面を持つ。一方、七物降下湯はARBとは異なり、腎糸球体だけではなく全身的なNO代謝に作用しているものと推測された。今回の実験で、七物降下湯群ではロサルタン群よりBUNの有意な低下が認められ、臨床における使いやすさが示唆された。ARBと七物降下湯は作用機序がことなることから临床上は併用の有用性が示唆され、今後、併用効果の検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 小野孝彦
慢性腎臓病 (CKD) における凝固系と凝固第 Xa 因子の役割 (Review).
YAKUGAKU ZASSHI 132:449-453, 2012
- ② Fan Bai, Toshiaki Makino, Takahiko Ono, Hajime Mizukami
Anti-hypertensive effects of shichimotsukokato in 5/6 nephrectomized Wistar rats mediated by DDAH-ADMA-NO pathway
J. Nat. Med. (in press)
- ③ Ayaka Sumi, Natsuko Y Hanada, Fan Bai, Toshiaki Makino, Hajime Mizukami, Takahiko Ono
Roles of coagulation pathway and factor Xa in the progression of diabetic nephropathy in db/db mice
Biol. Pharm. Bull. 34(6): 824-830, 2011
- ④ Takahiko Ono, Toshiaki Makino
Basic study and clinical practice of Kampo medicines in chronic kidney disease (CKD): chronic glomerulonephritis and nephrosclerosis
J. Trad. Med. 26(5/6): 230-234, 2009

[学会発表] (計4件)

- ① 小野孝彦ほか.
慢性腎臓病 CKD と関連病態の漢方治療. ~ 高血圧を伴った CKD に対する漢方治療の基礎と臨床.
第 61 回 日本東洋医学会学術総会 (2010 年 6 月 6 日、名古屋)
- ② 小野孝彦ほか.
ARB に七物降下湯の併用で尿蛋白の減少をみた慢性腎臓病の 1 例
第 40 回日本東洋医学会東海支部学術総会 (2010 年 11 月 7 日、名古屋)
- ③ Takahiko Ono, et al.
Protective Effects of Shichimotsukokato on Anti-Thy-1-Induced Irreversible Nephritis in Rats
43rd Annual Meeting, Renal Week 2010, Am. Soc. Nephrol. (2010 年 11 月 20 日、デンバー、アメリカコロラド州)
- ④ 白帆、牧野利明、小野孝彦、水上元.
Effects of shichimotsukokato on

hypertensive CKD model
第 28 回和漢医薬学会学術大会 (2011 年 8
月 28 日、富山)

[図書] (計 1 件)

- ① 小野孝彦ほか共著
腎保護を意識した循環器薬の使い方
BEAM シリーズ No. 1. 循環器の基本薬
を使いこなす. 文光堂、2010. 131 頁の
うち 5 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 孝彦 (ONO TAKAHIKO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・客員
教授
研究者番号 : 60243028

(2) 研究分担者

牧野利明 (MAKINO TOSHIAKI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教
授
研究者番号 : 80326561

(3) 連携研究者

なし