

八味地黄丸 ②

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授 牧野 利明

糖尿病性腎症モデル

Nakagawaら¹⁾は、ラットにストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内投与し、その後、医療用八味地黄丸エキス(以下HJGとする)製剤(ヒト常用量の約1倍量)を連日経口投与しながら5週間飼育し、屠殺した。正常群と比較してSTZを投与した対照群では、有意な血糖値、血中糖化タンパク質濃度、血中トリグリセリド(TG)濃度、尿タンパク量、腎臓重量、腎臓中終末糖化産物(AGEs)とソルビトールの量の高値を示したが、HJG群ではそれぞれ有意な抑制がみられた。

彰ら²⁾は、ラットにSTZを静脈内投与し、HJG(ヒト常用量の約10倍量)を混餌投与しながら4または16週間飼育した。16週後の空腹時血糖値、クレアチニンクリアランス(Ccr)、腎組織評価における糸球体面積、ボウマン嚢面積、ボウマン嚢に占める糸球体面積比は、それぞれ正常群と比較して対照群で有意に増加し、体重は有意に低下したが、HJG群ではそれぞれ有意に回復していた。尿中アルブミン排泄量は、4週、16週時ともに、正常群と比較して対照群で有意に増加し、尿中NO代謝物排泄量は有意に低下したが、HJG群ではそれぞれ有意な回復がみられた。

Yokozawaら³⁾は、ラットの左腎の半分を摘出し、その7日後に右腎を全摘、その後STZを腹腔内投与し、数日後からHJG(ヒト常用量の0.5、1、3倍量)を連日経口投与、3週間毎に採血しながら15週間飼育し、その後屠殺した。sham群と比較して対照群では、実験開始直後から血糖値と尿タンパク量の有意な高値と、Ccrの有意な低値を示したが、血糖値は6週からHJG高用量群で、9週から中用量群で、12週から全用量群で用量依存的に有意な改善が、尿タンパク量は3週から15週まで全用量群で、Ccrは12週から15週まで全用量群で、用量依存的に有意な改善が認められた。15週時の血清中糖化タンパク質、尿素窒素(BUN)、TG、総コレステロール濃度、マロンジアルデヒド(MDA)濃度と、腎組織中AGEs、ソルビトール量、MDA量は、正常群と比較して対照群で有意な高値を、血清アルブミン濃度は有意な低値を示したが、血清アルブミンとMDAの各濃度は高用量群でのみ、総コレステロール濃度は低用量と高用量群で、腎組織中AGEs量は中用量群から、それ以外の項目は全用量群で有意な改善が認められた。腎臓の組織評価では、糸球体硬化、尿細管間質、糸球

体メサンギウム領域拡大は低用量投与群から、腎動脈硬化は中用量群から、HJG群において有意な改善が認められた。

Yamabeら^{4, 5)}は、2型糖尿病自然発症Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットに、HJG(ヒト常用量の0.5、1、3倍量)を連日経口投与、8週間毎に採血しながら32週間飼育し、その後屠殺した。正常群であるLong-Evans Tokushima Otsuka(LETO)ラットと比較して、対照群では実験開始直後から有意に高い血糖値と尿タンパク量を示していたが、HJG群では、尿タンパク量は低用量群で8週後から、血糖値は16週後から高用量群で、24週後では全用量投与群で、用量依存的に有意な抑制がみられた。Ccrは、正常群と比較して対照群の32週後で有意な低値を示し、HJG群では低用量群から用量依存的に有意な改善がみられた。屠殺時の腎臓重量は、正常群と比較して対照群で有意な高値を示し、HJG中用量群でさらに有意な高値を示した。腎組織中の糖化タンパク質、AGEs、過酸化脂質量、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β_1 、フィブロネクチン、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)、2型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)、リン酸化I κ B発現量、膵臓におけるTGF- β_1 、フィブロネクチンの発現量は、正常群と比較して対照群で有意な高値を示し、HJG群では腎臓のiNOS、COX-2、リン酸化I κ B発現量、膵臓のTGF- β_1 、フィブロネクチン発現量が中用量群から、それ以外はそれぞれ低用量群から用量依存的に有意な改善がみられた。膵臓の重量は、正常群と比較して対照群で有意な低値を示し、HJG高用量群で有意な回復がみられた。膵臓におけるiNOS発現量は、正常群と対照群で差はみられなかったが、HJG中および高用量群で用量依存的で有意な低値を示した。

以上のことから、八味地黄丸は1型、2型糖尿病ともに有効性を示し、腎障害を予防する作用があることが示された。

低温ストレスによる尿閉モデル

Imamuraら⁶⁾は、ラットに、多糖類を除去した八味地黄丸熱水抽出エキス(100mg/kg/日、ヒトでの投与量との換算値は不明)を7日間連続経口投与したところ、対照群と比較して八味地黄丸投与群において皮膚温の有意な高値を認めた。その後ラットの膀胱にカテーテルを設置し、4℃環境に40分間静置したところ、正常群と比較して低温

環境にさらした対照群で、有意な排尿間隔と膀胱容量の低値が認められたが、それらは八味地黄丸投与群において有意に回復していた。また、八味地黄丸投与群において膀胱内の有意な最大排尿圧の低値が認められた。さらにその後、後肢皮膚を剥離し、免疫染色により一過性受容器電位チャンネル(TRP)サブファミリーM8の皮下における発現量を評価したところ、対照群と比較して八味地黄丸投与群で有意な低値が認められ、それはmRNA発現量とも相関していた。以上のことから、八味地黄丸は低温に対する抵抗力を持たせることにより、尿閉に対する改善作用を示すことが推測された。

シクロホスファミドによる過活動膀胱モデル

Leeら⁷⁾は、ラットにシクロホスファミドを腹腔内投与し、八味地黄丸エキス製剤(90mg/kg/日、台湾の製剤で、台湾でのヒト常用量とほぼ同じ)を翌日から5日間連続して強制経口投与した。5日目の24時間の排尿回数は、正常群と比較してシクロホスファミドを投与した対照群で有意に増加し、膀胱の収縮間隔は有意に低下したが、八味地黄丸投与群ではそれぞれ有意な回復がみられた。その後膀胱を摘出し、その重量は正常群と比較して対照群で有意に高値であったが、八味地黄丸投与群では有意な抑制がみられた。膀胱粘膜におけるプリン受容体ファミリーP2X2とP2X3、膀胱粘膜と平滑筋におけるムスカリン性ACh受容体2、3のタンパク発現量は、正常群と比較して対照群で有意に高値であったが、八味地黄丸投与群では有意な抑制がみられた。同様の処置をした5日目の別のラットに、酸性ATP水溶液を1.5時間点滴したところ、正常群と対照群との間で膀胱の収縮間隔に差は認められなかったが、対照群と比較して八味地黄丸投与群で有意な収縮間隔の低値がみられた。正常群と比較して、シクロホスファミドを投与せずに八味地黄丸を投与した群でも、有意な収縮間隔の低値がみられた。ATP処理したラットから採取した膀胱粘膜でのTRPV1、P2X2、P2X3発現量は、正常群と比較して対照群で有意な亢進がみられたが、八味地黄丸投与群では有意に抑制されていた。以上のことから、八味地黄丸は膀胱粘膜のP2X受容体、ムスカリン性ACh受容体の過剰発現を抑制することにより、過活動膀胱を改善することが推測された。

腎不全モデル

Yamabeら⁸⁾は、ラットの左腎の半分を摘出し、その10～14日後に右腎を全摘する3/4腎摘モデルを作り、数日後からHJG(ヒト常用量の0.5、1、3倍量)を連日経口投与、3週間毎に採血しながら15週間飼育し、その後屠殺した。血中BUNはsham群と比較して対照群では手術直後から有

意な高値を示したが、HJG投与群では高用量群で6週目から、中、低用量群では15週目で有意な抑制がみられた。屠殺時の腎臓の重量と腎組織評価での糸球体硬化率、間質の線維化、間質性炎症スコア、尿タンパクとメチルグアニジンの各濃度、血清Cr濃度は、sham群と比較して対照群で有意な高値を、Ccr、血清総タンパク質とアルブミン各濃度、腎組織ホモジネートのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性は有意な低値を示したが、HJG投与群では血清総タンパク濃度が高用量群のみで、尿中タンパク質濃度、血清アルブミン濃度と腎SOD活性は中用量群から、それ以外の項目はすべて低用量群から、それぞれ用量依存的に有意な改善を示した。腎ホモジネートのグルタチオンペルオキシダーゼ活性は、sham群と比較して対照群で有意な高値を示し、HJG中用量群でさらに有意な高値を示した。

Parkら⁹⁾は、ラットの左腎の3分の2を摘出し、その12～14日後に右腎を全摘する5/6腎摘モデルを作り、生葉から調製した八味地黄丸エキス(ヒト常用量の約3倍量)を連日経口投与しながら10週間飼育し、その後屠殺した。腎臓重量、BUN、血清中Cr、TG、非エステル化脂肪酸、総コレステロール、HDLコレステロール、LDL/VLDLコレステロール、の各濃度、尿タンパク量、腎臓中のTGと総コレステロール、核内因子(NF)- κ Bp65、COX-2のタンパク発現量は、Sham群と比較して対照群で有意に増加し、腎臓でのペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR)- α 、脂質合成転写因子(SREBP)-1、-2、SOD活性、還元型グルタチオン(GSH)量とGSH量/酸化型グルタチオン(GSSG)量比、酸化ストレス応答転写因子Nrf2タンパク発現量は有意に低下していたが、八味地黄丸エキス投与群ではそれぞれ有意な改善がみられた。腎組織観察でも八味地黄丸投与群で尿細管損傷の改善がみられた。

以上のことから、八味地黄丸には脂質代謝異常の改善と抗酸化作用により、腎保護作用を示すことが推測された。

記憶障害モデル

Hirokawaら¹⁰⁾は、ラットにHJG製剤(ヒト常用量の0.7および3倍量)を経口投与、その30分後にスコポリaminを腹腔内投与し、さらにその30分後に放射状迷路行動(8本のアームの先端に報酬となる餌を置き、食事制限によって空腹となったマウスに迷路内で餌を探索させる)を評価したところ、正常群と比較してスコポリaminを投与した対照群で有意な空間記憶障害が観察されたが、HJG群では両群とも有意な改善作用が確認された。また脳前頭皮質中のACh量は、正常群と比較してスコポリaminを投与した対照群で有意な低値であったが、高用量群で有意な回復が認められた。次に、正常ラットにHJG製剤(同0.7および3倍量)を7日間連続経口投与し、屠殺したときのラット脳前頭皮質中のACh量は、対照群と比較してHJG投与群では両群と

も有意に増加していた。HJG(同0.7および3倍量倍量)を正常ラットに単回投与して1時間後の脳前頭皮質中コリンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)活性は、対照群と比較して高用量群で有意な高値を、視床下部のAchエステラーゼの活性は対照群と比較して低用量群で有意な高値を認めた。以上のことから、八味地黄丸は中枢コリン作動性神経系を介して記憶改善作用を示すことが推測された。

無重力負荷モデル

Songら^{11, 12)}は、マウスにHJG(ヒト常用量の約13倍)を飲水として2日間投与後、7mLの生理食塩水を腹腔内投与し、10秒間の無重力環境にさらした。その後、絶水、絶

食下で体重を測定しながら飼育し、24時間後にマウスを屠殺した。対照群での体重減少曲線に対しHJG群では、無重力環境負荷1~5時間後の体重減少の有意な抑制、尿量と24時間後の血漿中抗利尿ホルモン濃度、脾臓における熱ショックタンパク(HSP)-70発現量の有意な低値が認められた。以上の変化は、無重力環境を負荷しなかったマウスでは認められなかった。次に、マウスにHJGを飲水として3日間投与後10秒間の無重力環境にさらし、その24時間後に採血した。対照群と比較してHJG群では、血中Ca濃度、P濃度の高値、血中Ca/P濃度比の低値がみられた。

以上のことから、八味地黄丸は無重力環境での水分代謝、骨代謝異常に対する保護作用を持つ可能性が示唆された。

表 各種モデルに対する試験結果(まとめ)

	著者	使用動物	投与量 (有意差のあった用量のみ記載)	結果 (一部抜粋)
糖尿病性腎症モデル	Nakagawaら ¹⁾	Wistarラット(♂) (160~170g, n = 8)	HJG 0.15g/kg/日 経口投与(5週間)	血糖値、糖化タンパク、TG、尿タンパク、腎臓重量、腎AGEs、ソルビトール(↓)
	彰ら ²⁾	SDラット(♂) (8週齢, n = 5)	HJG 0.8%混餌投与 (4, 16週間)	Ccr, 糸球体面積、ポウマン嚢面積、糸球体/ポウマン嚢面積比、空腹時血糖値、尿中アルブミン(↓) 尿中NOx(↑)
	Yokozawaら ³⁾	Wistarラット(♂) (5週齢, n = 8)	HJG 0.05, 0.1, 0.2g/kg/日 経口投与(15週間)	血糖値、尿タンパク、糖化タンパク質、BUN、TG、総コレステロール、AGEs、ソルビトール、MDA(↓) Ccr, 血清アルブミン(↑) 腎組織評価(↓)
	Yamabeら ^{4, 5)}	OLETFマウス(♂) (22週齢, n = 10)	HJG 0.05, 0.1, 0.2g/kg/日 経口投与(8~32週間)	腎糖化タンパク質、AGEs、過酸化脂質、iNOS、COX-2、リン酸化IκB(↓) 腎・脾臓TGF-β ₁ 、フィブロネクチン(↓) 脾臓重量(↑)
低温ストレスによる尿閉モデル	Imamuraら ⁶⁾	SDラット(♀) (10週齢, n = 12)	多糖類除去した熱水抽出エキス0.1g/kg/日 経口投与(7日間)	皮膚温、排尿間隔、膀胱容量(↑) 最大排尿圧、TRPM8発現量(↓)
CPAによる過活動膀胱モデル	Leeら ⁷⁾	Wistarラット(♂) (220~300g, n = 8)	台湾の製剤0.09g/kg/日 経口投与(5日間)	排尿回数、膀胱重量の改善 膀胱粘膜のP2X2、P2X3、M2、M3、TRPV1受容体タンパク発現量(↓)膀胱収縮間隔(↓)
腎不全モデル	Yamabeら ⁸⁾	Wistarラット(♂) (120~130g, n = 7)	HJG 0.05, 0.1, 0.2g/kg/日 経口投与(15週間)	血中BUN(↓)TP(↑) 腎臓重量、腎組織評価、尿中タンパク質、メチルグアニジン、Ccr、血清Cr、TP、Alb、腎組織SOD活性いずれも改善 グルタチオンペルオキシダーゼ(↑)
	Parkら ⁹⁾	Wistarラット(♂) (200g, n数不明)	生薬から調整したエキス 0.15g/kg/日 経口投与(10週間)	血清中脂質濃度、尿細管損傷の改善 腎臓中NF-κBp65、COX-2タンパク発現量(↓) PPAR-α、SREBP-1、2、SOD活性、GSH量、GSH/GSSG比、Nrf2タンパク発現量(↑)
記憶障害モデル	Hirokawaら ¹⁰⁾	Wistarラット(♂) (7~8週齢, n = 5~22)	HJG 0.1, 0.5g/kg/日 経口投与(単回, 7日間)	単回投与: 空間記憶障害改善 前頭皮質Ach、CAT活性(高用量: ↑) 視床下部Achエステラーゼ(低用量: ↑) 連続投与: 前頭皮質Ach(↑)
無重力負荷モデル	Songら ^{11, 12)}	ICRマウス(♂) (6週齢, n = 6)	HJG 1.0g/kg/日 飲水投与(2, 3日間)	体重(↑)尿量、24時間後の血漿中抗利尿ホルモン、脾臓HSP-70発現量(↓) 血中Ca、P(↑) 血中Ca/P比(↓)

【参考文献】

- 1) Nakagawa T, et al.: A study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. J Trad Med 18: 161-168, 2001
- 2) 彰 一祐 ほか: ストレプトゾチン誘発糖尿病ラットにおける八味地黄丸の効果. J Trad Med 20: 38-43, 2003
- 3) Yokozawa T, et al.: A study on the effects to diabetic nephropathy of Hachimi-jio-gan in rats. Nephron Exp Nephrol 97: e38-48, 2004
- 4) Yamabe N, et al.: Activity of the Chinese prescription Hachimi-jio-gan against renal damage in the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat: a model of human type 2 diabetes mellitus. J Pharm Pharmacol 58: 535-545, 2006
- 5) Yamabe N, et al.: Protective effect of Hachimi-jio-gan against the development of pancreatic fibrosis and oxidative damage in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. J Ethnopharmacol 113: 91-99, 2007
- 6) Imamura T, et al.: A galenical produced from Ba-Wei-Die-Huang-Wan (THC-002) provides resistance to the cold stress-induced detrusor overactivity in conscious rats. NeuroUrol Urodyn 32: 486-492, 2013
- 7) Lee WC, et al.: Ba-Wei-Die-Huang-Wan (Hachimi-jio-gan) can ameliorate cyclophosphamide-induced ongoing bladder overactivity and acidic adenosine triphosphate solution-induced hyperactivity on rats prestimulated bladder. J Ethnopharmacol 184: 1-9, 2016
- 8) Yamabe N, et al.: Protective effect of Hachimi-jio-gan against renal failure in a subtotal nephrectomy rat model. J Pharm Pharmacol 57: 1637-1644, 2005
- 9) Park CH, et al.: Rokumi-jio-gan-containing prescriptions regulate oxidative stress through improving dyslipidemia in a subtotal nephrectomized rat model. J Ethnopharmacol 148: 449-458, 2013
- 10) Hirokawa S, et al.: Effect of Hachimi-jio-gan on scopolamine-induced memory impairment and on acetylcholine content in rat brain. J Ethnopharmacol 50: 77-84, 1996
- 11) Song QH, et al.: Effect of Kampo herbal medicines on murine water metabolism in a microgravity environment. Am J Chin Med 30: 617-627, 2002
- 12) Song QH, et al.: Effects of traditional Chinese medicines on murine bone metabolism in a microgravity environment. Am J Chin Med 31: 739-749, 2003