

## 2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 調査・共同研究に対する助成 —

2002年3月20日

財団法人 日中医学協会  
理事長 殿

研究代表者氏名 横澤 隆子



所属機関名 富山医科大学

部署・役職 知漢薬研究所・助教

所在地 〒930-0194 富山市杉谷2630

電話 076-434-7631 内線 \_\_\_\_\_

### 1. 研究テーマ

糖尿病性腎症に有効な伝統薬物の探索

2. 研究期間 自 2001年5月1日 ～ 至 2002年3月15日

### 3. 研究組織

日本側研究者氏名 横澤 隆子

所属機関 富山医科大学 職名 助教

中国側研究者氏名 何 立群

所属機関 上海中医药大学 職名 教授

### 4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 糖尿病性腎症に有効な伝統薬物の探索

についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	339,658 円	50,000 円	610,342 円	1,000,000 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消耗品費	325,000 円	試薬等（並木薬品株式会社）
	14,658	フィルム, 現象（写真の大森）
旅 費	50,000	学会参加費（中川孝子）
そ の 他	250,719	パソコン-バック代（株式会社 コジマ）
	30,912	プリンタ代（株式会社 コジマ）
	250,000	研究協力謝金（Eun-Ju Cho）
	78,502	論文校正代と送料（ダグラス科学英訳校正サービス）
	209	切手代

## 糖尿病性腎症に有効な伝統薬物の探索

研究者氏名 助教授 横澤隆子

日本研究機関 富山医科薬科大学和漢薬研究所

中国共同研究者氏名 教授 何立群

中国所属機関 上海中医薬大学附属曙光病院

共同研究者名 中川孝子 (博士課程学生)

### 要旨

advanced glycation endproducts (AGEs) は糖尿病性腎症の成因に大きく関与しており, AGEs 生成の抑制が腎症発症・進展防止に重要であることが知られている。このことから, 本研究では AGEs 阻害薬の可能性を伝統薬物に求め, まず *in vitro* の評価系で検討した。使用した漢方方剤 12 種類のうち, 最も AGEs 生成を抑制した漢方方剤は温脾湯で, 次いで桃核承気湯, 桂枝茯苓丸, 大黃牡丹皮湯の順であった。実験に供した 21 種類の構成生薬では大黃, 桂皮, 牡丹皮, 芍薬に強い抑制作用を認め, 大黃剤, 駆お血剤ならびにタンニン生薬が AGEs の生成を抑制しているものと考えられた。またこれらは陽性対照物質のアミノグアニジンより強い活性を示した。一方, 糖尿病性腎症モデル動物を用いた実験では, 温脾湯, 八味地黄丸, 桂枝茯苓丸, 柴苓湯はそれぞれ異なった作用機序で, 糖尿病性腎症の進展を抑制している可能性が示唆された。

Key Words advanced glycation endproducts、糖尿病性腎症、温脾湯、桂枝茯苓丸、大黃

### 緒言:

わが国の透析患者数は年々増加し, 現在日本では約 20 万人が透析療法を受けている。しかし原疾患の約 1/4 は糖尿病性腎症が占め, 最近の維持透析患者数の増加の最大の原因となっている。このような状況下, 糖尿病性腎症の発症, 進展を規定する因子の解明とともに, 治療薬の開発が急がれている。

糖尿病性腎症の成因の源は持続する高血糖であることが Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) study の結果からも示され, 厳格な血糖コントロールを長期間にわたり維持できれば, 発症および進行を著明に抑制することが明らかになっている。しかし臨床的には実際上厳格なコントロールを達成することは, 副作用としての低血糖とのからみもあり必ずしも容易ではなく, これは DCCT study でも指摘されている問題点である。そこで血糖コントロールを厳格に維持できないために生ずる糖質代謝異常を是正して, 合併症の発症防止に少しでも貢献できる薬剤の開発が望まれ, 現在その代表的な流れとして, ポリオール代謝異常改善薬と蛋白糖化反応阻害薬があり, ポリオール代謝異常の改善については, 糖尿病におけるグルコースからソルビトールに至る代謝経路の亢進を是正するために, その触媒酵素であるアルドース還元酵素を阻害する薬剤が開発され, 糖尿病性神経障害を適応として市販されている。これに対して蛋白糖化反応阻害薬の方は, アミノグアニジンのみの開発が進められているが, 他の薬剤についてはほとんど知られていない。アミノグアニジンにしても, 臨床的には糖尿病性腎症を対象に大規模な第 3 相試験が進行中であるが, 安全性については慎重な治験が望まれている。一方, 漢方方剤や生薬のあるものは糖尿病や腎疾患などに対して一定の成績を挙げており, 多角的な治療薬剤としての可能性の高いことが示唆されている。

本報ではこの可能性をさぐる手始めに、糖尿病合併症に頻用されている大黄剤、柴胡剤、駆お血剤、八味地黄丸などの地黄剤を選び、その病因の AGEs 生成抑制作用を指標に、まずスクリーニング試験を行った。さらに 4 方剤について糖尿病性腎症モデル動物を用い検討した。

#### 方法:

in vitro 評価系:牛血清アルブミン (10 mg/ml) にグルコース、フルクトース、あるいは漢方方剤を加え、37°Cで 2 週間インキュベーション後、AGEs 生成量を蛍光検出器 (Ex=350 nm, Em=450 nm) で測定した。動物実験:Wistar 系雄性ラットに 3/4 腎摘を施し、次いでストレプトゾトシン (35 mg/kg 体重) を腹腔内投与し、糖尿病性腎症モデルを作製した。次いで温脾湯、八味地黄丸、桂枝茯苓丸、柴苓湯エキスをそれぞれ 150 mg/kg 体重/日経口投与し、5 週目の血中、尿中の生化学的パラメーターとチオバルビツール酸反応物質、腎組織中のソルビトール、AGEs を測定した。

#### 結果:

表 1 に示したように、AGEs 生成抑制作用は、大黄含有方剤で強く ( $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ )、駆お血剤、地黄剤も強い作用を示したが、柴胡剤は陽性対照物質のアミノグアニジンより弱かった。実験に供した 21 種類の構成生薬では大黄、桂皮、牡丹皮、芍薬に強い抑制作用を認めた。次に温脾湯 (大黄含有方剤)、八味地黄丸 (地黄剤)、桂枝茯苓丸 (駆お血剤)、柴苓湯 (柴胡剤) について、糖尿病性腎症モデルを用い検討した結果、血中グルコース、中性脂肪がいずれの方剤においても有意に低下したが、クレアチニンクリアランスと尿蛋白量は桂枝茯苓丸、八味地黄丸投与群で改善作用が認められた。一方、血中チオバルビツール酸反応物質は桂枝茯苓丸、温脾湯、柴苓湯投与群で有意に低下したが、腎組織中のソルビトールは八味地黄丸、柴苓湯、桂枝茯苓丸投与群で、AGEs は 4 方剤いずれにおいても有意に低下していた。なお腎機能に好影響を及ぼした桂枝茯苓丸、八味地黄丸について現在、長期動物実験を進行中である。

表 1.  $IC_{50}$  values of prescriptions tested against AGEs formation

方剤名	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
温脾湯	7.85 ± 0.15
桃核承気湯	10.96 ± 0.16
桂枝茯苓丸	11.56 ± 0.14
大黄牡丹皮湯	18.18 ± 0.44
真武湯	31.43 ± 0.14
当帰芍薬散	41.22 ± 1.38
八味地黄丸	45.55 ± 1.10
牛車腎気丸	47.03 ± 1.12
柴胡桂枝湯	54.82 ± 1.44
小柴胡湯	80.81 ± 0.90
柴苓湯	81.44 ± 1.96
補中益気湯	127.35 ± 1.13
アミノグアニジン	59.20 ± 1.47

## 考察:

食品の加熱調理ほど急速ではないが、蛋白糖化反応が生体内でも進行していることが判明し、糖尿病性腎症などの病態との関係が示唆されている。蛋白糖化反応は大略するとアマドリ転位産物を生成する前期反応と、その後 AGEs へと変化する後期反応に分けて考えることができ、AGEs は蛍光性、褐色化、分子架橋形成などの物理化学的な性状を有しており、また、血管内皮細胞やマクロファージなどに発現する細胞膜レセプターによって、リガンドとして認識されるという生物学的な特徴も有している。前期反応は、蛋白質のアミノ基とグルコースとの非酵素的な二分子反応であるため、反応を促進するためには蛋白質あるいはグルコースの濃度を上げる必要があるが、生体内でグルコース濃度が高くなるという病態は糖尿病状態にあてはまる。また、生体内蛋白質は個々の寿命が異なるので、当然、短寿命のものより長寿命の方が蛋白糖化反応が後期まで進行すると考えられている。一方、アマドリ転位産物の形成には酸化反応が関与しないのに対し、AGEs の特徴の 1 つである蛍光性、架橋構造の形成には酸化反応が関与すること、またアマドリ転位産物は、活性酸素によって酸化されて AGEs 化する反面、活性酸素の発生源でもあることが桜井ら (1988)、Smith ら (1992)、Fu ら (1994) によって報告されている。従って、蛋白糖化反応の進行は、アマドリ転位産物からの活性酸素の発生により、酸化ストレスを増加させると考えられている。しかし AGEs はその反応の性質上、単一の物質ではなく、多種なものと考えられており、本研究では AGEs に対する評価系を Vinson と Howard (1996) が報告している蛍光特性を用いた比色定量法で検討した。

実験に供した 12 種類の漢方方剤の中では、AGEs 生成を最も抑制したのは温脾湯であり、次いで桃核承気湯、桂枝茯苓丸、大黄牡丹皮湯と、大黄剤ならびに駆お血剤に強い活性を認めた。これに対し、柴胡桂枝湯、小柴胡湯、柴苓湯、補中益気湯のような柴胡剤は弱い結果を示していた。先に引網ら (2000) は糖尿病合併症患者 141 例を対象に和漢薬治療の効果を報告しているが、その中で厚生省糖尿病調査研究班の病期分類に従って糖尿病性腎症に用いられている漢方方剤の使用頻度を各病期別に検討し、駆お血剤や地黄剤は各病期に亘ってほぼ同程度に用いられているのに対し、柴胡剤は腎症の病期が進むにつれて減少する傾向にあること、また罹患歴で見た場合、柴胡剤は罹病年数が短い時期に多く用いられている傾向があり、駆お血剤はほぼ全ての罹病年数に亘り用いられていることを示している。本研究では地黄剤として八味地黄丸と牛車腎気丸を用いているが、これら方剤は大黄剤よりは弱かったが、柴胡剤よりは強い作用を示し、糖尿病合併症患者に用いられている場合、この地黄剤については異なっていた。

一方、漢方方剤を構成している生薬 21 種類の AGEs 生成に及ぼす効果を検討したところ、大黄が最も強い活性を示し、大黄剤で認められた作用は、大黄によることが推測された。また桂皮、牡丹皮、芍薬などのタンニン含有生薬が強い活性を示し、タンニンが蛋白糖化反応抑制に関与していることが示唆された。

桜井ら (1988)、Bucala ら (1991) はアマドリ化合物より AGEs が生成される過程で  $O_2^-$  が生じること、また  $O_2^-$  は NO と反応し、ONOO<sup>-</sup> さらには  $\cdot OH$  が生成されることを報告しているが、タンニンにこのようなラジカルを消去することを我々はすでに明らかにしており、AGEs 生成の抑制に影響を及ぼしているものと考えられた。これに対し地黄剤、柴胡剤の根幹をなしている地黄、柴胡には AGEs 生成を抑制する作用は認められず、地黄剤、柴胡剤で認められた作用がどのように発現しているのか、今後の検討課題である。

蛋白糖化反応阻害剤としてアミノグアニジンの開発が進められ、現在糖尿病性腎症を対象に、大規模な二重盲検試験が進行中であるが、本剤の有効性もさることながら安全性については特に慎重な治験が望まれている。このような状況下、アミノグアニジン以外の新たな蛋白糖化反応阻害剤の登場が望まれているが、現在までの所、メチルグアニジンやアミノグアニジン誘導体について糖尿病動物を用いた報告がなされているが、伝統薬物を用いた報告はほとんど見られない。しかし本実験結果より、漢方方剤と生薬にアミノグアニジンより強力な AGEs 生成抑制作用を見出し、伝統薬物からの糖尿病性腎症治療薬の開発の可能性が示

唆された。また動物実験から、温脾湯、八味地黄丸、桂枝茯苓丸、柴苓湯はそれぞれ異なった作用機序で、糖尿病性腎症の進展を抑制している可能性が示唆された。

注:本研究は、2001年8月18日『第18回和漢医薬学会大会』のミニシンポジウムにて口演発表、『Journal of Traditional Medicines』(Vol. 18, p. 107-112, 2001年; Vol. 18, p. 161-168, 2001)に掲載。

作成日:2002年3月15日