

ニュージーランドマウス (NZB/WF₁) の 腎障害に対するグリチルリチンの作用

織田 真智子

近畿大学医学部薬理学教室

Effects of glycyrrhizin on renal failure in NZB/WF₁ mice

Machiko Orita

Department of Pharmacology, Kinki University School of
Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

The effects of glycyrrhizin (Gly.) and dexamethazone (Dexa.) and the combination of the two drugs on the development of renal disease and survival in female NZB/WF₁ mice were examined.

The mice were treated with Gly. (dose 20 mg/kg of body weight) or Dexa. (dose 1.0 mg/kg of body weight) or a combination of the two drugs twice a week. These treatments were started at 4 weeks old and 20 weeks old. Control mice were given saline. Body weight and proteinuria were measured every two weeks and renal histology, hemolytic test (against sheep red blood cells) and the number of plaque forming cells were observed at 8 months old. When these treatments were started at 4 weeks old, the survival time was 314 days in Gly. -treated mice, 351 days in Dexa. -treated mice, 378 days in mice treated with both drugs and 263 days in untreated control mice. Survival time was prolonged similarly in Gly. -treated mice and in mice treated with Gly. and Dexa. starting at 20 weeks old.

Administrations of Gly., Dexa., or both drugs protected NZB/WF₁ mice from the development of glomerulonephritis and the combination therapy of the two drugs was the most effective. These results indicate that the use of Gly. alone or the combination of Gly. and a steroid might be valuable against autoimmune diseases.

Key words : Glycyrrhizin, dexamethazone, NZB/WF₁ mice

緒 言

NZB/WF₁ マウスは、生後4ヶ月前後で多種の自己抗体を産生し、尿蛋白の排泄などヒト・エリトマトーデス類似の免疫複合体腎炎を自然

発症するモデル動物として注目されている。現在、自己免疫疾患治療薬としては主にステロイド剤や免疫抑制剤などが使用されているが、副作用の問題もあり、必ずしも十分な治療効果が得られていない。

一方、グリチルリチン (Gly.) は生薬甘草の有効成分として単離精製され、構造式も明らかにされており、薬理作用の検討も盛んに行われている。グリチルリチンの薬理作用は極めて多様で、抗動脈硬化作用¹、脂質代謝系への作用²、糖質ホルモン拮抗作用³、実験的肝障害抑制作用⁴、免疫抑制作用⁵、ステロイドホルモン様の作用⁶等様々な報告があり、免疫系疾患に対して治療効果を示す可能性が推測されている。

本研究では NZB/WF₁ マウスに Gly. を投与し、腎病変の発症や生存日数に及ぼす影響を観察するとともにステロイド剤との併用効果などについても検討した。

材料と方法

1. 試薬

生薬甘草の有効成分であるグリチルリチン (Fig. 1) (以下 Gly. と略) はミノファーゲン製薬本舗製のグリチロン注一号 (グリチルリチン 20 mg/ml 溶液) を使用した。

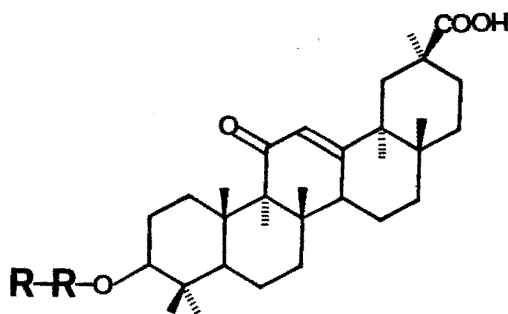


Fig. 1 The structure of Glycyrrhizin.
R = glucuronic acid

副腎皮質ホルモン製剤としては、萬有製薬株式会社製デカドロン注射液 (リン酸デキサメタゾン 4.0 mg/ml 溶液, 添加物として亜硫酸水素ナトリウム 0.5 mg, パラオキシ安息香酸メチル 1.5 mg, パラオキシ安息香酸プロピル 0.2 mg, クレアチニン 8.0 mg を含有) (以下 Dexa. と略) を使用した。

2. 実験動物

チャールズリバー社よりニュージーランド B/W F₁ マウス♀ 3.5週令を購入し、日本クレ

ア製固形飼料 CE-2 および水道水で通常条件下 (気温 22~23°C, 湿度 50%) で飼育した。

3. 実験方法

実験 1: 4週令の B/W F₁ マウス♀を 1群 50匹として 4群に分け、1群は対照群として生理食塩水を、2群は Gly. 単独投与群、3群は Dexa. 単独投与群、4群を Gly., Dexa. 併用群とした。2週間に 1回、体重を測定するとともにテストペーパー (マイルス三共株式会社製・ウリスティックス) で尿蛋白の測定を行いながら、生存日数を確認した。生後 8ヶ月目に、各群 6匹の腎組織所見を光学顕微鏡及び電子顕微鏡で観察した。また、各群 10匹のマウスについてヒツジ赤血球に対する溶血試験を行った。

実験 2: B/W F₁ マウスを通常条件下で尿蛋白の測定を行いながら飼育し、尿蛋白が検出され始めた 20週令のマウスを 1群 60匹として 4群に分け、実験 1と同様に Gly. と Dexa. の投与を行った。2週間に 1回、体重と尿蛋白を測定した。生後 8ヶ月目に各群 6匹の腎組織を光学顕微鏡・電子顕微鏡にて観察し、更に、ヒツジ赤血球に対する溶血試験および脾細胞を用いて Plaque forming cell (PFC) 試験を行った。

4. 薬物の投与量および投与方法

Dexa. の投与量は以下の予備実験によって決定した。

生後 4週令の B/W F₁ ♀マウス 30匹を 3群に分け、1群は Dexa. 1.0 mg/kg 週 2回筋肉内注射、2群は Dexa. 3.0 mg/kg 週 2回筋肉内注射、3群を対照として生理食塩水を投与した。2週間に 1回、テストペーパーでの尿タンパク量の測定および体重測定を行いながら生存日数を見た。この結果、生後 270日目の各群の生存率は 1群 100%, 2群 100%, 3群 0%, 生後 400日目の生存率は 1群 50%, 2群 50%となり、1, 2群間で Dexa. の作用力価をほぼ同等と判断し、Dexa. の投与量は 1.0 mg/kg, 投与回数は週 2回 (筋肉内注射) とした。

Gly. は大量に長期連用したとき、偽アルドステロン症があらわれる可能性のあることを除けば、ほとんど副作用が認められず、今回用い

た剤形で投与可能な最大量である 20 mg/kg (ヒト10倍量), 週2回筋肉内注射とした。

5. 溶血試験 (hemolytic test: HL test)

羊赤血球 5×10^9 cells/ml の 0.1 ml をマウス腹腔内に注射し, 4日目および7日目にエーテル麻酔下で頸静脈より採血し, 血清を分離し, 生理食塩水でこれを希釈した。血清希釈液 1.0 ml を小試験管に入れ, これに一定容量の抗原 (羊赤血球 2×10^8 cells/ml) 1.0 ml および補体として30倍希釈のモルモット血清 1.0 ml を加えてよく混和した後, 37°C , 60分間 incubate した。反応後 3,000 rpm の5分の遠心を行い, その上清の吸光度 (540 nm) を測定し, 羊赤血球 (2×10^8 cells/ml) 1.0 ml に蒸留水 2.0 ml を加えた上清の O. D. 値を100として溶血率を算出した。

6. plaque forming cells 検出法

Jerne⁷ の方法に従い, 羊赤血球 5×10^9 cells/ml を 0.1 ml マウス腹腔内に注射し, 4日後にエーテル麻酔下で脱血屠殺し, 脾臓の摘出を行い, 実験に供した。

免疫動物の摘出脾臓をイーグル培地により 2×10^8 cells/ml の細胞浮遊液に調整した。以下, Jerne⁷ の方法に準じ, 46°C に保温した 0.7% 寒天と 0.1% DEAE-dextran を含むイーグル MEM 培地に脾細胞浮遊液 0.1 ml と 20% 羊赤血球 0.1 ml を加えて混和した後, 直ちに 1.4% 寒天含有イーグル MEM 培地平板上に注ぎ, 37°C , 5% CO_2 恒温器内で1時間培養した。続いて, 補体として10倍希釈したモルモット血清を 1.0 ml 添加し, 30分間培養後, 溶血斑の数を算定した。脾細胞の濃度変化をつけた平板を各個体あたり2枚作成し, その平均を抗体産生細胞の数とした。

7. 顕微鏡的観察

生後8ヶ月令の各群のマウスを軽エーテル麻酔下で脱血屠殺した後, 右腎を摘出し, 10%ホルマリン液で固定したのち, パラフィン包埋し, 3~4 μ に薄切した標本に HE 染色, PAS 染色, PAM 染色して, 顕微鏡下で観察した。

この結果を統計的に処理するため各群6匹ず

つについて1検体約25個の糸球体を光学顕微鏡で観察し, 障害の程度を Grade 0: no change, Grade I: minor lesion, Grade II: mesangial proliferative glomerular change, Grade III: glomerulus showing segmental sclerosis, Grade IV: glomerulus showing global sclerosis, 以上の5段階の Grade に分け, Grade II についてはさらにメサンギウムの増殖の程度を軽度(A), 中等度(B), 高度(C)の3段階に分類して比較した。各 Grade の糸球体の数を全体数 (25個 \times 6匹 = 150個) に対する百分率で示した。

8. 電顕的観察

顕微鏡観察と同様に生後8ヶ月令の各群のマウスの左腎を摘出後, 直ちに3%グルタルアルデヒド水溶液 (0.1 M リン酸緩衝液で pH 7.4 に調整) に浸しつづ腎皮質を 1 mm^3 の大きさに細切し, さらに, 3%グルタルアルデヒド溶液で2時間固定した。その後, 0.1 M リン酸緩衝液で3回洗浄し, 1% OsO_4 (0.1 M リン酸緩衝液で pH 7.4 に調整) で1.5時間固定した。固定終了後, 3%酢酸ウラニル水溶液中に30分浸し, その後, 25%, 50%, 75%, 100% エタノールを用いて脱水を行い, エポン包埋した。Porter-Blum MT-1 (Sorvall) 超ミクロームを用いて超薄切片を作成し, ウラニルアセテートおよびクエン酸鉛で二重染色を行い, 日立 HS-9 型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 実験1

1.1. 体重の変化

実験開始前の4週令マウスの体重を100%としたときの体重増加率を, 生後28週令まで, 2週間毎に測定した (Fig. 2)。対照群では実験開始時から一定の体重増加が認められ, 28週令で57.4%の体重増加率を示した。Gly. 単独投与群の28週令においては体重増加率は56.2%, Dexa. 単独投与群では78.2%, Gly. と Dexa. 併用群では76.9%と Dexa. を投与したマウスでは対照群に比べ有意な体重増加が認められ

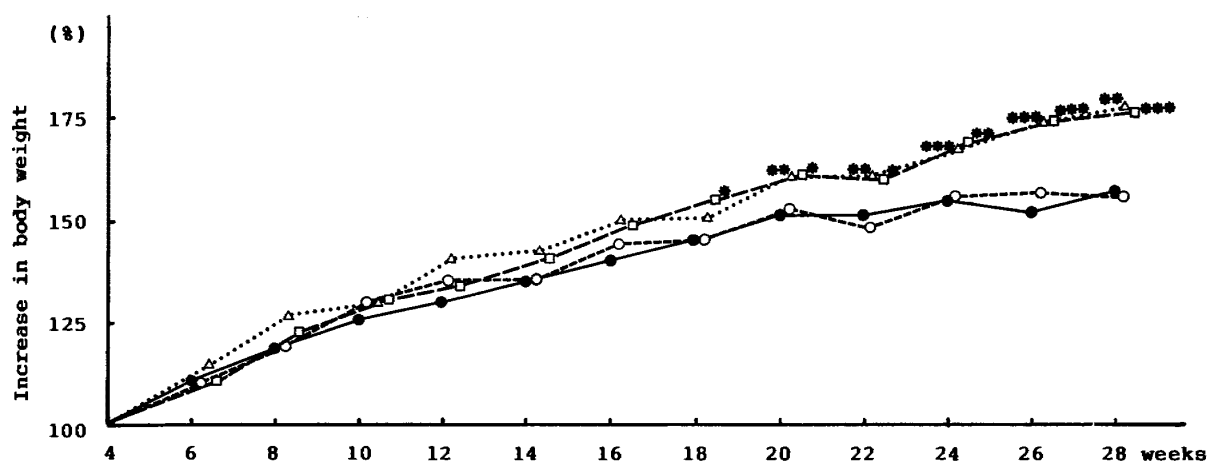


Fig. 2 Changes in body weight.

Body weight increase was calculated with that at the beginning of the experiment (4-week-old mice) taken as 100%.

●cont. ○Gly. △Dexa. □Gly.+Dexa.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.025$ *** $p < 0.01$; significant difference from control.

た。

1.2. 尿蛋白検出開始時期

テストペーパーで尿蛋白が持続的に 30 mg/dl 以上検出された日を尿蛋白検出開始日として平均生後日数を算出すると、対照群では214日、Gly. 投与群は266日、Dexa. 投与群は232日、Gly. と Dexa. 併用群では251日となり、Gly. 投与群で尿蛋白検出までの生後日数は最も長かつ

た。ただし、数値のばらつきが大きく有意差は得られなかった。

1.3. 生存率と平均生存日数

各群の生存率は、Fig. 3 に示す様に生後290日目で対照群では18%、Gly. 投与群で37.5%、Dexa. 投与群で66.7%、Gly.・Dexa. 併用群で85.7%となり、Gly. 投与群、Dexa. 投与群の生存率は対照群に比べて高く、Gly.・Dexa. 併用

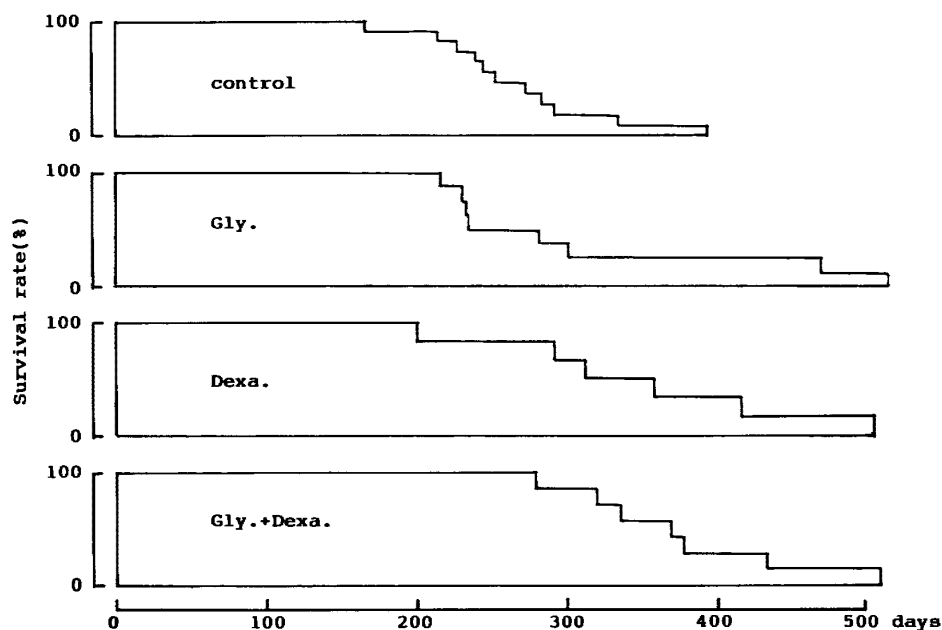


Fig. 3 The survival rates of NZB/W F_1 mice.

The average survival time was 263 days in control mice treated with saline, 314 days in mice treated with Gly., 351 days in mice treated with Dexa. 378 days in mice treated with Gly. and Dexa.

Table 1 Hemolytic test

treatment		serial dilution of serum		×50	×100	×200	×400	×800	×1600
4 weeks old mice	cont.			47.0	30.8	21.8	12.6	4.7	1.4
				±	±	±	±	±	±
	Gly.			16.8	18.4	16.4	10.5	3.9	1.2
				±	±	±	±	±	±
	Daxa.			54.9	38.0	26.2	20.2	9.5	2.6
				±	±	±	±	±	±
	Gly.+Dexa.			18.7	17.9	18.7	15.7	7.7	2.1
				±	±	±	±	±	±
	Gly.+Dexa.			96.0	70.5	45.3	19.2	6.2	1.8
				±	±	±	±	±	±
Gly.+Dexa.			7.9	12.2	13.1	7.0	2.4	0.7	
			±	±	±	±	±	±	
20 weeks old mice	cont.			88.3	73.9	68.5	51.7	24.0	6.9
				±	±	±	±	±	±
	Gly.			16.3	18.5	21.7	17.8	8.6	2.5
				±	±	±	±	±	±
	Dexa.			111.9	96.2	74.9	54.0	44.9	28.8
				±	±	±	±	±	±
	Gly.+Dexa.			3.6	7.5	13.6	18.5	20.9	14.9
				±	±	±	±	±	±
	Gly.+Dexa.			114.9	108.7	97.4	71.8	36.2	11.7
				±	±	±	±	±	±
Gly.+Dexa.			1.6	2.2	7.1	11.9	7.8	2.6	
			±	±	±	±	±	±	
Gly.+Dexa.			115.3	110.4	107.4	*97.2	**67.2	33.6	
			±	±	±	±	±	±	
Gly.+Dexa.			1.6	1.2	1.8	6.0	9.2	10.5	
			±	±	±	±	±	±	

All values are means±SE in each group.

*p<0.05, **p<0.025 Compared to the value of the control.

群ではさらに高かった。また、各群の平均生存日数は、対照群263日、Gly. 投与群314日、Dexa. 投与群351日、Gly.・Dexa. 併用群378日となり、有意差は得られなかったが、Gly.・Dexa. 併用群で最も長かった。

1.4. 溶血試験

羊赤血球 感作後 4 日目の各濃度の希釈血清 (50, 100, 200, 400, 800, 1,600倍希釈) を用いた溶血試験で、Gly. 投与群、Dexa. 投与群、Gly.・Dexa. 併用群のいずれも対照群に比べて

溶血率の亢進が認められ、併用群で最も高い溶血率を示した (Table 1)。

感作 7 日目では 4 日目に比べ溶血率は亢進したが、4 日目と同様、各濃度の希釈血清において、対照群に比べ Gly. 投与群および Dexa. 投与群で溶血率が増加し、Gly.・Dexa. 併用群で有意な溶血率の亢進が認められた。

1.5. 腎臓の光学顕微鏡所見

8 ヶ月令の各群マウスの腎系球体の組織所見を 5 つの Grade に分類し、各 Grade の所見

Table 2 Histological findings of kidneys in NZB/WF₁ mice

grade		0	I	II	III	IV		
		(%)	(%)	(A) (%)	(B) (%)	(C) (%)	(%)	
control	(n=6)	13.9	17.5	9.7	14.9	19.5	16.9	7.6
Gly.	(n=6)	13.8	23.0	12.5	17.8	21.7	8.6	2.6
Dexa.	(n=6)	15.0	25.6	14.4	18.1	16.9	6.3	3.7
Gly.+Dexa.	(n=6)	24.0	27.0*	13.5	15.3	14.7	5.5	0

*p<0.10 Compared to the value of the control

を示す糸球体数を百分率で示した (Table 2). 障害の程度の大きい Grade III, IVに属す糸球体の割合は対照群で最も多く, Gly. 投与群及び Dexa. 投与群では減少しており, Gly.・Dexa. 併用群では Grade IV に属す糸球体はなく, 障害の全く認められない Grade I の糸球体の割合が高いことが確認された.

この8ヶ月令における各群の代表的な組織所見を Fig. 4 に示した (PAS 染色). 対照群マウスの腎所見では, 糸球体の sclerosis が進行しており, 稀に半月体を形成しているものがみられた (Fig. 4-a) のに対して, Gly. 投与群 (Fig. 4-b) ではその程度が軽度であった. Dexa. 投与群 (Fig. 4-c) ではほとんど改善が見られなかったが, Gly.・Dexa. 併用群では sclerosis の所見を示す糸球体はほとんどなく, ほぼ正常に近い像を示した (Fig. 4-d).

1.6. 腎臓の電子顕微鏡所見

8ヶ月令マウスの腎糸球体の代表的な電子顕微鏡所見を Fig. 5 に示した. 対照群では, 糸球体上皮細胞の足突起の形状の乱れが著しく, 殆ど無構造の状態になっており, 基底膜の内皮下, 上皮下およびメサンジウム基質には電子密度の高い物質の沈着が認められた (Fig. 5-a). これに対して Gly. 投与群マウス (Fig. 5-b) および Dexa. 投与群マウス (Fig. 5-c) では, 対照群で見られるような電子密度の高い物質の沈着はいずれの部位においても減少傾向がみられ, 足突起の形態もかなり良く保存されているのが観察された. Gly.・Dexa. 併用群 (Fig. 5-d) では, 上皮細胞の足突起はほぼ正常に近い状態に維持されており, 基底膜内皮下, 上皮下およびメサンジウム基質における電子密度の高い物質の沈着も極めて少なかった.

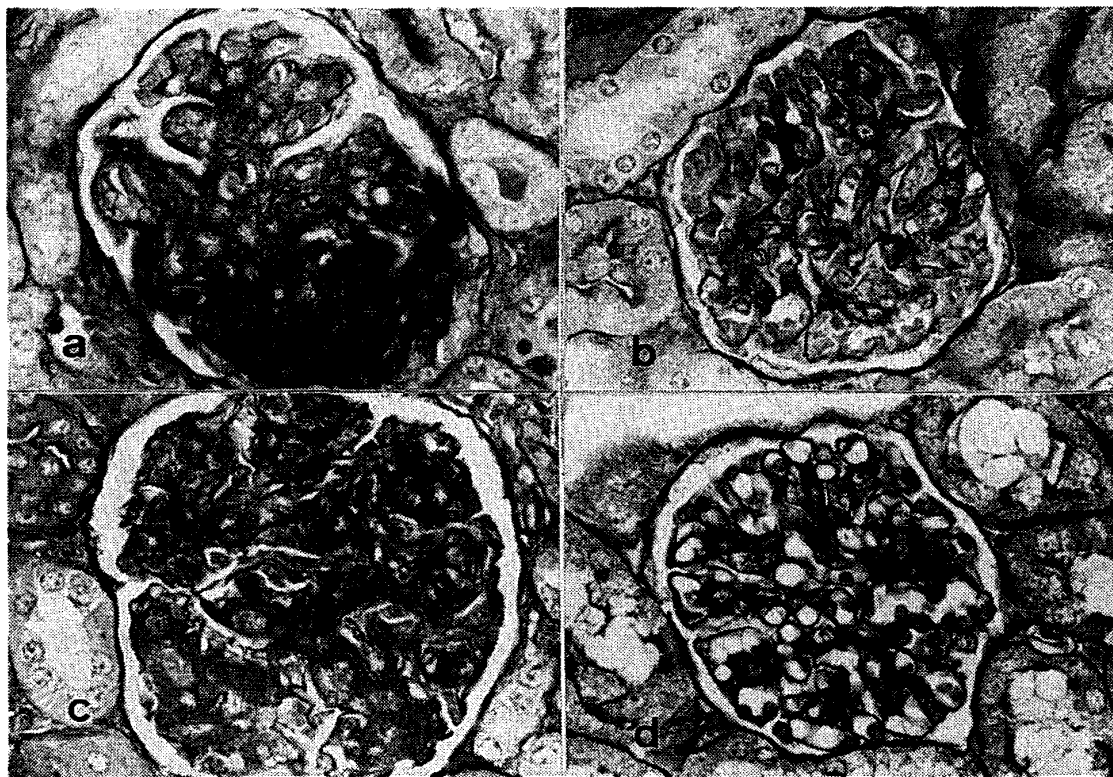


Fig. 4 Light microscopic observations of the kidney of 8 month-old mice ($\times 600$) (PAS staining).

a) Control mouse treated with saline: Note glomerular hyalinosis. b) Mouse treated with Gly.: Glomerular hyalinosis is not significant. c) Mouse treated with Dexa.: Note glomerular hyalinosis. d) Mouse treated with Gly. and Dexa.: The glomeruli shows almost normal construction.

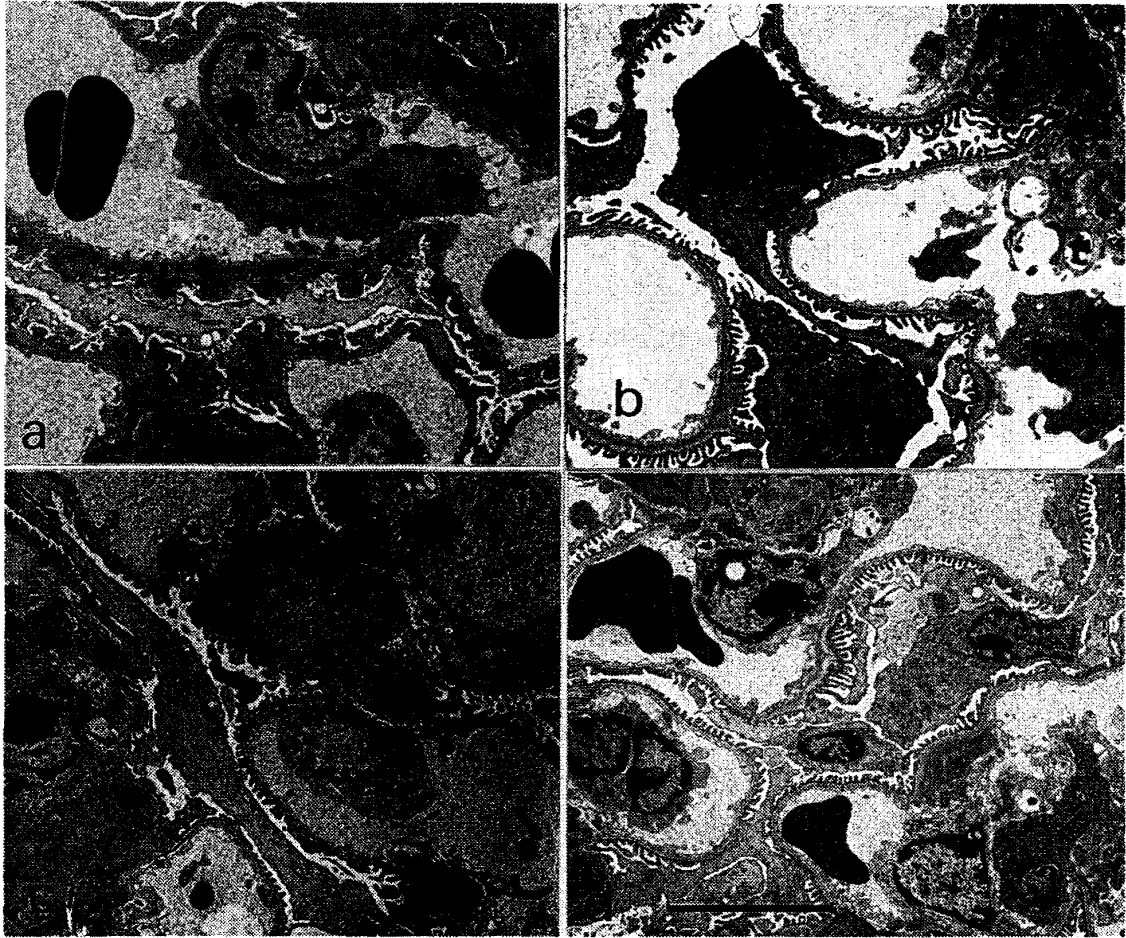


Fig. 5 Electronmicrographs of the glomeruli obtained from 8-month-old mice (bar : 6 μ).
 a) Control mouse treated with saline: Heavy deposits of electron-dense material are seen beneath the irregularly thickened basement-membrane and extend mesangial area. b) Mouse treated with Gly.: Foot processes show the almost normal constructions. Electron-dense material are seen beneath the basement-membrane. c) Mouse treated with Dexa.: Foot processes are visible, but are slightly fused. d) Mouse treated with Gly. and Dexa.: The constructions of basement-membrane and foot processes show the normal constructions.

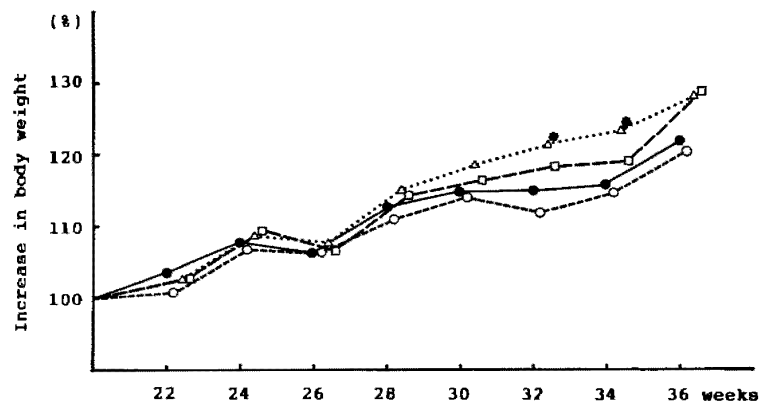


Fig. 6 Changes in body weight.
 Body weight increase was calculated with that at the beginning of the experiment (20-week-old mice) taken as 100%.
 ●cont. ○Gly. △Dexa. □Gly.+Dexa.
 * $p < 0.05$; significant difference from control.

2. 実験 2

2.1. 体重の変化

実験開始前の 20 週令の マウスの体重を 100% としたときの体重の増加率を生後 46 週令まで 2 週間毎に示した (Fig. 6). 4 週令で実験を開始した実験 1 に比べると, 各群共に体重の増加は緩徐で, 対照群では 46 週令で実験開始時の 21.9%, Gly. 投与群で 20.4%, Dexa. 投与群 28.0%, Gly. と Dexa. 併用群で 28.7% の増加がみられ, Dexa. 投与群で最も高い体重増加率を示した.

2.2. 生存率と平均生存日数

各群の生存率は Fig. 7 に示した. 生後 290 日目の生存率は 対照群 50.0%, Gly. 投与群 60.0%, Dexa. 投与群 66.7%, Gly.・Dexa. 併用群で 69.2% となり, Gly. 投与群, Dexa. 投与群の生存率は対照群に比べて高く, Gly.・Dexa. 併用ではさらに高かった. また各群の平均生存日数は, 対照群 304 日, Gly. 投与群 357 日, Dexa. 投与群 340 日, Gly.・Dexa. 併用群で 417 日となり, Gly.・Dexa. 併用群で最も長かった (Fig. 7).

2.3. 溶血試験

羊赤血球感作後 4 日目の 各々の濃度の希釈血清 (50, 100, 200, 400, 800, 1,600 倍希釈) を用いた溶血試験では, 対照群に比べ Gly. 投与群, Dexa. 投与群, Gly.・Dexa. 併用群いずれも溶血率の亢進が認められ, 併用群で最も高い溶血率を示した (Table 3).

感作 7 日目では, 4 日目と同様, 各濃度の希釈血清において, 対照群に比べ Gly. 投与群と Dexa. 投与群で溶血率の亢進が認められ, Gly.・Dexa. 併用群で有意に溶血率が亢進した.

2.4. Plaque forming cells test (PFC test)

羊赤血球感作後 4 日目の脾細胞の PFC 数は, Fig. 8 に示すように, 対照群の平均値が脾細胞 10^6 個あたり 81 個であるのに対し, Gly. 投与群で 38 個, Dexa. 投与群で 113 個, Gly.・Dexa. 併用群で 164 個であった. 各群の病変の進行度の違いにより, 標準偏差値が大きくて有意差は認められなかったが, 対照群に比べ Gly.・Dexa. 併用群では PFC 数の増加傾向が認められた (Fig. 8).

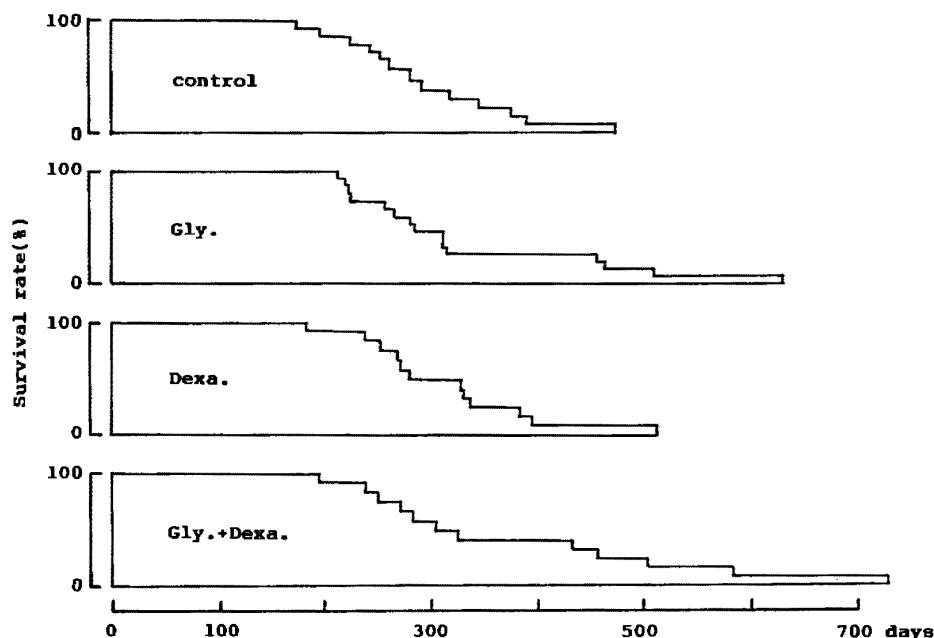


Fig. 7 Survival rates of NZB/W F₁ mice.

The average survival time was 304 days in control, 357 days in mice treated with Gly., 340 days in mice treated with Dexa. 417 days in mice treated with Gly. and Dexa.

Table 3 Hemolytic test

treatment	serial dilution of serum	×50	×100	×200	×400	×800	×1600
		4 weeks old mice					
4 weeks old mice	cont.	66.6	40.9	22.2	10.8	3.6	1.2
		±	±	±	±	±	±
	12.4	11.0	8.5	4.5	1.6	0.6	
	±	±	±	±	±	±	
Gly.	57.1	44.9	25.7	14.0	6.7	2.7	
	±	±	±	±	±	±	
11.7	10.0	8.7	7.5	4.4	1.7		
±	±	±	±	±	±		
Dexa.	75.3	53.3	38.	20.8	8.2	2.7	
	±	±	±	±	±	±	
11.7	10.8	9.59	6.0	2.5	0.7		
±	±	±	±	±	±		
Gly.+Dexa.	*94.2	76.4	*59.2	*44.1	*28.5	12.2	
	±	±	±	±	±	±	
9.9	9.5	10.2	10.6	8.5	4.5		
±	±	±	±	±	±		
20 weeks old mice							
20 weeks old mice	cont.	102.8	91.3	78.6	61.7	34.8	12.9
		±	±	±	±	±	±
	5.6	8.8	12.2	13.0	10.4	4.9	
	±	±	±	±	±	±	
Gly.	110.3	101.9	90.1	60.7	36.7	19.0	
	±	±	±	±	±	±	
4.8	6.2	9.1	11.3	9.9	9.0		
±	±	±	±	±	±		
Dexa.	104.9	94.7	79.2	59.9	38.8	18.6	
	±	±	±	±	±	±	
4.8	6.7	9.2	4.0	10.1	6.2		
±	±	±	±	±	±		
Gly.+Dexa.	110.2	102.4	92.5	76.2	54.7	31.7	
	±	±	±	±	±	±	
3.6	5.5	7.7	9.3	9.7	8.0		
±	±	±	±	±	±		

All values are means±SE in each group.

*p<0.05 Compared to the value of the control.

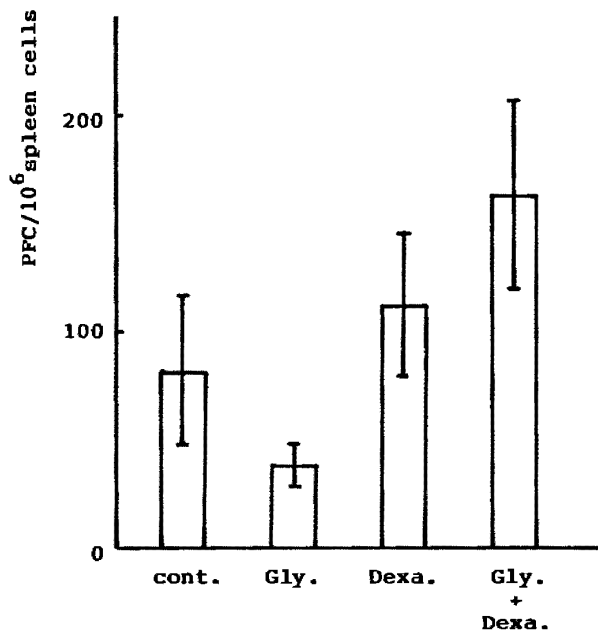


Fig. 8 Comparison of numbers of plaque forming cells. The number of plaque forming cells was 81 per 10⁶ spleen cells in control, 38 in mice treated with Gly., 113 in mice treated with Dexa., and 164 in mice treated with Gly. and Dexa., respectively.

2.5. 腎臓の光学顕微鏡所見

8ヶ月令マウスの腎臓の組織所見を実験1.5.と同様の方法で統計処理した。その結果対照群では、障害の程度の高い Grade III, IVに属す糸球体の割合が多かったが、Gly. 投与群及びDexa. 投与群共にその割合は減少しており、Gly.・Dexa. 併用群ではさらにこの傾向が顕著であった。

これらの各群の代表的な組織像を Fig. 9 に示した。対照群マウスの腎所見では、sclerosis が進行している糸球体が多く、capsule の癒着が目立ち、尿細管の萎縮も見られた (Fig. 9-a) のに対して、Gly. 投与群、Dexa. 投与群では、これらの病変はやや軽度であり (Fig. 9-b, c), Gly.・Dexa. 併用群では、ほぼ正常と思われる糸球体が多く認められた (Fig. 9-d)。PAM 染色においても、対照群で多く認められる sclerosis を示す糸球体 (Fig. 10-a) は、Gly. 投与群ではやや軽度であり (Fig. 10-b), Dexa.

Table 4 Histological findings of kidneys in NZB/WF₁ mice

grade		0	I	II	III	IV		
treatment		(%)	(%)	(A) (%)	(B) (%)	(C) (%)	(%)	(%)
		control (n=6)	20.3	25.9	8.6	12.3	15.4	12.3
Gly. (n=6)	24.4	35.4	9.8	8.5	12.2	7.9	1.8	
Dexa. (n=6)	26.0	27.3	13.3	12.7	12.7	5.3	2.7	
Gly.+Dexa. (n=6)	32.9	45.5**	9.6	7.2	3.0	1.8*	0	

**p<0.05, *p<0.10 Compared to the value of the control

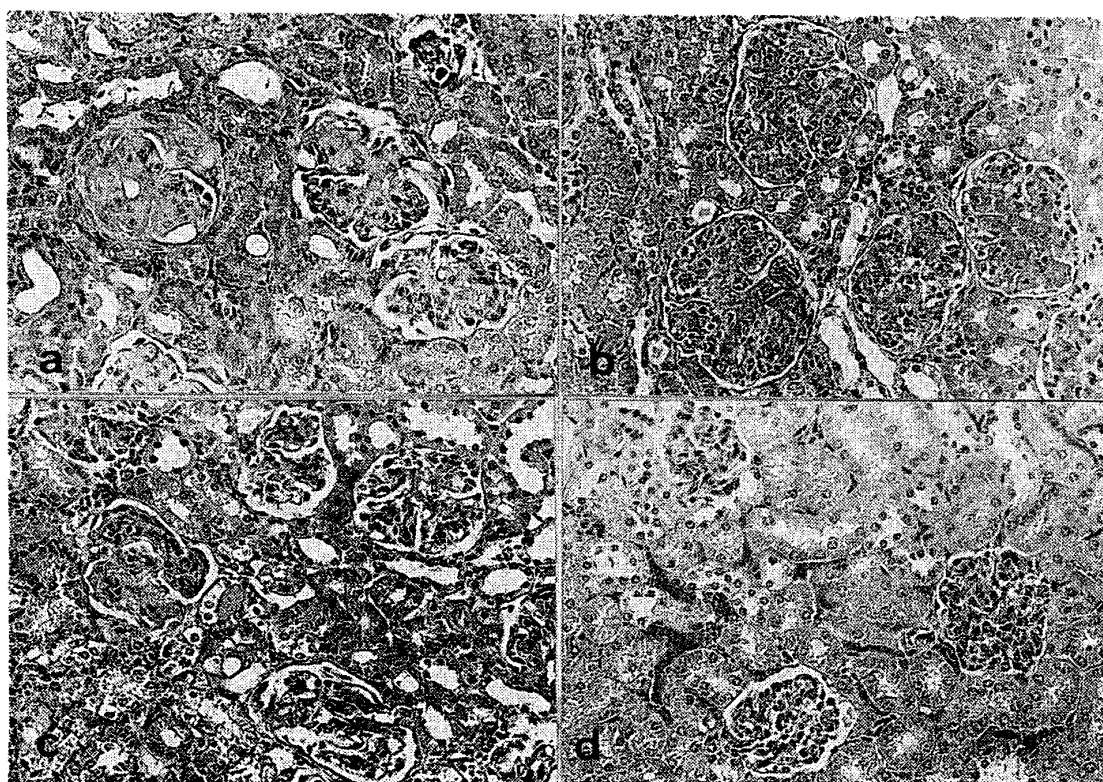


Fig. 9 Light microscopic observation of the kidney of 8-month-old mice ($\times 200$) (Hematoxylin-eosin staining)

a) Control mouse treated with saline: The glomeruli shows sclerosis. b) Mouse treated with Gly.: Showing mesangioproliferative glomerulonephritis. Glomerular sclerosis is not significant. c) Mouse treated with Dexa.: The glomeruli shows only minor changes. d) Mouse treated with Gly. and Dexa.: The glomeruli shows normal or only minor changes.

投与群では少なく (Fig. 10-c), Gly.・Dexa. 併用群 (Fig. 10-d) ではほとんど見られなかった。

2.6. 腎臓の電子顕微鏡所見

8ヶ月令の各群の代表的な腎糸球体電子顕微鏡所見を Fig. 11 に示した。対照群マウス腎糸球体では、上皮細胞の足突起の形状の乱れが著しく、基底膜内皮下、上皮、基底膜内および

メサンギウム基質に電子密度の高い物質の沈着や、糸球体係蹄毛細管腔の変形が認められた (Fig. 11-a)。これに対して Gly. 投与群マウスおよび Dexa. 投与群マウスでは、足突起の形状がかなり保持されており、対照群に比べ、各部位における電子密度の高い物質の沈着も減少しているのが観察された (Fig. 11-b, c)。Gly.・Dexa. 併用群では、上皮細胞の足突起はほぼ

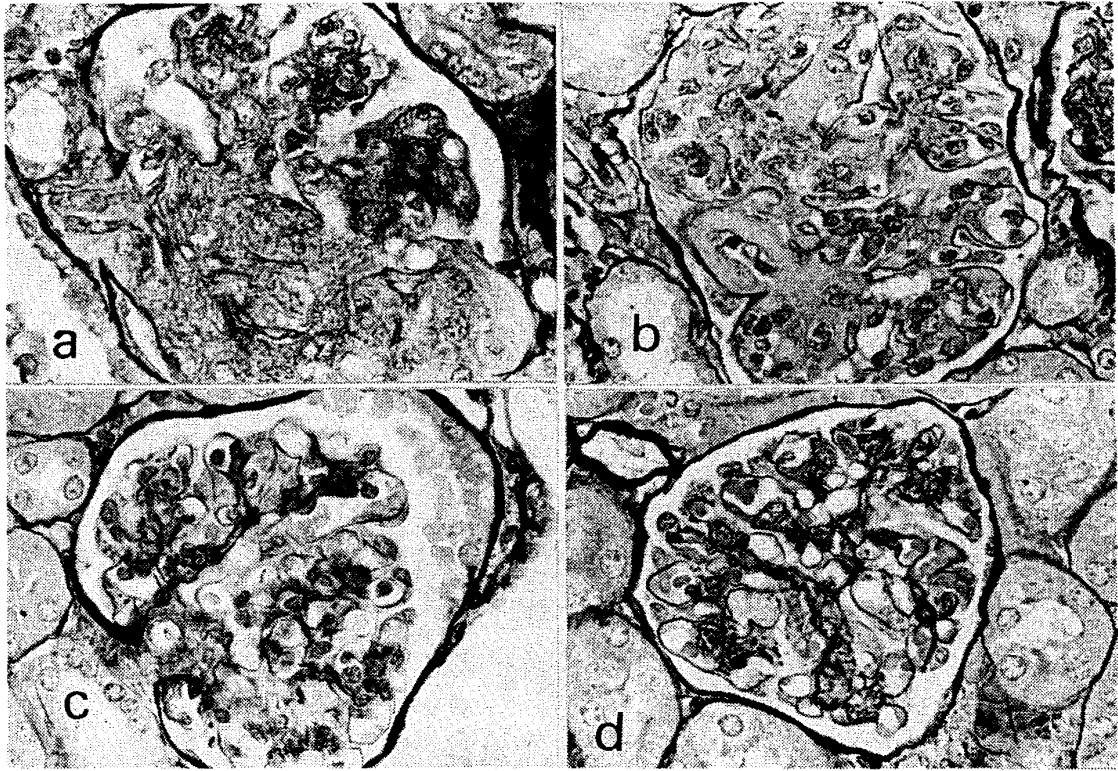


Fig. 10 Light microscopic observation of the kidney of 8-month-old mice (×600) (PAM staining).

a) Control mouse treated with saline: Advanced lesion of mesangial proliferative glomerulonephritis. Note glomerular sclerosis and adhesion to the Bowman's capsule. b) Mouse treated with Gly.: Note thickening of the mesangial matrix and cell proliferation. c) Mouse treated with Dexa.: The glomerulus shows only minor abnormalities. d) Mouse treated with Gly. and Dexa.: The glomerulus shows almost normal construction.

正常に近い状態に維持され、電子密度の高い物質の沈着も殆どなく、ほぼ正常に近い糸球体 (Fig. 11-d) が多く認められた。

考 察

♀ NZB と ♂ NZW の交配による F₁ マウスは、生後 2 ヶ月頃から血清抗核抗体陽性となり、4～5 ヶ月頃より多種の自己抗体を産生し、8 ヶ月で強陽性の蛋白尿を示すとともに、腹水貯留をきたし、終に尿毒症類似の症状を呈して死亡する^{8,9,10,11}。この自己免疫疾患自然発症マウスにステロイド剤を投与すると、生理食塩水を投与した対象群マウスに比べて尿蛋白の出現は遅延し、また、生存率、平均生存日数はいずれも改善されることは既に報告されている^{12,13,14}。しかし、実験的にも実際の臨床にお

いてもステロイド剤の治療によって必ずしも完全な治療効果は得られておらず、その治療法には多くの問題点が残されている。本研究結果はグリチルリチン投与による生存率や平均生存日数は、ステロイド剤単独投与にやや劣るが、F₁ マウスの疾患に対して有効性のあることや、ステロイド剤との併用によっていずれかの単独投与より更に改善効果が促進される事を示している。

NZB/WF₁ マウスにおける自己免疫疾患の発症機序は十分に明らかにされていないので、グリチルリチンの効果についての詳細な作用機序についても推察の域を脱しないが、グリチルリチンには既に免疫系修飾作用やステロイド様、あるいはステロイド増強作用のあることが報告されており¹⁵、NZB/WF₁ マウスに対する効果

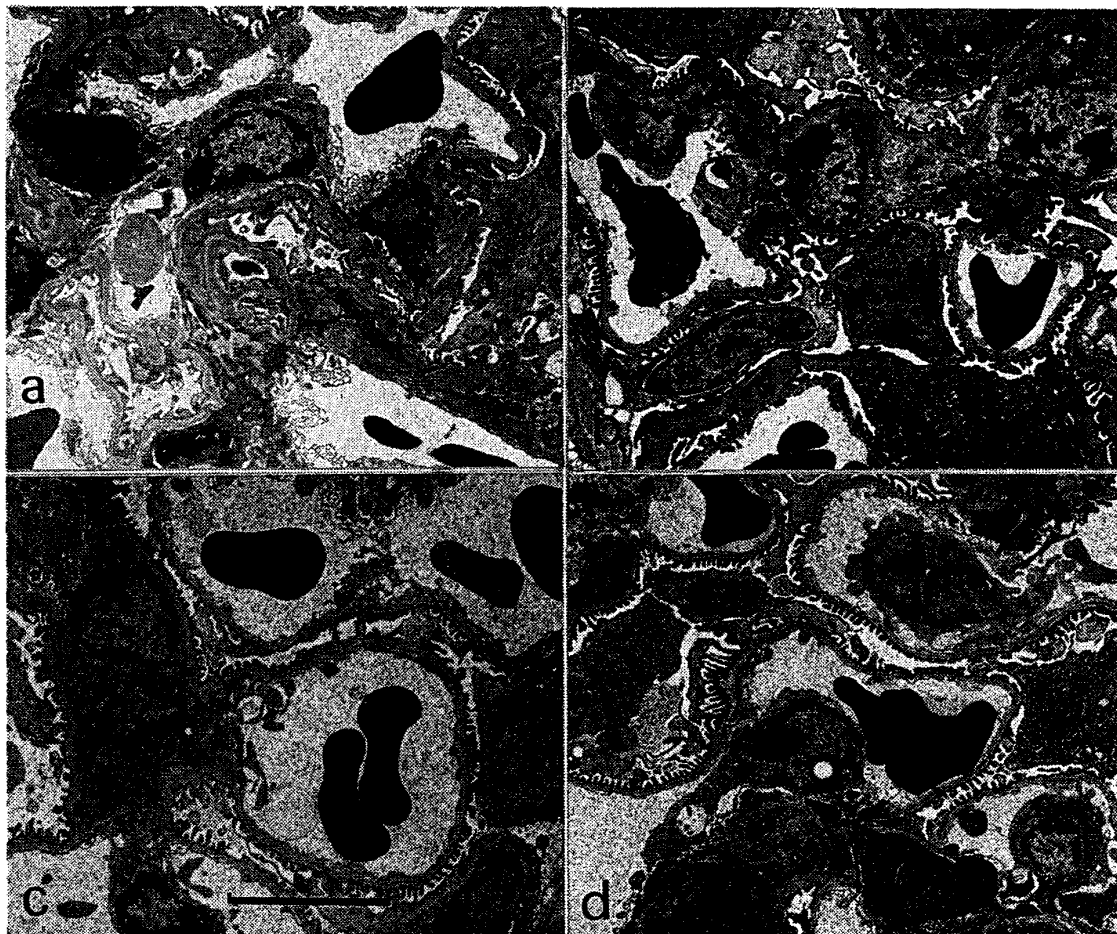


Fig. 11 Electron micrographs of the glomeruli obtained from 8 month-old mice (bar: 6 μ)
 a) Control mouse treated with saline: Heavy deposits of electron-dense material are seen mainly beneath the irregularly thickened basement-membrane and extend mesangial area. b) Mouse treated with Gly.: Basement membranes are thickened by accumulations of electron dense material. Foot processes are visible, but are slightly fused. c) Mouse treated with Dexa.: Foot processes are slightly fused. d) Mouse treated with Gly. and Dexa.: The construction of basement-membrane and foot processes seem to be almost normal.

もこれらの作用から説明することも可能なように思われる。しかし、NZB/WF₁ マウスに投与するステロイド剤を増加しても、必ずしも投与量に応じた濃度依存性の治療効果は得られていない（予備実験の結果；投与する Dexa. の量を 1.0 mg/kg より増量しても、1.0 mg/kg 投与時以上の効果は認められなかった）ことやデキサメタゾン投与による体重の増加がグリチルリチンの併用によって、抑制も促進もされなかったことなどを考慮すると、デキサメタゾンとグリチルリチンとの併用による改善効果の増加は、単にグリチルリチンのステロイド様作用、

あるいはステロイド作用増強効果だけからでは説明することは出来ないと思われる。

本研究で得た溶血試験の結果でも、8ヶ月令の対照 NZB/WF₁ マウスの免疫能の低下がグリチルリチンあるいはデキサメタゾンの投与によって抑制されており、plaque forming cell 試験においてもグリチルリチン、デキサメタゾンの併用によって免疫能が維持されることが明らかである。しかしグリチルリチンの投与開始時期が4週令であっても5ヶ月余であっても、特に延命効果や腎病態の発症時期に差がない事を考慮すると、免疫系への作用と共に、腎への

直接作用もまた、重要な役割を果たしている可能性が推測される。

近年免疫系の関与する腎疾患の発症機序に活性酸素などのフリーラジカルの関与が注目されており、NZB/WF₁ マウスに superoxide dismutase (SOD) を投与すると腎の病理所見が著しく改善されることが見出されている¹⁶。一方、グリチルリチン、およびそのアグリコン(基本骨格から配糖体を除いた分子構造)であるグリチルレチン酸には、ラジカルスカベンジャー作用のあることが報告されている⁴ ので、本実験における腎症の発症遅延や、平均生存日数の改善効果には、グリチルリチンのこのラジカルスカベンジャー作用も、極めて重要な役割を果たしている可能性が推測される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導、御校閲を承りました薬理学教室鈴木有朋教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始、御助言、御指導を賜りました東洋医学研究所第I研究部門、阿部博子教授に感謝の意を表します。

本論文の要旨は1989年8月第6回和漢医薬学会(東京)において発表した。

文 献

1. 堂野前維摩郷, 熊谷 朗, 国府達郎, 矢野三郎, 竹内 望, 柴田宣彦, 西野和彦, 植田 彪: グリチルリチンの薬理——特にその Corticoid 様作用, 脱コレステロールならびに動脈硬化形成阻止効果について——. 日本臨床 1961; 19: 2176-2184.
2. Yamamoto M. Takeuchi N. Kotani S. and Kumagai A. Effects of glychirrhizin and cortisone on cholesterol metabolism in the rat. *Endocrinol. Japon.* 1970; 17: 339-348.
3. Kumagai A. Yano S. Takeuchi K. Nishino K. Asanuma Y. Nanaboshi M. and Yamamura Y. An inhibitory effect of glycyrrhizin on the anti-granulomatous action of cortisone. *Endocrinology*, 1964; 74: 145-148.
4. Kiso Y. Kato O. and Hikino H. Assay methods for antihepatotoxic activity using peroxide-induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Plant Medica*, 1985; 50-52.
5. Kumagai A. Nanaboshi M. Asanuma Y. Yagura T. Nishino K. and Yamamura Y. Effect of glycyrrhizin on thymolytic and immunosuppressive action of cortisone. *Endocrinol. Japon.*, 1967; 14: 39-42.
6. Kumagai A. Yano S. Otomo M. and Takeuchi K. Study on the corticoid-like action of glycyrrhizine and the mechanism of its action. *Endocrinol. Japon.*, 1957; 4: 17-27.
7. Jerne N. K. and Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science*, 1963; 140: 405.
8. 御木達也, 西田雅喜, 菊岡正和, 天木一太: ニュージランド・マウスの自己免疫疾患に対する Cyclophosphamide と Prednisolone の併用療法および摘脾の効果. *アレルギー* 1976; 25(1): 24-31.
9. 石井孝子, 安部干之, 塩川優一: ニュージランドマウス (NZB×NZW)F₁ の免疫機能の経時的観察. *アレルギー* 1974; 23(10): 652-661.
10. Michael C. Gelfand, Alfred D. Steinberg, Raymond Nagle James H. Kneppshield, *Therapeutic Studies in NZB/W Mice. Arthritis and Rheumatism*, 1972; 15(3): 239-245.
11. Michael C. Gelfand and Alfred D. Steinberg, *Therapeutic Studies in NZB/W Mice II Relative Efficacy of Azathioprine, cyclophosphamide and Methylprednisolone. Arthritis and Rheumatism*, 1972; 15(3): 247-252.
12. S. Ikehara, K. Shimamura, T. Aoyama, S. Fujii and Y. Hamashima. Effect of FUT-175, a new synthetic protease inhibitor, on the development of lupus nephritis in (NZB×NZW) F₁ mice. *Immunology* 1985; 55: 595-600.
13. T. P. Casey. Systemic lupus erythematosus in NZB×NZW hybrid mice treated with the corticosteroid drug betamethasone. *J. Lab. & Clin.* 1968; 71(3): 390-399.
4. J. R. Manaligod, C. L. Pirani, F. Miyasato, V. E. Pollak and J. R. Manaligod. The renal changes in NZB/B₁ and electron microscopic studies. *Nephron* 1967; 4: 215-230.
15. 柴田承二: オレアナン系トルテルペンの生物活性 II *Minophagen Medical Review* 1990; 35(2): 1-11.
16. Diamond J. R., Bonoentre J. V., Karnorsky M. J. A. role for oxygen radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Intl.* 1986; 20: 478-483.