

Puromycin aminonucleoside 腎症ラットに対する 副腎皮質糖質ステロイドとセファランチンの 蛋白尿抑制効果

佐藤 暢 夫

新潟大学大学院医歯学総合研究科
内部環境医学講座・国際感染医学講座
腎・膠原病内科学分野, 呼吸器内科学分野,
臨床感染制御学分野
(新潟大学医学部第二内科)
(主任: 下条文武教授)

Suppression of Puromycin Aminonucleoside - induced Proteinuria by Combined Treatment with Glucocorticoid and Alkaroid Reagent, Cepharanthin

Nobuo SATO

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
Division of Clinical Nephrology, Rheumatology,
Respiratory Medicine and Infection Control and Prevention
(Director: Prof. Fumitake GEJYO)*

要 旨

ネフローゼ症候群の実験モデルである Puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症を用い, 植物性アルカロイド製剤であるセファランチンの蛋白尿抑制効果と, ネフローゼ症候群の代表的な治療薬である副腎皮質糖質ステロイド (プレドニゾロン) との併用効果について検討した. ラットに PAN 50mg/kg を静脈注射すると 6 日目より著しい蛋白尿が認められ, その蛋白尿は観察終了の 10 日まで持続した. しかし, PAN 50mg/kg を投与する 2.5 時間前にプレドニゾロン (0.2~5 mg/kg) を前投与すると, 用量依存性に 6 日目以後の蛋白尿が抑制され, その蛋白尿抑制効果はプレドニゾロン 5mg/kg 投与群で最も強く, 0.2mg/kg 投与群では軽度であった. セファランチンと副腎皮質糖質ステロイドとの併用効果の検討では, PAN 50mg/kg 投与後 6 日目より見られる著しい蛋白尿はプレドニゾロン 0.2mg/kg を単独投与した群と, セファランチン 5 mg/kg を単独で投与した群では, その抑制は中等度であったが, 両薬剤を併用投与した群で強い蛋白尿抑制効果が認められ, その抑制程度はプレドニゾロン 5 mg/kg 前投与に相当した. さ

Reprint requests to: Tadashi YAMAMOTO
Department of Structural Pathology Institute of
Nephrology Graduate School of Medical and
Dental Sciences Niigata University
1-757 Asahimachi - dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科腎研究施設構造
病理学分野 山本 格

らに、プレドニゾロンの持続時間の検討では、PAN 50mg/kg 投与の24時間前にプレドニゾロン 3 mg/kg を経口投与した群では蛋白尿は全く抑制されず、PAN 投与の8又は12時間前にプレドニゾロン 3 mg/kg を投与した群で僅かな抑制傾向が認められた。しかし、プレドニゾロン 3 mg/kg をPAN 投与の2.5時間前に投与した群では6日目以後の蛋白尿は強く有意に抑制され、プレドニゾロン 3 mg/kg を経口投与の効果は少なくとも2.5時間は持続することが分かった。セファランチンを併用することによりプレドニゾロンの作用時間が延長するかどうかの検討では、プレドニゾロン 3 mg/kg を8時間前に経口投与しても、PAN 50mg/kg 投与による蛋白尿を抑制できなかったが、プレドニゾロン投与と同時に、セファランチン 5 mg/kg を腹腔投与した群では蛋白尿は有意に抑制された。このことからセファランチンにはプレドニゾロンの作用効果を延長させる働きがあることが示唆された。本実験よりセファランチンと副腎皮質糖質ステロイドの併用は蛋白尿抑制に必要なステロイドの投与量を減ずるあるいは投与間隔を延ばす効果があることが示唆された。

キーワード：植物性アルカロイド、ピューロマイシン アミノヌクレオシド、蛋白尿、ネフローゼ症候群、プレドニゾロン

はじめに

微小変化型ネフローゼ症候群は小児期のネフローゼ症候群をきたす糸球体疾患の中で代表的な疾患で、光学顕微鏡での観察上明らかな糸球体病変を示さずに高度な蛋白尿がでるのが特徴である¹⁾。この疾患の詳細な発症メカニズムは未だ明らかではないが、広範な糸球体上皮細胞の障害により、蛋白質の漏出を防いでいるバリアーが機能しなくなり、蛋白尿が出ると考えられている。臨床的には副腎皮質糖質ステロイド剤が著効することが知られており、広く使用されている。しかし、副腎皮質糖質ステロイド剤には種々の副作用があり、その投与期間、使用量に対して多くの問題が指摘されている。

ラットに puromycin aminonucleoside (以下 PAN) を投与して作製する PAN 腎症は、この微小変化型ネフローゼ症候群の動物モデルとして広く使われているモデルである。PAN は糸球体上皮細胞に比較的特異的に取り込まれる性質を有し、アデノシン (adenosine) に類似した化学構造を持ち、アデノシンと同様にその代謝過程で活性酸素が発生することで、糸球体上皮細胞を障害すると考えられている。その結果、ヒト微小変化型ネフローゼ症候群と同じ様に糸球体上皮細胞の蛋白質バリアーが破壊され、高度の蛋白尿が出現する

が、副腎皮質糖質ステロイド剤投与によりその蛋白尿が抑制される²⁾。

タマツキツヅラフジより抽出した植物性アルカロイド製剤、セファランチンは白血球減少症、マムシ咬傷、アレルギー性疾患などに広く臨床に使用されている薬剤である。その作用機序や投与量については定説がないが、細胞膜安定化作用³⁾、免疫機能増強効果⁴⁾、血小板活性化抑制作用⁵⁾などを有することが知られている。また、セファランチンは特発性血小板減少性紫斑病の難治症例の治療に使用する副腎皮質糖質ステロイドの必要量を減少させることが報告されている^{6)–8)}。

今回、PAN により誘導される微小変化型ネフローゼ症候群ラットモデルを用いて、このモデルの副腎皮質糖質ステロイド剤による蛋白尿抑制効果にセファランチンの併用が有効かどうかを検討した。

材料と方法

動物

月齢3～4か月のWKYラット(Charles River Japan, 神奈川)を用い、動物は実験中、自由摂食、自由飲水下にて飼育した。

PAN 腎症の作成と薬剤投与

PAN 腎症はWKYラット体重当たり PAN

50mg/kg を尾静脈より 1 回投与して作成した。副腎皮質糖質ステロイド剤としてプレドニゾロン（メルク、ドイツ）を使用し、0.5%カルボキシルメチルセルロース（和光純薬株式会社、大阪）に 2～0.2mg/ml に調製し、0.2～5 mg/kg で PAN 投与の数時間前に胃ゾンデを用いて経口的に前投与した。セファランチン（科研生薬株式会社、東京）は生理的食塩水に 2 mg/ml に調整し、PAN 50mg/kg 静脈注射と同時に腹腔投与した。

尿蛋白量

WKY ラットは 2 日ごとに 10 日間代謝ケージに入れ、24 時間尿を採取した。尿蛋白排泄量は Bradford 法の変法で測定した。測定値は mean ± SD で表し統計解析は Mann-Whitney 法を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

プレドニゾロンの蛋白尿抑制効果

PAN 50 mg/kg 投与 2.5 時間前にプレドニゾロン 0.2～5 mg/kg を経口投与し、プレドニゾロンの蛋白尿抑制効果の用量依存性を調べた。ラットを 4 群に分け、プレドニゾロン非投与群 ($n = 13$)、プレドニゾロン 5 mg/kg 投与群 ($n = 9$)、プレドニゾロン 3 mg/kg 投与群 ($n = 3$)、プレドニゾロン 0.2mg/kg 投与群 ($n = 13$) とした。

プレドニゾロンとセファランチンとの併用効果

プレドニゾロン 0.2mg/kg を経口投与 2.5 時間後に PAN 50mg/kg を静脈注射し、同時に植物アルカロイド製剤、セファランチン 5 mg/kg も腹腔投与して、10 日目まで蛋白尿の推移を調べた ($n = 8$)。対照群は、プレドニゾロン 0.2mg/kg を PAN 50mg/kg を静脈注射する 2.5 時間前に投与した群 ($n = 8$)、セファランチン 5 mg/kg を PAN 50mg/kg を同時に腹腔投与した群 ($n = 8$)、プレドニゾロンとセファランチン両者非投与群 ($n = 9$)、プレドニゾロン 5 mg/kg 経口投与群 ($n = 8$) とした。

プレドニゾロンの作用持続時間の検討

プレドニゾロンの前投与の有効時間を検討する

ために、プレドニゾロン 3 mg/kg を経口投与後、24 時間 ($n = 8$)、12 時間 ($n = 5$)、8 時間 ($n = 5$)、2.5 時間 ($n = 12$)、後に PAN 50mg/kg を静脈注射し、蛋白尿の推移を観察した。

セファランチンによるプレドニゾロンの作用時間の延長効果

PAN 50mg/kg を静脈注射する 8 時間前にプレドニゾロン 3 mg/kg を経口投与したプレドニゾロン単独投与群 ($n = 5$)、プレドニゾロン 3 mg/kg 経口投与にセファランチン 5 mg/kg の腹腔投与を併用した群 ($n = 5$)、プレドニゾロンを投与しないでセファランチン 5 mg/kg だけを腹腔投与した群 ($n = 5$) の 3 群で蛋白尿の推移を観察した。

結 果

プレドニゾロンの蛋白尿抑制効果

PAN 50mg/kg を静脈注射すると 6 日目より蛋白尿が認められ、その後蛋白尿は増加し、観察終了の 10 日まで持続した (図 1)。PAN 50mg/kg を投与する 2.5 時間前にプレドニゾロンを前投与したラットでは用量依存性に 6 日目以後の蛋白尿が抑制された。すなわち、プレドニゾロンによる蛋白尿抑制効果は 5 mg/kg 投与群で最も強く、プレドニゾロン 0.2mg/kg 投与群では抑制効果は軽度であった。

セファランチンの蛋白尿抑制効果と副腎皮質糖質ステロイドの併用効果

PAN 50 mg/kg 投与後 6 日目より見られる著しい蛋白尿はプレドニゾロン 5 mg/kg を 2.5 時間前に経口投与しておくとも有意に抑制された (図 2)。しかし、プレドニゾロン 0.2mg/kg の前投与ではその抑制は顕著ではない。また、PAN 50mg/kg 静脈注射後の蛋白尿はセファランチン 5 mg/kg を同時に腹腔投与してもその抑制は中等度で、蛋白尿抑制の程度はこれらの 2 群ではほぼ同等であった。一方、両薬剤を併用投与した群で最も強い蛋白尿抑制効果が認められ、その抑制程度はプレ

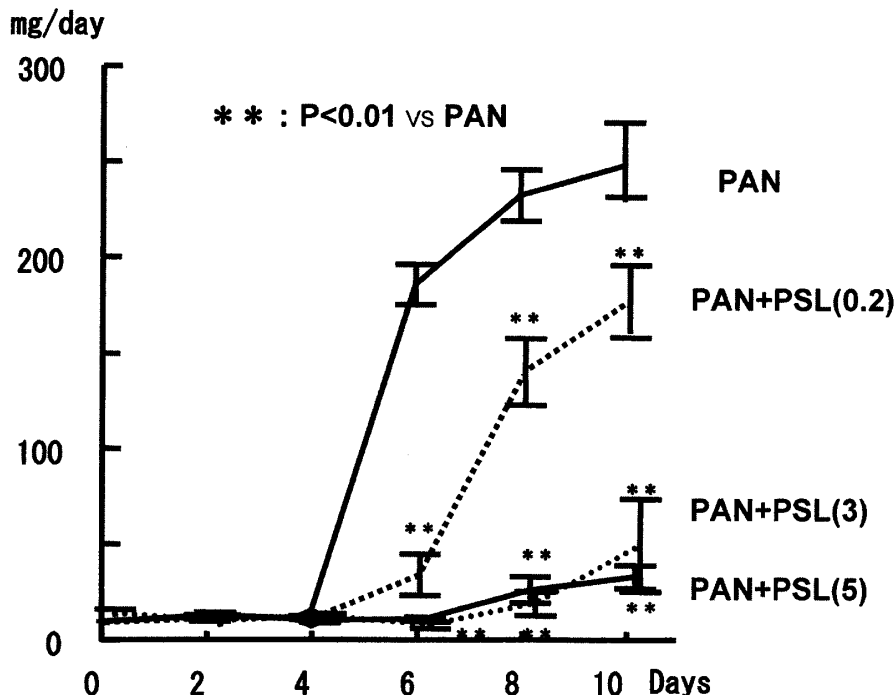


図1 プレドニゾロンの投与量と蛋白尿

PAN 50mg/kg を静脈注射すると6日目より著しい蛋白尿が認められ、その蛋白尿はPAN投与2.5時間前にプレドニゾン(PSL)を前投与すると用量依存性に蛋白尿が抑制された。PSL(0.2): 0.2mg/kg投与群, PSL(3): 3mg/kg投与群, PSL(5): 5mg/kg投与群。PAN群に対して有意に低下が認められる。

ドニゾン 5 mg/kg を前投与した群に近い効果を示した。

プレドニゾロンの作用持続時間の検討

PAN 50mg/kg投与の24時間前にプレドニゾン 3 mg/kg を経口投与した群ではPAN投与後6日目より認められる蛋白尿の抑制は認められなかった(図3)。PAN投与の8又は12時間前にプレドニゾンを投与した群では僅かな抑制傾向が認められたが、プレドニゾン非投与群と比較して有意な減少はみとめられなかった。一方、プレドニゾンをPAN投与の2.5時間前に投与した群では6日目以後の蛋白尿は強く有意に抑制され、プレドニゾン 3 mg/kg を経口投与の効果は少なくとも2.5時間は持続することが分かった。

セファランチンによるプレドニゾロンの作用時間の延長効果

PAN 50mg/kg投与の8時間前にプレドニゾン 3 mg/kg を経口投与しても、6日目以降の著しい蛋白尿は抑制できないが、プレドニゾン投与と同時に、セファランチン 5 mg/kg を腹腔投与した群では蛋白尿は有意に抑制された(図4)。このことはセファランチンにはプレドニゾロンの作用効果を延長させる働きがあることが示された。

考 察

これまでの研究から、セファランチンはPAN腎症モデルに対し、ある程度の蛋白尿の抑制効果があるという結果が得られていたが⁹⁾、今回の研究ではセファランチンとプレドニゾロンを併用し

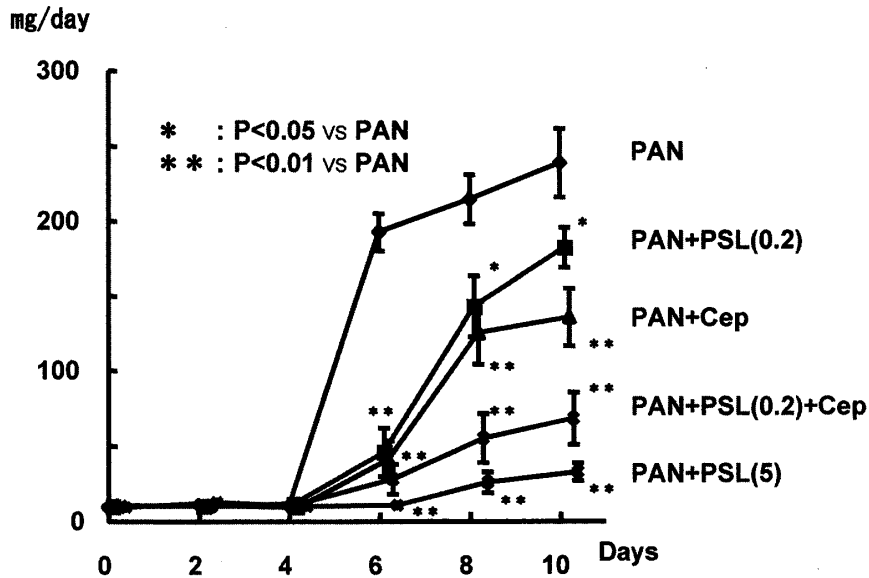


図2 セファランチンによるプレドニゾロンの投与量削減効果

PAN 50mg/kg 投与後6日目より見られる著しい蛋白尿はプレドニゾロン 5 mg/kg 前投与しておくこと (PSL (5)) 有意に抑制された。プレドニゾロン 0.2mg/kg 単独 (PSL (0.2)) やセファランチン 5 mg/kg 単独 (Cep) ではその抑制は強くないが、両者を併用 (PSL (0.2) + Cep) すると、強い蛋白尿抑制効果が認められる。

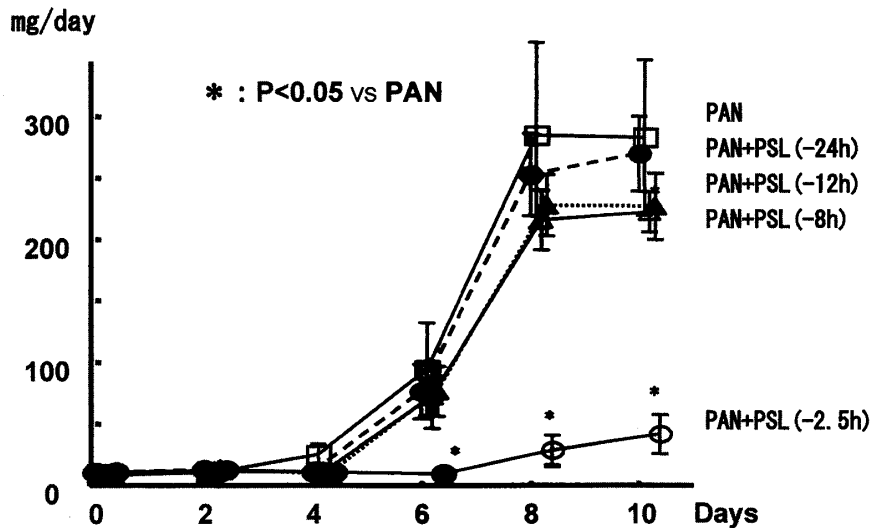


図3 プレドニゾロンの投与時間と蛋白尿

PAN 50mg/kg 投与前に 3 mg/kg を腹腔投与して蛋白尿の抑制を検討すると、プレドニゾロンを 24 (PSL (-24h)), 12 (PSL (-12h)), 8 (PSL (-8h)) 時間前に投与しても有意な蛋白尿の抑制は認められないが、プレドニンを PAN 投与の 2.5 時間前に投与した群 (PSL (-2.5h)) では蛋白尿は強く有意に抑制されている。

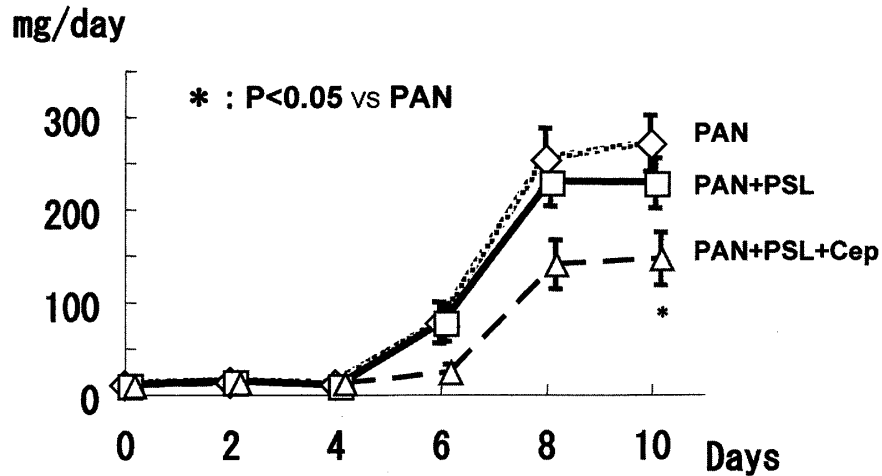


図4 セファランチンによるプレドニゾロンの作用延長効果

PAN 50mg/kg 投与の8時間前にプレドニゾロン 3 mg/kg を経口投与 (PSL) しても, 蛋白尿は抑制できないが, プレドニゾロン投与と同時に, セファランチン 5 mg/kg を腹腔投与した群 (PSL + Cep) では蛋白尿は有意に抑制された。

た効果を主に研究し, PAN 腎症モデルに対してセファランチンはプレドニゾロンと併用することで, より少ない量のプレドニゾロンで, また, プレドニゾロンの作用持続時間を長くすることで蛋白尿を有意に抑制できることが明らかになった。

PAN 腎症はヒトの微小変化型ネフローゼ症候群のモデルとされ, PAN は糸球体上皮細胞を主に障害し, その蛋白質漏出のバリアーを破壊することで, 高度の蛋白尿をきたすと考えられている。その発症は活性酸素の産生を抑制する薬剤や活性酸素を消費する薬剤を投与することで抑制されることから, 活性酸素が重要なメディエータと考えられている^{10)–12)}。PAN により活性酸素が生産される機構には2つの説が報告されており, 1つはPAN 自体が代謝されてその過程で活性酸素が生じるとする説であり, 他方はPAN が C-kinease を活性化し, phospholipase A2 を活性化することで, アラキドン酸カスケードが働き, その結果, 活性酸素が生じるとする説であるが, 未だ詳細は不明である。

現在, 糸球体腎炎に対する治療薬としては副腎皮質糖質ステロイド剤, 免疫抑制剤, 抗血小板薬,

抗凝固薬などが使用されており, 微小変化型ネフローゼなどのネフローゼ症候群に対しては主に副腎皮質糖質ステロイド剤が使用されることが多い。糸球体腎炎に対しての副腎皮質糖質ステロイド剤は, 免疫抑制作用と抗炎症作用が期待されて使用されているが, その作用機序の詳細はなお不明確な点も多い。プレドニゾロンはアラキドン酸カスケードの酵素活性を抑制するので, プレドニゾロンはPAN によるアラキドン酸カスケードの活性化を介した活性酸素を抑制することで糸球体上皮細胞障害を抑制すると考えられている¹¹⁾¹²⁾。本研究において作成したPAN 腎症モデルでは, プレドニゾロン 3 mg/kg をPAN 投与の2.5時間前に経口投与することで, PAN 投与後の蛋白尿が有意な抑制されることが示された。しかし, プレドニゾロンの投与量を 0.2mg/kg では蛋白尿の抑制効果は不十分で, 蛋白尿抑制はプレドニゾロンの用量依存性があることが示された。

また, 本研究ではプレドニゾロンの有効作用持続時間を検討するため, PAN 50mg/kg を投与する24, 12, 8, 2.5時間前にプレドニゾロン (3 mg/kg) を投与して, PAN による蛋白尿の抑制

効果を調べた。その結果、プレドニゾロン (3 mg/kg) を 2.5 時間前に投与したもののだけに蛋白尿抑制効果が認められ、プレドニゾロンの作用は 8 時間以上でほぼ消失していると考えられた。

植物性アルカロイド製剤であるセファランチンは副腎皮質糖質ステロイド様の作用を有する事が示唆されている。山本はセファランチンが PAN 腎症の蛋白尿を減少させる効果を有することを報告し、その作用機序としてセファランチンは構造的に副腎皮質糖質ステロイドに類似した構造をもち、副腎皮質糖質ステロイド様作用を持つことが示唆されている⁹⁾。セファランチンには副腎皮質糖質ステロイド同様、細胞膜の安定化作用があることが知られていたり³⁾、抗炎症作用があるとの報告もある¹³⁾⁻¹⁵⁾。Murakami らはセファランチンが好中球エラスターゼ、活性酸素の放出を直接的に抑制すると述べている¹⁶⁾。

セファランチンは既に臨床で使用されている薬剤であるが、これまで腎疾患の分野における使用検討は少ない。また、これまでにいくつかの活性酸素スカベンジャーの PAN 腎症に対する効果が検討されているが¹⁷⁾⁻¹⁹⁾、いずれのスカベンジャーも臨床応用されるまでには至っていない。本研究で、セファランチンは、ネフローゼ症候群などの代表的な治療薬であるプレドニゾロンと併用することにより、プレドニゾロンの有効使用量を減少させることができ、プレドニゾロンの作用時間を延長させることが認められた。セファランチン単独投与では蛋白尿抑制効果は十分ではないが、プレドニゾロンと併用することで、両者がその作用を補完あるいは増強しあう関係にあると考えられた。現在ネフローゼ症候群などの代表的な治療薬であるプレドニゾロンは、有効であるが、その副作用が問題視されており、その使用量、投与間隔を減少させる可能性があるセファランチンとの併用療法が臨床的にも考慮されるべき治療法になると考えられた。

炎症性の糸球体障害、すなわち糸球体腎炎に対しての副腎皮質糖質ステロイド剤は免疫抑制効果と抗炎症作用が期待されて使用されているが、その作用機序の詳細はまだ不明確な点が多い。同様

にセファランチンの蛋白尿抑制作用ではどの経路による活性酸素の抑制が重要かは不明である。本研究ではセファランチンとプレドニゾロンとの併用による相乗効果が認められたが、両者が異なった作用機序で相乗的に作用したか、あるいは作用機序は同一で、セファランチンとプレドニゾロンの併用により用量が増えた事により蛋白尿抑制効果が増強されたかは不明であった。今後、作用機序が解明されることにより、セファランチンが単にプレドニゾロンの代用としての役目を担うのか、あるいは免疫抑制剤等、他の薬剤との併用における効果等を検討していく必要がある。

結 論

セファランチンは、微小変化型ネフローゼ症候群の実験腎炎モデルである PAN 腎症に対して蛋白尿抑制効果を有し、代表的な治療薬であるプレドニゾロンと併用することにより、単剤では不十分であった蛋白尿抑制効果が明らかに増強された。両者がその作用を補完あるいは増強しあう関係にあると考えられ、セファランチンは現在代表的な治療薬で副作用も注目されているプレドニゾロンの使用量、投与頻度を減少させる可能性がある薬剤として今後の臨床応用などへの展開が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻内部環境医学講座 (第二内科) 下条文武教授、同腎研究施設構造病理学分野 山本 格教授に深謝致します。また、技術的援助を頂きました吉田 貫技官に深謝致します。

文 献

- 1) Lannigan R, Kark R and Pollak VE: The effect of a single intravenous injection of aminonucleoside of puromycin on the rat kidney: a light- and electron-microscope study. *J Pathol Bacteriol* 83: 357-362, 1962.
- 2) Fujiwara Y: an ultrastructural study of the effect of

- the steroid in puromycin aminonucleoside nephrosis rats. *Virchows arch a pathol anat histopathol* 405: 11-24, 1984.
- 3) 宮原正信, 内海耕慥, 杉山勝三, 青野 要: 生体膜に対するビスコクラウイン型アルカロイドの作用とその作用機序に関する研究 第1報 細胞膜傷害による K^+ 遊出に対するセファランチンの阻止作用. *岡山医会誌* 89: 749-756, 1977.
 - 4) 新上哲生, 前田栄樹, 橋本修治: Cepharranthinのimmunomodulatorとしての作用機序. *消と免疫* 9: 201-205, 1983.
 - 5) Watanabe S, Mrimoto MY, Shiraishi N, Sano A and Utumi K: The inhibition of platelet aggregation by biscoclaurine alkaloids. *Struct Funct* 6: 263-267, 1981.
 - 6) 小林正之, 片山俊雄, 落合成正, 吉田真弓, 海渡健, 増岡秀一, 島田 貴, 西脇嘉一, 酒井 紀: 特発性血小板減少性紫斑病に対するセファランチンの大量療法の試み. *臨床血液* 33: 405-407, 1992.
 - 7) 中山志郎, 松下章子, 市場茂樹, 永井謙一: 特発性血小板減少性紫斑病に対するセファランチンの臨床効果. *臨床血液* 33: 408-409, 1992.
 - 8) 小林正之, 田中英二, 師 保之, 塚原敏弘, 中山志郎, 岡野周子, 田口信行, 野村昌作, 太田八千雄, 太田 茂, 竹森信男, 斎藤永仁, 王 伯銘: 難治性特発性血小板減少性紫斑病に対するセファランチン大量療法の検討. *診断と治療* 83: 589-595, 1995.
 - 9) 山本 格: ネフローゼ腎症モデルへのセファランチンの効果. *アルカロイド研究会会誌* 23: 29-32, 1997.
 - 10) Diamond JR, Bonventre JV and Karnovsky MJ: A role of oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney int* 29: 478-483, 1986.
 - 11) Hartman ME, Hartman JD and Baldrige RC: Inhibition of aminonucleoside nephrosis by adenine. *Proc Soc Exp Biol Med* 100: 152-155, 1959.
 - 12) Derr RF, Loechler DK, Alexander CS and Nagasawa HT: inhibition of aminonucleoside nephrosis in rats. Prevention by N6-methyladenosine. *J Lab Clin Med* 72: 363-369, 1968.
 - 13) Kazunori M, Robert AC, Hal KH, Frank CS, Roy WM, Jeffrey MJ, Lillian DT and Daniel LT: Cepharranthine, an alkaloid from *stephania cepharantha*, inhibits increased pulmonary vascular permeability in an ovine model of sepsis. *SHOCK* 20: 46-51, 2003.
 - 14) 横田武彦, 横田欣也, 松浦達雄, 志和正明: 血液透析時の好中球 superoxide anion 産生に対するセファランチンの抑制効果についての検討. *透析会誌* 26: 1703-1708, 1993.
 - 15) Kondo TY, Takano F and Hojo H: Suppression of lipopolysaccharide-induced fulminant hepatitis and tumor necrosis factor production by bisbenzylisoquinoline alkaloids in bacillus Calmette-Guerin-treated mice. *Biochem Pharmacol* 46: 1861-1863, 1993.
 - 16) Murakami K, Okajima K and Uchiba M: The prevention of lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by pretreatment with cepharanthine in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 57-63, 2000.
 - 17) 鈴木真理子, 佐藤静生, 田崎理子, 沢村大輔, 野村和夫, 橋本 功, 帷子康雄: 多核白血球の活性酸素産生におよぼす Cepharranthin の効果. *西日本皮膚科* 48: 278-283, 1986.
 - 18) Thakur V, Walker PD and Shah SV: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int* 34: 494-499, 1988.
 - 19) Beaman M, Birtwisle R, Howie AJ, Michael J and Adu D: The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 73: 329-332, 1987.

(平成17年1月20日受付)