

ウレアーゼ阻害剤による尿路結石の予防
第3報 新ヒドロキサム酸誘導体によるウレアーゼ阻害と
膀胱結石形成の防止

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

竹 内 秀 雄
大 石 賢 二
吉 田 修

富山大学薬学部薬品生物化学教室 (主任: 長谷純一教授)

小 橋 恭 一
竹 部 幸 子
長 谷 純 一

PREVENTION OF INFECTED URINARY STONES
BY UREASE INHIBITOR

III. INHIBITION OF UREASE AND PREVENTION
OF INFECTED BLADDER STONE FORMATION
BY NEW HYDROXAMIC ACID DERIVATIVES

Hideo TAKEUCHI, Kenji OISHI
and Osamu YOSHIDA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Chairman: Prof. O. Yoshida, M. D.)*

Kyoichi KOBASHI, Sachiko TAKEBE
and Jun'ichi HASE

From the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

Hydroxamic acid, a potent and specific inhibitor of bacterial urease activity, was found to be effective for the prevention of alkalinization of infected urine and bladder stone formation.

1. Among new hydroxamic acid derivatives of hippuric acid, *m*-methoxyhippurohydroxamic acid (UCD II) was expected to be most effective, because of the strong inhibitory power against urease activity and the high urinary excretion in rats without degradation.

2. UCD II prevented the alkalinization of experimentally infected urine *in vitro*.

3. UCD II significantly prevented the bladder stone formation as well as alkalinization of urine *in vivo*, when the compound was orally administered to the rats with urinary tract infection caused by *Proteus mirabilis*.

4. Clinical application of UCD II was dependent upon the evaluation of safety of the compound, with reference to the prevention of pathologic sequelae of urinary infection with urease-producing bacteria.

結 言

尿路感染症に起因するリン酸塩結石の増大およびその再発防止は临床上重要な問題である。

われわれはこれまでウレアーゼの特異的阻害剤であるヒドロキサム酸¹⁾を用いリン酸塩結石予防の可能性を検討してきた。すなわちニコチノヒドロキサム酸を用いて感染尿のアリカリ化抑制効果 (*in vitro*) およびラット膀胱結石の形成抑制効果についてその有効性を報告した^{2,3)}。しかしニコチノヒドロキサム酸を含めこれまで知られている各種ヒドロキサム酸は尿中排泄率が低く上記の目的には必ずしも効果的でない³⁾。

そこでわれわれは新たに合成された馬尿酸誘導体のヒドロキサム酸について阻害力および尿中排泄率を調べ、それらの Effective Index* の比較からより効果的な新ヒドロキサム酸 UCD II (*m*-methoxyhippurhydroxamic acid, MW 226, m.p. 150°C) を得た。この新ヒドロキサム酸を用い *in vitro* での感染尿のアリカリ化抑制効果およびラットの膀胱結石形成抑制効果を検討したので報告する。

実 験 方 法

実験1. 新ヒドロキサム酸誘導体のウレアーゼ活性阻害力および尿中排泄

新ヒドロキサム酸は宗像敬一、田中悟および豊島昭二 (エーザイ株式会社) らにより合成成分与された。

ヒドロキサム酸の阻害力はなたまま粉末より抽出した粗ウレアーゼ標品を用いて一定条件下でウレアーゼ活性を50%阻害する濃度 (I_{50}) を求めることによって

測定した。ウレアーゼ活性は van Slyke ら⁴⁾ の方法に従って測定した。約18時間絶食したラット (Wistar 系メス (100~200 g)) に各種ヒドロキサム酸 100 mg/kg を胃ゾンデにて強制経口投与し、6時間および24時間の尿を採取した。集めた尿中のヒドロキサム酸量をウレアーゼ阻害法⁵⁾により定量し、未変化ヒドロキサム酸として投与量に対する回収率 (%) を求めた。

実験2. 実験的感染尿に対する UCD II のアルカリ化抑制効果

正常人尿中に *Proteus mirabilis* 10⁶/ml を混入し実験的感染尿とし、37°C 保温で8時間、24時間後の pH を測定した。UCD II を 2×10^{-4} M, 5×10^{-4} M および 1×10^{-3} M 濃度になるように加え、UCD II を加えないものを対照として尿 pH の変化を比較した。同一実験を3回くり返し、その平均値と標準偏差値を求めた。

なお *Proteus mirabilis* は臨床分離株を用い、細菌の定量培養には brain heart infusion agar にての混釈培養法にておこなった。尿 pH は LABOMATE II (東芝ベックマン製) にて測定した。

実験3. UCD II 経口投与によるラット膀胱結石の形成抑制

ラット膀胱内に *Proteus mirabilis* 付着の亜鉛片を挿入して作成する異物結石形成 (Fig. 1) に対する UCD II の抑制効果を調べた。

ラット (Wistar 系オス体重 200 g) を、次の3群にわけた。

- a) 無治療群 20匹
- b) UCD II 100 mg/kg/day 投与群 15匹

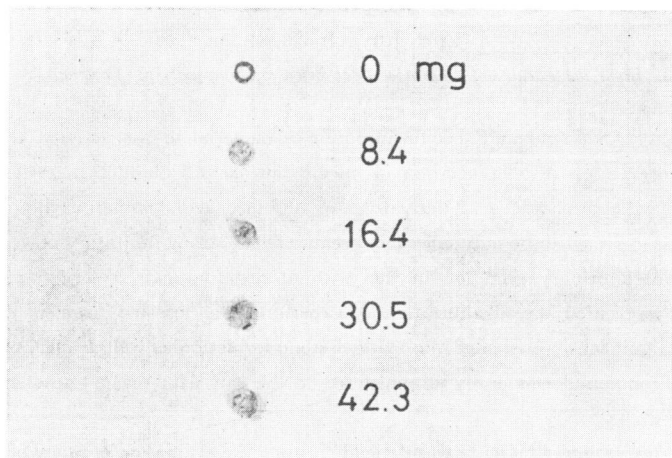


Fig. 1

* Effective Index = $\frac{I_{50} (\mu\text{M})}{\text{recovery \% in urine for 24 hr}}$

c) UCD II 200 mg/kg/day 投与群 10匹

3群ともに汚染亜鉛を入れる手術をおこない、実験群 b, c に対して術後 2 日目より朝晩の 2 回 UCD II を胃ゾンデにて強制投与し、尿量、尿 pH、尿中ヒドロキサム酸濃度を調べ 6 日目に殺し、結石重量、腎所見、尿中細菌数、BUN などを調べた。

挿入亜鉛片 (26 mg) は滅菌したのち *Proteus mirabilis* 10^7 /ml の細菌浮遊液に浸して汚染亜鉛片とした。*Proteus mirabilis* は実験 2 で用いた菌株と同一である。

尿 pH は代謝ケージにて 6 時間採尿後実験 2 と同じく LABOMATE II (東芝ベックマン製) にて測定した。

結石分析は赤外線分光分析にておこなった。

BUN の測定は尿素窒素テストワコー (和光純薬) を用いた。

細菌定量培養は brain heart infusion agar を用いての混濁培養法およびウリカルト (第一化学薬品製) の dip slide 法にておこなった。

腎所見は肉眼的所見および HE 染色にての顕微鏡所見によった。

実験結果

I. 新ヒドロキサム酸誘導体の尿中排泄

馬尿酸ヒドロキサム酸誘導体 9 種の阻害力 (I_{50})、尿中排泄 (%) および Effective Index を Table 1 に示した。

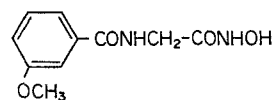
Table 1. Excretion of hydroxamic acid derivatives of hippuric acid.

Hydroxamic Acid	I_{50} μM	Recovery in Urine (%)			Effective Index
		0-6hr	6-24hr	Total	
hippuric	0.77	3.7	0.34	4.0	5.19
<i>o</i> -chloro-	0.50	3.7	0.17	3.9	7.80
<i>m</i> - "	0.74	4.1	0.15	4.3	5.81
<i>p</i> - "	1.00	1.7	0.42	2.1	2.10
<i>o</i> -methoxy-	1.3	3.0	0.11	3.1	2.38
<i>m</i> - "	1.2	15.0	0.59	15.6	13.0
<i>p</i> - "	1.7	16.0	0.29	16.3	9.59
<i>m</i> -nitro-	1.2	14.6	0.33	14.9	12.4
2-furyl-	1.3	15.5	0.68	16.2	12.5

ウレアーゼに対する阻害力は 9 種の化合物の間にそれほど差はなく I_{50} 値は 1.0 μM 前後であったが、尿中排泄率は前報³⁾に報告したニコチノール、カプリロールおよびベンゾヒドロキサム酸などよりもいずれも高い値を示した。これらの馬尿酸ヒドロキサム酸誘導体の中でも *m*-nitro- 14.9% (24時間回収率)、*m*-methoxy- 15.6%、*p*-methoxy- 16.3%、2-furyl- 16.2% ととくに高い排泄率を示した。

Effective Index の高いものは *m*-methoxy- 13.0、2-furyl- 12.5、*m*-nitro- 12.4、*p*-methoxy- 9.59 であって、Andersen⁶⁾ の報告した *p*-chloro- の 2.38 よりはるかに高かった。

これらのうち Effective Index が最大で、最も効果の期待される *m*-methoxyhippurohydroxamic acid (UCD II, Fig. 2) を用いた以下の実験をおこなった。なおこれら馬尿酸誘導体ヒドロキサム酸の合成法とウレアーゼ阻害力、尿中排泄率に関する構造・活性相関



UCD II : *m*-methoxy-hippurohydroxamic acid
Fig. 2

の詳細は別報として発表される予定である。

II. 実験的感染尿に対する UCD II のアルカリ化抑制効果

Fig. 3 に示すごとく、対照尿でははじめ pH 6.94 \pm 0.03 ($M \pm S.D.$) の尿は 8 時間後 pH 8.65 \pm 0.01 になり 24 時間後 9.15 \pm 0.04 により上昇したが、UCD II を加えたものではその濃度に応じ pH の上昇は抑制された。すなわち UCD II 2×10^{-4} M 存在下では 8 時間後 pH 7.65 \pm 0.03、12 時間後 pH 8.73 \pm 0.04、UCD II 5×10^{-4} M 存在下では pH 7.43 \pm 0.06、pH 8.17 \pm

0.13, UCD II 1×10^{-3} M 存在下では pH 7.22 ± 0.01 , pH 7.73 ± 0.08 であった。

また対照尿にて生ずる塩類の析出も UCD II 添加によって抑えられた。

なお同時に尿中の細菌数も調べたが24時間後ではすべて 1×10^7 /ml 以上となり UCD II の抗菌性は認められなかった。

III. UCD II 経口投与によるラット膀胱結石の形成抑制

術後, a)の無治療群 20 匹中途死亡ラット 4 例と感染不成立ラット 3 例を除外し, b)の UCD II 100

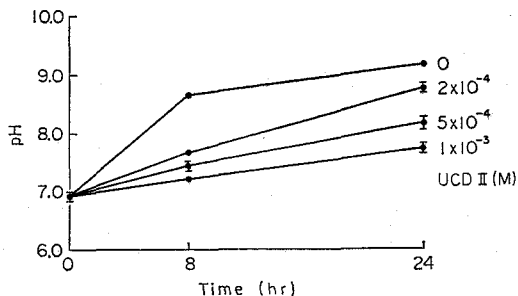


Fig. 3. Effect of UCD II on alkalization of urine.

Table 2. Effect of UCD II on bladder stone.

	No. of rats	Urine ml	pH	UCD II mg/ml	%	Stone mg	BUN mg%	Renal Infection
a. Control untreated	13	15.9	9.03 ± 0.21 (M \pm SD)	0	—	29.0 ± 6.5	38 ± 18	9/13
UCD II-treated								
b. 100 mg/kg	13	17.9	8.33 ± 0.38	0.12 ± 0.09	6.1 ± 1.5	18.3 ± 6.9	26 ± 11	5/13
c. 200 mg/kg	9	10.4	7.33 ± 0.51	0.80 ± 0.77	9.6 ± 2.4	16.1 ± 9.5	30 ± 12	5/9

%*: 0~24 hr Recovery %

mg/kg/day 投与群15匹中死亡1例, 感染不成立1例を除外, また c)の UCD II 200 mg/kg/day 投与群 10 匹中感染不成立1例を除外した。

Table 2 に示すごとく尿量では a 群と b 群ではあまり差がなかったが, c 群ではわずかに少ない傾向がみられた。

尿 pH は UCD II 投与により pH 上昇が抑制された。なお尿 pH は術後 3 日間の pH の平均を求めそれより各群の平均を示したものである。術後の尿 pH の変化を Fig. 4 に示した。術後 3 群とも pH 7.0 以下であったが術後 2 日目には 3 群とも pH 8.0 前後に上昇した。術後 3 日目には a 群は pH 8.93 ± 0.37 とさらに上昇し, b 群では pH 8.32 ± 0.62 と上昇は軽度

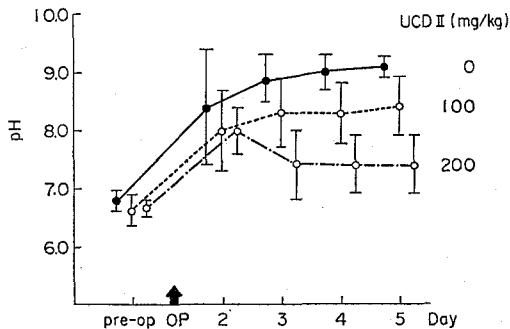


Fig. 4

で, c 群は pH 7.42 ± 0.68 とやや下降した。5 日目には a 群 pH 9.12 ± 0.13 と上昇するも, b 群は pH 8.37 ± 0.51 , c 群は pH 7.42 ± 0.52 と 3 日目の値とは変わらなかった。これらの値はいずれも術前よりは上昇しているが b 群および c 群は a 群に比し尿 pH 上昇は著明に抑制された。

尿中の UCD II の濃度は Table 2 に示したごとく b 群では 0.12 ± 0.09 mg/ml で, c 群では 0.80 mg/ml であった。1 日投与量に対する回収率はそれぞれ $6.1 \pm 1.5\%$, $9.6 \pm 2.4\%$ であった。なお UCD II の濃度は

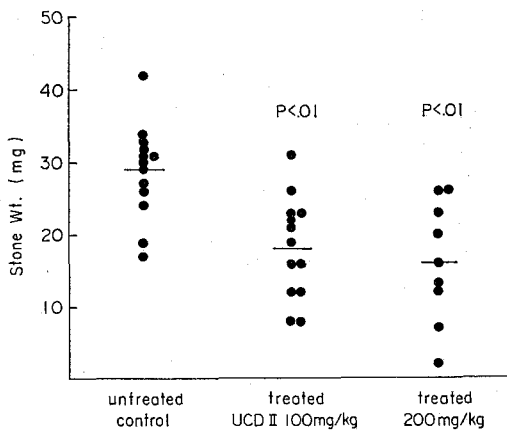


Fig. 5

各ラットにつき術後3日目および5日目の尿の濃度を平均を出し、それらより各群の平均を求めて示した。

結石重量は Table 2 および Fig. 5 に示すごとく、b, c 群はそれぞれ a 群に対し有意の低下が認められた ($p < 0.01$)。b 群と c 群では有意の差は認められなかった ($p > 0.1$)。結石の成分はすべてリン酸マグネシウムアンモニウム結石であった。

BUN は無治療群でやや高い傾向が見られた。また同時に生ずる腎盂腎炎、腎膿瘍などの腎の感染は UCD II 投与群でやや少なく、また程度も比較的軽度であった。

考 察

尿路結石の中でもリン酸結石はウレアーゼ産生菌の感染による尿アルカリ化が主要因となっている。*Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* 等のウレアーゼ産生菌は化学療法にも抵抗することが多く結石の再発、増大をきたす。結石の形成、増大はさらに尿流停滞、感染を助長し、たがいに影響しあって腎機能の悪化をもたらす。結石の形成増大を抑制することができれば、ある範囲内で感染も減弱しうる可能性もあり、結石の再発防止の対策が望まれる。

われわれはこれまでこの種の結石の形成予防をみるため、ウレアーゼの特異的阻害剤であるヒドロキサム酸を用い *in vitro* における感染尿のアルカリ化抑制実験²⁾ およびラット膀胱結石形成抑制実験³⁾ をおこなってきた。その結果ヒドロキサム酸は細菌由来のウレアーゼをじゅうぶんに阻害し、実験的感染尿のアルカリ化と結石形成を抑制することが認められた。しかし前報の実験に用いたニコチンヒドロキサム酸は経口投与の場合尿中回収率はラットで約1%³⁾ 正常人で0.5%と悪く、尿への排泄率のより高い誘導体が必要とされる。他の既知のヒドロキサム酸の尿中排泄率³⁾ も検討したが尿中回収率はいずれも小さく目的にかなう化合物を見いだしえなかった。そこで腎クリアランスの高い馬尿酸を誘導させて得たヒドロキサム酸について阻害力および尿中排泄を調べた (実験1)。一般的にこの種のヒドロキサム酸は尿中排泄率が高くその中でもメタメトキシヒプロヒドロキサム酸 (UCD II) が尿中回収率も高く阻害力も大で結石形成抑制には最も適当な化合物と考えられた。Andersen⁶⁾ の用いた Benurestat (*p*-chlorohippuro-hydroxamic acid) の尿中排泄率は UCD II にくらべて著しく劣っていた。なお阻害力はなたまためより抽出したウレアーゼに対するものであるため *Proteus* のウレアーゼに対する阻害力は化合物によって異なる可能性があり、最近われわれが調べたと

ころでは生菌に対しては約10分の1に阻害力が低下した。*Proteus* 菌体内に分布するウレアーゼに対して、ヒドロキサム酸が阻害するためにはまず菌膜を通過しなければならず、このことが生菌ウレアーゼに対する阻害力が低くなる理由と考えられる。なおヒドロキサム酸は *Proteus* により分解されないことは確認している。なお検討した馬尿酸ヒドロキサム酸誘導体は Benurestat を除き文献未知の新物質であり、その合成法については別に宗像らにより発表される予定である。またこれら誘導体の化学構造と植物および細菌由来のウレアーゼに対する阻害性および尿中移行率に関する構造・活性相関についても別誌に発表される予定である。

ついでわれわれはこの UCD II を用い実験的感染尿のアルカリ化抑制効果および結石形成抑制効果を調べた (実験2, 3)。その結果 UCD II は尿アルカリ化を顕著に抑制し、結石形成も同時に抑えた。すなわち実験2において UCD II 2×10^{-4} M 濃度において尿アルカリ抑制が、さらに 1×10^{-3} M では顕著な抑制効果がみられた。実験3において、尿 pH は UCD 投与群で低く、結石形成も抑えられた。しかし UCD II 100 mg/kg 投与と 200 mg/kg 投与にて結石重量には有意の差が認められなかった。このことは UCD II 投与群の尿中濃度がそれぞれ 0.12 mg/ml (5.3×10^{-4} M)、0.8 mg/ml (3.5×10^{-3} M) であり、これらの値はナタマメウレアーゼの90%阻害値 1×10^{-5} M より高く、両群とも尿中ウレアーゼ活性はほぼ同程度に阻害されていると考えられる。このため両者の結石重量に差を生じなかったものと思われる。また尿中回収率は6.1%、9.6%と健常ラットの1回投与の実験の15.6% (Table 1) に比し約半分に低下しているが、これは感染による腎機能障害のためかと思われる。また UCD II 投与群にて腎の感染、腎機能障害の程度はやや軽度であったが、これは UCD II には直接抗菌力はないので結石形成による尿路通過障害による二次的なもの、あるいはアンモニア産生抑制による腎機能保全によるものと思われる。

一般に動物実験においては条件設定の一定化が困難で、とくに結石形成実験では飲料水量、尿量、腎機能等が結石形成に大きな影響をおよぼしている。本実験では飲料水は自由摂取であるため個体差があり、また同時に感染を起こさせているため腎機能障害が加わり、尿量にも影響し、これが結石形成にどのようにはたらくかが問題である。腎機能障害は結石形成に対し抑制的にはたらくかと考えられるが、本実験では尿量、腎機能において大きな差がなく、したがって結石

形成は UCD II の投与により抑制されたものと考えられる。

以上述べたように UCD II はウレアーゼ阻害作用が強く、経口投与後の尿中回収率も高く、リン酸塩結石の形成抑制実験においてもその効果がみとめられた。

ヒドロキサム酸はこのように実験的感染尿のアルカリ化を抑制し結石形成を抑えるが、他にアンモニア産生による腎機能障害⁷⁾の抑制の可能性もあり、またヒドロキサム酸には直接抗菌性はないが尿素分解細菌（一般にアルカリ培地をこのむようであるが）に対し尿素分解を阻害することによる細菌の発育条件の変化をもたらす、そのことにより何らかの静菌的な作用のある可能性もありヒドロキサム酸の尿路への応用研究は今後さらに発展すべきものと思われる。

UCD II の臨床的応用にはなお解決すべき種々の問題（代謝、副作用、慢性毒性）があるがリン酸塩結石の予防薬剤としてきわめて有望である。

結 語

ウレアーゼの阻害剤であるヒドロキサム酸のうちで、阻害力が大で尿中排泄率の高い化合物を得るため新しく合成された馬尿酸ヒドロキサム酸誘導体数種についてウレアーゼ阻害性とラットの経口投与による尿中排泄を調べた。その結果よりメタメトキシヒプロヒドロキサム酸 (UCD II) を選び、これを用いて実験的感染尿のアルカリ化抑制効果および経口投与によるラット膀胱結石の形成抑制効果を調べた。

1) 9種の馬尿酸のヒドロキサム酸誘導体のうちで

尿中排泄が大で効果指数の最大のはメタメトキシヒプロヒドロキサム酸 (UCD II) であった。

2) UCD II 添加により実験的感染尿のアルカリ化は顕著に抑制された。

3) *Proteus* 菌汚染亜鉛片を膀胱内に挿入したラットに UCD II を 1 日 100 mg/kg および 200 mg/kg の経口投与をしたとき、それらの尿 pH の上昇は明らかに抑制され、ラット膀胱結石の形成も抑制されることが認められた。

4) UCD II は副作用、慢性毒性上の問題がなければ臨床応用の可能性がじゅうぶんにある。

なお本論文の要旨は1977年5月第65回日本泌尿器科学会総会（松本市）において発表した。

文 献

- 1) 小橋恭一：生化学，**44**: 187, 1972.
- 2) 竹内秀雄・高橋陽一・吉田 修・小橋恭一：泌尿紀要，**22**: 115, 1976.
- 3) 竹内秀雄・吉田 修・小橋恭一・竹部幸子・長谷純一：泌尿紀要，**23**: 113, 1977.
- 4) van Slyke, D. D. and Archibald, R. M.: J. Biol. Chem., **154**: 623, 1944.
- 5) Kobashi, K., Takebe, S., Terashima, N. and Hase, J.: J. Biochem., **83**: 287, 1978.
- 6) Andersen, J. A.: Invest. Urol., **12**: 381, 1975.
- 7) Musher, D. H., Griffith, D. P. and Rossen, R. D.: J. Infect. Dis., **131**: 177, 1975.

(1977年12月12日受付)

泌尿紀要訂正

第23巻（1977）人名索引

高山季則を高山秀則に訂正します。