

ラット腎結石形成に及ぼす Etidronate Disodium (EHDP) の効果

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

川村 寿一・野々村光生

岡田 裕作・吉田 修

京都大学医学部衛生学教室（主任：糸川嘉則教授）

高島真知子・糸川 嘉則

EFFECT OF ETIDRONATE DISODIUM (EHDP) ON CALCIUM OXALATE RENAL STONES INDUCED BY SYNTHETIC 1 α (OH) VITAMIN D₃ AND ETHYLENE GLYCOL IN RATS

Juichi KAWAMURA, Mitsuo NONOMURA,

Yusaku OKADA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida, M.D.)

Machiko TAKASHIMA and Yoshinori ITOKAWA

From the Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. Y. Itokawa, M.D.)

Combination of 1 α (OH) D₃(vit D) and ethylene glycol induced renal or ureteral stones or both consisting of calcium oxalate in male Wistar rats. This study investigates the effect of EHDP on calcium oxalate stone using the rat model. EHDP reduced the frequency of renal stone and calcium content in the kidney, and reduced the size of the stones in the renal pelvis and ureter. EHDP biochemically ameliorated renal injury induced by vit D and ethylene glycol. EHDP suppressed urinary excretion of calcium even though serum calcium slightly increased. EHDP had a phosphaturic action. EHDP elevated urinary excretion of magnesium. However, the severity of hypermagnesuria decreased in the rat which was not given EHDP concomitantly. Although EHDP slightly elevated urinary excretion of oxalate in the control rat, it did not affect the high level of urinary oxalate in the vit D/ethylene glycol rat. EHDP did not produce any histological change in the kidney or femoral bone.

These data indicate that EHDP can suppress renal stone formation in the vit D/ethylene glycol rat. It is speculated that firstly, EHDP may physicochemically inhibit stone formation in the process of nidus, aggregation and crystal growth of calcium oxalate, under the supersaturated condition of calcium oxalate in the urine, and secondly, EHDP may endocrinologically inhibit production of 1, 25(OH)₂ vit D in the kidney or inhibit 1, 25(OH)₂ vit D-mediated intestinal calcium absorption.

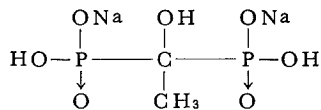
It is suggested that in order to prevent stone recurrence, EHDP may be clinically applied not only to calcium phosphate stones but also to calcium oxalate stones and hypercalciuria mediated by an active form of vitamin D.

Key words: Vit D/ethylene glycol-induced renal stone, Rat stone model, Calcium oxalate, EHDP

ま え が き

ひとの上部尿路結石に似た病態を実験動物に作ることはむつかしい。腎結石を作るため腎石灰化症をひきおこしても尿毒症にて、その動物を殺してしまうことが多い。われわれは、ビタミンDとエチレンジリン酸のそれぞれ単独では腎石灰化症や尿路結石の発生をみない投与量をもって、これら薬剤を同時に投与し、高カルシウム尿症と高尿酸尿症をおこして、尿酸カルシウムを成分とした結石を腎盂内や尿管に高率に作る事ができた^{1,2)}。

合成2リン酸化合物である、Etidronate disodium (1-hydroxy ethylidene diphosphonic acid disodium, 以下、EHDP と略す) は、つぎのような化学構造式をもち、主として骨に働いて骨融解を抑制し^{3,4)}、異所性石灰化を抑える働き⁵⁾をもつ。また、尿中においては、in vitro の実験からリン酸カルシウム塩の結晶成長や溶解を遅らせることも報告^{3,4,6)}されている。



今回、ラット尿酸カルシウム結石モデルを使ってEHDPを投与し、EHDPの結石形成におよぼす影響を尿中カルシウム、リン、マグネシウム、尿酸排泄態度からしらべ、臨床応用への可能性を検討したので報告する。

実験方法

実験動物としてWistar雄ラット(体重180g前後)を用い、基本飼料としてラットchow(CE-2日本クレア)を投与し、飲料水としては蒸留水を自由に摂取させた。エチレンジリン酸は0.5%濃度となるように飲料水に混ぜて投与し、ビタミンDは合成活性ビタミンD(1 α (OH)D₃, アルファロール® 中外製薬株式会社)の小児用油性のもの(以下、1 α D₃と略す)を用い、その0.5 μ g/mlを隔日に経口的に胃ゾンデにて強制投与した。EHDP(住友製薬株式会社)は、Fraserら⁷⁾の実験で示された最大効果濃度0.5%となるように原料粉末を蒸留水に溶解、調整し、飲水させた。

実験群として、つぎの8群に分け、G I ~ III ではそれぞれ10匹、G IV では15匹づつ用意した。

G I a : control (隔日に1ml ナタネ油を胃ゾンデより投与)

b : EHDP (のみ)

G II a : エチレンジリン酸 (のみ)

b : エチレンジリン酸+EHDP

G III a : 1 α D₃ (のみ)

b : 1 α D₃+EHDP

G IV a : エチレンジリン酸+1 α D₃

b : エチレンジリン酸+1 α D₃+EHDP

各群について、実験開始前、1週、2週、3週目に1匹ずつ代謝ケージに入れて24時間尿を採取し、同時に尾静脈より採血した。尿サンプルについては、カルシウム(Ca)、リン酸(P)、マグネシウム(Mg)、尿酸を測定して、1日排泄量として算出した。血液サンプルについては、BUN、Ca、P、Mgを測定した。3週終了後、イヌリンクリアランス(Cin・GFR)⁸⁾を測定し、大動脈よりヘパリン採血をおこなってト殺した。ト殺後ただちに開腹し、腎、尿管、膀胱における結石形成の有無をしらべた。右腎については重量測定後、右大腿骨とともに-20°Cに凍結保存し、後日それぞれ、Ca、P、Mg含有量を測定し、左腎、左大腿骨については、10%ホルマリン固定後、H.E.染色をほどこして組織学的に検索した。

測定法：血清および尿中のCaは0-クレゾールフタレンコンプレタソン法⁹⁾、PはChenらの方法¹⁰⁾、Mgはキシリジン・ブルー法¹¹⁾、イヌリンはアントロン法¹²⁾にて測定した。BUNはデアセチルモノオキシム法¹³⁾、尿中尿酸は市山らの方法¹⁴⁾にしたがって酵素法にて測定した。腎ならびに大腿骨中のCa、Mgは原子吸光分光光度計(島津AA646型)にて測定し、Pについては、Ca、Mg測定用の灰化材料を蒸留水に再溶解し、Chenらの方法¹⁰⁾にしたがって測定した。

得られたデータについて、各群間あるいは各群でのa、b間の有意差検定には、 χ^2 検定あるいはpair-tテストを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

BUN、血清Ca、P、Mgについては、3週の実験期間の終了時の値をTable 1に掲げた。G I ~ III群についてはa、bとも10匹の平均値が、G IV aは12匹、G IV bは13匹の平均値が示してある(以下、尿中のデータについても同じ)。

1. 腎機能 (Table 1)

経時的にみると、BUNについてG I ~ IIIではEHDPの投与の有無にかかわらず、3週まで変化しなかった(19~21 mg/100 ml)。しかし、G IV aでは2週以降に増加し、3週目には中等度 azotemia、

Table 1. Inulin clearance, BUN, serum calcium, phosphorus and magnesium at the end of experiment (Mean±SD)

Exp. Group	Inulin clearance ml/min	BUN mg/100ml	Serum Calcium mg/100ml	Serum Phosphorus mg/100ml	Serum Magnesium mg/100ml
G I a	2.04 ± 0.24	19.21 ± 5.01	8.75 ± 1.10	6.96 ± 0.84	2.62 ± 0.32
b	1.93 ± 0.16	21.89 ± 4.63	9.53 ± 0.94	6.87 ± 0.74	1.98 ± 0.42
G II a	1.99 ± 0.25	20.45 ± 4.81	8.88 ± 1.21	6.88 ± 0.72	2.84 ± 0.98
b	1.82 ± 0.37	23.05 ± 3.56	9.61 ± 1.14	7.42 ± 1.19	1.60 ± 0.15
G III a	1.97 ± 0.23	21.08 ± 4.65	10.32 ± 1.62	6.58 ± 0.74	2.60 ± 0.91
b	1.87 ± 0.15	22.88 ± 3.14	10.63 ± 1.44	6.39 ± 0.58	1.59 ± 0.17
G IV a	0.65 ± 0.38	45.21 ± 20.81	10.76 ± 1.58	7.89 ± 0.95	2.47 ± 0.74
b	1.06 ± 0.30	37.75 ± 14.74	11.04 ± 1.36	7.35 ± 1.16	1.66 ± 0.24

Statistically significant between a and b in each group: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

45.2±20.8 mg/100 ml を示した。いっぽう G IV b でも同じ傾向を示し増加したが、3週目で 37.8 ± 14.7 mg/100 ml と IV a 群に比べて低値であったが、有意な変化とはいえなかった。イヌリンクリアランス値で見ると、G I より G II, G II より G III と徐々に低下しているが、有意な変化とはいえなかった。G IV a では対照の半分以下に低下しているが (0.65±0.38 ml/min), EHDP の添加により、その下り方が有意に軽減された (1.06±0.30 ml/min)。

2. 血清 Ca, P, Mg の変化 (Table 1)

血清 Ca は、G III で1週目より、G IV で2週目から、そのレベルの上昇がみられた。EHDP の添加により、2週以降に非添加時に比べて増加度が大きであったが、それぞれの群で有意な変化ではなかった。

血清 P は、G IV a で少し3週目に増加したが、EHDP の添加によっても各群で、その血中レベルは余り影響されなかった。

血清 Mg は、EHDP 添加により各群において、2週以降に低下しはじめ、3週目には各群で有意に低値を示した。なお、各 a 群間では、G III, IV で低値なるも、有意ではなかった。

3. 尿中 Ca, P, Mg, 尿酸排泄量の変化 (Fig. 1~4)

尿量は control の G I で、EHDP の添加により

3週目に少し増加した (前値: 12.6 ± 2.2 ml → 3週: 17.7 ± 6.6 ml, p<0.05)。他群では、とくに EHDP 添加による尿量の変化はみられず、a, b 間で差はなかった。G II b では前値 12.8 ± 3.6 ml より、3週目に 21.3 ± 5.1 ml (p<0.05) と少し増加した。G III, IV では1週目より漸次、増加し、3週目で最大尿量となった。G III b では、前値: 13.9 ± 1.6 ml → 3週: 30.33 ± 10.9 ml (p<0.01), G IV b では、前値: 14.1 ± 3.1 ml → 3週: 40.1 ± 7.2 ml (p<0.001) であった (いずれも平均値 ± S.D.)。

尿中 Ca は、G III a, G IV a では、1週目より著明に増加し、EHDP 添加によりこの Ca 排泄増加が抑えられている。ことに G IV b ではこの変化が強く、G I b の EHDP 単独投与の変化に近い。G I, G II では、EHDP 投与によっても、尿中 Ca は変化を受けなかった (Fig. 1)。

尿中 P については、EHDP 添加により各群で尿中排泄増加がみられ、G II, G III でこの傾向が強く、G IV でも、1週、3週に有意ではないが少し増加傾向がみられたが、他群に比べて一番軽い変化であった (Fig. 2)。

尿中 Mg については、1αD₃ の投与されている G III a, G IV a において、1週以降より排泄増加がみられるが、EHDP 添加により、G III b では3週目に

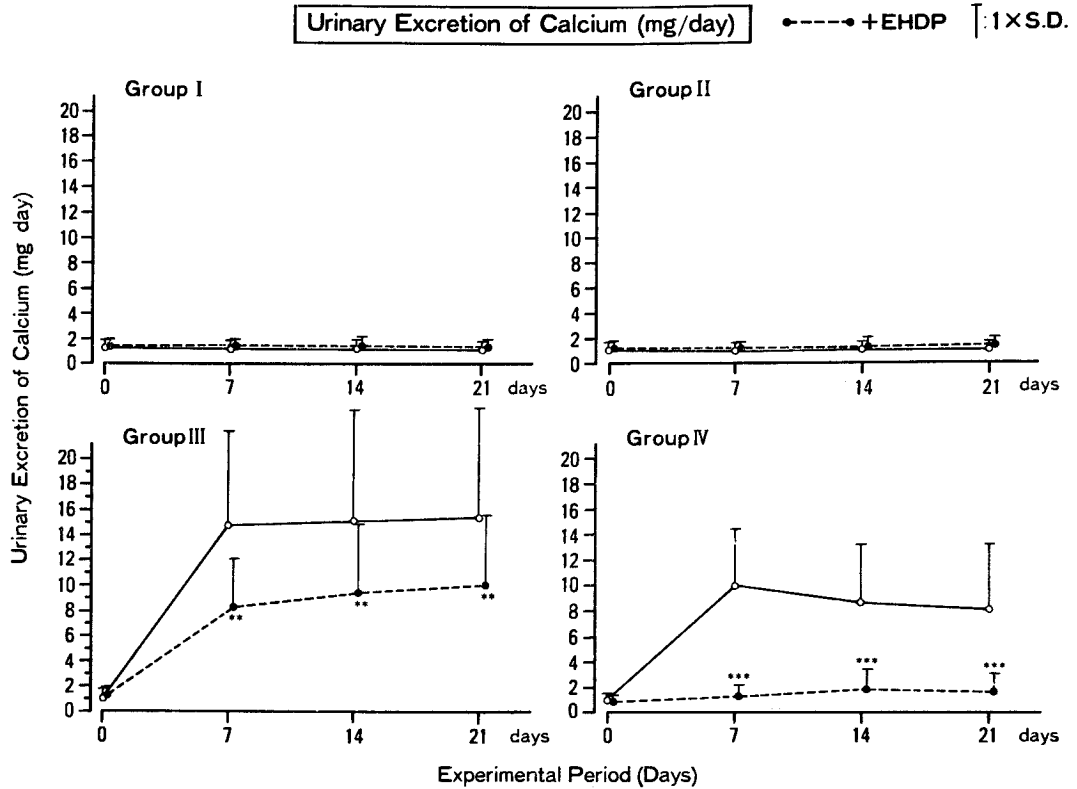


Fig. 1. Changes in urinary excretion of calcium in groups I-IV. ○—○: Experimental groups without EHDP (GI-IVa), ●---●: Experimental groups with EHDP (GI-GIVb)

さらに増加がみられたのに対し、GIVbでは2週以降、むしろMg排泄増加が抑えられた。GI, IIでは、GIIIと同様、EHDP添加により、Mg排泄増加がみられた (Fig. 3)。

尿中尿酸排泄については、EHDP単独投与でGIIIbにみるごとく、3週目に少し排泄増加がみられた。この変化は、 $1\alpha D_3$ を同時投与されたGIIIbにおいても観察された。エチレングリコール投与のGII, IVでは、当然1週目より尿中尿酸排泄が増加しているが、EHDP添加により、とくにこの効果が増強されるということとはなかった (Fig. 4)。

4. 結石発生率および腎ならびに大腿骨中のCa, P, Mg含有量 (Table 2)

腎盂、尿管結石の発生は、GIVにおいてのみみられた。GIVaでは、12匹中10匹 (83.3%)に、GIVbでは、13匹中7匹 (53.8%)に観察された。Fig. 5は、GIVa (upper), GIVb (lower)で結石のみられた腎の剖面写真である。EHDP添加により、一般に結石の個数は少なくなり、その大きさも小粒になり、容易に尿管にまで降下し、このため尿管閉塞をきたし、

腎盂腔が拡大していた (Fig. 5, lower)。結石成分は、GIVbもGIVaと同様、蔞酸カルシウムよりなっていた。また、GIVにおいて結石発生ラットと非発生ラット間で、前述した、血中ならびに尿中、Ca, P, Mg, 蔞酸の値に差は認められなかった。

腎Ca含有量は、EHDP添加によりGIでは軽度、GIVでは著明に減少した。腎Mg含有量については、各群でEHDP添加により軽度減少しているが、有意な変化ではなかった。腎P含有量はGIVで、EHDP添加により有意に減少したが、他群では変化がなかった。

大腿骨のCa, Mg, P含有量については、EHDP単独の効果として、GIIIbでCa含有量の減少を認めたが、GIIIaと比べて有意な変化とはいえなかった。まず、各群においてEHDP添加の影響はみられなかった。また、群間の比較では、GIVはGIに比べて、有意にCa含有量が減少していた。GIIIではGIに比べて、Mg含有量の減少を認めたが、有意な変化とはいえなかった。P含有量については、GIVでGIに比べて有意に減少していた。

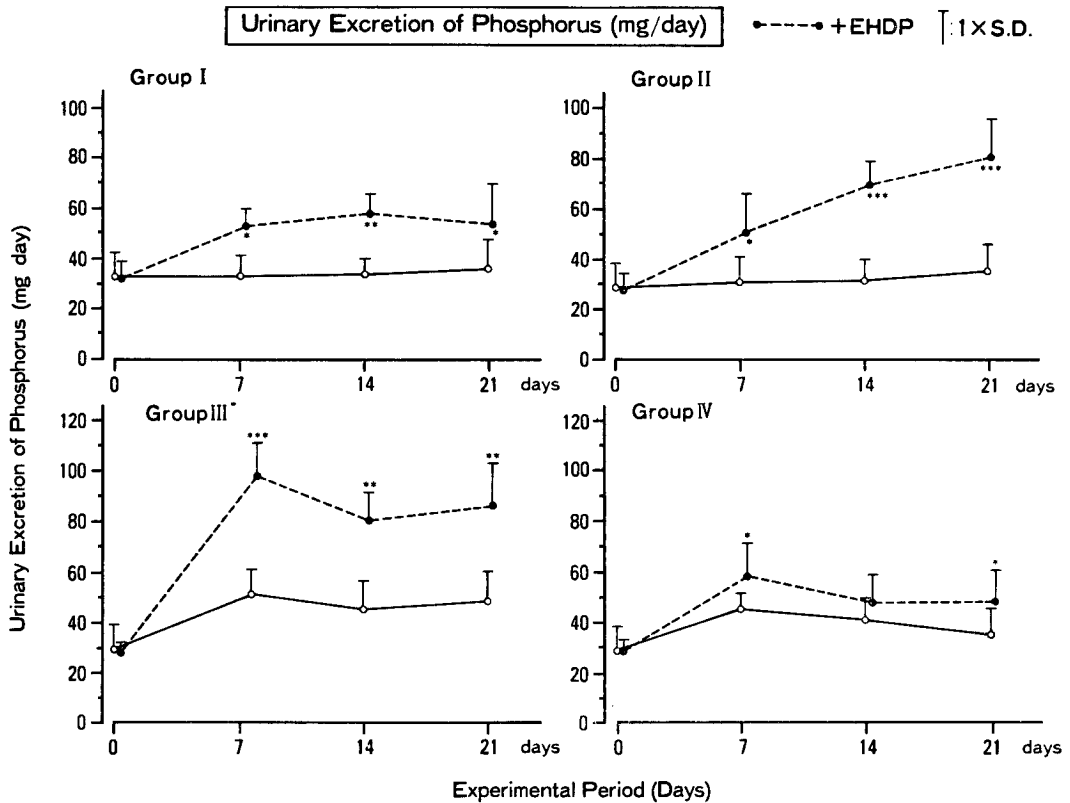


Fig. 2. Changes in urinary excretion of phosphorus in groups I-IV. ○—○: Experimental groups with EHDP (GI-GIVa), ●---●: Experimental groups with EHDP (GI-GIVb)

腎重量は、EHDP 添加により各群で減少がみられたが、G I, III で有意な変化といえた。群間の比較では、結石群、G IV での腎重量増加が目立った。

実験期間中の体重増加は、G IV においてわずかであったが、EHDP の影響は各群でみられなかった。

なお、G IV において結石発生ラットの腎重量、Ca 含有量は非発生ラットのそれらに比べて増加していたが、有意とはいえなかった。

5. 腎ならびに大腿骨の組織学的所見

腎の組織所見については、G II, G III では対照群に比べて変化がみられなかったし、EHDP の影響も、G I ~ III の a, b 群間で認められなかった。G IV にみられた所見は、つぎのようにまとめられるが、この結石群でも、EHDP 投与による変化はとくに認められなかった。i) 糸球体、尿細管上皮に変化を認めず、集合管の一部に蔘酸カルシウムと思われる結晶が管腔内にみられた。ii) 集合管や主として遠位尿細管上皮の扁平化、管腔の拡張がところどころにみられ、一部には蔘酸カルシウム結晶を管腔内にいれて、上皮の脱落もみられた(水腎症性変化)。iii) ii) の水腎症変化

が、集合管と遠位尿細管を中心にみられ、上皮の脱落、破壊の程度も強くなってきた。IV) 実験途中で死亡した尿毒症の程度強いラットでは、糸球体係蹄の萎縮がみられ、広範囲の尿細管上皮の脱落、破壊とともに管腔の拡張、間質への細胞浸潤も認められた。

大腿骨組織所見については、G I a に比べて、G I b, G II ~ IV a, b において、特記すべき変化は認められなかった。

考 察

EHDP は、P-C-P 結合をもつ合成リン化合物で、酵素や化学分解を受けにくい性質がある。その働きとして、骨における破骨細胞による骨融解を阻害することが知られている^{3,4)}。また、骨のリン酸カルシウムの表面に化学的に吸着し、ヒドロキシアパタイト結晶やその非結晶性前駆物質の形成、成長、溶解を抑制することがいわれている^{3,4,6)}。さらに、in vivo の実験では、ビタミンDによりひきおこされた皮膚、大動脈、腎の石灰化を、EHDP は阻害するという成績⁵⁾もみられ、腎におけるカルシウム沈着に対しては、EHDP

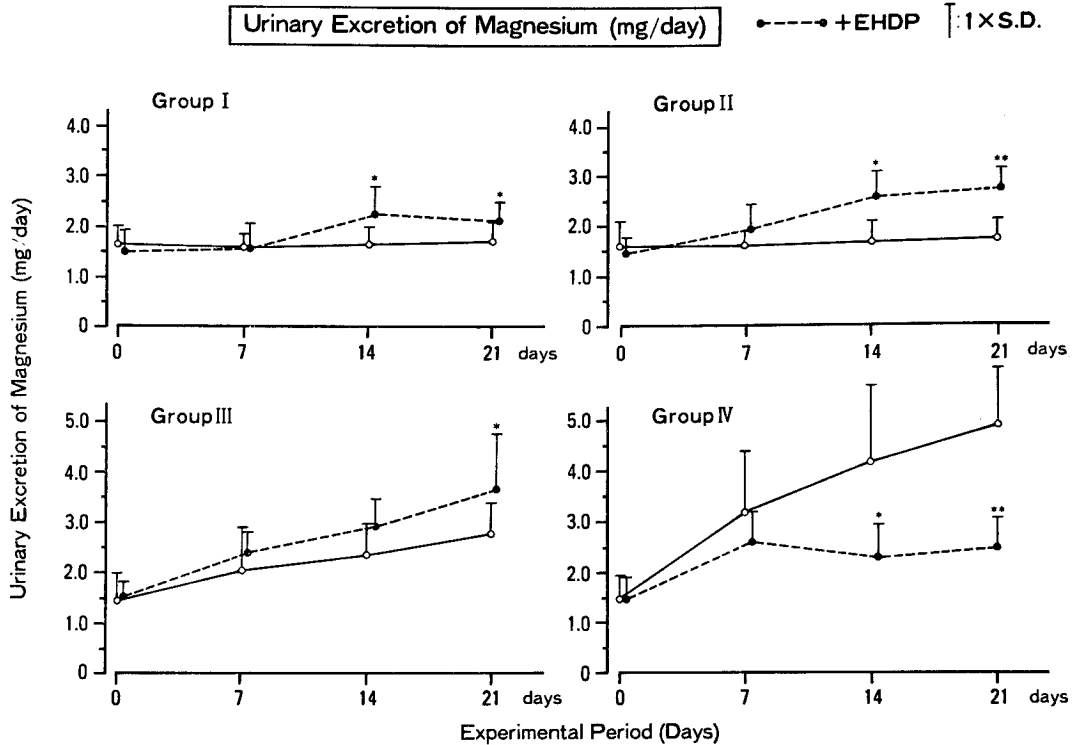


Fig. 3. Changes in urinary excretion of magnesium in groups I-IV. ○—○: Experimental groups without EHDP (GI-GIVa), ●—●: Experimental groups with EHDP (GI-GIVb)

の用量依存的に阻害効果がみられるともいわれている¹⁵⁾。

ところで、尿路結石に対するEHDPの効果については、*in vitro*の実験¹⁶⁾では、リン酸カルシウム塩結晶、ことにapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$)の成長や溶解を遅らせることが示されてきた。*in vivo*の実験では、Fraserら⁷⁾(1972)がラット膀胱結石に対するEHDPの効果を見ており、蔘酸カルシウムの核形成の阻害と同成分結石の重量減少、apatiteの発生頻度を下げることを観察しているが、struvite (Magnesium ammonium phosphate) に対しては無効であったと述べている。

いっぽう、臨床応用として、Ohata & Pak¹⁷⁾(1974)は、brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)に対するEHDPの効果を報告し、核形成を阻害し、核形成がおこっても結晶成長を阻害し、brushite腎結石の形成を予防すると述べている。また、apatiteに対しても、brushite核にして作られる時には、brushite nidusの発育を抑え、apatite結石の形成を防止できるかも知れないとも述べている。また、蔘酸カルシウム結石に対しては、その効果は疑問としながらも、リン酸カルシウムを核にして形成されるものには効果が期待できる

可能性があるとしている。

また、Robertsonら¹⁸⁾(1974)、Baumannら¹⁹⁾(1978)は、蔘酸カルシウム結石に対するEHDPの使用経験を報告している。それによると、蔘酸カルシウム結石の発育や凝集を阻害し、同結晶のサイズを小さくさせる効果のあることを述べている。しかし、同時に尿中蔘酸排泄の増加を観察しており、長期間のEHDP投与による骨軟化症の発生の問題²⁰⁻²³⁾とともに、臨床応用に関しては、既して否定的であった。

さて、本実験から、EHDPは純粋な蔘酸カルシウム結石に対しても効果がみられ、その発生頻度を減少させることが観察された。その形状、成分はEHDP非投与群(GIVa)の結石と大差なかったが、大きさについては「小粒」という表現があてはまるものであった。このことは腎カルシウム含有量の減少、尿中カルシウム排泄量の減少、腎機能低下の軽減という成績にも示された。しかし、Robertsonら¹⁸⁾、Baumannら¹⁹⁾のいうように、EHDP単独投与群(GIb)で尿中蔘酸排泄の増加がみられたことは、結石群では、GIVaに比べて、GIbではEHDP添加により蔘酸排泄がさらに増強されることはなかったものの、少し問題が残るようである。

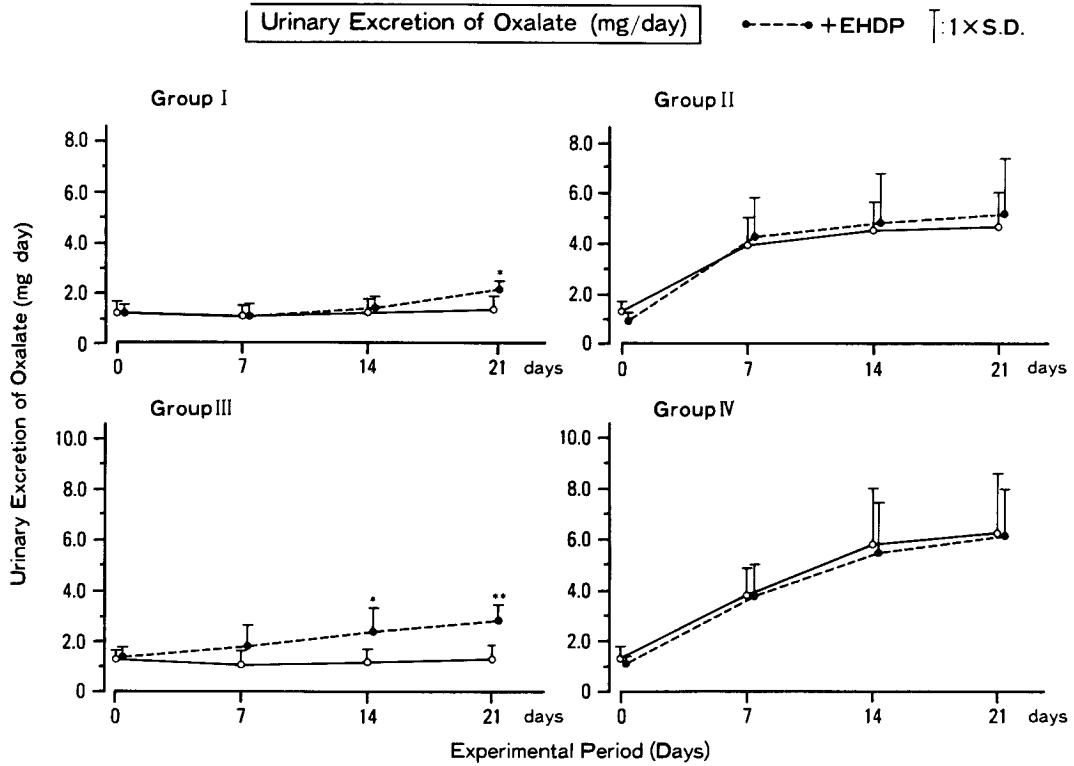


Fig. 4. Changes in urinary excretion of oxalate in groups I-IV. ○—○: Experimental groups without EHDP (GI-GIVa), ●—●: Experimental groups with EHDP (GI-GIVb)

つぎに、EHDP 投与により尿酸カルシウム結石の発生をへらし、尿中カルシウム排泄減少をきたす機序について考える。経口的に投与された EHDP の腸管からの吸収は、投与量の 1~3% 位とされ、吸収された EHDP の半分は尿中に排泄されるといわれている²⁴⁾。たとえば、平均最大 3% 吸収されるとして、0.5% EHDP だと、尿量 25 ml で 300 μ M の尿中頻度になることなる。Fraser ら²⁷⁾ (1972) は、in vitro で 4 μ M の EHDP が尿酸カルシウム結晶の析出を阻害すると述べ、尿中でカルシウムと EHDP (P-C-P ボンド) が結合する可能性を考えている。したがって、本実験系の尿中カルシウム—尿酸過飽和状態においても、nidus, aggregation, crystal growth という尿酸カルシウム結石形成の前段階で EHDP が働く可能性が十分に考えられる。また、EHDP が尿中カルシウムと結合した結果、尿中カルシウム排泄減少が認められても不思議はない。さらに、この尿中カルシウム排泄への影響は、腸管における Ca 吸収態度の変化からも考えられる。すなわち、腸管へはこぼれた EHDP がカルシウムと結合し、このカルシウムと拮抗的に尿酸吸収が進むことが考えられる。その

結果、体内に移行するカルシウム量が減少し、尿酸量が増加し、それぞれ尿中カルシウム排泄の減少、尿中尿酸排泄の増加として表われる。さらに、このことは、G III におけるビタミン D 誘発性の高カルシウム尿においても EHDP 添加により尿中カルシウム排泄が減少し、尿酸排泄が増加していることからもうなづける。

さらに、このような尿中 Ca 排泄量の減少を EHDP と Ca、あるいは尿酸との間の直接的な競合結合の結果、生じたものとの考え方のほかに、EHDP の内分泌学的な働きとして、ビタミン D の腎における 25 (OH) 化を阻害し、1, 25 (OH)₂D₃ の産生を抑制すること^{25,26)}、腸管においても 1, 25 (OH)₂D₃ の働きを阻害して Ca 吸収能力を低下させること^{27,28)}、が報告されてきた。したがって、G III b, G IV b でみられた尿中カルシウム排泄の抑制は、EHDP のビタミン D への作用阻害による間接的なカルシウム代謝へおよぼす影響も考えられる。

尿中 P 排泄については、G I b~IV b の各群で排泄増加がみられた。このことは、Recker & Saville²⁴⁾ (1973), Walton ら²⁹⁾ (1975) の実験や、Baumann

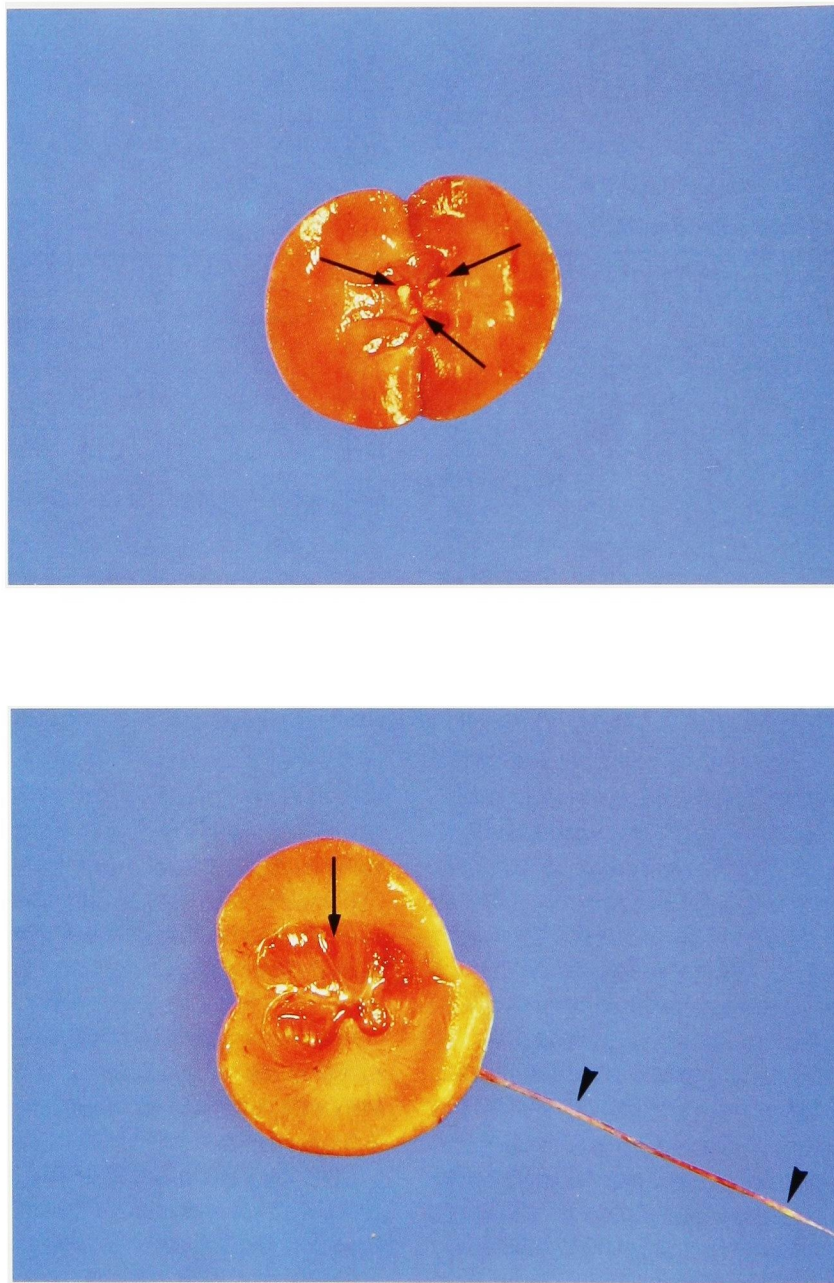


Fig. 5. Cut surface of kidneys in group IVa (upper) and group IVb (lower). Arrows in the upper figure indicate calcium oxalate stones in the renal pelvis in GIVa. Arrow heads in the lower figure indicate ureteral stones and arrow indicates a dilated renal pelvis in GIVb.

Table 2. Calcium, magnesium and phosphorus contents in the kidney and femoral bone or kidney weight and body weight at the end of experiment (Mean±SD)

Exp. Group	Kidney			Femoral Bone			Kidney Weight (g)	Body Weight (g)
	Calcium (μg/g·tissue)	Magnesium (μg/g·tissue)	Phosphorus (μg/g·tissue)	Calcium (mg/g·tissue)	Magnesium (μg/g·tissue)	Phosphorus (mg/g·tissue)		
G I a	37.50 ± 3.64	249.10 ± 6.64	3183.10 ± 33.42	165.62 ± 24.56	2679.24 ± 282.02	60.99 ± 6.67	1.38 ± 0.24	328.5 ± 27.1
b	29.93 ± 3.85	235.97 ± 15.06	3120.07 ± 178.24	151.16 ± 14.18	2628.31 ± 277.19	61.56 ± 7.25	1.15 ± 0.12	332.3 ± 26.4
G II a	40.74 ± 3.18	246.38 ± 10.12	3168.38 ± 190.85	138.98 ± 10.65	2474.82 ± 156.16	58.87 ± 6.07	1.36 ± 0.23	327.8 ± 25.8
b	42.45 ± 15.36	214.78 ± 14.73	2876.93 ± 196.48	150.26 ± 8.27	2672.08 ± 180.69	62.95 ± 4.04	1.25 ± 0.13	329.9 ± 26.3
G III a	50.02 ± 8.99	243.08 ± 9.18	2893.25 ± 182.41	139.05 ± 22.01	2335.28 ± 335.15	54.69 ± 8.74	1.35 ± 0.28	301.4 ± 27.6
b	51.97 ± 10.18	224.78 ± 10.06	2900.65 ± 23.87	135.65 ± 31.87	2313.93 ± 590.49	57.07 ± 13.60	1.10 ± 0.13	299.70 ± 27.8
G IV a	8786.72 ± 3697.63	247.04 ± 32.89	3225.56 ± 418.37	127.80 ± 19.73	2471.08 ± 400.33	52.74 ± 5.85	1.95 ± 0.40	215.4 ± 19.5
b	2106.11 ± 931.53	214.48 ± 14.81	2725.44 ± 197.30	131.74 ± 16.70	2209.41 ± 201.45	53.89 ± 5.39	1.68 ± 0.36	209.2 ± 16.3

Statistically significant between a and b in each group : * p<0.05

ら¹⁹⁾ (1978) の臨床例で観察されているが、その原因については EHDP がなんらかの機序で、リン酸の腎での処理能に変化が生じた結果であると述べている。Bonjour ら²⁸⁾ (1978) は、大量の EHDP 投与により、リン酸の尿細管再吸収が阻害されリン酸利尿が発現したことを報告し、この EHDP の働きは、1, 25 (OH)₂D₃ を同時投与しても防ぐことはできなかったと述べている。

このように、EHDP 投与に際してみられる尿中カルシウムの排泄減少と尿中リン酸の排泄増加を考える時、それらにおける 1, 25 (OH)₂D₃ の関与に関して、外因性に 1, 25 (OH)₂D₃ を添加すると、前者では EHDP の効果は消失されるが³⁰⁾ 後者ではその効果は失われないとされている²⁸⁾。すなわち、リン酸利尿に対しては EHDP と 1, 25 (OH)₂D₃ とは、互いに関係し合うことなく働いていると考えられる。従来より vit D 代謝物、1, 25 (OH)₂D₃ の投与によりリン酸利尿がみられることは報告されてきており³¹⁻³³⁾、本実験においても G III a, IV a で、リン酸利尿がみられ、EHDP の加わった G III b, IV b において、相加的にリン酸利尿の程度の増強 (G III b > G IV b) がみられたことは、この EHDP と 1, 25 (OH)₂D₃ が別個に働いた結果を示すようで興味深い。

尿中 Mg 排泄については、EHDP 添加により各群で排泄増加がみられたが、G IV b でのみ EHDP 非添加時の変化をしたまわった。1α (OH)D₃ 投与により高 Ca 血症、高 Ca 尿症のみられる時、尿中 Mg 排泄増加のみられることはすでに発表し³⁴⁾、その原因として、尿細管における吸収部位、主として、ヘンレ脚における Ca-Mg 間の競合吸収 (尿細管腔の Ca 濃度が増加し、Ca 吸収が最大におこなわれるため、Mg の吸収抑制がおこること) が考えられることを述べた。G III b の尿中 Mg 排泄の増加は、EHDP による尿中 Ca 排泄増加抑制効果にもかかわらず、まだ、Ca-Mg 競合吸収をおこしうるだけの尿中 Ca 濃度が保たれている結果と考えられる。しかし、G IV b では尿中 Ca 排泄増加が、EHDP により著明に抑制されているので、尿中 Mg 排泄は EHDP 非添加時に比べて、さらに増加してもよいと考えられるが、反対にその排泄増加は抑えられていた。この点、Ca-Mg 競合吸収現象では、説明がつかない。むしろ、尿中 Ca の影響が減少したために、G I b, G II b でみられたように、本来の EHDP の働きによる尿中 Mg 排泄増加パターンを示したと考えられる。すなわち、EHDP の利尿 (リン酸利尿) 効果により尿細管腔の流量の増加がおこり、ヘンレ脚での Mg の frac-

tional reabsorption を減少せしめる結果とも考えられる³⁵⁾。また、G IV においては、高 Ca 血症による PTH 分泌抑制がおこり、Mg 吸収の低下がおこったとも考えられるし³⁶⁾、さらに、G IV b は G IV a に比べて腎障害程度が軽いため、尿細管障害による Mg 吸収障害も軽減されたとも推測される。

さて、EHDP の連日投与にあって一番懸念されるのは骨における mineralization の抑制からくる骨軟化症の発生である。本実験において、0.5% EHDP 濃度を3週間飲水せしめる条件下では、H. E. 染色上、骨組織に変化は認められず、骨 Ca 含有量にも変化がなかった。しかし、臨床的には結石の再発予防を目的として長期間の投与が必要となり、投与量の決定とともに、その副作用については、まだ十分検討の余地が残っていると思われる。

以上、この実験結果より、臨床応用への道として、EHDP は今までいわれてきたような apatite や brushite のごときリン酸カルシウム結石のみならず、尿酸カルシウム結石に対しても、結石の発生や増大を抑える効果のあることが示されたといえる。ことに、ビタミンD誘発の高カルシウム尿症をモデルとした実験のゆえに、腸管における活性型ビタミンDの働きを介しておこる高カルシウム尿症を病態としてもつ腎結石症例³⁷⁻⁴¹⁾ に対して効果のあることが予想される。

ま と め

1α (OH) D₃ とエチレングリコールの同時投与により、ラットに惹起された尿酸カルシウム腎結石に対する0.5% EHDP の影響を検討したところ、つぎのような結論を得た。

1. 腎結石の発生頻度を減少させ、結石は小粒になり、腎組織中のカルシウム含有量も減少した。
2. ビタミンD由来、エチレングリコール由来の腎障害を軽減させた。
3. 血清カルシウム - レベルは上昇したが、尿中カルシウム排泄増加を著明に抑制した。
4. リン酸利尿が認められた。
5. 尿中マグネシウム排泄増加がみられたが、EHDP 非添加時に比べてその程度は軽かった。
6. EHDP 単独投与では、尿中尿酸排泄を増加させる傾向がみられたが、結石群では、EHDP 添加によりさらに尿酸排泄が増強されることはなかった。
7. 腎や骨について、組織レベルでは、とくに EHDP の効果は認められなかった。

これらのことから、EHDP はラット腎における尿酸カルシウム結石の発生を抑制するといえる。その機

序としては、直接的には尿中で尿酸カルシウムの過飽和状態において、結石形成の前段階、すなわち、核形成 (nidus)、凝集化 (aggregation)、結晶増殖 (crystal growth) の過程に、EHDP は働くことが推測された。また、間接的には、EHDP の腎における活性ビタミンD (1, 25 (OH)₂D₃) 産生の抑制、あるいは腸管における 1, 25 (OH)₂D₃ を介するカルシウム吸収能の抑制により、カルシウム代謝に影響をおよぼすことが考えられた。

EHDP の臨床応用への道として、リン酸カルシウム結石のみならず、尿酸カルシウム結石症例、とりわけ、活性型ビタミンDの働きを介しておこる高カルシウム尿症、ならびに、その結石発症例に対して、発生子防のために投与可能なことが示唆された。

本研究は、文部省科学研究費 (1983年, 1984年, 課題番号 58570657) の補助によっておこなわれた。

また、本実験において、各種測定にご協力願った樋口房子氏、井上登久子氏に感謝する。

また、EHDP の提供を受けた住友製薬株式会社、アルファロールの提供を受けた中外製薬株式会社に深謝する。

文 献

- 1) Okada Y, Kawamura J and Yoshida O: Experimental model for calcium oxalate urolithiasis. In: Urinary Stone. (Eds) Ryall R, Brockis JG, Marshall V and Finlayson B., p378~383, Churchill Livingstone, Melbourne Edinburgh London and New York, 1984
- 2) 岡田裕作・川村寿一・野々村光生・郭 俊逸・吉田 修: カルシウム含有結石の成因に関する実験的、臨床的検討。1. エチレングリコール、ビタミンDによるラット結石モデルの作成。泌尿紀要 31: 565~577, 1985
- 3) Fleisch H, Russell RGG and Francis MD: Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. Science 165: 1261~1264, 1969
- 4) Russell RGG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA and Fleisch H The influence of pyrophosphate, condensed phosphate, phosphates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomized rat. Calcif Tissue Res 6: 183~196, 1970
- 5) Casey PA, Casey G, Fleisch H and Russell RGG: The effect of polyphosphoric acid, polyestradiol phosphate, a diphosphonate and a polyphosphate on calcification induced by dihydrotachysterol in skin, aorta and kidney of rats. Experimentia 28: 137~138, 1972
- 6) Francis MD, Russell RGG and Fleisch H: Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. Science 165: 1264~1266, 1969
- 7) Fraser D, Russell RGG, Pohler O, Robertson WG and Fleisch H: The influence of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on the development of experimentally induced urinary stones in rats. Clin Sci 42: 197~207, 1972
- 8) Kawamura J, Yoshida O, Nishino K and Itokawa Y: Disturbances in kidney functions and calcium and phosphate metabolism in cadmium-poisoned rats. Nephron 20: 101~110, 1978
- 9) Conerty HV and Briggs AR: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. Am J Clin Pathol 45: 290~296, 1966
- 10) Chen PS, Toribata TY and Warner H: Microdetermination of phosphorus. Analyt Chem 28: 1756~1758, 1956
- 11) Rice EW and Lapara CZ: Rapid ultraviolet spectrophotometric determination of magnesium. Clin Chem Acta 10: 360~364, 1964
- 12) Führ J, Kaczmarczk J and Krüttgen CD: A simple colorimetric method for inulin determination for kidney clearance examinations in the metabolically healthy and in diabetes. Klin Wschr 33: 729~730, 1955
- 13) Coulombe JJ and Favreau L: A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea. Clin Chem 9: 102~108, 1963
- 14) 野々村光生・岡田裕作・川村寿一・吉田 修: 尿酸

- 酸化酵素を用いた新しい尿中尿酸定量法 (市山法). 泌尿紀要 31 : 397~405, 1985
- 15) Potokar M and Schmidt-Dunker M : The inhibitory effect of new diphosphonic acids on aortic and kidney calcification in vivo. *Atherosclerosis* 30 : 313~320, 1978
 - 16) Ohata M and Pak CYC : The effects of diphosphonate on calcium phosphate crystallization in urine in vitro. *Kidney Int* 4 : 401~406, 1973
 - 17) Ohata M and Pak CYC : Preliminary study of the treatment of nephrolithiasis (calcium stone) with diphosphonate. *Metabolism* 23 : 1167~1173, 1974
 - 18) Robertson WG, Peacock M, Marshall RW and Knowles F : The effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on calcium oxalate crystalluria in recurrent renal stone formers. *Clin Sci Mol Med* 47 : 13~22, 1974
 - 19) Baumann JM, Bisaz S, Fleisch H and Wacker M : Biochemical and clinical effects of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate in calcium nephrolithiasis. *Clin Sci Mol Med* 54 : 509~516, 1978
 - 20) Jowsey J, Riggs BL, Kelly PJ, Hoffman DL and Bordier P : The treatment of osteoporosis with disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate. *J Lab Clin Med* 78 : 574~584, 1971
 - 21) King WR, Francis MD and Michael WR : Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on bone formation. *Clin Orthopaed & Related Res* 78 : 251~270, 1971
 - 22) Schenk R, Merz WA, Mühlbauer R, Russell RGG and Fleisch H : Effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 11 : 196~214, 1973
 - 23) Bone HG III, Zerwekh JE, Britton F and Pac CY : Treatment of calcium urolithiasis with diphosphonate efficacy and hazards. *J Urol* 121 : 568~571, 1979
 - 24) Recker RR and Saville PD : Intestinal absorption of disodium ethane-1, 1-diphosphonate (disodium etidronate) using a deconvolution technique. *Toxicol Appl Pharmacol* 24 : 580~589, 1973
 - 25) Hill LF, Lumb GA, Mamer EB and Staunbury SW : Indirect inhibition of the biosynthesis of 1, 25-dihydroxycholecalciferol in rats treated with a diphosphonate. *Clin Sci* 44 : 335~347, 1973
 - 26) Baxter LA, DeLuca HF, Bonjour JP and Fleisch HA : Inhibition of vitamin D metabolism by ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate. *Arch Biochem Biophys* 164 : 655~662, 1974
 - 27) Gasser AB, Morgan DB, Fleisch HA and Richelle LJ : The influence of two diphosphonates on calcium metabolism in the rat. *Clin Sci* 43 : 31~45, 1972
 - 28) Bonjour JP, Troehler U, Preston C and Fleisch H : Parathyroid hormone and renal handling of P_i : effect of dietary P_i and diphosphonates. *Am J Physiol* 234 : F497~F505, 1978
 - 29) Walton RJ, Russell RGG and Smith R : Changes in the renal and extrarenal handling of phosphate induced by disodium etidronate (EHDP) in man. *Clin Sci Mol Med* 49 : 45~46, 1975
 - 30) Bonjour JP, Trechsel U, Fleisch H, Schenk R, DeLuca HF and Baxter LA : Action of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ and a diphosphonate on calcium metabolism in rats. *Am J Physiol* 229 : 402~408, 1975
 - 31) Crawford JD, Gribetz D and Talbot NB : Mechanism of renal tubular phosphate reabsorption and the influence thereon of vitamin D in completely parathyroidectomized rats. *Am J Physiol* 180 : 156~162, 1955
 - 32) Bonjour JP, Preston C and Fleisch H : Effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ on the renal handling of P_i in parathyroidectomized rats. *J Clin Invest* 60 : 1419~1428, 1977
 - 33) Garabedian M, Pezant E, Miravet L, Fellot C and Balsan S : 1,25 dihydroxycholecalciferol effect on serum phosphorus homeostasis in rats. *Endocrinol* 98 : 794~799, 1976

- 34) 川村寿一・岡田裕作・吉田 修：ビタミンD・エチレングリコール投与ラット結石モデルにおける尿中マグネシウム排泄について。マグネシウム 3: 27~34, 1984
- 35) Quamme GA and Dirks JH : Effect of intraluminal and contraluminal magnesium on magnesium and calcium transfer in the rat nephron. *Am J Physiol* 238: F187~F198, 1980
- 36) Harris LA, Burnatowska MA, Seely JF, Sutton RAC, Quamme GA and Dirks JH : Effect of parathyroid hormone on electrolyte transport in the hamster nephron. *Am J Physiol* 236: F342~F348, 1979
- 37) Kaplan RA, Haussler MR, Deftos LJ, Bone H and Pak CYC : The role of 1α 25-dihydroxy-vitamin D in the mediation of intestinal hyperabsorption of calcium in primary hyperparathyroidism and absorptive hypercalciuria. *J Clin Invest* 59: 756~760, 1977
- 38) Gray RW, Wilz DR, Caldas AE and Lemann J Jr: The importance of phosphate in regulating plasma $1,25$ (OH) $_2$ vitamin D levels in humans: studies in healthy subjects, calcium-stone formers and in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 45: 299~306, 1977
- 39) Shen FH, Baylink DJ, Nielsen RL, Sherrard DJ, Ivey JL and Haussler MR : Increased serum $1,25$ -dihydroxy-vitamin D in idiopathic hypercalciuria. *J Lab Clin Med* 90: 955~962, 1977
- 40) Caldas AE, Gray RW and Lemann J Jr : The simultaneous measurement of vitamin D metabolite in plasma : studies in healthy adults and in patients with calcium nephrolithiasis. *J Lab Clin Med* 91: 840~849, 1978
- 41) 川村寿一・岡田裕作・吉田 修・土光茂治・福永仁夫・山本逸雄・滋野長平・森田陸司・鳥塚莞爾：原発性副甲状腺機能亢進症ならびに特発性高カルシウム尿症にみられる高カルシウム尿症の成因、ことにカルシウム調節ホルモンの働きについて。泌尿紀要 27: 121~134, 1981

(1984年12月19日迅速掲載受付)