

## ラットにおける蓚酸の生体内動態

大阪市立城北市民病院泌尿器科 (部長: 松村俊宏)

杉本俊門, 加藤禎一, 松村俊宏

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 前川正信教授)

岸本武利, 山本啓介, 金沢利直, 千住将明, 前川正信

## PHARMACOKINETIC STUDY ON OXALATE IN RATS

Toshikado SUGIMOTO, Yoshikazu KATO and Toshihiro MATSUMURA

*From the Department of Urology, Shiokita Municipal Hospital**(Chief: Dr. T. Matsumura)*

Taketoshi KISHIMOTO, Keisuke YAMAMOTO, Toshinao KANAZAWA,

Masaaki SENJU and Masanobu MAEKAWA

*From the Department of Urology, Osaka City University Medical School**(Director: Prof. M. Maekawa)*

The pharmacokinetics of oxalate were studied in normal and nephrectomized rats, using radioisotope-labelled oxalate to resolve the mechanism of calcium oxalate stone formation. Plasma disappearance of  $^{14}\text{C}$ -oxalate was analyzed with a 2-compartment open model, and each compartment volume, the first-order rate constant for elimination, and the first-order rate constant for transfer between the central compartment and peripheral compartment were obtained. These values were compared with those for inulin. In normal rats, the total distribution volume was 57% of body weight for oxalate and 34% for inulin. The elimination rate constant from the central compartment for oxalate was lower than that for inulin, but oxalate had a much larger central compartment volume than inulin. Thus, the total clearance of oxalate was greater than that of inulin. In nephrectomized rats, total clearance of oxalate decreased to 1/6 of that in normal rats, while total clearance of inulin decreased to 1/27 of that in normal rats.

These results suggest that oxalate is more diffusible than inulin, and that oxalate is excreted mainly from the kidney.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1135-1140, 1988)

**Key words:** Oxalate, Renal clearance, Hepatic clearance, Pharmacokinetic study

## 結 言

蓚酸カルシウム結石症の原因を明らかにするには、カルシウムと蓚酸の吸収、生体内分布、代謝、排泄を含めた生体内動態を究明することが重要である。カルシウムに関しては多くの基礎的研究が行われ、その生体内動態は十分に解明されているが、蓚酸に関してはいまだ不明の点が多く、わずかに消化管からの吸収率<sup>1-5)</sup>や腎クリアランス値<sup>6-8)</sup>がアイソトープを用いた動物実験により明らかにされている程度である。そこで本研究では、蓚酸の生体内動態を解明する目的で、細胞内に拡散せず細胞外液にのみ分布する  $^3\text{H}$ -標識イヌリンを対照とした  $^{14}\text{C}$ -標識蓚酸の pharmacokinetic study をラットにおいて施行した。また、腎

機能が廃絶した場合に、他の臓器が腎の蓚酸排泄能を代償することができるかどうか、さらに、蓚酸の生体内分布に変化がみられるかどうかを知るために、腎摘ラットにおける蓚酸の生体内動態の解析を行い、正常ラットの場合と比較検討したのでその検果をもあわせて報告する。

## 実 験 方 法

## 1. 実験材料

実験動物は、雄性 Sprague-Dawley 系ラット (体重 200~250 g) を用いた。蓚酸とイヌリンの腎および肝クリアランス測定、pharmacokinetic study に用いた radioisotope (Amersham-Buchler GmbH & Co. KG., Braunschweig, West Germany) の

specific activity は,  $^{14}\text{C}$ -標識蓚酸が 108 mCi/mol,  $^3\text{H}$ -標識イヌリンが 1.6 Ci/mol であり, これらは生理的食塩水に溶解して使用した.  $^{14}\text{C}$  と  $^3\text{H}$  の血液, 尿, 胆汁中放射活性は, 液体シンチレーションカウンター (1217 Rackbeta, LKB Instrument GmbH, Turko, Finland) にて計測した.

### 2. 正常ラットでの腎, 肝クリアランス測定

クリアランス測定は, 正常群ラット7匹において施行した. ラットに tiobutobarbital 腹腔内注射 (100 mg/kg) をして麻酔した後, 頸部, 中切開を加えて気管内カニューレを挿入し, また, 頸静脈にカテーテルを留置して生理食塩水を 3.75 ml/h の割合で持続注入した. 血液採取のためには, 頸動脈にカテーテルを留置し, その内腔はヘパリン生理的食塩水で満たした. さらに, 尿を採取するために膀胱内にカテーテルを留置し, 続いて右上腹部に横切開を加え, 胆汁採取のためのカテーテルを胆管内に留置した. これらの手術手技が完了し, 生理的食塩水の持続注入約1時間後尿量が一定となったところで, priming dose として  $^{14}\text{C}$ -標識蓚酸と  $^3\text{H}$ -標識イヌリンそれぞれ  $5\ \mu\text{Ci}$  を静注し, 続いて  $4.7\ \mu\text{Ci/h}$  の割合で両アイソトープを持続静注した. 持続静注1時間後尿および胆汁を10分間6回採取し, 各時間帯の中間点で頸動脈カテーテルより動脈血を採取した. 各ラットにおいて, 6回の平均値を腎および肝クリアランス値とし, 体重 100 g あたりに換算して  $\mu\text{l}/\text{min}/100\ \text{g}$  body weight の単位で表現した.

### 3. Pharmacokinetic study

Pharmacokinetic study<sup>9,10</sup> は, 正常群ラット10匹, 腎摘群ラット7匹において施行した. 正常群では, クリアランス測定と同様の準備を行った後, 尿流量が一定となったところで  $^{14}\text{C}$ -標識蓚酸と  $^3\text{H}$ -標識イヌリンを  $40\ \mu\text{Ci}$  ずつ同時に静注し, 4時間後まで経時的に頸動脈カテーテルより動脈血を採取した. 同時に尿と胆汁を4時間採取し, 尿中および胆汁中の両アイソトープの回収率を測定した. 腎摘群では, 両側腎摘術を施行した後, ただちにカテーテル挿入などの準備をし, 胆汁流量が一定となったところで  $^{14}\text{C}$ -標識蓚酸  $5\ \mu\text{Ci}$  と  $^3\text{H}$ -標識イヌリン  $20\ \mu\text{Ci}$  を静注し, 動脈血の採取を経時的に静注後4時間まで行った. 両群において, 蓚酸とイヌリンの血中濃度変化から 2-compartment open model (Fig. 1) に基づいた fitting curve を蓚酸, イヌリンそれぞれについてコンピューターを使用して求め, この fitting curve の各係数から, 各コンパートメントでの両物質の初期濃度, コンパートメント間の移動速度定数, 中枢コン

パートメントからの消失速度定数などの pharmacokinetic parameter を計算した. さらに, これらの parameter から各コンパートメントの分布容積, 定常状態分布容積 (各コンパートメント分布容積の総和), 血中半減期, 全身クリアランスを算出した. なお, 蓚酸, イヌリンとも中枢コンパートメントからのみ排泄されると仮定したので (Fig. 1), 全身クリアランスは中枢コンパートメントの分布容積と消失速度定数の積で求めた.

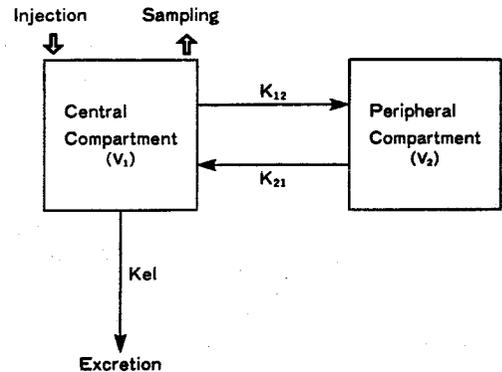


Fig. 1. Schematic diagram of the two-compartment open model.  $V_1$  and  $V_2$  are apparent volume of central and peripheral compartment.  $K_{12}$  and  $K_{21}$  indicate first-order rate constants for transfer between central and peripheral compartment.  $K_{e1}$  is the first-order rate constant for elimination from the central compartment.

## 実験結果

### 1. 正常ラットの腎および肝クリアランス

Table 1 は, 正常ラットの蓚酸とイヌリンの腎クリアランス測定の結果である. 蓚酸の腎クリアランスは  $886 \pm 86\ \mu\text{l}/\text{min}/100\ \text{g}$  body weight (Mean  $\pm$  SD), イヌリンの腎クリアランスは  $790 \pm 71\ \mu\text{l}/\text{min}/100\ \text{g}$  body weight で, 蓚酸の腎クリアランスはイヌリンのそのの 1.12 倍であった. Table 2 は, 両物質の肝

Table 1. Renal clearance for oxalate and inulin

No.	Inulin Clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ )	Oxalate Clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ )	Oxalate/Inulin Clearance ratio
1	777	819	1.05
2	770	910	1.18
3	656	728	1.11
4	840	966	1.15
5	875	952	1.09
6	777	882	1.14
7	833	945	1.13
Mean $\pm$ SD	790 $\pm$ 71	886 $\pm$ 86	1.12 $\pm$ 0.043

Table 2. Hepatic clearance for oxalate and inulin

No.	Inulin Clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ )	Oxalate Clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ )	Ratio of hepatic and renal oxalate clearance (%)
1	1.41	19.1	2.33
2	1.16	26.1	2.87
3	1.85	18.5	2.54
4	1.24	16.1	1.67
5	1.12	32.8	3.45
6	1.95	24.5	2.78
7	1.38	28.5	3.02
Mean $\pm$ SD	1.44 $\pm$ 0.33	23.7 $\pm$ 6.03	2.67 $\pm$ 0.57

クリアランス値である。蓚酸, イヌリンとも肝クリアランス値は腎クリアランスに比較すると非常に低い値であったが, 蓚酸の肝クリアランスはイヌリンのその16倍と有意に高い値であった。

2. Pharmacokinetic study

Fig. 2 は, pharmacokinetic study における正常ラットの蓚酸とイヌリンの経時的血中濃度変化と 2-compartment open model における fitting curve である。各ラットにおいて, 血中濃度の実測値と推定値の差は蓚酸, イヌリンとも 7% 以下であり, 相関係数は 0.95 以上で非常に良好であった。Table 3 は, この fitting curve の各係数から算出した各 pharmaco-

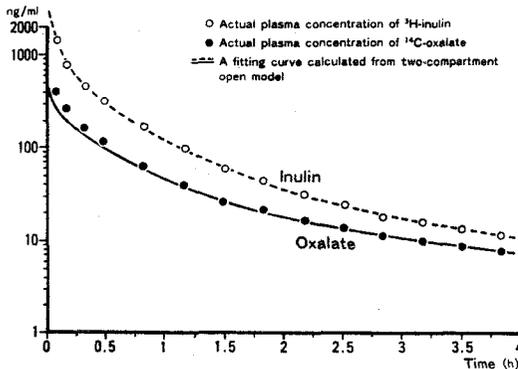


Fig. 2. Semilogarithmic plots of actual plasma concentrations of oxalate and inulin against time and the fitting curves obtained on the basis of two-compartment open model in normal rat.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of oxalate and inulin in normal rats (two-compartment open model)

	$K_{12}$ (/h)	$K_{21}$ (/h)	$K_{el}$ (/h)	$T_{50\%}$ (h)	$V_1$ (% of body weight)	$V_2$ (% of body weight)	$V_{ss}$ (% of body weight)	Total Clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ )
Oxalate	1.23 $\pm$ 0.57	1.13 $\pm$ 0.31	2.16 $\pm$ 0.44	<b>0.33</b> <b>0.06</b>	28.0 4.45	28.7 5.03	56.7 6.80	990 150
Inulin	1.12 $\pm$ 0.53	1.24 $\pm$ 0.38	2.77 $\pm$ 0.60	<b>0.26</b> <b>0.05</b>	18.3 3.39	15.7 3.01	34.0 4.79	823 127

kinetic parameter の値と, 血中半減期 ( $T_{50\%}$ ), 中枢コンパートメントおよび末梢コンパートメントの分布容積 ( $V_1, V_2$ ), 全身クリアランス (total clearance) の値である。蓚酸の定常状態分布容積 (中枢および末梢コンパートメントの分布容積の和,  $V_{ss}$ ) は体重の 56.7% を占め, イヌリンのその約 1.7 倍と推測された。中枢コンパートメントよりの消失速度定数 ( $K_{el}$ ) は, 蓚酸 2.16, イヌリン 2.77 とイヌリンの方が大きい数値を得た。すなわち, イヌリンの方が蓚酸より速く中枢コンパートメントより排泄されると考えられ, 血中半減期はイヌリンが 16 分, 蓚酸 20 分と推定された。中枢コンパートメントの分布容積と中枢コンパートメントからの消失速度定数の積から求められる全身クリアランスは, 蓚酸が  $990 \pm 150 \mu\text{l}/\text{min}/100 \text{g body weight}$  (Mean $\pm$ SD), イヌリン  $823 \pm 127 \mu\text{l}/\text{min}/100 \text{g body weight}$  と蓚酸の全身クリアランスはイヌリンの 1.2 倍であった。これは, 蓚酸の消失速度定数はイヌリンのそれより低値であるが, 中枢コンパートメントの分布容積を比較すると, 蓚酸の方がイヌリンよりかなり大きいためである。なお, 4 時間での尿中回収率は, 蓚酸 83~90%, イヌリン 93~98% であった。

腎摘ラットの蓚酸とイヌリンの経時的血中濃度実測値および 2-compartment open model を用いて解析した際の fitting curve を Fig. 3 に示した。各ラ

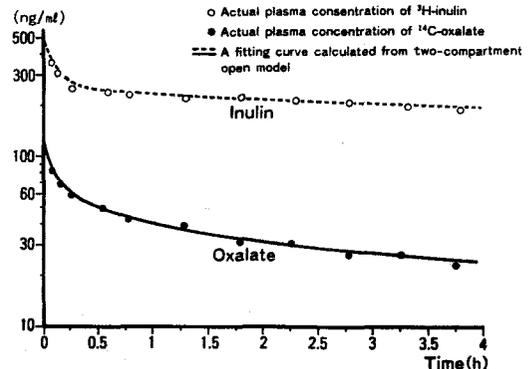


Fig. 3. Semilogarithmic plots of actual plasma concentrations of oxalate and inulin against time and the fitting curves obtained on the basis of two-compartment open model in nephrectomized rat.

ットにおいて, 血中濃度の実測値と推定値の差は 5% 以下であり, 相関係数は 0.96 以上で正常群と同様に良好であった。Table 4 は, それぞれのラットにおける fitting curve から得られた各 parameter の値である。蓚酸の定常状態分布容積は, イヌリンのそれよりやはり大きく, 2.2 倍であった。また, 中枢コンパートメントからの消失速度定数は, 両物質とも正常群

Table 4. Pharmacokinetic parameters of oxalate and inulin in nephrectomized rats (two-compartment open model)

	$K_{12}$ (/h)	$K_{21}$ (/h)	$K_{el}$ (/h)	$T_{50\alpha}$ (h)	$V_1$ (% of body weight)	$V_2$ (% of body weight)	$V_{ss}$ (% of body weight)	Total Clearance ( $\mu$ l/min/100g)
Oxalate	1.31 $\pm$ 0.35	1.66 $\pm$ 0.55	0.39 $\pm$ 0.06	1.85 $\pm$ 0.34	25.5 $\pm$ 2.81	21.2 $\pm$ 6.46	46.7 $\pm$ 8.48	177 $\pm$ 29
Inulin	4.11 $\pm$ 1.05	4.23 $\pm$ 0.88	0.17 $\pm$ 0.03	4.26 $\pm$ 0.78	10.7 $\pm$ 1.05	10.3 $\pm$ 1.00	21.0 $\pm$ 1.48	30 $\pm$ 5

に比し、かなり低い値を示した。しかし、正常群の場合と異なり、消失速度定数は尿酸の方が高値であり、血中半減期は尿酸1時間51分、イヌリン4時間16分と推測された。全身クリアランスは正常群と比較すると、尿酸は1/6、イヌリンは1/27に低下しているが、尿酸の全身クリアランスはイヌリンの6倍と推測された。腎摘群における尿酸とイヌリンの胆汁中への回収率は、4時間でそれぞれ11~14%、0.7~1.3%であった。

## 考 察

尿酸カルシウム結石症は(1)尿中尿酸濃度および飽和度<sup>11-13)</sup>、(2)尿酸カルシウム結晶の析出および成長の阻止因子<sup>14-18)</sup>、(3)fixed particleの発現<sup>19)</sup>などの要因が相互に作用しあって発症するものと考えられるが、より病因論的に尿酸カルシウム結石症の発症機序を解明するには、細胞内液や間質液を含めた体液中での尿酸の生体内動態を明らかにする必要があると考えられる。しかし、尿酸の血中濃度は尿中濃度に比べると非常に低いため、現在までの測定方法では微量の検体で血中の尿酸を測定することは困難であり、同様に組織中の尿酸濃度の定量も腎以外は不可能である。したがって尿酸の生体内運命に関しては、いまだ十分に明らかにされておらず、わずかに radioisotope を用いた動物実験によって消化管からの吸収率や腎での排泄動態が解明されているのみである。すなわち、経口投与された<sup>14</sup>C-標識尿酸のうち消化管から吸収されるのは数%で<sup>4-6)</sup>、尿中に排泄される尿酸はほとんどグリシンやアスコルビン酸が代謝されることにより産生された内因性のものであり、また、尿酸の腎クリアランスは、イヌリンクリアランスの1.2~1.3倍と報告<sup>6-8)</sup>されているにすぎない。

今回の実験において、腎クリアランスの測定結果は過去の報告同様で、尿酸クリアランスはイヌリンクリアランスより大きかった。このことは、尿酸は糸球体ろ過以外に尿細管からも分泌されていることを示唆す

るものである。腎クリアランスと同時に過去に報告をみない肝クリアランスも測定したところ、尿酸の肝クリアランスはイヌリンの肝クリアランスより有意に高かったが、腎クリアランスと比較すると非常に低値であった。この結果に加え、正常ラットでの pharmacokinetic study において静注した<sup>14</sup>C-標識尿酸の尿中回収率が83~90%であったこと、また、尿酸の全身クリアランスの計算値(990 $\pm$ 150  $\mu$ l/min/100 g body weight)が腎クリアランス値(790 $\pm$ 71  $\mu$ l/min/100 g body weight)よりわずかに高いだけであることから、尿酸は主として腎から排泄されることが示唆された。

正常ラットにおける pharmacokinetic study の結果、排泄動態のみならず体内分布においても、尿酸とイヌリンの間に相違点があることが示唆された。すなわち、2-compartment open model において、イヌリンの定常状態分布容積(各コンパートメントの分布容積の和)は、体重の34%であるのに対し、尿酸の場合は56.7%とイヌリンのその1.7倍であった。この結果は、静注された尿酸はイヌリンに比し、より自由に生体内に拡散していくことを示唆するものである。さらに、このことから、尿酸は、血液中にはタンパクと結合しない状態で存在することが推測される。また、尿酸の定常状態分布容積が体重の約60%であるということは、尿酸はラットのほとんどの体液中に分布していることを示唆するものである。イヌリンは、一般に細胞外液にのみ分布するとみなされている。したがって、その生体内分布容積は体重の20%前後と考えられる。今回の実験では、イヌリンの定常状態分布容積の推測値は、Hallら<sup>20)</sup>がイヌにおいてイヌリンと似た生体内動態を示す iothalamate を用いて行った実験結果と一致していたが、体重の34%と細胞外液量よりかなり大きい結果となった。それゆえ、尿酸の定常状態分布容積も実際には計算値より小さい可能性がある。しかし、いずれにせよ尿酸はイヌリンに比し、より広く体液中に分布すると考えられ、胆汁中にも排泄されることから、尿酸は細胞内にも拡散していくものと考えられる。なお、<sup>14</sup>C-標識尿酸の静注量を20  $\mu$ Ci, 60  $\mu$ Ci, 80  $\mu$ Ci と変化させても pharmacokinetic study の解析結果には再現性が認められたため、今回の実験の投与量(40  $\mu$ Ci)では、内因性尿酸の生体内動態には影響を与えていないものと考えられる。

腎摘群ラットにおける pharmacokinetic study の結果においても、尿酸の定常状態分布容積はイヌリンより大きく2.2倍であった。しかし、全身クリアランス値は、正常群に比し尿酸で6分の1、イヌリン

では27分の1に低下していた。腎摘群において、イヌリン全身クリアランス値が正常群に比較して無視できるほど小さい値であるのに対し、尿酸の全身クリアランス値は正常群の5分の1であることは、尿酸はイヌリンより腎以外の経路からの排泄率が高いということの意味する。事実、腎摘群の胆汁中の尿酸の回収率が4時間で11~14%であることから、肝胆道系が腎摘群での尿酸の主要排泄路の一つであると考えられた。

今回の実験により、尿酸は血管内液のみならず間質液中にも広く分布することが明らかになり、細胞内にも拡散していく可能性があることが明らかになった。また、尿酸は腎以外、特に肝胆道系からも排泄されることが証明されたが、その能力は腎に比べると低く、尿酸の生体内動態の亢進は、直接的に尿中尿酸排泄量の増加に反映、すなわち、尿酸カルシウム結石形成に大きく関与することが示唆された。

### 結 語

尿酸カルシウム尿路結石症の発症機序を解明する目的で、ラットを用いて radioisotope で標識した尿酸をトレーサーとして、腎および肝クリアランス測定を行うとともに、pharmacokinetic study を施行して解析し、イヌリンの場合と比較検討した結果、以下の知見を得た。

1. 尿酸の腎クリアランス値はイヌリンのその1.12倍であり、尿酸は糸球体でろ過されるとともに、尿細管からも分泌されることが示唆された。

2. Pharmacokinetic study により、尿酸は胆汁中にも排泄されることが明らかになったが、腎摘群においては肝は腎の尿酸排泄能を代償できなかったことから、尿酸の主要な排泄経路は腎であり、生体内動態の亢進がそのまま腎での尿酸排泄量増加に反映すると考えられた。

3. 尿酸の生体内分布容積がイヌリンのその1.7倍であることは、尿酸は間質液中に容易に拡散し、また、細胞内にも拡散していく可能性を示唆するものであった。

本論文の要旨は、第74回日本泌尿器科学会総会および第29回日本腎臓学会総会において発表した。なお、本研究は、昭和61年度文部省科学研究費補助金(課題番号61771186)の援助を受けた。

### 文 献

1) Zarembski PM and Hodgkinson A: Some factors influencing the urinary excretion of oxalic acid in man. *Clin Chem Acta* **25**: 1-10, 1969

2) Marshall RW, Cochran M and Hodgkinson A: Relation between calcium and oxalic acid intake in the diet and their excretion in the urine of normal and renal-stone-forming subjects. *Clin Sci* **43**: 91-99, 1972

3) Chadwick VS, Modah K and Dowling RH: Mechanism for hyperoxaluria in patients with ileal dysfunction. *New Engl J Med* **289**: 172-176, 1973

4) Madorsky ML and Finlayson B: Oxalate absorption from intestinal segments of rats. *Invest Urol* **14**: 274-277, 1977

5) Bannwart C, Hagmaier V, Rutishauser G and Sieler H: Absorption of oxalic acid in rats by means of a  $^{14}\text{C}$  method. *Eur Urol* **5**: 276-277, 1979

6) Knight TF, Senekjian HO and Weinman EJ: Effect of para-aminohippurate on renal transport of oxalate. *Kidney Int* **15**: 38-42, 1979

7) Knight TF, Senekjian HO, Taylor K, Steplock DA and Weinman EJ: Renal transport of oxalate: Effect of diuretics, uric acid, and calcium. *Kidney Int* **16**: 572-576, 1979

8) Hautmann R and Osswald H: Renal handling of oxalate: A micropuncture study in rat. *Naunyn-Schmidberg's Arc Pharmacol* **304**: 277-281, 1978

9) Greenblatt DJ and Koch-Weser J: Clinical pharmacokinetics (First of two parts). *New Engl J Med* **293**: 702-705, 1975

10) Dost FH: *Grundlagen der Pharmakokinetik*. Thiem, Stuttgart, 1968

11) Robertson WG and Peacock M: The cause of idiopathic calcium stone disease: Hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron* **26**: 105-110, 1980

12) Robertson WG, Peacock M and Nordin BEC: Activity products in stone-forming and non-stone-forming urine. *Clin Sci* **34**: 579-594, 1968

13) Pak CYC: *Calcium urolithiasis*. Plenum, New York, 1978

14) Miller GH, Vermuulen CW and Moore JD: Calcium oxalate solubility in urine: Experimental urolithiasis XIV. *J Urol* **79**: 607-612, 1958

15) Elliot JS and Eusebio E: Calcium oxalate solubility: The effect of inorganic salts, urea, creatinine, and organic acids. *Invest Urol* **3**: 72-76, 1965

16) Welshman SG and McGeown MG: Urinary citrate excretion in stone-formers and normal controls. *Br J Urol* **48**: 7-11, 1976

17) Sallis JD and Lumley MF: On the possible role of glycosaminoglycans as natural inhi-

- bitors of calcium oxalate stones. Invest Urol **16**: 296-299, 1979
- 18) Nakagawa Y, Abram V, Krezdy FJ, Kaiser ET and Coe FL: Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. J Biol Chem **258**: 12594-12600, 1983
- 19) Finlayson B and Reid F: The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. Invest Urol **15**: 442-448, 1978
- 20) Hall JE and Granger JP: Renal hemodynamics and arterial pressure during chronic intrarenal adenosine infusion in conscious dogs. Am J Physiol **249**: F32-F39, 1986

(1987年7月14日受付)