

尿酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する CG-120 の阻止効果

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任: 津川龍三教授)

鈴木 孝治, 津川 龍三

INHIBITORY EFFECT OF CG-120 ON THE FORMATION, GROWTH AND AGGREGATION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALS *IN VITRO*

Koji SUZUKI and Ryuzo TSUGAWA

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

(Director: Prof. R. Tsugawa)

The inhibitory effect of CG-120 on the formation, growth and aggregation of calcium oxalate (CaOx) crystals was estimated by the use of Coulter counter TA II in the whole urine system and seed crystal method.

In the whole urine system, after determining the metastable limit, the formation and growth of calcium oxalate crystals precipitated in response to a load of sodium oxalate was measured. CG-120 had a strong inhibitory effect on the formation and growth above the concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$.

In the seeded crystal system, inhibitory activity of aggregation (Ia) and growth (Ig) were calculated from the change in the number and volume of crystals. Above 250 $\mu\text{g/ml}$, CG-120 inhibited the aggregation and growth of added CaOx monohydrate and dihydrate crystals. CG-120 therefore might be useful for treating the recurrent stone formers.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1073~1076, 1988)

Key words: Calcium oxalate, Crystal formation, CG-120, Citrate

はじめに

尿中で尿酸カルシウム (CaOx) 結晶の成長, 凝集阻止物質として chondroitin sulfate, heparin などの acid glycosaminoglycans, RNA, glycoprotein など高分子物質¹⁻⁴⁾ やクエン酸, magnesium, pyrophosphate などの低分子物質が報告されている。これらのうち尿中で増加させることができるものは低分子物質のみである。クエン酸に凝集, 成長阻止効果のあることはすでに報告した⁵⁾ が, クエン酸製剤の CG-120 を日本ケミファ株式会社より提供され CaOx 結晶形成, 成長, 凝集に対する阻止効果を検討したので報告する。

実験方法

1. 全尿法

a) Metastable limit の測定

すでに報告した⁶⁾ が概要は次のごとくである。

24時間尿を採取後 paper filter, 次に 0.45 μm Mil

lipore filter を通し細胞成分を除去する。20 ml の容器に尿 20 ml および 0~150 $\mu\text{M/L}$ になるように sodium oxalate (NaOx と略す) を 200 μl 添加する。この容器を37℃の shaking water bath 中で30分間 incubate 後 Coulter counter TA II を使用し形成された結晶の各 size ごとの数を測定した後に結晶の体積, 平均直径, 累積体積率などを算出した。NaOx の添加濃度が増加するにつれある量を超過すると 2 μm 以上の結晶が急激に形成されてくる (これを metastable limit と呼ぶ)。この limit 以上では結晶量は添加した NaOx 量に直線的に比例して増加する (Fig. 1)。

b) NaOx 30 μM 追加時の結晶の変化

尿 100 ml に metastable limit の NaOx 量, さらに 30 μM の NaOx を追加添加し, 10分ごとに結晶数・体積を測定した。

上記 a), b) の反応系に CG-120 を最終濃度として 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し control における反応と比較した。

2. Seed crystal method⁵⁾

CaOx の metastable solution (CaCl_2 : 1 mM/l, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$: 0.2 mM/l, NaCl : 0.15 M/l を pH 6.0 に調整し 0.45 μm Millipore filter を通す.) を使用直前に作製する. 100 ml に CaOx crystal suspension (半井薬品 CaOx monohydrate (以下 COM と略) 100 mg を生理的食塩水 100 ml に投入し超音波にて 30 分処理) を 2.5 ml 添加し, 添加直後とマグネチックスターラーにて 1 時間攪拌後の各 size ごとの結晶数を Coulter counter TA II にて計測し, control と比較して CG-120 を添加した場合の結晶数の変化から凝集阻止能 (Ia) を, 結晶体積の変化から成長阻止能 (Ig) を算出した.

Seed crystal として COM のほかに CaOx dihydrate (COD) も使用した. COD 結晶作製法: metastable limit を測定した全尿に 30 μM 過量の NaOx を添加し 20 分攪拌後 0.45 μm Millipore filter で吸引濾過する. この filter を 105 $^\circ\text{C}$ で 5 分間乾燥しデシケーター内に保存する. または COD 100 mg を生理的食塩水 100 ml に投入し超音波処理 2 分間のち冷蔵保存する. 使用時には COD suspension 1.9 ml (Werness らの報告⁷⁾ に準じて COM と specific surface area が同様になるようにした.) を metastable solution に添加し上記と同様に Ia, Ig を算出する.

結 果

1. 全尿系における反応

a) metastable limit の測定

尿に CG-120 を 100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した場合の metastable limit は control と差は認められず 75

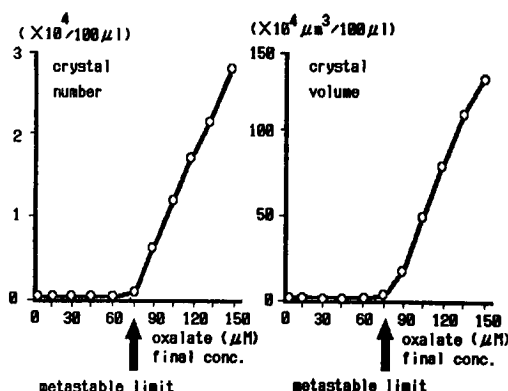


Fig. 1. The determination of the metastable limit of urine. Crystal number and volume are plotted in relation to the amount of sodium oxalate.

μM の NaOx 量であったが 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 105 μM , 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 150 μM の NaOx を必要とした.

b) NaOx (30 μM) 添加時の変化

Control において結晶数は急激に増加し 30 分後には plateau になった. 体積は時間とともに緩徐に増加した. 結晶の平均直径をみるとこの全尿系では時間経過につれて増大し, 5.5 μm で plateau となった. また 4 μm 以上の体積率は 60 分以上で 80 % を示した (Fig. 2: $n=8$, mean $\pm$ SD).

CG-120 を添加した場合は, 濃度が増加するにつれて結晶数の増加は抑制された. また結晶体積も濃度に依存して抑制効果が観察された (Fig. 3). 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では軽度の抑制効果をみるが, 1,000~2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 30~50% の結晶体積阻止効果があった.

2. CG-120 の凝集阻止能 (Ia), 成長阻止能 (Ig)

Fig. 4 に示すように metastable solution 中では COM は最終濃度 250~2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間で凝集阻止効果が認められ, 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 100% 以上で結

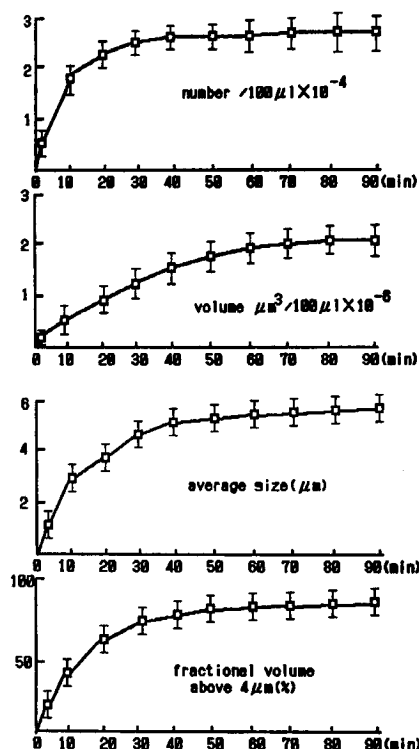


Fig. 2. Crystal number, volume, average size fractional volume after the addition of 30 μM of sodium oxalate above the metastable limit in the whole urine system ($n=8$, mean $\pm$ SD)

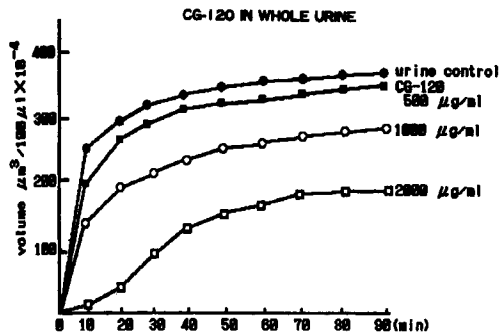


Fig. 3. The change in crystal volume after the load of CG-120

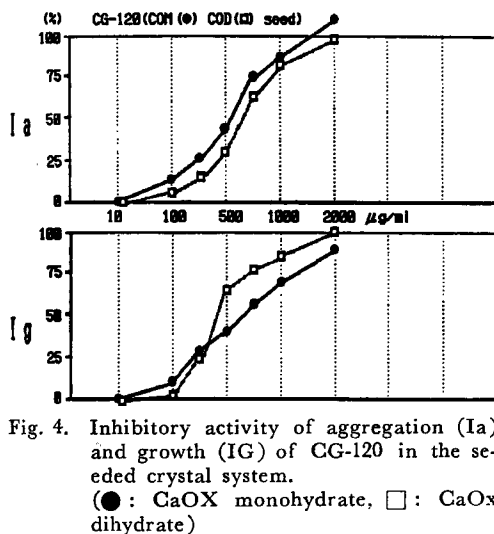


Fig. 4. Inhibitory activity of aggregation (Ia) and growth (IG) of CG-120 in the seeded crystal system.
(●: CaOx monohydrate, □: CaOx dihydrate)

晶の溶解が認められた。COD に対して CG-120 は COM に対してよりもやや低い凝集抑制効果を示したが両者に有意差は認められなかった。また成長阻止能は COM, COD とともに 250~2,000 $\mu\text{g/ml}$ で認められた。

考 察

実験に使用した CG-120 はクエン酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸カルシウムを 1:2:2 の割合で含有する合剤であり 1 包に 1 g 封入されている。全尿を使用した系においては形成される結晶は 20 分までは 99% COD であり、この系において CG-120 は 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で結晶の形成、成長を著明に抑制した。

結石患者では尿中クエン酸排泄量が少なくこれが結石形成の一因をなしているとも報告されている^{8,9)}。

CG-120 を人に 1 日 3 g 投与すると尿中クエン酸排泄量は 338 mg/day から 421 mg/day と著明に増加する¹⁰⁾。1 日尿量を 1,500 ml とすると 240 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で排泄されていることになる。250 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では全尿系においてはごくわずかな抑制作用しか認められないが、服用直後から数時間にわたっては尿中濃度の増加が認められ 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上になっていると考えられるため、CG-120 は尿中での CaOx 結晶形成、成長に対して抑制効果があると考えられた。

またこれらを裏付けるのが seed crystal method の結果である。この系は簡単に再現性もよく、多くの物質がこの系で評価されている。使用する結晶は CaOx 結晶のうち最も安定とされている COM が多く用いられている。しかし、尿中で観察される大部分の CaOx 結晶は COD であるため従来の COM を使用した結果と比較する目的で COD の結晶を作成し評価した。全尿系で形成される COD 結晶は metastable limit を測定後 30 μM 過量の NaOx を添加することにより容易に作成できる。またこのように作成した COD の結晶は 1 年間以上安定であることが赤外分光法、電顕により確かめられた。seed crystal method において COD と COM 結晶に対する CG-120 の Ia, Ig はほぼ同様の結果を示すことが明らかとなった。

このように全尿を使用した *in vitro* の系においては CG-120 は COD 結晶の形成、成長を抑制し、さらに seed crystal method においては COM, COD 結晶の凝集、成長を顕著に抑制することが証明されたわけで、この結果はすでに報告されているラットにおけるクエン酸、クエン酸塩の蔞酸カルシウム結石抑制効果^{11,12)}を裏付けるものと考えられる。

結 語

尿路結石の新しい治療薬として注目されているクエン酸製剤の CG-120 を対象として蔞酸カルシウム結晶に対する効果を検討し次の結果を得た。

① 全尿系において metastable limit を測定後 30 μM 過量になるように NaOx を添加したところ、COD 結晶体積の増加をみたが、CG-120 は 500~2,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に依存して抑制した。

② COD 結晶を全尿に NaOx を添加して作製した。

③ COM と COD 結晶を seed として結晶凝集、成長系で検討したところ CG-120 はほぼ同様の阻止作用のあることが判明し、最終濃度 250~2,000 $\mu\text{g/ml}$ で凝集、成長阻止能が観察された。

文 献

- 1) Robertson WG and Scurr DS: Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallizer using an artificial urine. *J Urol* **135**: 1322-1326, 1986
- 2) Nakagawa Y, Abram V, Kezdy 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
- 3) Koide T, Takemoto M, Itatani H, Takahashi M and Sonoda T: Urinary macromolecular substances as natural inhibitors of calcium oxalate crystal aggregation. *Invest Urol* **18**: 382-386, 1981
- 4) 有馬 滋: 尿路結石形成を抑制する尿中高分子物質. 腎と透析, 臨時増刊号腎尿路結石のすべて. pp. 485-491, 1987
- 5) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, 谷口利憲, 下在和, 津川龍三: Coulter counter を用いた尿酸カルシウム結晶の凝集能測定. 腎と透析, 臨時増刊号腎尿路結石のすべて. pp. 492-496, 1987
- 6) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, 谷口利憲, 下在和, 津川龍三: 尿酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する Sodium Copper Chlorophyllin の阻止効果. *日泌尿会誌* **78**: 1306-1310, 1987
- 7) Werness FG, Duckworth SC and Smith LH: Calcium oxalate crystal growth. *Invest Urol* **17**: 230-233, 1979
- 8) Menon M and Mahle CJ: Urinary citrate excretion in patients with renal calculi. *J Urol* **129**: 1158-1160, 1982
- 9) Nicar MJ, Skurla C, Sakhae K and Pak CYC: Low urinary citrate excretion in nephrolithiasis. *Urology* **11**: 8-14, 1983
- 10) 安川 修, 上原正樹, 森本鎮義, 吉田利彦, 深谷俊郎, 戎野庄一, 大川順正: 尿路結石症におけるクエン酸代謝の研究 2. 正常健康人におけるクエン酸剤投与後の尿中クエン酸及び尿路結石関連物質の経時的変化について. *日泌尿会誌* **78**: 626-633, 1987
- 11) 戎野庄一, 森本鎮義, 深谷俊郎, 宮崎善久, 安川修, 澤田佳久, 大川順正: 実験的尿酸カルシウム結石の研究 2. フィチン及びクエン酸の抑制効果について. *日泌尿会誌* **76**: 843-849, 1985
- 12) Ogawa Y, Tanaka T, Yamaguchi K, Morozumi M and Kitagawa R: Effects of sodium citrate, Potassium citrate and citric acid in preventing experimental calcium oxalate urolithiasis in rats. *Acta Urol Jpn* **33**: 1772-1777, 1987

(1987年12月23日迅速掲載受付)