

沢瀉および夏枯草のラットにおける蔘酸カルシウム 結石形成に対する作用

大阪大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 奥山明彦教授)

山口 誓司¹⁾, 劉 繼紅, 宇都宮 正登²⁾

吉岡 俊昭, 奥山 明彦

市立池田病院泌尿器科 (部長: 小出卓生)

小 出 卓 生³⁾

静岡県立大学薬学部漢方薬研究所 (主任: 横田正実助教授)

杉 山 清

THE EFFECT OF TAKUSHA AND KAGOSOU ON CALCIUM OXALATE RENAL STONES IN RATS

Seiji Yamaguchi, Lui Jihong, Masato Utsunomiya,

Toshiaki Yoshioka and Akihiko Okuyama

From the Department of Urology, Osaka University School of Medicine

Takuo Koide

From the Department of Urology, Ikeda Municipal Hospital

Kiyoshi Sugiyama

From the School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka

We examined the inhibitory effect of the two Kampo medicines, takusha and kagosou on the formation of calcium oxalate renal stones induced by ethylene glycol (EG) and $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($1\alpha\text{-D}_3$) in rats. Wister strain rats were divided into 4 groups (A: normal control, B: stone, C: kagosou, D: takusha). There was no significant difference in urinary calcium excretion or oxalate excretion between the stone group and kampo medicine groups. The calcium content of the kidneys was significantly lower in the takusha group than in the other two groups (Stone group and kagosou group). Takusha was effective in preventing oxalate stone formation in rats. Kagousou, which had strong inhibitory effect on calcium oxalate crystal growth and aggregation *in vitro* as well as takusha, was not effective against *in vivo* calcium oxalate stone formation in rats.

These findings suggest that takusha prevents the formation of calcium oxalate stone by inhibiting calcium oxalate crystal growth and aggregation.

(Acta Urol. Jpn. 41: 427-431, 1995)

Key words: Kampo medicine, Takusha, Kagousou, Calcium oxalate stone

緒 言

カルシウム含有結石症に対する薬物療法としては高カルシウム尿症に対する rice bran¹⁾, thiazide²⁾ や低クエン酸尿症に対する alkali citrate³⁾ などよく

知られているが、原因のはっきりしない特発性蔘酸カルシウム結石症に対しては現在のところ有効な薬物療法は確立されていない。われわれは古来より結石の治療薬として使用されてきた漢方薬である猪苓湯および夏枯草に注目し、従来よりの利尿作用による排石促進作用のみならず、結石再発予防作用としての可能性を *in vitro* の実験系を用いて検討してきており、猪苓湯の成分である沢瀉 (タクシャ) と古来より尿路結石

1) 現: 市立池田病院泌尿器科

2) 現: 宇都宮皮膚泌尿器科

3) 現: 大阪厚生年金病院泌尿器科

症に使用されてきた夏枯草（カゴソウ）に強い阻止活性があることはすでに報告しているが、今回さらに蓆酸カルシウム結石形成ラットのモデルを用いて *in vivo* での沢瀉および夏枯草の蓆酸カルシウム結石形成に対する効果を検討した。

方 法

1. 予備実験として岡田ら⁶⁾の報告に準じて Wister 系雄性ラット（8週齢，200g 前後）にエチレングリコール（EG）を活性型ビタミン D₃（VD₃）を投与する結石形成モデルを使用し、飼料として日本クレア製 CE-2 の自由摂取下，エチレングリコール 0.08, 0.10, 0.12, 0.14 ml の10倍希釈液の連日強制投与（分2）とアルファロール 0.5 μg の隔日強制投与を行い結石形成を促した。4週間飼育した後屠殺し、腎組織中のカルシウム測定および組織学的検討を行った。

2. 予備実験の結果を参考にして Wister 系雄性ラット（9週齢，200g 前後）に日本クレア製 CE-2 の自由摂取下，0.12 ml のエチレングリコール液の連日強制投与（分2）とアルファロール 0.5 μg の隔日強制投与を行い結石形成を促した。

漢方成分は臨床1日量の5倍量をエチレングリコールと共に強制投与を行った。すなわち，200g のラットに対して沢瀉は 6mg の原末を夏枯草は 18mg の凍結乾燥末を1日2回に分けて強制的に投与した。

投与方法は以下の4群に分けて飼育し28日目に屠殺した。

A群（control 群）：ラットにビタミン D₃ の control としてサラダ油 1.0 ml を隔日に強制投与し，エチレングリコール溶液の control として 1.6 ml の精製水を連日1日2回強制投与を行った。

B群（結石形成群）：ビタミン D₃ 液 1 ml（VD₃ を 0.5 μg 含む）を隔日に強制投与を行い，1.6 ml のエチレングリコール溶液（0.6 ml エチレングリコール + 1.0 ml 精製水）を連日1日2回強制投与を行った。

C群（夏枯草投与群）：ビタミン D₃ 液 1 ml を隔日に強制投与を行い，0.6 ml のエチレングリコール溶液と夏枯草エキス溶液 1.0 ml（夏枯草抽出物 18 mg/ml）を混合したものを連日1日2回強制投与を行った。

D群（沢瀉投与群）：ビタミン D₃ 液 1 ml を隔日に強制投与を行い，0.6 ml のエチレングリコール溶液と沢瀉エキス溶液 1.0 ml（沢瀉抽出物 6 mg/ml）を混合したものを連日1日2回強制投与を行った。

各群5匹ずつ4週間飼育し，飼育最終日に採血，採尿を行い，屠殺後両側腎の摘除を行い，結石形成の有無の観察および腎組織中のカルシウムおよびマグネシウムの測定および組織学的検討を行った。

結 果

1. 予備実験の生化学検査ではエチレングリコール量が 0.12, 0.14 ml の量にて尿素窒素，クレアチニンの有意の上昇を認めた。また，カルシウムは 0.12 ml の濃度で有意の上昇を認めた（Table 1）。

エチレングリコール量 0.12 ml と 0.14 ml の腎組織の HE 染色では，尿細管の拡張が著明であり，尿細管腔内には無色透明の結晶が多数存在していた。

各エチレングリコール濃度別の腎組織内カルシウム濃度の比較において，エチレングリコール量が 0.12, 0.14 ml で 0.08 ml と比較して有意に増加しており（Fig. 1），また 0.12 ml では 0.14 ml と比較して腎機能障害が軽度であることより，漢方薬の投与の実験系

Table 1. Serum biochemical data in preliminary experiment.

EG (ml/day)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)
0.08	17.8 ± 2.17	0.56 ± 0.05	12.24 ± 1.03	10.76 ± 1.05
0.1	28.6 ± 14.52	0.64 ± 0.22	12.76 ± 0.84	11.86 ± 0.25
0.12	31.3 ± 4.19	0.73 ± 0.13	14.28 ± 1.11	11.68 ± 1.81
0.14	36.4 ± 5.59	0.72 ± 0.04	13.36 ± 0.43	10.50 ± 0.79

Mean ± S.D.

Table 2. Serum biochemical data

	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)
Control	17.6 ± 1.342	0.70 ± 0.07	12.32 ± 0.77	12.64 ± 1.67
Stone	18.2 ± 4.32	0.68 ± 0.08	12.28 ± 0.36	11.68 ± 1.08
Kagosou	17.6 ± 3.1	0.80 ± 0.24	13.64 ± 1.33	12.80 ± 2.226
Takusha	14.8 ± 1.01	0.66 ± 0.06	12.72 ± 0.78	11.28 ± 0.904

Mean ± S.D.

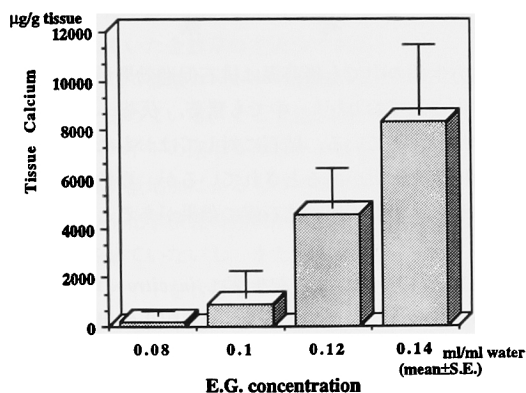


Fig. 1. Calcium concentration in renal tissue in preliminary experiment

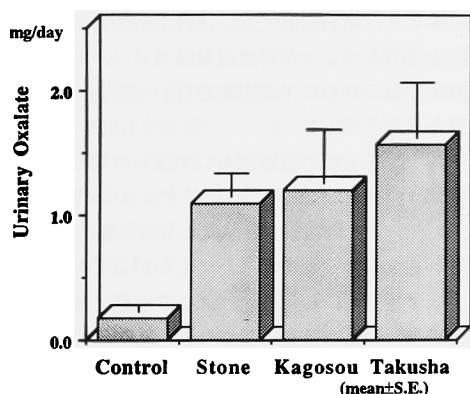


Fig. 2. The 24-hour urinary oxalate excretion

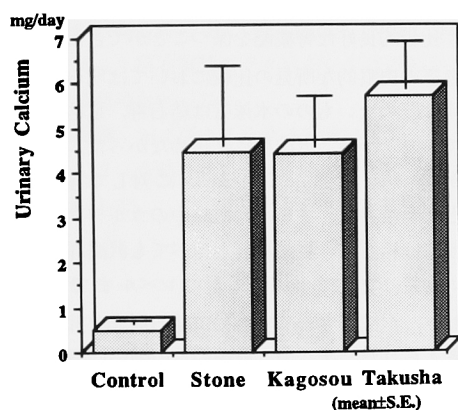


Fig. 3. The 24-hour urinary calcium excretion

においてはエチレングリコールは 0.12 ml/day を強制投与することとし、以下の実験を行った。

2. 本実験ではエチレングリコール量 0.12 ml/day の投与を行った。屠殺時採血した血液の生化学検査に

おいては、尿素窒素、クレアチニン、カルシウム、リンの測定を行ったが、4 群間に有意な差は認めず、また、このモデルにおいては結石形成群においても明らかな腎機能障害を認めなかった (Table 2)。

つぎに27日目に採取した、24時間尿における尿中尿酸排泄量は、B, C, D 群において control のA群に比較し有意に増加していた。しかしながら、B, C, D の3群間には有意差は認めなかった (Fig. 2)。

また尿中カルシウム排泄量は B, C, D 群において control のA群に比較し、有意に増加していたが、B, C, D の3群間には有意差は認めなかった (Fig. 3)。

27日目に採取した、24時間尿における尿中リン排泄量は、A, B, C, D の4群間には有意差は認めなかった。

摘出腎組織中のマグネシウム量は、control と他の3群間での有意な差は認めなかった (Fig. 4) が、腎組織中のカルシウムの含有量を見てみると、A群 16.4 ± 0.23 , B群 449.4 ± 328.51 , C群 296.96 ± 145.54 , D群 19.9 ± 0.93 µg/g wet tissue となっており、沢瀉

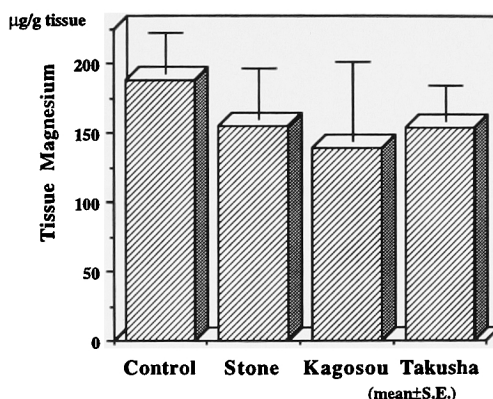


Fig. 4. Magnesium concentration in renal tissue

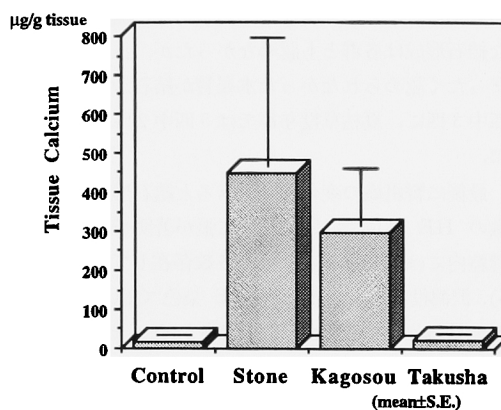


Fig. 5. Calcium concentration in renal tissue

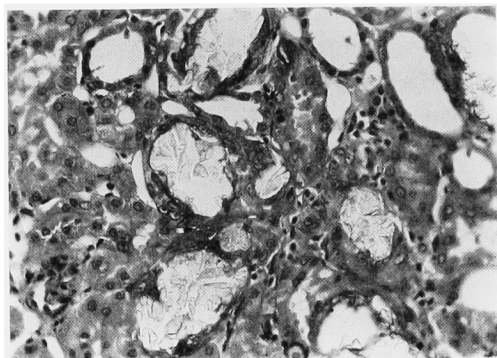


Fig. 6. Many calcium oxalate crystals were found in the renal tubules of renal stone-forming rat ($\times 400$).

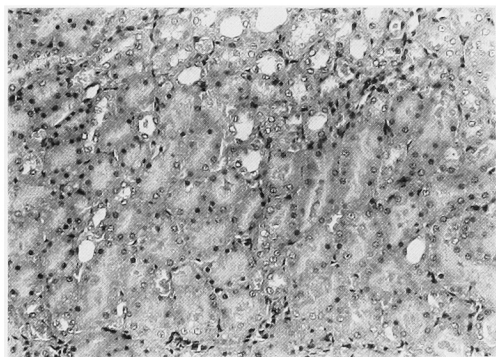


Fig. 7. Calcium oxalate crystal was not found in the renal tubules of takusha group ($\times 200$).

投与のD群は、結石形成群、夏枯草投与群と比較して腎組織中のカルシウム含有量は有意に少なく、結石形成が有意に抑制されていた (Fig. 5)。しかし、夏枯草投与群はほとんど抑制されず、結石形成群とは有意差は認めなかった。

しかも、屠殺時の腎尿管の肉眼的な所見では明らかな結石形成は各群とも認めなかったが、沢瀉投与群にまったく認められなかった尿管が結石形成群では5匹中3匹に、夏枯草投与群では5匹中2匹に認められた。

最後に腎組織の変化を見てみると結石形成群の腎組織のHE染色では尿管の拡張が著明であり、尿管腔内には無色透明の結晶が多数存在していた (Fig. 6)。沢瀉投与群の腎組織のHE染色では、結石形成群で見られた拡張した尿管はきわめてわずかであり、尿管内での結晶形成も認められず、組織学的検査においても沢瀉投与の有効性が示された (Fig. 7)。

考 察

漢方生薬の中でも猪苓湯は排石促進効果があることが報告されており^{6,7)}、中でも猪苓、茯苓、沢瀉に利尿作用を認めている。結石に対してはおもにこの利尿作用により効果があるとされているが、夏枯草も古来より利尿剤として尿路結石症に効果があるとされてきた⁸⁾。

われわれはすでに上記生薬に *in vitro* の実験系において尿酸カルシウム結晶成長凝集阻止作用のあることを見だし、なかでも沢瀉と夏枯草は低濃度においても強い阻止作用を示すことを報告した。この阻止作用が *in vivo* においても同様の効果を示すのかという点が興味のあるところであり、今回ラットを用いた岡田ら⁹⁾の実験系を参考にして行った。岡田ら⁹⁾の方法においては結石形成ラットは腎不全になる確率が高いことより、ラットが腎機能を保つレベルでの漢方薬の効果を見るために予備実験を行いエチレングリコール投与量を決定した。

実際に予備実験の段階においてはエチレングリコール量 0.14 ml/ml water およびビタミン D₃ 量 0.5 μ g においては結石形成はおこるものの腎不全にもなっているという状態であった。したがって腎内カルシウム含量も control 群と比較して有意に増大しているものの腎機能を比較的良好に保つという点からエチレングリコール量 0.12 ml/ml water およびビタミン D₃ 量 0.5 μ g とすることとして本実験を進めた。従って、本実験においては、各種の血清生化学、尿化学検査において結石形成群と control 群に有意差を認めず比較的良好な腎機能を保つことができた。

各群の肉眼的な所見の比較においては明らかな結石形成は認めないものの尿管は結石群、夏枯草群に認めておりながら、沢瀉群には認めなかったことより沢瀉が *in vivo* において結石形成に対して有効であることが示唆され、さらに腎組織中のカルシウム含量の比較では結石群、夏枯草群と比べても沢瀉群のカルシウム含量は有意に control 群のレベルまで抑制されており、沢瀉がきわめて有効に結石形成を抑制していると考えられた。そこで、沢瀉のこの強い結石形成阻止作用はどのような機序によるものか、また沢瀉に含まれるどの成分がこのように強い阻止作用を示すのかが問題であるが、小川⁹⁾の報告によるとラットを用いた実験系において沢瀉を含む猪苓湯に結石形成抑制作用を認めている。これは尿中への尿酸排泄量の低下により腎内尿酸量が低下したため結石形成を抑制したとしている。また、Hirayama ら¹⁰⁾の報告においてはラ

ットを用いた実験系において古くから結石溶解剤として用いられていた金錢草の主成分であるトリテルペノイドを投与して蓚酸カルシウム結石形成に対して強い抑制効果を認めている。そこで彼らはこの抑制効果はトリテルペノイドの尿中カルシウム排泄抑制効果と尿中クエン酸排泄増加によるものであるとしている。しかし今回の生化学検査の結果からは沢瀉は尿中蓚酸排泄を低下させていないし、また沢瀉自身もその成分にトリテルペノイドを含むものの尿中カルシウム排泄抑制効果も認めなかった。クエン酸代謝に関しては今回尿中クエン酸を測定していないので今後の検討課題であると思われるが、蓚酸、カルシウム排泄に関しては尿への排泄はむしろ増加している傾向があり、小川⁹⁾の報告、Hirayama ら¹⁰⁾の報告とは異なる結果であった。この点に関しては今後、沢瀉の構成成分別の検討を行わなければならないと考えている。

したがって、われわれの *in vitro* の実験系の結果から考えると沢瀉は結石形成過程での結晶成長、凝集過程において阻止的に働いたと思われる。

今後は沢瀉のどの分画が結石形成のいかなる過程において抑制作用を示すのか、また沢瀉を含む猪苓湯などのいわゆる市販の漢方薬としての再発予防効果の可能性について検討していかなければならないと考えている。

結 語

1. ラットを用いた蓚酸カルシウム結石実験モデルを用いて猪苓湯の成分である沢瀉を投与し、結石形成抑制作用があることが認められた。
2. *in vitro* の実験系で強い抑制作用を認めた夏枯草は、このラット結石実験モデルにおいては結石形成の抑制作用は認めなかった。
3. 沢瀉は蓚酸、およびカルシウム代謝に影響を与えことなく、ラット結石実験モデルにおいて結石形成抑制作用を示した。

4. 沢瀉の *in vivo* での結石形成抑制作用は *in vitro* の実験結果を考えると結石形成過程での結晶成長、凝集過程に作用している可能性が考えられた。

文 献

- 1) Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M. et al: Rice bran treatment for patients with hypercalcemia stones: experimental and clinical studies. *J Urol* **132**: 1140-1145, 1984
- 2) Scholz D, Schwille PO and Sigel A: Double-blind study with thiazide in recurrent calcium lithiasis. *J Urol* **128**: 903-907, 1982
- 3) Pak CYC, Fuller C, Sakhee K, et al: Long-term treatment of calcium nephrolithiasis with potassium citrate. *J Urol* **134**: 11-19, 1985
- 4) 宇都宮正登, 小出卓生, 山口誓司, ほか: 各種漢方成分による蓚酸カルシウム結晶成長、凝集阻止能の検討. 泌尿紀要 **37**: 1097-1102, 1991
- 5) 岡田裕作, 川村寿一, 野乃村光生, ほか: カルシウム含有結石の成因に関する実験的ならびに臨床的研究: (I) エチレングリコール, 1a(OH)-D3 投与によるラット腎結石発生実験モデル. 泌尿紀要 **13**: 565-577, 1985
- 6) 栗田 孝, 八竹 直, 郡健二郎: ツムラ猪苓湯の尿管結石排泄におよぼす効果の検討. 泌尿紀要 **27**: 801-814, 1981
- 7) 八竹 直, 南 光二, 秋山隆弘, ほか: 尿管結石の自然排泄について一とくにツムラ猪苓湯の影響についての検討一. 泌尿紀要 **26**: 89-95, 1980
- 8) 大川順正, 戎野庄一, 渡辺俊幸: 尿路結石症. 泌尿器外科 **5**: 565-569, 1992
- 9) 小川由英: 尿路結石に対する漢方製剤の化学的解析に関して. 漢方医 **9**: 119-122, 1985
- 10) Hirayama H, Wang Z, Nishi K, et al.: Effect of *Desmodium styracifolium-triterpenoid* on calcium oxalate renal stones. *Br J Urol* **71**: 143-147, 1993

(Received on December 21, 1994)

(Accepted on March 14, 1995)

(迅速掲載)