

沢瀉内服によるヒト尿中蓐酸カルシウム結晶 形成抑制効果についての検討

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：奥山明彦教授）

本多 正人*, 吉村 一宏, 三宅 修
吉岡 俊昭, 奥山 明彦

市立池田病院泌尿器科（部長：山口誓司）

山 口 誓 司

宇都宮皮膚泌尿器科

宇 都 宮 正 登

大阪厚生年金病院泌尿器科（部長：小出卓生）

小 出 卓 生

静岡県立大学薬学部漢方研究所（主任：横田正実助教授）

杉 山 清

INHIBITORY EFFECT OF ORAL ADMINISTRATION OF TAKUSYA ON CALCIUM OXALATE CRYSTALLIZATION IN HUMAN WHOLE URINE

Masahito HONDA, Kazuhiro YOSHIMURA, Osamu MIYAKE

Toshiaki YOSHIOKA and Akihiko OKUYAMA

From the Department of Urology, Osaka University School of Medicine

Seiji YAMAGUCHI

From the Department of Urology, Ikeda Municipal Hospital

Masato UTSUNOMIYA

From the Department of Urology, Utsunomiya Urology and Dermatology Hospital

Takuo KOIDE

From the Department of Urology, Osaka Kosei-Nenkin Hospital

Kiyoshi SUGIYAMA

From the Department of Pharmacology, Shizuoka Prefectural University

We previously reported that Takusya had the inhibitory effect on *in vitro* calcium oxalate crystallization and *in vivo* stone formation in an animal model and it could be a prophylactic agent against calcium oxalate stone formation. We studied the effect of Takusya on calcium oxalate crystallization in human urine. Takusya (500 mg/day and 1,000 mg/day) was administered to 16 healthy men for 3 days and then 24-hour urine samples were collected to measure the urinary excretion of calcium, phosphate, magnesium, uric acid, creatinine, citric acid and oxalic acid. The urine samples before the administration of Takusya was used as a control. The size and distribution of crystals, which were formed in the urine samples by adding calcium chloride and sodium oxalate, were measured using the Coulter counter technique. Urinary magnesium excretion was significantly reduced by 1,000 mg/day of Takusya compared with the control ($p < 0.05$). The growth of crystals was significantly inhibited by 500 mg/day of Takusya in the large crystal formers whose urine created crystals more than $3.5 \mu\text{m}$ before the administration of Takusya ($p < 0.05$). These findings suggested that Takusya inhibited the growth of crystals formed in human urine.

(Acta Urol. Jpn. 43 : 333-337, 1997)

Key words : Takusya, Kampou medicine, Urinary stone, Calcium oxalate, Inhibitor

* 現 : 大阪警察病院泌尿器科

緒 言

近年、尿路結石症に対する外科的治療法としては ESWL や endourological surgery などの治療法が確立したが、内科的治療法、特に結石再発予防治療に関してはさらなる進歩が望まれているのが現況である。結石再発予防に際しては長期間同一薬剤を服用することから、その薬剤については有効性ととも副作用の少ないことが必要と考えられる。元来漢方はその長期間の使用経験から比較的副作用は少ないと考えられており、われわれはそのなかで尿路結石、特に尿酸カルシウム結石の再発予防に有効な薬剤の有無について検討してきた。その結果漢方療法において古来尿路結石の治療に関して用いられてきた漢方のなかから *in vitro* の実験系で沢瀉および夏枯草に尿酸カルシウム結晶成長・凝集阻止活性があること¹⁾、さらにラットを用いた *in vivo* の実験系で両者のうち沢瀉に結石形成抑制作用が認められたこと^{2,3)}をすでに報告している。今回さらに沢瀉内服によるヒト尿の尿酸カルシウム結晶形成の変動について全尿系を用いて検討したので報告する。

方 法

尿路結石の既往のない健康成人男子ボランティア16名に沢瀉を投与しその前後で得られた尿を検体として以下の実験を行った。

1. 沢瀉の投与方法・投与量および採尿

沢瀉の煮沸抽出成分 500 mg をカプセル化し1日1カプセル朝食後および1日2カプセル朝夕食後をそれぞれ3日間服用、3日目に sodium azide 添加下に24時間蓄尿を施行した。この場合の沢瀉の投与量は、体重 70 kg のヒトの場合1日1カプセル内服時で沢瀉の古典的1日投与量の約1.2倍、1日2カプセル内服時で約2.4倍に相当する。沢瀉内服前の24時間蓄尿をコントロールとした。得られた尿検体は蓄尿終了後できるだけすみやかに pH および尿量の測定を行い、尿化学測定用サンプルを分取後 -20°C で凍結保存し実験の際に溶解して使用した。

2. 尿化学測定項目

尿化学はカルシウム、無機リン、マグネシウム、尿酸、クレアチニン、クエン酸⁴⁾、尿酸⁵⁾について測定した。

3. Inhibition assay (Fig. 1)

Inhibition assay は Tawashi⁶⁾らの方法に準じて施行した。すなわち 50 ml の各サンプル尿（内服前 500 mg 内服後 1,000 mg 内服後）を 0.22 μm filter に通した後、1 mol/l の塩化カルシウム 0.25 ml を添加後 pH を 5.7 に調整し、さらに 5 mmol/l 尿酸ナトリウム 2.5 ml を加えて 37°C で 3 時間震盪後、

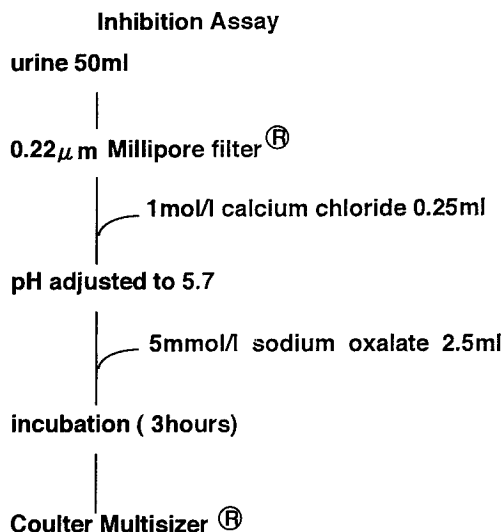


Fig. 1. Method of inhibition assay in the non-seeded crystal system

尿中に生じた尿酸カルシウムの結晶分布および結晶径を Coulter counter にて測定した。また生成総結晶量にたいする沢瀉の影響を調べるために以上の実験で生じる各尿の crystal volume を以下の方法で測定した。即ちサンプル尿 10 ml に先の方法と同様の割合で塩化カルシウムおよび tracer dose の ¹⁴C を添加した尿酸ナトリウムを加え 37°C で震盪し、3 時間および 24 時間後に 0.22 μm のフィルターに通して生じた結晶を除去した後、サンプル尿中に残存する ¹⁴C の量を測定した。その測定値から結晶が生じる際の ¹⁴C の消費量を計算し、crystal volume と考えた。

統計上の検定は Wilcoxon の符合付順位検定もしくは Mann-Whitney の U 検定および Friedman test を用いた。

結 果

1. 沢瀉内服による尿量、尿 pH、尿化学の変動

24 時間尿量、尿 pH、24 時間カルシウム、リン、尿酸、尿酸排泄量に関しては沢瀉内服前、500 mg 内服後、1,000 mg 内服後のいずれも有意な変動は認められなかった。クエン酸排泄量にも有意な変動は認められなかったが、24 時間マグネシウム排泄量に関しては 1,000 mg 内服後で内服前と比較して有意な低下が認められた (Fig. 2)。

2. Crystal Volume

上記の実験系において 3 時間および 24 時間後に生じる crystal volume には沢瀉内服前、500 mg 内服後、1,000 mg 内服後の 3 群間で有意な差は認められなかった (Fig. 3)。個々の尿ではそれぞれ supersaturation level は異なると考えられるが、この 3 群間の crystal volume に差は認められなかったことから生成総結晶量に対する沢瀉内服の影響はないものと考えら

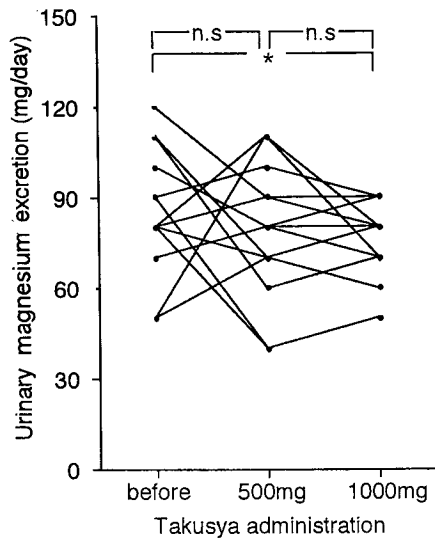


Fig. 2. The 24-hour urinary excretion of magnesium was significantly decreased by 1,000 mg/day of Takusya (* $p < 0.05$). Takusya at 500 mg/day had no significant effect on the urinary excretion of magnesium.

れた。

3. Crystallization

Inhibition assay で生じた平均結晶径の結果を Fig. 4 に示した。沢瀉 500 mg 内服時では、内服前と比べて平均結晶径が縮小する傾向が認められたが ($p = 0.098$)、1,000 mg 内服時では 500 mg 内服時と比べて結晶径は有意に増大した ($p < 0.01$)。内服前と 1,000 mg 内服時の間には有意差は認められなかった。このことから沢瀉 500 mg 内服によりヒト尿で生じる結晶は縮小する傾向があるものの、投与量を増加させるとその傾向は消失すると考えられた。沢瀉 500 mg 内服により尿中で生じる結晶が縮小したと考えら

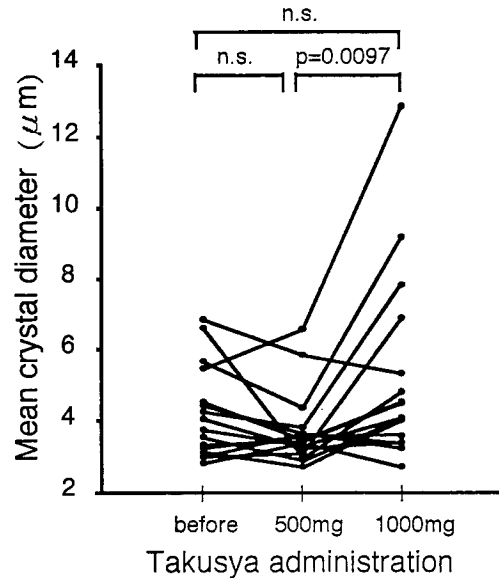


Fig. 4. Mean crystal diameter formed in urine specimens.

れる典型例の結晶分布図を Fig. 5 に示した。沢瀉内服時の尿中では内服前と比較して、3 時間後に生じた結晶は明らかに小さいと考えられた。平均結晶径の検討では沢瀉 500 mg の抑制効果は傾向差にとどまっているものの、この分布図からみられるように沢瀉 500 mg 内服が明らかに有効と考えられる例が存在することから沢瀉内服前と 500 mg 内服時の平均結晶径の結果についてさらに検討を加えた。沢瀉内服前の尿中で生じる結晶の大きさを $3.5 \mu\text{m}$ で 2 群に分類し、各群での沢瀉 500 mg 内服の効果について検討した。(Fig. 6)

沢瀉内服前の尿中で生じる結晶が大きな群では、沢瀉 500 mg 内服により結晶の縮小が認められた ($p < 0.05$)。沢瀉内服前の尿中で生じる結晶の小さい群で

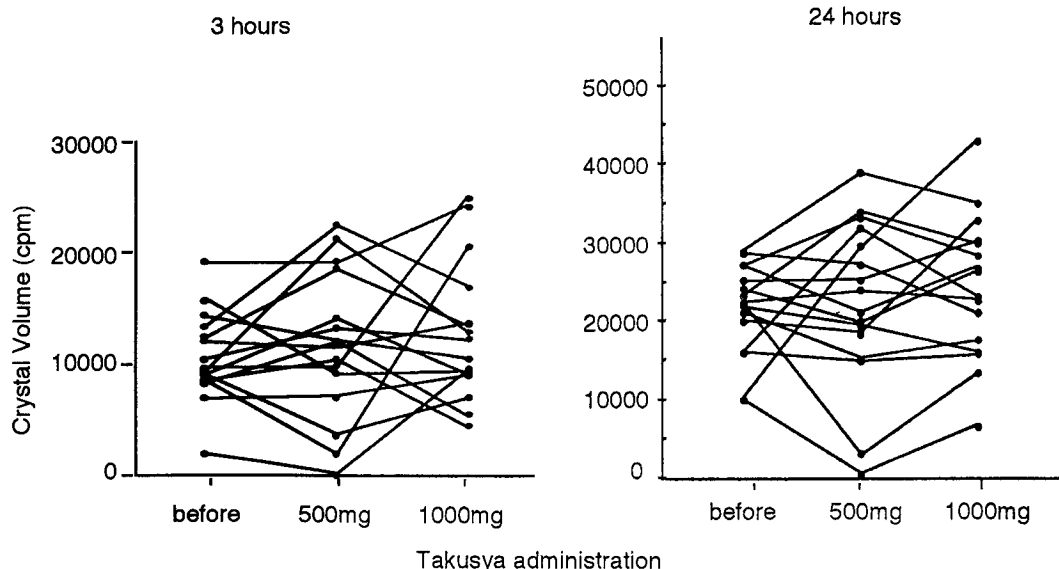


Fig. 3. The formed crystal volume. There were no significant differences in formed crystal volume in 24-hour urine.

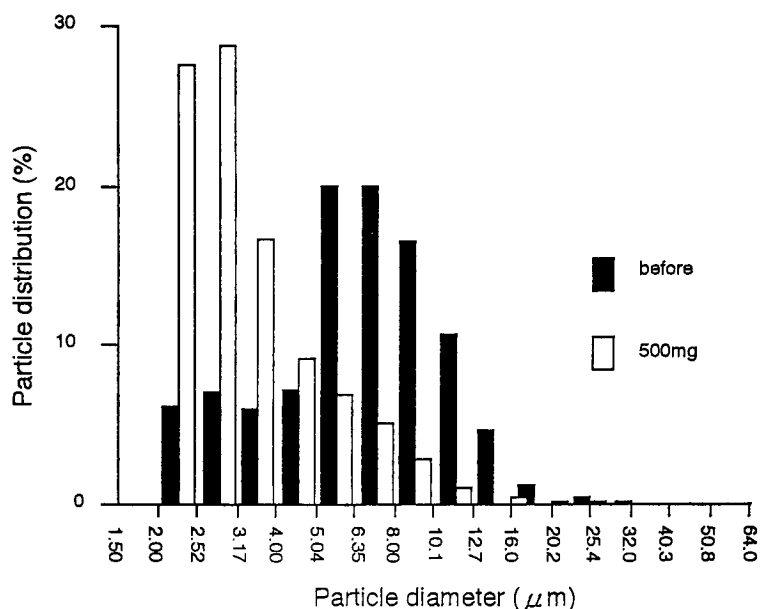


Fig. 5. Typical pattern of crystal distribution in a case. The crystal distribution became smaller by 500 mg/day of Takusya.

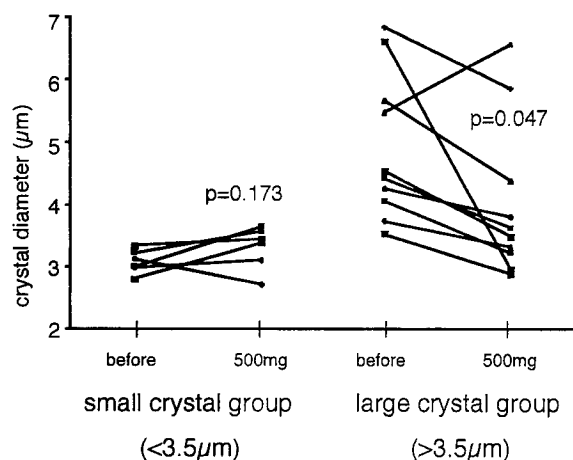


Fig. 6. Effect of 500 mg/day of Takusya on crystal growth. Crystal growth was inhibited by Takusya in the large crystal group.

は平均結晶径に変化はないと考えられた。

考 察

われわれは漢方療法において古来尿路結石の治療に関して用いられてきた漢方薬のなかから metastable solution をもちいた *in vitro* の実験系で沢瀉および夏枯草に蔞酸カルシウム結晶成長・凝集阻止活性があること¹⁾、さらにラットを用いた *in vivo* の実験系で両者のうち沢瀉に結石形成抑制作用が認められたこと^{2,3)}をすでに報告している。また全尿をもちいた *in vitro* の実験系でも沢瀉に蔞酸カルシウム結晶成長・凝集阻止活性が認められたことも報告されている⁴⁾。以上からわれわれは沢瀉に結石形成抑制作用を有する可能性があると考えているが、問題はヒトにおいてもラットと同様に結石形成抑制作用が認められるかという点に

ある。元来ヒト尿には蔞酸カルシウム結晶成長および凝集阻止能を有することはすでに知られており、その理由としてヒト尿に含まれるインヒビターの関与が推測されている。そこで今回われわれは沢瀉のヒトにおける結石形成抑制作用を検討するにあたり、まず沢瀉内服によるヒト尿のもつ蔞酸カルシウム結晶形成抑制作用の変化について検討を試みた。

今回の実験結果では結晶凝集に関しては評価困難であったが、結晶成長に関しては沢瀉 500 mg 内服後の尿中で生じた蔞酸カルシウム結晶の大きさは内服前と比較して縮小していることから、沢瀉内服によりヒト尿のもつ結晶成長抑制作用は増強されていると考えられた。ヒト尿が蔞酸カルシウム結晶成長抑制活性を有する機序として、尿に含まれる種々のインヒビターの存在が関与していると考えられている⁷⁾。沢瀉内服前の尿中で生じる結晶が小さいものはその個人の尿が有する結晶成長阻止能がもともと強い可能性があり、沢瀉 500 mg 内服による効果がマスクされている可能性があるとも推測される。そこで沢瀉内服前の尿中で生じる結晶の大きさで二群にわけて検討すると、沢瀉内服前に比較的大きな結晶が生じた群、言い換えればその尿のもつ結晶成長阻止能が低いと考えられる群において顕著な結晶成長抑制効果を示した。

今回の結果から直接、沢瀉が蔞酸カルシウム結石形成抑制効果を有するという結論には至らない。しかし沢瀉内服によりヒト尿の蔞酸カルシウム結晶成長抑制能が増強されたことは、ヒトにおいてもラットを用いた *in vivo* の実験結果同様、沢瀉の蔞酸カルシウム結石形成抑制効果を有する可能性があることを示唆する結果であると考えられる。さらに尿のもつ結晶成長阻止能が低いと考えられる群において顕著な結晶成長抑

制効果を示したことは、尿の結晶成長・凝集阻止能が低いとされる再発性尿路結石症に対して有用となる可能性もありうると考えられる。

沢瀉内服でなぜヒト尿の蓆酸カルシウム結晶成長抑制能が増強されるのかについては現時点では不明であるが、その機序として沢瀉の成分が尿中に増加して抑制作用を発揮する、あるいは沢瀉の成分による影響で抑制作用を発揮する物質が増加する等が推測される。*in vitro* の実験結果¹⁾から、少なくとも沢瀉の煮沸抽出成分には蓆酸カルシウム結晶成長・凝集を阻止する物質が含まれているものと考えられる。沢瀉はオモダカ科サジオモダカの根茎から調製される生薬で、猪苓湯などに含まれ、成分としてアリストール A, B, C などのトリテルペノイドや糖、澱粉、有機酸、アミノ酸、ビタミン類などを含み、利尿作用、抗コレステロール作用があることが知られているが^{1,9)}、含有成分については不明な点が多い。今回の検討では沢瀉内服により尿量の増加や尿 pH に変動は認められなかった。またカルシウム、尿酸、蓆酸、クエン酸の24時間尿中排泄量にも変化は認められなかった。尿中マグネシウム排泄量に関しても、沢瀉 500 mg 内服では内服前と比較して変動は認められなかった。したがって今回の結果にたいするクエン酸およびマグネシウム関与の可能性は低いと推察される。沢瀉の煮沸抽出成分中に含まれる蓆酸カルシウム結晶成長・凝集を阻止する物質について川村ら⁸⁾は沢瀉の分子量10,000以上の分画に阻止物質が含まれていることを報告している。われわれの検討では沢瀉の煮沸抽出成分を分子量1万以下、1万から5万、5万から30万、30万以上に分画した場合、1万以下および5万から30万の分画に蓆酸カルシウム結晶成長阻止活性が認められた¹⁰⁾。今後の検討課題として、沢瀉の煮沸抽出成分中に含まれるインヒビターの同定が急務であると考えられる。

また別の問題点として、今回沢瀉 500 mg 内服では蓆酸カルシウム結晶成長阻止効果が認められたものの、1,000 mg 内服では 500 mg 内服時と比較して有意に阻止効果の低下が認められたことがあげられる。1,000 mg 内服時と内服前においては有意差がなかったことから、今回の投与量の範囲内では沢瀉に promoter としての作用はないものと考えられたが、沢瀉 1,000 mg 内服時では低分子インヒビターであるマグネシウムの尿中排泄量が低下していることから沢瀉の至適投与量の決定という問題点が今回の実験で明らかになったと考えられる。沢瀉 500 mg 内服時と 1,000 mg 内服時の尿中マグネシウム排泄量に有意差がないことから、阻止活性の低下はマグネシウム由来とは考えにくく、沢瀉に含まれる各種成分の相互作用によるものの可能性が高いと思われる。従って至適投

与量の決定においても沢瀉に含有される阻止物質の検討が必要である。

結 語

- 1) 沢瀉のヒトにおける蓆酸カルシウム結石形成抑制効果の可能性を探るために、沢瀉内服によるヒト尿のもつ蓆酸カルシウム結晶成長抑制活性への影響について検討した。
- 2) 沢瀉 1 日 500 mg の投与により、投与前に生じる結晶が比較的大きな群、言い換えれば本来の尿の持つ抑制活性が低いと考えられる群で蓆酸カルシウム結晶の成長の抑制効果の増強が認められた。
- 3) 沢瀉に含まれる有効成分に関する検討が急務と考えられた。

本論文の要旨は第5回日本尿路結石症研究会において発表した。

文 献

- 1) 宇都宮正登, 小出卓生, 山口誓司, ほか: 各種漢方成分による蓆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
- 2) 山口誓司, 劉 繼紅, 宇都宮正登, ほか: 沢瀉および夏枯草における蓆酸カルシウム結石形成に対する作用. 泌尿紀要 **41**: 427-431, 1995
- 3) Koide T, Yamaguchi S, Utsunomiya M, et al.: The inhibitory effect of kampou extracts on *in vitro* calcium oxalate crystallization and *in vivo* stone formation in an animal model. Int J Urol **2**: 81-86, 1995
- 4) Moellering H and Gruber W: Determination of citrate with citrate lyase. Anal Biochem **17**: 369-376, 1966
- 5) 竹内秀雄, 岡田裕作, 吉田 修: 簡単な尿中蓆酸の測定法. 泌尿紀要 **27**: 505-508, 1981
- 6) Tawashi R, Consineau M and Dennis G: Calcium oxalate crystal growth in normal urine: role of contraceptive hormones. Urol Res **12**: 7-9, 1984
- 7) Meyer JL and Smith LH: Growth of calcium oxalate crystals: inhibition by natural urinary crystal growth inhibitors. Invest Urol **13**: 36-40, 1975
- 8) 川村研二, 森山 学, 中島千聡, ほか: 蓆酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する沢瀉の阻止効果. 泌尿紀要 **39**: 695-700, 1993
- 9) 曳野 宏, 岩川恒男, 大島吉輝, ほか: 沢瀉の利尿成分. 生薬誌 **36**: 150-153, 1982
- 10) 吉岡俊昭, 三宅 修, 吉村一宏, ほか: 尿路結石再発予防における漢方の作用 (続報). 第6回日本尿路結石症研究会記録集 (in press)

(Received on October 1, 1996)

(Accepted on February 9, 1997)