

蓼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

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任: 津川龍三教授)

川村 研二, 森山 学, 中嶋 千聡

宮澤 克人, 鈴木 孝治, 津川 龍三

THE INHIBITORY EFFECTS OF TAKUSHA ON THE FORMATION, GROWTH AND AGGREGATION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALS IN VITRO

Kenji Kawamura, Manabu Moriyama, Chiaki Nakajima,

Katsuto Miyazawa, Koji Suzuki and Ryuzo Tsugawa

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

The inhibitory effects of Takusha on the formation, growth and aggregation of calcium oxalate crystals were estimated by the microplate method and the use of Coulter counter TAI in the diluted urine system and undiluted urine system. In the diluted urine system, the inhibitory effect on aggregation and growth was calculated from the changes in the number and volume of crystals by the seed crystal method. Takusha had a strong inhibitory effect on the aggregation and growth when the concentration was above 10 μ g/ml.

In measuring the metastable limit by the microplate method, Takusha had a mild inhibitory effect on the formation of crystals above the concentration of 1 mg/ml. In the undiluted urine system, after determining the metastable limit, the formation and growth of calcium oxalate crystals which precipitated in response to a load of sodium oxalate were measured. Takusha had a strong inhibitory effect on the formation and growth at the concentration of 0.1~1 mg/ml.

Takusha had no glycosaminoglycans in the dimethylmethyle blue assay and had an inhibitory effect on aggregation and growth when its molecular weight was over 10,000.

Therefore, Takusha might be useful for preventing stones in recurrent stone formers.

(Acta Urol. Jpn. 39: 695-700, 1993)

Key words: Takusha, Calcium oxalate, Crystal formation

緒 言

尿路結石の大部分を占める蓼酸カルシウム (CaOx) 結石の発生原因は近年精力的に研究が進められしだいに解明されようとしている。われわれは結石再発予防の薬物療法の可能性を確認するために, Coulter counter method により各種薬剤の結晶成長凝集阻止能について報告してきた¹⁻⁵⁾。

一方, 漢方製剤の臨床応用としては, 猪苓湯等が主としてその利尿作用による排石促進剤として臨床において使用されている⁶⁾。また, in vitro では宇都宮ら⁷⁾が猪苓湯の構成成分, 金錢草と夏枯草について, metastable solution を用い結晶の成長と凝集に与える影響について検討している。

今回, われわれは猪苓湯の一成分である沢瀉 (タクシャ) を使用し結晶形成におよぼす影響について, 結晶核生成の段階は metastable limit 測定により, 結晶成長凝集の段階は seed crystal method を用いた阻止能の測定, さらに限外濾過尿を用いた阻止能の測定, 走査電顕を用いた結晶の形態について検討し, 沢瀉の結石再発予防薬としての可能性について検討したので報告する。

対 象 と 方 法

1) 沢瀉

沢瀉はツムラより提供された, 凍結乾燥末を使用し蒸留水または尿に溶解後, 濾紙で濾過し, さらに0.22 μ m Millipore filter を通した可溶性成分を対象とし

た.

2) seed crystal method^{1,2)}

CaOx の metastable solution (CaCl₂: 1 mM/L, Na₂C₂O₄: 0.2 mM/L, NaCl: 0.15 M と 10 mM sodium cacodylate で pH 6 に調整し, 0.45 μm の Millipore filter を通す) を使用直前に作製し, このうち 100 ml に CaOx crystal suspension (半井薬品 CaOx monohydrate 100 mg を生食 100 ml に投入し, 超音波にて 30 分間処理) を 2.5 ml 添加し, 添加直後とマグネチックスターにて 1 時間攪拌後の各サイズ毎の結晶数を Coulter counter TAI I にて計測し, control と比較して沢瀉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. それぞれ 6 検体を測定し, その平均を測定値とした.

3) metastable limit 測定

正常人男子 1 人の新鮮尿を 6,000 回転, 60 分間遠心し 5 μm さらに 0.22 μm の Millipore filter で濾過し遠心濾過尿 (spun and filtered urine; S & F) を作製した. つぎに旭化成限外濾過モジュール (AIP-1010) を使用し MW10,000 以上の物質を cut off した限外濾過尿 (ultrafiltered urine; UF) を作製した. microplate 法を用いこの UF 尿およびこれに, 沢瀉を 0.1, 1 mg/ml となるように添加した溶液の metastable limit を測定した. metastable limit 測定は microplate 法でおこなった⁸⁾ microplate 内に尿 200 μl と蓚酸ナトリウム (NaOx) を最終添加濃度 0 から 1.5 mM となるように 0.15 mM 間隔で micropipet を使い同時に 10 μl 添加し, 37°C 20 分間放置後倒立顕微鏡にて観察, 蓚酸カルシウム結晶が明らかに生成される最小蓚酸添加量 (mM) を metastable limit とした. それぞれ 6 検体を測定し, その平均を測定値とした.

4) 非希釈尿法^{3-5,9)}

UF 尿 100 ml に metastable limit の NaOx 量, さらに 30 μM の NaOx を追加添加し, 90 分間 15 分毎に結晶数, 体積を Coulter counter TAI I にて測定した. それぞれ 6 検体を測定し, その平均を測定値とした.

また, 90 分目の結晶を走査顕微鏡で観察した.

5) 沢瀉の阻止作用物質同定の試み

DMB (dimethylmethylene blue) 法¹⁰⁾を用い, S & F 尿, UF 尿, UF 尿に沢瀉を 0.1, 1 mg/ml となるように添加した溶液で, それぞれの glycosaminoglycan (GAG) の濃度を測定した.

つぎに Centrisart® を用い沢瀉を分子量 10,000 と

100,000 で cut off し上記の seed crystal method で Ia, Ig を測定した. なお, 沢瀉の溶液は 10 μg/ml を用いた.

結 果

1) seed crystal method による結晶成長凝集阻止能について (Fig. 1)

Ia, Ig の測定結果を示すが, この値が 100% であれば結晶の成長または凝集を完全に阻止したことになる. 沢瀉は 10 μg/ml の濃度について Ia=85.6%, Ig=109.2% と強い阻止能を認めた. それ以下の濃度では結晶成長凝集阻止能は認められなかった.

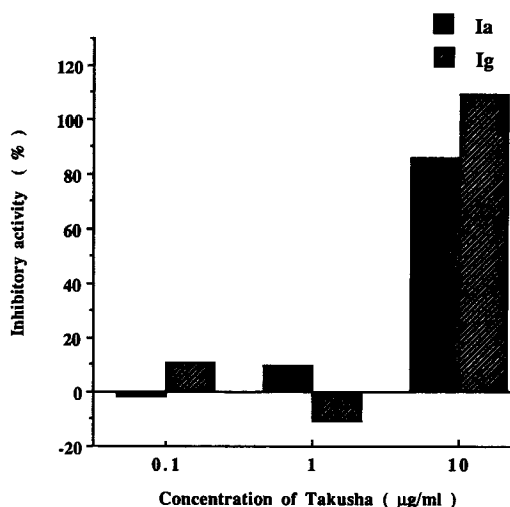


Fig. 1. Inhibitory activity of aggregation (Ia) and growth (Ig) of Takusha in seed crystal system.

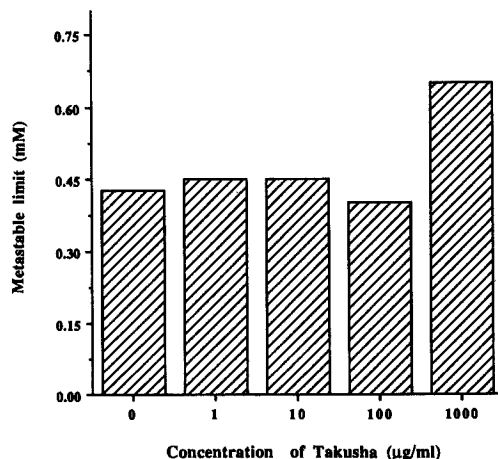


Fig. 2. Metastable limit of ultrafiltered urine after addition of Takusha by microplate method.

2) 結晶核生成の指標である metastable limit の変化 (Fig. 2)

沢瀉 1 mg/ml の濃度で metastable limit の上昇が認められた。それ以下の濃度では metastable limit に変化は認められなかった。

3) 非希釈尿法

UF 尿においては結晶数は急激に増加し15分後に最大値となり、30分以降は結晶数の減少傾向が認められた (Fig. 3)。結晶数が減少した理由は、結晶が生成された後、急速に結晶凝集が始まったためと考えられた。UF 尿において体積は時間とともに緩徐に増加した (Fig. 4)。結晶の直径をみるとこの系が一番大きく、直径のピークは約 11 μm であった (Fig. 5)。

S & F 尿においても結晶数は急激に増加し15分後には plateau となった (Fig. 3)。結晶体積は時間とともに緩徐に増加した (Fig. 4)。結晶直径のピークは約 7 から 9 μm で UF 尿よりやや小さい傾向であった (Fig. 5)。

沢瀉を添加した場合は、0.1 mg/ml では結晶数は急激に増加し 15分後には plateau となった。1 mg/ml では結晶数の増加は抑制され時間とともに結晶数は緩徐に増加した (Fig. 3)。また、体積は沢瀉濃度が増加するにつれて抑制された。90分目では 0.1 mg/ml では 53%, 1 mg/ml では 90%の体積阻止効果が認められた (Fig. 4)。結晶直径のピークは 0.1 mg/ml では約 6 μm , 1 mg/ml では 2 から 4 μm であり沢瀉

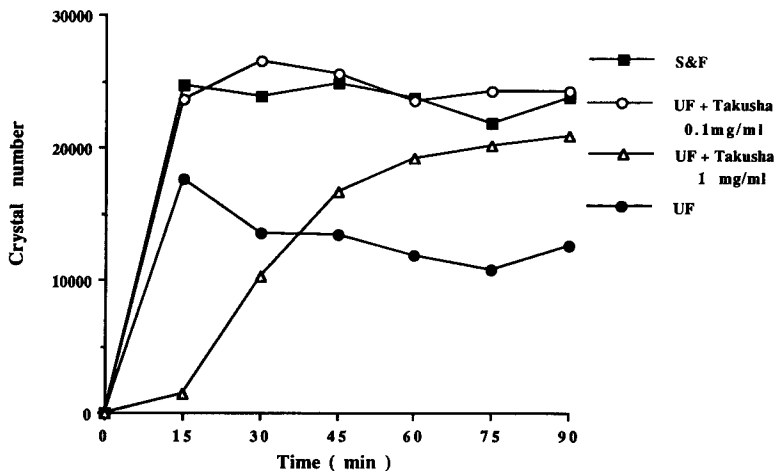


Fig. 3. The change in crystal number after the load of Takusha.

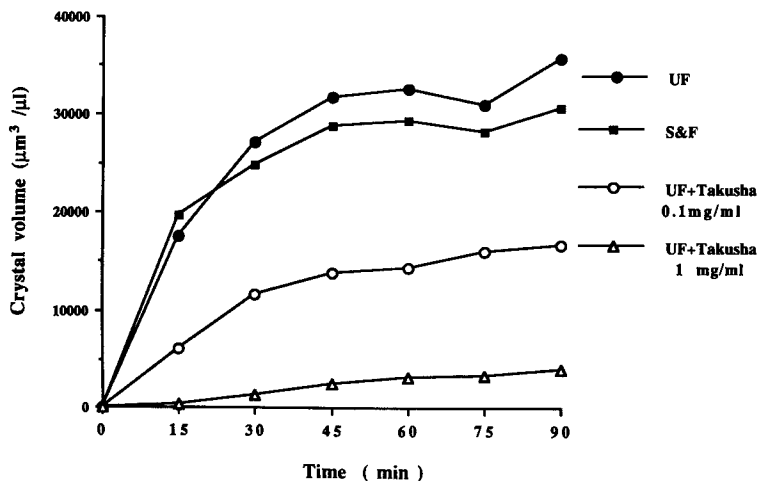


Fig. 4. The change in crystal volume after the load of Takusha.

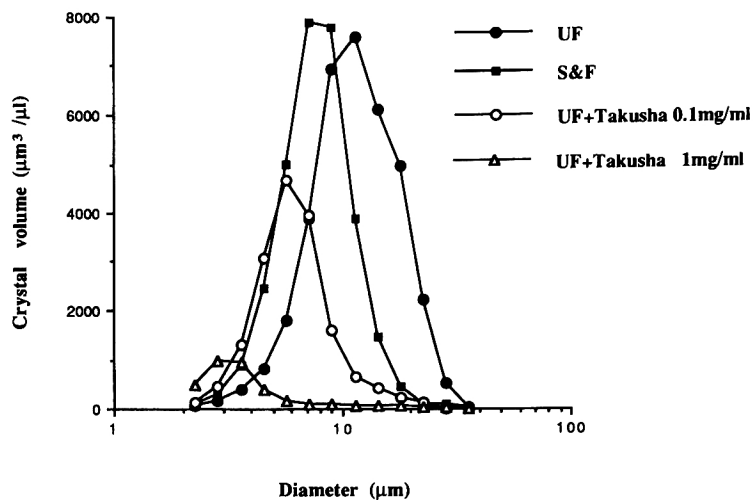
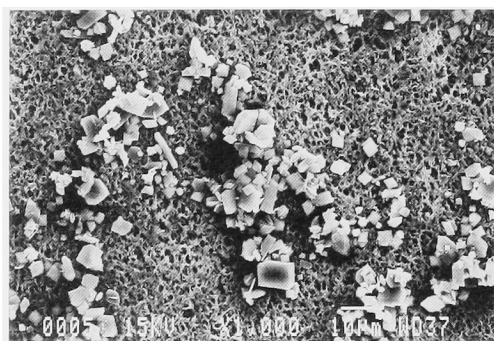
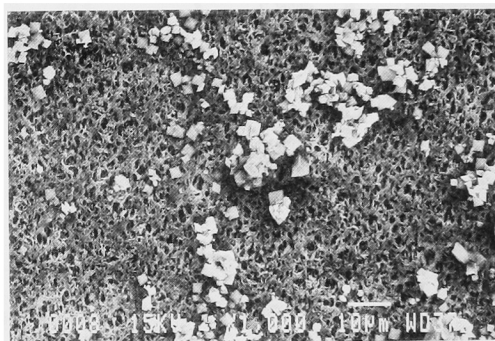


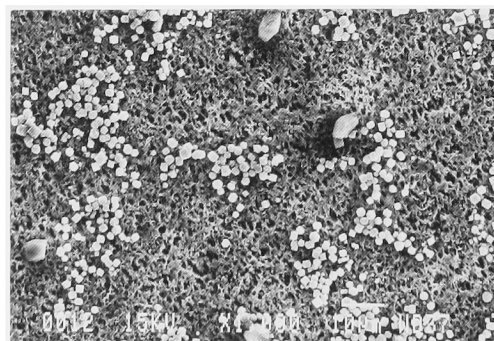
Fig. 5. Crystal volume distribution at 90 min.



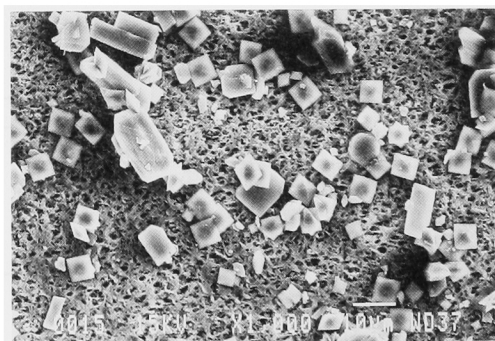
a. ultrafiltered urine (UF)



b. UF + Takusha 0.1mg/ml



c. UF + Takusha 1mg/ml



d. spun & filtered urine (S&F)

Fig. 6. Scanning electron micrography of calcium oxalate crystals at 90 min. after addition of an overload of sodium oxalate to the undiluted urine system.

濃度が増加するにつれて抑制された (Fig. 5).

4) 走査電顕による観察 (Fig. 6)

すべての系において, calcium oxalate dihydrate (COD) が観察された. UF 尿では著しい COD 結晶凝集が認められた. 沢瀉 0.1 mg/ml の濃度では, 結晶の凝集が認められたがそれぞれの結晶サイズは UF 尿のものより小さくなった. 沢瀉 1 mg/ml の濃度では小さな COD 結晶のみみられ, ほとんどの凝集は抑制されバラバラの状態であった.

S & F 尿では結晶個々のサイズは UF 尿に比べ大きい, 明らかな結晶凝集の抑制が認められた.

5) 沢瀉の阻止作用物質同定の試み

S & F 尿, UF 尿, UF 尿+沢瀉 0.1 mg/ml, UF 尿+1 mg/ml の GAG の濃度は, 12.5 µg/ml, 0 µg/ml, 0 µg/ml, 0 µg/ml であり, GAG が含まれているのは S & F 尿だけであり, UF 尿, 沢瀉には GAG は含まれていないと考えられた.

つぎに, 沢瀉溶液を分子量別に分け seed crystal method で Ia, Ig を測定した (Fig. 7). 分子量10,000以下の分画に Ia, Ig は認められず, 10,000 以上の分画に Ia = 56.5%, Ig = 70.7% と阻止能が認められた. さらに分子量100,000で分けた場合100,000以下の分画に Ia = 38.7%, Ig = 60.5%, 100,000以上の分画に Ia = 31.8%, Ig = 59.6% と阻止能が認められた.

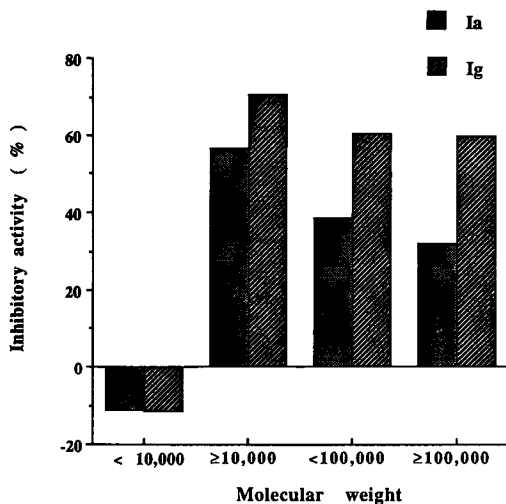


Fig. 7. The inhibitory effects of Takusha on aggregation (Ia) and growth (Ig), divided into different molecular weights.

考 察

沢瀉はオモダカ科サジオモダカの根茎から調整される生薬で, 猪苓湯, 八味地黄丸, 柴苓湯などに配合さ

れている. 成分は, 揮発油, 樹脂, 澱粉, 有機酸, アミノ酸, カリウム塩, ビタミン類, 糖類などが知られており, 利尿作用, 抗コレステロール作用などを有す¹¹⁾.

大川¹²⁾は, 漢方医学のもつ経験的な組み合わせと化学的な作用発現機序がどのあたりで一致するのかを推察するために, また漢方生薬のなかに結石溶解剤あるいは結石予防薬としての臨床応用の可能性を探索するために in vitro における検討が必要であるとしている.

宇都宮⁷⁾は metastable solution を用いた結晶の成長と凝集に与える影響について検討したが, 沢瀉が低濃度においても強い阻止能を認めたとしている. われわれも metastable solution を用いた希釈尿における評価で, 沢瀉が結晶の成長, 凝集を阻止することを確認した. この metastable solution を用いた seed crystal 法は, 結晶の成長と凝集を観察できる優れた方法であるが, 有効と考えられた薬剤が必ずしも全尿中で有効であるとはかぎらない³⁻⁵⁾.

そこで今回, 実際の尿を使用した検討を行った.

coulter counter 法による非希釈尿系の評価で, 限外濾過尿の系を用いた理由であるが, S & F 尿と UF 尿中の pH や電解質, 特に Ca, Ox はまったく同一であり蔘酸の添加で結晶が形成されるが, この時, 高分子領域にあると報告されている結晶成長凝集阻止能の成分を除いてやることにより結晶の凝集と成長が促進され, 結晶の凝集成長をみるのに非常に都合が良い系となるからである. 限外濾過尿を用いた検討で, 沢瀉により結晶体積の増加が抑制され, 結晶の形成, 成長が抑制されることが明らかになった. 走査電顕による観察では, 沢瀉の添加により結晶サイズは小さくなり高濃度では小さな結晶のみが形成されており, 明らかな結晶凝集の抑制が認められた. このように, 非希釈尿系において沢瀉は, 結晶核生成, 成長, 凝集のそれぞれの段階を抑制することが証明された.

しかしながら, 今回の検討では沢瀉の阻止物質がいったい何であるのかは特定できなかった. 宇都宮⁷⁾の報告と同様に, 沢瀉の成分中に GAG は含有されていないことが証明された. 本実験で明らかとなった沢瀉の可溶性成分のうち分子量 10,000 から 100,000 の分画さらには 100,000 以上の分画に阻止物質が含まれることから, この領域の成分同定が必要と考える.

結石再発予防薬が結晶系に直接作用する場合, その成分が尿中に少なくとも数%排泄されることが必須条件である. 今回, in vitro の系において沢瀉に結晶形成阻止能が認められたが, その成分の実体を特定できていない現在, 尿中排泄量の測定も困難である. 今

後、その成分の特定、in vivo の追加実験が必要と考えられた。

結 語

1) 全尿法を含む in vitro の検討で、沢瀉は結晶核生成、結晶成長、凝集のそれぞれの段階に抑制効果が認められることが明らかとなった。

2) 沢瀉の分子量10,000以上の分画に阻止物質が存在することが判明した。沢瀉に glycosaminoglycan は含有されていなかった。

3) 沢瀉が結石再発予防薬として有効であると確認するためには、沢瀉中の阻止物質の特定、その尿中排泄量を検討することが必要と考えられた。

稿を終えるにあたり、協力して頂いた百成智津枝技能員に感謝します。

本論文の要旨は、第2回北陸泌尿器科漢方研究会で発表した。

文 献

- 1) 鈴木孝治：尿路結石症の研究—蓚酸カルシウム結石患者における結晶凝集の検討—。日泌尿会誌 **72**：842-855, 1981
- 2) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, ほか：Coulter counter を用いた蓚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
- 3) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤正人, ほか：蓚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

- 4) 鈴木孝治, 津川龍三：蓚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。泌尿紀要 **34**：1073-1076, 1988
- 5) 鈴木孝治, 宮澤克人, 津川龍三：蓚酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する Sodium pentosan polysulfate の阻止作用。日泌尿会誌 **80**：526-531, 1989
- 6) 栗田 孝, 八竹 直, 郡健二郎：ツムラ猪苓湯の尿路結石症排出に及ぼす効果。泌尿紀要 **27**：801-814, 1981
- 7) 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
- 8) 川村研二, 鈴木孝治, 津川龍三：蓚酸カルシウム結石形成の危険因子に関する研究。日泌尿会誌 **80**：1733-1740, 1989
- 9) 鈴木孝治：蓚酸カルシウム結晶形成に対する heparan sulfate の役割。日本尿路結石研究会記録集 **2**：53-61, 1992
- 10) Farndale RW, Sayers CA and Barrett AJ: A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. Connect Tissue Res **9**：247-248, 1982
- 11) 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
- 12) 大川順正, 戒野庄一, 渡辺利幸：泌尿器科疾患と漢方：尿路結石症。泌尿器外科 **5**：565-569, 1992

(Received on March 1, 1993)
(Accepted on April 5, 1993)