

各種漢方成分による蓂酸カルシウム結晶成長 凝集阻止能の検討

大阪大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 園田孝夫教授)

宇都宮正登, 小出 卓生, 山口 誓司

吉岡 俊昭, 園田 孝夫

静岡県立大学薬学部漢方研究所 (主任 : 杉山 清)

杉 山 清

THE EFFECT OF KANPOU MEDICINE ON THE GROWTH AND AGGREGATION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALS IN VITRO

Masato Utsunomiya, Takuo Koide, Seiji Yamaguchi,

Toshiaki Yoshioka and Takao Sonoda

From the Department of Urology, Osaka University Medical School

Kiyoshi Sugiyama

From the School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka

The effects of the compositional drugs of kanpou medicine on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals were investigated in vitro. In the seeded crystal system, the inhibitory activities were calculated from the change of the number (Ia), total volume (Ig) and fractional volume (I) of crystals determined by a Coulter® Multisizer. Among the tested drugs (Takusha, Akyou, Chorei, Bukuryou, Kasseki, Kinsensou, Kagousou), only Takusha and Kagousou had strong inhibitory activities on the growth and aggregation at the concentration of 5 μ g/ml and 10 μ g/ml (Ia>80%, Ig, I>90%). No significant correlation was observed between inhibitory activities and alcian blue precipitable polyanions (ABPP) of each drug.

Thus some naturally existing substances composing the kanpou medicine may help prevent the stone formation in clinical use.

(Acta Urol. Jpn. 37: 1097-1102, 1991)

Key words: Calcium oxalate crystal, Coulter counter, Kanpou medicine, Crystal growth inhibitor, Crystal aggregation inhibitor

結 言

多種多様の物質が高濃度でしかも同時に可溶化した状態で存在する人尿において“なぜ結石が形成されるのか”という素朴な疑問に対する明確な答えはまだ出ていない。しかし尿路結石形成が核形成 (nucleation), 成長 (growth), 凝集 (aggregation), 固化 (concretion) という過程をへて形成されることが解明され, さらにそのおのおのの機序は徐々に解明されつつあり, 結石患者尿中においては, 結石成長凝集阻止能の低下している事実が明らかになってきた。また in vitro での inhibition assay の信頼性も高まり, その基礎研究から臨床応用への可能性が開けてきている。

尿路結石症に対する薬物治療は, 排石促進, 結石溶解, 再発予防の観点より施行されているが, 漢方薬剤の臨床応用は, 主として利尿作用による結石排石促進剤として使用されることが多く, 実際猪苓湯を中心とした臨床研究ではその有用性は多くが認めるところである^{1,2)}。しかしながらそのおのおのの構成成分の利尿作用以外の結石形成予防作用に関する研究はされていない。われわれは, 結石の溶解剤として一部の生薬が民間薬として長年服用されているとの事実より, 比較的臨床投与に対する安全性の確立した漢方成分をもちいて, 結石溶解剤あるいは結石予防剤としての可能性を探るべく, in vitro での蓂酸カルシウム結晶に対する成長凝集阻止能につき検討した。

対象および方法

1) 対象漢方成分

猪苓湯の成分である、沢瀉（タクシャ）、阿膠（アキョウ）、猪苓（チョレイ）、茯苓（ブクリョウ）、滑石（カッセキ）および利尿作用があるとされ、古来より尿路結石症に使用されてきた金錢草（キンセンソウ）および夏枯草（カゴソウ）を対象とした。おのおのの漢方エキ스는、静岡県立大学薬学部漢方研究所にて、同一条件下に沸騰30分抽出し、濾液を凍結乾燥し作成されたもので、蒸留水に溶解後、0.22 μ m Millipore filter を通し使用した。

2) 結晶成長、凝集阻止能の測定 (Fig. 1)

Robertson らの方法³⁾を用い、使用直前に作成した metastable solution 100 ml (CaCl_2 1 mM, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.2 mM, NaCl 0.15 M, Sodium cacodylate 10 mM, pH 6.0) に種々の漢方成分を加え、 CaOx crystal suspension 2.5 ml (100 mg/100 ml) を seed したうえで、温浴振盪 4 時間後での阻止能として算出した。Seed として用いた蔞酸カルシウムは市販の蔞酸カル

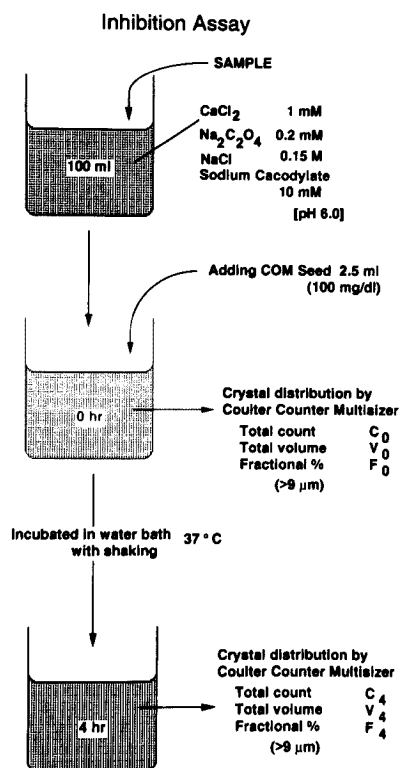


Fig. 1. Method of inhibition assay of samples in the seeded crystal system. (COM: calcium oxalate monohydrate)

Inhibition Index

$$Ia = [1 - \frac{\text{Sample } C_4}{\text{Control } C_4} - \frac{\text{Sample } V_0}{\text{Control } V_0}] \times 100\%$$

$$Ig = [1 - \frac{\text{Sample } V_4}{\text{Control } V_4} - \frac{\text{Sample } F_0}{\text{Control } F_0}] \times 100\%$$

$$I = [1 - \frac{\text{Sample } FV_4}{\text{Control } FV_4} - \frac{\text{Sample } FV_0}{\text{Control } FV_0}] \times 100\%$$

FV (Fractional Volume)
= Total volume x Fractional %

Fig. 2. Formula for the inhibition index (Ia = % Inhibition of Aggregation, Ig = % Inhibition of Growth, I = % Inhibition of Growth and Aggregation)

シウム、1 水和物を乳鉢で十分すりつぶし、テフロンビーカーにて 1 時間回転攪拌したものを用いた。結晶総数および総体積測定には Coulter® Multisizer を用い、aperture size は 100 μ m で 500 μ l のサイフォンにて 256 channel 解析を行った。

阻止能として算出した方法は、Ryall らの計算式⁴⁾に基づき、結晶総数および総体積からそれぞれ % Inhibition of Aggregation (Ia) および % Inhibition of Growth (Ig) を計算した。

さらに 9 μ m 以上の fractional volume を計算し、Robertson らの³⁾いう % Inhibition of Growth and Aggregation (I) を同時に算出し、おのおのの漢方成分について比較検討した (Fig. 2)。

3) 各成分中の ABPP 濃度

各漢方エキスの持つ結晶成長凝集阻止能が何らかの高分子物質、とくに酸性ムコ多糖 (glycosaminoglycans: GAG) によるものかどうかを探るため、Whiteman の方法⁵⁾に準じ、各成分の Alcian Blue Precipitable Polyanions (以下 ABPP と略す) を測定し比較検討した。

結 果

1) 100 μ g/ml における阻止能 (Fig. 3)

滑石のみまったく阻止能を有さなかったが、他の 6 成分においては阻止能が認められた。阿膠を除く 5 成分においては、I, Ia, Ig 共に 50% 以上の阻止能が観察された。

2) 10 μ g/ml における阻止能 (Fig. 4)

沢瀉に $I=98.24\%$, $Ig=96.37\%$, $Ia=85.25\%$ 、夏枯草に $I=98.32\%$, $Ig=99.70\%$, $Ia=94.81\%$ と強い阻止能が認められたが、他の 4 成分では 50% 以下へと低下するのが観察された。

3) 濃度による阻止能の変動 (Fig. 5)

10 μ g/ml の濃度にて強い阻止能を示した夏枯草、

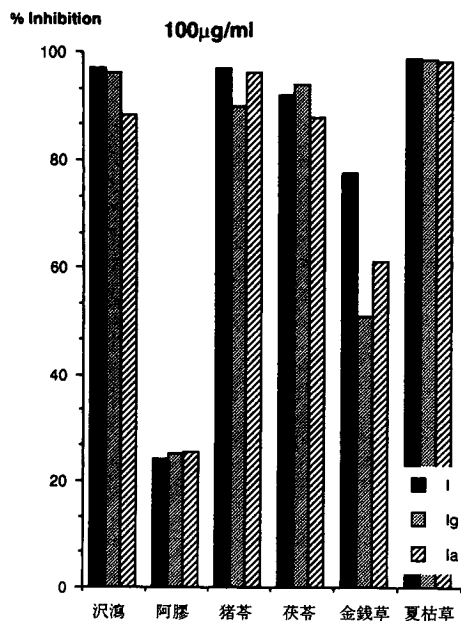


Fig. 3. Inhibitory activities of the tested drugs at the concentration of 100 µg/ml.

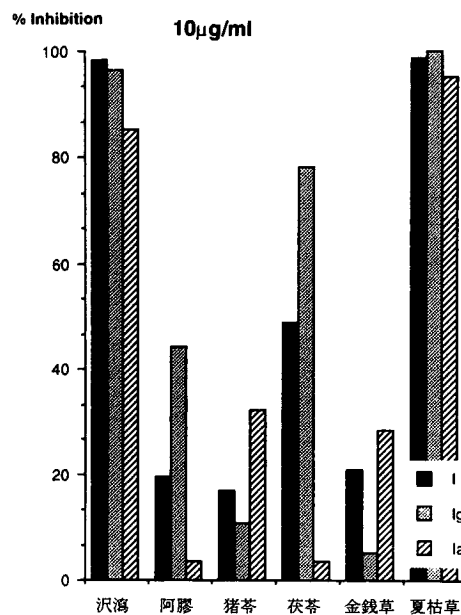


Fig. 4. Inhibitory activities of the tested drugs at the concentration of 10 µg/ml.

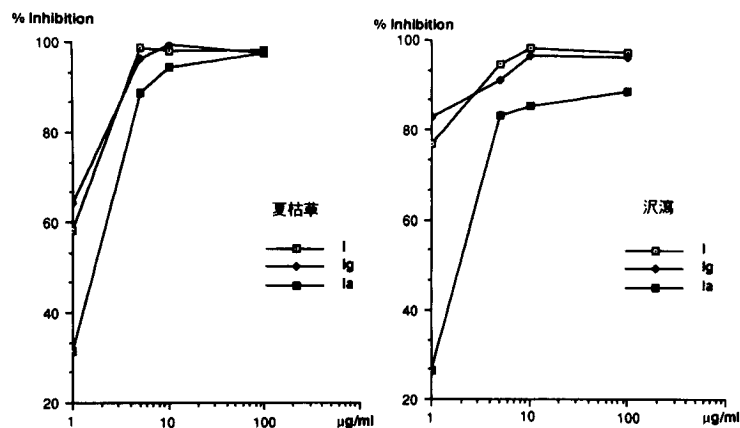


Fig. 5. Inhibitory activities of Kagosou (left) and Takusha (right) in the seeded crystal system. (final concentration=1, 5, 10, 100 µg/ml)

沢瀉において濃度における変化をみると、夏枯草の濃度におけるその結晶成長凝集阻止能は 5 µg/ml の濃度まで保持され、1 µg/ml でも I=58.29%, Ig=64.37%, Ia=31.43% の阻止能が観察された。沢瀉の阻止能も夏枯草と同様に 5 µg/ml まで保持されており、1 µg/ml では I=76.81%, Ig=82.96%, Ia=26.44% と夏枯草よりもやや強い阻止能が認められた。

4) 各成分中 ABPP 濃度 (Fig. 6)
同一濃度 (10 mg/ml) の漢方エキスの ABPP 濃度の吸光度 (620 nm) を図示したが、強い阻止能をも

つ夏枯草に高濃度の ABPP を認めたものの、同程度の阻止能をもつ沢瀉にはほとんど認められず、両者に相関は認められなかった。

考 察

1973年 Robertson ら¹⁾により metastable solution 中での尿酸カルシウム結晶の成長凝集の Coulter counter による測定法が発表されてから、in vitro での結晶動態を把握する手段として Coulter counter は有効な方法とされ、1981年 Ryall ら²⁾は

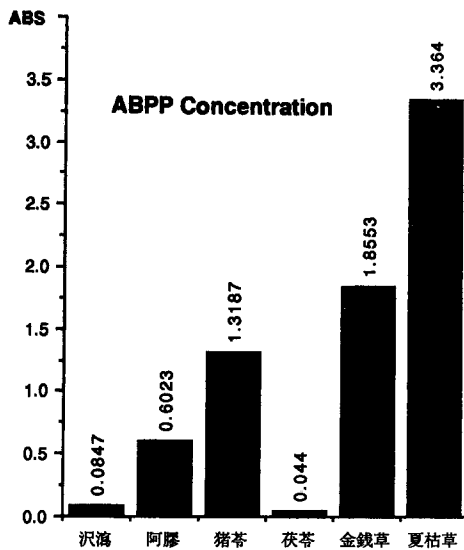


Fig. 6. Alcian blue precipitable polyanions (ABPP, E₆₂₀) of the tested drugs (10 mg/ml) using the method of Whiteman⁵⁷.

成長および凝集を別個に測定する計算式を発表した。鈴木らは本法を用い、蔞酸カルシウム inhibitor として、sodium pentosan polysulphate⁶⁵, sodium copper chlorophyllin⁷² などを見いだしており、逆にわれわれも Coulter counter TA II を用い副甲状腺機能亢進症の患者尿において promotive effect を持つことも突き止めている⁸²。また mixed suspension mixed product removal (MSMPR) 法等⁸³により、より生理的な環境にて結晶成長凝集動態を観察することが可能となってきた。以上より Coulter counter を用いた蔞酸カルシウム結晶成長凝集阻止物質のスクリーニング方法は、有用かつ再現性のあるものと考えられる。

一方体外物質、特に自然に存在する物質として尿路結石症治療薬としての臨床応用例は、大川らのカルシウムの腸管内での吸収阻害剤としての Rice-bran¹⁰², Lindsjö らによる蔞酸吸収阻害剤である 'Ox-Absorb'¹¹³ などが知られており、自然界にはなお、結石治療薬となりうる未知の有効な物質が存在すると考えられる。

さて漢方では生薬間の相互作用が重視されてきた歴史があり、「証」によって経験的な処方なされる点は西洋医学と根本的な相異点であり、おのおのの生薬についての西洋医学的アプローチにてその作用を明らかにした報告は少ない。

今回われわれは猪苓湯の成分を中心とした 7 生薬成

分を Coulter® Multisizer を用い、その蔞酸カルシウム結晶成長凝集阻止能を測定し、夏枯草および沢瀉の 2 成分にその強い阻止能を見いだした。平山らはラットの尿石形成に与える金錢草の抽出成分の影響について検討し、金錢草に CaOx 結石発生に対する抑制効果を報告している¹²²が、われわれの結果では前 2 者に比し弱い阻止能を認めた。夏枯草はソコ科のウツボグサの花穂もしくは全草を乾燥したもので、薬理作用として血圧降下作用、抗菌作用等があり、利尿消炎薬として応用されている。また沢瀉は、オモダカ科、サジオモダカの根茎で、成分としてアリストール A, B, C 等のトリテルペノイドと糖、でんぷん等を含み、利尿作用、抗脂肪肝作用が知られている。これらの構成成分あるいは未分析の含有物質のうち、何が結晶成長凝集阻止能を担っているのか、またその代謝経路および尿中排泄動態も現段階ではまったく不明である。また各種漢方成分の発現は、相加的、相乗的あるいは競合的に生体内に作用し、その結果として総合効果を発揮するという複雑なものであり、実際 in vitro での結果が生体投与に有効であるとは断定できない。しかし再発防止を目的とした場合、長期にわたる服用が必要とされるため、できるかぎり副作用の少ない薬剤が要求される点からは、漢方薬は非常に優れた薬剤と考えられる。

今後動物実験等の追加実験も含めて、さらに各種漢方成分の Medical Prophylaxis としての臨床応用にに向けて検討して行く予定である。

結 語

- 1) 各種漢方成分のなかには、in vitro にて強い結晶成長凝集阻止能を持つものが存在した。
- 2) 今回実験に用いた 7 成分中、夏枯草および沢瀉に低濃度においても、強い阻止能を認め、結石予防薬としての可能性が示唆された。
- 3) 各種エキスの阻止能と ABPP との間に相関は認められず、とくに沢瀉の成分中には GAG 以外の阻止物質の存在が示唆された。

文 献

- 1) 朝日俊彦, 荒木 徹, 陶山文三, はか: 尿路結石に関する臨床統計的観察 第 2 報: ツムラ猪苓湯とコスパノンの排石効果の比較検討. 西日泌尿 43: 631-635, 1981
- 2) 栗田 孝, 八竹 直, 郡健二郎: ツムラ猪苓湯の尿管結石排泄に及ぼす効果の検討. 泌尿紀要 27: 801-814, 1981
- 3) Robertson WG, Peacock M and Nordin

- BEC: Inhibitors of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* **43**: 31-37, 1973
- 4) Ryall RL, Bagley CJ and Marshall VR: Independent assessment of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals using the coulter counter. *Invest Urol* **18**: 401-405, 1981
- 5) Whiteman P: The quantitative determination of glycosaminoglycans in urine with alcian blue 8GX. *Biochem J* **131**: 351-357, 1973
- 6) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, ほか: 蔞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) 鈴木孝治, 宮澤克人, 津川龍三: 蔞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, 1980
- 8) Koide T, Yoshioka T, Oka T, et al.: Promotive effect of urine from patients with primary hyperparathyroidism on calcium oxalate crystal aggregation in an in vitro whole urine system. *J Urol* **140**: 1517-1574, 1988
- 9) 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
- 10) Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, et al.: Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: Experimental and clinical studies. *J Urol* **132**: 1140-1145, 1984
- 11) Lindsjö M, Fellström B, Ljunghall S, et al.: Treatment of enteric hyperoxaluria with calcium-containing organic marine hydrocolloid. *Lancet* **23**: 701-703, 1989
- 12) 平山英雄, 西 一彦, 王 植柔, ほか: ラットの尿石形成に及ぼす金錢草主成分 (Ds-t; Ds-a) の効果. *日泌尿会誌* **80**: 1971, 1989

(Received on February 18, 1991)
(Accepted on April 22, 1991)