

The Inhibitory Effect of Phosphocitrate on Experimental Calcium Oxalate Stone Formation in Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8310

Phosphocitrate の腎結石形成抑制効果に関する実験的研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

山口 一 洋

(平成4年1月22日受付)

Phosphocitrate の腎結石形成に及ぼす影響およびその尿中排泄, 50%致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 値についてラットを用いて検討した。Wistar 系雄性ラットに2.4%の高カルシウム食および1%エチレングリコール水を自由摂取させて腎結石形成モデルとした。これを4群に分け, それぞれに phosphocitrate 5 μ mol, クエン酸ナトリウム 5 μ mol, 500 μ mol (いずれも0.5ml), あるいは生理食塩水 0.5ml を連日腹腔内投与した。2週後に腎組織内のカルシウムおよび尿酸濃度を測定した。次に, phosphocitrate 25 μ mol を静脈内投与し, その尿中排泄について検討した。Phosphocitrate の測定にはイオンクロマトグラフィーを用いた。また, phosphocitrate の LD₅₀ 値などについても検討した。Phosphocitrate 投与群の腎組織内カルシウム濃度は, クエン酸ナトリウム 5 μ mol 投与群および生理食塩水投与群のそれに比し有意に低値であった。また, 腎組織内尿酸濃度についても, phosphocitrate 投与群は生理食塩水投与群に比し有意に低値であった。また, phosphocitrate の静脈内投与後に, 投与量の平均23.6%が24時間以内に未変化体のまま尿中へ排泄された。さらに, phosphocitrate の LD₅₀ 値は腹腔内投与において 700~800mg/kg, 静脈内投与において 100~150mg/kg の間と考えられた。この値は本実験における薬効発現用量の500倍以上であった。以上の成績は, phosphocitrate が安全域内の投与量にて腎における尿酸カルシウム結石の形成を抑制することを強く示唆しているものと考えられた。

Key words phosphocitrate, calcium oxalate stone, inhibitor of stone formation, hypercalciuria, hyperoxaluria

尿路結石症は泌尿器科領域における代表的な疾患の一つである。その治療方法は体外衝撃波結石破砕術の出現により著しく進歩したとはいえ, 再発率の高い疾患で, その予防に関しては未だに十分な成果を上げているとはいえない。本邦における尿路結石の約80%¹²⁾を占める尿酸カルシウム含有結石に関しては, ピロリン酸塩, フィチン酸塩, クエン酸塩, マグネシウム, グリコサミノグリカンなどが結石形成抑制物質³⁾として知られている。この中で再発予防法としてクエン酸療法⁴⁻⁷⁾, フィチンを含んでいる米糠療法^{8,9)}, あるいはグリコサミノグリカンの一種である sodium pentosan polysulphate 療法¹⁰⁾などが行われている。また, 尿中カルシウム排泄量の減少効果によるサイアザイド療法^{11,12)}も検討されているがいずれも満足できるものとはいえない。

著者はクエン酸に1個のリン酸基がエステル結合した物質で, 非晶質のリン酸カルシウムの結晶化を抑制するいろいろなリン酸化化合物の中でも最も強い抑制効果¹³⁾を有する phosphocitrate に着目し, この物質の尿酸カルシウム結石形成に及ぼす影響を実験的腎結石形成モデルラットを用いて検討した。さらに, 血清電解質およびクレアチニン濃度に及ぼす影響, 尿中カルシウムおよび尿酸排泄に及ぼす影響, 尿中排泄動態, および50%致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 値についても検討したので報告する。

材料および方法

I. Phosphocitrate の結石形成抑制効果, および血中, 尿中

パラメーターに及ぼす影響

Phosphocitrate は Tew ら¹⁴⁾の方法に準じて合成した。

実験動物には体重約200gのWistar系雄性ラットを用い, 各群5匹とした。被検ラットに2.4%のカルシウムを含有する高カルシウム食, および1%エチレングリコール含有水を自由摂取させ, 尿酸カルシウム結石形成モデルとした。実験群は以下の5群に分けた。A群からD群までの4群はこの結石形成モデルを使用し, A群には phosphocitrate 5 μ mol (0.5ml) を1日1回の用量で連日腹腔内投与した。B群およびC群にはクエン酸ナトリウムを投与し, その投与量はB群では5 μ mol, C群では500 μ mol (いずれも0.5ml) とした。D群には生理食塩水0.5mlのみを連日投与した。また, コントロール群にはカルシウム1.2%を含有する普通食, および蒸留水を自由摂取させ, 生理食塩水0.5mlを連日腹腔内投与した。1週および2週後に体重の変化および尿中のカルシウムと尿酸の排泄量を測定した。2週後, 麻酔下に下大動脈より採血し, 血清電解質およびクレアチニン濃度を測定した。さらに右腎を摘出し, その組織内カルシウムおよび尿酸濃度を測定した。また, 左腎はホルマリン固定後, glyoxal-bis (2-hydroxyanil) 染色^{15,16)}し, 組織内の尿酸カルシウム結晶を観察した。腎盂, 尿管および膀胱内に認められた結石は赤外分光光度計 IR-435 型 (島津製作所, 京都) を使用し, KBr 錠剤法による赤外分光分析にてその成分を同定した。

カルシウム濃度はオルトクレゾールフタレイコンプレクソン法¹⁷⁾, マグネシウム濃度はキシリジルブルー法¹⁸⁾, リン濃度は

Abbreviation: LD₅₀, median lethal dose

モリブデンブルー法¹⁹⁾、クレアチニン濃度は Folin-Wu 法²⁰⁾、尿酸濃度は尿酸酸化酵素法²¹⁾を用いて測定した。腎組織内のカルシウムおよび尿酸濃度は、摘出した右腎を 2N HCl 中で粉碎し、20% ズルフォサリチル酸で除蛋白したものを試料として用いた。

II. Phosphocitrate の定量法および尿中排泄

Phosphocitrate の定量法としては従来酵素的¹⁴⁾²²⁾または化学的定量法²³⁾が用いられてきたが、一般に誤差が大きく正確な測定は難しいため、新たにイオンクロマトグラフィーを用いての定量法を考案した。イオンクロマトグラフとしてイオンクロマトアナライザー Model IC 500 (横河電機、東京)を用い、カラムとしてプレカラムは PAM3-035 (4.6φ×30mm) (横河電機)、分離カラムは SAM3-035 (4.6φ×30mm) (横河電機)を使用した。また、カラム温度は40℃とした。サンプルを含む溶液 500 μl (8mM Na₂CO₃) を注入し、溶離液は 15mM Na₂CO₃ (1.5ml/min) を用い、溶離液の導電率を測定し、その測定カーブのピーク面積から phosphocitrate 量を求めた。上記の条件では phosphocitrate は11分付近にピークとして認められた。導電率のピーク面積と phosphocitrate の濃度の関係は0.05mg/ml から 1mg/ml の範囲で良好な直線性 ($r=0.998$) を示し、検出限界は 0.05mg/ml であった (図1)。カラムの再生は 30mM H₂SO₄ (2.5ml/min) で行った。

尿中 phosphocitrate の測定には尿 100 μl を前処理用の陰イオン交換カラム BOND ELUT (NH₂ phase, 100mg) (Varian Sample Preparation Products, Harbor, USA) に注入し、2ml の蒸留水で2回、さらに 2ml の 2mM Na₂CO₃ で2回洗浄した後、4ml の 8mM Na₂CO₃ で溶出した。溶出液 500 μl を上記のイオンクロマトグラフで測定した。この前処理によってイオンクロマトグラフでの phosphocitrate 定量の妨害物質がほぼ完全に除去でき、しかも標準液と同様のピークを得ることができた (図2)。

そこで、被検ラット (5匹) に phosphocitrate 25 μmol (0.5

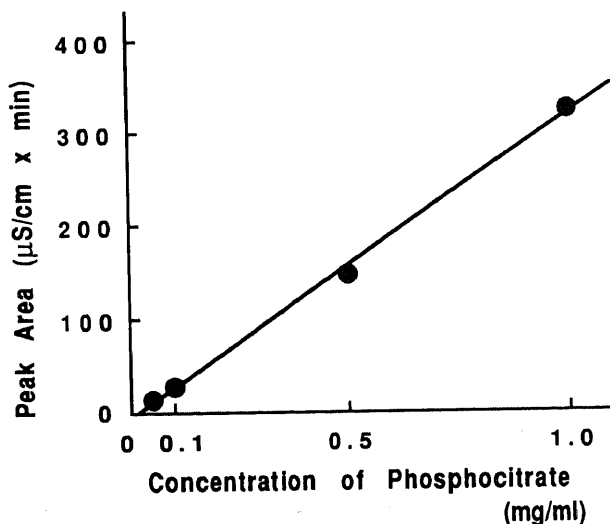


Fig. 1. Standard curve for phosphocitrate. Standard solutions of phosphocitrate (0.05 to 1.0mg/ml) were injected into an ion-chromatograph, and change in conductivity was measured. The peak area corresponding to phosphocitrate was calculated. $y = -5.3224x + 324.17x$, $r = 0.998$

ml) を静脈内投与し、24時間毎に4日後まで採尿し、その尿中排泄量を測定した。次に、高カルシウム食および1%エチレングリコール含有水を自由摂取させた結石形成モデルラット (5匹) を用い、phosphocitrate 25 μmol (0.5ml) を14日間連続腹腔内投与し、1, 3, 7および14日目に採尿し、その尿中排泄量を測定した。

III. Phosphocitrate の LD₅₀ 値および投与時の一般状態

Phosphocitrate の安全性を確認する目的でラットにおける LD₅₀ 値および投与時の一般状態について検討した。Phosphocitrate を生理食塩水に溶解し、1N NaOH で pH 7 に調整した。投与経路は腹腔および静脈内投与の2経路とした。投与量については腹腔内投与の場合、500mg/kg から 1,000mg/kg までの5用量を、また静脈内投与の場合、50mg/kg から 300mg/kg までの4用量を設定した。投与直後から3日間毎日一般状態を観察した。

IV. 統計学的検定法

実験結果の統計学的処理は対応のある t-検定および Dunnett 多重比較法により行った。

成 績

1. Phosphocitrate の結石形成および血中、尿中パラメーターに及ぼす影響

1. 体重の推移 (図3)

1週および2週後ともに、結石形成モデル群 (A, B, C および D 群) はコントロール群に比し、いずれも43~84%の体重増加抑制 (いずれも $p < 0.01$) が認められたが、これらの4群間には有意差は認められなかった。

2. 血清中電解質およびクレアチニン濃度 (表1)

結石形成モデル群 (A, B, C および D 群) の実験終了時における血清カルシウムおよびクレアチニン濃度は、コントロール

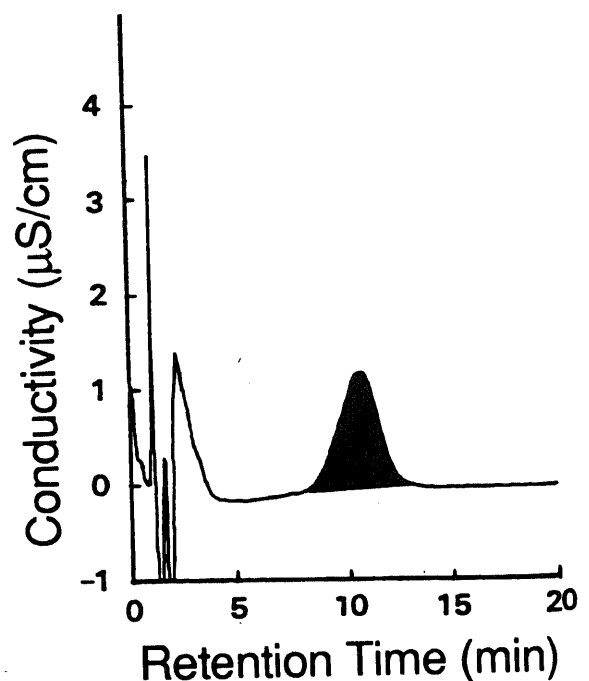


Fig. 2. Typical ion-chromatogram of urine containing phosphocitrate (0.5mg/ml).

群に比し、いずれも高値を示したが、有意差は認められなかった。A 群と D 群との比較において、いずれの項目においても有意差は認められなかった。

3. 尿中カルシウムおよび尿酸排泄量

尿中カルシウム排泄量は、A, B, C および D 群ともに実験開始前より、1 週および 2 週後においていずれも 2.2~5.6 倍の増加 ($p < 0.01$ または $p < 0.05$) が認められたが、A 群と他の 3 群間には有意差は認められなかった (図 4)。

また、尿中尿酸排泄量も各群ともに 1 週および 2 週後において実験開始前よりいずれも 4.2~7.0 倍の増加 ($p < 0.01$ または $p < 0.05$) が認められた。各群間の比較では、1 週後において A 群は D 群に比し 1.5 倍の高値 ($p < 0.05$) を示したが、そのほかの群間には、有意差は認められなかった。2 週後においては、いずれの群間においても有意差は認められなかった (図 5)。

4. 腎組織内カルシウム濃度 (図 6)

結石形成モデル群 (A, B, C および D 群) ではコントロール群に比し、いずれも 14~22 倍の高値 (いずれも $p < 0.01$) を示した。また、5 μ mol の phosphocitrate を投与した A 群では、生理食塩水投与群 (D 群) はもちろん、5 μ mol クエン酸ナトリウム投与群 (B 群) に比し、それぞれ 37%, 39% の低下 (いずれも $p < 0.01$) を認めた。500 μ mol のクエン酸ナトリウムを投与した C 群は、B 群および D 群より低値を示したが有意差は認め

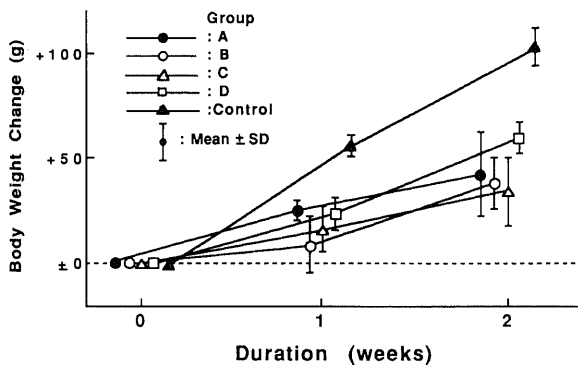


Fig. 3. Change in body weight. Values are given as the mean \pm SD. Group A, high calcium diet + 1% ethylene glycol solution + phosphocitrate (5 μ mol/day); Group B, high calcium diet + 1% ethylene glycol solution + sodium citrate (5 μ mol/day); Group C, high calcium diet + 1% ethylene glycol solution + sodium citrate (500 μ mol/day); Group D, high calcium diet + 1% ethylene glycol solution + isotonic saline (0.5ml/day); Control, middle calcium diet + distilled water + isotonic saline (0.5ml/day).

Table 1. Serum electrolytes and creatinine levels at the end of experiment

Group	Serum level of			
	Calcium (mg/dl)	Phosphate (mg/dl)	Magnesium (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
A	8.5 \pm 0.3	7.7 \pm 0.7	2.4 \pm 0.5	0.9 \pm 0.3
B	8.3 \pm 1.3	7.0 \pm 1.5	1.2 \pm 0.8	0.8 \pm 0.1
C	8.1 \pm 0.2	6.7 \pm 1.1	2.4 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3
D	8.8 \pm 0.8	8.6 \pm 0.6	2.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
Control	7.5 \pm 0.8	9.1 \pm 1.1	1.7 \pm 0.8	0.5 \pm 0.1

Values are given as the mean \pm SD.

られなかった。

血清カルシウム濃度とコントロール群の腎組織内カルシウム濃度はほぼ同程度であり、しかも結石形成モデル群でも血清カルシウム濃度はさほど変化がないことより、腎組織内カルシウム濃度の差は腎組織あるいは腎盂内でのカルシウムの存在の違いによるものと考えられた。

5. 腎組織内尿酸濃度 (図 7)

結石形成モデル群 (A, B, C および D 群) ではコントロール群に比し、いずれも 16~20 倍の高値 (いずれも $p < 0.01$) を示した。また、5 μ mol の phosphocitrate を投与した A 群は、生理食塩水投与群 (D 群) に比し 19% の低下 ($p < 0.05$) を認めたが、B 群および C 群に対しては低値を示したが、有意差は認められなかった。また、B 群、C 群および D 群の 3 群間には有意差は認められなかった。

6. 結石成分

結石形成モデル群における腎盂、尿管および膀胱内の結石の成分は、すべて尿酸カルシウムであった。また、glyoxal-bis (2-hydroxyanil) 染色では、拡張した遠位尿細管内に赤色に染ま

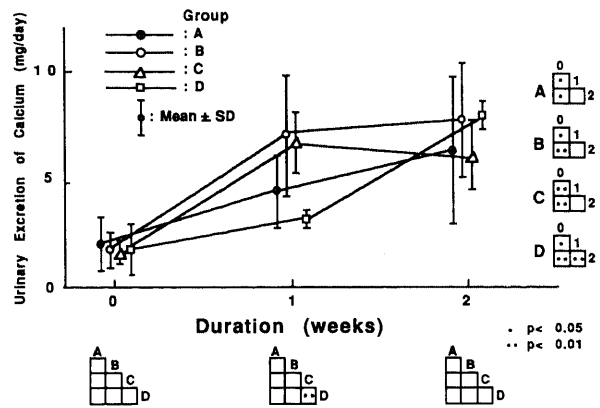


Fig. 4. Profile of urinary excretion of calcium. Values are given as the mean \pm SD. Group A, B, C or D are rats receiving daily intraperitoneal injections of 5 μ mol phosphocitrate, 5 μ mol or 500 μ mol sodium citrate or 0.5ml isotonic saline respectively.

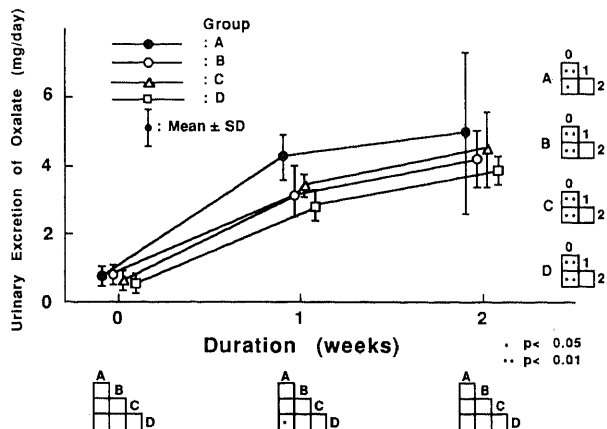


Fig. 5. Profile of urinary excretion of oxalate. Values are given as the mean \pm SD. Group A, B, C or D are rats receiving daily intraperitoneal injections of 5 μ mol phosphocitrate, 5 μ mol or 500 μ mol sodium citrate or 0.5ml isotonic saline respectively.

る尿酸カルシウム結晶が多数認められた (図 8)。

II. Phosphocitrate の尿中排泄

Phosphocitrate 25 μ mol を静脈内に投与したラットでの尿中排泄率は、24時間以内に最大31.4%、最小11.0%、平均23.6%であった (表 2)。24時間以後の尿中には phosphocitrate は検出されなかった。また、結石形成モデルラットにおける14日間連続腹腔内投与においては、一日の尿中排泄率は平均値で最大40.2%、最小10.0% (図 9) と静脈内投与時とほぼ同様であった。3日目および7日目の排泄率は1日目および14日目より著明に低下していた。

III. Phosphocitrate の LD₅₀ 値および投与時の一般状態

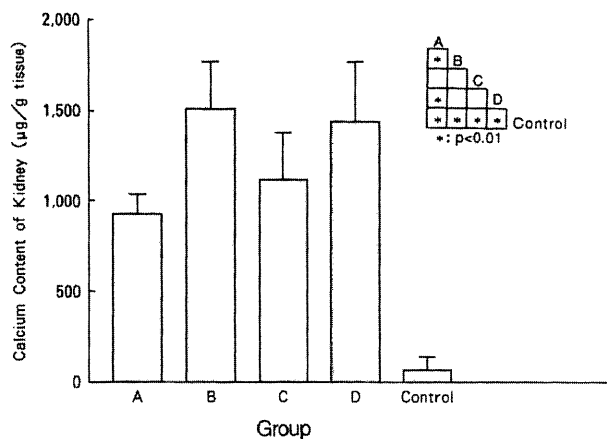


Fig. 6. Calcium content in kidney. Values are given as the mean+SD. Group A, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+phosphocitrate (5 μ mol/day); Group B, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+sodium citrate (5 μ mol/day); Group C, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+sodium citrate (500 μ mol/day); Group D, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+isotonic saline (0.5ml/day); Control, middle calcium diet+distilled water+isotonic saline (0.5ml/day).

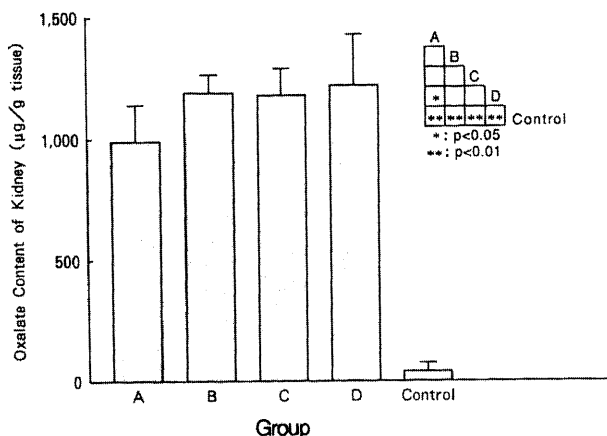


Fig. 7. Oxalate content in kidney. Values are given as the mean+SD. Group A, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+phosphocitrate (5 μ mol/day); Group B, high calcium diet +1% ethylene glycol solution+sodium citrate (5 μ mol/day); Group C, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+sodium citrate (500 μ mol/day); Group D, high calcium diet+1% ethylene glycol solution+isotonic saline (0.5ml/day); Control, middle calcium diet+distilled water+isotonic saline (0.5ml/day).

各群における死亡頻度および LD₅₀ 値を表 3 に示した。Phosphocitrate の LD₅₀ 値は、腹腔内投与で 700~800mg/kg、静脈内投与で 100~150mg/kg の間と考えられた。

また、phosphocitrate 投与時の一般状態および死亡状況としては、腹腔内投与では全群に自発運動の低下および腹臥が認められ、800mg/kg 群では投与3時間以内に全例が死亡し、また1,000mg/kg 投与群ではさらに痙攣が認められ、投与10分以内に死亡した。700mg/kg 以下の群では投与後3時間以内に正常

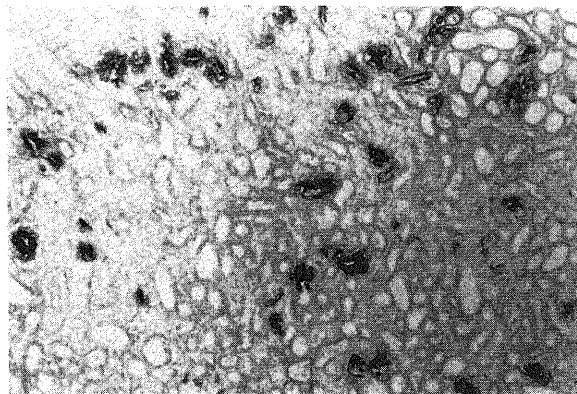


Fig. 8. Calcified kidney of group A rat stained with glyoxal-bis (2-hydroxyanil). Red granules were observed in the renal tubules. ($\times 40$)

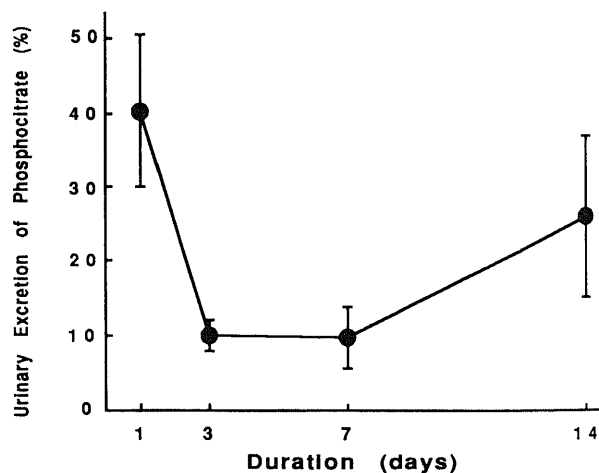


Fig. 9. Change in urinary excretion of phosphocitrate. Values are given as the mean \pm SD.

Table 2. Urinary excretion of intravenously administered phosphocitrate within 24 hours

Rat number	Urinary excretion of phosphocitrate		
	Concentration (mg/ml)	Content (mg/day)	Excretion rate (%)
1	0.23	3.57	30.9
2	0.24	2.97	25.7
3	0.31	3.63	31.4
4	0.15	2.20	19.0
5	0.10	1.27	11.0
Mean \pm SD	0.21 \pm 0.07	2.73 \pm 0.89	23.6 \pm 7.73

Table 3. LD₅₀ values of phosphocitrate in rats

Injection route ^{a)}	Dose injected (mg/kg)	Mortality ^{b)}	LD ₅₀ (mg/kg)
ip	1,000	5/5	700~800
	800	5/5	
	700	0/5	
	600	0/5	
	500	0/5	
iv	300	2/2	100~150
	150	5/5	
	100	0/5	
	50	0/5	

^{a)} ip, intraperitoneal; iv, intravenous.

^{b)} Number of dead rats/number of rats tested.

に復した。さらに、静脈内投与では、150mg/kg 以上の群では投与中に呼吸困難あるいは痙攣がみられ、投与直後に全例が死亡した。100mg/kg 以下の群では一般状態に特に異常は認められなかった。

考 察

1959年に Meyer ら²³⁾ が初めて phosphocitrate を合成して以来、この物質の生体内における役割についていろいろと論じられている。Phosphocitrate はラット肝細胞、腎細胞および腸細胞のミトコンドリア内に存在が確認されており²⁴⁾、その磷酸カルシウムの結晶化に対する強い抑制効果¹³⁾ によって、そこでの磷酸カルシウムの結晶化を抑制する²⁵⁾ と言われている。さらに、骨の石灰化に関する影響²⁶⁾ や大動脈の石灰化の抑制²⁷⁾ などについての研究がなされている。

尿路結石に関しては、1976年に Howard²⁸⁾ が尿中にはマグネシウムやクエン酸など磷酸カルシウム結晶の成長を抑制する物質があるが、これらよりもさらに強力な物質があり、これが phosphocitrate であろうと推論したのが本物質に関する研究の始まりである。その後、基礎実験においては磷酸カルシウム結晶に対する成長抑制効果¹⁴⁾ が、さらに動物実験においても磷酸カルシウム結石の形成抑制効果²⁹⁾ が報告されている。また Sallis ら³⁰⁾ は感染結石においてもその成長を抑制すると報告している。

しかしながら、磷酸カルシウム結石に対する効果については未だ一定の見解がない。Williams ら²¹⁾ は基礎実験において磷酸カルシウム結晶の成長を抑制したと報告しているが、一方 Brown ら²⁹⁾ は、磷酸ナトリウムを腹腔内投与する磷酸結石形成モデルラットにおいて、phosphocitrate は抑制効果を示さなかったと延べている。しかし、この実験モデルは phosphocitrate 投与5時間後に抑制効果の判定をしているため、長時間を要する結石形成のモデルとして適当とはいえないと考えられる。

今回の検討では、2週間という比較的長期にわたって結石形成促進物質を投与する方法を用いた。つまり、Gershoff ら³¹⁾ が結石形成モデルに使用して以来よく使われているエチレングリコールを投与し高磷酸尿症を惹起するとともに、高カルシウム食を与え、高カルシウム尿症を引き起こすことによって磷酸カルシウム結石を形成させた。形成された結石は赤外分光分析お

よび glyoxal-bis(2-hydroxyanil) 染色によって磷酸カルシウム結石であることを確認した。腎組織内のカルシウムおよび磷酸濃度ともに、phosphocitrate を投与した群は生理食塩水を投与した群に比し有意に低値であり、phosphocitrate の投与により磷酸カルシウム結石の形成が抑制されると考えられた。一方、現在臨床において使用されているクエン酸ナトリウムに関しては、phosphocitrate と同モルの投与のみならず、臨床的投与量の約10倍にあたる 500 μmol 投与においても生理食塩水投与群との間に、腎組織内カルシウム濃度、磷酸濃度ともに有意差は認められず、今回の検討においては結石形成抑制効果は認められなかったと言わざるを得ない。

Phosphocitrate のこうした結石形成抑制作用の一つは、そのカルシウムイオンとのキレート作用によるものと考えられる。すなわち、尿路結石形成には尿中因子が重要であり、今回の検討では phosphocitrate は尿中に投与量の10~40%が未変化体のまま排泄されており、尿中に排泄された phosphocitrate が、腎尿管レベルにおいて、Williams ら²¹⁾ の述べるごとく、磷酸カルシウム結晶の成長を抑制し、その結果として結石形成を抑制したものと考えている。また、もう一つの作用としては、磷酸カルシウム結石の形成過程において、初期の磷酸カルシウム結晶の形成が重要視されており^{32,33)}、phosphocitrate がこの磷酸カルシウム結晶の形成を抑制することによって、磷酸カルシウムの不均一核生成を抑制することが考えられる。一方、フィチン酸塩やサイアザイドなどは尿中カルシウム排泄量を減少させることにより、結石形成抑制効果を期待するのに対し、phosphocitrate は尿中のカルシウムおよび磷酸排泄量や血清カルシウム濃度に対してはほとんど影響を及ぼさず、こうした結石形成における危険因子を排除することによって結石形成を抑制するものではないと考えられる。

ところで、phosphocitrate の定量法として従来用いられていた酵素的測定法^{14,22)} や化学的測定法²²⁾ は、アルカリホスファターゼあるいは硫酸での加水分解によって phosphocitrate を分解し、その後クエン酸として定量することにより、phosphocitrate の濃度を求める方法であった。このため、クエン酸を含んだ溶液においては加水分解前後のクエン酸量の差が phosphocitrate の値となり、尿のようなクエン酸を多く含んだ検体の測定には誤差が多くなり不適当と言える。今回、著者が用いた測定方法は前処置として陰イオン交換カラムにて尿を処理した後、イオンクロマトグラフにて phosphocitrate を直接測定するため、クエン酸の影響を排除することができ、しかも比較的容易に行えることより、極めて有用な方法と考えられた。

Phosphocitrate の体内動態に関して、本物質は静脈内投与5分後に約15%が腎に取り込まれること²⁴⁾ が報告されているが、その尿中排泄についての検討は未だ報告を見ない。今回の検討で、本物質の単回静脈内投与において投与量の平均約24%が尿中に排泄されることが確認され、また、今回の結石形成モデルラットにおける投与経路である連日腹腔内投与においても10~40%の尿中排泄が認められ、この磷酸カルシウム結石形成抑制作用は、尿中に排泄された未変化の phosphocitrate によるものと思われた。

さらに LD₅₀ 値の検討で、phosphocitrate のラットにおける腹腔内投与での LD₅₀ 値は 700~800mg/kg の間と考えられた。クエン酸ナトリウムの LD₅₀ 値は 1,548mg/kg³⁴⁾ であり、phosphocitrate はクエン酸ナトリウムより約2倍毒性が強いこ

とがわかった。しかし、今回の検討で尿酸カルシウム結石の形成を抑制した投与量は約1.2mg/kgであり、LD₅₀値とは約500倍以上のひらきがあることより、安全域内の投与量で結石形成抑制効果が期待できる結果であった。また、phosphocitrate投与時の一般状態および死亡状況はクエン酸ナトリウム投与時の状態³⁾と類似しており、phosphocitrateの急性毒性にはクエン酸ナトリウムと比較し特異的な作用を示すものは認められなかった。さらに、結石形成抑制実験において血清電解質およびクレアチニン濃度や体重の推移にも影響を与えなかったことより、本物質の臨床への応用が期待される。

結 論

高カルシウム食およびエチレングリコールを用いたラット尿酸カルシウム結石形成モデルにおいて、phosphocitrateの投与が腎組織内のカルシウムおよび尿酸濃度を減少させたことより、phosphocitrateは尿酸カルシウム結石の形成を抑制するものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師久住治男教授に深甚なる謝意を表します。終始御教示、御助言をいただいた本学生化学第二教室久野滋名誉教授に深く感謝致します。さらに、直接御指導、御助言を賜りました当教室大川光央助教授に深謝致します。また、本研究に御協力頂きました土田貴夫技官、田中耕一技官に感謝します。

なお、本論文の要旨は第32回日本腎臓学会総会および第79回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Yoshida, O. & Okada, Y.: Epidemiology of urolithiasis in Japan: a chronological and geographical study. *Urol. Int.*, **45**, 104-111 (1990).
- 2) 山口一洋, 大川光央, 折戸松男, 布施春樹, 中嶋孝夫, 徳永周二, 久住治男: 尿路結石症の結石成分を中心とした臨床的検討. *日腎誌*, **30**, 375-383 (1988).
- 3) Fleisch, H.: Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int.*, **13**, 361-371 (1978).
- 4) Butz, M.: Oxalatsteinprophylaxe durch Alkali-Therapie. *Urologe (A)*, **21**, 142-146 (1982).
- 5) Pak, C. Y. C., Fuller, C., Sakhaee, K., Preminger, G. M. & Britton, F.: Long-term treatment of calcium nephrolithiasis with potassium citrate. *J. Urol.*, **134**, 11-19 (1985).
- 6) Preminger, G. M., Harvey, J. A. & Pak, C. Y. C.: Comparative efficacy of "specific" potassium citrate therapy versus conservative management in nephrolithiasis of mild to moderate severity. *J. Urol.*, **134**, 658-661 (1985).
- 7) 大川順正, 戒野庄一, 森本鎮義, 安川 修, 園田孝夫, 小出卓生, 岡 聖次, 阿曾佳郎, 東原英二, 北川龍一, 小川由英, 諸角誠人, 田島 惇, 牛山知巳, 八竹 直, 有馬 滋, 竹内正文, 若月 晶, 西尾俊治, 亀井 修, 阿部雄吉: 尿路結石症に対するクエン酸製剤 (CG-120) 療法の多施設共同臨床試験: 1. 臨床成績. *泌尿紀要*, **34**, 905-917 (1988).
- 8) Ohkawa, T., Ebisuno, S., Kitagawa, M., Morimoto, S. & Miyazaki, Y.: Rice bran treatment for hypercalciuric patients with urinary calculous disease. *J. Urol.*, **129**, 1009-1011 (1983).
- 9) Ebisuno, S., Morimoto, S., Yoshida, T., Fukatani, T., Yasukawa, S. & Ohkawa, T.: Rice-bran treatment for calcium stone formers with idiopathic hypercalciuria. *Br. J. Urol.*, **58**, 592-595 (1986).
- 10) 深谷俊郎: 尿路結石症における sodium pentosan polysulphate (SPP) 療法の研究 尿酸カルシウム結晶に対する作用の実験的研究並びに正常人における投与効果の検討. *日泌尿会誌*, **82**, 246-253 (1991).
- 11) Yendt, E. R. & Cohanin, M.: Prevention of calcium stones with thiazides. *Kidney Int.*, **13**, 397-409 (1978).
- 12) Ohkawa, M., Tokunaga, S., Nakashima, T., Orito, M. & Hisazumi, H.: Thiazide treatment for calcium urolithiasis formation in patients with idiopathic hypercalciuria. *Br. J. Urol.*, in Press.
- 13) Williams, G. & Sallis, J. D.: Structure-activity relationship of inhibitors of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.*, **184**, 181-184 (1979).
- 14) Tew, W. P., Mahle, C., Benavides, J., Howard, J. E. & Lehninger, A. L.: Synthesis and characterization of phosphocitric acid, a potent inhibitor of hydroxylapatite crystal growth. *Biochemistry*, **19**, 1983-1988 (1980).
- 15) Kashiwa, H. K. & Atkinson, W. B.: The applicability of a new schiff base, glyoxal bis (2-hydroxy-anil), for the cytochemical localization of ionic calcium. *J. Histochem. Cytochem.*, **11**, 258-264 (1963).
- 16) Kabra, V., Chaturvedi, R. P., Bhargava, A. P., Banerji, P., Bhargava, A., Rathore, M. S. & Kabra, S. G.: Staining with glyoxal bis-(2-hydroxy-anil) to identify calcium oxalate in urinary stones. *Indian J. Exp. Biol.*, **19**, 779-781 (1981).
- 17) Connerty, H. V. & Briggs, A. R.: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 290-296 (1966).
- 18) Mann, C. K. & Yoe, J. H.: Spectrophotometric determination of magnesium with sodium 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylcarboxanilido)-naphthalene-1'-(2-hydroxybenzene-5-sulfonate). *Anal. Chem.*, **28**, 202-205 (1956).
- 19) Taussky, H. H. & Shorr, E.: A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **202**, 675-685 (1953).
- 20) Bonsnes, R. W. & Taussky, H. H.: On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.*, **158**, 581-591 (1945).
- 21) Crider, Q. E. & Curran, D. F.: Simplified method for enzymatic urine oxalate assay. *Clin. Biochem.*, **17**, 351-355 (1984).
- 22) Williams, G. & Sallis, J. D.: The synthesis of unlabeled and ³²P-labeled phosphocitrate and analytical systems for its identification. *Anal. Biochem.*, **102**, 365-373 (1980).
- 23) Meyer, J., Bolen, R. J. & Stakelum, I. J. Jr.: The synthesis of citric acid phosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2094-2096 (1959).

- 24) Williams, G. & Sallis, J. D.: The sources of phosphocitrate and its role as an inhibitor of calcium phosphate and calcium oxalate crystallization. *In* L. H. Smith, W. G. Robertson & B. Finlayson (eds.), *Urolithiasis, Clinical and Basic Research*, 4th ed., p569-577, Plenum Press, New York, 1981.
- 25) Tew, W. P., Malis, C. D., Howard, J. E. & Lehninger, A. L.: Phosphocitrate inhibits mitochondrial and cytosolic accumulation of calcium in kidney cells *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5528-5532 (1981).
- 26) Reddi, A. H., Meyer, J. L., Tew, W. P., Howard, J. E. & Lehninger, A. L.: Influence of phosphocitrate, a potent inhibitor of hydroxyapatite crystal growth, on mineralization of cartilage and bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 154-159 (1980).
- 27) Shankar, R., Crowden, S. & Sallis, J. D.: Phosphocitrate and its analogue N-sulpho-2-amino tricarballoylate inhibit aortic calcification. *Atherosclerosis*, **52**, 191-198 (1984).
- 28) Howard, J. E.: Studies on urinary stone formation: a saga of clinical investigation. *Johns Hopkins Med. J.*, **139**, 239-252 (1976).
- 29) Brown, M. R. & Sallis, J. D.: N-sulfo-2-amino tricarballoylate, a new analog of phosphocitrate: metabolism and inhibitory effects on renal calcification. *In* P. O. Schuille, L. H. Smith, W. G. Robertson & W. Vahlensieck (eds.), *Urolithiasis and Related Clinical Research*, 5th ed., p891-894, Plenum Press, New York, 1985.
- 30) Sallis, J. D., Thomson, R., Rees, B. & Shankar, R.: Reduction of infection stones in rats by combined antibiotic and phosphocitrate therapy. *J. Urol.*, **140**, 1063-1066 (1988).
- 31) Gershoff, S. N. & Andrus, S. B.: Effect of vitamin B₆ and magnesium on renal deposition of calcium oxalate induced by ethylene glycol administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **109**, 99-102 (1962).
- 32) Chambers, A., Hodgkinson, A. & Hornung, G.: Electron probe analysis of small urinary tract calculi. *Invest. Urol.*, **9**, 376-384 (1972).
- 33) Malek, R. S. & Boyce, W. H.: Observations on the ultrastructure and genesis of urinary calculi. *J. Urol.*, **117**, 336-341 (1977).
- 34) Gruber, C. M. Jr. & Halbeisen, W. A.: A study on the comparative toxic effects of citric acid and its sodium salts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **94**, 65-67 (1948).

The Inhibitory Effect of Phosphocitrate on Experimental Calcium Oxalate Stone Formation in Rats Kazuyou Yamaguchi, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **101**, 189—195 (1992)

Key words phosphocitrate, calcium oxalate stone, inhibitor of stone formation, hypercalciuria, hyperoxaluria

Abstract

The inhibitory potential of phosphocitrate against calcium oxalate stone has been experimentally studied in rats. Male Wistar-strain rats, which had been fed a high-calcium diet (2.4% calcium) and distilled water containing 1% ethylene glycol, *ad libitum*, developed marked urinary calculi within 2 weeks. The rats were divided into 4 groups that received daily intraperitoneal injections of either 5 μ mol phosphocitrate, 5 μ mol or 500 μ mol sodium citrate or 0.5 ml isotonic saline. Two weeks later, animals from the four groups were sacrificed, and their right kidneys were removed for determination of calcium and oxalate content. The urinary excretion of phosphocitrate was measured following the intravenous administration of 25 μ mol phosphocitrate by ion chromatography. Significant differences in the calcium content of the kidneys were found between the phosphocitrate group and the 5 μ mol sodium citrate group or the isotonic saline group. There was also a significant difference in the oxalate content between the phosphocitrate group and the isotonic saline group. The mean urinary excretion rate of intravenously administered phosphocitrate within 24 hours was 23.6%. The LD₅₀ values of phosphocitrate ranged from 700 to 800 mg/kg and from 100 to 150 mg/kg in the intraperitoneal and intravenous administration groups, respectively. The former value was more than 500 times as high as the effective dosage in the present study. These results suggest that phosphocitrate can inhibit calcium oxalate stone formation at safe doses.