尿中物質とグリコサミノグリカンスの蔭酸

カルシウム結晶の凝集に対する作用

徳島大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 香川 征教授)

白根由美子 山本 晶弘 水田 耕治 香川 征

EFFECT OF URINARY MATERIAL AND GLYCOSAMINOGLYCANS ON CALCIUM OXALATE MONOHYDRATE CRYSTAL AGGREGATION

Yumiko Shirane, Akihiro Yamamoto, Koji Mizuta and Susumu Kagawa

Department of Urology, School of Medicine, University of Tokushima, Tokushima, Japan

We have examined by the coulter counter method whether some substances promote or inhibit calcium oxalate monohydrate crystal aggregation. The substances tested were hyaluronic acid, chondroitin sulfate and urinary lyophilized material of <10 k dalton fractions having aggregate activity. As a result, hyaluronic acid promoted aggregation at low concentrations but inhibited it at higher concentrations, and chondroitin sulfate only inhibited it. They seem, therefore, to have quite different effects, depending on their urinary concentrations, on calcium oxalate crystal aggregation process. However, urinary fractions only promoted aggregation in a dose-response manner. This promoting effect might be caused by not only hyaluronic acid that was contained in the fractions but also by some other promoters.

要旨: 人尿より調製した尿凝集能画分, ヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸の蔭酸カルシウム結晶凝集に対する作用を Coulter multisizer を用いて検討し, 次の結果を得た. (1) ヒアルロン酸はほぼ $10^{-1}\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を境として低濃度側では促進作用を高濃度側で抑制作用を示した. (2) コンドロイチン硫酸は $10^{-2}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で抑制作用を示した. (3) 尿凝集能画分は添加量の増加に伴い平均粒径を増大させ凝集促進作用を示した. この場合はヒアルロン酸の場合にみられる高濃度における凝集抑制はみられなかった. 以上の結果よりヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸はそれぞれの尿中濃度では蔭酸カルシウム結晶凝集過程において異なる作用を有すること, また尿凝集能画分には, そこに含まれているヒアルロン酸以外の凝集促進因子の存在が示唆された.

緒 言

カルシウム (Ca) 含有結石のマトリックス中に存在するグリコサミノグリカンス (GAG) はヒアルロン酸 (HA) とヘパラン硫酸 (HS) が主成分であり, それらは結石成分により, 選択的に含まれていると報告されている^{1)~3)}. また尿中の GAG 組成比率とは異なり尿中 GAG の主成分であるコンドロイチン硫酸 (ChS) を含んでいない. 著者らは人尿から得られる蔭酸カルシウム一水化物 (CaOX) 結晶を凝集させる画分には HA が存在することを報告した⁴⁾⁵⁾. 本研究では, 尿凝集能画分と HA 及び ChS の CaOX 結晶凝集に対する作用について検討し興味ある結果を得たので報告する.

実験材料と方法

1. 実験材料

1) 試料の尿凝集能画分は結石患者尿をすでに報告した方法⁴⁾⁵⁾に従ってゲル濾過し, 一定期間経過後, 凝集能を有する画分を凍結乾燥したものをを用いた. GAG の標準品としては K-HA (生化学工業) と Na-ChS (C) (生化学工業) をを用いた.

2) CaOX 結晶けん濁液は, $\text{CaOX} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (和光純薬) 150mg を乳鉢で細粉とした後, 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (NaCl 100mM 含む, pH 5.7) を100ml 加え超音波処理1時間, 5日以上スターラー攪拌したものを使用した.

3) Metastable solution は上記50mM 酢酸ナトリウ

ム緩衝液(pH 5.7)に別々に溶解した2mM CaCl_2 溶液, 0.4mM $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液を使用直前に同量ずつ混合し0.22 μm フィルターを通した。なお, Caを2mM, 4mM含む metastable solution の場合は, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ は0.1mM, 0.05mM 含むように調製した。すなわち Ca 濃度と尿酸濃度の積は一定となるようにした。

2. 実験方法

1) Coulter counter による結晶凝集能の測定

100ml 容量ビーカーに metastable solution 48.5 ml, 試料0.1~0.5ml(対照は蒸留水0.5ml), CaOX けん濁液1mlを加え, スターラー攪拌しながら37℃, 1時間反応させた後, Coulter multisizer (Coulter electronic 社)を使用して反応液中の CaOX 結晶の平均粒径(重量分布)を測定した。値は対照実験の平均粒径の増大分を100%としそれに対する増大率で示した。

2) 回転攪拌法による結晶凝集能の測定

20ml 容量液シンバイアルに metastable solution 9 ml, 試料0.01~0.2ml(対照は蒸留水0.2ml), CaOX けん濁液0.8mlを加え37℃, 1時間回転攪拌(44rpm)(ローテータ R-50, 大洋科学工業)した後拡大鏡にてバイアル底部の CaOX 結晶の状態を観察した。

結 果

1. HA は 5×10^{-3} ~約 $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ の濃度では平均粒径の増大率が100%を超えており $2 \times 10^{-2}\mu\text{g/ml}$ で最高126%を示し凝集が促進されたが, $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 以上では凝集が抑制された(Fig. 1)。回転攪拌法でも 8×10^{-2} ~ $2 \times 10^{-1}\mu\text{g/ml}$ で小球体の形成が認められ, 濃度が高くなると微細結晶数の増加とコロイド類似状態が観察された。

また, Ca濃度と尿酸濃度の積を一定($[\text{Ca}] \times [\text{OX}] = 0.2$)に保ちながら Ca 濃度を1, 2, 4mMと増加させると, 凝集抑制の起こり始める HA 濃度が高濃度側に移動した(Fig. 2)。

2. ChS では測定した $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で平均粒径の増大率が100%以下となり凝集を抑制した。 $10\mu\text{g/ml}$ では添加時の平均粒径に近い値を示した(Fig. 1)。

3. 尿凝集能画分では添加量の増加(0.3~9.4 $\mu\text{g/ml}$)と平均粒径の増大との間に正の相関が認められ凝集が促進された(Fig. 3)。9.4 $\mu\text{g/ml}$ における増大率は164%であった。回転攪拌法では5 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で小球体形成及び凝集体が認められたがそれ以上の濃度では微細結晶のコロイド類似状態が観察された。

Fig. 1 Effect of glycosaminoglycans on calcium oxalate crystal aggregation. ○, hyaluronic acid; ●, chondroitin 6-sulfate.

Fig. 2 Effect of hyaluronic acid on calcium oxalate crystal aggregation with various amounts of Ca. The amounts of Ca: ○, 1mM; ●, 2mM; △, 4mM.

Fig. 3 Effect of urinary material on calcium oxalate crystal aggregation.

考 察

HA の CaOX 結晶凝集に対する作用は, 低濃度では促進作用を, 高濃度では抑制又は分散作用を示し濃度により全く逆の作用を有していることが明らかになっ

た、凝集を促進する濃度は正常人尿中の濃度に近く¹⁾、このことから生理的にも HA が CaOX 結石形成に関与している可能性が一層強められた。Bisaz らは自然凝集させたハイドロキシアパタイトに HA を添加しその解凝集作用を調べたところ、低濃度 ($10^{-2} \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$) では凝集を促進するが、より高濃度では解凝集作用を示したと報告している⁶⁾。解凝集作用が認められる HA 濃度は著者らの凝集抑制作用の認められる濃度の約80倍であるが、これはすでに凝集した結晶に反応させていること及び Ca 濃度も使用した結晶種も著者らと異なることによるとと思われる。[Ca] $\times$ [OX] = 0.2とした条件で Ca 濃度を増加させると HA 濃度が高くなっても凝集促進作用を示すようになる。この現象から、異常に高い HA 濃度を有する副甲状腺機能亢進症 (HPT) 患者尿⁷⁾から結石が形成されているのは、同時に Ca 濃度も高くなっているために HA が凝集抑制作用よりも凝集促進作用を示すためと考えられる。事実、Koide らは HPT 患者尿が CaOX 結晶凝集に促進効果を示したと報告している⁸⁾。また正常人、Ca 結石患者とも尿中 Ca 濃度は 1mM 以上であり $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ より高い HA 濃度でも凝集促進作用を示すと考えられる。

CaOX 結晶の成長・凝集の抑制物質と考えられている ChS は Fig. 1 に示すように正常人尿中濃度に一致する濃度 ($1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$)¹⁾では添加時の平均粒径に近い値を維持しており CaOX 結晶の凝集を抑制することを示している。

尿凝集能画分は添加量の増加にともなって凝集が促進された。今回実験した範囲では高濃度でも凝集の抑制作用はみられなかった。増大率164%を示す添加量に含まれる HA 量は約 $2.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ と計算され、同濃度の HA では凝集が抑制されている (Fig. 1)。その理由として、尿凝集能画分には少なくとも HA と酸性蛋白質が構成成分として含まれるので⁹⁾、この増大率には HA 以外の因子の関与が考えられる。

結晶凝集能を測定する固有の方法はまだ確立されておらず、結晶成長・凝集阻止能の測定に汎用されている方法を⁹⁾準用して、反応液をスターラー攪拌し Coulter counter で粒子数分布を測定する Coulter counter 法を今回用いた。しかし、この方法は溶液中の粒子が小さい場合は再現性も優れているが、反応により粒子径が大きくなるものを測定するにはバラツキがあり、また in vivo では起こりえないスターラー攪拌による物理的な凝集抑制も考慮に入れなければならない

いなど弱点もある。そのため著者らは今回この方法の補助的手段として回転攪拌法も用いた。これは著者らがはじめて CaOX 結晶の凝集及び小球体形成という現象を見出した時の方法であり、計数化が難しいのと再現性に乏しいきらいはあるが HA が $8 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ で凝集体、小球体を形成し、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では微細結晶のコロイド類似状態が観察され、Coulter counter 法の結果を支持する結果が得られた。

今回の実験は単一成分のみで限定された条件 (塩濃度 150mM , Ca 濃度 1mM , OX 濃度 0.2mM)で行っているため多様な成分が混在する尿中で、ここに得られた濃度で作用を発揮するとは限らないが、はからずも HA, ChS とともに尿中濃度に近い濃度で結晶凝集に対しそれぞれ異なる作用を示したことは、GAG も成分により異なった役割を持っているのではないかという見解⁹⁾とも一致している。

結 語

尿凝集能画分、HA, ChS の CaOX 結晶凝集に対する作用を検討したところ次のことが明らかになった。

1. HA は濃度により凝集の促進と抑制という逆の作用を有することがわかった。
2. ChS は凝集抑制した。
3. HA と ChS は CaOX 結晶凝集過程において異なった作用を示すことが示唆された。
4. 尿凝集能画分は添加量の増加にともない凝集を促進した。その作用は含まれている HA 以外の促進因子の存在が示唆されるものであった。

文 献

- 1) 馬場志郎, 中沢和子, 小田島邦男, 藤岡俊夫, 中村宏: 尿路結石患者の尿中酸性ムコ多糖体排泄と結石の有機性基質分析. 日泌尿会誌, 74, 608—615, 1983.
- 2) Nishio, S., Abe, Y., Wakatsuki, A., Iwata, H., Ochi, K., Takeuchi, M. and Matsumoto, A.: Matrix glycosaminoglycan in urinary stones. J. Urol., 134, 503—505, 1985.
- 3) Roberts, S.D. and Resnick, M.I.: Glycosaminoglycans content of stone matrix. J. Urol., 135, 1078—1083, 1986.
- 4) 白根由美子, 平石攻治, 黒川一男: 蔞酸カルシウム結晶凝集を促進する尿中低分子量物質について. 日泌尿会誌, 78, 1149—1154, 1987.
- 5) 白根由美子, 山本晶弘, 水田耕治, 平石攻治, 黒川一男, 香川 征: 蔞酸カルシウム結石形成に関する尿中物質の研究. 日泌尿会誌, 投稿中.
- 6) Bisaz, S., Felix, R., Hansen, N.M. and Fleisch, H.: Disaggregation of hydroxyapatite crys-

- tals. *Biochim. Biophys. Acta*, 451, 560—566, 1976.
- 7) 西尾俊治：尿路結石の有機成分に関する研究—有機成分における酸性ムコ多糖の意義—。腎と透析，臨時増刊号，462—466，1987。
- 8) Koide, T., Yoshioka, T., Oka, T. and Sonoda, T.: Promoting effect of urine from patients with primary hyperparathyroidism on calcium oxalate crystal aggregation. *Urol. Res.*, 16, 228, 1988.
- 9) Robertson, W.G.: A method for measuring calcium crystalluria. *Clin. Chim. Acta*, 26, 105—110, 1969.

(1989年1月26日受理)