呈色接触プリント法による尿路結石内燐酸塩の検索

日本医科大学附属病院泌尿器科 戸 塚 一 彦
(主任: 川井 博教授)

CHEMICAL TEST OF PHOSPHATES IN URINARY CALCULI BY MEANS OF THE CHROMOGRAPHIC CONTACT PRINT METHOD

Kazuhiko Tozuka

Department of Urology, Nippon Medical School

(Chief: Prof. H. Kawai)

The chromographic contact print method making use of ammonium phosphomolybdate-ascorbic acid reaction is valid to detect phosphates in urinary calculi. This sensitive reaction may take place even if phosphates, especially apatite, are contained in calculi in so small amounts as to be under the confirmation-limits of X-ray and infrared analyses. This method with the aid of X-ray, infrared, or other means is valid to reveal the distribution-figure of apatite in urinary calculi.

はじめに

呈色接触プリント法とは、化学的定性分析法のひとつで、主に金属鉱物学の分野で用いられてきた¹⁾。

まず鉱物の研磨面をつくる。この研磨面を適当な溶解試薬(例えば、硝酸)を含んだゼラチン膜にあて、上よりおしつける。すると研磨面上のある種の物質は分解され、イオンとしてゼラチン膜に移る。このゼラチン膜を研磨面よりはがしてから、適当な反応試薬中で現像すれば、固着したイオンの部分が呈色する。これは、simple contact print method といわれる。

溶解試薬を含んだゼラチン膜に、鉱物研磨面をおしつける際、直流を通じれば、前法よりも短時間に明瞭な呈色を得ることができる。これは、electrographic contact print method といわれるが、不導体である尿路結石には応用できない。

本文は、simple contact print method (以下、プリント法)によつて、尿路結石中の燐酸塩の分布を検索したものである。

実験材料と方法

日本医科大学附属病院泌尿器科で、外科的に摘出された上部尿路結石12例および下部尿路結石6例が、プリント法に用いられた。

(I) 試薬

(a) モリブデン酸アンモニウム液: 100ml の蒸留水

に5g のモリブデン酸アンモニウムを溶かし、35ml の濃硝酸を加えたもの。

(b) アスコルビン酸液: 100ml の蒸留水に、100 mg の L-アスコルビン酸を溶かしたもの。

(II) 準備

結石は、ダイヤモンド・カッターにて、中心部をとるように切断された。左右に切断された結石の一方をプリント法、つづいて偏光顕微鏡的観察のための薄片作成に用いた。他方をX線回折および赤外線分光分析に用いた。

X線回折には、粉末法を用い、結石切断面全体をやすりで削つて得た試料を分析した。赤外線分光分析には、KBr 錠剤法を用い、結石切断面各部より採取した試料をそれぞれ別個に分析した。

プリント法に使用される結石切断面は、流水中で耐水研磨紙(silicon carbide)にて、平面ガラス板の上で研磨された。非常にろい結石では、切断面を除き、表面を樹脂で部分的に固めた。

本法に使用されたゼラチン膜は、ふつうの写真用印画紙上のゼラチン膜であるが、銀を充分に除去するために、定着液の中につけたのち水洗するという操作を3回以上繰り返してから乾燥させたものを使用した。

(III) 方法

適当な大きさの印画紙のゼラチン面に、モリブデン酸アンモニウム液を充分にしみ込ませる。過剰な液をロ紙

で吸い取つてから、ゼラチン面を上にしてハンドプレス器の台上に置く。次に、結石研磨面を下にして、ゼラチン面の上に重ねて置き、ハンドプレス器で、2～4分間加圧する。研磨面に加える圧力は、 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 以下でよい。加圧の際、結石の上（研磨面の反対側）にゴム粘土を載せるとよい。プレスしたのち、印画紙を研磨面よりていねいにはがすと、研磨面上の磷酸塩の分布に対応して、ゼラチン面上に黄色呈色が認められる。この印画紙を室内に放置して、充分に乾かす。次に、アスコルビン酸液をしみ込ませたロ紙を、過剰な液を他のロ紙で吸い取つてから、印画紙のゼラチン面上に重ねて置く。そして、ハンドプレス器で、数秒間、加圧する。アスコルビン酸液を含んだロ紙をていねいにはがしてから、数分間放置したのち、再度、この操作を繰り返す。5～6回程繰り返すと、黄色呈色は、青色呈色に変化する。黄色呈色としては不明瞭な部位も、青色呈色として明瞭に認められるようになる。プリント法に用いた結石研磨面は、軽く研磨することによって、再度プリント法に用いることができる。

この反応の機序を次に述べる。まず結石研磨面上の磷酸塩が硝酸によって分解され、生じた遊離磷酸イオンがゼラチン膜に移る。この磷酸イオンはモリブデン酸アンモニウムと反応して、黄色の燐モリブデン酸アンモニウムを形成する。燐モリブデン酸アンモニウムは、アスコルビン酸によって還元され“モリブデン・ブルー”を形成する²⁾。

実験結果

本法により得られた実験結果の大略は、次のとおりである。

(1) 18結石のプリント図には、1例（症例5）を除いてすべてに、明瞭な青色の研磨面輪郭が認められた。また、全例において、研磨面輪郭内に明瞭な青色領域が認められた。これらのことは、磷酸塩が結石表面および結石内部に広く分布していることを示している。

(2) アパタイト、磷酸アンモニウムマグネシウムおよび燐酸1水素カルシウムに反応して、青色呈色が認められた。他の磷酸塩は、18結石のうちには認められなかった。

アパタイトは全例に検出された。燐酸アンモニウムマグネシウムは3例に、そして、燐酸1水素カルシウムは1例にのみ検出された。本実験結果からも、アパタイトは尿石内磷酸塩の大部分を占めていることがわかる。

(3) プリント図上、青色呈色の認められない領域

は、通常、燐酸カルシウム1水化物あるいは尿酸から成り、well-developed radial striation³⁾を示す領域に対応していた。

(4) 結石研磨面には、しばしば、孔が観察された。燐酸カルシウム1水化物とアパタイトが、密に混在する領域には、多数の小孔が認められることが多かつた。

研磨面上に観察される孔は、プリント図上でも容易に認められた。また、研磨面の輪郭は、プリント図上、結石表面の磷酸塩量から予測される以上に、明瞭に描かれた。これらのことは、加圧により、モリブデン酸アンモニウム試薬が、孔内や研磨面外に圧排され、その結果、孔内や研磨面外の試薬貯留部に、大量の燐モリブデン酸アンモニウムが形成されるためと考えられる。したがって、孔や研磨面の輪郭に対応して認められる青色呈色は、その部位の磷酸塩含量に比例しないと考えられる。

(5) 3例では、結石研磨面の尿酸領域に、明瞭な青色呈色が認められたが、X線回折・赤外線分光分析・偏光顕微鏡の検索では、磷酸塩を証明できなかつた。しかし、他の分析法で、3例ともアパタイトの存在を確認した（症例5参照）。

プリント法は、尿酸領域内の磷酸塩の検索に、とくにすぐれている。

次に、5症例のプリント図の詳細について述べる。

(1) A.M. (膀胱結石)

この結石の内部には、燐酸カルシウム1水化物とアパタイトが、密に混在している。燐酸カルシウム2水化物は、表面に認められる。赤外線分光分析では、表層直下の一部を除けば、アパタイトと燐酸カルシウムの混合比⁴⁾は、ほぼ同じであつた。プリント図は、アパタイトが、結石研磨面上で、ほぼ均一に分布していることを示している。研磨面上には、中心部より周辺に至るまで、多数の小孔がみられるが、これらは、プリント図上、濃い青色斑点として認められる。また、研磨面輪郭は、外方にぼける傾向を有している（図1）。

(2) K.K. (右腎結石)

この結石は、アパタイトおよび燐酸アンモニウムマグネシウムから成っている。ともに磷酸塩のため、プリント図は、一様な青色呈色を示している。濃い青色斑点は、研磨面上の小孔に一致している。孔の輪郭は、内方にぼける傾向を有している。周辺部は、やや強い青色呈色を示すが、これは、同部の磷酸塩含量が高いためと考えられる（図2）。

(3) K.Y. (左尿管結石)

図1 プリント図のカラー写真。矢印は、研磨面輪郭の“ぼけ”を指す。

図3(a) 十字ニコルで撮影された写真。尿酸の厚い層が、尿酸カルシウム1水化物の薄層にて分断されている部位の外層に、アパタイトの存在が推定される(矢印)。

核部は、尿酸カルシウム1水化物およびアパタイトから成る。核部は、純粋なアパタイトの層により囲まれ、さらに、尿酸の厚い層により囲まれている。尿酸の層は、尿酸カルシウム1水化物の薄層にて分断されているが、その分断部に、少量のアパタイトの存在が推定される(図3(a))。

プリント図は、よくアパタイトの分布を表わしている。表面からは、磷酸塩が検出されなかつたが、研磨面の輪郭は、部分的に、青色輪郭として描かれている(図

図2 プリント図のカラー写真。矢印は、研磨面内の大きな孔を指す。

図3(b) プリント図の白黒写真。矢印は、図3(a)の矢印に対応する部位の青色呈色を指す。

3(b))。

(4) H.Y. (膀胱結石)

中心部には、尿酸カルシウム1水化物とアパタイトが混在している(図4(a))。周辺部も同じ組成であるが、中心部に比べて、アパタイト含量が少ない(図4(b))。表面は、尿酸カルシウム2水化物の結晶でおおわれている。

プリント図では、アパタイト含量の多い中心部は、濃い青色呈色を、そして、少ない周辺部は、淡い青色呈色を示している。研磨面にみられる多数の小孔は、プリント図上でも、明瞭に認められる(図4(c))。

図4(a) 症例4の中心部の赤外線スペクトル。アパタイトの吸収帯は、 1030cm^{-1} 、 600cm^{-1} 、および 560cm^{-1} 付近に認められる(矢印)。

図4(b) 症例4の周辺部の赤外線スペクトル。アパタイトの吸収帯は、 1030cm^{-1} 付近に、明瞭に認められる(矢印)。図4(a), (b)にて、 720cm^{-1} の吸収帯はアーチファクト。

図4(c) プリント図の白黒写真。

図5(a) プリント図の白黒写真。矢印は、研磨面の輪郭を指す。

図5(b) 症例5のX線回折図 ($\text{Cu}, \text{K}\alpha$)。

図5(c) 燃焼後のX線回折図 ($\text{Cu}, \text{K}\alpha$)。

(5) S.K. (膀胱結石)

本結石は、X線回折・赤外線分光分析では、純粋な尿酸結石と考えられたが、そのプリント図には、明瞭な青色呈色が認められた(図5(a)). 周辺部より得られた粉末の一部を、再度、X線回折にて検索したが、やはり、尿酸のピークのみしか認められなかつた(図5(b)). この粉末280mgを、るつぽで、約600°C、15分間加熱した。燃焼後の白色残渣4.5mgを、再度、X線回折で検索すると、明瞭なアパタイトのピークが認められた(図5(c)). 研磨面の他の部位からも、同様の方法で、アパタイトの存在を確認した。

本症例で用いられた燃焼法では、尿酸は、完全に分解される一方、アパタイトは、濃度および結晶性が高められ、ことにX線回折(または赤外線分光分析)で、検出が容易になる。

考 察

尿路結石の組成や構造の研究は、尿路結石症の解明に必要な不可欠のものである。とくに、その構造の研究は、尿路結石形成過程を知るうえで重要である。

概して、磷酸塩は、尿路結石の重要な構成成分であり、なかでもアパタイトは、主要な磷酸塩として、広く尿石に分布している。尿石中のアパタイトは、通常、非常に細かい粒子として存在し、その低い複屈折性とあいまつて、偏光顕微鏡下では、見逃されやすいか、あるいは、有機物質と混同されやすい。

プリント法は、尿石中の磷酸塩(ことに、アパタイト)の分布を知るのに有力な方法である。

次に、プリント法にて注意されるべきことがらを列挙する。

(1) モリブデン酸アンモニウムも、アスコルビン酸によつて還元され、青色呈色を生じる。しかし、この青色呈色は、淡く、そして、急速に褪色するので、本来の青色呈色と混同されることはない。さらに、蓚酸カルシウム領域には、モリブデン酸アンモニウムによる青色呈色は、認められない。

(2) 蓚酸は、燐モリブデン酸アンモニウムの形成を阻害するが、プリント法には支障とならない。ただ尿酸領域にみられる青色呈色は、蓚酸カルシウム領域にみられるそれよりも、色調が強く、また、より鋭敏に磷酸塩に反応してあらわれるので、蓚酸の阻害作用が予想され

るに過ぎない。

(3) プリント法では、“ぼけ”をまつたくなくすることは不可能で、反応物の多少の拡散は、やむを得ない。ことに、“ぼけ”が著明なのは、研磨面や孔の輪郭部で、これは、貯留したモリブデン酸アンモニウム試薬による。しかし、試薬の使用量をおさえれば、また、アスコルビン酸液を少量づつプリント面に加えれば、かなり明瞭なプリント図が得られる。

おわりに

18例の尿石に対して、プリント法を試みた。あわせて、X線回折、赤外線分光分析および偏光顕微鏡の検索を施行した。

次に、得られた結果を要約する。

(1) 燐モリブデン酸アンモニウムとアスコルビン酸の反応を利用したプリント法は、尿石内磷酸塩の分布を、明瞭に示した。

(2) この鋭敏な方法によれば、X線回折および赤外線分光分析の確認限界以下の磷酸塩、ことにアパタイトの検出も可能である。

(3) 本実験中に用いられた燃焼法は、尿石内微量のアパタイトの検出に有用である。

稿を終えるにあたり、終始深甚なる御指導、御校閲を賜わった川井博教授、実験に際し御指導、御協力いただいた近喰利光助教授、東京教育大学須藤俊男名誉教授、および本学法医学教室渡辺日章教授に、衷心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) Williams, D. and Nakhla, F.M.: Chromographic contact print method of examining metallic minerals and its applications. Bull. Inst. Min. Met., No. **533**, 257—296, 1951.
- 2) Feigl, F.: Qualitative Analysis by Spot Tests, p. 250, p. 421, p. 471, Elsevier Publishing Company, Inc. New York-Amsterdam, 1946.
- 3) Carr, J.A.: The pathology of urinary calculi: Radial striation. Brit. J. Urol., **25**, 26—32, 1953.
- 4) 高崎悦司: 尿石の赤外線スペクトルによる分析. 第2編. 定量的応用. 日泌尿会誌. **51**, 639—663, 1960.

(1979年5月22日受付)