尿路結石症の研究

—尿酸カルシウム結石患者における結晶凝集の検討—

金沢医科大学泌尿器科学教室
(主任: 津川龍三教授)
金沢大学医学部泌尿器科学教室
(主任: 黒田恭一教授)

鈴木 孝 治

STUDIES ON UROLITHIASIS: CRYSTAL AGGREGATION IN CALCIUM OXALATE STONE FORMERS

Koji Suzuki

Department of Urology, Kanazawa Medical University

(Director: Prof. R. Tsugawa)

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director: Prof. K. Kuroda)

The abnormalities in urine of calcium oxalate stone formers in comparison with control subjects were studied in order to clarify the mechanism of calcium stone formation.

The results were as follows:

1) The daily excretion of calcium, oxalic acid, uric acid and creatinine was determined in fifty-five normal men, fifty-two single stone formers and thirty-seven recurrent stone formers. The calcium excretion was higher in recurrent stone formers (190 ± 21 mg/day, mean $\pm$ SEM) and single stone formers (160 ± 11 mg/day) than in normal controls (116 ± 11 mg/day). The calcium to creatinine ratio of these groups showed almost similar value. The oxalic acid excretion was higher in recurrent stone formers (34.3 ± 4.0 mg/day) than in single stone formers (24.0 ± 2.3 mg/day) and controls (24.8 ± 1.6 mg/day). The value of calcium (mg/day) $\times$ oxalic acid (mg/day) was 6815 in recurrent stone formers, 4689 in single stone formers and 3195 in controls. The value of calcium $\times$ oxalic acid/creatinine was also elevated in relation to the severity of the disease. There was no difference of uric acid excretion among the three groups.

2) The particle size distribution of calcium oxalate crystals were measured in fresh morning urine from ten recurrent stone formers and five controls using Coulter counter Model ZBI. The crystal volume excreted by the controls was $0.37 \pm 0.05 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ (mean $\pm$ SEM), whereas the volume excreted by the stone formers was $2.21 \pm 0.21 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$. These values showed significant difference. It was concluded that patients with recurrent calcium oxalate stone disease excreted more crystals of calcium oxalate and the crystals were generally larger and more aggregated than those found in urine of normal subjects. These findings were also obtained with light microscopy. Using this technique calcium oxalate crystalluria may be expressed as either the number or the volume of crystals excreted per unit volume of urine.

3) A simple system was developed to study the effect of inhibitors of crystal aggregation in vitro under controlled conditions in which crystal growth could not be observed. A measure of the aggregation of added calcium oxalate crystals was obtained by calculating the percent increase in the fraction of particles greater than $9 \mu\text{m}$ in diameter after 4 hr incubation in metastable solution with respect to calcium oxalate. The aggregation of added crystals was determined by Coulter counter and compared with the control solution. The degree of aggregation was expressed as inhibitory activity.

In this system, urine of either controls or stone formers inhibited aggregation when added at con-

centration as low as 5%, where inhibitory activity was almost 100%. The inhibitory activity of the urine from ten recurrent stone formers was significantly decreased (38.4%) compared with fifteen controls (60.2%) and ten single stone formers (55.4%).

4) Effects of citrate, magnesium, urea, creatinine, methylene blue, sodium copper chlorophyllin, EDTA, pyrophosphate and glycosaminoglycans on calcium oxalate crystal aggregation were examined. Of the known inhibitors tested, citrate, magnesium, pyrophosphate, glycosaminoglycans and sodium copper chlorophyllin were effective, whereas methylene blue and EDTA had no effect on the aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. Urea and creatinine had no effect. Potent inhibition was observed with glycosaminoglycans, especially with heparin.

要旨: 尿酸カルシウム結石の発生機序解明の目的で、正常人と結石患者の尿における差を検討した。1) 結石患者とくに再発性結石患者では尿中カルシウムの著明な増加と尿酸の軽度増加が認められた。尿酸に差はなかった。結石症の severity はカルシウム×尿酸/クレアチニンと相関した。2) 尿中尿酸カルシウム結晶のみられた正常人と再発性結石患者における結晶量を Coulter counter 法で測定した結果、正常人では小さな結晶がみられ、結石患者では大きくかつ凝集された結晶が観察された。全体積量は 0.37 ± 0.05 (mean $\pm$ SEM) $\times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$, $2.21 \pm 0.21 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ であり両者に有意差を認めた。3) 結晶の成長はなく凝集のみが反応する系を確立した。この凝集系に正常人・結石患者の尿を添加し凝集阻止能を測定した結果、尿は非常に強い凝集阻止能をもつことが判明した。また1%にあたる尿添加時の変化では再発性結石患者に明らかな凝集阻止能の低下をみた。4) 凝集系を利用し種々の物質の阻止能を測定した。citrate, magnesium, pyrophosphate, sodium copper chlorophyllin, glycosaminoglycan に濃度依存性の強い阻止能が認められた。正常尿中に存在する物質のうちとくに heparin が強い阻止能を示した。urea, creatinine, methylene blue, EDTA に阻止能は認められなかった。

緒 言

尿路結石症は近年有病率、罹患率が増加している。吉田¹⁾の全国調査によると、15,328個の結石中尿酸カルシウム（以下 CaOx と略す）含有結石は71.4%を占め、金沢医科大学泌尿器科学教室での300個の分析結果²⁾でも76.3%を占めている。現在、尿酸結石、シスチン結石、感染性結石に関しては、多くの研究によりその発生原因、治療法、予防法がほぼ確立されているが、最も多い成分である CaOx 結石に関しては、最近精力的な研究がなされつつあるにもかかわらず未解決の問題が多く³⁾、そのために結石症そのものの解決が大局的にはなお程遠い現状にあるといわねばならない。

CaOx は尿においては正常人でも過飽和の状態で存在することが多く、とくに結石患者においては過飽和の程度が高く nucleation→crystal growth, crystal aggregation→stone formation の過程を進行するとされている⁴⁾。正常人でも尿中に CaOx 結晶を排泄することはよく知られており、Elliot⁵⁾ は4.2%, Hallson and Rose⁶⁾ は9%にもなるとその頻度を報告している。また結石患者では、“凝集された結晶”が多く排泄されることがあり^{4) 7)}、正常人と異なつて凝集を阻止する因子が不足しているた

めとする報告^{7) 8)}がみられる。現在のところ正常人および結石患者の尿において結晶凝集に関する阻止因子の役割を追求した報告は少ない。

著者は CaOx 結石患者の尿において正常人に比しいかなる異常が存在するかを検索することは CaOx 結石発生機序解明の糸口になるのではないかと考え、次の項目につき検討を行つた。1) 尿中カルシウム（以下 Ca と略す）、尿酸（以下 Ox と略す）排泄量、2) 尿中 CaOx 結晶量、3) 尿中 CaOx 結晶凝集阻止能。さらに CaOx 結晶凝集系の確立とこれを利用した種々の物質の持つ凝集阻止能についても検討した。

対象および方法

1. CaOx 結石患者と正常人の尿中 Ox, Ca 排泄量
CaOx 結石患者は赤外線分光分析法にてその結石成分中 CaOx が9割以上を占める患者とした。control としては感染のない腎機能良好な非結石患者および腎移植のため金沢医科大学病院泌尿器科入院中の腎提供者とした。対象はすべて男子に限定した。食餌は入院通常食 (2,000~2,200Cal, NaCl: 10~15g, Ca: 500~600mg, P: 1,100~1,300mg) とし、あらかじめ5%ヒビテン 5ml を入れた容器に24時間蓄尿し、その一部を測定に使用し

た。

Ox は modified Hodgkinson and Williams 法⁹⁾により測定した。Ca は OCPC 法で和光キットを使用し、クレアチニンは Folin-Wu 法で和光キットを使用し、尿酸は炭酸ナトリウム法で和光キットを使用して測定した。

再発性結石患者 (recurrent stone former, 以下 RSF と略す) は5年間のうちに少なくとも2回以上の結石が発生したものとし、単発性結石患者 (single stone former, 以下 SSF と略す) は1回のみで再発のみられない患者とした。対象とした症例数は SSF : 52例, RSF : 37例 control : 55例である。

2. 尿中 CaOx 結晶量測定法

早朝尿の顕微鏡検査で CaOx 結晶の認められた RSF : 10例, control : 5例を対象とした。

方法 : 尿を $74\mu\text{m}$ のフィルターを通したあと 90ml ずつに分ける。一方には 0.05M sodium cacodylate で pH6.0 に調整した 10% EDTA を 10ml 加えこれを A 液とする。他方には 10ml の生理的食塩水を入れこれを B 液とする。おのおの 37°C で 40 分間同速度で回転搅拌した。このうち Coulter counter Model ZB1 を使用して各 size ごとの結晶量を測定し体積を算出した。B 液と A 液の体積の差をもつて結晶の体積とした。

Coulter counter について (Fig. 1) : sample stand においた電解質溶液中の粒子が陰圧によって $100\mu\text{m}$ の aperture を通過する際に粒子の体積に比例した電気抵抗値の変化を生ずる。これを増幅して oscilloscope 上に垂直 spike として表示すると同時に上下の閾値間の spike pulse を count して数値を表示するものである。著者は

Fig. 1 Diagram of Coulter counter.

calibration には直径 $8.49\mu\text{m}$ の Latex 標準粒子を使用した。測定にあたっては $3\mu\text{m}$ ~ $33\mu\text{m}$ まで測定した。なお Coulter counter は従来生物学、物理学、化学の各分野で汎用されているが、結石症の研究に応用したのは Robertson¹⁰⁾ が最初であり、本邦では報告をみない。

ここで Coulter counter を利用した結晶量および体積測定法が正確なものかどうかを Robertson¹⁰⁾ の方法に準じて実験し確認してみた。結晶を含有する尿にさらに CaOx 結晶を添加し EDTA によって結晶が溶解する程度を観察した。その結果 37°C で 40 分間回転搅拌することで約 98% の結晶が溶解していることが判明した。このため結晶を含有する尿と結晶の溶解した尿との差で結晶の数および体積を算出することは妥当かつ有効な方法であると考えられた。

3. CaOx 結晶凝集阻止能測定法

これは、a) に述べる凝集系を確立しその信頼性を確認の上で、b) に述べるように種々の物質を添加しその結晶凝集の差異をみるものである。

a) 結晶凝集系の確立

CaOx の metastable solution (CaCl_2 : 1mM/L, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$: 0.2mM/L, NaCl: 0.15M/L を 10mM sodium cacodylate で pH6.0 に調整し $0.45\mu\text{m}$ milipore filter を通す) を使用直前に作製し、このうち 100ml に CaOx crystal suspension (100mg/100ml) を 2.5ml 添加し、添加直後と 37°C で回転搅拌 4 時間後の結晶量を Coulter counter で測定し体積を算出した。以上の系が凝集系として信頼性があるかどうかを、反応時間、温度、pH, Ca 濃度, Ox 濃度を変化させて検討した。なお結晶は CaOx monohydrate (半井薬品) を使い、超音波処理 1 時間後 37°C で 1 時間搅拌したものを使用した。搅拌にはマルチマグネスター・MU-2 型 (柴田化学器械工業 KK) を使用した。

b) 結晶凝集阻止能 (inhibitory activity) 測定法

a) に述べた metastable solution に種々の物質および CaOx 結晶を加え、その凝集の程度から inhibitory activity を算出した。control は添加物と同量の生理的食塩水を加えたものとした。種々の物質とは、正常人および SSF, RSF の尿, urea, creatinine, その他 Ca 結石形成の inhibitor として報告されている citrate, magnesium, methylene blue, sodium copper chlorophyllin, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate, heparin, pyrophosphate, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) である。

inhibitory activity は次の式で計算した.

$$\left(1 - \frac{T_4 - T_0}{C_4 - C_0}\right) \times 100 (\%)$$

なお T_4 は test solution 4 時間攪拌後の $9\mu\text{m}$ 以上の結晶の占める割合 (%) であり, T_0 は test solution において CaOx 結晶添加直後の $9\mu\text{m}$ 以上の結晶の割合 (%) を意味する. C_4 は control solution 4 時間攪拌後の $9\mu\text{m}$ 以上の結晶の占める割合 (%) であり, C_0 は control solution において CaOx 結晶添加直後の $9\mu\text{m}$ 以上の結晶の占める割合 (%) を意味する. 上式の数値が 0 % 以下は control 以上に凝集をおこす場合であり, 0 % は control と同じ凝集を示すため inhibitory activity はない. 0 ~ 100% は control に比しある程度の inhibitory activity を有することを示し, 100% は完全に凝集を阻止することを意味している. 100% 以上は添加した CaOx 結晶が溶解していることを表わす.

なお 使用に際してすべてのガラス製品は一昼夜 1N HCl 溶液に浸し, 蒸留水で 3 回以上洗浄後完全に乾燥したものを使用した.

実験結果

1. 尿中 Ox, Ca, 尿酸排泄量 (Table 1)

1 日尿中 Ox 排泄量は control では $24.8 \pm 1.6 \text{ mg/day}$ (mean $\pm$ SEM) であり, SSF は $24.0 \pm 2.3 \text{ mg/day}$, RSF は $34.3 \pm 4.0 \text{ mg/day}$ であり, RSF で有意に Ox 排泄量が増加していた. また結石患者全体では $28.3 \pm 2.2 \text{ mg/day}$ であり, control に比して高値を示したが, 有意差は認められなかった. またクレアチニン排泄量は各グループ間に有意差はなく, Ox のクレアチニン 1g あたりの排泄量をみると各グループ間には有意差はないが, RSF で高い値が得られた.

尿中 Ca 排泄量は control : $116 \pm 11 \text{ mg/day}$, SSF : $160 \pm 11 \text{ mg/day}$, RSF : $190 \pm 21 \text{ mg/day}$ であり, SSF, RSF とともに control よりも有意に排泄量が増加していた. またクレアチニン 1g あたりの Ca 排泄量も同様の結果であつた.

尿中尿酸排泄量には各グループ間に有意差は認められなかった.

次に CaOx 構成成分である Ca と Ox の積を求めたところ, control, SSF, RSF はそれぞれ 3,195, 4,789, 6,815 (mg $\times$ mg) で, RSF に高い値が観察された. またこの値とクレアチニンの比を求めても同様の傾向を示した.

Ox 濃度および排泄量と尿量の関係を調査した. 126

Table 1 Urinary excretion of oxalic acid, calcium and uric acid by controls and stone formers. (SSF : single stone former, RSF : recurrent stone former, mean $\pm$ SEM, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

	Control	SSF	RSF
Number	55	52	37
Urine volume (ml/day)	1632 $\pm$ 125	2076 $\pm$ 112	2089 $\pm$ 176**
U-Creatinine (mg/day)	1011 $\pm$ 49	1081 $\pm$ 52	1067 $\pm$ 63
U-Oxalic acid (mg/day)	24.8 $\pm$ 1.6	24.0 $\pm$ 2.3	34.3 $\pm$ 4.0*
U-OX/U-Creat (mg/g)	24.5 $\pm$ 2.1	24.1 $\pm$ 2.3	29.9 $\pm$ 3.7
U-Oxalic acid (mg/dl)	1.51 $\pm$ 0.15	1.15 $\pm$ 0.17	1.59 $\pm$ 0.17
U-Calcium (mg/day)	116 $\pm$ 11	160 $\pm$ 11**	190 $\pm$ 21***
U-CA/U-Creat (mg/g)	115 $\pm$ 11	169 $\pm$ 13**	180 $\pm$ 16**
U-Uric acid (mg/day)	570 $\pm$ 23	523 $\pm$ 32	560 $\pm$ 37
U-UA/U-Creat (mg/g)	566 $\pm$ 39	513 $\pm$ 26	563 $\pm$ 37
U-CA $\times$ U-OX (mg $\times$ mg)	3195 $\pm$ 479	4689 $\pm$ 790	6815 $\pm$ 1314**
U-CA $\times$ U-OX / U-Creat (mg $\times$ mg/mg)	3.50 $\pm$ 0.45	4.37 $\pm$ 0.77	6.16 $\pm$ 0.94**

Fig. 2 Relation between oxalic acid excretion and urine volume.

例の結石患者における尿量と Ox 排泄量の関係をみたところ, 両者に $Y = 8.73X + 8.91$ と正の相関関係が得られた (Fig. 2, $p < 0.001$). 尿量の増加に比例して尿中 Ox の排泄増加が認められた. 次に尿量と Ox 濃度の関係をみると, $Y = 1.68X^{-0.52}$ の有意な相関が観察された (Fig. 3, $p < 0.001$).

Fig. 3 Relation between oxalic acid concentration and urine volume.

Fig. 4 Volume-size distribution of calcium oxalate crystals in fresh morning urine.

2. 尿中 CaOx 結晶量 (Fig. 4)

まず control 群でみると、結晶の直径は 5~9 μm にピークがあり 17 μm 以下に限られ、全結晶体積は 0.37 ± 0.05 (mean $\pm$ SEM) $\times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ であった。これに対し RSF でみられた結晶は 9~13 μm , 21~25 μm にピークをもち、全結晶体積は $2.21 \pm 0.21 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ で直径、体積ともに大きく、両者間に明らかな推計学的差が認められた ($p < 0.001$)。

また以上と同様の所見は併行して行つた顕微鏡的観察でも得られた (Fig. 5)。

3. CaOx 結晶凝集阻止能

a) 結晶凝集系の検討

CaOx 結晶添加直後と 4 時間攪拌後の各 size におけ

Fig. 5 Calcium oxalate dihydrate crystals in control and stone former (A: Latex particle and small crystal from control subject, B: large crystal from recurrent stone former, C: large aggregated crystals from recurrent stone former)

る結晶の体積分布を Fig. 6 に示した。添加直後 5~9 μm にあつたピークが、4 時間後には 9~13 μm になり右方に偏位している。全体積量は直後では 11.85 ± 1.24 (mean $\pm$ SEM) $\times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ であり、4 時間後は $11.67 \pm 1.45 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ でほとんど変化は認められなかつた。また全体の体積に対する 9 μm 以上の結晶体積は $52.3 \pm 3.5\%$ から $71.3 \pm 3.6\%$ と有意に変化した ($p < 0.001$)。

この凝集系の経時変化をみると (Fig. 7), 9 μm 以上の体積比は直後から 3~4 時間経過すると一定となり、24 時間後に約 90% となつた。またこの間の全体積量の変化率をみると、4 時間まではほとんど変化がみられないが、6~24 時間では徐々に増加した。すなわち 4 時間目の測定では全体積量の変化が認められずかつ 9 μm

Fig. 6 Calcium oxalate crystal distribution before and after incubation in aggregation system.

Fig. 7 Effect of incubation time on calcium oxalate crystal aggregation and growth. (n=5)

- : crystal aggregation expressed as the percent of total crystal volume in aggregates larger than $9\mu\text{m}$ in diameter.
- : crystal growth expressed as the percent increase in crystal volume compared with non-incubated crystals.

以上の体積比が増加することから、本実験に使用した凝集系は結晶の成長を示すものではなく、凝集のみを示す反応系と考えられた。

次に凝集系を種々の条件下で検討した結果を示す。

温度による影響：25℃と37℃で行い比較した。両者とも全体積量の変化に影響はないが、全体積中に占める $9\mu\text{m}$ 以上の体積比は25℃では52%から84%に、37℃では53%から89%に変化し、37℃の方が凝集反応は優れていた。したがって以下の実験はすべて37℃で行った。

溶液の pH による影響：pH5.0における $9\mu\text{m}$ 以上の体積は結晶添加直後57.7%から4時間後90.6%に変化した。pH 6.0では54.8%から90.0%に、pH 7.0では52.6%から93.2%に変化した。pH 6.0における変化を100%とすると、pH 5.0では93.5%、pH 7.0では115.6%であり、pH による影響は大きいと考えられた。以下の実験ではすべて pH 6.0 に統一して実施した。

Ca を含まない反応系および Ox を含まない反応系：どちらの反応系でも結晶の体積減少がみられ、凝集はおこらず結晶が溶解していることが判明した。

metastable solution の Ca と Ox の積 ($0.2\text{mM}^2/\text{L}^2$) を一定にし濃度をたがいに变化させて測定した結果を示す。Ca : $0.5\text{mM}/\text{L}$, Ox : $0.4\text{mM}/\text{L}$ とした場合、 $9\mu\text{m}$ 以上の体積は直後44%から4時間後90%に増加した。また Ca : $0.2\text{mM}/\text{L}$, Ox : $1\text{mM}/\text{L}$ の溶液では43%から88%に増加した。これは Ca : $1\text{mM}/\text{L}$, Ox : $0.2\text{mM}/\text{L}$ の溶液の場合とほぼ同様の凝集がみられることを意味している。なおどの反応系も全体積量の変化はみられなかった。以下の実験では生体の尿中濃度に近い Ca : $1\text{mM}/\text{L}$, Ox : $0.2\text{mM}/\text{L}$ の溶液を使用するのが妥当と考えられた。

b) 各物質の inhibitory activity

正常人の尿と SSF および RSF の尿：正常人において1~5%にあたる尿を添加した場合の metastable solution 中の CaOx 結晶凝集の程度を観察した (Fig. 8)。正常者の5%尿では、inhibitory activity はほぼ100%の

Fig. 8 Effect of urine from five normal men on calcium oxalate crystal aggregation.

Fig. 9 The inhibitory activity in the 24 hr urines of controls, single stone formers and recurrent stone formers.

Fig. 10 The relationship between the inhibitory activity and the final concentration of citrate, magnesium, urea and creatinine.

値を示した。また RSF でも95~100%であり、尿中には非常に強い凝集阻止物質が存在していることが判明した。正常人と SSF, RSF との比較では、1~3%にあたる尿を添加して観察するのが適当と考えられた。1%尿

Fig. 11 The relationship between the inhibitory activity and the final concentration of methylene blue, sodium copper chlorophyllin, EDTA and pyrophosphate.

での inhibitory activity を Fig. 9 に示した。RSF では明らかに control, SSF に比して inhibitory activity が低下していることが判明した。

種々の物質の inhibitory activity を濃度を变化させて実験した結果を示す (Fig. 10, 11, 2)。

citrate (Fig. 10) : 濃度に比例して, inhibitory activity の増加が認められた。

magnesium (Fig. 10) : 凝集を阻止した。

urea (Fig. 10) : 凝集の inhibitory activity は認められなかった。

creatinine (Fig. 10) : inhibitory activity はなかった。

methylene blue (Fig. 11) : inhibitory activity はなかった。

sodium copper chlorophyllin (Fig. 11) : 非常に強い inhibitory activity を有していた。

EDTA (Fig. 11) : 凝集を阻止しなかった。

pyrophosphate (Fig. 11) : 濃度に比例して inhibitory activity が増加した。

glycosaminoglycans (以下 GAG と略す) (chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate, hepa

Fig. 12 The relationship between the inhibitory activity and the final concentration of glyco-saminoglycans.

Fig. 13 Diurnal variation of calcium, oxalic acid, calcium $\times$ oxalic acid/creatinine and inhibitory activity of calcium oxalate crystal aggregation in the urine of five controls and five stone formers.

rin) (Fig. 12) : おのおのの強い inhibitory activity を示し、中でも heparin が最も強力であった。

尿中 Ca, Ox および inhibitory activity の日内変動

Fig. 14 A model of calcium stone formation (from Robertson⁴⁾ (1976)).

を5例の正常人、5例の結石患者で観察した (Fig. 13)。各項目とも結石患者で変動が大きく、とくに食後変動が著明であつた。また結石患者では $\text{Ca} \times \text{Ox}/\text{creatinine}$ は午後増加し、inhibitory activity は午後低下するという事実が判明した。

考 察

尿路結石の発生原因については多くの因子があり、また多くの説がある。Drach¹¹⁾ によると、1) supersaturation/crystallization 説、2) matrix 説、3) inhibition absence 説、4) epitaxy 説、5) 上記の複合説などがあるとしている。それらを概観するときほぼ解明されたかにみえる部分もあるが、本研究の対象とした CaOx を主体とする尿石生成機序については未解決の問題が多い。とくに臨床的な結石塊の原基と目される物質の生成過程の解明は旧来の方法では限界に達し、多くの新しい物理化学的方法を駆使してこそ前進しうものと思われる。

ここに現在しばしば引用されば賛同を得ている Robertson による結石生成過程のモデル⁴⁾を図示する (Fig. 14)。すなわち、最初に結石を形成する塩が過剰に飽和された状態で核が形成され (nucleation phase)、次にこの核が成長し凝集することによってさらに大きな粒子となる (growth and aggregation phase) これが尿路を通過する間にその狭い部分に停滞し (trapping phase)、

最後にこの粒子が臨床的な結石に成長する (growth phase) というものである。これらの過程においては、結石を作ろうとする promoter の存在や supersaturation の程度およびそれらを阻止する inhibitor の存在があり、これらの相互作用によつてこれらの過程が調整されている。また食餌、腸管からの吸収、日内変動、季節変動などの因子が supersaturation の程度や inhibitory activity の強さに影響を与えるという。結石患者では supersaturation の程度が高く inhibitory activity が低いことから、Robertson ら¹²⁾は saturation-inhibition index を求め正常人と結石患者は明確に区別できるとした。

今回の実験においては、正常人と結石患者との尿中 Ca, Ox 排泄量、尿中結晶量、結晶凝集阻止能における差を見出すことにより、CaOx 結石の発生機序の一部を明らかにしようと試みた。以下今回得られた結果を含めて考察する。

結石患者のみならず正常人においても CaOx に関して尿は過飽和の状態にあることが多いと報告されている¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。結石患者と正常人の差の一つにこの過飽和の程度の差のあることが知られている。しかし過飽和度を測定するには複雑な測定と計算を必要とするため容易には評価し難い。過飽和度を推定するには CaOx の構成成分である Ca と Ox の濃度を測定することで最も簡単に実施しうる。

CaOx 結石における Ca の位置づけに関しては従来より多くの報告があり、とくに CaOx 結石患者における hypercalciuria の重要性が最近追求されてきている¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。hypercalciuria の subgroup の病態解明やそれを基礎にした治療法の進歩もみられ、なかでも Ca 排泄増加が CaOx 結石形成に最も重要な役割をはたしているとする考えが多い。しかし一方 hypercalciuria と結石の再発率の間にはあまり相関がないとする報告¹⁹⁾や、Ca 排泄量は結石患者の大半では正常範囲内にあるため結石形成にはさほど重要ではないという報告もみられる²⁰⁾²¹⁾。CaOx 結石の重要な構成成分である Ox に関しては、その測定法の困難さのために Ca に比して報告が少なく、その排泄量が結石患者においては著明に増加しているとする報告²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾や正常に近いとする報告²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾がある。

今回の実験からは結石患者とくに RSF においては Ca の著明な排泄増加がみられ、Ox は有意差はないものの軽度の増加が認められた。また creatinine 単位あたりの Ca×Ox 値は control, SSF, RSF の順に高く、

結石形成ならびに結石の severity と Ca, Ox の排泄に関連の深いことが判明した。Tiselius³¹⁾は Ca/Mg, Ca×Ox/Mg×creatinine が結石症の severity と相関したとし、著者と同様の結果を報告している。また Takasaki³²⁾は、RSF では SSF に比し Mg/Ca×Ox が低値であると報告している。Robertson⁴⁾は control に比し Ca, Ox とも SSF, RSF の順に排泄量が多かつたと報告している。以上の事実より、CaOx 結石発生にあつては Ca および Ox が単独でひきおこすことはなく両者の相関において発生していることが推定される。

ここで Ox の役割について考えてみたい。Robertson ら³³⁾は Ox 排泄量と stone episode の間に強い相関をみたが Ca との間には相関はみられなかつたと報告し、Marshall ら¹⁹⁾も同様の結論を発表している。また Ca 結石の“risk factor”を求める場合、尿量減少および Ox 増加が最も risk が多く、Ca 増加では少ないという報告²⁴⁾もある。Finlayson³⁴⁾は尿の結晶化過程において Ox は最も重要な factor であることを強調している。また CaOx 結晶量と Ox の濃度には相関があり、Ca 濃度とは相関がみられない³³⁾ことを考えあわせると、Ox は CaOx 結晶形成過程において Ca よりも重要な役割を持つていると言える。

今回の実験において Ox の排泄量は RSF でやや高い成績が得られた。また尿中 Ox 排泄量および Ox 濃度と尿量の間には有意な相関が得られた。興味ある所見として、尿量増加にともなつて Ox の尿中濃度は減少するが Ox 排泄量が増加している事実が明らかとなつた。これと同様のことを Zarembski ら²⁷⁾、八竹ら³⁵⁾も報告しており、Ox は単に尿量の増加に対応して希釈されているのではなく、Ox の尿細管での再吸収が受動的拡散によつて行われていることを裏づける事実と考えられる。

従来より Ox 排泄と Ca 排泄の間には相関のあることが知られている²³⁾²⁷⁾³³⁾が、この原因として Hodgkinson²⁴⁾は次のように説明している。経口摂取された Ca は腸管内で Ox と結合し難溶性の CaOx を形成するが、Ca 過剰吸収例においては吸収される Ca 量が多いため遊離 Ox が増加し、以下の腸管からの Ox 吸収が増加して尿中に出現し、mild hyperoxaluria になるという。また最近 Robertson and Peacock³³⁾は、CaOx 結石形成においては hypercalciuria は二次的な意味しかなく、mild hyperoxaluria がこそが重要でこの病態に注目する必要があることを強調している。

以上のごとく、CaOx 結石発生にあたっては Ca と Ox いずれもが非常に重要な役割を持つことは事実であるが、そのうちのどちらがより重要か、あるいはその生成過程の中での位置づけなどは今後の研究にまっところが多い。

次に尿中結晶について考えてみたい。従来より結晶尿と結石症の関係については多くの報告がある。すなわち、結晶尿が結石発生の risk を高めるという報告が圧倒的に多い^{4) 6) 7) 36) 37)}。しかし一部に相関はないという意見もある³⁸⁾。Robertson ら^{7) 36) 39)}は RSF では control に比し大きな凝集された結晶が多いと報告した。また彼ら⁴⁰⁾は RSF に対して効果的な治療を実施すると、結晶の大きさは小さくなり凝集された結晶も著減することを報告している。Smith³⁷⁾も primary hyperoxaluria の症例で同様の知見を得ている。

上記のごとく、結石症における結晶尿の意義は重要であり、その関連性は大きいと考えられたため、今回の実験においては正常人と結石患者における尿中 CaOx 結晶の大きさ、数、体積の差を Coulter counter を使用して検討した。正常人では直径・体積とも小さい結晶がみられるのに反し、RSF では明らかに直径・体積の大きい結晶がみられた。これは顕微鏡的観察でも同様であった。RSF における結晶が正常人と明らかに異なることは Robertson ら⁷⁾、Hallson and Rose⁶⁾、Crassweller ら⁴¹⁾によつて報告されている。Hallson and Rose は結石患者における結晶は次の所見が正常人と異なると述べている。すなわち、1. 結晶尿の頻度が高い、2. 結晶量が増加している、3. 大きな体積の結晶が多くみられる、4. 凝集された Ox 結晶が多いの4点である。今回の実験成績もほぼ同様であった。Elliot ら⁴²⁾は正常者(540検体)における結晶の平均直径は 12.0 μ m で結石患者(87検体)の 9.7 μ m に比して大きいと従来の知見と逆の結果を報告している。彼ら^{6) 42)}によると、正常人で結晶は 4.2%にみられ結石患者では 27%にみられたとしている。結晶尿が CaOx 結石形成に重要な位置を占めていることは事実であるが、どの報告者もまだ検体数が少ないため今後さらに検索する必要があると考えられる。

ところで、結石患者では尿飽和の程度が高いために正常人よりも結晶尿が多くみられると推定することは容易であるが、今回の実験結果からも明らかにように、注目すべき点は凝集された結晶の多いことである。このことが結石患者と正常人と区別する最も重要な点であるとする報告⁴⁾もある。確かに Ca と Ox の排泄量は正常人

に比し結石患者では増加しているが、その値に overlap が多いことも事実である。結石患者では CaOx 結晶の凝集を阻止する物質が不足しているために、正常人にみられるような散在した結晶ではなく凝集した結晶を排泄すると思われる。

CaOx の inhibitor として知られているもの⁴³⁾には pyrophosphate⁴⁴⁾、citrate⁴⁴⁾、magnesium⁴⁴⁾、methylene blue⁴⁵⁾、macromolecule⁴⁶⁾、metal⁴⁷⁾、sodium copper chlorophyllin⁴⁸⁾、phytate⁴⁷⁾、polyelectrolyte⁴⁷⁾ などがあるが、そのほとんどは nucleation の過程を阻止する物質とされているものである。aggregation の過程においての inhibitor の役割を追求した研究は少なく、Robertson ら⁴⁹⁾、Felix ら⁵⁰⁾、Baumann ら⁸⁾、Bowyer ら⁵¹⁾の報告がその代表である。Robertson ら⁴⁹⁾は Coulter counter を使用し、結晶の大きさの変化から凝集阻止の程度を観察した。また Felix ら⁵⁰⁾は agglomerometer を使用し、濾液の量から凝集の程度を間接的に測定するという方法をとっている。

Robertson らはその原著の中で彼らの系を“crystallization”もしくは“growth and aggregation”と表現しているが、著者は原法を種々の条件下で実験した結果、全体積の変化がなく、つまり crystal growth を進行させることなく、crystal aggregation のみがみられる反応系の確立に成功した。この凝集系に正常人の尿を添加すると CaOx 結晶の凝集は強力に阻止された。最終濃度 1%尿では約 50%、3%尿では約 75%、5%尿では約 100%の inhibitory activity を示した。また RSF、SSF、正常人の尿を 1%のレベルで比較すると、RSF では明らかに inhibitory activity が低下していることが判明した。この際添加した尿はわずか 1%尿であり、そこに含まれる Ca と Ox の総量は反応系にとつて無視できる量であるため、RSF では明らかに CaOx 結晶凝集を阻止する物質が不足していると結論できる。

CaOx 結晶凝集の inhibitor として Robertson ら⁴⁹⁾は pyrophosphate、diphosphonate、GAG をあげ、GAG のうち heparin と chondroitin-4-sulfate が強力なものであるとした。その後彼ら⁵²⁾は尿中での主たる凝集 inhibitor は GAG であることを示し、pyrophosphate は 10~15%の inhibitory activity しかないと報告した。CaOx 結石患者の約半数は GAG 濃度低下という異常があり、他の患者では GAG は正常濃度であるが、そのほとんどは hypercalciuria、hyperoxaluria、さらに興味あることは hyperuricosuria の傾向にあつたという。GAG が正常濃

度で hyperuricosuria のある結石患者においては, urate に GAG が吸着され, このため有効な GAG 量が低下していると推論し, urate がいわば間接的に “anti-inhibitor” として作用することを示した. このことは allopurinol が明らかに hyperuricosuric calcium stone former における結石再発率を低下せしめる事実^{53) 54)}の in vitro における証明とも考えられ非常に興味深い. Bowyer ら⁵¹⁾, Ligabue ら⁵⁵⁾も同様に, GAG が inhibitor として強力であることを報告している. 伊藤ら⁵⁶⁾は抑制活性のある高分子 inhibitor は GAG ではない未知の物質であるとしている.

Baumann ら⁹⁾は pyrophosphate が CaOx 患者で低下している事実とともに, CaOx 結晶凝集 inhibitor として本物質が最も重要であつたと報告している. しかし正常人と結石患者の間に inhibitory activity の差は認めなかつたとも述べている.

今回の実験では GAG, とくに heparin に強い inhibitory activity が認められた. また citrate, magnesium, pyrophosphate にも濃度依存性の inhibitory activity が確認された. Robertson ら⁴⁹⁾は magnesium は inhibitory activity をもたないと報告しているが, 今回の実験では明らかにその効果が認められた. nucleation inhibitor として知られている methylene blue, EDTA に inhibitory activity は認められなかつた. さらに最近 Tawashi ら⁴⁸⁾によつて報告されている sodium copper chlorophyllin に非常に強い activity が観察された.

正常尿中での GAG は約 $200\mu\text{g}/\text{dl}$ ⁵⁷⁾, pyrophosphate は $10^{-5}\sim 10^{-4}$ ⁵⁸⁾, citrate は $3.2\times 10^{-3}\text{M}$ ²⁶⁾, magnesium は $5\times 10^{-3}\text{M}$ ²⁶⁾ とされている. 以上を今回の 1%尿で得られた結果に換算すると, 全体の inhibitory activity のうち GAG が約 60~70%, pyrophosphate, citrate が各 10~20%, magnesium は 0~5%を占めると推定された. 現時点では inhibitory activity をもつ最終的な物質は同定されていないため今後さらに詳細に調査する必要がある. inhibitor は単一物質ではなく 2 種以上の複合したものという可能性もある. その物質の同定も勿論必要ではあるが, 結石発生における位置づけを決定する上で, 個人間の違いや日内変動, 季節変動, 食餌との関連性など多方面からの検討も考慮しなくてはならないだろう. また尿中に存在する inhibitor のみならず, sodium copper chlorophyllin などのような体外物質に関しても調査し, 生体応用へと発展させてゆく必要があると考える.

今回の凝集阻止能測定法においては次のような問題がある. 第 1 に, 使用した尿は 1%という希釈された状態で存在するため原尿で存在する場合と異なつた状態にあることであり, この状態では inhibitor 本来の性質が変化している可能性がある. 全尿系を使用した凝集阻止能測定法開発が是非とも望まれる. 第 2 に, 本実験で使用した CaOx 結晶は monohydrate であるが, 臨床的観察からは dihydrate が多いため, 今後は後者を使用した実験系も考慮されなければならない.

以上のような問題点があるが, 本実験で使用した凝集阻止能測定法は非常に簡便かつ再現性に富むものである. また, 種々の物質の凝集阻止能測定や臨床例における治療効果の評価の上でも非常に有用な手段となると考えている. 本実験で使用した Coulter counter はそれほど高価なものではなく, 全国の主要施設に配備され実際に物理・化学研究や臨床検査室で汎用されている. 操作が簡単でアイソトープ法の繁雑さもないので, 結石研究の推進にあつて大いに活用されるべき装置であることを強調したい.

結 語

CaOx 結石の発生機序を解明する一助として, 結石患者と正常人の尿中 Ox および Ca 排泄量, 尿中 CaOx 結晶量, 尿中 CaOx 結晶凝集阻止能につき実験した. さらに尿中結晶凝集阻止物質に関しても検討した. その結果次の諸点が明らかとなつた.

1) 正常人 55 例, SSF 52 例, RSF 37 例における尿中 Ox, Ca, 尿酸の 1 日排泄量を測定した結果, Ca は結石患者において有意に高く, とくに RSF に著明な増加が認められた (mean $\pm$ SEM; control: $116\pm 11\text{mg}/\text{day}$, SSF: $160\pm 11\text{mg}/\text{day}$, RSF: $190\pm 21\text{mg}/\text{day}$). Ox 排泄量は RSF では増加していた (control: $24.8\pm 1.6\text{mg}/\text{day}$, SSF: $24.0\pm 2.3\text{mg}/\text{day}$, RSF: $34.3\pm 4.0\text{mg}/\text{day}$). クレアチニン 1g あたりの Ox 排泄量は有意差はないが RSF に高い値が認められた. 尿酸排泄量は control と結石患者に差を認めなかつた. 以上より RSF においては高 Ca 尿および軽度の Ox 排泄増加がその発生に大きく関与していると考えられた.

2) 尿中 Ox 排泄量および Ox 濃度と尿量の関係を求めた結果, 有意な相関関係が観察された.

3) 尿中に CaOx 結晶のみられた正常人 5 例, RSF 10 例の結晶量を Coulter counter を使用して測定した. 正常人では $5\sim 9\mu\text{m}$ にピークをもつ小さな結晶がみられ, 結石患者では $9\sim 13\mu\text{m}$, $21\sim 25\mu\text{m}$ にピークをもつ

大きな結晶がみられた。全体積はそれぞれ 0.37 ± 0.05 (mean $\pm$ SEM) $\times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$, $2.21 \pm 0.21 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ であり、両者に有意差を認めた ($p < 0.001$)。

4) metastable solution 中での CaOx 結晶の変化を Coulter counter 法で観察し、全体の結晶体積の変化がみられず、凝集のみが進行する系を確立した。この凝集系を種々の条件下で実験した結果、優れた凝集系で再現性に富むことが判明した。

5) 凝集系に正常人および SSF, RSF の尿を添加して観察した結果、尿には非常に強い凝集阻止能の存在することが判明した。最終濃度 1% の尿を比較した結果、正常人 ($60.2 \pm 2.4\%$)、SSF ($55.4 \pm 4.0\%$) に比し、RSF ($38.4 \pm 5.1\%$) では明らかに凝集阻止能が低下していた ($p < 0.001$)。

6) 凝集系を利用し種々の物質を添加した場合の凝集阻止能を測定した。その結果、citrate, magnesium pyrophosphate, sodium copper chlorophyllin, GAG に濃度依存性の強い阻止能のあることが判明した。urea, creatinine, methylene blue, EDTA に凝集阻止能は認められなかった。以上の物質のうち heparin が最も強い阻止能を示した。

7) 尿中 Ca, Ox, Ca $\times$ Ox/creatinine および阻止能の日内変動をみた。各項目ともに結石患者においては正常人よりも大きな変動を示し、特に食後に著明であった。阻止能は午後最も低いレベルを示した。

8) CaOx 結晶量測定ならびに CaOx 結晶凝集阻止能測定に使用した Coulter counter は、操作が簡単で再現性も高く、今後の結石研究にきわめて有用な装置である。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師津川龍三教授ならびに金沢大学黒田恭一教授に深く感謝致します。測定にあたって御協力いただいた教室員各位ならびに百成智津枝氏に謝意を表します。

本論文の要旨は第 297 回、第 299 回日本泌尿器科学会北陸地方会および第 68 回日本泌尿器科学会総会（神戸、1980）において発表した。

文 献

- 1) 吉田 修：日本における尿路結石症の疫学。日泌尿会誌, **70**, 957-983, 1979.
- 2) 鈴木孝治, 沢木 勝, 山川義憲, 松浦 一, 津川龍三：尿路結石の赤外線分光分析結果。金医大誌, **3**, 126-134, 1978.
- 3) Pak, C.Y.C.: Calcium urolithiasis. Pathogenesis, diagnosis and management. p. 5-36, Plenum Medical, New York, 1978.
- 4) Robertson, W.G.: Physical chemical aspects of calcium stone-formation in the urinary tract. in Urolithiasis Research, Fleisch, H., Robertson, W.G., Smith, L.H. and Vahlensieck, W. (Eds.) p. 25-39, Plenum Press, New York and London, 1976.
- 5) Elliot, J.S., Rabinowitz, I.N. and Silvert, M.: Calcium oxalate crystalluria. J. Urol., **116**, 773-775, 1976.
- 6) Hallson, P.C. and Rose, A.: Crystalluria in normal subjects and in stone formers with and without thiazide and cellulose phosphate treatment. Br. J. Urol., **48**, 515-524, 1976.
- 7) Robertson, W.G. and Peacock, M.: Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone-formers. Clin. Sci., **43**, 499-506, 1972.
- 8) Baumann, J.M., Bisaz, S., Felix, R., Fleisch, H., Ganz, U. and Russell, R.G.G.: The role of inhibitors and other factors in the pathogenesis of recurrent calcium-containing renal stones. Clin. Sci. Mol. Med., **53**, 141-148, 1977.
- 9) 鈴木孝治：尿路結石症の研究—尿中尿酸測定法の検討—。泌尿紀要, **26**, 393-399, 1980.
- 10) Robertson, W.G.: A method for measuring calcium crystalluria. Clin. Chim. Acta, **26**, 105-110, 1969.
- 11) Drach, G.W.: Urinary lithiasis. in Urology, Campbell, M.F., 4th ed. p. 790-801, Saunders Co., Philadelphia, 1978.
- 12) Robertson, W.G., Peacock, M., Marshall, R.W., Marshall, D.H. and Nordin, B.E.C.: Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. N. Engl. J. Med., **294**, 249-252, 1976.
- 13) Robertson, W.G., Peacock, M. and Nordin, B.E.C.: Activity products in stone-forming and non-stone-forming urine. Clin. Sci., **34**, 579-594, 1968.
- 14) Finlayson, B., Roth, R. and DuBois, L.: Calcium oxalate solubility studies. in Urinary Calculi, Delatte, L.C., Rapado, A. and Hodgkinson, A. (Eds.) p. 1-7, Karger, Basel, 1973.
- 15) Pak, C.Y.C., Ohata, M. and Holt, K.: Effect of diphosphonate on crystallization of calcium oxalate in vitro. Kidney Int., **7**, 154-160, 1975.
- 16) Pak, C.Y.C., Ohata, M., Lawrence, E.C. and Snyder, W.: The hypercalciurias. Causes, parathyroid functions and diagnostic criteria.

- J. Clin. Invest., **54**, 387—400, 1974.
- 17) Broadus, A.E., Dominguez, M. and Bartter, F.C.: Pathophysiological studies in idiopathic hypercalciuria: Use of an oral calcium tolerance test to characterise distinctive hypercalciuric subgroups. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 751—760, 1978.
 - 18) Pak, C.Y.C.: Calcium Urolithiasis. Pathogenesis, diagnosis and management. p. 37—79. Plenum Medical, New York and London, 1978.
 - 19) Marshall, V. White, R.H., Chaput de Saintonge, M., Tresidder, G.C. and Blandy, J.P.: The natural history of renal and ureteric calculi. *Br. J. Urol.*, **47**, 117—124, 1975.
 - 20) Jorgensen, F.S.: The urinary excretion and serum concentration of calcium, magnesium, sodium and phosphate in male patients with recurring renal stone formation. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **9**, 243—248, 1975.
 - 21) Malek, R.S., Wilkiemeyer, R.M. and Boyce, W.H.: The stoneforming kidney: A study of functional differences between individual kidneys in idiopathic renal lithiasis. *J. Urol.*, **116**, 11—14, 1976.
 - 22) Welshman, S.G. and McGeown, M.G.: The relationship of the urinary cations, calcium, magnesium, sodium and potassium in patients with renal calculi. *Br. J. Urol.*, **47**, 237—242, 1975.
 - 23) Hodgkinson, A.: Relations between oxalic acid, calcium, magnesium and creatinine excretion in normal men and male patients with calcium oxalate kidney stones. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **46**, 357—367, 1974.
 - 24) Hodgkinson, A.: Evidence of increased oxalate absorption in patients with calcium-containing renal stones. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **54**, 291—294, 1978.
 - 25) Pinto, B., Crespi, G., Sole-Balcels, F. and Barcelo, P.: Patterns of oxalate metabolism in recurrent oxalate stone formers. *Kidney Int.*, **5**, 285—291, 1974.
 - 26) Robertson, W.G., Peacock, M., Heyburn, P.J., Marshall, D.H. and Clark, P.B.: Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *Br. J. Urol.*, **50**, 449—454, 1978.
 - 27) Zarembski, P.M. and Hodgkinson, A.: Some factors influencing the urinary excretion of oxalic acid in man. *Clin. Chim. Acta*, **25**, 1—10, 1969.
 - 28) Tiselius, H.-G.: Excretion of 4-pyridoxic acid and oxalic acid in patients with urinary calculi. *Invest. Urol.*, **15**, 5—8, 1977.
 - 29) Schwille, P.O., Paulus, M., Scholz, D., Sigel, A. und Wilhelm, E.: Urin-Oxalat bei rezidivierender Calcium-Urolithiasis ohne und mit Überfunktion der Nebenschilddrüsen und bei Gesunden. *Urologe A*, **18**, 215—224, 1979.
 - 30) Butz, M. and Kohlbecker, G.: Oxalate urolithiasis: Significance of serum and urinary oxalate. *Urol. Int.*, **35**, 303—308, 1980.
 - 31) Tiselius, H.-G.: Relationship between the severity of renal stone disease and urine composition. *Eur. Urol.*, **5**, 323—327, 1979.
 - 32) Takasaki, E.: Urinary magnesium and oxalic acid excretion in patients with recurrent oxalate urolithiasis. *Invest. Urol.*, **12**, 251—254, 1975.
 - 33) Robertson, W.G. and Peacock, M.: The cause of idiopathic calcium stone disease: Hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron*, **26**, 105—110, 1980.
 - 34) Finlayson, B.: Renal lithiasis in review. *Urol. Clin. North. Amer.*, **1**, 181—212, 1974.
 - 35) 八竹 直, 井口正典, 郡健二郎, 栗田 孝, 武本征人, 板谷宏彬: 尿中尿酸に関する検討. 第Ⅱ報, 尿路結石症における尿中尿酸排泄量について. *日泌尿会誌*, **70**, 291—299, 1979.
 - 36) Robertson, W.G., Peacock, M. and Nordin, B.E.C.: Calcium crystalluria in recurrent renal-stone formers. *Lancet*, **ii**, 21—24, 1969.
 - 37) Smith, L.H.: Application of physical, chemical and metabolic factors to the management of urolithiasis. in *Urolithiasis Research*, Fleisch, H., Robertson, W.G., Smith, L.H. and Vahlensieck, W. (Eds.) p. 199—211. Plenum Press, New York and London, 1976.
 - 38) Dyer, R. and Nordin, B.E.C.: Urinary crystals and their relation to stone formation. *Nature*, **215**, 751—752, 1976.
 - 39) Robertson, W.G., Peacock, M. and Nordin, B.E.C.: Calcium oxalate crystalluria and urine saturation in recurrent renal stone-formers. *Clin. Sci.*, **40**, 365—374, 1971.
 - 40) Robertson, W.G., Peacock, M., Marshall R.W. and Knowles, F.: The effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) on calcium oxalate crystalluria in recurrent renal stone-formers. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **47**, 13—22, 1974.
 - 41) Crassweller, P.O., Brandes, L., Katirtzoglou, A. and Oreopoulos, D.G.: Studies of crystalluria in recurrent calcium lithiasis. *Canad. J. Surg.*, **22**, 527—529, 1979.
 - 42) Elliot, J.S. and Rabinowitz, I.N.: Calcium oxalate crystalluria: Crystal size in urine. *J. Urol.*, **123**, 324—327, 1980.

- 43) Fleisch, H.: Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int.*, **13**, 361—371, 1978.
- 44) Meyer, J.L. and Smith, L.H.: Growth of calcium oxalate crystals.: II. Inhibition by natural urinary crystal growth inhibitors. *Invest. Urol.*, **13**, 36—39, 1975.
- 45) Rollins, R. and Finlayson, B.: Mechanism of prevention of calcium oxalate encrustation by methylene blue and demonstration of the concentration dependence of its action. *J. Urol.*, **110**, 459—463, 1973.
- 46) Gill, W.B., Karesh, J.W., Garsin, L. and Roma, M.J.: Inhibitory effects of urinary macromolecules on the crystallization of calcium oxalate. *Invest. Urol.*, **15**, 95—99, 1977.
- 47) Sutor, D.J.: Growth studies of calcium oxalate in the presence of various ions and compounds. *Br. J. Urol.*, **41**, 171—178, 1969.
- 48) Tawashi, R., Cousineau, M. and Sharkawi, M.: Effect of sodium copper chlorophyllin on the formation of calcium oxalate crystals in rat kidney. *Invest. Urol.*, **18**, 90—92, 1980.
- 49) Robertson, W.G., Peacock, M. and Nordin, B.E.C.: Inhibitors of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin. Chim. Acta*, **43**, 31—37, 1973.
- 50) Felix, R., Monod, A., Broge, L., Hansen, N.M. and Fleisch, H.: Aggregation of calcium oxalate crystals: Effect of urine and various inhibitors. *Urol. Res.*, **5**, 21—28, 1977.
- 51) Bowyer, R.C., Brockis, J.G. and McCulloch, R.K.: Glycosaminoglycans as inhibitors of calcium oxalate crystal growth and aggregation. *Clin. Chim. Acta*, **95**, 23—28, 1979.
- 52) Robertson, W.G., Knowles, F. and Peacock, M.: Urinary acid mucopolysaccharide inhibitors of calcium oxalate crystallization. in *Urolithiasis Research*, Fleisch, H., Robertson, W.G., Smith, L.H. and Vahlensieck, W. (Eds.) p. 331—334, Plenum Press, New York and London, 1976.
- 53) Coe, F.L.: Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int.*, **13**, 418—426, 1978.
- 54) Miano, L., Potta, S. and Gallucci, M.: Allopurinol in the prevention of calcium oxalate renal stones. Preliminary results. *Eur. Urol.*, **5**, 229—232, 1979.
- 55) Ligabue, A., Fini, M. and Robertson, W.G.: Influence of urine on “in vitro” crystallization rate of calcium oxalate: Determination of inhibitory activity by a [¹⁴C] oxalate technique. *Clin. Chim. Acta*, **98**, 39—46, 1979.
- 56) 伊藤晴夫, 島崎 淳: 尿酸カルシウム結晶の成長を抑制する高分子物質についての研究. 第4編, 尿中ペブシノーゲンおよびムコポリサッカライドの尿酸カルシウム結晶成長抑制活性について. *日泌尿会誌*, **69**, 1355—1359, 1978.
- 57) 日本生化学会: 生化学データブック〔I〕生体物質の諸性質, 生体の組成, p. 1601, 東京化学同人, 1979.
- 58) Russell, R.G.G. and Hodgkinson, A.: The urinary excretion of inorganic pyrophosphate by normal subjects and patients with renal calculus. *Clin. Sci.*, **31**, 51—62, 1966.

(1981年2月9日受付, 特別掲載)