脣酸カルシウム結晶凝集を抑制する尿中高分子 阻止活性の測定について

小 出 卓 生
武 本 征 人*
板 谷 宏 彬**
高 羽 津
園 田 孝 夫

大阪大学医学部泌尿器科学教室
(主任: 園田孝夫教授)

MEASUREMENTS OF URINARY MACROMOLECULAR INHIBITORY ACTIVITY OF CALCIUM OXALATE CRYSTAL AGGREGATION

Takuo Koide, Masato Takemoto*, Hiroaki Itatani**, Minato Takaha and
Takao Sonoda

Department of Urology, Osaka University School of Medicine, Department of Urology, Sakai City Hospital* and
Department of Urology, Sumitomo Hospital**

Urinary macromolecular inhibitory activity (more than 10,000 mol. wt.) of calcium oxalate crystal aggregation was studied by using in vitro new assay method of non-crystal-seed system. As to the mode of inhibitory effects, while macromolecular inhibitors showed their strong inhibition just on crystal aggregation, the process of crystal nucleation, e.g. formation product of calcium oxalate, was not affected by those inhibitors. Next, recurrent stone formers were compared with non-stone formers with regard to the urinary macromolecular inhibitory activity. As a result, the urinary macromolecular substances of recurrent stone formers showed much less inhibitory activity than those of non-stone formers. This fact suggests that urinary macromolecular inhibitors on crystal aggregation take a considerable part in the in vivo stone formation and that a quantitative decrease or qualitative alteration of the macromolecular inhibitors occurs in the urine of recurrent stone formers.

要旨: 尿中高分子領域に存在する脣酸カルシウム結晶凝集阻止活性測定法を, in vitro の non-crystal-seed system をもちいて確立し, 尿中高分子阻止活性の阻止作用様式および再発性結石患者尿中高分子阻止活性について検討を加えた。結果, 尿中高分子物質は結晶核生成過程すなわち脣酸カルシウムの formation product に何らの影響をおよぼすことなく結晶凝集を強く抑制することが判明した。また, 再発性結石患者と正常人の尿中高分子阻止活性を比較すると, 再発性結石患者ではこの尿中高分子阻止活性が有意に低下していた。すなわち再発性結石患者では尿中高分子阻止物質の質的変化ないしは量的減少が生じており, これが in vivo での結石形成要因として深く関与していることが示唆された。

緒 言

尿路結石は, まず結晶核生成 crystal nucleation にはじまり, 次いで結晶成長 crystal growth, 結晶凝集

crystal aggregation, さらに結石化 concretion の各過程を経て形成され则认为られている。カルシウム含有結石症の成因に関して, 従来の多くの研究では, これらの過程のうち主に第一の過程である結晶核生成の問題, すなわち結石形成イオンの過飽和度 supersaturation level の問題に関して論じられてきた。しかし, 結晶核生成

* 現, 市立堺病院泌尿器科

** 現, 住友病院泌尿器科

は結石形成の第1歩として不可欠の条件ではあるものの、カルシウム含有結石症の成因は、多くの場合この結晶核生成の問題のみでは解決しえないことや、正常人尿もしばしば尿酸カルシウムに関して過飽和状態を呈したり¹⁾²⁾、しばしば尿酸カルシウム結晶尿を呈することなど³⁾⁴⁾、最近では結石成因としてさらに次の過程である結晶成長・凝集が注目されつつある。最近我々は、ウサギをもちいた実験的腎結石形成モデルにおいて、結晶凝集こそが結石形成の最も重要な要素であることを報告した⁵⁾。ヒト尿中には、これら結晶成長・凝集に対する阻止物質の存在が示唆されているが、ピロリン酸^{6)~8)}などごく一部の低分子物質が同定されているにすぎず、阻止活性の大部分を占めるといわれる尿中高分子阻止物質^{9)~12)}については混乱している。そこで尿中高分子分画の尿酸カルシウム結晶凝集におよぼす阻止活性の測定法を検討し、次いで再発性結石患者と正常人の尿中高分子阻止活性を比較検討した。

対 象

再発性結石患者：34人の明らかに再発・多発傾向を認める上部尿路結石症患者を臨床的に注意深く選択した。患者の内訳は、男26人、女8人、年齢は19~63歳、平均37.4歳であり、すべての患者に尿路感染症の既往はない。結石成分は尿酸カルシウムが23人、リン酸カルシウムが6人、尿酸カルシウムとリン酸カルシウムの混合が5人とすべてがカルシウム含有結石患者である。

単発性結石患者：今回の実験の段階で、過去に結石の既往をもたず、かつ腎内に結石を有している患者9人を単発性結石患者とした。患者の内訳は、男7人、女2人、年齢は24~55歳、平均35.6歳であり、結石成分は尿酸カルシウムが7人、リン酸カルシウムが2人である。

正常対照者：過去に尿路結石症を含む腎・尿路系疾患の既往のない健康成人男子31人と女子4人であり、年齢は22~55歳、平均30.2歳である。

方 法

1. 尿採取および尿中高分子分画 (urinary macromolecules, 以下 UMM と略す) の調製

尿は蓄尿による成分変化を避けるため新鮮尿として早朝尿を採取し、一部を電解質、pH の測定に供し、残りは結晶析出を防ぐために蒸留水で2倍稀釈した後、Whatman No. 1 濾紙をもちいて有形成分を除去した。この2倍稀釈尿を Amicon Diaflo Membrane, PM 10 (排除分子量10,000, Amicon 社) をもちいて退外濾過・脱塩をおこない UMM を得た。UMM の濃度は、

実験系の検討では原尿と等濃度のものから10倍濃縮のものまで種々の濃度のものを調製し、個々の症例の結晶凝集阻止活性の検討には原尿と等濃度のものを調製した。以上の処理は4℃でおこなった。UMM から低分子物質が完全に除去されていることは、Na, K, Cl, Creatinine, Urea N, Ca, P, Mg, 尿酸に関して確認した。また UMM は新鮮時に実験に供した後、-80℃で凍結保存し、必要に応じて融解使用した。

2. 尿酸カルシウム結晶凝集阻止活性の測定

尿酸カルシウム結晶凝集阻止活性の測定にもちいた反応系は主に non-crystal-seed system でおこない、さらに比較検討のため crystal-seed system でも測定した。反応系にもちいた試薬はすべて特級であり、水は蒸留水をもちいた。

(1) Non-crystal-seed system

10ml 容量のプラスチック製蓋付滅菌チューブに、1.1 mM CaCl₂ 水溶液 5.0ml と UMM 0.5ml またはコントロールとして蒸留水 0.5ml を加えた後、tracer dose の ¹⁴C-oxalate (The Radiochemical Centre) を含む 21mM oxalate anhydrous 水溶液 0.2ml を添加する。37℃ shaking incubator 中で一定時間反応させた後、充分に攪拌した反応液の一部を Whatman No. 41 quantitative paper (pore size : 20~25μm, Whatman 社) で汙過した濾液と、2,000×g, 10min. 遠沈後の遠沈上清について、各々の ¹⁴C-radioactivity を Searle 社の Isocap で β-counting した。遠沈上清中の radioactivity 値は結晶化せずに溶解している尿酸量をあらわし、濾液の radioactivity 値は尿酸カルシウム結晶として析出したものの 20~25μm 以上の大きい塊、すなわち凝集結晶塊にならずに小さい塊のままとどまっている尿酸量と溶解尿酸量の和であると考えられる。従って、下式は析出総結晶量に対する非凝集結晶の割合を示すものと考え、これを非凝集結晶率 (non-aggregated crystal ratio, NAR) とした。

$$NAR = \frac{\text{d.p.m.} \cdot \text{filtrate} - \text{d.p.m.} \cdot \text{supernatant}}{\text{d.p.m.} \cdot \text{initial} - \text{d.p.m.} \cdot \text{supernatant}} \times 100$$

従って、(NAR · sample - NAR · control) 値が検体の結晶凝集阻止活性を示しており、この値を Inhibition Index として評価した。

(2) Crystal-seed system

尿酸カルシウムに関して準安定過飽和状態の溶液に seed crystal を加えることにより結晶形成を誘導する方法であり、反応液は Robertson ら¹³⁾に準じ、1mM CaCl₂, 0.2mM sodium oxalate を 0.15M の NaCl を含む 10

mM sodium cacodylate buffer (pH 6.0) に溶解し、これに tracer dose の ^{14}C -oxalate を加えた。seed crystal は Pak ら¹⁴⁾の方法にもとづき、1.25g/L の calcium oxalate monohydrate crystal suspension を作製した。10ml 容量のプラスチック製蓋付滅菌チューブに、上記の反応液 5.0ml と UMM 0.5ml または蒸留水 0.5ml を加え、これに crystal suspension 0.1ml を加えることにより反応を開始し、37°C shaking incubator 中で4時間反応させた後、反応液の一部を 0.45 μm の Millipore filter で濾過し濾液中の ^{14}C -radioactivity を測定した。

結晶凝集阻止活性は、下式でもとめた。

$$\frac{\text{d.p.m.} \cdot \text{filtrate}}{\text{d.p.m.} \cdot \text{initial}} \times 100$$

結 果

I. non-crystal-seed system の検討

1. 結晶形成量の経時的変化

正常人 UMM (以下 normal UMM と略す) と再発性結石患者 UMM (recurrent stone former UMM, 以下 RSF-UMM と略す) の各2検体について、UMM 終濃度8.8%の条件下 (原尿と等濃度の UMM を添加した場合) で、遠沈上清中の ^{14}C -radioactivity の経時変化を示した (Fig. 1)。normal UMM 添加群, RSF-UMM 添加群, コントロールともに反応開始時には不安定過飽和状態にあり、反応開始後2~4時間で添加した尿酸の約1/2が析出し、さらに72時間まで時間とともに尿酸カルシウムの析出が続くことがわかる。1時間以内の短い incubation では normal UMM 添加群でやや結晶形成量が多い傾向はあるものの、2時間以上の incubation ではこれら3群の間に差はみられない。

Fig. 1 遠沈上清中 radioactivity の経時変化。
normal UMM (○), RSF-UMM (●), control (×)。

2. 濾液中 ^{14}C -radioactivity の経時変化

UMM 終濃度8.8%の条件下で、濾液中の ^{14}C -radioactivity の経時変化を示した (Fig. 2)。遠沈上清とは異なり濾液の場合、normal UMM 添加群では2時間以上の incubation では非常にゆるやかな低下を示すのに対して、RSF-UMM 添加群およびコントロールでは時間とともに濾液中の radioactivity の減少がみられる。すなわち、normal UMM 添加群では他の2群に比して結晶凝集が抑制されており、大きい塊を形成する割合が少ないことが示されている。これに反して RSF-UMM 添加群ではコントロールに近い値を示しており、結晶凝集に対する抑制はみられない。

Fig. 2 濾液中 radioactivity の経時変化。normal UMM (○), RSF-UMM (●), control (×)。

3. non-aggregated crystal ratio (NAR) の経時変化

Fig. 3 に示すように、RSF-UMM 添加群およびコントロールでは NAR 値は経時的に低下しており、時間とともに結晶凝集による大きい塊の形成が進行することがわかるが、これに反して、normal UMM 添加群では2時間以上の incubation ではほぼ一定の NAR 値が維持されている。ただ著しく短時間の incubation では、コントロールで結晶凝集の進行が遅れる傾向がみられる。

以上の結果にもとづくと、normal UMM と RSF-UMM の間に存在することが予想される結晶凝集阻止作用の差異は、この in vitro の non-crystal-seed system では4時間以上の incubation でよくあらわされると考えられた。そこで以下の検討は24時間 incubation の条件でおこなった。Fig. 4 は、24時間反応後の normal UMM 添加群および RSF-UMM 添加群の反応液と半

Fig. 3 non-aggregated crystal ratio の経時の変化。normal UMM (○), RSF-UMM (●), control (×)。

Fig. 4 normal UMM 添加群と RSF-UMM 添加群の反応液および沈殿物の半偏光顕微鏡像(×400)。

偏光顕微鏡で観察した沈殿物であるが、RSF-UMM 添加群では成長した尿酸カルシウム結晶が多数凝集し大きい塊を形成しているのに対し、normal UMM 添加群では尿酸カルシウム結晶の多くは単離して存在し凝集塊は

少なく、反転混和直後の反応液は微細な結晶のため白濁している。なお形成された結晶は、赤外線分光分析の結果、いずれも尿酸カルシウム 1 水化物であった。

4. UMM 濃度と Inhibition Index の関係

原尿の1/2, 1, 2, 3, 4, 5 倍に濃縮した normal UMM を添加した場合 (UMM 終濃度は 各々, 4.4, 8.8, 17.6, 26.4, 35.2, 44.0%) の遠沈上清中 ¹⁴C-radioactivity と Inhibition Index を Fig. 5 に示した。析出総結晶量の指標である遠沈上清中の ¹⁴C-radioactivity は UMM 濃度に関係なくコントロールと同等に一定であり、UMM は結晶核生成に対しては何らの阻止作用を持たないことが示されている。他方、Inhibition Index は UMM 濃度の増加とともに高い値を示し、Inhibition Index で 0 ~ 50 の範囲では、Inhibition Index と UMM 濃度の間に強い直線相関が認められた ($r=0.97, p>0.005$.)

Fig. 5 遠沈上清中 radioactivity (■) および Inhibition Index (□) と UMM 濃度の関係

Table 1 尿中高分子阻止活性 におよぼす凍結保存の影響

	Inhibition Index (n = 5)
fresh UMM	21.9 + 4.7
preserved UMM	22.1 + 3.9

5. UMM の凍結保存による影響

normal UMM 5 検体について、調製後新鮮時と -80℃・1 週間凍結保存後に Inhibition Index を測定し比較した (Table 1)。新鮮時と凍結保存後の Inhibition Index に有意の差は認められず、凍結保存による結晶凝集阻止活性の劣化はない。

6. 再現性の検討

normal UMM 2検体と RSF-UMM 1検体について、UMM 終濃度8.8%, 24時間 incubation の条件下に再現性の検討をおこなった。測定は triplicate study でおこない、その平均値を測定値とし、各検体について各々3回、合計9回の測定をおこなった。Inhibition Indexで各検体の平均値±1.0以内に9回中4回が、平均値±2.0以内に9回中8回が含まれており、残り1回の測定値も平均値±2.6以内であり、再現性の点で問題はないと考えられた。ただし、UMM は結晶核生成に影響をおよぼす可能性のある低分子物質が十分に除去されていることが肝要であり不十分な脱塩の場合には再現性は悪くなるようである。また UMM 濃度を著しく高めた場合の再現性は悪くなる。これは非凝集結晶の増加に伴う濾過段階での誤差の問題によると考えられる。

7. Amicon Membrane の非特異的吸着の影響

UMM 調製にもちいた Amicon Diaflo Membrane, PM 10 による尿中高分子阻止物質の吸着の有無を正常人透析尿6検体をもちいて Amicon Membrane, PM 10 による限外濾過前後の阻止活性を比較することにより検討した。透析尿は4℃で低分子物質が完全に除去されるまで蒸留水に対して透析したものである。限外濾過前の阻止活性に比して、限外濾過後の阻止活性は6～11%の低下がみられ若干の阻止活性喪失が認められるものの問題となる程の吸着はないと考えられた。

II. 再発性結石患者と正常人の尿中高分子阻止活性の比較

34人の RSF-UMM と35人の normal UMM, さらに参考のため9人の単発性結石患者から得た UMM (single stone former-UMM, 以下 SSF-UMM と略す) について、それぞれの 尿酸カルシウム 結晶凝集阻止活性を non-crystal-seed system をもちいて比較した (Fig. 6)。normal UMM の Inhibition Index は 19.8 ± 5.1 であるのに対し、RSF-UMM の Inhibition Index は 6.4 ± 5.1 と低値を示しており、両者の間には有意の差を認めた (Student *t*-test, $p < 0.001$)。SSF-UMM は9例中5例に Inhibition Index で16.6 (RSF-UMM の平均+2SD) 以上の高値を。3例に11.5 (RSF-UMM の平均+1SD) 以下の値を認めており一定の傾向を見出すには至っていない。なお、これら Inhibition Index と UMM 調製にもちいた原尿のクレアチニン濃度に相関はみられず、Inhibition Index を UMM 調製にもちいた原尿のクレアチニン濃度で補正した Inhibition Index/g・Cr 値に於

Fig. 6 再発性結石患者、単発性結石患者および正常人の尿中高分子阻止活性の比較。(non-crystal-seed system)

Fig. 7 Inhibition Index/g・Cr であらわした再発性結石患者および正常人の尿中高分子阻止活性の比較。(non-crystal-seed system)

いても normal UMM と RSF-UMM の間には同様の有意の差が認められた (Fig. 7).

比較のため crystal-seed system によっても normal UMM と RSF-UMM の阻止活性を検討したが、同様の傾向を認めるものの両者の差異は non-crystal-seed system の方がより明瞭であつた (Fig. 8).

Fig. 8 再発性結石患者および正常人の尿中高分子阻止活性の比較. (crystal-seed system)

考 按

Howard ら¹⁵⁾が、正常ヒト尿中には *in vitro* でくる病ラット軟骨の石灰化を阻止する作用があることを報告して以来、ヒト尿中に存在する蔞酸カルシウムあるいはリン酸カルシウムの結晶形成阻止物質が注目をあつめている。実際、*in vitro* の実験系で、実に多くの尿中物質や化学物質が蔞酸カルシウムやリン酸カルシウムの結晶形成に阻止的に作用することが報告されている。しかし、これら多くの阻止物質の作用部位は、結石形成の各過程、すなわち結晶核生成、結晶成長あるいは結晶凝集と様々であり複雑である。従来の阻止物質に関する研究の多くは、これらの中で主に結晶核生成を抑制する物質、すなわち結石形成イオンの溶解度を高める物質についておこなわれてきたが、近年、結石成因として結晶成長さらには結晶凝集が重要視されるようになり^{9,10)}、結晶成長・凝集過程に作用する阻止物質の役割とその解明が待たれている。ところで尿中に存在する結晶成長・凝集阻

止物質には、大別して低分子阻止物質と高分子阻止物質の2つの阻止物質が示唆されているが、全尿の有する総阻止活性の大部分は後者の高分子阻止物質によつていといわれる¹⁰⁻¹²⁾。我々の予備実験でも、分子量10,000以下の低分子領域には全尿の総阻止活性のおよそ8~22%の阻止活性しか認められなかつたのに対し、分子量10,000以上の高分子領域には70~83%の阻止活性が認められており、蔞酸カルシウム結晶凝集を抑制する尿中物質の主役は高分子物質であろうと推測された。

従来の蔞酸カルシウム結晶成長・凝集阻止活性測定法には、蔞酸カルシウム準安定過飽和溶液に蔞酸カルシウム結晶やガラスファイバー片などの固相を投入することより始まる結晶成長・凝集を観察する seed system^{13,14)}と蔞酸カルシウム不安定過飽和溶液で均一核生成に始まる結晶成長・凝集を観察する non-seed system¹⁶⁾の大別して2つの系が報告されているが、再現性の点で前者が優つていと報告されている¹⁷⁾。しかし我々は、実験系の選択にあたり、正常人と結石患者尿の間に存在する相違をより明確にあらわすことのできる系を採用することが肝要と考え、両者を比較のうえ non-seed system を採用した。non-seed system の欠点といわれている再現性の問題¹⁷⁾は、尿中高分子物質溶液の調製時に結晶核生成に影響をおよぼす低分子物質を除去すべくおこなつた脱塩操作を充分におこなうことにより比較的良好な再現性が得られたが、全尿あるいは尿中低分子領域の阻止活性の検定の際は多少再現性に劣るようであつた。さらに結晶核生成、結晶成長、結晶凝集をできうる限り分離して観察するために、遠沈および20~25 μ mの孔径を有する濾紙による濾過をおこなつたが、これは通常成長した蔞酸カルシウム結晶とほとんどが8~10 μ m以下の大きさであり、20~25 μ m以上の塊はおおむね凝集結晶塊と考えうるからである。

ところで、non-seed system と seed system で差異の明瞭さに差はあるもののいずれの実験系においても、正常人に比してカルシウム含有尿路結石症患者の尿中高分子阻止活性は有意に低下していた。この再発性結石患者にみられる阻止活性の低下が結石形成に伴う単に2次的な尿中高分子物質の変化にもとづくものでないことは、腎内に結石を有する単発性結石患者9人中5人で再発性結石患者の平均 $\pm$ 2SDをうわまわる阻止活性が見出されたことや、再発性結石患者では stone free の時期にも阻止活性が低値を示していたことなどから推測できる。また結石患者に頻度の高いといわれる結晶尿^{9,10)}で

は、すでに阻止物質が消費されている可能性も考えられたが、数人の正常人結晶尿から得られた尿中高分子物質はすべて強い阻止活性を示しており、また試料の調製にもちいた尿のカルシウム濃度（酢酸カルシウム過飽和度に相関するといわれる¹⁸⁾）と阻止活性の間には一定の関係を認めなかつた。採尿後すみやかに尿を稀釈し新らたな多量の結晶析出を防げば、もしあるとしても結晶尿中での阻止物質の消費は無視しうると考えられる。また尿中阻止活性には日内変動があり、正午前後に高値を示し、零時前後に低値を示すとの報告がある¹⁹⁾。我々は蓄尿による尿成分の変化を避けるため新鮮尿として早朝尿を採取したが採尿の時間帯に大きな差はなく、また採取した尿の濃さを補正すべく算出した $g \cdot \text{クレアチニン}$ あたりの阻止活性値においても同様の有意の差を認めたことから、再発性結石患者の尿中高分子阻止活性の低下が採尿条件によるものとは考え難い。以上の事実から、尿中高分子阻止活性は *in vivo* での結石形成に深く関与しているものと推測され、再発性結石患者の結石成因のひとつとして尿中高分子阻止物質の量的減少ないし質的变化が強く示唆される。

ところで正常人に高く、再発性結石患者で低い活性を示すこの尿中高分子阻止物質の阻止作用の性質に関して興味深い新らたな知見が得られた。ひとつは、この尿中高分子阻止物質にはカルシウムイオンとの電気的結合などによる結晶核生成阻止作用はまったく認められず、総結晶形成量には何らの作用を示し得ないことである。この点で結晶核生成にも結晶成長・凝集にも阻止作用を有するといわれるピロリン酸²⁰⁻²¹⁾のような尿中低分子阻止物質とは作用様式を異にする。もうひとつは、この尿中高分子阻止物質の結晶凝集阻止作用は形成結晶のコロイドあるいはコロイド類似状態の維持作用としてあらわれていることであり、少なくとも結晶核に近い微細な結晶を把握して結晶成長・凝集を阻止するのではなく、ある程度成長した結晶の表面に何らかの作用をおよぼすことにより結晶凝集を抑制しているようである。またこの尿中高分子阻止物質は酢酸カルシウムの均一核生成に始まる結晶凝集にのみ特異的なものではないようであり、ガラスファイバー片²⁰⁾やガラス壁²¹⁾での結晶形成にも類似の作用を有するようである。従つてこの阻止物質の作用様式を解明することは、均一核生成に始まる結晶形成のみならず *epitaxis* の阻止についても役立つと考えられる。

結 語

1. 尿中高分子分画（分子量10,000以上）の酢酸カルシウム結晶凝集阻止活性測定法を *in vitro non-crystal-seed system* をもちいて確立した。

2. 34人の再発性カルシウム結石患者と35人の正常人の尿中高分子分画について酢酸カルシウム結晶凝集阻止活性を比較したところ、再発性結石患者ではこの阻止活性が有意に低下していた。この事実から、尿中高分子阻止活性は *in vivo* での結石形成に深く関与しているものと考えられ、また再発性結石患者の結石成因のひとつとして尿中高分子阻止物質の量的減少ないしは質的变化が重要な要因であろうと考えられた。

3. この尿中高分子阻止物質は、結晶凝集過程において強い阻止作用を示すが、結晶核生成過程、すなわち酢酸カルシウムの溶解性には何らの影響をおよぼさない。

本論文の要旨は第67・68回日本泌尿器科学会総会で発表した。なお本研究の一部は、昭和54年度文部省科学研究費補助金 No. 467258の援助を受けた。

文 献

- 1) Elliot, J.S. and Ribeiro, M.: Calcium oxalate solubility in urine: The state of relative saturation. *Invest. Urol.*, **5**, 239—243, 1967.
- 2) Hodgkinson, A., Marshall, R.W. and Cochran, M.: Diurnal variations in calcium phosphate and calcium oxalate activity products in normal and stone-forming urines. *Isr. J. Med. Sci.*, **7**, 1230—1234, 1971.
- 3) Robertson, W.G., Peacock, M. and Nordin, B.E.C.: Calcium crystalluria in recurrent renal-stone formers. *Lancet*, **2**, 21—24, 1969.
- 4) 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.
- 5) Itatani, H., Yoshioka, T., Namiki, M., Koide, T., Takemoto, M. and Sonoda, T.: Experimental model of calcium-containing renal stone formation in a rabbit. *Invest. Urol.*, **17**, 234—240, 1979.
- 6) Fleisch, H. and Bisaz, S.: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Amer. J. Physiol.*, **203**, 671—675, 1962.
- 7) Fleisch, H. and Bisaz, S.: The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experimentia*, **20**, 276—277, 1964.
- 8) 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.
- 9) 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.
 - 10) Robertson, W.G., Knowles, C.F. and Peacock, M.: Urinary acid mucopolysaccharide inhibitors of calcium oxalate crystallization., in *Urolithiasis Research*, edited by Fleisch, H., Robertson, W.G., Smith, L.H. and Vahlensieck, W., pp. 331—334, Plenum Press, New York, 1976.
 - 11) Gill, W.B. and Roma, M.J.: Determination of supersaturation levels and crystallization rates of calcium oxalate from urines of normal humans and stone formers: Effect of non-dialyzable materials. *J. Surg. Res.*, **21**, 45—49, 1976.
 - 12) Robertson, W.G., Peacock, M. and Knowles, C.F.: Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone formers., in *Urinary Calculi*, edited by Cifuentes Delatte, L., Rapado, A. and Hodgkinson, A., pp. 302—306, S. Karger, Basel, 1973.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) Howard, J.E., Thomas, W.C. Jr., Barker, L.M., Smith, L.H. and Wadkins, C.L.: The recognition and isolation from urine and serum of a peptide inhibitor to calcification. *Johns Hopkins Med. J.*, **120**, 119—136, 1967.
 - 16) Rose, M.B.: Renal stone formation. The inhibitory effect of urine on calcium oxalate precipitation. *Invest. Urol.*, **12**, 428—433, 1975.
 - 17) Nancollas, G.H.: Kinetics of crystal growth from solution. *J. Crystal Growth.*, **3**, 4, 335—339, 1968.
 - 18) Pak, C.Y.C.: Hypercalciuria in calcium urolithiasis., in *Pathogenesis, Diagnosis and Management*, pp. 37—79, Plenum Press, New York, 1978.
 - 19) Robertson, W.G.: Physical chemical aspects of calcium stone-formation in the urinary tract., in *Urolithiasis Research*, edited by Fleisch, H., Robertson, W.G., Smith, L.H. and Vahlensieck, W., pp. 25—39, Plenum Press, New York, 1976.
 - 20) Sutor, D.J.: Growth studies of calcium oxalate in the presence of various ions and compounds. *Brit. J. Urol.*, **41**, 171—178, 1969.
 - 21) 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.

(1981年6月18日受付)