尿路結石症におけるクエン酸代謝の研究

1. クエン酸リアーゼを用いた尿中クエン酸の測定

市立泉佐野病院泌尿器科 安 川 修
(部長: 高松正人) 高 松 正 人

戎 野 庄 一

和歌山県立医科大学泌尿器科 森 本 鎮 義
(主任: 大川順正教授) 吉 田 利 彦

大 川 順 正

STUDIES ON CITRATE METABOLISM IN UROLITHIASIS

1. An Enzymatic Determination of Urinary Citrate with Citrate Lyase

Shu Yasukawa and Masato Takamatsu

Department of Urology, Izumisano Municipal Hospital

(Chief: M. Takamatsu)

Shoichi Ebisuno, Shigeyoshi Morimoto, Toshihiko Yoshida and Tadashi Ohkawa

Department of Urology, Wakayama Medical College

(Director: Prof. T. Ohkawa)

A method for enzymatic determination of urinary citrate using citrate lyase is described. The optimum pH is 7.2 and the addition of zinc ion is found to activate the reaction, but the influence of pH and zinc ion on the reaction velocity is reduced in proportion to increase of citrate lyase. The effect of the Tris HCl buffer concentration on reaction velocity is also studied, and high concentrations of the Tris HCl buffer are found to inhibit the reaction.

The recovery rates of citrate added to urine ranged from 98.5% to 103% and the coefficient of variation of triplicate assay is 3.1%.

The urinary citrate excretion in healthy volunteers are 397 ± 159 and 474 ± 209 mg/day (mean $\pm$ SD) for 66 males and 23 females, respectively.

Since this method is highly precise and convenient, it may be readily adopted as a routine clinical examination.

要旨: クエン酸リアーゼ (以下 CL) を用いた尿中クエン酸測定法につき検討した。本反応の原理は、クエン酸が CL によりオキザロ酢酸に変換され、さらにオキザロ酢酸がリンゴ酸脱水素酵素と NADH の存在下にリンゴ酸に変換されるときに消費される NADH の量を 340nm で比色測定するというものである。本測定法に影響を与えると思われる諸因子につき検討したところ、Tris HCl buffer の pH は 7.2 付近が最適と思われ、亜鉛イオンの添加は反応を促進することが確認されたが、pH や亜鉛イオンの影響は CL の量が増加してゆくにつれて生じにくくなった。また Tris HCl buffer の濃度は 0.1M 付近で良好な反応が得られ、高濃度の buffer は反応を阻害するようであった。

本法におけるクエン酸の添加回収率は 98.5~103%, triplicate assay での変動係数は平均 3.1% と信頼に足り得るものであった。本法によって測定した健常人の 24 時間尿中クエン酸排泄量は男子 397 ± 159 mg/day ($n=66$), 及び女子 474 ± 209 mg/day ($n=23$) であった。

本測定法は前述した正確さに加え操作がきわめて簡便であり、日常検査として活用できるすぐれた方法であると思われた。

結 言

尿路結石患者では健康人に比して尿中クエン酸排泄量が低い傾向にあることが比較的早くから知られており^{1)~3)}, またクエン酸がリン酸カルシウムや尿酸カルシウムの形成を阻害するという報告もなされており⁴⁾, 尿路結石の成因やその再発防止に関してクエン酸代謝の検討はきわめて重要であると考えられる。しかしながらクエン酸の測定法が複雑かつ困難であったため尿路結石関連物質のなかではこれまでにルーチンには測定検討されていなかったのが現状である。1966年 Moellering & Gruber⁵⁾がクエン酸リアーゼ (以下 CL) を用いたクエン酸測定法を記載し, つづいて Costello & O'Neill⁶⁾, Welshman & McCambridge⁷⁾, さらに Nielsen⁸⁾ などにより本酵素法の尿中クエン酸測定への応用が報告された。この方法により尿中クエン酸の測定は非常に簡素化され, 以後欧米では本法を用いた報告がなされてきているが, 他方, 本邦ではいまだに一般的ではないようである。

著者らは Nielsen により記載された方法にもとづき, 本酵素法を用いた尿中クエン酸定量を施行したのでその検討した結果を記載する。

方 法

a. 原理

本測定法の原理は, 上記 1 の反応において生ずるオキサロ酢酸が 2 の反応によってリンゴ酸に変換される時に消費される NADH の量が, 基質であるクエン酸の量と比例することを利用し NADH の量の変化を 340nm で比色測定するものである。

b. 試薬, 酵素

試薬はすべて市販の特級規格を用いた。また, 試薬の希釈にはすべて triplicate distilled water が用いられた。

(1) 1M Tris HCl buffer pH 7.2: Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121.14g を再蒸留水に溶解し, 5N HCl で pH 調整をおこない。その後, 再度, 再蒸留水で 1ℓ とした。

(2) 0.13M Tris HCl buffer pH 7.2: 上記の 1M Tris HCl buffer 130ml に再蒸留水を加え 1ℓ とした。

(3) ZnSO₄ 0.6mM

(4) クエン酸標準液 2g/ℓ。作成後, 小試験管に細分凍結保存し, 当日必要量を解凍して使用した。

(5) β-Nicotine amide-adenine dinucleotide: reduced form (β-NADH; オリエンタル酵母工業, 測定当日 1mg/1ml となるように 0.13M Tris HCl buffer で溶解する。

(6) Malate dehydrogenase (MDH 1; Boehringer Mannheim) 測定当日 0.13M Tris HCl buffer で 50 倍希釈する。

(7) Citrate lyase (CL; Boehringer Mannheim) 測定当日 1mg/0.02ml となるように 0.13M Tris HCl buffer で溶解する。

(8) 測定当日, 上記の試薬を混合し下記の混合試薬を作成する。混合試薬;

1) 1M Tris HCl buffer pH 7.2	0.05ml/sample
2) 0.6mM ZnSO ₄	0.5ml/sample
3) β-NADH 溶液	0.4ml/sample
4) MDH 溶液	0.05ml/sample
	1.00ml/sample

β-NADH は -20℃ で, 混合試薬も含めた他の酵素類はすべて 4℃ で保存する。

C. 比色定量法

比色計は日本分光の UVIDEC70 型を用い 340nm の波長にて NADH 量の変化の比色定量をおこなった。

d. 測定法

標準液または尿 0.1ml に 0.13M Tris HCl buffer 1.9ml を加え, さらに上記の混合試薬 1.0ml を加え攪拌, 約 5 分間静置し 340nm で水に対する反応開始前の吸光度 E_1 を測定し, 次に CL 溶液 0.02ml (1mg) を加え攪拌し約 10 分間放置後反応完了後の吸光度 E_2 を測定, これより吸光度変化 ΔE ($E_1 - E_2$) を求める。盲検として蒸留水 0.1ml を試料のかわりに入れたもので同様の操作をおこない $\Delta E'$ ($E_1' - E_2'$) を求めると $\Delta E - \Delta E'$ が NADH の変化量をあらわすことになる。

結 果

(1) 本測定法の反応に影響を及ぼすと思われる各因子についての検討

a. 反応 pH と CL の量

Fig. 1 は各反応 pH について吸光度の変化を経時的に追跡したものであるが, pH 6.5~7.2 付近が良好な反応を示すことがわかる。しかし下図にみられるように 2mg/sample の CL を用いればいずれも反応はすみ

やかに完了し pH の影響は無視し得るようである。著者らは、CL が極めて高価である点も含め、1 検体あたり 1mg の CL を用い、反応が良好な pH 域のうち NADH 溶液が比較的安定と思われる pH 7.2 の Tris HCL buffer を用いて測定をおこなうことにした。

b. Tris HCl buffer の濃度

Fig. 2 は Tris HCl buffer の各濃度における反応につき検討した結果を示したものである。buffer の濃度が上昇するにつれて反応が悪くなる傾向がうかがえたが、本反応条件下では 0.1M 以下では反応速度に有意な差をみとめなかったため、著者らは最終濃度約 0.1M で測定をおこなうことにしている。

c. 亜鉛イオン

酵素活性化剤としての亜鉛イオンの必要性につき検討したところ、比較的大量の CL を用いれば Fig. 3 右図に示すごとく両群の差は有意ではなくなるが、CL 量を減量してゆくと明らかに亜鉛イオン添加群でその反応が良好となったため、著者らは最終濃度約 0.1mM となるように $ZnSO_4$ を添加している。

Fig. 1 Influence of variations in pH on reaction at varying concentration on citrate lyase. Reaction condition : NADH 0.4mg, MDH 0.005mg, citrate 800mg/l, $ZnSO_4$ final concentration 0.1mM, Tris buffer final concentration 0.1M, cuvette volume 3.02ml.

(2) クエン酸の標準曲線

以上の条件下に 40mg/l より 800mg/l までのクエン酸標準液の検量線を求めると Fig. 4 に示すごとく極めて良好な直線関係が得られた。

Fig. 2 Influence of the Tris buffer concentration on reaction.
Reaction condition : pH 7.2, CL 1mg. Otherwise as in Fig. 1

Fig. 3 Effect of the zinc ion on the reaction.
Reaction condition : pH 7.2, NADH 0.4mg, MDH 0.005mg, citrate 800mg/l, CL 1mg, Tris buffer final concentration 0.1M, cuvette volume 3.02ml.

Fig. 4 Standard curve for urinary citrate.

(3) 測定値の再現性

10例の検体を各々3回測定し、その測定値、平均値、および変動係数をTable 1に示した。変動係数は0.3~9.5%, 平均3.1%で、これは満足できるものであった。

(4) 既知量添加時のクエン酸回収率

Table 2は尿に各々50mg, 100mg, および200mg/lのクエン酸を添加し、それぞれの回収率を検討した結果を示したものである。その結果、各濃度において98~103%と極めて良好な回収率が得られた。

(5) 健康人の尿中クエン酸排泄量

本測定法を用い健康人男子66名、女子23名の尿中クエン酸排泄量を測定したところ、男子 397 ± 159 mg/day, 女子 474 ± 209 mg/day となり、女子の方が高値を示したが統計上有意な差はみとめなかった。

(6) クエン酸保存の検討

クエン酸標準液 (2g/l) を作成後、これを分割凍結保存し、測定当日このうち1つを解凍し26週にわたり追跡をおこなったが、凍結保存による測定値の有意な

Table 1 Reproducibility of triplicate determination of urinary citrate.

Subject	Citrate concentration (mg/l)			Mean $\pm$ S.D.	Coefficient of variation (%)
	1	2	3		
1	197	190	189	192.0 $\pm$ 4.4	2.3
2	893	890	896	893.0 $\pm$ 3.0	0.3
3	310	308	305	307.7 $\pm$ 2.5	0.8
4	74	69	69	70.7 $\pm$ 2.9	4.1
5	109	107	101	105.7 $\pm$ 4.2	3.9
6	217	206	205	209.3 $\pm$ 6.7	3.2
7	451	454	456	453.7 $\pm$ 2.5	0.6
8	431	420	417	422.7 $\pm$ 7.4	1.7
9	252	232	247	243.7 $\pm$ 10.4	4.3
10	133	110	124	122.3 $\pm$ 11.6	9.5
					(3.1 $\pm$ 2.7)

Table 2 Recovery of citrate added to urine.

before addition (mg/l)	Citrate added (mg/l)	after addition (mg/l)	Recovery (mg/l) %	
95	50	143	48	96
115	50	170	55	110
103	50	156	53	106
319	50	369	50	100
			51.5 $\pm$ 3.1	103 $\pm$ 6.2
95	100	189	94	94
115	100	225	110	110
103	100	201	98	98
319	100	411	92	92
			98.5 $\pm$ 8.1	98.5 $\pm$ 8.1
95	200	293	198	99
115	200	325	210	105
103	200	302	199	99.5
105	200	299	194	97
			200.3 $\pm$ 6.8	100.1 $\pm$ 3.4

Table 3 Urinary excretion of citrate (mg/day) in normal subjects.

Authors	Male	Female	Method
Hodgkinson (1962) ²¹	556 $\pm$ 199	716 $\pm$ 223	pentabromoacetone
Elliot & Ribeiro (1972) ³¹	528 $\pm$ 282	706 $\pm$ 377	pentabromoacetone
Weishman & McGeown (1976) ¹⁹	370 $\pm$ 172	552 $\pm$ 272	CL
Bach et al. (1981) ²⁰		524	CL
Rudman et al. (1982) ²¹	481 $\pm$ 115		CL
Schwille et al. (1982) ¹⁸	463	596	CL
Nicar. et al. (1983) ²²		643 $\pm$ 236	CL
松尾光雄 (1966) ²³		305 $\pm$ 81	pentabromoacetone
武本征人 (1978) ²⁴		261 $\pm$ 133*	Hori's method
井口正典 他 (1981) ²⁵		309*	Hori's method
Present study (1984)	397 $\pm$ 159	474 $\pm$ 209	CL

* mg/g·creatinine (CL : enzymatic determination of citrate using citrate lyase)

変化はみとめなかった。また無処理の尿を、室温、4℃、-20℃の3群にわけて保存し4週間の追跡をおこなったが、室温保存群で測定値の減少がみとめられたが他の2群では有意な差はみとめられなかった (Fig. 5)。

考 按

クエン酸は TCA cycle の一員でありその代謝を知

Fig. 5 Influence of preserving condition of urine specimens on urinary citrate concentration. 3 urine samples were stored at different conditions for 4 weeks. No significant change of citrate concentration was found at 4℃ or -20℃.

ることは有機酸代謝を知るうえで興味深く、したがって体液や組織中のクエン酸濃度を測定する試みは古くからなされていた。1929年、微量のクエン酸を測定する試みとして Thunberg⁹⁾により提唱された方法は胡瓜の種子から抽出されたクエン酸脱水素酵素を用いる方法であった。しかしこの方法は、酵素抽出から始まる手技の繁雑に加え、且つその正確さにも問題があり広く普及するには至らなかった。比較的最近まで用いられたのはクエン酸を pentablomoacetone へと酸化し、これを heptane や petroleum ether にて抽出後、thiourea-borax や sodium sulfide などで発色させるという3つの過程からなる方法で、これはその回収率や再現性などから満足すべきものとされ諸家によりこの方法で体液や組織内のクエン酸の測定が試みられてきた^{10)~15)}。しかしながらこの方法は検体の前処理に時間がかかり、尿中測定についていえば、比較的熟練したものででも1日30検体程度の測定を行なえるに過ぎないものであった。本邦では1974年 Hori ら¹⁶⁾がクエン酸と o-aminothiophenol を加熱するとこにより蛍光物質が形成されることを利用した測定法を報告したが、これについてもその操作が複雑で検体の前処理に比較的長時間を要し、前述の方法の問題点を解消したとはいえなかった。最近、Vasilikiotis ら¹⁷⁾により発表された indirect kinetic method も操作には熟練を要し、大量の検体を測定するには不向きであると思われる。

一方、CL を用いてクエン酸を測定しようという試みは1960年代初めに記載されているが、これが測定法として確立されたのは1966年 Moellering & Gruber の方法をもって嚆矢とするようである。彼らは本法を用いて血清中や組織中のクエン酸濃度を測定した結果を報告し、本法がきわめて微量のクエン酸を正確に測定でき、加えて本反応は他の TCA cycle の構成物質によっても反応速度や正確さに影響をうけず、感受性、特異性ともにすぐれた方法であることを提唱した。本法の特異性については後に Costello & O'Neill によって確認され、さらに Welshman & McCambridge は尿に対する添加回収率もきわめてすぐれたものであることを報告した。

また、Nielsen は本反応に影響を及ぼす種々の因子、すなわち buffer の pH や濃度、カルシウムイオンや亜鉛イオンなどの2価の陽イオン、LDH の必要性などにつき比較検討したが、今回著者らは諸家により比較的一定していない buffer の pH と濃度、亜鉛イオンの

必要性について検討を加えたものである。buffer の pH は7.6とするもの⁹⁾⁷⁾と、8.2が至適 pH とするもの⁸⁾¹⁾に大別できるが、今回著者らの検討では上述したいずれの pH よりもやや酸性側に良好な反応を示す部位がみつめられ、pH 8.0を超えてアルカリ域へ入るとむしろ急激に反応速度が低下する傾向さえみつめられた。CL の至適 pH は諸家により若干の相違はあるが pH 7.8~8.5⁸⁾¹⁸⁾と pH 8.0付近のアルカリ側にあることでは一致しており、今回なぜ pH 6.5~7.2の付近の反応がより良好であったかの詳細は不明であるが、あるいは MDH の至適 pH が7.4であることが影響を及ぼしているのかもしれない。今回の検討では pH 6.5から7.2の間では有意な反応速度の差はみつめなかったが、酸性域では NADH 溶液がきわめて不安定になる可能性があるため buffer の pH は7.2としたものである。なお、本反応条件においては尿は buffer など約30倍に希釈されるため、反応終了時の pH は尿の pH に全く影響をうけないことが確認されている。buffer の濃度は Triethanolamine を用いているものは最終濃度約65mM で反応をおこなっており⁹⁾⁷⁾、Tris を用いている Costello & O'Neill は約20mM、Nielsen は100mM と若干の差がみつめられるが、前者はクエン酸を 10^{-5} M 以下と極めて低濃度で測定しており、これを除くと概ね50~100mM の濃度が適するようである。Nielsen は buffer の濃度を上昇させると CL の活性が低下すると述べているが、今回の検討でも同様の結果が得られた。この理由は明らかにされていないがイオン強度などが何らかの影響を与えているのかもしれない。

酵素活性化剤としての亜鉛イオンについても、必要とするもの⁸⁾¹⁾、および必要としないもの⁹⁾⁷⁾の両方の見解が出されているが、基質量に対して酵素量が比較的多量であるときには本反応はすみやかに完了するため両群の間に差は生じにくく、酵素量の減量とともに明らかな差があらわれ、この際亜鉛イオン添加群が良好な反応を示すようである。また、亜鉛イオン濃度についても検討が必要であるが、今回著者らは諸家より報告されている0.1mM を用いた。

本法の測定限界は NADH 量に依っているが、尿中クエン酸濃度は概ね1,000mg/l 以下であることを考えると1検体あたり4~5mg を用いれば充分であると思われる。

本法を用いて健常人の尿中クエン酸排泄量を測定した結果は、男子397mg/day、女子474mg/day であり欧

米の報告とくらべると若干低い傾向がみとめられた (Table 3)。今回の検討では食事や水分の制限は何らおこなっていないこと、また女子に関しては性周期が考慮されていないこと、さらに蓄尿法の問題などの若干の問題点があるかもしれないが、本邦の2, 3の報告ともあわせ考えてみると、日本人の尿中クエン酸排泄量は欧米人に比してやや低値ではないかと推定されるところであるが、これらについては今後さらに検討してゆく予定である。

本測定法の最大の利点は従来のいずれの方法と比較しても操作がきわめて簡便で短時間に多量の検体の測定が可能という点にある。すなわち、本法は尿の前処理を全く必要とせず、混合試薬と溶解したCLを除けば他の試薬は比較的長期間保存することが可能であり、かつ2時間で50検体の測定が可能である。また今回の検討では回収率および再現性の点でも極めてすぐれた方法であるとの結果が得られており、本法は日常臨床検査としても十分に活用され得るものとする。

結 果

クエン酸リアーゼ (CL) を用いる尿中クエン酸測定法につき検討し以下の結果を得た。

(1) Tris HCl buffer の pH は7.2、最終濃度0.1Mで満足すべき反応が得られたが、CLを増量してゆくと pH による影響は生じにくくなるものと思われた。

(2) 亜鉛イオンはCL量が少量のときその反応を促進し、添加の必要性が認められた。

(3) 本法の尿におけるクエン酸の回収率は98~103%であり、triplicate assayでの変動係数は0.3~9.5%であった。

(4) 本法によって今回測定した健康人の尿中クエン酸排泄量は男子 $397 \pm 159 \text{ mg/day}$ ($n=66$)、女子 $474 \pm 209 \text{ mg/day}$ ($n=23$) であった。

(5) 本法は操作がきわめて簡便であるため短時間で多量の検体の測定が可能であり、日常検査として活用できるきわめてすぐれた方法であると思われた。

文 献

- 1) Kissin, B. and Locks, M.O.: Urinary citrates in calcium urolithiasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**, 216—218, 1941.
- 2) Hodgkinson, A.: Citric acid excretion in normal adults and in patients with renal calculus. *Clin. Sci.*, **23**, 203—212, 1962.
- 3) Elliot, J.S. and Ribeiro, M.E.: The urinary excretion of citric, hippuric, and lactic acid in normal adults and in patients with calcium

- oxalate urinary calculus disease. *Invest. Urol.*, **10**, 102—106, 1972.
- 4) Hallson, P.C., Rose, G.A. and Sulaiman, S.: Raising urinary citrate lowers calcium oxalate and calcium phosphate crystal formation in whole urine. *Urol. Int.*, **38**, 179—181, 1983.
- 5) Moellering, H. and Gruber, W.: Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.*, **17**, 369—376, 1966.
- 6) Costello, L.C. and O'Neill, J.J.: A simplified and sensitive method for citrate determination in biological samples. *J. Appl. Physiol.*, **27**, 120—122, 1969.
- 7) Welshman, S.G. and McCambridge, H.: The estimation of citrate in serum and urine using a citrate lyase technique. *Clinica Chimica Acta*, **46**, 243—246, 1973.
- 8) Nielsen, T.T.: A method for enzymatic determination of citrate in serum and urine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **36**, 513—519, 1976.
- 9) Thunberg, T.: Über das Vorkommen einer Citrico-Dehydrogenase in Gurkensamen und ihre Verwertung für eine hochempfindliche biologische Farbenreaktion auf Citronensäure. *Biochem. Z.*, **206**, 109—119, 1929.
- 10) Pucher, G.W., Sherman, C.C. and Vickery, H. B.: A method to determine small amounts of citric acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, **113**, 235—245, 1936.
- 11) Natelson, S., Lugovoy, J.K. and Pincus, J.B.: Determination of micro quantities of citric acid in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, **170**, 597—606, 1947.
- 12) Taussky, H.H. and Shorr, E.: A microcolorimetric method for the determination of citric acid. *J. Biol. Chem.*, **169**, 103—118, 1947.
- 13) Ettinger, R.H., Goldbaum, L.R. and Smith, L.H. Jr.: A simplified photometric method for the determination of citric acid in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, **199**, 531—536, 1952.
- 14) Beutler, E. and Yeh, M.K.Y.: A simplified method for the determination of the citric acid. *J. Lab. Clin. Med.*, **54**, 125—131, 1959.
- 15) Grumbaum, B.W. and Pace, N.: Microchemical urinalysis VII. Determination of citric acid in microliter quantities of urine. *Microchem. J.*, **15**, 673—676, 1970.
- 16) Hori, M., Kometani, T., Ueno, H. and Morimoto, H.: A new fluorometric analysis of citric acid. *Biochem. Med.*, **11**, 49—59, 1974.
- 17) Vasilikiotis, G.S., Papadopoulos, C., Themelis, D.G. and Sofoniou, M.C.: Indirect kinetic

- microdetermination of oxalate, citrate, and fluoride ions. *Microchem. J.*, **28**, 431—436, 1983.
- 18) Schwille, P.O., Scholz, D., Schwille, K., Leutsch, R., Goldberg, I. and Siegel, A.: Citrate in urine and serum and associated variables in subgroups of urolithiasis. Results from an outpatient stone clinic. *Nephron*, **31**, 194—202, 1982.
 - 19) Welshman, S.G. and McGeown, M.G.: Urinary citrate excretion in stone-formers and normal controls. *Brit. J. Urol.*, **48**, 7—11, 1976.
 - 20) Bach, D., Hesse, A. and Vahlensieck, W.: 24-hour excretion and circadian rhythm of citric acid in stone-formers and normal subjects on a standard diet. *Urinary Calculus*, p. 117, PSG Publishing Co., Littleton, Massachusetts, 1981.
 - 21) Rudman, D., Kunter, M.H., Redd, S.C. II., Waters, W.C. IIV., Geron, G.G. and Bleier, J.: Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. *J. Clin. Endo. Metab.*, **55**, 1052—1057, 1982.
 - 22) Nicar, M.J., Skurla, C., Sakhaee, K. and Pac, C. Y.C.: Low urinary citrate excretion in nephrolithiasis. *Urology*, **21**, 8—14, 1983.
 - 23) 松尾光雄：尿石症の成因に関する研究, 第 III 編. 尿石症における尿中 Citrate 排泄の意義について. *泌尿紀要*, **12**, 869—880, 1966.
 - 24) 武本征人：炭酸脱水素阻害剤によって誘発される尿路結石症の予防に関する臨床的研究. *日泌尿会誌*, **69**, 068—987, 1978.
 - 25) 井口正典, 片岡喜代徳, 郡健二郎, 八竹 直, 栗田 孝：尿路結石の発生原因に関する検討 (第 2 報) —正常女性における性周期が尿中クエン酸および電解質排泄量に及ぼす影響について—. *日泌尿会誌*, **72**, 856—864, 1981.

(1985年2月25日受付)