尿路結石症における尿中カルシウムイオン活量の研究

第1報 イオン選択電極による測定

和歌山県立医科大学泌尿器科学教室 森 本 鎮 義
(主任: 大川順正教授)

STUDIES ON URINARY CALCIUM ION ACTIVITY IN UROLITHIASIS

1. Determination of Calcium Ion Activity with an Ion-Selective Electrode

Shigeyoshi Morimoto

Department of Urology, Wakayama Medical College

(Director: Prof. T. Ohkawa)

Calcium ion activity is physicochemical value corresponding to effective calcium ion concentration, which directly relates to the saturation level of calcium complex in solution. Therefore, urinary calcium ion activity seems to be an important factor for the formation of urinary calculus. A method, using an ion-selective electrode, for the direct measurement of urinary calcium ion activity is described here. Calcium ion activity values of standard solutions were calculated by Debye-Hückel equation, and used to calibrate the electrode.

There was a good agreement between the calculated and measured values of calcium ion activities in a series of CaCl_2 -NaCl solutions. pH (5~8) and temperature (10~40°C) had no influence on the determination in CaCl_2 -NaCl solutions.

Reproducibility of calcium ion activity determination in urine was satisfactory. In urine, however, the measured activities were increased in proportion to the temperature, and decreased by alkalization, which induced precipitation of calcium salt.

Urinary calcium ion activity (25°C) of calcium stone formers was significantly higher than that of healthy controls. There was a significant correlation between urinary calcium ion activities and total calcium concentrations. The ratio of calcium ion activity to total calcium concentration showed no difference between controls and stone formers, but it was significantly lower in stone formers with crystalluria.

要旨: カルシウムイオン (Ca^{++}) 活量は, 有効 Ca^{++} 濃度を示すところの物理化学的な値であり, 溶液中 Ca 塩の飽和度に直接関与するとされている。そこで, 尿中 Ca^{++} 活量は尿路結石形成にとって重要な要素になりえるものとの考えから, Ca^{++} 選択電極を用いて, 尿中 Ca^{++} 活量の測定を試み, その基礎的検討ならびに臨床での測定結果を報告した。標準液の Ca^{++} 活量値を Debye-Hückel 式に従い計算し, これによってキャリブレーションを行った。

一連の CaCl_2 -NaCl 溶液において, 計算による Ca^{++} 活量値および電極による実測値が, ほぼ一致することを確認した。また, pH (5~8) および温度 (10~40°C) による測定値への影響は認められなかった。

本法による尿中 Ca^{++} 活量測定の再現性は満足すべきものであった。しかし, 尿中 Ca^{++} 活量測定においては, 温度上昇に比例して測定値は上昇し, またアルカリ化による Ca 塩の析出によって Ca^{++} 活量は低下した。

対照群44名および結石症例群68名での24時間尿を用いた, 25°C 下での Ca^{++} 活量測定値は, 各々 0.201 ± 0.066 (mean $\pm$ SD) および $0.243 \pm 0.104 \text{ mM}$ となり, 結石群で有意に高値となった。一方, 尿中 Ca^{++} 活量および総 Ca 濃度の間には有意な相関性が認められた。 Ca^{++} 活量/総 Ca 濃度比は, 対照群および結石群の間で差をみなかったが, 塩類尿を呈するものでは有意に低値となった。

結 言

尿路結石主成分の大半がカルシウム（以下Caと略す）塩で占められていることから、尿路結石の発生機序および原因を考えるうえで、尿中Caは常に注目されて来ている。尿路結石症例の中に過Ca尿症を呈するものが多いことは、既に周知のところであり、このことから同時に尿中Ca塩はより高い飽和状態にあるものと考えられている。尿中に排泄されるCaの中で、蓚酸あるいは磷酸イオンと結合し、Ca塩結晶を形成および増大するうえで重要なものはカルシウムイオン（以下Ca⁺⁺と略す）とされ、従って、尿路結石症の研究において尿中Ca⁺⁺を定量的に検討することの意義は大きいものと考ええる。

今回測定を試みたところのCa⁺⁺活量は、溶液中Caのイオン活性を示す物理化学的な値である。溶液中組成の化学平衡は、一般には濃度を用いて計算されるが、厳密にはこの活量によって決定される。とくに、尿路結石成分となる蓚酸Caなどの弱電解質において、その溶解性は、Ca⁺⁺活量および蓚酸イオン活量の積、すなわち溶解度積で表現されている¹⁾。尿中においても同様であるが²⁾、溶液中Ca塩の活量積は、溶解度積値に対する比をとることによって、飽和状態の指標となり、不飽和あるいは過飽和が判定される¹⁾。従って、尿中Ca⁺⁺活量の測定により、尿路結石形成におけるCaの要素はより確実に評価されるものと考ええる。

尿中Ca⁺⁺活量は、尿中組成の全てを定量し、形成される可溶性complexの安定度定数から、コンピューターを用いることによって計算されうるが³⁾⁴⁾、電極の測定原理を利用することによって簡便に実測することが可能である。今回著者は、Ca電極を用いた尿中Ca⁺⁺活量測定の基礎的検討を試み、次いで臨床的应用として、健康人および尿路結石症例での尿中Ca⁺⁺活量を測定し、それぞれを比較検討したので、その結果を併せ報告する。

1. 基礎的検討

方 法

1) Ca⁺⁺活量の理論値

溶液中の組成が明らかな場合、Ca⁺⁺活量は理論的に計算されうる値であり、これを求めるための関係式をFig. 1に示した。すなわち、Ca⁺⁺活量は個々の溶液中Ca⁺⁺濃度および活量係数との積で求められる。活量係数は、イオン強度の関数としてDebye-Hückelの理論式より導びかれる。イオン強度が0.01~0.3Mの範囲ではDebye-Hückelの第二近似式が成立するとされており⁵⁾、尿中イオン強度はこの範囲内に含まれるため⁶⁾、この近似式を用いた(Fig. 1, 式2)。定数Aは、溶媒の誘電率と温度によって決まるもので、25℃の水溶液では0.509となる⁵⁾。また、イオン強度は、溶液中の全てのイオン濃度および各々の価電数より計算される。

2) 測定方法

Ca⁺⁺活量測定には、Ionetics社のCalcium Analyzer Setを用いた。この装置は、Ca電極による血清中Ca⁺⁺濃度測定用のものであるが、後述する電極法の測定原理を利用して、Ca⁺⁺活量測定に供した。

Ca⁺⁺活量標準液として、同社の血清用Ca標準液(090-020-005P, -010P, -015P)を用いた。これ等標準液の組成は、いずれも150mM NaClでイオン強度を調節し、防腐剤として安息香酸ナトリウム0.417mMが添加されたものに、CaCl₂濃度が0.5, 1.0, 1.5mMとなるように加えられている⁶⁾。この組成から、Fig. 1の関係式に従い、イオン強度、活量係数およびCa⁺⁺活量を計算した(Table 1)。その結果、各標準液のCa⁺⁺活量

Fig. 1 Calculation of theoretical aCa⁺ value

1. Ca⁺活量 (Calcium Ion Activity : aCa⁺)

$$aCa^{+} = \gamma \times cCa^{+}$$

2. 活量係数 (Activity Coefficient : γ)

$$-\log \gamma = \frac{AZ_i^2 \sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}}$$

3. イオン強度 (Ionic Strength : μ)

$$\mu = \frac{1}{2} \sum Zi^2 Ci$$

(cCa⁺ : Ca⁺濃度, A : 定数, Zi : 荷電数,
Ci : 電解質モル濃度)

Table 1 aCa⁺ values in calcium standards (Ionetics, Inc.)

Calcium Standard	Ionic strength (μ) M	Activity coefficient of Ca ⁺ (γCa^{+})	Activity of Ca ⁺ (aCa ⁺) mM
Ca ⁺ 0.5mM	0.152	0.275	0.137
1.0	0.153	0.274	0.274
1.5	0.155	0.272	0.409

値は各々0.137, 0.274および0.409mM となった。

標準液の Ca^{++} 活量値によってキャリブレーションを行った後、被検液である尿あるいは Ca 溶液に電極を浸すことにより、デジタルで0.01mM の単位まで活量値が表示される。この電極装置に、自動記録計 (Shimazu, U-135) を接続することによって、キャリブレーションはより正確となり、0.001mM の単位までの活量の読み取りが可能となった。測定に要する検体量は最小約0.5ml で、測定時間は1分以内である。また、各検体毎に、キャリブレーションを行った。

この他の測定方法としては、尿中 Ca 濃度は原子吸光法 (Shimazu, AA-630-12), pH はガラス電極法 (Corning, M-125) で測定された。

3) Ca 溶液の作製

Ca^{++} 濃度およびイオン強度が異なる一連の Ca 溶液を作製し、それ等の Ca^{++} 活量について、理論値および

電極法による実測値とを比較した。すなわち、 CaCl_2 濃度が0.5, 1.0, 2.0, 3.0mM, および NaCl 濃度が50, 100, 150, 200mM となるよう、計16種類の CaCl_2 - NaCl 溶液を作製し、イオン強度は NaCl で調節した。この等 Ca 溶液の pH は5.84~6.07であった。 Ca^{++} 活量測定における pH の影響を検討する際には、希釈した HCl あるいは NaOH を添加し pH を調節した。

試薬類はすべて市販の特級規格あるいは分析用のものを、また水溶液の作製には蒸留水を Millipore 社の Milli-Q System に通した純水を用いた。

結 果

1) 理論値および実測値の比較

作製した Ca 溶液中の Ca は100%イオン化しているものとして、Fig. 1の式に従い Ca^{++} 活量を計算した。Fig. 2の如く、理論値と実測値とはほぼ一致することを確認した。両軸対数表を用いたのは、横軸について

Fig. 2 Comparison of measured $a\text{Ca}^{++}$ and calculated $a\text{Ca}^{++}$ in CaCl_2 - NaCl solutions

Fig. 3 Effects of pH and temperature on aCa^{++} values of $CaCl_2$ -NaCl solutions Fig. 4 Effect of temperature on urinary aCa^{++}

は後に説明するところの Nernst の式に従い、縦軸については Ca 電極装置に logarithm converter が内蔵されているためである⁷⁾。

2) pH および測定温度の影響

$CaCl_2$ 濃度が 0.1, 1.0mM および NaCl 濃度が 100, 150mM の 4 種類の Ca 溶液を用いて、 Ca^{++} 活量測定における pH および温度の影響について検討した (Fig. 3). pH 4 では Ca^{++} 活量測定値に僅かの低下をみたが、尿の生理的 pH 範囲である 5 ないし 8 の間では、測定値に変化は認められなかった。また、温度の影響については、10 ないし 40°C の間では測定値に変化を認めなかった。この場合、電極、標準液および被検液は、いずれも同一温度となるよう調節された。

ヒト尿での Ca^{++} 活量測定における、pH および温度の影響については、まず温度では、その上昇に比例して測定値にはかなりの上昇が見られた (Fig. 4). Ca 溶液での測定に際しては、温度による影響がみられなかったことと考え合わせると、尿中では温度の上昇に

Fig. 5 Effect of temperature on serum aCa^{++} Fig. 6 Effect of pH on urinary aCa^{++} Fig. 7 Reproducibility of urinary aCa^{++} values

Coefficient of variation

1	0.332mM
2	0.335
3	0.336
4	0.339
5	0.336
6	0.337
7	0.336
8	0.332
9	0.336
10	0.337
Mean	0.336
SD	0.002
CV(%)	0.65

Comparison to the value after 24 hours

より、 Ca^{++} 活量が高くなるものと考えられる。また、対比する意味で、血清中 Ca^{++} 活量測定での温度の影響をみたところ、血清では温度上昇により測定値の低下が認められた (Fig. 5). このことから、 Ca^{++} 活量測定においては温度を一定にすることが必要であり、以後の検討ではすべて 25°C に温度設定を行った。

次に、4 検体の尿を HCl あるいは NaOH 液で pH 調節し、 Ca^{++} 活量を測定したところ、pH 7 あるいは 8 以上のアルカリ化により、 Ca^{++} 活量性の低下を認めた (Fig. 6). この時、尿は肉眼的に白濁された。そこで、

各 pH での尿を Millipore filter ($0.45\mu\text{m}$) に通し、その濾液中 Ca 濃度を測定した結果、Ca 濃度の低下を認めたことから、尿のアルカリ化による Ca^{++} 活量の低下は、Ca 塩の析出によることが明らかとなった。

3) 再現性

尿での Ca^{++} 活量測定値について、その再現性を検討した (Fig. 7)。同一検体の10回連続測定では、その変動係数 (CV) 値は0.65%であった。次に、19検体について、24時間25°Cで放置した後に再測定したが、その誤差は0.03mM 以内であり、いずれも良好な再現性を示した。

2. 臨床的検討

対象および方法

健康対照例および Ca 塩を結石主成分とする尿路結石症例を対象として、その24時間尿の総 Ca 濃度、 Ca^{++} 活量、pH および尿量を測定し比較検討を行った。24時間蓄尿には防腐剤などの添加は行わなかった。結石症例のうち、尿中 Ca 濃度が、尿を Millipore filter (0.45

μm) に通すことにより、0.2mM 以上の低下をみたものは、著明な塩類尿を有するものとして別に分類した。対照例においても2例で塩類尿を認めたが、今回の検討からは除外された。対照群は44名 (男子34, 女子10名) で、年齢は 48.9 ± 9.9 歳 (mean $\pm$ SD) であった。結石非塩類尿群 (以下結石群と略す) および結石塩類尿群 (以下塩類尿群と略す) は、各々68名 (男子54, 女子14名) および12名 (男子11, 女子1名) で、年齢は 45.3 ± 12.1 歳および 45.5 ± 8.8 歳であった。3群における年齢には有意差を認めなかった。尿中 Ca^{++} 活量は、前述の Ca 電極を用いた方法により25°Cで測定された。

結 果

対照群、結石群および塩類尿群における24時間尿の、総 Ca 濃度 (TCa)、 Ca^{++} 活量、 Ca^{++} 活量/総 Ca 濃度比、Ca 排泄量、pH および尿量を Table 2 に示した。

まず、対照群および結石群の間で、尿中 Ca^{++} 活量および総 Ca 濃度について比較検討を行った (Fig. 8,

Fig. 8 Urinary aCa^{++} and total calcium concentration in controls and stone formers

Table 2 Mean values ($\pm$ SD) of urinary variables in controls and stone formers

	No. Pts.	TCa (mM)	aCa^{++} (mM)	$\text{aCa}^{++}/\text{TCa}$	Ca Excretion (mmol/24hr)	pH	Urine Volume (ml/24hr)
Controls	44	2.76 ± 1.12	0.201 ± 0.066	0.082 ± 0.034	2.91 ± 1.09	6.19 ± 0.37	1090 ± 310
Stone Formers (non-crystalluria)	68	3.24 ± 1.36	0.243 ± 0.104	0.078 ± 0.025	5.09 ± 2.30	5.95 ± 0.49	1680 ± 720
Stone Formers (crystalluria)	12	4.80 ± 1.79	0.188 ± 0.115	0.038 ± 0.021	5.31 ± 1.26	6.37 ± 1.16	1190 ± 360

Fig. 9 Correlation between urinary aCa⁺⁺ and total calcium concentration in controls and stone formers

Fig. 10 Ratios of aCa⁺⁺ to total calcium concentration of urine in controls and stone formers

Table 2). 尿中 Ca⁺⁺ 活性は、対照群で 0.201 ± 0.066 mM、結石群で 0.243 ± 0.0104 mM となり、結石群で有意に高値となった ($p < 0.02$)。総 Ca 濃度は、対照群で 2.76 ± 1.12 mM、結石群で 3.24 ± 1.36 mM となり、結石

群で高い傾向が見られた。両群での個々の症例における総 Ca 濃度および Ca⁺⁺ 活性値をプロットすると (Fig. 9)、両群の間でその分布に明らかな差を認めず、一方総 Ca 濃度および Ca⁺⁺ 活性値の間には有意な相関性が認められた ($r = 0.700, p < 0.001$)。従って、結石群で Ca⁺⁺ 活性が高値であるのは、総 Ca 濃度に依存するところが大きいものと考えられた。

そこで、総 Ca 濃度に対する Ca⁺⁺ 活性の比について比較検討したところ (Fig. 10, Table 2)、対照群で 0.082 ± 0.034 、結石群で 0.078 ± 0.025 となり、両群の間で差を認めなかった。他方、塩類尿群では 0.038 ± 0.021 となり、他の 2 群に比して有意に低値となった ($p < 0.001$)。

以上の結果を分析するにあたって、Table 2 で示した測定値の平均について 3 群の間で比較検討を行った (Table 3)。その結果、尿中 Ca 排泄量は、結石群および塩類尿群の間で差を認めず、両群とも対照群と比較して有意に高値であった。尿量は、結石群で有意に多く、一方対照群と塩類尿群の間では差をみなかった。これ等のことを反映して、総 Ca 濃度は塩類尿群で有意に高く、次いで結石群および対照群の順に高値であった。pH は 3 群の間で有意差を認めなかった。

考 按

血清中 Ca⁺⁺ 濃度の測定には、現在広く Ca 電極装置が用いられているが、この Ca 電極そのものは Ca⁺⁺ 濃度ではなく Ca⁺⁺ 活性に反応する。そこで、電極法の測定原理⁷⁾⁻⁹⁾ について概略的に述べると、被検液に Ca 電極を浸した時、電極先端にある Ca⁺⁺ に選択的に感応する膜を介して、電極内の一定の Ca⁺⁺ 活性と被検液中 Ca⁺⁺ 活性の差によって電位差が生ずるものである。生ずる電位差は、Nernst の式

$$E = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{a_o}{a_i} \dots\dots\dots (1)$$

を満足するとされている。ここで、E は膜電位、R は

Table 3 Probability for significant differences between three groups for urinary variables

	TCa	aCa ⁺	aCa ⁺ /TCa	Ca Excretion	pH	Urine Volume
Controls vs. S.F. (non-cryst.)*	n.s. (<0.1)	<0.02	n.s.	<0.001	n.s. (<0.1)	<0.001
S.F. (cryst.)** vs. Controls	<0.001	n.s.	<0.001	<0.001	n.s.	n.s.
S.F. (cryst.) vs. S.F. (non-cryst.)	<0.001	n.s.	<0.001	n.s.	n.s.	<0.01

* stone formers (non-crystalluria)

** stone formers (crystalluria)

ファラデー定数, T は絶対温度, Z は荷電数, a_i は電極内 Ca^{++} 活量および a_o は被検液中 Ca^{++} 活量である。膜電位を測定するためには電流 circuit の形成が必要とされ, Ca 電極に加えて標準電極が組み合わされる。標準電極は, 被検液の組成には影響を受けずに一定の電位を保つもので, この標準電位 (E') を式(1)に加え, Ca^{++} の荷電数の挿入, および自然対数を常用対数に置換すると,

$$E = E' + \frac{2.3RT}{2F} \log \frac{a_o}{a_i} \dots\dots\dots(2)$$

となる。さらに, 式(2)のうちの恒数を S でまとめると,

$$E = E' + S \log a_o \dots\dots\dots(3)$$

となる⁷⁾。従って, Ca 電極によって生ずる電位は被検液中の Ca^{++} 活量の対数値に比例したものとなる。この測定原理は, 他のイオン選択性電極でも同様である。

血清において Ca^{++} 濃度測定が可能である理由は, 血清の諸電解質濃度が生体の調節機構によってほぼ一定に保たれ, 血清中イオン強度に個人差が無いためである。すなわち, 血清のイオン強度は約 0.16M とされており, これと同じイオン強度を有する Ca 溶液を標準液とすることによって Ca^{++} 濃度が測定されうる^{9)~11)}。一方尿においては個々の尿によって電解質濃度およびイオン強度は著しく異なるため, 画一な標準液による Ca^{++} 濃度の測定は不可能である。しかしながら, もしイオン強度に影響する尿中電解質のうち主要なものを個々の尿で定量し, これと同じ濃度の電解質溶液に Ca^{++} が加えられた標準液を各尿検体に対し作製することが出来れば, 尿でも電極法による Ca^{++} 濃度の測定は可能となる³⁾¹²⁾。

電極法による Ca^{++} 濃度測定には, 以上のように被検液および標準液のイオン強度を同一に調整することが必要とされるが, Ca^{++} 活量を測定するうえでは被検液のイオン強度は問題とならない。既知の Ca^{++} 活量を有する標準液でキャリブレーションを行えば, 被検液中の他のイオン組成やイオン強度に関係なく, Ca^{++} 活量が測定される¹¹⁾。しかしながら, ここで銘記すべきことは, 単独イオンの活量は厳密には熱力学的な裏付けをもって定義されたものでなく, また熱力学的手法によっては実測されないもので, 電解質ではその構成イオンの平均活量が測定されるにすぎない¹³⁾¹⁴⁾。このことは, 単独イオンの活量を扱う場合に常につきまとう問題であるが, Debye-Hückel の理論式を用いることによっておおその解決がつくものとされ, 熱力学以外の手法によって理論的には単独イオンについての活

量を決めることが可能とされている¹⁴⁾。Kielland (1937)¹³⁾は, いくつかのイオン強度下における種々の単独イオンの活量係数について, Debye-Hückel 式を modify した実用式から求めた値, およびこれとは独立した有効イオン直径の計算から求められた値と, 過去に熱力学的に実測されている平均活量係数とを比較し, いずれも一致したことを報告している。また, Grima and Brand (1977)¹⁵⁾は, Debye-Hückel 式より計算された溶液中 Ca^{++} 活量値を用いて, Ca 電極の測定電位に及ぼす種々の要因について検討を行っている。

pH が, ある溶液中の水素イオン活量の負の対数と定義されることは周知のところであり, 電極法による測定は最も正確なものとして普及されている。この場合も, 単独イオンの活量が扱われ, Debye-Hückel 式に基づいて計算された標準緩衝液の pH でキャリブレーションがなされている。米国の National Bureau of Standards (NBS) で採用された pH 測定用の標準液が広く使用されているが, 国によっては異なる標準液が用いられているため, pH 測定値にも僅かな差を認めるとされている¹⁴⁾。従って, 電極法を用いて単独イオンの活量を測定するとき, ある理論式からイオン活量を計算したところの標準液との比較によって, 被検液中イオン活量が求められると, 理解しなければならない。例えば, Beynon (1981)¹⁶⁾の報告では, 150mM NaCl でイオン強度を調節した $0.5 \sim 5.0\text{mM}$ CaCl_2 溶液を標準液として, 測定した被検液中 Ca^{++} 活量は標準液での Ca^{++} 濃度値で表現されている。当然ながら, そこで記載された数値は, Ca^{++} 活量および Ca^{++} 濃度いずれをも示すものではないが, 電極法における標準液の本質的意義からみて, このような扱い方も可能であると考え。著者が用いた標準液は, 血清中 Ca^{++} 濃度測定用として Ionetics 社から市販されているものであり, その Ca^{++} 活量値の計算には, Gold が提唱したとされている Debye-Hückel の第二近似式を用いたが, これは提唱されている多くの実用式の中でも最も一般的なものである¹¹⁾¹⁷⁾。

Ca 電極は, 文字通り Ca^{++} に選択的に感応して膜電位を生ずるが, 共存する他の陽イオンによってもある程度の干渉を受け, 従って前述した式(3)は, より正確には

$$E = E' + S \log (a_o + \sum_i K_i a_i^{2/Z_i} \dots\dots\dots(4)$$

となる⁸⁾⁹⁾¹⁵⁾。ここで, a_i は共存する干渉イオンの活量, Z_i はその荷電数であり, K_i はその選択定数で Ca^{++} で

1としたときの干渉イオンでの値である。Ionetics社のCa電極では選択定数の詳細は明らかにされていないが、150mM NaCl液に電極を浸した時のbackgroundとしての電位は十分低く、また著者も確認したところのNernst効果(Fig. 2)は満足すべきものとされている⁷⁾。Orion社のCa電極では、尿中で問題となる陽イオンの選択定数は、 $KH^+=10^5$ 、 $KNa^+=KK^+=KNH_4^+=10^{-4}$ 、 $KMg^{++}=0.014$ とされ⁸⁾、これらの尿中濃度からみて、干渉イオンによる膜電位の誤差はごく僅かなものと考えられる。水素イオンの選択定数は非常に高いが、水素イオン濃度から考えて尿の生理的pH範囲内では問題とならない。しかし、pH 5以下では水素イオンの影響をうけて、pHの低下に従い膜電位は高くなる。Ca溶液を用いたpHの影響の検討において、pH 4で Ca^{++} 活量測定値が僅かに低下したことは逆の結果となるが、これはCa電極の種類によって生ずるくぼみ現象とも考えられる¹⁸⁾。

尿中 Ca^{++} 活量が温度の上昇に比例して高くなるという、これまでの記載は見られなかった。10~40℃の間で認めた尿中 Ca^{++} 活量値の変化は、Debye-HückelおよびNernst式に含まれるところ絶対温度の影響では説明されない。尿中Caの約50%は可溶性complexを形成し、残る50%がイオン化しているものと報告されているが³⁾、温度上昇がこの尿中Ca分画に影響を与えた可能性も考えられる。何故なら、まず溶液中Caがほぼ100%イオン化している作製したCa溶液では、温度変化による Ca^{++} 活量測定値への影響は見られなかった。次に、血清中 Ca^{++} 活量が温度上昇に逆比例して僅かに低下したことは、Arnoldら(1968)¹⁹⁾の報告と一致するところで、これは温度上昇による限外濾過性Ca分画の減少に伴う Ca^{++} 濃度の低下に依るものと考えられる¹⁰⁾²⁰⁾。従って、測定方法上の問題ではなく、実際に尿中 Ca^{++} 活量は温度によって変化したものと判断された。

用いたCa電極はdip型のもので、電極装置には温度調節が施されていない。むしろこのため、測定温度の設定は自由になるが、種々の試みの中で、このCa電極は磁力あるいは電氣的雰囲気によって測定電位に大きな変動を示した。恒温水槽、恒温灌流装置あるいは、magnetic stirrerを用いた測定では、いずれも異常な高値を示した。このため、測定温度に関する検討においては、プラスチック製のbathに標準液および被検液の入った試験管と、その周囲に数本の水温計を立てて、熱湯あるいは水を入れながら用手的に攪拌するこ

とによって温度調節を行った。電気恒温器(Yanagimoto, B-2A)では内部が金網によってシールドされているためか、測定電位は非常に安定していたので、25℃に調節したこの恒温器の中あるいは同温度の室内で尿中 Ca^{++} 活量は測定された。

Ca^{++} 活量は、 Ca^{++} 濃度と異なり尿中Caの分画を示すものでなく、イオン活性あるいは有効イオン濃度を意味するが、当然ながら尿量増大による希釈によっても影響される。但し、これまで説明した如く、尿量が2倍になれば活量は1/2となる性質のものではない。臨床的検討の結果を考察するにあたって気付かれたことは、結石群の24時間尿量が他の2群に比して有意に多く、これは医師の指導や患者自身の知識により日頃から経口水分を多く摂取しているためと推察される。このため、結石群での尿中総Ca濃度は、対照群と比較して高い傾向にあるものの有意差には至らなかったが、 Ca^{++} 活量は結石群で有意に高値となり、結石群においては尿中Ca塩の飽和状態はより高いものと示唆された。Robertsonら(1968)²¹⁾によれば、結石症例では対照例と比較して尿中 Ca^{++} 濃度および尿中Caのイオン化率はより高値であったと報告されているが、 Ca^{++} 活量/総Ca濃度比については両者の間で差を認めなかった。

結石症例の2群(結石群および塩類尿群)の間ではCa排泄量に差を認めず、いずれも対照群に比して高値であったことから、結石症例において塩類尿を呈するか否かは尿量によって左右される所が大きいことを示すものであった。一方、尿pHは両群で有意差をみないが、塩類尿群でやや高く、またpHが7以上であったものは結石群で68例中2例、塩類尿群で12例中4例であったことから、塩類尿の発生にはpHも関与されていた。アルカリ化に依る場合も含めて、塩類尿で Ca^{++} 活量が低下したことは、Ca塩についてより過飽和であった尿では、その結晶形成のため見かけの Ca^{++} 活量は低下することを意味し、塩類尿の有無によって尿中 Ca^{++} 活量測定値の意義は異なるものと考えられた。

結 語

(1) Ca^{++} 選択電極の測定原理を利用して、尿中 Ca^{++} 活量の測定を試みた。Debye-Hückel式を用いて標準液の Ca^{++} 活量を計算し、その値でキャリブレーションを行った。

(2) 作製したCa溶液の Ca^{++} 活量について、その理論値およびCa電極による実測値がほぼ一致すること

を確認した。Ca 溶液では、通常扱われる範囲の pH および温度による測定値への影響は認められなかった。

(3) 尿では、温度の上昇に比例して Ca^{++} 活量測定値にかなりの上昇がみられるため、測定温度の設定が必要とされた。尿のアルカリ化によって Ca 塩が析出され、これと共に尿中 Ca^{++} 活量の低下を認めた。

(4) 本法による尿中 Ca^{++} 活量測定の再現性は満足すべきものであった。

(5) 対照群 44 名および結石群 68 名での 24 時間尿の Ca^{++} 活量は、各々 $0.201 \pm 0.066 \text{ mM}$ および $0.243 \pm 0.104 \text{ mM}$ であり、結石群で有意に高値となった。一方、尿中 Ca^{++} 活量および総 Ca 濃度の間には有意な相関性が認められた。

(6) Ca^{++} 活量/総 Ca 濃度比は、対照群および結石群の間で差をみななかったが、塩類尿群 (12 名) では他の 2 群に比して有意に低値となった。

(7) Ca^{++} 活量は尿中 Ca 塩の飽和状態に直接関与するとされている物理化学的な値であるが、Ca 電極を用いて簡便に測定しうることを示した。また、塩類尿では見かけの Ca^{++} 活量は低下するため、非塩類尿としては尿中 Ca^{++} 測定値の意義は異なるものと考えられる。

稿を終るにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師大川順正教授に深く感謝の意を表しますとともに、種々御教示、御助言を頂いた戎野庄一講師に感謝致します。

文 献

- Freiser, H. and Fernando, Q.: Ionic equilibria in analytical chemistry. 1 st. ed. p. 125—143, Robert E. Krieger Publishing Co., Florida, 1963.
- Pak, C.Y.C. and Holt, K.: Nucleation and growth of brushite and calcium oxalate in urine of stone-formers. *Metabolism*, 25, 665—673, 1976.
- Robertson, W.G.: Measurement of ionized calcium in biological fluids. *Clin. Chim. Acta*, 24, 149—157, 1969.
- Pak, C.Y.C.: Physicochemical basis for formation of renal stones of calcium phosphate origin: Calculation of the degree of saturation of urine with respect to brushite. *J. Clin. Invest.*, 48, 1914—1922, 1969.
- 本田良行: 酸塩基平衡の基礎と臨床。基礎篇, 第 1 版, p. 22—29, 真興交易医書出版部, 東京, 1974.
- Personal communication to Ionetics Inc.,
- Ionetics, Inc., Calcium Analyzer Set. Instruction Manual, Manual No. 007—240—002, California, 1982.
- Ross, J.W.: Calcium-selective electrode with liquid ion exchanger. *Science*, 156, 1378—1379, 1967.
- 奥田 稔: カルシウム電極による混合溶液 Ca^{++} イオン活量の測定. 臨床検査, 13, 842—847, 1969.
- Siggaard-Andersen, O., Thode, J. and Wandrup, J. (越川昭三訳): 血漿中の遊離カルシウム “イオン化カルシウム”. 臨床麻酔, 10, 1241—1257, 1981.
- Moody, G.J. and Thomas, J.D.R. (宗森 信, 日色武夫共訳): イオン選択性電極. 第 1 版, p. 54—68, 共立出版, 東京, 1977.
- Jacobson, A.L., Singhal, P.C., Mandin, H. and Hyne, J.B.: Urinary ionic calcium and binding sites in normocalciuric idiopathic calcium urolithiasis. *Invest. Urol.*, 17, 218—222, 1979.
- Kielland, J.: Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 1675—1678, 1937.
- Linnet, N. (本田良行訳): pH 測定の理論と実際. pH メーターの基本的理解のための手引き, 第 1 版, p. 13—25, 真興交易医書出版部, 東京, 1971.
- Grima, J.M. and Brand, M.J.D.: Activity and interference effects in measurement of ionized calcium with ion-selective electrodes. *Clin. Chem.*, 23, 2048—2054, 1977.
- Beyron, L.L.: Urine calcium activity: A new ion-selective technique. In *Urinary Calculus*, Brockis, J.G. and Finlayson, B., 1 st. ed., p. 363—369, PSG Publishing Co., Massachusetts, 1981.
- Bard, A.J. (松田好晴, 小倉興太郎共訳): 溶液内イオン平衡. 理論と計算, 第 1 版, p. 101—112, 化学同人, 東京, 1978.
- Bagg, J. and Vinen, R.: Response of a calcium-selective electrode in acid solutions. *Anal. Chem.*, 44, 1773—1777, 1972.
- Arnold, D.E., Stansell, M.J. and Malvin, H.H.: Measurement of serum ionic calcium using a specific ion electrode. *Am. J. Clin. Path.*, 49, 627—634, 1968.
- Robertson, W.G. and Peacock, M.: New techniques for the separation and measurement of the calcium fractions of normal human serum. *Clin. Chim. Acta*, 20, 315—526, 1968.
- 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.

(1984年11月27日受付)