実験的蓂酸カルシウム結石に対する Pentosan Polysulfate, Chlorophyllin の阻止効果の定量的検討

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任: 津川龍三教授)

宮澤 克人 鈴木 孝治 津川 龍三

THE QUANTITATIVE STUDY OF INHIBITORY EFFECT OF PENTOSAN POLYSULFATE AND CHLOROPHYLLIN ON THE EXPERIMENTAL CALCIUM OXALATE STONE

Katsuhito Miyazawa, Koji Suzuki and Ryuzo Tsugawa

Department of Urology, Kanazawa Medical University

(Director: Prof. R. Tsugawa)

The purpose of this study is to evaluate the effect of sodium pentosan polysulfate (SPP) and sodium copper chlorophyllin (SCC) on the formation, growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vivo*, and to measure the number and the volume of crystals formed in the rat kidney, quantitatively, with a Coulter counter TA-II.

The deposition of calcium oxalate crystals in the rat kidney was induced by intraperitoneal injection of 2.5 g per Kg of body weight of hydroxy-L-proline and administration of 0.4% ethylene glycol as the drinking fluid *ad libitum* for 7 days. Daily excretions of urinary oxalate, calcium (ratio to urinary creatinine) and urinary volume were measured. Both kidneys were removed after protocol. The kidneys were homogenized with 0.2 M Tris-buffer (pH 8.0) and subsequently digested in soluene-100. After calcium oxalate crystals were collected, they were suspended in saline saturated with calcium oxalate. The crystal size distribution was measured with a Coulter counter TA-II. In addition, the renal calcium content was measured by atomic absorption spectrometry, and the kidneys were examined by optical microscopy and scanning electron microscopy. The crystals formed in the rats' kidneys were analyzed by infrared spectroscopy.

The results were as follows:

1. There was no deposition of crystals in the kidney of the rats which were not treated. There was intratubular deposition of crystals in the kidneys of the rats injected with hydroxy-L-proline and administered 0.4% ethylene glycol. They consisted of calcium oxalate monohydrate.
2. Renal calcium content was significantly higher in the groups with induced crystals than the control group.
3. The crystal volume and the mean size of crystals were statistically increased in the groups with induced crystals. In the groups with induced crystals, there was statistical difference between the crystal-forming group and sodium pentosan polysulfate or sodium copper chlorophyllin treated groups in the crystal volume and the mean size of the crystals.

The results suggest that it is valuable to measure the crystals induced in rat kidneys, quantitatively, with Coulter counter, and that SPP and SCC have a strong inhibitory effect on calcium oxalate crystal growth *in vivo*.

要旨: Hydroxy-L-proline の腹腔内投与および0.4%ethylene glycol の自由摂取によりラット腎尿管腔内に蓂酸カルシウム結晶を誘発し, その後摘出した腎を Soluene-100にて溶解し結晶を抽出し, この結晶を Coulter counter TA-II にて定量的に測定した. さらに本法により sodium pentosan polysulfate, sodium copper chlorophyllin の *in vivo* における蓂酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する影響を

検討した。また同時に腎組織内カルシウム濃度の測定、赤外分光分析法による結晶分析および光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡による観察を行った。

1) コントロール群では、腎尿管腔内結晶沈着は全く認めなかった。結晶形成群ではすべてのラットに腎尿管腔内に calcium oxalate monohydrate 結晶の沈着を認めた。

2) 腎組織内カルシウム濃度はコントロール群に比べ結晶形成群で高値であった。

3) Coulter counter による定量的結晶測定の結果、コントロール群に比べ結晶形成群が crystal volume, mean size において増加を認めた。結晶形成群間では sodium pentosan polysulfate または sodium copper chlorophyllin 投与群が非投与群と比べ crystal volume, mean size において減少を認めた。

Coulter counter によるラット腎尿管腔内尿酸カルシウム結晶の定量的測定の有用性および sodium pentosan polysulfate, sodium copper chlorophyllin が in vivo において尿酸カルシウム結晶の成長阻止物質としての作用を有することが証明された。

尿路結石は尿酸カルシウム（以下 CaOx と略す）より成るものが多く¹⁾, free particle theory²⁾, fixed particle theory³⁾といった見解の相違はあるものの結石発生の第一段階は腎尿管腔内での CaOx 結晶の形成であると考えられている。また実験動物による CaOx 結石の研究では種々のモデルが報告されており、CaOx 結晶沈着に関しては3ないし4段階に分類した定性的な表現が大部分である。一方、現在、臨床的にカルシウム結石に対する治療として行われている方法としては尿中尿酸やカルシウム排泄量を減少させる方法（食餌療法, thiazide, cellulose phosphate, rice bran）や阻止物質の増加を試みる方法（magnesium, citrate, orthophosphate）などが試みられているが未だ決定的な薬剤は開発されていない。これは尿路結石の発生原因が解明されていないためその治療法へのアプローチが困難であることを意味する。その理由の一つとしてヒト尿路結石の発生に類似する実験動物でのモデルが確立されていないことが考えられる。著者らは hydroxy-L-proline（以下 HLP と略す）の腹腔内投与および ethylene glycol（以下 EG と略す）の自由摂取によりラット腎尿管腔内に CaOx 結晶を発生せしめ、その数と体積を Coulter counter TA-II により定量的に測定する試みを行い、また同時にこれまで著者らが in vitro において CaOx 結晶の形成、成長、凝集に対する阻止物質として報告してきた⁴⁾⁵⁾ sodium pentosan polysulfate（以下 SPP と略す）、sodium copper chlorophyllin（以下 SCC と略す）の in vivo における阻止効果について検討を行い、この実験系の評価を行った。

対象と方法

実験動物は体重300~350gの雄 Sprague-Dawley ラット（日本クレア）を用い、飼育飼料は MM-3飼料

（船橋農場）を使用した。1週間の予備飼育の後、無作為に各群各々10匹の4群に分け Fig. 1 に示すプロトコルに従い実験を開始した。すなわち group I はコントロール群であり、group II は実験開始3日目に HLP 2.5g/kg の腹腔内投与およびその後1週間の 0.4%EG の自由摂取により CaOx 結晶形成を誘発した群で、group III, IV は各々 SPP, SCC の CaOx 結晶に対する阻止効果を検討するため結晶誘発に加え SPP 5mg/day および SCC 10mg/day を各々連日10間静脈内投与した群である。従って group II は group III, IV に対するコントロール群としての意味も兼ねることとなる。また、実験開始前およびプロトコル終了時に代謝ケージ内に収容し24時間尿の採集を行い尿量、尿中尿酸、カルシウム、クレアチニンの排泄量を測定した。尿中尿酸排泄量は尿酸酸化酵素を用いた尿中尿酸測定キット（Sigma）、尿中カルシウム排泄量はオルトクレゾールフタレインコンプレキソン発色法に基づいたカルシウム C-テスト（和光）、尿中クレアチニン排泄量は Jaffé 反応を利用したクレアチニン-テスト（和光）を用いて定量した。プロトコル終了後両腎を摘出し右腎を光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡の試料及び原子吸光法による腎組織内カルシウム濃度測定に用い、左腎を以下に記載した crystal size distribution の測定および赤外分光分析法の試料とした。なお、走査型電子顕微鏡での観察に際しては JSM-840 走査型電子顕微鏡で観察した。一方、元素の分析には乾燥後カーボンで真空蒸着を行い JEM-1200EX 透過型電子顕微鏡に付着した scanning image observation device (EM-ASID 10) で secondary electron image を確認しながらエネルギー分散型 X 線分析装置 (TN-2000) で分析した。

crystal size distribution の測定：摘出腎を 1ml/g・

Fig. 1 The protocol of this experiment

tissue の0.2M Tris-buffer (pH 8.0) とホモジネートし、次いで10ml/g・tissue の Soluene-100 (Packard) にて50℃の恒温槽で3時間振とうし腎組織を溶解する。次いで1,500回転で10分間遠心した後、上清を除去し、更に100%エタノールにて3回洗浄し結晶を抽出し

20ml 飽和 CaOx 溶液中の結晶を Coulter counter TA-II で測定した。
尚、統計学的処理は unpaired-t 検定を用いた。実験途中で死亡したラットは除外した。

Table 1 Daily urine volume and excretions of urinary calcium, oxalate (ratio to urinary creatinine) and creatinine in groups

	Pre (n=40)	Post			
		group I (n=7)	group II (n=8)	group III (n=10)	group IV (n=10)
U. V (ml)	12.7±3.8	17.6±4.4**	34.9±15.1**	48.4±23.2**	45.4±14.4**
U-Ca/U-Cr (mg/day)	0.93±0.511	0.658±0.178*	0.422±0.202**	0.584±0.23**	0.475±0.153**
U-Ox/U-Cr (mg/day)	1.193±0.464	1.517±0.439	1.033±0.465	2.163±1.939*	2.117±0.644**
U-Cr (mg/day)	76.1±20.88	67.53±9.02	55.97±27.18*	33.62±12.66**	38.71±12.87**

The results are expressed as the mean±SD
* P<0.05 ** P<0.01

結 果

1) 尿量および尿中尿酸、カルシウム、クレアチニン排泄量

各群の実験開始前およびプロトコル終了時の尿量および尿中尿酸、カルシウム、クレアチニン排泄量を Table 1 に示した。尚、実験動物の個体差あるいは尿採集時の誤差を少なくするためそれぞれの排泄量は尿中クレアチニンとの比で示した。

実験開始前およびプロトコル終了時の比較では、尿量に関してはすべての群でプロトコル終了時に有意に増加した。尿中カルシウム排泄量はすべての群でプロトコル終了時に有意に減少した。尿中尿酸排泄量は SPP, SCC 投与群 (group III, IV) でプロトコル終了時に有意に増加した。更に尿中クレアチニン排

泄量は結晶形成群 (group II, III, IV) でプロトコル終了時に有意に減少した。プロトコル終了時ににおけるコントロール群とその他の群の比較では、尿量は結晶形成群 (group II, III, IV) で有意に増加した。尿中クレアチニン排泄量は SPP, SCC 投与群 (group III, IV) で有意に減少した。更にプロトコル終了時の結晶形成群 (group II, III, IV) 間での比較では尿中尿酸排泄量が group IV で有意に増加している以外有意差は認めなかった。

2) 腎尿管腔内 CaOx 結晶沈着

コントロール群 (group I) ではすべてのラットに腎尿管腔内結晶沈着は全く認められなかった。結晶形成群 (group II, III, IV) ではすべてのラットに腎尿管腔内結晶沈着を認めた。その光学顕微鏡像および走査型電子顕微鏡像は Fig. 2, 3 に示した。また、エネルギー分散型 X 線分析装置での元素分析の結果、結晶はカルシウムを含有していた (Fig. 4)。更にこれら結晶の赤外分光分析による分析結果は CaOx monohydrate (whewellite) であった (Fig. 5)。

3) 腎組織内カルシウム濃度および crystal size distribution

各群の腎組織内カルシウム濃度および crystal num-

Fig. 2 Many crystals in the renal tubules were observed in groups treated with HLP and EG. H & E, reduced from $\times 400$.

Fig. 3 Scanning electron micrograph of calcium oxalate crystals in the renal tubules of the rat (group II)

Fig. 4 Energy dispersive X-ray analysis spectrum recorded for the deposits. The presence of CA is clearly indicated.

TRACOR-NORTHERN SPECTRAL PLOT

1st HALF: NO16 MIYAZAWA 11/27 LT = 160SECS 0.020 KEV

ROI I.D. RANGE(KEV) GROSS(12) NET(12)

0 (00) 3.520:3.860 21526 19512

COUNTS F.S. = 4096

Fig. 5 Infrared spectroscopy recorded the crystals were consisted of calcium oxalate monohydrate.

Table 2 Calcium content of rat kidney, and crystal number, volume, mean size and crystal volume over 16.0μm

	group I	group II	group III	group IV
	(n = 7)	(n = 7)	(n = 8)	(n = 8)
Renal Ca content (mg/g · tissue)	0.098 ± 0.020	0.320 ± 0.137	0.225 ± 0.162	0.385 ± 0.304
		**	**	**
	(n = 10)	(n = 8)	(n = 10)	(n = 10)
Crystal No	7162.0 ± 1635.0	7695.6 ± 1607.6	5673.8 ± 3629.7	7659.5 ± 2445.4
	(n = 10)	(n = 8)	(n = 10)	(n = 10)
Crystal Vol (μm ³ /100μl × 10 ⁻⁴)	63.9 ± 22.8	805.9 ± 319.1	278.6 ± 240.3	350.5 ± 282.1
		**	**	**
	(n = 10)	(n = 8)	(n = 10)	(n = 10)
Mean size (μm)	5.494 ± 0.447	12.221 ± 1.206	8.680 ± 1.723	9.251 ± 1.771
		**	**	**
	(n = 10)	(n = 8)	(n = 10)	(n = 10)
Crystal Vol (over 16.0μm)	18.2 ± 8.9	617.9 ± 269.9	172.4 ± 150.9	233.2 ± 196.2
		**	**	**

The results are expressed as the mean ± SD
* P < 0.05 ** P < 0.01

ber, crystal volume, mean sizeそして16μm以上の
crystal volumeをTable 2に示した。腎組織内カルシ

ウム濃度はコントロール群 (group I) に比較して結晶
形成群 (group II, III, IV) で有意に増加していた。

Fig. 6 Crystal size distribution in groups

crystal volume, mean size, 16μm 以上の crystal volume はコントロール群 (group I) に比較し結晶形成群 (group II, III, IV) で有意に増加していた。結晶形成群 (group II, III, IV) 間における比較では SPP, SCC 投与群 (group III, IV) が非投与群 (group II) に比較し crystal volume, mean size, 16μm 以上の crystal volume において有意に減少していた。各群の crystal size distribution curve では group II が crystal volume が最大で、次いで group IV, group III, 更に group I の順序であった。また、同様の順序で crystal size の peak 値も減少した (Fig. 6)。

考 察

CaOx 結石はヒト尿路結石で最も頻度が高い¹⁾。一方、ラットにおける CaOx 結石の自然発生はごくまれである⁶⁾が実験動物として一般的であることなどによりこれまで多くの実験モデルが報告されてきている。実験モデルとしては低リン食により尿中カルシウム増加をはかる方法⁷⁾⁸⁾なども散見されるが一般的には尿酸⁹⁾あるいは尿酸ナトリウム¹⁰⁾¹¹⁾を投与する方法、尿酸の前駆物質である glyoxylic acid¹²⁾, glycolic acid¹³⁾, hydroxy-L-proline¹⁴⁾¹⁵⁾, ethylene glycol^{16)~19)}を投与する方法、あるいは glyoxylate から glycine への transamination を減少させ glyoxylate とその転換物である oxalate を増加させ内因性尿酸を増加させるビタミン B₆ 欠乏食による方法²⁰⁾²¹⁾など尿酸増加による結晶、結石形成を試みる方法が用いられている。このことは Robertson ら²²⁾が in vitro の系では尿酸の方がカルシウムより結石形成においてより重要な役割を果たしていると報告していることを考慮すると興味深いものと考えられる。今回著者らが用いた HLP およ

び EG 投与によるプロトコールも尿酸増加によるものであり、投与物質の相違はあるものの Vermeulen ら^{23)~25)}の oxamide による triggering high dose と maintenance low dose による方法に基づいている。EG およびその代謝産物は腎尿管上皮細胞自体への毒性を有したり²⁶⁾、その慢性毒性は腎障害が最も著明であると報告されており²⁷⁾、これら毒性を極力減少させることが望ましいと考えられる。著者らのプロトコールでは 0.4%EG という Lyon ら¹⁷⁾が報告しているラットの general health に影響を及ぼさないとされる 1%以下の EG を使用し 1 週間という比較的短期間の投与で確実に CaOx 結晶を腎尿管腔内に沈着させることが可能であった。しかし、1 週間の投与期間はヒト腎結石発生のモデルとしては短期間過ぎることは否定できず、より長期間による実験モデルを検討中である。

尿中への尿酸、カルシウム、クレアチニン排泄量に関して実験開始前とプロトコール終了時では結晶形成群 (group II, III, IV) においてクレアチニン排泄量が減少しており腎障害の存在が示唆される。しかし、これが HLP, EG, あるいは SPP, SCC といった投与薬剤による直接作用かそれとも結晶沈着に基づくものかは不明である。プロトコール終了時の各群についてみるとコントロール群 (group I) と結晶形成群 (group II, III, IV) 間、および結晶形成群 (group II, III, IV) におけるコントロール群 (group II) と SPP, SCC 投与群 (group III, IV) 間には一定の相関は認めなかった。これらより尿中尿酸、カルシウム排泄量の測定は結晶形成の有無や程度およびこれに対する阻止物質の影響を観察するには適切とはいえないことが考えられる。

腎尿管腔内 CaOx 結晶沈着に関しては現在までのところ、その沈着の程度を組織学的に 3 ないし 4 段階の grade として表現した報告^{11)16)18)21)28)~30)}が大部分であり、planimetry により parenchymal calcification の area や一組織切片の CaOx 結晶を測定している報告¹⁸⁾¹⁹⁾がみられるが、いずれも定性的もしくは半定量的な評価法である。Tawashi ら¹⁵⁾は HLP の腹腔内投与により誘発した CaOx 結晶を抽出し Coulter counter によってその結晶を測定することによってラット腎尿管腔内に沈着した CaOx 結晶を定量的に測定する方法を報告しているが、その後本邦をはじめ諸家による追試検討の報告はみられない。Solunene-100 は通常、液体シンチレーション測定の際、

動物組織の可溶化剤として使用される第4級アンモニウム化合物の0.5M トルエン溶液で分子量386である。又, Soluene-100により結晶形態およびsizeに影響を及ぼさないことが報告されており¹⁵⁾, 著者らはこれに関し光学顕微鏡による結晶形態の観察及びCoulter counterによるcrystal size distribution測定により確認した。Coulter counterによる結晶測定の結果, 組織学的にCaOx結晶沈着を認めなかったコントロール群(group I)でcrystal number $7,162.0 \pm 1,635.0$ と結晶沈着を認めた結晶形成群(group II, III, IV)と有意差のないカウントが認められたが, これは腎組織溶解に伴う微細な細胞破片などをカウントしたためと考えられcrystal volumeについてみると $63.9 \pm 22.8 \mu\text{m}^3/100\mu\text{l} \times 10^{-4}$ とそれ以外の群に比較して有意($p < 0.01$)に減少しており, 更に, $16.0 \mu\text{m}$ 以上のcrystal volumeも $18.2 \pm 8.9 \mu\text{m}^3/100\mu\text{l} \times 10^{-4}$ と同様に有意($p < 0.01$)に減少しておりこれらがカウントされることが測定に与える影響は無視できる範囲のものと考えられる。crystal volumeとmean sizeに関して検討してみるとコントロール群(group I)と結晶形成群(group II, III, IV)間では結晶形成群(group II, III, IV)がコントロール群(group I)に比較してcrystal volume, mean sizeとも増加していた($p < 0.01$)。結晶形成群(group II, III, IV)間ではSPP, SCC投与群(group III, IV)が非投与群(group II)に比較してcrystal volume, mean sizeともに減少していた($p < 0.01$)。以上より本法によりラット腎尿管腔内に沈着したCaOx結晶を定量的に評価することが可能であることおよびSPP, SCCにCaOx結晶成長に対する阻止作用を有することが示唆される。戎野ら³⁰⁾は腎組織内カルシウム濃度がその結晶形成の重篤度と極めて良く一致し, 腎尿管腔内での結晶形成の有無あるいは抑制効果の判定に有用な一つの方法であるとしており, 今回の著者らの結果でもコントロール群(group I)と結晶形成群(group II, III, IV)間では結晶形成群(group II, III, IV)において腎組織内カルシウム濃度が高値($p < 0.01$)でありその有用性が認められた。しかしながら結晶形成群(group II, III, IV)間でのSPP, SCC投与群(group III, IV)と非投与群(group II)間には腎組織内カルシウム濃度に統計学的有意差は認めなかった。これに対し前述したようにcrystal volume, mean sizeに両群間で有意差($p < 0.01$)が認められ, このことは腎組織内カルシウム濃度による結晶形成の程度や阻止効果の判定の限界

および本法による定量的結晶測定の有用性を示唆するものと考えられる。

CaOx結石形成の阻止物質として従来よりピロリン酸, クエン酸, マグネシウムなどの低分子物質が知られているが, Meyerら³¹⁾が尿全体の阻止活性の中で低分子物質の占める割合はわずかであると報告し, またGillら³²⁾が阻止活性の主体は高分子物質にあるとして以来阻止物質としての高分子物質への関心が高まってきた。現在までに知られている主な高分子物質はglycosaminoglycans, ribonucleic acid, Tamm-Horsfall mucoprotein, glycoproteinなどのmacromolecular polyanionである。SPPは半合成glycosaminoglycan様物質でマイナスチャージしたsulphated polyanionであり経口投与された場合, その約2~4%が尿中に排泄されるとされ³³⁾³⁴⁾, フィブリン溶解剤, 抗脂血症剤として使用されている³⁴⁾。また, 最近では間質性膀胱炎の治療にも使用されている³³⁾³⁵⁾³⁶⁾。更にCaOx結石患者への投与も試みられはじめているが³⁷⁾, 本邦では未だその詳細な基礎的あるいは臨床的報告はみられない。今回, 著者らはSPPがin vitroにおける全尿系で5~100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度でCaOx結晶の形成と成長を阻止することより³⁸⁾, 経口投与と静脈内投与の相違はあるものの静脈内投与でも前述のごとく2~4%が尿中に排泄されると仮定すると5mg/dayの投与を行うと100~200 $\mu\text{g}/\text{day}$ の尿中排泄となり, 実験ラットの一日尿量を考慮すると2~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となると考え投与量を決定した。しかし, 前述の間質性膀胱炎に対する治療としての投与量は150~400mg/day³³⁾³⁵⁾³⁶⁾でありヒト体重を60kgとすると約6.6mg/kgとなり今回著者らが施行したラットに対する投与量はこれより過剰であり今後更に低および高濃度での検討を重ねていく必要があるがCaOx結晶の阻止物質として将来, 臨床的にも使用可能な有望な物質であると考えられる。

SCCに関してはBisaillonら³⁹⁾, Desjardinsら⁴⁰⁾がCaOx溶液中においてSCCが0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でも著明にCaOx monohydrate結晶形成および成長が遅延することを報告し, Tawashiら⁴¹⁾は人工尿中でのCaOx dihydrate結晶がSCCによって100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で成長を抑制することを報告している。更に, 鈴木ら⁹⁾はin vitroの系でseed crystal法においてSCCが0.01~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で凝集, 成長阻止能を認め, また全尿系では10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に依存して結晶形成, 成長を抑制したと報告している。in vivoにおいて

はTawashiら⁴²⁾はラットにおいて75mg/kgの静脈内投与でCaOx結晶の沈着と成長が阻止できたとしている。今回、著者らの結果ではこれより1/2以下の投与量でも結晶成長の阻止が認められた。SCCは既に消化性潰瘍治療剤の主要成分として本邦でも広く使用されておりin vitroの結果と合わせSPP同様CaOx結晶の阻止物質としての効果が期待される。

結 語

1) Hydroxy-L-prolineの腹腔内投与および0.4% ethylene glycolの自由摂取によりラット腎尿細管腔内に結晶沈着を誘発し、形成された結晶を光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡で確認した。赤外分光分析法による分析の結果、形成された結晶はcalcium oxalate monohydrateであった。

2) 実験開始前およびプロトコル終了時ではコントロール群(group I)と比較して結晶形成群(group II, III, IV)が尿量が増加しクレアチニン排泄量が低下した。プロトコル終了時ではコントロール群(group I)と比較して結晶形成群(group II, III, IV)で尿量の増加を認めたが、尿中尿酸、カルシウム排泄量には一定の相関は認めなかった。

3) 腎尿細管腔内に沈着した尿酸カルシウム結晶をCoulter counter TA-IIにて定量的に測定した。その結果コントロール群(group I)と比較して結晶形成群(group II, III, IV)がcrystal volume, mean sizeにおいて増加を認めた。

4) コントロール群(group I)と比較して結晶形成群(group II, III, IV)が腎組織内カルシウム濃度が高値であった。

5) 結晶形成群(group II, III, IV)間に腎組織内カルシウム濃度に有意差を認めなかったが、Coulter counterによる定量的結晶測定の結果sodium pentosan polysulfate, sodium copper chlorophyllin投与群(group III, IV)が非投与群(group II)に比較してcrystal volume, mean sizeが減少していた。

以上よりCoulter counterによるラット腎尿細管腔内尿酸カルシウム結晶の定量的測定の有用性およびsodium pentosan polysulfate, sodium copper chlorophyllinがin vivoにおいて尿酸カルシウム結晶の成長阻止物質としての作用を有することが考えられた。

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) Vermeulen, C.W., Lyon, E.S., Ellis, J.E. and

- Borden, T.A.: The renal papilla and calculogenesis. J. Urol., 97, 573—582, 1967.
- 3) Finlayson, B. and Reid, F.: The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. Invest. Urol., 15, 442—448, 1978.
- 4) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, 谷口利憲, 下在和, 津川龍三: Coulter counterを用いた尿酸カルシウム結晶の凝集能測定。腎と透析 臨時増刊号, 腎尿路結石のすべて, p. 492—496, 東京医学社, 東京, 1987.
- 5) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, 谷口利憲, 下在和, 津川龍三: 尿酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対するSodium Copper Chlorophyllinの阻止効果。日泌尿会誌, 78, 1306—1310, 1987.
- 6) Khan, S.R. and Hackett, R.L.: Calcium oxalate urolithiasis in the rat: Is it a model for human stone disease? A review of recent literature. In Scanning Electron Microscopy. p. 759—774, SEM Inc., AMF O'Hare (Chicago), 1985.
- 7) Coburn, S.P. and Packett, L.V.: Calcium, phosphorus and citrate interaction in oxalate urolithiasis produced with a low-phosphorus diet in rats. J. Nutr., 76, 385—392, 1962.
- 8) Werness, P.G., Knox, F.G. and Smith, L.H.: Low-phosphate diet in rats: A model for calcium oxalate urolithiasis. in Urolithiasis Clinical and Basic Research, Smith, L.H., Robertson, W.G. and Finlayson, B. (Eds.) p. 731—734, Plenum Press, New York and London, 1981.
- 9) Thomas, J., Melon, J.M., Thomas, E., Steg, A., Desgrez, P. and Aboulker, D.: Données récentes sur l'élimination urinaire de l'acide oxalique dans la lithiase oxalique. Ann. Urol., 6, 31—33, 1972.
- 10) Jordan, W.R., Finlayson, B. and Luxenberg, M.: Kinetics of early time calcium oxalate nephrolithiasis. Invest. Urol., 15, 465—468, 1978.
- 11) Dysktra, M.J. and Hackett, R.L.: Ultrastructural events in early calcium oxalate crystal formation in rats. Kidney. Int., 15, 640—650, 1979.
- 12) Melon, J.M., Thomas, J. and Pierre, R.: La lithiase oxalique expérimentale à l'acide glyoxylique chez le rat. Essai de prévention par la succinémide. Therapie., 26, 991—998, 1971.
- 13) Chow, F.C., Hamar, D.W. and Udall, R.H.: Prevention of oxalate and phosphate lithiasis by alanine. Invest. Urol., 12, 50—53, 1974.
- 14) Thomas, J., Thomas, E., Balan, L., Guillon, J.C., Melon, J.M. and Monsaingeon, A.: Realisation d'une lithiase oxalique expérimentale avec l'hydroxyproline. C.R. Society Biology, 165, 264—267, 1971.
- 15) Tawashi, R., Cousineau, M. and Sharkawi, M.: Calcium oxalate crystal formation in the kid-

- neys of rats injected with 4-hydroxy-1-proline. Urol. Res., 8, 121—127, 1980.
- 16) Gershoff, S.N. and Andrus, S.B.: Effect of vitamin B₆ and magnesium on renal deposition of calcium oxalate induced by ethylene glycol administration. Proc. Soc. Exp. Biol., 109, 99—102, 1962.
 - 17) Lyon, E.S., Borden, T.A. and Vermeulen, C.W.: Experimental oxalate lithiasis produced with ethylene glycol. Invest. Urol., 4, 143—151, 1966.
 - 18) Selikowitz, S.M. and Olsson, C.A.: Comparative effects of anticalculus management in the rat. Invest. Urol., 14, 120—123, 1976.
 - 19) Hering, F., Bigalke, K.H. and Lutzeyer, W.: Interaction of hyperuricuria and hyperoxaluria on renal calcium oxalate stone formation. Adv. Exp. Med. Biol., 122A, 99—107, 1980.
 - 20) Gershoff, S.N.: Vitamin B₆ and oxalate metabolism. Vitam. Horm., 22, 581—589, 1964.
 - 21) Gershoff, S.N., Faragalla, F.F., Nelson, D.A. and Andrus, S.B.: Vitamin B-6 deficiency and oxalate nephrocalcinosis in the cat. Am. J. Med., 27, 72—80, 1959.
 - 22) Robertson, W.G. and Peacock, M.: The cause of idiopathic calcium stone disease: Hypercalciuria or hyperoxaluria? Nephron., 26, 105—110, 1980.
 - 23) Vermeulen, C.W., Ellis, J.E. and Hsu, T.C.: Experimental observations on the pathogenesis of urinary calculi. J. Urol., 95, 681—690, 1966.
 - 24) Vermeulen, C.W., Lyon, E.S., Ellis, J.E. and Borden, T.A.: The renal papilla and calculogenesis. J. Urol., 97, 573—582, 1967.
 - 25) Vermeulen, C.W. and Lyon, E.S.: Mechanisms of genesis and growth of calculi. Am. J. Med., 45, 684—692, 1968.
 - 26) Bove, K.E.: Ethylene glycol toxicity. Am. J. Clin. Path., 45, 46—50, 1966.
 - 27) Blood, F.R.: Chronic toxicity of ethylene glycol in the rat. Food. Cosmet. Toxicol., 3, 229—234, 1965.
 - 28) Rushton, H.G., Spector, M., Rodgers, A.L., Hughson, M. and Magura, C.H.: Developmental aspects of calcium oxalate tubular deposits and calculi induced in rat kidneys. Invest. Urol., 19, 52—57, 1981.
 - 29) Rushton, H.G. and Spector, M.: Effect of magnesium deficiency on intratubular calcium oxalate formation and crystalluria in hyperoxaluric rats. J. Urol., 127, 598—604, 1982.
 - 30) 戎野庄一, 森本鎮義, 深谷俊郎, 宮崎善久, 安川修, 澤田佳久, 大川順正: 実験的尿酸カルシウム結石の研究 1. カルシウム及びマグネシウム環境と尿酸カルシウム結晶形成について. 日泌尿会誌, 76, 831—842, 1985.
 - 31) Meyer, J.L. and Smith, L.H.: Growth of calcium oxalate crystals: Inhibition by natural urinary crystal growth inhibitors. Invest. Urol., 13, 36—39, 1975.
 - 32) 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.
 - 33) Parson, C.L., Schmidt, J.D. and Poien, J.J.: Successful treatment of interstitial cystitis with sodium pentosan polysulfate. J. Urol., 130, 51—53, 1983.
 - 34) Alessandri, M., Fiorentini, P. and Garagnani, C.: Effecti della somministrazione orale di un solfopolisaccaride a basso peso molecolare in un gruppo di lavoratori sedentari con cardiovasculopatia arteriosclerotica. Giornale di Clinica Medica., 48, 935—947, 1967.
 - 35) Holm-Bentzen, M., Jacobsen, F., Nerstrøm, B., Lose, G., Kristensen, J.K., Pedersen, R.H., Krarup, T., Feggetter, J., Bates, P., Barnard, R., Lasen, S. and Hald, T.: A prospective double-blind clinically controlled multicenter trial of sodium pentosanpolysulfate in the treatment of interstitial cystitis and related painful bladder disease. J. Urol., 138, 503—507, 1987.
 - 36) Fritjofsson, Å., Fall, M., Juhlin, P., Persson, B. and Ruutu, M.: Treatment of ulcer and nonulcer interstitial cystitis with sodium pentosanpolysulfate: A multicenter trial. J. Urol., 138, 508—512, 1987.
 - 37) Norman, R.W., Scurr, D.S., Robertson, W.G. and Peacock, M.: Inhibition of calcium oxalate crystallisation by pentosan polysulphate in control subjects and stone formers. Brit. J. Urol., 56, 594—598, 1984.
 - 38) 鈴木孝治, 宮澤克人, 津川龍三: 尿酸カルシウム結晶形成成長凝集に対する sodium pentosan polysulfate の阻止作用. 日泌尿会誌, 80, 526—531, 1989.
 - 39) Bisaillon, S. and Tawashi, R.: Retardation of dissolution and growth of calcium oxalate monohydrate. J. Pharm. Sci., 65, 222—225, 1976.
 - 40) Desjardins, A. and Tawashi, R.: Growth retardation of calcium oxalate by sodium copper chlorophyllin. Eur. Urol., 4, 294—297, 1987.
 - 41) Tawashi, R. and Cousineau, M.: Growth retardation of weddellite (calcium oxalate dihydrate) by sodium copper chlorophyllin. Invest. Urol., 18, 86—89, 1980.
 - 42) 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.

(1989年3月14日受理, 特別掲載)