

# 尿路結石症における In vitro の結晶形成

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

## A STUDY OF CRYSTALLIZATION ON UROLITHIASIS IN VITRO

Katsuhito Miyazawa, Koji Suzuki and Ryuzo Tsugawa

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

The formation, growth and aggregation of calcium oxalate crystals were evaluated with a Coulter counter. CG-120 and sodium pentosan polysulfate (SPP) has inhibitory activity on calcium oxalate crystal formation, growth and aggregation in the seeded crystal system and whole urine system. In continuous crystallizer system, they inhibit the nucleation rate.

A new system of observing the crystal formation and growth of fragmented stones after extracorporeal shock wave lithotripsy has been developed. CG-120 has an inhibitory effect on their growth. The deposition of calcium oxalate crystals in the rat kidney was induced, and then, the volume and number of crystals were estimated using a Coulter counter. SPP has an inhibitory effect on calcium oxalate crystal growth in vivo.

(Acta Urol. Jpn. 37: 1091-1096, 1991)

**Key words:** CaOx crystal, Coulter counter, Continuous crystallizer system, CG-120, SPP

### 緒 言

尿路結石中もっとも多く存在する尿酸カルシウム結石に関し多施設によって精力的に種々の方法にてその発生機序の解明がなされているものの、いまだ不明な点が多く、その一因として実験的結石形成が困難であることがあげられる。結石は結晶核形成、成長、凝集の過程を経て結石に発達するとされており<sup>1)</sup>、われわれはこの点から結晶形成、成長、凝集の検討が結石発生のメカニズムの解明に重要であると考え主として Coulter counter を利用し種々の方法にて検討を行ってきた<sup>2-4)</sup>

Coulter counter 法は尿酸カルシウム (CaOx) の metastable solution における seed crystal の各サイズ毎の数を直接カウントする方法で、現在われわ

れは Coulter counter TA-II に interface を介し personal computer をオンライン化し測定している。今回近年広く尿酸カルシウム結石再発防止剤として臨床的に使用されているクエン酸製剤 CG-120 と体外阻止物質として注目されている sodium pentosan polysulfate (以下 SPP と略す。) の阻止効果を in vitro, in vivo の系において測定したので報告する。

### 実験方法

#### I. In vitro

##### 1. seed crystal method<sup>2)</sup>

CaOx の metastable solution を使用直前に作製し、このうちの 100 ml に CaOx crystal suspension を 2.5 ml 添加し、添加直後とマグネチックスターラーにて 1 時間攪拌後の各 size ごとの結晶数を

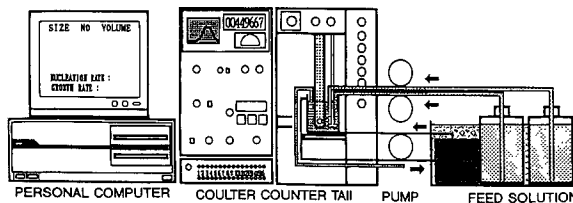


Fig. 1. Continuous crystallizer system.

Coulter counter にて計測し, control と比較して CG-120, SPP を添加した場合の結晶数の変化から凝集阻止能 (Ia) を, 結晶体積の変化から成長阻止能 (Ig) を算出した.

## 2. 全尿法

すでに報告したように<sup>4)</sup> metastable limit を測定後, 尿 100 ml に metastable limit の NaOx 量, さらに 0.3 mmol の NaOx を追加添加し10分毎に結晶数, 体積を測定しこれを control として CG-120, SPP 添加時の反応と比較した.

## 3. Continuous crystallizer system<sup>5)</sup>

約 150 ml の容量のビーカーにカルシウム系の溶液と蔞酸系の溶液をマルチポンプを使用し注入し溶液量が常に 100 ml となるよう注入量と同量を吸引する. ビーカーは二重構造で内部の溶液が常に 37°C となるよう温水を循環させる. また, ビーカー内の溶液はテフ

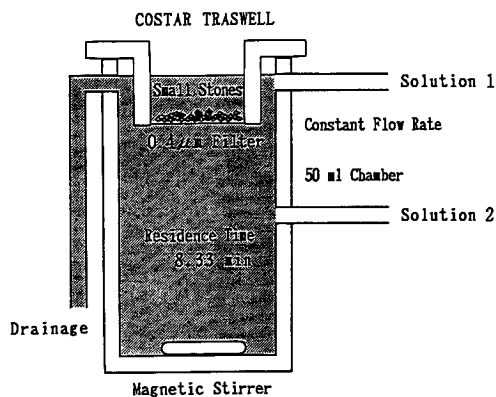


Fig. 2. Membrane filter crystallization system.

ロンコーティングのスターラーバーを使用し一定の速度で攪拌 (Fig. 1.) する. なお, 注入溶液は Robertson らの報告<sup>6)</sup>によるカルシウム最終濃度 6mmol, 蔞酸濃度は 0.6 mmol を使用した. CG-120, SPP を蔞酸系溶液に添加し注入し nucleation rate ( $B^*$ ), growth rate ( $G$ ) を測定した.

さらに, この装置を応用し, より dynamic な approach として ESWL 後の結石片を持続結晶作製装置内におき成長させる系を開発し<sup>7)</sup> CG-120 の溶解効果を検討した. 容量 75 ml のビーカー内に extracorporeal shock wave lithotripsy (以下 ESWL と略す.) 後排石された蔞酸カルシウム一水化物単独成分 100 mg の結石片を含有させたメンブレンフィルター式培養カップを置き, 注入液量が 50 ml となるよう注入量と同量を吸引し, 180分の反応後, 室温にて paper filter 上で24時間乾燥後重量を測定した (Fig. 2).

## II. In vivo

体重 300~350 g の雄 Sprague-Dawley ラットを用い1週間の予備飼育の後, Fig. 3 に示したプロトコルで蔞酸前駆物質である Hydroxy-L-proline の腹腔内投与および0.4% ethylene glycol の自由摂取により結晶を誘発し結晶形成および SPP の阻止効果をすでに報告した方法<sup>8)</sup>で腎組織をホモジネート後, Soluene-100 にて溶解し形成された結晶を抽出し Coulter counter にて測定, 検討した (Fig. 3).

## 結 果

### I. In vitro

#### 1. seed crystal method

CG-120 は 250~2,000  $\mu\text{g/ml}$  の間で凝集阻止効果

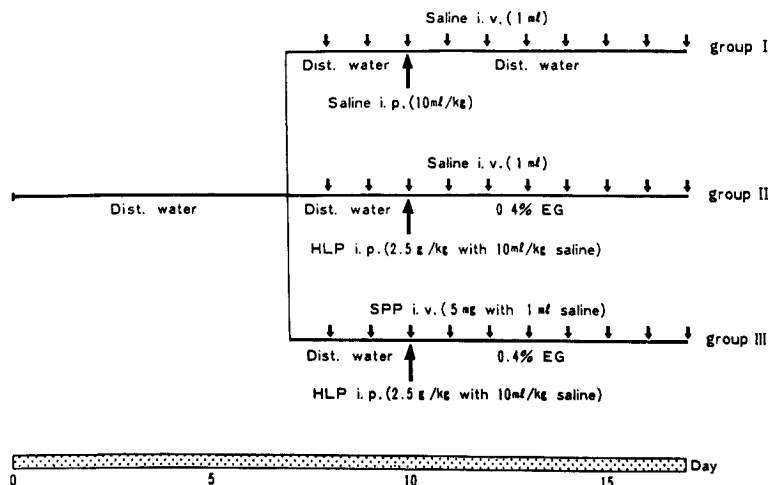


Fig. 3. The protocol of experiment in vivo

が認められ特に硫酸カルシウム水化物に対しては2,000  $\mu\text{g/ml}$ では100%以上で結晶の溶解が認められた (Fig. 4).

成長阻止能は 250~2,000  $\mu\text{g/ml}$  で認められた. SPP は 0.5  $\mu\text{g/ml}$  以上で凝集阻止効果が認められ 1  $\mu\text{g/ml}$  以上では100%近くの阻止効果を示した. 成長阻止能は 0.5~100  $\mu\text{g/ml}$  で認められた (Fig. 5).

2. 全尿系

CG-120 は最終濃度 500  $\mu\text{g/ml}$  以上で結晶体積阻止効果認められた (Fig. 6).

SPP は最終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  以上で同様に阻止効果認められた (Fig. 7).

3. Continuous crystallizer system

CG-120 では濃度増加に従い nucleation rate が抑制され, SPP でも同様に抑制され CG-120, SPP とも nucleation の段階で抑制的に作用することが判明した (Table 1).

ESWL 後の結石片は CG-120 の濃度の増加に伴い

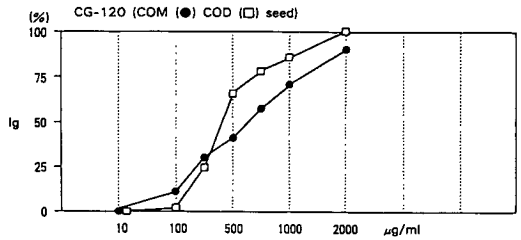
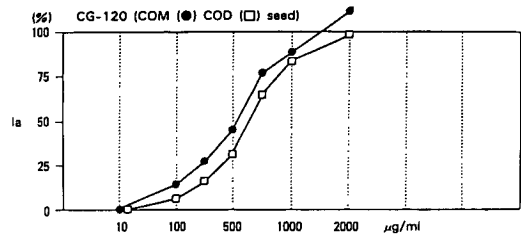


Fig. 4. Inhibitory activity of aggregation (Ia) and growth (Ig) of CG-120 in the seed crystal system.

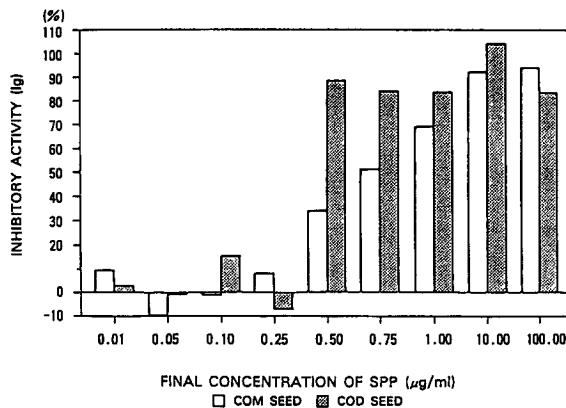
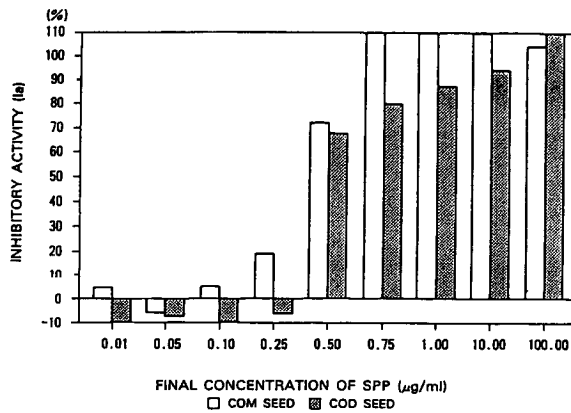


Fig. 5. Inhibitory activity of aggregation (Ia) and growth (Ig) of SPP in the seed crystal system.

結石重量が減少し、最終濃度 10 mmol の CG-120 では control の重量 4.26 mg に対し 1.34 mg と著明に減少した (Table 2).

## II. In vivo

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) で有意に増加していた. crystal volume, mean size,  $16 \mu\text{m}$  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) で有意に増加していた. 結晶形成群 (group II, III) 間では SPP 投与群 (group III) が非投与群 (group II) に比較し crystal volume, mean size,  $16 \mu\text{m}$  以上の crystal volume において有意に減少していた (Table 3).

## 考 察

seed crystal 法は metastable solution 中での尿酸カルシウム結晶の成長と凝集を観察できる優れた方法であるが 1% の希釈尿を使用することから全尿での反応とは異なることが考えられ Ryall らの報告<sup>9)</sup>以来全尿系への関心が高まってきている. とくに阻止物質の再発性尿路結石患者に対する評価という点では少なくとも二つの系での検討が必要と考えられる. しかしこれらの方法のほとんどは一定容量内において完結する batch system であり実際に腎臓で持続的に産生される尿とは異なると考えられてきた. ヒトにおける尿産生と同様な状態をつくるため continuous crystallizer を使用した概念が Finlayson により報告<sup>9)</sup>され、その後諸家が種々の装置を使用し阻止因子

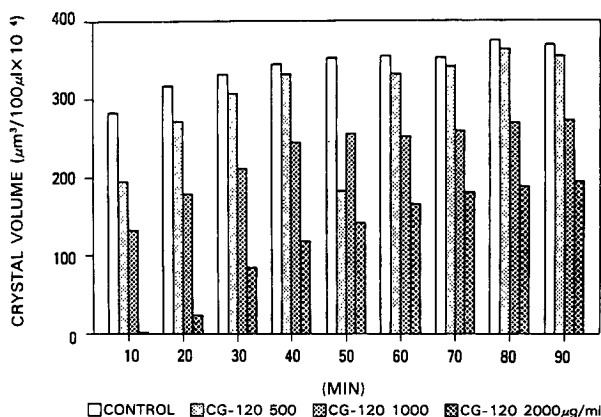


Fig. 6. Crystal volume formed in the whole urine system with or without CG-120 in response to overload of sodium oxalate above the metastable limit.

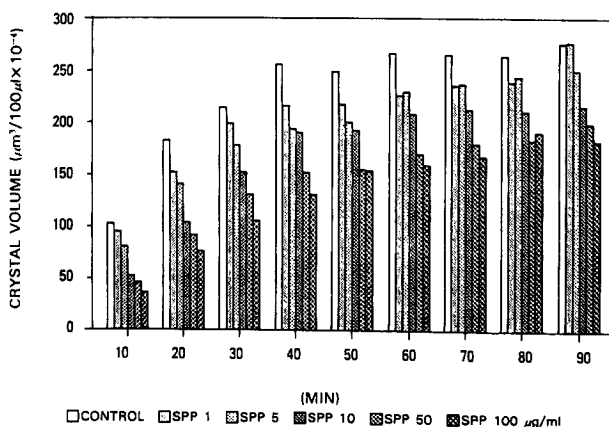


Fig. 7. Crystal volume formed in the whole urine system with or without SPP in response to overload of sodium oxalate above the metastable limit.

Table 1. Summary of the effect of CG-120 and SPP on nucleation rate, growth rate and crystal mass concentration.

Final concentration				n	Nucleation Rate		Growth Rate		Crystal mass	
Ca (mmol)	Ox (mmol)	Cit (mmol)	SPP (mg/L)		BO (No/min ml)	SD	G (microns/min)	SD	MT (mg/L)	SD
6	0.6	0	0	6	66290	1156	0.278	0.004	48.02	1.99
6	0.6	2	0	9	50722	6065	0.289	0.015	41.02	4.70
6	0.6	4	0	3	48169	1015	0.296	0.005	42.16	1.73
6	0.6	6	0	3	53979	5265	0.285	0.009	41.92	1.09
6	0.6	8	0	3	44368	652	0.290	0.008	36.36	3.18
6	0.6	10	0	3	45655	3905	0.295	0.018	41.29	3.30
6	0.6	2	10	3	41446	278	0.300	0.005	37.54	1.77
6	0.6	2	20	3	43423	1412	0.295	0.006	37.34	1.03
6	0.6	2	30	3	52260	1976	0.277	0.007	37.43	3.11
6	0.6	2	40	3	51593	2669	0.282	0.005	38.71	0.30
6	0.6	2	50	9	47434	2340	0.281	0.007	35.48	1.62

Table 2. Summary of the effect of CG-120 on nucleation rate, growth rate, crystal mass concentration and stone weight.

Final concentration			n	Nucleation Rate		Growth Rate		Crystal mass		Stone Weight	
Calcium (mmol)	Oxalate (mmol)	Citrate (mmol)		BO (No/min ml)	SD	G (microns/min)	SD	MT (mg/L)	SD	Wt (mg)	SD
6	0.6	0	6	66290	1156	0.278	0.004	48.02	1.99	4.255	0.735
6	0.6	2	6	50722	6065	0.289	0.015	41.02	4.70	3.940	0.430
6	0.6	4	6	48169	1015	0.296	0.005	42.16	1.73	3.560	0.530
6	0.6	6	6	53979	5265	0.285	0.009	41.92	1.09	2.895	0.195
6	0.6	8	6	44368	652	0.290	0.008	36.36	3.18	2.060	0.410
6	0.6	10	6	45655	3905	0.295	0.018	41.29	3.30	1.340	0.300

Table 3. Calcium content of rat kidney, and crystal number, volume, mean size and crystal volume over 16.0 μm.

	group I	group II	group III
Renal Ca content (mg/g·tissue)	(n=7) 0.098±0.020	(n=7) 0.320±0.137	(n=8) 0.225±0.162
Crystal No.	(n=10) 7162.0±1635.0	(n=8) 7695.6±1607.6	(n=10) 5673.8±3629.7
Crystal Vol. (μm <sup>3</sup> /100 μl × 10 <sup>-4</sup> )	(n=10) 63.9±22.8	(n=8) 805.9±319.1	(n=10) 278.6±240.3
Mean size (μm)	(n=10) 5.494±0.447	(n=8) 12.221±1.206	(n=10) 8.680±1.723
Crystal Vol. (over 16.0 μm)	(n=10) 18.2±8.9	(n=8) 617.9±269.9	(n=10) 172.4±150.9

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

の作用, 結石患者尿における異常などを報告している<sup>6,10-16)</sup>。今回の検討では CG-120, SPP とともに結晶成長, 凝集を評価可能な batch system および結晶核形成の評価可能な continuous crystallizer system でそれぞれ抑制効果を示した。

ESWL 後しばしば結石片の残存を経験するがこれらがふたたび結石に成長する可能性も否定できず ESWL 後再発防止としての薬物療法の意味で continuous crystallizer system を応用し結石片に対する

CG-120 の効果を検討した。in vitro での結果が in vivo においても反映されるか否かを SPP を用いて検討した。その結果 in vitro での結晶形成, 成長, 凝集の検討が in vivo の結果とある程度相関することが判明したが, 今後さらに腎の結晶形成に近似した in vitro システムの開発が必要と思われた。

今回, 治療への応用という意味を考慮し検討を行ったが, 近年報告されている heparan sulfate<sup>17)</sup> などのいわゆる体内阻止物質の方向からの追求も重要で,

さらに高分子阻止物質や促進物質の検討も必要と考える。

### 結 語

蔞酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集の検討を主として Coulter counter を用い以下の結果を得た。

1. seed crystal 法, 全尿系で CG-120, SPP に阻止効果を認めた。
2. CG-120, SPP が continuous crystallizer system で nucleation rate を抑制した。
3. ESWL 後の結石片を持続結晶作製装置内におき成長させる系を開発し CG-120 の溶解効果を検討し, 結石片成長阻止効果を認めた。
4. ラットに蔞酸カルシウム結晶を誘発させ in vivo においても SPP に結晶成長, 凝集阻止効果が認められた。

### 文 献

- 1) Drach GW: Urinary lithiasis. In: Campbell's Urology. Edited by Walsh, P.C. Gittes, R.F. Perlmutter, A.D., et al. 5th ed. pp. 1104-1114, Saunders Co. Philadelphia, 1986
- 2) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, ほか: Coulter counter を用いた蔞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, 1987
- 3) 宮澤克人, 鈴木孝治, 津川龍三: 実験的蔞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. 日泌尿会誌. 80: 861-869, 1989
- 4) 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, ほか: 蔞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
- 5) 鈴木孝治, 百成智津枝, 津川龍三. Continuous flow crystallizer system の開発と蔞酸カルシウム結晶形成率, 成長率測定の試み. 泌尿紀要: 投稿中
- 6) Robertson WG and Scur DS: Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallization using an artificial urine. J Urol 135:

1322-1326, 1986

- 7) Suzuki K, Tsugawa R and Ryall RL: Inhibition by sodium potassium citrate (CG-120) of calcium oxalate crystal growth on to kidney stone fragments obtained from ESWL. Br J Urol 68: 132-137, 1991
- 8) Ryall RL, Hibberd CM and Marshall VR: A method for studying inhibitory activity in whole urine. Urol Res 13: 285-289, 1985
- 9) Finlayson B: The concept of a continuous crystallizer. Its theory and application to in vivo and in vitro urinary tract models. Invest Urol 9: 258-263, 1972
- 10) Miller JD, Randolph AD and Drach GW: Observation on calcium oxalate crystallization kinetics in simulated urine. J Urol 117: 342-345, 1977
- 11) Drach GW, Randolph D and Miller JD: Inhibition of calcium oxalate dihydrate crystallization by chemical modifiers. I. Pyrophosphate and methylene blue. J Urol 119: 99-103, 1978
- 12) Drach GW, Thorson S and Randolph A: Effects of urinary organic macromolecules on crystallization of calcium oxalate: enhancement of nucleation. J Urol 123: 519-523, 1980
- 13) Rodgers AL and Garside J: The nucleation and growth kinetics of calcium oxalate in the presence of some synthetic urine constituents. Invest Urol 18: 484-488, 1981
- 14) Li MK, Blacklock NJ and Garside J: Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. J Urol 133: 123-125, 1985
- 15) Kohri K, Garside J and Blacklock J: The role of magnesium in calcium oxalate urolithiasis. Br J Urol 61: 107-115, 1988
- 16) Kohri K, Garside J and Blacklock J: The effect of glycosaminoglycans on the crystallization of calcium oxalate. Br J Urol 63: 584-590, 1989
- 17) Nishio S, Abe Y, Wakatsuki A, et al.: Matrix glycosaminoglycan in urinary stones. J Urol 134: 503-505, 1985

(Received on February 18, 1991)  
(Accepted on April 22, 1991)