

尿路結石症の研究

—結石形成腎および腎結石の組織化学的研究—

名古屋大学医学部泌尿器科学教室（主任：三矢英輔教授）

蔡 紹 謨*

STUDIES ON UROLITHIASIS

THE HISTOCHEMISTRY OF THE KIDNEY TISSUES AND STONES FROM PATIENTS WITH UROLITHIASIS

Shao-mo TSAI

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Nagoya University

(Director: Prof. H. Mitsuwa)

In this study, 17 kidney tissue specimens and 29 renal stones were obtained from patients with urolithiasis. Control kidney specimens were dissected from 7 individuals not suffering from urolithiasis. The tissue specimens were fixed with 1% cetylpyridinium chloride (CPC) in 10% formalin (for 24 hours at room temperature). Then the kidney tissue specimens were embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin for general observation as well as histochemically for demonstration of complex carbohydrates. Also, stone specimens were embedded in epon and thin sections made by the mineral polishing specimen preparation, and stained along with the kidney tissues. For identifying individual acidic and neutral carbohydrates, the enzyme digestion was performed for some tissue sections prior to histochemical staining.

The stone-forming kidney tissues, normal kidney tissues and urinary stones (calcium oxalate, mixed, struvite) contained some glycosaminoglycans and neutral glycoproteins, but uric acid stones and cystine stones did not.

The results of digestion with enzymes indicated that calcium oxalate stone-forming kidney tissue contains heparitin (heparan) sulfate; mixed stone-forming tissue contains sialic acid, hyaluronic acid, chondroitin sulfate A, B, C and heparitin (heparan) sulfate; struvite stone-forming tissue contains sialic acid, hyaluronic acid, chondroitin sulfate A, C and heparitin (heparan) sulfate; and cystine stone-forming tissue contains sialic acid, chondroitin sulfate A, C and heparitin (heparan) sulfate.

The stone organic matrix is classified into the amorphous and stratiform types. The amorphous type matrix contains chondroitin sulfate A, B, C and heparitin (heparan) sulfate, and the stratiform type matrix also contains sialic acid and hyaluronic acid.

The stone-forming kidney tissues, normal kidney tissues and stones (calcium oxalate, mixed, struvite) contain an appreciable amount of α -D-glucose, α -D-mannose and β -D-galactose, but the uric acid stones and cystine stones do not contain sugar residues.

Since the specific glycosaminoglycan composition differed for kidneys of different mineral content and stones of different morphological type, we believe that some glycosaminoglycans in kidneys and amorphous type matrix might play the role of a nucleating agent, and that a stratiform type matrix encourages stone enlargement.

Key words: Urolithiasis, Histochemistry, Complex carbohydrates

* 現：市立四日市病院泌尿器科

結 言

尿路結石症は泌尿器科領域において一般的疾患であり、その研究に関して多くの報告がなされてきた。それらは尿路結石症の疫学、成因、診断、治療などの多岐にわたっているが成因、治療に関してはいまだに多くの問題点が残っている。

Randall は結石形成の初期において腎乳頭の粘膜下間質および尿細管内に石灰板が生じ、この部の粘膜が破れて石灰板が腎盂内に露出し、これを核として結石が成長すると推定し^{1,2)}、Koch は、ラットによる実験的結石形成の研究においてこれらラット尿中には colloidal bodies (膠質小体) と名づけた球体が出現しそれを基として結石が発生成長すると報告した³⁾。その後 Boyce は尿中の有機成分および結石中の有機成分の化学的および組織化学的研究により、結石中の有機成分 (matrix) が結石発生の基と考えた^{4,5)}。以後、30年にわたり尿路結石の matrix に関して多数の研究がなされ、その構造と化学的組成について詳細な情報がもたらされた。

しかし、結石中の matrix を形成する有機成分の複合糖質がその成因をなすのか、あるいは成長促進因子となっているのか、また単なる結石形成中の付着物質であるのかはいまだなお不明である。結石発生における matrix の役割を理解するには、その結石内の正確な分布や結晶成分との関係を知ることが肝要であり、また結石形成の場である腎における複合糖質の異常も指摘されているがその詳細に関してはやはり不明な部分が多い。

従来、組織化学的方法による組織中の複合糖質の光顕的研究にはトルイジン青、PAS 染色などによって複合糖質の存在を知りその動向を推察していた。しかし近年種々の組織化学的研究方法の開拓進歩にともない、組織中の複合糖質組成を詳しく同定することが可能となってきた。

今回、われわれは最新の組織化学的方法を用いて結石形成腎組織中および結石中の複合糖質の変化を追求するために実験をおこなった。すなわち各結石成分別結石形成腎組織とその他の泌尿器科疾患における腎組織、および摘出結石を用いて、その複合糖質の存在を比較検討することによって結石成因の一部を解明しようとしたものであり、得られた結果の概要を報告する。

方 法

試料および固定

対象は名古屋大学医学部附属病院泌尿器科を受診し尿路結石の診断にて入院、手術をおこなった患者であり、試料は結石形成腎組織 17例、腎結石 29例であった。なお結石形成腎組織の対照として各種泌尿器科疾患の手術によって得られた腎組織を用いた。Table 1, 2 は各症例の年齢、性、結石成分、感染 (細菌尿、膿尿) の有無を示す。なお全例とも血中および尿中生化学的所見 (Ca, Mg, P, 尿酸)、腎機能などに異常を認めなかった。採取された検体はただちに 1% cetylpyridinium chloride を含む 10% ホルマリン溶液により室温で 24 時間固定後以下の 2 方法によって標本作製した。すなわち、腎組織に対してはパラフィン包埋後 4 μ の厚さの切片を作製、結石に対しては、損壊を予防するため電顕標本に準じてエポン包埋をおこない、鉋物研磨標本作製に準じて薄層切片を作製した。なお切片の厚さは偏光顕微鏡を用いて約 30 μ に調整した。

実験方法

1. ヘマトキシリン—エオジン染色 (HEX 染色) (腎組織のみ実施)

Harris のヘマトキシリン液を用いた HEX 染色により腎組織の全体像を把握するとともに、とくに炎症の有無、その程度の判定に用いた。

2. アリザリン赤 (AL-S) 染色 (結石、腎組織の両者に実施)

Dahl (1952)⁶⁾ の方法に従った。

3. チタン黄染色 (結石のみ実施)

岡本ら (1944)⁷⁾ の方法に従った。

4. Periodic acid-Schiff (PAS) 染色 (結石、腎組織の両者に実施)

McManus (1948)⁸⁾ の方法に従った。

5. アルシアン青 (AB) 染色 (結石、腎組織の両者に実施)

アルシアン青は Imperial Chemical Industry 製 (Blackley, Manchester) 8 GX を用いた。なお染色液の pH は 1.0 (Lev and Spicer, 1964)⁹⁾ と pH 2.5 (Pearse, 1968)¹⁰⁾ の 2 種類を作製使用した。

染色法

アルシアン青法 (pH 1.0)

- (1) 切片を脱パラフィンし水に入れる。
- (2) 1.0% アルシアン青 8GX-0.1 N 塩酸溶液 (pH 1.0) にて 30 分染色する。
- (3) 切片を濾紙でおおい色素液を吸いとる。
- (4) 100% エタノールを 2 回かえて脱水する。
- (5) 100% エタノールとキシロールの等量混合液に入れる。

Table 1. 結石形成腎

症例	年齢	性	成分 / 病名	細菌尿	膿尿
1	50	♂	Ca-Ox	+	+
2	48	♂	Ca-Ox	-	+
3	61	♀	Ca-Ox	-	+
4	33	♂	Ca-Ox	-	+
5	61	♂	Ca-Ox	-	+
6	43	♂	Ca-Ox	-	+
7	60	♀	Ca-Ox (Ca-P)	+	+
8	49	♂	Ca-Ox (Ca-P)	+	+
9	33	♂	Ca-Ox (Ca-P)	-	+
10	51	♂	Ca-Ox (Ca-P)	-	+
11	44	♀	Ca-Ox (Ca-P)	+	+
12	39	♂	Ca-Ox, Ca-P (Struvite)	+	+
13	60	♀	Struvite (Ca-P)	-	-
14	47	♂	Struvite (Ca-P)	-	+
15	46	♀	Struvite (Ca-P)	-	+
16	61	♀	Struvite	+	+
17	22	♂	Cystine	-	+
18	55	♂	腎盂腫瘍	+	+
19	42	♀	腎腫瘍	-	+
20	55	♂	腎腫瘍	+	+
21	44	♂	腎腫瘍	-	+
22	69	♀	腎腫瘍	-	-
23	28	♂	腎腫瘍	-	+
24	64	♂	腎盂腫瘍	+	+

Table 2. 腎結石

症例	年齢	性	成分	細菌尿	膿尿
1	33	♂	Ca-Ox	-	+
2	48	♂	Ca-Ox	-	+
3	33	♂	Ca-Ox	-	-
4	60	♀	Ca-Ox	+	+
5	49	♂	Ca-Ox	-	+
6	70	♀	Ca-Ox	-	-
7	57	♂	Ca-Ox	+	+
8	28	♂	Ca-Ox	-	-
9	36	♂	Ca-Ox	-	+
10	43	♂	Ca-Ox	-	+
11	61	♂	Ca-Ox	-	+
12	38	♂	Ca-Ox, Uric acid	-	+
13	39	♂	Ca-Ox, Ca-P	+	+
14	51	♂	Ca-Ox, Ca-P	-	+
15	57	♂	Ca-Ox, Ca-P, Struvite	+	+
16	60	♀	Ca-P, Struvite	-	+
17	47	♂	Ca-P, Struvite	+	+
18	44	♀	Ca-P, Struvite	+	+
19	59	♀	Ca-P, Struvite	+	+
20	72	♀	Ca-P, Struvite	-	-
21	39	♂	Ca-P, Struvite	-	+
22	61	♀	Ca-P, Struvite	+	+
23	28	♀	Ca-P, Struvite	+	-
24	41	♂	Ca-P, Struvite	-	+
25	39	♀	Struvite	+	+
26	33	♀	Struvite	+	+
27	20	♀	Cystine	-	+
28	19	♂	Cystine	+	+
29	58	♂	Uric acid	-	-

(6) キシロールで透徹し封入する。

結果：硫酸ムコ多糖だけが青く着色する。

アルシアン青法 (pH 2.5)

(1) 切片を脱パラフィンし水に入れる。

(2) 1.0% アルシアン青 8GX-3% 酢酸溶液 (pH 2.5) (新調し濾過したもの) にて30分染色する。

(3) 流水で5分洗う。

(4) エタノール列で脱水した後キシロールで透徹し封入する。

結果：弱酸性硫酸ムコ多糖, ヒアルロン酸, シアル酸糖蛋白は青く着色する。強酸性ムコ多糖は淡青色に着色するか染まらない。

6. 酵素消化法 (結石, 腎組織の両者に実施)

シアリダーゼ, 放線菌ヒアルロニダーゼ, 睾丸ヒアルロニダーゼ, コンドロイチナーゼ ABC, コンドロイチナーゼ AC, ヘパリチナーゼ, ヘパリナーゼ, α -アミラーゼの8種の酵素を使用した。切片を脱パラフィンし水洗後, 酵素処理し α -アミラーゼ消化切片以外は AB 染色をおこない, α -アミラーゼ処理切片には PAS 染色をおこなった。

酵素消化法は次のとおりである。

① シアリダーゼ (Boehringer GmbH, West Germany)

AB (pH 2.5) 染色前に [1 mg/ml, 0.1 M acetate buffer (pH 5.3), 0.04 M CaCl_2 含有, 40°C, 12時間] で処理する (Spicer et al, 1967)¹¹⁾。

② 放線菌ヒアルロニダーゼ (生化学工業)

AB (pH 2.5) 染色前に [100 TRU/ml, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0), 40°C, 3時間] で処理する (Yamada, 1973)¹²⁾。

③ 睾丸ヒアルロニダーゼ (Boehringer GmbH, West Germany)

AB (pH 1.0) または AB (pH 2.5) 染色前に [0.5 ~ 1.0 mg/ml, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5), 37°C, 3時間] で処理する (Leppi and Stoward, 1965)¹³⁾。

④ コンドロイチナーゼ ABC (生化学工業)

AB (pH 1.0) または AB (pH 2.5) 染色前に [1.25 U/ml, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 37°C, 2時間] で処理する (Yamada, 1972, 1974)^{14), 15)}。

⑤ コンドロイチナーゼ AC (生化学工業)

AB (pH 1.0) または AB (pH 2.5) 染色前に [1.25 U/ml, 0.1 M Tris-HCL buffer (pH 7.3), 37°C, 2時間] で処理する (Yamada, 1972, 1974)^{14), 15)}。

⑥ ヘパリチナーゼ (生化学工業)

AB (pH 2.5) 染色前に [20 U/ml, 0.1 M phos-

phate buffer (pH 6.8), 37°C, 2時間] で処理する。

⑦ ヘパリナーゼ (生化学工業)

AB (pH 2.5) 染色前に [20 U/ml, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8), 37°C, 2時間] で処理する。

⑧ α -アミラーゼ (丸石製薬)

PAS 染色前に [1% 麦芽ジアスターゼ水溶液, 37°C, 1時間] で処理する (Lille and Fullmer, 1976)¹⁶⁾。

なお、酵素消化法では常に2種類の対照 (無処理の切片, 酵素の溶媒で処理した切片) を作り比較検討した。また結石標本については作製切片の枚数が制限されるため1枚の標本を2分割し片側を対照として用いた。

7 糖残基同定法 (結石, 腎組織の両者に実施)

1) Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine (Con A-PO-DAB) 法

Yamada ら (1976)¹⁷⁾ の方法に従った。

結果: 複合糖質の α -D-mannose および α -D-glucose 残基は褐色に着色する。

2) Peroxidase-labelled Ricinus Communis agglutinin-I-diaminobenzidine (PO-RCA-I-DAB) 法 Yamada ら (1977)¹⁸⁾ の方法に従った。

結果: 複合糖質の β -D-galactose 残基は褐色に着色する。

以上の Lectin (LT)-PO-DAB 反応において、

ConA-PO-DAB 反応では、PO-DAB 反応と DAB 反応の2種を、PO-RCA-I-DAB 反応では DAB 反応のみを、対照染色として実施した。

実験結果

染色結果は、結石形成腎および結石とに分けて検討した。結石形成腎は結石成分によりシュウ酸カルシウム群 (以下シュウ酸群), シュウ酸カルシウム, リン酸カルシウム, リン酸アンモニウムマグネシウムのいずれかの混合群 (以下混合群), リン酸アンモニウムマグネシウム群 (以下 struvite 群), シスチン群 (Cys 群), 尿酸群 (UA 群) に分けそれぞれ糸球体, 尿細管, 間質の各別に対照群と比較検討し, 染色強度を (3+) ~ (+), (±), (-) に分け Table 3, 4 にまとめた。また, 結石標本も同様に成分別に分け観察を加えた。

(1) 結石形成腎

1. HEX 染色: 対照群より得られた組織像は軽度の尿細管間質の増生を認めるのみであり, 結石各群は各症例とも程度の差はあるが, 糸球体の減少や尿細管間質の増生など炎症性変化を認めた。

2. AL-S 染色: 対照群, 結石各群とも染色性は弱かったが, 結石各群で間質中の石灰沈着が多く認められた (Table 3)。

3. PAS 染色: 対照群, 結石各群に有意の差はなく, 糸球体基底膜, 尿細管基底膜が中等度の強さに染色されているが他の部位の染色性は低い (Table 3)。

Table 3. 結石形成腎組織の染色および消化結果

Method	Ca-Ox	Mixed	Struvite	Cystine	Control
(A) Stain [■]					
A B (pH 1.0)	2+	2+	2+	+	+
A B (pH 2.5)	3+	3+	3+	3+	+
P A S	2+	2+	2+	2+	2+
A L S	+	+	-	+	-
(B) Digestion [■]					
シアリダーゼ	-	+	+	+	-
放線菌ヒアルロニダーゼ	-	+	+	-	-
オミダシヒアルロニダーゼ	-	+	+	-	-
コンドロイチナーゼ ABC	-	+	-	-	+
コンドロイチナーゼ AC	-	+	+	+	+
ヘパリチナーゼ	+	+	+	+	+
ヘパリナーゼ	±	±	+	-	+
α -アミラーゼ	-	-	-	-	-
(C) Lectin [■]					
Con A-PO-DAB	3+	2+	2+	3+	+
PO-RCA-I-DAB	3+	3+	3+	3+	+

● (+) ~ (3+) は染色強度を示す。●● (+) は有消化、(-) は無消化を示す。

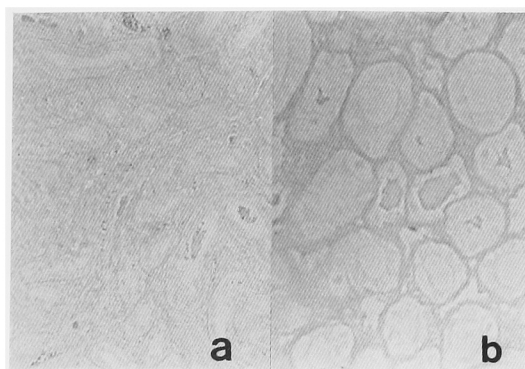


Fig. 1. AB (pH 1.0) 染色 a : 对照腎, b : シュウ酸結石腎

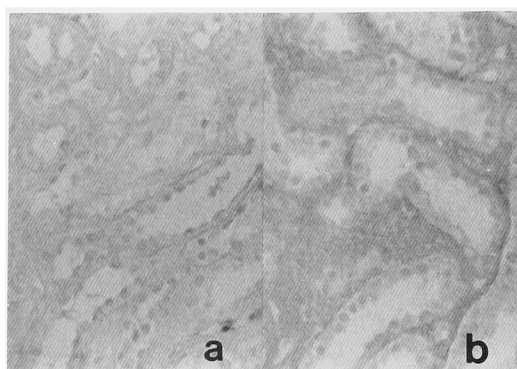


Fig. 2. AB (pH 2.5) 染色 a : 对照腎, b : 混合結石腎

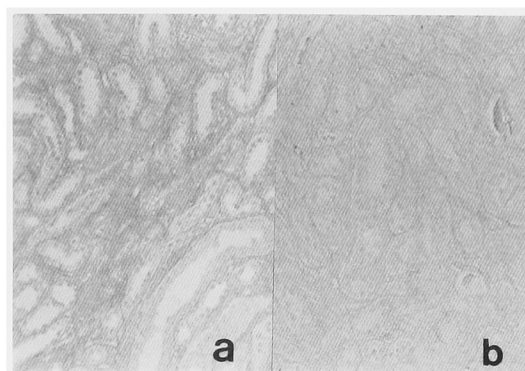


Fig. 3. 睾丸ヒアルロニダーゼ消化—AB (pH 2.5) 染色〔混合結石腎〕 a : 消化前, b : 消化後

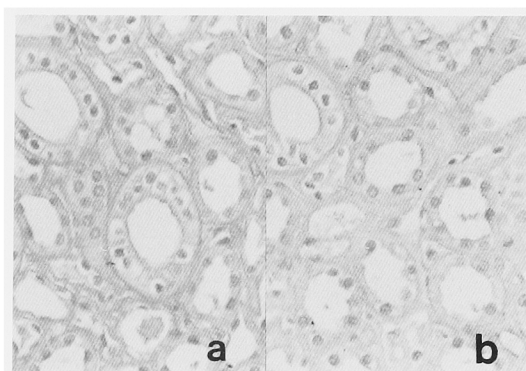


Fig. 4. コンドロイチナーゼ消化—AB (pH 2.5) 染色〔对照腎〕 a : 消化前, b : 消化後

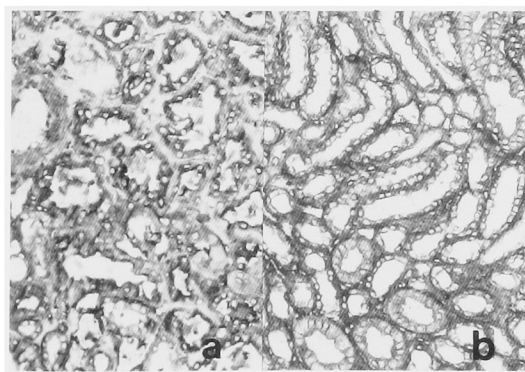


Fig. 5. Con A-PO-DAB 反応 a : 对照腎, b : シュウ酸結石腎

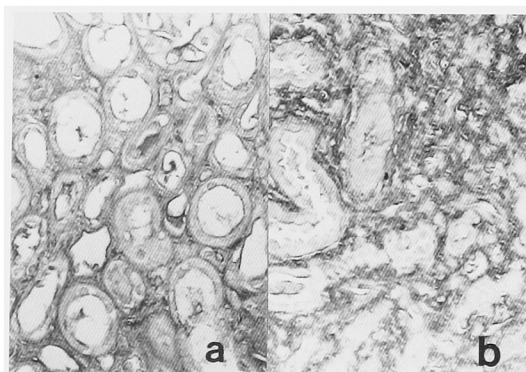


Fig. 6. PO-RCA-I-DAB 反応 a : 对照腎, b : 混合結石腎



Fig. 7. PAS 染色〔シュウ酸結石〕

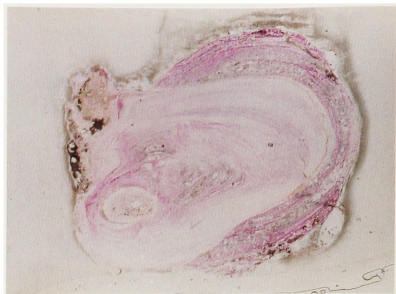


Fig. 8. PAS 染色〔混合結石〕

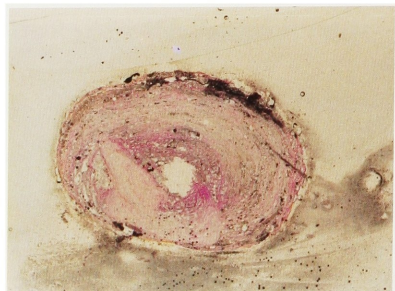


Fig. 9. PAS 染色〔Struvite 結石〕

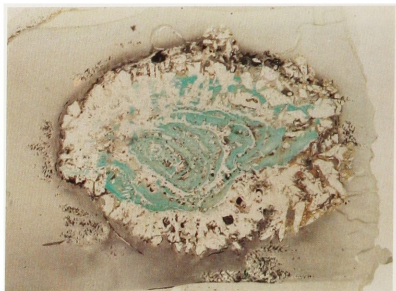


Fig. 10. AB (pH 2.5) 染色〔シュウ酸結石〕

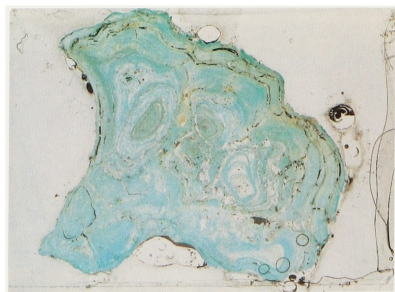


Fig. 11. AB (pH 2.5) 染色〔混合結石〕

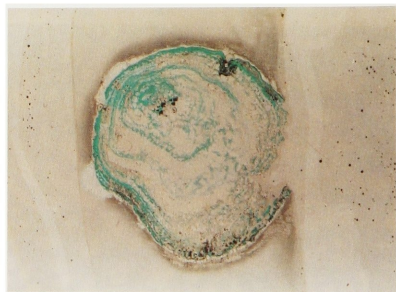


Fig. 12. AB (pH 2.5) 染色〔Struvite 結石〕



Fig. 13. AB (pH 2.5)-AL-S 二重染色 [シュウ酸結石]



Fig. 14. AB (pH 2.5)-AL-S 二重染色 [混合結石]



Fig. 15. AB (pH 2.5)-チタン黄二重染色 [Struvite 結石]

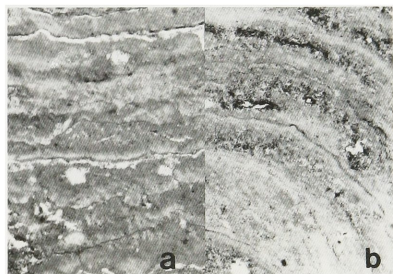


Fig. 16. シアリダーゼ消化-AB (pH 2.5) 染色 [混合結石] a : 消化前, b : 消化後

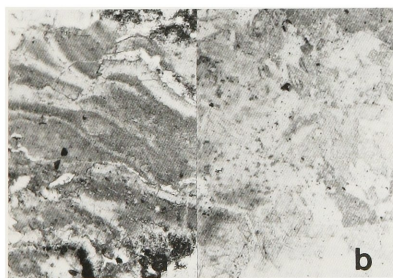


Fig. 17. 舉丸ヒアルロニダーゼ消化-AB (pH 2.5) 染色 [シュウ酸結石] a : 消化前, b : 消化後

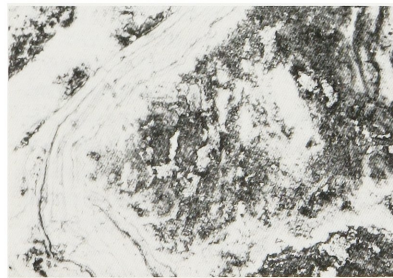


Fig. 18. Con A-PO-DAB 反応 : シュウ酸結石

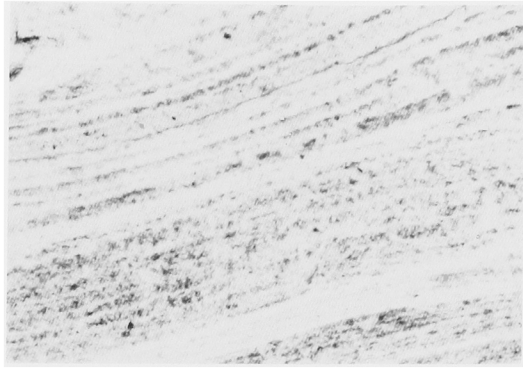


Fig. 19. Con A-PO-DAB 反応：混合結石

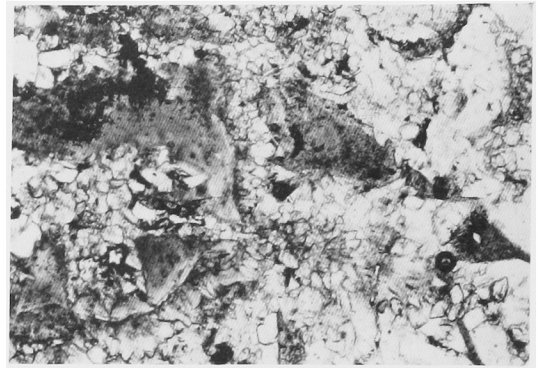


Fig. 20. PO-RCA-I-DAB 反応：シュウ酸結石

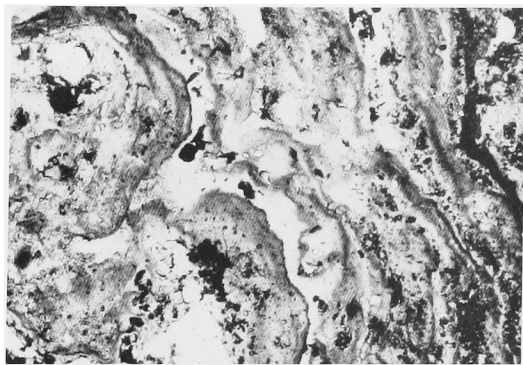


Fig. 21. PO-RCA-I-DAB 反応：混合結石

4. AB 染色 対照群および結石各群を AB (pH 1.0, 2.5) にて染色した結果を Table 3(A), Fig. 1, 2 に示す。Fig. 1 a, b に示すごとく AB (pH 1.0) 染色によると対照群ではおもに間質が軽度染色されている。これに対し結石各群でも同様に間質が染まっているが対照群に比べてやや染色性が強い。結石の成分別での AB (pH 1.0) の染色性には差はなかった。AB (pH 2.5) 染色によると、Fig. 2 a, b に示すごとく対照群では、糸球体、尿細管、間質の各部位が中等度に染色されておりとくに間質での反応が強い。結石各群ではいずれの群も尿細管、間質とも対照群より強く反応しており、この場合も間質の染色性が強い。

以上より結石形成腎における複合糖質の変化は尿細管および間質が主体と考えられたので、以後はおもにこれらについて検討を加えた。

5. 酵素消化法：AB (pH 1.0) および AB (pH 2.5) 染色の前に 7 種類の酵素を用いて消化をおこない、PAS 染色の前には α -アミラーゼによる消化をおこなった。Table 3(B) は各酵素消化実験の結果を結

石各群すなわちシュウ酸群、混合群、struvite 群、Cys 群、ならびに対照群別にまとめたものであり、消化による結果は糸球体、尿細管、間質にわけて検討し、間質の結果を Table 3 にまとめた。

シアリダーゼ消化実験の結果は混合群および struvite 群で中等度ないし高度に消化され、糸球体、尿細管、間質の染色性に差は認められない。

放線菌ヒアルロニダーゼ消化実験の結果においても混合群、struvite 群では中等度に消化され、尿細管及び間質がおもに変化する。これに対して対照群ではほとんど消化効果がみられなかった。

睾丸ヒアルロニダーゼ消化実験の結果は、結石各群、対照群のほぼ全群において、尿細管および間質を中心に強く消化されている。Fig. 3 a, b は混合群における所見を示したものでありよく消化されている。

コンドロイチナーゼ ABC 消化実験の結果は、混合群の一部と対照群では軽度に消化されており、混合群では尿細管および間質が、対照群では糸球体、尿細管、間質が消化されている。Fig. 4 a, b は対照群における消化効果を示したものである。

コンドロイチナーゼ AC 消化実験の結果は、シュウ酸群、混合群、対照群の一部および struvite 群において軽度に消化されている。

ヘパリチナーゼ消化実験の結果は、結石各群、対照群で糸球体、尿細管、間質各部位で軽度から中等度に消化効果がみられるが、消化の程度は結石各群のほうが強い。

ヘパリナーゼ消化実験の結果は、ヘパリチナーゼ消化の結果と同様に各部位とも結石各群、対照群で軽度から中等度に消化されているが、struvite 群および対照群での消化が高度である。

α -アミラーゼ消化の PAS 染色に対する結果は、結

Table 4. 結石成分別の染色および消化結果

Method	Ca-Ox	Mixed	Struvite
(A) Stain*			
A B (pH 1.0)	+	+	+
A B (pH 2.5)	3+	3+	3+
P A S	2+	2+	2+
A L S	2+	2+	-
Titan-yellow	-	+ or -	+
(B) Digestion**			
シアリダーゼ	-	+	+
放線菌ヒアルロニダーゼ	-	+	+
睾丸ヒアルロニダーゼ	+	+	+
コンドロイチナーゼ ABC	+	+	+
コンドロイチナーゼ AC	+	+	+
ヘパリチナーゼ	+	-	+
ヘパリナーゼ	-	-	+
α -アミラーゼ	-	-	-
(C) Lectin*			
Con A-PO-DAB	+	+	+
PO-RCA-I-DAB	+	+	+

* (+)~(3+)は染色強度を示す。 ** (+)は有消化、(-)は無消化を示す。

石各群、対照群ともほとんどが消化されていない。

6. 糖残基同定法：組織中の複合糖質の糖残基を同定する目的で Lectin (Con A, RCA-I)-PO-DAB 反応を実施した。

Table 3 (C) は糖残基に対する Con A-PO-DAB 反応および PO-RCA-I-DAB 反応の結果を示したものである。Con A-PO-DAB 反応では、結石各群において糸球体、尿細管、間質各部位で対照群に比して反応が強度であった。Fig. 5 a, b はシュウ酸群と対照群の反応結果を比較したものであるがシュウ酸群での反応がより強度である。PO-RCA-I-DAB 反応についても結石各群と対照群を比較すると間質においては結石各群のほうが反応が強いが、糸球体、尿細管の反応に差はなかった。Fig. 6 a, b は混合群と対照群の結果を示したものであり、混合群では間質に反応が強いが対照群では尿細管、間質とも同程度の反応を示した。

(2) 結石

1. AL-S 染色：カルシウム含有結石に対して実施した。シュウ酸群では結晶に一致して淡く赤色に染まり、混合群では層状に濃赤色に染まった (Table 4)。

2. チタン黄染色：マグネシウム含有結石に対し実施した。混合群、struvite 群ともに層状に黄橙色に染色された (Table 4)。

3. PAS 染色 シュウ酸群、混合群、struvite 群で陽性反応を示し Cys 群、UA 群では反応が陰性で

あった。前3群を比較するとシュウ酸群の方が混合群、struvite 群より反応が弱かった。染色の状態ではシュウ酸群ではおもに中心部周辺に不定形 (amorphous) に、混合群、struvite 群では結石全体が中心核を中心とする層状 (stratiform) (同心円状) に染まっている (Table 4) (Fig. 7, 8, 9)。

4. AB 染色 (pH 1.0, 2.5)

PAS 染色と同様にこれら両染色によりシュウ酸群、混合群、struvite 群にのみ染色性が認められたが各群の染色強度には差は認められなかった (Table 4)。

染色の分布は、シュウ酸群は中心部付近に不定形 (amorphous) に、混合群、struvite 群では層状 (stratiform) に染まっている。(Fig. 10, 11, 12) AB 染色と AL-S あるいはチタン黄染色との2重染色をおこなうとシュウ酸群ではカルシウム結晶の間隙に複合糖質が存在、混合群、struvite 群では層状に存在する複合糖質の間にカルシウムあるいはマグネシウムが分布していることがわかる (Fig. 13, 14, 15)。

5. 酵素消化法

AB, PAS 染色で染色性を示したシュウ酸群、混合群、struvite 群に対し8種の酵素による消化実験を実施し、その結果をTable 4 (B) にまとめた。

まずシアリダーゼ消化の結果は混合群、struvite 群では中等度から高度に消化され、シュウ酸群ではほとんど消化効果がなかった。Fig. 16 a, b は混合群における消化効果を示したものである。

睾丸ヒアルロニダーゼ消化実験の結果は、シュウ酸群、混合群、struvite 群の3群とも中等度ないし高度に消化されている。Fig. 17 a, b はシュウ酸群における消化効果を示したものである。

放線菌ヒアルロニダーゼ消化実験の結果は、混合群、struvite 群において軽度から中等度の消化効果がみられる。

コンドロイチナーゼ ABC, AC 消化実験の結果は、シュウ酸群、混合群、struvite 群でいずれも中等度に消化されている。

ヘパリチナーゼ、ヘパリナーゼ消化実験の結果は、シュウ酸群ではヘパリチナーゼのみにより、混合群、struvite 群ではヘパリチナーゼ、ヘパリナーゼの両者によって消化されている。

α -アミラーゼ消化前後の PAS 染色の結果は3群のいずれにおいてもほとんど消化効果はない。

6. 糖残基同定法

結石中の複合糖質の糖残基を同定する目的で Lectin (Con A, RCA-I)-PO-DAB 反応を実施し、結果を Table 4 (C) にまとめた。Fig. 18, 19, 20, 21

は糖残基に対する Con A-PO-DAB 反応および PO-RCA-I-DAB 反応の結果を示したものである。両反応とも AB、PAS 染色の結果と似てシュウ酸群では結石内層部に不定形 (amorphous) に、混合群、struvite 群では結石全体にわたって層状 (stratiform) に褐色に反応している。

考 察

尿路結石と複合糖質との関係については、1684年 Heyde が結石から結晶成分をとり除いて残った物質を "framework" と名づけ、これが有機物質であることを示した報告や¹⁹⁾ Epstein (1884) が尿中に有機物質が含まれていることを発見したことなどから²⁰⁾ 同物質が尿路結石の成因になんらかの役割をはたしていると推定されてきた。

一般に結石中の有機物質は総結石重量の 2～3% を占めることが知られており²¹⁻²⁴⁾、当初、この物質の機能的役割は結石成長における初期の構築成分^{25,26)}あるいは結晶に一致した再凝固に必要な二次的成分と考えられた²⁷⁾。Boyce は腎結石の光顕的研究^{21,28,29)}において matrix には、2つの型—①amorphous interfibrillar material と②a fibrillar form が存在することを報告し、これら matrix と結晶成分との関係について、結晶成分は fibril に沿って amorphous material 内に局在しているので結石形成において結晶沈着が matrix の発生にひきつづいて生ずることを示唆した²⁸⁾。

Spector らは、matrix を結石成分別 (シュウ酸カルシウム、尿酸、リン酸カルシウム・リン酸アンモニウムマグネシウム) にそのアミノ酸組成を測定したが、それによると aspartic acid と glutamic acid がシュウ酸カルシウム結石ではその50%を占め、尿酸結石では65%を、リン酸カルシウム・リン酸アンモニウムマグネシウム混合結石では30%を占めており、さらに20%を glycine が占めていた。この結果、結石の成分によって matrix のアミノ酸組成に差があることから matrix は核形成因子 (nucleating agent) の機能をもっていると推定された³⁰⁾。

結石形成において尿の役割も重要な因子のひとつである。結石患者の尿中ムコ多糖については多くの研究があるが、Keutel らは免疫学的方法によって尿中ムコ多糖を検索し、尿中には特異なムコ多糖 uromucoid が存在していて、これは正常尿、結石尿、stone matrix 内で同じような免疫反応を示し腎組織がその源であると述べている³¹⁾。

最近では馬場らが二次元電気泳動法によりカルシウ

ム結石患者および struvite 患者の尿中の酸性ムコ多糖 (glycosaminoglycan: GAG) の組成を健康成人を対照として検索した結果、struvite 患者では尿中酸性ムコ多糖排泄量が有意に増加しており、カルシウム結石患者では有意差を認めなかったが GAG 組成においてコンドロイチン硫酸が対照群と比べて有意に少く、セラタン硫酸は逆に有意に高い値を示すと報告した³²⁾。

Foye らは正常および結石患者の尿中よりムコ多糖を分離し、結石患者では正常よりその硫酸化の程度が高いと指摘、また結石患者からの硫酸性ムコ多糖は不溶性のカルシウム塩を形成するのに対し正常人ではカルシウムはイオンとして可溶性を呈すことから硫酸性ムコ多糖の存在がカルシウム結石患者における重要な因子であると報告した³³⁾。

以上のごとく、結石患者においての結石中および尿中のムコ多糖の異常が指摘されたが、さらにこれらの異常は腎組織の異常に基づく可能性が高く結石形成の場である腎におけるムコ多糖の変化が問題となる。

結石形成腎組織における複合糖質に関する研究は、Baker ら³⁴⁾、Sulkin ら³⁵⁾、Keutel ら³⁶⁾、Malek ら³⁷⁾、Khan ら³⁸⁾、Varalakshmi ら³⁹⁾などによっておこなわれた。

Baker らは正常腎、ラットによる実験的結石形成腎およびヒト結石形成腎におけるムコ多糖の変化を組織化学的に追求して、実験的結石形成腎、ヒト結石形成腎ともに正常に比し尿細管にびまん性にムコ多糖が増加していることから、腎結石は尿細管疾患であって尿細管ムコ多糖異常がその原因であると結論している³⁴⁾。

また Sulkin らは腎盂、尿管、膀胱上皮中の複合糖質を結石、非結石患者について比較し前者では PAS 陽性糖蛋白が含まれるが、後者ではこれを欠いていることから糖蛋白が尿路上皮より分泌され結石の保全が保たれていることを指摘した³⁵⁾。

Malek らは腎生検によって得られた腎組織を用いて AL-S 染色をおこない腎組織中のカルシウム沈着を調べたが、結石患者ではカルシウム沈着が多く認められるが非結石患者でもその 1/3 にカルシウム沈着が認められることを報告した³⁷⁾。

以上のごとく腎組織内でのムコ多糖の異常が結石形成においてなんらかの役割を果たしていることが示唆されてきた。そこで著者もなんらかの原因により腎組織中の複合糖質に変化を生じ、結石発生への病態が進行し、最終的に結石となると考え、腎組織中とくに尿細管および間質、さらに結石中に存在する複合糖質の組

織化学的同定を試みた。

まず結石形成腎組織について AL-S 染色によるカルシウム沈着の証明は結石各群で多く認められたが、対照群でも認められ Malek らの結果と同様、この所見は結石患者に特異的なものである可能性は低い。

PAS 染色およびアミラーゼ消化試験で、結石各群、対照群において染色性に差はなく糸球体基底膜、尿細管基底膜などの PAS 陽性物質はアミラーゼで消化されない。すなわち両基底膜には糖蛋白が含まれていることを示した。この結果は前述の Sulkin らの尿路上皮における結果とは相異しており、腎実質においては PAS 陽性物質の変化を認めなかった。

AB 染色では、対照とした腎組織において間質の結合織が AB (pH 1.0) で軽度、糸球体、尿細管、間質は AB (pH 2.5) で中等度に染色され、また結石各群でも AB (pH 1.0) で間質が、AB (pH 2.5) で糸球体、尿細管、間質が染色されたが、その反応の強さは対照群における染色性と比べると有意に増加していた。以上の観察結果と AB (pH 1.0) (Lev and Spicer)⁹⁾、AB (pH 2.5) (Spicer, Horn and Leppi)¹¹⁾ の染色選択性より、正常腎組織および結石形成腎組織、おもに尿細管、間質には、酸性ムコ多糖類が存在することを示した。

シアリダーゼ消化試験 (Spicer and Warren)⁴⁰⁾によれば結石群のうち混合群、struvite 群、シスチン群でシアリ酸の存在が認められ、他の群では認められなかった。

放線菌ヒアルロニダーゼ消化試験 (Yamada and Hirano)⁴¹⁾によれば混合群、struvite 群でヒアルロン酸の存在が示された。

皰丸ヒアルロニダーゼ消化試験の結果は、Weismann ら⁴²⁾の皰丸ヒアルロニダーゼの基質特異性によ

りその組織中にコンドロイチン硫酸 A, C およびヒアルロン酸の存在の有無を示すことになる。ゆえにコンドロイチナーゼ AC, コンドロイチナーゼ ABC 消化試験の結果と総合して検討すると、混合群でコンドロイチン硫酸 A, B, C が、struvite 群、Cys 群でコンドロイチン硫酸 A, C が、対照群でコンドロイチン硫酸 A, B, C が存在することになる。

ヘパリチナーゼ、ヘパリチナーゼ消化試験によれば結石各群、対照群の両群にヘパリチン硫酸の存在を示した。

以上の結果をまとめると Table 5 のごとくなる。すなわち、結石形成腎における複合糖質のおもな組成はシュウ酸群では、ヘパリチン硫酸、混合群ではシアリ酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A, B, C、ヘパリチン硫酸、struvite 群ではシアリ酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A, C、ヘパリチン硫酸、Cys 群ではシアリ酸、コンドロイチン硫酸 A, C、ヘパリチン硫酸、対照群はコンドロイチン硫酸 A, B, C、ヘパリチン硫酸となる。

また腎組織中の複合糖質の糖残基については Lectin (Con A, RCA-I) の結合性より、 α -D-mannose, α -D-glucose, β -D-galactose の存在が示されたが、対照腎に比し結石形成腎ではその増加が認められた。

複合糖質はムコ多糖、糖蛋白、糖脂質の総称であり生体の諸構造に広く分布しており、腎組織中にも複合糖質が存在することが知られている。

腎組織における複合糖質に関しては、村田⁴³⁾、綿鍋^{44,45)}、井上⁴⁶⁾がヒト正常腎においてムコ多糖の組成を同定している。

村田は剖検時に得られたヒト腎をその周囲結合組織より分離し、腎組織中のムコ多糖をセルロース・アセテート膜電気泳動法にて測定した結果、ヒト腎組織で

Table 5. 結石形成腎中の複合糖質組成

複 合 糖 質	Ca-Ox	Mixed	Struvite	Cystine	Control	Normal ^{*)}
シ ア ル 酸	—	+	+	+	—	—
ヒ ア ル ロ ン 酸	—	+	+	—	—	+
コンドロイチン硫酸 A	—	+	+	+	+	+
コンドロイチン硫酸 B	—	+	—	—	+	+
コンドロイチン硫酸 C	—	+	+	+	+	+
ヘパリチン硫酸	+	+	+	+	+	+
グリコーゲン	—	—	—	—	—	—
α -D-mannose	3+	2+	2+	3+	+	
α -D-glucose	3+	2+	2+	3+	+	
β -D-galactose	3+	3+	3+	3+	+	

注) (+)(-)はその複合糖質の存在の有無を示す。

(*) 村田による正常腎⁴³⁾

糖残基の(+)(3+)は反応強度を示す

はヘパリン硫酸 (HS), ヒアルロン酸 (HA), コンドロイチン硫酸 B がおもに存在しこれに少量のコンドロイチン硫酸 A, コンドロイチン硫酸 C, 低硫酸コンドロイチン硫酸などが存在すると報告した⁴³⁾。また綿鍋も剖検などより得られたヒト腎を0.5% CPC 10倍中性ホルマリンで48時間固定後, 7 μ 連続パラフィン切片としたものを HEX, AZAN 染色各種ムコ多糖分解酵素 (放線菌ヒアルロニダーゼ, コンドロイチナーゼ ABC, 皰丸ヒアルロニダーゼ) 処理を併用した pH 4.1 Toluidine blue metachromasia 法を実施し, 消去法によって組織中のムコ多糖の分布状態を検索し村田と同様の結果を報告している⁴⁴⁾。

今回, われわれが対照とした腎組織は泌尿器科手術で摘出した腎の病変部以外の組織学的に正常と思われた部分であるが, 組織化学的にはヒアルロン酸を欠いていて村田らの報告とは相異した。これは村田らが剖検時の死体腎を用いたのに対しわれわれは腎摘による阻血腎を用いたための違いが影響していると思われる。

実験的結石形成腎において腎組織中のムコ多糖が増加することは前述したが, Varalakshmi らは同様の研究においてムコ多糖の変化はコンドロイチン硫酸 B の減少とヘパリン硫酸の増加であると報告している³⁹⁾。今回のわれわれの結石各群での結果もこれと同様の傾向を示した。

しかし結石形成腎におけるこれらの複合糖質の変化は結石の存在による炎症等の結果であって, 単なる非特異的な変化であるとの意見もある。渡辺は炎症における結合組織の動態を基質におけるムコ多糖の変化を中心に組織化学的に観察し, その変化はおもにヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸 B, コンドロイチン硫酸 A/C 比の増加であることを指摘した⁴⁷⁾。また, 腎の炎症においてもヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸 A/C 比が増加すると報告されている⁴⁸⁾。さらに糖蛋白であるシアル酸も急性期反応物質と考えられ尿路感染症において血中シアル酸が増加することが指摘されている⁴⁹⁾。今回のわれわれの結果では混合群, Struvite 群でシアル酸の出現とヒアルロン酸の増加を認め, これらの結石群での結石形成助長因子としての感染の存在を考えるとこれらの報告と相容れる。またヘパリン硫酸が結石各群で一様に増加しているのは結石による機械的刺激のための反応性変化とも考えられる。しかしシュウ酸群でのヒアルロン酸の消失やコンドロイチン硫酸 A, B, C の消失, Struvite 群でのコンドロイチン硫酸 B の消失, シスチン群でのシアル酸の出現とヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸 B の

消失は各結石成分に特異的な変化と考えられる。

以上, 結石腎組織においてその酸性ムコ多糖の組成に変化を認め結石の成因との密接な関係が示唆されたが, 結石形成における matrix の役割を理解するためには結石自体における酸性ムコ多糖の分布, 組成を知ることも重要となってくる。

この点に着目して Boyce らが最初に結石の組織化学的研究をおこなったが⁴⁾, 通常, 結石の95%は結晶成分であり, 光顕の研究に必要な薄片を得るには技術的に困難なため, EDTA によって結石を脱灰して研究を進めた。この研究は matrix についての性質や形態に関しては十分な情報をもたらしたが, 結晶と matrix の関係やその分布型については不明の部分が多い。Khan らは最近結石を agar (寒天) にて包埋し, その後 EDTA にて脱灰して薄片標本作製すると結石中の脱灰された結晶の部分が形態を失わずに crystal ghost として残存するため matrix と結晶との相互関係が観察可能となることを報告した⁴⁹⁾。しかし, この方法を用いても実際の結石をそのまま用いているのではなく間接的に結晶と matrix の関係や分布を推定しているにすぎない。今回, われわれは鉤物研磨標本作製に準じて結石をできるだけ自然に近い状態で, 光顕にて観察できるレベル (厚さ約 30 μ) の薄片を作製し研究にもちいた。

AB (pH 1.0, 2.5) 染色, PAS 染色によるとシュウ酸カルシウム, リン酸カルシウム, リン酸アンモニウムマグネシウムの各結石中には弱酸性, 強酸性ムコ多糖および中性糖蛋白が存在することがわかり, その分布は結石の中心部周辺では不定形 (amorphous) に, 周囲にいくにしたがって層状 (stratiform) に存在しており両型の比率はシュウ酸カルシウム結石では前者が, 他の成分の結石では後者が大部分を占めている。またシスチン結石, 尿酸結石においては, AB, PAS 染色で染色性を認めず結晶成分のみであった。カルシウム染色である AL-S 染色またはマグネシウム染色であるチタン黄染色との併用による二重染色ではムコ多糖の不定形 (amorphous) な部ではその周囲に, 層状 (stratiform) の部はその間隙にカルシウムまたはマグネシウムが存在していて両者に密接な関係のあることが推定された。

さらに結石中の複合糖質の酵素消化実験をおこなった結果を各酵素における基質特異性より判定すると Table 6 のような結果となる。すなわちシュウ酸カルシウム結石にはコンドロイチン硫酸 A, B, C, ヘパリン硫酸が, 混合結石にはシアル酸, コンドロイチン硫酸 A, B, C, ヒアルロン酸が, struvite 結石にはシ

Table 6. 結石中の複合糖質組成

複 合 糖 質	Ca-Ox	Mixed	Struvite
シ ア ル 酸	—	+	+
ヒ ア ル ロ ン 酸	—	+	+
コンドロイチン硫酸 A	+	+	+
コンドロイチン硫酸 B	+	+	—
コンドロイチン硫酸 C	+	+	+
ヘパリチン硫酸	+	+	+
グリコーゲン	—	—	—
α -D-mannose	+	+	+
α -D-glucose	+	+	+
β -D-galactose	+	+	+

注) (+)(-)はその複合糖質の存在の有無を示す

糖残基の(+)(-)は反応強度を示す

アル酸, コンドロイチン硫酸 A,B,C, ヒアルロン酸, ヘパリチン硫酸が存在し, 結石成分ごとにムコ多糖の組成に差が認められ, struvite 結石の組成はシュウ酸カルシウム結石と混合結石の各組成の和に等しかった。

また結石中の複合糖質の糖残基については各結石(シュウ酸結石, 混合結石, struvite 結石)とも α -D-mannose, α -D-glucose, β -D-galactose が存在したが成分ごとの差は認めなかった。

以上のことから, matrix が複合糖質からなり, 2つの形態1)不定形(amorphous), 2)層状(stratiform)からなり, その組成も各結石成分により差があることが判明した。では, これら Matrix は結石形成に対しいかなる働きをもつ因子であるであろうか。これについては2つの見方がある。すなわち結石中の matrix は単なる尿中物質の混入したもので結石形成時の二次的物質であるという見解と, これに反して結石形成における初期の物質で, これに無機物質が沈着して結石を形成するという考えかたである。今回われわれの結果では結石成分別にその酸性ムコ多糖の組成が異なり, また例数は少ないがシスチン結石, 尿酸結石では酸性ムコ多糖が存在していないことから, これらは尿中成分の単なる混入とは考えにくい。なぜなら, もしも単なる尿中の混入物質であるならば, 結石成分のいかにかわらず酸性ムコ多糖が存在し, その組成も同じでなければならない。また matrix を構成する複合糖質と無機物質の分布状態からみても両者に強い因果関係があることは否定できない。

またその組成差について, シュウ酸カルシウム結石と, 感染結石であるリン酸カルシウム, リン酸アンモニウムマグネシウムなどの混合結石に分けて検討する

と後者ではすでに腎組織で述べたと同様な理由で感染時に増加するヒアルロン酸とシアル酸が結石中にも存在する。このことは, 感染により結石形成腎において酸性ムコ多糖の組成に異常を生じすでに形成されていたシュウ酸カルシウム結石の増大またはあらたに結石が発生するのではないだろうか。その結果, 感染結石では結石中のムコ多糖組成が変化し, 形態的にも不定形(amorphous)から層状(stratiform)へと変化しているものと思われる。

酸性ムコ多糖と無機物質に関しては, 軟骨や骨組織において詳細な報告がある⁵⁰⁾。軟骨および骨は組織学的に支持組織として分類され, ムコ多糖を多く含んでいる。このうち軟骨はとくにムコ多糖が多い。軟骨にはしだいに硬化してついには骨に変わる一時的軟骨とそのままの硬さで骨には変わらない永久性軟骨とがある。Mathew⁵¹⁾は軟骨が骨化するとき, 関係するのはコンドロイチン硫酸 A であると述べている。彼は軟骨が石灰化して骨に変わるときコンドロイチン硫酸 A の含量が増加することを認め, コンドロイチン硫酸 A は骨の形成に必要な因子であると考えた。さらに Burger らは *in vitro* において再凝集コラーゲンのカルシウム結合力がコンドロイチン硫酸の存在で増強することを示した⁵²⁾。また糖蛋白も石灰沈着の場を与えることが知られており, 弾性線維の microfibril には石灰が沈着しやすい⁵³⁾。これは糖蛋白にアルカリホスファターゼ活性が証明されており, それによって遊離するリン酸イオンが石灰沈着に重要な役割を果たすものと推定されている⁵⁴⁾。

以上のことより結合組織中の基質をなす複合糖質—コンドロイチン硫酸, 糖蛋白が骨化つまりカルシウム沈着に密接な因果関係のあることが示唆された。しかし, このことをすぐに結石にもあてはめることは早計

であるがわれわれの結果とあわせて考えると結石形成にさいして複合糖質とくに酸性ムコ多糖の異常が腎、特に尿細管で生じ、これにカルシウムが沈着し周囲の酸性ムコ多糖環境(感染等)の影響をうけ増大し最終的な結石となっていくものと推定される。

結 語

結石形成腎および腎結石を用いてそれら組織中の複合糖質の消長を組織化学的に検索し以下の結果を得た。標本は1% CPC-10%ホルマリン液にて固定後、腎組織はバラフィン包埋し4 μ の切片を、結石は鉱物研磨標本作製に準じ約30 μ の薄切標本をおのおの作製し、研究に用いた。

1) 対照腎、結石形成腎組織中にはともに弱酸性、強酸性ムコ多糖、中性糖蛋白が存在した。

2) シュウ酸カルシウム結石腎にはヘパリチン(ヘパラン)硫酸、混合結石腎にはシアル酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A, B, C、ヘパリチン(ヘパラン)硫酸、リン酸アンモニウムマグネシウム結石腎にはシアル酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A, C、ヘパリチン(ヘパラン)硫酸、シスチン結石腎にはシアル酸、コンドロイチン硫酸 A, C、ヘパリチン(ヘパラン)硫酸がそれぞれおもに存在した。

3) 上記の結果を正常腎のそれと比較すると、シュウ酸カルシウム結石腎ではヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A, B, C の消失、リン酸アンモニウムマグネシウム結石腎ではコンドロイチン硫酸 B の消失など各結石成分に特異的な変化を認め、さらに感染結石である混合結石腎、リン酸アンモニウムマグネシウム結石腎では炎症反応に基づくシアル酸の出現とヒアルロン酸の増加が認められた。

4) 腎組織中の糖残基については ConA-PO-DAB 反応および PO-RCA-I-DAB 反応の結果、正常腎、結石形成腎ともに α -D-mannose, α -D-glucose, β -D-galactose の存在を認めるが、結石形成腎では三者とも有意に増加していた。

5) 結石ではシュウ酸カルシウム結石、混合結石、リン酸アンモニウムマグネシウム結石において弱酸性、強酸性ムコ多糖、中性糖蛋白が存在したが、シスチン結石、尿酸結石では複合糖質は存在しなかった。この結果から結石の matrix は単なる混入物質ではなく結石発生の重要な原因のひとつと考えられる。

6) 結石の matrix は形態的に不定形(amorphous)と層状(stratiform)に分けられ、前者はシュウ酸カルシウム結石の中心部付近に後者は混合結石、リン酸アンモニウムマグネシウム結石の周辺部付近に多く認

められた。

7) 結石の複合糖質組成は不定形(amorphous)の matrix ではコンドロイチン硫酸 A, B, C、ヘパリチン(ヘパラン)硫酸からなり、層状(stratiform)の Matrix ではこれにさらにシアル酸、ヒアルロン酸が加わっていた。

8) 結石の糖残基については、結石腎と同様に不定形(amorphous)、層状(stratiform)の matrix とも α -D-mannose, α -D-glucose, β -D-galactose の3種の糖残基をもつ中性糖が検出された。

9) 結石の不定形(amorphous)の matrix はその分布、組成から結石形成の初期物質と考えられ、層状(stratiform)の matrix は感染結石における結石成長助長因子のひとつと推定された。

稿を終えるにあたり、終始深甚なる御指導御校閲を賜りました恩師三矢英輔教授に深謝いたします。また直接御指導を賜った三宅弘治助教授、名古屋市立大学第二解剖学教室山田和順教授ならびに御協力いただいた教室員諸兄に衷心より感謝の意を表します。

なお本論文の要旨は第33回泌尿器科中部連合総会および第72回日本泌尿器科学会総会で発表した。

文 献

- 1) Randall A: The origin and growth of renal calculi. *Ann Surg* **105**: 1009~1027, 1937
- 2) Randall A and Melvin PD: The morphology of renal calculus. *J Urol* **37**: 737~745, 1937
- 3) Koch FE: Tierexperimentelle Befunde am Gefäßsystem der Niere während der Harnsteinbildung. *Langenbeck's Arch Klin Chir* **282**: 954~964, 1955
- 4) Boyce WH, Garvey FK and Norfleet CM Jr: The metal chelate compounds of urine, their relation to initiation and growth of calculi. *Am J Med* **19**: 87~95, 1955
- 5) Boyce WH, Pool CS and Kinsg JS Jr: Organic matrix of urinary calculi, microradiographic comparison of crystalline structure with microscopic and histochemical studies. *Acta Radiol* **50**: 543~560, 1958
- 6) Dahl LK: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol* **80**: 474~479, 1952
- 7) 岡本耕造・妹尾正人・芝田大三 マグネシウムの顕微化学的証明法。日本体質学雑誌 **13**: 77~82, 1944

- 8) McManus JFA: Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* **23**: 99~108, 1948
- 9) Lev R and Spicer SS: Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* **12**: 309, 1964
- 10) Pearse AGE: Phthalocyanin dyes, alcian blue. *Histochemistry, theoretical and applied*, Vol. 1, 344~349, Churchill Ltd, London & New York, 1968
- 11) Spicer SS, Horn RG and Leppi TJ: Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. *Connective tissue*, 251~303, Williams Wilkins Co, Baltimore, 1967
- 12) Yamada K: The effect of digestion with streptomyces hyaluronidase upon certain histochemical reactions of hyaluronic acid-containing tissue. *J Histochem Cytochem* **21**: 794~803, 1973
- 13) Leppi TJ and Stoward PJ: On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue section. *J Histochem Cytochem* **13**: 406~407, 1965
- 14) Yamada K: Histochemical methods for study of mucopolysaccharides. *Protein Nucleic acid Enzyme* **17**: 775~790, 1972
- 15) Yamada K: The effect of digestion with chondroitinases upon certain histochemical reactions of mucopolysaccharide-containing tissues. *J Histochem Cytochem* **22**: 266~275, 1974
- 16) Lille RD and Fullmer HM: Glycogen demonstration method. *Histopathologic technic and practical histochemistry*, 4 th, 626~632, McGraw-Hill Book Co, New York, 1976
- 17) Yamada K and Shimizu S: Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine (Con A-PO-DAB)-alcian blue (AB), A reliable method for dual staining of complex carbohydrates. *Histochemistry* **47**: 159~169, 1976
- 18) Yamada K and Shimizu S: The histochemistry of galactose residues of complex carbohydrates as studied by peroxidase-labelled ricinus communis agglutinin. *Histochemistry* **53**: 143~156, 1977
- 19) Hyde A: Die Steinerkrankungen. *Handbuch der Urologie*, X. 27, Springer-Verlag, 1961
- 20) Epstein W・中野 等: 泌尿器系結石の発生に関する化学的・鉱物学的研究, *皮泌誌* **24**: 1020~1047, 1924より引用
- 21) Boyce WH and Sulkin NM: Bicolloids of urine in health and in calculous disease. III. The mucoprotein matrix of urinary calculi. *J Clin Invest* **35**: 1067~1079, 1956
- 22) King JS Jr and Boyce WH: Amino acid and carbohydrate composition of the mucoprotein matrix in various calculi. *Proc Soc Exp Biol Med* **95**: 183~187, 1957
- 23) King JS Jr and Boyce WH: Analysis of renal calculous matrix compared with some other matrix materials and with uromucoid. *Arch Biochem Biophys* **82**: 455~461, 1959
- 24) Finlayson B, Vermeulen CW and Stewart EJ: Stone matrix and mucoprotein from urine. *J Urol* **86**: 355~363, 1961
- 25) Boyce WH and King JS Jr: Crystal-matrix interrelations in calculi. *J Urol* **81**: 351~365, 1959
- 26) Boyce WH: Organic matrix of human urinary concretions. *Amer J Med* **45**: 673~683, 1968
- 27) Vermeulen CW and Lyon ES: Mechanisms of genesis and growth of calculi. *Amer J Med* **45**: 684~692, 1968
- 28) Boyce WH and Garvey FK: The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi. a review. *J Urol* **76**: 213~227, 1956
- 29) Boyce WH, Pool CS, Menchan I and King JS Jr: Organic matrix of urinary calculi: microradiographic composition of crystalline structure with microscopic and histochemical studies. *Acta Rad* **50**: 543~560, 1958
- 30) Specter AR, Garvey A and Prien EL Jr: Kidney stone matrix: differences in acidic protein composition. *Invest Urol* **13**: 387~389, 1976
- 31) Keutel HJ, King JS Jr and Boyce WH: Further studies of uromucoid in normal and stone urine. *Urol Int* **17**: 324~341, 1964
- 32) 馬場志郎・中沢和子・小田島邦男・藤岡俊夫・中村 宏: 尿路結石患者の尿中酸性ムコ多糖排泄と結石の有機性基質分析. *日泌尿会誌* **74**: 608~

- 615, 1983
- 33) Foye WO, Hong HS, Kim CM and Prien EL Jr: Degree of sulfation in mucopolysaccharide sulfates in normal and stone-forming urines. *Invest Urol* **14**: 33~37, 1976
- 34) Baker R and Sison F: Demonstration of altered tissue mucopolysaccharides in renal calculous disease by selective staining technique. *J Urol* **72**: 1032~1045, 1954
- 35) Sulkin NM and Boyce WH: A histochemical study of mucopolysaccharides of the urinary tract in calciferous disease. *Anat Rec* **124**: 443~444, 1956
- 36) Keutel HJ: Localization of uromucoid in human kidney and in sections of human kidney stone with the fluorescent antibody technique. *J Histochem Cytochem* **13**: 155~159, 1965
- 37) Malek RS and Boyce WH: Intranephronic calculosis: its significance and relationship to matrix in nephrolithiasis. *J Urol* **109**: 551~555, 1973
- 38) Khan SR, Finlayson B and Hackett R: Histologic study of the early events in oxalate induced intranephronic calculosis. *Invest Urol* **17**: 199~202, 1979
- 39) Varalakshmi P and Anandam B: Alterations in kidney tissue glycosaminoglycans in experiment urolithiasis. *Indian J Med Res* **69**: 1019~1022, 1979
- 40) Spicer SS and Warren L: The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins. *J Histochem Cytochem* **8**: 135~137, 1959
- 41) Yamada K and Hirano K: The histochemistry of hyaluronic acid containing mucosubstances. *J Histochem Cytochem* **21**: 469~472, 1973
- 42) Weismann B, Hadjiioanon S and Tornheim J: Oligosaccharase activity of β -N-acetyl-D-glucosamidase of beef liver. *J Biol Chem* **239**: 56~63, 1964
- 43) 村田克己・ムコ多糖と加齢変化. 結合組織 **11** 13~16, 1979
- 44) 綿鍋維男・渡辺洋望・大高裕一: ヒト腎における酸性ムコ多糖の組織化学的観察-加齢に伴う変化について-. 結合組織 **11**: 144~145, 1980
- 45) 綿鍋維男・渡辺洋望・大高裕一: ヒト腎における酸性ムコ多糖の組織化学的観察-疾病との関連について-第3報. 結合組織 **13**: 240~241, 1982
- 46) Inoue G, Sawada T, Fukunaga Y and Yoshikawa M: Level of acid mucopolysaccharides in aging human kidneys. *Gerontologia* **16**: 261~265, 1970
- 47) 渡辺洋望: 炎症における結合組織の動態-基質における組織化学的所見を中心に-. 結合組織 **4**: 13~15, 1972
- 48) 大川光央・岡所 明・天野俊康・竹前克明・折戸松男・菅田敏明・久住治男: 急性尿路感染症患者における血清中 sialic acid の急性相反物質としての意義について. 日泌尿会誌 **75**: 951~958, 1984
- 49) Khan SR, Finlayson B and Hackett RL: Agar-embedded urinary stones: a technique useful for studying microscopic architecture. *J Urol* **130**: 992~995, 1983
- 50) 長谷川栄一・鈴木 旺・瀬野信子・平野茂博: 病態生化学, 軟骨および骨, ムコ多糖の構造と機能. 第2版, 161~165, 南江堂, 東京, 1968
- 51) Mathew MB: Structure and function of connective and skeletal tissue. 181, Butterworth & Co, London, 1965
- 52) Burger M, Sherman BS and Sobel AE: Observations of the influence of chondroitin sulfate on the rate of bone repair. *J Bone Joint Surg* **44 B**: 675~687, 1962
- 53) Robert L, Grosogeat Y, Robert AM and Robert B: Mechanism of calcification of elastic tissue. Induction of a typical arteriosclerotic lesion by immunization of rabbits with purified elastin. *Isr J Med Sci* **7**: 431~432, 1971
- 54) Vittur F and de Bernard B: Alkaline phosphatase activity associated to a calcium binding glycoprotein from calf scapula cartilage. *FEBS Lett* **38**: 87~90, 1973

(1985年8月1日迅速掲載受付)