

CONTINUOUS FLOW CRYSTALLIZER SYSTEM の開発と尿酸カルシウム結晶形成率・成長率測定を試み

金沢医科大学泌尿器科学教室（主任：津川龍三教授）

鈴木 孝治, 百成智津枝, 津川 龍三

THE DEVELOPMENT OF CONTINUOUS CRYSTALLIZER AND OBSERVATION OF FORMATION AND GROWTH OF CALCIUM OXALATE CRYSTALS

Koji Suzuki, Chizue Domiki and Ryuzo Tsugawa

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

A continuous flow crystallizer system of calcium oxalate has been developed. Crystal nucleation rate (B^0) and growth rate (G) were calculated by the formula by Randolph and Larson.

Nucleation rate, growth rate and crystal mass concentration were decreased with increase of residence time. A linear relationship was observed between growth rate and nucleation rate ($B^0 = 1.58 \times 10^4 G^{0.924}$, $r=0.981$).

Crystals formed in the solution were composed of calcium oxalate dihydrate by infrared spectroscopic analysis.

Growth rate and crystal mass did not change between pH 5.0 and 6.5 but increased above pH 7.0.

CG-120 and sodium pentosan polysulfate inhibited the nucleation rate, crystal mass concentration but did not influence the growth rate of the crystals.

(Acta Urol. Jpn. 37: 569-575, 1991)

Key words: Continuous flow crystallizer, Growth rate, Nucleation rate, Sodium pentosan polysulfate (SPP), CG-120 (citrate)

緒 言

尿酸カルシウム (CaOx) 結石の原因は過カルシウム尿症, 過尿酸尿症, 結石阻止物質の低下等が知られている。これらの原因がいかにして結石を発生せしめるかについては不明であるが一般的には核形成→成長→凝集→固化の過程を経て臨床的結石に成長すると考えられている¹⁾。とくに結晶の nucleation (核形成) や growth (結晶成長) の段階における発生機序は研究方法の限界もありほとんど解明されてはいない現状である。

nucleation, growth を観察する in vitro の実験に関しては metastable solution 中における seed crystal の変化を観察する方法, 全尿中に尿酸を添加し結晶の状態を観察する方法など多くの手法が開発され, われわれもこれらを使用し結晶形成における阻止因子の解明を実施してきた²⁻⁸⁾。しかしこれらの方法

のほとんどは一定容量において完結する batch system であるため現実には腎臓で持続的に形成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持続結晶作成装置 (continuous crystallizer) を使用した実験と理論が (Finlayson)⁹⁾, Randolph and Larson¹⁰⁾ によって展開されその後 Randolph, Drach, Robertson ら¹¹⁻¹⁶⁾, Gar-side, Blacklock, Kohri ら¹⁷⁻²⁰⁾ が種々の装置を使用し阻止因子の作用, 結石患者尿における異常などを報告している。われわれはこの装置を近畿大学郡博士の協力であらたに試作し, 基礎実験の結果と種々の条件下における結晶の変化を調査したので報告する。

実験方法

1. 持続結晶作製装置 (Fig. 1)

約 150 ml の容量を持つガラス製ビーカー (近畿大学郡博士より提供されたものを使用) にカルシウム

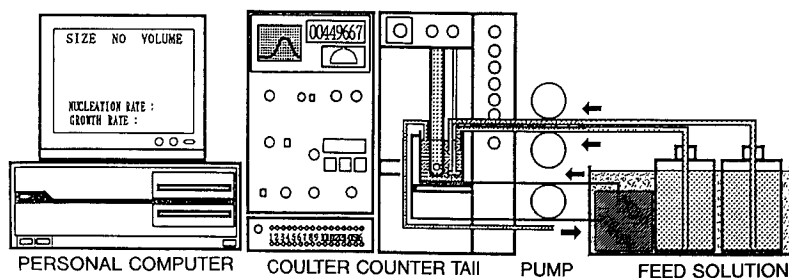


Fig. 1. Continuous flow crystallizer system.

Table 1. Composition of feed solution and final concentration of solution A and B.

Feed solution	A : Robertson (1985)		B : Kohri (1989)	
	MV	g/l	mmol/l	g/l
1 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02	1.765	12.01	3.530
Na_2SO_4	142.04	4.862	34.23	4.862
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.48	1.460	5.92	1.460
NH_4Cl	53.49	4.643	86.80	4.643
KCl	74.56	12.133	162.73	12.140
SDS	288.38	0.040	0.14	0.040
2 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	134.00	0.161	1.20	0.268
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156.01	6.800	43.59	6.800
Na_2HPO_4	141.96	0.870	6.12	0.870
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294.10	1.183	4.02	1.183
NaCl	58.44	13.505	231.09	13.510
SDS	288.38	0.040	0.14	0.040
Final Ca			6.00	12.00
Oxalate			0.60	1.00
Citrate			2.01	2.01
Mg			2.96	2.96
Na			184.90	185.78
K			81.40	81.41
Cl			252.30	264.43
NH_4			43.40	43.40
SO_4			20.10	20.10
PO_4			24.85	24.85
SDS			0.14	0.14
pH			5.80	5.50

(Ca)系の溶液と尿酸(Ox)系の溶液をマルチポンプ PA-42 型(ヤマト科学)を使用し同速度で注入し溶液量が常に 100 ml となるように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 になるように温水を循環させる。注入溶液と循環温水は恒温水中であらかじめ加温しておく。ビーカー内の溶液はテフロンコーティングのスターラーバーを使用して一定の速度で攪拌する。

2. 溶液

A液(Robertson ら¹⁸⁾): Ca の最終濃度は 6 m-

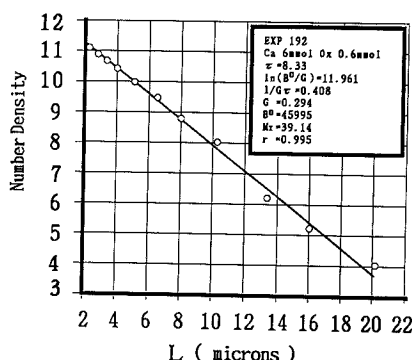


Fig. 2. Population density distribution of crystals formed in control solution A.

mol, Ox 濃度は 0.6 mmol を主に使用した。また B 液(Kohri ら¹⁹⁾: Ca 12 mmol, Ox 1 mmol も一部の実験に使用した (Table 1)。

3. 結晶量の測定

本装置で形成された結晶は Coulter counter TAIL を使用し各 size ごとの数を測定し、パーソナルコンピュータ PC-9801 で計算した。アパーチャは 100 μm のものを使用した²⁾。

4. 結晶の nucleation rate, growth rate, total solid mass concentration の計算:

continuous flow system における結晶の変化は次の式に従うとされている¹⁰⁾。

$$n = (B^0/G) \exp \{-L/G\tau\} \quad (a)$$

それぞれの意味は

n: 結晶数, B^0 : nucleation rate, G: growth rate, L: size of crystal, τ : residence time (溶液量/溶液総注入速度) である。

この (a) 式は

$$\log_e(n) = \log_e(B^0/G) - L/G\tau \quad (b)$$

の式に変換される。X軸に L, Y 軸に n を plot するとこの式は傾きが $(-1/G\tau)$ の直線で Y 軸との交点は B^0/G となる。これに実験結果を当てはめると Fig. 2

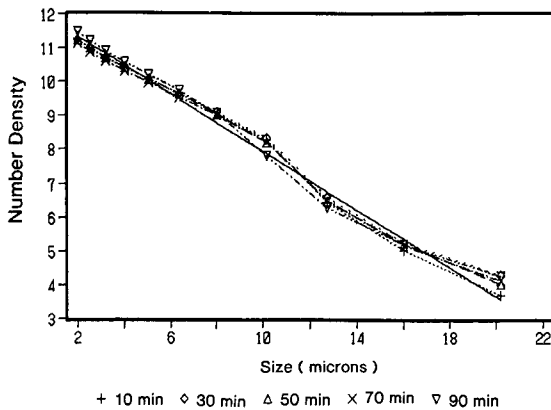


Fig. 3. Time difference of population density distribution of crystals formed in control solution A.

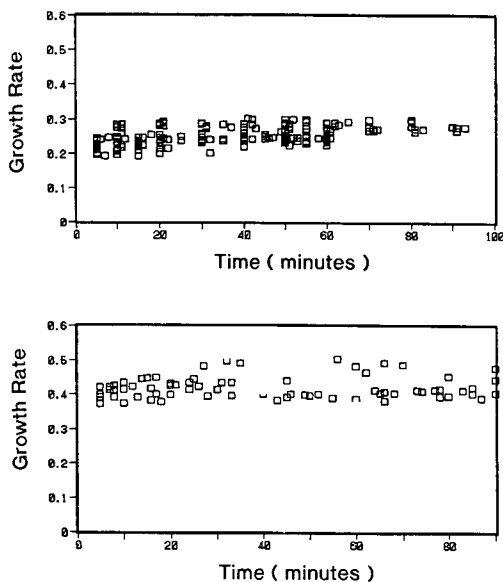


Fig. 4. Time course of growth rate in control solution A and B.

のように直線となる。

また形成される結晶量は次式から求められる。

$$M_T = 6\rho kvBG^3\tau^4 \quad (c)$$

M_T : total crystal mass concentration,

ρ : specific gravity (CaOx では 2.22 g/cm^3),

kv : volume shape factor ($\pi/6$)

溶液注入速度を変化させたときの nucleation rate, growth rate, crystal mass を計測した。また pH による影響も測定した。

5. CG-120 (citrate 製剤), sodium pentosan

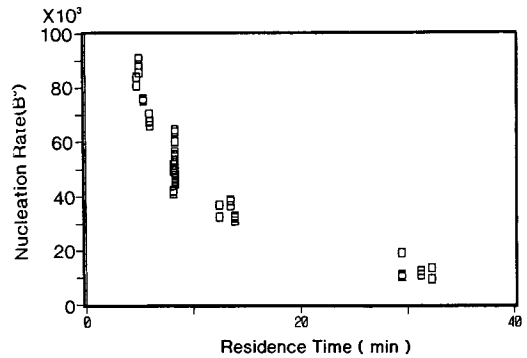


Fig. 5. Relation between residence time and nucleation rate (B^0) in solution A.

polysulfate (SPP) の作用:

seed crystal 法, 全尿法で結晶形成, 成長, 凝集阻止作用のある CG-120 (日本ケミファ株式会社より提供された。単位は mmol of citrate で表現) (4) および sodium pentosan polysulfate (Sigma 社)²⁰ を Ox 系溶液に添加し注入し B^0 , G を測定した。

結果および考察

1. control における経時的結晶形成

A 液の時間ごとの結晶数の変化を Fig. 3 に示した。10分後から90分まで結晶数の変化はみられなかった。また, A 液, B 液の growth rate 測定結果では時間による影響は観察されなかった (Fig. 4)。時間経過に伴って growth rate, nucleation rate は変化するとの報告がある²⁰⁾が, 今回の実験では最初から安定した測定値が得られた。また, Robertson らは長時間観察すると凝集が進行し, 結晶数の直線化が変化し size の大きなものが多くなるとしている。われわれの観察結果からは crystal size と $\log_e(n)$ の間の直線関係に大きな変化は観察されず Landolph らのいうように¹⁰⁾この実験系では結晶凝集は評価できないことが確認された。しかし, 実験器具, 条件などの違いもあり今後の検討を要すると考えられた。

2. Residence time による影響 (A 液)

溶液流量の変化, 言い替えれば Residence time (τ) の変化と nucleation rate, growth rate, M_T の相関を Fig. 5, 6, 7 に示す。residence time 増加にともない B^0 , G , M_T が次第に減少していることが判明した。また, このときの G と B^0 の関係は Fig. 8 に示すように有意な直線関係が観察された ($BO = 1.58 \times 10^6 G^{0.924}$, $r = 0.981$)。

通常の実験では, 溶液内の結晶形成がほぼ安定した

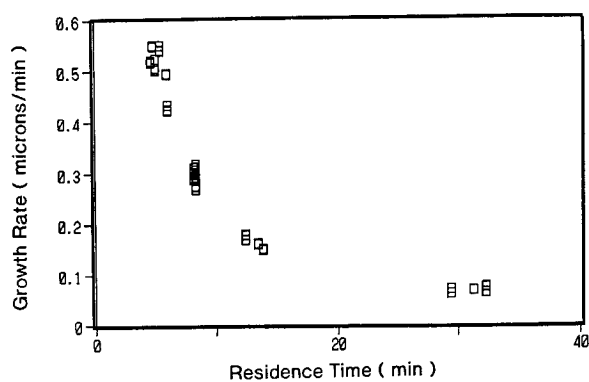


Fig. 6. Relation between residence time and growth rate (G) in solution A.

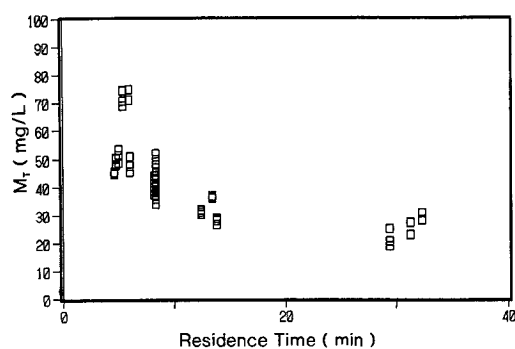


Fig. 7. Relation between residence time and crystal mass concentration.

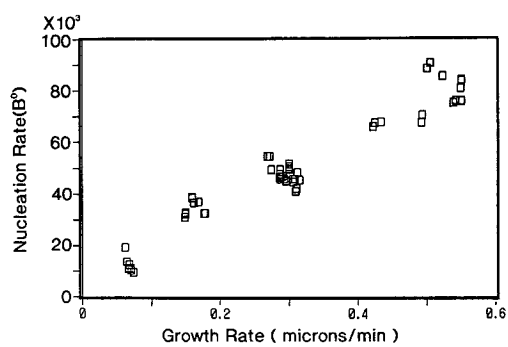


Fig. 8. Relation between growth rate (G) and nucleation rate (B^0) in solution A.

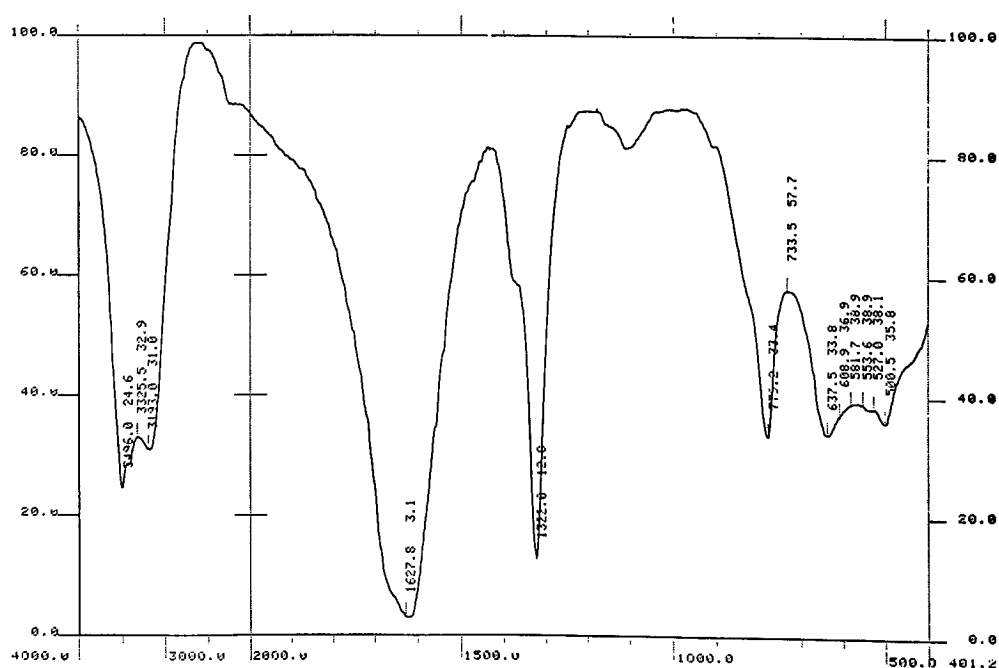


Fig. 9. Infrared spectroscopic analysis of crystal formed in control solution A.

Table 2. Effect of pH on nucleation rate, growth rate and crystal mass concentration in solution A.

pH	n	Nucleation rate		Growth rate		Solid mass conc	
		BO (No/ml·min)	SD	G (microns/min)	SD	MT (mg/L)	SD
5.0	6	64,971	2,249	0.293	0.006	55.07	2.91
5.5	6	60,160	1,495	0.297	0.003	52.82	1.34
6.0	6	60,917	1,916	0.299	0.004	54.47	1.33
6.5	6	60,291	2,472	0.301	0.003	55.50	2.74
7.0	6	60,711	5,427	0.318	0.011	65.32	1.33

Table 3. Summary of the effect of CG-120 and SPP on nucleation rate, growth rate and crystal mass concentration in solution A and B.

Solution	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
A	6	0.6	0	0	6	66,290	1,156	0.278	0.004	48.02	1.99
	6	0.6	2	0	9	50,722	6,065	0.289	0.015	41.02	4.70
	6	0.6	4	0	3	48,169	1,015	0.296	0.005	42.16	1.73
	6	0.6	6	0	3	53,979	5,265	0.285	0.009	41.92	1.09
	6	0.6	8	0	3	44,368	652	0.290	0.008	36.36	3.18
	6	0.6	10	0	3	45,655	3,905	0.295	0.018	41.29	3.30
A	6	0.6	2	10	3	41,446	278	0.300	0.005	37.54	1.77
	6	0.6	2	20	3	43,423	1,412	0.295	0.006	37.34	1.03
	6	0.6	2	30	3	52,260	1,976	0.277	0.007	37.43	3.11
	6	0.6	2	40	3	51,593	2,669	0.282	0.005	38.71	0.30
	6	0.6	2	50	9	47,434	2,340	0.281	0.007	35.48	1.62
B	12	1.0	0	0	6	61,214	6,449	0.314	0.012	63.20	2.59
	12	1.0	2	0	6	62,840	4,674	0.317	0.004	66.99	5.06
	12	1.0	4	0	6	58,249	5,371	0.325	0.011	66.64	5.16
	12	1.0	6	0	6	59,125	3,136	0.324	0.005	67.17	3.03
	12	1.0	8	0	6	65,297	3,128	0.312	0.005	66.32	4.48
	12	1.0	10	0	6	60,413	7,893	0.305	0.006	57.25	7.42
B	12	1.0	2	5	6	60,235	1,300	0.315	0.002	63.10	0.75
	12	1.0	2	10	6	64,031	3,862	0.314	0.005	66.68	6.11
	12	1.0	2	20	6	63,497	6,009	0.309	0.010	62.37	1.81
	12	1.0	2	40	5	67,998	8,687	0.315	0.014	71.41	8.80
	12	1.0	2	60	6	59,333	3,667	0.318	0.005	64.23	3.64
	12	1.0	2	80	6	64,470	2,996	0.319	0.013	70.79	8.83
	12	1.0	2	100	5	65,139	5,799	0.311	0.006	65.31	2.88

状態と考えられる 7 τ (流量 12 ml/min, 溶液量 100 ml) では τ 8.33 分のため測定時間は約 60 分目となる) で測定した。このときの τ はヒトの腎尿の通過時間を考慮して 3 分から 10 分が適当とされているが、研究者によってそれぞれ設定値が異なっている。ヒト尿細管は 200 μ m の結晶で閉塞されるとされている⁹⁾ が、A 液を使用した場合の実験では約 50 μ m の結晶が最大であった。B 液では 100 μ m アパーチャは頻繁に閉塞し除去清掃しなければならないほど大きな結晶が形成された。B 液を使用して計測する場合は 100 μ m

以上のアパーチャを装着することが望ましいと考えられた。

形成された結晶を赤外線分光分析した結果、すべての結晶は蔞酸カルシウム 2 水加物と判明した (Fig. 9)。

3. pH による影響 (A 液)

pH を 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 と変化させた場合、pH 5.0 から 6.5 まではほぼ安定しているが、pH 7.0 では G と MT が著明に増加した (Table 2)。顕微鏡的観察および赤外線分光分析から形成された結晶の成分は CaOx ではなく蔞酸カルシウムであった。pH 上昇

にともない結晶数が増加したためであると考えられた。

4. CG-120, SPP の影響 (A液, B液)

A液およびB液に CG-120, SPP を添加した場合の B^0 , G , M_T 測定結果を Table 3 に示す。A液において CG-120 は濃度増加にしたがって B^0 , M_T を抑制したが, G は増加した。SPP においても B^0 , M_T の抑制が観察されたが, G はやや増加した。B液では CG-120, SPP とともに B^0 , G , M_T に大きな変化は与えなかった。CG-120 および SPP とともに batch system では強力な凝集成長阻止物質であることが判明している³⁻⁵⁾ が, 今回の実験結果から nucleation の段階で抑制的に作用することが判明したといえる。ヒトにおける citrate の排泄量は 2 mmol/L とされているが, この濃度でも B^0 , M_T を抑制したことは結石治療の観点からも有望な薬剤であることが確認されたといえる。また, SPP は heparin 類似作用を持つ対外物質であるが 300 mg 投与の場合尿中には 10 mg/L 前後排泄される。この濃度でも nucleation のみならず crystal mass も著明に抑制したため, 結石予防薬として有効であると考えられた。

以上のように, continuous flow crystallizer system は結石研究において最も重要であるとされている結晶核形成率や結晶成長率を算出できるという優れた装置であると同時に人工的に最も尿産生に近い状態を自由に作り出すことができるため, 結石患者尿の評価や種々の阻止物質の機序解明に利用でき有効な装置であるといえよう。

稿を終えるにあたり, マグナス管を提供していただき適切なアドバイスをいただいた 近畿大学郡博士に深謝の意を表します。

文 献

- Drach GW: Urinary lithiasis. In: Campbell's Urology. Edited by Walsh PC, Gittes RE, Perlmutter AD, et al.: 5th ed. p. 1104-1114, Saunders Co., Philadelphia, 1986
- 鈴木孝治, 山口智正, 宮澤克人, ほか: 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. pp. 492-496, 1987
- 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
- 鈴木孝治, 津川龍三: 尿酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する CG-120 の阻止効果. 泌尿紀要 34: 1073-1076, 1988
- 宮澤克人, 鈴木孝治, 津川龍三: 実験的尿酸カルシウム結石に対する pentosan polysulfate, chondrophyllin の阻止効果の定量的検討. 日泌尿会誌 80: 861-869, 1989
- 川村研二, 鈴木孝治, 津川龍三: 尿酸カルシウム結石形成の危険因子に関する研究—microplate 法による metastable limit 簡易測定法について—。日泌尿会誌 80: 1733-1740, 1989
- Suzuki K, Miyazawa K and Tsugawa R: A simple method for determining the metastable limit of calcium oxalate. In: Urolithiasis. Edited by Walker VR, Sutton RA, Cameron ECB, et al.: pp. 65-66, Plenum Press, New York, 1989
- Miyazawa K, Suzuki K and Tsugawa R: The inhibitory effect of sodium pentosan polysulfate on calcium oxalate crystal formation in vitro and in vivo. In: Urolithiasis. Edited by Walker, V.R., Sutton, R.A., Cameron, E.C.B., et al.: pp. 197-200, Plenum Press, New York, 1989
- 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
- Randolph AD and Larson MA: Theory of particle processes. Academic Press. New York, 1971
- Miller JD, Randolph AD and Drach GW: Observation on calcium oxalate crystallization kinetics in simulated urine. J Urol 117: 342-345, 1977
- 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
- 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
- Drach G, Kraljevic Z and Randolph AD: Effects of high molecular weight urinary macromolecules on crystallization of calcium oxalate dihydrate. J Urol 127: 805-810, 1982
- Drach GW, Robertson WG, Scurr DS, et al.: Pyrophosphate inhibition of calcium oxalate dihydrate crystallization in simulated urine: Continuous flow studies. World J Urol 1: 146-149, 1983
- Robertson WG and Scurr 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
- 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
- 18) Li MK, Blacklock NJ and Garside J: Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urol* **133**: 123-125, 1985
- 19) Kohri K, Garside J and Blacklock J: The role of magnesium in calcium oxalate urolithiasis. *Br J Urol* **61**: 107-115, 1988
- 20) Kohri K, Garside J and Blacklock J: The effect of glycosaminoglycans on the crystallization of calcium oxalate. *Br J Urol* **63**: 584-590, 1989

(Received on May 28, 1990)

(Accepted on June 26, 1990)