



Title	Influence of ionic strength on crystal adsorption and inhibitory activity of macromolecules
Author(s)	宇都宮, 正登
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38548">https://hdl.handle.net/11094/38548</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 宇 都 の みや 宮 まさ と 登

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 8 7 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 7 月 1 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 Influence of ionic strength on crystal adsorption and  
inhibitory activity of macromolecules  
(高分子物質の結晶吸着と阻止能に対するイオン強度の影響)

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 奥山 明彦

(副査)  
教 授 谷口 直之 教 授 網野 信行

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

尿中には、尿路結石形成における結晶成長凝集阻止因子の存在が認められており、とくに高分子阻止物質は、主として結晶表面に吸着することによってその阻止作用を発現すると考えられる。しかしヒト尿中での周辺環境は一定ではなく常に変動しているため、周辺環境によって阻止物質の作用が変化することが考えられる。本研究の目的は、周辺環境、特にイオン強度が高分子阻止物質の作用に与える影響を明らかにするために、代表的な高分子阻止物質であるヘパリンを用い、その蓚酸カルシウム結晶吸着と阻止能に与えるイオン強度の影響につき検討した。さらにヒト尿中に存在する高分子分画 (Urinary macromolecular substances; UMMs) を抽出し、その蓚酸カルシウム結晶成長凝集阻止能に対するイオン強度の影響につき検討した。

### 【方 法】

- 1) Seed crystal 法による検討：塩化ナトリウムにて種々のイオン強度 (0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 M NaCl) に調整した緩衝液20ml (10 mM Sodium Cacodylate, pH 6.0) に、微量の [ $^3\text{H}$ ]-ヘパリン (0.037 MBq) および市販の蓚酸カルシウム結晶200mgを添加し、温浴振盪 2 時間前後での上清中の [ $^3\text{H}$ ] を Liquid Scintillation Counter を用い測定し、その消費量から結晶吸着率を計算した。
- 2) Non-seed crystal 法による検討：市販のヘパリン0.1ml (100 anticoagulant units) を添加した同様の緩衝液20 mlにおいて、1 M 塩化カルシウム0.2mlおよび0.2M 蓚酸ナトリウム1.0mlを同時に添加し、蓚酸カルシウム結晶形成を惹起した。ヘパリンおよび蓚酸に Tracer dose の [ $^3\text{H}$ ]-ヘパリン (0.037 MBq), [ $^{14}\text{C}$ ]-蓚酸 (0.00925 MBq) を加え、37°C, 温浴振盪 2 時間後での上清中の [ $^3\text{H}$ ] および [ $^{14}\text{C}$ ] を Liquid Scintillation Counter を用い測定し、ヘパリン吸着量 (units) および結晶生成量 ( $\mu\text{mol}$ ) を測定し、単位結晶量あたりの結晶吸着量 (units/ $\mu\text{mol}$ ) を計算した。さらに同一条件下に Coulter Multisizer® を用いその粒度分布および平均粒径よりその阻止活性を測定した。
- 3) UMMs の阻止能に対するイオン強度の影響の検討：10人の健康成人男性より得られたプール尿を限外濾過膜

(Labomodule®) を用い限外濾過後凍結乾燥を行ない分子量6000以上のヒト尿由来高分子分画 (UMMs) を抽出した。前述の緩衝液100mlにおいて UMMs 50mgを添加し, 1 M 塩化カルシウム1.0mlおよび0.2M 蔞酸ナトリウム5.0mlを添加し, 蔞酸カルシウム結晶形成を惹起した。温浴振盪2時間後に Coulter Multisizer®を用いその粒度分布および平均粒径よりその阻止活性を測定した。

#### 【成績】

- 1) Seed crystal 法におけるヘパリンの結晶吸着率は, イオン強度によって変化し, イオン強度が低いほどその吸着率は増大した (0.45M-87.1, 0.35M-87.0, 0.25M-87.8, 0.15M-89.0, 0.05M-90.4%)。
- 2) Non-seed crystal 法においてもその単位結晶あたりの吸着量に有意な変化が認められ, やはりイオン強度の低下と共に吸着量も増大した (0.45M-0.188, 0.35M-0.206, 0.25M-0.201, 0.15M-0.255, 0.05M-0.298units/ $\mu$ mol)。結晶の重量平均粒径は, イオン強度の低下と共に吸着量に応じて小さくなることから, 結晶成長凝集阻止能は増強したと考えられた (0.45M-6.95, 0.35M-6.98, 0.25M-6.68, 0.15M-6.14, 0.05M-4.67 $\mu$ m)。
- 3) 蔞酸カルシウム結晶成長凝集に対する UMMs の阻止能は, ヘパリンと同様にイオン強度による影響を受け, 結晶の重量平均粒径からみた阻止活性は, イオン強度の低下と共に平均粒径は小さくなり, UMMs の結晶成長凝集阻止能は増強したと考えられた (0.45M-9.26, 0.35M-9.11, 0.25M-9.16, 0.15M-8.41, 0.05M-7.568 $\mu$ m)。

#### 【総括】

高分子阻止物質としてのヘパリンの結晶吸着量および成長凝集阻止能はイオン強度に影響されることが判明した。イオン強度の低下と共にその吸着量は増大し, 吸着量に応じ蔞酸カルシウム結晶成長凝集阻止能が増強した。さらに UMMs の蔞酸カルシウム結晶成長凝集阻止能もイオン強度の低下と共に増強することより, 尿中に存在する高分子阻止物質もやはりイオン強度の低下と共により多くの蔞酸カルシウム結晶表面に吸着し, 結晶成長凝集をより強く阻止すると考えられた。すなわち, 薄い尿では蔞酸カルシウム結晶成長凝集阻止物質濃度の低下するリスクも報告されているが, 薄い尿中ではむしろ高分子阻止物質の作用活性が増強されるものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

高分子物質の蔞酸カルシウム結晶に対する吸着, それに伴う成長凝集阻止能に対する周辺環境, 特にイオン強度の影響につき検討した。

結晶吸着の検討は, イオン強度を調整した緩衝液20ml (0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 M NaCl+10mM Sodium Cacodylate, pH6.0) を人工尿とし, Seed crystal 法及び Non-seed crystal 法を用い, [<sup>3</sup>H] ヘパリンおよび, [<sup>14</sup>C] 蔞酸による Solution depletion technique により検討した。阻止能の検討は, 同一条件下に Coulter Multisizer®を用い, その粒度分布および平均粒径よりその阻止活性を測定した。さらには, ヒト尿中より高分子分画を分離抽出し (>6000), Coulter Multisizer®を用い, 同様にその阻止活性を検討した。ヘパリンの蔞酸カルシウム結晶吸着および成長凝集阻止能はイオン強度に影響されることが判明し, イオン強度の低下と共にその吸着量は増加し, 吸着量に応じ結晶成長凝集阻止能は増強した。尿中高分子分画の蔞酸カルシウム結晶成長凝集阻止能は, ヘパリンと同様にイオン強度の低下と共に増強した。またその傾向は, 生理的範囲 (0.05~0.25) にて顕著であった。

以上の実験より, 尿中に存在する高分子 inhibitor はイオン強度の低下と共により多く結晶表面に吸着し, 成長凝集をより強く阻止することが示唆された。以上, in vitro の実験系を用い, 高分子物質の蔞酸カルシウム結晶吸着と成長凝集阻止能がイオン強度の低下によって増強することを明かにし, さらに生理的範囲において顕著であることを証明したことは学位論文に値する。