

ビリルビン系石に対する直接溶解剤としての キレート剤に関する基礎的研究

福岡大学医学部第1外科 (指導: 志村秀彦教授)

池 尻 裕 一

FUNDAMENTAL STUDIES ON CHELATING AGENTS OF DIRECT SOLUBILIZER FOR BILIRUBIN-CALCIUM GALLSTONES

Yuichi IKEJIRI

First Department of Surgery, School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka

(Director: Prof. Hidehiko SHIMURA)

ビリルビン系石に対する直接溶解剤の開発を目的として、鎖状ポリリン酸の鎖長とカルシウムキレート効果の関係を明らかにするとともに、キレート剤の生理的条件下でのキレート効果を明らかにするために、種々のキレート剤の pH 7.4, 温度37°Cにおける条件安定度定数を求め比較検討した。

その結果、鎖状ポリリン酸を含む種々のキレート剤のキレート効果には、この条件下では著しい差異はなく、今までに報告されたこれらの毒性の結果を併せ考える時、鎖状ポリリン酸キレート剤 (LPPC) は、現在のところ最も有効なビ系石直接溶解剤の1つであると結論した。

索引用語: 直接胆石溶解剤, 遺残胆石症, キレート剤, 鎖状ポリリン酸ナトリウム, 鎖状ポリリン酸キレート剤 (LPPC)

緒 言

胆石症における最近の飛躍的な術前検査法の進歩により、胆石手術時には胆道系に関する的確な情報を持ち得るようになるとともに、最近の術中検査法や手術手技の向上に伴って、遺残胆石の頻度は著しく減少したと考えられる。

遺残胆石の発生頻度は、Glenn によれば胆石症全体の1.1%であり¹⁾、諸家の報告を併せ考えると、本邦でも胆石症手術例中遺残胆石の発生頻度は、数%ぐらいである²⁾³⁾。

ビリルビン系石(ビ系石)を主体とした肝内胆石症も、最近では胆石症全体の約5~7%^{4)~7)}とされ、これは以前に報告された頻度約11~15%^{8)~11)}に比較し、かなり低下している。

しかしながら、肝内胆石症は、胆石症再手術例の約50~60%¹²⁾¹³⁾を占め、術後遺残胆石の中でも最も頻度が高く、胆道外科領域での残された重要な課題の1つである。

肝内胆石症においては、手術時に種々の截石法を試みても、解剖学的関係から手技的に限界があり、胆石が遺残しているのを承知の上で、止むを得ず手術を終らざるを得ないことが多い。また、術後にも胆管ドレーンを経由して、最近著しく進歩した胆道鏡¹²⁾や steerable catheter¹³⁾などの非観血的截石術に期待しても、肝内胆石の完全な除去は困難なことが多い。そして、胆石遺残により胆管炎を繰り返して肝機能障害が強くなり、遂には肝硬変症となり死に至る悲惨な転帰をとる例もしばしば経験する。良性疾患でありながら、難治性疾患として取り扱われる所以である。

遺残胆石症例に対する非観血的治療法としては、可能な限り機械的截石術によって一気に胆石を除去するのが最も簡単であるが、術後に問題となる例は、もともと術中に外科医の限界を越える例がほとんどであるため、これらの方法を用いても完全な肝内遺残胆石の除去は困難なことが多いのが現状である。したがって、まず直接胆石溶解剤を用いて胆石の脆弱化を図り、排除し易い状態

とした後に機械的方法で胆石の除去を試みるのが合理的である。

このような観点から、1959年久次は、ビス系石がビリルビン・カルシウムより成るとすれば、キレート効果によりビス系石からカルシウムをはずし、胆石よりの脱金属を図ってビス系石を崩壊に導くという考え方を提唱した¹⁴⁾。彼は、生体応用可能なキレート剤として、いわゆるヘキサメタリン酸ナトリウム (HMP) を開発し、ビス系石崩壊の *in vitro* 実験に引きつづき、臨床応用を開始した¹⁵⁾¹⁶⁾。

ところが、久次の協同研究者である五十君らの300余例の臨床経験によると、いわゆる HMP のビス系石に対する有効率は10~20%程度と低く¹⁷⁾、著者らの本剤によるビス系石の *in vitro* 浸漬実験でも、色素を溶出して溶解ないし崩壊するものから、全く変化をしないものまで様々であった。

これらの事実から考えねばならないことは、従来からビス系石として一括されている胆石が、全て同じ組成を持っているのかという疑問である。ビス系石の分析や溶解実験などの経験から、ビス系石は、ビリルビンの重合体、ビリルビン・カルシウム、ビリルビン+カルシウム塩の3つに、大きく分れるのではないかと考えられる。キレート剤の効果は、胆石がどれだけ Ca^{2+} を含有し、またどれだけ強く結合してキレート剤の作用に抵抗しているかにかかっていると思われる。

ここにいたって、キレート剤が生理的な条件下でどれだけキレート作用を持つか、すなわち種々のキレート剤の条件安定度定数を明らかにすることが、今後のビス系石直接溶解剤開発のために是非とも必要である。このため、まず鎖状ポリリン酸塩の鎖長とカルシウム錯体形成能の関係を検討し、次いで鎖状ポリリン酸塩のみならず、EDTA などのコンプレキサン型キレート剤などの pH 7.4、温度37°Cにおける条件安定度定数を求め比較検討したので報告する。

実験材料

- 1) オルトリン酸二水素一ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.W.=156.01) 半井化学, 一級
- 2) オルトリン酸一水素二ナトリウム (Na_2HPO_4 , M.W.=141.96) 半井化学, 一級
- 3) 一規定塩酸 (1N HCl) 半井化学, 標準規定液
- 4) 一規定水酸化ナトリウム (1N NaOH)
- 5) 塩化カリウム (KCl) 石津製薬, 特級
- 6) 塩化カルシウム (CaCl_2) Merck, 特級, 元素分

析用

- 7) 塩化ナトリウム (NaCl) 半井化学, 特級
- 8) トリス (ハイドロキシメチル) アミノメタン (Trizma Base) Sigma, 特級
- 9) カルシウム C-テスト, 和光純薬, カルシウム測定用
- 10) モリブデン (V)-モリブデン (VI) 試薬, 調製して使用した¹⁸⁾。
- 11) ピロリン酸ナトリウム (P_2) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ M.W.=446.06 米山薬品工業, 特級, 市販品をそのまま使用した。
- 12) トリリン酸ナトリウム (P_3) $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ M.W.=475.95 米山薬品工業, 特級, アルコールで再結晶させて使用した¹⁹⁾。
- 13) テトラリン酸アンモニウム (P_4) $(\text{NH}_4)_6\text{P}_4\text{O}_{13} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ M.W.=547.88, 合成して使用した²⁰⁾。
- 14) 平均鎖長 (\bar{n}) が, 5, 9, 18, 40, 77 の鎖状ポリリン酸ナトリウム, 合成して使用した²¹⁾。
- 15) エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム (EDTA-4Na) $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ M.W.=452.25 半井化学, 特級
- 16) エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-2Na) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ M.W.=372.25 半井化学, 特級
- 17) ニトリロトリ酢酸 (NTA) $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_6$ M.W.=191.14 同仁薬化学, 特級
- 18) ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$ M.W.=393.35 同仁薬化学, 特級
- 19) クエン酸ナトリウム $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ M.W.=294.10 キンダ化学, アミノ酸自動分析装置用
- 20) 塩化ランタン ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 片山化学, 原子吸光分析用
- 21) イオン交換蒸留水

実験方法

1. $\bar{n}=5, 10, 20, 50, 100$ の鎖状ポリリン酸 Na の合成²¹⁾。

出発物質としてオルトリン酸二水素一 Na とオルトリン酸一水素二 Na を用い、目的物質の $\text{Na}_2\text{O}/\text{P}_2\text{O}_5$ の比と同一の比を全体として有するように混合した。この混合物を白金のつばに入れ、酸化炎で加熱した後、電気炉中で970°C、2時間半脱水縮合させ、電気炉より取り出して銅板上に注いで急冷させ、固化したガラス状物質を得た。

2. 市販および合成した鎖状ポリリン酸塩の鎖長ないし \bar{n} の決定

Van Wazer²²⁾, Griffith²³⁾ らの方法に従い、末端基滴定法で決定した。

3. 溶出液および試料溶液の調製

目的の Ca^{2+} 濃度を有する $CaCl_2$ 溶液を溶出液とした。pH はトリス緩衝液で調整し、ゲルクロマトグラフィーの副効果である Donnan 効果²⁴⁾²⁵⁾によるイオン吸着を打ち消し、イオン強度を0.10に保つために、0.10~0.25M の $NaCl$ 溶液を使用した。この溶液中の Ca^{2+} 濃度 $[Ca]_0$ は、オルトクレゾールフタレイン (o-CPC) 法²⁶⁾で決定した。

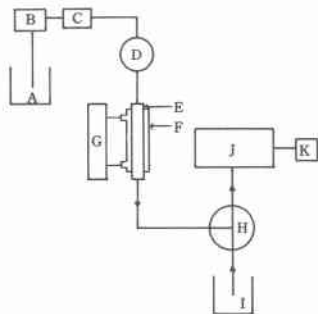
試料溶液は、カラム内で平衡状態が得られるような希望量の試料を秤量し、カラムを平衡に達せしめた同一の溶出液で溶解して、全体を100ml として調製した。

試料溶液中の全リン濃度は、モリブデン (V)-モリブデン (VI) 試薬により、830nm で比色定量した (島津分光光度計, QB-50)¹⁸⁾。

4. 溶出実験

図1に示すような装置を用いて実験した²⁷⁾²⁸⁾。0.8×70cm の恒温ジャケット付カラム (E, F, 協和精密) に、0.1M $NaCl$ 溶液に一昼夜浸漬し十分に膨潤させた Sephadex G-15 (Pharmacia, particle size 40-120 μ) を充填した。溶出実験中のカラム温度は、恒温槽 (G, Lauda K2RD) を用い目的の温度に保った。

図1 流路系の模式図



- A: 溶出液槽 B: ポンプ C: エアー・ダンパー D: 試料注入器
- E: 分離カラム F: 恒温ジャケット G: 恒温槽 H: 三方連絡管
- I: 補給槽 J: 原子吸光度計 K: 記録計

溶出液を少なくともカラム容量の2倍以上流して、カラムを溶出液で平衡に達せしめた後、注入器 (D, サンプラー M_2 , 協和精密) を用いて、試料溶液 1ml を注入し、溶出を行なった。溶出液の速度は、定常流ポンプ

(B, JLC-P₂, JEOL) を使用し、1.78ml/min. に調整した。

カラムは原子吸光度計 (J, Perkin-Elmer 403型) に直結し、補給槽 (I) よりイオン交換蒸留水または Ca^{2+} の測定における PO_4^{3-} の干渉を除去するために $10^{-2}M$ $LaCl_3$ 溶液を吸引させながら、波長 211nm で溶出液中の Ca^{2+} を自動連続的に検出し記録した。

5. 配位子に結合したカルシウム量の算出

Ca と配位子 L との間に 1 : 1 錯体 ML を生成する反応は、次式の通りである。



カルシウム錯体の濃度平衡定数 K は、

$$K = \frac{[Ca-L]}{[Ca][L]} \quad \dots\dots ②$$

[] は、 Ca , L , $Ca-L$ のモル濃度を表わす。

Hummel-Dreyer 法²⁹⁾³⁰⁾の特徴として、 $[Ca]$ は溶出液濃度 $[Ca]_0$ に等しいので、

$$K = \frac{[Ca-L]}{[Ca]_0[L]} \quad \dots\dots ③$$

すなわち、 $[Ca-L]/[L]$ は常に一定に保たれる。

今、全配位子濃度を $[L]_t$ とすると、

$$[L] = [L]_t - [Ca-L] \quad \dots\dots ④$$

③, ④式より

$$K = \frac{[Ca-L]}{[Ca]_0([L]_t - [Ca-L])} \quad \dots\dots ⑤$$

$[Ca]_0$, $[L]_t$ は既知の値であるから、 $[Ca-L]$ の吸光度を測定することにより、K が求まる。

図2 Hummel-Dreyer 法の模式図

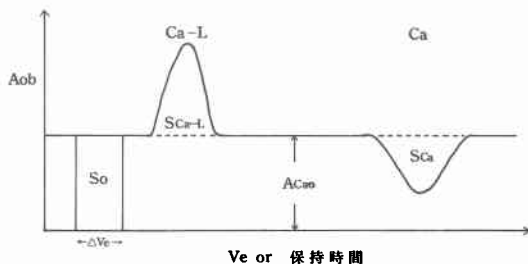


図2の如く、 $[Ca-L]$ のピーク面積 S_{Ca-L} は単位時間 (min.) 当りの面積 So , すなわち A_{Ca0} が示す吸光度の面積を内部標準として、配位子に結合した Ca 量 (Q_{Ca-L}) に容易に変換できる。

$$Q_{Ca-L} \text{ (mole)} = -\frac{S_{Ca-L}}{So} \times \text{溶出液速度} \times [Ca]_0 \times 10^{-3} \text{ (mole)} \quad \dots\dots ⑥$$

S_{Ca-L} は、 Ca のピーク面積 S_{Ca} に等しい。

6. リン1個当りに結合したカルシウムの数 (\bar{m}) の算出

試料溶液中の全リノ量を ΣP (mole) とし、次式により計算した。

$$\bar{n} = \frac{Q_{Ca-L}}{\Sigma P} \quad \dots\dots ⑦$$

7. 条件安定度定数 (log K) の算出

試料溶液中の全配位子量を Q_{Lt} (mole) とすると、

⑤式は次のように書き換えられる。

$$K = \frac{Q_{Ca-L}}{[Ca]_0 (Q_{Lt} - Q_{Ca-L})} \quad \dots\dots ⑧$$

低分子の配位子の場合には、一般に 1 : 1 錯体が知られているので、⑧式より log K を求めた。

しかし、高分子の場合は一分子中に複数の結合部位 (s) を持つことが予想される。ここで、安定度定数の等しい一群の結合部位だけが存在し、1つの結合部位が飽和されても他の結合部位の安定度定数に影響を及ぼさないと仮定すると³¹⁾、⑧式は次のように書くことができる。

$$K = \frac{Q_{Ca-L}}{[Ca]_0 (sQ_{Lt} - Q_{Ca-L})} \quad \dots\dots ⑨$$

配位子一分子当りに結合した Ca の数を、 \bar{f} とすると

$$\bar{f} = \frac{Q_{Ca-L}}{Q_{Lt}} = \bar{n} \times \text{鎖長 (P)} \quad \dots\dots ⑩$$

ここで、K, s, \bar{f} の関係を整理するために、⑩式から $Q_{Ca-L} = \bar{f} \times Q_{Lt}$ を導入すると、

$$K = \frac{\bar{f}}{[Ca]_0 (s - \bar{f})} \quad \dots\dots ⑪$$

となる。

これは次のように、Scatchard プロットの式に書き換えられる。

$$\frac{\bar{f}}{[Ca]_0} = -K\bar{f} + sK \quad \dots\dots ⑫$$

$\bar{n} = 5$ 以上の鎖状ポリリン酸塩については、単一鎖長 P として Scatchard プロットを行ない³¹⁾³²⁾、得られたグラフの勾配の逆数より K を求め、log K を求めた。

実験結果

本実験装置における Ca^{2+} に対する検量線は、Fig. 3a, 3b の如くであった。少なくとも 20ppm までは、 Ca^{2+} 濃度とピーク面積との間に直線関係が認められた。

$P_2, P_3, P_4, \bar{n} = 5, \bar{n} = 10, \bar{n} = 20, \bar{n} = 50, \bar{n} = 100$ の鎖状ポリリン酸塩の末端基滴定の結果は、それぞれ $P = 2, 3, 4$ および $\bar{n} = 5, 9, 18, 40, 77$ であった。いわゆる HMP の \bar{n} は 9 であった。以後の実験には、これらの結果を鎖状ポリリン酸塩の鎖長ないし \bar{n} として取り扱った。

図 4 ~ 6 に、Hummel-Dreyer 法による溶出パターン例を示した。それぞれ、pH 7.40 ± 0.05, 温度 37.0 ± 0.1°C, $[Ca]_0 = 1.0 \times 10^{-4} M$ の条件における $P_3, \bar{n} = 9$,

図 3a 分離カラムを流路系に連結したときのピーク形

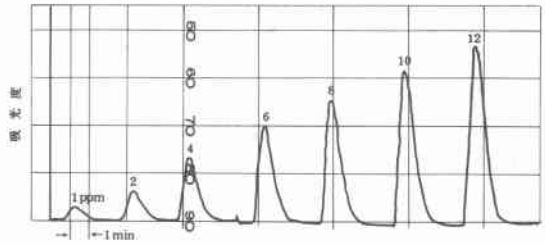
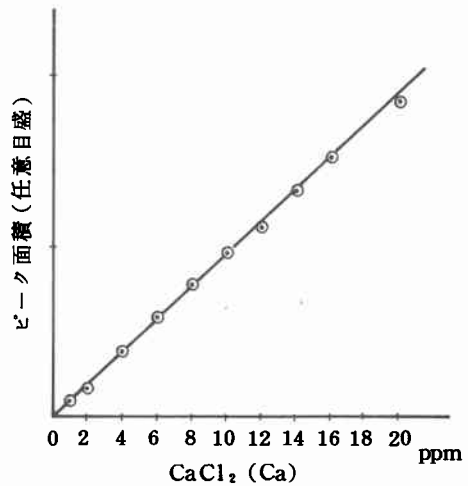


図 3b 注入した試料量とピーク面積との関係。流速 1.78ml/min.



EDTA-4Na の溶出例を示した。それぞれの Q_{Lt} ないし ΣP は、 $P_3 = 0.456 \mu\text{mole}$, $\bar{n} = 9$ は $1.87 \mu\text{mole}$ (PO_4 単位), $EDTA-4Na = 0.302 \mu\text{mole}$ であった。

Ca^{2+} 測定の際、 PO_4^{3-} による干渉を除去するために、 $LaCl_3$ 溶液を使用しなかった場合には、正のピークは干渉のために抑制され、 S_{Ca-L} は S_{Ca} より小さかった。そこで、 $1.0 \times 10^{-2} M$ $LaCl_3$ 溶液を使用した場合には、 S_{Ca-L} と S_{Ca} は等しかった。正と負のピーク間には起伏がなく基線に一致しており、これはカラム内でカルシウムの錯体が平衡状態を保ち、再解離を生じていないことを示す。

カルシウム-リン酸錯体の溶出は、鎖長の長いものほど早く溶出された。この際、 Na^+ の溶出位置は、配位子の溶出位置とは完全に離れているので、 Na^+ と PO_4^{3-} のイオン対生成は起こっていないことを示す。

\bar{n} と溶出液濃度との関係

図 7 は、pH 7.40 ± 0.05, 温度 37.0 ± 0.1°C の条件の

図4 カルシウム- P_3 錯体の溶出像. Sephadex G-15カラム. 溶出液, $[Ca]_0 = 1.02 \times 10^{-4} M$ (pH 7.4). 温度, $37^\circ C$. P_3 , $0.45 \mu mole$.

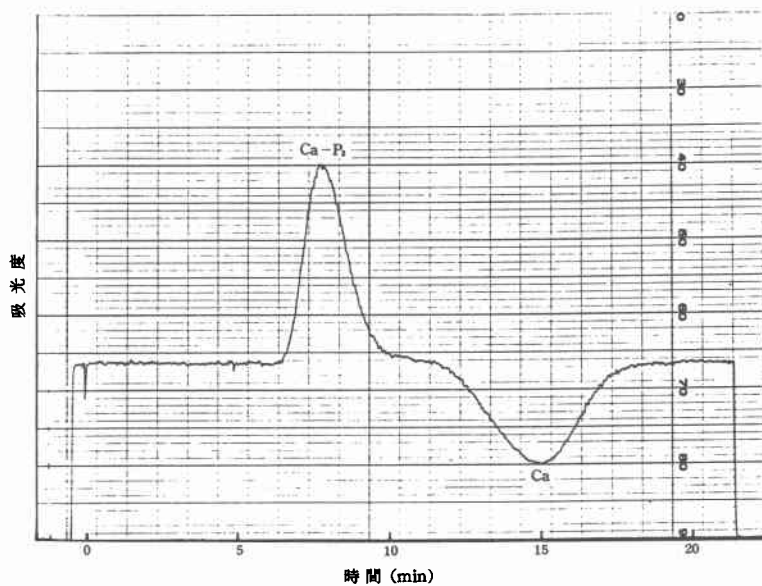


図5 $\bar{n} = 9$ のカルシウム錯体の溶出像. Sephadex G-15カラム. 溶出液, $[Ca]_0 = 1.02 \times 10^{-4} M$ (pH 7.4). 温度, $37^\circ C$. $\bar{n} = 9$, $1.87 \mu mole$ (PO_4 unit).

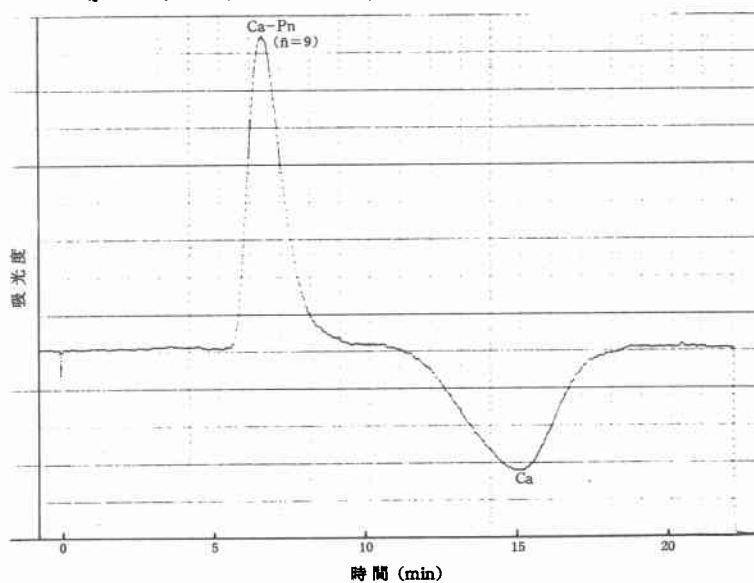


図6 カルシウム-EDTA錯体の溶出像. Sephadex G-15カラム, 溶出液, $[Ca]_0=1.00 \times 10^{-4}M$ (pH 7.4). 温度, $37^\circ C$. EDTA-4Na, $3.02 \times 10^{-1} \mu mole$.

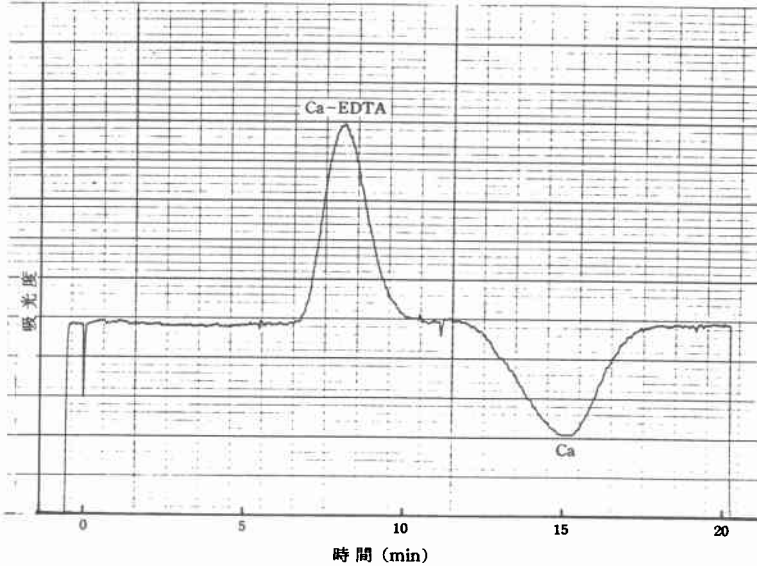


図7 \bar{m} の溶出液濃度依存性
pH 7.40 ± 0.05 温度 $37.0 \pm 0.1^\circ C$

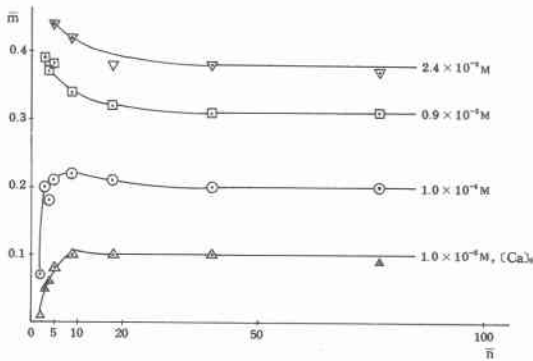
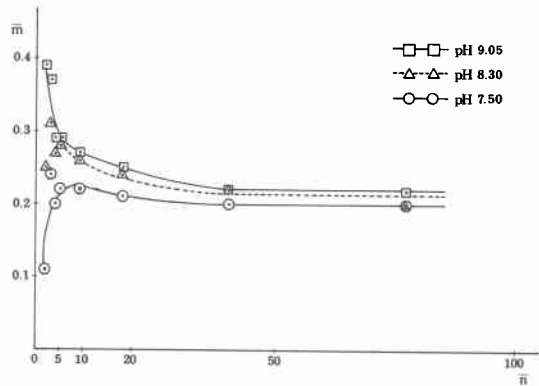


図8 \bar{m} に及ぼす pH の影響

温度 $25.0 \pm 0.1^\circ C$ 溶出液 $1.0 \times 10^{-4} M CaCl_2, 0.1 M NaCl$



下に, \bar{m} と \bar{n} との関係は溶出液濃度との関係においてみたものである。

\bar{m} には, 著明な溶出液濃度依存性が認められ, 溶出液濃度が大きくなるに従い, \bar{m} の値は増加した。

しかし, 同一濃度の溶出液では, 鎖長の違いによる \bar{m} の値の差は, $\bar{n} \approx 10$ 以上では殆んど認められなくなり, 一定化傾向を示すようになって, 鎖長の違いによるカルシウム結合力の差は認められなかった。

低鎖長の鎖状ポリリン酸塩ほど, 溶出液濃度による影響が大きく, 濃度変化による \bar{m} 値の変化が大きいが, 溶出液濃度が $0.94 \times 10^{-3} M$ 以上に大きくなると, P_2 ,

P_3 , P_4 の順に試料溶液の沈澱を生じた。 $\bar{n} = 5$ 以上の鎖状ポリリン酸塩では沈澱を認めなかった。

pH の \bar{m} に及ぼす影響

溶出液濃度は一定で, それぞれ温度 $25.0 \pm 0.1^\circ C$, $37.0 \pm 0.1^\circ C$ の条件で, pH を $7.50 \sim 9.05$ の範囲で変化させた時の, pH と \bar{m} との関係を図8および図9に示した。 pH が高いほど \bar{m} は大きくなる傾向にある。しかし, \bar{m} の pH による影響は低鎖長のものでは大きい, ある一定の鎖長 ($\bar{n} \approx 10$ 以上) では, pH にあまり

図9 \bar{m} に及ぼす pH の影響
 温度 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 溶出液 $1.0 \times 10^{-4} \text{M CaCl}_2, \text{c}$ 0.1 M NaCl

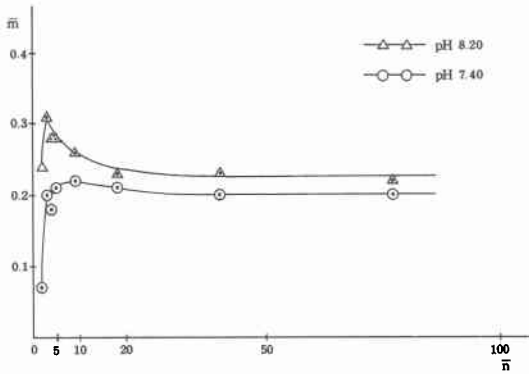
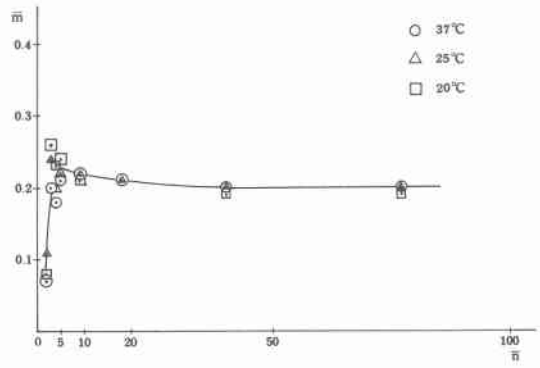


図10 \bar{m} と温度との関係
 pH 7.50 ± 0.05 溶出液 $1.0 \times 10^{-4} \text{M CaCl}_2, \text{c}$ 0.1 M NaCl



影響されず、しかも \bar{m} の値が一定化してくるという結果を得た。

\bar{m} と温度との関係

図10は、溶出液濃度は一定で、 \bar{m} と \bar{n} との関係と温度との関係においてみたものである。 \bar{m} には、温度 $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C} \sim 37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ の範囲における影響は認められなかった。

pH 7.40 ± 0.05 , 温度 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, すなわち生理的条件下での種々のキレート剤の条件安定度定数の比較

$\text{P}_2, \text{P}_3, \text{P}_4$ などの低鎖長結晶状ポリリン酸塩の、この

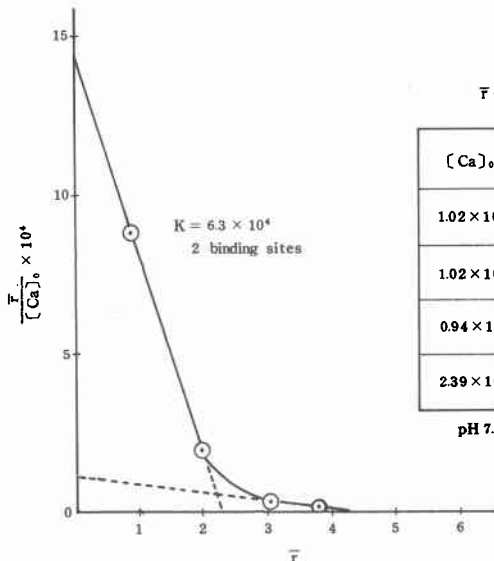
表1 鎖状ポリリン酸塩の条件安定度定数

Ligand	$\text{OL}_i \times 10^{-4} \text{mole}$	$\text{Q}_{\text{Ca-L}} \times 10^{-4} \text{mole}$	log K
P_1	9.45	1.30 ± 0.04	3.20 ± 0.01
P_3	4.56	2.74 ± 0.09	4.17 ± 0.03
P_4	5.00	3.68 ± 0.08	4.44 ± 0.04

(n = 5, t = 0.05)

pH 7.40 ± 0.05 , 温度 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$
 QL_i : 試料溶液中の全配位子量
 $\text{Q}_{\text{Ca-L}}$: 配位子に結合した Ca 量

図11 鎖状ポリリン酸塩の Scatchard プロット ($P = 9$)
 pH 7.40 ± 0.05 温度 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$



\bar{r} の溶出液濃度依存性 ($P = 9$)

$[\text{Ca}]_0, \text{M}$	$\bar{r} (\bar{m} \times 9)$	$\frac{\bar{r}}{[\text{Ca}]_0} \times 10^4$
1.02×10^{-3}	0.90	8.82
1.02×10^{-4}	1.98	1.94
0.94×10^{-3}	3.06	0.33
2.39×10^{-3}	3.78	0.16

pH 7.40 ± 0.05 温度 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$

条件下における Ca^{2+} に対する $\log K$ を⑧式より算出し、表1に示した。それぞれの $\log K$ は、 $P_2=3.20 \pm 0.01$, $P_3=4.17 \pm 0.03$, $P_4=4.14 \pm 0.04$ ($n=5$, $t=0.05$) であった。

$P=5$ 以上の鎖状ポリリン酸塩については、Scatchard プロットを行い $\log K$ を求めたが、1例として鎖長9 ($P=9$) とした時の、溶出液濃度の変化による \bar{r} の変化を図11中の表に示した。 \bar{r} の値は溶出液中の遊離 Ca^{2+} 濃度に依存し、溶出液濃度が大きくなるに従い増加した。他の鎖状ポリリン酸塩についても、全く同様の結果が得られた。

この \bar{r} の濃度依存性を利用して、 $\bar{r}/[Ca]_0$ を縦軸に、 \bar{r} を横軸にプロットした(図11)。他の鎖状ポリリン酸塩でも同様の結果であったが、結合部位が一群だけの時にみられるような直線としてはプロットされず、2つの直線線分を有する曲線としてプロットされた。すなわち、異なった条件安定度定数を有する二種類の結合群が存在することが分った。曲線の2つの直線線分のうち、傾きが大きい線分の勾配の逆数である K を求めて $\log K$ を概算し、 $\log K=4.8$ という値を得た。また、横軸との交点より、 Ca^{2+} に対し強く結合する部位の数に相当する s を求め、約2という値を得た。すなわち、鎖長9の鎖状ポリリン酸塩には、 Ca^{2+} に対して2個の強い結合部位が存在し、さらに弱い結合部位の存在も定性的に示されている。

他の鎖状ポリリン酸塩についても、同様にして $\log K$ および s を求め、それらの結果を表2にまとめた。 Ca^{2+} に対し強い結合部位の数は、 $P=5$ の場合は1個であるが、それ以上のものは複数個であり、鎖長の増大とともに結合部位の数は増える。しかも、鎖長と結合部位の数との間には規則性が認められ、 PO_4 単位約5個をひと組として、 Ca^{2+} に対して強く結合する部位が1個存在する。

表1と表2の結果より得られた、鎖状ポリリン酸塩の鎖長と $\log K$ との関係を図12に示した。pH 7.40 ± 0.05, 温度 37.0 ± 0.1°C における $\log K$ は、鎖長が長くなるに従い増大するが、その増大の仕方は次第に緩やかになり、鎖長が10付近以上では一定化してくる。この時の $\log K$ の値は5近傍であり、この傾向は鎖長と \bar{r} との関係で得られた結果と一致する。

EDTA などのコンプレキサン型キレート剤およびクエン酸 Na などの、 Ca^{2+} に対する $\log K$ の算出結果は表3の如くであった。それぞれ、EDTA-4Na=4.27

表2 鎖状ポリリン酸塩の条件安定度定数

Chain Length	log K	s
P = 5	4.7	1
9	4.8	2
18	4.9	4
40	4.9	9
77	4.9	17

pH 7.40 ± 0.05 温度 37.0 ± 0.1°C

log K : Ca^{2+} に対して強く結合する部位の条件安定度定数
s : Ca^{2+} に対して強く結合する部位の数

表3 コンプレキサン型キレート剤などの条件安定度定数

Ligand	$Q_{Li} \times 10^{-4}$ mole	$Q_{Ca-L} \times 10^{-4}$ mole	log K
EDTA-4Na	3.02	1.96 ± 0.07	4.27 ± 0.04
EDTA-2Na	3.05	2.46 ± 0.05	4.62 ± 0.05
NTA	3.20	1.88 ± 0.04	4.15 ± 0.04
DTPA	3.11	2.05 ± 0.05	4.29 ± 0.09
Na-Citrate	30.0	3.10 ± 0.06	3.06 ± 0.01

(n = 5, t = 0.05)

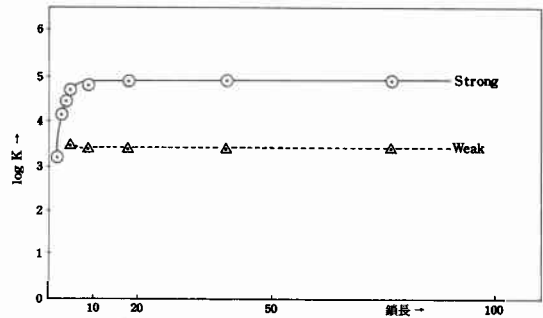
pH 7.40 ± 0.05, 温度 37.0 ± 0.1°C

Q_{Li} : 試料溶液中の全配位子量

Q_{Ca-L} : 配位子に結合した全Ca量

図12 鎖状ポリリン酸塩の条件安定度定数と鎖長との関係

pH 7.40 ± 0.05 温度 37.0 ± 0.1°C



±0.04, EDTA-2Na=4.62±0.05, NTA=4.15±0.04, DTPA=4.29±0.09, クエン酸 Na=3.06±0.01 ($n=5$, $t=0.05$) であった。この条件下では、コンプレキサン型キレート剤の $\log K$ には、著明な差は認められなかった。これらの $\log K$ は、鎖状ポリリン酸塩の $\log K$ と比較しても、差は認められない。

考察

現在、ビ系石直接溶解剤として久次により開発され用

いられているポリリン酸塩は、一般にヘキサメタリン酸 Na (HMP-Na) と呼ばれている¹⁴⁾。ところが、リン化学における HMP-Na は環状の構造を有している³³⁾。

縮合リン酸塩は、その分子構造から分類すると、大別して鎖状ポリリン酸塩および環状ポリリン酸塩の二種類に分類される²¹⁾。

縮合リン酸塩と金属イオンとの錯体の安定度については、一般的に同一の金属については鎖状ポリリン酸錯体の方が対応する環状ポリリン酸錯体より安定であり、実際に縮合リン酸塩の中でキレート作用があるのは鎖状ポリリン酸塩であり、環状ポリリン酸塩にはその作用はほとんどないとされている³⁴⁾。

それでは、臨床に用いていた市販のいわゆる HMP-Na は何であるか著者が分析したところによれば、平均鎖長9~10の鎖状ポリリン酸塩であった。

そこで、今後はいわゆる HMP-Na という呼称をやめ、鎖状ポリリン酸キレート剤 (LPPC) と呼ぶが、これは本実験中鎖長9の鎖状ポリリン酸塩のことである。LPPC は一定の統計的分布を持つ種々の鎖長の鎖状ポリリン酸塩の混合物であり、無定形 (ガラス状) 縮合リン酸塩の一種である²¹⁾。

鎖状ポリリン酸塩は、一般式 $M_{n+2}P_nO_{3n+1}$ で表わされる鎖状構造を有し、金属対リンの比すなわち M_2O/P_2O_5 の比 R が $2 \geq R > 1$ の範囲で理論上は無数に存在する²¹⁾。したがって、まずビス石の直接胆石溶解剤として臨床使用に適切な、鎖状ポリリン酸塩の鎖長はどのくらいが妥当であるか、いわゆる LPPC で適当であるかという問題を検討するために、ゲルクロマトグラフィーにより、鎖状ポリリン酸塩の鎖長の違いによるカルシウム結合力の違いを調べた。

その結果、図7~10に示されるように、鎖状ポリリン酸塩は一般に溶出液濃度や pH による依存性が認められるが、 $\bar{n} \approx 10$ 以上の鎖状ポリリン酸塩の \bar{m} は、同一濃度の溶出液では一定化し、しかも pH には殆んど影響されないという結果が得られた。すなわち、溶液の濃度や pH が一定ならば、 $\bar{n} \approx 10$ 以上の鎖状ポリリン酸塩のカルシウム結合力は一定化する。また、図7で明らかかなように、低鎖長のものほど溶出液濃度による影響が大きい傾向にあるが、溶出液濃度が大きすぎる条件では、 P_2, P_3, P_4 の順に溶液の沈澱を生じ易くなるという結果が得られた。

以上のことは、図12からも明らかである。pH 7.40、温度37.0°Cにおける log K は、鎖長の増大とともに

大きくなるが、 $\bar{n} \approx 10$ 以上では一定化する。すなわち、 $\bar{n} \approx 10$ 以上の鎖状ポリリン酸塩のカルシウム結合力は一定で、低鎖長のもののカルシウム結合力より大きい。この条件下における log K は、低鎖長のものほど小さいために早く飽和に達し易く、沈澱を生じてしまうものと考えられる。低鎖長のものほど、溶液濃度が大きくなると沈澱し易いということは、生理的胆汁中の Ca^{2+} 濃度が $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3} M^{35)}$ ぐらいであることを考慮すれば、 P_2, P_3, P_4 などは胆管内に注入すると胆汁と接触するだけで沈澱してしまう可能性を示している。

以上の結果より、 $\bar{n} \approx 10$ 以上の鎖状ポリリン酸は、pH や濃度に影響を受けにくく、低鎖長のものに比較し、カルシウム結合力が大きいということが分った。

今回実験に用いた LPPC の \bar{n} は9~10であり、この実験結果は、生理的条件下においては、LPPC がそれ以上の鎖長を持つ鎖状ポリリン酸塩と同様のキレート効果を示し、しかも pH や濃度により影響を受けにくい最低鎖長であることを示している。必要以上に長い鎖長の鎖状ポリリン酸塩は、カルシウム結合力の点から考えても不必要と思われるので、LPPC は臨床応用にはまず妥当な鎖長の鎖状ポリリン酸キレート剤と考えられる。

一般に鎖状ポリリン酸塩はその一分子中に2個の末端 PO_4 と $(n-2)$ 個の中間 PO_4 を有する²¹⁾。また PO_4^{3-} に H^+ が結合する場合の生成定数は $P_2 > P_3 > P_4$ と鎖長が長くなるに従い小さくなり、鎖長が短いほど H^+ と結合し易い³⁶⁾。鎖長が短いほど単位容積当りの末端 PO_4 の比率が大きく、鎖長が長くなるに従い中間 PO_4 の比率が大きくなるので、低鎖長の鎖状ポリリン酸塩ほど pH や溶出液濃度の影響が大きいのは、末端 PO_4 が pH や溶出液濃度の影響を受け易いものと考えられる。換言すれば、低鎖長ほど H^+ と Ca^{2+} との間の競合反応が大きいことを反映している。これに反し鎖長が長くなると、中間 PO_4 の比率が大きくなるために、末端 PO_4 は存在するが全体の中の僅かな部分を占めるだけなのでほとんど無視でき、pH や溶出液濃度の影響が少なくなると考えられる。また $\bar{n} \approx 10$ 以上よりカルシウム結合力が一定化してくるのは、鎖長が長くなるに従い、pH や濃度により影響を受け易い末端 PO_4 からの構造的距離が長くなるために、鎖状ポリリン酸の構造に対する末端 PO_4 の影響が及ばなくなるためではないかと考えられる。

ところが、鎖状ポリリン酸塩の Scatchard プロット

の結果によると、鎖状ポリリン酸塩には、 Ca^{2+} に対して強く結合する部位が PO_4 単位約5個に1個の割合で存在し、しかも Ca^{2+} に対して弱く結合する部位の存在も定性的に示されている。すなわち、鎖状ポリリン酸塩には異なった $\log K$ を有する二種類の結合群が存在する。同様のことは、蛋白質にも観察されている³⁷⁾。弱い結合部位の $\log K$ や s に関するさらに詳しい解析は、他の研究の成果に待つとして、以上の事実、鎖状ポリリン酸塩と Ca^{2+} の結合は、単に末端 PO_4 と中間 PO_4 のカルシウム結合力の違いだけではなく、conformation の違いがカルシウム結合力に反映されていると考えた方が良いのではないかと推測させる。

長鎖長の結晶状縮合リン酸は、そのX線解析によると、ラセン構造を呈することが証明されている³⁸⁾。また、長鎖長の鎖状リン酸が水溶液中で加水分解する時は、環状リン酸を生じて分解することが知られている。これらの事実より、鎖状ポリリン酸は水溶液中でもラセン構造を呈しているのではないかと推測されているが、あくまでも推定の域を出ない。

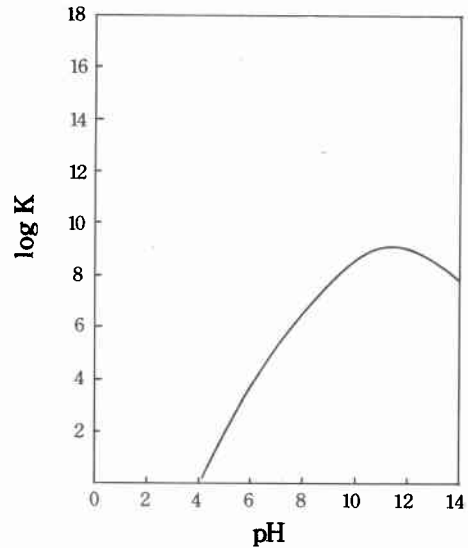
しかし、今回の結果は、鎖状ポリリン酸は水溶液中でもラセン構造をとると考えると、異なった二種類の結合群が存在することへの説明が付き易い。すなわち、 PO_4 四面体が約5個で一回りするラセン構造を呈し、その一回りの間にPの立体的位置とPからの距離のために、強い結合部位が1個存在し、さらに弱い結合部位も存在すると仮定すれば説明し易い。

最近キレート剤として最もポピュラーな EDTA-4Na が、ビ系石の直接溶解剤として *in vitro* で検討され、LPPC とその効果の面で比較されている³⁹⁾。ところが、キレート剤が最高に Ca を結合することができる時の値である安定度定数でもって比較がなされており、臨床では、生体に対する影響はもちろんであるが、キレート剤が生理的な条件下でどれだけのキレート効果を持つか、すなわち生理的 pH 範囲内における条件安定度定数が問題とされねばならない。

EDTA などのコンプレキサン型キレート剤や、クエン酸などの脂肪酸カルボン酸についてみると、これらのキレート剤のカルシウム錯体の安定度定数は測定条件により若干の差は認められるが、およそ EDTA=10.59⁴⁰⁾、NTA=6.40⁴¹⁾、DTPA=10.74⁴²⁾、クエン酸=3.16⁴³⁾ という値が知られている。

一方、長鎖長の鎖状ポリリン酸については、その単離

図13 カルシウム-EDTA 錯体の安定度定数と pH との関係⁴⁷⁾



の困難さの故にあまり研究は進んでいないが、 P_2 や P_3 を主として種々の方法でそれらの安定度定数が得られている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。

文献によれば、鎖状ポリリン酸の安定度定数は、 $P_2=5.4$ 、 $P_3=6.4$ 、 $P_4=5.93$ 、 $P_5=5.85$ 、 $P_6=6.00$ 、 $P_7=6.00$ 、 $P_8=6.01$ である⁴⁶⁾。

EDTA や DTPA などの安定度定数は、鎖状ポリリン酸のそれに比較し、はるかに大きい。EDTA-4Na がビ系石の直接溶解剤として、その臨床応用を試みられようとしているのも、このカルシウム錯体の安定度定数が、他の物質に比べて大きいということに着目されたものであろう。

しかし、図13⁴⁷⁾から明らかのように、カルシウム-EDTA 錯体の条件安定度定数は、至適 pH における安定度定数に比べてかなり低い。このように、ある限定された特殊な条件下でキレート効果を論じる場合は、安定度定数ではなく、種々の副反応を考慮した条件安定度定数が必要である。

本実験においても、pH 7.40、温度37°Cという条件では、表1、2、3に示す如く、条件安定度定数は、前記した安定度定数に比較し、かなり低い値を示した。しかも、鎖状ポリリン酸とコンプレキサン型キレート剤との間には、それらの Ca^{2+} に対するキレート効果には著明な差は認められなかった。本実験値が、各試料物質の安定度定数より、はるかに小さい値であるのは、生理的

条件に近づけたため、緩衝液として使用したトリスへの Ca^{2+} の配位や、pH が低い（中性）ための Ca^{2+} と H^+ との競合、これに加えて Ca^{2+} と Na^+ との競合などが生じているためと考えられ、これらの種々の副反応の影響を反映した値として、総合的に表現されているためと思われる。

したがって、ビス石の直接溶解剤としてキレート剤を生体に応用する場合、キレート剤が直接接触する胆汁中では、胆汁酸や脂質などの影響の他、ヒト肝胆汁の生理的条件、特に pH は無視できない重要な条件と考えられ、胆汁内条件における条件安定度定数が重要となってくる。

pH 7.40、温度37.0°Cという生理的条件下では、鎖状ポリリン酸とコンプレキサン型キレート剤との間に、条件安定度定数の差がほとんど認められないということは、ビス石の直接溶解剤としては、LPPC も EDTA-4Na も同一程度の効果を持つと考えられる。

LPPC の Ca^{2+} キレート効果を考える時、今までに報告されたこれらの毒性の結果を考慮すると¹⁶⁾⁴⁸⁾、LPPC は現在のところ最も有効な直接溶解剤の1つと考えられる。

LPPC の効果が不確実な一因として、その製造過程における加熱滅菌操作により、ポリリン酸がオルトリン酸に加水分解されることが原因であることは、すでに報告されている⁴⁹⁾。LPPC の有効性をさらに増すためには、今まではビス石がビリルビンカルシウムを主成分とする胆石であるという認識のために、単にキレート効果により Ca^{2+} を取り込むと考えられてきた LPPC が、どのような機序で、ビス石のどの部分に作用して、溶解しない崩壊をもたらすのかという問題が是非とも解決されねばならない。

しかし、今回実験に用いた全てのキレート剤の条件安定度定数が、それらの安定度定数に比べてかなり低い値で近似されることは、直接胆石溶解剤としてのキレート剤そのものの限界を示していると考えられる。

今後、さらに有効なビス石の直接溶解剤を開発するためには、ビス石をさらに詳しく分類し、混合物であるビス石の各組成に有効な直接溶解剤を開発し、多剤併用による有効性の増大を図る以外にないものと思われる。

結 語

ゲルクロマトグラフィーを用いて、鎖状ポリリン酸の鎖長とカルシウムキレート効果の関係を明らかにするとともに、鎖状ポリリン酸を含む種々のキレート剤の pH

7.4、温度37°Cにおける条件安定度定数を比較検討した。その結果、以下の結論を得た。

1) 平均鎖長10付近の鎖状ポリリン酸は、pH や濃度により、キレート効果が影響を受けにくい最低鎖長の鎖状ポリリン酸である。

2) 現在、ビス石の直接溶解剤として臨床応用されている LPPC (鎖状ポリリン酸キレート剤) の平均鎖長は9~10であり、鎖状ポリリン酸の中では最も妥当な物質である。

3) LPPC その他の鎖状ポリリン酸と EDTA などのコンプレキサン型キレート剤のキレート効果は、生理的条件下では差が認められず、ビス石の直接溶解剤としては同一程度の効果を持つ。

4) LPPC は、カルシウムキレート効果および今まで報告された毒性の点から考えて、現在のところ臨床応用には最も妥当なキレート剤である。

5) 実験に用いた全てのキレート剤の条件安定度定数が、それらの安定度定数に比べてかなり低い値で近似されることは、直接胆石溶解剤としてのキレート剤そのものの限界を示している。

本論文の要旨は、第65回および第66回日本消化器病学会総会において発表した。

稿を終るに臨み、ご校閲を賜りました恩師志村秀彦教授および直接研究をご指導戴いた五十君裕玄講師に深甚なる謝意を表わすとともに、ご協力を受けた教室員各位に深謝する。

さらには、研究生としてご指導戴いた九州大学理学部分析化学大橋茂教授、与座範政博士、宮島徹博士ならびに教室諸兄に、深甚なる謝意を表す。また、多大のご支援、ご助言を戴いた久光製薬(株)井出博之博士、中川晃博士を初め研究所の皆様のご協力を深謝する。

文 献

- 1) Glenn, F.: Retained Calculi with in the Biliary Ductal System., Ann. Surg., 179: 528—539, 1974.
- 2) 羽生富士夫ほか: 遺残結石. 臨床外科, 31: 1549—1559, 1976.
- 3) 佐藤寿雄ほか: 遺残胆石の臨床. 臨床と研究, 54: 1499—1505, 1977.
- 4) 佐藤寿雄ほか: 肝内結石症の外科的療法. 日本医師会雑誌, 63: 812—821, 1970.
- 5) 木下博明ほか: 本邦における最近5年間の肝内胆石症に関する統計的観察. 臨床外科, 31: 925—931, 1976.
- 6) 鈴木範美ほか: 遠隔成績からみた肝内結石症の

- 治療方針について。日消外会誌, 11: 764—768, 1978.
- 7) 高田忠敬ほか: 肝内結石症の病態と治療上の問題点。日消外会誌, 11: 769—774, 1978.
 - 8) 綿貫重雄ほか: 肝内結石症。手術, 22: 68—77, 1968.
 - 9) 志村秀彦: 肝内結石症。外科診療, 13: 1327—1336, 1971.
 - 10) 西村正也ほか: 肝内胆石症の外科的治療法の検討。外科治療, 21: 34—44, 1969.
 - 11) 三宅博ほか: 肝内胆石症。外科治療, 12: 101—107, 1963.
 - 12) Yamakawa, T.: Experience with Routine Postoperative Choledochoscopy via the T-tube Sinus Tract., *World J. Surg.*, 2: 379—385, 1978.
 - 13) Burhenne, H.J.: Nonoperative Instrument Extraction of Retained Bile Duct Stones., *World J. Surg.*, 2: 439—445, 1978.
 - 14) 久次武晴: 人胆石の崩壊に関する研究。医学研究, 29: 1773—1787, 1959.
 - 15) 久次武晴ほか: 胆石溶解剤の臨床—外科の立場から—。最新医学, 30: 978—985, 1975.
 - 16) 五十君裕玄: 遺残胆石の非観血的治療。臨床成人病, 6: 1257—1263, 1976.
 - 17) Personal communication
 - 18) Yoza, N., et al.: A New Method for the Colorimetric Determination of Hypophosphate Ions with the Molybdenum (V)-Molybdenum (VI) Reagent., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 37: 33—37, 1964.
 - 19) Watters, J.I., et al.: The Acidity of Triphosphoric Acid., *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 4855—4858, 1956.
 - 20) Griffith, E.J.: The Preparation of Ammonium Tetrapolyphosphate, $(\text{NH}_4)_3\text{P}_4\text{O}_{13} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 26: 1381—1383, 1964.
 - 21) 大橋茂: 縮合リン酸塩の化学。工業化学雑誌, 66: 538—542, 1963.
 - 22) Van Wazer, J.R., et al.: Analysis of Phosphorous Compounds, Automatic pH Titration of Soluble Phosphates and Their Mixtures., *Anal. Chem.* 26: 1755—1759, 1954.
 - 23) Griffith, E.J.: Analysis of Phosphorous Compounds, Rapid Hydrolysis of Condensed Phosphates in Volumetric Analyses., *Anal. Chem.*, 28: 525—526, 1956.
 - 24) Neddermeyer, P.A., et al.: Gel Filtration Behavior of Inorganic Salts., *Anal. Chem.*, 40: 775—762, 1968.
 - 25) Yoza, N., et al.: The Effect of Sample Concentration on the Gel Chromatographic Behavior of Alkaline Earth Metal Ions on Sephadex Columns., *J. Chromatog.*, 52: 329—338, 1970.
 - 26) Connerty, H.V., et al.: Determination of Serum Calcium by means of Orthocresolphthalein Complexone., *Am. J. Clin. Path.*, 45: 290—296, 1966.
 - 27) Yoza, N., et al.: The Application of Atomic Absorption Method as a Flow Detector to Gel Chromatography., *Anal. Lett.*, 6: 595—601, 1973.
 - 28) Yoza, N., et al.: Atomic Absorption Spectrophotometric Analysis of Condensed Phosphates by a Flow Detector Connected with a Gel Chromatographic Column. *Anal. Lett.*, 8: 641—653, 1975.
 - 29) Hummel, J.P., et al.: Measurement of Protein-binding Phenomena by Gel Filtration., *Biochim. Biophys. Acta*, 63: 530—532, 1962.
 - 30) Yoza, N.: Determining the Stability Constant of a Metal Complex by Gel Chromatography., *J. Chem. Education* 54: 284—287, 1977.
 - 31) Scatchard, G.: The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660—672, 1949.
 - 32) Price, P.A.: Characterization of Ca^{2+} and Mg^{2+} Binding to Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease A., *Biol. Chem.*, 247: 2895—2899, 1972.
 - 33) Griffith, E.J.: The Preparation and Properties of the Twelve-Membered Ring Hexametaphosphate Anion., *Inorg. Chem.*, 4: 549—551, 1965.
 - 34) 大橋茂ほか: リンのオキソ酸ポリマーの化学。化学の領域, 33: 434—444, 1979.
 - 35) Davenport, H.W.: Physiology of the Digestive Tract., p. 154, 4th ed., Year Book Medical Publishers Inc., Chicago, 1977.
 - 36) Watters, J.I.: The Acidity of Tetraphosphoric Acid., *Inorg. Chem.* 2: 765—767, 1963.
 - 37) Edsall, J.T., et al.: Biophysical Chemistry, Vol. I. p. 618, Academic Press, New York, 1968.
 - 38) Thilo, E.: The Structural Chemistry of Condensed Inorganic Phosphates., *Angew. Chem. internat. Edit.*, 4: 1061—1071, 1965.
 - 39) Nakamura, Y., et al.: Study on Dissolution and Disintegration of Calcium Bilirubinate Stone., *Tohoku J. exp. Med.*, 125: 121—134, 1978.
 - 40) Pollard, R.R.: Amino Acid Chelating Agents in Detergent., *Soap Chem. Spec.*, 42: 58—63, 130—135, 1966.
 - 41) Grimes, J.H.: The Stabilities of the Alkaline Earth Chelates of Some Polyaminopolycarboxylic Acids., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 25: 1225—1238, 1963.
 - 42) Chaberek, S., et al.: Interaction of Some Divalent Metal Ions with Diethylenetriaminepentaacetic Acid., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 11: 184

- 196, 1959.
- 43) Matsushima, Y.: Determination of Complex Stability Constants by Ion Exchange Method. (Extension of Schubert's Method to Lower pH Region)., *Chem. Pharm. Bull.*, **11** : 566—570, 1963.
- 44) Irani, R.R., et al.: Metal Complexing by Phosphorous Compounds. I. The Thermodynamics of Association of Linear Polyphosphates with Calcium., *J. Phys. Chem.*, **64** : 1398—1407, 1960.
- 45) Van Wazer, J.R., et al.: Metal Complexing by Phosphates., *Chem. Rev.*, **58** : 1011—1046, 1958.
- 46) Miura, M., et al.: The Stability of Calcium Complexes of Purely-separated Polyphosphate., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **37** : 1522—1526, 1964.
- 47) Ringbom, A.: *Complexation in Analytical Chemistry*, p. 52, John Wiley & Sons, New York, 1963.
- 48) Foreman, H.: Toxic Side Effects of Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid., *J. Chronic Dis.*, **16** : 319—323, 1963.
- 49) 堀岡正義ほか：胆石溶解剤として安定なヘキサメタリン酸ナトリウム液の製造法. *薬剤学*, **35**: 60—66, 1975.