

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052010

腎結石的離子化合物們

學校名稱：國立虎尾高級中學

作者： 高一 賈子寬 高一 趙家榆 高一 陳儷文	指導老師： 林孟美 陳尚民
---	-----------------------------

關鍵詞：腎結石、OD 值、抑制劑

摘要

本研究主要研究人類尿液中，腎結石中的奈米細菌(nanobacteria)是礦物結晶或細菌成長作用，使用自製分光光度計，以 OD 值的差異劃分，結果顯示奈米細菌呈現礦物結晶特徵，成分分析亦證為磷酸鈣。之後研發腎結石抑制劑時，使用自製人工尿液，以磷酸鈣 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、草酸鈣 CaC_2O_4 和尿酸($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$)為主體，分別測試維他命 C、 $(\bullet\text{OH})$ 、模擬管壁發炎、模擬尿液 pH 值變化，並觀察其結晶型態變化，結果發現模擬管壁發炎 OD 值最高 1.4，尿液 pH 值 5 時 OD 值 1.3 次之。推斷腎結石主因與管壁發炎最密切，其次是 pH 值變化，偏酸與過鹼皆易產生結晶。最後以自製的結石抑制劑比較傳統 $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$ (檸檬酸鉀) 抑制劑，本研究抑制劑 OD 值呈現較佳抑制效果。

壹、研究動機

本團隊指導老師患有嚴重腎結石，好幾次指導過程中結石痛苦的表情令人於心不忍，且常常到醫院去治療，經團隊討論決定研究腎結石議題，藉以讓老師了解結石成因，以達到預防甚至治療效果。本團隊以老師尿液為樣本以 SEM(Scanning Electron Microscope)觀察，其中發現奈米細菌(nanobacteria)蹤跡，列入研究方向，並由老師結石鑑驗報告中的草酸鈣 CaC_2O_4 、磷酸鈣 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和尿酸($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$)等成分為主體，自製分光光度計(spectrometer)，以人工尿液取代人體尿液，並計算 OD 值討論結晶成長、細菌成長與結石抑制效果。

貳、研究目的

本研究針對腎結石的特性做實驗，主要目的有下列各項：

- 一、厘清腎結石中奈米細菌的性質，並了解其在尿液中扮演的角色。
- 二、運用掃描式電子顯微鏡(SEM)、能量散射光譜儀(EDS)、穿透式電子顯微鏡(TEM)，分析 腎結石結晶的形狀、成分與結構。
- 三、使用分光光度計 (*spectrophotometer*) 比較腎結石中主要幾種成分的差異。
- 四、使用人工尿液替代人體尿液，簡化操作變因，並實驗自製抑制劑的效用。
- 五、運用實驗結果歸納出腎結石成因，並探討如何有效抑制結石發生。

參、研究設備及器材

表一、研究設備及其用途

編號	物品	數量	用途
一	筆記本、筆	1 本 2 支	實驗日記，紀錄觀察結果
二	數位相機	2 台	拍攝實驗過程
三	人體尿液	26 組	成分分析實驗用
四	人工尿液	26 組	抑制劑實驗用
五	DMEM 培養基	1 瓶	實驗用藥品
六	ethanol	2 瓶(75%)	消毒實驗藥品
七	penicillin	1 瓶	抗生素
八	Trypsin-EDTA solution	1 瓶	實驗用
九	DPBS	1 瓶	實驗用藥品
十	高溫高壓滅菌釜	1 台	實驗器材殺菌
十一	無菌操作臺	1 台	實驗過程殺菌
十二	恆溫培養箱	2 台	實驗環境溫控
十三	共軛焦顯微鏡	1 台	觀察用
十四	無菌試管	52 組	實驗器材
十五	離心機	1 台	尿液離心
十六	定量吸管(pipet)	2 支	抽取尿液
十七	電子天平	1 台	秤重
十八	二次蒸餾水	50 公升	調配與稀釋實驗藥品
十九	HCl	1 瓶	清洗器材
二十	自製分光光度計	1 台	分析生長量(沉降量)
二十一	冰桶	1 個	避免尿液在運送時滋生細菌
二十二	維他命 A	1 罐	實驗用
二十三	維他命 B6	1 罐	實驗用
二十四	維他命 C	1 罐	實驗用
二十五	紙吸管	一包	實驗操作變因
二十六	壓克力箱	一個	實驗用

肆、研究過程與方法

一、本研究過程方法的流程圖如下所示：

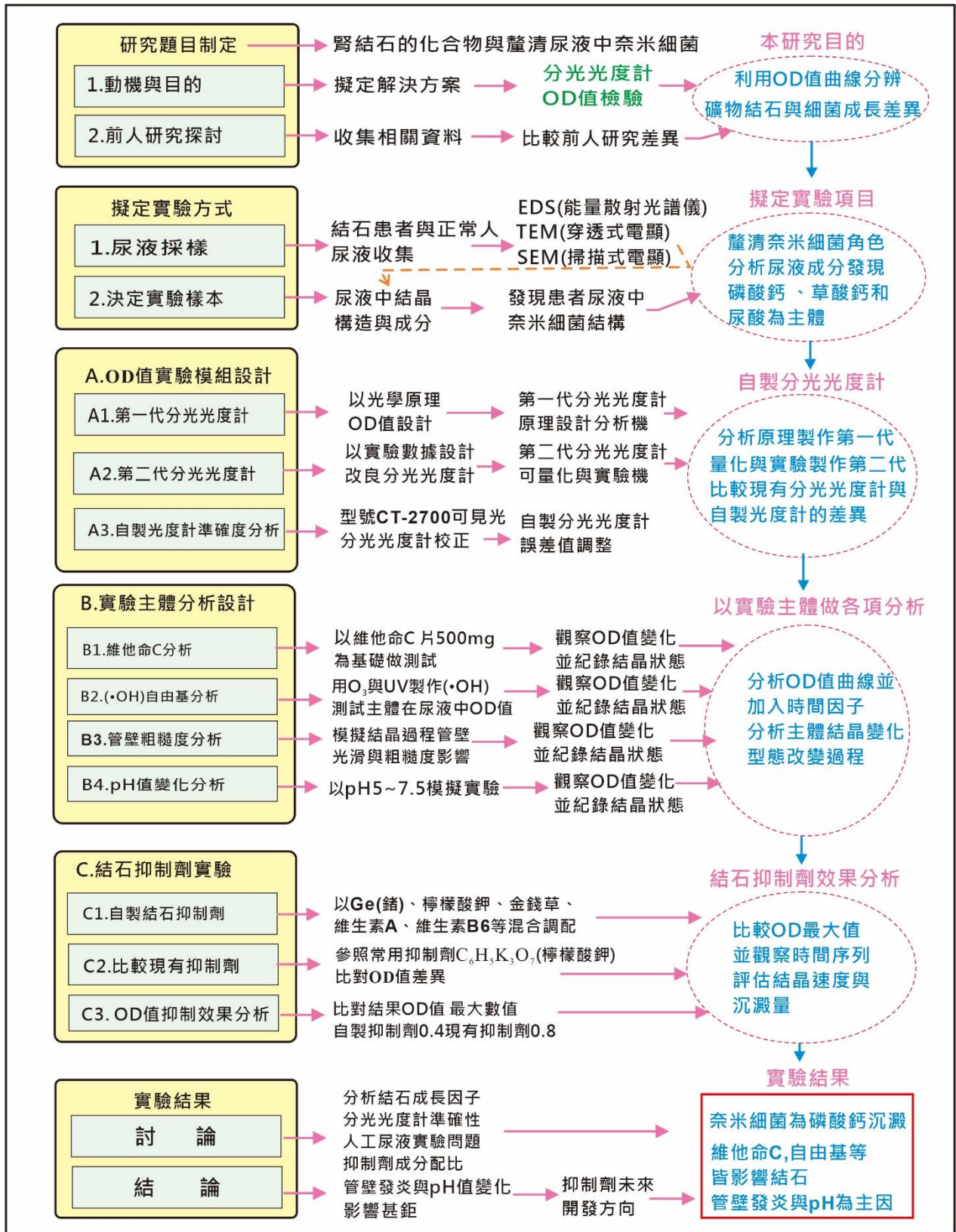


圖 1. 研究流程圖

二、前人研究文獻蒐集

(一) *Folk RL (1993)*，美國德州大學福克 (*Folk*) 用反射式電子顯微鏡 (*SEM*) 觀察義大利維特波溫泉 (*Viterbo hot springs*) 的岩石樣本，首次發現「奈米細菌」並命名為 *nannobacteria*。



圖 2. *Folk RL (1993)* 奈米細菌命名 *nannobacteria*

(二) *McKay DS, Gibson EK Jr, Thomas-Keprta KL, Vali H, Romanek CS, et al. (1996)*，在美國航太總署詹森太空中心的馬凱發表在南極洲找到的火星隕石 *ALH84001*，也有類似的奈米化石。



圖 3. 火星隕石 *ALH84001*

(三) *Ciftcioglu N, Kajander EO (1998)*，首次提出奈米細菌是一種生命形式的證據。將這種細菌命名為 *Nanobacterium sanguineum*。



圖 4. *Ciftcioglu N (1998)* 奈米細菌命名 *Nanobacterium sanguineum*

(四) *Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, et al. (2000)*，宣稱在鈣化的血管樣本裡找到的奈米細菌，不但含有 *DNA* 與蛋白質，似乎還能製造 *RNA*。

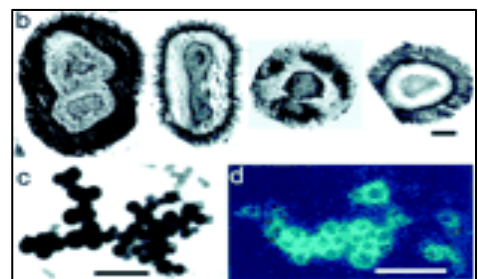
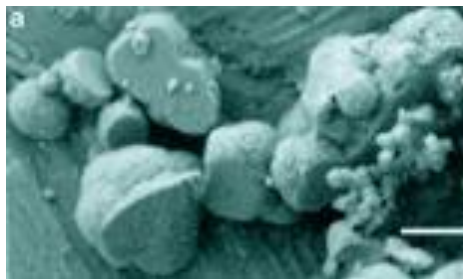


圖 5. *Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, et al. (2000)* 鈣化血管中的奈米細菌

(五) *Benzerara K, Menguy N, Guyot F, Dominici C, Gillet P (2003)*，對奈米細菌提出不同的觀點，發現常見於細胞膜的磷脂質能夠和鈣離子與磷酸結合，促進磷酸鈣晶體（羥基磷灰石，*HAP, hydroxyapatite*）的形成。



圖 6. Benzerara K, Menguy N, Guyot F, Dominici C, Gillet P (2003)提出 (羥基磷灰石, HAP, hydroxyapatite) 概念

- (六) Young JD, Martel J, Young L, Wu C-Y, Young A, et al. (2009), 楊定一教授等長庚大學團隊, 成功以血清 (serum) 混合無生命的物質製造奈米細菌, 在實驗室以 30kGy 伽瑪雷射做破壞性的照射, 證明它們不是「活」的生物體。

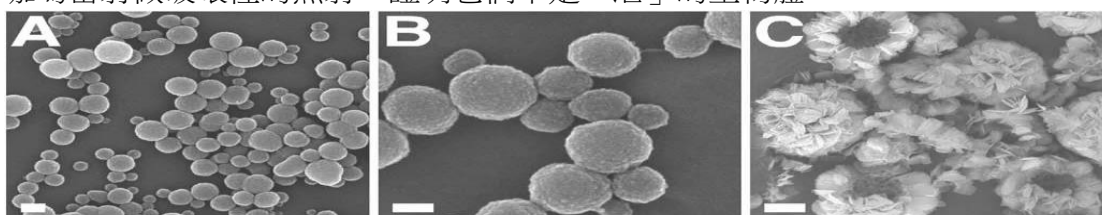


圖 7. Young JD, Martel J, Young L, Wu C-Y, Young A, et al. (2009)證明奈米細菌非活體

- (七) 喻堅忍(2007)某些巨噬細胞會因草酸鈣結晶而產生特定介白素, 引起急性或慢性發炎反應, 但實驗驗證後, 發現和前人做過的介白素 SNP 位點沒有太大的關聯性。但被培養的人體腎臟細胞顯露在草酸鈣結晶時, 位於近端小管的皮膜細胞也會受到損傷, 因此發炎反應應該會在腎結石患者的身上產生。
- (八) 黃鶴翔(2002)自由基和草酸鈣對腎臟傷害可能有關。使用腎臟灌流方法去尋找和定位自由基在腎臟標本中生長的位置及數量多寡。當草酸鹽對腎小管造成傷害時, 會伴隨著自由基的成長, 因此草酸鈣結石會很明顯的出現在腎臟內。

伍、 研究結果

一、 研究實體分析

(一) 尿液收樣

尿液大量收集會造成個體差異大, 再加上主要目的針對老師的腎結石為重點, 因此腎結石實驗樣本主要收集老師的尿液, 且為了比較正常人差異, 再收集了一份正常人尿液, 並且在老師的體檢報告中可以看到大致上為草酸鈣結石、磷酸鈣結石及尿酸結石, 因此三者為主要觀察對象。



本研究尿液收集步驟如下所示：

1. 準備試管 3 支、塑膠杯 2 個、滴管 2 支、保冷箱一個
2. 試管、塑膠杯及滴管放入保冷箱中冷藏，避免細菌滋生。
3. 請受測者將實驗樣本置入塑膠杯中。
4. 使用滴管將塑膠杯中的樣本吸取並且置入 2 支試管中。
5. 將一份樣本放入保冷箱中保存，另一份放入實驗室冰箱中保存。
6. 製作一份人工尿液(比照下表(K))。
7. 將人工尿液與其中一份樣本一同放入保冷箱中保存，並且請化驗室檢驗草酸根磷酸根含量。



圖 9. 實驗保冷箱



圖 10. 收集尿液後的保存狀況



圖 11. 人體尿液收集

表 2. 人工尿液成分與劑量

成分	濃度(mM)
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	4.76
NH_4Cl	21.36
KCl	40.05
CaCl_2	2.46
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.81
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.85
NaCl	54.95
Urea	98.52
Uric acid	0.49
Creatinine	1.97
$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	0.48

(二) 尿液成分分析

將尿液送檢後，將另一份放置在冰箱中的尿液取出，使用自製分光光度計測量，每三分鐘測量一次 OD(optical density)值，並且再製作一份人工尿液予以比較。

步驟：

- 1.將樣本冰置一天
- 2.將冰置一日的樣本取出
- 3.將樣本放入恆溫箱中，模擬人體溫度 37°C，放置一個鐘頭
- 4.測量樣本 OD(optical density)值
- 5.每隔三分鐘重複一次步驟 3.
- 6.作人工尿液 100ml
- 7.以人工尿液為對象仿照步驟 3.~4.

(三) 腎結石患者尿液收集與尿液成分分析結果

將送檢樣本取回，並且得到如下表(K)的成分分析，從結果可看出腎結石患者臨酸鈣、草酸鈣含量為常人的數倍，而為飽和濃度的 10 倍以上，文獻提到雖然機制不明，但一般人體內的磷酸鈣結石與草酸鈣結石通常飽和濃度，卻不會析出，而要達到飽和濃度的十倍以上才會析出。

表 3.人體尿液與人工尿液化驗結果

項目 \ 化驗項目	磷酸鈣	草酸鈣	磷酸根	草酸根	鈣離子
人體尿液 (患者)	0.0339g/100 ml	0.00725g/100ml	0.145g/100ml	0.0254g/100 ml	0.012g/100ml
人工尿液	0.0124g/100 ml	0.00405g/100ml	0.100g/100ml	0.0145g/100 ml	0.009g/100ml
人體尿液	0.0145g/100 ml	0.00301g/100ml	0.092g/100ml	0.0122g/100 ml	0.007g/100ml

上表(3)可看出人體的尿液中，草酸根含量遠高鈣含量，因此主要決定結石與否的為鈣含量。除此之外，腎結石患者的草酸鈣與磷酸鈣含量也遠高於常人。

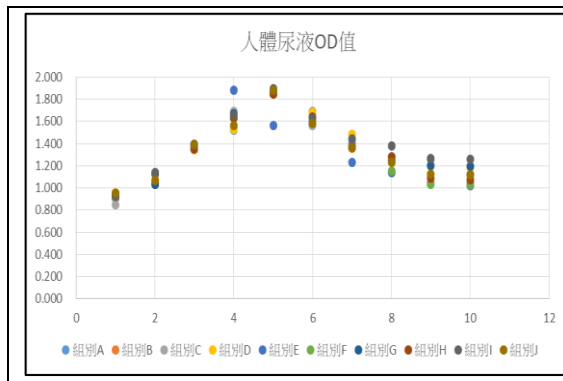


圖 12. 人體尿液 OD 值變化

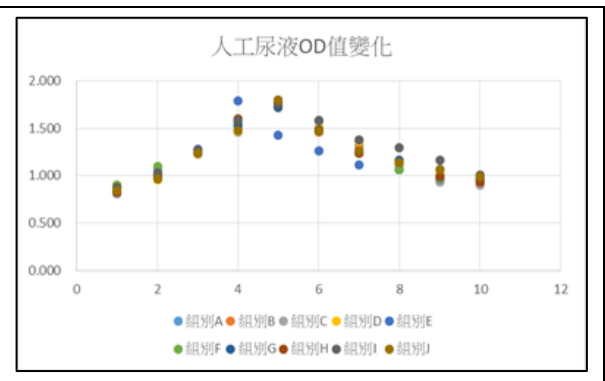


圖 13. 人工尿液 OD 值變化

於圖(12)及(13)中可以看出人體尿液與人工尿液 OD 值的成長曲線為先快速上升，後緩慢下降，此種 OD 值很類似於礦物結晶，而以(實驗 G1)比較人工尿液 OD 值上升與加入生物的 OD 值變化。

(四) 加入酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的人工尿液與一般人工尿液 OD 值變化

於前研究尿液成分分析中發現人體尿液與人工尿液的 OD 值曲線近似於倒 V 字形，此種曲線類似於礦物結晶曲線，而與生物成長曲線有所不同，因此在人工尿液中加入生物(B)予以比較。

步驟：

1. 依照表(K)製作人工尿液 100ml
2. 分別將人工尿液各 50ml 裝入兩支試管中
3. 將其中一管人工尿液加入少量生物(B)
4. 將兩管人工尿液都加入培養基中，放入實驗室冰箱中保存一日
5. 將實驗室冰箱中的人工尿液取出，放入恆溫箱保存一個鐘頭
6. 將兩管實驗樣本皆取出，使用自製光譜儀測量 OD 值變化

(五) DMEM 培養基調配過程如下(在室溫下進行)：

1. 使用二次蒸餾水製作超純水



圖 14. 尿液觀察培養器具



圖 15. 二次蒸餾水

2. 使用電子天平秤取所需重量之乾粉培養基（使用前須先鋪紙再歸零）
3. 將乾粉培養基加入約最終體積一半的三蒸水中，並加以攪拌使之完全溶解（此時呈現橘色）。
4. 根據指示加入碳酸氫鈉（3.7g/1000ml）培養基並均勻攪拌，DMEM 變成紫紅色



圖 16. DMEM 調配情形

5. 加水到所需總體積，再用 IM 的氫氧化鈉和氫氯酸使 pH 值歸回 7.0，以 0.22 微米的濾膜過濾殺菌，並分裝於無菌的試管中，放入 4°C 冰箱保存（pH 值會上升 0.1 到 0.3）



圖 17. DMEM 過濾情形

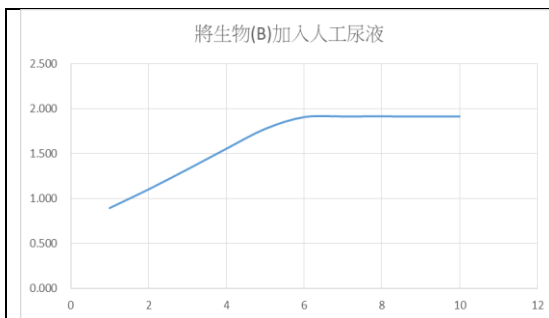


圖 18. 加入酵母菌的人工尿液 OD 值變化圖

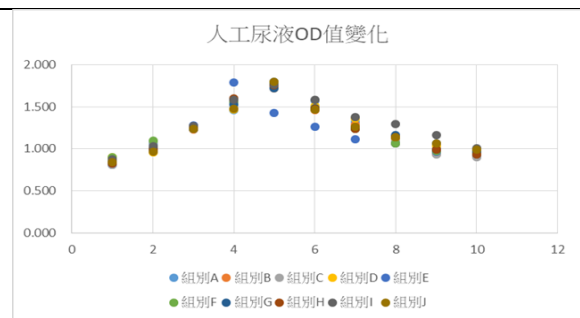



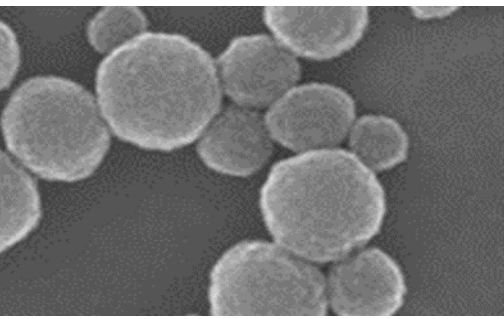




圖 19. 未加入生物的人工尿液 OD 值變化

由上圖 18 中可以看到加入酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的人工尿液 OD 值變化曲線為上升後動態平衡，此為生物的生長曲線，由此可知奈米細菌，不為生物種。因生物中的生長曲線應似於 J 字形。而按照楊定一教授的說法，奈米細菌應為磷酸鈣。因此本研究以多種儀器測量分析奈米細菌的結構。

(六) 以顯微鏡觀察是否加入酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的人工尿液內部成分結構

因證實了奈米細菌非微生物種，而須觀察其結構作為比較，使用了掃描式電自顯微鏡(SEM)、穿透式電自顯微鏡及能量散射光譜儀(EDS)觀察未加入生物的人工尿液(樣本 2)的結構，並且比較生物結構與非生物結構的差異性。

1. 觀察樣本的結構

	
<p>圖 20. 掃描式電子顯微鏡</p>	<p>圖 20-1. 樣本 2 掃描式電子顯微鏡照片</p>
	
<p>圖 21. 穿透式電子顯微鏡</p>	<p>圖 21-1. 樣本 2 穿透式電子顯微鏡照片</p>
	
<p>圖 22. 生物顯微鏡</p>	<p>圖 22-1. 樣本 1 結構</p>

由圖 20-1 以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察奈米細菌，可發現其外型由球狀變成花瓣狀或扇葉狀，這是因為培養液中的蛋白質用盡，結晶作用佔優勢，在表面

長出針狀突起，最後結構崩塌行成花瓣狀或扇葉狀。而由穿透式電子顯微鏡觀察奈米細菌，可發現奈米細菌隨時間成長會逐漸變的不透明，是因為奈米細菌吸附蛋白質等有機物，使其結構變的小而緻密，中央的孔洞構造也被填滿。由圖可以看出樣本 1 的照片同一般的微生物樣貌，而與奈米細菌的結構有大差異。與一般培養皿培養出的生物結構相同，而可證實奈米細菌確實不為生物，而是礦物結晶，但此次實驗使用特定人的尿液，而不保證與其他人相同。

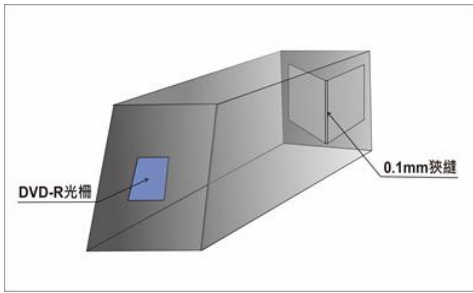
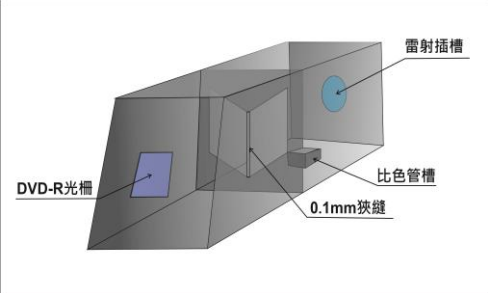
二、光譜密度 OD (optical density)值實驗模組設計-實驗 A

OD 值使用分光光度計，製作原理為 Beer-Lambert Law。當光穿透樣品溶液時，光的吸收度 (A) 與吸收係數 (α)、光徑長 (l)、濃度 (c) 三者均呈正比： $A=\alpha lc$ ，其中 α 為吸收係數 (absorptivity)，亦可稱為消光係數 (extinction coefficient, k)。常見的 Beer-Lambert Law 表示方法為： $A=\epsilon bc = \log \frac{1}{T} = -\log \frac{I_{透}}{I_{入}}$ ，T 為吸收率， $I_{透}$ 為透射光強度， $I_{入}$ 為入射光強度。

(一) 第一代分光光度計製作-實驗 A1

分光光度計原理為白光可透過三稜鏡分光而形成多色之光譜。亦可利用光柵分光展開光譜。光譜儀是在特定波長範圍來測量來源光線的設備。

1. 繪製設計圖

名稱	一代分光光度計製作	一代分光光度計修正
圖片		

說明	光由右側經狹縫射入，再經左側光柵繞射後射出，出現光譜	光由右側射入後，經比色皿，再經狹縫，最後經由左側光柵繞射後射出，出現光譜
備註	因為無法將比色皿置入，所以無法固定距離，且因比色皿在裝置外，必須在暗室中執行，但較為簡便	可將比色皿置入其中，且裝置可密封，所以在各處皆可使用

圖 23.第一代分光光度計設計圖

2. 選擇光柵

- (1) 以最下層 DVD 片的內側作為光柵的光譜儀能產生較好的光譜（分辨 DVD 的內外側要看表面有無凸起，凸起的是外側）。
- (2) 用最下層 DVD 片的外側所製作的光譜儀幾乎不能產生光譜，但在切割前卻可以，可能是在固定時塗抹白膠的動作會破壞內側的光柵，如果固定時只在 DVD 片的邊緣塗上白膠就能看見光譜。因為步驟複雜又較難製作，所以不建議使用。
- (3) 實驗後我們發現 SONY 的 DVD 片很難將鋁層去除，但如果成功去除鋁層後，SONY 的 DVD+R 能拍出最好的日光燈光譜。
- (4) 製作成光譜儀後效果較佳的 DVD 片，照射光線後能反射較多的光線，產生的光譜也較清晰。

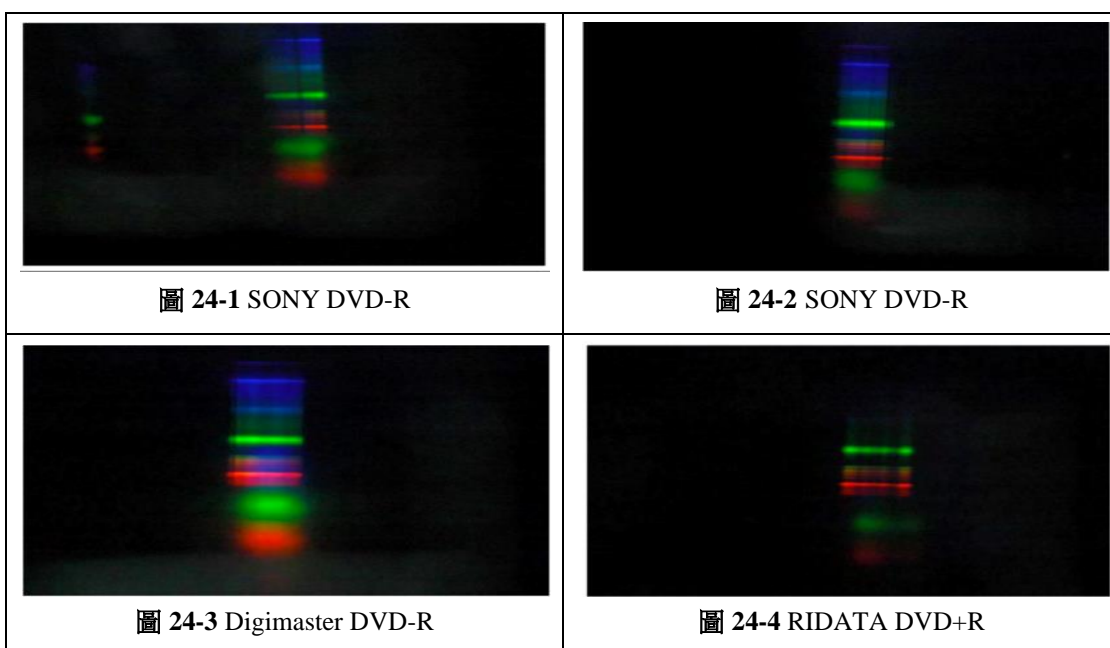


圖 24 各式光柵所拍攝出的光譜圖

3. 計算光柵角度

本研究設定觀看的光譜是第一級的繞射光譜，所以 $m=1$ 。在 DVD-R的溝，是每mm有1350條，所以溝距是740nm，旋轉光柵至繞射角為 0° ，這時可由光柵的法線處觀測到第1級繞射的光譜，同樣地以DVD-R光柵及波長為550nm綠光為例，利用光柵方程式，當繞射角為 0° 時，光柵順時針旋轉了 36.6° 。

(二) 製作第二代分光光度計-實驗 A2

1. 光源設計

本研究主要以可見光波段 550nm 做分析，使用鹵素燈(Tungsten Halogen)為光源，其波段範圍 320~1100nm。



圖 25.實驗用鹵素燈(本研究設計)

2. 入射狹縫與反射鏡設計

光線先經過狹縫與反射鏡，產生如同太陽光束的平行光，照射到光柵上。

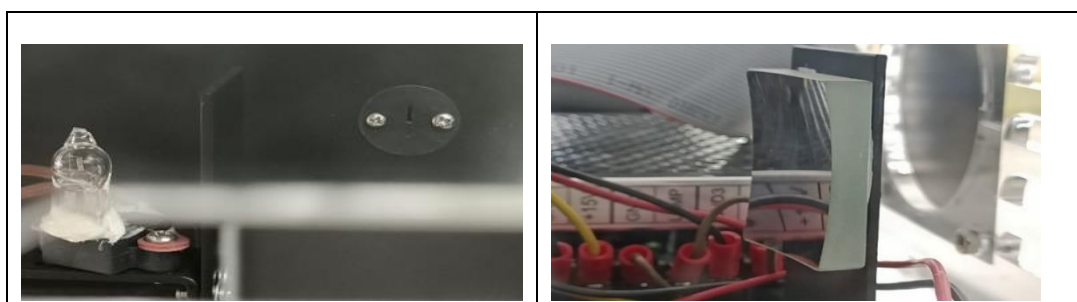


圖 26. 入射狹縫與反射鏡元件圖(本研究設計)

3. 光柵

一種利用光的繞射原理所設計的光學分光元件。光柵的表面做成微小的鋸齒狀，用來將混合波長的原始光線(白光)，分散成色光。早期的分光光度計，是使用三稜鏡來分光，如今三稜鏡被更精密穩定的光柵所取代。

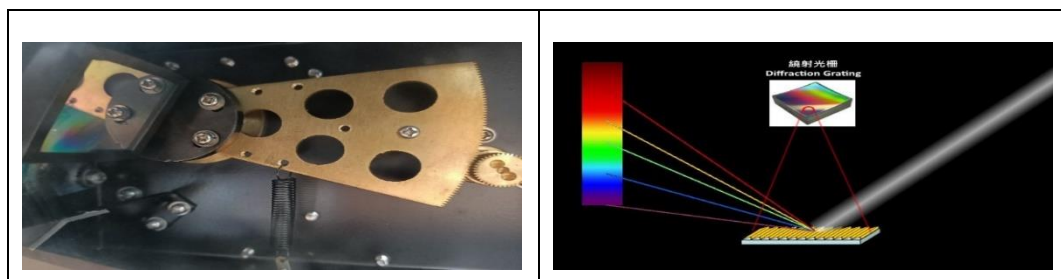


圖 27. 光柵元件圖(本研究設計)

4. 準直鏡、射出狹縫

分光後的色光，像扇子一樣展開，透過準直鏡旋轉角度，可以讓某個波長的色光，對準在射出狹縫上，並經過濾光片，產生純淨的單一色光。濾鏡設置的位置順序，各家廠商的設計不盡相同。



圖 28. 準直鏡、射出狹縫元件圖
(本研究設計)

5. 其他配件

包含比色管、比色座、光譜波段轉盤、電源供應器、控制晶片等，如下所示：



圖 29. 比色管座



圖 30. 測試波段轉盤

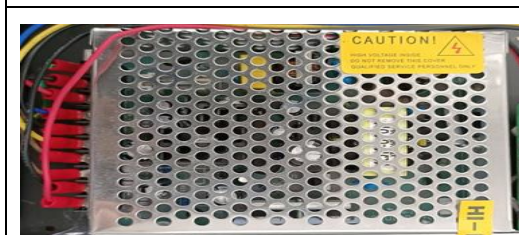


圖 31. 電源供應器



圖 32. 控制晶片

6. 設計組裝完成品

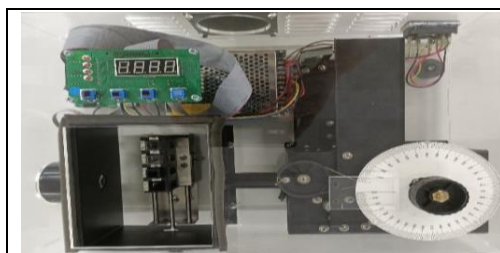


圖 33. 比色管元件位置

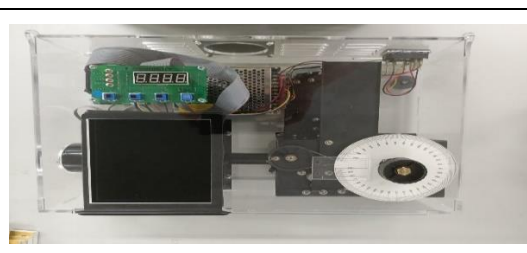


圖 34. 暗箱元件設計

(三) 自製分光光度計 DO 值比對-實驗 A3

本研究自製分光光度計與實驗室中，型號 CT-2700 可見光分光光度計計算同樣樣品 OD 值，結果顯示線性回歸 R 值正相關性達 0.91。



圖 35-1. 型號 CT-2700 可見光分光光度計

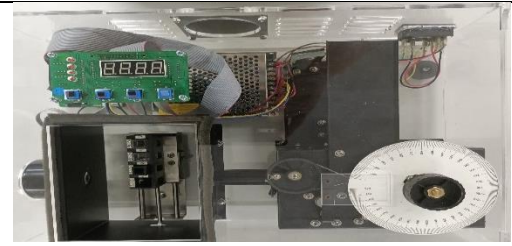


圖 35-2 本研究自製分光光度計

圖 35. 分光光度計(spectrophotometer)比較圖

三、實驗主體分析設計-B

本研究以磷酸鈣、草酸鈣、與尿酸為主體，分析以下物質對主體的影響程度：

(一) 維他命 C 對於腎結石的影響-B1

部分醫生認為多喝礦泉水會造成腎結石的形成機率增加，理由是礦泉水中富含豐富的礦物質，礦物質的沉澱將有助於結石的產生，但是另一方面而言，維他命 C 也是常見的保健食品，十分不符合人的印象，維他命 C 因是水溶性礦物質，而大多數人認為不會對身體產生副作用，但是卻有一定的影響。因此採用將維他命 C 加入人工尿液中的方式，測量其對於 OD 值的影響。

<p>步驟：</p> <p>(1) 製作人工尿液 150c.c.的人工尿液</p> <p>(2) 將人工尿液每管 10c.c.裝入試管中</p> <p>(3) 以每管 500mg 的劑量，將維他命 C 加入人工尿液中</p>	<p>(4) 將樣本放入保冷箱中一日</p> <p>(5) 將樣本放入恆溫箱中模擬人體溫度 37°C，一個小時</p> <p>(6) 將樣本取出搖晃，測量 OD 值</p>
--	--

由圖中可以看出加入了維他命 C 的人工尿液的 OD 值確實比一般的人工尿液高，但是若是不攝取過量的維他命 C，對身體應該不會有過大的負擔。但若攝取過多，則會增加腎結石的機率。

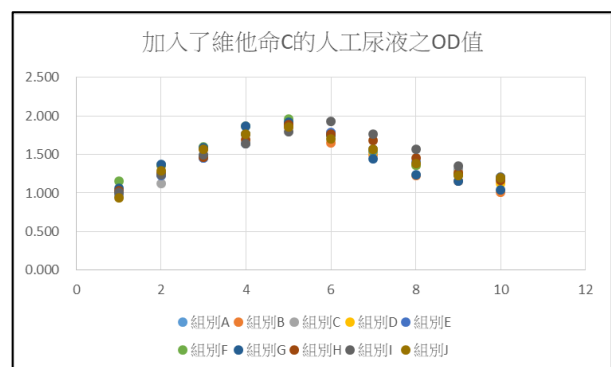


圖 36. 加入維他命的 OD 值圖

(二) 管壁結晶對於腎結石的影響-B2

1. UV 膠對比較一般試管 OD 值差異。

某些巨噬細胞會因草酸鈣結晶而產生介白素，引起發炎反應(編碼)。若反過來說，發炎反應會不會使草酸鈣結晶形成呢?因此本實驗想模擬管壁發炎，以分光光度計測量 OD 值，並觀察發炎反應是否會讓草酸鈣結晶增加。而發炎反應會引起的表面變化就是造成外表的突出、不平，此種構造容易吸附物質，請見(實驗 G)。試管均為近圓柱狀，若要仿效突出結構，只能再將內層加突出帶，最理想能夠方便且決定突出程度的為將內層塗上膠狀，而因為顏色會對於 OD 值有大影響，所以必須為透明的，可用保麗龍膠或 UV 膠等，而 UV 膠因為性質關係，較好控制，除此之外紫外線燈照可以讓 UV 膠可以快速乾。因此方式為塗 UV 膠，以紫外線燈照射，用光譜儀照測試是否有塗 UV 膠的 OD 值差異，確定無差異，才能做實驗。

實驗步驟如下: (1) 將一支試管內側塗滿 UV 膠，盡量抹成凹凸狀 (2) 以紫外光照射試管，待 UV 膠乾掉	(3) 將兩支試管都裝入水 (4) 將裝著乾 UV 膠的試管與一般試管放入自製光譜儀中測量 OD 值
--	---

測量結果為塗了 UV 膠的試管的 OD 值為 0.020，而沒有塗 UV 膠的試管 OD 值為 0.018，並沒有大差異，符合先決條件，而可進行下一步實驗。

2. 發炎反應對於草酸鈣或磷酸鈣晶體的結晶程度影響

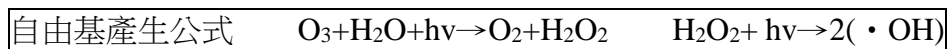
發炎後的管壁是否對於晶體附著有所影響，需透過構造差異來比較，因此按照前述，須將試管塗抹 UV 膠，並且在當中裝置人工尿液，測量 OD 值，比較其與一般光滑試管對於草酸鈣或磷酸鈣結晶的影響。

<p>步驟:</p> <p>(1) 將 10 支試管內側塗滿 UV 膠</p> <p>(2) 以紫外光照射試管，待 UV 膠乾掉，並且準備另 10 支光滑試管</p> <p>(3) 20 支試管皆倒入尿液，裝至七分滿</p> <p>(4) 放入保冷箱中一日</p>	<p>(5) 將 20 試管均取出，並且放入恆溫箱，模擬人體溫度 37°C 放置一個鐘頭</p> <p>(6) 先將所有試管取出</p> <p>(7) 搖晃一下</p> <p>(8) 放入光譜儀中測量 OD 值變化</p>
<p>塗抹UV膠</p> <p>圖 37.塗抹 UV 膠 OD 值變化</p>	<p>未塗抹UV膠</p> <p>圖 38 未塗抹 UV 膠試管 OD 值變化</p>

從圖(N)到圖(N)當中可以看出塗抹 UV 膠的試管的 OD 值上升較快，因此可知粗糙表面確容易造成結晶的附著，因此 OD 值上升快。

(三) 自由基對於腎結石的影響-B3

文獻以發炎反應，促成自由基的形成，形成的自由基會對腎臟造成顯著的傷害，並且提到因為腎小管上方皮膜的剝落，碎片會使結晶機率提升。而若是以處理汗水的角度來看，許多處理汗水法，當中會使用自由基，據其說法是自由基會勾附其他物質，使物質沉澱，因此有可能造成物質的沉澱。礙於技術，無法確定是否因腎小管的管壁剝落而造成容易聚集。



<p>步驟</p> <p>(1) 使用 UV 配合臭氧產生含氫氧自由基水</p> <p>(2) 步驟 2.製成人工尿液 150c.c.</p> <p>(3) 步驟 3.將自由基加入人工尿液中</p>	<p>(4) 將人工尿液放入冰箱中冷藏一日</p> <p>(5) 將樣本取出放入恆溫箱中一個鐘頭</p> <p>(6) 將試管取出搖晃，將樣本放入光譜儀中測量 OD 值變化</p>
---	--

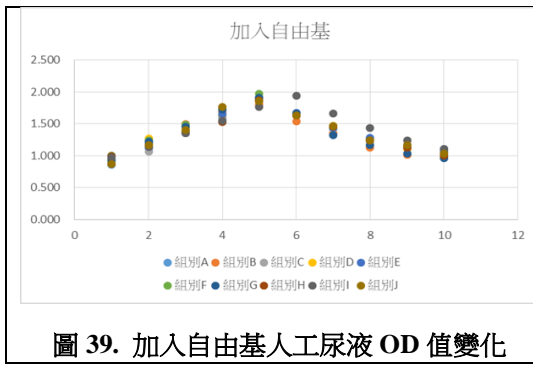


圖 39. 加入自由基人工尿液 OD 值變化

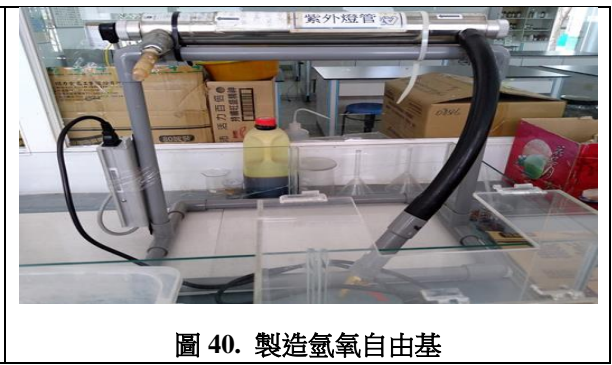


圖 40. 製造氫氧自由基

從圖 39 當中可以看出加入了氫氧自由基的人工尿液的 OD 值確實有較高的趨勢，而因為沒有管壁所以沒剝落影響，可證實因氫氧自由基勾附的說法，而若是因管壁脫落造成的影響，仍須為未來技術證明。

(四) 加氫水對於自由基的抑制影響-B4

外面有市售著加氫水，據傳聞能夠抑制腎結石，而若以自由基的角度而言，或許是兩者發生了化變。因此我們想將加氫水放入含有自由基的人工尿液中，測量其 OD 值變化，以測試抑制效果。

<p>步驟</p> <p>(1) 步驟 1.製作人工尿液 150c.c.</p> <p>(2) 步驟 2.將人工尿液放入冰箱中冷藏</p> <p>(3) 步驟 3.使用 UV 與臭氧製作含氫氧自由基的水</p> <p>(4) 步驟 4.將含自由基本加入人工尿液中</p> <p>(5) 步驟 5.將樣本放入冰箱中冷藏一日</p> <p>(6) 步驟 6.將樣本放入恆溫箱中，模擬人體 37°C，放置一個鐘頭</p>	<p>(7) 步驟 7.將試管取出搖晃，使用光譜儀測量 OD 值變化</p> <p>(8) 步驟 8.製作人工尿液 150c.c.</p> <p>(9) 步驟 9.將加氫水置入人工尿液中</p> <p>(10) 步驟 10.將人工尿液放入冰箱中冷藏一日</p> <p>(11) 步驟 11.將人工尿液放入恆溫箱中，模擬人體 37°C 放置一個鐘頭</p> <p>(12) 步驟 12.將試管取出搖晃，使用光譜儀測量步驟 8.~步驟 11.的人工尿液的 OD 值變化</p>
---	--

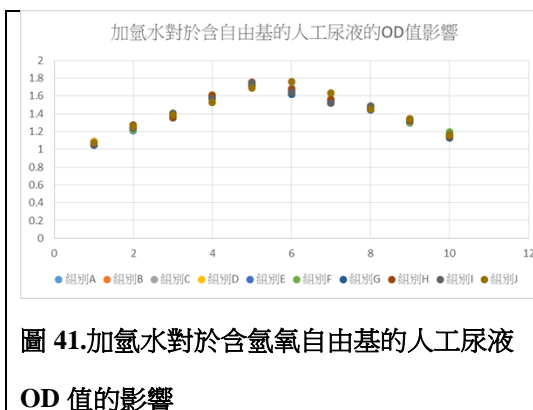


圖 41.加氫水對於含氫氧自由基本的人工尿液 OD 值的影響

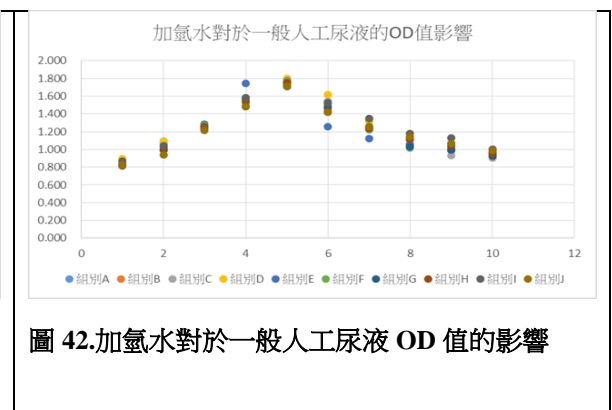
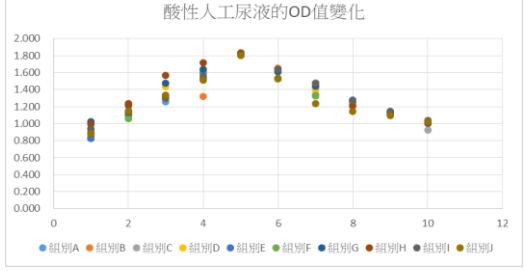
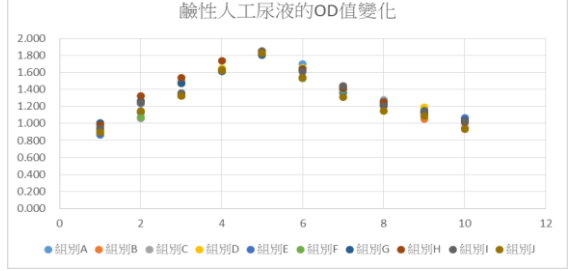


圖 42.加氫水對於一般人工尿液 OD 值的影響

從圖 41 當中可看出加氫水著實對於 OD 值有影響力，在加有氫氧自由基的人工尿液中，可以看到 OD 值不同純粹加氫氧自由基水的人工尿液的 OD 值，OD 值更低，但是若加於一般人工尿液中，則不會使 OD 值變化太大，與以往的人工尿液沒有太大的差別。

(五) pH 值對於 OD 值的影響-B5

腎結石主要為草酸結石，而人類的尿液為弱酸，若過於酸，則會造成腎結石容易形成，那若鹼或者中性呢?我們好奇其影響力，而以弱鹼物質及弱酸物質加入人工尿液中微調 pH 值，測量 OD 值差異。

<p>步驟：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 製作人工尿液 250c.c 2. 將樣本放入冰箱中冷藏 3. 將人工尿液各 10c.c.置入 20 支試管中 4. 製作 1M 氫氧化鈉水溶液 30c.c.及 1M 鹽酸水溶液 30c.c. 	<ol style="list-style-type: none"> 5. 將各 2c.c 的氫氧化鈉置入 10 支試管中 6. 將各 2c.c.鹽酸水溶液置入十支試管中 7. 將 20 支試管皆放入冰箱中冷藏 1 日 8. 將試管取出放入恆溫箱中模擬人體溫度 37°C放置一個鐘頭 9. 將樣本取出搖晃，測量其 OD 值變化
 <p>酸性人工尿液的OD值變化</p>	 <p>鹼性人工尿液的OD值變化</p>
<p>圖 43. 酸性人工尿液對的 OD 值變化</p>	<p>圖 44. 鹼性人工尿液的 OD 值變化</p>

四、結石抑制劑實驗-C

腎結石得病率在世界人口約有十分之一，由此可得知腎結石是一易得疾病，因此也衍伸出了許多的治療方法，當中不乏藥物、藥草，而若可以透過測試沉澱量比較抑制效果，在未來則能夠有效遏止腎結石患者患病情形惡化，除此之外，若是能夠透過混合抑制劑方式，達到抑制劑效果增強，則能更有效治療腎結石患者。

(一) 自製結石抑制劑-C1

本研究使用不同的抑制劑，配合人體尿液與人工尿液，測量其 OD 值變化，進而得知吸光值、透光率多寡，作為測量沉澱量的標準。本此主要自製的抑制劑成分為檸檬酸鉀、維生素 A、維生素 B6、鋅、金錢草，檸檬酸鉀被認為是當中效

果最好，而金錢草主要用在中醫的藥中，為一種傳統用法，因為沒有太多的論文證，效果還須經測量而知。配置自製抑制劑，經過多種比例調和，測量出效果最佳的自製抑制劑，而採取此種自製抑制劑比較其他種類抑制劑。

<p>步驟：</p> <p>(1) 準備抑制劑各 100c.c.並且放入冰箱中冷藏</p> <p>(2) 按照表(N)配置 650c.c.的人工尿液</p> <p>(3) 將人工尿液以滴管吸取 10c.c. 60 管放入共放入量筒中</p> <p>(4) 以量筒測量計量至 10c.c.共 60 管</p> <p>(5) 將不同的抑制劑以每管 5c.c.各加入 10 支試管中</p> <p>(6) 將所有試管放入保實驗室冰箱中保存一日</p> <p>(7) 將所有試管放入恆溫箱中，模擬人體溫度 37°C，放置一個鐘頭</p> <p>(8) 待時間過去後一管一管取出</p>	<p>(9) 搖晃試管使其內物質均勻分散</p> <p>(10) 將試管放入自製光譜儀中測量</p> <p>(11) 研究室分光光度計與自制分光光度計測量差異</p> <p>(12) 重複步驟 7.~步驟 9.</p> <p>(13) 製作 150c.c.人工尿液</p> <p>(14) 將人工尿液各 10c.c.十組置入試管中</p> <p>(15) 於冰箱中保存一日</p> <p>(16) 將試管放入恆溫箱中，模擬人體溫度 37°C，放置一個鐘頭</p> <p>(17) 搖晃試管使其內物質均勻分散</p> <p>(18) 試管放入自製分光光度計中測量</p> <p>(19) 數據紀錄</p>
--	---

表 4.使用抑制劑

項目	化學式/學名	編碼
鍺	Ge	試管 A-J
檸檬酸鉀	$K_3C_6H_5O_7$	試管 A2-J2
維生素 A	$C_{20}H_{30}O$	試管 A3-J3
維生素 B6	$C_8H_{11}NO_3$	試管 A4-J4
金錢草	<i>Lysimachia christinae</i>	試管 A5-J5
自製配方		試管 A6-J6

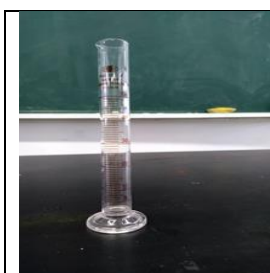


圖 45. 量筒



圖 46. 抑制劑滴入



圖 47. 尿液滴入



圖 48. 人工尿液

(二) 各抑制劑 OD 值比較-C2

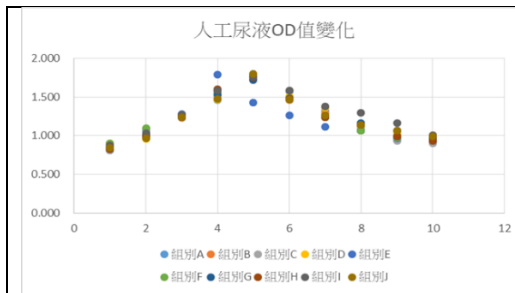


圖 49. 未加抑制劑的人工尿液 OD 值變化

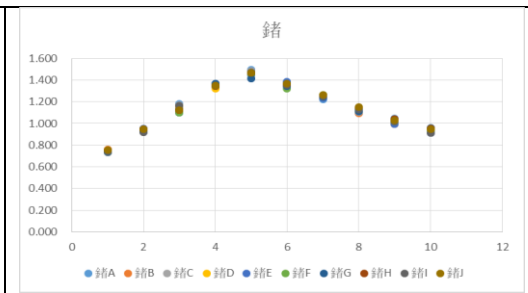


圖 50. 試管 A-J 的 OD 值變化

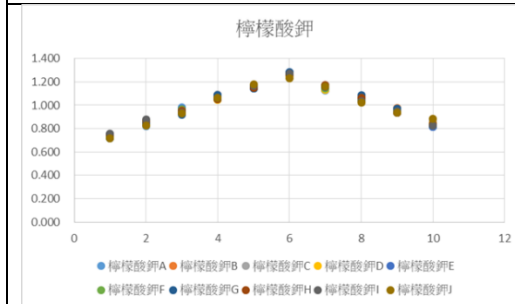


圖 51. 試管 A2-J2 的 OD 值變化

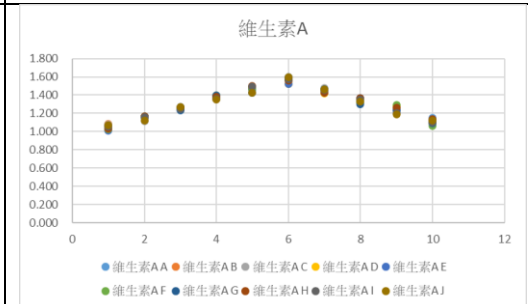


圖 52. 試管 A3-J3 的 OD 值變化

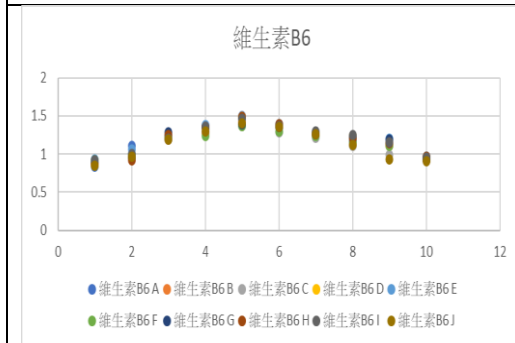


圖 53. 試管 A4-J4 的 OD 值變化

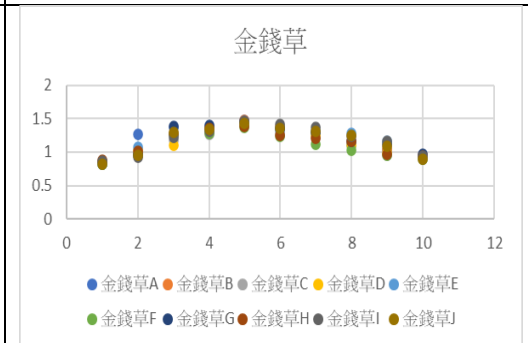


圖 54. 試管 A5-J5 的 OD 值變化

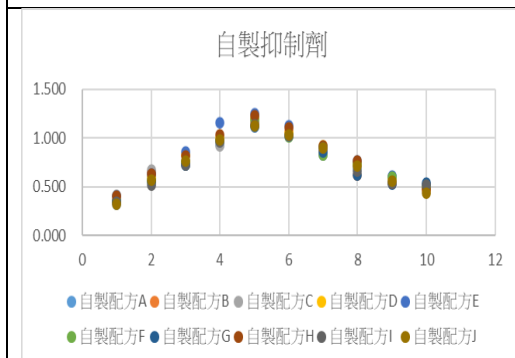


圖 55. 試管 A6-J6 的 OD 值變化

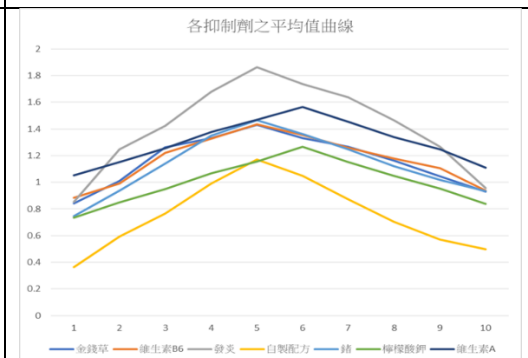


圖 56. 加入各抑制劑的人工尿液平均 OD 值

由上圖可看出即使加了抑制劑，OD 值曲線依舊是快速上升後緩慢下降。

以上圖 49 至圖 56 顯示了除了自製抑制劑外，檸檬酸鉀的效果最為顯著，自製

抑制劑效果遠高於其他種類抑制劑，而其他抑制劑雖有抑制劑效果，卻遠不如檸檬酸鉀與自製抑制劑。而是否是因為劑量關係?為了探討這個問題，設計了(實驗 G)，(實驗 G)將各抑制劑以 1 : 2 : 3 : 4 : 5 的劑量加入微量人工尿液中。

(三) 抑制劑劑量對於人工尿液 OD 值變化的影響-C3

因前實驗皆使用了大量抑制劑，而效果明顯，但若是僅使用微量呢?將各抑制劑以 1 : 2 : 3 : 4 : 5 的劑量加入人工尿液中，並且以每個濃度單一抑制劑十組的大量數據比較 OD 值變化，而得知劑量對於抑制效果，而試管編號如下表 5.

<p>步驟：</p> <p>(1) 配置出各抑制劑 20c.c.，放入冰箱中冷藏</p> <p>(2) 按照表(N)配置人工尿液 350c.c.</p> <p>(3) 將人工尿液以 1c.c.置入盒中 50 個格子中，並且加入 0.1c.c.、0.2c.c.、0.3c.c.、0.4c.c.、0.5c.c.的檸檬酸鉀水溶液置入盒中</p> <p>(4) 將配置好的液體放入冰箱中放置</p> <p>(5) 將人工尿液以 1c.c.置入盒中 50 個格子中，並且加入 0.1c.c.、0.2c.c.、0.3c.c.、0.4c.c.、0.5c.c.的鍺水溶液置入盒中，並重複步驟 4.</p> <p>(6) 將人工尿液以 1c.c.置入盒中 50 個格子中，並且加入 0.1c.c.、0.2c.c.、0.3c.c.、0.4c.c.、0.5c.c.的維生素 A 水溶液置入盒中，並重複步驟 4.</p>	<p>(7) 將人工尿液以 1c.c.置入盒中 50 個格子中，並且加入 0.1c.c.、0.2c.c.、0.3c.c.、0.4c.c.、0.5c.c.的維生素 B6 水溶液置入盒中，並重複步驟 4.</p> <p>(8) 將人工尿液以 1c.c.置入盒中 50 個格子中，並且加入 0.1c.c.、0.2c.c.、0.3c.c.、0.4c.c.、0.5c.c.的金錢草水溶液置入盒中，並重複步驟 4.</p> <p>(9) 將人工尿液以 1c.c.置入盒中 50 個格子中，並且加入 0.1c.c.、0.2c.c.、0.3c.c.、0.4c.c.、0.5c.c.的自製配方置入盒中，並重複步驟 4.</p> <p>(10) 將樣本冰置 1 日，隔日將其取出，並且放入恆溫箱中 5 分鐘</p> <p>(11) 將樣本置入光譜儀中，設定搖擺與波長，測量 OD 值</p>
--	---

表 5. 實驗抑制劑試管編號

項目	劑量	編號	項目	劑量	編號
鍺	0.1	B-K	檸檬酸鉀	0.1	CA-LA
	0.2	B2-K2		0.2	C2A-L2A
	0.3	B3-K3		0.3	C3A-L3A
	0.4	B4-K4		0.4	C4A-L4A
	0.5	B5-K5		0.5	C5A-L5A

維生素 A	0.1	DB-MB	維生素 B6	0.1	EC-NC
	0.2	D2B-M2B		0.2	E2C-N2C
	0.3	D3B-M3B		0.3	E3C-N3C
	0.4	D4B-M4B		0.4	E4C-N4C
	0.5	D5B-M5B		0.5	E5C-N5C
金錢草	0.1	FD-OD	自製抑制劑	0.1	GE-PE
	0.2	F2D-O2D		0.2	G2E-P2E
	0.3	F3D-O3D		0.3	G3E-P3E
	0.4	F4D-O4D		0.4	G4E-P4E
	0.5	F5D-O5D		0.5	G5E-P5E



圖 57.微量滴管

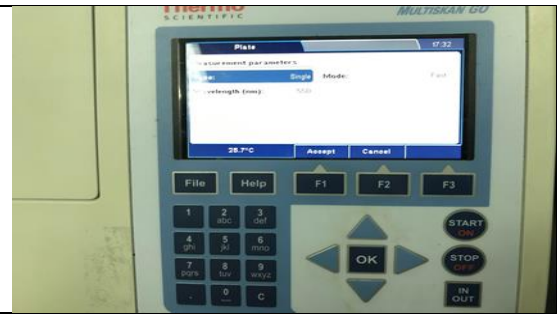


圖 58.光譜儀

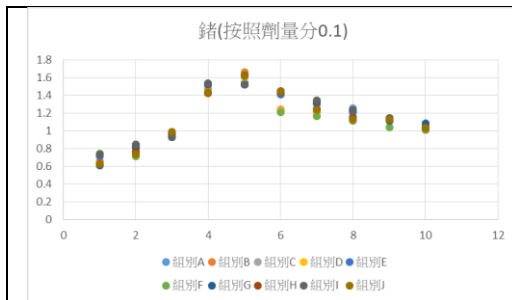


圖 59. 試管 B-K 的 OD 值變化

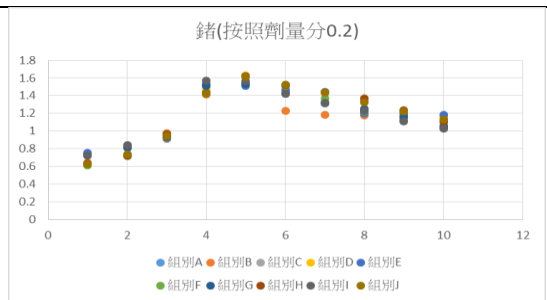


圖 60. 試管 B2-K2 的 OD 值變化

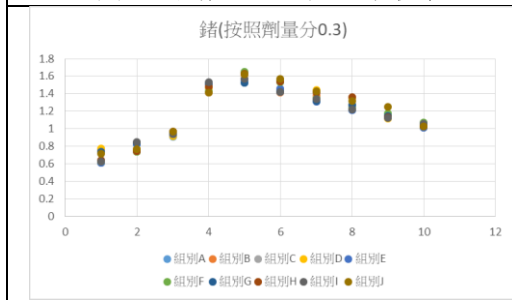


圖 61. 試管 B3-K3 的 OD 值變化

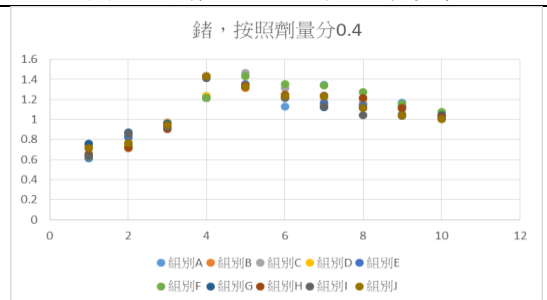


圖 62. 試管 B4-K4 的 OD 值變化

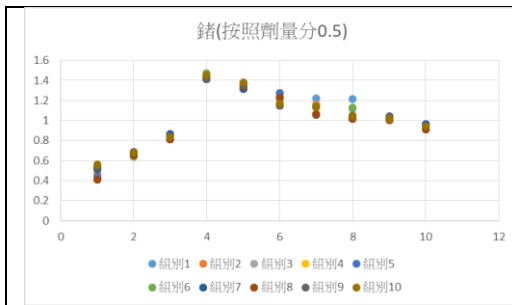


圖 63. 試管 B5-K5 的 OD 值變化

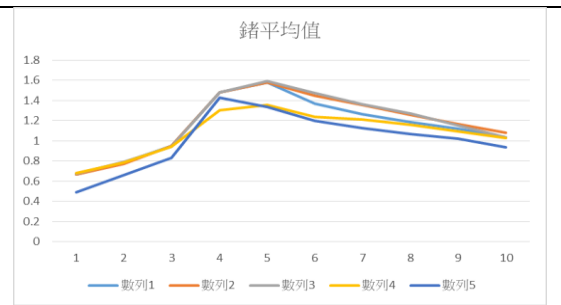


圖 64. 試管 B-K 系列的平均 OD 值變化

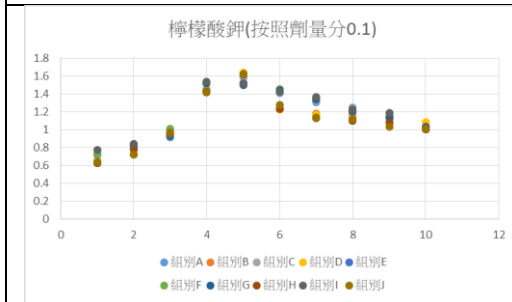


圖 65. 試管 CA-LA 的 OD 值變化

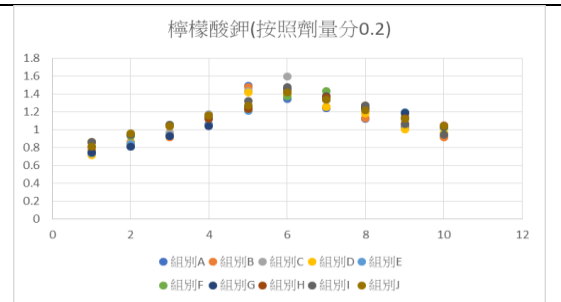


圖 66. 試管 C2A-L2A 的 OD 值變化

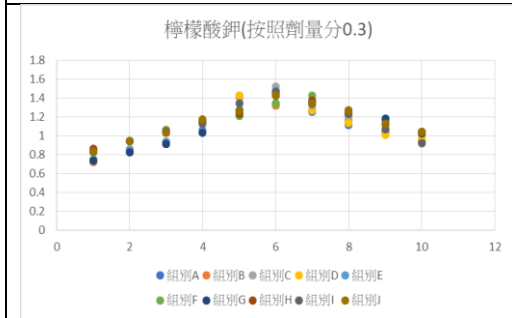


圖 67. 試管 C3A-L3A 的 OD 值變化

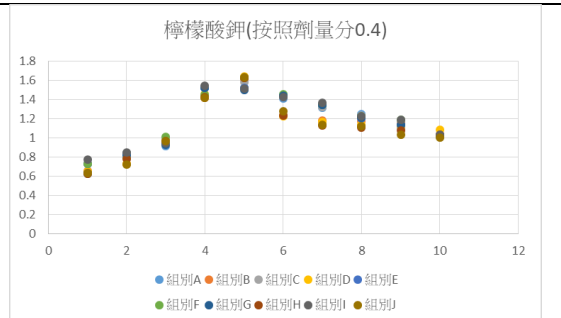


圖 68. 試管 C4A-L4A 的 OD 值變化

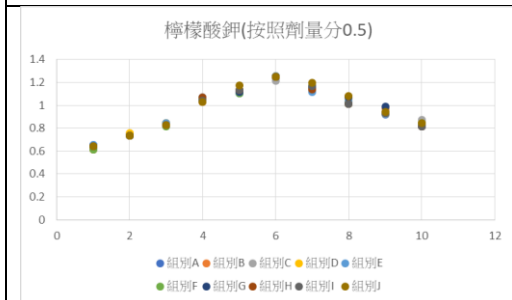


圖 69. 試管 C5A-L5A 的 OD 值變化

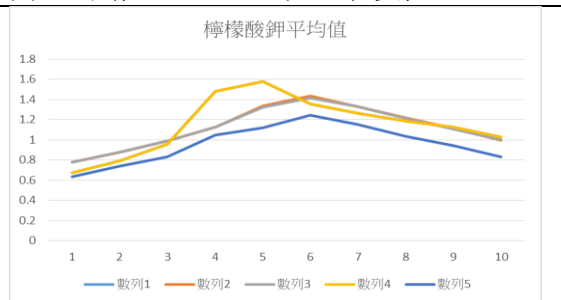


圖 70. 試管 CA-LA 系列平均 OD 值變化

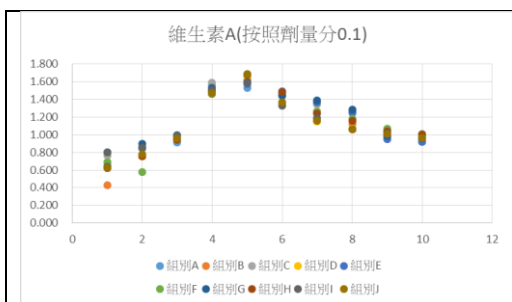


圖 71. 試管 DB-MB 的 OD 值變化

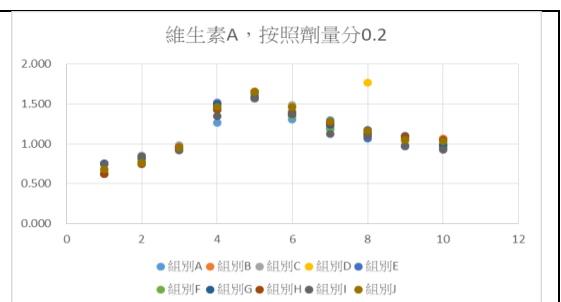


圖 72. 試管 D2B-M2B 的 OD 值變化

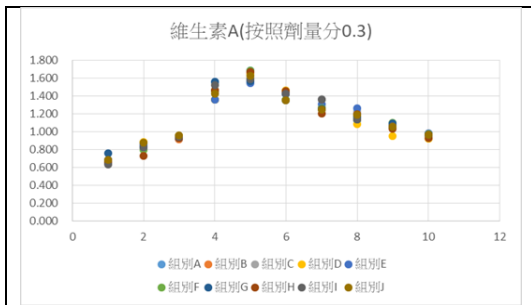


圖 73. 試管 D3B-M3B 的 OD 值變化

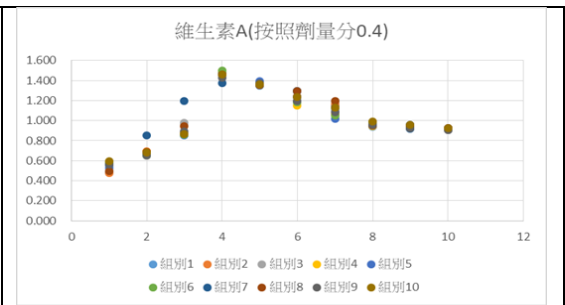


圖 74. 試管 D4B-M4B 的 OD 值變化

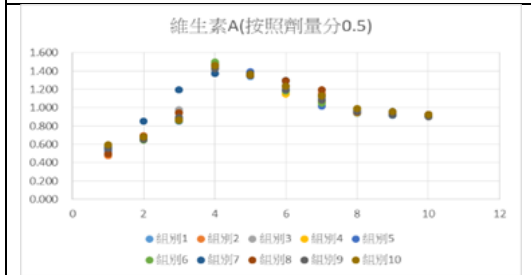


圖 75. 試管 D5B-M5B 的 OD 值變化

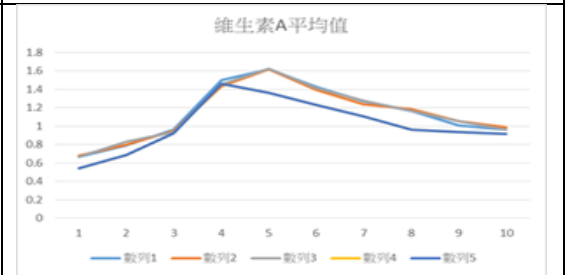


圖 76. 試管 DB-MB 系列的平均 OD 值變化

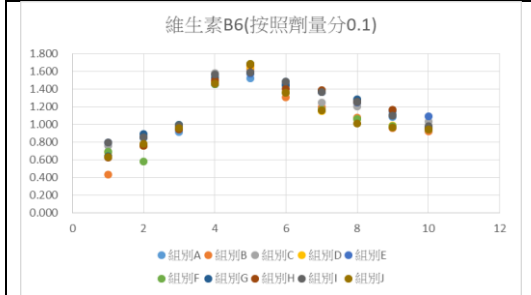


圖 77. 試管 EC-NC 的 OD 值變化

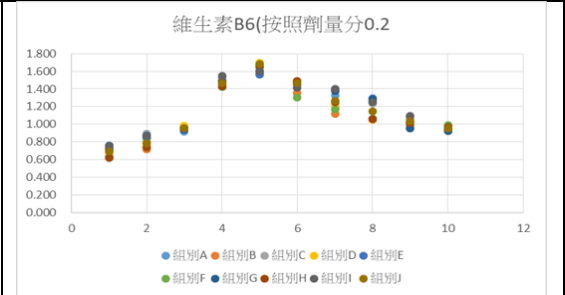


圖 78. 試管 E2C-N2C 的 OD 值變化

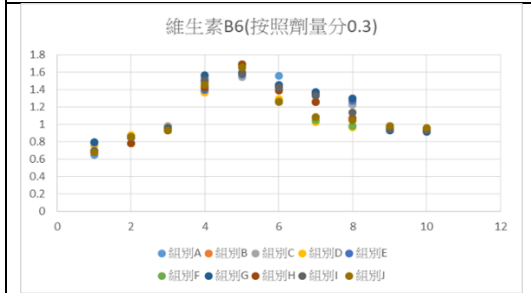


圖 79. 試管 E3C-N3C 的 OD 值變化

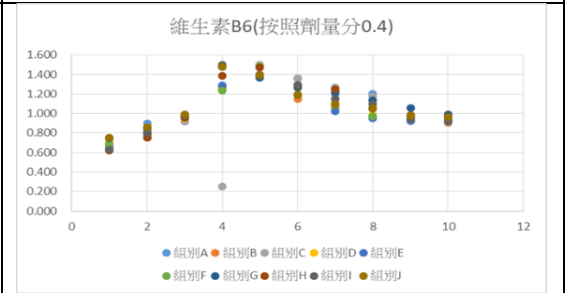


圖 80. 試管 E4C-N4C 的 OD 值變化

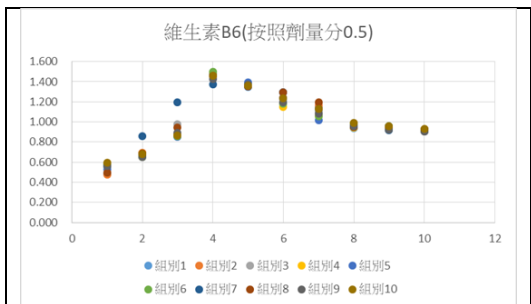


圖 81. 試管 E5C-N5C 的 OD 值變化

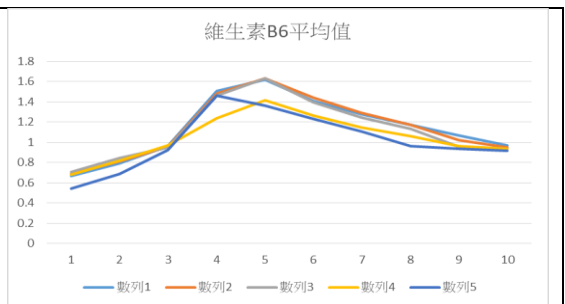


圖 82. 試管 EC-NC 系列的 OD 值變化

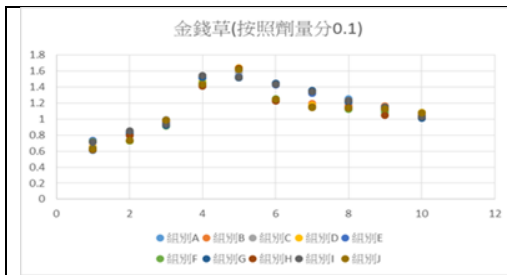


圖 83. 試管 FD-ND 的 OD 值變化

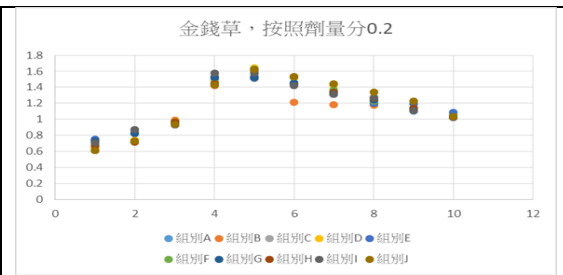


圖 84. 試管 F2D-N2D

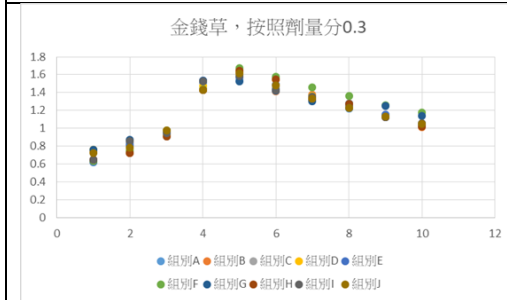


圖 85. 試管 F3D-N3D 的 OD 值變化

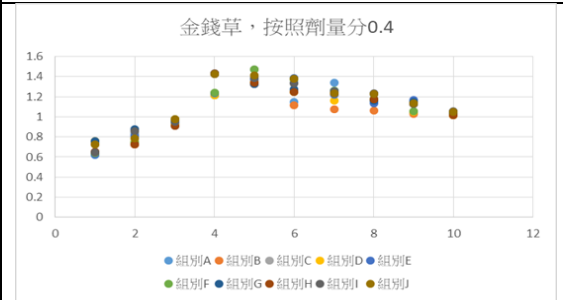


圖 86. 試管 F4D-N4D 的 OD 值變化

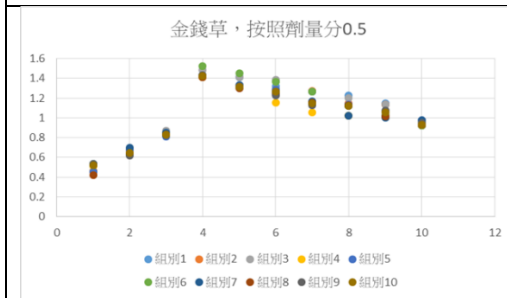


圖 87. 試管 F5D-N5D 的 OD 值變化

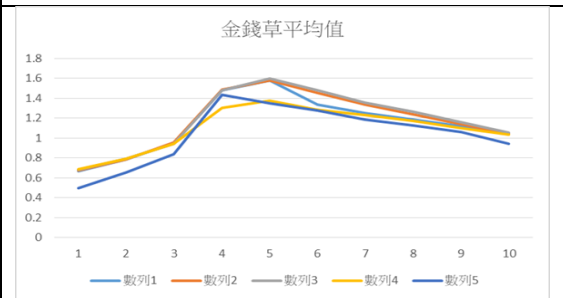


圖 88. 試管 FD-ND 系列平均 OD 值變化

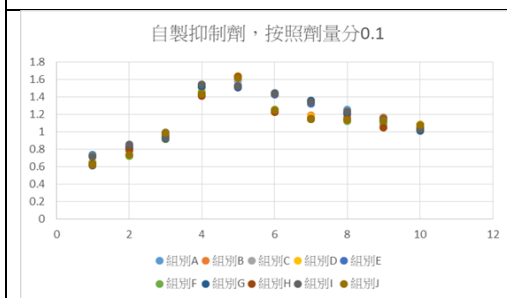


圖 89. 試管 GE-PE 的 OD 值變化

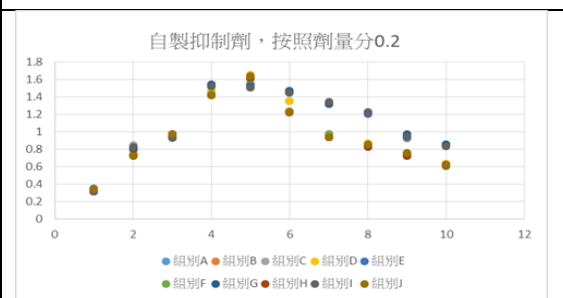


圖 90. 試管 G2E-P2E 的 OD 值變化

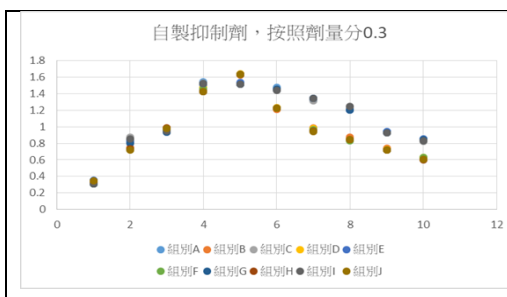


圖 91. 試管 G3E-P3E 的 OD 值變化

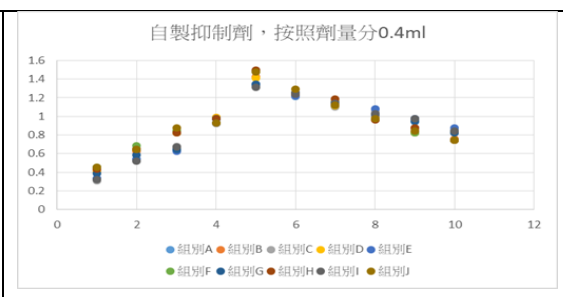


圖 92. 試管 G4E-P4E 的 OD 值變化

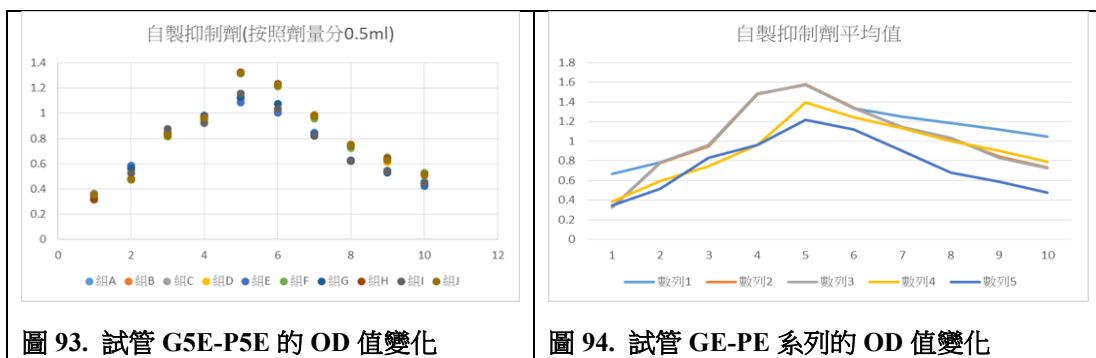


圖 93. 試管 G5E-P5E 的 OD 值變化

圖 94. 試管 GE-PE 系列的 OD 值變化

陸、討論

一、針對尿液部分

本研究主要的研究對象為老師，目的是根治老師的腎結石，因此，此實驗的研究目的乃是作為一種針對老師的身體情形，雖或許對於他人也有療效，但不保證具有絕對的效果，若未來有更高的技術與權限，希望可以測量更多病患的尿液，已得到確切方式。奈米細菌分析部分患者結石磷酸鈣為主，但是非所有人皆為磷酸鈣，楊定一教授的論文認為人體的奈米細菌為磷酸鈣結石。而若以先前的顯微鏡看來，也確實是磷酸鈣結石。

二、針對光譜儀部分

OD 值是否可以解決實驗中的沉積量，還在討論中，並沒有所謂過去的相關依據，純為本研究團隊的想法，但向中正大學及中山大學生物化學教授請教，他們認為此為合理作法，具有可行性。光譜儀使用鹵素燈，雖然波長範圍不大，但是符合此研究所使用的 550nm。

三、針對促進結石的原因

醫生有種說法，人類不應該飲用過多的礦泉水，原因是因為礦泉水中過多的礦物質容易造成人體結石產生。維他命 C 被視為一種保健食品，許多人食用，但是有限制克數，那若維他命 C 攝取過多呢？維他命 C 為水溶性得礦物質，攝取過多，容易在尿液中造成結晶。OH 自由基使用臭氧及 UV 產生，有許多報告說明自由基影響腎結石，此次報告也說明了，因為管壁發炎，而造成自由基更多，OD 值上升，試著減少 OH，加氫水減少 OH，之後 OD 值減少。

四、針對抑制劑與 pH 值

無論尿液太鹼或太酸，都會增加結石的機率與量，但是所謂的鹼性尿只是一種假設，人類尿液微弱酸性，並沒有過鹼的尿液。而關於抑制劑的使用，如前文所說的過多的維他命 C 會對人體造成不良影響，過多部會是好的，而抑制劑目前可確定對於人體無害，只要使用的抑制劑不過於人體需求，不會有問題，但若是大量食用，則還需要再研究。傳統治療中的貓鬚草會造成下降 pH 值，可能對人體造成影響，但具體下降量與食用量的關係仍不清楚。

五、針對結晶形狀與菌及病毒的關係

結晶在人體內分為了很多種，包括了生理型與病理型，病理型由疾病而生，而生理型為自體反應，其中有種特殊的結晶稱為亮氨酸結晶，其結晶的形狀乍看下為環狀的，而也說明了疾病對於人體的結晶有一定程度的影響，那是否病毒會影響人的腎結石還有待討論。

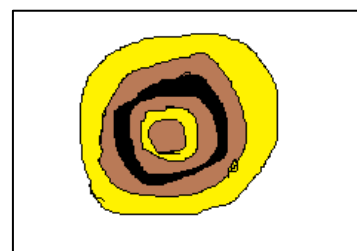


圖 95. 亮氨酸結晶示意圖

六、針對 pH 值對於結晶種類的影響

pH 值在化學中，常對化學反應有所影響，酸鹼對於雙向反應的反應方向有大影響，而結晶呢？對於結晶有何影響？就如同化學反應式中的反應物與生成物一般，總有適合的酸鹼值。草酸鈣易於弱酸中形成，與人體尿液的 pH 值差不多，而確實人體尿液中，草酸鈣結石是最多的，易在鹼性中存在的磷酸鈣是第二多的，乃是因為老人易長期臥病在床，而造成鈣質不足，身體自然反應從骨頭當中釋出鈣，形成磷酸鈣結晶。本研究推測碳酸鈣之所以不易出現在人體中，是因為其無法像尿酸鈣結晶一樣，可以在酸性及鹼性尿液並存。在測試 pH 值對於沉澱量的影響量時，使用了 SEM 觀察結晶外觀構造差異，pH 值對於沉澱量有所影響，而是否 pH 值對於結晶形狀也有所影響？按照使用的計量計算，此次的酸性水溶液 pH 值大約是 3.8，鹼性水溶液的 pH 值大約是 10.2，使用 SEM 觀察酸性水溶液當中的草酸鈣結晶形態是正八面體，而鹼性水溶液產生的草酸鈣是針狀的，八面體是雙水草酸鈣會有的，而針狀則是單水草酸鈣的型態之一，因此推論酸性水溶液中容易產生雙水草酸鈣，而鹼性水溶液則容易產生單水草酸鈣，驗證 pH 值對於結晶的結構有所影響，而其他構造的草酸鈣結晶或許會在其他不同的 pH 值下產生，又或許是在其他不同的溫度下產生。

柒、 結論

- 一、受試者腎結石中奈米細菌(*nanobacteria*)的性質，本研究結果判定為磷酸鈣結晶。
- 二、受試者尿液腎結石中奈米細菌(*nanobacteria*)經培養過後，由顯微鏡觀察結果，其結晶外型由球狀變成花瓣狀或扇葉狀，這是因為培養液中的蛋白質用盡，結晶作用佔優勢，在表面長出針狀突起，最後結構崩塌行成花瓣狀或扇葉狀。
- 三、本研究結果得知分光光度計 (*spectrophotometer*) 測量沉澱量可行，除此之外，也有向中山大學的教授請教，教授認為此種測量方法，確實可以得知沉澱量，本研究團隊認為雖然確實可以得知沉澱量的多寡，但是若需要確切數字，則需要另外計算，確實較為麻煩，但是目前也沒有具體方法測量沉澱量。
- 四、本研究因想根除腎結石，而探討各種民間或是醫學上常有的抑制劑，但是效果都沒有差太多，欲自行研發一款抑制劑，而調配比例。本研究所使用的抑制劑之抑制效果確實比其他抑制劑高出許多，雖然人體尿液與一般尿液有所差異，但是本研究已做初步探討，未來可繼續以此抑制劑針對人體的不同改良，而得到較適合抑制劑。
- 五、研究過程除探討抑制劑效果，同時也探究腎結石成因，當中採納了管壁粗糙度、維他命 C 及酸鹼值，而得知的結論為管壁粗糙、維他命 C 過多、pH 值過高或過低都會較容易產生結石，而一般人體具有抑制腎結石的能力，但是體內鈣質不足或者過酸、過鹼，又或許是礦物質攝取過多，都容易造成腎結石

捌、 參考資料及其他

(一) 中文文獻：

1. 楊定一、馬奕安 (Jan Martel) (2010年2月) *科學人雜誌第96期*。P28~P41。
2. 徐明達 (2004年11月) *細菌的世界*。天下雜誌股份有限公司。
3. 張碧芬、袁紹英、游呈祥 (2004年)。 *腎結石成因*。天下雜誌股份有限公司。
4. 張榮發(2008年6月17日)。 *奈米細菌無生命20年迷團解惑*。中國時報。
5. 呂研嫻(2016年)。 *腎臟結石處置與繼發性高血壓的關係*。國立清華大學／生物資訊與結構生物研究所碩士論文。
6. 喻堅忍(2007年)。 *台灣草酸鈣型腎結石與介白素基因的DNA變異相關性研究*。國立清華大學生物資訊與結構生物研究所碩士論文。

(二) 外文文獻：

1. John D. Young, Jan Martell, Lena Young, Cheng-Yeu Wu, Andrew Young, David Young (February 2009) Putative Nanobacteria Represent Physiological Remnants and Culture By-Products of Normal Calcium Homeostasis
2. Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO (1999) Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 56:893–1898.
3. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M (2003) The serum protein alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 112: 357–366.
4. Drancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, et al. (2003) Attempted isolation of Nanobacterium sp. Microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 41: 368–372
5. Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO (1999) Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 56:1893–1898.
6. Kajander EO, Kuronen I, Akerman K, Peltari A, Ciftcioglu N (1997) Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng* 3111: 420–428.
7. Clark JS, Turner RC (1954) Reactions between solid calcium carbonate and orthophosphate solutions. *Can J Chem* 33: 665–671.

(三) 網路文獻：

1. 楊定一、馬奕安 (2009)。奈米細菌一度被認定是最小的病菌，現在卻證實是種奇異的物質。它們的確能影響健康，只不過跟原先想的不一樣。2011/11/30，取自：<http://sa.ylib.com/read/readshow.asp?FDocNo=1528>
2. 楊定一 (2010)。生物學奈米細菌非細菌！。2011/12/2，取自：
<http://www.mcut.edu.tw/onweb.jsp?webno=3333332503>
3. 王高山 (2004-05-21)。奈米細菌是新的生命形式嗎？。2011/12/15，取自：
<http://big5.cri.cn/gate/big5/gb.cri.cn/3821/2004/05/21/664@166964.htm>
4. 王素音(無日期)。傳說中的奈米細菌。2011/12/30，取自：
http://www.pptuu.com/show_74050_1.html

【評語】 052010

本研究針對腎結石的特性做實驗，主要目的有下列各項：

一、厘清腎結石中奈米細菌的性質，並了解其在尿液中扮演的角色。二、運用掃描式電子顯微鏡(SEM)、能量散射光譜儀(EDS)、穿透式電子顯微鏡(TEM)，分析腎結石結晶的形狀、成分與結構。三、使用分光光度計 (spectrophotometer) 比較腎結石中主要幾種成分的差異。四、使用人工尿液替代人體尿液，簡化操作變因，並實驗自製抑制劑的效用。五、運用實驗結果歸納出腎結石成因，並探討如何有效抑制結石發生。

建議：

1. 維他命 C 對於腎結石的影響已經很多研究了。
2. OD 值是否可以解決實驗中的沉積量的確尚未知？
3. 人工尿液是否具代表性值得商榷。
4. 光譜儀的準確性也必須再確定。

摘要

本研究主要研究人類尿液中，腎結石中的奈米細菌(nanobacteria)是礦物結晶或細菌成長作用。使用自製分光光度計，以OD值的差異劃分，結果顯示奈米細菌呈現獨特結晶特徵，成分分析亦證實為磷酸鈣。之後研發腎結石抑制劑，使用自製人工尿液，以磷酸鈣Ca₃(PO₄)₂、草酸鈣CaC₂O₄和尿酸(C₅H₄N₂O₃)為主體，分別測試維他命C、(+OH)、槲寄生發芽、槲寄生尿pH值變化，並觀察其結晶型態變化，結果發現槲寄生發芽OD值最高1.4，尿液pH值5時OD值1.3次之，推斷腎結石主因與腎發芽最密切，其次是pH值變化，偏酸與過飽易易產生結晶，最後以自製的結石抑制劑比較傳統Ca₅(HPO₄)₃(檸檬酸鈣)抑制劑，本研究抑制劑OD值呈現較佳抑制效果。

壹、研究動機

本團隊指導老師患有嚴重腎結石，好幾次指導過程中結石痛苦的表情令人不忍心，且常常到醫院去治療，經團隊討論決定研究腎結石議題，藉以讓老師了解結石成因，以達到預防甚至治療效果。本團隊以老師尿液為樣本以SEM(Scanning Electron Microscope)觀察，其中發現奈米細菌(nanobacteria)族群，列入研究方向，並由老師結石產物報告中的草酸鈣CaC₂O₄、磷酸鈣Ca₃(PO₄)₂和尿酸(C₅H₄N₂O₃)等成分為主體，自製分光光度計(spectrometer)以人工尿液取代人體尿液，並計算OD值討論結晶成長、細菌成長與結石抑制效果。

貳、研究目的

本研究針對腎結石的特性做實驗，主要目的有下列各項：
 一、厘清腎結石中奈米細菌的性質，並了解其在尿液中扮演的角色。
 二、運用掃描式電子顯微鏡(SEM)、能量散射光譜儀(EDS)、穿透式電子顯微鏡(TEM)，分析腎結石結晶的形狀、成分與結構。
 三、使用分光光度計 (spectrophotometer) 比較腎結石中主要幾種成分的差異。
 四、使用人工尿液替代人體尿液，釀化操作變因，並實驗自製抑制劑的效用。
 五、運用實驗結果歸納出結石成因，並探討如何有效抑制結石發生。

參、研究設備與器材

研究設備與器材詳情請參照作品說明書

肆、研究過程或方法

一、本研究過程方法的流程圖如下所示：



圖1. 研究流程圖

二、前人研究文獻彙集：

- (一) Folk RL (1993)，美國德州大學福克(Folk)用反射式電子顯微鏡(SEM)觀察義大利維特羅溫泉(Viterbo hot springs)的岩石樣本，首次發現「奈米細菌」並命名為nanobacteria。
- (二) McKay DS, Gibson EK Jr, Thomas-Keprta KL, Vali H, Romanek CS, et al.(1996)。在美國阿納漢森太空中心的馬凱發在南極洲找到的火星隕石ALH 84001，也有類似的奈米化石。
- (三) Ciftcioglu N, Kajander EO (1998)，首次提出奈米細菌是一種生命形式的證據。將這種細菌命名為Nanobacterium sanguineum。
- (四) Hjelte JT, Miller-Hjelte MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, et al.(2000)，實驗在鈣化的血管壁本找到的奈米細菌，不但含有DNA與蛋白質，似乎還能製造RNA。
- (五) Benzerara K, Menguy N, Guyot F, Dominiac C, Gillet P (2003)，對奈米細菌提出不同的觀點，發現常見於細胞膜的礦質質能夠和鈣離子與磷酸結合，促進磷酸鈣晶體(羟基磷灰石·HAP·hydroxyapatite)的形成。



圖6. Benzerara K, Menguy N, Guyot F, Dominiac C, Gillet P (2003)提出(羟基磷灰石·HAP·hydroxyapatite) 概念

(六) Young JD, Martel J, Young L, Wu C-Y, Young A, et al. (2009)，楊定一教授等長庚大學團隊，成功以血清(serum)混合無生命的物質製造奈米細菌，在實驗室以30kGy伽馬雷射破壞性的照射，證明它們不是「活」的生物體。

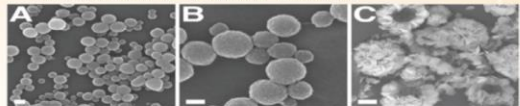


圖7. Young JD, Martel J, Young L, Wu C-Y, Young A, et al. (2009)證明奈米細菌非活體

- (七) 喻盛恩(2007)某些巨噬細胞會因草酸鈣結晶而產生特定介素，引起急性或慢性發炎反應，但實驗驗證後，發現和前人做過的介素SNP位點沒有太大的關聯性，但被培養的人體腎臟細胞暴露在草酸鈣結晶時，位於近端小管的皮膜細胞也會受到損傷，因此發炎反應應該會在腎結石患者的身上產生。
- (八) 黃鶴翔(2002)自由基和草酸鈣對腎臟傷害可能有關，使用腎臟灌注法去尋找和定位自由基在腎臟標本中生長的位置及數量多寡。當草酸鈣對腎小管造成傷害時，會伴隨著自由基的成長，因此草酸鈣結石會很明顯的出現在腎臟內。

伍、研究結果

一、研究實驗分析

(一) 尿液採樣：原液大量收集會造成個體差異大，再加上主要目的針對老師的腎結石為重點，因此腎結石實驗本主要收集老師的尿液，且為了比較正常人差異，再收集了一份正常人的尿液，並且在老師的體檢報告中可以看到大致上為草酸鈣結石、磷酸鈣結石及尿酸結石，因此三者為主要觀察對象。



圖9. 實驗保冷箱 圖10. 收集尿液後的保存狀況 圖11. 人體尿液收集

本研究尿液收集步驟如下所示：
 將尿液送檢後，將另一份放置在冰箱中的尿液取出，使用自製分光光度計測量，每三分鐘測量一次OD(optical density)值，並且再製作一份人工尿液予以比較。

(二) 腎結石患者尿液收集與尿液成分分析結果
 將送檢樣本取出，並且得到如下表(3)的成分分析，從結果可看出腎結石患者磷酸鈣、草酸鈣含量為常人的數倍，而為飽和濃度的10倍以上，文獻提到雖然機制不明，但一般人體內的磷酸鈣結石與草酸鈣結石過飽和濃度，卻不會析出，而要達到飽和濃度的十倍以上才會析出。

表3. 人體尿液與人工尿液化驗結果

化驗項目	磷酸鈣	草酸鈣	磷酸根	草酸根	鈣離子
人體尿液(患者)	0.0339g/100ml	0.00725g/100ml	0.145g/100ml	0.0254g/100ml	0.012g/100ml
人工尿液	0.0124g/100ml	0.00405g/100ml	0.100g/100ml	0.0145g/100ml	0.009g/100ml
人體尿液	0.0145g/100ml	0.00301g/100ml	0.092g/100ml	0.0122g/100ml	0.007g/100ml

上表(3)可看出人體的尿液中，草酸根含量過高鈣含量，因此主要決定結石與否的為鈣含量，除此之外，腎結石患者的草酸鈣與磷酸鈣含量也遠高於常人。

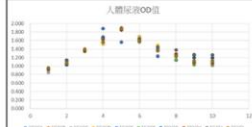


圖12. 人體尿液OD值變化

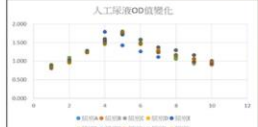


圖13. 人工尿液OD值變化

於圖(12)及(13)中可以看出人體尿液與人工尿液OD值的成長曲線為先快速上升，後緩慢下降，此種OD值很類似於礦物結晶，而以實驗比較人工尿液OD值上升與加入生物的OD值變化。

(三) 加入酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)的人工尿液與一般人尿液OD值變化：
 於前研究尿體成分分析中發現人體尿液與人工尿液的OD值曲線近似於U字形，此種曲線類似於礦物結晶曲線，而與生物成長曲線有所不同，因此在人工尿液中加入酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)予以比較。

(四) DMEM培養基調配過程如下(在室溫下進行)：

1. 使用二次蒸餾水作超純水。
 2. 使用電子天平秤取所需重量的乾粉培養基(使用前須先鋪紙再秤)。
 3. 將乾粉培養基加入約最終體積一半的三蒸水中，並加以攪拌使之完全溶解(此時呈現橘色)。
 4. 根據指示加入碳酸鈉(3.7g/1000ml)培養基並均勻攪拌，DMEM變成紫紅色。
-
5. 加水到所需總體積，再用IM的氫氧化鈉和氫氯酸使pH值歸回7.0，以0.22微米的濾膜過濾設備，並分裝於無菌的試管中，放入4℃冰箱保存(pH值會上升0.1到0.3)。

圖17. DMEM過濾情形

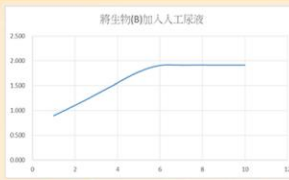


圖18. 加入酵母菌的人工尿液OD值變化圖

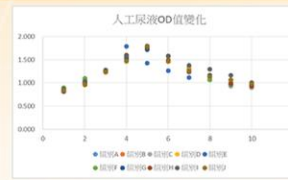


圖19. 未加入生物的人工尿液OD值變化

由上圖18中可以看到加入酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的人工尿液OD值變化曲線為上升後動態平衡，此為生物的生長曲線，由此可知奈米細菌，不為生物中，因生物中的生長曲線類似於J字形，而按照構定一較慢的說法，奈米細菌應為硫酸鈣，因此本研究以多種儀器測量分析奈米細菌的結構。

(五)以顯微鏡觀察是否加入酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的人工尿液內部成分結構：
因證實了奈米細菌非微生物種，而須觀察其結構作為比較，使用了掃描式電子顯微鏡(SEM)、穿透式電子顯微鏡及能量散射光譜儀(EDS)觀察未加入生物的人工尿液(樣本2)的結構，並且比較生物結構與非生物結構的差異性，1.觀察樣本結構：

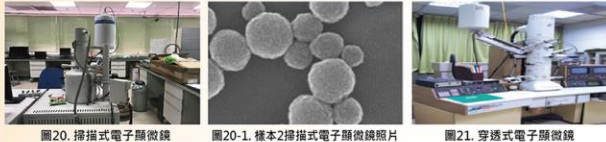


圖20. 掃描式電子顯微鏡 圖21. 樣本2掃描式電子顯微鏡照片 圖22. 穿透式電子顯微鏡

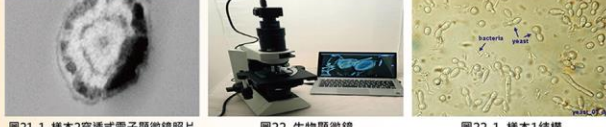


圖21-1. 樣本2穿透式電子顯微鏡照片 圖22-1. 樣本1結構

由圖20-1以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察奈米細菌，可發現其外型由球狀變成花瓣狀或扇狀，這可能是因為培養液中的蛋白質量用，結晶作用佔優勢，在表面長出針狀突起，最後結構崩塌行成花瓣狀或扇狀。

二、光譜密度OD (optical density)值實驗組組設計：實驗A：
OD值使用分光光度計，製作原理為Beer-Lambert Law，當光穿過樣品溶液時，光的吸收度(A)與吸收係數(α)、光徑長(L)、濃度(c)三者均呈正比： $A = \alpha \cdot c \cdot L$ ，其中α為吸收係數(吸光率)亦可稱為消光係數(extinction coefficient, k)，常見的Beer-Lambert Law表示方法為： $A = \epsilon \cdot c \cdot L = \log_{10} \frac{I_0}{I}$ ，T為吸收率，I為透射光強度，I₀為入射光強度。

(一)第一代分光光度計製作-實驗A1
分光光度計原理為白光可透過三稜鏡分光而形成多色之光譜，亦可利用光柵分光開光譜，光譜儀是在特定波長範圍來測量光源光線的設備。

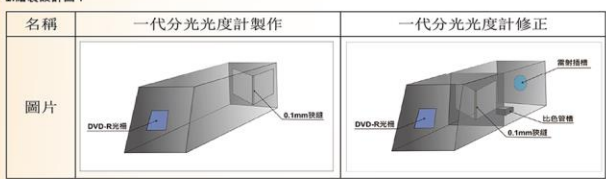


圖23. 第一代分光光度計設計圖

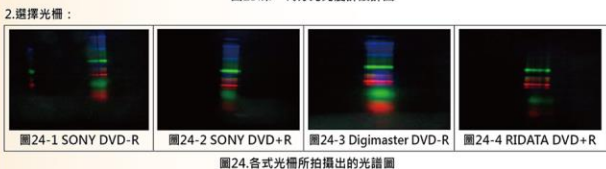


圖24. 各式光柵所拍攝出的光譜圖

2. 選擇光柵：
3. 計算光柵角度：
本研究設定觀看的光譜是第一級的繞射光譜，所以 $m = 1$ 。在DVD-R的溝，是每mm有1350條，所以溝距是740nm，旋轉光柵至繞射角為0°，這時可由光柵的法線處觀測到第一級繞射的光譜，同樣地以DVD-R光柵及波長為550nm綠光為例，利用光柵方程式，當繞射角為0°時，光柵順時旋轉了36.6°。

(二)製作第二代分光光度計-實驗A2
1. 光源設計：本研究主要以可見光波段550nm做分析，使用鹵素燈(Tungsten Halogen)為光源，其波段範圍320~1100nm。
2. 入射狹縫與反射鏡設計：光線先經過狹縫與反射鏡，產生如同太陽光束的平行光，照射到光柵上。

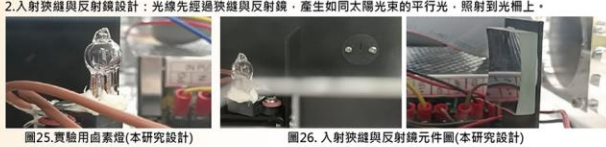


圖25. 實驗用鹵素燈(本研究設計) 圖26. 入射狹縫與反射鏡元件圖(本研究設計)

3. 光柵：一種利用光的繞射原理所設計的光學分光元件，光柵的表面做成微小的鋸齒狀，用來將混合波長的原始光線(白光)，分散成色光。早期的分光光度計，是使用三稜鏡來分光，如今三稜鏡被更精密穩定的光柵所取代。

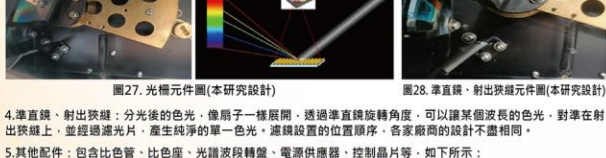


圖27. 光柵元件圖(本研究設計) 圖28. 準直鏡、射出狹縫元件圖(本研究設計)

4. 準直鏡、射出狹縫：分光後之色光，像扇子一樣展開，透過準直鏡旋轉角度，可以讓某個波長之色光，對準在射出狹縫上，並經過濾光片，產生純淨的單一色光。透鏡設置的位置順序，各家廠商的設計不盡相同。
5. 其他配件：包含比色管、比色座、光譜波段轉盤、電源供應器、控制晶片等，如下所示：



圖29. 比色管座 圖30. 測試波段轉盤 圖31. 電源供應器 圖32. 控制晶片



圖33. 比色管元件位置 圖34. 光柵元件設計

三、實驗主體分析設計-B：
本研究以硫酸鈣、草酸鈣、與尿酸為主體，分析以下物質對主體的影響程度：
(一)維他命C對於腎結石的影響-B1
由圖中可以看出加入了維他命C的人工尿液的OD值確實比一般的人工尿液高，但是若不攝取過量的維他命C，對身體應該不會有過大的負擔，但若攝取過多，則會增加腎結石的機率。

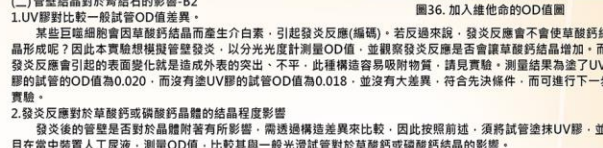


圖36. 加入維他命的OD值圖

(二)管壁結晶對於腎結石的影響-B2
1. UV膠比較一般試管OD值差異。
某些嗜菌細胞會因尿酸鈣結晶而產生自白素，引起發炎反應(痛癢)。若反過來說，發炎反應不會使尿酸鈣結晶形成呢？因此本實驗想模擬管壁發炎，以分光光度計測量OD值，並觀察發炎反應是否會讓尿酸鈣結晶增加，而發炎反應會引起的表面變化也是造成外表的突出、不平，此種構想容易吸附物質，請見實驗，測量結果為塗了UV膠的試管的OD值為0.020，而沒有塗UV膠的試管OD值為0.018，並沒有太大差異，符合先決條件，而可進行下一步實驗。
2. 發炎反應對於尿酸鈣或磷酸鈣晶體的結晶程度影響
發炎後的管壁是否對於晶體附着有所影響，需透過構造差異來比較，因此按照前述，須將試管塗抹UV膠，並且在當中裝置人工尿液，測量OD值，比較其與一般光滑試管對於尿酸鈣或磷酸鈣結晶的影響。

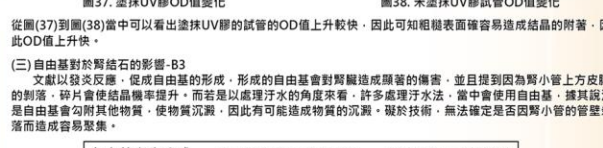


圖37. 塗抹UV膠OD值變化 圖38. 未塗抹UV膠試管OD值變化

從圖(37)到圖(38)當中可以看出塗抹UV膠的試管的OD值上升較快，因此可知粗糙表面確實容易造成結晶的附着，因此OD值上升快。

(三)自由基對於腎結石的影響-B3
文獻以發炎反應，促成自由基的形成，形成的自由基會對腎臟造成嚴重的傷害，並且提到因為腎小管上方皮膚的剝落，碎片會使結晶機率提升，而若是以處理汙水的角度來看，許多處理汙水法，當中會使用自由基，其說法是自由基會勾附其他物質，使物質沉澱，因此有可能造成物質的沉澱，凝於技術，無法確定是否因腎小管的管壁剝落而造成容易聚集。

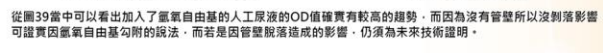


圖39. 加入自由基人工尿液OD值變化

從圖39當中可以看出加入了自由基的人工尿液的OD值確實有較高的趨勢，而因為沒有管壁所以沒塗落膠，可證實因氣自由基勾附的說法，而若是因管壁脫落造成的影響，仍須為未來技術證明。

(四)加氯水對於自由基的抑制影響-B4
外面有市售加氯水，據傳能能夠抑制腎結石，而若以自由基的角度而言，或許是兩者發生了化學，因此我們想將加氯水放入含有自由基的人工尿液中，測量其OD值變化，以測試抑制效果。

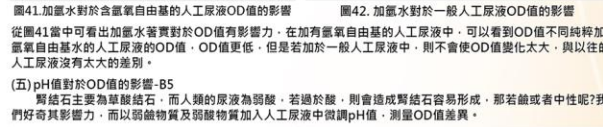


圖41. 加氯水對於含氯氣自由基的人工尿液OD值的影響 圖42. 加氯水對於一般人工尿液OD值的影響

從圖41當中可看出加氯水確實對於OD值有影響力，在含有氯氣自由基的人工尿液中，可以看到OD值不純粹加氯氣自由基的人工尿液的OD值，OD值更低，但是若加於一般人工尿液中，則不會使OD值變化太大，與以往的人工尿液沒有太大的差別。

(五)pH值對於OD的影響-B5
腎結石主要為草酸結石，而人類的尿液為弱酸，若過於酸，則會造成腎結石容易形成，那若酸或者中性呢？我們好奇其影響力，而以弱鹼物質及弱酸物質加入人工尿液中微調pH值，測量OD值差異。

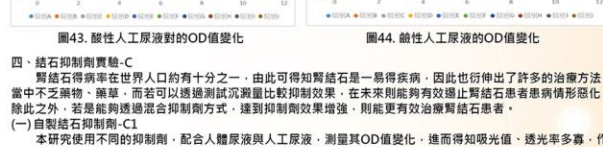


圖43. 鹼性人工尿液對的OD值變化 圖44. 酸性人工尿液的OD值變化

四、結石抑制劑實驗-C
腎結石患病率在世界上人口約有十分之一，由此可知腎結石是一易得疾病，因此也衍生了許多的治療方法，當中不乏藥物、藥劑，而若以透過測試沉澱量比較抑制效果，在未來則能夠有效阻止腎結石患者患病情形惡化，除此之外，若是能夠透過混合抑制劑方式，達到抑制劑效果倍增，則能更有效治療腎結石患者。

(一)自製結石抑制劑-C1

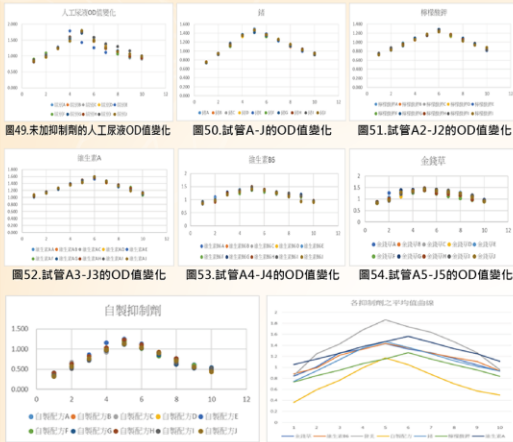
本研究使用不同的抑制劑，配合人體尿液與人工尿液，測量其OD值變化，進而得知吸光值、透光率多寡，作為測量沉澱量的標準。本此主要自製的抑制劑成分為檸檬酸鉀、維生素A、維生素B6、鎳、金雞草，經過多種比例調和，測量出效果最佳的自製抑制劑，而採取此種自製抑制劑比較其他種抑制劑。

項目	化學式/學名	編碼
鎳	Ge	試管 A-J
檸檬酸鉀	$K_2C_6H_5O_7$	試管 A2-J2
維生素 A	$C_{20}H_{30}O$	試管 A3-J3
維生素 B6	$C_8H_{11}NO_3$	試管 A4-J4
金雞草	<i>Lysimachia christinae</i>	試管 A5-J5
自製配方		試管 A6-J6



圖45. 量筒 圖46. 抑制劑滴入 圖47. 尿液滴入 圖48. 人工尿液

(二)各抑制劑OD值比較-C2



由上圖可看出即使加了抑制劑，OD值曲線依舊是快速上升後緩慢下降。

(三)抑制劑劑量對於人工尿液OD值變化的影響-C3
因前實驗皆使用了大量抑制劑，而效果明顯，但若是僅使用微量呢？將各抑制劑以1:2:3:4:5的劑量加入人工尿液中，並且以每個濃度單一抑制劑十組的大量數據比較OD值變化，而得知劑量對於抑制效果，而試管編號如下表5。

表5.實驗抑制劑試管編號

項目	劑量	編號	項目	劑量	編號
錯	0.1	B-K	檸檬酸鉀	0.1	CA-LA
	0.2	B2-K2		0.2	C2A-L2A
	0.3	B3-K3		0.3	C3A-L3A
	0.4	B4-K4		0.4	C4A-L4A
	0.5	B5-K5		0.5	C5A-L5A
維生素A	0.1	DB-MB	維生素B6	0.1	EC-NC
	0.2	D2B-M2B		0.2	E2C-N2C
	0.3	D3B-M3B		0.3	E3C-N3C
	0.4	D4B-M4B		0.4	E4C-N4C
	0.5	D5B-M5B		0.5	E5C-N5C
金錢草	0.1	FD-OD	自製抑制劑	0.1	GE-PE
	0.2	F2D-O2D		0.2	G2E-P2E
	0.3	F3D-O3D		0.3	G3E-P3E
	0.4	F4D-O4D		0.4	G4E-P4E
	0.5	F5D-O5D		0.5	G5E-P5E



圖57.微量滴管



圖58.光譜儀

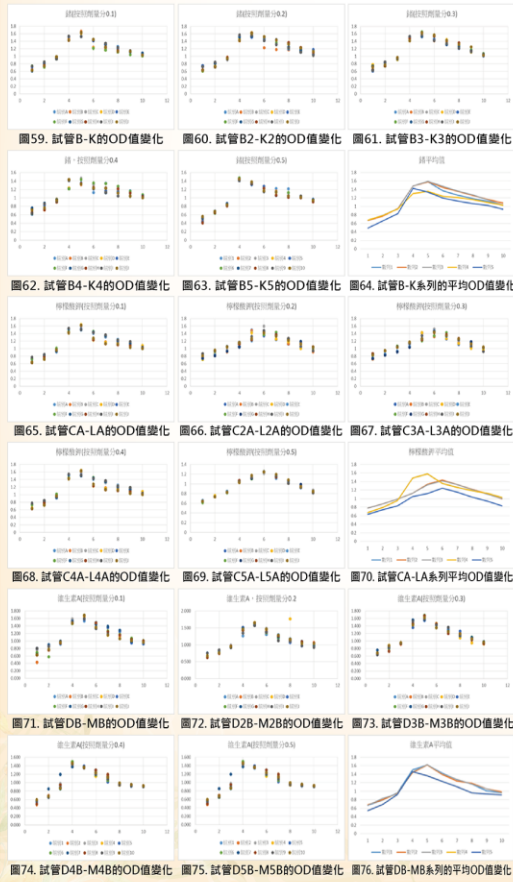


圖74.試管D4B-M4B的OD值變化 圖75.試管D5B-M5B的OD值變化 圖76.試管D6-M6的平均OD值變化

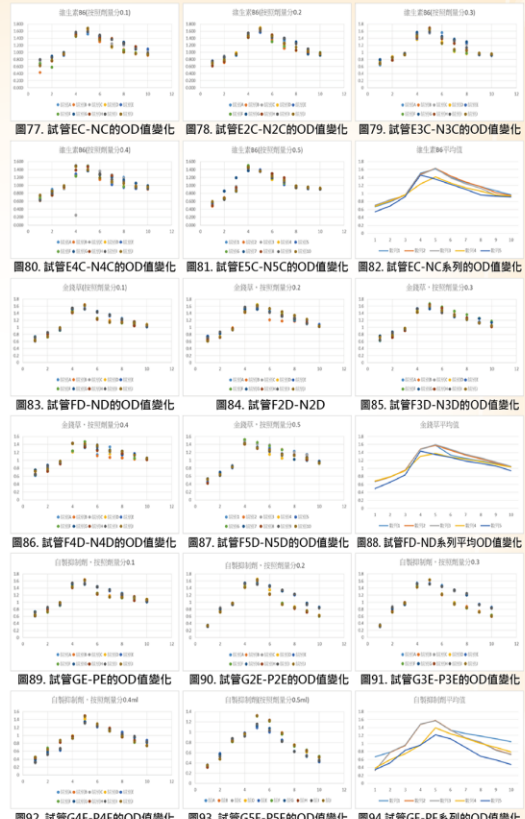


圖92.試管G4E-P4E的OD值變化 圖93.試管G5E-P5E的OD值變化 圖94.試管GE-PE系列的OD值變化

陸、討論

一、針對尿液部分：
本研究主要的研究對象為老師，目的是根治老師的腎結石。因此，此實驗的研究目的乃是作為一種針對老師的身體情形，雖或許對於他人也有療效，但不保證具有絕對的效果。若未來有更高等的技術與構建，希望可以測量更多病患的尿液，已得到確切方式。奈米細菌分析部分患者結石磷酸鈣為主，並非所有人皆為磷酸鈣，構成一教授之論文認為人體的奈米細菌為磷酸鈣結石，而若以先前的顯微鏡看來，也確實是磷酸鈣結石。
二、針對光譜儀部分：
OD值是否可以解決實驗中的沉積量，還在討論中，並沒有所談過去的相關依據，純為本研究團隊的想法，但中正大學及中山大學生物化學教授講課，他們認為此為合理作法，具有可行性，光譜儀使用由重鐵，雖然波長範圍不大，但是符合此研究所使用的950nm。
三、針對促進結石的原因：
醫生有種說法，人類不應該飲用過多的礦泉水，原因是因為礦泉水中過多的礦物質容易造成人體結石產生。
四、針對抑制劑與pH值：
無論尿液太酸或太鹼，都會增加結石的機率與量，但是所謂的鹼性尿只是一種假設，人類尿液微弱鹼性，並沒有過鹼的尿液，而關於抑制劑的使用，如前文所說的過多的維他命C會對人體造成不良影響，過多都會是好的，而抑制劑目前可確定對人體無害，只要使用的抑制劑不過於人體需求，不會有問題，但若是大量食用，則還需要再研究。
五、針對結晶形狀與菌及病毒的關係：
結石在人體內分為很多種，包括了生理型與病理型，病理型由疾病而生，而生理型為自體反應，其中有種特殊的結晶稱為尿酸結晶，其結晶的形狀乍看為環狀的，但也說明了疾病對於人體的結晶有一定程度的影響，那是否病毒會影響人的腎結石有待討論。
六、針對pH值對於結晶的影響：
pH值在化學中，常對化學反應有所影響，酸鹼對於雙向反應的反應方向有大影響，而結晶呢？對於結晶有何影響？就如同化學反應式中的反應物與生成物一般，總有適合的酸鹼值，草酸鈣易於弱鹼中形成，與人體尿液的pH值差不多，而確實人體尿液中，草酸鈣結石是最多的，易在鹼性中存在的磷酸鈣是第二多的，乃是因為人易長期臥床在床，而造成鈣質不足，身體自然反應從骨髓當中釋出鈣，形成磷酸鈣結晶。



圖95.亮氨酸結晶示意圖

柒、結論

一、受試者腎結石中奈米細菌(nanobacteria)的性質，本研究結果判定為磷酸鈣結晶。
二、受試者尿液結石中奈米細菌(nanobacteria)經培養過程，由顯微鏡觀察結果，其結晶外型由球狀變成花瓣狀或扇狀，這因為培養液中的蛋白質用盡，結晶開始佔優勢，在表面表出針狀突起，最後結構漸行成花狀或扇狀。
三、本研究結果得知分光光度計(spectrophotometer)測量沉澱量可行，除此之外，也有向中山大學的教授講課，教授認為此種測量方法，確實可以得知沉澱量，本研究團隊認為雖然確實可以得知沉澱量的多寡，但是若需要確切數字，則需要另外計算，確實較為麻煩，但是目前也沒有具體方法測量沉澱量。
四、本研究因想根除腎結石，而探討各種民間或是醫學上常用的抑制劑，但效果都沒有差太多，欲自行研發一款抑制劑，而調配比例，本研究所使用的抑制劑之抑制效果確實比其他抑制劑高許多，雖然人體尿液與一般尿液有所差異，但是本研究已做初步探討，未來可繼續以此抑制劑針對人體的不同改良，而得到較適合抑制劑。
五、研究過程除探討抑制劑效果，同時也探究腎結石成因，當中探討了管壁粗糙度、維他命C及酸鹼值，而得知的結論為管壁粗糙，維他命C過多、pH值過高或過低都會較容易產生結石，而一般人具有抑制腎結石的能力，但是體內鈣質不足或過酸、過鹼，又或許是礦物質攝取過多，都容易造成腎結石。

捌、參考資料及其他

(一)中文文獻：
1. 楊定一、馬安宏(Jan Martel) (2010年2月) 科學人雜誌第96期，P28-P41。
2. 徐明強(2004年11月) 遠東的世界，天下雜誌股份有限公司。
3. 張龍芬、袁紹英、游星輝(2004年)，腎結石成因，天下雜誌股份有限公司。
4. 張景發(2008年6月17日)，奈米細菌與無生命20年追隨經驗，中國時報。
5. 呂研儀(2016年)，腎臟結石處置與繼發性高血壓的關係，國立清華大學/生物資訊與結構生物研究所碩士論文。
6. 喻賢忍(2007年)，台灣草酸鈣型腎結石與白素基因的DNA變異與相關性研究，國立清華大學生物資訊與結構生物研究所碩士論文。
(二)外文文獻：
1. John D. Young, Jan Martel1,2, Lena Young, Cheng-Yeu Wu, Andrew Young1, David Young (February 2009) Putative Nanobacteria Represe Physiological Remnants and Culture By-Products of Normal CalciumHomeostasis.
2. Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander E (1999) Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. Kidney Int 56:893-1898.
3. Schaffer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Kettler M (2003) The serum protein alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. J Clin Invest 112: 357-366.
4. Dancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, et al. (2003) Attempted isolation of Nanobacterium sp. Microorganisms from upper urinary tract stones. J Clin Microbiol 41: 368-372.