92　隕石学的手法による尿路結石の形成機序解明とその予防	安井　孝周

【目的】尿路結石は、90%以上の無機成分と数%の有機成分で構成されている。その形成過程は、結晶核形成、成長、凝集、石灰化を辿ると考えられてきたが、その詳細な機序は未だ解明されていない。本研究の目的は、尿路結石の成長機序を解明するために、隕石学・鉱物学の技術を応用した尿路結石内の無機成分と有機成分の二次元マッピング法を開発し、さらにこの分析技術によって無機成分と有機成分の分布・構造の関係性を見出すことである。

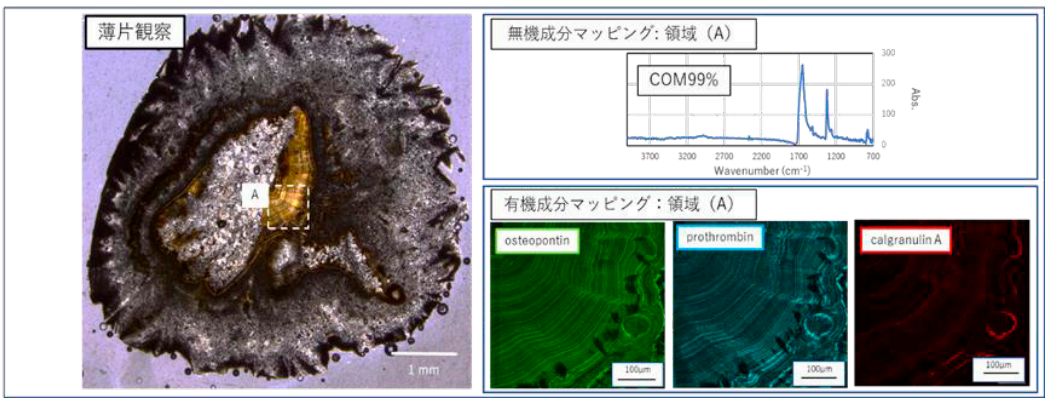
【方法】10 サンプルのシュウ酸カルシウム結石から、平面研磨によって構造観察や成分分析が可能な厚さ 20μm の薄片を作製し、以下の研究を行った。研究 1：偏光顕微鏡を用いた尿路結石の結晶構造を観察した。研究 2：フーリエ変換赤外分光分析（FT-IR）を用いた無機成分の分布構造解析を行った。研究 3：蛍光免疫染色を用いた有機成分（osteopontin（OPN）、Renal prothrombin fragment 1（RPTF-1）、calgranulin A（Cal-A）の分布構造解析を行った。

【結果】まず代表的なサンプル 1 を評価した（図）。研究 1：偏光顕微鏡観察の光学的特徴から、結石中心部では、層状構造を呈した結晶領域（A）、直径 50μm の結晶で構成された領域（B）、辺縁部では、直径 10μm 以下の結晶で構成された領域（C）に分類できた。研究 2：研究 1 の領域（A）、（B）では、シュウ酸カルシウム一水和物（COM）99%に対して、領域（C）では、二水和物（COD）40%を含んでいた。研究 3：領域（A）では、OPN、RPTF-1 のみが層状かつ数μm 均一の間隔で分布していた。領域（B）（C）では OPN、RPTF-1 は結晶内に分布するものの、Cal-A は結晶粒界に分布していた。

さらに我々は 10 サンプルの追加分析から、尿路結石を構成する COM、COD 結晶の種類、およびそれぞれの結晶サイズ・構造の類似性から 4 つの Type に分類した。結石中心部では、数μm 大の COM 結晶から成る顆粒状領域（Type1）と、数十μm 大の COM 結晶 から成るモザイク状領域（Type2）を確認した。辺縁部では、数 nm 大の COM 結晶から成る層構造領域（Type3）と、数十μm 大の COD 結晶から成る領域（Type4）を確認した。Type1 と Type2 では、OPN、RPTF-1 は結晶内部に、Cal-A は結晶粒界に分布していた。Type3 では、OPN、RPTF-1 は数μm 均一な周期で、Cal-A は不均一な周期で層状に分布していた。Type4 では、OPN は結晶内を点状かつ直線状に、RPTF-1 は線状かつ縞状に分布していた。

【結論】今回我々は、隕石学・鉱物学で用いられた技術を応用することで、尿路結石の無機成分・有機成分の二次元マッピング法を開発した。この手法により COM、COD の無機成分における OPN、RPTF-1、そして Cal-A の局在を初めて可視化することに成功した。また複数のサンプル分析結果から、尿路結石を構成する COM、COD 結晶の種類・サイズ・構造には類似性があり、その分類別の結晶においての 3 つの有機成分の分布に違いがあることがわかった。有機成分の局在の違いから、無機成分に対する相互作用が異なることが考えられた。

薄切切片を用いた有機成分マッピング



92. 隕石学的手法による尿路結石の形成機序解明とその予防

安井　孝周

名古屋市立大学 大学院医学研究科 腎・泌尿器科学分野

Key words：尿路結石の薄片，隕石学的手法，二次元マッピング法，フーリエ変換赤外分光分析，多重免疫染色

緒　言

わが国における尿路結石の生涯罹患率は 12%に達し、今や国民病となりつつある［1］。その予防法は飲水・食事指導が主体であるが、5 年再発率は約 50%と非常に高く、難治性である［2］。尿路結石は、90%以上の無機成分と数%の有機成分で構成され、その形成過程は、結晶核形成、成長、凝集、石灰化を辿ると考えられてきたが、その詳細な機序は未だ解明されていない。

私たちは「尿路結石本体には無機成分や有機成分の成分情報だけでなく、結石がどのようにして大きく成長したのかといった“成長の軌跡”など重要な情報が含まれる」と考えた。従来の結石研究では、粉末化した結石に対して赤外分光分析、LC-MS 解析するなど、結石成分の網羅的解析が主体であった［3〜5］。しかし、この分析方法では、結石を粉末化することで結石構造が破壊されるため、結石内部における表面的・空間的構造情報は把握できない。そこで今回着眼したのが、鉱物学・隕石学的アプローチである。鉱物学・隕石学では、薄片（岩石や鉱物を薄く成形し、組織観察や分析を可能にしたもの）を作製し、その観察や種々の分析結果から、岩石や鉱物が作られた成因を推定する分野である。さらにこの手法は、地上で得られる岩石からの地球内部環境や、宇宙から飛来した隕石や宇宙塵からの太陽系形成初期の宇宙環境の解明など、鉱物構成の時間軸を探るには非常に有効である。

本研究の目的は、鉱物学・隕石学的アプローチを応用し、尿路結石の形成機序の解明することである。まず薄片作製が困難とされていた尿路結石から、無機成分・有機成分の破損を最小限にとどめた状態で薄片を作製した。その薄片から無機分子の分布構造解析（偏光顕微鏡・FTIR）と有機分子の分布構造解析（蛍光免疫染色）を行うことで、尿路結石の形成機序を解明するために役立つ新規性のある結石分析技術を開発することである。さらに、これらの分析手法を応用することで、結石内に含まれる無機成分・有機成分の構造的関係性を明らかにすることである。

方　法

1. サンプル整形法の確立

尿路結石形成の成因を調べるためには、臨床的に採取した尿路結石から標本を作製し、その構造における構成成分の分布を明らかにすることが重要である。そのために、患者から回収した尿路結石から無機成分・有機成分の破損を最小限にとどめた状態で結石薄片を作製した。平面研磨によって、構造観察や成分分析が可能な厚さ 20〜30 μm の薄片を 1 試料から“複数枚”を作製した。それらを用いて、下記の【研究 1】【研究 2】【研究 3】の 3 段階の構造分布解析を行った。

2. 尿路結石を構成する無機分子の構造・分布解析

尿路結石を構成する無機成分の 70%以上がシュウ酸カルシウムである。シュウ酸カルシウムには、無水物、一水和物（COM）、二水和物（COD）、三水和物（COT）が存在し、結石中に見られるのは主に COM と COD である。今回我々はシュウ酸カルシウムの COM、COD に対して下記の方法で分析を行った。

【研究 1】偏光顕微鏡観察による結石構造解析：偏光顕微鏡を用いて結石薄片を観察し、構造的・光学的特性から、結晶構造・成分を推定した。さらに、構造の異なる各層で結晶成分の違いを検討した。

【研究２】フーリエ変換赤外分光分析を用いた結石構造解析：①で捉えた結晶構造領域から得た FTIR スペクトラムからデータベースに対応付けることで成分同定ならぶに含有率を算出した。

3. 尿路結石を構成する有機分子の構造・分布情報解析

結石に含まれる有機成分には、100 以上のタンパク質が同定されている。中でもカルシウム結合タンパク質は、カルシウムイオンに特異的に結合するため結石成長に大きな影響を及ぼすといわれる。今回私たちは、3 つのカルシウム結合タンパク質（Osteopontin（OPN）、Renal Prothrombin-1（RPTF-1）、Calgranulin-A（Cal-A））に着目し、分布構造解析を行った。

【研究３】蛍光免疫染色を用いた有機分子の分布情報解析：クエン酸によるエッチング処理を行った薄片に対して、複数の有機分子の局在を蛍光免疫染色（蛍光多重染色法）で可視化した。目的とする有機分子に対する特異的な一次抗体を薄片に反応させ、その後蛍光標識された二次抗体を反応させた。蛍光顕微鏡で観察し有機分子の分布情報を評価した。

結　果

まず、尿路結石の代表的サンプルに対して【研究１】【研究 2】【研究 3】の構造分布解析を行った（図 1）。

【研究１】偏光顕微鏡観察の光学的特徴から、結石中心部では均一な層構造を呈している領域（A）、直径 10μm 程度の不均一な結晶が凝集している領域（B）、に、結石辺縁部では直径数μm の結晶が凝集している領域（C）、楔形状構造を呈している領域（D）に分類できた。

【研究２】その分類した領域に対し FTIR で分析した結果、結石中心部領域（A）、領域（B）では 99%が COM を認めたのに対して、結石辺縁部領域（C）領域（D）では COD が 30%以上を認めた。

【研究３】領域（A）では、OPN、RPTF-1 のみが層状かつ数μm 均一の間隔で分布していた。一方、Cal-A は層状に分布を認めるも 10μm～50μm の不均一な間隔で分布していた、領域（B）（C）（D）では OPN、RPTF-1 は結晶内に分布するものの、Cal-A は結晶粒界に分布していた。

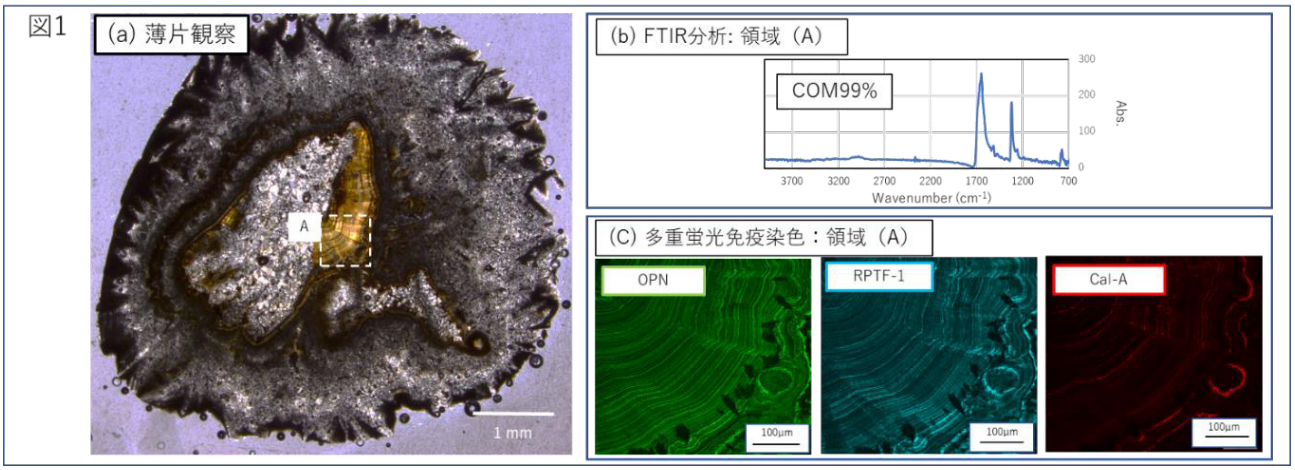


図 1. 薄切切片を用いた有機成分マッピング

a） サンプル 1 に対する偏光顕微鏡観察。

b） 領域（A）に対する FTIR 分析結果。

c） 領域（A）に対する OPN、RPTF-1、Cal-A の蛍光免疫染色結果。

さらに我々は 10 サンプルの追加分析結果から、尿路結石を構成する COM、COD 結晶の種類、およびそれぞれの結晶サイズ・構造の類似性から 4 つの Type に分類した（図 2）。

結石中心部では、数μm 大の COM 結晶から成る顆粒状領域（Type1）と、数十μm 大の COM 結晶から成るモザイク状領域（Type2）を多く認めた。一方で結石辺縁部では、数 nm 大の COM 結晶から成る層構造領域（Type3）と、数十μm 大の COD 結晶から成る領域（Type 4）を多く認めた。蛍光免疫染色の結果から、Type1 と Type2 では、OPN、RPTF-1 は結晶内部に分布していたが、Cal-A は結晶粒界にしか分布していなかった。Type3 では、OPN、RPTF-1 は数μm 均一な周期で層状に分布していたが、Cal-A は 10～50μm の不均一な周期で層状に分布していた。Type4 では、OPN は結晶内を点状で直線状に、RPTF-1 は線状かつ縞状に分布していた。

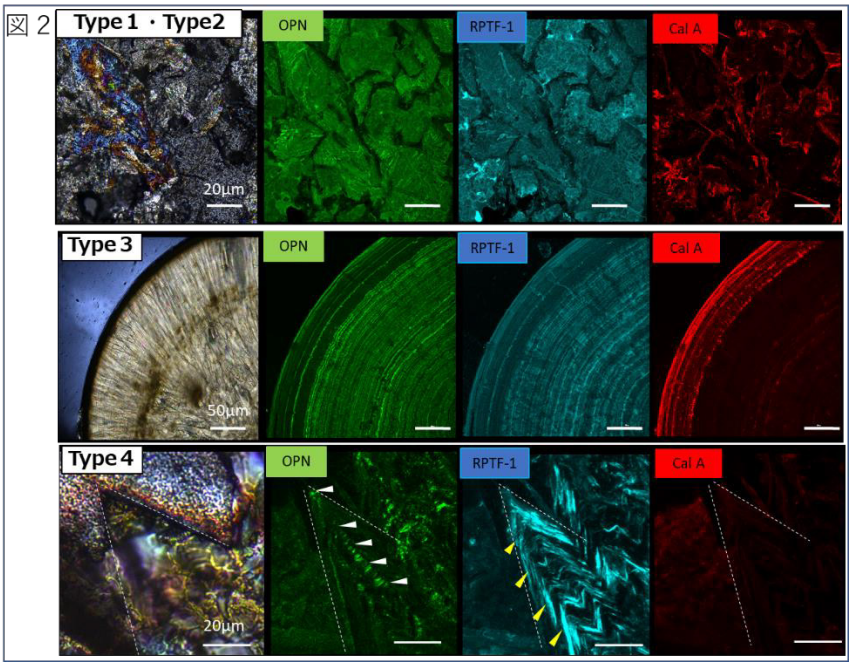


図 2. Type1～4 に対する OPN、RPTF-1 および Cal-A に対するそれぞれの蛍光免疫染色結果

考　察

今回我々は、隕石学・鉱物学で用いられた技術を応用することで、尿路結石の無機成分・有機成分の二次元マッピング法を開発した。この手法により尿路結石を構成する COM、COD の無機成分の同定そして含有量を評価することができ、さらに有機成分である OPN、RPTF-1、そして Cal-A の局在を可視化することに成功した。また複数のサンプル分析結果から、COM、COD 結晶の種類・サイズ・構造には類似性があり、それぞれの結晶において 3 つの有機成分の分布に違いがあることがわかった。

有機成分の局在の違いから、結石形成過程において無機成分との相互作用が異なることが示唆された。今後さらに無機成分と有機成分の構造的関係性が明らかにし、結石形成メカニズムの解明につなげていきたい。

共同研究者・謝辞

共同研究者は、大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻の森勇介、名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野の岡田淳志、大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻の丸山美帆子である。終始熱心なご指導を頂いた森勇介教授には感謝の意を表します。共同研究者である、岡田淳志先生、丸山美帆子先生には、検体の採取、分析手法・考察など、細部にわたるご指導をいただきました。ここに感謝いたします。薄切、マッピングなどのデータに尽力された田中勇太朗先生はじめ本研究に助言、尽力いただきました METEOR Project の先生方に感謝申し上げます。

文　献

1) Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Ando R, Taguchi K, Tozawa K, Kohri K. Pathophysiology-based treatment of urolithiasis. Int J Urol. 2017 Jan;24(1):32-38. doi: 10.1111/iju.13187. PubMed PMID: 27539983.

2) Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, Gambaro G, Canales BK, Doizi S, Traxer O, Tiselius HG. Kidney stones. Nat Rev Dis Primers. 2017 Jan 12;3:17001. doi: 10.1038/nrdp.2017.1. PubMed PMID: 28079115.

3) Sivaguru M, Saw JJ, Williams JC Jr, Lieske JC, Krambeck AE, Romero MF, Chia N, Schwaderer AL, Alcalde RE, Bruce WJ, Wildman DE, Fried GA, Werth CJ, Reeder RJ, Yau PM, Sanford RA, Fouke BW. Geobiology reveals how human kidney stones dissolve in vivo. Sci Rep. 2018 Sep 13;8(1):13731. doi: 10.1038/s41598-018-31890-9. PubMed PMID: 30213974; PubMed Central PMCID: PMC6137216.

4) Ryall RL, Chauvet MC, Grover PK. Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. BJU Int. 2005 Sep;96(4):654-63. PubMed PMID: 16104927.

5) Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. Biomed Res Int. 2013;2013:292953. doi: 10.1155/2013/292953.