Osaka University Knowledge Archive

Title	Heparan sulfate in the stone matrix and its inhibitory effect on calcium oxalate crystallization
Author(s)	山口, 誓司
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38591
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【41】

氏　　名	山口誓司（やまぐち せいじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第 10879 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	Heparan sulfate in the stone matrix and its inhibitory effect on calcium oxalate crystallization **(尿路結石マトリックス中のヘパラン硫酸と蓚酸カルシウム結晶形成におけるその作用)**
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】

尿路結石中には必ず有機性基質（Stone Matrix）が含まれているが，このStone Matrixの尿路結石形成過程における作用は未だ明らかにはされていない。本研究はこのStone Matrixの由来と尿路結石形成過程における役割を明らかにするために，Stone Matrixの中の可溶性分画（Soluble Stone Matrix），蓚酸カルシウム結晶表面吸着物質，及び尿中高分子分画について，Glycosaminoglycans（以下GAGsと略す）の分析とそれぞれの蓚酸カルシウム結晶形成に対する作用につき比較検討を行なった。

【方　法】

1. 尿中高分子分画（Urinary macromolecular substances；以下UMMsと略す）の精製：細胞成分等を除去したプール尿を分画分子量3000の限外濾過膜にて脱塩，濃縮し凍結乾燥を行ない，UMMsの試料とした。2. 蓚酸カルシウム結晶表面吸着物質（Crystal surface binding substances；以下CSBSと略す）の作製：細胞成分等を除去したプール尿1ℓに，1Mの$CaCl_2$ 32mlと0.1Mの$Na_2C_2O_4$ 320mlを添加し，37℃，6時間振盪後，遠沈を行ない蓚酸カルシウム結晶を得た。これを多量の蓚酸カルシウム飽和水溶液にて洗滌後，10%EDTA溶液にて結晶を溶解した。次いで，分画分子量3000の限外濾過膜を用いて，脱塩，濃縮後，凍結乾燥しCSBSの試料とした。3. Seed crystal surface binding substances（以下Seed CSBSと略す）の作製：CSBSと同様に処理した尿3ℓに市販蓚酸カルシウム1水和物の結晶50gを加え，37℃，6時間振盪した後，CSBSと同様の処理をし，得た試料をSeed CSBSとした。4. Soluble Stone Matrixの精製：乾燥保存していた結石の中から蓚酸カルシウム1水和物を選び，細かく粉砕した後，透析チューブ（分画分子量3500）に入れ，5%EDTA溶液にて脱灰した。さらに三日間の蒸留水透析を行なった後，Stone Matrix溶液を遠沈後，上清を採取し，Soluble Stone Matrix溶液を得た。この溶液を凍結乾燥し，試料とした。5. ウロン酸，蛋白量の測定：各試料はBitter and Muirらの方法により，ウロン酸量の測定を行ない，蛋白量はBradford法にて測定を行なった。6. GAGsの分析：除蛋白した各試料はHata and Nagaiの方法によるセルロースアセテート膜を用いた二次元電気泳動法を行ない，含まれるGAGsの同定を行

なった。7. 蓚酸カルシウム結晶形成に対する阻止作用の検討：Robertson の方法に準じ，準安定過飽和溶液を用いた seed crystal 法にて阻止活性の測定を行なった。

【成　績】

1. 二次元電気泳動において，UMMs ではコンドロイチン硫酸，ケラタン硫酸，デルマタン硫酸（DS），ヒアルロン酸，及びヘパラン硫酸（HS）が認められた。Seed CSBS では UMMs と同様の GAGs が認められたが，HS の占める割合が高くなっていた。急激な結晶形成の過程において吸着した CSBS では HS と少量の DS のみが認められた。Soluble Stone Matrix では HS だけが認められた。
2. 阻止活性の測定における UMM, CSBS, Soluble Stone Matrix の三者の比較では単位重量あたり，単位蛋白量あたりでは差を認めなかったが，ウロン酸量あたりで Soluble Stone Matrix が最も阻止活性が強く次いで CSBS であり，UMMs は最も弱かった。さらに，Soluble Stone Matrix の阻止活性を蛋白分解の前後で比較すると単位重量あたりでの比較では差を認めなかったが，ウロン酸量あたりでの比較で蛋白分解後は阻止活性が低下していた。

【総　括】

1. GAGs の分析で Seed CSBS は UMMs の一部が特異的に結晶表面に吸着したものであり，さらに CSBS にはその傾向が強く，Soluble Stone Matrix は CSBS の一部が特異的に取り込まれたものと考えられた。
2. HS の含有率が増加するにつれ，その阻止活性が増強することから，これらの高分子物質の阻止作用は HS-蛋白複合体がその主たる作用を担っていると考えられた。
3. Soluble Stone Matrix 中の HS は結晶表面に吸着した結晶凝集の強い阻止物質でありながら，結石形成過程において結石内に取り込まれたものであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Stone Matrix の由来と尿路結石形成過程における役割を明らかにするために，Stone Matrix 中の可溶性分画（Soluble Stone Matrix），蓚酸カルシウム結晶表面吸着物質，及び尿中高分子分画について，Glycosaminoglycans（GAGs）の分析とそれぞれの蓚酸カルシウム結晶形成に対する作用につき比較検討した。

尿中高分子分画 Urinary macromolecular substances(UMMs)と Soluble Stone Matrix の精製をおこない，プール尿に 1 M $CaCl_2$と0. 1M $Na_2C_2O_4$を加えて蓚酸カルシウム結晶形成を促し Crystal surface binding substances（CSBS）を抽出し，さらにプール尿に市販蓚酸カルシウム 1 水和物の結晶を加えて結晶に吸着する物質 Seed crystal surface binding substances（Seed CSBS）を抽出した。

セルロースアセテート膜を用いた二次元電気泳動において，UMMs ではコンドロイチン硫酸，ケラタン硫酸，デルマタン硫酸（DS），ヒアルロン酸，及びヘパラン硫酸（HS）が認められた。Seed CSBS では UMMs と同様の GAGs が認められたが，HS の占める割合が高くなっていた。急激な結晶形成の過程において吸着した CSBS では HS と少量の DS のみが認められた。Soluble Stone Matrix では HS だけが認められた。

阻止活性の測定における UMMs, CSBS, Soluble Stone Matrix の三者はウロン酸量あたりの比較で Soluble Stone Matrix が最も阻止活性が強く次いで CSBS であり，UMMs は最も弱かった。さらに，Soluble Stone Matrix の阻止活性を蛋白分解の前後で比較すると蛋白分解後は阻止活性が低下していた。

GAGs の分析で Soluble Stone Matrix は CSBS の一部が特異的に取り込まれたものであることが示唆され，さらに Soluble Stone Matrix 中の HS は HS-蛋白複合体として結晶表面に吸着した結晶凝集の強い阻止物質でありながら，結石形成過程において結石内に取り込まれたものであることを明らかにしたことは学位論文に値する。