

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14464

研究課題名(和文)腎臓を模倣した膜晶析装置を用いた尿路結石の発生機構および抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of urolithiasis and its inhibition using a membrane crystallizer that mimics kidney

研究代表者

小堀 深(KOHORI, Fukashi)

早稲田大学・理工学術院・専任講師

研究者番号：70329093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、食生活の欧米化により尿路結石症患者は年々増加している。尿路結石は体内に生じるシュウ酸カルシウム結晶によって引き起こされる疾患である。そこで、水のみを透過させる膜を用いて原尿模擬水を濃縮し、腎臓の機能を簡易的に再現することで、シュウ酸カルシウム結晶析出挙動の解明を計画した。また、結晶が析出しない条件を検討するために、尿中の成分であるクエン酸とマグネシウムを用いて実験を行った。その結果、膜面上にシュウ酸カルシウム結晶を核化・成長させることができた。さらに添加剤を変化させることで、不安定な水和物が析出することが分かった。これらの成果により、尿路結石の発生抑制と再発防止に新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、人間の腎臓で起こる尿の濃縮を模した装置を使い、生体内での尿路結石の発生機構の解明を目指したものである。血中シュウ酸濃度が上昇すると尿路結石ができやすいことがわかっている。また、一度り患してしまうと、再発する可能性が非常に高い。しかし、これらの機構が不明であり、新たな知見が望まれていた。本研究では、血中のクエン酸やマグネシウムイオンがシュウ酸カルシウム結晶の発生・成長を抑制する機構を明確にした。これにより、尿路結石の発生抑制や再発防止に寄与する知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Recent years, the number of patients with urolithiasis has been increasing year by year due to westernization of eating habits. Urinary tract stones are diseases caused by calcium oxalate crystals that occur in the body. Therefore, we planned to elucidate the precipitation behavior of calcium oxalate crystals by concentrating raw urine simulated water using a membrane that only allows water to reproduce the function of the kidney. In addition, in order to investigate the conditions under which crystals do not precipitate, an experiment was conducted using citric acid and magnesium, which are the components in urine. As a result, it was possible to nucleate and grow calcium oxalate crystals on the membrane surface. Further, it was found that unstable hydrate was precipitated by changing the additives. As a result, new findings were obtained for the prevention of urinary stones and their recurrence.

研究分野：化学工学

キーワード：尿路結石 腎臓 膜晶析 シュウ酸カルシウム クエン酸 マグネシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

晶析現象の1つとして、バイオミネラリゼーションに関する研究が行われている。バイオミネラルとは、生体における無機物質から成る硬質組織であり、一例として歯や骨をはじめ、貝殻、真珠、珊瑚などが挙げられる。生物はバイオミネラルによって自身の生体基盤を形成している一方で、この現象によってもたらされる疾患も存在する。その例として結石症が挙げられる。結石とは、分泌物の成分が石のように固まった無機硬質物質であり、発生する部位は様々である。その中でも、尿路(腎臓から尿道)で発生する尿路結石は、泌尿器科における発生頻度が最も高く、年間罹患率も年々上昇を続ける非常に問題視される疾患である。その症状として、腰背部から側腹部にかかる激痛や下腹部への放散痛に加え、血尿や排尿トラブルが挙げられるが、治療法としては破石治療や開腹手術など限られた治療法しかない。そのため、新たな治療法や予防法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

尿路結石発生のメカニズムに関する既往研究では、結石の主成分がシュウ酸カルシウム(CaC_2O_4)、結石形成抑制物質がクエン酸やマグネシウムであること、および腎臓内の遠位尿細管から集合管における水分の再吸収によって生じた過飽和から結石が形成されることなどが知られている。しかし、尿路結石症に関する研究の多くは医学分野(遺伝因子や環境因子)で行われているため、工学的知見は少なく、特に遠位尿細管から集合管におけるシュウ酸カルシウム結晶の核化挙動に関する知見が少ない現状である。したがって、尿路結石発生のメカニズムに対する工学的アプローチにより、新たな知見を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、腎臓(遠位尿細管から集合管)における水分の再吸収(原尿濃縮)により生じる晶析現象を、実験系としてモデル化するために、当研究室が専攻する晶析分野に膜分離技術を応用させた膜濃縮晶析法を用いた。これにより、尿路結石という生体内における晶析現象を実験系として再現し、尿路結石の発生源であるシュウ酸カルシウム結晶の形成プロセス(核化挙動・成長挙動)の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) シュウ酸イオン高濃度下での結晶発生

シュウ酸濃度 45mg/L での CaC_2O_4 結晶化プロセスの観察を行った。試料調製直後に溶液が白濁し、結晶の析出が確認された。 CaC_2O_4 には水和物の存在が知られており、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ が存在する。これらの結晶の形はそれぞれ $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が長い六角形板状、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は八面体、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ が平行四辺形板状である。今回得られた結晶では、形の違いだけで判別することは難しかった。また、結晶の大きさも時間経過によって変化があまり見られなかった。図1に析出した結晶のXRDスペクトルを示す。このスペクトルから、今回の

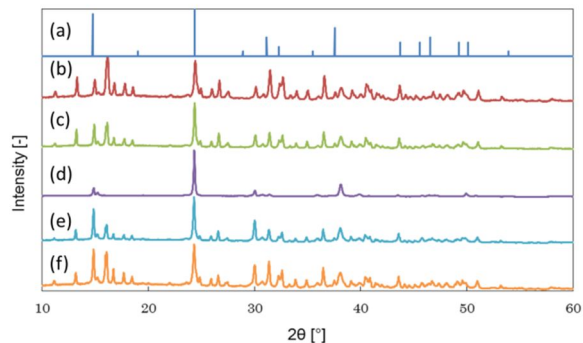


図1 XRD spectrum

(a) $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (b) 7 hours (c) 5 hours
(d) 3 hours (e) 1 hour (f) 0 hour

実験では $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ と $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ が析出していることが分かった。攪拌時間が3時間のとき、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ のみ析出した。それ以外の攪拌時間では $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ と $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ が析出していることが確認できた。XRD装置での定量分析を行ったところ、どの攪拌時間においても $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ の方が析出量が多かった。このことから、 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が安定形だと考えられる。

(2) 共存物質の影響

添加物質無し、 Mg^{2+} のみ添加、 Mg^{2+} とクエン酸を添加した溶液を用いてそれぞれ実験を行った。SEMを用いて確認した膜面上を図2から図4に示す。倍率1200倍で観察を行った。無添加系では楔形および八面体型の微結晶が析出した(図2)。このことから $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が析出したことが確認できた。 Mg^{2+} 添加系では楔形および八面体型の結晶のほかに柱状結晶も確認できた(図3)。 Mg^{2+} のみを添加した系では $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以外に $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ も析出した。最も原尿組成に近い系である、 Mg^{2+} とクエン酸添加系では他の二つよりも明らかに結晶が大きく、八面体型の結晶が析出した(図4)。八面体型の結晶は、実際の尿路結石患者の体内で析出する $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ に特有の形である。クエン酸を添加することで不安定な二水和物が主に析出した。また、他の系と比較して結晶個数が減少していることが確認できた。添加剤を変化させることで析出する CaC_2O_4 結晶が変わり、添加した系では不安定な二水和物、三水和物が析出した。析出した結晶個数が減少した理由として、 Mg^{2+} 添加により核化が抑制されたためと考えられる。

次に, EDX での定性分析を行った。すべての EDX の結果から CaC_2O_4 結晶が析出していることが確認できた。また, EDX の結果から他に出現しているピークは Na と Cl であるため, 結晶表面に付着した NaCl の可能性が挙げられるが, 膜面上に立方体型結晶は存在していないので, 確認できる結晶は CaC_2O_4 結晶と考えられる。

析出した CaC_2O_4 結晶の粒径分布を図 5 に示す。何も添加していない系では微結晶がたくさん析出し, $5\ \mu\text{m}$ 未満の結晶がほとんどであった。この平均粒径は $2.93\ \mu\text{m}$ となった。 Mg^{2+} 添加系では, 何も添加していない系と比較して結晶個数が少なくなり, 粒径が大きくなった。この平均粒径は $6.39\ \mu\text{m}$ となった。 Mg^{2+} とクエン酸添加系では結晶の大きさがさらに大きくなった。この平均粒径は $10.6\ \mu\text{m}$ となった。

最後に, 残った母液に含まれる $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 濃度を確認するため IC 分析を行った。今回用いた無病者の原尿を単純化した試料溶液に対し, $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ の溶解度は $0.8429\ \text{mg/L}$ であり, 難溶であることが分かった。濃縮は $200\ \text{mL}$ から $40\ \text{mL}$ まで行った。濃縮を行うことで過飽和をつけているため, セル内に残った試料溶液のシュウ酸濃度は上がっているはずである。全ての試料溶液について, 実験を行う前の $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 濃度は $0.0036\ \text{mg/L}$ である。何も添加していない系では, 溶液に含まれるシュウ酸が少なかったため IC ではピークを測定することができなかった。マグネシウムを添加した系では $0.0151\ \text{mg/L}$ となった。また, マグネシウムとクエン酸を添加した系では $1.4430\ \text{mg/L}$ となった。このことからクエン酸を添加することによって $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ の溶解度が上がった。これはマグネシウムが核化を抑制し, クエン酸がキレート効果によってカルシウムを取り込みシュウ酸と結合することを抑制していると考えられる。

以上より, シュウ酸カルシウム結晶の添加物に対する様々な変化を観察することができた。これらの知見を基に, 尿路結石の核生成機序の解明にもつながることが期待される。

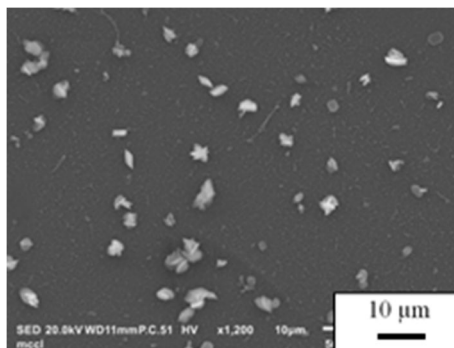


図 2 SEM image of CaC_2O_4 crystals (free)

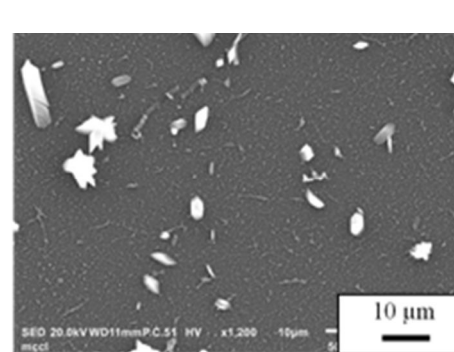


図 3 SEM image of crystals (Mg^{2+})

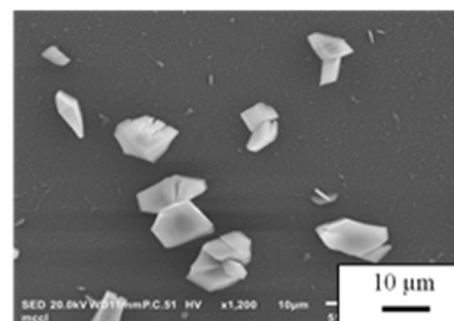


図 4 SEM image of CaC_2O_4 (Mg^{2+} , Citric acid)

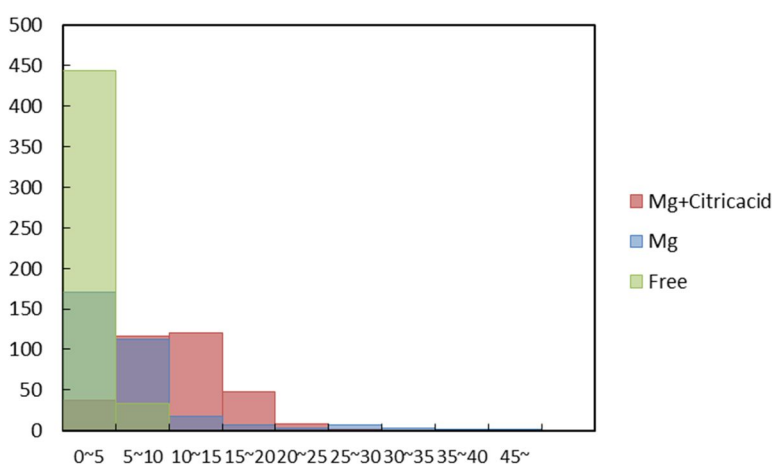


図 5 Crystal size distribution of CaC_2O_4 crystals

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Momoko Oda, Izumi Hirasawa, Fukashi Kohori	4. 巻 43
2. 論文標題 Analysis of Morphological Changes in Monosodium Urate Monohydrate Crystals for Gout Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Engineering Technology	6. 最初と最後の頁 1087-1092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ceat.201900634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chihiro Ozono, Izumi Hirasawa, Fukashi Kohori	4. 巻 40
2. 論文標題 Shape Change and Growth Behavior of Monosodium Urate Monohydrate in a Gout Model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Engineering & Technology	6. 最初と最後の頁 1231-1234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ceat.201600680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Momoko Oda, Izumi Hirasawa, Fukashi Kohori
2. 発表標題 Growth behavior of monosodium urate monohydrate by changing concentration in modeling gout
3. 学会等名 BIWIC 2019, 26th International Workshop On Industrial Crystallization (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村公亮、平沢泉、小堀深
2. 発表標題 尿路結石形成プロセスにおけるCaC ₂ O ₄ 結晶へのクエン酸およびMg ²⁺ の影響
3. 学会等名 化学工学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小堀深、中村公亮、大園千尋、平沢泉
2. 発表標題 生体内における晶析現象と析出結晶の性状
3. 学会等名 化学工学会第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihiro Ozono, Izumi Hirasawa, Fukashi Kohori
2. 発表標題 Shape change and growth behavior of monosodium urate monohydrate in model of gout
3. 学会等名 BIWIC 2016, 23rd International Workshop on Industrial Crystallization (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 榎本拓侍、平沢泉、小堀深
2. 発表標題 層状ケイ酸塩を用いた蒸気拡散法によるタンパク質結晶化制御
3. 学会等名 化学工学会第48回秋季大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----