総説

蓆酸カルシウム結晶内阻止物質

金沢医科大学

鈴木孝治

INHIBITORS IN CALCIUM OXALATE CRYSTALS

Koji Suzuki

Department of Urology, Kanazawa Medical University

はじめに

正常人でも尿中に蓆酸カルシウム (CaOx) 結晶をみることが日常診療においてよく経験するが, これはヒトの尿中では CaOx が過飽和状態で存在し, 蓆酸もしくはカルシウムのわずかな濃度変化でも結晶形成を引き起こすことに起因する。正常人でみられる CaOx 結晶は大きさが小さく, 散在性であり, 結石を形成するには至らず, 90% 以上の日本人は生涯尿路結石症にならない。この原因として, 正常人では尿中 CaOx 結晶の形成, 成長, 凝集を促進する因子が不足しているか, もしくは CaOx 結晶の形成・成長・凝集を阻止する因子が豊富に存在するためと考えられる。これに対し再発性 CaOx 結石患者では促進因子が多いか, 阻止因子が少ないため, 大きな凝集した結晶を見ることが多く¹⁾ 半数以上は再発することが知られている²⁾。尿中の蓆酸, カルシウム, 尿酸は CaOx 結晶の促進因子であり, クエン酸, マグネシウムは低分子阻止因子であることは従来の研究で明らかにされてきた。尿路結石は高分子物質の有機成分 (マトリックス) と結晶質から構成されている。結晶質がそのほとんどを占めるが, 有機成分は結石乾燥重量の 3~5% しかない。しかし高分子物質が結石・結晶の表面または結晶中に存在するという事実はこれらが結石形成に対して何らかの役割を果たしていることを強く示唆する。なぜ高分子物質が結石の中に存在するのか, どのようにして結石の中に入ったのか, この高分子物質は結石の中でどのような作用を示すのか, その存在は結石の原因であるのか結果であるのか, といった種々の疑問が湧いてくる。これら結石・結晶中に存在する高分子物質の機能的解析

は研究方法の発展しつつある現状でも未解決の問題も多い。多くの高分子物質が結石・結晶内から同定されているがその機能は全て解決されたわけではない。高分子物質がただ単に結石の中に存在するのではなく特異的な機能, すなわち結晶の形成・成長・凝集の阻止作用を持っているのではないかと考えられるようになり, 機能を解析しようとする研究が行われるようになってきた。

CaOx 結石形成に関与する高分子物質研究対象としては, 1) 尿中の成分, 2) 結石や結晶に含有される成分, 3) 腎細胞や代謝経路などがある。本稿では 2) の CaOx 結晶中から分離同定された有機マトリックス (glycosaminoglycans および結石・結晶内蛋白質) を中心にして, 私共の研究室で得られた知見も併せて論じてみたい。

1. glycosaminoglycans (GAGs)

尿中には GAGs として chondroitin sulfate (ChS), keratan sulfate (KS), heparan sulfate (HS), hyaluronic acid (HA), dermatan sulfate (DS) がそれぞれ 60%, 18%, 15%, 4%, 2% 含まれている^{3)~5)}。heparin は代表的な GAG であるが尿中には存在しない。

GAGs のもつ阻止能の評価は主に seed crystal 法などの CaOx 過飽和溶液の系で研究されてきた。ChS, heparin についての報告が中心で, 合成 GAG である sodium pentosan polysulfate (SPP) も研究対象とされた。初期には尿中で最も多い成分である ChS が研究対象に選ばれてきた^{6)~11)}。ChS は in vitro の系において CaOx 結晶の形成・成長・凝集を阻止するとの報告が多いが, 人工尿系の実験では核形成を促進するとの研

究報告もある。Heparin も同様に CaOx 結晶形成・成長・凝集阻止作用が報告されている^{6)~11)}。これら CaOx 過飽和溶液の実験系はカルシウム、蓚酸量が尿と類似し、再現性が良好ではあるが、実際の尿中での反応とは異なる結果を示すことがあり、本来の機能を過大もしくは過小評価してしまう危険性がある。このため、尿や動物を対象にした GAGs のよりヒトの腎に近い系における評価が求められるようになった。

ChS は CaOx 過飽和溶液では明らかに CaOx 結晶の形成・成長・凝集を阻止する結果を示していたにもかかわらず、全尿系における実験結果で結晶に対して何の影響も及ぼさないというものであった^{12)~14)}。Michelacci らによると、ChS および HS は CaOx 結晶形成を促進するとしている。結晶の形成促進それ自体は結晶に発生する以後の反応を進行しにくくし、結果的に小さな結晶として尿流に乗せて排出しやすくしているのかもしれない。Ryall らは高分子物質を除去した限外濾過尿に ChS を添加し、結晶形成を Coulter counter で測定した結果、結晶に対しては全く阻止作用を示さず、走査電子顕微鏡による観察でも同様であったとしている¹²⁾。実験に用いられた限外濾過尿では他の高分子物質が除外されているため、ChS がこれらと共同で何らかの作用を発揮している可能性は否定できないものの、CaOx 過飽和溶液で得られた結果よりも期待を裏切るものであった。Shum らの凍結尿を使用した実験で、HS は核形成を促進するものの、成長は阻止するというものであった¹⁴⁾。また、Suzuki らは限外濾過尿に HS をあらかじめ添加し蓚酸を加えると得られた結晶は HS によって著明に抑制されたと報告している¹⁵⁾。

SPP は合成された GAG であるがその強い CaOx 結晶形成・成長・凝集阻止作用は CaOx 過飽和溶液でも報告されていたが、全尿系や動物実験の結果でも強い阻止効果が確認された^{16)~18)}。正常尿中には存在しないが、静脈内もしくは経口投与により約 3% が尿中に排出され、結晶凝集阻止にとって十分な尿中濃度が得られることから、治療薬として有効であったとの報告もある¹⁸⁾。

GAGs が CaOx 結石中に存在することは Boyce らによって示唆されていたが¹⁹⁾、その特異的な意義について研究されるようになったのは最近のことである。HS と HA が CaOx 結石中に存在するが、ChS は発見されなかったことを Nishio らは cellulose acetate 電気泳動膜を使用した 2 次元電気泳動法で証明し²⁰⁾、

Roberts らも同様の結果を報告している²¹⁾。さらに CaOx 結晶中にも GAG が含有されており、HS が GAGs の主成分であることを Yamaguchi ら、Suzuki らが報告している^{22) 23)}。HS は heparitinase によって特異的に消化されるという手法を用いてその存在が明らかになった。ChS は通常の分析法を用いた場合には結石や結晶では発見されない。ChS は限外濾過尿に蓚酸ナトリウムを添加して形成される結晶の形態や凝集にほとんど影響しないが、HS は結晶の形成や凝集を強く抑制することが走査電子顕微鏡と Coulter counter による結晶 size 変化の測定で明らかとなった²⁴⁾。限外濾過尿中での HS と ChS の競合実験を実施すると、通常の HS および ChS 濃度では HS のみが結晶内から検出されるが、HS が存在しない場合には ChS が含有されている²⁴⁾。このことから ChS と HS は結晶表面の結合部位を競合していることが示唆された。また、SPP と ChS を使用した競合実験では CaOx 結晶内には SPP>HS の順に取り込まれた²⁵⁾。Angel は CaOx 結晶に対する親和性はそのイオン強度から heparin > HA > ChS > SPP の順としていたが²⁵⁾、私共の実験結果では Fellström らの報告と同様に SPP>HS>ChS という結果が得られた²⁶⁾。これら GAGs の同定には主に電気泳動、染色による半定量という手法が用いられていたが、Iida らは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて結石内 GAGs を正確に定量測定した²⁷⁾。その結果 HS>chondroitin 4 sulfate もしくは chondroitin 6 sulfate という結果であり、HA および chondroitin は微量であったとしている。

以上のことから GAGs のうち特異的に HS が結晶内に取り込まれていることが判明したが、腎尿細管で産生されている HS が結晶形成とともにどのように関連しているかはまったく不明であった。しかし Nishio らは結石形成ラットを用いて結石および腎尿細管に HS が強く発現することを免疫組織学的に証明した²⁸⁾。Iida らは HS の母体である HS proteoglycan (syndecan) の core protein mRNA が結石形成ラットで発現増加することを観察し、HS proteoglycan が結石形成に強く関わっていることを分子生物学的手法を用いて証明した²⁹⁾。

2. 結石/結晶内蛋白質

尿路結石成分中最も多い成分である蓚酸カルシウム (CaOx) 結石には様々な尿中成分が含有されている。

albumin³⁰⁾、globulin³⁰⁾、Tamm-Horsfall glycoprotein³¹⁾、nephrocalcin³²⁾、 α_1 -microglobulin³³⁾、hemoglo-

bin³⁴⁾, neutrophil elastase³⁴⁾, transferrin³⁵⁾, inter- α -trypsin inhibitor (bikunin)³⁶⁾, crystal matrix protein³⁷⁾, uropontin (osteopontin)³⁸⁾, α_1 -antitrypsin³⁹⁾, lithostathine⁴⁰⁾⁴¹⁾, CD59 protein (protectin)⁴²⁾, superoxide dismutase⁴³⁾, calprotectin⁴⁴⁾, β_2 -microglobulin⁴⁵⁾, α_1 -acid glycoprotein⁴⁵⁾, apolipoprotein A 1⁴⁵⁾, retinol-binding protein⁴⁵⁾, urinary prothrombin F 1⁴⁶⁾などが報告されている。

これらの有機成分は結石を構成している結晶内、もしくは結晶の間に存在するものと想像される。当初、尿中に存在する高分子物質は結晶表面に吸着している状態、もしくは結晶間隙に糊のように存在し結晶同士を接着しているものと考えられてきた。しかしながら、結晶内に存在する物質は決して尿中成分と同じではなく極めて特異性の高いものであることが最近の研究によって明らかにされてきた。

crystal ghost⁴⁷⁾⁴⁸⁾はCaOx結晶をethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を含んだゲル内でCaOx結晶質だけを溶解したあとに残る立体構造物であるが、これこそが結晶の中に存在する高分子物質であり、種々の高分子物質が含有されている本態である。CaOx結晶の有機成分を分析する手法としてKoideらは遠心濾過尿に蓚酸およびカルシウムを添加することにより結晶を作成し、これをEDTAで溶解することによって得られた高分子物質をcrystal surface binding protein (CSBS)⁴⁹⁾と呼び結晶に含有される高分子物質研究の手法を導入した。Doyleらは新鮮尿を使用し遠心濾過尿に蓚酸ナトリウムを添加することによりCaOx結晶を作成し、同様にEDTAにて溶解後、電気透析、凍結乾燥し、crystal matrix extract (CME)を作成し、これを結晶内高分子物質とした³⁷⁾。このCMEは結晶凝集に対して非常に強い阻止作用を示すことが明らかになっている⁵⁰⁾。

CaOx結晶内高分子物質の研究では尿を遠心濾過し、蓚酸単独または蓚酸およびカルシウムを添加して結晶を作成する方法がとられているが、Atmaniらは遠心濾過という操作によりalbumin, Tamm-Horsfall glycoprotein (THP), osteopontin (OPN)が減少すること、この操作なしではalbumin, prothrombin, OPNが主要蛋白でinter- α -trypsin inhibitor, α_1 microglobulinも検出されたとしている⁵¹⁾。研究手法の多様化と進歩により多くの蛋白質の存在が明らかになってきたが、これらの蛋白質がただ単に結石の中に存在するのではなくCaOx結石に対して特異的な機能を発揮して

いたと推測される。特に結晶・結石の中に多量に含有されるものがCaOx結晶の形成・成長・凝集の阻止物質ではないかと考えられるようになり、結晶内蛋白質を構成する高分子物質の同定と機能面の評価が実施されてきた。

これまでの研究で結石および結晶内に存在するCaOx結晶形成・成長・凝集阻止物質として明らかにされてきたものには次のようなものがある。

nephrocalcin (14 kDa)⁵²⁾, THP (80 kDa)⁵³⁾, intertrypsin inhibitor (40 kDa)³⁶⁾, crystal matrix protein (31 kDa)³⁷⁾, uropontin (45 kDa)³⁸⁾, uronic acid rich protein (35 kDa)⁵⁴⁾, OPN (45 kDa)^{38) 55)}, などである。以下各々の蛋白の特徴をみる。

a) nephrocalcin (NC)

NCはシカゴ大学のNakagawaが尿から抽出したCaOx結晶の成長阻止物質である。1978年CaOx結晶の成長を阻止するacidic glycopeptideとして報告され⁵⁶⁾、以後glycoprotein inhibitorとして報告されてきた^{52)57)~60)}。1987年に初めてNCとして発表されている³²⁾。分子量は14 kDa⁵⁶⁾であるが、polymerizationのため23~30, 45~48, 60~68 kDaと異なる分子量を示す⁵⁷⁾⁶⁰⁾。最初NCは尿から分離された⁵⁶⁾が、その後腎細胞培養液⁵⁷⁾、腎結石³²⁾、結石患者尿³²⁾、腎細胞癌患者尿⁶¹⁾からも分離されている。NCは近位尿管およびHenle loop上行脚の上皮細胞に局在する⁶²⁾。NCの尿中濃度は5~16 mg/lで、正常人では γ -carboxyglutamic acid (Gla)を2~3個含有しているが⁵²⁾⁵⁷⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾、結石患者ではGlaは欠損しているとされた⁶³⁾。残念ながらアミノ酸配列は現時点まで明らかにされていない。NCはinter- α -trypsin inhibitorのlight chain (bikunin)との類似性を指摘する報告もあるが⁶⁴⁾、NCのアミノ酸配列、DNA塩基配列が決定されれば他の阻止物質との異同や相関関係が明らかになると思われる。

b) Tamm-Horsfall glycoprotein (THP)

尿中で最も多い蛋白成分であるが、その正確な機能は不明である。遠位尿管とHenle loop上行脚の上皮細胞に局在し⁶⁵⁾、1日に20~200 mgと大量に排泄される⁶⁶⁾。細胞との接着作用を有するArg-Gly-Asp (RGD)配列をその構造の中に持つ。分子量は80 kDaで高濃度陽イオンの存在や低pHで凝集しやすい状態となる⁶⁵⁾。結石患者と正常人では排泄量に差はない⁶⁷⁾。CaOx結石マトリックスの中に存在することが確認されているが⁶⁶⁾、新鮮CaOx結晶内には見られな

い³⁷⁾。CaOx 過飽和溶液では THP は CaOx 結晶の成長阻止作用を示し⁶⁸⁾⁶⁹⁾、限外濾過尿を使用した場合には明らかに CaOx 結晶凝集阻止作用を示す^{12) 70)}。尿中においては CaOx 結晶形成促進作用を示したとの報告もある^{69) 71)}。強イオンの存在や低 pH では阻止作用は消失する。このように in vitro では促進作用を示したり、阻止作用を示したりすることから生体内でどのように作用するのかは不明であり、今後の更なる解明を必要とする。全尿系の実験のほとんどは THP を除去する目的で NaCl を加え遠心濾過を実施しているためこれらの前処理をしない条件下で THP の意義づけが求められる。

c) osteopontin (uropontin)

osteopontin (OPN) は骨の石灰化に必要で osteoblast と hydroxyapatite との架橋的役割を担う蛋白である⁷²⁾。結晶表面に吸着する特異的構造を持つとされる aspartic acid rich protein の superfamily であり⁷³⁾、細胞との接着作用を有する Arg-Gly-Asp (RGD) 配列が存在する⁷⁴⁾。

CaOx 結晶形成阻止作用があるとして Shiraga らが発表した uropontin³⁸⁾ はアミノ酸配列が osteopontin と同一であったため、OPN の urinary form とした。その後、培養細胞から OPN を分離した Worcester ら⁷⁵⁾ は osteopontin と呼称している。Kohri らは Ca 含有結石に含まれる有機物質から作成した抗体でヒト腎 cDNA を調査し OPN を決定した。また、結石形成ラットで OPN mRNA の発現増強を確認している⁷⁵⁾。Hoyer らは CaOx monohydrate には多く含まれているが、dihydrate にはわずかししか含まれていないとしている⁷⁷⁾。OPN は Henle loop 下行脚と乳頭部に局在している⁷⁸⁾。

CaOx 結石のマトリックス中にも OPN の存在が確認されている⁷⁹⁾。OPN はカルシウムとの結合に重要な役割を持つ aspartic acid を多く含んでいるため結石・結晶内に存在するようになったものと推測される。Ca 結石誘発ラットの in situ hybridization で OPN mRNA と蛋白の発現があることが証明されている⁸⁰⁾。また、Yamate らは OPN により Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に CaOx 結晶の接着が促進されることから OPN には結石形成促進作用があるとしている⁸¹⁾。さらに OPN antisense oligonucleotide を使用した実験で CaOx 結晶付着が阻止されることからこのことを追認している⁸²⁾。OPN は in vitro の系で CaOx 結晶の形成・成長・凝集を阻止することも明ら

かにされた⁸³⁾。Min らによると尿中濃度は 1.9 µg/ml である⁸⁴⁾。OPN はヒトの胃腸、胆嚢、尿路、生殖器、肺、耳下腺、汗腺など様々な管腔上皮に存在していることから、尿路結石形成に対しても生体防御機構の一つとして機能している可能性が想定される。

d) inter- α -trypsin inhibitor (bikunin)

inter- α -trypsin inhibitor (ITI) は 1990 年代に入ってから尿路結石との関連性が明らかにされた CaOx 結晶成長阻止物質である。Sørensen は尿中から CaOx 結晶成長阻止物質として分離した glycoprotein が、構造は未解明としながらもアミノ酸配列から ITI と関連があるとした記載に始まる³⁶⁾。その後 Atmani は同様に CaOx 結晶成長阻止糖蛋白を分離した。分子量 35 kDa のこの糖蛋白にはウロン酸が含まれており、uronic acid-rich protein (UAP) として発表した⁸⁵⁾。その後 UAP は urinary bikunin, plasma bikunin とアミノ酸配列が一致すること⁸⁶⁾、結石患者の UAP は正常人に比し低下していることを発表した⁵⁴⁾。

1995 年 Tang らは ITI light chain (HI-30) を同定し、bikunin であることを証明した⁶⁴⁾。また、NC は bikunin の fragment⁸⁷⁾ である可能性が高いと報告している。1997 年 Iida は bikunin mRNA の発現を、RT-PCR を用いて証明している⁸⁸⁾。1998 年 Kobayashi は CaOx 結晶凝集阻止能は、主に c-terminal domain が関与していることを明らかにした⁸⁹⁾。CaOx 過飽和溶液中での評価によって CaOx 結晶形成、成長阻止物質であることは証明されているが、結石や結晶内への含有の病態や、全尿系での検討、in vivo における実験など、今後さまざまな角度から解析される必要がある。

e) crystal matrix protein (CMP, urinary prothrombin F 1)

1991 年 Flinders Medical Centre の Ryall のもとで研究していた Doyle は尿を遠心濾過し、これに蓚酸ナトリウムを添加して大量に作成した CaOx 結晶を EDTA で溶解後、電気透析ののち濃縮し sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で結晶内高分子物質を観察した。分子量 31 kDa の少し幅広のバンドが最も多く存在し、他のバンドはわずかに淡染されるにすぎず、この 31 kDa の蛋白質を CaOx 結晶の中の主要物質とした³⁷⁾。その時点で知られている様々な尿中蛋白の抗体を用いて Western blotting を実施しても反応する蛋白は発見できず蛋白質を同定するには至らなかった。しかし CaOx 結晶と特異的な反応を示すこの蛋白の存在は明らかであ

り、これを crystal matrix protein (CMP) として報告した。その後 Suzuki らはこの蛋白を同様の手法で分離したあと HPCL 逆相クロマトグラフィーで精製し、アミノ酸配列を決定した。その結果 Gla の部分を除いて prothrombin activation peptide とアミノ酸の配列が同一であった⁹⁰⁾。このあと Stapleton らも同様の結果を報告している⁹¹⁾。中嶋らは CaOx 過飽和溶液および全尿系を用いて CMP の結晶凝集阻止能を測定した結果、CMP は prothrombin とほぼ同等の非常に強力な凝集阻止物質であることを証明した^{92) 93)}。Ryall らも同様の結果を報告している⁹⁴⁾。CMP のポリクローナル抗体を用いた免疫組織学的研究で Stapleton らは Henle loop 上行脚と遠位尿細管に分布するとした⁹⁵⁾が、森山らは CMP に特異的なモノクローナル抗体である PIVKA II 抗体を用いて CMP の腎における局在を実験した結果、糸球体を除くネフロンに広く分布することを観察した⁹⁶⁾。Stapleton によると CaOx 結石内には CMP は存在するが感染性結石などには存在しないことから CMP は血液由来ではなく尿中の特異的反応の結果取り込まれるものであるとしている⁴⁶⁾。また、CMP の monoclonal 抗体を使用し CaOx 結晶表面における CMP の分布を免疫走査電子顕微鏡法で実験すると CMP は CaOx 表面に散在性に分布していることを私共の教室で証明した⁹⁷⁾。

Stapleton らは prothrombin activation peptide F 1 の抗体を使用した Western blotting で、CMP は prothrombin F 1 であることを強く示唆する所見を得た⁹⁸⁾。このあと Suzuki らも CMP の C 端アミノ酸配列を決定し F 1 であることを証明している⁹⁹⁾。通常 prothrombin は N 端付近に 10 個の Gla を持つことが知られている。CMP の Gla 数を測定すると正常の prothrombin は平均 10 個であるのに対し、男性 CMP では 0～1、女性 CMP では 3～4 であり、明らかに Gla の部分欠損した F 1 であることが判明した。結晶作成および抽出の作業中にも Gla が欠損することがあるということを考慮に入れても、Gla 数が減少していることが明らかとなった。以上の実験結果から CMP は prothrombin F 1 の類似構造を持つものが、Gla が部分欠損していることから、protein induced vitamin K absence (PIVKA) の family の範疇に属すると考えられた。言い換えれば PIVKA-F 1 が CMP の本態であるといえる⁹⁹⁾。Stapleton らは CMP の本態は prothrombin F 1 ではあるが SDS-PAGE で単一のバンドを示さないことから urinary prothrombin F 1

(UPTF 1) と表現している。prothrombin の Gla 数を化学的に修飾することによって Gla 欠損 prothrombin を作成し、その CaOx 結晶凝集阻止能を観察すると、Gla 数が 2 以上の prothrombin では Gla 数に比例して凝集阻止能が増強する¹⁰⁰⁾。

Degen によると腎において prothrombin は胎生期のみ発現が確認されるが、以後発現はないとされている¹⁰¹⁾。これまでの私共が実施した免疫組織学的観察や Western blotting などの結果からは prothrombin が腎尿管において発現していることが強く示唆された。このため prothrombin の mRNA の発現を検討したところ、ヒトおよびラットにおいて肝臓よりは弱いものの明らかに prothrombin が腎で発現しているという新事実が証明できた¹⁰²⁾。Stapleton も同様にヒト腎において prothrombin の発現を確認している¹⁰³⁾。

腎尿管において prothrombin が産生され、CaOx 結晶に強く影響を与えていることが明らかとなったが、さらに研究を進めるにあたっては解決しなくてはならない諸問題が山積している。尿中には肝臓で産生された血清由来の prothrombin F 1 が排泄されていると考えられるが、この prothrombin F 1 が CMP とどのように関与しているのか、prothrombin が腎尿管から分泌されたとしてもどのような機序で F 1, F 2, thrombin が切断されるのか、また、産生された F 1 はどのような機序で Gla が部分欠損するのか、他の阻止物質とどのように関連しているのか、はたして結石患者では prothrombin の発現が増加しているのか、結石患者では CMP の結晶凝集阻止能力は少ないのか、もし少ないと仮定した場合にそれを増加させる手段はあるのか、など今後解決すべき諸問題は多い。

おわりに

尿路結石に対する体外衝撃波結石破碎治療法のような革新的治療法の発達に比して、基礎研究による治療法確立の進歩は極めて遅れているように思われてはいるが¹⁰⁴⁾、分子生物学的手法の導入など研究手法の発達や研究者の努力により近年着実に進歩してきた。尿路結石症研究において分子生物学的手法が用いられるようになってきたのは 2,8-dihydroxyadenine 結石の APRT 遺伝子変異の研究からである。CaOx 結石関連の遺伝性疾患では familial idiopathic hypercalciuria, Dent's disease, X-linked recessive nephrolithiasis, idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis, primary hyperoxaluria など責任遺伝子が同定されるようになってきた。その結果、最近では Online Mendelian In-

heritance in Man (OMIM) database (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) によると 30 以上の遺伝性疾患が尿路結石症と関連があるとされるようになってきた。CaOx 結石マトリックスに含有されている高分子物質も OPN, HS (HS-PG), CMP, bikunin など分子生物学的研究方法が取り入れられ次々に新知見が明らかにされてきた。これからの結石研究にあたっては Web 検索による情報収集も重要である。Medline 検索だけでなく GenomeNet や OMIM の検索を行うことも不可欠な手法となろう。各細胞の DNA を構成する約 30 億文字配列を決定し、遺伝子の質・量を決定するというゲノム解析が現在進行中でここ数年でほとんどの物質の遺伝子が解析されるという。当然結石研究もその成果に大いに左右されることになることは容易に推測される。

しかし、分子生物学的手法が尿路結石の発生機序や治療法などすべてを解決するものではない。ヒトという種族を対象に様々な研究手法を駆使して CaOx 結石症の発生機序を解明し、予防を実現してゆくことが重要である。

結晶内マトリックスの研究に関しては、単一の物質を抽出、同定し、結晶との関連や腎における発現を検討するなどといった研究方法は確立されつつあるが、物質相互の関係を明らかにした報告はほとんど見当たらない。マトリックス相互関係の追及、crystal-cell interaction などとも考慮し、結石発生機序を総合的に解明することが今後必要となろう。尿路結石は促進物質や阻止物質など多因子が複雑に影響しあって発生するとされているが、攻撃因子と防御因子によって説明されていた胃潰瘍という疾患がピロリ菌の発見によって急激に新局面を迎えたのと同様なことが尿路結石研究でも起こるかも知れない。一例であるが、CaOx 結石と関連の深い calcium phosphate を産生するという nano-bacteria が結石内に存在するという報告もあり¹⁰⁵⁾、尿路結石症研究においても従来の研究手法や考え方を覆す日が来るのかも知れない。

謝辞：本研究の一部は金沢医科大学プロジェクト研究 (P 98-8) および平成 9 年度および平成 10 年度文部省科学研究費基盤研究 (c-09671653) の補助によるものである。

文 献

- 1) Hallson, P.C. and Rose, G.A.: Crystalluria in normal subjects and in stone formers with and without thiazide and cellulose phosphate treatment. *Br. J. Urol.*, **48**, 515—524, 1976.
- 2) Robertson, W.G., Peacock, M., Marshall, R.W., Marshall, D.H. and Nordin, B.E.: Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 249—252, 1976.
- 3) Goldberg, J.M. and Cotlier, E.: Specific isolation and analysis of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) from human urine. *Clin. Chim. Acta*, **41**, 19—27, 1972.
- 4) Wessler, E.: The nature of the non-ultrafilterable glycosaminoglycans of normal human urine. *Biochem. J.*, **122**, 373—384, 1971.
- 5) 西尾俊治：尿路結石症における酸性ムコ多糖の関与。日泌尿会誌, **85**, 1597—1609, 1995.
- 6) Robertson, W.G., Peacock, M. and Nordin, B.E.: Inhibitors of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin. Chim. Acta*, **43**, 31—37, 1973.
- 7) Pak, C.Y.C., Holt, K. and Zerwekh, J.E.: Attenuation by monosodium urate of the inhibitory effect of glycosaminoglycans on calcium oxalate nucleation. *Invest. Urol.*, **17**, 138—140, 1979.
- 8) Ryall, R.L., Harnett, R.M. and Marshall, V.R.: The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin. Chim. Acta*, **112**, 349—356, 1981.
- 9) Robertson, W.G. and Scurr, D.S.: Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallizer using an artificial urine. *J. Urol.*, **135**, 1322—1326, 1986.
- 10) Scurr, D.S. and Robertson, W.G.: Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. II. Studies on their mode of action in an artificial urine. *J. Urol.*, **136**, 128—131, 1986.
- 11) Kohri, K., Garside, J. and Blacklock, N.J.: The effect of glycosaminoglycans on the crystallisation of calcium oxalate. *Br. J. Urol.*, **63**, 584—590, 1989.
- 12) Ryall, R.L., Harnett, R.M., Hibberd, C.M., Edyvane, K.A. and Marshall, V.R.: Effects of chondroitin sulphate, human serum albumin and Tamm-Horsfall mucoprotein on calcium oxalate crystallization in undiluted human urine. *Urol. Res.*, **19**, 181—188, 1991.
- 13) Michelacci, Y.M., Boim, M.A., Bergamaschi, C.T., Rovigatti, R.M. and Schor, N.: Possible role for chondroitin sulfate in urolithiasis: in vivo studies in an experimental model. *Clin. Chim. Acta*, **208**, 1—8, 1992.
- 14) Shum, D.K. and Gohel, M.D.: Separate effects of urinary chondroitin sulphate and heparan sulphate on the crystallization of urinary calcium ox-

- 1) Hallson, P.C. and Rose, G.A.: Crystalluria in normal subjects and in stone formers with and without thiazide and cellulose phosphate treatment.

- alate : differences between stone formers and normal control subjects. *Clin. Sci. (Colch)*, **85**, 33—39, 1993.
- 15) Suzuki, K. and Ryall, R.L. : The effect of heparan sulphate on the crystallization of calcium oxalate in undiluted, ultrafiltered human urine. *Br. J. Urol.*, **78**, 15—21, 1996.
 - 16) 鈴木孝治, 宮澤克人, 津川龍三 : 硫酸カルシウム結晶形成, 成長, 凝集に対する Sodium Pentosan Polysulfate の阻止効果. *日泌尿会誌*, **80**, 526—531, 1989.
 - 17) 宮澤克人, 鈴木孝治, 津川龍三 : 実験的硫酸カルシウム結石に対する pentosan polysulfate, chlorophyllin の阻止効果の定量的検討. *日泌尿会誌*, **80**, 861—869, 1989.
 - 18) Osswald, H., Weinheimer, G., Schutt, I. - D. and Ernst, W. : Effective prevention of calcium-oxalate crystal formation in vitro and in vivo by pentosan polysulfate. In Walker, V.R, Sutton, R.A L., Cameron, E.C.B., Pak, C.Y.C. and Robertson, W. G (eds) *Urolithiasis*, p 141—144, Plenum Press, New York, 1989.
 - 19) Boyce, W. and Garvey, F.K. : The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi : a review. *J. Urol.*, **76**, 213—227, 1956.
 - 20) Nishio, S., Abe, Y., Wakatsuki, A., Iwata, H., Ochi, K., Takeuchi, M. and Matsumoto, A. : Matrix glycosaminoglycan in urinary stones. *J. Urol.*, **134**, 503—505, 1985.
 - 21) Roberts, S.D. and Resnick, M.I. : Glycosaminoglycans content of stone matrix. *J. Urol.*, **135**, 1078—1083, 1986.
 - 22) Yamaguchi, S., Yoshioka, T., Utsunomiya, M., Koide, T., Osafune, M., Okuyama, A. and Sonoda, T. : Heparin sulfate in the stone matrix and its inhibitory effect on calcium oxalate crystallization. *Urol. Res.*, **21**, 187—192, 1993.
 - 23) Suzuki, K. and Tsugawa, R. : Analysis of glycosaminoglycans induced in newly formed calcium oxalate crystals using an undiluted urine system. *Scanning. Microsc.*, **9**, 1089—1095 ; discussion 1095—1096, 1995.
 - 24) Suzuki, K., Mayne, K., Doyle, I.R. and Ryall, R.L. : Urinary glycosaminoglycans are selectively included into calcium oxalate crystals precipitated from whole human urine. *Scanning. Microsc.*, **8**, 523—530, 1994.
 - 25) Angell, A.H. and Resnick, M.I. : Surface interaction between glycosaminoglycans and calcium oxalate. *J. Urol.*, **141**, 1255—1258, 1989.
 - 26) Fellström, B., Lindsjö, M., Danielson, B.G., Karlsson, F.A. and Ljunghall, S. : Binding of glycosaminoglycan inhibitors to calcium oxalate crystals in relation to ionic strength. *Clin. Chim. Acta*, **180**, 213—220, 1989.
 - 27) Iida, S., Takazono, I., Suzuki, K., Shimada, A., Yahara, J., Yoshi, S., Matsuoka, K. and Noda, S. : Analysis of matrix glycosaminoglycans (GAGs) in urinary stones by high-performance liquid chromatography. In Pak, C.Y. C. Resnick, M.I. and Preminger, G.M. (eds) *Urolithiasis 1996*, p 284—285, Millet The Printer, Dallas, 1996.
 - 28) Nishio, S., Ide, M., Yokoyama, M., Iwata, H. and Takeuchi, M. : Production of heparan sulfate in rat renal tubules in the process of calcium oxalate microlith formation. In Pak, C.Y C., Resnick, M.I. and Preminger, G.M. (eds) *Urolithiasis 1996*, p 32—33, Millet The Printer, Dallas, 1996.
 - 29) Iida, S., Miyajima, J., Suzuki, K., Matsuoka, K., Inoue, M. and Noda, S. : Expression of heparan sulfate proteoglycan mRNA in rat kidneys during calcium oxalate nephrolithiasis. *Urol. Res.*, **25**, 361—364, 1997.
 - 30) Boyce, W.H, King, J.S. and Fielden, M.L. : Total non-dialysable solids (TNDS) in human urine. XIII. Immunological detection of a component peculiar to renal calculous matrix and to urine of calculous patients. *J. Clin. Invest.*, **41**, 1180—1189, 1962.
 - 31) Melick, R.A., Quelch, K.J. and Rhodes, M. : The demonstration of sialic acid in kidney stone matrix. *Clin. Sci.*, **59**, 401—404, 1980.
 - 32) Nakagawa, Y., Ahmed, M., Hall, S.L, Deganello, S. and Coe, F.L. : Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in gamma-carboxyglutamic acid. *J. Clin. Invest.*, **79**, 1782—1787, 1987.
 - 33) Morse, R.M. and Resnick, M.I. : A new approach to the study of urinary macromolecules as a participant in calcium oxalate crystallization. *J. Urol.*, **139**, 869—873, 1988.
 - 34) Petersen, T.E, Thøgersen, I. and Petersen, S.E. : Identification of hemoglobin and two serine proteases in acid extracts of calcium containing kidney stones. *J. Urol.*, **142**, 176—180, 1989.
 - 35) Fraij, B.M. : Separation and identification of urinary proteins and stone-matrix proteins by minislab sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin. Chem.*, **35**, 658—662, 1989.
 - 36) Sørensen, S., Hansen, K., Bak, S. and Justesen, S. J. : An unidentified macromolecular inhibitory constituent of calcium oxalate crystal growth in human urine. *Urol. Res.*, **18**, 373—379, 1990.

- 37) Doyle, I.R., Ryall, R.L. and Marshall, V.R. : Inclusion of proteins into calcium oxalate crystals precipitated from human urine : a highly selective phenomenon. *Clin. Chem.*, **37**, 1589—1594, 1991.
- 38) Shiraga, H., Min, W., VanDusen, W.J., Clayman, M. D., Miner, D., Terrell, C.H., Sherbotie, J.R., Foreman, J.W., Przysiecki, C., Neilson, E.G. and Hoyer, J.R. : Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin : another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**, 426—430, 1992.
- 39) Umekawa, T., Kohri, K., Amasaki, N., Yamate, T., Yoshida, K., Yamamoto, K., Suzuki, Y., Sinohara, H. and Kurita, T. : Sequencing of a urinary stone protein, identical to alpha-one antitrypsin, which lacks 22 amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 1049—1053, 1993.
- 40) Verdier, J.M., Dussol, B., Casanova, P., Daudon, M., Dupuy, P., Berthezene, P., Boistelle, R., Berland, Y. and Dagorn, J.C. : Evidence that human kidney produces a protein similar to lithostathine, the pancreatic inhibitor of CaCO_3 crystal growth. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**, 469—474, 1992.
- 41) Verdier, J.M., Dussol, B., Casanova, P., Daudon, M., Dupuy, P., Berthezene, P., Boistelle, R., Berland, Y. and Dagorn, J.C. : Renal lithostathine : a new protein inhibitor of lithogenesis. *Nephrologie*, **14**, 261—264, 1993.
- 42) Binette, J.P. and Binette, M.B. : A cationic protein from a urate-calcium oxalate stone : isolation and purification of a shared protein. *Scanning. Microsc.*, **7**, 1107—1110, 1993.
- 43) Binette, J.P. and Binette, M.B. : Sequencing of proteins extracted from stones. *Scanning. Microsc.*, **8**, 233—239, 1994.
- 44) Umekawa, T. and Kurita, T. : Calprotectin-like protein is related to soluble organic matrix in calcium oxalate urinary stone. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**, 309—313, 1994.
- 45) Dussol, B., Geider, S., Lilova, A., Leonetti, F., Dupuy, P., Daudon, M., Berland, Y., Dagorn, J.C. and Verdier, J.M. : Analysis of the soluble organic matrix of five morphologically different kidney stones. Evidence for a specific role of albumin in the constitution of the stone protein matrix. *Urol. Res.*, **23**, 45—51, 1995.
- 46) Stapleton, A.M., Dawson, C.J., Grover, P.K., Hohmann, A., Comacchio, R., Boswarva, V., Tang, Y. and Ryall, R.L. : Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation : urinary prothrombin fragment 1 is present in stone matrix. *Kidney. Int.*, **49**, 880—888, 1996.
- 47) Khan, S.R. and Hackett, R.L. : Microstructure of decalcified human calcium oxalate urinary stones. *Scan. Electron Microsc.*, **1984**, 935—941, 1984.
- 48) Khan, S.R. and Hackett, R.L. : Crystal-matrix relationships in experimentally induced urinary calcium oxalate monohydrate crystals, an ultrastructural study. *Calcif. Tissue Int.*, **41**, 157—163, 1987.
- 49) Koide, T., Yoshioka, T., Yamaguchi, S., Hosokawa, S., Utsunomiya, M. and Sonoda, T. : Urinary crystal surface binding substances on calcium oxalate crystals. *Urol. Res.*, **18**, 387—392, 1990.
- 50) Doyle, I.R., Marshall, V.R., Dawson, C.J. and Ryall, R.L. : Calcium oxalate crystal matrix extract : the most potent macromolecular inhibitor of crystal growth and aggregation yet tested in undiluted human urine in vitro. *Urol. Res.*, **23**, 53—62, 1995.
- 51) Atmani, F., Glenton, P.A. and Khan, S.R. : Identification of proteins extracted from calcium oxalate and calcium phosphate crystals induced in the urine of healthy and stone forming subjects. *Urol. Res.*, **26**, 201—207, 1998.
- 52) Nakagawa, Y., Abram, V., Kezdy, F.J., Kaiser, E.T. and Coe, F.L. : Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 12594—12600, 1983.
- 53) Hess, B., Nakagawa, Y. and Coe, F.L. : Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am. J. Physiol.*, **257**, F 99—106, 1989.
- 54) Atmani, F., Lacour, B., Jungers, P., Druke, T. and Daudon, M. : Reduced inhibitory activity of uronic-acid-rich protein in urine of stone formers. *Urol. Res.*, **22**, 257—260, 1994.
- 55) Kohri, K., Suzuki, Y., Yoshida, K., Yamamoto, K., Amasaki, N., Yamate, T., Umekawa, T., Iguchi, M., Sinohara, H. and Kurita, T. : Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 859—864, 1992.
- 56) Nakagawa, Y., Kaiser, E.T. and Coe, F.L. : Isolation and characterization of calcium oxalate crystal growth inhibitors from human urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 1038—1044, 1978.
- 57) Nakagawa, Y., Margolis, H.C., Yokoyama, S., Kezdy, F.J., Kaiser, E.T. and Coe, F.L. : Purification and characterization of a calcium oxalate monohydrate crystal growth inhibitor from human kidney tissue culture medium. *J. Biol. Chem.*, **256**, 3936—3944, 1981.
- 58) Nakagawa, Y., Abram, V. and Coe, F.L. : Isolation of calcium oxalate crystal growth inhibitor from

- rat kidney and urine. *Am. J. Physiol.*, **247**, F 765—772, 1984.
- 59) Nakagawa, Y., Abram, V., Parks, J.H., Lau, H.S., Kawooya, J.K. and Coe, F.L. : Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. *J. Clin. Invest.*, **76**, 1455—1462, 1985.
 - 60) Nakagawa, Y., Parks, J.H., Kezdy, F.J. and Coe, F.L. : Molecular abnormality of urinary glycoprotein crystal growth inhibitor in calcium nephrolithiasis. *Trans Assoc. Am. Physicians*, **98**, 281—289, 1985.
 - 61) Nakagawa, Y., Netzer, M., Michaels, E.K., Suzuki, F. and Ito, H. : Nephrocalcin in patients with renal cell carcinoma. *J. Urol.*, **152**, 29—34, 1994.
 - 62) Nakagawa, Y., Netzer, M. and Coe, F.L. : immunohistochemical localization of nephrocalcin (NC) to proximal tubule and thick ascending limb of Henle's loop (TALH) of human and mouse kidney. *Kidney. Int.*, **37**, 474, 1990.
 - 63) Hess, B., Nakagawa, Y. and Coe, F.L. : Nephrocalcin isolated from human kidney stone is a defective calcium-oxalate-monohydrate crystal-aggregation inhibitor. In Walker, V., Sutton, R.A.L., Cameron, E.C., Pak, C.Y.C. and Robertson, W.G. (eds) *Urolithiasis*, p 137—139, Plenum Press, New York, 1989.
 - 64) Tang, Y., Grover, P.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Ryall, R.L. : Is nephrocalcin related to the urinary derivative (bikunin) of inter-alpha-trypsin inhibitor? *Br. J. Urol.*, **76**, 425—430, 1995.
 - 65) Kumar, S. and Muchmore, A. : Tamm-Horsfall protein-uromodulin (1950—1990). *Kidney. Int.*, **37**, 1395—1401, 1990.
 - 66) Hess, B. : The role of Tamm-Horsfall glycoprotein and Nephrocalcin in calcium oxalate monohydrate crystallization processes. *Scanning. Microsc.*, **5**, 689—695 ; discussion 696, 1991.
 - 67) Bichler, K.H., Kirchner, C. and Ideler, V. : Uromucoid excretion of normal individuals and stone formers. *Br. J. Urol.*, **47**, 733—737, 1975.
 - 68) Scurr, D.S. and Robertson, W.G. : Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. III. Studies on the role of Tamm-Horsfall mucoprotein and of ionic strength. *J. Urol.*, **136**, 505—507, 1986.
 - 69) Grover, P.K., Ryall, R.L. and Marshall, V.R. : Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? *Clin. Chim. Acta*, **190**, 223—238, 1990.
 - 70) Grover, P.K., Marshall, V.R. and Ryall, R.L. : Tamm-Horsfall mucoprotein reduces promotion of calcium oxalate crystal aggregation induced by urate in human urine in vitro. *Clin. Sci. (Colch)*, **87**, 137—142, 1994.
 - 71) Hallson, P.C. and Rose, G.A. : Uromucoids and urinary stone formation. *Lancet*, **1**, 1000—1002, 1979.
 - 72) Reinholt, F.P., Hultenby, K., Oldberg, A. and Heinegard, D. : Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 4473—4475, 1990.
 - 73) Addadi, L. and Weiner, S. : Interactions between acidic proteins and crystals : stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **82**, 4110—4114, 1985.
 - 74) Oldberg, A., Franzen, A. and Heinegard, D. : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 8819—8823, 1986.
 - 75) Worcester, E.M., Blumenthal, S.S., Beshensky, A. M. and Lewand, D.L. : The calcium oxalate crystal growth inhibitor protein produced by mouse kidney cortical cells in culture is osteopontin. *JB. one Miner. Res.*, **7**, 1029—1036, 1992.
 - 76) Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshioka, K., Iguchi, M., Yamate, T., Umekawa, T., Suzuki, Y., Sinohara, H. and Kurita, T. : Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *JB.iol. Chem.*, **268**, 15180—15184, 1993.
 - 77) Hoyer, J.R. : Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner. Electrolyte Metab.*, **20**, 385—392, 1994.
 - 78) Kleinman, J.G., Beshensky, A., Worcester, E.M. and Brown, D. : Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney. Int.*, **47**, 1585—1596, 1995.
 - 79) Yamate, T., Umekawa, T., Iguchi, M., Kurita, T. and Kohri, K. : Detection of osteopontin as matrix protein in calcium-containing urinary stones. *Hinyokika Kiyo*, **43**, 623—627, 1997.
 - 80) Umekawa, T., Kohri, K., Kurita, T., Hirota, S., Nomura, S. and Kitamura, Y. : Expression of osteopontin messenger RNA in the rat kidney on experimental model of renal stone. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35**, 223—230, 1995.
 - 81) Yamate, T., Kohri, K., Umekawa, T., Amasaki, N., Amasaki, N., Isikawa, Y., Iguchi, M. and Kurita, T. : The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur. Urol.*, **30**, 388—393, 1996.
 - 82) Yamate, T., Kohri, K., Umekawa, T., Iguchi, M. and Kurita, T. : Osteopontin antisense oligonucleotide inhibits adhesion of calcium oxalate crystals in Madin-Darby canine kidney cell. *J. Urol.*, **160**, 1506—1512, 1998.

- 83) Asplin, J.R., Arsenault, D., Parks, J.H., Coe, F.L. and Hoyer, J.R. : Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney. Int.*, **53**, 194—199, 1998.
- 84) Min, W., Shiraga, H., Chalko, C., Goldfarb, S., Krishna, G.G. and Hoyer, J.R. : Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney. Int.*, **53**, 189—193, 1998.
- 85) Atmani, F., Lacour, B., Drueke, T. and Daudon, M. : Isolation and purification of a new glycoprotein from human urine inhibiting calcium oxalate crystallization. *Urol. Res.*, **21**, 61—66, 1993.
- 86) Atmani, F., Lacour, B., Strecker, G., Parvy, P., Drueke, T. and Daudon, M. : Molecular characteristics of uronic-acid-rich protein, a strong inhibitor of calcium oxalate crystallization in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 1158—1165, 1993.
- 87) Hochstrasser, K., Reisinger, P., Albrecht, G.J., Wachter, E. and Schonberger, O.L. : Isolation of acid-resistant urinary trypsin inhibitors by high performance liquid chromatography and their characterization by N-terminal amino-acid sequence determination. *Hoppe. Seylers ZP.hysiol. Chem.*, **365**, 1123—1130, 1984.
- 88) Iida, S., Tardieu, J.J., Glenton, P., Byer, K., Peck, A. B. and Khan, S.R. : Molecular detection of bikunin in normal and oxalate exposed kidneys and renal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **8**, 563 A, 1997.
- 89) Kobayashi, H., Shibata, K., Fujie, M., Sugino, D. and Terao, T. : Identification of structural domains in inter-alpha-trypsin involved in calcium oxalate. *Kidney. Int.*, **53**, 1727—1735, 1998.
- 90) Suzuki, K., Moriyama, M., Nakajima, C., Kawamura, K., Miyazawa, K., Tsugawa, R., Kikuchi, N. and Nagata, K. : Isolation and partial characterization of crystal matrix protein as a potent inhibitor of calcium oxalate crystal aggregation : evidence of activation peptide of human prothrombin. *Urol. Res.*, **22**, 45—50, 1994.
- 91) Stapleton, A.M., Simpson, R.J. and Ryall, R.L. : Crystal matrix protein is related to human prothrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 1199—1203, 1993.
- 92) 中嶋千穂, 鈴木孝治, 津川龍三 : 尿中 crystal matrix protein (CMP) の蔞酸カルシウム結晶に対する成長および蔞集阻止能について. *金医大誌*, **20**, 184—193, 1995.
- 93) Nakajima, C., Suzuki, K. and Tsugawa, R. : Inhibitory potency of crystal matrix protein on the crystallization of calcium oxalate. *Int. J. Urol.*, **3** (suppl 1), s 76-s 79, 1996.
- 94) Ryall, R.L., Grover, P.K., Stapleton, A.M., Barrell, D.K., Tang, Y., Moritz, R.L. and Simpson, R.J. : The urinary F 1 activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted human urine in vitro. *Clin. Sci. (Colch)*, **89**, 533—541, 1995.
- 95) Stapleton, A.M., Seymour, A.E., Brennan, J.S., Doyle, I.R., Marshall, V.R. and Ryall, R.L. : Immunohistochemical distribution and quantification of crystal matrix protein. *Kidney. Int.*, **44**, 817—824, 1993.
- 96) 森山 学, 鈴木孝治, 津川龍三 : PIVKA-II 関連モノクローナル抗体のヒト腎組織に対する免疫性についての検討. *金医大誌*, **20**, 42—50, 1995.
- 97) Suzuki, K., Nakajima, C., Moriyama, M., Miyazawa, K. and Tsugawa, R. : Backscattered electron imaging of crystal matrix protein on the surface of calcium oxalate crystals using colloidal gold. *Int. J. Urol.*, **2**, 87—91, 1995.
- 98) Stapleton, A.M. and Ryall, R.L. : Blood coagulation proteins and urolithiasis are linked : crystal matrix protein is the F 1 activation peptide of human prothrombin. *Br. J. Urol.*, **75**, 712—719, 1995.
- 99) Suzuki, K., Miyazawa, K. and Tsugawa, R. : Crystal matrix protein is related to activation peptide (F1) of human prothrombin. In Pak, C.Y.C., Resnick, M.I and Preminger, G.M. (eds) *Urolithiasis 1996*, p 224—225, Millet The Printer, Dallas, 1996.
- 100) Suzuki, K. and Tsugawa, R. : Modified gamma-carboxyglutamic acid residues in human prothrombin and the inhibitory activity to calcium oxalate crystal aggregation and growth. In Pak, C.Y.C., Resnick, M.I and Preminger, G.M. (eds) *Urolithiasis 1996*, p 220—221, Millet The Printer, Dallas, 1996.
- 101) Degen, S.J. : The prothrombin gene and its liver-specific expression. *Semin. Thromb. Hemost.*, **18**, 230—242, 1992.
- 102) Suzuki, K., Suga, K., Miyazawa, K. and Tsugawa, R. : Where is the origin of crystal matrix protein ? — expression of prothrombin mRNA in human and rat kidney. *Br. J. Urol.*, **80** (Supp 2), 322, 1997.
- 103) Stapleton, A.M., Timme, T.L. and Ryall, R.L. : Gene expression of prothrombin in the human kidney and its potential relevance to kidney stone disease. *Br. J. Urol.*, **81**, 666—671 ; discussion 671—672, 1998.
- 104) Baumann, J.M. : Stone prevention : why so little progress? *Urol. Res.*, **26**, 77—81, 1998.
- 105) Kajander, E.O. and Ciftcioglu, N. : Nanobacteria : an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 8274—8279, 1998.