

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第37号

2014年9月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 26 年 9 月 20 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. <small>タクシノロス</small> TAKSINOROS	<small>サラウート</small> SARAWUT [博士 (生物工学)]	1
--	---	-------	---

論文博士

1. 谷 田 周 平	[博士 (生物工学)]	4
------------	-------------	-------	---

氏名（本籍）	タクシノロス サラウート TAKSINOROS SARAWUT (タイ)
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第17号
学位授与年月日	平成26年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	An <i>In Vitro</i> Study on the Mechanism of Formation of Rounded Melamine Cyanurate Crystals with Special Reference to Melamine-Triggered Urolithiasis in the Kidney
論文審査委員	主 査 村田 英雄 教授 副 査 竹内 実 教授 " 中田 博 教授

論文内容の要旨

Melamine toxicity, which adversely affects the urinary system, has been extensively reported in humans and animals. The consumption of melamine-adulterated foodstuffs can cause occlusion of the renal tubules leading to kidney malfunction and failure. Melamine alone has low acute toxicity. However, simultaneous exposure to melamine and its derivative cyanuric acid has an affect that is more toxic than exposure to each compound individually. The compound formed by melamine and cyanuric acid, melamine cyanurate (M-C), accumulates in renal tubules, where it causes obstruction and subsequent kidney dysfunction.

The pathogenesis of melamine-associated renal disorder still remains unclear. Therefore, the main purpose of this *in vitro* study was to investigate the mechanism of melamine-induced urolithiasis in the kidney and to provide a potential explanation for the formation of M-C urolites *in vivo*.

The present thesis is divided into three chapters. The first chapter focuses on the threshold concentrations of melamine and cyanuric acid for formation of M-C crystals, which do not form in the presence of low concentrations of melamine and cyanuric acid. The second chapter documents the effects of melamine, cyanuric acid and M-C on the expression of nephrin and podocin by podocytes; needle-like M-C crystals were shown to significantly decrease the expression of both proteins. The third chapter deals with the effects of serum proteins and an artificial macromolecule polyvinylpyrrolidone (PVP), whose

physico-chemical properties are comparable to those of high-molecular-weight serum proteins, on the morphology of M-C crystals. Macromolecular serum proteins and PVP were found to alter the shape of M-C crystals to a spherical form.

Based on these *in vitro* studies, I propose a possible mechanism for M-C crystal formation *in vivo*. 1) M-C crystals may not be formed outside the urinary system. 2) Needle-like M-C crystals may cause micro-injury of the podocyte slit diaphragm, inducing downward leakage of macromolecular serum proteins. 3) These leaked macromolecular serum proteins may affect the formation of M-C urolites, resulting in a rounded crystal structure.

Although further details of the mechanism involved remain to be clarified, my proposed model for the involvement of proteins somewhere in the nephron seems to provide a potential explanation for the *in vivo* pathogenesis of melamine-induced urolithiasis.

論文審査結果の要旨

「球状メラミンシアヌレート形成機序に関する *in vitro* 研究（特にメラミン誘導性の腎尿路結石症との関連に着目して）」（仮邦訳、原題は英文）は、乳幼児用粉ミルクおよびペットフードに混入したメラミンによって生じた腎尿路結石症を対象として、既報の知見や本論文の3章に亘る申請者独自の *in vitro* 研究成果に基づいて、その結石の形成機序に関する新しい仮説を提唱している。

各章の概要は以下のとおりである。

まず、第1章では、メラミンシアヌレートの生成時の会合濃度を検討している。その背景は次のとおりである。すなわち、メラミン由来結石症の罹患患者や動物では、痛風（尿酸結晶の全身的蓄積）のような結晶形成の様相とは異なり、腎尿路以外の結晶の沈着・蓄積は報告されていないが、その理由はまだ明らかになっていなかった。申請者は、第1章の *in vitro* 実験で、メラミンおよびその誘導体シアヌル酸の会合濃度が $200 \mu\text{g/ml}$ 未満の場合には、メラミンシアヌレート結晶が生成しないことを見出した。この濃度（閾値）は、発症例の患者や動物の血液中濃度（概ね $20 \mu\text{g/ml}$ 以下）よりはるかに大きかった。この *in vitro* 知見は、発症患者あるいは動物の体内では腎尿路系（排泄のための選択的濃縮が行われる部位）以外、たとえば血液や主要臓器内にメラミンシアヌレート結晶が見られないことを解釈する上で重要な根拠の一つといえる。

第2章では、メラミン、シアヌル酸およびメラミンシアヌレート結晶（針状）が、腎尿路系の濾過組織の主要細胞であるポドサイトとその網目状スリット構成タンパク質に及ぼす影響をマウス（ハツカネズミ）由来の培養株化細胞を用いて解析している。いずれの物質も細胞の形態には目立った変化をもたらさなかったものの、メラミンシアヌレート結晶はスリット構成タンパク質であるポドシン、ネフリンの発現、すなわち産生を抑制するという結果を得ている。

第3章では、メラミン由来結石症の臨床例あるいは実験発症例で報告されている結石主成分メラミンシアヌレートの球状（顆粒状）形状が、実験室内でメラミンとその誘導体シアヌル酸の混和反応によって生じるメラミンシアヌレート結晶の針状形状とは著しく異なることに注目し、その形状変化は生体内で何らかの要因により誘導されると思惟し、それに関与する生体成分について *in vitro* 試験により解析した。その結果、種々の血液タンパク質が球状メラミンシアヌレートの生成を仲介することを世界に先駆けて明らかにした。さらに、タンパク質だけではなく、医療目的や化粧品でも多用される人工高分子物質（ポリビニルピロリドン）も同様の形態変化を誘導する作用があることを見出している。なお、これらの生体あるいは人工の高分子物質が及ぼすメラミンシアヌレートの結晶形成に及ぼす物理化学的作用は、本論文の主目的外なので、考察されているのみであるが、今後その機序を解明していくことも有益と思われる。

これら第1から3章に亘る *in vitro* 研究成果と既報の知見を勘案し、本論文は、メラミン由来の腎尿路結石がどのように形成されるかについて、新仮説を提案している。その骨子は次のように概説される。メラミンとその誘導体シアヌル酸は循環血液内では、その低濃度のため、メラミンシアヌレート結晶を産生しない。その血液が腎内で濃縮され、十分量のメラミンとシアヌル酸が会合してメラミンシアヌレート（おそらく初期は針状）を形成する過程で、糸球体濾過スリットが傷害され、それが血漿タンパク質の漏出を誘導する。そのタンパク質がメラミンシアヌレート形成に介在し、臨床例で報告されているような球状結晶塊の尿路内蓄積、すなわち結石の形成に導く、というものである。なお、本論文の要旨は、動物実験/獣医学分野の国際専門雑誌の一つである *J.Vet.Med.Sci.* 誌 74 巻 1569-1573 頁、および同誌 75 巻 653-655 頁に掲載されている。

主査、副査から構成される博士論文調査委員はこれらの内容を精査した結果、本論文は十分な新規性と独自性を含む学術的価値があるとして、委員全員一致で「合格」すなわち「博士の学位に値する水準である」と判定した。本論文には、世界に先駆けた新知見が多く含まれており、それらはメラミンによる腎尿路結石症の病態を解明するうえで大変意義があると評価できる。

以上、報告する。