ヒドロキシリジン配糖体の尿中排泄レベルの日内・日間変動, 並びに 排泄レベルに及ぼすタンパク質摂取の影響の検討¹⁾

吉原一博, 高橋克明, 持留成年, 早川ゆみ子, 永田 稔
東京薬科大学

Study on Dietary Effect of Protein Intake on Urinary Excretion Levels of Hydroxylysine Glycosides and Their Diurnal and Day to Day Variations

KAZUHIRO YOSHIHARA, KATSUAKI TAKAHASHI, NARITOSHI MOCHIDOME,
YUMIKO HAYAKAWA and MINORU NAGATA

Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji,
Tokyo 192-03, Japan

(Received May 17, 1993)

The amount of urinary hydroxylysine glycosides (Hyl-Gs) is an index of collagen metabolism. The diurnal and day to day variations in the urinary excretion levels of Hyl-Gs and the effects of diet, especially the intake of a large amount of protein on them, were investigated.

The diurnal variation in the urinary excretion levels of Hyl-Gs was within the range of healthy controls; on the other hand, the day to day variation in the urinary excretion levels of Hyl-Gs was not observed. Although the urinary excretion of Hyl-Gs follows the same physiological variations as urinary hydroxyproline, it was not influenced by the dietary protein intake.

The contents of Hyl-Gs ($\mu\text{mol/g creatinine}$) in the first micturition urine after arising and those in the 24-h urine were found to be highly correlated, so it is suggested that the first micturition urine after arising, instead of the 24-h urine, is useful to evaluate the diurnal collagen metabolism.

Keywords — hydroxylysine glycosides; urinary markers; diurnal variation; day to day variation; dietary protein intake; collagen degradation

緒 言

老人の“寝たきり化”の主要基底疾患として社会的にも関心を持たれている骨粗鬆症は、骨形成に比べ骨吸収が過大となることでもたらされる病態である。著者らは骨吸収状況の指標としてコラーゲン構成アミノ酸であるヒドロキシリジン配糖体 (Hyl-Gs) の尿中排泄レベル測定の有用性についてこれまで検討を加えてきた。²⁾ すなわち尿中に排泄される2種の Hyl-Gs, O- β -D-Galactopyranosylhydroxylysine (GH) 及び 2-O- α -D-Glucopyranosyl-O- β -D-galactopyranosylhydroxylysine (GGH) において, GH は骨コラーゲンに、一方皮膚及び腎糸球体基底膜には GGH が優位に存在し、各組織中の存在量が

異なることが明らかにされている。^{3,4)} したがって、その尿中排泄レベルを測定し、両者の比 (GGH/GH 比) を観察することで骨吸収状態の有力な指標を得られるものと推測される。同様な見地からこれまでに Paget's 病、あるいは骨軟化症などのコラーゲン代謝異常に基づく疾患の罹患時に尿中 Hyl-Gs 排泄レベルの検討がなされてきている。⁴⁻⁶⁾ このような背景の下、Hyl-Gs の尿中排泄レベルに及ぼす摂取食餌の影響、あるいは検体としての尿における Hyl-Gs 排泄レベルの日内、日間変動等についての詳細な検討が必要である。

本報はこのような観点から尿中 Hyl-Gs 排泄レベルの日内、日間変動と併せて、摂取食餌の Hyl-Gs 排泄レベルに及ぼす影響を特にタンパク質摂取の面か

ら基礎的検討を行った。また、尿中 Hyl-Gs 排泄レベル評価における早朝尿利用の可能性についてあわせて検討した。

実験方法

1. 実験計画及び採尿方法 1) 尿中 Hyl-Gs の日内、日間変動——健康男性3名(22—24歳)について計7日間にわたって検討した。すなわち、検討開始日より3日間、同一内容の通常食を1日3回摂取させ、「起床時」、「起床時—12時」、「12時—18時」、「18時—就寝時」の4時間帯に区分して蓄尿した。この場合「起床時」の尿とは起床後最初の自然排尿1回分全量であり、一方「起床時」のスポット尿は早朝尿に相当する。第4日目以降は各自の自由食とし、第5日起床時から第7日就寝時までの3日間、上記と同じ4時間帯ごとに蓄尿した。なお、尿採取開始日より3日間は水以外の茶類、酒類等の飲料の摂取は禁止した。また検討期間中、就寝・起床時間及び食事時間を設定した以外は特別な行動制限は設けなかった。採取した尿は計量後その一部を測定時まで -20°C で凍結保存した。

2) 摂取食餌の影響——尿中 Hyl-Gs 排泄レベルに及ぼす食餌の影響を特にタンパク質多量摂取の面から以下の方法で検討した。健康な男性4名(22—24歳)について、当初7日間は各人の自由食とし、この間、6、7日目の中断を除いた計5日間について一日尿を採取した。続いて、8日目18時に牛肉500g(タンパク質量として120g)を、また10日目の18時にゼラチン120gをそれぞれの通常食に負荷し、8日目から11日目までの各1日尿を採取し、その一部を測定時まで -20°C で凍結保存した。

一方、上述の対象者とは別に対照群として健康者41名(20—29歳；男性22名、女性19名)より早朝尿を採取した。

2. 測定方法 尿試料は緩徐に融解した後、尿中 Hyl-Gs はダンシクロライドで蛍光誘導体化した後 HPLC で定量した。尿中クレアチニンは Jaffe 法に基づく比色法により、検査キット(クレアチニンテストワコー；和光純薬工業製)を用いて測定した。Hyl-Gs の測定値は尿中クレアチニン値により補正し、 $\mu\text{mol/g creatinine}$ (以下 $\mu\text{mol/g cre.}$) で表した。なお、統計学的検討には t 検定(Student)を用い、危険率5%以下をもって有意と判定した。

結果と考察

1. 尿中 Hyl-Gs 排泄レベルの日内、日間変動

一般に、尿成分の定量値をもとに被検者の健康状況を判定しようとするとき、試料尿としてはスポット尿よりも不確定要因がより少ない一日尿が望ましいことは明らかである。しかしながら、外来患者あるいはスクリーニングを目的とした集団検査等の場合には、被検者の試料採取並びに採取した試料尿管等の負担を軽減するためにスポット尿を用いるのが通常であり、早朝尿がこれにあてられることが多い。そこで、Hyl-Gs 排泄レベルの日内、日間変動について検討しておくことが検査値の評価の上で欠かせない。Fig. 1 に健康者3名について調査した日内、日間変動の結果を示す。検討開始日より3日間は各被検者とも同一内容の食餌を摂取しているにもかかわらず各時間帯の Hyl-Gs 尿中排泄レベルは、被検者間で若干の変動が認められる。しかしながら、各時間帯の排泄レベルは、GH では

「起床時」 11.8 ± 5.24 (mean $\pm$ S.D.)

「起床時—12時」 12.3 ± 5.56

「12時—18時」 12.2 ± 4.19

「18時—就寝時」 12.1 ± 3.11

一方、GGH は

「起床時」 12.0 ± 3.29 (mean $\pm$ S.D.)

「起床時—12時」 11.5 ± 2.96

「12時—18時」 12.3 ± 5.30

「18時—就寝時」 13.5 ± 6.10

Fig. 1. Day to Day and Diurnal Variation of Urinary Excretion Levels of Hydroxylysine Glycosides

Closed circle (●) denotes GH, open circle (○) GGH, respectively. The subjects were three healthy males with an age range of 22—24 years old.

Fig. 2. Day to Day and Diurnal Variation of Urinary GGH/GH Ratio

と、同年齢群の健常者レベル [GH; 16.46 ± 8.79 , GGH; 19.81 ± 7.09 ($n=41$)] 内にあった。また、この健常者レベルと比較して食餌内容制限のない5日目以降の尿中 GGH 及び GH 排泄レベルに統計的有意差が認められるものは見当らなかった。このことは通常の食餌内容では Hyl-Gs の尿中排泄レベルに有意差が生じるような変動は生じないことを示しているといえよう。同様に GGH/GH 比について3日目までの値と5日目以降の値とを比較すると (Fig. 2), 同一被検者内、被検者間共に有意な変動は認められなかった。また、1日排泄レベル ($\mu\text{mol/d}$) に換算した比較においても観察期間中の Hyl-Gs 排泄レベルはほぼ一定であり、通常の食事内容及び生活状況の変動範囲では、尿中 Hyl-Gs 排泄レベル及び GGH/GH 比の日間変動は比較的安定した範囲内にとどまるものと判断された。

2. 高タンパク質摂取が Hyl-Gs の尿中排泄レベルに及ぼす影響

ヒドロキシプロリンの尿中排泄レベルは食事内容、特にタンパク質摂取量の影響を受けることが指摘されている。^{8,9)} そこで、タンパク質多量摂取と尿中 Hyl-Gs 排泄レベルとの関係について検討した。検討開始日より連続5日間の各被検者の尿中 Hyl-Gs 排泄レベルと、それに続く8日目と10日目に食餌性タンパク質を負荷した際の Hyl-Gs 排泄レベルを比較検討した (Fig. 3)。一日排泄レベル ($\mu\text{mol/g cre.}$) では各被検者とも5日目までは GGH, GH 共にほぼ一定の排泄レベルで推移している。8日目以降の測定値は、対前日比で9日目に減少傾向、11

Fig. 3. Effect of Protein Abundant Diet Intake on Urinary Excretion Levels of Hydroxylysine Glycosides in Four Subjects

Closed circle (●) denotes GH, open circle (○) GGH, respectively. All subjects were allowed to take an ad lib. diet except on the days 8th and 10th. On those days (arrows), 500 g of beef and 120 g of gelatin, respectively, were supplemented.

日目には上昇傾向といった多少の変動が見られたものの、その変動範囲はいずれも前出の健常者の日間変動範囲内にあった。また、5日目までの測定値と8日目以降の測定値を比較するとき、被検者 (C) 以外はその値に有意差は認められず、排泄レベルを $\mu\text{mol/d}$ として検討しても同様な結果が得られた。ゼラチンはコラーゲンに多少の変性を加えたものであり、その 120 g 中には $600 \mu\text{mol}$ の Hyl-Gs を含んでいる。しかしながらタンパク質及びゼラチン負荷による明らかな尿中 Hyl-Gs 排泄レベルの変動は観察されなかった。

Askenasi ら¹⁰⁾ は通常食とコラーゲンフリー食とを比較し、Hyl-Gs 排泄レベルに及ぼす影響が観察されなかったことを報告している。他方、Segrest らもタンパク質摂取の尿中 Hyl-Gs 排泄レベルに及ぼす影響を検討しているが、その観察は一時的なもので

あり本報のような詳細な検討はなされていない。⁵⁾

3. 一日尿と早朝尿の Hyl-Gs 排泄レベル

Fig. 4. Effect of Protein Intake on Urinary GGH/GH Ratio

Hyl-Gs の尿中排泄レベルの測定からコラーゲンの代謝状況を評価しようとする場合、ヒトの生活リズムなどを考え併せると1日を単位とするのが妥当であり、したがって1日蓄尿して分析試料に当てることが望ましいと言えよう。しかしながら集団検診、臨床的応用性を考えるとき1日蓄尿の実施は難しく、また採り忘れ、採りこぼし等の採尿の不完全さも全く否定はできない。

Fig. 5に健常人における尿中 Hyl-Gs 排泄レベルの1日尿と早朝尿の関連性を示す。図にみるように「起床時」、すなわち早朝尿の Hyl-Gs 排泄レベルは1日尿のそれと高度な相関関係を示した (GGH; $r=0.827$, GH; $r=0.833$)。他方、それぞれ1日尿との関係を見ると

「起床時～12時」: 0.567, 0.553

(GH, GGH 以下同様)

「12時～18時」: 0.686, 0.779

「18時～就寝時」: 0.640, 0.641

と、早朝尿が最も相関性が高く、1日尿に十分代替し得ることが確認された。これまでに尿中 Hyl-Gs 排泄レベルを検討した諸報告において、その採尿時間はまちまちであり試料としての妥当性が懸念される処である。それに対し上記の検討は尿中 Hyl-Gs 排泄レベルを評価しようとするとき、早朝尿の有用性を示すものといえよう。入院患者では蓄尿や再度の採尿による検査も可能であり、1回の測定結果で評価をしてしまうことはあり得ない。しかし一般住民を対象とした場合、種々の制約上の問題から1回

Fig. 5. Correlation of Excretion Levels of Hydroxylysine Glycosides between First Micturition Urine after Arising and 24 h Urine

の検査結果で評価せざるを得ない場合が非常に多い。上記の結果はこれらの状況を鑑み、早朝尿利用の有効性を示したものである。しかしながら他時間帯においてもその測定値が健常人範囲内であったことから早朝尿採取が困難な場合、他時間帯の尿でもコラーゲン代謝状況の評価が可能なが示唆された。

一方、クレアチニン補正は測定に際し尿量不明な早朝スポット尿を1日レベルに換算するのに有効であり、¹¹⁾ これまでの尿中 Hyl-Gs 排泄レベルに関する諸報告値がすべてクレアチニン補正を採用しているのもこの事由によるものと考えられる。本研究結果においてもクレアチニン補正を利用したが今後は

尿比重等による補正も検討課題となろう。

結 語

尿中 Hyl-Gs 排泄レベルの評価に際し、混乱因子となるおそれのある摂取食事内容、特に一時的な高タンパク質摂取の影響について検討した。その結果食事内容、特に一時的な高タンパク質摂取による影響は見られず、また、一日尿と早朝尿との間には Hyl-Gs 排泄レベルに高度の相関が認められ、早朝尿でコラーゲン代謝状況を把握することが十分可能なことが確認された。上記の所見は集団検診への適用の可能性を示すものとして、公衆衛生上大きな意義を持つものといえよう。

引 用 文 献

- 1) 吉原一博, 早川ゆみ子, 加藤元彦, 三浦正典, 今野賢一郎, 宮越 護, 永田 稔, 日本薬学会第 112 年会講演要旨集 3, 福岡, 1992 年 3 月, p.166.
- 2) 吉原一博, 持留成年, 高橋克明, 永田 稔, 第 51 回日本公衆衛生学会総会抄録集, 東京, 1992 年 10 月, p.777.
- 3) R.G. Spiro, S. Fukusi, *J. Biol. Chem.*, **244**, 2049 (1969).
- 4) S.R. Pinnell, R. Fox, S.M. Krane, *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 119 (1971).
- 5) J.P. Segrest, L.W. Cunningham, *J. Clin. Invest.*, **49**, 1497 (1970).
- 6) R. Askenasi, *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 673 (1974).
- 7) K. Yoshihara, N. Mochidome, Y. Shida, Y. Hayakawa, M. Nagata, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 604 (1993).
- 8) D.J. Procop, K.I. Kivirikko, *Ann. Intern. Med.*, **66**, 1243 (1967); T.A. Dull, P.H. Henneman, *The New England Journal of Medicine*, **268**, 132 (1963).
- 9) K. Yoneyama, S. Ishigure, J. Ikeda, H. Nagata, *Jpn. J. Hyg.*, **39**, 587 (1984); M. Ziff, A. Kibrick, E. Dresner, H.J. Gribetz, *J. Clin. Invest.*, **35**, 579 (1956).
- 10) R. Askenasi, *Clin. Chim. Acta*, **59**, 87 (1975).
- 11) 小泉直子, 井上芳樹, 塚本利之, 日衛誌, **38**, 667 (1983).