尿路結石の成因に関する研究

—各種条件下の尿中 γ -カルボキシグルタミン酸排泄量について—

中 村 章 一 郎
平 石 攻 治
徳島大学医学部泌尿器科学教室
(主任: 黒川一男教授)
白 根 由 美 子
米 澤 正 隆
黒 川 一 男

STUDY ON THE CAUSATIVE FACTOR PRODUCING URINARY CALCIUM STONES

—Excretion on Urinary γ -Carboxyglutamic Acid in Various Conditions—

Shoichiro Nakamura, Koji Hiraishi, Yumiko Shirane, Masataka Yonezawa
and Kazuo Kurokawa

Department of Urology, Faculty of Medicine, University of Tokushima, Tokushima, Japan
(Director: Prof. K. Kurokawa)

We have previously reported that the excretion of urinary γ -carboxyglutamic acid (Gla) in calcium stone formers was lower than that in healthy adults. However, it has not yet been clarified whether this is caused by inhibitory actions of Gla on calcium stone formation or Gla is only adsorbed on the surface of stones.

In order to clarify this point, we compared the urinary Gla-excretion in the presence and absence of calcium stones. Moreover, also investigated the urinary Gla-excretion before and after ingestion of low calcium diet or administering thiazide in patients with idiopathic hypercalciuria to observe how Gla-excretion varies with changes of the urinary Gla-excretion.

In the presence of stones, urinary Gla-excretion was $38.3 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ in males (12 patients) and $30.7 \pm 5.3 \mu\text{mol/day}$ in females (7 patients). After extripation of the stones, it increased to $42.2 \pm 5.7 \mu\text{mol/day}$ in males and to $39.5 \pm 7.0 \mu\text{mol/day}$ with a significant difference ($p < 0.001$) in females.

In the case of ingestion of low calcium diet, the values before and after ingestion were $39.5 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ and $41.6 \pm 7.3 \mu\text{mol/day}$, respectively, in males (17 patients), and $34.5 \pm 7.8 \mu\text{mol/day}$ and $37.0 \pm 4.4 \mu\text{mol/day}$, respectively, in females (6 patients), without significant difference.

In the case of administration of thiazide, the values before and after administration were $40.9 \pm 7.1 \mu\text{mol/day}$ and $45.2 \pm 7.5 \mu\text{mol/day}$ in males (11 patients), and $38.2 \pm 7.2 \mu\text{mol/day}$ and $36.7 \pm 6.5 \mu\text{mol/day}$ in females (10 patients), respectively, without significant difference.

From the above results, we inferred that decrease in the urinary Gla-excretion was caused by the action that urinary Gla is adsorbed on the surface of stones independent of changes of the urinary calcium-excretion.

要旨: われわれは、カルシウム (以下 Ca) 結石症患者の尿中 γ -カルボキシグルタミン酸 (以下 Gla) 排泄量が健常者に比し低値を示すことはすでに報告した。この理由として、Gla が Ca 結石形成の抑制因子として働いているのかもしれないが、ただ単に結石表面に吸着されているだけかもしれない。このことを明らかにするために、Ca 結石存在下と非存在下における尿中 Gla 排泄量を比較検討した。また、尿中 Ca 排泄量の変化に対し、Gla 排泄量はいかに変動するのかをみるために、特発性高 Ca 尿症患者において、低 Ca 食前後、およびサイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 排泄量を比較検討した。

結石存在下では、男性 ($n=12$) では、 $38.3 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ で、女性 ($n=7$) では、 $30.7 \pm 5.3 \mu\text{mol/day}$

day であり、結石摘出後は、男性で $42.2 \pm 5.7 \mu\text{mol/day}$ と増加傾向にあり、女性では $39.5 \pm 7.0 \mu\text{mol/day}$ と有意に増加した ($p < 0.01$)。

低 Ca 食前では、男性 ($n=17$) $39.5 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ で、低 Ca 食後は $41.6 \pm 7.3 \mu\text{mol/day}$ 、女性 ($n=6$) では、 $34.5 \pm 7.8 \mu\text{mol/day}$ から $37.0 \pm 4.4 \mu\text{mol/day}$ といずれも有意差は認められなかった。

サイアザイド剤投与前では、男性 ($n=11$) $40.9 \pm 7.1 \mu\text{mol/day}$ で、投与後は $45.2 \pm 7.5 \mu\text{mol/day}$ 、女性 ($n=10$) では、 $38.2 \pm 7.2 \mu\text{mol/day}$ から $36.7 \pm 6.5 \mu\text{mol/day}$ といずれも有意差は認められなかった。

以上の結果より、尿中 Gla 排泄量は尿中 Ca 排泄量の変動による影響は受けず、尿中 Gla が結石に吸着されている可能性があると考えられた。

結 言

γ -カルボキシグルタミン酸(以下 Gla)は、カルシウム(以下 Ca)との結合力が強い性質を有し、Gla 含有蛋白質は、calcium-binding protein として各分野で注目されている。1977年、Lian ら¹⁾は、Ca を主成分とする尿路結石中に Gla を多く含んだ蛋白質を認めたと報告した。われわれは、Gla が Ca 含有結石形成に何らかの役割を果していると考え、尿中 Gla 排泄量を測定し報告した。ただし、尿中の Gla は大部分が遊離形であり、結石中に認められた Gla 含有蛋白質ではない。

われわれの成績では、尿中 Gla 排泄量は男性の方が女性より高値を示し、Ca 結石症患者は健常者に比し低値を示した²⁾。この理由として、Gla が Ca^{++} とキレート結合することより、Ca 結石形成の抑制因子としての役割も考えられるが、ただ単に結石表面に吸着されているだけかもしれない。このことを明らかにするために、Ca 結石存在下と非存在下における尿中 Gla 排泄量を比較検討した。また、尿中 Ca 排泄量の変化に対し、Gla 排泄量はいかに変動するのかをみるために、特発性高 Ca 尿症患者において、低 Ca 食前後、およびサイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 排泄量を比較検討した。

対象と方法

1. 結石摘出前後の尿中 Gla 排泄量

対象は、短径 2cm 以上の上部尿路結石を有し、その結石成分に Ca が含まれ、対側腎に結石のない症例で、高度の尿路感染症を有する例と手術の際腎実質に切開を加えた例は除いた。男性は 12 例で平均年齢は 51.8 歳 (32~70 歳)、女性は 7 例で平均年齢は 44.6 歳 (30~62 歳) であった。

これらの症例に、手術前後に病院普通食下 (Ca 600~700mg/day, P 1,200~1,400mg/day 含有) で、各々 24 時間尿を連続 3 日間採取し、尿中 Gla 排泄量を測定し平均値をとった。なお、手術後の測定は、輸液、薬剤を中止した時点 (手術後約 2 週目) で行なった。

2. 低 Ca 食前後の尿中 Gla 排泄量

対象は、上部尿路に Ca 含有結石を有する特発性高 Ca 尿症患者 (表 1) で、男性は 17 例で平均年齢は 49.8 歳 (26~80 歳)、女性は 6 例で平均年齢は 46.7 歳 (30~62 歳) であった。

これらの症例に、病院普通食下で連続 3 日間 24 時間尿を採取し、次いで低 Ca 食 (Ca 130mg/day) を 5 日間投与し、最後の 3 日間の 24 時間尿を採取した。尿中 Gla 排泄量は各々の平均値で検討した。

3. サイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 排泄量

対象は、上部尿路に Ca 含有結石を有する特発性高 Ca 尿症患者で、男性は 11 例で平均年齢は 48.5 歳 (26~60 歳)、女性は 10 例で平均年齢は 53.2 歳 (34~70 歳) であった。

これらの症例に、病院普通食下で連続 3 日間 24 時間尿を採取し、次いでサイアザイド剤 (trichlormethiazide) 4mg/day を 1 週間投与し、最後の 3 日間の 24 時間尿を採取した。尿中 Gla 排泄量は各々の平均値で検討した。

各症例とも血清クレアチニン値に異常がなく、骨疾患を有していない例を選んだ。なお、蓄尿に際しては防腐剤の添加は行なわなかった。

尿中 Gla 測定法は Per Fernlund³⁾の方法に従った

表 1 特発性高 Ca 尿症

1) 尿路 Ca 結石

2) 血清 Ca 値が正常

3) 尿中 Ca 排泄量

男性: 250mg/day 以上

女性: 200mg/day 以上

(普通食下: 600~700mg Ca/day,
1200~1400mg P/day)

4) 尿路結石の他の原因が認められない

が、その詳細については白根ら⁴⁾がすでに報告しているので省略する。なお、尿中 Ca 排泄量は、オートアナライザーによる Orthocresolphthalein Complexone 法にて測定した。

結 果

1. 結石摘出前後の尿中 Gla 排泄量

結石存在下での尿中 Gla 排泄量は、男性では $38.3 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ で結石摘出後は $42.2 \pm 5.7 \mu\text{mol/day}$ と増加傾向にあった。女性では $30.7 \pm 5.3 \mu\text{mol/day}$ から $39.5 \pm 7.0 \mu\text{mol/day}$ と有意に増加 ($p < 0.01$) した (図 1)。

尿中 Gla 濃度について同様の検討をすると、男性では $26.3 \pm 9.7 \mu\text{mol/l}$ から $23.0 \pm 9.0 \mu\text{mol/l}$ で、女性では $21.6 \pm 3.2 \mu\text{mol/l}$ から $30.8 \pm 10.5 \mu\text{mol/l}$ といずれも有意差は認められなかった (図 2)。

2. 低 Ca 食前後の尿中 Gla 排泄量

低 Ca 食前の尿中 Ca 排泄量は男性では $282 \pm 35.1 \text{ mg/day}$ で、低 Ca 食後は $156 \pm 53.9 \text{ mg/day}$ と有意に低下 ($p < 0.01$) し、女性でも $240 \pm 36.3 \text{ mg/day}$ から

$145 \pm 41.8 \text{ mg/day}$ と有意に低下 ($p < 0.01$) した (図 3)。

尿中 Gla 排泄量は男性では $39.5 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ から $41.6 \pm 7.3 \mu\text{mol/day}$ で、女性では $34.5 \pm 7.8 \mu\text{mol/day}$ から $37.0 \pm 4.4 \mu\text{mol/day}$ といずれも有意差は認められなかった (図 4)。

濃度では、男性は $25.7 \pm 11.0 \mu\text{mol/l}$ から $25.0 \pm 8.4 \mu\text{mol/l}$ 、女性は $19.8 \pm 4.2 \mu\text{mol/l}$ から $17.5 \pm 3.2 \mu\text{mol/l}$ といずれも有意差は認められなかった (図 5)。

図 3 低 Ca 食前後の尿中 Ca 排泄量の変動

図 1 結石摘出前後の尿中 Gla 排泄量の変動

図 4 低 Ca 食前後の尿中 Gla 排泄量の変動

図 2 結石摘出前後の尿中 Gla 濃度の変動

図 5 低 Ca 食前後の尿中 Gla 濃度の変動

5).

3. サイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 排泄量

サイアザイド剤投与前の尿中 Ca 排泄量は、男性では $281 \pm 36.2 \text{ mg/day}$ で、投与後は $161 \pm 57.3 \text{ mg/day}$ と有意に低下 ($p < 0.01$) し、女性でも $274 \pm 64.2 \text{ mg/day}$ から $156 \pm 50.7 \text{ mg/day}$ と有意に低下 ($p < 0.01$) した (図 6)。

図 6 サイアザイド剤投与前後の尿中 Ca 排泄量の変動

図 7 サイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 排泄量の変動

図 8 サイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 濃度の変動

尿中 Gla 排泄量は男性では $40.9 \pm 7.1 \mu\text{mol/day}$ から $45.2 \pm 7.5 \mu\text{mol/day}$ で、女性では $38.2 \pm 7.2 \mu\text{mol/day}$ から $36.7 \pm 6.5 \mu\text{mol/day}$ といずれも有意差は認められなかった (図 7)。

濃度では、男性は $25.2 \pm 10.0 \mu\text{mol/l}$ から $20.0 \pm 6.8 \mu\text{mol/l}$ と有意差はなく、女性では $24.3 \pm 6.0 \mu\text{mol/l}$ から $19.1 \pm 4.2 \mu\text{mol/l}$ と有意に低下 ($p < 0.05$) した (図 8)。

考 案

γ -カルボキシグルタミン酸は、1974年に、Stenflo ら⁵⁾によって、プロトロンビンを構成するアミノ酸の1つとして発見され、以後、血液中以外にも、骨の Gla 含有蛋白質 (オステオカルシン)⁶⁾、アテローム性動脈硬化部位の Gla 含有蛋白質 (アテロカルシン)⁷⁾、その他、腎⁸⁾、異所性石灰化部⁹⁾などで Gla 含有蛋白質がみついている。さらに、1977年、Lian ら¹⁾は、Ca を含んだ腎結石中に Gla 含有蛋白質の存在を明らかにした。そして、尿路結石中でも、Ca を含まない尿酸、シスチン、純粋なリン酸マグネシウム、アンモニウム結石には認められなかったとしている。

Gla の Ca^{++} との親和性や、尿路結石でも、Ca を含まない結石中には存在しないことから、Ca 結石形成に Gla が関与していることが予想される。

尿中 Gla 排泄量は、Ca 結石症患者では、男性(41例) $38.3 \pm 7.8 \mu\text{mol/day}$ 、女性(30例) $34.2 \pm 8.6 \mu\text{mol/day}$ で、健常人では、男性(24例) $48.6 \pm 8.8 \mu\text{mol/day}$ 、女性(11例) $36.6 \pm 6.4 \mu\text{mol/day}$ であり、Ca 結石症患者では健常人に比し、Gla 排泄量が低値を示したことはすでに報告した²⁾。

今回、結石存在下と非存在下での尿中 Gla 排泄量、低 Ca 食前後及びサイアザイド剤投与前後の尿中 Gla 排泄量の比較検討を行なった。

結石存在下では、尿中 Gla 排泄量が減少する傾向があり、結石に Gla が吸着されている可能性を示す結果であった。しかし、これが単なる吸着か、マトリックスとして働いているのかは不明で、今後の課題である。

低 Ca 食及びサイアザイド剤投与により、尿中 Ca 排泄量は著明に減少するが、尿中 Gla 排泄量には変化なく、尿中 Ca 排泄量の変動による影響は受けないことも判明した。

尿中 Gla はほとんどが遊離形で、ごくわずかのものが蛋白質と結合しているといわれている¹⁰⁾。また、骨疾患の程度によっても増減し¹¹⁾、ワーファリン投与によって減少する¹²⁾。ワーファリン長期投与患者に尿路

結石が生ずるという事実はなく、尿中 Gla 排泄量と尿路結石形成とは直接関係しないかもしれない。むしろ、遊離形の Gla と Gla 含有蛋白質とを別個に考える必要があると思われる。

種々の部位で発見されている Gla 含有蛋白質は、アミノ酸構成が少しずつ異なっており、Ca 結石中の Gla 含有蛋白質が、腎に存在する Gla 含有蛋白質と同一のものであるか否かを明らかにすること、が大切だと思われる。

腎の Gla 含有蛋白質は皮質に存在するといわれているが、腎皮質のどの部位に局在しているのか、また、その部位でどのような生理的役割を演じているのか、さらに、Ca 結石形成時には、どのような変化が生じて来るのか、また、Ca⁺⁺を含めた尿中排泄物質との関連はどうなっているのか、まだまだ不明な点が多い。われわれも現段階では、遊離形の Gla しか測定していないが、今後は Gla 含有蛋白質に焦点をあわせて検討していく予定である。

結 語

1. 上部尿路 Ca 結石の存在下と非存在下の尿中 Gla 排泄量を測定した結果、結石存在下では尿中 Gla 排泄量は減少する傾向があり、結石に Gla が吸着されている可能性がある。

2. 低 Ca 食及びサイアザイド剤投与により尿中 Ca 排泄量は有意に減少するが、尿中 Gla 排泄量には変化はなかった。

本論文の要旨は日本泌尿器科学会第36回西日本総会において発表した。

文 献

- 1) Lian, J.B., Prien, E.L., Glimcher, M.J. and Gallop, P.M.: The presence of protein-bound γ -carboxyglutamic acid in calcium-containing renal calculi. *J. Clin. Invest.*, **59**, 1151—1157, 1977.
- 2) 中村章一郎, 白根由美子, 平石攻治, 黒川一男: 尿路結石の成因に関する研究—結石患者における尿中 γ -カルボキシグルタミン酸の排泄量について. *日泌尿会誌*, **75**, 744—750, 1984.
- 3) Fernlund, P.: γ -Carboxyglutamic acid in human urine. *Clin. Chim. Acta*, **72**, 147—155, 1976.

- 4) 白根由美子, 中村章一郎, 平石攻治, 黒川一男: 高速アミノ酸分析法による尿中 γ -Carboxyglutamic acid の測定. *臨床化学*, **12**, 297—303, 1983.
- 5) Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. and Roepstorff, P.: Vitamin K-dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2730—2733, 1974.
- 6) Hauschka, P.V. and Gallop, P.M.: Purification and calcium-binding properties of osteocalcin, the γ -carboxyglutamate-containing protein of bone. *Calcium binding proteins and calcium function*, ed. by R.H. Wasserman, R.A., Corradino, E. Carafoli, R.H. Kretsinger, D. H. MacLennan and F.L. Siegel, Elsevier-North Holland, New York, 338—347, 1977.
- 7) Levy, R.J., Lian, J.B. and Gallop, P.M.: Atherocalcin, a γ -carboxyglutamic acid containing protein from atherosclerotic plaque. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 41—49, 1979.
- 8) Huschka, P.V., Friedman, P.A., Traverso, H.P. and Gallop, P.M.: Vitamin K-dependent γ -carboxyglutamic acid formation by kidney microsomes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1207—1213, 1976.
- 9) Lian, J.B., Skinner, M., Glimcher, M.J. and Gallop, P.M.: The presence of γ -carboxyglutamic acid in the proteins associated with ectopic calcification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 349—355, 1976.
- 10) Kian, J.B., Glimcher, M.M.J. and Gallop, P.M.: Identification of γ -carboxyglutamic acid in urinary proteins. *Calcium binding proteins and calcium function*, ed. by R.H. Wasserman, R.A. Corradino, E. Carafoli, R.H. Kretsinger, D.H. MacLennan and F.L. Siegel, Elsevier-North Holland, New York, 379—381, 1977.
- 11) Gallop, P.M., Lian, J.B. and Hauschka, P.V.: Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N. Engl. J. Med.*, **302**, 1460—1466, 1980.
- 12) Levy, R.J. and Lian, J.B.: γ -carboxyglutamate excretion and warfarin therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **25**, 562—570, 1979.

(1985年3月6日受付)