非高 Ca 尿症型特発性 Ca 結石症での骨代謝 marker の検討

— γ -carboxyglutamic acid および hydroxyproline の測定—

1) 松阪中央総合病院泌尿器科

2) 奈良県立医科大学泌尿器科学教室

丸山 良夫¹⁾ 平田 直也¹⁾ 山田 一¹⁾ 佐々木憲二²⁾

本宮 善恢²⁾ 平尾 佳彦²⁾ 岡島英五郎²⁾

A STUDY ON MARKERS OF BONE METABOLISM IN PATIENTS WITH NON HYPERCALCAIURIC CALCIUM STONE

—Measurement of γ -Carboxyglutamic Acid and Hydroxyproline—

Yoshio Maruyama, Naoya Hirata and Hajime Yamada

Department of Urology, Matsusaka Chuo Hospital

Kennji Sasaki, Yoshihiro Motomiya, Yoshihiko Hirao and Eigoro Okajima

Department of Urology, Nara University School of Medicine

Thirty-one patients (26 male and 5 female patients) of non-hypercalciuric Ca stone formers were studied concerning their bone metabolism. We measured plasma free γ -carboxyglutamic acid, plasma hydroxyproline, urinary free γ -carboxyglutamic acid and urinary hydroxyproline as markers of bone metabolism.

Plasma free γ -carboxyglutamic acid level showed significantly higher in stone formers than normal controls (1.01 ± 0.37 nmol/ml vs 0.39 ± 0.13 nmol/ml). But no significant difference were observed in plasma hydroxyproline level (1.99 ± 0.73 μ g/ml vs 2.27 ± 0.92 μ g/ml), urinary free γ -carboxyglutamic acid (52.0 ± 17.6 nmol/mg·Cr vs 45.7 ± 9.8 nmol/mg·Cr), and urinary hydroxyproline (3.87 ± 2.02 μ g/mg·Cr vs 3.33 ± 1.63 μ g/mg·Cr).

In conclusion, these results suggest that abnormality of bone metabolism may be not a primary event in causing stone formation in these patients.

Key words: non-hypercalciuric Ca stone, γ -carboxyglutamic acid, hydroxyproline

要旨: 尿酸 Ca を結石の主成分とする症例について, 骨代謝異常の存在の有無を検討した。

症例は男性26例女性5例の計31例で Ca 負荷食を投与後全尿中の Ca 濃度を測定し300mg/day 以下であることを確認した。これらの症例において尿中および血中の hydroxyproline, γ -carboxy glutamic acid (γ -gla) を測定し, 健康成人男性6例, 女性7例の計13例の測定値と比較検討した。

血漿 γ -gla は患者群で 1.01 ± 0.37 nmol/ml, 対照群で 0.39 ± 0.13 nmol/ml と有意に患者群で高値を認めた。血漿 hydroxyproline は患者群では 1.99 ± 0.73 μ g/ml, 対照群では 2.27 ± 0.92 μ g/ml と有意差は見られなかった。尿中 γ -gla は患者群では 52.0 ± 17.6 nmol/mg·Cr, 対照群では 45.7 ± 9.8 nmol/mg·Cr と有意差は見られなかった。また尿中 hydroxyproline も患者群で 3.87 ± 2.02 μ g/mg·Cr, 対照群では 3.33 ± 1.63 μ g/mg·Cr とやはり有意差は見られなかった。

尿中の free γ -gla および hydroxyproline は従来より骨代謝のマーカーとして知られており, 今回患者群と対照群との間のこれらの値に有意差が見られなかったことより非高 Ca 尿症型特発性 Ca 結石症において骨代謝異常の存在は否定的であると考えられた。なお血漿 γ -gla 値の有意な上昇に関しては, 今回の測定結果から説明することは困難であった。

キーワード: 非高 Ca 尿症型特発性 Ca 結石, 遊離型 γ カルボキシグルタミン酸, ハイドロキシプロリン

結 言

Ca 結石症は高 Ca 尿症群と非高 Ca 尿症群の 2 つの臨床的カテゴリーに大きく分けられる。

後者においては結石形成の要因として尿中 Ca 濃度の意義は前者程大きくないと考えられているが、結石発症の背景に非高 Ca 尿症型特発性 Ca 結石症患者に共通する Ca 代謝異常を見いだすことが出来るか否かは、再発予防の見地から興味ある、臨床課題である。

生体内における最大の Ca 代謝の場は骨組織であり、我々は特発性 Ca 結石症例において Ca 代謝異常の原因として、骨代謝異常が関与しているか検討してきたが、今回は結石分析で確認された尿酸 Ca を主成分とする特発性 Ca 結石症の中から、さらに Ca 負荷食下での尿中 Ca 排泄量で非高 Ca 尿症であることが確認された症例 31 例において、尿中、血中 γ -gla および hydroxyproline を測定し、骨代謝異常の有無について検討した。

対象と方法

対象：尿路結石にて ESWL を施行した症例で男性 26 例、女性 5 例の計 31 例、年齢は 19 歳から 68 歳、平均 46.2 ± 14.2 歳で、肝機能、腎機能、凝固機能、血清尿酸値、及び電解質の各検査に異常のある症例、また明らかな骨疾患の存在する症例は除外した。結石成分は全例尿酸 Ca が主成分で、外来受診時のスポット尿で Ca/Cr 比が 0.28 以下、さらに入院時、1,000mg/day の Ca 負荷食 3 日間規制後全尿 Ca 量が 300mg 以下の症例を対象とした (Table 1)。

また recurrent stone former 10 例と single stone former 21 例の 2 群に分けて検討した。

γ -Gla 測定法：Kuwada ら¹⁾の方法を用い Fig. 1 の如く HPLC 法で測定した。尿およびヘパリン採血した血漿をセントリザルト I (分画分子量 5,000, ギルトリウス社製) で除蛋白し、オルトフタルアルデヒド (OPA) でラベル化した後分離カラムとして Nucleosil-5SB 4.6mm $\times$ 25cm を用い HPLC 法にて測定した。

hydroxyproline 測定法：菅野ら²⁾の方法に準じて Fig. 2 の如く測定した。即ちセントリザルト I (分画分子量 5,000) にて除蛋白を行い 4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン (NBD-F) でラベル化した後分離カラムとして Wacosil 5C18 4.6 $\times$ 250mm を用い HPLC 法にて測定した。

その他：HS-PTH は PTH キット「ヤマサ」を用いた RIA 法で SRL (八王子, 東京) に測定を依頼した。

Table 1 Patient's profile

Sex	Male 26	Female 5
Mean age		46.2 ± 14.2
Urinary Ca/day	(mg/day)	173 ± 89
Al-P	(K-A U)	5.7 ± 1.7
HS-PTH	(pg/ml)	351 ± 136

Fig. 1 Measurement of urine γ -Gla by HPLC

Fig. 2 Measurement of plasma hydroxyproline by HPLC

血清 Al-P は PNP 法で測定した (King-Armstrong 単位)

対照：承諾の得られた健康成人男性 6 例女性 7 例計 13 例、年齢 22 歳から 45 歳、平均 28.4 ± 7.0 歳についても、同様に測定し本研究の対照とした。尚対照例の尿中 Ca

排泄量はスポット尿中の Ca/Cr 比が0.07~0.24で全員正常範囲内であった。

結 果

1) 血漿 γ -gla 濃度：血漿 γ -gla は患者群では30例中28例が0.5nmol/ml 以上を示し、そのうち11例に1.0 nmol/ml 以上の高値が見られ、平均 1.01 ± 0.37 nmol/ml であった。対照群ではほとんどが0.5nmol/ml 以下の低値を示し、平均 0.39 ± 0.13 nmol/ml と $p < 0.001$ で患者群で有意に高値を示した (Fig. 3)。

2) 血漿 hydroxyproline 濃度：血漿 hydroxyproline の平均値は患者群では 1.99 ± 0.73 μ g/ml、対照群では 2.27 ± 0.92 μ g/ml で有意差はみられなかった

Fig. 3 Plasma level of free γ -Gla in non hypercalciuric Ca stone formers and normal controls

Fig. 4 Plasma level of hydroxyproline in non hypercalciuric Ca stone formers and normal controls

(Fig. 4).

3) 尿中 free γ -Gla 濃度：尿中 free γ -Gla の平均値は患者群では 52.0 ± 17.6 nmol/mg $\cdot$ Cr、対照群では 45.7 ± 9.8 nmol/mg $\cdot$ Cr でやはり 2 群間に有意な差は見られなかった (Fig. 5)。

4) 尿中 hydroxyproline 濃度：尿中 hydroxyproline の平均値は患者群では 3.87 ± 2.02 μ g/mg $\cdot$ Cr、対照群では 3.33 ± 1.63 μ g/mg $\cdot$ Cr でやはり有意差は見られなかった (Fig. 6)。

5) 尿中 γ -gla とハイドロキシプロリンの相関を見ると $r = 0.164$, $p < 0.5$ ($n = 20$) と有意な相関は見られなかった (Fig. 7)。

6) スポット尿中の Ca/Cr と HS-PTH との相関を見たがやはり $r = 0.193$, $p < 0.3$ ($n = 32$) と有意な相関は認められなかった。

Fig. 5 Urinary level of free γ -Gla in non hypercalciuric Ca stone formers and normal controls

Fig. 6 Urinary level of hydroxyproline in non hypercalciuric Ca stone formers and normal controls

Fig. 7 Correlation between urinary γ -Gla and hydroxyproline in non hypercalciuric Ca stone formers

7) 血漿 γ -Gla 濃度は recurrent stone former 群で 0.99 ± 0.55 nmol/ml, single stone former 群で 1.03 ± 0.27 nmol/ml と有意差は見られず, また尿中 free- γ -Gla 濃度も各々 51.3 ± 23.4 nmol/mg·Cr, 52.3 ± 15.7 nmol/mg·Cr とやはり有意差は見られなかった。

8) 血漿 hydroxyproline 濃度は recurrent stone former 群で 2.07 ± 0.77 μ g/ml で single stone former 群で 1.96 ± 0.61 μ g/ml と有意差は無く, また尿中 hydroxyproline 濃度も各々 3.74 ± 0.55 μ g/mg·Cr, 4.03 ± 0.27 μ g/mg·Cr と有意差は見られなかった。

考 察

従来より骨代謝マーカーとして, 尿中 hydroxyproline が測定されてきた³⁾。hydroxyproline は骨コラーゲン (I 型) に多く含まれているが, その排泄経路は必ずしも腎依存型と言える程でなく, かつ食事による影響が大きいことが指摘されている⁴⁾。一方, 尿中 γ -gla は腎そのものを重要な代謝臓器とし, ほぼ腎排泄型であり, かつ食事による影響が少ないことが確認されている⁵⁾。しかしながら hydroxyproline が他の蛋白での含有率に比べ I 型コラーゲンにはほぼ特異的と言える程多く含まれているのに対し, γ -gla は BGP⁶⁾, MGP⁷⁾などの骨蛋白以外に凝固系蛋白⁸⁾を始め多数の gla 蛋白に共通に含まれている。従って尿中 hydroxyproline の内因性部分は骨コラーゲンには由来するのに対し, 尿中 γ -gla は 1/3 程度が骨コラーゲン蛋白に由来するにすぎない⁹⁾。この様に尿中 γ -gla 及び hydroxyproline は骨代謝マーカーとしてそれぞれ一長一短の両面を有しているが, 両者はいずれも free の前駆体 (proline および glutamine) から作られること

なく, procollagen や proBGP などの既成の前駆 peptide の特定部位の proline や glutamine が小胞体上で酵素反応により修飾されてつくられ, しかも再利用されない。このため, 尿中の内因性の γ -gla および hydroxyproline はこれらを含んでいた蛋白の生体内の分解によってのみ変動することになり, 正確な骨代謝に関する情報を提供すると考えられる。Bataille ら¹⁰⁾は高 Ca 尿症型のうち特に食餌中 Ca 量に非依存性の高 Ca 尿症型ではコントロール群に比べて絶食中の尿中総 hydroxyproline 及び尿中 Ca はともに高値で, 両者の間に相関が見られ, さらに椎体の mineral density も有意に低値であることを示し, primary bone hyperresorption がその主要因であると報告している。また Isikawa ら¹¹⁾も尿路結石症の一部の症例で Osteocalcin の上昇を報告し, 高 Ca 尿症型 Ca 結石症の骨代謝異常の存在を指摘している。非高 Ca 尿症型を対象とした今回の測定結果では血中および尿中 hydroxyproline ならびに尿中 γ -gla いずれも正常群と差が見られず, 非高 Ca 尿症型特発性 Ca 結石症での骨代謝異常の潜在は前報同様否定的であることを示唆したものと解釈される。一方血中 γ -gla の測定結果は尿中 γ -gla ならびに hydroxyproline の測定結果と矛盾して有意な上昇を示した。今回の検討では血清 BGP は測定していないため, 腎機能正常の場合の BGP 由来の血漿 γ -gla 画分が無視しうるか否か断定出来ないが, 前回の報告では血清 BGP 値の上昇はみられていない。また成人血清 BGP 濃度は骨格全体の BGP 量の 0.001~0.03% にすぎないとの報告¹²⁾もあり, 今回の血清 γ -gla 値の上昇は尿中 γ -gla および hydroxyproline の測定結果を否定するものではないと考えられる。

また最近腎組織 gla 蛋白 (Nephrocalcin)¹³⁾が GAG¹⁴⁾や Tamm Horsfall protein¹⁵⁾と並んで重要な結石形成抑制物質として注目されている。今回測定された尿中 γ -gla には一部 Nephrocalcin 由来の γ -gla が当然含まれていることになるが, Nephrocalcin 由来の尿中 γ -gla に関する報告は現時点では見あたらず, 今後の研究課題として興味深いものと思われる。

文 献

- 1) Kuwada, M. and Katayama, K.: A high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of γ -carboxyglutamic acid and glutamic acid in proteins, bone, and urine. Anal. Biochem., 117, 259-265, 1981.

- 2) 菅野正彦, 山里藤男, 茂手木皓喜: ハイドロキシプロリンに関する研究. 第1報, 血清および尿中遊離型ハイドロキシプロリンの新測定法. 機器・試薬, 14, 1—12, 1991.
- 3) Dull, T.A. and Henneman, P.H.: Urinary hydroxyproline as an index of collagen turnover in bone. *N. Engl. J. Med.*, 268, 132—134, 1963.
- 4) Prockop, D.J. and Sjoerdsma, A.: Significance of urinary hydroxyproline in man. *J. Clin. Invest.*, 40, 843—849, 1961.
- 5) Fernlund, P.: γ -carboxyglutamic acid in human urine. *Clin. Chim. Acta.*, 72, 147—155, 1976.
- 6) Hauschka, P.V., Lian, J.B. and Gallop, P.M.: Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Biochemistry*, 72, 3925—3929, 1975.
- 7) Price, P.A. and Williamson, M.K.: Primary structure of bovine matrix gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J. Biol. Chem.*, 260, 14971—14975, 1985.
- 8) Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. and Roepstorff, P.: Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 2730—2733, 1974.
- 9) Levy, R.J. and Lian, J.B.: γ -carboxyglutamate excretion and warfarin therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 25, 562—570, 1979.
- 10) Bataille, P., Achard, J.M., Fournier, A., Boudailliez, B., Westeel, P.F., Esper, N.E., Bergot, C., Janos, I., Lalau, J.D., Petit, J., Henon, G. M., Jeantet, M.A.L., Bouillon, R. and Sebert, J. L.: Diet, vitamin D and vertebral mineral density in hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney Int.*, 39, 1193—1205, 1991.
- 11) Ishikawa, Y., Kodama, M., Katayama, Y., Takada, M., Katoh, Y., Kataoka, K., Iguchi, M., Kohri, K. and Kurita, T.: Evaluation of serum osteocalcin in patients with urolithiasis. *J.B.M. M.*, 7, 131—135, 1989.
- 12) 浜本洋子, 香川靖雄: 骨の γ -カルボキシグルタミン酸含有タンパク質. 蛋白質・核酸・酵素, 33, 1975—1984, 1988.
- 13) Kaiser, E.T. and Bock, S.C.: Protein inhibitors of crystal growth. *J. Urol.*, 141, 750—752, 1989.
- 14) Sallis, J.D.: Glycosaminoglycans as inhibitors of stone formation. *Mineral Electrolyte Metab.*, 13, 273—277, 1987.
- 15) Yoshioka, T., Koide, T., Utsunomiya, M., Itatani, H., Oka, T. and Sonoda, T.: Possible role of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate crystallisation. *Br. J. Urol.*, 64, 463—467, 1989.

(1992年10月9日受理)