骨吸収マーカーとしての尿中ピリジリノリンおよび デオキシピリジリノリンの測定 前立腺癌骨転移例における有用性

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科 (主任: 斉藤 博教授)

竹 内 信 一 吉 田 謙 一 郎

ASSAY OF URINARY PYRIDINOLINE AND DEOXYPYRIDINOLINE AS POTENTIAL MARKERS OF THE RATE OF BONE RESORPTION: Usefulness of Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline in Patients with Prostate Cancer with Bone Metastases

Shin-ichi Takeuchi and Ken-ichiro Yoshida

Department of Urology, Saitama Medical Center of Saitama Medical School
(Director: Prof. Hiroshi Saitoh)

The collagen crosslinks, pyridinoline (Pyr) and deoxypyridinoline (D-Pyr), were recently identified as potential markers of the rate of bone resorption. To determine whether urinary concentrations of Pyr and D-Pyr might provide an early warning of bone metastases in patients being monitored for cancer of the prostate, we compared these two newer parameters with the conventional indicators, that is, the serum concentrations of Bone Gla protein (BGP: osteocalcin) and alkaline phosphatase (ALP), in patients with prostate cancer with and without bone metastases vs. those of age-matched patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). Urinary excretion of these compounds, expressed as a ratio to urinary creatinine (mg/dl), was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in 23 patients with prostate cancer (16 with bone metastases and 7 without bone metastases) and in 23 patients with BPH. The mean values of urinary Pyr and D-Pyr; 65.02 ± 38.16 pmol/ μ mol of creatinine and 8.87 ± 7.01 pmol/ μ mol of creatinine and 8.87 ± 7.01 pmol/ μ mol of creatinine, respectively, for patients with bone metastases of prostate cancer were significantly higher than those for patients without bone metastases of prostate cancer (27.43 ± 10.29 pmol/ μ mol of creatinine and 4.24 ± 1.88 pmol/ μ mol of creatinine) or for patients with BPH (25.58 ± 7.54 pmol/ μ mol of creatinine and 3.52 ± 1.07 pmol/ μ mol of creatinine). Among these three groups of patients, there were statistically significant (Pyr: $P=0.0001$, D-Pyr: $P=0.001$). The mean value of serum ALP for patients with bone metastases of prostate cancer (266.50 ± 147.46 IU/L) was significantly higher than that for patients without bone metastases of prostate cancer (135.14 ± 20.32 IU/L) and for patients with BPH (144.52 ± 30.95 IU/L) ($P=0.0001$). Urinary levels of both Pyr and D-Pyr were significantly correlated with serum ALP activity in patients with prostate cancer with bone metastases. Contrary to above results, differences in serum BGP levels of three groups of patients were not statistically significant.

Measurement of urinary Pyr and D-Pyr may provide a useful marker of metastatic spread to bone in patients with prostate cancer.

Key words: pyridinoline, deoxypyridinoline, prostate cancer

要旨: 最近, 骨吸収のマーカーとして同定されたコラーゲン架橋因子である尿中 Pyr, D-Pyr が前立腺癌

において骨転移の指標になり得るか否かを検討する目的で、従来の骨代謝のマーカーである血中 BGP, ALP と前立腺癌骨転移(+)群, 骨転移(-)群, および同年齢の前立腺肥大症との間で比較検討した。尿中 Pyr, D-Pyr の測定は高速液体クロマトグラフィーで行い, 尿中クレアチニン量で補正した。対象は 23 例の前立腺癌症例; 16 例: 骨転移(+)群, 7 例: 骨転移(-)群と 23 例の前立腺肥大症であった。

前立腺癌骨転移(+)群の尿中 Pyr, D-Pyr の平均値は $65.02 \pm 38.16 \mu\text{mol of creatinine}$, $8.87 \pm 7.01 \mu\text{mol of creatinine}$ であり, 骨転移(-)群: $27.43 \pm 10.29 \mu\text{mol of creatinine}$, $4.42 \pm 1.88 \mu\text{mol of creatinine}$, 前立腺肥大症: $25.58 \pm 7.54 \mu\text{mol of creatinine}$, $3.52 \pm 1.07 \mu\text{mol of creatinine}$, のそれより有意に高値を示した。これら 3 群間において尿中 Pyr, D-Pyr とともに統計学的に有意差を認めた (Pyr: $P=0.0001$, D-Pyr: $p=0.001$)。前立腺癌骨転移(+)群の血中 ALP の平均値は $266.50 \pm 147.46 \text{IU/L}$ であり, 骨転移(-)群: $135.14 \pm 20.32 \text{IU/L}$, 前立腺肥大症: $144.52 \pm 30.95 \text{IU/L}$, のそれより有意に高値を示した ($p=0.0001$)。前立腺癌骨転移(+)群においては, 尿中 Pyr, D-Pyr どちらも血中 ALP と有意な相関を認めた。これらに比して, 血中 BGP は 3 群間において有意差を認めなかった。以上の結果より, 尿中 Pyr, D-Pyr の測定は前立腺癌において骨への転移の拡がりを知る有用な指標になり得ると思われる。

キーワード: 前立腺癌, ピリジノリン, デオキシピリジノリン

緒 言

前立腺癌は一般的に造骨性の骨転移をきたすことが多く, 進行癌においてはこの骨転移の診断, 治療の効果判定が臨床問題となる。この骨転移の診断, 経過観察には一般的には骨シンチグラムが用いられている¹⁾。しかし, この骨シンチグラムによる診断, 経過観察には核種を用いるため設備面の問題のほか, 定量性の問題, 比較的多く偽陽性が含まれる, など限界がある。従って, 転移性骨腫瘍においては簡便で再現性のある骨代謝マーカーが必要である。従来の骨代謝の生化学マーカー^{2)~5)}はその代謝面からみて骨特異性に乏しく, また食餌の影響を受けるなど, 骨吸収を必ずしも正確に反映していなかったのが現状である。近年, 骨吸収の生化学的指標としてコラーゲンの架橋因子である蛍光性物質, ピリジノリン (Pyr) およびデオキシピリジノリン (D-Pyr) の尿中排泄量の測定が注目され⁶⁾⁷⁾, その信頼できる測定法が確立し⁸⁾, これらの物質は骨吸収の特異的マーカーであることが知られるようになった⁹⁾。

そこで, 今回, 我々は Pyr および D-Pyr の尿中排泄量の測定が前立腺癌の骨転移の判定に有用であるか否かを判定する目的で, 前立腺癌骨転移(+)群, 骨転移(-)群および同年齢の前立腺肥大症の 3 群間で, 従来の骨代謝のマーカーである血中オステオカルシン (BGP) 濃度, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性と比較検討した。

対象および方法

1. 対象

対象は 1992 年 9 月から 1993 年 4 月までに埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科に入院した未治療およびホルモン抵抗性となった前立腺癌 23 症例である。23 例の平均年齢は 72.3 ± 8.5 歳 (52~84 歳), その組織型は高分化~中分化型: 1 例, 中分化型: 3 例, 中分化~低分化型: 10 例, 低分化型: 9 例, 病期分類は Whitmore-Jewett 分類¹⁰⁾によると Stage A₂: 1 例, Stage C: 6 例, Stage D₂: 16 例, である。16 例は骨転移が明らかな Stage D₂ で, そのうち 5 例はホルモン抵抗性となった症例である。治療前の病期分類は一般的理学所見, 排泄性腎造影, 胸部 X-P, 後腹膜および骨盤部の CT scan そして骨シンチグラムにて行った。同時に血中カルシウム (Ca) 濃度, ALP 活性, BGP 濃度および尿中 Pyr, D-Pyr 排泄量を測定した。また, 同時期に入院し, 組織学的に診断し得た前立腺肥大症 23 例を対象とした。前立腺肥大症 23 例の平均年齢は 71.2 ± 7.3 歳で, これらの症例においても治療前に血中 Ca 濃度, ALP 活性, BGP 濃度および尿中 Pyr, D-Pyr 排泄量を測定した。なお, 血中 BGP 濃度は腎機能低下例においては上昇することが知られているので¹¹⁾, 血中クレアチニン値が 1.1mg/dL 以上である症例は除外した。

検体尿の採取は早朝の 2 時間尿 (6a.m.~8a.m.) とし, 10~20ml を凍結し, 測定まで -70°C で保存した。血清も同じく早朝, 空腹時に採血し, 測定まで -70°C で保存した,

2. 方法

A. 尿中 Pyr, D-Pyr の測定

Pyr および D-Pyr の分離定量は Uebelhart らの方法⁹⁾に準じて蛍光検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて行った。尿試料1ml に12N-塩酸1ml を加えて107°C、18時間の加水分解後、CF-1セルロースカラム (Whatman Co. Ltd., Maidstone, England) にて粗精製した。次いで、HPLC (Capsel Pak C₁₈: 資生堂) にて n-Heptafluorobutyric acid (HFBA) 存在下、アセトニトリルの Linear gradient により Pyr および D-Pyr を分離溶出させ、その蛍光特性を利用して定量した。励起波長は297nm、測定波長は395nm で、検出機は F-1050 蛍光モニター (日立) を使用した。Pyr および D-Pyr の値は尿中クレアチニン量で補正し、pmol/ μ mol of creatinine で示した。尿中 Pyr および D-Pyr の基準値は健康男性: 89例 (23~57歳), 女性: 60例 (21~40歳) から算定し、それぞれ 17.7~41.9 (Mean $\pm$ 2SD), 2.2~6.1 (Mean $\pm$ 2SD) とした。

B. 血中 Ca 濃度, ALP 活性, BGP 濃度の測定

血中 Ca 濃度の測定は O-Cresolphthalein Complexon (OCPC) 法にて行い、ALP 活性の測定は P-Nitrophenyl Phosphate (PNP) 基質法にて行った。血中 BGP 濃度の測定は市販の Bone Gla-protein IRMA kit (三菱油化) を用いた immunoradiometric assay にて行った。血中 BGP 濃度の基準値は上記 kit を用いた成人健常者: 66例 (23~56歳) から算定し、3.1~12.7ng/ml (Mean $\pm$ 2SD) とした。

3. 統計処理

測定値は Mean $\pm$ S.D. で表し、各群間の独立性は χ^2 検定を用いて有意差検定を行い、両側検定で $p < 0.05$ を推計学的有意と判定した。平均値の差は t 検定を用いて行い、有意差検定は Kruskal-Wallis 法にて行った。項目間の相関係数は Spearman の順位相関係数により求めた。

結 果

Fig. 1 および 2 に尿中 Pyr, D-Pyr の 3 群, すなわち前立腺癌骨転移 (+) 群, 骨転移 (-) 群, 前立腺肥大症, における測定値を示す。前立腺癌骨転移 (+) 群では、尿中 Pyr, D-Pyr の基準値上限を超えるものはそれぞれ 13/16 (81%), 7/16 (44%) であったが、骨転移 (-) 群ではそれぞれ 1/7 (14%), 1/7 (14%) であった。一方、前立腺肥大症ではそれぞれ基準値上限を超える症例は 1 例も認めなかった。前立腺癌骨転移 (+) 群の尿中 Pyr の平均値は 65.02 ± 38.16 pmol/ μ mol of creatinine で、骨転移 (-) 群: 27.43 ± 10.29

Fig. 1 Urinary excretion of pyridinoline (Pyr) relative to urinary creatinine in three groups, viz, prostate cancer with bone metastases, without bone metastases, and BPH.

Fig. 2 Urinary excretion of deoxypyridinoline (D-Pyr) relative to urinary creatinine in three groups, viz, prostate cancer with bone metastases, without bone metastases, and BPH.

Fig. 3 Serum Bone Gla protein (BGP; osteocalcin) concentration in three groups. viz, prostate cancer with bone metastases, without bone metastases, and BPH.

pmol/ μ mol of creatinine, 前立腺肥大症: 25.58 ± 7.54 pmol/ μ mol of creatinine, より有意に高値を示した。これら3群間では統計学的に有意差を認めた ($p =$

0.0001)。また、前立腺癌骨転移(+)群の尿中D-Pyrの平均値は 8.87 ± 7.01 pmol/ μ mol of creatinineで、骨転移(-)群: 4.24 ± 1.88 pmol/ μ mol of creatinine, 前立腺肥大症: 3.52 ± 1.07 pmol/ μ mol of creatinine, のそれより有意に高値を示した。尿中D-Pyrも3群間において統計学的に有意差を認めた ($p = 0.001$)。尿中PyrとD-Pyrは3群間において統計学的に有意の相関を認めた。Fig. 3に3群の血中BGP濃度を示す。前立腺癌骨転移(+)群では基準値上限を超える症例は1例認めしたが、骨転移(-)群, 前立腺肥大症では1例も認めなかった。前立腺癌骨転移(+)群の血中BGP濃度の平均値は 6.16 ± 3.94 ng/dLで、前立腺癌骨転移

Table 1 Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline, and serum Osteocalcin levels in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

	Prostate Cancer		BPH
	Bone meta (+)	Bone meta (-)	
Pyridinoline	65.02 ± 38.16^a	27.43 ± 10.29^b	25.58 ± 7.54^b
Deoxypyridinoline	8.87 ± 7.01^a	4.24 ± 1.88^b	3.52 ± 1.07^b
Osteocalcin	6.16 ± 3.94	5.56 ± 2.56	5.98 ± 2.02

Unit; Pyridinoline, Deoxypyridinoline: pmol/ μ mol of creatinine, Osteocalcin: ng/ml. Values are presented as mean plus or minus standard deviation. Mean values on a line with a common superscript differ significantly ($p < 0.01$).

Fig. 4 Relationship of serum ALP activity to urinary excretion of pyridinoline (Pyr) relative to urinary creatinine in patients with prostate cancer with bone metastases.

Fig. 5 Relationship of Serum ALP activity to urinary excretion of deoxypyridinoline (D-Pyr) relative to urinary creatinine in patients with prostate cancer with bone metastases.

(一) 群, 前立腺肥大症のそれはそれぞれ 5.56 ± 2.56 ng/dL, 5.98 ± 2.02 ng/dL であったが, 3 群間に統計学的に有意差は認めなかった. Table 1 に 3 群の Pyr, D-Pyr の尿中排泄量および血中 BGP 濃度の一覧を示す.

採尿の際に測定した血中 Ca 濃度は 3 群すべての症例において, 正常範囲内であった. 前立腺癌骨転移(+) 群の血中 Ca 濃度の平均値は 8.20 ± 0.40 mg/dL で, 骨転移(-) 群: 8.60 ± 0.23 mg/dL, 前立腺肥大症: 8.52 ± 0.34 mg/dL, のそれより低値を示したが 3 群間には統計学的に有意差を認めなかった. また, 前立腺癌骨転移(+) 群の血中 ALP 活性は 266.50 ± 147.46 IU/L で, 骨転移(-) 群: 135.14 ± 29.32 IU/L, 前立腺肥大症: 144.52 ± 30.95 IU/L, のそれより高値で統計学的にも有意差を認めた ($p=0.0001$). Fig. 4, 5 に前立腺癌骨転移(+) 群の血中 ALP 活性と尿中 Pyr, D-Pyr 排泄量との相関を示すが, これらは統計学的に有意の相関性がみられた. 血中 ALP 活性と尿中 Pyr 排泄量との相関係数は 0.62 ($p=0.011$) であり, 尿中 D-Pyr 排泄量との相関係数は 0.60 ($p=0.0145$) であった. 一方, 前立腺癌骨転移(-) 群, 前立腺肥大症においては血中 ALP 活性と尿中 Pyr, D-pyr 排泄量との間に統計学的に有意の相関性はみられなかった.

考 察

癌の骨転移の診断・治療や代謝性骨疾患の指標として, 骨代謝の生化学的マーカーが研究されており^{2,3,12}), これらには尿中 Ca^{40} , 尿中ハイドロキシプロ

リン^{2,5}), 血中 ALP 活性^{3,5}) が含まれるが, これらは全て骨吸収の程度を反映している. しかし, これらのマーカーは骨機能に特異的ではないといわれている. これに対して血中 BGP 濃度は新しい骨形成や骨芽細胞の活性を反映しているため骨代謝の特異的マーカーと考えられている^{3,13}). 血中 BGP 濃度の上昇は転移性骨疾患を含めて骨転移が昂進している状態を示すといわれ^{3,11}), 実際, 前立腺癌において骨転移を認める進行癌の方が骨転移を認めない症例より高い値を示し, しかも治療に伴う経過観察手段としてより有効であったとする報告がある¹⁴). しかし, 我々の検討では前立腺癌骨転移症例と骨転移を認めない症例との間に治療前の血中 BGP 濃度には統計学的に有意差は認めなかった. 一方, 我々の検討で前立腺癌骨転移(+) 群の血中 ALP 活性が前立腺癌骨転移(-) 群や前立腺肥大症より有意に高値を示したが, 前立腺癌骨転移(-) 群および前立腺肥大症においては正常値上限を超えている症例が 0 に対して, 前立腺癌骨転移(+) 群でも 7/16 (44%) に過ぎなかった. 以上の結果は, 前立腺癌骨転移症例においてもいつも骨代謝が昂進しているわけではなく, また, 血中 BGP 濃度が必ずしも前立腺癌において骨転移の存在を示す有用なマーカーとは限らない事を示唆しているものと思われた.

最近, コラーゲン架橋物質として知られる新しいタイプの骨吸収マーカーが同定されている^{6,7}). 種々のコラーゲン架橋物質やエラスチンがリジン又はハイドロキシリジンの残基から合成され, その合成の始まりは

ϵ -aldehydes の形成であることが知られている¹⁵⁾。ペリジノリンを含む架橋物質である triple-chained peptide は牛のアキレス腱からプロネースを用いた消化作用後に分離され¹⁶⁾、そのアミノ酸組成は特徴的でヒスチジン、アルギニン、ハイドロキシプロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、メチオニン、ロイシンと一つのペリジノリン残基から成り、リジンとハイドロキシリジンは欠いている¹⁶⁾。尿中のコラーゲン架橋物質の同定に追従して、Pyr の同定も immunoassay や HPLC を用いて発展している⁹⁾。Pyr は3-ハイドロキシプロリンの誘導体で骨、象牙質や軟骨といった硬い結合組織に存在し、皮膚のコラーゲンには存在しない。同族のコラーゲン架橋物質である D-Pyr もまた尿中に同定され¹⁹⁾、その存在は大部分、骨や象牙質に局限している⁶⁾。Pyr, D-Pyr のどちらもコラーゲンの減成によりほとんど完全に尿中に排泄され、食事の影響は受けない²⁰⁾。そして、尿中 Pyr, D-Pyr 増加は骨吸収の昂進を反映しているといわれる⁹⁾²¹⁾。最近の研究によると、尿中 Pyr, D-Pyr の測定はページェット病、原発性副甲状腺機能亢進症、骨粗しょう症といった代謝性疾患⁹⁾²¹⁾や乳癌の骨転移²²⁾²³⁾の有用なマーカーになり得るとされている。

我々の検討でも、骨転移の明らかな前立腺癌の方が尿中 Pyr, D-Pyr とともに基準値を超える比率が骨転移を認めない症例や BPH よりもより多く認めた。さらにより顕著なことは尿中 Pyr の方が前立腺癌骨転移(+)群と骨転移(-)群との間により差異を認め、尿中 Pyr の方が尿中 D-Pyr より骨転移(+)群において基準値上限を超える症例が多かった。しかし、最近の報告²⁴⁾で前立腺癌において尿中 Pyr, D-Pyr 排泄量を測定し、我々の結果と同じく骨転移(+)群が骨転移(-)群に比して有意に高値を示したとする一方、尿中 D-Pyr の方が骨転移の存在の同定により役立ったと結論している。これは、我々の結果と異なっているがこの点については、D-Pyr は Pyr の同族体として知られているが、Pyr の代謝と D-Pyr のそれとは異なる可能性が示唆され更なる検討が必要であると思われた。さらに、上記報告では尿中 Pyr, D-Pyr は骨転移の診断をするのではなく骨代謝の推移、例えば骨転移巣の早期診断や治療に伴う経過を追跡する手段として有用であるとしている。従って、今後は前立腺癌においては骨シンチグラムに比して、骨転移巣を早期に診断し得るか否か、更には、骨転移を有する症例においては経時的に測定することにより他の骨代謝マーカー、例え

ば血中 ALP 活性と治療に対する反応の面からどちらが特異性が高いか比較検討する必要があると思われた。また、我々の結果では尿中 Pyr, D-Pyr の排泄量が血中 ALP 活性と相関していたが、この事は前立腺癌の骨転移巣においては造骨作用と骨破壊が同時に昂進している可能性を示唆しているものと思われた。

文 献

- 1) Pollen, J.J., Gerber, K., Ashburn, W.L., Schmidt, J.D.: Nuclear bone imaging in metastatic cancer of the prostate. *Cancer*, **47**, 2585—2594, 1981.
- 2) Blomqvist, C., Elomaa, I., Virkkunen, P., Karonen, L.S.-L., Risteli, D.J.: The response evaluation of bone metastases in mammary carcinoma. *Cancer*, **60**, 2907—2912, 1987.
- 3) Coleman, R.E., Whitaker, K.B., Moss, D.W., Mashiter, G., Fogelman, I., Rubens, R.D.: Biochemical prediction of response of bone metastases to treatment. *Br. J. Cancer*, **58**, 205—210, 1988.
- 4) Campbell, F.C., Blamey, R.W., Woolfson, R.W., Elston, C.W., Hosking, D.J.: Calcium excretion (Ca_E) in metastatic breast cancer. *Br. J. Surg.*, **70**, 202—204, 1983.
- 5) Stepan, J.J., Mikulecky, M., Bek, V., Bloilik, P., Pacovsky, V.: Bone alkaline phosphatase isoenzymes and urinary hydroxyproline in healthy subjects, patients with osteolytic metastases, and patients with primary hyperparathyroidism. *Neoplasma*, **36**, 495—501, 1989.
- 6) Eyre, D.R., Oguchi, H.: hydroxypyridinium crosslinks of skeletal collagens: their measurement, properties and a proposed pathway of formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 403—410, 1980.
- 7) Beardworth, L.J., Eyre, D.R., Dickson, L.R.: Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxyllysyl pyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J. Bone Miner. Res.*, **5**, 671—676, 1990.
- 8) James, I.T., Perret, D., Thompson, P.W.: Rapid assay for hard tissue collagen cross-links using ion-pair reverse phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **525**, 43—57, 1990.
- 9) Uebelhart, D., Gineyts, B., Chapuy, M.-C., Delias, P.D.: Urinary excretion of pyridinium cross-links: a new marker of bone resorption in metastatic disease. *Bone Miner.*, **8**, 87—96, 1990.
- 10) Catalona, W.J., Scott, W.W.: Carcinoma of the prostate. In Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, Stamey TA (eds): "Campbell's Urology," 5th ed. vol. 2, Sec. XI, pp. 1263

- 1525, WB Saunders, Philadelphia, 1986.
- 11) Lian, J.B., Gundberg, C.M.: Osteocalcin: Biochemical consideration and clinical application. *Clin. Orthop.*, **229**, 267—281, 1980.
 - 12) Hortobagyi, G.N., Libshitz, H.I., Seabold, J.E.: Osseous metastases of breast cancer. Clinical, biochemical, radiographic and scintigraphic evaluation of response to therapy. *Cancer*, **55**, 577—582, 1984.
 - 13) Price, P.A., Parthemore, J.G., Deftos, L.J.: New biological marker for bone metabolism: measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J. Clin. Invest.*, **66**, 878—883, 1980.
 - 14) Arai, Y., Takeuchi, H., Oishi, K., Yoshida, O.: Osteocalcin: Is it a useful marker of bone metastasis and response to treatment in advanced prostate cancer? *Prostate*, **20**, 169—177, 1992.
 - 15) Gallop, P.M., Blumenfeld, O.O., Seifter, S.: Structure and metabolism of connective tissue proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 617—672, 1972.
 - 16) Fujimoto, D., Moriguchi, T.: Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. Quantitative determination, distribution, and isolation of a crosslinked peptide. *J. Biochem.*, **83**, 863—867, 1978.
 - 17) Fujimoto, D., Moriguchi, T., Ishida, T., Hayaishi, H.: The structure of pyridinoline, collagen cross-link. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52—57, 1978.
 - 18) Robins, S.P.: Cross-link of collagen. *Biochem. J.*, **215**, 167—173, 1983.
 - 19) Ogawa, T., Ono, T., Tsuda, M., Kawanishi, Y.: A novel fluor in insoluble collagen: a crosslinking molecule in collagen molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1252—1257, 1982.
 - 20) Segrest, J.P.: Urinary metabolites of collagen. *Method Enzymol.*, **82**, 398—410, 1982.
 - 21) Uebelhart, D., Schlemmer, A., Johanson, J.S., Goneyts, E., Christiansen, C., Delmas, P.D.: Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **72**, 367—373, 1991.
 - 22) Paterson, C.R., Robins, S.P., Horobin, J.M., Preece, P.E., Cusschieri, A.: Pyridinium cross-links as markers of bone resorption in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer*, **64**, 884—886, 1991.
 - 23) Coleman, R.E., Houston, S., Ford, J.: Preliminary results of the use of urinary excretion of pyridinium crosslinks for monitoring metastatic bone disease. *Br. J. Cancer*, **65**, 766—768, 1992.
 - 24) Miyamoto, K.K., Mcsherry, S.A., Robins, S.P., Besterman, J.M., Mohler, J.L.: Collagen cross-link metabolites in urine as markers of bone metastases in prostatic cancer. *J. Urol.*, **151**, 909—913, 1994.
- (1994年5月18日受付, 7月15日受理, 特別掲載)