岩手医科大学第一内科 佐々木正孝

概要 基礎検討として血漿中のアミノ酸(AA)の日内変動の平均と24時間尿中AA排泄量の間に有意の相関を確認した。これをもとに糖尿病時のAA代謝異常の全体像を追求すべく糖尿病症例の24時間尿中アミノ酸特に分枝鎖AA(BCAA)と糖原性AA(GGAA)排泄量について検討したが血糖コントロール不良時には、BCAA、セリン、アラニンの尿中排泄量が有意に増加した。これは末梢組織でのインスリン作用不足を示唆している。インスリンで血糖を厳格にコントロールするとBCAA、セリンは迅速に減少し正常に近づいた。これらの成績より、尿中BCAAおよびセリンの測定は末梢組織におけるインスリン作用を知る指標になるうと思われる。糖尿病時の尿中AA分析の意義を認めた。〔日内会誌 78: 345~351, 1989〕

緒 言

インスリンは、種々の中間代謝の中心的な調節ホルモンであり、筋、肝、脂肪組織等に対しさまざまな作用を有する。蛋白、アミノ酸(AA)代謝についてみるとインスリンは、筋、肝でのアミノ酸摂取、蛋白合成を促進し蛋白分解を抑制する。したがってインスリンの欠乏あるいは作用不足状態の糖尿病では、様々なAA代謝異常の発生が想定され、事実、臨床的にも実験的にも種々の報告がなされている¹⁾²⁾。それらの報告を総合すると、糖尿病時の血漿AA異常として、BCAAの増加と、アラニン、セリン等の糖原性AA(GGAA)の減少が比較的特徴的といわれている³⁾。しかし、血漿AAは種々のホルモン、年齢、性、食事、運動量等の影響をうけ^{4)~6)}、さらに日内変動も呈するため⁷⁾、種々の病態における血漿AAレベルの変化や正常域の設定にも報告によって大きな差が認められる。したがって1回の血漿AAレベルの測定から生体全体のAA代謝状態に対する明確な判断を下しえないこともある。一方、尿中AAレベルの測定は従来よりフェニールケトン尿症や楓糖尿症などの遺伝的な酵素欠損によるAA代謝異常の診断や病態の把握に用いられてきた。最近では、3-メチルヒスチジンの24時間尿中排泄量が栄養評価および筋蛋白代謝の指標とされるなど⁸⁾⁹⁾尿中AAレベ

ルの測定から各種疾患の蛋白代謝異常の総合的な情報を得られる可能性が示唆されている。

著者は糖尿病時の血漿AAの日内変動が大きいことから、今回、24時間尿中のAA酸排泄量をAA代謝酸推定のための指標にしようと試みた。すなわち、基礎実験として健常人において、血漿AAレベルの日内変動の平均値と当日の24時間尿中のAA排泄量の相関を検討したところ、多くのAAで有意の正の相関が得られた。そこで、本研究では糖尿病時のAA代謝異常、とくにBCAAとおよびGGAAの異常について24時間尿中排泄量の測定をもとにしてcross-sectionalおよびlongitudinalに検討し、血糖コントロールとの関連性を追求した。

対象および方法

1) Preliminary study

健常人9名を対象とした。内訳をみると、男6名、女3名、平均年齢54才、平均身長158cm、平均体重56kg、body mass index(BMI)平均22.4であった。これらの対象に同一の食事(2000kcal/日、炭水化物330g、蛋白80g、脂肪40g)を約2週間摂取させている状態で各食前30分に静脈採血し、ただちに血漿に分離し血漿AAを定量した。また同日の24時間尿を採取して尿中AAを測定し、血漿AAの日内変動の平均と24時間尿中へのAA排泄

〔昭和63年6月21日受稿〕

Studies on urinary excretion of amino acids in diabetic patients

Masataka SASAKI, The First Department of Internal Medicine, Iwate Medical University of Medicine, Morioka

量との相関をみた。なお、24時間尿はあらかじめ6N-HCl 20mlを蓄尿瓶に入れておき酸性蓄尿とし4℃で保存した。

2) Cross-sectional study

表1に示すように、対象は当科糖尿病外来に定期的に通院中または入院中の糖尿病患者31名(男14名, 女17名)である。インスリン依存型糖尿病(IDDM)症例は12名, 非インスリン依存型糖尿病(NIDDM)症例は19名であった。IDDM群では全例がインスリンで, NIDDM群では全例スルフォニール尿素(SU)剤で治療されていた。なお、各群を空腹時血糖(FPG), ヘモグロビンA-I(HbA-I)にてgood control群(FPG<120mg/100ml, HbA-I<9.0%), poor control群(FPG≥120mg/100ml, HbA-I≥9.0%)の2群に分類し尿中AA排泄を比較検討した。また、年齢、性のはぼ一致した健常人21名を正常対照とした。

3) Longitudinal study

糖尿病以外の代謝疾患あるいは糖尿病性腎症, その他の腎疾患等の合併症のないNIDDM患者8名(男4名, 女4名)を対象とした(表2)。これらの対象の糖尿病罹病期間は平均1.7年で8名のうち5名は発症後食事療法のみ, 3名は食事療法とSU剤で治療中であつたがいずれもコントロール不良であった。そこで、8名を全員入院させ、約10日間にわたり30kcal/kg・body・weightの食事療法のみを行った後、各症例の血糖値に応じたインスリン療法を開始した。インスリン療法前のFPGは平均196mg/100ml, BMIは平均22.7であり、インスリン投与前の血糖の日内変動を、Schlicht-krullのM値の後藤らの変法¹⁰⁾で表わすと平均130と高値であった。インスリン療法開始前と開始後4日ごとに血糖の日内変動を検査し、インスリン療法開始前と厳格に血糖をコントロール

表1. 対象の臨床成績 (Cross-sectional study)

Group	N(M, F)	Age (years)	FPG (mg/100ml)	HbA _{1c} (%)	BMI
Healthy controls	16(8, 8)	52±4	87.2±8.1	—	22.2±1.2
Diabetics					
IDDM					
Good control	7(3, 4)	54±7	105.1±6.6	8.5±0.1	23.2±1.1
Poor control	5(2, 3)	56±2	163.2±29.7	13.6±0.7	24.2±1.2
NIDDM					
Good control	8(4, 4)	58±1	105.1±2.8	8.3±0.2	23.6±1.0
Poor control	11(5, 6)	53±2	174.6±6.6	13.4±0.6	23.5±1.0

Mean±SE

FPG: Fasting plasma glucose. BMI (Body mass index): weight in kg/(height in m)².

p<0.01, *p<0.001

表2. 血糖コントロール前後の臨床成績 (Longitudinal study)

Examination period	Age (years)	Duration of diabetes (years)	Insulin dosage (unit/day)	BMI	FPG (mg/100ml)	M-value
Before insulin treatment (n=8)	53±7	1.7±0.9	—	22.7±0.9	196±11	130±21
After insulin treatment (n=8)	—	—	21.2±2.9	22.0±0.6	94±4***	18±2***

Mean±SE M-value: An index of diurnal plasma glucose fluctuation (see text).

***p<0.001

図1. 血漿アミノ酸レベルの日内変動の平均と24時間尿中排泄量との相関（健常人）

し得た時点で24時間尿を採取し尿中AAを測定した。血糖コントロールには速効型および中間型インスリンを単独または併用した。コントロールに要したインスリン量は平均21単位/日、要した日数は12日から20日であった。血糖コントロールの程度はFPGおよびM値で判定したが、コントロール後のFPGは平均94mg/100ml、M値は平均18であった。なおインスリン治療中低血糖症状を呈したり著明な体重減少を示した症例はなかった。

4) Laboratory and statistical analysis

血糖はglucose-oxidase法で測定した。血漿AAの場合には血漿1mlに20%スルフォサリチル酸0.25ml、尿中AAの場合には尿1mlに4%スルフォサリチル酸1mlをそれぞれ加えて除蛋白した後、攪拌、遠心分離（2500r.p.m. 5分間）し、その上澄みをサンプル管に移し、AA自動分析器（日立835型）にて各AAを定量した（オルトフタルアルデハイド法：OPA法）¹¹⁾。なお、標準AA混合液は和光純薬、AN型およびB型を混合希釈して用いた。血漿AAはmg/100mlで表わし尿中AAは尿中クレアチニン（CRNN）をJaffe法¹²⁾にて定量後、mg/g・CRNNの単位で表わした。得られた結果の推計学的処理にはt検定を用い、 $p < 0.05$ を有意と

した。

結 果

1) Preliminary study

図1に6種の血漿AAの日内変動の平均値と24時間尿中排泄量との相関を示した。BCAAとGGAAでは、24時間尿中への排泄量が若干異なっていた。個々のAAについて見ると、ロイシン($r = 0.691$, $p < 0.01$)、イソロイシン($r = 0.799$, $p < 0.01$)、バリン($r = 0.794$, $p < 0.01$)、セリン($r = 0.672$, $p < 0.05$)、グリシン($r = 0.898$, $p < 0.01$)と5種のAAで血漿レベルの日内変動の平均と24時間尿中排泄量のあいだに有意の正の相関が認められた。しかし、アラニンは、有意の負の相関($r = -0.708$, $p < 0.05$)を示した。以上の検討より24時間尿中AA排泄量は血漿AAレベルの日内平均値を反映していると判定できる。

2) Cross-sectional study

まず初めに、糖尿病患者群を血糖コントロールの良否により2群に分類し、さらに糖尿病の病型別に分類して検討を加えた。図2に各群別にみたAAの24時間尿中排泄量を示した。全体として見ると、健常群にくらべ糖尿病群でAAの尿中レベルの上昇傾向が認められたがすべてのAAでgood

図2. 各群の尿中アミノ酸排泄量 (Cross-sectional study)

control群と健常群の間に有意差は認められなかった。また、IDDM群とNIDDM群を比べると、有意差はないもののIDDM群でロイシン、バリン、グリシン、アラニンなどの尿中レベルがむしろ低い傾向が見られた。個々のAAについて見ると、ロイシンでは、poor controlのIDDM群、NIDDM群ともに健常群およびgood controlの各群に比べ有意の上昇を示し、イソロイシンでは、poor controlのIDDM群およびNIDDM群で健常群に比べ有意の上昇を示した。バリンでは、poor controlのNIDDM群がgood controlのNIDDM群および健常群に比べ有意の上昇を示した。またセリンに関しては、NIDDM症例のpoor control群とgood control群の間に有意差が認められた。グリシンでは各群間に有意差は認められなかったが、アラニンではIDDM症例、NIDDM症例ともにpoor control群とgood control群の間に有意差が認められ、さらにpoor controlのNIDDM症例は健常群に比

図3. 蛋白尿の有無からみた尿中アミノ酸排泄量

べ有意の上昇を示した。

次に、糖尿病群の24時間尿中AA排泄量が糖尿病性腎症の有無により変化するか否かを見るために、good control群、poor control群をそれぞれ蛋白尿の有無により2群に分類し検討を加えた。ただし、蛋白尿(+)群でも血液尿素窒素(BUN)および血清クレアチニン値が異常高値を示す症例はなかった。図3に各AAの尿中レベルを示した。各AAでgood control群とpoor control群の間に差は認められるが、すべてのAAにおいて蛋白尿(+)群と蛋白尿(-)群の間に有意差を認めなかった。この結果から、24時間尿中AAレベルは、軽度の糖尿病性腎症の有無により大きな影響は受けないと思われた。

3) Longitudinal study

表3にインスリン治療前と、インスリンにて血糖を厳格にコントロールし得た時点における24時間尿中AAを示した。すなわち、コントロール前の

表 3. 血糖コントロール前後の尿水アミノ酸排泄量 (Longitudinal study)

Examination period	Urinary amino acids(mg/g of creatinine/24 hours)					
	Branched-chain amino acids			Glucogenic amino acids		
	Leucine	Isoleucine	Valine	Serine	Glycine	Alanine
Before insulin treatment (n=8)	10.7±1.6	4.2±0.4	11.7±1.4	62.4±16.2	65.7±19.1	69.2±17.1
After insulin treatment (n=8)	5.0±1.7**	2.1±0.6**	6.7±1.2**	27.5±9.3**	78.1±22.5	51.8±11.6
Healthy controls (n=16)	5.5±0.9	2.6±0.3	6.2±0.7	33.1±7.6	69.6±8.8	40.9±5.6

Mean±SE

**p<0.01 (compared with the value before insulin treatment)

値をみると、ロイシンは $10.7 \pm 1.6 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ 、イソロイシンは $4.2 \pm 0.4 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ 、バリンは $11.7 \pm 1.4 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ 、セリンは $62.4 \pm 16.2 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ と健常群にくらべ有意 ($p < 0.01 \sim 0.001$) の上昇を示していたが、インスリン療法によりFPGが 196 mg/100ml から 94 mg/100ml へ、M値が130から18へと著明に血糖コントロールが改善されるに伴い、ロイシンは、 $5.0 \pm 1.7 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ 、イソロイシンは $2.1 \pm 0.6 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ 、バリンは $6.7 \pm 1.2 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ 、セリンは $27.5 \pm 9.3 \text{ mg/g} \cdot \text{CRNN}$ とそれぞれ有意 ($p < 0.01$) の減少を示し健常群に近似したレベルとなった。

考 察

従来から、糖尿病時の血漿中のAAについては若干の報告が認められる。しかし、成績は必ずしも一致していない。血中総遊離AAは増加しているとの報告が多いが、木村ら¹³⁾は総遊離AAは減少し特にFPGの高い例にその傾向が見られると報告している。個々の血漿AAについても、Feligら¹⁾は、糖尿病ケトアシドーシス患者の観察から、インスリン作用不足の状態である糖尿病では、BCAAの増加と、GGAAであるグリシン、アラニン等の低下が特徴的と結論し、この変化をインスリンのAA代謝における二つの作用すなわちケトン原性AA動員の抑制 (蛋白質合成促進)、およびGGAAの肝での取りこみの抑制作用のいずれもが糖尿病時に減弱するためと説明している。

GGAAの変化に関しては同様の説が多い。しかし、糖尿病の際のBCAAの変化に関してはなお不明の点が多く、kinneyら¹⁴⁾は、インスリンの不足により骨格筋の異化が亢進し血中へ放出されるAAが増加するが、その中でBCAAのみが肝で取り込まれないため血中濃度が高値を示すと推論している。一方、鈴木ら¹⁵⁾は動物実験の結果から、糖尿病では筋でのBCAAの代謝は亢進しているが、インスリン不足によりBCAAの膜透過性が低下し筋への取り込みが減少し、また蛋白合成の低下があるため全体として血漿BCAAの上昇を招いていると推論している。

さらにVanniら¹⁶⁾は、糖尿病時の血漿AAの変化は、BCAAの増加とGGAA、特にアラニンの低下が特徴的でBCAAはインスリン治療により著明に低下し糖尿病コントロールの指標になりうると報告している。Burgerら¹⁷⁾もインスリノーマ患者および若年性糖尿病患者における検討で血漿BCAAがFPG、血中ケトン体、FFAなどと相関がありインスリンの作用に最も影響を受けやすいAAであると報告している。一方、GGAAのインスリン治療前後の変化は不明の点が多い。Vanniら¹⁶⁾によると、GGAAであるアラニンは血糖コントロールの指標になり得ないと結論されている。GGAAやBCAAばかりでなくその他の血漿各AAはそれぞれ起源が多岐にわたり、肝や筋への放出や取りこみのバランスのほかに食後の門脈からの

流入により修飾されるため1回の血漿レベルの測定から代謝異常の判断を下すのは困難である。

今回、筆者は、1日の血中レベルの変化が反映されていると推定された24時間尿中AA排泄量からのアプローチを試みた。すなわち、基礎実験として行った健常人での血漿AAの日内変動の平均と24時間尿中AA排泄量との検討では、5種のAAで有意の正の相関が認められ、アラニンでは有意の負の相関が認められた。AAの尿中排泄には、血漿レベルのほか尿細管での再吸収機構が関与しているが現在のところ尿細管のAA転送系としては6種のものが知られている¹⁸⁾。しかしアラニンの転送系は、イソロイシンやバリンと同じ転送系でありアラニンの尿中排泄の特異性を尿細管のAA転送の差により説明することはできず、血中における収支と尿中排泄の間に他の特別なメカニズムが存在するものと思われた。したがって、アラニンを含め、血漿各AAの日内変化が24時間の尿中排泄量によく反映されていることから、AA代謝の状態を把握する手段として24時間尿中AAレベルの単一分析の意義はあると思われた。

Cross-sectional studyから見ると、AAの24時間尿中排泄量は健常群にくらべ糖尿病群で増加傾向を示していたが、good control群と健常群の間には、有意差は認められなかった。しかし、good control群とpoor control群との間では、ロイシン、アラニンが、IDDM群、NIDDM群ともに有意差を示し、バリン、セリンはNIDDM群で有意差を示した。また、IDDM群とNIDDM群の間には、有意差は認められなかったがNIDDM群により強く尿中AA排泄量の増加傾向が認められた。この結果は治療法の違いを反映しているものと見られ、IDDM群ではNIDDM群に比べインスリン治療により末梢でのインスリンレベルが高いことを示していると思われた。高柳ら¹⁹⁾は、小児IDDM患者の検討から血漿BCAAレベルが糖尿病の管理指標であるHbA-I、血糖等と相関することから、BCAAは末梢組織、特に骨格筋代謝を調節しているインスリンの作用を反映し、BCAA測定がインスリンの治療効果の指標として有用であると述べてい

る。今回の著者の成績は高柳らの報告¹⁹⁾を支持する。一方、セリンは、GGAAでありインスリン不足状態の糖尿病では糖新生が亢進し肝への取り込みが増加するため血漿レベルの低下とともに尿中排泄量も減少すると考えられたが、健常群にくらべ逆に増加傾向を示した。この変化は、インスリン不足による肝、筋などでの放出と取り込みのバランスの変化だけでは説明がつかない。Lowryら²⁰⁾によると血漿セリンの多くの部分が主に腎でグリシンより生成されるが、今回の著者の成績からこのセリン-グリシン相互変換系にインスリンが関与していることが示唆される。すなわち、インスリン不足状態では、グリシンからセリンへの合成反応が促進し、インスリン治療によりその反応が逆転する可能性も考えられた。

次に24時間尿中AA排泄量が蛋白尿の有無により影響を受けるか否かを検討したが、影響は認められず、軽度の糖尿病性腎症を有する症例でも尿中アミノ酸の測定からアミノ酸代謝を推定することが可能と思われた。

Longitudinal studyでは、血糖コントロール不良時のBCAAとセリンの尿中排泄量は健常群にくらべ有意に増加していたが、グリシンは有意差はないものの逆に減少傾向を示した。その後、インスリンにて血糖を厳格にコントロールするとBCAAとセリンは著明に減少しほぼ健常群に近似した値となったがグリシンは逆に増加傾向を示した。この結果はcross-sectional studyより得た結果からの推論を支持する。これより、尿中BCAAとともに尿中セリンおよびグリシンの測定も末梢組織でのインスリン作用を知るための良い指標になると思われた。

結 論

1) 血漿中の各AAレベルの日内変動の平均とその24時間尿中の排泄量は、多くのAAで正の相関関係を示し、24時間尿中AAの単一分析の意義が認められた。

2) 糖尿病時には尿中AAの排泄増加が認められた。とくにBCAA、セリン、アラニンで増加が有意であり末梢組織におけるインスリン作用不足

を示していると思われた。

3) 糖尿病時の尿中AA排泄量は、軽度の糖尿病性腎症の存在にあまり影響をうけず蛋白尿(+)群でも尿中AAの測定が有意義と考えられた。

4) 血糖コントロール不良時のBCAA、セリンの有意の増加は、インスリンによる血糖の厳格なコントロールによりこれらは迅速に正常範囲に近づいた。すなわち、24時間尿中のBCAAやセリンの測定は末梢組織でのインスリン作用を知る指標となりうる。

5) インスリン投与後セリンとグリシンの排泄量が逆転することから、両者の相互変換系にインスリンが関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Felig P, et al: Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 19: 727, 1970.
- 2) Borsnan JT, et al: Inter-organ metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rats. *Am J Physiol* 244: E151, 1983.
- 3) Loris B, et al: Plasma and skeletal muscle free amino acids in type I, insulin-treated diabetic subjects. *Diabetes* 34: 812, 1985.
- 4) Armstrong MD, et al: A study of plasma free amino acids levels III, Variations during growth and aging. *Metabolism* 22: 571, 1973.
- 5) Armstrong MD, et al: A study of plasma free amino acid levels II, Normal values for children and adults. *Metabolism* 22: 561, 1973.
- 6) Judith P, et al: Factors affecting plasma amino acid concentrations in control subjects. *Metabolism* 28: 313, 1979.
- 7) Feign RD, et al: Rhythmicity of plasma amino acids and relation to dietary intake. *Am J Clin Nutr* 24: 329, 1971.
- 8) Huszer G, et al: Urinary 3-methylhistidine excretion in juvenile-onset diabetics: Evidence

of increased protein catabolism in the absence of ketoacidosis. *Metabolism* 31: 188, 1982.

- 9) Marchesini G, et al: Muscle protein break down in uncontrolled diabetes as assessed by urinary 3-methylhistidine excretion. *Diabetologia* 23: 456, 1982.
- 10) 後藤由夫, 他: 真血糖値に対するM値に関する研究. *糖尿病* 15: 319, 1972.
- 11) 加藤尚澄, 他: オルトフタルアルデヒドを用いた蛍光全自動高速アミノ酸分析器の開発. *日本臨床検査自動化学会雑誌* 8: 340, 1983.
- 12) Husdan H, et al: Estimation of creatinine by the Jaffe reaction: A comparison of three methods. *Clin Chem* 14: 22, 1968.
- 13) 木村栄一, 他: 糖尿病のアミノ酸代謝. *糖尿病* 12: 232, 1969.
- 14) Elwyn PH, et al: Effect of fasting on muscle concentrations of branched chain amino acids. "Metabolism and clinical implications of branched chain amino and ketoacids". Waiser M, Elsevier North-Holland, New York, 1981, p547.
- 15) 鈴木晟時, 岡 博: アミノ酸代謝異常. 診断と治療 8: 159, 1985.
- 16) Vanni P, et al: Branched chain amino acids and alanine as indices of metabolic control in type I (insulin-dependent) and type II (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 22: 217, 1982.
- 17) Berger M, et al: Blood amino acid levels in patients with insulin excess (functioning insulinoma) and insulin deficiency diabetic ketosis. *Metabolism* 27: 793, 1978.
- 18) Karlson P, et al: Pathobiochemistry. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978, p300.
- 19) 高柳正樹, 他: インスリン依存性糖尿病における血中アミノ酸の検討. *糖尿病* 26: 1081, 1983.
- 20) Lowry M, et al: Renal metabolism of amino acids in vivo: Studies on serine and glycine fluxes. *Am J Physiol* 252: F304, 1987.