

慢性維持透析患者における血漿中遊離 γ -カルボキシグルタミン酸に関する研究

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

守屋 昭

STUDIES ON FREE- γ -CARBOXYGLUTAMIC ACID IN PLASMA FROM CHRONIC MAINTENANCE HEMODIALYSIS PATIENTS

AKIRA MORIYA

Department of Urology, Nara Medical University

Received July 28, 1989

Summary: The clinicopathological future of renal osteodystrophy (ROD) associated with patients of long-term hemodialysis is well known to be very complicated. In the diagnosis of ROD and the monitoring of its clinical course, several biochemical parameters have been appreciated as the most useful indicators. Among these parameters, the current clinical investigation proved that bone gla protein (BGP) which contained three γ -glutamic acid residues per one molecule, was one of the most sensitive parameters of ROD. Based upon this background, we assayed free- γ -carboxyglutamic acid (free- γ Gla) in plasma in 36 patients with long-term hemodialysis and compared these values with other parameters of ROD. In conclusion plasma free- γ Gla levels of hemodialysis patients indicated significantly higher than those of controls ($P < 0.0001$). And evident correlations were found between plasma free- γ Gla and serum PTH-C ($r = 0.46$, $P < 0.01$), serum PTH-M ($r = 0.64$, $P < 0.01$), serum intact PTH ($r = 0.40$, $P < 0.05$), serum ALP ($r = 0.44$, $P < 0.01$), serum ALP III ($r = 0.71$, $P < 0.01$), serum TRACP ($r = 0.40$, $P < 0.05$), serum Hydroxyproline ($r = 0.36$, $P < 0.05$) and serum BGP ($r = 0.50$, $P < 0.01$). On the other hand plasma free- γ Gla and each parameter of digital image processing method (MCI and Σ GS/D) have not shown evident correlation. These results suggest that plasma free- γ Gla is one of the most important parameters of ROD in chronic maintenance hemodialysis patients.

Index Terms

chronic maintenance hemodialysis, plasma free- γ -carboxyglutamic acid, renal osteodystrophy

緒 言

γ カルボキシグルタミン酸 (以下 γ -Gla と略す) は、1974年 Stenflo ら¹⁾ により発見されたウシプロトロンビン中のカルシウム結合性の酸性アミノ酸であり、ペプチド中のグルタミン残基 γ 位の炭素基が、ビタミン K

依存性カルボキシラーゼによってカルボキシル化されて生成される¹⁾。生体内では、プロトロンビン (以下 Proth と略す) をはじめとする血液凝固因子 (第X, IX, VII因子) や血漿蛋白質であるプロテイン C²⁾, S³⁾, Z⁴⁾ や、動脈硬化に伴って蓄積するアテロカルシン⁵⁾、骨や異所性石灰化部位に見い出されるオステオカルシン (bone γ -

Gla-containing protein: BGP)⁸⁾等の蛋白質中に確認されている。 γ -Gla は、生体内で脱炭酸化されてグルタミン残基になることはなく、その代謝はほとんどが腎で行われ、遊離 γ -Gla (以下 free- γ Gla と略す) となつて、尿中へ排出されることが確認されており⁷⁾、尿中では free- γ Gla として同定されている⁸⁾。

今日、維持透析患者における腎性骨異常症 (以下 ROD と略す) の病態の追跡には、生化学的パラメーターの monitoring と骨 X 線学的手法による解析が一般的となっている。近年、X 線学的な解析方法の進歩はめざましく、Microdensitometry (以下 MD と略す) 法や Dual-photon absorptiometry 法⁹⁾、Quantitative computed tomography 法¹⁰⁾ があり、本邦では井上らにより報告された MD 法が簡便な方法として繁用されている。1988 年日本骨代謝学会においては、MD 法の精度を画像解析器を用いて高めた Digital image processing (以下 DIP と略す) 法¹¹⁾ が報告され、今後広く臨床応用されると考えられる。生化学的指標には、アルカリフォスファターゼ (以下 ALP と略す)、副甲状腺ホルモン C 末端 (以下 PTH-C と略す) をはじめとして近年では、血漿中のヒドロキシプロリン (以下 Hypro と略す)¹²⁾、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (以下 TRACP と略す)¹³⁾、アルカリフォスターゼ III (以下 ALP III と略す)¹⁴⁾ など種々のものが検討されており、 γ Gla 含有蛋白である BGP も、骨形成、骨石灰化および骨吸収も含めた骨代謝回転の良好な指標として重要視されている¹⁵⁾。しかし、その測定は Radioimmunoassay (以下 RIA と略す) 法によっており、また現在入手可能な抗血清の認識領域が活性を有する領域とは異なるなどの測定上の問題点を抱えている。一方 γ Gla の測定は、アミノ酸分析装置を利用した方法や¹⁶⁾¹⁷⁾、陰イオン交換樹脂と蛍光検出法を用いて尿中 free- γ Gla を測定する方法¹⁸⁾ が、報告されているが、時間を要し、感度も不充分とのことで、Kuwada ら¹⁹⁾ は高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す) を用いた比較的簡便な尿中の free- γ Gla 測定法を報告したが、これまで血漿中での測定報告はなく、近年維持透析患者での BGP の報告が多いなかで、free- γ Gla に関する報告はみられない。本研究では、血漿中の free- γ Gla を健康成人と維持透析患者について、Kuwada らの方法に準じて HPLC 法にて測定し、ROD の各種生化学的指標および DIP 法を用いた骨塩量評価値と比較し、血漿中 free- γ Gla が、ROD の病態上どのような意義をもつものかを検討した。

対 象

対象症例は、奈良県立医科大学およびその関連施設における慢性維持透析患者 36 例 (男性 23 例、女性 13 例)、29 歳~78 歳、平均年齢 49.3 ± 12.9 歳、透析歴 31 ヶ月~162 ヶ月、平均透析歴 91.8 ± 35.3 ヶ月と、血漿 free- γ Gla の測定の対照としてボランティアによる健康成人 15 例 (男性 9 例、女性 6 例)、23 歳~45 歳、平均年齢 31.3 ± 11.4 歳) である。対象症例の原疾患は、慢性糸球体腎炎 17 例、糖尿病性腎症 11 例、嚢胞腎 8 例である。透析方法は、全例ホローファイバー型ダイライザーを使用し、透析液カルシウム (以下 Ca) 濃度は、 7.4 mg/dl 、アルミニウム (以下 Al) 濃度は $10 \mu\text{g/l}$ 以下であり、逆浸透処理水を用いた重炭酸透析にて、1 回 3-5 時間で週 2-3 回施行した。

方 法

1) 血漿および透析液過剰中の free- γ Gla 値の測定 血漿 free- γ Gla 値

ヘパリン採血した血漿をセントリーザルト (ザルトリウス社製、USA) に入れ除蛋白し、限外濾過を行い、HPLC (東洋ソーダ社製、東京) を用いて測定した。HPLC 法は、Kuwada ら¹⁹⁾ の方法に準じて、試料 $50 \mu\text{l}$ をマイクロビペットにて HPLC へ注入した。アニオン交換体カラム Nucleosil-5SB ($5 \mu\text{m}$ 粒子、 $46 \times 250 \text{ nm}$ 、センシウ社製、東京) を 47°C に保持し、溶出緩衝液は pH 4.25 の 0.05 M クエン酸緩衝液 (和光純薬、東京) を用い、緩衝液の流速は、 30 ml/h とした。カラムよりの流出液は 0

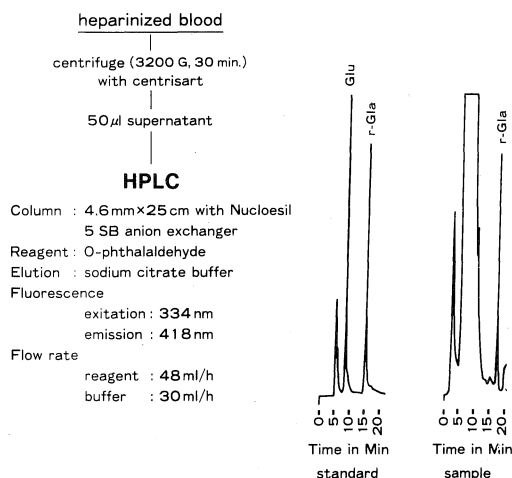


Fig. 1. Measurement of free γ -carboxyglutamic acid by HPLC.

-フタルアルデヒド (OPA) 試薬 (和光純薬, 東京) を用い、反応コイルに導入し、その流速は 48 ml/h で、誘導体形成のための滞留時間は 10 秒間とした。誘導体の蛍光は励起波長 334 nm, 蛍光波長 418 nm で検出した。各試料の free- γ Gla 濃度の計算はピークエリアより標準液 (γ -Gla 標準品, Calbiochem 社製, USA) から導出した (Fig. 1)。

透析液過剰 free- γ Gla 値

透析液過剰 10 ml を 3000G 10 分間遠心し、得られた上清を試料として血漿と同様に測定した。

2) 血清 PTH-C 値の測定

抗ヒト副甲状腺ホルモン (46-84) モルモット血清 (栄研社製, 東京) を用いた PTH-C 栄研社製キットによる RIA 法にて SRL 社にて測定した。

3) 血清 PTH-M 値の測定

Dainabot 社製 PTH-M キットによる RIA 法にて SRL 社にて測定した。

4) 血清 intact PTH の測定

アングロ社製 intact PTH キットにて (39-84) PTH 抗体と 125 I (1-34) PTH 抗体を用いた immunoradiometric assay によって日本メジフィクス社にて測定した。

5) 血清 ALP 値の測定

ALP 活性は、Kind-King 法に準じ、和光純薬キットを用いて測定した。

6) 血清 ALP III 値の測定

Rosalki ら²⁰⁾ の方法に準じて得られた沈澱物試料を、Kind-King 法に準じて 500 nm にて吸光度測定のうち、検量線より活性値を測定した。

7) 血清 TRACP 値の測定

酵素安定剤として 20% 酢酸を加え、基剤をフェノール、発色はフェリシアン化カリウムを使用し、フェニリン酸法で測定した。

8) 血清 Hypro 値の測定

東洋醸造社に依頼し、アミノ酸分析法にて測定した。

9) 血清 BGP 値の測定

抗ウシ BGP ウサギ血清 (東洋醸造社製, 東京) を用いた東洋醸造社製キットを使用し、RIA 法にて測定した。

10) 血漿中 Proth 値の測定

クエン酸塩加血漿に発色性ペプチド基質を加えて反応させる合成基質法にて測定した。

11) Protein induced by vitamine K absence (PIVKA) 値の測定

ラテックス凝集法にて測定した。

12) DIP 法

中外製薬社に依頼して測定した。アルミスケールとともに被検者手部を X 線撮影し、その X 線フィルムを透過照明にて計測用 TV カメラを用いて撮影して、取り込んだ画像を高度分解能画像処理器により、X 線フィルムの画像輝度分布を計測し、アルミスケールとの比較により第二中手骨の骨塩量を測定した。骨塩量の指標 Metacarpal index (骨幅に対する骨皮質の割合, 以下 MCI と略す) と平均骨塩濃度 (以下 Σ GS/D と略す) は、従来の MD 法²¹⁾ にて算出した。また、各症例の骨変化を、Jensen ら²²⁾ の subperiosteal resorption (以下 SPR と略す) の grading に基いて新たに 4 種類 (grade 0 を 0 群, grade 1 を I 群, grade 2 を II 群, grade 3 以上を III 群) の段階に分類して、その重症度を表現した。

血液尿素窒素 (以下 BUN と略す) 値, クレアチニン (以下 Cr と略す) 値, ヘマトクリット (以下 Ht と略す) 値は従来の方法にて測定した。

統計学的処理は、連続数値については、t 検定を用い、非連続値については X^2 検定を用いた。

結 果

対象症例の性別症例数, 平均年齢, 平均透析歴, 原疾患は Table 1 に示すごとくである。対象症例の平均 Ht

Table 1. Patient's profile

Sex	Male 23	Female 13
Mean age (years)	49.3 ± 12.9	
Mean duration of HD	91.8 ± 35.3	
Original disease	CGN 17	DMN 11 PCK 8
	CGN: Chronic glomerulonephritis	
	DMN: Diabetes mellitus nephropathy	
	PCK: Polycystic kidney	

Table 2. Basic clinical data of HD patients

	mean ± SD
Hematocrit (%)	23.8 ± 3.55
BUN (mg/dl)	89.7 ± 10.4
Serum creatinine (mg/dl)	13.4 ± 2.47

BUN: blood urea nitrogen

Table 3. Patient's clinical data related to hemocoagulation

Prothrombin (IU)	14.6 ± 1.72
PIVKA	<1.0

PIVKA: protein induced by vitamin K absence

値, BUN 値および Cr 値は Table 2 に示すごとくである。対象症例の Proth 値および PIVKA 値は Table 3 に示したごとくいずれも正常範囲内であった。対象症例における PTH-C, PTH-M, intact PTH, ALP, ALP III, TRACP, Hypro, BGP, free- γ Gla の平均値は Table 4 に示すごとくで, Table 5 では, 対象症例における free- γ Gla と Cr の血漿中および透析液過剰中の各平均値を表示した。free- γ Gla の回収率は 78% で Cr の 81% とほぼ同等の値を示した。

健康成人と慢性維持透析患者における血漿中 free- γ Gla 値について

対象群の free- γ Gla 値は 12.88 ± 3.62 nmol/ml で対照群では 1.29 ± 0.37 であり, 対象群の慢性維持透析患者において極めて高い値を示した ($p < 0.0001$, Fig. 2)。

各骨変化群における血漿中 free- γ Gla 値の変化について

骨変化群 0 群では 10.16 ± 2.39 nmol/ml, I 群では 11.25 ± 2.2 nmol/ml であり, II 群においては 14.09 ± 4.42 nmol/ml および III 群では 13.45 ± 3.56 nmol/ml と 0 群から, III 群へ重症度が増すにつれ, free- γ Gla 値も上昇する傾向がみられ, 0 群と III 群には明らかな差が認められた ($P < 0.01$, Fig. 3)。

対象群での BGP 値と透析歴の関係について

透析月数が多い症例では BGP 値も高く, 透析歴の短い症例での BGP 値は低値を示す傾向がみられた (Fig. 4)。

Table 4. Patient's clinical data related to bone metabolism

PTH-C (ng/ml)	12.1 ± 13.9
PTH-M (ng/ml)	45.9 ± 46.1
Intact PTH (pg/ml)	270 ± 374
ALP (KAU)	369 ± 384
ALP III (KAU)	16.3 ± 16.8
TRACP (KAU)	2.93 ± 1.36
Hypro (μ g/ml)	4.38 ± 2.86
BGP (ng/ml)	64.5 ± 46.9
Free- γ Gla (nmol/ml)	12.8 ± 3.62

Table 5. Clearance of free- γ Gla and creatinine by hemodialysis

	Free- γ Gla (nmol/ml)	Creatinine (mg/dl)
Plasma	12.88 ± 3.62	13.4 ± 2.47
Dialysate	10.13 ± 4.05	10.85 ± 2.01
Clearance rate	78%	81%

対象群での free- γ Gla 値と透析歴の関係について
free- γ Gla 値は透析歴に関係なく高値から低値まで分布しており, 相関傾向は認められなかった (Fig. 5)。

対象群における血漿中 free- γ Gla 値と血清 PTH-C 値との関係について

対象群の血清 PTH-C の高値にもなって free- γ Gla

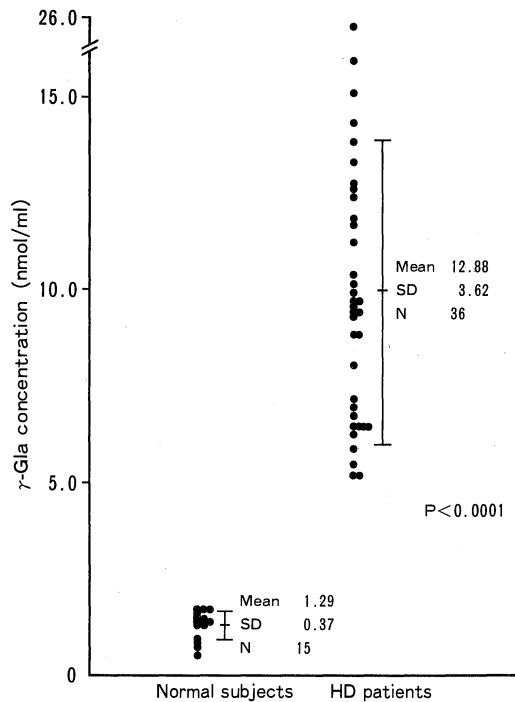


Fig. 2. Chromatograms of plasma free γ -carboxyglutamic acid in normal subjects and hemodialysis patients by HPLC.

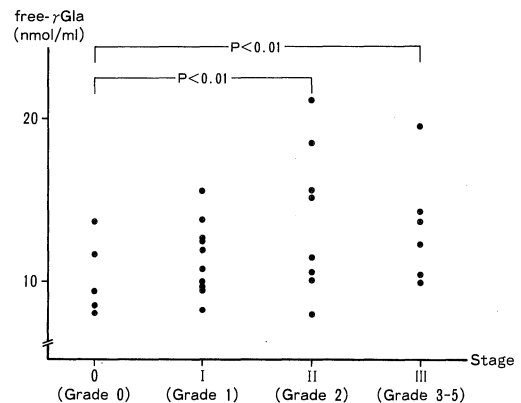


Fig. 3. Free- γ Gla value in each stage based on Jensen's grading of SPR.

の高値を示す症例が多く、相関係数 $r=0.46$ ($P<0.01$) で正の相関が認められた (Fig. 6).

対象群における血漿中 free- γ Gla 値と血清 PTH-M 値の関係について

また血清 PTH-M 値についても血清 PTH-C と同様に PTH-M 値が高値を示す症例では free- γ Gla 値が高

くその相関係数は $r=0.64$ ($P<0.01$) と正の相関が認められた (Fig. 7).

血漿中 free- γ Gla 値と血清 intact PTH 値の関係について

同様に血清 intact PTH 値が高値を示す症例において

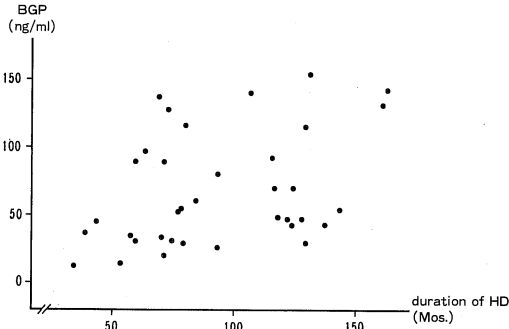


Fig. 4. Correlation between BGP and duration of hemodialysis in patients with chronic hemodialysis.

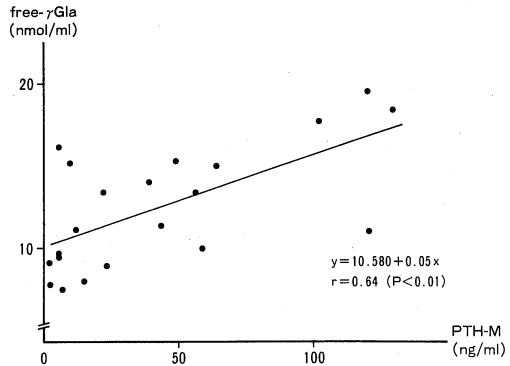


Fig. 7. Correlation between free- γ Gla and PTH-M in patients with chronic hemodialysis.

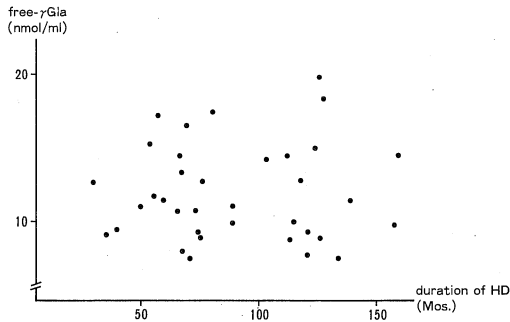


Fig. 5. Correlation between free- γ Gla and duration of hemodialysis in patients with chronic hemodialysis.

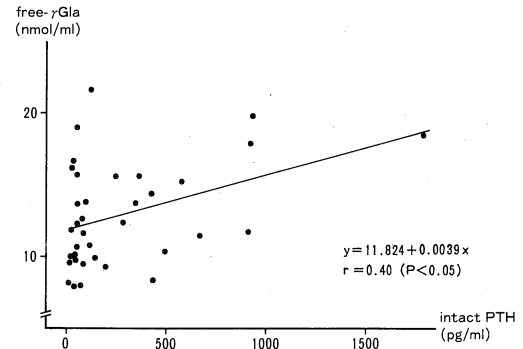


Fig. 8. Correlation between free- γ Gla and intact PTH in patients with chronic hemodialysis.

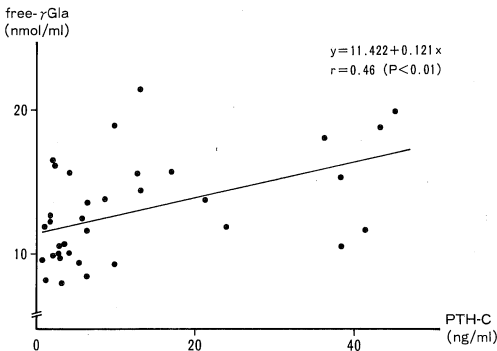


Fig. 6. Correlation between free- γ Gla and PTH-C in patients with chronic hemodialysis.

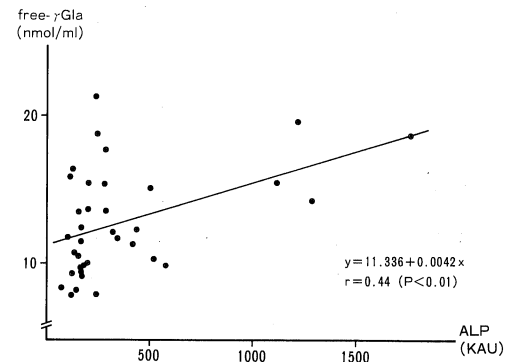


Fig. 9. Correlation between free- γ Gla and ALP in patients with chronic hemodialysis.

free- γ Gla 値が高く、その相関係数は $r=0.40$ ($P<0.05$) にて正の相関が認められた (Fig. 8).

血漿中 free- γ Gla 値と血清 ALP 値の関係について血清 ALP 値が高値を示す症例において、血漿 free-

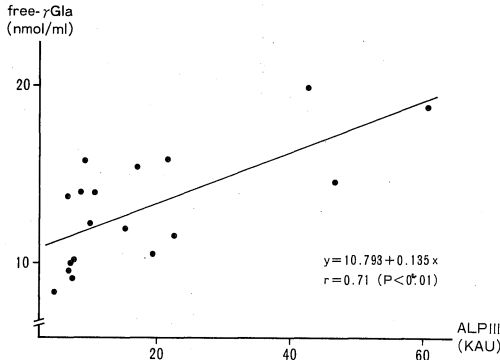


Fig. 10. Correlation between free- γ Gla and ALP III in patients with chronic hemodialysis.

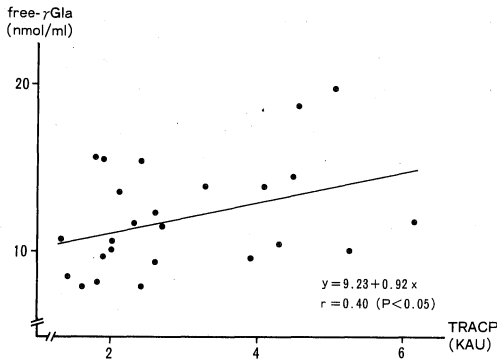


Fig. 11. Correlation between free- γ Gla and TRACP in patients with chronic hemodialysis.

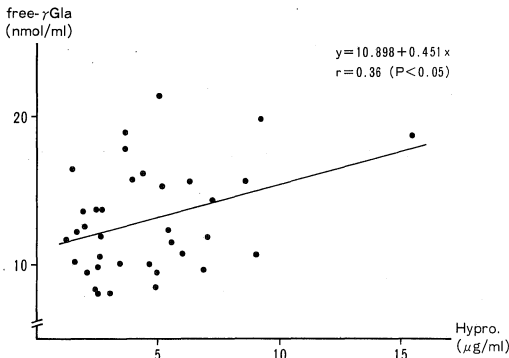


Fig. 12. Correlation between free- γ Gla and hydroxyproline in patients with chronic hemodialysis.

γ Gla 値も高値を示すものが多く、その相関係数は $r=0.44$ ($P<0.01$) で正の相関が認められた (Fig. 9).

血漿中 free- γ Gla 値と血清 ALP III 値の関係について血清 ALP III が高い症例では血漿 free- γ Gla 値が高く、その相関係数は $r=0.71$ ($P<0.01$) で正の相関が認められた (Fig. 10).

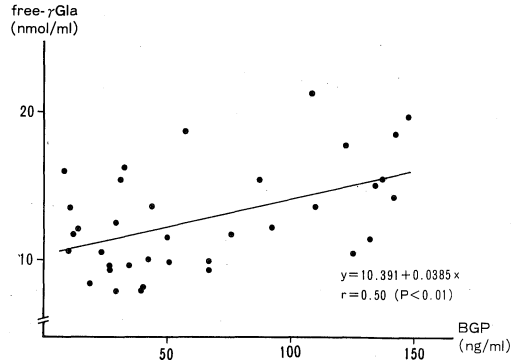


Fig. 13. Correlation between free- γ Gla and BGP in patients with chronic hemodialysis.

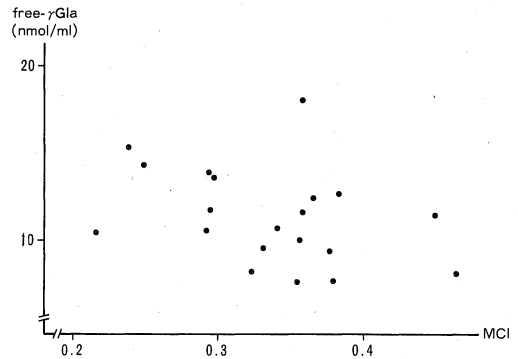


Fig. 14. Correlation between free- γ Gla and MCI in patients with chronic hemodialysis.

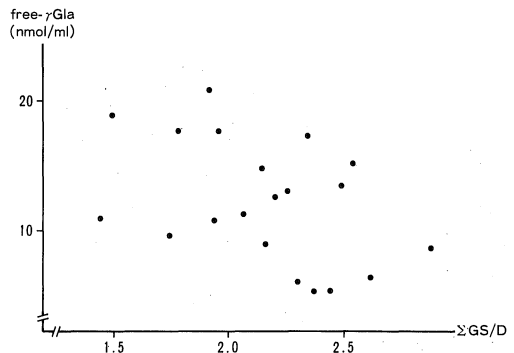


Fig. 15. Correlation between free- γ Gla and Σ GS/D in patients with chronic hemodialysis.

血漿中 free- γ Gla 値と血清 TRACP 値の関係について

血清 TRACP 値が高い症例において血漿 free- γ Gla 値が高い傾向がみられ、 $r=0.40$ ($P<0.05$) と正の相関が認められた (Fig. 11).

血漿中 free- γ Gla 値と血清 Hypro 値の関係について
血清 Hypro 値についても高値を示す症例において血漿 free- γ Gla 値が高いものが多く、その相関係数は $r=0.36$ ($P<0.05$) と正の相関が認められた (Fig. 12).

血漿中 free- γ Gla 値と血清 BGP 値の関係について
血清 BGP 値が高値を示す症例において、血漿 free- γ Gla 値も高値を示し、 $r=0.50$ ($P<0.01$) と正の相関が認められた (Fig. 13).

血漿中 free- γ Gla 値と MCI 値の関係について
MCI 値が高い症例において血漿 free- γ Gla 値が低値を示す症例が多く、負の相関傾向が認められた (Fig. 14).

血漿中 free- γ Gla 値と $\Sigma GS/D$ 値との関係について
同様に $\Sigma GS/D$ 値が高値の症例では血漿 free- γ Gla 値が低値を示す症例が多く、負の相関傾向が認められた (Fig. 15).

考 察

ROD の診断は、骨生検が最も確実な方法であるが、浸襲的であるため、現在では血液生化学検査、骨 X 線学的検査、骨シンチグラム等の種々の検査が行われている。

MD 法の精度を向上した DIP 法と free- γ Gla は明確な関係をしめさなかったが、low turnover bone 等も考慮すれば、X 線学的骨変化と骨生化学的指標とは一概に相関するとはいえないと考えられる。

血液生化学的検査は、簡便に ROD の病態の全体像を把握できるため ALP、PTH をはじめ、BGP などが臨床的にも測定されており、ことに BGP は、近年 γ Gla 含有蛋白として骨中に見いだされ²³⁾、現在 ALP よりも良好な骨形成の指標としての臨床的意義を有する²⁴⁾ ことが広く認識されている^{8,25)}。本研究においても、BGP は他の ROD の指標とも相関を示し、その有用性が確認された。BGP は、49 個のアミノ酸よりなる分子量 5879 の骨性蛋白質である²⁶⁾。また、骨蛋白質の 95% はコラーゲン性であるが、残りの約 5% は非コラーゲン性であり²⁷⁾、そのうちの約 10-20% が BGP といわれる。BGP 1 分子中には、3 個の Gla 残基の存在が確認されている²⁸⁾。BGP の生理的意義はなお不明確であるが、骨芽細胞より形成され²⁹⁾、骨基質のハイドロキシアパタイトと結合して存在し²⁸⁾、骨石灰化や、骨よりの急激な Ca^{2+} 喪失予防等の働きが

推測されており³⁰⁾、正常な骨組織の維持に必須の蛋白であるとされている。

しかしながら BGP は、腎で代謝排泄される腎依存性排泄型の蛋白であり⁷⁾、クレアチンクリアランス 30 ml/min 以下では急激な血中濃度の上昇がみられ³¹⁾、腎不全状態では PTH-C と同様に蓄積する³²⁾ ことが確認されている。また血中 BGP には、heterogeneity が認められており³³⁾、BGP は、ROD の病態を必ずしも正確に反映していない可能性がある。

Shah ら⁹⁾ によれば、血中 BGP も腎で代謝されて尿中に free- γ Gla として排泄されるといわれ、本研究においても、free- γ Gla と BGP は高い正の相関を示し、維持透析患者で上昇した血漿中 free- γ Gla は、BGP に由来するものと考えられる。free- γ Gla が維持透析患者血漿中において上昇する機序として、以下の 4 点が考えられる。すなわち、1) 既に形成された骨基質から骨の吸収課程で血漿中に free- γ Gla として出てくる可能性、2) 既に形成された骨基質から骨吸収課程で血漿中に遊離した BGP が腎、肝臓、骨などで分解されて free- γ Gla が放出される可能性、3) 骨芽細胞より直接分泌または漏出する可能性、4) 骨芽細胞自体の cell life cycle の中で骨芽細胞消滅にもなって遊離する可能性である。Hypro は、骨のコラーゲンに高濃度に含まれるアミノ酸で、種々の骨疾患で上昇し³⁵⁾、骨コラーゲンの turnover の指標としても有用であり³⁶⁾、一般に骨吸収の程度とよく相関する³⁷⁾ ことが報告されている。本研究で free- γ Gla が、Hypro と相関を示したことは、上記の 1) または 2) の機序が、維持透析患者血漿中 free- γ Gla の上昇の主な機序であることを示唆している。さらに free- γ Gla が、破骨細胞を直接の標的細胞とする PTH の各 fragment (PTH-C、PTH-M) および生物学的活性を有する intact PTH³⁸⁾ や、破骨細胞のマーカー酵素である TRACP とも相関を示したことは、この考えを支持するものである。一方、free- γ Gla は、骨芽細胞活性の指標である ALP や³⁹⁾ ALP III とも相関を示し、これらは上記機序の骨芽細胞を介した 3)、4) の機序の関与を示唆している。

近年、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨新生を繰り返すリモデリング⁴⁰⁾ 過程においては、mesenchymal stromal cell の分化により生じる⁴¹⁾ 骨芽細胞が、リンホカインなどの液性因子を介して⁴²⁾ 血液幹細胞に由来する⁴³⁾ 破骨細胞を誘導させる一連の相互作用が認識されている⁴⁴⁾。従って ROD においても、骨吸収亢進状態で骨芽細胞活性の上昇がみられることは理論的にも矛盾しないと考えられる。しかしながら、free- γ Gla は主に骨吸収亢進を背景として上昇すると考えるのが妥当

と思われ、維持透析患者の血漿 free- γ Gla の上昇は、骨吸収状態を示す場合が多いと考えられる。

骨基質の非コラーゲン蛋白として、近年 BGP 以外に Matrix Gla Protein (以下 MGP と略す) が報告されている⁴⁵⁾。MGP は分子量 9900 で、1 分子中に 5 個の Gla 残基を含み、新しい Gla 含有蛋白として注目されている。現在 RIA 法による測定が可能であるが⁴⁶⁾、BGP の存在しない軟骨にも存在し⁴⁶⁾、BGP を産生する骨芽細胞より未熟な骨芽細胞から BGP より早期に分泌される⁴⁷⁾などのユニーク性をもっている。free- γ Gla が、この MGP の動態の情報物質である可能性は極めて興味深い。一般的にはより未熟な骨芽細胞ほど強い ALP 活性を有すると考えられるので、今回の研究での free- γ Gla と ALP との相関は一部 MGP 産生能との関係が関与している可能性が考えられる。血漿中 free- γ Gla の origin が BGP、MGP のいずれであるにしても、維持透析患者における指標として、腎排泄能の廃絶による非特異的蓄積の程度の確認は、重要な問題である。BGP の蓄積性は既に確認されているが、free- γ Gla に関しては Table 5 に示したごとく通常の血液透析では Cr と同等の透析性が確認された。従って BGP の様な腎依存排泄性物質ではないことは明らかであり、free- γ Gla が BGP に比べてより real time に骨変化の病態を反映し得ることが示唆された。本研究でも、BGP は透析年数と共に上昇傾向を示したのに対し、血漿中 free- γ Gla は上昇傾向を示さなかった。

また透析導入時既に、ある程度の ROD の合併がみられることが指摘されており⁴⁸⁾、慢性腎不全における骨変化の中で保存期での骨変化が重要な臨床的課題となっているが、free- γ Gla が、保存期腎不全における ROD の指標として BGP より優れた index substance となりうると思われる。

生体内で Gla 残基は、血液凝固因子中にも見いだされており、これらに由来する free- γ Gla は ROD の指標として、血漿中 free- γ Gla 測定上最も大きな問題である。凝固系因子のうちプロトロンビンは最も血中濃度が高く⁴⁹⁾、1 分子中の Gla 残基数も 10 個と多い⁵⁰⁾。またこれらの蛋白はいずれも半減期が短いので free- γ Gla の血漿中濃度におよぼす影響は大きい。しかしながら、文献的にはワーファリン投与下で凝固系蛋白の合成を止めた状態での検討から、血漿中 free- γ Gla の約 75 % が石灰化組織由来であると報告されている³⁰⁾。BGP の半減期も極めて短く、しかも骨組織中の BGP は、乾燥骨 1g 当り 2-3 mg 存在し、体重 70 kg の男性で総量約 15 g になるといわれ⁹⁾、MGP 等も含めた骨全体の γ Gla 含有量は、血液凝固系の free- γ Gla 含有量に比べ圧倒的に多いと考えら

れる。これらの点から free- γ Gla の評価は慎重に行わねばならないが、今回の研究で各骨生化学的パラメーターと相関を認めたことは、今後 BGP とともに ROD の診断に有益な情報源になりうると思われ、新たな研究課題としてより広く臨床的解析をすすめる価値があるものと考えられる。

結 論

健康成人 15 例と慢性維持透析患者 36 例について、血漿中の free- γ Gla を HPLC 法にて測定した。慢性維持透析患者については ROD の生化学的指標を測定し、X 線学的骨変化は Jensen らの SPR の grade を基に新たに staging し、また骨塩量を DIP 法によって測定した。free- γ Gla とこれらと比較し以下の結果を得た。

- 1) 血漿中 free- γ Gla は慢性維持透析患者で、健康成人に比べ、著増を示した。
- 2) 慢性透析患者では骨変化が進むと血漿中 free- γ Gla も増加した。
- 3) free- γ Gla の測定には血液凝固系の異常の有無を確認する必要があると考えられた。
- 4) free- γ Gla は DIP 法の各指標と負の相関傾向を認めたが、骨軟化症を含めた骨塩量の指標にはなりにくいと考えられた。
- 5) 慢性維持透析患者で、free- γ Gla は、PTH-C、PTH-M、intactPTH、ALP、ALP III、TRACP、Hypro、BGP と正の相関を認め、骨吸収を中心とした ROD の指標として有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授、ならびに御校閲を賜りました第 1 内科学教室石川兵衛教授、病態検査学教室中野博教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、直接御指導頂きました本宮善恢講師に深謝するとともに、技術的御指導頂きました東京都老人医療センター研究検査課白木正孝博士ならびに教室の諸兄に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、1988 年 10 月 12 日、第 31 回日本腎臓学会総会において報告した。

文 献

- 1) Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. and Roepstorff, P.: Vitamin K dependent modification of glutamic acid residues in prothrombin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 2730-2733, 1974.
- 2) Stenflo, J.: A new vitamin K-dependent protein: Purification from bovine plasma and pre-

- liminary characterization. *J. Biol. Chem.* **251**: 355-363, 1976.
- 3) **Discipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G. and Davie, E.W.**: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **16**: 698-706, 1977.
 - 4) **Prowse, C. V. and Esnouf, M. P.**: The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. *Biochem. Soc. Trans.* **5**: 255-256, 1977.
 - 5) **Levy, R. J., Lian, J. B. and Gallop, P.**: Atherocalcin, a γ -carboxyglutamic acid containing protein from atherosclerotic plaque. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 41-49, 1979.
 - 6) **Hauschka, P. V., Lian, J. B. and Gallop, P.**: Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 3925-3929, 1975.
 - 7) **Shah, D. V., Tews, J. K., Harper, A. E. and Suttie, J. W.**: Metabolism and transport of γ -carboxyglutamic acid. *Biochem. Biophys. Acta* **539**: 209-217, 1978.
 - 8) **Levy, R. J. and Lian, J. B.**: γ -carboxyglutamate excretion and warfarin therapy. *Pharmacol. Ther.* **5**: 562-570, 1979.
 - 9) **Wahner, H. W., Dunn, W. L., and Riggs, B. L.**: Assessment of bone mineral. part 2. *J. Nucl. Med.* **25**: 1241-1253, 1984.
 - 10) 大塚信昭, 福永仁夫, 曾根照喜, 永井清久, 村中 明, 柳本真一, 友光達志, 森田陸司, 山本逸雄, 鳥塚莞爾: Renel osteodystrophy 症例における第3腰椎海綿骨の骨塩量の測定: 脊椎骨 phantom を併用した CTscan による方法: 腎と骨代謝—第4回腎と骨代謝研究会記録. 協和企画通信, 東京, p 37-42, 1986.
 - 11) 林 康史, 山本吉蔵, 石橋利信, 高橋吉也, 西井易穂: 手部 X 線写真の画像解析による新しい骨量測定法 (DIP 法: Digital Image Processing Method) の開発. 日骨代謝会誌. **6**: 214, 1988.
 - 12) 渡辺繁子, 浅見 直: 小児ネフローゼ症候群および慢性腎炎における骨コラーゲン代謝について—free-Hydroxyproline の動態. 日見誌. **87**: 252-262, 1983.
 - 13) **Minkin, C.**: Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tis. Int.* **34**: 285-290, 1982.
 - 14) 金子佳照: 慢性血液透析患者における腎性骨異常栄養症に対するオステオカルシンおよび骨性 AI-P アイソザイムの検討. 奈医誌. **38**: 1085-1098, 1987.
 - 15) **Malluche, H. H., Faugere, M. C., Fanyi, P. and Price, P. A.**: Plasma levels of Gla protein reflect bone formation in patients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int.* **26**: 869-874, 1984.
 - 16) **Hauschka, P. V.**: Quantitative determination of γ -carboxyglutamic acid in proteins. *Anal. Biochem.* **80**: 212-213, 1977.
 - 17) **Madar D. A., Willis, R. A., Koehler, K. A. and Hiskey, R. G.**: Analysis of γ -carboxyglutamic acid via amino acid analysis. *Anal. Biochem.* **92**: 466-472, 1979.
 - 18) **Gundberg, C. M., Lian, J. B. and Gallop, P. M.**: γ -Carboxyglutamate analysis by selective anion exchange elution and fluorescent detection. *Anal. Biochem.* **98**: 219-225, 1979.
 - 19) **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.
 - 20) **Rosalki, S. B. and Foo, A. Y.**: Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin. Chem.* **30**: 1182-1186, 1984.
 - 21) 井上哲朗, 串田一博, 山下源太郎: 手部 X 線像による方法. 骨代謝 **14**: 91-104, 1981.
 - 22) **Jensen, P. S. and Kliger, A. S.**: Early radiographic manifestations of secondary hyperparathyroidism associated with chronic renal disease. *Radiology* **125**: 645-653, 1977.
 - 23) 森内幸子, 堤ちはる, 細谷憲政: オステオカルシンとその機能. ビタミン **59**: 160-166, 1985.
 - 24) 三浦義昭, 石山 剛, 長尾政之助, 殷 熙安, 北岡正雄, 大原一彦, 荒川正昭, 高橋栄明, 笠井隆一: 血液透析患者の血清 bone Gla-protein: 骨代謝の指標としての意義について. 透析会誌. **21**: 861-870, 1988.
 - 25) **Price, P. A., Parthemore, J. G. and Deftos, L. J.**: New biochemical marker for bone metabo-

- lism. Measurement radioimmunoassay of Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J. Clin. Invest.* **66**: 878-883, 1980.
- 26) Poser, L. W., Esch, F. S., Ling, N.C. and Price, P. A.: Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. *J. Biol. Chem.* **25**: 8685-8691, 1980.
- 27) Delmas, P. D., Tracy, R. P., Riggs, B. L. and Mann, K. G.: Identification of the noncollagenous proteins of bovine by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcif. Tis. Int.* **36**: 308-316, 1984.
- 28) Price, P. A., Otsuka, A. S., Poser, J. W., Kristaponis, J. and Raman. N.: Characterization of a γ -carboxyglutamic acid containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1447-1451, 1976.
- 29) Lian, J. B. and Friedman, P. A.: The vitamin K-dependent synthesis of gamma-carboxyglutamic acid by bone microsomes. *J. Biol. Chem.* **253**: 6623-6626, 1978.
- 30) 濱本洋子, 香川靖雄: 骨の γ -カルボキシグルタミン酸含有蛋白質. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 133-142, 1988.
- 31) 大塚和子, 小出 輝, 森内幸子, 堤ちはる: 血液透析患者における血清骨 γ -カルボキシグルタミン酸含有蛋白 (BGP) の臨床的研究. 透析会誌. **22**: 55-60, 1989.
- 32) Delmas, P. D., Wilson, D. M., Mann, K. G. and Riggs, B. L.: Effect of renal function on plasma levels of Bone Gla-protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**: 1028-1030, 1983.
- 33) Gundberg, C. M. and Weinstein, R. S.: Multiple immunoreactive forms of osteocalcin in uremic serum. *J. Clin. Invest.* **77**: 1762-1767, 1986.
- 34) Price, P. A. and Nishimoto, S. K.: Radioimmunoassay for the vitamin-K dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2234-2238, 1980.
- 35) Bonadonna, G., Merlino, M. J., Myers, W. P. L. and Sonenberg, M.: Urinary hydroxyproline and calcium metabolism in patients with cancer. *N. Engl. J. Med.* **275**: 298-305, 1966.
- 36) Horsman, A., Marshall, D. H., Nordin, B. E. C., Crilly, R. G. and Simpson, M.: The relation between bone loss and calcium balance in women. *Clin. Sci.* **59**: 137-142, 1980.
- 37) 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.
- 38) 今城保定, 西谷 博, 趙 秀憲, 姜 宗憲, 橋中保男, 山本忠司, 山川 楨, 中野ひろみ, 三木隆巳, 萩原 聡, 西沢良記, 森井浩世: 維持透析患者における血清 i-PTH (intact-PTH) の臨床的意義. 腎と骨代謝 **2**: 381-387, 1989.
- 39) 鈴木正司, 平沢由平: アルカリ・フォスファターゼの変動からみたビタミン D および副甲状腺摘出術の効果. 腎と骨代謝—第 5 回腎と骨代謝研究会記録. 協和企画通信, 東京, p 273-282, 1987.
- 40) 福本誠二, 松本俊夫: 体内におけるカルシウムの役割と代謝動態. 臨床栄養 **74**: 571-579, 1989.
- 41) Nijweide, P. J., Burger, E. H. and Feyen, J. H. M.: Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol. Reviews* **66**: 855-886, 1986.
- 42) McSheehy, P. M. J. and Chambers, T. J.: Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* **119**: 1654-1659, 1986.
- 43) Scheven, B. A. A., Visser, J. W. M. and Nijweide, P. J.: In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature* **321**: 79-81, 1986.
- 44) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martinand, T. J. and Suda, T.: Osteoblastic cell are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**: 2600-2602, 1988.
- 45) 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.
- 46) Hale, J. E., Fraser, J. D. and Price, P. A.: The identification of matrix gla protein in cartilage. *J. Biol. Chem.* **263**: 5820-5824, 1988.
- 47) 濱本洋子: γ -カルボキシグルタミン酸含有蛋白とビタミン D. 実験医学 **5**: 720-723, 1987.

- 48) 鈴木正司, 平沢由平: 慢性腎不全 (未透析) 例での腎性骨症と $1\alpha\text{-OH-D}_3$ による治療効果. 骨代謝 **12**: 109-110, 1979.
- 49) 権守日出海, 前川 正: 血液凝固と γ -カルボキシンググルタミン酸. 代謝 **19**: 875-886, 1982.
- 50) 森田陸司, 岩永貞昭: γ カルボキシンググルタミン酸含有蛋白の発見. 代謝 **19**: 843-854, 1982.

Abbreviations in tables and figures

ALP: alkaline phosphatase

BGP: bone gla protein

free- γ Gla: free- γ -carboxyglutamic acid

HPLC: high performance liquid chromatography

Hypro: hydroxyproline

MCI: metacarpal index

PTH: parathyroid hormone

SPR: subperiosteal resorption

TRACP: tartrate resistant acid phosphatase

Σ GS/D: mean bone mineral content per unit length

HD: hemodialysis