

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591789

研究課題名（和文）

高尿酸血症に対するアラニングリオキシル酸変換酵素、グリオキシル酸還元酵素の測定

研究課題名（英文）

Measurements of Alanine:Glyoxylate transamination and Glyoxylate Reductase for hyperoxaluria

研究代表者 永田 仁夫 (NAGATA MASAO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70397397

研究成果の概要（和文）：SPT/AGTの活性測定は健常者のみでなくPH1患者においてもSGT活性によって測定可能である。GRの活性はDGDH活性により測定可能であり、9名の結石患者の平均は $1.81 \pm 0.76$  nmol/min/mg proteinであった。L-GlycerateはキラルカラムによるHPLCにて測定可能であり、非結石患者52名(non-stone former:non-SF)と結石患者9名(stone former:SF)のL-Glycerateを比較したところ、中央値でnon-SF  $13.3 \mu\text{mol/L}$ 、SF  $21.3 \mu\text{mol/L}$ と有意差をもってSFの値が高かった。

研究成果の概要（英文）：The activity of SPT/AGT can be measured by SGT activity also not only in a healthy person but in PH1 patient. The activity of GR can be measured by DGDH activity, in nine stone patients' average was  $1.81 \pm 0.76$  nmol/min/mg protein. L-Glycerate can be measured by HPLC used a chiral column. The comparison of L-Glycerate with 52 non-stone patients (non-stone former:non-SF) and nine stone patients (stone former:SF), The value of SF was high with non-SF  $13.3 \mu\text{mol/L}$ , SF  $21.3 \mu\text{mol/L}$ , is a significant difference at the median.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	117,0000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1900,000	570,000	2470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：結石症学

## 1. 研究開始当初の背景

尿路結石症は男性において生涯罹患率が14%であり、その80%が尿酸カルシウム含有結石である。尿路結石形成のリスクファクターの1つである高尿酸血症の原因には遺伝性疾患である原発性高尿酸血症1型(PH1)、原発性高尿酸血症2型(PH2)があるが、大部分は原因不明である。

PH1は、肝細胞内に存在するserine/pyruvate:alanine/glyoxylate aminotransferase (SPT/AGT)の異常によって起こり、年少期に全身への尿酸沈着による多臓器不全のため死に至らしめる。われわれは、過去の文献報告より集計し得た1962年～2003年の本邦のPH1発症59例をまとめ、その診断に貢献してきた

(Takayama T., Nagata M., Ichiyama A., Ozono S., Primary hyperoxaluria type 1 in Japan, *American Journal of Nephrology* 25:297-302, 2005.)。このうち、近年の事例は、本申請者が実際に SPT/AGT を測定することにより、確定診断に到っている。しかし、現在の酵素法による測定において必須の酵素である Glyoxylate reductase (GR) が発売中止になっており、世界的に PH1 の確定診断に支障を来しているのが現状で、他の方法による SPT/AGT 活性の測定法の確立が強く求められていた。そこで、本申請者は、平成 19 年度の科学研究補助金 (原発性高尿酸尿症 1 型に対する抗 SDH 抗体を用いた診断法の確立:若手研究(B),課題番号:19791105) の補助により、抗 serine dehydratase(SDH)抗体を用いることで、GR を用いる必要のない SPT/AGT アッセイの開発に成功し・論文化し報告した。(Nagata M., Ichiyama A., Takayama T., Oda T., Mugiya S., Ozono S., Assay of Alanine:Glyoxylate Aminotransferase in Human Liver with Its Serine:Glyoxylate Aminotransferase Activity, *Biomedical Research*, impress)

一方、PH2は、Glyoxylate reductase (GR) の異常によっておこり、本邦における過去の報告例は2例のみである(うち1例は、本教室で新しい遺伝子変異を同定し、報告しており、本申請者も研究に参画した(Takayama T., Nagata M., Ozono S., Nonomura K., Scott D. Cramer, A novel mutation in the GRHPR gene in a Japanese patient with primary hyperoxaluria type 2, *Nephrol Dial Transplant* 22(8):2371-2374, 2007.) )。しかしながら、PH2はPH1に比べ再発性尿路結石症を来すが全身状態の悪化は少なく、診断方法も高尿酸尿症を証明したのち、L-グリセリン酸の増加を証明するというもので、いずれも保険収載されていないため、その診断には専門的な注意深い観察が求められるとともに時間・経費も要する状態にある。したがって、原因不明の尿酸カルシウム含有結石患者の一部はこの酵素異常による可能性が十分にあると考えられている。

近年、Knight Jら(Knight J., Ross P. Holmes, Dawn S. Milliner, Carla G. Monico, Scott D. Cramer, Glyoxylate reductase activity in blood mononuclear cells and the diagnosis of primary hyperoxaluria type 2, *Nephrol. Dial. Transplant.* 21(8):2292-2295, 2006.)により、GR を抹消血液中の単球を用いて測定し、PH2 の診断を行うことが可能であるという報告がなされた。この報告では、健康人(非日本人)と PH2 の GR 活性につい

ては検索されていたが、結石症患者での GR 活性については調査されていないため、本研究を実施する必要性があると考えられる。なお、本研究の共同研究者である高山は、前述の研究室に留学しており、この測定法を熟知している。

尿酸は、尿中で常に過飽和状態にあり、軽度の上昇で速やかに尿酸カルシウム結晶を作ることがわかっており、この前駆物質の代謝に関わる GR 活性の低下によっても尿路結石症を惹起すると考えられる。そこで、本研究において GR 活性を検討することは、未だ原因不明である多くの尿路結石症患者の原因の一部を究明に寄与すると考えられる。

以上のごとく、本申請者はこれまでの間、尿結石症および原発性高尿酸尿症の研究と診療に携わってきた背景を踏まえ、この度、以下の研究を着想するに至った次第である。

## 2. 研究の目的

(1) PH1 の確定診断に用いる「抗 SDH 抗体を用いた SPT/AGT の測定法」に関しては、これが確立したため、全国から送られてくる検体の測定を行い、研究期間内に症例の蓄積を行う予定である。また、PH2 が疑われる患者、もしくは原因不明の高尿酸尿症の患者については GR 活性を測定し、高尿酸尿症の原因を検索する予定である。

(2) 前述のごとく、尿路結石症は罹患率が非常に高いにもかかわらず、原因不明とされる症例が多くいる現状と、その中に原発性高尿酸尿症の亜型が存在する可能性を踏まえ、本研究を計画した。以上の研究は、現時点で発見されることなく病脳する原発性高尿酸尿症患者の診断に寄与するのみならず、尿路結石症の原因の一部を究明にも繋がる可能性があると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) SPT/AGT 活性の測定  
従来の SPT/AGT 活性の測定で必須であった GR の発売が中止となり、平成 19 年、20 年に科学研究補助金 (原発性高尿酸尿症 1 型に対する抗 SDH 抗体を用いた診断法の確立:若手研究(B),課題番号:19791105) にて測定法を確立したのでこれを用いて測定する。具体的には SPT/AGT が Serine/Glyoxylate aminotransferase(SGT)活性も併せ持つこと、及びヒトでは基質とする L-Serine に反応する SDH 活性がほとんどないことを利用し、SPT/AGT により L-Serine と Glyoxylate を基質として生じた OH-Pyruvate に NADH を加え LDH にて反応させることで生じる

NAD(OH-pyruvate+NADH → L-glycerate+NAD+H<sup>+</sup>)による吸光度の変化を利用して測定を行う。

(2) GR 活性の測定

末梢血より Knight J.ら(Knight J., Ross P. Holmes, Dawn S. Milliner, Carla G. Monico, Scott D. Cramer, Glyoxylatereductase activity in blood mononuclear cells and the diagnosis of primary hyperoxaluria type 2, Nephrol. Dial. Transplant. 21(8):2292-2295, 2006.)の方法を用いて測定する。具体的にはまず末梢血から単球を分離する。その後 GR が D-glycerate dehydrogenase の活性を持つことを利用し、これを反応させたのち、反応物質を HPLC にて測定する。

(3) 尿中 L-Glycerate の測定

尿より Mohamed S. Rashed ら(Mohamed S. Rashed, Hassan Y. Aboul-Enein, Mohamed AlAmoudi, Minnie Jakob, et.al., Chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry in the determination of the configuration of glyceric acid in urine of patients with D-glyceric and L-glyceric acidurias, Biomed. Chromatogr. 16:191-198.2002.)の方法を用いて測定する。具体的には尿を除蛋白したのち、キラルカラムと呼ばれるカラムを用い HPLC にて光学異性体を分離し、その後質量分析器にて測定する。

4. 研究成果

(1) SPT/AGT 活性の測定

SGT 活性による SPT/AGT の測定は健常人において測定法を確立したが、PH1 患者および肝移植ドナーの SGT 活性は測定されていなかったため、最初の 5 例は同時に SPT 活性も測定し、PH1 の患者においても SPT 活性と同様に低値を示し、ドナーにおいても SGT 活性は SPT 活性とパラレルな値を示すことを確認した。その後の 10 例においては SGT 活性のみにて SPT/AGT の活性低下を確認した。

以下に測定結果を示す。(Table 1)

Table 1.

症例	PH1 or Donor	SGT	SPT
a	PH1	0	0
b	Donor	0.56	0.5
c	PH1	0	0
d	Donor	0.38	0.32
e	PH1	0.05	0
f	PH1	0	
g	Donor	1.05	

h	PH1	0
i	PH1	0
j	PH1	0
k	PH1	0.02
l	Donor	1.69
m	PH1	0.04
n	Donor	2.32
o	PH1	0.45

SPT/AGT の SGT 活性による測定により SPT 活性による診断と同様に PH1 を診断可能である。SPT 活性測定の必須酵素である GR は現在も発売再開されていないが、LHD を使用した SGT 活性を用いることによりこれからも SPT/AGT の酵素活性を測定可能であり、PH1 の確定診断が今後も可能であると考えられた。

(2) GR 活性の測定

まず Hydroxy-Pyruvate の検量線を作成した(R<sup>2</sup>=0.9992)。次にそれを用い、同意の得られた結石患者 9 名の DGDH 活性を測定したものが以下に示すとおりである (Table 2)

Table 2.

症例	DGDH activities	
	(nmol/min/mg protein)	
p	1.39	
q	1.12	
r	2.87	
s	1.46	
t	2.57	
u	2.56	
v	2.29	
w	1.17	
x	0.86	

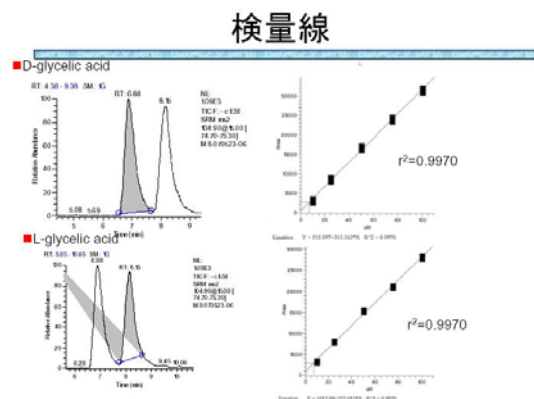
Average 1.81±0.76

この値は過去の文献 (Normal (n=20):0.97±0.2) に比べ高い値となった。原因については不明であるが DGDH の測定は可能であった。

(3) 尿中 L-Glycerate の測定

まず D-Glycerate, L-Glycerate の検量線を作成した(R<sup>2</sup>=0.9970)。(Fig 1)

Fig 1.



それを用い、同意の得られた 61 名の尿検体を測定したものが以下のとおりである (Table 3)。

Table 3.

	n	Mean	(SD)	Min.	Max.
D-Glycelate(μmol/L)	61	7.3	(2.8)	2.4	15.5
L-Glycelate(μmol/L)	61	16.8	(9.1)	3.6	54.6
(μmol/mol Cre)		0.73	(1.49)	0.04	10.29

※high L-Glyceluria: >28μmol/mol Cre

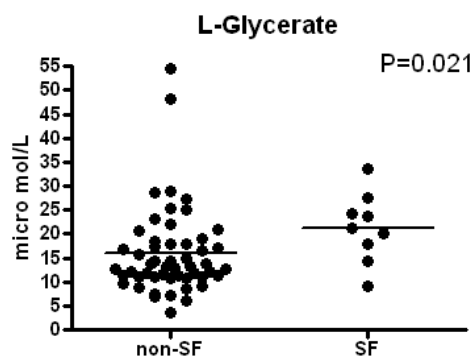
高 L-Glycerate 尿症の患者は認めず、この中に PH2 はいないと考えられた。

次に非結石患者 52 名 (non-stone former:non-SF) と結石患者 9 名 (stone former:SF) の L-Glycerate を比較したところ、中央値で non-SF 13.3 μmol/L、SF 21.3 μmol/L と有意差をもって SF の値が高かった。(Fig 2)

これまで GR および L-Glycerate の測定が困難であったため、結石症患者のおけるそれらの測定はされてこなかった。もし結石患者の L-Glycerate が健常人に比べ高く、GR の活性が低ければ、結石生成の原因の一つに GR の活性低下が関与していることの証明となったが、今回の研究にて結石患者の GR の活性は健常人より高い値であった。

しかしまだ症例数は少なく、症例数を増やして検討すれば変化が現れる可能性がある。また GR の活性を DGDH にて測定したことが活性が高く出た原因の可能性もあり、今後 GR 活性にて測定する方法も検討する予定である。

Fig 2.



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 永田仁夫, 高山達也, 麦谷荘一, 小田敏明, 市山 新, 大園誠一郎, SGT 活性による AGT 測定系の確立, 日本尿路結石症学会誌, 査読無, 9 巻 2 号, 2010, 105-109.
- ② 高山達也, 永田仁夫, 麦谷荘一, 大園誠一郎, 蔞酸代謝関連酵素に尿路結石治療の未来を求めて, 泌尿器科紀要, 査読有, 57 巻 1 号, 2011, 39-41.
- ③ 永田仁夫, 高山達也, 麦谷荘一, 大園誠一郎, 特集:カルシウム代謝と尿路結石;カルシウム結石予防のための薬物療法, CLINICAL CALCIUM, 査読無, 21 巻 10 号, 2011, 102-106.
- ④ 高山達也, 永田仁夫, 大園誠一郎, XII 各種病態にみられる腎障害 代謝性疾患、電解質異常:高シュウ酸尿症, 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 18 腎臓症候群 (第 2 版) 下-その他の腎臓疾患を含めて-, 査読無, 18 巻, 2012, 338-341.
- ⑤ 高山達也, 永田仁夫, 大園誠一郎, III 有機酸・脂肪酸代謝異常;原発性高シュウ酸尿症 II 型, 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 19 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 上 -病因・病態研究, 診断・治療の進歩-, 査読無, 2012, 488-492.
- ⑥ 高山達也, 永田仁夫, 大園誠一郎, III 有機酸・脂肪酸代謝異常;原発性高シュウ酸尿症 III 型, 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 19 先天代謝異常症候群 (第 3 版) 上 -病因・病態研究, 診断・治療の進歩-, 査読無, 2012, 493-496.
- ⑦ 高山達也, 永田仁夫, 大園誠一郎, XI ペルオキシソーム病 単独酵素欠損症;原発性高シュウ酸尿症 I 型, 別冊日本臨牀

新領域別症候群シリーズ No. 20 先天代謝異常症候群(第2版)下-病因・病態研究, 診断・治療の進歩-, 査読無, 2012, 450-453.

なし

[学会発表] (計4件)

- ① SGT 活性による AGT 測定系の確立, 永田仁夫, 高山達也, 麦谷荘一, 小田敏明, 市山 新, 大園誠一郎, 第20回日本尿路結石症学会, 2010.08.27, 大阪市
- ② SGT 活性による原発性高尿酸血症1型の診断, 永田仁夫, 高山達也, 鈴木孝尚, 松本力哉, 伊藤寿樹, 杉山貴之, 大塚篤史, 古瀬 洋, 麦谷荘一, 大園誠一郎, 第99回日本泌尿器科学会総会, 2011.04.23, 名古屋市
- ③ Ethnic differences in GRHPR gene mutation in primary hyperoxaluria type 2, Takayama T, Takaoka N, Nagata M, Johnin K, Okada Y, Kuhara T, Rumsby G, Cramer SD, Ozono S, 10th International primary hyperoxaluria workshop, 2012.06.22, Bonn, Germany
- ④ PH1 can be also diagnosed by measuring SGT activity, Nagata M, Ichiyama A, Takayama T, Mugiya S, Ozono S, 10th International primary hyperoxaluria workshop, 2012.06.22, Bonn, Germany

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田 仁夫 (NAGATA MASAO)  
浜松医科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 70397397

### (2) 研究分担者

大園 誠一郎 (OZONO SEIICHIRO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00183228

高山 達也 (TAKAYAMA TATSUYA)  
浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 90324350

### (3) 連携研究者