

ホモシステイン代謝

橋本隆男,* 篠原佳彦, 長谷川 弘

Homocysteine Metabolism

Takao HASHIMOTO,* Yoshihiko SHINOHARA, and Hiroshi HASEGAWA

*Department of Pathophysiology, School of Pharmacy Tokyo University of Pharmacy and Life Science,
1432-1 Horinouchi, Hachioji City 192-0392, Japan*

(Received May 9, 2007)

Homocysteine, a sulfur amino acid, is an intermediate metabolite of methionine. In 1969, McCully reported autopsy evidence of extensive arterial thrombosis and atherosclerosis in children with elevated plasma homocysteine concentrations and homocystinuria. On the basis of this observation, he proposed that elevated plasma homocysteine (hyperhomocysteinemia) can cause atherosclerotic vascular disease. Hyperhomocysteinemia is now well established as an independent risk factor for atherosclerotic vascular disease. Mild hyperhomocysteinemia is quite prevalent in the general population. It can be caused by genetic defects in the enzymes involved in homocysteine metabolism or nutritional deficiencies in vitamin cofactors, certain medications or renal disease. An increase of 5 μmol per liter in the plasma homocysteine concentration raises the risk of coronary artery disease by as much as an increase of 20 mg per deciliter in the cholesterol concentration. In this article, we review the biochemical, experimental and clinical studies on hyperhomocysteinemia, with emphasis on the metabolism and pharmacokinetics of homocysteine.

Key words—homocysteine; methionine; stable isotope; cardiovascular disease; GC-MS

1. はじめに

筆者は腎不全、透析などの診療に従事していた一時期、尿毒症症状や身体的異常の出現とアミノ酸代謝異常の関連に注目し、HPLCによるアミノグラム上、健常人に認められないピークの存在に気付いた。いわゆる uremic toxins 探索の延長としてのアミノ酸や様々な異常オリゴペプチド類が存在している可能性を想定したが、分析技術の不足から十分な解析ができなかった。平成9年に東京薬科大学に着任後直ちに、これまで教室で培われてきた技術を用いて疫学的に心血管疾患への関与が示唆されつつあったホモシステインについて研究を開始した。

ホモシステインはメチオニン代謝の中間代謝物として生成されるチオール基を持つアミノ酸である。1969年、McCullyは先天性代謝異常症の1つで血漿中ホモシステイン濃度が著しく高値であるホモシ

スチン尿症患者において若年期に動脈硬化性、血栓性病変を発症することを見出した。¹⁾ その報告以来、ホモシステインと心血管疾患との関連性が注目されるようになった。最近では、多くの疫学研究によって、血漿ホモシステイン濃度が健常者に比べてわずかに高値である軽度高ホモシステイン血症でも、心血管疾患の危険因子となることが明らかにされている。²⁻⁵⁾ 軽度高ホモシステイン血症の頻度は一般人口の5-7%といわれ、冠動脈疾患患者、脳血管疾患患者ではそれぞれ30%、42%にも上る。⁶⁾ しかし、心血管疾患の危険因子としての高ホモシステイン血症は高脂血症と比べると、その重要性の認識が低い。本稿では、高ホモシステイン血症に関する基礎研究及び臨床研究を紹介する。

2. ホモシステインの代謝

メチオニンとATPの縮合で生成したS-アデノシルメチオニン(SAM)はメチル基供与体として働き、脱メチル化体としてS-アデノシルホモシステイン(SAH)を生じる。これが加水分解されてホモシステインができる(Fig. 1)。ホモシステインは再メチル化経路かイオウ転移経路により代謝さ

東京薬科大学薬学部病態生理学(〒192-0392 八王子市堀之内1432-1)

*e-mail: tak-hasimoto@q06.itscom.net

現住所: 〒152-0003 東京都目黒区碑文谷1-4-4

本総説は、平成18年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

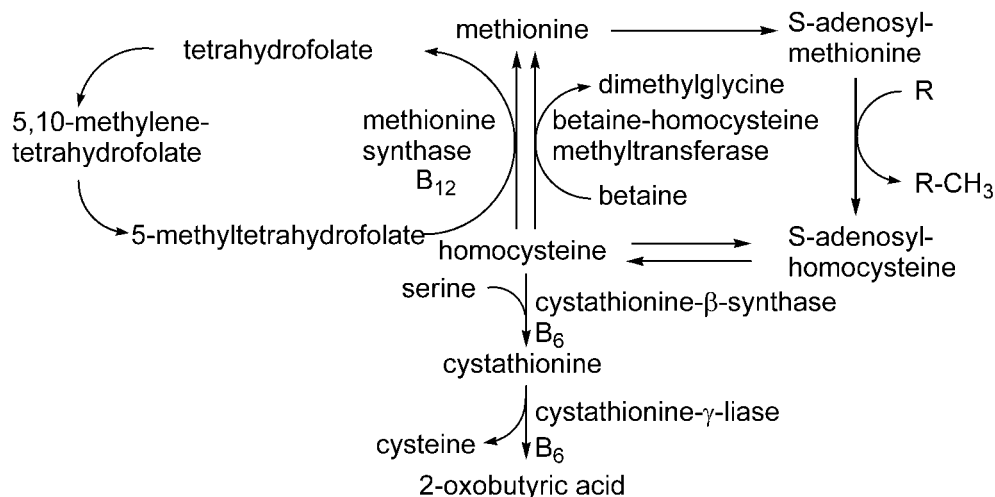


Fig. 1. Homocysteine Metabolism and the Enzymes and Vitamins Involved

れる。⁷⁻⁹⁾ 再メチル化は2種の異なった酵素, すなわちメチオニンシンターゼ (MS) 及びベタイン-ホモシステインメチル転移酵素 (BHMT) により行われる。MSはビタミンB12を補酵素として, 5-メチルトetraヒドロ葉酸 (Methyl-THF) からメチル基をホモシステインに転移する。メチル基供与体である Methyl-THF はメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) の作用で5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (Methylene-THF) から生成する。もう1つのメチル化酵素である BHMT はベタインをメチル基供与体としてメチオニンを生成する。一方, イオウ転移経路では, シスタチオンin-β-シンターゼ (CBS) によりホモシステインはセリンと縮合してシスタチオンinを形成し, ついでシスタチオンin-γ-リアーゼ (CGL) により加水分解されてシステインと2-オキソ酪酸になる。CBS, CGL はともにビタミンB6を補酵素として要求する。これらの経路で代謝されないホモシステインが細胞内から血液中に移行する。

3. 血漿ホモシステイン

血漿中では, ホモシステインとして存在する割合はわずかで, それ自身や他のチオール基を持つ化合物, 例えばシステインやタンパク質とジスルフィド結合を形成して存在する (Fig. 2)。タンパク質と結合しているホモシステインをタンパク結合型ホモシステイン, ホモシステイン及び他の低分子チオール化合物と結合しているホモシステインをタンパク非結合型ホモシステインという。通常, 血漿ホモシステイン濃度は, タンパク結合型ホモシステインと

非結合型ホモシステインの合計量つまり総ホモシステインとして測定される。健常者の血漿総ホモシステイン濃度は3-15 nmol/ml 未満である。¹⁰⁾ また, Uelandらによる精力的な研究¹¹⁻¹³⁾により, ホモシステインとして血漿中に存在する割合はわずか1%程度であり, タンパク結合型ホモシステインが70-80%, 残りがタンパク非結合型ホモシステインとして存在することが示されている。血漿総ホモシステイン濃度が15 nmol/ml 以上を高ホモシステイン血症と呼び, 重度の高ホモシステイン血症では100 nmol/ml 以上になる。

4. 血漿総ホモシステイン濃度の測定法

血漿総ホモシステインの定量は主にHPLCにより行われている。¹⁴⁾ これは, ABD-F, SBD-Fなどのチオール基に選択的に結合する蛍光誘導化剤¹⁵⁻¹⁷⁾やDTT, TBP, TCEPなどのジスルフィド結合の還元剤^{18,19)}が開発されたことに負うところが多い。今日では, GC-MS, LC-MS, EIAなどによる種々の測定法²⁰⁻²²⁾が開発されている (Fig. 3)。

筆者らは, 安定同位体標識体を内標準物質として用いてGC-MS-SIMにより血漿中のメチオニン及びホモシステインを同時に分別定量する方法を開発した。²³⁾ すなわち, 市販されているDL-[3,3,4,4-²H₄]メチオニン (DL-[²H₄]メチオニン) 及びDL-[3,3,3',3',4,4,4',4'-²H₈]ホモシステイン (DL-[²H₈]ホモシステイン) の一定量を分析学的内標準物質として血漿試料に加えたのち, dithiothreitolによりジスルフィド結合を切断し, 固相抽出したのち, N(O,S)-isobutoxycarbonyl ethyl ester 誘導体としてGC-MS

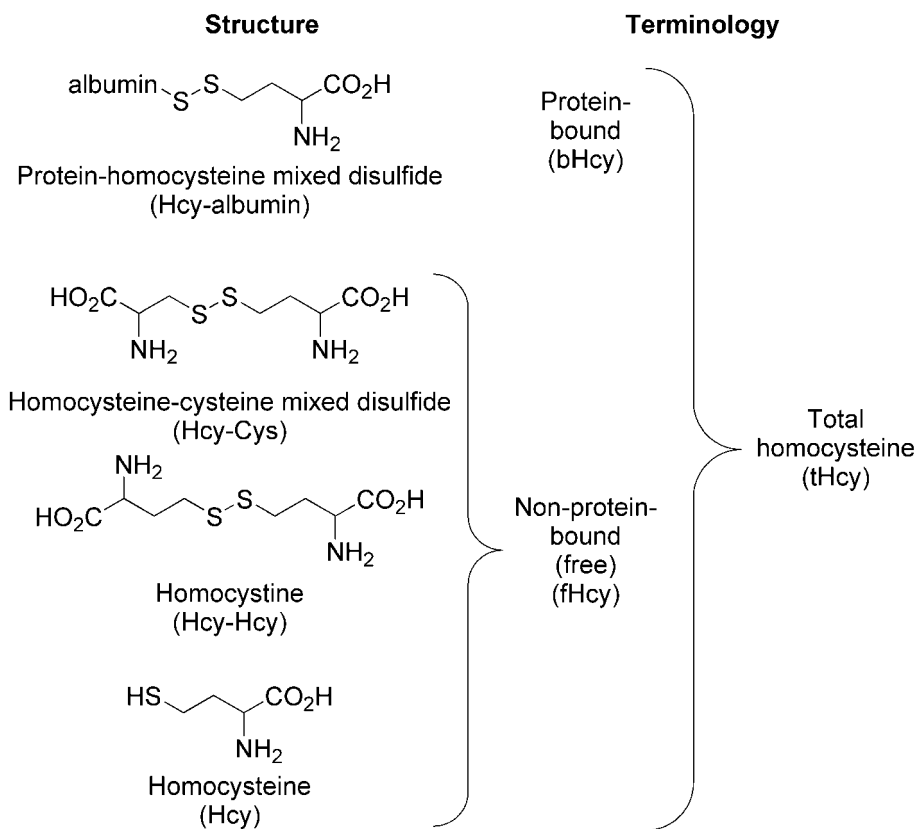


Fig. 2. Homocysteine and Its Oxidized Species in Plasma

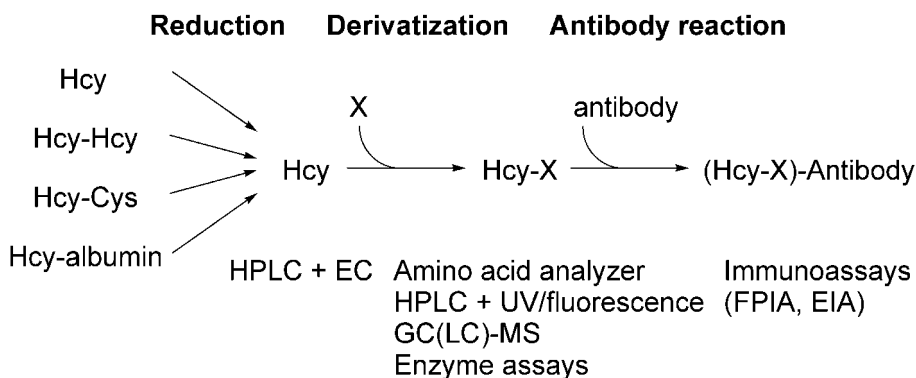


Fig. 3. Principles for Determination of Total Homocysteine

(CI) に注入し、 m/z 282 ($[^2\text{H}_4]$ メチオニン), m/z 278 (メチオニン), m/z 368 ($[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン), m/z 364 (ホモシステイン) をモニターした. 血漿メチオニン濃度は添加した $[^2\text{H}_4]$ メチオニンの量と m/z 278 と 282 のピーク面積比から算出した. 同様に, 血漿ホモシステイン濃度は添加した $[^2\text{H}_8]$ ホモシステインの量と m/z 368 と 364 のピーク面積比から算出した. 本法は高い精度, 感度及び再現性を有していることを確認した. また, これまでは固相抽

出において溶出液の留去に長時間を費やす欠点があったが, 誘導体調製時に用いる液体を固相抽出の溶出液として用いたため, 抽出・精製及び誘導化を短時間で行うことが可能になった.

安定同位体を内標準物質にして GC-MS-SIM で定量する方法は, GC の保持時間による分離と質量数による選別を同時に行うので選択性は一段と高くなり, 内標準物質はキャリアーとして働くので目的物の回収率は向上し, しかも同位体希釈分析法であ

るので回収率を自動的に補正できる等の長所がある。

5. 血漿ホモシステイン濃度の上昇要因

血漿ホモシステイン濃度の上昇には、加齢、男性などの生理的要因、ホモシステイン代謝に必要なビタミン B6, B12 又は葉酸などの補酵素の不足、喫煙やコーヒー摂取などの生活習慣及びホモシステイン代謝に関与する酵素の欠損あるいは活性低下などが関わっていると考えられている。

イオウ転移経路の酵素である CBS の欠損はホモシステイン尿症の原因となって重度の高ホモシステイン血症をもたらす。若年期に心血管疾患を発症する。¹⁾ CBS 欠損症患者は人口 20 万人に 1 人と極めて稀である。一方、軽度高ホモシステイン血症の原因の 1 つとして考えられているのが MTHFR をコードする遺伝子の一塩基多型 C677T である。²⁴⁾ この点変異により MTHFR の 226 番目のアミノ酸がアラニンからバリンへ変換され、MTHFR は熱不安定となり活性が低下することが *in vitro* 発現系を用いた実験により明らかにされている。²⁵⁾ この変異は common mutation であり、日本人を含む多くの人種において T 変異アレル頻度が 0.33 であること、TT 型のヒトではほかに比べて血漿ホモシステイン濃度が高いことが知られている。^{26,27)} 冠動脈疾患患者及び脳梗塞患者では T 変異アレル頻度がそれぞれ 0.42, 0.45 と健常対照者と比べて有意に上昇していること、血漿ホモシステイン濃度も対照群と比べて高値を示すことから、MTHFR C677T 多型を介したホモシステイン濃度の上昇と心血管疾患の関連性が指摘されている。²⁶⁾ われわれが成人男性を対象にして行った研究では CC 型のヒトでは葉酸濃度に係わらずホモシステイン濃度は低値を示し、CT 型では葉酸濃度が低いとホモシステイン濃度が高い傾向にあった。TT 型ではホモシステイン濃度に高値を示す傾向が認められ、葉酸濃度も基準値内低値を示す傾向にあった。TT 型であっても血漿中ホモシステイン濃度が正常範囲内にあるものも多いことから、葉酸を含むビタミン B 群摂取などの環境要因の影響も受け易いことも考えられ、そのような報告もみられる。²⁸⁾

その他にも MTHFR A1298C 多型、MS A2756G 多型、CBS ins84bp 多型などと高ホモシステイン血症との関連性が研究されているが、否定的な報告が多い。²⁹⁻³⁴⁾

6. ホモシステインによる血管障害機序

高ホモシステイン血症がどのような機序で心血管疾患を発症するのかについては、まだ不明な点が多いが、*in vitro* 系での研究によりホモシステインは血管内皮細胞障害、血管平滑筋細胞増殖、血小板活性化、血栓形成などの作用があることが知られている。³⁵⁻³⁹⁾ すなわち、ホモシステインがジスルフィド結合を形成する過程で生じた過酸化水素やスーパーオキシドラジカルなどが酸化ストレスとして内皮細胞を障害すると考えられている。これらの活性酸素種は、内皮由来の NO を不活性化して内皮機能を低下させたり、LDL を酸化 LDL に変性させる。また、ホモシステインはサイクロリン依存性キナーゼ活性を亢進して血管平滑筋細胞の分裂・増殖を促進する。さらに、ホモシステインは凝固の初期に必要な組織因子を誘導したり、第 V 因子を活性化したりして凝固亢進状態を引き起こす一方、トロンボモジュリンの発現抑制、プロテイン C 活性化の抑制、組織プラスミノゲンアクチベーターのアネキシン II への結合抑制などの抗凝固作用を低下させ、血栓形成を起し易い状態を引き起こすことも示唆されている。

高ホモシステイン血症状態では細胞内のホモシステイン濃度も高いことが推察される。生体諸反応の調節には多くのメチル基転移反応が関与しているが、そのほとんどがホモシステインの前駆物質である SAM をメチル基供与体としている。その反応は DNA のメチル化による遺伝子発現調節、RNA やタンパク質の修飾による機能制御、生理活性アミンやクレアチンの合成・分解など多岐に渡る。ホモシステインは種々のフィードバック機構により SAM によるメチル化反応を抑制すると考えられることから、ホモシステイン代謝の破綻がメチル化反応に影響し DNA の発現調節異常などを介して細胞障害に係わる可能性がある。

ホモシステインが環化して生成するホモシステインチオラクトンの血管障害性については Jakubowski によって報告されている。⁴⁰⁻⁴²⁾ タンパク合成に必要なメチオニン-tRNA 合成の際に誤って生成するホモシステイン-tRNA を分解する過程でホモシステインチオラクトンが生成する。これがタンパク質のリジン残基などをアシル化しタンパク質を変性させることが血管障害を誘導する可能性も

報告されている。

以上のように、ホモシステインの血管障害性には細胞内のホモシステイン代謝の破綻による細胞内環境の障害と血液中に汲み出された高濃度のホモシステインによる細胞外からの攻撃という2面性が考えられている。

7. 安定同位体標識メチオニン投与試験

ホモシステイン代謝の異常経路を検出する1つの手段としてメチオニン負荷試験が行われている。^{43,44)} すなわち、メチオニンを体重 kg 当たり 100 mg を経口服用し、2-4 時間後の血漿ホモシステイン濃度の上昇を評価するものである。この負荷試験は元来 CBS が関与する代謝異常を検出するために導入されたもので、イオウ転移経路に異常がみられる場合、このメチオニン負荷により血漿ホモシステイン濃度が上昇する。しかし、再メチル化経路に異常がみられる場合でも血漿ホモシステイン濃度が上昇することもあること⁴⁵⁾や、負荷したメチオニンから生成したホモシステインと内因性のホモシステインとの区別ができないことから、代謝異常の部位を特定することができない短所を有している。

アミノ酸などの生体成分の *in vivo* における挙動を追跡する有効な手段として、安定同位体トレーサー法がある。⁴⁶⁻⁴⁹⁾ この方法は、検出に質量分析計を用いることで、同一化学構造を持つ標識体と内因性の非標識体を区別して測定することが可能であ

る。筆者らは、安定同位体標識したメチオニンを投与することによりホモシステイン代謝の異常経路を特定する方法を構築することを目指して以下に示す研究を行った。

安定同位体標識メチオニン投与試験の概略を Fig. 4 に示した。メチオニンの 3,4 位及び S-メチル基に重水素を導入した [3,3,4,4-S-methyl-²H₇]メチオニン (²H₇メチオニン) を投与すると、体内で脱メチル化されて [3,3,4,4-²H₄]ホモシステイン (²H₄ホモシステイン) が生成する。これが再メチル化されると、メチル基は内因性物質由来の非標識メチルが導入されるので ²H₄メチオニンが生成する。一方、セリンと縮合すると [3,3,4,4-²H₄]シスタチオニン (²H₄シスタチオニン) が生成する。²H₇メチオニン、²H₄メチオニン及び内因性ホモシステインはそれぞれ質量差から区別して測定できる。同様に、²H₄ホモシステインと内因性ホモシステイン、²H₄シスタチオニンと内因性シスタチオニンを区別して測定できる。このように各代謝物を内因性物質と分別定量できることから、脱メチル、再メチル及びイオウ転移経路を定量的に評価することが可能である。

7-1. 安定同位体標識体の合成 まず、投与あるいは希釈分析に必要となる各種標識アミノ酸の合成を行った。⁵⁰⁾ Figure 5 には ²H₇メチオニンの合成法を示した。この合成で最も重要なことは、生成

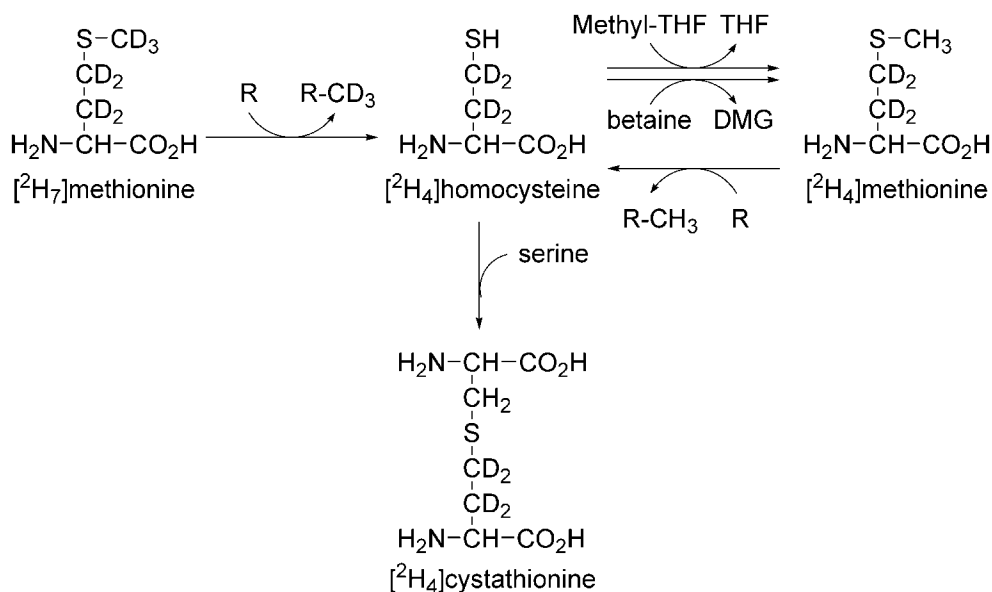


Fig. 4. Metabolic Scheme for ²H₇methionine

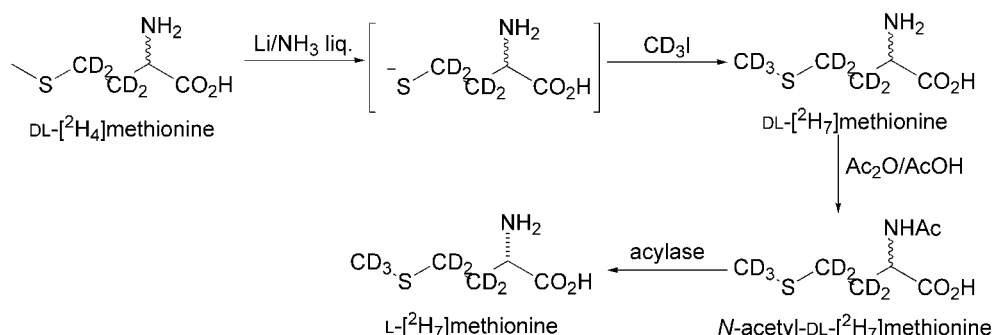


Fig. 5. Synthetic Scheme for L-[²H₇]methionine

物である [²H₇]メチオニンの中に原料である [²H₄]メチオニンが混入しないこと、すなわち [²H₄]メチオニンから S-CH₃ 基を定量的に除くことにあった。常法であるナトリウム/液体アンモニアでは脱メチル化しないこと、ナトリウムをリチウムに変えることによって数時間で脱メチル化が進行することを見出した。得られた DL-[²H₄]ホモシステインチオアニオンに [²H₃]ヨウ化メチルを加え再メチル化し、DL-[²H₇]メチオニンを得た。¹H NMR, ¹³C NMR 及び GC-MS による測定で、DL-[²H₇]メチオニンの中に DL-[²H₄]メチオニンの混入していないことが確認できた。ついで、DL-[²H₇]メチオニンを N-アセチル化した後、アシラーゼで加水分解し、光学純度の高い L-[²H₇]メチオニンを得ることができた。同様の手法を用いて、L-[²H₄]メチオニン、L-[²H₄]ホモシステインチオラクトン、DL-[¹³C₂]ホモシステインなど必要な標識体を合成している。

7-2. メチオニンの血漿中動態 ラットを対象として安定同位体標識メチオニン投与試験の基礎検討を行った。⁵¹⁾ ホモシステイン代謝の異常経路を投与試験で検査するためには投与量の決定が重要である。血漿メチオニン濃度は飢餓時に低下し、食後に約 1.5 倍上昇する^{52,53)}が、血漿ホモシステイン濃度は食事の摂取に影響されず、日内変動がほとんどない。⁵⁴⁾ 血漿ホモシステイン濃度がほぼ一定に保たれているのは、メチオニンから生成される SAM がホモシステインの代謝を制御しているためと考えられている。すなわち、SAM はイオウ転移経路を亢進してメチオニンを消費し、再メチル化経路を阻害する。そのため、食後は SAM が高濃度になりイオウ転移経路を亢進し、飢餓時は逆に再メチル化経路が亢進してメチオニンを保留する。ところが、現在行

われている非標識メチオニン負荷試験では体重 kg 当たり 100 mg 負荷され、成人における 1 日当たりのメチオニン必要量 13 mg/kg⁵⁵⁾ と比較しても大量の負荷量となるため、健常者でも血漿中メチオニン濃度は通常あり得ない濃度にまで上昇することから、生理的条件下における代謝過程を評価することは困難である。

成人の 1 日必要量の約 1/3 である 5 mg/kg の [²H₇]メチオニンをラットに静脈内投与し、血漿中の内因性メチオニン、ホモシステインを [²H₇]メチオニン、 [²H₄]メチオニン、 [²H₄]ホモシステインとともに GC-MS-SIM を用いた二重希釈分析法で定量した。内因性メチオニン及びホモシステイン濃度は [²H₇]メチオニン投与前とほとんど変化しなかった。また、投与直後の [²H₇]メチオニン濃度は内因性メチオニン濃度とほぼ同じであったことから、この投与量ならば生理的条件に近い状態での代謝過程を評価できると考えた。投与した [²H₇]メチオニンは約 35 分の半減期で消失すること、また [²H₄]ホモシステイン生成は非常に迅速であることが明らかになった。さらに、投与したメチオニンと再メチル化で生成するメチオニンを区別して測定でき、 [²H₇]メチオニンから [²H₄]ホモシステインを経由して [²H₄]メチオニンへの変換の評価が可能になった。

7-3. ホモシステイン代謝異常検査法の開発 安定同位体標識メチオニンを投与することによりホモシステイン代謝異常部位を特定する方法を構築することを目標として、ホモシステイン代謝過程に関与するビタミン類の欠乏飼料で飼育することで作成した再メチル化経路障害ラット及びイオウ転移経路障害ラットにおける [²H₇]メチオニンの血漿中動態変化を比較検討した。⁵⁶⁾

MS の基質となり得る葉酸, BHMT の基質であるベタインの前駆物質コリン, 及び CBS の補酵素であるビタミン B6 が欠乏した飼料でラットを飼育したところ, 葉酸欠乏群, 葉酸とコリンの両欠乏群で高ホモシステイン血症になったが, コリン欠乏群, ビタミン B6 欠乏群の血漿ホモシステイン濃度は対照群とほぼ同じだった. これらのラットに $[^2\text{H}_7]$ メチオニン を 5 mg/kg 静脈内投与し, 血漿中の $[^2\text{H}_7]$ メチオニン及び代謝物の $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン及び $[^2\text{H}_4]$ メチオニンの濃度を測定した. その結果, $[^2\text{H}_7]$ メチオニンの血漿中濃度はいずれの群も最終採血点である 120 min まで対照群と有意な差は認められず, $[^2\text{H}_7]$ メチオニンの消失にこれらの欠乏による影響はほとんどないことが明らかになった. 代謝物である $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン及び $[^2\text{H}_4]$ メチオニンの血漿中濃度は各欠乏群に相違がみられた (Figs. 6 and 7). 特に, 投与後 5 min の変化が最も顕著であり, 葉酸欠乏群では $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン濃度の上昇, コリン欠乏群では $[^2\text{H}_4]$ メチオニン濃度の低下, 葉酸・コリン欠乏群では $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン濃度の上昇と $[^2\text{H}_4]$ メチオニン濃度の低下, ビタミン B6 欠乏群では $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン濃度の上昇がみられた. 葉酸欠乏群とビタミン B6 欠乏

群において投与直後の $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン濃度の上昇が両群で観察されたが, 葉酸欠乏群では 120 min まで有意な上昇をするのに対してビタミン B6 欠乏群では 60 min 以降の上昇がみられなかった. 以上のことから, $[^2\text{H}_7]$ メチオニン投与後 5 min 及び 60 min の $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン及び $[^2\text{H}_4]$ メチオニンの血漿中濃度を測定することによりホモシステインの代謝経路の異常部位を判別できる可能性が示唆された.

MS 及び BHMT はいずれもホモシステインのメチル化酵素であるが, ラットにおいて MS は全身の組織に分布しているのに対して, BHMT は肝に局在化していることが知られている.^{8,57,58)}しかし, *in vivo* において両酵素がどのような役割を担っているかは不明な点が多い. 上記に記載した $[^2\text{H}_7]$ メチオニン投与試験において, 葉酸欠乏群では血漿中 $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン濃度が上昇したにも係わらず $[^2\text{H}_4]$ メチオニン濃度は対照群と差がなかったのに対して, コリン欠乏群では血漿中 $[^2\text{H}_4]$ メチオニン濃度が低下したことから, MS 及び BHMT の寄与に関して Fig 8 に示すような仮説を提案した. すなわち, MS により触媒されて生成した $[^2\text{H}_4]$ メチオニンは細胞内でタンパク又は SAM の合成に用いら

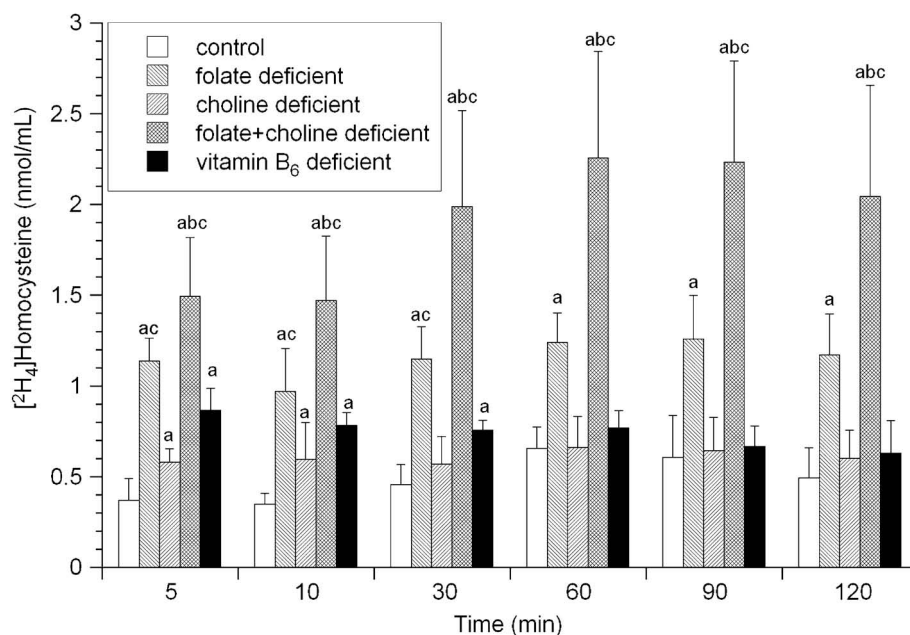


Fig. 6. Plasma Concentrations of Total $[^2\text{H}_4]$ homocysteine after a Bolus Intravenous Administration of $[^2\text{H}_7]$ methionine (5 mg/kg body weight) to Vitamin-deficient Rats

Each value represents the mean \pm S.D. ($n=6$). a: $p < 0.05$ compared with control group, b: $p < 0.05$ compared with folate deficient group, c: $p < 0.05$ compared with vitamin B6 deficient group.

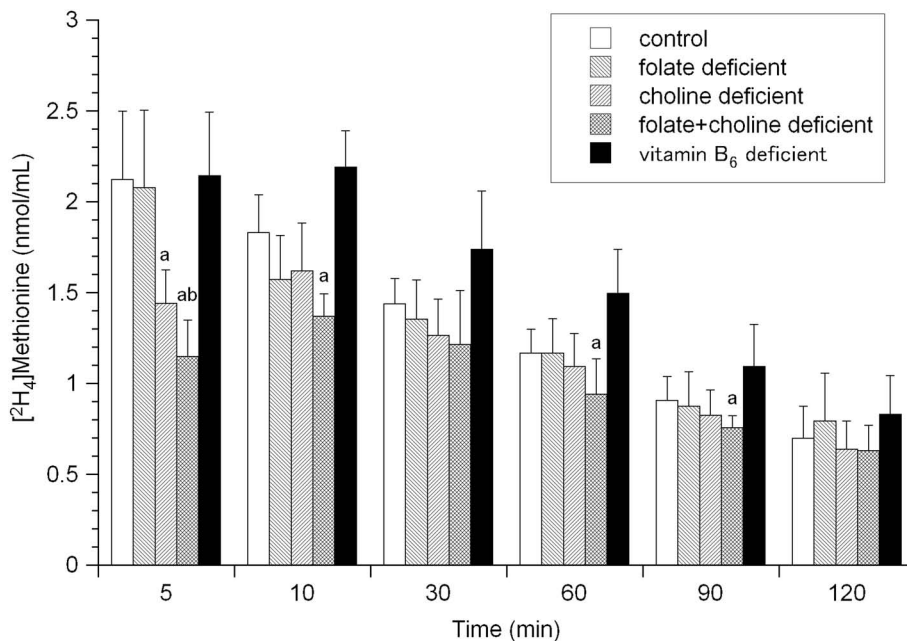


Fig. 7. Plasma Concentration of $[^2H_4]$ methionine after a Bolus Intravenous Administration of $[^2H_7]$ methionine (5 mg/kg body weight) to Vitamin-deficient Rats
 Each value represents the mean \pm S.D. ($n=6$). a: $p < 0.05$ compared with control group, b: $p < 0.05$ compared with folate deficient group.

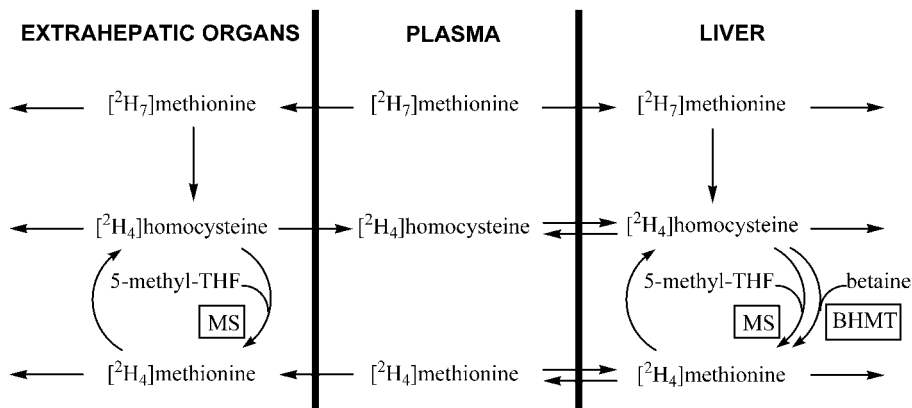


Fig. 8. Contribution to Plasma Levels of $[^2H_4]$ homocysteine and $[^2H_4]$ methionine by 5-Methyl-THF and Betaine

れるので、血漿中にはほとんど移行しない。葉酸不足では MS による反応が阻害されるので処理しきれなかった過剰の $[^2H_4]$ ホモシステインが細胞内から血漿中へ移行し、その濃度が上昇するが、 $[^2H_4]$ メチオニン濃度は変化しない。各臓器から放出された $[^2H_4]$ ホモシステインは血液により肝に運ばれ、BHMT 及び MS により再メチル化され $[^2H_4]$ メチオニンに戻される。この $[^2H_4]$ メチオニンは肝細胞でも利用されるが、血液中に放出され、各臓器に送られて利用されると考えられた。

8. 片腎摘除ラットにおけるホモシステインの体内動態

ホモシステインは末期腎不全患者において蓄積し易く、透析患者の主要な死因の1つである心血管疾患との関連性が指摘されている。⁵⁹⁻⁶⁴⁾しかし、末期腎不全患者における血漿ホモシステイン濃度上昇の機構は不明な点が多い。健康者及び末期腎不全患者においてホモシステインの腎排泄は微量であること、^{59,65)}ラットの腎動脈と静脈のホモシステイン濃度に大きな差があること⁶⁶⁾から、腎はホモシステインの排泄臓器というよりも代謝に大きな役割を果た

していると考えられている。さらに、MSは種々の臓器に広く分布しているが腎に最も高い活性があること、CBSは腎では近位尿細管に局在化していることが知られている。^{8,67)} このようにホモシステイン代謝に関する酵素の臓器分布や活性に関する知見は得られているものの、*in vivo*で腎がホモシステインの体内動態にどの程度寄与するかを検討した報告はこれまでなかった。筆者らは、renal massを減少させたラット及び正常ラットにおいて安定同位体標識ホモシステイン ($[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン)を投与したときのそれ自身及び代謝物の差異を評価すれば、ホモシステイン体内動態に対する腎の寄与を明らかにできると考え、まず片腎摘除による検討を開始した。

片腎摘除したラットの血漿中の内因性ホモシステイン、メチオニン及びクレアチニン濃度は観察した術後20日まで術前とほとんど変化しなかった。術後7日の片腎摘除ラット及び対照ラットに $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン $30 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重を静脈内投与し、それ自身及び代謝物である $[^2\text{H}_4]$ メチオニンの血漿時間推移を測定した。その結果、Fig. 9に示すように $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン濃度は投与30 min以降の採血点において片腎摘除群が対照群に比べて有意に高くなり、 $[^2\text{H}_4]$ ホモシステインの全身クリアランスは

片腎摘除群で対照群の約65%に低下した。また、両群において $[^2\text{H}_4]$ ホモシステイン投与直後から $[^2\text{H}_4]$ メチオニンの生成が認められ、そのAUCは対照群と比較して片腎摘除群で高い傾向にあった。

本研究により、ホモシステインの体内動態に腎が大きく貢献していることが*in vivo*において初めて明らかになった。

9. 痛風・高尿酸血症と高ホモシステイン血症

メタボリック症候群に代表されるように生活習慣病の集積は心血管疾患発症リスクを相乗的に増悪する。痛風・高尿酸血症は他の生活習慣病を合併し、動脈硬化による心筋梗塞、脳血管障害による死亡が多い疾患で、インスリン抵抗性の一因とも考えられている。⁶⁸⁾ 高ホモシステイン血症と種々の生活習慣病との関連性を検討した報告は多数ある中で、痛風・高尿酸血症との関連性の研究例は少ない。痛風患者では血漿ホモシステイン濃度が健常者に比べて高いとの報告^{69,70)}がある一方で、これを否定する報告もある。⁷¹⁾ 壮年男性を対象にMTHFR C677T多型と血清尿酸濃度との関連性を調べると、高尿酸血症の被験者のT変異アレル頻度は正常群に比べて高く、尿酸濃度上昇にMTHFR C677Tが関与していると報告されている。⁷²⁾ 葉酸は生体内で様々な分子形で存在するが、主にMethyl-THFとして存在する。MTHFR C677T多型がTT型の場合には葉酸インバランスが崩れ、Methyl-THFが低下するとともにプリン体の*de novo*合成に關与する10-ホルミルテトラヒドロ葉酸の濃度が上昇する。⁷³⁻⁷⁵⁾ また、SAHの加水分解でホモシステインとともに生成するアデノシンは、一部はsalvage経路により再利用されるが、残りは代謝され尿酸の基になる。これらのことから葉酸代謝を介して尿酸代謝とホモシステイン代謝に関連性があると考えられた。そこで、東京慈恵会医科大学倫理委員会承認の下、約100名の痛風・高尿酸血症患者を対象に、その血清尿酸濃度及び血漿ホモシステイン濃度測定、MTHFR C677T多型検査を行い、それらの関連を臨床的背景とともに解析した。まず、高尿酸血症成因にMTHFR C677T多型が関与しているとしたらどのような機序なのかを明らかにするために、治療開始時点の尿酸クリアランス、1日尿酸排泄量を用い被験者を尿酸産生過剰型、尿酸排泄低下型、混合型に分類し、これらの尿酸動態パラメータとMTHFR

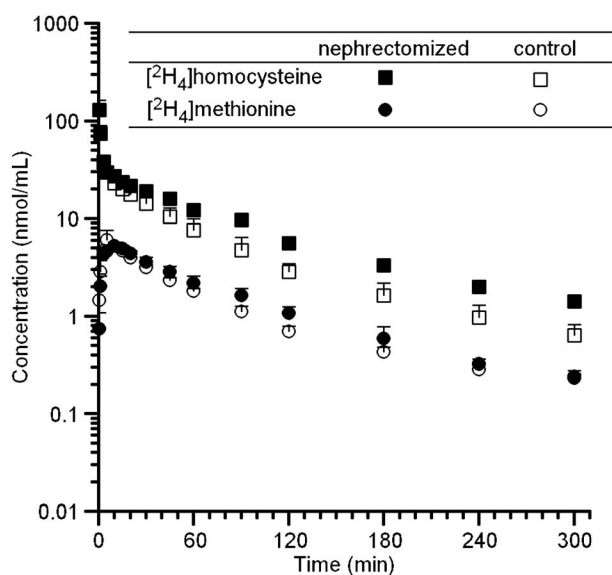


Fig. 9. Plasma Concentration versus Time Profiles for $[^2\text{H}_4]$ homocysteine and $[^2\text{H}_4]$ methionine after a Bolus Intravenous Administration of $[^2\text{H}_4]$ homocysteine ($30 \mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight) to Uninephrectomized and Control Rats

C677T 多型の関連性を検討した。その結果、尿酸産生過剰型の被験者において、血清尿酸濃度や尿酸産生の指標となる 1 日尿酸排泄量は MTHFR C677T 多型間に差異は認められず、MTHFR C677T 多型が TT 型であっても尿酸産生が亢進する可能性はないと考えられた。同様に、尿酸排泄低下型の被験者において尿酸クリアランスは MTHFR C677T 多型間に差異は認められなかった。これらのことから、高尿酸血症と MTHFR C677T 多型には関連性がないことが示唆された。

被験者の血漿ホモシステイン濃度は 14.0 ± 4.5 nmol/ml と基準値内であったものの、同年代 (60 歳代) の健常者に比べて高い傾向を示した。MTHFR C677T 多型が TT 型の被験者では CC 型に比べて有意に血漿ホモシステイン濃度の高値を示したが、被験者の T 変異アレル頻度は健常者に比べてやや高い傾向に留まった。MTHFR C677T 多型以外の血漿ホモシステイン濃度上昇因子を探索したところ、尿酸排泄低下型の被験者が尿酸産生過剰型の被験者に比べて有意に高値を示す (Fig. 10) ことを見出した。しかし、被験者は検体採取時には尿酸低下薬を服用していたことから、尿酸低下薬が血漿ホモシステイン濃度に影響している可能性があった。そこで、尿酸低下薬と血漿ホモシステイン

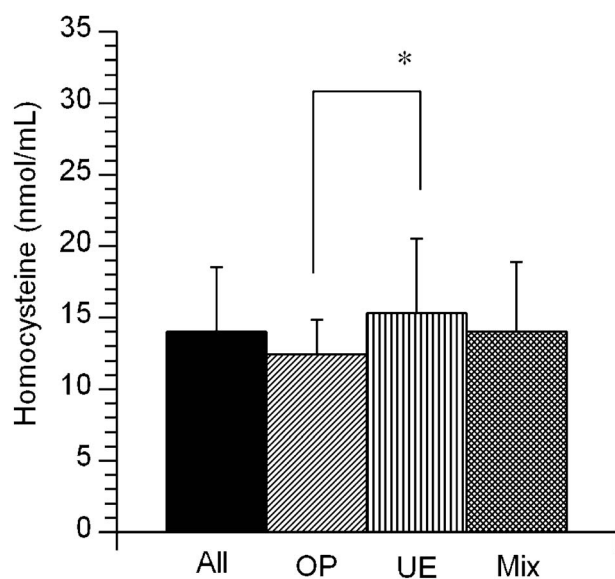


Fig. 10. Comparison of Plasma Total Homocysteine Concentration among Clinical Types of Hyperuricemia

OP: overproduction type. UE: underexcretory. Mix: the combined type.

* $p < 0.05$.

濃度の関連性を検討したところ、アロプリノールは血漿ホモシステイン濃度に影響しないことが明らかになったが、ベンズブロマロンのホモシステインへの影響は明確な結果が得られなかった。ラットにベンズブロマロンを投与し続け、血漿ホモシステインの濃度推移を観察した。その結果、ベンズブロマロンを投与しても血漿ホモシステイン濃度はほぼ一定であった。ヒトでの服用試験ではないので明確なことはいえないが、ベンズブロマロンが血漿ホモシステイン濃度の上昇への影響は少ないことが示唆された。腎機能低下に伴って血漿ホモシステイン濃度が上昇することはよく知られているものの、尿酸排泄低下型の被験者のクレアチニンクリアランスは健常者に比べてわずかに低下した程度であり、この程度の腎機能低下が血漿ホモシステイン濃度上昇に関連性があるとは考え難い。したがって、尿酸排泄低下を招くような微細な腎尿細管機能変化がホモシステインの腎における代謝排泄動態に影響していることが推測された。

10. 血漿ホモシステイン、システイン濃度上昇が血漿アルブミンの還元能に与える影響

ホモシステインとシステインは CH_2 基数が 1 つ違うだけで、物理化学的性質もよく似ている。しかし、血漿ホモシステイン濃度の上昇は心血管疾患の危険因子と認識されているのに対して、血漿システイン濃度の上昇と心血管疾患との関連性は否定的な報告が大勢を占めている。^{76,77)} 血漿ホモシステイン、システイン濃度の上昇には様々な因子が関与しているが、共通因子として知られているのは腎機能低下と加齢である。慢性腎不全患者、特に維持血液透析患者の主要な死因の 1 つは心血管疾患であるが、血漿ホモシステインの上昇がその一因ではないかと疑われている。

ところで、SH 基を有する化合物は生体内の酸化還元緩衝系を担っており、酸化ストレスに対する防御系の 1 つとして機能する。最近、血漿アルブミンが、その構造中に 1 ヶ所存在する遊離 SH 基を利用することで血漿の抗酸化作用を担っていると考えられている。⁷⁸⁾ SH 基が遊離なものを還元型アルブミン、ホモシステインやシステインなどの低分子 SH 基化合物とジスルフィド結合しているものを酸化型アルブミンという。健常者では還元型アルブミンと酸化型アルブミンの存在比は 75 : 25 とほぼ一定に

保たれているが、腎機能低下や加齢によって還元型アルブミンの割合が低下している。⁷⁹⁾ 特に、維持血液透析患者では還元型アルブミンの割合は大きく低下していることから、長期間に渡って酸化ストレスに曝露され、このことが心血管疾患発症につながる可能性が指摘されている。

腎機能低下や加齢に伴って血漿ホモシステインやシステインが上昇すれば血漿酸化型アルブミンが上昇することは容易に推察できるが、両者の関連性を証明した報告はない。そこで、腎機能低下に伴う血漿ホモシステイン及びシステインの上昇が血漿アルブミンの酸化還元状態にどのように影響するか、また、血液透析による血漿ホモシステイン、システインの除去が血漿アルブミンの酸化還元状態にどのように寄与するかを明らかにすることを目的として、共同研究先である杏林大学医学部倫理委員会の承認の下以下の検討を行った。

まず、保存期腎不全患者を対象に血漿ホモシステイン、システイン濃度測定及び血漿アルブミンの酸化還元比測定を行い、それらの関連性を臨床背景を含めて解析した。その結果、システインはクレアチニンクリアランス (Ccr) の低下に伴って血漿濃度が上昇する傾向が認められた。これに対して、ホモシステインは Ccr が 30 ml/min 以上のときにはほぼ基準範囲内なのに対して、Ccr が 30 ml/min を下まわると高値を示す傾向にあった。また、血漿ホモシステイン、システインの上昇に伴って酸化型アルブミンが増加した (Fig. 11)。システインの方が約

25 倍血漿濃度が高いことから、酸化型アルブミンの増加にはホモシステインよりもシステインの方が大きく寄与することが推測された。

次に、維持血液透析患者を対象に透析施行前後で採血し、血漿ホモシステイン及びシステイン濃度をタンパク結合型及び非結合型に分けて測定し、透析前後のそれらの変動から低下機序を検討した。その結果、タンパク結合型と非結合型の総和である総ホモシステイン及び総システインはともに透析前で健康者に比べて著しく高値であった。透析によって総システインはほぼ基準値まで低下したが、総ホモシステインは低下したものの基準値を超えていた。ホモシステイン、システインのタンパク結合型、非結合型のいずれの血漿中濃度も透析によって低下した。タンパク非結合型のホモシステイン、システインが透析によって除かれるのは自明であるが、タンパク結合型も透析によって低下したことから透析時間中にタンパク質に結合していたホモシステインやシステインの一部が解離していると考えられた。除去の指標となる変化率を算出したところ、タンパク結合型、非結合型ともにシステインに比べてホモシステインの変化率は小さく、ホモシステインの方が除去され難い傾向を示した。さらに、透析前では著しく高値を示していた酸化型アルブミンの割合が透析によって低下した。以上のことから、透析によってタンパク非結合型ホモシステイン、システインが低下するとアルブミンと結合していたホモシステイン、システインの解離が進み、結果として還元型ア

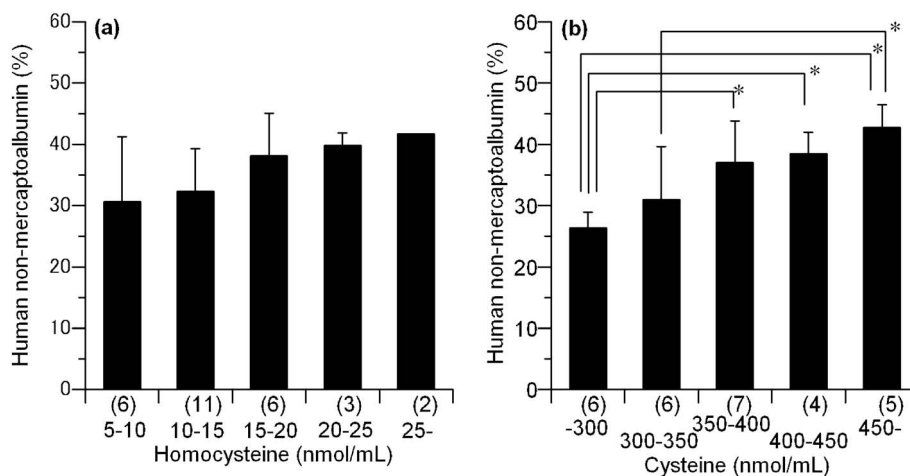


Fig. 11. Effect of (a) Total Homocysteine and (b) Total Cysteine on the Redox Status of Plasma Albumin
* $p < 0.05$, () number.

ルブミンが増加することが示唆された。また、ホモシステインがシステインよりも透析によって除去され難い理由として、システインに比べてホモシステインはタンパク結合能が強く非結合型に解離し難いためと考えられた。

維持透析患者は週3回の透析を続けている。1回の透析によってホモシステイン、システインともに低下しアルブミンの還元能が回復することから、血漿の酸化還元緩衝系の維持といった観点からも透析は重要である。しかし、透析導入後、長期間を経るとタンパク結合型ホモシステインが徐々に蓄積していき、血漿アルブミンの還元能を低下させ酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させる可能性が示唆された。

11. おわりに

ホモシステインは生体内メチル化反応の鍵となる化合物であり、ホモシステインの病態生理的意義として最近特に注目されているのは、染色体のエピジェネティック制御機構の中心をなすDNAメチル化との関連性である。現在、心血管疾患のみならずアルツハイマー病、二分脊椎症などの神経疾患と高ホモシステイン血症との関連性が指摘されていることを考えると、エピジェネティック研究においてホモシステインがどのような役割を担っているかは重要な課題である。

以上、ホモシステインにおける組織障害性に関与すると考えられる一因を示唆するとともに、アミノ酸解析に有用な安定同位体をトレーサーとして用いた方法の開発について述べた。安定同位体トレーサー法の最大の長所は放射線障害に危険性のないことであるが、トレーサーの化学構造の変化についての情報が得られることから代謝産物の構造解析に有効な方法であり、さらに検出に特定の質量数を指定することによって標識体及びその変化物質を同時に別々に追跡することが可能である。現在、臨床では安定同位体で標識した尿素を用いた呼気試験がピロリ菌感染の診断法として非侵襲的で精度の高い検査であることが確認されているのは周知の通りである。ヒトで安定同位体トレーサー法を行うに際して安定同位体による毒性は考える必要はほとんどないことは現在一致した見解で、ヒトにおける精密な代謝の解析に今後大いに利用されるべき方法の1つであると考えられる。

REFERENCES

- 1) McCully K. S., *Am. J. Pathol.*, **56**, 111-128 (1969).
- 2) Townend J., O'Sullivan J., Wilde J. T., *Blood Rev.*, **12**, 23-34 (1998).
- 3) Welch G. N., Loscalzo J., *N. Engl. J. Med.*, **338**, 1042-1050 (1998).
- 4) The Homocysteine Studies Collaboration, *JAMA*, **288**, 2015-2022 (2002).
- 5) Den Heijer M., Lewington S., Clarke R., *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 292-299 (2005).
- 6) Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B., Graham I., *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1149-1155 (1991).
- 7) Selhub J., *Annu. Rev. Nutr.*, **19**, 217-246 (1999).
- 8) Finkelstein J. D., *J. Nutr. Biochem.*, **1**, 228-237 (1990).
- 9) Castro R., Rivera I., Blom H. J., Jakobs C., Tavares de Almeida I., *J. Inherit. Metab. Dis.*, **29**, 3-20 (2006).
- 10) Refsum H., Ueland P. M., Nygard O., Vollset S. E., *Annu. Rev. Med.*, **49**, 31-62 (1998).
- 11) Mansoor M., Ueland P. M., Aarsland A., Svardal A. M., *Metabolism*, **42**, 1481-1485 (1993).
- 12) Mansoor M. A., Bergmark C., Svardal A. M., Lonning P. E., Ueland P. M., *Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 232-240 (1995).
- 13) Chambers J. C., Ueland P. M., Wright M., Dore C. J., Refsum H., Kooner J. S., *Circ. Res.*, **89**, 187-192 (2001).
- 14) Araki A., Sako Y., *J. Chromatogr.*, **422**, 43-52 (1987).
- 15) Imai K., Toyo'oka T., Watanabe Y., *Anal. Biochem.*, **128**, 471-473 (1983).
- 16) Toyo'oka T., Imai K., *J. Chromatogr.*, **282**, 495-500 (1983).
- 17) Toyo'oka T., Imai K., *Anal. Chem.*, **56**, 2461-2464 (1984).
- 18) Humphrey R. E., Potter J. L., *Anal. Chem.*, **37**, 164-165 (1965).
- 19) Krijt J., Vackova M., Kozich V., *Clin. Chem.*, **47**, 1821-1828 (2001).
- 20) Ueland P. M., Refsum H., Stabler S. P., Malinow R., Andersson A., Allen R. H., *Clin. Chem.*, **39**, 1764-1779 (1993).

- 21) Pfeiffer C. M., Huff D. L., Smith J., Miller D. T., Gunter E. W., *Clin. Chem.*, **45**, 1261–1268 (1999).
- 22) Ducros V., Demuth K., Sauvant M., Quillard M., Causse E., Candito M., Read M., Draï J., Garcia I., Gerhardt M., *J. Chromatogr., B*, **781**, 207–226 (2002).
- 23) Shinohara Y., Hasegawa H., Tagoku K., Hashimoto T., *J. Chromatogr., B*, **758**, 283–288 (2001).
- 24) Frosst P., Blom H. J., Milos R., Goyette P., Sheppard C. A., Matthews R. G., Boers G. J. H., den Heijer M., Kluijtmans L. A. J., van den Heuvel L. P., Rozen R., *Nat. Genet.*, **10**, 111–113 (1995).
- 25) Yamada K., Chen Z., Rosen R., Matthews R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 14853–14858 (2001).
- 26) Morita H., Taguchi J., Kurihara H., Kitaoka M., Kaneda H., Kurihara Y., Maemura K., Shindo T., Minamino T., Ohno M., Yamaoki K., Ogasawara K., Aizawa T., Suzuki S., Yazaki Y., *Circulation*, **95**, 2032–2036 (1997).
- 27) Morita H., Kurihara H., Tsubaki S., Sugiyama T., Hamada C., Kurihara Y., Shindo T., Oh-hashì Y., Kitamura K., Yazaki Y., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 1465–1469 (1998).
- 28) Jacques P. F., Bostom A. G., Williams R. R., Ellison R. C., Eckfeldt J. H., Rosenberg I. H., Selhub J., Rozen R., *Circulation*, **93**, 7–9 (1996).
- 29) Hanson N. Q., Aras O., Yang F., Tsai M. Y., *Clin. Chem.*, **47**, 661–666 (2001).
- 30) van der Put N. M. J., Gabreels F., Stevens E. M. B., Smeitink J. A. M., Trijbels F. J. M., Eskes T. K. A. B., van den Heuvel L. P., Blom H. J., *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 1044–1051 (1998).
- 31) Meisel C., Cascorbi I., Gerloff T., Stangl V., Laule M., Muller J. M., Wernecke K. D., Baumann G., Roots I., Stangl K., *Atherosclerosis*, **154**, 651–658 (2001).
- 32) Hyndman M. E., Bridge P. J., Warnica J. W., Fick G., Parsons H. G., *Am. J. Cardiol.*, **86**, 1144–1146 (2000).
- 33) Klerk M., Lievers K. J. A., Kluijtmans L. A. J., Blom H. J., den Heijer M., Schouten E. G., Kok F. J., Verhoef P., *Thromb. Res.*, **110**, 87–91 (2003).
- 34) Kluijtmans L. A. J., Young I. S., Boreham C. A., Murray L., McMaster D., McNulty H., Strain J. J., McPartlin J., Scott J. M., Whitehead A. S., *Blood*, **101**, 2483–2488 (2003).
- 35) Tawakol A., Omland T., Gerhard M., Wu J. T., Creager M. A., *Circulation*, **95**, 1119–1121 (1997).
- 36) Tsai J., Perrella M. A., Yoshizumi M., Hsieh C., Haber E., Schlegel R., Lee M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6369–6373 (1994).
- 37) Ungvari Z., Csiszar A., Edwards J. G., Kaminski P. M., Wolin M. S., Kaley G., Koller A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 418–424 (2003).
- 38) Lawrence de Koning A. B., Werstuck G. H., Zhou J., Austin R. C., *Clin. Biochem.*, **36**, 431–441 (2003).
- 39) Lang D. L., Kredan M. B., Moat S. J., Husain S. A., Powell C. A., Bellamy M. F., Powers H. J., Lewis M. J., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 422–427 (2000).
- 40) Jakubowski H., *FASEB J.*, **13**, 2277–2283 (1999).
- 41) Jakubowski H., Zhang L., Bardeguet A., Aviv A., *Circ. Res.*, **87**, 45–51 (2000).
- 42) Jakubowski H., *J. Nutr.*, **136**, 1741S–1749S (2006).
- 43) Bostom A. G., Jacques P. F., Nadeau M. R., Williams R. R., Ellison R. C., Selhub J., *Atherosclerosis*, **116**, 147–151 (1995).
- 44) van der Griend R., Haas F. J. L., Duran M., Biesma D. H., Meuwissen O. J. A. T., Banga J., *J. Lab. Clin. Med.*, **132**, 67–72 (1998).
- 45) Cattaneo M., Lombardi R., Lecchi A., Zighetti M. L., *Blood*, **93**, 1118–1120 (1999).
- 46) Hasegawa H., Matsukawa T., Shinohara Y., Hashimoto T., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 920–924 (2000).
- 47) Hasegawa H., Matsukawa T., Shinohara Y., Hashimoto T., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 1436–1440 (2002).
- 48) Hasegawa H., Matsukawa T., Shinohara Y., Konno R., Hashimoto T., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **287**, E160–E165 (2003).
- 49) Hasegawa H., Shinohara Y., Akahane K., Hashimoto T., *J. Nutr.*, **135**, 2001–2005 (2005).
- 50) Hasegawa H., Shinohara Y., Tagoku K., Ha-

- shimoto T., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **44**, 21–30 (2001).
- 51) Shinohara Y., Hasegawa H., Tagoku K., Hashimoto T., *Life Sci.*, **70**, 727–734 (2001).
- 52) Kono M., Kodayashi J., Murawaki Y., *Nippon Rinsho*, **62**, Suppl 11, 567–570 (2004).
- 53) Guttormsen A. B., Schneede J., Finskerstrand T., Ueland P. M., Refsum H. M., *J. Nutr.*, **124**, 1934–1941 (1994).
- 54) Ubbink J. B., Vermaak W. J. H., van der Merwe A., Becker P. J., *Clin. Chim. Acta*, **207**, 119–128 (1992).
- 55) Young V. R., Wagner D. A., Burini R., Storch K. J., *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 377–385 (1991).
- 56) Shinohara Y., Hasegawa H., Ogawa K., Tagoku K., Hashimoto T., *Metabolism*, **55**, 899–906 (2006).
- 57) Mckeever M. P., Weir D. G., Molloy A., Scott J. M., *Clin. Sci.*, **81**, 551–556 (1991).
- 58) Sunden S. L. F., Renduchintala M. S., Park E. I., Miklasz S. D., Garrow T. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **345**, 171–174 (1997).
- 59) Hultberg B., Andersson A., Sterner G., *Clin. Nephrol.*, **40**, 230–234 (1993).
- 60) Moustapha A., Naso A., Nahlawi M., Gupta A., Arheart K. L., Jacobsen D. W., Robinson K., Dennis V. W., *Circulation*, **97**, 138–141 (1998).
- 61) Moustapha A., Gupta A., Robinson K., Arheart K., Jacobsen D. W., Schreiber M. J., Dennis V. W., *Kidney Int.*, **55**, 1470–1475 (1999).
- 62) Bostom A. G., Culleton B., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 891–900 (1999).
- 63) Mallamaci F., Zoccali C., Tripepi G., Fermo I., Benedetto F., Cataliotti A., Bellanuova I., Malatino L. S., Soldarini A., *Kidney Int.*, **61**, 609–614 (2002).
- 64) Abdel-Raheem M. M., Hebert B., Potti A., Koka V. K., Danielson B. D., *Thromb. Res.*, **105**, 299–302 (2002).
- 65) House J. D., Brosnan M. E., Brosnan J. T., *Kidney Int.*, **54**, 1601–1607 (1998).
- 66) Bostom A., Brosnan J. T., Hall B., Nadeau M. R., Selhub J., *Atherosclerosis*, **116**, 59–62 (1995).
- 67) House J. D., Brosnan M. E., Brosnan J. T., *Biochem. J.*, **328**, 287–292 (1997).
- 68) Facchini F., Chen Y. D., Hollenbeck C. B., Reaven G. M., *JAMA*, **266**, 3008–3011 (1991).
- 69) Istok R., Kovalancik M., Rovensky J., *J. Rheumatol.*, **26**, 2068–2069 (1999).
- 70) Cheng T., Lai H., Chang H., Luo S., *Clin. Rheumatol.*, **24**, 103–106 (2005).
- 71) Tsutsumi Z., Moriwaki Y., Yamamoto T., Takahashi S., Hada T., Fukuchi M., *J. Rheumatol.*, **29**, 1805–1806 (2002).
- 72) Zuo M., Nishio H., Lee M. J., Maejima K., Mimura S., Sumino K., *J. Hum. Genet.*, **45**, 257–262 (2000).
- 73) Bagley P. J., Selhub J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 13217–13220 (1998).
- 74) Stern L. L., Bagley P. J., Rosenberg I. H., Selhub J., *J. Nutr.*, **130**, 2238–2242 (2000).
- 75) Friso S., Choi S., Girelli D., Mason J. B., Dolnikowski G. G., Bagley P. J., Olivieri O., Jacques P. F., Rosenberg I. H., Corrocher R., Selhub J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 5606–5611 (2002).
- 76) van der Brandhof W. E., Haks K., Schouten E. G., Verhoef P., *Atherosclerosis*, **157**, 403–409 (2001).
- 77) El-Khairy L., Vollset S. E., Refsum H., Ueland P. M., *Clin. Chem.*, **49**, 895–900 (2003).
- 78) Himmelfarb J., McMonagle E., *Kidney Int.*, **60**, 358–363 (2001).
- 79) Era S., Kuwata K., Imai H., Nakamura K., Hayashi T., Sogami M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1247**, 12–16 (1995).