

尿グルカリン酸測定法の改良とその応用

長谷川浩平,^a 清水久実代,^a 森本茂文,^b 八野芳巳,^b 長谷川健次,^b 庄野嘉治,^c
堀内哲也,^c 田伏克惇,^c 榊井友梨奈,^a 山口敬子,^a 藤田芳一^{*,a}

Improvement of Urinary D-Glucaric Acid Assay and Its Application

Kohei HASEGAWA,^a Kumiyo SHIMIDZU,^a Shigehumi MORIMOTO,^b Yoshimi HACHINO,^b
Kenji HASEGAWA,^b Yoshiharu SHONO,^c Tetuya HORIUCHI,^c Katsuyoshi TABUSE,^c
Yurina MASUI,^a Takako YAMAGUCHI,^a and Yoshikazu FUJITA^{*,a}

^aDepartment of Clinical Chemistry, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara,
Takatsuki City 569-1094, Japan, ^bDepartment of Pharmacy, and ^cDepartment of Surgery,
National Hospital Organization Osakaminami Medical Center, 2-1
Kidohigashi-cho, Kawachinagano City 586-8521, Japan

(Received August 2, 2007; Accepted September 19, 2007)

We propose an improved method to measure urinary D-glucaric acid (GA), which might be of value as an indirect index of the activity of cytochrome P450 (CYP). This method was about 20 times more sensitive than existing methods. Beer's law was obeyed in the concentration range 5.5–66 ng ml⁻¹ for GA, with the effective molar absorptivity at 533 nm and the relative standard deviation being $9.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and 0.69% ($n=6$), respectively. In addition, we introduced the correction value {GA/Cr ratio $\times 10$ } of urinary GA by measuring urinary creatinine (Cr) at the same time. Based on the proposed method, the GA and Cr values in spot urines of healthy persons and cancer patients were subsequently measured and the correction values of both groups subjected to comparison. As a result, a statistically significant difference was recognized between the two groups.

Key words—urinary D-glucaric acid; cytochrome P450 activity; cancer patient

緒 言

尿には、タンパク質・核酸代謝物の終末産物や中間代謝物、無機質、ビタミン、ホルモン、酵素などを始め、薬物やその代謝物など種々の物質が様々な割合で含まれており、本来、健康状態の把握あるいは疾病の早期発見・診断、病態の変化や治療効果等をチェックできる豊富な情報を持っている。また、わが国においては、2003年5月より健康増進法が施行されたのを契機としてセルフケア、セルフチェックの重要性が認識されている。さらに、臨床現場においては、ポイント・オブ・ケアテスト (POCT, point of care testing)^{1,2)}あるいはプライマリ・ケア (primary care)³⁾などの面より、尿は無侵

襲で常時大量に得られ、繰り返し検査も可能で、体液中の正常成分の変動や異常成分を鋭敏に、しかも早期に反映するので、尿検査の重要性が近年とみに高まってきている。

チトクローム P450 (CYP) は生体の主要な薬物代謝酵素であり、脂溶性物質をより水溶性の高いものに変換して体外への排出を促進する役目を果たしているが、⁴⁻⁶⁾ CYP は基質特異性がゆるやかで、基質に対応する反応性が極めて多様に富んでいるので、CYP 個々の主要な機能、作用機序についてはまだ未解明な部分が多い。この CYP の活性を測定するために、ヒドロコルチゾール比を用いるなど、多くの大学及び研究機関で研究が進められているが、現時点では肝生検を必要とすることが多く臨床応用しがたい。したがって薬物代謝機能、薬効の判定の指標となる CYP 活性を簡便、正確に測定する日常分析法の開発は大きな意義がある。

一方、D-グルカリン酸 (GA, サッカリン酸) は、

^a大阪薬科大学臨床化学研究室, ^b国立病院機構大阪南医療センター薬剤科, ^c国立病院機構大阪南医療センター外科

*e-mail: fujitay@gly.oups.ac.jp

CYPに誘導されるグルクロン酸代謝系の最終代謝産物であり、このGAの尿中排泄量が、CYP活性を間接的に反映し、その指標になることがHunterら⁷⁾によって示唆されている。さらに、CYP代謝は、ミトコンドリアに依存するアデノシン三リン酸(ATP)を利用し、かつ補酵素系ではフラビンアデニンヌクレオチド(FAD)を必要としているので、尿中GA量が薬物代謝に加え、肝実質量、栄養状態をも反映するので、GA値が肝病態の把握の一助となり得る。しかしながら、濃縮や希釈が起こり成分量にバラツキが生じる随時尿を用いる場合、測定成分の排泄量を正確に測定するためには、生理的変動因子の影響を受けず、濃度の変動がそのまま尿量誤差に反映する尿中クレアチニン(Cr)量を同時に測定し、尿中成分の尿量誤差を補正する必要がある。

尿中GA測定法としては、フェノールフタレイン法⁸⁻¹¹⁾が報告されているが、本法は、1) 検量線

において、GA量を濃度の対数としている、2) 操作時間が長い、3) 前処理操作を行っている、4) 発色したフェノールフタレインが退色し易い、などの欠点を有している。したがって今回まず、フェノールフタレイン法によるGA測定法を改良する目的で検討し、さらに尿中GA量と尿中Cr量を求め、GA量を尿中補正GA値[(尿1ml中のGA値/尿1ml中のCr値)×10]として算出した。ついで、改良したGA測定法を用い、健常者及びがん患者(国立病院機構大阪南医療センターの患者の同意を得、同病院の倫理委員会の承認を受けたもの)の尿中補正GA値を測定し、両群について比較検討した。

なお、フェノールフタレイン法によるGA測定法の原理は次の通りであり、それをFig. 1に示す。GAを酸性条件下で加熱すると、D-グルカロ-1,4-ラクトン(GL, D-glucaro-1,4-lactone)と平衡状態となるが、一方、 β -グルクロニダーゼは基質であ

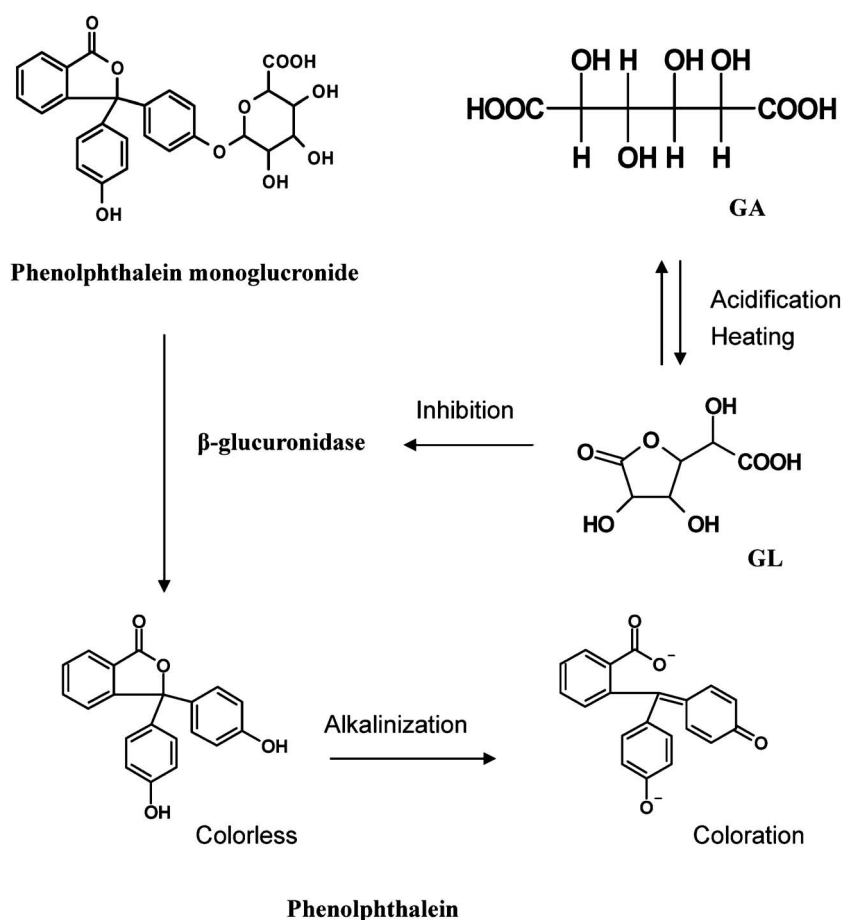


Fig. 1. Principle of GA Assay

るフェノールフタレインモノグルクロナイドと反応して、フェノールフタレインを生成する。GLは β -グルクロニダーゼの阻害剤となる¹²⁾ため、基質からのフェノールフタレインの生成を濃度依存的に抑制し、その結果生じる吸光度差を求める。すなわち、GAの脱水縮合物であるGLが酵素の β -グルクロニダーゼを阻害するが、この酵素は基質のフェノールフタレインモノグルクロナイドを測定物質であるフェノールフタレインに加水分解するので、GL量すなわちGA量が測定できる。

実 験

1. 試薬及び装置 GA溶液：Sigma製サッカリン酸カリウム (Sigma社製) を水で溶解して0.5 mg/mlとし、冷暗所に保存した。使用に際しては、本溶液を適宜水で希釈して用いた。

フェノールフタレインモノグルクロナイド液：フェノールフタレインモノグルクロナイド (Sigma社製) を水で溶解して1.0 mmol/l水溶液として用いた。

β -グルクロニダーゼ液： β -グルクロニダーゼ (Sigma社製) を、界面活性剤の1.0%ポリエテレングリコールモノ-*p*-オクチルフェニルエーテル (Triton X-100) 液へ溶解し、水を加えて125 U/mlとして用いた。

界面活性剤溶液：ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及び Triton X-100 のそれぞれ0.5 gを水で溶解し、100 ml水溶液として用いた。

酸性緩衝液：0.2 mol/l酢酸溶液及び0.2 mol/l酢酸ナトリウム溶液をpHメーターで測定しながら混合し、pH 3.8の緩衝液として用いた。

塩基性緩衝液：1.5 mol/lグリシン溶液及び1.5 mol/l水酸化ナトリウム溶液をpHメーターで測定しながら混合し、最終液性pH 10.3として用いた。

なおその他の試薬はいずれも試薬特級品を精製せずそのまま用いた。また、実験に用いた水はすべて日本ミリポア製純水製造装置 (Milli-Q Academic) による精製水を用いた。

吸収スペクトル及び吸光度の測定には島津 UV-160A型分光光度計で層長10 mmの石英製セルを用いた。

2. GA標準定量操作 改良したGA測定法は次の通りである。すなわち、共栓試験管にGAを

含む溶液1.0 ml及び0.2 mol/l酢酸塩緩衝液 (pH 3.8) 7.0 mlを加え、120°C 20分加温反応し、水で冷却後、その1.0 mlを試験管に精取し、基質の1.0 mmol/lフェノールフタレインモノグルクロナイド溶液1.0 mlを加えよく混合したのち、37°C 10分間静置する。次に本溶液に酵素125 U/ml β -グルクロニダーゼ液2.0 mlを加え、さらに37°C 30分間反応させたのち、1.5 mol/lグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10.3) 5.0 ml及び界面活性剤液1.0 mlを加えて得た本溶液の吸光度を、同様にして得られた試薬ブランク溶液とともに水を対照に553 nmで測定し、両溶液の吸光度差 (ΔA) を求める。

3. 尿中GA定量操作 尿中GA測定に際しては、健常者及び患者の尿を前処理せず、正確に10倍希釈したのち、2項のGA標準定量操作に従って測定した。また、測定に際しては、標準添加法を用いた。

実 験 結 果

1. 加熱温度と時間の検討 GAからGLへの変換に際しては加温反応が必要となるので、その加温温度と加温時間について検討した。その結果、従来法での加温操作は、沸騰水浴中で45分間行っていたが、アルミブロック恒温槽中120°C 20分間加温反応するとき、反応時間の短縮と同時に、 ΔA 値の大きさ及び ΔA の安定性において最良の結果が得ることができた。

2. 液性の影響 本呈色反応時におけるpHの影響と用いる緩衝液の種類と濃度について検討した。その結果、フェノールフタレインが発色する液性に緩衝能を有するホウ砂-水酸化ナトリウム緩衝液、炭酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液のうち、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を高濃度 (1.5 mol/l) に用い、最終液性をpH 10.1-10.4に調整するとき、 ΔA 値はほぼ一定であった。

3. 界面活性剤の影響 フェノールフタレインモノグルクロナイドより生成するフェノールフタレインは、最終的に測定する液性域ではやや不安定で退色し易く、測定値にバラツキが生じ易いので、呈色の安定性を期待して界面活性剤の添加について検討した。界面活性剤としては、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化セチルピリジニウムの

ような陽イオン性, SDS のような陰イオン性, ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20), Triton X-100 のような非イオン性, あるいは, これらの混合液などを比較検討した. その結果, SDS 単独使用の際には, 吸光度は高くなるが安定性において難点があるのに対し, SDS と Triton X-100 を併用するとき, 吸光度は若干低くなるものの, 室温 30 分までの測定値の安定性が優れていた. したがって, 今回, SDS と Triton X-100 の等量混合物の 1.0% 水溶液とした界面活性剤を全量 10 ml に対し 1.0 ml 加え, よく混和した直後の ΔA を測定することにした.

4. 酵素量の検討 酵素の β -グルクロニダーゼ濃度としては, 文献の記載値に準拠¹¹⁾して一定 (250U) にし, 反応液量が全量 10 ml になるように, 125 U/ml 酵素液を 2.0 ml 加えることとした.

5. 酵素添加後の反応時間の検討 酵素添加後の反応時間について検討したところ, 25-35 分において, ΔA 値は, ほぼ一定であったので, 酵素反応の反応時間を 37°C で 30 分に設定した.

6. 吸収スペクトル 設定した基礎的定量条件に従い, 最終溶液の吸収スペクトルを測定した. その結果, Fig. 2 にみられるように, 極大波長は 553 nm 付近に認められ, GA 量に比例してその吸光度が減少することを認めた.

7. 検量線の作成と改良法の評価 標準定量操作法に従って GA の検量線を作成すると, GA の最終濃度 5.3-66 ng/ml の範囲において, $r=0.993$ の良好な直線が得られた. GA の見掛けのモル吸光係数 (ϵ) は, $\epsilon=9.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり, また, 39 ng/ml における相対標準偏差は $\text{RSD} = 0.69\%$ ($n=6$) を示した. 本 GA 測定法は, 従来報告されている GA 測定法⁸⁻¹¹⁾に比べ, 1) 20 倍以上の感度の上昇, 2) 精度の向上, 3) 操作時間の短縮, 4) 前処理操作が不要, 5) 発色したフェノールフタレインの安定性の増大, などの面で著しく改善された. なお, 感度が飛躍的に増大した原因については今後詳細に検討する余地がある.

8. 共存物質の影響 本操作法における共存物質の影響を検討した. GA に対し 1000 倍量のナトリウムイオン, カリウムイオン, カルシウムイオン, アンモニウムイオン, 亜鉛 (II) イオン, 鉄 (III) イオン, 硝酸イオン, 塩化物イオン, 硫酸イ

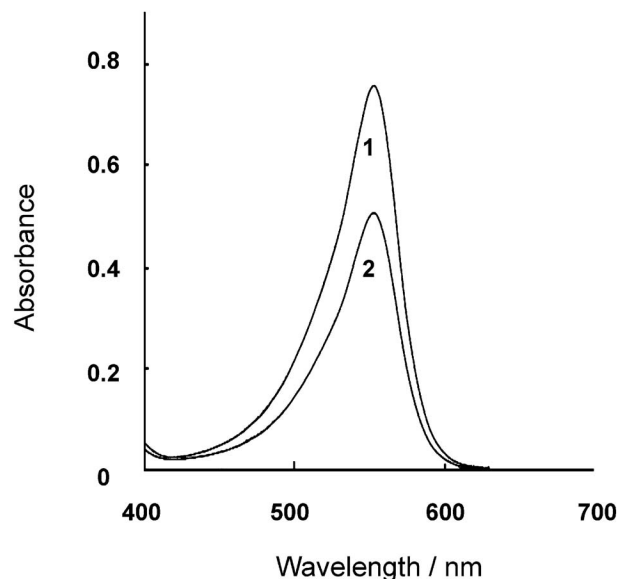


Fig. 2. Absorption Spectra of Sample (2) and Blank (1) Solutions

Phenolphthalein monoglucuronide: 1.0×10^{-4} M, β -glucuronidase: 25.0 U/ml, surfactant: 0.1%, pH 10.3, reference: water. GA concentrations (ng/ml): Curve 1 (0), Curve 2 (53 ng/ml).

オン, リン酸イオン, シュウ酸イオン, グルコース, グリシン, 尿素, 尿酸などの共存は全く影響しなかった. 一方, 尿成分のクレアチニン, タンパク質は 1000 倍量では正の誤差を与えるが, 実試料を測定する場合においては, 全く共存の影響はないと考えられる.

9. 尿中 GA の測定 尿中 GA 定量操作に従い, ヒト尿を試料として尿中 GA を測定した. 試料としては, 健常者 19 検体, がん患者 9 検体を用い, この 2 群に分け比較検討をした. 臨床現場においては, 種々の薬物やその代謝物等を測定する場合, 性, 年齢, 生活習慣あるいは疾患など, 様々な要因を考慮して, 測定対象群をより細分化することが必要であるが, 改良法の実用分析上への有用性, 利便性の検討並びに試料数の少なさを考慮し, 本実験においては, 健常者群, がん患者群の 2 群のみとした. 全検体での GA の回収率の平均値は 106% であった.

10. 尿中 Cr 測定 測定した GA 値は随時尿を用いているので, 測定した GA 値を補正する目的で, 尿中 Cr を測定した. 尿中の Cr 測定には, 和光純薬製の L・M タイプワコー (CRE L・M) を用いた. なお, クレアチニン測定に用いた尿試料は, 健常者では 10 倍希釈, がん患者では 2 倍希釈

し用いた。

11. 補正 GA 値の算出と 2 群の比較 10 項で測定した Cr 量より、9 項の GA 量を補正した。補正 GA 値としては、両者の尿中での含有量を考慮して、尿 1 ml 中における GA 値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を尿 1 ml 中での Cr 値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) で割り、10 を掛けた値 [(尿 1 ml 中の GA 値/尿 1 ml 中の Cr 値) $\times 10$] として求めた。さらにその GA 補正値をがん患者群、健常者群の 2 群に分け比較した。GA 補正値の結果を平均値及び標準偏差 (SD) とともに Table 1 及び Fig. 3 に示す。

12. 有意差検定と補正 GA 値の評価

12-1. F 検定及び t 検定 2 群での有意差の有無を検討する目的で F 検定及び t 検定を行った。t 検定を行う前に健常者群の値とがん患者群の値の分散が等しいか否かの検定、すなわち F 検定を行った。その結果、各群の自由度を 8 及び 18、危険率 5%とした場合の F (8, 18, 0.025) に対する観測された F_0 の値が小さいので、健常者群の値とがん患者群の値のバラツキは等しい、つまり等分散であると仮説される。次に、健常者群の値とがん患者群の値

の平均が相違するか否かの検討、すなわち t 検定を行った結果、自由度を 26、危険率を 1%とした場合の t 境界値両側: t (26, 0.01) に対する観測された値 (t_0) が大きいので 2 群間には有意差があることが認められた。

12-2. マン・ホイットニーの U 検定 もう 1 つの有意差検定として、マン・ホイットニー検定を行った。マン・ホイットニーの U 検定は次のように算出する。まず、健常者及びがん患者両群の全数値を小さいものから順に並べ、通し番号 (順位) を付ける。このとき、同じ値のものがあれば各順位の平均をその値の順位とする。ついで、健常者、がん患者の順位の和をそれぞれ R_1, R_2 として計算する。この R_1, R_2 を用い下記に示すように U_1, U_2 を求めその小さいほうを統計量 U とする。

上記に従い検定を行った結果、各群の順位の和を R_1, R_2 とすると $R_1=227.5, R_2=178.5$ となるため、健常者群を A、がん患者群を B とすると、 $U_1=133.5, U_2=37.5$ となる。 U_1 と U_2 のうち小さいほうが U となるため、これが統計量 $U=37.5$ となる。各群の人数が 9 人及び 19 人、危険率 2%とした場合のマン・ホイットニー検定の値: U (9, 19, 0.02) は 38 のため、健常者群の値とがん患者群の値の間には危険率 2%で有意差が認められる結果を得た。

12-3. 補正 GA 値の評価 測定検体数が少なく正確に議論することができないが、12-1 項及び

Table 1. Comparison of GA* Values in Two Groups

	Cancer patients	Healthy persons
	0.356	0.116
	0.210	0.203
	0.462	0.190
	0.361	0.133
	0.179	0.210
	0.298	0.252
	0.217	0.145
	0.166	0.114
	0.265	0.152
		0.204
		0.154
		0.100
		0.218
		0.241
		0.253
		0.334
		0.155
		0.197
		0.292
Mean	0.279	0.193
S.D.	0.099	0.063

* {(GA ($\mu\text{g}/\text{urine 1 ml}$)/Cr ($\mu\text{g}/\text{urine 1 ml}$)) $\times 10$.

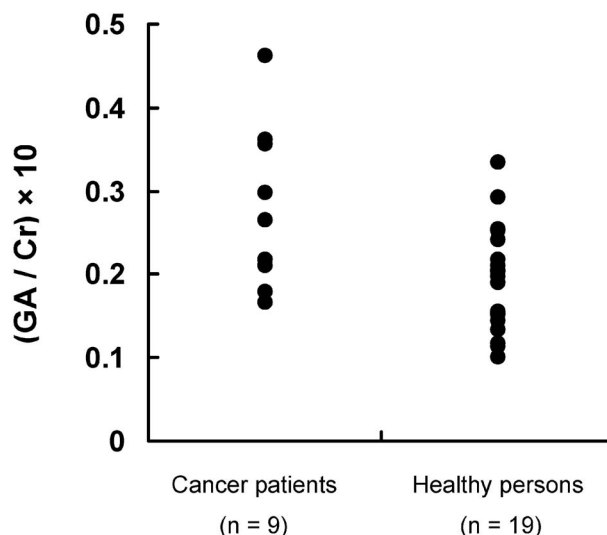


Fig. 3. Comparison of GA Values in Two Groups

12-2 項の有意差検定から、がん患者群は、健常者群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。すなわち、がん患者群は相対的に肝臓における CYP 活性が高くなっていることが推定された。

考 察

CYP は、肝臓での脂質代謝や薬物代謝など、特に薬物代謝に関して大きな役割を果たしており、代謝部位における相互作用のうち 9 割以上がこの CYP を介したものと考えられている。したがって、この CYP 活性を簡便、正確に測定することは临床上、大変重要である。本研究では、CYP 活性の指標となり得る尿中 GA 測定法の改良を行った。改良 GA 測定法は、迅速、高感度 ($\epsilon=9.1 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)、高精度 (RSD=0.69%)、などの特長を有し、尿中 GA を簡便、迅速かつ正確に測定することができた。さらに GA と同時に測定した Cr 値で補正することにより、健常者群とがん患者群において、統計的有意さを認めることができた。しかしながら、測定検体数も少なく正確な議論ができないため、今後さらに測定数を増やし、より精査することが必要であると考えられる。

抗がん剤使用法は、最大耐量で通常の治療が行われるが、抗がん剤の長期投与においては薬物の耐性が大きな問題となってくる。適切な薬物投与量を設定するためには、患者毎に薬物治療モニタリング (TDM) を行いながら投与することが必要になるが、TDM の基礎となる薬物動態パラメータは、限られた例数、限られた疾患の患者を対象として得られているに過ぎず、至適濃度の設定は経験的で、血中濃度と治療効果と副作用発現との関係はエビデンスに

乏しいのが現状である。尿中 GA 値の正確な測定は、無侵襲で、肝臓での薬物代謝能を迅速かつ簡便に評価できると考えられ、今後、血中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) などに基づく薬剤投与計画の一助を担うツールになる可能性が十分示唆される。

REFERENCES

- 1) Fleisher M., *Clin. Biochem.*, **26**, 6-8 (1993).
- 2) Santrach P., Burritt M., *Clin. Proc.*, **70**, 493-494 (1995).
- 3) Marshall M., *BMJ*, **328**, 233 (2004).
- 4) Sogai M., *Saishiniryō*, **45**, 1794-1797 (1990).
- 5) Horai Y., *Nipponrinsho*, **46**, 1097-1105 (1988).
- 6) Shimada H., *Kagaku To Seibutu*, **36**, 465-469 (1990).
- 7) Hunter J., Maxwell J.D., Stewart D. A., Williams R., *Biochem. Pharm.*, **22**, 743-747 (1973).
- 8) Colomni A., Maroni M., Antonini C., Casiana T., Gambini A., Foá V., *Clin. Chim. Acta*, **128**, 337-347 (1983).
- 9) Sandle L. N., Braganza J. M., *Clin. Chim. Acta*, **162**, 245-256 (1987).
- 10) Mocarrelli P., Brambilla P., Colombo L., Marochehi A., Crespi C., Tramacere P., Mondonico A., *Clin. Chem.*, **34**, 2283-2290 (1988).
- 11) Endo R., Soda N., Yamane T., Takahashi M., Chiba R., Shibayama A., Ishizuka A., Hanagami H., *Igakukennsa*, **40**, 1545-1551 (1991).
- 12) Levvy G. A., *Biochem. J.*, **52**, 464-472 (1952).