

大阪市立大学生活科学部紀要・第39巻(1991)

## Duchenne型筋ジストロフィー児の尿中酸可溶性ペプチド (ペプチド態ロイシン)の検討

- 体蛋白質代謝指標としての有用性 -

平野久美子<sup>1</sup>, 田中和子<sup>1</sup>, 板垣泰子<sup>2</sup>

### Urinary Excretion of Acid Soluble Peptides in Children with Muscular Dystrophy of the Duchenne Type

KUMIKO HIRANO, KAZUKO TANAKA and YASUKO ITAGAKI

#### はじめに

成長不全の場合や経管、経腸栄養を行っている時、ステロイドホルモン投与後など临床上、患児の蛋白質代謝状態を把握する必要がある場合がしばしば生ずる。しかし体蛋白質の合成、分解の状態を量的に正確に把握することはかならずしも容易ではない。

この目的に対しては従来、窒素平衡試験が用いられてきた。この方法は大変な労力を要する上に、あくまでバランス試験であり、体蛋白質の合成量と分解量の差としてしか把握できない。そこで蛋白質代謝状態を把握するために、より適切な指標が望まれているところである。

最近、野口ら<sup>1,2)</sup>は尿へ排泄される酸可溶性ペプチド値(以下ASP)が、体蛋白質代謝のよい指標になる可能性があることを実験データから証明し、これを全身の蛋白質代謝状態の把握の必要性に応えうる指標として新しく提案している。この方法は尿を酸性にして除蛋白し、酸可溶性画分を分離した後、この画分のペプチド態アミノ酸組成を分析し、このうちのロイシンとバリンの含量を定量してASPの代表値とするものである。野口らは、これをASP法と呼んでいる。

本研究ではこのASP法の有用性を調べる目的で、筋蛋白の分解が異常に亢進していることが病因<sup>3)</sup>とされているDuchenne型筋ジストロフィー児(以下筋ジス)を対象として尿中ASPを測定した。

ところで今日、蛋白質代謝状態を把握する簡便な方法として、広く用いられているのは3-メチルヒスチジン法<sup>4)</sup>である。尿中3-メチルヒスチジン(以下3MH)の排泄量が、筋蛋白分解量を反映するとして尿中3MH量の測定を通して、Duchenne型筋ジス<sup>5)</sup>をはじめ腫瘍や感染<sup>6)</sup>、低栄養<sup>7)</sup>、飢餓<sup>8)</sup>、外傷<sup>9)</sup>、発熱等の窒素損失と関連のある疾患における筋蛋白分解に関して種々の報告がなされている。ただ尿中3MHには内因性のものと食事性のものとが含まれているので、食事性3MHを除くために、72時間以上の食事制限(肉、魚食品摂取禁止)が必要とされている<sup>10)</sup>。

Jan Sjolín<sup>11)</sup>は尿中1-メチルヒスチジン(以下1MH)排泄量と肉、魚摂取量が相関することを明らかにし、尿中1MHは肉、魚摂取状況の判定に役立つと述べている。

われわれも先に、長時間に亘る厳格な食事制限ができない場合、3MHと同時に測定した1MH値が基礎値未満であれば、その時の3MHは筋蛋白分解量の目安として用いることが可能であることを報告した<sup>5)</sup>。そこで今回、3MHおよび1MHも測定し、ASPとこれらアミノ酸との関連についても検討した。

さらに、筋ジスに対する治療の一つとして試みられているプロテアーゼ阻害剤のBestatin投与が、ASPにおよぼす影響についても検討した。

Bestatinは、梅沢らによりStreptomyces olivoreticuliの培養濾液中に発見された低毒性、低分子量のペプチドで、哺乳動物の細胞表面に存在するアミノペプチダーゼBおよびロイシニアミノペプチダーゼの活性を拮抗阻害する。その化学式はC<sub>20</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、構造式は3-(R)amino-2-(5)-hydroxy-4-phenylbutan-1-ol-(s)leucineで無臭

\* 大阪市立大学生活科学部発達保健

\* 1 大阪市立大生活科学部児童学科平成元年卒

\* 2 国立療養所宇多野病院小児科

の白色結晶性粉末で苦味を呈する物質である<sup>12)</sup>。

### 実験方法

#### 1) 対象および採尿

対象は国立療養所宇多野病院に通院しているDuchenne型筋ジストロフィー(以下筋ジス)18名(4~13歳)および対照として大阪市立小学校3年生(8~9歳)の健常児46名(男23名、女23名)である。

筋ジス児は来院診察時に採尿した尿を、健常児は早朝第一尿を用いた。尚、筋ジス児の一部に対しては採尿前日の夕食から当日の朝食後採尿時まで、肉、魚食品の摂取禁止を指示した。採尿後、冷凍保存し測定直前に解凍して用いた。

さらに筋ジス児のうち13名(障害度1)に、double blinde法で7名にはBestatinを、6名にはplaceboをそれぞれ1日300mg経口投与した。投与期間は9カ月間である。

#### 2) 尿中総クレアチニンの測定<sup>5)</sup>

尿を加水分解した後、総クレアチニン量をFolinの方法で測定し、尿1ml中のmgを算出した。

#### 3) 尿中1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンの分離および測定<sup>5)</sup>

Dowex50w×4(200~400mesh)2.6ルチジン型樹脂を用いて尿中イミダゾールアミノ酸分画を分離後、さらにペーパークロマトグラフィーを行い1MH、3MHを分離した。次いでこれらに相当するニンヒドリン発色斑をそれぞれメタノールで抽出した。各液の吸光度を比色計で測定した後、尿1ml中のμgを算出した。

#### 4) 尿中酸可溶性ペプチド値の分離および測定

尿に等量の4%ズルホサリチル酸を加え、よく混和後ワットマンNO.44濾紙で濾過し、その濾液をアンバライトCG120H型樹脂のカラムに通して脱塩除蛋白した。得られた試料中の遊離ロイシンと、また濾液を加水分解後、同様に樹脂処理して得られた試料中の総ロイシンを、一次元ペーパークロマトグラフィー(展開溶媒;ブタノール・アセトン・酢酸・水:7:7:2:4)を用いて分離後、1MHや3MHと同様の方法で定量した。

ASP値は総ロイシン量から遊離ロイシン量を差し引いて求め、尿1ml中のμgを算出した。

1MH,3MH,ASPの各測定値は、部分尿のため総クレアチニンあたりで表示した。

筋ジス児では健常児に比べてクレアチニンの排泄量が減少し、逆に健常児ではほとんど排泄されないクレアチンが増加し、その和は健常児との間に有意の差がないと言われている<sup>13)</sup>。そこで本研究では各測定値は、総クレ

アチニン1mgあたりのμg(μg/Crmg)で表示することにした。以下それぞれ1MH/Cr,3MH/Cr,ASP/Crと記す。また1MH/Crの基礎排泄値はJan Sjol-inらが算出した $7.4 \times 10^{-3}$ (1MH/Cr mol比)を換算して $11.0 \mu\text{g}/\text{Crmg}$ とした。1MH/Cr値が基礎値以上時の3MH/Cr値は、筋ジス児群と健常児群との比較や、ASP/Crとの関連について検討する際にはデータから除いた。

### 実験結果

#### 1) 尿中3-メチルヒスチジン

1MH/Crが基礎排泄値未満の場合の3MH/Crは表1と図1に示すように、筋ジス群が $43.9 \pm 14.0 \mu\text{g}/\text{Crmg}$ で、健常児群の $18.0 \pm 5.4 \mu\text{g}/\text{Crmg}$ に比べて5%の危険率で有意に高値を示した。尚、筋ジス群、健常群とも1MH/Crが基礎値未満時の3MH/Crよりも以上時の3MH/Crの方が高値であった。

表1 尿中1MH/Cr別尿中3MH/Crの平均値

1MH/Cr	筋ジス群		健常児群	
	人数	3MH/Cr	人数	3MH/Cr
基礎値未満 $11.0 \mu\text{g}/\text{Crmg}$	4	$43.9 \pm 14.0$	6	$18.0 \pm 5.4$
基礎値以上 $11.0 \mu\text{g}/\text{Crmg}$	13	$57.4 \pm 15.0$	39	$28.9 \pm 12.4$

(μg/mg)

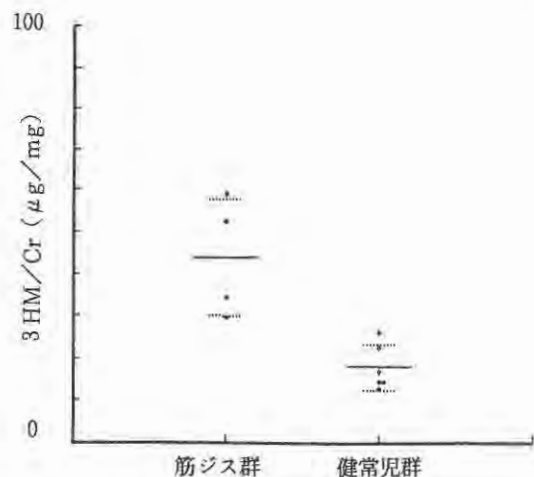


図1 筋ジス児群と健常児群の尿中3MH/Crの頻度分布

2) 尿中酸可溶性ペプチド

尿中ASP/Crと1MH/Crの関係を表2に示した。1MH/Crが基礎値未満時のASP/Crと、基礎値以上時のASP/Crとの間に差は見られなかった。

筋ジス群のASP/Crは $30.3 \pm 21.8 \mu\text{g}/\text{Crmg}$ で、健常児群の $11.8 \pm 4.7$ に比し2.5倍と有意に高値であった。図2は、両群の頻度分布図を示したものである。筋ジス群では個人のばらつきが大きかった。最高値は健常児群の平均値の8.4倍であった。

筋ジス群の中でも、7歳以下の年少群に高値を示す者が多く、その平均値は、 $38.1 \pm 24.3 \mu\text{g}/\text{Crmg}$ で、8歳以上の年長群の $17.2 \pm 6.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ に比べて5%の危険率で有意に高値であった。(表3)

表2 尿中1MH/Cr別尿中ASP/Crの平均値

1MH/Cr	筋ジス群		健常児群	
	人数	ASP/Cr	人数	ASP/Cr
基礎値未満 $11.0 \mu\text{g}/\text{Crmg}$	4	$34.7 \pm 20.0$	6	$10.0 \pm 6.6$
基礎値以上 $11.0 \mu\text{g}/\text{Crmg}$	13	$29.7 \pm 23.4$	39	$12.1 \pm 4.4$
全員	17	$30.0 \pm 21.8$	45	$11.8 \pm 4.7$

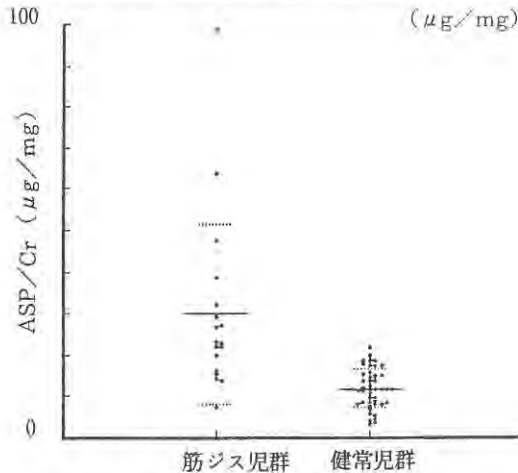


図2 筋ジス児群と健常児群の尿中ASP/Crの頻度分布

表3 筋ジス児群の年齢別尿中ASP/Cr

年齢	7歳以下	8歳以上
ASP/Cr	$38.1 \pm 24.3$	$17.2 \pm 6.6$

( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

3) 尿中酸可溶性ペプチドと尿中3-メチルヒスチジンの関連

図3に示した通り、ASP/Crと3MH/Crとの間に有意の相関が見られた。相関係数は  $r=0.842$  であった。

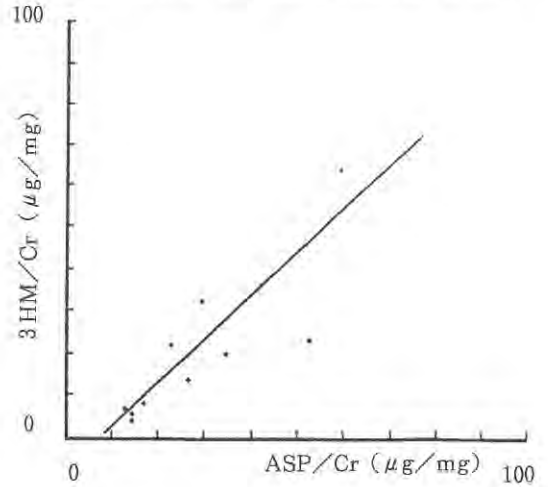


図3 尿中3MH/CrとASP/Crとの相関

4) Duchenne型筋ジストロフィー児の尿中酸可溶性ペプチドにおよぼすBestatin投与の影響

Bestatinを筋ジス児に経口投与し、ASP/Crにおよぼす影響をPlacebo群と比較した。図4に示すようにBestatin投与群は投与後、10倍以上の異常高値を示す者が7名中4名に見られた。一方、Placebo投与群では投与前と投与後で変化は見られなかった。

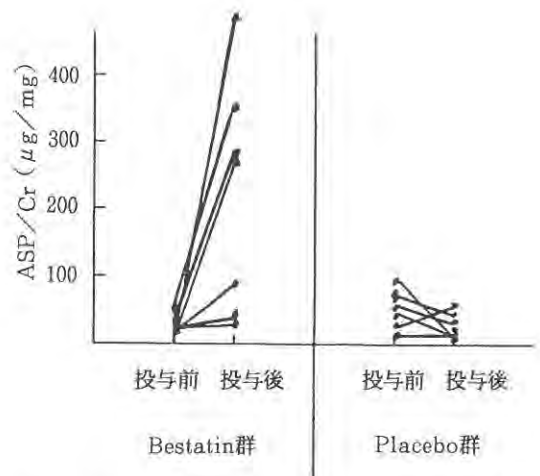


図4 尿中ASP/CrにおよぼすBestatin投与の影響

## 考 察

野口らは尿中酸可溶性ペプチド値(代表値としてペプチド態バリン+ロイシン)が、体蛋白分解を反映することをラットを用いた研究で明らかにした<sup>15)</sup>。

本研究では、その病因が筋膜のジストロフィン欠損によって引き起こされる筋蛋白分解の異常亢進であるといわれている<sup>16) 17)</sup> Duchenn 型筋ジストロフィー-児の、尿中酸可溶性ペプチド値(本研究ではペプチド態ロイシンASP/Cr)を測定し健常児のそれと比較した。同時に、筋蛋白分解の指標<sup>3)</sup>として用いられている尿中3-メチルヒスチジン (3MH/Cr)も測定した。その結果、ASP/Crは筋ジス群が 健常児群の約2.5倍の高値を示した。3MH/Crも筋ジス群の方が有意に高かった。

3MH/Crは筋ジスでは有意に高値を示すという従来<sup>3)</sup>の報告と一致した<sup>18)</sup>。また、ASP/Crと3MH/Crの間に有意の相関が得られた。これらの結果は、ASP/Crは野口らの<sup>11) 15)</sup> 報告と同様に、体蛋白分解を反映することを示唆していると思われる。

尿中3ME/Crは肉、魚由来の食事性3MH 摂取の影響を受ける。内因性の3MHと食事性の3MH を判別する指標として 1MH/Crが役に立つことが報告されている。Jan Sjölnら<sup>10)</sup>は1MH/Crの基礎排泄値は $7.4 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ ( $11.0 \mu\text{g/Cr mg}$ )であること、また基礎排泄値以上の尿は分析試料から除くべきであることを指示している。本研究でも健常児群で、1MH/Crが基礎値以上時の3MH/Crは、基礎値未満時の3MH/Crよりも有意に高値であった。3MH/Crは肉、魚などの摂取食事の影響を受けることを確認し、1MH/Crが基礎値以上時の3MH/Crは、分析データから除いた。これに対してASP/Crは、1MH/Crが基礎値以上の時と、未満の時とで差は見られず、摂取食事の影響を受けないように思われた。

野口ら<sup>15)</sup>も食事蛋白質のペプチドが、尿へ排泄される可能性は小さいと述べている。したがって、ASP/Crは体蛋白代謝指標として、食事制限の条件なしに用いることができ、3MH/Crよりも、さらに簡便な体蛋白代謝指標として、利用価値があるのではないかとと思われる。

ただし、野口らは、ラットを用いた研究で、ASP/Crは年齢の影響を受けると述べている<sup>20)</sup>。ASP/Crを体蛋白代謝の指標に用いる時は、対照群の年齢を比較対象群の年齢と一致させることが必要であろう。

尿中ASP/CrにおよぼすBestatin投与の影響を調べた結果は、Bestatin投与群では、投与後のASP/Crが投与前のおよそ10倍の、異常高値を示す者が57%にみら

れた。Bestatinの構成成分としてロイシンが含まれているので、この異常高値は、投与したBestatinの多くが未変化のまま排泄されたのではないと思われる。Bestatinを成人男子に経口投与した場合、24時間尿中に投与量の67-73%が未変化体で検出されるということである<sup>12)</sup>。

異常高値を示さなかった例は、投与したBestatinが、すでに排泄されていて、分析に用いた尿には残っていないのではないかと思われる。

一方、Placebo投与群では投与前と後で、大きな変化が見られたものは一例もなかった。

Bestatinの投与効果の判定指標としては、ASP/Crは適当ではないことがわかった。

尚、本研究では、尿中酸可溶性ペプチド値の代表値としてペプチド態ロイシンのみを測定したが、その後の研究で、野口らの報告のごとく、ペプチド態ロイシンとバリンの含量を代表値とする方が、より適切であることを認めている。

## 要 約

野口らが提案している尿中酸可溶性ペプチドが、体蛋白代謝の指標として有用かどうかを調べるために、筋蛋白の分解亢進が病因とされているDuchenne型筋ジストロフィー-児を対象として尿中ASP/Cr, 3MH/Cr, 1MH/Crを測定した。その結果は以下の通りである。

- 1) D型筋ジストロフィー-群の尿中ASP/Crは健常児群のASP/Crに比べて有意に高値を示した。
- 2) ASP/Crと筋蛋白の分解の指標になりうると考えられている3MH/Crとの間に、有意の相関がみられた。
- 3) 以上の結果は、ASP/Crは体蛋白分解を反映することを示唆するものと思われた。
- 4) 肉、魚摂取状況の指標とされる尿中1MH/Crが、基礎値未満群のASP/Crと、以上群のASP/Crとの間に差はみられなかった。ASP/Crは摂取食事の影響を受けないように思われた。従って、ASP/Crは測定に際し食事制限の必要がないので、食事制限が必要な3MH/Crよりもさらに簡便な体蛋白代謝指標として有用であると思われた。
- 5) D型筋ジストロフィー-児にBestatinを経口投与し、ASP/Crにおよぼす影響を調べた。投与後10倍以上の異常高値を示す者が半数以上に見られた。Bestatinの構成成分のロイシンが排泄されたものと思われる。Bestatin投与の効果判定には、ASP/Crは役に立たなかった。

本論文の一部は、第32回日本小児精神神経学会において発表した。

## 文 献

- 1) 野口 忠:蛋白質代謝の指標としての尿中酸可溶性ペプチド・非侵襲的な体内蛋白質代謝評価の新しい指標をさぐる, 医学のあゆみ, 158 :418, 1990
- 2) Noguti, T., Nam, T. j., Kato, H. and Naito, H.: Further studies on the nutritional factors affecting the urinary excretion of acid-soluble peptides in rats, *British journal Nutrition* 60: 321-337, 1988
- 3) 杉田秀夫: 進行性筋ジストロフィー、杉田秀夫、山村雄一監修, 先天性代謝病・免疫病ハンドブック<代謝>19巻 10月臨時増刊号 中山書店、東京: 798-801, 1982
- 4) 真島吉也:蛋白質代謝栄養の指標としての3-メチルヒスチジン, 医学のあゆみ, 150 :606, 1989
- 5) 平野久美子他: Duchenne型筋ジストロフィー児の尿中3-メチルヒスチジン・クレアチニン比について-測定条件の検討とベスタチン投与の影響-, 阪市大生紀要 36:257-267, 1988
- 6) Milewski, P., Holbrook, I. and Irving, M.: Urinary 3-methylhistidine:creatinine ratio in patients on long-term parenteral nutrition, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 4:286-289, 1980
- 7) Nagabhushan, V. S., Narasinga, Rao: Studies on 3-methylhistidine metabolism in children with protein-energy malnutrition, *Am. J. Clin. Nutr* 31: 1322-1327, 1978
- 8) Young, V. R., Haverberg, L. N., Bilmazes, C. and Munro, H. N.: Potential use of 3-methylhistidine excretion as an index of production in muscle protein catabolism during starvation, *Metabolism* 22:1429-1435, 1973
- 9) Iapichino, G., Radrizzani, D., Solca, M., Bonetti, G., Leoni, L. and Ferro, A.: Influence of total parenteral nutrition on protein metabolism following acute injury: Assessment by urinary 3-methylhistidine excretion and nitrogen balance, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 9: 42-46, 1985
- 10) 平山千里、村脇義和、堀 立明:メチルヒスチジン、日本臨床 43・秋季臨時増刊号:268-271, 1985
- 11) Sjolín, J., Hjort, G., Friman, G. and Hambræus, L.: Urinary excretion of 1-methylhistidine: A qualitative indicator of exogenous 3-methylhistidine and intake of meats from various sources, *Metabolism* 12:1175-1184, 1987
- 12) 塚越 茂:ベスタチンについて, 癌と化学療法 14: 23-85-2391, 1987
- 13) 柿本泰男、佐藤 勝、井上良一、三宅正治、稲田浩、向井玲二:筋ジストロフィー症をめぐる二つの研究-患者の心理とその対策および筋萎縮の病態の生化学-, 松山赤十字病院医学雑誌 3:9-19, 1978
- 14) Sjolín, J., Stjernstrom, H., Henneberg, S., Hambræus, L. and Friman, G.: Evaluation of urinary 3-methylhistidine excretion in infection by measurements of 1-methylhistidine and the creatinine ratios, *Am. J. Clin. Nutr.* 49:62-70, 1989
- 15) Noguti, T., Okiyama, A., Naito, H., Kaneko, K. and Koike, G.: Some nutritional and physiological factors affecting the urinary excretion of acid soluble peptides in rats and women, *Agric. Biol. Chem.* 46:2821-2828, 1982
- 16) 荒畑喜一: Duchenne型筋ジストロフ-症の膜ペプチド “ジストロフィン”, 医学のあゆみ, 151 : 45, 1989
- 17) Carpenter, S., Karpaty, G., Zuberzycka-Gaarn, E., Bulman, DE., Ray, P. N. and Worton, R. G., *Muscle & Nerve* 13:376-380, 1990
- 18) 熊谷俊幸他:小児神経筋疾患の尿中3-メチルヒスチジン、脳と発達、16:445-449, 1984
- 19) Eira, M., Carter, S. and Smith, R.: The effect of 3-methylhistidine in food on its urinary excretion in man, *Clinical Science*, 59:509-511, 1980
- 20) 南 澤正、原田秀幸、岸 恭一、新山喜昭、野口 忠:第43回日本栄養食糧学会講演集, 188, 1989

(平成3年10月11日受理)



### Summary

Noguchi proposed that acid soluble peptide (ASP) in urinary excreta can be applied as an index of protein catabolism of whole body. In order to investigate validity of the hypothesis urinary excreta of 18 children with Duchenne muscular dystrophy (DMD), who suffer for continuous breakdown of skeletal muscle protein, and of 46 normal children were examined.

The mean value of ASP in the children with DMD was significantly higher than in normal controls.

Concentration of ASP and that of 3-methylhistidine (3MH) which was proposed as an index of muscle breakdown were correlated. This result shows that urinary ASP reflects catabolism of body protein.

I could not observe correlation between concentration of ASP and that 1-methylhistidine (1MH) which is used as an objective index of ingestion of meat or fish.

After administering bestatin, inhibitor of leucine aminopeptidase, unusual increase of urinary ASP among children with DMD was observed. I believe this increase was caused by bestatin itself.

Consequently it appears that urinary ASP can be applied as more convenient index of protein catabolism than urinary 3MH which requires several restrictions to apply. However, it should be not be applied when effect of bestatin administration is evident.