

健常者における尿中ポルフィリン濃度の日内変動に関する研究

－ 遺伝性ポルフィリン症の難病指定による基準値の検討 －

Circadian changes in the urinary porphyrin concentration
of healthy subjects

－ Investigation of standard levels of urinary porphyrins
to study porphyria specified as an incurable disease －

網 中 雅 仁

くらしき作陽大学・作陽音楽短期大学『研究紀要』

第49巻 第1号 別刷

2016年9月

健常者における尿中ポルフィリン濃度の日内変動に関する研究 — 遺伝性ポルフィリン症の難病指定による基準値の検討 —

Circadian changes in the urinary porphyrin concentration of healthy subjects
— Investigation of standard levels of urinary porphyrins to study porphyria specified as an incurable disease —

網中雅仁*
Masahito AMINAKA

Abstract

The objective of this study was to elucidate the circadian changes in urinary porphyrin (Por) concentrations of healthy subjects. Fifteen subjects were housed under controlled living conditions for 3 days. Subjects collected their entire urine during the experiment, and the volume, specific gravity, and collection time of the collected urine were recorded. The mid-day sample (24 hours) was used for measurements in the actual analysis.

Measurement of the time between urinations was used to examine the excretion of each analyte per unit time. Urine volume, Por concentration and creatinine (Cr) concentration increased in the morning per unit time. In addition, the Cr concentration showed a somewhat multi-good trend, in that it was almost constant during the daytime while variation was observed in the evening.

Por and Cr concentrations showed individual differences and separate diurnal variations, which confirmed their differences. With regard to a method for enhancing the usefulness of Por and Cr concentrations as diagnostic criteria for Por diseases with spot urine tests, these data suggest that several spot urine tests are required.

Key words ; porphyrin, circadian changes, standard levels, healthy subjects

はじめに

ポルフィリン (Por) は、ヘム合成における代謝過程で産生される代謝産物である¹⁾。生体内ではポルフィリノーゲンとして存在し、過剰な代謝物は尿や糞便中に排出される。また、Por は環状構造をしており、側鎖の-COOH 基の数が異なる形態およびそれらの異性体が存在する。ヒトの尿中 Por 濃度は、体外に排出される Por 濃度の変動からヘム代謝に影響を与える疾患の診断や環境影響による有害物質の曝露、酸化ストレスなどによる生物学的曝露指標としてすでに確立されている^{2, 3)}。一方、遺伝性 Por 症は、ヘム合成に関与する酵素活性の遺伝的障害によって発症する疾患群の総称であり、関与する7つの酵素すべてにおいて障害が報告されており、8病型に分類される。主訴から

* くらしき作陽大学食文化学部栄養学科
Faculty of Food Culture, Department of Dietetics, Kurashiki Sakuyo University

急性型と皮膚型に大別され、急性型では神経症状や肝機能障害、皮膚型では皮膚の水疱形成や色素沈着、指末端の欠損が見られる。これらの症状は過剰に産生される Por の体内蓄積が原因とされ、体内での活性酸素の発生が関与する。根治治療はなく、ヒトヘミン (Normosang) が対処薬として 2015 年に承認されたのみである。またヒトヘミンは、すべての Por 症に有用ではなく、急性型に分類される Por 症の発作時に保険適用が認められているだけである。

厚生労働省は 2015 年 7 月に遺伝性 Por 症を難治性疾患克服研究事業の指定疾患 (難病指定) に認定した。しかし遺伝性 Por 症は希少疾患であり、専門医でなければ診断が困難なうえ、発作時の処置が適当でない場合、重篤化して死に至る場合もある。そのため、症状を的確に捉えるために、Por 排泄濃度の基準値を明確にする必要がある。現在、尿中 Por 濃度の測定にはスポット尿によるクレアチニン (Cr) 補正值を用いているが、その根拠は曖昧で利便性や患者負担を考慮したためである。

遺伝性 Por 症は認知度も低く、また症例数も限られているため、前述のようにスクリーニングにおける診断基準のカットオフ値に関する根拠も曖昧である。本研究では健常者の尿中 Por 濃度の日内変動を明らかにすることで、スポット尿を用いた診断基準となるカットオフ値の推定及び診断における信頼性向上の一助となるよう検討をおこなった。

対象と方法

1. 対象

被験者には 19~20 歳の健康な女性 15 名を対象とした。被験者は慢性疾患、薬・サプリメントの服用が無いこと、既往歴、現在の体調に問題ないことを確認し、本研究への参加を依頼した。被験者は運動や食事など基本的な生活環境を統一するために 2 泊 3 日の宿泊期間を設定し、その期間における全ての尿を採取した。起床時刻は午前 6 時 30 分に統一し、初回の排尿時刻とした。それ以降の排尿は、各自尿意を感じた時点で採尿をおこない、時刻および尿量、尿比重を記録した。検査期間中の運動および食事内容、摂取量は同程度であったが、水分補給や就寝時刻は各自の自由とした。実際の分析には中間日の早朝から翌朝 (24 時間) を分析対象の試料とした。

2. 分析方法

尿中 Por 測定には高速液体クロマトグラフィー (GRIVER 800, CAPCELPACK U-150 JUSCO ; 東京) 蛍光検出法を用いた⁴⁾。また、Por 濃度分析では尿からの分離同定が可能な 6 物質のうち、健常者においても相応の排泄量が認められるコプロポリフィン I (CP I)、コプロポリフィン III (CP III) について検討した。スポット尿は、補正值の有用性を比較検討するため、尿中 Cr 測定および尿比重 (U.G.) をおこなった。尿中 Cr 濃度測定にはラボアッセイクレアチニン測定キット テストワコー (和光純薬 ; 東京) を用いた。また U.G. 測定は臨床用屈折率計 (MASTER-URC ATAGO ; 東京) を用いた。

3. 試料の採取及び輸送方法

尿試料は宿泊施設で採取された後に遮光下ドライアイスで凍結状態のまま輸送して尿中ポリフィリンの測定をおこなった。測定時以外はすべて -80°C 以下で保存した。

4. 統計処理

得られたデータの解析には SPSS Statistics 18 を使用し、統計学的な分析法には Mann-Whitney U 検定を用いた。

5. 倫理的配慮

本研究における検査および情報収集は国の倫理指針が定められる以前に実施されたため、研究機関等における倫理審査委員会の審査、UMIN 臨床試験審査登録申請は受けていない。しかし、本研究

の遂行はヘルシンキ宣言に基づき本人の承諾を得て、倫理的配慮のもとに実施された研究である。

結果および考察

本研究では、尿中 Por 濃度の分離同定が可能な 6 物質のうち 2 物質について分析を実施した。ヘム代謝の中間代謝産物である Por は、同一の代謝過程における各段階の上流域から下流域で産生される物質であることから、個々における各 Por の日内変動に大きな隔たりは生じないと推定した。

そこで CP I と CP III の相関を調べた結果、両物質には有意な相関関係のあることが確認できた ($p < 0.001$)。これにより、個々の CP I / CP III は各試料でほぼ等しいことが確認された。また、被験者の Cr、CP I、CP III の日内変動について調べた (図 1~3)。

図 1~3 は、実験開始時刻を 0 min として 24 時間後の 1440 min を終了時刻としたグラフである。排尿回数は 4~9 回/day、各回の容量は 11.9~195.2 ml、排尿量は 408~1495 ml/day であった。また、Por 排泄量は CP I が 12.0~37.2 $\mu\text{g/day}$ 、CP III が 24.7~65.6 $\mu\text{g/day}$ 、Cr 濃度は 0.04~0.4 g/回、排泄量は 0.86~1.4 g/day であった。一方、U.G. は 1.005~1.037 であった (表 1)。図 1~3 に示した Cr 及び CP I、CP III は実測値であり、Cr の日内変動も類似の傾向であることを見出すことができた。

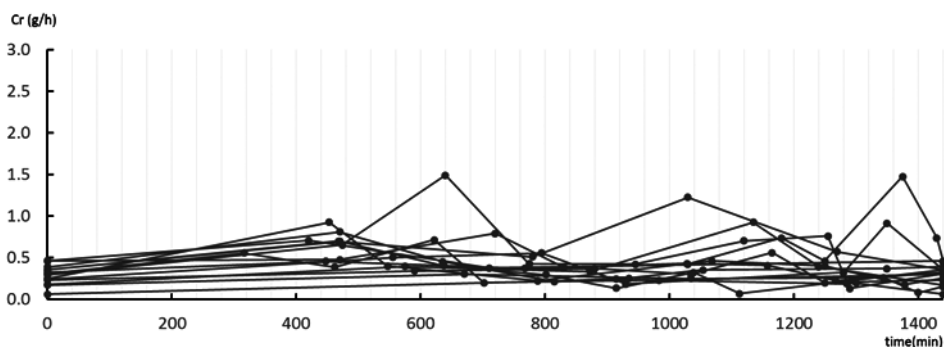


図 1 被験者におけるクレアチニン値の日内変動

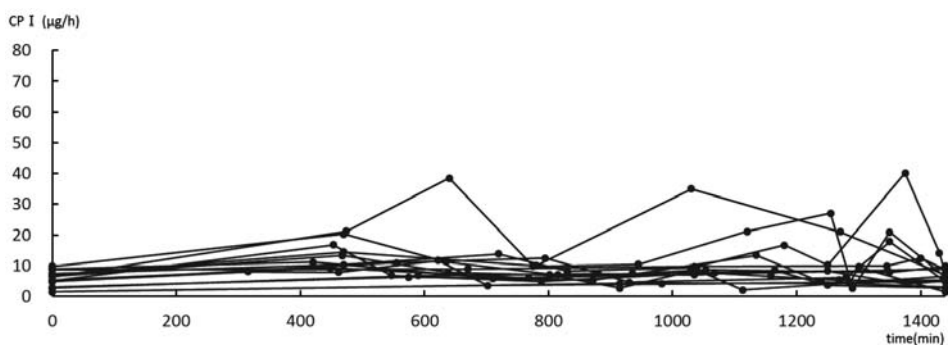


図 2 被験者における CP I 濃度の日内変動

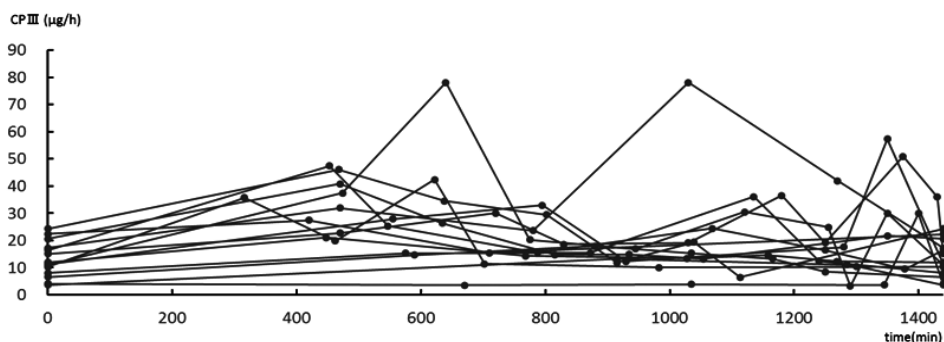


図 3 被験者における CP III 濃度の日内変動

一方、表1に示したように測定した全ての項目で極めて有意な相関を認めた。特に U.G.と CP I の相関係数が 0.698、CP III が 0.736 であったのに対して Cr と CP I の相関係数が、0.825、CP III が 0.843 であったことから、Cr が Por 濃度との間でより有意な相関関係となった。個々の試料ごと関連性を見出すため、相関図で表し (図 4、5)、検討をおこなった。その結果、U.G.補正では比重が高くなるにつれて、CP III の正誤差としての乖離が多くなっていくことが明らかとなった (図 4)。一方、Cr 補正は U.G.補正に比較して特徴的な乖離は無く、低濃度から高濃度まで相応の相関が見いだされた。つまり、U.G.よりも Cr がより有用性のある補正であるということが確認された。また、個々の日内変動に関する傾向として Por の実測値と Cr 補正値を排泄ごとの変動係数で比較したところ、実測値では CP I が 15.8~98.4%、CP III が 9.2~59.3%、Cr 補正を行った場合は、CP I が 9.3~95.2%、CP III が 2.8~59.2%であり、補正をおこなっても変動係数に変化が見られなかった。

以上の結果から、補正によって1日排泄量を推計する場合、軽微な Por 濃度の変化まで追うことは困難ではないかと思われた。

表1 尿比重およびクレアチニン、ポルフィリンの相関

	U.G.	Cr	CP I	CP III
U.G.	1			
Cr	0.860 ***	1		
CP I	0.698 ***	0.825 ***	1	
CP III	0.736 ***	0.843 ***	0.744 ***	1

*** $p < 0.001$

次に排尿時間ごとに早朝尿、中間尿、夜間尿に分けて比較検討をおこなった。早朝尿は朝食前まで、昼間尿は朝食後から夕食前まで、夜間尿は夕食後から翌朝までとし、その結果を表2にまとめた。

Cr 濃度では1日排泄量に比較して、早朝尿では有意に高く、また夜間尿は有意に低かった。このため、Cr 補正した CP I および CP III においても同様の結果を認めた。

尿補正を行う場合に Cr は最も頻繁に用いられている。しかし、筋肉組織から排出されることから体型や年齢、活動量によって変動する。一方、CP I 及び CP III にも相応の日内変動は認められたが、Cr 濃度の変動ほどではなかった。そのため、1日量に比較して早朝尿は有意に高値、夜間尿は有意に低値となることが明らかになった。

以上の結果からスポット尿は昼間尿を用いること、Cr 値で補正をおこない、その基準値として CP I は $30.22 \pm 16.55 \mu\text{g/g Cr}$ 、CP III は $69.588 \pm 41.58 \mu\text{g/g Cr}$ が一つの目安となるのではないかと推察した。

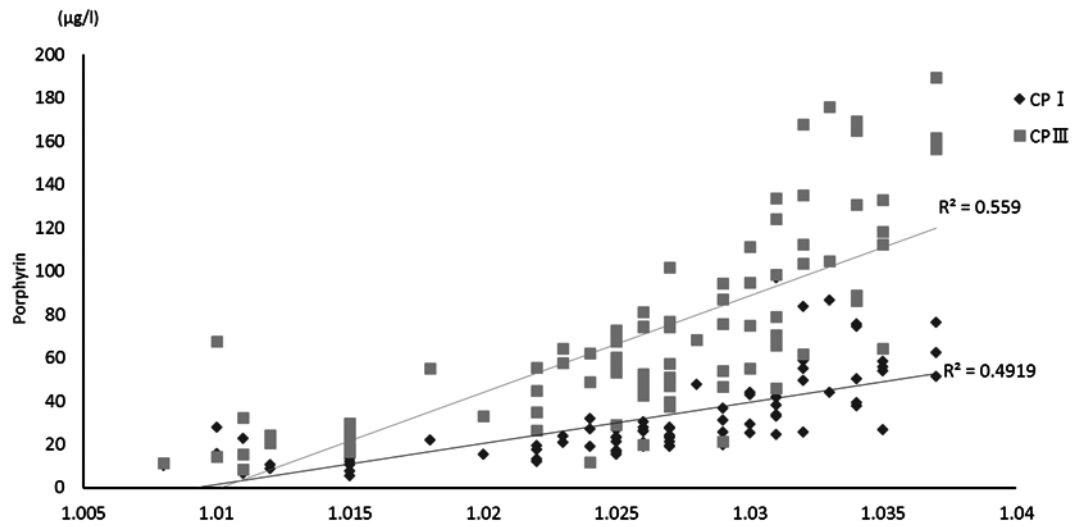


図4 15名の各スポット尿におけるS.G.値とポルフィリン濃度(CP I, CP III)との相関

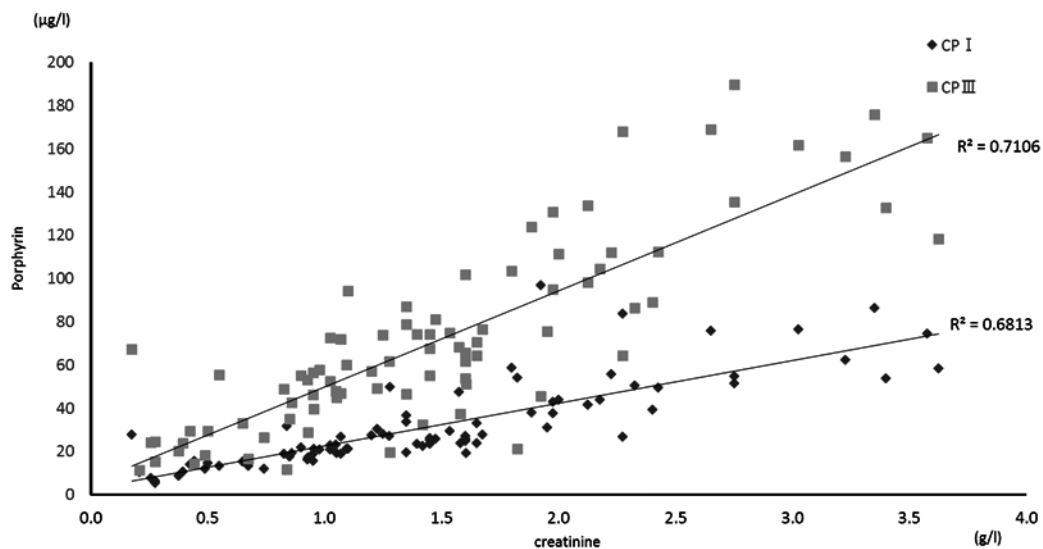


図5 15名の各スポット尿におけるクレアチニン値とポルフィリン濃度(CP I, CP III)との相関

表2 排泄時間ごとの尿比重およびクレアチニン、ポルフィリン濃度補正の変化

	U.G.	Cr	Cr 補正值 (µg/g Cr)	
			CP I	CP III
1 日量	1.026±0.008	1.636±0.910	31.45±18.46	72.38±46.19
早朝尿	1.029±0.006	2.081±0.727**	39.18±86.62*	86.62±42.91*
昼間尿	1.026±0.007	1.520±0.797	30.22±16.55	69.58±41.58
夜間尿	1.022±0.011	1.244±0.909*	25.01±18.71*	56.38±45.32*

1 日量に対する各尿の有意差 * $p < 0.01$ 、** $p < 0.05$

結論

Por 症では、発作時には高濃度の尿中 Por 排泄を認める。これによって、明確な診断が可能となる。しかし、安定時に検査を受診した場合、病型によっては、尿中 Por 濃度がほとんど健常者と変わらない場合がある。確定診断前の患者では、特に注意が必要とされている。現状では、尿試料に加えて血液や糞便、涙、骨髄液からも Por 濃度測定が可能となっている。また、病型によっては、遺伝子検査によって確定診断も可能であるが、費用や時間、検査可能な研究機関が限られているために普及には時間が必要である。Por 症患者への負担や簡便性を考慮した場合、尿試料による検査の有効性は極めて高い。それらをふまえ、より正確な検査結果を求めるため、検査試料の採取には昼間尿を数回にわたって分析することが必要である。またこれまでの研究成果によって性別および年齢階級別の健常者における Por 濃度や酸化ストレスの変化が明らかにされているため^{5, 6)}、これらのデータも参考に対象試料の検査値におけるカットオフ値を見極める必要がある。

2015 年 7 月の遺伝性 Por 症の難病指定からまだ 1 年ほどである。今後、これまで診断不明とされた多くの潜在的患者の検査診断が見込まれることから、より正確な確定診断の検査結果が求められることになるであろう。

本論文の研究内容は第 24 回日本臨床環境医学会総会にて発表した。また、研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金『遺伝性ポルフィリン症：新病型の診断法と新しい診療のガイドラインの確立に関する研究』に基づき、研究成果をまとめた。

参考文献

- 1) 菊池吾郎 他. ポルフィリン・ヘムの生命科学. 東京化学同人 現代化学 増刊 27.1995.
- 2) 網中雅仁、近藤雅雄、高田礼子. 血液症候群 赤血球の異常 ポルフィリン代謝異常 後天性ポルフィリン代謝異常. 日本臨牀. 別冊:490-493.2013.
- 3) 網中雅仁、吉田勝美、近藤雅雄、他. ポルフィリン症の発症と予防における酸化ストレスの役割と尿中ポルフィリンの動態. 薬理と治療. 35:S 3 235-240.2007.
- 4) 網中雅仁. 日本人健常者の尿中ポルフィリン濃度に関する研究. 日本臨床環境医学雑誌 11:29-35.2002.
- 5) 中野 創 他. 遺伝性ポルフィリン症：新病型の診断法と新しい診療ガイドラインの確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成 24～25 年度 総合研究報告書.2014.
- 6) 網中雅仁、近藤雅雄、高田礼子 他. ポルフィリン症患者およびその未発症血縁者における酸化ストレスに関する研究. 日本衛生学雑誌. 63:628-635.2008.