

20. 安定同位体呼気試験によるビタミン A 栄養状態の評価法

松浦 知和

東京慈恵会医科大学 医学部 臨床検査医学講座

Key words : ビタミン A, 安定同位体, 呼気試験, 栄養状態, 質量分析法

緒 言

ビタミン A (VA) 欠乏症は、貧困、戦争といった社会情勢とも密接に関与しており、未だに、アフリカや南・東南アジアでは VA 欠乏症が蔓延している。WHO によると、世界では 980 万人の妊娠女性が VA 欠乏による眼球乾燥症を発症し、失明に至る事例も多い。また、およそ 1 億~1 億 4 千万人の子供が VA 欠乏状態で、毎年 25~50 万人が視力を失い、さらにその半数が失明後命を落としている [1]。免疫不全による易感染性によって、はしかや下痢性腸疾患、呼吸器感染症での乳幼児死亡率が極めて高くなる。一方、一見豊かな国・日本においてもまた、貧困・偏食・飲酒・消化器疾患などを原因とする VA 不足・欠乏が問題となっている。小児喘息と VA 不足の関係について、我々も報告してきた [2]。VA 欠乏・不足の診断は、夜盲症、眼球乾燥症といった臨床症状と、血中 VA であるレチノール (ROH) の高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) による測定で行われる。しかし、生体では肝臓の VA 貯蔵細胞である星細胞 (伊東細胞) に通常は 80~90% の VA がエステル型 VA (主に retinyl palmitate : R pal) として蓄えられており、そのリザーブされた VA が欠乏してはじめて血中 ROH レベルが低下する。このため、従来の血中 VA 測定方法では、VA 欠乏を末期状態でしか診断できない。

本研究では、肝臓における VA 貯蔵状態を評価することで、生体の VA の栄養状態 (過剰・正常・不足・欠乏) を診断するための ^{13}C -VA 呼気試験を新規に開発する。 ^{13}C -VA 呼気試験は、簡便ではあるが、早期の VA 欠乏を検知できる可能性がある。新規 ^{13}C -VA 呼気試験によって、生体の VA の栄養状態を簡便に評価できれば、欠乏に至る前の潜在的不足患者への栄養改善に介入できる。日本では、VA 不足が疑われる乳幼児・貧困家庭学童・老人の VA 栄養状態を評価し、不足・欠乏があれば栄養指導・栄養補充で介入できる。世界的な VA 欠乏地域でも、地域の一定数の住民を抽出し、現場で ^{13}C -VA 呼気を行えば、地域の VA 栄養状態を明らかにして、VA サプリメントの投与などで介入できる。

^{13}C -VA 呼気試験の原理であるが、通常は生体の 80~90% の VA を貯蔵する肝臓星細胞での R pal プールが小さい (VA 不足・欠乏状態) で、検査食とともに ^{13}C -R pal を摂取すると、 ^{13}C -R pal は、肝細胞で水酸化され ^{13}C -ROH となり、さらに、 ^{13}C -レチノイン酸 (RA) に酸化され、最終的に $^{13}\text{CO}_2$ となって呼気中に排出される。肝臓での VA プールが小さいと ^{13}C -Rpal は肝臓での貯蔵に回らず、末梢で消費されるため、呼気の $^{13}\text{CO}_2$ 排出量は増加する (VA 栄養状態不足・欠乏)。VA プールが大きいとその逆で呼気の $^{13}\text{CO}_2$ 排出量は低下する (VA 栄養状態正常)。放射性同位元素である ^{14}C でラベルした R pal を投与すると、呼気に $^{14}\text{CO}_2$ が検出されることが確認されている [3]。本研究は、放射性崩壊を起こさない安定同位体 ^{13}C が標識された R pal を用いる、安全で非侵襲的な検査法開発である。なお、実際の研究では、経口製剤として臨床でも服用され、retinol より安定で、R pal より合成が簡便な retinyl acetate (R ace) を用いることとした。

方 法

1. ^{13}C -retinyl acetate の合成

呼気試験に用いる ^{13}C -VA は、神戸薬科大学・和田昭盛教授によって合成された。VA の 13 位の炭素を ^{13}C にラベルした ^{13}C -retinyl acetate (^{13}C -R ace) を合成した。

2. $^{13}\text{CO}_2$ の測定

$^{13}\text{CO}_2$ の測定は、呼吸ガス用質量分析装置 プレスマス（日本金属化学株式会社）で行った。呼吸バックに採取したガスを5 mL プレスマスに注入し、1分間で測定し、データを出力。解析は日本IBMの協力で行い、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の動態を比較した。

3. バイオ人工肝臓での ^{13}C -VA 呼気試験シミュレーション

ヒト肝臓細胞 FLC-4 を、ハイドロキシアパタイトビーズ（アパセラム-AX GA-2(N)、HOYA-PENTAX）を細胞培養担体として充填した5 mL容量のラジアルフロー型バイオリクター（RFB）（株式会社バイオット）に播種した。培養液はASF-104N 無血清培養液（味の素株式会社）を用い、RFBのバイオ人工肝臓部と培養液がガス交換を行うリザーバー部を150 mLの培養液が閉鎖系で還流された。リザーバーには5% CO_2 ・95%Airが注入され、液面でガス交換の上、注入と同量が排出路から排出された（図1）。細胞が増殖し、安定したところで、 ^{13}C -R ace 濃度が100 μM に調整した培養液にリザーバー内の培養液を交換し、還流を開始し、継続的に排気（呼気）を呼吸バックで採取した。24時間還流後、再度 ^{13}C -R ace 濃度が100 μM の培養液に交換し、培養をさらに24時間継続し、排気を採取した。

FLC-4細胞を培養したバイオ人工肝臓は同時に2台稼働させ、一台に100 μM の ^{13}C -R ace を含有する培養液を還流し、もう一台には ^{13}C -R ace を添加していない通常の培養液のみ還流した。リザーバーに注入される直前の5% CO_2 ・95%Airを各サンプル前に採取し、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比を測定しベース値として、排気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値からさし引いた [4]。



図1. バイオ人工肝臓での ^{13}C -retinyl acetate 呼気試験

FLC-4細胞をRFBで高密度還流培養する。リザーバーの培養液に ^{13}C -retinyl acetate を添加し、24時間培養。継続的に排気を採取し、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比を質量分析装置で測定した。

結果

FLC-4細胞を培養したバイオ人工肝臓は同時に2台稼働させ、一台に100 μM の ^{13}C -R ace を含有する培養液を還流し、もう一台には ^{13}C -R ace を添加していない通常の培養液のみ還流した。継続的に採取した排気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値の動態を図2に示す。点線が排気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値から注入した混合ガス中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値をさし引いた値である。赤の点線は100 μM の ^{13}C -R ace を添加したリアクターでの動態、青の点線は ^{13}C -R ace 未添加の培養液を還流したリアクターでの動態を示す。100 μM の ^{13}C -R ace を添加すると1回目の還流では、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値は3時間をピークに上昇し、その後、低下する。2回目の添加では3時間の上昇は観察されなかった。一方、 ^{13}C -R ace 未添加条件でも、1回目はわずかに $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値は上昇したが、わずかであった。1回目のVA欠乏状態での還流では、3時間目をピークとして、 ^{13}C -R ace がレチノイン酸を経て、 $^{13}\text{CO}_2$ まで代謝され代謝ガス中に排出されたと解釈された。



図 2. ^{13}C -retinyl acetate 還流実験における $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の動態

バイオ人工肝臓に ^{13}C -retinyl acetate を添加し、24 時間還流。その後、2 回 VA 未添加の培養液で洗った後、2 回目の ^{13}C -retinyl acetate の添加を行って、継続的に排気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比を測定した。赤の点線が、 ^{13}C -retinyl acetate を添加したバイオ人工肝臓。青の点線が未添加バイオ人工肝臓。

考 察

本シミュレーション実験によって、 $100\ \mu\text{M}$ の ^{13}C -R ace を添加すると、1 回目の還流では 3 時間目をピークとして、 ^{13}C -R ace がレチノイン酸を経て、 $^{13}\text{CO}_2$ まで代謝され代謝ガス中に排出されたと解釈される。FLC-4 細胞は無血清培養で維持されており、ビタミン A 欠乏状態で培養されている。このため、1 回目の還流では、レチノイン酸に代謝され、さらに最終代謝産物である $^{13}\text{CO}_2$ が検出されたと考えられる。一般に、血中レチノール濃度は $2\ \mu\text{M}$ であり、今回添加した ^{13}C -R ace $100\ \mu\text{M}$ は大過剰量である。このため、1 回目の還流でバイオ人工肝臓の VA は充足され、エステル型 VA への代謝経路が亢進した可能性がある。このため、2 回目の添加では、レチノイン酸への代謝経路は低下し、3 時間の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値のピークが消失したと考えられる。

バイオ人工肝臓を用いた基礎研究の結果から、ヒトの VA 栄養状態の評価法への実用化を図るために、以下の検討が必要であると考えた。1. 安定同位体標識試薬の改善：検査の感度をあげるため、排出 $^{13}\text{CO}_2$ 量を増やす必要がある。このため、Race の炭素への ^{13}C の標識数を増やす必要がある。2. $^{13}\text{CO}_2$ の測定法の改善：本研究では、当初、臨床検査で用いる赤外分光光度計を用いて排出 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の測定を試みた。しかし、測定感度が十分でなく、質量分析法を採用した。ブレスマスは生体ガス内成分をカラムに吸着させる必要なく、ガスのまま機器に注入し、数分で測定を終了することができる。また、検出感度も高く、ガス内の CO_2 以外の成分も検出できる。臨床サンプル測定用にはさらに改善を進める必要がある。3. 動物実験での確認：実験動物モデルを作製し、動物の呼気で検討する。動物モデルとしては、ラット VA 欠乏モデル、ラット肝障害モデルを作製し、検討を進めている。4. ヒトでの臨床研究の推進の準備： ^{13}C -glucose 呼気試験は既に臨床応用されている [5]。また、R ace も製剤として臨床でも用いられており、安全性は高い。1~3 の検討を行った後に、臨床実用化研究へ進むことは可能と考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸薬科大学・生命有機化学の和田昭盛教授、東京農業大学国際食料情報学部国際食農科学科の古庄律教授、日本 IBM 東京基礎研究所の堀部晃啓、末岡邦昭、相原達研究員、日本金属化学（株）技術部の菅原純一技術員である。また、RFB での細胞培養、排気のサンプリングを行った中村まり子助教に深謝いたします。

文 献

- 1) Micronutrient deficiencies. Vitamin A deficiency. WHO. <https://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/>
- 2) Mizuno Y, Furusho T, Matsuura T, *et al.* Serum vitamin A concentrations in asthmatic children in Japan. *Pediatr Int* 2006, 48:261-264. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2006.02200.x
- 3) Furusho T, Wada M, Yasuhara T, *et al.* Tissue specific-distribution and metabolism of vitamin A are affected by dietary protein levels in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1998, 68:287-292, PMID: 9789760
- 4) 松浦知和、目崎喜弘、政木隆博、松本喜弘、前橋はるか、中村まり子、中田浩二、朴ジョンヒョク、横山寛. パイオ人工肝臓開発から臨床検査医学へ - 空腹時 ^{13}C -glucose 呼気試験の開発 - . *臨床病理* 2016, 64(5), 558-563.
- 5) 松浦知和、江崎敬裕、中村まり子、目崎喜弘、政木隆博. 空腹時 ^{13}C -glucose 呼気試験による肝臓インスリン抵抗性の簡易診断法. *RADIOISOTOPES* 2019, 68:1-6, doi: 10.3769/radioisotopes.68.