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

【目的】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。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。

【方法】初めに、VAの13位の炭素を ^{13}C にラベルした ^{13}C-retinyl acetate（^{13}C-Race）を合成した。ヒト肝癌細胞FLC-4を、5 mL容量のラジアルフロー型バイオリアクター（RFB）に播種し、バイオ人工肝臓を作製した。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。細胞が増殖し、安定したところで、^{13}C-Race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、継時的に排気（呼気）を呼気バックで採取した。24時間還流後、再度 ^{13}C-Race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。$^{13}CO_2$の測定は、呼気ガス用質量分析装置で行った。

【結果】FLC-4細胞を培養したバイオ人工肝臓に100 μMの ^{13}C-Raceを含有する培養液を還流した（図）。100 μMの ^{13}C-Raceを添加すると1回目の還流では、$^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$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-Race未添加条件でも、1回目、2回目ともわずかに $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$比値は上昇した。従って、VA欠乏状態のバイオ人工肝臓に ^{13}C-R aceを投与することで、最終産物の $^{13}CO_2$が生成し、その検知によってVA欠乏が診断できる可能性が示唆された。

^{13}C-retinyl acetate還流実験における $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$比の動態



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$^{13}CO_2$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$^{13}CO_2$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$^{13}CO_2$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$^{14}CO_2$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. $^{13}CO_2$ の測定

$^{13}CO_2$ の測定は、呼気ガス用質量分析装置 ブレスマス（日本金属化学株式会社）で行った。呼気バックに採取したガスを 5 mL ブレスマスに注入し、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、$^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 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

ヒト肝癌細胞 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アクター（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、継時的に排気（呼気）を呼気バックで採取した。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、$^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 比を測定しベース値として、排気中の $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 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。継時的に排気を採取し、$^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 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。継時的に採取した排気中の $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 比値の動態を図 2 に示す。点線が排気中の $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 比値から注入した混合ガス中の $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 比値をさし引いた値である。赤の点線は 100 μM の ^{13}C-Race 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、$^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 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 $^{13}CO_2$／$^{12}CO_2$ 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-Race がレチノイン酸を経て、 $^{13}CO_2$ 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 $^{13}CO_2/^{12}CO_2$ 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、継時的に排気中の $^{13}CO_2/^{12}CO_2$ 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 μM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、$^{13}CO_2$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$^{13}CO_2$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 μMであり、今回添加した^{13}C-R ace 100 μM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$^{13}CO_2/^{12}CO_2$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$^{13}CO_2$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. $^{13}CO_2$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$^{13}CO_2/^{12}CO_2$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. バイオ人工肝臓開発から臨床検査医学へ - 空腹時 ^{13}C-glucose 呼気試験の開発ー. 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.