

# 安定同位体呼気試験の臨床応用

*Clinical application of  $^{13}\text{C}$ -breath test*

東京慈恵会医科大学・臨床検査医学講座<sup>1</sup>、消化器肝臓内科<sup>2</sup>

講座担当教授 松浦 知和<sup>1</sup>、助教 田中 賢<sup>2</sup>、助教 進藤 大典<sup>1</sup>

Tomokazu Matsuura, MD., PhD (Professor)<sup>1</sup>, Ken Tanaka, MD., PhD (Assistant Professor)<sup>2</sup>, Daisuke Shindo, PhD (Assistant Professor)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine & <sup>2</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine

## 1. はじめに

$^{13}\text{C}$ は、自然界に1.115%存在する安定同位体である。 $^{13}\text{C}$ メタンなどを自然界から取り出し、濃縮する技術も進歩し、種々の $^{13}\text{C}$ 標識化合物を合成することができる。 $^{13}\text{C}$ -グルコースや $^{13}\text{C}$ -オクタン酸など比較的安価な $^{13}\text{C}$ 化合物であれば、ヒトに投与する量も容易に手に入れることが可能である。 $^{13}\text{C}$ で標識された化合物を生体に投与し、その代謝産物である $^{13}\text{CO}_2$ を呼気で測定することにより化合物の生体での代謝・動態を評価することができる<sup>1)</sup>。臨床検査では、すでに $^{13}\text{C}$ -尿素( $^{13}\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ )を利用し、ヘリコバクター・ピロリ感染の診断および治療後の評価系(尿素呼気試験 Urea Breath Test)として応用されている<sup>2)-4)</sup>。本編では、 $^{13}\text{C}$ 化合物を応用した呼気試験に関して概説する。

## 2. 安定同位体の医学応用

同位体(Isotope)とは、同じ原子番号を持つ元素の原子において、原子核の中性子数、つまりその原子の質量数が異なる核種のことである。この中で、放射性崩壊を起こさず、安定して存在する同位体を安定同位体(Stable isotope:SI)という。英国の科学者であるFrancis William Astonによって発見され、Astonにはこの功績によって1922年にノーベル化学賞が授与されている(図1)。

近年、SIの医学応用が進んでいる。

①代謝測定:重水( $\text{D}_2\text{O}$ )、水- $^{18}\text{O}$ あるいは $^{13}\text{C}$ で標識した試薬を生体内に投入すると、生体内で代謝が進むことにより、呼気や尿・血液などから $^{13}\text{C}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、重水素

(D)を天然存在比よりも多く含んだ二酸化炭素や水などが採取できる。この採取した物質の同位体比を測定する事により、生体内の代謝状況を解析することができる。現在では質量分析技術が革新的に進歩し、ある瞬間の細胞、組織、臓器のメタボロームのプロファイルを一斉に解析するメタボロミクス技術(stable isotope-resolved metabolomics: SIRM)が確立している。安定同位体で標識した化合物が、細胞や生体でどのように代謝されていくか、時間軸で一斉解析することもできる。一方で、微量な蛋白質やペプチドなどのバイオマーカーを質量分析で解析するターゲットプロテオミクスでは、内部標準として安定同位体標識ペプチドを用いて定量している。また、臨床検査用で、なおかつ、Point of Care Testing (POCT)にも応用できる簡易 $^{13}\text{CO}_2$ 測定用赤外分光光度計が開発・実用化され、



図1 Francis William Aston<sup>24)</sup>

$^{13}\text{C}$ 呼気試験の臨床応用が急速に進んでいる。

### ②核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance:NMR)

**構造解析:** 同一原子であっても同位体核種により核スピンの異なることを利用して、高分子のタンパク質のNMR構造解析ができる。例えば、アミノ酸の炭素に $^{13}\text{C}$ を標識すれば、 $^{12}\text{C}$ のみのアミノ酸が組み込まれた蛋白質は検出されず、 $^{13}\text{C}$ で標識された蛋白質は検出できる。一方、炭化水素の水素を重水素で標識すれば、重水素はNMRを起こさないで検出されず、炭化水素以外の水素を感度良く検出できる。このため、重クロロホルムや重アセトンに溶媒として用い、試料を溶かして測定すると感度があがる。水素に重水素や溶媒の利用が欠かせない。NMRには、重水素、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体が用いられている。

### ③ポジトロン断層法(Positron Emission Tomography: PET)

**PET:** 癌診断に用いられるPET試薬である2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-D-glucose( $^{18}\text{FDG}$ )を合成する際、標識する放射性同位体 $^{18}\text{F}$ (半減期約108分)の原料として、酸素の安定同位体、 $^{18}\text{O}$ 原子で標識したWater- $^{18}\text{O}$ ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ )が必要である。 $\text{H}_2^{18}\text{O}$ をサイクロトロンで核反応させることで、 $^{18}\text{F}$ を作製し、 $^{18}\text{FDG}$ を合成している。

国内では、大陽日酸株式会社が独自の超高純度酸素深冷分離技術を開発し、空気中にわずか0.2%しか存在しない $^{18}\text{O}$ を、98%まで濃縮した $\text{H}_2^{18}\text{O}$ を2004年から製造している。現在年間100kgの製造能力があるが、新設プラントを新設して年間300kgの生産供給体制となる予定である(<https://www.tn-sanso.co.jp/jp/closeup/water-18o.html>)。 $^{15}\text{N}$ はSIサイエンス株式会社が製造している(<http://www.kagaku.com/shoko/>)。しかし、 $^{13}\text{C}$ を製造していた東京ガス株式会社はSI事業から撤退している。海外では、Cambridge Isotope Laboratories, Inc.(CIL)が、主要な安定同位体およびその標識化合物を製造販売している。

## 3. $^{13}\text{C}$ 呼気試験

また、現在までに様々な施設で $^{13}\text{C}$ で標識した糖質( $^{13}\text{C}$ -glucose<sup>5</sup>,  $^{13}\text{C}$ -galactose<sup>6</sup>)、脂質( $^{13}\text{C}$ -triolein<sup>7, 8</sup>),  $^{13}\text{C}$ -trioctanoin<sup>7, 9-11</sup>),  $^{13}\text{C}$ -hiolein<sup>12</sup>,  $^{13}\text{C}$ -octanoil glycerol<sup>13</sup>),

クロレラ産生混合中性脂肪<sup>14, 15</sup>)やアミノ酸( $^{13}\text{C}$ -alanine<sup>16</sup>,  $^{13}\text{C}$ -phenylalanine<sup>16, 17</sup>,  $^{13}\text{C}$ -methionine<sup>16</sup>,  $^{13}\text{C}$ -leucine<sup>18</sup>)や薬物( $^{13}\text{C}$ -phenacetine<sup>19</sup>,  $^{13}\text{C}$ -methacetine<sup>20</sup>,  $^{13}\text{C}$ -aminopyrine<sup>6</sup>,  $^{13}\text{C}$ -caffeine<sup>21</sup>)を基質として、代謝の面から肝機能や消化吸収機能を評価しようという臨床研究が行なわれ、実用化されている(表1)<sup>22</sup>。

$^{13}\text{C}$ 呼気試験が実用化されて実臨床の検査として用いられるには、もちろん検査としての意義が重要であるが、同時に検査の価格が安く、迅速で、患者の負担が少ない安全な検査であることが重要である。従って、 $^{13}\text{C}$ 標識試薬は、薬剤よりは通常の食事にも含まれる糖質・脂肪・アミノ酸・有機酸がよく、経口で服用し、2時間以内に結果が出る定点測定の実用化が望ましい。

## 4. 感染症診断—尿素呼気試験—

ヘリコバクター・ピロリ、いわゆるピロリ菌感染は、繰り返す胃・十二指腸潰瘍の原因である。近年では、胃癌の発生にも大きな役割をはたしていると考えられ、胃カメラ検査で慢性萎縮性胃炎があり、さらに種々の検査でピロリ菌の感染があれば、積極的に除菌する方針となっている。

ピロリ菌の感染診断には、胃カメラ検査で組織をとって、病理組織的に菌体を検出するか、胃粘膜組織から菌を培養して証明するか、迅速ウレアーゼ試験で陽性反応がでるかで検討する。あるいは、非侵襲検査として、血清抗体検査、便中抗原検査さらに尿素呼気試験がある。組織検査、培養検査では、感度が低いため、実際には血清抗体検査、迅速ウレアーゼ試験で感染の確定を行う場合が多い。尿素呼気試験は感度・特異度とも高い検査で、迅速性もあり、感染診断にも用いられるが、除菌療法後の判定診断に特に有用である。

尿素呼気試験は、ピロリ菌の持つウレアーゼ活性を特異的に検出する検査法である。 $^{13}\text{C}$ を標識した尿素を空腹時に服用すると、胃内にピロリ菌がいると $^{13}\text{CO}_2$ とアンモニアに分解される。胃壁より $^{13}\text{CO}_2$ は吸収され、血中に入り、肺から呼気中に排出される。試薬の服用から呼気の採取まで20分ほどで終了する(図2)。除菌療法後6週間ほどで、死菌も胃内から排出され、除菌判定を比較的早く行うことができる。日本国内では $^{13}\text{C}$ 呼気試験で唯一保険収載された検査である。

表1  $^{13}\text{C}$ 呼気試験による消化管・肝臓・膵臓の機能試験(文献22参考、一部追記)

適応	基質(試薬)	費用	解析	臨床的重要性	既存検査		
Helicobacter pylori 感染	$^{13}\text{C}$ -尿素	安価	定点	重要	血清抗体価、便抗原検査、迅速ウレアーゼテスト、培養、組織検査		
胃排出能(固形食)	$^{13}\text{C}$ -オクタン酸	安価	動態	重要	シンチグラフィ		
胃排出能(液体食)	$^{13}\text{C}$ -アセテート	安価	動態	重要	シンチグラフィ		
肝機能	$^{13}\text{C}$ -アミノピリン	中間	動態	中等度	臨床スコア(HOMA-IRなど)、MEGX-テスト、ICGテストなど		
	$^{13}\text{C}$ -メタセチン	安価	動態/定点	未定			
	$^{13}\text{C}$ -フェナセチン	中間	動態	未定			
	$^{13}\text{C}$ -エリスロマイシン	高価	定点	重要			
	$^{13}\text{C}$ -フェニールアラニン	中間	動態/定点	重要			
	$^{13}\text{C}$ -アラニン	中間	動態	未定			
	$^{13}\text{C}$ -ロイシン	中間	動態	未定			
	$^{13}\text{C}$ -カフェイン	高価	動態	未定			
	$^{13}\text{C}$ -メチオニン	高価	定点	未定			
	$^{13}\text{C}$ -オクタン酸	安価	動態	重要			
	$^{13}\text{C}$ -ガラクトース	高価	動態	未定			
	$^{13}\text{C}$ -グルコース	安価	動態/定点	重要			
	膵臓外分泌脳	$^{13}\text{C}$ -混合中性脂肪	中間	動態		中等度	PFD試験、セクレチン試験
		$^{13}\text{C}$ -トリオレイン	高価	動態		中等度	
$^{13}\text{C}$ -トリオクタノイン		中間	動態	中等度			
$^{13}\text{C}$ -ヒオレイン		高価	動態	未定			
吸収	$^{13}\text{C}$ -パルミチン酸	高価	動態	未定			
	$^{13}\text{C}$ -オクタン酸	安価	動態	未定			
腸のエネルギー代謝	$^{13}\text{C}$ -酪酸	安価	動態	重要			

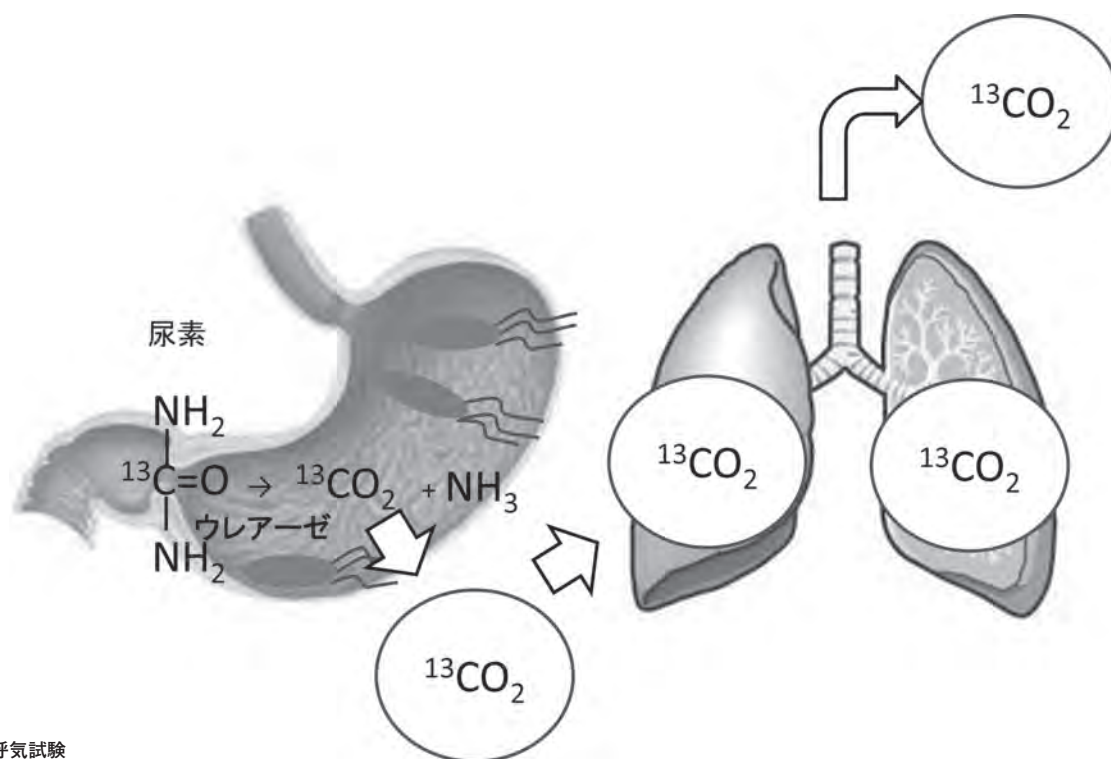


図2 尿素呼気試験

## 5. 肝臓インスリン抵抗性の診断 - 空腹時 $^{13}\text{C}$ -グルコース呼吸試験 -

$^{13}\text{C}$ -グルコース呼吸試験は、微生物、哺乳動物細胞、生体の糖代謝を簡易かつ鋭敏に評価する検査方法である。

肝臓では、グルコースはGlucose transporter 2 (GLUT-2) を介して肝細胞に入り、Glucokinase (GK) によってGlucose 6 phosphate (G6P) に変換されて解糖系やグリコーゲン合成などの代謝経路に進む。また、糖新生時はGlucose 6-phosphatase (G6Pase) やPhosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) などの非可逆的律速段階を担う酵素によって調節される。血糖値は解糖系、グリコーゲン分解、糖新生のバランスによって調節されている。肝臓でインスリン抵抗性の状態になると、インスリン作用が不全となり、糖新生の経路が活性化する<sup>8)</sup>。解糖系経路は抑制され、ミトコンドリアのTCAサイクルにおける好氣的エネルギー産生は低下し、 $\text{CO}_2$ の産生が低下する<sup>9), 10)</sup>。In vivoの研究から、生体でも空腹時に血糖上昇を誘導しない程度の、微量な $^{13}\text{C}$ を標識したグルコースを投与した代謝産物としての $^{13}\text{CO}_2$ を測定し、その動態から肝臓でのインスリン抵抗性を評価できるのではないかと考えた<sup>22)</sup>。

用いた $^{13}\text{C}$ -glucose (D-Glucose-U- $^{13}\text{C}6$ ,  $^{13}\text{C}$ :99atom%,

Chlorella Industry Co., LTD. Tokyo, Japan) は、グルコース1分子中の6か所の炭素基がすべて $^{13}\text{C}$ に置換されている。一晩の絶食の後、被検者に100mlの水に溶解した100mgの $^{13}\text{C}$ -glucoseを服用させた。摂取終了時を開始時間とした。試験開始前に、baselineの呼吸サンプルを容量1.3L呼吸サンプリングバッグ (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に採取した。以降、被験者は基礎代謝量に変化が加わらないように安静とした。経時的な呼吸サンプルは、グルコース摂取後15分・30分・60分・90分・120分・150分・180分・240分・300分・360分の計10回採取した。採取された呼吸中の $^{13}\text{CO}_2$ は、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 存在比として赤外分光分析装置であるPOC one™ (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。測定した $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 存在比を、実際に排出された $^{13}\text{CO}_2$ 排出量に換算し、さらに $^{13}\text{C}$ 排出速度の動態曲線に変換した。

空腹時 $^{13}\text{C}$ -グルコース呼吸試験 (Fasting  $^{13}\text{C}$ -glucose breath test: FGBT) では、HOMA-IR (インスリン抵抗性指数) 2.5以上の肝臓インスリン抵抗性、HbA1c (ヘモグロビン・エイワンシー) 6.3以上の糖尿病 (耐糖能異常) を本試験で検出できたが、HOMA-IRでは検出されなかった男女差がFGBTでは検出されたことから、肝臓のエネルギー代謝に関して感度よく評価できる試験と考えられた (図3)。

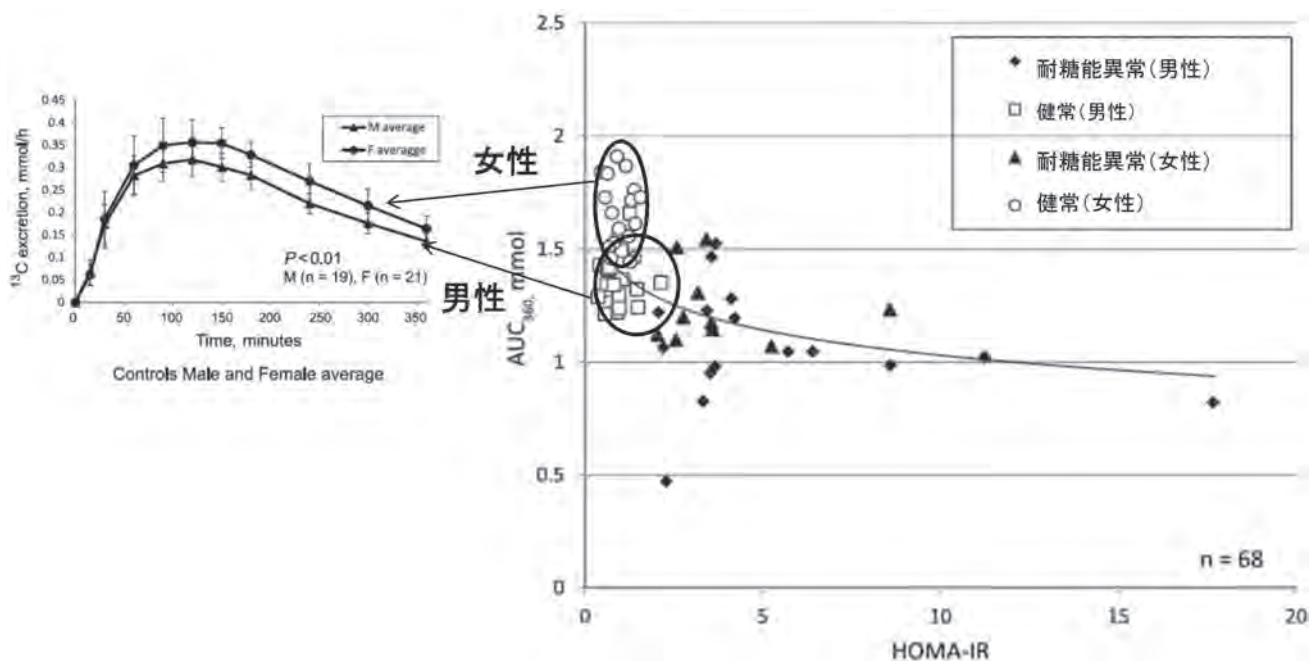


図3 空腹時 $^{13}\text{C}$ -グルコース呼吸試験  
空腹時 $^{13}\text{C}$ -グルコース呼吸試験で、健常女性では健常男性に比較して、肝臓糖代謝能が高いことが示唆された。(文献23より、一部改訂)

## 6. まとめ

安定同位体呼気試験は、質量分析技術の進歩、簡易測定機器の開発によって、急速に臨床応用の可能性が広がっている。安定同位体化合物の服用と呼気中の<sup>13</sup>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>測定のみで、生体内の代謝診断、感染微生物の感染診断、胃腸の生理機能検査が可能であり、非侵襲で安全な検査である。新生児や高齢者の検査としても有用であり、簡易機器で測定できるため、クリニックや在宅で行うPOCTとして、迅速検査としても有用である。

国内では尿素呼気試験の保険収載より10年以上が経過し、それ以降新規の安定同位体呼気試験が保険収載されることは今のところないが、安定同位体化合物を開発・合成する製薬・検査試薬メーカーと医療業界が一体となって、安定同位体の医療応用に取り組むべきである。

## 参考文献

- 1) 梶原正宏. “安定同位体<sup>13</sup>Cと医学面での有用性について”. <sup>13</sup>C-呼気試験の実際 基礎と実践的応用. <sup>13</sup>C医学応用研究会編. 2002, 4-7.
- 2) Graham, D.Y.; Klein, P.D.; Evans, D.J. Jr.; Evans, D.G.; Alpert, L.C.; Opekun, A.R.; Boutton, T.W. *Lancet*. 1987, 1(8543), 1174-1177.
- 3) Thijs, W.J.; Thijs, J.C.; Kleibeuker, J.H.; Elzinga, H.; Stellaard, F. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol*. 1995, 7(7), 603-607.
- 4) Savarino, V.; Vigneri, S.; Celle, G. *Gut*. 1999, 45(1), I18-I22.
- 5) Lewanczuk, R.Z.; Paty, B.W.; Toth, E.L. *Diabetes Care*. 2004, 27(2), 441-447.
- 6) Giannini, E.G.; Fasoli, A.; Borro, P.; Botta, F.; Malfatti, F.; Fumagalli, A.; Testa, E.; Polegato, S.; Cotellessa, T.; Milazzo, S.; Risso, D.; Testa, R. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005, 3(3), 279-285.
- 7) Nakamura, T.; Arai, Y.; Terada, A.; Kudoh, K.; Imamura, K.; Machida, K.; Kikuchi, H.; Takebe, K. *J. Gastroenterol*. 1994, 29(6), 756-762.
- 8) 馬場忠雄, 近持信男, 織田四郎. “<sup>13</sup>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>呼気検査の内科への応用”. <sup>13</sup>C医学(別冊) <sup>13</sup>C呼気検査の研究と応用. 1993, 36-39.
- 9) McClean, P.; Harding, M.; Coward, W.A.; Green, M.R.; Weaver, L.T. *Arch. Dis. Child*. 1993, 69(3), 366-370.
- 10) 坂本昭雄, 碓井貞仁, 豊泉惣一郎, 高石聡, 鍋谷圭宏, 奥山和明, 小野田昌一, 磯野可一, 竜崇正. *日本消化器外科学会雑誌*. 1990, 23(1), 47-51.
- 11) 早川真人, 宮川秀一, 岩瀬克己, 堀口明彦, 石原慎, 庭本直達, 三浦かおる. *消化と吸収*. 1995, 18(1), 138-141.
- 12) Lembcke, B.; Braden, B.; Stein, J.; Caspary, W.F. *Gastroenterology*. 1993, 104, A316.
- 13) Vantrappen, G.R.; Rutgeerts, P.J.; Ghoo, Y.F.; Hiele, M.I. *Gastroenterology*. 1989, 96(4), 1126-1134.
- 14) 松林恒夫, 安藤洋太郎, 丸山涉, 松崎武嗣, 坂本昭雄, 大原裕康, 佐々木康人. <sup>13</sup>C医学. 1995, 5, 12-13.
- 15) 成木行彦, 小川博, 大塚幸雄, 松林恒雄. *消化と吸収*. 1996, 19(1), 42-46.
- 16) 石井敬基, 石川紘一, 浅井聰. *日本薬理学雑誌*. 2002, 120(2), 101-106.
- 17) Burke, P.A.; Stack, J.A.; Wagner, D.; Lewis, D.W.; Jenkins, R.L.; Forse, R.A. *Am. J. Surg*. 1997, 173(4), 270-274.
- 18) 鈴木茂, 石井敬基, 浅井聰. <sup>13</sup>C医学. 2006, 16, 34-35.
- 19) Kajiwara, M.; Okazaki, T.; Iida, K.; Narumi, S.; Hirose, M.; Ijichi, M.; Abel, T.; Hirano, S.; Iinuma, M. *Chem. Pharm. Bull*. 1996, 44(6), 1258-1260.
- 20) Lalazar, G.; Ilan, Y. *J. Breath. Res*. 2009, 3(4), 047001.
- 21) Park, G.J.; Katelaris, P.H.; Jones, D.B.; Seow, F.; Lin, B.P.; Le Couteur, D.G.; Ngu, M.C. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2005, 22(5), 395-403.
- 22) Pizzoferrato, M.; Del Zompo, F.; Mangiola, F.; Lopetuso, L.R.; Petito, V.; Cammarota, G.; Gasbarrini, A.; Scaldaferrri, F. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2013, 17(2), 45-50.
- 23) Tanaka, K.; Matsuura, T.; Shindo, D.; Aida, Y.; Matsumoto, Y.; Nagatsuma, K.; Saito, M.; Ishii, H.; Abe, H.; Tanaka, F.; Shimada, T.; Nakada, K.; Ikewaki, K.; Aizawa, Y.; Tajiri, H.; Suzuki, M. *Transl. Res*. 2013, 162(3), 191-200.
- 24) 「フランス・アストン」『フリー百科事典 ウィキペディア日本語版』。URL: <http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%95%E3%83%A9%E3%83%B3%E3%82%B7%E3%82%B9%E3%83%BB%E3%82%A2%E3%82%B9%E3%83%88%E3%83%B3>