

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590572
 研究課題名（和文） ^{13}C -グルコース呼気試験によるインスリン抵抗性簡易診断法の開発

研究課題名（英文） The development of the insulin resistance simple diagnostic method by the ^{13}C -glucose breath test

研究代表者

松浦 知和 (MATSUURA TOMOKAZU)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30199749

研究成果の概要：

本研究では、 ^{13}C -グルコース負荷/ $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験を、生体におけるグルコース代謝とインスリン抵抗性評価法として利用するための基礎的検討、および臨床的検討を行った。肝臓モデル（ミニ肝臓）で検討したところ $^{13}\text{CO}_2$ 産生の変化は、グルコース消費量で評価するより鋭敏であった。健常人で ^{13}C -グルコース負荷試験を行ったところ、6 時間までの $^{13}\text{CO}_2$ 産生の動態を簡便迅速に観察できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：インスリン抵抗性、安定同位体、糖代謝、呼気試験、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病発症前のメタボリック症候群の重要性が注目されている。メタボリック症候群の本体は、インスリン抵抗性であるが、臨床病態検査において客観的かつ簡易的な診断・評価法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、平成 19 年度と 20 年度の 2 年

間で、 ^{13}C -glucose 呼気試験を利用したインスリン抵抗性簡易診断法の開発を行った。まず、ヒト肝臓由来細胞を 3 次元培養したミニパイオ人工肝臓（ミニ肝臓）を用い、 ^{13}C -glucose 呼気試験の基礎的検討を行った。ついで、ヒトに ^{13}C -glucose を投与し、呼気の $^{13}\text{CO}_2$ の動態からインスリン抵抗性が評価できないか検討した。

3. 研究の方法

1) ミニ肝臓を用いた ^{13}C 安定同位体標識化合物の代謝排出 $^{13}\text{CO}_2$ 測定による細胞活性検定系

申請者らの開発したミニ肝臓にはヒト肝機能・代謝能が発現しており、薬物や培養液の栄養組成の変化によってその機能が変化する。小型ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) システムは、① RFB (5ml 容量) ② リザーバー③ ポンプ④ CO_2 ・エア混合ガス供給装置で構成されている。例えば、上のリアクターに薬物を添加、下のリアクターはコントロールといった形で実験を行う。実際に呼気試験を行う際は、リザーバーの排気側に呼気バッグを装着し、閉鎖系にし、約 10 分間呼気バッグに排気ガスを集める。

肝代謝能の変化を感度よく、迅速に、手軽に計測するため、 ^{13}C 安定同位体化合物を基質として加え、代謝されて発生する $^{13}\text{CO}_2$ を呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 分析装置 (赤外分光光度計) で計測し、投与医薬品や食品添加物による肝代謝能変化を評価する。あらかじめブランクとして採取していた流入 CO_2 ・エア混合ガスバッグとサンプルを $^{13}\text{CO}_2$ 分析装置 (赤外分光光度計) POCone (大塚電子株式会社) に装着し $^{13}\text{CO}_2$ を測定する。

2) ミニ肝臓におけるブドウ糖代謝の検討

肝代謝能の変化を感度よく、迅速に、手軽に計測するため、 ^{13}C 安定同位体化合物を基質として加え、代謝されて発生する $^{13}\text{CO}_2$ を呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 分析装置 (赤外分光光度計) で計測し、投与医薬品や食品添加物による肝代謝能変化を評価する。

代謝基質として使用したグルコースはクロレラ工業株式会社から供与されたグルコースで、炭素基 6 個がすべて ^{13}C に置き換わ

ったグルコースである。この ^{13}C グルコースを培養液全グルコースの 10% になるよう添加した。グルコースの細胞内代謝経路である。解糖系から TCA サイクルに入り代謝を受けると 1 分子のグルコースから 6 分子の CO_2 が産生される。産生された CO_2 の炭素基は ^{13}C でラベルされており、 $^{13}\text{CO}_2$ として測定できる。

インスリン抵抗性改善薬は、糖尿病治療薬として日常臨床で汎用されている。今回、RFB を用いて 3 次的に培養した肝組織を用いて、糖代謝の変化を $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験により測定、比較した。2 台の RFB にマウス肝細胞 IMH-4 を 1×10^7 個ずつ播種し、約 2 週間培養し、一方にインスリン抵抗性改善薬を投与し 2 日間作用させた。その後、インスリンを 2mg ずつ投与し、60 分ごとに排気中の $^{13}\text{CO}_2$ を測定した。

3) ヒトにおける ^{13}C 標識ブドウ糖を用いた糖代謝試験

各年代 (20 代・40 代・50 代・60 代) の健康人ボランティアに 100mg の ^{13}C グルコースを経口摂取させた群と、同一被検者 に 460kcal の食事に 100mg の ^{13}C グルコースを経口摂取させた群の 2 群を測定した。2) と同様に、呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ を $^{13}\text{CO}_2$ 分析装置で経時的に測定し、糖代謝の動態を評価した。

4. 研究成果

1) ミニ肝臓におけるブドウ糖代謝の検討

インスリン抵抗性改善薬を添加し、さらにインスリンを加えると、非添加群に比較して、約 20% グルコース消費は増加した。また、 $^{13}\text{CO}_2$ 産生は 50% 増加し、インスリン抵抗性改善薬の効果を *in vitro* で評価できた。

2) ヒトにおける ^{13}C 標識ブドウ糖を用いた糖代謝試験代謝試験での効果検定

8名の糖尿病をもたない健常者で空腹時の¹³C-glucose呼吸試験を行った。動態を計算するには、¹³Cの量として比較検討することが必要である。このため、¹³CO₂量を¹³C量に変換した。

空腹時での糖代謝変化は、肝臓でのインスリン抵抗性を反映する。8名の健常被験者のうち、AUCを計算すると6名が2前後、2名が1前後であった。投与¹³C量は3なので、低値の2名に関しては、今後糖代謝異常が生じてくる可能性がある。また、このうち1名は、HbA1cは基準値内であるが、肥満、TGの上昇を認め、明らかなメタボリック症候群である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Shibata S, Marushima H, Asakura T, Matsuura T, Eda H, Aoka K, Matsudaira H, Ueda K, Ohkawa K. Three-dimensional culture using a radialflow bioreactor induces matrix metalloprotease 7-mediated EMT-like process in tumor cells via TGF β 1/Smad pathway. *Int J Oncol* 2009, 34:1433-1448.
2. Tatsukawa H, Fukaya Y, Frampton G, Marthine-Fuentes A, Suzuki K, Kuo TF, Nagatsuma K, Shimokado K, Okuno M, Wu J, Iismaa S, Matsuura T, Tsukamoto H, Zern MA, Graham RM, Kojima S. Role of Transglutaminase 2 in Liver Injury via Cross-linking and Silencing of Transcription Factor Sp1. *Gastroenterology*, 2009 Jan 14. [Epub ahead of print]
3. Nagatsuma K, Hyashi Y, Matsuura T et al. Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. *Liver Int.* 29:47-54,2009. 2008 Jun 9. [Epub ahead of print]
4. Im R, Mano H, Matsuura T, Nakatani S, Shimizu J, Wada M. Mechanisms of blood glucose-lowering of aqueous extract from stems of Kothala himbutu (Salacia reticulate) in the mouse. *J. Ethnopharmacol* 121: 234-240, 2009.
5. 松浦知和、岩城隆昌、木村直史. 急性肝不全と再生医療、致死性の肝性脳症改善のための対外循環型バイオ人工肝臓の開発. *臨床消化器内科* 23 : 1821-1827、2008年
6. Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J Virol Methods.* 148(1-2):174-81, 2008
7. Saito M, Matsuura T, Nagatsuma K, Tanaka K, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Kato F, Kashimori I, Tajiri H, Braet F. The Functional Interrelationship between Gap Junctions and Fenestrae in Endothelial Cells of the Liver Organoid. *J Membr Biol.* 2007 Jun 14;217 : 115-121
8. Mamori S, Nagatsuma K, Matsuura T, Ohkawa K, Hano H, Fukunaga M, Matsushima M, Masui Y, Fushiya N, Onoda H, Searashi Y, Takagi I, Tagiri H. Useful detection of CD147 (EMMPRIN) for pathological diagnosis of early hepatocellular carcinoma in needle biopsy

samples. *World J Gastroenterol*. 2007 Jun
7;13(21):2913-7.

〔学会発表〕（計4件）

2007年度

1. ^{13}C -glucose呼気試験を用いたミニバイオ人工肝臓における糖代謝の検討、第22回肝臓洞壁細胞研究会学術集会、田中賢、松浦知和、他、2008年11月30日、久留米
2. ミニバイオ人工肝臓を用いた ^{13}C -glucose呼気試験の基礎的検討、第24回 ^{13}C 医学応用研究会、第11回日本呼気病態生化学研究会合同学術大会2008、田中賢、松浦知和、他、2008年10月25日、東京

2008年度

3. 第23回 ^{13}C 医学応用研究会、第10回日本呼気病態生化学研究会 平成19年10月27日、東京、バイオ人工肝臓におけるGJIC機能と糖代謝の検討— ^{13}C -グルコース呼気試験を用いて—
4. ^{13}C -glucose呼気試験を利用した3次元還流培養系の活性測定法とその応用、シンポジウム：呼気試験をめぐるコンセンサスと将来の展望、第50回日本消化器病学会大会 (DDWJ2008) 松浦知和、大川清、2008年10月4日、東京

〔図書〕（計1件）

1. 松浦知和、丸島秀樹、中田浩二、松林恒夫：3次元組織培養系への応用、 **^{13}C -呼気試験の実際—生命科学の解明に向けて—**第2章 ^{13}C -化合物の医学分野への利用と展望、98-101, 2007年

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 知和 (MATSUURA TOMOKAZU)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：30199749

(2) 研究分担者

池脇 克則 (IKEWAKI KATSUNORI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40287199

(2007年度)

(3) 研究協力者

田中 賢 (TANAKA KEN)

東京慈恵会医科大学・医学部・大学院生

永妻啓介 (NAGATSUMA KEISUKE)

東京慈恵会医科大学・医学部・大学院生

斉藤勝也 (SAITO MASAYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

前橋はるか (MAEHASHI HARUKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・実験助手