

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19726

研究課題名（和文）安定同位体自然存在度分析を用いた代謝モニタリング法の開発

研究課題名（英文）Development of methods for monitoring metabolic states using stable isotope analysis at natural abundance levels

研究代表者

山田 桂太（YAMADA, Keita）

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：70323780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト呼気中のアセトン、イソプレン、二酸化炭素の安定炭素同位体組成を自然存在レベルで分析する方法を確立した。この方法を3人の被験者の呼気に適用し、呼気中のアセトン濃度と安定炭素同位体組成の変化を、血糖値の変化とともに4日間モニターした。以前から指摘されていた血糖値の変化と呼気アセトン濃度の変化との相関は認められず、呼気アセトン濃度は血糖値の変化の指標にはならないことがわかった。アセトン濃度の変化と安定炭素同位体組成の変化との間には相関が認められ、呼気アセトンはグルコース代謝と脂質代謝の割合を反映していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在健康科学・医科学分野で用いられる、標識された代謝前駆体の投与と代謝物の同位体標識の程度を追跡する標識同位体技術は明確な代謝情報を提供するが、非常に高価な標識化合物を必要とし、投与量によっては人体に有害となることや、通常とは異なる代謝状態を形成する可能性がある。さらに、標識化合物の滞留時間のみの限られた代謝状態の観測となり、長期モニタリングは出来ない。標識化合物の投与を必要とせず、通常の代謝状態変化を長期間モニタリングが可能となる安定同位体自然存在度技術を、健康科学・医科学分野に導入したことが本研究の意義である。

研究成果の概要（英文）：A method was established to analyse the stable carbon isotopic composition of acetone, isoprene and carbon dioxide in exhaled breath at natural abundance levels. The established method was applied to the exhaled breath of three subjects and changes in the concentration and stable isotopic composition of acetone in the exhaled breath were monitored for four days together with changes in blood glucose levels. No correlation was found between blood glucose level changes and exhaled acetone concentration changes, which has been pointed out previously, and it was found that exhaled acetone concentration was not an indicator of blood glucose level changes. A correlation was observed between changes in acetone concentration and changes in stable isotope composition, suggesting that the exhaled acetone concentration reflects the proportion of glucose and lipid metabolism.

研究分野：有機地球化学・環境化学

キーワード：安定同位体自然存在度分析 呼気分析 非侵襲代謝モニタリング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿や呼気に含まれる代謝有機分子の濃度分析は、血糖や血中脂質などの代謝状態を簡便かつ非侵襲的にモニタリングする方法を提供する可能性から、健康科学・医科学分野で注目されている[例えば、Schmidt&Podmore, 2015]。しかし、代謝有機分子の濃度変化は、個人差が大きいことや、濃度変化の支配要因が十分に理解されていないことから、代謝状態の指標としての曖昧さや、それを用いることの危険性が指摘されている[例えば、Wang et al., 2013]。代謝有機分子の濃度変化と代謝状態変化の関連付けを行う研究が続けられているものの、定量的な関連性は見出されておらず、呼気・尿などを用いた非侵襲代謝モニタリング法の開発は行き詰まっている。ところで地球化学分野では、環境中の有機分子の起源物質や反応経路の変化をモニタリングするために、有機分子の濃度に加えて、有機分子を構成する元素の安定同位体自然存在度が分析される。これは、有機分子の安定同位体自然存在度が起源と反応経路に依存して決まるため、その変化を分析することで起源物質や反応経路の変化を定量的に検知でき、有機分子の濃度変化の要因を推察できるからである。この分析は、微生物・植物・動物の代謝前駆体や代謝反応の変化を読み解く手法として、生態学、生化学、生物学分野などで利用されるようになってきた。この分析を人間に適用できれば、濃度分析のみとは違い、個人差とは無関係に代謝状態の変化を定量的に検知し、その濃度変化の要因をも推察できる。それにより、行き詰まった代謝モニタリング法開発に新たな展開をもたらすことが期待できる。しかし、健康科学・医科学分野では、従来、標識安定同位体は利用されてきたが、自然存在度での安定同位体については、その有用性が示されておらず、ほとんど利用されていない。

2. 研究の目的

本研究では、安定同位体自然存在度分析を用いた非侵襲的代謝モニタリング法を開発することを目的とする。具体的には、呼気中アセトン・イソプレンの安定同位体自然存在度分析を行うことで、血糖および血中脂質の変化を非侵襲的にモニタリングする方法を開発する。現在、呼気アセトンの濃度分析を用いた非侵襲的な血糖値モニタリング法の開発が進められているが、未だ成功していない。開発できればメタボリックシンドロームや糖尿病、脂質代謝異常症などの予防、診断、予後観察にも利用でき、健康科学・医科学分野における有用性を示すことができる。

3. 研究の方法

これまで地球化学分野で開発利用してきた有機分子の安定炭素同位体自然存在度(以下、 ^{13}C 自然存在度と呼ぶ)分析を、呼気アセトン・イソペンに適用し、濃度分析では得られない代謝前駆体の変化情報を取得することで本研究目的を達成する。

これまでに尿に含まれる代謝アセトンの ^{13}C 自然存在度分析法を開発し、尿アセトンの経時変化観測を行い、食後に尿アセトンの ^{13}C 自然存在度が高くなり、時間がたつにつれ低くなることを見出した[Yamada et al., 2016]。これは、アセトンの基質である血中の糖 (^{13}C 自然存在度が相対的に高い) と脂肪酸 (^{13}C 自然存在度が相対的に低い) の利用割合が変化することで説明できるとし、観測した尿アセトンを、糖および脂質に由来するアセトンに分割した。ここで、糖由来のアセトン濃度変化が血糖値の変化に相関することが期待できる。しかし、尿を用いた観測ではデータの時間分解能が悪く、血糖値の変化との関係を検証することはできなかった。また、基質(糖・脂肪酸)の ^{13}C 自然存在度の変化についても実測値が得られていないため、分割にも曖昧さが残された。本研究では、尿アセトンに対して確立した分析法を基に、呼気アセトン分析法を確立し、併せて基質の ^{13}C 自然存在度の分析法を確立し、呼気アセトンおよび基質の ^{13}C 自然存在度変化を高時間分解能で観測して、血糖値との相関関係を検証する。

一方、イソペンについては、どのような代謝状態の指標になり得るかが未だ明らかにされていない。本研究では、イソペンについても分析法を実現し、経時観測を行うとともに、絶食や糖・脂質成分のみの摂取、運動などにより糖・脂質代謝に摂動を与え、イソペン ^{13}C 自然存在度の変化と比較することで、イソペンの持つ代謝情報を探索する。

4. 研究成果

(1) 呼気アセトン・イソペンの ^{13}C 自然存在度分析法の確立

あらかじめ硫酸ナトリウム 1g を入れた 100cc のガラスバイアルに、ストローを使って呼気を吹き入れ、すぐにブチルゴムでキャップをして呼気試料とした。75 μm カルボキセン/ポリジメチルシロキサン (Carboxen/PDMS) を有機分子吸着ファイバーとしたマイクロ固相抽出 (SPME) 法によって、呼気から二酸化炭素、アセトン、イソペン抽出し、ガスクロマトグラフィー 燃焼同位体比質量分析 (GC-C-IRMS) システムに導入し、それぞれ濃度、 ^{13}C 自然存在度を測定し

た。SPME の吸着条件は 15 、60 分とした。本条件を用いることで、呼気アセトン濃度 300ppb 以上であれば、濃度 ±5%、 ^{13}C 自然存在度（以下、 ^{13}C 値とする。標準物質の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比に対する試料の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比のずれを千分率で表したものの。標準物質には VPDB を用いる） $\pm 0.15\%$ の精度で測定が可能となった。

（2）呼気アセトンの濃度および炭素安定同位体比と血糖値変動

食事および運動に制限を設けない日常生活下での濃度および ^{13}C 値変動の観測
確立した方法を 3 名の被験者の呼気試料に適用し、日常生活における呼気アセトンの濃度および ^{13}C 値を観測した。本観測は、ヒト代謝有機分子の ^{13}C 値について高時間分解能で得られた世界ではじめてのモニタリング結果である。

呼気アセトンの濃度が高くなると ^{13}C 値は低くなり、逆に濃度が低くなると ^{13}C 値が高くなる傾向が被験者全員に共通して観測された。これは呼気アセトンが、 ^{13}C 値の低い血中脂質と ^{13}C 値の高い血糖の両方の寄与率で決まることを示唆するものである。すなわち、糖代謝が亢進する場合、 ^{13}C 値の高い糖に由来するアセトンの割合が高くなるが、アセトンの前駆物質であるアセチル CoA がエネルギーとして利用されるため生成するアセトン量は小さくなる。逆に、酸化が亢進すると、アセチル CoA が余剰になることで生成するアセトン量が多くなり、さらに ^{13}C 値の低い脂質由来のアセトンの割合が高くなる。この観測結果より、呼気アセトンが糖代謝および酸化といったエネルギー代謝の変化を反映する可能性が示唆された。糖および脂質の ^{13}C 値を仮定し、糖に由来するアセトンの濃度を算出し、血糖値変化と比較したところ、予想に反し、血糖値変動との間には相関がみられなかった。

絶食条件下での濃度および ^{13}C 値変動の観測

絶食期には、血糖の供給停止とそれに続く脂肪酸の酸化の亢進によって呼気アセトン濃度の増加と ^{13}C 値の減少が起こると予想し、絶食試験を行った。しかしながら、3 名の被験者ではそれぞれ増加、減少および増減の繰り返しといった濃度変化を示し、 ^{13}C 値は予想に反して増加した。 ^{13}C 値の増加から、脂肪酸の酸化以外にも、糖新生やグリコーゲン分解といったいくつかの前駆体の要因の寄与が考えられた。呼気アセトンの濃度が単に糖代謝および脂肪酸の酸化の亢進に起因するわけではないことが明らかになった。

^{13}C 値既知の糖を使ったグルコース負荷試験下での濃度および ^{13}C 値変動の観測

摂取したグルコースの ^{13}C 値が呼気アセトンの ^{13}C 値に及ぼす影響を検討するために ^{13}C 値既知の糖を使ったグルコース負荷試験を行った。グルコースを摂取した際の呼気アセトンの ^{13}C 値はグルコースと同じもしくは少し小さい値（脂肪酸由来のアセトンの寄与）と予想されたが、3 名ともにグルコースよりも 5%程度大きな値を示した。この試験と同様に、呼気アセトンが単に糖代謝および脂肪酸の酸化の亢進に起因するわけではないことが示唆された。

からの試験において、呼気アセトン濃度および ^{13}C 値の変動と血糖値変動の間には相関がみられなかった。呼気アセトン濃度が血糖値と相関をもち、血糖値の指標となるとする既報とは異なる結果が得られた。 ^{13}C 値の変化と併せて解析することでアセトンの基質に関する議論が可能になることが示唆された。

（3）呼気イソプレンの濃度および炭素安定同位体比の変動

本研究では、イソペンレンについても分析法を確立し、アセトンと同時にイソペンレン濃度および ^{13}C 値のモニタリングを行うことができた。しかしながら、イソペンレンの濃度変動および ^{13}C 値変動には被験者全員に共通する特徴が見出されず、また日常生活下、絶食試験下、グルコース負荷試験下においても三者三様の変動様式が観測された。近年、呼気イソプレンの濃度の変化は筋肉の血流に依存することが濃度観測とモデルによる解析で示唆されている [Mochalski et al., 2023]。本研究では、運動の影響を見るための実験は行わなかった。今後、運動の影響を考慮した実験を行う必要がある。

<引用文献>

- Schmidt K. Podmore I. Journal of Biomarkers, volume 2015, Article ID 981458
- Wang et al., J. Breath. Res., 7(3):037109, 2013
- Yamada K. et al., Anal. Bioanal. Chem., 408, 1597-1607, 2016
- Mochalski P. et al., J Breath Res., 17(3), 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Julien Maxime, Zhao Yu, Ma Ran, Zhou Youping, Nakagawa Mayuko, Yamada Keita, Yoshida Naohiro, Remaud G?rald S., Gilbert Alexis | 4. 巻 174 |
| 2. 論文標題 Re-evaluation of the 13C isotope fractionation associated with lipids biosynthesis by position-specific isotope analysis of plant fatty acids | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Organic Geochemistry | 6. 最初と最後の頁 104516 ~ 104516 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.orggeochem.2022.104516 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|