

[¹³C]アミノ酸トレーサーを用いた生体アミノ酸・タンパク質カイネティクス

藤田保健衛生大学 櫻井洋一

キーワード： アミノ酸，蛋白代謝

連絡先： 和洋女子大学家政学群健康栄養学類人間栄養学研究室 櫻井洋一

〒272-8533 千葉県市川市国府台2-3-1

Tel : 047-371-2174

Fax : 047-371-2174

E-mail : y-sakurai@wayo.ac.jp

要旨

栄養評価法の中でヒト生体内におけるアミノ酸，蛋白代謝を正確に定量化し，代謝動態を評価することはもっとも重要である。すなわち蛋白分解，合成速度を個別に定量化した上で蛋白バランスを評価する必要がある。蛋白バランスの定量的評価法として窒素バランス法はgold standardとして長年にわたり使用されてきたが多くの問題点があり，各種の生理学的，病的変化をきたした条件下では信頼性の高いデータを得ることが困難である。これに対し，安定同位元素標識トレーサーを用いた蛋白代謝動態の測定はヒト生体内のアミノ酸，蛋白代謝の定量に最も正確で優れた方法である。全身的な蛋白バランスは蛋白合成速度(PS)，分解速度(PB)の両者により決定される。これらは生理的，病的条件下で病態に応じて独立して変化するため，PS，PBを別個に算出可能な方法が要求される。安定同位元素標識アミノ酸トレーサーを用いた方法はPS，PBを独立して算出可能である。

安定同位元素標識トレーサー (tracer)は自然界に微量に存在する放射活性のない同位元素であるため，ヒト生体内に安全に投与することが可能である。またトレースされる分子(tracee)と区別なく代謝され，生体に対して全く無害であるという大きな利点を有する。ヒト生体内の代謝回転を算出する方法にはトレーサーとして用いられる標識されたアミノ酸の種類や投与方法の違いなどにより，さまざまな異なる方法が存在し，それぞれの方法には利点，欠点がある。これらの詳細はここでは述べないが，本講演では呼気分析と組み合わせることにより最も簡便にPS，PBを算出することが可能なロイシントレーサーを用いた方法について解説する。すなわち，安定同位元素標識トレーサー [¹³C] leucineを用いて，全身(whole body)のロイシン出現速度(Ra leucine)とロイシンの代謝産物である α -ketoisokaproic acid (α -KIC)と呼気中のisotopic enrichment測定を含めたによるロイシン酸化速度(Leucine oxidation, Leucine OX)を算出する。Ra leucineとLeucine OXから最終的にPS (Non-oxidative leucine disposal, NOLD)，PB (Ra leucine)を算出することができる。本稿では安定同位元素標識トレーサーアミノ酸トレーサーを用いた蛋白分解速度，合成速度の測定法を中心に解説する。

はじめに

外科侵襲後などの栄養状態を把握する上で生体における体蛋白バランスを定量的に評価することは栄養アセスメントの中で最も重要である。近年蛋白合成、分解の制御因子や機構が次第に明らかにされてきており、蛋白分解、合成を個別に定量化し蛋白バランスを評価する必要がある。窒素バランス法は蛋白バランス評価法のgold standardとして使用されてきたが、多くの問題点があり新しい栄養治療法の効果の評価、判定には不十分である。

本稿ではロイシンの安定同位元素標識トレーサーである[$1-^{13}\text{C}$] leucineを用いた蛋白分解速度、合成速度の測定法について解説し、各種外科重症病態下における栄養指標としての本法の意義を評価した。

窒素バランス法の問題点

蛋白必要量の算出は80年以上前の1920年代より行われ、窒素バランス法が蛋白バランスの評価法として長年用いられてきた^{1, 2)}。しかし以前より多くの問題点が指摘されている。Hegstedら³⁾は過去に行った数多くの蛋白バランスのデータから、蛋白摂取量が維持量を越えるか0.5 g/kg per day程度窒素バランス陽性のところでは摂取量の20%程度の窒素が体内に残留することを報告し、このことにより窒素バランスのデータがばらつくことを指摘している(図1, 3)。さらにこの窒素の体内在留は実験期間にかかわりなくおこることより単なる生体の蛋白バランスの適応現象ではないと推察している。実際に通常の条件下で汗や呼気中にも大量の窒素排泄がみられ、これらの窒素排泄量が窒素バランスの算出に考慮されておらず、発汗が多い手術後などの条件下では誤差が大きい。また本法では窒素バランスのデータのみしか得られないため、当然のことながら蛋白代謝速度、分解速度のデータは得られない。

安定同位元素標識トレーサーを用いた代謝動態の算出

全身的な蛋白バランスは蛋白合成速度、分解

速度の両者によって決定されるものであり、これらは生理的、病的条件下で独立して変化するためこれらのパラメーターを別個に算出可能な方法が要求される。安定同位元素標識アミノ酸トレーサーを用いた方法は蛋白合成速度(rate of protein synthesis, PS)、分解速度(rate of protein breakdown, PB)を独立して算出可能であり、正確に蛋白代謝動態を評価することが可能である^{4, 5)}。

安定同位元素標識トレーサーによる方法は自然界に微量に存在する放射活性のない同位元素であるため、ヒト生体内に安全に投与することが可能である^{6, 7)}。また追跡(トレース)される分子(tracer)と区別なく代謝されるため、生体に対して全く無害であるという大きな利点がある^{6, 7)}。ヒト生体内の代謝回転を算出する方法にはトレーサーとして用いられるアミノ酸の種類、投与方法などさまざまな方法が存在し、それぞれの方法には利点、欠点が存在する^{8, 9)}。これらの詳細については別稿⁹⁾にゆずるが、本稿では比較的簡便にPS, PBを算出することが可能なロイシントレーサーを用いた方法について以下に解説する。

安定同位元素標識ロイシントレーサーを用いたPS, PBの算出

必須アミノ酸のひとつであるロイシンは空腹時では細胞内の蛋白分解により細胞内、血中に遊離アミノ酸として存在し、一定の細胞内濃度、血中濃度が維持されている。したがって血清中のロイシン出現速度(Ra leucine)は蛋白分解速度を示すパラメーターとして使用することが可能である。ロイシンはアミノ基転移により細胞内でケト酸のひとつである α -ケトイソカプロン酸(α -ketoisocaproic acid, α -KIC)に変換されるため、Ra leucineの算出には α -KIC enrichmentが用いられる(図2)。細胞内に取り込まれたロイシンは α -KICとなりその一部は細胞内で酸化され、isovaleryl CoAとなりエネルギー基質として用いられる(図3)。また細胞内に遊離アミノ酸として存在するロイシンは同時に細胞内蛋白の再合成の基質としても利用される。ロイシンからの細胞内

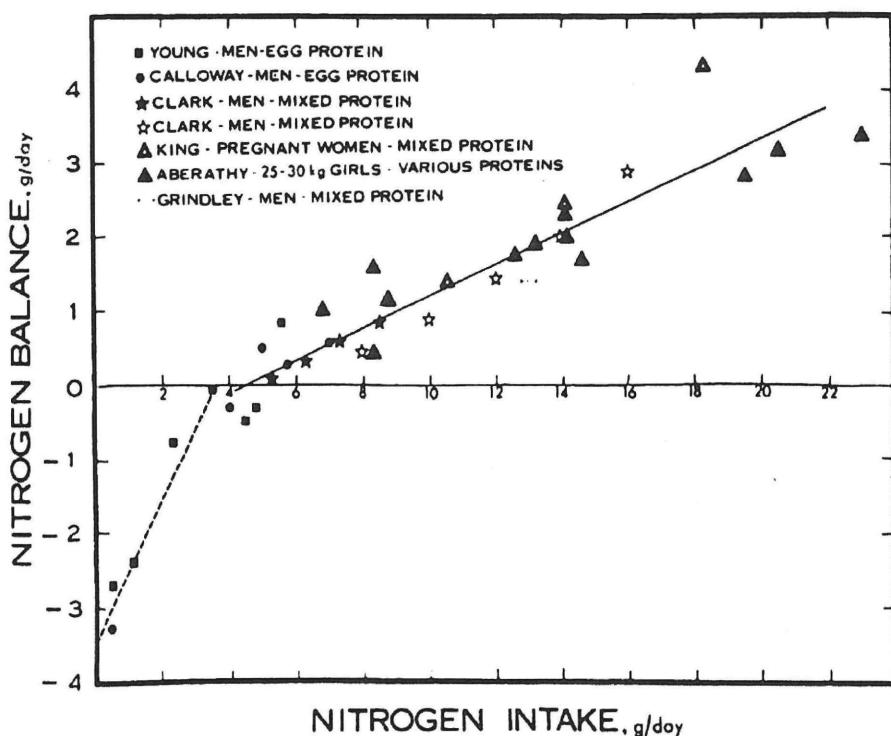


FIG. 2. Results reported in some recent and apparently typical nitrogen balance studies. From Hegsted (16).

Hegsted DM: *Am J Clin Nutr* 31: 1669-1677, 1978

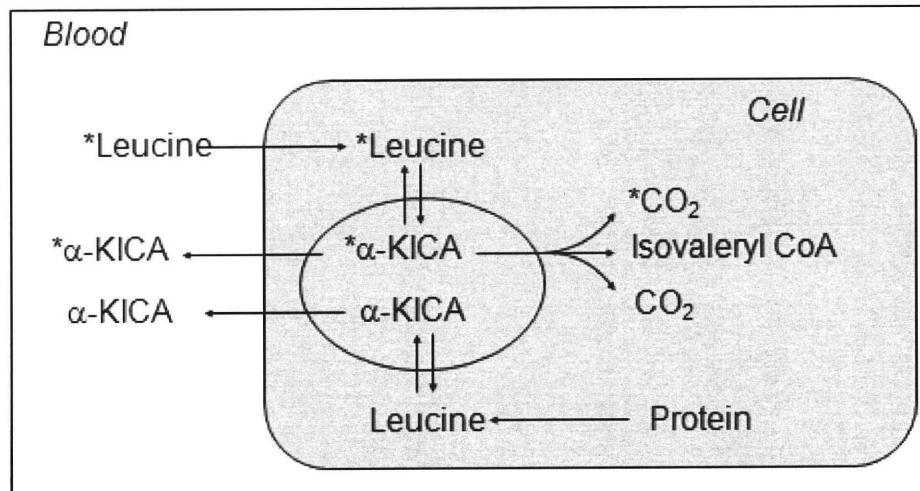
Hegsted DM: *J Nutr* 106: 307, 1976

図1 窒素バランス法における窒素摂取量の多い時の窒素貯留 (Hegsted, DM 文献 3 より引用)

Ra leucine = PB (Rate of protein breakdown)

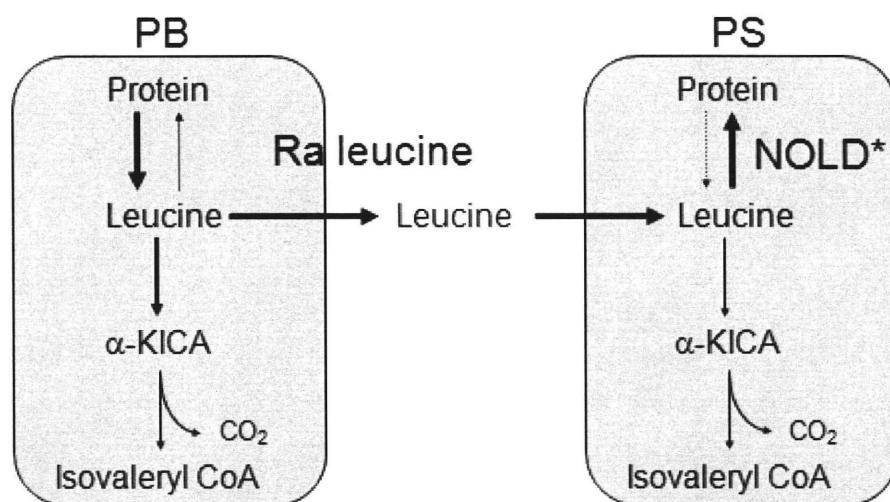
$$Ra \text{ leucine} = \frac{F}{IE \text{ leucine}}$$

図2 Ra leucine の算出 (Wolfe, RR 文献 6, 7 より一部改変して引用)



Enrichment of α -KICA during an infusion of $[1-^{13}\text{C}]$ leucine is appropriate value to use in calculation of total leucine oxidation

図3 血中、細胞内におけるロイシン代謝経路 (Wolfe, RR 文献 6, 7 より一部改変して引用)



* NOLD: Non-oxidative leucine disposal

図4 細胞内外におけるロイシン代謝モデルをもちいた蛋白合成速度(PS), 分解速度(PB)の算出(Wolfe, RR 文献6, 7より一部改変して引用)

$$\begin{aligned} & \text{Total leucine oxidation} = \frac{\text{IE } ^{13}\text{CO}_2 \text{ excretion in breath}}{\text{IE } \alpha\text{KICA}} \\ & \text{NOLD} = \text{Ra leucine} - \text{Leucine oxidation} \\ & \text{Rate of Protein synthesis (PS)} \end{aligned}$$

図5 Leucine OX の算出 (Wolfe, RR 文献6, 7より一部改変して引用)

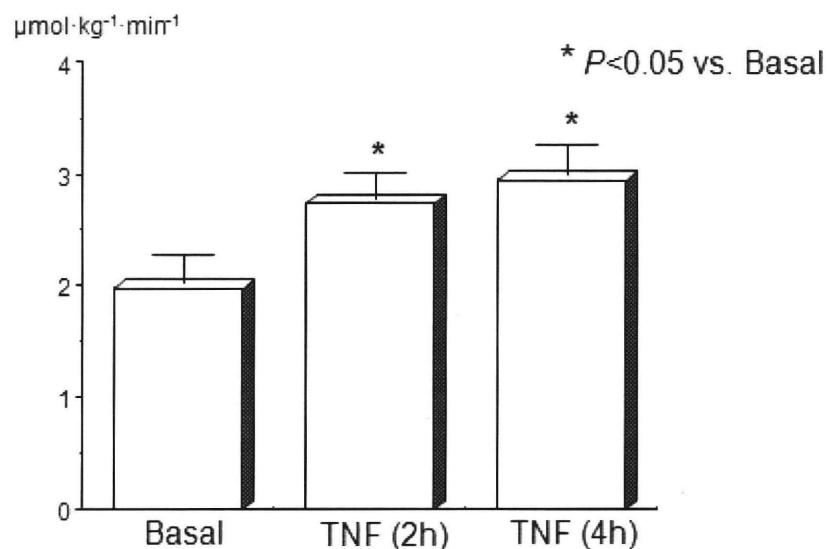


図6 TNF- α 投与におけるnet protein catabolismの変化 (Sakurai, Y., et al. 文献4を一部改変して引用)

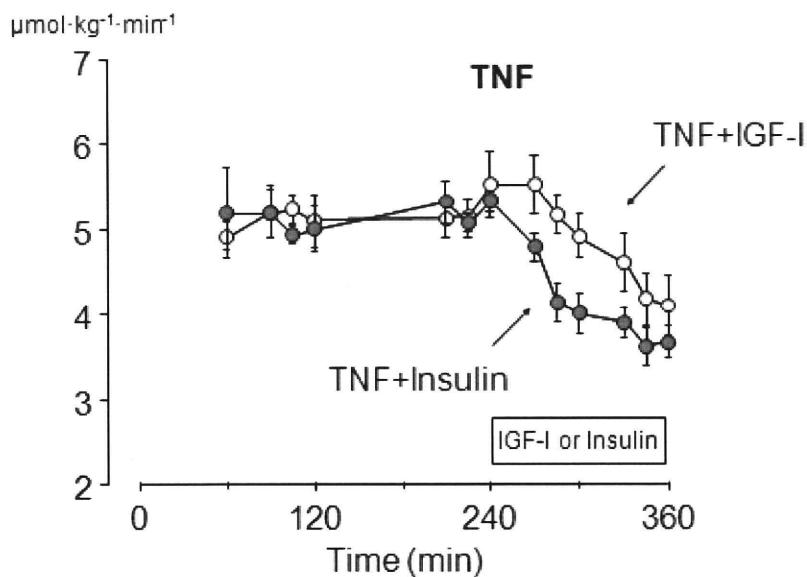


図7 TNF- α 単独およびインスリン、IGF-1併用投与時におけるわRa leucineの変化 (Sakurai, Y., et al.文献11より引用)

蛋白再合成速度はnon-oxidative leucine disposal (NOLD, 図4)とよばれ、細胞内蛋白合成速度(PS)の指標となる(図4). したがって細胞内のロイシンは酸化される経路と蛋白合成に用いられる経路にて代謝され、ロイシンの酸化速度(rate of leucine oxidation, Leucine OX)はnet protein catabolismの指標となる(図5).

これらの細胞内外のロイシン代謝モデルから、ロイシンの血中出現速度(Ra leucine)はPBを、細胞内におけるNOLDはPSを反映するパラメーターとして用いることができる(図4, 5). さらに得られたNOLD ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), leucine OX ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)を体蛋白質中に存在するロイシンの平均含有量である590 $\mu\text{mol/g-protein}$ で除した値がそれぞれPS, PB ($\text{g-protein} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)となり、全身における蛋白代謝(whole-body level)の指標として用いることができる¹⁰⁾.

ロイシンモデルを用いた TNF- α , anabolic hormone の蛋白代謝に対する効果

ロイシン代謝モデルを用いて蛋白代謝の評価を行った結果を示す. 本実験の目的は¹⁾ proinflammatory cytokineのひとつであるTNF- α が蛋白異化の重要な制御因子であるか、²⁾ イ

ンスリン、IGF-1などのanabolic hormoneは蛋白代謝を改善するかについて検討した^{4, 5)}. 本検討でもRa leucineを蛋白分解速度、NOLDを蛋白合成速度、leucine oxidationを負の蛋白バランス指標としてそれぞれ用いた. その結果、TNF- α によりnet protein catabolismは有意に増加した(図6, 4). TNF- α のみではRa leucineは変化しなかったが、anabolic hormone投与によりRa leucineは有意に減少することが明らかとなった(図7, 11). 一方Leucine oxidationはTNF投与により、著明に増加し、anabolic hormone併用投与により著明に減少することも明らかとなった¹¹⁾. 以上の結果から、サイトカインや蛋白同化ホルモンによる蛋白代謝制御のメカニズムは複雑であり、従来の窒素バランス法で得られないPS, PBが別個に算出されるため、より詳細な制御機構を知ることができると考えられた. さらに安定同位元素標識アミノ酸トレーサーを用いて実際の患者でも蛋白代謝動態を測定することも可能である¹²⁾.

おわりに

本法は安定同位元素標識アミノ酸トレーサーの微量投与と血清中、呼気中のIEの測定のみで比較的短時間にヒト生体内の蛋白合成、分解速度を定量化することが可能であり、近年の質量分析器

(GCMS, IRMS)の発達とともに簡便に利用できる方法と考えられた。

本法はPS, PBが定量的に算出でき、蛋白代謝の定量的評価法としてとして得られるデータは非常に客観的かつ有用である。栄養アセスメントの手段として日常的に用いるというよりもむしろ、何らかの新しい栄養投与法や栄養剤が開発された場合や、開発途上の際にその効果をヒト生体内で測定し、その効果自体や、効果発現の機序を知りたいときなどに威力を発揮する方法であろう。

文 献

- 1) Sherman HC: Protein requirement of maintenance in man and the nutritive efficiency of bread protein. *J Biol Chem* 41 : 97, 1920
- 2) Scrimshaw NS, Hussein MA, Murray E, et al: Protein requirements of man: variations in obligatory urinary and fecal nitrogen losses in young men. *J Nutr* 102 : 1595-1604, 1972
- 3) Hegsted DM : Assessment of nitrogen requirements. *Am J Clin Nutr* 31 : 1669-1677, 1978
- 4) Sakurai Y, Zhang X, Wolfe RR: Effect of tumor necrosis factor on substrate and amino acid kinetics in conscious dogs. *Am J Physiol* 266 : E936-E945, 1994
- 5) Sakurai Y, Zhang X, Wolfe RR: TNF directly stimulates glucose uptake and leucine oxidation and inhibits FFA flux in conscious dogs. *Am J Physiol* 270 : E864-E872, 1996
- 6) Wolfe, R.R. *Tracers in Metabolic Research: Radioisotope and Stable Isotope/Mass Spectrometry Methods*, New York: Alan R. Liss, Inc., 1985.
- 7) Wolfe, R.R. *Radioactive and Stable Isotope Tracers in Biomedicine: Principles and Practice of Kinetic Analysis*, New York: Wiley-Liss, 1992.
- 8) 桜井洋一, Robert R. Wolfe, 落合正宏, 船曳孝彦. 安定同位元素標識トレーサーを用いた生体代謝動態の測定の意義. *外科診療* 38 : 501-507, 1996
- 9) Sakurai Y: Protein metabolism in critical illness: Methodologies and their problems underlying in kinetic studies using isotope tracers in vivo. *Keio J Med* 48 : 69-78, 1999
- 10) Waterlow, J.C., Garlick, P.J. and Millward, D.J. *Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body*, Amsterdam : North-Holland, 1978. pp. 225-300.
- 11) Sakurai Y, Zhang X, Wolfe RR: Insulin-like growth factor-I and insulin reduce leucine flux and oxidation in conscious TNF -infused dogs. *Surgery* 117 : 305-313, 1995
- 12) Sakurai Y, Aarsland A, Chinkes DL, et al: Stimulation of muscle protein synthesis by long-term insulin infusion in severely burned patients. *Ann Surg* 222 : 283-297, 1995