第2部 論文集 2-7

^{13}C -acetate の投与量の違いによる検討

^{13}C 法における胃排出能評価の指標について

バイオアベイラビリティの概念を導入した解析プログラムの検討

滋賀医科大学消化器内科

小山 茂樹, 西山 順博, 石塚 泉

Examination by the difference in the amount of medication ^{13}C acetate
Index of ^{13}C gastric emptying test

Examination of an analysis program using Bioavailability

Shigeki KOYAMA, Norihiro NISHIYAMA and Izumi ISHIZUKA

Internal Medicine, Shiga Medical School

I. は じ め に

本稿では、 ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査について、「臨床的胃排出能検査」、「 ^{13}C とは」、「 ^{13}C -呼気試験とは」、「 ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査とは」、「 ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査の実際」、「 ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査の標準化」、「バイオアベイラビリティの概念を導入した解析プ

ログラムの検討」、「Ghoos の理論を用いた解析プログラム」、「 ^{13}C -acetate 50 mg 投与量による ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査の検討」、「 ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査法確立の必要性」の項目で、前半は総論を、後半は本題について記載する。

II. 臨床的胃排出能検査

臨床的胃排出能検査には電気的変化を観察する胃電図法、インピーダンス法、収縮運動を観察する超音波法、内圧法、内容物移動を直接観察する超音波/超音波ドップラ法、放射線非透過マーカー法、バリウム法、MRI 法、CT 法、ラジオアイソトープ (RI 法)、内容物移動を間接観察するアセトアミノフェン法、スルファメチゾール法、呼気ガス法がある。RI 法は直接胃排

出能検査であり、各種胃排出能検査の gold standard となっている。RI 法は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In を用い、固形食、半固形食、液状食の、全胃、近位胃、遠位の感心領域 (ROI) における RI カウントより残存率を求め、胃内における RI 動態を検討する方法である (図 1)。

^{13}C 呼気試験法胃排出能検査は、安定同位体の ^{13}C 標識化合物を経口投与し、胃からの排出、

連絡先: 小山 茂樹

〒520 2192 滋賀県大津市瀬田月輪町 滋賀医科大学消化器内科

TEL 077-548-2111

図1. RI法による胃排出能検査

小腸での消化吸收, 肝における代謝過程を経て呼気中に現われ, 呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ が増加することを利用した間接胃排出能検査法である. 水溶性の acetic acid- $1\text{-}^{13}\text{C}$ ($\text{CH}_3^{13}\text{CO}_2\text{H}$), 脂溶性の

octanoic acid- $1\text{-}^{13}\text{C}$ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6^{13}\text{COOH}$) が用いられ, 赤外分光分析器により $\Delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ を求める方法である.

III. ^{13}C

同一元素であるが質量数(陽子と中性子の和)が異なる核種を同位体(同位元素, アイソトープ)といい, 原子核の安定性により, 安定同位体(原子核が安定)と放射性同位体(ラジオアイソトープ)(原子核が不安定)に分けられる. ^{12}C は天然存在比 98.985%, ^{13}C は天然存在比 1.115% で安定同位体である. ^{14}C は原子核が不安定で, β 崩壊し, 半減期 5730 年で安定な核種

とは

である窒素に変換する放射性同位体で, 天然存在比 $1 \times 10^{-10}\%$ である.

^{13}C 二酸化炭素は存在比 1.115% から 99% まで濃縮でき, ^{13}C 標識化合物が作成され, 質量分析法, 赤外分析法, ^{13}C 核磁気共鳴法により検出スペクトル分析ができる. ^{13}C 標識化合物は誰でも, 何処でも取り扱いができ, 廃棄が自由で, 開放系実験・検査が可能である.

IV. ^{13}C -呼気試験とは

^{13}C 標識化合物などの安定同位体を負荷し, 経時的あるいは一定時間後に呼気に排出される $^{13}\text{CO}_2$ などの標識物質のわずかな増減を検出する方法である.

同位体比 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比はスモールデルター; δ で表示し, 単位は ‰ (パーミル; 千分率) である. ^{13}C 標識化合物を 10~100 mg 経口

投与しても, 呼気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比は数十% 微増加するのみで, 食事の影響で変化するため, 食事の有無・時間は無視できない. 空腹時の δ は -20.8‰ 前後であるため, ^{13}C 負荷試験前の呼気 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比を基準 0‰ として一定時間後の呼気 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の増分をラージデルター (Δ) ($\Delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_t - \delta^{13}\text{C}_0$) として表

示する。

V. ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査とは

胃排出能検査は、主に固形試験食として ^{13}C -octanoic acid, 液状試験食として ^{13}C -acetate を用い、呼気中に現われる $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の経時的な変化から胃排出速度を調べる方法である。胃排出が亢進すると単位時間当たりに小腸から吸収される ^{13}C 標識化合物の量も増加し、 $\Delta^{13}\text{C}$

(‰) を表す曲線の立ち上がりの勾配は急峻となりピーク値も高くなる。逆に胃排出が遅延すると単位時間当たりの小腸吸収 ^{13}C 標識化合物量も低く、 $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) を表す曲線の立ち上がりの勾配は緩徐となりピーク値も低値となる。

VI. ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査の実際

試験食摂取前に呼気の採取を行い、 ^{13}C 標識化合物混和試験食を摂取させ、ある一定の時間間隔毎に呼気を採取する。呼気の採取は、通常の吸気後、数秒間息こらえし、吐き出し、後半の呼気をバックに吐き出すようにし、終末呼気を採取する。採取した呼気はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー法や赤外分光分析装置にて $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比を測定し、 $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) を算出する。以上の操作は、*Helicobacter pylori* 存在診断で用いている Urea Breath Test の赤外分光分析装置でデータ算出は可能である。しかし、実測値からは、 $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) の最

高値を取る時間 ($T_{\max}$) と $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) 折れ線グラフを得ることができる (図 2)。 $T_{\max}$ は RI 法との検討より、RI 法の $T_{1/2}$ (50% 胃排出時間) と相関する。また $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) 折れ線グラフは、0 分から $T_{\max}$ までと $T_{\max}$ から後半に分けられ、 ^{13}C 標識化合物の胃排出、小腸消化吸收、肝臓代謝、呼気排泄の、 $T_{\max}$ までの前半は代謝・排泄より排出・吸収を、 $T_{\max}$ からの後半は排出・吸収より代謝・排泄を反映しているの、 $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) 折れ線グラフパターンより、 ^{13}C 標識化合物の経口投与より呼気中排泄までの障害部位の推測が可能である。

VII. ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査の標準化

検査法の標準化は、その検査法の実地臨床における普及であり、より多くの実地医家が、簡便に、安全に、低費用にて実施でき、簡単にその結果を得ることができ、診断・治療に役立つ方法でなければならない。 ^{13}C 呼気試験法胃排

出能検査の標準化に関しては、試験食・測定方法・評価指標の統一を目指し、全国 10 施設が「 ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査 (^{13}C 法) の標準法の確立と普及のための懇話会」のもと、標準法の一部 (液食) を確立した。その標準法は、他

図 2. 赤外分光分析器による実測値のプロット

図3. 赤外分光分析器. 左: 大塚電子 UBiT-IR300, 右: 日本分光 HBP-100

稿にて詳細に述べられているが、その要約は、液状試験食としてラコール® (200 Kcal/200 ml, 蛋白質 18%, 脂質 20%, 糖質 62%) (大塚製薬) 一袋, ^{13}C 標識化合物として ^{13}C -acetate 100 mg, 測定方法として摂食前, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分の呼気採取を行い, $\Delta^{13}\text{C}(\%)$ を求め, $\Delta^{13}\text{C}(\%)$ が最高値をとる時間 ($T_{\max}$) を求める. その平均は $45.7 \pm 11.6 \text{ min. (m} \pm 1\text{SD)}$, $45.7 \pm 23.2 \text{ min. (m} \pm 2\text{SD)}$ である.

この標準法は, 赤外分光分析器 (UBiT-

IR300; 大塚電子, HBP-100; 日本分光) (図3) を保有し, 試験食としてラコール® と ^{13}C 標識化合物として ^{13}C -acetate の入手が可能であれば, 簡便な方法である. しかし, 普及にはラコール® 及び ^{13}C -acetate の試験食及び検査試薬としての安定供給と保険収載が必要である. かつ, $T_{\max}$ 及び $\Delta^{13}\text{C}(\%)$ 折れ線グラフパターン of の意義, 疾患における特徴についての検討も必須事項である.

VIII. バイオアベイラビリティーの概念を導入した解析プログラムの検討

$\Delta^{13}\text{C}(\%)$ により得られるデータのもつ意義については, 今後の検討が必要であるが, これらのデータから, さらなる検討項目因子を得るには, バイオアベイラビリティーの概念の導入が必要である.

バイオアベイラビリティー (生物学的利用能, bioavailability) とは, 薬理学分野において, 薬物が生体に投与された後, 体内薬物量 (または血中薬物濃度) の変化速度は薬物の体内に入る速度と体内から消失する速度の差として表現され, 体内に入る速度に関連した内容がバイオアベイラビリティーであり, 「投与された薬物が全身循環血中に到達した量と, 全身循環血中に到達する速度」と定義され, bioavailability: F は, $F(\%) = \text{AUC}_{\text{po}} / \text{AUC}_{\text{iv}} \times 100$ (AUC: area under curve, po: 経口投与, iv: 静脈投与) で計算される.

$\Delta^{13}\text{C}(\%)$ は, ^{13}C 標識化合物を経口投与し, 胃排出・小腸消化吸收・肝臓代謝・呼気排泄の総

合結果としての値であるが, その値を用い, 胃内の量を求めるには, 完全に排出され得られる total $\Delta^{13}\text{C}$ 量が必要である. 時間 t における胃内の量 (胃内残存率) (GRRt; Gastric Residual Ratio) は, バイオアベイラビリティーの式より次式により求められる. $\text{GRRt}(\%) = \{1 - (\text{AUC}_t / \text{AUC}_{\infty})\} \times 100$ (図4)

しかし, AUC_{∞} を得るためには, 多くの測定ポイントが必要で, かつ AUC を求めなければならない. そこで, 我々は田端健司氏 (京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野, 現藤沢薬品工業 (株)) の協力の下, 非線形最小二乗法による薬物動態解析法を応用し, Microsoft Excel を用いた Non-linear Regression Analysis software for Gastric Empty: GEMPT (EXCEL) (図5) を開発した. Excel マクロ機能を用い, $\Delta^{13}\text{C}(\%)$ 値を入力するのみで, $\text{GRR} (1 - \text{AUC}(t/\infty)) (\%)$ 曲線と Fitting Model 曲線, Lineal Regression Parameter K と Lag

図4. バイオアベイラビリティを用いた胃内残存率

Nonlinear Regression Analysis Software for Gastric Empty : GEMPTY (EXCEL)

DSet		2000/1/11 15:31:14	
ID	999999	$\Delta\%$ max	38.9
Name	K. tabata	$\text{AUC}(\text{inf})$	2877.4
Gender	Male	Linear Regression Parameter	
Age	30	k	0.0148
		RP	14
		AIC	-21.7099

GEMPTY.xls ver.00/1/9				
Time (min)	% (R)	$\Delta\%$ (R)	$\text{AUC}(T)$	$1 - \text{AUC}(T)/\text{inf}$ (%)
0	13.1	0.0	0.0	100.0
10	27.8	14.7	73.5	97.4
20	52.0	38.9	341.5	88.1
30	49.9	36.8	720.0	75.0
40	41.0	27.9	1045.8	63.7
50	37.2	24.1	1303.5	54.7
60	33.5	20.4	1528.0	47.0
70	30.0	16.9	1712.5	40.5
80	27.9	14.8	1871.0	35.0
90	25.2	12.1	2009.5	30.3
100	22.9	9.8	2115.0	26.5
110	22.9	9.8	2213.0	23.1
120	21.1	8.0	2302.0	20.0
130	21.3	8.2	2383.0	17.2
140	18.2	5.1	2449.5	14.9
150	20.5	7.4	2512.0	12.7

n = 16

Nonlinear Regression Analysis Software for Gastric Empty : GEMPTY (EXCEL)

2000/1/11 15:31:15		Model Fitting	
ID	999999	Name	K. tabata
Name	K. tabata	Gender	Male
Gender	Male	Age	30
Age	30	k	0.01
		Lag Time	10

GEMPTY.xls ver.00/1/9		
Time (min)	Observed	Predicted
10	97.4	99.1
20	88.1	85.6
30	75.0	73.9
40	63.7	63.8
50	54.7	55.1
60	47.0	47.0
70	40.5	41.1
80	35.0	35.5
90	30.3	30.6
100	26.5	26.5
110	23.1	22.8
120	20.0	19.7
130	17.2	17.0
140	14.9	14.7
150	12.7	12.7

n = 15

Final Parameters	
k	0.0148
s.d.	0.00009
Lag Time	9.50001
s.d.	0.43043
AIC	-23.66281

Damping Gauss-Newton Method	
Loop	2
ss	0.15815

ss1	
ss2	
ss3

図5. Nonlinear Regression Analysis software for Gastric Empty : GEMPTY (EXCEL)

time が得られ, RI 法の解析因子である Lag time (5% 排出時間), $T_{1/2}$ (50% 排出時間), TET (95% 排出時間), 150% RR (150 分残存率) が算出できる (図6)。

Helicobacter pylori 陰性健康成人男性 (20 歳台) の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA 3mCi と 100 mg ^{13}C -acetate との同時投与による検討では, 水 400 ml の liquid gastric emptying time は, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -

DTPA の $T_{1/2}$ と ^{13}C -acetate の $T_{1/2}$ は相関 ($r=0.915$) し (図7), 日本平滑筋学会がストログラム研究班提唱標準固形食 (ホットケーキ) (protein 8.1 g, lipid 5.7 g, carbohydrates 51.6 g, energy 291 Kcal) の solid gastric emptying time は, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA の 150RR と ^{13}C acetate の 150 RR は相関 ($r=0.950$) した。

呼吸試験は, 呼吸採取ポイントが多いことも

図6. バイオアベイラビリティ概念導入解析プログラムによる胃内残存率曲線

図7. RI法と呼気法(GEMPTy(Excel))との同時測定による相関性

欠点の一つである。我々は、呼気採取を 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 分の 16 ポイントにて行っている。また、今回提唱の標準法では 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分の 12 ポイントの呼気採取を推奨している。

Non-linear Regression Analysis software for Gastric Empty: GEMPTy (EXCEL) は

Fitting curve を得ることができことより、測定ポイントのシミュレーションを行ったところ、液食では 0, 30, 60, 90, 120 分の 5 ポイント (誤差 $m \pm 1SD = 3.14 \pm 1.93$) (図8)、固形食では 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分の 7 ポイント (誤差 $m \pm 1SD = 6.77 \pm 4.16$) で簡易化することが判明した。

IX. Ghoos の理論を用いた解析プログラム

Ghoos の理論を用いた解析プログラムとして、「 ^{13}C 標識化合物による胃排出パラメータソフト for Excel」((株) スターメディカル) がある (図9)。

単位時間に排出された $^{13}\text{CO}_2$ の割合 (^{13}C 排出速度: %dose/hr) は、 CO_2 の生成速度を考慮

して、 $\% \text{dose/hr} = A\% \times \text{体表面積} \times 300 \times 0.01123 \times 10 / (\text{濃縮度} \times \text{投与量} / \text{分子量})$ の計算式により算出される。各時間における %dose/h は χ^2 確率密度関数モデル $\% \text{dose/hr} = a \cdot b \cdot e^{-ct}$ によって表され、 $T_{\max\text{-calc}} = b/c$, Gastric emptying coefficient = GEC = $\ln(a)$ が算出さ

図8. GEMPTY (Excel) を用いたシミュレーションによる測定ポイントの簡易化

図9. ^{13}C 標識化合物による胃排出パラメータソフト for Excel (株) スターメディカル)

れる。また、%dose/hr の時間累積 (^{13}C 累積回収率: C%D) は、Power exponential モデル $C\%D = m(1 - e^{-kt})^\beta$ によって表され、 $T_{1/2}$ が算出される (図10)。 ^{13}C 標識化合物による胃排出パラメータソフト for Excel は、身長・体重・ $\Delta^{13}\text{C}(\%)$ を入力することにより、%dose/h、 ^{13}C cumulative % dose の曲線とそのパラ

メータである $a, b, c, \text{GEC}, m, k, \beta, T_{1/2}, T_{\text{lag}}$ が得られる (図9, 図10)。

上述2解析プログラムを紹介したが、それより得られる各種パラメータの意義・有用性については、今後の検討であるが、より多くの因子の算出は、解析に役立つことは明白である。

X. ^{13}C -acetate 50 mg 投与量による ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査の検討

今回、 ^{13}C -acetate 100 mg 投与によるラコール⁰⁰ (200 Kcal/200 ml) (大塚製薬) 一袋を用いた液食胃排出 ^{13}C 呼気試験法の標準法及び実測値による T_{max} の健常成人値が提唱されたが、 ^{13}C -acetate 量の 100 mg から 50 mg への減量が可能か否かを検討した。*Helicobacter pylori* 陰性健康成人男性 18 名 (20 歳台) を対象に、ラコール⁰⁰ 一袋に ^{13}C -acetate 50 mg を混和し、

投与、0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240 分の終末呼気を採取し、Non liner Regression Analysis software for Gastric Empty: GEMPTY (EXCEL) と ^{13}C 標識化合物による胃排出パラメータソフト for Excel を用い解析した (図11)。

$\Delta^{13}\text{C}(\%)$ が最高値をとる時間 (T_{max}) の平均は、 49.2 ± 14.4 min. ($m \pm 1\text{SD}$) であった。今回

図 10. Ghoos の理論を用いた解析

図 11. ^{13}C -acetate 50 mg による ^{13}C 呼吸試験法胃排出能検査

提唱されたラコール® 一袋に ^{13}C -acetate 100 mg の $T_{\max}$ 45.7 ± 11.6 min. ($m \pm 1\text{SD}$) とは同一対象者でない、測定間隔が15分間隔と10分間隔と違うことより、一概に比較はできないが、

ほぼ同様の値をとった。少なくとも、 ^{13}C -acetate 50 mg でも呼気中に $^{13}\text{CO}_2$ が検出でき、 ^{13}C 呼吸試験法胃排出能検査が可能であることは示せた。

XI. ^{13}C 呼吸試験法胃排出能検査法確立の必要性

社会情勢の変化(ストレス・情報過多社会、非自然社会)により、脳・腸相関(Brain-gut interaction)により生じるFGID(Functional Gastrointestinal Disorder, 消化管機能異常症)が増加している。FGIDの代表疾患はS-GERD(symptomatic gastro-esophageal reflux disease), FD(Functional dyspepsia), IBS(Irritable bowel syndrome), FC(Functional constipation)である。FDは、multicenter random-

ized, double-blind, placebo-controlled study の *Helicobacter pylori* 除菌療法による症状改善が得られなかったことより、症状発現は知覚過敏(perception)と消化管運動異常が想定されている。FDはRome IIによりGIMD(Gastrointestinal Motility Disorder: 消化管運動障害)とGIFD(Gastrointestinal Functional Disorder: 消化管機能障害)に分類され、Working Team Reportは胃運動障害の診断は $^{99\text{m}}\text{Tc}$

による RI 検査を診断法として推奨している。このような情勢下で、本邦における FD の診断は、RI 法による診断がし難い状況であり、かつ RI 法に変わる検査法が確立されていないため、FD が perception との関与で述べられつつあ

る。実際、FD における運動異常の関与は 1/3 であると報告され、RI 法が使い難い本邦においては ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査法の確立は必要である。

XII. お わ り に

安定同位体を用いた呼気試験は、採血・採尿・組織採取や X 線・放射能被爆などがなく、無侵襲的検査で、今後の普及が期待されている検査法である。胃排出能検査には種々の方法があり、一部 (RI 法、アセトアミノフェン法、レントゲン不透過マーカー法) は標準法が提唱されているが、試薬・試料及び検査法自体保険収載されておらず、実地医療においては施行不可能であ

る。 ^{13}C 呼気試験法も同様であるが、他の検査法に比べ、無侵襲検査である特徴を持ち、Urea Breath Test の普及により、赤外分光分析器を保有している施設が多いことより、普及の可能性があり、標準法の提唱と共に、 ^{13}C 標識化合物の安定供給及び保険収載に関する努力が必要である。

文 献

- Braden, B., Adamus, S., Duan, L.-P., Orth, K.-H., Maul, F.-D., Lembcke, B., Hçr, G. and Caspary, W.F. (1995). The [^{13}C] acetate breath test accurately reflects gastric emptying of liquids in both liquid and semisolid test meals. *Gastroenterol.* **108**: 1048-1055.
- Choi, M-G., Cammilleri, M., Burton, D.D., Zinsmeister, A.R., Forstrom, L.A. and Naio, K.S. (1997). [^{13}C] octanoic acid breath test for gastric emptying of solids: accuracy, reproducibility, and comparison with scintigraphy. *Gastroenterol.* **112**: 1155-1162.
- Ghoos, Y.F., Maes, B.D., Geypens, B.J., Mys, G., Hiele, M.I., Rutgeerts, P.J. and Vantrappen, G. (1993). Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterol.* **104**: 1640-1647.