ガスクロマトグラフィーによる肺胞気中アセトン 定量法の検討とその臨床応用

北海道大学医学部内科学第一講座（指導 村尾 誠教授）

黒田 練介

THE DETERMINATION OF ACETONE CONCENTRATION IN ALVEOLAR AIR WITH GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY —EVALUATION OF THE METHOD AND ITS CLINICAL APPLICATION—

Rensuke KURODA

The First Department of Internal Medicine, Hokkaido University

School of Medicine, Sapporo, Japan

(Director: Prof. Makoto Murao)

概要 呼気中アセトンをガスクロマトグラフィーにより測定する際の問題点について検討し、独自の測定法を用いてその実用性を評価したが、感度、迅速性および再現性ともに満足すべき結果が得られた。その定量には精度の高い標準ガスを要した。著者の方法による健常者の早朝空腹時における呼気肺胞気中アセトン濃度は 1.89 ± 0.76 (S.D.) $\mu\text{g/L}$ ($n=24$) であり、糖尿病患者では有意の増加を示した。食餌、運動などの因子がアセトンに対して著明な影響を与えることを認めたので、ヒトにMCTを与えてケトosisのモデルを作り検討を加えた。健常者にMCT 15 gを与えると肺胞気中アセトンは平均 3.5時間後に最大値 7.89 ± 1.95 (S.D.) $\mu\text{g/L}$ ($n=10$) に達する増加を示した。しかしMCTによるアセトンの増加量は糖尿病患者で有意の高値を示さなかつた。呼気中アセトンと尿中アセトン体は必ずしも平行せず、肝のアセトン体産生を検索する上で呼気は理論的にも臨床的にも適切な試料と考えられた。

I. 緒 言

細胞レベルにおける肝のアセトン体産生の増加にかんする代謝調節機構は未だ十分に解明されておらず、in vivoにおける代謝調節への直接の実験的アプローチが不足している今日、in vitroにおける幾多の実験成績の解釈は一樣ではない¹⁾

臨床の立場からみても、ヒトのアセトン体代謝には数多くの因子が関与しており²⁾、さらに従来の血清あるいは尿中のアセトン体の定量法³⁾⁴⁾が

煩雑で手技に熟練を要する上に再現性に乏しいという欠点を有することもあつて、生体のアセトン体代謝の正確な把握は一層困難となつている。

血清あるいは尿中におけるアセトンなどの揮発性物質を定量する際の技術上の難点⁵⁾は呼気において測定することにより回避し得る可能性があり、古くから呼気についての測定が試みられたが操作が煩雑で実用の段階に至らなかつた。この分野にガスクロマトグラフィーを導入したという報告は1960年のChem. Eng. News誌⁶⁾上にみられるのが最初である。この中で匿名の筆者はヒトの呼

〔昭和45年11月19日受稿〕

気からアセトンをはじめ11種の有機物と4種の未知の物質が検出されたと述べているが、方法の詳細は明らかでない。その後何らかの方法で濃縮した呼気についての測定が行なわれた^{7,8)}。さらに最近になつてガスクロマトグラフィーにより、前処理を行わず直接呼気についてのアセトンの定量が報告されているが、各方法の詳細は必ずしも明確でなく、いずれも実際のガスクロマトグラムが示されていない⁹⁻¹¹⁾。健常者の値について、Stewartら⁹⁾は早朝空腹時の肺胞気中アセトン濃度を $1.1 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ (mean $\pm$ S.D.) と報告している。このように測定の対象となるアセトンがきわめて微量であるために、定量法の詳細については未だ検討すべき問題が残されていると考えられる。

著者は最初に、ガスクロマトグラフィーにより呼気中アセトンを測定するにあつて、これらの報告を参考にして、その測定条件について検討し、独自の方法を採り入れて、その定量法の実用性を評価しようとした。アセトン体は代謝異常を鋭敏に反映して変動するとされ¹²⁾、呼気は臨床上特に経時的な変動を把握するには適切な試料と考えられる。そこで著者は次に、この方法を臨床に応用し、ヒトのアセトン体代謝を呼気相から追究しようと試みた。この際数多くの因子がヒトのアセトン体代謝に影響を与えることを考慮し、中鎖脂肪酸トリグリセライド(以下MCTと略す)を導入してケトosisのモデル実験を行ない検討を加えた。

II. 基礎実験

ガスクロマトグラフィーにより呼気中に含まれるアセトンを測定する場合、その濃度がきわめて低いことがまず問題になつてくる。この点を解決するには、試料である呼気を何らかの方法で濃縮するかあるいは装置の測定感度を向上させるか、いずれかの方法によらねばならない。この場合試料の濃縮過程における汚染の問題、さらには回収率をも含めた測定条件の安定性および簡易性などを考えれば、装置の工夫により1回呼気分析法に

より定量分析を行なうことが望ましいので、著者はガスクロマトグラフィーの分析条件について、すでに報告された方法を参考にして、検討を行なつた。次に絶対定量を行なうに際し、calibrationを正確になし得るかどうか、微量の揮発性ガスの定量ということを考えれば、重要な課題である。さらには試料採取の点をも含めた測定法の安定性、再現性および簡易性などが実用上要求されるわけである。著者はこれらの点について検討を加えた。以下著者の用いた方法とその成績について述べる。

1. 実験装置および方法

1) 実験装置

著者はきわめて高感度においてガスクロマトグラフを操作する際、安定しかつ分析の対象とすべきアセトンが定量分析に好ましいピークをえがくようなガスクロマトグラムを得ることを主眼として検討を行なつた。その際、rebreathing法ではあるが、方法が比較的詳しく述べられ、かつガスクロマトグラムが示されているLeveyら⁸⁾の条件を主として参考にして種々検討した結果、下記に述べる条件が上記の目的を満足させるものであることを知り得た。

著者の用いた装置は水素炎イオン化検出器付 Beckman GC-2Aガスクロマトグラフである。カラムは長さ6フィート、外径 $1/4$ インチのstainless-steel tubeで、カラム充填薬としては、固定相担体には酸処理をしたchromosorb W60~80meshを使い、固定相液体には15%のpolyethyleneglycol 1500を用いた。カラム温度は55°Cに設定した。carrier gasはヘリウムを使用し、カラム入口圧を30psi. とした。カラムは適宜パージを行なつた。検出器はBeckman社の水素炎イオン化検出器で、水素圧7psi.、空気圧7psi. とし、attenuatorは 1×10 から 1×10^2 の範囲で用いた。レコーダは1 mV full scaleで full scale応答時間が1秒の横河ラボラトリレコーダLER-10S1を使用した。記録紙送り速度は毎分1cmとしてガスクロマトグラムをえがいた。アセトン量は三角法により算出した

Table 1. Gaschromatographic conditions for analysis of alveolar volatile substances.

Instrument	Beckman GC-2A
Column	6feet. 1/4inch Stainless-steel Chromosorb W 60-80mesh 15%polyethyleneglycol 1500 Temperature, 55°C
Carrier Gas	Helium, 30psi.
Detector	Hydrogen Flame Ionization Detector Hydrogen, 7psi. Air, 7psi. Attenuator, $1 \times 10^{-1} \times 10^2$
Recorder	1mV Full Scale Response, Full Scale 1sec. Chart Speed, 1cm/min.

ピーク面積から求めた。上記の条件をTable 1に一括する。

2) calibration

著者はアセトンのcalibrationを行なうにあたって、東京芝浦電気株式会社に依頼して特に作製した0.89ppmおよび5.67ppmの2種のヘリウムバランスのアセトン標準ガスを使用した。なお毎日のcalibrationには0.89ppmのアセトン標準ガスを使用した。

3) 試料の採取および注入

被験者にノーズクリップをつけマウスピースをくわえさせて安静呼吸をさせた後、最大呼吸を行なわせ、その終末呼気相を直接マウスピースから注射器に採取する方法をとった。採取したサンプルの5 mlを直ちにガスクロマトグラフに直接注入した。注入針は側面に穴のあいたものを用いた。なお注入に際してはHamilton社のgas tight syringe1010および特に作製した定量用インジェクターについても検討した。

2. 実験成績

1) calibration

0.89ppmおよび5.67ppmの2種のヘリウムバランスのアセトン標準ガスをそれぞれ1, 2, 3, 4および5 ml注入してcalibrationを行なうと、アセトン 2.15×10^{-9} gから 6.84×10^{-8} gの間にはFig. 1のように、明らかな直線性が認められた。

2) 測定感度

著者の方法によれば、アセトン最小検出量は

Fig. 1. Relationship between the acetone level and peak area measurements.

Fig. 2. Gaschromatogram of alveolar volatile substances in a normal subject.

Fig. 3. Gaschromatogram of alveolar volatile substances in a diabetic subject.

10^{-9} gであり、健常者についてその呼出肺胞気5 mlを直接注入する1回呼気分析により、十分定量性のあるアセトンピークを得ることができた。

健常者の早朝空腹時の呼出肺胞気から得られたガスクロマトグラムの1例をFig. 2に示す。糖尿病患者からの1例をFig. 3に示す。矢印をつけたピークがアセトンのピークであり、この健常者例(No. 1)では呼出肺胞気中のアセトン濃度は $2.0\mu\text{g/L}$ であり、糖尿病患者例(No. 25)では $4.5\mu\text{g/L}$ である。なおこれらの例ではattenuatorはいずれも 1×10 である。

3) 迅速性

Fig. 2に示されるように、アセトンの保持時間は、試料注入からピーク頂までをとると、4分5秒であり、分析に要する時間は短かくて済んだ。

4) 基線の安定性

Attenuator 1×10 での基線はFig. 2, Fig. 3に示されているように、安定している。attenuator 1×5 でも基線に多少のnoiseがみられるが、実用に差し支えないものとみなせる。しかし著者が測定したかぎりでは、健常者は全てattenuator 1×10 において十分定量性のあるピークを示した。attenuatorが 2×10 以上では、基線は全く安定していた。

5) 再現性および測定操作の安定性

健常な同一被験者(No. 1)について、連続測定を行なつて得られたガスクロマトグラムの1例をFig. 4に示す。この例では呼出肺胞気中アセトン濃度は $1.9\mu\text{g/L}$, $1.9\mu\text{g/L}$ と一定である。

Fig. 4. Duplicate gaschromatographic analyses of alveolar volatile substances in a normal subject.

Table 2. Successive determinations of acetone concentrations in alveolar air within 2 hours from 3 normal subjects.

Subject No.	Alveolar Acetone ($\mu\text{g/L}$)
1	1.9
	1.9
	1.8
	1.9
	2.0
	2.0
2	2.5
	2.7
	2.7
	2.8
	2.7
	2.8
3	1.5
	1.5
	1.5
	1.5
	1.5
	1.6

Table 3. Acetone concentrations in alveolar air obtained over a period of a month from 3 normal subjects.

Subject No.	No. of Determinations	Alveolar Acetone ($\mu\text{g/L}$)			
		Mean	S. D.	S. E.	Range
1	26	1.92	0.43	0.09	1.2-2.9
2	12	2.36	0.68	0.20	1.4-3.5
3	7	1.51	0.40	0.15	0.9-2.1

同じ健常者3例(No. 1, No. 2およびNo. 3)について早朝空腹時に、被験者の状態を一定に保つようにしながら、2時間を越えない間で測定した値はTable 2に示す如くで、その変異係数(C.V.)はそれぞれ3.9, 4.1および2.7%であり、No. 1, No. 2およびNo. 3の各測定値の各平均値に対する偏差の絶対値をそれぞれ求め、それらの値の各平均値に対する百分率を計算すると $2.4 \pm 2.3 \pm 0.5\%$ (mean $\pm$ S.D. $\pm$ S.E., $n=18$)であり、実用上満足すべき再現性を示すことを認めた。

なお同じ健常者3例について、それぞれ1カ月を越える期間にわたつて測定した早朝空腹時の呼出肺胞気中アセトン濃度は、Table 3に示すように、ほぼ一定の傾向を示すことを認めた。

上に述べた再現性のうち連続測定した場合に、生体側の状態は変わらないものと仮定すれば、誤差があるとしたらそれは測定操作の過程において

生じたものと考えられる。特に呼気採取の点について検討したところ、呼気終末相を迅速に吸引するという点に注意を払いさえすれば、特別な問題は起こらないことが知られた。なおHamilton社のgas tight syringe1010は終末呼気相を採取する際に、迅速性の点で、高価な割に必ずしも満足すべきものではない。定量用インジェクターについては、これなしでも十分満足すべき結果が得られた。

III. 臨床実験

呼出肺胞気中アセトンの定量は実用性の高い測定法であることを知り得たので、著者はこの方法を臨床に応用することを試みた。まず健常者および糖尿病患者を対象として、その呼気中アセトンの濃度を測定し、かつその値に影響を与える二、三の因子について検討した。次いでこれらの因子による影響を考慮して、MCT投与により実験的にケトーシスのモデルを作つて実験をすすめた。その際呼出肺胞気中アセトン濃度と尿中アセトン体濃度について比較観察し、アセトン体代謝とくに肝におけるアセトン体産生を検索する上での、呼気中アセトン定量の意義について検討した。MCT投与によるケトーシスの研究に呼気中アセトンの測定法を導入しているのはFreundら¹²⁾のみであり、この分野にかんする実験の殆どが、アセトン体の測定にかんしては、他の方法により検討されている。そこで著者はMCTによるケトーシスについて呼気相から検討を加えた。

1. 実験対象および方法

1) 実験対象

健常者としては、糖尿病の既往歴および家族歴を認めず、糖代謝障害を招くとされる疾患を除外した18~67才のもの24例を、糖尿病患者としては、北海道大学医学部附属病院第一内科および関連病院で糖尿病と診断された19~65才のもの17例をそれぞれ対象とした。糖尿病の診断については阿部正和教授の基準を参考とし、境界例は除いて診断の確実なものを選んだ。

2) 方法

呼気中アセトンは既述した著者の方法により測定した。尿中アセトン体の簡易測定法としてはAmes社製ケトスティックスを使用した。血糖値は静脈血についてautoanalyser法により測定した。血清遊離脂肪酸（以下NEFAと略す）は宇井・板谷法により測定した。血清immunoreactive insulin（以下IRIと略す）の測定はMorgan-Lazarow法に準じた。MCTは小野薬品工業株式会社製のものをを用い、長鎖脂肪酸トリグリセライド（以下LCTと略す）としては市販のマーガリンを代用し、いずれも経口的に投与した。被験者は実験の間は水分は自由にとらせ、また運動負荷の実験を除いて、運動は必要最小限に制限した。

2. 実験成績

1) 健常者および糖尿病患者の肺胞気中アセトン濃度とその変動

a) 健常者の早朝空腹時の呼出肺胞気中アセトン濃度

健常者24例について早朝空腹時に測定した呼出肺胞気中アセトン濃度はTable 4に示す如く $1.89 \pm 0.76 \mu\text{g/L}$ (mean $\pm$ S.D.)であつた。なお $0.4 \mu\text{g/L}$ と最低値を示したのは、37才の男子事務員で食生活は米食に偏していた。最高値 $4.2 \mu\text{g/L}$ を示したのは20才の男子学生で運動部員であり、糖質が比較的少ない食習慣を有していた。

b) 糖尿病患者の早朝空腹時の呼出肺胞気中アセトン濃度

糖尿病患者17例について早朝空腹時に測定した呼出肺胞気中アセトン濃度はTable 4に示す如く $3.04 \pm 1.79 \mu\text{g/L}$ (mean $\pm$ S.D.)であり、健常者に比べて推計学的に有意の増加を示すことを認めた ($P < 0.05$)。なお $0.8 \mu\text{g/L}$ と最低値を示したのは34才の男子で未治療の肥満型糖尿病患者であ

Table 4. Acetone concentrations in alveolar air from normal and diabetic subjects.

Group	No.	Alveolar Acetone ($\mu\text{g/L}$)			
		Mean	S.D.	S.E.	Range
Normal	24	1.89	0.76	0.16	0.4-4.2
Diabetic	17	3.04	1.79	0.43	0.8-7.6

Fig. 5. Diurnal rhythm of alveolar acetone in normal and diabetic subjects.

り、最高値 $7.6\mu\text{g/L}$ を示したのは52才の女子でインスリン治療中の患者であつた。

c) 肺胞気中アセトンの日内変動ならびに食餌、運動および気温の影響

日内変動を追求し得た健常者3例 (No. 1, No. 2およびNo. 3) および糖尿病患者3例 (No. 25, No. 26およびNo. 27) の肺胞気中アセトン濃度はFig. 5に示されるように、健常者では朝食前に高く夕食後に低い日内変動を示すことを認めたが、糖尿病患者では健常者と異なつた傾向を示した。

なお42時間絶食させた健常者3例 (No. 1, No. 2およびNo. 3) について、肺胞気中アセトン濃度を経時的に観察すると、絶食16時間ほどで呼気中アセトン濃度の増加が目立ちはじめ、翌朝つまり絶食36時間から再び測定すると増加の割合は急激となり、42時間後に平均 $49.67\mu\text{g/L}$ に達し

Fig. 6. Effects of fasting and ingestion of 100gm. of glucose on alveolar acetone in 3 normal subjects.

Fig. 7. Effect of moderate exercise on alveolar acetone in 3 normal subjects.

た。この状態の被験者にブドウ糖 100gを与えるとき、呼気中アセトンが急速に減少してくることが認められた (Fig. 6)。

健常者3例 (No. 1, No. 2およびNo. 3) について運動による影響を検討した。早朝空腹時に肺胞気中アセトン濃度を測定した後、約12kmの距離を2時間ほどで歩行させて経時的に測定した。結果はFig. 7に示されるように、運動負荷中あるいは直後の値は明らかな変動を示さないが、負荷後経時的に測定した値は、同じ被験者が安静にしている場合と比べ、著明な増加を示すことを認めた。

なお著者はTable 3に示された、同一被験者についての早朝空腹時の肺胞気中アセトン濃度の長期観察例のうち、No. 1について12~2月および5~9月に測定した値を選び出して、気温による差を検討したが、前者は $2.01 \pm 0.55\mu\text{g/L}$ (mean $\pm$ S.D., $n=7$) で、後者 $1.85 \pm 0.52\mu\text{g/L}$ (mean

Fig. 8. Reproducibility of alveolar acetone response to ingested 15gm. of MCT in a normal subject.

$\pm$ S.D., $n = 8$) より増加していたがこの差は推計学的に有意ではなかった。

2) MCT投与による臨床実験

a) MCT投与によるケトーシスの再現性

同一健康者(No. 1)に、少なくとも2日間以上の間隔をおいて、早朝空腹時にMCT 15gを与え経時的に観察すると、Fig. 8に示す如く、肺胞気中アセトン濃度はほぼ再現性のある増加を示し、3.5時間後に最大値 $7.96 \pm 0.70 \mu\text{g/L}$ (mean $\pm$ S.D., $n = 5$) に達し、そのC.V.は8.8%であった。

b) MCT投与量による肺胞気中アセトンの変化

同一健康者(No. 1)に2日間以上の間隔をおいて、早朝空腹時にMCTを5, 15, 25および40g投与した場合の肺胞気中アセトン濃度は投与量に対応して増加し、かつその濃度が最大に達する時間も延長することを認めた(Fig. 9)。

c) MCTおよびLCTの催ケトン性の比較

Fig. 9. Effect of ingestion of increasing amounts of MCT on alveolar acetone in a normal subject.

Fig. 10. Alveolar acetone responses to ingested 15gm. of MCT and LCT in 3 normal subjects.

Fig. 11. Effects of starvation and ingestion of glucose on MCT-induced ketosis in a normal subject.

健康者3例(No. 1, No. 2およびNo. 3)に3日以上の間隔をおいて、MCTおよびLCTをそれぞれ15g与えて肺胞気中アセトン濃度を比較した成績は、Fig. 10に示される如くであり、LCT投与によつては肺胞気中アセトンは何も与えない場合に比べて明らかな変化を示さなかった。

d) MCT投与によるケトーシスに対する投与前の絶食時間および糖質投与の影響

同一健康者(No. 1)について、通常の12時間ほどの絶食後と、28時間という長時間の絶食後にそれぞれMCT 15gを与えて比較観察すると、Fig. 11に示されるように、負荷前の絶食時間を延長すれば肺胞気中アセトンの増加も強く、かつこの例ではMCT投与後8時間まで観察しても減少する傾向は認められなかった。

これに反し同一被験者に、早朝空腹時にあらかじめブドウ糖 100gを与えておいてから、MCT 15gを負荷すると、肺胞気中アセトン濃度の増加が抑えられ、かつそれが最大に達する時間も短縮することが認められた。

e) MCT投与時の呼出肺胞気中アセトン濃度と尿中アセトン体濃度の相関

健康者10例について、MCT 15gを与えて呼出肺胞気中アセトン濃度とケトスティックスによつて半定量した尿中アセトン体濃度との相関を観察した。Table 5にみられるように呼出肺胞気中アセトン濃度の増加が続いているのに、尿ケトスティックスが減少あるいは陰性化してしまう場合が

Table 5. Acetone concentrations in alveolar air and urinary acetone bodies determined by Ketostix after ingestion of 15gm. of MCT in 10 normal subjects.

Subject No.	Alveolar Acetone ($\mu\text{g/L}$) and Urinary Acetone Bodies (Ketostix Reading) at Time (hrs)										
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
1	2.0(-)	2.8(-)	4.4(+)	5.8(+)	6.9(+)	7.9(+)	8.0(+)	8.5(+)	8.2(-)	8.2(-)	7.4(-)
2	2.6(-)	3.4(+)	4.2(+)	5.0(+)	7.9(+)	9.0(+)	8.8(+)	8.9(+)	8.6(+)	8.2(+)	7.0(-)
3	1.5(-)	2.2(-)	3.1(-)	4.1(-)	4.5(-)	4.8(-)	5.0(+)	5.3(+)	5.3(-)	4.9(-)	4.6(-)
4	3.1(-)	4.3(+)	4.5(+)	6.2(+)	8.4(+)	11.5(+)	10.9(+)	11.2(+)	10.8(+)		
5	1.6(-)	1.6(-)	2.8(+)	4.8(+)	7.4(+)	8.7(+)	9.7(+)	9.7(+)	9.0(-)		
6	1.9(-)	3.0(-)	3.7(-)	4.3(+)	4.8(+)	4.6(-)	4.7(+)	5.4(+)	5.1(+)		
7	2.1(-)	3.7(+)	2.9(-)	4.1(+)	4.4(+)	5.4(+)	6.0(+)	5.8(+)	8.8(+)		
8	1.5(-)	2.6(-)	2.9(-)	3.4(-)	4.2(+)	5.7(+)	6.8(+)	8.1(+)	7.3(+)		
9	1.9(-)	2.0(-)	3.3(+)	3.5(+)	5.7(+)	8.2(+)	7.1(+)	7.2(+)	6.4(+)		
10	3.4(+)	4.3(+)	4.9(+)	5.0(+)	6.3(+)	7.8(+)	8.5(+)	8.8(+)	7.8(-)		
Mean	2.16	2.99	3.67	4.62	6.05	7.34	7.55	7.89	7.51		
S. D.	0.66	0.93	0.78	0.92	1.56	2.23	2.01	1.95	1.70

Fig. 12. Blood sugar, serum NEFA, serum IRI and alveolar acetone after ingestion of 25gm. of MCT in 5 normal subjects. Vertical bars represent standard errors.

認められた。呼出肺胞気中アセトン濃度はMCT 15g 負荷後やや急激に増加して平均 3.5時間後に前値の約 3.7倍という最大値に達した後次第に減少する傾向を示すのに比べて、ケトステックスを用いて測定した尿中アセトン体濃度は増加あるいは減少がやや不規則であり、両者は必ずしも平行して変動するとはかぎらないことを認めた。

f) MCT 投与による血糖、血清 NEFA および血清 IRI の変化

健常者 5 例に MCT 25g を与えてこれらの値を

Table 6. Acetone concentrations in alveolar air after ingestion of 15gm. of MCT in 7 diabetic subjects.

Subject No.	Alveolar Acetone ($\mu\text{g/L}$) at Time (hrs)										
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
25	4.8	5.2	6.3	7.9	8.4	12.2	13.5	13.0	13.1	12.6	11.7
26	4.0	5.1	8.3	8.0	9.6	11.5	12.1	12.1	13.6	14.0	13.2
27	2.5	3.6	4.6	3.9	5.5	6.3	6.0	7.0	6.8	6.2	5.7
28	1.7	2.5	2.1	2.6	6.8	7.1	9.3	9.8	8.9		
29	1.9	2.5	4.4	5.3	7.0	7.6	8.3	8.0	8.4		
30	1.4	1.8	2.5	4.4	5.9	6.0	6.8	6.8	6.4		
31	3.4	4.7	5.8	7.0	9.6	8.9	11.2	11.6	10.8		
Mean	2.81	3.63	4.86	5.59	7.54	8.51	9.60	9.76	9.71		
S. D.	1.29	1.39	2.16	2.09	1.69	2.49	2.79	2.53	2.90		

測定すると、Fig. 12に示すような結果が得られた。血糖および血清 NEFA の減少する傾向ならびに血清 IRI の増加する傾向がみられたが、2時間後の血糖値 ($P < 0.05$) を除けば、これらの変化はいずれも推計学的に有意ではなかつた。

g) 糖尿病患者および健常者におけるMCT投与によるケトーススの比較

糖尿病患者 7 例に早朝空腹時にMCT 15g を与えて、呼出肺胞気中アセトン濃度を経時的に観察した結果をTable 6に示す。Table 5に示された健常者の場合と比べて、糖尿病患者ではMCT 負荷

Fig. 13. Mean increase in alveolar acetone after ingestion of 15 gm. of MCT in 10 normal and 7 diabetic subjects. Vertical bars represent standard errors.

後の値は高値を示す傾向にあるが、負荷前の値もすでに高い傾向を示している。そこで負荷後の増加量について比較すると、糖尿病患者では健常者より高値を示す傾向を認めた (Fig.13). しかしこれらの変化は推計学的にはいずれも有意ではなかった。

IV. 考 案

1) ガスクロマトグラフィーによる呼気中アセトン定量法の問題点について

呼気中に含まれるアセトンがきわめて微量であるために、その測定にあたって何らかの形で呼気を濃縮する前処置がとられることがある⁶⁾⁻⁸⁾が、その際は回収率についての検討が必要なのはもちろんであるが、濃縮過程における汚染の問題についても十分配慮する必要があると著者は考えている。1回呼気分析により直接呼気について測定できれば、この点にかんする問題を避けることができよう。

ガスクロマトグラフィーの実際については、分析の対象となるアセトンが定量性のある理想的なピークとしてえがかれるように、分析条件を選ぶべきであり、得られたガスクロマトグラムによつてその条件が評価されるべきであろう。呼気そのものについて直接アセトンを定量したという従来報告には、いずれも実際のガスクロマトグラムが示されていない⁹⁾⁻¹¹⁾

次にcalibrationについて述べると、微量の揮発性ガスの測定ということを考えれば、定量法の実

際にあたっては重要な問題である。Roothら¹¹⁾は稀釈したアセトン水溶液を用いてcalibrationを行なっているが、著者の経験では満足すべき結果は得られていない。きわめて低濃度のアセトン水溶液を作製しその1~2µlという微量を注入する操作を正確に行なうことは必ずしも容易ではない。さらにきわめて高感度でガスクロマトグラフィーを行なうこともあつて汚染についても注意する必要がある。著者は実験中とくにエタノールピークについて明らかに汚染による影響と思われる現象に遭遇した。Freundはエタノール水溶液を用いて、窒素により稀釈したエタノールガスを実際に作つて毎日のcalibrationを行なつていたが¹⁰⁾、後の報告では、10ppmの窒素バランスのヘキサンガスを用いている¹²⁾ Stewartら⁹⁾は空気により稀釈したアセトンガスを用いているようであるがその詳細は明確でない。

著者は特に作製した0.89ppmおよび5.67ppmの2種の濃度の異なるヘリウムバランスのアセトン標準ガスを用いてcalibrationに正確を期したが、このような方法は未だ報告されていない。著者の方法で測定した値はStewartら⁹⁾、およびRoothら¹¹⁾の値より高いが、その一因としてcalibrationの精度が関与している可能性が考えられる。

2) 生体のアセトン体代謝の臨床研究に占める呼気中アセトン定量法の意義について

血中から肺胞気へのアセトンの排泄は拡散により行なわれるとされ、Brechnerら¹³⁾はイスにアセトンの点滴注射を行なつて、実際に測定した動脈血中の濃度と、肺胞気中アセトン濃度から下記の計算式により算出した血中アセトン濃度とがよく一致することを確認している。

$$\begin{aligned} \text{Mg. \% art. blood} &= \% \text{ (conc. alv. gas} \times \text{vap. dens.} \\ &\times \frac{273+38}{273} \times \frac{\text{gas}}{\text{blood}} \text{ solub. coef.} \\ \text{the gas/blood partition coefficient} &= 333 \\ \text{the vapor density} &= 2.59 \end{aligned}$$

血中のアセトンを測定する代りに呼気についての測定が試みられるのはこの理論に基いているのである。

アセトン体は尿中に排泄され、尿について測定することが広く行なわれている。著者は健常者にMCTを用いてケトosisのモデルを作り肺胞気中アセトン濃度を経時的に測定した際、同時に尿中アセトン体濃度の半定量を行なつたところ、両者は必ずしも平行して変動するとはかぎらないことを認めた。尿中への排泄には利尿などの状態が影響を与えよう²⁾。したがって尿は、生体におけるアセトン体の動態を正確に把握することが望まれる場合、試料としては満足すべきものとはいえない。臨床の立場からみても、血液について繰返し採取することは患者の負担などを考えれば適切な方法とは思えない。この点にかんしても、試料としての呼気は、患者に苦痛も与えず容易に繰返し採取できるので、適切なものと考えられる。

アセトン体は一般に肝において産生され、肝静脈を通つて肺へ到達するので、肝静脈におけるその値がより高く、大腿動脈におけるそれとの比較がWerkら¹⁴⁾によつてなされている。肺胞気は肝静脈血を含む混合静脈血とより平衡に達しやすく、肺胞気中アセトン濃度は肝のアセトン体産生をよりよく反映しているとみなすことができよう。血中のアセトン体濃度が肝における産生と組織における利用のほかに腎における排泄も考慮し、それらの平衡の上に成り立っていると一般に考えられがちであるが¹⁴⁾、さらにアセトン体排泄の場としての肺も無視されるべきではない。

アセトンとアセトン体との関係について、伊藤¹⁵⁾の臨床成績にふれると、彼はヒトの尿アセトン体排泄量を270検体について、アセトン+アセト酢酸および β -ヒドロオキシ酪酸に分けて、Bloom法変法を用いて測定し、アセトン体総量が増加する際には前者が増し、後者は殆ど変わらなかつたと報告している。

肺におけるアセトン体の排泄を一步進めて考える時、アセト酢酸が脱炭酸されてアセトンに至る過程、さらに肺胞膜透過性を含めた拡散の問題などについては、未だ十分に明らかにされているとはいえないであろう。

3) 呼気相からみたヒトのアセトン体代謝とそれに影響をおよぼす諸因子について

糖尿病患者における早朝空腹時の呼気中アセトン濃度が、健常者におけるそれと比べ有意の増加を示したことは諸家の報告とほぼ一致している⁸⁾⁹⁾¹¹⁾。しかし同一被験者については日内変動が観察され、おそらく内分泌系を介する諸因子の関与が考えられた。

食餌性因子については絶食16時間ほどで呼気中アセトンの増加が目立ちはじめている点に注意を払う必要がある。

運動による影響については、著者の負荷した運動量はCourtice & Douglas¹⁶⁾のそれに近く、彼らと同様に、運動後アセトンが持続性の増加を示すことを認めている。しかし彼らの報告には絶食のみによる対照実験を欠いており、Johnsonら²⁾は計算により求めた不足カロリーから、絶食によるケトosisとの比較を試みている。この点にかんし著者は絶食の状態で経時的に肺胞気中アセトンを定量した成績と直接対比することにより、運動それ自身が催ケトン性を有することを示した。運動の間および直後は明らかな変化は認められず、筋におけるアセトン体の利用が考えられる。馬淵⁵⁾が、条件はMaster's two step testと異なるが、運動負荷後アセトンが減少する傾向を報告しているのはこの間の事情を物語っているのかもしれない。Johnsonら²⁾が指摘する寒冷条件下におけるアセトン体の増加については著者の実験成績からは明らかにし得なかつた。

いずれにせよ、生体のアセトン体を測定しその値を比較検討する際には、上記した諸因子を考慮し、測定する時点での生体の状態をできるだけ同一にするよう配慮がなされるべきであることを強調したい。さらにヒトのアセトン体代謝を問題にする場合、その経時的変動を観察することによつてその把握がより容易になる場合があることに留意すべきであろう。

4) MCT投与によるケトosisについて

ケトosisのモデルを作る手段として、MCT

の投与は、飢餓あるいは運動負荷に比べて容易である。Freund¹²⁾が主張するように、MCTによるアセトン体の増加は再現性においてはほぼ満足すべきものであり、MCT投与量の増加あるいは糖質投与によつてその程度を加減し得ることを示した。著者の実験ではMCTの量は15g程度でも肺胞気中アセトンの増加は明らかであり、Bergen¹⁷⁾の100gに比べてはるかに少ないが、アセトンの増加の程度は彼らの成績にはほぼ相当しており、さらにそれが最大に達する時間は、彼らの0.5～2時間という報告に比べ、著者の成績は2.5～4時間と明らかな差が認められる。これらの相違を生じた一因として、肺胞気中アセトン濃度と静脈血アセトン体濃度の差が関与しているのかもしれない。経口的に投与されたMCTは、LCTと異なり、急速に吸収・代謝されて肝においてアセチルCoAを作り、これがTCAサイクルでの処理能力との関係で、アセトン体生成に向かうのであろう¹²⁾¹⁷⁾。MCT投与後の血清IRIの上昇ならびに血糖および血清NEFAの下降については、著者の成績からは明確に得ない。これらの点については諸家の報告は必ずしも一致しておらず、その機序にかんしても議論が多い¹⁸⁾。1969年、Pi-Sunyer¹⁹⁾は健常者に体重1kgにつき1gという比較的大量のMCTおよびLCTを投与して血清IRI、血糖および血清アセトン体を測定した成績から、血清IRIの上昇に胃腸管系ホルモンの関与を想定しているがそれを直接証明する実験成績は得られていない。MCTが代謝されて生じたアセトン体が血清IRIの増加をもたらす可能性はもちろん否定できないが、血清IRIが増加する際MCT投与後0.5～1時間ですでに最大に達するとされているが¹⁸⁾¹⁹⁾、肺胞気中アセトンは、著者のわずか15gのMCT投与による実験でも、2.5～4時間後に最大に達しており、この時間的ずれが留意されるべきかもしれない。いずれにせよ今後検討されるべき問題であらう。

著者は健常者10例および糖尿病患者7例にMCTをそれぞれ15g投与して肺胞気中アセトンの増

加量を比較検討したが、両群の間に推計学的に有意差を認め得なかつた。著者の得た成績は、Bergen¹⁷⁾の糖尿病患者において健常者より増加量が有意に大であつたとする報告と一致しない。この点にかんしては他にFreund¹²⁾の報告があるのみであるが、彼らは少数例においてMCT投与後やはり糖尿病患者においてアセトン濃度が健常者より高いと報告しているが、その前値よりの増加量が不明である。著者は糖尿病患者にMCTを投与してそのアセトン体の反応を検討した成績から、糖尿病の個々の病態についての検索が必要と考えているが、教室の井出²⁰⁾は糖尿病患者にMCTを投与した際の血糖値の反応が必ずしも一様の態度を示さないことを観察しており、この点については今後の検討にまたねばならない。

MCTはケトーシスの研究には有用な物質であり、ケトーシスを起こしやすい傾向を臨床的に予測する手段となる可能性があらう。

Wieland¹⁾がその綜説で述べているように、in vivoでのアセトン体代謝調節への実験的アプローチは現在不足しており、MCT投与によつてケトーシスを検討する際、実用的な肺胞気中アセトン定量法は、とくに肝のアセトン体産生の増加を検索する上で試みられるべき一つの手段といえよう。

V. 結 論

1) 呼気中に含まれるアセトンを水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフを用いて、定量する際の条件について検討した。Chromhsorb W 60/80を固定相担体、15%polyethyleneglycol1500を固定相液体とする長さ6フィート、外径 $\frac{1}{4}$ インチのstainless-steelのカラムを温度55°Cで用い、carrier gasとしてはヘリウムをカラム入口圧30 psi. で使用し、採取した呼出肺胞気5mlを直接注入した。calibrationには特に作製した2種のヘリウムバランスのアセトン標準ガスを用いて精度の向上を期した。上記の条件によるアセトン最小検出量は 10^{-9} gで健常者についても十分定量でき

た。アセトンの保持時間は4分5秒で迅速に測定結果が得られ、連続測定の誤差は 2.4 ± 2.3 (S.D.) % ($n=18$) であった。

2) 肺胞気中アセトンと尿中アセトン体の濃度は必ずしも平行しないことが認められ、アセトン体の変動を把握する際、呼吸は理論的にも臨床的にも適切な試料と考えられた。

3) 健常者24例について早朝空腹時に測定した肺胞気中アセトン濃度は 1.89 ± 0.76 (S.D.) $\mu\text{g/L}$ であり、糖尿病患者では有意の増加を示した。その濃度には日内変動が観察され、健常者について42時間絶食で $50 \mu\text{g/L}$ に達する増加および糖質投与による減少ならびに中等度運動負荷後の持続性増加を示す成績を得た。

4) 健常者10例にMCT 15gを与えると、LC Tと異なり、平均3.5時間後に最大値 7.89 ± 1.95 (S.D.) $\mu\text{g/L}$ に達する肺胞気中アセトンの増加が認められ、その程度は飢餓により増強し、糖質投与により抑制された。MCT 25gの投与によって血糖、血清NEFAおよびIRIは有意の変化を示さなかつた。糖尿病患者にMCT 15gを与えて健常者と比べると、そのアセトンの増加量が有意に高値を示すという成績は得られなかつた。ケトosisの研究にMCTは有用な物質であるが、その際肺胞気中アセトン定量法はとくに肝のアセトン体産生の増加を検索する上で試みられるべき一つの手段と考えられた。

(本研究の費用の一部は三島海雲記念財団の学術奨励金によつたことを附記し、感謝の意を表します。)

文 献

1) Wieland, O.: Ketogenesis and its regulation, in "Advances in metabolic disorders" (R. Levine and R. Luft, eds.), Vol. 3, p. 1. Academic Press, New York, 1968. —2) Johnson, R.E. et al.: Multiple factors in experimental human ketosis. Arch. intern. Med., 107: 111, 1961. —3) Greenberg, L. A. & Lester, D.: A micromethod for

the determination of acetone and ketone bodies. J. biol. Chem., 154: 177, 1944. —4) Bloom, W. L.: The determination of ketone bodies in biologic fluids. J. Lab. clin. Med., 51: 824, 1958. —5) 馬淵 宏: 尿および血清揮発成分にかんする研究. 日内会誌, 58: 731, 1969. —6) Anonymous: SwRI pegs trace compounds in body fluids. Chem. Eng. News, March 14, p. 36, 1960. —7) Eriksen, S.P. & Kulkarni, A.B.: Methanol in normal human breath. Science, 141: 639, 1963. —8) Levey, S. et al.: Studies of metabolic products in expired air. II. Acetone. J. Lab. clin. Med., 63: 574, 1964. —9) Stewart, R.D. & Boettner, E.A.: Expired-air acetone in diabetes mellitus. New Eng. J. Med., 270: 1035, 1964. —10) Freund, G.: The calorie deficiency hypothesis of ketogenesis tested in man. Metabolism, 14: 985, 1965. —11) Rooth, G. & Östenson, S.: Acetone in alveolar air, and the control of diabetes. Lancet, 2: 1102, 1966. —12) Freund, G. & Weinsier, R.L.: Standardized ketosis in man following medium chain triglyceride ingestion. Metabolism, 15: 980, 1966. —13) Brechner, V.L. & Bethune, R.W.M.: Determination of acetone concentration in arterial blood by vapor phase chromatography of alveolar gas. Diabetes, 14: 663, 1965. —14) Werk, E.E., Jr. et al.: Studies on ketone metabolism in man. I. A method for the quantitative estimation of splanchnic ketone production. J. clin. Invest., 34: 1256, 1955. —15) 伊藤光武: 尿ケトン体の動向からみた糖尿病のコントロール, 大阪市立大学医学雑誌, 16: 47, 1967. —16) Courtice, F.C. & Douglas, C.G.: The effects of prolonged muscular exercise on the metabolism. Proc. Roy. Soc. London, 119B: 381, 1936. —17) Bergen, S.S., Jr. et al.: Hyperketonemia induced in man by medium-chain triglyceride. Diabetes, 15: 723, 1966. —18) Greenberger, N.J. & Skillman, T.G.: Medium-chain triglycerides, physiologic considerations and clinical implications. New Eng. J. Med., 280: 1045, 1969. —19) Pi-Sunyer, F.X. et al.: Insulin and ketone responses to ingestion of medium and long-chain triglycerides in man. Diabetes, 18: 96, 1969. —20) 井出肇他: 第11回日本老年医学会総会講演, 1969.