

人体の非侵襲的脂質等代謝測定法の開発と評価

Development of Non-invasive Measurement System of Lipid Metabolism in Human and Its Assessment



吉田 敏

岐阜大学大学院工学研究科 生命工学専攻
〒501-1193
岐阜市柳戸 1-1

Satoshi YOSHIDA
Faculty of Engineering, Gifu University
1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

論文要旨：人体の脂質・脂肪酸の動態を調べるときは、通常は血液を医療機関で採取してその血清や血球中の脂質・脂肪酸を生化学的検査あるいはクロマトグラフィー法等を用いて臨床検査室において測定し、様々な病態との関連を調べることになる。これに対して、この人体の脂質脂肪酸動態をどこでも手軽に、かつ非侵襲的即時的に計測して個人の健康管理に役立つような技術を開発しよう、という試みはかなり前から行われてきた。特に、フーリエ変換赤外分光法（FTIR）などの振動分光法を用いた脂質脂肪酸測定方法の開発は有望であり、近年の測定装置の小型化と解析技術の進歩と相俟って、実用段階に入った感がある。また、リポタンパク質動態を疫学的に調べるために血清の核磁気共鳴（NMR）分光法を用いた非破壊的検査法も実用化されて久しく、盛んに疫学的研究に貢献している。このような多数の試料に対して、短時間での計測に向けた分光法を使った脂質脂肪酸の評価法の、今後の発展が期待される。

Abstract: Lipid and fatty acid metabolism in human is usually measured by using whole bloods or sera of subjects and by detecting lipids and fatty acids in serum or erythrocytes with biochemical and chromatographic apparatus in clinical laboratory. On the other hand, many trials have been made for a long time to develop non-invasive diagnostic methods for monitoring lipid and fatty acid metabolism in human instantly at anywhere and anytime, especially to contribute for personal health care. For this purpose vibrational spectroscopy such as FTIR used for lipid and fatty acid measurements seems promising because of its analytical advancement and mobility. The technique of NMR spectroscopy for non-destructive measurement of human serum lipoproteins has been established and contributed to various epidemiological researches. These spectroscopic techniques are suitable for non-invasive or non-destructive and instantaneous measurements, and expected for further development of clinical measurements of lipid and fatty acid metabolism in human.

Key words: lipids, fatty acids, metabolism, non-invasive, spectroscopy, human

1 はじめに

生体、特にヒトの脂質・脂肪酸の動態を調べるという場合は、通常は被験者の状態のある瞬間を反映する被験者の血液を用いて、生化学的あるいはクロマトグラフィー技術などによって臨床検査機関において脂質・脂肪酸の変動が測定されている。

ヒトの脂質・脂肪酸代謝の状態を調べるには、厳密にはヒトの組織細胞内の状態と、細胞外である血液の状態を分けて考える必要がある。臨床検査の場合は血液の脂質・脂肪酸量の変動でもって「体の脂質脂肪酸代謝」の状態を判断することが多いが、本来体内脂質脂肪酸動態は、肝臓や筋肉などの組織細胞内の状態と、細胞と血液の間の輸送の状態と、血液中の脂質脂肪酸量の変動（さらに厳密には血漿と赤血球等の血液細胞内の状態に分ける必要がある）とに区別して観察していった、それらを

連絡者：吉田 敏
E-mail : xyosida@gifu-u.ac.jp

統合して判断していくことで体の脂質代謝の全体像を把握することができるはずである。ところが、このような細胞内の代謝動態や輸送活性を通常の臨床的な検査で測定することは、ほとんどされてはいない。

それに対して、人体の脂質脂肪酸の血液以外の組織細胞での代謝動態を、いつでもどこでも、かつ非侵襲的即時的に計測して個人の健康管理に役立つような技術が確立できれば、この分野では極めて大きな進歩となる。

これまでの非侵襲的非破壊的な脂質脂肪酸計測法の技術開発の歴史の中で、基本的に使われてきた計測法は電磁波を用いた分光法（スペクトロスコピー法）である。その中でも特に赤外分光（IR）法、近赤外（NIR）分光法、レーザーラマン散乱分光法などのいわゆる振動分光法と、核磁気共鳴（NMR）分光法である。これらの技術の中で、フーリエ変換赤外分光（FTIR）法はNMR法とならんで化学分析における基礎的技術の一つであり、精度が高く装置も小型のものもあり手軽に使える方法であるため、最近では生化学分野でタンパク質定量法としてルーチンに使われるような装置が開発されたり（Millipore社）、また培養細胞のバイオプロセスのリアルタイムモニターに使われたり（Mettler社）、と応用範囲が広がってきている。

この総説では、これらの技術がヒトの脂質脂肪酸代謝の評価にどのように貢献してきたか、また今後臨床診断にどのように期待されているのか、我々の研究を含めて振り返り、今後の課題について論じたい。

2 非侵襲的非破壊的な脂質脂肪酸代謝計測法の技術的背景

これまでの脂質あるいは脂肪酸の測定の標準的方法は、高速液体クロマトグラフ法（HPLC）、ガスクロマトグラフ法（GC）などクロマトグラフィーを基本にして様々な高感度検出器（蛍光検出器や質量分析装置など）を装備して測定するものである。これは、理想的には一つの成分だけに物理的に分離してから測定するものであり、充分信頼できる方法としてルーチンに使われてきている。ただし、この分離的方法は、試料の前処理に時間を掛け多くの有機溶媒やガスを必要とし、分離するために時間をかける必要があり、結局信頼のおけるデータを得るには手間と時間（とお金）のかかる方法であった。このような分離的手法は、時間的（場合によっては空間的）に成分物質をお互いに分離する、いわば時間スケールの上に物質を2次元的に並べる作業である。

これに対して、スペクトロスコピー的手法の一つは、基本的には各成分物質の持つ固有のエネルギー分布（スペクトル）に従ってそれらの混合物をデコンボリューション（逆たたみ込み）する手法であり、いわばエネルギー

スケールの上に各成分を2次元的に並べる手法とよんでもよい。即ち、たたみ込まれた各成分のスペクトルを統計的（数学的）方法で抽出し解析する手法である。

もう一つのスペクトロスコピー的手法では、混合物の各成分の固有のスペクトルが明瞭には分かっていなくても、多数の成分の混合物の中で、ある一つの成分の量が明確に分かっていて、その成分量が異なる何種類かの混合物のスペクトルがある場合、それらのスペクトルから多変量解析的な処理によってその成分量に関するパラメータを求めて、未知の混合物のスペクトルからその成分量を推定する回帰分析の手法がある。この手法ではある成分の量が異なる混合物試料7~10のサンプルを用いてキャリブレーションを行い、パラメータを求める。この場合、実際にはいくつかの最適な波数領域を設定しPRESS値という予測誤差が最小になるように因子の数を設定する、など細かな設定作業が必要になり専用のソフトウェア（Panorama™など）を用いて行う。一旦最適なパラメータが決定されれば、それによってその成分量が未知の混合物のスペクトルから、瞬時にその成分量をコンピュータ処理だけで推定することができる。ここで使われる方法として主成分分析法に近い部分最小二乗回帰分析（PLS: Partial Least Squares Regression）等が知られていて、以後略してPLS法と呼ぶが、もっと広義ではケモメトリックス（Chemometrics）的手法¹⁾と呼ばれることも多い。

3 赤外分光法による脂質脂肪酸代謝計測法の開発

実際の赤外分光法では、近赤外分光法やレーザーラマン散乱法などの振動分光法まで入れると、脂肪酸組成分析法だけでも多くの報告がある²⁻⁶⁾。この小論では私達の研究を中心にFTIRによる種々の生体組織中の脂質脂肪酸分析に絞った成果をご紹介します。

3・1 FTIRによる脂肪酸組成の予測（食用油脂、ヒト口腔粘膜）

全反射（ATR）方式のFTIR装置（FTIR-ATR）を用いて、試料との接触面（2mm径のダイヤモンドプローブ）で試料の深さ方向で約1μmの試料のIRスペクトルを測定する場合、試料は液体でも固体でもよい。試料がダイヤモンドの面ときちんと密着している必要があり、これが感度を左右する。液状の食用油脂の場合は、何の前処理も無しにそのまま小さな1滴の油脂をATRプローブに載せるだけで測定できる。これで様々な油脂を測定し企業から提供されている脂肪酸組成表を元に（一部は研究室でも脂肪酸組成を測定）、いくつかの脂肪酸についてPLS解析をおこなった。その結果、食用油脂中のオレイン酸やリノール酸、αリノレン酸などの組

成を FTIR-ATR 法で実用的なレベルで予測できることがわかった³⁾。さらに最近、食品の様々な栄養素の簡便分析にも赤外分析法が使われることが期待されている⁷⁾。

一方、ヒトの体の状態や病態を知る上で血液や組織細胞の脂肪酸組成を測定することは、臨床医学的にも栄養学的にも重要である。しかし、多数の検体について脂肪酸組成を従来のガスクロマトグラフィーなどによって測定するのは、時間的にも労力的にもコスト的にも大変である。そのため、多数の検体の測定を必要とする疫学的研究に FTIR による脂肪酸分析が使えるかどうか、検討することにした。

ヒトの口腔粘膜細胞の懸濁液を用い（イラン、ベトナム、インドネシア各国から全 425 試料を集めて冷凍しておいたもの）、遠心して得た細胞ペレットを FTIR-ATR 法で直接赤外スペクトル測定を行ない、その中の 10 数検体だけ GCMS 法により正確に脂肪酸組成を測定した。それからそれ以外の試料に PLS 法を適用し、いくつかのメジャーな脂肪酸の組成を粘膜細胞の赤外スペクトルから予測することができた。しかし、DHA などの割合の少ない脂肪酸の組成予測は誤差が大きく、実用的とはいえなかった。例えば口腔粘膜のリノール酸 (C18:2 n-6) の Content (%) のヒストグラムを作ると、イラン国民の場合の最頻値 (Mode) は 11% だが、ベトナムでは 13.5%、インドネシアでは 15% であり、各国の食生活の違いの影響と思われる結果を得ることができた⁶⁾。

3・2 口唇を通して測定したドコサヘキサエン酸 (DHA) と過酸化脂質の代謝

ヒトの脂肪酸代謝の研究は過去にいくつか行われているが、すべて血液を用いた研究であり、安定同位体でラベルされた脂肪酸を通常の食事の中で摂取し、その脂肪酸がどのような時間経過で血漿や赤血球膜に取り込まれていくかをチェイスしたものである⁸⁾。この方法では、摂取した脂肪酸が血液以外の各組織細胞に取り込まれていく時間経過は報告されていなかった。そこで、食事で摂取した脂質脂肪酸が、消化管で吸収され血流に乗って肝臓や皮膚などの組織に運ばれ組織の細胞に取り込まれていく、という代謝の様子を簡便に見る方法の構築をめざした。当然肝臓などの内臓組織への取り込みは生検という手術行為が必要なもので簡便にはできないので、皮膚組織への取り込みがあれば外からでも比較的容易に観測できるかもしれない、という考えで皮脂腺の無い口唇表面を直接 FTIR 測定することを試みた（装置については次のセクションで述べる）。

その結果我々は、FTIR-ATR 法によってヒト口唇を測定するとその口唇表面に食事で摂取した DHA を含むトリグリセリド (TG) が 1~2 時間後に出てくることを

in situ で観測することができた⁹⁾。

以前我々は口腔粘膜（下唇の内側）に FTIR-ATR プローブ（棒状の ZnSe 結晶）を直接当てて血液中のトリグリセリド値を予測する方法を提案したが⁹⁾、口唇赤色部を使うとより効果的に脂質代謝を観ることができるとわかった。これは、FTIR で DHA に特徴的な 3013~3014 cm^{-1} 付近の、シス型アルケン CH 伸縮振動由来の赤外吸収スペクトルの時間変化を解析することで、明らかにできた。不飽和脂肪酸の不飽和度が高くなるほどこの CH 伸縮振動由来の赤外吸収位置が高波数側にシフトすることがわかっていて、オレイン酸は 3005 cm^{-1} に見られ、リノール酸は 3009 cm^{-1} に、アラキドン酸は 3012 cm^{-1} に見られる。さらに、過酸化不飽和脂肪酸ができる時に生じるトランス型不飽和脂肪酸が昼ごろ口唇表面で増え、その後減少することも FTIR で観測でき（968 cm^{-1} 付近で測定）、実際口唇表面のヒドロペルオキシド体の生成の生化学的検出によって FTIR 法での変化を裏付けることができた（Fig. 1）。この DHA を含む脂質 (TG) の消化管での吸収→血流→組織細胞取り込み（ここでは口唇組織）という代謝の様相を「代謝スピード」と表現すると、成人男性で喫煙しているヒトと、していないヒトではその「代謝スピード」が違い喫煙者では遅くなっていることも見出している⁹⁾。このように、口唇表面には皮脂腺や汗腺がなくても脂質類が「出てくる」のを直接観測することができたが、この場合脂質類は次のセクション 3・3 で述べる細胞間ラメラ (Intercellular lamellae) の状態で「滲み出して」くるのであろうと考えられる。皮膚表面は角質細胞 (Corneocyte) が何層にも重なっていて、生体にとってはバリアとしての機能を持っているが、その角質細胞の間を細胞間ラメラが動いていると考えられている。その細胞間ラメラは角質層の下にある顆粒層や基底層などの細胞や毛細血管の血液とも物質交換をしながら皮膚の性質の維持（保湿性など）に貢献している。角質層の薄い口唇の場合、滲み出してくる脂質類の変化は FTIR で見たところ周期的に起こるので（周期 20 分程度）、一方向の滲み出しではなく内向きの再取り込みの流れもあると考えているが、まだ十分には証明されていない。

3・3 FTIR による口唇生体分子変化の測定と病態診断 (HbA1c 値予測)

上記セクションでも述べたが、ヒトの口唇赤色部には他の顔面皮膚と違って汗腺や皮脂腺がない。そのため口唇表面の生体分子は各腺組織の独自代謝の影響を受けず、口唇表皮組織（基底層、有棘層、顆粒層など）あるいは血液成分の影響を直接受けて、表面角質層の細胞間ラメラという脂質と水溶性物質の混合物の染み出しに

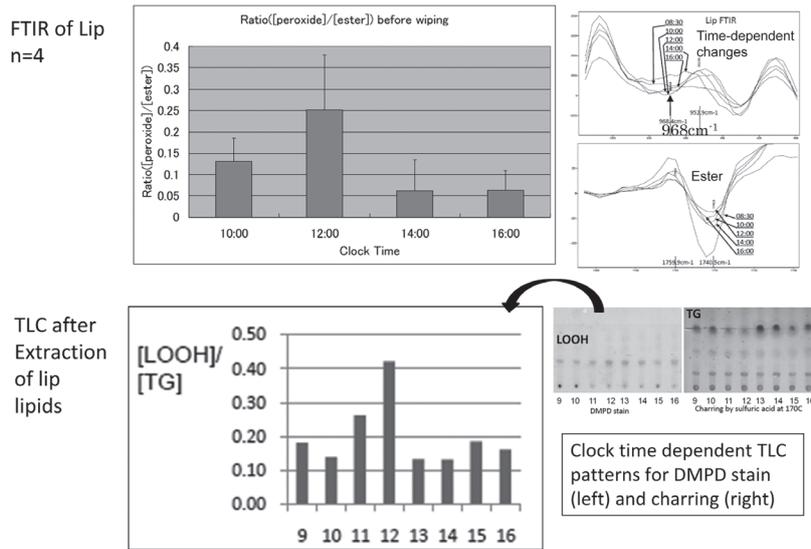


Fig. 1. 口唇表面の過酸化脂質の分析。(上図右) 2次微分赤外スペクトル (968 cm^{-1} 付近 (Peroxidized : 上) と 1740 cm^{-1} 付近 (Ester : 下)) の時間変化。(上図左) IR 強度比の時間変化 ($[968\text{ cm}^{-1}]/[1740\text{ cm}^{-1}]$)。 (下図右) 口唇表面から抽出した脂質の TLC パターンの時間変化 (DMPD 染色 : 左, 炭化パターン : 右, 上の濃いスポットが TG)。 (下図左) TLC 上の TG および LOOH (DMPD 染色) のスポット濃度比の時間変化。IR の時と同様 12 時 (昼食前) に過酸化脂質が相対的に最大になった。

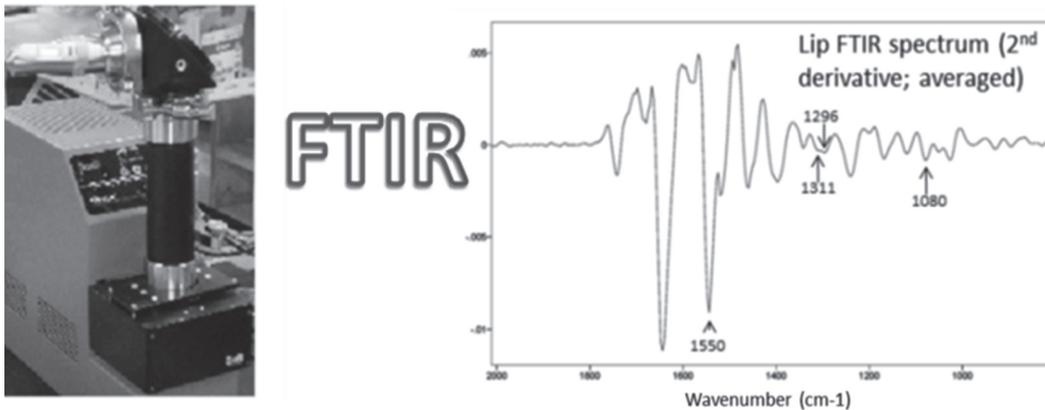


Fig. 2 当研究室で開発した顔面皮膚測定用 FTIR-ATR 装置 (左) とそれで測定した口唇表面の IR の 2 次微分スペクトル (被験者 25 名の平均化スペクトル) (右)。

よって、表面の保湿性が保たれ、またその細胞間ラメラと角質細胞の物性によってバリア機能が維持される。このような特徴を持つ口唇表面を FTIR-ATR 法によって非侵襲的に簡便に測定できるアダプタを開発し (Fig. 2), 前記のように脂肪酸の代謝状態を観察することが可能になった^{9, 11, 12)}。さらに、この口唇表面の測定によって、糖尿病のマーカーである HbA1c 値を予測することを検討した。糖尿病の非観血的診断 (血糖値測定) に振動分光法を使うというのは古くから試みられてきた方法であり、最近では蛍光分光法によって皮膚の AGEs (最終糖化産物) の測定を行うような装置 (Diagnooptics 社 : AGE Reader) も開発され試験的に使われているが、まだ臨床現場で本格的に使用されることは少ない。そこで

FTIR-ATR 法で、口唇の細胞間ラメラに入ってくるであろう AGEs を直接測定して、糖尿病被験者の HbA1c 値の予測が可能かどうかを、学内倫理委員会の許可を得て可搬性の FTIR 装置を病院に持込み、検討した。この方法で皮膚表面の数十 pmol レベルの AGEs が FTIR-ATR 法で測定可能であり、蛍光分光法で検出できない AGEs も計測できた。

その結果、HbA1c 値が 6.5% 以上のグループとそれ未満のグループの口唇の赤外スペクトルを比較し差スペクトルをとると、そのパターンは一部の AGEs (カルボキシメチル化生成物) の赤外スペクトルとよく相関した。さらに、PLS 法を適用して各被験者の HbA1c 値を予測した所、相関係数 $R=0.82$ と比較的よく予測することが

できた (n=25)。またその予測のときに出てくる偽陰性の人たちは2名 (16名患者中) いたが、口唇のトランス型不飽和脂肪酸由来の 968 cm^{-1} の赤外吸収強度による分類を付け加えることで偽陰性の人たちをすべて見出し、高HbA1c値 (6.5%以上) の被験者を100%スクリーニングすることが可能であった¹³⁾。この場合、トランス型不飽和脂肪酸は主として脂質の過酸化物として生成されたものと考えられるので、AGEsの変化と過酸化物の変化とを両方考慮することで、糖尿病のマーカーであるHbA1c値をより良く予想できたことを示しているのかもしれない。

4 NMR分光法による血中脂質計測法の革新

血中脂質は主にリポタンパク質の一部として存在することが多く、主要脂質であるトリグリセリドやリン脂質、コレステロールなどはLDLやHDLなどの形で血液を介して輸送される。循環器系の病態のマーカーとも考えられているこれらのリポタンパク質の量と質を評価することは、臨床研究にとって重要と考えられており、これらのリポタンパク質の粒子サイズや数を、NMR分光法を用いて非破壊的に測定するサービスを行うリポサイエンス社¹⁴⁾ (米国NC州) が知られている。この企業は、Dr. OtvosとDr. Jeyarajah¹⁵⁾によって1997年に創業されたが、現在では世界中のリポタンパク質の疫学的研究を一手に引き受けている感のある新進の企業となっている。このNMR法では、400 MHz以上のNMRにプローブを取り付け数分で (NMR測定だけだと約40秒; プローブ洗浄と試料注入に約2分) 血清のメチルプロトンシグナル形状を計測し、デコンボリューション法によってVLDL, LDLやHDLの粒子サイズと数のみならず、各粒子中のコレステロールやTG量を予測しLipoProfileとして提供するサービスを行っていた。メチルプロトンのシグナルは0.8 ppm前後に検出されるが、サイズが大きく低密度のリポタンパク質 (VLDL) の場合、そのシグナルは0.84 ppmに検出され、またサイズの小さな高密度のリポタンパク質 (small HDL) では、0.78 ppmに検出される。このメチルプロトンのケミカルシフトは、リポタンパク質のサイズと非線形であるが数式に書ける関係にあることがわかっているので、NMRデータからそのサイズを求めることができる。さらに、粒子濃度もメチルプロトンのNMRシグナルの形と面積から求めることができる。各リポタンパク質の持っているコレステロール (Chol) 量やChol+TG量も、各スペクトルの積分値と比較的良く相関するので、それらの脂質量も計算することができる。

これらのリポタンパク質の従来の測定法である超遠心

法や電気泳動法などの分離的手法よりもNMR法のほうが短時間で測定でき、多数の検体を扱えるので、特に大規模な臨床研究において採用され、これまでに200報近い論文が出版されているという。最近では新しくLp(a)やsdLDLなどの測定も手がけて、臨床研究に貢献してきている。一方でFTIRの方法で血清中のLDL (アポリポタンパク質) 量を測る非破壊的計測方法も提案されている¹⁶⁾。

5 まとめ

人体の脂質脂肪酸の代謝研究あるいは臨床研究において、分光法によって比較的短時間に多数の検体の脂肪酸組成や脂質量を測定し、組織中の脂肪酸量を予測できる様々な手法が開発されその有用性も一部では認識されつつある。ただ、FTIRによる脂肪酸組成計測や口唇を通じた脂質脂肪酸代謝の計測法はまだ確立されておらず、より有効な手法として認識されるためにはさらなる研究の広がりや装置技術開発が必要である。そして、臨床研究においては脂質脂肪酸代謝の研究と同時に糖代謝や他の代謝の変化を同じ時間軸で捉えていく必要があり、様々な代謝が関係する病態の非侵襲的即時的検査法の開発を人々が希求している限り、脂質や糖なども一斉に分析可能な赤外分光法のような分光学的検出法の研究は広がっていくことが期待される。

文 献

- 1) Otto M. Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH, FRG, ISBN 3-527-29628-X (1999).
- 2) Ripoché A, Guillard S. *Meat Science* **58** (3), 299-304 (2001).
- 3) Yoshida S, Yoshida H. *Biopolymers*, **70** (4), 604-613 (2003).
- 4) Afseth NK, Segtnan VH, et al. *Appl Spectrosc* **59** (11), 1324-1332 (2005).
- 5) Beattie JR, Bell SE, et al. *Lipids* **41** (3), 287-294 (2006).
- 6) Yoshida S, Okazaki Y, et al. *Lipids* **43** (4), 361-372 (2008).
- 7) <http://www.scientificamerican.com/> (March 1, 2013: Organic versus Conventional).
- 8) Brossard N, Croset M, et al. *J. Lipid Res.* **38**, 1571-82 (1997).
- 9) Yoshida S, Zhang QZ, et al. *Lipids in Health and Disease* **8**: 28 (2009).
- 10) 吉田敏, 酒井久美子, 岡田恵子, 竹下正純. 医学のあゆみ, **164** (2), 147-148 (1993).
- 11) Sakuyama S, Hirabayashi C, et al. *Skin Res. Technol.* **16** (2), 151-160 (2010).
- 12) Yoshida S, Koike K. (Book) Chapter 1 in *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, (Elsevier; Edit-

- ed by Dr. Aleš Igljč) 13, Pages 1-32, ISBN: 978-0-12-387721-5 (2011).
- 13) Yoshida S, Yoshida M, *et al.* *J. Pharm. Biomed. Anal.* **76**, 169-176 (2013).
- 14) <http://www.liposcience.com/>
- 15) Otvos JD, Jeyarajah EJ, *et al.* *Clin Chem.* **37**, 377-386 (1991).
- 16) Liu KZ, Man A, *et al.* *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1809-1814 (2007).