

トピックス

安定同位体標識ビタミン B₁₂ を用いた、ビタミン B₁₂ の新規吸収試験 Novel absorption test for vitamin B₁₂ using a stable isotope-labelled vitamin B₁₂

はじめに

ビタミン B₁₂ は藻類を除き基本的に動物性食品にしか含まれておらず、先進国であっても厳格な vegan ではビタミン B₁₂ 欠乏症が起こることが報告されている¹⁾。我が国の現状として、令和元年度国民健康・栄養調査結果によると、ビタミン B₁₂ 摂取量の平均値は、男女ともに全ての年齢区分において日本人の食事摂取基準(2020年版)の推奨量を超えている²⁾。しかし、ビタミン B₁₂ は吸収障害が重要な問題となるビタミンである。吸収障害の特定には放射性コバルト標識ビタミン B₁₂ を投与するシリング試験が用いられていたが、現在は実施困難であり、最近、非放射性的の安定同位体で標識したビタミン B₁₂ の開発が報告されたので本稿にて紹介する。

ビタミン B₁₂ の吸収機構と障害³⁾⁴⁾

タンパク質と結合した食品中のビタミン B₁₂ は、胃酸・ペプシンの作用により、食品から遊離し、唾液腺由来のハプトコリンと結合する。十二指腸において、タンパク質分解酵素により、ハプトコリンが分解し、遊離したビタミン B₁₂ は、胃の壁細胞から分泌された内因子(intrinsic factor)と結合し、IF-ビタミン B₁₂ 複合体は、回腸末端の特異的吸収部位から吸収される。吸収障害の原因としては、内因子分泌細胞である胃の壁細胞が自己免疫機構により萎縮する自己免疫疾患、胃がんなどによる胃切除、プロトンポンプ阻害薬(PPI)の長期服用、炎症性腸疾患などがあげられる。このようにビタミン B₁₂ の病態生理において、吸収障害はきわめて重要であり、ビタミン B₁₂ 欠乏によって悪性貧血を含む巨赤芽球性貧血や神経障害、さらに高ホモシステイン血症による心血管疾患リスクや骨折リスクの増加が引き起こされるため、その診断は大きな臨床的意義をもつ。その診断の標準法とされてきたのはシリング試験であるが、放射性コバルト標識したビタミン B₁₂ をヒトに投与するため、現在では実施困難であり、

臨床的にビタミン B₁₂ の吸収障害を診断する方法がないという状態にあった。しかし、ごく最近非放射性的安定同位体である¹³Cで標識したビタミン B₁₂ を用いた吸収試験が報告された。

シリング試験の概要⁵⁾

1 μCi の⁵⁷Co または⁵⁸Co 標識シアノコバラミンを経口投与し、約2時間後1 mg という大量の非標識ビタミン B₁₂ が筋肉注射される。大量投与された非標識ビタミン B₁₂ により、血液中ビタミン B₁₂ 結合タンパク質が飽和し、投与された標識ビタミン B₁₂ は尿中に排泄される。吸収障害が起こっていれば、そもそも標識ビタミン B₁₂ は糞便中に排泄され、体内には吸収されないため、尿中への排泄も起こらない。尿中ビタミン B₁₂ 排泄量が低値の場合、標識シアノコバラミンと同時に内因子をも同時投与して、試験を繰り返す。内因子同時投与により、標識シアノコバラミンの吸収率が改善するようであれば、悪性貧血のような、内因子欠乏による吸収障害が示唆される。

しかし、シリング試験は操作が煩雑であり、24時間畜尿が必要という問題点に加えて、現在ではヒトに対する放射性コバルトの投与は困難であり、シリング試験は行われなくなった。

悪性貧血の診断において、血液検査により抗胃壁抗体や抗内因子抗体測定のような、自己抗体測定が行われるが、これは悪性貧血という疾患の原因となる自己抗体の検査であり、吸収試験ではない。すなわちシリング試験が用いられなくなった現在では、実際に吸収障害が起こっているのかどうかを診断する方法がなかった。

シリング試験の代替試験

最近10年余りの間に、シリング試験の代替方法としての、ビタミン B₁₂ 吸収障害評価法が2つ報告された。一つは Cobasorb 試験である。血液中ビタミン B₁₂ はホロトランスコバラミンまたはハプトコリンに結合して

おり、前者が生物学的に活性なものとして、active B₁₂ と呼ばれる⁶⁾。本検査では、6時間間隔に3回、非標識ビタミン B₁₂ を投与し、血清ホロトランスコバラミンを測定するものである。Cobasorb 試験については、血清ホロトランスコバラミン測定が必須であるが、海外では自動分析機器を用いた血清ホロトランスコバラミン測定が一般的に行われているのに対し、日本では全く行われておらず、少なくとも日本での実施は困難である。

もう一つは、サルモネラ (*Salmonella enterica*) 菌に¹⁴C 標識化合物を与えて培養し、¹⁴C 標識ビタミン B₁₂ を合成させたものを経口投与し、血液・尿・便中ビタミン B₁₂ 濃度を測定するものであるが、¹⁴C は弱いエネルギーのβ線放出核種ではあるが、放射性物質であり、やはり放射性物質を投与するという問題点がある⁷⁾。またいずれもまだ十分基礎検討が行われているとは言えない状況である。

安定同位体標識ビタミン B₁₂ を用いたビタミン B₁₂ の新規吸収試験

ごく最近、非放射性である¹³C 標識ビタミン B₁₂ を用いた、新規吸収試験が発表された⁸⁾⁹⁾。Deviらは、¹⁴C 標識ビタミン B₁₂ 作成で用いられたのと同じサルモネラ (*Salmonella enterica*) 菌を用い、¹³C 標識ビタミン B₁₂ を作成した。高用量 (18.3 μg) 及び低用量 (2.3 μg) の¹³C-ビタミン B₁₂ (シアノコバラミン) をヒトに投与し、経時的に採血した結果、¹³C-ビタミン B₁₂ の血液中濃度は約7時間後にピークとなり、⁵⁷Co・⁵⁸Co・¹⁴C 標識ビタミン B₁₂ で得られたのと同程度の値であった。低用量 2.3 μg (食事摂取基準における成人の推奨量 2.4 μg/日に近い量) における、¹³C-ビタミン B₁₂ の平均生体利用効率は約46%であり、これも従来の報告に近かった。一方高用量の¹³C-ビタミン B₁₂ に関しては、約7.6%と低かった。回腸末端の特異的吸収部位は、2~3 μg 程度で飽和すると考えられていることと、矛盾しない結果であった。

ビタミン B₁₂ については細胞内代謝が知られている。シアノコバラミンは細胞質において、methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein (MMACHC) の作用によりシアノ基が外れ、細胞質とミトコンドリアに振り分けられた後、細胞質ではメチル B₁₂ となってメチオニン合成酵素に関わり、ミトコンドリアではアデノシル B₁₂ となってメチルマロニル CoA ムターゼの補酵素となる¹⁰⁾。今回の研究はシアノコバラミン投与実験だが、血液中¹³C-ビタミン B₁₂ の主要同族体はメチルコバラミンであり、細胞内における、脱シアノな

どの代謝は活性が高く、迅速に起こるものと考えられた。

安定同位体の意義

安定同位体のヒトへの応用として良く知られているのは、尿素呼気試験であろう。¹³C-尿素を含んだ検査薬を服用すると、胃内にピロリ菌が存在すれば、ピロリ菌の産生するウレアーゼにより、尿素が二酸化炭素とアンモニアに分解され、呼気中の¹³C-二酸化炭素が増加する¹¹⁾。¹³C は非放射性の安定同位体なので、ヒトに対しても、有害事象なく使用できる。

栄養素の吸収試験において、非放射性の安定同位体が存在するかどうかは、非常に重要な点である。カルシウムの吸収に関して、上西らは、⁴⁴Ca および⁴²Ca 標識化合物を用いた吸収試験を報告しているが、これはカルシウムには、存在比97%の⁴⁰Ca 以外に、複数の安定同位体が存在するため、このような厳密な吸収試験が可能になったものである¹²⁾。リンについては、³¹P 以外に安定同位体が存在しないため、上記のような吸収試験はできない。コバルトに関して、天然に存在する安定同位体は⁵⁹Co ただ1種類のみであり、それ以外の22種類の同位体はすべて放射性であるため、これまでシリング試験の代替法開発が困難であったが、本論文は、コバルトではなく安定同位体の炭素を用いて、安定同位体標識のビタミン B₁₂ を得たものである。

おわりに

本稿で紹介した論文はまだ今のところ、安定同位体標識 B₁₂ の合成、及びその体内動態を示した内容ではあるが、シリング試験が利用できない現状にあっては、その代替となる新規吸収試験となりえる可能性を持っている。報告されたデータから考えると、1回経口投与し、6~8時間後に採血するだけですむ可能性があり、シリング試験の煩雑さとは対照的である。吸収障害が欠乏・不足の重要な原因となるビタミン B₁₂ 吸収障害の評価法として、興味あるものと考えて紹介した。

Key words : vitamin B₁₂, malabsorption, stable isotope, Schilling test, cyanocobalamin

¹Faculty of Health and Nutrition, Osaka Shoin Women's University

²Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University

³Research Support Center, Shizuoka General Hospital

Misora Ao¹, Kiyoshi Tanaka^{2,3}

¹大阪樟蔭女子大学 健康栄養学部

² 神戸学院大学 栄養学部

³ 静岡県立総合病院 リサーチサポートセンター
青 未空¹, 田中 清^{2,3}

利益相反：申告すべきものなし

(2022.4.6 受付)

文 献

- 1) Pawlak R, Lester SE, Babatunde T (2014) The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B₁₂: a review of literature, *Eur J Clin Nutr* **68**, 541-8
- 2) 厚生労働省. 令和元年国民健康・栄養調査報告. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/r1-houkoku_00002.html
- 3) Green R, Allen LH, Björke-Monsen A-L, Brito A, Guéant J-L, Miller JW, Molloy AM, Nexo E, Stabler S, Toh B-H, Ue PM, Yajnik C (2017) Vitamin B₁₂ deficiency, *Nat Rev Dis Primers* **29**, 3:17040
- 4) Brito A, Habeych E, Silva-Zolezzi I, Galaffu N, Allen LH (2018) Methods to assess vitamin B₁₂ bioavailability and technologies to enhance its absorption. *Nutr Rev* **76**, 778-792
- 5) Schilling RF (2004) Intrinsic factor studies: II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the oral administration of radioactive vitamin B₁₂. *J Lab Clin Med* **144**, 268-72
- 6) Nexo E, Hoffmann-Lücke E (2011) Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* **94**, 359S-365S
- 7) Carkeet C, Dueker SR, Lango J, Buchholz BA, Miller JW, Green R, Hammock BD, Roth JR, Anderson PJ (2006) Human vitamin B₁₂ absorption measurement by accelerator mass spectrometry using specifically labeled ¹⁴C-cobalamin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 5694-5699
- 8) Devi S, Pasanna RM, Shamsuddin Z, Bhat K, Sivadas A, Mandal AK, Kurpad A. (2020) Measuring vitamin B-12 bioavailability with [¹³C]-cyanocobalamin in humans. *Am J Clin Nutr* **112**, 1504-1515
- 9) Miller JW, Green R (2020) Assessing vitamin B-12 absorption and bioavailability: read the label. *Am J Clin Nutr* **112**, 1420-1421
- 10) Gherasim C, Lofgren M, Banerjee R (2013) Navigating the B₁₂ road: Assimilation, delivery, and disorders of cobalamin. *J Biol Chem* **288**, 13186-13193
- 11) Keller J, Hammer HF, Afolabi PR, Benninga M, Borrelli O, Dominguez-Munoz E, Dumitrascu D, Goetze O, Haas SL, Hauser B, Pohl D, Salvatore S, Sonyi M, Thapar N, Verbeke K, Fox MR, and European ¹³C-breath test group (2021) European guideline on indications, performance and clinical impact of ¹³C-breath tests in adult and pediatric patients: An EAGEN, ESNM, and ESPGHAN consensus, supported by EPC. *United European Gastroenterol J* **9**, 598-625
- 12) Uenishi K, Fujita T, Ishida H, Fujii Y, Ohue M, Kaji H, Hirai M, Kakumoto M, Abrams S (2010) Fractional absorption of active absorbable algal calcium (AAACa) and calcium carbonate measured by a dual stable-isotope method. *Nutrients* **2**, 752-61