

亜鉛安定同位体によるヒトの亜鉛代謝解析の検討

横井 克彦

(聖徳大学大学院・人間栄養学研究科*)

Required Analytical Precision for Human Zinc Metabolism by Stable Zinc Isotopes

Katsuhiko YOKOI

Department of Human Nutrition, Seitoku University Graduate School

Summary

The usage of enriched stable isotopes in nutritional sciences is increasing and includes measurements of kinetic parameters for micronutrients and amino acids, determination of true absorption rates based on single-tracer and double-tracer techniques, and quantification of endogenous losses. The suitable compartment model and required precision in the isotope ratio measurements by mass spectrometry for human zinc metabolism are discussed. The 500 data sets of the simulated plasma zinc disappearance obtained from giving 2 % normal random noise to Miller et al's polyexponential model were analyzed by nonlinear regression. The three-compartment open mammary model was found appropriate for the 9-day observation period; the closed model was found appropriate for the 24-hour observation. Approximately one percent overall precision in isotope ratio measurements is necessary and feasible in kinetic analyses of zinc metabolism over 24-hour to 9-day observation period.

元素は同位体の混合物であり、存在比の低い同位体を濃縮したものをトレーサーとして利用できる。近年、同位体分析が比較的容易となったことから、安定同位体の栄養学への応用が拡大している¹⁾。

その利用法として第一に、速度論的パラメーターの測定を挙げることができる。速度論的パラメーターは、当該ミネラルまたはビタミンおよびアミノ酸等の代謝解析・体内動態の解析に用いられる²⁻⁵⁾。また、交換性プールの大きさを測定して、栄養指標として利用することが可能である⁶⁾。

第二に、真の吸収率の測定を挙げられる。シングルトレーサー法では、トレーサーを経口投与した上で、出納実験を行い、トレーサーの真の吸収率が算出される⁷⁾。この方法により、サプリメントなどの化学形態ごとの吸収率を求めることができる。ダブルトレーサー法では、二種の異なる同位体を経口並びに経静脈的に投与し、一定時間後に、血漿または尿を採取することにより、吸収率が測定される⁸⁾。また、食事中に元々ある内因性 (intrinsic) の栄養素と後から食事に加えた外因性 (extrinsic) の標識栄養素 (トレーサー) の間に化学平衡が成り立つ場合には、外因性トレーサーを用いて食事中栄養素の真の吸収率を測定することが可能である⁹⁾。

第三に、同位体を経静脈投与した上で、出納を行なうことにより、内因性排泄量を測定し、食事からの見かけの吸収量に加えることにより、真の吸収量ならびに真の吸収率を求めることも可能となる¹⁰⁾。

安定同位体には被曝の問題はなく、ヒトへの応用が可能であるという利点はあるものの、分析上の問題点がある。精度の高い熱イオン化質量分析法 (thermal ionization-mass spectrometry) では、前処理法としてイオン交換による精製が必須であり、しかも、サンプルスルーットが非常に低いという問題点がある¹¹⁾。

*所在地：千葉県松戸市岩瀬550 (〒270-8555)

誘導結合プラズマ質量分析法 (inductively couple plasma-mass spectrometry, ICP-MS) は、前処理は灰化または希釈のみで済むことが多く比較的簡便であるが、同位体や機器によっては溶媒抽出やイオン交換等が必要になる場合がある¹²⁾。

分析方法としては、精度を上げるために同位体比分析が行なわれる。普及している四重極型ICP-MSでは、同一測定内の繰り返し分析精度は通常0.5%程度であり、全分析工程を通して実現可能な分析精度は高々1%程度であると見積もることができる¹²⁾。

安定同位体を用いた代謝解析が近年最も盛んに行なわれている元素は亜鉛である。Millerらは放射性亜鉛を用いて長期間観察を行なった結果を単純化し、10日間程度の観察期間に対して乳頭様モデル (mamillary model) を適用した亜鉛代謝モデルを提唱している¹³⁾ (Fig. 1)。Fig. 1のQ₁は、中央の血漿コンパートメントを示し、周辺コンパートメントは血漿との間でのみ亜鉛のやり取りをする。また、システムからの亜鉛の消失は血漿コンパートメントのみから生ずると仮定される。

そこで、四重極型ICP-MSを用い、Millerらの亜鉛代謝モデルを使って実施した亜鉛の速度論的研究を対象として、要求される精度とその実現可能性について検討した。

方 法

1. Millerらの亜鉛代謝モデル

Millerらの亜鉛代謝モデルはFig. 1に示した。Eq. 1に示すように、4コンパートメントモデル (four-compartment model) の場合、静脈内に投与したトレーサーの血漿中残存率E(t)は、4つの指数関数項の和 (tetra-exponential function) となる。Millerらの亜鉛代謝モデルでは、その代表値としてH₁からH₄、g₁からg₄の値が示されている。

$$E(t) = H_1 \exp(-g_1 t) + H_2 \exp(-g_2 t) + H_3 \exp(-g_3 t) + H_4 \exp(-g_4 t) \cdots \cdots \text{(Eq. 1)}$$
$$H_1 = 0.9545, H_2 = 0.03046, H_3 = 0.01443, H_4 = 0.000628$$
$$g_1 = 137.6 \text{ day}^{-1}, g_2 = 3.564 \text{ day}^{-1}, g_3 = 0.1106 \text{ day}^{-1}, g_4 = 0.00232 \text{ day}^{-1}$$

ただし、時間tの単位は、day

2. Monte Carlo法によるデータ作製

分析誤差の影響を検討するため、投与後24時間の観察期間では、11時点すなわち5, 15, 30, 40, 50, 60, 90分, 2, 6, 12, 24時間を設定した。投与後9日間の観察期間では、さらに5時点すなわち2, 3, 5, 7, 9日を追加した。Eq. 2に示すように誤差を含んだトレーサーの残存率R(t)として、Millerらの消失式E(t)で設定された値に、正規擬似乱数を用いた2%のランダムノイズを加えたデータ500セットを用意した。

$$R(t) = E(t) (1 + 0.02 \delta) \cdots \cdots \text{(Eq. 2)}$$

ただし、 δ は平均値0、標準偏差1の正規擬似乱数

3. 消失曲線の解析

Millerらのモデルにおいて第4項は、年余にわたる観察期間から求められたものであり、10日間以下ではその項に基づくトレーサーの減少は観測されない。そこで、作製したシミュレーションデータには、Eq. 3に示す3項からなる多指数関数 (tri-exponential function) を当てはめて係数を求め、Fig. 2に示す3コンパートメントからなる開いた乳頭様モデル (open mamillary model) におけるパラメーターを求めた⁶⁾。

$$E(t) = H_1 \exp(-g_1 t) + H_2 \exp(-g_2 t) + H_3 \exp(-g_3 t) \cdots \cdots \text{(Eq. 3)}$$

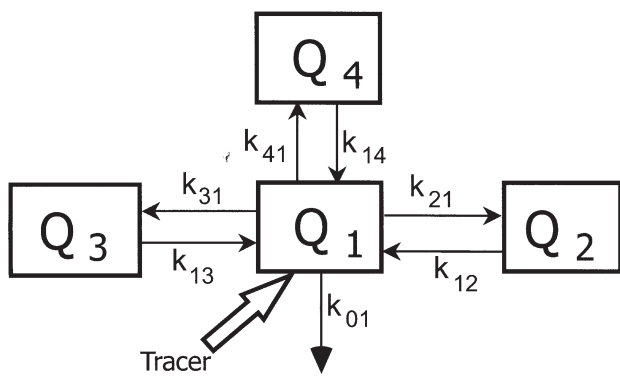


Fig. 1 Diagrammatic representation of the four-compartment mammillary model of human zinc kinetics proposed by Miller et al.¹³⁾

Q₁ indicates a size of the central Zn pool (compartment 1). Q₂, Q₃ and Q₄ indicate sizes of the peripheral Zn pools (compartments 2, 3, and 4). k_{ij} represents a fractional transfer rate into compartment i from compartment j . Open arrow shows the route of Zn tracer administration.

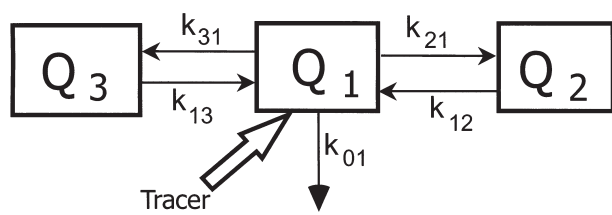


Fig. 2 Diagrammatic representation of the three-compartment mammillary model of human zinc kinetics suitable for the observation period approximately less than ten days.

The explanation of symbols is same as Fig. 1.

なお、24時間の観察期間では、求めうるパラメーターの推定精度を上げることを目的としてEq. 4に示す第3項を定数項とした多指数関数 (truncated tri-exponential function) も当てはめ、どの関数を用いるのが適切であるのか、検討した。なお、第3項を定数項とした多指数関数では、システムからのトレーサーの消失を示す速度定数 k_{01} は0と仮定され、閉じた乳頭様モデル (closed mammillary model) に相当する。

$$E(t) = H_1 \exp(-g_1 t) + H_2 \exp(-g_2 t) + H_3 \quad \dots \dots \dots \text{(Eq. 4)}$$

曲線当てはめには、Simplex法による非線形回帰を適用した。乱数発生と解析のため、統計パッケージSYSTAT Ver. 5を用いた。

結果と考察

Table 1には、トレーサーの血漿中残存率が完全にMillerらの消失式¹³⁾に従い、まったくノイズがなかったとの仮定のもとに作製したデータから、消失式の係数を逆算した結果を示す。このように、ノイズがないデータの場合には、ほぼ設定値 (set value) に一致した結果が得られた。ただし、これは仮想的なものであり、現実には測定誤差が存在することに留意すべきである。

Table 2は、9日間の観察期間で2%ランダムノイズを加えたデータ500セットを、3項からなる多指数関数 (tri-exponential function) で解析した結果を示す。当てはめた値の平均値 (mean) は、ほぼ設定値 (set value) に一致した。また、変動係数も5%以下であり、非常によく元の値が推定された。この求められた係数から、開いた乳頭様モデルのパラメーターを計算した結果をTable 3に示した。推定値の平均値は、設定値の97.0から101.2%に納まり、変動係数も1.7から4.2%であった。9日間の観測ですべてのパラメーターを精度よく推定できることが明らかであるが、この条件で研究を実施するならば被験者も9日間拘束されることを示しており、より短い観察期間で必要なパラメーターが得られる条件を探る必要性が認められた。

Table 4は、24時間の観察期間で2%のランダムノイズを加えたデータ500セットを、3項からなる多指数関数 (tri-exponential function) で解析した結果を示す。平均値では g_3 以外の相対値 (relative value) は、99.9から102.6%であり、比較的よく推定できた。しかしながら、 g_3 は、定義上あり得ないマイナスの値となった。また、変動係数は、 g_3 以外で

も40%近いものが現われ、開いた乳頭様モデル (open mammillary model) を適用するのは不適切であった。

Table 5は、24時間の観察期間で2%のランダムノイズを加えたデータ500セットを、第3項を定数項とした多指数関数 (truncated tri-exponential function) で解析した結果を示す。 H_3 と g_2 が過小評価されたが、変動係数は最大でも6%程度であった。ただし、 g_3 は定義上求めることはできない。この解析結果に基づいて閉じた乳頭様モデル (closed mammillary model) における種々のパラメーターを計算した (Table 6)。 k_{13} は25%の過小評価、 Q_3 は50%の過大評価となったが、変動係数は最大7%までに納まった。生理学的重要性が指摘されている Q_2 および k_{12} と k_{21} は⁶⁾、変動係数

Table 1 Comparison of the set values reported by Miller et al.¹³⁾ and the parameters reconstituted from the fitting of tri-exponential functions to the representative disappearance curve of Zn tracer from plasma

	H_1	H_2	H_3	g_1	g_2	g_3
				day^{-1}	day^{-1}	day^{-1}
Set value	0.955	0.0305	0.0144	137.6	3.564	0.1106
9-d Open	0.954	0.0305	0.0150	137.6	3.536	0.1027
24-h Open	0.954	0.0305	0.0150	137.6	3.536	0.1027
24-h Closed	0.953	0.0321	0.0133	137.4	3.321	n.d.

“9-d Open” represents the tri-exponential function that corresponds to the open mammillary model with three compartments adapted to the 9-day observation period after intravenous dose.

“24-h Open” represents the tri-exponential function that corresponds to the open mammillary model with three compartments adapted to the 24-hour observation period after intravenous dose.

“24-h Closed” represents the truncated tri-exponential function that corresponds to the closed mammillary model with three compartments adapted to the 24-hour observation period after intravenous dose.

n.d.: not defined

Table 2 Various parameters obtained from the fitting of the tri-exponential function to the simulated 500 data sets generated by adding 2 % normal random error to the representative disappearance curve of Zn tracer from plasma over 9-day observation period after intravenous dose

	H_1	H_2	H_3	g_1	g_2	g_3
				day^{-1}	day^{-1}	day^{-1}
Set value	0.955	0.0305	0.0144	137.6	3.564	0.1106
Mean	0.953	0.0306	0.015	137.5	3.546	0.1029
Relative value, %	99.9	100.3	103.6	99.9	99.5	93.0
SD	0.024	0.0008	0.0003	2.3	0.165	0.0034
CV, %	2.5	2.5	1.9	1.6	4.6	3.3

Relative value is the mean divided by the set value shown in percentage.

Table 3 The parameters obtained from the fitting of the open mammillary model to the simulated 500 data sets generated by adding 2 % normal random error to the representative disappearance curve of Zn tracer from plasma over 9-day observation period after intravenous dose

Mammillary Model	k_{11}	k_{12}	k_{21}	k_{13}	k_{31}	k_{01}	Q_1	Q_2	Q_3
	day^{-1}	day^{-1}	day^{-1}	day^{-1}	day^{-1}	day^{-1}	μmol	μmol	μmol
Set value	131	8.90	85.0	0.92	40	6.40	0.0370	0.353	1.61
Mean	131	8.89	85.1	0.908	40	6.21	0.0371	0.355	1.63
Relative value, %	100.0	99.9	100.1	98.7	100.0	97.0	100.3	100.6	101.2
SD	2	0.24	1.8	0.036	1.7	0.19	0.0009	0.014	0.04
CV, %	1.7	2.7	2.1	4	4.2	3	2.4	3.9	2.2

Relative value is the mean divided by the set value shown in percentage.

Table 4 Various parameters obtained from the fitting of the tri-exponential function to the simulated 500 data sets generated by adding 2 % normal random error to the representative disappearance curve of Zn tracer from plasma over 24-hour observation period after intravenous dose

	H_1	H_2	H_3	g_1	g_2	g_3
Set value	0.955	0.0305	0.0144	day^{-1} 137.6	day^{-1} 3.564	day^{-1} 0.1106
Mean	0.954	0.0311	0.0145	137.6	3.656	-0.039
Relative value, %	99.9	102.0	100.6	100.0	102.6	-35.4
SD	0.025	0.0048	0.0054	2.4	0.926	0.5902
CV, %	2.6	15.4	37.3	1.8	25.3	1507

Relative value is the mean divided by the set value shown in percentage.

Table 5 Various parameters obtained from the fitting of the truncated tri-exponential function to the simulated 500 data sets generated by adding 2 % normal random error to the representative disappearance curve of Zn tracer from plasma over 24-hour observation period after intravenous dose

	H_1	H_2	H_3	g_1	g_2	g_3
Set value	0.955	0.0305	0.0144	day^{-1} 137.6	day^{-1} 3.564	day^{-1} 0.1106
Mean	0.953	0.0321	0.0132	137.3	3.327	n.d.
Relative value, %	99.8	105.4	91.7	99.8	93.4	n.d.
SD	0.024	0.0007	0.0005	2.3	0.207	n.d.
CV, %	2.5	2.3	3.5	1.7	6.2	n.d.

Relative value is the mean divided by the set value shown in percentage.
n.d.: not defined

Table 6 The parameters obtained from the fitting of the closed mammillary model to the simulated 500 data sets generated by adding 2 % normal random error to the representative disappearance curve of Zn tracer from plasma over 24-hour observation period after intravenous dose

Mammillary Model	k_{11}	k_{12}	k_{21}	k_{13}	k_{31}	k_{01}	Q_1	Q_2	Q_3
Set value	day^{-1} 131	day^{-1} 8.90	day^{-1} 85.0	day^{-1} 0.92	day^{-1} 40	day^{-1} 6.40	μmol 0.0370	μmol 0.353	μmol 1.61
Mean	131	8.77	86.6	0.691	44.6	n.d.	0.0371	0.367	2.4
Relative value, %	100.0	98.5	101.9	75.1	111.5	n.d.	100.3	104.0	149.1
SD	2.0	0.27	1.9	0.048	2.1	n.d.	0.0009	0.017	0.09
CV, %	1.7	3.1	2.2	7.0	4.8	n.d.	2.5	4.7	3.7

Relative value is the mean divided by the set value shown in percentage.
n.d.: not defined

5%以下で大きな過大評価や過小評価もなく、適切に推定することができた。被験者の拘束も比較的短時間であり、亜鉛代謝解析を行なう上では実用に耐えるものであった。

四重極型ICP-MSを用いた場合、1回の分析の同時再現性 (within-run precision) として変動係数0.5%程度の精度が得られるので全分析工程で1%程度の精度を確保することは必ずしも容易ではないが¹²⁾、注意深い分析を行なうことにより実現可能であることが明らかとなった^{6, 14)}。

参考文献

- 1) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (2000). National Academy Press, Washington, DC.
- 2) Yokoi K, Alcock NW, Sandstead HH (1994) Iron and zinc nutriture of premenopausal women: Associations of diet with serum ferritin and plasma zinc disappearance and of serum ferritin with plasma zinc and plasma zinc disappearance. *J Lab Clin Med* 124: 852-861.
- 3) Yokoi K, Alcock NW, Sandstead HH (1994) Determination of the plasma zinc disappearance constant using stable zinc isotope and inductively coupled plasma-mass spectrometry, and its application for assessing zinc status. *Biomed Res Trace Elements* 5: 69-76.
- 4) Gregory JF, 3rd, Caudill MA, Opalko FJ, Bailey LB (2001) Kinetics of folate turnover in pregnant women (second trimester) and nonpregnant controls during folic acid supplementation: stable-isotopic labeling of plasma folate, urinary folate and folate catabolites shows subtle effects of pregnancy on turnover of folate pools. *J Nutr* 131: 1928-1937.
- 5) Davis SR, Stacpoole PW, Williamson J, Kick LS, Quinlivan EP, Coats BS, Shane B, Bailey LB, Gregory JF, 3rd (2004) Tracer-derived total and folate-dependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E272-279.
- 6) Yokoi K, Egger NG, Ramanujam VM, Alcock NW, Dayal HH, Penland JG, Sandstead HH (2003) Association between plasma zinc concentration and zinc kinetic parameters in premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1010-E1020.
- 7) Patriarca M, Lyon TD, Fell GS (1997) Nickel metabolism in humans investigated with an oral stable isotope. *Am J Clin Nutr* 66: 616-621.
- 8) Hotz C, DeHaene J, Woodhouse LR, Villalpando S, Rivera JA, King JC (2005) Zinc absorption from zinc oxide, zinc sulfate, zinc oxide + EDTA, or sodium-zinc EDTA does not differ when added as fortificants to maize tortillas. *J Nutr* 135: 1102-1105.
- 9) Serfass RE, Ziegler EE, Edwards BB, Houk RS (1989) Intrinsic and extrinsic stable isotopic zinc absorption by infants from formulas. *J Nutr* 119: 1661-1669.
- 10) Hambidge KM, Mazariegos M, Solomons NW, Westcott JE, Lei S, Raboy V, Grunwald G, Miller LV, Sheng X, Krebs NF (2007) Intestinal excretion of endogenous zinc in Guatemalan school children. *J Nutr* 137: 1747-1749.
- 11) Sah RN, Brown PH (1998) Isotope ratio determination in boron analysis. *Biol Trace Elem Res* 66: 39-53.
- 12) Ramanujam VM, Yokoi K, Egger NG, Dayal HH, Alcock NW, Sandstead HH (1999) Polyatomics in zinc isotope ratio analysis of plasma samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry and applicability of nonextracted samples for zinc kinetics. *Biol Trace Elem Res* 68: 143-158.
- 13) Miller LV, Hambidge KM, Naake VL, Hong Z, Westcott JL, Fennessey PV (1994) Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: Alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake. *J Nutr* 124: 268-276.
- 14) Yokoi K, Sandstead HH, Egger NG, Alcock NW, Ramanujam VMS, Dayal HH, Penland JG: Association between zinc pool sizes and iron stores in premenopausal women without anaemia. *Br J Nutr* (in press).