

《技術報告》

レーザ分光法を用いた同位体分析計と¹³C-呼気検査応用

東 陽二* 大原 裕康** 成木 行彦*** 井上 優介****
佐々木康人****

要旨 従来から¹³C-呼気検査用同位体分析計として質量分析計(MS)が使われているが、測定に熟練を要す、高価である等の理由から、臨床での使用的制約となっている。臨床において、簡便に使用できかつ信頼性の高い分析計として、レーザ分光法を用いた同位体分析計を開発し、種々の¹³C-呼気検査にて、その適用性を評価した。

同一試料の繰り返し測定値の変動は0.65%(1σ)以下であり、また、¹³C-グリシン、¹³C-メタセチン、¹³C-尿素化合物を経口投与した呼気検査を行い、MSと比較した結果、非常によく一致し、有効な分析装置と言える。

(核医学 33: 415-421, 1996)

I. はじめに

炭素の安定同位体¹³Cで標識した化合物を経口投与後、呼気中に排出された¹³CO₂を分析し、消化・吸収・代謝機能等の疾患を診断する¹³C-呼気検査は放射線被曝を伴わずかつ無侵襲な検査方法なので、成人はもちろん、乳幼児、妊婦、若年成人等広い範囲に適用できることが特徴である。

¹³C-呼気検査は他の生化学検査に比べ、疾患の程度をより直接的に反映したユニークな情報が得られ、非常に有用であると言われながら日常診断への応用は未だ実現されていない。その理由として

1. 安定同位体標識化合物がきわめて高価である。

2. 臨床の場で使用できる安価で簡便な分析装置がない。

等があり、応用の障害となっている。

従来から呼気検査用安定同位体分析計として質量分析計(MS)が使われているが、MSは高精度で同位体を分析できるが高価、分析測定に熟練を要す等で臨床の場での使用が困難である。

著者らはこれらの課題を克服すべき分析装置として、レーザ分光法を用いた同位体分析計を開発した。近年、AlGaAs系、InGaAsP系の半導体レーザが光通信、光情報機器用として開発され、その性能は飛躍的に向上している。この半導体レーザは可視から近赤外域の範囲で発振可能で、周波数可変、单一モード発振、低雑音と分光用光源に適している。また、安価、小型、長寿命と实用上優れた特徴を有している。このような特徴のある半導体レーザを同位体分析用光源として用いることにより、簡便で高精度な同位体分析計ができた。

本報告ではこのような同位体分析計の概要とその特性について述べ、最後に¹³C-呼気検査応用について報告する。

* 日本無線(株)研究所

** 聖マリアンナ医科大学第三内科

*** 東邦大学医学部第一内科

**** 東京大学医学部放射線科

受付：7年5月24日

最終稿受付：8年1月10日

別刷請求先：埼玉県上福岡市福岡2-1-4 (番356)

日本無線(株)研究所埼玉分室

東 陽二

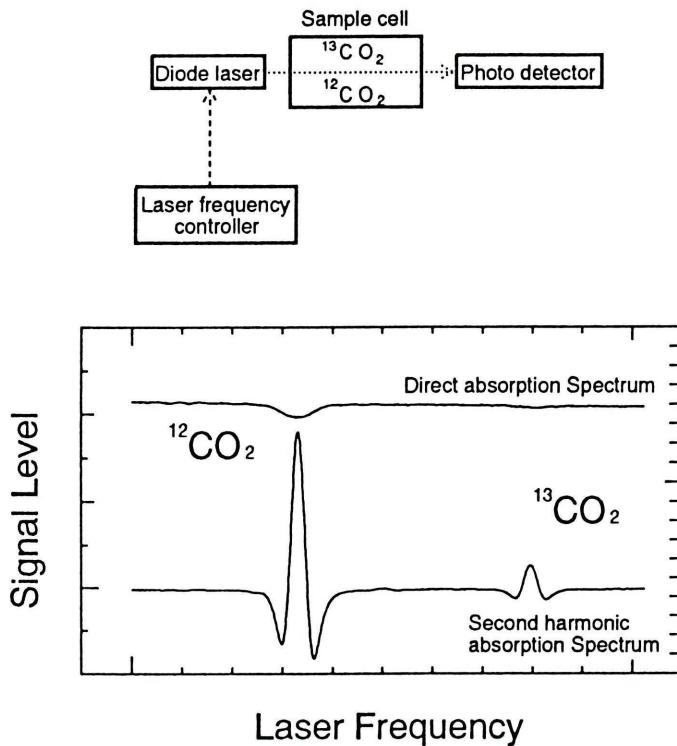


Fig. 1 Measurement method of $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ isotope ratios using tunable diode laser spectroscopy.

II. 同位体分析計の開発

1. 測定原理 (Fig. 1)¹⁾

同位体効果により $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ は異なった周波数の光を吸収する。高輝度で発振スペクトル幅の狭い半導体レーザを周波数可変光源として用い、試料セル内の $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ の光吸収スペクトルを測定し、そのスペクトル強度から ^{13}C の存在比を求める。

CO_2 の赤外領域での光吸収スペクトルは振動スペクトル（振動エネルギー準位間の遷位）に回転スペクトル（回転エネルギー準位間の遷位）が複数個重畳した形状となっている。その回転スペクトルの間隔は $\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$ 、スペクトル幅は $\sim 0.01 \text{ cm}^{-1}$ である。一方、半導体レーザの発振スペクトル幅は $\sim 0.0001 \text{ cm}^{-1}$ と非常に狭いので、これらのスペクトルを高分解能、高精度に測定できる。また、高輝度なレーザ光を100% 利用してスペクト

ルを測定しているので、外来光、熱雑音等の外乱の影響を受けにくい。このような特徴により、同位体の存在比を高精度、かつ安定に測定できる。

Fig. 1 のスペクトルは本分析計で測定した天然存在比の $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ のスペクトル例である。上のスペクトルは試料セルを透過した光強度を光検出器で測定した直接吸収スペクトル、下のスペクトルは 3. 結果で述べる高感度検出手法を用いて測定した 2 次微分吸収スペクトルを示している。このように $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ スペクトルを完全に分離して測定できるので、スペクトル相互の重なりの補正計算の必要がない。

2. 設計方針

ベッドサイドで簡便に使用できる分析計の開発を目的とし、以下の 3 点について考慮した。

- 1) 同位体比の変化を精度 3‰ (3σ) 以下で測定できる。
- 2) 操作を容易にする。

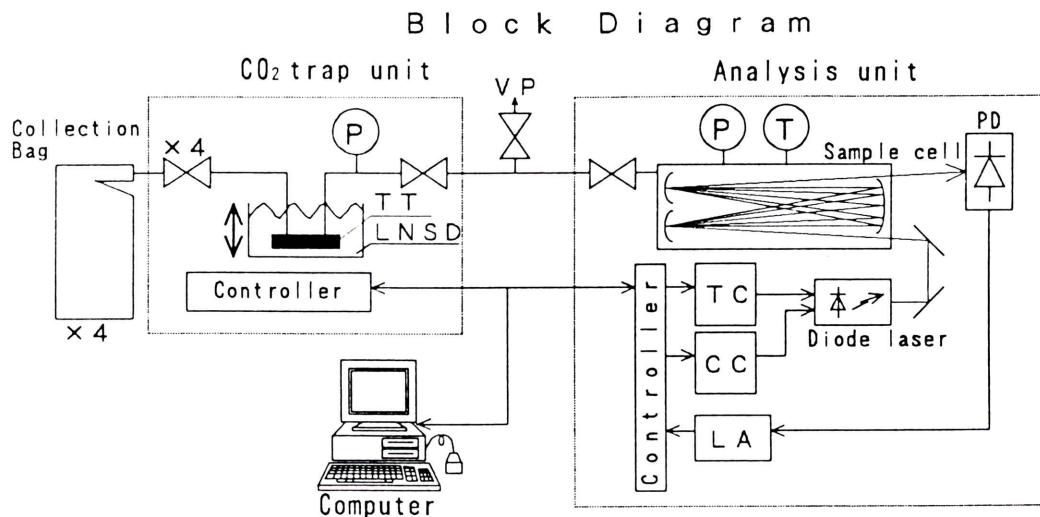


Fig. 2 Block diagram of tunable diode laser spectroscopy system for ¹³C-breath tests. P: Pressure sensor, T: Temperature sensor, LNSD: Liquid Nitrogen Storage Dewar, TT: Trap Tube, VP: Vacuum Pump, PD: Photo Detector, TC: Temperature Controller, CC: Current Controller, LA: Lock-in Amp.

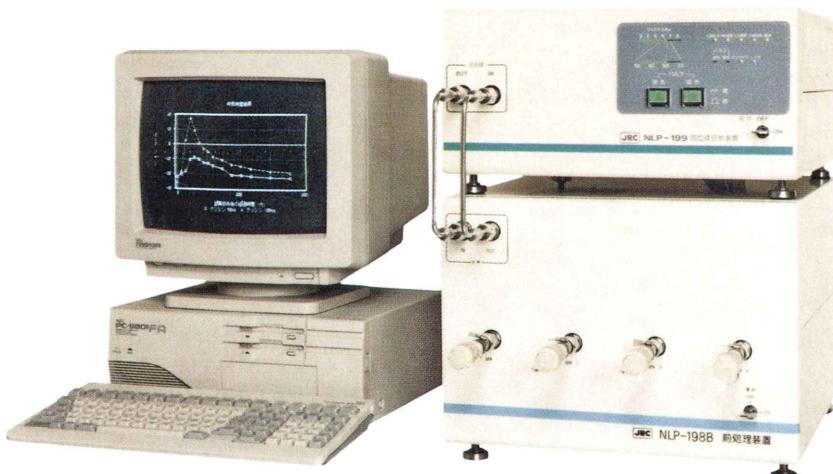


Fig. 3 Photograph of tunable diode laser spectroscopy system for ¹³C-breath tests.

- 3) 小型で卓上に設置可能にする。
- 1) の実現のためにスペクトルを S/N よく測定する検出方法の開発を、また、2) についてはコンピュータによる自動化を行った。3) については周

波数可変レーザとして、周波数の可変が電気的に容易にでき、かつ小形である半導体レーザを採用した。

3. 結 果

1) 構 成^{2,3)}

同位体分析計のプロック図をFig. 2に示す。前処理部では呼気バッグで採取した呼気よりCO₂のみが抽出され、分析部では抽出されたCO₂の光吸収スペクトル(¹³CO₂, ¹²CO₂)が測定される。コンピュータ操作で各部の制御、同位体比の導出が行われる。

前処理部の接続ポートに呼気バッグを接続し、電磁弁を逐次切り換えて呼気バッグを選択し呼気をトラップ管に導入する。呼気中のCO₂は液体窒素でトラップされ、他のガスは真空ポンプで外部へ排気される。

分析部の半導体レーザの温度を掃引して、発振周波数を精密に掃引する。また、駆動電流を制御し、周波数変調(FM)、光出力の調整を行う。半導体レーザより射出されたレーザ光は、吸収セルを透過後ホトダイオードで検出される。吸収セルはレーザ光を多数回往復反射させ吸収量を增幅するホワイト型を用いている。検出された信号はロックインアンプで変調周波数の2倍の周波数で同期検波され、2次微分スペクトルが測定される。本検出方法により雑音が低減されている。

コンピュータ操作で前処理部・分析部の自動制御、同位体比の算出等の処理を行っており、呼気バッグを取り付けるだけで、後はすべてコンピュータで処理される。

2) 特 性

・安定性

$\delta^{13}\text{C}$: -26.2‰(PDB標準: 0‰=0.011237)のCO₂ガス、および $\delta^{13}\text{C}$: -11.4‰の呼気をそれぞれ8個の呼気バッグに連続採取して、これらを逐次測定し測定値の変動を求めた。その結果、変動は標準偏差でそれぞれ0.45‰、0.65‰であった。これらより、本分析計の精度は約2.0‰(3σ)と見積もれる。

・直線性

Glycine-1-¹³C化合物(H₂NCH₂¹³COOH)を複数人に投与し、投与後の呼気を15分毎に呼気バッグ採取した後に本分析計およびMSで分析し、

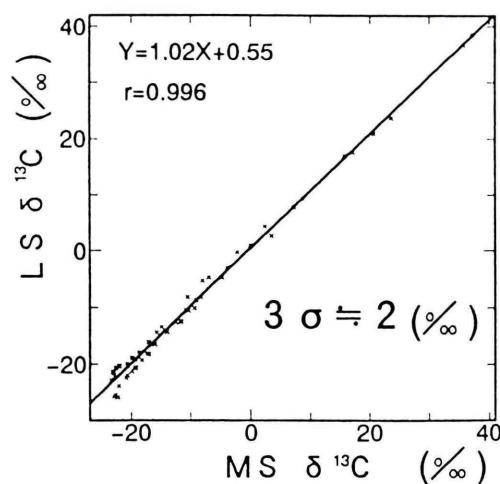


Fig. 4 Correlation between $\delta^{13}\text{C}$ measured values obtained MS and LS.

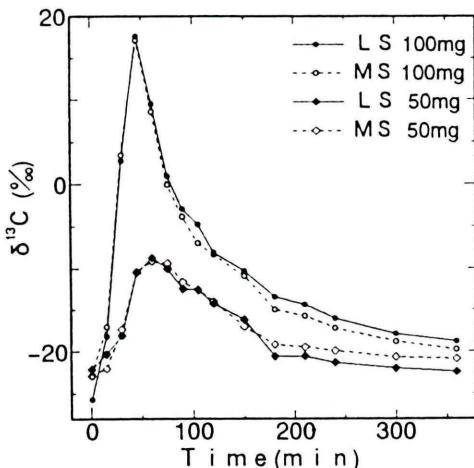


Fig. 5 Results of ¹³C-breath tests measured by MS and LS after oral administration of glycine-1-¹³C to healthy volunteers. Measured values with LS were identical with those measured with MS within 2.8‰ less.

MS分析値(SIRA-10, VG-ISOTECH社)を真値として直線性を評価した(Fig. 4)。採取した試料は60個、期間は約2か月にわたり行った。

両同位体比の関係は

$$Y = 1.02X + 0.55$$

X : MS 分析値 (%)

Y : 本分析計分析値 (%)

で示され、また、X、Y の相関係数は 0.996 と高い相関があった。さらに、誤差の標準偏差は 0.65‰ であり、これからも精度は約 2.0‰ 程度と見積もれる。

III. 呼気検査への応用

1. 検査方法と対象

3 種類の¹³C-呼気検査を行った。¹³C-グリシン (Glycine-¹³C, 99% 濃縮、日本酸素)、¹³C-メタセチン (Methacetin-¹³C, 99% 濃縮、日本酸素)、¹³C-尿素 (Urea-¹³C, 濃縮 99%、日本酸素) を経口投与し、経時的に呼気試料を採取した。採取した呼気ガスを本装置と MS とで測定し比較した。対象は健常志願者男性 6 名 (20~56 歳、平均 34 歳) および胃潰瘍患者男性 1 名である。

2. 結 果

1) ¹³C-グリシン呼気検査

健常者 (56 歳 71 kg) に Glycine-1-¹³C 化合物をそれぞれ 50 mg, 100 mg 投与し、呼気を 15 分毎に呼気バッグ (2 l) に採取し、同位体比の時間変化をトレースした。同時に採取したバッグより呼気を 50 ml 採取して MS で分析した。

呼気中の¹³CO₂ は急速に増加し、約 50 分後にピークに達した後漸減した。ピーク値は 100 mg 投与で、17.1‰、50 mg 投与で -9.1‰ であった。また、MS 分析結果との誤差は 2.8‰ 以下であった。(Fig. 5)

2) ¹³C-メタセチン呼気検査

健常者 2 名 (26 歳 76 kg, 27 歳 74 kg) に Methacetin-¹³C 化合物 (¹³CH₃OC₆H₄NHCOCH₃) をそれぞれ 30 mg (0.4 mg/kg), 148 mg (2.0 mg/kg) 投与し、呼気を採取し分析した。

2.0 mg/kg 投与では 30 分後にピーク値 (15.7‰)、0.4 mg/kg 投与では 45 分後にピーク (-11.7‰) を示した後に漸減する曲線が得られた。MS との誤差は 2.5‰ 以下であった。(Fig. 6)

3) ¹³C-尿素呼気検査

胃潰瘍患者に Urea-¹³C 化合物 (H₂N¹³CONH₂) を

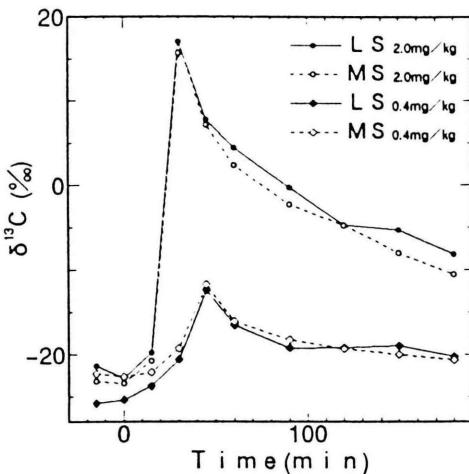


Fig. 6 Results of ¹³C-breath tests measured by MS and LS after oral administration of methacetin-¹³C to healthy volunteers. Measured values with LS were identical with those measured with MS within 2.5‰ less.

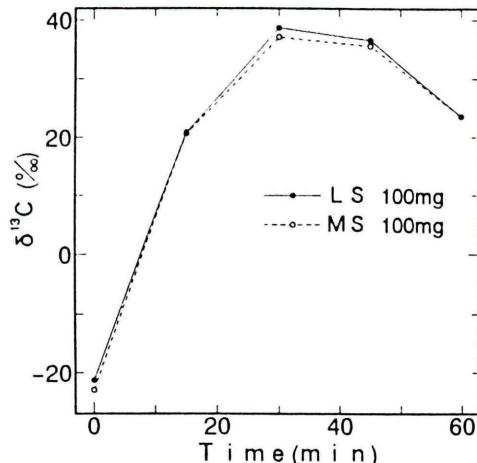


Fig. 7 Results of ¹³C-breath tests measured by MS and LS after oral administration of urea-¹³C to patient with gastric ulcer. Measured values with LS were identical with those measured with MS within 1.6‰ less.

100 mg 投与し、呼気を 15 分毎に 5 個の呼気バッグに採取し同位体比を測定した結果を Fig. 7 に示す。

30分後にピーク(37.1%)を示す曲線が得られた。この曲線はウレアーゼによる尿素分解によるもので *Helicobacter Pylori* (HP) 隆性群では $\Delta^{13}\text{C}$ が 3‰ 以下であり、この症例では HP の感染を示唆できた。MS との誤差は 1.6‰ 以下であり非常によく一致した。

IV. 考 察

1960 年代に ^{14}C -標識化合物の臨床応用として始まった呼気検査は、1970 年代に放射能を持たない安定同位体 ^{13}C 標識化合物に切り代わり、その適用拡大と共に広く普及することが期待されながら、実際には広く利用されるに至らなかつた⁴⁾。

普及を妨げている要因として、 ^{13}C 化合物がきわめて高価であること、安価で扱いやすい測定装置がないことが指摘されているが、近年、これらの問題が改善されつつある。

化合物においては、安定同位体の分離濃縮技術や化合物合成技術が進歩し、化合物の合成が容易になり、また、 ^{13}C -呼気検査、 $^{13}\text{C-NMR}$ の応用研究が広がり、化合物の使用量も増加してきた。その結果、まだ十分でないがかなり安価となってきている。

一方、分析装置においては、現在、MS が主に使われているが、高価であると共に、操作、維持・管理に高度の専門技術が必要であったが、最近ではコンピュータによる自動化がなされ、かなり扱い易くなってきた。

また、小型で操作が容易な分析装置として赤外分光法を用いた ^{13}C 同位体分析用の分光計がある。この分光計では $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ の両吸収強度比より同位体比が求められているが、光周波数の分解能が高くないので、微弱な $^{13}\text{CO}_2$ のスペクトルに $^{12}\text{CO}_2$ のスペクトルが重なり、この重なりを計算で差し引く必要があるとの報告がある⁵⁾。

レーザ分光法を用いた同位体分析計の特徴は光源にレーザを使うことにより周波数分解能を非常に高くでき、スペクトルの重なりを生じることなく吸収強度が求まることである。このようなレーザ分光法を用いて同位体比を求める研究として

Joseph F. Becker が赤外域の半導体レーザを用いて行っており、精度 4‰ を得ている⁶⁾。また、光音響分光法⁷⁾、光ガルバノ分光法⁸⁾を用いて分析する分析計も研究されている。これらの分析計は

1) MS より精度は若干劣るが赤外分光計より良い。

2) MS より扱い易い

と MS と赤外分光計の中間に位置付けられるであろう。

開発した分析計の測定精度は 2‰(3σ) が実現でき、設計目標値を達成できた。さらに高精度になると ^{13}C 化合物の投与量が少なくて済むが、内因性のベースラインの変動（空腹時の呼気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ の変動）は 0.2‰(1σ) との報告があり⁹⁾、また、簡便に呼気検査・同位体分析を行う（呼気採取時の大気の混入、セル内の試料ガスの残存等に特別に注意しない）ことを考慮すると測定精度は 1‰ 程度(3σ) が妥当と推測される。

また、操作性は 4 個の呼気バッグを前処理部の接続ポートに接続するだけで、逐次自動分析できることが実験により確認でき、操作の容易な分析装置が実現できた。

V. まとめ

今回開発した分析計の精度は約 2.0‰、また ^{13}C -呼気検査で MS とほぼ同様な曲線が得られ、 ^{13}C -呼気検査に有用であることが実証できた。今後は、さらに高精度化、処理時間の短縮化等の改善を行い、簡便で堅牢な分析計を開発する。

文 献

- 1) 中川賢一、東 陽二、清水忠雄: 半導体レーザによる NH_3 分子の近赤外レーザ分光。物理学会秋の分科会予稿集 2: 340, 1988
- 2) 東 陽二: 半導体レーザを用いた近赤外レーザ分光計とその応用。応用物理学会放射線 17(3): 3-9, 1991
- 3) 東 陽二、大原裕康、佐々木康人: レーザ分光法を用いた同位体分析計と ^{13}C -呼気テストへの応用。 ^{13}C 医学 3: 12-13, 1993
- 4) 佐々木康人: わが国での炭素同位体呼気検査の進歩。 ^{13}C 医学別冊、 ^{13}C 呼気検査の研究と応用: 3-12, 1993

- 5) 熊沢喜久雄: 赤外吸収法による¹³Cの定量法の発達. 最新医学, **42**(6): 1323-1326, 1987
- 6) Becker JF, Sauke TB, Loewenstein M: Stable isotope analysis using tunable diode laser spectroscopy. APPLIED OPTICS **31**: 1921-1927, 1992
- 7) Walsh F: A Laser-based Photoacoustic Spectrometer for Direct Breath ¹³CO₂/¹²CO₂ Measurement. DOE Report; 1-33, 1987
- 8) Murnick DE, Peer BJ: Laser-Based Analysis of Carbon Isotope Ratio. SCIENCE **263**: 945-947, 1994
- 9) 末広牧子, 飯尾正宏: 呼気検査における¹³CO₂ 分析法. RADIOISOTOPES **31**: 321-329, 1982

Summary

Application of Laser Spectroscopy for ¹³C-Breath Tests

Yoji HIGASHI*, Hiroyasu OHARA**, Yukihiko NARUKI***
Yusuke INOUE**** and Yasuhito SASAKI****

*Laboratory, Japan Radio Co., Ltd.

**Third Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine

***First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine

****Department of Radiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

A new device Tunable Diode Laser Spectroscopy (LS) was developed for the analysis of isotope ratios of ¹³CO₂/¹²CO₂. Its applicability for breath tests was validated.

The exhaled breath is collected in a 2 l aluminum bag, of which CO₂ is separated by cryogenic system and introduced into LS.

Repeat measurements (8 times) of two kinds of gases ($\delta^{13}\text{C}$: -2.62 and -1.14%) revealed 0.045% and 0.065% variation (1S.D.), from which precision of measurement was estimated as 0.2% (3S.D.). Seven healthy volunteers were given orally different dose of ¹³C-glycine (50 mg-200 mg in 5 subjects) and ¹³C-methacetin (30 mg and 150 mg in 2 subjects). One patient with gastric ulcer with helicobacter pylori (HP)

infection was given 100 mg of ¹³C-urea. Serial breath samples (9-15) were taken and measured both by LS and mass spectrometer (MS) thereafter.

Appreciable peaks were obtained at 30-50 min. after glycine and methacetin ingestions. The height of the peaks were dose dependent. Increased excretion of ¹³CO₂ characteristics to HP infection was obtained in ¹³C-urea breath test. Measured values with LS were identical with those measured with MS (60 samples) with the range of difference within 0.2% (3S.D.). [Y (LS)=1.02X (MS)+0.55, r=0.996]

We conclude the LS is suitable for various ¹³C-breath tests.

Key words: Laser spectroscopy, ¹³C-breath test, Stable isotope analyzer.