

血清アルブミン機能測定を用いた新たな栄養評価法の開発

田中 守¹⁾, 廣内智子²⁾, 佐藤 厚³⁾

(2012年10月1日受付, 2012年12月18日受理)

Development of new nutritional assessment via Serum Albumin-functional measurement

Mamoru TANAKA¹⁾, Tomoko HIROUCHI²⁾, and Atsushi SATO³⁾

(Received : October 1, 2012, Accepted : December 18, 2012)

要 旨

本研究では, ラット血清アルブミンのCibacron Blue 3 GAへの結合能を測定することで, 栄養状態に伴う血清アルブミンの質(機能)的評価の指標になり得るのかどうかを検討した。Wistar系ラットをコントロール群, 中度低栄養群, 高度低栄養群の3群に分け, それぞれ25 g/日, 13 g/日, 5 g/日の飼料を27日間与え, 体重測定, 血清アルブミン量, A/G比および血清アルブミンのCibacron Blue 3 GAへの結合能を測定した。コントロール群, 中度低栄養群, 高度低栄養群の体重はそれぞれ280 g, 237 g, 143 gであった。血清総タンパク質におけるアルブミンの割合は, コントロール群に比べ高度低栄養群では低下していたにも関わらず, アルブミンの結合能は上昇していた。以上の結果から, Cibacron Blue 3 GAを用いた血清アルブミンの質的評価は栄養状態判定の指標になり得る可能性が示唆された。

キーワード: 低栄養, アルブミン, 栄養評価, Cibacron Blue 3 GA, ラット

Abstract

In this study, evaluation of the quality (function) of serum albumin on nutritional conditions was investigated using binding capacity to Reactive Blue 3GA of the serum albumin. We divided Wistar rats into three groups (control group, moderate hypoalimentation group, high hypoalimentation group). We gave feeds 25 g/day, 13 g/day, 5 g/day to each group for 27 days and measured the weight, quantity of serum albumin, A/G rates and binding capacity to Cibacron Blue 3 GA of the serum albumin. Body weight of control group, moderate hypoalimentation group and high hypoalimentation group were 280g, 237g, 143g. The concentration of serum albumin decreases by the undernutrition, but the albumin binding capacity increases. These results suggested that this model using Reactive Dye may be evaluate the quality of serum albumin.

Key Words : malnutrition, albumin, nutritional assessment, Cibacron Blue 3GA, rat

1) 高知県立大学健康栄養学部健康栄養学科 助教
2) 高知県立大学健康栄養学部健康栄養学科 講師
3) 高知県立大学健康栄養学部健康栄養学科 教授

Department of Nutrition, Faculty of Nutrition, University of Kochi.
Department of Nutrition, Faculty of Nutrition, University of Kochi.
Department of Nutrition, Faculty of Nutrition, University of Kochi.

緒言

高齢者の最も重要な栄養管理問題の一つとして、タンパク質・エネルギー低栄養状態（PEM：protein-energy malnutrition）が挙げられる。我国においてはPEMを呈する高齢者は病院外来通院者では約10%，地域在住自立高齢者では1%未満であり，自立して生活している高齢者におけるPEMの割合は低い。しかし，入院高齢患者では約30%にPEMが認められ，さらに在宅診療を受けている高齢者の32～35%にPEMが認められている¹⁾。葛谷ら²⁾の報告によると，デイケアサービス使用要介護高齢者の栄養調査では，低栄養状態と判断された高齢者は要介護認定が低いほど増加し，要介護5では66.7%にも及んだ。

低栄養とは，身体への栄養素の供給において量的および質的な不足，あるいは利用障害が長期間にわたり生ずることにより起こる身体的または精神的症状を指す。また，低栄養は免疫力の低下をもたらす，肺炎などの感染症系疾患を合併しやすくなり，治療の遅延をもたらすと考えられている³⁾。さらに，高齢者の栄養状態は疾病の発症と進行により生活機能の自立性等に影響する。

高齢者においては，加齢に伴い基礎代謝が低下するため，エネルギー必要量が少なくなり摂食行動は成人に比較して抑制される⁴⁾。このため，栄養摂取量が少なくなるので低栄養状態は容易に出現する。また，高齢者は加齢に伴う唾液分泌の減少や消化管蠕動運動の低下などの身体的要因，介護状況や経済的問題などの社会的要因，さらには基礎疾患に対して投与された薬物の副作用などの医原的要因等の低栄養のリスクを抱えていることが多く，低栄養の危険は常に存在する。低栄養がいったん進行すると，それ自身を要因として様々な合併症を伴って低栄養は進行していく⁵⁾。

血清アルブミンは血清総タンパク質の約50～60%を占め，生体内において膠漆浸透圧の維持や各種ホルモン，遊離脂肪酸，ビリルビン，尿酸，薬物等を末梢組織に運搬する単体として重要な役割

を果たしている。アルブミンは肝臓で合成されるが，血管外に大きなプールを持ち生物学的半減期も14～21日と長いこと，比較的長期的な栄養状態を反映する栄養リスクマーカーとして有用とされている⁶⁻⁷⁾。また各種疾患等における死亡率と低アルブミン血症の発症に有意な相関が報告されており，臨床における予後指標としても有効なマーカーである⁸⁻¹¹⁾。

しかし，現在のアルブミン測定法では，血清アルブミン量は測定できても，肝硬変や低栄養状態のようなタンパク質喪失やタンパク質合成抑制のみられる疾患の場合に，ホメオスタシスによるアルブミンの半減期が延長するため¹²⁾，正確な栄養状態の判定は困難である。そのため，栄養状態が不良であっても，一見，値は正常値を示す場合がある。今回我々は血清アルブミンの質，特にCibacron Blue 3 GAへの結合能を測定することで，これまでになかった新しい栄養状態判定のための指標となり得るのかどうかの検討を行った。

材料および方法

1. 実験動物

体重約200gのWistar系雄ラット（日本SLC）10匹を無作為にコントロール群（n=4），中度低栄養群（n=3），高度低栄養群（n=3）の3群に分け，表1の組成の市販の固形MF飼料（オリエンタル酵母工業）をそれぞれ25g/日（コントロール群），13g/日（中度低栄養群），5g/日（高度低栄養群）与えて27日間飼育した。実験期間中の飼育期間は，室温22±2℃，明暗サイクル12時間（8:00～20:00明期）の明暗サイクル条件で飼育した。

飼育最終日の体重測定を行った後，血液採取を行い，血液を遠心分離（500g，10分）し，血清を得た。

表 1. 固形MF飼料 (100 gあたり) の栄養組成

公表値	MF
水分 (g)	7.9
粗タンパク質 (g)	23.1
粗脂質 (g)	5.1
粗灰分 (g)	5.8
粗繊維 (g)	2.8
可溶性無窒素物 (g)	55.3
カロリー (kcal)	359

2. 血清アルブミンおよびアルブミン/グロブリン比 (A/G比) の測定

採血して得られた血清中のアルブミンおよびA/G比の測定は、BCG法を測定原理とする市販キットのA/G B-テストワコー (和光純薬工業) で測定した。検量はキット添付標準血清で行った。

3. 血清アルブミンのCibacron Blue 3 GA結合能

血清中のタンパク質の分画はLaemmli¹³⁾の方法に従ってNative-PAGEを行った。泳動用試料は血清を10 μ l, 40%スクロース (ナカライテクス) を10 μ l, 10 mg/mlのCibacron Blue 3 GA

(SIGMA) を25 μ l 混合し, 30°Cで10分間インキュベートしたものを用いた。電気泳動には5%ポリアクリルアミドゲルをスタッキングゲルに, 10%ゲルをセパレーションゲルに用い, それぞれの試料をアルブミン量が一定になるように調整した後, アプライし, 20 mAの定電流で泳動を行った。

Native-PAGE後, ゲルから目的のバンドを切り出し, 1%NP-40 (ナカライテクス) を用いてアルブミン-Reactive Blue 3 GA複合体を抽出した。その後, 抽出液について分光光度計で波長600 nmにおける吸光度を測定した。

結果

1. 飼料摂取量がラットの体重に及ぼす影響

27日間の飼育を通してのラットの平均体重増加曲線を図1に示した。コントロール群および中度低栄養群の体重は, 実験開始日より緩やかな体重増加傾向を示し, 実験終了時にはコントロール群を100.0% (280 \pm 10.7 g) とした場合, 中度低栄養群では84.6%であった。一方, 高度低栄養群の体重は, 実験開始日より緩やかな体重減少傾向を示し, 実験終了時には51.1%であった。

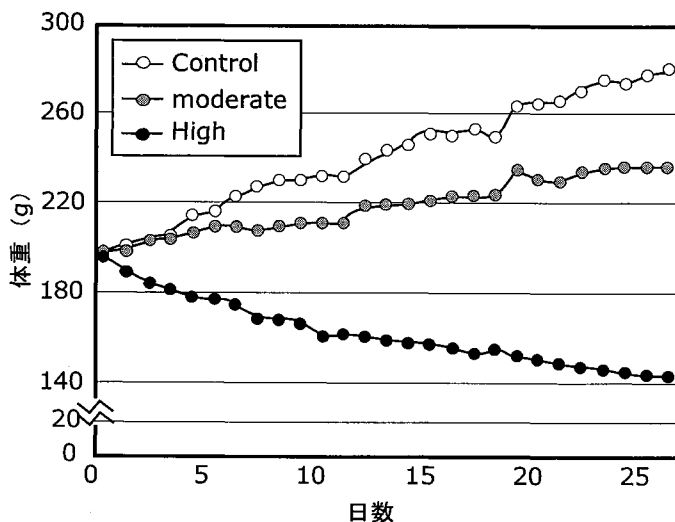


図 1. 27日間のラットの平均体重増加曲線
Control, コントロール群 (n=4);
moderate, 中度低栄養群 (n=3);
High, 高度低栄養群 (n=3)

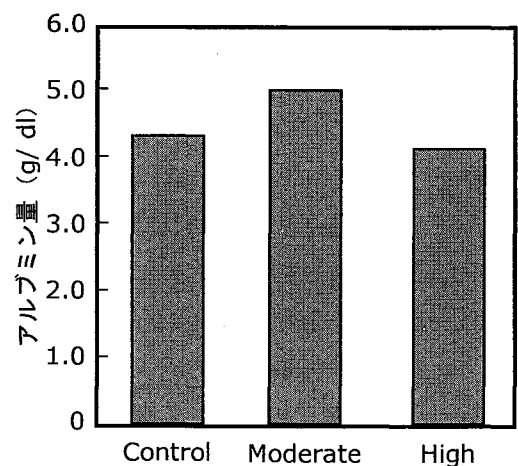


図 2. 27日後の血清アルブミン量の比較
Control, コントロール群 (n=4);
moderate, 中度低栄養群 (n=3);
High, 高度低栄養群 (n=3)

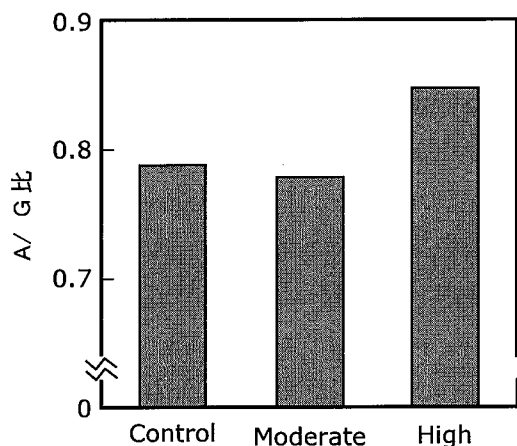


図3. 27日後のA/G比の比較
Control, コントロール群 (n=4) ;
moderate, 中度低栄養群 (n=3) ;
High, 高度低栄養群 (n=3)

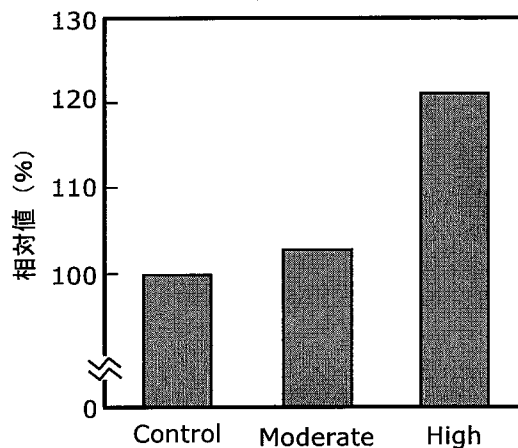


図4. 血清アルブミン1g当たりのCibacron Blue 3 GA結合能の比較
Control, コントロール群 (n=4) ;
moderate, 中度低栄養群 (n=3) ;
High, 高度低栄養群 (n=3)

2. 飼料摂取量がラットの血清アルブミンおよびA/G比に及ぼす影響

ラットの血清アルブミン量を図2, A/G比を図3に示した。1dlあたりの血清アルブミン量は、中度低栄養群 (5.0g/dl) で、コントロール群 (4.3g/dl) と比較して高値を示した。一方、高度低栄養群 (4.2g/dl) は、コントロール群と比較して同程度であった。

A/G比は、中度低栄養群 (0.78) で、コントロール群 (0.79) と比較して同程度であった。一方、高度低栄養群 (0.85) は、コントロール群と比較し高値の傾向を示した。

3. 血清アルブミンのCibacron Blue 3 GA結合能

ラットの血清アルブミン1g当たりのCibacron Blue 3 GA結合能を図4に示した。アルブミン1g当たりの結合能力は、中度低栄養群 (103%) で、コントロール群 (100%) と比較して同程度であった。一方、高度低栄養群 (121%) は、コントロール群と比較し高値の傾向を示した。

考察

栄養状態判定の指標として、血清アルブミン値はアウトカムを予測するための最適な指標とされている⁶⁻⁷⁾。しかし、これまで血清アルブミンの質を評価した研究はほとんどない。本研究では、栄養状態の新たな指標を確立することを目的に血清アルブミンに対するCibacron Blue 3 GAの結合能について検討をした。

一般に高齢者の低栄養はマラスムス型とクワシオルコル型の2つのタイプに大別される。マラスムス型PEMは、骨格筋や脂肪組織の消耗が著明で体重の減少が著しい。しかし、内臓タンパク質は比較的保たれるため浮腫が認められない。一方、クワシオルコル型PEMは、タンパク質合成の抑制と異化亢進によって内臓タンパク質の低下が著しく、下腿を中心に高度の浮腫を伴うのが特徴である。実際には両者が混在することが多いことが報告されている⁷⁾。アルブミン合成の調節においては、食事が最も重要な因子の一つであり¹⁴⁾、とりわけタンパク質・アミノ酸摂取の影響を強く反映する可能性が示唆されている¹⁵⁻¹⁶⁾。従って、ラットの食事摂取量を減らすことによって低栄養ラッ

トを作製できると考えた。そのため、本研究では、低栄養状態のラットを作製するため、市販固形飼料の量がコントロール群の52% (中度低栄養群) あるいは20% (高度低栄養群) と異なる2種類を用意し、ラットに27日間与えた。結果、その生育は明らかに飼料の摂取量を反映していた。すなわち、コントロール群はもっとも成長が良く、続いて中度低栄養群であった。一方、高度低栄養群では実験開始日より体重が減少し続けた。また、本研究では、各群間で1 dlあたりの血清アルブミン量に違いは認められなかったが、A/G比はコントロール群、中度低栄養群と比較して高度低栄養群で高値の傾向を示した。これらの結果は、低栄養状態になるほど体重が減少し、血清総タンパク質におけるアルブミンの割合が低下することを示すものであり、マラスムス・クワシオルコル混合型PEMの特徴とよく一致するものであった¹⁷⁾。

臨床的には血液生化学検査の中で血清アルブミンやA/G比に代表されるように、PEMを始め各種疾患において血中濃度の増減のみで評価される場合が多く⁸⁻¹¹⁾、アルブミンの質的な変化についてはほとんど評価されていない。一方、ヒト血清アルブミンには還元型アルブミン、酸化型アルブミンなどのマイクロヘテロジェニシティがあることが知られている。Eraら¹⁸⁾は、酸化型アルブミンが加齢とともに増加することを報告している。また、酸化ストレスとの関係から検討すると、酸化型アルブミンと比較して還元型アルブミンはラジカル消去能が高いことが報告されている。肝硬変患者では、酸化型のアルブミンの割合が多く重症度の進行に伴いその程度は明らかとなっている¹⁹⁾。このようにアルブミンは、加齢や酸化ストレスにより影響を受けることから、低栄養状態においてもアルブミンの質的变化が起こっている可能性が考えられる。そこで、本研究では、Native-PAGEを用いてReactive Dyeの1種であるCibacron Blue 3 GAと血清アルブミンとの結合能を評価した。Reactive Dyeは、生体内のATP、GTPなどのヌクレオチドと類似構造を持ってい

る色素で、アルブミンなどのタンパク質に結合する特徴がある。Cibacron Blue 3 GAと血清アルブミンの結合能を調べた結果、コントロール群と比較して高度低栄養群でアルブミンの結合能の高値傾向が認められた。すなわち、栄養状態の違いで血清アルブミンに対するCibacron Blue 3 GAの結合能が異なった。

結論として、コントロールラット群に比べ低栄養ラット群では血清総タンパク質におけるアルブミンの割合は低下傾向を示していたにも関わらず、アルブミンの結合能は上昇傾向を示していた。本研究では、栄養状態の違いでCibacron Blue 3 GAの結合能が異なった理由は明らかにならなかったが、アルブミンの質の変化、構造の変化が起き、Cibacron Blue 3 GAの結合能に変化が生じたものと考えられる。このことの生物学的意味は、おそらく、低栄養に起因するアルブミン量減少を補うための反応であると推測される。以上の結果から、Cibacron Blue 3 GAを用いた血清アルブミンの質的評価は栄養状態判定の指標になり得る可能性が示唆された。一方、タンパク質色素結合法は、簡易な手法であるために利便性が高い。その反面、目的タンパク質以外の血中に含まれる尿素窒素、尿酸やクレアチニン等の共存物質の影響が生じることが予想される。今後は今回の研究で明らかにならなかったCibacron Blue 3 GAと共存物質の関係についても検証する必要がある。また、Cibacron Blue 3 GAを用いた血清アルブミンの質的評価がヒト栄養状態の判定の指標になり得るのかを実証するため、ヒトの血清を用いた試験により検討する必要がある。

今後、栄養状態をより正確に評価することが可能となれば、高齢者のみならず、様々なライフステージにおける低栄養状態の早期発見が可能となり、低栄養の予防および改善につながる事が考えられる。

参考文献

- 1) 杉山みち子, 清水瑠美子, 岩木陽子, 中本典子, 小山和作, 三橋扶佐子, 小山秀夫 (2000) 高齢者の栄養状態と実態 -nationwide study-. 栄養-評価と治療 17: 553-62.
- 2) Izawa S, Kuzuya M, Okada K, Enoki H, Koike T, Iguchi A (2006) The nutritional status of frail elderly with care needs according to the mini-nutritional assessment. *Clinical Nutrition* 25: 962-7.
- 3) 葛谷雅文 (2003) 高齢者の栄養評価と低栄養対策. 医老医誌 40: 199-203.
- 4) 渡辺 猛 (1988) 日本人の栄養所要量-特に中高年の基礎代謝. 医学のあゆみ 147: 118.
- 5) 榎 裕美, 加藤昌彦 (2007) 高齢者の低栄養の要因と栄養障害のパターン. 薬局 58: 2011-4.
- 6) 神田しげる, 井口昭久 (1998) 低栄養. *Geriatr Med* 35: 865-8.
- 7) 大荷満生 (2007) 高齢者の栄養評価. 静脈経腸栄養 22: 439-45.
- 8) Owen WF, Lew NL, Liu Y, Lowrie EG, Lazarus JM (1993) The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *The New England Journal of Medicine*.329: 1001-6.
- 9) Corti MC, Salove ME, Guralnik JM (1996) Serum albumin and physical function as predictors of coronary heart disease mortality and incidence in older persons. *Journal of Clinical Epidemiology* 49: 519-36.
- 10) Gibbs J, Cull W, Henderson W, Daley J, Hur K, Khuri SF (1999) Preoperative serum albumin level as a predictor of operative mortality and morbidity: result from the National VA Surgical Risk Study. *Archives of Surgery* 134: 36-42.
- 11) Moriwaki H, Miwa Y, Tajika M, Kato M, Fukushima H, Shiraki M (2004) Branched-chain amino acids as a protein- and energy-source in liver cirrhosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312: 405-9.
- 12) 菊池修一 (1997) 特集血液製剤の正しい使い方 アルブミン製剤輸血. 臨床成人病 27: 807-812.
- 13) Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- 14) De Feo P, Horber FF, Haymond MW (1992) Meal stimulation of albumin synthesis: A significant contributor to whole body protein synthesis in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 26: E794-9.
- 15) Caso G, Scalfi L, Marra M, Covino A, Muscaritoli M, McNurlan MA, Garlick PJ, Contaldo F (2000) Albumin synthesis is diminished in men consuming a predominantly vegetarian diet. *The Journal of Nutrition* 130: 528-33.
- 16) Caso G, Feiner J, Mileva I, Bryan LJ, Kelly P, Autio K, Gelato MC, McNurlan MA (2007) Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 446-451.
- 17) 開 登志晃, 田村聡子 (2011) リハビリテーションにおける栄養管理の効果判定. 静脈経腸栄養 26: 1359-64.
- 18) Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M (1995) Age-related change in redox state of human serum

albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*
1247: 12-16.

- 19) Watanabe A, Matsuzaki S, Moriwaki H,
Suzuki K, Nishiguchi S (2004) Problems
in serum albumin measurement and
clinical significance of albumin
microheterogeneity in cirrhosis. *Nutrition*
20: 351-357.