

令和元年6月13日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26253037

研究課題名(和文) 生体ガスによる活性酸素種計測法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Developments of analytical systems for hydroxyl radicals and their clinical applications

研究代表者

下内 章人 (SHIMOUCHI, Akito)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：80211291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,300,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種の中でも特にヒドロキシルラジカルは特に酸化作用が強く種々の組織細胞毒性があることが知られているが、OHラジカルを直接計測することは技術的には難しかった。本研究では大気圧イオン化質量分析装置ならびにレーザー誘起蛍光法を用いることにより、呼気や皮膚ガスなどの生体ガス中にもOHラジカルが存在することを明らかにした。抗酸化剤や低濃度水素ガスを吸入することにより皮膚ガス中のOHラジカルが低減し、運動負荷によりOHラジカルが増加することを見出した。また、慢性心不全患者では睡眠前後の呼気水素分子が低下し、心筋細胞内のミトコンドリアの破壊像と併せると心筋内酸化ストレスの増加が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素は体の中で種々の作用があり、特にヒドロキシルラジカルは細胞障害を引き起こし有害である。この活性酸素そのものを安全に計測することは難しく、血液や尿などに含まれる活性酸素と体内にある物質が反応してできたものを計測するより他には安全な方法はなかった。本研究では活性酸素の中でも悪玉であるヒドロキシルラジカルを質量分析やレーザーを用いた方法により、呼気や皮膚ガスで計測することができるようになった。この方法により抗酸化剤によりヒドロキシルラジカルが低下、運動により増加することなどを生体ガス中で観察できるようになった。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyl radicals (OH) play a key role of oxidative stress, but a noninvasive detection method of OH radicals has not been established. In this study, we developed non-invasive analytical method of hydroxyl radicals from breath and skin gases using atmospheric pressure ionization mass spectrometry and laser-induced fluorescent methods. We found that OH radicals partially and stably exist in the air as water clusters, that OH radicals were detected in the skin gas and that inhaled H<sub>2</sub> play a role of a scavenger against OH radicals in the biological systems. In the cardiac muscles of the patients with chronic heart failure, decrease in exhaled hydrogen concentration reflected oxidative stress suggesting that hydrogen molecules play a role of anti-oxidative stress against reactive oxygen species.

研究分野：生体医工学

キーワード：活性酸素種 ヒドロキシルラジカル 質量分析 レーザー誘起蛍光法 生体ガス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸や皮膚ガスなどの生体ガスには延べ 1800 種類以上の微量成分が含まれ、その大部分の病態生理学的意義は不明である。その原因として生体微量ガス分析を行う上で水や不純物などの妨害因子の存在があげられた。代表者らは 2001 年以降クリーン化を徹底させた独自開発の生体ガス採取法と超高感度質量分析装置を組み合わせ、生体ガスを安定した条件下で、再現性よく、リアルタイムに一括分析可能なシステムを構築した。この独自開発技術を用いた予備調査を経て 2010 年より吹田コホート調査に参加し、生体ガス中の既知ガス定量分析と未知成分を含む質量スペクトラムの解析を進め、生体に重要と考えられる低分子化合物の定量スペクトラムにより、高脂血症、高尿酸血症、高血圧などの生活習慣病を含めた代表的疾患や疲労・ストレス・睡眠障害などの身体症状が鑑別可能であることを実証した。他方、代表者らはヒト全身・皮膚ガス中の活性酸素種生成量の計測法を開発した。すなわち、生体内ラジカルのうち特に重要な役割をもつ活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS, 主にスーパーオキシド ( $O_2^-$ ), 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ), ヒドロキシルラジカル (以下、 $\cdot OH$  と表記) は反応性が極めて高く短寿命であるが、気相中では比較的寿命は長い。生体内では  $O_2^-$  と  $H_2O_2$  は細胞内情報伝達として重要な役割を果たす一方、 $\cdot OH$  は種々の細胞障害をもたらす、酸化ストレス疾患の病態機序の核心となる。しかしヒト ROS 直接計測法はなかったため、代表者らは、水素分子 ( $H_2$ ) の選択的  $\cdot OH$  消去作用を利用した  $H_2$  消費量計測による全身の間接的  $\cdot OH$  生成推定法(水素水法と水素ガス吸入法)を開発し、健康成人の全身では少なくとも  $2 \mu mol/min$  の  $\cdot OH$  生成があること、皮膚ガスの負イオン付加高感度質量検出法では ROS に相当する  $m/z$  信号強度が抗酸化剤により有意に低下することから皮膚ガスにも ROS が存在し、さらに、レーザー誘起蛍光法 (Laser Induced Fluorescence; LIF) によるヒト手掌皮膚からの  $\cdot OH$  放出の直接計測法を開発し、抗酸化剤内服で LIF 信号の有意な低下を示すことから ROS が生体由来であることを証明した。

### 2. 研究の目的

以上の ROS 計測を臨床実用化するには、生体ガスへの ROS 放出の詳細な機序を解明する必要がある。本研究では、LIF システムが簡便かつ高精度・高時間分解能をもつ有力な活性酸素計測法であるため、皮膚ガスのみならず呼吸活性酸素計測にも応用し、両者の小型汎用化技術の開発と臨床評価による有用性の検証を目的とした。

### 3. 研究の方法

生体ガスに含まれる活性酸素を検出するため、以下に述べる独自のインターフェース成果並びに )を開発し、大気圧イオン化質量分析ならびにレーザー誘起蛍光法を用いて、呼吸並びに皮膚ガス中におけるヒドロキシルラジカルの計測法を開発した。さらに健康成人を対象に臨床評価試験を実施した。さらに病態下における生体内活性酸素を意義を明確にするため、心不全患者を対象における呼吸水素濃度を評価し、心不全重症度との関連を検討した。

### 4. 研究成果

成果(1):水蒸気に特定波長のレーザー光を照射するとヒドロキシルラジカルが気相中で発生することが知られている。本研究では、密閉チャンパー内で超高純度空気を流入させながら水銀ランプを照射して、出現する活性酸素種がどのような質量パターンで現れるのかを検討した。チャンパー内に高純度人工空気をキャリアガスとして流し、チャンパー内に特定波長のレーザー光を照射、照射後のガスを大気圧イオン化質量分析に導入した。質量分析は負イオン付加モードで実施した。 $m/z=7, 35, 53, 72$  に  $(OH)(H_2O)_n$  の存在を示唆するピークが認められた。このピークはレーザー照射強度に依存して増高した。このことから気相中には比較的安定した状態でヒドロキシルラジカルの水和化合物が存在することが示された。このことから皮膚ガス中に存在する  $\cdot OH$  ラジカルは発汗と同時に水和クラスターが放出することが示唆された。

成果(2) 皮膚活性酸素の卓上型計測装置の開発:皮膚活性酸素は皮膚周囲の物理環境(温湿度、圧、ガス組成など)にも依存する。そこで、装置側の諸条件、即ちチャンパー内容積や形状、温度、湿度、キャリアガスの還流量と圧力、接触皮膚面積などの各種パラメータの関係を詳細に検討する。また、臨床応用を可能にするには、レーザー光路の遮光性の低減と光路長の短縮、同時に背景信号となるラマン/レイリー散乱を低減することが課題であった。皮膚活性酸素計測の際は、皮膚接触面積を可及的に低減した独自のチャンパーを製作し、その上面を皮膚で覆い、高純度ガスを低流量で還流させ、皮膚から放出される  $\cdot OH$  と混合させた。チャンパー空間内で皮膚表面に平行に特定波長の半導体レーザー光を照射し、活性酸素特有の励起光を検出することにより皮膚活性酸素放出量を検出した。この際、キャリアガス種の選択や皮膚採取部内面のチャンパーと流路を種々の形状で最適化させ、内面の表面処理の可否なども検討した。背景信号を低減するためシステム全体の遮光性を改善し、S/N 比を向上させることができた。さらに現状プロト機にチャンパー内温度/湿度の微細な制御機構の設置し、また、レーザー発信・皮膚ガス採取部・検出部を堅牢なものに一体化し、臨床使用可能な可搬型卓上機を製作した。この臨床応用評価試験として、健康被験者を対象として、抗酸化剤であるビタミン C または E を投与すると対象試験として実施した同量の飲水の場合と比較して、皮膚ガス中の  $\cdot OH$  シグナルが有意に低下した。皮膚活性酸素を半導体レーザーと独自の皮膚採取法を開発することにより、卓上型皮

膚活性酸素系装置を開発した。S/N比が従前と比べて格段に向上した。これを用いたところ皮膚ガス中の活性酸素は生体内に由来することが強く示唆された。

成果(3) 呼気成分と活性酸素の関連: 本研究課題の一部として、大気圧イオン化学装置(APIMS)を用いて、蓄積データ1011例をもとにCornel Medical Indexの疲労得点を指標として、再評価したところ、疲労に関連するm/zが抽出でき、疲労度に応じて有意な変動をみたm/zの間隔が活性酸素の質量数に応じていた。疲労が心理的・身体的な生体内代謝活性に対応していることが推察された。

成果(4) 心不全と活性酸素の関連: 他方、国立循環器病研究センター心不全科に入院した心不全患者を対象に呼気中のアセトン濃度を計測したところ、心不全のNYHA重症度に依存して、呼気アセトン濃度が増加することを見出し、呼気アセトン濃度が心不全バイオマーカーとして確立しているBNPと有意に相関することを判明した。さらに睡眠前後の呼気水素の低下は心不全重症度と有意相関を示し、心筋ミトコンドリアの崩壊とよく相関することも判明した。このことは心筋内活性酸素の発生と水素消費との間に密接な関連があることを推察された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

1. Shibata A, Sugano Y, Shimouchi A, Yokokawa T, Jinno N, Kanzaki H, Ohta-Ogo K, Ikeda Y, Okada H, Aiba T, Kusano K, Shirai M, Ishibashi-Ueda H, Yasuda S, Ogawa H, Anzai T. Decrease in exhaled hydrogen as marker of congestive heart failure. *Open Heart*. 2018 Sep 12;5(2):e000814. doi: 10.1136/openhrt-2018-000814. eCollection 2018.
2. Yokokawa T, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Yoshihisa A, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh SI, Ishida T, Shimouchi A, Takeishi Y. Change of Exhaled Acetone Concentration Levels in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *Int Heart J*. 2018 Jul 31;59(4):808-812. doi: 10.1536/ihj.17-482. Epub 2018 May 23.
3. Yokokawa T, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Yoshihisa A, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh SI, Ishida T, Shimouchi A, Takeishi Y. Elevated exhaled acetone concentration in stage C heart failure patients with diabetes mellitus. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017, 17(1), 280. doi: 10.1186/s12872-017-0713-0.
4. Yokokawa T, Ichijo Y, Houtsuki Y, Matsumoto Y, Oikawa M, Yoshihisa A, Sugimoto K, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh SI, Shimouchi A, Takeishi Y. Change of Exhaled Acetone Concentration in a Diabetic Patient with Acute Decompensated Heart Failure. *Int Heart J*. 2017, 58(5), 828-830. doi: 10.1536/ihj.16-556. Epub 2017 Sep 30.

### 〔学会発表〕(計3件)

1. Fatigability closely associates with discoordination between heart rate variability and physical activity during free-moving days in younger women, ポスター, Taniguchi K, Jinno N, Seiyama A, Shimouchi A, 日本生理学会, 2018.
2. 生体ガス中におけるアセトン濃度の関連要因, 口頭, 下内章人, 横川哲朗, 野瀬和利, 神野直哉, 奥村直也, 谷口健太郎, 菅野康夫, 安斉俊久, 宮本恵宏, 近藤孝晴, 日本安定同位体・生体ガス医学応用学会, 2017.
3. Exhaled breath and the distributions of H<sub>2</sub> and CO molecules in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension, 口頭, Shimouchi A, Mizukami T, Jinno N, Nose K, Taniguchi K, Shirai M, Seiyama A, 日本呼吸器学会, 2017.

### 〔図書〕(計5件)

1. 下内章人, 呼気診断技術への期待と課題. *Aroma Research* 18(2):172-175, 2017.
2. 近藤孝晴, 奥村直也, 下内章人. 呼気成分の意義, 測定法. *Pharm Stage* 17: 75-79, 2017.
3. 近藤孝晴, 奥村直也, 下内章人. 生体ガス研究の動向. *空気清浄コンタミネーションコントロール*, 54:321-328, 2017.
4. 近藤孝晴, 奥村直也, 下内章人. 生体ガスと病気の診断. *におい・かおり環境学会誌*. 48(6): 402-409 2017.
5. 奥村直也, 近藤孝晴, 下内章人. 呼気分析の臨床的背景, 呼気診断法の現状と課題. 「生体ガス計測と高感度ガスセンシング」, シーエムシー出版, p21-2, 2017.

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況(計1件)

名称: 皮膚ガス測定装置及び皮膚ガス測定方法

発明者: 神野直哉, 下内章人

権利者: 学校法人中部大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-241464

出願年: 2017

国内外の別: 国内

取得状況（計 1 件）

名称：生体内活性酸素量の測定法

発明者：下内章人，水上智恵，野瀬和利，利川寛

権利者：国立研究開発法人国立循環器病研究センター，株式会社タイヨウ

種類：特許

番号：特許第 6041377 号

取得年：平成 28 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等：

<https://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/0609a6967cd1add7329637b9e9141ca443d36d7c.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：近藤 孝晴

ローマ字氏名：(KONDO, Takaharu)

所属研究機関名：中部大学

部局名：健康増進センター

職名：特任教授

研究者番号（8 桁）：20135388

【平成 29 年度削除】

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：神野 直哉

ローマ字氏名：(JINNO, Naoya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。