

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15450

研究課題名(和文)水素分子の生体内生理活性機序の解明

研究課題名(英文)Explorative studies on physiological mechanism of molecular hydrogen

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：分子状水素は生体内では腸内嫌気性発酵により生成され、大部分は溶存水素として下部消化管からの血流により門脈、肝臓、下大静脈、右心、肺血管への静脈血流に乗り、呼気として排気され。特に門脈-肝静脈間での水素濃度較差が有意に認められた。一部、不明の分子構造物に捕獲されている可能性があるものの化合物は特定できなかった。他方、呼気水素濃度は年齢依存的に夜間睡眠前後の呼気水素低下が有意に認められた。また、心不全の重症度に依存し、その傾向が強くなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素分子は生体内では未消化の食物繊維などが腸内細菌により生成され、呼気やオナラにより排気される。体内の水素分子がどのような仕組みで体の外にでてくるのか、健康とどのような関連があるのかを人や動物で調べた。その結果、大部分の水素は血流に乗って肺に到達した後、呼気として排気されるが、一部は活性酸素を消去したり、不明のメカニズムにより体の成分に取り込まれたりする可能性があること、また、心不全の重い人ほど睡眠中に呼気中の水素が減る傾向にあることも分かった。

研究成果の概要(英文)：It is reported that molecular hydrogen improves oxidative stress-induced disease models by inactivation of hydroxyl radicals. Human body possesses hydrogen-producing process via colonic fermentation. We found that a part of exogenous hydrogen molecules such as ingestion of hydrogen-rich water and inhaled hydrogen was consumed in the human bodies and in the rat liver. Furthermore, breath hydrogen was significantly decreased, depending upon ages and in patients with higher severity of congestive heart failure.

研究分野：呼吸生理学

キーワード：水素分子 溶存水素 活性酸素 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種にはスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどがあり、種々の酸化ストレス性疾患の原因物質である。この中でもヒドロキシルラジカルは反応性が強く DNA 損傷や脂肪酸化、蛋白変性などを引き起こす悪玉である。水素水や水素ガス吸入として投与された分子状水素は生体内ヒドロキシルラジカルを消去し、酸化ストレス障害の病態を抑制することが報告されている(Ohsawa, Nature Medicine, 2009)。代表者らは研究開発当初の背景として、すでに水素水ならびに水素ガス吸入による間接的な生体内ヒドロキシルラジカル生成の推定法を開発し、生体内でのヒドロキシルラジカル生成は少なくとも $1.0 \pm 0.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{m}^2$ であること(Shimouchi, AEMB, 2012, 2013)、レーザー誘起蛍光法を用い、皮膚表面からヒドロキシルラジカルが放出されていることを発見(Che, IEEE Sen J, 2013)、さらに大気圧イオン化質量分析を用い、皮膚からのヒドロキシルラジカルは水和クラスターを形成して放出されていることも明らかにした。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、分子状水素は生体内ではヘンリーの法則に従う物理的溶存のみならず高分子化合物に水素結合や高分子化合物に幾何学的形状のため捕獲されている可能性もあり、その物質はどのような化合物であるのかを探索することが当初の研究動機としてあった。腸内発酵に伴い水素分子が拡散のみならず溶存水素として血行性の移動のみならず、他にも運搬体の存在を明らかにすることを研究目的とした。また、水素分子がヒドロキシルラジカルを弱いながらも選択的に消去すること、腸内嫌気性発酵に伴う内因性水素分子が生体側のどのような健康因子と関連するのか、また、疾患との関連が認められるのかを検証することも目的とした。

生体内には活性酸素種 - 抗酸化バランスに寄与すること、さらに外因性水素分子(水素水飲水または低濃度水素ガス吸入)投与による水素分子消失量が生体側のどのような因子と関連するか、あるいは活性酸素や酸化ストレスとのバランスを補正する過剰活性酸素種分を反映することである。しかしながら、運動トレーニングなどによる抗酸化システム系の機能亢進や食事摂取内容による抗酸化物質の関与など種々の要因が絡み複雑であることが予想される。本申請では難消化性多糖類などの摂取に伴う腸内嫌気性発酵による水素分子産生が活性酸素種 - 抗酸化バランスにどの程度寄与しているかを検討する。本研究の基礎となる新規概念は食物繊維学会が提唱するルミナコイドの概念をさらに進め、独自開発の活性酸素計測手段により活性酸素種と水素分子生成量を定量的に評価する発展的概念である。申請者は既報の水素水投与または水素ガス吸入による水素分子消費量は生体内ヒドロキシルラジカル生成の一部を見積もり、この水素分子消費量が過剰活性酸素種を表す指標に相当すると考えている。さらにヒト臨床試験により生体内水素分子が種々の健康指標や疾患病態とどのような関連が認められるかを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト血液試験

血液の酸素運搬に関連して、酸素とヘム基以外のヘモグロビンの幾何学的構造に依存して物理化学的に結合する部位が特定され、酸素運搬に利用されている可能性が出てきている。こうした高分子の幾何学的構造と物理化学的特性を利用した水素分子の運搬・貯蔵・放出する分子化学システムがある可能性も否定できない。そこで、研究代表者らは一定量の血液を密閉容器内の死腔内を既知の水素濃度の混合ガスを置換し十分な振蕩をかけた後、headspace 内の水素濃度と固形物を除いた水分中への H_2 溶解度とから計算された血液中には溶存水素量以外にも 10% 程度上積みした形で水素分子が未知分子に抱合(抱接)されている結果を得た。このため、上積みされた H_2 は血液成分のうちタンパク成分(ヘモグロビン、アルブミン、グロブリン)に水素結合などの形で結合されるものと仮説をたて、種々のタンパク成分への結合量を検討した。

(2) 動物試験

9週齢の Specific Pathogen-Free, Sprague Dawley 雄ラットを麻酔・人工呼吸下にて血圧・動脈血ガスが安定した状態で、呼気ならびに動脈血を採取した後、ただちに開腹/開胸し、腸管・肝臓・肺・心の各臓器を摘出した。なお腸管は十二指腸上端と直腸下端を結サツ後、糞便が漏れないように一塊として摘出した。各臓器は生理食塩水で洗浄した後、放出量は PTFE 製ミニコック付きの三層アルミバッグに摘出した臓器を封入し、一度バッグ内のガスを抜いた後に一定量の純空気を入れ保持した後、ガス分析を行った。臓器内含有量の計測は肺、肝、上部小腸、下部・上部結腸をそれぞれガスタイトチューブ内に迅速に封入、粉碎後、遠心分離を行い、ヘッドスペースのガス分析を行った。さらに血液中の低分子ガス濃度の勾配をみる目的で、大動脈、右心室腔、肝静脈、門脈の順に迅速に血液を採取し、密閉ガラス瓶内に封入、充分な震盪の後、ヘッドスペースのガス濃度から血液中水素分子溶存量を算出した。水素濃度分析にはガスクロマトグラフ半導体センサーを用いた。

(3) 臨床試験

特記すべき疾患のない健康成人を対象とし、水素水摂取に伴う呼気水素濃度の変動曲線をもとに解析した結果から、水素分子のマスバランスから得られる呼気摂取量を算出し、健康情報との間の関連を検討した。地域住民を対象としたに成人被験者を対象として、在宅での呼気成分の日内変動ならびに水素濃度の変動を調査した。地域住民を対象とした「生体ガス成分の調

査」の集積データについて、皮膚ガス成分とキュートメータを用いた皮膚特性に着目し解析を行った。入院中の心不全患者を対象として、睡眠前後の1回呼出終末呼気を採取、ガスクロマトグラフ法により呼気水素とアセトンを計測し、循環指標と呼気成分の関連を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト血液試験

ヘモグロビン、アルブミン水溶液には水素分子吸着は認められず、血漿中の溶存した未知物質からの吸着寄与率が10%程度あることが明らかとなった。この未知候補物質として、検討の残された脂質、糖質、グロブリン、電解質などの可能性があったが、血液中の仮想的な水素分子運搬体の特定は未解決に終わった。組織中の多糖類や脂質などが有力な候補物質として記載されているが、血中多糖類は少なく血球脂質膜に着目する必要があるものと考えられた。

(2) 動物試験

各臓器単位重量当りの水素分子含有量は、肺に比べ、肝臓、腸と上昇し、腸管のうちでは上部結腸が一番高く、これは、バクテリアが多く存在しているためと考えた。さらに血液中の溶存水素分子濃度を門脈血、肝静脈、右心室腔内、大動脈にわたるカスケードをみたところ、水素分子は血流の走行に沿って有意な低下を示し、特に呼気により腸内発酵水素の大部分は呼気に放出されていることが分かった。また、肝臓をはさんだ門脈と肝静脈血の前後における水素濃度の低下は門脈・肝静脈の血流比から推定される低下分よりはるかに大きく、この原因のひとつとして肝臓内での水素分子が一部消失していることが分かった。他方、モノクローリン投与群の免疫組織学的検討を行ったところ、肝細胞内における8-OHdGの上昇と脂肪変性様所見を認め、モノクローリン誘発性肝障害に伴う活性酸素種による水素分子消去または脂肪成分への水素分子捕捉が推察された。

(3) ヒト臨床試験

水素水摂取に伴う呼気水素濃度曲線から得られる水素排気量を再検討したところ、BMIと水素排気量の間には有意ではなかったが、緩やかな負の相関を認めた。すなわち、肥満者は水素水飲水後の呼気水素濃度のピーク値ならびに曲線下面積の水素排気量曲線下面積も低下傾向にあった。推察の範囲にとどまるものの、肥満者では脂肪組織内あるいは水素水飲水後に取り込まれる経路に当たる肝臓をはじめとした周囲脂肪組織への水素分子の捕捉、あるいは活性酸素による水素分子の消去のいずれかが考えられた。地域住民を公募により参加した20~80歳の成人被験者を対象として、在宅での呼気水素濃度の変動を調査したところ、睡眠前後における呼気水素濃度較差は高齢者群で有意に低下することが判明した。呼気水素濃度は種々の生活習慣（食生活・運動など）と関連し、特に加齢に伴い有意に低下した。50歳~80歳の比較的高齢者群における手掌からの水素分子の放出と不感蒸泄を対比したところ、水素分子の皮膚からの放出は水分放出と有意な正相関を認めた。心不全の重症化にともない睡眠前後の呼気水素濃度較差は有意に大きくなり、心不全の酸化ストレスに伴う水素分子の消費が夜間睡眠中に亢進することが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 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	4. 巻 5(2)
2. 論文標題 Decrease in exhaled hydrogen as marker of congestive heart failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Heart	6. 最初と最後の頁 e000814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/openhrt-2018-000814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokokawa Tetsuro, Sato Takamasa, Suzuki Satoshi, Oikawa Masayoshi, Yoshihisa Akiomi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Suzuki Hitoshi, Saitoh Shu-ichi, Ishida Takafumi, Shimouchi Akito, Takeishi Yasuchika	4. 巻 59
2. 論文標題 Change of Exhaled Acetone Concentration Levels in Patients with Acute Decompensated Heart Failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 808 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 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	4. 巻 17
2. 論文標題 Elevated exhaled acetone concentration in stage C heart failure patients with diabetes mellitus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cardiovasc Disord	6. 最初と最後の頁 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12872-017-0713-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokokawa T, Ichijo Y, Houtsuki Y, Matsumoto Y, Oikawa M, Yoshihisa A, Sugimoto K, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh SI, Shimouchi A, Takeishi Y	4. 巻 58
2. 論文標題 Change of Exhaled Acetone Concentration in a Diabetic Patient with Acute Decompensated Heart Failure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 828-830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.16-556.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下内章人	4. 巻 18
2. 論文標題 呼気診断技術への期待と課題	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Aroma Research	6. 最初と最後の頁 172-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokokawa T, Sugano Y, Shimouchi A, Shibata A, Jinno N, Nagai T, Kanzaki H, Aiba T, Kusano K, Shirai M, Takeishi Y, Yasuda S, Ogawa H, Anzai T	4. 巻 80(5)
2. 論文標題 Exhaled Acetone Concentration Is Related to Hemodynamic Severity in Patients With Non-Ischemic Chronic Heart Failure	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 1178-1186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj-16-0011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 近藤孝晴, 堀田典生, 奥村直也, 松本敦史, 申ウソク, 佐藤一雄, 山根則夫, 下内章人, 神野直哉	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 糖尿病患者における呼気アセトン及びイソブレン測定の意義	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 安定同位体と生体ガス	6. 最初と最後の頁 4-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 奥村直也, 堀田典生, 近藤孝晴, 下内章人, 北辻浩司, 申ウソク, 佐藤一雄	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 呼気成分の随時値に及ぼす要因の検討	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 安定同位体と生体ガス	6. 最初と最後の頁 20-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤孝晴, 奥村直也, 下内章人	4. 巻 54(5)
2. 論文標題 生体ガス研究の動向	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 空気清浄	6. 最初と最後の頁 321-328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神野直哉, 下内章人	4. 巻 16(7)
2. 論文標題 呼吸検査の診断的価値と市場	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PharmStage	6. 最初と最後の頁 48-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naoya Okumura, Naoya Jinno, Kentaro Taniguchi, Kenichi Tanabe, Sadako Nakamura, Takaharu Kondo and Akito Shimouchi	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of Cooking Processes on Breath Hydrogen and Colonic Fermentation of Soybean	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Nutrition and Food Science	6. 最初と最後の頁 488-493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1573401316666200226104601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Shimouchi A, Jinno N, Taniguchi K, Okumura N
2. 発表標題 Volatile compounds in exhaled air associated with scores of general physical and mental conditions
3. 学会等名 International Association of Breath Research Summit 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okumura N, Taniguchi K, Jinno N, Shimouchi A
2. 発表標題 Changes in exhaled components after the ingestion of soybean in healthy adults
3. 学会等名 International Association of Breath Research Summit 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akito Shimouchi, Tomoe Mizukami, Naoya Jinno, Kentaro Taniguchi, Mikiyasu Shirai
2. 発表標題 Exhaled breath and the distributions of H ₂ and CO in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 生体ガス中におけるアセトン濃度の関連要因
3. 学会等名 日本安定同位体・生体ガス医学応用学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Norio Hotta, Ayami Sugitani, Nobue Okubo, Kanae Matsuo, Kiyono Naruse, Naoya Okumura, Naoya Jinno, Takaharu Kondo, and Akito Shimouchi
2. 発表標題 Effect of change in exercise intensity and subsequent alteration in oxygen uptake on hydrogen consumption in humans
3. 学会等名 International Association of Breath Research Summit 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Naoya Okumura, Norio Hotta, Koji Kitatsuji, Akito Shimouchi, Takaharu Kondo, Woosuck Shin, Kazuo Sato
2. 発表標題 Breath constituents collected randomly in non-fasting state
3. 学会等名 International Association of Breath Research Summit 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Naoya Jinno, Akito Shimouchi
2. 発表標題 Detection of hydroxyl radicals in the skin gas by using a novel compact laser induced fluorescence system
3. 学会等名 International Association of Breath Research Summit 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Akito Shimouchi
2. 発表標題 Exhaled hydrogen molecules may be an anti-oxidative biomarker
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society. 2019 Apr. 13, Tokyo (oral)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奥村直也, 近藤孝晴, 下内章人	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 254
3. 書名 生体ガス計測と高感度ガスセンシング	

〔産業財産権〕

〔その他〕

中部大学教員情報

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

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 孝晴 (KONDO Takaharu) (20135388)	中部大学・健康増進センター・特任教授 (33910)	