

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2013

課題番号：21240057

研究課題名(和文) 高感度分析による呼気診断解析システムの開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of analytical system for exhaled breath and clinical application

研究代表者

下内 章人 (SHIMOUCHI, Akito)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80211291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円、(間接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：呼気中には生体由来の代謝産物が多く含まれ、その大部分は低分子微量化合物である。呼気微量ガス成分中には病態生理に関わる種々の生体内代謝情報が含まれるものと考えられる。本研究では独自開発の高感度分析用呼気採取法と高感度質量分析法を用い、予備調査で集積した成人の呼気データをもとに生活習慣ならびに代表的な呼気成分パターンを明らかにした。さらに、この調査結果をもとに生体ガスコホート調査を開始した。他方、生体内活性酸素の非侵襲的検査法と簡易型呼気水素計測装置の開発した。また動物モデルを用いて低分子ガスの生体内分布や水素分子の抗酸化ストレス作用を評価した。

研究成果の概要(英文)：Chemical compounds in breath originate mainly from volatile metabolic products in health and diseases. Fasted 1011 subjects aged from 20 to 88 years old volunteered for the study. Minute ventilation volumes of carbon dioxide (CO₂), oxygen (O₂), hydrogen (H₂), methane (CH₄), carbon monoxide (CO), nitric oxide (NO) and nitrogen oxide (NO_x) were measured by the standard methods. V_{O2}, V_{CO2} and V_{H2} were significantly decreased in age-dependent manner. Contrarily, V_{CH4} was increased in aged subjects. V_{CO} was significantly increased to aging especially in women, while V_{NO} did not significantly changed. Significant increases in V_{CO} and decrease in V_{NO} were observed in heavy smokers. V_{CO} was increased in the 4th week after the starting date of menstruation. Furthermore, we developed the analytical method for non-invasive direct measurement of OH radicals emanated from the human skin, indirect methods by ingestion or inhalation of H₂ and convenient breath H₂ analyser.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：呼気 質量分析 生活習慣 分析法

1. 研究開始当初の背景：呼気には少なくとも 1800 種類以上の微量ガス成分が含まれていることが知られている。しかし、その大部分の病態生理学的意義は不明である。代表研究者らは呼気微量ガス分析を行う上で、水や不純物などの妨害因子であったためクリーン化を徹底させた呼気採取法を開発し、超高感度な大気圧イオン化質量分析装置 (Ambient Pressure Ionization Mass Spectrometer, 以下 APIMS) と組み合わせ、生体由来の種々の呼気微量ガス化合物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。このシステムと専用分析装置を用いて、成人 1000 人規模の呼気既知ガス分析と未知成分を含む質量スペクトラムのデータの蓄積を行い、生体に重要と考えられる低分子化合物 7 種のスペクトラムパターンにより、高脂血症、高尿酸血症、高血圧などの生活習慣病を含め 24 種類の疾患が鑑別診断可能であることを示す結果を得ていた。しかしながら、特定疾患を有しない比較的健康なボランティアでも喫煙・飲酒・運動習慣・睡眠習慣・食品嗜好・職業・生活環境などの生活習慣とかがわる因子との相関をみる生体ガス成分の存在が認められた。

2. 研究の目的：研究代表者らは所属施設ですでに進行中の「吹田研究(Suita Study)」に参加し、生体ガスの前向き調査を開始し、比較的高齢者群における生体ガスと疾患の関連を調査することにあつた。本調査では研究室レベルで従来実施していた調査よりもさらに標的分子を拡大した分析システムのラインアップにより、呼気による鑑別診断のみならず生活習慣の推定と種々の疾患発症予測法を確立させることを目的とした。本研究では独自開発の高感度呼気分析システム技術をさらに改良した上、他の専用分析装置も併せて他の低分子化合物も幅広く定量的分析を行うこととした。なお「生体ガスのコホ

ート調査」は本研究期間が終了した後も継続し、生体ガスデータを継続的に積み重ねる予定である。

3. 研究の方法：対象は国立循環器病研究センター施設予防健診部で実施中の吹田調査参加者のうち「生体ガスの長期調査」(倫理委員会承認、平成 22 年 11 月開始)の初期参加者を対象とし、第一次断面調査として種々の生活習慣アンケートと網羅的な呼気分析結果を対比させた。被験者は早朝空腹の状態由来研、安静坐位で終末呼気採取法ならびに一方方向弁付きマウスピースを介した高純度人工空気呼吸に伴う呼気を連続的に採取した。呼気は高感度質量分析装置を用い、3~200 までの質量数(m/z:質量荷電比)を網羅的に分析した質量スペクトラムを得た。また定量分析の可能な低分子化合物については、ガスクロマトグラフ質量検知/半導体検知法、化学発光法などにより計測した。これにより生体ガスのスペクトラム、健康関連アンケート調査や血液検査結果等の基礎データをもとに統計解析を行い、生体ガスと食生活習慣、喫煙・禁煙、運動などの生活習慣と生体ガスとの関連について詳細な探索を行った。さらに種々の難消化性多糖類に伴う呼気水素変動、呼気水素の日内変動、内因性一酸化炭素の生体内代謝などの検討を行った。開発技術として、水素水または水素ガス吸入による間接的生体内活性酸素種の推定法、レーザー誘起蛍光法による皮膚活性酸素放出の計測法の開発などを行った。

4. 研究成果

【水素】 近年、水素分子が生体内で抗酸化作用を発揮することが報告されている。生体内水素濃度は呼気水素に反映されるため、呼気水素を上昇させる食品に着目し、食物繊維をはじめとした難消化性糖類を含む牛乳、玄米、ウコンなどに着目し呼気水素への影響を検討した。牛乳、玄米、ウコンを含むカレー摂取は呼気水素をそれぞれの対照試験と比

較し有意に上昇させた^{10,11}。さらに呼気水素の日内変動をみたところ乳製品摂取日は非摂取日と比較し明らかに呼気水素濃度を上昇させ、変動パターンには個体差があるものの比較的再現性があった¹²。

【VOC, アセトン】心肺運動負荷試験は心肺予備能力を把握することができ、吸器循環器疾患やスポーツ医学のみならず種々の臨床にもしばしば応用されているが、運動中の呼気 O_2/CO_2 以外の呼気成分の動態は不明のところが多い。そこで、独自のAPIMS代謝モニターシステムを用いて運動負荷中の呼気皮膚ガス成分の動態を検討したところ、運動強度の増大に伴い酸素摂取量の推移とほぼ一致して変動する呼気・皮膚ガス微量成分の m/z を各々5/6種類見出した⁹。またトレーニングメニューを変えた際の運動中ならびに運動後における呼気アセトンの推移も検討した^{13,15}。

【NO_x と CO】非喫煙者群では呼気中窒素酸化物・一酸化炭素が年齢依存的に増加していることが判明した。これらは加齢・動脈硬化などを基盤とした循環器疾患と関連していることが示唆された。さらにヒト生体内では内因性COがどのようにCO₂に代謝されていくか安定同位体¹³C₁₈Oを用いて明らかにした⁸。

【硫黄系化合物】生体ガスの中でも糞便細菌叢に由来する硫黄化合物の検出法は確立していない。検知テープ光電光度法と検知管を用い、糞便から放出される硫黄化合物の計測を試みた。成人の排泄直後の糞便を空気/純窒素存在下で密閉封入後、一定温度で保管、定時間隔でヘッドスペースのH₂S、二酸化硫黄(SO₂)、メルカプトエタノール(RSH)を計測した。腸内ガス環境の状況に近い状態と考えられる低酸素³⁷が糞便の硫黄化合物の放出速度を有意に増加させたが、時間経過と共に糞便からのH₂S放出が減少傾向にあった。糞便からの硫黄化合物の放出ガス量には大きな日差変動が認められた。成分比率で見る

とH₂SとRSHで90%以上を占め、SO₂放出比は少なく、観察期間中の3者の比率はほぼ一定であった。

【活性酸素】独自のレーザ誘起蛍光計測法(LIF)とガス採取法を組み合わせたシステムにより、皮膚ガス中におけるOH[•]の検出を試みた。その結果、皮膚ガス導入時にLIF信号よる明確なピークが308.93 nm付近で観測でき、OH[•]遷移に伴う固有波長と一致していた。このピークは抗酸化剤であるビタミンCならびにビタミンE内服により有意に低下した。このことから、生体由来のOH[•]が皮膚から放出されることを確認できた。ROSの一部が生体ガスとして放出され、LIFによるROSの非侵襲かつ連続計測の可能性がでてきた²。

【低分子ガスの生体内分布と水素分子機能】

呼気ガスの病態生理学的意義を解明するには生体内ガス分布の知る必要がある。そこで肺高血圧症モデルを用いて正常ラットとモノクロタリン(MCT)肺高血圧症ラットの生体内ガス分布を比較したところMCT群では肝臓内でのCO産生の亢進と腸内H₂産生の低下が有意に認められた。いずれの群でも腸内H₂産生と呼気H₂の間には有意な相関があり、また、呼気COは肝臓内CO産生をよく反映していた。他方、MCT群では腸内H₂S産生が有意に低下しており、MCT誘発性肺高血圧の病態に何らかの関連があるものと示唆された。その他の動物試験において、ラットの人工心肺モデルへの水素分子添加が酸化ストレス障害を防御し⁴、水素ガス添加が一過性心筋虚血に伴う心筋障害を改善した⁵。

【技術開発と臨床評価】活性酸素計測技術：活性酸素は寿命が短く、測定が困難である。生体内の活性酸素測定にはESR法が一般的であったが、装置が高額かつ大型であり、スピントラップ剤の利用など煩雑な前処理を必要とする。水素が生体内の活性酸素を消去する能力を利用した、生体内活性酸素量の推定法を開発した^{1,6,17,19}。生体内に投与した水素

はそのほとんどが呼気として排気されるが、一部は生体内で活性酸素により消費される。呼気として排気される水素をモニタリングし、投与した水素量との差を取ることで簡便に生体内活性酸素量を推定することができた。

水素ガスセンサー：呼気水素濃度は食物通過時間による上部消化管機能の計測や腸内異常醗酵を生じる過敏性腸症候群などの各種消化管疾患の診断に用いられてきた。そこで、水素選択性の高い半導体センサーと乾燥剤充填の呼気回路と組合せた簡易型携帯用呼気水素計測装置の性能評価と臨床試験を行った。同時再現性はCV5%以下、本機種とGC半導体検知法による結果を比較したところ、良好な相関を得た。携帯型呼気水素計測装置は同時再現性、GC半導体検知法との相関ともに良好であった。携帯型水素計測装置は生体内水素動態を探る上で種々の臨床応用への可能性が考えられた¹²。また、熱電型水素センサーを臨床的に評価し呼気水素分析に有用であることを実証した⁷。

【疫学調査結果】呼気中 CH_4 、 H_2 の年齢依存性は欧米・国内の報告では明確にされていなかった。呼気中 CH_4 、 H_2 水素の大部分は腸内細菌によるものと考えられている。特に CH_4 産生細菌については、従来、大腸癌、認知症、種差などが報告されてきたが、結局はよく分かっていない。予備調査では、原因は明らかではないが、若年者において呼気 H_2 が、高齢者においては呼気 CH_4 が増加した。

【呼気分析診断技術に関する調査】最近、呼気診断への関心が次第に高まり、特に技術的な開発が進み始めてきた。そこで呼気ガス医療診断の現状と課題、さらに今後の展望に関して本研究成果と文献調査をもとに解説記事を執筆し社会的還元を行った¹⁶。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件、全件査読済)

1. Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che DC,

Shirai M. Molecular hydrogen consumption in the human body during the inhalation of hydrogen gas. *Adv Exp Med Biol.* 789:315-321. 2013.

2. Che DC, Shimouchi A, Mizukami T, Nose K, Seiyama A, Kasai T. Emanation of hydroxyl radicals from human skin. *IEEE Sensors J* 13:1223-1227, 2013.

3. Wakida S, Miyado T, Shimazu K, Shibutani Y, Mizukami T, Nose K, Shimouchi A. High-Throughput Separation Assay for NO Metabolites in Blood Using Microfluidic Electrophoresis. *ECS Trans.* 50: 165-170, 2013.

4. Fujii Y, Shirai M, Inamori S, Shimouchi A, Sonobe T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Takewa Y, Tatsumi E, Taenaka Y. Insufflation of Hydrogen gas restrains the inflammatory response of cardiopulmonary bypass in a rat model. *Artif Organs* 37:136-141, 2013.

5. Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S, Yamazaki S, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Shimouchi A, Sano M, Asakura M, Minamino T, Takashima S, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. $\text{H}(2)$ mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther* 26: 217-226, 2012.

6. Shimouchi A, Nose K, Shirai M, Kondo T. Estimation of oxygen radical production in the human whole body by molecular hydrogen consumption after the Ingestion of hydrogen-rich water. *Adv Exp Med Biol* 737: 245-250, 2012.

7. Shin W, Nishibori N, Izu N, Itoh T, Matsubara I, Nose K, Shimouchi A.

- Monitoring breath hydrogen using thermoelectric sensor. Sensor Letters 9: 1-4, 2011.
8. Sawano M, Shimouchi A. A tracer analysis study on the distribution and oxidization of endogenous carbon monoxide in the human body. J Clin Biochem Nutr 47:107-110, 2010
 9. Shimouchi A, Nose K, Shirai M. Analysis of Breath and Skin Gases Emanating during Exercise using an Original Biogas Sampling System connected to an Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometer IEEE Sensors Journal 10:85-91, 2010.
 10. Shimouchi A, Nose K, Yamaguchi M, Ishiguro H, Kondo T. Breath hydrogen produced by ingestion of commercial hydrogen water and milk. Biomarker Insights 4:27-32 2009
 11. Shimouchi A, Nose K, Takaoka M, Hayashi H, Kondo T. Effect of dietary turmeric on breath hydrogen. Dig Dis Sci 54:1725-1729, 2009.
 12. 利川 實, 下内章人, 池田大祐, 鈴木登, 大槻知佐, 木村郁彦. 携帯型呼気水素計測器の開発と臨床使用経験. 安定同位体と生体ガス, 5: 7-13, 2013.
 13. 垣津奈美, 永峰康一郎, 近藤孝晴, 下内章人, 野瀬和利, 加賀谷みえ子: 運動による呼気中アセトン濃度の変動, 安定同位体と生体ガス, 3: 23-30, 2011.
 14. 野瀬和利, 下内章人, 山口誠, 石黒洋, 近藤孝晴. 水素ガス吸入における皮膚ガス水素の動態. 安定同位体と生体ガス 2: 35-39, 2010.
 15. 垣津奈美, 永峰康一郎, 近藤孝晴, 下内章人, 野瀬和利, 加賀屋みえ子. 呼気中アセトン濃度の変動についての基礎データの検討. 安定同位体と生体ガス 2: 40-46, 2010.
 16. 下内章人, 近藤孝晴. 呼気ガス医療診断の現状と課題, 今後の展望. 応用物理 83: 26-32, 2014.
〔学会発表〕(計 11 件) (国際学会筆頭のみ)
 17. Shimouchi A, Kondo T. Possible clinical significance of breath hydrogen monitoring as an anti-oxidative biomarker. Breath Analysis Summit 2013, Saarbruecken, Germany, June, 2013.
 18. Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che D-C, Shirai M. Hydrogen Consumption in the Human Body during the Inhalation of Hydrogen Gas. Tokyo, April, 2012
 19. Shimouchi A, Mizukami T, Nose K, Taniguchi K. Increases in Breath Carbon Oxide during Night Sleep are associated with Deterioration of Mental Health Conditions. Jap Physiological Society, Tokyo, Mar. 2013.
 20. Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che D-C, Shirai M, Kondo T. Molecular Hydrogen Consumption in the Human Whole Body during Inhalation of Hydrogen Gas, International Society of Oxygen Transport to Tissues, July, 2012, Belgium.
 21. Shimouchi A, Nose K, Shirai M, Kondo T. Estimation of oxygen radical production in the human whole body by molecular hydrogen consumption after the Ingestion of hydrogen-rich water. The International Society on O2 Transport to Tissue 2010, Ascona, Switzerland (2010/7/18-23).
 22. Shimouchi A, Inui N, Nose K. Relationships between Physical Activities and Qualities of Night

- Sleep in young and middle-aged woman. Japanese Respiratory Society, 47 Special issue:350,2009, Tokyo, May, 2009,
23. Shimouchi A, Nose K, Yamaguchi M, Ishiguro H, Kondo T. Exhalation and consumption of hydrogen gas after ingestion of hydrogen-rich water. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto (2009.07.30)
24. Shimouchi A, Nose K, Takaoka M, Hayashi H, Kondo T. Effects of dietary turmeric on breath hydrogen and bowel motility, 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto (2009.07.30)
25. Shimouchi A, Nose K, Yamaguchi M, Ishiguro H, Kondo T. Exhalation and consumption of hydrogen gas after ingestion of hydrogen-rich water. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto (2009.07.30)
26. Shimouchi A, Nose K, Takaoka M, Hayashi H, Kondo T. Effects of dietary turmeric on breath hydrogen and bowel motility. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto (2009.07.30)

〔図書〕(計2件)

27. 下内章人, 白井幹康. 低酸素性血管攣縮. 酸素ダイナミクス研究会「からだと酸素の事典」朝倉書店 242-244, 2009.
28. 野瀬和利, 下内章人. 質量分析法. 酸素ダイナミクス研究会「からだと酸素の事典」朝倉書店 94-97, 2009.

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 生体内活性酸素種の測定法

発明者: 下内章人, 野瀬和利, 水上智恵, 利川寶

権利者: 独立行政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: 特許願 2012-171570

出願年月日: 2012年8月4日

国内外の別: 国内

名称: 体表ガス中の活性酸素測定装置及び測定方法

発明者: 蔡徳七, 下内章人, 溝上員章

権利者: 大阪大学, 独立行政法人国立循環器病研究センター, 株式会社日本エイピーアイ

番号: 特許願 2012-071189

出願年月日: 2012年3月27日

国内外の別: 国内

名称: 生体内活性酸素推定法

発明者: 下内章人, 野瀬和利

権利者: ヒューマンサイエンス振興財団

番号: 特許願 2010-235771

出願年月日: 2010年10月20日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cardiac_physiology/studium_b.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下内章人 (Shimouchi, Akito)

国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号: 80211291

(2) 研究分担者

近藤孝晴 (Kondo, Takaharu)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号: 20135388

(3) 連携研究者

溝上員章 (Mizokami, Takaharu)

(株)日本エイピーアイ・代表取締役社長

研究者番号: 40520630