

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659211

研究課題名（和文）呼気水素による新規酸化ストレス指標の創出

研究課題名（英文）Breath hydrogen as a possible anti-oxidative stress marker against hydroxyl radicals

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・心臓生理機能部・室長

研究者番号：80211291

研究成果の概要（和文）：

最近、水素分子がヒドロキシルラジカル(OH \cdot)をはじめとする生体内活性酸素種を消去することが明らかになってきた。本研究では「水素水摂取による外因性水素摂取量は活性酸素種の生成量を反映する」という仮説をたて、呼気水素濃度センサーならびに呼気水素摂取量の計測法を開発し、ヒト全身における生体内活性酸素生成量を推定した。さらに種々の腸内嫌気性醗酵に伴う呼気水素の変動と抗酸化ストレスとの関連の検討した。

研究成果の概要（英文）：

It is reported that molecular hydrogen is a weak but selective scavenger against hydroxyl radicals. This study hypothesized that molecular hydrogen consumption after ingestion of hydrogen water reflects production of reactive oxygen species. We developed a new method to estimate hydroxyl radical production in the whole body by the mass-balance of ingested and exhaled hydrogen. We also developed a hydrogen sensor and evaluated for clinical use. Furthermore, we explored hydrogen-producing dietary foods and found that breath hydrogen originated from colonic fermentation significantly correlated with biological antioxidant potentials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	0	1,000,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：水素・酸化ストレス・肺循環障害・生活習慣

研究開始当初の背景

1. 研究開始当初の背景

呼気水素は従来、未消化炭水化合物の腸内

嫌気性醗酵によるものとされ、主に消化器疾患の診断に用いられてきた。水素分子の還元性から酸化ストレスの消去作用を予測する

仮説があり、2007年より水素分子が弱いながらも選択的にOH・を消去する種々の酸化ストレス障害モデルを改善することが報告された。本研究開発当初は水素分子がOH・を選択的に消去することは*in vitro*では実証されていたが、OH・などの反応性活性酸素種(O₂⁻, H₂O₂, ONOO⁻等)はきわめて寿命が短く、特にWhole Bodyで直接定量することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では水素水飲水または水素ガス吸入による外因性の水素投与のうち、どれだけ呼気・皮膚ガス・尿へ排泄されるかを非侵襲的に連続モニターするための技術開発と、それを応用した動物実験と臨床試験を行う。呼気水素摂取量計測法、皮膚ガス水素排気量計測法、ヒトにおける水素摂取量計測法を確立させる。水素水飲水と食事性による腸内嫌気性醗酵に伴う呼気水素の変動を対比させその特徴を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画は平成21～23年度の3年間にわたり主として研究代表者(下内)と連携研究者(白井, 佐田)の所属施設(国循セ)で実施し、技術開発には松原, 申, 西堀(産総研), さらに臨床試験には近藤(名古屋大学)が参加した。

水素摂取量測定法の要素技術として、まず、ガスクロマトグラフ半導体検知法(GC/SCD法)による水素摂取量の計測法の開発を行った。主に液体試料中の水素濃度はGC/SCD法で計測し、予測される水素濃度に応じ試料を50～200μL採取し、密閉バイアル瓶に留置、30分以上の室温震盪によりヘッドスペース部のガスを1ml採取し、GC/SCD法により水素濃度を分析し、試料中溶存水素濃度を計算する手法を開発した。次いで、熱電型水素センサーの呼気水素連続測定への応用するため、

連携研究者ら(申, 西堀, 松原)の開発した熱電型水素センサーを水素水飲水試験に応用した。検出限界は数ppmであるが、%レベルまでの広範囲な測定レンジと高分解能をもち、かつ応答速度が極めて速いため、これと熱線流量計を組み合わせた分時水素摂取量連続計測装置として利用できるか否かを評価した。さらに半導体水素センサーの簡易センサーは呼気・皮膚ガスの連続モニター用として半導体水素センサーの試作品が完成しており、検出限界0.1ppm, 定量限界0.3ppm, 1～150ppmまでは直線性を持ち、皮膚ガスの高感度連続モニター使用に耐えることを確認している。これを独自開発の皮膚ガス採取器具にとりつけ出力信号をAD変換しPC内に取り込む。呼気水素の計測に有用であることを臨床的に有用であることを実証することを目的とした。さらに腸内嫌気性醗酵に伴う呼気水素を計測し、呼気水素を上昇させる食品の事例を明確にし、一部食品摂取における呼気水素と抗酸化ストレス能との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 携帯型呼気水素計測器の臨床応用

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。呼気水素は1～100ppmの低濃度であり、このレベルの水素濃度が計測可能な分析装置の大部分は卓上もしくは床置型である。臨床で用いられている卓上式の簡易計測装置としては主にガスクロマトグラフ(GC)半導体センサーである。今回、水素選択性の高い半導体センサーを保護膜で覆い、センサー信号をAD変換後8000個まで連続保存可能な携帯型呼気水素測定器を乾燥剤を充填した独自の呼気回路と組合せ、そ

の性能評価と臨床試験を行った。同時再現性試験では安定した低濃度呼気水素を示す被験者で呼気水素を連続計測したところ、 1.21 ± 0.06 (SD, CV=4.7%) , 指示値 49ppm 標準ガスでは 42.5 ± 1.07 ppm (CV=2.5%) , 指示値 104ppm 標準ガスでは 100.8 ± 3.17 (SD) ppm (CV=3.1%) となり、いずれも CV 5%以下と良好であった。本機種(Y)と GC 半導体検知法(X)を用いて、同一被験者の呼気水素の日内変動を同時計測したところ両者の間には $Y=0.988X+0.587$ (R=0.996, $p<0.001$) ときわめて良好な相関を得た。健康成人における呼気水素の日内変動は著しく個体差も大きいことが認められた。さらにラクツロース負荷の有無により呼気水素変動の経時変化を検討したところ、ラクツロース負荷により、呼気中水素濃度が著しく上昇し、乳糖不耐性が診断可能であることを示した。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。ラクツロース負荷試験でも顕著な水素濃度上昇を示した。

(2) 水素水を利用した生体内活性酸素種生成の間接的定量法の開発

水素水の摂取や H_2 ガス吸入が種々の酸化ストレス性疾患モデルで有効であることとする報告が蓄積しつつある。障害部位前後の動静脈 H_2 濃度較差があることから H_2 は障害部位で活性酸素により消去されたとされる。しかし、摂取 H_2 が全身でどの程度消費されるかを定量的に計測した報告はなかった。成人を対象に、前夜から絶食とし腸内醗酵を抑制した上で、0.5mM 水素水 500mL を 1 分間で飲水、マウスピースを介した人工空気呼吸下で分時呼気排気量と呼気 H_2 濃度を 60 分間計測し、 H_2 の摂取と排気のマスバランスを計測した。水素水の H_2 含量は密閉容器内でのヘッドスペース濃度から算出した。その結果、摂取 H_2 のうち 59%は呼気に排気、41%は消失した。

別の検討で、開放系に攪拌した水素水の H_2 消失は 2 分間で 2%以内、全体表からの H_2 放出量は摂取量の 0.1%、 H_2 水摂取に伴う呼気メタンの上昇はなく、腸内醗酵抑制のため抗生物質を連日内服した上での H_2 消失量は不変、皮膚からの H_2 放出と腸内細菌による H_2 消費はなく、 H_2 消失量は VitC 内服で容量依存的に低下した。 H_2 消失分が全て活性酸素種の消去によるとすれば、少なくとも $1\mu\text{mol}/\text{min}/\text{m}^2$ の活性酸素が全身で生成されていることになる。本法の応用として安静 1 時間、次いでエルゴメータ負荷 $20W \times 1$ 時間を行ったところ、運動時 H_2 消失は安静と比較して増大、負荷後安静時には負荷前よりさらに低下した。

(3) ターメリック含有食品の呼気水素上昇作用

ターメリック (TMC) の主成分であるクルクミンには化学構造上、プロトン供与体として抗酸化作用があるとされる。カレースパイスの主役である TMC が腸内嫌気性醗酵を促進させるか否かをカレー摂取後の呼気水素で検討した。TMC を含む 4 種類のスパイスによる標準的レシピに従い、TMC 有無のカレーを作成した。被験者は空腹状態で来研、定量の米飯と合わせたカレーライス を 15 分で摂食し、以後、15 分間隔で 6 時間、終末呼気をバッグ内に呼出し、ガスクロマトグラフ半導体検知法により呼気水素をモニターした。カレー摂取後の呼気水素の変動パターンには個体差が大きかった。TMC(-)では呼気水素の上昇は顕著ではなく、TMC(+)での呼気水素は食直後~2 時間、4~6 時間後を中心に全般的に上昇、呼気水素 AUC を有意に上昇させた。さらに TMC (+) は TMC(-)と比較し Oro-Cecal transit time を有意に短縮した。TMC 摂取による呼気水素上昇の詳細な機序は不明であるが、腸内水素産生細菌の嫌気性醗酵のみ

ならず、消化管輸送も亢進させることが示唆された。

(4) 腸内嫌気性醗酵に伴う呼気水素

「腸内嫌気性醗酵に伴う水素産生は生体内活性酸素種消去による抗酸化ストレス作用がある」という仮説を立て、腸内醗酵を促進する食品群のうち牛乳を例にとり、水素水摂取後の呼気水素と対比し、さらに牛乳摂取による酸化ストレス指標の変動を検討した。健康成人を対象とし、予め 12 時間の絶食下で約 0.4mM 水素水または牛乳を 300ml 摂取し終末呼気水素をモニターした。また同一被験者が 1 週間間隔で牛乳を 0, 200, 400 mL 摂取した際の抗酸化ストレス能を検討した。水素水では呼気水素は飲水後 10 分で最大 40ppm まで上昇したが、投与後 1 時間以内でベースラインにもどった。他方、同量の牛乳では 1~2 時間以内で呼気水素は次第に上昇、7 時間で最大 40-50ppm となり遷延性に高値を維持した。呼気水素 AUC は、同量の牛乳では水素水の約 60 倍に達した。同一被験者での 1 週間間隔の牛乳摂取による実験では、容量依存性に呼気水素 AUC は増加、静脈血酸化ストレス度 (d-ROM) は摂取後徐々に低下、抗酸化ストレスポテンシャル (BAP) は呼気水素と正相関を認めた。牛乳摂取に伴う水素産生は抗酸化ストレス能を上昇させ、酸化ストレスを減少させた。他に食物繊維や難消化性食品として考えられてきた食品群の中にも腸内水素産生を促進させる多くの食品が知られており、これらも水素分子を介した抗酸化ストレス作用があることが推察され、新規抗酸化ストレス機能食品としてみなすことができる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Shimouchi A, Nose K, Shirai M, Kondo T.

Estimation of molecular hydrogen consumption in the human whole body after the ingestion of hydrogen-rich water. *Adv Exp Med Biol.* 737: 245-50, 2012

- ② 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.
- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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(1) : 35-39, 2010.
- ⑥ 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.
- ⑦ Shimouchi A, Nose K, Takaoka M, Hayashi H, Kondo T. Effect of dietary turmeric on breath hydrogen. *Dig Dis Sci* 54:1725-1729, 2009.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 下内章人, 野瀬和利, 水上智恵, 白井幹

- 康, 近藤孝晴. 水素水飲水に伴う生体内水素消費量の計測. 東邦大学医学部, 2011年11月5日, 東京.
- ② 下内章人, 野瀬和利, 水上智恵. 生体と雰囲気のマスバランスを考慮した呼気微量ガス成分の評価法. 日本分析化学会, 2011年9月16日, 名古屋.
- ③ 下内章人. 腸内嫌気性醗酵に伴う水素分子の抗酸化ストレス機能. 日本酸化ストレス学会, 2011年7月2日, 北海道.
- ④ 下内章人. ウコン含有食品の呼気水素上昇作用. 日本酸化ストレス学会シンポジウム, 2011年7月2日, 北海道.
- ⑤ 下内章人, 野瀬和利, 近藤孝晴. 乳製品嗜好・牛乳摂取による呼気水素と酸化ストレスの関係. 第2回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会, 2010年10月30日, 東京.
- 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. The International Society on O2 Transport to Tissue. 2010年7月18-23日, Switzerland.
- ⑦ 下内章人, 池田大祐, 鈴木登, 大槻知佐, 野瀬和利, 木村郁彦, 利川寶. 携帯型呼気水素計測器の開発と臨床試用経験. 分子状水素医学シンポジウム, 2010年2月19日, 名古屋.
- ⑧ 野瀬和利, 下内章人, 近藤孝晴. 水素水飲水と低濃度水素ガス吸入時における皮膚ガス水素の動態. 分子状水素医学シンポジウム, 2010年2月18日, 名古屋.
- ⑨ 下内章人, 野瀬和利, 山口誠, 石黒洋, 近藤孝晴. 水素水飲水に伴う生体内水素摂取量の推定とその考察, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月24日, 北海道.
- ⑩ 野瀬和利, 下内章人, 木村郁彦, 利川寶. 水素水摂取に伴う皮膚ガス水素の動態, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月24日, 北海道.
- ⑪ 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, 2009年7月30日, 京都.
- ⑫ 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, 2009年7月30日, 京都.
- ⑬ Nose K, Kimura I, Toshikawa T, Shimouchi A. Metabolic gas analyzer applied to breath and skin gas for acetaldehyde, ethanol and acetone. 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009年7月30日, 京都.
- ⑭ 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, 2009年7月30日, 京都.
- ⑮ 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, 2009年7月30日, 京都.

〔図書〕(計2件)

- ① 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.
- ② 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)

①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:大阪大学学長名, 国立循環器病研究センター総長名, 株式会社日本エイピーアイ
番号:特願 2012-071189
出願年月日:2012年3月27日
国内外の別:国内

②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:特願 2010-235771
出願年月日:2010年10月20日
国内外の別:国内

③名称:腸内醗酵抑制剤
発明者:下内章人, 野瀬和利, 利川實
権利者:国立循環器病センター総長名, 利川實
番号:特願 2009-118745
出願年月日:2009年5月14日
国内外の別:国内

○取得状況(計0件)

〔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)
独立行政法人 国立循環器病研究センター・
心臓生理機能部・室長
研究者番号:80211291

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

松原 一郎 (MATSUBARA ICHIRO)
産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究
部門・研究グループ長
研究者番号:40344220

申 ウソク (SHIN WOSUCK)
産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究
部門・主任研究員
研究者番号:10357246

西堀 麻衣子 (NISHIBORI MAIKO)
産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究
部門・研究員
研究者番号:20462848

白井 幹康 (SHIRAI MIKIYASU)
独立行政法人 国立循環器病研究センター・
心臓生理機能部・部長
研究者番号:70162758

佐田 誠 (SATA MAKOTO)
独立行政法人 国立循環器病研究センター・
呼吸器科・医長
研究者番号:00280892

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