

## 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25年6月6日現在

機関番号：33903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550085

研究課題名（和文） ダイエット指標としての呼気成分センサーの開発

研究課題名（英文） Development of Sensor for Exhaled Breath Components as Diet Therapy Monitoring

研究代表者

手嶋 紀雄（TESHIMA NORIO）

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号：30292501

研究成果の概要（和文）：ヒトの呼気には、体内の代謝を反映した揮発性有機化合物（VOCs）が含まれているため、呼気分析は痛みを伴わない病態診断法として有用である。VOCsの内、アセトン・イソプレンは、脂肪の代謝に深く関係するため、有効なダイエット指標となる可能性が高い。本研究では、呼気アセトンの自動計測法を開発し、食事や運動による呼気アセトン濃度の変化をモニターすることに成功した。また、新規なイソプレンガスの計測法も開発した。

研究成果の概要（英文）：Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath reflect products of metabolism in our body in the expired air. Therefore, noninvasive breath analysis has the potential of replacing blood and urine analyses for many compounds. Monitoring breath acetone and/or isoprene can be useful to follow patients on a prescribed diet regimen. In this work, a flow injection analysis (FIA) system was developed for the determination of breath acetone. The FIA system has been successfully applied to the monitoring of variation of breath acetone affected by meal and exercise. A new FIA system was also proposed for the determination of gaseous isoprene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：呼気分析，呼気アセトン，イソプレン，吸光光度法，蛍光光度法，フローインジェクション分析

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満に加えて、高血糖、高血圧、脂質異常のうち、いずれか2つ以上を合わせもった状態をいう。平成20年4月から、健康保険組合、国民健康保険組合などに対し、40歳以上の加入者を対象としてメタボリックシンド

ロームに着目した特定健診および特定保健指導の実施が義務付けられている。ダイエットとは個人的な関心としての単なる「減量」を示すことがあるが、医学的には医師が治療・体重調節を行う「食事療法」を示す。ケト原生物質（主に脂肪酸）は肝臓内でβ酸化により代謝されるが、糖尿病、高脂質食、

あるいは健常者であっても飢餓状態によってβ酸化が亢進するため、βヒドロキシ-βメチル-グルタリル-補酵素 A (HMG-CoA) が過剰に産生し、大量のアセトンが血中に現れる。また HMG-CoA は、別の経路によるコレステロール生合成の過程で、イソプレンを産生するので、やはり血中イソプレン濃度が上昇する。すなわち、呼気アセトンと呼気イソプレンの同時計測が、有効な「ダイエット指標」(食事療法、減量の両者)となり得ると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

糖尿病患者の呼気には、健常人に比べて高いアセトンガスが含まれていることが、古くから知られていた。これは、インスリン欠乏のため、エネルギー源としての糖をうまく利用することができないことから、代替りのエネルギー源として脂肪酸を代謝して、その代謝産物であるアセトンが呼気として排出されることに起因する。このことから、糖尿病の検診に呼気アセトン計測が注目されたが、現在では簡便な血糖測定およびインスリン注射がシステム化されているため、「呼気アセトン計測=糖尿病検診」という観点より「呼気アセトン=ダイエット指標」の確証を得る方が、社会的な潜在価値が高い。上述のように、イソプレンも HMG-CoA を起源とすることに注目すると、「呼気アセトン・イソプレン同時計測=より有効なダイエット指標」と成り得る可能性がある。

そこで本研究では、(1)呼気アセトンおよび(2)呼気イソプレンの自動化学センサーを開発し、食事・絶食・運動による脂肪代謝のデータを多くの被験者から獲得することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)呼気アセトンの自動分析法

アセトンガスの定量原理を図 1 に示す。呼気を捕集用風船に吹き込む。この風船を構築された分析システムにセットし、内部の呼気を拡散スクラバー (Diffusion Scrubber, DS)

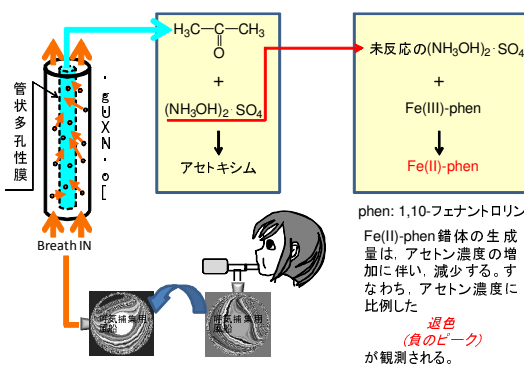


図 1 呼気アセトンの定量原理

に導く。DS には、管状の多孔性膜が内蔵されており、アセトンガスはこの膜を透過し、内部の水に吸収される。この吸収液中のアセトンは、硫酸ヒドロキシルアミンと反応し、アセトキシムを生成する。ここで、未反応の残存する硫酸ヒドロキシルアミンは、Fe(III)-1,10-フェナントロリン (phen) 錯体を還元し、赤色の Fe(II)-phen 錯体 ( $\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$ ) が生成する。この赤色錯体の生成量は、アセトン濃度の増加 (つまり残存する硫酸ヒドロキシルアミンの減少) により、減少する。すなわち 510 nm における吸光度の減少 (退色現象) によって、アセトン濃度を定量することができる。この原理を、自動計測が可能なフローインジェクション分析 (Flow Injection Analysis, FIA) システムに導入した。

### (2)イソプレンガスの分析法

イソプレンの定量原理を図 2 に示す。イソプレンは、オゾンと反応して、ホルムアルデヒドを生成する。このホルムアルデヒドは、ジメドンと反応し蛍光誘導体 ( $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 463 \text{ nm}$ ) を生成するので、この蛍光強度からイソプレンを計測することができる。この定量原理を FIA システムに導入し、分析の自動化を図った。

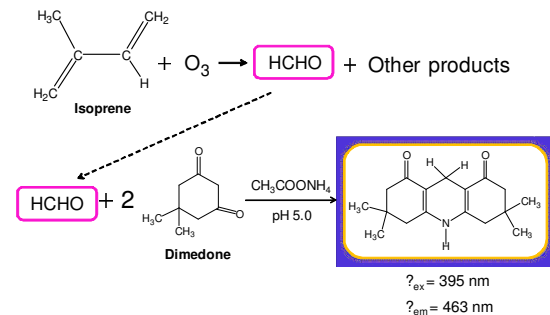


図 2 イソプレンの定量原理

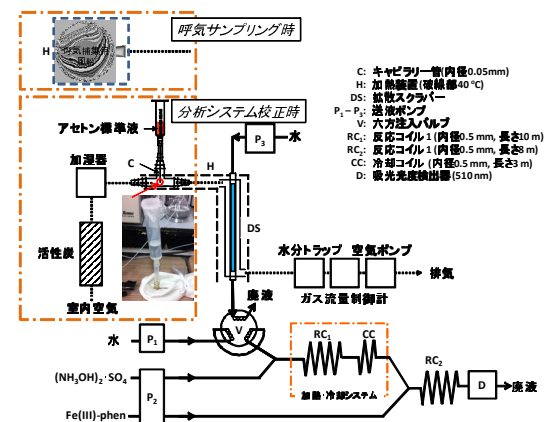


図 3 呼気アセトンの FIA システム

#### 4. 研究成果

##### (1) 呼気アセトンの自動分析法

最終的に構築された呼気アセトン定量のための FIA システムを図 3 に示す。

##### ① 分析システムの校正

3. (1) 節では、風船に捕集した呼気を DS に導入する説明をしたが、呼気を分析する前に、分析システムを校正する必要がある。このために、図 3 内に示すような標準アセトンガス発生装置を構築した。シリンジにアセトン標準液を入れ、この標準液は、キャピラリー管 (内径 0.05 mm) から 136 nL/min というごく少量の流量で自然滴下される。キャピラリー管の先端は、T-コネクタの内部に配置され、この部分を 40℃ に加熱する。滴下量はごく微量なので、40℃ において完全に蒸発し、標準アセトンガスを発生させることが可能であった。この方法によって分析システムを校正した。

##### ② 絶食による呼気アセトン濃度の変化

構築された FIA システムを用いて、絶食並びに食事による呼気アセトン濃度を計測した。結果を図 4 に示す。被験者 A, B は共に健康者であり、正午に食事をし、その後に水分補給を除いて絶食状態に入ってもらい、数時間毎の呼気アセトンを計測した。図 4 に示すように、両者ともに呼気アセトン濃度が徐々に上昇していった。これは、絶食によりブドウ糖の供給が無くなり、エネルギー源として脂肪酸を代謝することにより、結果的にアセトン濃度が上昇したと考えられる。前回の食事から 27 時間後に食事をとり、その後に被験者 A で約 0.8 ppmv、被験者 B で 1.2 ppmv まで達した。その後に減少に転じているのは、ブドウ糖供給により、脂肪酸代謝が減少に転じたことによると考えられる。

##### ③ 食事と運動による呼気アセトン濃度の変化

食事によるブドウ糖供給に加え、運動が及ぼすアセトン濃度変化について検討した。結果を図 5 に示す。健康な被験者 C~F の 4 名

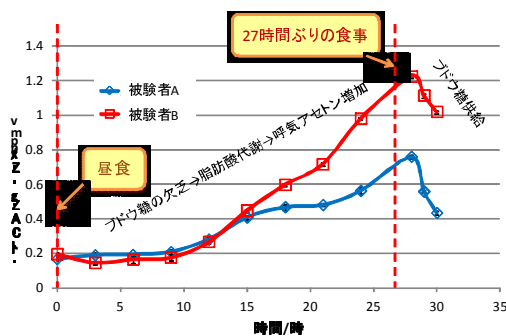


図 4 絶食と食事による呼気アセトン濃度の変化

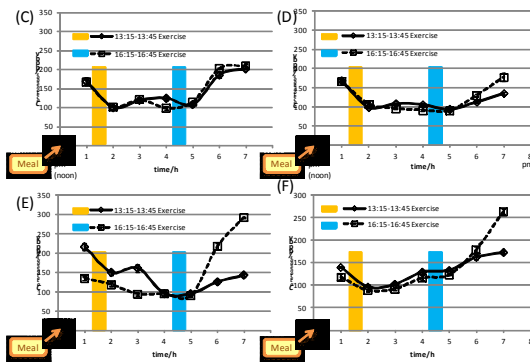


図 5 食事と運動による呼気アセトン濃度の変化

にそれぞれ 2 日間 (いずれも午後) の実験に参加してもらった。各人が正午に食事をし、その後 1 時間おきに呼気アセトンを捕集した。各人とも、初日は午後 1:15~1:45 までの 30 分間の軽いジョギング (約 4 km) を行い、2 日目は午後 4:15~4:45 まで同様の運動を行った。

図 5 の黄色が初日の 30 分間の運動時間、青色が 2 日目の 30 分間の運動時間帯を示している。運動に関係なく、いずれも曲線も、概ね下に凸の曲線を示した。これは、正午の食事によりブドウ糖が供給されて脂肪酸代謝が減少し、夕方ごろからブドウ糖欠乏状態になり、呼気アセトン濃度が上昇したものと考えられる。

興味深いことに、被験者 D, E, F において、2 日目の夕方の呼気アセトン濃度が初日に比べて明らかに高くなっている。これは、より空腹時の運動の方が、脂肪酸の代謝を促し、結果的に呼気アセトン濃度が上昇したと考えられる。被験者 C では、このような差はほとんど見られなかったが、減量という意味のダイエットとしては、より空腹時の運動の方が効果的であることが示唆された。

##### (2) イソプレンガスの分析法

呼気イソプレンの計測に必要な数百 ppbv の感度は、本科研費の研究期間内に達成することができなかったが、イソプレンガスの新規な計測方法を開発したので、ここに記す。

##### ① 分析システムの校正

標準イソプレンの発生法として、パーミエーションチューブ法を採用した。チューブ材質として、テフロン PFA チューブ (内径 4.35 mm, 外径 6.35 mm) を用いた。このチューブに窒素雰囲気化でイソプレン標準溶液を注入し、両端をスウェージロックとユニオン継手で密封した。このチューブをガラス瓶に入れ、恒温装置に設置し、室内空気を 0.4 SLPM (Standard Liters per Minute) で数

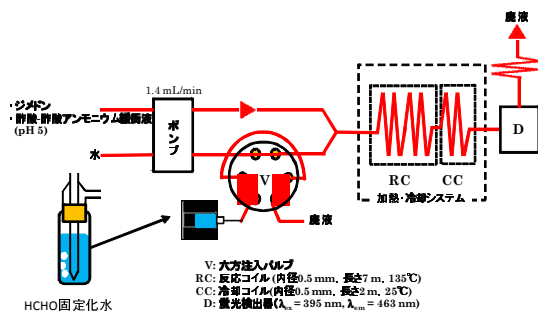


図6 イソプレンの定量のためのフローシステム

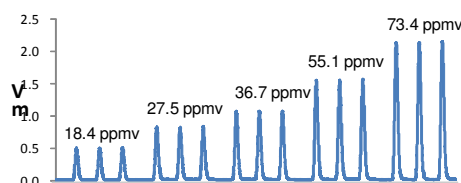


図7 イソプレンのフローシグナル

日間導入した。数日後、適当な間隔でパーミエーションチューブを恒温装置から取り出し、秤量を繰り返した。イソプレン標準溶液を密閉してからの時間に対し、質量減少量をプロットすると直線が得られ、この直線から、パーミエーションチューブの外壁を透過するイソプレンガスの発生量が求められた。

#### ②イソプレンの FIA システム

①で記述した方法を用いて得られたイソプレン標準ガスを、インピンジャー内のオゾン水に吹き込んだ。このとき、インピンジャー内の水中でイソプレンとオゾンが反応しホルムアルデヒドが生成する。このホルムアルデヒド固定化水を図6に示す FIA システムに注入した。ホルムアルデヒドは、ジメドンと酢酸塩緩衝液 (pH 5) の混合溶液と合流し、蛍光誘導体となり、この蛍光強度はイソプレン濃度に比例した (図 7)。定量濃度範囲は 18.4~73.4 ppmv であり、呼気イソプレンの定量に必要なサブ ppmv レベルの感度は得られなかったが、このシグナルから相関係数 0.996 の良好な検量線が得られた。

#### ③室内空気 (作業環境) 中のイソプレンガスの定量

実験室に設置されているダクトレスドラフトチャンバー (以下単にドラフト) を室内空間に見立てて、作業環境中のイソプレンガスを定量する模擬実験を行った。メスフラスコに入れたイソプレン標準溶液をメスフラスコの蓋を開けたままドラフト内に放置し、ドラフト内の空気をインピンジャー内のオゾン水に吸収し、ホルムアルデヒド固定化水

を得た。これを図6に示す FIA システムで測定したところ、11.8 ppmv のイソプレンガスが検出された。

室内空間に見立てたドラフトは、ダクト設備がないもので、ドラフト上部の特殊フィルターによって、化学物質を吸着するタイプのものである。このフィルターを通過した後の空気を同様にサンプリングして測定したところ、イソプレンガスは検出されなかった。すなわち、フィルターによってイソプレンガスが吸着されたことを示した。

本研究では、模擬的実験にとどまったが、室内環境のイソプレンガスの定量には、本法を十分適用できると考える。また、今後、感度の向上を図ることにより、呼気イソプレン計測法への応用を目指している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

(1) Saiphon Chanpaka, Somchai Lapanantnoppakhun, Norio Teshima, Tadao Sakai, Gary D. Christian, Kate Grudpan, Sequential Injection Lab-at-Valve Micro-Solvent Extraction Assay of Tetracycline, J. Flow Injection Anal., 査読有, 29, 2012, 85-88.

[http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29\\_2/HP/JFIA29%282%29%282012%29PP.85.pdf](http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29_2/HP/JFIA29%282%29%282012%29PP.85.pdf)

(2) Saiphon Chanpaka, Norio Teshima, Tadao Sakai, Gary D. Christian, Kate Grudpan, Micro-solvent extraction with sequential injection lab-at-valve for successive determination of cationic and nonionic surfactants, J. Flow Injection Anal., 査読有, 29, 2012, 25-28.

[http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29\\_1/HP/JFIA29%281%29%282012%29PP.25.pdf](http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29_1/HP/JFIA29%281%29%282012%29PP.25.pdf)

(3) Nuanlaor Ratanawimarnwong, Kraingkrai Ponghong, Norio Teshima, Duangjai Nacapricha, Kate Grudpan, Tadao Sakai, Shoji Motomizu, Simultaneous injection effective mixing flow analysis of urinary albumin using dye-binding reaction, Talanta, 査読有, 96, 2012, 50-54.

DOI: 10.1016/j.talanta.2012.02.027

(4) 安藤詩菜, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 本水昌二, 新規な同時注入/迅速混合流れ分析法による残留塩素の定量, 分析化学, 査読有, 61, 2012, 115-121.

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.61.115

(5) Kraingkrai Ponghong Norio Teshima, Kate Grudpan, Shoji Motomizu, Tadao Sakai, Simultaneous injection effective mixing analysis system for the determination of direct bilirubin in urinary samples, *Talanta*, 査読有, 87, 2011, 113–117.

DOI: 10.1016/j.talanta.2011.09.48

(6) Norio Teshima, Flow injection spectrophotometric determination of formaldehyde based on its condensation with hydroxylamine and subsequent redox reaction with iron(III)-ferrozine complex, *Talanta*, 査読有, 84, 2011, 1205–1208.

DOI: 10.1016/j.talanta.2010.12.019

(7) 中井洋和, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 硫酸ヒドロキシルアミンと鉄(III)-1,10-フェナントロリン錯体を用いる排水ホルムアルデヒドのフローインジェクション吸光光度分析, *分析化学*, 査読有, 59, 2010, 273–278.

(8) Saowapak Teerasong, Natchanon Amornthamarong, Kate Grudpan, Norio Teshima, Tadao Sakai, Duangjai Nacapricha, Nuanlaor Ratanawimarnwong, A multiple processing hybrid flow system for analysis of formaldehyde contamination in food, *Anal. Sci.*, 査読有, 26, 2010, 629–633.

(9) 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 流れを利用する分析法の高機能化, *ぶんせき*, 査読有, 2010, 281–286.

[学会発表] (計 23 件)

(1) Norio Teshima, Megumi Harada, Tadao Sakai, Flow Injection Spectrophotometry Coupled to a Diffusion Scrubber for the Determination of Breath Acetone, 2013年06月09日～2013年06月12日, ドイツ・ザールルイ Hotel Scheidberg.

(2) 手嶋紀雄, がん検診を指向した呼吸バイオマーカー検出法の開発, 名古屋電気学園創立100周年記念 愛工大テクノフェア～創造・ひとつくり・ものづくり～, 2012年12月07日～2012年12月07日, 愛知工業大学.

(3) 手嶋紀雄, フローインジェクション分析の基礎と応用, 第23回クロマトグラフィー科学会議, ワークショップ B-分離科学の基礎- (招待講演), 2012年11月14日～2012年11月14日, 長良川国際会議場.

(4) 杉山恭一郎, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 蛍光光度法を用いるイソプレングスのフローインジェクション分析, 第43回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2012年11月10日～2012年11月11日, 名古屋工業大学.

(5) 原田恵, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, アセトンガス分析のためのフローインジェクション分析法の開発, 第43回 中部化学関係学協会

支部連合秋季大会, 2012年11月10日～2012年11月11日, 名古屋工業大学.

(6) 杉山恭一郎, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, イソプレングスのフローインジェクション分析法の開発, 第2回 CSJ 化学フェスタ 2012, 2012年10月14日～2012年10月17日, 東京工業大学.

(7) 原田恵, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 呼吸アセトンのフローインジェクション分析, 第2回 CSJ 化学フェスタ 2012, 2012年10月14日～2012年10月17日, 東京工業大学.

(8) 手嶋紀雄, フロー化学分析によるヒト代謝物質評価手法の開発, 日本分析化学会第61年会 (招待講演), 2012年09月19日～2012年09月21日, 金沢大学.

(9) 杉山恭一郎, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, イソプレンのフローインジェクション蛍光光度分析, 日本分析化学会第61年会, 2012年09月19日～2012年09月21日, 金沢大学.

(10) 原田恵, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, ヒドロキシルアミンとの縮合反応を用いるアセトンのフローインジェクション吸光光度分析, 日本分析化学会第61年会, 2012年09月19日～2012年09月21日, 金沢大学.

(11) Norio Teshima, Flow Injection Fluorimetric Determination of Isoprene, Mini-Symposium on Flow Injection Analysis with Professor Gary D.Christian / 第49回フローインジェクション分析講演会, 2011年12月3日, 愛知工業大学.

(12) 手嶋紀雄, FIA によるオンライン前処理技術, JAIMA セミナー“これであなたも専門家—FIA 編 (招待講演), 2011年9月9日, 幕張メッセ.

(13) 手嶋紀雄, 新しい概念を組み込む流れ分析法への挑戦, *Separation Sciences 2011* (招待講演), 2011年9月7日, 幕張メッセ.

(14) 杉山恭一郎, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, オゾンとの反応を用いるイソプレンのフローインジェクション蛍光光度法, *Separation Sciences 2011*, 2011年9月6日, 幕張メッセ.

(15) 手嶋紀雄, 流れ分析法の基礎及び先端技術, 株式会社三菱化学アナリティック 2011 FIA (フローインジェクション分析) セミナー (招待講演), 2011年6月23日, 株式会社三菱化学アナリティック茅ヶ崎事業所.

(16) 手嶋紀雄, Simultaneous Injection Effective Mixing Analysis System for Urinary Protein, IUPAC International Congress on Analytical Sciences, 2011年5月24日, 国立京都国際会館.

(17) N. Teshima, N. Ratanawimarnwong, T. Sakai, D. Nacapricha, A hybrid analytical system composed of solid phase extraction and stopped-in-loop flow spectrophotometry for the determination of

urinary vanadium/creatinine ratio, Pacificchem 2010, 2010年12月19日, 米国, ハワイコンベンションセンター.

(18) 手嶋紀雄, 魅力ある分析化学のあいまいさ不完全さ(招待), 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第10回高山フォーラム, 2010年11月12日, 高山市図書館.

(19) 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 糖尿病ケアに役立つ流れ分析(招待), 第41回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2010年11月6日, 豊橋科学技術大学.

(20) 手嶋紀雄, N. Ratanawimarnwong, D. Nacapricha, 酒井忠雄, オンライン濃縮/ストップインループフロー分析法による尿中バナジウム・クレアチニン比の測定, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15日, 東北大学.

(21) 宮崎俊幸, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, サリチルアルデヒドを用いる呼気アセトンの定量, 第29回分析化学中部夏期セミナー, 2010年8月19日, リトリートたくら.

(22) 手嶋紀雄, 微小反応場を用いる環境水オンライン分析(招待), 日本水環境学会中部支部平成22年度総会及び講演会, 2010年8月11日, ウィンクあいち.

(23) 手嶋紀雄, 酒井忠雄, ヒドロキシルアミンと金属錯体を用いる排水中ホルムアルデヒドのフローインジェクション吸光光度定量, 第71回分析化学討論会, 2010年5月15日, 島根大学.

[図書] (計1件)

① 手嶋紀雄, 丸善, 改訂六版 分析化学便覧, 4.2.5.a“フローインジェクション分析”, 5.3.7“染料・有機顔料, 2011, 863 (222 - 224 及び 467 - 471).

[その他]

ホームページ等

<http://www.aitech.ac.jp/~analabo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

手嶋 紀雄 (TESHIMA NORIO)

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号: 30292501

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: