ノ ー ト

ヒト皮膚表面より放出されるアセトンガス量と 血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度との相関

野瀬 和利^{®1}, 近藤 孝晴², 荒木 修喜³, 津田 孝雄⁴

Relationship between Concentrations of Acetone Vapor Emanated from Human Skin and β -Hydroxybutyrate in Blood

Kazutoshi NOSE¹, Takaharu KONDO², Shuki ARAKI³ and Takao TSUDA⁴

¹ Department of Materials Science & Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8555

² Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8601

³ OMOHI college, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8555

⁴ Incubation Center Office 5, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8555

(Received 20 May 2004, Accepted 23 October 2004)

Since both acetone and β -hydroxybutyrate are metabolized compounds from acetoacetate, the relationship between the concentrations of acetone and β -hydroxybutyrate in gases released from human skin and blood, respectively, were studied. For collecting gases released from human skin, a home-made collector was used. The collector was a bag-type (inner volume, 70 ml), which was made with sheets of perfluoro (ethylene/propylene). After a finger was pushed into the collector at the center of a shield film made by PARAFILM[®], its state was maintained for a period of 3 minutes for collecting human emanated gases from the inserted finger. Then, the acetone concentration in the collector was estimated by gas chromatography. We found a good relationship between them. Its correlation factor was 0.88 ($p < 0.01$). The concentration of acetone can be used as an alternative marker for β -hydroxybutyrate in blood. The present proposed method for estimating the ketone-value is non-invasive, and its sampling procedure is very easy.

Keywords : gases emanated from human skin ; non-invasive ; acetone ; β -hydroxybutyrate.

1 緒 言

多様な疾患の治療のために生体情報を種々の方法で得ている。生体より得られるサンプル（生体サンプル）として信頼性が高くはん用されているサンプルは血液、尿である。血液、尿の他として、汗¹⁾、呼吸、唾液があり、更に

本研究ではヒト皮膚表面より放出されるガス（皮膚ガス）²⁾³⁾を提案している。これらは、痛みを伴わず（非侵襲）、また、出血することなく（非観血）採取可能な生体サンプルである。これらに含まれる成分を分析することにより、様々な生体情報を得ることが可能である。このような非侵襲かつ非観血で採取可能なサンプルは、採取時に提供者の同意を得られやすい、感染症の恐れがない、など様々な利点がある。更に皮膚ガスに関しては、常にヒト皮膚表面より放出されているため、連続的なサンプル採取を行うことが可能であり、生体内の日内変動に関する情報を得ることに適しているものと考えられる。これらの利点を有する皮膚ガス中の微量成分を測定し、その有用性の評

¹ 名古屋工業大学大学院工学研究科: 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

² 名古屋大学総合保健体育科学センター: 464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

³ 名古屋工業大学大学院おもひ領域: 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

⁴ 名古屋工業大学インキュベーション施設: 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

Fig. 1 Schematic diagram of handy gas collector made from FEP sheets

This collector is used for collecting gas emanated from human skin. (a): modified FEP sheets; (b): 2-way stopcock; (c): connector made from polyvinyl chlorides

価及び医療面への適用の可能性に関する考察を行うことが本研究の目的である。

アセトン⁴⁾は、アセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸とともにケトン体と称される物質である。重度の糖尿病患者においては、体からアセトン臭がすることはよく知られている⁵⁾。これらケトン体は、体内のグルコース濃度が低下した際に、エネルギーの供給を目的として脂肪酸の代謝によって生成する。したがって、アセトン測定は、糖尿病改善の指標として、あるいは体重コントロールのための絶食や偏食の指標としての利用の可能性が示唆される⁶⁾⁷⁾。

本研究では、アセトンに関して皮膚ガスと血液中成分との相関関係を調べることで、皮膚ガス測定の有用性を評価した。

2 実験

2.1 皮膚ガス採取条件

実験の主旨を説明し、同意を得た上で3人のボランティアから皮膚ガス及び血液を採取した。被験者は、23, 25, 63歳の健康人男性（以後、それぞれ被験者A、被験者B、被験者Cとする）である。

被験者に関して、実験日前日の夕食摂取後から実験終了までは絶食、禁煙とし、水以外の摂取を行わなかった。

絶食時間約16～20時間の範囲で約60分おきに皮膚ガス及び血液の採取を行った。

皮膚ガスは、換気設備が整った部屋で採取した。

2.2 皮膚ガス採取容器

本実験で皮膚ガス採取を行うに際し、フッ素樹脂 {perfluoro (ethylene/propylene): FEP} バッグを主体とする

採取容器（以後、皮膚ガス採取容器）を製作した。製作した皮膚ガス採取容器の概略図をFig. 1に示す。

皮膚ガス採取容器は、ガス流入口に二方コックを有し、底部に張ったパラフィルム[®]及び塩化ビニル製のコネクターによりバッグ状のフッ素樹脂内にガス採取可能な空間を有する採取容器である（内容積約70 ml）。皮膚ガス採取時に、容器内のガスを全量回収可能であることが特長として挙げられる。

2.3 皮膚ガス採取方法

皮膚ガス採取容器を用いた皮膚ガス採取方法は次のとおりである。測定対象となる左手人差し指を水道水及び蒸留水を用いて洗浄後、キムワイプ（クレシア製）でよくぬぐう。短冊状にカットしたフィルムシート（幅約10 mm）をあらかじめ指の根元に巻き付けておく。採取容器底部に張ったフィルムシート（パラフィルム[®]）にハサミにて長さ約10 mmの切れ目を作り、ここから指を根元まで挿入し、次いで指を後ろへ少し引く。これにより、容器底部のフィルムシートがあらかじめ巻いていた短冊状のフィルムシートと接触して引き出される。引き出されたフィルムシートを上から押さえることにより、指に巻いていたフィルムシートと密着させ、指と採取容器の隙間をふさぐ。このような方法により、容器は指に固定される。その後、シリンジ（50 ml、テルモ製）で容器内のガスを一度すべて除き、50 mlの大気を容器内に注入してコックを閉じ（この時をサンプリング開始時刻とする）3分間のサンプリングを行う。次に、シリンジで容器内の皮膚ガスを自作のポリフッ化ビニル製バッグ（テドラー[®]シート：12 cm × 12 cm 2枚、専用シーラーにて熱圧着、GLサイエンス製）に採取する。バッグ内に得られたガスを皮膚ガスサンプルとした。

2.4 皮膚ガスブランク（大気）の採取

2.3に記したように、本研究で使用した皮膚ガス採取方法では、大気をブランクガスとして使用する。したがって、皮膚ガス中アセトン量を算出する際に、大気中のアセトン量を用いる（3.3参照）。

大気は、絶食16, 18, 20時間の皮膚ガス採取直前に採取を行った。絶食17, 19時間の2点のブランクに関しては、それぞれ16, 18時間, 18, 20時間において採取した大気中に含まれるアセトン量を平均して算出した値を用いた。

また、被験者の呼気として放出されるアセトンがブランクである大気に影響を及ぼさないように、以下のような注意を払った。1) 大気の採取は被験者から約1 m離れた位置で採取した。2) 換気が十分に行われている室内で大気を採取した。3) 被験者は、皮膚ガス採取時にのみ、皮膚

Fig. 2 Typical gas chromatograms of (a): blank (room air) and (b): the gas emanating from a finger. Arrows are indicated of acetone peaks.

ガス採取場所に移動し、採取時以外は皮膚ガス採取場所には居ないようにした。

2・5 皮膚ガス中アセトン量の測定

採取した皮膚ガスは、必要に応じて窒素ガスを用いて1～2倍に正確に希釈した後、cold-trap システム⁸⁾を使用し、25 ml のサンプルガスを液体窒素冷却濃縮し、ガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。

分離には、Porapak Q キャピラリカラム (Type G-950, 内径 1.2 mm, 長さ 40 m, 化学物質評価研究機構より提供) を使用した。測定には GC-FID (Type GC-14B, 島津製) を使用し、検出器温度は 150℃ とした。昇温条件は、50℃ で 2 分間保持, 2℃/分の速度で 60℃ まで昇温, 5℃/分の速度で 75℃ まで昇温とした。また、キャリアーガスにはヘリウム (入口圧: 0.75 kgf/cm²) を使用した。

2・6 検量線の作成

10, 20, 35, 55, 80 μ l のアセトンそれぞれ 100 ml の蒸留水に溶解し、5 種類の濃度のアセトン水溶液を調製した。5 種類のアセトン水溶液の 3 μ l をそれぞれ 1000 ml の窒素ガスを封入したテドラー[®] バッグ (内容積: 1 l) 内に注入することにより、0.091, 0.18, 0.31, 0.49, 0.72 ppm のアセトン標準ガスを調製した。

皮膚ガス採取容器内のガスを一度すべて除した後、調製した標準ガスの 50 ml を封入し、3 分間保持する。3 分間保持した標準ガスをシリンジで自作のポリフッ化ビニル製バッグに全量 (50 ml) 回収する。バッグ内に得られたガスを検量線用のガスサンプルとした。ガスサンプルの 25 ml を cold-trap システムにより液体窒素冷却濃縮し、分析した。その分析結果を基に、検量線を作成した。

Fig. 3 Calibration curve for acetone amount released from human skin

The amount of acetone is injection amount of acetone contained in 25 ml standard acetone gas. Standard gas concentrations are 0.091, 0.18, 0.31, 0.49, 0.72 ppm, respectively.

2・7 血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度の測定

左手中指をファインレット (三和化学研究所製) を用いて穿刺し、採取した血液を測定用ケトフィルム N (三和化学研究所製) に添加, 次の反応試薬と反応させ, ケトメーター N (三和化学研究所製) を用いて血中濃度を測定した⁹⁾。 β -ヒドロキシ酪酸は、アセトン、アセト酢酸と合わせてケトン体と称される。また、 β -ヒドロキシ酪酸及びアセトンは同じアセト酢酸の代謝生成物であり、血中で両者の相関が確立されているので¹⁰⁾、本実験では血中の β -ヒドロキシ酪酸をアセトンの代わりに測定した。

3 結果と考察

3・1 皮膚ガス中アセトンの検出

本研究で使用した方法により、簡便に皮膚ガスを採取することが可能である。得られたサンプルガスを必要に応じて希釈し、そのガスの 25 ml を cold-trap システムにより液体窒素冷却濃縮した。濃縮管に保持された成分は瞬時に過熱脱離し、カラムへオンライン注入される。採取した皮膚ガスを GC を用いて測定して得られる典型的なクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

3・2 検量線

作成した検量線を Fig. 3 に示す。アセトン標準ガス 25 ml を分析して得られたクロマトグラムのピーク面積を基に作成した検量線である。検量線は $r^2 = 0.992$ の直線性を示した。また、この検量線は、皮膚ガス採取方法に順じた方法 (2・3, 2・6 参照) によって得られたサンプルを分析して作成したものである。したがって、皮膚ガス採取容器が検量線の濃度範囲において安定に使用できることを示している。

Fig. 4 Variation of both rates of acetone amount released from human skin and concentrations of β -hydroxybutyrate in blood according to fasting period for the subject C

Skin surface area of the subject is 33 cm^2

3.3 皮膚ガス中アセトン量の算出

採取した皮膚ガスサンプルを分析して得られたアセトンのピーク面積を Fig. 3 の検量線に当てはめることにより、皮膚ガスサンプル 25 ml 中に含まれるアセトン量を算出した。実際に採取したサンプルは 50 ml なので、得られた値を 2 倍することにより、採取したサンプル 50 ml 中に含まれるアセトン量を算出した。この値は、皮膚から放出されたアセトン量と、サンプリングに使用した大気中に含まれるアセトン量との和であるため、大気中アセトン量を減算することにより、皮膚から放出されたアセトン量を算出した。以下に述べる結果に関しては、皮膚から放出されたアセトン量に対して皮膚表面積 (30, 29, 33 cm^2 : それぞれ被験者 A, B, C), 皮膚ガス採取時間 (3 分) を考慮し、単位皮膚表面積、単位時間当たりのアセトン放出量として表した。以後、この値を便宜的に皮膚ガス中アセトン量とする。

3.4 皮膚ガス中アセトン量と血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度との相関

3 人の健康人被験者から皮膚ガス及び血液をほぼ同時に採取し、皮膚ガス中アセトン量と血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度の経時変化を調べた。その結果の代表例を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 に、代表例として被験者 C における結果を示したが、絶食時間経過に伴い、皮膚ガス中アセトン量及び血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度が増加する傾向が見られた。健康人における血中 β -ヒドロキシ酪酸の基準値は、早朝空腹時において $76 \mu\text{M}$ 以下とされているが、本研究のように長時間の絶食を行った場合は、 $76 \mu\text{M}$ を越える場合がある¹¹⁾¹²⁾。これは、アセトン及び β -ヒドロキシ酪酸を含むケ

Fig. 5 Relationships between rates of acetone amount released from human skin and concentrations of β -hydroxybutyrate in blood during fasting period for three subjects

This correlation factors is 0.88 ($p < 0.01$).

トン体が、体内のグルコース濃度が低下した際に、エネルギーの供給を目的として、脂肪酸の代謝によって生成することに起因する。すなわち、絶食時間が長いほど、脂肪酸の代謝が進み、アセトン及び β -ヒドロキシ酪酸濃度が上昇するものと考えられる。

更に、本実験により得られた 3 人の被験者の皮膚ガス中アセトン量と血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度の相関関係を調べた結果 (Fig. 5), 相関係数 $r = 0.88$ ($p < 0.01$) であり、よい相関関係が得られた。

Fig. 5 において、血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度が定量限界以下の場合に皮膚ガス中アセトン量が約 $0.2 \text{ ng cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ 存在する結果が得られたが、これはアセトン及び β -ヒドロキシ酪酸の産生起源、すなわち、脂肪酸の代謝が関係するものと考えられる。脂肪酸は肝臓における代謝の過程でアセト酢酸を生成し、更にこのアセト酢酸から β -ヒドロキシ酪酸やアセトンが生成する。このとき、アセトンは代謝されないのに対し、 β -ヒドロキシ酪酸は代謝され、肝臓以外の組織で利用される。したがって、 β -ヒドロキシ酪酸が定量限界以下のような低濃度の場合でもアセトンは存在しており、皮膚ガス中に放出されることが示唆される。

4 結 論

本研究により、皮膚ガス中アセトン量と血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度との間により相関関係 ($r = 0.88$: $p < 0.01$) が成り立つことが分かった。この結果から、皮膚ガス中アセトン量が血中 β -ヒドロキシ酪酸濃度の指標となり得るものとする。すなわち、皮膚ガスを用いることにより、血液同様に生体情報を得ることが可能であることが示唆される。本研究で用いた皮膚ガス採取方法は、皮膚ガス提供

者への負担が小さく, 採取場所を選ばない. また, 採取方法が簡便である. したがって, 日常の自己健康管理への適用の可能性があろう.

本研究を行うにあたり, (財)科学技術交流財団先導的科学技術共同研究より多大なるご支援をいただき, 誠に感謝いたします.

文 献

- 1) T. Kamei, T. Tsuda, Y. Mibu, S. Kitagawa, H. Wada, K. Naitoh, K. Nakashima: *Anal. Chim. Acta*, **365**, 259 (1998).
- 2) T. Kondo, T. Tsuda, K. Nose, H. Ishiguro, T. Mitsui, Kai-Ping Gao, K. Fujiki: *Am. J. Gastroenterol.*, **97**, 1271 (2002).
- 3) K. Naitoh, T. Tsuda, K. Nose, T. Kondo, A. Takasu, T. Hirabayashi: *Instrum. Sci. Technol.*, **30**, 267 (2002).
- 4) Musa-Veloso, Kathy, Likhodii Sergei S., Cunnane Stephen C.: *Am. J. Nutr.*, **76**, 65 (2002).
- 5) E. Owen Oliver, V. E. Trapp, C. L. Skutches, M. A. Mozzoli, R. D. Hoeldtke, G. Boden, G. A. Reichard, Jr.: *Diabetes*, **31**, 242 (1982).
- 6) H. A. Byrne, T. L. Dornen, K. L. Tiezen, J. P. New, S. Hollis: *Diabetes Care*, **23**, 500 (2000).
- 7) S. K. Kundu, J. A. Bruzek, A. M. Judilla: *Clin. Chem.*, **39**, 87 (1993).
- 8) K. Naitoh, Y. Inai, T. Hirabayashi, T. Tsuda: *Anal. Chem.*, **72**, 2797 (2000).
- 9) D. H. Williamson, Mellanby Jane, rebs H. A. K.: *Biochem. J.*, **82**, 90 (1962).
- 10) C. N. Tassopoulos, D. Barnett, T. R. Fraser: *Lancet*, **28**, 1282 (1969).
- 11) Klein, Samuel, R. Robert: *Am. Physiol. Soc.*, E631 (1992).
- 12) W. Jerzy, Kolaczynski, V. Robert, Considine, Joanna Ohanesian, Cheryl Marco, Irina Opentanova, Mark R. Nyce, Michael Myint, Jose F. Caro: *Diabetes*, **45**, 1511 (1996).