

電気化学センサーを用いた簡易型皮膚ガス分析装置による 運動時の皮膚ガス中アセトン濃度分析の試み

名古屋工業大学大学院 伊 藤 宏
(共同研究者) 同 大 桑 哲 男
名古屋工業大学 津 田 孝 雄

Changes In Skin-Gas Acetone Concentrations Following Exercise by Portable Skin-Gas Acetone Analyzer Using Electrochemical Sensors

by

Hiroshi Itoh, Tetsuo Ohkuwa
*Graduate School of Engineering,
Nagoya Institute of Technology*
Takao Tsuda
Research Fellow, Nagoya Institute of Technology

ABSTRACT

We examined the changes in skin-gas acetone concentrations following the 60% heart rates (HR) max cycle exercise by the portable skin-gas acetone analyzer using electrochemical sensors.

The standard acetone gases significantly ($r=0.992$, $p<0.05$) related to the results of same standard gas measurements by the portable skin-gas acetone analyzer. Thus, we confirmed the reliability of acetone gas measurements by the portable skin-gas acetone analyzer.

Six healthy male students (22.2 ± 1.5 years; mean $\pm$ SD) volunteered as the subjects, and none of them were smokers. The subjects performed 60% HRmax cycle exercise for 30 min. Skin-gas acetone concentrations of each subject were measured

from the first finger of right hand using a probe at rest, 5, 10, 15, 20, 30 min during, and 5, 10, 20 min after the exercise. HR were also measured at same point using HR monitor of the cycle ergometer.

Skin-gas acetone concentrations significantly increased 20 ($p<0.01$) and 30 ($p<0.05$) min during exercise compared to the resting value, then returned to the resting value after the exercise.

These results suggest that the skin-gas acetone concentrations increase following 60% HRmax cycle exercise for 30 min. Thus, the portable skin-gas acetone analyzer using in this study is reliable and useful to measure skin-gas acetone concentrations from the fingertip for only 2min.

要 旨

本研究は、電気化学センサーおよび半導体センサーを用いた簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置による運動前後の皮膚ガス中アセトン濃度の分析を試みようとした。標準ガスと装置の標準ガス実測値との間には有意な相関関係 ($r=0.992$, $p<0.05$) が認められ、各被験の安静値の変動係数が5%未満であったことから分析装置の信頼性が確かめられた。

健康な男子学生 6 人 (22.2 ± 1.5 歳) を対象に、自転車エルゴメーターを用いた最大心拍数 (heart rate max; HRmax) の 60% の運動を 30 分間行わせ、運動前の安静、運動中 5, 10, 15, 20, 30 分、運動終了後 5, 10, 20 分に利き手の人差し指に取り付けた測定装置の専用プローブも用いて皮膚ガスを採集してアセトン濃度分析を行った。また、心拍数については自転車エルゴメーター付属の心拍モニターにより測定した。

皮膚ガス中アセトン濃度は、安静値に対して上昇し、運動開始後 20 ($p<0.01$), 30 分 ($p<0.05$) に有意に高い値が認められ、運動終了後には低下して安静値に回復する傾向が見られた。

以上、本研究で簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置の信頼性が確かめられた。また、その装

置を用いて 60%HRmax, 30 分間の運動で認められた皮膚ガス中アセトン濃度の有意な上昇は、肝臓での脂肪酸酸化によるケトン体生成増大や血中 β ヒドロキシ酪酸濃度上昇などを反映している可能性が推察された。

緒 言

ケトン体とは、脂質代謝の中間代謝産物でアセト酢酸、アセトン、 β -ヒドロキシ酪酸の総称を指す¹⁻³⁾。生体内におけるケトン体生成は、主に肝臓における脂肪酸の β 酸化によるもので、 β -ヒドロキシ酪酸は酵素的にアセト酢酸に変換され、 β -ケト酸であるアセト酢酸は不安定な物質のため容易に非酵素的に脱炭酸してアセトンへと変化する^{1,2,4)}。 β -ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸はエネルギー源として脳、心臓、腎臓、骨格筋などの組織で利用される^{2,4)}が、アセトンは最終代謝物であり揮発性物質のためエネルギー源としては利用されずに呼吸^{5,6)}や皮膚ガス^{1,7)}を介して体外へ排出される⁸⁾。このようなことから、過剰なケトン体生成状態では呼吸^{5,9)}や皮膚ガス^{10,11)}中アセトン濃度が上昇し、呼吸や皮膚ガス中アセトン濃度の上昇は肝臓でのケトン体生成量の増加や血中 β -ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸濃度の上昇を反映すると考えられている^{1,2,12)}。

実際にグルコース代謝に支障がある糖尿病患者では、肝臓での脂肪酸酸化が亢進して代償的に大量にケトン体生成が促進されるため、呼気^{5,6,9)}や皮膚ガス^{10,11)}中アセトン濃度が健常者に比べて高いことが知られている。

一方、運動時には解糖系や β 酸化により生成されたアセチル CoA は速やかにクエン酸回路により消費されるが、運動によって肝臓でも過剰なアセチル CoA が生成されると、肝臓のミトコンドリアではアセチル CoA は β -ヒドロキシ酪酸あるいはアセト酢酸へと変換される^{1,2)}。しかし、肝臓自体はケトン体をエネルギー源として利用出来ないため、激しい運動時には血中ケトン体(β -ヒドロキシ酪酸)^{4,8)}や呼気^{12,13)}および皮膚ガス^{14,15)}中アセトン濃度が上昇することが報告されている。

ところで上述した先行研究では、従来、呼気や皮膚ガス中アセトン濃度分析方法としてガスクロマトグラフ(gas chromatograph; GC)が主流であった^{11,14,15)}。GC は高感度、高精度で再現性が高い分析を可能とするが、装置が大きく実験室内での設置が限定されること、装置そのものが高価であること、1 サンプルの分析に要する時間が30 分前後であることなどから装置を持ち運んで多くのサンプルを分析するには適さない。

そこで、本研究では電気化学センサーおよび半導体センサーを用いた携帯可能、約2 分間で分析可能な開発中の簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置の信頼性を確かめようとした。また、その装置を用いて最大下の自転車運動が指先から採集された皮膚ガス中アセトン濃度変化に及ぼす影響についても分析を試みようとした。

1. 研究方法

1. 1 被験者

被験者は、非喫煙者でビタミン剤を含めた特別な薬物を服用していない健康な男子学生6 名とし

た。被験者には、名古屋工業大学生命倫理審査委員会に承認された本研究の目的と実験内容を十分説明し同意を得た。被験者は全員、特別な運動習慣がなく、実験の前3 日間の激しい運動、また前日の飲酒を制限し、実験当日は実験開始2 時間前までに朝食を摂らせた。また、被験者には午前10 時前後に室温、湿度を一定に保った実験室にて30 分間、座位で安静を保たせた。表1 に被験者の身体的特性を示した。

表1 被験者の身体的特性

N=6	Age (years)	Height (cm)	Mass (kg)	BMI (kg/m ²)
Mean	22.2	172.6	75.6	25.3
SD	1.5	7.5	17.1	5.0

BMI: body mass index

1. 2 皮膚ガス採集および皮膚ガス中アセトン濃度分析方法

本研究では、電気化学センサーおよび半導体センサーを用いた簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置(ピコデバイス社製試作機)により皮膚ガス中アセトン濃度を求めた。

本装置の専用プローブを被験者の効き手人差し指、指先から第2 関節まで取り付け、30 秒間プローブ内を実験室内の空気を60ml/ 分で流して洗浄した後、20 秒間プローブ内の空気を駐留させ、その後駐留させたガスを皮膚ガスサンプルとして採集し、20 秒間でアセトン濃度分析を行った(図1)。

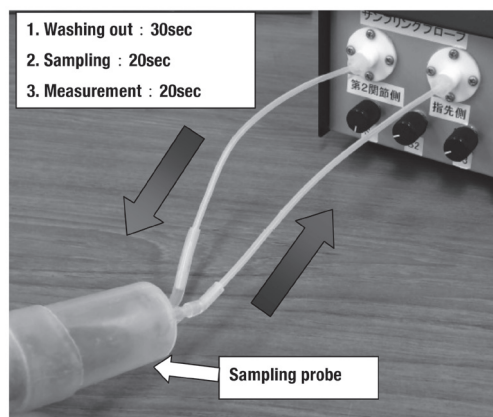


図1 皮膚ガスサンプリング概略

装置のサンプリング，分析の合間があるため，実際の分析に要する時間は2分程度であった．安静値については3回連続して測定した値の平均値を安静値とし，運動前後の値については決められた時間の60秒前から装置を稼働させてその時間の値とした．

1. 3 装置の信頼性

装置のサンプルバッグ内洗浄を行わないガスバッグ測定モードにより標準ガス（0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2ppm）を測定して検量線を作成し，装置のディスプレイに表示される数値が正しいか否かを検証した．さらに装置の信頼性，再現性を検討するため各被験者の安静値について，プローブ内の洗浄作業を行う測定モードにより10回連続測定して変動係数を求めた．

1. 4 運動負荷

被験者には，実験の1週間前に自転車エルゴメーター（エアロバイク 900U，コンビウエルネス社製）を用いて最大心拍数（heart rate max; HRmax）の60%となる負荷を決めるために15分間のプレテストを行った．実験当日，被験者は60 watt，70回転/分で自転車エルゴメーターによる運動を開始し，2分毎に10または20 watt ずつ負荷を漸増させて10分までに各被験者の60% HRmax となるように調節した．皮膚ガス中アセトン濃度の分析は，安静，運動開始後5, 10, 15, 20, 30分，さらに運動終了後5, 10, 20分に測定して各時間の値とした．また，心拍数は皮膚ガスと同じ時間に自転車エルゴメーター付属の心拍メモリーを用いて記録した．

1. 5 統計処理

全てのデータは平均値 ± 標準偏差とし，反復測定－分散分析後，Sheffé法を用いて post hoc 検定を実施し，有意水準は $p<0.05$ とした．

2. 結 果

2. 1 分析装置の信頼性

アセトンの標準ガス（0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ppm）を作成して分析装置の実測値による回帰直線を求めた．その結果，標準ガスと分析装置による値との間には有意な正の相関関係（ $r=0.992$, $p<0.05$ ）が認められ，本研究の分析装置によるアセトン濃度分析結果の信頼性が確認できた（図2）．また，被験者6名の安静値についての連続測定時変動係数は各々4.9, 3.8, 2.8, 1.4, 1.5, 2.9%であった．このように被験者全員の測定値の変動係数が5%未満であったことから本装置の再現性が確認出来た．

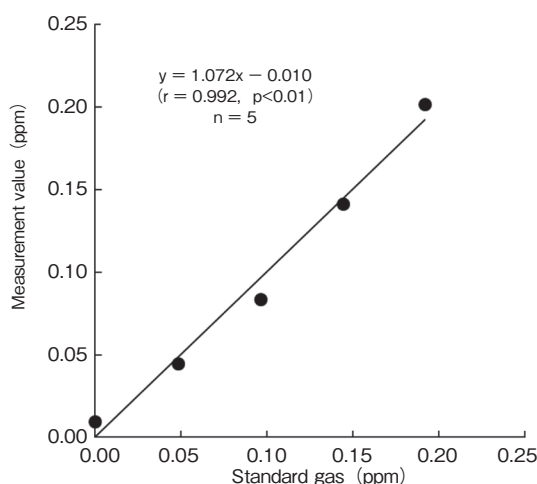


図2 アセトン標準ガスに対する簡易型測定装置の実測値

2. 2 運動前後の心拍数の変化

運動前後のHRの変化は図3に示した．各被験者によって運動負荷，HRの変化は異なるが，運動開始後からHRは有意（ $p<0.01$ ）に上昇し，10分にはどの被験者も概ね60% HRmaxに達した．また，運動終了後には速やかに低下して安静値に回復する傾向が見られた．

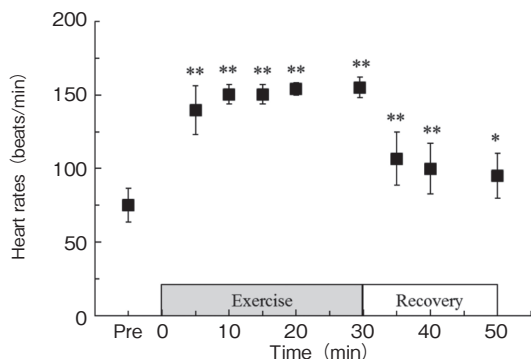


図3 運動前後の心拍数の変化

Values are Mean $\pm$ SD.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different vs. pre.

2. 3 運動前後の皮膚ガス中アセトン濃度の変化

皮膚ガス中アセトン濃度は、安静値に対して運動直後から上昇し、運動開始後 20 ($p < 0.01$) および 30 ($p < 0.05$) 分にそれぞれ有意に高い値が認められた (図 4)。また、運動終了後の皮膚ガス中アセトン濃度は低下し、運動終了後 5, 10, 20 分のいずれにおいても安静値に対して有意な差が認められず、回復する傾向が見られた。

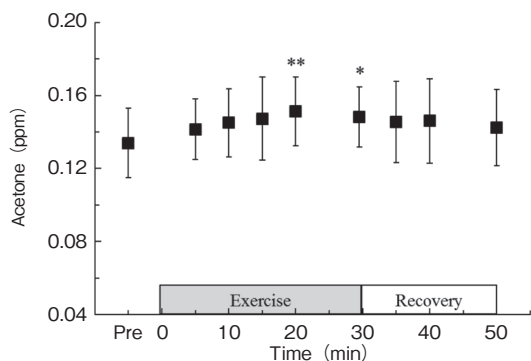


図4 運動前後の皮膚ガス中アセトン濃度変化

Values are Mean $\pm$ SD.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different vs. pre.

2. 4 皮膚ガス中アセトン濃度の各被験者における最大値

図 5 に皮膚ガス中アセトン濃度、各被験者の安静値と運動後の最大値を示した。各被験者の最

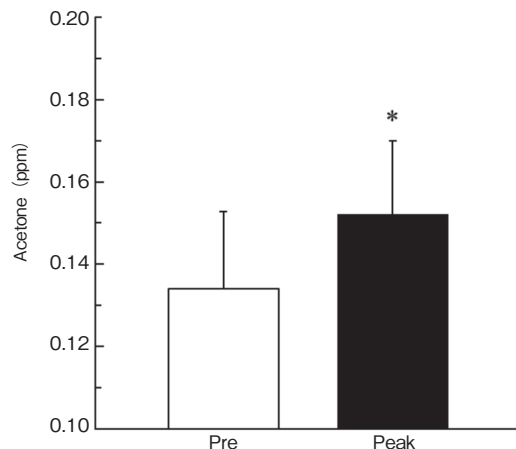


図5 各被験者の皮膚ガス中アセトン濃度安静値および運動後の最大値

Values are Mean $\pm$ SD.

* $p < 0.05$ significantly different vs. pre.

大値は安静値に対して約 1.2 倍の有意 ($p < 0.05$) に高い値が認められた。

3. 考 察

これまでも呼気^{1, 5, 6, 8, 9, 12, 13)} や皮膚ガス^{7, 11, 14, 15)} 中のアセトン濃度分析は行われてきた。これらの多くは GC による分析であり、高精度で信頼性の高いものである。

一方、従来から用いられてきた GC 分析装置は装置本体が大きく持ち運びには適さないこと、また 1 サンプル分析に 30 分前後の時間を要することから簡易的で短時間の分析には適さない。そこで本研究では、電気化学センサーおよび半導体センサーを用いた携帯可能な簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置による皮膚ガス中アセトン濃度分析を試み、その信頼性、妥当性を確かめようとした。アセトン標準ガスと標準ガス実測値との間には有意 ($p < 0.05$) な正の相関関係が認められ、各被験者の安静値の変動係数は 5% 未満であった。さらに、本研究の分析装置では 1 サンプルに対して皮膚ガスサンプリングにおける洗浄、分析時間等を合わせても約 2 分と非常に短時間であること、装置も持ち運び可能であることから携帯型

分析装置として優れていることが確かめられた。

運動により血中ケトン濃度が上昇することはよく知られている^{8, 12, 16-18)}。Balasse と Frey ら¹²⁾は最大酸素摂取量の 40-60%, 120 分のトレッドミル走により血中ケトン濃度が上昇し、40% よりも 60% のトレッドミル走の方がその上昇の程度が大きかったことを報告している。運動後にヒトの呼気^{8, 12, 16, 17)}、皮膚ガス^{14, 15)}中アセトン濃度が上昇することも報告されている。その中でも Yamai ら¹⁴⁾は、5 分間隔、15 分間の漸増負荷による自転車運動において、15 分後の 990kgm/分の運動強度において呼気および皮膚ガス中アセトン濃度が有意に上昇したことを報告している。皮膚ガスに関してはその他にハンドグリップ運動によってアセトン濃度が上昇したとの報告¹⁵⁾もあるが、本研究のような最大下の自転車運動による皮膚ガス中アセトン濃度変化に関するものは Yamai ら¹⁴⁾を除いて見当たらない。本研究における 60%HRmax の自転車運動後に見られた皮膚ガス中アセトン濃度上昇は Yamai ら¹⁴⁾の結果を支持するものである。本研究における運動後の皮膚ガス中アセトン濃度の上昇も先行研究^{1, 2, 12)}で論じられているように、肝臓における脂肪酸酸化によるケトン体生成が亢進したこと、血中ケトン濃度が上昇したことを反映している可能性が示唆された。

一方、運動時の骨格筋におけるアセチル CoA の消費やケトン体の取り込みについては運動強度、持続時間によって異なり、血中の遊離脂肪酸 (free fatty acid: FFA) レベル、肝臓における血流や FFA の取り込みなど多くの要因に関わる^{12, 13)}ため非常に複雑である。運動時には β 受容体刺激が強まり脂肪酸動員が促進する^{18, 19)}が、その脂肪酸動員は最大酸素摂取量の 25% で最も大きく、強度が高くなると減少する²⁰⁾。これらのことから、運動中の脂肪酸の分解は 60% よりも低強度の運動でも十分に高まることが考えられ、本

研究のように定常状態に至る 30 分程度の運動であれば 60% に満たない強度の最大下運動でも皮膚ガス中アセトン濃度が上昇する可能性も考えられる。

4. まとめ

本研究では、電気化学センサー及び半導体センサーを用いた簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置の信頼性が確かめられた。

本研究の分析装置により、60%HRmax、30 分間の自転車運動時における皮膚ガス中アセトン濃度は、安静値に対して運動後 20 ($p<0.01$)、30 ($p<0.05$) 分にそれぞれ有意に高くなり、運動終了後には安静値に回復する傾向が認められた。これらの皮膚ガス中アセトン濃度の増減は、肝臓における脂肪酸酸化に伴うケトン体生成の増減、さらにその血中濃度変化を反映している可能性が示唆された。

以上、本研究の簡易型皮膚ガス中アセトン濃度分析装置は、コンパクトで携帯性が高く、約 2 分間という短時間での分析が可能であり、GC に替わる新しい分析装置として期待できることが確かめられた。また、運動時の脂肪酸燃焼によるダイエット指標や糖尿病の新たな診断指標として本研究の皮膚ガス中アセトン濃度分析装置利用が実用化される可能性が高まった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学財団に心から深謝いたします。また、本研究実施にあたり多大なご協力をいただいた田村耕佑、松浦海、吉井雄二、宇津有磯、加藤大貴、高井紗英氏の名古屋工業大学学生各諸氏に厚く御礼申し上げます。本研究は一部「知の拠点あいち」研究プロジェクトとして技術援助等をいただきましたことを深謝いたします。

文 献

- 1) Amann, A., L. Costello Bde, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby: The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *Journal of breath research*, **8** (3) 034001 (2014)
- 2) Laffel, L.: Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, **15** (6) 412-26 (1999)
- 3) Mitchell, G.A., S. Kassovska-Bratinova, Y. Boukaftane, M.F. Robert, S.P. Wang, L. Ashmarina, M. Lambert, P. Lapierre, E. Potier: Medical aspects of ketone body metabolism. *Clinical and investigative medicine*, **18** (3) 193-216 (1995)
- 4) Owen, O.E., V.E. Trapp, C.L. Skutches, M.A. Mozzoli, R.D. Hoeldtke, G. Boden, G.A. Reichard, Jr.: Acetone metabolism during diabetic ketoacidosis. *Diabetes*, **31** (3) 242-8 (1982)
- 5) Musa-Veloso, K., S.S. Likhodii, S.C. Cunnane: Breath acetone is a reliable indicator of ketosis in adults consuming ketogenic meals. *The American journal of clinical nutrition*, **76** (1) 65-70 (2002)
- 6) Wang, Z. C. Wang: Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. *Journal of breath research*, **7** (3) 037109 (2013)
- 7) Naitoh, K., Y. Inai, T. Hirabayashi, T. Tsuda: Exhalation behavior of four organic substrates and water absorbed by human skin. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **25** (7) 867-71 (2002)
- 8) Wigaeus, E., S. Holm, I. Astrand: Exposure to acetone. Uptake and elimination in man. *Scandinavian journal of work, environment & health*, **7** (2) 84-94 (1981)
- 9) Li, W., Y. Liu, X. Lu, Y. Huang, Y. Liu, S. Cheng, Y. Duan: A cross-sectional study of breath acetone based on diabetic metabolic disorders. *Journal of breath research*, **9** (1) 016005 (2015)
- 10) Turner, C.: Potential of breath and skin analysis for monitoring blood glucose concentration in Diabetes. *Expert review of molecular diagnostics*, **11** (5) 497-503 (2011)
- 11) Yamane, N., T. Tsuda, K. Nose, A. Yamamoto, H. Ishiguro, T. Kondo: Relationship between skin acetone and blood beta-hydroxybutyrate concentrations in Diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **365** (1-2) 325-9 (2006)
- 12) Balasse, E.O. F. Fery: Ketone body production and disposal: effects of fasting, diabetes, and exercise. *Diabetes/metabolism reviews*, **5** (3) 247-70 (1989)
- 13) Wahren, J., Y. Sato, J. Ostman, L. Hagenfeldt, P. Felig: Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *The Journal of clinical investigation*, **73** (5) 1367-76 (1984)
- 14) Yamai, K., T. Ohkuwa, H. Itoh, Y. Yamazaki, T. Tsuda: Influence of cycle exercise on acetone in expired air and skin gas. *Redox Rep.*, **14** (6) 285-9 (2009)
- 15) Mori, K., T. Funada, M. Kikuchi, T. Ohkuwa, H. Itoh, Y. Yamazaki, T. Tsuda: Influence of dynamic hand-grip exercise on acetone in gas emanating from human skin. *Redox Rep.*, **13** (3) 139-42 (2008)
- 16) Senthilmohan, S.T., D.B. Milligan, M.J. McEwan, C.G. Freeman, P.F. Wilson: Quantitative analysis of trace gases of breath during exercise using the new SIFT-MS technique. *Redox Rep.*, **5** (2-3) 151-3 (2000)
- 17) King, J. et al.: Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer. *Journal of breath research*, **3** (2) 027006 (2009)
- 18) Wahrenberg, H., J. Bolinder, P. Arner: Adrenergic regulation of lipolysis in human fat cells during exercise. *European journal of clinical investigation*, **21** (5) 534-41 (1991)
- 19) Arner, P., E. Kriegholm, P. Engfeldt, J. Bolinder: Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *The Journal of clinical investigation*, **85** (3) 893-8 (1990)
- 20) Romijn, J.A., E.F. Coyle, L.S. Sidossis, A. Gastaldelli, J.F. Horowitz, E. Endert, R.R. Wolfe: Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *The American journal of physiology*, **265** (3 Pt 1) E380-91 (1993)