

令和元年6月16日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04923

研究課題名(和文) 脳内における化学物質の空間分布評価システムの研究

研究課題名(英文) Development of biomonitoring system for assessment of spatiotemporal distribution of chemical substances

研究代表者

工藤 寛之 (KUDO, HIROYUKI)

明治大学・理工学部・専任准教授

研究者番号：70329118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臓器・組織由来の乳酸分泌量と空間的な分布を連続計測するシステムについて開発を進め、特に脳内のエネルギー代謝に伴う乳酸生成のリアルタイム計測に応用するとともに開発した技術の更なる応用展開についても検討した。研究機関全体を通じた成果として、新規に開発したシステムを用い、(1)脳標本から分泌する乳酸量の連続計測を行い、その変動がブドウ糖濃度と相関する様子を実験的に示した。(2)またこの検出される乳酸量が標本への化学的刺激に依存することを明らかにした。(3)加えて、本システムが臓器・組織のみならず個体レベルでのモニタリングにも応用可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生命現象に対する理解は興味の対象とする生命のスケール(タンパク質等の分子から細胞、臓器等)に特化しており、異なるスケールでの知識の有機的な結びつきという点では未だ課題が多い。そこで、スケール非依存的に生体の分泌物がいつ・どこから・どの程度分泌されるかモニタリングする技術を開発し、特に脳標本のエネルギー代謝に伴う乳酸の分泌を連続計測した。また本システムが個体レベルでの計測にも応用できることを確認した。本研究を通じて、様々な生体のスケールで、物質の変化としての生命活動をより精緻に捉えることが可能となるとともに、医療や運動など暮らしの中でのモニタリングにも利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A biomonitoring system aimed at assessment of lactic acid secretion from living organ sample was developed and utilized in brain lactic acid monitoring. Also, the biomonitoring system was tested in other applications. Using the biomonitoring system, (1) lactic acid produced in metabolic activity in block brain samples, (2) dependence of lactic acid secretion on the biochemical stimulation. (3) Also, our system was confirmed to be useful not only in the monitoring of organ level phenomenon, but also useful in monitoring of body fluids within individual-levels.

研究分野：マイクロ・ナノ科学

キーワード：生体計測 バイオマイクロシステム 電気化学 乳酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生命現象に対する理解は興味の対象とする生命のスケール（タンパク質等の分子から細胞、臓器等）に特化しており、異なるスケールでの知識の有機的な結びつきという点では未だ課題が多い。そこで、スケール非依存的に生体の分泌物がいつ・どこから・どの程度分泌されるかモニタリングする技術を開発し、特に脳標本のエネルギー代謝に伴う乳酸の分泌を連続計測した。また本システムが個体レベルでの計測にも応用できることを確認し、様々な生体のスケールで、物質の変化としての生命活動をより精緻に捉えることを可能とし、また医療や運動など暮らしの中でのモニタリングにも利用できる可能性を実験的に示す必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、脳など臓器・組織の標本より分泌される成分をサンプリングし、その空間的な分布と時間変化を同時計測可能なバイオマイクロシステムを開発する。このシステムを用いて、脳やその他の臓器・組織の状態変化に伴う分泌物の濃度変化をモニタリングし、生命活動、特に脳の活動を支える物質的基盤を明らかにするためのツールを提案することが目的である。より具体的な計画の一例として、平成30年までの研究期間の間に薬剤の投与や環境変化による代謝状態の変化を分泌される乳酸分泌量として評価し、その動的な相関関係を明らかにする。また同システムの有用性を確認したうえで、多様な臓器、あるいは個体レベルでのバイオモニタリング技術への応用にも展開する。

3. 研究の方法

本研究では、臓器・組織から分泌される生体成分を連続計測することと、そのシステムをベースとして個体レベルの生体成分モニタリングに適用できることを示すことが目的としている。特に、臓器レベルで生命活動をモニタリングする技術として、ブロック脳標本の乳酸産生をリアルタイムにモニタリングし、代謝活動を評価するシステムを構築した。

具体的には、脳標本をリアルタイム計測するための小型チャンバ、脳内の乳酸とブドウ糖を同時並行的、かつ選択的に計測するためのバイオセンサ、サンプリングした分泌成分をブドウ糖用の電極と乳酸用の電極にそれぞれ導入するためのマイクロフローチャネルを開発し、図1に示すような実験系を構築した。このフロー式のバイオモニタリングシステムを用いて脳標本由来の乳酸をモニタリングするとともに、個体レベルでの乳酸計測に適した最適化を行い、人の汗中乳酸計測にも応用できるか調べた。

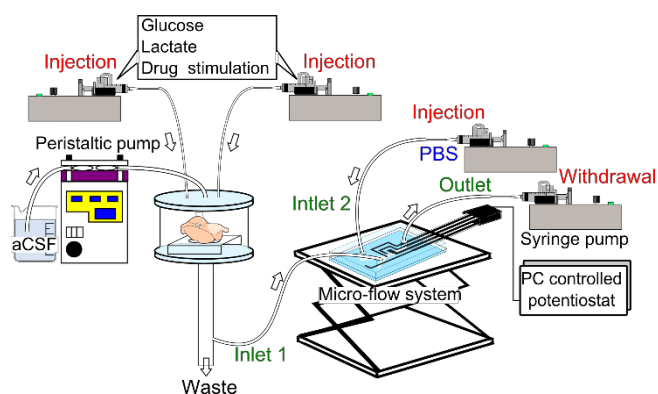


図1. 開発した乳酸モニタリングシステム（論文6より抜粋）

4. 研究成果

平成28年度は脳内成分の空間的・時間的な変化をモニタリングする新しいマイクロフロー計測技術に必要なセンサデバイスの改良と、生体試料サンプルの評価を行った。(1)センサデバイスの開発では、オスミウム錯体をメディエータとして用い、西洋わさび由来ペルオキシダーゼによって酸化酵素の反応生成物である過酸化水素の分解を電気化学的に計測する、酵素センサを開発した。センサの作製では一つのカウンター電極並びに参照電極と、二つの同一形状を有する作用電極を1チップ上に集積化し、片方の作用電極にのみ酸化酵素を固定化した。両作用電極の出力差を計測する事で、酵素反応以外の夾雑物による影響(分泌成分に由来するノイズ)を打ち消すことが可能となり、多様な成分を含む生体液中の乳酸をより選択的に計測することが可能となった。(2)樹脂製のスタンプ表面に酵素溶液を浸潤させ、電極上に転写するスタンプ式酵素固定化法を開発し、乳酸センサに応用した。スタンプ材料の最適化を行ったところ、メラミン樹脂製のスタンプが酵素スタンプに適していることが確認され、本手法を用いて作製したセンサは応答速度が従来法の約60秒から8秒へと向上し、リアルタイムでの脳内乳酸計測に適していることが示された。この応答性の向上は、当該固定化方が薄く均一な酵素膜の形成に有用であったためである。(3)流路系の改善では、従来PDMS製のフローチャネルをスクリーン印刷にて形成した電極上に直接貼り付けていたが、電極とPDMSの間に中間層としてPVC製のレイヤーを形成することで、電極近傍におけるキャリアフローの滞留やリークが解消され、上記応答速度

の向上に資することが確認された。

平成 29 年度においては、システムの最適化を中心に研究を進めた。脳標本を使用する実験では人工脳脊髄液(aCSF)を使用するが、これには高濃度(10mM)のグルコースが含まれている。本研究で開発したグルコース電極の定量範囲は $10 < [\text{Glucose}(\mu\text{M})] < 2000$ であり、ダイナミックレンジを超えている。これは、グルコース 酸化酵素の触媒活性が律速となるためである。aCSF 中に含まれる高濃度のグルコースを計測する為にはサンプルそのものの濃度を希釈する必要がある。そこで、乳酸のリアルタイム計測における感度を犠牲にすることなく、グルコースを計測する際のみ PBS を常時供給することでサンプルを希釈しながら計測するための微小流路を考案した。具体的には、サンプルと PBS が 1:2 の割合でセル内に導入されるデバイスを構築し、グルコースを計測する際にサンプルの濃度を約 1/3 に希釈することを可能とした。これにより脳標本由来の分泌物の動態が、グルコースの濃度にどのように依存するかを調査することが可能となった。また、開発しているシステムの更なる応用展開についても詳細な検討を開始した。当初より、本システムが生体由来の分泌物をリアルタイム計測する目的に有用 であることから、注目する対象のスケールを個体レベルとした場合の応用についても言及してきた。システムの改良に伴って、これらの応用についても現実的なものとなってきたので、皮膚表面からの乳酸計測に本システムを応用し、その有効性を確認した。

平成 30 年度においては、本システムを用いて実際に生体試料(臓器から個体までを含む)のモニタリングを行う応用面での研究に著しく進展が見られた。具体的には、脳標本由来の乳酸を連続的にモニタリングし、その標本に化学的刺激を加えることで乳酸量が増加する様子を明らかにした。また、研究実施計画に示した通り検出用のバイオセンサにバリエーションを持たせ、多様な物質への応用展開も行った。特に、汗中の乳酸においては運動や医療現場でのモニタリングに利用できる可能性を実験的に示し、その成果は本年度より実施予定の研究課題(基盤 C:19K04432)の基盤となっている。またオキシトシンなどのペプチドホルモンの計測が可能な電気化学免疫センサも開発し(Proc. BMEiCON2018, Doi:10.1109/BMEiCON.2018.8609952)、乳酸以外の生体成分についても適用可能とした。

図2を見ると、脳に供給するブドウ糖量が増加すると、分泌する乳酸量も減少することがわかる。系に乳酸を供給していないにも関わらず、このような変化を示すことから、脳の活動に伴う乳酸の分泌をモニタリングできることが実験的に示された。

加えて本システムを個体レベルの生体モニタリングとして汗中の乳酸モニタリングに適用するため最適化を施し、運動中の汗中乳酸のリアルタイム計測に適用した。この結果について IEEE-NEMS2018(国際会議 1)等で報告した。

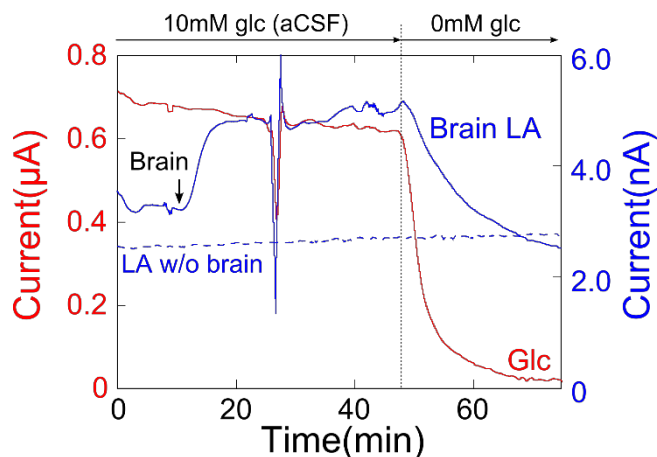


図2. 脳標本へのブドウ糖の供給低下に伴う乳酸分泌量の変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Tojo Y., Saito H., Enomoto K., Kudo H., “Sweat Lactic Acid Biosensor using Continuous Flow as Sample Career,” IEEE xplore digital library, Proc BMEiCON 2018. DOI: 10.1109/BMEiCON.2018.8609931
2. Ikemoto Y., Imamura Y., Takagi Y., Kudo H., “Simplified Salivary Uric acid Sensing System using a Filter paper for Saliva Colle,” IEEE xplore digital library, Proc BMEiCON 2018. DOI: 10.1109/BMEiCON.2018.8609993
3. Asano A., Shiibashi M., Kudo H., “Development of an Electrochemical Immunosensor for Salivary Oxytocin Determination,” IEEE xplore digital library, Proc BMEiCON 2018. DOI: 10.1109/BMEiCON.2018.8609952
4. Enomoto K., Jingushi Y., Kudo H. “Sweat Lactic Acid Monitoring System for Assessment of Exercise Intensity,” ECS Trans., 75(52), 2017, pp. 61-66. DOI:10.1149/07552.0061ecst

5. 榎本圭吾, 清水亮佑, 工藤寛之. 「運動負荷の評価を目的とした皮膚表面における乳酸分泌量のリアルタイム計測システム」電気学会論文誌E (センサ・マイクロマシン部門誌), 137, 2017, pp. 450-454. DOI: 10.1541/ieejsmas.137.450
6. Negishi S., Kamada S., Kajiwara R., Kaneko Y., Dong H. Y., Sekiguchi T., Shoji S., Kudo H., “Development of an ex vivo Brain Lactic Acid Monitoring System,” IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, 137, 2017, pp. 38-43. DOI: 10.1541/ieejsmas.137.38
7. Kamada S., Negishi S., Takashima I., Kudo H., Kajiwara R., “Continuous Lactic Acid Monitoring System for various ex-vivo Block Preparations,” Proc. Life Eng. Symp. 2016, 2016, pp. 244-246. ISSN: 21879605

以上、すべて査読あり

[学会発表] (計 23 件)

招待講演

1. Kudo H., “Simplified Biomonitoring Systems for Healthcare IoT,” to be presented at The 13th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS2018), 22-26, April 2018, Singapore.
2. Kudo H., “Development of Biochemical sensors aimed at Healthcare IoT,” 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 18-20 January 2018, Tokyo, Japan.

国際会議発表

1. Suzuki Y., Kawai N., Hosoyama A., Morisawa K., Taira Y., Kudo H., “Development of Continuous Sweat Lactic Acid Monitoring for Clinical Applications,” 13th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2018), 22-26, April 2018, Singapore.
2. Enomoto K., Kurose T., Kudo H., “Telemetric lactic acid Monitoring System for Real-time Assessment of Exercise Intensity,” 2018 International Conference on Agriculture, Food and Biotechnology (ICAFB 2018), 24-26 January 2018, Bangkok, Thailand.
3. M. Izzat. F. Z., Kamada S., Tojyo Y., Takashima I., Kudo H., Kajiwara R., “Continuous Quantitative Measurement of Lactic-Acid released from an in-vitro Mouse Brain Slice using Electrochemical Biosensor,” 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 18-20 January 2018, Tokyo, Japan.
4. Kamada S., Negishi S., Takashima I., Kudo H., Kajiwara R. “Real Time Monitoring System for Lactic Acid Released from Ex-vivo Preparations,” Society for Neuroscience 2017, 11-15 November 2017, Washington D.C., USA.
5. Enomoto K., Shimizu R., Kudo H., “Microfluidic Lactic Acid Monitoring System based on Electrochemical Biosensor for Non-invasive Evaluation of Metabolic Activity,” The 4th Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering, 20-22 June 2017, Hanoi, Vietnam.
6. Kamei K. and Kudo H., “Basic Research on a Miniaturized Immunosensor for Fast Measurement of Oxytocin,” The 4th Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering, 20-22 June 2017, Hanoi, Vietnam.
7. Kawai N., Kurose T., Kudo H., “Fundamental Study on Continuous Sweat Lactic Acid Monitoring for Clinical Applications,” The 4th Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering 20-22, June 2017, Hanoi, Vietnam.
8. Negishi S., Kamada S., Kajiwara R., Kudo H., “Microfluidic Multi-Analyte Biosensor for Ex Vivo Brain Monitoring,” 7th International Conference on Bioscience, Biochemistry

and Bioinformatics, 21-23 January 2017, Bangkok, Thailand.

9. Kudo H., "Continuous Lactic Acid Monitoring System for Non-invasive Assessment of Anaerobic Metabolism," 2017 International Conference on Biological Engineering and Natural Sciences (ICBENS), 21-23 February 2017, Singapore.

国内学会発表

1. 東條良紀, 齋藤晴名, 工藤寛之. 「パッド印刷電極を用いたスロットイン型バイオセンサの開発」第 35 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2018 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 札幌.
2. 鈴木悠亮, 工藤寛之, 細山明子, 森澤健一郎, 平 泰彦. 「救急医療への応用を目的とした医療用汗中乳酸モニタリングシステムの開発」, 第 35 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2018 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 札幌.
3. 浅埜愛理, 椎橋真子, 工藤寛之. 「唾液中オキシトシン計測を目的とした小型免疫計測システムに関する研究」, 第 35 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2018 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 札幌.
4. 鈴木悠亮, 河合 望, 工藤寛之, 細山明子, 森澤健一郎, 平 泰彦. 「連続的かつ非侵襲的な代謝評価を目的とした医療用汗中乳酸モニタリングシステムの開発」, 平成 30 年電気学会全国大会, 2018 年 3 月 14 日-16 日, 福岡.
5. 池本有輝, 高木優樹, 工藤寛之. 「濾紙による簡便な唾液採取を特徴とした唾液中尿酸計測システム」, 平成 30 年電気学会全国大会, 2018 年 3 月 14 日-16 日, 福岡.
6. 工藤寛之, 高木優樹. 「HRP 酸化還元反応を用いた唾液中尿酸計測用マイクロシステムに関する研究」電気学会フィジカルセンサ研究会, 2017 年 11 月 17 日, 金沢.
7. 榎本圭吾, 高山健人, 工藤寛之. 「小型パッチ式乳酸モニタリングシステムの運動時における代謝状態のリアルタイム評価への応用」, 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 広島.
8. 高木優樹, 林周平, 工藤寛之. 「唾液中尿酸計測のための小型バイオセンシングシステム」, 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 広島.
9. 林周平, 高木優樹, 工藤寛之. 「唾液中尿酸計測のための小型バイオセンシングシステム」, 平成 29 年電気学会 E 部門総合研究会, 2017 年 6 月 29-30 日, 姫路.
10. 河合望, 榎本圭吾, 工藤寛之. 「乳酸計測用マイクロフロー計測システムを用いた長時間連続計測の検討」, 平成 29 年電気学会全国大会, 2017 年 3 月 15-17 日, 富山.
11. 鎌田翔仁, 根岸周也, 高島一郎, 工藤寛之, 梶原利一. 「Ex-vivo 生体組織標本からのリアルタイム乳酸計測システムの開発」, 計測制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2016, 2016 年 11 月 3 日-5 日, 大阪.
12. 榎本圭吾, 清水亮佑, 工藤寛之. 「運動負荷の評価に向けた皮膚表面における乳酸分泌量のリアルタイム計測システム」, 第 33 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2016 年 10 月 24-26 日, 平戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：梶原利一

ローマ字氏名：Riichi Kajiwara

所属研究機関名：明治大学

部局名：理工学部

職名：専任准教授

研究者番号（8桁）：60356772

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。