

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号： 12602
研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間： 2017～2019
課題番号： 16KK0143
研究課題名（和文）疾患スクリーニングを目指した生体ガスモバイル診断システムの創生（国際共同研究強化）
研究課題名（英文）Toward development of mobile diagnostic system via human volatolome for disease screening(Fostering Joint International Research)
研究代表者
荒川 貴博（Arakawa, Takahiro）
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師
研究者番号：50409637
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円
渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：University of California Los Angeles校のOzcan教授の研究室に長期出張し、Ozcan教授グループと国際共同研究を行った。生体由来の化学成分に対し、高い選択性を有する連続的かつ生体由来の成分を計測・画像化する新規のイメージングシステムの実現を目指し、疾患や身体の代謝や生理的状态に伴い生体から放出される揮発性成分をイメージングするシステムを構築することができた。このイメージングシステムの小型化や新しいモバイルイメージングシステムの開発を行い、国際共同研究を進めることができた。滞在先で習得した技術や知識を活用して、引き続き研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外国の研究室での共同研究を通して、日本以外の研究室における研究に対する考え方や取り組み方について身をもって学ぶことができた。研究成果においては基盤研究での研究成果をもとに、現地での実験を行い、教授やポスドクなどと議論をし、新しい研究プロジェクトの立案などの経験もできた。研究成果としては新しい計測装置を一から作製することができ、現在評価を進めている。これまでの専門と違う研究者とも共同研究することができ学術的にも意義の高い研究を実施することができた。また、所属していた研究グループ以外の研究者とのネットワークを構築することもでき、今後更なる研究の発展を目指していきたい。

研究成果の概要（英文）：I visited Prof. Ozcan's laboratory at the University of California Los Angeles (UCLA) for international collaborative research. I focused on the realization of a novel imaging system for the measurement and imaging of continuous, bio-derived components with high selectivity for bio-derived chemical components. I was able to construct a system for imaging volatile components released by living organisms in response to disease and the body's metabolic and physiological states. I was able to miniaturize this imaging system and develop a new mobile imaging system, which allowed me to pursue international collaborative research. I gained a lot of skills and knowledge through my research. And we are continuing our research.

研究分野：計測工学

キーワード：イメージング モバイル装置 CMOS 酵素 モバイルデバイス 蛍光イメージング 計測工学

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

生体では代謝に伴い体外に発せられる「生体ガス情報」を利用した診断法として、尿素呼気試験法や口臭診断等の呼気を用いた非侵襲的な診断法が用いられているが、呼気採取を要するため連続計測が難しく、拘束性を伴うなどの課題がある。現在、主に診断に用いられている生体ガス情報として口臭診断がある。この診断では、ガスクロマトグラフィや半導体式ガスセンサを用いる方法があるが、感度には優れるものの、簡便性や選択性に課題がある。また、医師が患者の口臭を直接嗅いで口臭の有無や強度を判定する手法では、嗅覚の個人差により感じる臭いの強さが異なるため診断者の主観に左右されやすく、生体ガス情報を用いた診断基準は明確でないのが現状である。

生体由来のガス成分としては、呼気と同様に皮膚ガス中にも疾患や身体の生理的狀態に伴う揮発性化学成分が含まれることが報告されており、様々装置が開発されている。これまでに身体から放出される皮膚ガス中に含まれる揮発性化学成分としては、糖尿病患者においてアセトン計測した例が報告されているが、これはサンプリングを行い、ガスクロマトグラフにより計測するため、装置が高価、操作が複雑といった課題とともに、連続計測ができないことから経時的な分泌動態情報が得られず、有効な手段となっていない。さらに、皮膚ガス中成分は呼気成分に含まれる量と比較すると低濃度であり、簡便性・感度・高い選択性を兼ね備えた皮膚ガス計測法は存在しない。そのような理由から、皮膚ガス中の生体代謝に伴うガス成分を高感度かつ選択的に、そして連続的に計測する技術が求められている。特に皮膚ガス成分の空間的・時間的情報を兼ね備えたイメージングが可能となれば、発生部位の特定や濃度の連続測定が可能なる非侵襲な疾患スクリーニング法として応用が可能と考えられる(図1)。

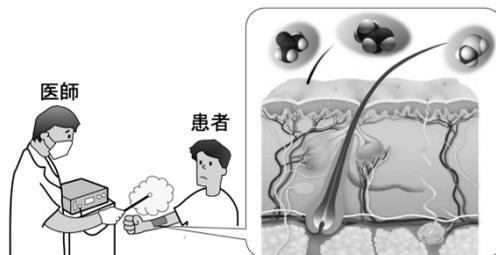


図1 生体代謝ガスのイメージングを利用した疾患スクリーニングにおける応用イメージ

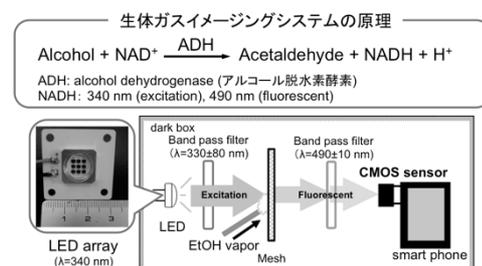


図2 生体ガスイメージングシステムの概略図と測定原理

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体由来のガス成分に対し、高い選択性を有する連続的かつ生体由来ガス成分を画像化するイメージングシステムの開発である。疾患や身体の代謝や生理的狀態に伴い生体の皮膚表面から放出される生体代謝ガス成分を可視化(イメージング)するシステムの構築を目指している。

生体代謝ガス成分と特異的に反応する酵素を固定化した担体上で生じる自家蛍光を有するNADHによる蛍光をCMOSカメラで生体ガス成分の放出に伴う画像として撮影するイメージングシステムを構築する(図2)。対象成分としてまずエタノールガスでの基礎特性の評価を行い、アセトンガスへと展開する。本研究での計測部位は手、首などの皮膚表面にて生体代謝ガスの放出動態の可視化を目指し、イメージングシステムを設計し、評価を行う。さらに、マイクロ流体システムを利用したバイオセンサについて検討を行い、長時間安定評価が可能なるバイオイメージングデバイスの作製を行う。また、Prof. Ozcanのグループが開発しているモバイルイメージング装置の開発技術と融合することで、簡易的に撮像できる装置の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) バイオセンサとマイクロデバイスを融合したイメージングシステムの構築

生体触媒である酵素を利用したイメージングでは、酵素の分子認識機能はタンパク質の熱変性、長時間使用、反応生成物の影響により機能が低下、失活してしまう影響がある。そこで温度管理や試薬循環によりタンパク質の機能の維持を目的としたマイクロデバイスとの融合について検討を行う。イメージングに用いる酵素を固定化する担体の選定の検討を行う。当初は酵素のドットパターンを形成することを検討したが、設備の課題が有り、担体をレーザー加工により微細なパターンを形成する手法を選択した。酵素パターンを作製したメッシュの面への試薬の拡散が考えられるため、反応試薬、酵素機能、出力の安定化に関わる緩衝液を供給できるようなマイクロデバイスとイメージングに用いるバイオセンサを一体とした系を検討する。

(2) 生体成分の計測に向けたイメージングシステムの構築

酵素を用いたバイオセンシングによるイメージング条件の最適化とCMOSイメージセンサを利用した可視化装置の開発を行う。UCLAのProf. Ozcanのグループの構築しているモバイル診断装置の技術を応用し、現状では卓上サイズの生体ガスイメージングシステムをスマートフォンを用い、簡便かつ安価に生体ガスの計測・評価が可能なる可視化システムの構築を目指す。バイオセンサを組み合わせ、モバイル生体ガス診断装置を作製し、評価する。

4. 研究成果

(1) 酵素固定化担体の選定

酵素固定化材料として、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC)とメタクリル酸 2-エチルヘキシル (EHMA) の共重合体 (PMEH)、およびグルタルアルデヒド (glutaraldehyde, GA, 25%水溶液)を検討した。コットンメッシュ担体に、PMEH または GA を用いて二級アルコール脱水素酵素 (secondary alcohol dehydrogenase, S-ADH) 2 unit (1 unit/mg) を固定したメッシュと、親水性のポリテトラフルオロエチレン (H-PTFE) 膜に PMEH を用いた固定化膜をそれぞれ準備し、リン酸カリウム緩衝液にて調製した NADH 溶液を湿潤させた。そして可視化システム内に設置し、アセトンガス 1 ppm の負荷による蛍光強度の減少を測定した。なお比較として、固定化材を用いずに S-ADH をコットンメッシュへ物理吸着させた酵素メッシュについても実験を行った。

最後に、H-PTFE 膜の加工および膜の種類について検討を行った。H-PTFE 膜にガス透過用の貫通孔を設けるため、メッシュパターン 2 種 (square 型 (図 2-(a))、honeycomb 型 (図 2-(b))) の図面を作成し、CO₂ レーザー加工機にて、レーザー強度およびスキャンスピードを最適化したのち、H-PTFE 膜にメッシュ加工を行った。そして、H-PTFE メッシュを 15×15 mm² に切り出し、PMEH を用いて S-ADH を固定化し、作製した酵素固定化メッシュを用いてアセトンの可視化計測を評価した。

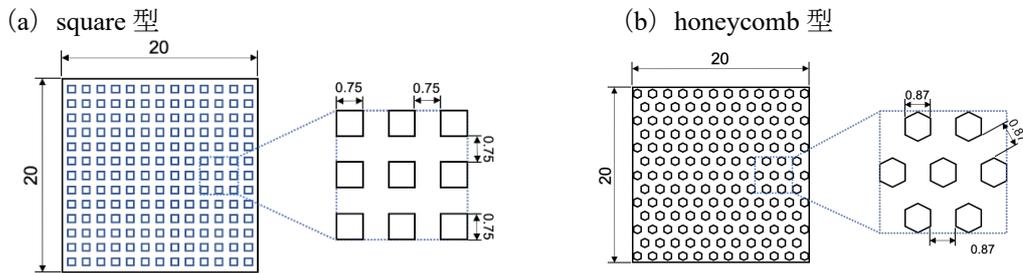


図 3 H-PTFE 膜に設けた貫通孔の模式図 (a)square 型 (b)honeycomb 型

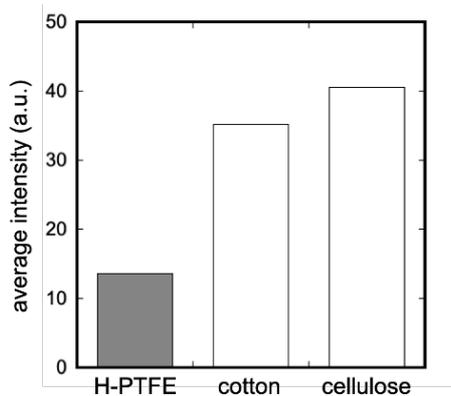


図 4 担体および固定化材の組み合わせによるアセトンガスに対する出力比較

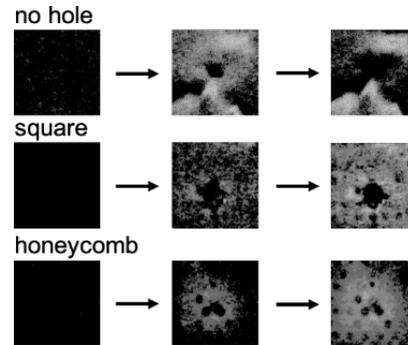


図 5 レーザー加工により作製した貫通孔の有無および形状による蛍光変化の様子

アセトンガスの可視化での酵素固定化用として、3 種の担体の自家蛍光を調べた。図 4 に示すように、蛍光強度を比較したところ、H-PTFE はコットンとセルロース膜に比して、低い自家蛍光を示した。天然由来の繊維中には、リグニンなどの共役系化合物が多く含まれるため、コットンやセルロースでは自家蛍光が生じるものと考えられる。

次に、H-PTFE 膜とコットンメッシュに S-ADH を GA 架橋および H-PTFE によって固定化し、標準アセトンガスの負荷による蛍光変化を比較した。H-PTFE 膜に PMEH で固定化した場合に、最も高い出力が得られ、S-ADH を PMEH にて包括固定することが最適と確認された。

しかし、H-PTFE 膜に PMEH を用いた酵素膜では、アセトンガス負荷による NADH 蛍光の減少は観察できたものの、蛍光分布のバラツキが観察された。原因として、ガスを負荷した際に H-PTFE 膜上のガスの滞留が考えられた。そこで、H-PTFE 膜に貫通孔を設けることでバラツキの抑制を検討した。square 型と honeycomb 型に加工した H-PTFE メッシュ (図 3) を用いてアセトンの可視化計測を行った結果、貫通孔を設けなかった場合と比較して蛍光分布のバラツキが減少し、特に honeycomb 型ではガス負荷点を中心とする蛍光の変化が観察された (図 5)。honeycomb 型の H-PTFE メッシュを用いることでアセトンガスの計測が可能であると確認された。H-PTFE を用いた PMEH での S-ADH メッシュではアセトンガス負荷前後の蛍光安定性やガス負荷点付近の乾燥に課題がある。そこで、H-PTFE 膜の孔径と膜厚による NADH 溶液の保持能力やガス負荷による膜乾燥への影響を調べた。実験の結果、Millipore 製の孔径 10 μm 膜厚 85 μm の H-PTFE 膜を用いることで、比較的良好なアセトンガスの可視化計測が可能であった。

(2) 酵素イメージングの最適化と CMOS イメージセンサを利用した可視化装置の開発

S-ADH 固定化メッシュにおける酵素量の最適化を行った。酵素メッシュは CO₂ レーザー加工機にてハニカム構造状に加工した H-PTFE メッシュに各濃度 (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 unit/cm²) に調整した S-ADH 20 μL と 10% PME₂H 20 μL の混合液を滴下し、4°C の冷暗所にて 3 時間乾燥させて作製した。次に、酵素メッシュを 500 μM NADH 溶液 40 μL に湿潤させ、暗箱内に設置した (図 6)。そして、メッシュの裏側からアセトンガス (1 ppm, 60 ml/min) を負荷し、酵素反応により減少した蛍光を高感度カメラにて撮像し、画像処理にて数値化することで酵素量による出力と応答性への影響を調べた。また、本システムの至適 pH も調べた。各 pH の緩衝液 (acetate: 3.0–5.0, potassium phosphate: 5.0–8.5, carbonate bicarbonate: 9.0–11.0) にて調製した 500 μM の NADH 溶液を S-ADH 固定化メッシュに湿潤し、標準アセトンガスを負荷した際の出力を比較した。そして、アセトンガスに対する出力応答性を向上させるため、画像解析ソフトで蛍光動画を微分解析を行った。

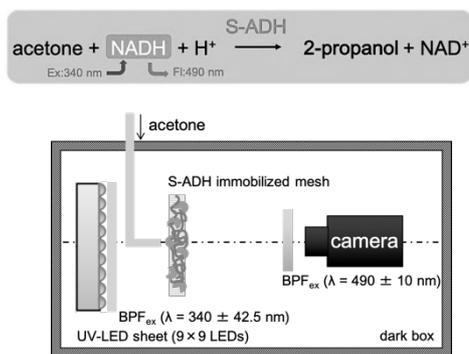


図 6 S-ADH を用いたアセトン計測原理とアセトンガスの可視化装置の概略図

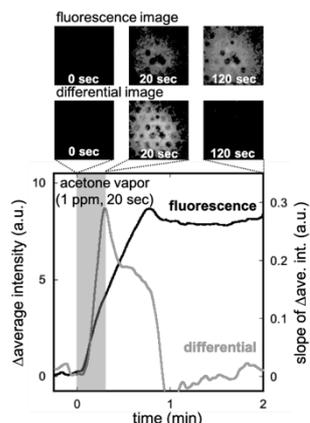


図 7 アセトンガス (1 ppm) に対する蛍光強度変化 (黒) と微分解析の結果 (赤)

可視化システムについて、最適な pH の検討を行った。各 pH の緩衝液で調整した NADH 溶液 (500 μM, 40 μl) を S-ADH 固定化メッシュに塗布し、アセトンガス (1 ppm) を負荷した際の出力応答を比較した結果、pH6.5 のリン酸カリウム緩衝液を用いた際に最大の出力が観察された。

上記条件にて作製した酵素メッシュにて標準アセトンガスを負荷した結果、負荷点を中心とした蛍光の減少、そして負荷後は速やかに蛍光強度が安定する様子が観察された (図 7 上画像)。そして、得られた動画を解析し、その蛍光強度を求めたところ、図 7 下のような経時変化が得られた。しかし、アセトン負荷にて NADH が酸化されると NAD⁺ が生成され、メッシュ上に残留するため、濃度分布の変化を示すことができない。そこで、微分解析を用いて蛍光強度の単位時間あたりの変化速度を求め、動画として表示することとした。まず、微分解析における変化速度の最大値を評価するため Δt の値を検討した。移動平均後 Δt を 2 sec とすることで、ピークを持つ微分値として算出可能となった。

ガス負荷に応じた出力上昇と濃度に応じた蛍光強度とピーク値が観察された。上記の結果をもとに、蛍光強度の定常値と微分解析のピーク値からアセトンガス濃度に対する定量性を調べたところ、蛍光強度・微分解析の両方においてアセトンガスの計測を実現することができた。

(3) 呼気アセトンガスの可視化計測システムの構築

生体由来の成分の可視化計測を行った。作製した酵素メッシュを、リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5, 100 mM) を用いて 500 μM に調節した NADH 溶液 40 μL を用いて湿潤させ高感度 CMOS カメラとともに暗箱内に設置した。メッシュ担体の裏側から 2 mm の位置に呼気流量制御装置を用いて導入した呼気を負荷し、酵素反応により消費した蛍光を連続撮影した。

呼気流量制御装置を用いて、健康被験者の空腹 6 時間の呼気を直接可視化システムに負荷した際の蛍光の様子を図 8 に示す。標準アセトンガスと同様に、呼気負荷に伴う酵素固定化メッシュ上における蛍光強度の速やかな変化が確認され、その後定常化する様子が確認された。画像解析にて算出された平均蛍光強度と微分解析による蛍光強度の変化速度の経時変化を評価し、得られた定常値から、検量式を元にして呼気中のアセトンガス濃度を算出すると、800 ppb と確認された。生体ガス成分を開発した可視化システムを用いて、定量することも可能であった。

現在、今回構築した生体ガスのイメージング装置を、より簡便なシステムとして実現するため、モバイル端末の CMOS イメージセンサを利用した可視化装置での評価を進めている。

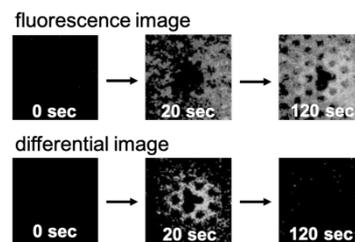


図 8 呼気アセトンガスの可視化イメージ(上)蛍光画像と(下)微分解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arakawa Takahiro, Suzuki Takuma, Tsujii Masato, Iitani Kenta, Chien Po-Jen, Ye Ming, Toma Koji, Iwasaki Yasuhiko, Mitsubayashi Kohji	4. 巻 129
2. 論文標題 Real-time monitoring of skin ethanol gas by a high-sensitivity gas phase biosensor (bio-sniffer) for the non-invasive evaluation of volatile blood compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 245 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Arakawa T, Suzuki T, Tujii M, Chien P-J, Ye M, Toma K, Iwasaki Y, Mitsubayashi K
2. 発表標題 Direct skin gas monitoring system using high-sensitive ethanol bio-sniffer (gas-phase biosensor) by detecting NADH consumption on enzymatic reaction
3. 学会等名 Biosensors 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arakawa T, Ye M, Toma K, Mitsubayashi K
2. 発表標題 Acetone bio-sniffer (biochemical gas sensor) for breath acetone as a volatile organic compound of lipid metabolism
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development (iLIM-3)（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arakawa T, Mitsubayashi K
2. 発表標題 Fluorometric sniff-cam (gas-imaging system) for breath and skin gas analysis
3. 学会等名 International conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS & Applications (Bio4Apps2018/2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Arakawa, Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Non-Invasive Biosensing for Preemptive Medicine
3. 学会等名 Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS)2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	オズキャン エイドガン (Ozcan Aydogan)	カリフォルニア大学ロサンゼルス校・電気情報工学科・教授	