

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01759

研究課題名(和文) 疾病・代謝由来の低濃度な生体臭成分(皮膚ガス)を高感度計測する生化学式ガスセンサ

研究課題名(英文) Highly sensitive bio-sniffer devices for body volatile chemicals related to diseases and metabolism

研究代表者

三林 浩二 (Mitsubayashi, Kohji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：40307236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体ガス成分は疾患や代謝に関連する新しいバイオマーカー候補として報告されている。本課題では、酵素固定化した光学プローブを気液セルに組み込み、さらにガス濃縮装置を用いることで、ガス計測用の蛍光バイオスニファを構築した。実験では、二級アルコール脱水素酵素(S-ADH)を、生体適合性ポリマーを用いた酵素捕捉技術により多孔質膜に固定化し、アセトン用バイオスニファを作製した。開発したセンサは、酵素の特異性に基づくガス選択性を示し、サブppbレベルの高感度なアセトンガス計測が可能であった。また生体応用として皮膚ガス計測を行ったところ、有酸素運動等の脂質代謝に関わる皮膚アセトンガスを測定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発したセンサでは、ガス認識素子として酵素を用い、また光学的な検出素子と組み合わせることで、高いガス選択性と高感度なガス計測を実現した。特に、疾病や代謝に基づき呼気や皮膚ガスとして放出される生体ガスの高感度計測に適しており、非侵襲にて血液由来のガス成分を経皮計測を可能とした。また本センサは認識素子である酵素を交換することで、多様なガス成分の計測も可能で今後、早期の疾病スクリーニングや非侵襲での代謝評価などへの応用が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human volatile components have been reported new biomarker candidates related to some diseases and metabolic conditions. In this project, a fluorometric bio-sniffer device was constructed by incorporating an optical probe into a gas/liquid cell with enzyme diaphragm for detecting a target volatile chemical. Secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) was immobilized into a porous membrane by an enzyme entrapping technique with a biocompatible polymer and applied to bio-sniffer device for a gaseous acetone measurement. The sensor was able to measure acetone vapor (sub-ppb level) with good selectivity based on the specificity of the enzyme. As the physiological application, the sensor also succeeded to be applied for measuring skin acetone vapor involved in lipid metabolism such as aerobic exercise.

研究分野：センサ医工学

キーワード：皮膚ガス ガスセンサ 疾病 代謝 高感度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌探知犬の話題に伴い、生体臭による癌診断が世界的に注目を集めている。癌に限らず、疾病・代謝に基づく臭気成分が呼気や皮膚ガスに反映することは医療現場では良く知られており、高感度な人工アセトンは脂質代謝にて生成され、呼気や皮膚ガス嗅覚(ガスセンサ)が期待されている。加えて、簡便かつ迅速な生体ガス計測が可能となれば、日常生活にて早期の疾病スクリーニングが行え、高齢化により医療費が増大する日本において極めて有効であり、世界に展開できる新たな医療計測技術となる。

申請者は、これまでに酵素や抗体を生体認識素子として利用した「生化学式ガスセンサ」を開発してきた。本センサは、生体認識素子を用いることで極めて選択性が高く、他のガス成分や湿度の影響を受けることがなく、多様な成分や水分を含む「呼気や皮膚ガス」においても対象ガスの選択的な計測が行える。また近年、紫外線領域の発光ダイオードを励起光源として用い、匂い成分を連続計測できることを示した。

本課題では、紫外領域の光源として高輝度な UV-LED を用い、蛍光領域へのノイズを下げるためバンドパスフィルタを利用し、また高感度フォトマルチプライアを設備導入することで、高感度 NADH 蛍光検出系を作製し、高感度な生化学式ガスセンサの構築を行う。また皮膚表面からの低濃度ガスを高感度に計測するために、「微量ガス濃縮装置」を導入する。本装置は皮膚ガス成分の濃縮等を目的とし、低温凝縮捕集方式を用いることで、少量の皮膚ガスを濃縮する。この装置を上記のセンサに組み込むことで、低濃度な臭気成分の測定が可能で「超高感度なガスセンサシステム」を構築する。さらに「皮膚ガスフローシステム」を導入し、疾病・代謝に基づく微量な皮膚ガス成分の「高感度な生体ガス連続計測」を実現する。対象とする生体臭成分には、アセトンのほか、イソプロパノール、エタノール、アセトアルデヒド等とし、各化学成分を脱水素反応または還元反応する酵素を用い、高感度な生体臭センサへと発展させる。

2. 研究の目的

本申請課題では、嗅覚コミュニケーションの対象成分である“疾病・代謝に起因する低濃度の皮膚ガス成分を計測する「超高感度なガスセンサシステム」を、生化学式ガスセンサの技術に高感度光学検出系と微量ガス濃縮装置を導入し実現することを目標とする。

(1) 研究では、生体ガスの触媒が可能な酵素を認識素子として用い、その補酵素 NADH を高感度に検出するための高感度光学系を構築して、NADH 蛍光検出系を作製する。

(2) 次に、微量ガス濃縮装置を計測流路に組み入れ、皮膚ガス成分用の超高感度なガスセンサを構築する。そして皮膚ガスフロー系を導入し、疾病・代謝のマーカである皮膚アセトンガスを直接モニタリングし、生体臭計測による新たな診断法・代謝評価法へと発展させる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、疾病・代謝に起因する低濃度の皮膚ガス成分を計測する「超高感度なガスセンサ：人工嗅覚システム」の実現を目標としており、まず補酵素 NADH を高感度に検出するための高感度光学系を構築して、NADH 蛍光検出系を作製することが目標であった。そこで生化学式ガスセンサでは、生体ガス成分を酵素にて認識し、触媒反応へと導き、その際の補酵素 NADH が自家蛍光を検出し、対象ガス成分を測定することとした。アセトンガス計測は、2 級アルコール脱水素酵素 (S-ADH) の還元反応にて生じる NADH 濃度の消費による減少を UV-LED (340nm) を励起光源とし蛍光検知し、アセトンガスの測定を行った。まず紫外領域の光源として UV-LED を用い、蛍光領域へのノイズを下げるためバンドパスフィルタを利用し、また高感度フォトマルチプライアを設備導入することで、高感度 NADH 蛍光検出系を作製し、次に本蛍光検出系を用いて「生化学式ガスセンサ」の構築を行った。この「生化学式ガスセンサ」の構築では、S-ADH を固定化した酵素膜を隔膜とする「気液隔膜セル」を作製し、この液相セル側に NADH 蛍光検出系の光ファイバ先端を装着し、「生化学式ガスセンサ」とした。

(2) 次に、開発した「生化学式ガスセンサ」について、標準ガス発生装置を用いて、センサの最適化と特性評価を実施した。なお蛍光特性が少ない酵素固定化用の高分子材料 (MPC-co-EMHA) の合成を実施した。この MPC-co-EMHA で酵素触媒を H-PTFE 膜に包括固定化し、その酵素膜を気液隔膜セルの隔膜として光ファイバの感応部に装着して、蛍光計測プローブとした。なお光プローブと酵素膜とのギャップ、気相セルのガス流速、液相セルの緩衝液流速、緩衝液の pH 等について最適化を実施した。また初年度に導入した微量ガス濃縮装置について性能を評価した後、開発した「生化学式ガスセンサ」と組み合わせ、低濃度ガス成分を測定可能な「超高感度なガスセンサシステム」の開発を進めた。

(3) なお高感度ガスセンサ開発の応用である皮膚アセトンガス計測を検討したところ、当初の予想に反し、他のガス成分に比してガス濃度が低く、詳しく検討する必要があり、予算の繰越の事由が発生した (平成 30 年 12 月)。そこで、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) を導入 (レンタル) した。

(4) 開発したガスセンサシステムについて、低濃度ガス発生装置を用いて、センサ特性を詳細に評価した。さらに新たに「皮膚ガスフローシステム」(図1)をガスセンサに組み込み、低濃度な皮膚ガス成分の計測に適用し、倫理承認に基づき、被験者からの皮膚アセトンガス計測を行い、有効性を調べた。生体ガス計測では、発汗計測器を改良した「皮膚ガスフローシステム」をガスセンサシステムに組み込み、生体臭に含まれる低濃度成分の高感度な連続計測に適用した。

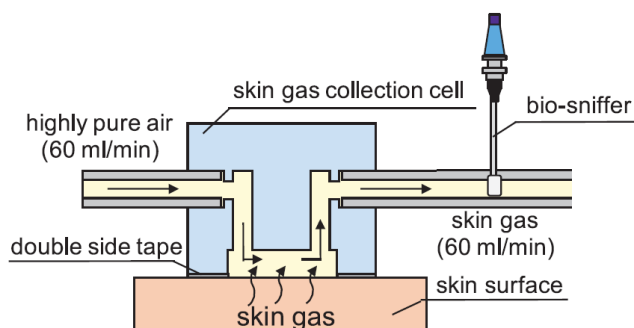


図1. 皮膚ガス計測のためのフローシステム

4. 研究成果

(1) S-ADH を固定化した酵素膜を隔膜とする「気液隔膜セル」を、液相セル側に NADH 蛍光検出系の光ファイバ先端を装着した「生化学式ガスセンサ」において、標準アセトンガスを付加したところ、気相セル側のアセトンガスが気液隔膜として機能する S-ADH 酵素膜に拡散し、液相セル側の NADH を消費しながら還元反応を生じ、この NADH の減少を光ファイバにて蛍光検出することで、アセトンガスを測定可能であった。また嗅覚の粘膜層のように液相セルの緩衝液を還流することで、pH の維持と、NADH の供給も行うことができた。

(2) 次に、蛍光特性が少ない酵素固定化用の高分子材料(MPC-co-EMHA)にて酵素触媒を H-PTFE 膜に包括固定化し、その酵素膜を気液隔膜セルの隔膜として光ファイバの感応部に装着したガスセンサに、初年度に先行導入した微量ガス濃縮装置を組み合わせた「超高感度なガスセンサシステム」について、光プローブと酵素膜とのギャップ、気相セルのガス流速、液相セルの緩衝液流速、緩衝液の pH 等について最適化を実施したのち、半連続的にガス成分の超高感度にセンシングを行ったところ、ガス発生装置の発生限界である数 ppb のアセトンガスの高感度計測を達成した。また、他の生体臭成分であるイソプロパノール、エタノール、アセトアルデヒドなどの成分についても、酵素を変更することで、選択的な計測が可能であった。

(3) 予算の繰越しにて導入したガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)にて、感度ガスセンサ開発の応用である皮膚アセトンガス計測を想定した低濃度ガスの定量を実施し、また酵素反応系の再検討と光学系の改良を実施したところ、sub-ppb レベルのガス計測を実現した(2019年9月末:6ヶ月延長)。

(4) 最後に、既設の低濃度標準ガス発生装置を用いてアセトンガスに対するセンサ特性を調べたところ、sub-ppb の定量特性を確認した。また呼気などに含まれる生体ガス成分をセンサ感応部に負荷したところ、酵素の基質特異性に基づく、アセトンガスに対する高い選択性が得られた。そして、生体ガス計測では、発汗計測器を改良した「皮膚ガスフローシステム」をガスセンサシステムに組み込み、生体臭に含まれる低濃度成分の高感度な連続計測に適用したところ、皮膚からの発汗を計測しながら、同時に皮膚アセトンガスの計測を可能とした。実験では、予め健康者にてアンケートを実施した後、皮膚アセトン計測を行ったところ、有酸素運動による脂肪代謝の増加に伴うアセトン濃度の上昇が確認され、開発したセンサの生体計測の有効性が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3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) 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 該当する
1. 著者名 Mitsubayashi Kohji	4. 巻 30
2. 論文標題 Cavitas Biosensors: Noninvasive Approaches to Blood Glucose Monitoring for Diabetes Mellitus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 2313 ~ 2313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/SAM.2018.2011	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 -
1. 著者名 三林浩二	4. 巻 86
2. 論文標題 5. バイオ蛍光式「バイオスニファ」「探嗅カメラ」による高感度な生体ガス計測と可視化応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Denki Kagaku	6. 最初と最後の頁 118 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/denkikagaku.18-FE0014	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 三林浩二	4. 巻 83
2. 論文標題 バイオセンサ技術を用いた非侵襲生体計測	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 171-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Iitani Kenta, Toma Koji, Arakawa Takahiro, Mitsubayashi Kohji	4. 巻 5
2. 論文標題 Transcutaneous Blood VOC Imaging System (Skin-Gas Cam) with Real-Time Bio-Fluorometric Device on Rounded Skin Surface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 338 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b01658	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 -

1. 著者名 Majdinasab Marjan, Mitsubayashi Kohji, Marty Jean Louis	4. 巻 37
2. 論文標題 Optical and Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Quinolones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 898 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tibtech.2019.01.004	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 該当する

1. 著者名 Iitani Kenta, Toma Koji, Arakawa Takahiro, Mitsubayashi Kohji	4. 巻 91
2. 論文標題 Ultrasensitive Sniff-Cam for Biofluorometric-Imaging of Breath Ethanol Caused by Metabolism of Intestinal Flora	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 9458 ~ 9465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.8b05840	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 -

1. 著者名 Toda Kanako, Mizutani Koji, Minami Isao, Ye Ming, Arakawa Takahiro, Mitsubayashi Kohji, Ogawa Yoshihiro, Araki Kouji, Shinada Kayoko	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of oral health instructions on glycemic control and oral health status of periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus: A preliminary observation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 171 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2019.01.009	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 該当する

1. 著者名 Iitani Kenta, Hayakawa Yuuki, Toma Koji, Arakawa Takahiro, Mitsubayashi Kohji	4. 巻 197
2. 論文標題 Switchable sniff-cam (gas-imaging system) based on redox reactions of alcohol dehydrogenase for ethanol and acetaldehyde in exhaled breath	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 249 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2018.12.070	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12件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 青田 崇志、簡 伯任、叶 明、當麻 浩司、荒川 貴博、三林 浩二
2. 発表標題 二級アルコール脱水素酵素を用いたアセトン用バイオセンサ
3. 学会等名 '17 SAS Symposium
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三林浩二
2. 発表標題 疾病の超早期診断のための呼気・皮膚ガス成分の高感度バイオ計測&イメージング
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ(日本化学会)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Non-invasive biomedical devices for the future of medicine
3. 学会等名 SDM-18 (Sustainable Design and Manufacturing 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Cavitas biosensors for IoT health care & preventive medicine
3. 学会等名 A Joint Taiwan-Japan Research Grant 2018, "Secure IoT-Based Information Platform with Privacy-Preserving Data Mining on Big Data for M-Healthcare" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Sniff-cam for real-time imaging of volatile chemicals
3. 学会等名 DOS annual meeting 2018 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Non-invasive Biosensing Devices for Preemptive Medicine
3. 学会等名 Bio4Apps2018/2019 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川力、青田 崇志、當麻 浩司、荒川 貴博、三林 浩二
2. 発表標題 気相用バイオセンサとガス濃縮装置を融合したエタノールガス用高感度計測システム
3. 学会等名 2019SASシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Gas-phase biosensors (Bio-sniffer and Sniff-cam) for volatile chemicals
3. 学会等名 SPIE 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Gas-phase biosensors for volatile chemicals
3. 学会等名 Huawei Healthcare Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi, Takahiro Arakawa
2. 発表標題 Principle of Gas phase biosensors: Biosniffer & Sniff-cam for medical and healthcare applications
3. 学会等名 ISOEN 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Gas-Phase Biosensors (Bio-Sniffer & Sniff-Cam) for Human Volatile Chemicals
3. 学会等名 ICBME2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohji Mitsubayashi
2. 発表標題 Bio-fluorometric gas sensing and imaging of human volatiles (Bio-sniffer & Sniff-cam)
3. 学会等名 ICONN 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 三林浩二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)シーエムシー出版	5. 総ページ数 249
3. 書名 代謝センシング - 健康、食、美容、薬、そして脳の代謝を知る -	

1. 著者名 Kohji MITSUBAYASHI, Osamu NIWA, Yuko UENO	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 406
3. 書名 Chemical, Gas, and Biosensors for Internet of Things and Related Applications	

1. 著者名 三林浩二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 300
3. 書名 酵素トランスデューサーと酵素技術展開	

〔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
研究 分 担 者	荒川 貴博 (Arakawa Takahiro) (50409637)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師 (12602)	
研究 分 担 者	當麻 浩司 (Toma Koji) (40732269)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教 (12602)	