

平成 21 年 12 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390170  
 研究課題名（和文）カーボンナノチューブセンサーによるリアルタイム生体モニタリングの研究  
 研究課題名（英文）THE STUDY OF REAL-TIME LIVING BODY MONITORING USING CARBON NANOTUBE SENSOR  
 研究代表者  
 千葉 仁志（CHIBA HITOSHI）  
 北海道大学・大学院保健科学研究院・教授  
 研究者番号：70197622

研究成果の概要（和文）：高齢者でも乳酸閾値レベル(疲労物質の乳酸が蓄積しはじめる直前のレベル)の運動を持続すると体力向上が得られる。そのために手軽に血中の乳酸値を運動中に測定できる簡便な測定装置が求められている。また、高齢者は抗酸化能が低下するため、酸化ストレスレベルを測定して動脈硬化防止策を講じる必要がある。本研究で開発したカーボンナノチューブセンサーは、乳酸や酸化ストレスレベルを簡便に測定できる。

研究成果の概要（英文）：The elderly can improve their physical strength by continuing physical training at lactate threshold levels. For this purpose, convenient lactate monitors usable on exercise are needed. Further, the elderly have lower anti-oxidant power, and need to measure their own oxidative stress level in order to avoid atherosclerosis. The carbon nanotube sensor developed in the present study can measure conveniently oxidative stress levels as well as lactate levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：病態検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：カーボンナノチューブ、バイオセンサー、乳酸、酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者に適当な運動負荷を与えると最大酸素摂取量・骨格筋量・骨密度・神経機能の維持と増進が可能であり、これにより QOL が大幅に改善する。全国で健康増進施設が設けられたが、利用者は地域人口の 1%程度にとどまる現実があり、高齢者が生活の場にお

いて運動することの重要性が認識されている。分担者の石井のグループは、在宅や老人福祉施設の高齢者に簡単なステップ運動を個人の乳酸閾値レベル(疲労物質である乳酸が蓄積しはじめる直前のレベル)で与え、著しい体力向上が得られたと報告している (Ayabe, M. et al.: Simple assessment of

lactate threshold by means of the bench stepping in older population. Int J Sport Health Sci, 1(2): 207-215, 2003)。乳酸閾値レベル運動は、十分な酸素摂取量に到達しながら長時間の持続が可能で、有効かつ安全な体力向上が得られるのが特徴である。未曾有の高齢社会へと進む日本において本研究の意義は大きい。

問題は、高齢者の乳酸閾値レベルは幅が狭く、個人差が大きく、体調により日々刻々と変化することである。一律の運動負荷は心臓死や脳卒中の危険をとまうが、安全面だけを重視しては体力向上が得られないジレンマがある。一人一人の高齢者に適切な負荷レベルであることをリアルタイムにモニターできるシステムが待望されている。

そのためのセンサーは、皮膚に貼付けて運動できるほど小型・軽量で、生体情報を直接に電気信号に換えて送信でき、安価で、安全でなければならない。カーボンナノチューブ (CNT) は、低電力で駆動する単一電子トランジスタ/電界効果トランジスタとして、表面で起こる生化学反応を直接かつリアルタイムに電流量の変化として捉える。従って、検出器は不要である。極小 (直径 1nm 前後)、高強度 (引っ張り、曲げ、破断にきわめて強い)、耐熱性、化学的に安定、不溶性などの特徴は、高い生体適合性を保証する。電流量の変化を発信させれば遠隔モニタリングも可能である。分担者の武笠は CNT を用いて超高感度で瞬時に結果が得られるイムノセンサーを開発し、非常に良好な結果を得ている。

## 2. 研究の目的

今日の医療事情に適した臨床検査の在り方として、診療現場での迅速検査、すなわち Point-of-Care Testing (POCT) の必要性が言われている。しかし、本研究が挑戦するのはそこから更に一歩進めた Point-of-Life-Testing (POLT)、すなわち生活の場でのリアルタイム生体モニタリングであり、その目的に適した分析パラダイムの創成である。

具体的には、本研究期間内に、超小型カーボンナノチューブ (CNT) 乳酸センサーを開発し、高齢者の健康増進運動の最適化に応用する。カーボンナノチューブという日本発の新技术を、高齢者の乳酸閾値のリアルタイム測定という日本において特に必要性が高い明確な目標に向けている点特徴的である。従来のナノテクノロジー応用は技術の新規性にとらわれ、アプリケーションの有用性や具体性に乏しかった。

本研究により、高齢者の健康増進事業を進めることが容易になり、高齢者の福祉に貢献するだけでなく、医療費・介護費の増加を抑

制することができる。本研究で得られる技術は、病院内でのリハビリや一般の生活習慣病予防にもすぐに応用でき、今後の医療に対するインパクトは限りなく大きい。

## 3. 研究の方法

### (1) 固相法の試み

センサ素子として機能する基板作製の歩留りおよび素子個々の均一性を揃えるため、(i) 金属多層膜触媒構成による CNT 成長密度制御、(ii) CVD 成長条件による CNT 成長密度制御、(iii) 触媒面積による CNT 成長密度制御、(iv) 触媒形成蒸着器ロードロック室増設、(v) 電極パターニング・リフトオフ工程の改善、(vi) プローブカードを用いた 24 素子自動計測システム導入、(vii) 金属的特性を持つ CNT の選択的切断、を改善することにより、導通率が 12.5 倍、FET 特性を示す素子の歩留まりが 5.2 倍に向上した。

シリコン基板上に、シラン化試薬を介してアミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) のゾルゲル層を作製し、酸/過酸化水素混液で処理した CNT を選択的に固定化することで、導通率が ~100%、FET 特性を示すものが ~60% の割合で作製できた (図 1)。当該法により作製した素子は、再現性よく pH 測定できた。

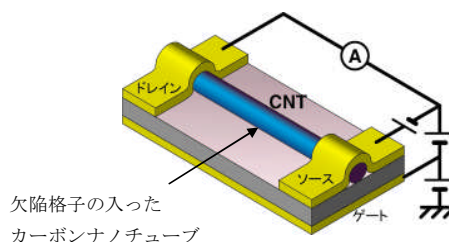


図 1. 作製した CNT センサーの模式図

*Aerococcus viridans* 由来乳酸酸化酵素 (LOD) 遺伝子 cDNA をクローニングした。精製および配向的固定化の目的でアミノ末端あるいはカルボキシル末端にヒスチジンタグを導入し、大腸菌で発現して組換え LOD を取得したが、ヒスチジンタグの導入により酵素活性が消失した。そこで、精製過程は煩雑になるが、タグを具備しない組換え体を使用し、架橋試薬により固定化を試みた。しかし、センサー上に乳酸酸化酵素活性を確認できなかった。以後、液相法に切り替えて実験を継続した。

(2) 液相法による乳酸センサーの開発  
市販の単層カーボンナノチューブ (SWCNT) を酸処理し、フラグメント化した 0.5mg/ml SWCNT 分散液を用いて作用電極を作製した。Ag/AgCl 電極を参照電極として、作用電極と

カウンター電極間の電圧を 50 mV とした時の作用電極に流れた電流量を測定した。電流量は滴下した SWCNT 分散液量依存性を示した。作用電極に分散液量を 5, 10 あるいは 20  $\mu$ l 滴下して作製した CNT-バイオセンサーについて、様々な濃度の過酸化水素の酸化還元電流を測定したところ、20  $\mu$ l で最も高い再現性を示したので、以下 SWCNT 分散液滴下時には同用量を用いた。分光学的な乳酸測定は、乳酸酸化酵素により乳酸を酸化して過酸化水素を産生する反応と、産生した過酸化水素をペルオキシダーゼにより定量する反応よりなる。電気化学的手法で過酸化水素を測定できれば、ペルオキシダーゼが不要であり、簡便安価な測定が可能となる。そこで、CNT-バイオセンサーによる緩衝溶液(20 mM リン酸カリウムバッファー、pH 7.2)中の過酸化水素の定量を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 液相法による乳酸測定

初めに液相法による過酸化水素測定について述べる。上記の方法で、30  $\mu$ M から 30 mM の過酸化水素において検量線が作成できた(図2)。この測定は、乳酸濃度が 0 mM から 1.0 mM に相当し、この時感度は分光学測定法と同程度で、測定ダイナミックレンジは高濃度側で当方法のほうが広がった。

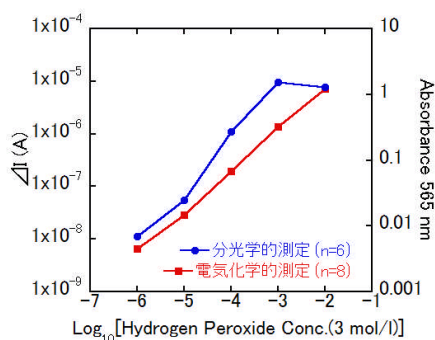
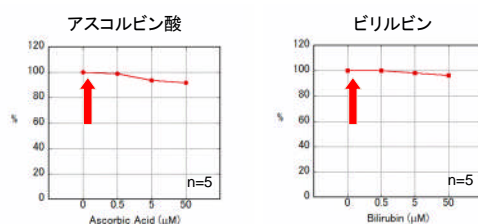


図2. 乳酸の検量線

アスコルビン酸、ビリルビン、尿酸、ヒト血清アルブミンによる阻害実験では、正常基準範囲の中央値においてアスコルビン酸は



矢印は各物質の生体内基準範囲の中央値(血清100倍希釈時)を示している。

図3. 干渉物質の影響

##### • 処理手順

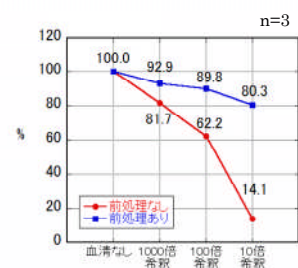
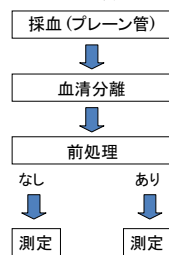


図4. 血清の影響と前処理による低減化

10%以下の阻害、それ以外は5%以下の阻害であった(図3)。しかし、血清存在下では大きな測定阻害を受け、血清100倍希釈で37.8%の阻害を示した(分光学的測定法では血清100倍希釈で阻害を受けなかった)。しかし、血清を独自の方法で前処理することで影響を小さくすることができ、100倍希釈血清において10.2%の阻害効果が観察された(図4)。

##### (2) 酸化ストレスの測定

上記の段階で、本センサーの過酸化水素に対する良好な反応性が確認されたので、研究計画を変更して、センサーを酸化ストレスセンサーとして利用できるかについて検討することにした。本センサーを用いて、酸化ストレスの測定を試みたところ、物質X(特許出願中につき物質名は伏せる)とXの酸化物を測定すると、酸化物に強いシグナルが得られ、酸化ストレス測定に応用できることが分かった。カーボンナノチューブでそのような性質は報告されていないので、特許出願に至ることができた。

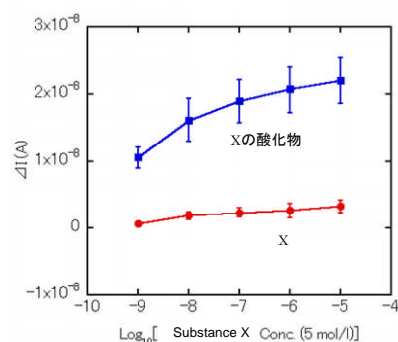


図5. センサーによる酸化物測定

本センサーはカーボンナノチューブセンサーとして初めての酸化ストレスセンサーであり、また、抗酸化センサーとして利用することも可能である。小型簡便なメリットを利

用すれば、保健領域や抗酸化食品・抗酸化薬品の開発において利用価値が高い。これらは高齢化が進む現代社会において本センサーが高い利用価値を持つことを意味し、今後は国際特許出願に向けて研究を継続する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ①Kishimoto N, Okita K, Takada S, Sakuma I, Sajo Y, Chiba H, Ishii K, Kishi R, Tsutsumi H. Lipoprotein metabolism, insulin resistance, and adipocytokine levels in Japanese female adolescents with a normal body mass index and high body fat mass., *Circ J*, 73: 534-539, 2009 (査読有)
  - ②Nagasaka H, Yorifuji T, Momoi T, Yorifuji J, Hirano K, Ota A, Takatani T, Tsukahara H, Takayanagi M, Kobayashi K, Chiba H, Sato Y, Miida T. Lipoprotein profiles in children with two common cholesteryl ester transfer protein gene mutations, D442G and I14A during the first year of life, *Clin Chim Acta*, 406: 52-56, 2009. (査読有)
  - ③Yanai H, Chiba H, Matsuno K. : Elevated plasma plasminogen activator inhibitor-1 in CD36 deficiency., *Diabetes Care*, 31: e72-e72, 2008. (査読有)
  - ④Nagasaka H, Miida T, Hirano K, Ota A, Yorifuji T, Takatani T, Tsukahara H, Takayanagi M, Hui SP, Kobayashi K, Chiba H. Reduced apolipoprotein E-rich high-density lipoprotein level at birth is restored to the normal range in patients with familial hypercholesterolemia in the first year of life, *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 779-783, 2008. (査読有)
  - ⑤Nagasaka H, Miida T, Hirano KI, Ota A, Murayama K, Yorifuji T, Kobayashi K, Takatani T, Tsukahara H, Hui SP, Takayanagi M, Chiba H. : Fluctuation of lipoprotein metabolism linked with bile acid-activated liver nuclear receptors in Alagille syndrome, Atherosclerosis, 198: 434-440, 2008. (査読有)
  - ⑥Atsumi T, Chiba H, Yoshioka N, Bucala R, Koike T : Increased Fructose 2,6-bisphosphate in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Diabetes, *Endocr J*, 54: 517-520, 2007. (査読有)
  - ⑦Yanai H, Watanabe I, Ishii K, Morimoto M, Fujiwara H, Yoshida S, Hui SP, Matsuno K, Chiba H. Attenuated aerobic exercise capacity in CD36 deficiency. *J Med Genet*. 44:445-447, 2007. (査読有)
  - ⑧Hironori Nagasaka, Hitoshi Chiba, Shu-Ping Hui, Hajime Takikawa, Takashi Miida, Masaki Takayanagi, Tohru Yorifuji, Makoto Hasegawa, Akemi Ota, Ken-ichi Hirano, Hideaki Kikuchi, Hirokazu Tsukahara, and Kunihiro Kobayashi : Depletion of High-density Lipoprotein and Appearance of Triglyceride-rich Low-density Lipoprotein in a Japanese Patient With FIC1 Deficiency Manifesting Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45: 96-105, 2007. (査読有)
  - ⑨Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba, Toshihiro Sakurai, Chitose Asakawa, Hironori Nagasaka, Tsuyoshi Murai, Hajime Ide, Takao Kurosawa : An Improved HPLC Assay for Phosphatidylcholine Hydroperoxides (PCOOH) in Human Plasma with synthetic PCOOH as Internal Standard, *Journal of Chromatography B*, 857: 158-163, 2007. (査読有)
  - ⑩Tobina T, Kiyonaga A, Akagi Y, Mori Y, Ishii K, Chiba H, Shindo M, Tanaka H. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and exercise trainability in elderly women: An electrocardiological approach. *J Clin Sports Sci Med*, 6: 22-226, 2007. (査読有)
- [学会発表] (計 5 件)
- ①千葉仁志「大きな変革の時代に来た脂質・リポ蛋白検査」(シンポジウム)、日本医学検査学会総会、2009年7月31日、横浜。
  - ②千葉仁志「新しい脂質の時代」(ランチョンセミナー)、日本臨床検査医学会総会、2009年8月28日、札幌。
  - ③千葉仁志、武笠幸一ほか、「カーボンナノチューブ-バイオセンサーを用いた乳酸の測定」、日本臨床検査医学会総会、2009年8月28日、札幌。
  - ④千葉仁志ほか「カーボンナノチューブ-バイオセンサーを用いた乳酸の測定」、日本臨床化学会年次学術集会、2009年9月18日、長崎。
  - ⑤千葉仁志「転換期を迎えた脂質検査」(教育講演)、日本臨床化学会年次学術集会、2009年9月18日、長崎。
- [図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：CNTセンサーによる過酸化物を電氣的に測定する方法

発明者：

千葉仁志（北海道大学大学院保健科学研究所）

武田晴治（北海道大学大学院保健科学研究所）

石井 睦（北海道大学大学院保健科学研究所）

中村基訓（旭川工業高等専門学校）

武笠幸一（北海道大学大学院保健科学研究所）

惠 淑萍（北海道医療大学）

黒澤隆夫（北海道医療大学）

権利者：

国立大学法人 北海道大学

惠 淑萍（北海道医療大学）

黒澤隆夫（北海道医療大学）

種類：特許

番号：特願 2009-169126

出願年月日：平成 21 年 7 月 17 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千葉 仁志（CHIBA HITOSHI）

北海道大学・大学院保健科学研究所・教授

研究者番号：70197622

### (2) 研究分担者

石井好二郎（ISHII KOJIRO）

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：30245320

（H18, 19 年度まで）

武笠 孝一（MUKASA KOICHI）

北海道大学・創成科学共同研究機構・特任教授

研究者番号：00001280

### (3) 連携研究者

石井好二郎（ISHII KOJIRO）

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：30245320

（H20 年度から連携研究者）