

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380119

研究課題名（和文）魚類のための生体留置型ワイヤレスバイオセンサーの創出に関する研究

研究課題名（英文）Development of implantable wireless-biosensor for fish

研究代表者

遠藤 英明（Endo Hideaki）

東京海洋大学・海洋科学部・教授

研究者番号：50242326

研究成果の概要（和文）：200字

本研究は、水産養殖分野における魚類の迅速・簡便な健康診断法の確立を念頭におき、魚体内に留置可能なバイオセンサを微小電極と酵素を用いて製作し、陸上からリアルタイムに魚の健康診断を行うことができる測定システムを創出することを目的とした。研究の結果、魚を自由に遊泳させた状態で、健康度の重要な指標となる血液中のグルコース及び総コレステロール濃度をリアルタイムにモニタリングすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Periodic checks of fish health and the rapid detection of abnormalities are necessary at fish farms. Several studies indicate that blood glucose and total cholesterol levels closely correlate to fish health. In this study, implantable wireless-biosensor systems were developed using the newly developed needle-type enzyme sensor, consisting of a micro-electrode and immobilized enzyme. Glucose and total cholesterol levels in fish could be monitored in free-swimming fish.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究代表者の専門分野：水圏環境化学，生体機能利用学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：バイオセンサ，魚類，血糖値，グルコース，コレステロール，ワイヤレス，モニタリング，測定

1. 研究開始当初の背景

近年、水産食品業界の分野において HACCP 方式の導入が積極的に進められ、魚の供給源となる養殖分野においても健全な魚を生産するために、その適用が注目されている。すなわち、養殖場においては、魚類病原性細菌の感染症による養殖魚の大量弊死

が近年多発しており、経済的にも大きな被害をもたらしている。また、安全な魚を市場に送り出すという食品衛生的な観点からも、抗生物質等の薬漬けにされた魚ではなく、薬剤に頼らない安全な養殖生産を目指すことが重要な課題となっている。こうしたことから、実際の現場では養殖魚の健康度を定期的に

評価し、早期に異常を察知していくことが必要となっている。魚の健康度の指標としては、血中グルコース濃度の変化が魚類のストレスの度合いや呼吸障害、栄養状態を示すことが近年の研究によって明らかにされている。また血中コレステロール濃度の低下も、細菌感染症に対する抗病性の低下を示す重要な指標になることが報告されている。現在、これらの検査項目はヒト用臨床検査キットを用いて測定されているが、血液の採取やその血漿化、吸光分析法による測定など煩雑な操作と時間を必要としている。養殖現場での健康診断の普及を図るためには、魚の健康状態のリアルタイム測定を実現し、より多くの症例を集め、魚の生理的状態を監視することが必要であり、その場に適応した迅速かつ簡便な測定法の開発が求められている。

そこで研究代表者は、これまで上記要望に対応可能なバイオセンサシステムの開発研究を手がけ、平成 17~18 年度科学研究費基盤研究 (C)「養殖魚の健康診断のための生体刺入型バイオセンサの創出に関する研究」において、魚類のための健康診断用バイオセンサの試作を行った。本研究によって考案されたシステムは、小型 (文庫本 1 冊程度の分光装置とノート型 PC のみ) で携帯性に優れたモバイルバイオセンシングシステムであり、養殖魚の血中グルコース濃度を数分で測定することに成功した。しかしながらこのシステムは、センサ出力の伝達方法に光ファイバーを用いているため、測定の迅速・高感度化は実現できたものの、常に有線の状態であった。したがって養殖場の生け簀内に遊泳している魚を一度採取し、センサを魚体に刺入して測定を行った後、再度生け簀に戻さねばならない煩雑な作業が問題点として残っていた。

一方、現代社会においてユビキタス環境が急激に発展していることを鑑み、水産業界においてもユビキタス・センシングに対応した情報デバイスの必要性が高まりつつあることが予想される。ユビキタス・センシングとは「いつでも」「どこでも」「簡単に」、目的の物質をセンシングできる技術を示し、研究代表者はこれまで、ユビキタス・センシングを念頭においたバイオセンサの研究に携わってきた。こうしたことから、水産養殖場においても生きた魚体に直接センサを埋め込み、測定信号をワイヤレスの状態で陸上の端末に送信することができれば、上述のようなユビキタス環境を満たせるようなシステムが構築でき、魚を遊泳させた状態でストレスを与えることなくその健康状態をリアルタイムで把握することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では前述の背景を鑑み、センサを魚

体内に直接埋め込み、かつ測定データをワイヤレスの状態で陸上の端末に送信が可能なユビキタス計測を目標としたバイオセンサシステムの構築を目指した。すなわち、魚類の健康診断用ユビキタス・センシングの実現を念頭に置いて、(1) 魚体におけるセンサ挿入箇所の検討、(2) 魚類の体内に留置可能なセンサの設計と作製、(3) ワイヤレス状態での測定法の確立、(4) 遊泳状態の魚類におけるグルコース及びコレステロールのリアルタイム測定の実現等を目指して、研究を遂行した。

なお本研究では、魚体へのセンサ挿入箇所の検討、バイオセンサの製作・評価、及び研究の総括は研究代表者の遠藤英明 (生体機能利用学) が担当し、酵素固定化担体の調製及び固定化法に関する検討は連携研究者の東京海洋大学海洋工学部の大貫等 (有機薄膜工学) が担当した。また、ワイヤレスシステム及びデータロガーの設計・製作は、(財)函館地域産業振興財団工業技術センター研究開発部の村田政隆 (計測システム学) が研究協力者として担当した。

3. 研究の方法

本研究では、計測デバイスに微小電極を、分子識別生体素子に各種固定化酵素を利用することにより、魚類血液中のグルコースおよび総コレステロールの検査項目に対して測定が可能で、ワイヤレスの状態でリアルタイムな測定が行える魚の健康診断用バイオセンサシステムを構築した。これら物質 (基質) の測定には分子識別生体素子としてグルコースオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼ/コレステロールオキシダーゼを用い、酵素反応により生じた最終的な過酸化水素の濃度変化を、電流値の変化としてとらえ、これを無線信号に変換することにより目的物質を測定する原理に基づいている。

(1) 魚体におけるセンサの挿入箇所の検討: 魚類の血中成分を測定する場合、センサを血管内に挿入すると、留置時間の経過に伴い血液中のフィブリノーゲン等の凝固因子の作用により血液凝固が生じ、酵素活性を著しく低下させることが知られている。したがって、バイオセンサを用いて血液成分を測定する場合、これまではセンサを血管中に数分間程度刺入し、測定後はセンサを抜き取る必要があった。本研究では、長期にわたって魚の健康診断を可能にするセンサの開発を目標としているため、魚の血管以外の箇所にセンサを留置して測定を行う必要があった。一般にヒトの場合は、血液中のグルコース濃度と皮膚と筋肉の間に位置する皮下組織の間質液中のグルコース濃度との間に相関があることが知られていた。フィブリノーゲンを含まない間質液は凝固しないため、ここにセ

ンサを留置すれば長期にわたり酵素の活性を維持できると考えられる。しかしながら、魚類の間質液の生化学的特性に関する研究はほとんど報告されておらず、その相関性に関しては未知の部分が多い。そこで、本研究では魚類（ティラピア、ヒラメ）の眼球裏に存在する間質液に着目した。この間質液中に含まれるグルコース含量と、血液に含まれるそれとの相関を比較検討することを試みた。また、総コレステロール濃度においても同様の検討を行った。

(2) 魚体内に留置可能なバイオセンサの設計と製作：ワイヤレスバイオセンサシステムの概略を図1に示す。まず、直径500 μ mの白金-イリジウム線（テフロンコート済）を2cm程度に切断し、先端から3mmまでの部分に被覆してあるテフロンを剥離し、作用電極を作製した。次にテフロンが被覆してある部分に銀塩化銀インクを塗布し、これを参照電極として、魚体内留置用微小電極を作製した。これら電極にリード線を各々固定し、周囲を熱収縮チューブで覆うことにより、防水性を保たせた。次に本電極の作用極上にグルコースオキシダーゼとウシ血清アルブミンとの混合溶液を塗布し、これにグルタルアルデヒドを用いて電極に架橋的に結合させることにより、グルコース測定用バイオセンサを作製した。また総コレステロール測定用バイオセンサに関しては、コレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼを用いて、同様に電極上に固定化することにより製作した。

(3) 水中ワイヤレス測定システムの製作：魚を遊泳させた状態でのリアルタイムモニ

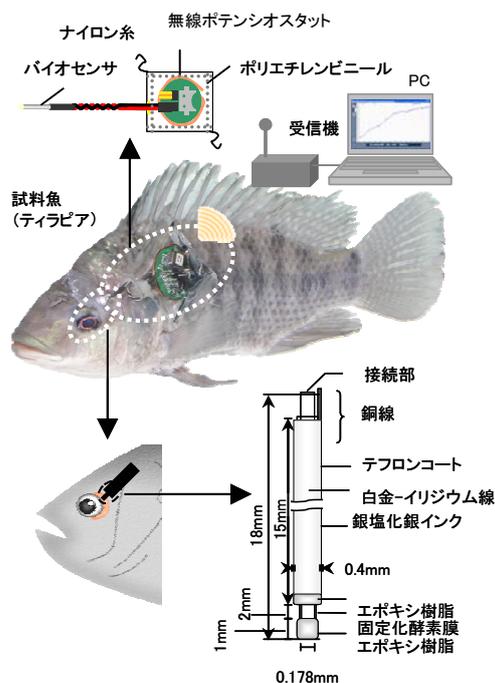


図1 ワイヤレスバイオセンサシステム

タリングを可能にするため、水中での測定に適用できるポテンシostat及びその出力を送信するためのワイヤレスシステムを製作した。まず、無線ポテンシostat（米国 Pinnacle technology 社製 Model 3102BP）をポリエチレンビニールで覆い、エポキシ系接着剤で防水加工を施した。これに上記バイオセンサを接続し、接続部分にも防水加工を施した。本システムは魚体に取り付けられたワイヤレス測定システム、発信信号を受信するためのデータレシーバー（Model 3100RX Pinnacle technology 社製）、及びデータロギング用 PC により構成される。

(4) 遊泳状態の魚類におけるグルコース及び総コレステロールのリアルタイム測定：バイオセンサを魚体へ装着するために、水槽より採取した試料魚を 2-フェノキシエタノール溶液を用いて麻酔を施した。次に、魚の眼球周辺の水滴をキムワイプで拭き取った後、サーフローを用いて眼球外膜に 1mm 程度の挿入口を作り、センサを挿入した。挿入口付近には生体接着剤を用いてセンサと皮膚層を接着した。これに防水加工を施した無線ポテンシostatのポリエチレンビニール部分と背鰭、尻鰭をナイロン糸で縫合し、ワイヤレス測定システムを魚体に取り付けた。

4. 研究成果

本研究ではまず、試料魚（ティラピア）における血液と間質液に含まれるグルコース及び総コレステロール濃度の関係を調べた。結果を図2に示す。

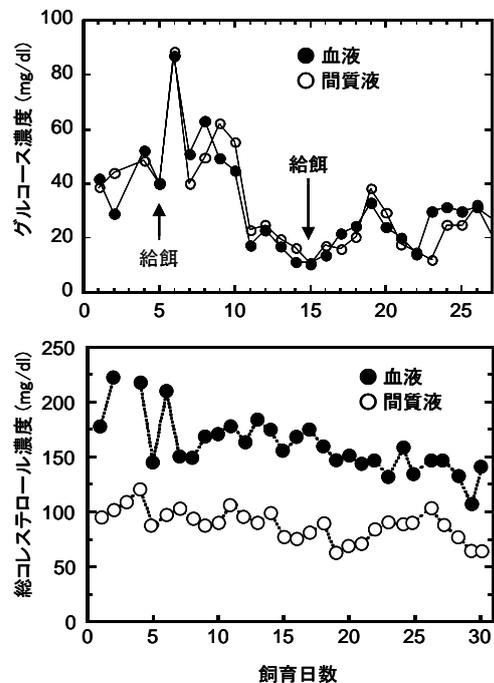


図1 飼育に伴う各成分の経時変化

(上図：グルコース、下図：総コレステロール濃度)

図中，横軸は飼育日数を示し，縦軸はそれらの濃度を示す．グルコースについては，EISF 中の濃度が血液中のそれより若干低い傾向が認められたが，経時的には両者の変動はほぼ一致していることがわかる．ヒト及び動物においては，ISF 中のグルコース濃度は血糖値の 80～103%程度であるとの報告もあるため，この測定値は妥当であると考えられる．一方，総コレステロール濃度においても，同様に関連性があることが認められる．しかしながら，両者の変動を各日毎に比較すると，顕著な関連性がみられる部分とそうではない部分が存在している．また，間質液中の総コレステロール濃度は，血液中それと比較して約半分の値を示した．この理由として，血液と間質液間のコレステロールの物質収支における特性が影響しているものと予想されるが，長期的なスパンでみると両者は類似した経時的変動を示している．以上の結果から，血液中のグルコース及び総コレステロール濃度の変化が，EISF 中のそれらの濃度にも反映され，EISF を測定試料とすることで各項目のモニタリングが可能であることがわかった．

次に，制作したグルコース用バイオセンサをティラピア体内に留置し，遊泳状態におけるグルコースのリアルタイム測定を試みたところ，血糖値の変化に伴いセンサの出力電流も類似した変化が認められた．(図 3)．さらに，センサを留置したままの長時間測定を試みたところ，3 日間以上にわたり，安定した応答電流が得られ，血糖値の変化をリアルタイムに測定することが可能であった [Biosens. Bioelecton. 24, 1417-1423 (2009) ; Anal. Chim. Acta, 633, 90-96 (2009)]．

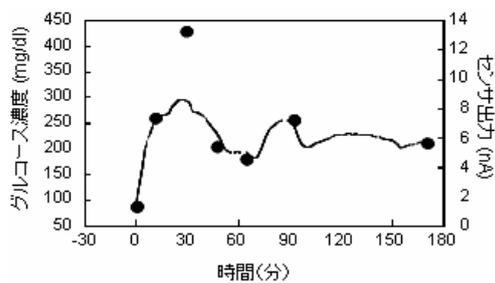


図 3 グルコースの測定結果

一方，同様に制作した総コレステロール用バイオセンサによるリアルタイム測定の結果を図 4 に示す．この図から認められるように，約 40 時間にわたり実測値を反映した良好な測定を行うことが可能であることがわかった [Talanta 80, 909-915 (2009)]．

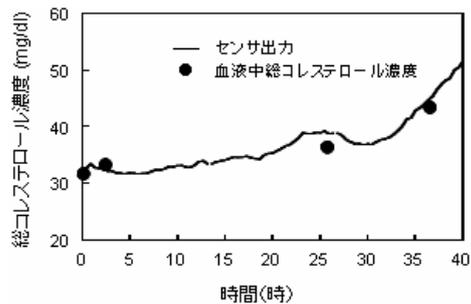


図 4 総コレステロールの測定結果

一方，本研究では海水魚類のヒラメについても同様の検討を行った．ヒラメの場合，体重あたりの間質液の量が，ティラピアの量に比べて少量であった．まず，血液及びEISF 中のグルコース濃度を定量したところ，血糖値が 9～27mg dl⁻¹の範囲で良好な相関関係が認められた ($r=0.8895$)．次にワイヤレスシステムを用いた場合は，16 時間に渡って血糖値の変動をモニタリングすることが可能であった [Fish. Sci. 76, 687-694 (2010)]．

さらに，上述のコレステロールセンサの測定値の再現性を高めるため，新しい酵素の固定化法についても検討した．すなわち，脂溶性のコレステロールの測定にはシリコーン樹脂を固定化担体として用いることにより，基質に対する酵素の反応効率が高まるのではないかと考えた．本研究では，コレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼを混合し，さらにこれをシリコーン樹脂と共に包括的に固定化した．その結果，水溶性の担体を用いた場合よりも安定した酵素反応過程を実現でき，測定値の再現性を高めることに成功した．なお，この成果は平成 21 年度日本水産学会論文賞を受賞するに至った [Fish. Sci. 75, 1329-1336 (2009)]．

以上本研究は，世界的にみても例のない魚類に特化した水中使用対応型ワイヤレスバイオセンサの構築を試みたものである．将来的には，センサが極めて微小なことから，何種類ものセンサを集積することが可能となり，グルコースや総コレステロールをはじめ，数種の指標を同時にモニタリングできるような多機能型健康診断システムが構築できる可能性がある．さらに本システムは，魚類をはじめ生体内の生理的な生化学情報を離れた場所からリアルタイムにモニタリングできる特徴を有していることから，養殖魚の健康診断ばかりでなく，魚の健康状態を指標とした新しい水環境の水質モニタリング法の確立，さらには，マグロやウナギ等の天然魚類やイルカやクジラ等の海獣類の生態調査にも，その応用が大いに期待できる．

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 8 件)

- ① H. Endo, E. Takahashi, M. Murata, H. Ohnuki, H. Ren, W. Tsugawa, K. Sode: Wireless monitoring of blood glucose levels in flatfish with a needle biosensor. *Fish. Sci.* **76**, 687-694 (2010) 査読有
- ② U. Ryumae, K. Hibi, Y. Yoshiura, H. Ren, H. Endo: Rapid and highly sensitive detection of *Flavobacterium psychrophilum* using high gradient immunomagnetic separation with flow cytometry. *Aquaculture* **309**, 125-130 (2010) 査読有
- ③ H. Endo, Y. Yonemori, K. Hibi, H. Ren, T. Hayashi, W. Tsugawa, K. Sode: Wireless enzyme sensor system for real-time monitoring to blood glucose levels in fish. *Biosens. Bioelectro.* **24**, 1417-1423 (2009) 査読有
- ④ Y. Yonemori, E. Takahashi, H. Ren, T. Hayashi, H. Endo: Biosensor system for continuous glucose monitoring in fish. *Anal. Chim. Acta*, **633**, 90-96 (2009) 査読有
- ⑤ H. Endo, J. Hao, M. Maita, T. Hayashi, H. Ren, K. Hibi: Use of an optical biosensor with a silicone-immobilized enzyme to determine plasma total cholesterol concentrations in fish. *Fish. Sci.* **75**, 1329-1336 (2009) 査読有 (平成 21 年度日本水産学会論文賞受賞)
- ⑥ Y. Yoneyama, Y. Yonemori, M. Murata, H. Ohnuki, K. Hibi, T. Hayashia, H. Ren, H. Endo: Wireless biosensor system for real-time cholesterol monitoring in fish "Nile Tilapia". *Talanta* **80**, 909-915 (2009) 査読有
- ⑦ 遠藤英明: 魚類の健康バイオセンシング. 未来材料 **10**, (5), 30-35 (2010) 査読無
- ⑧ 遠藤英明: バイオセンサーによる迅速・簡便な魚類の健康診断. 養殖 **592**, (6), 25-27 (2010) 査読無

[学会発表] (計 30 件)

1) 国際会議

- ① T. Omori, E. Takahashi, M. Murata, K. Sode, W. Tsugawa, H. Endo: Glucose biosensor using biocompatibility polymers for wireless monitoring of blood glucose levels in fish: Biosensors 2010, Glasgow, **UK**, June 28, 2010
- ② H. Endo, E. Takahashi, M. Murata, H. Ren, T. Hayashi, W. Tsugawa, K. Sode: Wireless biosensor for real-time blood

glucose monitoring in sea fish "flatfish". Euroanalysis 2009, Innsbruck, **Austria**, September 8, 2009

- ③ U. Ryumae, K. Hibi, Y. Yoshiura, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo: Rapid and highly sensitive detection of *Flavobacterium psychrophilum* using high-gradient immunomagnetic separation. Euroanalysis 2009, Innsbruck, **Austria**, September 8, 2009
- ④ H. Endo, Y. Yonemori, H. Ren, T. Hayashi, W. Tsugawa, K. Sode: Wireless enzyme sensor system for real-time monitoring to blood glucose levels for fish. The Tenth World Congress on Biosensors, Shanghai, **China**, May 15, 2008
- ⑤ Y. Yoneyama, Y. Yonemori, K. Sode, W. Tugawa, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo: Wireless biosensor system for real-time cholesterol monitoring in fish. PRiME (Pacific Rim Meeting on electrochemical and Solid-State Science) 2008, Honolulu, **USA**, October 15, 2008

2) 国内学会

- ⑥ 大森健史・高瀬麻以・村田政隆・任恵峰・遠藤英明: 魚類の血中グルコース/コレステロール同時測定のための生体刺入型バイオセンサの試作に関する研究. 日本水産学会春季大会東京海洋大学 2011年3月27日
- ⑦ 遠藤英明: 魚類の健康バイオセンシング (特別依頼講演) 第 77 回電気化学会 富山大学 2010年3月30日
- ⑧ 稲葉今日子・日比香子・任 恵峰・遠藤英明: マグネティック酵素センサによる魚類の血中グルコース濃度の測定. 日本水産学会秋季大会 京都大学 2010年9月22日
- ⑨ 米山洋平・林哲仁・任恵峰・遠藤英明: ワイヤレスバイオセンサを用いたティラピアの総コレステロール濃度のモニタリング. 日本水産学会春季大会 東京海洋大学 2009年3月30日
- ⑩ 高橋英治・大森健史・村田政隆・林哲二・任恵峰・遠藤英明: バイオセンサによるヒラメ血糖値のリアルタイム測定. 日本水産学会春季大会 東京海洋大学 2009年3月30日 他

[その他]

1) 受賞歴 (計 5 件)

- ① 平成 21 年度日本水産学会論文賞, (社) 日本水産学会, Determination of plasma total cholesterol concentrations in fish using an optical biosensor with a silicone-immobilized enzyme: H. Endo, J. Hao, M. Maita, T. Hayashi, H. Ren, K.

- Hibi. Fish. Sci. 75, 1329–1336 (2009)
(First author), 2010年3月
- ②Euroanalysis 2009, Innsbruck, Austria
(Organizer: *Anal. Bioanal. Chem., Springer*), Best Poster Award (Second Prize): Rapid and Highly Sensitive Detection of *Flavobacterium Psychrophilum* Using High-Gradient Immunomagnetic Separation: U. Ryumae, K. Hibi, Y. Yoshiura, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo (Corresponding author), 2009年9月
- ③The 5th World Fisheries Congress (WFC 2008), Yokohama, Japan, Best Poster Presentation: Needle type cholesterol biosensor specialized consecutive health diagnosis of fish: Y. Yoneyama, Y. Yonemori, M. Murata, K. Sode, W. Tugawa, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo (Corresponding author), 2008年10月
- ④The Tenth World Congress on Biosensors, Shanghai, China (Organizer: *Biosens & Bioelectron., Elsevier*), Best Poster Award 2008: Wireless enzyme sensor system for real-time monitoring to blood glucose levels for fish: H. Endo, Y. Yonemori, H. Ren, T. Hayashi, W. Tugawa, K. Sode (Presenter, Corresponding author), 2008年5月 他

2) 報道歴

■TV放映 (1件)

- ①10 mini. ボックス「動物の観察 ～血液中の糖」(理科2) NHK 教育テレビ, 4月10日(金)午前1:00~1:10

■新聞報道 (計20件)

- ①岩手日報 2010年1月25日 p.4: 魚の産卵期 血液から予測 東京海洋大遠藤准教授 養殖業に活用期待
- ②日刊工業新聞 2009年9月1日(火) p.26: 魚に有害な細菌 簡単検出 東京海洋大が装置開発 水1mlあたり10個から観測
- ③水産経済新聞 2008年12月9日(火曜日) p.1: 養殖にまた新たな技術 魚にセンサを装着 健康情報得て安全・安心
- ④岩手日報(夕刊) 2008年8月11日(月曜日) p.4: 泳ぐ魚を健康診断 東京海洋大がシステム開発 安全な養殖に力
- ⑤北海道新聞(夕刊) 2008年8月5日(火曜日) p.4: 泳ぐ魚の健康診断 血糖値からストレス, コレステロール値から抵抗力 東京海洋大・遠藤准教授ら 養殖時の薬品減量に期待
- ⑥熊本日日新聞 2008年7月30日(水曜日) p.10: 泳がせながら魚診断 東京海洋大遠藤准教授ら開発へ 養殖の安全向上に期

待

- ⑦琉球新報 2008年7月29日(火曜日) p.9: 泳ぐ魚を健康診断 血糖値測るシステム開発中 投薬減, 安全向上へ
- ⑧信濃毎日新聞 2008年7月28日(月曜日) p.6: 泳いだまま魚を健康診断 東京海洋大准教授ら開発

3) 講演, 連携授業等 (計5件)

- ①これがバイオセンサーだ! 『ナマズのヒゲで美味しさを測定できる?』: 高大連携授業, 於 千葉県立勝浦若潮高等学校 2010年1月18日
- ②バイオセンサの海洋・水産分野への応用: 第8回国際バイオ EXPO, 於 東京ビックサイト 2009年7月1日
- ③バイオセンサーの食品・水圏環分野への応用: 広島大学大学院特別講義, 於 同大学院生物圏科学研究科C-305 教室 2008年12月3日
- ④食品安全管理用バイオセンサーの開発研究: 第46回 粉体技術専門講座 『食品(粉体)プロセスに求められる基礎と技術革新』, 於 東京ガーデンパレス 2008年7月17日
- ⑤魚の「体調がセンシングできる」バイオセンサーの開発: 第7回国際バイオ EXPO, 於 東京ビックサイト 2008年7月4日 他

4) ホームページ

■遠藤英明研究室

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~endo/endo/index.html>

■東京海洋大学研究者総覧データベース

<http://olcr.kaiyodai.ac.jp/kaiyokagakubu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 英明 (ENDO HIDEAKI)
東京海洋大学・海洋科学部・教授
研究者番号: 50242326

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大貫 等 (OHNUKI HITOSHI)
東京海洋大学・海洋工学部・助教
研究者番号: 60223898