

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04544

研究課題名(和文)皮膚微小還流針による極低侵襲乳酸動態モニタリング

研究課題名(英文)Minimally invasive lactate dynamic monitoring with a skin microperfusion needle

研究代表者

鶴岡 典子(Tsuruoka, Noriko)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：70757632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,600,000円

研究成果の概要(和文)：運動時の乳酸濃度動態を明らかとするため、皮膚微小還流を応用した乳酸モニタリングシステムを開発した。皮膚微小還流針は10 μ mの微小穴が開いた膜で覆われた流路を搭載しており、これを用いて乳酸回収を行う。表面の穴径が大きいため、皮膚に刺入した状態でプッシュポンプにより還流液を流すと、皮膚内に還流液が漏れ出ることからプッシュプルまたはプル駆動での還流が必要であることが明らかとなった。このため、還流液中乳酸濃度センサ部として、2層の流路間に疎水性多孔質膜を配置することで、気泡がセンサ内に流入することを防ぎながら、連続的に乳酸濃度を計測できる酵素電極センサを作製・評価し、連続的な乳酸濃度計測を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、運動時の乳酸濃度動態を明らかとすることを目的として運動時連続測定可能な乳酸センサシステムを開発した。極細径で痛みのない針を1mm程度の浅い皮膚に刺入しただけで計測が可能のため、アスリート向けのトレーニング用乳酸濃度モニタや生活習慣病予防のための運動の習慣化に役立つだけでなく、術後の虚血モニタや敗血症の兆候モニタなど医療分野にも広く応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A lactate monitoring system based on skin microperfusion was developed to clarify the dynamics of lactate concentration during exercise. The skin microperfusion needle, which is used for lactate collection, has micro flow channel which covered by perforated membrane (the hole diameter is 10 μ m) on the surface of the needle. Because of the large diameter of the holes on the surface, it became clear that push-pull or pull-pumping was necessary because perfusate leaked into the skin when perfusate flowed using a push pump while the needle was inserted into the skin. Therefore, we fabricated and evaluated an enzyme electrode sensor with bubble removal flow channel that can continuously measure lactate concentration as the lactate concentration sensor part in the microperfusion system. By placing a hydrophobic porous membrane between two layers of flow channels, it prevents bubbles from flowing into the enzyme sensor and enabling continuous measurement of lactate concentration.

研究分野：医工学

キーワード：微小還流 乳酸センサ 連続計測

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や高血圧などの生活習慣病は、近年メタボ検診の導入などにより予防意識が高まりつつあるが、患者数は未だに増加傾向にある¹⁾。生活習慣病の予防には食生活の改善や適度な運動が有効であるとされている。しかし、「時間がない」「効果が実感できない」などの理由により²⁾、適切な運動習慣を持つ者は未だに人口の3割程度と少ない¹⁾。運動強度の把握方法の一つとして、血中乳酸濃度計測が挙げられる。乳酸は運動時、糖が分解されてエネルギーが産生される際の代謝産物として作られる。血中乳酸濃度は運動強度(運動の激しさや持続時間)に応じて変曲点をもって増加する。この変曲点は乳酸作業閾値(LT)と呼ばれ、運動強度に対し糖の利用が急に高まる強度である。運動強度に対するLTの位置は、運動能力によって変化する。このため、血中乳酸濃度を計測しながら運動を行うことで、自身の運動能力に適した運動習慣を身に着けることが可能となる。

しかし、現在市販されている簡易血中乳酸センサは、微採血を行い計測する方式であり、使用できるのは医療従事者に限られている。また、運動中何度も採血を行うことは、使用者の負担が大きいため、運動終了後のみに計測する場合も多い。例えば、60秒間のオールアウト(全力運動)後の血中乳酸濃度の変化をみると、運動後3~8分で乳酸濃度のピークが現れており、これをとらえるために2分毎の採血が必要となっている²⁾。このように、血中乳酸濃度は運動強度の良い指標であるが、従来センサでは複数回の採血が必要であり、生活習慣病予防のための運動の習慣化などに用いるには、より侵襲性が低く、非観血的に、連続または数分毎の間欠的計測ができるセンサが求められる。

応募者はこれまで、極低侵襲な乳酸センサシステムを目指し微小還流による生体成分回収システムを開発してきた。細径(外径約250 μ m)の鍼灸針表面に、非平面微細加工技術により生体適合性のあるポリイミド製の微小流路を作製した³⁾。この流路は根本側の流入口から針先で折り返し、根本側の流出口に戻る構造になっており、皮膚に刺入する流路部には微小な穴が作製されている(図1)。この針を皮膚に刺入した状態で流路に還流液として生理食塩水を流すと、皮膚中の乳酸分子が濃度拡散により流路内に侵入する。体外で回収した還流液中の乳酸濃度を計測する微小還流の手法により、皮膚中の乳酸濃度を推定する。

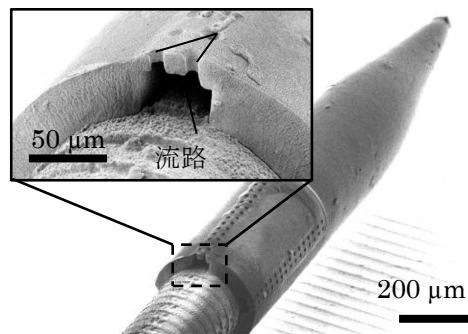


図1. 作製した皮膚微小還流針の断面図

乳酸などの低分子量の物質は血管壁を通ることができるため、真皮や皮下組織に満たされている皮下組織液中の乳酸濃度は血中とほぼ同じである⁴⁾。

微小還流針は極低侵襲に真皮または皮下組織にアプローチでき、表皮上の物質や汗の影響を受けないため、血中濃度と関連したデータを得ることが可能である。独自に開発した非平面微細加工技術を用い、鍼灸針の表面にポリイミドを用いた流路と膜が形成されていることから、鍼灸針がもともと持っている皮膚刺入性を生かした構造になっている。

これまで開発してきた微小還流針では、皮膚で微小還流を行うことにより非観血的に血中乳酸濃度を推定できた。この微小還流針を応用し、運動の習慣化に用いることが可能な、低侵襲で、非観血的に、連続的な乳酸計測が可能なセンサシステムに応用できないかと考えた。このようなシステムによる血中乳酸濃度計測は、エクササイズ時の運動強度管理だけでなくアスリートのトレーニング管理、オーバーワークの防止など様々な応用が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、皮膚微小還流を応用し、乳酸濃度の連続測定を可能とする。さらに、これまで数分毎の計測からしか推定できなかった、マウスおよびヒト運動時の乳酸濃度動態を明らかにするためのモニタリングシステムを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、非観血的な乳酸連続計測を目指し、皮膚微小還流による計測システムの確立を目指した。皮膚微小還流システムのイメージを図2に示す。皮膚微小還流針により回収した乳酸は体外に設置した酵素電極センサにより還流液中乳酸濃度を連続計測する。本システムを用いて運動時の連続的乳酸動態計測を行う際に、プッシュポンプによる還流では皮膚組織内に還流液が漏れ出てしまうという問題点があった。このため、プッシュプルまたはプル駆動でのポンピングが必要となるが、この際還流液には気泡が混入してしまい酵素電極センサでの計測の際のノイズとなり連続計測の妨げとなることが明らかとなった。そこで、混入した気泡を除去しながら連続的に乳酸濃度計測が可能な気泡除去流路付き酵素電極センサの作製・評価を行った。

気泡除去流路付き酵素電極センサの構造を図3に示す。センサの底面には、乳酸濃度を測定する酵素電極をパターンニングしたガラス板を用いた。酵素電極としてAuのパターンニングにより

作用極 (WE)、対極 (CE)、参照極(Ref)を作製した。参照極上には Ag ナノメタルインクをインクジェットプリンタにより塗布し、作用極上には、メディエータとしてプルシアンブルー (PB) を成膜し、乳酸酸化酵素 (LOD) を PEGDE により固定化した。

1 層目流路は、電極表面に直接貼り付ける。流路壁は厚さ 0.1 mm の両面粘着テープ (PRT フィルム透明両面粘着テープ, 厚さ: 0.1 mm, イノベクト株式会社) をカッティングプロッタ (ValueCut, II-600, 武藤工業株式会社) によりカットし作製した。各層の流路幅は 1.7 mm とした。高さ 0.1 mm の流路は 1 枚、高さ 0.2 mm の流路は、2 枚重ねてテープを貼ることで作製した。1 層目流路の天井面は 2 mm 厚の PMMA 板を用いた。板には、1 層目に流入するための流入口と 2 層目に接続するための貫通穴、多孔質膜を設置するための 6 mm 角の 0.1 mm 深さの溝と、その中心に 2 mm 角の貫通穴を切削加工した。加工した溝には、6 mm 角の疎水性多孔質膜 (孔径 0.1 または 1.0 μm , 厚み 0.09 mm, 材質: PTFE, Membrane Filter, アバンテック東洋株式会社) を中心に 2 mm 角の穴を加工した両面粘着テープ (基材: ポリエステルフィルム, 粘着剤: アクリル系, 厚さ: 0.03 mm) により接着した。疎水性多孔質膜と両面テープの厚みを合計して 0.093 mm となり、0.1 mm 深さの溝に設置する際の作製誤差も考慮すると、段差はほぼ生じない。ただし、溝の側面と多孔質膜の間には貼付けの際に微小な隙間が生じている可能性があるため、ここに気泡がトラップされる可能性がある。溝に疎水性多孔質膜を接着した PMMA 板に 1 層目流路となる両面テープを流入口および 2 層目に接続するための貫通穴が流路内に入るように貼付けた後、酵素電極上に設置した。

2 層目流路も 1 層目と同様に 0.1 mm 厚の両面粘着テープをカットすることで作製した。2 層目流路の天井面も 2 mm 厚の PMMA 板を用い、この板には流出口を作製した。作製した PMMA 板に 2 層目流路の形状に加工した両面テープを流出口の穴が流路内に設置されるように貼付け、1 層目の天井部分の PMMA 板に 2 層目に作製した流出口が、疎水性多孔質膜の中心になるように設置した。流入口および流出口は、板に作製した穴にポリエチレンチューブ (内径 0.5 mm, 外径 1.0 mm, 株式会社夏目製作所) を挿入しエポキシ系接着剤で固定した。作製した 2 層型気泡除去流路を図 4 に示す。

(1) 皮膚微小還流時の気泡除去性能評価

作製した気泡除去流路が、外径 0.2 mm の鍼灸針表面に幅 50 μm の微小流路を作製した微小還流針³⁾を、ブタ摘出皮膚に刺入し還流を行った際に発生する気泡を除去できるかを確認した。微小還流針の流路は、針先端側の 1 mm 長さの流路の表面に直径約 10 μm の穴を多数作製しており、これを皮膚に刺入し、留置した状態で還流液を流路に流すことで、浸透圧により皮膚中の物質が流路内に拡散することで生体成分を回収することができる。

実験のセットアップを図 5 に示す。本実験での気泡除去流路は、膜の孔径 1.0 μm 、流路高さ 0.2 mm の流路を用い、流路内の気泡を観察しやすくするために底面には酵素電極の代わりに PMMA 板を用いた。酵素電極の基板であるガラスが親水性であるのに対し、PMMA 板は疎水性であり底面側に気泡が留まりやすくなる。このことから、酵素電極を用いた場合よりも気泡が疎水性多孔質側に移動しづらく、除去性能が低下する可能性があるが、本実験におい

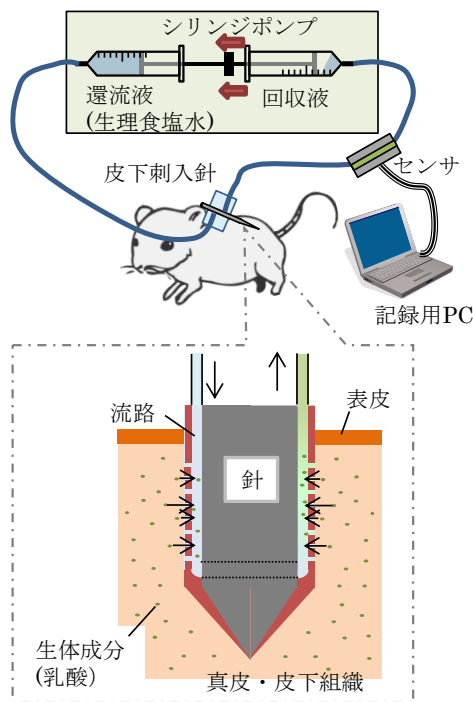


図 2. 作製する乳酸モニタのイメージ

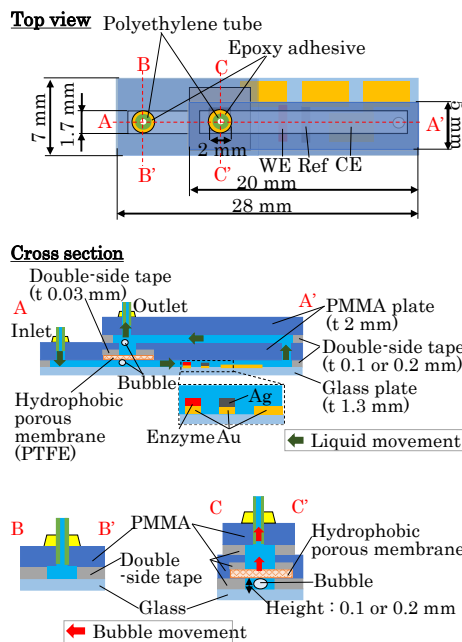


図 3. 気泡除去流路付き酵素電極センサーの構造

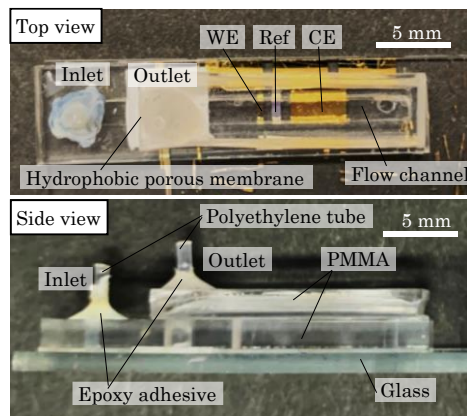


図 4 作製した気泡除去流路付きセンサー

て十分な気泡除去性能が得られれば、酵素電極を用いた際にも問題なく気泡除去が行えると考えられる。入り口側チューブと流路内部を観察し、気泡の除去性能を評価した。シリンジポンプのプル側シリンジには液体（純水）を満し、プッシュプル駆動とプル駆動の2種類を用いた。気泡の体積変化を観察するために、気泡除去流路に接続した流入側チューブには、端から50 mmのところを印をつけ、気泡の流入量および流路内の気泡除去の様子を顕微鏡で観察した。本実験において微小還流針を刺入する対象としてブタ鼻皮膚を用いた。シリンジポンプの流量は3、5、10 $\mu\text{L}/\text{min}$ を用い10 min 還流した。

(2) 乳酸濃度連続計測時の気泡除去性能評価

酵素電極センサによる連続計測中の気泡除去性能を評価するため、膜の孔径 $1.0 \mu\text{m}$ 、流路高さ 0.2 mm の気泡除去機能付き流路と従来の同じ流路幅、高さの機能除去機能無しの流路とで測定値の比較を行った。実験セットアップを図6に示す。作用極への印加電圧を 0.5 V とし、ポテンショスタット (ALS1205B, ALS Co., Ltd) により電流値を計測した。シリンジポンプを $5 \mu\text{L}/\text{min}$ のプル駆動で駆動し、流入側側のチューブをリン酸緩衝液 (0 mM 乳酸溶液) に 300 sec 浸し、 30 sec 液面から引き上げて空気を流入させた後、 0.5 mM の乳酸溶液に 270 sec 浸すことを3回繰り返した。

4. 研究成果

(1) 皮膚微小還流時の気泡除去性能評価

ブタ皮膚から流入した気泡の体積と間隔の平均値を表1に示す。プッシュプル駆動において $3 \mu\text{L}/\text{min}$ では気泡の混入は見られなかった。還流により混入する気泡の体積は $15 \sim 42 \text{ nL}$ の範囲であり、気泡が流入する間隔は $7 \sim 38 \text{ sec}$ であった。混入する気泡の体積に大きな違いはないが、気泡が流入する間隔は $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で駆動した場合に小さい傾向にあった。溶液中の気泡半径は一般に Young-Laplace 式が知られており、気泡の内外圧差は気泡半径に反比例する⁵⁾。流量が大きくなるほど、流路内が陰圧になりやすくなる、つまり気泡内圧力に対し圧力差が大きくなるため、これに比例して気泡半径は小さくなったと考えられる。これに対し、大気圧に比べて流路内圧が陰圧になるほど、接続部等からの気泡混入の可能性や溶存気泡の膨張は大きくなることから、混入する気泡体積は大きくなる。このために、気泡混入の時間的な間隔は狭く、頻回になったと考えられる。

ブタ皮膚微小還流時に発生する気泡除去試験において、ブタ皮膚微小還流時に発生するすべての実験条件において気泡を除去することが可能であり、プッシュプルやプル駆動においても気泡除去が可能な構造を実現できたといえる。

入口側チューブから流入した気泡の総体積を図7に示す。また、流入側中心から気泡の先端距離を気泡先端位置 (Bubble position) とし、これを 10 sec ごとに計測した結果を図8に、流路内の気泡の様子を図9に示す。図9は流路を底面の PMMA 側から観察した様子であり、白く見えている部分が疎水性多孔質膜である。この疎水性多孔質膜の中心 2 mm の範囲に2層目との貫通穴が作製されている。流路内に流入した気泡は気泡除去部を超えて電極設置位置 (流入側から約 12 mm) に到達することはなかった。流入した気泡の総体積 (図7) を見ると、プル駆動に比べプッシュプル駆動の場合が発生した気泡が少なかった。プッシュプル駆動の場合、プル駆動に比べ、流路内が陰圧になり難いためと考えられる。また、流量に対する気泡量の関係についてもプル駆動の場合は流量に依存して気泡の総体積が大きくなったが、プッシュプル駆動の場合は流量への依存性は見られなかった。皮膚微小還流において流路内に気泡を発生させないためにはプッシュプル駆動が望ましいと考えられる。

流路内の気泡の先端位置 (図8) は、線形な変化ではなく段階的に気泡が成長する様子が見られた。気

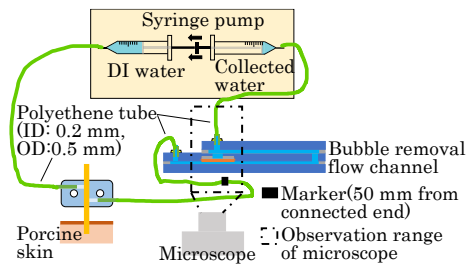


図5. 気泡除去性能評価の実験方法

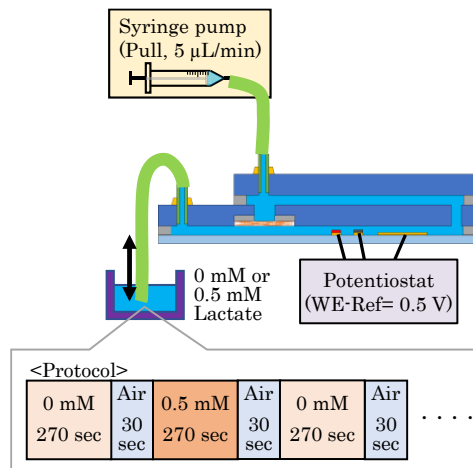


図6. 乳酸濃度連続測定の実験方法

表1. 作製した気泡除去流路付きセンサ

Pump ing	Flow rate	Bubble volume	Bubble interval
Push pull	$3 \mu\text{L}/\text{min}$	-	-
	$5 \mu\text{L}/\text{min}$	41.87 nL	38 sec
	$10 \mu\text{L}/\text{min}$	15.91 nL	29 sec
Pull	$3 \mu\text{L}/\text{min}$	32.89 nL	15 sec
	$5 \mu\text{L}/\text{min}$	27.90 nL	15 sec
	$10 \mu\text{L}/\text{min}$	19.18 nL	7 sec

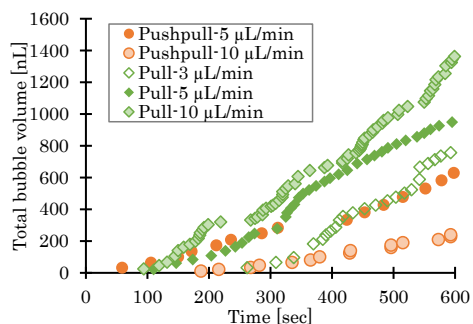


図7. 流入した気泡の総体積

泡が流路内に蓄積し、表面張力よりも気泡内圧が大きくなった時点で気泡の先端位置が移動するためにこのような変化になったと考えられる。また、流路内の気泡の様子を観察すると、疎水性多孔質膜（図8の黄色部分）の端部分で気泡が除去されやすいため、この位置付近で気泡先端が停止する傾向がみられた。気泡先端が停止したのは、プル駆動 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ の場合で 510 sec 、 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ の場合で 430 sec の時点であり、この時の流入した気泡の総体積（図7）はそれぞれ約 800 nL 、 750 nL であった。つまり、気泡体積が一定（ $700\sim 800 \text{ nL}$ 程度）以上となった時に、気泡内圧および気泡を疎水性多孔質側に押す力の合力が、気泡が疎水性多孔質膜を通過するのに必要な力を超え、気泡は疎水性多孔質膜を通り抜けていと予想される。

(2) 乳酸濃度連続計測時の気泡除去性能評価

気泡除去機能付き流路および気泡除去機能無し流路を用いた際の時間に対する電流値の変化を図10に、測定終了時の気泡除去機能無し流路を用いたセンサの様子を図11に示す。気泡除去機能無し流路の場合、気泡が電極に到達するまでは 0.5 mM 乳酸溶液流入に応じて電流値変化が見られたが、図11のように気泡が流入した後電極上に気泡が留まり、図10の $1500\sim 2100 \text{ sec}$ のように乳酸濃度に対する電流値変化が小さくなる現象が見られた。このとき、濃度に対する電流値変化の時間遅れも見られている。気泡が電極上に留まることで、溶液と電極が接している面積が小さくなり、見かけ上の電極サイズが小さくなったために乳酸濃度に対する電流値変化が小さくなったと考えられる。この時、流路内の溶液の流れは気泡により妨害され、流量が一定ではなくなるため、乳酸濃度に対する反応も時間遅れが生じたと考えられる。乳酸濃度を連続して計測する場合、この気泡が流路上から移動すると元の電流値変化に戻ることが考えられ、乳酸濃度が変化しなくても、気泡の有無により電流値の変化が発生する。ゆえに、気泡の流入は乳酸濃度の測定精度に影響を及ぼす可能性がある。

これに対し、気泡除去機能付きセンサの場合濃度に対して安定した電流値変化が見られ、時間遅れも見られなかった。しかし、図10の 1200 sec 、 1800 sec 付近の気泡除去流路から気泡が流出するタイミングで、大きな電流値ノイズが見られた。皮膚微小還流時の気泡除去性能評価の際も見られた通り、流路内では気泡が流入口付近で蓄積されていき、ある程度気泡が大きくなった時点で疎水性多孔質膜を通過して気泡が流出していた。計測中の流路の様子を観察していたところ、電流ノイズが発生していたタイミングは流出口から気泡が流出したタイミングであり、この時一時的に電極上の流速が変化してしまうために、このようなノイズが発生したと考えられる。今後は、流入出口を含む流路デザインを工夫し、気泡が蓄積されない構造とすることで、このようなノイズは低減できると考えられる。

<参考文献>

- 厚生労働省, 国民健康・栄養調査. 2) M.L. Goodwin *et al.*, *J Diabetes Sci Technol*. 1:558–569(2007). 3) N.Tsuruoka *et al.*, *Biomed Microdevices*. 2016Feb;18(1):19.
- N. Ito *et al.*, *Anal Chim Acta*, 312:323–328(1995).
- 松本充弘, 京都大学数理解析研究所講究録, 1721:88–99(2010).

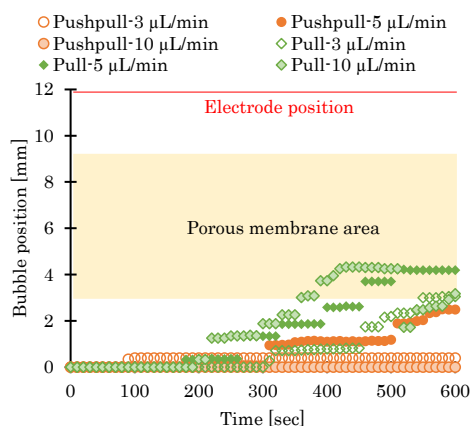


図8. 気泡の先端位置の変化

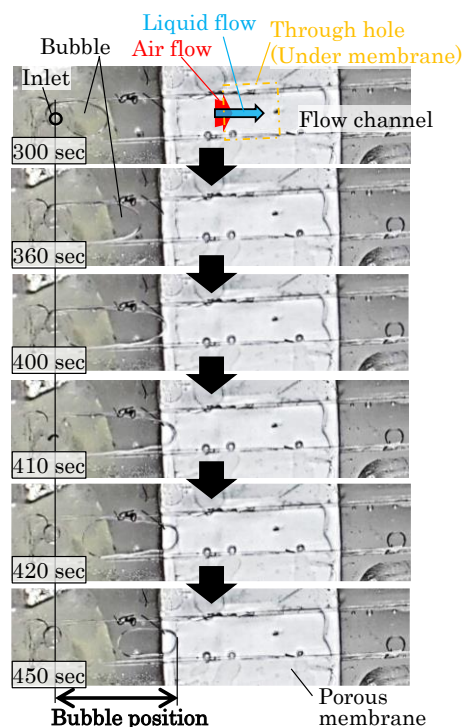


図9. 流路内の気泡の様子 (プル駆動、 $10 \mu\text{L}/\text{min}$)

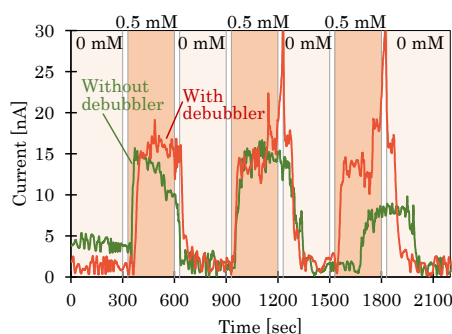


図10. 乳酸連続測定時の電流値変化

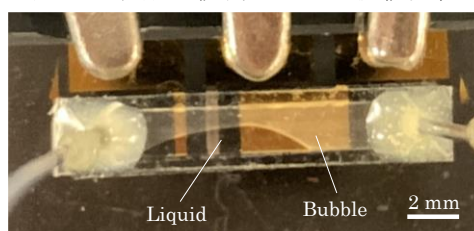


図11. 電極の様子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Noriko Tsuruoka
2. 発表標題 Development of skin insertion type biological substance measuring system
3. 学会等名 電気学会 マイクロマシン・センサシステム・ノケミカルセンサ/バイオ・マイクロシステム 合同研究会「International Meeting on Sensors and Microsystems for SDGs」(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴岡典子, 継枝健太, 芳賀洋一
2. 発表標題 陰圧駆動可能な2層型気泡除去機能付き酵素電極センサによる連続的成分濃度計測
3. 学会等名 第39回「センサマイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴岡典子, 継枝健太, 芳賀洋一
2. 発表標題 陰圧駆動可能な2層型気泡除去機能付き酵素電極センサの気泡除去機能評価
3. 学会等名 2022(令和4)年度 電気学会E部門総合研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 継枝健太, 鶴岡典子, 芳賀洋一
2. 発表標題 皮膚微小還流システムのため気泡除去路の作製と気泡の除去性能評価
3. 学会等名 第38回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noriko Tsuruoka
2. 発表標題 Minimally Invasive Microperfusion System for Measurement of Subepidermal Biological Substances,
3. 学会等名 IEEE NEMS2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 継枝健太、鶴岡典子、芳賀洋一
2. 発表標題 皮膚微小還流システムのための気泡除去流路付き酵素電極センサ
3. 学会等名 電気学会 マイクロマシン・センサシステム/ケミカルセンサ/バイオ・マイクロシステム 合同研究会
4. 発表年 2021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
研究分担者	芳賀 洋一 (Haga Yoichi) (00282096)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	永富 良一 (Nagatomi Ryoichi) (20208028)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	川副 友 (Kawazoe Yu) (70405421)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------