

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592282

研究課題名(和文) 光ファイバカテーテルを利用した血液ブドウ糖濃度の連続測定法の開発

研究課題名(英文) Development of a fiber-optic intravenous catheter system for continuous blood glucose concentration monitoring

研究代表者

土井 松幸 (DOI, MATSUYUKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10155616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：血中ブドウ糖濃度を連続測定できる光ファイバ内蔵血管内カテーテルの臨床応用を目標として以下の研究を行った。光ファイバカテーテルの先端に装着するブドウ糖検出センサー素材の検索した。アントラセン-フェニルボロン酸化合物はブドウ糖存在下で370 nmの励起光にて430 nmにピークを持つ蛍光を発生させ、その蛍光強度は400mg/dlまでブドウ糖濃度依存性であった。連続測定12時間までは蛍光強度は初期値の90%程度を維持したが、その後蛍光強度は徐々に減衰することが観察された。アントラセン-フェニルボロン酸化合物は、ブドウ糖検出センサーとして利用可能であるが、経時的安定性の向上を必要とする。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a fiber-optic intravenous catheter system for continuous blood glucose concentration monitoring. We investigated materials as blood glucose sensor to be mounted on the tip of the catheter. We found anthracene-phenyl-diboronic acid was suitable as the sensor. It emitted 430 nm fluorescence with 370 nm excitation light. The intensity of the fluorescence depended on glucose concentration up to 400 mg/dl, but gradually diminished beyond 12 hours monitoring time. Anthracene-phenyl-diboronic acid was one of promising glucose sensors, but required improvement of long time suitability.

研究分野：集中治療医学

キーワード：光技術 血中濃度測定 ブドウ糖

## 1. 研究開始当初の背景

近年光テクノロジーの発達はめざましく、生体内微量物質の定量や細胞内レベルでのイオンの移動など医学分野の最先端の研究に利用されている。しかし臨床の医療における光テクノロジーの応用は限定されており、生体内物質の定量に関してはヘモグロビンや注入色素など高濃度の光吸収物質の測定に利用されているのみである。また血管内に留置できる光ファイバー内蔵のカテーテルが臨床使用可能であるが、その利用方法も血液中のヘモグロビン分画比の測定に留まっている。そこで光ファイバー内蔵血管内カテーテルと最新の光テクノロジーを組み合わせることによって、さまざまな血液中微量物質を連続的に定量できる装置の開発が可能であることを着想した。この測定法を臨床医療の広い分野で応用可能な技術に発展させることを目標として、本研究計画を科学研究費として申請し、平成 13-14 年度の萌芽的研究、平成 15-17 年度基盤研究(C)、平成 19-21 年度基盤研究(C)として採用された。

萌芽的研究と基盤研究(C)の 9 年間の成果として、臨床用のアボット社製光ファイバー内蔵血管内カテーテルを実験動物の大静脈に留置し、血液中の蛍光物質や吸光物質を検出することが可能となった。

しかし、現在の測定システムには以下に列挙する制約があることも明らかになった。

- (1) 血液中に大量に存在するヘモグロビンにより 650 nm より短い波長の可視光は、ほぼ完全に吸収されてしまうため 400 nm から 650 nm の可視光を利用できない。
- (2) 血中物質を吸光により検出する測定系では、血液内に入射した光の反射光の強さは、血液内物質の吸光のみでなく光路長により影響を受けるが、現行の測定系では光路長を特定できず、吸光物質の定量が困難である。
- (3) 血中物質に特定の励起光をあてて蛍光強度より濃度を定量する測定法では、励起光の到達距離を制御する必要があるが、現行の測定系では励起光の到達距離は上記の吸光測定系よりはばらつきが小さいものの正確な制御は困難である。

これらの問題点を克服するためにエバネッセント蛍光測定法の利用を検討したが、すべてを解決することは困難であった。そこでカテーテル先端に、光センサーを装着し問題点を解決することを着想した。光センサーは物質に特異的であるので、臨床的にもっとも測定意義が大きいブドウ糖を対象に定めた測定システムの開発を計画した。

## 2. 研究の目的

血中ブドウ糖濃度を連続測定できる光ファイバー内蔵血管内カテーテルの臨床応用を目標とし以下の項目を検討することが本研究の目的であった。

### (1) 光ファイバーカテーテルの先端に装着するブドウ糖検出センサー素材の検索

ブドウ糖は可視光や近赤外光領域の吸光が微弱で、紫外領域の蛍光強度も弱いので血液に直接入光して、吸光や蛍光でブドウ糖濃度を計測することは困難である。そこでブドウ糖濃度に依存して蛍光強度が変化する物質を検出センサーとして光ファイバーカテーテル先端に装着することとした。本研究の第一段階として、ブドウ糖検出光センサーに適した蛍光物質を検索することとした。

### (2) 光ファイバーカテーテルのデザインの検討

光ファイバーカテーテルの先端に選定したブドウ糖検出光センサーをどのような形状で装着すれば安定した測定が可能か検討すること。また励起光を送る入光ファイバーと蛍光を伝達する受光ファイバーの配置もあわせて検討すること。さらに、入光ファイバーと光源、受光ファイバーと蛍光検出器との接続分である光カプラの形状も検討すること。これらにより光ファイバーカテーテルの形状をデザインすることとした。

### (3) 光源と蛍光検出器の作成

光センサーに蛍光を発生させるためには、強力な単一波長の励起光をカテーテルに供給する必要がある。強力な光源を、カテーテルに接続させるためのライトガイド、カプラを作成する。強い励起光に相対して、

蛍光は極めて微弱であるので、励起光と蛍光の波長を弁別する高性能のフィルターと高感度の蛍光検出器を備えた装置を作成することとした。

(4) 試験管内血液中ブドウ糖濃度の測定  
上記(2), (3)にて作成した血管内カテーテルと光源・蛍光検出器を用いて、試験管内の血液中に添加した蛍光物質の濃度を定量し、本測定系の精度を検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ブドウ糖検出センサーの検討

##### ① ブドウ糖結合蛋白

ブドウ糖結合蛋白は数多くが知られているが、マレクチン、ガレクチン1、ヘキソキナーゼの3物質について検討した。

それぞれの物質は0.1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/lの溶液を作成して以下の測定を行った。

i 250 nm - 1000 nm の範囲の吸光スペクトラムを記録し、ブドウ糖 100 mg/dl, 400 mg/dl を添加した際の吸光スペクトラムの変化を記録した。

ii ブドウ糖結合蛋白溶液の蛍光を検索した。

iii ブドウ糖 100 mg/dl, 400 mg/dl を添加した際の蛍光強度の変化を記録した。

iv 1 mg/l のマレクチン、ガレクチン1、ヘキソキナーゼ溶液に、アガロースを加えてゲル状にし、100 mg/dl, 400 mg/dl のブドウ糖水溶液を表面に滴下した。この過程における蛍光の変化を観察した。

##### ② ボロン酸化合物

ブドウ糖センサーとして基礎的研究が進められているボロン酸化合物(引用文献1-2)について検討した。引用文献1の方法を参考にして、アントラセン-フェニルボロン酸を合成した。アントラセン-フェニルボロン酸溶液にブドウ糖を50, 100, 150, 200, 300, 400 mg/dl の濃度で添加し、蛍光特性を測定した。

#### (2) 光ファイバーカテーテルのデザインの検討

光ファイバーカテーテルについて、Hospira社製 Oximetrix カテーテル、Edwards Lifescience社製ペディアサット・オキシメ

トリーカテーテルまたはプリセップカテーテル、自作カテーテルの3者を候補とした。励起光と蛍光はカテーテル内蔵の光ファイバーを通して血液と測定装置を繋ぐこととした。カテーテル先端にブドウ糖センサーを装着し、センサーが発生する蛍光を安定して計測できるデザインを検討した。

#### (3) 光源と蛍光検出器の作成

Edwards Lifescience社製光ファイバー内蔵カテーテルに、任意の波長の励起光を送光し、特定波長の蛍光を受光し検出できる装置を設計し作成した。

#### (4) 試験管内血液中ブドウ糖濃度の測定

この研究期間内で、ブドウ糖センサーをカテーテル先端に装着するところまで到達しなかったため、試験管内血液中ブドウ糖測定を実施できなかった。

### 4. 研究成果

#### (1) ブドウ糖検出センサー

ブドウ糖検出センサーの研究を行う基礎資料として、pH4 から pH12 の条件下で、ブドウ糖自体は600 nm から 1500 nm の光を吸収せず、またこの範囲の波長の励起光によって蛍光を発しないことを確認した。

##### ① ブドウ糖結合蛋白

i 0.1mM/l, 1mM/l, 10 mM/l のマレクチン、ガレクチン1、ヘキソキナーゼの3物質の溶液にブドウ糖 100 mg/dl, 400 mg/dl を添加したが、いずれの場合も600 nm から 1500 nm の吸光スペクトラム変化を検出できなかった。

ii マレクチン、ガレクチン1、ヘキソキナーゼ溶液は、いずれも280 nm の励起光によって340 nm にピークを持つ比較的広い波長帯の蛍光を発した。蛍光の強さはブドウ糖結合蛋白の濃度に依存して強くなった。

iii ブドウ糖結合蛋白溶液にブドウ糖 100 mg/dl, 400 mg/dl を添加した際に280 nm の励起光による340 nm の蛍光強度がわずかに増強したが濃度依存性を認めなかった。

iv 1 mg/l のマレクチン、ガレクチン1、ヘキソキナーゼのゲルに、100 mg/dl, 400 mg/dl のブドウ糖水溶液を表面に滴下した際に、280 nm の励起光による340 nm の蛍光強度がわずかに増強したが濃度依

存性を認めなかった。

これらの結果より、3種類のブドウ糖結合蛋白質は、ブドウ糖の存在により蛍光が変化する可能性があったが、蛍光強度は弱く生理的濃度のブドウ糖を検出するセンサーとして直ちに応用することが困難であると判断した。

## ② ボロン酸化合物

文献1のKawanishiらの方法を参考にして、アントラセン-フェニルボロン酸化合物を合成した。アントラセン-フェニルボロン酸溶液にブドウ糖を添加すると370 nmの励起光により420 nmにピークを示す蛍光を発した。400 mg/dlまでのブドウ糖を添加により、濃度依存性に蛍光強度が増強した。研究期間中には溶液中にアントラセン-フェニルボロン酸を合成できたのみで、ゲル化することはできなかった。

ボロン酸化合物が、有望なブドウ糖センサーであることは複数の報告がなされている。ボロン酸化合物を薄層ゲル状にできれば、カテーテル先端に装着するブドウ糖センサーの有望な候補の一つとなることが示唆された。

(2) 光ファイバーカテーテルのデザイン  
Hospira社製 Oximetrixカテーテル、Edwards Lifescience社製ペディアサット・オキシメトリーカテーテルまたはプリセップカテーテル、自作カテーテルの中で、もっとも細径であることからEdwards Lifescience社製ペディアサット・オキシメトリーカテーテルを基本材料として用いることとした。Hospira社製のカテーテルは、米国からの輸入が中断しており再開の見処がないこともあって、採用を見合わせた。今後ブドウ糖検出センサーを薄層ゲルに加工してカテーテル先端に装着する計画である。ゲル自体が発した蛍光を、カテーテルの送光、受光機能を利用して検出装置まで導くことが可能とする計画である。

## (3) 光源と蛍光検出器の作成

光カップラー：Edwards Lifescience社製カテーテルに送光部からの光を投入し、カテーテルからの光を受光部に導くことができるように、光カップラーの形状を作成した。

送光部：200 nm から 2000 nm の波長の光を放つことができるハロゲンライトを主要光源とした。可視光-紫外光を利用する場合は赤外領域を除去するフィルターを利用し、光路

への熱を遮断する事ができる。光源の光をレンズにて集光し、バンドパスフィルターを選択することによって任意の波長の光を光カップラーに供給できるようにした。また特定の波長をより高いエネルギーで供給するために、半導体レーザー光源を直接光カップラーに導くための光路を設定できるようにした。

受光部：カテーテルから光カップラーで受光した蛍光強度を測定できるように作成した。受光した光から励起光を除去するための短波長カットフィルター、バンドパスフィルターを選択できるようにした。フィルターを通過した蛍光強度を定量する主要検出器にはフォトダイオードを装備した。微弱な蛍光を検出する必要がある場合は、光電子倍增管を利用できるように光路を選択できるようにした。

総括 ブドウ糖検出センサーの検討に時間が費やされ、当初の計画の一部が研究期間内に実施できなかった。しかしボロン酸化合物がセンサーとして有望であるとの知見が得られたので、ボロン酸化合物を薄層ゲル化することができれば、血管内カテーテルに装着し血中ブドウ糖濃度の連続モニタリングの実現が期待できる。

## 引用文献

1. Kawanishi T, Romey MA, Zhu PC, Holody MZ, Shinkai S. A study of boronic acid based fluorescent glucose sensors. *Journal of Fluorescence* 14, 2004, 499-512
2. Gamsey S, Suri JT, Wessling RA, Singaram B. Continuous glucose detection using boronic acid-substituted viologens in fluorescent hydrogels: linker effects and extension to fiber optics. *Langmuir* 22, 2006, 9067-9074

## 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 2 件)

- ① 土井松幸, レミマゾラム, 日本臨床麻酔学会誌, 査読有, 34 巻, 2014, 860-866,

DOI なし

- ② Ozaki M, Takeda J, Tanaka K, Shiokawa Y, Nishi S, Matsuda K, Doi M, Kakihana Y, Fujino Y, Takinami M, Kawai M, Safety and efficacy of dexmedetomidine for long-term sedation in critically ill patients, Journal of Anesthesia, 査読有, Vol 28, 2014, 38-50, DOI 10.1007/s00540-013-1678-5

[学会発表] (計 2 件)

- ① 御室総一郎, 土井松幸, 加藤孝澄, 佐藤重仁, 吉見美生, マイクロダイアライシス法を用いた出血モデルラットにおける NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> の変化の検討, 日本蘇生学会第 33 回大会, 2014 年 12 月 6 日, 静岡県・浜松市
- ② 土井松幸, 心臓血管麻酔後の集中治療管理のエビデンスと工夫, 日本心臓血管麻酔学会第 61 回大会, 大阪府・吹田市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土井 松幸 (DOI, Matsuyuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 10155616