

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560512

研究課題名(和文)疾患スクリーニングのための生体由来ガス成分のイメージングシステムの構築

研究課題名(英文)An imaging system of human body gas for evaluation of disease screening using chemiluminescence

研究代表者

荒川 貴博(Arakawa, Takahiro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師

研究者番号：50409637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：疾病や身体状態に伴い、生体から発散される揮発性生体成分には様々な生体情報が含まれており、医療診断や口腔衛生評価などへの適用が期待されている。エタノールガスを時間的・空間的な動態変化を生体触媒である酵素及びルミノール試薬にて化学発光へ誘導することで光学情報に変換し、高感度CCDカメラを用いて撮影することで視覚化するシステムを構築した。倫理委員会の承認に基づき、生体からのエタノールガスの放出について評価を行った。飲酒後の被験者の皮膚より数百ppb程度のエタノールガスが放出されていることが示唆された。代謝に伴い生体から放出されるガス成分の濃度変化や放出動態について評価できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：An ethanol sensing and imaging system in the gas phase has been developed for analysis of breath ethanol. This breath gas imaging system has been expected to be easy, rapid and painless approach for sampling from patients to diagnose diseases. The system provides the image of ethanol distribution as chemiluminescence (CL) on the enzyme-immobilized mesh. The spatio and temporal changes in CL generated by ethanol in exhaled breath after ethanol oral administration was detected by employing an electron multiplier CCD camera. Breath samples from volunteers with aldehyde hydrogenase 2 (ALDH2) (+) and (-) are detected and analyzed with the imaging system. This imaging system for the human odor and skin gas has been expected to be the safe and useful assessment for metabolism in the body.

研究分野：計測工学

キーワード：計測工学 イメージング ガス計測 酵素 バイオセンサ 生体計測 生体ガス

1. 研究開始当初の背景

生体から発せられる「生体ガス情報」を利用した診断法として、尿素呼気試験法や口臭診断等の呼気を用いた非侵襲的な診断法が用いられているが、呼気採取を要するため連続計測が難しく、拘束性を伴うなどの課題がある。現在診断に用いられている生体ガス情報として口臭診断がある。この診断では、ガスクロマトグラフィやガスセンサを用いる方法があるが、簡便性や選択性に問題があり、医師が患者の口臭を直接嗅いで口臭の有無や強度を判定する手法では、嗅覚の個人差により感じる臭いの強さが異なるため診断者の主観に左右されやすく、生体ガス情報を用いた診断基準は明確でないのが現状である。また、生体由来のガス成分としては、呼気と同様に皮膚ガス中にも疾患や身体の生理的狀態に伴う揮発性化学成分が含まれることが報告されており、高い関心が寄せられている。これまでに身体から放出される皮膚ガス中に含まれる揮発性化学成分としては、糖尿病患者においてアセトン計測した例が報告されているが、これはサンプリングを行い、ガスクロマトグラフにより計測するため、装置が高価、操作が複雑といった課題とともに、連続計測ができないことから経時的な分泌動態情報が得られず、有効な手段となっていない。さらに、皮膚ガス中成分は呼気成分に含まれる量と比較すると低濃度であり、簡便性・感度・高い選択性を兼ね備えた皮膚ガス計測法は存在しない。そのような理由から、皮膚ガス中の生体由来のガス成分を高感度かつ選択的に、連続的に計測する技術が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚表面から放出される生体由来ガスに含まれる揮発性化学情報を高感度かつ選択的に画像化する技術を構築することである。生体から放出されるガス成分はその濃度が空間的・時間的に大きく変動することから、その濃度分布をリアルタイムで画像化し、空間的・時間的情報を兼ね備えた生体ガス情報のイメージングが可能となれば、発生部位の特定や濃度の連続測定が可能で、新規な非侵襲計測法となり得ると考えられる。代謝産物であるヒトの産生する糖尿病由来のアセトン、肝臓の代謝能評価としてエタノールなどの皮膚ガス情報をイメージングが可能なシステムを構築し、新しい疾患のスクリーニングへの応用を目指す研究である。

3. 研究の方法

3.1 エタノールガス可視化システムの構築

可視化システム(図1)におけるエタノールガスの可視化原理を図2に示す。アルコール酸化酵素(alcohol oxidase, AOD, from *Pichia pastoris*, 47 mg protein/ml, 32 units/mg protein,

Sigma-Aldrich Inc.)はエタノールを酸化触媒し、過酸化水素が生成される。過酸化水素はルミノールの存在下で、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase, HRP, 100 units/mg, 和光純薬(株)の触媒反応により励起状態の3-アミノフタル酸となり、3-アミノフタル酸が基底状態に戻る際に波長 460 nm をピークとする青色の発光が生じる。

この青色発光をオンチップの電子増倍機能を有した高感度 CCD カメラ(L3C95, e2v Inc.)にて撮影することで、エタノールガスの動態(濃度分布、経時的な濃度変化)を可視化することが可能となる。

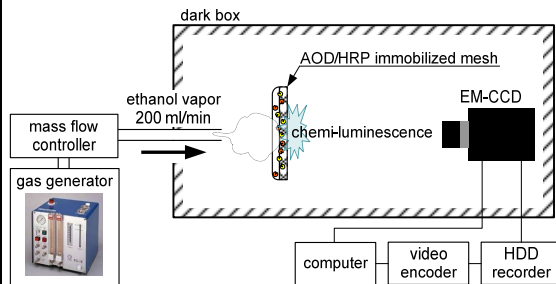


図1 標準エタノールガスの可視化計測システムの概略図

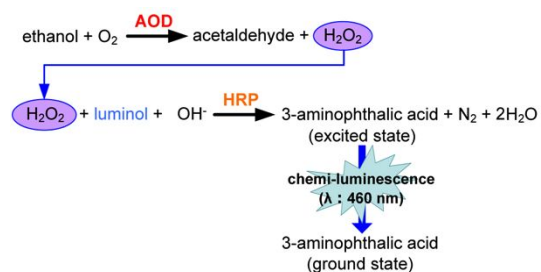


図2 エタノールガスの可視化計測の原理

酵素メッシュの作製では、市販のコットンメッシュに上記2種類の酵素、リン酸緩衝液(PBS, pH 7.5, 0.1 mol/l)、紫外線架橋樹脂(PVA-SbQ, Biosurfine SPH, 東洋合成工業(株))の混合液を均一に塗布し、4の冷暗所にて乾燥させた後、紫外線を照射することにより酵素を包括固定化した。可視化実験では、酵素メッシュをルミノール溶液に浸漬し暗箱内に設置した後、標準ガス発生装置にて調整した各濃度のエタノールガスを負荷(流量: 200 ml/min、負荷時間: 10秒)し、酵素反応により生じたルミノール発光を高感度 CCD カメラにて動画撮影した。なおルミノール発光にて励起状態の3-アミノフタル酸が基底状態に戻る際の青色発光(ピーク波長: 460 nm)を可視化するため、その発光領域に感度を有するオンチップの電子増倍型 CCD カメラ(L3C95, e2v INC.)を用いた。撮影した動画は、多機能汎用画像解析ソフト(cosmos32, (株)ライブラリー)を用いて解析を行った。

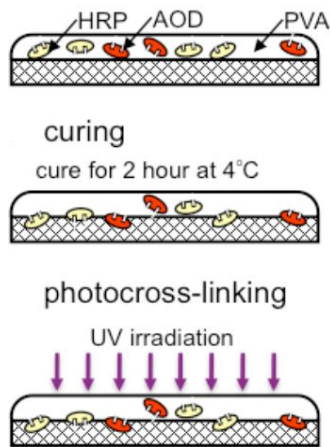


図3 AOD/HRP の固定化メッシュ膜の作製方法

3.2 呼気中エタノールの可視化計測

本システムを、飲酒後の呼気中エタノールガスの可視化計測に適用した。被験者には予め、アルコールパッチテストを行い、飲酒実験が可能と判断された被験者に対し実験を行った(東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・倫理委員会 承認番号:2012-6)。実験では健康な男性被験者を対象として、飲酒(体重1 kg あたり0.4 g エタノール)後の呼気ガスを可視化計測に供した。

3.3 手掌部より放出されるエタノールガスの可視化計測

飲酒後の皮膚からはエタノールガスが放出されていることが報告されており、特に評価の簡易性より手掌部を対象とした実験が実施され報告されている。そこで、開発した可視化システムを、飲酒後の手掌部より放出されるエタノールガスを可視化計測するシステムへと改良した。飲酒後の被験者の手掌部をセルプレートに密着させ、皮膚ガスの発生に伴う発光を高感度 CCD カメラにて撮影した(図4)。

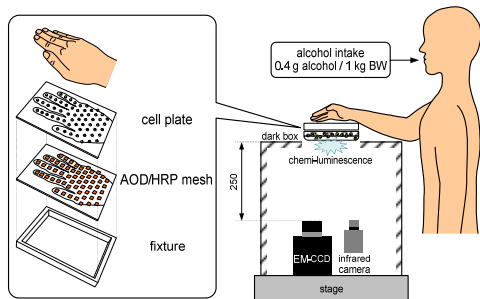


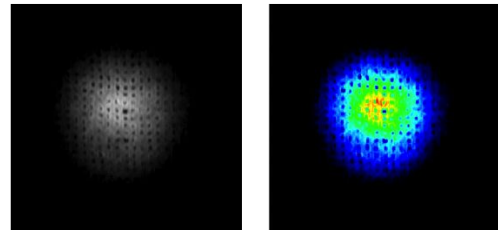
図4 皮膚ガス中エタノール計測実験系の概略図

4. 研究成果

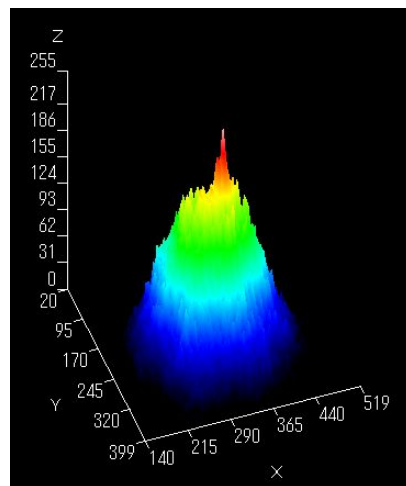
4.1 エタノールガスの可視化計測と選択性の評価

構築した可視化システムに標準エタノールガス(100, 400 ppm)を负荷した結果、負荷

点を中心として周囲に発光が広がっていく様子が観察され、ガス濃度に応じた発光分布の画像が得られた。発光強度はガスの負荷(200 ml/min, 10 秒間)に伴い増加し、ピーク強度に達した後に漸次消光しており、エタノールガスによる発光(濃度分布及び経時変化)を二次元的に可視化することができた(図5(a))。



original CL image 2-D color image
(a) 200 ppm gaseous ethanol imaging



(b) 3-D image of 200 ppm gaseous ethanol

図5 可視化システムを用いたエタノールガスの2Dイメージと3Dイメージ

また高さ方向で発光強度を示した三次元プロファイルとして画像化することも可能であった(図5(b))。次に得られた動画像をもとに画像解析にて発光強度を算出したところ、ガス負荷に対する著しい平均発光強度の上昇と、濃度に応じたピーク値が観察され、エタノールガスの負荷に伴うルミノール発光の経時変化を数値化することが可能であった。なお、エタノールガス濃度と動画像の発光強度に相関性が確認され、酒気帯び運転の判断値の78 ppmを含む、30~400 ppmの範囲でエタノールガスの定量が可能であった(図6)。

また、呼気ガス中の他のガスの影響を評価するため、呼気に含まれる主な成分(メタノール、アセトアルデヒド、トリメチルアミン、アセトン、メチルメルカプタン、硫化ジメチル)について、呼気ガス相当の濃度を可視化システムに负荷したところ、エタノールガス以外の成分では発光が観察されず、呼気計測ではエタノールガスを選択的に測定が可能

であることを確認した(図7)。

以上より、本システムはエタノールガスの濃度分布と経時変化を動画像として可視化することができ、画像解析によりエタノールガスの濃度定量が可能であった。

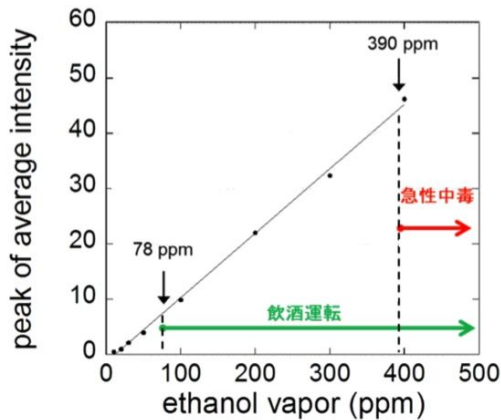


図6 可視化システムを用いた標準エタノールガスの定量特性 (30~400 ppm エタノールガス)

gas (conc. In breath(ppm))

ethanol	(0.15)	EtOH : 50 ppm
methanol	(0.20)	N.D. (0.2 ppm)
acetaldehyde	(0.08)	N.D. (4 ppm)
trimethylamine	(0.11)	N.D. (1 ppm)
acetone	(0.74)	N.D. (50 ppm)
methylmercaptan		N.D. (0.1 ppm)
dimethyl sulfide		N.D. (1 ppm)

図7 可視化システムの呼気中ガスへの選択性評価

4.2 呼気中エタノールの可視化計測

呼気導入部と可視化システムの間定流量制御装置 (AFC-150, ACE (株)) を介し、可視化実験系を構築した。呼気導入部と定流量制御装置の間には流量センサを介し、定流量制御装置の制御特性を評価した。

被験者を利用した評価において、呼気流量を流量センサで測定したところ、6000~8000 ml/min の範囲の不安定な流量であった。流量を設定した定流量制御装置を導入することで200 ml/min の安定した流量の呼気を吐出することが可能であった。構築したシステムの生体ガスに対する有用性を確認するため、飲酒後の呼気中エタノールを用いて、可視化計測を行った。本システムに呼気流量制御装置を介し、飲酒後の呼気ガス (200 ml/min) を供したところ、呼気中エタノールガスにおいて、標準エタノールガスと同等の二次元の可視化動画像が得られた。

また、可視化画像を用いて、飲酒後の呼気エタノールガス濃度の経時変化を調べた結

果、アルコール摂取後直ちに呼気中エタノールガス濃度は上昇し、30分後にピーク値に達した後、アルコール代謝に伴う一次関数的な濃度低下が観察された(図8)。さらに、アルデヒド脱水素酵素2型の活性型ALDH2(+)と不活性型ALDH2(-)の被験者で呼気中のエタノール濃度が大きく異なることが確認された。このように構築したシステムにて、生体ガスである呼気中エタノールの可視化計測を行うことができ、本システムの代謝機能評価への有用性が示唆された。

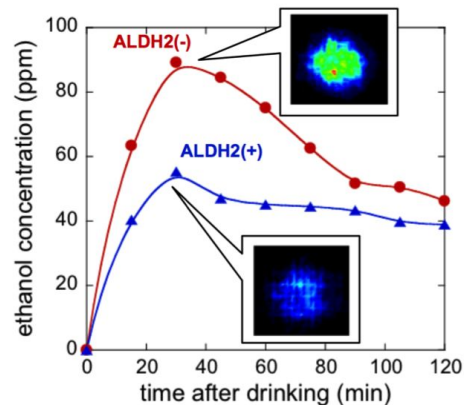


図8 可視化計測によるアルコール摂取後の代謝に伴うALDH2(+)と(-)の被験者毎の呼気中アルコール濃度変化

4.3 手掌部での皮膚エタノールガスの可視化計測

本システムにて飲酒後に手掌部より放出されるエタノールガスの可視化計測を行った。放出部位を詳細に評価するため、手掌部を細かい範囲で計測することが可能な10 mm角のパターンで酵素メッシュを作製した。10 mm角のパターンを手の形状を模して配置した酵素メッシュを用いて、皮膚から放出されるエタノールガスの可視化計測を行った。この時、高純度ルミノール溶液に増感剤としてエオシン Y を用いた高感度可視化システムにて評価を行った。

本システムに被験者の手掌部を静置させ、飲酒に伴う発光を観察した。実験の結果、飲酒30分後より手掌部からのエタノールガス放出に伴う発光の増加が確認され、その後消光していくことが観察された(図9)。手掌部全体の平均発光強度の経時変化は既報値の経皮エタノールガスの放出時間と矛盾するものではなかった。また、酵素パターン毎に発光量が異なっていることから、手掌内の各部位で皮膚ガスの放散量が異なることが考えられ、放出されるエタノールガスが手掌部において一定ではなく、濃度分布が存在することが示唆された。以上のことから、本システムにて手掌部より放出されるエタノールガスを直接可視化が可能であった。本システムにて皮膚ガスの発生分布やその分泌動態評価への応用が示唆された。

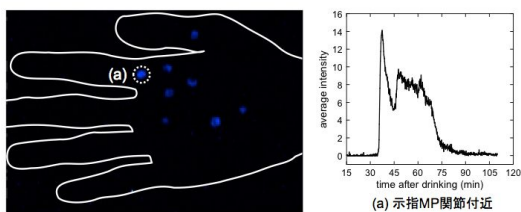


図9 手掌部におけるエタノールガスの放出に伴う発光の様子と発光強度の変化

4.4 研究の成果のまとめ

エタノールガスをモデル成分とし、酵素反応によるルミノール発光を高感度 CCD カメラにて可視化する計測システムを構築した。AOD と HRP の固定化メッシュを作製したエタノールガス可視化システムでは、エタノールガスの負荷に対して、円形状のルミノール発光が観察され、ガスの濃度分布とその経時変化を高感度 CCD カメラにて可視化することが可能であった。また、画像解析により 30 ~ 400 ppm の濃度範囲でエタノールガスの定量が可能であった。さらに飲酒後の呼気サンプルの可視化計測に適用したところ、アルコール代謝能に応じた出力を得られ、本システムの生体ガスの可視化計測に対する有効性を確認された。また、手掌部からのエタノールガスの可視化にも適用したところ、皮膚ガス中に含まれるエタノールガスの放出分布を可視化することが可能であった。今後、可視化計測システムの高感度化を目指し、生体から放出される生体ガスの放出動態について検討を進めていきたいと考えている。

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5件)(全て査読有り)

Arakawa T, Kita K, Wang X, Miyajima K, Toma K, Mitsubayashi K, Chemiluminescent imaging of transpired ethanol from the palm for evaluation of alcohol metabolism, *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 570-575, 2015.

Arakawa T, Iitani K, Wang X, Kajiro T, Toma K, Yano K, Mitsubayashi K, A sniffer-camera for imaging of ethanol vaporization from wine: the effect of wine glass shape, *Analyst*, 140, 2881-2886, 2015.

Arakawa T, Wang X, Kajiro K, Miyajima K, Takeuchi S, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K, A direct gaseous ethanol imaging system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 186, 27-33,

2013.

Arakawa T, Ando E, Wang X, Miyajima K, Takeuchi S, Kudo H, Saito H, Takahashi M, Mitani T, Mitsubayashi K, Chemiluminescent visualization for evaluation of gaseous ethanol distribution during 'La France' pear maturation, *IEEE Sensors Journal*, vol. 13, No. 8, 2842-2848, 2013.

Arakawa T, Eri Ando, Xin Wang, Miyajima Kumiko, Hiroyuki Kudo, Hirokazu Saito, Tomoyo Mitani, Mitsuo Takahashi, Kohji Mitsubayashi, A highly sensitive and temporal visualization system for gaseous ethanol with chemiluminescence enhancer, *Luminescence*, 27, 328-333, 2012.

[学会発表](計10件)

Arakawa T, Sato T, Iitani K, Toma K, Mitsubayashi K, Fluorometric biosniffer camera (gas-imaging system) with UV-LED excitation sheet for transdermal ethanol vapor from palm skin surface, 4th International Conference on Bio-Sensing Technology, Lisbon, Portugal, 2015.

Arakawa T, Wang W, Sato T, Miyajima K, Munkhjargal M, Mitsubayashi K, Optical imaging of breath ethanol using real time biochemical luminescence for evaluation of alcohol metabolic capability, *EUROPT(R)ODE XII*, Greece, 2014.

Arakawa T, Wang X, Kajiro T, Miyajima K, Yano K, Mitsubayashi K, Direct imaging system of gaseous ethanol from exhaled human breath for non-invasive analysis of alcohol metabolism, *Biosensors 2014*, Melbourne, Australia, 2014.

Arakawa T, Wang X, Miyajima K, Munkhjargal M, Mitsubayashi K, 2-dimensional gaseous ethanol visualization system for noninvasive analysis of alcohol metabolism from exhaled human breath, *IUMRS-ICA 2014*, Fukuoka, Japan, 2014.

Arakawa T, Kita K, Wang X, Miyajima K, Toma K, Mitsubayashi K, Gaseous ethanol imaging system from human breath and skin for evaluation of alcohol metabolism, *Bio4Apps 2014*, Shanghai, China, 2014.

Arakawa T, Sato T, Wang X, Kita K, Munkbayar M, Toma K, Mitsubayashi K, "Scent camera" for real-time imaging of breath (body) ethanol after

alcohol drinking, DOS 2014, Tokyo, Japan, 2014.

Arakawa T, Wang X, Kita K, Miyajima K, Munkhjargal M, Mitsubayashi K, A gaseous ethanol visualization system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath, 12th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XII), Fukuoka, Japan, August 22-24, 2013.

Arakawa T, Wang X, Kita K, Miyajima K, Munkhjargal M, Mitsubayashi K, Gaseous ethanol imaging system for real-time alcohol analysis using emission of human breath and body, 8th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications (IMA 2013), Thessaloniki, Greece, September 15-19, 2013.

荒川貴博, 王昕, 神白匠, ムンフジャルガルムンフバヤル, 宮島久美子, 工藤寛之, 矢野和義, 三林浩二. アルコール代謝機能評価のための呼気中エタノールガスの可視化計測システムに関する研究, 電気学会センサ・マイクロマシン部門, 第30回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 仙台, 2013年.

荒川貴博, 王シン, 安藤恵理, 宮島久美子, 工藤寛之, 三林浩二, 食品由来エタノールガスの可視化センシングシステムに関する研究, 日本分析化学会第61年会, 金沢, 2012年.

〔図書〕(計2件)

荒川貴博, 三林浩二(分筆). 第二編 第4章 生体ガスの可視化計測, スマート・ヒューマンセンシング ~健康ビッグデータ時代のためのセンサ・情報・エネルギー技術~, シーエムシー出版, 2014年3月.

荒川貴博, 三林浩二(解説); センサ医工学に基づく生化学式ガスセンサ "バイオスニファ" とガス成分の可視化システムの構築, 特集: 医療周辺機器の開発, 日本設計工学会誌, 49, 12-17, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

・ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/inst/inst-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 貴博 (Arakawa Takahiro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師

研究者番号: 50409637