

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500411

研究課題名（和文）

超小型ブドウ糖センサ及びインスリン皮下注入方式を組み込んだ携帯型人工膵島の開発

研究課題名（英文）Development of wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor and closed-loop subcutaneous insulin infusion algorithm

研究代表者 下田 誠也 (SHIMODA SEIYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：60398203

研究成果の概要（和文）：本研究では、次世代型携帯型人工膵島の開発を目標に、超小型ブドウ糖センサ及び高濃度超速効型インスリンアナログを用いた closed-loop インスリン皮下注入アルゴリズムを組み込んだ人工膵島の開発を行った。さらに糖尿病犬に対して、これらのセンサ及びアルゴリズムを組み込んだ人工膵島を用いて、血糖日内変動時の血糖制御を試みた結果、良好な血糖制御が可能であった。以上より、超小型ブドウ糖センサ及び高濃度超速効型インスリンアナログを用いた皮下注入アルゴリズムを組み込んだ人工膵島システムが有用であったことを示された。近い将来、次世代型携帯型人工膵島の使用により、より長期にわたる糖尿病患者の厳格な血糖管理が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We applied the artificial endocrine pancreas (AEP) system with PI sensor and a closed-loop subcutaneous insulin infusion algorithm developed for glycemic control in diabetic dogs. The use of the WAEP system resulted in excellent glycemic control after a meal load of 80 kcal/kg (post-challenge blood glucose levels: from 70.2 to 181.8 mg/dL), without any hypoglycemia. Thus, the new AEP with PI sensor and a closed-loop subcutaneous insulin infusion algorithm developed is potentially suitable for clinical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器工学・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

現在約 890 万人といわれる糖尿病患者の最大の治療目標は、失明や腎不全に至る糖尿病性細小血管合併症や心筋梗塞や脳血管障害などの大血管合併症の発症・進展を阻止することである。そのために、できる限り厳格な血糖管理を長期にわたり遂行することが重要であることは、我々が行った2型糖尿病を対象とした10年間に亘る randomized prospective study である Kumamoto Study から明らかとなった。しかしながら、強化インスリン療法によっても十分な血糖コントロールが得られず、合併症を発症する患者が存在する。従って、厳格な血糖コントロールを可能とするそのほかの手段が求められている。このような長期間にわたる厳格な血糖コントロールを可能とする手段のひとつとして、計測と制御を closed-loop とした人工膵島の開発が挙げられる。

我々は、計測部門、治療制御部門、操作部門を closed-loop とした大型人工膵島を既に開発し、次いでブドウ糖酸化酵素を固定化したブドウ糖バイオセンサを開発、計測部門の小型化を可能とし、ベッドサイド型人工膵島を完成させた。このシステムは、1983 年厚生省の認可を得、1984 年より高度先進医療技術、さらに 1988 年 4 月より保険適用となり、一般臨床応用に供する事ができるようになった。しかし、長期間にわたる血糖制御のためには、携帯型あるいは植込み型の人工膵島の開発が必要である。この目的のため、我々は世界で初めて皮下組織内留置可能な微小針型ブドウ糖センサを開発、それを組み込んだ携帯型人工膵島による糖尿病患者の生理的血糖制御の可能性を示唆した。

さらに携帯型人工膵島をより長期間応用可能とすべく、東京医科歯科大学医用器材研究所との共同研究により、優れた生体適合性を有する MPC 膜の開発に成功した。また、従来の微小針

型センサの欠点である酸素分圧依存性を改善すべく、フェロセン付加微小針型ブドウ糖センサの開発に成功し、最外層に MPC 膜を被覆することにより、7 日間以上に亘る連続血糖計測を可能とした。また、マイクロダイアリス・サンプリング法を応用した超小型血糖モニタリングシステムを開発、本システムにて用いるホローファイバー表面に MPC 膜を被覆することにより、微小針型ブドウ糖センサと同様、7 日間以上に亘る連続血糖計測を可能とした。さらにこれらの技術を基に、操作性に優れる平成 17 年・18 年度科学研究費補助金若手研究 (B) において、ポリイミドを主軸に用いた超小型針型ブドウ糖センサを開発した。一方、治療制御部門に関しては、平成 19 年・20 年度科学研究費補助金基盤研究 (C) において、高濃度の超速効型インスリンアナログを用いたインスリン皮下注入アルゴリズムを開発し、インスリン注入方式の改善に成功し、携帯型人工膵島の長期臨床応用の可能性を示唆してきた。

以上のごとく、これまでの研究・開発により、携帯型人工膵島の基本構成は、ほぼ完成した。今後広く一般臨床応用に供するにあたり、開発したブドウ糖センサ及びインスリン注入アルゴリズムを同時に組み込んだ携帯型人工膵島の有用性を検証する必要がある。

2. 研究の目的

現在、機械型人工膵島の開発が精力的に行われており (Dauber A *et al.* 2013, Hovorka R *et al.* 2010) 近い将来人工膵島の臨床応用が可能となることが期待される。当教室においても、まずは従来型携帯型人工膵島の改良を行うことにより、一日も早く一般臨床応用に供することが至上命題であると考えており、そのためには①計測部門の更なる小型・高性能化及び低侵襲化、②システムの小型軽量化が必須となる。

従来型携帯型人工膵島においてはインスリン注入ポンプの精度の限界から濃度 4U/ml のイン

スリンを使用していたため、インスリンリザーバーが大型となり、さらに頻回にインスリンを補充する必要があり、患者自身での管理は困難であった。そこで、これらの問題点を解決すべく、まず、次世代型携帯型人工膵島の治療制御部門に組み込むアルゴリズムとして、前述のごとく、濃度 100U/ml 超速効型インスリン皮下注入方式を開発した。次のステップとして、これまで開発してきた計測部門と治療制御部門を組合せ、システムとしての有用性を検証する必要がある。

そこで本研究では、closed-loop 皮下注入アルゴリズムを組み込んだ高濃度インスリンを使用できるシリンジタイプの高性能ポンプとポリイミドを用いた超小型ブドウ糖センサを組み込んだ携帯型人工膵島システムの有用性を検討すること、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究は全て熊本大学本荘地区動物実験委員会に申請し承認され、熊本大学動物実験指針に基づいて行った。実験には体重 9~12 kg の健常ビーグル犬(成犬, 雄), 及び糖尿病犬を用いた。糖尿病犬の作成, 管理は以下の通りに行った。アロキササン(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 65 mg/kg を, pH4.4 となるように 0.1 mol/l の酢酸緩衝溶液で希釈し, これをビーグル犬に静脈内投与することにより, 投与2日目以降, 空腹時血糖値 400 mg/100ml 以上, 血漿インスリン濃度測定感度以下 (1.5 μ U/ml 以下) の状態とした。

(2) インスリン注入ポンプの基本性能の検討

現在, 製作中のシリンジタイプのインスリン注入ポンプは, 市販されているカートリッジタイプのインスリンをそのまま用いることを想定, そのため, 従来型携帯型人工膵島のようにインスリンを希釈したり, インスリン皮下持続注入療法

continuous subcutaneous insulin infusion therapy

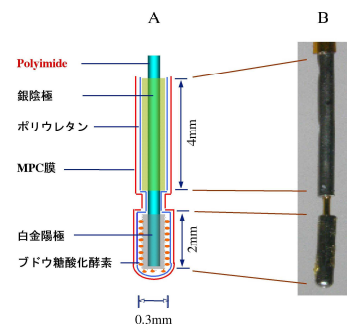
(CSII)のように患者自身がインスリンを注射器で引く必要がなく, 衛生面や管理面においても優れていると言える。このポンプの基本性能としての送り精度, 早送り流量, 最小吐出量及び最大吐出量を, 従来型携帯型人工膵島に組み込んだ小型ローラタイプの注入ポンプと比較検討した。

(3) インスリン持続皮下注入システムの in vivo 動物実験での基礎的検討

インスリン持続皮下注入システムの基礎的検証を行うべく, 健常及び糖尿病モデルラットに対し, 腹部皮下組織にインスリン注入カニューラ及びブドウ糖センサを挿入, 固定し, 7 日間にわたる濃度 100U/ml インスリンの持続皮下注入時の皮下組織反応について検証した。

(4) ポリイミドを用いた超小型ブドウ糖センサの in vitro での有用性の検討

新たに開発した PI センサ(図 1)を以下の 5 項目について検討した。a)水溶液中のブドウ糖濃度に対するセンサ出力の直線性, b)センサの残余電流および 200 mg/100ml ブドウ糖水溶液に浸した際のセンサ出力, c)水溶液中ブドウ糖濃度の変化に対するセンサ出力の応答性(90%応答時間:T90%), d)センサ出力の安定性(baseline drift), e)皮下組織液蛋白濃度を再現した 5%アルブミン添加ブドウ糖水溶液にセンサを 14 日間浸した際のセンサ出力の維持能力について検討した。



(図 1) PI センサの模式図(A)と先端部分の拡大写真(B) 主軸にポリイミドを用い,

遠位部に白金陽極，近位部に銀陽極を配置。

(5) 糖尿病犬に対する経静脈ブドウ糖負荷時におけるブドウ糖センサの妥当性の検討

携帯型人工膵島の一般臨床応用を目的に開発したポリイミドを用いた微小針型ブドウ糖センサを，腹部皮下組織に留置した健常犬に対し 2 g/kg 経口ブドウ糖負荷を行い，この際，同時にもう一つの PI センサを大腿静脈に挿入留置し，血糖値の連続計測を行うことで，皮下組織ブドウ糖濃度の血糖値に対する追従性及び時間遅れについて検討した。さらに，皮下組織ブドウ糖濃度と実測血糖値の相関を検討するために静脈血採血を 10 分間隔で行い，HemoCue B-glucose analyzer にて全血血糖値を測定した。また使用前後のセンサ表面の変化についても評価した。

(6) 血糖値に対する皮下組織ブドウ糖濃度の時間遅れの検討

全血血糖曲線と皮下組織ブドウ糖濃度曲線を基に，血糖値に対する皮下組織ブドウ糖濃度の時間遅れについての検討を行った。1 例ずつ，時間遅れを 0～12 分まで 1 分間隔にて仮定した場合の相関係数の変化を検討した。

(7) 糖尿病犬に対する血糖日内変動の制御

アロキサン糖尿病犬 5 例に対して，ポリイミドを用いた超小型ブドウ糖センサと高濃度超速効型インスリンを用いた closed-loop 皮下注入アルゴリズムを組み込んだ携帯型人工膵島を用い，血糖日内変動における制御を行い，本システムの長期応用時の有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) インスリン注入ポンプの基本性能の検討

ポンプの基本性能については，以下の通りであった。

従来型: 送り精度 $\pm 5\%$ 以内，早送り約 30 ml/h，最小吐出量 50 ml/h，最大吐出量 120 ml/h。

次世代型: 送り精度 $\pm 1\%$ 以内，早送り約 5 ml/h，最小吐出量 1 ml/h，最大吐出量 30 ml/h。

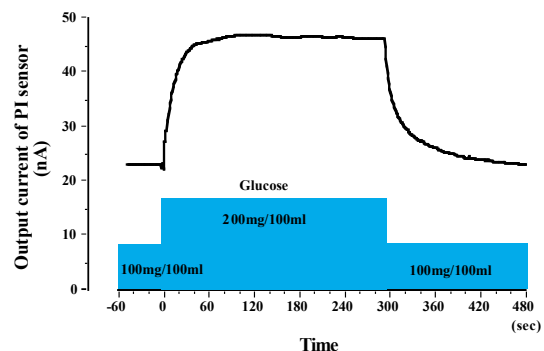
以上の如く，基本的性能に関しては，いずれの項目も従来型に比し優れていることを確認し得た。

(2) インスリン持続皮下注入システムの in vivo 動物実験での基礎的検討

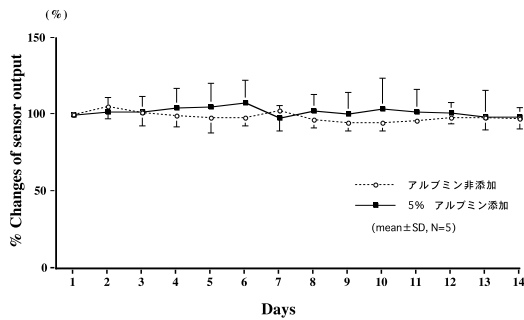
インスリン注入カニューラ挿入部位の皮下組織の組織学的検査において，線維芽細胞及び巨細胞は認めなかった。一方，ブドウ糖センサ挿入部位の組織学的変化として留置 1 日目に白血球の浸潤，7 日目に軽度のフィブリン沈着を認めており，このことは，時間経過に伴うセンサ膜表面への蛋白質の付着に加え，生体組織反応の結果としての体液灌流低下がセンサ機能劣化の大きな原因と考えられた。

(3) ポリイミドを用いた超小型ブドウ糖センサの in vitro での有用性の検討

検討の結果，a)センサ出力の直線性は 0～500 mg/100ml の広い範囲で直線性を示した。b)残余電流は 2.8 nA と低値で安定しており，濃度 200mg/100ml ブドウ糖水溶液でのセンサ出力は 58.0 nA と高い出力を示した。c)T90%はブドウ糖濃度上昇時 69.5 秒，下降時 78.5 秒であり，十分に速やかな応答性を示した(図 2)。d)baseline drift は 4.8 %と非常に安定していた。e)14 日目においてもセンサ出力は開始日の 97.2%であり，有意な出力の低下を認めなかった。(図 3)



(図 2) PI センサの 90%応答時間

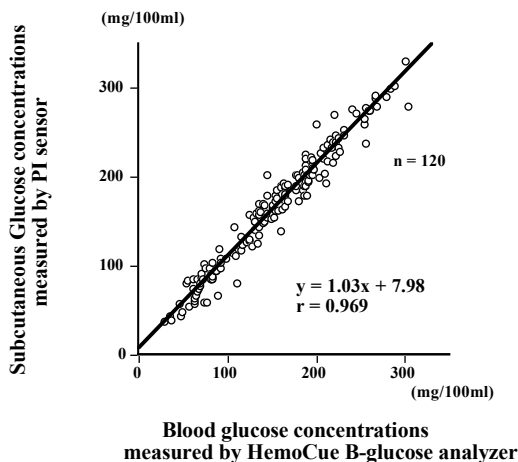


(図3) アルブミン添加・非添加ブドウ糖水溶液中におけるセンサ出力の経時的変化

今回新たに開発したPIセンサは、主軸に polyimide を用い電極を分けて配置したことで、電極の反応面積が拡大した結果、ブドウ糖センサとして優れた *in vitro* 特性を示した。

(4) 糖尿病犬に対する経静脈ブドウ糖負荷時におけるブドウ糖センサの妥当性の検討

連続全血血糖値と実測血糖値の関係は、ほぼ一致していた。このことより、PIセンサにて計測した連続血糖曲線は血糖値の変化をリアルタイムに表していることを確認し得た。同様に、PIセンサにて計測した皮下組織ブドウ糖濃度もブドウ糖負荷後の血糖値の変化に対し、追従していた。実験で得られた全てのデータを基に、PIセンサにて計測した皮下組織ブドウ糖濃度とその時の実測血糖値の相関について検討した結果、血糖値が30から300 mg/100mlの範囲で相関係数0.969と良好に相関することを確認した。(図4) また、センサ表面における変化については、蛋白付着など有意な変化は認めなかった。



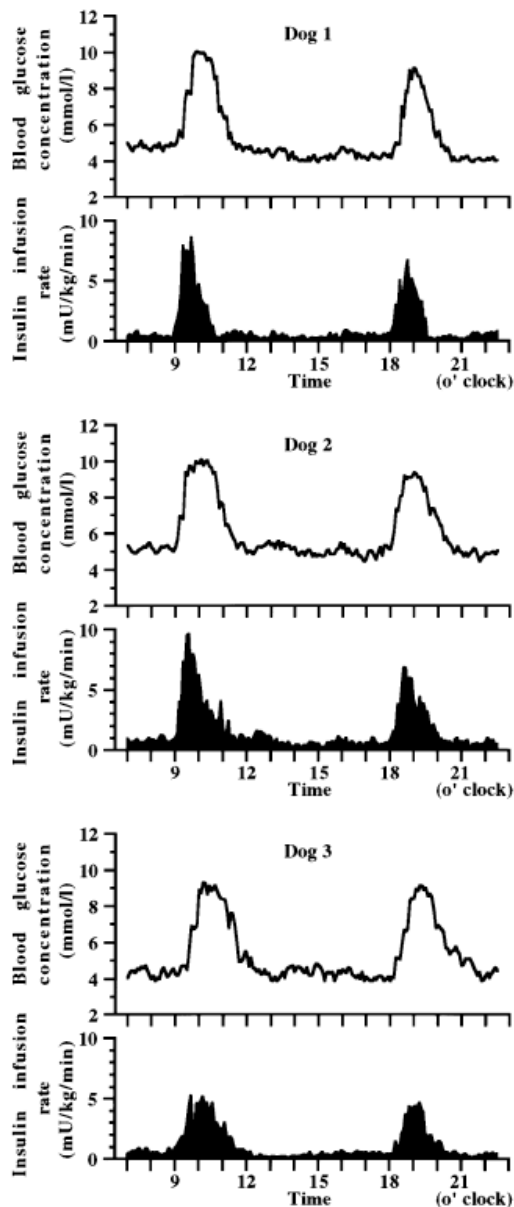
(図4) ブドウ糖負荷時の皮下組織ブドウ糖濃度と全血血糖値との相関関係

(5) 血糖値に対する皮下組織ブドウ糖濃度の時間遅れの検討

1例ずつ、時間遅れを0~12分まで1分間隔にて仮定した場合の相関係数の変化を検討した結果、ある例では、時間遅れを加味しない場合、即ち、時間遅れが0の場合、相関係数は0.948であったが、時間遅れを6分と仮定すると両者の相関係数は最高値0.984を示した。従って、血糖値に対する皮下組織ブドウ糖濃度の時間遅れは、本例では6分であったと考えた。同様の方法にて5例全ての実験結果を解析すると、血糖値に対する皮下組織ブドウ糖濃度の時間遅れの平均値は 6.6 ± 1.2 分であった。

(6) 糖尿病犬に対する血糖日内変動の制御

アロキサン糖尿病犬5例に対して、ポリイミドを用いた超小型ブドウ糖センサと高濃度超速効型インスリンを用いたclosed-loop皮下注入アルゴリズムを組み込んだ携帯型人工膵島を用い、血糖日内変動の制御を試みた結果、低血糖を来すことなく、血糖日内変動を70.2mg/dLから181.8mg/dLの範囲に制御し得た。(図5)



(図 5)携帯型人工膵島を用いた糖尿病犬における血糖日内変動の制御

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 3 件)

1. 西田健朗, 下田誠也, ベッドサイド型人工膵島による臨床検査. 第 3 回ベッドサイド型人工膵島による血糖管理. プラクティス, 査読無, 2011, 28 巻 251-253
2. 西田健朗, 下田誠也: ベッドサイド型人工膵島による臨床検査. 第 2 回クラン

プ・0GL 法. プラクティス, 査読無, 2011, 28 巻 130-131

3. 西田健朗, 下田誠也, 一ノ瀬賢司: 重症患者の血糖管理とベッドサイド型人工膵島の臨床応用. 日本集中治療医学会雑誌, 査読無, 2010, 17 巻 464-467

[図書] (計 4 件)

1. 荒木栄一, 下田誠也: 人工膵島. 朝倉書店, 内科学第 10 版, 2013, in press
2. 西田健朗, 下田誠也: 人工膵島による血糖管理. 一般社団法人日本人工臓器学会, 人工臓器 2012 第 28 回教育セミナー, 2012, 75-84
3. 荒木栄一, 下田誠也, 岩下晋輔: 人工膵島. メディカルレビュー社, 糖尿病ナビゲーター第 2 版, 2010, 390-391
4. 下田誠也, 後藤理絵子, 荒木栄一, 西田健朗: 人工膵島. 新興医学出版社, 新しい糖尿病の治療, 2010, 147-149

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 誠也 (SHIMODA SEIYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号: 60398203

(2) 研究分担者

古川 昇 (FURUKAWA NOBORU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 90335795

荒木 栄一 (ARAKI EIICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 10253733