

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310099

研究課題名(和文) ソフトマテリアルとMEMS技術を融合した生体モニタリングデバイス

研究課題名(英文) Biomonitoring device based on soft-materials and microelectromechanical systems

研究代表者

工藤 寛之 (Kudo, Hiroyuki)

明治大学・理工学部・准教授

研究者番号：70329118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の推進により得られた成果として重要な点は、ソフトマテリアルとMEMS技術を融合したセンシングデバイスを開発することでこれまでの研究代表者らが検討してきたデバイスに加え、対象とする生体のスケールによらない汎用性の高い生体センシングシステムを構築し、その応用可能性を調べた点である。具体的には、PET基板上に形成した集積化炭素電極とOs-HRP酸化還元反応を応用した酵素反応系を組み合わせることで、多様な生体成分に対応できるプラットフォームを構築し、さらに次世代バイオモニタリングへの応用可能性についても脳内及び汗中の成分のモニタリングを通じてその有用性を実験的に示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, a high sensitive biosensing system suitable for multi-scale and multi-analyte biomonitoring. On the basis of biosensors formed on the soft polymers, we utilized an Os-HRP modified carbon electrode, on which lactate oxidase was immobilized, formed on the PET sheet for biomonitoring purpose. The sensing system was utilized in the monitoring of lactic acid contained in the sweat and CSF, respectively. As a result, both lactic acid was successfully monitored using our system. The level of lactic acid in the sweat after anaerobic exercise increased by 7.2 folds in comparison with that of normal situation. This indicates that the biosensor reflects the physiological situation of the human subject.

研究分野：バイオ・マイクロシステム

キーワード：MEMS バイオセンサ 電気化学 バイオマイクロシステム

1. 研究開始当初の背景

生体の様々な部位に小型のセンサを装着することでセンサネットワークを構築し、得られた情報を医療・ヘルスケアをはじめとしたサービスにフィードバックする、ユビキタス生体モニタリング(あるいは近年ではデジタルヘルスケア等とも呼ばれる)の考え方は従前より存在し、その有効性についても十分に議論されている。しかしながら、近年のデバイス技術が飛躍的な進歩を遂げ、社会の情報化が進む中であっても、こうした技術の実用化は十分に進んでいるとは言えない。特に、加速度センサやジャイロセンサなどの物理センサで得られる生体情報は限定的であるものの娯楽やスポーツ、ヘルスケア等で用いられるようになってきているのに対し、生体の化学情報については糖尿病のインスリンポンプ療法等でごく一部実用化に向けた試みが見られるものの、広く普及するには依然としてブレークスルーが必要である。疾患の治療や健康管理で重要な生体成分の情報を調べる生体計測用の化学センサで、感度や信頼性の向上のみならず、装着感や安全性・連続計測への適性といった機能も重要視される。また、化学センサの中には溶存酸素電極やバイオセンサなど素子に水分を必要とする他、寿命や使い勝手の面で制約がある場合がある。

そこで、研究代表者らは「ソフトマテリアルである polydimethylsiloxane(PDMS)上にイオンビームスパッタ法で良質な薄膜電極を形成することで、生体に容易に装着し、生体成分をモニタリング可能なフレキシブル電極 (Kudo H et al. Biosens Bioelectron., 2006)」及び「細胞膜の構造を高分子化学の技術で模倣した 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と 2-ethylhexyl methacrylate(EHMA)の共重合体 (PMEH) を用いた酵素固定化法(Kudo H et al. Anal. Bioanal. Chem., 2008)」を開発し、これら2つの技術を融合することで、個体を対象とした各種の生体センシングデバイスを開発してきた。一方、これらの技術に MEMS 技術を応用し、また反応系に工夫を加えることで、例えば臓器レベルで生体成分のモニタリングなども期待され、対象とする生体成分も飛躍的に広がると考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、本研究では研究グループが従来行ってきた涙液糖のモニタリングに加え、対象とする生体のスケール(例えば臓器や個体など)によらず、さまざまなレベルで利用できる生体計測システムを開発し、その応用可能性をについて評価することを目的とした。より具体的には、(1)平成24年度までは従来の涙液糖モニタリングデバイスの改良を進め、(2)平成25年度には異

なる生体の部位や成分に応用するデバイス群への検討を実施し、(3)平成26年にはこれらの技術から発展させた新しい生体モニタリングの可能性として、臓器と個体といった異なるレベルでの生体計測へと展開することである。

3. 研究の方法

本研究では、モールディングによる PDMS などソフトマテリアルの成形と MEMS 技術を組み合わせることにより、生体のさまざまな成分をモニタリングするデバイス群を開発した。尚、個体レベルの生体モニタリングでは涙液及び汗を、臓器レベルの生体モニタリングでは脳由来の成分をターゲットとして定めた。

センシングシステムは、いずれも生体触媒である酵素とその反応生成物を電気化学的に検出する電極、及び計測対象に最適化された構造体で形成される。

例えば涙液計測用バイオセンサにおいては PDMS 製のソフトコンタクトレンズ上に電極を形成し、その感応部にグルコース酸化酵素を固定化することで作製した。一方、これを生体のさまざまなスケールや成分に展開するためのプラットフォームとして、平成25年度には PET 基板上に複数の作用電極を集積化し、マルチポテンシオスタットを用いて成分同時計測を可能とするシステムを構築した。また、このシステムに最適な生化学反応系として、 $0s$ -HRP 酸化還元反応を用いた酵素反応系を適用することとした。平成26年度には新規に開発したこのシステムを用い、脳内並びに汗中の成分のモニタリングに応用し、その利用可能性について評価した。

4. 研究成果

本研究課題の推進により得られた成果として重要な点は、ソフトマテリアルと MEMS 技術を融合したセンシングデバイスを開発することでこれまでの研究代表者らが検討してきたデバイスに加え、対象とする生体のスケールによらない汎用性の高い生体センシングシステムを構築し、その応用可能性を調べた点である。具体的には、PET 基板上に形成した集積化炭素電極と $0s$ -HRP 酸化還元反応を応用した酵素反応系を組み合わせることにより、多様な生体成分に対応できるプラットフォームを構築し、さらに次世代バイオモニタリングへの応用可能性についても脳内及び汗中の成分のモニタリングを通じて評価した。以下では、年度毎の主な成果の各論についてまとめる。

(1) 涙液糖計測用バイオセンサ (H24)

平成24年度は、これまで行ってきた機能性高分子と MEMS 技術を融合したバイオセンサ技術をさらに深化させることで、長時間に

わたり無観血・無拘束にて生体の化学情報をモニタリングを行う技術を提案することを念頭に研究を進めた。研究実施計画に従い、SCL 型バイオセンサの最適化及び涙液モニタリングを重点的に進めた。SCL の成型については既存の鋳型を用い、高分子材料をキャストすることで作製した。PDMS 上への電極形成に関しては、IBS 法及び平行平板スパッタ法にて薄膜電極の形成を行い、密着性や電極としての特性を評価した。現在のところ、IBS 法においてスパッタ原子のランディング時のエネルギーが高いため、より密着性に富む、良質な薄膜電極が得られている。

加えて、当該度はレーザーマイクロ加工装置を導入することで、電極パターンニング用のステンシルマスクを短時間で作製できるようになり、電極の設計変更が容易になった。このことで、SCL 型バイオセンサの引き出し電極などについても、最適化を進めた。センサの最適化と並行して、家兔（日本白色種）による涙液グルコース計測に関しても実験を繰り返し、グルコース経口投与に伴う動的变化についても調べた。具体的には、家兔の眼部に作製した SCL 型バイオセンサを装着し、グルコースを含む生理食塩水を点眼することで点眼に伴うグルコース濃度の上昇と、その後の涙液の基礎分泌に伴い、点眼したグルコースが低減する様子（分泌動態）を評価してセンサの正常動作を確認した後、グルコース経口投与に伴う SCL 型バイオセンサの出力変化を調べ、涙液糖モニタリングの可能性について見通しを得た。

(2)スケール非依存的多成分生体計測 (H25)

平成 25 年度は前述の機能性高分子と MEMS 技術を融合させたバイオセンサ技術を更に深化させることで、生体計測への最適化及びさまざまな生体成分への対応を進めた。

特に、生体の皮膚並びに粘膜表面より分泌される液性成分をモニタリングするためのデバイスとして、乳酸、ヒスタミン、アルコール等を計測するセンサ群を開発した。また同様の技術を応用し、唾液中のストレスマーカーである α -アミラーゼの活性を評価するデバイスについても検討を行った。これらの成分を電気化学式のバイオセンサにて計測する上で夾雑物の影響を低減するため、オスミウム錯体を電子メディエータとして西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの過酸化水素分解反応を検出する方法を適用することとした。

この手法により、電極に印加する電位を 0.6V vs. Ag/AgCl から 0V vs. Ag/AgCl へと低減することが可能となった。例えばこの駆動電位の低減は、尿酸などの影響を除外するのに極めて有効である。開発したセンサ群は、それぞれ各種の基質成分に対して選択的なモニタリングが可能であり、例えば乳酸においては定量範囲が 10nM ~ 5mM と広いダイナミックレンジにて計測可能であった。

(3)生体試料を用いた応用展開 (H26)

平成 26 年度においては、開発したセンサシステムの応用として、個体、臓器・組織のスケールにて各種の生体試料をモニタリングする実用展開を進めた。

酵素及び Os-HRP 修飾炭素電極と PMMA 製のマイクロフローチャンネルを有する小型のチップを組み合わせたマイクロフロー計測システムを開発した。開発したシステムの検出部には、乳酸酸化酵素 (LOD) とグルコース酸化酵素 (GOD) を修飾しており、乳酸 (0.02 ~ 1mM) 及びグルコース (0.05 ~ 1mM) を独立して定量可能であった。また、フローセル内にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を試薬と共に導入しそれぞれの流入量を調節することで流路内の試薬 50 ~ 100% の濃度に希釈することが可能であり幅広い成分に対応が可能と考えられる。

臓器レベルの生体計測においては、空間分解能を向上させることで、分泌量の分布を評価することができる。本研究では、セル内に異なる濃度の乳酸とグルコースを含むポリアクリルアミドゲルを 3×4 のアレイ上状に配置しセル内を PBS で満たした後、各ゲルファントム近傍 (100 ± 10µm) にてプローブを走査させ、各成分を計測した。その結果、位置の違いによる濃度の違いを評価することが出来、本システムが分泌成分のマッピングにも応用できることが実験的に示唆された。

また、同様の反応系を有するセンサを人の汗中の乳酸の評価に適用し、その応用可能性についても評価した。本センサは、汗に含まれることが知られる、尿酸、尿素、グルコース、アルコール等に対し、40 以上の高い選択比を示し、生体由来の乳酸計測に適した結果を得た。運動後の汗に含まれる乳酸の評価では、無酸素運動による嫌氣的代謝に伴う発汗では、非運動時に比して 7.2 倍の高値を示した。この結果は本センサが運動による代謝の状態変化を適切に反映していることを示唆しており、今後スポーツ科学や日常の健康管理に应用が期待される。

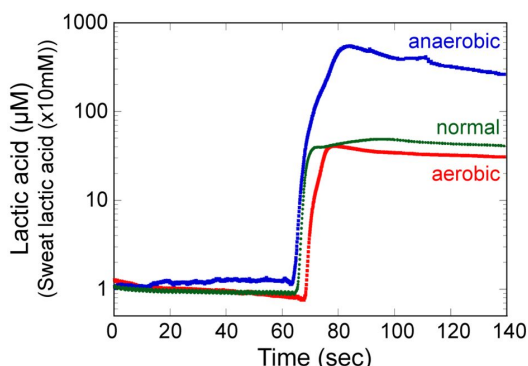


図 1 代謝の違いによる汗中乳酸の評価結果

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 6 件)

1. Kudo H, Yamashita T, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K, “NADH-fluorometric biochemical gas sensor (bio-sniffer) for evaluation of indoor air quality,” IEEE Sens. J. 13, 2828-2833, (2013)

2. Miyajima K, Koshida T, Arakawa T, Kudo H, Saito H, Yano K, Mitsubayashi K. “Fiber-optic fluoroimmunoassay system with a flow-through cell for rapid on-site determination of escheria coli O157:H7 by monitoring fluorescence dynamics,” Biosensors, 3, 120-131, 2013.

3. Arakawa T, Ando E, Wang X, Miyajima K, Kudo H, Saito H, Mitani T, Takahashi M, Mitsubayashi K. “A highly sensitive and temporal visualization system for gaseous ethanol with chemiluminescence enhancer,” Luminescence, 53, 1657-64 (2012)

4. Kudo H, Wang X, Suzuki Y, Ye M, Yamashita T, Gessei T, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K. “Fiber-optic biochemical gas sensor (bio-sniffer) for sub-ppb monitoring of formaldehyde vapor,” Sens. Actuators B Chem., 161, 486-492 (2012)

5. 工藤寛之, 荒川貴博, 三林浩二. “涙液糖モニタリング用ソフトコンタクトレンズ型バイオセンサの開発状況と将来展望 (レビュー)”, 電気学会論文誌 E, 132, 451-454, 2012

[学会発表](計 9 件)

1. 根岸周也, 小園寛明, 河合望, 高島一郎, 梶原利一, 工藤寛之, Os-HRP 酸化還元反応を用いたフローインジェクション型乳酸モニタリングシステム, 電気学会 E 部門総合研究会, 福岡, 2015 年 7 月.

2. 根岸周也, 山崎篤, 工藤寛之. 「臓器・組織の乳酸評価をめざした小型フロー計測システム」, 電気学会バイオマイクロシステム研究会, 川崎, 2015 年 3 月.

3. 工藤寛之, 「デジタルヘルスを志向した生体の化学計測」第 24 回テクニスト研究会(招待講演), 東京, 2015 年 3 月.

4. Negishi S, Jingushi Y, Yamazaki A, Ono Y, Kajiwara R, Kudo H, High sensitive lactate biosensor using Os-HRP redox polymer. Int. Bioscience Conf. 2014, Thailand, Sep. 2014.

5. Kudo H, Electrochemical biosensors for future personal ‘life’ record systems. Meiji-NTU

Neurobiology and Cognitive Neuroscience Exchange Program, Kawasaki, Sep. 2014.

6. Negishi S, Yamazaki A, Kajiwara R, Kudo H, Lactate Biosensor using HRP-Os redox polymer for in-situ biomonitoring, Meiji-NTU Neurobiology and Cognitive Neuroscience Exchange Program, Kawasaki, Sep. 2014.

7. Nagao K, Yamazaki A, Kudo H, Development of differential histamine sensor based on micro flow injection system, Meiji-NTU Neurobiology and Cognitive Neuroscience Exchange Program, Kawasaki, Sep. 2014.

8. Ye M, Yamashita T, Gessei T, Miyajima K, Munkhjargal M, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K, “Biochemical gas sensor based on NADH fluorometry for sub-ppb monitoring of formaldehyde vapor,” 10th Asian Conf. Chem. Sens. (ACCS2013), Thailand, Nov.2013.

9. 工藤寛之. 「デジタルヘルスケア時代の医療計測」, 明治大学科学技術研究所公開講演会, 川崎, 2013 年 7 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 寛之 (HIROYUKI KUDO)
明治大学・理工学部・准教授
研究者番号: 70329118

(2) 研究分担者

三林 浩二 (Kohji Mitsubayashi)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号: 40307326

(3) 研究分担者

荒川 貴博 (Takahiro Arakawa)
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

(4) 研究分担者

梶原 利一 (Riichi Kajiwara)
明治大学・理工学部・准教授
研究者番号: 60356772