

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04013

研究課題名(和文) 生体代謝ガス成分の光イメージング法の確立と疾患スクリーニングへの展開

研究課題名(英文) Development of imaging method for gas components related to metabolism and its application

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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸・皮膚ガスなどの生体ガス中には、代謝や疾患に基づく揮発性の化学物質が含まれており、これら成分を計測することで代謝機能評価および疾患スクリーニングが可能と期待されている。さらに対象ガス成分を可視化することにより、ガスの放出動態や部位の特定が可能になる。本研究では、酵素反応により生成する補酵素の自家蛍光を検出し、エタノールガスの時空間的な変化を動画像として捉える可視化システム(探嗅カメラ)を構築し、飲酒後の呼気中エタノールガスの可視化計測へ適用した。その結果、生体から代謝に伴う揮発性有機化合物の計測を実現し、その有用性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体ガス情報を画像情報として表示することで、特定の皮膚表面から放出される生体ガスの濃度分布や経時変化を評価できる可能性がある。生体ガス情報に関する新しい知見を利用した計測・診断手法として、従来にはない生体由来の化学情報の画像化を提案する極めて学術的意義の高い研究である。身体の皮膚表面から放出される生体ガス由来のガス成分の情報をイメージングすることにより、評価者(医師)や被験者(患者)が直接視認できることで簡便かつ迅速な評価方法となるものと考えられ、医療分野においてこれまでにない新しい非侵襲診断、疾患スクリーニングを提案する社会的意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Various volatile organic compounds can be found in human transpiration, breath and body odor. A novel two-dimensional fluorometric imaging system for ethanol vapor released from human breath and palm skin was constructed. This imaging system measures ethanol vapor concentrations as intensities of fluorescence through an enzymatic reaction induced by alcohol dehydrogenase (ADH). The imaging system consisted of multiple UV-LED excitation sheet, an ADH enzyme immobilized mesh substrate and a high-sensitive CCD camera. It measures ethanol vapor by measuring fluorescence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), which is produced by an enzymatic reaction on the mesh. This NADH fluorometric imaging system achieved the two-dimensional real-time imaging of ethanol vapor distribution. The system showed rapid and accurate responses and a visible measurement, which could lead to an analysis of metabolism function at real time in the future.

研究分野：計測工学

キーワード：バイオセンサ 生体計測 ガス イメージング 酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体では代謝に伴い体外に発せられる「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、主に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半導体式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る。また、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。

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状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を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、皮膚ガス中の生体代謝に伴うガス成分を高感度かつ選択的に、そして連続的に計測する技術が求められている。特に皮膚ガス成分の空間的・時間的情報を兼ね備えた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非侵襲な疾患スクリーニング法として応用が可能となる。

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の高感度かつ選択的な画像化(イメージング)の実現を目指している。体内の代謝に伴い呼気や皮膚ガスとして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。その濃度変化や放出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・診断法となり得ると考えられる。本申請課題は、代謝産物である糖尿病由来のアセトンや肝臓にて代謝されるエタノールなどの揮発成分を含む呼気や皮膚ガスを、光イメージングにより情報化が可能で計測システムを構築し、非侵襲かつ簡便で新しい疾患のスクリーニングへの応用を目指した研究である。

3. 研究の方法

本研究計画は4つの要素技術確立、要素技術を集積化・機能化したシステム構築と疾患スクリーニングを目指して研究を進めていく。確立を目指す要素技術として、(1)生体由来ガスのイメージングシステムの構築、(2)蛍光イメージングのための自家蛍光の少ない酵素固定化担体の検討と高感度化、(3)皮膚表面での生体ガス成分イメージングの基礎検討、(4)マイクロ流体システムを利用したバイオセンサについて検討を行い、長時間安定評価が可能で生体ガスの光イメージングデバイスの構築を行う。(1)～(4)の要素技術を応用して、(5)生体代謝ガス成分の連続計測により、被験者の代謝機能評価を行った。

(1) 化学発光と NADH の蛍光を用いた生体代謝ガス成分イメージングシステムの構築

生体由来のガス成分の光イメージング方法として、図1に示すような生体触媒を利用した化学発光によるイメージングと NAD⁺(NAD 酸化型)と NADH(NAD 還元型)の補酵素を利用した蛍光によるイメージングによる生体代謝ガス可視化システムの構築と最適化を行った。

(2) 蛍光イメージングのための自家蛍光の少ない酵素固定化担体の検討と ppb レベルへの高感度化

紫外領域のLED光源での励起により、イメージングに必要な担体の自家蛍光が問題となる。化学発光を利用したイメージングではコットンやセルロース製のメッシュ担体を使用していたが、紫外励起により微弱な蛍光を計測するため、材料由来の自家蛍光がイメージングに大きく影響することが確認されている。そこでイメージングに最適な材料の検討を行った。

(3) 皮膚表面での生体ガス成分イメージングによる放出動態の基礎検討

皮膚ガス計測では広い皮膚面を対象とすることから、皮膚面と酵素メッシュとの間隔を一定にすることが不可欠である。そこで、同一形状のセルをドット状に配置したパターンプレートを作製し、そ

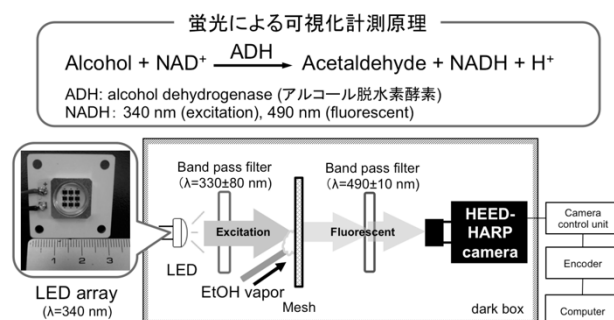


図1 エタノールガスを用いた NADH の蛍光によるイメージング原理とシステムの概略図

れを酵素固定化メッシュにて覆う設計とする。また酵素固定化メッシュには、セルと同様の酵素ドットパターンを形成して皮膚と指を一度に高感度 CCD カメラにてイメージングできる面積の酵素パターンを作製して評価を行った。

(4) マイクロ流体システムとバイオセンサを融合したイメージングシステムの構築

生体触媒である酵素を利用したイメージングでは、酵素の分子認識機能はタンパク質の熱変性、長時間使用、反応生成物の影響により機能が低下、失活してしまう影響がある。そこで温度管理や試薬循環によりタンパク質の機能の維持を目的としたマイクロ流体システムとの融合について検討を行う。酵素ドットパターンを作製したメッシュの面への試薬の拡散が考えられるため、反応試薬、酵素機能、出力の安定化に関わる緩衝液を供給できるような並列マイクロ管路とイメージングに用いるバイオセンサを一体とした系を作製した。

(5) バイオイメージングシステムを用いた代謝機能評価

(1)～(4)の要素技術を集積化して、疾患由来の生体ガスのバイオイメージングシステムの構築を目指す。測定の対象成分としては、肝臓の代謝機能評価のための皮膚ガス中に含まれるエタノールガスの放出動態を評価した。

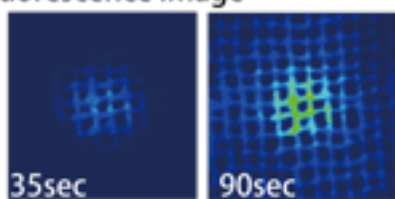
4. 研究成果

(1) 可視化システムの特性評価

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の ADH を用いた可視化システムに各濃度の標準エタノールガスを負荷し、可視化計測を行った。実験の結果、エタノールガスを負荷した点を中心とした蛍光が観察され、負荷後は緩やかに蛍光強度が安定する様子が確認された (図 2 左)。得られた動画像を解析し、その蛍光強度を求めたところ、図 2 右のような経時変化が得られた。しかし、酵素反応に伴い生成した NADH がメッシュ担体に残留し蛍光の強度が低下しないことから、エタノールガス負荷での分布の増減を示すことが困難である。そこで、微分解析を用いた蛍光強度の単位時間あたりの変化を求め、再度、動画像として表示することとした。

まず、微分解析における変化量の最大値を評価するため Δt の値を検討した。 Δt を大きくすることで、微分値が分散することなく波形として変化量を示すことが可能となる。しかし、 Δt の増加に伴い変位の微分解析におけるピーク値は減少するため、移動平均を用いて蛍光強度の経時変化を平滑化し微分することとした。移動平均後 Δt を 5 秒とすることで、ピークを持つ微分値として算出可能となった。得られたピーク曲線はガスの負荷による増加と、停止による減少を示し、2 種酵素を用いた発光での可視化に比して良好な応答性を示した (50 ppm における 90% 応答: 35 sec(化学発光) → 20 sec)。なお挿入画像は、この方法により作成した微分された動画像の各時刻におけるカラーイメージ(20、40、80 秒)である(図 2 左下)。この画像からわかるように、本システムにより得た NADH の蛍光動画を微分解析することで、エタノールガスの空間分布を評価可能となった。これらの結果をもとに、本システムでのエタノールガスに対する蛍光強度に基づく定量特性を評価したところ、図 3 に示すようにエタノールガスを 0.5~150 ppm の濃度範囲で定量が可能であった。

fluorescence image



differential image

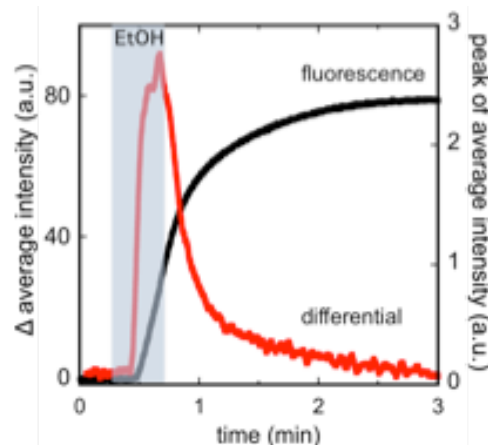


図 2 画像微分による可視化画像及び数値化

左上 可視化画像、左下 微分可視化画像、右 可視化画像の解析で得られた蛍光強度変化

(2) 飲酒後の呼気中エタノールガスの生体計測応用

先の実験結果に基づき、本システムを飲酒後の呼気中に含まれるエタノールガス計測に適用した。予め実験の趣旨を説明し、理解を得た健康被験者(20代・男性)の飲酒後の呼気を流量制御装置を介して負荷し得られた結果より算出したエタノールガス濃度の経時変化を図 4 に示す。この図からわかるように、本システムにて呼気中エタノールガスの可視化計測が可能で、飲酒後 30 分をピークとする呼気中エタノールガスの濃度変化が観察された。

また、飲酒後の皮膚ガスの可視化画像を図5に示す。この図からわかるように、手掌部の皮膚ガスに含まれるエタノールガスを可視化することができ、エタノールの放出が手掌部に広がる様子が確認された。バイオ蛍光による本可視化システムでは、飲酒後15分にてエタノールガスの放出が確認された。従来の化学発光に比して、感度と応答性が向上したことから、本システムを利用することで、生体ガスの発生を詳細に評価できるものと考えられる。

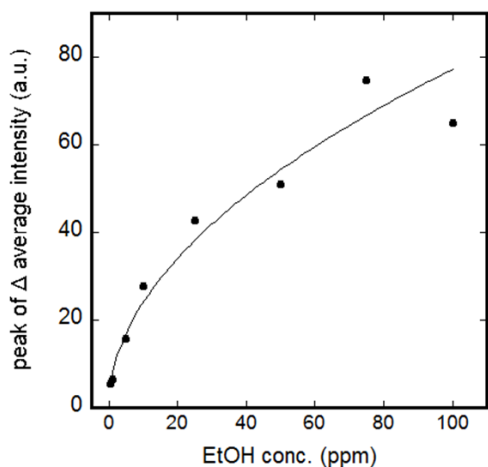


図3 本システムでのエタノールガスに対する蛍光強度に基づく定量特性

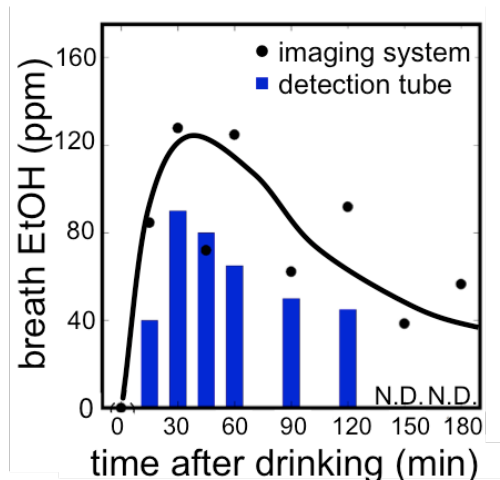


図4 健常被験者の飲酒後における呼気の可視化計測の結果より算出したエタノール濃度の経時変化と検知管との比較

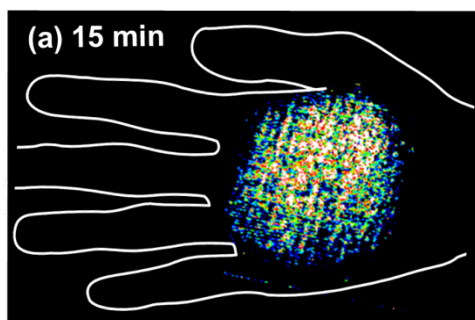


図5 飲酒後の被験者における皮膚由来のエタノールガスの可視化画像

(3) 可視化計測システムの研究成果のまとめ

酵素としてADHを用い、その反応生成物であるNADHの自家蛍光を検出し、エタノールガスを蛍光動画として撮像可能な可視化計測システムを開発した。本システムにて、エタノールガスの可視化計測の応答性と感度の向上を実現し、エタノールガスを0.5~150 ppmの濃度範囲で定量が可能であった。また得られた動画を微分解析することで、エタノールガスの空間分布と経時変化を詳細に表示することができた。また生体ガスへの応用として、本システムに飲酒後の呼気計測に適用したところ、呼気中エタノールガスの可視化が可能であった。また飲酒後の皮膚ガス計測においても、手掌部にて皮膚由来のエタノールガスの蛍光可視化を実現した。以上、ガス可視化システムの非侵襲的な計測法への応用の可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. [Arakawa T](#), Suzuki T, Tsujii M, Iitani K, Chien PJ, Ye M, Toma K, Iwasaki Y, [Mitsubayashi K](#), Real-time monitoring of skin ethanol gas by a high-sensitivity gas phase biosensor (bio-sniffer) for the non-invasive evaluation of volatile blood compounds, Biosensors and Bioelectronics, 129, 245–253, 2019.
2. Iitani K, Hayakawa Y, Toma K, [Arakawa T](#), [Mitsubayashi K](#), Switchable sniff-cam (gas-imaging system) based on redox reactions of alcohol dehydrogenase for ethanol and acetaldehyde in exhaled breath. Talanta 2019; 197: 249-256.
3. Iitani K, Sato T, Naisierding M, Hayakawa Y, Toma K, [Arakawa T](#), [Mitsubayashi K](#), Fluorometric sniff-cam (gas-imaging system) utilizing alcohol dehydrogenase for imaging concentration distribution of acetaldehyde in breath and transdermal vapor after drinking, Analytical Chemistry, 90, 2678-2685, 2018.
4. Iitani K, Chien P-J, Suzuki T, Toma K, [Arakawa T](#), Iwasaki Y, [Mitsubayashi K](#), Fiber-optic bio-sniffer (biochemical gas sensor) using ADH reverse reaction for exhaled acetaldehyde, ACS Sensors, 3, 2, 425-431, 2018.
5. [Arakawa T](#), Sato T, Iitani K, Toma K, [Mitsubayashi K](#). Fluorometric Bio-sniffer Camera “Sniff-cam” for Direct Imaging of Gaseous Ethanol in Breath and Transdermal Vapor,

- Analytical Chemistry, 89, 4495–4501, 2017.
- Iitani K, Sato T, Munire N, Hayakawa Y, Toma K, Arakawa T, Mitsubayashi K, Fluorometric gas-imaging system (sniff-cam), using the extinction of NADH with an ADH reverse reaction, for acetaldehyde in the gas phase, *The Analyst*, 142, 3830–3836, 2017.
 - Ye M, Arakawa T, PJ Chien, Suzuki T, Toma K, Mitsubayashi K, Acetone biosensor based on fluorometry of reduced nicotinamide adenine dinucleotide consumption in reversible reaction by secondary alcohol dehydrogenase, *IEEE Sensors*, 17, 5419–5425, 2017.
 - Iitani K, Chien P-J, Suzuki T, Toma K, Arakawa T, Iwasaki Y, Mitsubayashi K, Improved sensitivity of acetaldehyde biosensor by detecting ADH reverse reaction-mediated NADH fluoro-quenching for wine evaluation, *ACS Sensors*, 2, 940–946, 2017.
 - Arakawa T, Iitani K, Sato T, Toma K, Mitsubayashi K, Ethanol vapor imaging system “sniffer camera” for evaluation of alcohol metabolism from breath and palm skin gas, *Procedia Engineering*, 168, 522–528, 2016.

[学会発表] (計 22 件)

- Arakawa T, Mitsubayashi K, Fluorometric sniff-cam (gas-imaging system) for breath and skin gas analysis, Bio4Apps2018/2019(招待講演)
- Arakawa T, Suzuki T, Tujii M, Chien P-J, Ye M, Toma K, Iwasaki Y, Mitsubayashi K, Direct skin gas monitoring system using high-sensitive ethanol bio-sniffer (gas-phase biosensor) by detecting NADH consumption on enzymatic reaction, *Biosensors 2018*.
- Arakawa T, Mitsubayashi K, Non-Invasive Biosensing for Preemptive Medicine, *Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS) 2018*(招待講演)
- 荒川貴博, 飯谷 健太, 佐藤 敏征, 當麻 浩司, 三林 浩二、可視化計測システム(探嗅カメラ)を用いた 生体ガスの非侵襲モニタリングへの応用、第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2018 年
- Arakawa T, Iitani K, Sato T, Toma K, Mitsubayashi K, 2D fluorometric sniff-cam with ADH immobilized mesh and UV-LED sheet for gaseous ethanol imaging from a palm skin, *Biosensors 2016*.
- Arakawa T, Iitani K, Sato T, Naisierding M, Toma K, Mitsubayashi K, Fluorometric imaging system "Sniffer-cam" for huma breath and skin gas in evaluation of alcohol metabolism, *Optical MEMS 2016*.
- Arakawa T, Iitani K, Sato T, Toma K, Mitsubayashi K, Ethanol vapor imaging system “sniffer camera” for evaluation of alcohol metabolism from breath and palm skin gas, *Euroensors 2016*.
- 荒川貴博、バイオセンサの基礎と生体情報計測・医療への応用展開、第 25 回センサテクノスクール「次世代センサ・アクチュエーターの基礎から最先端技術(招待講演)、2016 年
- 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, 2015.
- Arakawa T, Iitani K, Sato T, Toma K, Mitsubayashi K, A two-dimensional fluorometric imaging “sniffer camera” of ethanol vapor for evaluation of alcohol metabolism using enzymatic reaction, *IEEE sensors 2015*.
- Chien P, Ye M, Iitani K, Sato T, Toma K, Arakawa T, Mitsubayashi K, Ethanol vapor imaging system “sniffer camera” with UV-LED excitation sheet for monitoring of alcohol metabolism from human, *Pacificchem*, 2015, 2015.
- 荒川貴博、飯谷健太、佐藤敏征、當麻浩司、三林浩二、バイオ蛍光法用いた可視化システム(探嗅カメラ)による 生体由来のエタノールガス計測、第 32 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2015 年 10 月

その他 10 件

[図書] (計 2 件)

- 荒川 貴博, 當麻 浩司, 三林 浩二(分筆)、生体ガス・糖尿病における呼吸アセトン&イソプロパノールガス濃度、シーエムシー出版、2018 年
- 三林浩二, 荒川貴博、センサ医工学における医用計測の展開、次世代センサ協議会、2015 年

[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) 研究分担者

研究分担者氏名：三林 浩二

ローマ字氏名：MITSUBAYASHI, Kohji

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：生体材料工学研究所

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40307236

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。