

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K10956

研究課題名(和文) 光テクノロジー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 continuous blood glucose concentration monitoring system using photo-technology

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) 3,700,000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ー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。光技術を用いてブドウ糖濃度を定量する方法を検討した。アントラセン-フェニルボロン酸化合物はブドウ糖濃度に依存して370 nmの励起光にて430 nmにピークを持つ蛍光を発生させるが、時間経過により蛍光強度が不安定となる現象を解決できなかった。1200 nmまでの近赤外領域のブドウ糖の吸光スペクトラムを検討したが、ブドウ糖の定量に利用できる波長は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集中治療を必要とする急性期重症患者では血中ブドウ糖濃度が大きく変動するが、その濃度を至適な範囲に調節することにより予後が改善することが知られている。精密な血中ブドウ糖濃度制御のためには高精度のブドウ糖濃度連続測定が重要であるが、現在臨床使用に適した装置はない。そこで光技術を用いた光ファイバー内蔵血管内カテーテルによる血中ブドウ糖連続測定システムの開発を行った。

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 techniques to estimate blood glucose concentration using photo-technology. Anthracene-phenyl-diboronic acid with glucose emitted 430 nm fluorescence with 370 nm excitation light. The intensity of the fluorescence depended on glucose concentration, but was unstable beyond 2 hours monitoring time. We could not solve this issue in this study. We also investigated light absorption of glucose in near infra-red up to 1200 nm. We could not find any wave length suitable for blood glucose concentration estimation.

研究分野：集中治療医学

キーワード：血中濃度測定 ブドウ糖 光技術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、臨床用のアポ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が、開発した装置ではブドウ糖を検出することができなかった。そこで、平成 23-26 年度基盤研究(C)では、先端にブドウ糖に反応する光センサーを装着した光ファイバーカテーテルの開発を目指した。検討した数多くの光センサー化合物の中で、アントラセン - フェニルボロン酸が優れた蛍光特性を示しブドウ糖検出センサーとして利用できることが明らかになった。光センサーの検討に時間を費やしたために、カテーテルの試作開発には至らなかった。そこで臨床使用に直結する血中ブドウ糖連続測定用カテーテルの開発を目標にして本研究を計画した。

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て以下の 2 つの研究を計画した。

2-1 ブドウ糖検出センサーを用いた光ファイバーカテーテルの開発

(1) ブドウ糖結合たんぱくを用いたブドウ糖検出法の検討

ブドウ糖結合蛋白である、マレクチン、ガレクチン 1、ヘキソキナーゼの 3 物質について検討する。

(2) アントラセン - フェニルボロン酸を用いたブドウ糖検出装置の設計

アントラセン - フェニルボロン酸(以下光センサー)はブドウ糖水溶液と接触すると 370 nm の励起光で 430 nm の蛍光を発する。ブドウ糖濃度に依存する蛍光強度の変化と、時間的安定性について検討する。光ファイバーカテーテルでは光センサーと血液を直接接触させず、水やブドウ糖などの低分子のみを通過させる膜を介する必要がある。その膜は血液蛋白や凝血に影響されにくい特性が求められる。適切な光センサーの形状、膜の材質について検討する。

(3) 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。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。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ブラの形状も検討する。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。

2-2 近赤外線スペクトラムを用いた血中ブドウ糖濃度定量法の開発

以前研究を行った 400 nm から 800 nm の間の少数の固定波長での吸光度の分析ではブドウ糖濃度を定量することは不可能であったが、700 - 1400 nm の高分解能の近赤外線スペクトラムを用いればブドウ糖濃度を測定できる可能性がある。ブドウ糖検出センサーを用いる方法と

平行して、近赤外線スペクトラム解析によるブドウ糖濃度定量法の研究を実施する。

3．研究の方法

3-1 ブドウ糖検出センサーを用いた光ファイバーカテーテルの開発

(1) ブドウ糖結合たんぱくを用いたブドウ糖検出法

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。

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) アントラセン-フェニルボロン酸化合物を用いたブドウ糖検出法

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、370 nm の励起光での 430 nm の蛍光強度を測定した。

ii アントラセン-フェニルボロン酸溶液にブドウ糖を 200 mg/dl の濃度で添加した溶液の 430 nm の蛍光強度の時間的推移を測定した。

3-2 近赤外線スペクトラムを用いた血中ブドウ糖濃度定量法の開発

700 – 1400 nm の高分解能の近赤外線スペクトラムを用いて、純水の吸光スペクトラムを基準としたブドウ糖水溶液の吸光スペクトラムを記録した。

4．研究成果

4-1 ブドウ糖検出センサーを用いた光ファイバーカテーテルの開発

(1) ブドウ糖結合たんぱくを用いたブドウ糖検出法

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。

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応用することが困難であると判断した。

(2) アントラセン-フェニルボロン酸化合物を用いたブドウ糖検出法

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。ブドウ糖を 50, 100, 150, 200, 300, 400 mg/dl の濃度で添加したところ、濃度依存性に蛍光強度が増強した。しかしながらブドウ糖による蛍光強度は、時間

と共に減弱した。蛍光強度の時間的安定性を獲得するために、アントラセン-フェニルボロン酸溶液の濃度、温度、pH、を調整して検討したがこの問題を克服できなかった。アントラセン-フェニルボロン酸化合物をブドウ糖検出センサーとして応用することを断念した。

4-2 近赤外線スペクトラムを用いた血中ブドウ糖濃度定量法の開発

純水の吸光スペクトラムを基準として、ブドウ糖濃度 100mg/dL と 300mg/dL の水溶液の吸光スペクトラムを記録した。1200nm から 1400nm の近赤外領域に微弱な吸収を検出することができた。1200nm から 1400nm の間で 10nm 刻みで吸光の濃度依存性を検討したが、分光光度計の安定性が不十分で測定系の吸光ノイズを除去できず、微弱な吸光の信号ノイズ比が小さくいずれの波長でも濃度吸光関係を得ることが困難であった。800nm から 1400nm までの近赤外領域での吸光によるブドウ糖濃度定量を試みたが、臨床応用できる可能性は極めて小さいとの結論に至った。

総括 血管内光ファイバーカテーテルによる血中ブドウ糖濃度の定量装置の開発を目標として、ブドウ糖の近赤外吸光スペクトラムやアントラセン-フェニルボロン酸化合物をはじめとした蛍光センサーの可能性を検討した。検討した検出法では生理的範囲のブドウ糖濃度を安定して定量することは困難であった。

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

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Doi Matsuyuki, Morita Kiyoshi, Takeda Junzo, Sakamoto Atsuhiko, Yamakage Michiaki, Suzuki Toshiyasu	4. 巻 34
2. 論文標題 Efficacy and safety of remimazolam versus propofol for general anesthesia: a multicenter, single-blind, randomized, parallel-group, phase IIb/III trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 543 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02788-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Doi Matsuyuki, Hirata Naoyuki, Suzuki Toshiyasu, Morisaki Hiroshi, Morimatsu Hiroshi, Sakamoto Atsuhiko	4. 巻 34
2. 論文標題 Safety and efficacy of remimazolam in induction and maintenance of general anesthesia in high-risk surgical patients (ASA Class III): results of a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group comparative trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 491 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02776-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------