

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18396

研究課題名(和文) 局所糖負荷試験による新たなインスリン抵抗性評価装置

研究課題名(英文) A novel insulin resistance evaluation device using local glucose tolerance test

研究代表者

鶴岡 典子 (Tsuruoka, Noriko)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：70757632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗性評価の新たな手法として局所糖負荷試験を提案し、それに使用する針の作製・評価を行った。局所糖負荷試験に用いる針として、細径鍼灸針の表面にポリイミド製の2本の流路を作製した。1本はグルコース注入用流路であり、針を皮膚に刺入後、局所に微量のグルコース溶液を注入するために用いる。もう1本の計測用流路は、根本側から針先で折り返し、根本側に戻るような構造となっており、針先部分のみに微小穴が多数空いている。この流路に生理食塩水を流すことで濃度拡散により皮膚中のグルコースを回収する。ヒトの皮膚構造に近いブタ摘出皮膚において、注入・計測機能評価を行い、十分な機能を有していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではインスリン抵抗性増加を全身の代表として局所の皮膚組織で診断を行う針を作製・評価した。このように局所に働きかけ、局所での反応を計測することで全身の状態を把握するという手法は、自律神経診断の皮膚紋画試験や、アレルギー診断のプリックテスト等が行われているが、いずれも局所での刺激に対する反応を見ることで煩雑な手法を用いなくても身体の状態を把握できている。本研究で開発された局所糖負荷試験用針により局所負荷試験で全身的な状態を把握することができれば、これまで診断が煩雑であった他の様々な身体の状態を局所に着目することで低侵襲的に簡易に診断する新たな手法へ展開できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： In order to measure insulin resistance, minimally invasive needle for local glucose tolerance test was fabricated. Two flow channels were fabricated around thin acupuncture needle with polyimide. Using glucose administration flow channel, trace amount of glucose will be administered into subepidermal tissue. Measurement flow channel starts from the root side of the needle, and winds its way from the needle-tip side back to the root side of the needle. Ten-micrometer diameter holes were fabricated at the tip area of the flow channel for transport of the biomedical substances. Glucose is administered through the flow channel and glucose concentration of skin is measured by microperfusion. The administration and measurement functions were evaluated in pig isolated skin.

研究分野：医工学

キーワード：微小還流 微小流路 インスリン抵抗性 糖負荷試験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の国内の患者数は約 317 万人にのぼり¹⁾、世界では成人の 11 人に 1 人が糖尿病有病者と推定されている²⁾。生活習慣の乱れなどが原因となり中高年に多い 2 型糖尿病は、高血糖時に膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌が正常に行われなくなるインスリン分泌不全とインスリンの作用が障害され正常に働かなくなるインスリン抵抗性増加によって発症する^{3,4)}。日本人は欧米人に比べインスリン分泌能が低く、糖尿病の原因もインスリン分泌不全が大きいと考えられてきたが、脂質摂取量の増加により肥満を伴うインスリン抵抗性が原因の糖尿病患者も増加している⁵⁾。インスリン分泌不全とインスリン抵抗性増加の治療はインスリン注射を除いて投与される薬や治療法が異なることから⁶⁾、それぞれの度合いを正確に把握することで最適な治療が行え、それぞれの治療効果の把握も可能である。インスリン分泌不全は血中や尿中の C ペプチドを計測することで正確に把握することができるが⁷⁾、インスリン抵抗性を最も正確に診断できるグルコースクランプ法では、インスリンとグルコースを持続的に注射するなど手法が煩雑であり、低血糖の危険性もあるためあまり行われていない^{8,9)}。

そこで、本研究では従来よりも患者、施術者ともに負担が少なく極低侵襲で正確なインスリン抵抗性を診断できる新たな手法を提案できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、極低侵襲的にインスリン抵抗性を正確に把握できる新たな診断手法の有用性を確認することを目的とした。この手法は、表面に 2 本の微小流路を作製した外径約 250 μm 、長さ 1 mm 程度の微細針を用いて局所での糖（グルコース）負荷試験を行うことでインスリン抵抗性を把握する。針表面の流路は、1 本はグルコース注入用、もう 1 本は皮膚内グルコース濃度測定用とし、グルコース濃度の測定は微小還流により連続的に計測する（図 1）。微小還流とは流路表面に微小な穴の開いた針先で折り返した流路を作製した針を皮膚に刺入・留置し、流路に生理食塩水等の還流液を流すことにより、浸透圧により針周囲のグルコース分子が流路内に拡散するため、これを体外まで流すことでグルコースを回収し、還流液中のグルコース濃度から体内濃度を測定する。局所へのグルコース注入後、皮膚細胞により糖代謝が起こり、インスリン抵抗性が増加している場合グルコース濃度の低下速度が遅くなると予想され、ここからインスリン抵抗性を評価する。

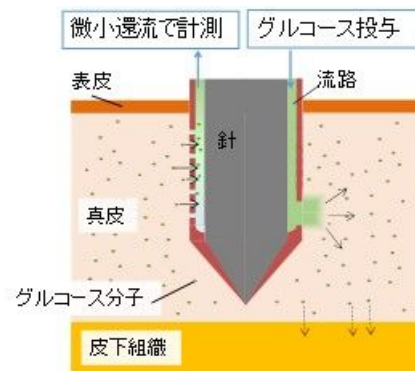


図 1. 局所糖負荷試験の概念図

3. 研究の方法

本研究では、インスリン抵抗性評価の新たな手法として局所糖負荷試験を提案し、それに使用する 2 本の流路が作製された針の作製、評価を行った。

(1) 局所糖負荷試験用針の作製

局所負荷試験用針の構造を図 2 に示す。皮膚へ刺入しやすい鍼灸針（ステンレス製）を基材として用い、表面に生体適合性のあるポリイミド製の流路を作製した。注入用流路は、幅 150 μm 、高さ 20 μm で、先端部に 100 \times 100 μm の開口部を設けている。計測用流路は根本側と針先側を往復する幅 50 μm 、高さ 20 μm の 1 本の流路となっており皮膚に刺入される部分には 30 μm 間隔で直径 10 μm の穴をあけている。この穴を通して、皮膚内のグルコース分子を回収する。

この針は使い捨てが想定されることから、図 3 のように針を複数本 V 溝上に並べて固定し、流路を作製することにより複数本を一括で作製できるプロセスとした。

はじめに、針を V 溝上に固定した状態で、ポジ型電着レジスト（PEPRTM2400、ローム・アンド・ハース電子材料株式会社）を約 25 μm 塗布し、レーザー露光により流路パターンを露光した（図 3 (b)、図 4 (b)）。鍼灸針の表面が露出した部分に、犠牲層である銅を 20 μm 電解めっきした。レジスト剥離後、生体適合性ポリイミド（V-TEC PI-851、Richard Blaine International, Inc.）をディップコートし、流入・流出口、薬液注入口、微小

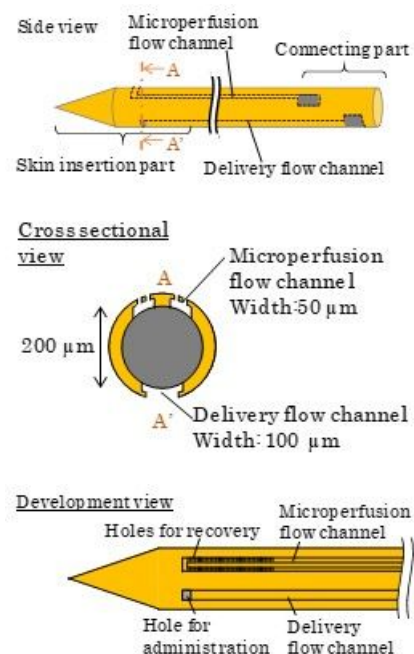


図 2. 局所糖負荷試験用針の構造

還流用穴をレーザーアブレーション（波長：355 nm）にて作製した。その後、硝酸により銅犠牲層をエッチングし流路構造を作製した。

(2) 投与用流路の注入圧評価

皮膚厚がヒトに近いブタ摘出皮膚を用い、投与用流路から溶液を注入するのに必要な注入圧を計測した。シリンジポンプに設置したシリンジと針上流路との間に圧力センサを接続し、ブタ皮膚へ針を刺入した後、シリンジポンプから純水を注入した。注入量を 50 μl に固定し、流量を 5~1,000 $\mu\text{l}/\text{min}$ に変化させた場合の最大注入圧、および流量を 1,000 $\mu\text{l}/\text{min}$ に固定し、注入量を皮内注射の注入量である 20~100 μl に変化させた場合の最大注入圧を計測した。

(3) 計測用流路の還流圧評価

ブタ摘出皮膚に針を刺入した状態で、還流液を還流する際に必要な還流圧を計測した。還流にはプッシュプルシリンジポンプを用い、流入側シリンジと針上流路の間に圧力センサを接続した。圧力センサは注入圧計測を同様のものを用い、還流速度を 3~10 $\mu\text{l}/\text{min}$ に変化させた場合に必要な還流圧を計測した。

(4) 注入前後の皮膚中グルコース濃度評価

注入および回収機能の評価として、ブタ摘出皮膚に針を刺入した状態で、グルコース注入前後の皮膚中グルコース濃度を微小還流により計測した。実験のセットアップを図 4 に示す。作製した針の計測用流路の流入・流出チューブは、プッシュプルシリンジポンプに設置したシリンジに接続した。還流液には生理食塩水を用いた。注入用流路に接続したチューブは、グルコース溶液を入れたシリンジに接続した。微小還流は 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ で行い、10 分間ずつ還流液を回収した。還流を始めて 10 分後に、注入用流路からグルコース溶液を 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 50 μl 注入した。グルコース溶液は血中グルコース濃度を参考に 100, 150 mg/dl とした。グルコース注入開始後 30 分間還流を続けた。回収された還流液は、蛍光染色キット（Glucose Assay Kit, BioVision, Inc.）により染色後、蛍光プレートリーダー（Fluoroscan Ascent, Thermo Fisher Scientific K.K.）にて蛍光強度を計測することにより、溶液中グルコース濃度を計測した。本実験では、注入量が 50 μl で一定でグルコース濃度を 20, 50, 100 mg/dl に変えた場合、および、グルコース濃度が 100 mg/dl で一定で注入量を 10, 20, 50 μl 注入した場合の皮膚中グルコース濃度変化を計測した。

4. 研究成果

(1) 局所糖負荷試験用針の作製

図 5 のように外径約 260 μm の流路付き針を作製できた。図 3(b) のように、正面からのレーザー露光により流路を作製したため、流路が菱形状になっているが、設計通りの流路を作製することができた。作製した針は、シリコンゴム製治具に設置し、シリコン系接着剤にて針および接続用チューブ（内径 0.2 mm, SP-8, 夏目製作所）を接続した。

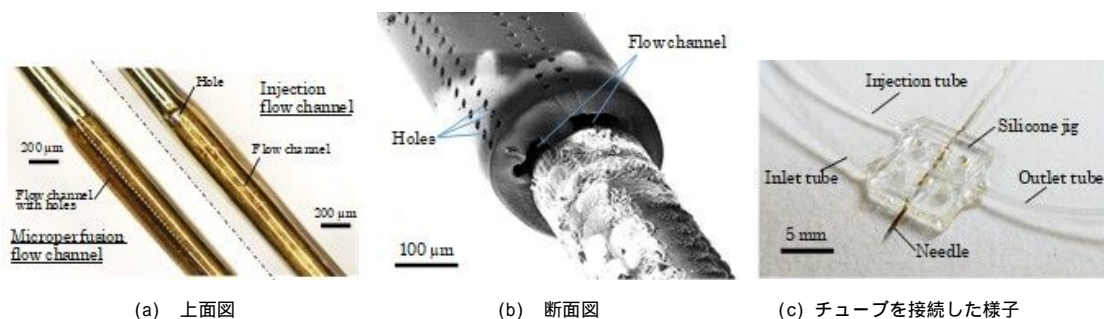


図 5. 流路作製結果

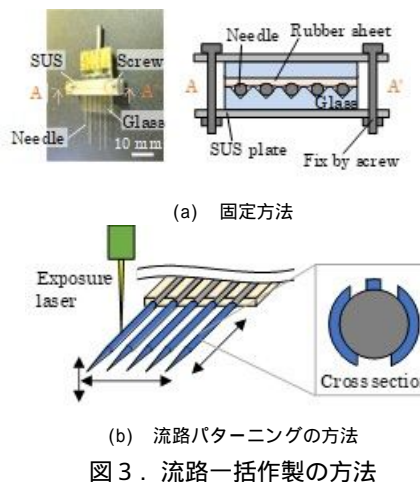


図 3. 流路一括作製の方法

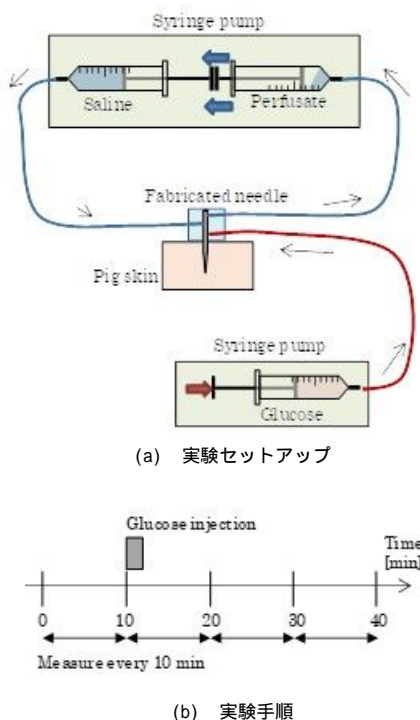


図 4. 注入前後のグルコース濃度評価方法

(2) 投与用流路の注入圧評価

注入圧の計測結果を図 6 に示す。注入量が一定の場合、流量による注入圧の違いはほとんど見られず、注入量に応じて注入圧が変化した。微小流路に溶液の流す場合、流路抵抗による圧力損失があると考えられる。この系にダルシー・ワイスバッハの式を適用できると仮定すると、流路長さを l [m]、水力平均深さを m [m]、管内摩擦係数を λ 、還流液密度を ρ [kg/m³]、平均流速を V [m/sec] とした場合、圧力損失 ΔP [Pa] は以下の式で求められる。

$$\Delta P = \lambda \frac{l}{4m} \cdot \frac{\rho V^2}{2} \quad (1)$$

ここで、レイノルズ数 Re は動粘度を ν [m²/sec] とすると

$$Re = \frac{4mV}{\nu} \quad (2)$$

で求められ、本研究で用いる流量ではレイノルズ数は十分小さく、層流域であるとみなせる。この時、管内摩擦係数 λ は、

$$\lambda = \frac{64}{Re} \quad (3)$$

となることから、圧力損失 ΔP は流速 V すなわち流量に比例して増加すると考えられる。注入圧が流量に依らずほぼ一定であり、注入量に応じて増加したことから、注入の際に必要な注入圧は流路損失よりも皮膚組織にグルコース溶液を押し出す力の方が十分に大きかったと推測される。

(3) 計測用流路の還流圧評価

流量を変化させた場合の還流圧変化を図 7 に示す。流量に応じてほぼ線形に還流圧は増加した。式 (1) ~ (3) より、管内流れの圧力損失は一定断面積の流路では流量に比例することから、還流圧は流路の圧力損失に依存して変化しており、組織への還流液の漏れなどは少ないと考えられる。

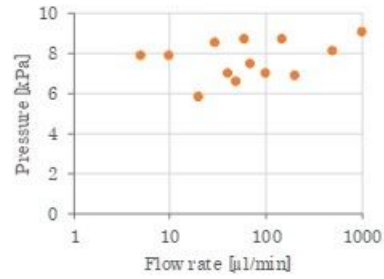
(4) 注入前後の皮膚中グルコース濃度評価

各測定時間帯における還流液中グルコース濃度の変化を図 8 に示す。注入を開始した 10 ~ 20 分で注入前よりも高いグルコース濃度が得られ、その後、グルコースが皮膚中に拡散していくため徐々に低いグルコース濃度となった。また、注入したグルコース量 (= 濃度 × 注入量 [mg]) に対する還流液中最大グルコース濃度を図 9 に示す。注入する濃度を変化させた場合も、グルコース注入量を変えた場合も、注入したグルコース量が多いほど計測されるグルコース濃度が高かった。

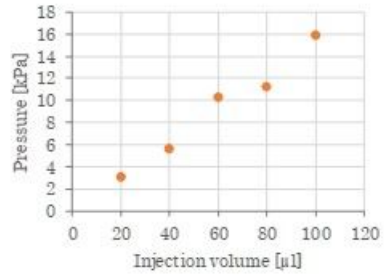
グルコース注入後の還流液中グルコース濃度は最大でも 7 mg/dl であり、注入した 20 ~ 100 mg/dl よりも十分に低く、注入後 30 分でも組織中グルコース濃度が注入前よりも高いことから、注入したグルコースがそのまま計測用流路に入り込み回収されるのではなく、組織中に拡散し組織内のグルコース濃度が上昇したことを微小還流により測定したと考えられる。

グルコース溶液の濃度および注入量を変えた場合、グルコース濃度が高いほど計測されるグルコース濃度が高く、注入量が多いほど計測されるグルコース濃度は高かった (図 8, 9)。また、注入したグルコース量に対する還流液中最大グルコース濃度は注入量を変えた場合も濃度を変えた場合もほぼ同じ近似直線となった。このことから糖負荷の度合いは濃度・注入量の両方によって制御可能であり、注入するグルコース量に依存することが示された。

局所糖負荷時の組織内グルコース濃度は、通常の経口



(a) 注入量 50 μ l 時の流量に対する注入圧



(b) 流量 1,000 μ l/min 時の注入量に対する注入圧

図 6 . 注入圧計測結果

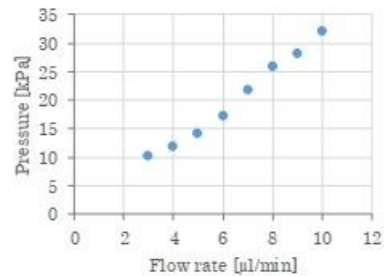
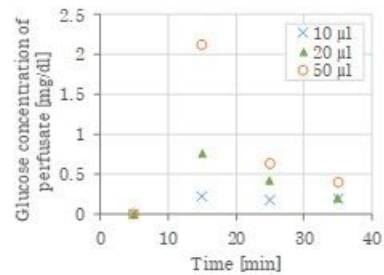
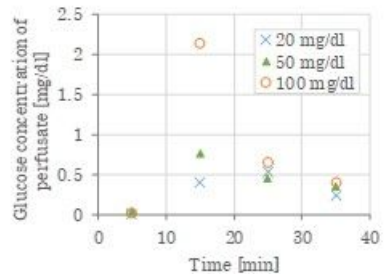


図 7 . 還流圧計測結果



(a) グルコース溶液注入量を変えた場合 (濃度 100 mg/dl)



(b) 注入するグルコース濃度を変えた場合 (注入量 50 μ l)

図 8 . 還流液中グルコース濃度の時間変化

糖負荷試験における血中グルコース濃度である 200～300 mg/dl 程度が適していると予想される。この時、これまでの研究より微小還流による皮膚からのグルコース回収率は約 0.52 %であったことから¹⁰⁾、皮膚中グルコース濃度 200～300 mg/dl となった場合、還流液中のグルコース濃度は 1.14～1.71 mg/dl となる。このため、図 9 の近似式から投与するグルコース量は 0.029～0.042 mg となり、すなわちグルコース注入の条件は、注入量を 50 μ l として濃度を調整する場合、50～100 mg/dl の間の濃度、濃度を 100 mg/dl として注入量を調整する場合は 20～50 μ l の間が適していると考えられる。ただし本実験では、摘出組織を用いているため組織によるグルコース取り込みが行われなかったことから、糖負荷時の皮膚組織内グルコース濃度は高くなっていると考えられるが、今後は健常マウスおよび糖尿病モデルマウスにおいて、負荷強度を変えながら局所糖負荷試験を行うことにより、適した負荷強度を検討する必要がある。

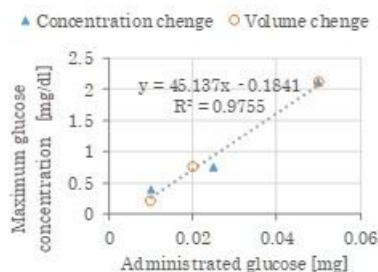


図 9 注入グルコース量に対する還流液中最大グルコース濃度

<参考文献>

- 1) 厚生労働省、平成 26 年患者調査
- 2) 国際糖尿病連合、糖尿病アトラス
- 3) R.A. DeFronzo, J.D. Tobin, R. Andres, Glucose Clamp Technique: A Method for Quantifying Insulin Secretion and Resistance, The American journal of physiology, Vol. 237, 1979, E214-E223
- 4) Y.T. Kruszynska, J.M. Olefsky, Cellular and Molecular Mechanisms of Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, Journal of investigative medicine, Vol. 44, 1996, 413-428
- 5) 稲垣暢也、病態と発症機序を考える 2) 日本人型インスリン分泌不全を考える、日本内科学雑誌、105 巻、2016、396-401
- 6) 日本糖尿病学会、糖尿病治療ガイドライン 2016-2017
- 7) 葛谷健、中川昌一、佐藤譲、金澤康徳、岩本安彦、小林正、南條輝志男、佐々木陽、清野裕、伊藤千賀子、島健二、野中共平、門脇孝、糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告、糖尿病、42 巻、1999、385-404
- 8) 塩之入太、山田信博、インスリン感受性評価法、日本循環器病予防学会誌、34 巻、1999、162-168
- 9) R. Muniyappa, S. Lee, H. Chen, M.J. Quon, Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage, American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, Vol. 294, 2008, E15-E26
- 10) N. Tsuruoka, K. Ishii, T. Matsunaga, R. Nagatomi, Y. Haga, Lactate and glucose measurement in subepidermal tissue using minimally invasive microperfusion needle. Biomedical Microdevices, 2016 Feb;18(1):19

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴岡 典子, 松永 忠雄, 芳賀 洋一
2. 発表標題 計測・投与用流路を備えた局所負荷試験用極低侵襲針
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴岡 典子, 葉 煬, 明石 真, 松永 忠雄, 芳賀 洋一
2. 発表標題 体表からの生体成分および生細胞の極低侵襲採取と診断・治療への応用
3. 学会等名 第58回 日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴岡典子, 松永忠雄, 芳賀洋一
2. 発表標題 局所糖負荷試験用極低侵襲針の投与・計測機能評価
3. 学会等名 第36回 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野田和俊, 鶴岡典子, 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 222
3. 書名 暮らしと人を見守る水センシング技術	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----