

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350532

研究課題名(和文)人工膵島への応用を見据えた血管内留置型センサによる連続血糖計測システムの開発

研究課題名(英文) Development of miniaturized glucose monitoring system by combining a needle-type glucose sensor with intravenous microdialysis sampling method for artificial endocrine pancreas

研究代表者

下田 誠也 (SHIMODA, SEIYA)

熊本大学・生命科学研究部・准教授

研究者番号：60398203

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)：糖尿病患者の治療においては、「低血糖を来すことのない厳格な血糖管理」を達成するためにも人工膵島の実用化が望まれ、現行の血糖計測システムの問題点を解決した新規計測部門を開発し、その有用性を検証する必要がある。そこで、本研究では、血管内留置型のマイクロブドウ糖センサにより、採血せずにリアルタイム連続血糖計測を行うシステムの開発を行った。開発した連続血糖計測システムの基礎的検討及び糖尿病犬における連続計測を試みた結果、優れた直線性と追従性を確認し得た。以上より、本システムが有用であったことを示された。近い将来、携帯型人工膵島の新たな計測部門として使用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed the glucose monitoring system by combining a needle-type glucose sensor with an intravenous microdialysis sampling technique for long-term subcutaneous tissue. This system was tested both in vitro and in vivo. Response time to reach 90% of the final plateau value was calculated by switching the probe from 100 to 200 mg/dL glucose. The overall correlation between blood glucose measured by this system (X) and blood glucose concentration (Y) was $Y = 0.997X + 0.245$ ($r=0.952$). Thus, the new glucose monitoring system developed is potentially suitable for clinical application.

研究分野：総合領域

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、できう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た。さらに平成 22 年・23 年・24 年度科学研究費補助金基盤研究 (C) において、これらのセンサとアルゴリズムを組み合わせたシステムの開発に取り組み、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、携帯型人工膵島の開発に取り組んできた。しかし、今後、様々な糖尿病患者において広く一般臨床応用に供するためには、これまでの血糖計測システムとは異なる、新たな計測部門についても開発を進める必要がある。

2. 研究の目的

現在、機械型人工膵島が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、これまでに closed-loop で血糖管理を行うシステムである人工膵島の開発に携わってきた。連続血糖計測に関しては、皮下組織内に留置するタイプの電極型のブドウ糖センサや、マイクロダイアリス・サンプリング法を応用したシステムの開発を進めてきた。また、海外では皮下組織内に留置するセンサで皮下間質液中のブドウ糖濃度を計測するシステムが商業化されており、その一

部がわが国にも導入されている。しかし、これらの皮下組織液を用いる計測システムは、皮下組織の血液灌流に問題のない状態では応用可能であるが、皮下組織の血液灌流が変動する周術期や重症患者では正確に計測できないといった課題も残されている。

一方、連続的に血液中のブドウ糖濃度を測定するシステムとして一般臨床応用されたものとして、我々が開発したベッドサイド型人工膵島（日機装 STG-22 及び STG-55）がある。このシステムは、静脈内に留置した二重内腔カテーテルを介して連続採血された血液中のブドウ糖濃度をフローセル内に設置したブドウ糖センサにより連続血糖計測している。このため、約 50ml/日の採血が必要であり、かつ血栓による回路内閉塞もしばしば起こり、長期間の応用が困難な理由の一つとなっている。

血管合併症の発症・進展阻止における厳格な血糖管理の重要性が強く叫ばれている一方で、近年報告された糖尿病領域の大規模臨床研究においては、罹病期間が長く血管合併症を有する症例において厳格な血糖管理を行うと死亡率がかえって上昇するといった報告もなされている。このような現象が見られる原因のひとつとして、厳格に血糖管理を行った結果、意識障害を呈するような重症低血糖が増加してしまい、これが虚血性心疾患の引き金となることが考えられている。

即ち、低血糖を来すことなく厳格な血糖管理が可能であれば、予後が改善することが期待される。しかし、これまでのインスリン注入プロトコールでは血糖測定が間歇的であり、低血糖発症のリスクを回避できない。従って、「低血糖を来すことのない厳格な血糖管理」を達成するためにも人工膵島の実用化が望まれ、前述の計測システムの問題点を解決した新規計測部門を開発し、その有用性を検証する必要がある。

そこで本研究では、人工膵島の新規計測部門を開発すべく、血管内留置型のマイクロブドウ糖センサにより、採血せずにリアルタイム連続血糖

計測を行うシステムを開発し、臨床応用するとともに、将来的には携帯型人工膵島の計測部門への応用を試み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) 血管内留置型ブドウ糖センサを用いた連続血糖計測システムの開発

Hollow-fiber probe を血管内に留置し, バッテリー駆動方式の小型のマイクロ・インフュージョンポンプにて微量の生理食塩水を一定速度で注入, 他方より回収した透析灌流液をフローセル内の針型ブドウ糖センサにて連続計測するシステムの開発を行った。本システムの特性として, 透析液中には蛋白が含まれていないことにより, センサ膜汚染を防止でき, センサの長寿命化が期待出来る。

a) 陽極(白金電極)と陰極(銀電極)の比率に関する検討

陽極と陰極の比率を最適とすることが望ましく, 白金の突き出し部分と銀陰極の面積比を変化させて, 最も安定した出力が得られた比率で電極を作成した。

b) 白金陽極の長さの検討

皮下に挿入することを考慮するとできるだけ短い方が望ましいが, センサ出力の向上を目指した場合, 長い方が望ましい。そこで, 白金陽極の長さを変化させて, 過酸化水素電極としての反応性や強度について検討し, 長さを決定した。

c) ブドウ糖酸化酵素被覆に関する検討

200mg/dl のブドウ糖濃度に対し 100nA のセンサ出力を示すことを目標とし、ブドウ糖酸化酵素水溶液中に留置、乾燥を繰り返す回数を決定した。ブドウ糖酸化酵素を被覆した後にグルタルアルデヒドにて架橋することにより固定、ブドウ糖制限膜である 6%ポリウレタンを被覆した後に、生体適合性膜である 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)膜を被覆することによりブドウ糖センサを作製した。

(3) 無採血連続血糖計測システムの in vitro における基礎的検討

In vitro における基礎的検討として、以下の項目について検討した。

- 1) ブドウ糖濃度に対するセンサ出力の直線性
- 2) ブドウ糖濃度を 100mg/dl から 200mg/dl へ変化させた場合と、200mg/dl から 100mg/dl へ変化させた場合の 90%応答時間

(4) 無採血連続血糖計測システムの in vivo における基礎的検討

静脈内にブドウ糖センサを留置した糖尿病犬に対し、経静脈的にブドウ糖を投与、血糖値を 80mg/dl~250mg/dl へ変化させた際の血糖値に対するセンサ出力の追従性を検討するとともに、回帰分析を行い、in vivo における有用性の検討を行った。この際、血糖値はベッドサイド型人工膵島(STG-22)を用いて、1 分毎に測定した。

(5) 無採血連続血糖計測システムによる糖尿病犬におけるブドウ糖濃度の連続計測

糖尿病犬の静脈内ブドウ糖センサを挿入・装着し、ブドウ糖濃度の連続計測を試みた。経口ブドウ糖負荷を施行、血糖値に対するセンサ出力及び血糖変動に対する追従性を検討した。

4. 研究成果

(1) 血管内留置型ブドウ糖センサを用いた連続血糖計測システムの開発

スウェーデン製の CMA 70 Microdialysis Bolt Catheter を用い、血管内留置型ブドウ糖センサを用いた連続血糖計測システム(図 1, 図 2)を開発した。Hollow-fiber の特性に関しては以下

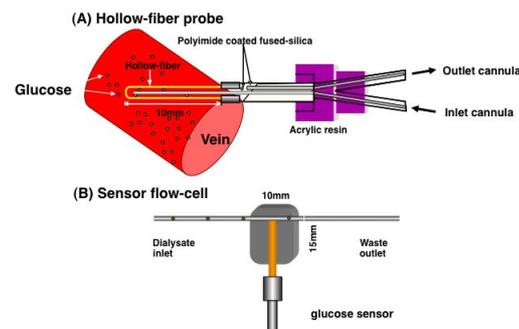
の通りとした。

Length: 10 mm

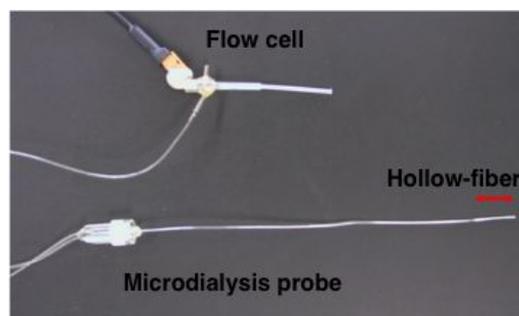
Outer diameter: 0.6 mm

Material: Polyamide

Molecular cutoff: 20,000



(図 1) Hollow-fiber probe(A)と針型ブドウ糖センサを組み込んだ flow-cell (B)のイメージ図。



(図 2) 開発した無採血連続血糖計測システム。

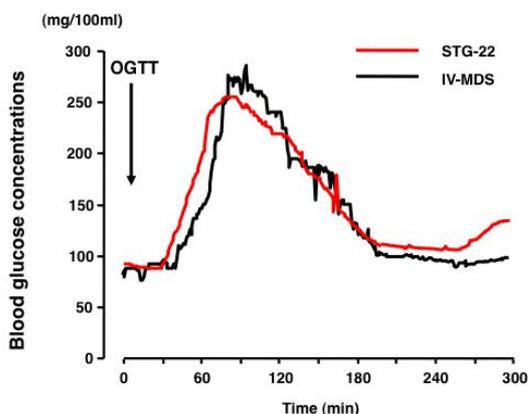
(2) 無採血連続血糖計測システムの in vitro における基礎的検討

まず、ブドウ糖濃度に対するセンサ出力の直線性を確認した。ブドウ糖濃度を 100mg/dl から 200mg/dl へ変化させた場合の 90%応答時間は、 68.5 ± 12.0 秒、200mg/dl から 100mg/dl へ変化させた場合の 90%応答時間は 82.0 ± 18.2 秒であった。以上の如く、基本的性能に関して、確認し得た。

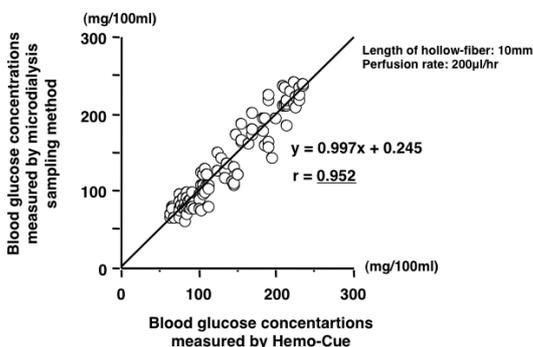
(3) 無採血連続血糖計測システムの in vivo における基礎的検討及び糖尿病犬におけるブドウ糖濃度の連続計測

in vivo での実験では、透析回収液中ブドウ糖濃度をブドウ糖回収率で除して算出した皮下組織液ブドウ糖濃度は実測血糖値とよく一致し、血糖変動に追従していた。ブドウ糖センサを留置した糖尿病犬における経静脈的ブドウ糖負荷時の血糖値(y)に対するセンサ出力より算出した

測定値(x)の直線性及び追従性に関しては、 $y = 0.997x + 0.245$, $r=0.952$ と優れた追従性(図3)と直線性(図4)を認めた。尚、この際の灌流速度は $200 \mu\text{L/hr}$ とした。



(図3) 無採血連続血糖計測システムによる糖尿病犬におけるブドウ糖濃度の連続計測



(図4) 無採血連続血糖計測システムにて計測したブドウ糖濃度と全血血糖値との相関関係

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7件)

1. Igata, M., Tsuruzoe, K., Kawashima, J., Kukidome, D., Kondo, T., Motoshima, H., Shimoda, S., Furukawa, N., Matsumura, T., Miyamura, N. and Araki, E*. Coexistence of resistance to thyroid hormone (RTH β) and papillary thyroid carcinoma. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* in press (査読有)
2. Shimoda, S., Sato, M., Sekigami, T.,

Motoshima, H., Yoshimura, R., Fukuda, K., Matsuo, Y., Noda, H., Okubo, M., Ichimori, S., Fujisawa, K., Fukunaga, M., Araki, E* and Kumamoto Insulin Degludec

Observational (KIDUNA) Study Group.

A 1-year, prospective, observational study of Japanese outpatients with type 1 and type 2 diabetes switching from insulin glargine or detemir to insulin degludec in basal-bolus insulin therapy (Kumamoto Insulin Degludec Observational study). *J Diabetes Investig.* in press (査読有)

3. Kukidome, D., Nishikawa, T., Sato, M., Igata, M., Kawashima, J., Shimoda, S., Matsui, K., Obayashi, K., Ando, Y. and Araki, E*. Measurement of small fibre pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. *Diabet Med.* doi:10.1111/dme.12797, 2015 (査読有)
4. Shimoda, S., Okubo, M., Koga, K., Sekigami, T., Kawashima, J., Kukidome, D., Igata, M., Ishii, N., Shimakawa, A., Matsumura, T., Motoshima, H., Furukawa, N., Nishida, K. and Araki, E*. Insulin requirement profiles in Japanese hospitalized subjects with type 2 diabetes treated with basal-bolus insulin therapy. *Endocr J.* 62: 209-216, 2015 (査読有)
5. Shimoda, S., Iwashita, S., Sekigami, T., Furukawa, N., Matsuo, Y., Ichimori, S., Goto, R., Maeda, T., Watanebe, E., Kondo, T., Matsumura, T., Motoshima, H., Furukawa, N., Nishida, K. and Araki, E*. Comparison of the efficacy of sitagliptin and glimepiride dose-up in Japanese patients with type 2 diabetes poorly controlled by sitagliptin and glimepiride in combination. *J Diabetes Investig.* 5: 320-326, 2014 (査読有)
6. Matsumura, T.* , Taketa, K., Motoshima, H., Senokuchi, T., Ishii, N., Kinoshita, H.,

Fukuda, K., Yamada, S., Kukidome, D.,
Kondo, T., Hisada, A., Katoh, T., Shimoda,
S., Nishikawa, T., and Araki, E. Association
between circulating leukocyte subtype
counts and carotid intima-media thickness in
Japanese subjects with type 2 diabetes.

Cardiovasc Diabetol. 12:177. doi:

10.1186/1475-2840-12-177, 2013 (査読有)

7. Shimoda, S., Iwashita, S., Ichimori, S.,
Matsuo, Y., Goto, R., Maeda, T., Matsuo, T.,
Sekigami, T., Kawashima, J., Kondo, T.,
Matsumura, T., Motoshima, H., Furukawa,
N., Nishida, K. and Araki, E.*. Efficacy
and safety of sitagliptin as add-on therapy on
glycemic control and blood glucose
fluctuation in Japanese type 2 diabetes
subjects ongoing with multiple daily insulin
injections therapy. *Endocr J.* 60:
1207-1214, 2013 (査読有)

[図書] (計 1 件)

1. 荒木栄一 , 下田誠也 : 人工膵島 . 朝倉書
店, 内科学第 11 版 , 2016 , in press

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・特任准教
授

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