

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25790070

研究課題名(和文) バイオセンサを用いた糖尿病合併症バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Fiber-optic biosensor for sensitive detection of sorbitol-induced diabetic complications

研究代表者

月精 智子 (GESSEI, Tomoko)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第二部 バイオ応用技術グループ・副主任研究員

研究者番号：80520220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病合併症は、ポリオール代謝経路の活性化によるソルビトールの蓄積が成因の1つであることが知られている。そこで本研究では、糖尿病合併症の予防を目的として、ソルビトールを高感度に計測可能な光ファイバ型バイオセンサを開発し、評価した。その結果、開発したバイオセンサは、糖尿病合併症の診断基準値を含む範囲で、ソルビトール濃度の定量が可能であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The sorbitol is known as an effective biomarker of diabetes complications by previous studies. The sorbitol sensor with simple, compact and relatively accurate is required for daily prevention of diabetic complications. We constructed and tested fiber-optic biosensor for sensitive detection of sorbitol. The result gained from the measurement of sorbitol indicates that calibration of sorbitol in concentration ranges from 1.0 to 1000  $\mu\text{mol/l}$ . This range also includes the standard sorbitol value in urine and blood for diabetic complication diagnosis.

研究分野：人間医工学

キーワード：バイオセンサ ソルビトール 糖尿病合併症 光ファイバ 蛍光検出

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の1つである糖尿病罹患患者数は年々増加しており、日本国民の5人に1人は糖尿病を発症しているのが現状である。糖尿病は自覚症状に乏しいものの、進行すると神経障害・網膜症・腎症などの重篤な合併症を併発するため、糖尿病の治療は合併症を防ぐことにあると考えられている。また、少子高齢化に伴う国民医療費の高騰が懸念されている日本において、糖尿病合併症の有無による医療費格差も問題となっており、糖尿病合併症の予防は経済面においても重要な課題として位置付けられている。そのため、経済産業省の技術戦略マップ「創薬・診断分野」においても、糖尿病は検討対象の疾患に選定されており、必要な技術開発として合併症リスク診断に有効なバイオマーカーの開発等が挙げられている。

糖尿病診断は血糖値やHbA1cを用いた方法が一般化されているが、合併症診断については実用的なバイオマーカーが確立されておらず、糖尿病患者は自己血糖センサによる血糖値管理を日常的に行うことで、各種合併症の発症を抑制しているのが現状である。合併症診断のバイオマーカーは、慢性的な高血糖状態により活性化されるポリオール代謝経路に関連して、ソルビトールや終末糖化物質(AGEs)等が提案されているが、臨床検査会社などによる大型装置を用いた測定でしか実施されておらず、結果を得るまでに時間を要することなどから、患者のQOL向上には適さない。

また、糖尿病合併症診断に限らず、現在の疾患の予防や診断では、臨床サンプルの数不足や散逸のため、非臨床試験や少数のサンプルから得られたバイオマーカーを画一的に利用しているのが現状である。このような現状を打破するためには、前臨床試験にて有用性が認められたバイオマーカーについてPOCT(Point Of Care Testing)検査のように正確かつ簡便に測定する技術を開発し、患者の糖尿病進行度管理を支援すると同時に、ルーチ的に莫大なサンプル数を網羅的に解析することで各疾患と遺伝子発現の関係等を調べていく必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、選択性に優れているバイオセンサ技術を利用し、糖尿病合併症の代表的なバイオマーカーであるソルビトールに着目し、糖尿病の進行度を簡便に計測できるバイオセンサシステムを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)ソルビトールバイオセンサの構築

バイオセンサによるソルビトールの測定原理を図1に示す。ソルビトール脱水素酵素反応により生成する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の蛍光特性

(340nmの励起光を照射すると491nmの蛍光を発する)を利用して、ソルビトールを検出する。

NADH 蛍光検出システムは、励起光源であるUV-LEDと、光検出器である分光器や光電子増倍管を2分岐の光ファイバで接続して構築した。励起光源側には $340 \pm 10\text{nm}$ のバンドパスフィルタ、光電子増倍管を使用する際には蛍光検出側に $490 \pm 10\text{nm}$ のバンドパスフィルタを介することで、特定波長の抽出を行った。2分岐の光ファイバの先端には、光ファイバプローブを接続し、微生物由来のソルビトール脱水素酵素を固定化した親水性のテフロン膜を取り付け、ソルビトールバイオセンサを作製した。酵素の固定化には、生体膜を模倣したポリマーによる包括固定化法を用いた。

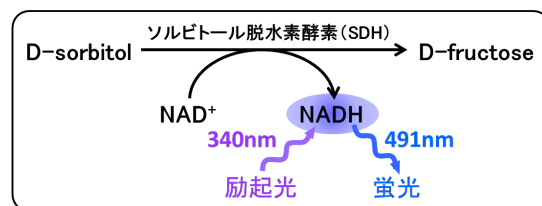


図1 ソルビトールの測定原理

#### (2)ソルビトールバイオセンサの評価方法

まず始めに、NADH 蛍光検出システムの特性評価を行った。NADH 濃度の測定では、黒キュベットに $300 \mu\text{l}$ の純水を注入し、光ファイバの先端を浸した。黒キュベットにNADH 溶液を滴下し、NADHの蛍光波長である491nmの蛍光強度変化を光検出器を用いて計測した。

ソルビトールバイオセンサの評価では、黒キュベット内に酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD+)を含むトリス塩酸緩衝液(pH 9.0、 $10\text{mmol/L}$ )を $300 \mu\text{l}$ 注入し、ソルビトール脱水素固定化膜を取り付けた光ファイバプローブを浸し、ソルビトール溶液を指定濃度になるように滴下し、蛍光強度の変化を計測した。

最後に、生体試料への応用を検討するため、正常ラットの血漿にソルビトールを添加し、開発したバイオセンサによるソルビトールの測定を行った。血液の前処理方法は、(株)J.K. International製のF-kitで推奨されている方法を参考にした。まず、ラットの全血を遠心分離( $1500\text{g} \times 10\text{min}$ )して得られた血漿にソルビトールを添加した後、過塩素酸( $1.0\text{mol/L}$ )によりタンパク質を変性させ、遠心分離( $3000\text{rpm} \times 10\text{min}$ )で上清を採取した。得られた上清に水酸化カリウム( $1.0\text{mol/L}$ )を加えてpHを調整し、遠心分離( $5000\text{rpm} \times 10\text{min}$ )を行い、得られた上清を生体試料のサンプルとした。

### 4. 研究成果

#### (1)NADH 蛍光検出システムの評価

構築したNADH 蛍光検出システムを用いて、NADH 溶液の滴下実験を行ったところ、491nm

をピークとする NADH の蛍光波長が観察された。また、NADH 溶液の濃度に伴う蛍光強度の増加が確認され、分光器を用いた NADH 蛍光検出システムでは、1.0~200  $\mu\text{mol/L}$  の範囲で、NADH の定量が可能であった。

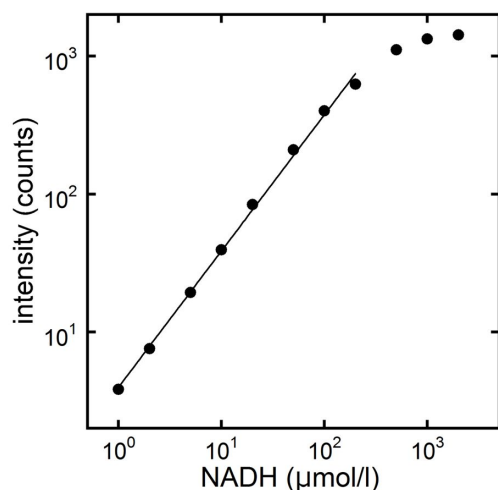


図2 NADH 蛍光検出システムの定量特性

### (2)ソルビトールバイオセンサの特性評価

構築した NADH 蛍光検出システムにソルビトール脱水素酵素を固定化した膜を取付け、ソルビトール計測に展開した。その結果、ソルビトール溶液の滴下に伴う NADH の蛍光が観察され、ソルビトール濃度の増加に伴い、蛍光強度の増加が確認された。また、光検出器を分光器から光電子増倍管に変更したところ、SN 比が 2.6 倍向上し、ソルビトールバイオセンサの高感度化が可能であった。さらに、開発したバイオセンサの出力を微分解析することで、5~10 分ほど要していたセンサ応答を、2 分以内に短縮することができた。光電子増倍管を用いたソルビトールバイオセンサの定量特性を調べたところ、1.0~1000  $\mu\text{mol/L}$  の範囲でソルビトールの定量が可能であることが分かった。

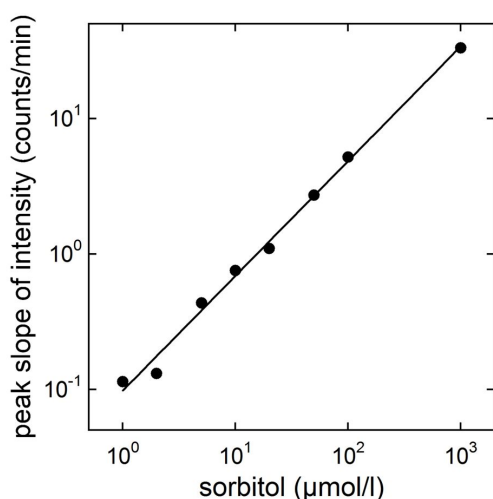


図3 ソルビトールバイオセンサの定量特性

### (3)生体試料への応用検討

ラットの血漿にソルビトールを添加して前処理した生体試料サンプルに対する出力と緩衝液中ソルビトール溶液に対する出力を比較したグラフを図4に示す。緩衝液中ソルビトール溶液に対するセンサ出力と比較して、血漿中に添加したソルビトール溶液に対する出力は若干低かったものの、前処理を施すことで開発したソルビトールバイオセンサを用いた生体試料中ソルビトール計測への可能性が示唆された。

今後は、糖尿病の進行度管理に向けて、生体試料の前処理方法やバイオセンサの更なる改良を進めていきたい。

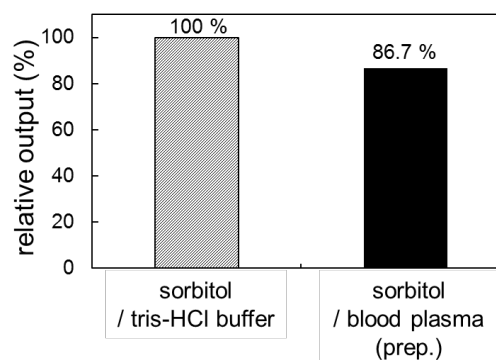


図4 血漿及び緩衝液中ソルビトールの出力比較

### <引用文献>

Hiroyuki Kudo, Masayuki Sawai, Xin Wang, Tomoko Gessei, Tomoyuki Koshida, Kumiko Miyajima, Hirokazu Saito, Kohji Mitsubayashi, A NADH-dependent fiber-optic biosensor for ethanol determination with a UV-LED excitation system, Sensors and Actuators B-Chemical, 2009, Vol.141, pp. 20-25.

Tomoko Gessei, Takahiro Arakawa, Hiroyuki Kudo, Kohji Mitsubayashi, A fiber-optic sorbitol biosensor based on NADH fluorescence detection toward rapid diagnosis of diabetic complications, Analyst, Vol.140, 2015, pp. 6335-6342.

### 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 1件)

Tomoko Gessei, Takahiro Arakawa, Hiroyuki Kudo, Kohji Mitsubayashi, A fiber-optic sorbitol biosensor based on NADH fluorescence detection toward rapid diagnosis of diabetic complications, Analyst, 査読有, Vol.140, 2015, pp. 6335-6342, DOI : 10.1039/c4an01593b

〔学会発表〕(計 1件)

Tomoko Gessei、Yuki Takimoto、Akira Monkawa、Takahiro Arakawa、Kohji Mitsubayashi、Fiber-optic biosensor with a UV-LED excitation system for sensitive determination of sorbitol-induced diabetic complications、The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015、平成27年12月16日、ホノルル(アメリカ合衆国、ハワイ州)

〔図書〕(計 0件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

月精 智子(GESSEI, Tomoko)

東京都立産業技術研究センター・開発本部・開発第二部・バイオ応用技術グループ・副主任研究員

研究者番号：80520220

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

三林 浩二(MITSUBAYASHI, Kohji)

工藤 寛之(KUDO, Hiroyuki)

荒川 貴博(ARAKAWA, Takahiro)

紋川 亮(MONKAWA, Akira)

瀧本 悠貴(TAKIMOTO, Yuki)