

# バイオセンシング技術による新規な生体計測

Novel biomedical measurements with biosensing techniques

三林 浩二

Kohji MITSUBAYASHI

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 センサ医工学分野

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10

TEL 03-5280-8091

E-mail: m.bdi@tmd.ac.jp

## 1. はじめに

IoT社会の実現に向け、ウェアラブルデバイスの研究開発および産業化が活性化している。特に、ヘルスケアや医療の領域においては次世代デバイスとして、生体の化学/バイオ情報を捉える「非侵襲計測が可能なバイオセンサ」への期待が高まっており、対象サンプルとして涙液や唾液、生体ガスなどが有効と考えられる。非侵襲計測におけるバイオセンサには「デバイスの生体親和性や融和性」が大切であり、また「非接触にて生体情報を捉える技術」も重要である。本講演では、涙液や唾液を非侵襲サンプルとして、涙液嚢や口腔などの「体腔」に装用可能なデバイスである「キャビタス（体腔）センサ」(Cavitas sensors、図1)<sup>[1]</sup>、そして疾病や代謝由来の生体ガス計測用のバイオスニフファ（気相用バイオセンサ）と探嗅究カメラ（可視化システム）を紹介し、新規生体計測のためのバイオセンサの可能性を示す。

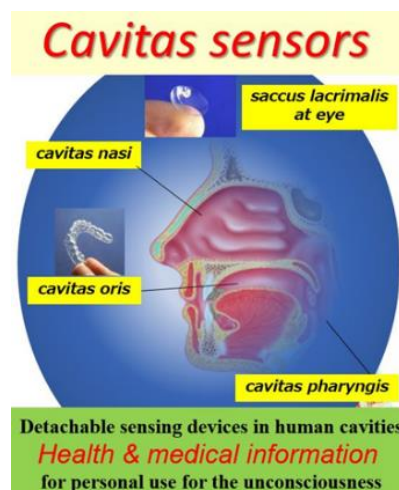


図1 窩腔への脱着が可能なキャビタスセンサの概念図

## 2. 窩腔に装着するキャビタスセンサ

人体には口腔や鼻腔、咽腔、結膜嚢などの窩腔（キャビタス）が多数あり、その窩腔に装着するデバイスとしてコンタクトレンズやマウスガードなどが広く社会に普及している。

これらデバイスにバイオセンサ機能を付加することで、涙液や唾液に含まれる化学/バイオ情報を計測し、「健康管理・疾病予防」や「疾病・予後モニタリング」などの日常ケアが可能となる。筆者らは、これまでに結膜嚢に連続装着が可能な「コンタクトレンズ型センサ」や、嚥下診断を目的とした「光ファイバ型の咽頭圧センサ」、口腔内での留置が可能な「マウスガード型センサ」等を研究・開発してきた。以下にソフトコンタクトレンズ型とマウスガード型のグルコースセンサについて説明する。

## 2.1 涙液グルコースのためのソフトコンタクトレンズ型バイオセンサ

世界的に、2型糖尿病の罹患者数が年々増加しており、大きな社会問題となっている。血糖値測定では、血糖自己測定器（SMBG）や持続血糖測定器（CGM）が用いられているが、観血的な方法は患者にとって大きな負担であり、また感染症などの危険性もある。現在、多様な非侵襲計測法が検討されており、血糖値と相関する各種体液（涙液・唾液）を利用する方法も考えられている。そこで、高分子材料にMEMS技術を用い、柔軟なコンタクトレンズ（SCL）形状のバイオセンサを開発し、涙液グルコースの変化を計測し、血糖値評価の可能性を調べた。



図2 コンタクトレンズ型バイオセンサの外観写真（左）、経口ブドウ糖負荷試験での家兔涙液糖（実線）と血糖値（破線）の比較（右）<sup>[2]</sup>

ソフトコンタクトレンズ（SCL）型バイオセンサの開発では、眼部に装着して涙液計測を行うことから、医療機器にも使われるポリジメチルシロキサン（PDMS）を材料とし、鋳型を用いてコンタクトレンズを作製した。次にポリマーレンズに薄膜電極を形成し、電極感応部にグルコース酸化酵素（GOD）を固定化し開発した<sup>[2]</sup>。電極の成膜では、コンタクトレンズの凸面にステンシルを介して、スパッタにてPt 作用電極・Ag 電極を形成し、Ag 電極は塩化処理にて Ag/AgCl 電極とした。酵素の固定化では、生体適合性 MPC ポリマー（2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer）を用いて、GODを電極感応部に固定化し、SCL型グルコースセンサとした（図2左）。作製したSCL型バイオセンサは高い柔軟性を有し、PDMS への高い密着性を維持しており、曲げ応力に対しても電極層が剥離やクラックが生じたりすることなく、バイオセンサとして機能する。なお本センサは、涙液濃度（0.05～0.36 mmol/L）を含む、0.03 ～ 5.0 mmol/L の範囲でグルコースの定量が可能であった。

次に、作製したSCL型バイオセンサを家兔（日本白色種）の眼部に装着し、涙液グルコースの連続計測を行った。実験では電極、リード線、端子部を有するセンサをコンタクトレンズ上にPDMSにて一体化し用いることとし、無麻酔の家兔・眼部にバイオセンサ装着し、グルコース（1g/体重 1kg）の経口投与による出力の変化をアンペロメトリック計測にて調べた。なお比較のため耳介静脈より採血し、血糖値変化を計測した。

家兔の実験結果（図2右）からわかるように、グルコースの経口投与後、速やかに血糖値は上昇を始め、投与後 47 分にピーク値を示した。これに対し、SCL型センサの出力は数分の遅れを以って血糖値に追従し、ピークに達した後に低下しており、両者とも同様な濃度変動を示した。本結果より、SCL型センサは涙液糖の濃度変化を連続的にモニタリングすることが可能で、時間的な遅れがあるものの、涙液糖による血糖値評価の可能性が示唆された。今後、薄膜の通信機器やエネルギーシステムの開発などが必要である。なお、開発した

技術は眼部のみならず、皮膚表面や口腔内、さらには体内埋め込み用デバイスへの展開の可能性を有する。次節では本技術を利用した無線通信機能付きのマウスガード型バイオセンサについて説明する。

## 2.2 Bluetooth4.0 LE を搭載したマウスガード型センサ

マウスガード (MG) 型グルコースセンサも SCL 型センサと同様に、MEMS 技術を用いて薄膜電極を成形し、GOD を固定化し作製した。センサ用 MG については、市販の MG 材料であるポリエチレンテレフタレートグリコール (PETG) を選択した。なお MG 型バイオセンサでは、2 枚 (上部、下部) の MG を重ね合わせ、測定回路と通信回路を被い作製した (図 3)。まず歯型を吸引型成型器に設置し、シート材料から MG (下部) を 3 次元成型し、次に臼歯の頬側に回路が位置するように固定化し、上部の MG を加工した。先述のように、下部のマウスガードの口腔内側表面部に電極薄膜 (Pt、Ag/AgCl) を成形し、感応部に GOD を固定化した。次に回路入力部と電極端子を接合し、MG 型バイオセンサとした [1]。なお無線計測のため、回路 (ポテンシオスタットと A/D コンバータ、2.4GHz 無線通信) を設計・外製し、ボタン電池 (1.5 V) 1 個を定電位電流計測・無線通信の電源として用いた。センサからの出力電流値は、受信機に送信され、リアルタイムで PC 画面に表示される。



図 3. マウスガード型センサの口腔内への装着写真<sup>[1]</sup>

次に、作製した無線機能付きマウスガード型センサの性能を、人工唾液を用いた標準グルコース溶液にて調べたところ、溶液負荷による著しい出力電流値の低下が観察された。これは人工唾液中のタンパク質 (ムチン等) が感応部に付着したことが原因と考えられたことから、生体適合性膜 MPC を感応部にオーバーコートしタンパク質の影響を防止した。改良したバイオセンサでは S/N 比の向上が確認され、唾液中グルコース濃度 (20~200  $\mu\text{mol/l}$ ) を含む、10~1000  $\mu\text{mol/l}$  の濃度範囲でグルコースの定量が可能であった [1]。なおセンサの選択性を、各種の糖類 (ガラクトース、ソルビトール、キシリトール等) を用いて調べたところ、グルコースに対して高い選択性を示し、唾液中グルコースの計測の可能性が示唆された。本センサは生体への装着性や審美性に優れ、現在は本学歯学部と唾液糖の連続計測について実験を進めている。

## 3. 生体ガス (呼気・皮膚ガス) 計測のための生化学式ガスセンサ

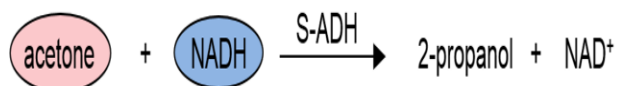
生体は食物を消化・代謝するだけでなく、その臭気成分を分解する機能がある。この体内の代謝酵素を利用することで、嗅覚とは異なるガスセンサ (気相用バイオセンサ) を開発

することができる。また生体からは疾病や代謝異常に基づき揮発性成分が放出されることから、そのガス成分を代謝に基づきに測定できれば、代謝評価や疾病スクリーニングが可能な気相用バイオセンサ（バイオスニファ）が開発できる。これまでに例えば、遺伝疾患である魚臭症候群について、その遺伝的な欠損酵素を用いることで、魚臭成分であるトリメチルアミン用のバイオスニファを開発した。また同様に、他の薬物代謝酵素を利用し、口臭成分であるメチルメルカプタンを計測するバイオスニファを構築した。本稿では、新たに開発した「アセトン用バイオスニファ」と、生体ガスの空間的な広がりを動画像として捉えるバイオ蛍光式の「可視化計測システム：探嗅カメラ」を解説する。

### 3.1 呼気中アセトン計測用バイオスニファ（生化学式ガスセンサ）

呼気アセトンは、糖尿病患者において高濃度で、健常者においても肥満・空腹・運動により濃度が増加する。例えば、空腹状態で体内の糖質が不足する状態や、エネルギーが必要とされる有酸素運動では脂肪代謝により、脂肪組織から血液中に遊離脂肪酸が放出され、アセチル CoA を介して、ケトン体であるアセトン・アセト酢酸・ $\beta$ -ヒドロキシ酪酸が産生される。揮発性のアセトンは血液を介して呼気・尿として体外へ排泄されることから、その濃度を測定することで脂肪代謝やケトosisの状態を評価できる。また、糖尿病ではインスリンが機能しないことで、空腹状態と同様に、エネルギー源として脂肪酸を用いる。つまり、呼気中アセトン濃度を測定することにより、糖尿病の進行度合や脂肪燃焼状況の非侵襲評価が可能である。そこで、バイオセンサ技術を用いた呼気アセトン用センサを開発した。

二級アルコール脱水素酵素(S-ADH) はイソプロパノールなどの二級アルコールを基質とする脱水素酵素であるが、pH 依存の可逆性を有する。つまり酸性環境下では、逆反応であるアセトンの還元反応が生じ、電子供与体である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH) 酸化・消費される(下式)。



この NADH は自家蛍光(ex. 340 nm, fl. 491 nm) を有することから、その蛍光減少を検出することでアセトン用バイオセンサを開発した。本センサでは、紫外発光ダイオード(UV-LED,  $\lambda=335$  nm) と光電子増倍管(PMT)からなる「光ファイバ型 NADH 蛍光検出系」に、S-ADH 固定化酵素膜を取り付けて構築した。S-ADH 酵素膜は、多孔質の親水性ポリテトラフルオロエチレン膜に、包括固定化し作製した。次にガス成分のバイオ計測を行うため、S-ADH 酵素膜を装着した気液隔膜フローセルに光ファイバ先端を取り付け、アセトンガス用バイオスニファとした[3]。なおセルの液相部には NADH を含むリン酸緩衝液が循環する。

S-ADH 固定化バイオスニファに、各濃度の標準アセトンガスを負荷したところ、図4左に示すように NADH の蛍光出力の減少(図中では差分増加)と濃度に応じた安定値が得られた。本センサの定量特性を調べたところ、健常者(200 - 900 ppb)及び糖尿病患者(>900 ppb)の呼気濃度を含む、20 - 5300 ppb の濃度範囲でアセトンガスの定量( $R=0.999$ )が可能であった。なお本センサに、呼気に含まれる各種ガスをその平均濃度で負荷したところ、アセトン以外にはほとんど出力を示さず、酵素の基質特異性を基づく選択性が確認された。

次に本センサにて、健常者および糖尿病患者における呼気アセトンのガス計測を行った。実験の趣旨を予め説明し同意を得た健常成人・糖尿病患者において、本学医学部・歯学部との共同研究にて実施した(東京医科歯科大学・倫理委員会承認)。図4右に、糖尿病患者(加療中)と健常者の呼気中アセトンガスの結果を示す。実験の結果、健常者の呼気アセトンの平均濃度は 750ppb で既報値に準ずる値を示し、年齢・男女での有意差は確認されなかった。

一方、1 型糖尿病では 1641ppb、2 型糖尿病では 1121ppb でそれぞれ有意差を以って高く、特に 1 型糖尿病においては健常者の 2 倍以上の濃度が確認された[4]。先述のように、糖尿病患者においてはエネルギー源として脂肪酸を利用することから、加療中の患者においても呼気アセトン濃度が高く、特にインスリンの分泌に障害を有する 1 型糖尿病では極めて高い値を示したものと考察された。開発したアセトン用バイオスニファは高感度であると共に、呼気に含まれる湿度や成分の影響を受けることなくアセトン測定が行えることから、今後、呼気濃度のモニタリングや脂肪代謝の度合いの評価等に利用できると考えられる。

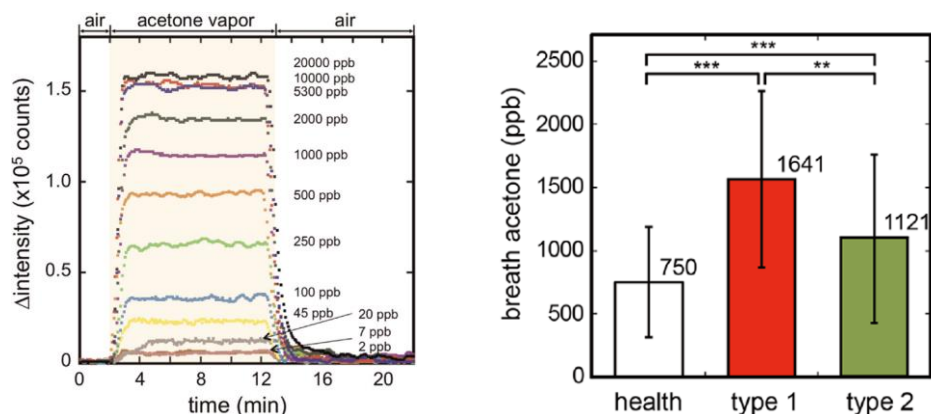


図4 各濃度の標準アセトンガスに対するバイオスニファの出力応答（左）[3]と、被験者（健常者、1 型、2 型糖尿病）の呼気アセトン濃度の比較（右）[4]

### 3.2 生体ガス（呼気・皮膚ガス）用探嗅カメラ（ガス可視化計測システム）

ガス成分濃度分布をリアルタイムで画像化できれば、生理代謝や疾病スクリーニングに加え、ガスの発生源を「嗅ぎ探る（探嗅）」ことが可能となる。そこで、飲酒後に血液を介して生体ガスとして放散されるエタノールをモデル成分とし、バイオスニファ技術を用いて「可視化システム：探嗅カメラ」を構築し、呼気エタノールガスの可視化を行った。

本システムでは、酵素固定化メッシュと電子増倍型カメラを用い、酵素反応に伴うルミノール発光を動画像として撮影する。酵素メッシュには、エタノール酸化触媒用のアルコール酸化酵素(AOD)と、その反応生成物である過酸化水素を基質とし、ルミノール発光を生じる西洋わさび由来ペルオキシターゼ(HRP)の2種類の酵素をメッシュ担体に固定化した。作製したAOD/HRP固定化メッシュをルミノール溶液で湿潤させて、標準エタノールガスを一定流速で酵素固定化膜に負荷し、膜上に生じた発光を高感度カメラにて動画像撮影した。実験の結果、標準エタノールガスの負荷点を中心とした二次元のルミノール発光が観察され、エタノールガスの濃度分布及び経時変化を可視化計測することが可能であった。なお可視化画像の発光強度とガス濃度には高い相関性があり、酒気帯び運転の判断値(78 ppm: 0.15 mg/L)を含む、30 ~ 400 ppmの範囲でエタノールガス濃度の定量が可能であった[5]。次に本システムを、飲酒(0.4 g エタノール/体重 1 kg)後の呼気中エタノールガスの可視化計測に適用したところ、標準エタノールガスと同様に可視化の動画像が得られた(図5上)。さらに、動画像をもとに濃度解析を行ったところ、既報でのアルコール代謝の評価結果と同様に、呼気中エタノールガス濃度は飲酒後約 30 分でピーク値に達し、その後、一次関数的に濃度が低下する様子が観察された[5]。

また探嗅カメラに pH 依存性のアルコール脱水素酵素 (ADH) を用い、エタノールの酸化とアセトアルデヒドの還元を pH 制御することで、NADH の増・減をバイオ蛍光法にて可視化す

ることで、両ガス成分の高感度な可視化計測が可能となった。本システムは皮膚より放出される僅かなエタノールおよびアセトアルデヒドガス[6, 7]の可視化が可能で、ガスの発生分布（図5下）や濃度変化、そして高濃度な発生部位の特定（探嗅）の利用が可能である。なお酵素種や反応系を選択することで、多様なガス成分を可視化計測できることから、簡易的な疾患スクリーニングや口腔衛生診断、ガス発生源の探嗅などへの展開が期待される。

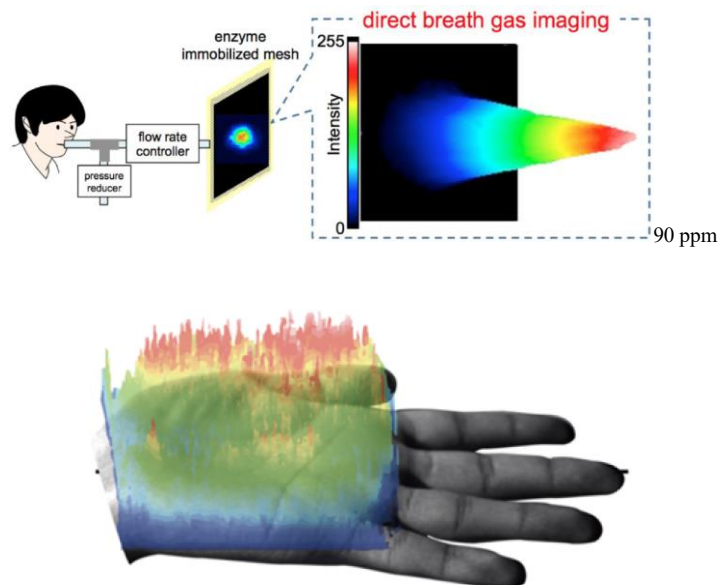


図5 アルコール摂取後の呼気中エタノールの可視化（上） [5]と、皮膚アセトアルデヒドガス分布の可視化（下） [7]

#### 4. 最後に

今後の医療・ヘルスケア（予防医療）において、バイオセンサによる非侵襲計測は極めて重要であり、本報では、ソフトコンタクトレンズやマウスガードを用いたキャピタスセンサと、脂質代謝評価のためのアセトンガス用バイオスニファ及び探嗅カメラを紹介した。上述の非侵襲バイオ計測の実現には、多様なシーズを有する業界が医療産業に取り組むこと、そして異種産業の融合が不可欠である。本領域の研究開発が産官学の連携により、一層活性化されることが期待される。

#### 謝 辞

本報の内容は、本学学生並びに多数の共同研究者との研究に基づく成果であり、各種研究助成（JSPS、JST、MEXT、IDDM、NEDO）による内容を含むものである。

#### 参考文献

- [1] Arakawa, T. et al.: *Biosens. Bioelectronics*, 84(2016) 106-111(2016).
- [2] Chu, M.X. et al.: *Talanta*, 83, 960-965(2011).
- [3] Ye, M. et al.: *Biosens. Bioelectronics*, 73, 208-213(2015).
- [4] Chien, P.J. et al.: *Anal. Chem.*, 89, 12261-12268(2017).
- [5] Arakawa, T. et al.: *Sens. Actuators B*, 186, (2014) 27-33(2013).
- [6] Arakawa, T. et al.: *Biosens. Bioelectronics*, 67, 570-575, (2015).
- [7] Iitani, K. et al.: *Anal. Chem.*, 90, 2678-2685, (2018).