非侵襲バイオ計測の展望について*

Future Vision of Non-Invasive Bio-Sensing

三林浩二**
Kohji MITSUBAYASHI

Key words

non-invasive, cavitas sensor, cavity, contact lens, mouth guard, body volatile chemical, enzyme, imaging, bio-monitoring, biosensor

1. はじめに

近年、ウェアラブルデバイス、センサネットワーク、IoTなどの研究や産業化が活性化している。特に医療やヘルスケアの領域における利用が期待されているが、今後は「生体の化学/生化学情報を捉える、非侵襲バイオ計測」が期待される。そして、その実現には採血などを行わず、身体を傷つけない方法が必要であり、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。

非侵襲かつ被験者が意識しないような生化学モニタリングを実現するには、身体への装着性に加えて、「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。本報では、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」に連続的に装用可能なデバイスとして提案している「キャビタス（体腔）センサ」(Cavitas sensors, 図1)について解説する。また、疾病や代謝由来の生体ガスの非侵襲計測およびイメージングを行う、バイオスニファ（生化学式ガスセンサ）と探嗅カメラ（可視化システム）を紹介し、非侵襲バイオ計測の可能性を示す。

2. キャビタス（体腔）センサ

身体には口腔や咽腔、結膜嚢などの体腔（キャビタス）が多数あり、その体腔を利用したコンタクトレンズやマウスガードなどの医療機器が広く社会に普及している。

これらデバイスにセンサ機能を付加することで、涙液や唾液に含まれる生化学的・化学的・生物学的な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」などの日常ケアへの応用が可能となる。筆者らは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グルコースセンサとマウスガード型センサについて説明する。

2.1 非侵襲血糖値評価のためのソフトコンタクトレンズ型センサ

2型糖尿病は罹患者数が年々増加しており、特に先進国では大きな社会問題となっている。血糖値評価では、簡易的な測定器による自己血糖評価法が用いられているが、血液サンプリングは患者に大きな負担であり、感染症などの危険性もあり、非観血的な方法が求められている。現在、多様な非侵襲計測法が検討されているが、血液サンプルを直接調べるのではなく、血糖値と関連する非侵襲サンプル

図1 体腔への脱着が可能なキャビタスセンサの概念図¹⁾

*原稿受付 平成28年5月21日

**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（東京都千代田区神田駿河台2-3-10）

図2 コンタクトレンズ型グルコースセンサの外観写真，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 [2]改編]

を利用する方法も考えられている。例えば，排泄尿や細胞間質液による評価や，唾液や涙液の利用も検討されている。筆者らは，生体適合性材料にMEMS技術を用い，柔軟性に優れたソフトコンタクトレンズ（SCL）のバイオセンサを開発し，眼部に装着することで涙液グルコースの変化を *in situ* モニタリングし，血糖値評価の可能性を調べた。

SCL 型バイオセンサは，眼部に装着して長時間の涙液計測を行うことを目的とすることから，まず医療機器に使われるポリジメチルシロキサン（PDMS）を材料とし，テンプレートを用いてコンタクトレンズを作製した。次にPDMS 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）を固定化した²⁾。電極成膜は，コンタクトレンズの凸面にTi製ステンシルを用いて，PtそしてAgをイオンビームスパッタ法にてパターン成膜し，Pt作用電極およびAg電極を形成した。酵素固定化では，生体適合性MPCポリマー（2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer）を改良し，GODを電極感応部に包括固定化し，柔軟なコンタクトレンズ型グルコースセンサとした（図2上）。作製したSCL型センサは高い柔軟性を有し，曲げ応力に対しても電極層が剥離したり，クラックが生じたりすることなく，PDMSへの高い密着性を維持しており，電気化学計測に利用することができる。本センサの特性を調べたところ，涙液濃度（0.05～0.36 mmol/L）を含む，0.03～5.0 mmol/Lの間でグルコースの

定量が可能であった。

次にSCL型センサを日本白色種家兔の眼部結膜嚢に装着し，涙液糖の計測を行った。実験では無麻酔の家兔の眼部にセンサを装着し，グルコース（1 g/体重1 kg）を経口投与した後，涙液糖の濃度変化を調べた。比較のため耳介静脈より採血し，市販の自己血糖評価キットにて血糖値変化を計測した。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，計測を行った。

図2下の結果から分かるように，グルコースの経口投与後，血糖値は直ちに上昇を始め，投与後47分にピーク値を示したのに対し，SCL型センサでの出力は約8分の時間遅れをもって血糖値に追従し，ピーク値に達した後に減少した。このように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，数分の時間遅れがあるものの，涙液糖による血糖値評価の可能性が示された。今後，通信機器やエネルギーシステムの開発が必要である。なお，開発した技術は，生体適合性を有する多様な形状のバイオデバイスの開発へと展開できる。次節にて本技術を利用し，通信回路とバッテリーを組み込んだ「無線通信機能付きのマウスガード型センサ」について説明する。

2.2 口腔内情報の連続計測のためのマウスガード型センサ

マウスガード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形成し，GODを固定化した。センサ用マウスガード材については，ポリエチレンテレフタレートグリコール（PETG）を選択し，センサ電極（PtとAg）をスパッタ装置にて成膜した。次に，GODを生体適合性ポリマーにて包括固定化した。なお本センサでは，2枚（上部，下部）のマウスガード用シートにて，測定回路と通信回路，電池を被い作製した（図3上）。作製では歯型を吸引型成型器に設置し，まずシート材料からマウスガード（下部）を3次元成型した。次に白歯の頬側に測定回路と通信回路が位置するように固定化し，成型器にて上部のマウスガードを加工した。先述の電極作製方法にて，下部のマウスガードの口腔内側表面部にバイオセンサを構築した。次に測定回路の入力部と電極端子を接合し，マウスガード型バイオセンサとした¹⁾。

無線計測のために，ポテンシオスタットとA/Dコンバータ，無線通信の機能を有する「測定・通信回路」を設計・外製した。無線通信における周波数帯域には，医療機器用の周波数帯である2.4 GHz帯を採用した。また，ボタン電池1個を定電位電流計測および無線通信の電源とした。センサで得られた出力電流値は，数値データとして受信機に送信され，リアルタイムでPCに表示される。

人工唾液をもとに調整した標準グルコース溶液に，作製した無線機能付きマウスガード型センサを負荷したところ，出力電流値の著しい低下がみられた。これは，人工唾液に含まれるタンパク質（ムチン等）がセンサ感応部に吸

図3 マウスガード形状の唾液用グルコースセンサの模式図（上）とマウスガード型センサの口腔内への装着写真（下）[1]改編]

着することが原因と考えられた。そこで、センサ感応部へのPMEHでのオーバーコートによりタンパク質の影響を防止し、また、電極面積を拡大することで出力電流値の増加と無線計測の最適化を行った。改良したセンサではS/N比の向上が確認され、唾液濃度を含む、 $10\sim 1000\ \mu\text{mol/l}$ の濃度範囲でグルコースの定量が可能となった¹⁾。なお作製したセンサの選択性を、各種の糖類（ガラクトース、ソルビトール等）を用いて調べたところ、グルコースに対して高い出力値を示し、唾液糖の選択計測が可能と考察された。現在は人体を模したファントムでの実験を経て、本学歯学部との共同研究にて、無線通信機能付きのインビズイブル（invisible：不可視）なマウスガード型センサ（図3下）を開発し、唾液糖の連続計測の実験を進めている。

3. 呼吸および皮膚ガス成分のバイオセンシング

生体は食物を消化・代謝するだけではなく、その臭気成分を分解する働きや、排泄前の消化物の臭いを体外に放出させない能力がある。この体内の代謝機能を用いることで、嗅覚とは異なる新しいガスセンサを開発することができる。身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。そのガス成分を代謝に基づき、高感度かつ選択的に測定できれば、ガス計測にて身体状態やその異常を検知できる。つまり、生体由来の揮発性成分を、代謝評価や疾病スクリーニングが可能な「非侵襲バイオマーカー」として捉えられる。

筆者らは、代謝障害に着目した高感度なガスセンサを開発してきた。例えば、「魚臭症候群」と呼ばれる遺伝的疾患において、その遺伝的な欠損酵素である薬物代謝酵素を利用することで、魚臭成分：トリメチルアミンを高感度に

計測する「生化学式ガスセンサ（バイオスニファ）」を開発した。同様に、他の代謝酵素を使用することで、口臭計測のためのメチルメルカプタン用センサを開発した。以下に、新たに開発した「アセトン用バイオスニファ」と生体ガスの可視化が可能な「探嗅カメラ」を詳解する。

3.1 脂肪代謝評価のための呼吸アセトンガス用バイオスニファ

呼吸のアセトンガスは肥満や空腹、運動において濃度が増加することや、糖尿病患者においては健常者より高濃度であることが報告されている。空腹時のように、体内の糖質が不足する状態において、エネルギーが必要とされる運動負荷を加えることにより、脂肪組織から血液中に遊離脂肪酸が放出され、 β 酸化によりアセチル CoA が産生される。そしてアセチル CoA は肝細胞に取り込まれ、ケトン体（アセトンやアセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸）を産生しながら、ATP生成の経路に向かう。アセトンは血液を介して呼吸や尿として体外へ排泄され、これら生成されるケトン体の濃度を測定することで、運動時のケトシス状態や脂質代謝などを評価することができる。糖尿病においては、インスリンが不足することで、空腹状態と同じ代謝状態となりやすく、エネルギー源として脂肪酸を優先的に用いる。つまり、脂質代謝の指標として呼吸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評価が可能である。

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、その逆反応である「アセトンの還元反応」を行うことで、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）が酸化、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、その蛍光減少を捉える「光ファイバ型アセトンセンサ」を開発した。本センサでは、紫外発光ダイオード（UV-LED, $\lambda=335\text{ nm}$ ）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を固定化した酵素膜を適用して構築した。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、生体適合膜PMEHを用いて包括固定化し作製した。次に、蛍光検出用の光ファイバ先端を、S-ADH固定膜を装着した気液隔膜フローセルに取り付け、アセトンガス用バイオスニファとした³⁾。なお、フローセルの液相部には、NADHを含むリン酸緩衝液を循環させた。

S-ADH固定化バイオセンサに各濃度の標準アセトンガスを負荷したところ、図4に示すようにNADHの蛍光出力の減少（図中は差分増加）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）および糖尿病患者（>900 ppb）の呼吸濃度を含む、20～5300 ppbの濃度範囲でアセトンガスを定量可能であった。次に、呼吸に含まれる各種ガスを本セン

図4 各濃度の標準アセトンガスに対するS-ADH固定化バイオセンファの出力応答 [3]改編]

サに負荷したところ、他のガス成分には出力を示さず、酵素の基質特異性を基づく高い選択性が確認された。

本センサを呼気中アセトンガスの計測に適用した。実験では、運動負荷試験にともなう呼気中アセトン濃度の変化をアセトン用バイオセンファにて調べた。実験の趣旨をあらかじめ説明し同意を得た健康成人にて、食物を6時間摂取しない状態で、エルゴメーターの運動負荷(50 W, 30分間)を行い、その後は安静状態とした。呼気サンプルは、運動負荷30分前より、負荷後150分までの間でサンプルバックに採取し、アセトンガスの濃度測定をバイオセンファにて行った。運動負荷での濃度変化を調べたところ、運動にともなうアセトンガス濃度の上昇が観察され、運動終了後15分から30分で最大濃度を示した。空腹状態での運動負荷に際して、脂肪代謝により肝細胞でケトン体が生成され、揮発性のアセトンが呼気として放出されることで、呼気濃度が上昇したと考察された。現在、呼気中のアセトンガスの濃度計測に加えて、その経時的な変化、そして脂肪代謝の度合い、糖尿病の評価などの研究を展開している。

3.2 探嗅カメラによる呼気・皮膚ガスのエタノールガス可視化計測

ガス成分の濃度分布をリアルタイムで画像化し、時間的・空間的情報を兼ね備えたイメージングが可能となれば、生理代謝や疾患スクリーニングなどが可能となり、ガスの発生源を「嗅ぎ探る(探嗅)」ことも可能となる。そこで、飲酒後のエタノールをモデル成分とし、バイオセンファの技術を用いて、エタノールガスを二次元動画像として捉える。「可視化システム(探嗅カメラ)」を構築し、呼気中エタノールガスの可視化、そして簡便なアルコール代

謝評価の応用を行った。

本システムでは、酵素固定化メッシュと電子増倍型CCD(EM-CCD)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、エタノールガスを酸化触媒するアルコール酸化酵素(AOD)と、その酵素反応の生成物である過酸化水素を基質として、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種類をメッシュ担体に同時固定化した。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メッシュに負荷し、メッシュ上に生じた発光をEM-CCDにて動画撮影した。実験の結果、エタノールガスの負荷点を中心としたルミノール発光像が観察され、エタノールガスの濃度分布と経時変化のイメージングが可能であった。なお、可視化像の発光強度とガス濃度との間には高い相関が確認され、酒気帯び運転の判断値の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⁴⁾。

次に、探嗅カメラを飲酒後の呼気中エタノールガスの可視化計測に適用した(図5)。複数の健康被験者において、4時間以内での摂食がない状態で、アルコール摂取(0.4 gエタノール/体重1 kg)の後に、呼気サンプルを本システムに供したところ、標準ガスと同様に可視化の動画像が得られた。この動画像をもとにガス濃度を解析した結果、呼気中エタノールガス濃度は飲酒後の約30分でピーク値に達し、その後に既報でのアルコール代謝の評価結果と同様に、一次関数的に濃度が低下していく様子が観察された⁴⁾。

また、高純度ルミノール溶液と増感剤を用い、システムの高感度化を図ることで、3 ppmからのエタノールガスの可視化を行うことができた⁵⁾。改良したシステムは、飲酒後に皮膚より放出されるわずかなエタノールガスの可視化が可能で、発生部位を嗅ぎ探る(探嗅)ことができる。本システムでは、固定化する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、簡易的な疾患の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。

4. おわりに

今後の医療、ヘルスケアそして先制医療において、非侵襲バイオ計測は不可欠であり、本報ではその例として、ソフトコンタクトレンズやマウスガードを用いたキャビタス(体腔)センサと、脂質代謝評価のためのアセトンガス用センサおよび探嗅カメラを紹介した。世界的に高齢化が進む現状において、特に高齢化が突出している本邦では先導すべき領域といえる。上述を含む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が必要であり、また、異種産業の融合が不可欠である。本領域における、産官学の連携による一層の活性化が期待される。

図5 アルコール摂取後の呼気中エタノールの可視化（上）と ALDH2（+，-）の呼気比較（下）[4]改編]

謝 辞

本報の内容は、本学学生ならびに共同研究者との研究に基づく成果であり、各種研究支援（JSPS, JST, MEXT）による内容を含む。

参 考 文 献

- 1) T. Arakawa, Y. Kuroki, H. Nitta, P. Chouhan, K. Toma, S. Sawada, S. Takeuchi, T. Sekita, K. Akiyoshi, S. Minakuchi and K. Mitsubayashi: Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor, *Biosens. Bioelectronics*, **84** (2016) 106-111.
- 2) M.X. Chu, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, K. Sano, S. Sawada, H. Kudo, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, M. Mochizuki and K. Mitsubayashi: Soft contact lens biosensor for in situ monitoring of tear glucose as non-invasive blood sugar assessment, *Talanta*, **83** (2011) 960.
- 3) M. Ye, P.J. Chien, K. Toma, T. Arakawa and K. Mitsubayashi: An

acetone bio-sniffer (gas phase biosensor) enabling assessment of lipid metabolism from exhaled breath, *Biosens. Bioelectronics*, **73** (2015) 208.

- 4) T. Arakawa, X. Wang, T. Kajiro, K. Miyajima, S. Takeuchi, H. Kudo, K. Yano and K. Mitsubayashi: A direct gaseous ethanol imaging system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath, *Sens. Actuators B*, **186** (2014) 27.
- 5) T. Arakawa, K. Kita, X. Wang, K. Miyajima, K. Toma and K. Mitsubayashi: Chemiluminescent imaging of transpired ethanol from the palm for evaluation of alcohol metabolism, *Biosens. Bioelectronics*, **67** (2015) 570.

三林浩二

豊橋技術科学大学エネルギー工学科卒業（1983年）、同大学院修士課程修了（1985年）。東京大学大学院博士課程先端学際工学科修了（1994年）、同年博士（工学）取得。1998年東海大学電気工学科助教授。2003年国立大学法人東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授（2014年より同大副理事）、現在に至る。