バイオ蛍光法による生体揮発性成分の高感度センシングおよび可視化計測

三林 浩二

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 (〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10)

Bio-Fluorometric Sniffer & Sniff-Cam for Real-Time Analysis of Body Volatiles

Kohji MITSUBAYASHI

*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062*

(Received April 29, 2018)

Biofluorometric bio-sniffers (biochemical gas sensor) for acetone and isopropanol (IPA) were constructed by connecting a UV-LED and a photomultiplier tube to an optical fiber with a flow-cell equipped an S-ADH (secondary alcohol dehydrogenase) membrane. Gaseous acetone and IPA were measured by detecting auto-fluorescence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (ex. 340 nm, fl. 491 nm) as a coenzyme of S-ADH redox reactions. Both breath volatiles from healthy and diabetic subjects were analyzed by the bio-sniffers, thus diabetic acetone showing significant higher than that of healthy subjects. Similarly, a volatile-imaging system (sniff-cam) employing alcohol dehydrogenase (ADH) that detects acetaldehyde (AcH) vapor was also developed using a ADH mesh, a UV-LED array sheet and high sensitive camera, and applied for imaging AcH in breath and skin gas after drinking. The ADH sniff-cam allowed to visualize the concentration distribution of AcH in breath and skin gas. The biofluorometric sniff-devices would be useful for non-invasive disease screening and assessment.

Key Words: Biofluorometry, Gas sensing, UV-LED, Body volatiles, Autofluorescence, Gas imaging

1. はじめに

「花の香り」や「食物の匂い」、「生体臭」などは多様な揮発性化学成分の集合体として構成されている。しかしながら、これら個々のガス成分を高い選択性を以って、高感度かつリアルタイムに個別に計測(定性・定量)する情報化技術はまだ確立されていない。加えて、空間を漂っているガス成分は“その濃度分布”と“時間による変動”が著しい。つまり「ガス成分の情報化」は、単に検知するだけでなく、“成分を特定する高い選択性”、“濃度変化のリアルタイム計測”、“空間分布の認識”を以って評価することである。また湿度の影響を回避することも重要である。

生体における匂いには、「発生」と「知覚」の2つの側面がある。五感において、空間中の揮発性成分の一部は“匂い”として知覚されることから、嗅覚レセプターやメカニズムを利用することで匂い成分の計測が可能である。しかしながら、無臭成分であったり、嗅覚閾値以下の低濃度の揮発性成分を認識することは容易でない。一方、空間中の多様な揮発性成分の「生成」「分解」について、その多くは生物の「代謝」が担っている。筆者は生体における“生体ガス”と“代謝”の関連に着目し、

生体ガス成分を認識し代謝分解する酵素を用いることで、対象となる揮発性成分を酵素の触媒反応にてバイオセンシングする「生化学式ガスセンサ：バイオスニファ(Bio-sniffer)」を多数開発してきた¹⁻⁵⁾。またこの酵素触媒にて光学変化を伴う反応もあることから、検出素子として「光学デバイス」を組み合わせることで、揮発性化学情報を光学情報へ変換し、「ガス成分の高感度な光計測」さらに「その濃度分布や時間変化をリアルタイム捉える可視化」へと展開することが可能となった。例えば、自家蛍光(励起: 340 nm, 蛍光: 490 nm)を有する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド: NADHなどの補酵素を消費・生成する酸化還元酵素が存在することから⁶⁻⁸⁾、この蛍光の増減を検出することで、バイオ蛍光式による「バイオスニファ: Bio-sniffer」の開発が可能である。また、光学検出器として高感度カメラを用いることで、ガス濃度分布を時空間情報として捉える「可視化計測システム(探嗅カメラ: Sniff-cam)」へ展開できる⁹⁻¹¹⁾。

本稿では、「糖尿病の早期診断」「脂質代謝の非侵襲評価」を目的とする呼気中アセトンとイソプロパノール(IPA)ガス用の「バイオ蛍光式バイオスニファ」と、アルコール代謝評価のための呼気および皮膚ガス中のアセト

アルデヒドガスを可視化計測する「バイオ蛍光式探嗅カメラ」を概説する。

2. バイオ蛍光式の高感度アセトン&イソプロパノール用バイオスニファ

生体ガス中の成分は多様な疾患や代謝に基づくことが多く、例えば、糖尿病患者の呼気中アセトンガス濃度は健常者よりも高く、また健常者でも空腹・運動により濃度が増加する¹²⁾。空腹時のように体内の糖が不足した状態に運動負荷を加えると、脂肪組織から血中に遊離脂肪酸が放出され、ケトン体であるアセトンを生成する^{13,14)}。またアセトンの還元体であるイソプロパノール(IPA)濃度も増加する。糖尿病患者ではインスリン機能(分泌・認識)に障害があることから、エネルギー生成が血糖ではなく、脂肪(または脂肪酸)により行われることから、空腹・運動時と同様に、アセトン及びIPA濃度が上昇する。血中のアセトンおよびIPAは、肺でのガス交換にて呼気として体外へ排出されるため、これら濃度を調べることで「脂質代謝の評価」ならびに「糖尿病の早期診断・症状評価」が可能と考えられる。そこで呼気中のアセトンとIPAの計測が可能な各バイオスニファを開発し、呼気計測に応用した。

2.1 UV-LEDを用いたアセトンおよびIPAガス用バイオスニファ

二級アルコール脱水素酵素(S-ADH)は可逆酵素であることから、二級アルコールであるIPAの酸化反応(正反応)を行い、また酸性環境下では逆反応としてアセトンを還元する(eq.1)。

アセトンおよびIPA用バイオスニファでは、S-ADHの酸化と還元の利用し、その際に電子供与体また電

子受容体として機能する補酵素NADHの減少または増加を検出することで、両ガスをそれぞれ測定する。本センサは、紫外発光ダイオード(UV-LED, λ : 335 nm, Sensor Electronic Technology, Inc., USA)、二分岐光ファイバ、光電子増倍管(PMT, Hamamatsu Corporation, Japan)、S-ADH固定化膜にて構築した(Fig. 1)²⁻⁴⁾。UV-LEDからの励起光は光ファイバプローブ端面からNADHに照射し、励起されたNADHから放出された蛍光をPMTにて測定する。2種のバンドパスフィルタ(BPF, Asahi Spectra Co., Ltd., Japan)をそれぞれUV-LED側(λ : 340 nm)、PMT側(λ : 490 nm)に配置した。光ファイバプローブにはフローセルを装着し、そのセル端面にS-ADH固定化膜を固定した。S-ADH膜は、親水性PTFE膜にS-ADHを生体適合性ポリマーPMEHにて包括固定化した¹⁵⁾。なおフローセル中には、補酵素であるNADHもしくはNAD⁺を含むリン酸緩衝液を灌流することで、感応部へ補酵素を供給しながら余剰基質・反応生成物の除去を行い、アセトンまたIPAのガス計測を行うことができる。なお本センサでは感応面が常時水分を含む状態であり、呼気などに含まれる湿度の影響を受けない。

特性評価では、各濃度のアセトンまたはIPAの標準ガスをセンサに負荷し、蛍光強度の変化を調べて行った。Fig. 2は異なる濃度のIPAガスの負荷に対する蛍光強度の出力応答と定量特性を示す。この図からわかるように、ガス負荷に伴う蛍光の増加と、濃度に応じた定常出力、そして負荷停止による蛍光強度の減少(回復)が観察された(Fig. 2中では蛍光強度の変化量は $\Delta\text{intensity}$ と表記した)。同様に、アセトンガスの負荷では蛍光の減少が観察され、アセトンガスに対して呼気中アセトン濃度を含む1-5000 ppbの濃度範囲にて、IPAガスについては呼気IPA濃度を含む1-9060 ppbの濃度範囲にて、それぞれ高い再現性(変動係数: アセトン = 2.3%, IPA = 2.6%)を以て各々定量が可能であった。

なお、アセトンとIPA、並びに主な呼気成分の標準ガス成分にて、S-ADHバイオスニファの出力を比較した

Fig. 1 Experimental setup of bio-fluorometric sniffer for acetone and isopropanol.³⁾

Fig. 2 Calibration curve and typical responses for isopropanol in the gas phase.³⁾

ところ、pH 7.0のアセトン計測ではケトンである2-ブタノンガスに出力を示し、pH 8.5のIPA計測では2級アルコールである2-ブタノールに応答を示したものの、これら成分は健常者の呼気中では極めて低濃度に存在することから¹⁶⁾、呼気計測には影響を及ぼさない。また他の成分からは出力がほとんど観察されず、S-ADH固定化バイオスニファは酵素の基質特異性に基づき、緩衝液のpHを適宜選択することで、呼気中のアセトンとIPAの計測にそれぞれ利用できると考察された。

2.2 S-ADHバイオスニファによる呼気中アセトン・イソプロパノールの高感度計測

先述したように、糖尿病においてはインスリン機能に障害があることから、エネルギー産生に脂肪酸を利用することで、呼気中アセトンまたその代謝物であるIPAの濃度が増加する¹⁷⁾。そこで開発した両センサにて、健常者および糖尿病患者における呼気中アセトンとIPA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および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)。被験者にて、安静状態の呼気サンプルを採取し、両バイオスニファにてアセトンとIPAのガス濃度をそれぞれ計測した。

Fig. 3に、糖尿病患者(加療中)と健常者の呼気中アセトンガス(Fig. 3(a, b))とIPAガス濃度(Fig. 3(c, d))の結果を示す。実験の結果、健常者の呼気アセトンとIPAの平均濃度は750 ppbと15.4 ppbで、それぞれ既報値に準ずる値を示した。なお別途、「年齢」ならびに「男女」での群について調べたところ、有意差は確認されなかった。一方、糖尿病の患者では平均濃度がアセトン：1207 ppbで、加療中の患者においても健常者に比して有意差を以って高い値を示した。Fig. 3(b)には1型糖尿病と2型糖尿病の結果を分けて示した。この図からわかるように、呼気アセトンについては1型糖尿病では1641 ppb、2型糖尿病では1121 ppbでそれぞれ有意差を以って高く、1型糖尿病においては健常者の2倍以上の濃度が得られた。

Fig. 3 Comparison of exhaled acetone & IPA between health and diabetic (type 1 & 2) subjects.⁴⁾ (****: $p < 1 \times 10^{-6}$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, ns: no significant difference).

先に述べたように、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、呼気中アセトン濃度が増加し、特にインスリンの分泌に障害を有する1型糖尿病において極めて高い値を示したと考察された。健常者においても、空腹時や有酸素運動時にはアセトン濃度が増加することが知られているが、まだ治療を行っていない患者においては更に高いアセトン濃度に達していると考察され、呼気アセトン計測による糖尿病の簡便な早期診断が可能になるものと考えられる。なお糖尿病患者のIPA濃度は23.1 ppbであった。しかしFig. 3(d)に示すように、1型と2型糖尿病患者と分けた場合、両者とも高い値を示すものの、明瞭な有意差は見られなかった。この結果は投薬治療等の影響が考えられ現在、更なる考察を進めている。

3. バイオ蛍光式探嗅カメラと生体ガス成分の可視化応用

先述のように、ガス成分を酵素にて認識・触媒し光情報に変換することで、高感度なガスセンシングが可能となり、また光学検出器を高感度CCD等に変更することで、ガス成分の画像化が可能となる。例えば、生体ガスにおいて呼気のみならず、皮膚ガスをリアルタイムに可視化計測できれば、「生理的な代謝評価」「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」が可能となる。そこでバイオ蛍光式スニファの技術を応用し、呼気および皮膚ガスを対象とした「可視化システム(探嗅カメラ)」を開発した。本報では一例として、飲酒後に呼気や皮膚ガス中に放出され、エタノール(EtOH)の代謝産物であるアセトアルデヒド(AcH)について、その探嗅カメラの詳細と生体ガス応用を説明する。

3.1 アセトアルデヒドガスのためのバイオ蛍光式探嗅カメラ

アセトアルデヒドガス用の探嗅カメラにはNADH依存型の脱水素酵素の酸化還元反応を利用した。Fig. 4(a)に示すようにアルコール脱水素酵素(ADH)の触媒反応に基づき、エタノール(EtOH)およびアセトアルデヒド(AcH)はpHに依存した可逆性を以って、それぞれ酸化・還元される。つまりADHにおいてpH調整により、「NAD⁺存在下ではEtOH負荷にてNADH由来の蛍光強度は増加」し、「NADH存在下ではAcH負荷にて蛍光強度は減少」する。そこでAcHガスの可視化については、ADH固定化メッシュ上のNADHの蛍光の消光変化を高感度カメラにて観察することで画像化を行った。

Fig. 4(b)にAcHガス用探嗅カメラを用いた可視化実験系の概略図を、またFig. 4(c) (d)に呼気ガスおよび皮膚

Fig. 4 (a) ADH redox reactions dependent on pH, (b) Set-up of sniff-cam for AcH, (c) Breath application unit, (d) Epidermis AcH gas application.²⁰⁾

ガスでの実験系を示す^{18,19)}。本システムはAcHを認識するADH固定化メッシュを中心に、UV-LEDシート(9×9 array, Dowa, Japan)と高感度カメラ(HEED-HARP, Pioneer, Japan)を対向配置した。ADH固定化メッシュは、自家蛍光の低いメッシュ担体上にADHをグルタルアルデヒド架橋にて固定化し作製した。次に構築した探嗅カメラについて、標準AcHガスを用いて可視化計測および特性評価を行った。AcHの可視化計測ではADH固定化メッシュをNADH溶液(pH 6.5)にて湿潤し、標準ガス発生装置にて作製したAcHガスを負荷した際のADH固定化メッシュ上における蛍光強度の減少を高感度カメラで撮像し、特性評価は蛍光強度変化を数値化し行った。

AcHガス(10 ppm)をADH固定化メッシュに負荷した結果(Fig. 5 左), ガス負荷部を中心とした蛍光強度の減少が観察され、3次元カラー表示にてAcHガスの濃度分布を空間的および経時的な変化として詳細に捉えることができた。しかしAcHガス負荷停止後も、酵素メッシュでのNADHの濃度は回復しないことから、AcHガスへの追従(負荷や停止など)をリアルタイムに画像化することはできない。そこで、ガス負荷に追従した蛍光変化の可視化を行うため、蛍光動画像について画像微分解析を行った(eq. 2)。

$$\frac{dI}{dt} = \frac{g(t+\Delta t) - g(t)}{\Delta t} \quad (2)$$

I : 蛍光強度 (arb. unit), t : 時間 (sec),
 $g(t)$: 時間 t (sec) における可視化画像

Fig. 5 右は異なる濃度のAcHガスについて、負荷時の蛍光動画像を微分解析し、その平均値(変化量)の経時変化を示したものである。この図からわかるように「ガス負荷に応じた出力変化」と「ガス負荷停止での出力の回復」を、高い応答性を以って表示できることが確認された。なおガス濃度に応じたピーク値が得られ、本可視化システムにて、AcHガスを0.1–10 ppmの範囲で定量することが可能であった。なおpHを調整したことで、EtOHのADHメッシュでの酸化反応は抑制でき、酵素の基質特異性に基づくガス選択性が確認された。

3.2 探嗅カメラによる呼気および皮膚ガスの可視化計測

アセトアルデヒドガス用の探嗅カメラを用いて、呼気および皮膚ガスの可視化計測に適用した。生体におい

Fig. 5 Fluorescence and dimple images of gaseous AcH (10 ppm), Differential value changes with time to AcH vapors.¹⁹⁾

て、飲酒後にアルコール代謝により生成されたAcHは、主に肝臓内の2型アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)により代謝されるが、日本人を含むモンゴロイドの約半数は遺伝的にALDH2の活性が低い「非活性群」であり、飲酒後の血中AcH濃度は「活性群」と比較して出力が高い。なお血中AcHは呼気に反映(分配係数100)されることが報告されている^{21,22)}。

まず呼気実験(Fig. 4(c))では、飲酒後の呼気を呼気流量制御装置にて流量に調節し、ADH固定化メッシュに負荷した。予めアルコールパッチテストにて、各被験者での実験の可否を調べ、ALDH2の活性型(ALDH2[+])もしくは不活性型(ALDH2[-])に群を分けた。次に各被験者に対し、エタノールの経口摂取(体重1 kgあたり0.4 g)させ、呼気中AcHの可視化計測を行った。標準AcHガス負荷時と同様に、飲酒後の呼気においても、可視化が可能で、Fig. 6に呼気負荷時の蛍光強度の微分平均値より算出した呼気中AcH濃度の経時変化を示す(ヒストグラムは検知管の結果)。この図に示すように、飲酒後30分をピークとして呼気中AcH濃度が漸次減少する様子が確認され、ALDH2[-]ではALDH2[+]に比して高い値(2.6倍)を示した。

次に探嗅カメラを皮膚AcHガスの可視化計測に応用した。飲酒後の手掌部より放出されるAcHガス濃度分布の可視化計測(Fig. 4(d))を行った²²⁾。実験では、飲酒後の手掌部を酵素メッシュに20秒間かざすことで皮膚ガスを探嗅カメラへ供し、皮膚ガス負荷後のメッシュ上の蛍光強度を可視化計測した。Fig. 7(a)は飲酒後30分時点にお

ける飲酒後の被験者(ALDH2[+])の手掌部より放出された皮膚AcHガスの濃度分布の可視化画像を示しており、皮膚から放出されたAcHガスの画像化が可能であった。またFig. 7(b)に示すように、平均出力値が飲酒後30分をピークとして漸次減少する様子も観察された。以上のように、バイオ蛍光式探嗅カメラは高感度かつ選択的に呼気や皮膚由来のAcHガスの可視化計測が行え、視覚的にAcH濃度変化を確認できた。今後は簡便な代謝能評価やガスの発生分布評価、発生部位特定に利用できるものと考えられる。

4. おわりに

バイオと光学の技術を融合することで、ガス成分を高感度に光学計測するバイオスニファと、可視化する探嗅カメラを開発した。これらデバイスはガス成分を酵素にて認識し、光計測することで、匂いを構成するガス成分の高感度計測を実現すると共に、空間的・時間的なガス濃度分布の変化を画像として捉えることに成功した。本成果は、五感での対象の一つである「匂い」を情報化へと導く新たな技術と考えられる。また呼気や皮膚ガスなどのように、多様なガス種や湿度を含む生体ガスにおいても、対象成分を(有臭・無臭にかかわらず)選択的に高感度計測および可視化できることから、近未来医療において「疾病の早期診断」「疾患部位の特定」「非侵襲での病態モニタリング」へと利用できるものと期待される。

謝 辞

本稿の内容は、日本学術振興会科学研究費補助金、文部科学省特別教育研究経費、共同利用共同研究経費、科学技術振興機構事業に基づく研究での成果であり、また本学医学部および歯学部との共同研究の成果を含むもので、学生をはじめ多くの共同研究者に謝意を表します。

参考文献

- 1) K. Mitsubayashi and Y. Hashimoto: IEEE Sensors J. **2** (2002) 133.
- 2) M. Ye, P. J. Chien, K. Toma, T. Arakawa, and K. Mitsubayashi: Biosens. Bioelectron. **73** (2015) 208.
- 3) P. J. Chien, T. Suzuki, M. Tsujii, M. Ye, K. Toma, T. Arakawa, Y. Iwasaki, and K. Mitsubayashi: Biosens. Bioelectron. **91** (2017) 341.
- 4) P. J. Chien, T. Suzuki, M. Tsujii, M. Ye, I. Minami, K. Toda, H. Otsuka, K. Toma, T. Arakawa, K. Araki, et al.: Anal. Chem. **89** (2017) 12261.
- 5) K. Iitani, P. J. Chien, T. Suzuki, K. Toma, T. Arakawa, Y. Iwasaki, and K. Mitsubayashi: ACS Sens. **3** (2018) 425.
- 6) P. J. Chien, M. Ye, T. Suzuki, K. Toma, T. Arakawa, Y. Iwasaki, and K. Mitsubayashi: Talanta **59** (2016) 418.
- 7) K. Iitani, P. J. Chien, T. Suzuki, K. Toma, T. Arakawa, Y. Iwasaki, and K. Mitsubayashi: ACS Sens. **2** (2017) 940.
- 8) M. Ye, T. Arakawa, P. J. Chien, T. Suzuki, K. Toma, and K. Mitsubayashi: IEEE Sensors J. **17** (2017) 5419.
- 9) X. Wang, E. Ando, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, H. Saito, and K. Mitsubayashi: Talanta **82** (2010) 892.
- 10) T. Arakawa, K. Kita, X. Wang, K. Miyajima, K. Toma, and K. Mitsubayashi: Biosens. Bioelectron. **67** (2015) 570.

Fig. 6 Comparison of temporal AcH changes in the exhaled air between (a) ALDH2[+] and (b) ALDH2[-] subjects.²⁰⁾

Fig. 7 (a) Typical distribution images of epidermis AcH vapor 30 min after drinking, (b) Temporal change of average fluorescence intensity after drinking.²⁰⁾

- 11) T. Arakawa, K. Iitani, X. Wang, T. Kajiro, K. Toma, K. Yano, and K. Mitsubayashi: *Analyst* **140** (2015) 2881.
- 12) T. P. J. Blaikie, J. A. Edge, G. Hancock, D. Lunn, C. Megson, R. Peverall, G. Richmond, G. A. D. Ritchie, and D. Taylor: *J. Breath Res.* **8** (2014) 046010.
- 13) K. Musa-Veloso, S. S. Likhodii, E. Rarama, S. Benoit, Y. M. C. Liu, D. Chartrand, R. Curtis, L. Carmant, A. Lortie, and F. J. E. Comeau: *Nutrition*. **22** (2006) 1.
- 14) K. Musa-Veloso, S. S. Likhodii, and S. C. Cunnane: *Am J Clin Nutr* **76** (2002) 65.
- 15) H. Kudo, T. Yagi, M. X. Chu, H. Saito, N. Morimoto, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, and K. Mitsubayashi: *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008) 1269.
- 16) S. Van den Velde, F. Nevens, P. Van hee, D. van Steenberghe, and M. Quirynen: *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **875** (2008) 344.
- 17) W. Li, Y. Liu, Y. S. Cheng, and Y. Dua: *RSC Adv.* **7** (2017) 17480.
- 18) T. Arakawa, T. Sato, K. Iitani, K. Toma, and K. Mitsubayashi: *Anal. Chem.* **89** (2017) 4495.
- 19) I. Kenta, T. Sato, M. Naisierding, Y. Hayakawa, K. Toma, T. Arakawa, and K. Mitsubayashi: *Analyst* **142** (2017) 3830.
- 20) I. Kenta, T. Sato, M. Naisierding, Y. Hayakawa, K. Toma, T. Arakawa, and K. Mitsubayashi: *Anal. Chem.* **90** (2018) 2678.
- 21) T. Fukunaga, K. Yamamoto, J. Adachi, Y. Ueno, and Y. Mizoi: *Japanese J. Alcohol Stud. Drug Depend.* **24** (1989) 405.
- 22) A. W. Jones: *Alcohol* **30** (1995) 271.