

複数のガス成分の濃度分布の 選択的イメージング計測

東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所
講師 飯谷健太

2024年12月19日

サマリー

□ 光バイオ技術を用いたガスイメージング原理・装置を開発

- 酵素を用いて特定のガス状分子の濃度分布を動画像化
- 撮像範囲最大 100 mm × 100 mm

□ 複数種のガスイメージングへ展開可能

- 多様な酵素反応を組み合わせて利用可能
- 前処理なしで生体ガス（ヒト・動物・植物）のような混合ガスを測定
- 環境中の水分の影響を受けないバイオセンサ技術

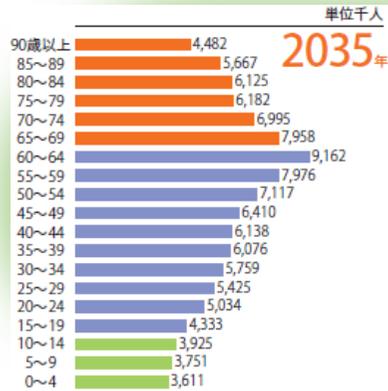
□ 本技術の応用につき共同研究を進めるパートナー企業を探索中

※医用外での共同研究も可能です

疾患や代謝評価の重要性

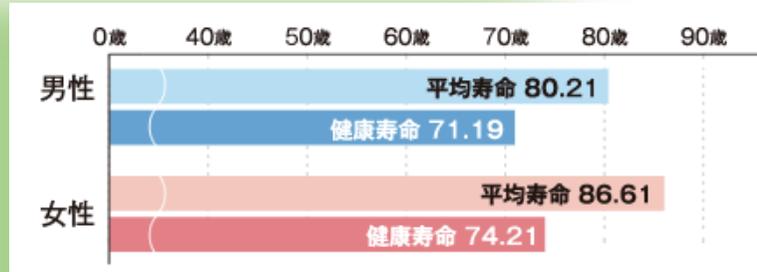
疾患や代謝異常の早期発見の重要性について

超高齢化社会



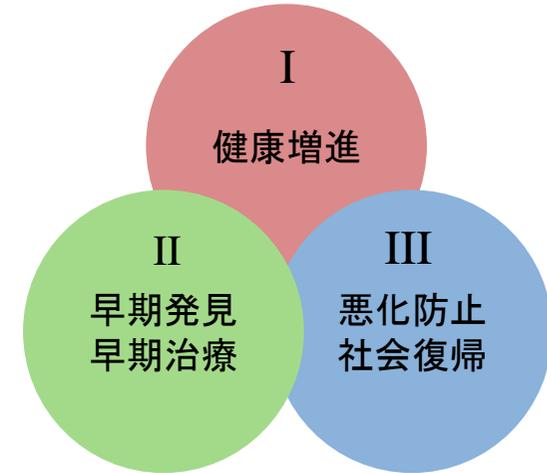
国立社会保障・人口問題研究所
「日本の将来推計人口(2013年1月推計)」

健康寿命の延伸



平均寿命: 厚生労働省「平成25年簡易生命表」
健康寿命: 厚生労働省「平成25年簡易生命表」、「平成25年人口動態統計」等

介護負担や医療費増大の対策



短周期での健康診断・日常的なモニタリングが早期発見を支える

従来の疾患スクリーニング手法など

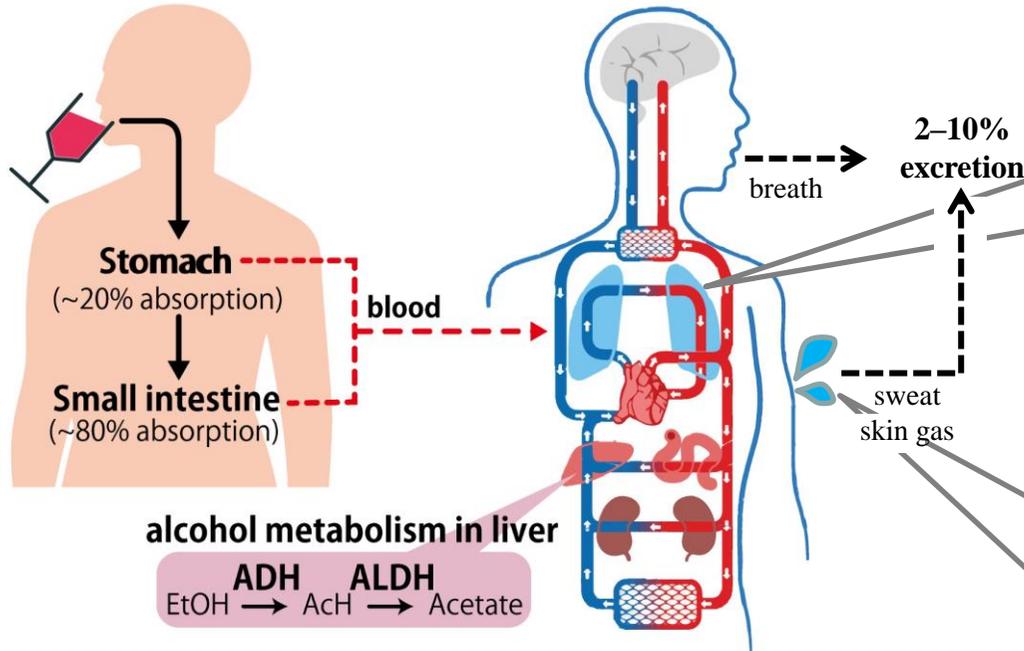
	血液検査	尿検査	内視鏡検査	X線診断	生体検査
侵襲性	あり	なし	なし	なし	あり
簡便さ	×	△	×	×	×

非侵襲かつ簡便な疾患診断・スクリーニング法が必須

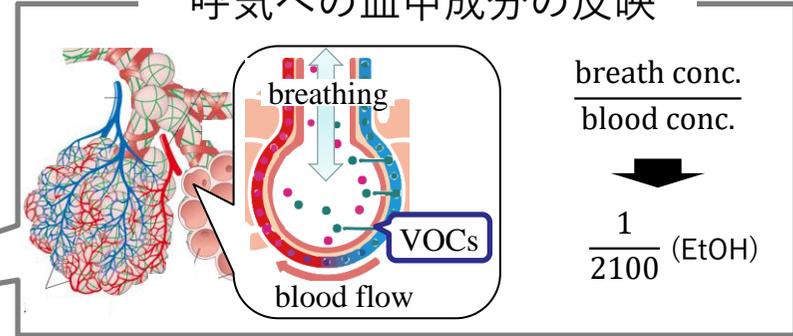
生体ガスによる非侵襲評価

血中成分の呼気・皮膚ガスへの反映メカニズム (例: エタノール)

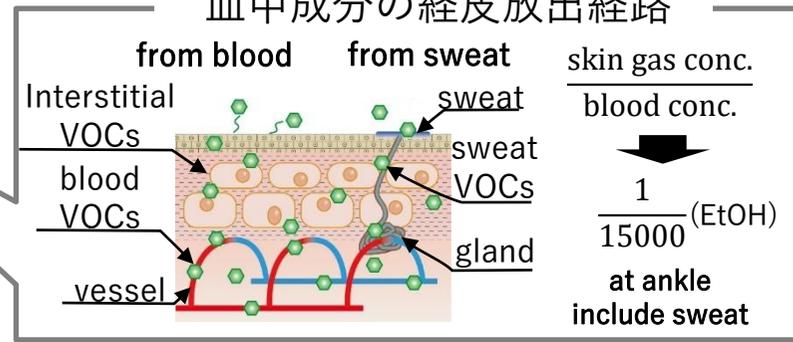
経口摂取後のアルコール吸収・代謝経路



呼気への血中成分の反映



血中成分の経皮放出経路



J.S. Hawthorne, *Can. Soc. Forensic Sci. J.*, 39, 65-71, 2006.

呼気・皮膚ガス中VOCsの臨床的意義および濃度

VOCs	significance	blood conc. (mg/dL)	breath (ppb)	skin gas (fmol cm ⁻² min ⁻¹)
ethanol	alcohol metabolism	0.001	37-207	200
acetaldehyde	esophageal cancer	0.0018	3-89.5	244
acetone	diabetes	0.01-0.02	200-900	1100
isopropanol	lung cancer	-	50-250	105

VOCs計測による非侵襲かつ簡便な疾患スクリーニング・代謝評価

生体ガス計測の現状と課題

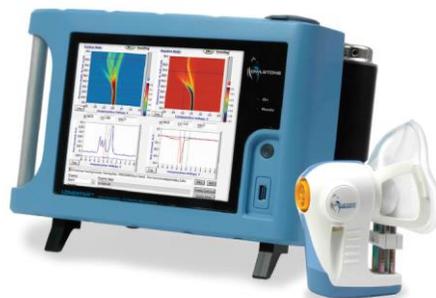
世界における呼気・皮膚ガスの計測方法に関する研究の動向

University of Leicester in UK
Scientists develop 'electronic nose' for rapid detection of C-diff infection



<https://phys.org/news/2014-08-scientists-electronic-nose-rapid-diff.html>

Owlstone at Cambridge
FAIMS: early detection of chronic diseases including cancer and diabetes



Owlstone's ReCIVA breath sampler and Lonestar gas analyzer will be assessed in a clinical trial aimed at detecting colorectal cancer early from breath and urine samples.

Philippidis, Clinical OMICs, 4, 12-13, 2017.

University of Innsbruck in Austria
Measuring human volatile except breath using PTR-MS



Agapiou et al., TrAC, 66, 158-175, 2015.

既存のガス計測法と生体ガス（低濃度・混合体）計測における課題

	GC/MS	PTR-MS	semiconductor
sensitivity	1ppb ~	10 ppb ~	50 ppb~
selectivity	◎	△	△
continuity	×	○	◎
convenience	×	×	○

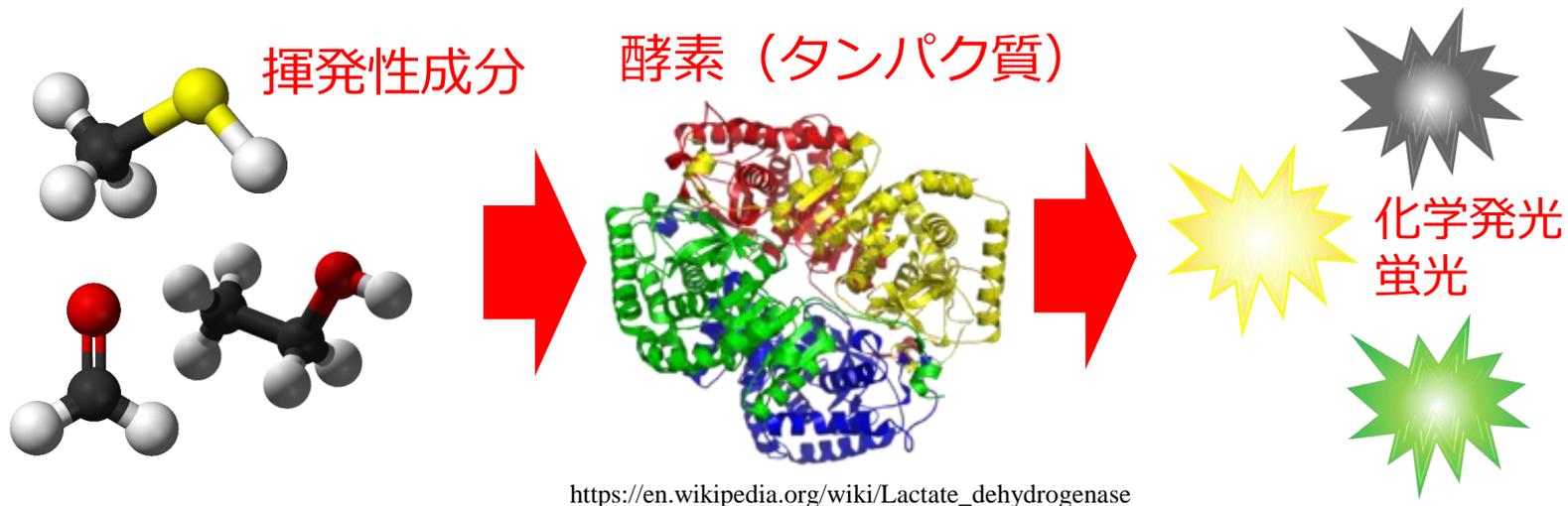
GCMSなどの分析装置

- > 装置の価格・メンテナンスのコスト
- > 測定者の熟練が必要
- >>> ラボ外での利用は非現実的

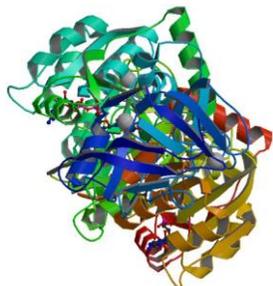
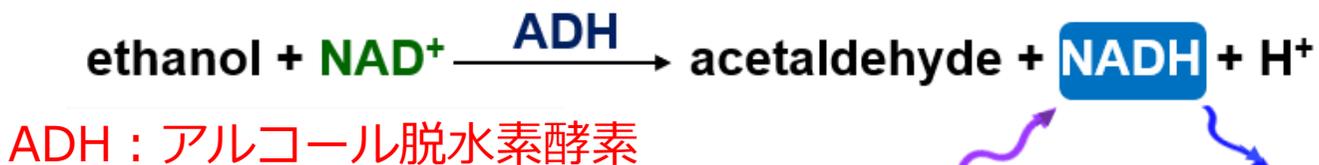
半導体などに基づくガスセンサ

- > 生体ガスでは感度が不足
- > 複数の成分に反応する測定原理
- >>> 高信頼性が求められる用途に不適

酵素を用いたガス成分の光情報化



例：バイオ蛍光法によるエタノールガスの選択的検出



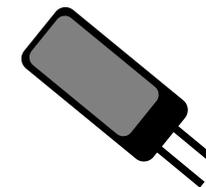
ex:340 nm

UV-LED



fl:490 nm

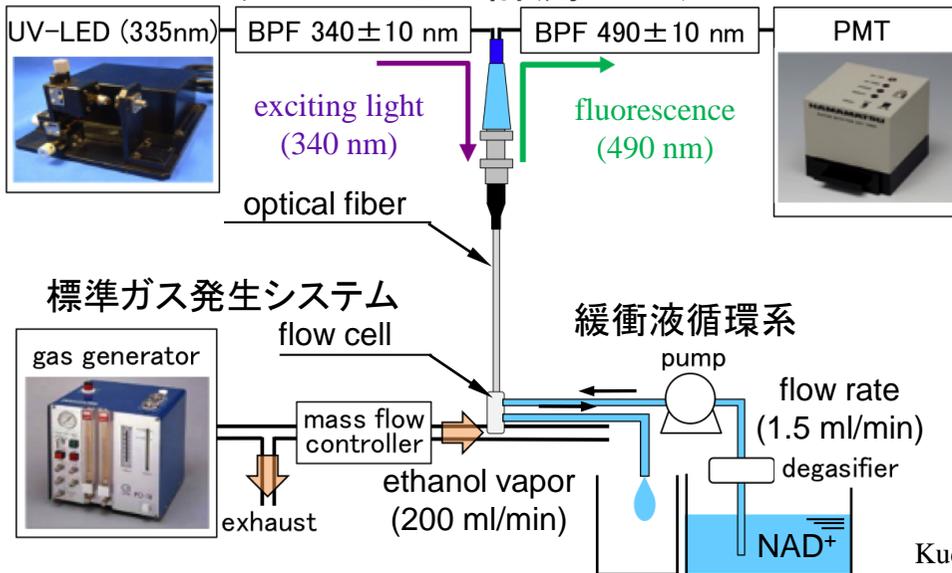
PMT



NAD⁺: nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH: nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)

コア技術：バイオ蛍光ガスセンサ

エタノールガス計測システム



酵素の連続利用を実現する固定化

1. spread enzyme (PMEH & enzyme)

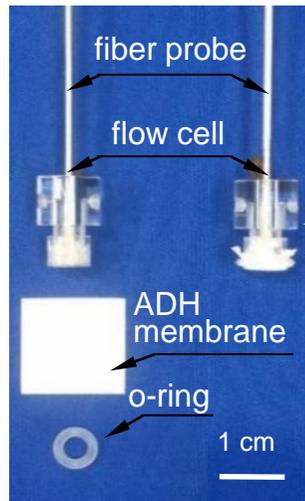
ADH (60 U/cm²)
15%PMEH
PTFE (2 × 2 cm : 4 cm²)
2. spread & cure

drying (180 min, 4°C)
3. rinse

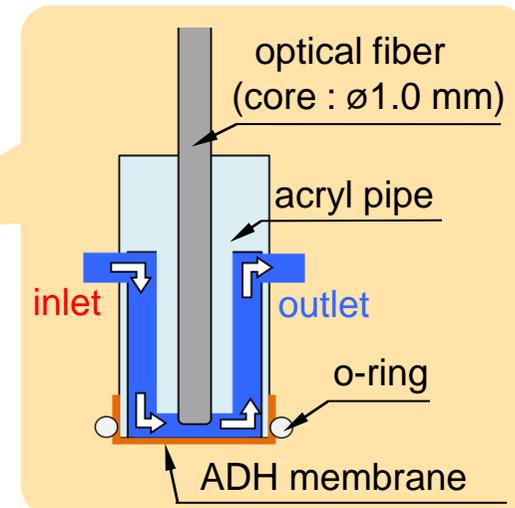
removing surplus enzymes

Kudo et al., Sens. Acta. B:Chem, 2010.

装着前

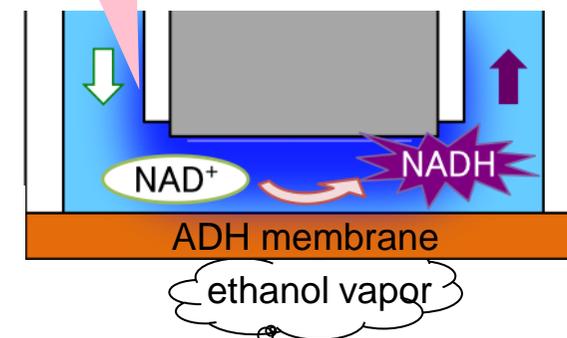


装着後



NAD⁺を含む緩衝液を送液

- ・ 補酵素NAD⁺の供給
- ・ 反応生成物の洗浄
- ・ 酵素失活防止

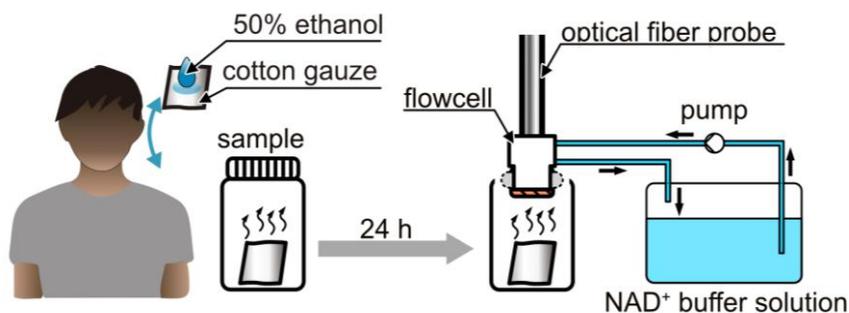


気相成分の連続的な「その場計測」

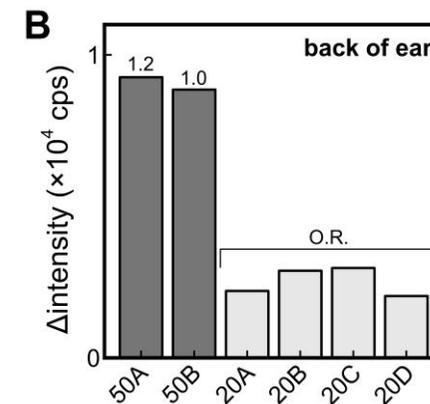
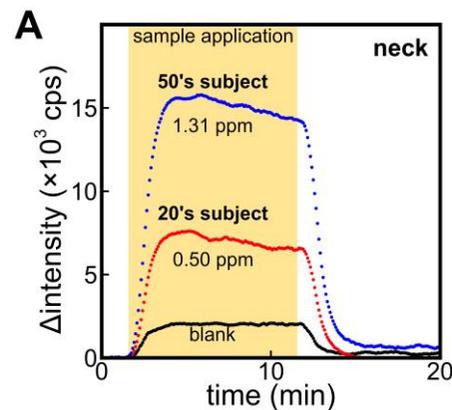
これまでに開発したガスセンサ

VOCs	significance
エタノール	アルコール依存症治療
アセトアルデヒド	口腔・食道がんリスク評価
メタノール	腸内環境の評価
アセトン	糖尿病・脂質代謝評価
イソプロパノール	糖尿病・脂質代謝評価
ホルムアルデヒド	肺がん
アンモニア	肝臓の疾患など
ジメチルスルフィド	口臭・口腔環境の評価
トリメチルアミン	魚臭症候群等
2-ノネナール	加齢臭の原因成分

加齢臭成分ノネナール用ガスセンサ



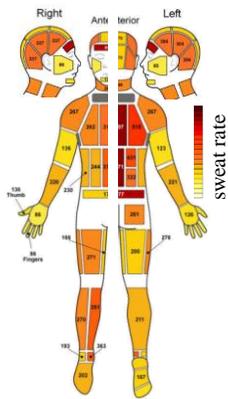
Iitani et al., Sensors, 23(13), 5857, 2023.



従来技術で困難な濃度分布計測

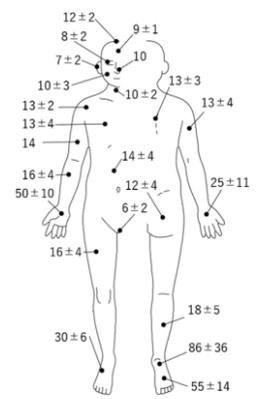
皮膚ガス放出に影響する皮膚特性

発汗強度分布



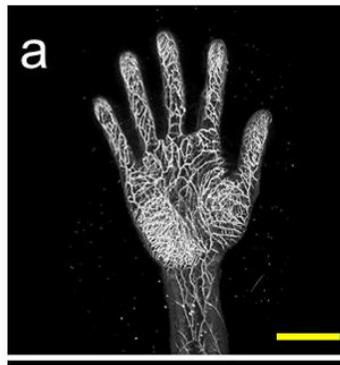
CJ Smith et al., *Eur. J. Appl. Physiol.* 2011.

角層数の分布



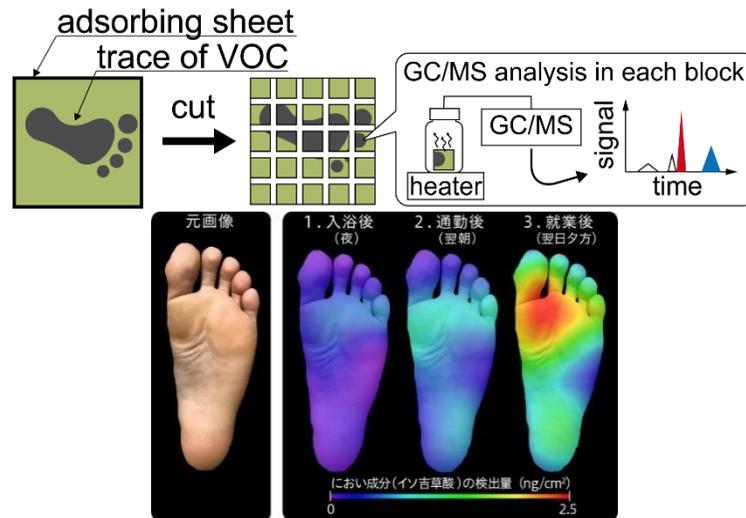
Z. Ya-Xian et al., *Arch. Dermatol. Res.*, 1999.

毛細血管の分布



K. Nagae et al., *F1000 Research*, 2018.

既存の皮膚ガス分布計測技術



Kao, ScentEYE, 2018

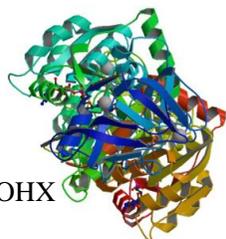
皮膚特性と皮膚ガス放出の理解が重要

放出動態の評価が困難

探嗅カメラ(Sniff-cam) : バイオ蛍光法によるガス可視化



ADH : アルコール脱水素酵素

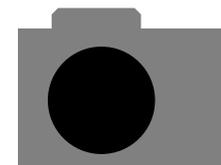


<https://www.rcsb.org/structure/2OHX>

ex:340 nm



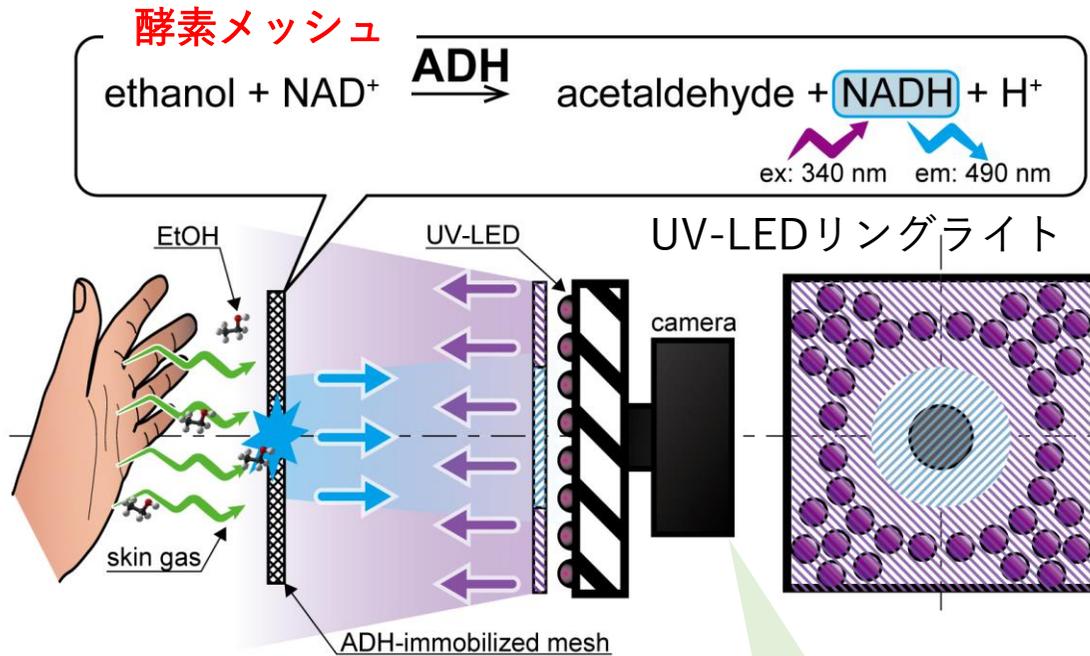
fl:490 nm



camera

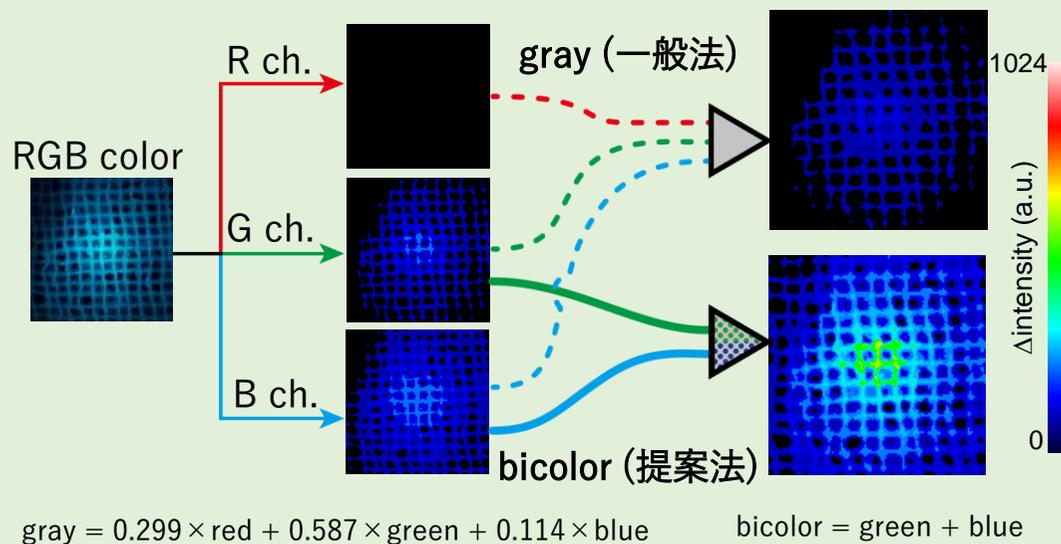
経皮ガス計測に最適な部位をガス分布から探索 (→探嗅)

バイオ蛍光によるガスイメージング



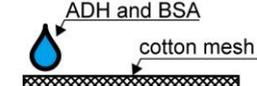
litani K et al., Analytical Chemistry, 91, 9458-94565, 2019.

RGB画像を活用した蛍光画像処理



ADH酵素メッシュ作製

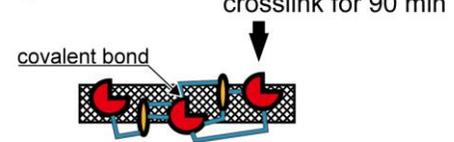
1. enzyme seeding



2. GA cross-linking

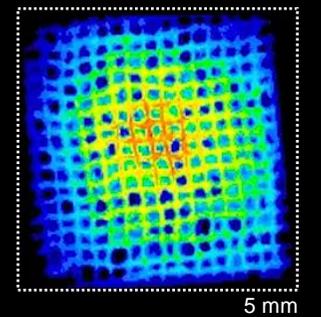


3. rinsing



微分処理による時空間表示

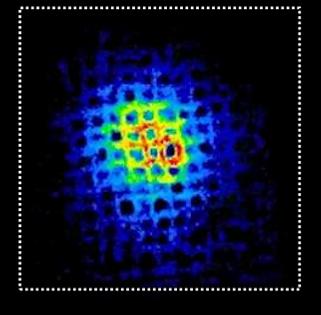
蛍光強度解析



$$\frac{dI(x,y)}{dt}$$

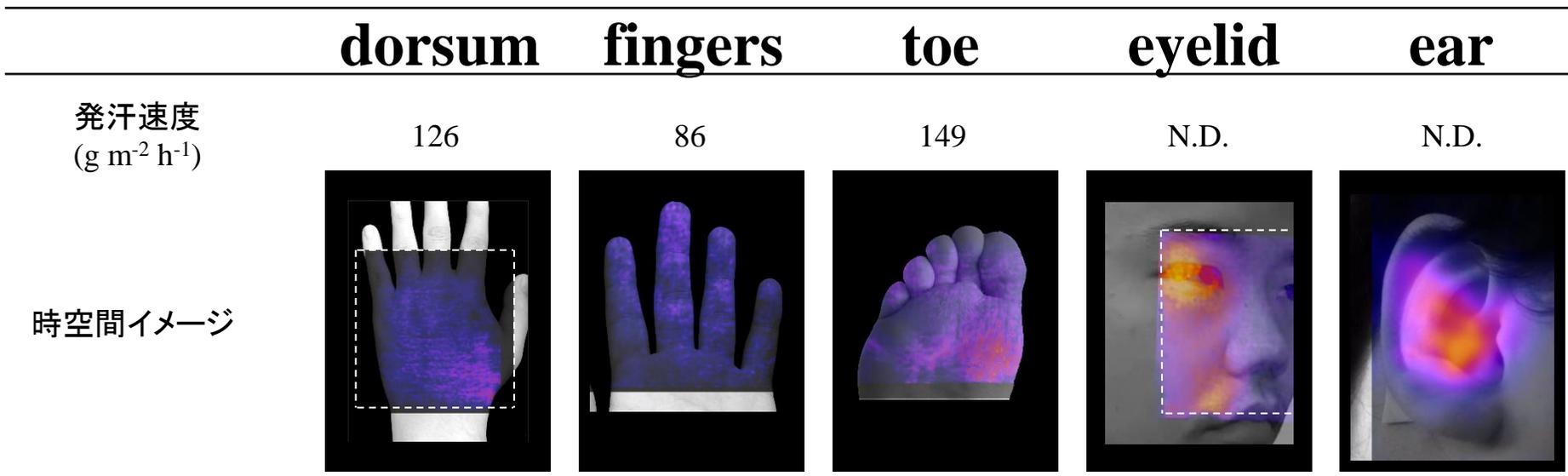
dt = 5s

反応速度解析



経皮ガスの分布計測と「探嗅」

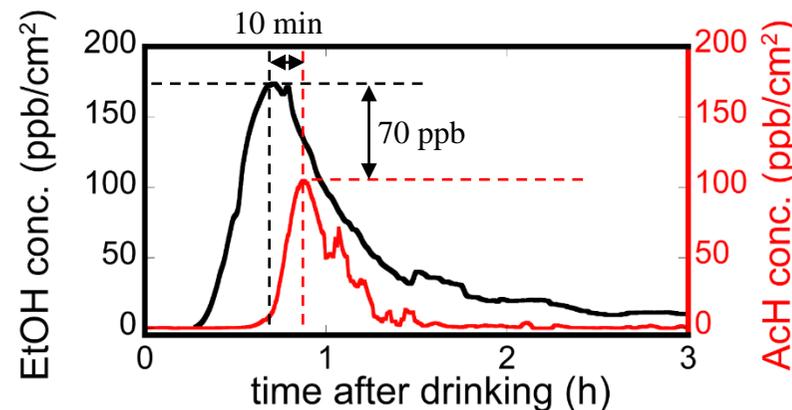
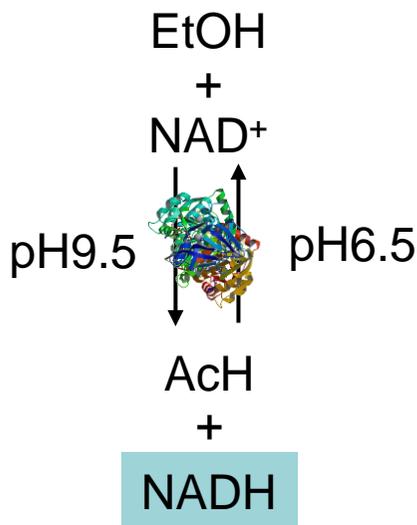
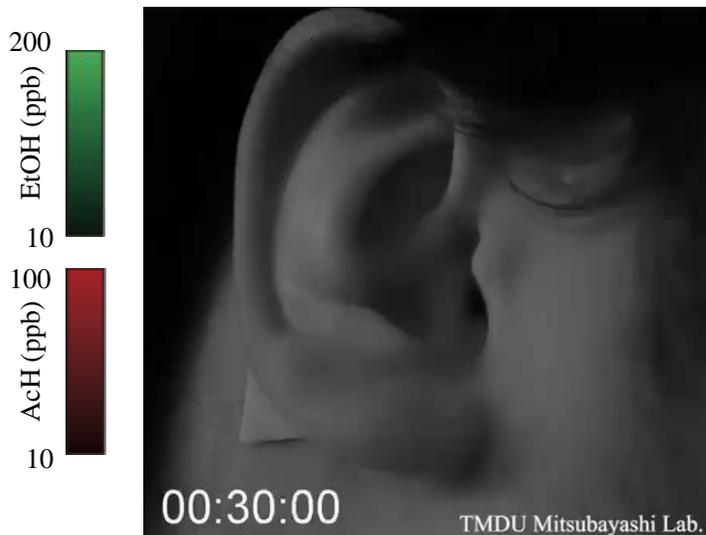
様々な身体部位におけるEtOH可視化結果の比較



耳由来の経皮ガスによるアルコール代謝モニタリング

litani K et al., ACS Sens, 2020.

※ EtOHとAcH可視化実験は同一被験者で別日に実施



血中VOCs濃度変化に類似

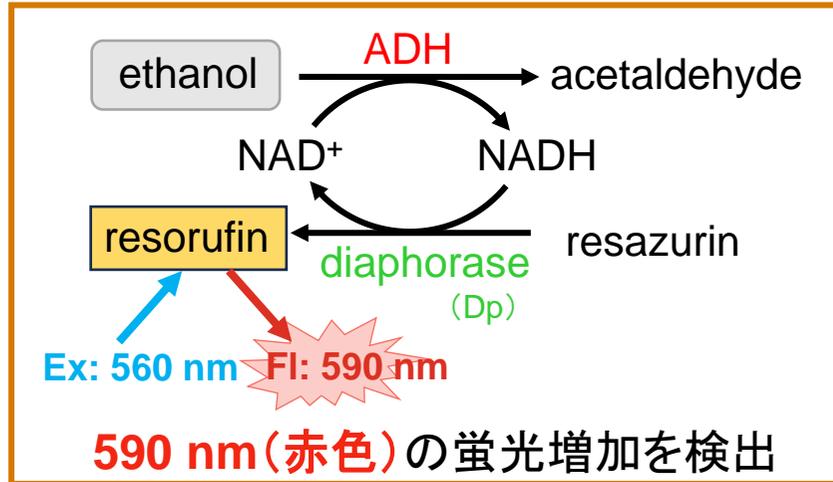
AcHは遅れて放出し、濃度も低い
→ アルコール代謝を反映

課題：複数の成分を同時に、同視野で計測できない制限

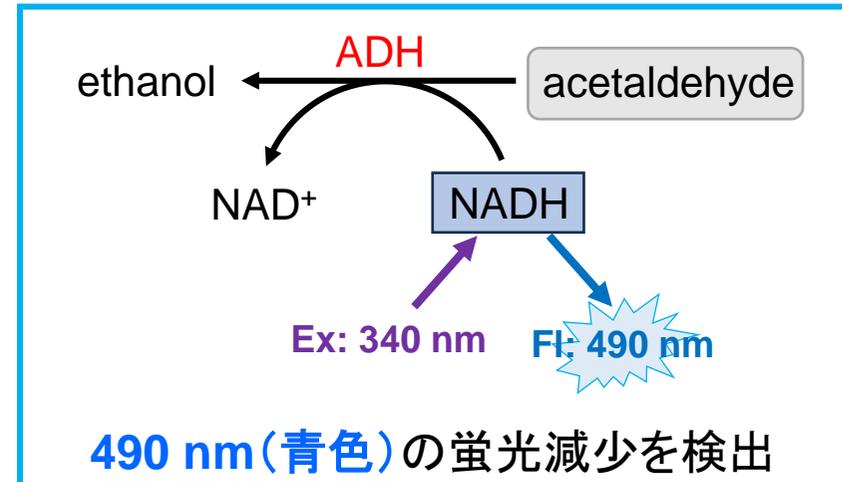
新技術：複数波長による同時計測

特願2023-168639

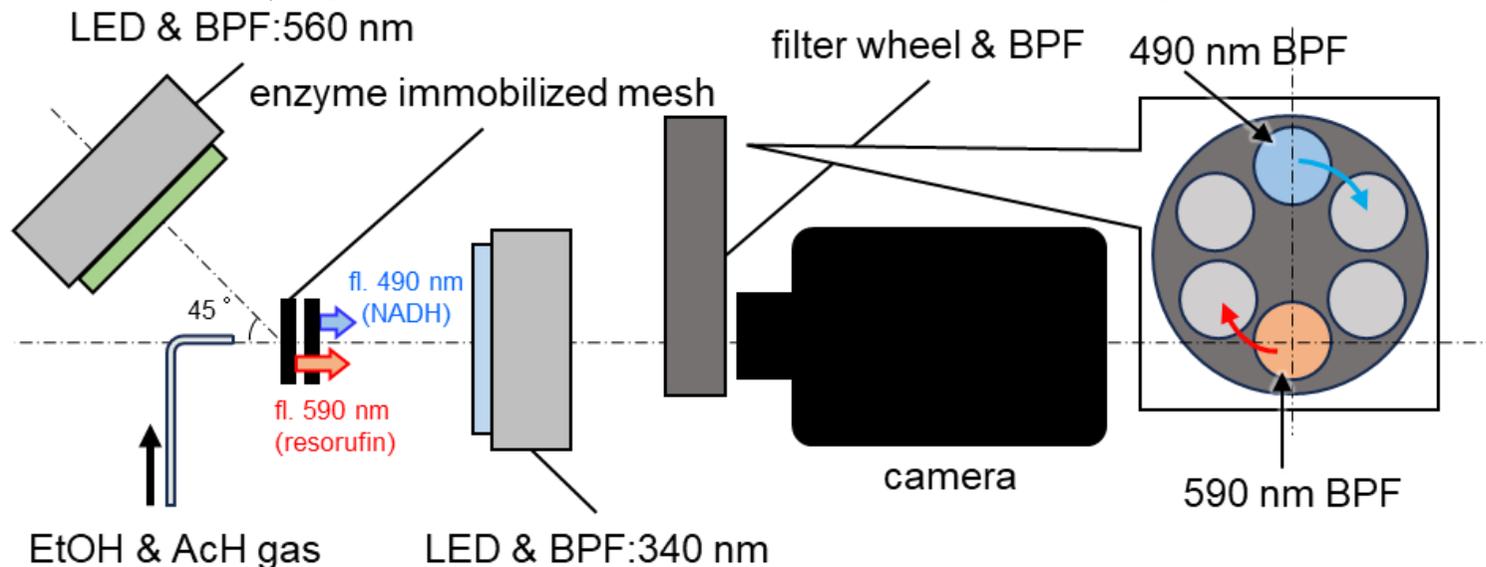
EtOHのイメージング原理



AcHのイメージング原理



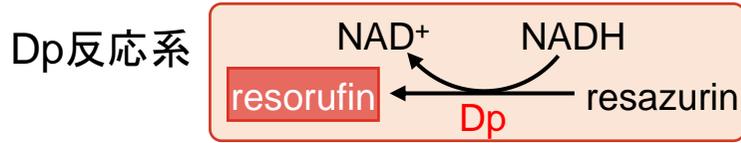
2波長同時イメージングシステムの概略図



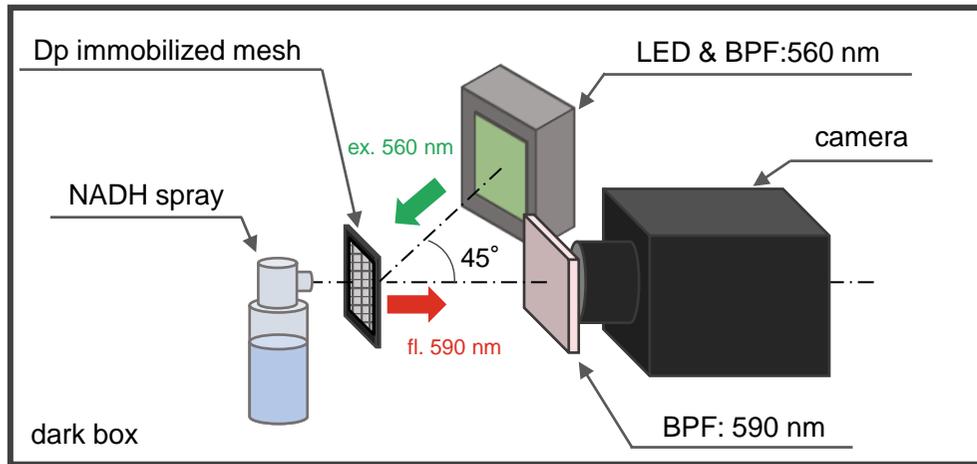
FWを用いたBPF切り替えによる異波長イメージング

実証データ1

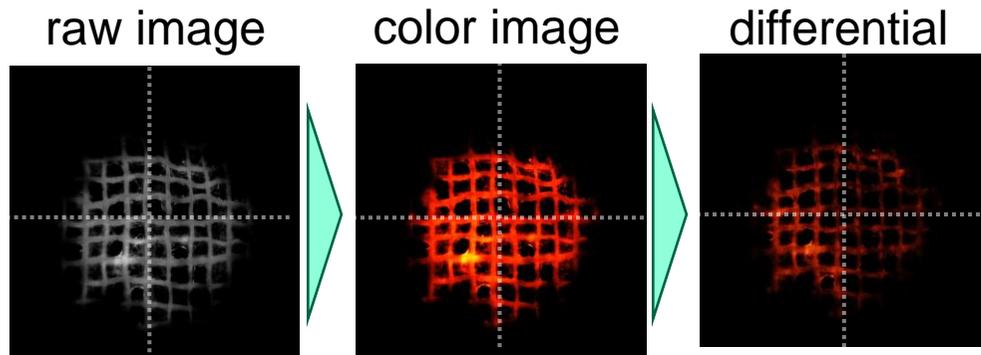
赤色蛍光でのNADHイメージング



溶液噴霧によるNADHイメージングシステム



蛍光動画像の処理方法



$$\frac{dI}{dt} = \frac{g(t + Dt) - g(t)}{Dt}$$

I: 蛍光強度
t: 時間
g(t): 時刻tにおける蛍光画像

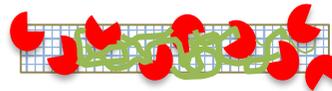
酵素固定化メッシュ作製法

① Dp spread



dry for 60 min at 4°C

② GA cross-link



crosslink for 90 min at 4°C

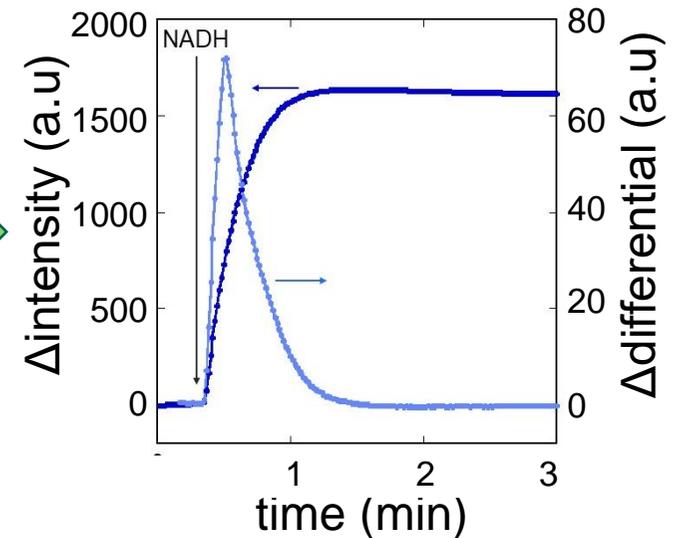
③ rinse



④ add resazurin



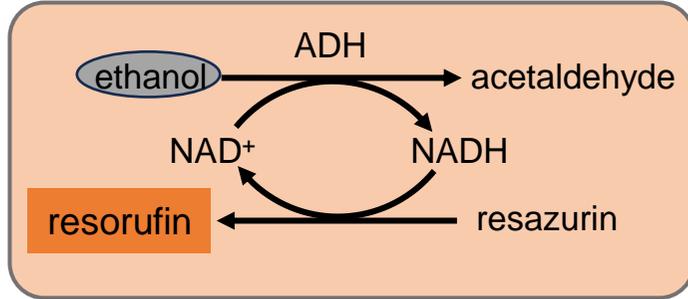
蛍光強度・微分値経時変化



実証データ2

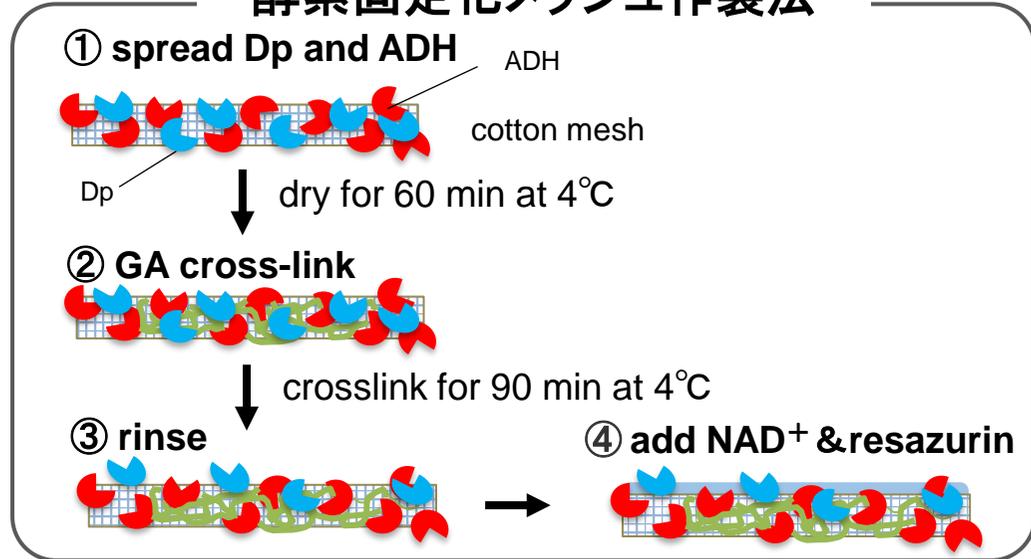
赤色蛍光でのEtOHイメージング法

エタノールガス動画像化の原理

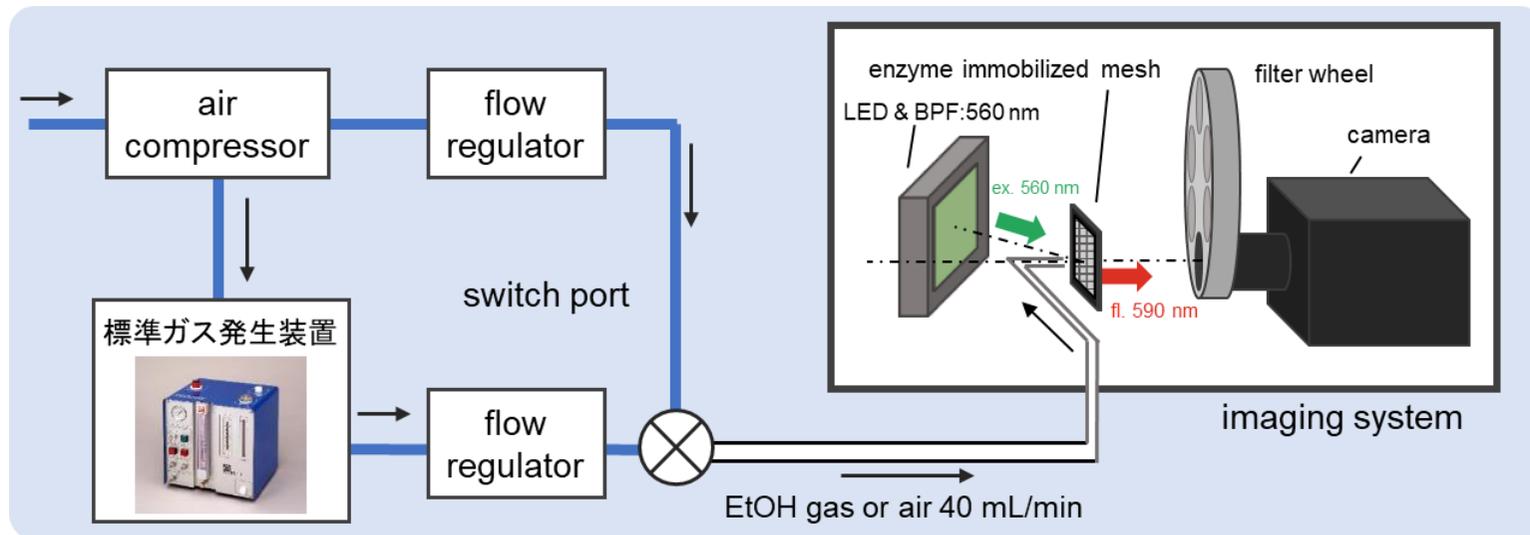


ADH-Dpカスケード反応による生成されるレゾルフィンの590 nmの自家蛍光を利用

酵素固定化メッシュ作製法



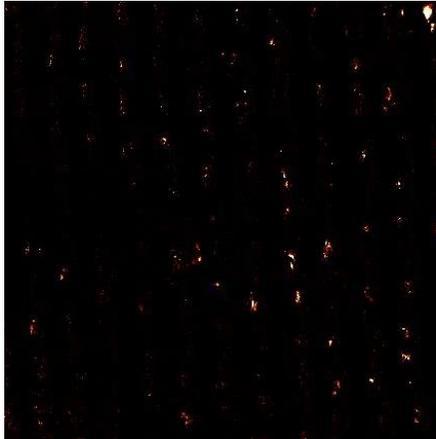
ガス動画像化システムの構成



実証データ2

赤色蛍光でのEtOHイメージング

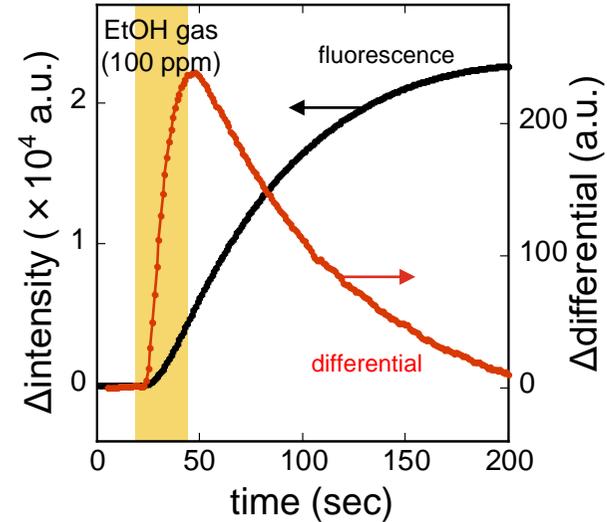
微分動画像



輝度プロファイル

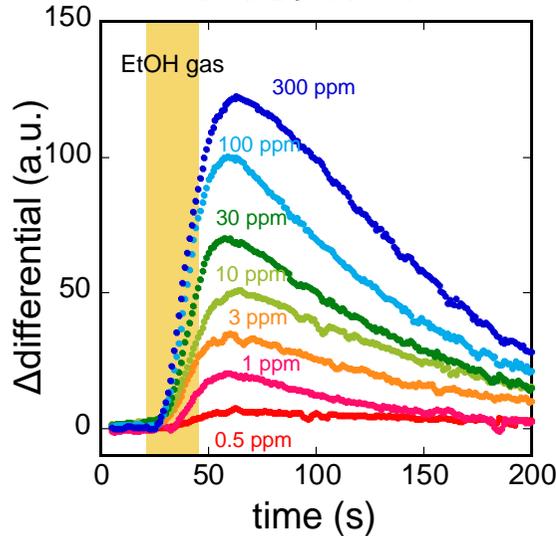


蛍光強度・微分値経時変化

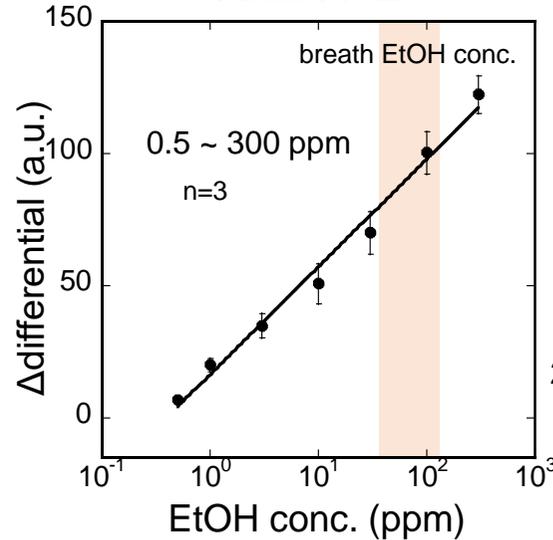


負荷点を中心とした蛍光強度分布を観察

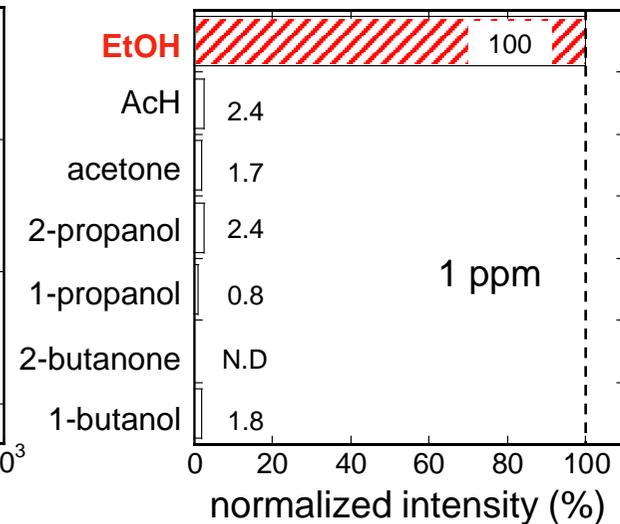
蛍光変化率



定量特性



EtOHガスに対する選択性

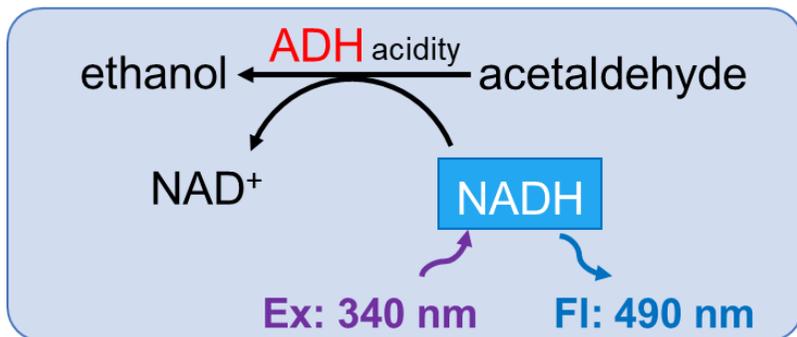


レゾルフィンの自家蛍光を用いたエタノールガスのイメージングと濃度定量が可能

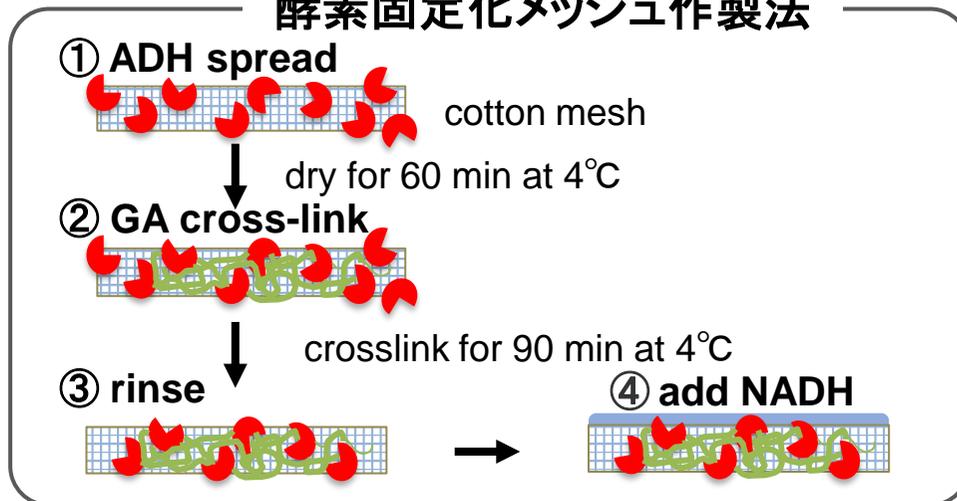
実証データ3

青色蛍光でのAcHイメージング

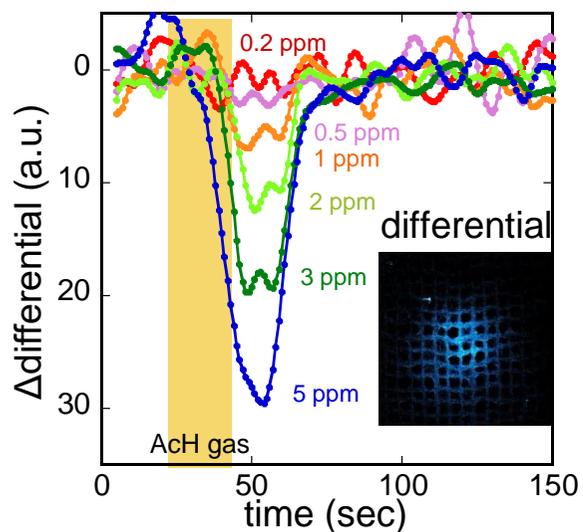
AcHガス動画像化の原理



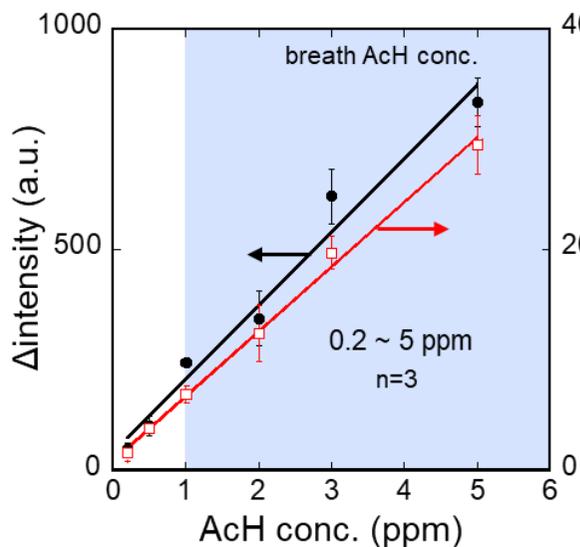
酵素固定化メッシュ作製法



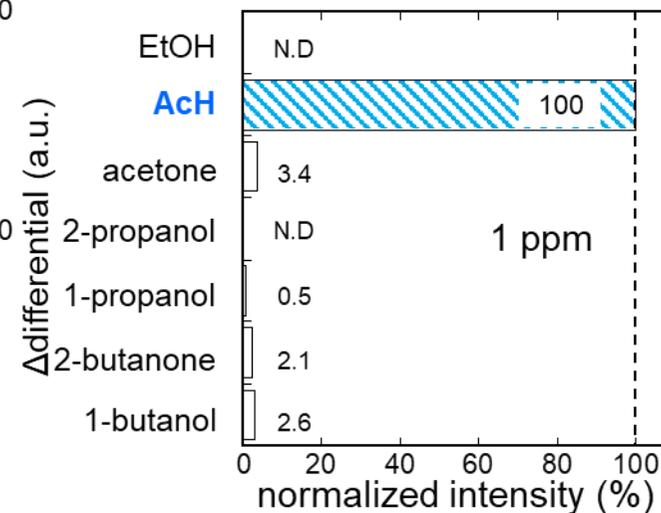
AcHガス濃度に応じた蛍光変化率



AcHガスに対する定量特性



AcHガスに対する選択性

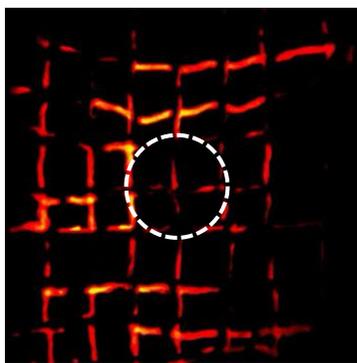


飲酒後の呼気中AcH濃度を含む範囲で定量可能

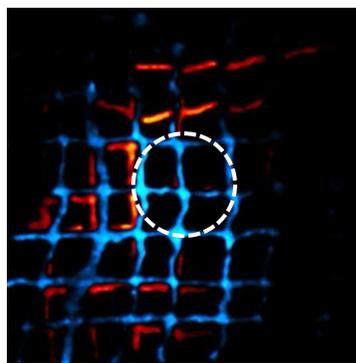
実証データ5

同空間EtOH・AcH同時イメージング

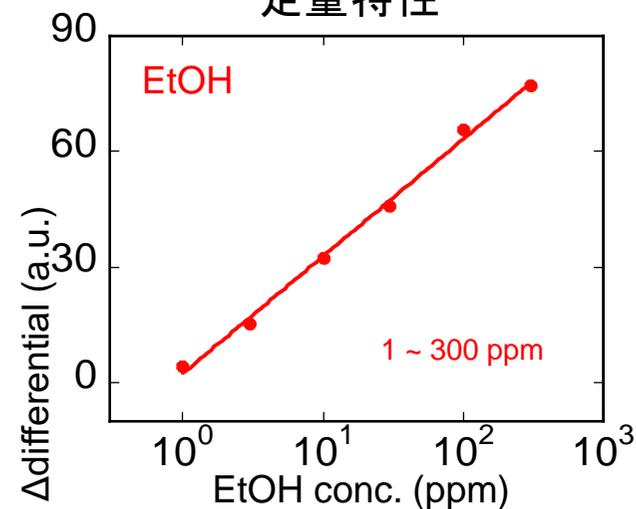
蛍光変化動画



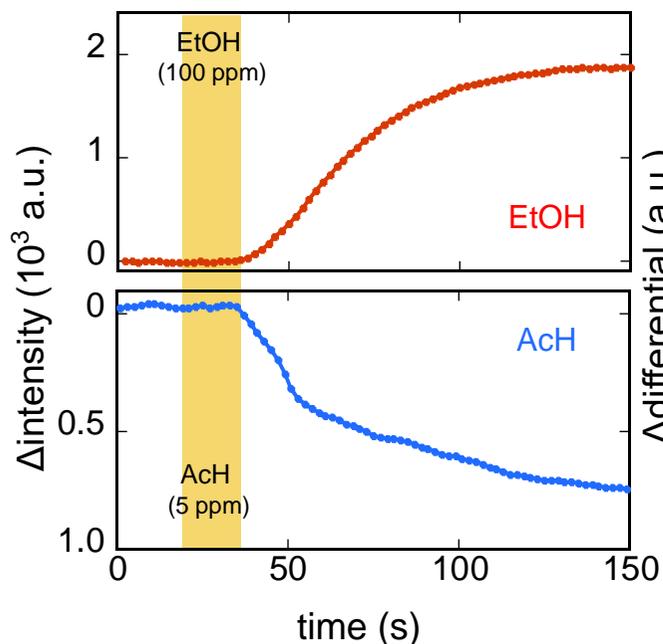
同時イメージング



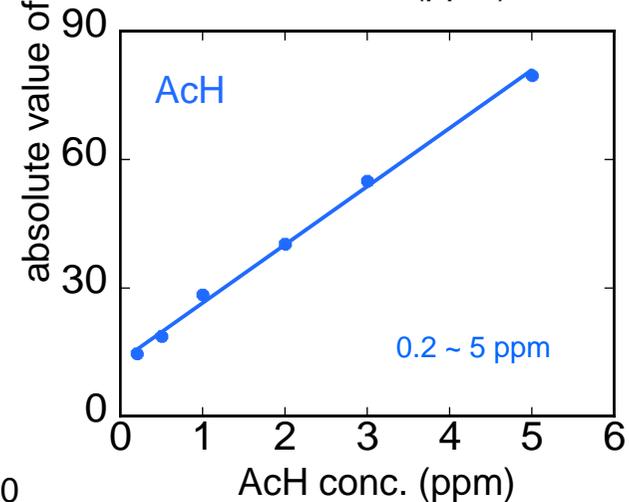
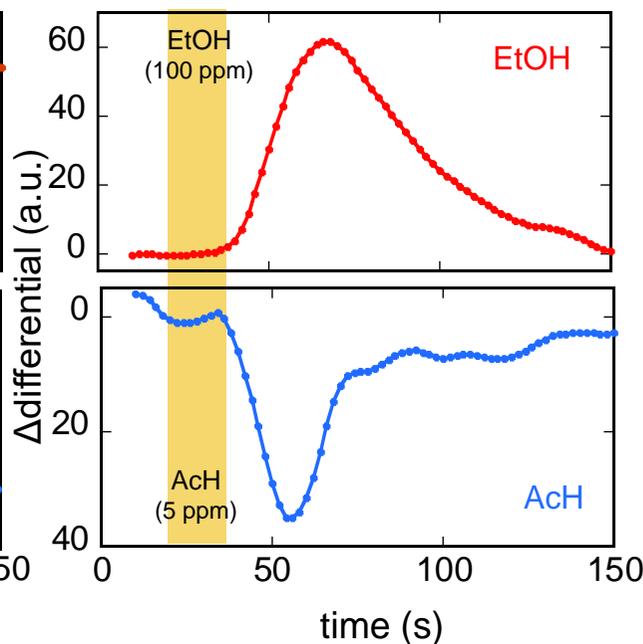
定量特性



蛍光強度経時変化



微分値経時変化

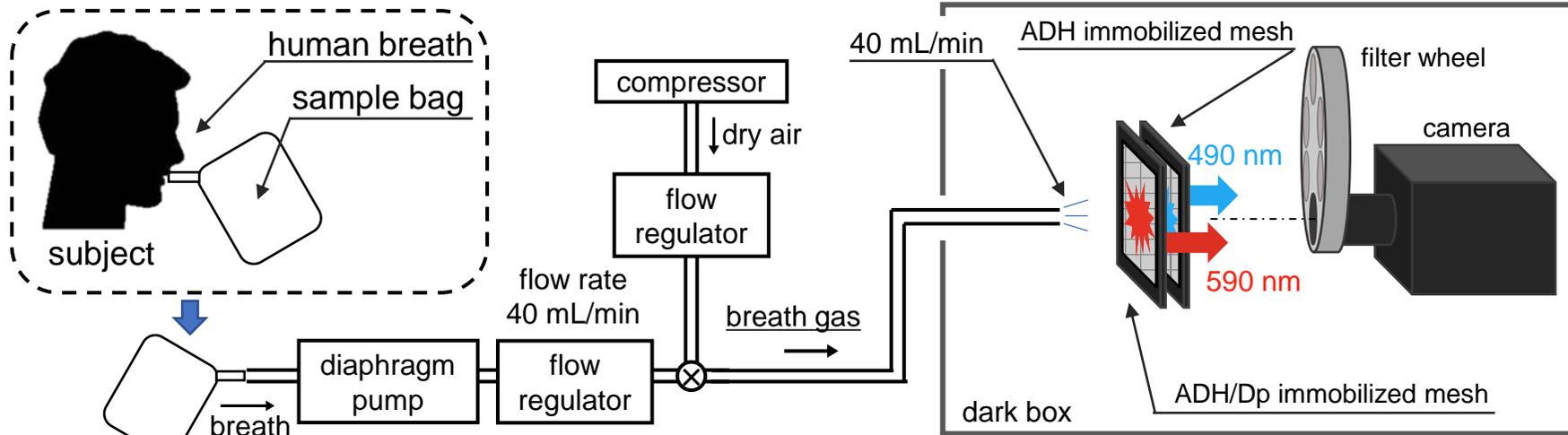


EtOH (590 nm) と AcH (490 nm) を同一領域にてイメージング

実証データ6

呼気中EtOH・AcH同時イメージング法

呼気中EtOH・AcHガスの同時動画像化システム



呼気をサンプルバッグに回収しシステムに負荷

アルコールの摂取条件

- <被験者>
 - ・ 呼気ガスの採取に同意
 - ・ 健常成人
- <アルコール摂取量>
 - ・ 体重1 kgあたり0.4 g
- <アルコール摂取条件>
 - ・ 72時間以内の飲酒ならびに服薬なし
 - ・ 空腹状態(4h 以上)
 - ・ 15分以内での摂取

東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会 承認: M2018-160

アルコールの代謝能の差異

human race	ALDH2 [+] (%)	ALDH2 [-] (%)	none (%)
mongoloid	56	40	4
caucasoid	100	0	0
negroid	100	0	0

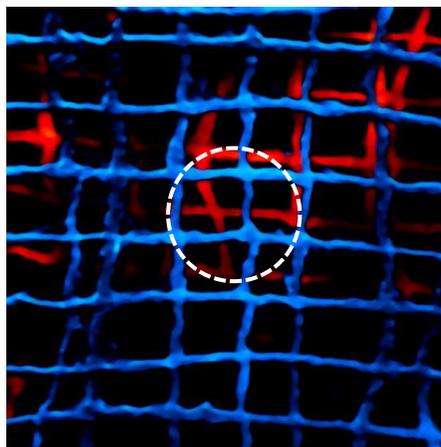
パッチテストにてALDH2活性を評価

ALDH2[+]と[-]に分類し、生体計測へ

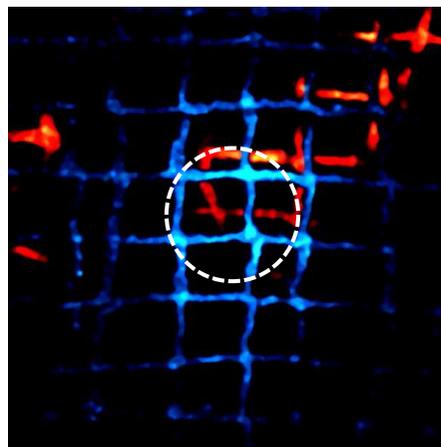
実証データ6

呼気中EtOH・AcH同時イメージング

蛍光動画画像



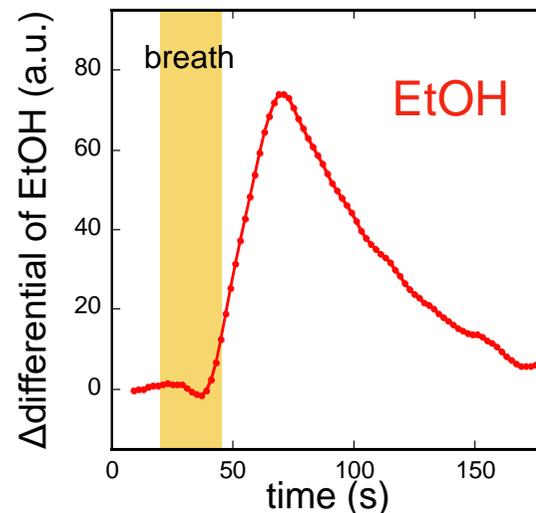
微分動画画像



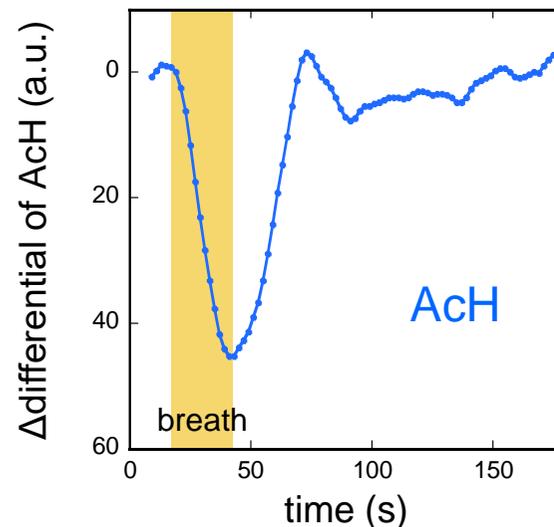
EtOH濃度 : 129.2 ppm

AcH濃度 : 1.99 ppm

EtOH蛍光変化率経時変化



AcH蛍光変化率経時変化



同一領域で呼気中EtOHとAcHを同時動画画像化

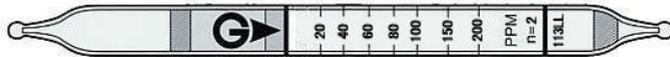
実証データ6

同時イメージングによるアルコール代謝能評価

ガス検知管を用いた呼気計測

測定範囲

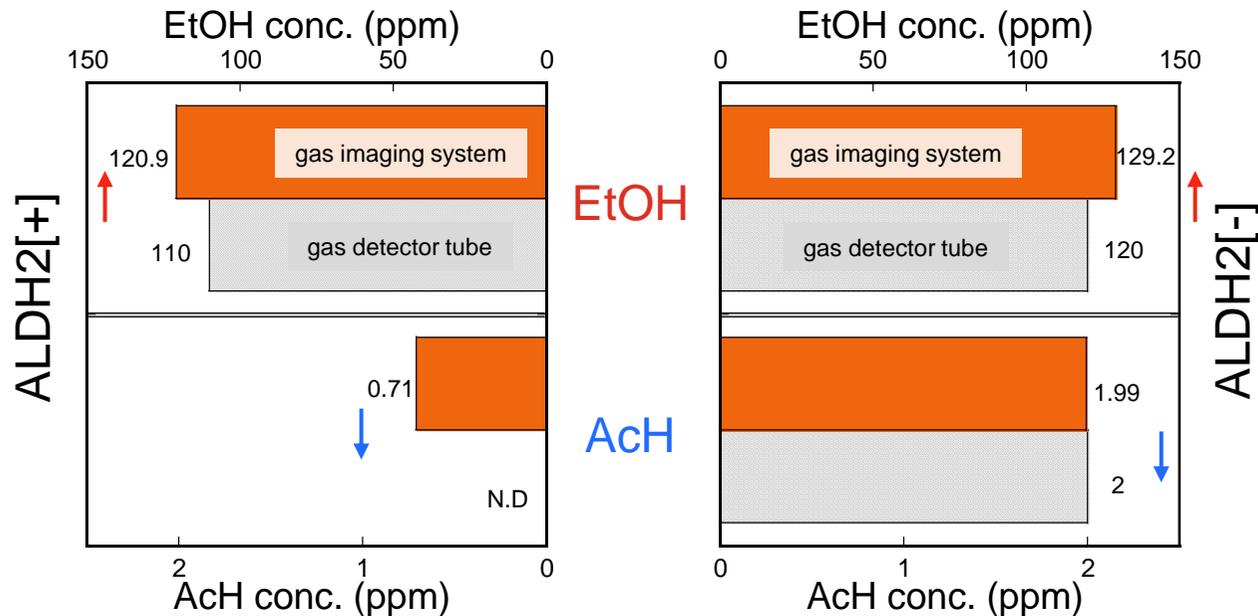
- ・100 mlの吸引
- ・EtOH : 50~2000 ppm
- ・AcH : 1~20 ppm



https://www.gastec.co.jp/product/detector_tube/type/
<https://gastech.com/gastechtubes/detail/1131l/index.htm>



本システムとガス検知管によるEtOH・AcH濃度の比較(飲酒後30分)

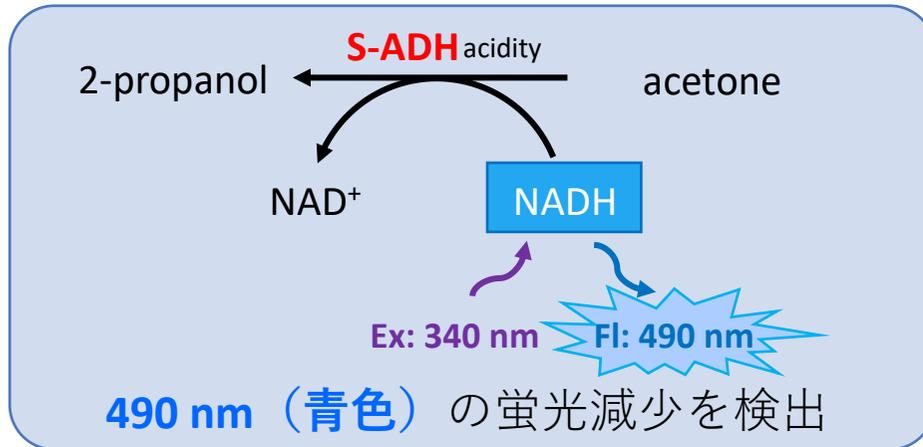


両被験者においてガス検知管と同様のEtOH・AcH濃度値が得られた

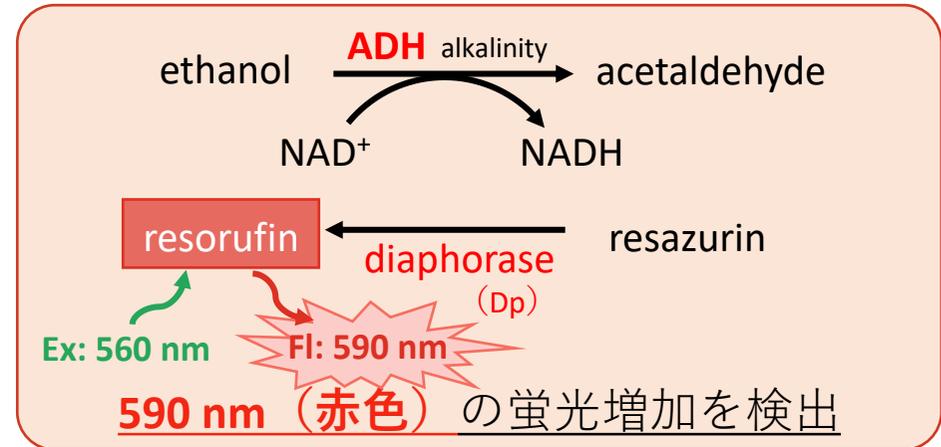
アルコール代謝の呼気による非侵襲評価

ガス成分の組み合わせの例

アセトンのイメージング原理



エタノールのイメージング原理



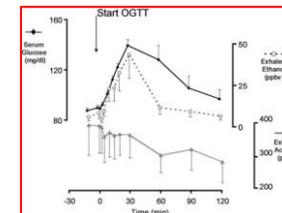
S-ADH: secondary alcohol dehydrogenase

ADH: (primary) alcohol dehydrogenase

アセトンガス + エタノールガス 計測意義

- ・糖を含む飲食物を経口摂取すると、常在菌による代謝が生じてエタノールを生じる
 - ・血糖値が減少すると脂質代謝が生じてアセトンを生じる。
- 糖を基軸とする二項対立の成分であるため、アセトン+エタノールの計測が血中グルコース濃度の推定に寄与するとの論文報告がある

Galassetti et al., Breath ethanol and acetone as indicators of serum glucose levels: an initial report, *Diabetes Technol Ther.*, 7, 115-123, 2005.



実用化に向けた課題

□ 光学系の小型化

- 2つの励起光源の一体化
- フィルターホイールの小型化
 - ・ チューナブルフィルタ or マルチスペクトルカメラ

□ ガス検出メッシュの一体化

- 異なる酵素反応を独立に進行可能な繊維構造体

□ 二種以上のガス検出の原理実証

- 酵素反応の光学的検出方法の検証
 - 化学発光、蛍光色素 etc.

企業への期待

□ ニーズ情報の提供

- 測定したいガス種
 - ・医療応用に限らず、ガス分布計測が有効な物理・化学現象の評価

□ 共同研究への展開

- ニーズに基づくガス計測原理の開発および特許化

□ ガスイメージング系の実用化に向けた装置開発

- 光学系の小型化

企業への貢献・PRポイント

□ 特定ガスのイメージングによる明確な根拠

- 目に見えないガスを視覚化することによる、製品効果を示す明確な根拠の提供（現在、同様のデータを得る方法は他に無い）

□ 生体計測応用に関する知見

- 医歯学系に所属し、研究実施のための倫理審査等を含めた生体計測に関する知見を提供

□ 目的ガスのニーズに応じた技術開発

- 目的ガスに応じた酵素反応系・検出系の開発の技術指導

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：生体ガス計測方法及び生体ガス計測装置
 - 出願番号：特願2023-168639
 - 出願人：東京医科歯科大学
 - 発明者：三林浩二、飯谷健太、三浦凜太郎
-
- 発明の名称：生体ガス計測装置
 - 出願番号：特願2019-555385
 - 出願人：東京医科歯科大学
 - 発明者：三林浩二、荒川貴博、當麻浩司、鈴木卓磨、飯谷健太

お問合せ先

東京科学大学
医療イノベーション機構

T E L 03-5803-4733

e-mail openinnovation.tlo@tmd.ac.jp