

201308018A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

24時間機能可能な携帯型人工膵臓の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹内 昌治

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
2 4時間機能可能な携帯型人工膵臓の開発 -----	1
竹内 昌治	
II. 分担研究報告	
1. 連続グルコース測定モジュールの研究開発 -----	5
高橋 正幸	
2. 体内埋め込み型ポンプの検討 -----	11
竹内 昌治	
3. グルコースセンサ開発のためのin vivo検証系の研究開発 -----	16
興津 輝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	20

24時間機能可能な携帯型人工膵臓の開発

研究代表者 竹内 昌治 東京大学生産技術研究所 教授

研究要旨

生体における血液中のグルコース濃度（血糖値）の恒常性維持の破綻は生命の危機につながるため、インスリン依存状態糖尿病の治療として、安定した血糖値維持を可能とするインスリン製剤の投与方法確立が求められている。そこで本研究では、24時間モニタリングのグルコース濃度に合わせてインスリン製剤を自動的に連続投与する携帯型人工膵臓について、ラットを用いた人工膵臓システムのプロトタイプ実証を行う。24時間機能可能な携帯型人工膵臓は、①連続グルコース測定モジュール、②インスリン投与モジュール、③インスリン投与アルゴリズムの3つから構成される。本年度は①の安全性及び機能性について重点的に研究を進めると共に、②の原理検討、③の検討へ向けた動物実験の評価系構築を進めた。センサの安全性評価では、グルコース応答性蛍光物質及び蛍光ゲルの細胞毒性を評価し、毒性が無いことを確認した。また、生体内へセンサを埋め込む場合、炎症反応などによる蛍光ゲルの劣化が問題となる。そこで、蛍光ゲル劣化の原因の一つと考えられる過酸化水素の酸化作用から保護するため、白金やカタラーゼといった抗酸化物質を混合したゲルについて検討を進めた。結果、カタラーゼを混合した蛍光ゲルで劣化防止の可能性が示唆された。蛍光ゲルを測定するための測定器開発では、実用化を意識してこれまでの透過測定装置から反射型装置へと測定方式を変更し、ラットへ装置を装着した実験で反射方式での蛍光強度測定が可能であることを実証した。インスリン投与モジュールについては、タンクと駆動源が一体となった機構を考案し、ポンプ機能の原理確認を実施した。アルゴリズム検討へ向けた動物実験系として、覚醒下動物へカテーテルを挿管し、血糖値を操作しながらの血糖測定を可能とする実験環境を構築した。今後も引き続き①のセンサモジュール開発を重点的に進めると共に、システム全体としてセンサとポンプを連動させ、人工膵臓のアルゴリズム検討を容易に行える実験環境を整える。

分担研究者

興津 輝 東京大学生産技術研究所／特任教授
高橋 正幸 テルモ株式会社 研究開発本部

A. 研究目的

生体における血液中のグルコース濃度（血糖値）の恒常性維持の破綻は生命の危機につながるため、インスリン依存状態糖尿病の治療として、安定した血糖値維持を可能とするインスリン製剤の投与方法確立が求められている。携帯型人工膵臓は24時間グルコース濃度を監視し、生体内のグルコース濃度に応じてインスリン投与量を調節するためのシステムである。これにより、無自覚的に糖尿病患者の血糖をコントロールすることが期待される。しかし、グルコース濃度変化やインスリンの吸収時間、運動、睡眠、食事といった様々な要素についての個体差が大きいため、完全な血糖コントロールを実現することは難しい。また、インスリン投与量を定めるための連続グルコース測定器の測定精度も十分ではなく、インスリン投与量の細かな調整は難しい。そこで本研究では、携帯型人工膵

臓システムの課題とされる連続グルコース測定システムのセンサ開発について重点的に研究を進め、これをインスリン投与ポンプ、インスリン投与投与アルゴリズムと組み合わせたラットでの概念実証を行うことを目的とする。本年度は特にこれらの要素技術について、実用化を念頭にした原理検証と評価系構築を進めた。

B. 研究方法

24時間機能可能な携帯型人工膵臓は、Fig.1に示すように①連続してグルコースを測定する

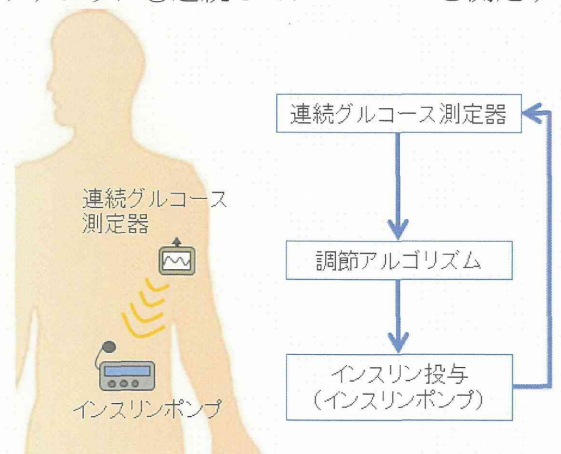


Fig.1 携帯型人工膵臓の3要素

技術、②インスリン製剤を投与する技術、③それらを制御するアルゴリズムの3要素から構成される。本年度は連続グルコース測定システムについては、センサ機能の改善と安全性評価、反射型蛍光検出装置の開発を進めた。インスリン投与システム開発については埋め込み型ポンプの原理検討を進め、インスリン投与アルゴリズムについては動物実験プラットホームの構築及び血糖コントロール条件についての検討を進めた。

B-1. 連続グルコース測定モジュールの研究

B-1-1. 蛍光ゲルセンサ

我々は過去の研究において、生体内に埋め込んで機能する完全埋め込み型のグルコースセンサを開発した。しかし、実用化を意識した安全性の確認や長期埋め込みによる生体内劣化への対策が不十分であった。そこで本年度は蛍光ゲル及び蛍光色素の細胞毒性試験と、劣化要因と考えられている酸化物質からの保護を目的とした抗酸化物質を混合した蛍光ゲルの劣化防止効果について評価を進めた。

細胞毒性試験は、試験サンプルを我々の研究施設にて作製し、毒性評価を実施している外部受託機関（株式会社ボゾリサーチセンター）に評価を依頼した。蛍光ゲルと蛍光色素粉末（S41）を評価対象とし、蛍光ゲルについては24時間抽出液を使用し、蛍光色素粉末は溶媒へ溶かし濃度を調節した。本試験は乳類培養細胞（V79）を用いたコロニー形成実験にて細胞毒性を評価した。なお、本評価は「医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方（薬食機第0301第20号：平成24年3月1日付厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知）」及び「ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Tests for in vitro cytotoxicity: 2009 (E)」に従い実施された。

劣化対策として白金またはカタラーゼを混合させた蛍光ゲルを作製し、その劣化防止効果について過酸化水素浸漬前後におけるグルコース溶液への反応性の変化を評価した。過酸化水素を使用した理由は、生体内で劣化を誘引すると考えられるマクロファージなどが異物を攻撃する際、局所的に過酸化水素を放出することが知られている。

B-1-2. 反射型蛍光測定器

皮下へ埋め込んだ蛍光ゲルの蛍光測定を実施するため、反射型蛍光測定器の開発に取り組んだ。これまで我々が取り組んできた透過測定では体の薄い部分での測定にしか対応できないため実用化が難しい。そこで本研究では反射型測定の原因

確認器を構築した。本測定で要求される光学部品などすべての装置を動物に長期間装着させることは難しい。そこで、測定装置本体は実験ケージの上部に吊り下げ、測定部位の反射検出原理はそのままに、装置に接続した光ファイバーを介して動物に埋植された蛍光ゲルの励起、蛍光検出を行えるような装置を設計した。蛍光検出部は市販のLED、PDを用いて構築し、励起光量を確保するためPD用の光ファイバ周囲にLED用の光ファイバを数本配置した。さらに自由に行動させるラットを測定する場合、有線によるデータ送信及び電力供給ではラットの動きに線が対応できず絡まってしまうため、無線化も同時に進めた。開発した装置の原理及び測定性能確認はin vitroでの実験を終えた後、ラット耳に埋め込んだ蛍光ゲルに対する蛍光実体顕微鏡と反射型蛍光測定器の同時測定により実施した。

B-2. 体内埋め込み型ポンプに関する研究

インスリン投与モジュールとして、インスリン用のタンクと駆動源が一体となったバルーン型ポンプについて原理確認を実施した。バルーンが収縮する際に内部溶液に伝える圧力は、内部溶液の残量に応じて変化する。さらに、マイクロ流路をレギュレータとして使用することで、シンプルな構造での流量制御が可能となる。

バルーン式タンクは支柱にシリコンゴムチューブを固定することで作製した支柱の両端には液体が流し込み可能な穴が開いており、一端の穴から液体を流し込むと、支柱表面に作られた流路を通り支柱とチューブの間に液体を溜めることができる。本バルーン式タンクでは、膨張させたチューブが元の形状に戻ろうとする力によって液体を押し出すことができる。バルーン式タンクの駆動特性評価として、1 mLの水を注入してバルーンを膨張させた後、バルーン収縮時の排出圧力と排出流量の経時的な変化を評価した。

マイクロ流路への入力圧力と排出流量の関係を理論検討した後、ソフトリソグラフィーを用いてレギュレータとして使用するシリコンゴムのマイクロ流路を作製した。次に、仮想的に精細なマイクロ流路を設けるため、polyethylene glycol diacrylate (PEGDA)が空気に接触すると硬化できない性質を利用して硬化した樹脂とマイクロ流路表面の間に精細なマイクロ流路を作製した。

B-3. グルコースセンサ開発のためのin vivo検証系の研究開発

本研究では、SDラットの頸静脈および大腿静

脈にカテーテルを挿入し、摂食量の制御や記録が可能なケージに入れてフリームービングの状態で行動に関するパラメータの記録制御と採血実験が可能な実験システムを構築した。グルコースセンサの機能評価に寄与するため、本実験システムを用いてグルコース負荷試験におけるグルコース負荷速度の検討及び、高血糖クランピングの検討を行った。

グルコース負荷試験ではグルコース負荷時間を5min、10min、15min、30minと設定し、経時的な血糖値の変動を測定した。これにより、本実験に最適なグルコース負荷速度の検討を行った。

高血糖クランプでは、グルコース負荷試験の結果を参考に、グルコース負荷の注入速度を制御することでフリームービングの正常ラットの血糖値を350mg/dlに30分以上維持し、その後100mg/dLにクランピングできることを検証した。

(倫理面の配慮)

本研究での動物実験は東京大学における動物実験実施規則に則り、動物実験専門委員会の承認の下に行っている。

C. 研究結果

C-1. 連続グルコース測定モジュール

C-1-1. 蛍光グルコースセンサ

細胞毒性試験の結果、蛍光ゲルの抽出液処理群の相対コロニー形成率について、非処理群及び陰性耐性材料抽出液処理群と同等であり、コロニー形成に対する阻害作用は認められなかった。蛍光色素の相対コロニー形成率についても同様の評価を行い、最高容量群においても非処理群及び陰性対照群と同等であった。これらの結果から、本蛍光ゲルセンサに使用する蛍光物質及び蛍光ゲルはほぼ乳類培養細胞 (V79) に対して毒性は無いと結論された。

白金を混合した蛍光ゲルについての劣化評価では、過酸化水素浸漬後に60%程度蛍光強度が低下した。また、カタラーゼを混合した蛍光ゲルでは、同様の処理後に20%程度の蛍光強度低下に抑えることができた。白金については濃度を高くすることも検討候補として考えられたが、白金を混合した蛍光ゲルはそれ自体が黒くなるため元々の蛍光消失も大きく、本劣化対策のメインからは外すこととした。今後、カタラーゼを混合した蛍光ゲルとしない蛍光ゲルを比較し、実際の生体内における効果検証を続ける。

C-1-2. 反射型蛍光測定器

市販のLED、PDを用いた測定が可能な無線式の反射型蛍光測定器を構築し、in vitro及びin vivoでの機能実証に成功した。In vivo機能実証で

は耳へ蛍光ゲルを埋め込んだラットに対して糖負荷試験を行い、蛍光実体顕微鏡と反射型蛍光測定器にて同時測定において、蛍光強度が上昇するタイミングやベースライン値に対する変動幅が両方の蛍光強度測定においてはほぼ一致していることが確認できた。その相関係数は0.996であった。以上より、我々の構築した反射型蛍光測定器により、蛍光強度変化を測定できていることが示された。次年度以降、本測定器の小型化及び省電力化を進め、長時間の連続測定を実現するとともにラットへの負担軽減を目指す。

C-2. 体内埋め込み型ポンプに関する研究

1 mLを注入した時の、バルーン式タンクの経時的な排出圧力と排出流量の変化について検討した結果、バルーン式タンクのみでは5秒以内に全保持溶液を出し尽くしてしまい、経時的に排出流量と排出圧力が低下していくことが分かった。バルーン式タンクでは溶液の長時間一定流量を排出し続けることは困難である。

マイクロ流路の寸法と流量制御特性の関係を明らかにするため、断面辺長25、50、75 μm 、長さ15、30、45、60 cmの計12種類のマイクロ流路を作製し、ゲージ圧0.3~2.5 $\times 10^5$ Paで水を注入した際の排出流量を計測した。理論式から予想した通り、断面辺長が短くなるまたは流路長が長くなることで排出流量を一定にでき、断面辺長の変化の方が流路長の変化よりも流量制御に対して支配的に働くことがわかった。マイクロ流路の断面辺長を短くすることで、より効果的に一定排出流量が実現可能である。

マイクロ流路中にバルブを設けることにより、マイクロ流路に0.5~1.5 $\times 10^5$ Paのゲージ圧をかけた際に、圧力に関わらず数十 $\mu\text{L}/\text{min}$ の一定流量での排出を実現した。マイクロ流路壁面とバルブの隙間に断面辺長5.5 μm の仮想的な微小流路が構築されたことが示唆された。以上の結果より、バルブをマイクロ流路中に設けることで精細なマイクロ流路が構築され、流量制御特性が改善することが示された。

C-3. グルコースセンサ開発のための in vivo 検証系の研究開発

正常ラットにおける負荷速度と血糖値の関係性に関する基礎的なデータを得るため、単回でグルコースを負荷した場合の血糖値変動をとらえる実験を行った。本検討により投与時間が短いほど血糖値のピークが高い傾向が認められたが、投与時間が5min以下であった場合は、採血間隔が投与時間に対して大きいため、血糖値のピークを捉えることが難しかった。一方、30min以上の投与時間の場合、血糖値は350mg/dLを超えず、投与終了後に100-150mg/dLの血糖値に戻るまで、15min程度要した。グルコース投与時間

が10min-15minである場合、血糖値のピーク値は500mg/dLを超えた。グルコースの投与が終了した後は血糖値は低下し、100-150mg/dLに戻るまで15min以上かかることが確認された。

C-1の結果を参考に、高血糖(350mg/dL)に30min以上クランピングする場合の注入速度を検討した。その結果、約45-42mg/min/kg体重のグルコース注入速度において、クランピングが可能であった。また、グルコース注入を停止することで、20min以内に速やかに100-150mg/dLの血糖値まで戻ることがわかった。

D. 考察

本年度は連続グルコース測定モジュールについて重点的に進め、センサ機能改善及び安全性評価、そして反射型蛍光測定器の開発に取り組んだ。携帯型人工膵臓の重要な構成要素である連続グルコース測定モジュールは、長期間にわたって高精度にグルコース濃度を測定できることが求められる。次年度以降も引き続き連続グルコース測定モジュールの研究に重点を置き、高精度測定を実施するための蛍光ゲルセンサ及び測定装置改善を実施する必要がある。例えば、蛍光ゲルセンサに参照物質を導入することでベースラインの安定化及び、計測部位のずれをキャンセルしていくことが考えられる。また、現在は測定部平面に耳を接着しているだけであるが、この方法だと自由行動下ラットの測定ではラットが動くことによるノイズが大きい。そこで、埋め込んだゲルと測定部平面の接着についても改良を進める。反射型蛍光測定器に関しては、機体自体が大きく扱いづらいため、引き続き省電力化と小型化に取り組む必要がある。特に、光ファイバと光源でのロスが大きいため、ファイバ接続にレンズを用いるなどしてロスを減らす必要があるだろう。インスリン投与モジュールについては、バルーン型のポンプを提案し、小型化及び流量制御用の構造について構築できる可能性を示すことができた。今後も引き続き、MEMS技術を応用した装置の小型化について検討を進める。インスリン投与アルゴリズムについて、血糖値を制御するためのカニューレ導入技術及び投与条件について検討を進め、60~300mg/dlまでの血糖コントロールを実現できた。ただし実際の糖尿病患者ではもっと広い範囲で血糖変動することが予想されるため、今後、他の開発装置を装着する場合の実験スケジュールやより高低濃度にクランプするための実験条件についての検討を継続して進める必要があるだろう。

システム全体として、本年度は基礎技術の確立に取り組み、徐々に環境が整ってきた。次年度以降は実際に測定装置をラットへ装着し、シ

ステム全体として稼働させるように、各装置を連動させることも目指していく。

E. 結論

本年度は携帯型人工膵臓の連続グルコース測定モジュールの開発を中心に、要素技術開発と実験システムの準備を進めた。蛍光ゲルセンサについては細胞毒性での安全性を確認し、劣化対策の可能性を示すことができた。また、反射型測定装置を作製し、反射測定での検討が可能か環境を整えることができた。今後は、同時に検討を進めてきたラットの血糖値制御システムと組み合わせることで、インスリン投与アルゴリズムの概念実証へ向けた環境整備を進めていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋正幸、竹内昌治、体内埋め込み型グルコースセンサ、スマート・ヒューマンセンシング、シーエムシー出版、pp. 75-78, 2014

2. 学会発表

向山祐未、森本雄矢、興津輝、竹内昌治、“体内薬物注入に向けたバルーン式ポンプ”、第28回化学とマイクロ・ナノシステム、pp. 3P28, 姫路、12月2013年

竹内昌治：マイクロ・ナノデバイス技術の創薬・医療応用、NBCI (ナノテクビジネス推進協議会) ライフ分科会講演会 2月28日

竹内昌治：BioMEMSが拓く医療・環境センサ、TrillionSensors Summit JAPAN 2014-2-21

竹内昌治：マイクロナノデバイス技術が拓く最先端バイオセンシング材料、第2回先端エレクトロニクス材料のためのコロイド・界面化学 12月13日

竹内昌治：脂質、ハイドロゲル、細胞を使ったモノづくり、日本MRS 12月9日 基調講演

竹内昌治：マイクロ流体デバイス技術を利用した創薬・医療応用、生化学会、2013-9-11

Shoji Takeuchi: Microfluidically-engineered Hydrogels for Biomedical applications. MESA+Colloquium, 2013-5-14

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録E

該当なし

3. その他

該当なし

連続グルコース測定モジュールの研究開発

分担研究者 高橋 正幸 テルモ株式会社 研究開発本部

研究要旨

本研究では連続グルコース測定モジュールの構成要素である①完全埋め込み型グルコースセンサと②蛍光検出装置の開発を実施した。我々が提案する測定方法は、グルコース濃度に応じて蛍光強度の変化するゲルを体内に埋め込み、蛍光強度の変化からグルコース濃度の変化を読み取る。センサは生体内と接するため、センサ自身の安全性と耐久性が課題となる。そこで本年度は、安全性確認としての細胞毒性試験と生体内での劣化対策を実施した。蛍光検出装置開発では、これまでの透過型測定ではヒトへの応用が難しいと想定されるため、反射型測定への変更を行った。蛍光ゲルに対する細胞毒性試験では、陰性対照群や非処理群と比較して有意な毒性は現れなかった。よって、蛍光ゲルの毒性は低いことが期待される。劣化対策では、白金とカタラーゼによる生体内過酸化水素からの保護を検討した。白金では蛍光の消失が大きく、期待した結果が得られなかった。しかし、カタラーゼを混ぜた蛍光ゲルでは過酸化水素を用いた *in vitro* 評価にて過酸化水素処理後も 80%以上の蛍光を保持できた。反射型蛍光測定器開発では、光ファイバーを利用した原理確認機を作製し、麻酔下での動物実験において蛍光検出可能なことを確認できた。今後、センサについては実際生体内へ埋植し劣化に対する効果の検証を進める。蛍光検出装置については、覚醒下ラットでも測定可できるように、装置の装着方法の改善と測定精度についての検討を進める。

A. 研究目的

携帯型人工膵臓は膵β細胞の機能が完全に消失した患者の血糖値を24時間コントロールするツールとして期待されている。血糖をコントロールするためには、血糖値を常時モニタリングする必要がある。この常時モニタリングには、連続グルコース測定器が使われている。現在、針型のセンサを使用する連続グルコース測定器が主流となっているが、測定精度がインスリン投与量を決めるのに充分ではなく、センサ寿命も短いため長期に使用することができない。これら測定精度の低さとセンサ寿命の短さは、センシングに使用している酵素の生体内劣化が速く、ベースの値が変わってしまうことに原因がある。

そこで本研究では、安定性を保持するための劣化対策として、白金とカタラーゼを導入した蛍光ゲルについて評価した。また、センサ埋め込みによる周辺組織への影響を調べるため、細胞毒性試験を実施した。

これまで我々が作製してきた蛍光検出装置は耳での測定を前提としていたため、透過測定を行っていた。しかし、ヒトへの応用を考えた場合、皮膚透過性の問題から透過測定を続けるのは難しい。そこで、光ファイバーによる導光を利用した反射型測定器を作製し、その原理確認をおこなった。

B. 研究方法

連続グルコース測定モジュールはセンサと蛍光測定器から構成される。センサ部については劣化対策と細胞毒性試験、蛍光測定器に関しては反

射型測定を行うための原理試作器を作製し、*in vivo*での機能評価を実施した。

B-1. センサ開発

B-1-1. 細胞毒性試験

試験サンプルについては我々の研究施設にて作製し、細胞毒性試験については毒性評価を実施している外部受託機関（株式会社ボゾリサーチセンター）にて評価を依頼した。今回評価したサンプルは蛍光ゲルと蛍光色素粉末の2つである。蛍光ゲルについては24時間抽出液を使用した。ほ乳類培養細胞（V79）を用いたコロニー形成実験にて細胞毒性を検討した。なお、本評価は「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方（薬食機第0301第20号：平成24年3月1日付厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知）」及び「ISO 10993-5:Biological evaluation of medical devices - Tests for *in vitro* cytotoxicity:2009 (E)」に従い実施された。

B-1-2. 蛍光劣化対策（白金、カタラーゼ）

白金は過酸化水素を水と酸素に分解する触媒として、カタラーゼも同様の作用を持つ酵素として広く使われている。そこで、本研究では生体内過酸化水素の1つである過酸化水素への耐性を得るため、白金コロイドまたはカタラーゼを混合した蛍光ゲルを作製し（Fig.1, 2）、過酸化水素溶液への浸漬に対する効果を評価した。両方とも通常の蛍光ゲル作製手順と同様に行い、必要な量だけ白金コロイドを混合、または高濃度カタラー

ゼ溶液を希釈して蛍光ゲルを作製した。抗酸化物を混ぜたゲルは、黒っぽく変色し、膨潤しても通常のゲルほど大きくはならなかった。

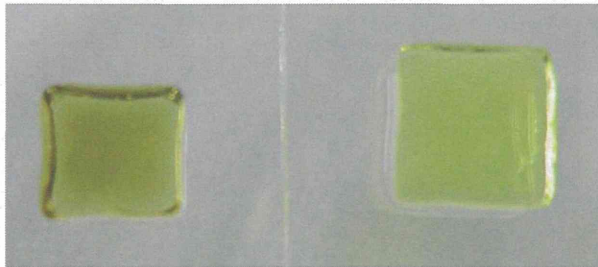


Fig. 1 (左) 白金入り (右) 通常ゲル

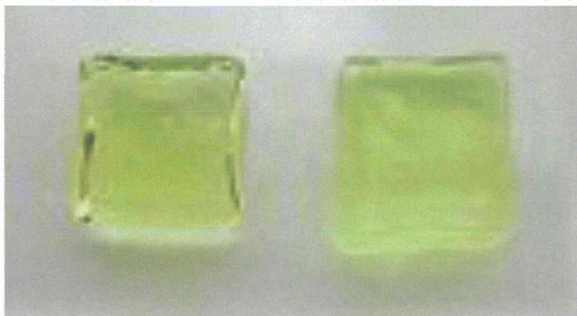


Fig. 2 (左) カタラーゼ入り (右) 通常ゲル

B-1-3. 蛍光劣化評価

劣化対策の効果について、過酸化水素浸漬前後におけるグルコース溶液への反応性の変化を評価した。過酸化水素を使用した理由は、生体内で異物反応や免疫反応に関与するマクロファージが異物を攻撃する際、局所的に過酸化水素を放出することが知られているからである。蛍光ゲルを埋め込む場合も、埋め込みによる創傷部位の炎症と、蛍光ゲル自体が生体から異物と認識されることが想定されるため、過酸化水素への耐性を評価することが劣化を評価する上で重要と考えた。

実験は2日にかけて実施し、まず初日に0mg/dlと1000mg/dlのグルコース溶液それぞれに浸漬した場合の蛍光強度変化を記録した。その後24時間過酸化水素溶液へ浸漬させ、2日目に過酸化水素溶液を除いたのち、初日と同様にグルコース溶液の濃度変化に対する蛍光強度変化を記録した。グルコースへの反応性については、各日における蛍光強度差の変化量で評価した。

B-2. 検出装置開発

B-2-1. 反射型蛍光測定器設計、試作

自由行動下のラットで長時間測定を可能とするため、装置制御部、光学測定部、無線通信部から成る半差y型蛍光測定器を設計した。ただし、検討段階では小型化を実現するのが難しいと考えられたため、測定装置本体を実験ケージの上部に吊り下げ、装置に接続した光ファイバーを介し

て、動物に埋植された蛍光ゲルの励起、蛍光検出を行えるようにした。また、本装置の無線化は市販のXbee (スイッチサイエンス) を利用し、パソコンからインタラクティブに操作できるシステムを構築した。

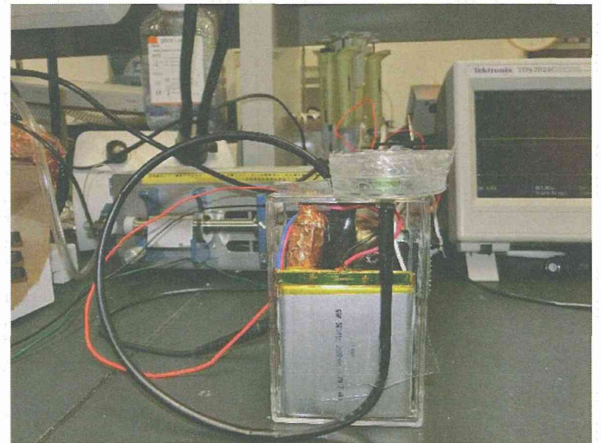


Fig. 3 反射型蛍光検出装置 (無線)

蛍光検出部については、市販のLED、PDを使用した。一本の光ファイバーを介した測定で実施する場合、励起光と蛍光を分光する必要がある。ただし、分光部を設けると装置が大きくなってしまふことが予想された。そこで本研究では、励起用の光ファイバと蛍光検出用の光ファイバを分け、蛍光検出用の光ファイバ周囲に励起用の光ファイバを配置するように設計した (Fig. 4)。

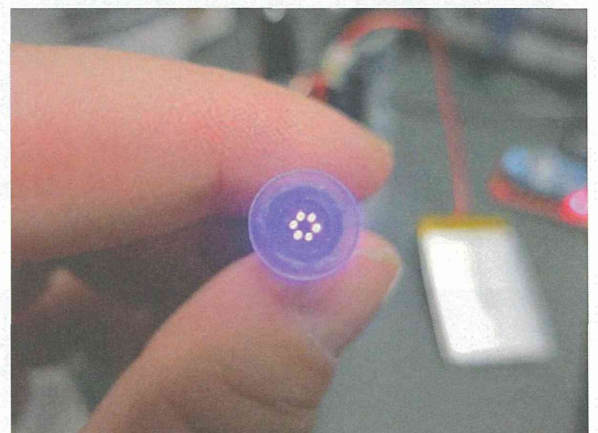


Fig. 4 光ファイバ先端

B-2-2. グルコース溶液での測定確認

反射型蛍光測定器の機能を評価するため、ガラス板上に接着させた蛍光ゲルについて、グルコース溶液濃度を0~1000mg/dlへと変化させた場合における蛍光強度測定を実施した。なお、本測定はグルコース溶液交換によるノイズを抑えるため、溶液を還流させながら測定し、温度による蛍光強度変化を抑えるため、液温を25度に保った。

B-2-3. ラット耳での蛍光測定能確認

経皮的な蛍光強度変化を測定できるか確認するため、麻酔をかけたラットの耳に反射型蛍光測定器を装着し、糖負荷試験を実施した。蛍光ゲルのラット耳への埋め込みは、過去の検討と同様、留置針を利用して耳先端へアクセスし、ゲルを留置した (Fig. 5)。反射型蛍光測定器が蛍光測定可能なことを確認するため、蛍光実体顕微鏡との同時測定を試みた。本検討では血糖変動以外の外乱影響で反射型蛍光測定器の値が変化することも考えられるため、他の方法による検証が必要だと考えたからである。反射型蛍光測定器を装着したラットを蛍光実体顕微鏡の下にセットし、反射型蛍光測定器で励起した蛍光を反射型蛍光測定器で測定すると同時に、蛍光実体顕微鏡でも測定できるように、実験系を構築した (Fig. 6)。ラットの耳が薄いため、反射型蛍光測定器の励起光で励起された蛍光が、反対側の実体顕微鏡にて測定可能である (Fig. 7)。蛍光測定は変動を詳細に解析するため1分ごとに行った。さらに、血糖変動と蛍光変動の関係性を調べるため、5分ごとに尻尾から採血し、血糖値を市販の血糖測定器にて測定した。測定では血糖値を上昇させるため腹腔から50%のグルコース溶液を投与し、血糖値を下げるために同様の投与経路にて0.25%インスリン溶液を投与して血糖変動を作り出した。



Fig. 5 耳へ埋め込まれた蛍光ゲル



Fig. 6 in vivo蛍光測定実験セットアップ

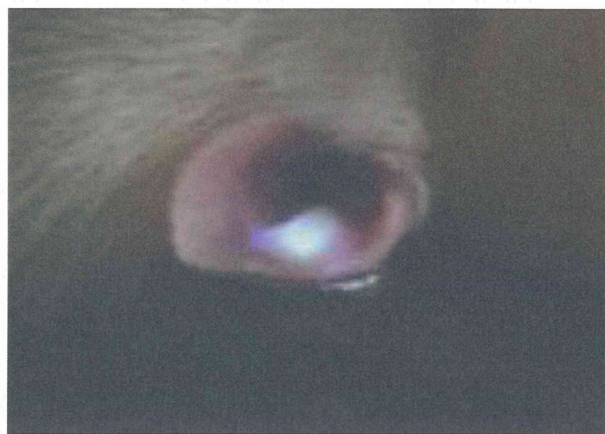


Fig. 7 反射型蛍光測定器 (ラット耳下側) から励起光を当て、反対側から観察した様子

C. 研究結果

C-1. センサ

C-1-1. 細胞毒性評価結果

細胞毒性試験の結果、蛍光ゲルの抽出液処理群の相対コロニー形成率は、6.25、12.5、25.0、50.0、75.0及び100%において、それぞれ107、97、108、102、109及び89%であり、非処理群 (100%) 及び陰性耐性材料抽出液処理群 (96%) と同等であり、コロニー形成に対する阻害作用は認められなかった。蛍光色素の相対コロニー形成率についても同様の評価を行い、最高容量群において110%であり、非処理群 (100%) 及び陰性対照群 (102%) と同等であった。

以上の結果から、本蛍光ゲルセンサに使用する蛍光物質及び蛍光ゲルはほ乳類培養細胞 (V79) に対して毒性は無いと結論される。

C-1-2. 蛍光劣化のin vitro評価

白金を混合した蛍光ゲルについての劣化評価では、過酸化水素浸漬後に60%程度蛍光強度が低下した。白金を混合しないゲルでの蛍光強度はほぼ消失してしまうことから、白金による過酸化水素劣化の効果を確認できた。しかし、半分以上蛍光強度が落ちており、これ以上の効果を得るためには白金コロイドの濃度を上げる必要がある。ただし、Fig. 2で示すように白金を混合した蛍光ゲルはそれ自体が黒くなるため、白金コロイドの濃度を上げると元々の蛍光消失も大きくなる。そのため、白金を利用した劣化対策によるこれ以上の効果を得ることは難しく、蛍光強度の低下に対する大きな効果は期待できないと判断した。

カタラーゼを混合した蛍光ゲルの劣化評価では、同様の処理後に20%程度の蛍光強度低下に抑えることができた。既述したように、本評価の環境は生体内よりも厳しい条件で実施しているため、20%程度の劣化であれば生体内へ埋め込んだ

後も劣化による大きな蛍光強度低下につながる恐れはないと考えられる。今後、カタラーゼを混合した蛍光ゲルをラットの生体内に埋め込み、その効果検証を継続する。

C-2. 反射型蛍光検出装置

C-2-1. グルコース溶液での機能評価

蛍光検出装置の基本性能を確認するため、ガラス板に接着した蛍光ゲルをグルコース溶液に浸漬させ、0mg/dlと1000mg/dlの濃度変化を蛍光強度変化として反映できることを確かめた。濃度を変化させ1分ごとに測定した結果をFig. 8に示す。1000mg/dlへ溶液を交換すると蛍光強度が上昇し始め、約60分後に一定となった。蛍光強度変化に時間がかかっているのは、0mg/dlから1000mg/dlへ徐々に溶液が入れ換わっていくことと、蛍光ゲルの片面がガラスと接着しているため、溶液が浸透するまでに時間がかかっている可能性がある。

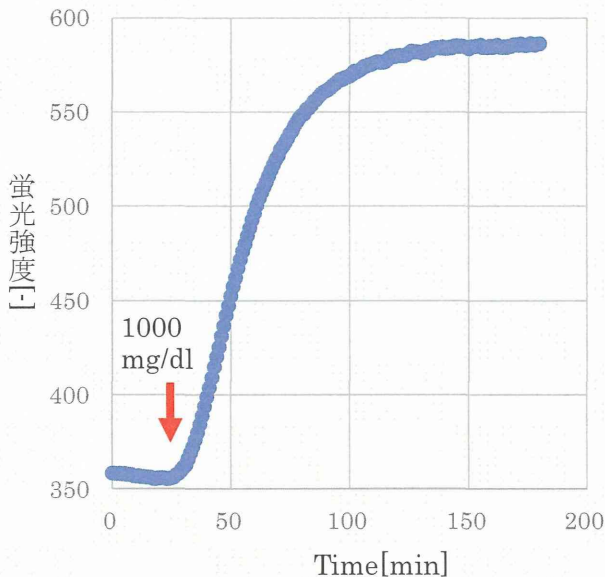


Fig. 8 グルコース溶液測定結果

C-2-2. In vivo 蛍光測定確認結果

蛍光ゲルが埋め込まれたラットに対して糖負荷試験を行い、蛍光実体顕微鏡と反射型蛍光測定器にて同時測定した結果をFig. 9に示す。黄色のプロットは蛍光実体顕微鏡で測定した結果を、青色のプロットは反射型蛍光測定器で測定した結果を示す。なお、両方のベースライン値が違うため、グルコース溶液投与前の蛍光強度に対してベースラインを合わせた。Fig. 8から明らかなように、蛍光強度が上昇するタイミングやベースライン値に対する変動幅まで、両方の蛍光強度変化はほぼ一致しており、その相関係数は0.996であった。以上より、我々の構築した反射型蛍光測定器

により、蛍光強度変化を測定できていることが示された。

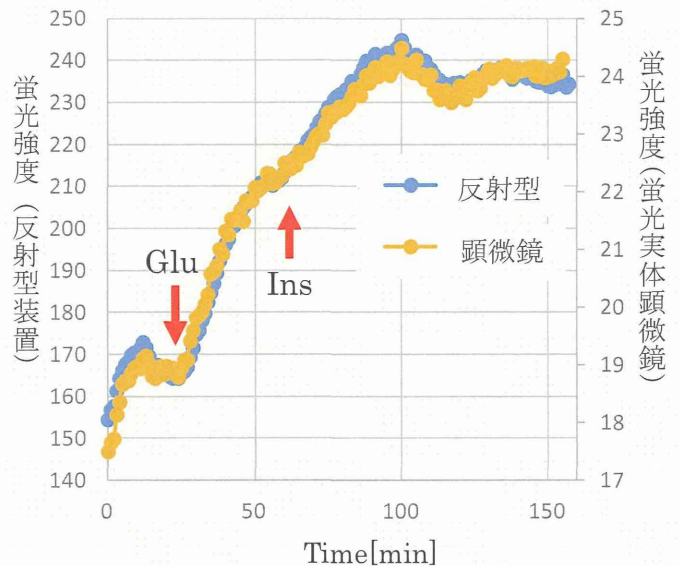


Fig. 9 蛍光実体顕微鏡と反射型蛍光測定器の測定値比較

血糖変動と反射型蛍光測定器で測定した蛍光強度を重ねた結果をFig. 9に示す。グルコース投与後の血糖上昇に対しては、蛍光強度も同様の変動を示した。しかし、インスリン投与後に血糖値は降下したが、蛍光強度の変動は見られなかった。既述したように実体顕微鏡と反射型蛍光測定器の変動はほぼ一致していたため、本結果は装置の性能とは別に、埋め込んだ蛍光ゲルが正常に機能していないため起こったことが考えられる。特に、装置を耳に装着することは耳組織にとっても相当な負担となることが予想され、代謝異常などにつながった可能性が考えられる。

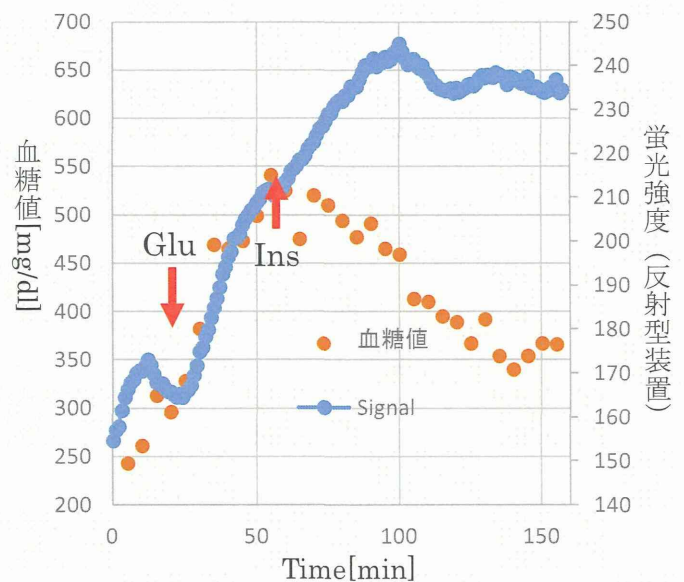


Fig. 10 血糖変動と蛍光変動の比較

(倫理面の配慮)

本研究での動物実験は東京大学における動物実験実施規則に則り、動物実験専門委員会の承認の下に行っている。

D. 考察

D-1. 劣化対策

本研究では劣化対策としてカタラーゼを混合させた蛍光ゲルを作製し、過酸化水素溶液浸漬後も80%程度の蛍光強度が保たれていることを確認した。生体内（特に炎症部位）での過酸化水素濃度を正確に測定するのは困難であるが、一般的には数十 μM と言われている。今回用いた過酸化水素溶液は200 μM であることから、かなり厳しい条件で実験を実施した。したがって、80%の蛍光残存率を達成できたことは、実際生体内へ埋め込んだとしても大きな効果が期待できる。しかし、カタラーゼは酵素であるため常温での安定性を保つのが難しいのも事実である。本研究における検討では作成後1週間以内に実験を行ったが、実用化を考えた場合、1年保存後に測定するようなことも想定する必要がある。よって、今後カタラーゼの効果検証を進めると同時に、保存安定性についても評価を継続する。また、カタラーゼだけでなく、本検討で用いた低濃度の白金コロイドや他の抗酸化物質との組み合わせなど、より効果的な劣化対策についても検討を進める必要がある。

D-2. 反射型蛍光測定器の改良

本研究では反射型蛍光測定器のプロトタイプを作製し、ラットの耳を用いた蛍光実体顕微鏡との同時測定により蛍光測定が可能であることを示した。今後は、本年度作製した機体をベースにして、省電力化と小型化を進める。特に現在使用している光ファイバとLEDは接続効率が悪く、光ファイバに入れることで励起光強度が半分以下に落ちてしまう。そのためLEDを強く光らせる必要があり消費電力も大きい。この課題を解決するために本検討では数本の光ファイバを束ねて励起光強度を上げたが、光ファイバを多く使用すると測定部が大きくなってしまい、小型化が難しい。そこで、今後は現在使用している光ファイバとLED、PDの接続部にレンズを導入により、光を効率的に取り入れるようにすると共に、光ファイバの本数も測定性能を保てる程度に減らしていく必要がある。また、装置全体としても、無線通信や装置の全体としての消費電力低減を検討する。

D-3. 血糖値変動と蛍光変動の乖離について

Fig. 10に示したように、*in vivo*での糖負荷試験においては蛍光変動が血糖変動に追従しなかった。これは、Fig. 10に示した実験以外にも何度か見られている。しかし、過去の結果では血糖変

動に蛍光変動が追従していた。今回の原因として考えられるのは①埋め込み部位の代謝異常、②蛍光ゲルの変性の2つである。

埋め込み部位の代謝異常に関しては、今回の実験を蛍光ゲル埋め込み1日後に実施したため、埋め込みによる損傷の影響が残っており、代謝異常を引き起こした可能性が考えられる。また、過去の実験では耳に装置を装着するような測定方法ではなかったが、本実験では反射型蛍光測定器を粘着テープで固定しているため、測定部周辺が圧迫されて内部の組織に影響を与えてしまった可能性がある。このように炎症や貼り付けによる圧力などの要因が重なってしまい、代謝異常が起きてしまったと考えられる。埋め込みによる影響を抑えるため、今後は埋め込み後1週間ほどして炎症反応が落ち着いてから実験をすることも検討する。さらにこのような結果が継続する場合、今回の結果と比較するため埋め込み後の蛍光ゲルを連続して測定し、いつからこのような代謝異常が起きてしまうのか、詳細に調べる必要があるだろう。なお、装置装着方法に関しても、ラットへの負担を軽減できるよう装着治具の軽量化、固定方法や接着方法を改善する。

もう1つの原因として考えられるのが蛍光ゲル自体の変性である。埋め込みによる損傷が大きく、埋め込み直後から蛍光ゲルは様々な炎症関連物質に晒される。これにより、グルコースをキャッチできるがリリースできなくなってしまった可能性がある。これについては、今後、埋め込み後のゲルについての劣化対策を進める中で、埋め込み後の経時的な劣化を評価する予定であり、その中で詳細に検討していく。

E. 結論

本年度は、連続グルコース測定モジュールに使用する蛍光ゲルセンサと蛍光測定装置について開発を進めた。蛍光ゲルについては安全性評価と基本特性の向上について検討を進め、細胞毒性試験による安全性の確認と抗酸化物質を用いた劣化への耐性を示すことができた。次年度は蛍光ゲルセンサの劣化対策について生体内評価を進める。測定装置については、これまでの透過型測定器から反射型蛍光測定器へとシフトし、蛍光実体顕微鏡との同時測定で蛍光強度変化を測定可能であることを示した。次年度は装置の省電力化及び小型化を進めると共に、測定精度についても評価を進める。

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋正幸、竹内昌治、体内埋め込み型グルコース

センサー, スマート・ヒューマンセンシング, シ
ーエムシー出版, pp. 75-78, 2014

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録E
該当なし
3. その他
該当なし

体内埋め込み型ポンプの検討

研究代表者 竹内 昌治 東京大学生産技術研究所 教授

研究要旨

糖尿病の治療法として、インスリンの長時間一定量注入をポンプにより実現し、24時間連続して安定した血統制御を得ることが試みられている。しかし、従来の薬液注入ポンプはインスリンを含有しているタンク以外に駆動源や流量制御部が必要であるため、携帯可能なポンプが保持できるインスリン液量には限界があり、連続注入可能な時間には限りがあった。

本研究では、長時間インスリンを一定量注入することが可能な、小型インスリンポンプの作製を目指す。本目的を達成するため、バルーンの収縮力を駆動源とし、レギュレータとしてマイクロ流路を使用するポンプを提案する。インスリン液を保持するタンクをバルーンにすることで、駆動源とタンクを一体化でき、余分な駆動源を必要とせず送液が可能となる。さらに、シリコンゴムのマイクロ流路中にバルブ構築することで、マイクロ流路表面とバルブの隙間に断面辺長が短い流路が構築され、小型のレギュレータとして流量制御が可能となる。将来的に、本研究成果は体内埋め込み型インスリンポンプの開発に寄与すると考えている。

A. 研究目的

インスリンの長時間一定量注入を実現するポンプとして、これまでに重力、電力、浸透圧を駆動力として利用する点滴、電動ポンプ、浸透膜ポンプが提案されている。しかし、いずれのポンプもインスリンのタンク以外に駆動源や流量制御部が必要であるため、デバイスの全体積は保持可能な液量の4倍以上となっている。その結果、携帯可能なポンプが保持できるインスリン液量には限界があり、連続注入可能な時間には限りがあった。

そこで本研究では、長時間インスリンを一定量注入することが可能な小型インスリンポンプの作製を目指す。本目的を達成するため、バルーンの収縮力を駆動源とし、レギュレータとしてマイクロ流路を使用するポンプを提案する(Fig. 1)。インスリン液を保持するタンクをバルーンにすることにより、駆動源とタンクを一体化でき、余分な駆動源を必要とせず送液が可能となる。さらに、マイクロ流路をレギュレータとして使用することで、複雑な構造を用いずにシンプルな構成で流量制御が可能となる。生体に本ポンプを応用するに当たり、生体適合性の高いシリコンゴムのマイクロ流路を用いることが望まれるが、シリコンゴムで精細なマイクロ流路を構築するのは困難である。そこで、本研究ではマイクロ流路中にバルブを構築して、バルブとマイクロ流路の隙間に仮想的に精細なマイクロ流路を作製することで、微細領域における流量制御の実現を目指す。これにより、体内に埋

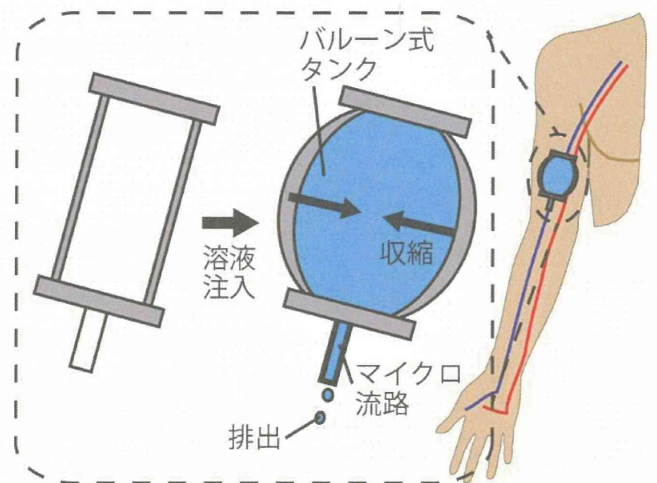


Fig.1 提案のインスリンポンプ概念図

め込んだ状態でインスリンの長時間一定量送液可能になると考えられる。

B. 研究方法

B-1. マイクロ流路による流量制御の理論検討

バルーンが収縮する際に内部溶液に伝える圧力は、内部溶液の残量に応じて変化する。この変化する圧力に対して、一定流量を排出するマイクロ流路が必要である。そこで、マイクロ流路への入力圧力と排出流量の関係を理論検討する。マイクロ流路中に溶液流入により発生する圧力損失と排出流量の関係は、流路断面が正方形であるとするファニングの式より、

$$\Delta P = P_{in} - P_{out} = \frac{32\mu L Q_{out}}{D^4}$$

と表すことができる。ただし、 ΔP は圧力損失、 P_{in} は入力圧力、 P_{out} は排出圧力、 Q_{out} は排出流量、 μ は粘度、 L は流路長、 D は断面辺長であるとする。また、排出圧力と排出流量の関係は、ベルヌーイの式より、

$$P_{out} = \frac{\rho}{2} \left(\frac{Q_{out}}{CD} \right)^2$$

と表せる。ただし、 ρ は流体密度、 C は流出係数であるとする。以上の両式を組み合わせることにより、マイクロ流路への入力圧力と排出流量の関係は、

$$Q_{out} = \frac{C^2}{\rho} \left(-32\mu L + \sqrt{(32\mu L)^2 + 2\rho D^4 \left(\frac{1}{C} \right)^2 P_{in}} \right)$$

と表せる。本式より、同じ種類の溶液を使用する場合、流路長 L が長くなる、または断面辺長 D が短くなると排出流量 Q_{out} が小さくなり入力圧力に対する変化量も少なくなることが分かる。に図示した本関係を表すグラフより、断面辺長の変化量の方が流路長の変化量よりも支配的に働くことから、断面辺長が短いマイクロ流路を作製することが、レギュレータとして応用するには必要であると考えられる。

B-2. バルーン式タンクの構築

バルーン式タンクは支柱にシリコンゴムチューブを固定することで作製した。まず、光造形装置で支柱と蓋を作製し、支柱に厚さ14 mmのシリコンゴムチューブを被せた(Fig.2(a))。このチューブ両端の上から糸を巻きつけること

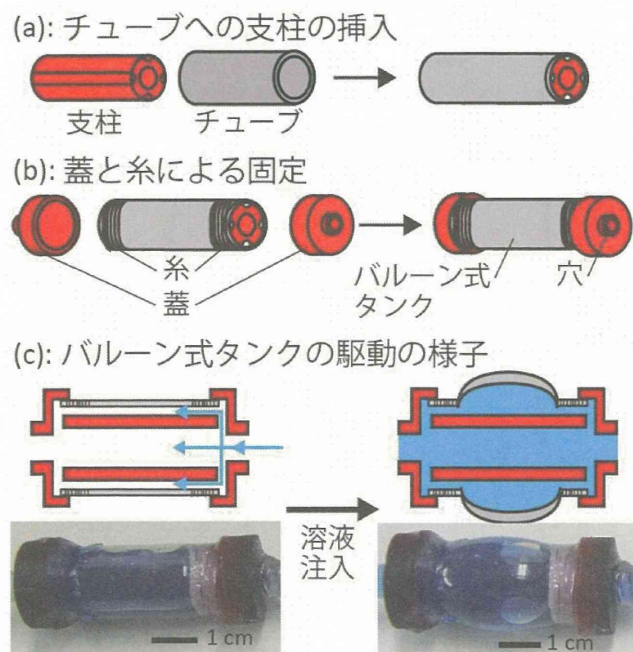


Fig.2 バルーン式タンクの(a, b)作製方法と(c)駆動様式

により、支柱にチューブを固定した。最後に両端に蓋を被せることにより、バルーン式タンクを作製した(Fig.2(b))。支柱の両端には液体が流出入可能な穴が開いており、一端の穴から液体を流し込むと、支柱表面に作られた流路を通り支柱とチューブの間に液体を溜めることができる。液体の流入を進めるとチューブが膨張していき、更なる量の液体をタンク内に流し込み保持することが可能となる(Fig.2(c))。本バルーン式タンクでは、膨張させたチューブが元の形状に戻ろうとする力によって液体を押し出すことができる。

B-3. バルブ付きマイクロ流路の構築

本研究では、ソフトリソグラフィを用いてレギュレータとして使用するシリコンゴムのマイクロ流路を作製した。まず、シリコンウェハ上にスピコートにより均一厚のSU-8層を作製した(Fig.3(a))。このSU-8層にガラスマスクを通して紫外光を当て、流路形状をSU-8層にパターンニングした(Fig.3(b))。その後、poly(dimethyl siloxane) (PDMS) 溶液中にSU-8層付きシリコンウェハを包埋し、熱によりPDMSを硬化させた(Fig.3(c))。PDMS硬化後、SU-8層付きシリコンウェハから流路形状が転写されたPDMSを外した。本PDMSをガラス上で半硬化させたPDMS層上に配置し、熱をかけることによりPDMS同士を接合させ(Fig.3(d))、全ての表面がPDMSから成るマイクロ流路を作製した(Fig.3(e))。

次に、仮想的に精細なマイクロ流路を設けるため、マイクロ流路中にバルブを作製した。まず、マイクロ流路中に光硬化性樹脂である polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) を注入し、デジタルミラーデバイスを用いて設定された露光範囲のみに紫外光を当てて樹脂を硬化させた(Fig.4(a))。このPEGDAは空気に接触していると硬化することができない。本性質により、空気

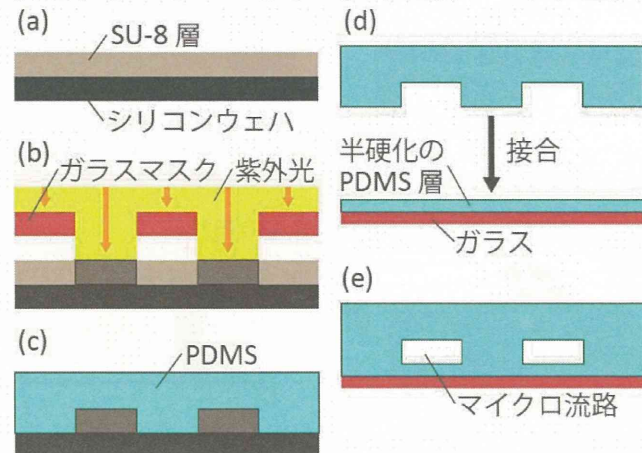


Fig.3 マイクロ流路の作製方法

を透過するPDMSの表面近傍ではPEGDAの硬化が起きず、硬化した樹脂とマイクロ流路表面の間に隙間が発生した(Fig.4(b))。この隙間を仮想的に精細なマイクロ流路として用いることで、流れる溶液の流量制御を試みる。

B-4.特性評価方法

バルーン式タンクの駆動特性評価として、1 mLの水を注入してバルーンを膨張させた後、バルーン収縮時の排出圧力と排出流量の経時的な変化を評価した。排出圧力はバルーン出口に圧力計(GP-M 001, KEYENCE)を設置して計測し、排出流量はバルーン出口にメスシリンダーを設けることで計測した。

マイクロ流路またはバルブ含有マイクロ流路のレギュレータ特性評価のため、特定の入力圧で水を注入した際の排出圧力と排出流量を測定した。排出圧力と排出流量はバルーン式タンクの駆動特性評価と同じ方法にて計測し、入力圧は圧力駆動ポンプ(MFC-100, FLUIGENT)により制御した。

C. 研究結果

C-1.バルーン式タンクの駆動特性

1 mLを注入した時の、バルーン式タンクの経時的な排出圧力と排出流量の変化をFig.5に示す。本結果より、バルーン式タンクのみでは5秒以内に全保持溶液を出し尽くしてしまい、また経時的に徐々に排出流量と排出圧力が低下していく

ことが分かった。バルーン式タンクでは溶液の保持と排出の両機能が発揮可能であるが、長時間一定流量を排出し続けることは困難である。

C-2.マイクロ流路の流量制御特性

マイクロ流路の寸法と流量制御特性の関係を明らかにするため、断面辺長25、50、75 μm 、長さ15、30、45、60 cmの計12種類のマイクロ流路を作製し、ゲージ圧0.3~2.5 $\times 10^5$ Paで水を注入した際の排出流量を計測した。理論式から予想した通り、断面辺長が短くなるまたは流路長が長くなることで排出流量を一定にでき、断面辺長の変化の方が流路長の変化よりも流量制御に対して支配的に働くことがわかった(Fig.6)。本結果より、マイクロ流路の断面辺長を短くすることで、より効果的に一定排出流量が実現可能であると考えられる。

C-3.バルブ設置による流量制御特性

マイクロ流路中にバルブを設けることによる流量制御特性の差をFig.7に示す。バルブを設けることで、マイクロ流路に0.5~1.5 $\times 10^5$ Paのゲージ圧をかけた際に、圧力に関わらず数十 $\mu\text{L}/\text{min}$ の一定流量での排出を実現した。本結果とB-1記載の理論式を比較することで、マイクロ流路壁面とバルブの隙間に断面辺長5.5 μm の仮想的な微小流路が構築されたことが示唆された。以上の結果より、バルブをマイクロ流路中に設けることで精細なマイクロ流路が構築され、流量制御特性が改善することが示された。

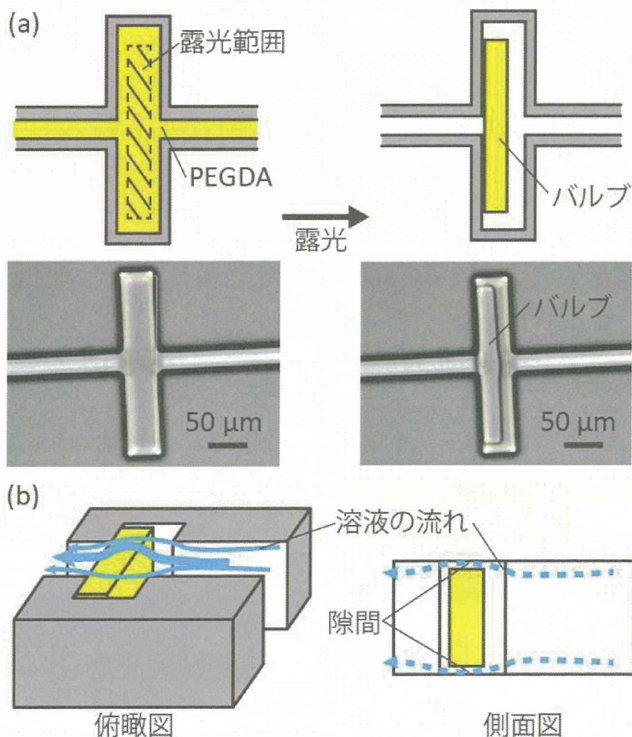


Fig.4 バルブの(a)作製方法と(b)バルブがある状態での溶液の流れ

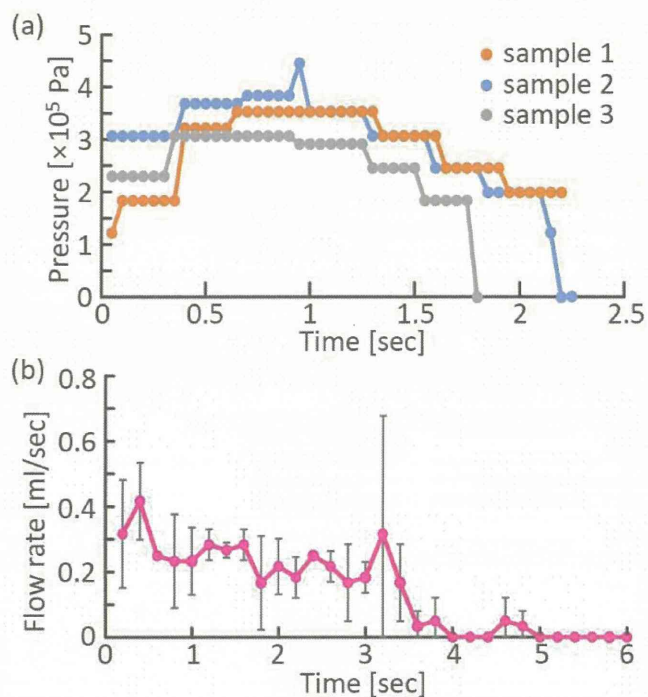


Fig.5. バルーン式タンクの送液特性 (a)排出圧力の経時変化、(b)排出流量の経時変化

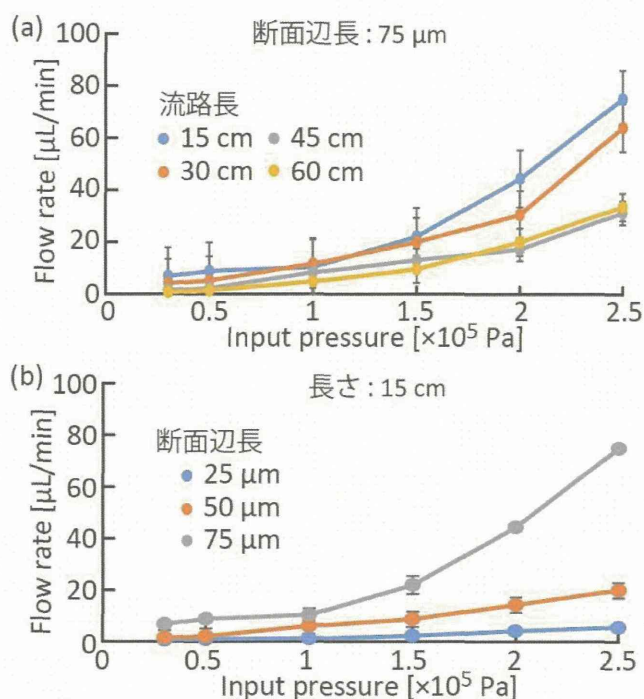


Fig. 6 マイクロ流路のの排出流量制御特性
 (a)断面辺長一定時の、流路長と排出流量の関係
 (b)流路長一定時の、断面辺長と排出流量の関係

D. 考察

バルーン式タンクを構築することで、膨張したバルーンが収縮する力を用いて、内部で保持した溶液を排出することが可能となった。本研究で用いたバルーンや支柱の寸法は溶液の保持と排出という基本的な機能に影響を与えないと考えられるため、バルーンの厚みや支柱を細くすることでバルーン式タンクの小型化を目指すことが可能となる。

マイクロ流路を流量制御特性として、断面辺長を短くすることが排出流量安定化に支配的に働くことが確認された。バルブと精細なマイクロ流路の隙間はPDMS表面近傍における空気存在量によって決定されると考えられる。脱気によりPDMSの保持する空気量を少なくすることで、更に細い隙間をマイクロ流路表面とバルブの間に構築可能であると期待できる。一方、マイクロ流路の流路長を長くすることも、排出流量の安定化に寄与する。バルブ寸法を変更することで、マイクロ流路表面とバルブの間に生まれる隙間の長さを変化させることができる。そのため、バルブ寸法を最適化してバルブ厚みを増すことによっても、長さの長い隙間を構築可能であると考えられる。

E. 結論

本研究では、バルーン式タンクとレギュレータとして使用可能なマイクロ流路を組み合わせ

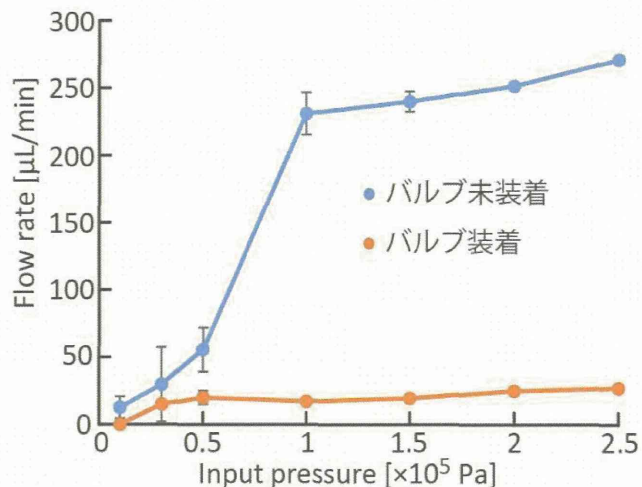


Fig. 7 バルブ有無によるマイクロ流路のの排出流量制御特性の変化

ることで、小型化可能なインスリンポンプの確立を目指した。バルーン式タンクにより、溶液の保持と排出を同一デバイスに担わすことができた。また、断面辺長の短いマイクロ流路を使用することで、長時間一定流量が排出するように流量制御が可能となった。以上の特性は本構成によりインスリンポンプが作製可能であることを示しており、バルーン式タンクの寸法とマイクロ流路の寸法の最適化により、更に小型の埋め込み可能なインスリンポンプが実現できると期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

向山祐未, 森本雄矢, 興津輝, 竹内昌治, “体内薬物注入に向けたバルーン式ポンプ”, 第28回化学とマイクロ・ナノシステム, pp. 3P28, 姫路, 12月2013年

竹内昌治: マイクロ・ナノデバイス技術の創薬・医療応用, NBCI (ナノテクノロジー推進協議会) ライフ分科会講演会 2月28日

竹内昌治: BioMEMSが拓く医療・環境センサ, TrillionSensors Summit JAPAN 2014-2-21

竹内昌治: マイクロナノデバイス技術が拓く最先端バイオセンシング材料, 第2回先端エレクトロニクス材料のためのコロイド・界面化学 12月13日

竹内昌治: 脂質、ハイドロゲル、細胞を使ったモノづくり, 日本MRS 12月9日 基調講演

竹内昌治: マイクロ流体デバイス技術を利用した創薬・医療応用, 生化学会, 2013-9-11

Shoji Takeuchi: Microfluidically-engineered Hydrogels for Biomedical applications. MESA +Colloquium, 2013-5-14

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

4. 特許取得
該当なし
5. 実用新案登録E
該当なし
6. その他
該当なし

グルコースセンサ開発のためのin vivo検証系の研究開発

分担研究者 興津 輝 東京大学生産技術研究所 特任教授

研究要旨

本研究では、携帯型人工膵臓の構成要素である連続グルコース測定システムにおいて重要となるグルコースセンサの開発及びインスリン投与アルゴリズムの検討に必要なin vivoでの検証系の確立を目指している。今年度は、フリームービングの状態、薬剤負荷と採血のための2本のカテーテルを挿入したラットでの、1) グルコース負荷試験におけるグルコース負荷速度の最適化と2) 高血糖クランプのためのグルコース負荷方法の開発を行った。1) グルコース負荷試験においては、負荷グルコース量を2g/kg体重を10-15分間で注入する（体重300gとしてグルコースの注入速度40-60mg/min）のが、本実験系で最適であると考えられた。血糖値の上昇から最高値が500mg/dlを超えるのを規定の採血間隔でとらえることができた。5分間以内での注入の場合は急峻に上昇する血糖値の全容をとらえることができず、30分間以上かけた場合は、最高血糖値が350mg/dlを超えなかった。2) 30分以上350mg/dlの血糖値を維持する高血糖クランプのための負荷グルコース量は先に行ったグルコース負荷試験を参考として実現可能であることが分かった。

A. 研究目的

本プロジェクトの目的である携帯型人工膵臓の構成要素となる連続グルコース測定システムの開発及びインスリン投与アルゴリズム検証のためには、グルコースセンサのin vivoでの検証系の確立が必須となる。この検証系では、実験動物が麻酔薬などの血糖値に影響を与える薬剤に曝露されておらず、グルコースやインスリンなどの投与によって血糖値を自在に変化させることができ、かつ既に確立された標準的な方法で血糖値を経時的に測定することができる必要がある。そのため、マウスではなく複数回の採血ができるラットに対し、採血用と試薬負荷用のカテーテルを血管内に留置しフリームービングの状態で採血を行える実験系が最適となる。この実験系において、グルコースセンサの検証に適したグルコース負荷試験、血糖値クランプの手技について既存のものではなく、その方法を確立する。

B. 研究方法

SDラット（体重250-350g、10-11週齢）の頸静脈および大腿静脈にカテーテル（内径0.36mm）を挿入し、実験ケージ（摂食飲水行動量測定装置 RDFシリーズ シンファクトリー）に入れてフリームービングの状態、採血実験を行った（Fig.1）。自動採血装置（DR-II エイコム社）により採血した血液は直ちに遠心機で血漿成分と血球成分に分け、グルコースCIIテストワコーあるいは自動糖分析装置（GA05 A&T）を用いて血糖値を算出した。開発を目指すグルコースセンサの検証に適したin vivoの実験系を作製するためには、グルコースあるいはその他の薬剤（例：

インスリン）を用いて、ラットの血糖値を変動できることを検証する必要があったため、以下の検討を行った。

B-1. グルコース負荷試験におけるグルコース負荷速度の検討

グルコース負荷試験において、負荷グルコース量を2g/kg体重としてグルコース負荷の時間を5min、10min、15min、30minと設定し、経時的に採血して血糖値の変動を測定した。これにより、本実験系において、グルコース負荷速度の検討を行った。自動採血装置（DR-II エイコム社）において、グルコースの負荷速度を検討した。

B-2. 高血糖クランピングの検討

高血糖クランプのためのグルコース負荷方法の検証を行った。グルコース負荷試験の結果を参考として予想されるグルコース負荷の注入速度によって、フリームービングの正常ラットの血糖値を350mg/dlに30分以上維持し、その後100mg/dLにクランピングできることを検証した。

（倫理面への配慮）

本研究での動物実験は東京大学における動物実験実施規則に則り、動物実験専門委員会の承認の下に行っている。

C. 研究結果

C-1. グルコース負荷試験におけるグルコース負荷速度の最適化

正常ラットにおける負荷速度と血糖値の関係性に関する基礎的なデータを得るため、単回でグルコースを負荷した場合の血糖値変動をとら

える実験を行った。Fig 1 A,Bのようにセッティングしたラットの投与側カテーテルからグルコースを持続投与し、採血側カテーテルから採血を行った。投与開始時間を0minとして投与後の時間と血糖値をプロットしたグラフがFig 2である。投与時間が短いほど血糖値のピークが高い形状が認められたが、投与時間が5min以下であった場合は、採血間隔が投与時間に対して大きく、血糖値のピークを捉えることが難しかった。一方、30min以上の投与時間の場合、血糖値は350mg/dLを超えず、投与終了後に100-150mg/dLの血糖値に戻るまで、15min程度要した。グルコース投与時間が10min-15minである場合、血糖値のピーク値は500mg/dLを超えた。グルコースの投与が終了した後は血糖値は低下し、100-150mg/dLに戻るまで15min以上かかることが確認された。

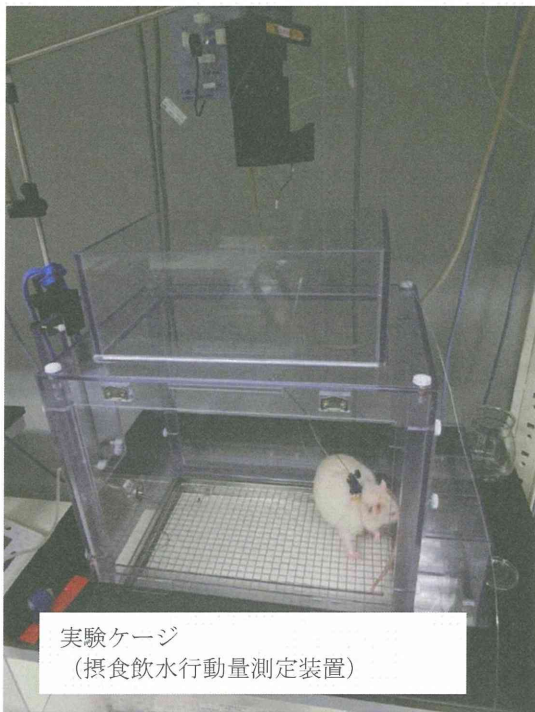


Fig1A 自動飲水・摂食・運動量測定装置内で飼育されるカテーテル留置ラット



Fig1B 自由運動が可能な状態のカテーテル留置ラット

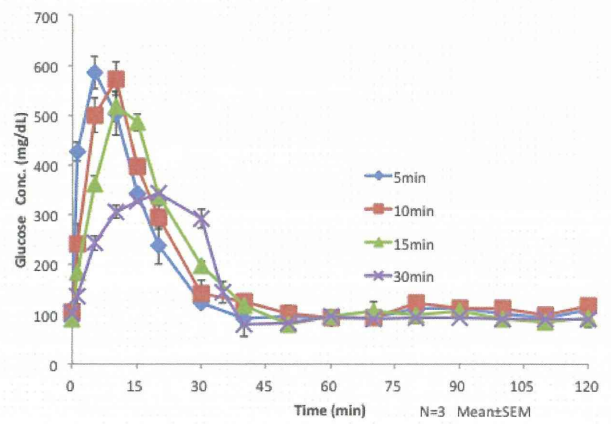


Fig2 グルコースの負荷時間と血糖値

Fig2 グルコース負荷時間による血糖変動

C-2. 高血糖クランプのためのグルコース負荷方法の開発

グルコースの持続投与開始時間を0minとして、10min毎に行った血糖値の測定結果とグルコースの注入速度をグラフ化し、Fig3に示した。C-1の結果を参考に、高血糖 (350mg/dL) に30min以上クランプする場合の注入速度を検討した。その結果、約45-42mg/min/kg体重のグルコース注入速度において、クランプが可能であった。また、グルコース注入を停止することで、20min以内に速やかに100-150mg/dLの血糖値まで戻ることがわかった。

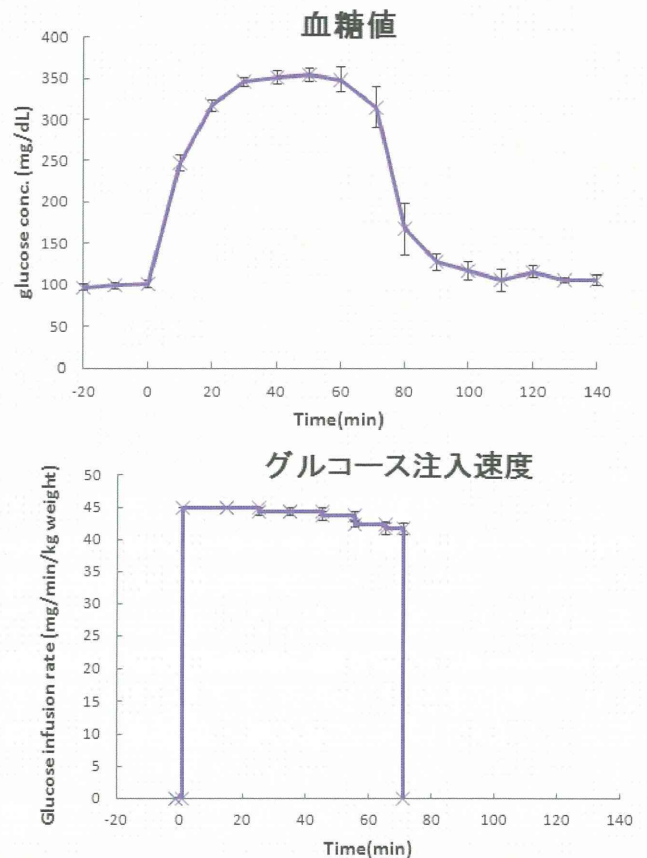


Fig3 高血糖クランプ時のグルコース注入速度と血糖値

D. 考察

D-1. グルコース負荷試験におけるグルコース負荷速度の最適化

グルコースセンサーの評価に必要な血糖値の変化の条件として、1)急峻な血糖値の変動を再現できる、2)ピーク血糖値と通常血糖との差が大きい、3)急峻な血糖値の変動過程を実測値として測定できる採血点がある、といった条件が必要となる。自動採血装置 (DR11) を用いた採血を実施し、血糖値など各測定項目において再現性の高い実験系を構築することを本実験系では必要としているが、当該装置を用いた採血間隔は最小で約5minであるため、5min以下のグルコース負荷時間の場合、血糖値のピークを正確にとらえることができない可能性が高くなると考えられた。一方、グルコースの負荷時間が10-15minの場合、条件1)-3)を満たしていた。このことから、ラットの耐糖能を調べる際に汎用されるグルコース投与量 (2g/kg) において、本実験系で血糖値の変動を測定する場合、グルコース負荷時間は10-15minが妥当であると考えられた。

D-2. 高血糖クランプのためのグルコース負荷方法の開発

in vivoで血糖値をクランピングする技術は、別途開発中のグルコースセンサーにより測定された組織間液の糖濃度と血糖値のタイムラグを補正するアルゴリズムを開発する過程で必要となる技術である。また、ラット個体の耐糖能を測定する実験系として活用することでインスリン投与のアルゴリズム開発に活用可能となる。

本検討では、高血糖値で30min以上維持し、通常血糖値まで戻る実験系を確立した。今後、昏倒を引き起こすなど臨床的に重要な低血糖値でのセンサー評価に必要な低血糖クランピングの条件を確立する必要があると考えている。

E. 結論

H25年度は、自動採血装置および実験ケージといった装置の組み合わせに適したグルコースの投与方法の検討を行い、フリームービング状態のSDラットに対し2剤以上の薬剤を血管経路で持続的に投与し、同時に採血できる実験系を構築することができた。来年度以降、この実験系を用いてグルコースセンサーの評価を行い、グルコースセンサーの血糖値測定アルゴリズムを検討する。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録E
該当なし
3. その他
該当なし