

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	日本	2014	pp.114-122

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

第5章 体内埋め込み型グルコースセンサ

高橋正幸*¹, 竹内昌治*²

1 背景

私たちの体は様々な物質に対するセンサが存在し体の状態を制御, 維持している。その1つとしてグルコースセンサがある。血中グルコースの濃度(血糖値)は70~140 mg/dlの間で変動している。何か食べれば血糖値は高くなり, その血糖値の高さを膵臓のベータ細胞で検知し, 血糖の高さに応じてインスリンを放出することで血糖値を下げる。現在世界中で患者数が増加している糖尿病は, このベータ細胞が壊されてインスリンを作ることができない, もしくは肥満などが原因でインスリンへの抵抗性が出てしまう病気である。糖尿病患者はベータ細胞を介した血糖コントロールができないため, 高血糖で体がつらい状態が続く可能性がある。さらに, 高血糖状態が続くと腎症や心血管疾患, 脳疾患などの合併症へとつながる恐れがあり, これら合併症を含めた治療費は国の医療財政を圧迫する一因ともなっている¹⁾。

糖尿病の重篤化やこれら合併症リスクを回避するために, 糖尿病患者にとって血糖値を上手にコントロールすることが重要となる。一般的に糖尿病患者は自己血糖測定器(SMBG: Self Monitoring of Blood Glucose)で血糖測定を行い, 血糖値に応じてインスリンなどの血糖降下薬を投与して, 血糖値を正常範囲内にコントロールしている。

現在最も一般的な血糖測定方法は, 指から採血し, 試験紙上の酵素と血中のグルコースを反応させ, 電気化学的もしくは呈色反応として検出する方法である。この測定方法は簡便で測定精度も高いが, 採血の必要があるため侵襲度が高い²⁾。また, 測定時の血糖値しか知ることができないため, 食事直後の高血糖や一日の血糖変動を知ることができない。そこで, これらの問題を解決するため, 近年, 連続グルコース測定システム(CGM: Continuous Glucose Monitoring)が日本でも導入され, 医療現場で使われ始めている。本システムは連続して血糖値を測定できるため, 食後高血糖や一日の血糖変動といった糖尿病治療に役立つ情報を提供することができる。しかし, 現在世界で使われている連続グルコース測定システムのほとんどはセンサの寿命が短く(6日), 測定精度も高くないという課題を抱えている³⁾。これらの課題は, 主に酵素の寿命が短いことに起因する。また, 体内に留置したセンサはシグナルを外へ伝えるために体外の装置と接続する部分を必要とするため(半埋込み型センサ), センサ挿入部における感染の恐れがあり, 長期の装着はできない。

*1 Masayuki Takahashi テルモ(株) 研究開発本部

*2 Shoji Takeuchi 東京大学 生産技術研究所 准教授

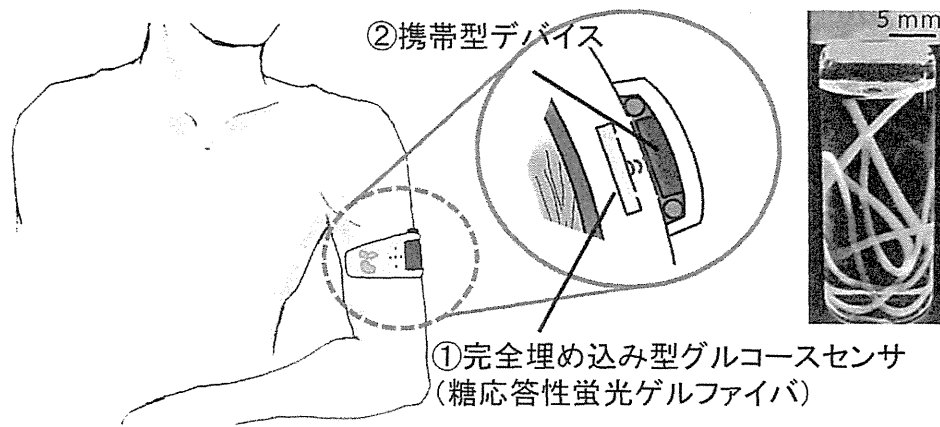


図1 完全埋め込み型グルコースセンサシステム

そこで我々はこれらの課題解決を目指し、蛍光色素を利用した長時間体内留置が可能な完全埋め込み型グルコースセンサを提案している^{4, 5)}。本項では、我々が提案する完全埋め込み型グルコースセンサについて、その概略と蛍光色素、体内埋め込みに適した形状として検討したビーズ形状とファイバ形状それぞれの利点と課題について述べる。

2 完全埋め込み型グルコースセンサ

我々が提案する完全埋め込み型グルコースセンサは、デバイス（電気、機械的）を埋め込むのではなく、グルコース応答性の蛍光ゲルだけをグルコースセンサとして埋め込み、蛍光強度を経皮的に検出する（図1）。蛍光物質を利用した理由は、体表面に近いところへ埋め込むことで、外からシグナルの検出が可能であると考えたからである。酵素型センサの場合、電氣的にシグナルを検出するため、測定装置や電池、記憶部など様々な電気部品を体内に埋め込まなければならない、埋め込める装置の大きさにも制約がある。近年、ペースメーカーに代表されるように埋め込みデバイスが珍しくなくなってきたものの、装置を体へ埋め込むことへの抵抗感や危険性は高い。我々の提案する完全埋め込み型センサは体表面近くに蛍光ゲルだけを埋め込んでおけばよいので、より小型化が可能で、侵襲度の低い埋め込み方法を提案できる。さらに、半埋め込み型のように外界と体内が接する挿入部がないため感染のリスクが低く、長期間の体内留置が可能となる。

3 糖応答性蛍光色素

糖応答性蛍光色素の化学式を図2に示す。本蛍光モノマーは、グルコースと特異的に結合するボロン酸基と蛍光を発するアントラセンから構成される。グルコースがボロン酸に結合していない状態では、窒素原子の不対電子とアントラセン間の光誘起電子移動により、アントラセンから

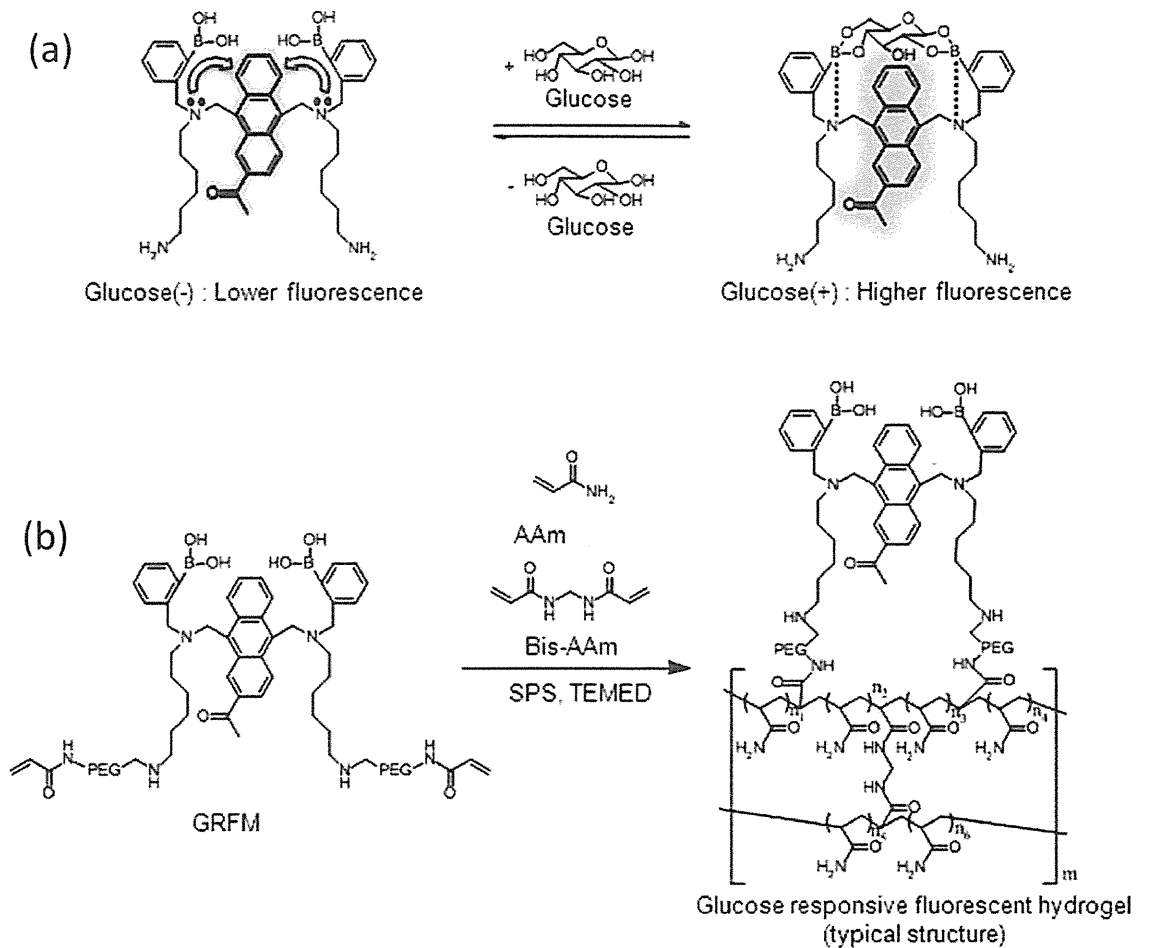


図2 糖応答性蛍光色素

グルコースが蛍光色素のボロン酸基と結合すると、強い蛍光を発する。

の蛍光が抑制される。グルコースがボロン酸基に結合すると、この効果が弱められ励起光 (405 nm) を照射すると蛍光 (488 nm) が発せられる⁶⁾。我々は本蛍光色素をアクリルアミドと化学結合させて外へ漏れ出ないようにし、体内埋め込み可能な蛍光ゲルを作製した。

アクリルアミドゲルは生体適合性が良いことでも知られており、埋め込みに適した材料である⁷⁾。なお、蛍光色素をアクリルアミド溶液と混合してゲル化させると蛍光物質の自由度が下がり蛍光強度が低下するため、蛍光色素のニトロ基末にポリエチレングリコール (PEG, Mw3,400) を導入して自由度を高め、蛍光強度の低下を防いだ。

4 糖応答性蛍光ゲルビーズ

4.1 糖応答性蛍光ゲルビーズの作製

体内へ埋め込む場合、大きなサイズのゲルでは埋め込みにも手間がかかり、異物反応による負担も大きい。そこで、できる限り小型で、侵襲の低い方法で体に埋め込むことが望ましい。これ

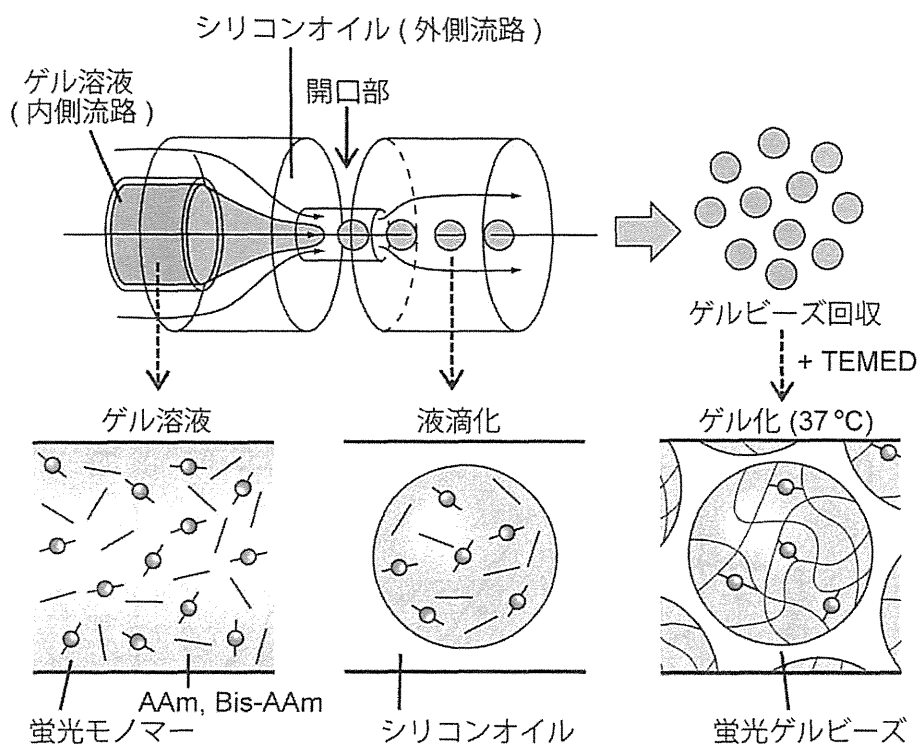


図3 蛍光マイクロゲルビーズの作製方法

光造形装置を使ってマイクロ流体デバイスを作製した。蛍光モノマーとアクリルアミドゲルを混ぜたゲル溶液をデバイスの内側から流し、外側からシリコンオイルを流した。開口部を内側の蛍光ゲル溶液が通過する際、シリコンオイルの流れによって、内側を流れる蛍光ゲル溶液が液滴状になる。内側と外側の流速を調整し、中心サイズ $130\ \mu\text{m}$ の液滴を作製した。

に適した形状として、我々は糖応答性蛍光ゲルをマイクロビーズ状に加工し、注射針を使って埋め込むことを検討した⁴⁾。

蛍光ゲルビーズの作製は、マイクロ流体デバイスを使用した (図3)。蛍光モノマーとアクリルアミドゲル溶液を混ぜた溶液をデバイスの内側から流し、外側からシリコンオイルを流した。こうすることで、開口部を内側の蛍光ゲル溶液が通過する際、シリコンオイルの流れによって内側を流れる蛍光ゲル溶液が液滴状になる。内側と外側の流速を調整することでビーズサイズをコントロールできる。今回は細胞よりも少し大きい中心サイズ $130\ \mu\text{m}$ の液滴を作製した⁴⁾。液滴状になった蛍光ゲル溶液をシリコンオイル中に30分静置してゲル化させ、ゲル化していない余分なアクリルアミド溶液は発癌物質となるため、水で洗浄した。

4.2 蛍光ゲルビーズの埋め込み及び血糖応答性評価

蛍光ゲルビーズを耳に埋め込んだマウスの写真を図4(a)に示す。蛍光ゲルビーズを生理食塩水と共にシリンジに充填した後、麻酔で眠らせたマウスの耳先端に注射針を使ってアクセスし、蛍光ゲルビーズを耳先端に留置した。マウスの耳を選んだ理由は、皮膚が薄いため外からの励起光が通り易く、また蛍光も観察し易いからである。

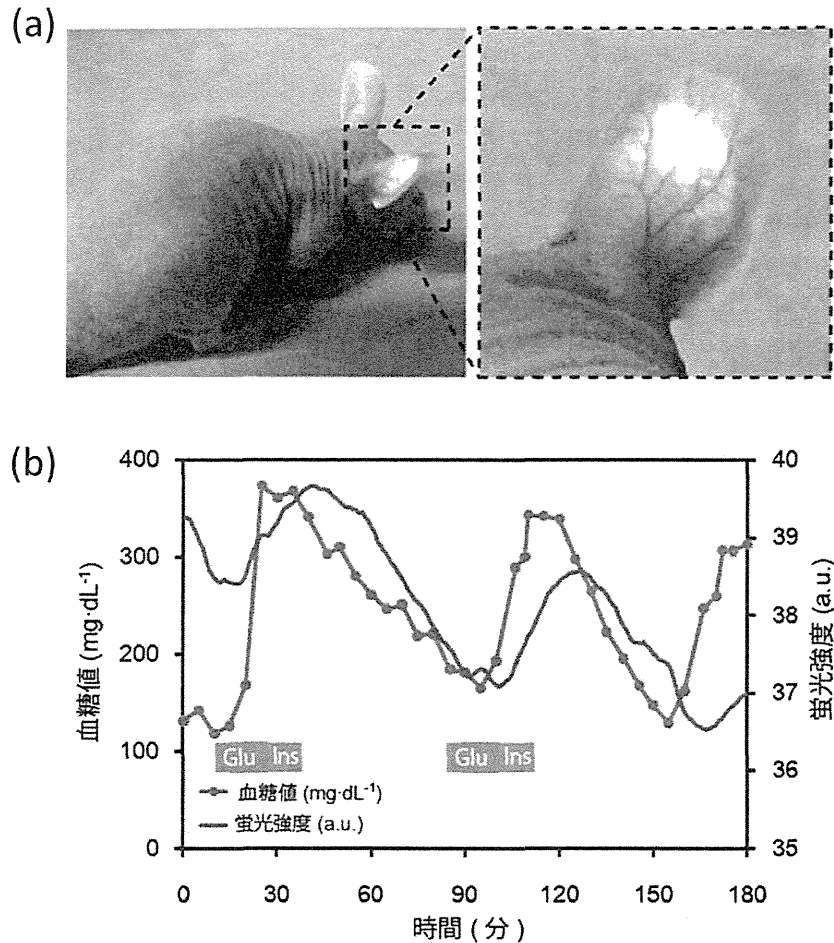


図4 蛍光ゲルビーズ埋め込みマウスと糖負荷試験

(a)蛍光ゲルビーズを耳へ埋め込まれたマウスの写真。経皮的な観察が可能。(b)糖負荷試験の結果。グルコースを静脈投与して血糖を上昇させ、同様の方法でインスリンを投与し血糖値を下げた。血糖の変動に応じて蛍光強度が変化することを確認できた。

埋め込んだ蛍光ゲルビーズの糖応答性を確認するため、糖負荷試験を実施した。糖負荷試験では、麻酔下のマウスに対し、静脈内にグルコース溶液を投与して血糖値を上昇させ、同投与経路からインスリンを投与して血糖値を下げた。血糖値との相関性を確認するため、5分毎に尻尾から採血し、市販の血糖測定器で血糖を測定した。蛍光観察は蛍光実体顕微鏡 (Carl Zeiss, SteREO Lumar) を用いて埋め込み部位の画像データを1分ごとに取得し、得られた画像を蛍光画像解析ソフトにて処理して蛍光強度を算出した。糖負荷試験における2度の血糖値変動に対し、蛍光強度も追従して変化する様子を観察できた (図4(b))。

得られた結果では、蛍光強度が血糖値の変動に対して約10分遅れて変動した。蛍光ゲルビーズは間質液中のグルコースと反応するためであり、一般に血液中のグルコースが血管から間質液へと移動するのに約10分の時間遅れがある。

4.3 蛍光ゲルビーズの課題

これまで示したように、蛍光ゲルビーズは簡便な埋め込みと機能性の実現が可能であった。しかし、埋め込みから数日経つと蛍光が徐々に消失してしまうことがわかった。ビーズのサイズが小さかったため、埋め込まれた場所から移動してしまったと予想される。ビーズ形状は埋め込みやすく観察も容易であるが、長期間の埋め込みには向かないことが考えられる。そこで我々は蛍光ゲルのサイズを大きくし、埋め込み型として扱いやすく観察しやすいゲル形状及び、生体適合性の向上についてさらに検討を進めた⁵⁾。

5 糖応答性蛍光ゲルファイバ

5.1 糖応答性蛍光ゲルファイバの作製

埋め込みやすく測定しやすい形状として、ファイバ形状に注目した。ファイバ形状は、注射針を利用した埋め込みが可能である。また、ピンセット等での扱いも容易であり、蛍光ゲルが不要になったときは、取り出すことが可能である。蛍光ゲルビーズでは埋め込みやすさを追求したが、センサとしての機能がなくなった後に、不要となったセンサを取り出せる形状とすることは安全性の面からも重要である。なお、蛍光ゲルファイバの埋め込みによる炎症反応や異物反応の惹起が予想されるため、ポリエチレングリコール (PEG) と混合させた多孔質性の蛍光ゲルを作製した^{8, 9)}。炎症反応は埋め込み部位周辺の代謝状態に影響を与え、炎症反応による皮膚状態の変化は蛍光強度の低下など経皮的測定に影響を与える可能性がある。

作製方法はアクリルアミドゲルと蛍光色素、PEG (5%) の混合溶液を用意し、ポリオレフィンチューブ (直径1 mm) 内に充填した。その後、溶液を充填したポリオレフィンチューブを36℃の環境で30分静置し、ゲル化させた。ゲル化していない溶液を洗浄するため、水の中で48時間振とうさせ、蛍光ゲルファイバを得た。

5.2 糖応答性蛍光ゲルファイバの埋め込み及び炎症性評価

蛍光ゲルファイバの埋め込みがマウスの耳に与える影響を調べるため、埋め込み部位の炎症状態について評価した (図5)。比較のため PEG 有りと無しとの二種類の蛍光ゲルファイバを作製し、それぞれをマウスに埋め込み、PEG の生体適合性効果について調べた。評価は埋め込んだ部位の発赤、浮腫、痂皮について3段階でスコアをつけ、それらの合計値を炎症スコアとした。この指標に従って、埋め込みから31日目までの炎症反応を評価した。

埋め込み初期においては、PEGの有無に関わらず埋め込み手技による傷が原因の早期炎症反応が起こり、14日目まで症状が続いた。埋め込みから14日目以降は、PEG有り蛍光ゲルファイバを埋め込んだマウスにおいて炎症反応の鎮静化が見られたが、PEG無し蛍光ゲルファイバを埋め込んだマウスでは炎症反応が継続した (図5)。また、PEG無し蛍光ゲルファイバを埋め込まれたマウスでは炎症による発赤で蛍光の観察が困難となったが、PEG有り蛍光ゲルファイバを

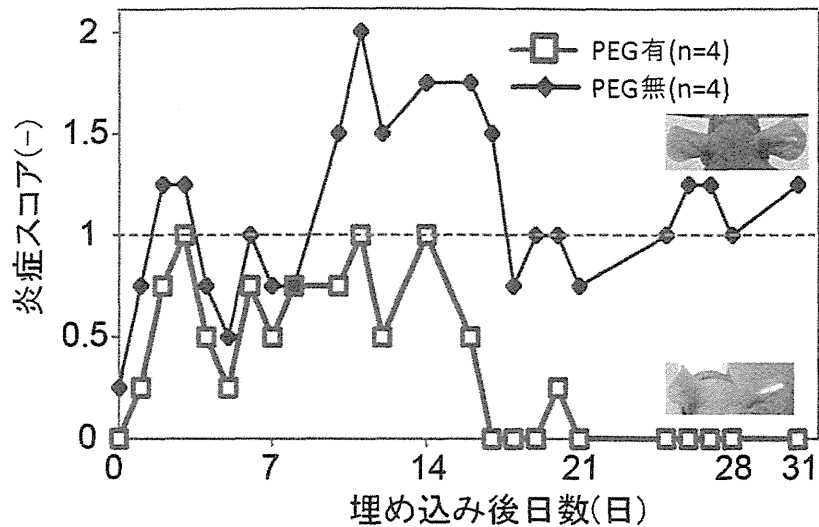


図5 蛍光ゲルファイバ埋め込み後の炎症スコア推移
PEGを導入したファイバでは14日以降炎症がおさまるが、PEGを導入しなかったファイバでは炎症の症状が続いた。

埋め込まれたマウスでは炎症が治まり、31日目での蛍光観察が可能であった。これらの観察結果より、PEGを蛍光ゲルに混合することで、埋め込み後慢性的に起こる炎症を抑制できることがわかった。

5.3 長期埋め込み後の性能評価

長期埋め込み後の糖応答性能を評価するため、蛍光ゲルファイバ埋め込みから140日後のマウスに対し糖負荷試験を実施した(図6)。埋め込み直後の糖負荷試験結果と比較して、長期埋め込み後も蛍光強度の血糖値追従性に低下は見られなかった。長期埋め込みでは炎症反応や異物反応による蛍光ゲルの劣化による蛍光強度の低下や糖応答性の消失が予想されたが、PEGにより慢性的な炎症反応による影響を抑えられ、長期埋め込み後の蛍光強度や糖応答性の保持につながったと考えられる。

5.4 蛍光ゲルファイバの課題

本項で紹介した蛍光ゲルファイバは、生体内で140日間機能を保持した。しかし、現在使用しているファイバは蛍光ゲルの扱いやすさや観察のしやすさ(視野、蛍光強度の確保)を考慮して直径1mmとしているため、埋め込み時の侵襲度が少し高い。マウスへ埋め込む際は16Gの針を使用する。また、取り出すためには切開する必要があることも大きな課題である。今後、これらの課題を解決するため、素材の強度と扱いやすさを保ちつつ、小型化を検討する。

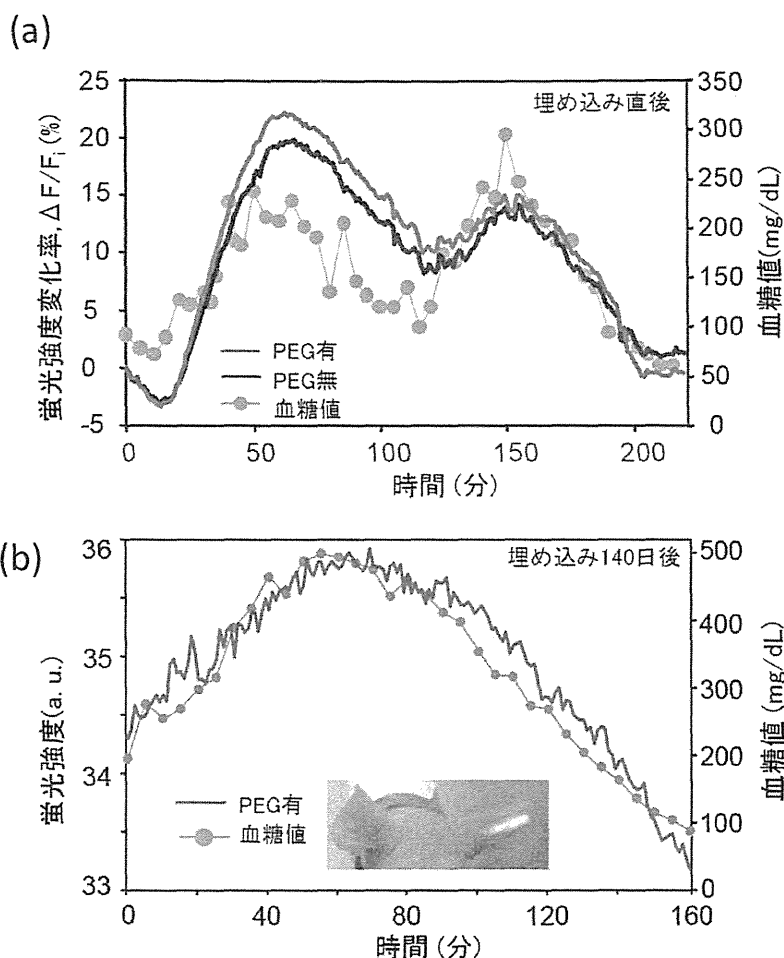


図6 蛍光ゲルファイバ長期埋め込み後の糖負荷試験結果
 (a)埋め込み直後の糖負荷試験結果。(b)埋め込みから140日後の糖負荷試験結果。
 140日経っても、蛍光強度は血糖変動に追従した。

6 測定装置について

我々は完全埋め込み型センサを開発し、長期埋め込み性能と測定性能を示してきた。しかし、センサシグナルの測定には受発光部を持った測定装置が必要である。これまでの実験では蛍光実体顕微鏡を用いた測定を行ってきたが、現在、埋め込んだ蛍光ゲルのシグナルを体に装着した装置で容易に測定する方法についても検討を進めている。装置は励起用の光源と蛍光検出用のディテクターで構成され、簡単に皮膚へ張り付けられる構造を設計中である。しかし、蛍光ゲルと光学系部品の位置がずれるとシグナルが変動してしまうといった大きな課題がある。また、長期間皮膚へ接着できる方法や、皮膚の状態、外界ノイズのキャンセル、測定データのキャリブレーション方法など課題が多い。今後、センサ形状と埋め込みの低侵襲化を目指すと同時に、これらの測定装置の課題解決にも取り組んでいく。

7 おわりに

糖尿病患者の世界的な増加により糖尿病関連医療機器や薬剤、再生医療などに対する注目が高まっており、世界中で対応が急がれている。その動きの中で、我々が開発している連続血糖測定器は、糖尿病の治療と予防の二方向から貢献することが期待される。治療については携帯型人工膵臓の血糖測定部として、予防については超早期糖尿病診断ツールとしてである。人工膵臓は連続血糖測定器とインスリンポンプ、投与アルゴリズムの3つから構成されるが、連続血糖測定器の精度が十分でないため、日常生活における十分な血糖制御を実現できていない。我々の完全埋め込み型センサは生体内での安定性が高いため、測定精度の長期的な保持が期待できる。さらに、長期間のデータ取得が可能なことから、日常生活における詳細な血糖変動解析が可能になり、初期糖尿病患者の診断へつなげられる可能性がある。今後このような可能性を意識しつつ、引き続き本センサの開発とトータルな測定システムの開発を進め、実用化へと近づけていきたい。

謝辞

この成果（の一部）は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務の結果得られたものである。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, J. Shaw, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **94**, 311-321 (2011)
- 2) J. Y. Poirier, I. Guilhem, N. L. Prieur, H. Allannic, L. Campion, D. Maugendre, *Diabetes Care*, **21**, 1919-1924 (1998)
- 3) W. L. Clarke, L. G. Frederick, S. Anderson, D. Cox, L. Farhy, B. Kovatchev, M. Breton, *Diabetes Care*, **28**, 2412-2417 (2005)
- 4) H. Shibata, Y. J. Heo, T. Okitsu, Y. Matsunaga, T. Kawanishi, and S. Takeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (42), 17894-17898 (2010)
- 5) Y. J. Heo, H. Shibata, T. Okitsu, T. Kawanishi, and S. Takeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (33), 13399-13403 (2011)
- 6) T. Kawanishi, M. A. Romey, P. C. Zhu, M. Z. Holody, and S. Shinkai, *J. Fluorescence*, **14** (5), 499-512 (2004)
- 7) E. Karadag, D. Saraydin, S. Cetinkaya and O. Guven, *Biomaterials*, **17**, 67-70 (1995)
- 8) M. Malmsten, K. Emoto, and J. M. V. Alstine, *J. Colloid Interface Sci.*, **202**, 507-517 (1998)
- 9) P. C. Karlsson, R. Hughes, J. J. Rafter, W. R. Bruce, *Cancer Lett.*, **223**, 203-209 (2005)

