

Table 2 Histopathological findings at implant sites

N-HT140235

Observation Parameter	Implantation substance Animal No.	Control ^{a)}					Test sample				
		281	282	283	284	285	281	282	283	284	285
Cell type / response ^{b)}											
1) Polymorphonuclear cells		0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
2) Lymphocytes		1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
3) Plasma cells		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4) Macrophages		0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
5) Giant cells		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6) Necrosis		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total		2	3	3	3	2	6	6	6	6	6
	Average	2.6					6				
Other findings (response) ^{b)}											
7) Neovascularization		0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
8) Fibrosis		0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
9) Fatty infiltrate		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Sub-total		0	0	0	0	0	3	3	4	5	4
	Average	0					3.8				
Total		2	3	3	3	2	9	9	10	11	10
	Average	2.6					9.8				

^{a)}: Subcutaneous tissue in the section

^{b)}: See the tables of scoring criteria (ISO 10993-6:2007 (E))

Cell type/response

Cell type/response	Score				
	0	1	2	3	4
Polymorphonuclear cells	0	Rare, 1-5/phf ^{c)}	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Lymphocytes	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Plasma cells	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Macrophages	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-2/phf	3-5/phf	Heavy infiltrate	Sheets
Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Severe

^{c)}: phf = per high powered (x400) field

Response

Response	Score				
	0	1	2	3	4
Neovascularization	0	Minimal capillary proliferation, focal, 1-3 buds	Groups of 4-7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surrounding the implant

研究成果の刊行に関する一覧表

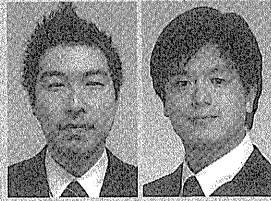
書籍 該当なし

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	体内埋め込み型バイオセンサとバイオマテリアル	バイオマテリアル学会誌	日本医学館	日本	2014	

雑誌 該当なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sachine Yoshida, Yuya Morimoto, Taishi Tonooka, Shoji Takeuchi	An inhalation anesthetic device for stereotaxic operation on mouse pups	Journal of Neuroscience Methods	243	63-7	2015

体内埋め込み型バイオセンサーとバイオマテリアル



高橋正幸^{a)} (写真左), 竹内昌治^{b)} (右)

JJSB

Implantable biosensors and biomaterials

Both the measurement accuracy and the life time of biosensors are problems of the enzymatic electrochemical biosensor for the continuous glucose monitoring (CGM). The glucose sensors using fluorescent materials have the potential to overcome these problems. We developed the glucose responsive fluorescent hydrogel. The fluorescent materials with boronic acid were bonded to the acryl amid hydrogel. The boronic acid can bind to the glucose molecule. We optimized the figure of the fluorescent hydrogel for implantable sensors.

The implanted fiber in the ear of a rat tracked the fluctuation of the glucose concentration and the chronic inflammatory reaction was not observed until 140 days from the implantation.

連続グルコース測定用の酵素電極型グルコースセンサーでは、センサー寿命と測定精度が課題となっている。近年、低グルコース濃度域の測定精度が高く、生体内での寿命も長い蛍光物質を利用したセンサーの開発が進められている。筆者らはボロン酸とグルコースが結合することを利用した蛍光物質とハイドロゲルを結合させた蛍光ゲルを作製し、体内埋め込み型センサーに適した形状(ビーズ、ファイバー)を検討した。

開発した蛍光ゲルファイバーでは、埋め込みから140日後も血糖変動への追従性を示し、慢性的な炎症も観察されなかった。

Masayuki Takahashi^{a)}, Shoji Takeuchi^{b)}

Key words : glucose, CGM, fluorescence, implantable, biosensor

背景

1. 糖尿病と血糖測定

糖尿病は生活習慣病の一つとして、近年身近な話題となっている。2012年に厚生労働省が行った調査によると約950万人の糖尿病患者がおり、予備群とされる人も1,100万人いるとの報告がある。世界的にも2011年で3億6千万人、2030年には5億人を突破すると予想されており、日本だけでなく世界

規模で課題となっている¹⁾。

通常、人の血中グルコースの濃度(血糖値)は、70~140mg/dLの間で変動している。食べて血糖値が高くなっても、膵臓のベータ細胞で血糖値を検知し、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。糖尿病は、このベータ細胞が壊されてインスリンをつくらなくなってしまう病気である^{2,3)}。糖尿病の原因は、生活習慣の乱れによる肥満や運動不足、加齢、遺伝などさまざまな要因によって引き起こされる。

糖尿病患者は、血糖値のコントロールができなくなってしまうため、高血糖状態がつづくとう腎症、神経症、網膜症などの細小血管に関連の合併症や、心血管疾患、脳疾患などの大血管に関連の合併症へとつながるおそれがある。このように糖尿病が重篤化すると、合併症の治療も行う必要があり、患者にとって体の負担が大きくなるだけでなく、合併症も含めた医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は、血糖値を正常範囲内にコントロールすることが重要となる⁴⁾。糖尿病初期であれば運動療法や食事療法で対処していくが、検査で糖尿病と診断された場合にはインスリンなど血糖降下薬による治療が必要となる。糖尿病患者は自己血糖測定(self monitoring of blood glucose, SMBG)を行い、血糖値に応じて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する。

現在、最も一般的な血糖値の測定方法は、指から採取した血液中の糖(以下、グルコース)を試験紙上の酵素と反応させ、電気化学反応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、採血の必要があり患者の負担も大きい⁴⁾。糖尿病患者は1日に4回程度の血糖測定と薬剤投与が必要となる。また、測定時の血糖値しか知ることができないため、食後の高血糖や就寝時の低血糖など、24時間の生活における血糖コントロールの状況を正確に把握することは難しい。そこで、これらの課題を解決するため、近年、連続グルコース測定システム(continuous glucose monitoring, CGM)が日本でも導入され、医療現場で使われはじめている。本システムは酵素電極型のセンサーにより連続してグルコース濃度を測定できる。1日の血糖変動に基づいた療養指導を行えるため、患者に応じた薬剤選択や効果検証に役立っている。さらにCGMを積極的に治療へ活かす試みとして、インスリンポンプと連動させた人工膵臓の研究も進められている。このように、CGMは糖尿病診断・治療のツールとして使用されているが、一方でセンサー寿命の短さや測定精度の低さ、キャリブレーションが必要といった課題も残っている⁵⁾。

2. 新しいグルコースセンシング技術

現在、これらの課題解決方法として注目されているのは、グルコースと可逆的に反応する蛍光物質もしくはタンパク質を利用した検出方法である。これらの物質は一般的に電極型センサーで使われる酵素よりも安定であり、平衡反応を利用したグルコース検出は、これまでの酵素電極型センサーのようなグ

ルコースの消費がないため低濃度域での検出精度が高くなることが期待される。筆者らが用いている蛍光物質は、ボロン酸とグルコースが結合することを利用して合成された化合物である^{6,7)}。

ボロン酸と結合している蛍光物質は、グルコースが結合すると、内部のエネルギー状態が変わるため蛍光強度が増す。その他、グルコース結合性のレクチンとFRET効果を利用した検出方法も多くの研究報告がある^{8,9)}。

蛍光標識されたタンパク質とデキストランなどの糖鎖をペアとしたFRET効果を利用して、グルコースの濃度に応じた蛍光強度の変化を実現できる。また、同様のFRET効果をグルコース結合時の構造変化を利用して成立させる方法も存在する^{10,11)}。すでに臨床研究が行われている手法もあるが、生体内での安定性やグルコース測定精度に課題があり実用化には至っていない。このような課題解決に向け、筆者らはボロン酸をベースとした蛍光色素とポリアクリルアミドを結合させた糖応答性蛍光ゲルを作製し、これを体内埋め込み型センサーデバイスとして使用することを検討している^{7,12)}。

3. 体内埋め込み型センサーデバイス

現在、筆者らが提案する完全埋め込み型グルコースセンサーシステムは、グルコース応答性の蛍光色素をアクリルアミドゲルと結合させ、グルコースセンサーとしての蛍光ゲルだけを体表面近傍に埋め込む^{7,12)}。経皮的に蛍光物質の励起と検出を行い、蛍光強度をグルコース濃度に換算する(図1)。このような方法を従来の酵素電極型の測定方法で実現することは難しく、蛍光型センサーのみで実現可能な方法である。蛍光ゲルだけを埋め込むため小型化が可能で、侵襲度の低い埋め込み方法が期待できる。また、測定装置自体の自由度も高く、埋め込んだ場所や用途に応じた形状の測定装置を開発することも可能である。しかし、経皮的な測定となるため皮膚の状態や色、測定装置とセンサーマテリアルとの位置関係などが誤差要因となり、測定値が安定しないリスクがある。これを回避するため、装置とセンサーマテリアルの位置関係を定める接着方法を検討する必要がある。

^{a)} TERUMO Corporation テルモ株式会社
 【略歴】高橋正幸 2007年 慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻修士前期課程修了。2007年 テルモ株式会社入社、DM開発技術開発課。2011年 経産省異分野融合次世代デバイス製造技術プロジェクト LIFE BEANS センターへ出向。2013年 同上研究所への出向解除。テルモ株式会社研究開発本部へ帰属。現在に至る。
^{b)} Institute of Industrial Science, The University of Tokyo 東京大学生産技術研究所
 【略歴】竹内昌治 2000年 東京大学工学系研究科機械情報工学専攻修士課程修了(工学)。2000年 日本学術振興会特別研究員PD。2001年 東京大学生産技術研究所講師。2003年 同助教授(2007年より准教授)。2004~2005年 ハーバード大学化学客員研究員。2005~2008年 JST さきがけ研究員(構造機能と計測分析)。2008~2012年 経産省異分野融合次世代デバイス製造技術プロジェクト LIFE BEANS センター長。2008年 産総研研究所 バイオナノ融合プロセス連携研究センター長。2010年 JST-ERATO 竹内バイオ融合プロジェクト研究総括。2014年 同教授。現在に至る。

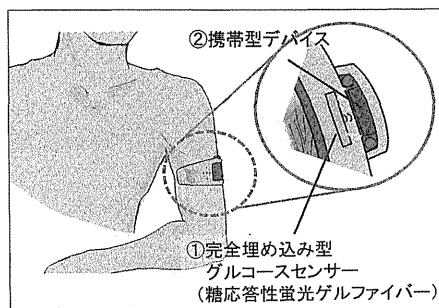


図1 完全埋め込み型グルコースセンサーシステム

体内埋め込み型センサーデバイスとしては、センサーマテリアルと測定部の一体型測定装置を埋め込む方法も提案されている¹³⁾。一体型の埋め込みデバイスではセンサーマテリアルを外部からの衝撃から保護でき、ゲルと測定部との位置関係やズレも生じにくい。測定の安定性が高くなると期待される。しかし、すべての部品を一つにパッケージングするため小型化には限界があり、切開などの方法で埋め込む必要があるため侵襲度は高くなる。また、機械的な部品や電池を体へ埋め込むことに対する抵抗感を感じる人もいと想定され、埋め込んだ後のリスクも高くなる。

以下、筆者らが開発を進める糖応答性蛍光ゲルについて、その埋め込み形状の検討と機能性の評価結果について紹介する。

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⁷⁾。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(405nm)を照射すると蛍光(488nm)が発せられる⁶⁾。また、センサーの基材として用いているポリアクリルアミドは、生体適合性がよいことでも知られており、埋め込みに適した材料である

14)。筆者らは本蛍光色素をポリアクリルアミドと共有結合させることで、グルコース濃度に応じて蛍光強度が変化する蛍光ゲルを作製した。なお、ゲル化された蛍光色素は蛍光物質の自由度が下がるため、蛍光強度が低下する。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。グルコース濃度に対する蛍光強度の変化は直線ではなく、濃度の上昇と共に徐々に変化量も小さくなるようなカーブを描く(図3)⁷⁾。

糖応答性蛍光ゲルビーズ

1. 糖応答性蛍光ゲルビーズの作製

体表面近くへ埋め込む場合、センサーサイズが大きいと埋め込みにも手間がかかり、埋め込まれた物質に対する異物反応の負担も大きい。そこで、まずはセンサー形状を小さくすることを目的とし、糖応答性蛍光ゲルをマイクロビーズ状に加工することを試みた。また、マイクロビーズ状にした蛍光ゲル(蛍光ゲルビーズ)と生理食塩水の混合液を、注射針により体表面へ埋め込むことを検討した⁷⁾。

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4)⁷⁾。蛍光モノマーとアクリルアミドゲル溶液を混ぜた蛍光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。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。本検討では細胞よりも少し大きい中心サイズ130 μ mの液滴を作製した^{7,15)}。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、ゲル化していない成分を取り除くため、水で洗浄した。

2. 蛍光ゲルビーズの埋め込みおよび血糖変動応答性評価

蛍光ゲルビーズを耳に埋め込んだマウスの写真を図5aに示す⁷⁾。蛍光ゲルビーズを生理食塩水とともにシリンジに充填したあと、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

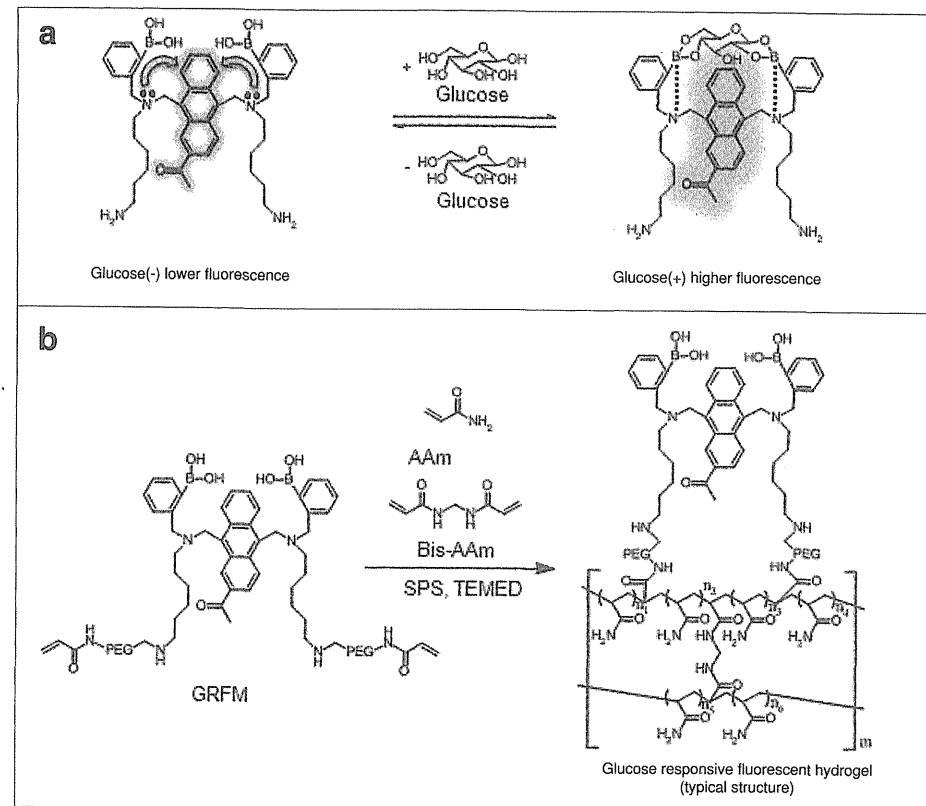


図2 糖応答性蛍光色素

a: 蛍光色素。b: PEGを付加した蛍光色素をアクリルアミドと結合させた。(Shibata H et al., 2010 より)⁷⁾

ビーズを耳先端に留置した。マウスの耳を選んだ理由は、耳は皮膚が薄いため外からの励起光が通りやすく、また蛍光も観察しやすいからである。

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値を測定した。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分毎に取得し、得られた画

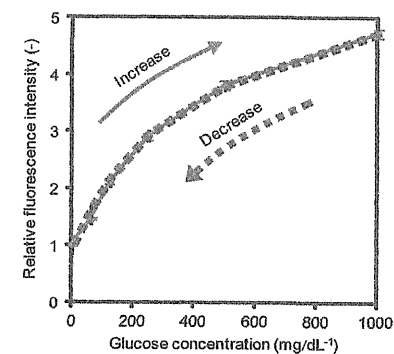


図3 グルコース濃度と蛍光強度の関係(Shibata H et al., 2010 より)⁷⁾

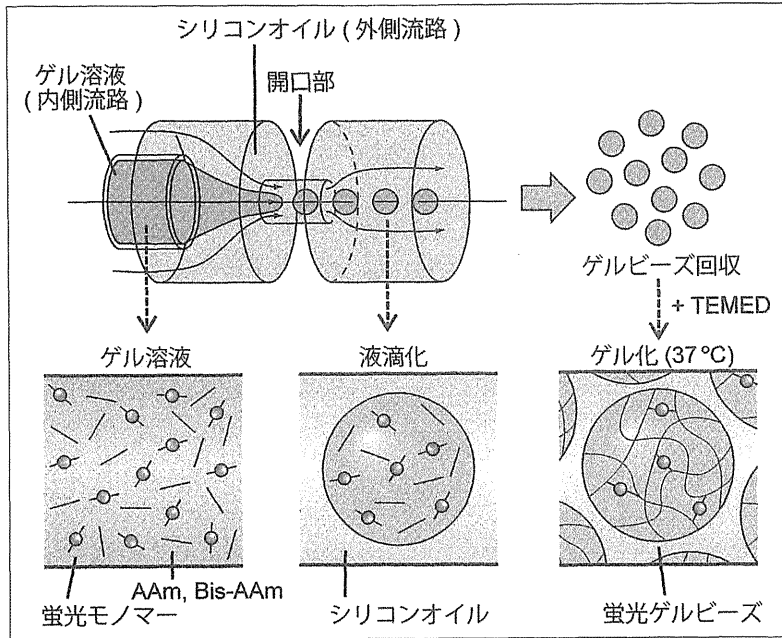


図4 蛍光マイクロゲルビーズの作製方法

光造型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 μ mの液滴を作製した。

(Shibata H et al., 2010 より)⁷⁾

像を蛍光画像解析ソフトにて処理し、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5b)⁷⁾。

なお、図5b⁷⁾の結果では血糖値の変動に対して蛍光強度は約10分遅れて変動する。これは主に血液中のグルコースが間質液へと移動するのに時間がかかるためである。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、このような時間遅れが生じる。

3. 蛍光ゲルビーズの課題

上記検討において、蛍光ゲルビーズによる体表面近くへの簡便な埋め込みと血糖変動に応じた蛍光変動を観察することができた。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⁷⁾。これは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つたと予想される。

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と示唆された。そこで、ゲルの移動を防ぐため蛍光ゲルのサイズを大きくするとともに、埋め込み型として扱いやすく観察しやすいゲル形状および、生体適合性の向上についてさらに検討を進めた¹²⁾。

糖応答性蛍光ゲルファイバー

蛍光ゲルビーズの課題を解決する方法として、ファイバー形状を検討した¹²⁾。ファイバー形状は径を調節することで注射針での埋め込みが可能であり、蛍光ゲルビーズで検討した埋め込み方法を変える必要がない。また、ピンセットなどでの扱いも容易で

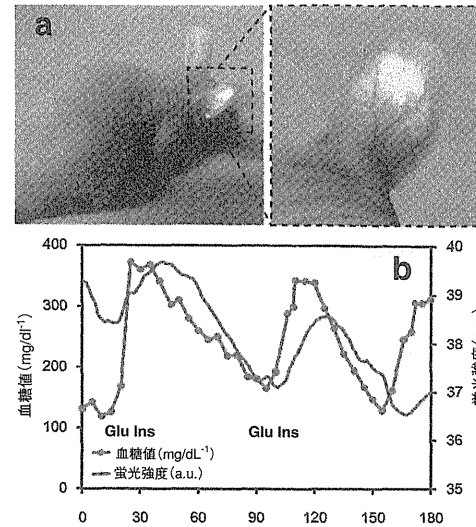


図5 蛍光ゲルビーズ埋め込みマウスと糖負荷試験

a: 蛍光ゲルビーズを耳へ埋植したマウスの写真

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。(Shibata H et al., 2010 より)⁷⁾

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。蛍光ゲルビーズと違い、動きにより少し測定部がずれたとしても測定部の蛍光ゲル量や形状に変化がないため、測定値も安定することが期待される。

炎症反応や異物反応の惹起が蛍光ビーズよりも高まることが予想されるため、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^{16,17)}。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測定に影響を与えるため、できる限り炎症反応を抑える必要がある。

1. 糖応答性蛍光ゲルファイバーの作製方法

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1mm)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 $^{\circ}$ C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、蒸留

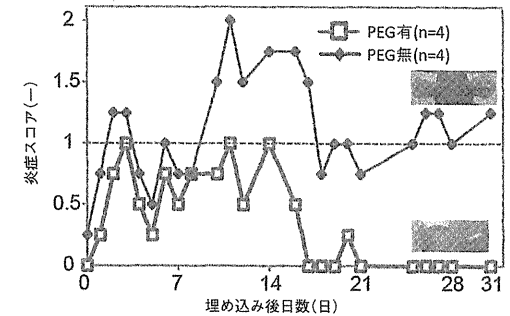


図6 蛍光ゲルファイバー埋め込み後の炎症スコア推移
PEGを導入したファイバーでは14日以降炎症がおさまるが、PEGを導入しなかったファイバーでは炎症の症状がつづいた。(Heo YJ et al., 2011 より)¹²⁾

水中で48時間振盪させ、蛍光ゲルファイバーを得た。蛍光ゲルファイバーは、埋植前に生理食塩水へ浸漬させた。

2. 埋め込み部位の炎症性評価

蛍光ゲルファイバーの埋め込み方法は蛍光ゲルビーズと同様の方法で耳の先へ埋め込んだ。比較のためPEG有と無の2種類の蛍光ゲルファイバーを作製し、それぞれをマウスに埋め込み、PEG導入の生体適合性効果についても調べることにした。埋め込み部位の炎症状態について評価するため、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(図6)¹²⁾。およそ埋め込みの炎症反応が落ち着くと考えられる埋め込みから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、すべてのサンプルで14日目まで炎症反応がつづいた。すべてのサンプルで同様の反応がみられたため、埋め込み手技による創傷が原因で起こった反応だと考えられる。埋め込みから14日目以降は、PEG有蛍光ゲルファイバーを埋め込んだマウスにおいて、炎症反応の鎮静化がみられたが、PEG無蛍光ゲルファイバーを埋め込んだマウスでは炎症反応が継続した(図6)¹²⁾。

また、PEG無蛍光ゲルファイバーでは炎症による発赤で蛍光の観察が困難となったが、PEG有りの蛍光ゲルファイバーを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を蛍光ゲルに導入す

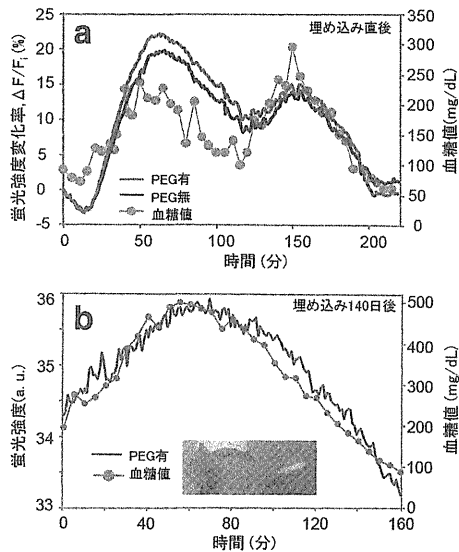


図7 蛍光ゲルファイバー長期埋込み後の糖負荷試験結果
 a: 蛍光ゲル埋込み直後の糖負荷試験結果
 b: 埋込みから140日後の糖負荷試験結果。140日経っても、蛍光強度が血糖変動に追従性を示した。
 (Heo YJ et al., 2011 より)¹²⁾

ることで、埋込み後慢性的に起こる炎症を抑制できることが示唆された。

3. 長期埋込み後の性能評価

長期埋込み後の糖応答性を評価するため、蛍光ゲルファイバー埋込みから140日後のマウスに対し糖負荷試験を実施した(図7)¹²⁾。糖負荷試験および蛍光強度の観測方法は蛍光ゲルビーズでの実験と同様の方法で実施した。埋込み直後の糖負荷試験結果と比較して、長期埋込み後も蛍光強度の血糖値追従性を確認できた。

長期埋込みでは、生体反応による蛍光ゲルの劣化が起り、蛍光強度の低下や糖応答性の消失が予想される。しかし、PEGを導入したことで慢性的な炎症反応による影響を抑えられ、長期埋込み後の糖応答性の保持につながったと考えられる。

4. 蛍光ゲルファイバーの課題

本項で紹介した蛍光ゲルファイバーの実験は、生

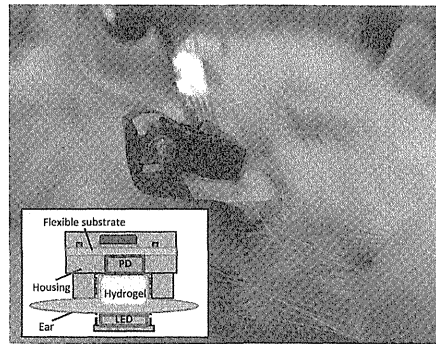


図8 ラットの耳用検出器

体内で140日間埋込んだ後の機能性を確認した。しかし実際に連続グルコース測定用センサーとして使用する場合、測定間隔は1~5分毎で、毎日使用することが想定される。蛍光ゲルは励起光によって多少劣化が進むため、実際の寿命はもう少し短くなると予想される。そこで、今後は長期に連続して測定した場合の機能性評価及び蛍光ゲルの保護を検討する必要がある。

また、現在使用しているファイバー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、埋込み時に皮膚切開が必要である。侵襲度を下げるために細径化をするとシグナルも低下するため、シグナル検出とのバランスを考慮して小型化を検討する。

計測装置

蛍光ゲルファイバーにより長期間の埋込みが可能で、蛍光実体顕微鏡を用いて経皮的にシグナル検出可能なセンサーを開発することができた。しかし、実用化には受発光部を持った専用測定装置が必要である。現在、シグナルを検出のための小型装置開発も検討を進めている(図8)。

光学部品とゲルと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。そのため、動物を覚醒させた状態では安定な測定を実現するのが難しい。また、長期間皮膚へ設置できる方法や、外乱光の影響、測定データのキャリブレーション方

法などの課題を解決する必要があるとわかってきた。

今後、センサーの固有課題解決とともに、これらの測定装置課題についても検討を進める。

今後の展望

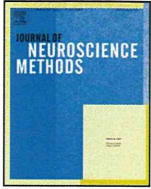
糖尿病はその注目の高まりから、さまざまな機序の薬が開発され市場に出てきている^{18~20)}。また、再生医療に関してもiPS細胞を軸とした研究の動きが活発である²¹⁾。一方、測定機器に関しても連続血糖測定器が登場し、これまでの酵素電極式の測定方法ではなく、蛍光物質を使用した新しい測定方法、センサー物質等の研究が盛んに進められているだけでなく、人工臓への応用も検討されている²²⁾。

筆者らの開発している蛍光ゲルも新しいセンサーとして、測定精度の向上と長期的な生体内安定性を目指して検討している。本研究において筆者らの蛍光ゲルが生体内に埋込んでも測定が可能で、一定期間、生体内で安定であるとの結果を得ることができた。ただし、数日間の連続測定における安定性や測定精度についてはまだまだ未知な部分が残されている。今後は、これらの課題を明らかにしつつ、生体内での安定性を向上させるセンサーマテリアルの開発に取り組む。また、本センサーは測定システムの一部であり、測定装置やデータ処理アルゴリズムについても引き続き検討を進め、実用化へと近づけていきたい。

文献

- Whiting DR, Guariguata L, Weil C et al.: IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, 94: 311-321.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S et al.: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003, 52: 102-110.
- Daneman D: Type 1 Diabetes. *Lancet* 2006, 367: 847-858.
- Poirier JY, Le Prieur N, Campion L et al.: Clinical and statistical

- evaluation of self-monitoring blood glucose meters. *Diabetes Care* 1998, 21: 1919-1924.
- Clarke WL, Frederick LG, Anderson S, Cox D, Farhy L, Kovatchev B, Breton M: *Diabetes Care* 2005, 28: 2412-2417.
- Kawanishi T, Romey MA, Zhu PC et al.: A study of boronic acid based fluorescent glucose sensors. *J Fluoresc* 2004, 14: 499-512.
- Shibata H, Heo YJ, Okitsu T et al.: Injectable hydrogel microbeads for fluorescence-based in vivo continuous glucose monitoring. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107: 17894-17898.
- Liao K C et al.: Percutaneous fiber-optic sensor for chronic glucose monitoring in vivo. *Biosens Bioelectron* 2008, 23(10): 1458-1465.
- Ballerstadt, R, Gowda A, McNichols R: Fluorescence resonance energy transfer-based near-infrared fluorescence sensor for glucose monitoring. *Diabetes Technol Ther* 2004, 6(2): 191-200.
- Kevin J et al.: Continuous Glucose Monitoring Using a Novel Glucose/Galactose Binding Protein: Results of a 12-Hour Feasibility Study with the Becton Dickinson Glucose/Galactose Binding Protein Sensor. *Diabetes Technology & Therapeutics* 2011, 13(3): 309-317.
- Helen VH, Douglas BS, Sandra AA, Terry JA and Ptiner JB: Fluorescence Resonance Energy Transfer Glucose Sensor from Site-Specific Dual Labeling of Glucose/Galactose Binding Protein Using Ligand Protection. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2012, 6(6): 1286-1295.
- Heo YJ, Shibata H, Okitsu T et al.: Long-term in vivo glucose monitoring using fluorescent hydrogel fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108: 13399-13403.
- Arth EC, Hui J: Increased in vivo stability and functional lifetime of an implantable glucose sensor through platinum catalysis. *Journal of Biomedical Materials Research* 2013, 101A: 1274-1282.
- Karadag E, Saraydin D, Cetinkaya S and Guven O: *Biomaterials* 1995, 17:67-70.
- Morimoto Y, Tan WH and Takeuchi S: Three-dimensional axisymmetric flow-focusing device using stereolithography. *Biomedical Microdevices* 2009, 11: 369-377.
- Malmsten M, Emoto K, and Alstine JMV. *J Colloid Interface Sci* 1998, 202: 507-517.
- Karlsson PC, Hughes R, Rafter JJ, Bruce WR. *Cancer Lett* 2005, 223: 203-209.
- Aschner P, Kipnes MS, Lunceford JK, Sanchez M, Mickel C, Williams-Herman DE: Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006, 29: 2632-2637.
- Ling Li et al.: Incretin treatment and risk of pancreatitis in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of randomised and non-randomised studies. *Bio Medical Journal* 2014, 348: 2366.
- Wright EM, Hirayama BA, Loo DF: Active sugar transport in health and disease. *J Intern. Med* 2007, 261: 32-43.
- Donghui Z, Wei J, Hongkui D et al.: Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Nature Cell Research* 2009, 19: 429-438.
- Weinstock R: Closing the loop: Another step forward. *Diabetes Care* 2011, 34:2136-2137.



Basic neuroscience

An inhalation anesthetic device for stereotaxic operation on mouse pups

Sachine Yoshida^{1,2}, Yuya Morimoto, Taishi Tonooka, Shoji Takeuchi*

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

HIGHLIGHTS

- The described anesthetic device for stereotaxic operation on mouse pups consists of polydimethylsiloxane (PDMS).
- The PDMS device is fabricated from 3D computer-aided design (CAD) data obtained from an actual mouse pup head.
- Day 10 pups were anesthetized and stabilized in a non-invasive manner and successfully injected using the PDMS device.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2014

Received in revised form 19 January 2015

Accepted 22 January 2015

Available online 31 January 2015

Keywords:

3D printer

CAD data

PDMS

Tracer injection

ABSTRACT

Background: Mouse pups are invaluable model animals for understanding the molecular and neural basis underlying behavioral development. Stereotaxic operations with anesthetic control are useful tools in systems neuroscience. However, there are no commercially available anesthetic or stereotaxic devices for mouse pups. Current devices have several problems such as invasive approach for stabilization, poor sanitary control, and less flexibility to combine other surgical apparatuses.

New Method: Here, we developed an inhalation anesthetic device equipped with stereotaxic function for mouse pups, by using polydimethylsiloxane (PDMS). PDMS is tolerant to heat and water exposure, and soft enough to cut or make a hole. The anesthetic and the stereotaxic parts were fabricated from the three-dimensional computer-aided design (3D CAD) data obtained from the head of a real mouse pup.

Results: To confirm its utility, a tracer was injected into the brain. We were able to anesthetize and stabilize pups at once in a non-invasive manner using the PDMS device. The histological staining revealed that tracer injection was successful. Our device was compatible with various types of commercial stereotaxic and anesthetic apparatuses via trimming and tube insertion, respectively.

Comparison with existing method(s): To our knowledge, this is the first report of a device that can stabilize the mouse pup's head with the non-invasive manner and functions as an inhalation anesthetic device that can be sterilized.

Conclusions: The present fabrication method will provide a handy and functional instrument for stereotaxic operations in animal models at various developmental stages.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mice are invaluable experimental animals for understanding the behavioral regulation at the molecular level. In the experimental systems neuroscience, stereotaxic surgical operations in adult

mice are highly effective and have various applications such as site-specific brain lesions, targeted delivery of chemicals and vectors, and implantation of electrodes (Tsuneoka et al., 2013; Cetin et al., 2006). To perform these operations, adult mice are often anesthetized using barbiturates, and stabilized using commercially available stereotaxic apparatus. However, the stereotaxic operations in mouse pups that provide valuable information in the neural basis of behavioral development have technical difficulties in stabilizing the head and in controlling the dosage of the barbiturates. In pups, it is impossible to stabilize the head by using ear bars, since the external auditory meatus that accepts the ear bars in the adult are not fully opened yet. The skull is too fragile to stabilize tightly. In addition, the dosage control of barbiturate anesthesia is hard, unlike adult mice, because immature animals have lower levels

Abbreviations: BDA, biotinylated dextran amine; BLP, basolateral amygdaloid nucleus posterior part; CAD, computer aided design; LEnt, lateral entorhinal cortex; PDMS, polydimethylsiloxane; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid nucleus; PND, postnatal day; Py, pyramidal tract.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5452 6650; fax: +81 3 5452 6649.

E-mail address: takeuchi@iis.u-tokyo.ac.jp (S. Takeuchi).

¹ Present address: Faculty of Medicine, Toho University, Tokyo, Japan.

² Present address: JST, PREST, Saitama, Japan.

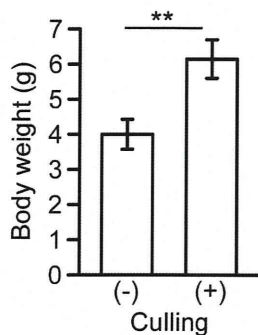


Fig. 1. Body weight comparison of PND 10 pups between without (-) and with (+) culling. All numerical data are shown as mean \pm SD. ** $p < 0.01$. $n = 24$ (-), 15 (+). Coefficient of variation: 10.66 (-), 8.95 (+).

of serum albumin and body fat, which contribute to the diminished efficacy of the barbiturates (Flecknell, 1987). Consequently, there are no commercial inhalation anesthetic devices or stereotaxic instruments specialized for mouse pups that can stabilize the head in a non-invasive manner.

In this paper, we develop an inhalation anesthetic device equipped with stereotaxic function. To stabilize the pup's head in a non-invasive manner, we employ three-dimensional (3D) computer-aided design (CAD) data of an actual pup head and develop the anesthetic and stereotaxic parts. The present device consists of polydimethylsiloxane (PDMS), a silicone-based organic polymer, which is one of the most commonly used materials in bio-medical microdevices because of their easy fabrication process, biocompatibility, and low cost (Jose et al., 2007; Sia & Whitesides, 2003). We first conduct the stereotaxic operation on mouse pups using the PDMS device and evaluate its utility. Finally, we discuss advantages of this PDMS device and future applications of our method.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All animal experiments were approved by the University of Tokyo and Toho University, and followed rules of the animal experiment committee of these universities. C57BL/6 mice were purchased from Sankyo Laboratory (Japan). Mice were maintained in clean cages with purified paper bedding (Alpha-Dri, Shepherd Specialty Papers, USA) under a 12-h light/dark cycle (lights-on 07:00) with food and water *ad libitum*. To reduce the body size differences, pups were culled to five at postnatal day (PND) 2 (Agnish and Keller, 1997). Body weight was measured at PND 2 and 10. At PND 10, pups with culling showed increased body weight and decreased variation coefficient compared to those without culling (Fig. 1). All experiments were performed between 8:00 and 11:00.

2.2. Fabrication of an anesthetic device with stereotaxic function

In this study, we developed an anesthetic device with brain stereotaxic function using 3D scanned data from an actual head of a mouse pup. The overall fabrication process is shown in Fig. 2. First, a 10-day-old pup (6.1 g) was scanned to acquire the 3D CAD data using a 3D scanner (Hamano engineering, Japan) (Fig. 2a). This data was incorporated into the design of a single flow channel for anesthetic gas using 3D modeling software (Fig. 2b). The actual information for dimensions of our device was provided in Suppl. Fig. 1. After fabricating 3D molds using a 3D printer (KEYENCE, Japan), we transcribed the upper and lower PDMS (Torey, Japan) replicas from the molds and bonded them using etching system

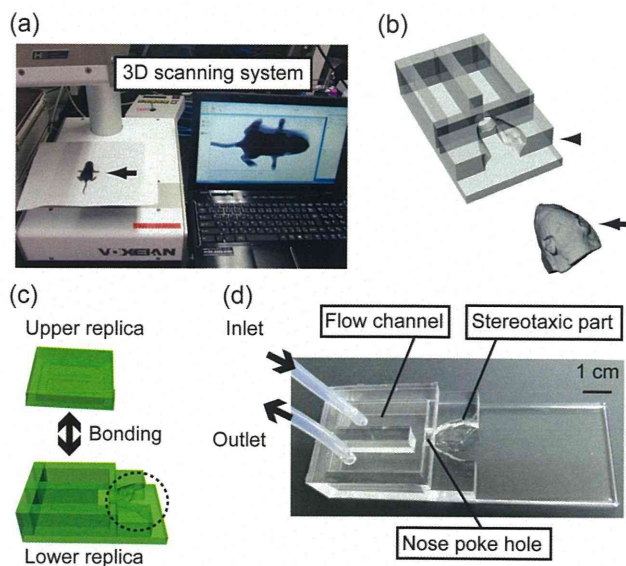


Fig. 2. Fabrication flow of an inhalation anesthetic device for mouse pups equipped with a brain stereotaxic instrument. (a) A day 10 pup (arrow) was scanned to obtain 3D CAD data. (b) The shape of the scanned head part (arrow) was subtracted from the design of the device (arrowhead). (c) After fabricating molds using a 3D printer, upper and lower polydimethylsiloxane (PDMS) replicas were transcribed and bonded. The dotted circle shows the structure based on a real pup head. (d) Two tubes are inserted to acquire inlet and outlet ports. The device consists of a single flow channel for anesthetic gas having a nose poke hole and a brain stereotaxic part.

FA-1 (Samco, Japan) (Oxygen gas: 20 mL/min, Power: 50 W, Time: 5 s) (Fig. 2c). Two holes (4 mm in diameter) were made using biopsy punch (Fig. 2d). Finally, two tubes were inserted into these holes to connect to a commercial inhalation anesthesia apparatus (Muromachi, Japan). To measure how much force was necessary to remove a pup's head from the PDMS device, a tail of pup anesthetized by sodium pentobarbital was pulled toward horizontal direction using a force gauge (IMADA, Japan) (Suppl. Fig. 2a).

2.3. Confirmation of anesthetic control by tail pinch

PND 10 pups were gently handled and placed into the PDMS device by the experimenter and exposed to 1, 2, or 4% isoflurane. The tails were pinched using tweezers every 15 s for up to 10 min. The time at which the pup stopped responding to the tail pinch was recorded.

2.4. Tracer injection into mouse pup brain using the PDMS device

PND 10 pups (6.1–6.2 g) were used for the brain microinjections. The PDMS device was incorporated within a commercially available stereotaxic apparatus (Narishige, Japan). First, the PDMS device (arrows, Fig. 5a) was set at an orthogonal orientation to the ear bars (arrowheads, Fig. 5a) in front. Next, the pup's nose and head were promptly placed into our device for head stabilization and anesthesia. After 2% isoflurane anesthesia, the skull was exposed and a hole was drilled. For tracer injection, biotin-conjugated dextran amine (BDA) (Molecular Probes, USA) was dissolved in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) to a final concentration of 5%. Glass micropipettes with a tip diameter of 50–60 μ m were prepared for the BDA injection. BDA was injected iontophoretically (5 μ A, 7 s on/7 s off for 5 min) at the stereotaxic coordinates A–2.5, L 3, V 4 on the right hemisphere. After injection, skin was sutured and returned to the home cage with mother and siblings. After 3 days (PND 13), pups were sacrificed to confirm the injection.

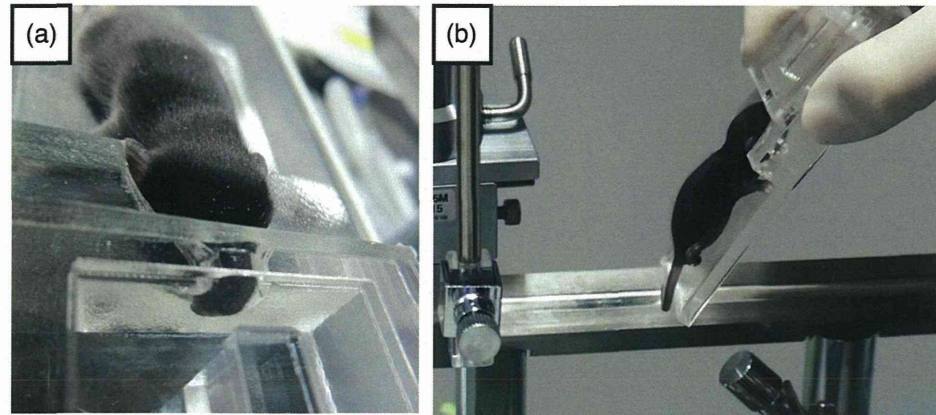


Fig. 3. Confirming the fitting of the pup head into the PDMS device. (a) The head of a PND 10 pup was put into the device and its nose fitted into the nose poke hole. (b) The PDMS device was tilted to examine whether the pup would fall off or not.

2.5. Preparation and staining of the brain sections

Mice were deeply anesthetized by sodium pentobarbital injection (50 mg/kg, intraperitoneally) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M PBS, pH 7.4. The brains were removed and additionally fixed in 4% PFA for 5 h on ice, and then placed in 30% sucrose in PBS overnight at 4 °C. The brains were embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound (Sakura FineTek, Japan), and 14- μ m coronal cryosections were prepared using a cryostat. For visualization of the BDA-labeled neurons, sections were rinsed with 0.1 M PBS, permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS, incubated with 0.3% H₂O₂ in methanol for 1 min, and then in ABC peroxidase reagent (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, USA) for 1 h according to the manufacturer's protocol. The labeling was visualized under a microscope after incubating the sections in 3, 3'-diaminobenzidine solution (Nakarai, Japan) for 15 min.

2.6. Statistical analyses

Student's *t*-test was performed with significance set at $p < 0.05$. All statistical analyses were conducted using R2.9.0 (R Development Core Team (<http://www.R-project.org>)).

3. Results

The PDMS device was fabricated using data from a PND 10 pup as described in Section 2.2 (Fig. 2). We evaluated the PDMS device for stabilization, anesthetic control, and stereotaxic operation. The head of a pup was placed in the PDMS device and its nose was fitted into the nose poke hole (Fig. 3a). Even upon tilting the device, the head fitted well and the pup did not fall off the PDMS device (Fig. 3b). When the PDMS device was set vertically, the pup fell off the device meaning that the holding force of the device was less than the pup's own body weight. The head of a pup remained in the PDMS device after pulling the pup with 0.056 N ($n = 3$, $SD = 0.001$) that corresponded to 93.22% of own body weight, and started removing from the device at 0.058 N ($n = 3$, $SD = 0.001$, 96% of own body weight) (Suppl. Fig. 2b). To confirm the anesthetic control, we checked the responses of the pup to the tail-pinch test, across different isoflurane concentrations (Fig. 4). Pups exposed to 1% isoflurane showed continuous nociceptive responses. With 2% isoflurane, which is normally used for inhalation anesthesia, pups showed no response to the tail-pinch after 135–180 s exposure. Pups exposed to 4% isoflurane were anesthetized quickly within 90 s. None of the pups died during or after this examination. The

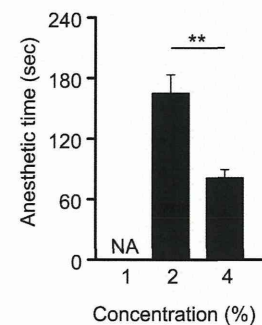


Fig. 4. Confirmation of the anesthetic control. PND 10 pups were exposed to 1, 2, and 4% isoflurane with tail pinches every 15 s. The times at which the pups stopped responding to the tail pinch were recorded and compared. ** $p < 0.01$. $n = 5$ in each condition. NA, not applicable.

PDMS device was autoclaved or washed with 70% ethanol after use. Finally, we performed stereotaxic operation using our device (Fig. 5). The PDMS device was applied in combination with a commercially available stereotaxic apparatus (Fig. 5a). The PDMS device was also successfully connected to a commercially available anesthetic apparatus via two tubes for inlet and outlet ports (Fig. 5a). After the start of inhalation anesthesia using 2% isoflurane, the head of the pup was put into the PDMS device. Since the head was fitted to the stereotaxic part, we were able to make a small incision and a drilled hole in the skull without vibration. A BDA-filled glass capillary was inserted into the hole (Fig. 5b). After 3 days, the histological staining revealed that BDA injection was possible using our PDMS device (Fig. 5c).

4. Discussion

In the previous studies, while a miniaturized stereotaxic instrument for surgery in rat pups was developed, it required a wide incision in the head skin to expose the membranous external acoustic meatus for stabilization (Cunningham & McKay, 1993). Plasticine clay had been used to fabricate a mold for non-invasive stabilization (Hoorneman, 1985). The clay mold had poor sanitary control and less flexibility in combination with other experimental equipment such as an inhalation anesthetic apparatus. The clay mold was also unsuitable for mass production. In contrast, the PDMS device presented here overcomes those problems and has additional advantages. First, our device is capable of stabilizing the pup head in a non-invasive manner. Since the skull of a pup is very soft, the PDMS device needs to avoid holding the head too tight.

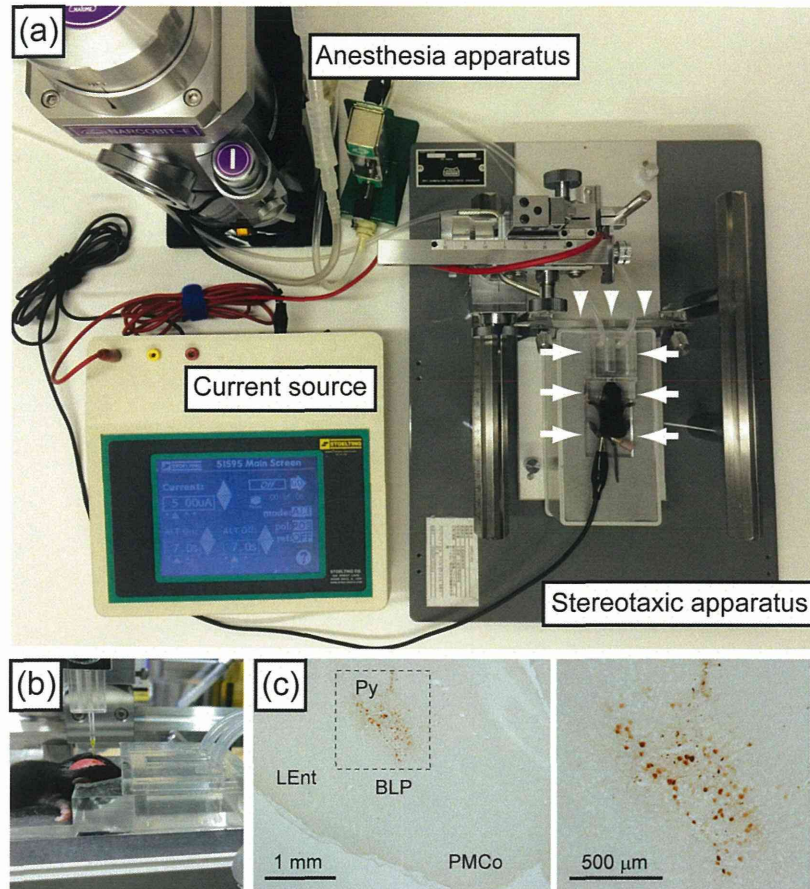


Fig. 5. Microinjection into a pup brain using the PDMS device. (a) The PDMS device (arrows) was incorporated in a commercially available typical stereotaxic apparatus. The device was set in orthogonal orientation to ear bars in front (arrowheads). Two ports of the device were connected to an inhalation anesthesia apparatus. Biotinylated dextran amine (BDA) was filled into the glass capillary. (b) The head of a PND 10 pup was placed into the device and its nose fitted into a nose poke hole. After making a small hole on the skull, the glass capillary was inserted into the hole for BDA injection. (c) An example of histological staining showing BDA injection using the PDMS device. The right panel showed a high-magnification image of a square in the left panel. BLP, basolateral amygdaloid nucleus posterior part; LEnt, lateral entorhinal cortex; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid nucleus; Py, pyramidal tract.

Although the PDMS device is unable to support pup's own body weight, our data indicate the holding force of the device corresponded to 93% of own weight is sufficient to stabilize the head for brain surgery. Second, because PDMS is autoclavable and washable, it is easy to maintain sterilized conditions. Third, PDMS is soft enough to cut and make a hole. Our device is compatible with various types of commercial stereotaxic and anesthetic apparatuses via trimming and tube insertion, respectively. Fourth, the PDMS device is suitable for mass production since it is replicated from 3D CAD data. Finally, additional advantages include reduction in the number of animals used. Because 3D scanned data can be taken from lightly anesthetized pups, there are no needs to sacrifice only for making the mold. Moreover, the PDMS device is simple to use and contributes to reducing the operation time. The present study indicates that our device can stabilize the pup's head with the non-invasive manner and functions as an anesthetic device that can be sterilized.

By applying the present fabrication method, it is possible to easily prepare an anesthetic device equipped with stereotaxic function for various brain sizes. Though the PDMS device has need to be newly fabricated according to pup's size, our method is capable of rapid fabrication of the device within 2 days at a low price from the scanning to the PDMS bonding. There are also outsourcing services for the scanning or 3D printing. A device fabrication for specific operations as presented here will be a major strategy in

neuroscience research of animal behavior. Appropriate instruments for stereotaxic operation on mouse pups will facilitate in the studies on understanding of molecular basis of behavioral development in combination with genetic engineering such as targeted injection of vectors and drugs into mutant pups.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical support provided by Saori Mori and Maiko Onuki (The University of Tokyo). This work was supported by Health and Labour Sciences Research Grants, JSPS KAKENHI Grant Number 25861038 and JST PRESTO program.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.01.025>.

References

- Agnish ND, Keller KA. The rationale for culling of rodent litters. *Fundam Appl Toxicol* 1997;38:2–6.
- Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg P, Osten P. Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 2006;1:3166–73.

- Cunningham MG, McKay RD. A hypothermic miniaturized stereotaxic instrument for surgery in newborn rats. *J Neurosci Methods* 1993;47:105–14.
- Flecknell PA. *Laboratory animal anaesthesia. An introduction for research workers and technicians*. Waltham: Academic Press; 1987.
- Hoorneman E. Stereotaxic operation in the neonatal rat; a novel and simple procedure. *J Neurosci Methods* 1985;14:109–16.
- Jose NM, de Almeida Prado LA, Schiavon MA, Redondo SU, Yoshida IV. Partially pyrolyzed poly (dimethylsiloxane)-based networks: Thermal characterization and evaluation of the gas permeability. *J Polym Sci, B: Polym Phys* 2007;45:299–309.
- Sia SK, Whitesides GM. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* 2003;24:3563–76.
- Tsuneoka Y, Maruyama T, Yoshida S, Nishimori K, Kato T, Numan Michael, et al. Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J Comp Neurol* 2013;52:1633–63.

