

201434016A

厚生労働科学研究委託費

医療機器開発推進研究事業

皮膚ガス測定による無侵襲血糖モニタリングシステムの開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 飯塚 陽子

平成27(2015)年 3月

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の医療機器開発推進委託事業による委託業務として、飯塚陽子
が実施した平成26年度「皮膚ガス測定による無侵襲血糖モニタリングシステムの開発」
の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） 皮膚ガス測定による無侵襲血糖モニタリングシステムの開発 飯塚陽子	1
II. 委託業務成果報告（業務項目） 1. 血糖値と皮膚ガスの相関に関わる研究 ～ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定 大桑哲夫	11
2. センサーの特定と計測方法に関する研究（現行機の改良） 津田孝雄	26
3. 皮膚ガスの取得方法に関する研究開発 ～センサパッド作製のための基盤技術研究（腹部採取用パッド開発） 塩谷俊人	36
III. 学会等発表実績	53

厚生労働科学研究委託費（医療機器開発推進研究事業）

委託業務成果報告（総括）

皮膚ガス測定による無侵襲血糖モニタリングシステムの開発

担当責任者 飯塚陽子 東京大学医学部附属病院 特任講師

研究要旨

本研究は世界的に増加の一途を辿っている糖尿病や糖尿病合併症発症予防・進展抑制を目指し、皮膚ガス測定による無侵襲血糖モニタリングシステム開発に向けて、ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定による血糖値と皮膚ガスの相関に関わる研究では、3種類（アセトアルデヒド・アセトン・ヘキサナール）の皮膚ガス成分から重回帰分析を用い、グルコース経口投与下において、耐糖能が低下した肥満ラットの血中グルコースを推定したところ、グルコース推定値の平均値と標準偏差は $r=0.910\pm 0.086$ となり、グルコースと皮膚ガス間に高い相関関係が得られ、皮膚ガス成分から血中グルコース濃度の推定が可能であると考えられる。また、現行機の改良を伴うセンサーの特定と計測方法に関する研究では、皮膚ガスと血糖値の相関性が存在することが明らかとなり、皮膚ガス中に血糖値に対応する複数の化学物質の存在が判明したことにより、これらの化学物質をセンシングするための複数のセンサーを搭載した装置を製作すれば、今後有効なセンサーを見出し、迅速に血糖値が測定できる装置の製作基盤が構築できたと考えられる。さらに、腹部採取用パッド開発も含めたセンサパッド作製のための基盤技術研究による皮膚ガスの取得方法に関する研究開発では、ガス・クロマトグラフィの分析結果から、既存の柔らかいポリエチレンのプラスチック成型品に着色剤を取り除いたものを処理することにより、腹部採取用パッドとして使用可能な素材が得られることが判明し、既存のヘルスケア製品の接着剤は、皮膚ガス取得の際に影響を及ぼす可能性があるため、センサパッドの作製時に皮膚ガス取得部分に接着剤がかからない構造が必要であることが明らかになった。次年度はより精度の高い小型化の機器開発に向けて取り組みたい。

A. 研究目的

国際糖尿病連合の調査では、2013年に世界糖尿病人口は3億8200万人で、日本を含む西太平洋地域は1億3800万人を有し、世界最大の糖尿病人口を抱えることが改めて浮き彫り

になった。世界糖尿病人口は中国が1位、日本が10位ということから、インスリン分泌が欧米の半分以下のアジア諸国において、ライフスタイルの欧米化に伴い、糖尿病発症率が上昇し続けていることが明らかになった。

2012 年日本国民健康栄養調査では、日本においても、糖尿病の発症は5年ごとの調査でも増加傾向であり、糖尿病と診断されていても、3割から5割の方が糖尿病の治療を受けていない現状も浮き彫りとなった。2013 年糖尿病データマネジメントの調査では、47.1%の方は糖尿病のコントロールが不十分であり、糖尿病の方の肥満は年々増加傾向であり、さらに、平均寿命の調査では、糖尿病の方は、男性では約 10 歳、女性では約 13 歳と平均寿命が短いことも大きな課題である。合併症に関する調査では、毎年糖尿病により新たに人工透析になるのは 16000 人、失明は 3000 人、下肢切断は 3000 人以上、また、糖尿病は心筋梗塞・脳梗塞といった動脈硬化の大きなリスクとなっており、糖尿病は人類の生命を脅かす存在となっていると言っても過言ではない。

世界的に増加の一途を辿っている糖尿病や糖尿病合併症の発症予防・進展抑制のためには、血糖値を長期にわたり良好なコントロールが必要となり、これまでの単純な血糖値モニタリングからより質の良い血糖値を含めた包括的な在宅マネジメントサポートシステムが必要になる。

無侵襲の自己血糖測定機器を開発することにより、測定結果から、パターン分析・特徴提示・フィードバックコメント表示等ができる、モチベーション維持も含めたトータル在宅血糖管理システムの構築が必要である。

血糖値を測定する機器は、現状大勢

を占めている血液を測定する採血タイプ（自己血糖測定 SMBG）と間質液から測定する間質液タイプ（持続血糖測定 CGMS）が存在する。採血タイプでは、測定毎の採血と採血部位の変更が必要であり、1日当たりの測定回数（頻度）が限定され、多くても7回（毎食前後と就寝前）しかできないのが現状である。一方、間質液タイプの機器は連続測定を可能にしたが、体内に装着する際の強い痛みを伴う穿刺の必要性・採液穿刺部のかぶれや違和感・採液部位変更などの患者負担が大きく、最長で6日間しか測定できない問題点が生じている。糖尿病や糖尿病合併症の発症予防・進展抑制は血糖値を高頻度でかつ就寝時であっても測定できる24時間モニタリングが理想となる。

これまで、呼気ガス成分から血中グルコースを推定する試みがなされており、1型・2型糖尿病および健常者の呼気ガス成分から重回帰分析を用い、血中グルコース濃度を推定することが可能であると数多く報告されている。

しかし、呼気は食物や口臭などの影響で精度に問題が出やすく、連続モニタリングのために、鼻や口に常時センサパッドをつけることは患者への負担が大きい。また、意識的に一定時間毎に測定することも患者の負担になる。

それを解決するため、本研究は皮膚から排出される皮膚ガスの検出の研究・開発を行ってきた(有)ピコデバイ

スと連携し、皮膚ガス測定による無侵襲血糖モニタリングシステムの開発に試みた。無侵襲で血糖値を把握するための代替マーカー検出による測定機器が実現すれば、苦痛を伴うことのない高頻度な血糖値測定が可能になり、糖尿病の診断・治療の質の向上が期待できる。

また、測定機器の小型化に取り組み、ポータブル性を付与することができれば、血糖値の長時間モニタリングが容易となり、キメの細かい血糖値コントロールが可能になる。

初年度は予備臨床研究からのフィードバックにより血糖値に換算可能な定量的数値を測定出来るプロトタイプ機を開発し、2年目は在宅対応の持ち出し可能な小型機、3年目は無線通信などを取り入れたシステムを目標とする。

本研究では無侵襲で就寝時間帯も含め日常生活を普段通り行いながら測定できる機器システムの開発と上市により血糖値測定のハードルを飛躍的に下げ、高度な血糖値コントロールの大幅な普及を促進することにより、食事・運動などの生活習慣情報提供システムと連動した糖尿病・生活習慣病予防のためのシステム・サービスの大衆化を実現する突破口としたい。機器の安全性や性能については、PMDAでの薬事戦略相談を積極的に活用していきたい。

患者・一般生活者の観点から、検査の簡便化が実現でき、また、常時連続でモニタリングできるため、急激な血

糖値変化にも対応することができる。

医師の観点から、高頻度で睡眠時を含む血糖値推移の把握が可能になるため、より詳細な病状の把握に基づく診断・治療の高度化を図ることができる。将来的に、インスリンの自動調整が可能になれば、連続モニタリングとの組み合わせにより患者の生活の質の向上に貢献できる。

糖尿病の家族歴があり、肥満等ハイリスク群や糖尿病予備軍を対象に、自動血圧計と同様な位置づけで、血糖値を定期的に測定し、意識することにより、血糖値の改善に繋がり、最終的に糖尿病の発症予防にも貢献することを目的としている。

本研究は、学術的には血糖と代謝物（皮膚ガス）の代謝メカニズムの究明、経済的には現在糖尿病予備軍と言われる人々の糖尿病を未然に予防することによる医療費削減にも貢献できる。

その他、生活習慣情報との統合的解析により、糖尿病予防施策、更には生活習慣病全般への対処戦略立案の貴重な基礎情報提供が可能となり、健康寿命増進に貢献できる。

B. 研究方法

1. 血糖値と皮膚ガスの関連に関わる研究～ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定

皮膚ガス分析のヒトへの応用を行う前に、耐糖能が低下した肥満ラットを対象に皮膚から放出される生体ガスを測定し、血中グルコースの推定を

試みた。

1) 実験動物

16 週齢の肥満・耐糖能異常 Zucker fa/fa ラット、および同年齢の対照ラット (Zucker +/+ラット)、それぞれ 8 匹を対象に実験を行った。

2) グルコースの経口投与

ラットを 4 時間絶食後、グルコース 2g/体重(kg) を経口投与した。

3) 血中グルコースの測定

グルコース投与前(0 分)、投与 30, 60, 90, 120 分後にラットの静脈中の血糖値をグルテストエブリで測定した。

4) ラット皮膚ガスの採集

ラットは固定具 (図 2) に入り、ポリエチレン素材で作成した皮膚ガス採取用バッグをラットの尻尾に装着し、パラフィルムで密閉後、50 ml の窒素ガスを注入しバッグ内を 2 回洗浄し、50 ml の窒素ガスを注入し、10 分間、皮膚ガスを採集した。

5) 皮膚ガスの分析

ラットの尻尾から放出される 5 種類の皮膚ガス (一酸化窒素、アセトアルデヒド、アセトン、ヘキサナール、6-メチル-5-ヘプテン-2-オン) を測定した。

6) 統計分析

値は平均値±標準偏差、あるいは標準誤差で示し、有意差検定、回帰分析および重回帰分析は Excel を用いて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

2. センサーの特定と計測方法に関する

研究 (現行機の改良)

本研究は血糖値に関与する複数のセンサーを見出し、センサーを評価するシステムの構築も含め、皮膚ガスから血糖値を測定する装置の製作を行った。具体的に、1) 皮膚ガスから血糖値を推算するための迅速小型測定器の開発に関しては、皮膚ガスを用いた血糖測定器の製作方針および市販センサー現状の総括、皮膚ガスから血糖測定器の試作、皮膚ガスによる血糖測定試作器を用いた測定実験を行った。2) 試作器を用いた試験データの取得、3) 血糖推算ソフトの製作、4) 皮膚ガスによる血糖測定器に用いる指プローブの製作を行った。

また、皮膚ガスには多数の化学物質が含まれており、血糖値によく対応する皮膚ガス中の化学物質を見出すことを目的として、皮膚ガスの GC/MS 測定を通して、その成分中の化学物質の探索を行った。具体的に、5) 血糖値に関連する皮膚ガス中の化学物質の GC/MS による探索に関しては、糖負荷試験におけるヒト皮膚ガスの変化、皮膚ガスの GC/MS 変化について統計処理を加えた皮膚ガス化合物の探索、解析から得られたマスフラグメントの寄与度情報を評価した。

3. 皮膚ガスの取得方法に関する研究開発～センサパッド作製のための基盤技術研究 (腹部採取用パッド開発)

血糖値を連続的にモニタリングするため、体の一部分に固定して皮膚ガスを収集できるセンサパッドが必要

とされる。腹部採取用パッド開発のために、1) 材料の探索、2) 着色剤による影響の検討、3) 着色剤洗浄の効果に関する検討、4) 接着剤の成分分析、5) 固定方法・装着方法の検討、6) 形状・大きさの検討・試作品の作成等実施した。

事前に病院内のヒトゲノム倫理委員会に研究申請を行いその了承を得る。その後、外来患者様に研究の主旨について文書で説明を行い書面での同意を取る。なお、解析の際には連結可能匿名化を行い、プライバシーの保護に十分注意を払う。

C. 研究結果

1. 血糖値と皮膚ガスの相関に関わる研究～ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定

1) 肥満群と対照群における体重・摂餌量・飲水量の比較

対照群に比べ、肥満群の体重(図3)は有意に高く、摂餌量(図4)・飲水量(図5)は有意に多かった。

2) 経口グルコース投与下における肥満群と対照群血糖値の比較

経口グルコース投与下において、対照群に比べ、肥満群のグルコース投与30分、60分、90分、120分後のいずれにおいても、平均血糖値は有意に高かった(図6)。

3) 経口グルコース投与下における肥満群と対照群皮膚ガスの比較

経口グルコース投与下において、対照群の投与60分後の一酸化窒素平均

値は顕著に増加がみられたが、肥満群において変動は認められなかった(図7)。

皮膚ガスアセトアルデヒド(図8)、アセトン(図9)、ヘキサナール(図10)、6-メチル-5-ヘプテン-2-オン(図11)のいずれにおいても、皮膚ガス各濃度の平均値は両群間に有意差は認めなかった。

4) グルコースと3変数の重相関係数

重回帰分析により、5種類の皮膚ガスのうち、グルコースとアセトアルデヒド・アセトン・ヘキサナールと最も重相関係数が高い($r=0.910$ 、表1-B、図12)ことが明らかになった。対照群は $r=0.701 \sim 0.995$ 、肥満群は $r=0.869 \sim 0.999$ と高い相関が得られ、標準偏差は0.086とばらつきが最も小さいことが明らかになった。

5) 実測値と推定値の誤差

実測値と推定値の誤差は、20ポイントのうち、3ポイントは20%前後で、その他17ポイントはすべて15%以下であった(表2)。

6) グルコースと2変数の重相関係数

いずれの群においても、グルコースと2変数と高い重相関係数が認めなかった(表3)ことが分かった。

7) 血糖値と4変数の重相関係数

いずれの群においても、グルコースと4変数と高い重相関係数がみられなかった(表4)。

2. センサーの特定と計測方法に関する

る研究（現行機の改良）

1) 皮膚ガスから血糖値を推算するための迅速小型測定器の開発

皮膚ガスを用いた血糖測定器の製作方針について、多数のセンサーを用い、血糖に関連性の高い特定物質を検知することにより、血糖値を推測することを目指し、直列型の流路図で、指プローブからの皮膚ガスを採取する工程、内部洗浄の工程、大気ガスをクリン化する工程および皮膚ガスを検知する工程の中で、直接皮膚ガスを検出するセンサー、選択性を高めるため、吸着剤や反応性の化合物を設置することにより補助手段としてのセンサー、一酸化窒素の減圧下での検知といったデザインとした（図13）。

市販センサーの現状について、市販センサーは数多く存在するが、感度が皮膚ガスセンサーとして不足するものが多く、市販センサーの特異性・感度等を考慮して選択する必要がある。

皮膚ガスから血糖測定器の試作について、センサーを6個搭載した試作器を作製した（図14）。2台を作製し、2台同時に用い、10～12個のセンサーを検討できるように設計した。

皮膚ガスによる血糖測定試作器を用いた測定実験について、指からの皮膚ガスをアセトン・エタノール検知器で測定し、血糖値との相関性を検討し、予備ソフトを作製した。

2) 試作器を用いた試験データの取得

ブドウ糖負荷試験による血糖値と皮膚ガスの相関性を検討した結果、ほ

ぼ実測値と推定値が近い値を示す（図16）ことが分かった。

湿度センサーと血糖値の関係について、水分量と血糖値と逆相関を示す（図17）ことから、湿度センサーで補正する必要があると考えられた。

3) 血糖推算ソフトの製作

以上の検討を踏まえ、新たに血糖推算ソフトを作製し、その結果、皮膚ガスと血糖値の相関性がより向上された（図18）ことが明らかとなった。

4) 皮膚ガスによる血糖測定器に用いる指プローブの製作

指プローブは、射出成型用金型（図19）を製作し、その金型を用い、使い勝手が良く、多数の被験者に適用できる指プローブ（図20、図21）を製作した。

5) 血糖値に関連する皮膚ガス中の化学成分のGC/MSによる探索

ブドウ糖負荷試験におけるヒト皮膚ガスの変化について、皮膚ガスGC/MS測定により、アセトアルデヒド（図22）、アセトン（図23）、ノネナールおよび2-エチルヘキサノール（図24）、シアノシクロヘキセン（図25）それぞれと血糖値の良い相関性が認められ、これらの化合物は、ラットの動物実験における皮膚ガスの変化とほぼ同一であることが分かった。

皮膚ガスのGC/MS変化について統計処理を加えた皮膚ガス化合物の探索について、血糖値の実測値と計算から得られた血糖値の推定値とは非常に良い相関（ $R=0.92$ ）が得られた（図

26)。

解析から得られたマスフラグメントの寄与度情報について、60、70、80、110、230付近において、プラス寄与の化学物質の存在、73、78、90、130付近において、マイナス寄与の化学物質の存在(図27)が明らかになった。

3. 皮膚ガスの取得方法に関する研究開発～センサパッド作製のための基盤技術研究(腹部採取用パッド開発)

1) 材料の探索について、ポリエチレンを用いた用具を作製し(図38)、皮膚ガス収集の際に問題となるか評価するため、ガス・クロマトグラフィで分析検討した結果、常温(図39)、50℃加熱(図40)で、かなり多様な物質が含まれていることが明らかになった。

2) 着色剤による影響の検討では、着色剤による影響を検討するため、着色剤を取り除いたタイプを作製し、同様にガス・クロマトグラフィで用具素材を分析した結果、50℃加熱での結果(図41)は、着色剤を除かないもの(図40)と比べ、かなり素材の成分が絞られており、オクタン、デカン、ドデカンなどのアルカン系の物質が多く見られることが分かった。

3) 着色剤洗浄の効果について、製造時の油脂成分が落ちていないと考えられるため、界面活性剤等で洗浄により、着色剤の除去による有効性が確認できた(図41)。

4) 接着剤について、ガス・クロマトグラフィで接着剤を分析した結果

(図42、図43)、皮膚ガスと同様のガスがみられたため、肌に密着させる際に接着剤が内部のガスが混ざらない形状のセンサパッドにする必要があることが明らかとなった。

5) 固定方法・装着方法の検討について、体にシールで貼る(図32)、ベルトで固定する(図33)、パンツと一体型(図34)というセンサパッドシステムを考案した。

6) 形状・大きさの検討・試作品の作成について、内部空間に柱を設けた図面デザイン(図35)の元、3次元CAD(Computer Aided Design)にて円状の形状を確認し(図36)、3次元プリンタを用い、外径112mm・内径72mmのもの、外径75mm・内径45mmのもの、外径65mm・内径45mmのもと大きさの異なるモックアップ(図37)を作製した。

D. 考察

1. 血糖値と皮膚ガスの相関に関わる研究～ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定

1) グルコースを経口投与下において、耐糖能異常のある肥満ラットと対照ラットを対象に、血中グルコース濃度を皮膚から放出される揮発性ガス濃度からの推定を試みた。採取した5種類の皮膚ガス成分のうち、3種類(アセトアルデヒド・アセトン・ヘキサナール)の皮膚ガス成分から重回帰分析を用い、血中グルコースを推定したところ、グルコース推定値の平均値と標準偏差は 0.910 ± 0.086 と高い相

関関係が得られ、これまで報告された研究とほぼ同様な結果であった。

2) これら3種類の皮膚ガス成分から推定した血糖値と実測値の誤差は、20ポイントのうち、3ポイントが20%前後で、その他は15%以下であり、高い精度で血中グルコースが推定できることが明らかとなった。

3) 呼気ガス成分から血中グルコースを推定する試みがなされており、1型・2型糖尿病および健常者の呼気ガス成分から重回帰分析を用い、血中グルコース濃度を推定することが可能であると数多く報告されている。

4) しかし、正常ラットと耐糖能の低下した肥満ラットにおいて、グルコース経口投与後の血中グルコース濃度は単一の皮膚ガス成分と高い相関関係は認められなかった。血中グルコース濃度と呼気ガス濃度の関係は異なる報告がなされており、統一した見解が得られていないのが現状であり、今後の検討課題である。

2. センサーの特定と計測方法に関する研究（現行機の改良）

1) 皮膚ガスによる血糖値評価装置の製作を実施し、本装置の適用によるセンサーの評価が進展できる基礎が固められた。

センサー評価のため、装置を2台製作した。製作した1台は実際に指からの皮膚ガスを用いた血糖値評価システムとして使用した。この装置には、予備実験に基づく多変数解析により得られたソフトを搭載した。

ブドウ糖負荷試験を実施し、第一次ソフトに適用し、ソフトの問題点、センサーの問題点、センサーの配置の問題点等を明らかにし、それを踏まえ、第二次ソフトを製作し、血糖値と装置のセンサーの応答から推定した値と相関を検討したところ、かなり良好な結果が得られ、本研究目的が将来的に達成されるとの感触が得られた。

2) センサー評価用に製作したもう1台の装置には、これまで用いなかったセンサーを一部搭載し、基礎実験に用いる体制を取った。センサーの選択について、ラットの実験及びヒトの皮膚ガスの解析結果から評価していく。2台の評価装置は、良好な作動を示している。

3) 皮膚ガスを捕集し、GC/MS測定を実施し、多変数解析を用いた血糖値と皮膚ガスの相関性に関しては、良好な関係が成立することを見出した。

4) 血糖値と相関を持つ化学物質に関しては、アセトアルデヒド、アセトン等が対応することを見出し、多変数解析により複数のプラス依存、マイナス依存物質のフラグメント数が明らかになった。皮膚ガス中の血液応答性化学物質探索の基礎実験が実施できたので、次年度における化学物質の確定に繋げていく。

3. 皮膚ガスの取得方法に関する研究開発～センサパッド作製のための基盤技術研究（腹部採取用パッド開発）

1) 形状・小型化の探索に関しては、試行錯誤の結果、センサパッドの形状

が概ね決定したが、センサパッドを小型化するために皮膚ガスの効率的な取得方法も含め考える必要がある。次年度には皮膚ガスの気流の流れのシミュレーション等を行い、効率のよい形状をさらに探索していく。

2) 素材の絞り込みに関しては、今年度は着色剤を除いたもので概ね使用可能だと判明し、次年度は洗浄を施行した後の分析およびその対策を実施することにより、素材の決定に繋げていく。

3) 接着剤の取り扱いに関しては、接着剤が皮膚ガスに影響を与えることが明らかとなったため、センサパッドの皮膚ガス収集部分に接着剤が入らない構造にする必要があると考えられる。次年度はその試作品の作製を実施していく。

4) 固定の工夫に関しては、身体の動きに合わせ、フィット感のあるものを目指し、次年度は再度材料や形状の見直しを行っていく。

5) 小型化に向けて、既存の文献や他の類似の機器を参考にし、センサパッドシステム全体での問題点をクリアしつつ、リスク分析も含め次年度は小型化システムのモックアップを作製していく。

E. 結論

1. 血糖値と皮膚ガスの相関に関わる研究～ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定

1) グルコース経口投与下において、耐糖能が低下した肥満ラットの血中

グルコースを、5種類の皮膚ガス成分のうち、3種類（アセトアルデヒド・アセトン・ヘキサナール）の皮膚ガス成分から重回帰分析を用い、推定したところ、グルコース推定値の平均値と標準偏差は 0.910 ± 0.086 とグルコースと皮膚ガスの高い相関関係が得られた。

2) 実測値と推定値の誤差は、20ポイントのうち、3ポイントは20%前後で、その他は15%以下であり、高い精度で血中グルコースが推定できることが明らかになった。

3) 皮膚ガス成分から血中グルコース濃度の推定が可能であると考えられる。

2. センサーの特定と計測方法に関する研究（現行機の改良）

1) 本研究課題の皮膚ガスと血糖値の相関性があることを明らかになった。

2) 皮膚ガス中に血糖値に対応する複数の化学物質の存在が判明した。

3) これらの化学物質をセンシングするための複数のセンサーを搭載した装置を製作し、今後有効なセンサーを見出し、迅速に血糖値が測定できる装置の製作基盤が構築できた。

3. 皮膚ガスの取得方法に関する研究開発～センサパッド作製のための基盤技術研究（腹部採取用パッド開発）

1) 素材のガス・クロマトグラフィの分析結果から、既存の柔らかいポリエチレンのプラスチック成型品に着

色剤を取り除いたものを処理することにより、腹部採取用パッドとして使用可能な素材が得られることが判明した。

2) 既存のヘルスケア製品の接着剤に関しては、ガス・クロマトグラフィの解析結果から、皮膚ガス取得の際に影響を及ぼす可能性があるため、センサパッドの作製時に皮膚ガス取得部分に接着剤がかからない構造が必要であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

「パーキンソン病疾病の皮膚ガス成分の特徴と GC/MS フラグメントからの重度の推定」津田、平山、角田、大野、日本薬学会第 135 年会、ポスター発表 (27PA-p m 1 3 2)、平成 27 年 3 月 27 日

血糖値と皮膚ガスの相関に関わる研究
—ラットの尻尾から放出された揮発性ガスから血糖値の推定—

名古屋工業大学 物質工学専攻 大桑哲男

研究要旨

本研究は、皮膚ガス分析のヒトへの応用を行う前に耐糖能が低下した肥満ラットを対象に皮膚から放出される生体ガスを測定し、血中グルコースの推定を試みた。16週齢の Zucker fa/fa ラット8匹（肥満、耐糖能低下、高血圧発症ラット）および同年齢の対照ラット（Zucker +/+ラット）8匹を対象に実験を行った。4時間の絶食後、グルコース 2g/kg 体重を経口投与し、投与前、投与後 30, 60, 90, 120 分にラットの静脈中の血糖値およびラットの尻尾から放出される5種類の皮膚ガス（一酸化窒素、アセトアルデヒド、アセトン、ヘキサナール、6-メチル-5-ヘプテン-2-オン）を測定した。5種類の皮膚ガスのうち、アセトアルデヒド、アセトン・ヘキサナールから重回帰分析にて求めたグルコース推定値の平均値と標準偏差は $r = 0.910 \pm 0.086$ (0.701~0.999 の範囲) となり、高い相関関係が得られた。このことから皮膚ガス成分から血中グルコース濃度の推定が可能であると考えられる。

A. 研究目的

厚生労働省（2013年）は、日本の糖尿病有病者は男性15.2%、女性9.2%で、50歳以上でその割合が増加し、糖尿病や高血圧が深く関与する心臓血管や脳血管疾患が増大していると報告している。にもかかわらず、このような合併症を予防するのに必要な血糖値の管理ができていないし、また定期的な健康診断を受診していない人が多く存在する。また日本以上に中国、インド、アメリカは糖尿病患者が多く、年々増大している。血中グルコースレベルは糖尿病の診断と自己管理のための優れたバイオマーカーである。糖尿病の合併症予防には患

者自身が各自で血糖値を管理することが重要である。ヒトの呼気ガスや皮膚ガス（皮膚から放出される生体ガス）は多くの揮発性有機化合物（Volatile Organic Components; ）が含まれており、これらの生体ガスは生体の複雑な代謝状態（糖・脂質代謝、タンパク質代謝、酸化ストレス状態、炎症など）を反映していることから病気の診断や治療効果の指標として利用されてきた。近年、VOCs 分析技術が向上し（測定ガス分析の検出限界と再現性の改善など）測定技術の問題は解消されつつある。呼気ガスや皮膚ガスは採血しないことから痛みが伴わないで非（低）侵襲にサンプル採取が可

能であることから皮膚ガスから血糖モニタリングができれば、糖尿病のスクリーニング、診断や予防に大いに役立たせることが可能であると考えられる。これまで呼気ガスサンプルを用いて単一ガス成分と血中グルコース濃度の関係が報告されてきた (Paradi ら 1999; Galassetti ら 2005 ; Novak ら 2007; Lee 2009 ら)。OGTT (Oral glucose tolerance test) 時において、各個人の呼気ガス一酸化炭素と (Paradi ら ; 1999) と血糖値は密接に関係していることが報告されている。Novak ら (2007) も個人において呼気ガス硝酸メチルと血中グルコース濃度は高い相関関係が認められたと報告している。また夜間絶食後においてアセトン、エタノールとメタノールは血中グルコースと高い相関関係が認められたが、イソプレンは高い相関関係が認められなかったと報告されている (Righetton ら 2008)。一方 OGTT 時での呼気および皮膚ガス中のメタノール、エタノール、プロパノール、アセトン濃度は血中グルコース濃度と相関関係が認められなかったとの報告もあり (Galassetti ら 2005; Turner ら 2008)、単一ガス成分と血中グルコースレベルは一致した結果は得られていないことから、詳細な検討が必要である。これらの結果に対し、Lee ら (2009) は OGTT 中のエタノール、アセトン、硝酸メチル、エチルベンゼン、m/p-キシレン、o-キシレンの6種類の呼気ガスのうち、4種類~6種類の組み合わせによる重回帰分析から血中

グルコース濃度を推定したところ実測値と高い相関関係が認められたと報告している。Mihn ら(2011)も高血糖時および高インスリン注入により正常血糖時の個人の血中グルコースは呼気ガスアセトン、硝酸メチル、エタノールおよびエチルベンゼンを組み合わせでの重相関係数は 0.667~0.999 と高い相関関係が認められたことを報告している。OGTT あるいはグルコース静脈注射により血中グルコース増大に伴う複数の呼気ガスを測定し、2~6種類の呼気ガス中成分と血中グルコース濃度は高い相関関係が認められることが Galassetti らの研究グループにより報告されている。これらの呼気ガス成分には硝酸メチルを含んで重回帰分析が行われている。しかしこの成分は市販されておらずガスクロマトグラフィでは測定が困難である。またこのグループは1型糖尿病、2型糖尿病患者、健常者を対象に呼気ガスサンプルで同様の報告をしている。呼気ガスは深呼吸後ゆっくり呼気ガスを呼出し最後の残気容量(終末呼気)を分析に利用することから、高齢者や子供にとってはサンプル採集にストレスがかかること、さらに呼気ガス採取は感染症など安全性への配慮が必要である。我々はこれまでにラットの尻尾から放出される生体ガスの研究を進めてきた (Nakanishi ら 2013)。皮膚ガス採集は高齢者と子供にとっても身体的負担は少なく安全性も高いと考えられる。本研究は皮膚ガス分析のヒトへの応用を行う前に耐糖能

が低下した肥満ラットから放出される生体ガスを測定し、血中グルコースの推定を試みた。

B. 研究方法

倫理面への配慮

本実験は名古屋工業大学安全管理委員会動物実験安全部会の承認を得たのち実施した（受付番号 26012号）。

1) 実験動物

本実験は9週齢の Zucker fa/fa ラット 8匹（肥満、耐糖能低下、高血圧発症ラット）および同年齢の正常ラット（Zucker +/+ラット）8匹を購入し（中部科学資材、名古屋）、肥満を発症し、耐糖能が低下した7週間の飼育後（16週齢時）に実験を行った。



図1. Zucker 肥満ラット（上）と対照ラット（下）

飼育室の気温は 22 ± 1 °C、12時間毎

の明暗サイクルに調整された飼育室にてラットを飼育した。飼料（CE-2飼料）および水は24時間自由摂取とした。食餌量と水分摂取量は毎日測定した。ラットは購入直後から、毎日ラット固定器具に慣れさせるために毎日5分間固定具に入る練習を行った。ラット固定具は大、中、小の3種類を用意した。もっとも大きい固定器具は長さ25.5 cm、直径8.5 cm、中型の固定具は長さ23 cm、直径8 cm、小型のものは長さ23 cm、直径7 cmであり、ラットの大きさに適した器具を用いて実験を行った。なおすべての固定器具は1.5 cm 間隔で3段階の長さに調節できるように工夫されている。

2) グルコース経口投与

肥満ラットおよび対照ラットにグルコース 2g/kg 体重を経口投与した。

3) ラット皮膚ガス採集方法

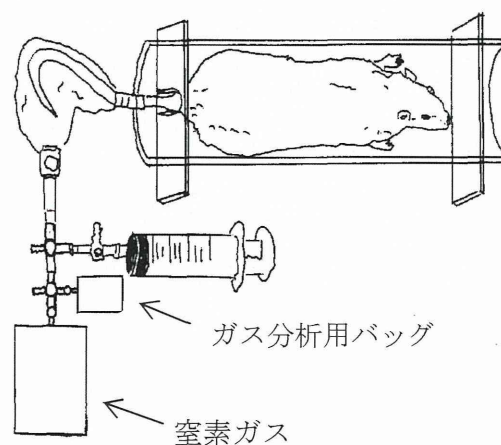


図2. ラットの尻尾からの皮膚ガス採取方法

ラットは4時間の絶食後（早朝餌箱を外し）、固定具（図2）に入り尻尾を蒸留水で洗浄し、キムワイブ（kimwiper S-200, Kimberly-Clark Co., Kulesia, Tokyo）できれいに水分を拭き取った後、ポリエチレン素材で作成した皮膚ガス採取用バッグをラットの尻尾に装着し、パラフィルムで密閉した。密閉後50 mlの窒素ガスを注入しバッグ内を洗浄した。バッグ内の洗浄は2度行った後、50 mlの窒素ガスを注入し、10分間、皮膚ガスを採集した。10分後、採集した皮膚ガス45 mlを別の分析用バッグに移し、分析に用いた。その後皮膚ガス採取直前にバッグ内の洗浄を2回行い同様な方法で30、60、90、120分に皮膚ガスを採取した。

4) 血中グルコース測定

ラットを4時間、絶食にさせ（早朝餌箱を外し）、ラットの尾静脈から血液を採取し、血糖測定器（グルテストエブリ、三和化学）を用いて血中グルコース濃度を測定した。ラットは図2に示すような固定器具に入り、激しく動くようなことはなかった。採血はグルコース投与前、投与後30、60、90、120分の5回行った。

5) 皮膚ガス分析方法

皮膚ガス成分のうち一酸化窒素濃度は一酸化窒素測定装置（ppb-NO; ピコデバイス社製、名古屋）を用いて測定した。皮膚ガス一酸化窒素濃度は5, 10, 15, 20ppbの既知の一酸化窒素標準ガスを用いて校正し濃度を測定した。皮膚ガス中のアセトアルデヒド、アセト

ン、ヘキサナール、6-メチル-5-ヘプテン 2-オンは Cold-trap gas chromatographic system (Yamane ら 2006; Naitoh ら 2000)を用いて算出した。このシステムは濃縮器 (NIT-3; ピコデバイス、名古屋) とガスクロマトグラフ (GC-2010; Shimadzu, Kyoto) からなる。ガスクロマトグラフの検出器には FID (水素炎イオン検出器)を用い、カラムは DB-WAXETR (長さ 30m、内径 0.32 mm; Agilent Technology, J&W, USA) を使用し、注入温度と検出部温度は 150°C、カラム温度初期には 40°Cで3分間に設定し、その後8分間にわたり1分間に 20°Cずつ上昇させ、200°Cにまで上昇させ、5分間その温度を維持し、測定を行った。キャリアガスおよびメイクアップガスにはヘリウムを使用し、それぞれの流量はキャリアガスが 12.0 ml/min、メイクアップガスが 20 ml/min、水素ガスは 25.0 ml/min、空気が 250.0 ml/min であった。アセトアルデヒド(AA)、アセトン(A)、ヘキサナール(H)、6-メチル-5-ヘプテン 2-オン(M)の 50, 100, 150 ppb 濃度の標準ガスを作成し濃度を算出した。

6) 統計分析

値は平均値±標準偏差あるいは標準誤差で示した。有意差検定、回帰分析および重回帰分析は Excel を用いて行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

C. 研究結果

図3には両群の体重を示した。肥満群は対照群に比べ有意に高い体重が認められた。

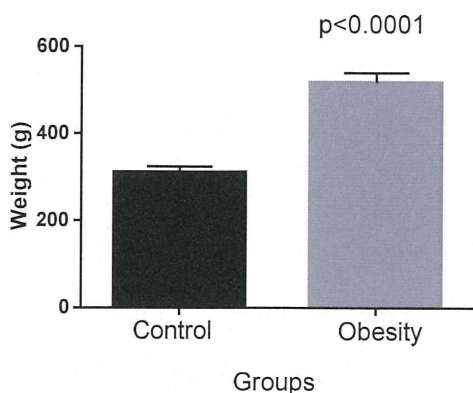


図 3. 肥満群と対照群の体重の比較

図 4 は両群の食餌量を示した。肥満群の食餌量は対照群に比べ有意に多い食餌量であった。

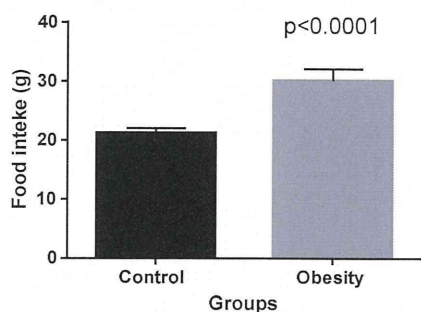


図 4. 肥満群と対照群の食餌量の比較

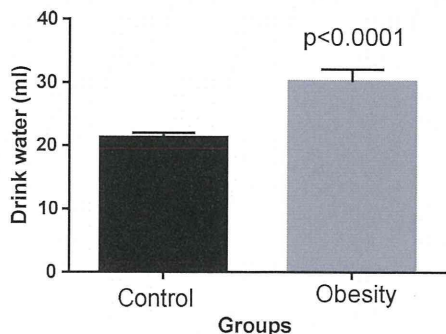


図 5. 肥満群と対照群の水分摂取量の比較

図 5 には両群の水分摂取量を示した。

肥満群の水分摂取量は対照群に比べ有意に多い量であった。

図 6 は肥満群と対照群の OGTT 時の血中グルコースの変化を示したものである。グルコース投与前は両群間に有意差は認められなかった。30, 60, 90, 120 分ではいずれの時間において両群間に有意差が認められた ($p < 0.0001$)。肥満群の血糖値は、30 分と 60 分に著しい増加が認められたが、対照群では大きな変化は見られなかった。

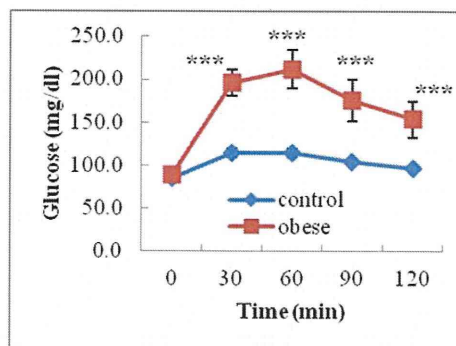


図 6. 肥満群と対照群における OGTT 時の血中グルコースの平均値の比較

図 7 はラットの尻尾から採集した皮膚ガス中の一酸化窒素測定結果を示したものである。対照群では 60 分に著しい増加が認められたが、肥満群では大きな変動は見られなかった。

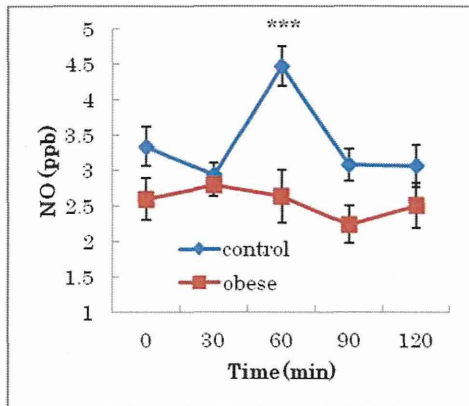


図7. 肥満群と正常群における OGTT 時の皮膚ガス一酸化窒素濃度の平均値の比較

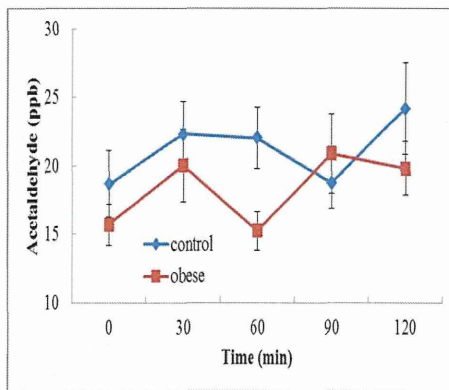


図8. 肥満群と正常群における OGTT 時の皮膚ガスアセトアルデヒド濃度の平均値の比較

図8は OGTT 時の皮膚ガスアセトアルデヒド濃度を両群で比較したものである。対照群と肥満群で有意差は認められなかった。

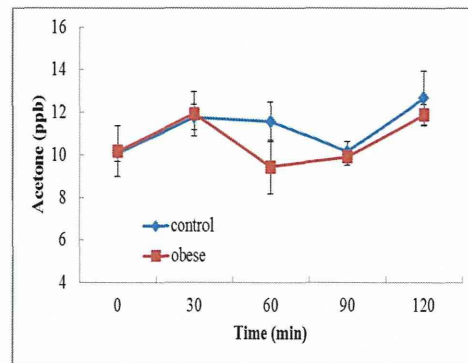


図9. 肥満群と対照群における OGTT 時の皮膚ガスアセトン濃度の平均値比較

図9は OGTT 時の皮膚ガスアセトン濃度を両群で比較したものである。OGTT時の皮膚ガスアセトン濃度はアセトアルデヒドと同様に肥満群および対照群ともに30分とで上昇し、60分から90分で減少し120分で両群とも増大したが、いずれの時間においても有意な差は認められなかった。

図10は OGTT 時の皮膚ガスヘキサナール濃度を両群で比較したものである。アセトン濃度と同様に30分で増大した。対照群と肥満群でいずれの時間帯においても有意差は認められなかった。

図11は OGTT 時の皮膚ガス中6-メチル-5-ヘプテン-2-オン濃度を両群で比較したものである。他の皮膚ガス濃度と同様に30分で増大したが、対照群と肥満群でいずれの時間帯においても有意差は認められなかった。

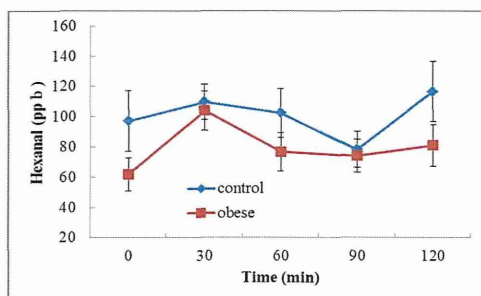


図 10. 肥満群と対照群における OGTT 時のヘキサナール濃度の平均値比較

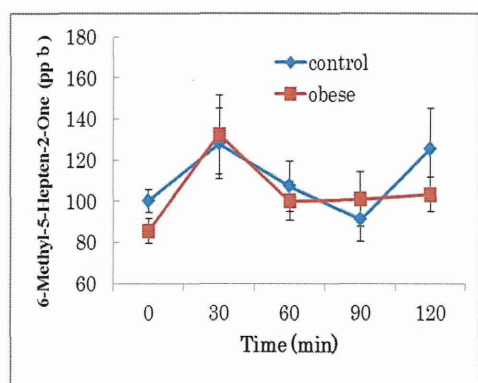


図 11. 肥満群と対照群における OGTT 時の皮膚ガス 6-メチル-5-ヘプテン-2-オン濃度の平均値比較

表 1 には各ラットにおけるグルコースと 3 変数の重相関係数を示した。3 変数の平均値 (M) と標準偏差 (SD) を求めたところ、アセトアルデヒド、アセトン・ヘキサナールが最も重相関係数が高い値が得られた ($r=0.910$)。対照群で最も高い値は $r=0.995$ (No.1)、最も低い値は $r=0.701$ (No.8)であった。また肥満において最も高い値は $r=0.999$ (No. 11)、低い値は $r=0.869$ (No. 14)であった。アセトアルデヒド、アセトン・ヘキサナールから求めた相関係数の最低値は $r=0.701$ であった。さらに、この 3 種類の皮膚ガスから求

めた重相関係数は最も低い標準偏差 (0.086)が得られ、バラつきが最も小さかった。図 12-A, -B, -C, -D は対照群 (No.1 と No.8) と肥満群 (No.11 と No.14)において、推定値と実測値の重相関係数について、最も高い値と低い値を示した。表 1-A と表 1-B は (推定値 - 実測値) / 実測値 $\times 100$ から求めた誤差を示した。

表 1-A と表 1-B. 各ラットにおけるグルコースと 3 変数間の重相関係数

表 1-A

No	N・AA・A	N・AA・M	N・H・M	N・A・H
1	0.813	0.649	0.669	0.625
2	0.379	0.468	0.993	0.954
3	0.998	0.994	0.965	0.952
4	0.905	0.919	0.925	0.879
5	0.707	0.524	0.958	0.996
6	0.911	0.987	0.736	0.751
7	0.822	0.797	0.976	0.888
8	0.700	0.701	0.685	0.701
9	0.793	0.325	0.500	0.721
10	0.982	0.954	0.857	0.883
11	0.999	0.992	0.980	0.999
12	0.999	0.999	0.963	0.999
13	0.817	0.826	0.667	0.591
14	0.683	0.673	0.659	0.620
15	0.866	0.433	0.676	0.937
16	0.986	0.442	0.947	0.937
M	0.835	0.730	0.822	0.839
SD	0.159	0.228	0.156	0.142