

# 汗中の乳酸モニタリングを目指した蛍光イメージングシステムの開発

## Development of a fluorescence imaging system for monitoring lactic acid in sweat

石井健太郎<sup>1)</sup>

指導教員 荒川貴博<sup>1,2)</sup>, 研究協力者 大西佳悟<sup>2)</sup>, 千本拓実<sup>2)</sup>

1) 東京工科大学 大学院 工学研究科 サステイナブル工学専攻

2) 東京工科大学 工学部 電気電子工学科

キーワード：蛍光，モバイルイメージング，ペーパーベース，乳酸，流体デバイス

### 1. 緒言

近年、医療・スポーツ医学分野において、生体情報を取得するバイオセンサの利用に注目が集まっている。例えば、生体内の組織酸素代謝の指標として用いられるバイオマーカーの一つである乳酸は、乳酸脱水素酵素の触媒作用によってピルビン酸から生成される。血中乳酸濃度と運動には関係があり、運動により筋肉を動かすエネルギーが必要になると、筋肉中のグルコースを乳酸に分解することでエネルギーを生み出す<sup>(1)</sup>。このときの血中乳酸濃度 LT(Lactate Threshold)は運動強度の評価に用いられている<sup>(2)</sup>。

本研究では、乳酸を非侵襲に連続計測することを目的とし、生体適合性の高いウェアラブルバイオセンサの開発を目指す。まず比色法を利用して乳酸濃度を測定するバイオセンサを作製し、基礎特性を評価した。その後スマートフォンのカメラを用いて蛍光イメージングを行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 紙製の流路の作製

安価で簡便な流路を作製するためクロマトグラフィペーパー(ろ紙)上に疎水性バリアを有する紙製流路作製の検討を行った。2 mm×10 mmの流路の作製のため疎水性バリアを形成するためパラフィンを利用した。まず、ろ紙を 25 mm×30 mmの大きさに切断する。次に、流路を作製するろ紙(N紙)に

パラフィンを全面に浸透させたろ紙(P紙)をのせる。3Dプリンタ(Form 3+, Formlabs)で作製したスタンプをホットプレートで120℃に加熱し、P紙の上から圧力をかけパラフィンを熱転写する。最後に裏面に固体パラフィンを塗布し流路を作製した。

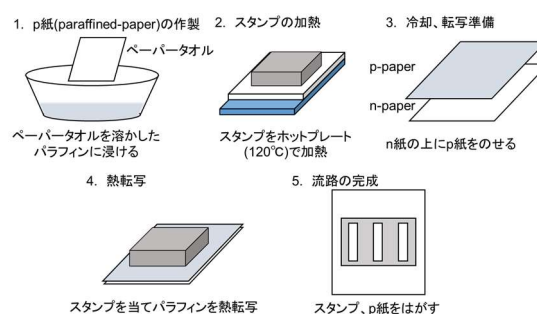


Fig.1 ペーパーベース流路の作製方法

#### 2.2 光学系の構築と分光計を用いた測定

安定した蛍光イメージングを実現するため、スマートフォンや励起光源となるLEDを固定する器具を3Dプリンタで作製した。試料とカメラの距離を30 mmに短縮することで高輝度の画像の撮影を図った。次に、NADHが放出する蛍光波長を観察するため分光計を用いて測定を行った。流路に2.5 μLのNADH溶液を0 mMから1 mMの範囲で0.1 mM刻みでそれぞれ滴下する。5分後に365 nmの励起光を照射し、マルチチャンネル分光器(SR-4, Ocean Insight)でスペクトルを測定した。

#### 2.3 スマートフォンを用いた蛍光イメージング

作製した流路に1 μM-10 mM NADH溶液を滴下する。10分後に365 nmの励起光を照射しスマート

フォン(Google Pixel 7 Pro)で撮影する。撮影した画像を画像処理ソフト ImageJ で処理し、NADH の蛍光を計測した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 作製した流路の評価

パラフィンで加工した流路の画像を Fig.2 に示す。作製した流路の寸法は  $9.96 \times 2.41$  mm であり、面積は設計上の面積の 95% であった。しかし、流路の角が正確に加工できなかった。角の形状を弧にすることで加工精度が向上すると考える。

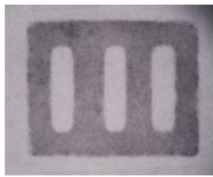


Fig2 パラフィンで加工した流路の顕微鏡写真

#### 3.2 光学系の構築およびスペクトル計測

作製した固定器具の概略図と外観を Fig.3 に示す。スマートフォン、LED、フィルタを固定できること、撮影に支障がないことを確認した。

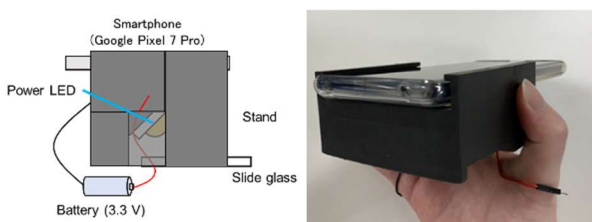


Fig.3 イメージングシステムの概略図(左)と作製したシステムの概観(右)

Fig.4 に分光計で計測した NADH の濃度別のスペクトルを示す。波長 500 nm 付近で蛍光を確認した。この範囲での定量特性は指数関数的であった。また、大きな信号を得るため積分時間を変更して計測を試みた。しかし積分時間 1000 ms では励起光が過大になり蛍光波長帯まで飽和してしまったため蛍光の確認ができなかった。

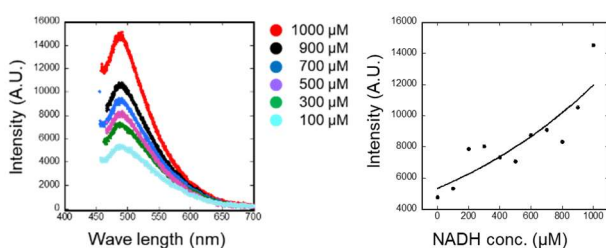


Fig4 NADH のスペクトル(左)と定量特性(右)

#### 3.3 NADH の蛍光イメージング

流路上の NADH の輝度の分布を Fig.5 に、NADH 定量特性を Fig.6 に示す。100  $\mu$ M 以上の NADH 濃度では蛍光を確認することができた。一方、50  $\mu$ M 以下では背景光の影響により NADH の蛍光を確認できなかった。100  $\mu$ M 以上の濃度において NADH 濃度に対する輝度の相関が確認された。バックグラウンドが高い原因は、励起光が 450 nm バンドパスフィルタを通過していることによるものと考えられる。高感度計測のために励起光強度やバンドパスフィルタの種類を最適化する必要がある。

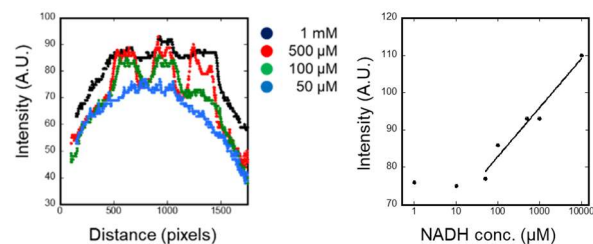


Fig.5 NADH の輝度分布 Fig.6 NADH 定量特性

### 4. 結言

本研究では、生体中の乳酸濃度をカメラで計測するセンサの開発のため、バイオセンサの作製手順の検討や評価を行った。まず、ろ紙を用いた流路の作製を行った。スタンプを用いることで 95% の加工精度を実現した。また、光学系を製作し、測定条件の固定化と高い安定性を有しており、100  $\mu$ M の NADH の蛍光イメージングを実現した。今後は計測条件を最適化し、乳酸脱水素酵素と  $\text{NAD}^+$  を用いた蛍光イメージングを実施する計画である。

### 参考文献

- [1] R. A. Robergs, F. Ghasvand, D. Parker, "Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 287, pp502-516, 2004.
- [2] Y. Muramoto *et al.*, "Estimation of maximal lactate steady state using the sweat lactate sensor", *Scientific Reports*, vol. 13, 2023