

## “Sniffer-camera” using enzyme reaction for visualization of transpired ethanol from palm skin

酵素反応を用いた匂いカメラによる手掌部のエタノールガスの可視化計測

Kenta IITANI, Toshiyuki SATO

*Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University,  
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan*

Xin WANG, Koji TOMA, Takahiro ARAKAWA, Kohji MITSUBAYASHI

*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,  
2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062 Japan*

*TEL: x81-3-5280-8091 FAX: x81-3-5280-8094 e-mail: m.bdi@tmd.ac.jp*

(Received 25 February, 2015 Accepted 20 May, 2015)

An imaging system for gaseous ethanol transpired from human palm skin, based on an enzymatic reaction, was assembled and validated. This system uses a highly sensitive camera that measures gaseous ethanol concentrations as intensities of chemiluminescence from luminol's reaction induced by alcohol oxidase (AOD) and a luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase (HRP) system. Conversion of gaseous ethanol concentrations and distributions proceed on an enzyme-immobilized mesh substrate with luminol solution in a dark box. In order to visualize ethanol transpired from human palm skin, we improved the chemiluminescence sensitivity of the imaging system with a mixture of a high-purity luminol solution of luminol sodium salt HG solution and an enhancer of eosin Y solution. The detection limit of the ethanol concentration was 4.9 ppm. This highly sensitive imaging allows successful visualization of ethanol transpired from palm skin.

**Keywords :** Imaging system, Ethanol, Chemiluminescence, Skin gas, Sniffer-camera

### I. INTRODUCTION

呼吸や皮膚ガスなど生体ガスには代謝や疾患に基づき放出される揮発性物質が含まれ、これら成分を非侵襲的に測定・分析することは代謝機能評価や疾病スクリーニングに役立つものと期待される。<sup>1,2</sup> 例えば、揮発性生体成分の空間分布や経時変化を可視化することで、迅速かつ視認にて評価が可能となる。先行研究では、生化学発光を用いた呼吸中に含まれるエタノール成分の可視化計測及び代謝機能評価が可能となっている。<sup>3</sup> しかしながら呼吸中成分の計測では被験者が検査を意識して呼吸を吐出する必要がある。他方、皮膚ガスは皮膚表面から定

常的に放出されており、皮膚ガスの放出動態を直接かつリアルタイムに可視化できれば、無意識での計測が可能な非侵襲計測法となり得る。皮膚ガス中エタノール成分は呼吸中エタノール成分に比べて微量であるが、先行研究により高純度発光試薬と増感剤の導入によりルミノール化学発光の増幅が可能であることが示されている。<sup>4</sup>

以上を踏まえ、本研究では、対象成分としてエタノールガスを選択し、生体触媒を用いてルミノール化学発光により光学情報に変換し、高感度カメラを用いて撮影すると共に、その時間的・空間的な変化を動画像として捉える「可視化システム」「Sniffer-camera」の構築を行った。また、皮膚ガス計測応用において、飲酒後に手掌部より放出されるエタノールガスの可視化計測を行った。

---

SAS Award was given to this paper presented as Poster Presentation at the 2014 SAS Intelligent Symposium.

## II. EXPERIMENTAL SETUP

アルコール酸化酵素(alcohol oxidase, AOD, A2404-1kU, 10-40 units/mg protein, Sigma-Aldrich Co.) の酵素触媒反応によりエタノールは酸化反応にて過酸化水素を生成し、ルミノール存在下で、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase, HRP, 169-10781, 100 units/mg protein, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) の触媒作用により、化学発光(中心波長: 460 nm)へと誘導することができる。この2種の酵素を紫外線架橋性樹脂 PVA-SbQ (Type SPH, 9C-10L, 10.4 wt%, Toyo Gosei Co., Ltd.)を用いてコットンメッシュ担体に固定化し、酵素メッシュを製作した。まず、システムの高感度化を確認するため、高純度試薬であるルミノール HG (L-HG, 5.0 mmol/l, Lot CDR7140, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) と発光強度を増幅させる増感剤エオシン Y (EY, 3.0 mmol/l, Lot CDM1099, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) の混合溶液の場合と通常ルミノール試薬(5.0 mmol/l, 01253-60, Kanto Chemical Co., Inc.) のみの場合で、各濃度の標準エタノールガスを負荷した際の発光強度のピーク値に基づき、検量線を作成し比較を行った。実験では、L-HG・EY 混合溶液または、ルミノール溶液で湿潤させた酵素メッシュを暗箱内に設置し、エタノールガスを負荷した際に生じる化学発光を高感度カメラ(L3C95-05, EM-CCD, 30 fps, spectral peak 550 nm (quantum efficiency 95%), e2v technologies plc.)にて撮影し、可視化計測を行った。最後に、皮膚面と酵素メッシュとの距離を一定とするセルプレートを導入することで、本システムを飲酒後の手掌部皮膚ガスの可視化に適用した。(Fig. 1) 飲酒実験では、15分間で体重1kgあたり0.4gのアルコールを摂取した健常被験者(20代男性、1名)の手掌部をセルプレートに密着させ、皮膚ガスを酵素メッシュに直接負荷し、飲酒後15分より皮膚ガス中エタノール成分の可視化計測を行った。(東京医科歯科大学倫理審査委員会 承認 No.2012-6)

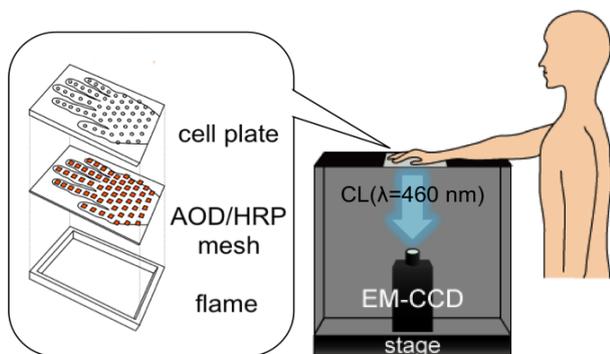


Fig. 1. Imaging system for transpired ethanol from skin.

## III. RESULTS AND DISCUSSION

構築したシステムに L-HG・EY 混合溶液またはルミノール溶液を用いて各濃度の標準エタノールガスを負荷し可視化計測を行った結果、エタノールガス濃度と発光強度に相関性が確認された。通常ルミノール試薬のみの場合、50 ppmであった定量下限が4.9 ppmへと高感度化し、L-HG・EY 混合溶液を使用した場合には4.9~60 ppmの範囲でエタノールガス濃度の定量が可能であった(Fig. 2)。ルミノール試薬には夾雑物質として、製造原料であるヒドラジン及び硫化物イオンが含まれることから、高純度の L-HG を使用することにより、阻害が低減され、発光強度が高くなったと考えられる。さらに、EY は 270 - 518 nm に励起波長、500 - 560 nm に蛍光波長を持つため、ピーク波長 460 nm のルミノール発光が励起光となって蛍光を生じ、高感度カメラの波長感度特性ピークである 550 nm 付近の波長の発光強度が増加することでエタノール検出感度が増加すると考えられる。

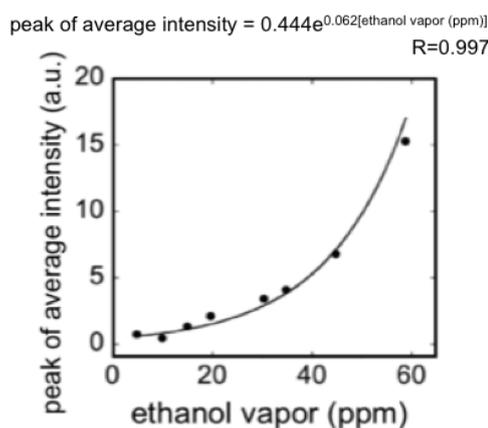


Fig. 2. Calibration curve of the ethanol gas imaging system with L-HG and EY.

続いて、本システムを飲酒後の被験者の手掌部に用いたところ、皮膚より放出されるエタノールガスの可視化が可能であり、発光分布を調べた結果、手掌内の部位により発光強度が異なり、濃度の経時変化が確認された(Fig. 3)。また、本システムにエタノール以外のガスを付加したところ、AODの基質特異性によりエタノール以外のガス種において発光が確認されず、エタノールガスを選択的に可視化計測可能であったため、計測結果は手掌ガス中エタノール成分に由来すると考えられる。さらに、非飲酒時の対照実験では発光が確認されなかった。

以上のことから、可視化システムにより飲酒後に手掌部から放出されるエタノールガスを可視化可能で、濃度

分布をもって手掌部よりエタノールガスが放出されることが示唆された。

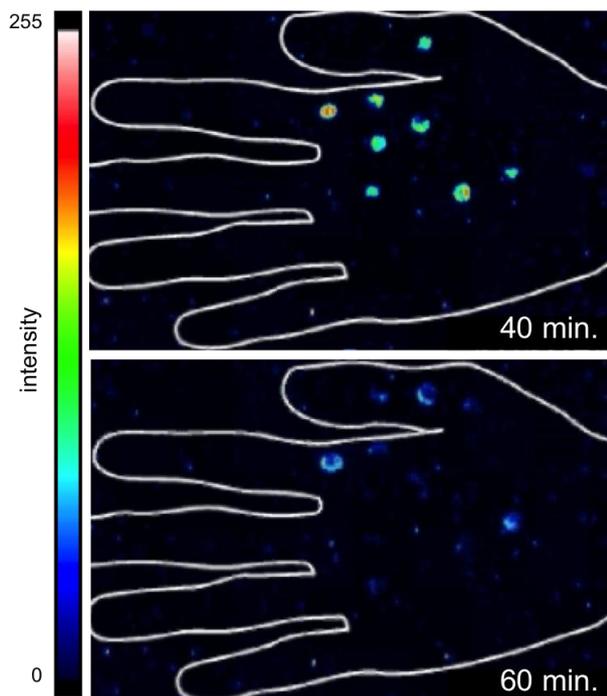


Fig. 3. Time-intensity plot of image of transpired gaseous ethanol on the palm 40 min and 60 min after alcohol administration.

#### IV. CONCLUSIONS

皮膚から放出されるエタノールガスをリアルタイムに可視化計測することを目的に、2種の酵素を用いて皮膚ガス可視化計測システムを構築した。本システムでは各エタノールガス濃度に対する出力値に相関が確認された。また、飲酒後の被験者の手掌部より放出されるエタノールガスの可視化を行い、濃度分布及び時間変化を計測することに成功した。今後、新しい生体ガス計測法として代謝に伴う生体ガスの放出動態について評価を行う。

#### REFERENCES

- <sup>1</sup> M. Shirasu, K. Touhara, *J. Biochem.*, 150(3), 257-266 (2011).
- <sup>2</sup> Kippenberger S, Havlíček J, Bernd A, Thaçi D, Kaufmann R, Meissner M, *Exp. Dermatol.*, 21, 655-659 (2012).
- <sup>3</sup> Arakawa T, Wang X, Kajiro K, Miyajima K, Takeuchi S, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K, *Sens. Actuators B*, 186, 27-33 (2013).
- <sup>4</sup> Arakawa T, Ando E, Wang X, Miyajima K, Kudo H, Saito H, Mitani T, Takahashi M, Mitsubayashi K, *Luminescence*, 27, 328-333 (2012).