

Image-based parallel measurement of alcohol metabolism-related ethanol and acetaldehyde in exhaled air

アルコール代謝に基づく呼気中エタノールおよびアセトアルデヒドの並列画像計測

Riki SHINOHARA* and Yuuki HAYAKAWA*

Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8580, Japan

Kenta IITANI** and Kohji MITSUBAYASHI**

Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Institute of Biomaterials and Bioengineering, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

TEL: +81-3-5280-8091 FAX: +81-3-5280-8094 e-mail: m.bdi@tmd.ac.jp

(Received 30 January, 2023 Accepted 16 May, 2023)

Measurement of volatile organic compounds (VOCs) contained in exhaled air and skin gas would be effective for the noninvasive assessment of metabolism and disease screening. Furthermore, simultaneous measurement of multiple VOCs that were generated at the same metabolic pathway is important for understanding metabolic functions, e.g., evaluation of alcohol metabolism possible by measuring ethanol (EtOH) and acetaldehyde (AcH). Here we report a parallel gas-imaging system of breath EtOH and AcH using the oxidation and reduction reactions of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH). This system allowed gas-imaging of two VOCs by using a high-sensitivity camera to capture a fluorescence of NADH (excitation:340 nm, fluorescence: 490 nm), which increased by the oxidation of EtOH and decreased by the reduction of AcH catalyzed by the ADH in the enzyme immobilized meshes placed parallel in front of the camera. In addition, the system was possible to quantify the EtOH and AcH in exhaled air after alcohol consumption based on the image analysis technique.

Keywords: Enzyme-based biosensor, Gas-imaging, Fluorescence, Alcohol metabolism, Exhaled air

I. INTRODUCTION

呼気や皮膚ガスには疾患や代謝に関連して生成される血中由来の揮発性有機化合物(VOCs)が含まれている。これらの濃度を計測することで、非侵襲的な代謝評価や疫病スクリーニングへの応用が可能で、¹ また新たな計測応用も期待されている。例えば、VOCsの生化学的な評価応用において、代謝経路や疾患メカニズムに基づく複数のVOCsを同時に計測し評価することで、生理学的な

信頼性に資する情報を提供できるものと考えられる。本研究ではアルコール代謝を対象とし、その代謝経路 (EtOH→AcH→酢酸) にて段階的に生成される EtOH と AcH を、同時に並列イメージング可能な装置を開発し、飲酒後のアルコール代謝評価に応用し、その有効性を調べた。

II. METHODS AND MATERIALS

II-A. Construction of gas-imaging system

ADHの可逆反応を利用したEtOHとAcHのバイオ蛍光検出原理をFig. 1 (a)に、またガスイメージング装置の概略図をFig. 1 (b)に示す。可逆酵素であるADHは、その酸化・還元反応を溶液のpHにより制御可能であり、

* 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科

** 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

SAS Award was given to this paper presented as Poster Presentation at the 2022 SAS Symposium.

pH9.0にてEtOHの酸化、pH6.5ではAcHの還元が支配的な反応となる。² その際に、補酵素である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)が生成または消費される。このNADHは自家蛍光(励起:340 nm, 蛍光:490 nm)を有し、この蛍光の増減を高感度カメラで捉えることにより2成分をイメージングすることができる。本システムは暗箱内に設置された励起光源(UV-LED)、励起光用バンドパスフィルタ(BPF, $\lambda = 340 \pm 42.5$ nm)、並列に配置された酵素メッシュ、蛍光用BPF($\lambda = 490 \pm 10$ nm)、高感度カメラを用いて構築した。酵素メッシュは、ADHをコットンメッシュ(15×15 mm²)にグルタルアルデヒドにて架橋結合にて固定化した後、NAD⁺溶液(EtOH用)・NADH溶液(AcH用)をそれぞれに浸漬し、並列に配置した。

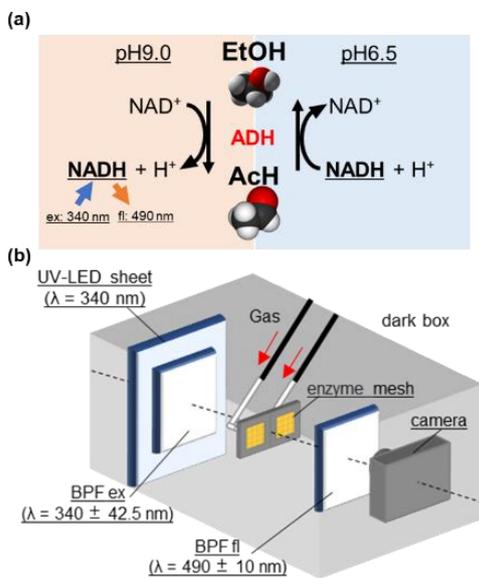


Fig. 1. (a) Biofluorometric detection principle of EtOH and AcH using reversible reactions of ADH, (b) Gaseous EtOH and AcH parallel-imaging system based on detection of NADH autofluorescence.

II-B. Imaging of EtOH and AcH in exhaled air

呼気中EtOHおよびAcHの濃度は肺でのガス交換に基づくことから、血中濃度を反映している。また遺伝子多型により、アルコール代謝に関連する肝臓中のADHおよびアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の活性が異なることから、各濃度は酵素活性にも影響を受ける。本研究では予め、被験者にアルコールパッチテストを実施し、ALDH2不活性型(ALDH2[-])と活性型(ALDH2[+])に分類した。各群の被験者には、4 h以上の空腹状態で0.4 g/体重1 kgの摂取量となるようにアルコール飲料を15分か

け摂取させ、呼気を0, 15, 30, 45, 60, 90分後にサンプルバッグにて回収した。その後、採取した呼気を保湿カバーにて36°C保持後、小型DCダイアフラムポンプを用いて、各メッシュに負荷した(EtOH用酵素メッシュ: 100 mL/min, AcH用酵素メッシュ: 40 mL/min)。ガス計測では「清浄ガス(20 s)→呼気ガス(20 s)→清浄ガス(140 s)」の順でガスを負荷し、得られた動画を画像解析することで、呼気EtOHとAcH濃度の経時変化を調べた(東京医科歯科大学 承認番号: 2012-6)。なお比較のため、検知管(EtOH: 112 L, AcH: 92 L, GASTEC)による濃度計測も実施した。

III. RESULTS AND DISCUSSION

III -A. Measurement of standard gases

Fig. 2(a)は、100 ppm EtOH並びに5 ppm AcHの両ガスを負荷して得られた蛍光強度分布の経時変化を3D表示した結果である。この図に示されるように、EtOHとAcHガス負荷により蛍光強度が増・減し、同一カメラで2成分を並列にて同時イメージングが可能であった。また、動画像より、蛍光変化速度を算出したところ、各ガス負荷による出力を明確なピークを有する曲線として取得できた[Fig. 2(b)]。また異なる濃度の標準ガス濃度を負荷した結果、飲酒時の呼気中濃度を含む、濃度範囲(EtOH: 0.1~1000 ppm, AcH: 0.2~10 ppm)で各ガス濃度を定量可能であった。³

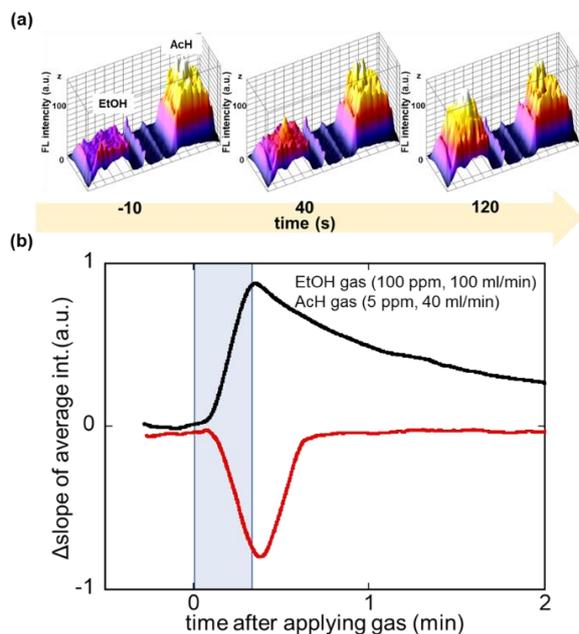


Fig. 2. (a) 3D views of parallel imaging results with application of standard gases (EtOH: 100 ppm, AcH: 5 ppm), (b) Changing with time in differentiations of NADH fluorescence intensity by EtOH & AcH.

III-B. Evaluation of alcohol metabolism

Fig. 3 に、飲酒後 30 分の ALDH2[-] と ALDH2[+] 群の呼気中 EtOH と AcH のガス濃度の比較を示す。なお両群ともに飲酒後 30 分をピークとして、EtOH と AcH のガス濃度の漸次低下が観察され、検知管においても同等の濃度値が得られた。この図に示すように、ALDH2[-] 群は ALDH2[+] 群に比べ呼気中 AcH 濃度が 4.8 倍高い値を示した。これは ALDH2 が AcH を酢酸に代謝分解することから、ALDH が低活性の被験者では血中 AcH 濃度が高くなると共に、肺でのガス交換を介して呼気濃度にも反映し、高い値を示したものと考えられる。

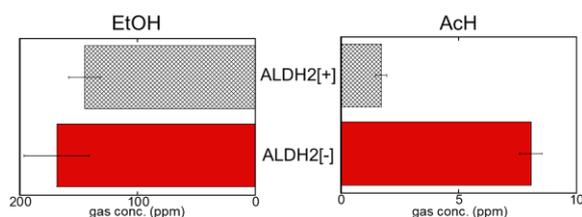


Fig. 3. Comparisons of EtOH and AcH concentrations in exhaled air between ALDH2[-] and ALDH2[+] subject groups 30 min after drinking.

IV. CONCLUSIONS

本研究では、アルコール代謝に関わる EtOH と AcH を対象ガス成分として、ADH の酸化並びに還元反応を利用した並列のガスイメージング装置を構築し、飲酒後の呼気中のガス成分を計測すると共に、アルコール代謝評価を行った。実験の結果、標準ガスを用いたセンサ特性評価にて、本システムは両ガス成分を同時かつ並列イメージング、および飲酒時の呼気レベルを含む濃度範囲にてガス計測が可能で、飲酒後の呼気に含まれる EtOH と AcH のガス計測も行なうことができた。

ACKNOWLEDGEMENTS

本研究の一部は、JSPS 科研費 JP22K14267, JP21H04888 および生体医歯工学共同研究拠点の支援を受けて行われた。

REFERENCES

- ¹ M. Phillips, *Sci. Am.*, 267, 1, pp. 74-79 (1992).
- ² K. Iitani, P. Chien, T. Suzuki, K. Toma, T. Arakawa, Y. Iwasaki, K. Mitsubayashi, *ACS Sens.*, 2, 7, pp. 940-946 (2017).
- ³ A. W. Jones, *Alcohol*, 30, 3, pp. 271-285 (1995).