

〈特集：第25回年次学術集会から〉

非侵襲サンプル（涙液、生体ガス）の 生化学モニタリングについて

三林 浩二

Biochemical monitoring using non-invasive samples such as lacrimal fluid and body gas for daily health care

Kohji Mitsubayashi

Summary Bio/chemical monitoring using non-invasive samples (i.e. lacrimal fluid, saliva, breath, body gas) is important not only for medical but also health care management. For 20 years, we have developed several types of detachable sensors into human cavitas sites (conjunctiva, pharyngeal, oral cavity, etc.) with biocompatible materials and harmless device techniques for daily health care in the future. In this contribution, soft contact-lens (SCL) type and mouthguard (MG) type biosensors have been developed using biocompatible materials and MEMS techniques. On the other hand, a highly sensitive bio-sniffer (gas sensor) for breath acetone (related lipid metabolism) has also been developed using secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) and a UV-LED fluorometric system. In addition, a sniff-cam (spatiotemporal gas imaging system) was developed with an electron multiplying CCD camera which detects bio-chemiluminescence caused by enzyme reactions, thereby providing two-dimensional images of ethanol vapor in body gases (exhaled air and palm skin gas) after drinking.

Key words: biochemical sensing, non-invasive sample, enzyme, contact lens, mouthguard, breath, skin gas, healthcare

I. はじめに

ユビキタス社会の構築が謳われてから10年近くが経過し、医療や健康科学の領域においてもウェアラブルデバイス、センサネットワーク、IoTなどの研究や産業化が活性化している。医療やヘルスケアの領域においても、生体情報を

リアルタイムで常に計測するデバイスや計測技術が求められているが、今後は「生体の化学/生化学情報を捉え、如何に情報化を行なうか」が大きな課題である。例えば化学/生化学情報を測定する時に、採血などを行わず、身体を傷つけない「非侵襲的な計測」が有効と考えられ、涙液や唾液、生体ガスなどの「非侵襲サン

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
センサ医工学分野
〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

Department of Biomedical Devices and Instrumentation,
Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo
Medical and Dental University
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062,
Japan

プル」が注目されている。

もちろん無意識での生化学モニタリングを実現するには、身体に装着していることを感じさせないような「生体親和性や融和性に優れたデバイスやシステム」の開発、また「非接触にて生体情報をモニタリング（イメージング）」する技術が重要である。そして、これらデバイス開発や計測技術には、既存のMEMS素子やバイオセンサ技術を高度化し、機能性材料や生体材料を利用した「高機能なバイオデバイス」を構築する必要がある。本報では、筆者らが涙液や唾液を測定対象として、涙液嚢や口腔などの「体腔」に連続装着できるデバイスとして提案している「キャピタス（体腔）センサ」（Cavitas sensors）について解説する。また疾病や代謝異常に基づく生体ガスの高感度計測を目的とし、代謝酵素を利用し開発した生化学式ガスセンサ（バイオスニファ）及び、その光計測技術を応用した生体臭のバイオイメージングシステム（探嗅カメラ）を紹介し、「非侵襲サンプル」の生化学モニタリングの可能性を示す。

II. キャピタス（体腔）センサ

生体には口腔や咽腔、結膜嚢などの体腔（キャピタス）が多数あり、その体腔を利用したコンタクトレンズやマウスガードなどの医療機器がすでに広く社会に普及している。これらデバイスにセンサ機能を付加することで、涙液や唾液に含まれる生化学的・化学的・生物学的な生体情報をモニタリングし、「健康管理・疾病予防」や「疾病・予後モニタリング」などの日常ケアへの応用が可能となる。筆者らは、これまでに結膜嚢に連続装着が可能な「コンタクトレンズ型センサ」や、嚙下診断を目的とした「光ファイバ型の咽頭圧センサ」、口腔内での留置が可能な「マウスガード型センサ」等を研究・開発してきた。以下に「ソフトコンタクトレンズ型グルコースセンサ」と「マウスガード型センサ」について詳解する。

II-1 Soft-MEMS技術を利用したソフトコンタクトレンズ型グルコースセンサ

2型糖尿病は罹患者数が年々増加しており、特に先進国では大きな社会問題となっている。

血糖値測定では、簡易測定器を用いる自己血糖評価法が用いられているが、血液のサンプリングは患者にとって大きな負担であり、また感染症などの危険性もある。現在、多様な計測法が検討されているが、血液サンプルを直接調べるのではなく、血糖値と相関する各種体液を利用する方法が考えられている。例えば、排泌尿や細胞間質液による評価や、唾液や涙液の利用も検討されている。そこで、高分子材料にMEMS技術を用い、柔軟性に優れたソフトコンタクトレンズ（SCL）形状のバイオセンサを開発し、眼部に装着することで涙液グルコースの変化を *in situ*（その場）モニタリングし、血糖値評価の可能性を調べた。

ソフトコンタクトレンズ（SCL）型バイオセンサの開発では、眼部に装着して長時間の涙液モニタリングを行うことを目的とすることから、医療機器に使われるポリジメチルシロキサン（PDMS）を材料とし、鋳型を用いてコンタクトレンズを作製した。次にポリマーレンズに薄膜電極を形成し、電極感応部にグルコース酸化酵素（GOD）を固定化し開発した^{1),2)}。電極の成膜では、コンタクトレンズの凸面にTi製ステンシルを介して、PtそしてAgをイオンビームスパッタ法にてパターン成膜し、Pt作用電極及びAg電極を形成した。酵素の固定化では、生体適合性MPCポリマー（2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer）を用いて、GODを電極感応部に包括固定化し、柔軟なSCL型グルコースセンサとした（図1）。作製したSCL型センサは、既存のデバイスと異なり、高い柔軟性を有し、曲げ応力に対しても電極層が剥離したり、クラックが生じたりすることはなく、PDMSへの高い密着性を維持しており、電気化学計測に供することができる。なお本センサは、涙液グルコース濃度（0.05～0.36 mmol/L）を含む、0.03～5.0 mmol/Lの間でグルコースの定量が可能であった。

次にSCL型センサを家兎（日本白色種）の眼部に装着し、涙液糖の連続計測を行った。実験では無麻酔の家兎の眼部にSCL型センサを装着し、グルコース（1 g/体重1 kg）を経口より投与した後、涙液糖の濃度変化を調べた。また比較のため耳介静脈より採血し、市販の自己血糖評価キットにて血糖値変化を調べた。なお実験

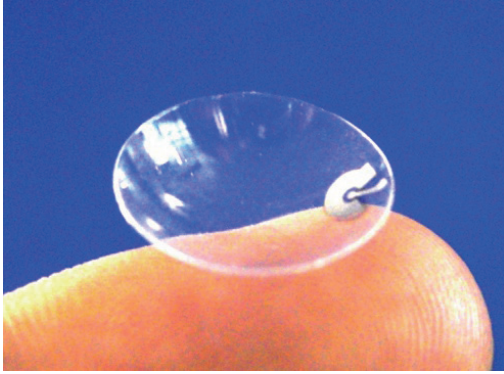


図1. コンタクトレンズ型グルコースセンサの外観写真 (M.X. Chu, et.al., Talanta, 83 (2011), p960-965より)

では、電極、リード線、端子部を有するセンサをコンタクトレンズ上にPDMSにて一体化し、アンペロメトリック計測を実施した。

図2の家兎の実験結果からわかるように、グルコースの経口投与後、血糖値は直ちに上昇を始め、投与後47分にピーク値を示したのに対し、SCL型センサでの出力は約8分の時間遅れをもって血糖値に追従し、ピークに達した後に低下した。本結果より、SCL型センサは涙液糖の濃度変化を連続的にモニタリングすることが可能で、時間的な遅れがあるものの、涙液糖による血糖値評価の可能性が示唆された。今後、薄膜の通信機器やエネルギーシステムの開発などが必要である。なお開発した技術は、生体適合性を要するあらゆる形状のバイオデバイスの開発へと展開できることから、眼部のみならず、皮膚表面や口腔内、さらには体内埋め込み用のナノデバイスへと展開できる。次節では本技術を利用し、通信回路とバッテリーを組み込んだ無線通信機能付きのマウスガード型センサについて説明する。

II-2 マウスガード型グルコースセンサの開発

マウスガード型グルコースセンサもSCL型センサと同様に、MEMS技術を用いて薄膜電極を成形し、グルコースの認識素子としてグルコース酸化酵素 (GOD, glucose oxidase) を用いた。センサ用マウスガードについては、市販のマウスガード材料であるポリエチレンテレフタレー

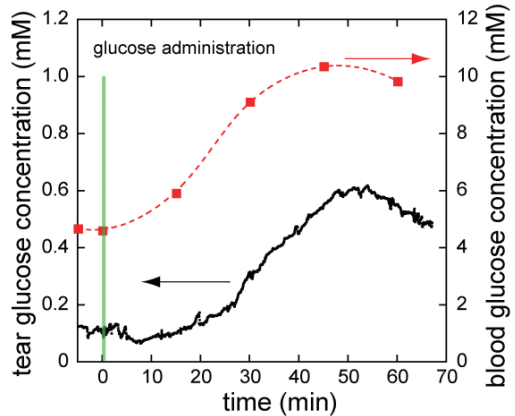


図2. 経口ブドウ糖負荷試験での家兎涙液グルコース (実線) と血糖値 (破線) の変化 (M.X. Chu, et.al., Talanta, 83 (2011), p960-965より)

トグリコール (PETG) を選択し、センサ電極 (Pt と Ag) の薄膜をスパッタ装置にて成膜した。次に、GODをMPCポリマーにて包括固定化し作製した。なおマウスガード型バイオセンサでは、2枚 (上部、下部) のマウスガード用シートを積層し、測定回路と通信回路を被い作製した (図3)。まず歯型を吸引型成型器に設置し、シート材料 (厚さ: 0.5 mm) からマウスガード (下部) を3次元成型した。次に臼歯の頬側に測定回路と通信回路が位置するように固定化し、成型器にて上部のマウスガードを加工した。先述の電極作製方法にて、下部のマウスガードの口腔内側表面部にバイオセンサを構築した。次に測定回路の入力部と電極端子を接合し、マウスガード型バイオセンサとした³⁾。

なお無線計測のため、ポテンシオスタットとA/Dコンバータ、無線通信の各機能を有する「測定・通信回路」を設計・外製した。無線通信における周波数帯域には、産業・医学用機器の周波数帯である2.4 GHz帯を採用し、無線ICチップには低消費電力のCC2500 (Texas Instruments) を用いた。また、ボタン電池 (1.5 V) 1個を定電位電流計測および無線通信の電源とした。センサで得られた出力電流値は、数値データとして受信機に送信され、リアルタイムでPCの画面に表示される。

人工唾液をもとに調整した標準グルコース溶液に、作製した無線機能付きマウスガード型センサを負荷したところ、出力電流値の著しい低

Mouth guards for packing of wireless transmitter

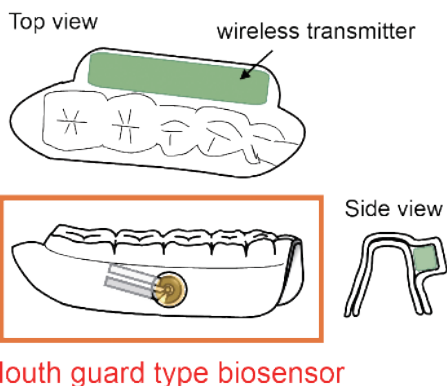
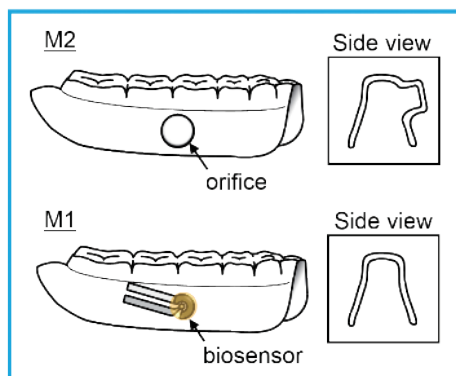


図3. マウスガード形状の唾液用グルコースセンサの模式図 (Arakawa T, et al., Biosensors and Bioelectronics, in press, 2016.より改編)

下が見られた。これは、人工唾液に含まれるタンパク質（ムチン等）がセンサ感応部に吸着することが原因と考えられた。そこで、センサ感応部へのMPCポリマーでのオーバーコートによりタンパク質の影響を防止し、また電極面積を拡大することで出力電流値の増加と無線計測の最適化を行った。改良したバイオセンサではS/N比の向上が確認され、唾液中グルコース濃度（20～200 μmol/L）を含む、10～1000 μmol/Lの濃度範囲でグルコースの定量が可能となった³⁾。次に作製したセンサの選択性を、各種の糖類（ガラクトース、ソルビトール、キシリトール、フルクトース）を用いて調べたところ、グルコースに対して高い選択性を示し、唾液中グルコースの計測が可能と考察された。現在は人体を模したファントムでの実験を経て、本学歯学部との共同研究にて、開発した無線通信機能付きのインビジブル (invisible: 不可視) なマウスガード型センサ (図4) を口腔内に装着し、唾液グルコースの連続計測について実験を進めている。

Ⅲ. 生体ガス（呼吸、皮膚ガス）成分のバイオセンシング

生体には摂取した食物を消化・代謝するだけでなく、その臭気成分を分解する機能や、排泄前の消化物の臭いを体外に放出させない能力がある。この体内の代謝機能を利用することで、



図4. インビジブル (invisible: 不可視) なマウスガード型センサの口腔内への装着写真

嗅覚とは異なる「生体機能に基づく新しいガスセンサ」を開発することができる。生体からは疾病や代謝異常に基づき揮発性成分が放出されることから、そのガス成分を「生成反応の逆反応」を使って高感度かつ選択的に測定できれば、簡便なガス計測にて身体の状態やその異常を検知できる。つまり生体由来の揮発性成分は、代謝評価や疾病スクリーニングが可能な「非侵襲バイオマーカー」と考えられる。

筆者らはこれまでに代謝障害に着目した高感度なガスセンサを開発している。例えば、魚臭症候群と呼ばれる代謝に関わる遺伝的疾患にお

いて、その遺伝的な欠損酵素である肝臓の薬物代謝酵素を逆に利用することで、魚臭成分であるトリメチルアミンを高感度に計測する「生化学式ガスセンサ（バイオスニファ）」を開発した⁴⁾。また同様に、他の薬物代謝酵素を使用することで、口臭成分であるメチルメルカプタンを計測するセンサを開発した⁵⁾。以下に、新たに開発したアセトン用バイオスニファと、さらに生体ガス成分の空間的な広がりや画像として捉える「可視化計測システム：探嗅カメラ」を詳解する。

Ⅲ-1 呼吸による脂質代謝評価のためのアセトン用バイオスニファ

呼吸中のアセトンガスは、糖尿病患者においては健常者より高濃度であることや、肥満や空腹、運動において濃度が増加することが報告されている⁶⁾。空腹時のように、体内の糖質が不足する状態において、更にエネルギーが必要とする運動負荷を加えることにより、脂肪組織から血液中に遊離脂肪酸が放出され、 β 酸化によりアセチルCoAが産生される。そしてアセチルCoAは肝細胞に取り込まれ、ケトン体であるアセトンやアセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸を産生しながら、ATP生成の経路に向う。アセトンは血液を介して呼吸や尿として体外へ排泄され、これら生成されるケトン体の濃度を測定することで、運動時のケトosis状態や脂質代謝などを評価することができる。また、糖尿病においてはインスリンが不足することで、空腹状態と同じ代謝状態となり易く、エネルギー源として脂肪酸を優先的に用いる。そのため脂質代謝の指標として呼吸中アセトン濃度を測定することにより、糖尿病の進行度合や脂肪燃焼状況の評価が可能であると報告されている⁷⁾。

二級アルコール脱水素酵素 (secondary alcohol dehydrogenase, S-ADH) はイソプロパノールなどの二級アルコールを基質とする脱水素酵素で、その逆反応であるアセトンの還元反応を利用することで、電子供与体である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) が酸化され消費される。このNADHは自家蛍光 (ex. 340 nm, fl. 491 nm) を有することから、その蛍光減少を捉えることで「光ファイ

バ型アセトンセンサ」を開発した。本アセトンセンサでは、紫外発光ダイオード (UV-LED, $\lambda=335$ nm) と光電子増倍管 (PMT) からなる「光ファイバ型NADH蛍光検出系」に、S-ADH固定化酵素膜を取り付けて構築した (図5)。S-ADH酵素膜は、多孔質の親水性ポリテトラフルオロエチレン膜に、生体適合膜PMEHを用いて包括固定化して作製した。次に蛍光検出用の光ファイバ先端を、S-ADH固定化膜を装着した気液隔膜フローセルに取り付け、アセトンガス用バイオスニファ (ガスセンサ) とした⁸⁾。なおフローセルの液相部には、NADHを含むリン酸緩衝液を循環させた。

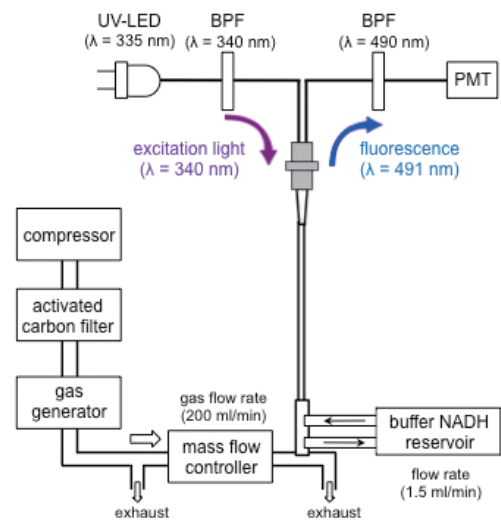


図5. バイオスニファによるアセトンガスの蛍光計測実験系 (Ye M, et al., Biosensors and Bioelectronics, 73, 208-213, 2015 より改編)

S-ADH固定化バイオセンサに各濃度の標準アセトンガスを負荷したところ、図6に示すようにNADHの蛍光出力の減少 (図中は差分増加) と濃度に応じた安定値が得られた。本センサの定量特性を調べたところ、健常者 (200-900 ppb) 及び糖尿病患者 (>900 ppb) の呼吸濃度を含む、20-5300 ppbの濃度範囲でアセトンガスを定量可能 (R=0.999) であった。次に本センサに呼吸に含まれる各種ガスを負荷したところ、他のガス成分にはほとんど出力を示さず、酵素の基質特異性を基づく選択性が得られた。

次に本センサを呼吸中アセトンガスの計測に

適用した。実験では、運動負荷試験に伴う呼気中アセトン濃度の変化をアセトン用バイオスニファにて調べた。予め実験の趣旨を説明し同意を得た健常成人において、食物を6時間摂取しない状態で、エルゴメーターにて50 W（30分間）の運動負荷を行い、その後は安静状態とした。呼気サンプルは、運動負荷30分前より、負荷後150分までの間で適宜サンプルバックに採取し、S-ADH固定化バイオスニファにてアセトンガスの濃度測定を行った。

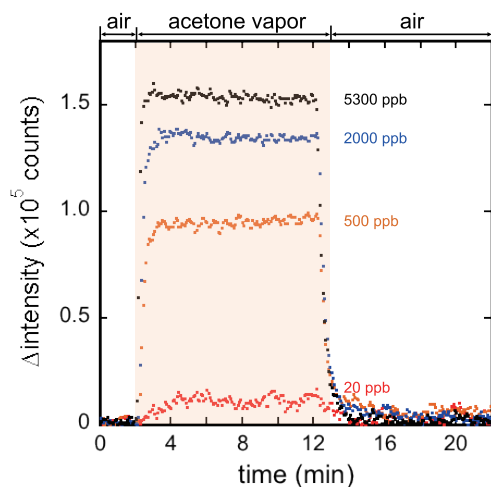


図6. 各濃度の標準アセトンガスに対するS-ADH固定化バイオスニファの出力応答 (Ye M, et al., Biosensors and Bioelectronics, 73, 208-213, 2015 より改編)

運動負荷での濃度変化を調べたところ（図7）、運動に伴うアセトンガス濃度の上昇が観察され、運動終了後15分から30分で最大濃度を示した。空腹状態での運動負荷に際して、脂肪代謝により肝細胞でケトン体が生成され、揮発性のアセトンが呼気として放出されることで、呼気濃度が上昇したと考察された。今後、本センサを用いることで、呼気中のアセトンガスの濃度計測や、その経時的な変化、そして脂肪代謝の度合いを評価できるものと考えられる。

Ⅲ-2 エタノールガス用探嗅カメラによる呼気・皮膚ガスの可視化計測

揮発性成分の濃度分布をリアルタイムで画像化し、時間的・空間的情報を兼ね備えた可視化

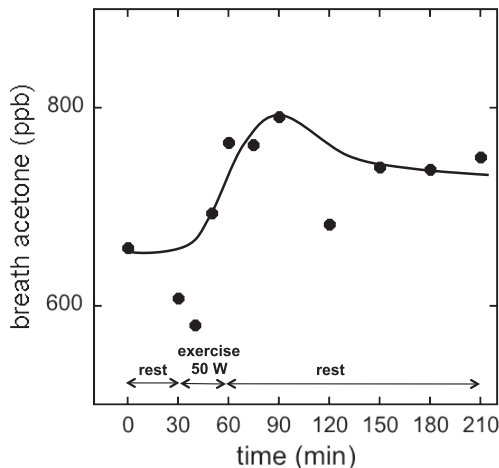


図7. 運動負荷（50W 30分間）における呼気アセトン濃度の経時変化 (Ye M, et al., Biosensors and Bioelectronics, 73, 208-213, 2015 より改編)

計測が可能となれば、生理代謝や疾病スクリーニングなどに加え、ガスの発生源を「嗅ぎ探る（探嗅）」ことが可能となる。そこで、飲酒後の生体ガスに含まれるエタノールをモデル成分とし、バイオスニファの技術を用いて、エタノールガスを二次元動画像として捉える「可視化システム（探嗅カメラ）」を構築した。そして、実際に呼気中エタノールガスのリアルタイム可視化、及び簡便なアルコール代謝評価の応用を行った。

本システムでは、酵素固定化メッシュと電子増倍型CCD（EM-CCD）カメラを用い、酵素反応に伴うルミノール発光を動画像として撮影する。酵素メッシュには、エタノールガスを認識する素子である「アルコール酸化酵素（alcohol oxidase, AOD）」と、その酵素反応の生成物である過酸化水素を基質として、ルミノール発光を生じる「西洋わさび由来ペルオキシターゼ（horseradish peroxidase, HRP）」の2種類の酵素をメッシュ担体に同時固定化した。作製したAOD/HRP固定化メッシュをルミノール溶液で湿潤させて、標準エタノールガスを一定流速で酵素固定化膜に負荷し、膜上に生じた発光をEM-CCDにて動画像撮影した。実験の結果、標準エタノールガスの負荷点を中心とした二次元のルミノール発光が観察され、エタノールガスの濃度分布及び経時変化を可視化計測することが可能であった。また可視化画像の発光強度と

ガス濃度との間に高い相関性が確認され、酒気帯び運転の判断値の78 ppm (0.15 mg/L) を含む、30 ~ 400 ppm の範囲でエタノールガス濃度の定量が可能であった^{9), 10)}。

次に可視化システムを、飲酒後の呼気中エタノールガスの可視化計測に適用した (図8)。

複数の健常被験者において、4時間以内での摂食がない状態でアルコール摂取 (0.4 gエタノール/体重 1 kg) の後に、呼気サンプルを本システムに供したところ、標準エタノールガスと同様に可視化の動画画像が得られた。この動画画像をもとにガス濃度を解析した結果、呼気中エタノールガス濃度は飲酒後約30分でピーク値に達し、その後、既報でのアルコール代謝の評価結果と同様に、一次関数的に濃度が低下していく様子が観察された (図8左)。また予め、アルコールパッチ試験にて飲酒の代謝能 (ALDH2 [+], [-]) を判定し、同様の飲酒後の呼気可視化実験を行ったところ、図8右に示すように、アルコール代謝能のALDH 2 [+] を有する被験者ではALDH 2 [-] に比して、可視化出力が有意に小さく、アルコール代謝能の評価に利用可能であった^{9), 10)}

また探嗅カメラにて、高純度ルミノール溶液と増感剤を活用することで、高感度化を図るこ

とが可能で、3 ppmからのエタノールガスの可視化を行うことができ、飲酒後の皮膚ガス計測に適用した。前述の実験同様、一定量のアルコールを飲酒し、手掌部と手指部でのエタノールの可視化実験を実施したところ、図9に示すように手掌部から出力の漸次増加が観察された¹¹⁾。可視化システムを高感度化することで、手掌部より放出される僅かなエタノールガスの検出および可視化が可能であり、発生しやすい皮膚部位などを嗅ぎ探す (探嗅) ことができる。なお開発した可視化システムはエタノールガスにとどまらず、固定化する酵素種や反応系を選択することで、多様な匂い成分を可視化計測できることから、簡易的な疾患のスクリーニングや口腔衛生診断、ガス発生源の探嗅などへの展開が期待される。

IV. おわりに

今後の医療及びヘルスケアにおいて、非侵襲サンプルより生体情報を計測できるセンサデバイスやシステムが不可欠であり、本報ではその例として、柔軟性に優れたソフトコンタクトレンズやマウスガードを利用した「キャビタス (体腔) センサ」と、生体の代謝機能を光学系と融

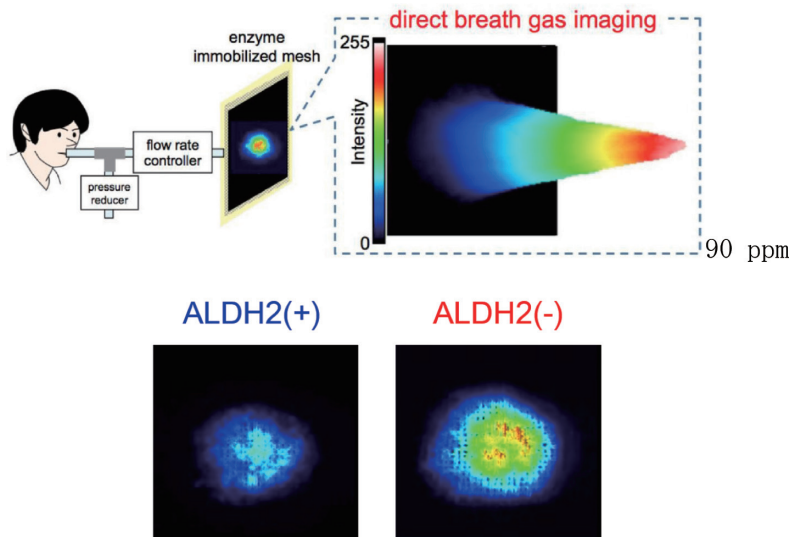


図8. アルコール摂取後の呼気中エタノールの可視化 (上) とALDH2 (+,-) の呼気比較 (下) (Sensors and Actuators B, 186, pp.27- 33, 2013より改編)

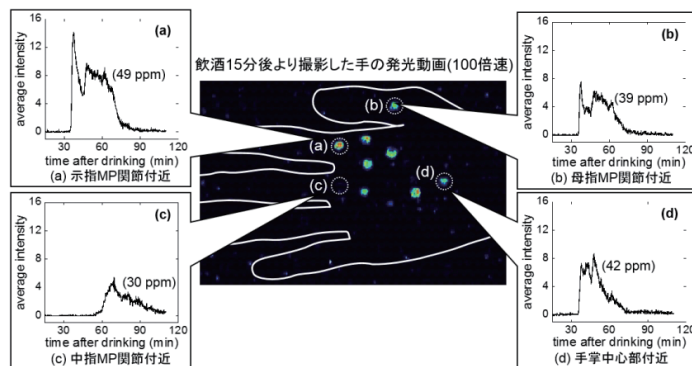


図9. アルコール摂取後の手掌からの皮膚エタノールガスの可視化 (Biosensors and Bioelectronics, 67, pp.570-575, 2015より改編)

合させた高感度なアセトンガス用センサ及び可視化システム(探嗅カメラ)を紹介した。今後、コンタクトレンズやマウスガードなどが機能化し、オーダーメイド化が進むことが予想され、また生体ガスの高感度計測や可視化による疾病スクリーニングが考えられることから、非侵襲サンプルを用いる「新たな医療&ヘルスケア」が展開されるものと期待される。

V. 謝辞

本報の内容は本学学生並びに多数の共同研究者との研究に基づくものであり、各種研究支援(日本学術振興会科学研究費補助金、JST・東京都地域結集型研究開発プログラム、文部科学省特別教育研究経費「異種バイオサイエンス技術の連携によるネオバイオロジー推進基盤創出事業[センシングバイオロジー領域]」)による成果を含むものである。

参考文献

- 1) Chu M.X., Miyajima K., Takahashi D., Arakawa T., Sano K., Sawada S., Kudo H., Iwasaki Y., Akiyoshi K., Mochizuki M., Mitsubayashi K.; Soft contact lens biosensor for in situ monitoring of tear glucose as non-invasive blood sugar assessment, *Talanta*, 83, 960-965, 2011
- 2) Chu M.X., Shirai T., Takahashi D., Arakawa T., Kudo H., Sano K., Sawada S., Yano K., Iwasaki Y., Akiyoshi K., Mochizuki M., Mitsubayashi K.; Biomedical soft contact-lens sensor for in situ ocular biomonitoring of tear contents, *Biomed Microdevices*, 13, 603-611, 2011.
- 3) Arakawa T., Kuroki Y., Nitta H., Chouhan P., Toma K., Sawada S., Takeuchi S., Sekita T., Akiyoshi K., Minakuchi S., Mitsubayashi K., Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, in press, (2016).
- 4) Mitsubayashi K., Hashimoto Y.; Bioelectronic Sniffer Device for Trimethylamine Vapor Using Flavin Containing Monooxygenase, *IEEE SENSORS JOURNAL*, 2 (3), 133-138, 2002.
- 5) Mitsubayashi K., Minamide T., Otsuka K., Kudo H., Saito H.; Optical bio-sniffer for methyl mercaptan in halitosis, *Analytica Chimica Acta* 573-574, 75-80, 2006.
- 6) Blaikie TP1, Edge JA., Hancock G., Lunn D., Megson C., Peverall R., Richmond G., Ritchie GA., Taylor D.; Comparison of breath gases, including acetone, with blood glucose and blood ketones in children and adolescents with type 1 diabetes, *J Breath Res.* 8(4) 046010, (2014).
- 7) Wang Z., Wang C.; Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements, *J Breath Res.* 7 (3), 037109 (2013)
- 8) Ye M., Chien PJ., Toma K., Arakawa T., Mitsubayashi K.; An acetone bio-sniffer (gas phase biosensor) enabling assessment of lipid metabolism from exhaled breath, *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 208-213, 2015.
- 9) Wang X., Ando E., Takahashi D., Arakawa T., Kudo H., Saito H., Mitsubayashi K.; 2D spatiotemporal visualization system of expired gaseous ethanol after oral administration for real-time illustrated analysis of

- alcohol metabolism, *Talanta*, 82, 892–898, (2010).
- 10) Arakawa T., Wang X., Kajiro T., Miyajima K., Takeuchi S., Kudo H., Yano K., Mitsubayashi K.; A direct gaseous ethanol imaging system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath, *Sens. Actuators B*, 186, 27–33, (2013).
- 11) Arakawa T., Kita K., Wang X., Miyajima K., Toma K., Mitsubayashi K.; Chemiluminescent imaging of transpired ethanol from the palm for evaluation of alcohol metabolism, *Biosens. Bioelectronics*, 67, 570–575, (2015).