

生体内モニタリング用
微細針型バイオセンサの開発

2014年3月

枝川和明

目次

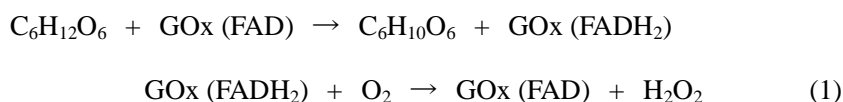
序章	1
1. 研究の背景	1
2. 本論文の目的と構成	10
第1部 生体内測定用微細針状酵素固定センサの作製	17
第1章 フレキシブルな SUS 電極を用いたグルコースセンサの作製	17
第2章 ポリグルタミン酸を内部膜酵素固定膜として用いた 微細針状グルコースセンサの作製	26
第3章 ポリグルタミン酸を用いたグルコース/ラクテートデュアルバイオセンサの作製	36
第2部 種々の生体適合性材料を用いた血管内測定用微細針状 グルコースセンサの作製及びそのインビボ評価	49
第4章 ヘパリンを用いた微細針状グルコースセンサの作製及びその評価	49
第5章 ヘパリン/ウロキナーゼを用いた 微細針状グルコースセンサの作製及びその評価	58
第6章 微細針状グルコースセンサを用いた血管内グルコースモニタリング	64
第7章 種々の生体適合性材料を導入した 微細針状グルコースセンサを用いた血管内モニタリング	71
第8章 まとめ	85
謝辞	87

序章

1. 研究の背景

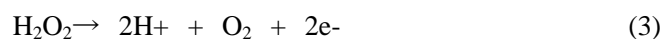
化学物質を選択的に認識して、これの反応を触媒する酵素は 1940 年代から分析試薬として用いられていた。バイオセンサは酵素の反応によって生成する化学物質か、消費される化学物質を測定することによって元の化学物質を定量することができる。例えば、血糖値を調べる場合、血液中にはタンパク質、有機化合物やイオン類など多種類の化学物質が含まれているが、この中のグルコースを測定するためには、共存する他の化学物質を取り除くか、これらの化学物質が共存しても選択的に反応する試薬を用いる必要がある。グルコース酸化酵素(glucose oxidase, GOx)やグルコース脱水素酵素(glucose dehydrogenase, GDH)は、グルコースと選択的に反応することから、これらの酵素を用いることによりグルコースを定量することができる。¹

GOx を用いたグルコースセンサの測定原理を Fig. 1 に示す。GOx 固定電極を用いて試料溶液にグルコースを添加すると、式 1 のように GOx の触媒作用により酵素が還元され、過酸化水素が生成する。



*FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド) 補酵素

この試料中の酸素の消費量または過酸化水素の生成量を測定することにより、グルコース濃度を定量できる。そのため、酸素電極または過酸化水素電極が用いられている。



酵素および過酸化水素は、式(2)および式(3)に示す電極反応により、還元および酸化されることからそれぞれの濃度を電気化学的に容易に導くことができる。

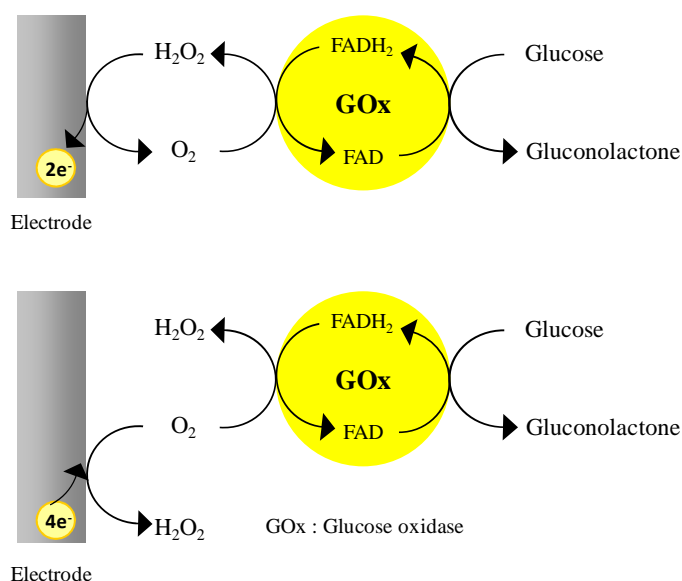


Fig. 1 Measurement principle of amperometric glucose sensor using glucose oxidase.

ここで、糖尿病という病気が知られている。糖尿病とはインスリンの作用不足に基づく慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群であり、代謝以上が軽度であれば自覚症状がほとんど現れないことから、長期間放置されることがある。これを放置すると糖尿病性の網膜症、腎症などの慢性合併症を引き起こすことが知られている。2010年のWHOの調査によると、この病気にかかっている人の数は世界で2億8500万人(日本でも700万人以上)であり、2030年には3億4700万人になると予想されている。²糖尿病は1型糖尿病と2型糖尿病に大別されるが、約90%の糖尿病患者は2型糖尿病である。この合併症を予防する有効な方法が、自己による血糖値のコントロールである。そのためにグルコースの測定が簡単にできる方法の開発が強く要望されている。

また、運動のエネルギーとして糖が使われる時、生成される物質である乳酸は、酸であることから血液中に多くが蓄積され、血液が酸性に傾き、筋肉の動きを阻害することが知られている。安静時や、運動強度が高くない時には、乳酸は生成されると同時に、酸化されエネルギーとして利用されるので、血中乳酸は増加することなく、正常値(0.5~1.78 mM)を保っている。しかし、運動強度がある一定レベルを超えると、酸化が追いつかず、血中乳酸が溜まっていくことから、急激に増加した乳酸により、筋活動が困難になる。一方で、脳内においてもグリコリシス(解糖)や代謝においても乳酸は生成され、脳内の乳酸値が脳外傷患者への影響を及ぼすことも報告されている。乳酸値に

限らず糖や生体にとって必須アミノ酸であるグルタミン酸等も脳にとって重要であるが、それらのメカニズムについてはまだ十分に解明されていない。そこで、脳内の乳酸値をバイオセンサでモニタリング出来れば脳内の代謝やメカニズム解明などの医療アプリケーションとして有用である。

一方、近年救命救急治療の現場においては非糖尿病患者であっても、事故や震災時等により敗血症を発症すると、インスリン抵抗性が生じて急性高血糖状態になることが知られている。³⁻⁵ 敗血症とは、感染症に起因する全身性炎症反応症候群であり、敗血症患者においてはインスリンが過剰投与されるが、術後敗血症が治癒するとインスリンの効果が高まり、急激に低血糖状態におちいることがある。血糖値が 30 mg/dL 以下の低血糖状態では昏睡状態に陥り、この状態が続くと脳にダメージを与え、更には死に到るケースもあることから、低血糖状態ではグルコース投与等の迅速な対応が求められる。2012 年改訂版 Surviving Sepsis Campaign Guidelines (SSCG)³ では、敗血症患者の血糖コントロールを厳密に行うことが推奨されている。推奨度を 1(強い)、2(弱い)の 2 つに分類し、エビデンスグレードを A(高)~D(弱)の 4 つとして、敗血症における血糖コントロールに対して以下 4 つの推奨がまとめられている。

1. 重症敗血症や高血糖を伴う集中治療(ICU)患者には血糖値を下げる目的でインスリンの持続静注を行う(1B)
2. インスリン持続静注による血糖値調節は、180 mg/dL (10 mM)未満を目標とする(1A)
3. インスリン持続静注を受ける患者の血糖値とインスリン投与速度が安定するまでの 1~2 時間ごとの血糖値測定(1C)
4. 毛細血管からの採血による血糖値測定は注意が必要である(1C)

推奨 2 において、血糖値のコントロールは 180 mg/dL を目標とされているが、これは正常血糖範囲(80-110 mg/dL)でのコントロールでは 3 日以内で低血糖症による死亡率が高いためである。しかし、180 mg/dL においては、まだ高血糖状態であることから合併症のリスクが高まる。また、SSCG では、術後も 1~2 時間ごとの血糖値測定が必要とされているが、特に敗血症回復後の急激な低血糖症を認識するためにも測定回数を増やすことが望ましい。しかし、医療現場の現状として人員確保が難しいことも考慮されている。

ここで、現在血糖値管理を行うために市販されている血糖値測定器の一例として、血糖自己測定(self-monitoring of blood glucose, SMBG)として指先等の血液をランセット(穿刺)を用いて採血

し測定を行う簡易型血糖測定器 Arkray 社のグルコメーター等 (Fig. 2 左)、体内のグルコース濃度をリアルタイムで連続測定を行う皮下留置型持続血糖モニタリングシステム (Continuous Glucose Monitoring System, CGMS)として Medtronic 社の Mini Med 等 (Fig. 2 中) 及び、静脈から持続的に採血を行いモニタリングを行う日機装社の人口膵臓 (Fig. 2 右) 等がある。



Fig. 2 Commercial equipments for blood glucose measurement.

現在、糖尿病患者の血糖値測定で利用されている血糖値計は、簡易携帯型のものが主流で、使い捨てのセンサチップが血糖値計測に使われている。⁶ このセンサチップに用いられている酵素電極法では、GOx を利用した GOx 電極法、アドバンテージなどのグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を利用した GDH 電極法、その他のメディセーフなどの発色色素を利用した比色定量法がある。GOx 電極法では溶存酸素濃度の影響を受け、低酸素状態では実際の血糖値より低い値を示すことから、実際の血糖値と測定値の間に誤差を生じる問題点がある。一方、GDH 電極法 (補酵素 PQQ) は、溶存酸素濃度の影響を受けないが、輸液に含まれるマルトース等、グルコース以外の糖が多く存在する場合、高値を示す危険性がある。⁷ しかしながら、最近では NAD, NADP および FADH を補酵素とする GDH はグルコース以外の糖との反応性が非常に低いもしくはないことが確認されていることから、今後はこれらの酵素を用いた血糖値計にシフトしていくと思われる。^{8,9}

簡易血糖値計を利用した測定方法では、穿刺針を指先等に突き刺してから採血を行うため、一日に約 7-8 回の SMBG を行うことが必要な糖尿病患者にとっては大変な負担となる。¹⁰ また、敗血症患者においては、SSCG により推奨されている 1-2 時間ごとの血糖値測定では、敗血症回復後の急激な低血糖症を認識することは困難であり、測定回数を増やす必要があるが、医療現場の現

状として人員確保が難しい。また、血中血糖値とのタイムラグが生じる事¹¹や低血糖を見落とす可能性もある。

一方、皮下留置型 CGMS は、睡眠時の血糖値測定の煩わしさを軽減し、測定値をにインスリンポンプにフィードバックして使用でき、患者の生活の質(QOL)の向上に貢献し、また、低血糖時の発作の早期発見につながることから開発が行われている。¹²⁻¹⁵ 現在、米国食品医薬品局(FDA)の承認等、実用されている CGMS としては、皮下にセンサを留置する低侵襲アンペロメトリー法 (Medtronic 社 MiniMed Paradigm[®] REAL-Time System¹⁶、DexCom 社 Dexcom SEVEN Plus¹⁷、Abbott Diabetes Care 社 FreeStyle Navigator^{®18}) 等がある。また、日本においても 2009 年 10 月の薬事承認を取得以降糖尿病患者の診断および血糖コントロールに急速に活用されている。しかしながら、皮下留置型 CGMS においては血中血糖値とのタイムラグが生じる事や^{19,20} 低血糖を見落とす可能性もある。²¹ また、いずれのセンサも SMBG による補正が必要である。

一方、静脈から持続的に採血を行いモニタリングを行う日機装社の人口臍臓では、血液中の血糖値を測定していくことからより正確なモニタリングが可能である。しかしながら、装置が高価であり普及が難しく、血液の廃棄量(2 mL/h)を少なくすることも課題としてあげられる。

敗血症患者の血糖モニタリングにおいては、特に急激な血糖値の変化を迅速に認識し、グルコース投与等の対応が必須である。ここで、血液を測定する CGMS では皮下間質液を測定する CGMS に比べてタイムラグも低く、急激な変化に対する相関性も高い。そこで、血液中のグルコースを直接測定することが出来れば、血糖値の急激な変化も追従し低血糖を早期認識出来ることが予想され、血管内に留置し、血液を直接測定する CGMS は、敗血症患者の血糖管理に非常に有用と思われる。

生体内埋め込み (*in vivo*) 型センサを作製する上で、センサ設計は非常に重要である。生体内の血糖値をリアルタイムでモニタリング可能な生体内設置型グルコースセンサデザインにおいて求められるファクターを以下に示す。^{22,23}

1. 小型化(低侵襲)

In vivo 測定では、生体内にセンサを設置するため、できるだけ低侵襲で痛みを軽減し生体への負担を少なくする必要がある。そのため、センサは極力微細・微小化することが求められる。外径

が 200 ミクロン以下の針では、痛みを感じる事が少ないといわれていることから、200 ミクロン以下のセンサ径でデザインすることが望ましい。

2. 透過選択性(基質特異性、生体内に存在する存在する電気化学的活性な物質の影響を抑制する)

電極に酵素 GOx を固定したセンシング膜は、還元性物質のアスコルビン酸や尿酸、風邪薬の成分であるアセトアミノフェンなどの生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)の影響を受ける。したがって、これらの影響を抑制するような選択透過性膜の導入が必要である。カチオン交換膜であるナフィオン²⁴は静電的反発作用により、アニオン性の尿酸やアスコルビンなどの影響を取り除くことができる。また酢酸セルロースは、分子サイズによるふるい効果を利用して透過抑制を行うことができる。センシング層の外部膜として導入した場合、基質(グルコース)の透過阻害も起こるため、一般的には内部膜として導入し、分子サイズの小さい過酸化水素との区別化により妨害物質の透過を抑制する。ポリフェニレンジアミン^{25,26}、ポリピロール²⁷、ポリフェノール²⁸などの電解重合膜も選択透過性膜として用いられている。

3. 耐久性(物理的強度)

センサを生体内に留置する場合、破損を防ぐために物理的強度を考慮する必要がある。生体内にセンサを挿入する時や設置時にセンサが折れ曲がり破損する可能性がある。電極針材としては、白金は過酸化水素に対して強い触媒作用があることから埋め込み型酵素固定化電極の電極材料として使用されている。

4. 生体適合性

一般に、生体内にセンサを留置すると、生体は体内に存在する異物を排除しようとする防御のための生体反応が起こる。体液と直接接触するセンサ表面にはタンパクの吸着が起こり、グルコースの透過が抑制されるため、センサ感度の低下が起こる。そのため、タンパクを抑制するような膜の被覆が必要である。また、血管内の血液中のグルコース測定においては、皮下間質液に比べてフィブリノゲン等のタンパクが多く存在していることから皮下間質液測定を想定したよりも更に高い生体

適合性(抗血栓性)が必要である。

5. 安定性(長期安定性)

生体内にセンサを設置する *in vivo* 測定環境は、40 °C、pH 7.4 近傍での酵素活性の維持が重要であるが、現実的には酵素活性の低下は免れることはできない。そのため、酵素活性が低下してもセンサ感度の低下に現れにくくするため、大過剰の酵素固定が行われており、また、センサを留置した状態でのタンパクの吸着が一定になれば長期間の安定性が期待できる。また、センサの安定期間が長くなれば補正回数を減らしての測定が可能となる。

6. 安全性(無毒性)

インビボ測定用のセンサは体内に埋め込むことから高い安全性が求められる。医療用具および医療材料の安全性の評価は、厚生労働省医薬局や FDA (Food and Drug Administration) の報告によると、国際標準である ISO10993 基準で検査されており、²⁹これに従い基準をクリアする必要がある。安全性評価を受けた動物由来医療品による感染のリスクは低いが、動物由来材料は、そのリスクを完全に排除することはできない。そのため、より高い安全性が求められる。

上述の様に、作製において様々なファクターがあり *in vivo* 型センサを作製するには目的に応じ様々な方法を検討する必要がある。酵素の固定方法もその 1 つであり、電極への酵素の固定はその活性を損なわない方法が望ましく、用いる電極や酵素の種類に応じて様々な固定化法が考案されている。Fig. 3 に固定化法をまとめた。固定化法には、物理的方法と化学的方法とがあり、物理的方法には、包括法と吸着法がある。包括法は、酵素を高分子マトリックス中に包括し固定する方法である。包括法の一つである電解重合法は、通電した部位のみに膜形成が可能であることから、微小酵素センサの作製が容易であるといった特徴を有する。³⁰⁻³²吸着法では、担体に酵素を物理吸着させる方法であり、吸着力が弱く溶出しやすい場合がある。そこで半透膜で被って保護する方法と併用されることがある。そして化学的方法には、架橋法と共有結合法とがある。架橋法は、グルタルアルデヒドのような官能基を複数持つ試薬を用い酵素間に共有結合の橋をかけ、酵素の膜を作る方法である。³³⁻³⁷ また、牛血清アルブミン(BSA)とグルタルアルデヒドを用いた架橋化法は、

埋め込み型グルコースセンサの作製方法として最も一般的な方法として取り入れられている。共有結合法は、固定膜の官能基(アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基など)と酵素の間に共有結合を形成し、酵素を固定化する方法である。^{38,39}

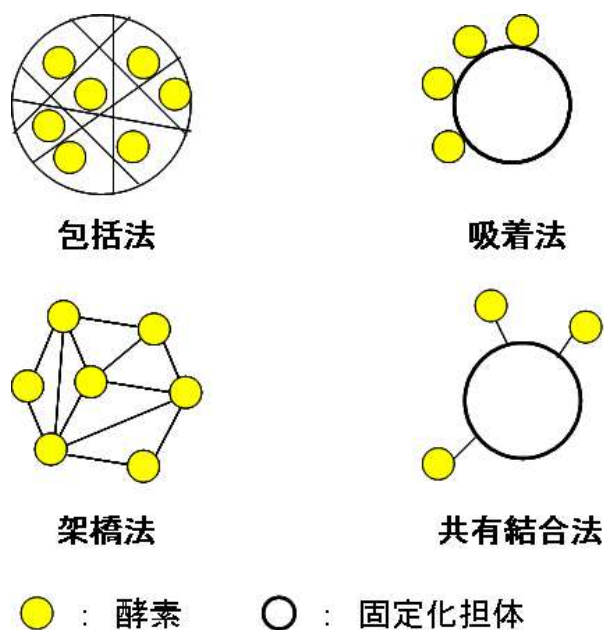


Fig. 3 Enzyme immobilization procedure.

また、作製されたセンサの生体内測定でのセンサ精度を評価する方法として、エラーグリッド解析がある(Fig. 4)。1987年にClarkeらが考案したエラーグリッド解析(Clarke -Error Grid Analysis : EGA)⁴⁰は、血液中の実際の血糖値とセンサから得られる血糖値を比較するものである。センサ値と血糖値は、A～Eの5つの領域に分けて評価する。センサ値と血糖値をプロットし、プロットした点が斜め45°の線上にのればセンサ値は血糖値と完全に一致したことになる。エラーグリッドは、A～Eまでの5つの領域に分けられており、A(臨床的測定精度を有する)、B(Aには劣るが測定精度は臨床的に問題ない)、C(不必要な処置を実施する恐れがある)、D(低血糖及び高血糖であることを見過ごす恐れがある)、E(低血糖であるが高血糖であると診断する可能性があるなどの混乱を招く恐れがある)である。臨床への適用を考えると、すべてのプロットがAおよびBの領域に入ることが望ましく、Aの領域にほとんどが入ることが望ましい。⁴¹

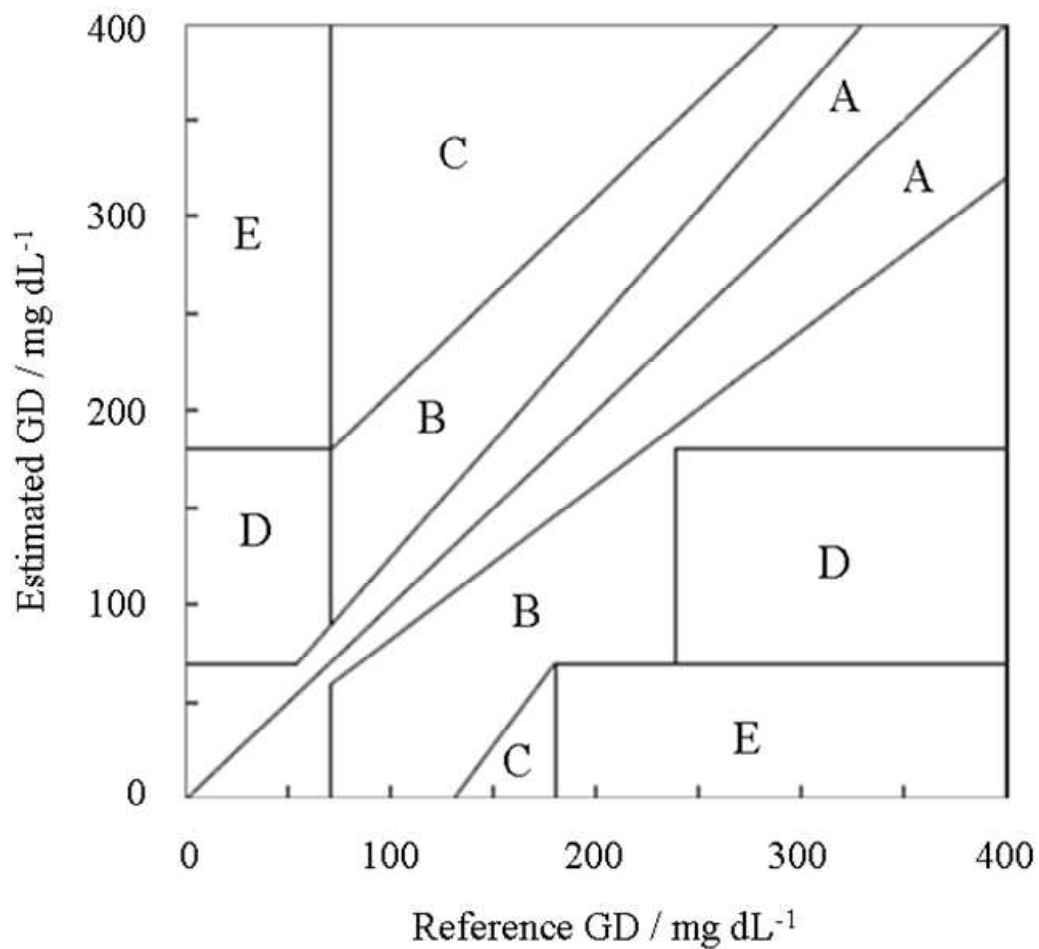


Fig. 4 Error grid analysis for each single blood glucose meter. Single readings of the glucose meters are plotted against the mean of duplicate measurements from the reference method.

このエラーグリッド解析は、センサ値を血糖値に換算し、センサ精度を評価するために用いられており、センサを留置し測定する CGMS の体内埋め込み型グルコースセンサでは、補正法を用いて換算される。インビボ測定でのセンサ値(電流値)の血糖値への換算には、二つのパラメーターが用いられる。モニタリングしたセンサ値(電流値)と同時間点に対応する SMBG 用の血糖値計の測定値(血糖値)データをもとに算出する。換算方法については、1 点補正法が用いられる。^{42,43}1 点補正法は、選択した 1 点のセンサ値と血糖値の割合 S (センサ感度) から換算する方法である。バックグラウンド電流値 (I_0) の変動や、電気化学的活性な物質(妨害物質)の影響を無視し、 I_0 を 0 と

みなす方法である。

1 点補正法(one-point calibration)

$$S = I_1 / BG_1$$

$$G(t) = I(t) / S$$

I: センサ電流値, BG: 血糖値計により測定した血液中の血糖値,

S: センサ感度, G(t): 換算した血糖値

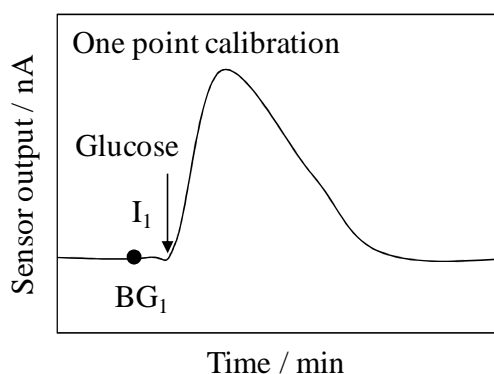


Fig. 5 One point calibration.

2. 本論文の目的と構成

生体内での測定においては、生体への損傷の軽減、並びに痛みや違和感を少なくするにはセンサがフレキシブルであることが望ましい。また、用いる材料も安全性の高いものを用い必要がある。そこで、第1章から第3章までを第1部とし、センサ作製材料に注目し、フレキシブルな材料の導入、並びに非動物性由来の材料を用い生体内測定用グルコース又はラクテートセンサの作製を試みた。

敗血症患者においては、敗血症発症によりインスリン抵抗性が高まりインスリンの過剰投与が必要である。そのために、非糖尿病患者においても厳格な血糖値モニタリングが術後患者の生存に大きく影響してくる。従来の皮下間質液測定用CGMSでは、血中血糖値とのタイムラグや数値のズレが生じやすいため、より迅速に、また確実に血糖値を把握するには、血管内での血糖値測定が望ましい。しかしながら、血管内測定では、従来の皮下間質液測定を想定したセンサ作製では、表面の生体適合性(抗血栓性)が十分ではなく血栓の吸着により長期的な測定は困難であることが

予想される。そこで、第4章から第7章までを第2部とし種々の生体適合性材料のセンサ表面へ導入した微細針型グルコースセンサの作製を試みた。また作製したセンサは、実験動物を用い血管内での長期モニタリングにより評価を行った。

第1章では、生体内測定においては生体へのダメージを十分に考慮する必要があるために、フレキシブルなステンレスワイヤを用いたグルコースセンサの作製を行い、センサの特性評価を行った。過酸化水素を測定するグルコースセンサでは、電極表面に過酸化水素に対し触媒活性の高いPtを有する必要がある。そこで、ステンレスワイヤ表面に電気化学的な方法又はスパッタリング法を用い電極表面上にPtを導入し作製を試み、評価を行った。

第2章では、センサ作製に用いる材料の安全性を考慮し、CGMS用センサ作製などで用いられている牛血清アルブミン等の動物由来材料でありリスクを伴う。そのため、非動物由来材料であるポリグルタミン酸(PGA)を用いたセンサ作製を行い、センサ特性評価を行った。牛血清アルブミンと酵素をグルタルアルデヒドを用い架橋化して酵素固定を行う方法は、最も一般的なグルコースセンサの作製法といえる。しかしながら、動物由来材料を使用することは、これまでもウイルス性肝炎、ヤコブ病、BSE等、残存する未知のウイルス感染やプリオンへの混入に起因する発症に対する危険性を100%取り除くことはできない。そこで、毒性もなく、安価で生分解性の非動物由来材料であるポリグルタミン酸に着目し、インビボ測定用センサ作製材料としての有用性についての検討を行った。

第3章では、生体内測定では血糖値に限らず、乳酸値や酸素等といった様々なモニタリングが医療分野において必要とされている。また、センサを用い様々なものを同時に測定する場合、複数のセンサを用いるよりも1つのセンサで様々なものを測定することが可能であれば留置の手間も少なくなり容易になる。そこで、1つのセンサでグルコース及びラクテートが同時に測定可能な微細針型グルコース/ラクテートデュアルバイオセンサの作製を行い、その特性評価を行った。電極作製では、Pt-Ir(第1作用極)の絶縁膜として用いるポリイミドチューブ表面にスパッタリング法によりPtコートを行い第2作用極の作製を行った。センサ作製においては、酵素固定膜兼内部膜として第2章同様に非動物性由来の材料であるPGAを用いた。

第4章では、敗血症患者のグルコースモニタリングにおいては、血管内での直接測定が望まし

い。しかしながら、血管内測定においては皮下間質液に比べてフィブリノゲン等のタンパクが多数存在することから、従来の皮下間質液測定用センサの外部膜であるポリウレタン(PU)/ポリジメチルシロキサン(PDMS)のみではセンサ表面の生体適合性(抗血栓性)が十分ではないことから長期測定が困難であった。そこで、人工透析にも用いられ、抗凝固薬であるヘパリンを外部膜としてセンサ表面への導入を試みた。ヘパリンのセンサ表面への導入は、マイナスチャージを有していることからプラスチャージを有しているポリエチレンイミンを用いて導入し、センサの特性評価を行った。

第 5 章では、血管内にセンサ等異物の留置後では、生体の異物防御システムが非常に高く血栓形成が促進されるため、抗凝固薬であるヘパリンのみでは留置後の血栓形成を十分に抑制することが困難であった。また、血栓はセンサ表面から離れ心臓や脳に到達すると心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす可能性があり、留置後における血栓形成抑制および形成した血栓を溶解させることで血栓の血管内への流出を防ぐことが可能であると考えた。そこで、ヘパリンに加えて血栓溶解能を有するウロキナーゼをセンサ表面に同時固定を試みた。

第 6 章では、センサ外部膜として、皮下間質液測定に用いられている PU/PDMS を用いた微細針型グルコースセンサの作製を行い、実験動物を用い血管内にセンサ留置を行い血糖値モニタリングを試みた。インビボ測定方法として、実験動物へのセンサ留置箇所や麻酔の有無、採血方法等やグルコースの投与方法を検討した。実験動物として、犬を用い血流が十分確保可能な頸部静脈に留置し評価を行った。換算方法として、1 点補正を行い、エラーグリッドにより有用性を検討した。

第 7 章では、第 4 章および第 5 章で作製した種々の生体適合性材料を導入した微細針型グルコースセンサの実験動物を用いた評価を行った。実験動物として、ウサギを用い耳の静脈に留置を行い長期的に血糖値モニタリングし評価を行った。低血糖領域におけるセンサ精度の評価を行うために、インスリンを用いた評価も行った。換算方法として、1 点補正に加えて、1 点補正の補正回数を増やした方法も用いた。また、エラーグリッドにより有用性を検討した。

第 8 章では、微細針状酵素固定電極の作製法およびインビボ測定のまとめについて述べた。

参考文献

1. 軽部征夫 : バイオセンサーのはなし, 日刊工業新聞社, 2012
2. WHO. : <http://www.who.int/diabetes/en/>
3. R. P. Dellinger, M. M. Levy, A. Rhodes, D. Annane, H. Gerlach, S. M. Opal, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, I. S. Douglas, R. Jaeschke, T. M. Osborn, M. E. Nunnally, S. R. Townsend, K. Reinhart, R. M. Kleinpell, D. C. Angus, C. S. Deutschman, F. R. Machado, G. D. Rubenfeld, S. A. Webb, R. J. Beale, J. L. Vincent, R. Moreno, *Crit Care Med* **41**, 580 (2013).
4. V. R. Kondepati, H. M. Heise, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 545 (2007).
5. I. Vanhorebeek, L. Langouche, G. Van den Berghe, *Chest*, **132**, 268 (2009).
6. 軽部征夫 : バイオセンサ・ケミカルセンサ事典, テクノシステム, 2007.
7. Food and Drug Administration : FDA public health notification : <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/alertsandnotices/publichealthnotifications/ucm176992.htht>
8. J. P. Frias, C. G. Lim, J. M. Ellison, C. M. Montandon, *Diabetes Care*, **33**, 728 (2010).
9. H. Yamaoka, K. Sode, *J. Diabetes Sci. Technol.*, **1**, 28 (2007)
10. J. D. Newman, A. P. F. Turner, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 2435.
11. J. M. Elison, J. M. Stegmann, S. L. Colner, R. H. Michael, M. K. Sharma, K. R. Elvin, D. L.

Horwitz, *Diabetes Care*, **25**, 961 (2002).

12. V. Thome-Duret, B. Aussedat, G. Reach, M. N. Gangnerau, F. Lemonnier, J. C. Klein, Y. Zhang, Y. Hu, G. S. Wilson, *Metabolism*, **1998**, 47, 799.

13. B. Aussedat, M. Dupire-Angel, R. Gifford, J. C. Klein, G. S. Wilson, G. Reach, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2000**, 278, 716.

14. B. Yu, N. Long, Y. Moussy, F. Moussy, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 2275.

15. Y. M. Ju, B. Yu, T. J. Koob, Y. Moussy, F. Mou, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2008**, 87A, 136 .

16. R. M. Bergenstal, W. V. Tamborlane, A. Ahmann, J. B. Buse, G. Dailey, S. N. Daivis, C. Joyce, T. Peoples, B. A. Perkins, J. B. Welsh, S. M. Willi, M. A. Wood, *N. Engl. J. Med.*, **2010**, 363, 311.

17. T. S. Bailey, H. C. Zisser, S. K. Garg, *Diabetes Technol Ther.*, **2007**, 9, 203.

18. R. L. Weinstein, S. L. Schwartz, R. L. Brazg, J. R. Bugler, T. A. Peyser, G. V. McGarraugh, *Diabetes Care*, **2007**, 30, 1125.

19. B. P. Kovatchev, D. Shields, M. Breton, *Diabetes Technol Ther.*, **11**, 139 (2009).

20. A. Kamath, A. Mahalingam, J. Brauker, *Diabetes Technol Ther.*, **11**, 689 (2009).

21. E. Cengiz, W. V. Tamborlane, *Diabetes Technol Ther.*, **11**, S11 (2009).

22. バイオセンシングとそのシステム 日本化学会編, 学会出版センター, 1988

23. G. S. Wilson, R. Gifford, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *20*, 2388.
- 24 D. S. Bindra, Y. Zhang, G. S. Wilson, D. R. Thevenot, D. Moatti, G. Reach, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 1692.
25. D. Centonze, C. Malitesta, F. Palmisano, P.G. Zambonin, *Electroanalysis*, **1994**, *6*, 423.
26. J. Wang, L. Chen, J. Liu, F. Lu, *Electroanalysis*, **1996**, *8*, 1127.
27. J.-C. Vidal, E. Garcia, J.-R. Castillo, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, *13*, 371.
28. Z. Zhang, H. Liu, J. Deng, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 1632.
29. Food and Drug Administration : <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm080735.htm>
30. C. Jimenez, J. Bartrol, N. F. de Rooij, M. K.-Hep, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *351*, 169.
31. Y. Tani, K. Tanaka, T. Yabutani, Y. Mishima, H. Sakuraba, T. Ohshima, J. Motonaka, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *619*, 215.
32. M. Yasuzawa, T. Matsuki, H. Mitsui, A. Kunugi, T. Nakaya, *Sens. Actuators, B*, **2000**, *66*, 25.
33. S.-K. Jung, G. S. Wilson, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 591.
34. M. Suzuki, H. Akaguma, *Sens. Actuators, B*, **2000**, *64*, 136.

35. M. Yang, Y. Yang, B. Liu, G. Shen, R. Yu, *Sens. Actuators, B*, **2004**, *101*, 269.
36. P.-C. Chen, B.-C. Hsieh, R. L.C. Chen, T.-Y. Wang, H.-Y. Hsiao, T.-J. Cheng, *Bioelectrochemistry*, **2006**, *68*, 72.
37. J. Yu, D. Yu, T. Zhao, B. Zeng, *Talanta*, **2008**, *74*, 1586.
38. M. Yasuzawa, T. Nieda, T. Hirano, A. Kunugi, *Sens. Actuators, B*, **2000**, *66*, 77.
39. S. Zhang, N. Wang, H. Yu, Y. Niu, C. Sun, *Bioelectrochemistry*, **2005**, *67*, 15.
40. W. L. Clake, D. J. Cox, L. A. Gonder-Fredric, W. R. Carter, S. L. Pohl, *Diabetes Care*, **1987**, *10*, 622.
41. 先進化学センサ 電気化学会 化学センサ研究会編, 学会出版センター, 348, **2008**
42. D. W. Schmidtke, A Heller, *Anal. Chem.*, **70**, 2149 (1998).
43. C. Choleau, J. C. Klein, G. Reach, B. Aussedat, V. Demaria-Pesce, G. S. Wilson, R. Gifford, W. K. Ward, *Biosens Bioelectron*, **17**, 647 (2002).

第 1 部 生体内測定用微細針状酵素固定センサの作製

第 1 章 フレキシブルな SUS 電極を用いたグルコースセンサの作製

1. はじめに

既存の CGMS 等に用いられる材料である Pt や Pt-Ir 線を用いた針状センサでは強度やフレキシビリティが十分とは言えず、生体内の損傷の可能性がある。生体内で測定を行う場合、体内にセンサを挿入、設置することは、痛みや違和感を伴うことから、微細化、微小化は不可欠であるが、生体への影響を考慮するとセンサのフレキシビリティも重要である。また、微細化、微小化に伴うデバイスの強度も十分に考慮する必要がある。特に血管内での測定を行う場合では、フレキシビリティを有していないセンサの場合、生体が動くことにより血管内の損傷や血管を突き破る可能性も考えられる。また、用いる材料も考慮する必要がある。フレキシビリティを有する材料として超弾性合金である Ni-Ti^{1,2} などは医療用器具としても用いられており優れた強度を有する。一方、医療分野で生体に使用されている金属材料には、生体組織に対する反応性の低いステンレス鋼、コバルトクロム合金、チタンおよびチタン合金³、タンタルなどがある。特に SUS304 等のオーステナイト系ステンレスは、医療材料としては安価で加工性の良さから生体に導入し易い金属材料である。これらの材料はフレキシビリティが高いとは言えないが、スプリング形状加工することにより、フレキシビリティが向上する。

本研究では、スプリング形状加工した SUS304 を用い、フレキシブルな生体内測定用微細針状グルコースセンサの作製を試みた。過酸化水素を検出するグルコースでは触媒活性の高い Pt を用いる事が高感度測定に有用であることから、SUS 表面には Pt のコーティングが必要である。そこで、SUS 表面への Pt 薄膜形成は、①直接 Pt 電解メッキをする方法(Pt/SUS)、②Au スパッタリングを行い Pt スパッタを行う方法(Pt-Au/SUS)、および③スパッタの密着性の向上を期待しナフィオン薄膜形成後 Au 及び Pt のスパッタリングを行う方法(Pt-Au/Naf/SUS)の 3 種類の方法で行った。作製したそれぞれの電極は過酸化水素を用い応答確認を行った。その後、作製したセンサはリン酸緩衝溶液(PBS)中又は馬血清中(containing 0.55 mM glucose)で測定を行った。

2. 実験

試薬

SUS304 線はニラコ社のものを使用した。Pt メッキ剤であるプレシャスファブ Pt3000、イートレックス 12、イートレックス 15 は、日本エレクトロプレイティングエンジニアーズのものを用いた。PTFE (TEF)熱収縮チューブはハギテックのものを使用した。グルコースオキシダーゼ (265 U/mg, purified from *Aspergillus niger*)は Biozyme Laboratories、牛血清アルブミン(BSA) は Sigma、グルタルアルデヒド (GA) (25% in water)は関東化学のものを使用した。セルロースアセテート (CA) はキシダ化学、ナフィオン (perfluorinated ion exchange powder 5 wt% in mixture of lower aliphatic alcohols and water) は Aldrich のものを使用した。ポリウレタン(Tecoflex)は Thermedics、ポリジメチルシロキサンは NuSil のものを使用した。D-(+)-グルコースは関東化学のものを使用した。馬血清(含 0.55 mM グルコース)は Tissue Culture Biologicals のものを使用した。溶液の調製に用いた水はミリ Q を使用した。実験に用いたその他の試薬は、研究グレードのものを使用した。

装置

Pt スパッタリング装置は Ion Coater IB-3(EIKO Engineering Co, Japan)、Pt の電解メッキはガルバノスタット HA-105(北斗電工)、グルコース応答測定は 4 channel potentiostat Model 3104(Pinnacle Technology, Lawrence, KS)を用いた。

酵素固定電極の作製

Fig. 1-1 にフレキシブルなステンレスワイヤの図及びセンサ概略図を示す。フレキシブルな SUS 電極は ϕ 0.2 mm SUS304 に ϕ 0.1 mm SUS304 を密に巻きつけることで作製(ϕ 0.46 mm)した。

加工した金属線製品には表面に油分、酸化物、指紋などの汚れがあることがあり、これが電解メッキ不良の要因となる。このため、Pt 電解メッキにおいては、前処理として脱脂工程が必要である。また、表面の活性を高め、薄膜形成を実施し易くするため、表面の活性化処理も重要である。ここでは、SUS 電極への Pt 薄膜形成を実施するにあたり、以下の前処理、電解メッキ工程により薄膜形成を実施した。

- 1)酸洗い(イートレックス 15, 25 °C, 30 s)
- 2)電解脱脂(イートレックス 12, 60 °C, 1 min)
- 3)酸活性化(10%硫酸浸漬)
- 4)Pt メッキ(プレシヤスファブ 65 °C, 9 min, 1 A/dm²)

酸荒いとして 25 °C のイートレックス 15 溶液に 15 s ディップを行い、電解脱脂として 60 °C のイートレックス 12 溶液に 1 min ディップを行い、酸活性化として 10%の硫酸溶液中で浸漬を行った。電解メッキは対極に白金を用いてガルバナスタットによって行い、印加電流を計算によって 1 A/dm² として 65°C のプレシヤスファブ溶液中で 9 min 印加し Pt を導入し Pt/SUS 電極とした。

また、Au 及び Pt スパッタ(3 nA, 10 min)を両面に行い Pt-Au/SUS 電極とした。Pt-Au/Naf/SUS は 5%ナフィオン溶液をリングで被覆し、乾燥後スパッタリングを行うことで作製した。

熱収縮 PTFE チューブを絶縁膜として用いアラルダイトを用いてセンシング部位を 2 mm とした。センシング部位は、内部膜、酵素固定膜、外部膜の 3 層からなり、内部膜として、5%ナフィオン及び 5%酢酸セルロースを直径 2 mm の Pt リングを溶液に浸漬し、電極をリングに通すことで被覆した。これを交互に 5 層被覆した。続いて、10 mg/mL グルコースオキシダーゼ、0.25% (v/v) 牛血清アルブミン及び 0.125% (v/v) グルタルアルデヒドの混合溶液 0.5 µL をマイクロシリンジで電極に液滴し、架橋法により酵素固定膜の形成を行い 30 分室温にて乾燥させた。この操作を 2 回繰り返した。外部膜としては、1.3 wt% ポリジメチルシロキサン、4.3 wt% ポリウレタンの混合溶液を内部膜同様 Pt リングを用いて被覆した。内部膜および外部膜は、Wilson らの方法で、^{4,5} 被覆した。

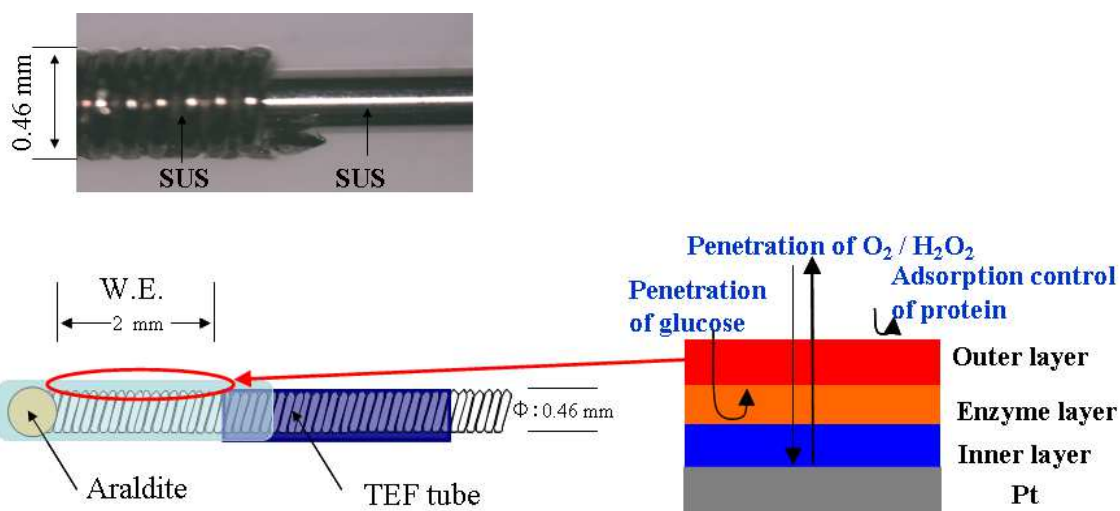


Fig. 1-1 Photograph of flexible SUS wire and schematic illustration of a fine needle-type glucose sensor.

過酸化水素に対する応答評価

作製したそれぞれの電極は、0.1 M の NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) 中、40 °C、0.6 V (vs Ag/AgCl) で通電後、電流値が一定になった後に、過酸化水素を添加し、得られた電流値変化を過酸化水素応答電流として測定した。

センサ応答特性評価

作製したグルコースセンサは、0.1 M の NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) 中、40 °C、0.6 V (vs Ag/AgCl) で通電後、電流値が一定になった後に、グルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として測定した。また、0.55 M のグルコースを含む馬血清中及び生体内に存在する電気化学的活性な物質 (妨害物質) のセンサ応答への影響の評価も行った。

3. 結果と考察

過酸化水素に対する応答

Fig. 1-2 にそれぞれの電極の過酸化水素に対する応答を示す。いずれの電極も 25 mM の過酸化水素に対し応答を示した。Pt/SUS 及び Pt-Au/SUS においては、Pt-Au/Naf/SUS に比べて 2~3 程度の倍高い応答を示した。最も応答が高かった Pt/SUS は、電解メッキによりコイル状に巻いた

SUS の内側まで Pt がメッキされたことによるものであると思われる。スパッタリング法では、表面にしか Pt コートを行えないために、少し低い応答を示した。一方、ナフィオンを被覆した電極では過酸化水素に対して他の電極に比べて応答は低かった。これはナフィオンを被覆したことによりコイル状に巻いた起伏のあった表面がなだらかになり表面積が低くなったためであると考えられる。しかしながら、いずれの電極においても十分に過酸化水素に対する応答が確認されたことより、電解メッキ法及びスパッタリング法ともに Pt コートが十分行われている事を示した。

PBS 中での検量線評価

Fig. 1-3 に、PBS 中でのグルコースに対する検量線を示す。いずれのセンサにおいても広範囲においてグルコースに対して良好な直線性(Pt/SUS : $r^2=0.9915\pm 0.032(0\sim 15.9\text{ mM})$, Pt-Au/SUS : $r^2=0.9982\pm 0.011(0\sim 21.6\text{ mM})$, Pt-Au/Naf/SUS : $r^2=0.9940\pm 0.022(0\sim 21.6\text{ mM})$)を示した。しかしながら、バックグラウンド電流において Pt/SUS 及び Pt-Au/SUS は、100 nA 程度示した。これは、電解メッキやスパッタリングのみでは、ピンホール等ができており SUS が剥き出しの状態になっていると考えられる。一方、Pt-Au/Naf/SUS では、密着性を期待して被覆したナフィオンが SUS の絶縁膜としても働き、その上に Au-Pt をスパッタリングしたため、低いバックグラウンド電流値を示した。

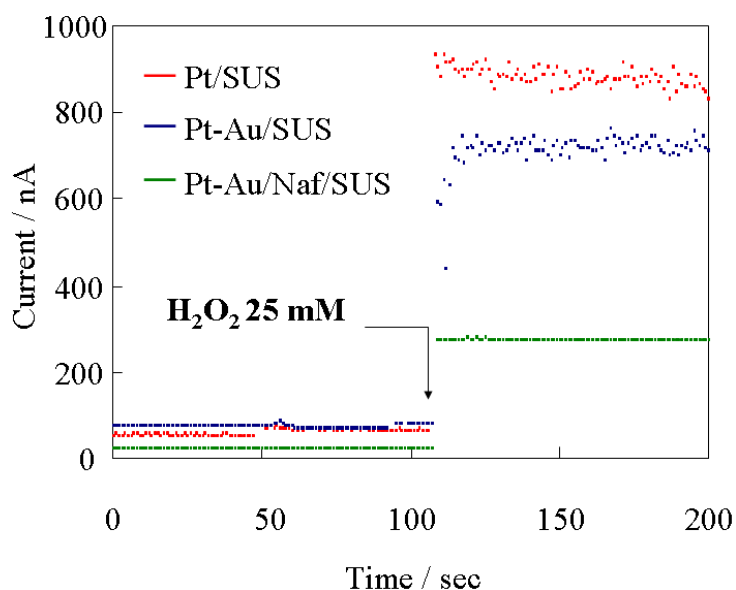


Fig. 1-2 Typical current-time response of the electrodes with H_2O_2 in PBS.

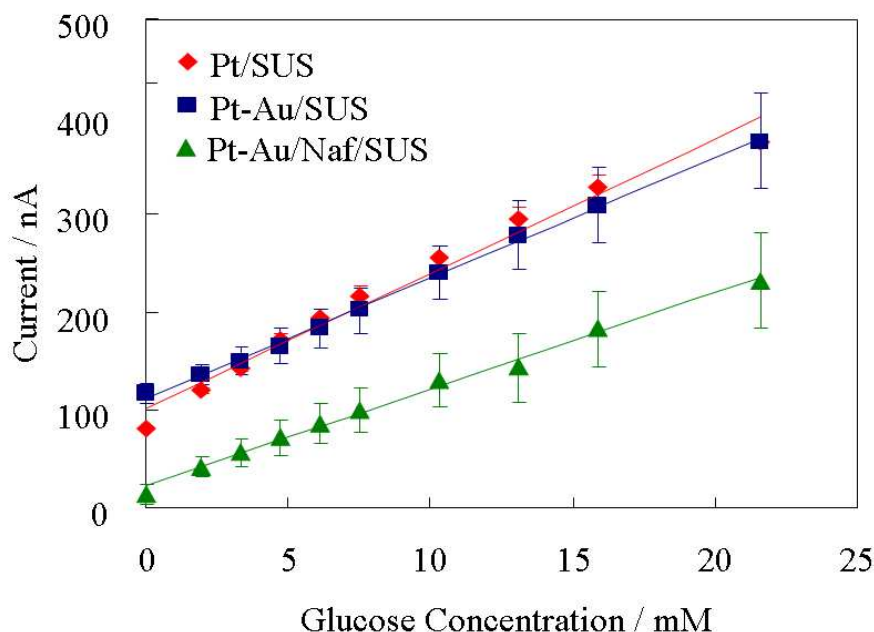


Fig. 1-3 Typical calibration curves of the glucose sensor in PBS. ($n=3$)

妨害物質の影響評価

Table 1-1 に、作製したセンサの妨害物質に対する影響を示す。また、アセトアミノフェン、アスコルビン酸及び尿酸などの電気化学的活性物質に対する影響も評価を行ったところ、いずれのセンサにおいても生理的 maximum 濃度に対し 5% 程度の応答 (5.6 mM グルコースの応答に対して) しか示さなかった。内部膜であるアセトアミノフェンとナフィオンによる十分な透過抑制が行われている。

馬血清中でのグルコース応答評価

Fig. 1-4 にグルコース 0.55 mM 馬血清中におけるセンサの検量線を示す。作製したセンサは、馬血清中においても PBS 中での応答と類似した応答を示した。血清中でのグルコース応答は、タンパクなどの吸着等に伴う感度低下が予想されたが、Pt/SUS 及び Pt-Au/Naf/SUS においては PBS 中での感度と同程度、また Pt-Au/SUS においては血清中では高い感度を示した。血清中で高い感度を示した理由は定かではないが、まだ十分に膜の定常化が行われていなかったためによるものと推察する。しかしながら、良好な応答が得られたことから、外部膜の導入により十分なタンパク吸着が抑制されている。

Table 1-1 Influence of interferences on glucose response current in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 0.1 M NaCl.

Interferent	Physiological conc. (mM)	i_{G+I} / i_G		
		SUS-Pt	SUS-Au/Pt	SUS-Naf-Au/Pt
Acetaminophen	0.10	1.0±0.05	1.0±0.06	1.0±0.04
Ascorbic acid	0.11	1.0±0.04	1.0±0.03	1.0±0.05
Uric acid	0.48	1.0±0.03	1.0±0.02	1.0±0.03
Urea	4.30	1.0±0.00	1.0±0.04	1.0±0.01
D-(-)-Fructose	0.40	1.0±0.02	1.0±0.03	1.0±0.00

i_G : Response current of glucose (5.6 mM).

i_{G+I} : Response current of glucose (5.6 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

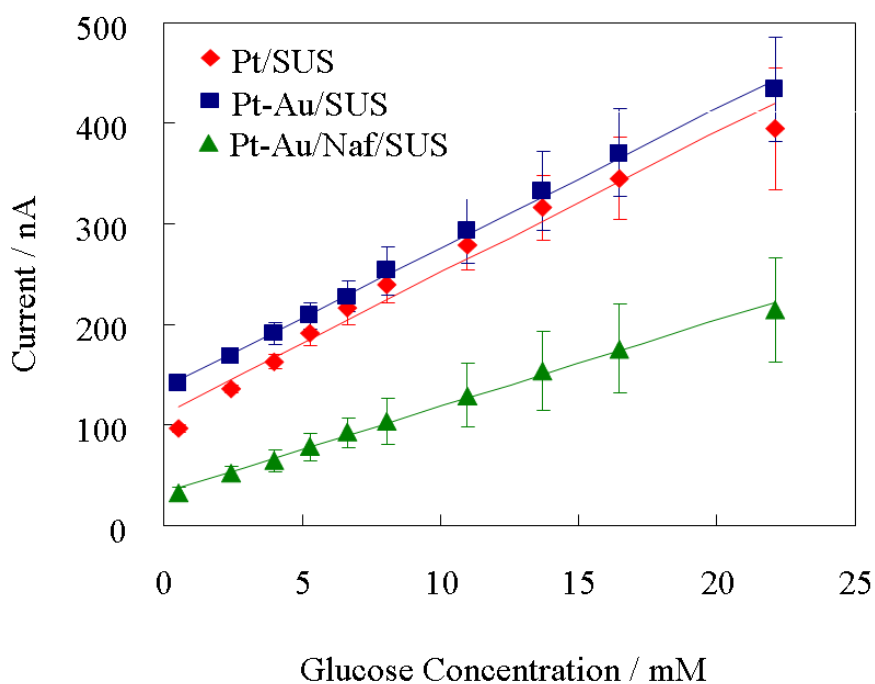


Fig. 1-4 Typical calibration curves of the glucose sensor in Horse serum (containing 0.55 mM glucose). ($n=3$)

長期安定性の評価

Fig. 1-5 に作製したセンサの長期安定性について評価した結果を示す。作製したセンサは

測定後脱イオン水で表面を洗浄し、PBS 中に漬け 4 °C で保存を行った。長期安定性については、測定開始直後からグルコースに対する応答の増加が見られ作製から 6 日目以降応答が安定し 30 日以上安定な応答を示し続けた。応答の増加は電極表面に固定した膜が時間が経つにつれて膨潤していきグルコースの透過が増加していったためである。

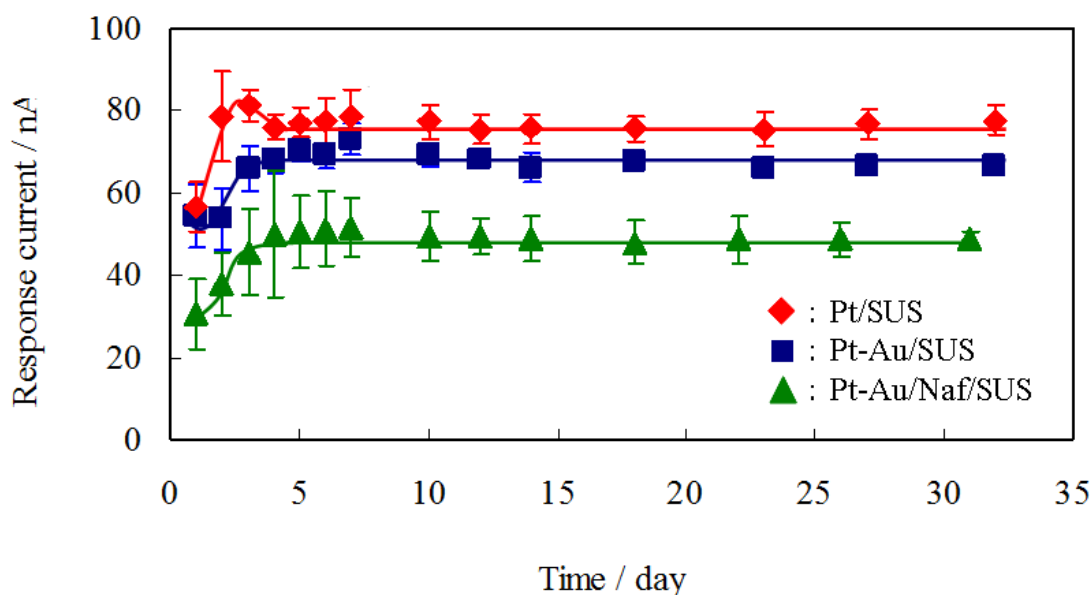


Fig. 1-5 Long-term stability of the glucose sensors. (n=3)

4. まとめ

ここでは、生体内に留置することを考慮し、フレキシビリティを有する微細針型酵素固定電極の作製を行った。電極材料としては、医療用としても用いられる SUS304 をコイル状に巻きつけることで作製を行った。電極への Pt の導入は電解メッキ及びスパッタを用い行いスパッタの密着を向上させるためにバインダーとしてナフィオンを被覆した電極の作製も行った。作製したセンサはいずれも PBS 中でグルコース対し良好な直線性を示したが、電解メッキ及びスパッタにより作製した電極においては、ピンホールによりバックグラウンド電流が非常に高い値を示した。一方、ナフィオンを被覆しスパッタを行ったセンサでは低いバックグラウンド値を示した。これは、密着性を期待して被覆したナフィオンが SUS の絶縁膜としても働き、その上に Au-Pt をスパッタしたためである。また、妨害物質の影響も非常に抑制されており、馬血清中での測定においても PBS 中と類似した応答を示し非常に良好であった。長期安定性においても 30 日以上安定した応答を示すことから、生体内測定用グルコースセンサとして有用であることが示唆された。

参考文献

1. T. Yoneyama, H. Doi, H. Hamanaka, K. Tomitsuka, H. Yoshimasu, N. Tanaka, T. Amagasa, *Biomaterials*, **1994**, *15*, 71.
2. X. Ren, N. Miura, J. Zhang, K. Otsuka, K. Tanaka, M. Koiwa, T. Suzuki, Yu. I. Chumlyakov, M. Asa, *Materials Science and Engineering A*, **2001**, *312*, 196.
3. D. Bogdanski, M. Köller, D. Müller, G. Muhr, M. Bram, H. P. Buchkremer, D. Stöver, J. Choi, M. Epple, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 4549.
4. D. S. Bindra, Y. Zhang, G. S. Wilson, D. R. Thevenot, D. Moatti, G. Reach, *Anal Chem*, **63**, 1692 (1991).
5. B. Aussedat, M. Dupire-Angel, R. Gifford, J. C. Klein, G. S. Wilson, G. Reach, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, 716 (2000).

第 2 章 ポリグルタミン酸を内部膜酵素固定膜として用いた微細針状グルコースセンサの作製

1. はじめに

実用性のあるインビボ型グルコースセンサの作製においては序章で述べた様にいくつかの要素がある。長期安定性のための酵素の安定した固定化、正確なグルコース測定のための高度な選択的検出、生体間質液測定のためのセンサ表面の生体適合性、安全で無毒でありおよび滅菌可能であることなどである。これらの要素の中で、安全性は *in vivo* 測定用のセンサ開発において最優先事項である。したがって、センサを製造するための材料の選択は非常に重要である。医療製品の安全性は、日本の厚生労働省や食品医薬品局 (FDA) による世界基準である ISO10993 に基づいて行われる。人や動物由来の材料は、未知の感染症及びプリオン疾患の危険性を取り除くことが出来ない。^{1,4} また、パーフルオロ化合物(PFCs)は分解されないことより、世界中で使用の規制がかけられています。⁵ 特に長鎖の炭素鎖を有するものは実験動物においても毒性効果があることが報告されており、生体内に蓄積されることで人間の健康への影響を無視出来ない。^{6,7} 日常生活の中でよく目にするものとして、台所用品や実験機器にコーティングされているフッ素系ポリマーはポリテトラフルオロエチレン(PTFE)である。PTFE はまた、カテーテル、医療用フィルターや人工血管などの医療分野でも応用されている。また、PTFE コーティングされたワイヤは、バイオセンサの製作のために最も用いられる電極材料の一つである。⁸⁻¹¹ フッ素スルホン化イオン交換ポリマーであるナフイオン[®]は、静電相互作用によってセンサ応答に対する電気化学的活性物質の影響を抑制するために有効であることが知られており、バイオセンサの作製において広く使用される材料である。

11-15

ここで、ポリグルタミン酸(PGA)は、納豆のネバネバの主成分で、グルタミン酸が直鎖状に結合してできた納豆キナーゼを触媒として合成される天然のポリマー (高分子体)で、親水性で保湿力が高く、生分解性、生体適合性といった性質を有していることから、医療用アプリケーションとして用いられている。¹⁶ また、多数のカルボキシル基を有することから、カチオン交換膜として機能し、電気化学的活性を有するアスコルビン酸および尿酸の透過抑制に効果を期待し、内部膜兼酵素固定膜としての機能する可能性がある。

ここでは、PGA を酵素固定膜としてのみではなく妨害物質の透過抑制膜である内部膜として用いた。PGA と水溶性の縮合試薬である 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC)を用いて酵素を固定する方法に着目し、グルコースセンサを作製した。酵素は縮合材である EDC により PGA のカルボン酸基とアミド結合される(Fig. 2-1)。作製した電極は内部膜のみを被覆して妨害物質に対する評価を行い、酵素を固定することでセンサとした。作製したセンサの特性はリン酸緩衝溶液中又は馬血清中で行った。比較として、ナフィオンを内部膜として用いたセンサの作製も行った。

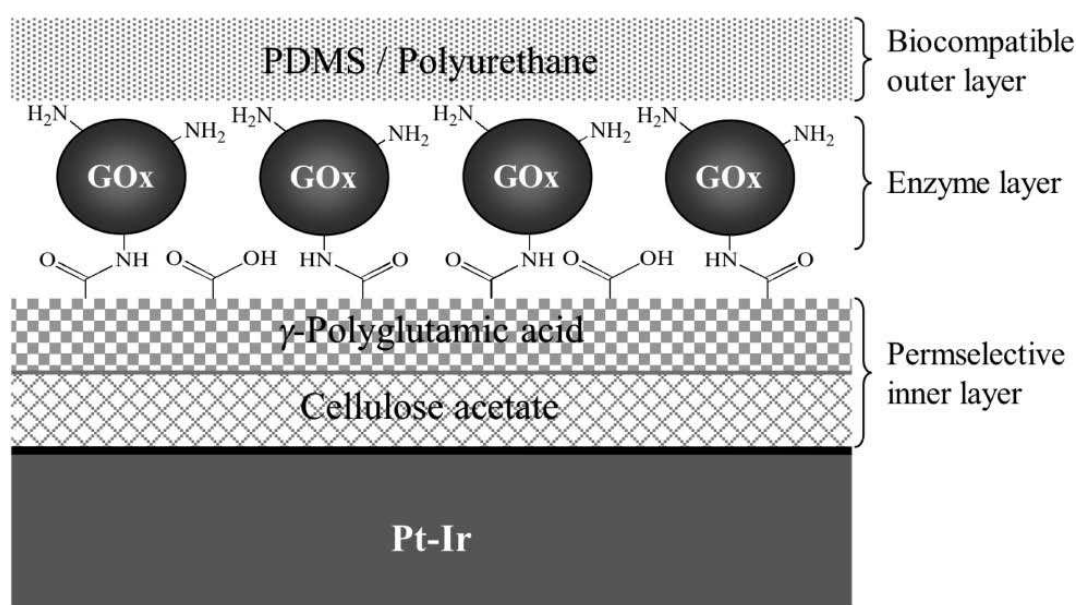


Fig. 2-1 Schematic illustration of the sensing region of the glucose sensor.

2. 実験

試薬

グルコースオキシダーゼ (265 U/mg, purified from *Aspergillus niger*) は、Biozyme Laboratories のものを、PGA ($M_w = 800000 - 1000000$) は日本ポリグルのものを使用した。水溶性の縮合試薬である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)は東洋化成のものを使用した。酢酸セルロースはキシダ化学、ナフィオン (perfluorinated ion exchange powder 5 wt% in mixture of lower aliphatic alcohols and water) は Aldrich のものを使用した。ポリウレタン

(Tecoflex)は Thermedics から、ポリジメチルシロキサンは NuSil のものを用いた。D-(+)-グルコースは関東化学のものを用いた。馬血清(含 0.55 mM グルコース)は Tissue Culture Biologicals のものを使用した。実験に用いたその他の試薬は、研究グレードのものを使用した。Pt-Ir 線 (ϕ 0.1 mm Pt90%-Ir10%)は Nilaco から、絶縁膜として使用したポリイミドチューブ(内径 0.12 mm)は古河電工のものを使用した。その他の試薬は、分析用グレードのものを使用した。

装置

グルコース応答測定は 4 channel potentiostat Model 3104 (Pinnacle Technology, Lawrence, KS)、を用いた。

酵素固定電極の作製

Fig. 2-2 にセンサの作製方法を示す。Pt-Ir 線(30 mm の 2 mm)をポリイミドチューブを用いてセンシング部位とした。センシング部位に 5%酢酸セルロース及びジメチルスルホキシドに溶かした疎水性の 5% PGA (PGAH)を内部膜兼酵素固定膜としてリングを用い被覆した。酵素の固定は、20 mg/mL LOx と 0.125 % (v/v) EDC を溶かした溶液と 5 mg/mL GOx と 0.125 % (v/v) EDC を溶かした溶液、それぞれをマイクロシリンジを用いセンシング部位に 0.5 μ L ずつ液滴により固定を行った。外部膜として 4.3 wt% PU 及び 1.3 wt% PDMS を含むテトラヒドロフラン(THF)溶液をリングで被覆し乾燥させた。作製して得られたセンサを GO_x/PGA-CA とした。また、比較のためにナフィオンを内部膜に用いたセンサも作製した。センサの作製は Wilson らの方法^{10,11}を用いた。選択透過性膜である内部膜の被覆、酵素の固定、生体適合性膜である外部膜の被覆により作製した。内部膜としてエタノール/アセトン(50:50)に溶かした 5%酢酸セルロース溶液及びエタノールに溶かした 5%ナフィオン溶液を直径 2 mm のリングを用いそれぞれ 5 回ずつセンサに通し乾燥させることで被覆を行った。酵素固定は、10 mg/mL のグルコース酸化酵素(GOx:265 U/mg)、0.125 % (v/v) グルタルアルデヒド及び 25 mg/mL 牛血清アルブミンを酵素溶液とし、シリンジでセンシング部位に 0.5 μ L を 2 回液滴することで架橋固定を行い 1 h 乾燥させた。外部膜として 4.3 wt% PU 及び 1.3 wt% PDMS を含むテトラヒドロフラン(THF)溶液をリングで被覆し乾燥させた。作製したセンサは GOx/Nafion-CA とした。

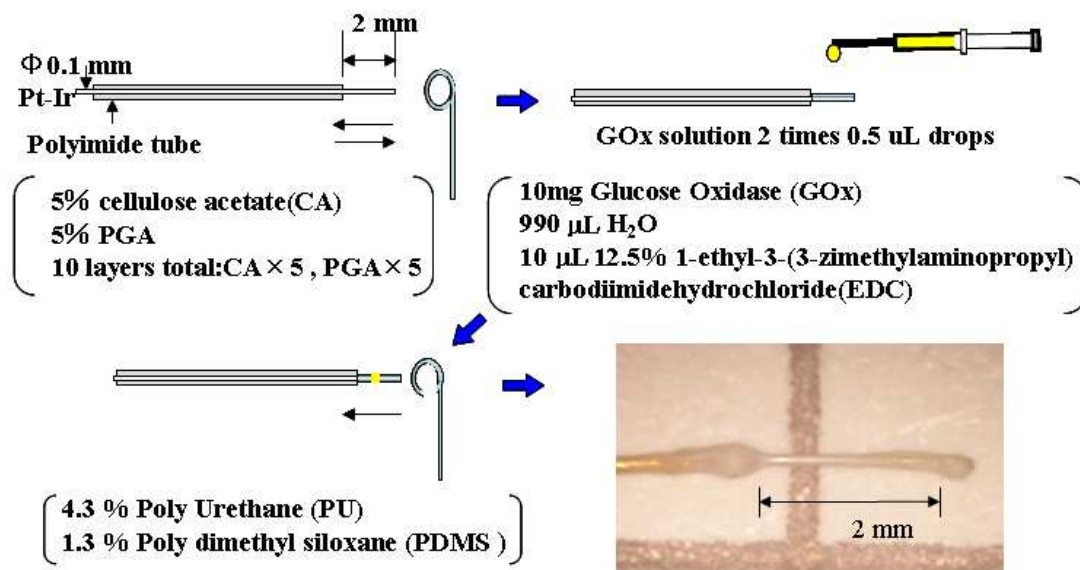


Fig. 2-2 Schematic diagram of needle type glucose sensor fabrication.

内部膜の評価方法

0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4)を用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl)で通電後、電流値が一定になった後に過酸化水素溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。また、生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)の電極応答への影響の評価は、アセトアミノフェン、アスコルビン酸、尿酸がそれぞれ生理学的最大濃度存在下するとき、過酸化水素応答に影響を与える割合より調べた。比較として、1% , 3% , 5% PGA を5回被覆したのみの電極を作製した。

センサ応答測定方法

0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4)又は 0.55 mM のグルコースを含む馬血清用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl)で通電後、電流値が一定になった後にグルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。また、生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)のセンサ応答への影響の評価は、アセトアミノフェン、アスコルビン酸、尿酸がそれぞれ生理学的最大濃度存在下するとき、5.6 mM のグルコース応答に影響を与える割合より調べた。測定は 40 °C で行った。

3. 結果と考察

PBS 中での内部膜評価

Table 2-1 に内部膜の妨害物質に対する応答を示す。生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)の過酸化水素応答への影響については、過酸化水素を測定する電位において電気化学的活性なアスコルビン酸、尿酸および風邪薬の成分であるアセトアミノフェンを用いて測定した。過酸化水素応答値と生理的 maximum 濃度の妨害物質存在下での過酸化水素応答値の比 i_{H+I}/i_H により評価を行った。PGA (1~3%) のみでは、いずれの妨害物質に対しても過酸化水素に対して 2 倍以上影響を示した。特に尿酸においては、その影響は顕著に見られ、PGA のみでは抑制が難しいと判断した。一方で、PGA に加えて酢酸セルロースを被覆した電極では従来型のナフィオンを用いた場合と類似した影響抑制値を示した。このことより、5% の PGA に加えて酢酸セルロースを被覆した電極を最適とし酵素の固定及び外部膜の被覆を行った。

Table 2-1 Influence of interferences on the H_2O_2 response current in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 0.1 M NaCl.

Permselective film	i_H (nA)	i_{H+I}/i_H		
		Acetaminophen (0.17 mM)	Ascorbic acid (0.11 mM)	Uric acid (0.48 mM)
1 % PGA	36	4.8	2.2	7.8
3 % PGA	40	3.9	2.5	8.1
5 % PGA	25	3.8	2.4	11
5 % CA / 5 % PGA	1.4	2.1	0.9	0.9
5 % CA + 5 % Nafion	1.9	2.0	1.1	0.9

i_H : Response current of H_2O_2 (25 mM).

i_{H+I} : Response current of H_2O_2 (25 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

PBS 中でのセンサ応答の評価

Fig. 2-3 に作製した GOx/PGA-CA 及び GOx/Nafion-CA の検量線を示す。グルコース濃度 22.4

mM までの範囲で測定を行ったところ、いずれのセンサもグルコース濃度の増加に伴う応答電流値の増加が見られた。いずれのセンサも直線性は $r^2 > 0.98$ (0~8.4 mM)を示した。PGA を用いたセンサはナフイオンを用いた従来のセンサと類似した応答を示したことから、機能していることが示唆された。インビボ測定用センサへの応用を考慮すると、25 mM までの範囲内のグルコース濃度を直線性良く測定出来ることが望ましい。

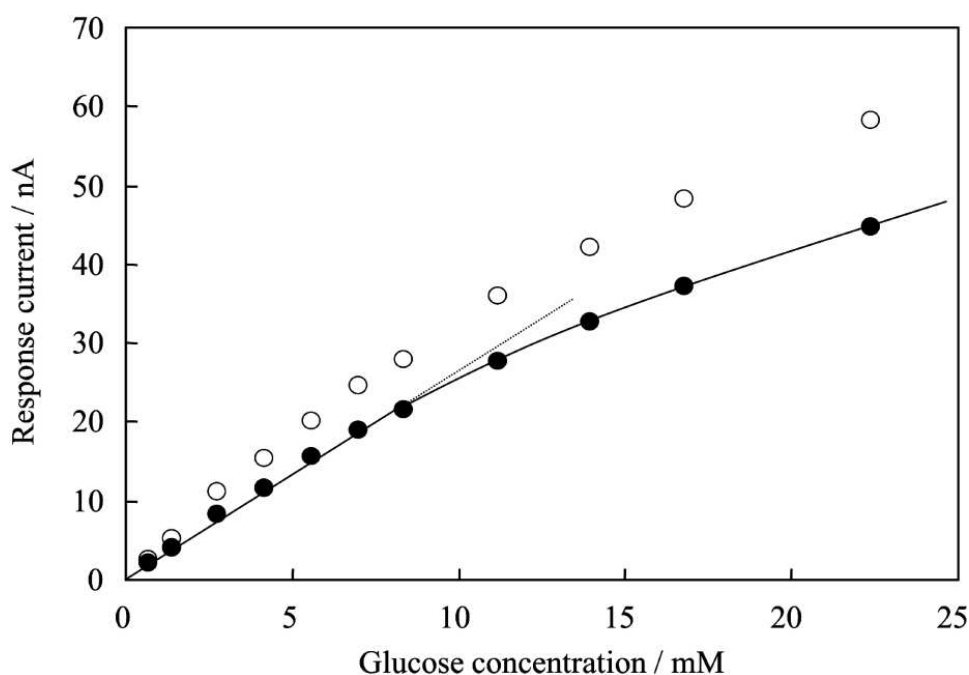


Fig. 2-3 Typical calibration curves of GOx/PGA-CA (closed circles) and GOx/Nafion-CA (open circles), measured in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) at 40 °C.

センサ応答の評価

Fig. 2-4 に作製した GOx/PGA-CA 及び GOx/Nafion-CA の馬血清中での応答を示す。PGA を用いたセンサは明らかに血清中においても機能していることが確認された。どちらのセンサの応答電流も 22.4 mM までグルコース濃度の増加とともに増加した。それにもかかわらず、グルコースに対する応答は 2.8 mM~8.4mM の範囲で計算した傾きの比から、PBS 中に比べ馬血清中で約 25%低かった。馬血清中での低い電流は、センサ表面へのタンパクの吸着による酵素層へのグルコースの拡散を低下である。しかし、グルコース濃度との相関係数は 2.8~22.4 mM の範囲においても 0.98 よりも高かった。PBS に比べ馬血清で得られたより広い直線関係は、電極の表面に形成さ

れた膜タンパク質の拡散抑制効果である可能性がある。

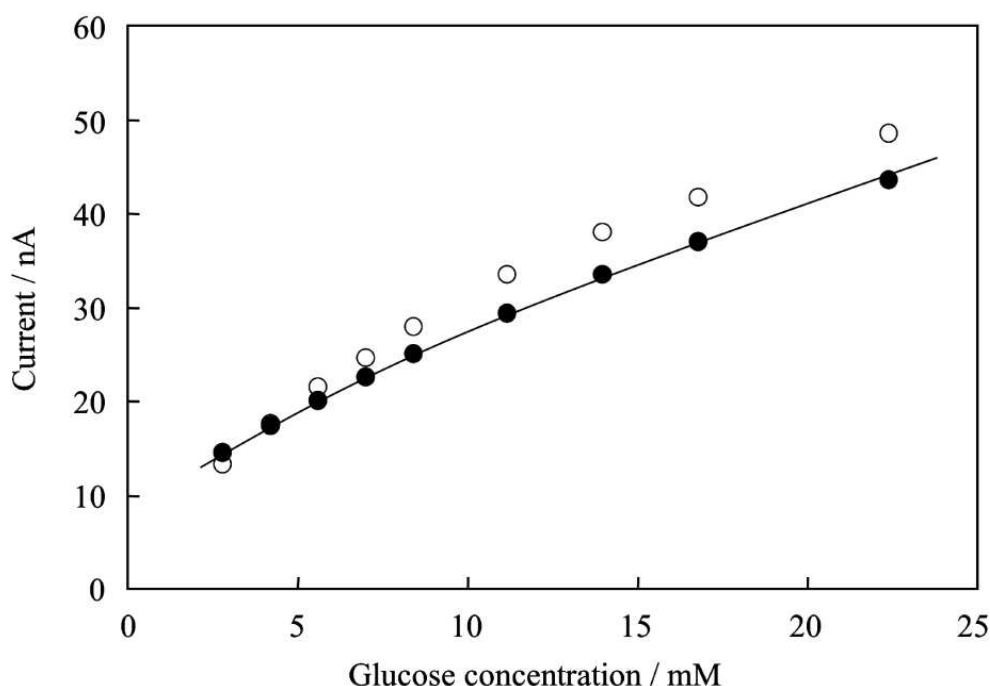


Fig. 2-4 Variation of current with the glucose concentration for GOx/PGA-CA (closed circles) and GOx/Nafion-CA (open circles), measured in horse serum containing 0.55 mM glucose at 40 °C.

長期安定性の評価

Fig. 2-5 に作製した GOx/PGA-CA の長期安定性の結果を示す。作製したセンサの保存は PBS 中に漬け 4 °C で保存を行った。作製したセンサは 3 日目までの応答の減少以降、1 ヶ月以上安定した応答を示した。3 日目までの応答減少は結合していなかった酵素の溶出によるものである。

妨害物質の影響評価

Table 2-2 に妨害物質への影響の結果を示す。生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)のグルコース応答への影響については、過酸化水素を測定する電位において電気化学的活性なアスコルビン酸、尿酸および風邪薬の成分であるアセトアミノフェンを用いて測定した。グルコース応答値と生理的 maximum 濃度の妨害物質存在下でのグルコース応答値の比 I_{G+I}/I_G により評価を行った。作製した GOx/PGA-CA はアスコルビン酸等の影響を受けなかった。これは、PGA が内

部膜として働き、妨害物質の透過を防いでいることによる。

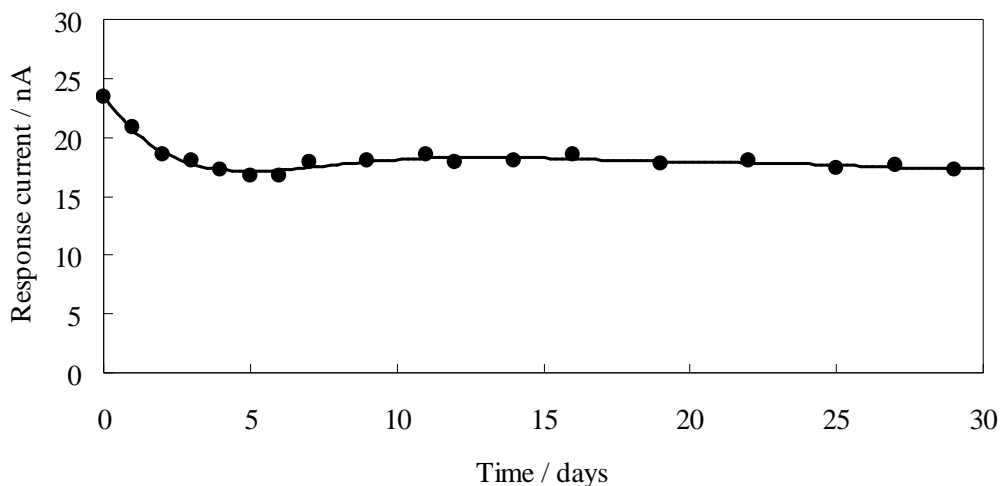


Fig. 2-5 Long-term stability of GOx/PGA-CA measured in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) at 40 °C.

Table 2-2 Influence of interferences on the glucose response current in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 0.1 M NaCl.

Electrode	i_G (nA)	i_{G+I}/i_G		
		Acetaminophen (0.17 mM)	Ascorbic acid (0.11 mM)	Uric acid (0.48 mM)
GOx/PGA-CA	27.2	1.05	1.00	1.01
GOx/Nafion-CA	24.5	1.02	1.00	1.00

i_G : Response current of glucose (5.6 mM).

i_{G+I} : Response current of glucose (5.6 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

4 まとめ

生分解性を有し、安価な非動物由来材料である PGA を内部膜兼酵素固定材料に用いた微細 GOx 固定電極の作製を行い、センサ特性評価を行った。酵素固定化電極は、三層構造からなり、選択透過性を有する内部膜(酢酸セルロース/PGA)および生体適合性を有する外部膜

(PU/PDMS)を導入した。作製した電極は生体内に存在する電気化学的活性物質であるアスコルビン酸、尿酸やアセトアミノフェンの影響を抑制し30日以上安定した応答を示した。また、PBS中でもナフィオンを用いたセンサと類似した応答を示し馬血清中においても良好な応答を示した。このことから、PGA膜が妨害物質の透過を抑制する内部膜に加えて酵素を固定するための膜としても十分に機能することが示唆された。

参考文献

1. C. N. Berger, P. L. Donne, H. Windemann, *Biologicals*, **33**, 1 (2005)
2. Evaluation of medical devices incorporating products of animal origin, Compilation prepared by European Commission (EC), http://ec.europa.eu/enterprise/medical_devices/meddev/2_5-8_02-1999.pdf/.
3. Application of Council Directive 93/42/EEC taking into account the Commission Directive 2003/32/EC for Medical Devices utilising tissues or derivatives originating from animals for which a TSE risk is suspected, Compilation prepared by European Commission (EC), http://ec.europa.eu/enterprise/medical_devices/meddev/2_11_1_rev2_bsetse_january2008.pdf/.
4. A Practical Guide to ISO 10993: Part 1—Introduction to the Standards, Compilation prepared by Medical Device Link, <http://www.devicelink.com/mddi/archive/98/01/023.html/>.
5. P. Rostkowski, S. Taniyasu, Y. Miyake, K. Y. Kwok, L. W. Y. Yeung, P. Lam, K. Kannan, N. Yamashita, *Organohal. Comp.*, **69**, 2812 (2007)
6. Environmental Protection Agency, *Federal Register*, **75**, 4292. (2010)
7. S. D. Richardson, *Anal. Chem.*, **82**, 4742 (2010)

8. B. Linke, W. Kerner, M. Kiwit, M. Pishko, A. Heller, *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 151 (1994)
9. P. Dungal, N. Long, B. Yu, Y. Moussy, F. Moussy, *J. Biomed. Mater. Res.*, **85**, 699 (2009)
10. R. Gifford, M. M. Batchelor, Y. Lee, G. Gokulrangan, M. E. Meyerhoff, G. S. Wilson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **75**, 755 (2005)
11. D. S. Bindra, G. S. Wilson, *Anal. Chem.*, **61**, 2566 (1989)
12. I. L. Mattos, L. V. Lukachova, L. Gorton, T. Laurell, A. A. Karyakin, *Talanta*, **54**, 963 (2001)
13. J.-J. Xu, Z.-H. Yu, H.-Y. Chen, *Anal. Chim. Acta*, **463**, 239 (2002)
14. M. Yasuzawa, M. Kitahara, T. Yabutani, J. Motonaka, *Bunseki Kagaku*, **58**, 941 (2009)
15. H. Takaoka, M. Yasuzawa, *Anal. Sci.*, **26**, 551 (2010)
16. W.-C. Lin, D.-G. Yu, M.-C. Yang, *Colloids Surf., B*, **47**, 43 (2006)

第3章 ポリグルタミン酸を用いたグルコース/ラクテートデュアルバイオセンサの作製

1. はじめに

脳内の代謝物のモニタリングは、代謝のメカニズム解明などの医療アプリケーションとして有用である。脳内(海馬)のグルコース、^{1,2}グルタミン酸、³乳酸、¹アスコルビン酸⁴のモニタリングの研究も注目されている。そのために、糖や乳酸に限らずグルタミン酸や酸素なども代謝に関与しておりこれらを脳内でモニタリングすることは有用である。また、非糖尿病患者である敗血症患者においても術後の血糖値の厳格なモニタリングが重要視されている。⁵⁻⁷ 同時に外傷患者において乳酸値が高い場合、心原性ショックによる死亡率が高くなることが言われており、早期乳酸のクリアランスが重要であることが報告されている。⁸ そのために、留置を行う際に1つの電極で多数の成分を同時にモニタリングすることが出来れば、留置の手間も少なく出来る。

ここで、脳内に限らず生体内にセンサを埋め込み測定を行うCGMSの材料には非動物性由来の材料を用いる事が望ましい。一方PGAは、納豆のネバネバの主成分で、グルタミン酸が直鎖状に結合してできた納豆キナーゼを触媒として合成される非動物性由来の天然のポリマー(高分子体)である。親水性で保湿力が高い、生分解性、食用可能といった性質を有していることから、化粧品保湿剤、食品の鮮度保持剤や生分解性プラスチック、水質浄化用凝集剤など工業製品の基礎材料として多岐にわたり使用されている。毒性がなく生体適合性⁹を有していることから医療分野においても体液吸収材、医療用接着剤、¹⁰⁻¹³薬物伝達システム(DDS)、^{12,14,15}再生医工学(Tissue engineering)などに利用されており、¹⁶⁻¹⁸体内に安全に導入することが可能な材料である。¹⁹多数のカルボキシル基を有することから、カチオン交換膜として機能し、電気化学的活性を有するアスコルビン酸および尿酸の透過抑制に効果を期待し、内部膜兼酵素固定膜として過去の研究で既存の方法で作製したセンサと同様の効果があることを示した。^{20,21}

ここでは、生体内測定を目的とし、センサ固定材料として納豆のネバネバ成分である植物由来のPGAの導入を行ない、グルコースと乳酸を同時に測定可能なデュアルバイオセンサの開発の検討を行った。Pt-Ir線を第1作用極、絶縁膜の上にPtスパッタを行い第2作用極を作製した。生体内で測定を行う場合たんぱく吸着抑制効果のあるPU/PDMSの導入は必要不可欠である。十分に被覆が行われていない場合たんぱく吸着により感度の低下を招く可能性がある。そこで、

PU/PDMS の被覆回数最適化の検討を行った。また、デュアルバイオセンサの作製を行う場合、特にグルコースと乳酸のお互いの作用極同士の干渉を抑制することが重要であることから、双方のセンシング部位の位置(距離)の検討も必要である。作製したセンサは PBS または血漿を用いた *in vitro* 測定により特性評価を行った。

2. 実験

試薬

グルコースオキシダーゼ (265 U/mg, purified from *Aspergillus niger*) は、Biozyme Laboratories のものを、PGA ($M_w = 800000 - 1000000$) は日本ポリグルのものを使用した。ラクテートオキシダーゼ (10.5 U/mg) は、東洋紡から提供されたものを使用した。水溶性の縮合試薬である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)は東洋化成のものを使用した。酢酸セルロースはキシダ化学、ナフィオン (perfluorinated ion exchange powder 5 wt% in mixture of lower aliphatic alcohols and water) は Aldrich のものを使用した。ポリウレタン (Tecoflex) は Thermedics から、ポリジメチルシロキサンは NuSil のものを用いた。D-(+)-グルコースは関東化学のものをを用いた。人血漿(含 5.15 mM グルコース, 2.9 mM ラクテート)は採血した血液から分離したものを使用した。馬血清は Tissue Culture Biologicals のものを使用した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)は東京化成のものを使用した。Pt-Ir 線 (ϕ 0.1 mm Pt90%-Ir10%)は Nilaco から、第2作用極兼絶縁膜として使用したポリイミドチューブ(内径 0.12 mm, 外径 0.15 mm)、及び絶縁膜として使用したポリイミドチューブ(内径 0.18 mm, 外径 0.22 mm)は古河電工のものを使用した。その他の試薬は、分析用グレードのものを使用した。

装置

Pt スパッタリング装置は Ion Coater IB-3(EIKO Engineering Co., Japan)、グルコース応答測定は 4 channel potentiostat Model 3104(Pinnacle Technology, Lawrence, KS)、を用いた。血液を分離する装置は久保田の 5800 を、分離した血漿のグルコース及びラクテートはアーレイの G+メーター及びラクテート・プロを使用した。

酵素固定電極の作製

Fig. 3-1 にセンサの模式図を示す。LOx の固定を行う第 1 作用極として主軸に ϕ 0.1 mm の Pt-Ir 線を用い、GOx の固定を行う第 2 作用極として Pt スパッタ(膜厚:20 nm)によりコーティングを行った ϕ 0.12 mm のポリイミドチューブを被覆した。さらに ϕ 0.18 mm のポリイミドチューブを被覆して、センシング部位はそれぞれ 1 mm の長さに調整し、センシング部位同士の距離は $X=1, 2, 3$ mm のものをそれぞれ作製した。その後 Ag 線を巻きつけ酸化させることで参照極兼対極とした。

センシング部位に 5% 酢酸セルロース及びジメチルスルホキシドに溶かした疎水性の 5%PGA (PGAH)を内部膜兼酵素固定膜として 5 回ずつリングを用い被覆し乾燥させた。酵素の固定は、20 mg/mL LOx と 0.125 % (v/v) EDC を溶かした溶液と 5 mg/mL GOx と 0.125 % (v/v) EDC を溶かした溶液、それぞれをシリンジを用いセンシング部位に 0.5 μ L ずつ液滴により固定を行った。外部膜として 4.3 wt% PU 及び 1.3 wt% PDMS を含むテトラヒドロフラン(THF)溶液をリングで被覆し乾燥させた。

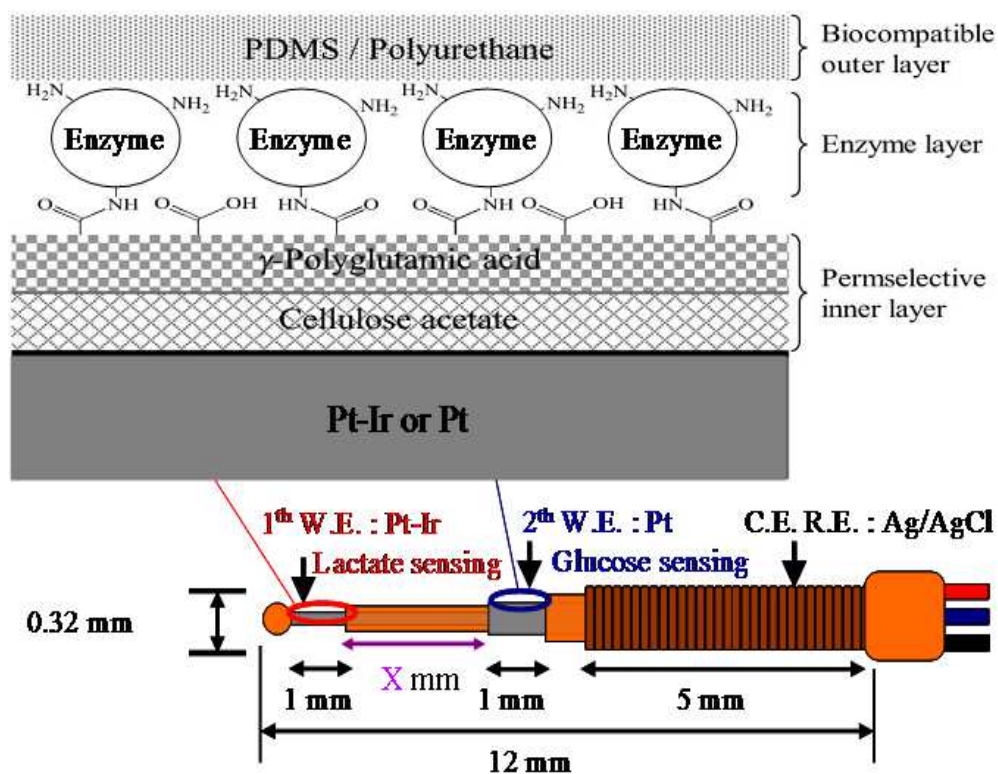


Fig. 3-1 Schematic illustration of a fine needle-type glucose lactate dual biosensor.

タンパク吸着評価

Fig. 3-2 にタンパク吸着試験の図を示す。埋め込み用センサの芯材絶縁層として用いられる ϕ 0.18 mm のポリイミドチューブを用い、何も被覆を行っていない、PU/PDMS を 1 回被覆、2 回被覆したサンプルをそれぞれ作製した。作製したサンプルは 40 °C の馬血清中で 3 h 浸漬を行い洗浄した後、1 mg/mL のフルオロセインイソチアネート(FITC)溶液中で 10 min サンプル表面のたんぱくに吸着させた。サンプルは、蛍光顕微鏡を用い励起波長 495 nm 蛍光波長 520 nm により観察を行った。

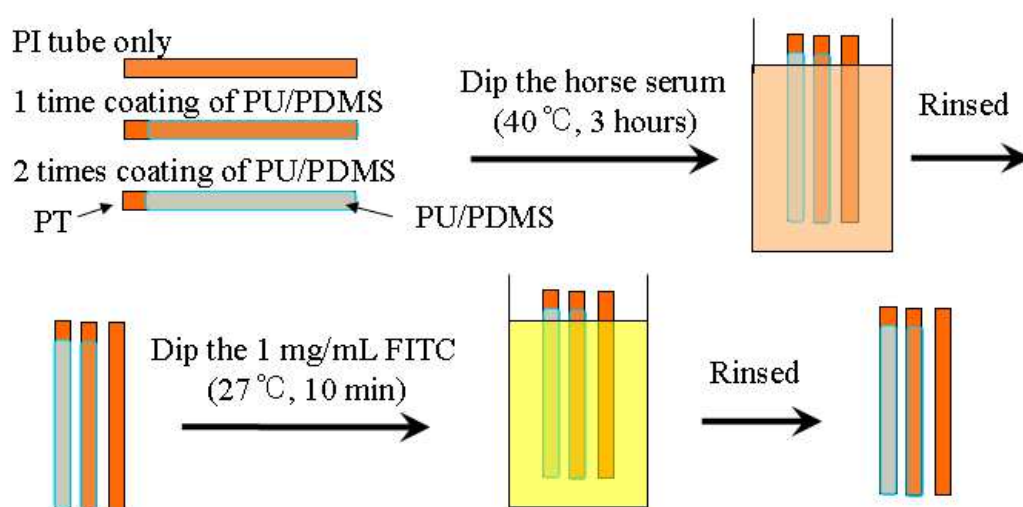


Fig. 3-2 Diagram of protein adsorption evaluation of PI tube.

センサ応答評価

0.1 Mリン酸緩衝溶液 (pH 7.4)又は5.15 mMグルコース及び2.9 mMラクテートを含む人血漿を用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl) で通電後、電流値が一定になった後にグルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。Fig. 3-3 に人血漿の作製図を示す。採血を行った血をクエン酸ナトリウムと9:1になるように混ぜ、1000 rpm で 30 min の条件で遠心分離を行った。その後上澄みの血漿液を簡易測定器を用いて測定した。また、生体内に存在する電気化学的活性な物質 (妨害物質) のセンサ応答への影響の評価は、アセトアミノフェン、アスコルビン酸、尿酸、尿素とフルクトースがそれぞれ生理学的最大濃度存在下するとき、5.6 mM のグルコース又は 2.0 mM のラクテートの応答に影響を与える割合より調べた。測定は 40 °C で行った。

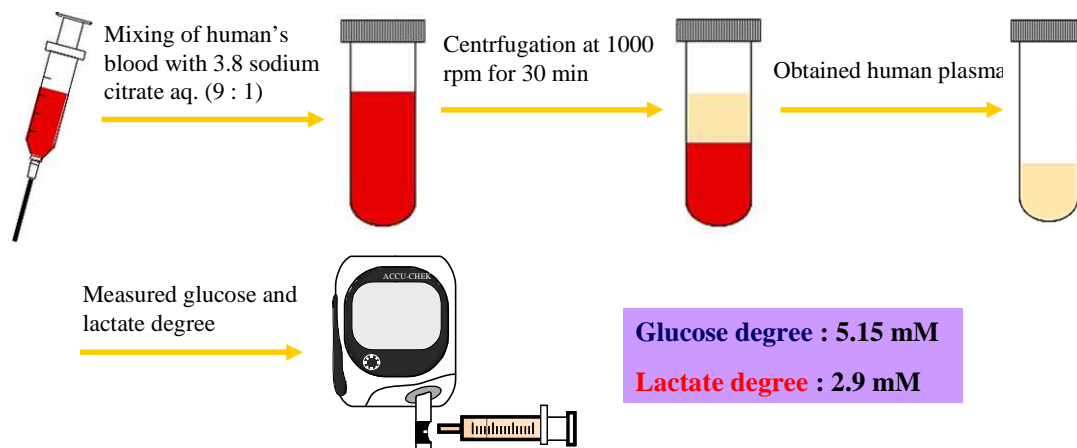


Fig. 3-3 Fabrication of human plasma.

3. 結果と考察

外部膜被覆の最適化

Fig. 3-4 に蛍光顕微鏡で観察を行ったポリイミドチューブサンプル表面の画像を示す。何も被覆していないサンプルでは表面全体にタンパクの吸着が確認された。PU/PDMS を 1 回被覆したサンプルでは表面にタンパクの吸着が少し確認されたが、2 回被覆を行う事で表面にはたんぱくの吸着が確認されなかった。PU/PDMS1 回被覆のみでは、たんぱく吸着抑制が十分とは言えず 2 回被覆することを最適とした。

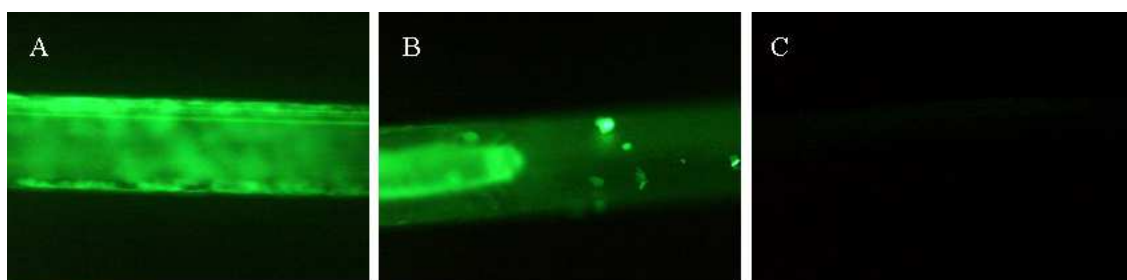


Fig. 3-4 Fluorescence microscopy image of protein adhesion to the surface of PI tubes soaked in fibrinogen solution for 7 days at 30°C. (A) Bare PI tube. (B) PU/PDMS single-coated PI tube. (C) PU/PDMS double-coated PI tube.

グルコースとラクテートの緩衝抑制評価

Table 3-1 にセンシング部位の距離を変えて干渉を評価した結果を示す。グルコース応答値とラ

クテートの存在下でのグルコース応答値の比 i_{G+L} / i_G で、ラクテート応答の場合は i_{G+L} / i_L により評価を行った。GOxを固定した作用極ではラクテートの影響があまり見られなかったが、センシング部位の間隔が 1 mm の場合、LOxを固定した作用極でラクテート応答に対して30%前後のグルコース応答の影響が見られ、間隔 2 mm での場合においても30%程度の影響を示した。しかし、間隔を 3 mm に広げたところ、干渉を10%程度に抑制できたことから、センサ間距離 3mm をセンサ作製の最適値とした。

Table 3-1 Influence of cross-talking response. n=3.

	X=1	X=2	X=3
Lactate sensor i_{G+L} / i_L	1.31 ± 0.15	1.28 ± 0.09	1.08 ± 0.03
Glucose sensor i_{G+L} / i_G	1.05 ± 0.04	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01

i_G : Response current of glucose (5.6 mM)

i_L : Response current of lactate (2.0 mM)

i_{G+L} : Response current of glucose (5.6 mM) and lactate (2.0 mM)

妨害物質への影響評価

Table 3-2 に妨害物質に対する影響評価を示す。生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)のグルコース及びラクテート応答への影響については、過酸化水素を測定する電位において電気化学的活性なアスコルビン酸、尿酸、風邪薬の成分であるアセトアミノフェン、尿素およびフルクトースを用いて測定した。グルコース応答値と生理的 maximum 濃度の妨害物質存在下でのグルコース又はラクテート応答値の比 i_{G+I} / i_G および i_{L+I} / i_L により評価を行った。ほとんどの妨害物質に対し 10%程度またはそれ以下まで抑制されたが、LOx センシングについては尿酸及び尿素、GOx センシングについてはアセトアミノフェン及び尿酸に対し 15~20%程度の影響が確認された。特に尿酸については影響抑制が難しい物質であり、今後妨害物質透過抑制膜である内部膜の被覆回数を増やす等の再検討を行う必要がある。

Table 3-2 Influence of interferents on the glucose response current of dual biosensors in a PBS ($n=3$).

Interferent	Concentration (mM)	i_{L+I} / i_L Lactate sensor	i_{G+I} / i_G Glucose sensor
Acetaminophen	0.10	1.06 ± 0.04	1.13 ± 0.02
Ascorbic acid	0.11	1.08 ± 0.04	1.06 ± 0.02
Uric acid	0.48	1.08 ± 0.07	1.13 ± 0.06
Urea	4.30	1.06 ± 0.08	1.01 ± 0.01
D-(-)-Fructose	0.40	1.01 ± 0.04	1.01 ± 0.01

i_G : Response current of glucose (5.6 mM)

i_L : Response current of lactate (2.0 mM)

i_{G+I} : Response current of glucose (5.6 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

i_{L+I} : Response current of lactate (2.0 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

検量線及び血漿中での応答評価

Fig. 3-5 に PBS 中におけるグルコース及びラクテートに対する応答を測定した時間-応答のグラフを示す。グルコースとラクテートを交互に添加し良好な応答を得られた。また、グルコースとラクテートのセンシング部位を 3 mm にしたことでお互いの緩衝も十分に抑制されている。

また、Fig. 3-6 に PBS 中でのグルコース及びラクテートに対する検量線 (black circle)、血漿中におけるグルコース (blue circle) 及びラクテート (red circle) の検量線を示す。いずれのセンサもグルコースとラクテートに対して非常に良好な応答が得られ、広範囲にわたりラクテート $r^2=0.9883 \pm 0.0100$ (0~8 mM)、グルコース $r^2=0.9974 \pm 0.0010$ (0~20 mM) と良い直線性を示した。また、人血漿中 (5.15 mM グルコース及び 2.9 mM 乳酸含む) においては、感度の低下 (ラクテート: $22 \pm 3\%$, グルコース $24 \pm 15\%$) が見られたが、これは血漿中においては血清よりもフィブリノゲン等のタンパクの存在が多いために表面への吸着によりグルコース及びラクテートの透過が抑制されたものである。また、バックグラウンド電流の増加も見られたが、これは妨害物質の透過抑制が十分に出来ていなかったため、妨害物質の応答がバックグラウンドに影響したと考える。しかしながら、PBS 中での応答と類似した良好な応答が得られた。

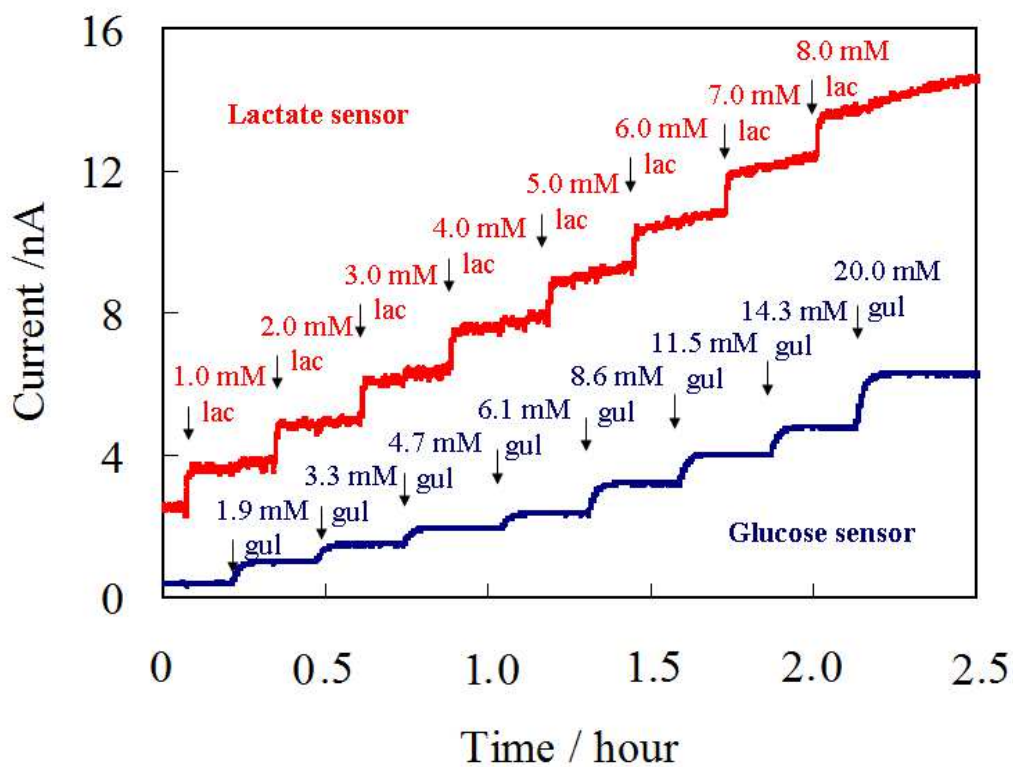


Fig. 3-5 Typical current time response of the sensors with increasing concentration of glucose and lactate in PBS at 40 °C.

長期安定性評価

Fig. 3-7 に作製したセンサの長期安定性の結果を示す。作製したセンサの保存は PBS 中に漬けて 4 °C で保存を行った。作製後 10 日程でセンサ応答が安定し 30 日を過ぎても良い安定性を示した。作製直後からの応答増加は、膜の膨潤が起りグルコースやラクテートの透過が増加していったことを示す。10 日目以降は膜が定常状態になり安定していったことを示す。

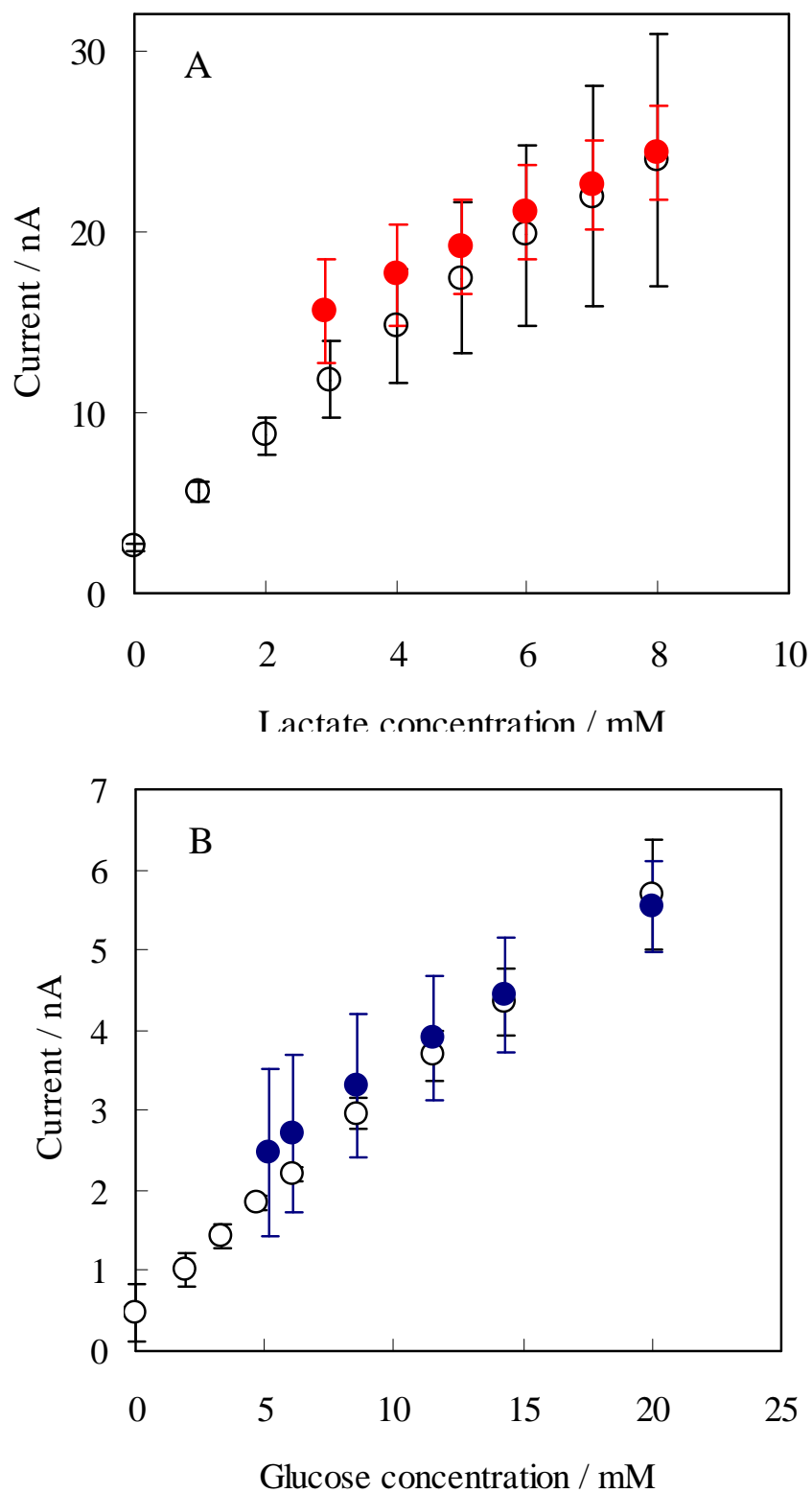


Fig. 3-6 Typical calibration curves of the lactate sensor (A) and glucose sensor (B) measured in PBS (open circle) and human plasma (closed circle) (containing 5.15 mM glucose and 2.9 mM lactate) at 40 °C. $n=3$. $n=3$.

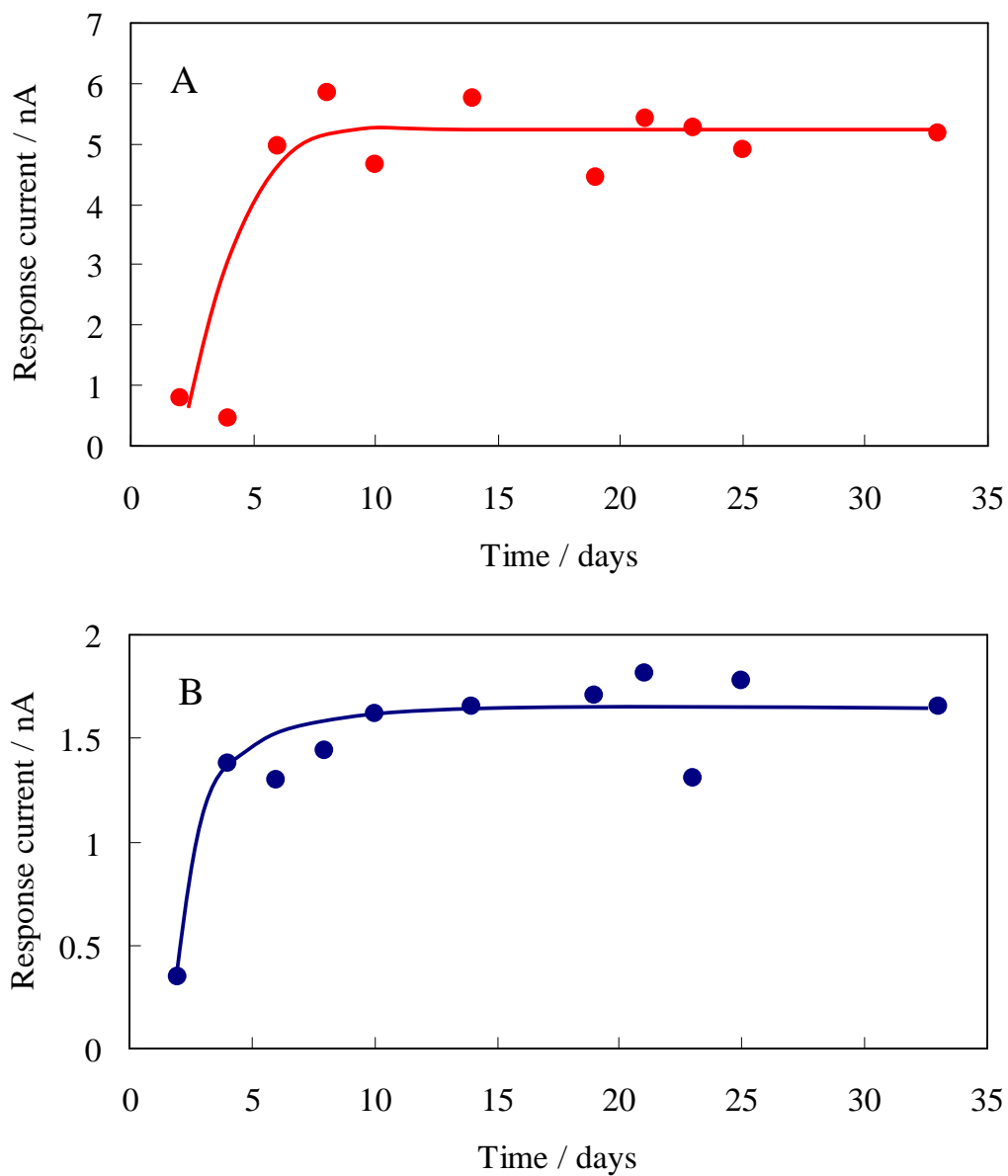


Fig. 3-7 Long-term stability of the lactate sensor (A) and glucose sensor (B) measured in PBS.

4 まとめ

ここでは、1つのセンサで血糖値および乳酸値を同時に測定可能なグルコース/ラクテートデュアルバイオセンサの作製を試みた。生体内で測定を行う場合、センサ固定材料として非動物性由来の材料を用いることが望ましいため、植物由来であるPGAを内部膜兼酵素固定膜として導入しセンサ作製を行った。生体内で測定を考慮し、たんぱく吸着を抑制するための外部膜の被覆回数

検討を行ったところ、被覆回数を増やすことで、十分なたんぱく吸着抑制が確認された。デュアルセンサの場合グルコースとラクテートの応答干渉を抑制することが重要であるため第1作用極と第2作用極の距離を調整することで十分な応答干渉の抑制することができた。また、その後 PBS 中及び人血漿中で特性評価を行ったところ、妨害物質の抑制においてはまだ検討の余地があったものの、グルコースやラクテートに対する検量線及び長期安定性については良好な結果を示した。そのため、今回導入をした植物由来の PGA は、内部膜及び酵素固定化膜材料として十分に機能し、安全性の高いデュアルセンサの作製に繋がること示唆された。

参考文献

1. G. Rocchitta, O. Secchi, M. D. Alvau, D. Farina, G. Bazzu, G. Calia, R. Migheli, M. S. Desole, R. D. O'Neill, P. A. Serra, *Anal. Chem.* **85**, 10282 (2013)
2. A. S. Ian, E. Maria, *J. Neurosci.*, **14**(8), 5068 (1994)
3. V. Sauvinet, S. Parrot, N. Benturquia, E. M. Bravo, B. Renaud, L. Denoroy, *Electrophoresis*, **24**(18):3187 (2003)
4. G. Calia, G. Rocchitta, R. Migheli, G. Puggioni, Y. Spissu, G. Bazzu, V. Mazzarello, J. P. Lowry, R. D. O'Neill, M. S. Desole, P. A. Serra, *Sensors*, **9**(4), 2511 (2009)
5. R. P. Dellinger, M. M. Levy, J. M. Carlet, J. Bion, M. M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D. C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J. F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J. J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B. T. Thompson, S. Townsend, J. S. Vender, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent, *Crit Care Med* **36**, 296 (2008).
6. V. R. Kondepati, H. M. Heise, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 545 (2007).

7. I. Vanhorebeek, L. Langouche, G. Van den Berghe, *Chest*, **132**, 268 (2009).
8. R.C. Arnold, N. I. Shapiro, A. E. Jones, C. Schorr, J. Pope, E. Casner, J. E. Parrillo, R. P. Dellinger, S. Trzeciak, *E.M. Shock*. **32**(1), 35 (2009)
9. W.-C. Lin, D.-G. Yu, M.-C. Yang, *Colloids Surf., B*, **47**, 43 (2006)
10. Y. Otani, Y. Tabata, Y. Ikada, *Biomaterials*, **1996**, *17*, 1387.
11. Y. Otani, Y. Tabata, Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1996**, *31*, 157.
12. H. Iwata, S. Matsuda, K. Mitsuhashi, E. Itoh, Y. Ikada, *Biomaterials*, **1998**, *19*, 1869.
13. Y. Otani, Y. Tabata, Y. Ikada, *Biomaterials*, **1998**, *19*, 2091.
14. H.-F. Liang, C.-T. Chen, S.-C. Chen, A. R. Kulkarni, Y.-L. Chiu, M.-C. Chen, H.-W. Sung, *Biomaterials*, **2006**, *27*, 2051.
15. S. Karmaker, T. K. Saha, Y. Yoshikawa, H. Yasui, H. Sakurai, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 1535.
16. Y. Otani, Y. Tabata, Y. Ikada, *Biomaterials*, **1998**, *19*, 2167.
17. C.-Y. Hsieh, S.-P. Tsai, D.-M. Wang, Y.-N. Chang, H.-J. Hsieh, *Biomaterials*, **2005**, *26*, 5617.
18. S. Murakami, N. Aoki, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 2122.

19. W.-C. Lin, D.-G. Yu, M.-C. Yang, *Colloids Surf., B*, **2006**, *47*, 43.

20. M. Yasuzawa, K. Edagawa, T. Matsunaga, H. Takaoka, T. Yabutani, *Anal. Sci.*, **27**, 337 (2011)

21. H. Takaoka, M. Yasuzawa, *Anal. Sci.*, **26**, 551 (2010)

第2部 種々の生体適合性材料を用いた血管内測定用微細針状グルコースセンサの作製及びそのインビボ評価

第4章 ヘパリンを用いた微細針状グルコースセンサの作製及びその評価

1. はじめに

非糖尿病患者である敗血症患者においても感染症等により、インスリン抵抗性が生じるために厳格な血糖コントロールが必要不可欠である。¹⁻³ 特に、敗血症が治癒するとインスリンの効果が高まり、急激に低血糖状態になることから昏睡状態に陥り、この状態が続くと脳にダメージを与え、更には死に到るケースもあるため、低血糖状態ではグルコース投与等の迅速な対応が求められる。しかしながら、感染症の改善によるインスリン抵抗性の回復時期の予想が困難であるため、低血糖に対するレスポンスの速い持続血糖モニタリングシステム(CGMS)の開発が求められている。現在市場にある皮下間質液測定用CGMSは、血中グルコース濃度との誤差やタイムラグが生じやすく⁴、血糖値の早い変化を追従することは困難である。そのため、敗血症発症患者の血糖値測定には、術中又は事故現場等術前に血管内にセンサを留置する血糖モニタリングが有用と思われる。しかしながら、血中には皮下間質液に比べてフィブリノゲン等のタンパクが多数存在する。そのために、従来皮下間質液測定用CGMSの外部膜に用いられるポリウレタン(PU)/ポリジメチルシロキサン(PDMS)より更なる生体適合性(抗血栓性)の向上が必要である。

ここで、ヘパリンは人工透析によく用いられる生体適合性(抗血栓性)材料の1つであり、人工臓器⁵やstent-graft^{6,7}などにも用いられている。また、マイナスチャージを有していることからプラスチャージを有するポリエチレンイミン(PEI)等をバインダーとして用いることにより簡易に固定が可能である。⁸⁻¹³

ここでは、ヘパリン及びPGAを皮下間質液測定用CGMSの外部膜として主に用いられているPU/PDMSに加えてそれぞれセンサ表面に導入した。作製したセンサは0.1 MのNaClを含む0.1 Mリン酸緩衝溶液(pH 7.4)(PBS)中で40 °Cで評価を行った。また、ヘパリンの生体適合性評価として、フルオレセインイソチアネート(FITC)を用いたフィブリノゲン吸着試験も行った。

2. 実験

試薬

テフロン被覆 Pt-Ir 線(10% Ir-90% Pt, ϕ 0.178 mm)および銀線(ϕ 0.05 mm) は Nilaco のものを用いた。グルコースオキシダーゼ (GOx) (265 U/mg) は Biozyme Laboratories、D(+)-グルコースは関東化学のものを使用した。酢酸セルロースはキシダ化学、Polydimethylsiloxane (MED-4211) は NuSil (Carpinteria, CA)のものを使用した。ナフィオン (perfluorinated ion-exchange polymer 5 wt% in a mixture of lower aliphatic alcohols and water), ポリエチレンイミン (25,000 M_w) およびフィブリノゲン (from human plasma) はアルドリッチのものを使用した。ポリウレタン TECOFLEX は、Thermedics Inc. (Woburn, MA)のものを使用した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)およびヘパリン (from hog intestine)は東京化成のものを使用した。トリトン X-100 は、Acros Orgnic のものを使用した。ポリイミドチューブ(PI) (0.12 mm i.d., 0.16 mm o.d.)は古河電工のものを使用した。その他の試薬は、研究グレードのものを使用した。

装置

グルコース応答測定は、ポテンショスタット(4-channel Potentiostat Model 3104, Pinnacle Technology 社製)を使用した。フィブリノゲンの吸着試験の評価は、分光光度計 F-7000(日立社製)を用いて行った。

酵素固定電極の作製

Fig. 4-1 に微細針型針状グルコースセンサの模式図を示す。グルコースセンサはテフロン被覆白金イリジウム線(10% Ir, 90% Pt, ϕ 0.178 mm) に銀線 (ϕ 0.05 mm) を巻き付け、0.1 M FeCl_3 を含む 0.1M HCl 溶液で酸化により Ag/AgCl 電極部位を作製した。センサの作製は Wilson らの方法を用いて行った。^{14,15} センサ作製は 3 ステップ: 選択透過性膜である内部膜の被覆、酵素の固定、生体適合性膜である外部膜の被覆により作製した。内部膜としてエタノール/アセトン(50:50)に溶かした 5% 酢酸セルロース溶液及びエタノールに溶かした 5% ナフィオン溶液を直径 2 mm のリングを用いそれぞれ 5 回ずつセンサに通し乾燥させることで被覆を行った。酵素固定は、10 mg/mL のグ

ルコース酸化酵素(GOx:265 U/mg)、0.125 % (v/v) グルタルアルデヒド及び 25 mg/mL 牛血清アルブミンを酵素溶液とし、シリンジでセンシング部位に 0.5 μ L を 2 回液滴することで架橋固定を行い 1 h 乾燥させた。外部膜として 4.3 wt% PU 及び 1.3 wt% PDMS を含むテトラヒドロフラン(THF)溶液をリングで被覆し乾燥させた。その後ヘパリンは 5 % の PEI 溶液をリングで 5 回被覆し乾燥後、5 mg/mL のヘパリン溶液に 24 h 浸漬させることで固定し脱イオン水で洗浄し固定を行った。

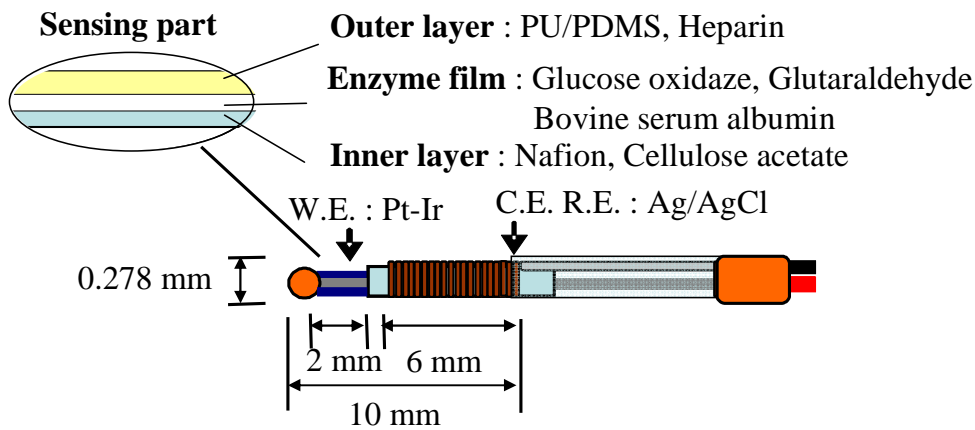


Fig. 4-1 Schematic illustration of a fine needle-type glucose sensor.

センサ応答特性評価

0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4)を用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl)で通電後、電流値が一定になった後にグルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。また、生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)のセンサ応答への影響の評価は、アセトアミノフェン、アスコルビン酸、尿酸がそれぞれ生理学的最大濃度存在下するとき、5.6 mM のグルコース応答に影響を与える割合より調べた。測定は 40 °C で行った。

フィブリノゲン吸着評価

Fig. 4-2 にフィブリノゲン吸着試験の図を示す。ヘパリン膜の生体適合性評価は、FITC を用いたフィブリノゲンの吸着により行った。PI チューブを用い外部膜として PU/PDMS を被覆したサンプルヘパリンを被覆したサンプルの作製をセンサ作製同様に行った。また、比較として何も被覆していない PI チューブも用いた。作製したサンプルは、0.2 mg/mL のフィブリノゲン溶液(30 °C)に 24 h,

72 h, 168 h 浸漬させた。その後、1 mg/mL FITC 溶液中で 10 min フィブリノゲンに FITC を吸着させ、脱イオン水でリンスした。FITC が吸着した表面は蛍光顕微鏡により観察を行った。FITC の吸着量は、界面活性剤である 10 mg/mL Triton-X 溶液中で 1 h 漬けた後に、溶液を分光光度計(励起波長:495 nm, 蛍光波長:520 nm)にて測定した。

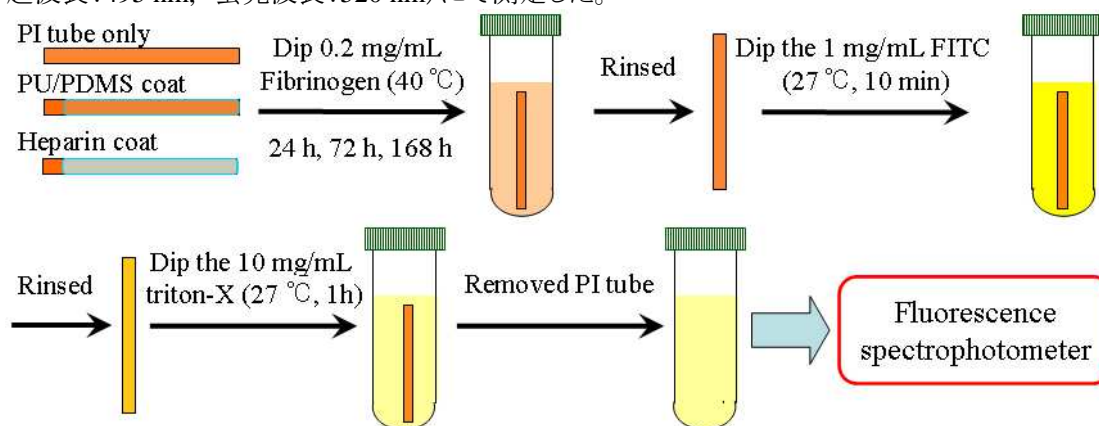


Fig. 4-2 Diagram of fibrinogen adsorption evaluation of PI tube with and without membrane coating.

3. 結果と考察

グルコース検量線の評価

Fig. 4-3 は、ヘパリンを固定する前のセンサと固定後のセンサのグルコース(0~22.4 mM)に対する検量線を示す。グルコース濃度 22.4 mM までの範囲で測定を行ったところ、グルコース濃度の増加に伴う応答電流値の増加が見られた。ヘパリンを固定する前と固定後ではグルコースに対する感度の低下は 25% 見られ、グルコースに対しても良好な応答(相関性: $r^2 > 0.98$ (0~7.5 mM)) が得られた。

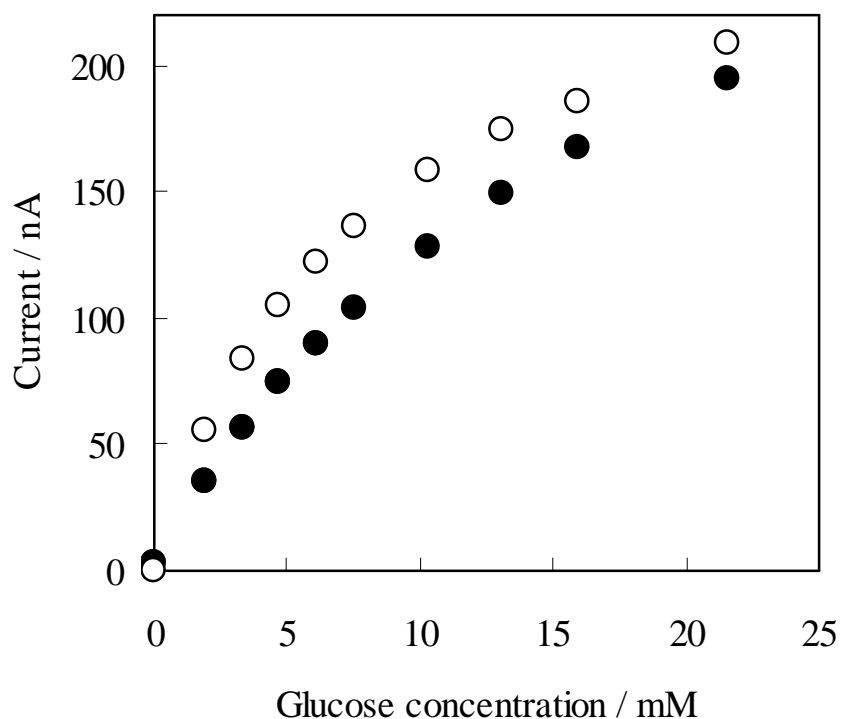


Fig. 4-3 Typical calibration curves of glucose sensor before (open circle) and after (closed circle) the introduction of heparin outer membrane. Measurement was performed in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) at 40 °C.

妨害物質の影響

生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)のグルコース応答への影響について評価した。過酸化水素を測定する電位において電気化学的活性なアスコルビン酸、尿酸および風邪薬の成分であるアセトアミノフェンを用いて測定した。グルコース応答値と生理的 maximum 濃度の妨害物質存在下でのグルコース応答値の比 i_{G+I}/i_G により評価を行った(Table 4-1)。いずれの妨害物質に対してもグルコース応答の 5%以内まで抑制することが出来た。作製された、センサは分子ふるいである酢酸セルロースおよびカチオン交換膜であるナフィオンにより十分に妨害物質の透過抑制が行われている。

Table 4-1 Influence of interferents on glucose response current in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 0.1 M NaCl.

Interferent	Physiological conc. (mM)	i_{G+I} / i_G
Acetaminophen	0.10	1.02
Ascorbic acid	0.11	0.95
Uric acid	0.48	1.01

i_G : Response current of glucose (5.6 mM).

i_{G+I} : Response current of glucose (5.6 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

フィブリノゲン吸着の評価

Fig. 4-4 に蛍光顕微鏡による 7 日間フィブリノゲン溶液に浸漬させた PI チューブの表面を示す。何も被覆されていない PI チューブでは、表面全体にフィブリノゲンが吸着していることが確認出来る。一方 PU/PDMS を被覆した PI チューブではフィブリノゲンの吸着が大幅に抑制されていることが確認されたが、まだ生体適合性が十分でないことからフィブリノゲンの吸着が確認された。一方、ヘパリンを固定したセンサにおいては、僅かに吸着が確認出来るのみであった。これは、PU/PDMS に比べて更に生体適合性が向上したことによるものである。

また、Fig. 4-5 に分光高度計により FITC の吸着していた強度を示す。PU/PDMS のみにおいては、時間が経つごとに浸漬直後からフィブリノゲンの吸着量が増大していくが、PU/PDMS を被覆したサンプルではフィブリノゲンの吸着量が微増しかなかった。更に、ヘパリンを固定したサンプルでは更に低い吸着量を示した。ヘパリンにおいては、浸漬直後から 3 日目まではフィブリノゲンの吸着量が減少していくことが確認された。これにより、ヘパリン膜がフィブリノゲンの吸着を効果的に抑制していることが分かった。しかしながら、浸漬 3 日目以降は、フィブリノゲンの吸着量が微増した。これは、水溶性であるヘパリンが溶液中へ徐々に溶解し、ヘパリンの被覆量が減少したためだと考えられる。

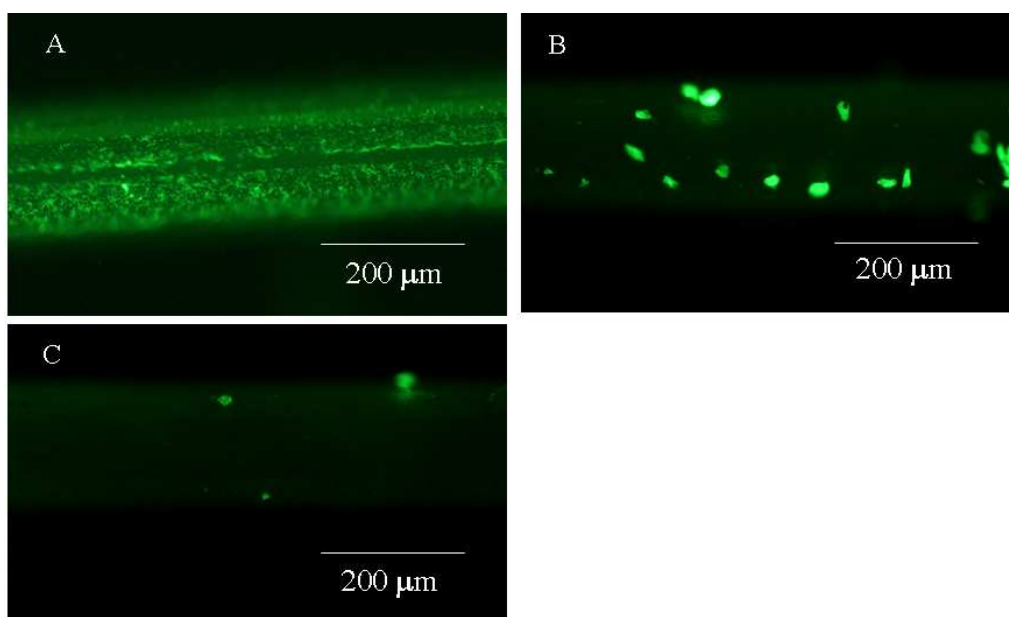


Fig. 4-4 Fluorescence microscopy image of fibrinogen adhesion to the surface of PI tubes soaked in fibrinogen solution for 7 days at 30 °C. (A) Bare PI tube, (B) PU/PDMS-coated PI tube and (C) heparin-coated PI tube.

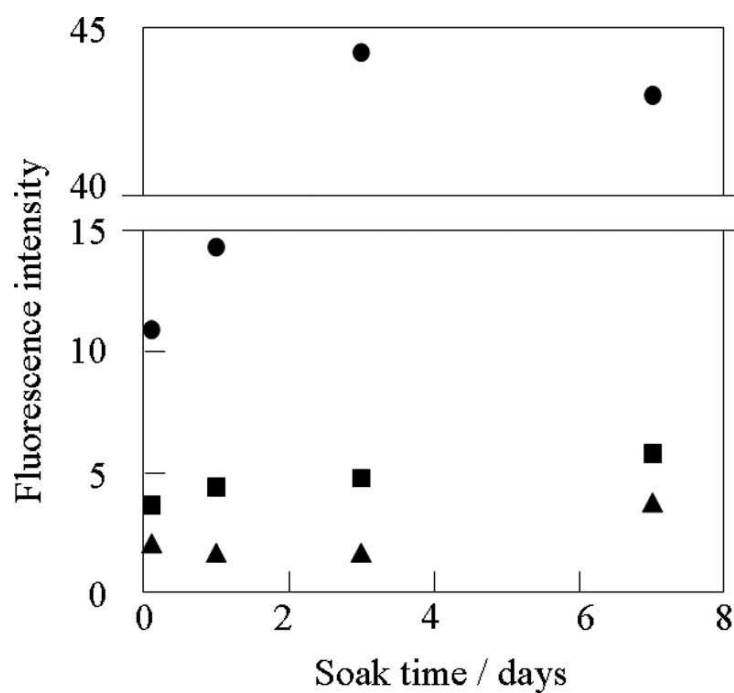


Fig. 4-5 Comparison of fibrinogen adsorption on bare PI tube (●), PU/PDMS coated PI tube (■), and heparin coated PI tube (▲). Fibrinogen adsorption was evaluated by fluorescence detection of FITC labeled fibrinogen.

4 まとめ

血管内測定では、センサは血管内に留置することから血液と直接接触れる。その時、センサ表面はフィブリノゲン等が吸着し血栓を形成することで、グルコースの透過を著しく遮断しセンサは機能を失う。そのため、センサ表面は血栓等の吸着を抑制する機能を有する必要がある。従来の皮下間質液測定用CGMSの外部膜であるPU/PDMSのみでは、生体適合性(抗血栓性)が十分とは言えないことから、ここでは抗凝固薬であるヘパリンを外部膜として導入を行った。作製したセンサは、検量線において良好な応答を示し、またアスコルビン酸、尿酸やアセトアミノフェンの妨害物質の影響も抑制した。さらに、フィブリノゲン吸着評価において、3日目以降ヘパリンの溶解によるフィブリノゲン吸着量増加を示したものの、PU/PDMSに比べて高い生体適合性を示した。作製したセンサは、血管内の測定においても、血栓の吸着を抑制し血糖値のモニタリングを可能にすることを示唆した。

参考文献

1. R. P. Dellinger, M. M. Levy, A. Rhodes, D. Annane, H. Gerlach, S. M. Opal, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, I. S. Douglas, R. Jaeschke, T. M. Osborn, M. E. Nunnally, S. R. Townsend, K. Reinhart, R. M. Kleinpell, D. C. Angus, C. S. Deutschman, F. R. Machado, G. D. Rubenfeld, S. A. Webb, R. J. Beale, J. L. Vincent, R. Moreno, *Crit Care Med* **41**, 580 (2013).
2. V. R. Kondepati, H. M. Heise, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 545 (2007).
3. I. Vanhorebeek, L. Langouche, G. Van den Berghe, *Chest*, **132**, 268 (2009).
4. B. P. Kovatchev, D. Shields, M. Breton, *Diabetes Technol. Ther.* **11**(3) 139(2009)
5. T. Daniel, *Med. Engi. Physics*, **33**, 1041 (2011)

6. C. Kjeld, L. Rolf, E. Hakan, E. Graciela, L. Anders, *Thromb. Res.*, **115**, 245 (2005)
7. M. Sheng, L. Zongjun, S. Li, G. Zhang, L. C. Laisheng, Z. Wei, D. Qiangguo, G. Junbo, *Biomaterials*, **30**, 2276 (2009)
8. T. N. Quang, P. Zhenghua, N. Tuyen, R. Pierre, *J. Membr. Sci.*, **213**, 85 (2003).
9. D. Ping, H. Weichang, W. Xu, W. Tianmin, *Thin Solid Films*, **516**, 5168 (2008).
10. D. Ping, H. Weichang, X. Yayi, D. Guozu, W. Tianmin, *J. Mater. Sci. Technol.*, **26**, 1027 (2010).
11. M. S. Marcus, P. Dieter, S. Xavier, P. A. Josep, G. Thomas, *Biomaterials*, **30**, 4939 (2009).
12. H. Yan, H. F. Wang, *Anal. Chem.*, **83**, 8589 (2011).
13. J. S. Won, N. Kun, H. B. You, *Sens. Act., B*, **99**, 393 (2004).
14. D. S. Bindra, Y. Zhang, G. S. Wilson, D. R. Thevenot, D. Moatti, G. Reach, *Anal Chem*, **63**, 1692 (1991).
15. B. Aussedat, M. Dupire-Angel, R. Gifford, J. C. Klein, G. S. Wilson, G. Reach, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, 716 (2000).

第 5 章 ヘパリン/ウロキナーゼを用いた微細針状グルコースセンサの作製及びその評価

1. はじめに

血管内にセンサ等異物の留置後では、生体の異物防御システムが非常に高く血栓形成が促進される。そのために、センサ表面の高い生体適合性(抗血栓性)は必要不可欠である。また、長期間の体内留置に伴う免疫応答や炎症反応等の異物反応も問題となる。¹ 第 4 章で抗凝固薬であるヘパリンを外部膜として用いたセンサでは、従来の皮下間質液測定用の CGMS に用いられる PU/PDMS のみに対して良好な生体適合性を示した。² しかしながら、ポリエチレンイミンを用いたヘパリンの固定では、ヘパリンの溶液中への溶解がみられ長期的な測定が難しいことが示唆され、留置後の長期測定で血栓形成を十分に抑制することが難しいと判断される。また、血栓はセンサ表面から離れ心臓や脳に到達すると心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす可能性がある。留置後における血栓形成抑制および形成した血栓を溶解させることで血栓の血管内への流出を防ぐことも必要である。ここで、ウロキナーゼは、血栓溶解能を有する材料であることから、ヘパリンと同時に電極表面に安定に固定することでセンサ表面の生体適合性の向上が予想される。

ここでは、ヘパリン/ウロキナーゼを用いた血管内測定用微細針状グルコースセンサの作製を試みた。従来の CGMS 用外部膜に用いられている PU/PDMS に加えて、ヘパリン/ウロキナーゼの同時固定を行った。作製したセンサは 0.1 M の NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 7.4)(PBS)中で 40 °C で評価を行った。

2. 実験

試薬

テフロン被覆 Pt-Ir 線(10% Ir-90% Pt, ϕ 0.178 mm)および銀線(ϕ 0.05 mm) は Nilaco のものを用いた。グルコースオキシダーゼ (GOx) (265 U/mg) は Biozyme Laboratories、D(+)-グルコースは関東化学のものを使用した。酢酸セルロースはキシダ化学、Polydimethylsiloxane (MED-4211) は NuSil (Carpinteria, CA)のものを使用した。ナフィオン (perfluorinated ion-exchange polymer 5

wt% in a mixture of lower aliphatic alcohols and water)はアルドリッチのものを使用した。ポリウレタン TECOFLEX は、Thermedics Inc (Woburn, MA)のものを使用した。メチルビニルエーテル無水マレイン酸共重合体は International Specialty Products 社のものを使用した。ポリエーテルブロックアミドは Atochem 社のものを使用した。トリドデシルメチルアンモニウムクロライドは Polysciences 社のものを使用した。ウロキナーゼは JCR 社製、ヘパリンナトリウムは Diosynth 社製のものを使用した。その他の試薬は、研究グレードのものを使用した。

装置

グルコース応答測定は、ポテンシオスタット(4-channel Potentiostat Model 3104, Pinnacle Technology 社製)を使用した。

酵素固定電極の作製

Fig. 5-1 に微細針型針状グルコースセンサの模式図を示す。グルコースセンサはテフロン被覆白金イリジウム線(10% Ir, 90% Pt, ϕ 0.178 mm) に銀線 (ϕ 0.05 mm) を巻き付け、0.1 M FeCl_3 を含む 0.1M HCl 溶液で酸化により Ag/AgCl 電極部位を作製した。センサの作製は Wilson らの方法を用いて行った。^{3,4} センサ作製は 3 ステップ: 選択透過性膜である内部膜の被覆、酵素の固定、生体適合性膜である外部膜の被覆により作製した。内部膜としてエタノール/アセトン(50:50)に溶かした 5% 酢酸セルロース溶液及びエタノールに溶かした 5% ナフィオン溶液を直径 2 mm のリングを用いそれぞれ 5 回ずつセンサに通し乾燥させることで被覆を行った。酵素固定は、10 mg/mL のグルコース酸化酵素(GOx: 265 U/mg)、0.125 % (v/v) グルタルアルデヒド及び 25 mg/mL 牛血清アルブミンを酵素溶液とし、シリンジでセンシング部位に 0.5 μL を 2 回液滴することで架橋固定を行い 1 h 乾燥させた。外部膜として 4.3 wt% PU 及び 1.3 wt% PDMS を含むテトラヒドロフラン(THF)溶液をリングで被覆し乾燥させた。

ヘパリン/ウロキナーゼの固定は、バインダーを用い固定を行った。アセトンに溶かした 2%メチルビニルエーテル無水マレイン酸共重合体溶液、THFに溶かした2%ポリエーテルブロックアミド溶液と、トリドデシルメチルアンモニウムクロライドを 3:2:1 となるように添加してバインダー溶液とした。リングを用いバインダー溶液を 6 回被覆し 60 °C で 3 h 乾燥させた後に、300 IU/mL ウロキナーゼお

よび 0.7 % ヘパリンを含む生理食塩水中に 24 h 浸漬し乾燥させて固定した。

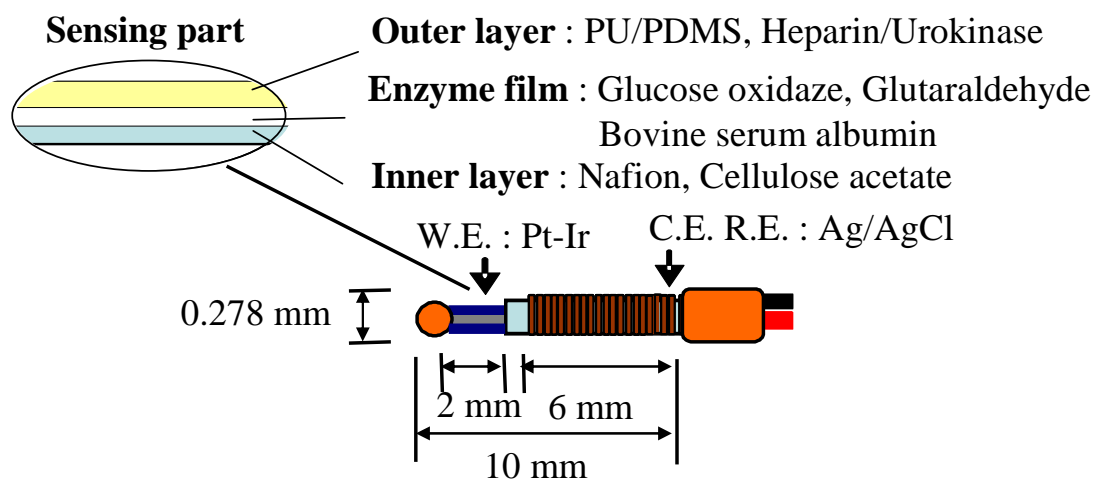


Fig. 5-1 Schematic illustration of a fine needle-type glucose sensor.

センサ特性評価

0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl) で通電後、電流値が一定になった後にグルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。また、生体内に存在する電気化学的活性な物質 (妨害物質) のセンサ応答への影響の評価は、アセトアミノフェン、アスコルビン酸、尿酸がそれぞれ生理学的最大濃度存在下するとき、5.6 mM のグルコース応答に影響を与える割合より調べた。測定は 40 °C で行った。

3. 結果と考察

グルコース検量線の評価

Fig. 5-2 は、ヘパリン/ウロキナーゼを固定したセンサのグルコース(0~22.4 mM)に対する検量線を示す。グルコース濃度 22.4 mM までの範囲で測定を行ったところ、いずれのセンサもグルコース濃度の増加に伴う応答電流値の増加が見られた。また、検量線の直線性は $r^2=0.9923\pm 0.0016$ (0~22.4 mM) で非常に良好であった。

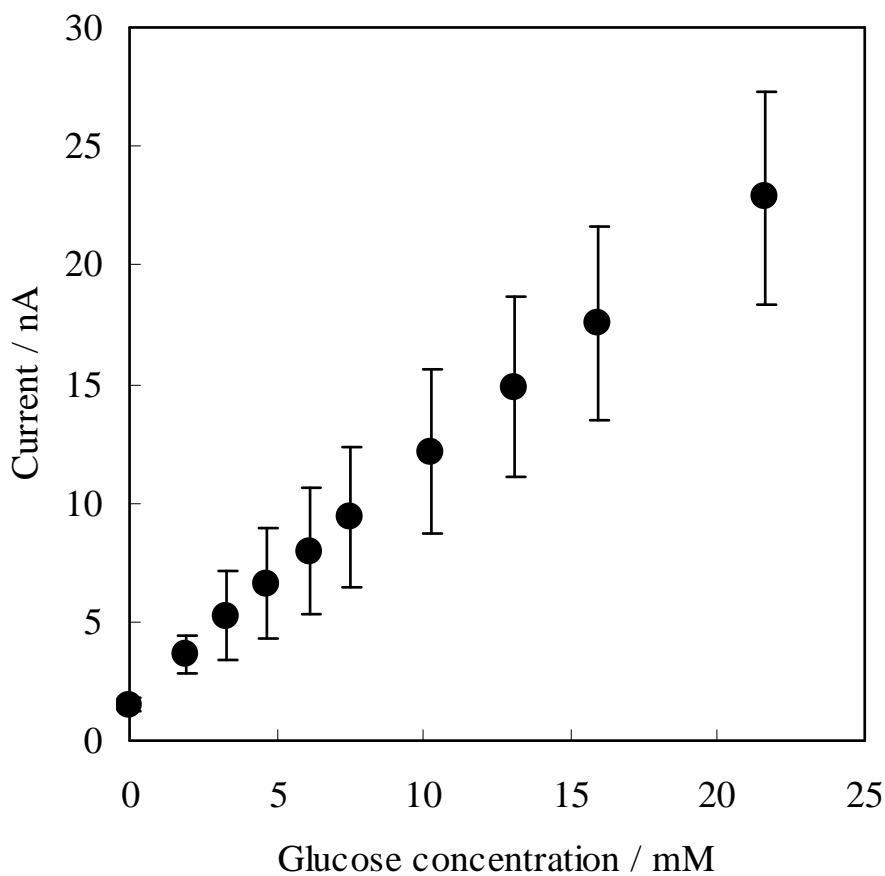


Fig. 5-2 Calibration curves of electrodes with heparin/urokinase outer film in PBS. ($n=3$)

妨害物質の影響

生体内に存在する電気化学的活性な物質(妨害物質)のグルコース応答への影響について評価した。過酸化水素を測定する電位において電気化学的活性なアスコルビン酸、尿酸および風邪薬の成分であるアセトアミノフェンを用いて測定した。グルコース応答値と生理的 maximum 濃度の妨害物質存在下でのグルコース応答値の比 i_{G+}/i_G により評価を行った(Table 5-1)。いずれの妨害物質に対してもグルコース応答の 5%以内まで抑制することが出来、非常に良好である。作製された、センサは分子ふるいである酢酸セルロースおよびカチオン交換膜であるナフィオンにより十分に妨害物質の透過抑制が行われている。

Table 5-1 Influence of interferents on the glucose response current of heparin/urokinase-coated sensor in a PBS ($n=3$).

Interferent	Physiological conc. (mM)	i_{G+I} / i_G
Acetaminophen	0.10	1.0 ± 0.05
Ascorbic acid	0.11	1.0 ± 0.04
Uric acid	0.48	1.0 ± 0.03

i_G : Response current of glucose (5.6 mM)

i_{G+I} : Response current of glucose (5.6 mM) in presence of interferent at physiological maximum.

4 まとめ

血管内にセンサ等異物の留置後では、生体の異物防御システムが非常に高く血栓形成が促進されるために、非常に高い生体適合性が必要とされる。また、長期的に測定する場合には、生体適合性材料の溶液中への溶解を防ぐことも必要である。ここでは、ヘパリンとウロキナーゼの長期的に安定な固定化をセンサ表面に行った。作製したセンサは、検量線において広い範囲にわたり非常に良好な直線性を示し、またアスコルビン酸、尿酸やアセトアミノフェンの妨害物質の影響も十分に抑制した。作製したセンサは、血管内の測定においても、長期的に血栓の吸着を抑制し血糖値のモニタリングを可能にすることを示唆した。

参考文献

1. 石原一彦 : 生体材料の最近の進歩, 4. 抗血栓性材料の新展開, 61, 132 (1999)
2. K. Edagawa, Y. Fuchiwaki, M. Yasuzawa, *J. Electrochem. Soc.*, **161** (2), B3111 (2014)
3. D. S. Bindra, Y. Zhang, G. S. Wilson, D. R. Thevenot, D. Moatti, G. Reach, *Anal Chem*, **63**, 1692 (1991).

4. B. Aussedat, M. Dupire-Angel, R. Gifford, J. C. Klein, G. S. Wilson, G. Reach, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, 716 (2000).

第6章 微細針状グルコースセンサを用いた血管内グルコースモニタリング

1. はじめに

血管内での *in vivo* 測定を行う場合以下のことを考慮する必要がある。

a. センサ留置箇所

センサを留置する場合、人間においては手や足などから留置することが術中や術後のことを考慮すると望ましい。しかしながら、実験動物においては手足の血管経が限られており、また覚醒化においては異物感や痛みにより激しく動いたり、センサを皮膚上から触ることが予測され、センサへのダメージが懸念される。センサを留置し長期測定を行うためには、留置血管箇所の十分な検討および対策が必要である。また、血流についても十分に確保できる部位が望ましく十分な血管径を有する箇所が望ましい。

b. グルコースの投与方法

グルコースの投与方法については、経口投与、皮下投与、血管内投与があるがここでは、経口投与及び皮下投与は全身にグルコースが周るのに時間がかかる。敗血症患者の血糖値モニタリングを想定し、血糖値の急激な変化をセンサで追跡させたいために血管内投与が望ましい。

c. 麻酔の有無

通常 *in vivo* 測定では生体へのダメージや負荷を考慮し麻酔を使用する。しかしながら、麻酔を使用することで、血糖値のコントロールが難しくなることが報告されているために、留置は麻酔下で行い測定は覚醒下で行なうことが望ましい。

d. 採血方法

採血方法は、①カテーテルを静脈に留置し採血を行う、②指先等から穿刺を用いて採血し測定を行う方法を行った。穿刺による採血時には実験動物が抵抗したり激しく動くためにノイズやスパイクシグナルが発生するために、足の静脈等にカテーテルの留置を行い採血することが望ましい。

ここでは、微細針状グルコースセンサの作製を行い、実験動物(犬)を用い血糖値モニタリングを試みた。生体適合性膜である外部膜として従来皮下間質液測定に用いられている PU/PDMS を被覆した。センサの留置箇所は、動脈に比べて皮膚表面に近く留置が容易な静脈が良いと判断し、実験動物の頸部静脈に留置を試みた。また、センサの留置箇所や採血方法等の検討も *in vivo* 測

定過程で検討した。センサの換算方法は 1 点補正を用いて行い^{1,2}、評価はクラークエラーグリッド解析により評価を行った。³

2. 実験

試薬

グルコース (D (+) - Glucose) は関東化学、生体内へのセンサ留置時に麻酔薬および採血のために静脈内に留置したカテーテルの血液凝固防止用として使用したヘパリンや消毒エタノールなどその他の試薬は、医療用のものを使用した。

装置

In vivo 測定にはワイアレスポテンシオスタット Model 3100RX(Pinnacle Technology, Lawrence, KS)、血糖値計 は Arkray 社 GT-1820 を使用した。血糖値計は GOx 法が使われているものを用いた。

測定動物

使用動物は 40 ヶ月齢のビーグル犬 (13.3 kg) を用いた。

In vivo 用センサ作製

Wilson らの方法を用い作製を行った。^{4,5} 内部膜として、酢酸セルロースナフィオンを被覆、酵素の固定はグルタルアルデヒドと牛血清アルブミンを用いた架橋法で行い、外部膜として PU/PDMS を被覆した。

In vitro 測定

0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4)を用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl)で通電後、電流値が一定になった後にグルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。測定は 40 °C で行った。

In vivo 測定

作製したセンサは留置直前にあらかじめ電子線滅菌を 24 h 行った。麻酔静脈静注後に犬の首をメス等により切開し静脈を剥き出しにする。その後、センサ留置はカニューラを用いて行い固定後に切開部分を縫合した。その後、無線式ポテンシオスタットを用いて、0.60 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加し、モニタリングを開始した。グルコースは足の静脈から行い、血糖値比較のための採血は足静脈にカテーテルを留置し行った。

3. 結果と考察

In vitro 測定

作製したセンサのグルコースに対する検量線を Fig. 6-1 に示す。グルコース濃度 22.4 mM までの範囲で測定を行ったところ、グルコース濃度の増加に伴う応答電流値の増加が見られた。作製したセンサはグルコースに対し良好な応答を示し、相関性 $r^2=0.9956$ を示した。

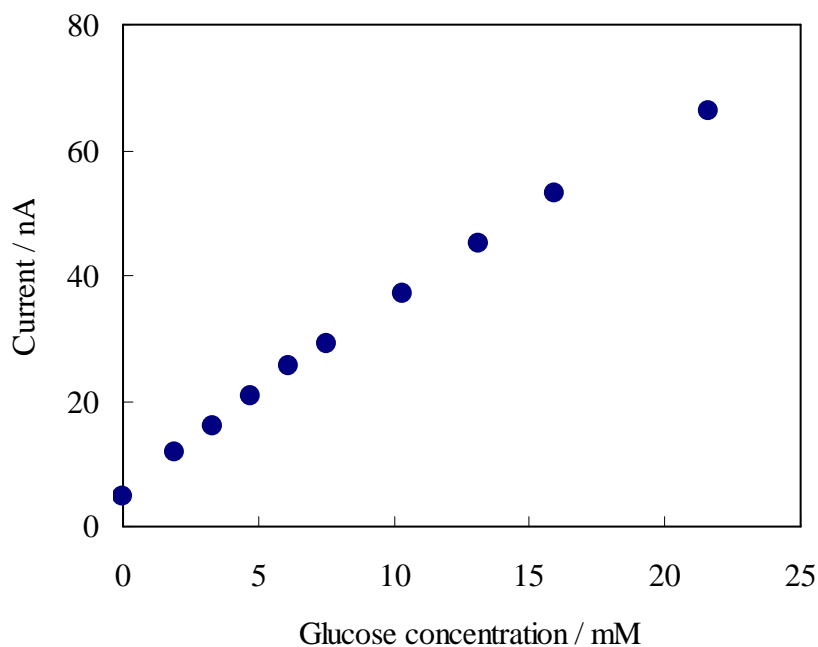


Fig. 6-1 Typical calibration curves of the sensor measured in 0.1 M PBS solution (pH 7.4) at 40 °C.

In vivo 測定

Fig. 6-2 に作製したセンサの血管内での応答を示す。センサ留置 4 h 後においてはグルコース注入による血糖値の変化をセンサで追従出来た。静脈へのグルコース注入後は 1min 以内にセンサ応答の上昇が見られ血中血糖値の増加をセンサで確認出来た。しかしながら、その後徐々にセンサ応答は減少し留置から 18 h 後においてはグルコース注入後採血値に変化は見られたもののセンサ応答に変化は見られなかった。さらに、センサ応答が前日の 10~20 nA から 10 pA までの減少が見られた。これは、センサ表面に血栓が吸着することでグルコースの透過を抑制していることによる。

Fig. 6-3 にエラーグリッドを示す。臨床精度を有する A,B の範囲は 86%(A+B=57%+29%)であった。臨床測定可能な範囲が 80%以上示し制度が高いと言える。逆に採血値は低血糖を示したもののセンサ値が正常値又は高血糖を示した以上範囲にあたる D の範囲においては 14%であったが、限りなく A の領域に近い正常値を示していた。同じ静脈においても、測定部位によって血糖値が異なるためのズレであると考えられる。

また、抜去後にセンサ表面の観察を行ったところセンサ表面に多数の血栓吸着が確認された (Fig. 6-4)。PU/PDMS のみでは、血栓が吸着することで長期的な測定は難しいと判断された。犬の首静脈にセンサの留置を行った場合、カラーを付けているものの翌日にセンサが抜けているものも見られた。これは、カラーを付けており足での接触は防げたものの、首を激しく動かしていたために抜けたものと思われる。そこで、今後の *in vivo* 測定では留置箇所の再検討が必要である。本実験では、カテーテルを足静脈に留置し採血を行った。しかしながら、覚醒下で実験動物が動く際にカテーテルが曲がり詰まる事で、スムーズな採血を困難にしていた。また、ヘパリンロックを行っていたにも関わらず、カテーテル内に血栓が形成され採血不能な場合もあった。このようなことから、長期的にカテーテルを用いて採血を行うことは難しい。

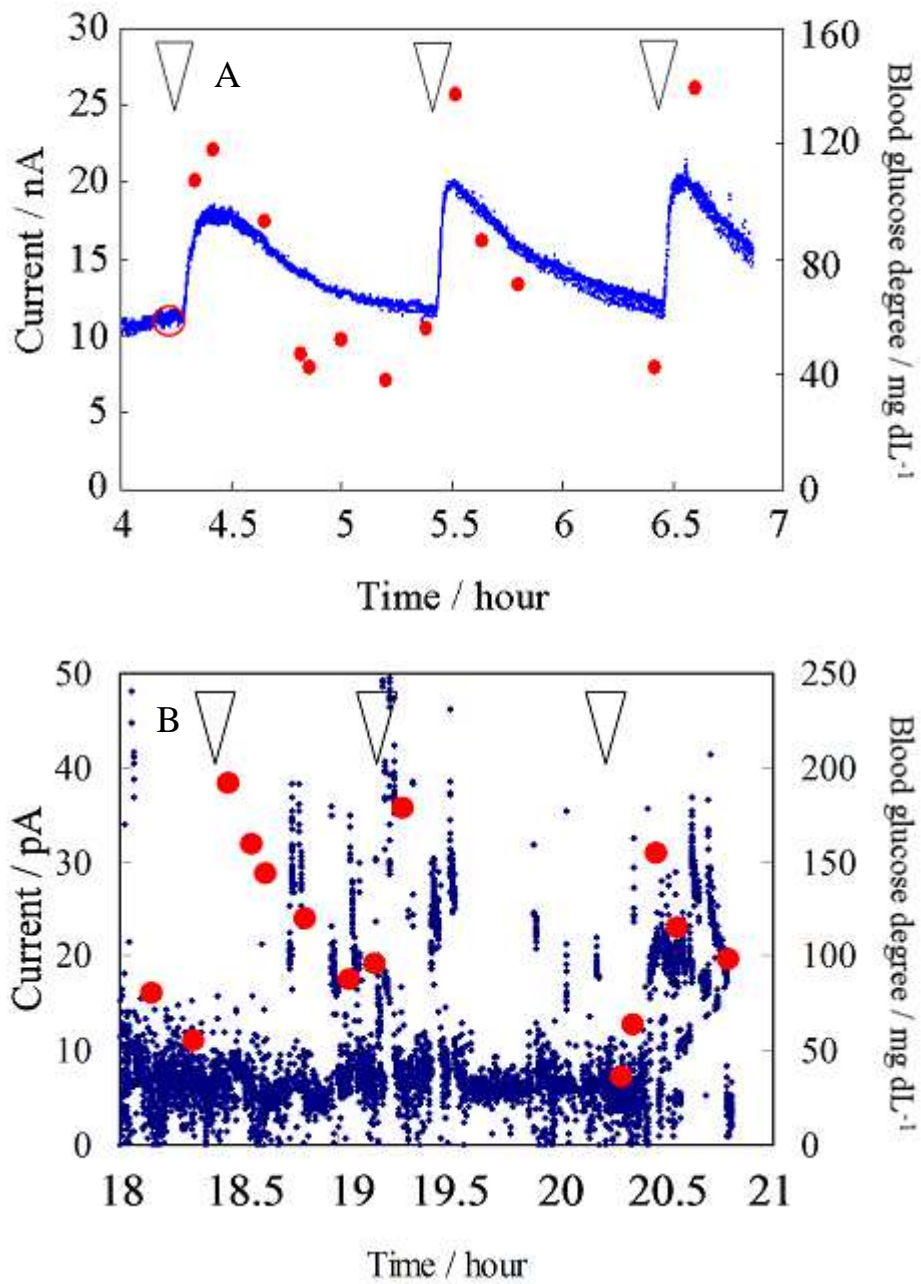


Fig. 6-2 Comparison of the glucose sensor response (solid line) and blood glucose measured using commercial glucose meter (solid circle) on first day (A) and second days (B). White arrows indicate the injection of glucose.

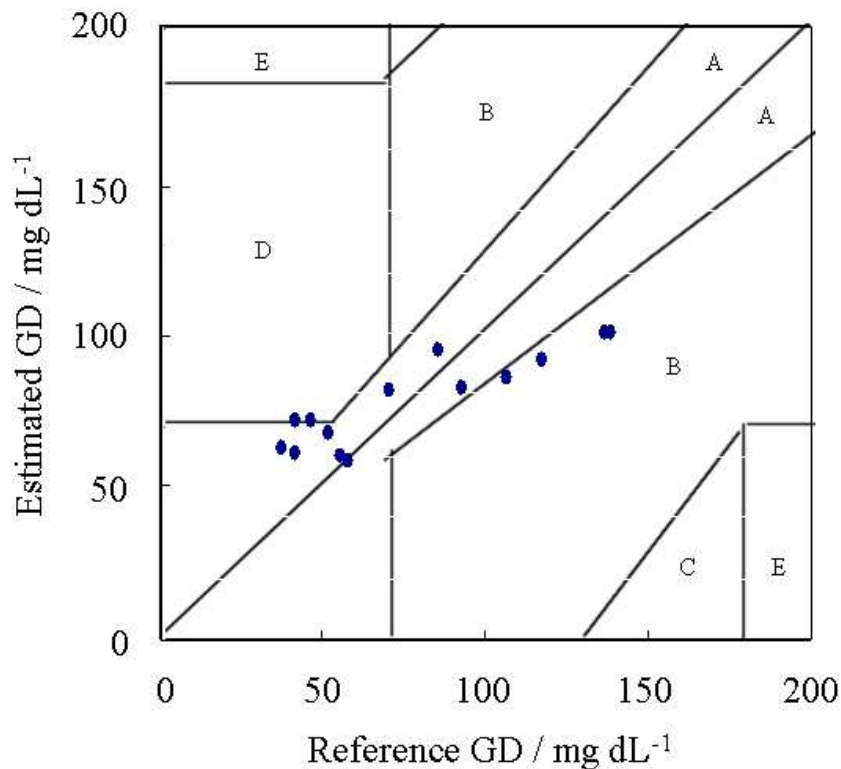


Fig. 6-3 Clark-Error grid analysis plotting the results (solid blue line) of first days.



Fig. 6-4 Photograph of glucose sensor with PU/PDMS-outer membrane after 7 days implantation in blood vessel.

4 まとめ

ここでは、微細針状グルコースセンサを用い血管内での血糖値モニタリングを試みた。血管内でのモニタリングにおいては、センサ留置箇所、グルコースの投与方法、麻酔の有無や採血方法など最良な選定が必要であることから検討も行った。留置箇所については、目視し易く留置が容易である事から犬の首を用いたが、覚醒下の動物の動きにより留置したセンサが抜けることもあった。また、首静脈に留置を行う場合切開、留置、固定、縫合とプロセスが複雑であり、更に技術も必要であることから更なる簡易な留置箇所の再考が必要である。グルコースの投与方法は、静脈への直接投与が最適であった。採血方法においては、採血用カテーテルを用いた方法では血栓形成等

により長期的に用いることは難しいと判断した。

作製したセンサは、*in vitro* 測定において留置直後は良好な結果を示し、実験動物の血糖値変化をセンサで相関良く追従することが出来た。しかしながら、2 日目においては血栓形成により応答は非常に小さくなり測定は出来なかった。血管内での長期モニタリングにおいては、センサ表面の生体適合性改善が必須である。

参考文献

1. D. W. Schmidtke, A Heller, *Anal. Chem.*, **70**, 2149 (1998).
2. C. Choleau, J. C. Klein, G. Reach, B. Aussedat, V. Demaria-Pesce, G. S. Wilson, R. Gifford, W. K. Ward, *Biosens Bioelectron*, **17**, 647 (2002).
3. W. L. Clake, D. J. Cox, L. A. Gonder-Fredric, W. R. Carter, S. L. Pohl, *Diabetes Care*, **1987**, *10*, 622.
4. D. S. Bindra, Y. Zhang, G. S. Wilson, D. R. Thevenot, D. Moatti, G. Reach, *Anal Chem*, **63**, 1692 (1991).
5. B. Aussedat, M. Dupire-Angel, R. Gifford, J. C. Klein, G. S. Wilson, G. Reach, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, 716 (2000).

第 7 章 種々の生体適合性材料を導入した微細針状グルコースセンサを用いた血管内グルコースモニタリング

1. はじめに

非糖尿病患者である敗血症患者においても感染症等により、インスリン抵抗性が生じるために厳格な血糖コントロールが必要不可欠である。¹⁻³ 特に、敗血症が治癒するとインスリンの効果が高まり、急激に低血糖状態になることから昏睡状態に陥り、この状態が続くと脳にダメージを与え、更には死に到るケースもあるため、低血糖状態ではグルコース投与等の迅速な対応が求められる。しかしながら、感染症の改善によるインスリン抵抗性の回復時期の予想が困難であるため、低血糖に対するレスポンスの速い持続血糖モニタリングシステム(CGMS)の開発が求められている。現在市場にある皮下間質液測定用 CGMS は、血中グルコース濃度との誤差やタイムラグが生じやすく⁴、血糖値の早い変化を追従することは困難である。そのため、敗血症発症患者の血糖値測定には、術中又は事故現場等術前に血管内にセンサを留置する血糖モニタリングが有用と思われる。しかしながら、血中には皮下間質液に比べてフィブリノゲン等のタンパクが多数存在する。そのために、従来皮下間質液測定用 CGMS の外部膜に用いられるポリウレタン(PU)/ポリジメチルシロキサン(PDMS)より更なる生体適合性(抗血栓性)の向上が必要である。

本研究では、従来の皮下間質液測定用 CGMS の外部膜として用いられている PU/PDMS に加えてヘパリンを固定したセンサおよびヘパリンに加えてウロキナーゼも同時に固定したセンサを用い実験動物の血管内に留置を行い血糖値のモニタリングを行った。また、アミノ酸の一種であり納豆のネバネバ成分であるポリグルタミン酸(PGA)は生分解性の親水性ポリマーである。⁵ また、カルボン酸基を有しマイナスチャージを有していることから、血液凝固因子でマイナスチャージを有するフィブリノゲンの吸着を抑制し血栓形成を抑制することが期待されることから、PGA を導入したセンサの作製も行い評価を行った。実験動物としてウサギを用い、センサ留置は動物が足で触れる恐れのない耳静脈に留置を行った。また、採血は簡易血糖値計を用い足の指先から穿刺により採血を行った。センサの換算方法は 1 点補正を用いて行い^{6,7}、評価はクラークエラーグリッド解析により評価を行った。⁸

2. 実験

試薬

グルコース (D (+) - Glucose) は関東化学、インスリンは日本イーライリリーのヒトインスリン注射液(ヒトインスリン R-注 U-40(40 単位/mL))を用いた。PGA($M_w=800000-1000000$)は日本ポリゲルのものを用いた。生体内へのセンサ留置時に麻酔薬および採血のために静脈内に留置したカテーテルの血液凝固防止用として使用したヘパリンや消毒エタノールなどその他の試薬は、医療用のものを使用した。

装置

In vivo 測定にはワイアレスポテンシオスタット Model 3100RX(Pinnacle Technology, Lawrence, KS)又はポテンシオスタット(4-channel Potentiostat Model 3104, Pinnacle Technology 社製)を使用した。血糖値計 は Arkray 社製 GT-1820 を使用した。血糖値計は GDH 法が使われているものを用いた。

測定動物

使用動物はウサギ(2.0 kg 程度)を用いた。

In vivo 用センサ作製

第 4 章 第 5 章で作製したものを使用した。PGA については、内部膜、酵素膜および外部膜被覆後にジメチルスルホキシドに 5%になるように溶かしてリングを用いてセンサに被覆し乾燥させることで固定を行った。

In vivo 測定

Fig. 7-1 にインビボ測定方法の手順、7-2 および 7-3 に図を示す。作製したセンサは留置直前にあらかじめエチレンオキシドガス又は電子線滅菌を 24 h 行った。麻酔を静脈静注後にカニューラを用い留置を行った。その後、ヘパリンを導入したセンサ 2 本を 1 羽目のウサギに留置し、ヘパリン

又は PGA を導入したセンサを 2 羽目に留置を行い、無線式ポテンシオスタットに接続した。ヘパリン/ウロキナーゼを固定したセンサ 3 羽目に 3 本留置を行い有線式ポテンシオスタットに接続し、0.60 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加し、モニタリングを開始した。グルコース又はインスリン静注は耳の静脈から行い、血糖値比較のための採血は足の指先から穿刺により行ない測定した。測定が終われば、無線式ポテンシオスタットを用いている動物は接続状態のまま飼育箱に、有線式ポテンシオスタットに接続している動物は切断し飼育箱へ戻した。有線式に関しては、測定の間のみ接続を行った。

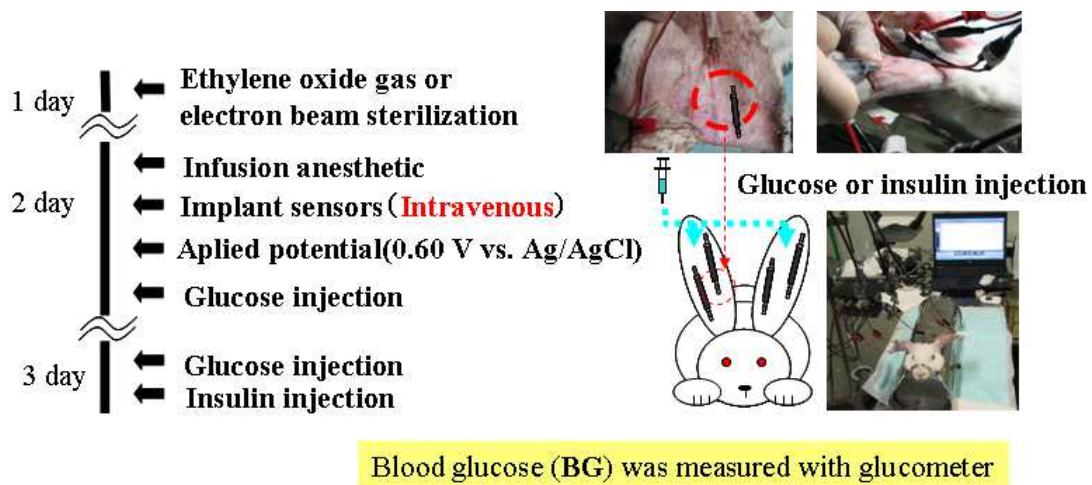


Fig. 7-1 Diagram of *in vivo* measurement procedure.

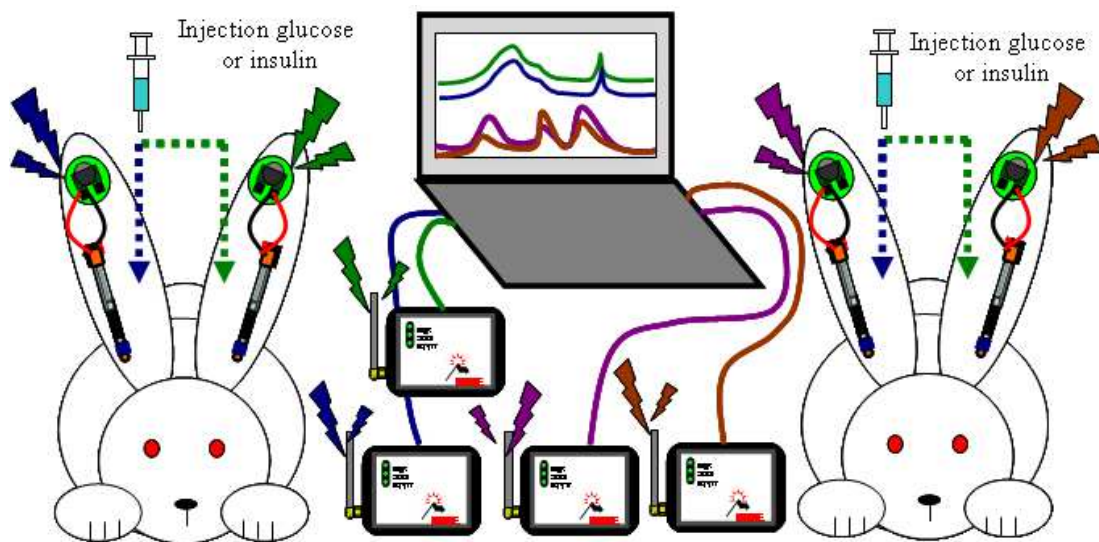


Fig. 7-2 Schematic diagram of wireless continuous glucose monitoring system using fine needle type glucose sensors implanted in rabbit ear veins.

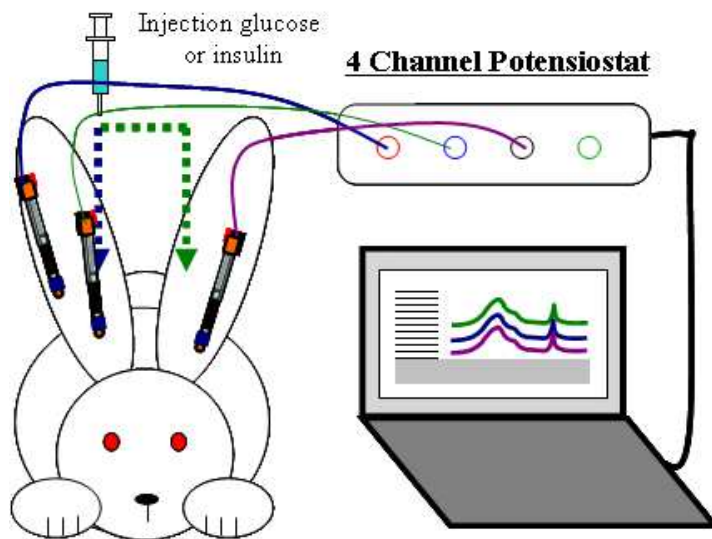


Fig. 7-3 Schematic diagram of wired continuous glucose monitoring system using fine needle type glucose sensors coated heparin/urokinaze implanted in rabbit ear veins.

In vitro 測定

0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.4)を用いて、印加電位 0.6 V (vs Ag/AgCl)で通電後、電流値が一定になった後にグルコース溶液を添加し、得られた電流値変化をグルコース応答電流として評価した。測定は 40 °C で行った。

3. 結果と考察

ヘパリン,PGA を固定したセンサの in vivo 測定

Fig. 7-4 の A に 1 羽目に留置したヘパリンセンサ B にヘパリン又は PGA センサの留置 2 日目の応答を示す。ヘパリン及び PGA を固定したセンサでは、留置 2 日目においてもセンサ応答が確認された。特に 1 羽目においては、右耳に留置したセンサ(青実線)および左耳に留置したセンサ(緑実線)も血糖値の急激な変化もセンサで追隨できた。

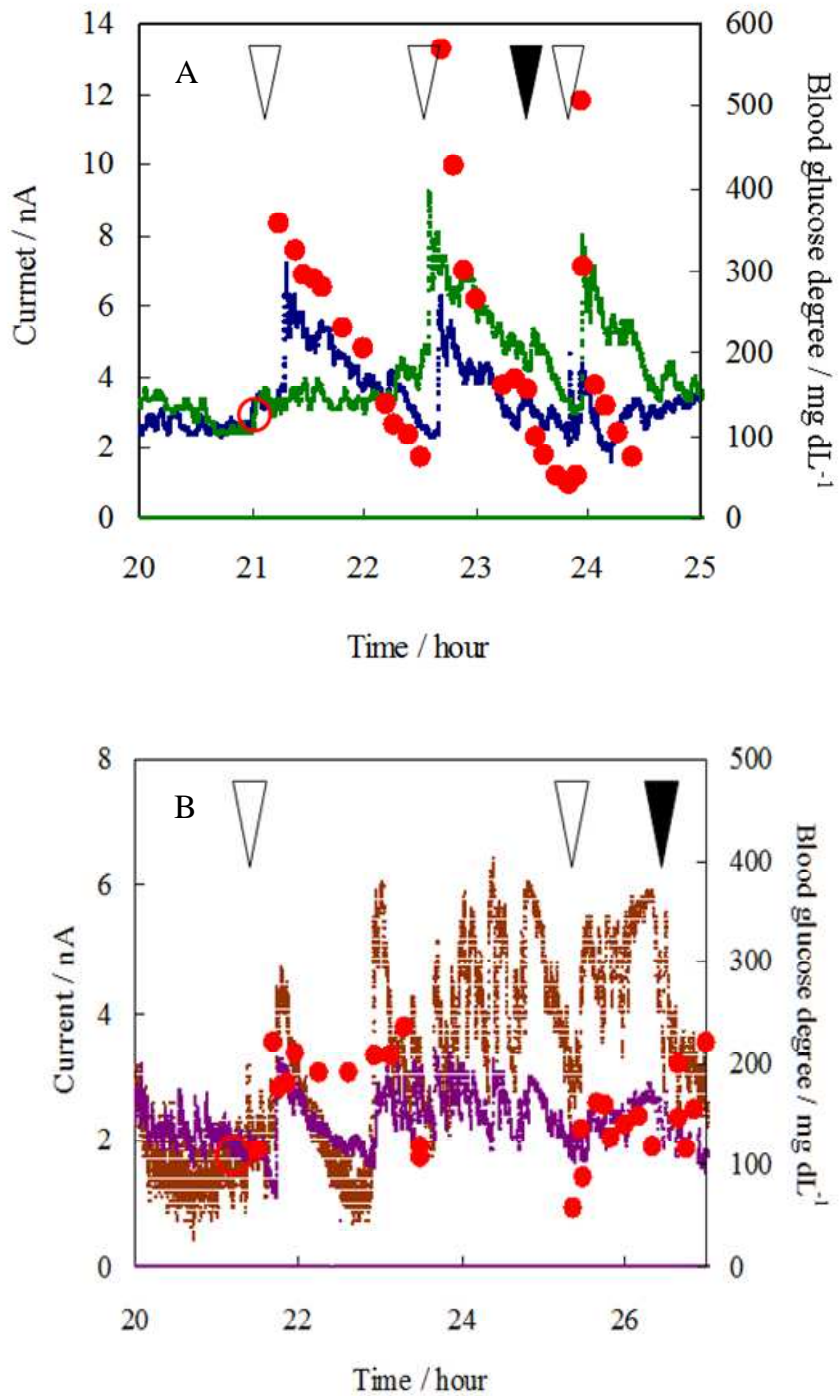


Fig. 7-4 Comparison of the glucose sensors response (solid line) and blood glucose measured using commercial glucose meter (solid circle) with time. Blue, green and purple lines were the response for heparin- coated sensors and brown line was that for PGA-coated sensor. Glucose sensors were inserted in blood vessel of two rabbits (A (2.2 kg) and B (2.3 kg)) and measured on the 2nd day of implantation. White and black arrows indicate the injection of glucose and insulin, respectively.

しかしながら、右耳に留置したヘパリンセンサ(実線緑)の最初のグルコース注入ポイントではセンサ応答に顕著な変化が見られなかった。これは、1 回目のグルコース注入時には血流が安定しておらずセンサ留置部位の静脈まで巡らなかったためと考えられる。一方、2 羽目の右耳に留置したヘパリンセンサ(実線紫)と左耳に留置した PGA センサ(実線茶)においては、応答はみられたものの採血値との相関が低く、またグルコース注入後の血糖値の変化も安定しなかった。用いた実験動物の血流などが個体差により違うため、1 羽目に比べ良くなかったことで十分な相関性が得られなかった。その後留置を続け 7 日目にも測定を行ったがいずれのセンサにおいてもグルコースに対するセンサ応答は確認されなかった。

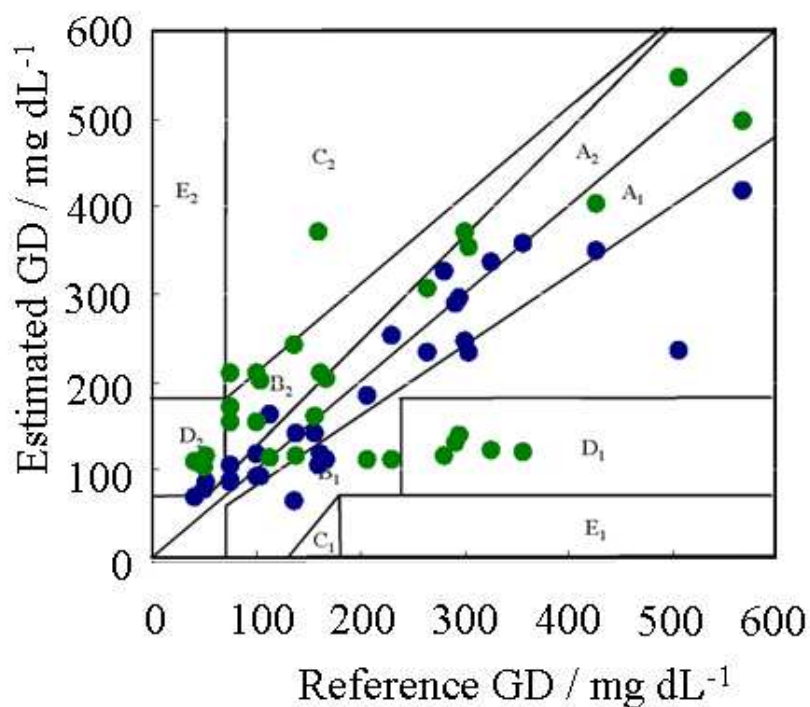


Fig. 7-5 Error grid analysis of glucose sensors implanted in veins of right ear (blue circle) and left ear (green circle).

ここで、1 羽目におけるインビボ結果のエラーグリッド解析を行った(Fig. 7-5)。臨床測定可能な A および B において 77% (右) および 59% (左) を示した。反対に異常な範囲 D においては、23% (右) および 30% (左) を示した。特に採血値が低血糖を示しているにも関わらず正常値又は高血

糖を示す D_2 の領域においても 11% および 12% を示し、低血糖を見逃す可能性がある。これは、血糖値の急激な変化時においては、血流の違いや変化により測定するサイトにおいて血糖値の反映に時間差があることによる。⁶⁻⁸

そこで、1 羽目の右耳に留置していたセンサのインビボの結果について、補正を最初のポイントに加えて(80 分後(114 mg/dL),170 分後(76 mg/dL))にて補正を増やした(Fig. 7-6)。1 点補正のみに比べて、採血値をセンサ応答でより追従することが出来た。また、このエラーグリッド解析を Fig. 7-7 に示す。補正点を増やした場合、エラーグリッドにおいて臨床測定可能な範囲において 100% まで大幅に向上した。

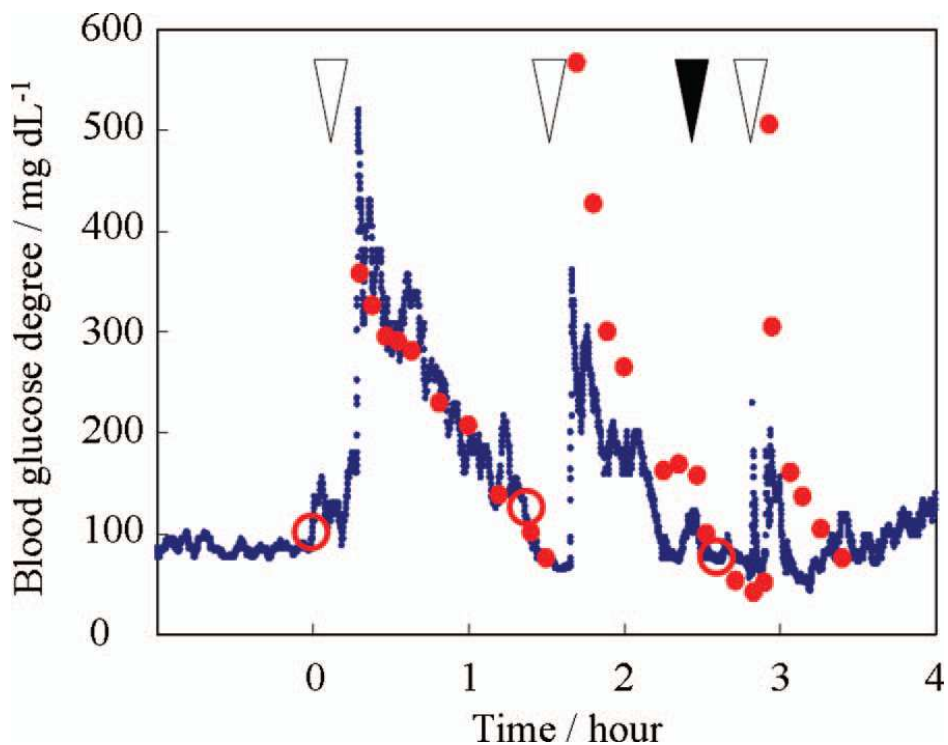


Fig. 7-6 Comparison of glucose sensors response implanted in vein of right ear and blood glucose degree measured using commercial glucose meter (closed circles) with time. Sensor sensitivity was adjusted three times using the blood glucose value obtained from toes (open circles).

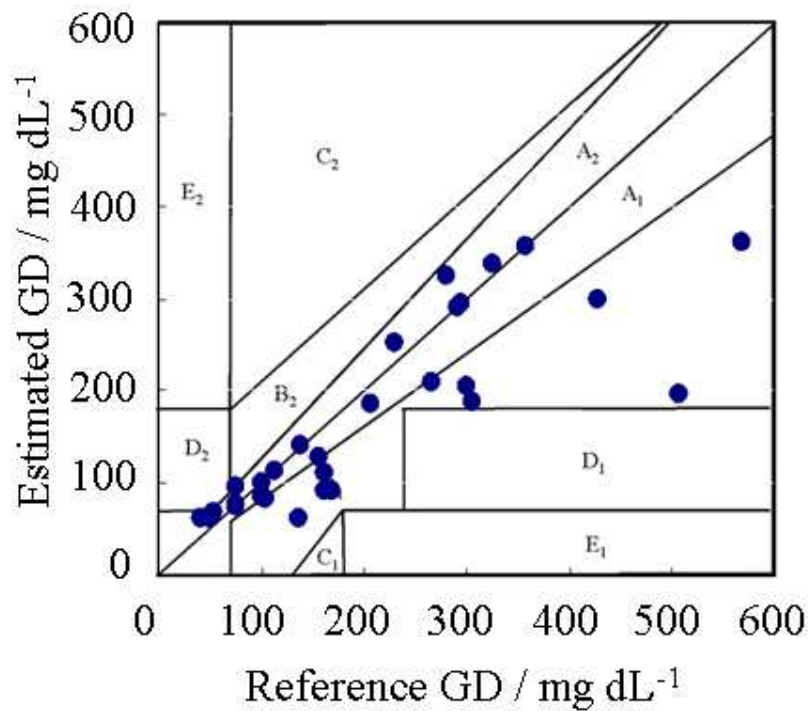


Fig. 7-7 Error grid analysis of glucose sensor implanted in vein of right ear. Three blood glucose values were employed for the adjustment of glucose sensor sensitivity.

また、7日間留置後センサを抜去し表面の観察を行ったが、留置を行ったいずれのセンサにおいても表面に血栓の吸着は確認出来なかった(Fig. 7-8)。また、抜去後に *in vitro* 測定を行ったが、30%程度の感度の低下はみられたもののグルコースに対する応答は確認された。この感度の低下は長期的(7日間)に血管内にセンサを留置し続けていたことによる酵素活性の低下によるものと思われる。



Fig. 7-8 Photograph of heparin-coated glucose sensor after 7 days implantation in blood vessel.

へパリン/ウロキナーゼを固定したセンサの *in vivo* 測定

Fig. 7-9 にセンサを血管内に留置した直後および 2、4、7 および 10 日目の応答を示す。センサは、右耳に2本(実線青および紫)と左耳に1本(実線緑)留置を行った。留置直後は明瞭なセンサ応答が見られなかった。これはセンサ膜の膨潤が少なく、グルコースの透過が低かったのに加え、センサ留置時に細菌等侵入の侵入によりセンサ近傍の血液循環が不十分であったことが考えられる。2日目以降では、センサ応答の上昇が確認されたが、ノイズも多かったことから明確な測定が困難であった。これは、グルコースの注入および採血を覚醒下で行ったため、ウサギへのストレスおよびウサギの激しい動きによりノイズが発生したものと思われ、特に4日目においては明瞭な応答を確認出来なかった。一方、7日目以降では、センサ応答が明瞭になった。これは、血管内の損傷が回復し、血液の十分な循環が改善されたためだと考えられる。さらに、留置10日目においては、明瞭なセンサ応答が確認された。特に、グルコース注入による高血糖状態と共にインスリン注入による低血糖状態のモニタリングを行ったが、急激な血糖値の変化においてもセンサ応答で追従することが出来、採血値との良好な相関性が確認された。

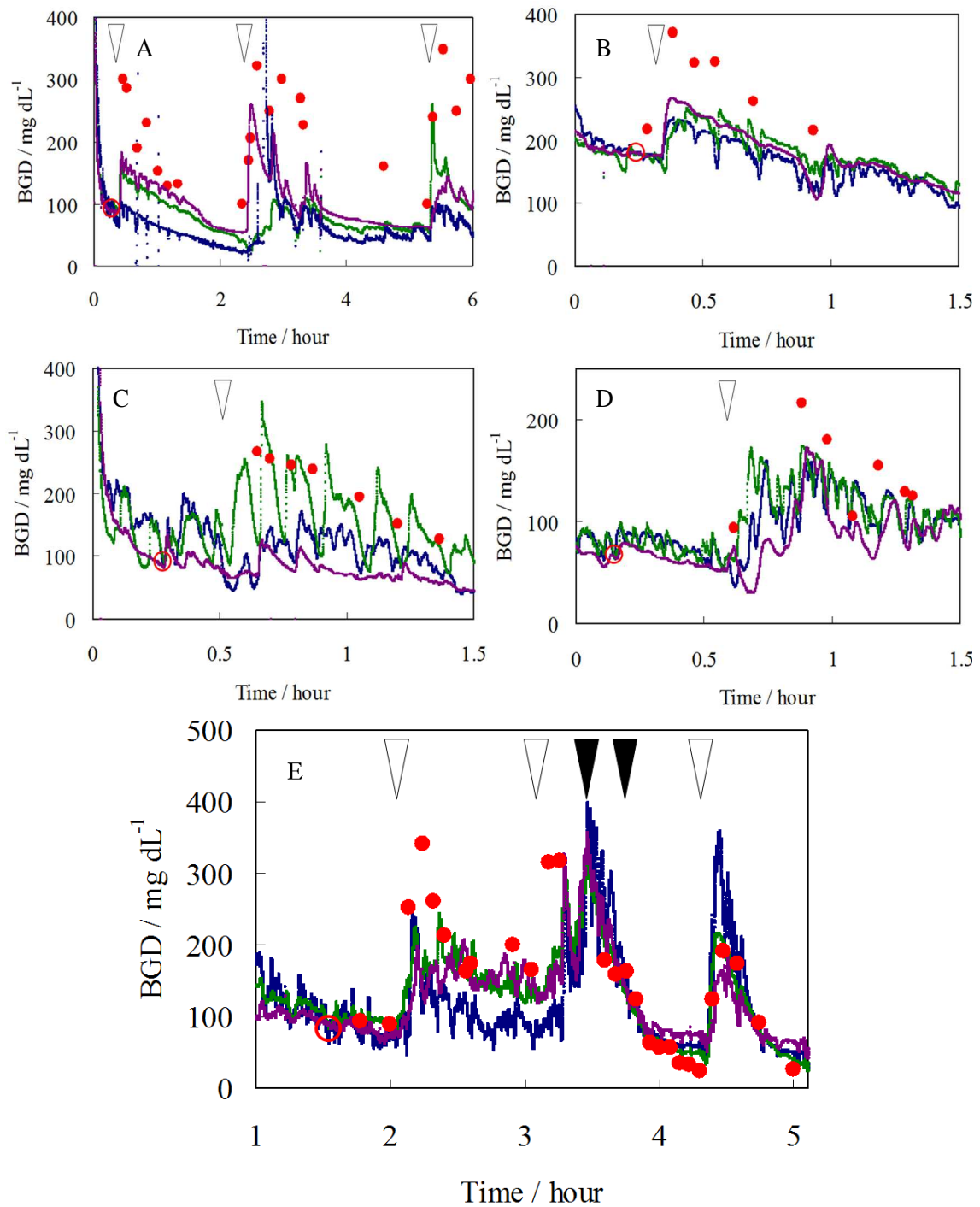


Fig. 7-9 Comparison of the glucose sensor response (solid line) and blood glucose degree measured using commercial glucose meter (solid circle) with time. Glucose sensor was inserted in blood vessel for 10 days. A, B, C, D and E indicate the sensor response observed at 1st, 2nd, 4th, 7th and 10th days, respectively. White and black arrows indicate the injection of glucose and insulin, respectively.

また、Fig. 7-10 に 10 日目の *in vivo* 結果(実線青)のクラークエラーグリッド解析の結果を示す。いずれのセンサの結果も臨床測定精度・誤差を有する範囲 A, B においてそれぞれ(青,緑,紫) 82%, 75%, 71%示した。また、異常範囲(D)もそれぞれ 18%, 21%, 29%含まれたが低血糖領域においては非常に良好な相関性を示した。

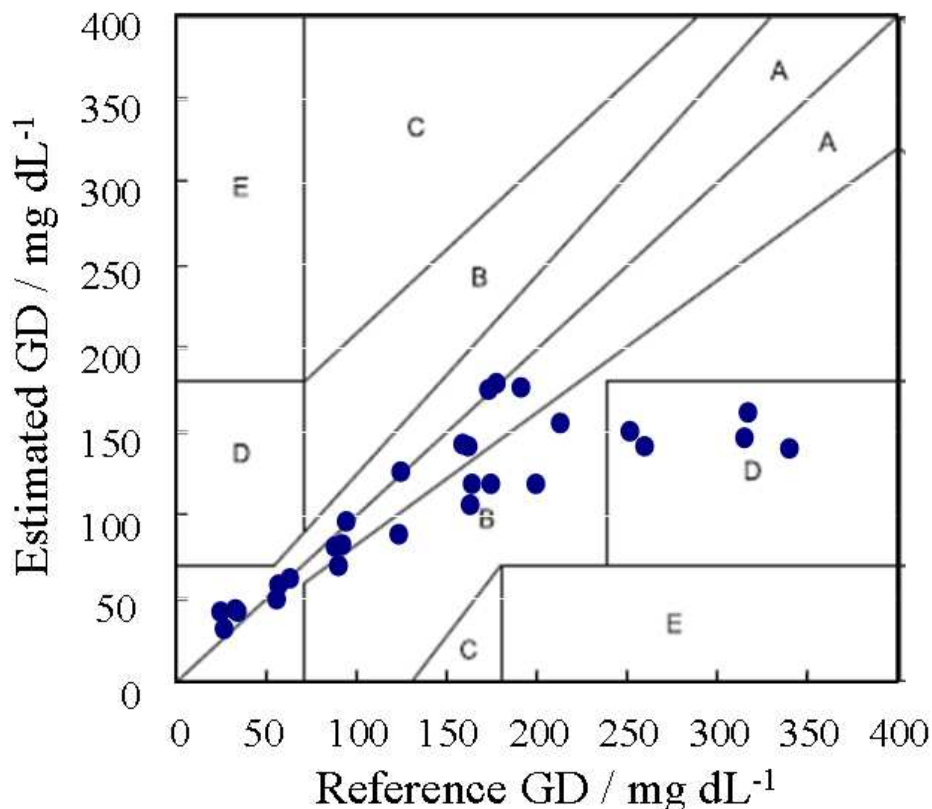


Fig. 7-10 Clark-Error grid analysis of glucose sensor response on the 10th days of implantation.

また、10 日間留置を行ったセンサの表面の観察を行ったが血栓の吸着は一切確認されなかった(Fig. 7-11)。Fig. 14 に留置前のグルコースに対する検量線と 10 日間留置したあとのセンサの検量線を示す。留置前に比べてそれぞれ 38%, 47%, 63%の感度の低下が見られたがいずれのセンサも $r^2=0.99$ 以上の非常に高い直線性を示した。ヘパリンに加えてウロキナーゼを固定したセンサの生体適合性が飛躍的に向上し、血管内での長期測定においても血栓の吸着を抑制し良好な相関性を示した(Fig. 7-12)。



Fig. 7-11 Photograph of heparin/urokinase-coated glucose sensor after 10 days implantation in blood vessel.

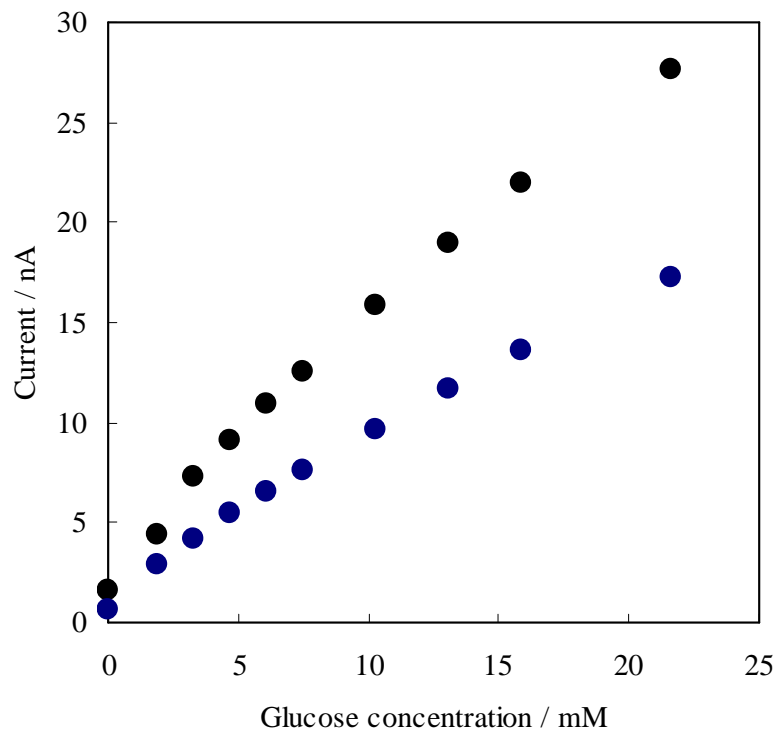


Fig. 7-12 Typical calibration curves of glucose sensor measured in PBS, before implantation (black circle) and after 10 days *in vivo* measurement (blue circle).

4 まとめ

ここでは、種々の生体適合性材料を用い作製したセンサの血管内長期グルコースモニタリングを試みた。血管内での直接グルコースをモニタリングすることにおいては、第3章の結果より従来の皮下間質液測定用CGMSの外部膜に用いられるPU/PDMSのみでは血栓の吸着により長期的な測定が不可能であった。一方、ヘパリンおよびPGAを導入したセンサにおいては2日目において

もセンサ応答が確認された。特に、1 羽目においては、急激なグルコースの変化もセンサ応答で追随することができ、エラーグリッド解析において臨床測定可能範囲が 77%を示した。さらに、検量線の傾きによるセンサ応答の補正を行い 1 点補正の回数を増やすことで 100%まで改善された。一方、2 羽目においては、ヘパリンおよび PGA を導入したセンサでは十分な応答を得られなかった。これは、2 羽目においては血流等が 1 羽目に比べて十分では無かったことに起因する。

しかしながら、ヘパリンに加えてウロキナーゼも同時に導入したセンサにおいては、10 日目においても非常に良好なセンサ応答を示した。また、エラーグリッド解析においても低血糖領域の相関性が非常に高かった。これは、ヘパリンに加えてウロキナーゼをセンサ表面に長期的に安定に固定されていたからである。

参考文献

1. R. P. Dellinger, M. M. Levy, A. Rhodes, D. Annane, H. Gerlach, S. M. Opal, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, I. S. Douglas, R. Jaeschke, T. M. Osborn, M. E. Nunnally, S. R. Townsend, K. Reinhart, R. M. Kleinpell, D. C. Angus, C. S. Deutschman, F. R. Machado, G. D. Rubenfeld, S. A. Webb, R. J. Beale, J. L. Vincent, R. Moreno, *Crit Care Med* **41**, 580 (2013).
2. V. R. Kondepoti, H. M. Heise, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 545 (2007).
3. I. Vanhorebeek, L. Langouche, G. Van den Berghe, *Chest*, **132**, 268 (2009).
4. B. P. Kovatchev, D. Shields, M. Breton, *Diabetes Technol. Ther.* **11**(3) 139(2009)
5. W. C. Lin, D. G. Yu, M. C. Yang, *Colloids Surf.*, **B47**, 43 (2006)
6. T. Koschinsky, K. Jungheim, L. Heinemann, *Diabetes Technol. Ther.*, **5**, 829 (2003).

7. T. Koschinsky, K. Jungheim, *Diabetes Care*, **25**, 956 (2002).

8. M. Metzger, G. Leibowitz, J. Wainstein, B. Glaser, I. Raz, *Diabetes Care*, **25**, 1185 (2002).

第 8 章 まとめ

本研究では、生体内モニタリング用微細針型グルコースセンサの開発を行った。第 1 部では、生体内モニタリング用センサの設計にあたり、安全性の高いセンサ固定材料に注目し酵素固定電極の作製について論じた。生体へのダメージを軽減するために、既存のセンサ芯材である Pt-Ir 線ではフレキシビリティが十分ではないことから、医療用にも用いられている SUS304 を用いフレキシブルなステンレスワイヤ作製しセンサ作製を試みた。ナフィオンを被覆し Pt スパッタにより作製したセンサにおいては、バックグラウンド電流も低く PBS 中でも直線性の高い応答を示した。また、センサは血清中でも良い性能を示しインビボへの応用の可能性を示唆した。また、安全性の面から生体内測定用センサの材料は非動物性由来の材料を用いることが望ましい。既存の方法においては、動物由来の牛血清アルブミンを用いることから、植物由来である PGA を内部膜兼酵素固定層としたグルコースセンサの作製を試みた。作製したセンサは既存の Wilson らの方法により作製したセンサと類似した性能を示したことから PGA の内部膜兼酵素固定膜への有用性を示した。脳内における複数の代謝物を同時に測定出来ることは、医療用のアプリケーションとして有用である。そこで、1 つのセンサでグルコース及びラクテートの同時測定可能なグルコース/ラクテートデュアルセンサの作製を試みた。また、作製にあたり、内部膜兼酵素固定膜に非動物由来である PGA を用いた。外部膜やセンシング部位の距離の改良を行い血漿中においても良好な応答を示すセンサの作製に繋がった。

第 2 部では非糖尿病患者である敗血症患者の厳格な血糖モニタリングが必要であることから、血管内へのセンサ留置を目的としたセンサ作製及び血管内モニタリングについて論じた。敗血症においては、特に低血糖症の早期認知が患者の生存に大きく影響することから、タイムラグを少なくするために血管内でのモニタリングが必要であった。また、血管内においては皮下間質液測定に比べて生体適合性(抗血栓性)の向上が必要であることから、既存の CGMS に用いられている外部膜の PU/PDMS にみでは不十分であることが予想されたために、PGA、ヘパリンやウロキナーゼの導入により生体適合性の改善を試みた。PU/PDMS のみでは、留置直後は応答が見られたものの血栓の吸着による長期測定が難しい結果となった。また、ヘパリンを固定したセンサでは 2 日目においても良好な応答が確認され 1 点補正回数を増やすことでエラーグリッド解析においても大幅

な改善が見られた。しかしながら、以降応答は確認されなかった。ヘパリンのみではまだ十分な生体適合性(抗血栓性)が得られずヘパリンによる生体適合性低下も否めなかった。一方ヘパリンに加えてウロキナーゼの固定を行ったセンサでは、10日目においても良好な応答を示し、血糖値の急激な変化や低血糖領域においてもセンサ応答で追従することができた。また、血管内の測定において、センサ留置箇所、グルコースの投与方法、麻酔の有無、採血方法を考慮する必要があったため、検討改善を行うことで評価システム構築にも繋がった。

謝辞

本論文の作成にあたり、懇切なるご指導を頂いた 徳島大学 ソシオテクノサイエンス研究部 安澤幹人准教授に深く感謝致します。また本研究を遂行するにあたって、動物実験にご協力を頂いた田辺三菱 R&D の橋本善勝様に深く感謝致します。また、実験や論文作成にあたり御助言頂いた産業技術総合研究所 瀧脇雄介主任研究員に深く感謝致します。また、ご支援を頂いた徳島大学 工学部 化学応用工学科の大学院生ならびに学部生に心から感謝致します。