

唾液中グルコース計測のための マウスガード型バイオセンサ（キャビタスセンサ）の開発

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 ○荒川貴博、三林浩二

Mouth guard type biosensor “cavitas sensor” for monitoring of salivary glucose
by ○Takahiro ARAKAWA, Kohji MITSUBAYASHI

1. 研究背景と目的

糖尿病は膵臓のインスリン作用の不足により慢性的な高血糖状態となる疾患であり、網膜症や腎症、神経障害などの合併症を引き起こす可能性がある¹。糖尿病の罹患者は食事療法や運動療法などの他、血糖計測に基づくインスリン療法などにより自己の血糖値の適切な管理が求められる。しかし食後高血糖や夜間低血糖などの血糖値の大きな日内変動により、インスリン療法による血糖コントロールは非常に難しく、適切な処方が必要とされる²。また血糖値の管理には、自己血糖測定器(self monitoring of blood glucose, SMBG)が広く用いられるが、採血による侵襲的な方法で、痛みや感染症の恐れを伴う。最近では、持続血糖測定(continuous glucose monitoring, CGM)のための連続的な血糖値評価キットも普及し始めている³。しかしCGMは腹部などに装置を装着する必要があり、血糖値管理において非侵襲かつ無拘束な評価法が求められている。一方、非侵襲な評価法として、血糖値と相関関係のある各種体液成分を指標とする方法が報告されている^{4,5}。唾液中に含まれるグルコースについても、その濃度と血糖値の相関関係が報告されている⁶。この研究では、健常者と糖尿病患者を対象に、サンプリング測定により唾液中グルコース濃度と血糖値の相関関係を示し、唾液糖計測の有用性を示唆している⁷。

本研究課題では血糖値との相関関係が報告されている唾液中グルコースに着目し、口腔内への装着が可能なマウスガード型グルコースセンサ（キャビタスセンサ: cavitas sensor）を目指し、歯科材料をもとに半導体プロセス技術を利用してマウスガード材料を用いたシート状グルコースセンサを作製し、その特性を調べた。

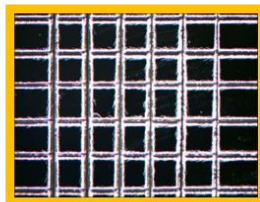
2 研究成果

2. 1 マウスガード材料を基板とした電極の作製

歯科用のマウスガード材料に、Micro electro mechanical systems(MEMS)技術を用いて薄膜電極を成形し、電極感応部には 2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline(MPC)と 2-ethylhexyl methacrylate(EHMA)の共重合体PMEH(poly(MPC-co-EHMA))の機能性高分子を用い、グルコースの認識素子として GOD を電極表面に固定化し作製した。センサ用マウスガード材料の選定のため、歯科用のマウスガード材料(Erkodent 社)に対して、センサ電極(Pt と Ag)の薄膜をスパッタ装置(E-230, Canon Anelva)にて成膜し、薄膜の密着性を JIS 規格の付着性-クロスカット試験法(JIS K5600-5-6)に基づき評価した。

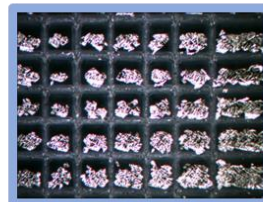
センサ基板材料の選定のため実施したクロスカット試験法による密着性評価の結果例を Fig.1 に示す。この結果は、クロスカット試験後のエルコジュール(PETG)とマウスガード(EVA)での Pt 薄膜の表面状態を示したものである。両者を比較すると、エルコジュールは強固な薄膜(付着率 99.7%)を形成しているのに対し、マウスガードは薄膜が容易に剥離(付着率 49.0%)していることが確認された。以上の結果をもとに、金属薄膜の良好な密着性と材料厚の種類を考慮し、PETG をマウスガード型バイオセンサの基板材料として用いることとした。

エルコジュール(PETG)



black: Pt thin film

マウスガード(EVA)



white: Pt thin film

Fig. 1 付着性-クロスカット試験後の Pt 膜の表面写真 左: PETG エルコジュール(付着率 99.7%)、右: EVA マウスガード(付着率 49.0%)

2. 2 マウスガード材料を用いたグルコースセンサの特性評価

シート型グルコースセンサの模式図を Fig.2 に示す。本センサでは、上記方法で選定したマウスガード材料上に、Pt 作用電極(厚さ 200 nm)、Ag/AgCl 参照電極(対極) (厚さ 300 nm)を形成し作製した。薄膜電極の成膜では、各電極パターンを形成するためのシールステンシルを用いた。シート状のマウスガード材料にシールステンシルを貼付し、薄膜電極をスパッタ装置にて Pt と Ag の薄膜を成膜した。次に、センサ感応部と端子部以外を Polydimethylsiloxane (PDMS)で絶縁化被覆した後、Ag 薄膜に塩化処理を行い、Ag/AgCl 参照電極とした。

グルコースセンサは、Fig.2 に示した電極の感応部上に生体適合性ポリマーPMEH を用いて GOD(G7141 from *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich)を固定化した。PMEH は MPC と EHMA の共重合体で、生体適合性に優れた機能性高分子材料である。酵素の固定化では、PMEH とエタノールを 1:9 の質量比で混合させた 10 wt% の PMEH 溶液 20 μ l と GOD 2.0 mg の混合溶液を電極感応部に塗布した後、乾燥させて GOD を包括固定化した。さらに酵素面からの酵素の漏出を防ぐため、3 wt% の PMEH 溶液にてオーバーコートした。電極感応部上に固定化した GOD により、グルコースと酸素の存在下で過酸化水素が産出される。Pt 電極(作用電極)に+400 mV(vs. Ag/AgCl)の定電位を印加し過酸化水素の酸化電流を測定することで、グルコース濃度を決定する。

Fig.3 にシート型センサのグルコースに対する定量特性を示す。グルコース溶液の滴下に伴い、著しい出力電流値の上昇が観察された。応答性の結果をもとに、グルコース濃度に対する出力電流値の定量特性を調べた結果、1~5000 μ mol/l の範囲で相関性が確認された。この定量範囲は、既報値の唾液中グルコース濃度(20~200 μ mol/l)を含む範囲であり、本バイオセンサを用いて唾液中グルコースの計測の可能が示唆された。

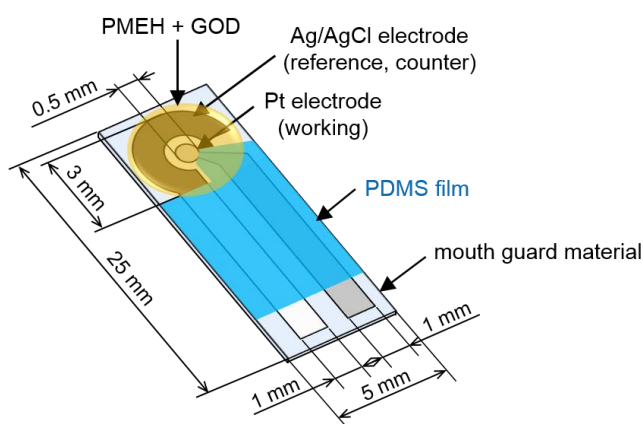


Fig. 2 マウスガード母材を利用したシート型グルコースセンサ(2電極式)の模式図

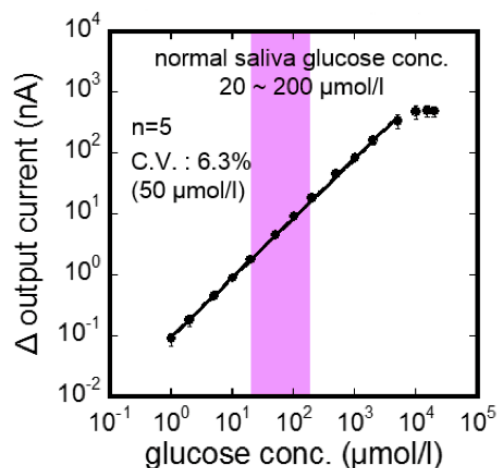


Fig. 3 マウスガード材料を用いたシート型バイオセンサのグルコース溶液に対する定量特性

3. 参考文献

- (1) C.R. Kahn, Gordon C. Weir, Alan M. Jacobson, et al. *Joslin's Diabetes Mellitus* 14th Edition. (2004)
- (2) International Diabetes Federation, *Guideline for Management of Postmeal Glucose in Diabetes* (2011)
- (3) Marilyn Cox. An Overview of Continuous Glucose Monitoring Systems. *Journal of Pediatric Health Care* 23:344-347, (2009)
- (4) Yoshio Watanabe. Changes of Glucose in Sweat during Glucose Tolerance Test. *Journal of the Japan Diabetes Society* 28:1271-1273 (1995)
- (5) Chu MX, 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)
- (6) Radhika Sashikumar, Ranganathan Kannan. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:706-711 (2010)
- (7) Masaki Yamaguchi, Hajime Kimura, Yoshio Kano, et al. Individual Correlation of Blood Glucose and Saliva Glucose. (in Japanese, English abstract). *Journal of the Japan Diabetes Society* 40:335-340 (1997)