

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04506

研究課題名（和文）腎機能低下の早期発見に役立つ「絹フィブロインを用いたバイオセンサー」の開発

研究課題名（英文）Study on a biosensor for kidney function testing using enzyme-modified silk-fibroin films

研究代表者

小池 一步 (Koike, Kazuto)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：40351457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腎機能マーカー（クレアチニン、尿素）を検出するための酵素膜を作製し、拡張ゲートFETを用いたバイオセンサーへ応用した。拡張ゲート電極への酵素の固定化には、生体適合性の高い絹フィブロインを用いた。クレアチニンセンサーと尿素センサーを試作したところ、前者はクレアチニン濃度0.01～0.3 mg/mLの範囲で、後者は尿素濃度0.1～10 mg/mLの範囲で、感度が得られた。血中クレアチニンの正常値は、男性で0.012 mg/mL以下、女性で0.01 mg/mL以下であり、血中尿素窒素の正常値は0.2 mg/mL以下である。このことから、試作したセンサーは正常値以上の濃度を測定できることが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病の代表例の一つに慢性腎臓病（CKD）がある。国内のCKD患者数は約1300万人で慢性透析患者数は約35万人と報告されている。腎機能の低下は初期段階で自覚症状が現れにくいため、日常的に腎機能を評価できる低侵襲のバイオセンサーの実現が待たれる。本研究では、生体適合性の高い絹フィブロインを用いて腎機能マーカーである尿素とクレアチニンを検出するための酵素膜を開発し、拡張ゲートFET型バイオセンサーへ応用した。絹フィブロインを用いて酵素を固定化する方法を提案し、かつ、ウェアラブル化に有利な拡張ゲートFET型バイオセンサーへ応用できること示したことから、学術的・社会的に意義があったといえる。

研究成果の概要（英文）：We fabricated enzyme membranes for the detection of the kidney function markers creatinine and urea and applied them to an extended gate FET biosensor. Creatinine deiminase and urease were used as the enzymes for creatinine and urea. A biocompatible silk fibroin was used for the immobilization of the enzymes on the extended gate electrode. Prototype creatinine and urea sensors were fabricated and the former was sensitive to creatinine concentrations ranging from 0.01 to 0.3 mg/mL and the latter to urea concentrations ranging from 0.1 to 10 mg/mL. The normal values for blood creatinine are less than 0.012 mg/mL for men and 0.01 mg/mL for women, while the normal value for blood urea nitrogen is less than 0.2 mg/mL. Therefore, the prototype sensors were able to measure concentrations above normal levels.

研究分野：バイオセンサー

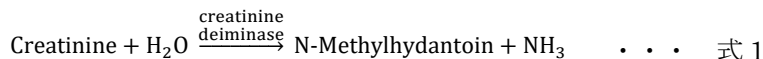
キーワード：バイオセンサー クレアチニン 尿素 絹フィブロイン 酵素固定化 拡張ゲートFET

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、腎機能マーカーであるクレアチニンと尿素を長時間連続モニタリングできるパーソナルユースのバイオセンサーの開発を目指した。クレアチニンや尿素は蛋白が体の中で分解されたときに生成される物質で、そのほとんどが腎臓の糸球体から排泄される。しかし、濾過機能が低下すると血中のクレアチニンや尿素濃度が高くなる。生活習慣病の一つである慢性腎臓病 (CKD) は自覚症状が現れにくく、気がついた時には重症化しており透析治療へ移行する機会が多い。腎機能マーカーを普段の生活環境下で長時間連続モニタリングすることができれば、腎機能の低下を早期に発見できる可能性がある。このことから、日常生活下で簡便に腎機能を測定できるバイオセンサーの開発が待たれる。このような背景の下、研究代表者らは生体適合性の高い絹フィブロインを用いてクレアチニンや尿素を検出するための酵素膜を開発し、ウェアラブル化に有利な拡張ゲート FET 型バイオセンサーへ応用する研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎機能マーカーであるクレアチニンと尿素を検出するための酵素膜を開発し、長時間連続モニタリング可能な拡張ゲート FET 型バイオセンサーへ応用することである。クレアチニンと尿素の酵素として、クレアチニンデヒミナーゼとウレアーゼを使用した。これらの酵素は式 1、2 のとおり、酵素反応によってアンモニアを生成する。アンモニアは被検液中でアンモニウムイオンに置き換わるため、FET の拡張ゲート電極に酵素膜を形成することで、酵素反応をゲート表面の電位変化として検出することが可能である。本研究では、まず、松田養蚕場株式会社のナノフィブロイン®パウダーを用いて、拡張ゲート電極に酵素を含む絹フィブロイン膜を成膜する技術を開発し、次に、拡張ゲート FET 型バイオセンサーへ応用を目指した。



3. 研究の方法

まず、ガラス基板上に厚さ約 300 nm の Ti 膜をスパッタ成膜し、酸素雰囲気中で 450°C・1h 熱処理を行い、表面に緻密な TiO₂ 膜を形成した。次に、拡張ゲート表面へシランカップリング処理を施し、酵素 (クレアチニンもしくはウレアーゼ) を含む絹フィブロイン水溶液を滴下・スピコートした。酵素膜を自然乾燥させた後、エタノール水溶液で不溶化処理を行い、酵素電極を作製した。図 1 に酵素固定化プロセスを示す¹⁾。作製した酵素電極の酵素活性を比色測定で調べ、酵素活性を確かめた後、酵素電極を市販の n チャネル MOSFET のゲート端子と接続し、センサー回路を構成した。酵素電極と Ag/AgCl 参照電極をリン酸緩衝液に浸し、溶液中のクレアチニンもしくは尿素濃度を変化させて、センサーの性能を評価した。

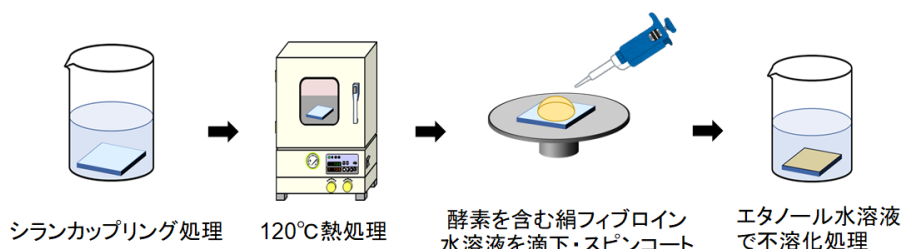


図 1 酵素膜作製手順¹⁾

4. 研究成果

クレアチニンデヒミナーゼを含む絹フィブロイン膜 (酵素膜) の表面モロロジーを調べるため、共焦点レーザー顕微鏡で表面を観察した。図 2 左は TV モードで、右は共焦点 (CF) モードで観察した表面像を示す²⁾。TV モードでは比較的平坦に見えるが、CF モードでは多孔質なモロロジーになっていることが判る。多孔質なモロロジーは絹フィブロインの特徴で、被検液と接触する比表面積が大きくなるため酵素膜として適している。次に、不溶化前後の構造変化を調べるため、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) で化学結合状態を調べた。図 3 に不溶化前後のスペクトルを比較して示す²⁾。1650, 1540 cm⁻¹ 付近に見られる吸収帯はそれぞれアミドバンド I、II と呼ばれるタンパク質特有の吸収帯であり、前者はペプチド結合における C=O の伸縮振動、後者は N-H 変角振動と C-N 伸縮振動によるものである。この結果より、不溶化前は random coil または α-helix 構造が支配的であったが、不溶化処理によって β-sheet もしくは逆平行 β-sheet 構造へ結

晶化が進行していることが確かめられた。

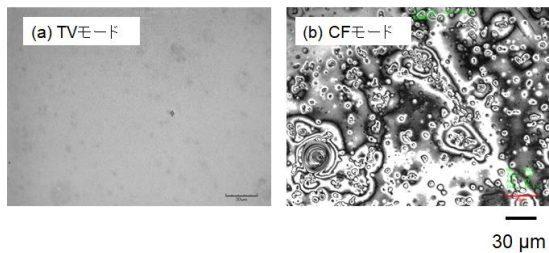


図2 不溶化処理後の共焦点レーザー顕微鏡写真 (左はTVモード、右はCFモード)²⁾

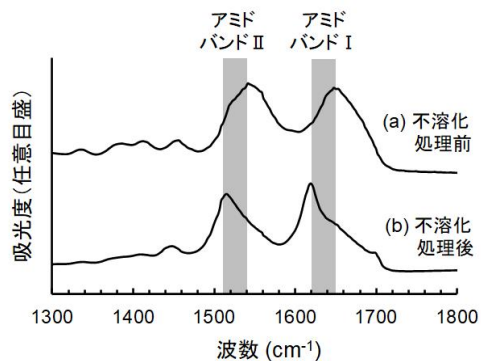
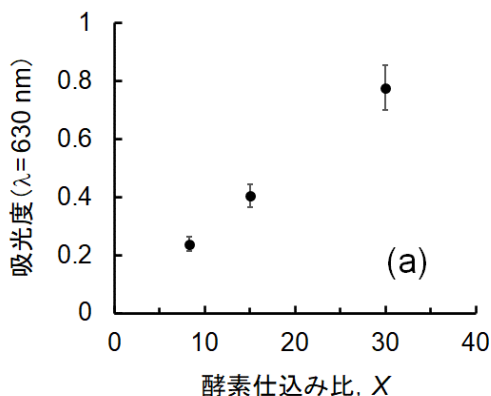


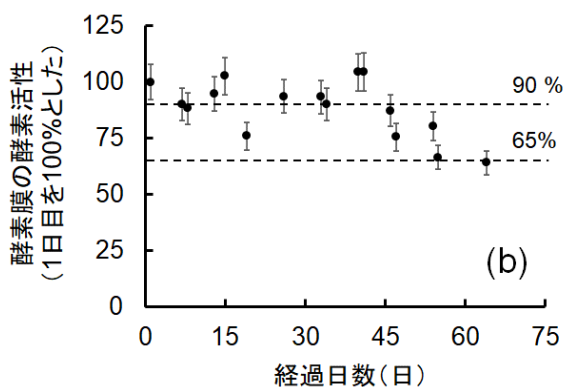
図3 不溶化処理前後のFTIRスペクトル²⁾

次に、クレアチンデヒミナーゼを含む絹フィブロイン膜に対して、比色法で酵素活性を調べた。図4に酵素：絹フィブロイン：水 = X : 60 : 140 (X = 9、15、30) の酵素水溶液を用いて作製した酵素膜に対して、比色液で呈色する波長での吸光度を測定した結果を示す。酵素仕込み比の増加に伴って、吸光度が線形的に増加していることが明らかになった¹⁾。図5はX = 9で作製した酵素膜の経過日数(4℃に保たれた冷蔵庫で保管した日数)に対する酵素活性変化を調べた結果である¹⁾。1ヶ月経過後も酵素活性が90%程度保たれることも明らかになった。



(酵素：絹フィブロイン：水 = X : 60 : 140)

図4 酵素膜の酵素仕込み比と吸光度の関係¹⁾



(酵素：絹フィブロイン：水 = 9 : 60 : 140)

図5 酵素膜の活性持続性¹⁾

作製した酵素電極を用いて拡張ゲート FET 回路を構成した。図6に回路と測定セットアップを示す²⁾。ここで、ExG1は酵素を含まない絹フィブロイン膜が、ExG2は酵素を含む絹フィブロイン膜が、形成された拡張ゲート電極である。被検液には pH 8.0、1 mM に調整したリン酸緩衝液を用いた。2つの MOSFET のドレイン電流 I_D を 100 μA 一定に保った状態で、それぞれのソース・ドレイン電圧の差 ΔV ($V_{DS} - V_{DS\text{Ref}}$) を測定した。これにより、被検液の温度変化による電圧ドリフトを抑制しながら、ExG2 表面で酵素反応によって生じた表面ポテンシャルの変化を検出することが可能である。図7に被検液のクレアチニン濃度を $0 \rightarrow 0.01 \rightarrow 0.03 \rightarrow 0.1 \rightarrow 0.3 \rightarrow 0 \text{ mg/mL}$ と段階的に変化させた際の電圧応答を示す²⁾。クレアチニン濃度の増減に対して可逆的に電圧応答すること、長時間連続動作可能であることが明らかになった。健康な成人の血清クレアチニン濃度の正常値は男性で 0.012 mg/mL 以下、女性で 0.01 mg/mL 以下であり、透析導入適応の基準値は 0.08 mg/mL 以上 (厚生省科学研究 1992 年) である。このことから、試作したクレアチニンセンサーは腎機能の測定に必要な感度を有していることが判った。さらに、血中に含まれる妨害物質であるグルコース、尿素、アスコルビン酸の存在下でクレアチニンを選択的に検出できるか調べた。その結果、クレアチニン濃度 0.048 mg/mL (ミカエリス・メンテン定数) で電圧変化量が約 30 mV であったのに対して、グルコース濃度 1.4 mg/mL で約 2 mV、尿素濃度 0.43 mg/mL で 0.5 mV、アスコルビン酸濃度 0.014 mg/mL で 1 mV の変化量にとどまることが判った²⁾。このことから、試作センサーはクレアチニンに対して検出選択性が高いことも判った。以上のことから、研究代表者らが試作したクレアチニンセンサーは実用デバイスとして有用であることが示された。

研究代表者らは、前述と同様のプロセスで尿素を検出するための酵素膜も作製し、拡張ゲート FET 型尿素センサーを試作した。その結果、被検液の尿素濃度 0.1~10 mg/mL の範囲で電圧応答

が得られた。血中尿素窒素の正常値は 0.2 mg/mL 以下であるため、正常値以上の濃度を検出することが可能といえる。しかし、繰り返し測定を行う度に、センサーの感度が低下する問題が生じた。このことから、尿素センサーに適した酵素膜の成膜プロセスを見直す必要がある。

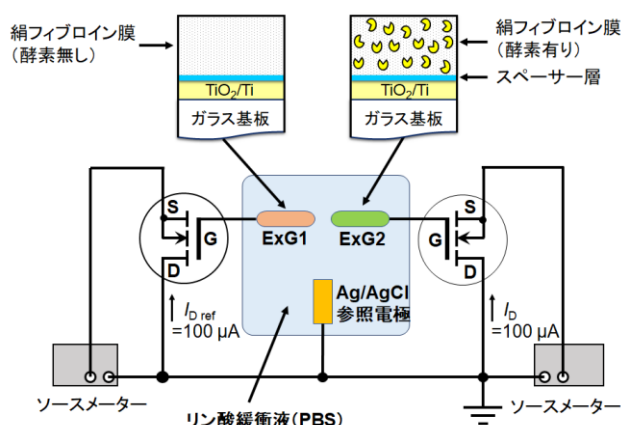


図6 測定セットアップ²⁾

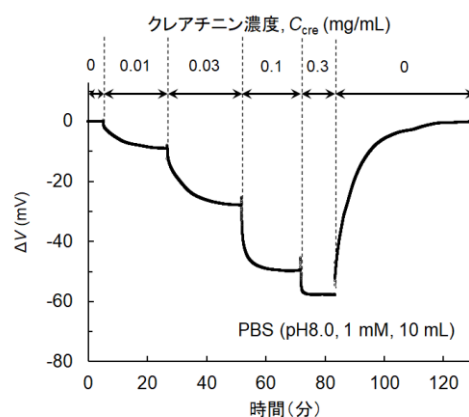


図7 クレアチニン濃度変化に対するセンサーの電圧応答²⁾

本研究で、生体適合性の高い絹フィブロインを用いた酵素膜の作製方法を提案し、かつ、拡張ゲート FET 型バイオセンサーへ応用できることを示した。実用化に向けて課題は残されたものの、腎機能マーカーを検出対象とするウェアラブル・バイオセンサーの実用化に有用な知見を与えたといえる。

参考文献

- 1) 廣芝伸哉、牧野賀成、道端涼、広藤裕一、小池一步、”腎機能指標クレアチニン検出用酵素膜の作製と拡張ゲート FET 型バイオセンサー応用”、電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)、143 巻、2023 年、498～503.
- 2) 小池 一步、道端 涼、日後 太一、前川 英輝、楯 凱貴、山本 青依、広藤 裕一、廣芝 伸哉、”差動型拡張ゲート電界効果トランジスターを用いたクレアチニンセンサーの作製と評価”、材料、73 巻、2024 年、掲載決定.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 廣芝伸哉, 牧野賀成, 道端 涼, 広藤裕一, 小池一步	4. 巻 143
2. 論文標題 腎機能指標クレアチニン検出用酵素膜の作製と拡張ゲートFET型バイオセンサー応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 電気学会論文誌C	6. 最初と最後の頁 498, 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejieiss.143.498	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 廣芝 伸哉, 小池 一步	4. 巻 58
2. 論文標題 拡張ゲート電界効果トランジスターを用いたバイオセンサー	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 設計工学	6. 最初と最後の頁 84, 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koike Kazuto, Sasaki Taihou, Hiraki Kenta, Ike Kodai, Hirofuji Yuichi, Yano Mitsuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Characteristics of an Extended Gate Field-Effect Transistor for Glucose Sensing Using an Enzyme-Containing Silk Fibroin Membrane as the Bio-Chemical Component	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 57 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bios10060057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中村 充, 橋口千聖, 寺尾俊輝、真鍋 圭, 小池一步, 矢野満明, 平井智康, 藤井秀司, 中村吉伸	4. 巻 56
2. 論文標題 シランカップリング材の分子量が表面処理層の化学吸着率におよぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本接着学会誌	6. 最初と最後の頁 472 ~ 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計37件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Koki Kato, Kento Mimura, Masato Nishiwaki, Takayuki Hasegawa, Nobuya Hiroshiba, Kazuto Koike, Toshihiko Maemoto, Akira Fujimoto
2. 発表標題 Sensing of Nitrate Ions Using Graphene-Extended Gate Field-Effect Transistor
3. 学会等名 13th International Conference on Nano-Molecular Electronics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道端 涼, 牧野 賀成, 楯 凱貴, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步
2. 発表標題 溶液塗布熱分解法による酸化バナジウム薄膜の作製とpHセンサー応用
3. 学会等名 応用物理学会関西支部 75周年記念講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道端 涼, 牧野 賀成, 楯 凱貴, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步
2. 発表標題 拡張ゲート電界効果トランジスターを用いたクレアチニンセンサーの作製 ()
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道端 涼, 牧野 賀成, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步
2. 発表標題 クレアチニンを対象とした拡張ゲート電界効果トランジスター型バイオセンサーの作製と性能評価
3. 学会等名 応用物理学会関西支部第1回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池一步, 広藤裕一, 廣芝伸哉
2. 発表標題 拡張ゲート電界効果トランジスターを用いたバイオセンサー
3. 学会等名 令和3年電気関係学会関西連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野賀成, 平木健太, 道端涼, 広藤裕一, 廣芝伸哉, 小池一步
2. 発表標題 腎機能指標クレアチンを対象としたFET型バイオセンサー開発に向けた酵素膜の作製と評価
3. 学会等名 日本材料学会半導体エレクトロニクス部門第一回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平木 健太, 佐々木 太鳳, 牧野 賀成, 広藤 裕一, 小池 一步, 矢野 満明
2. 発表標題 拡張ゲート電界効果トランジスターを用いたクレアチニンセンサーの作製
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>絹フィブロインを用いた酵素膜の作製と拡張ゲートFET型バイオセンサーへの応用 https://www.research.oit.ac.jp/oitid/seeds/seeds/seeds-2705/ 大阪工業大学ナノ材料マイクロデバイス研究センター http://www.oit.ac.jp/japanese/nanotech/ 大阪工業大学地域産業支援プラットフォーム http://www.oit.ac.jp/oitp/introduction/detail10.html 大阪工業大学技術シーズ集 https://www.oit.ac.jp/japanese/sangaku/pdf/2019sd0041.pdf</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小山 政俊 (Koyama Masatoshi) (30758636)	大阪工業大学・工学部・准教授 (34406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関