

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500510

研究課題名(和文) 低血糖症の早期発見を目的とした低侵襲パッチ型グルコースセンサの開発

研究課題名(英文) Development of low-invasive patch type glucose sensor for fast hypoglycemia discovery

研究代表者

安澤 幹人 (Yasuzawa, Mikito)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70210250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：微細電極作製技術を基に体内への埋込長さを1 mm以下にした低侵襲型グルコースセンサを試作し、インビトロ測定に加え、実験動物を用いたインビボ測定評価を行った。血糖値変化に対して良好に追従したセンサは得られず、大きなタイムラグが生じた。そこでセンシング部位及び管内部深さ減少させたところ、センサ応答速度の向上が確認された。管内部深さの減少により、センサ感度は低下したが、バックグラウンド電流が低下したため良好なセンサ応答が確認された。センサ針をPEEK材にしたパッチ型センサ開発研究では、皮膚内部に容易に挿入可能であったことから、プラスチック製パッチ型センサの材料として有用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：A fine needle tube type glucose sensor, which requires only the tip to be implanted in the tissue for glucose monitoring, was prepared by placing the sensing region at the tip inside of a tube electrode. The combination of electrodeposition and electropolymerization was employed for enzyme immobilization of the sensor for in vivo measurement, while new approach such as electrodeposition/photopolymerization method, and cellulose dispersed enzyme solution method were also investigated. When the sensing region was placed from the tip to deep inside the tube electrode, the response time was very slow. Therefore, optimum depth length was investigated and a sensor with good response time and clear glucose sensor response was obtained. PEEK tube was also applied for the sensor fabrication. PEEK needle was strong enough to implant the sensor inside the skin. Skin model flow measurement system using agar membrane as film was also developed for sensor evaluation near in vivo measurement.

研究分野：電気化学

キーワード：CGM バイオセンサ 血糖値 低侵襲 糖尿病 低血糖症 パッチ 酵素電極

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は、インスリンの減少やその作用の不足により、体内血糖値コントロールがうまく機能せず、様々な合併症を引き起こす高血糖状態や昏睡状態から死にいたることもある低血糖状態に陥る危険性を有する。そのため、糖尿病患者の健康維持には、血糖コントロールが最も重要であり、薬物療法を行っている患者の多くは、1日に数回から8回程度採血を行い、血糖自己測定(SMBG)並びにインスリンまたはグルコースの注入等の対応による血糖値コントロールを行っている。合併症の発症を抑えるには、強化インスリン療法(IIT)等による厳格な血糖管理が有用であるが、同時に低血糖症の発症リスクが著しく高まる。低血糖症の発症は、糖尿病患者にとって負担の大きい深夜・早朝に多く見られることから、厳格な血糖管理の導入の障害となっている。近年、センサ針を体内に埋め込み、皮下組織の間質液のグルコース測定を行い、血糖モニタリングに応用した体内埋込型グルコースセンサの実用化が進められており、インスリンポンプと組み合わせた人工膵臓モデルも開発されている。これらのセンサは、静脈等の血管に留置するのではなく、患者自身の設置も容易な皮下内に留置することから、血栓、敗血症のリスクは低い。皮下内組織の間質液(IG)のグルコース濃度を測定することから、実際の血糖値(BG)のグルコース濃度とでは、当然ながら数値にズレが生じ、急激な血糖値上昇においては、5~10分間の遅れが生じることが知られている。しかし、血糖値が著しく変化しておらず、インスリンの注入から十分な時間が経過した状態においては、タイムラグは生じるもののIGからBGを換算することが可能とされており、血糖値を点ではなく、変動情報として提供することから、薬の種類、投与量、タイミングを再考するのに非常に有用と認識されている。また、インスリンを用いた薬物療法を行っている糖尿病患者においては、睡眠時の深夜から明け方にかけて発症リスクが高い低血糖症の恐怖があることから、センサを低血糖症の早期発見・予知を行うツールとしての応用も期待されている。一方、現存のセンサは体内に1cm以上挿入する必要があるため、糖尿病患者にとって、肉体的・精神的負担が小さくはない。これは、従来のセンサでは、センシング部位、並びに、対極・参照極も側面に配置したデザインを有することに起因するが、患者のクオリティ・オブ・ライフ(QOL)の向上の観点から、更なるセンサの低侵襲化が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体への負担を軽減するため、センサの微細化と共に、体内へのセンサの挿入長さを1mm以下にした体内グルコースモ

ニタリング用センサの開発を目的とする。そのため、テーパ化した微細管の先端内部にセンシング部位を有するグルコースオキシダーゼ固定電極の作製に必要な技術開発を行う。

開発する主な内容は、(1)微小センシング部位へのピンポイント酵素固定技術、(2)密着性の良い導電性および絶縁性薄膜形成技術、(3)銀-塩化銀薄膜電極形成技術、及び(4)良好な強度を有する低侵襲型電極形状の最適化の4点である。

上記の技術開発は主に白金電極を用いて行うが、センサの製品化への応用を考慮すると、使用する白金量を低減させたセンサ作製技術に取り組む必要がある。そこで出発材料を白金管から、テーパ化した微細ステンレス管に変更し、管内部に白金膜を形成してセンサを作製した。さらに、より患者の使用に対する精神的ストレスを低減できるとと思われるプラスチック材料を用いたセンサの作製も検討した。

構築した技術により作製したセンサは、インビトロ測定により感度、応答時間、選択性等の基礎データを取得した後、マウス等の実験動物を用いたインビボ測定評価を行うが、センサの留置場所、留置方法等の性能評価の実験法を確立する必要がある。そこで、実験動物を用いたセンサ性能評価システムの構築を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 微小センシング部位へのピンポイント酵素固定技術の開発

代表的な電気化学的酵素固定手法である電解重合法は、通電を行った部位にピロール等のポリマーが形成し、酵素がポリマー膜に取り込まれて固定するため、微小局所酵素固定方が可能である(電解重合法)。また、Triton-X等の界面活性剤の存在下で酵素を電析させた後、フェノール等の電解重合膜を形成させる方法は、酵素の高密度固定と同時にアスコルビン酸、尿酸等の透過を抑制する膜としても機能することから、微細管先端内部の局所に酵素を固定する方法として極めて有用である(電解析出法+電解重合法)。しかし、この方法は電解析出用と電解重合用の二種類の電解液を用意する必要があり、操作が煩雑である。電解重合は、酵素の電解析出だけでは、得られる酵素膜から酵素が遊離するのを抑制する目的である、そこで新たな方法として、電解重合の代わりに、光重合膜形成による酵素膜の酵素保磁力の向上を試みた。その他、セルロースを酵素包括固定膜に用いたセンサ作製についても検討した。

#### (2) 密着性の良い導電性および絶縁性薄膜形成技術の開発

#### 導電性膜

白金薄膜はセンシング部位でもあり、センサ感度、精度、安定性等、センサ性能に影響を与える。無電解メッキ法およびスパッタリング法で白金薄膜形成を行うが、白金を被覆する基材の表面処理の影響についても検討した。

#### 絶縁性膜

絶縁性膜としてポリイミドを用い、ディップ及び電着法等による膜形成を試みた。さらに、加熱処理によりシリカ膜形成が可能なペルヒドロポリシラザン、フッ素樹脂等についても検討した。

#### (3) 銀-塩化銀薄膜電極形成技術の開発

銀/塩化銀電極は、センサの参照極及び対極として用いた。銀/塩化銀薄膜の作製法は、基板に無電解メッキ法等により銀薄膜形成を行った後、その表面を化学的及び電気化学手法等を用いて塩化銀に変換、もしくは塩化銀膜を被覆することにより、作製した。

#### (4) 良好な強度を有する低侵襲型電極形状の最適化

体内に埋め込むセンサにおいて、センササイズの微小・微細化は重要であるが、センサの強度を低下させる。そこで、体内での使用においてセンサの破損等が生じない強度の確保が不可欠である。センサの形状は、センサの耐久性だけではなく、センサ感度、応答速度等に影響を与えることから、種々の形状を有するセンサを試作し、形状等の違いによるセンサ性能への影響を検討した。

#### (5) 白金の使用量を低減させたセンサ作製技術の開発

酵素固定法やセンサ形状によるセンサ性能への影響等の評価は、主に白金電極を用いて行うが、センサの製品化への応用を考慮すると、使用する白金量を低減させたセンサ作製技術に取り組む必要がある。そこで出発材料を白金管から、テーパ化した微細ステンレス管に変更し、管内部に白金膜を形成してセンサを作製した。さらに、より患者の使用に対する精神的ストレスを低減できると思われるプラスチック材料を用いたセンサの作製も検討した。

#### (6) 実験動物を用いたセンサ評価システムの構築

実験動物としてヌードマウスおよびウサギを用い、センサの留置場所、留置方法、留置後の動物のアクセスによるセンサの破損対策、得られるセンサの応答値の評価方法等について検討した。

#### 4. 研究成果

白金管を出発材料とし、洞穴先端を有する微細電極作製技術をもとに種々の形状(先端部の外径、内径、テーパ角等)を有するグルコ

ースセンサを作製した。管の軸を中心にテーパ化するだけでは、センサの挿入時に最も負荷の掛かる先端部の強度が不十分であったから、テーパ化した後、最先端部を斜めに切った形状にした。テーパ化した白金管の外部側面はペルヒドロポリシラザンによるシリカ膜とフッ素樹脂(CYTOP)を被覆して絶縁膜形成を行った。また、洞穴先端内部をセンシング部位とするセンサでは、管内部の深さの最適化が重要であることが分かった。これは管内部の深さが大きくなると、電極面積の拡大および酵素固定量の増加が可能であることから、センサ感度を向上させるのに有利であるが、グルコースが奥深くまで進入するため、濃度変化に対する追従が悪くなり、センサ応答の遅いセンサとなる。そのため、管内部に接着剤を注入し、センシング部位及び管内部容積を調整した。センシング部位への酵素固定は、高感度および共存物質の影響抑制機能の両面で判断し、電解析出法と $\alpha$ -フェニレンジアミンの電解重合膜形成を組み合わせた方法を用いて行った。管内部容積を制限することにより、センサ応答が定常状態に達するまでの時間を著しく短縮することができた。なお、センサ感度は減少したが、バックグラウンド電流が低くなったことから、良好なグルコースセンサ応答が得られた。

テーパ化した微細ステンレス管を出発材料としたセンサ作製では、先端部の形状調整を行った後、管内部に白金のメッキ液を送液しながら電解メッキを行い、白金膜を形成させた。ステンレス管の外部側面の絶縁膜形成は、ペルヒドロポリシラザンを用いたシリカ膜を形成した後、ポリイミド膜被覆を行った。酵素固定は白金管を出発材料として時と同じ、電解析出法と電解重合法を組み合わせた方法を用いた。得られたセンサは、白金管で作製したセンサ同様、良好なセンサ応答を有していた。

センサ針をプラスチック部材にしたプラスチックタイプセンサでは、当初はPETフィルムの熱圧縮成形によるプラスチックセンサ針パッチ型センサを試作していたが、PETフィルムで作製したセンサでは体内に挿入することが困難であった。これは微小・微細化したセンサ針の硬度が不足していたためだと考え、強度が高く硬いPEEKでセンサ針を作製した。外径0.5 mm 内径0.2 mm PEEK管の管内部に白金線を挿入固定した後、PEEK管のテーパ化、さらに白金部分を含めた先端部の形状成形を行った。なお、酵素の固定は電解析出法と電解重合法を組み合わせた方法で行った。得られた電極は良好なグルコースセンサ応答を示した。また、PEEK板を用い、3D切削加工機によるセンサ作製も試みた。PEEKで作製したセンサ針は、外径が0.3 mm程度であっても強く、硬かったことから皮膚内部への挿入も可能であった。

微細管内部の特定微小領域への新たな酵素固定技術の確立を目指した研究においては、メタクリル化合物を有する電解液で酵素の電解析出を行い、次に紫外線照射による光重合膜形成を行う、酵素固定方法の検討を行った。種々の官能基を有する5種類のメタクリル化合物を用いてグルコースオキシダーゼ(GOx)の固定を試みた結果、水酸基を有する2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)を用いたセンサが感度、長期安定性の両面で最も高い値を示した。GOxと静電的相互作用に有利な正の電荷を有するメタクリレート(NMA)やGOxと共有結合形成が期待されるエポキシ基を有するメタクリレート(GMA)の方がより高い応答を示すと期待したにも関わらず、低いセンサ性能を有する結果となった。動的光散乱によるメタクリル化合物を加えた酵素溶液の粒径分布を調べたところ、HEMAを用いたものに比べ、NMAおよびGMAを用いたものは著しく高い粒径を有することがわかった。また、電解液の調整方法、すなわち、用いる酵素、界面活性剤、メタクリル化合物、開始剤等を混合する順番を変更することにより、得られる酵素電極のセンサ感度が数倍変化することが分かった。さらに粒径はメタクリレートの濃度によって変化することが確認されており、今後はさらなる詳細な条件検討を行う予定である。

酵素固定方法として、水溶液中に良好に分散したセルロース水溶液を用いる方法についても検討した。セルロースは中性条件下では水に溶けにくい、高圧に加圧したセルロース粒子同士を斜向衝突させたセルロース分散水を用いることにより、透明に近いセルロース水溶液を得ることができた。そこでこの溶液に酵素(GOx)を加えて白金電極に塗布したところ、酵素が安定に固定されたグルコースセンサとして機能し、特にグルコースを加えてから、センサの応答が定常状態に達するまでの時間が1秒と、非常に早いことがわかった。

実験動物としては、ヌードマウスおよびウサギを用いた。マウスではセンサを背中に、ウサギでは比較的毛が少なく、安定して固定できる耳の周辺部分にセンサを設置した。実験動物にグルコース等を投与し、体内グルコース濃度を変化させ、その時のセンサ応答の動向を血糖値変化と比較することによるセンサ性能評価を行った。カテーテルを血管内に留置して採血を行いことも試みたが、ヘパリン等を用いても管内が詰まり、採血が困難であったことから、主にランセットを用いた採血による血糖値測定を行った。体内グルコース濃度変化によると思われるセンサ応答も見られたが、明瞭でなかったことから寒天を人工皮膚に見立てたフロー型評価システムを作製し、センサ評価に活用した。寒天で作

製した膜にセンサを留置し、種々の濃度のグルコース溶液を送液し、センサ応答測定を行った。この時フローセルの溶液内、および寒天膜にそれぞれ従来から用いられている側面にセンシング部分が存在するセンサを留置し、センサ応答の比較も行った。フローセルの溶液内に留置したセンサが瞬時にグルコースに対する応答が定常状態に達するのに対し、寒天膜内に留置したセンサは数分後に明瞭なセンサ応答が確認されたが、定常状態に達するのには数十分以上の時間を要した。特に初期に作製した管内部の深さの長いセンサでは定常状態に達するまでの時間が数時間以上要するものもあった。管内部の深さの短くすることにより、側面にセンシング部分を有するセンサに近い時間で定常状態に達するセンサを作製することが可能であった。

本研究において、動物実験を用いたインビボ測定評価を行ったセンサは、酵素固定法として電解析出法と電解重合法を組み合わせた方法を用いており、新規に開発した電解析出法および光重合法を組み合わせた方法や、セルロース分散水を用いた方法についてはまだ行っていない。今後はこれらの方法を用いて作製したセンサについてもインビボ測定評価を行う予定である

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

M. Yasuzawa, T. Toba, K. Hiura, J. Li, P. Koinkar, T. Ueki, and Y. Fuchiwaki, Preparation of micro-biosensor for continuous glucose monitoring, Modern Physics Letters B 査読有 Vol. 29, No. 6, 2015, 1540040.

DOI:10.1142/S0217984915400400

安澤幹人, 大村優矢, 日裏健太郎, 李江, 淵脇雄介, 田中正人, セルロース水溶液を用いた酵素固定電極の作製, 化学センサ 査読無, Vol.31A, 2015, pp.94-96, <http://chemsens.electrochem.jp/journal/2015/2015a-abt.html#31>

安澤幹人, 三川純平, 李江, 日裏健太郎, 淵脇雄介, セルロース分散液を用いた酵素固定膜の作製およびそのセンサへの応用, 化学センサ 査読無, Vol.30B, 2014, pp.130-132, <http://chemsens.electrochem.jp/journal/2014/2014b-abt.html#41>

日裏健太郎, 枝川和明, 淵脇雄介, 安澤幹人, 電解析出法を用いた生体識別素子固定電極の作製及びそのセンサへの応用, 化学センサ 査読無, Vol.30A, 2014, pp.13-15, <http://chemsens.electrochem.jp/journal/2014/2014a-abt.html#5>

日裏健太郎, 枝川和明, 安澤幹人, 電解析出法および光重合法を組み合わせた酵素固定電極の作製, 化学センサ 査読無,

Vol.29B, 2013, pp.13-15,  
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2013/2013b-abt.htm#5>

安澤幹人, 李 江, 枝川和明, 低侵襲型グルコースセンサの作製及びその評価, 化学センサ 査読無, Vol.29B, 2013, pp.10-12,

<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2013/2013b-abt.htm#4>

M. Yasuzawa, S. Sato, H. Nakanishi, and K. Edagawa, Fabrication of minimally-invasive patch type glucose sensors, ECS Transactions 査読有, Vol.50, No.12, pp.83-87, 2012

DOI:10.1149/05012.0083ecst

〔学会発表〕(計 21 件)

安澤幹人, 大村優矢, 日裏健太郎, 李 江, 淵脇雄介, 田中正人, セルロース水溶液を用いた酵素固定電極の作製, 第 58 回化学センサ研究発表会, 2015 年 3 月 17 日, 横浜国立大学(神奈川県・横浜市).

李 江, 日裏健太郎, 安澤幹人, 淵脇雄介, 田中正人, 低侵襲型グルコースセンサの作製及びその特性評価, 電気化学会第 82 回大会, 2015 年 3 月 15 日, 横浜国立大学(神奈川県・横浜市).

M. Yasuzawa, Fabrication of glucose oxidase immobilized electrode for in vivo glucose monitoring, Pre-symposium Indo-Japanese Workshop on Sensing Mechanisms, Materials & Applications, Yashwantrao Chavan Academy of Development Administration, 2015.3.7, Pune (India).

日裏健太郎, 李 江, 淵脇雄介, 安澤幹人, 電解析出法と光重合法を組み合わせた酵素固定電極の作製およびそのセンサ特性評価, 第 3 回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム, 2015 年 1 月 28 日, 岡山大学鹿田キャンパス(岡山県・岡山市).

日裏健太郎, 李 江, 淵脇雄介, 安澤幹人, 電解析出法および光重合法を用いたグルコースオキシダーゼ固定電極の作製及びその評価, 2014 年度第 3 回関西電気化学研究会, 2014 年 12 月 13 日, 関西大学千里山キャンパス(大阪府・吹田市).

M. Yasuzawa, Patch type glucose sensor for low-invasive glucose monitoring, India-Japan Workshop on "Nanotechnology: Synthesis & Sensing Applications", 2014.10.16, Pune (India).

M. Yasuzawa, S. Furukawa, Immobilization of enzyme using electrodeposition technique for biosensor application, 3rd International Conference NANOCON 014, 2014.10.14, Pune (India).

M. Yasuzawa, J. Li, K. Hiura, K. Edagawa and Y. Fuchiwaki, Development of minimally invasive biosensor for

continuous glucose monitoring, 2014 ECS and SMEQ Joint International Meeting, 2014.10.6, Cancun (Mexico).

K. Hiura, S. Furukawa, Y. Fuchiwaki and M. Yasuzawa, Preparation of glucose oxidase immobilized electrode using electrodeposition procedure and its glucose sensor properties, 2014 ECS and SMEQ Joint International Meeting, 2014.10.7, Cancun (Mexico).

安澤幹人, 三川純平, 李 江, 日裏健太郎, 淵脇雄介, セルロース分散液を用いた酵素固定膜の作製およびそのセンサへの応用, 第 57 回化学センサ研究発表会, 2014 年 9 月 28 日, 北海道大学(北海道・札幌市).

K. Hiura, J. Li, Y. Fuchiwaki and M. Yasuzawa, Stabilization of enzyme-immobilized film prepared using electrodeposition procedure, International Conference on Advanced Materials Development and Performance 2014 (AMDP 2014), 2014.7.19, Busan (South Korea).

J. Li, D. Oyama, K. Hiura, Y. Fuchiwaki and M. Yasuzawa, Preparation and evaluation of a fine tapered needle type glucose sensor, International Conference on Advanced Materials Development and Performance 2014 (AMDP 2014), 2014.7.19, Busan (South Korea).

M. Yasuzawa, T. Toba, K. Hiura, J. Li and Y. Fuchiwaki, Preparation of micro-biosensor for continuous glucose monitoring, International Conference on Advanced Materials Development and Performance 2014 (AMDP 2014), 2014.7.18, Busan (South Korea).

李 江, 枝川和明, 日裏健太郎, 淵脇雄介, 安澤幹人, 体内グルコースモニタリング用パッチタイプセンサの試作及びその評価, 電気化学会第 81 回大会, 2014 年 3 月 28 日, 関西大学千里山キャンパス(大阪府・吹田市).

日裏健太郎, 枝川和明, 淵脇雄介, 安澤幹人, 電解析出法を用いた生体識別素子固定電極の作製及びそのセンサへの応用, 第 56 回化学センサ研究発表会, 2014 年 3 月 28 日, 関西大学千里山キャンパス(大阪府・吹田市).

M. Yasuzawa, S. Sato and K. Edagawa, Patch type glucose sensor for low-invasive glucose monitoring, 224th ECS Meeting, 2013.10.29, San Francisco (USA).

日裏健太郎, 枝川和明, 安澤幹人, 電解析出法および光重合法を組み合わせた酵素固定電極の作製, 第 55 回化学センサ研究発表会, 2013 年 9 月 27 日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都).

安澤幹人, 李 江, 枝川和明, 低侵襲型グルコースセンサの作製及びその評価, 第 55 回化学センサ研究発表会, 2013 年 9 月 27 日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都).

K. Hiura, S. Furukawa, K. Edagawa and M. Yasuzawa, Preparation of enzyme-immobilized biosensor by the combination of electrodeposition and electropolymerization, 223rd ECS Meeting, 2013.5.14, Toronto (Canada).

日裏健太郎, 古川晋也, 枝川和明, 安澤幹人, 電解析出法を用いた酵素固定電極の作製及びその評価, 電気化学会創立第 80 周年記念大会, 2013 年 3 月 29 日, 東北大学川内キャンパス (宮城県・仙台市)

② M. Yasuzawa, S. Sato, H. Nakanishi and K. Edagawa, Fabrication of minimally-invasive patch type glucose sensors, PRiME 2012, 2012.10.8, Honolulu (USA).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

安澤 幹人 (YASUZAWA, Mikito)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・准教授

研究者番号：70210250