

博士論文

酵素を用いたバイオセンサの研究

パナソニック株式会社

先端研究本部

吉岡 俊彦

2015年5月

目次

| | |
|-------------------------------|----|
| 第 1 章 序章 | 1 |
| 第 2 章 血糖値測定用センサの作製と評価 | 2 |
| 2.1 緒言 | 2 |
| 2.2 試薬と実験方法 | 4 |
| 2.2.1 試薬 | 4 |
| 2.2.2 センサの作製方法 | 4 |
| 2.2.3 センサ応答の測定方法 | 7 |
| 2.2.4 グルコース水溶液の調製方法 | 8 |
| 2.2.5 全血試料の調製方法 | 8 |
| 2.3 結果と考察 | 9 |
| 2.3.1 センサ試薬層の構造 | 9 |
| 2.3.2 酵素量の検討 | 14 |
| 2.3.3 フェリシアン化カリウム添加量の検討 | 17 |
| 2.3.4 親水性高分子の添加効果 | 21 |
| 2.3.5 溶存酸素による影響の原因解析 | 28 |
| 2.3.6 酸素と反応しない酵素系による検証 | 32 |
| 2.3.7 血液に対する基本応答特性 | 35 |
| 2.3.8 血液中の妨害物質による影響 | 39 |
| 2.4 小括 | 44 |

| | |
|------------------------------------|-----|
| 第 3 章 血糖値測定用センサの長期保存特性に関する検討 | 45 |
| 3.1 緒言 | 45 |
| 3.2 試薬と実験方法 | 45 |
| 3.2.1 試薬 | 45 |
| 3.2.2 センサの作製方法 | 46 |
| 3.2.3 センサの保存方法 | 48 |
| 3.2.4 センサ応答の測定方法 | 48 |
| 3.2.5 グルコース水溶液及び全血試料の調製方法 | 48 |
| 3.3 結果と考察 | 49 |
| 3.3.1 グルコースセンサの保存特性 | 49 |
| 3.3.2 試薬多層型グルコースセンサの保存特性 | 64 |
| 3.4 小括 | 83 |
| 第 4 章 食品分析用スクロースセンサの作製と評価 | 84 |
| 4.1 緒言 | 84 |
| 4.2 試薬と実験方法 | 86 |
| 4.2.1 試薬 | 86 |
| 4.2.2 センサの作製方法 | 86 |
| 4.2.3 センサの測定原理 | 89 |
| 4.3 結果と考察 | 91 |
| 4.3.1 pH による影響評価と緩衝塩添加効果の検討 | 91 |
| 4.3.2 スクロースとグルコースの同時測定の検討 | 101 |
| 4.3.3 果汁成分の分析結果 | 105 |
| 4.3.4 スクロースセンサの保存特性 | 108 |

| | | |
|---------|-----------------------|-----|
| 4.3.4.1 | 実験方法 | 108 |
| 4.3.4.2 | 結果と考察 | 109 |
| 4.4 | 小括 | 119 |
| 第 5 章 | 高感度化に向けた計測原理の研究 | 120 |
| 5.1 | 緒言 | 120 |
| 5.2 | 試薬と実験方法 | 120 |
| 5.2.1 | 試薬 | 120 |
| 5.2.2 | センサの作製方法 | 121 |
| 5.2.3 | センサ応答特性の評価方法 | 123 |
| 5.3 | 結果と考察 | 123 |
| 5.3.1 | ゲル被覆銀電極の特性 | 127 |
| 5.3.2 | 試作ドライセンサの特性評価 | 127 |
| 5.4 | 小括 | 130 |
| 第 6 章 | 総括 | 131 |
| 謝辞 | | 134 |
| 論文目録 | | 136 |
| 引用文献 | | 137 |

第 1 章 序章

バイオセンサは Clark らによって、固定化酵素と酸素電極の組合せからなる酵素電極が提案されてから、今日まで数多くの研究がなされてきた¹⁾。当初、酵素タンパク質を酸素電極の近傍に半透膜で保持したものであった²⁾が、酵素固定化技術の進歩に伴って、繰り返し使用が可能で保存寿命の長いバイオセンサが研究された。また、過酸化水素検出型や電子伝達化合物を用いた電流検知型（アンペロメトリック）バイオセンサに関しては、臨床検査分野を中心に研究開発と実用化が進んできた^{3,4)}。

バイオセンサを臨床検査分野へ応用するにあたっては、メンテナンスの煩雑さや血液サンプル等による汚染といったことが課題として挙げられる。その解決方法のひとつが、センサのディスポーザブル（使い捨て、ワンショット）化の取組みである。これは、小型化したセンサチップ上に酵素などの必要な試薬を配置したものである。さらに、簡易測定を可能にした方式として、「ドライケミストリー」と呼ばれる方法がある。これはフィルムスライド上に反応試薬を乾燥状態で配置したもので、測定対象物が溶け込んだ試料液体を直接フィルム上へ滴下し、透過光や光反射率、電位の変化などから反応生成物量を定量することによって、測定対象物をセンシングするものである。現在、糖や脂質、各種酵素、電解質などを対象とした医療分析用スライドが実用化されている。

以上の背景に基づき、本研究では従来光学比色法に代わってより高精度な計測が簡易に実現できる方法として、酵素と電極を組み合わせた計測方法の確立を目的として以下の 3 つの検討をした。

(1) 血糖値測定技術の検討。(2) 血糖値以外の展開技術として、食品中のスクロース計測技術の検討。(3) 疾病の早期診断などを旨として、計測の高感度化技術の検討。

第2章 血糖値測定用センサの作製と評価

2.1. 緒言

代表的な生活習慣病である糖尿病は、その患者数が世界的に増加する傾向にある⁵⁾。糖尿病による重篤な合併症を抑制し、患者の QOL(Quality of Life) を高めるためには、携帯可能な血糖自己測定機器を用いた日常的な血糖値コントロールが必要である⁶⁾。図 2-1 に、血糖値コントロールの一例を示す。

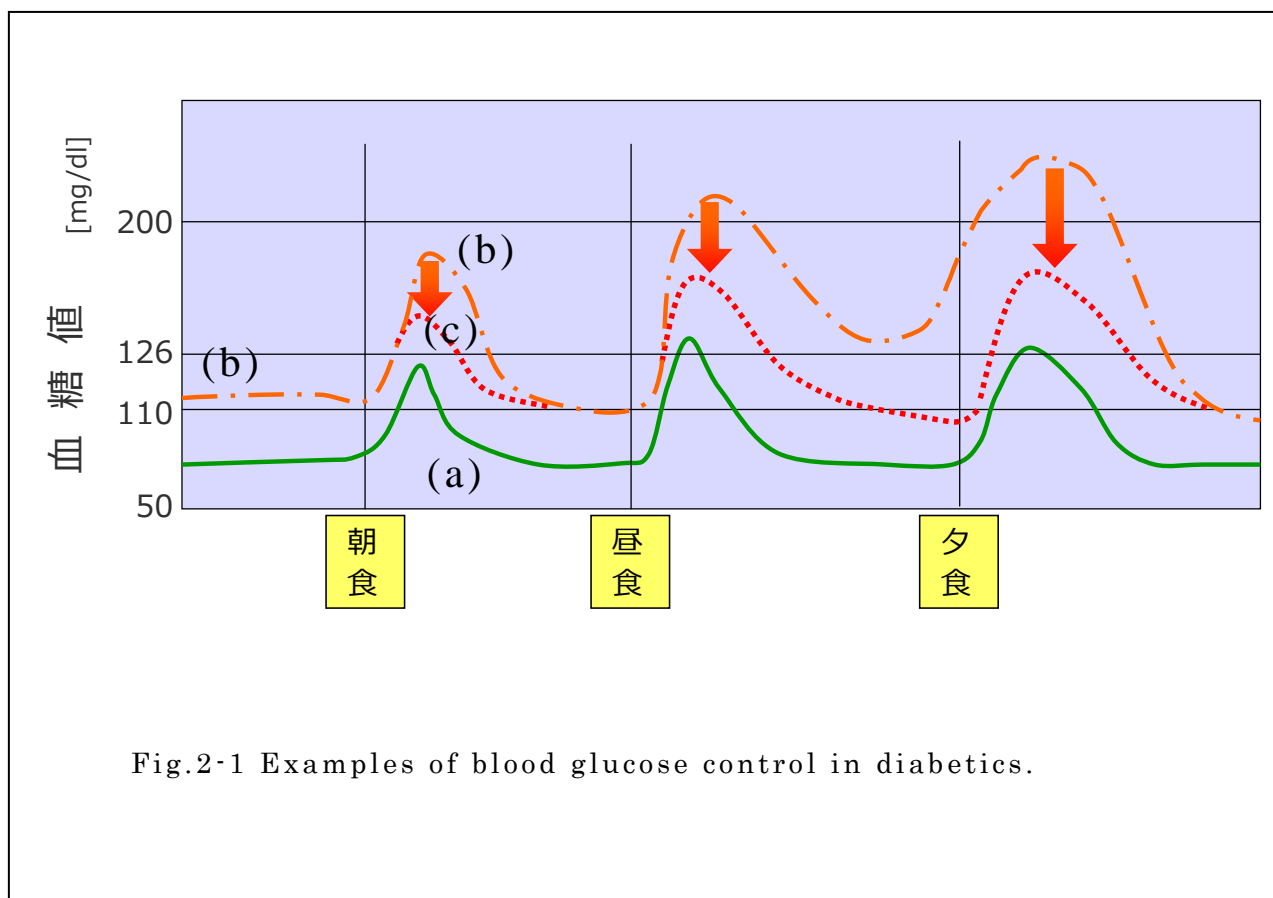


Fig.2-1 Examples of blood glucose control in diabetics.

健常者では、図 2-1 中(a)のように食事の度に血糖値が上昇するが、膵臓より分泌したインスリンの働きによってその上昇は短時間のうちに抑えられ、結果としてそれほど大きな変動は見られない。一方、糖尿病患者では、食事の後で、インスリンが分泌されない、あるいはインスリンの分泌はあるのだが、分泌量が十分ではなかったり、インスリンが作用し難いなどの理由によって、血糖値が大きく上昇し、さらには長時間に亘って高い値を維持すると

いったことが認められる。この高血糖状態によって、大血管がダメージを受けると脳梗塞や脳卒中といった脳疾患や、心筋梗塞などの心疾患が引き起こされ、抹消血管が障害を受けると腎臓病、網膜症、神経障害などの合併症が発症する。そこで、あるレベル以上の糖尿病の治療には、血糖自己測定とインスリン自己注射のセットが用いられることが多い。糖尿病患者は、血糖自己測定によって食事の前の血糖値を把握し、医師に処方されたインスリン(種類・量)を微調整して自己注射する。図 2-1 では、糖尿病患者(b)は食事によって血糖値が上昇するのだが、インスリンの自己注射によって(c)の状態にまで血糖値を下げることによって、合併症のリスクを小さくすることが期待できる。

ここで用いられる自己測定用の血糖計は、その結果によってインスリンを微調整するため、高い精度が求められるのは当然だが、特に、高めの誤差値には注意が必要とされる。実際の血糖値よりも高い値を誤表示すると、患者は必要量以上のインスリンを注射してしまうリスクが高まる。その結果、低血糖状態に陥ることがある。低血糖状態とは、血糖値が 50mg/dL より低い状態であり、意識を失ったり、場合によっては昏睡から死に至ることもある。さらに血糖計は、患者自身が日常生活の中で用いるため、極めて簡易な操作性が要求される。国際的な基準である ISO によっても、「求められる正確さの要求事項」(ISO15197)として、次のように規定されている^{7,8)}。

『自己検査用測定システムの測定結果に対する最小許容精確さは下記の要求を満たさなければならない。グルコース濃度 75mg/dL 未満の試料においては、販売製造業者の測定手順の値の±15mg/dL 以内に測定の 95%が入らなければならない。かつグルコース濃度 75mg/dL 以上の試料においては±20%以内に個々の測定の 95%が入らなければならない。』

血糖自己測定機器の歴史は 1970 年代に米国 AMES 社が光学比色法に基づく医療機器を商品化して以来、より使い勝手が良くかつ精度の高い機器が患

者および医師を中心に切望されてきた。

本研究では、酵素タンパク質と電極反応を組合せたバイオセンサ技術について取り組んだ。血糖値を測定するグルコースセンサについて、酵素タンパク質、酵素反応から電極へ電子を伝える電子伝達化合物、測定精度の向上に寄与する高分子材料などがセンサ応答特性に与える影響や効果を明示し、そのメカニズムの一部について明らかにした。さらに、センサ作製から6ヶ月後、最長2年後までの保存特性変化に関する評価検討を通じて、センサ特性低下の要因に関する考察を行った。

2.2. 試薬と実験方法

2.2.1 試薬

酵素試薬：Glucose oxidase(GOx, G-6125, 23U/mg, EC 1.1.3.4 *from Aspergillus niger*)は Sigma Aldrich 社より購入して使用した。Glucose dehydrogenase(PQQ-GDH:EC 1.1.5.2 *from Acinetobacter Calcoaceticus*)は、東洋紡株式会社が作製したものを購入して使用した。

化学薬品：Potassium Ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$ ：試薬特級)はナカライテスク株式会社より購入して使用した。Carboxy methyl cellulose sodium salt (CMC, セロゲン EP) は、第一工業製薬株式会社から購入して使用した。

電極作製用ペースト材料：銀ペースト (LS) および熱硬化性ソルダーレジスト (スーパーレジスト CCR-240GS-V) は株式会社アサヒ化学研究所より、導電性カーボンペースト (Electrodag) は日本アチソン株式会社 (現在のヘンケルジャパン株式会社) より、それぞれ購入して使用した。

2.2.2 センサの作製方法

図 2-2 に作製したグルコースセンサの分解構造図を示す。センサは、ポリエチレンテレフタレート (PET) 製の電極基板と試薬層と PET 製のスペーサと

カバーから構成した。電極基板上には、スクリーン印刷法を用いて以下の手順で電極系を作成した。銀ペーストを用いて2本のリードパターンを印刷して温風乾燥機中で乾燥させてリード部分を作製した。次にカーボンペーストを用いて作用極パターンを印刷して温風乾燥機中で乾燥させて作用極部を作製した。次にレジストペーストを用いて作用極の面積を一定にし、リードや作用極の不要部分を覆い被せるようなパターンを印刷、乾燥させてレジスト層を作製した。最後にカーボンペーストを用いて対極パターンを印刷、乾燥させて対極部を作製した。このようにして出来た電極系は、エイジング処理のために、乾いて清浄な不織布を用いて軽く表面をこすり、更に常圧空气中で熱処理（100℃×4時間）を施したものを使用した。作製した電極系の作用極面積は1.0平方ミリメートル、対極面積は7.6平方ミリメートルとした。

次に試薬層の作製方法を説明する。まず、0.5重量%のCMC水溶液5 μ Lを測定極と対極上へ滴下後50℃の恒温乾燥機中で30分間乾燥させてCMC層を作製した。続いて、Glucose oxidaseとフェリシアン化カリウムとCMCの混合水溶液5 μ LをCMC層上へ滴下後50℃の恒温乾燥機中で30分間乾燥させて試薬層を作製した。

さらに、PET製で厚み300 μ mのスペーサを両面テープで電極基板上へ貼り付け、その上からPET製の厚み100 μ mのカバーを両面テープでスペーサ上に貼り付けることによって、グルコースセンサを作製した。スペーサとカバーによって、試薬層部分に約2 μ Lの空間部を形成した。血液などの試料液は、毛細管力によってセンサ先端から空間部へ引き込まれる。試薬はこの試料液に溶解し、酵素（Glucose oxidase）と基質（グルコース）の反応等が次々に生じるが、スペーサとカバーによって、測定の間水分の蒸発を防ぐことが出来ると共に、ユーザーがセンサを触っても、直接試料液が手に付着することを防ぐことが出来、特に血液など感染性が危惧される試料液を対象とする場合には安全性が高まる。

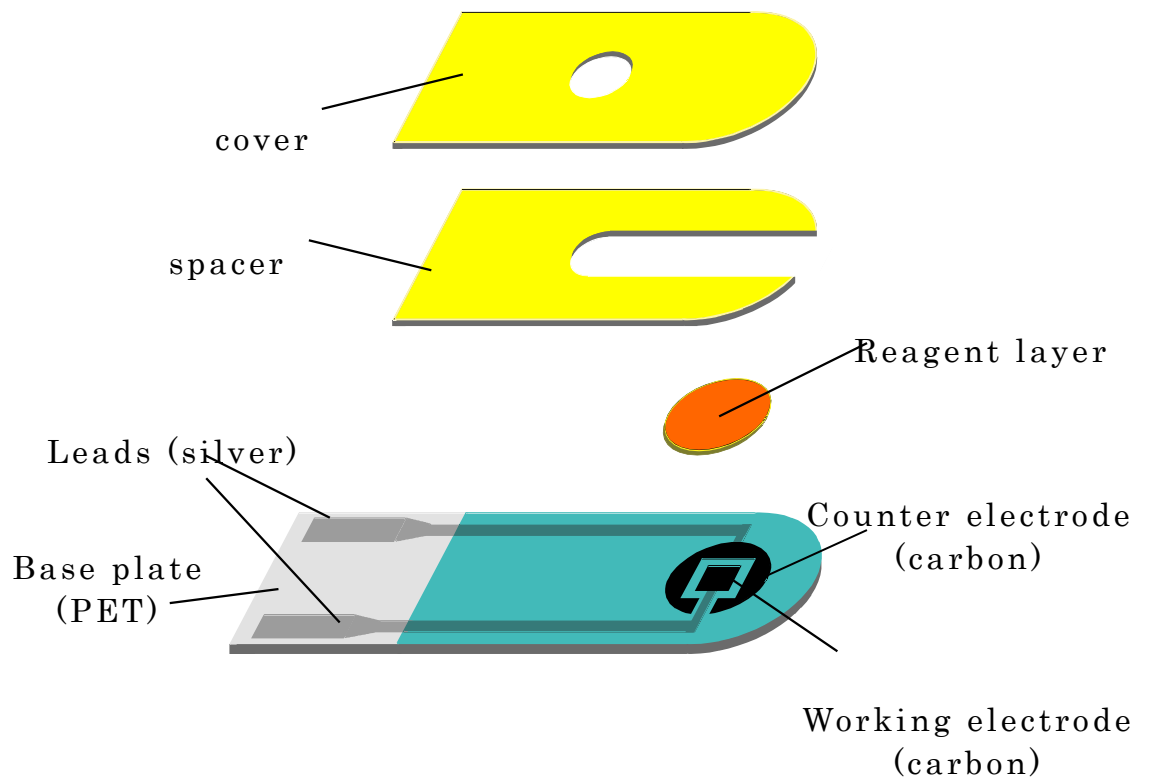
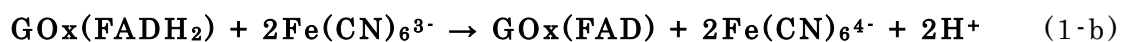


Fig.2-2 Structure of glucose sensor.
 Reagent layer was made of glucose oxidase, potassium ferricyanide and carboxymethyl cellulose.

2.2.3 センサ応答の測定方法

センサ応答特性の測定評価は以下の手順で行った。センサのリード部分を測定器のコネクタに差し込んだ後に、グルコース水溶液や血液などの試料液をセンサに供給した。その後、電極に一定電圧を印加して流れる電流値を測定した。原則として、この電流値より応答特性を評価した。従来の臨床検査装置などとの比較においては、センサ応答電流値とグルコース濃度との関数を求めて検量線とし、この検量線を利用して電流値からグルコース濃度への換算をした。測定原理を含め、詳細を以下に示す。

血液などの試料液をセンサの先端部分に接触させると、毛細管力によって試料液はセンサ先端から空間部へ引き込まれる。試薬層の構成試薬は試料液に溶解し、まず酵素（Glucose oxidase）と基質（グルコース）の酵素反応が生じる。(1-a)式に示したように、Glucose oxidase の補酵素フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）は還元体（FADH₂）となる。続いて(1-b)式に示したように、補酵素の還元体 FADH₂ と試薬中に存在する 3 価の鉄錯体であるフェリシアン化物イオンが反応し、2 価の鉄錯体フェロシアン化物イオンが生成する。その後、例えば 10 秒後に作用極と対極間にポテンショスタットなどによって一定電圧 500mV を 5 秒間印加すると(1-c)式に基づく酸化電流が得られる。還元型電子伝達化合物（フェロシアン化物イオン）が作用極で電気化学酸化されることによる。500mV を印加してから一定時間後、例えば 5 秒後の電流値をサンプリングして特性を評価した。さらに、事前に作成した検量線(相関関数)を用いることによって、グルコース量の定量結果を得た。



2.2.4 グルコース水溶液の調製方法

評価に用いた試料液の調製方法について説明する。試料液としては、グルコースを脱イオン水に溶解させて調製したグルコース水溶液と、ヒト全血の2種類を用いた。

はじめに、グルコース水溶液の調製方法について示す。グルコース水溶液は、実験毎に β -グルコース粉末試薬を脱イオン水に溶解して調製し、少なくとも2時間以上、評価実験の環境温度（たとえば25℃）に静置したものを用いた。2時間以上静置の目的は、奥田らの報告⁹⁾を基にして、グルコースの α 体と β 体が平衡状態に達した状態の試料液を用いるためである。

グルコース濃度としては、90mg/dL（5mM）と360mg/dL（20mM）を多用したが、これは臨床検査技師の助言等を基にして、前者を健常者の血糖値領域の代表とし、後者を糖尿病患者の血糖値領域の代表と考えたことによる。

2.2.5 全血試料の調製方法

ヒト全血試料液の調製方法を示す。ヒト全血試料は健常者から採血した全血（含グルコース濃度： \sim 5mM）および、この全血にグルコースを添加して調整した。詳細は以下の手順に従った。

健常者から採血管または注射器を用いて採血した全血を、軽く遠心分離（1,000rpm \times 1min）して赤血球等を分離して血漿成分主体の上清を得た。この血漿部分に β -グルコースを加えて溶解させた後、先に分離した赤血球等成分と静かにかつ確実に転倒混和させて調製した。赤血球成分を分離したのは、高濃度のグルコースが直接赤血球膜に触れると、急激な浸透圧変化から赤血球膜が破壊されることを避けるためである。その後、添加したグルコースの α 体および β 体が平衡状態に達するまで、室温で1時間程度静置した。採血に用いた採血管は、解糖阻止剤としてフッ化ナトリウムと、抗凝固剤と

して EDTA-2Na が含まれるものを用いた。

グルコースセンサへの試料液供給は、事前にサンプル管をゆっくりと転倒混和して、血球等の有形成分が出来る限り均一になるようにしてから、実験用マイクロピペットを用いて試料液の取り出しとセンサへの供給を行った。

2.3 結果と考察

2.3.1 センサ試薬層の構造

作製したセンサの電極～試薬層部断面の走査型電子顕微鏡（SEM）写真を図 2-3 に示す。PET 製の基板(a)上に銀リード(b)、カーボン製作用極(c)、試薬層(d)が、順に積層していることが分かる。銀リード(b)と作用極(c)の厚みは場所によって多少のばらつきはあるが約 6～7 μm 、試薬層厚みは 2～4 μm であった。

試薬層(d)部分は、場所によって SEM 像が少し異なることが分かったため、少し倍率を上げて、試薬層表面部分とカーボン電極(c)に近い部分の観察を行った。結果をそれぞれ図 2-4 と図 2-5 に示す。

図 2-4 は、試薬層表面近くの SEM 像である。試薬層の上部にはロッド状の結晶が多くみられた。本結晶は、別途作成したフェリシアン化カリウム単体の SEM 像と類似であることより、表面近くにはフェリシアン化物イオンの微結晶が多く、その大きさは、直径約 0.1 μm 、長さは 0.5～1.0 μm であった。一方、カーボン電極に近い部分の SEM 像を見ると、ロッド状の結晶は少なく、崩れたような結晶が認められた（図 2-5）。酵素やフェリシアン化カリウムの混合水溶液をカーボン電極上に滴下後、恒温乾燥機中で乾燥させる場合に、表面からのみ水が蒸発し、それに伴って試薬層の上部から順に結晶が析出すると考えられる。表面近くである上部は比較的短時間に結晶化し、下部の結晶化はそれよりも時間がかかることより、フェリシアン化カリウムの結晶成長時間の差によって、このような違いが生じたものと考えられる。

更に、酵素タンパク質が試薬層中で均一に分布していない可能性も示唆された。SEM 観察からはタンパク質の分布状態は不明であり、この点については今後の研究が必要である。

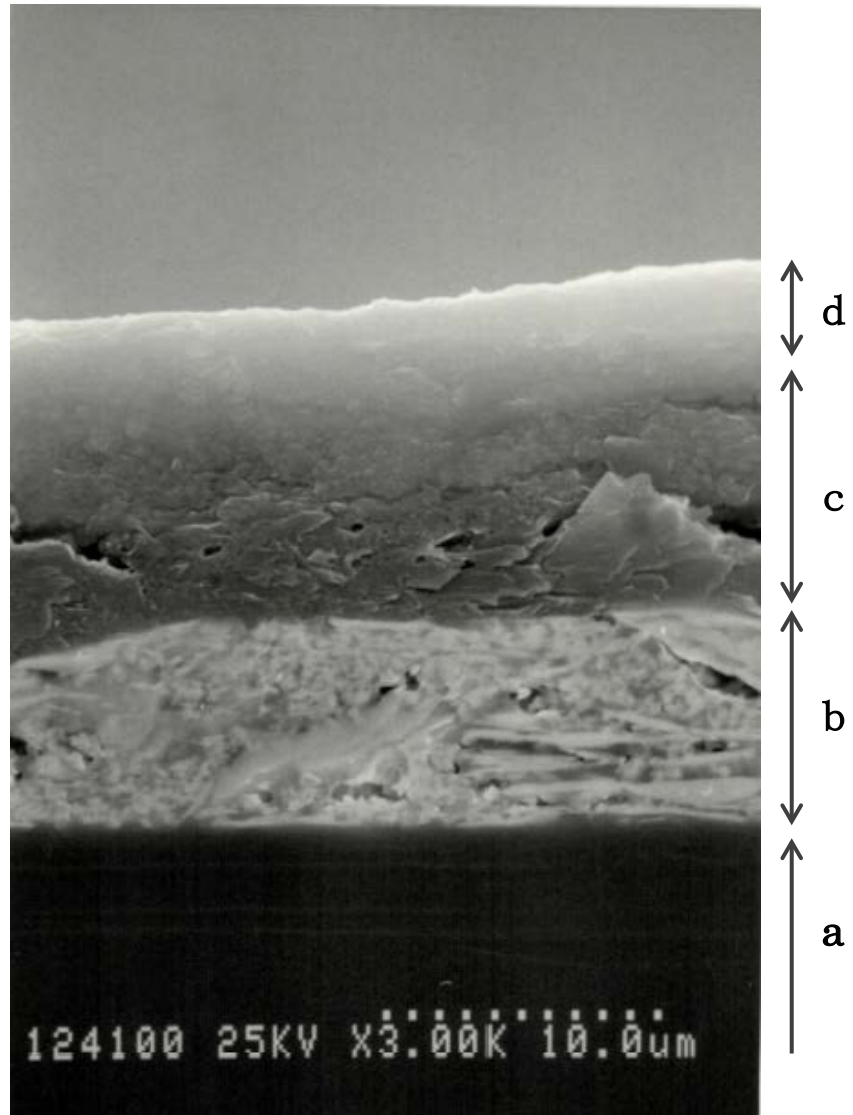


Fig.2-3 SEM of cross section of the glucose sensor.
(a)polyethylene terephthalate base, (b)silver lead, (c)carbon electrode, (d)reagent layer (enzyme, ferricyanide and carboxymethyl cellulose).

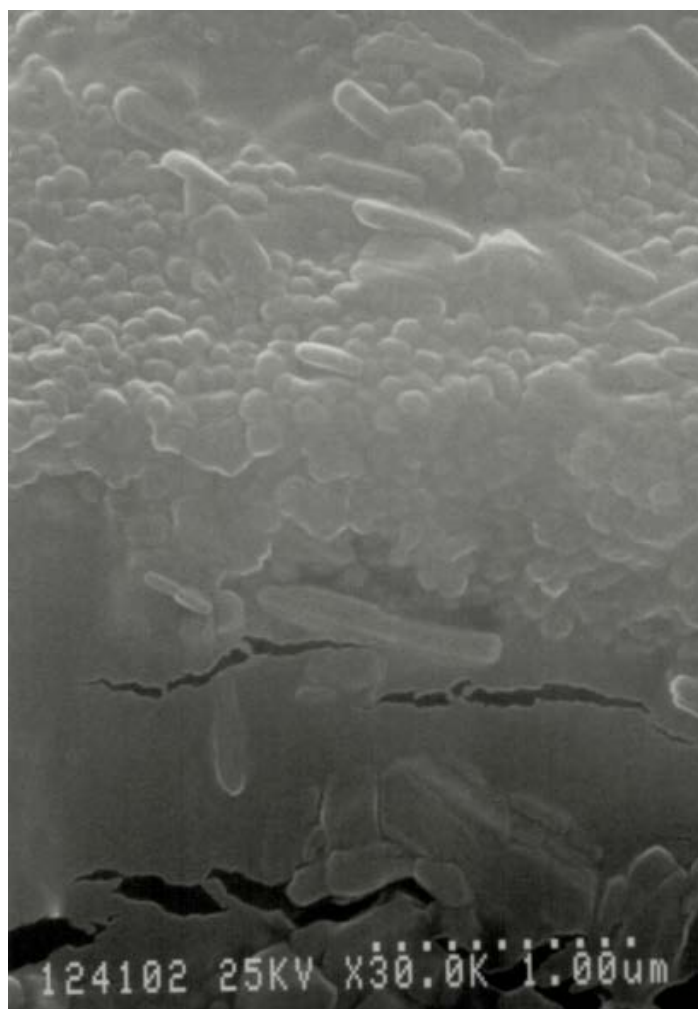


Fig.2-4 SEM of upper part of reagent layer.

This layer contained enzyme, ferricyanide and carboxymethyl cellulose.

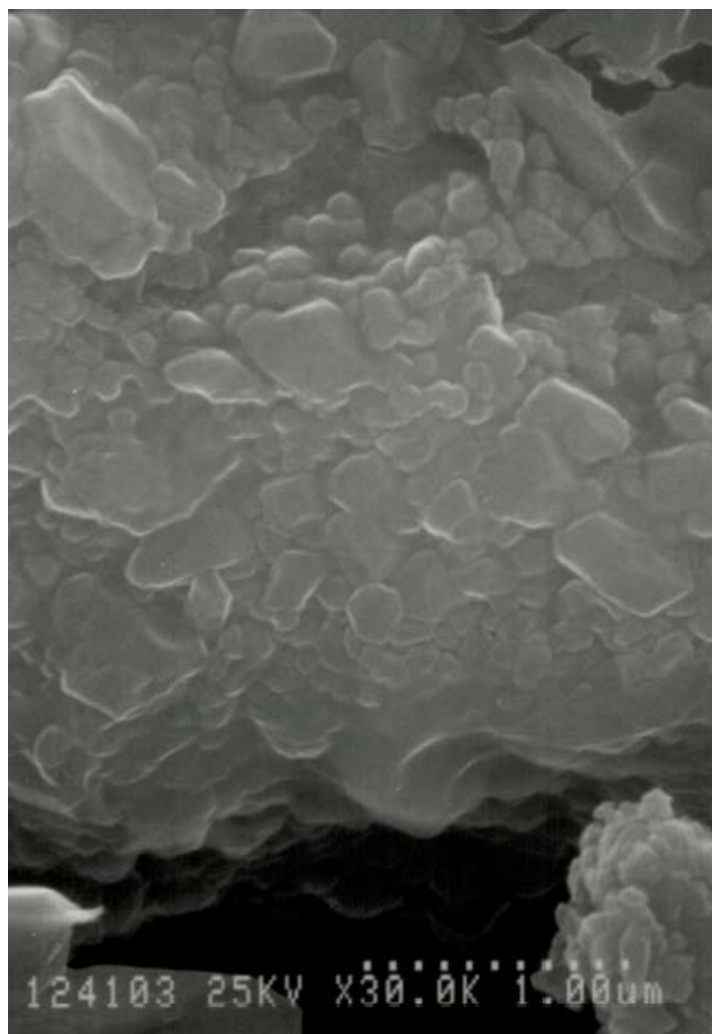


Fig.2-5 SEM of lower part of reagent layer.

This layer contained enzyme, ferricyanide and carboxymethyl cellulose.

2.3.2 酵素量の検討

本バイオセンサは、酵素反応に基づいて基質成分を定量するため、センサに含まれる酵素活性が重要である。一方で、本センサ反応系は試料液を供給する前は試薬層が乾燥状態にあり、試料液に溶解した後は攪拌子などによる溶液攪拌をすることが無いため、通常酵素活性を求める均一な溶液条件とは大きく異なる。更には、CMCのような親水性高分子も反応系内に存在するため、実際に酵素反応が生じている環境の溶液はおよそ「均一系溶液」とは言い難いことが容易に想像できる。センサに必要とされる酵素量を見積もるには、通常の方法で求められた酵素活性値は使えないため、必要な酵素量に関する検討を行った。

グルコースセンサに用いる酵素 Glucose oxidase 量がセンサ応答に与える影響を評価した結果を、図 2-6 に示す。Glucose oxidase は 10 から 100 μg / センサとし、測定時間は 60 秒とした。

Glucose oxidase 10 μg から酵素量を増やすと共に応答値の増加が認められ、50 μg 付近で極大となることが解った。本検討に用いた Glucose oxidase の試薬としての比活性は 23 units/mg であり、センサ当り 50 μg というのは、1.15 units / sensor と算出される。Units は 1 分当り基質 1 μmol の反応を触媒するという定義からは、センサに含まれる酵素が均一溶液条件下と同様に働くと仮定すると、1 分間に $1.15 \times 180 \times 10^{-6} \text{g} = 207 \times 10^{-6} \text{g}$ のグルコースの酸化反応に寄与することが期待される。一方、センサに供給された試料液は 5 μL であり、20 mM グルコース水溶液 5 μL 中に含まれるグルコースは、 $3.60 \text{g/L} \times 5 \times 10^{-6} \text{L} = 18 \times 10^{-6} \text{g}$ となる。よって、センサ化することにより、実質的な酵素活性は、 $18/207 = 0.087$ に低下していると考えられる。

低下の原因としては、先にも述べたが、均一な溶液ではないこと、CMC のような親水性高分子の共存によって溶液粘度が向上して分子の拡散係数が低下していること、さらには溶液 pH が酵素の至適 pH からずれていることな

どが考えられる。

一方で、センサに供給された試料液中の基質（グルコース）全てが反応しているとは限らない。センサ応答は、フェリシアン化物イオンを介して電気化学的な応答で見ているため、電極近傍のイオン濃度変化を中心に反映するからである。

以上結果より、センサに必要とされる酵素量は試薬としての酵素活性からは直接判断出来ないが、少なくとも 8% 程度には見積もれることが明らかとなった。

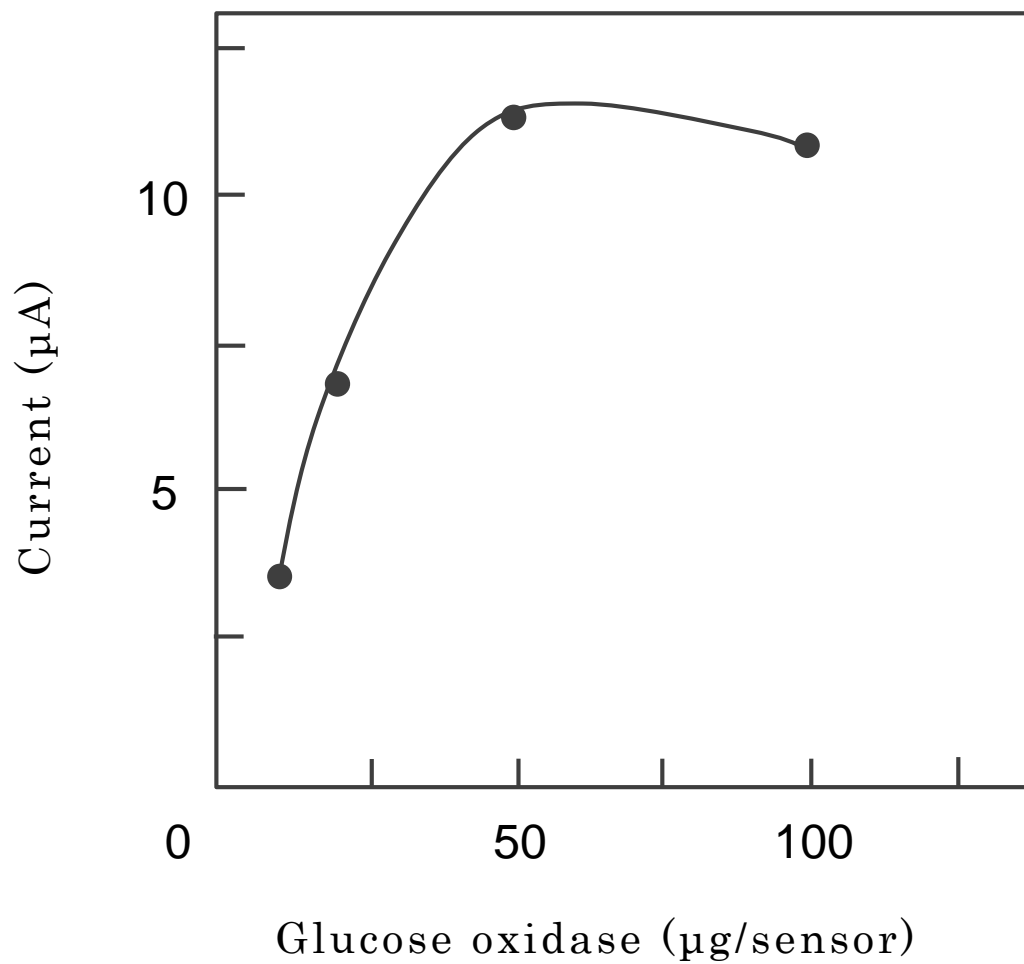


Fig.2-6 Effect of amount of glucose oxidase on sensor response. Sample was 20mM glucose solution. Measurement time was 60sec.

2.3.3 フェリシアン化物イオンの効果

本センサに用いた酵素 **Glucose oxidase** は、酵素反応に伴う電子伝達機能を酸素分子が担うことが知られている¹⁾。図 2-7(a)に、酸素分子が電子伝達をするスキームを示した。**Glucose oxidase** の補酵素 **FAD**(**flavin adenine dinucleotide**)は、グルコース酸化反応に伴って還元体 **FADH₂** となるが、共存する酸素分子との電子授受を行って酸化体 **FAD** に戻る。同時に酸素から過酸化水素が生成する。この過酸化水素と適当な色素を共役させることによって、その色変化（実際には特定波長の吸光度変化）からグルコースを定量することが出来る。あるいは、過酸化水素を電極によって直接酸化させることによって酸化電流値からグルコース定量が可能である。病院などで用いられる臨床検査機器はこの酸素／過酸化水素反応を用いたものが多い。臨床検査装置のほとんどは、測定検体を専用の緩衝溶液などで 100 倍程度に希釈するプロセスになっているため、測定基質量に対する溶存酸素量が十分に見込める。

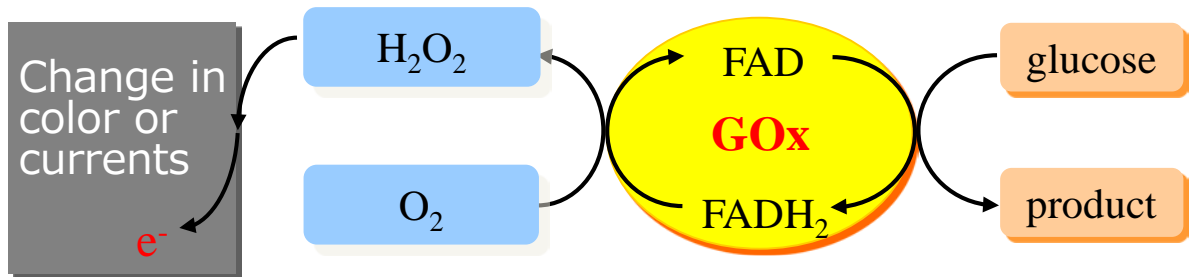
しかしながら、本センサのように試料液量が極めて少ない場合には、溶存酸素量が不足することによって、十分な測定が出来ないことが予想される。そこで、本センサの構造をそのまま用いて、試薬層からフェリシアン化カリウムを除き、過酸化水素を定量できるように電極に印加する電圧を従来の 500mV から 1,000mV に上げてグルコースに対する特性を評価した。結果を図 2-8(b)に示す。

グルコース 36mg/dL(2mM)付近から応答の低下傾向が認められ、約 400mg/dL (22.2mM) 付近で飽和値に達した。これは、試料溶液中の溶存酸素量の不足が原因と考えられる。

そこで、**Glucose oxidase** 中の補酵素 **FAD** と電子授受を行う電子伝達化合物としてフェリシアン化カリウムをセンサ試薬層中に導入し、グルコース濃

度依存性を評価した。電子授受のスキームを図 2-7(b)に、応答特性を図 2-8(a)にそれぞれ示す。センサへのフェリシアン化カリウム導入量は $66.0 \mu\text{g}/\text{sensor}$ ($0.2 \mu\text{mol}/\text{sensor}$) とした。溶存酸素を用いた場合 (図 2-8(b)) とは異なり、グルコース濃度域 600mg/dL (33mM) 以上までの直線性が得られた。

a) Oxygen as an electron mediator



b) Ferricyanide as an electron mediator

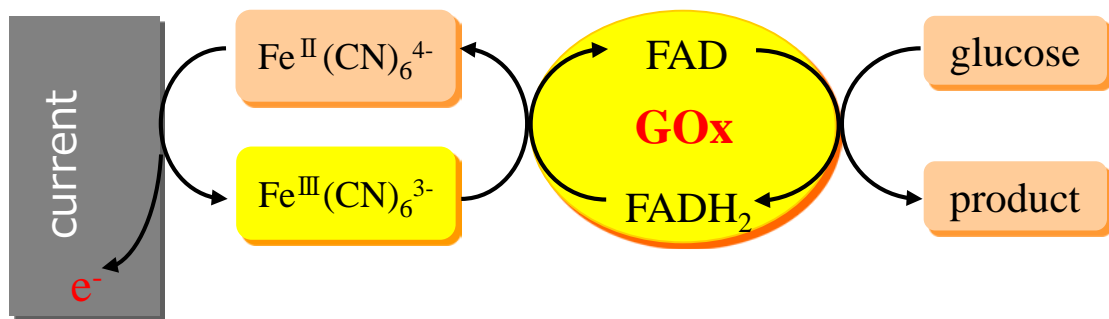


Fig.2-7 Measurement principles of glucose sensor.

Glucose oxidase is employed as an enzyme.

FAD: flavin adenine dinucleotide

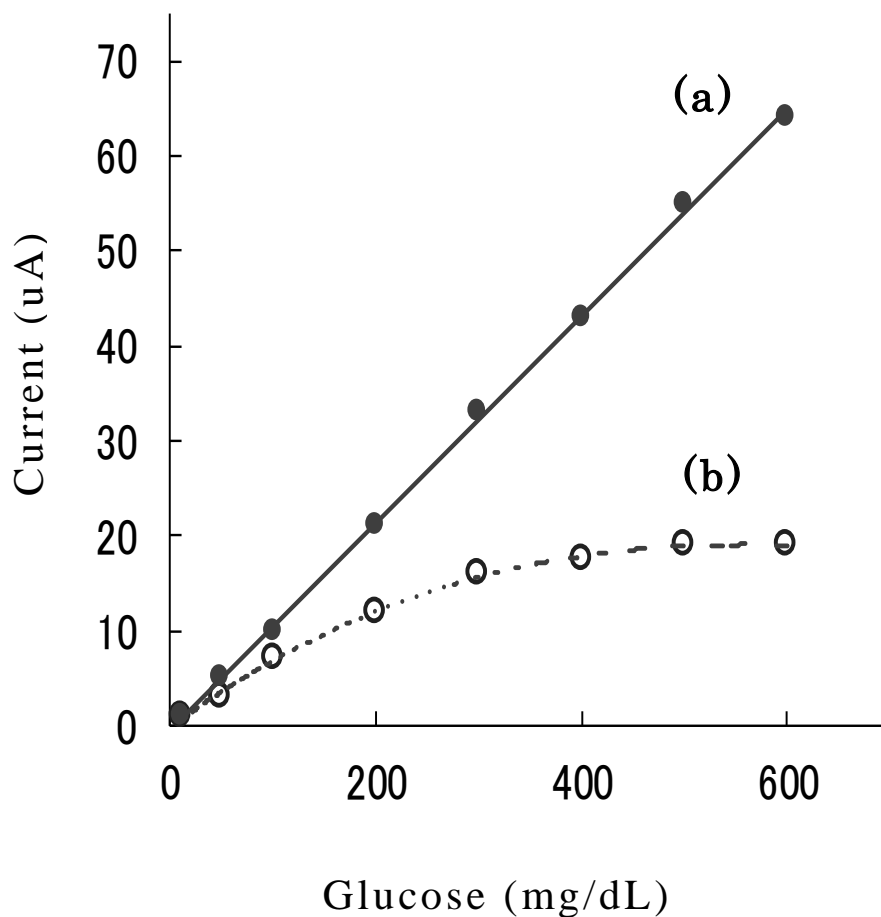


Fig.2-8 Response of glucose sensor employing (a) ferricyanide ion, (b) dissolved oxygen as an electron mediator. Glucose oxidase was used as an enzyme. Applied potentials were (a)500mV, (b)1,000mV.

2.3.4 親水性高分子の添加効果

本グルコースセンサの主な化学反応は、酵素反応と電気化学反応であり、Glucose oxidase とフェロシアン化物イオンと電極によって構成されることは既に示した。ここではセンサを実生活の中で活用する際に課題となる点を挙げ、その対応策として、親水性高分子である Carboxymethyl cellulose(CMC)を用いた場合のセンサ特性に関する評価結果を示して考察を加える。

実用上の課題としては以下の2点が挙げられる。一つ目は、測定中に電極部分が振動を受けると応答に正誤差が出ることであり、二つ目は、血液中の赤血球やアルブミンなどタンパク質の影響によって負誤差が出ることである。

まず振動による正誤差について説明する。本測定原理のうち、生成したフェロシアン化物イオンを電極で酸化して電流値を計測するプロセスがあるが、ここで外部から振動が加わると、スパイクノイズが入り、結果として正誤差となり得る。図 2-9(b)に、CMC など親水性高分子を用いずに作製したセンサの電流値変化を示す。更に電極表面を図 2-10(a)に示す。センサに試料液を導入してから 60 秒後に、電極間に 500mV を 10 秒間に亘って印加し続けたが、500mV を印加した瞬間を x 軸の「時間 = 0 秒」とした。電極表面のフェロシアン化物イオンが酸化されて酸化電流が流れ、電極から少し離れた溶液中からのフェロシアン化物イオンの移動には時間が掛かるため、電流値は減少傾向を示す。その途中の約 1.2 秒後と 4.2 秒後の 2 回、測定中のセンサに対して軽い振動刺激を外部から与えた（実験上は、実験者の指で軽く触る程度の刺激）。結果、CMC 被覆をしていないセンサでは、振動に伴うスパイクノイズが観測された。これは、外部振動によって電極上の溶液が一瞬攪拌された状態となり、電極から離れて存在していたフェロシアン化物イオンが、一気に電極表面に近寄って来たことで酸化され、その酸化電流がスパイク状に重畳されたものと考えられる。ノイズが重畳されると、見かけの電流値が

大きくなるためにセンサ応答の正誤差となる。

これに対して、電極表面を CMC で被覆した場合（図 2-9(a)、図 2-10(b)）には、同様の外部振動を与えた場合にもスパイク状のノイズは観測されなかった。これは、CMC が電極表面でゲル状となり、外部からの振動刺激に対する緩衝材料の効果を持ったことによると考えられる。

次に、血液中の赤血球やアルブミンなどタンパク質の影響によって負誤差に対する効果について検討した結果を図 2-11 に示す。CMC による電極被覆の有無と、被覆する場合にはその量を変えて評価した。電極上に CMC 水溶液を滴下、乾燥させて被覆をするが、その際の CMC 濃度を図 2-11(a)0.5wt% から (c)0.1wt% とした。試料液はグルコース水溶液として、さらにウシ血清アルブミン(BSA)を最終濃度として 10 から 30mg/dL になるように添加した。(a)0.5wt% の場合には、BSA の量とは関係なく一定の応答が得られたが、CMC の量が減るに従って BSA 添加にともなう応答低下傾向が認められた（図 2-11(b)から(d)）。これは、BSA が電極表面に存在あるいは吸着することによって、電極表面近傍のフェロシアン化物イオンの動きが妨害されたこと、及び電極に吸着した場合には、活性な電極表面積が小さくなったため電流値が低下したものと考えられる。

CMC 効果のイメージを図 2-12 に示す。CMC 層は高分子マトリックスとして分子フィルターの効果を持つと考えられる。アルブミンや赤血球などはこのフィルターによってそれ以上は進めず、センサの応答特性に直接寄与するフェロシアン化物イオンは分子量も 330 と小さいため、CMC 層を通過しやすい。その結果、電極表面にはフェロシアン化物イオンが優先的に到達する。

全血試料を前処理無しにそのまま測る場合には、赤血球などの有形成分や、アルブミンなどのタンパク成分が同様の影響を与えることが想定されるが、CMC 被覆によって影響が最小化できることが分かった。

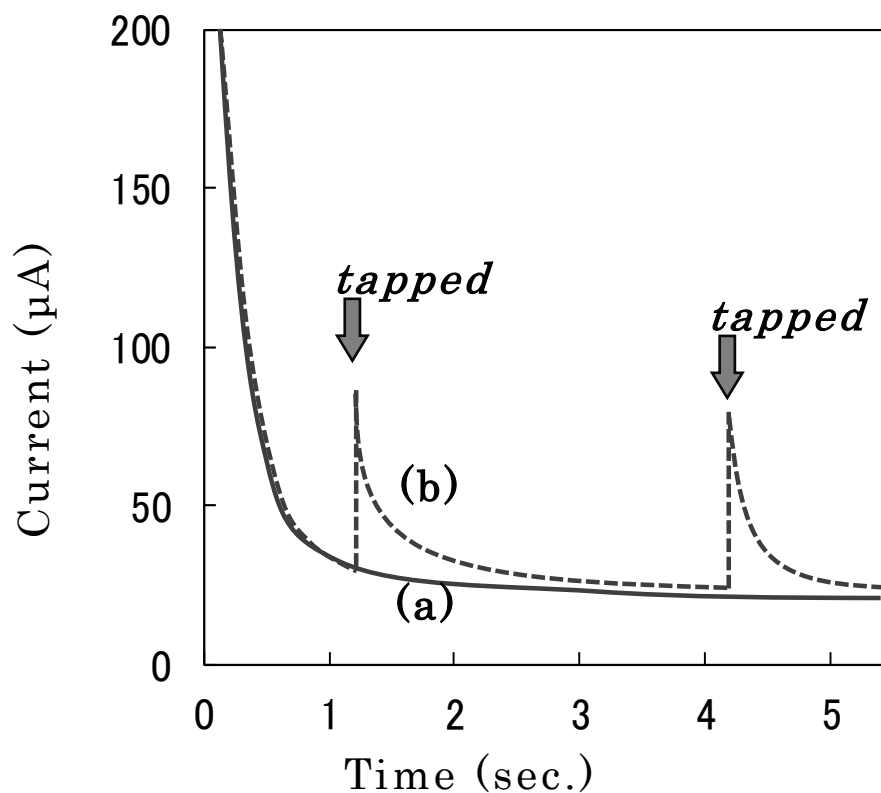


Fig.2-9 Effect of CMC as an insulator on sensor response. (a: solid line)CMC coated electrode, (b: dashed line) without CMC coat. Electrode was tapped lightly by finger at “tapped” time.

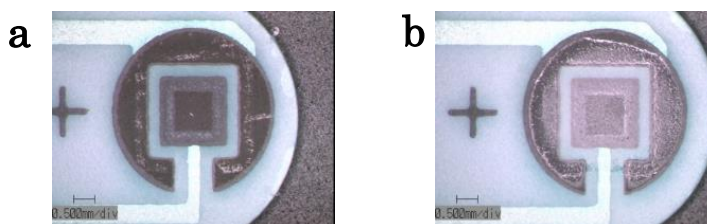


Fig.2-10 Surface of the sensor electrodes.

(a) without CMC(bare electrode), (b)coated with CMC.

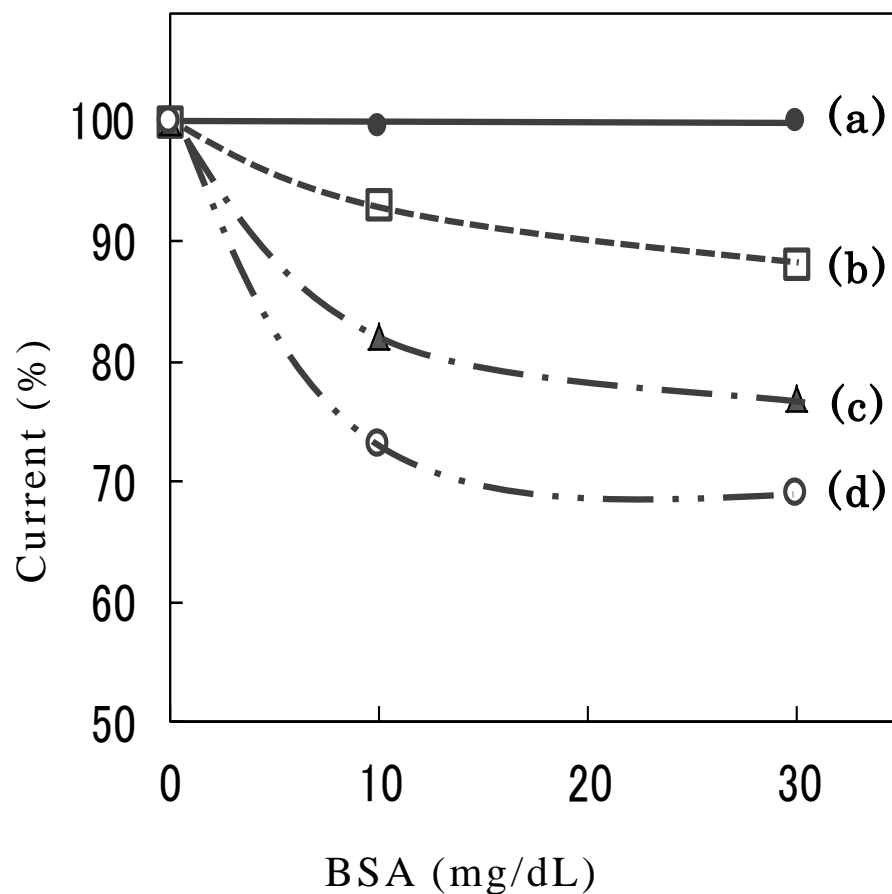


Fig.2-11 Response of glucose sensor employing CMC in the reagent layer. Prepared CMC solutions : (a)0.5wt%, (b)0.25wt%, (c)0.1wt%, (d)without CMC. Sample was bovine serum albumin and glucose mixed solution.

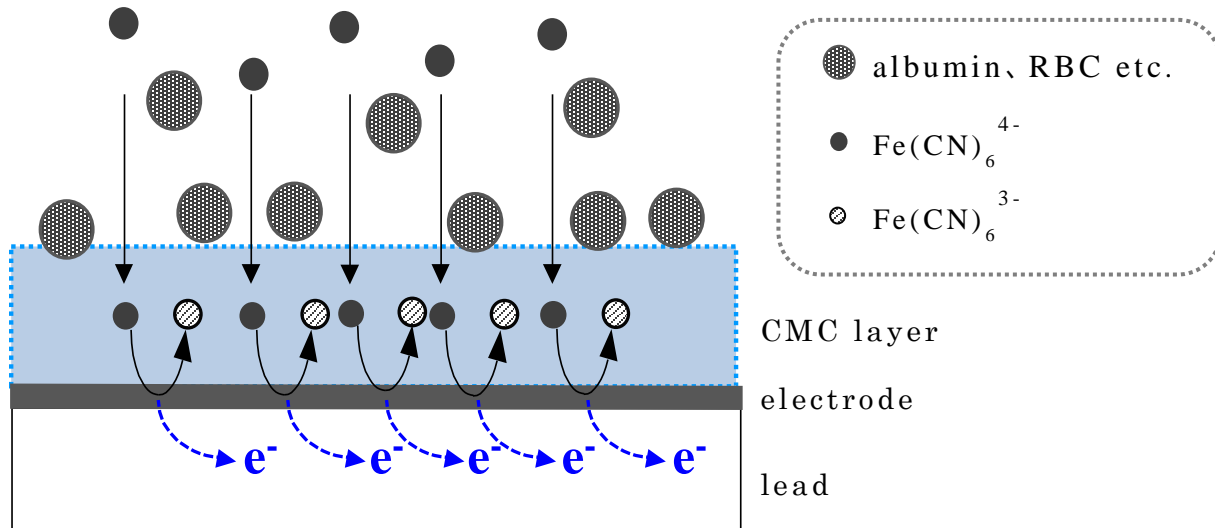


Fig.2-12 Model of CMC effects. Proteins and blood cells are set away by CMC layer.

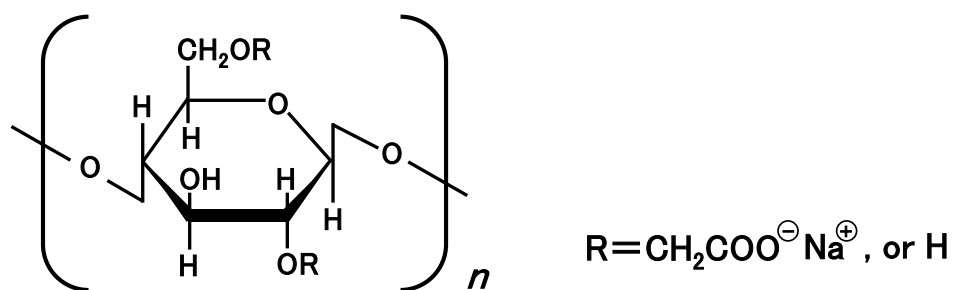


Fig.2-13 Molecular structure of CMC.

ここまで、CMCの2つの効果として、①外部からの振動対策と、②血液中の有形成分対策についての研究結果について示した。確かに実験結果としては効果が認められたが、親水性高分子を酵素反応系に共存させると、溶液粘度の向上などによって負の影響も予測できるにもかかわらず、それほど大きな負の影響が認められなかった。そこで、さらに正の効果があるために正負が打ち消し合っているという仮説の元、酵素反応に対する正の効果として、酵素活性について実験考察を行った。

CMC添加の有無に伴う酵素活性変化を図2-14に示す。酵素活性評価手順は、試薬供給者であるSigma-Aldrich社の手順に原則従い、CMCは最終濃度が0.5wt%となるように添加した。pH条件を変えるために、0.1Mリン酸緩衝液(pH5.6~pH8.0)を用いた。最終pH値は反応系全体のpHを実測した。

CMCが無い場合には、図2-14(a)のようにpH5.6からpH7.6に向けて約55%の酵素活性低下が認められた。一方でCMCを添加した場合には、pH上昇に伴う酵素活性低下の傾向はみられたが、その程度は小さくなっており、pH5.6からpH7.7において約30%の低下であった。

この原因としては、CMCマトリックス中でGlucose oxidaseの構造変化が制限されることによる活性維持が考えられる。CMCの網目構造の中にGlucose oxidaseが入ったような形になることで、pH変化時の酵素構造変化が生じ難くなることを想定しているが、詳細についてはCDスペクトルなどタンパク質構造に関する分析手段を用いて、Glucose oxidaseの構造変化に関して明らかにする必要がある。

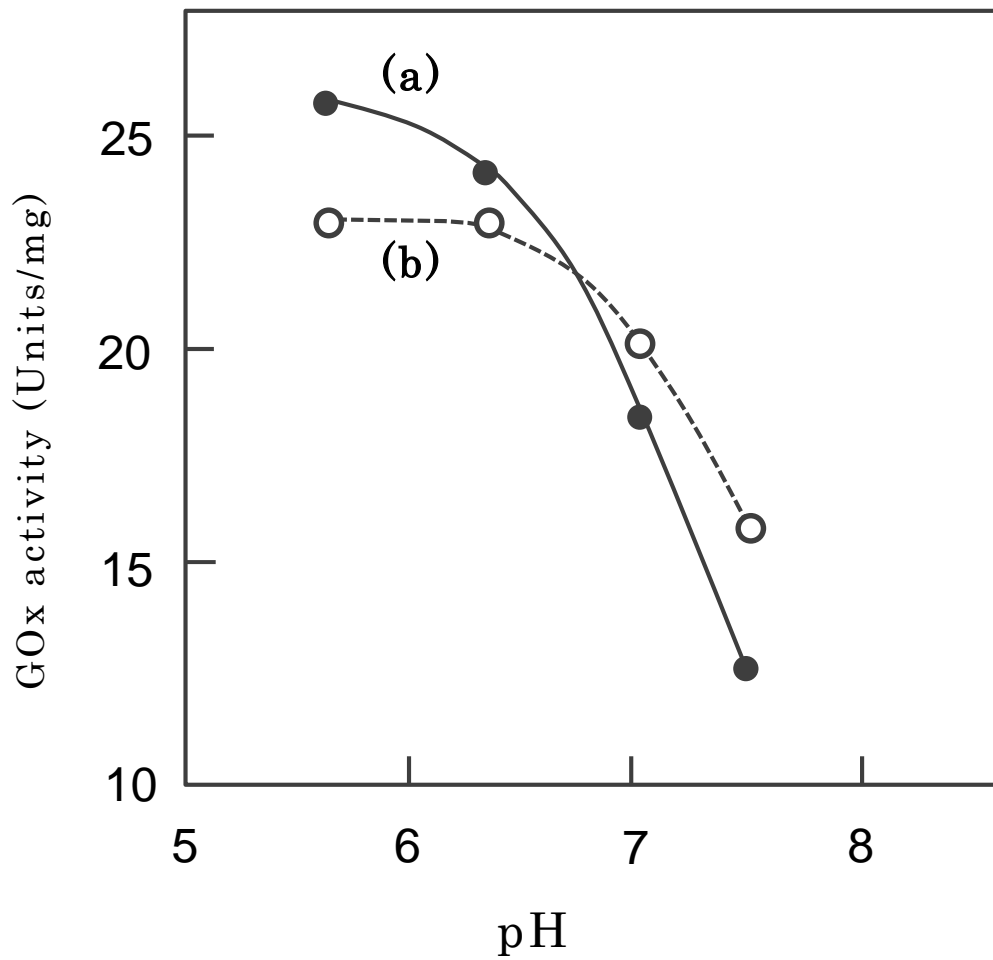


Fig.2-14 Effect of CMC on enzyme activity. Glucose sensor : (a) without CMC, (b) with CMC.

2.3.5 溶存酸素による影響の解析

本センサに用いる酵素 **Glucose oxidase** が、溶存酸素と電子授受を行うことは先にも述べた。本センサの測定原理では、電極間に 500mV を印加するため、生成した過酸化水素の酸化電流を計測することが出来ない(図 2-15)。そこで、まず本センサの溶存酸素依存性について評価した。結果を図 2-16 に示す。

溶存酸素量の増加に伴って、直線的な応答低下が見られた。センサ応答はフェロシアン化物イオンに基づく電流値のみであるから、この直線的な低下傾向より、フェロシアン化物イオンに比べて溶存酸素の方が反応性が高いことが予測される。そこで、**Glucose oxidase** との電子伝達機能に関する反応速度論的な評価解析を行った。

実験は BAS 株式会社製のポテンシostat CV-50W を用いて 25°C で行った、作用極にはグラッシーカーボン (BAS 株式会社：直径 1mm) を、対極にはスパイラル状にした白金線を、参照極には銀/塩化銀電極 (BAS 株式会社：RE-1B) をそれぞれ用いた。

表 2-1 に **Glucose oxidase** と電子伝達化合物との反応二次速度定数 k_{crs} を示す。二次速度定数 k_{crs} は、電気化学的な測定を基にして、図 2-17 に示す Liaudet の式¹⁰⁾より算出した。

n は反応に関わる電子数、 F はファラデー定数、 A は電極面積、 D_0 は電子伝達化合物の拡散係数、 C_{ET} は全酵素濃度、 C_R は電子伝達体の還元体濃度である。サイクリックボルタモグラムより I_{lim} を求め、上記式により k_{crs} を算出した結果、 $1.28 \times 10^3 [M^{-1} s^{-1}]$ となった。Weibel らによると、**Glucose oxidase** と酸素の反応二次速度定数は $1.50 [M^{-1} s^{-1}]$ である¹³⁾ ことより本センサで用いるフェロシアン化物イオンは溶存酸素に比べて、1,000 倍以上反応が遅いことが分かった。これは、電子伝達体と酵素の反応速度はその電荷に影響を受けるとした Fraser らの報告¹⁴⁾とも整合する。

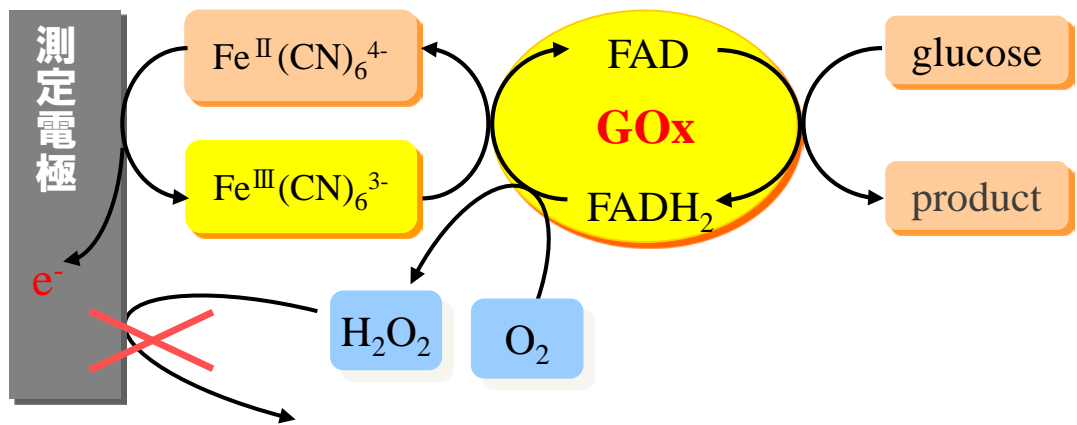


Fig.2-15 Reaction of glucose oxidase and ferricyanide or dissolved oxygen.

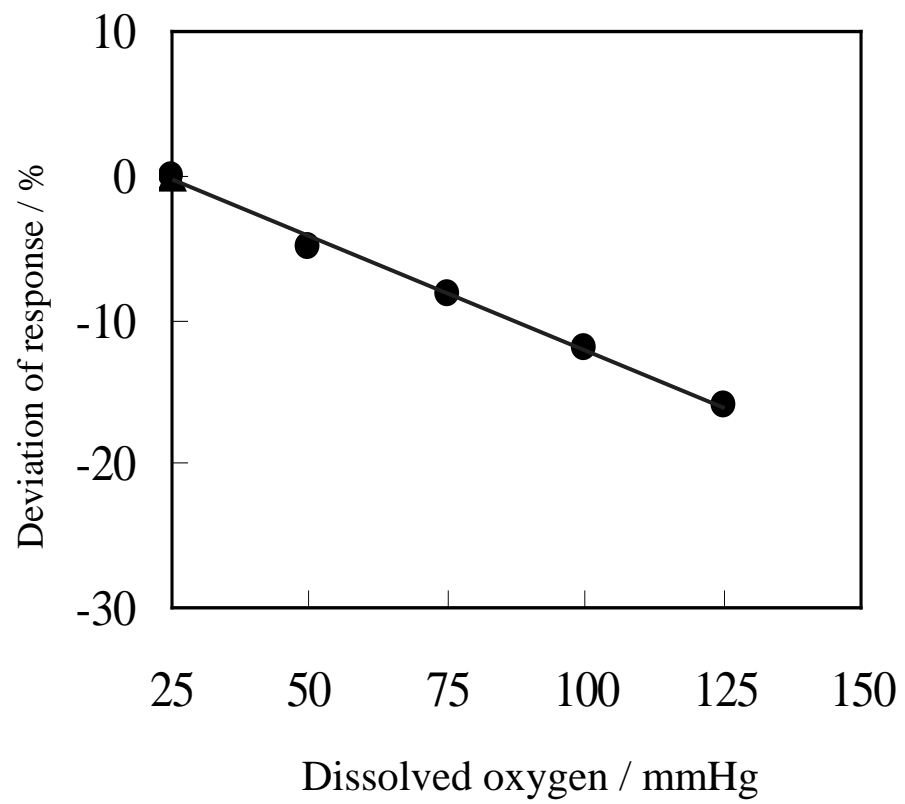


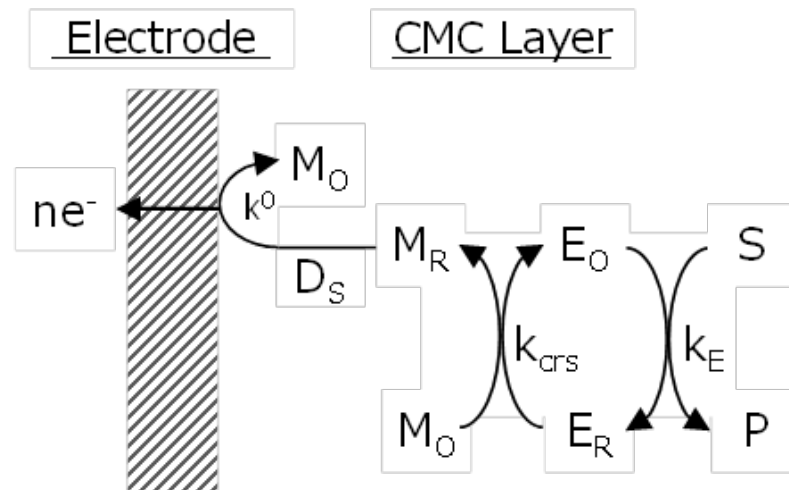
Fig.2-16 Influence of dissolved oxygen.

Enzyme: glucose oxidase.

Table 2-1 Kinetic data obtained for several electron mediator/glucose oxidase systems.

| Mediator / Enzyme | $K_{crs} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-3}$ | Ref. |
|--|---|------|
| $Fe(CN)_6^{3-} / GOx$ | 1.28 | a |
| $Fe(CN)_6^{3-} / LOx$ | 8.30 | 11 |
| $Ru(CN)_6^{3-} / GOx$ | 10.0 | 12 |
| Fc-COOH / GOx | 201 | 4 |
| Fc-Me-N ⁺ Me ₃ / GOx | 525 | 4 |
| Fc-Vinyl / GOx | 30.0 | 4 |
| O ₂ / GOx | 1500 | 13 |

a: this work



Liaudet's equation.
$$I_{lim} = nFA(2D_0 k_{crs} C_{ET})^{1/2} C_R$$

Fig.2-17 Kinetic model of enzyme/electrode reaction.

2.3.6 酸素と反応しない酵素系による検証

Glucose oxidase 反応において、酸素とフェリシアン化物イオンが競合することは既に知られており^{4,15,16)}、本研究の反応速度論的な解析によって、本センサが溶存酸素の影響を受ける主メカニズムとして、Glucose oxidase に対するフェリシアン化物イオンと酸素の反応速度の違いが示唆された。本センサの反応系は、酵素反応と電極反応の組合せであるため、前半の酵素反応部分に主要因があることは明らかだが、後半の電極反応部分に酸素が影響するか否かについては依然明確ではない。そこで、これに関する知見を得るために、以下の実験を行った。

グルコースの酸化反応は触媒するが、酸素への電子授受を行わない酵素として、Pyrroloquinoline quinone(PQQ)を補酵素とする Glucose dehydrogenase (PQQ-GDH:EC 1.1.5.2 from *Acinetobacter Calcoaceticus*) を用いて溶存酸素による影響を評価した。PQQ-GDH の反応機構を図 2-18 に、酵素のデータを表 2-2 にそれぞれ示す¹⁷⁾。

PQQ-GDH を用いて、Glucose oxidase の時と同様にグルコースセンサを作製した。溶存酸素に対する影響を評価した結果を図 2-19 に示す。Glucose oxidase (図 2-19(b)) では直線的な低下を示したが、PQQ-GDH では溶存酸素濃度に関わらず一定の値を示した (図 2-19(a))。これより、溶存酸素は酵素反応部分のみに影響し、電極反応部分には影響が無いことが明らかとなった。

本 PQQ-GDH を用いて溶存酸素の影響を無くすことは糖尿病治療の現場においても意味がある。血液中の溶存酸素濃度は、静脈で 40~50mmHg、指先など毛細血管で 70~90mmHg、動脈では 85~105mmHg である。糖尿病患者が自己血糖測定を行う場合には、指先採血の場合が非常に多いので、溶存酸素濃度がばらつくことはそれほど多く無い。しかし、病院内において本セン

サが使われる場合には、静脈採血もあり得るし、救急現場などでは動脈血から血糖値を測る場合も可能性としてはあり得る。

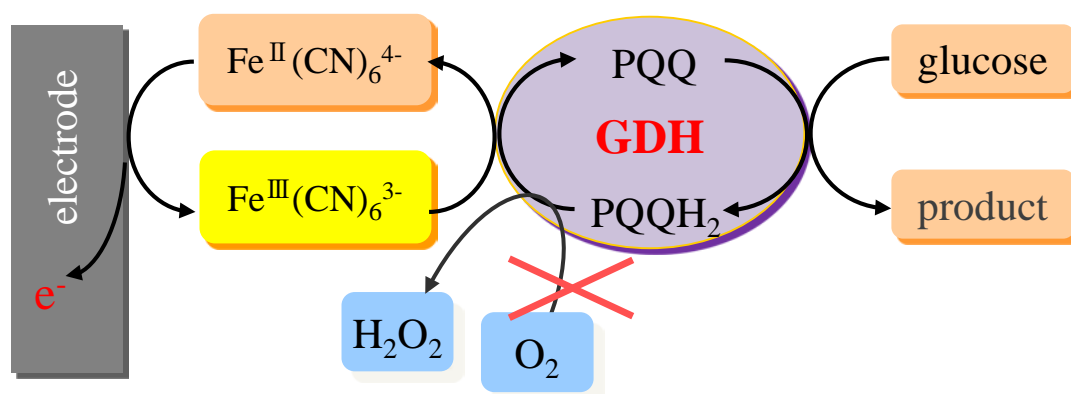


Fig.2-18 Reaction of PQQ-glucose dehydrogenase and ferricyanide or dissolved oxygen.

Table 2-2 Data of PQQ-glucose dehydrogenase.

| | PQQ Glucose dehydrogenase |
|------------------|------------------------------------|
| 起 源 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| 分子量 | 約100kDa |
| K _M 値 | 4.8 mM |
| 至適pH・温度 | pH7.0・37℃ |
| pH安定性 | 3.5-8.5 |

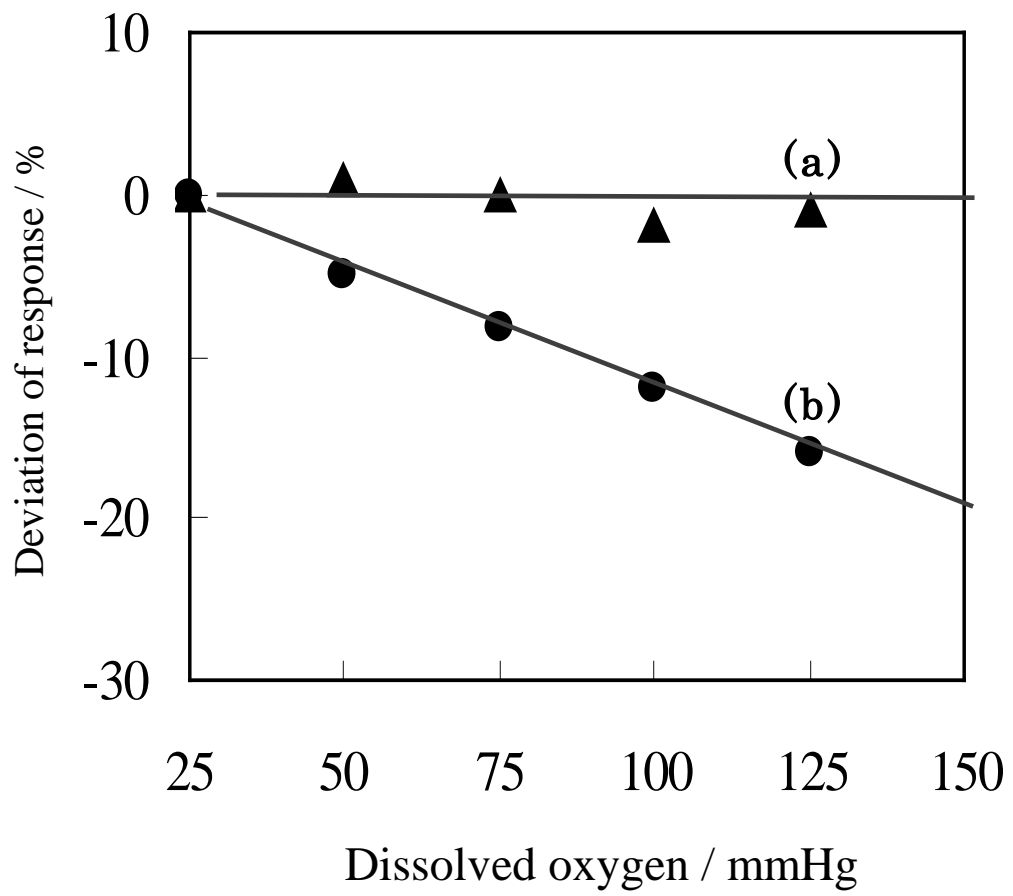


Fig.2-19 Influence of dissolved oxygen. Enzyme :
(a)PQQ-glucose dehydrogenase, (b)glucose oxidase

2.3.7 血液に対する基本応答特性

Glucose oxidase を用いたグルコースセンサについて、全血試料を用いた場合の応答特性を図 2-20 に、グルコース水溶液を用いた場合の結果を図 2-21 に、それぞれ示す。図 2-20 より、全血試料液に対しては、血中グルコース濃度 25mM 付近まで直線的な応答増加が認められた。各測定点は 12 個のセンサの応答値の平均値であるが、それぞれの点の変動係数（CV 値：Coefficient of Variation）は 3% 以下であった。

同じセンサを用いて、グルコース水溶液に対する応答特性を評価した結果を図 2-21 に示す。グルコースの濃度範囲は、全血は 25mM 付近まで、水溶液は 70mM 近くまでを評価した。全血の高グルコース濃度試料液はグルコースを添加して調製するため、あまり高い濃度の試料は溶血などの影響が顕著となり作り難い。よって、測定濃度域については比較が出来ないが、応答電流値は、水溶液に比べて全血試料の方が低い値となることが分かった。これは、試薬層中の CMC による効果があるとは言え、赤血球や共存タンパク質の影響を全く無くすることが出来ないため、それらによる影響と考えられる。

次に、全血に対する測定時間依存性評価を行った結果を、図 2-22 に示す。血中グルコース濃度が、5.5mM と 23.1mM の 2 種類の血液を用いて評価をした。グルコース 5.5mM の全血に対しては、30 秒から 120 秒の間で応答値はほとんど変化が無く一定値であり、30 秒以内に十分な反応が進行していることが示唆された。一方で、23.1mM の全血では、30 秒から 90 秒にかけて応答値の増加が認められ、90 秒から 120 秒の間の変化値は 5% 以内であった。

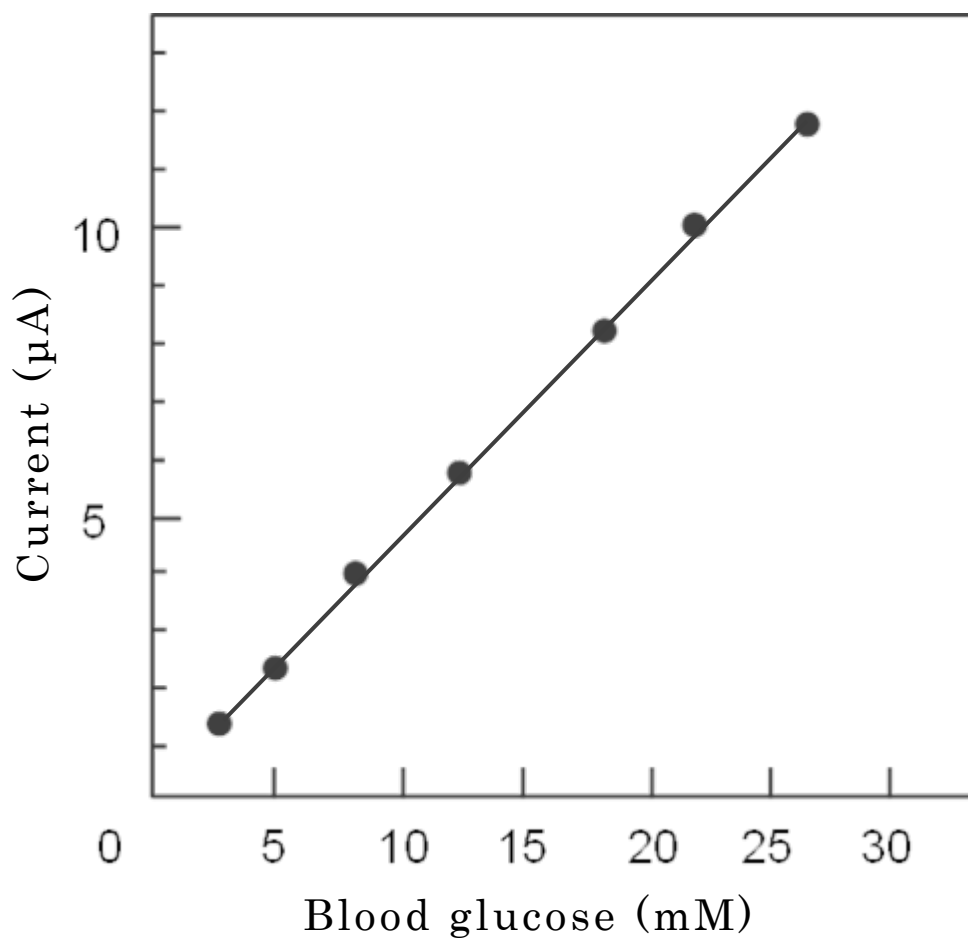


Fig.2-20 Response of glucose sensor.

Samples were human whole blood.

Measurement time was 60sec.

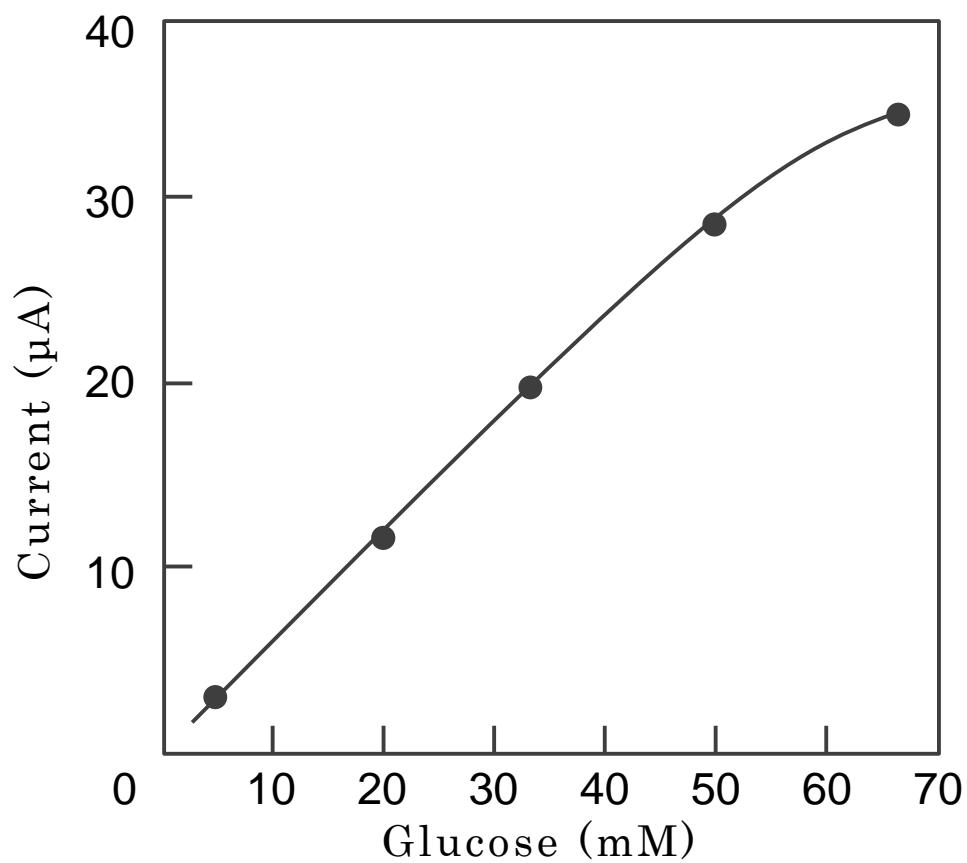


Fig.2-21 Response of glucose sensor.

Samples were glucose solutions.

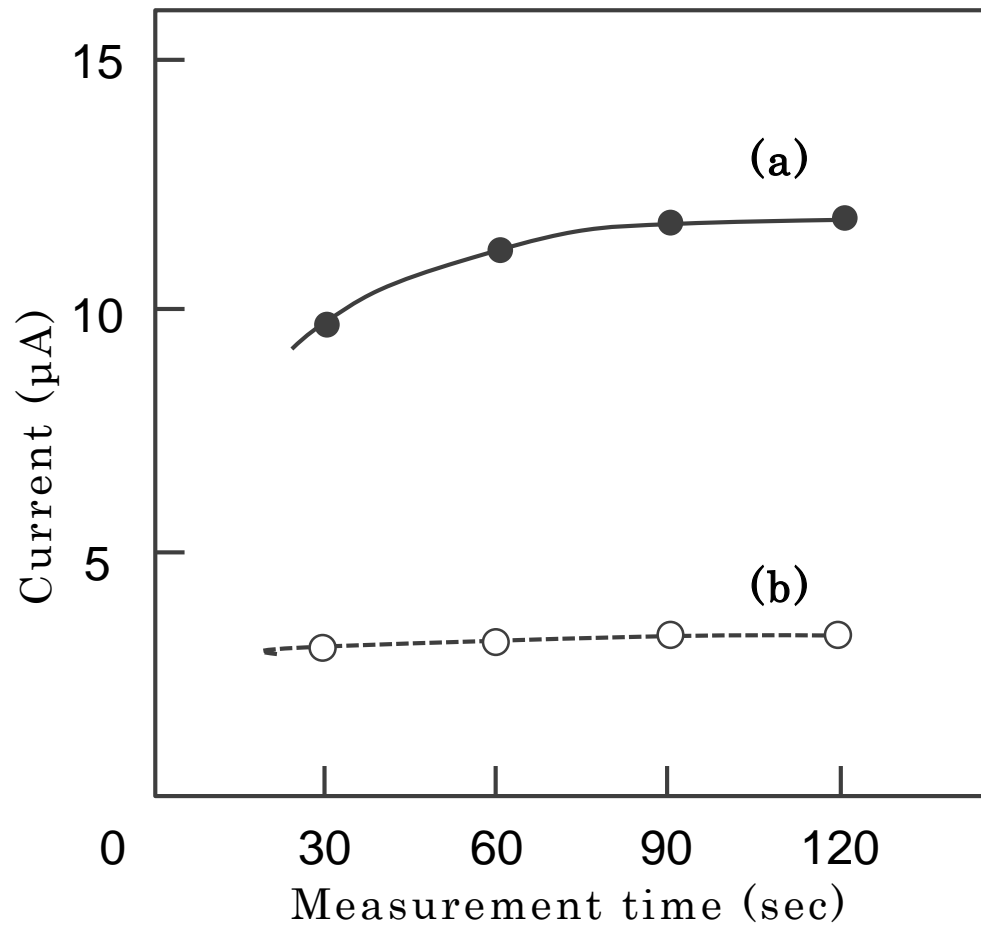


Fig.2-22 Response of glucose sensor. Blood glucose was (a) 23.1mM, (b) 5.5mM. Measurement time was 60sec.

2.3.8 血液中の妨害物質による影響

Glucose oxidase を用いたセンサで全血試料を測定する際に測定の妨害となることが予想されるのは、先に示した溶存酸素以外に、大きく分けて 2 つの種類がある。一つは、電極活性なために正誤差を与える共存物質。他方は、赤血球やタンパク質のように酵素反応および電極反応の双方に影響して負誤差を与えるような物質である。

正誤差を与える共存物質としては、L-アスコルビン酸や尿酸などその化学物質の酸化還元電位が比較的負であるために、電極で直接酸化されて正誤差を与えることが想定される。代表的物質として、L-アスコルビン酸の影響を図 2-23 に示した。2 種濃度 (5.0mM、16.3mM) の全血試料に対して、それぞれ最終濃度が 5~20mg/dL となるように L-アスコルビン酸試薬を添加して調製した。L-アスコルビン酸添加量が増えるに従って直線的に応答値が増えることがわかる。しかしながら、日常生活の中における血中 L-アスコルビン酸濃度は最大でも 2mg/dL 程度であり直接的な影響はほとんど無いと考えられるが、ビタミン錠剤を服用した直後などは一時的に血中濃度が高い場合もあるかもしれず、注意は必要である。

次に、負誤差を与える要因として、血液中の赤血球に対する影響を評価した結果を図 2-24 に示す。横軸はヘマトクリット (%) とした。ヘマトクリットは、血液中の赤血球容積比率のことであり試料の調製は以下の手順で行った。全血を軽く遠心分離 (1,000rpm×1min) して、血漿成分中心の上清と赤血球に略分離した。次に血漿成分を適当量ピペットで移した後、緩やかに転倒混和させて血漿と赤血球を均一にした。

図 2-24(b)より、血糖値 5mM の試料液ではヘマトクリットの影響は認められなかった。しかし、高濃度 (25.4mM) 試料では、ヘマトクリットの増加に伴う応答低下がみられた。先に図 2-22 で示した、測定時間依存性の結果も含めると、比較的低濃度域 (~10mM) においては、妨害が予想される種々

の因子の影響はほとんど受けないことが分かった。一方で高濃度域（～25mM）では予想される影響が見られた。

最後に、臨床検査室で用いる測定装置との比較結果について図 2-25 に示す。横軸は静脈採血試料の血漿成分を臨床検査装置で測定した結果、縦軸は、本グルコースセンサを用いて、指先採血試料を基にした測定結果である。65名分のデータより、相関係数 0.991 と高い相関性が得られた。

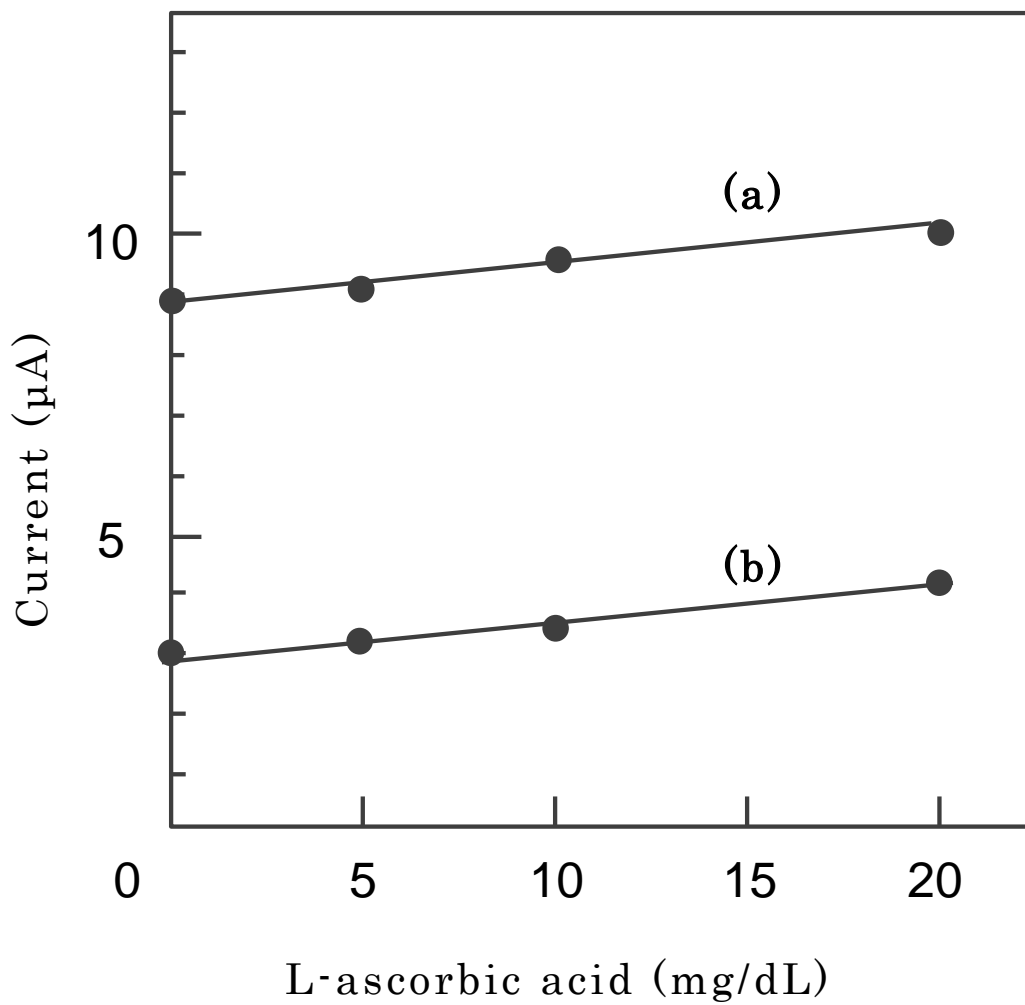


Fig.2-23 Influence of L-ascorbic acid. Blood glucose was (a)16.3mM, (b)5.0mM. Measurement time was 60sec.

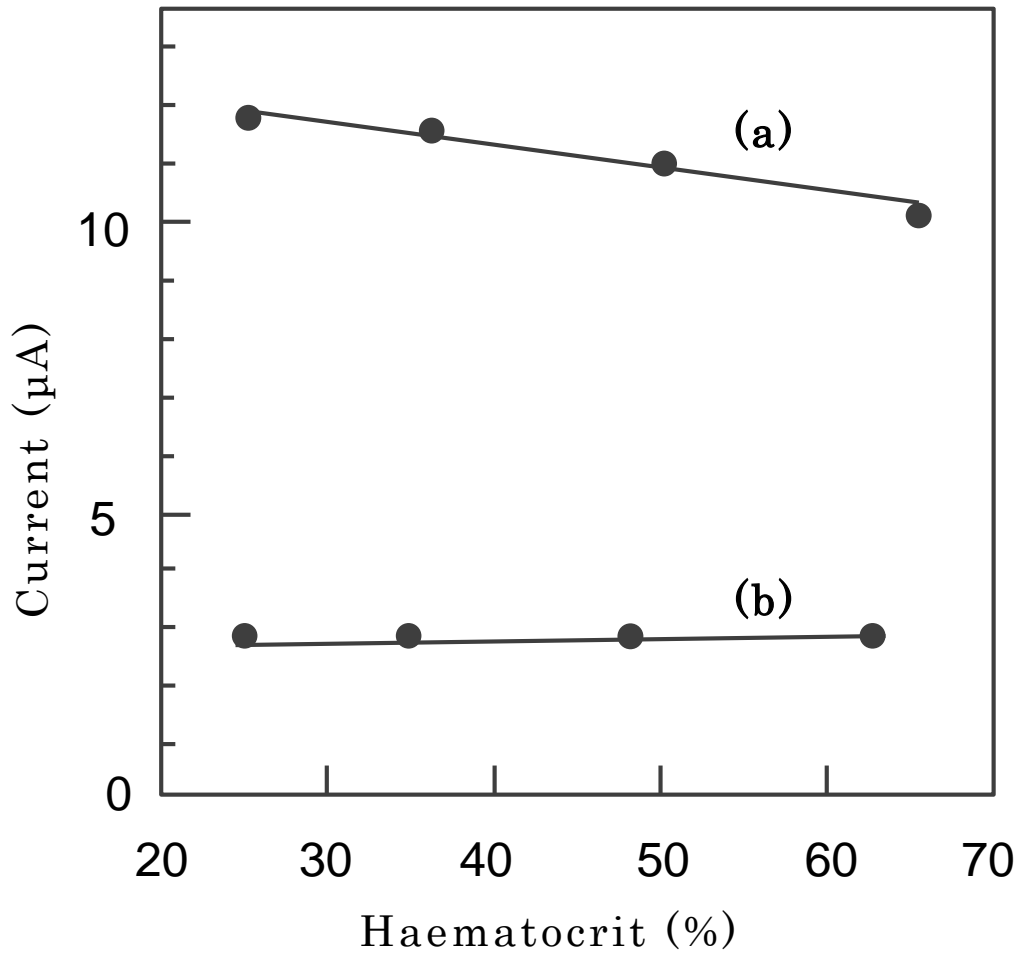


Fig.2-24 Influence of haematocrit. Blood glucose was (a) 25.4mM, (b) 4.5mM. Measurement time was 60sec.

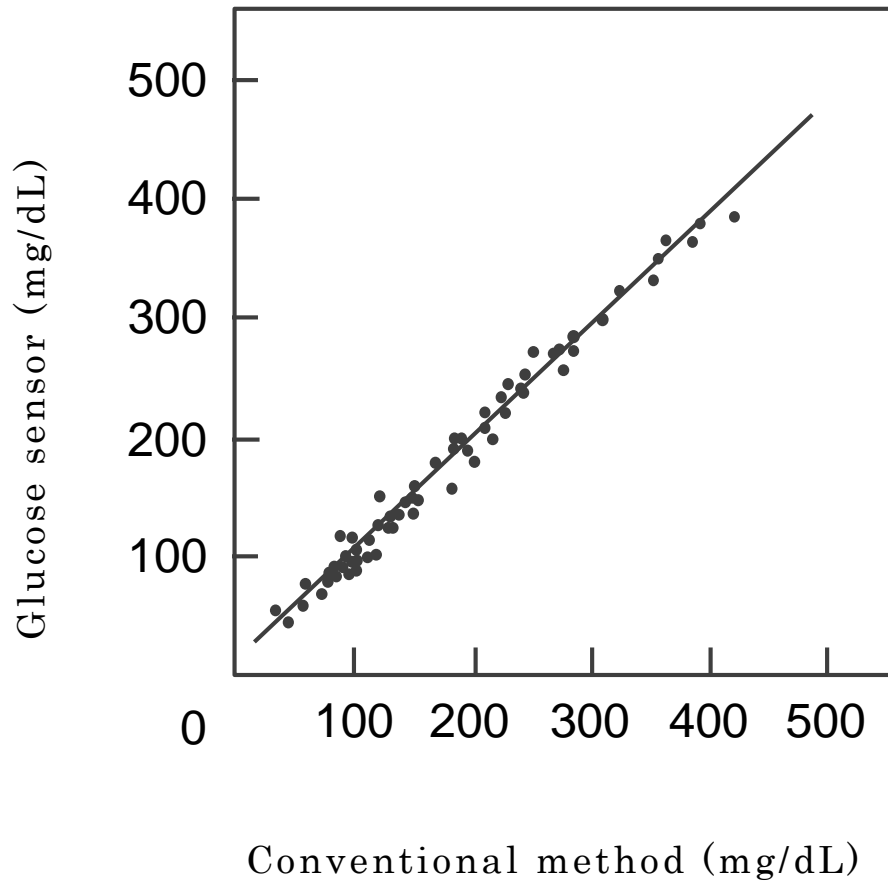


Fig.2-25 Correlation between the glucose sensor (capillary blood) and conventional method (venous plasma). Correlation coefficient(r)=0.991 (n=65)

2.4 小括

酵素に Glucose oxidase を用い、電子伝達化合物にフェリシアン化カリウムを用いたグルコースセンサの特性について明らかにした。また、グルコースとの反応には直接的な関係は無いが、親水性高分子である CMC を添加することで振動対策や妨害物質対策が出来ることを、一部メカニズムを含めて明らかにした。

一般の糖尿病患者が日常生活の中で血糖値を測る場合には、測定中にセンサを机の上に置いたり、手で持ち変えたりすることは頻繁にあるが、そこでセンサに伝わる振動ノイズが課題となりうる。振動ノイズは正誤差となるが、正誤差は糖尿病患者にとっては非常に危険であるといえる。高い血糖値を確認すると、多めのインスリンを自己注射する可能性があるが、実際よりも高い血糖値をセンサが表示した場合には、インスリン過多に伴う低血糖状態に陥るからである。著しい低血糖状態は昏睡から心肺停止に至ることもあるため、血糖センサの正誤差は避けなければならない。本研究で明らかにした親水性高分子の添加技術によってその一部がクリアできたものと考えられるが、まだ未解明な部分も多いため、更なる研究が求められる。

本研究成果を基にして試作したグルコースセンサの特性について、従来より血液検査に用いられてきた臨床検査装置と比較した結果、相関係数 0.991 ($n=65$)と高い相関性が得られ、簡単な測定操作で精度の高い血糖値測定が可能であることが示された。

第3章 血糖値測定用センサの長期保存特性に関する検討

3.1 緒言

前章で示したグルコースセンサは血液試料を用いるため、感染予防など衛生面からの配慮を含めて、一回使用後は再使用が出来ないように設計した。主ユーザーとなる患者には、使用の都度廃棄していただくことが前提である。また、化学反応の視点からみても、試料液中のグルコースとセンサ試薬層中の酵素などの試薬が反応した後は、計測したグルコース濃度によって試薬組成が異なるため、再使用すると応答の再現性が得られにくい。

センサを作製する側の視点でみると、作製後に個々のセンサ特性を事前に評価することが出来ない。センサ特性評価が破壊試験となるため、作製ロットからの抜き取り試験は可能であるが、全数試験が出来ない。従って、センサの作製ロット間初期特性を揃えることと共に、作製後の特性変化を最小限に抑えることが必要とされる。

そこで、試作したグルコースセンサの保存信頼性について評価を行い、作製から数ヶ月～数年までの特性変化を確認すると共に、それを通じて特性変化に関わる因子やそのメカニズム、制御方法などに関する検討を行った。

3.2 試薬と実験方法

3.2.1 試薬

Glucose oxidase(GOx, G-6125 Type2, 23U/mg, EC 1.1.3.4 from *Aspergillus niger*)は Sigma Aldrich 社より購入して使用した。β-グルコース(試薬特級)、Potassium Ferricyanide (K₃Fe(CN)₆: 試薬特級)、及び Polyvinyl pyrrolidone (PVP, K-90: 一級試薬)はナカライテスク株式会社より購入して使用した。Carboxy methyl cellulose sodium salt (CMC, セロゲン EP) は、第一工業製薬株式会社から購入して使用した。レシチン(レシノール S-10EX, 大豆由来) は、日本サーファクタント工業株式会社より購入

して使用した。エタノール（試薬特級）は関東化学株式会社より購入して使用した。シリカゲルは、青色粒状（中粒）のものを関東化学株式会社より購入し、加熱乾燥などの処理は行わず、新品を開栓後そのまま使用した。

3.2.2 センサの作製方法

2.2.2 に記載した方法と同様にして、図 2.1 に分解構造を示したグルコースセンサと同じものを作製した。

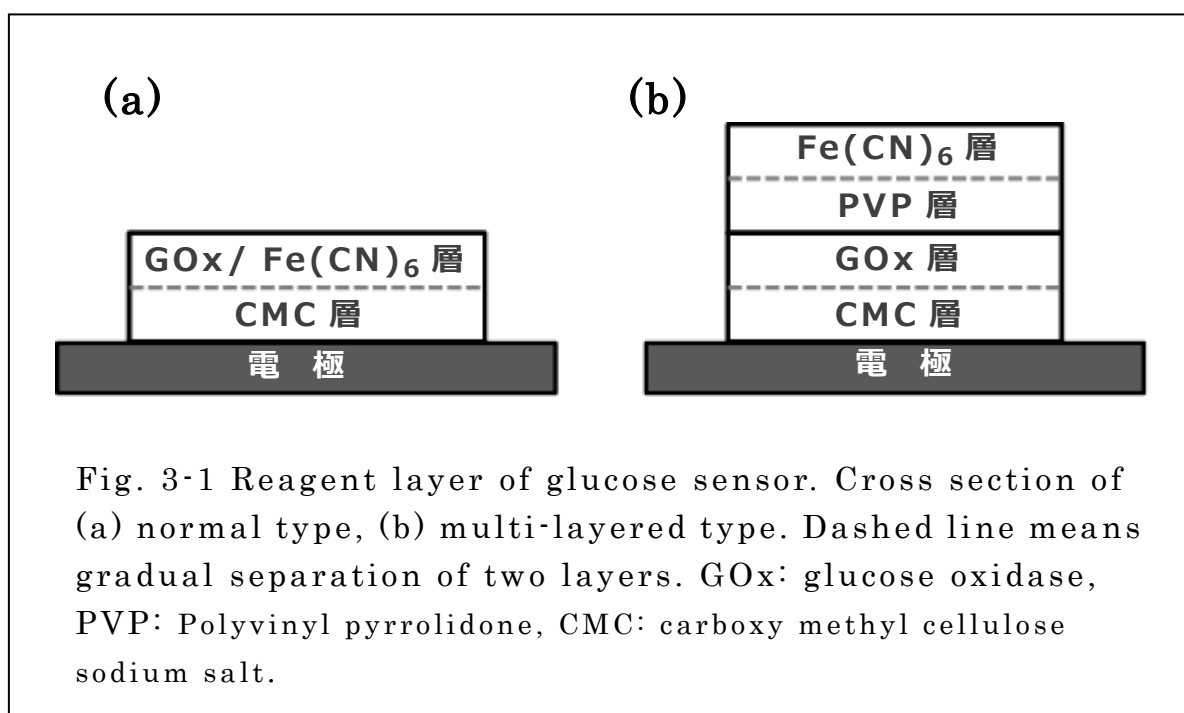
次に、試薬層中の酵素 **Glucose oxidase** と電子伝達化合物フェリシアン化カリウムを試薬層中で分離させた「試薬多層型グルコースセンサ」（図 3-1 参照）の作製方法を以下に示す。

0.5 重量%の CMC 水溶液 $5\mu\text{L}$ を測定極と対極上へ滴下後、 25°C 、相対湿度 15% の環境下で 45 分間静置乾燥して CMC 層を作製した。次に、**Glucose oxidase** 20mg を 0.5 重量% CMC 水溶液 1mL に溶解させた溶液 $4\mu\text{L}$ を先に形成した CMC 層の上に滴下し、 25°C 、相対湿度 15% で 60 分間静置乾燥して GOx-CMC 層を作製した。続いて、Poly vinyl pyrrolidone の 0.5 重量% エタノール溶液 $3\mu\text{L}$ を GOx-CMC 層上へ滴下して、 25°C 、相対湿度 15% で 30 分間静置乾燥して PVP 層を作製した。これを、乾燥剤であるシリカゲルで満たした常圧デシケータ中に約 12 時間置いて緩やかに試薬層中の水分を除去した。最後にフェリシアン化カリウム微結晶のエタノール分散液 $3\mu\text{L}$ を PVP 層上へ滴下して 25°C 、相対湿度 15% で 60 分間静置乾燥してフェリシアン化カリウム層を作製して「試薬多層型」の試薬層を作製した。

フェリシアン化カリウム微結晶のエタノール溶液の調製方法を以下に示す。市販されているフェリシアン化カリウムは水溶液からエタノールを用いて再結晶させ、ボールミルを用いて 4 時間粉碎することで微結晶化した。この微結晶フェリシアン化カリウム 190mg を 0.5 重量% レシチンのエタノール溶液に分散させて調製した。フェリシアン化カリウムはエタノール溶液中で分散

剤として用いたレシチンの効果によって微結晶が分散した状態であった。フェリシアン化カリウムの濃度は、31.3mg/mL（溶媒：エタノール）とした。

さらに、厚み 300 μ m の PET 製スペーサとカバーを両面テープで基板上へ貼り付けて、「試薬多層型」グルコースセンサを作製した。



3.2.3 センサの保存方法

作製したグルコースセンサは 12 個のセンサと乾燥剤（シリカゲル）約 2g をポリエチレン袋に入れて密封した。このセンサと乾燥剤が入ったポリエチレン袋 7~8 袋を、シリカゲル約 80g と共に保存用ガラス瓶に入れて密封した。ガラス瓶は紫外線の影響を避けるために褐色のものを用い、各保存温度環境下に置いた。保存温度は、-15℃から 70℃とし、-15℃は冷凍庫、4℃は冷蔵庫、20℃から 70℃は送風型定温恒温器をそれぞれ用いた。

3.2.4 センサ応答の測定方法

センサ応答特性の測定評価は以下の手順で行った。保存用のガラス瓶からセンサを取り出し、シリカゲルの入ったポリエチレン袋のまま 25℃になるまで 2 時間程度静置した。

センサのリード部分を測定器のコネクタに差し込んだ後に、グルコース水溶液および血液試料液をセンサに供給した。試料液供給から 55 秒後に電極間に電圧 500mV を印加して流れる電流値を測定し、電圧印加から 5 秒後の電流値を「応答電流 (μA)」とした。

3.2.5 グルコース水溶液及び全血試料の調製方法

評価に用いた試料液は、グルコースを脱イオン水に溶解させて調製したグルコース標準液と、ヒト全血の 2 種類を用いた。各試料液に対するグルコースセンサの応答電流値の変化によって保存特性を評価した。

グルコース標準液は、90mg/dL (5mM: 健常者の血糖値領域) と 360mg/dL (20mM: 糖尿病患者の血糖値領域の代表) の 2 種濃度とし、測定評価毎に β -グルコースを脱イオン水に溶解して調製し、少なくとも 2 時間以上、評価実験の環境温度である 25℃に静置したものを用いた。

ヒト全血試料液は、健常者から採血した全血（含グルコース濃度：～5mM）および、この全血へグルコースを添加して調整した調整血の2種類を用いた。

調製血の調整法を以下に示す。健常者から採血した全血を軽く遠心分離（1,000rpm×1min）して赤血球等を分離した血漿部分にβ-グルコースを加えて溶解させた後、先に分離した赤血球等成分と静かにかつ確実に混合させて調製した。赤血球成分を分離したのは、高濃度のグルコースが直接赤血球膜に触れると、急激な浸透圧変化から赤血球膜が破壊されることを避けるためである。その後、グルコースアノマー（α体およびβ体）が平衡に達するまで、室温で1時間程度静置した⁹⁾。

採血に用いた採血管は、解糖阻止剤としてフッ化ナトリウムと、抗凝固剤としてEDTA-2Naが含まれるものを用いた。

グルコースセンサへの試料液供給は、事前にサンプル管を緩やかに転倒混和して、血球等の有形成分が出来る限り均一になるようにしてから行った。

3.3 結果と考察

3.3.1 グルコースセンサの保存特性

保存環境温度を-15℃～70℃に設定して、6ヶ月までの保存試験を行った。グルコースセンサの応答特性変化について、グルコース水溶液を用いた結果について表3-1から表3-8、および図3-2から図3-9に示す。全血試料を用いた評価は30℃保存についてのみ実施し、その結果を表3-9と図3-10に示す。

-15℃から35℃の範囲内で、応答特性に関する大きな変化は見られなかった。30℃保存については、全血試料を用いた評価も併せて実施したが、ほとんど特性変化が無かった（表3-9、図3-10）。各測定点のばらつきも、変動係数4%以下（n=12）であり、初期の特性が維持されていることが分かった。

保存温度が上がると、40℃保存では2ヶ月あたりから、50℃保存では1ヶ月目からグルコース 0mg/dL 水溶液に対する応答（ブランク応答）値の上昇が認められた（表 3-5、図 3-6）。50℃保存では、特に高濃度（20mM）で保存開始後1ヶ月以内に10%程度の低下がみられたがその後は大きな変化は見られなかった（表 3-6、図 3-7）。60℃保存ではブランク応答値の急激な上昇がみられ、グルコース 5mM 水溶液の応答もブランク応答の上昇に平行した増加がみられた（表 3-7、図 3-8）。この現象より、Glucose oxidase やフェリシアン化物イオンは変質をしているが、5mM 程度のグルコースと反応することは可能であることが示唆された。グルコース 20mM の応答は大きく変化していないが、ブランク応答の影響を受けると仮定すると、酵素による反応は十分に進んでいないと考えられる。70℃保存では保存直後から、ブランク応答の急激な上昇と、グルコース 20mM に対する応答低下がみられ、本温度で置かれると、数日以内に特性劣化が生じることが分かった（表 3-8、図 3-9）。

全体をみると、特性の変化は、①ブランク応答の増加と、②20mM グルコース水溶液に対する応答値の低下の2点に注目できる。

まず、①ブランク応答の増加は、その電流値の大きさより、試薬層に含まれる電気化学活性な化合物のうちフェリシアン化物イオンの還元によって生成したフェロシアン化物イオンの増加に基づくものと推定される。それ以外の化学物質でこれほどの大きな電流値に関与するものは見当たらない。そこで、別途、フェリシアン化カリウムと CMC と Glucose oxidase の混合物をシャーレに入れて乾燥後、加温保存をした後に電気化学的な分析を行ったところ、フェロシアン化物イオンの生成を確認できた。これより、グルコースセンサの保存後ブランク応答は、フェロシアン化物イオンの生成に基づくものと考えられるが、そのメカニズムについては明らかではない。

次に、② 20mM グルコース水溶液に対する応答値の低下は、試薬として用いる酵素 Glucose oxidase の失活が主要因であると考えられる。そこで、CMC とフェリシアン化カリウムと Glucose oxidase を混ぜた溶液を乾燥後、加温保存の後に Glucose oxidase の酵素活性を評価した。結果を図 3-11 に示す。

酵素活性は 50℃で 6 ヶ月間保存後も初期の 90%程度を維持していた（図 3-11(a)）。酵素活性がこのような高温で長期間保持されるのは予想外だが、その原因としては、例えば、CMC の添加による効果が考えられる。Glucose oxidase が CMC マトリックス中で自由な動きを制限され、その構造変化に伴う活性低下が少なくなったことが考えられるが詳細については不明である。本仮説については、更なる研究によって検証されることを期待する。さらに温度が上がると、図 3-11(b)(c)にあるように、数ヶ月で酵素活性が半分以下となることが分かった。70℃保存では、6 ヶ月にはほとんど酵素活性は残っていなかった（図 3-11(c)）。

Table 3-1 Storage characteristics of glucose sensor under -15°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 |
| 5 | 2.88 | 2.84 | 2.73 | 2.74 |
| 20 | 11.7 | 11.5 | 11.7 | 11.4 |

Unit: μ A

Table 3-2 Storage characteristics of glucose sensor under 4°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 |
| 5 | 2.88 | 2.84 | 2.73 | 2.74 |
| 20 | 11.7 | 11.5 | 11.7 | 11.4 |

Unit: μ A

Table 3-3 Storage characteristics of glucose sensor under 30°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 0 | 0.23 | 0.23 | 0.27 | 0.23 | 0.27 | 0.27 |
| 5 | 2.88 | 2.69 | 2.56 | 2.92 | 2.74 | 2.81 |
| 20 | 11.7 | 11.0 | 11.5 | 10.9 | 11.0 | 11.1 |

Unit: μ A

Table 3-4 Storage characteristics of glucose sensor under 35°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 |
| 5 | 2.88 | 2.84 | 2.73 | 2.74 |
| 20 | 11.7 | 11.5 | 11.7 | 11.4 |

Unit: μ A

Table 3-5 Storage characteristics of glucose sensor under 40°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 0 | 0.23 | 0.27 | 0.27 | 0.33 | 0.33 | 0.53 |
| 5 | 2.88 | 2.66 | 2.75 | 2.84 | 2.65 | 2.66 |
| 20 | 11.7 | 10.8 | 11.2 | 11.2 | 10.6 | 11.0 |

Unit: μ A

Table 3-6 Storage characteristics of glucose sensor under 50°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 0 | 0.23 | 0.30 | 0.30 | 0.37 | 0.60 | 0.47 | 0.47 | 0.77 |
| 5 | 2.88 | 2.72 | 2.86 | 2.67 | 2.64 | 2.90 | 3.03 | 3.07 |
| 20 | 11.7 | 10.1 | 10.2 | 10.2 | 10.6 | 10.6 | 10.9 | 11.0 |

Unit: μ A

Table 3-7 Storage characteristics of glucose sensor under 60°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.13 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 0 | 0.23 | 0.30 | 0.40 | 0.57 | 0.63 | 1.03 | 1.67 | 2.33 | 4.23 |
| 5 | 2.88 | 2.58 | 2.71 | 2.94 | 2.80 | 3.33 | 4.27 | 4.72 | 5.84 |
| 20 | 11.7 | 10.7 | 10.6 | 10.3 | 10.5 | 10.6 | 12.3 | 9.9 | 10.3 |

Unit: μ A

Table 3-8 Storage characteristics of glucose sensor under 70°C

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.13 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 0 | 0.23 | 0.73 | 0.83 | 1.37 | 2.57 | 2.77 | 4.43 | 5.97 | 8.00 |
| 5 | 2.88 | 2.89 | 3.11 | 3.49 | 4.56 | 4.82 | 5.42 | 6.56 | 8.10 |
| 20 | 11.7 | 10.2 | 10.0 | 10.0 | 10.3 | 9.2 | 7.8 | 7.6 | 8.7 |

Unit: μ A

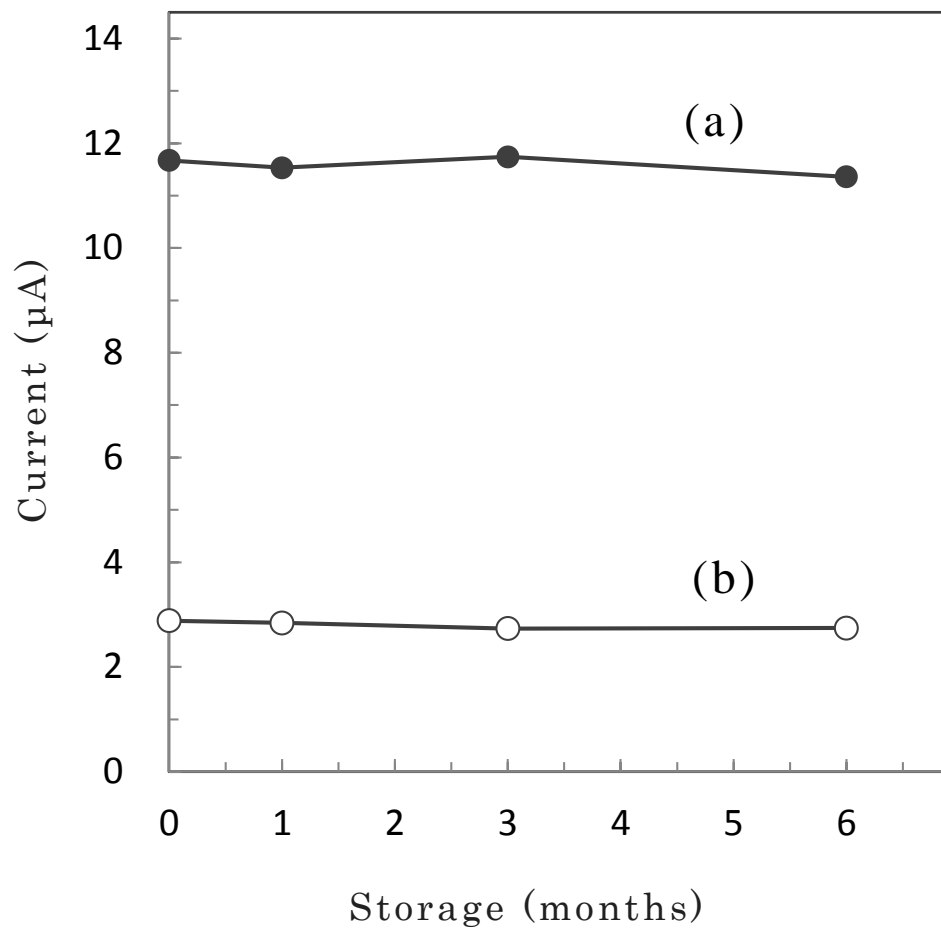


Fig.3-2 Storage characteristic of glucose sensor (-15°C)
Glucose : (a)20mM, (b)5mM

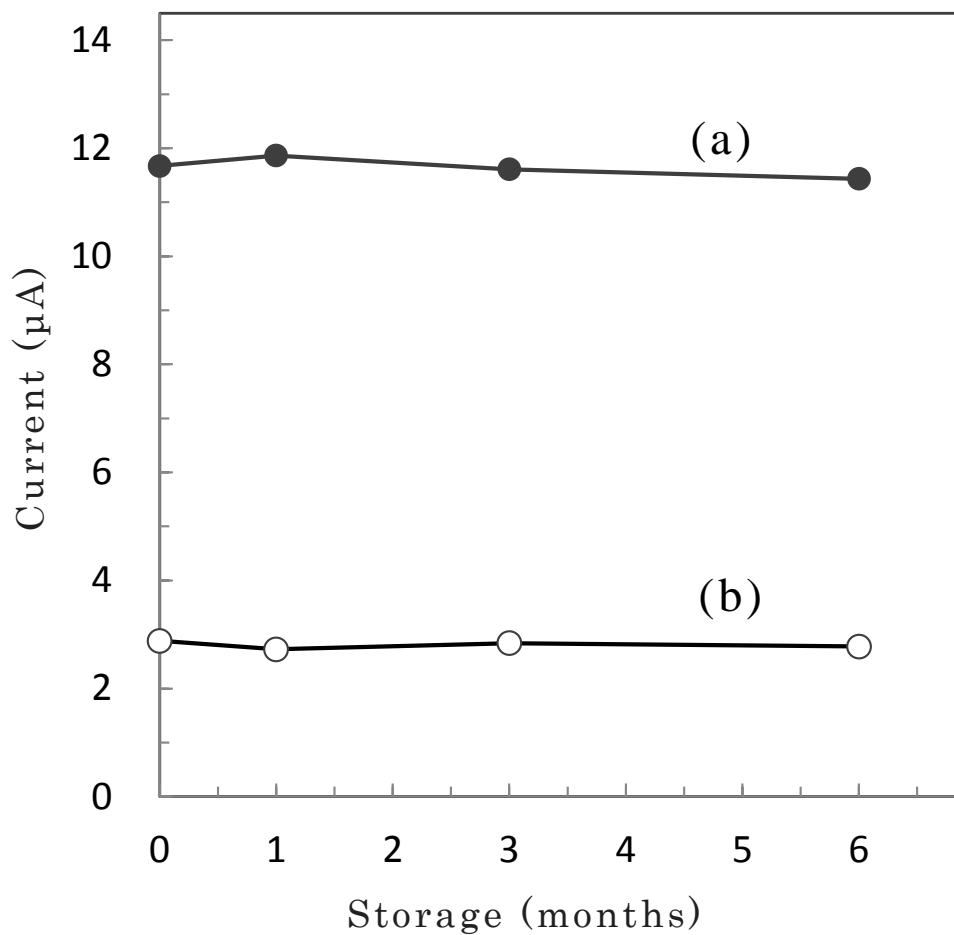


Fig.3-3 Storage characteristic of glucose sensor (4 °C)
Glucose : (a)20mM, (b)5mM.

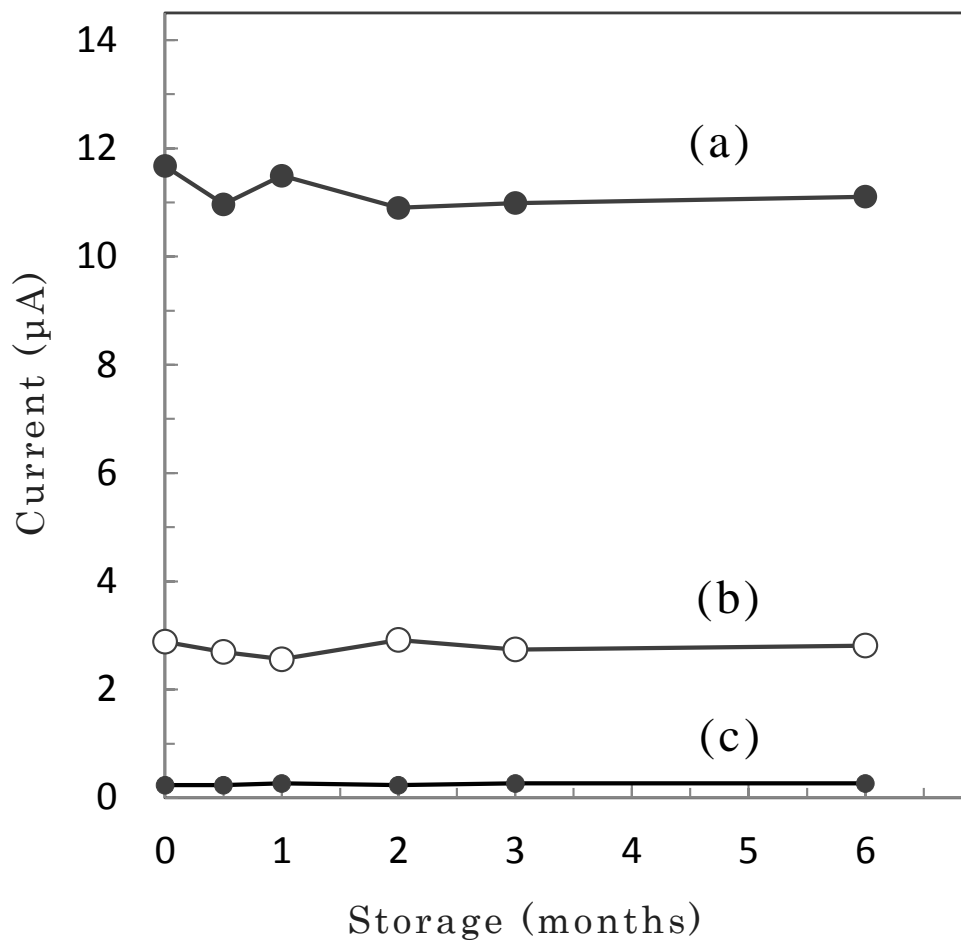


Fig.3-4 Storage characteristic of glucose sensor (30 °C)
Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

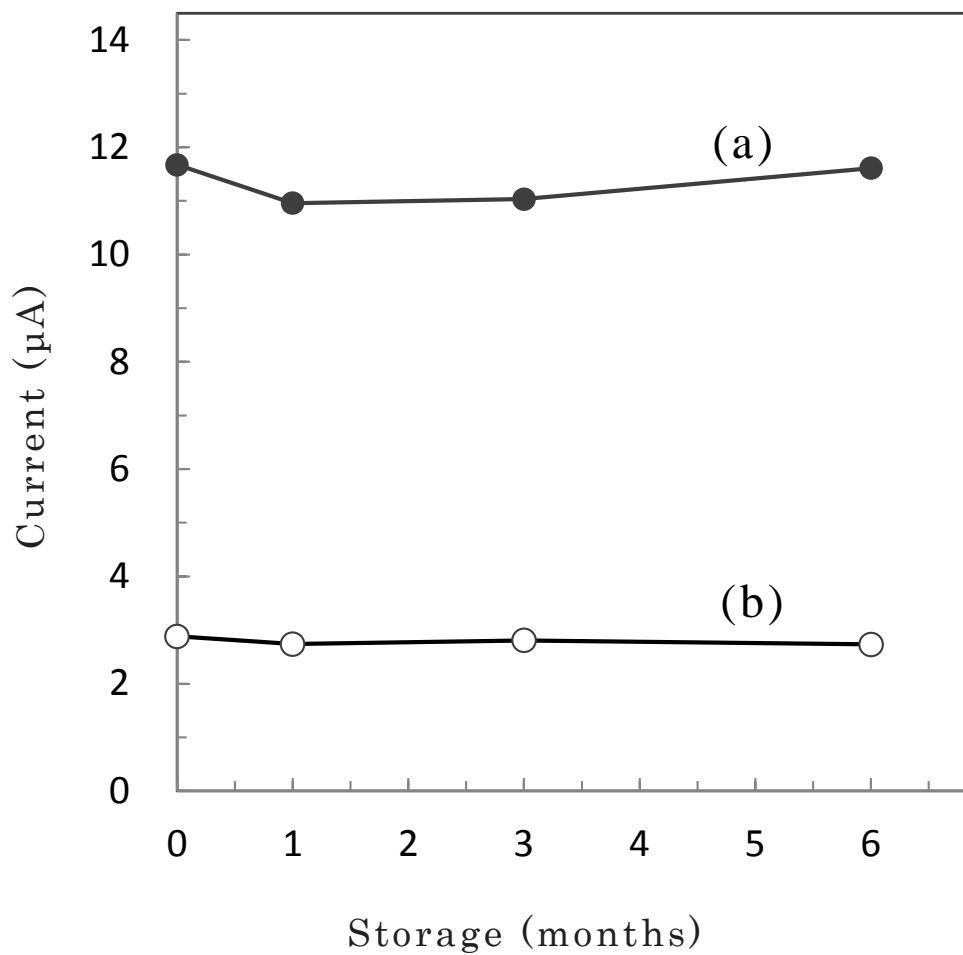


Fig.3-5 Storage characteristic of glucose sensor (35 °C)
Glucose : (a)20mM, (b)5mM.

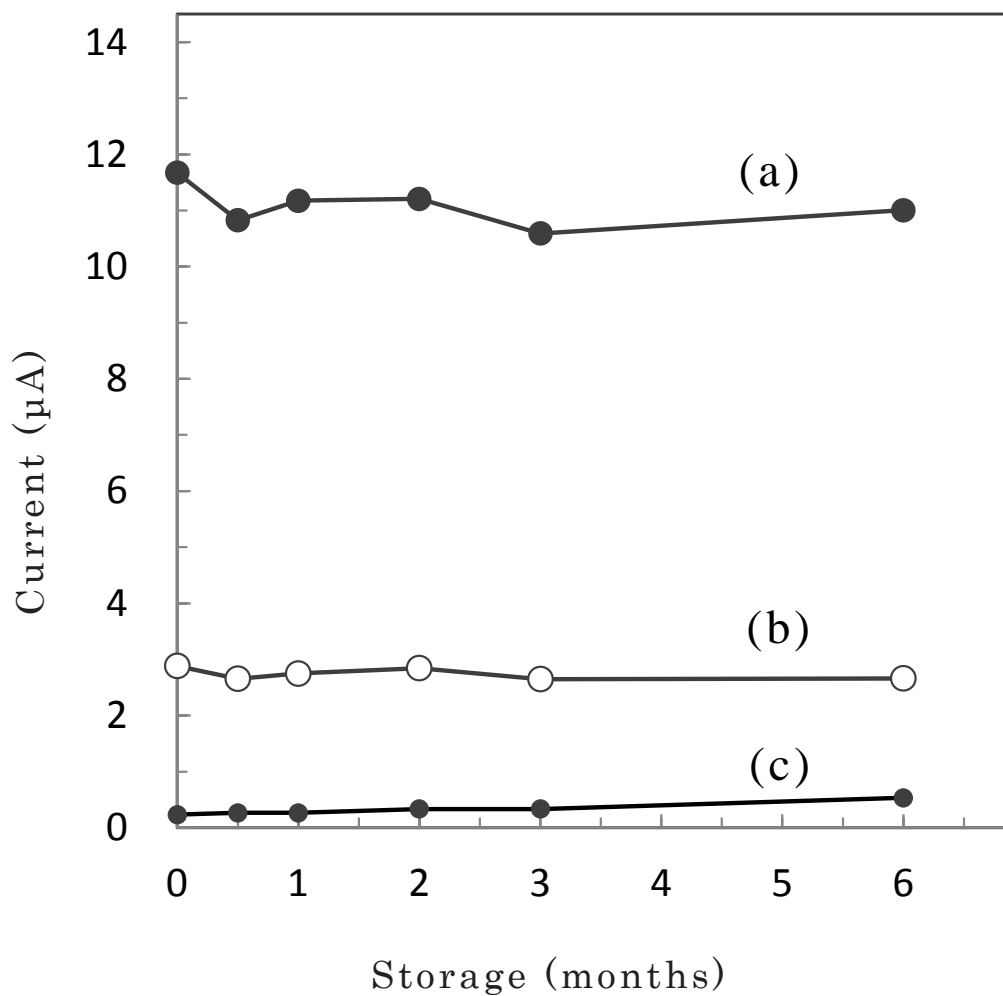


Fig.3-6 Storage characteristic of glucose sensor (40 °C)
Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

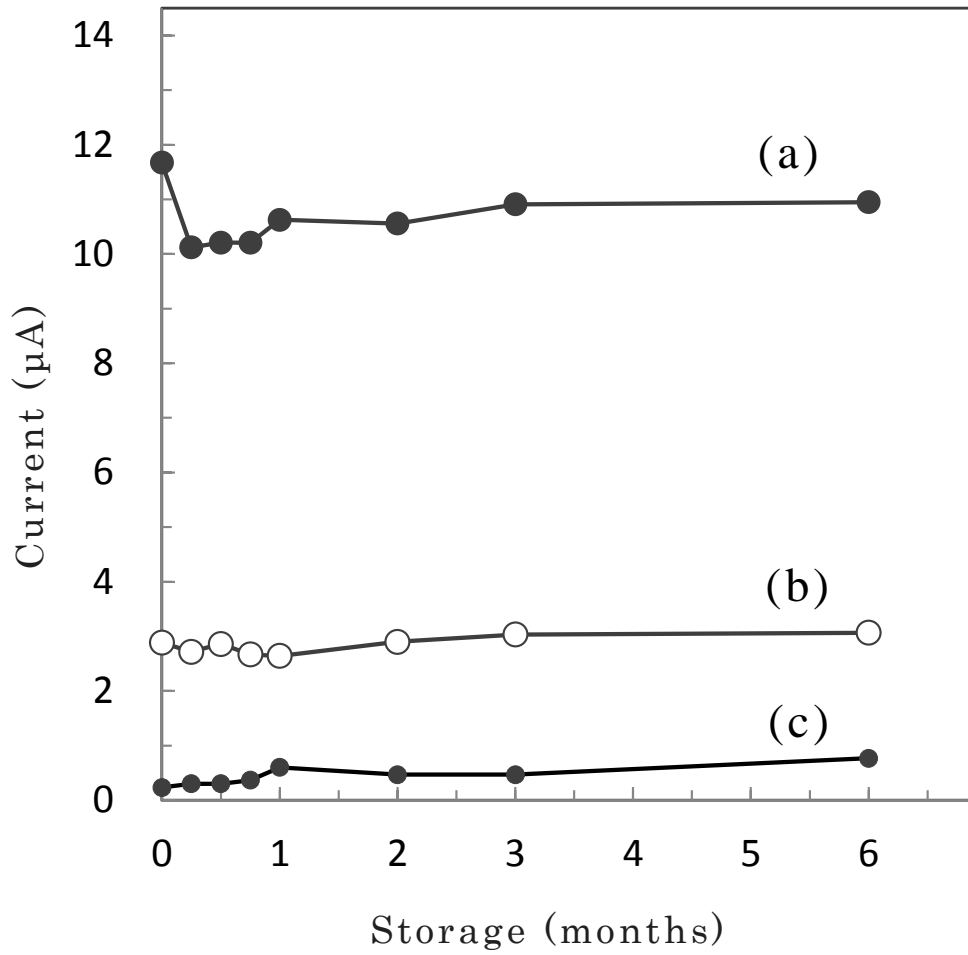


Fig.3-7 Storage characteristic of glucose sensor (50 °C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

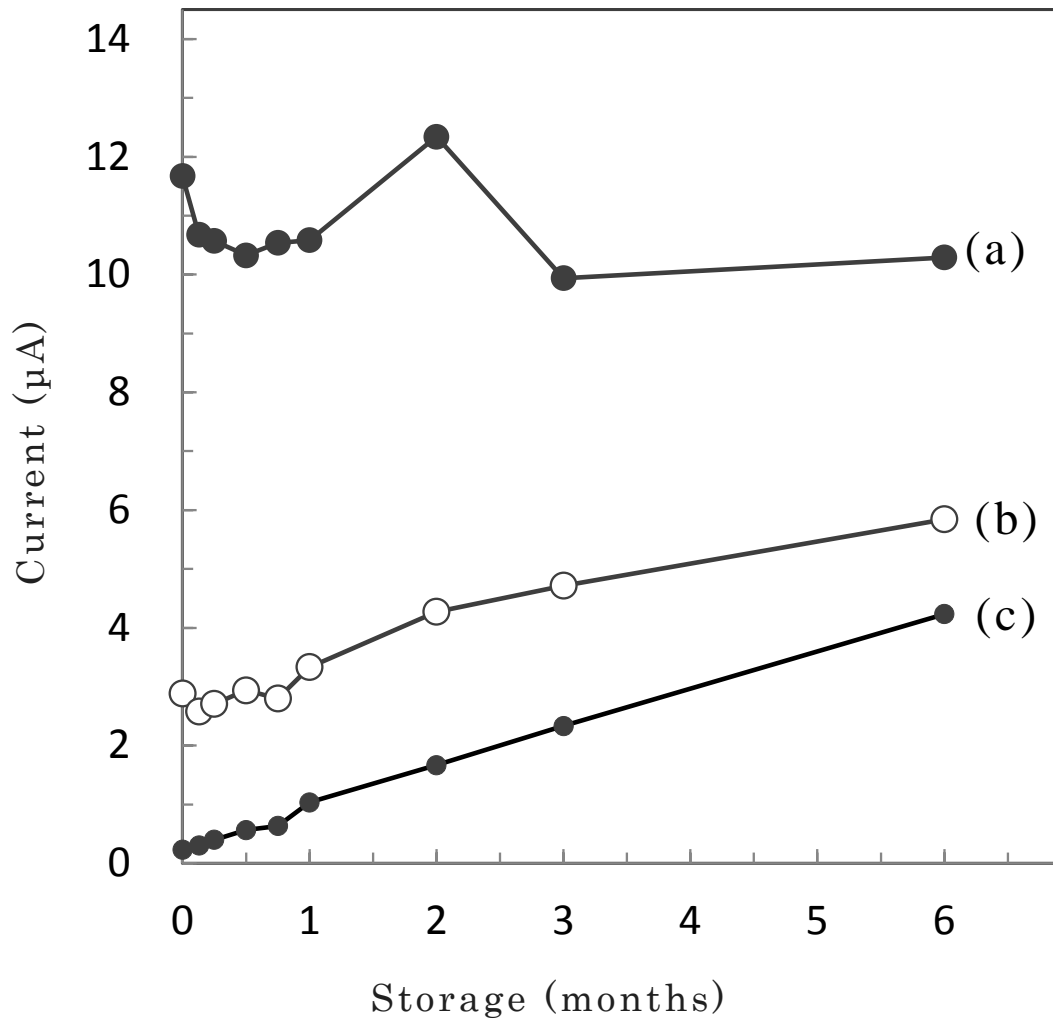


Fig.3-8 Storage characteristic of glucose sensor (60 °C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

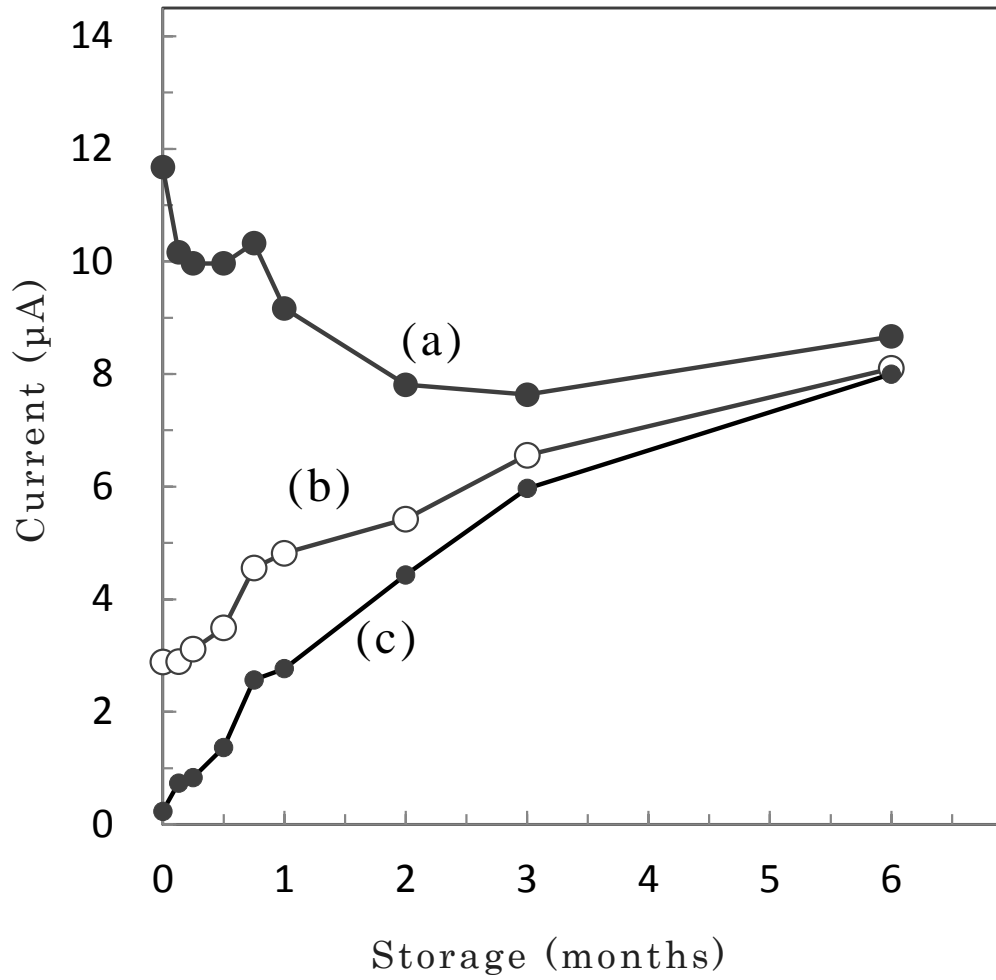


Fig.3-9 Storage characteristic of glucose sensor (70 °C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

Table 3-9 Storage characteristics of glucose sensor (30°C).
Whole blood samples were used.

| storage (months) | Blood glucose (mg/dL) | | |
|------------------|-----------------------|------|------|
| | 88 | 369 | 434 |
| 0 | 2.62 | 9.31 | — |
| 6 | 2.19 | — | 10.3 |

Unit: μ A

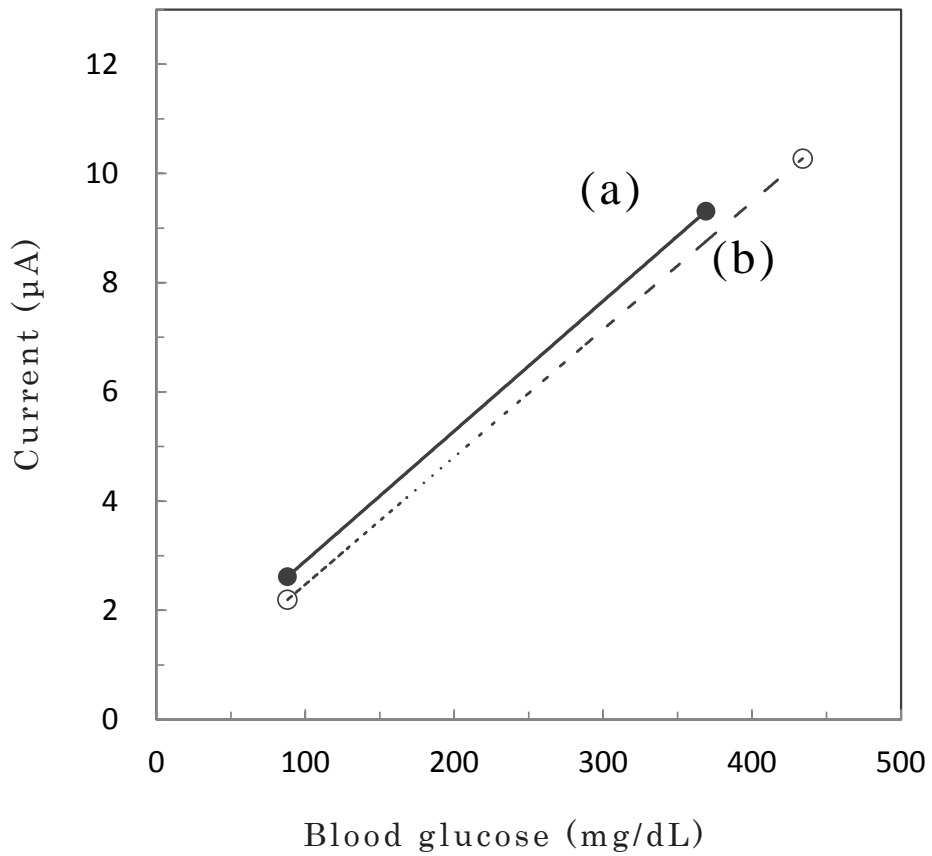


Fig.3-10 Storage characteristic of glucose sensor (30°C)
Whole blood samples were used.
(a) initial response, (b) stored 6 months.

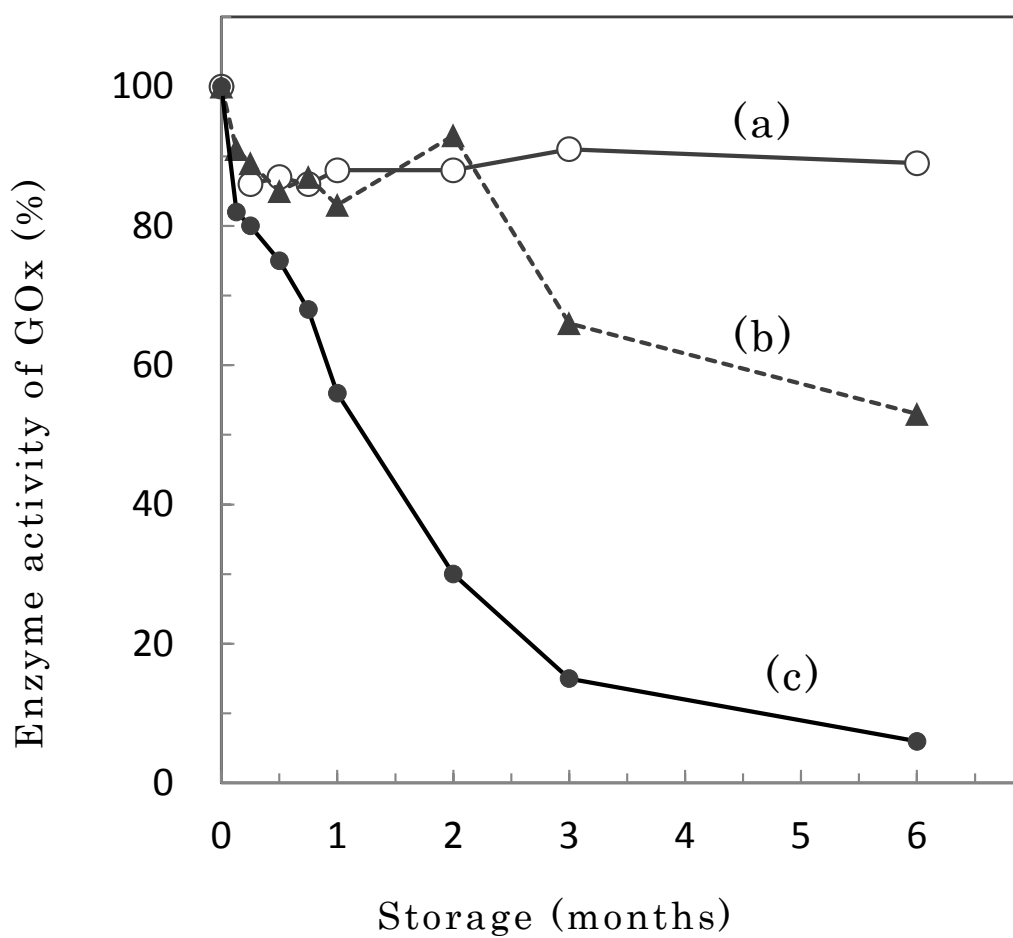


Fig.3-11 Changes in GOx enzyme activity of the glucose sensor under storage conditions. (a)50°C ,(b)60°C ,(c)70°C

3.3.2 試薬多層型グルコースセンサの保存特性

上記（3.3.1）で得られた保存による特性変化、特にブランク応答の増加と酵素活性の低下が、どのような原因で生じているかについて明らかにするために、以下の実験を行った。

試薬層を構成する試薬は、CMCと酵素 Glucose oxidase とフェリシアン化カリウムの3種であり、この中で酸化還元反応に直接関与する成分である酵素とフェリシアン化カリウムに注目し、これらが混ざり合った状態で高温条件下に置かれると、フェロシアン化物イオンの生成と酵素活性低下が引き起こされるという仮説を考えた。この仮説検証に向けて、試薬層中の酵素とフェリシアン化カリウムを分離した状態にする構成を、以下のプロセスで実現した。試薬層の構成を図 3-12（図 3-1 と同じ）に示す。

電極に近い層には、CMCとともに酵素 Glucose oxidase を配置した。次に、水と有機溶剤の両方に溶ける高分子として、Poly vinyl pyrrolidone（PVP）層を設置した。PVPのエタノール溶液を調製し、これを CMC と Glucose oxidase からなる層上にキャストして PVP 層を製膜した。Glucose oxidase はエタノールには不溶のため、CMC-Glucose oxidase と PVP とは分離した層として作製できた。次に、フェリシアン化カリウムの微結晶をエタノール中に分散したものを PVP 層上へキャストして、フェリシアン化カリウムの微結晶をそのまま PVP 層上へ配置させた。このプロセスによって、試薬層が、CMC-Glucose oxidase 層と、PVP 層とフェリシアン化カリウム微結晶の層に分離された構成のセンサを作製した。これを、「試薬多層型」あるいは簡略化して「多層型」のグルコースセンサと呼ぶことにする。

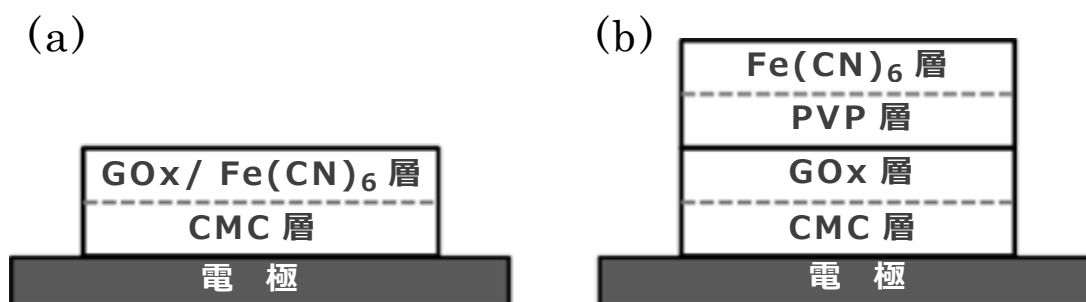


Fig.3-12 Reagent layer of glucose sensor. (a) normal type, (b) multi-layered type. Dashed line means gradual separation of two layers. GOx: glucose oxidase, PVP: Polyvinyl pyrrolidone, CMC: carboxy methyl cellulose sodium salt.

本センサについて、(3.3.1に示した) 通常のグルコースセンサと同様の方法で、長期の保存信頼性評価を行った。保存温度は、-15℃から 70℃まで、評価期間は 2 年間まで実施した。結果を図 3-13 から図 3-21、および表 3-10 から表 3-18 に示す。

「試薬多層型」グルコースセンサの保存特性を評価した結果、先に示した通常型のグルコースセンサに比べて、応答値の低下度合い、グルコース 0mg/dL 水溶液に対する応答 (ブランク応答) 値の増加程度が大きく緩和され、初期特性を長期間に亘って維持していることが明らかになった。通常型のグルコースセンサでは、40℃保存 6 ヶ月でブランク応答の微増傾向およびグルコース高濃度域における計測値の変動幅が大きくなる傾向が認められたが、試薬多層型グルコースセンサでは、50℃保存 2 年後においても変化は認められず

(図 3-18)、高い保存信頼性を有することが明らかとなった。試料液として全血を用いた場合にも、30℃保存 2 年後に応答特性がほとんど変わらないことが確認できた (表 3-19、図 3-22)。

通常型と試薬多層型グルコースセンサのブランク応答値の変動比較を、図 3-24 に示す。保存温度条件 60℃と 70℃の結果について示した。70℃保存において、従来型では 0.23 μ A から 8.0 μ A へと 35 倍の増加が認められた (表 3-8) が、試薬多層型の場合には、同様の条件下でブランク応答値は 0.3 μ A から 1.43 μ A へ 4.7 倍の増加で抑えられていた (表 3-18)。

同様にして通常型と試薬多層型グルコースセンサの試薬層をスケールアップした実験により、加温保存に伴う酵素活性変化について評価した結果を図 3-25 に示した。60℃以上では、共に酵素活性の低下は認められるが、その程度は通常型より試薬多層型の方が緩やかであり、試薬多層型の場合には、70℃保存で 6 ヶ月後も約 35%の酵素活性が残っていることが分かった (図 3-25(b))。

以上の結果より、保存に伴うグルコースセンサの特性劣化は、主に酵素である Glucose oxidase と電子伝達化合物であるフェリシアン化物イオンが接触状態にあることによって引き起こされ、これらを離れた状態にしておくことで、特性変化を抑えられることが明らかとなった。

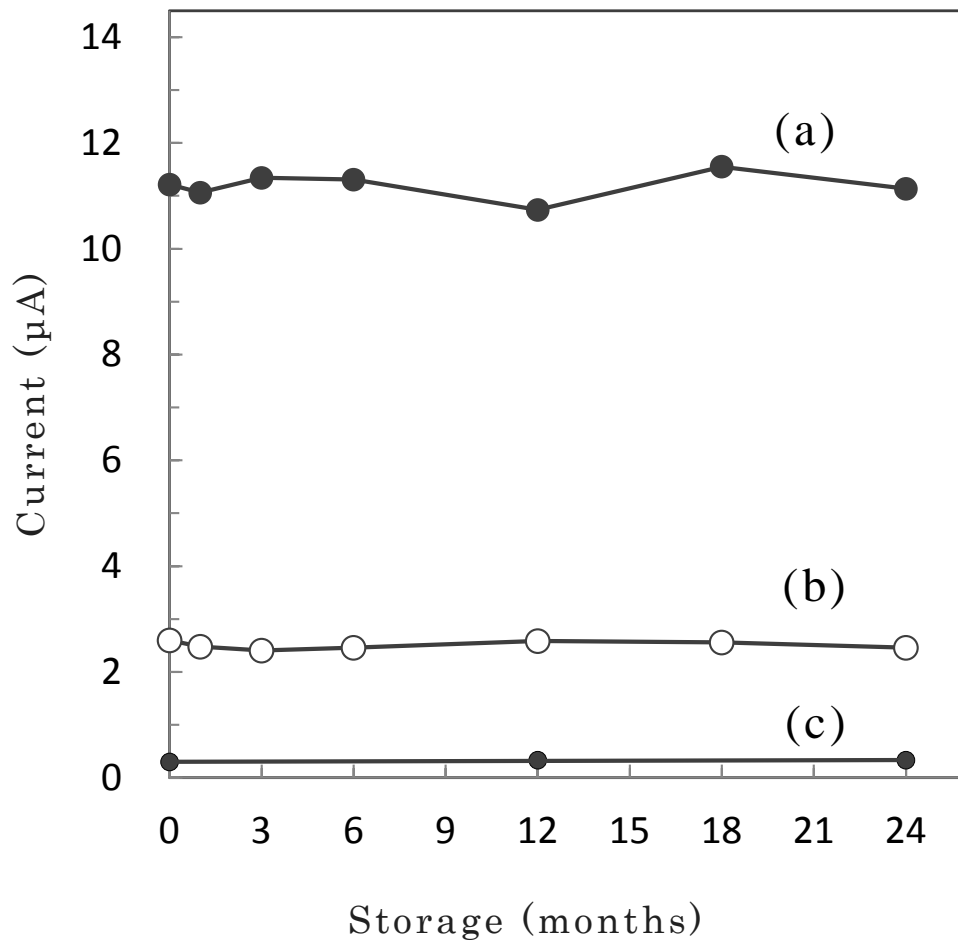


Fig.3-13 Storage characteristic of glucose sensor (-15°C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

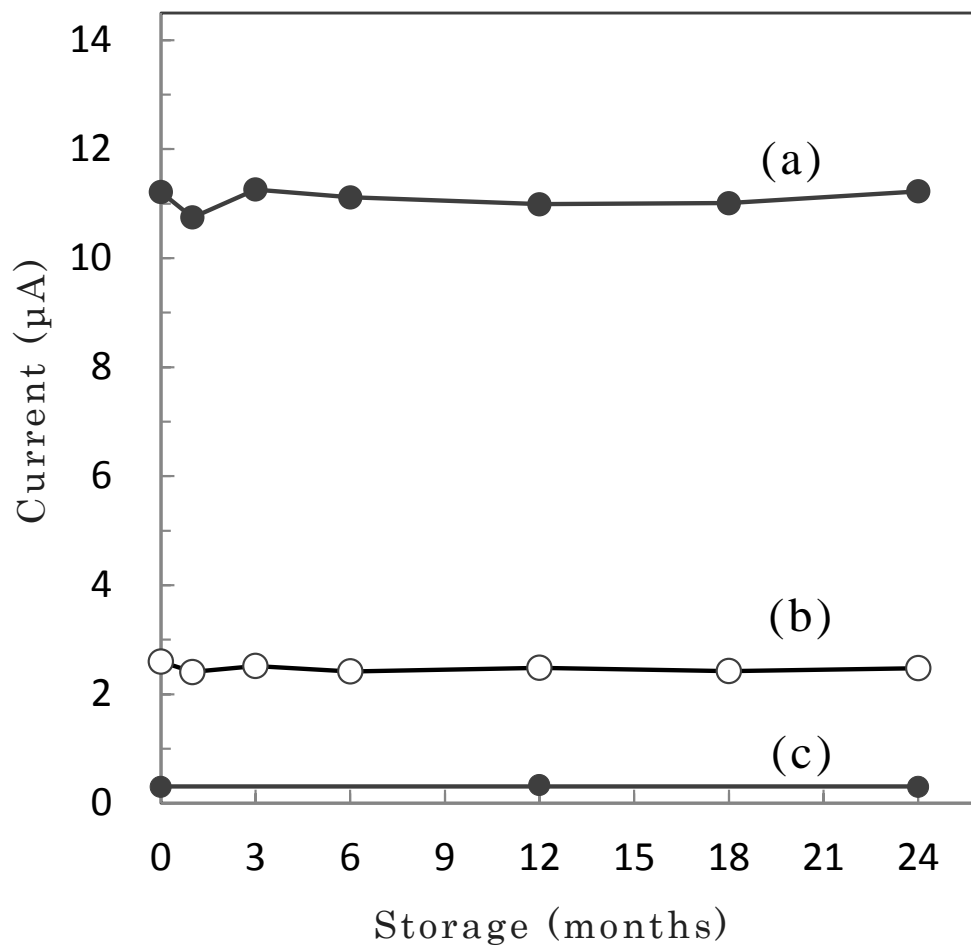


Fig.3-14 Storage characteristic of glucose sensor (4°C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

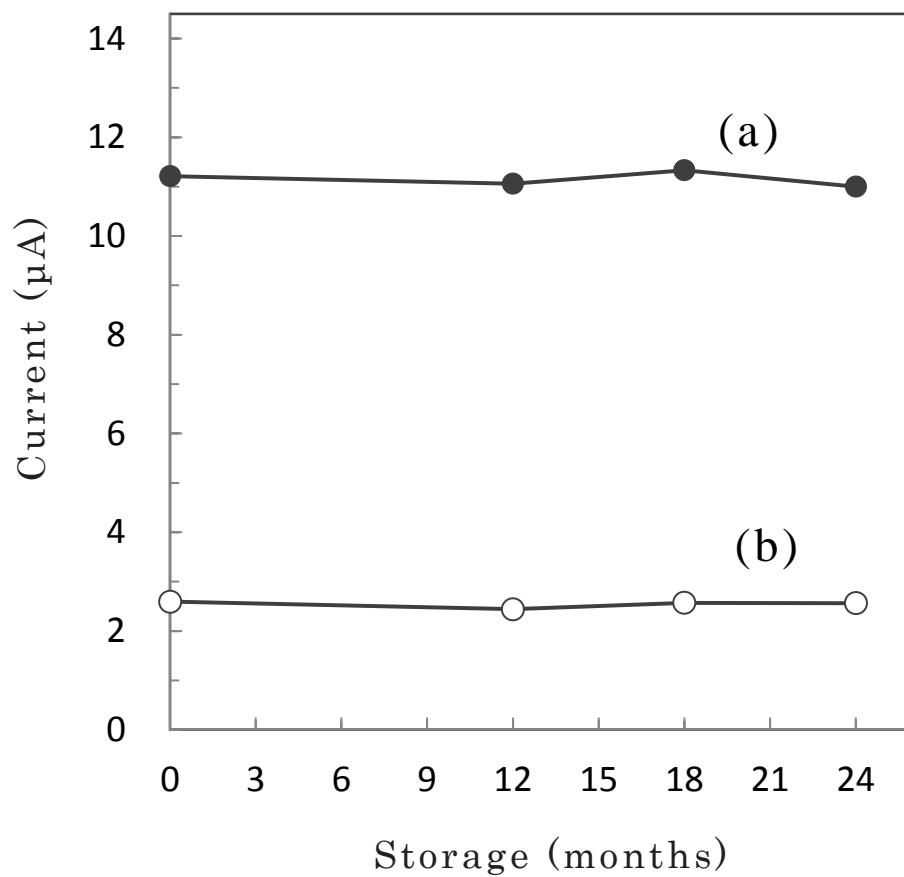


Fig.3-15 Storage characteristic of glucose sensor (20°C)
Glucose : (a)20mM, (b)5mM.

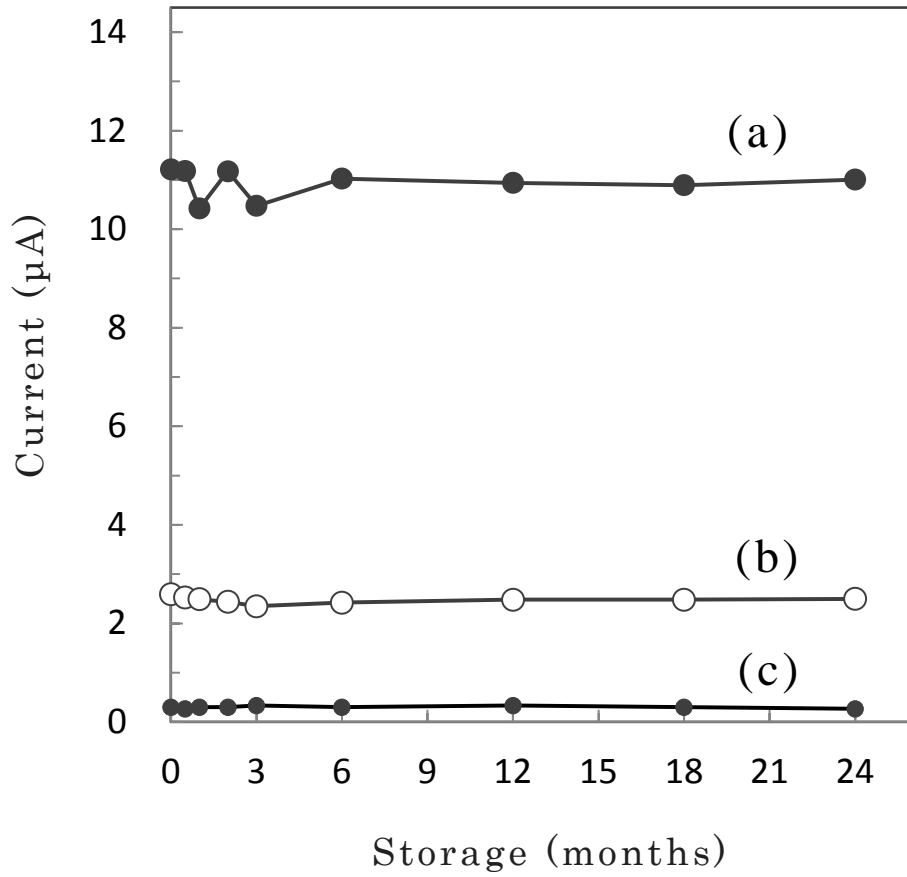


Fig.3-16 Storage characteristic of glucose sensor (30°C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

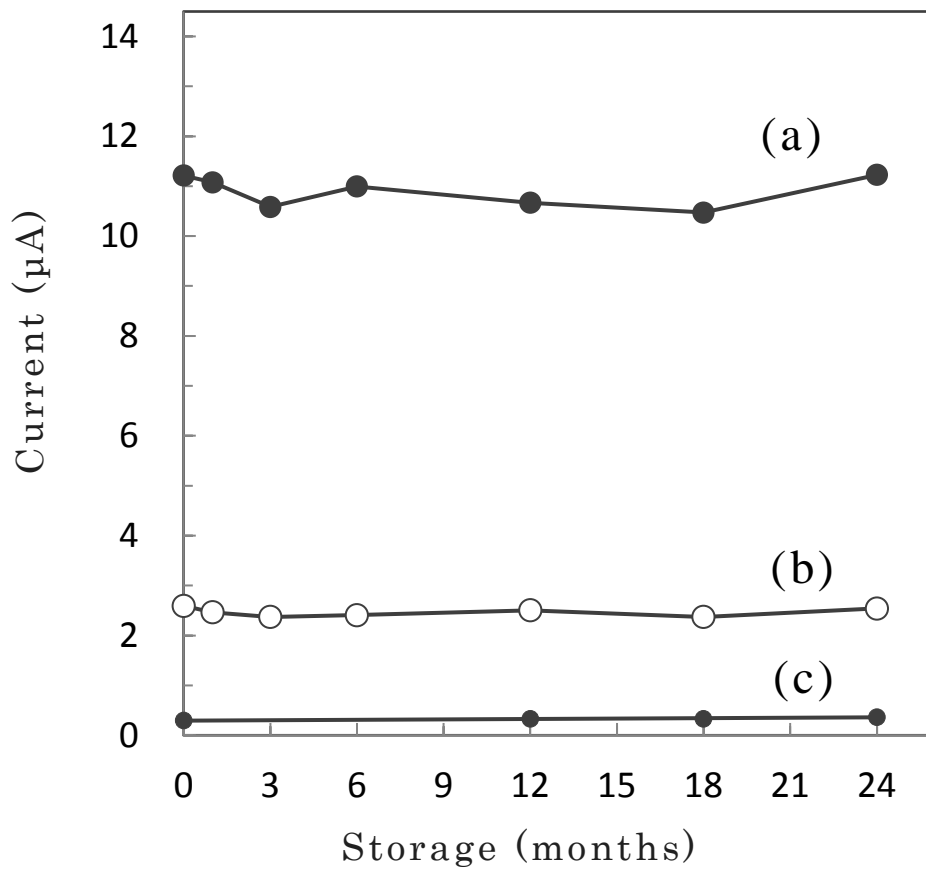


Fig.3-17 Storage characteristic of glucose sensor (35°C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

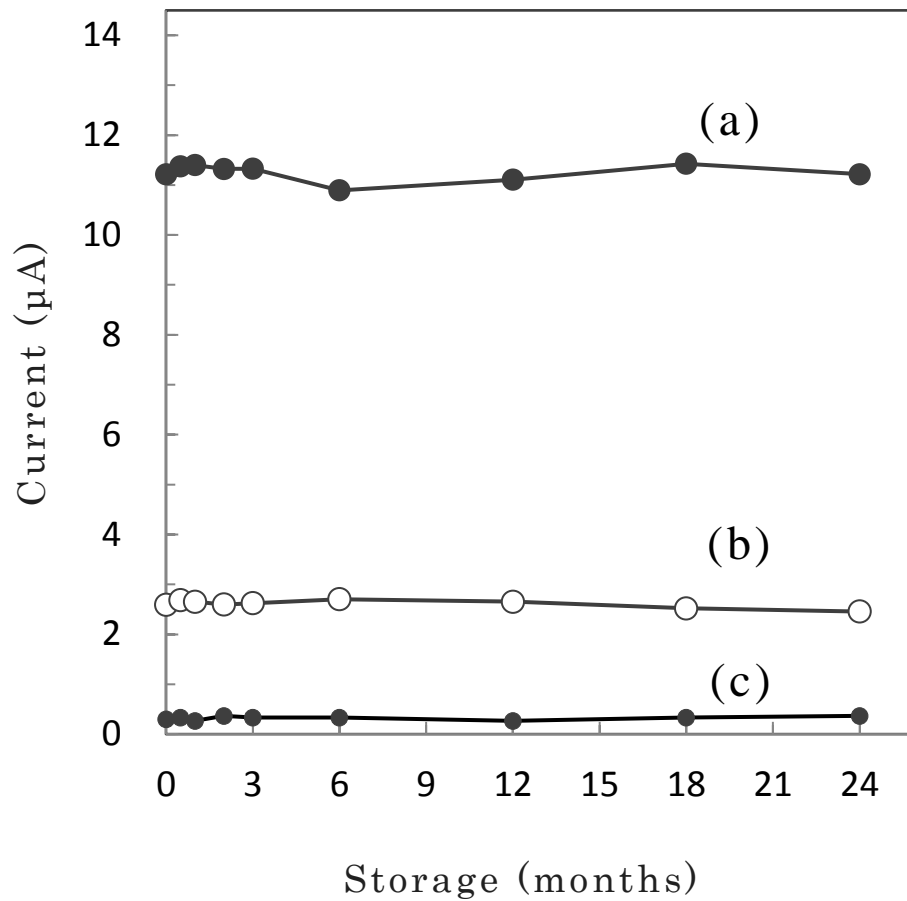


Fig.3-18 Storage characteristic of glucose sensor (40°C)
 Glucose : (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

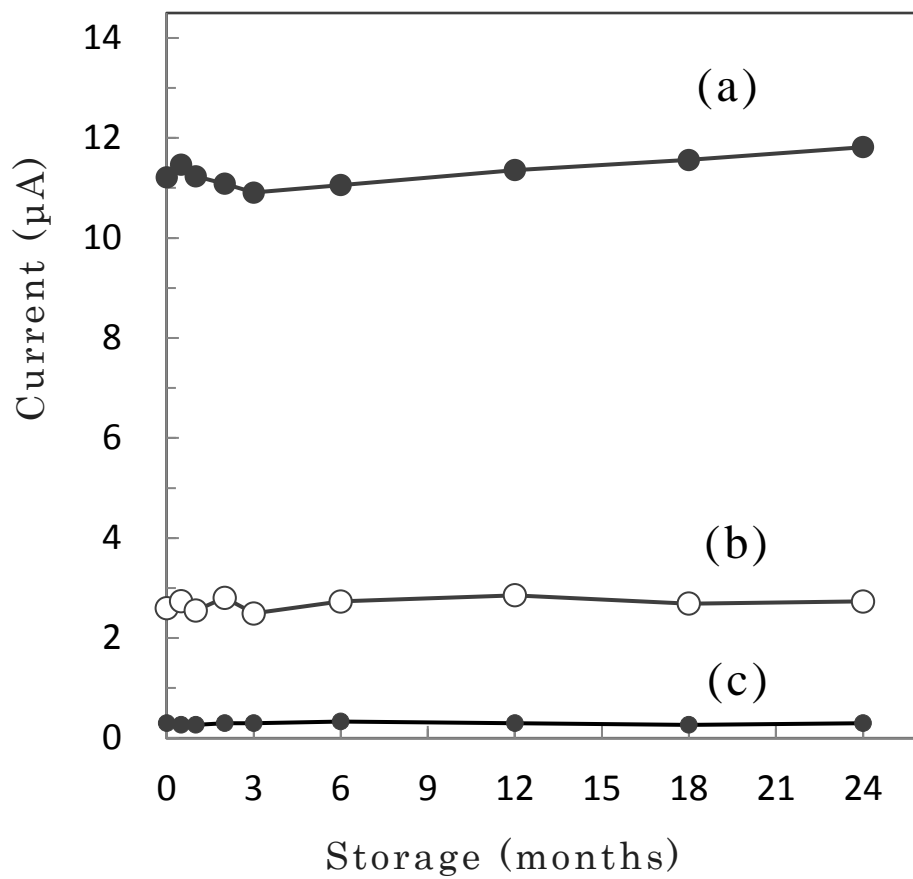


Fig.3-19 Storage characteristic of glucose sensor (50°C)
Glucose (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

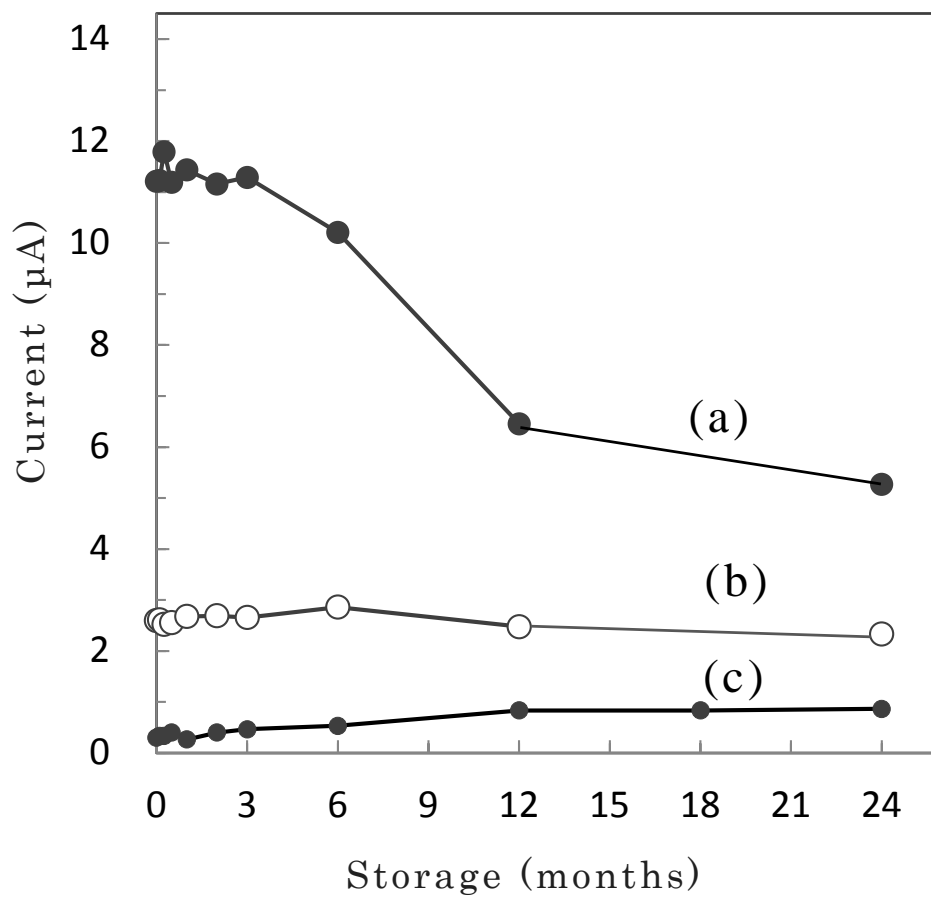


Fig.3-20 Storage characteristic of glucose sensor (60°C)
 Glucose (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

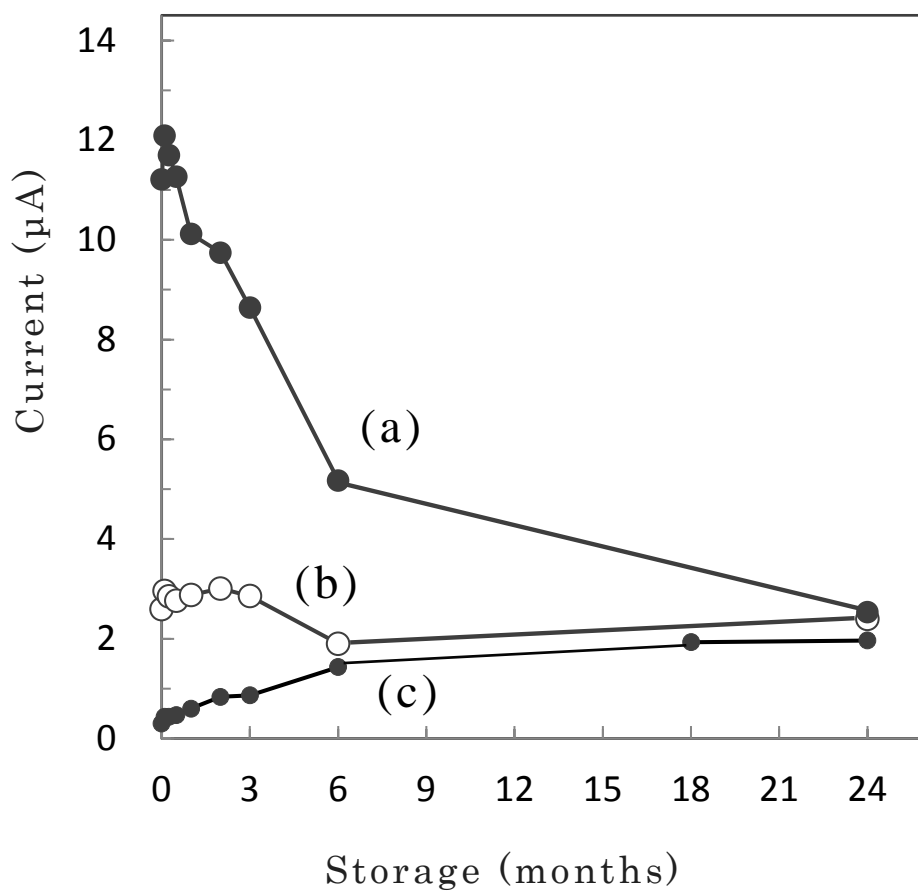


Fig.3-21 Storage characteristic of glucose sensor (70°C)
 Glucose (a)20mM, (b)5mM, (c)0mM.

Table 3-10 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (-15°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | | | | 0.33 | | 0.33 |
| 5 | 2.60 | 2.48 | 2.41 | 2.46 | 2.58 | 2.56 | 2.46 |
| 20 | 11.2 | 11.1 | 11.3 | 11.3 | 10.7 | 11.6 | 11.1 |

Unit: μ A

Table 3-11 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (4°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | | | | 0.33 | | 0.30 |
| 5 | 2.60 | 2.41 | 2.52 | 2.42 | 2.48 | 2.42 | 2.48 |
| 20 | 11.2 | 10.7 | 11.3 | 11.1 | 11.0 | 11.0 | 11.2 |

Unit: μ A

Table 3-12 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (20°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|
| | 0 | 12 | 18 | 24 |
| 5 | 2.60 | 2.44 | 2.57 | 2.57 |
| 20 | 11.2 | 11.1 | 11.3 | 11.0 |

Unit: μ A

Table 3-13 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (30°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | 0.27 | 0.30 | 0.30 | 0.33 | 0.30 | 0.33 | 0.30 | 0.27 |
| 5 | 2.60 | 2.53 | 2.49 | 2.44 | 2.35 | 2.42 | 2.48 | 2.48 | 2.50 |
| 20 | 11.2 | 11.2 | 10.4 | 11.2 | 10.5 | 11.0 | 10.9 | 10.9 | 11.0 |

Unit: μ A

Table 3-14 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (35°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | | | | 0.33 | 0.33 | 0.37 |
| 5 | 2.60 | 2.47 | 2.37 | 2.41 | 2.51 | 2.37 | 2.54 |
| 20 | 11.2 | 11.1 | 10.6 | 11.0 | 10.7 | 10.5 | 11.2 |

Unit: μ A

Table 3-15 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (40°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | 0.33 | 0.27 | 0.37 | 0.33 | 0.33 | 0.27 | 0.33 | 0.37 |
| 5 | 2.60 | 2.69 | 2.66 | 2.60 | 2.63 | 2.71 | 2.66 | 2.52 | 2.46 |
| 20 | 11.2 | 11.4 | 11.4 | 11.3 | 11.3 | 10.9 | 11.1 | 11.4 | 11.2 |

Unit: μ A

Table 3-16 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (50°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | 0.27 | 0.27 | 0.30 | 0.30 | 0.33 | 0.30 | 0.27 | 0.30 |
| 5 | 2.60 | 2.74 | 2.55 | 2.81 | 2.49 | 2.73 | 2.86 | 2.69 | 2.73 |
| 20 | 11.2 | 11.5 | 11.2 | 11.1 | 10.9 | 11.1 | 11.4 | 11.6 | 11.8 |

Unit: μ A

Table 3-17 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (60°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | 0.33 | 0.33 | 0.40 | 0.27 | 0.40 | 0.47 | 0.53 | 0.83 | 0.83 | 0.87 |
| 5 | 2.60 | 2.61 | 2.53 | 2.56 | 2.68 | 2.69 | 2.66 | 2.86 | 2.48 | | 2.33 |
| 20 | 11.2 | 11.2 | 11.8 | 11.2 | 11.4 | 11.2 | 11.3 | 10.2 | 6.5 | | 5.3 |

Unit: μ A

Table 3-18 Storage characteristics of multi-layered glucose sensor (70°C)

| glucose (mM) | storage (months) | | | | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|------|
| | 0 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 6 | 12 | 18 | 24 |
| 0 | 0.30 | 0.43 | 0.43 | 0.47 | 0.60 | 0.83 | 0.87 | 1.43 | | 1.93 | 1.97 |
| 5 | 2.60 | 2.96 | 2.85 | 2.77 | 2.88 | 3.01 | 2.86 | 1.90 | | | 2.40 |
| 20 | 11.2 | 12.1 | 11.7 | 11.3 | 10.1 | 9.7 | 8.6 | 5.2 | | | 2.5 |

Unit: μ A

Table 3-19 Storage characteristics of glucose sensor (30°C). Blood sample.

| storage (months) | Blood glucose (mg/dL) | | | | | | | |
|------------------|-----------------------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | 90 | 93 | 92 | 94 | 398 | 377 | 358 | 303 |
| 0 | 2.72 | | | | 10.01 | | | |
| 12 | | 2.62 | | | | 9.30 | | |
| 18 | | | 2.51 | | | | 8.78 | |
| 24 | | | | 2.43 | | | | 7.44 |

Unit: μ A

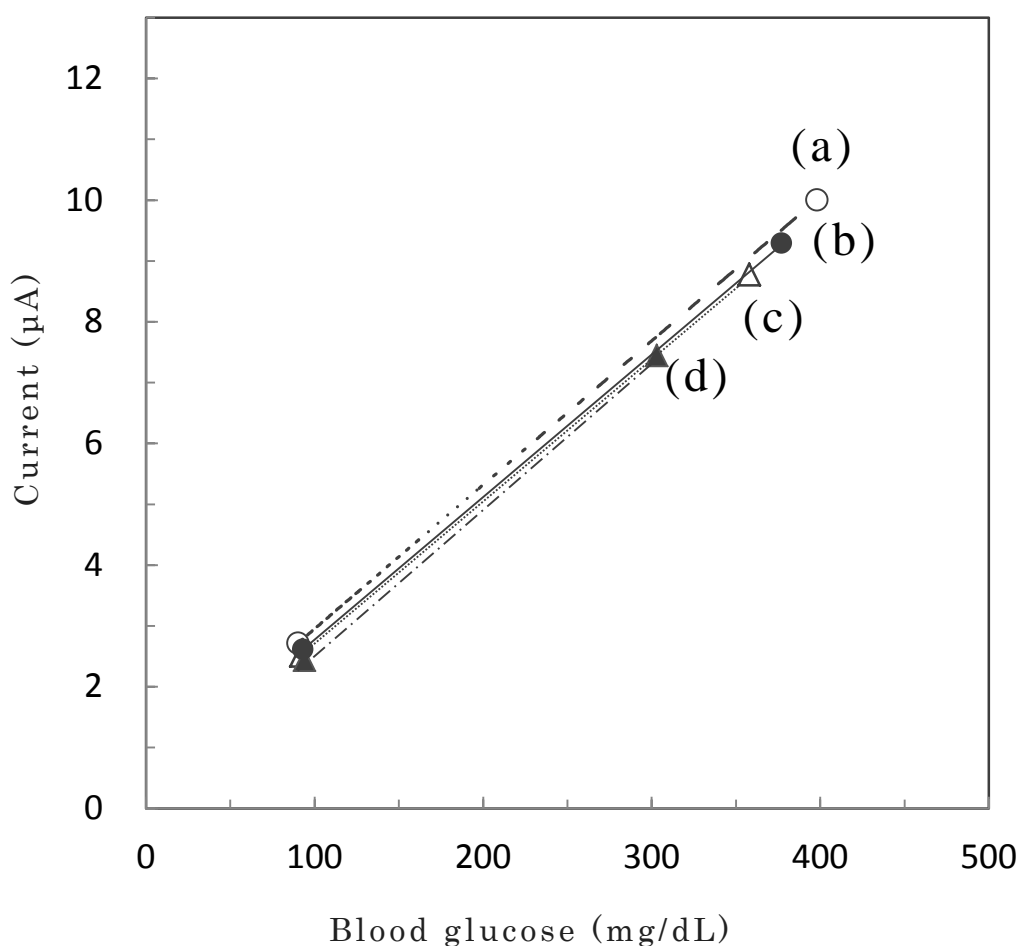


Fig.3-22 Storage characteristic of glucose sensor (30°C) Whole blood samples were used. (a) initial response, (b) 12 months, (c) 18 months, (d) 24 months storage.

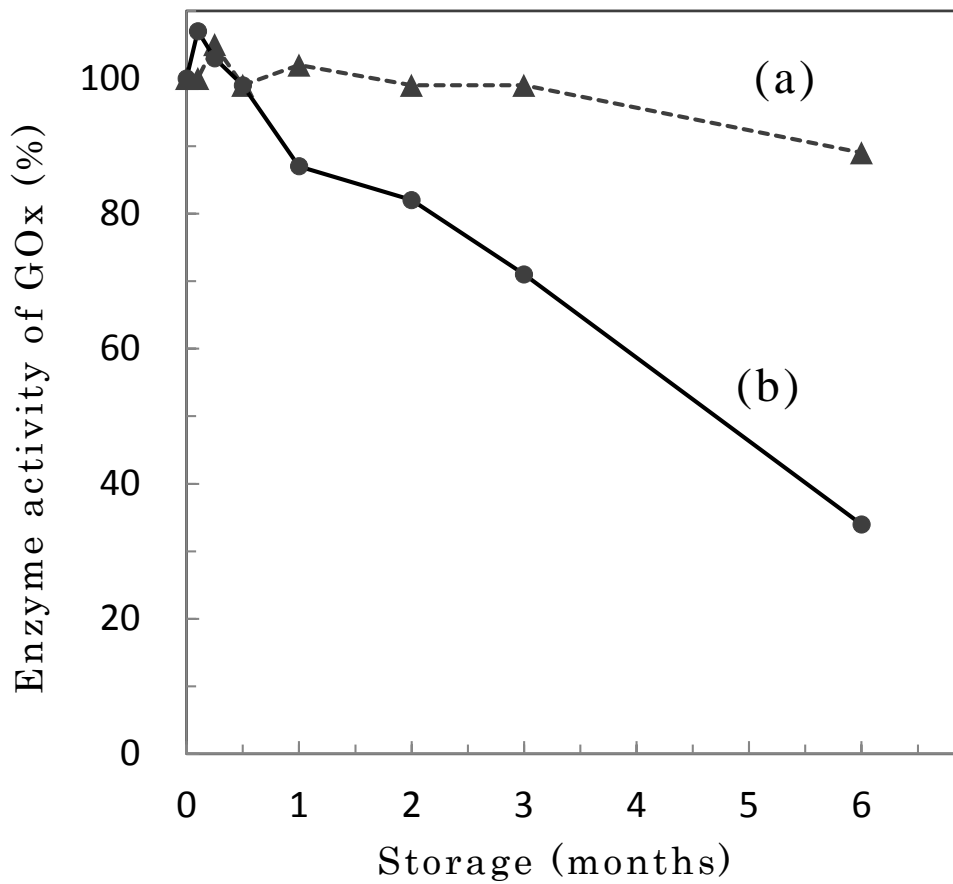


Fig.3-23 Changes in enzyme activity of the glucose sensor through the storage under (a)60°C,(b)70°C . Multi-layered glucose sensors were used.

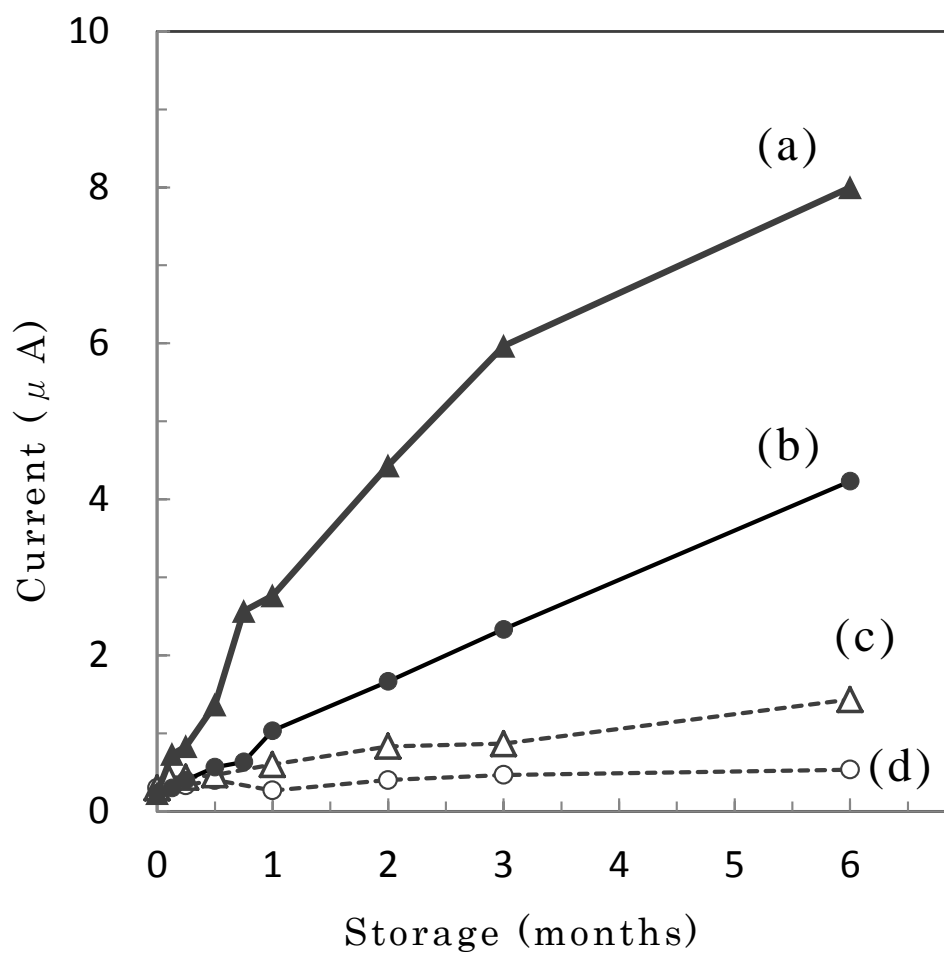


Fig.3-24 Changes in blank response (glucose 0mg/dL) through the storage.
 (a) normal, 70°C, (b) normal, 60°C,
 (c) multi-layered, 70°C, (d) multi-layered, 60°C

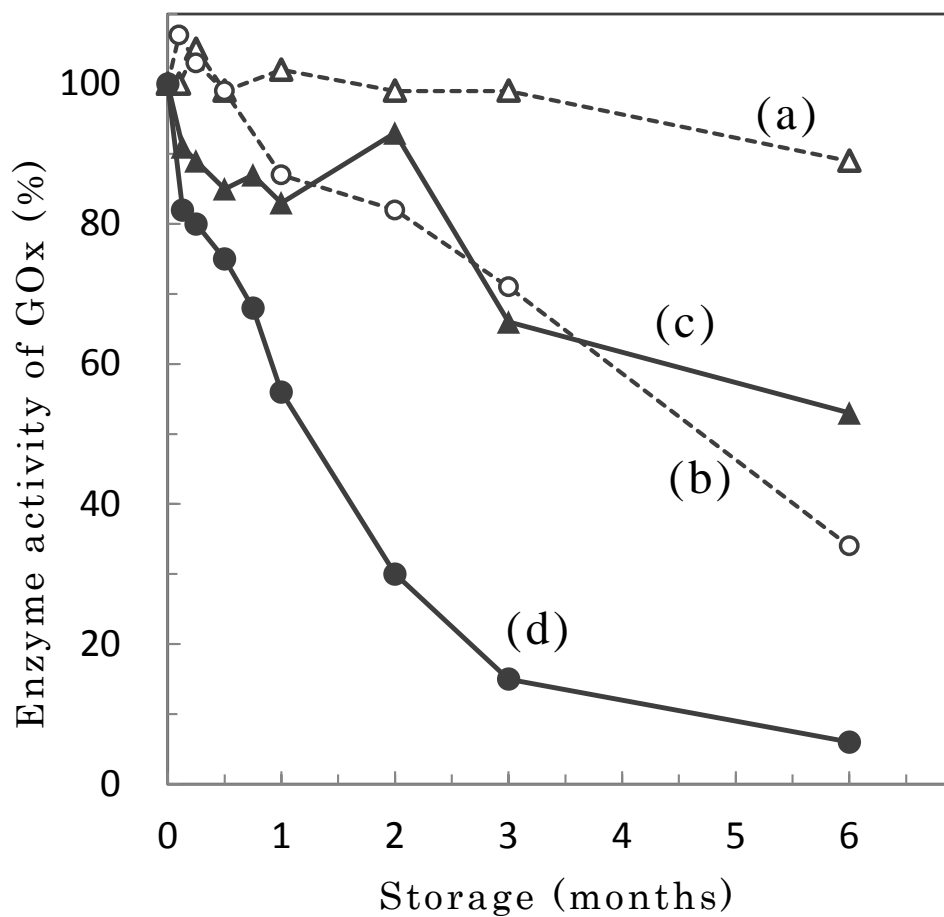


Fig.3-25 Changes in enzyme activity of the glucose sensor through the storage.

(a)multi-layered, 60°C, (b)multi-layered, 70°C,
(c)normal, 60°C, (d)normal, 70°C

3.4 小括

酵素に **Glucose oxidase** を用いたグルコースセンサについて、長期の保存特性に関するデータを取ることが出来た。保存温度を -15°C から 70°C まで設定して6ヶ月間の特性変化を見ることによって、下記のことが明らかとなった。

- ① -15°C から 35°C の間では、6ヶ月保存後も特性変化はみられない。
- ② 40°C 以上の保存では、ブランク応答の増加と高濃度域の応答低下が見られる。
- ③ ブランク応答の要因はフェロシアン化物イオンが生成していること、高濃度域の低下は **Glucose oxidase** の酵素活性低下が主要因である。

更に、通常の試薬層ではなく、**Glucose oxidase** とフェリシアン化カリウムを親水性の高分子（**PVP**）によって分離させた試薬層構成のセンサを作製して、その保存特性を評価した結果、通常型に比べて保存信頼性が大きく向上する結果が得られた。ブランク応答の増加と酵素活性の低下といった問題が、**Glucose oxidase** とフェリシアン化カリウムを分離して保存することで改善する可能性を得ることが出来た。

まだ、特性低下の明確なメカニズム特定には至っていないが、上記の知見を基にして更なる研究が進むことを期待する。

第 4 章 食品分析用バイオセンサ

4.1 緒言

現在、多くの食品が栽培・加工・製造され、消費者は自分の嗜好や必要性に応じて適宜選択をしている。食品成分の分析は、栽培、食品加工・流通・販売に関わる業者が、品質の向上、ブランド力強化などに取り組む場合に、非常に重要な手段となっている。また、時代を反映するように急増する生活習慣病の中には、治療プロセスの一部に食事制限が含まれる場合も多くあり、消費者の毎日摂取する食品について情報を得る需要は高まっている。

ここでは、筆者が主に臨床分析目的に取り組んできたバイオセンサ技術をベースにして、酵素の持つ高い選択性を活かし、食品中の成分を簡易な操作で測定できる食品分析用バイオセンサの概要と特性、実際の食品分析に適用した結果等について示す。

食品成分の分析手法としては、従来から種々の方法が研究され実用化されている。一例として糖類の定量分析法について取り上げると、物理的な方法としては、旋光度計測、化学的手法として比色法、還元滴定法、酵素法、クロマトグラフ（ガスクロマトグラフィー：GC、液体クロマトグラフィー：HPLC）などがある。各測定法それぞれに利点がある一方で、選択性の不十分さや測定操作の煩雑さ、測定に要する時間の長さ、機器の導入から維持管理費の点といった課題も有する場合も多い。

第 2 章で取り上げた、ワンショットタイプ（使い捨て型）のバイオセンサは、酵素反応と電気化学反応を組み合わせた分析法である。酵素の持つ高い基質選択機能を活用することによって、多くの成分が混在する試料液や、濁った試料液であっても特定成分の定量が容易に可能であり、さらに D 体や L 体といった光学異性体の判別も容易である場合が多い。また、電気化学測定技術をベースにしているために、分光学的な方法の場合に問題となりやすい試料液が着色していたり、懸濁している場合においても優位性があると考え

られ、本分析分野において期待される技術といえる。筆者が研究の過程で作したセンサと測定器を図 4-1 に示した。図 4-1(b)はセンサを装着した測定器の外観である。本測定器は電池駆動により持ち運び可能な軽量小型のものである。センサは測定器のコネクタ部に差し込んで使用する。測定結果は液晶画面に表示される。

ここでは食品分析への応用の一例として、スクロースセンサを作製・評価した結果について報告する。スクロースセンサの基本特性と共に、スクロースとグルコースの 2 成分定量や、果汁中の糖分分析結果、更にはセンサの長期保存特性について明らかにし、今後の課題を含めて検討した。

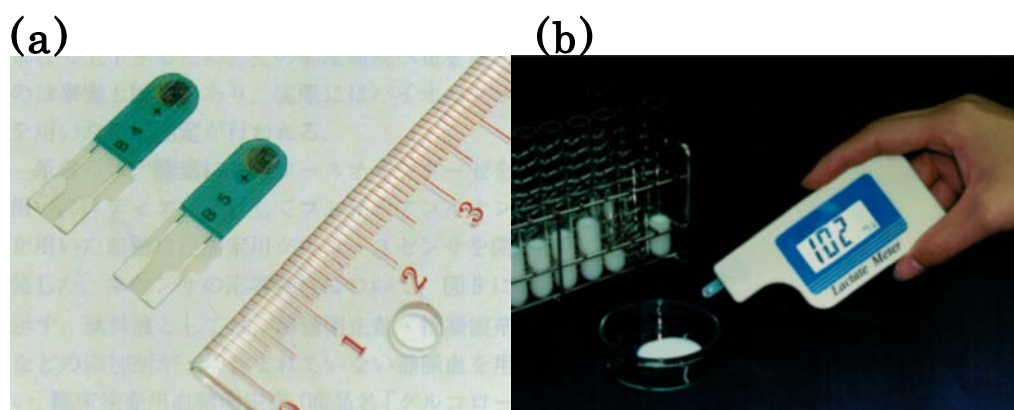


Fig.4-1 Biosensor for food analysis. (a) sensors, (b) meter and sensor.

4.2 試薬と実験方法

4.2.1 試薬

Glucose oxidase(GOx、G-6125、23U/mg、G-7773、25kU/g、EC 1.1.3.4 *from Aspergillus niger*)は Sigma Aldrich 社より購入して使用した。

スクロース加水分解酵素として β -Fructofuranosidase (Invertase、#104922、490U/mg、EC 3.2.1.26 *from Yeast (Saccharomyces cerevisiae)*) は、ベーリンガー・マンハイム社 (現在のロシュ・ダイアグノスティックス社) より購入して使用した。

グルコース異性化酵素として Aldose 1-epimerase(Mutarotase、M-9776、2,300 U/mg、M-4286、250 U/mg、EC 5.1.3.3、*from Porcine Kidney*) は、Sigma Aldrich 社より購入して使用した。

Potassium Ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$: 試薬特級)はナカライテスク株式会社より購入して使用した。Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC、セロゲン EP) は、第一工業製薬株式会社から購入して使用した。

リン酸緩衝液は、りん酸二水素カリウム (試薬一級、ナカライテスク株式会社)、りん酸水素二カリウム (試薬特級、ナカライテスク株式会社) を脱イオン水に溶解して 0.2M 溶液を調製後、これらを混ぜることによって目的の pH 値になるように調製した。

広域緩衝液として McIlvaine の緩衝液は、りん酸二水素ナトリウム (試薬特級、ナカライテスク株式会社) の 0.2 水溶液と、クエン酸一水和物 (試薬特級、ナカライテスク株式会社) の 0.1M 水溶液を脱イオン水を用いて調製し、これらを適当に混合させることによって目的の pH 値になるように調製した。

4.2.2 センサの作製方法

まず、センサの構成及び作製方法について説明する。図 4-2 はバイオセンサの分解構造図である。センサは、ポリエチレンテレフタレート(PET)製の電極基板と試薬層と PET 製のスペーサとカバーから構成される。電極基板には、スクリーン印刷法を用いて以下の手順で電極系を作製した。銀ペーストを用いて 2 本のリードパターンを印刷して温風乾燥機中で乾燥させてリード部分を作製した。次にカーボンペーストを用いて作用極パターンを印刷して温風乾燥機中で乾燥させて作用極部を作製した。次にレジストペーストを用いて作用極の面積を一定にし、リードや作用極の不要部分を覆い被せるようなパターンを印刷、乾燥させてレジスト層を作製した。最後にカーボンペーストを用いて対極パターンを印刷、乾燥させて対極部を作製した。このようにして作製した電極系は、エイジング処理のために、清浄かつ乾燥した不織布を用いて軽く表面を研磨し、更に常圧空气中で熱処理 (100℃×4 時間) を施したものを使用した。作製した電極系の作用極面積は 1.0 平方ミリメートル、対極面積は 7.6 平方ミリメートルとした。

次に試薬層の作製方法についてスクロースセンサを例にとって説明する。まず、0.5 重量%の CMC 水溶液 5 μ L を測定極から対極まで拡がる様に滴下し、50℃の恒温乾燥機中で 30 分間乾燥させて CMC 層を作製した。続いて、Glucose oxidase と Mutarotase と Invertase とフェリシアン化カリウムを 0.2M リン酸緩衝液 (pH : 5.6~7.4) に溶解させた水溶液 5 μ L を CMC 層上へ滴下して 50℃の恒温乾燥機中で 30 分間乾燥させて試薬層を作製した。さらに、厚み 300 μ m の PET 製スペーサを両面テープを用いて電極基板上へ貼り付け、その上から厚み 100 μ m の PET 製カバーを両面テープで貼り付けることによって、スクロースセンサを作製した。

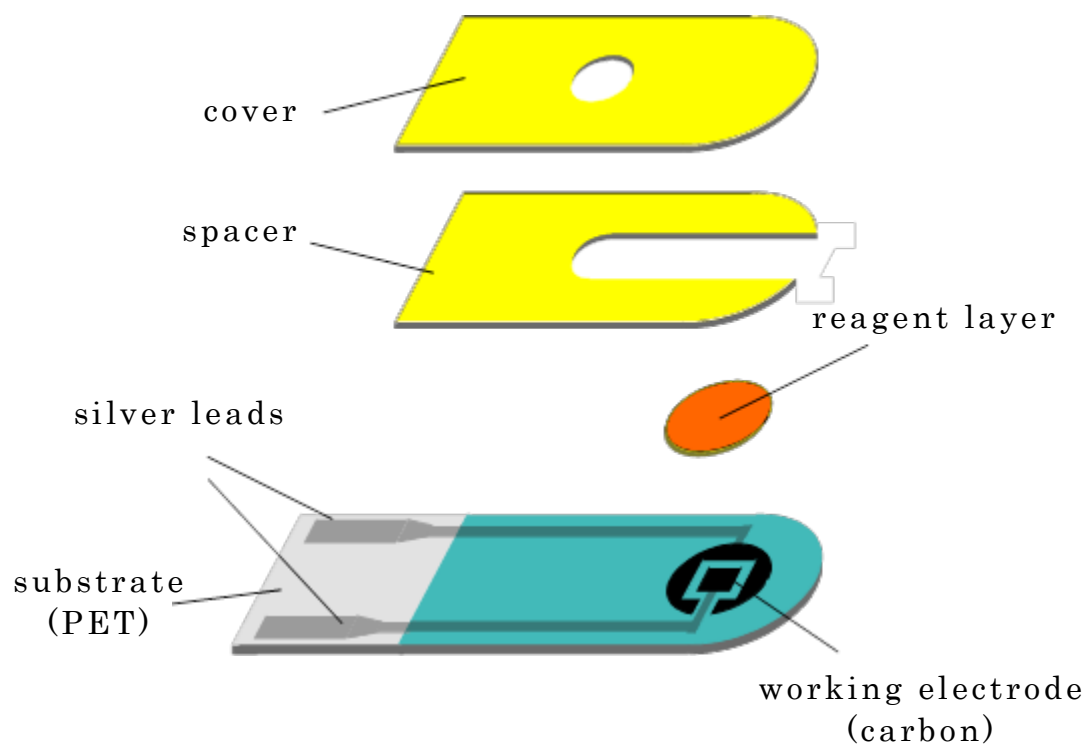


Fig.4-2 Structure of sucrose sensor.

Reagent layer was made of invertase, mutarotase, glucose oxidase, potassium ferricyanide and carboxymethyl cellulose.

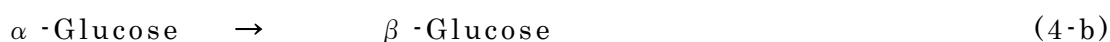
4.2.3 センサの測定原理

スクロースセンサの測定原理について次式(1)~(4)に示す。

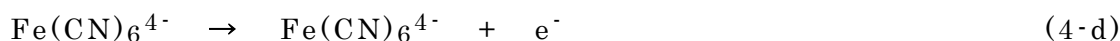
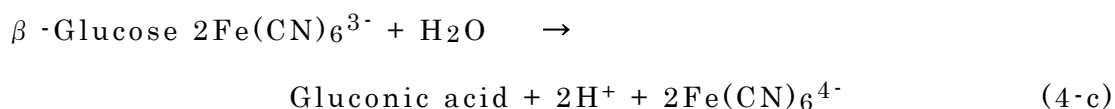
< Invertase >



< Mutarotase >



< Glucose oxidase >



< >内は、直下の反応を触媒する酵素である。

試料液中のスクロースは Invertase によって加水分解され、(4-a)式に従って α -グルコースとフルクトースが生じる。さらにこの α -グルコースから β -グルコースへの異性化を Mutarotase によって促進させる ((4-b)式)。次に β -グルコースを Glucose oxidase によって酸化させる際にフェリシアン化物イオンを共存させると、 β -グルコース量に比例したフェロシアン化物イオンが生成するため ((4-c)式)、このフェロシアン化物イオンを電極で電解酸化させると、(4-d)式に基づく酸化電流値を得ることが出来る。この電流値により基質であるスクロースの濃度が定量可能である(図 4-3)。

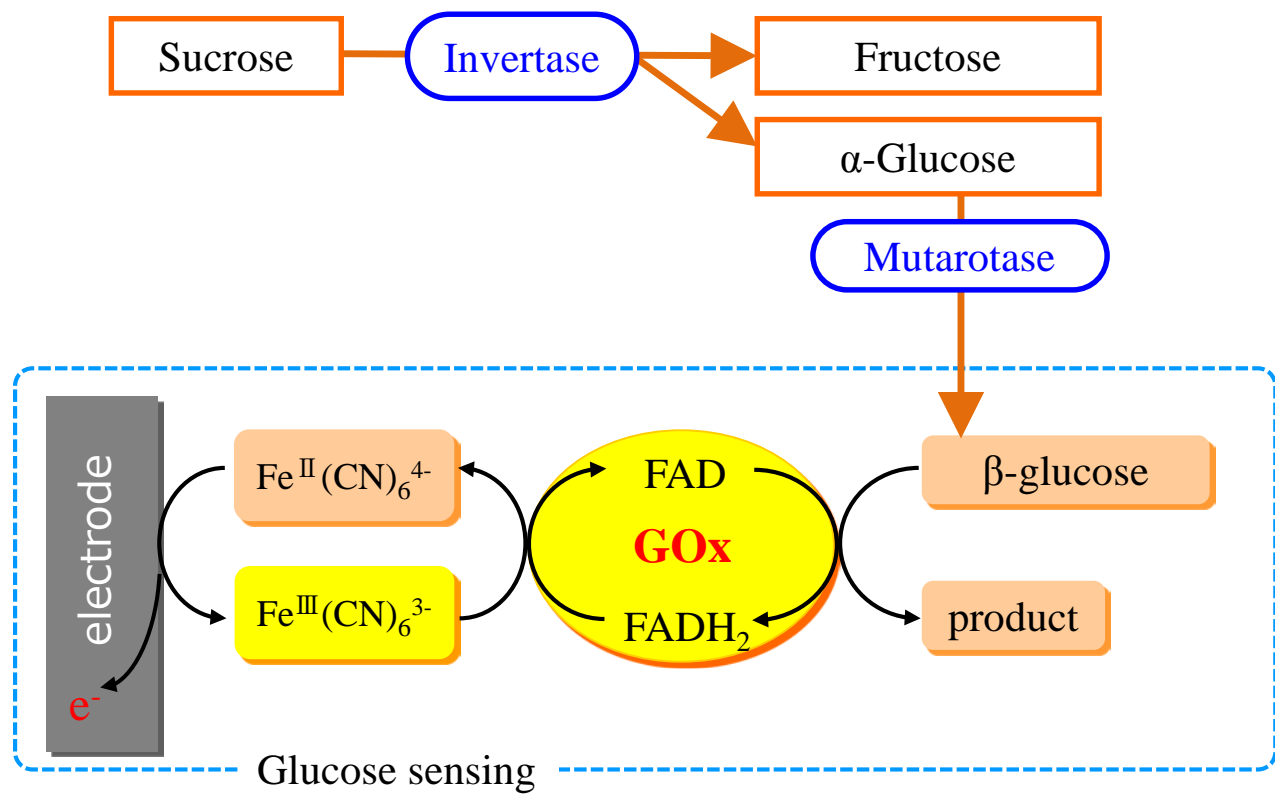


Fig.4-3 Reaction scheme of sucrose sensor.

4.3 結果と考察

4.3.1 pH による影響評価と緩衝塩添加効果の検討

果汁中などに含まれるスクロースを定量する場合には、含まれる有機酸によって試料液が酸性であることが多い。従って果汁中の糖類分析のためには低い pH 領域で作用するスクロースセンサが必要である。

そこでまず試薬層中に緩衝性の塩を含まないスクロースセンサについて、試料液の pH 依存性に関する評価を行った。結果を図 4-4 と表 4-1 に示す。試料液の pH は、広域緩衝液である McIlvaine の緩衝液(0.1M クエン酸、0.2M リン酸水素二ナトリウム)により、3 から 7 にコントロールし、測定時間は 3 分とした。試料液の pH が 4 以下ではスクロース濃度が増加しても応答電流値の増加は極めて少なく pH5 から 6 以上で応答電流値の増加が認められた。pH7 で最も高い電流値が得られたが、スクロース 30mM 以上の試料液に対しては十分な応答が得られなかった。

この原因を特定するために、スクロースセンサに用いる 3 種類の酵素について酵素活性の pH 依存性を調べた。結果を図 4-5 に示す。Glucose oxidase、Mutarotase、Invertase の pH 依存性はそれぞれ異なり、例えば pH4 付近では Invertase と Glucose oxidase の酵素活性は維持されているが、Mutarotase はほとんど酵素としての機能を発現していないことが分かる。酸性領域でスクロースセンサの応答電流値が低下した主な原因は、この酵素活性の低下であるという仮説の基で、次の実験を行った。

スクロースセンサ試薬層を作製する時に、リン酸緩衝液(0.2M~0.8M、pH7.4)を用いることによって、試薬層中に緩衝性の塩を含有させた。緩衝塩の含有量は 4 種類として、その傾向が分かるようにした。本スクロースセンサについて試料液 pH 依存性を評価した結果を、図 4-6 から図 4-9 と、表 4-2 から表 4-5 にそれぞれ示す。

試薬層中にリン酸緩衝塩を含ませることによってスクロース濃度に依存した応答電流値の増加傾向が認められた。0.2M リン酸緩衝液を用いて作製したセンサでは、試料液 pH の値によって応答値が変化した（図 4-6、表 4-2）。スクロース濃度と pH 値の 2 つの因子によってセンサ応答電流値が変化するため、センサの特性としては不十分と考えられる。添加するリン酸緩衝塩の量を更に増やすとこの傾向は緩和され、0.6M リン酸緩衝液を用いて作製したスクロースセンサでは、試料液 pH に依存しない応答特性が得られることが分かった（図 4-8、表 4-4）。

試薬層中に担持したリン酸緩衝塩の pH 緩衝作用によって、用いる 3 種類の酵素が全て酵素活性を発現可能な pH 領域である pH7 近辺（図 4-5）に制御出来たことによる。以上の結果より、センサの試薬層を作製する際に緩衝液として用いたリン酸塩が試料液 pH の影響緩和に効果的であることが分かった。

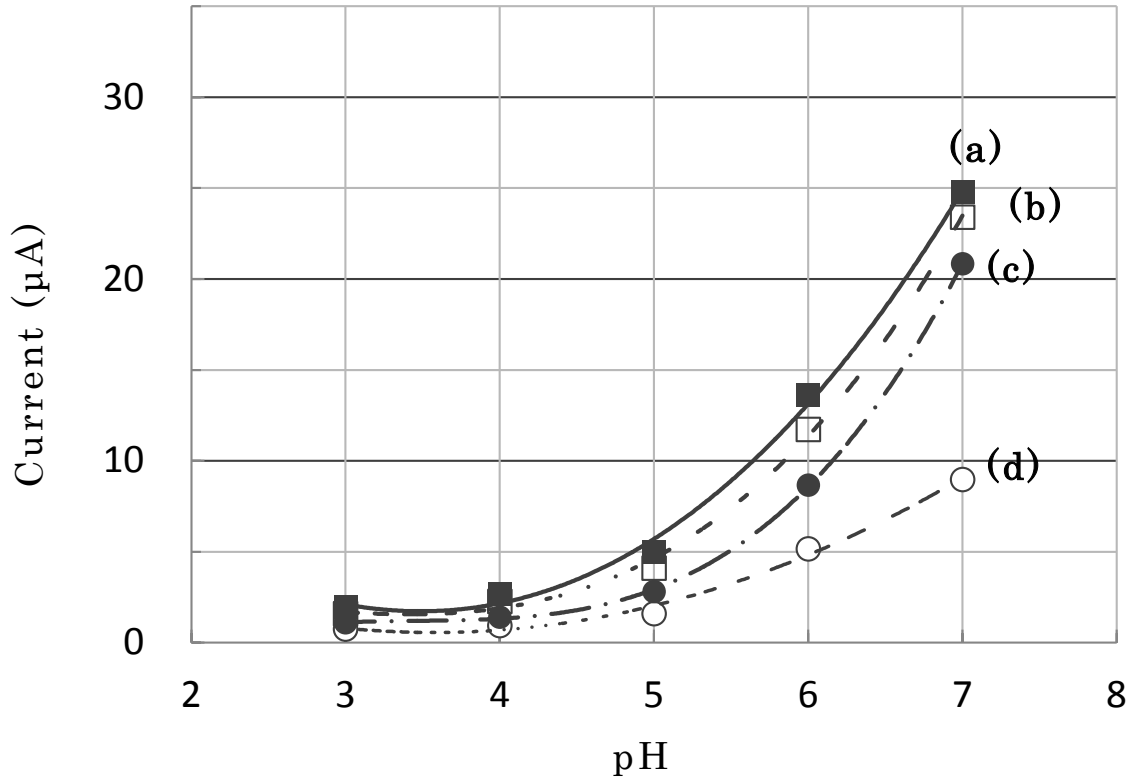


Fig.4-4 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor without phosphate buffer salts in the reagent layer. Sucrose (a)40mM, (b)30mM, (c)20mM, (d)10mM. Sample fluid pH was controlled with McIlvaine buffer (pH 3-7).

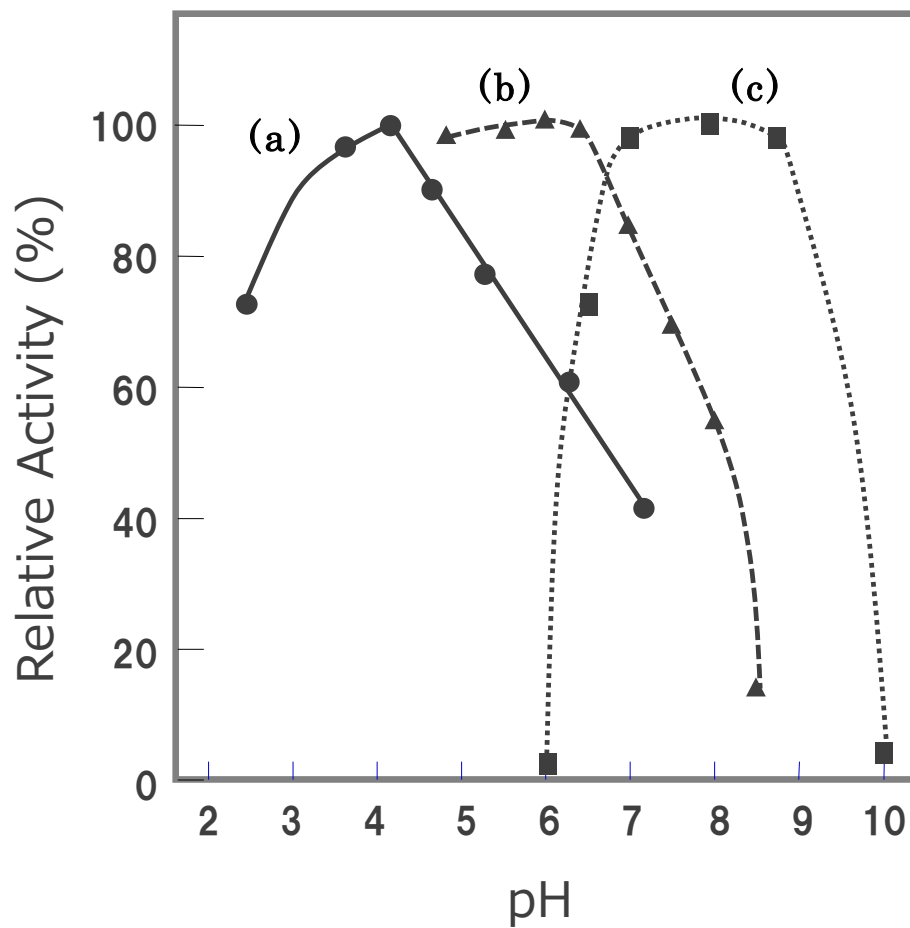


Fig.4-5 pH profile of enzyme activity: (a) invertase, (b) glucose oxidase, (c) mutarotase.

Table 4-1 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor without phosphate buffer salts in the reaction layer.

| sucrose (mM) | pH | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 10 | 0.75 | 0.94 | 1.60 | 5.17 | 8.97 |
| 20 | 1.10 | 1.41 | 2.81 | 8.67 | 20.8 |
| 30 | 1.60 | 2.27 | 4.10 | 11.7 | 23.4 |
| 40 | 1.99 | 2.67 | 4.97 | 13.6 | 24.8 |

Table 4-2 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.2M phosphate buffer salts in the reaction layer.

| sucrose (mM) | pH | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 10 | 4.10 | 7.43 | 8.73 | 8.67 | 8.93 |
| 20 | 7.57 | 13.5 | 16.0 | 16.4 | 17.6 |
| 30 | 11.2 | 17.8 | 22.3 | 22.8 | 24.1 |
| 40 | 13.1 | 21.9 | 27.7 | 29.3 | 31.3 |

Table 4-3 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.4M phosphate buffer salts in the reaction layer.

| sucrose (mM) | pH | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 10 | 8.07 | 7.93 | 8.77 | 8.60 | 7.83 |
| 20 | 15.4 | 15.3 | 16.4 | 16.5 | 16.5 |
| 30 | 22.0 | 24.5 | 24.6 | 24.1 | 26.7 |
| 40 | 27.1 | 31.1 | 31.0 | 31.7 | 28.7 |

Table 4-4 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.6M phosphate buffer salts in the reaction layer.

| sucrose (mM) | pH | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 10 | 8.57 | 8.53 | 8.27 | 8.20 | 7.93 |
| 20 | 16.8 | 16.6 | 16.2 | 15.5 | 15.1 |
| 30 | 23.0 | 23.3 | 23.1 | 22.6 | 21.4 |
| 40 | 29.4 | 30.7 | 30.8 | 29.6 | 27.7 |

Table 4-5 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.8M phosphate buffer salts in the reaction layer.

| sucrose (mM) | pH | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 10 | 9.10 | 7.27 | 7.47 | 7.77 | 7.53 |
| 20 | 14.4 | 14.3 | 13.8 | 14.4 | 14.3 |
| 30 | 22.0 | 21.9 | 20.2 | 20.6 | 20.1 |
| 40 | 28.5 | 27.0 | 25.6 | 25.9 | 23.9 |

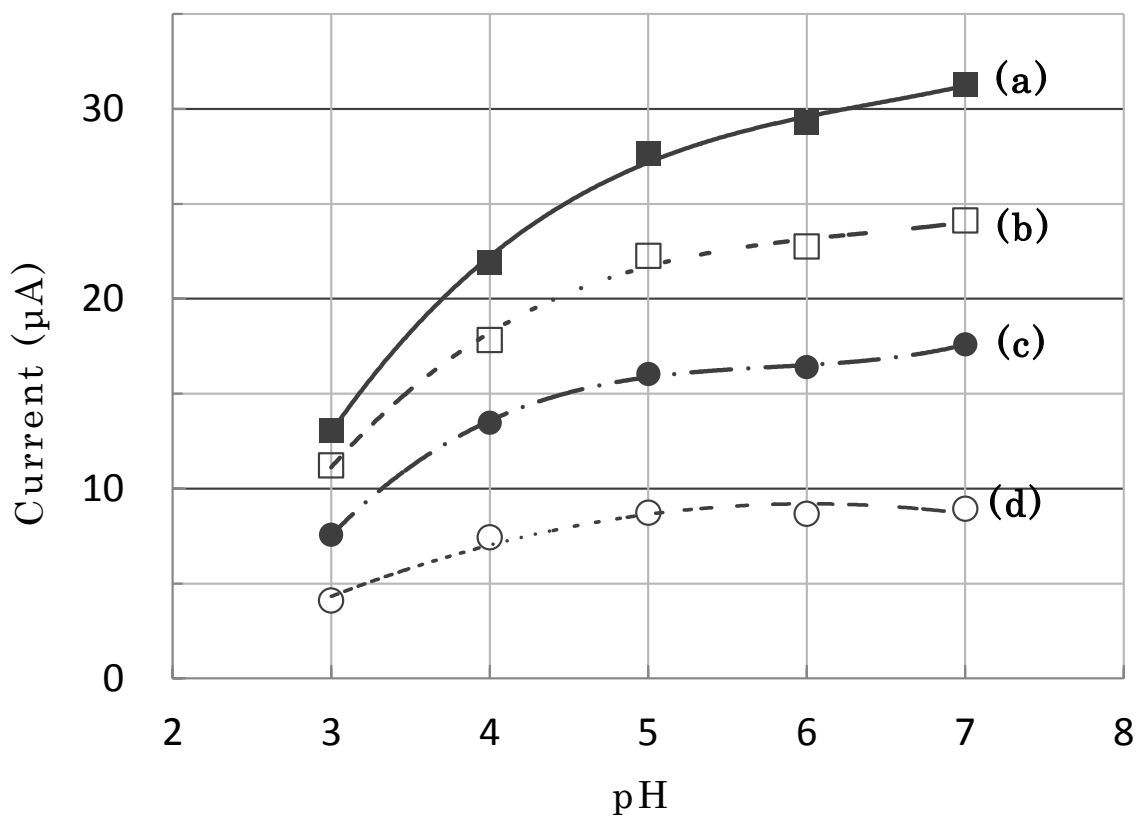


Fig.4-6 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.2M phosphate buffer salts in the reagent layer. Sucrose (a)40mM, (b)30mM, (c)20mM, (d)10mM. Sample fluid pH was controlled with McIlvaine buffer (pH 3-7).

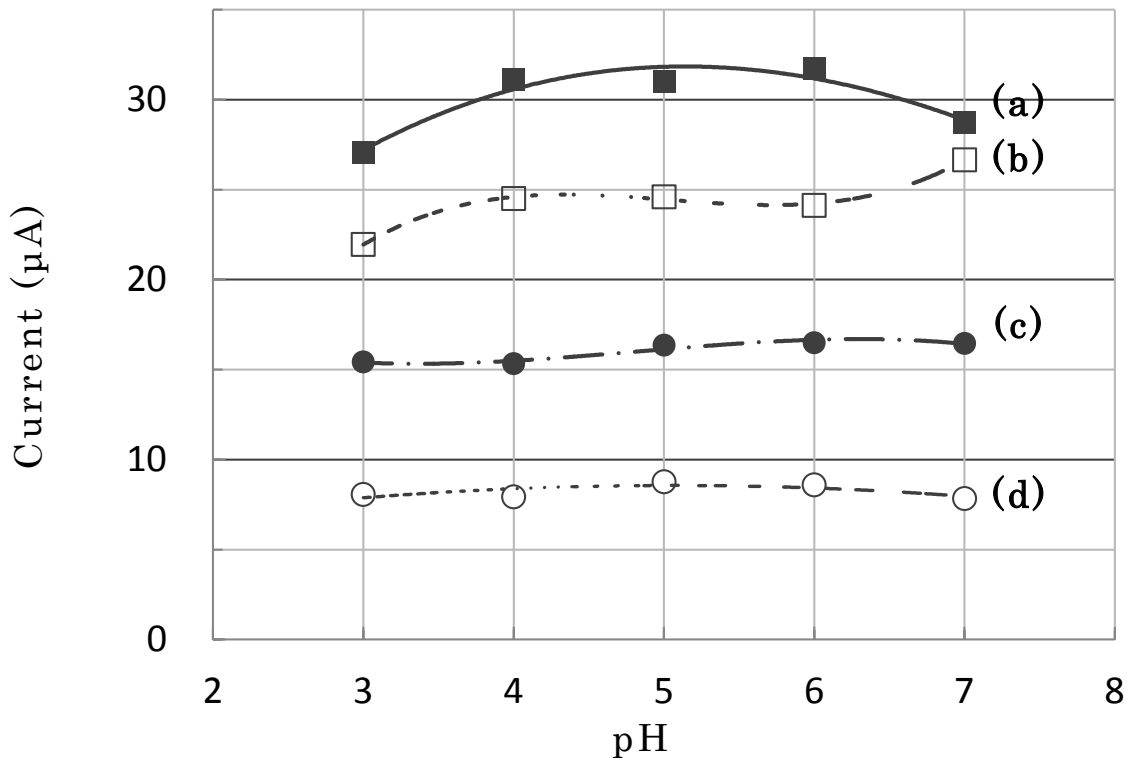


Fig.4-7 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.4M phosphate buffer salts in the reagent layer. Sucrose (a)40mM, (b)30mM, (c)20mM, (d)10mM. Sample fluid pH was controlled with McIlvaine buffer (pH 3-7).

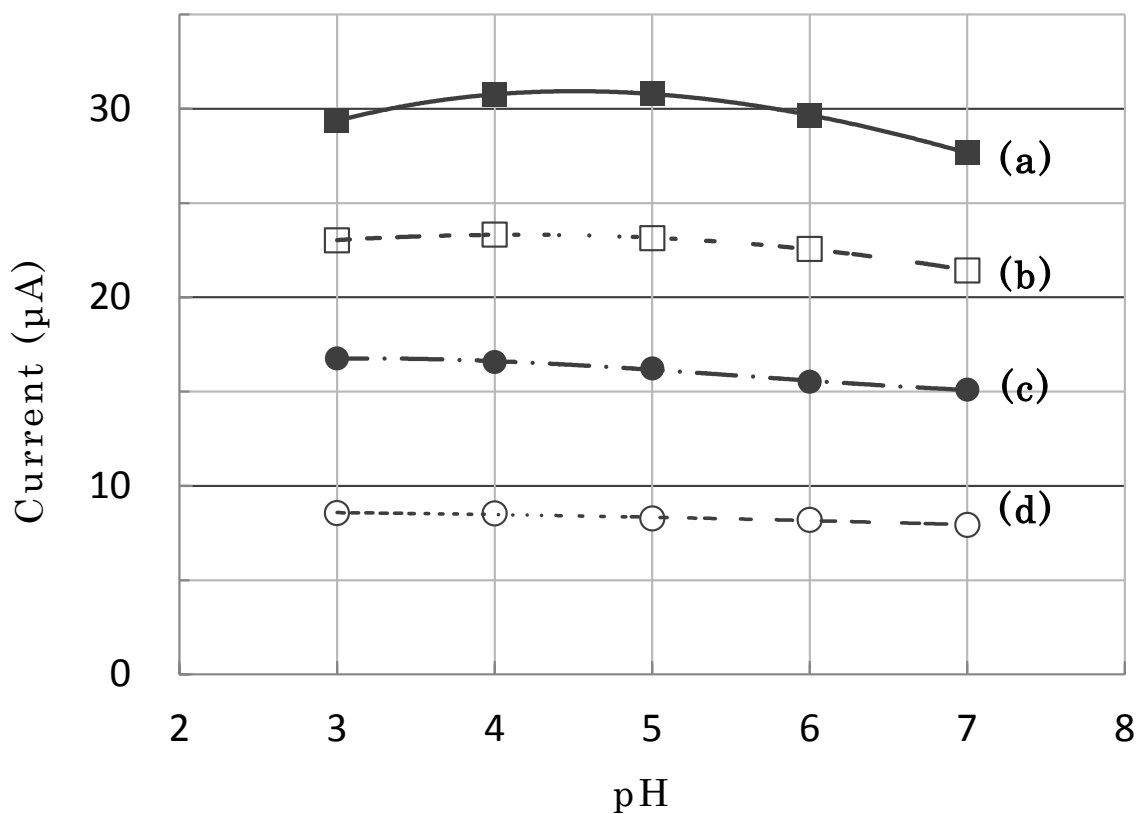


Fig.4-8 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.6M phosphate buffer salts in the reagent layer. Sucrose (a)40mM, (b)30mM, (c)20mM, (d)10mM. Sample fluid pH was controlled with McIlvaine buffer (pH 3-7).

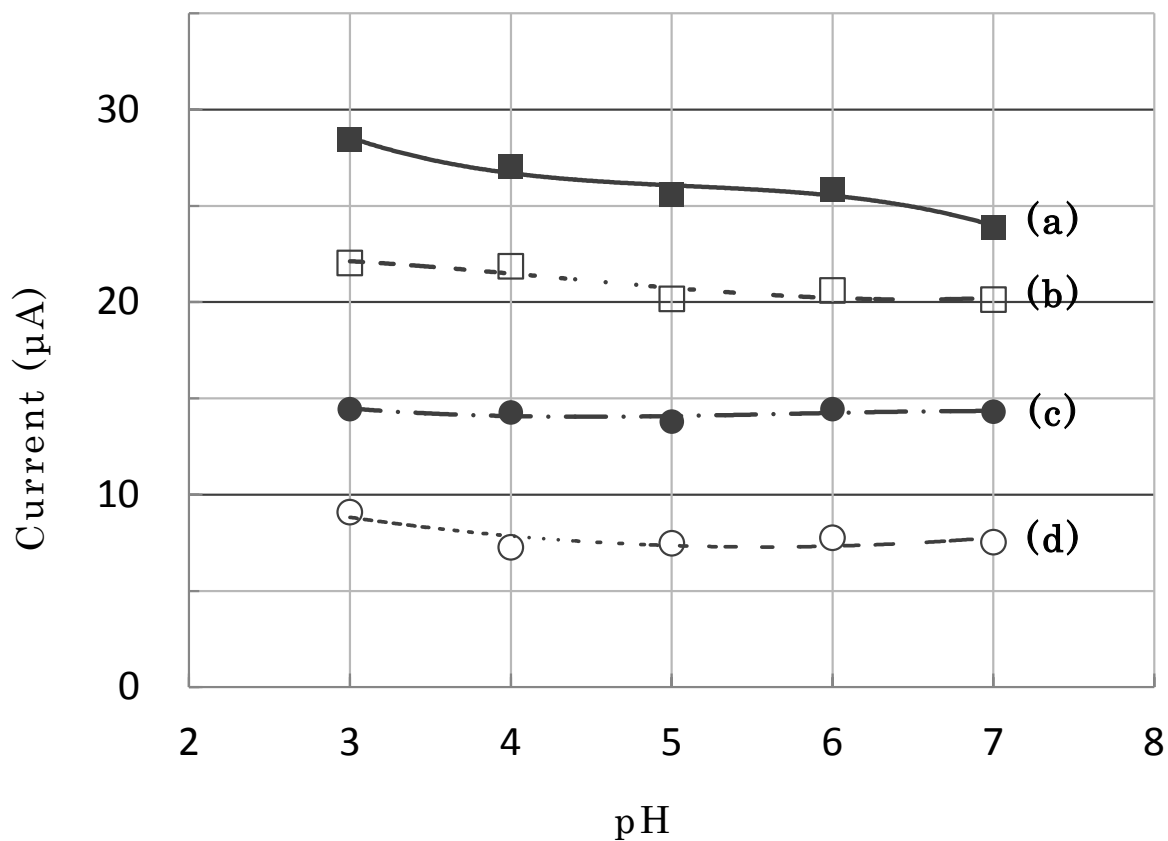


Fig.4-9 Influence of sample fluids pH on sucrose sensor with 0.8M phosphate buffer salts in the reagent layer. Sucrose (a)40mM, (b)30mM, (c)20mM, (d)10mM. Sample fluid pH was controlled with McIlvaine buffer (pH 3-7).

4.3.2 スクロースとグルコースの同時測定の見直し

本反応系では、図 4-3 から明らかなように、スクロースの定量測定に際して共存するグルコースの影響を受けることが予測される。本センサの反応過程において生成した β -グルコースは **Glucose oxidase** によって酸化反応を受けるが、試料液中に予め含まれる β -グルコースもまた、**Glucose oxidase** による酸化反応を受けるためである。最終的な応答電流から両者を区別することは原理的には難しい。

そこで、グルコースとスクロースの混合水溶液に対する応答特性を評価した。結果を図 4-10 に示す。グルコースおよびスクロースの双方が 40mM 程度までの直線性を得られるように、測定時間は 3 分とした。まず、グルコースを含まないスクロースだけの試料液では、図 4-10(d) の結果が得られた。これら試料液へグルコースの最終濃度が 10mM になるようにして添加し、調製したスクロースとグルコースの混合水溶液に対する応答特性を評価した結果、先の (d) が平行移動したような特性 (図 4-10(c)) が得られた。更に添加するグルコース量を、30mM、50mM と増やすに従って、応答性は同様の増加傾向を示した (図 4-10(b) および (a))。

共存するグルコースは、その濃度に応じて直線的な応答増加を示すことより、スクロースセンサに加えて、グルコースセンサを併用し、その応答電流値の差を取ることによって、スクロース濃度を高精度に定量することの可能性が得られた。

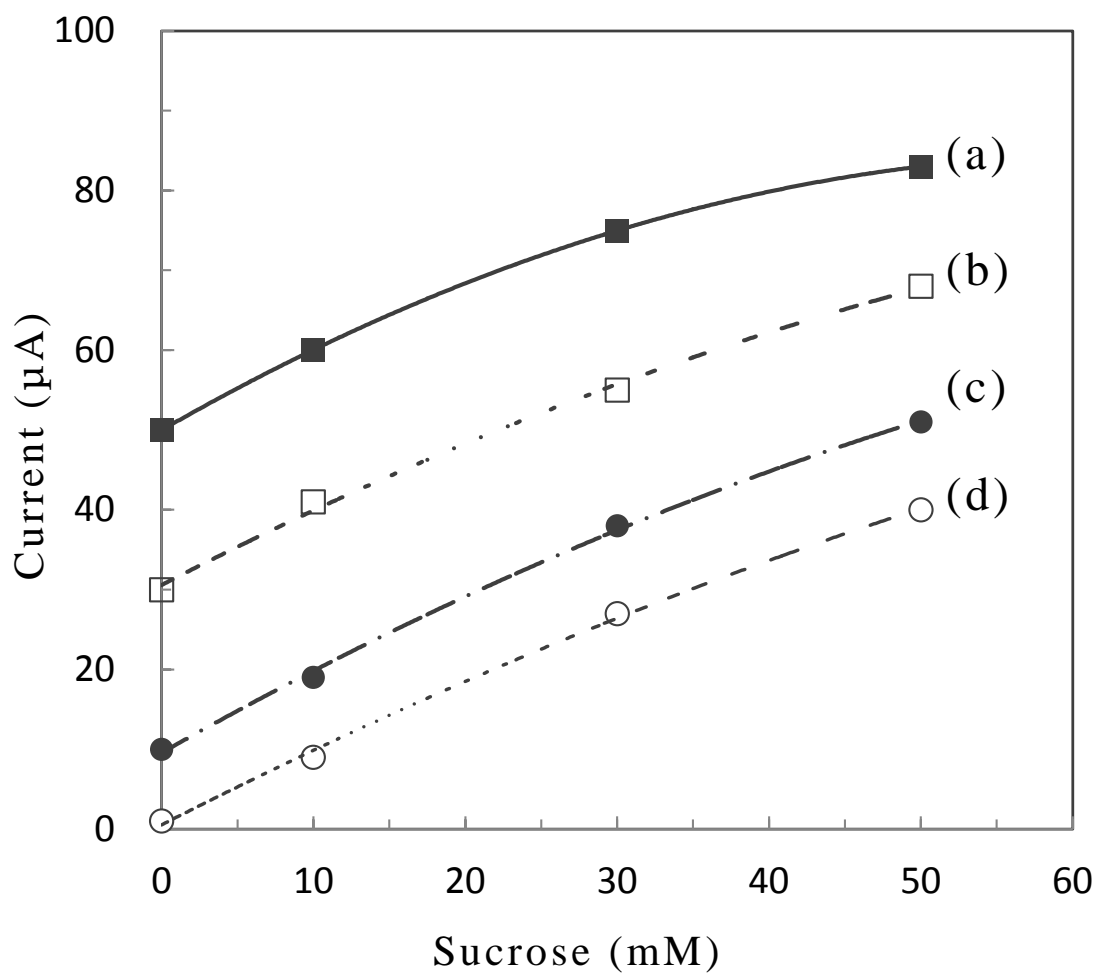


Fig.4-10 Response of sucrose sensor, obtained with mixed sample solution of sucrose and glucose. (a) 50mM glucose, (b) 30mM glucose, (c) 10mM glucose were added to sucrose samples, (d) without glucose. Measurement time was 3min.

次に、別の視点でグルコースとスクロースの同時定量を可能とする仮説を立てて実証した結果を図 4-11 に示す。今まで示したデータと大きく異なるのは、その反応時間である。グルコースおよびスクロースを、それぞれ別にスクロースセンサに供給後、10 秒後に電極間に電圧を印加し、さらに 5 秒後の電流値を計測した。

図 4-11(a)はグルコース試料液に対するスクロースセンサの応答電流である。試料液中のグルコースは、センサ試薬層中の *Glucose oxidase* と反応し、濃度依存的な電流増加を示した。一方、図 4-11(b)はスクロース試料液に対するスクロースセンサの応答電流である。スクロースは、*Invertase* と *Mutarotase*、2 つの酵素反応を経た結果として β -グルコースが生成される (図 4-3) が、10 秒間ではこの 2 つの酵素反応が十分に進んでいないことが考えられる。

この結果より、グルコースとスクロースの混合試料液に対して、まず 10 秒後に 1 回目の電圧印加と電流 (i_1) 計測を実施し、さらに 3 分後に 2 回目の電圧印加と電流 (i_2) 計測を実施することで、複数のセンサを用いることなく、2 成分 (グルコースとスクロース) の同時定量が可能であることが示唆された。図 4-11 から明らかのように、電流 i_1 からグルコース濃度を定量することが可能である。また、図 4-10 より、電流 i_2 からグルコースとスクロースの和を知ることが可能なため、電流 i_1 よりグルコース濃度を、電流 i_1 と i_2 の差よりスクロース濃度を得られることが示唆された。実際に測定をしたところ、スクロース濃度の算出に少し係数をかけることが必要ではあるが、狙い通りの結果が得られた。

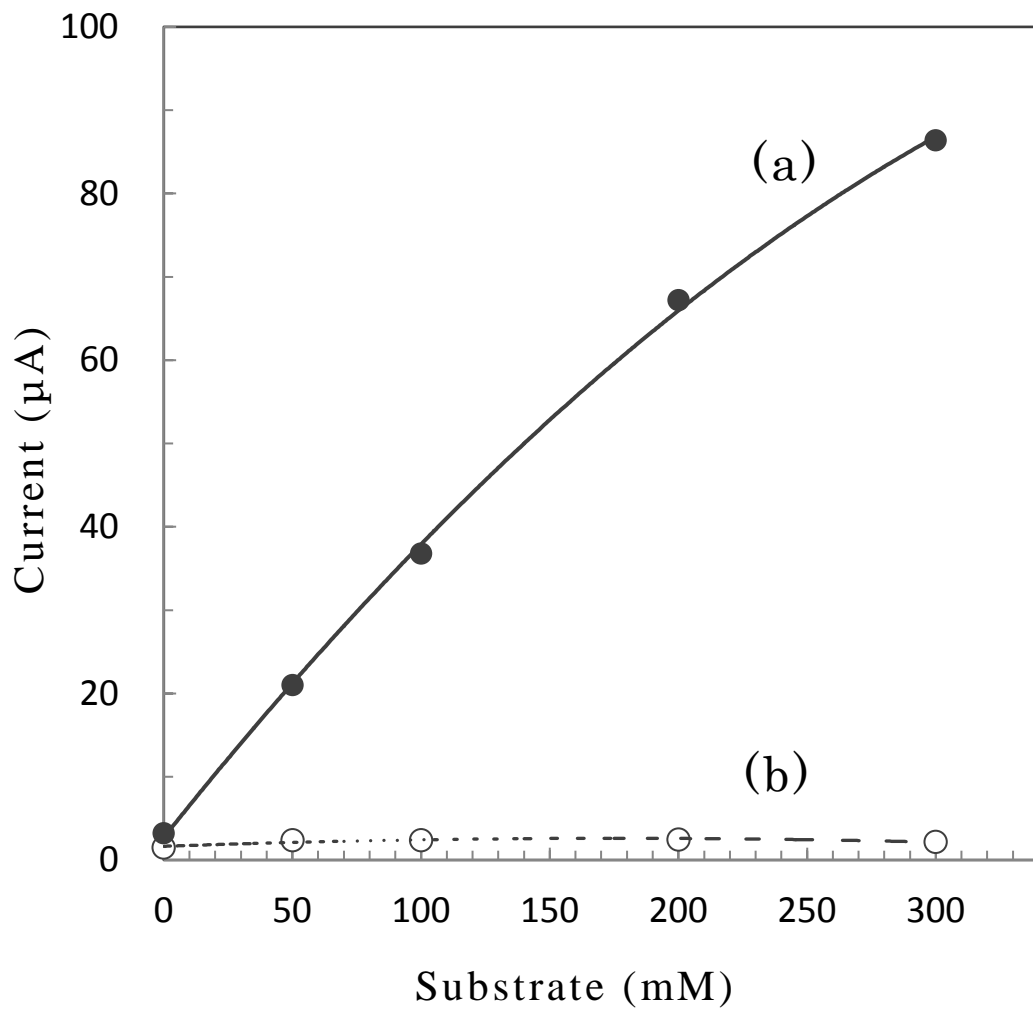


Fig.4-11 Response of sucrose sensor. Substrates were (a) glucose and (b) sucrose. Measurement time was 10sec.

4.3.3 果汁成分の分析結果

実際の食品分析に適用した例として、果汁に含まれるスクロースとグルコースについて測定を行い、高速液体クロマトグラフィー（HPLC：High Performance Liquid Chromatography）と比較した結果を表 4-6 に示す。用いた試料溶液は市販されている果実（メロン、すいか、りんご、グレープフルーツ、温州みかん、パイナップル、キウイ、ぶどう）を搾って得られた果汁液を、脱イオン水で 10 倍に希釈して調製した。全ての果実について、外皮を除いた後に速やかに果汁を搾取した。

グルコースセンサはスクロースセンサのうち **Invertase** を除いて、スクロースセンサと同様の手順で作製した。スクロースとグルコースを共に含む試料液に対するスクロースセンサの応答は、前述したようにスクロースとグルコース濃度の和に比例するため、スクロースセンサとグルコースセンサの応答電流値の差よりスクロース濃度を算出した。

全体的に、センサに基づく定量値の方が HPLC に比べてやや低い傾向が見られたが、これは各糖成分（スクロース、グルコース）の定量に用いた検量線を、スクロースおよびグルコースの水溶液によって作成したことが原因と考えられる。図 4-12 にはスクロースセンサと HPLC の結果を比較したグラフを示した。相関係数 0.99 と良い直線性を示しており、検量線の修正によって、定量の精度は更に高められることが分かった。

Table 4-6 Correlation between biosensor and HPLC.

| Fruits | Glucose (mM) | | Sucrose (mM) | |
|------------|--------------|------|--------------|------|
| | sensor | HPLC | sensor | HPLC |
| melon | 2.9 | 1.7 | 20.7 | 26.2 |
| watermelon | 4.8 | 5.3 | 14.2 | 18.6 |
| apple | 13.9 | 15.8 | 4.1 | 5.0 |
| grapefruit | 14.8 | 15.8 | 9.5 | 10.5 |
| orange | 17.9 | 20.1 | 13.1 | 16.2 |
| pineapple | 22.1 | 25.1 | 14.9 | 20.0 |
| kiwifruit | 28.4 | 30.1 | 3.6 | 4.9 |
| grape | 41.9 | 47.9 | 0.0 | 0.6 |

Samples are diluted with distilled water ($\times 10$)

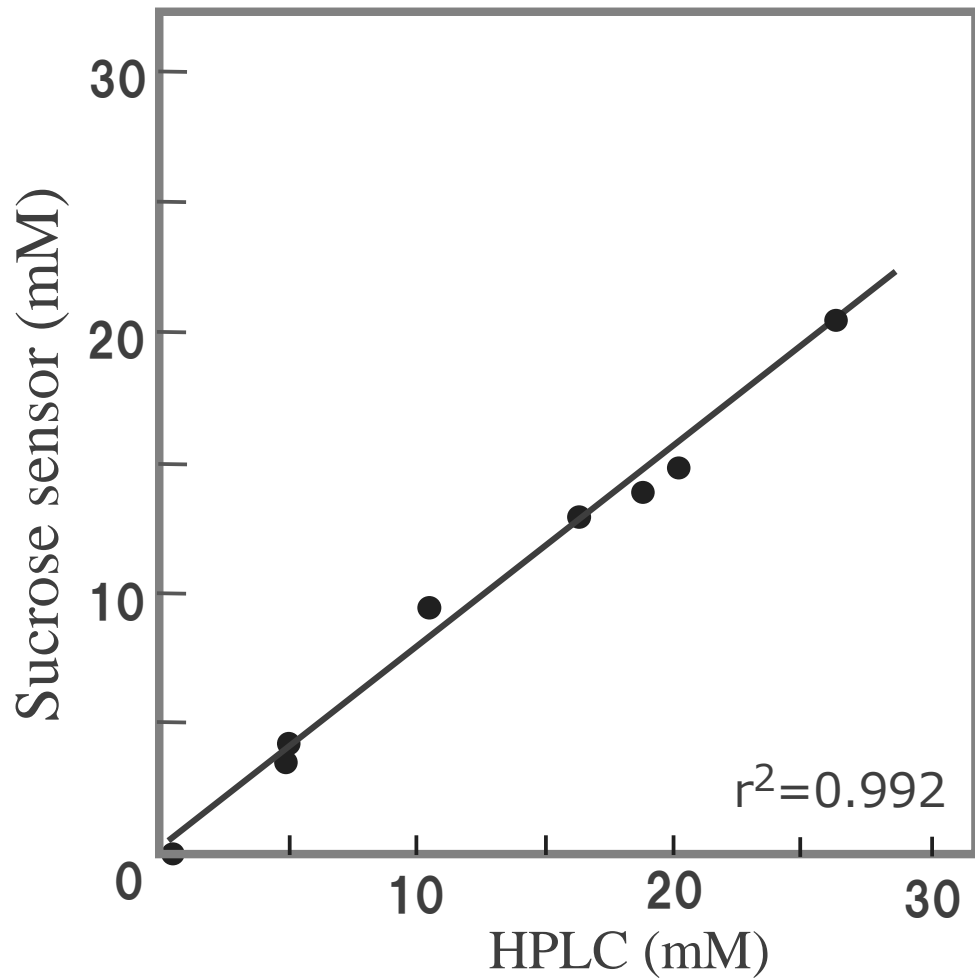


Fig.4-12 Correlation between biosensor and reference method (HPLC: High performance liquid chromatography). Samples were diluted with distilled water ($\times 10$).

4.3.4 スクロースセンサの保存特性

本研究で設計、試作したスクロースセンサの保存信頼性について評価を行った。

4.3.4.1 実験方法

スクロースセンサは一度使うと再使用が出来ない「使い捨て型（ワンショットタイプ）」の設計であるため、予め評価に使う全個数のスクロースセンサを試作し、初期特性を評価した後に、一定の温度環境下において保存した後に特性を評価した。

評価に用いたスクロースセンサは、試薬層中に含ませるリン酸緩衝剤の量を通常の 0.2M リン酸緩衝液 4 μ L を用いて作製したものと、3 倍濃度 (0.6M) リン酸緩衝液 4 μ L を用いて作製したものの 2 種類を用意した。試薬層に含ませるリン酸緩衝塩の量を変えることによって、リン酸緩衝塩が試薬の変質・変性に与える影響の有無とそのメカニズムに関して考察することを狙いとした。

特性の評価は、0～50mM に調整した 6 種類濃度のスクロース水溶液を用いて得られたセンサ応答電流値 (μ A) を測定して実施した。スクロースセンサを一定期間保存した後の評価に用いたスクロース水溶液は、評価の都度、新しいものを調製して用いた。

保存環境条件について以下に説明する。スクロースセンサを乾燥剤と共にポリエチレン製の小袋に入れて密封し、紫外線の影響を避けるために褐色のガラス瓶に入れて密閉し、各評価温度 (30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C) に設定した送風型定温恒温器中に保存した。乾燥剤としては、粒状シリカゲルを予め 100 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱して水分を除去したものを室温まで戻してから用いた。測定評価実験は 25 $^{\circ}$ C の環境下で実施した。

4.3.4.2 結果と考察

まず始めに試薬層に含むリン酸緩衝塩を 0.2M 溶液で作製したスクロースセンサの保存特性について、表 4-7 から表 4-9 と、図 4-13 から図 4-15 に示す。30℃ 保存では、30 日後でスクロース 40mM 以下では変化は見られなかった。60 日後にはスクロース 40mM の応答値に僅かな低下傾向が見られた。50mM についても保存開始 10 日過ぎくらいから応答値が少しずつ低下する傾向がみられたが、それほど大きな特性変化とは言えなかった（表 4-7、図 4-13）。保存温度の上昇に伴って応答低下の傾向が認められるが、主としてスクロース 30mM 以上の試料液に対してであり、スクロース 20mM 以下では 60 日までほとんど変化は認められなかった（表 4-8,4-9、図 4-14,4-15）。

次に、試薬層に含むリン酸緩衝塩を 0.6M 溶液で作製したスクロースセンサの保存特性について、表 4-10 から表 4-12 と図 4-16 から図 4-18 に示す。試薬層中のリン酸塩量を 3 倍に増やした結果、30℃ 保存では、スクロース 30mM 以上で保存開始直後から特性低下の傾向がみられた。保存温度が上昇すると応答低下は更に顕著となり、保存温度 50℃ ではスクロース高濃度の応答低下と共に、ブランク電流値（スクロースを含まない試料液に対する応答電流値）の増加傾向が保存 30 日後から認められた。

試薬層中の緩衝塩量増加は、試料液の pH による影響を最小化するために有効な手段ではあるが、保存信頼性には逆効果であることが分かった。この原因としては、緩衝塩に含まれる水分が保存期間中に酵素タンパク質の構造変化の要因となっていることなどが考えられるが、更なる検討が必要である。

本研究によって、通常は熱に弱いとされる酵素タンパク質が、前章のグルコースセンサの保存特性でも分かったように、保存状態によってはかなり高温（50℃～）でも数ヶ月は活性が維持されることが示されたことは非常に興味深い。長期保存を実現する条件としては、期乾燥剤と共に密封したことに

よって、試薬中の水成分が減っており、著しい構造変化が生じていないことなどが予想されるが、詳細は今後の研究に期待したい。

Table 4-7 Storage characteristics of sucrose sensor under 30°C

| storage (days) | sucrose (mM) | | | | | |
|----------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 0 | 0.47 | 9.13 | 16.6 | 23.9 | 29.9 | 35.3 |
| 10 | 0.63 | 9.47 | 17.1 | 23.9 | 30.8 | 35.1 |
| 30 | 0.77 | 9.50 | 16.8 | 23.7 | 29.7 | 33.9 |
| 60 | 0.93 | 9.57 | 17.1 | 22.5 | 27.7 | 32.1 |

Unit: μ A

Sensors were prepared with 0.2M phosphate buffer

Table 4-8 Storage characteristics of sucrose sensor under 40°C

| storage (days) | sucrose (mM) | | | | | |
|----------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 0 | 0.47 | 9.13 | 16.6 | 23.9 | 29.9 | 35.3 |
| 10 | 0.80 | 9.27 | 17.1 | 23.3 | 28.2 | 31.5 |
| 30 | 1.10 | 9.90 | 17.1 | 23.4 | 28.7 | 33.9 |
| 60 | 1.27 | 9.63 | 17.1 | 23.1 | 28.3 | 31.9 |

Unit: μ A

Sensors were prepared with 0.2M phosphate buffer

Table 4-9 Storage characteristics of sucrose sensor under 50°C

| storage (days) | sucrose (mM) | | | | | |
|----------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 0 | 0.47 | 9.13 | 16.6 | 23.9 | 29.9 | 35.3 |
| 10 | 1.13 | 9.77 | 16.4 | 22.4 | 28.5 | 32.3 |
| 30 | 1.60 | 9.90 | 17.0 | 23.7 | 26.7 | 29.8 |
| 60 | 1.90 | 10.2 | 17.1 | 23.2 | 28.5 | 32.1 |

Unit: μ A

Sensors were prepared with 0.2M phosphate buffer

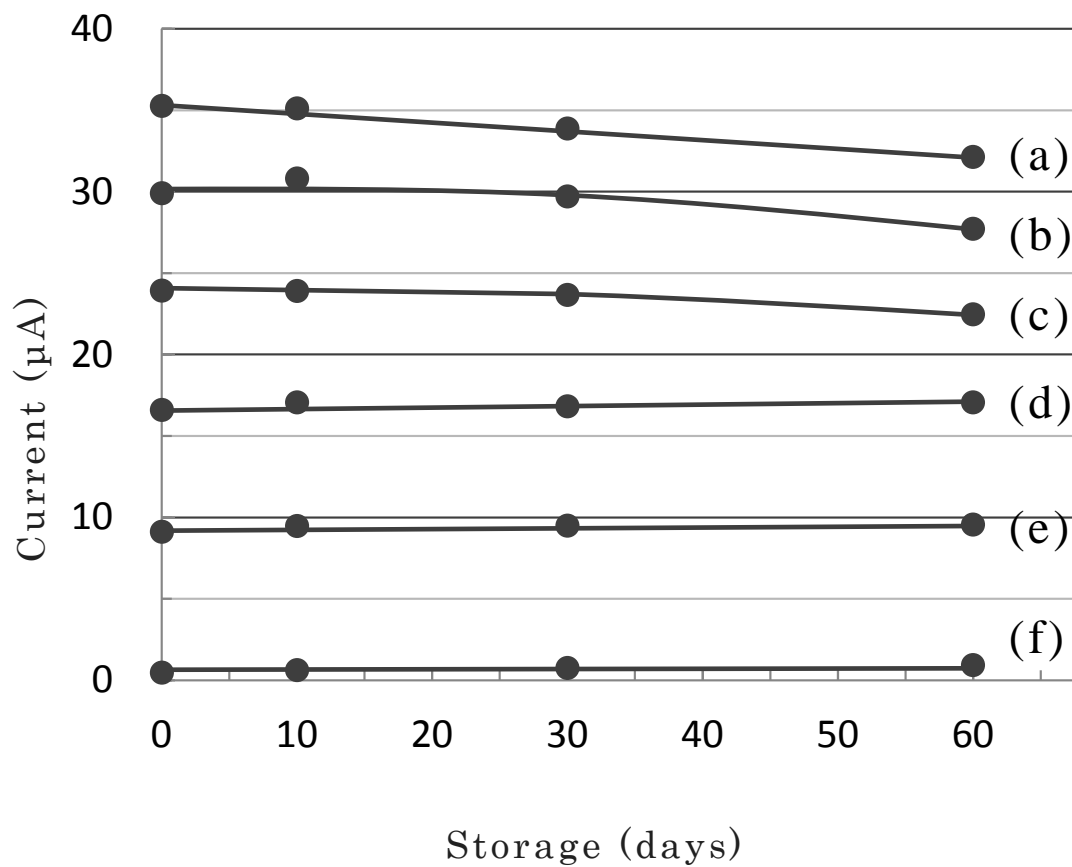


Fig.4-13 Storage characteristic of sucrose sensor (30°C). Sucrose (a)50mM, (b)40mM, (c)30mM, (d)20mM, (e)10mM, (f) 0mM. Reagent layers of the sensors were prepared with 0.2M phosphate buffer.

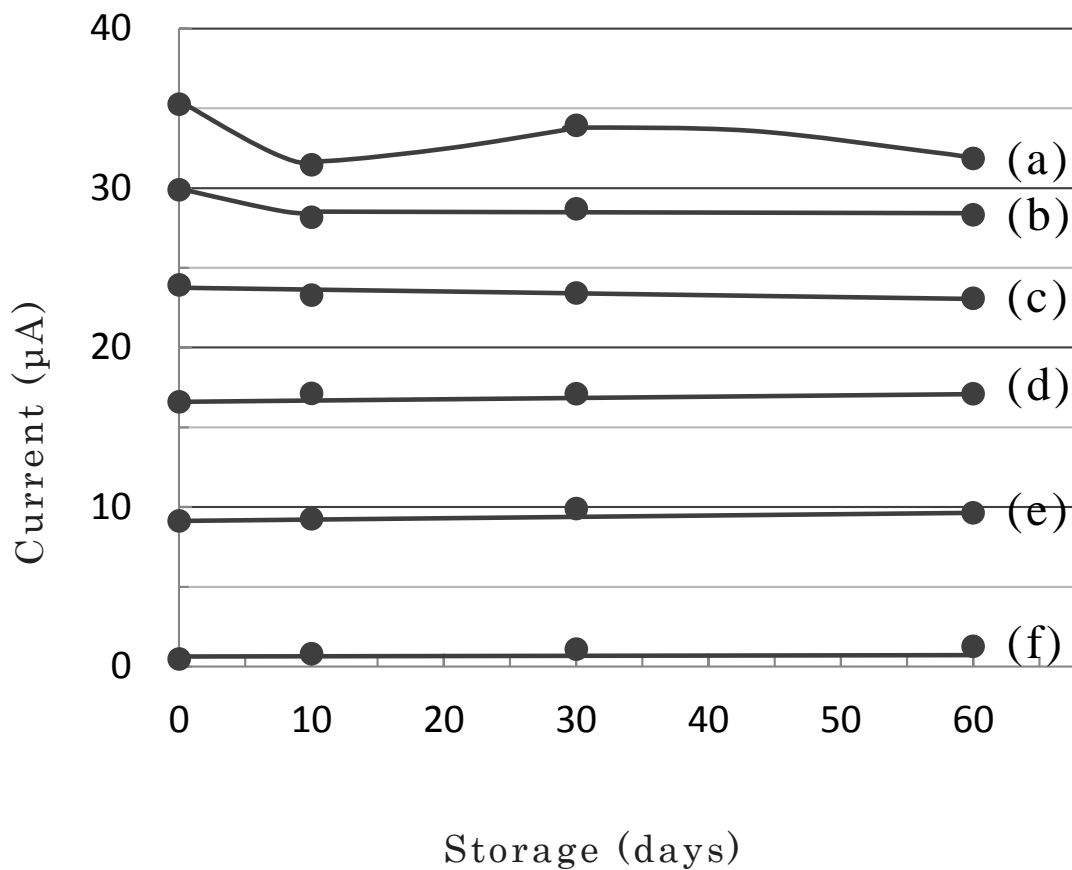


Fig.4-14 Storage characteristic of sucrose sensor (40°C). Sucrose (a)50mM, (b)40mM, (c)30mM, (d)20mM, (e)10mM, (f) 0mM. Reagent layers of the sensors were prepared with 0.2M phosphate buffer.

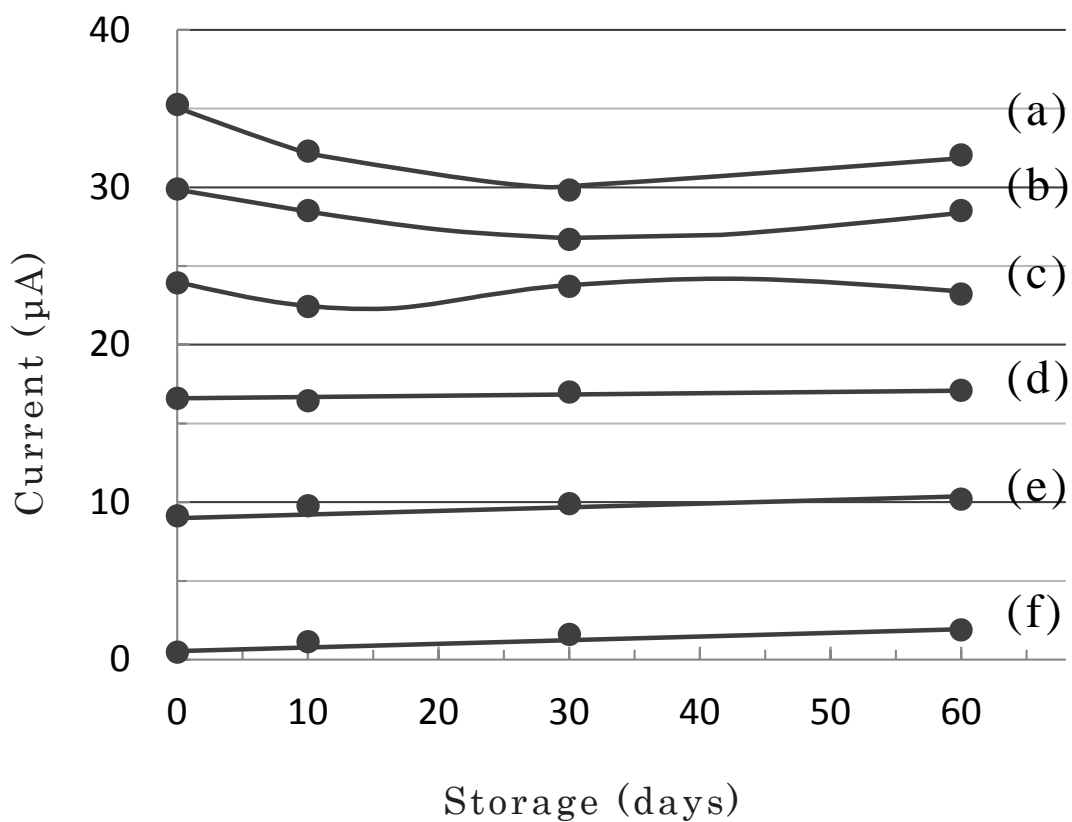


Fig.4-15 Storage characteristic of sucrose sensor (50°C). Sucrose (a)50mM, (b)40mM, (c)30mM, (d)20mM, (e)10mM, (f) 0mM. Reagent layers of the sensors were prepared with 0.2M phosphate buffer.

Table 4-10 Storage characteristics of sucrose sensor under 30°C

| storage (days) | sucrose (mM) | | | | | |
|----------------|--------------|-------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 0 | 0.50 | 8.37 | 15.6 | 21.9 | 28.5 | 31.9 |
| 10 | 0.60 | 11.47 | 14.4 | 19.7 | 25.0 | 28.0 |
| 30 | 0.70 | 8.33 | 14.7 | 19.8 | 19.9 | 21.9 |
| 60 | 0.70 | 8.30 | 13.5 | 17.5 | 20.6 | 23.1 |

Unit: μ A

Sensors were prepared with 0.6M phosphate buffer

Table 4-11 Storage characteristics of sucrose sensor under 40°C

| storage (days) | sucrose (mM) | | | | | |
|----------------|--------------|-------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 0 | 0.50 | 8.37 | 15.6 | 21.9 | 28.5 | 31.9 |
| 10 | 0.77 | 11.73 | 14.3 | 20.3 | 22.5 | 24.6 |
| 30 | 0.80 | 7.80 | 13.2 | 17.3 | 17.9 | 21.4 |
| 60 | 0.93 | 7.50 | 12.1 | 16.4 | 18.3 | 21.5 |

Unit: μ A

Sensors were prepared with 0.6M phosphate buffer

Table 4-12 Storage characteristics of sucrose sensor under 50°C

| storage (days) | sucrose (mM) | | | | | |
|----------------|--------------|-------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 0 | 0.50 | 8.37 | 15.6 | 21.9 | 28.5 | 31.9 |
| 10 | 0.83 | 11.70 | 13.6 | 18.2 | 22.1 | 25.0 |
| 30 | 1.10 | 8.23 | 13.0 | 16.9 | 18.3 | 19.7 |
| 60 | 1.37 | 8.1 | 12.3 | 16.2 | 19.1 | 22.5 |

Unit: μ A

Sensors were prepared with 0.6M phosphate buffer

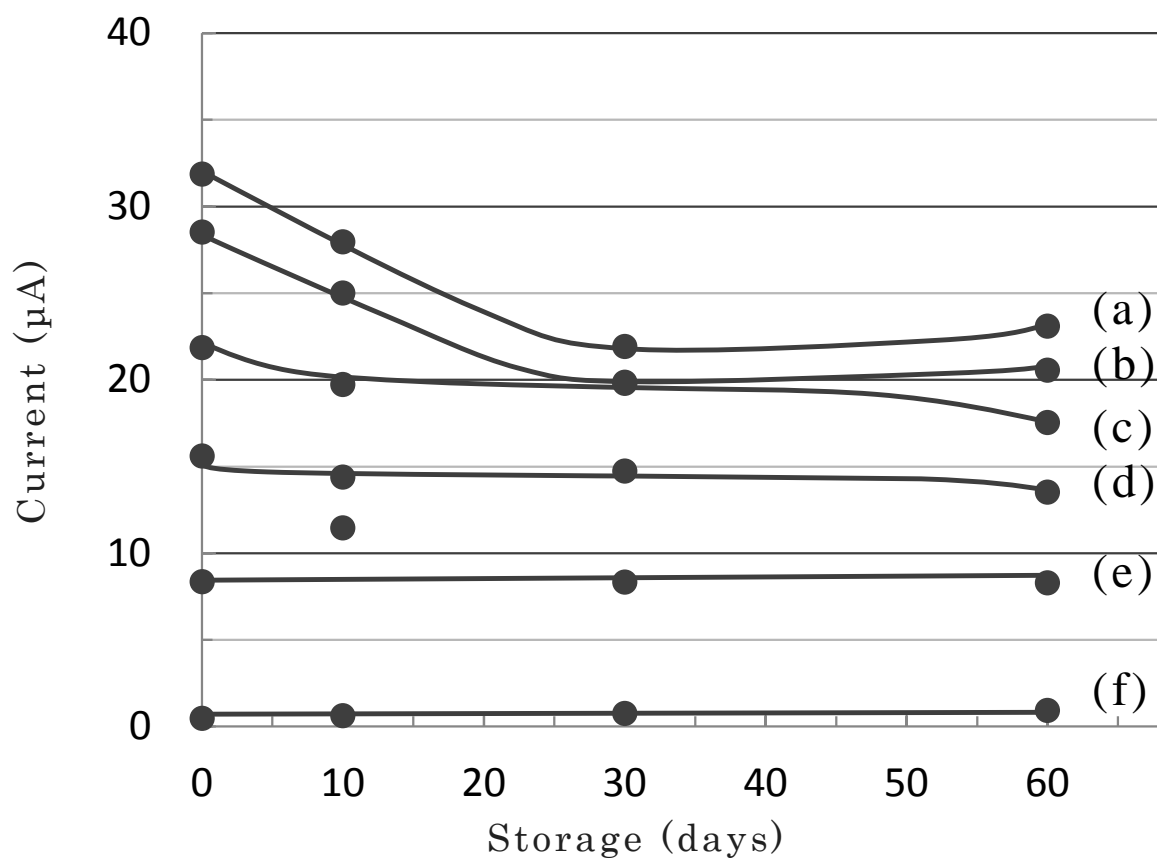


Fig.4-16 Storage characteristic of sucrose sensor (30°C). Sucrose (a)50mM, (b)40mM, (c)30mM, (d)20mM, (e)10mM, (f) 0mM. Reagent layers of the sensors were prepared with 0.6M phosphate buffer.

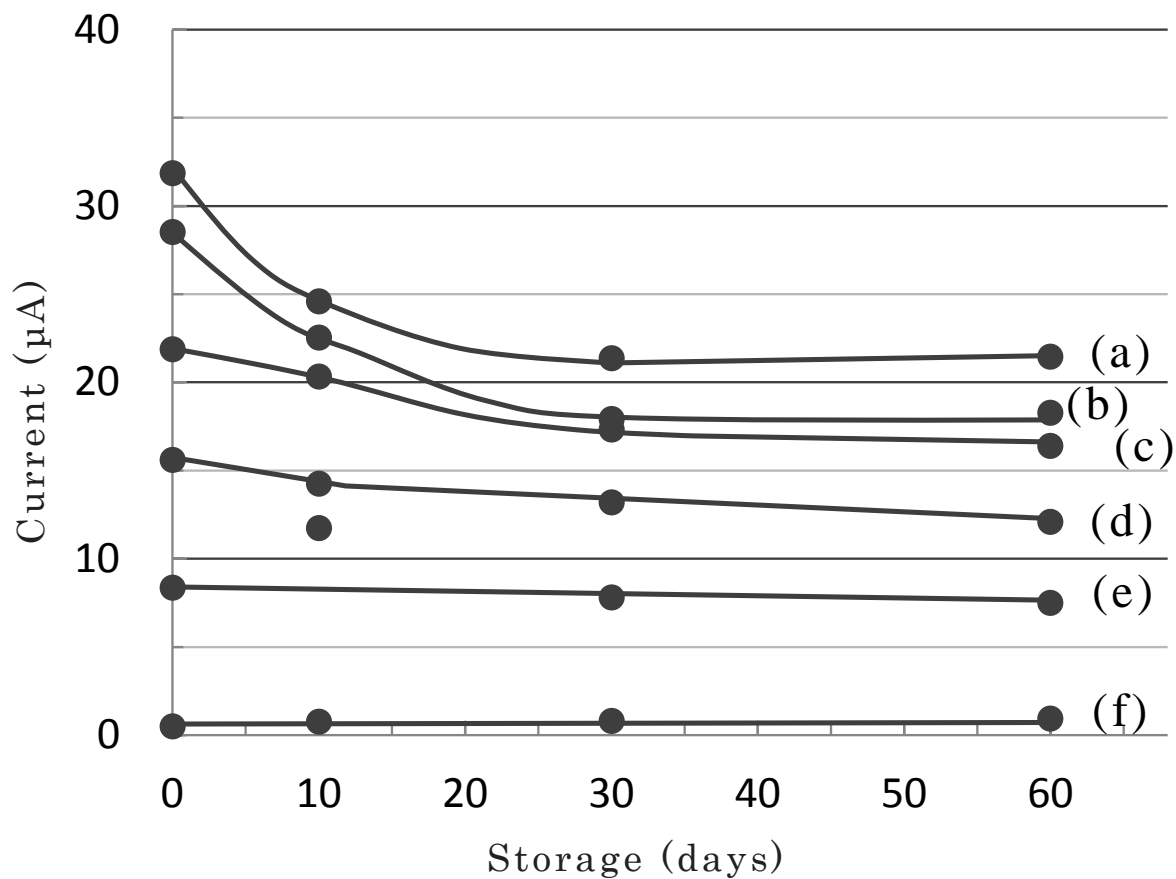


Fig.4-17 Storage characteristic of sucrose sensor (40°C). Sucrose (a)50mM, (b)40mM, (c)30mM, (d)20mM, (e)10mM, (f) 0mM. Reagent layers of the sensors were prepared with 0.6M phosphate buffer.

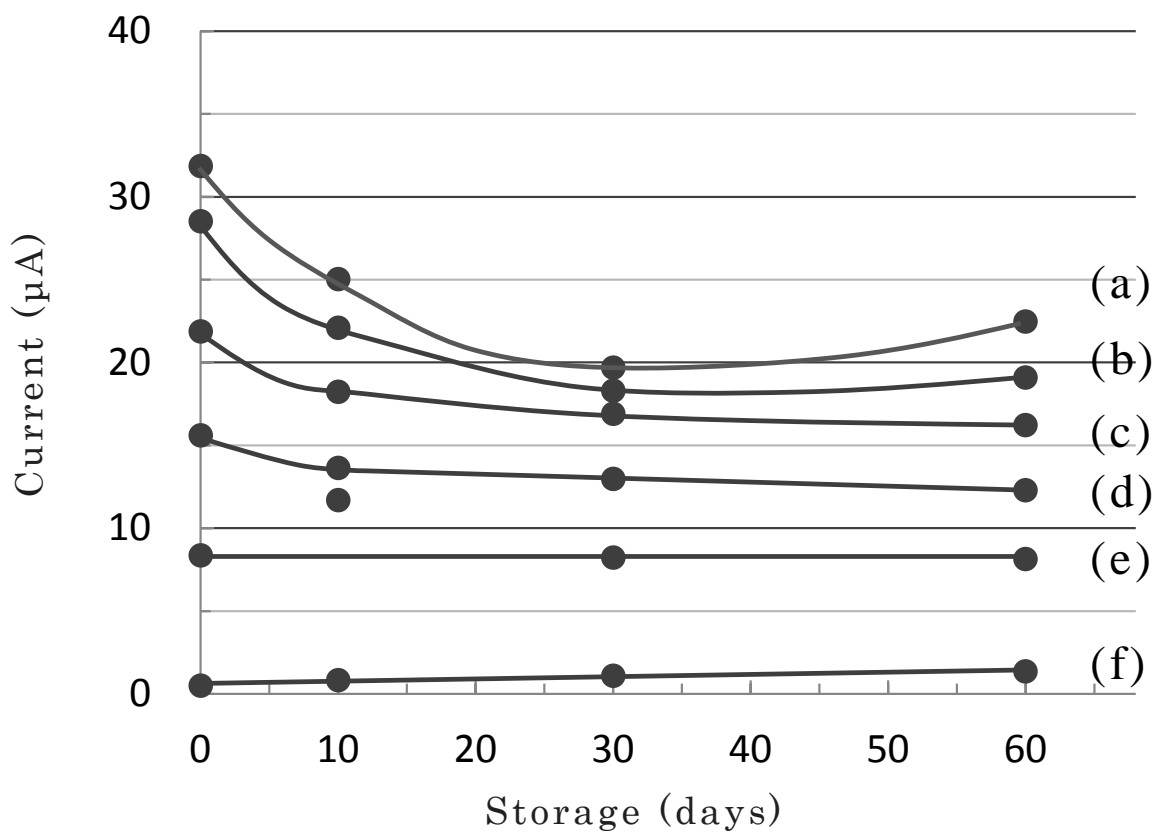


Fig.4-18 Storage characteristic of sucrose sensor (50°C). Sucrose (a)50mM, (b)40mM, (c)30mM, (d)20mM, (e)10mM, (f) 0mM. Reagent layers of the sensors were prepared with 0.6M phosphate buffer.

4.4 小括

スクロースセンサについて、作製直後から長期間保存後までの特性変化を明らかにすることによって、酵素を用いたバイオセンサが持つ「食品分析分野への応用可能性」の一端について示すことが出来た。

食品分析への応用に際しての問題として、共存する有機酸の影響などが考えられる。例えば、果汁中に含まれる有機酸の一つとしてクエン酸があるが、クエン酸 100mM を含むスクロース水溶液の pH 実測値は 2.3 であり、この pH 条件下では、スクロースセンサに用いる 3 種類の酵素はほとんどその活性を発現することが出来ない。本章で述べた試薬層中のリン酸塩の緩衝作用により、適当な pH 条件下で酵素反応が進行しており、これによって果汁中のスクロースを定量できる可能性が示された。実際にスクロースとクエン酸の混合水溶液を調製してスクロースセンサの応答特性を評価したところ、クエン酸 100mM 添加についてもクエン酸を添加していない試料液の場合と同様のスクロース濃度定量が可能であった。

共存する L アスコルビン酸やタンニン酸など、電極で直接酸化されてセンサ応答電流に正誤差を与える物質については今後の対応が必要である。例えば、スクロースを測定するための電極とは異なる位置に、酵素反応が関与しない補助電極を設ける方法等が考えられる。補助電極では、L アスコルビン酸などの酸化電流値を得ることが可能であるため、センサ応答から補助電極で得られた応答電流値を差し引くことによって、正の誤差を除去する方法である。

また、保存特性については、30℃で 2 ヶ月間保存後も大きな特性変化が見られないことが明らかとなった。一方で、試薬層中に含むリン酸緩衝塩の量を 3 倍にすると 30℃でも 1 ヶ月以内に特に高濃度域（スクロース 20mM～40mM）において特性低下がみられるなど、まだまだ改善の余地があると言える。

第 5 章 高感度化に向けた計測原理の研究

5.1 緒言

医療費の高騰が世界的に社会問題化しており、その対策の一つとして、疾病の早期発見ニーズがますます高まってきている。誰もが、健康な状態で長生きすることを望んでいるが、疾病そのものを全面的に克服することは現実的には難しい。そこで、疾病の早期発見によって、早期治療を実現することで、医療費の削減と個人の QOL (Quality Of Life) を維持していくことが重要である。

第 4 章までに示した「酵素を用いたバイオセンサ技術」は、トレーニングを受けた専門家ではなく、一般の人が使った場合にも正確な測定を可能とするような基本特性を持つことが示された。そこで、酵素を用いたバイオセンサ技術を更に高感度化させることが出来れば、一般の人が日常生活の中で疾病を早期発見するためのツールになり得るのではないかと考え、以下の研究に着手した。

バイオセンサの高感度化測定技術の中で変換ストリッピング法に注目した。変換ストリッピング法は、電気化学的な測定方法であり、くし型電極による微小電流値の増幅と、塩化銀の析出などを利用した信号蓄積とから構成される。従来研究されてきた変換ストリッピング法は溶液系を用いる方法であり、これでは一般の人が日常的に活用するのは難しい。そこで、ゲル材料を活用して、変換ストリッピング法をドライセンサ化することに取組んだ。

5.2 試薬と実験方法

5.2.1 試薬

1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)amide と、1-butyl-3-methylimidazolium chloride は東京化成工業株式会社より購入し

て使用した。メタクリル酸メチルポリマー ($M_w = 10,000$) は関東化学株式会社より購入して使用した。フェロセンカルボン酸は和光純薬工業株式会社より購入して使用した。

5.2.2 センサの作製方法

メタクリル酸メチルポリマー 50mg を氷冷しながらアセトン 1mL に溶解させた。10 mM の 1-butyl-3-methylimidazolium chloride を含んだ 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)amide 50 μ L をアセトン溶液に滴下して十分に攪拌した。その溶液 1.5 μ L を銀電極上へ電極全体を覆うようにして滴下した後、3 時間以上減圧してアセトンを除去した。以上の操作によってゲル被覆の銀電極を作製した。

図 5-1 に、試作した電極の構成を示す。絶縁性の基板上に対極と参照極を作製し、作用極としては金のくし型電極を用いた。くし型電極は、電極幅および電極間距離が共に 1 μ m (150 対)、各電極長さが 2.6mm のものをリソグラフィー法によって作製したものを貼り付けた。

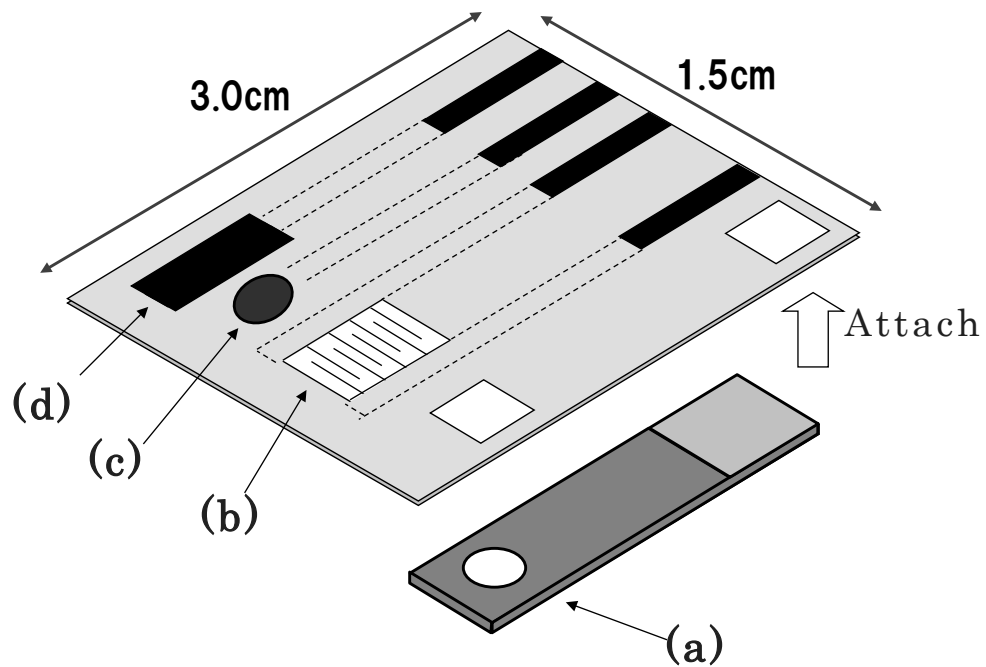


Fig.5-1 Schematic illustration of the substrate comprising (a)gel-coated Ag electrode, (b)interdigitated array microelectrode, (c)reference electrode and (d)counter electrode. The dashed lines are leads on the back side.

5.2.3 センサ応答特性の評価方法

ゲル被覆銀電極の評価方法について述べる。予め、塩素イオン源である 1-butyl-3-methylimidazolium chloride を含んだゲルと含まないゲルを調製して銀電極上を被覆し、リン酸緩衝液を滴下してからサイクリックボルタンメトリーによって電気化学特性を評価した。

次に、ゲル被覆銀電極を用いた変換ストリッピング法の評価方法について示す。図 5-1 に示した電極を用いて、ゲル被覆銀電極、くし形電極（コレクタ極とジェネレータ極を交互に配置）、対極、参照極を覆うようにして、フェロセンカルボン酸のリン酸緩衝溶液 30 μ L を滴下した。くし型電極のコレクタ極とゲル被覆銀電極をつないで電位が一定になってから、くし型電極のジェネレータ極 400mV を 60 秒間印加することで、くし型電極間における酸化還元サイクル反応を生じさせた。次にくし型電極のコレクタ極にゲル被覆銀電極だけがつながった状態にして、コレクタ極への電子供給をゲル被覆銀電極からのみとした。この時のゲル被覆銀電極の電位変化を 180 秒間計測した。この電位変化量 ($\Delta E / \text{mV}$) をセンサ応答値として用いた。

5.3 結果と考察

まず初めに、従来型の変換ストリッピング法について、図 5-2 を用いて説明する。変換ストリッピング法は、通常の電気化学測定の構成要素である、作用極、対極、参照極の組み合わせに、ハロゲン化物イオンを含む補助溶液と補助電極系を加えた基本構成であり、作用極のある溶液と補助溶液は塩橋で結ばれている。さらに、作用極にはくし型電極を用いている。

本方法の測定は、前電解ステップとストリッピングステップの 2 つから成っている。前電解ステップを説明する。例えば酵素反応によって生成した電子伝達化合物の還元体（フェロシアン化物イオンなど）は、くし型電極のジ

エネレータ極で酸化反応を受ける。同時に、くし型電極のコレクタ極では還元反応が生じて両極間に酸化還元のサイクル反応が生じる。この時にコレクタ極で必要となる電子を、補助電極におけるハロゲン化銀の析出反応から供給することが出来る。ここで析出するハロゲン化銀の量はコレクタ極における電子変化量に依存し、これは酵素反応によって生じた電子伝達化合物の還元体量にも比例関係にあるため、酵素反応の基質量を反映することになる。

次に、ストリッピングステップについて説明するが、これは上記の「析出したハロゲン化銀の量」を求めるステップである。具体的には、補助電極の電位を掃引することで析出したハロゲン化銀を電解剥離する時の電荷量からハロゲン化銀の析出量を求めることが出来る。

この反応系は、図 5-2 より溶液が不可欠である。そこで、ドライセンサ化に向けて、次の取り組みを行った。従来の変換ストリッピング法では、溶液が 2 種類存在する (図 5-2)。このうち、くし型電極が入った方は、溶液を試料液に置き換えることが可能である。第 2 章から第 4 章で述べたバイオセンサはこの方式といえる。ハロゲン化物イオンを含む補助溶液をドライ化するために、疎水性のイオン液体と疎水性高分子の組み合わせからイオン可動性のゲル材料を作製することにした。イオン液体と高分子とを混合する取り組みはいくつか報告されており¹⁸⁻²¹⁾、それらを参考にして疎水性イオン液体として 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)amide を、疎水性高分子としてメタクリル酸メチルポリマーをそれぞれ用いた。本材料は、①ゲル内部を塩化物イオン(Cl⁻)が移動可能、②ゲルと水溶液(血液など検査液)の界面を介してイオンが移動可能、③ゲルが水溶液(血液など検査液)と混じり合わない、という 3 つの条件をクリアしており、それゆえハロゲン化物イオンを含む補助溶液から塩橋の部分 (図 5-3 中、破線で囲った部分) をドライ化することが可能である。

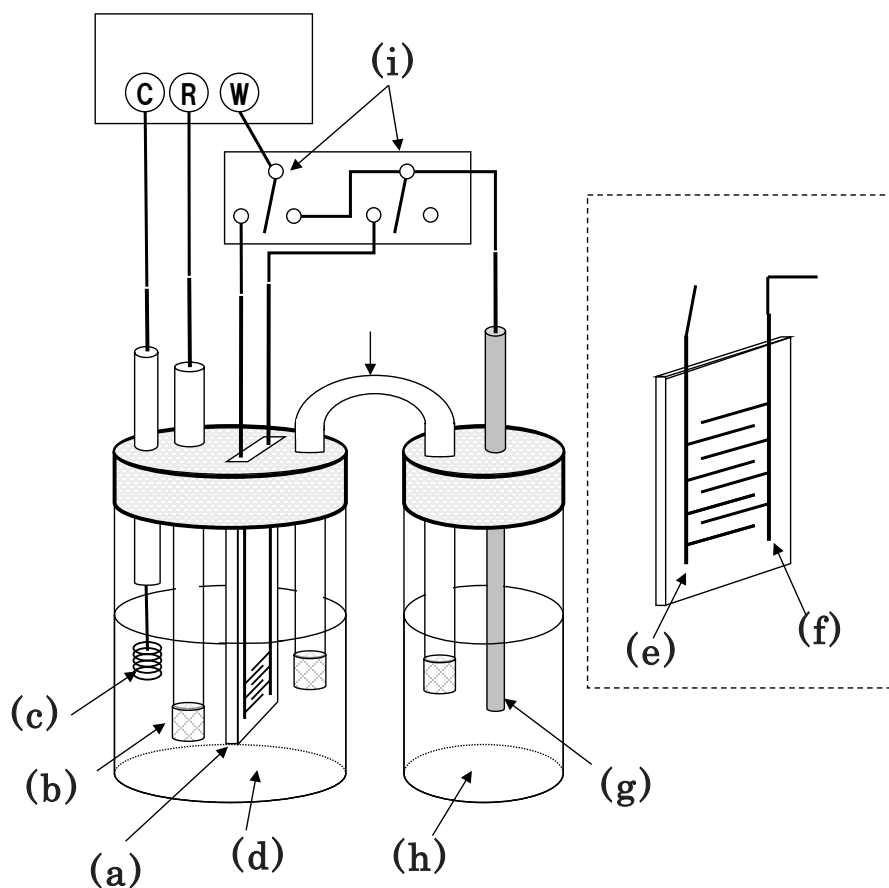


Fig.5-2 Illustration of substitutional stripping voltammetry system. (a) interdigitated array microelectrode, (b)reference electrode, (c)counter electrode, (d)sample solution, (e) generator electrode, (f)collector electrode, (g)Ag electrode, (h)halogen ion solution, (i)switch. Dashed area is interdigitated array microelectrode.

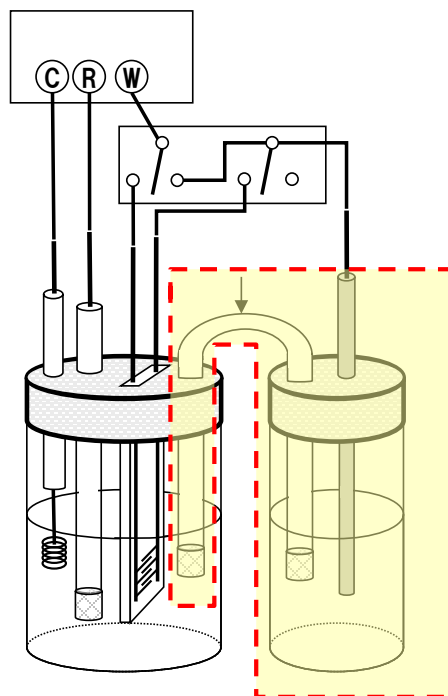


Fig.5-3 Illustration of substitutional stripping voltammetry system. Dashed area is the replacement target by gel-coated Ag electrode.

5.3.1 ゲル被覆銀電極の特性

イオン液体と疎水性高分子を用いて作製したゲル被覆銀電極についてのサイクリックボルタモグラムの図 5-4 に示す。塩化物イオンを含まない電極では図 5-4(b)のように酸化還元反応はみられなかった。一方で、10 mM の塩化物イオンを含んだゲル電極では、銀/塩化銀の酸化還元反応に基づくピークが得られた(図 5-4(a))。このことより、ゲル被覆銀電極がハロゲン化物イオンを含む補助溶液と銀電極(図 5-3 中の破線の囲み部分)の代替機能を有していることが確認できた。

5.3.2 試作ドライセンサの特性評価

ゲル被覆銀電極とくし型電極を一体化したドライセンサ(図 5-1)を用いて、フェロセンカルボン酸の濃度を変えて調製した試料溶液に対する応答特性を評価した。結果を図 5-5 に示す。フェロセンカルボン酸濃度が 10^{-10}M レベル以下になると応答値のばらつきも大きくなるが、 10^{-9}M まではセンサとして使用可能であることが分かった。これより、高感度計測の可能性が示された。

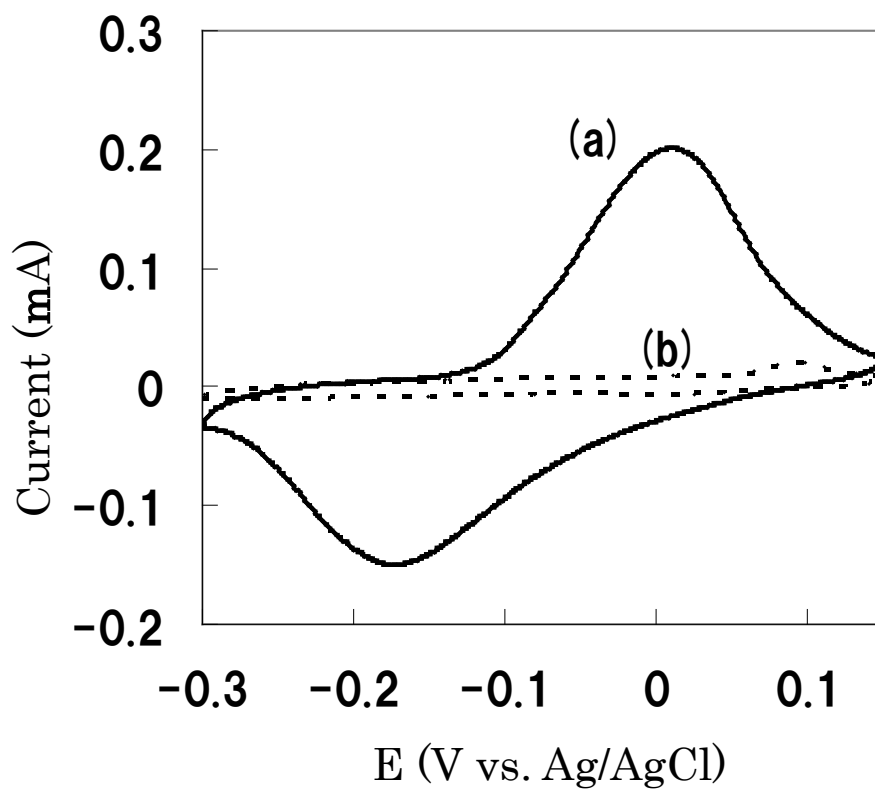


Fig.5-4 Cyclic voltammograms taken in phosphate buffer in the presence (a) and the absence (b) of 10mM 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in the gel.

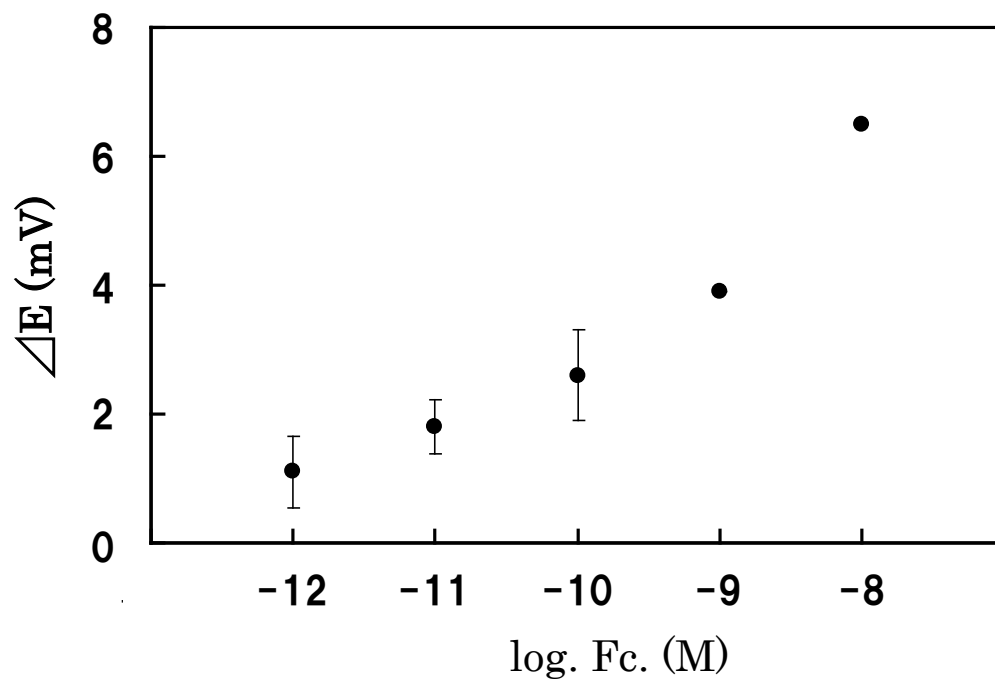


Fig.5-5 Plots of the amount of potential shifts over 30sec, starting from 20sec.
Fc: ferrocenecarboxylic acid

5-4 小活

酵素を用いたバイオセンサの高感度化技術として、変換ストリッピング法を応用した新たなセンサ構成の設計と測定手法について示した。イオン液体と疎水性ポリマーからなるゲル材料によって、従来の変換ストリッピング法における塩橋から補助電極系をドライ系に置き換えられることが分かった。

現状では、研究に着手したばかりであり今後多くの課題が出てくることが予想されるが、従来の簡易型センサでは出来なかった 10^{-9}M オーダーの高感度検出の可能性を示すことが出来た。

今後は本技術の研究を更に進めることにより、高感度な簡易計測型バイオセンサの実現が期待される。

第 6 章 総括

本研究は、酵素と電極を組み合わせたバイオセンサ技術について、主に試薬構成に関する評価検討を通じて実社会への応用可能性を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では、血糖値測定用のグルコースセンサについて述べた。酵素 *Glucose oxidase* と電子伝達化合物（フェリシアン化物イオン）に親水性高分子を添加することによって、電気化学信号のノイズが低減され、試料液中の赤血球やタンパク質成分の影響を緩和する効果について示した。更に、pH 変化に伴う酵素活性の変動を緩和する結果から、セルロース高分子マトリックスが *Glucose oxidase* の構造変化を制御していることが示唆された。

Glucose oxidase と電子伝達化合物との電子移動について、反応速度論的な評価を通じて、溶存酸素とフェリシアン化物イオンの反応性の違いを反応二次速度定数との比較から論じた。また、酸素との電子授受をしない酵素として PQQ を補酵素とする *Glucose dehydrogenase* を用いたセンサ特性評価を通じて、酸素は酵素反応過程のみに関与し、電極反応過程には直接影響しないことを示した。このグルコースセンサ用いて、全血中のグルコース計測を行い、血中妨害成分による影響度合いについて言及し、従来法との比較によって実用上は大きな問題にならないレベルであることを示した。

第 3 章では、このグルコースセンサの長期保存特性について評価検討した。実際に社会で使用されることを前提として、6 ヶ月間に亘る評価を行った。予想通り保存温度による特性変化が見られたものの、35℃以下であれば6ヵ月後も大きな特性変化がみられないことを示すことが出来た。更に、冷凍保存（-15℃）によっても特性は低下しないことが分かった。一方、40℃以上でみられた特性変化の原因に関する検討の結果、*Glucose oxidase* の活性低下と、フェリシアン化物イオンの非酵素プロセスによる還元反応の2つの因子が支配的であることを示唆する結果が得られた。

このメカニズム解析に向けて、センサ試薬層中の Glucose oxidase とフェリシアン化物イオンを層分離させた試薬多層型グルコースセンサを考案して、同じく長期保存特性試験を実施した。その結果、分離させた 2 つの化学物質 (Glucose oxidase とフェリシアン化物イオン) の相互作用によって、特性低下が生じている可能性を示すことが出来た。試薬多層型グルコースセンサについては、50℃で 2 年間保存しても初期特性をほぼ維持していることが分かった。

第 4 章ではグルコースセンサの原理を基にし、二糖類の加水分解酵素などを追加したスクロースセンサを作製、評価した結果を示した。主として食品分析分野への応用を狙いとし、試料液の pH がセンサ応答に大きな影響を与える結果を得た。この要因として、用いる酵素の酵素活性 pH 依存性が主要因であるとの仮説を立て、試薬層中に適当な pH 緩衝塩を含ませることでスクロースが再現性良く計測できることを明らかにした。本スクロースセンサについても、保存特性を評価することによって、pH 緩衝塩の添加は試料液の pH 対応には効果的であるが、一方で保存信頼性の低下要因となるという結果を得た。長期保存における特性低下のメカニズム解明の手がかりとなると考えられ、さらなる研究成果が期待される。

第 5 章では酵素を用いたバイオセンサの高感度化に向けた取り組みとして、電極部分に変換ストリッピング法を導入する研究成果について示した。通常の変換ストリッピング法は溶液系で行うものであるが、これを、イオン液体と疎水性高分子を組合せたゲル材料を用いることで、ドライセンサ化できるという可能性を得た。本研究はまだ緒に着いたばかりであり、高感度測定についても可能性が見えてきた段階で、これからの取り組みが大いに期待される。

以上のことから、酵素を用いたバイオセンサは、血中グルコース測定から食品分析へ展開可能であることが得られた。また、変換ストリッピング法をドライセンサ化するアプローチで、疾病の早期診断が可能な簡易型センサの

原理モデルを示すことが出来た。それぞれの技術については、その反応機構が十分に解明出来ていない部分が残されており、今後の研究が重要であるが、今後、多くの人々の役に立つ技術として、酵素を用いたバイオセンサ技術の可能性を示すことが出来たと考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり多くの方々にお世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究はパナソニック株式会社の研究部門で行われた研究であり、本論文は、1988年から2014年までの私の研究成果のうちから内容を選択してまとめたものです。研究成果を博士論文としてまとめるにあたって、格別なるご指導を賜りました帝京大学大学院薬学研究科教授 丸山一雄博士には、甚大なる謝意をここに表します。過去の研究成果の中から必要なデータを見極め、博士論文として仕上げていくための議論を何度もして頂いたことによって、本論文にまとめることが出来ました。これからはこの経験を基に、研究者として、また研究組織の責任者として社会の役に立つべく努力を続けて参ります。

貴重なご教示を賜りました帝京大学大学院薬学研究科教授 夏莉英昭博士、教授 高橋秀依博士、教授 金子希代子博士、教授 土屋雅勇博士に心より感謝申し上げます。ご多忙な先生方からご指導ご助言を頂いたお陰で、本論文の完成度を高めることが出来ました。本当にありがとうございました。

研究活動においては、兵庫県立大学大学院物質理学研究科教授 水谷文雄博士、准教授 安川智之博士より特にバイオセンシングの最新技術についてご指導頂いたことに感謝を致します。

会社において研究内容から業務全般についてご指導いただいたパナソニックヘルスケア株式会社顧問 南海史朗様、また、日々の研究活動を共にさせて頂いたパナソニックヘルスケア株式会社技術部長 池田信博士、技術課長 亀井明仁様、パナソニック株式会社主任研究員 湯川系子様、主任研究員 有本聡博士、パナソニック株式会社ご在職中に一緒に研究活動をさせて頂いた、

河栗真理子様、辻（藤澤）里子様、博士論文をまとめるにあたって多くのアドバイスを頂いたパナソニック株式会社主幹研究員 中山浩様に心から感謝申し上げます。皆様のお陰で日々厳しい研究生活の中で楽しい時間を持つことが出来、結果として研究が進んだと信じています。

最後になりましたが、日々の研究活動と博士論文のまとめにおいて、いろいろな面で協力をしてくれて支えてくれた妻と子供たちに心より感謝致します。

ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞と致します。

平成 27 年 春

吉岡 俊彦

論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

Kawaguri M., Yoshioka T., Nankai S.

Disposable glucose sensor employing potassium ferricyanide as a mediator., *Denki Kagaku*, **58**, 1119-1124 (1990).

Yoshioka T., Fujisawa S., Nankai S.

Disposable sucrose sensor: Effect of buffering salts in the reaction layer., *Proceeding of the symposium on Chemical Sensors II.*, **93-7**, 812-818 (1993).

Ikeda S., Yoshioka T., Nankai S.

Electrochemistry of hexacyanoferrate(III) as an electron mediator for glucose oxidase., *Denki Kagaku*, **63**, 1145-1147 (1995).

Arimono S., Kamei A., Yasukawa T., Mizutani F., Yoshioka T.

Development of highly sensitive electrochemical measurement on dry chemistry measuring electrode potential shift., *Electrochimica Acta*, **108**, 776-780 (2013)

引用文献

1. Clark L. C. Jr., Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad. Sci.*, **102**, 29-45 (1962).
2. Updike S. J., Hicks G. P. The Enzyme Electrode. *Nature*, **214**, 986-988 (1967)
3. Schläpfer P., Mindt W., Racine P. Electrochemical measurement of glucose using various electron acceptors. *Clin. Chim. Acta.* **57**, 283-289 (1974).
4. Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667-671 (1984).
5. *IDF Diabetes Atlas 6th edition*, International Diabetes Federation (2013)
6. 糖尿病治療ガイド 2014-2015, 日本糖尿病学会編 (2014)
7. 薬食発第 0302006 号 (2007).
8. ISO15197, In vitro diagnostic test systems – Requirement for blood

glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus. (2013)

9. 奥田潤, 田口忠緒. D-グルコース α および β アノマーとそのアルデヒド型の生化学, *化学と生物*, **26**, 364-373 (1988).
10. Liaudet E., Battaglini F., Calvo E. J. Electrochemical study of sulphonated ferrocenes as redox mediators in enzyme electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **293**, 55-68 (1990)
11. Taniguchi I., Miyamoto S., Tomimura S., Hawkrige F. M. Mediated electron transfer of lactate oxidase and sarcosine oxidase with octacyanotungstate(iv) and octacyanomolybdate(iv). *J. Electroanal. Chem.* **240**, 333-339 (1988)
12. Crumbliss A. L., Hill H. A. O., Page D. J. The electrochemistry of hexacyanoruthenate at carbon electrodes and the use of ruthenium compounds as mediators in the glucose/glucose oxidase system. *J. Electroanal. Chem.*, **206**, 327-331 (1986)
13. Weibel M. K., Bright H. J. The glucose oxidase mechanism. Interpretation of the pH dependence. *J. Biol. Chem.* **246**, 2734-2744 (1971).
14. Fraser D. M., Zakeeruddin S. M., Grätzel M. Towards mediator design: II. Optimization of mediator global charge for the mediation

- of glucose oxidase of *Aspergillus niger*. *J. Electroanal. Chem.*, **359**, 125-139 (1993)
15. Kulys J. J., Cenas N. K., Oxidation of glucose oxidase from *Penicillium vitale* by one- and two-electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 57-63 (1983)
 16. Kulys J. J., Buch-Rasmussen T., Bechgaard K., Razamas V., Kazlauskaitė J., Marcinkeviciene J., Christensen J. B., Hansen H. E. Study of the new electron transfer mediators in glucose oxidase catalysis. *J. Mol. Catal.*, **91**, 407-420 (1994).
 17. Matsushita K., Shinagawa E., Adachi O., Ameyama M. Quinoprotein D-glucose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41: the membrane-bound enzyme is distinct from the soluble enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, **55**, 53-57 (1988).
 18. Arimoto S., Kageyama H., Torimoto T., Kuwabata S. Development of in situ scanning electron microscope system for real time observation of metal deposition from ionic liquid. *Electrochem. Commun.* **10**, 1901-1904 (2008).
 19. Fuller J., Breda A. C., Carlin R. T. Ionic Liquid - Polymer Gel Electrolytes. *J. Electrochem. Soc.*, **144**, L67-L70 (1997).

20. Fukushima T., Asaka K., Kosaka A., Aida T. Fully Plastic Actuator through Layer-by-Layer Casting with Ionic-Liquid-Based Bucky Gel. *Angew. Chem. Int. Ed.* **117**, 2462-2465 (2005)

21. Tsuda T., Baba M., Sato Y., Sakao R., Matsumoto K., Hagiwara R., Kuwabata S. Nonvolatile RTIL-Based Artificial Muscle: Actuation Mechanism Identified by in situ EDX Analysis. *Chem. Eur. J.* **17**, 11122-11126 (2011)