

涙液に含まれるグルコースの評価を目的とした ソフトコンタクトレンズ型グルコースセンサ

A soft contact-lens type glucose sensor for evaluation of glucose in tear fluids

○平沼義貴 (日大) 初 明星 (東医歯大) 宮島久美子 (東医歯大) 荒川貴博 (東医歯大)
工藤寛之 (東医歯大) 平松秀夫 (日大) 三林浩二 (東医歯大)

Yoshitaka HIRANUMA, Nihon University, Ming Xing CHU, Tokyo Medical and Dental University,
Kumiko MIYAJIMA, Tokyo Medical and Dental University, Takahiro ARAKAWA, Tokyo Medical and Dental
University, Hiroyuki KUDO, Tokyo Medical and Dental University, Hideo HIRAMATSU, Nihon University
Kohji MITSUBAYASHI, Tokyo Medical and Dental University

Abstract:

A soft contact-lens (SCL) type glucose sensor for monitoring of tear sugar level was fabricated and tested. In this study, with the aim of noninvasive measurement of glucose, *in-vitro* characteristics of SCL-type glucose sensor was evaluated, then the sensor was placed onto the rabbit eye. Pt and Ag electrodes were formed on a PDMS membrane using a sputter deposition system. In the immobilization of enzyme, a mixture of glucose oxidase (GOD) and biocompatible PMEHE was coated onto the sensing region. The sensor characteristics was evaluated using a potentiostat in which potential of +400 mV was applied to the Pt electrode, and then the current change was monitored by adding glucose solution to the phosphate buffer. As a result, the output current of the glucose sensor was linearly related to glucose concentration in a range of 0.03 - 5.0 mmol/l. The stable output current was observed in the sensor placed onto rabbit eye.

Key Words: glucose sensor, wearable biosensor, biocompatible polymer

1.はじめに

近年、日本国内外において生活習慣と社会環境の変化ならびに高齢化に伴い、2型糖尿病の罹患者数が増加している。糖尿病は食後直後の血糖値の急激な上昇と高血糖状態の持続などの症状を伴うものの、自覚症状に乏しく、神経症状や網膜症、腎症などを併発する危険性がある。一般に、糖尿病の治療は、合併症の発症、進行を予防するために血糖値を適切に管理する必要がある。患者自身による自己血糖評価法は、採血を要する観血的な手法が広く用いられている。しかし、採血による感染の恐れや連続計測に適さないなどの課題があるため、新たな血糖値評価法が提案されている。たとえば、細胞間質液などの各種生体液を用いて血糖値を非侵襲に連続計測する機器の開発が行われている⁽¹⁾⁽²⁾。また涙液には様々な生化学成分が含まれ、その濃度変化は血液成分と相関することが報告されており、涙液中のグルコースは血糖値の約1/10程度であり、その濃度変化は約5分遅れで血糖値に追従することが知られている⁽²⁾。つまり、眼部にセンサを装着し、常時分泌されている涙液中のグルコースを連続計測できれば、採血を必要としない血糖値の連続評価が可能になると考えられる。

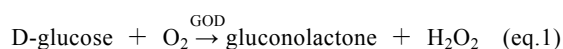
本研究では、生体適合性の機能性高分子にMEMS技術を適用することで、眼部に装着可能なソフトコンタクトレンズ(SCL)型グルコースセンサを作製し、日本白色種家兎での涙液グルコースモニタリングによる連続的な血糖評価応用への可能性を調べた。

2.実験

2-1 SCL型バイオセンサの構築

ソフトコンタクトレンズ(SCL)型グルコースセンサは glucose oxidase(GOD)の触媒反応によって生成される過酸化水素を電気化学的に計測することで、グルコース濃

度を定量する(eq.1)。



本センサは、polydimethyl siloxane(PDMS)膜上にPtならびにAg/AgCl電極が形成され、その感応部にグルコース酸化GODが固定化されたフレキシブル電極とPDMS製のソフトコンタクトレンズが接合された構造となっている。フレキシブル電極の作製ではまず、シリコンウエハ上にスピコート法にて厚さ80 μmのPDMS膜を作製した。次に、Pt、Agのパターンを形成したTi製のステンシルをPDMS膜上に貼付し、スパッタ法にてPt電極(t=200 nm)及びAg電極(t=300 nm)をパターン成膜して薄膜電極を形成した。次に、電極感応部、端子部以外にPDMSを塗布し乾燥させ、感応部以外を絶縁化処理した後、Ag電極を塩化処理にてAg/AgCl電極とした。その後、別途キャスト法にて作製したPDMS製のSCL(ベースカーブ8.6)とフレキシブル電極を、PDMSをバインダーとして接合し一体化することでSCL型センサとした。最後に、電極感応部上に生体適合性高分子であるPMEH (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)と2-ethylhexylmethacrylate (EHMA)の共重合体)とGODの混合溶液を塗布し、4°Cで2時間乾燥させることでGODを包括固定化し、SCL型グルコースセンサとした(Fig.1)。

作製したセンサの*in-vitro*における特性評価では、リン酸緩衝液(pH7.4, 20 ml)にセンサ感応部を浸漬し、ポテンシオスタットにてPt電極に+400 mV(vs.Ag/AgCl)の定電位を印加してグルコース濃度に対する出力電流変化を計測することで、応答性や定量性、再現性などの性能を調べた(Fig.2)。

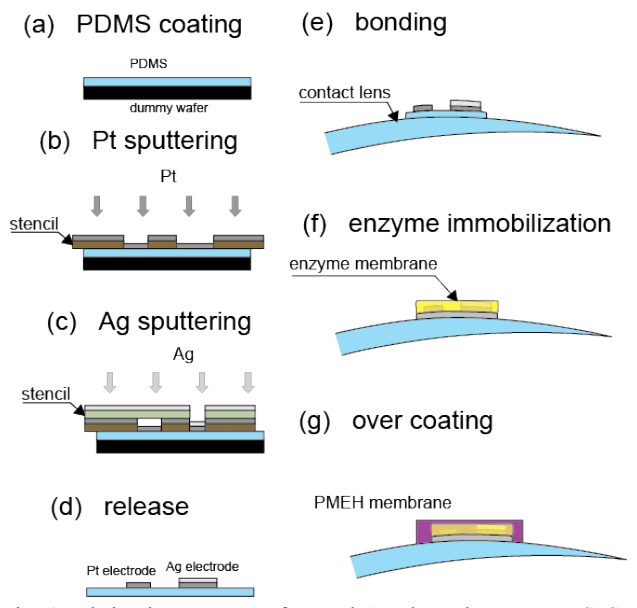


Fig. 1 Fabrication process of Pt and Ag electrodes on PDMS-CL

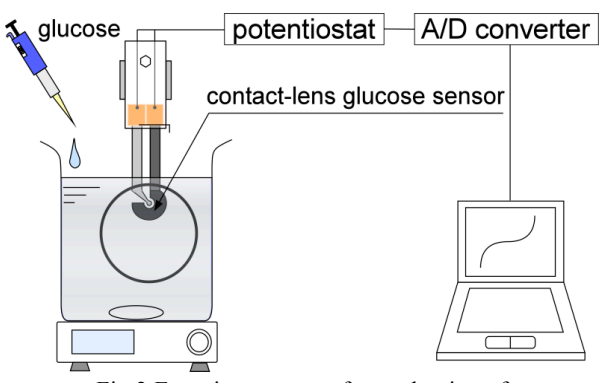


Fig.2 Experiment set up for evaluation of SCL-type glucose sensor

2-2 SCL型グルコースセンサによる涙液グルコース計測

前臨床実験として、日本白色種を押田式固定器に固定し、作製したセンサを装着し、定常状態での涙液グルコース計測および経口グルコース負荷試験(OGTT)を行った。測定では、作製したセンサを家兎の眼部に装着した後、ポテンシオスタットにてPt電極に+400 mV(vs.Ag/AgCl)の定電位を印加して、定常状態における涙液糖計測の可能性を調べた。またOGTT(経口ブドウ糖負荷試験)では、作製したセンサを家兎の眼部に装着し、安定な出力値を確認した後、家兎の体重1 kg当たり1 gとなるように調整したグルコース溶液を家兎に経口投与し、涙液グルコースの濃度変化をモニタリングした。なお血糖値との比較のため、血液を耳介静脈から採血し、血糖値の変化(投与前、投与後0、15、30、45、60分)を市販の血糖値評価キットを用いて評価した。

3.結果及び考察

3-1 SCL型バイオセンサのin-vitroにおける特性評価

作製したSCL型バイオセンサは柔軟性に富み、曲げ応力による変形などに対しても薄膜電極の剥離や、クラックの形成はみられず、電極とPDMSとの高い密着性が確認された。In-vitroにおける特性を調べたところ、グルコースの負荷に伴う著しい出力電流値の増加と安定値が観測された。得られた出力値をもとにして定量特性を調べたところ、報告されている涙液グルコース濃度(0.05 - 0.36 mmol/l)を含む、0.03 - 5.0 mmol/lの間でグルコースの定量が可能であつ

た(Fig.3)。

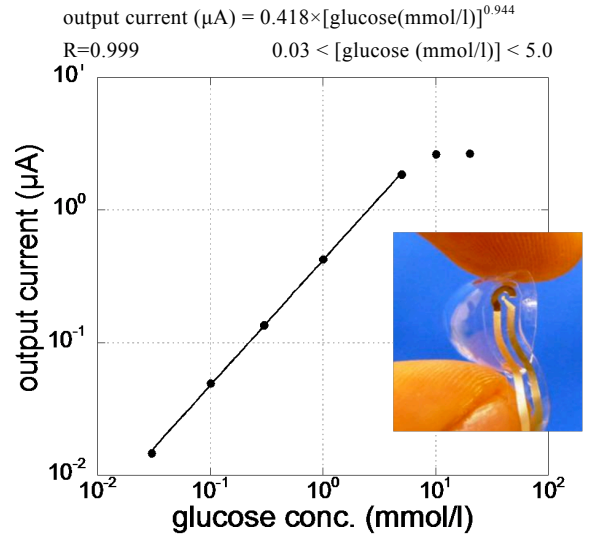


Fig.3 Calibration curve of the SCL sensor for glucose

3-2 SCL型グルコースセンサによる涙液グルコース計測

本センサを家兎の眼部に装着し、定常状態での涙液グルコース計測を行った結果、比較的安定した出力計測が可能であった。出力電流値をもとに、検量線よりグルコース濃度を計測した結果、家兎の涙液グルコース濃度は約0.14 mmol/lと算出され、既報値と矛盾しない結果が得られた。さらに、経口グルコース負荷試験を実施したところ、出力電流値はグルコースの経口投与後、ただちに上昇し、血糖値の変化に対し、涙液グルコース濃度は約8分の時間遅れをもって追従することが観察され、血糖値を連続的に評価することが可能であることが示唆された。また、実験前後にて日本白色種家兎の眼部の微視観察を行った結果、炎症などの障害は観察されなかった。以上の結果より、涙液グルコース計測による血糖値の非侵襲な連続評価の可能性が示唆された。

4.まとめ

機能性高分子にMEMS技術を適用することでSCL型グルコースセンサを構築した。作製したセンサは涙液グルコースを含む0.03-5.0 mmol/lの範囲でグルコースの定量が可能であった。本センサを日本白色種家兎の眼部に装着した結果、安定な出力電流値が得られ、涙液中のグルコースを計測可能であった。また、OGTTに伴い、涙液グルコースの濃度変化にモニタリングが可能であった。今後は、本センサを用いて涙液グルコースの動態を調べていく予定である。

5.参考文献

- (1)Badugu R. et al., A glucose sensing contact lens: A non-invasive technique for continuous physiological glucose monitoring, Journal of Fluorescence, vol.13, pp371, 2003
- (2)Alen P. et al., Miniaturized fiber-optic hybrid sensor for continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue, Sensors and Actuators B, vol.122, iss.1, pp.60-68, 2007
- (3) Jin Z. et al., Determination of Glucose in Submicroliter Samples by CE-LIF Using Precolumn or On-Column Enzymatic Reactions. Anal. Chem., vol 69, pp.1326-1331, 1997