

血清中での尿酸計測を目指したバイオセンサの出力向上に関する研究 Research on Improving the Output of Biosensors Aimed at Measuring Uric Acid in Serum

佐藤瑞基¹⁾

指導教員 荒川貴博^{1,2)}

1) 東京工科大学大学院工学研究科サステイナブル工学専攻

2) 東京工科大学工学部電気電子工学科

Key words: ウェアラブル, 尿酸, ウリカーゼ, キトサン, 人工血清

1. 研究背景

現代社会において、高齢化や糖尿病、肥満の増加に伴い、糖尿病性足潰瘍などの慢性創傷が増加している⁽¹⁾。また世界中で外科手術の件数が増加しており、それに伴う創傷管理の頻度も増加している。世界中で約 670 万人が慢性創傷に悩まされている。慢性創傷は患者の創傷被覆材の交換や入院の長期化による医療費負担の増加や Quality of Life に影響を与えている。そのため創傷部位の治療技術の進化、簡易的なモニタリング、低価格化が求められており、そのような機能を持った生体に装着可能なウェアラブルセンサが求められている。様々な化学成分の中で、尿酸は先行研究で示されているように創傷の重症度と相関性がある⁽²⁾ことから、バイオマーカーとして注目されている。

本研究では、創傷部位の状態の評価が可能なウェアラブルの創傷部位の状態計測バイオセンサ「wound sensor」の作製を目的としている(Fig. 1)。創傷部位の評価のために、尿酸を測定するためのバイオセンサを作製した。wound sensor を作製のため、まずポリエチレンテレフタレート(PET)基板上に炭素及び銀の導電性塗料を用いて電極を作製した。PET

基板に炭素作用電極、銀参照電極を作製し、作用電極上に尿酸酸化酵素(ウリカーゼ)を固定化し、バイオセンサを作製した。作製したバイオセンサの尿酸計測の応答性や連続計測の結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 PET 基板への炭素・銀電極の作製

PET 基板(1.5 mm × 2.5 mm, 厚さ 1 mm)上に、カッティングマシン(CAMM-1 GS-24, Roland)を使用して作製した電極パターンのシールを貼り付け、参照電極として銀(DOTITE XA-3513, Fujikura Kasei Co.)を塗布する。その後ホットプレート(RSH-1DN, AS ONE)を用いて 65°C で 30 分加熱して、電極を形成する。次に作用極として炭素(DOTITE XC-3050, Fujikura Kasei Co.)を電極の型を利用して塗布し、ホットプレートを用いて 65°C で 30 分加熱して炭素電極を作製した。作製した銀電極を塩化処理し、塩化銀電極とした。

2.2 尿酸バイオセンサの作製と特性評価実験

尿酸バイオセンサは電極の感応部上にカッティングシートを用いて尿酸酸化酵素(Uricase), 1 mg(3.40 U)と生体適合性材料の多糖類の一種であるキトサン(C₆H₁₁NO₄)_n, 3wt%, 10 μL の混合溶液を炭素電極部分のみを露出させ塗布し、その後、冷暗所で 18 時間乾燥させて作製した。作製した尿酸バイオセンサの特性評価を行った。PB(50 mM, pH7.0) 50 mL の入ったビーカー内に +0.8 V の電位を印加し、尿酸濃度が

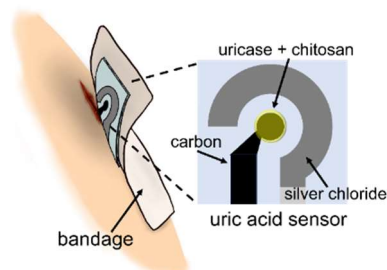


Fig. 1 皮膚に装着する創傷部位モニタリング用尿酸センサーの模式図

500 nM, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M と変化するように、3 分ごとに尿酸溶液 ($C_5H_4N_4O_3$) を滴下して出力電流値を測定した。

2.3 ウシ血清を用いた尿酸計測

実際の生体計測に模した環境での評価として、ウシ血清アルブミン(BSA, 7.5wt%, pH7.0) 50 ml の入ったビーカー内で尿酸の計測を行った。また、リン酸緩衝液中とウシ血清アルブミン溶液中で、CV 特性の評価を行った。まずリン酸緩衝液中で CV 特性を計測したのち、ウシ血清アルブミン溶液中で CV 特性の計測を行い比較した。次に、ウシ血清溶液中での出力向上のために、作用電極をプルシアンブルーでコーティングした。プルシアンブルー溶液($C_{18}Fe_7N_{18}$, 1.16 mM) を 10 μ L 作用電極に滴下法と電解めっき法による出力比較を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 キトサンを用いた尿酸センサの特性評価

カッティングシールを用いたことにより、厚さ約 6 μ m のキトサン膜の作製に成功した(Fig. 2)。作製した尿酸センサの出力を Fig. 3 に示す。尿酸 100 μ M に対し、約 320 nA の出力電流が得られた。出力電流の平均値から定量性を評価したところ、ヒトの創傷部位の尿酸濃度(220~750 μ M)を含む、2.5~100 μ M で高感度計測が可能であった。

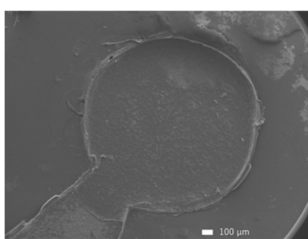


Fig. 2 SEM を用いて観察したウリカーゼ固定化後の電極外観

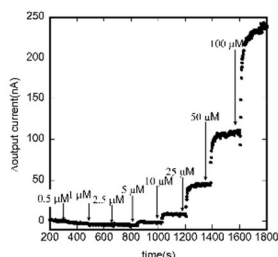


Fig. 3 尿酸センサの出力応答

3.2 人工血清下での尿酸計測

ウシ血清アルブミン溶液中で尿酸計測を行った際の出力応答は、尿酸溶液の 500 nM~100 μ M の滴下に対し、0.12 nA ほどの出力であった。これはリン酸緩衝液中で計測を行った際の 1/100 以下の出力であり、原因として血清中に含まれるタンパク質が酵素反応

の阻害や電極表面への吸着による出力電流の低下が考えられる。

3.3 プルシアンブルーを用いた電極コーティング

Fig. 4, Fig. 5 にプルシアンブルーを滴下と電解めっきでコーティングした際の人工血清下での CV 特性の出力比較を示す。プルシアンブルーを電解めっきした電極において高い出力電流がみられた。これはプルシアンブルーには酸化還元反応を促進する効果があるためである。この電極を尿酸センサに用いると、尿酸の酸化によって得られる過酸化水素を触媒的に還元することで、低電位での動作が可能になると考える。低電位での動作は、他の電気化学的な分子の干渉を最小限に抑えるのに役立つため、電極の特異性と選択性を高め、バイオセンサの性能向上につながると考える。

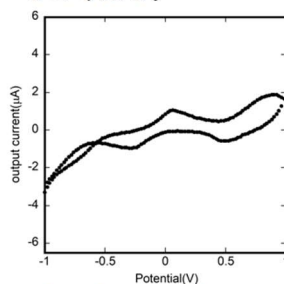


Fig. 4 プルシアンブルー滴下後の電極の CV 特性

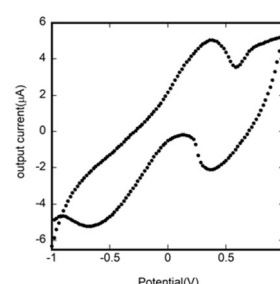


Fig. 5 プルシアンブルー電解めっき後の電極の CV 特性

4. 結言

本研究では、酵素固定化材料としてキトサンを用いた尿酸バイオセンサを作製し、特性評価を行った。カッティングシートを用いて酵素膜を薄く塗布することにより、出力電流値と安定性の点で優れた性能を示した。また電極をプルシアンブルーで電解めっきすることによりタンパク質の影響を受けにくい電極を作製した。今後はこの電極を用いての人工血清下での尿酸計測や、鶏肉の表面で計測を行うなど、実際の生体計測の環境に合わせて実験を行っていく。

参考文献

- [1] C.K. Sen et al., Longaker, *Wound Repair Regen.* 17 (2009) pp.763–771.
- [2] P. Kassal et al., *Electrochem commun*, vol. 56 (2015)pp. 6–10