糖尿病患者の「汗」計測による常時容態管理システムの開発

Development of diabetes condition managing system by sensoring sweat ketone using a novel enzyme electrode

2041029

研究代表者　沼津工業高等専門学校 制御情報工学科　講　師　横　山　直　幸

［研 究 の 目 的］

糖尿病の国内患者数は 316 万 6000 人（厚生労働省 H26 年調査）であり増加傾向にある。これら糖尿病患者の多くは，食物から摂取した糖をエネルギとして利用することができないため，代替エネルギとして脂肪酸を分解してケトン体を生成してエネルギとする。本代謝系により過剰に生成されたケトンが血液中に高濃度で残留し，血中ケトン濃度が閾値を超えると，糖尿病性ケトアシドーシス（症状：腹痛・吐き気・低体温・意識障害・昏睡）となる。本症に対しては輸液による血液希釈が基本的治療方針であり，早期発見および予防が重要である。

ケトアシドーシスを予防するためには定期的な血中ケトン濃度計測が有効であるが，現在主流である採血による血液検査は痛みや感染症，皮膚硬化などの医学的課題のみならず，経済的負担が大きい。このため，尿を用いた間接計測が検討されているが，本測定方法は尿中のアセトンを標的とした化学反応を計測原理とするため選択性が低く，疑陽性が課題となっている。また，尿などの体液として湧出する低濃度のケトン体に対して計測精度の向上が見込めない。

本研究では，固定化酵素リアクタと過酸化水素電極を用いることで，汗の中に含まれるケトン体（3-Hydroxybutyric Acid,3-HB）を高精度に定量できる計測システムと，汗腺から湧出する汗の濃度を計測する電極を開発し，計測精度に対する実験評価を行った。

［研究の内容，成果］

1. ケトン濃度計測システム

カラム内にて 3-HB 脱水素酵素（3-HBDH）と還元型 NAD 酸化酵素（NADHOD）を共同固定化し，NAD および FAD を微量添加した緩衝液を充填した固定化酵素リアクタと，H_2O_2 選択透過膜にて隔離した Pt 電極と Ag/AgCl 参照電極からなる過酸化水素電極を試作した（図 1）。以下①，②の反応は酸化還元反応であるため，緩衝液には pH を調整したリン酸緩衝液を用いた。

［3-HBDH による酵素反応］

3-HB＋NAD →アセト酢酸 ＋NADH　①

［NADHOD による酸化触媒反応］

$NADH + O_2 \rightarrow NAD + H_2O_2$　②

［H_2O_2 電極で生じる電気分解］

$H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$　③

以上の反応を連続的に発生させ，ポテンシオスタットにより 0.6-0.7［V］の一定電圧を印加した過酸化水素電極（Pt）に流れる電流値をオシロスコープにより定量した。

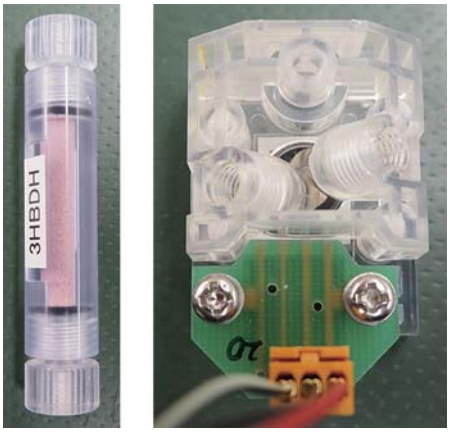

図1　（左）酵素リアクタ（右）過酸化水素電極

2. 汗濃度電極

汗が含有するイオン濃度と導電率の関係を利用して，汗濃度を定量する電極を試作した。BAS 社の導電率測定用電極（図 2）の電極間距離を 30 [μm] に調整し，電極間に流入した汗の導電率を 2 端子法により定量するシステムとした。直流安定化電源を用いて，端子間に 3 [mA] の電流を流し，電圧値の測定を行った。

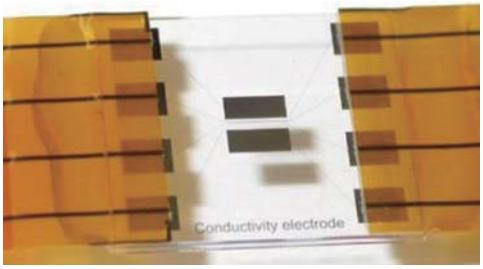

図2　汗濃度電極

3. 計測システム構成

計測システムの概要を図 3 に示す。本システムの流路は内径 ϕ0.5 [mm] のシリコンチューブで構成し，連続流ポンプ BFPU5（王子計測機器）により緩衝液の還流を行った。計測試料（ケトン含有汗）は流路途中に設置したマニュアルインジェクタ BFM-300B（同）からマイクロピペット（30 [μL]）を用いて注入した。また，酵素リアクタと過酸化水素電極，汗濃度電極は空気式恒温槽 BFTS2129（同）内に設置し，電気化学反応における温度管理を行った。計測試料の撹拌と回路流速の安定化を目的に，恒温槽の入口・出口にそれぞれミキシングコイルと末端背圧コイルを設けた。

4. 計測試料および評価方法

酵素リアクタおよび 2 つの電極の性能評価を目的に，ケトン体（3-HB）と汗イオン（NaCl）の濃度を調整した数種類の試薬 30 [μL] を，ポンプ流量 1.0 [mL/min] で還流している計測回路内に注入し，「ケトン濃度－H_2O_2 電極起電流」と「イオン濃度－電気抵抗値」の関係をプロットした。

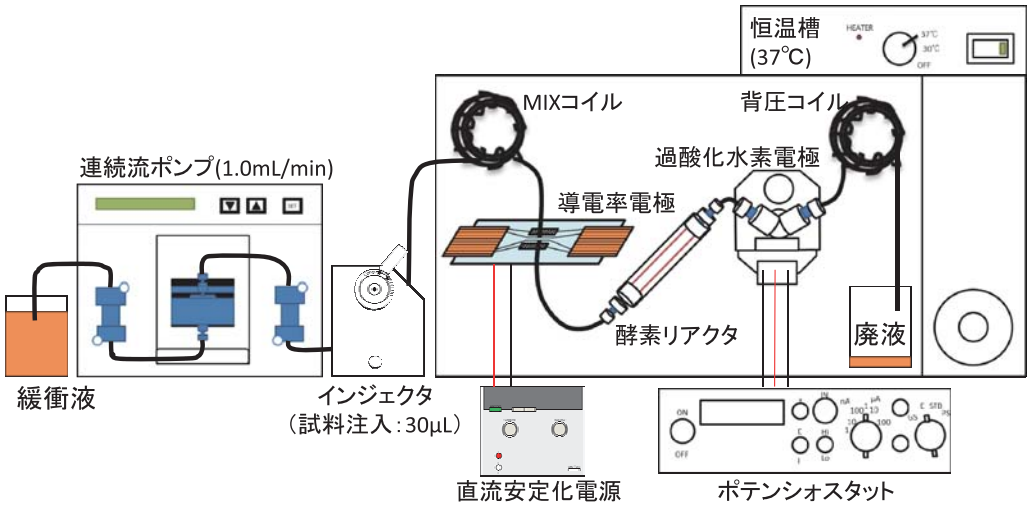

図3　ケトン計測システムの概要

5. 実験結果および考察

図 4 にケトン体（3-HB）濃度と過酸化水素電極の Pt 電極に発生した起電流の計測結果を示す。本実験では，酵素リアクタにおける酵素活性の持続期間について評価するため，実験は 1 週間刻みで合計 12 回行った。なお，酵素リアクタを含む計測システムは，3 か月間常温で放置し，回路に充填する緩衝液のみ，実験毎の入れ替えを行った。

実験の結果，ケトン濃度：5.0 [mM] の計測において最も高い標準偏差（1.6 [nA]）が観察されたが，酵素の放置日数との相関はなく，実験手技と試薬濃度の誤差による結果と考察された。この結果から，本研究にて新規に開発した酵素リアクタおよび過酸化水素電極を用いたケトン体計測システムは，3 か月程度の酵素活性と計測精度を維持できる可能性が示唆された。また，糖尿病において医療措置を要する血中ケトン濃度である 1.5 [mM] の前後において，高い測定精度を有していると考えられた。

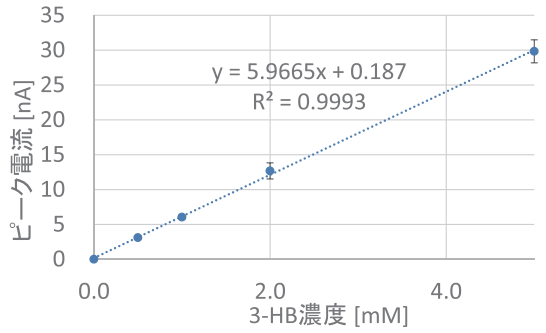

図 4　ケトン体（3-HB）濃度と起電流

図 5 に試料注入後から過酸化水素電極上で電圧が生じるまでに要した時間を示す。グラフより，ケトン濃度と酵素リアクタにおける反応速度との間に相関は見られなかった。実験では 100 [mM] 以上の高濃度ケトンの計測も行ったが，同様の結果であった。

図 6 に汗濃度計測の結果を示す。導電率計測電極を用いて試作した汗濃度センサにおける電気抵抗値は，平均的な汗中のナトリウム濃度である 38.5–77 [mM]，血液中のナトリウム濃度の 115.5–154 [mM] に対して線形相関（R^2 = 0.94）を示した。

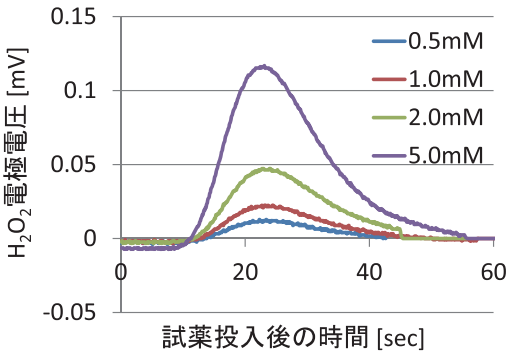

図 5　試薬注入から定量までの時間

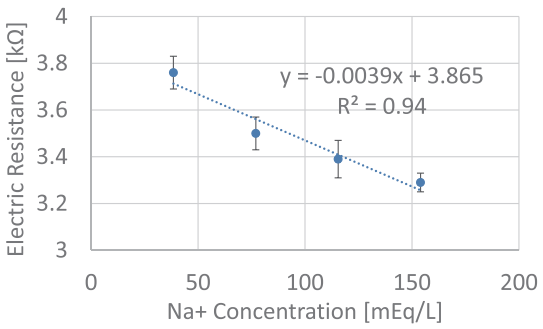

図 6　Na イオン濃度と電気抵抗値

ケトン体とナトリウムを混合した試料を用いて行った計測の結果，本システムは，試料中に含有するケトン濃度とナトリウム濃度を高い精度で測定できることがわかった。また，酵素リアクタにおける酵素反応には即時性があり，酵素の活性期間も常温で 3 か月以上であることが証明された。また，ケトン濃度の違いによる汗（ナトリウムイオン）濃度の計測結果と，汗濃度の違いによるケトン濃度の計測結果には相互依存性は観測されなかった。

［今後の研究の方向，課題］

本研究にて開発を行った「酵素リアクタと過酸化水素電極を併用したケトン体計測法」は，酵素触媒反応を用いているため高い選択性と反

応速度を有しており，3-HBDH と NADHOD を共同固定化した酵素リアクタの酵素活性も 3 か月以上の長期耐久性を有することが判った。また，酵素反応により生じる過酸化水素の濃度を電気化学的に定量する多段階計測としていることにより，3-HB と NAD の反応のみから生じる起電力を増幅し，高精度に定量できる方法となっている。また過酸化水素電極については，医療現場で一般的に使用されている過酸化水素水を用いた電極のキャリブレーションも可能である。本計測法を用いることで，血液中ケトン濃度をさらに高精度に計測することが可能となり，血液成分が希釈されている体液（尿・汗）を用いた間接的な血中ケトン濃度計測も可能となると考えられる。

他方，体温や自律神経活動により日内変動する体液の濃度を定量するために考案した「汗濃度電極」は，試料の導電率からナトリウム濃度を計算し，ナトリウム濃度から汗濃度を推定するものである。本研究では，ケトン体と生理食塩を純水で希釈したものを実験試料として用いたが，体液中に含まれる他のイオンが導電率に対して及ぼす影響については考慮できていない。また，本研究のテーマである“糖尿病患者の「汗」計測による常時容態管理システム”を実現するためには，30 [μL] の汗を容易かつ精密に採取し，計測システムへ注入するための方法が必須となる。これらの点が今後の課題である。

［成果の発表，論文等］

Biophysical Society Annual Meeting における本研究成果に関する発表を計画している。