

口腔内における唾液中グルコース連続計測のための マウスピース型バイオセンサの開発

Development of mouthguard biosensor for monitoring of saliva glucose in oral cavity

2161001



研究代表者

東京医科歯科大学
生体材料工学研究所

講師

荒川 貴博

[研究の目的]

近年、食生活の多様化や生活環境の変化により、生活習慣病の患者数が増加している。その中でも、糖尿病は日本においては予備群も含めて2,000万人以上、世界においては有病者のみでも約3億8,200万人（2013年現在）と報告されている。糖尿病は膵臓のインスリン作用の不足により慢性的な高血糖状態となる疾患であり、網膜症や腎症、神経障害を始めとする多くの合併症を引き起こす可能性がある。そのため、罹患者は食事療法や運動療法などの他、血糖計測に基づくインスリン療法などにより自己の血糖値を適切に管理する必要がある。

現在、血糖値の管理には、自己血糖測定器（Self monitoring of blood glucose, SMBG）が広く用いられているが、採血を必要とする侵襲的な方法であり、痛みや感染症の恐れといった負担を伴う。今後の血糖値管理において、非侵襲かつ無拘束な血糖値のモニタリング技術が求められている。一方、非侵襲な血糖値の連続評価では、血液を直接調べるのではなく、血糖値と相関関係のある各種体液成分を指標とする方法が多数報告されている。唾液中に含まれるグルコースについてもその濃度と血糖値の相関関係が報告されている。既報では健常者と糖尿病患者を対象に、空腹時における経口ブドウ糖負荷試験を行い、サンプリング測定により唾液中グ

ルコース濃度と血糖に相関関係があることを示し、血糖値評価における唾液中グルコースの有用性を示唆した。しかし既報の計測法は、口腔からサンプリングした唾液を分析するものであり、唾液の分泌に伴うグルコースの濃度変化の連続的な計測を実現できていない。その他の唾液成分を対象とした計測においても、サンプリングや計測前の処理を要するため、連続的な変化を計測する技術は報告されていない。

そこで本研究では、血糖値との相関関係が報告されている唾液中グルコースを非侵襲かつ無拘束に連続計測することを目的とし、口腔内への装着が可能なマウスピース型バイオセンサを開発した。また独自設計したマウスピース内蔵型のテレメータを開発し、歯科用ファントムでの測定を行った。

[研究の内容・成果]

1. マウスピース型グルコースセンサの作製

マウスピース型バイオセンサは、口腔への装着を目的としていることから、生体適合性のある市販のマウスピース材料から成型したマウスピースに、Micro Electro Mechanical System (MEMS) 技術を施し薄膜電極を成形し、電極感応部には MPC と 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA) の共重合体 PME (poly (MPC-co-EHMA)) の機能性高分子を用い、グルコース

の認識素子としてグルコース酸化酵素 (glucose oxidase, GOD) を電極表面に固定化し作製した (図1)。

市販のマウスピース材料に対して、センサの電極を構成する Pt 及び Ag 薄膜を生体適合性デバイス用成膜装置 (E-230, ANELVA) にて成膜した。

マウスピース材料上に、Pt 作用電極 ($t=200$ nm), Ag/AgCl 参照/対電極 ($t=300$ nm) が形成されたものである。薄膜電極の成膜では、まず各電極パターンを形成するためのシルステンシルを作製した。ポリプロピレンシートにカッティングマシン (CAMM-1 SERVO GX-24, Roland DG) を用いて、Pt 電極用及び Ag 電極用のパターンを切り出した。

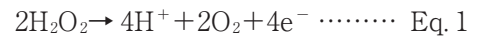
作製したシルステンシルをマウスピース材料に貼付し、薄膜電極を生体適合性デバイス用成膜装置にて Pt, Ag の順序で成膜した (図2)。セン

サ感応部と端子部以外を Polydimethylsiloxane (PDMS) で絶縁化した後、0.1 mol/l の塩酸中に、Pt 板、本センサの Ag 電極をそれぞれ浸漬し、塩化処理を行い、グルコースセンサ用の電極を作製した。酵素の固定化では、生体適合性ポリマーである PMEHE を使用した。PMEHE 溶液 20 μ l と GOD 2.0 mg の混合溶液を用いた。この混合溶液を電極の感応部上に 2 μ l 塗布した後、4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫で 2 h 乾燥させて GOD を電極感応部上に包括固定化した。

2. マウスピース型グルコースセンサの評価

Pt 電極 (作用電極) に +400 mV (vs. Ag/AgCl) の定電位を印加した本センサを溶液中に浸漬し、電極表面上に過酸化水素が拡散することで、Eq. 1, 2 の反応が起こり、過酸化水素に応じた出力電流値を計測できる。

Pt 電極:



Ag/AgCl 電極:



また、電極感応部上に固定化した GOD は、グルコースと酵素の存在下で過酸化水素とグルコノラクトンを生成する。この触媒反応によって生じる過酸化水素を検出することで、グルコース濃度を計測する (Eq. 3)。

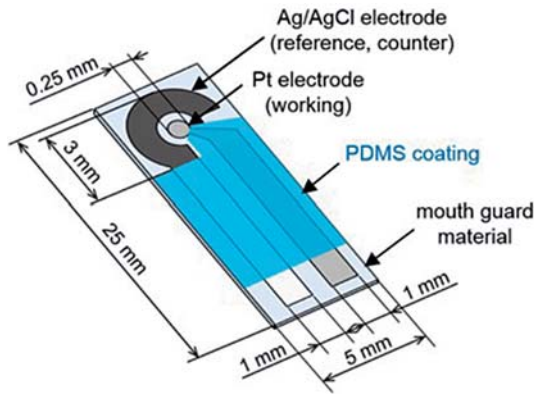
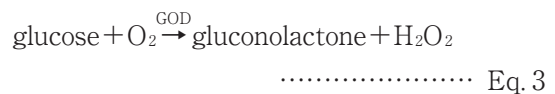


図1 ポリエチレンテレフタレートグリコール基板上に作製したグルコースセンサの概略図

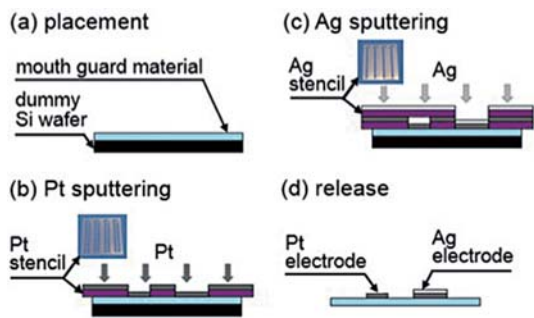


図2 PETG 基板上へのグルコースセンサ用の電極の作製プロセス

グルコースに対する定量性の評価では、センサ感応部をリン酸緩衝液で満たしたビーカーに浸漬し、ポテンシオスタット (Keithley, 2450-EC) にて Pt 電極に +400 mV (vs. Ag/AgCl) の定電位を印加し、グルコース溶液の滴下に伴う出力電流値の変化を計測した。

図3 にシート型の歯科材料基板上に作製したグルコースセンサのグルコースに対する定量特性を評価した結果を示す。グルコース溶液の滴下に伴い、著しい出力電流値の上昇が観察され

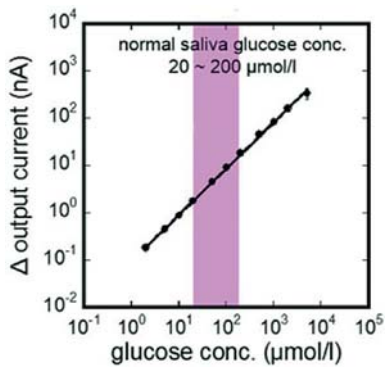


図3 グルコースセンサの定量特性

た。応答性の結果をもとに、グルコース濃度に対する出力電流値の定量特性を調べた結果、5-1000 $\mu\text{mol/l}$ の範囲で相関性が確認された。この定量範囲は、既報値の唾液中グルコース濃度 (20-200 $\mu\text{mol/l}$) を含む範囲であり、本センサを用いて唾液中グルコースの計測が可能であると考えられる。

マウスピース型バイオセンサの作製では、まず、歯型を吸引型成型器 (バキュームアダプター I 型, 山八歯材工業) に設置し、市販マウスピースシート材料 (厚さ: 0.5 mm) を成型器にて加熱・軟化・吸引し、歯型に合わせたマウスピースを 3 次元成型した (1 枚目)。成型したマウスピースに、第一小臼歯から第三大臼歯の頬側に位置するように送信機をポリイミドテープで固定し、成型器に再度設置する。同様にしてマウスピースを 3 次元成型することで、無線送信機を模ったマウスピースを作製した (2 枚目)。シート型グルコースセンサの作製と同様にして、1 枚目の口腔内側の表面部にバイオセンサの機能を持たせた。2 枚のマウスピースを熱溶着により接合することで一体化したマウスピース型バイオセンサとした。

無線装置はポテンシオスタットと A/D コンバータ、無線機能を有する設計となっている。無線通信における周波数帯域には、産業・医学用機器の周波数帯である 2.4 GHz 帯を採用し、無線 IC チップには低消費電力かつ 2.4 GHz 帯での通信が可能な CC2500 (Texas Instruments) を用いた。

無線通信機を組み込んだマウスピース型バイオセンサを図 4 に示す。グルコースセンサに定電圧を印加するポテンシオスタットの機能と 2.4 GHz の無線通信モジュールが一体となっている。作製したマウスピースを装着すると、審美性に優れた装着が可能であることが確認できた。なお、装着後のマウスピース型バイオセンサを確認したところ、無線装置への溶液の侵入などはなく良好な密閉性が確認された。

作製したマウスピース型グルコースセンサを用いて、センサ特性の評価を行った。人工唾液は、水酸化ナトリウムを加えて pH 7.4 に調整し作製した。人工唾液における出力電流値は、リン酸緩衝液時と比べ約 1/3-1/4 程度低下していることが確認された。定量範囲についても 10-1000 $\mu\text{mol/l}$ に狭まった。これは、人工唾液に含まれるタンパク質がセンサ感応部に吸着しているためだと考えられる。そこで、センサ感応部への PMEHL のオーバーコートによりセンサ出力の向上を行った。PMEHL 濃度 1.0 wt% において出力電流の向上が確認された。それ以上の濃度においては保護膜の膜厚が厚くなり、感応部へのグルコースが到達しにくくなり出力電流が小さくなった。これは、複数の成分が混在し、タンパク質吸着の恐れがある人工唾液中のグルコース計測において保護膜の有用性、優れた機能性を示すものであり、ヒト唾液中においても、タンパク質の影響を防止できることを示唆している。

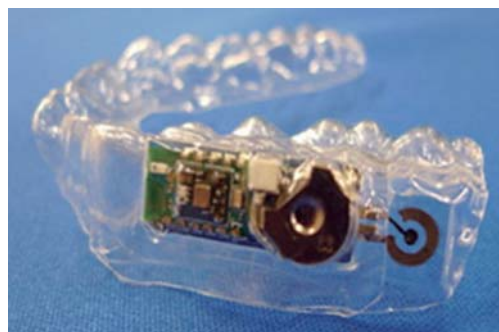


図4 バイオセンサと無線通信装置を内蔵したマウスピース型バイオセンサの外観

3. 歯科用ファントムを用いた特性評価

安静時の唾液中グルコース濃度 $20 \mu\text{mol/l}$ を含む人工唾液を用いた。ペリスタポンプ (SJ-1211L, ATTO Co.) にて、平均唾液分泌速度 0.5 ml/min でファントム口腔内の舌下腺・顎下腺位置より人工唾液を送液した。口腔内の溶液を循環させるため、排液は舌先の下顎から同流速で行った。人工唾液をファントム口腔内に送液・排液した状態でセンサ感应部に標準グルコース溶液を滴下し、出力電流値の変化からグルコース濃度の動態変化を調べた (図5)。

次に、歯科用ファントムを用いたグルコース計測の結果を示す (図6)。ヒト口腔内環境を模倣したファントムにおいて、 $0.5, 1.0 \text{ mmol/l}$

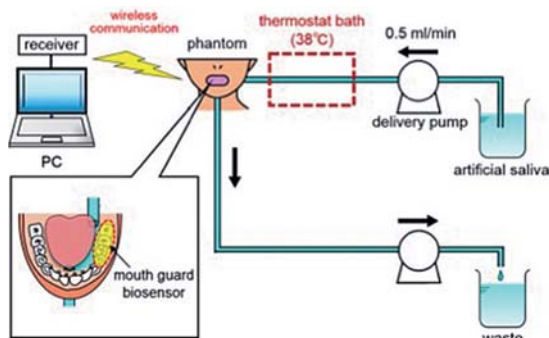


図5 マウスピース型バイオセンサを用いた歯科用ファントムでの特性評価のための実験系

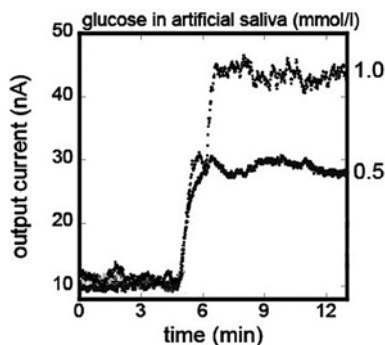


図6 生体を模したファントムを用いた人工唾液に対するグルコースセンサの応答特性

の標準グルコース溶液の導入に対して著しい出力電流値の増加が確認された。これはマウスピース型バイオセンサの優れた動的特性を示すものである。

4. まとめ

本研究では唾液中グルコースの無拘束計測を目的として、酵素電極法を用いたバイオセンサとそのセンサを口腔内に設置するためのマウスピースとを組み合わせてマウスピース型バイオセンサを開発することに成功した。人工唾液においても既報の唾液中グルコース濃度 ($20\text{--}200 \mu\text{mol/l}$) を含む範囲でグルコースの定量が可能であった。作製したマウスピース型バイオセンサを、口腔内を模したファントムを用いた実験によりセンサの優れた動的特性が示された。今後は実際にヒト口腔内に適用し、唾液中グルコースの無拘束計測を目指す。

[今後の研究の方向, 課題]

現在、口腔内でのグルコース計測に向けた検討を進めている。口腔内での違和感のない装着のための無線装置の小型化、長時間計測のための小型電源の開発についても重要な課題である。さらに、唾液中に含まれる他の化学成分についても測定を目指し研究を展開していきたいと考えている。

[成果の発表, 論文等]

荒川貴博, 黒木祐輔, 仁田大揮, 張志偉, 戸本佳佑, 當麻浩司, 竹内周平, 関田俊明, 水口俊介, 三林浩二, 口腔内グルコース計測のためのマウスガード型バイオセンサの開発, 第33回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 平戸, 2017年10月24~26日