

# Readout

HORIBA Technical Reports

特集 血液をはかる

July 1991 ■ No.3

---

## グルコースセンサーの試作と 血液分析への応用

Development of Glucose Sensor and  
Applications for Blood Analysis

河野 猛

Takeshi KOHNO

(Pages 49-54)

---

株式会社 堀場製作所



# グルコースセンサーの試作と血液分析への応用

## Development of Glucose Sensor and Applications for Blood Analysis

河野 猛  
Takeshi Kohno

### 要 旨

バイオセンサー (Biosensor) は生体の持つ分子認識機能を巧みに利用したセンサーであり, 酵素や微生物などを分子認識素子として用い, これと電気化学デバイスなどの物理デバイスを組み合わせて構成されている。本稿では, 医療検査の場でも測定されているグルコース (ブドウ糖) 濃度を測定するバイオセンサーとして, グルコースセンサー (Glucose Sensor) の試作評価と本センサーを用いて血液・尿などの生体中のグルコース濃度を測定した結果について報告する。

### Abstract

A biosensor is a sensor that makes ingenious use of the body's ability to recognize molecular structure. The biosensor uses enzymes and other microorganisms as molecular sensor elements. These elements are configured with a physical device, such as an electrochemical device. One important use of such devices is in the medical field, where it is necessary to measure glucose concentration. This paper reports on experimental evaluation of a new Horiba glucose sensor. Examples are given of results of glucose concentration measurements in the blood, urine, and other bodily fluids.

## 1. はじめに

生体内の反応を円滑に進める作用を持つ酵素は, 分子を選択的に識別し, その反応を触媒する機能をもっている。従って, 酵素はその特異的な反応性を利用した分析用試薬として古くから利用されている。表題のグルコースセンサーは, 酵素の持つ高い分子選択性を巧みに利用した酵素センサー (広義にはバイオセンサー) の一つである。本稿では, グルコースセンサーの動作原理, 構造, 基本特性, グルコース濃度測定器の試作および評価結果について述べる。

## 2. グルコースセンサーの測定原理と構成

グルコースセンサーの基本構成を図1に示す。<sup>1)</sup>本センサーは, 白金と銀か

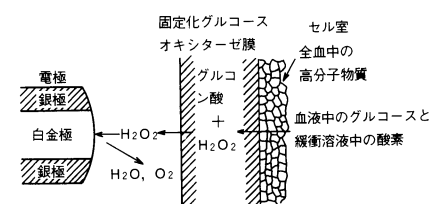


図1 グルコースセンサーの基本構成<sup>1)</sup>  
Basic configuration of glucose sensor

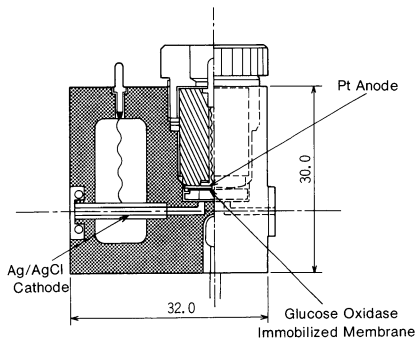


図2 流通形グルコースセンサーの構造  
The flow-through type glucose sensor

らなる2極ポーラロ形過酸化水素電極と、グルコースの酸化反応を触媒する酵素であるグルコース・オキシダーゼを親水性有機膜上に固定した酵素膜とから構成されている。2極ポーラロ形電極は、銀極を基準電極（対極）として、白金極に+0.65Vの電圧を印加している。一方、酵素膜上では、式(1)に示すように、グルコースが膜中に固定化されたグルコース・オキシダーゼの作用により、グルコン酸と、過酸化水素に分解される。生成物である過酸化水素は、濃度拡散によって電極表面に到達し、式(2),(3)に示すように、白金極で酸化、銀極で還元され反応電流を生じる。この反応電流は、過酸化水素濃度に比例するため、その値を実測することで、グルコース濃度に換算できる。

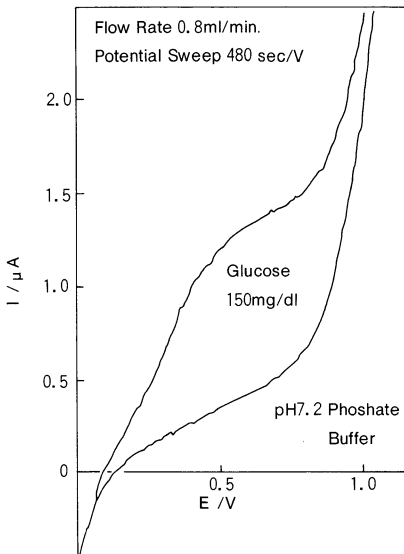
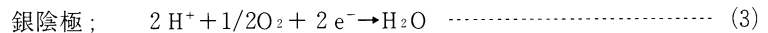
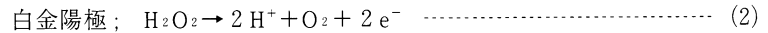
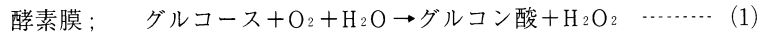


図3 流通形グルコースセンサーの電流・電圧特性  
Typical polarograms of the flow-through type glucose sensor

## 2.1 流通形グルコースセンサーの構造

臨床検査用分析計に利用することを前提として、本センサーは、図2に示すように、微量サンプルの計測が可能で、検体（血液や尿など）による汚染の少ない流通形とした。本センサーの特長は、銀極（対極）を塩化銀処理した筒状とし、白金極のみ酵素膜を装着することである。そのため、微量な試料でも銀極（作用極）に対して広い接触面積の確保ができ、その結果、電極反応量を増すことが可能となった。この流通型グルコースセンサーの電流-電圧特性を、図3に示す。

## 2.2 グルコース・オキシダーゼ固定膜の作成

酵素を担体に固定化する方法には、物理吸着法と化学結合法がある。<sup>2)</sup> 本稿では、担体に対する酵素の固定化量を制御し易い化学結合法を用いた。担体として、アセチルセルロースをラミネートした親水性多孔質ポリプロピレン膜（商標 ジュラガード3700：ポリプラスチクス社製）を用い、この膜に、有機アミノシラン剤であるγ-アミノプロピルトリエトキシシラン（γ-APTS）をシラノール縮合により修飾し、このアミノ基を官能基として、グルタルアルデヒドとグルコース・オキシダーゼおよび牛血清アルブミンを作用させて固定化処理を行った。γ-APTS濃度と、酵素固定量（電極出力に比例する）の関係を図4に、反応諸条件の模式図を図5に示す。

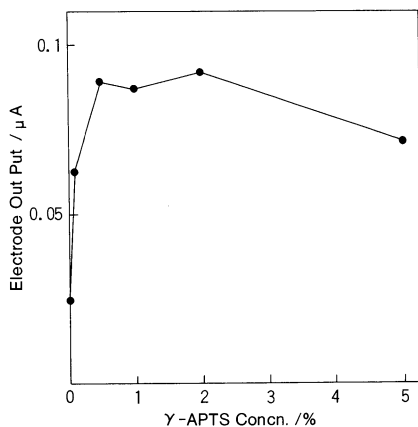


図4 グルコースセンサー出力とγ-APTS濃度との関係 100mg/d l グルコース溶液  
Glucose sensor output vs. γ-APTS concentration 100mg/d l Glucose

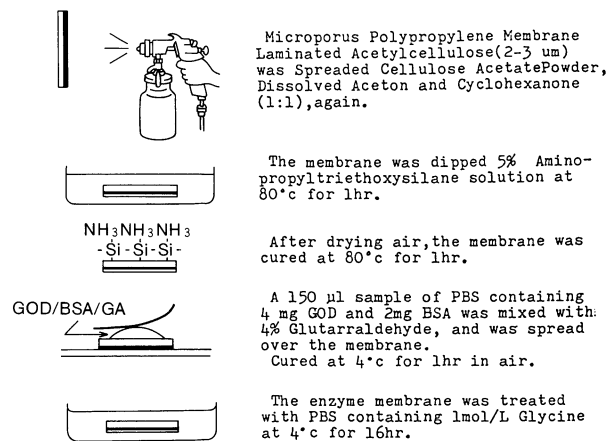


図5 グルコース・オキシダーゼの固定化方法  
Fixing glucose oxidase in the membrane

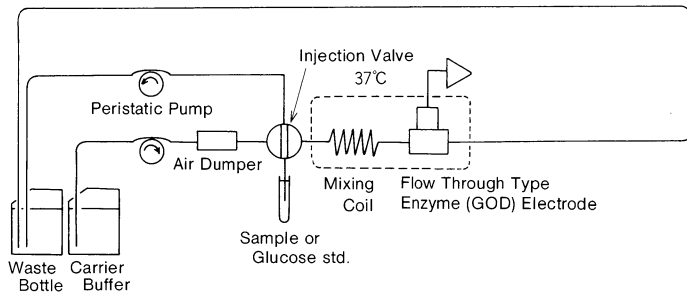


図6 グルコースセンサー評価用FIAのブロックダイアグラム  
Schematic diagram of the FIA system

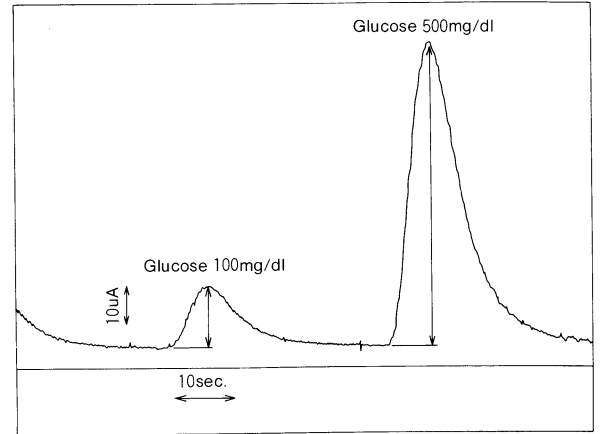


図7 グルコースセンサーの応答例  
Response curves of glucose sensor

### 3. グルコースセンサーの評価

#### 3.1 測定系

グルコースセンサーの評価は、図6に示すフローインジェクション (Flow Injection Analysis ; FIA) の系で測定した。インジェクションバルブでサンプリングされた約  $5 \mu\text{l}$  のグルコース標準液または被検液は、キャリア緩衝液で拡散希釈されながら送液されてセンサー部に到達する。グルコースセンサーの応答曲線は図7に示すように、約5~10秒後にピーク電流値が得られる。センサーの応答量は、このピーク電流値で表すこととした。

#### 3.2 基本性能

##### (1) 直線性

本測定系で、各濃度のグルコース標準液に対する応答曲線と、直線性を図8、9に示す。グルコース濃度が0~1000mg/dlの範囲で直線性が得られた。

##### (2) 同時再現性

本測定系でのグルコース標準液および血清に対する同時再現性を表1に示す。

	Glucose 100mg/dl	Glucose 200mg/dl	Glucose 500mg/dl	Serum
n	20	20	20	20
$\bar{X} \pm \text{SD}$ (mg/dl)	$97.9 \pm 1.8$	$216.3 \pm 3.1$	$496.7 \pm 5.0$	$116.9 \pm 3.2$
CV (%)	1.8	1.4	1.0	2.8

表1 グルコース標準液と血清に対する同時再現性  
Repeat accuracy of glucose sensor for (1) various glucose standard fluids and (2) blood serum

##### (3) 共存物質の影響

100mg/dlのグルコース標準液に、血液や尿中に含まれる可能性の高い過酸化水素電極への妨害物質 (アスコルビン酸や尿酸など) を標準添加したものを試料として、共存物質の影響を調べた。図10に示す通り、グルコース濃度に対して影響を及ぼさないことが確認された。これは、酵素膜の表面にラミネートされたアセチルセルロース層が妨害物質の透過を阻止しているためであると考えられる。酵素の共有結合に利用した $\gamma$ -APTS濃度と妨害物質の透過阻止効果を図11に示す。過酸化水素は膜を透過するが、アスコルビン酸と尿酸については膜を透過できないため電極反応が生じないと考えられる。

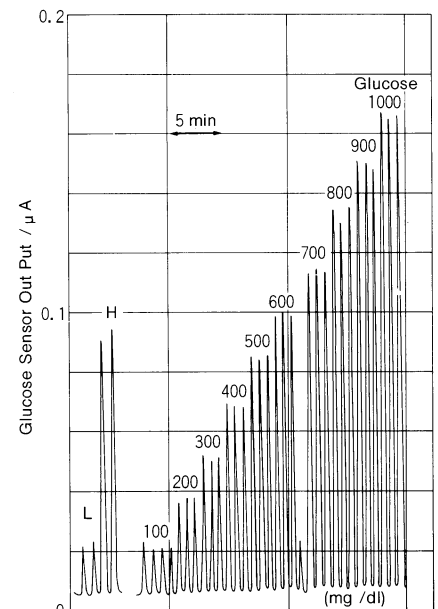


図8 グルコース標準液に対する応答  
Response curves of glucose sensor for various glucose standard fluids

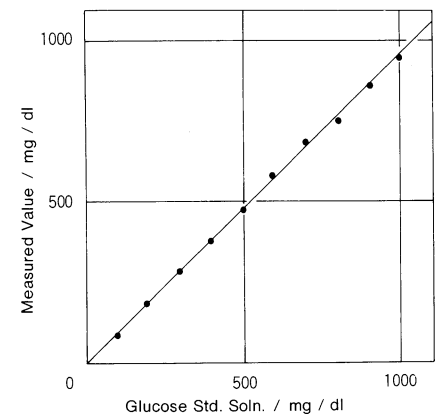


図9 グルコースセンサーの直線性  
Lineality of glucose sensor for glucose standard

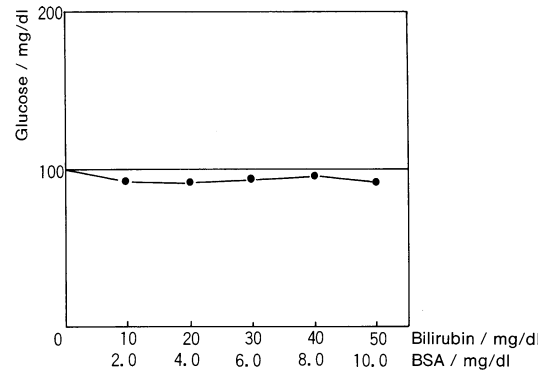
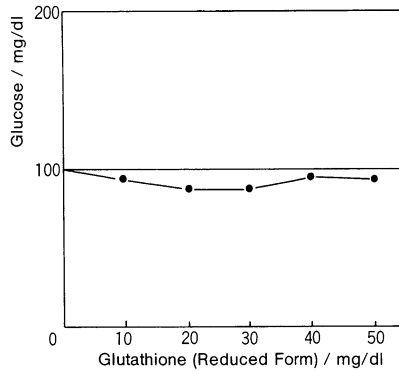
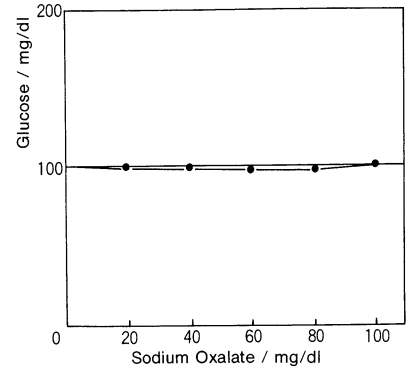
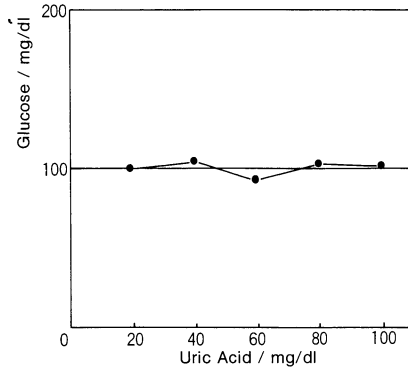
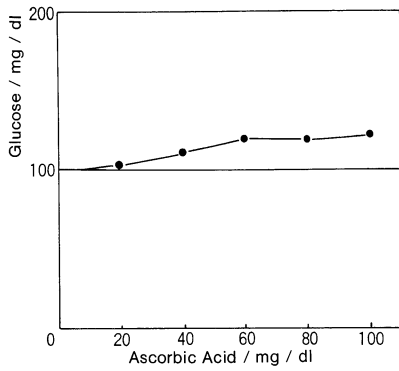


図10 妨害物質による測定値への影響  
Effects of interference by foreign matter on measurement results

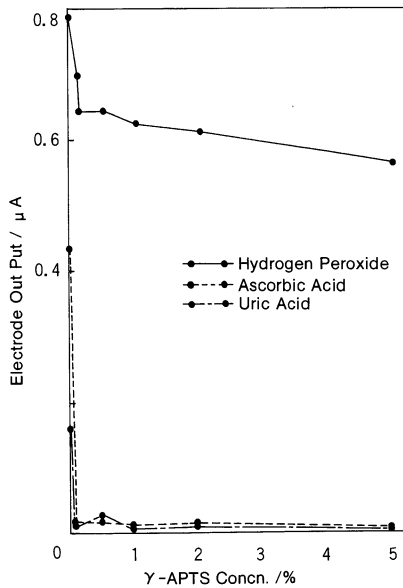


図11 過酸化水素・アスコルビン酸・尿酸に対するグルコースセンサー出力とY-APTS濃度との関係  
Glucose sensor output vs. Y-APTS concentration for (1) hydrogen peroxide, (2) ascorbic acid, and (3) uric acid

## 4. グルコース濃度測定器の試作と性能評価

### 4.1 仕様

試作器の概略仕様と測定系のブロック図を、それぞれ表2、図12に示す。本試作器は、内部標準液による自動2点校正および5検体毎の自動一点校正を行い、検量線から濃度演算を行うことができる。

測定方法	グルコース・オキシダーゼ固定膜装着流通形過酸化水素電極
対象	全血・血清・血漿・尿
測定範囲	グルコース 0~1000mg/dl
必要検体量	80 $\mu$ l (但し、測定には約5 $\mu$ lを使用)
処理能力	90テスト/時
校正方法	内部標準液による自動2点校正

表2 グルコース濃度測定器の概略仕様  
Glucose analyzer : basic specifications

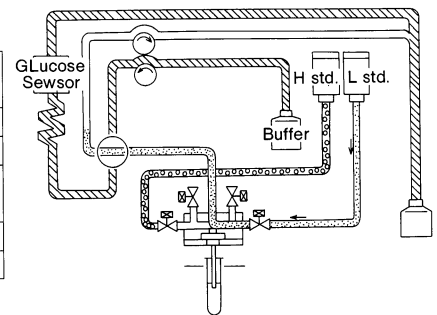


図12 グルコース濃度測定器のブロックダイアグラム  
Schematic diagram of glucose analyzer

### 4.2 評価結果

#### (1) 添加回収試験

グルコース標準液、及びプール血清にグルコースを添加し、その回収率を表3に示す。両試料とも回収率は、ほぼ100%であり、妨害影響および、干渉影響のないことが確認された。

#### (2) 市販管理血清測定

市販管理血清6種類についての測定結果とアッセイ値を表4に示す。アッセイ値通りの測定値が得られることが確認された。

Added Glucose Concn. (mg/dl)	Glucose Std.		Serum	
	Measured Value (mg/dl)	Recovery (%)	Measured Value (mg/dl)	Recovery (%)
0	96.0		100.3	
39.6	132.4	93	139.6	99
77.3	169.3	95	180.0	103
113.6	197.6	90	215.4	101
148.5	224.4	87	244.2	97
182.2	261.5	91	275.2	96
214.6	294.6	93	311.2	98
246.0	330.0	95	338.5	97

表3 グルコース標準液と血清に対する添加回収試験  
Recovery tests of glucose sensor for (1) various glucose standard fluids and (2) blood serum

Control Serum	Assay Value (mg/dl)	Measured Value (mg/dl)
Consera N	93	94.4
Consera AN	328	328.0
Baker N	83~101	87.8
Baker AN	285~325	310.4
OMEGA AN	274~294	289.0
Q-PAK AN	233~285	265.6

表4 市販管理血清に対する測定結果  
Results of measurements using commercially-available control serum

	Serum	Blood
n	5	14
X±SD (mg/dl)	86.5±1.3	69.8±5.5

表5 全血と血清に対する測定値の違い  
Differences in measurement results using (1) blood serum and (2) whole blood the same individual

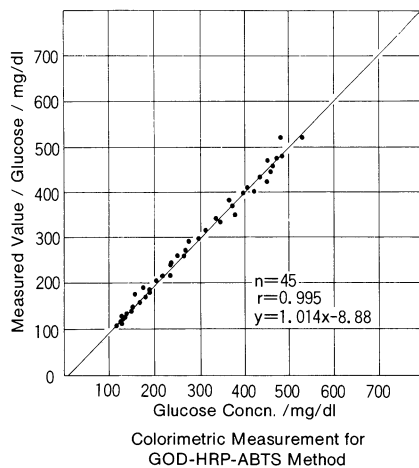


図13 血清検体に対する他法との相関  
Comparisons of results on various serum samples using (1) the Horiba glucose sensor and (2) the colorimetric method

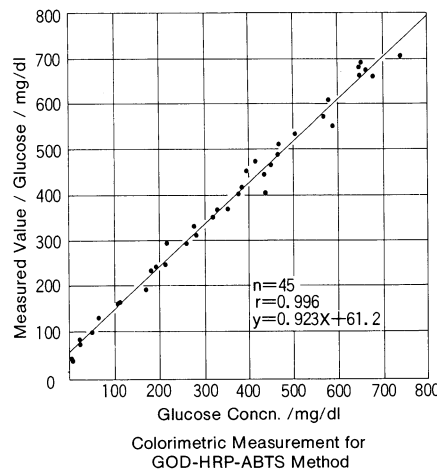


図14 尿検体に対する他法との相関  
Comparisons of results on various urine samples using (1) the Horiba glucose sensor and (2) the colorimetric method

### (3) 従来法との相関

従来法として、グルコース・オキシダーゼ反応で生成する過酸化水素を、ペルオキシダーゼと2,2-アジノジ(3-エチルベンゾアゾリン)-6スルホン酸(ABTS)で反応させ、比色定量する方法を用いた。本法と本試作器の測定値との相関性を、血清および尿について調べた。

図13, 14に示す通り良好な結果が得られた。

### (4) 全血測定におけるヘマトクリットの影響

同一の検体提供者の全血と血清を同時期に採取し、その測定値及び同時再現性を比較した結果を表5に示す。血清に比べて、全血の方が約20%程低い値になる。これは、全血中の血清成分以外の物質、即ち、血球や血小板などによる容積置換によるものであると考えられる。<sup>3)</sup>全血測定する場合は、

同時にヘマトクリット値を求めて補正する必要がある。

## 5. まとめ

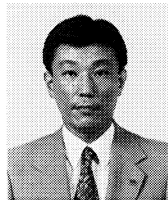
流通形グルコースセンサーの試作と、フローインジェクション法を利用したグルコース濃度測定器を試作し、血糖および尿糖の測定を試みた。電気化学センサーで生体成分を計測する場合、その干渉影響を取り除く工夫が重要である。本稿で述べた酵素固定膜は、ラミネートされたアセチルセルロース層の効果により、目的物質だけを透過し、干渉物質の透過をほぼ完全に阻止することができた。その結果、同一条件で血液および尿が測定できたものと考えられる。これからの検討事項としては、固定化膜の酵素活性、および下地電極の耐久性・安定性の向上、また固定化法の改善による高活性度の酵素膜の作成などがある。

本稿では、血液測定に限って試験結果を紹介したが、食品分析にも適用が可能である。今後、酵素種をかえて、種々の酵素センサーの試作に着手し、多成分同時測定に展開できるよう努めて行きたい。

(1988年3月 日本分析化学会近畿支部第7回分析サロンにおいて一部発表)

### 参考文献

- 1) 大澤久男：臨床検査, 29, 998~1002 (1985)
- 2) a) O.R., Zoborsky, "Immobilized Enzyme", CRC Press (1973)  
b) C.J. Suckling, Chem. Soc. Rev., 6, 215 (1977)  
c) 千畑一郎 編, 「固定化酵素」, 講談社 (1975)
- 3) 高原喜八郎：臨床検査, 32(2), 213 (1988)



河野 猛

Takeshi Kohno

開発2部 係長  
1955年10月9日生  
大阪府立大学大学院  
農学研究科農芸化学専攻





