

研究助成報告書（中間・終了）

No.1

整理番号	2024-J-004	報告者氏名	大阪工業大学 工学部 小池 一歩
------	------------	-------	---------------------

研究課題名

腎機能マーカーであるクレアチニンと尿素を同時検出可能なウェアラブル・バイオセンサーの開発

<代表研究者> 機関名：大阪工業大学 職名：教授 氏名：小池 一歩

<共同研究者> 機関名：大阪工業大学 職名：准教授 氏名：廣芝 伸哉

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

研究内容

本研究では、腎機能マーカーであるクレアチニンおよび尿素を検出するために、各基質と特異的に反応する酵素としてクレアチニンデイミナーゼおよびウレアーゼを用いて酵素膜を作製した。市販のNチャネルMOSFETのゲート端子を、TiO₂/Ti/ガラス電極基板あるいはTiフレキシブル電極基板と接続し、その電極表面に絹フィブロインで包括固定化した酵素膜を修飾することで、拡張ゲート電界効果トランジスター(EGFET)型バイオセンサーを構築した。

本研究で実施した主な内容は以下の3点である。

- 酵素膜中の酵素濃度を変化させ、センサー応答に最適な条件を検討した。
- 差動回路を導入し、センサー信号の安定化とノイズ低減を図った。
- 妨害分子がセンサーの応答に与える影響を調べた。

研究成果の要約

腎機能指標であるクレアチニンと尿素を長時間にわたりリアルタイムで検出可能な、差動回路を組み込んだEGFET型バイオセンサーを試作した。本センサーは、TiO₂/Ti/ガラス基板およびTiフレキシブル基板をEG電極として、その表面に絹フィブロインを担体としたクレアチニンデイミナーゼもしくはウレアーゼ酵素膜を固定化した。1mmol/Lのリン酸緩衝液(PBS)を被検液として測定を行った結果、いずれのセンサーも基質濃度の増加に対して電圧変化量が大きくなること、リフレッシュ溶液に置き換えると電圧レベルが初期値へ戻ることから、基質濃度の増減を連続的に検出できることが明らかになった。さらに、血中に含まれる妨害分子がセンサーに与える影響を調べたところ、いずれのセンサーも検出対象の基質に対して選択的に応答することが明らかになった。このことから、当初の目的を概ね達成した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

研究発表（口頭）

1. 日後 太一, 山名 一生, 小野 寛太, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “腎機能指標であるクレアチニンと尿素窒素を検出するためのポテンショメトリックバイオセンサーの開発”, 電気学会電子材料研究会, 大阪工業大学 梅田キャンパス, 2024年11月29日.
2. 日後 太一, 山名 一生, 本多 真也, 安藤 樹, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “腎機能マーカーの尿素をリアルタイム検出するための拡張ゲート FET 型バイオセンサー”, 電気学会 電子・情報・システム部門大会, 金沢工業大学 扇が丘キャンパス, 2025年8月27~29日.
3. 山名 一生, 日後 太一, 本多 真也, 安藤 樹, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “腎機能指標である尿素を検出するための拡張ゲート FET 型バイオセンサーの開発”, 材料学会 半導体エレクトロニクス部門研究会, 京都工芸繊維大学, 2025年11月29日(予定).

研究発表（ポスター）

1. 山名 一生, 日後 太一, 小野 寛太, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “慢性腎臓病の早期発見に役立つ拡張ゲート FET 型クレアチニンセンサーの作製と性能評価”, 応用物理学会関西支部 2024年度第2回講演会, 大阪工業大学 大宮キャンパス, 2024年11月6日
2. 日後 太一, 山名 一生, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “腎機能マーカーを検出するための FET 型バイオセンサーの作製と評価”, 第72回 応用物理学会春季学術講演会, 東京理科大学 野田キャンパス, 2025年3月14~17日.
3. 山名 一生, 日後 太一, 本多 真也, 安藤 樹, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “溶液法によるガラス基板上への α 相 MoO₃薄膜の成膜とバイオセンサー応用”, 応用物理学会関西支部 2025年度第1回講演会, 産業技術総合研究所 関西センター, P-2, 2025年6月3日.
4. 山名 一生, 日後 太一, 本多 真也, 安藤 樹, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “腎機能指標の尿素を検出するための拡張ゲート FET 型バイオセンサー”, 第86回 応用物理学会秋季学術講演会, 名城大学 天白キャンパス, 2025年9月7~10日.
5. 本多 真也, 日後 太一, 山名 一生, 安藤 樹, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步, “フレキシブル Ti を用いた拡張ゲート FET 型尿素センサーの作製と性能評価”, 応用物理学会関西支部 2025年度第2回講演会, P-04, 関西学院大学 西宮上ヶ原キャンパス, 2025年11月6日.

研究発表（論文）

1. 小池 一步, 道端 涼, 日後 太一, 前川 英輝, 楢 凱貴, 山本 青依, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, "差動型拡張ゲート電界効果トランジスタを用いたクレアチニンセンサーの作製と評価", 材料, 73卷, 10号 (2024) 763-767.
2. Kazuto Koike, Taichi Higo, Issei Yamana, Masaya Honda, Itsuki Ando, Yuichi Hirofushi, Nobuya Hiroshima, "Extended-gate field-effect transistor-based biosensors for the detection of urea as an indicator of renal function", Japanese Journal of Applied Physics 64 (2025) 086501.
3. 小池 一步, 日後 太一, 山名 一生, 本多 真也, 安藤 樹, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, "尿素濃度を連続測定可能な拡張ゲート FET 型バイオセンサー", 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌), 投稿中.

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

研究目的

本研究の目的は、腎機能マーカーであるクレアチニンと尿素を検出するための酵素膜を開発し、これらのマーカーを同時に検出するためのウェアラブル・バイオセンサーへ応用することである。

研究結果

図1にEGFETを用いたバイオセンサーの構成と測定セットアップを示す。酵素を包括固定する担体として生体適合性の高い絹フィブロインを使用した。酵素を固定化したEG電極と絹フィブロインのみ固定化したEG電極を市販のNチャネルMOSFETのゲート端子に接続し、差動回路を構成した。差動回路を用いることで、センサー動作中の被検液の温度や外部光照射による電圧ドリフトを抑制することができる。酵素膜の作製手順を図2に示す。まず、ガラス基板上に約300 nmのTi薄膜を非加熱条件でスパッタ成膜した。その後、大気中450 °Cで1時間熱処理を行い、表面にイオン感応膜であるTiO₂を形成した。次に、その表面にアミノシランによるシランカップリング処理を施し、酵素膜を強固に固定化するための足場を形成した。続けて、クレアチニンディミナーゼもしくはウレアーゼを含む絹フィブロイン水溶液を表面に滴下・スピンドルコートした。最後に、エタノール水溶液で不溶化処理を施した。ここで、クレアチニンディミナーゼはクレアチニンと、ウレアーゼは尿素と特異的に反応する酵素である。酵素を固定化したEG電極の結線部はすべてエポキシ樹脂で被覆し、1 mMのPBS中に浸漬させた。2つのEG電極の表面電位を正確に測定するため、Ag/AgCl参照電極を2つのMOSFETのドレイン端子に接続しPBS中に配置した。電流源にはDCソースメーターを用い、動作時には両MOSFETに100 μAのドレイン電流を印加し、ソース・ドレイン間電圧差（ΔV）を出力信号とした。

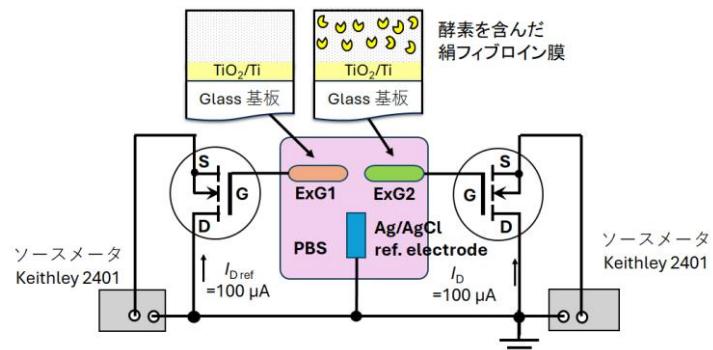


図1 EGFET型バイオセンサーの構成

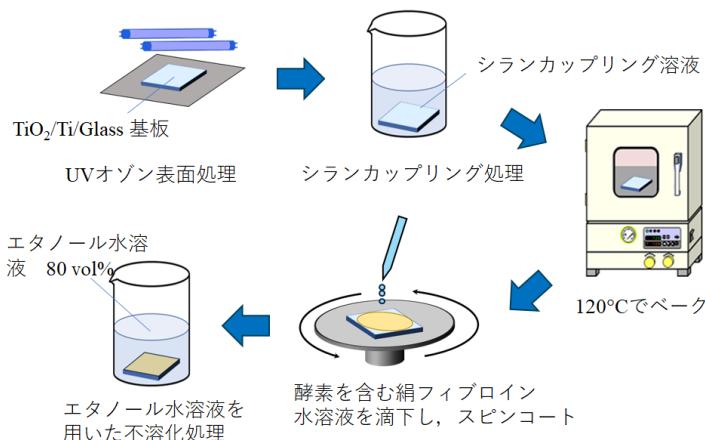


図2 酵素膜の成膜手順

次に、作製したクレアチニンセンサーと尿素センサーの性能を調べた。図3にクレアチニンセンサーのクレアチニン濃度変化に対する電圧応答およびクレアチニン濃度と ΔV の関係を、図4に尿素センサーの尿素濃度変化に対する電圧応答および尿素濃度と ΔV の関係、をそれぞれ示す。いずれも基質濃度の増加に伴い ΔV が増加すること、基質濃度を可逆的かつ長時間連続測定が可能であることが明らかになった。

次にクレアチニンセンサーのクレアチニン濃度と ΔV の関係をミカエリス・メンテン式で解析したところ、最大電圧変化量の半分を与える基質濃度(K_m^{app})は4.8 mg/dLであり、図中に示す40歳男性のeGFR(腎臓が老廃物を濾過する能力を示す指標で、年齢、性別、血清クレアチニン濃度で決定される)の濃度範囲で感度を有していることが分かった。表1に40歳男性のクレアチニン値とeGFRの関係を示す。

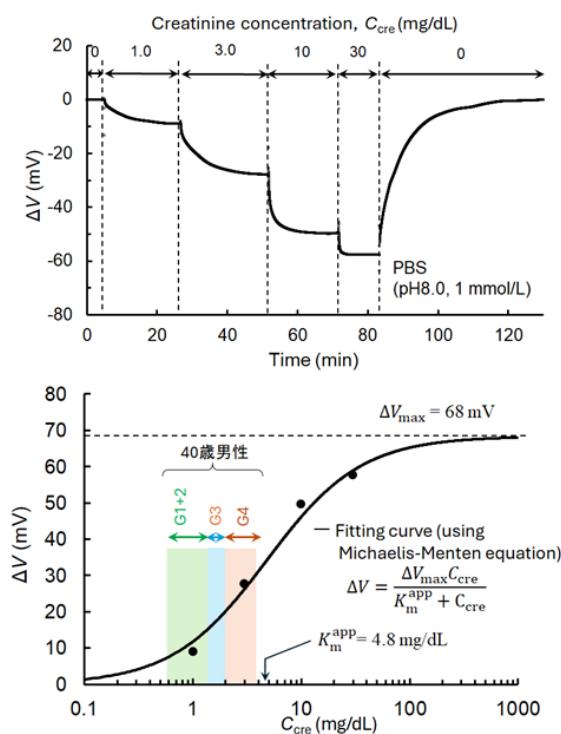


図3 クレアチニンセンサーの性能

表1 クレアチニン値とeGFRの関係

例) 40歳男性		
	C_{cre} (mg/dL)	eGFR
G1	0.6~1.1	117.7~60.6
G2	1.2~1.3	55.1~50.5
G3	1.4~2.0	46.6~31.5
G4	2.1~3.9	29.9~15.2

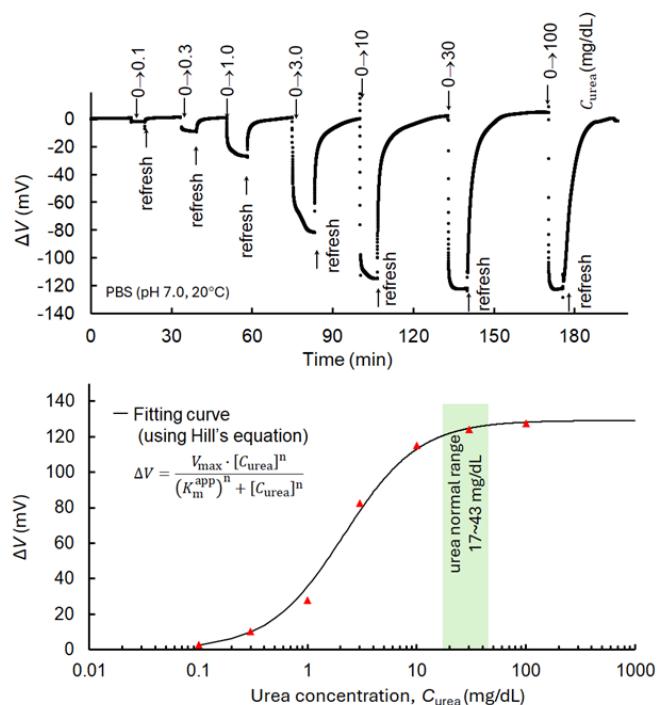


図4 尿素センサーの性能

一方、尿素センサーの尿素濃度と ΔV の関係もヒル式で解析したところ、 $K_m^{app}=2.1\text{mg/dL}$ であり、血中の尿素基準範囲である17~43 mg/dLの範囲で十分感度を有することが分かった。ここで、ヒル式はもともとヘモグロビンなどアロステリック酵素の基質飽和度を表す経験式であるが、ウレアーゼは、反応生成物であるアンモニアによる酵素阻害の影響を反映できるため解析に適用した。

さらに、センサー動作時に酵素を固定化したEG電極部に外部光が照射された場合の影響を調べた。センサー動作時に照度600 lxおよび4000 lxの蛍光灯を照射したところ、それぞれ0.2 mVと3 mVの応答が現れた。本実験を行った屋内の照度が約600 lxであったことから、屋内での使用であれば蛍光灯照射による影響はほとんど無視できることが確認できた。これは、本センサーが差動回路で構成されているためである。

センサーのウェアラブル化を検討するため、フレキシブルな厚み 0.1 mm の Ti フィルムを EG 電極の基板として用いた。Ti フィルム表面へ前述の方法でシランカップリング処理を施し、ウレアーゼ酵素膜を形成した。図 5 に、試作した尿素センサーの尿素濃度変化に対する ΔV の応答を示す。尿素濃度 1.0~1000 mg/dL の広い範囲で応答すること、濃度の増減に対して可逆的に応答することが確かめられた。

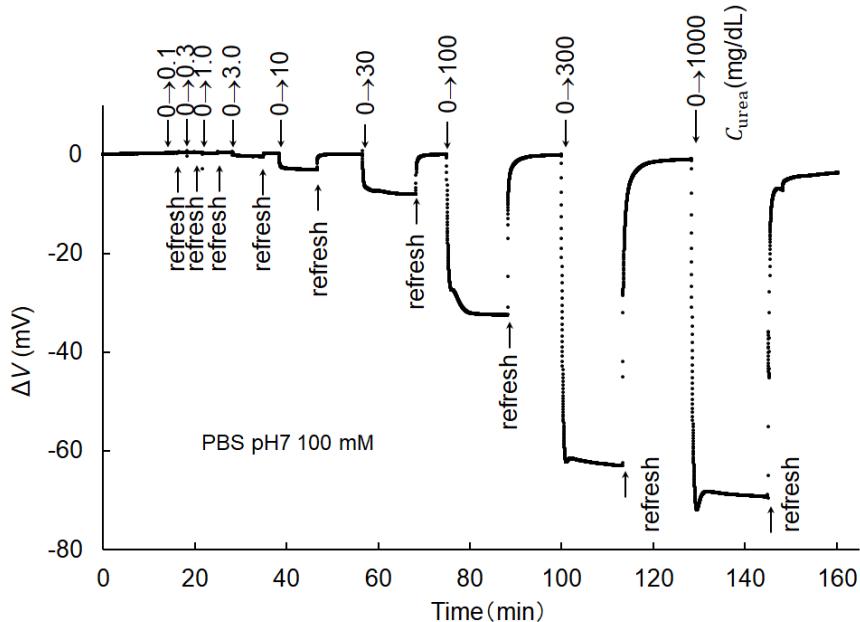


図 5 酵素固定化フレキシブル Ti 基板を EG 電極とする尿素センサーの性能

さらにセンサー動作時に、被検液へ血中の代表的な妨害物質を入れた際の電圧応答を調べた。図 6 に、尿素 100 mg/dL → リフレッシュ → グルコース 140 mg/mL、クレアチニン 1.2 mg/dL、アスコルビン酸 1.4 mg/dL、BSA 5.0 g/dL、尿素 100 mg/dL → リフレッシュ、の順に被検液中の成分を変化させた際の ΔV の応答を示す。なお、これらの妨害分子の濃度は、成人の血中に含まれる正常な濃度範囲の上限値である。尿素に対して 40 mV 程度の明瞭な応答を示したが、いずれの妨害物質に対してもほとんど応答しないことが分かった。以上のことから、本センサーは、ウェアラブル・バイオセンサーへ応用できる可能性が示された。

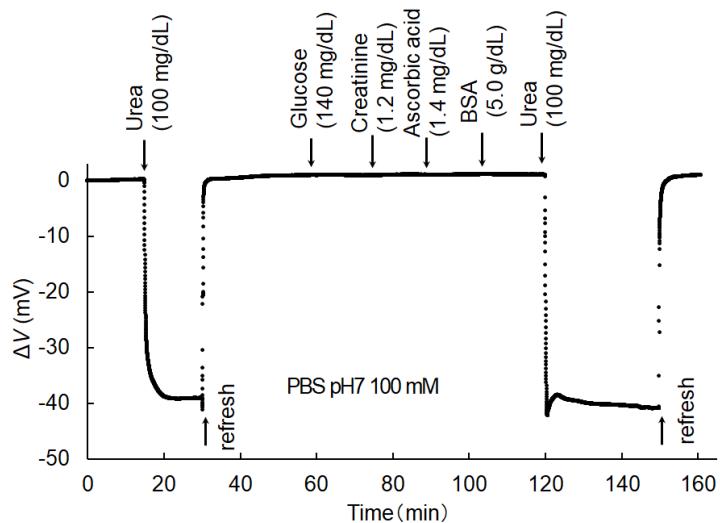


図 6 フレキシブル尿素センサーの妨害分子による影響