

半導体グルコースセンサの臨床的評価

兼吉昭雄¹⁾, 篠原志緒¹⁾, 吉田安雄²⁾, 大倉博文³⁾

Clinical Evaluation of Semiconductor Biosensor

Abstract

The incidence of diabetes mellitus is increasing every year, recently. A blood sugar value is one of the most important items in blood tests, and it varies with meals or exercises. Therefore it is necessary to establish a simple and accurate method for measuring glucose concentration.

A glucose sensor is newly invented by applying SOS (Silicone On Sapphire)/ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). In this paper, its efficiency in measuring glucose concentration in blood plasma is investigated.

Key Words:

バイオセンサ (Biosensor), 半導体 (Semiconductor), SOS/イオン感応性電界効果トランジスタ (SOS/ISFET), 血糖値 (blood sugar), グルコース (glucose)

はじめに

近年, 糖尿病患者は年々増加傾向にあるが, 食事や運動などによって短時間で変動する血中のグルコース濃度の管理は他の血液成分と異なり, 非常に重要でなおかつ緊急性の高いものである。従って, 血糖値がより迅速に,

簡単に, 測定できることが求められている¹⁻³⁾。

今回, 日本電気で開発した SOS (Silicone On Sapphire)/ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor: イオン感応性電界効果トランジスタ) を使ったグルコースセンサを用いて, ヒト血漿中のグルコース濃度の測定

1) 日本電気㈱医療機器事業部; Akio Kaneyoshi, Shio Shinohara, Medical equipment Division, NEC Corporation, Tokyo, Japan.

2) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科; Yasuo Yoshida, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

3) 信州大学医学部附属病院中央検査部; Hirofumi Ohkura, Central Clinical Laboratories, Shinshu Univ. Hospital.



図1 半導体 (ISFET) グルコースセンサ

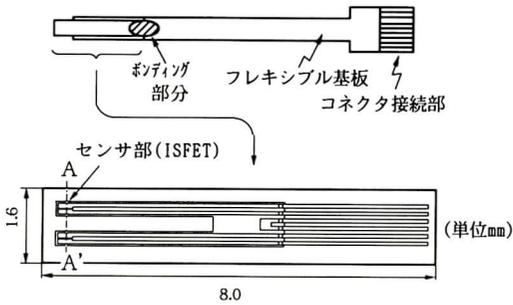


図2 センサチップとセンサ拡大図

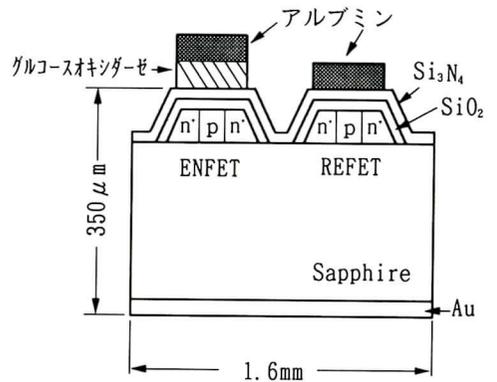


図3 センサの断面図 (図2のA-A')

を行い、その性能について検討したので報告する。

センサの基本的特性

1. センサの作動原理

図1はセンサの写真である。大きさは図2に示すように、現在市販されている分析装置⁴⁾に使われている酸素電極や過酸化水素電極と比べて極めて小さく、実際に液体に浸る部分は先端から1 mm程度で十分であり、数 μl の微量の液体でも測定が可能である。ISFETは水素イオンに感応するFETであり、その出力はpHに比例する。日本電気が開

発したグルコースセンサは、図3に示すようにSOS基板の上に2個のISFETを形成し、このうち一方のISFETのゲート上にはグルコースオキシダーゼが酵素膜として固定化(ENFET: Enzyme FET)されている。2つのISFETのゲート上に形成されたアルブミン膜は、酵素膜やpH感応膜の表面に血液中の蛋白質などが直接付着するのを防止するために重層されている。グルコースは式(1)に示すように、グルコースオキシダーゼを触媒として溶液中の酸素と反応して、グルコン酸を

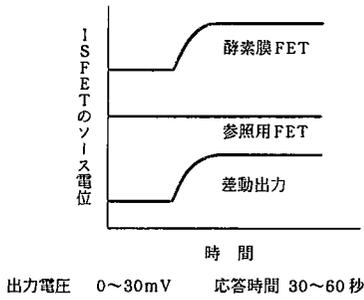
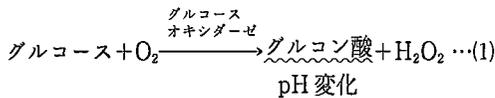


図4 センサの出力特性

生成する。このグルコン酸によって酵素膜内の pH が変化すると、ENFET のゲート、ソースの順に電位が変動するが、もう一方の ISFET (REFET: Referense FET) のソース電位は変動しないので、ENFET、REFET のソース間電圧がグルコース濃度に比例し、グルコースセンサ (以下センサと記す) として機能する。



この電位変動の様子を示したのが図4で、グルコース測定時にはこの差動出力を、センサ出力として測定している。

また、グルコースオキシダーゼの代わりに他の物質を用いると、別の成分が検出可能なバイオセンサを作ることができ、既にウレアーゼで尿素、パリノマイシンで K⁺イオンを検出するセンサの試作にも成功している⁵⁾。

以上がセンサの作動原理であるが、このセンサには以下のような利点が考えられる。

- (1) 半導体であるため小型化が容易である。
- (2) 半導体の製造工程が使えるため、大量生産に適し、コスト低減が可能である。
- (3) ISFET と同一チップ内に信号処理回路などの集積化が可能である。

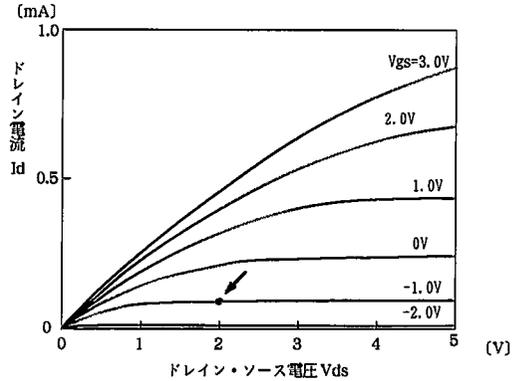


図5 FET 特性

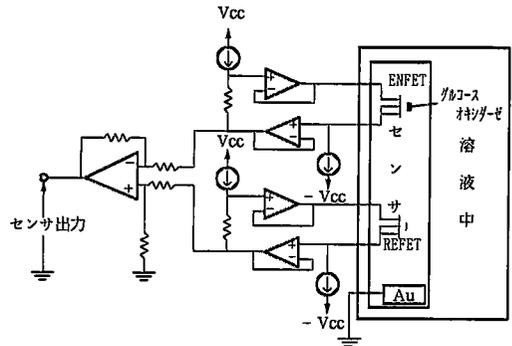


図6 測定 (センサ駆動) 回路

- (4) 微量のサンプルで測定が可能である。
- (3)は、カテーテルの先端に取り付けるなどの小型化が考えられる。また、被測定溶液の流路にセンサを設置すれば、グルコースの連続測定 (モニタ) も実現可能と思われる。

2. 回路構成

図5はセンサに使用している ISFET のトランジスタ特性を示したグラフである。測定にはグラフ上の矢印で示す飽和領域(例えば、Vds=2V, Id=0.1mA)を使用する必要がある、図6に示すような回路でセンサ上の2つの ISFET (ENFET と REFET) のドレイン・ソース間に定電圧・定電流を供給している。酵素膜中の pH 変化により、ISFET 表面

(ゲート)と溶液の界面電位が変化すると、ゲート・ソース間電圧は一定なため、ソース電位も界面電位と同様に变化する(ソースフォロワ)。更にこのENFETとREFETの差動出力をアンプで増幅するような構成になっている。

3. 基本特性

(1) 雑音の影響

差動出力を取り出す利点として外来雑音に強いことがあげられる。図7は1個のISFETのソース電圧と2個のISFETの差動出力の周波数スペクトルを比較したものである。1個の出力は商用電源から来る交流雑音(50Hzとその高調波)の影響を受けているが、差動出力では周波数に関係なくノイズレベルが低く、一定していることがわかる。

(2) pH特性

ISFETのpH特性は、理論的には(2)に示すネルンストの式⁶⁾に従い、その感度は300Kの時、約58mV/pHである。このネルンスト

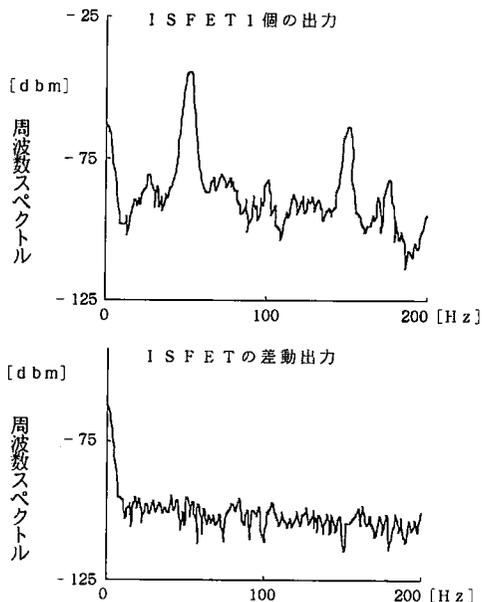


図7 センサ出力の周波数スペクトル

トの式に従ったグラフと、試作したISFETのpH感度の実測値を図8に示す。理論上の式に近い特性を示した。

$$E = E_{\text{ref}} - \frac{RT}{F} \ln[A^+] \quad \text{ネルンストの式} \quad \dots(2)$$

E: 出力電圧

E_{ref}: 参照電極(金電極)の電位

R: 気体定数 F: ファラデー定数

T: 絶対温度 A⁺: 電解液中のイオン活量

$$\frac{RT}{F} \ln[A^+] = 58 \log_{10}[A^+] \text{ mV} \quad (T=300\text{Kの時})$$

(3) 温度特性

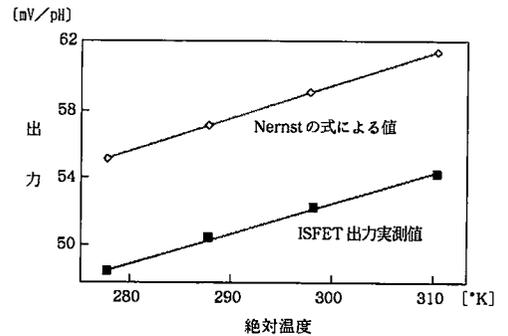


図8 ISFETのpH感受性の温度依存性

ISFETのpH感度は温度に比例するが、グルコースセンサとなると、必ずしも温度に比例するわけではない。酵素活性は体温に近い37°C付近で最も大きいはずであるが、実際に測定してみると図9のように37°Cよりも25°Cで大きな出力が得られた。この原因は溶液中の溶存酸素量に依存するためと考えられている。即ちグルコースの反応には酸素が必要であるが、温度が上昇すると溶液中の溶存酸素量は減少し、反応に関与する酸素が十分に得られないためである。逆に温度が低いと酵素

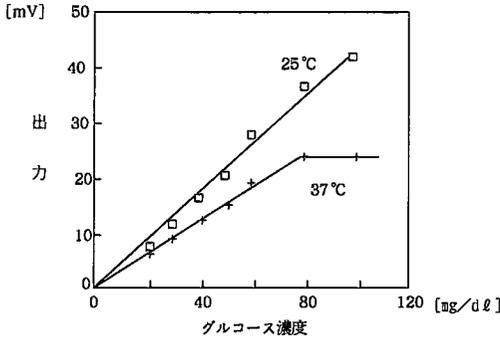


図9 温度とグルコース濃度の関係

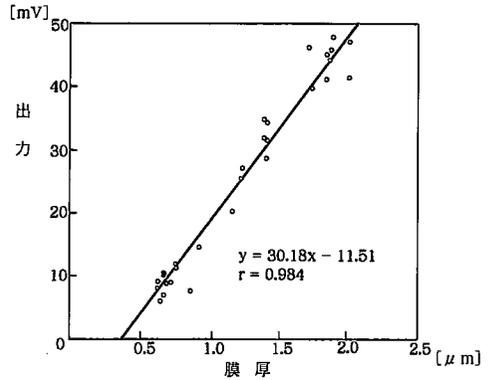


図11 酵素膜厚とセンサ出力の関係

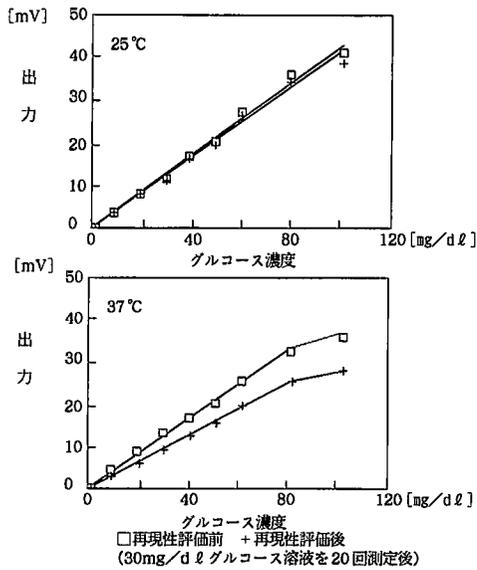


図10 温度と出力再現性

活性, pH 感度とも低下するため, センサ出力は当然低下する。また図10は, 30mg/dl のグルコース溶液を20回連続測定した前後の検量線を比較したものであるが, 出力の再現性, 並びにグルコース濃度に対する線形性についても, 25°Cのほうが37°Cよりも良い結果が得られた。

(4) 酵素膜厚

ISFET のゲート上に形成する酵素膜の厚さは, 通常の半導体の製造工程で用いるスビ

ン塗布によって μm オーダのレベルで制御が可能である。図11は酵素膜厚と出力の関係を示したものである。膜が厚いほど出力が高い結果となった。しかしながら, 膜が厚いほどセンサ出力が飽和状態に達するまでの時間が長くなるため, 実用上は適切な出力と測定時間を考慮した上で酵素膜厚を決定する必要がある, このセンサでは $1\mu\text{m}$ 程度の厚さに制御している。

(5) ドリフト

乾燥状態にあるセンサを pH 緩衝液に浸した直後はドリフトが観察されるが, 1時間で数 mV 程度であり, 3~4 時間程度経過すると安定状態になる。これは ENFET 上の酵素膜が pH 緩衝液によって膨潤し, 電氣的に安定するにはある程度の時間が必要なためと考えられる。

(6) その他の特性

・光の影響——半導体は光が照射されると光を吸収し, 光電効果を起こす。市販のトランジスタや IC では樹脂などで半導体部分は封入されているので光の影響は皆無であるが, ISFET の場合は表面が外界に露出しているため, 光によって出力が若干変動したり, ノイズが発生したりすることがあるので, なる

べくセンサ部分を暗くするなどして光の影響を受けないようにする必要がある。しかしながら、我々の使用している SOS/ISFET は基板がシリコンでないため、通常の ISFET と比較して光の影響は少ない。

・電源の影響——FET の特性を表すのに(3)式に示す相互コンダクタンスがあるが、この定数をグラフにしたものが図12で、ISFET、MOSFET (Metal Oxide semiconductor FET), JFET (Junction FET) の三者を比較している。この測定に使用した ISFET はゲートをアルミニウムで形成しているので、構造上は MOSFET と同じである。従って、ISFET の特性は MOSFET の特性に近いが、JFET とは大きく異なっている。このグラフをドレイン電流側から見ると、ドレイン電流の微小な変動に対して JFET のゲート電圧の変動は小さいが、ISFET や MOSFET では大きいことがわかる。即ち、図6の回路で使用している定電流源が不安定であると、ゲート電圧も不安定となるので回路系に対する注意も必要である。あるいは、(3)式からわ

かるようにチャネル幅を大きくして相互コンダクタンスを大きくすることによってもドレイン電流に対する安定性を向上させることができる。

$$g_m = \frac{\Delta I_d}{\Delta V_{gs}} \propto \frac{W}{L} \dots\dots\dots(3)$$

g_m : 相互コンダクタンス
 I_d : ドレイン電流 W : チャネル幅
 V_{gs} : ゲート電圧
 L : ドレイン・ソース間のチャネル長

(7) 測定範囲

図10に示したように、液温が37℃であってもグルコース濃度が 0 ~ 80mg/dl であれば、直線性は良い。従って、血糖値を測定する場合には血漿検体を 5 倍以上希釈する必要がある。

センサの臨床評価

1. 測定方法

グルコースの測定には図6の回路に信号増幅部と A/D 変換器を実装した専用の測定ボードをパソコンと接続し、このボードとセンサを専用のケーブルを介して、センサ信号を入力する構成とした。また希釈液の秤量をなるべく正確に行うために、市販の分析装置の電極取付部を ISFET グルコースセンサに付け替えて測定実験を行った。送液、排液、並びに試料の攪拌機構についてはこの装置のものをそのまま利用し、試料は手動で注入した。また、この分析装置はセンサの反応槽が 37℃になるようにコントロールされているが、前述の理由から恒温装置は動作させず、液体の温度はコントロールせずに、室温を 25℃程度の一定にし、希釈液、検体、グルコース液の液温が変動しないようにした。また希釈倍率10倍 (pH 緩衝液900 μ l + 検体またはグ

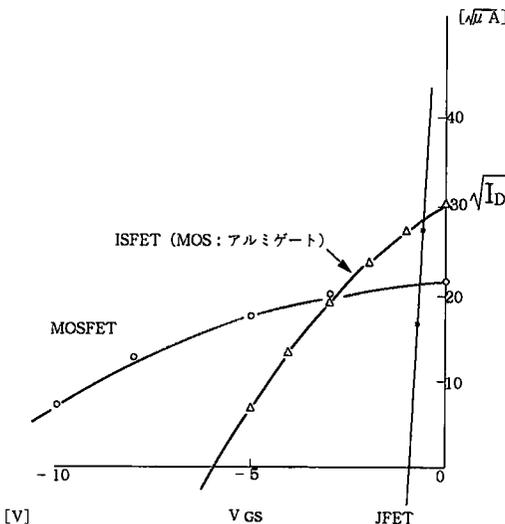


図12 FET の特性比較

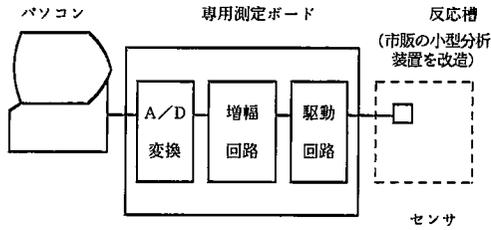


図13 測定系

ルコース液100 μ l)とした。この測定系を図13に示す。

次に測定手順について説明する。センサは初め、グルコースを全く含まない一定量(900 μ l)のpH緩衝液に浸してセンサ信号を100Hzでサンプリングして約3秒間入力し、この平均値Aを記録しておく。この後血漿検体(以下、検体と記す)、または濃度が既知のグルコース液をマイクロピペットで秤量(100 μ l)して注入すると、センサ信号が上昇していくが、注入して1分後に再び100Hzでサンプリングしたセンサ信号の約3秒間の平均値Bを求めてB-Aをセンサ出力と定義した。1回の測定はセンサ出力が飽和状態に達した後pH緩衝液で反応槽を洗浄し、センサ信号をモニタしながらセンサ信号が十分下がったことを確認後、次の試料の測定を行うようにした。

* pH緩衝液：10mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) pH7.5 イオン強度0.15

2. 測定結果

1. の測定方法に従い、出力再現性、日内・日差変動、干渉物質の影響、自己相関、並びに他法との相関について実験を行った。実験に使用した検体は信大病院より提供された患者の血漿で、血漿中に抗凝固剤としてEDTA2ナトリウム、フッ化ナトリウムが添加されている。また出力校正に使用したグル

コース液はpH緩衝液にグルコースを溶解させたものである。以下にその結果と考察をまとめた。

(1) 出力再現性

図14は検体を連続10回測定した時の結果で

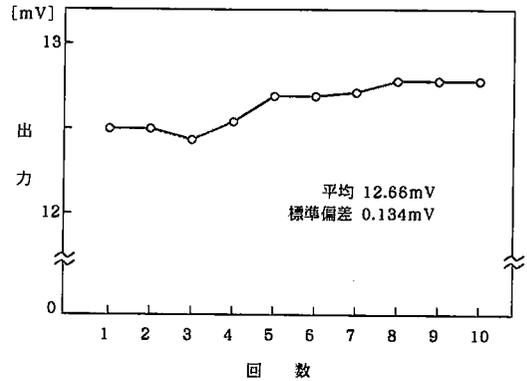


図14 検体の出力再現性

ある。標準偏差は0.134mVで、これはセンサのノイズレベルに等しい。また10回程度の連続測定では出力の低下は認められなかった。

(2) 日内変動

図15は検体の測定前後におけるセンサ出力の検量線を比較したものである。(a)は1時間で15検体、(b)は7時間で80検体の測定を行った。15検体測定後は3%、80検体測定後は約20%の出力低下が認められた。この原因はセンサの酵素膜がグルコースとの反応を繰り返すうちに、しだいにその活性を失いつつあることと、後で述べる残留グルコースの影響とが考えられる。

(3) 日差変動

図16は連続2日間のセンサ出力の変動を調べたものである。1日目の測定終了後、センサはpH緩衝液に浸し、冷蔵庫で保存した。1日目の終わりりと2日目の最初の出力が殆んど変化しておらず、日差変動は0.1mV程度と小

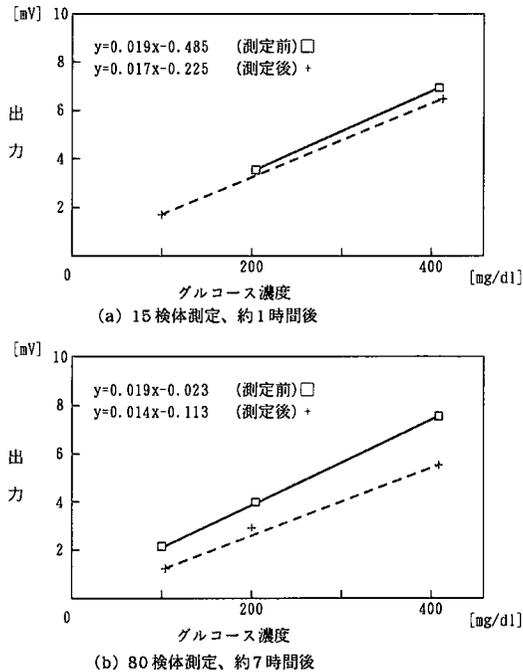


図15 センサ出力の日内変動

さかった。

(4) 干渉物質の影響

臨床検査機器，試薬の妨害物質検討用物質「干渉チェック・Aプラス」（国際試薬株製）を用いてビリルビンF，溶血ヘモグロビン，乳ビ（濁度），ビリルビンCの影響を検討した。検討範囲（以下に記す）では影響はみられな

かった。

ビリルビンF ……0～18.5mg/dl

溶血ヘモグロビン…0～470mg/dl

乳ビ ……ホルマジン濁度0～2840度

ビリルビンC ……0～27.7mg/dl

ナトリウムイオン，カリウムイオンについては，1つのISFET出力，差動出力ともに，各々 10^{-4} ～ 10^{-1} Mの範囲では影響はみられなかった。但し，反応前後のイオン強度は0.15で一定とした。

(5) 自己相関並びに他法との相関

図17は15検体を2回測定し，その相関をとったものである。標本数は少ないものの相関係数は0.971で良好な結果が得られた。図18は30検体に対してGDH法との相関をとったものである。相関係数は0.929と良好であるが，回帰直線のY切片の値が1.054となっており，これをグルコース濃度に換算すると10.61mg/dlと高くなっている。この直接の原因は，図18の中にある最も濃度の高い点Aのセンサ出力が小さかったことにある。事実この点Aを除くと，相関係数は0.945と向上し，Y切片のグルコース濃度換算値も10.61が4.89と減少し，回帰直線は原点近くを通過する結果となる。点Aの出力が低下した原因として

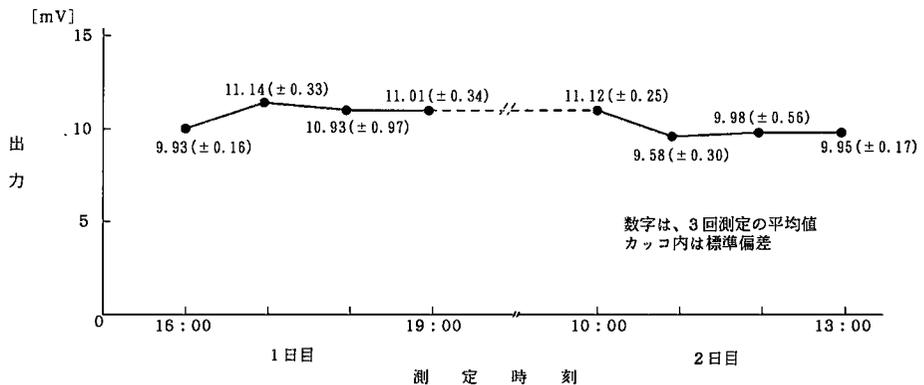


図16 センサ出力の日差変動

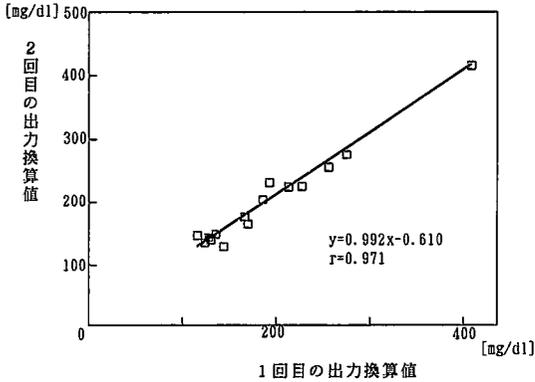
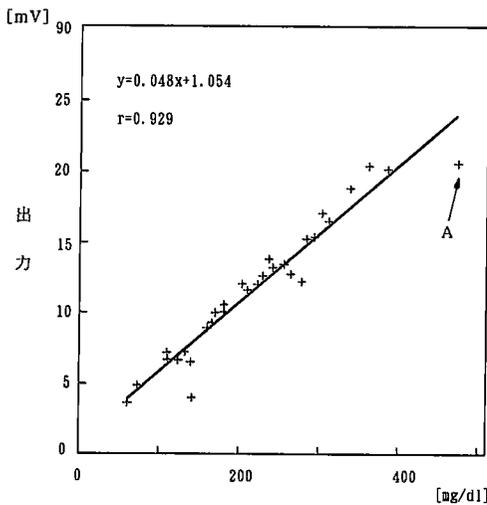


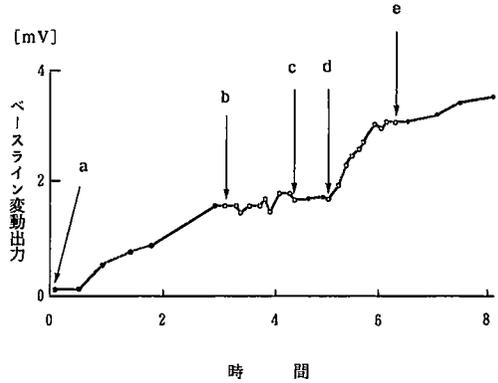
図17 出力換算値の相関



GDH法による測定値

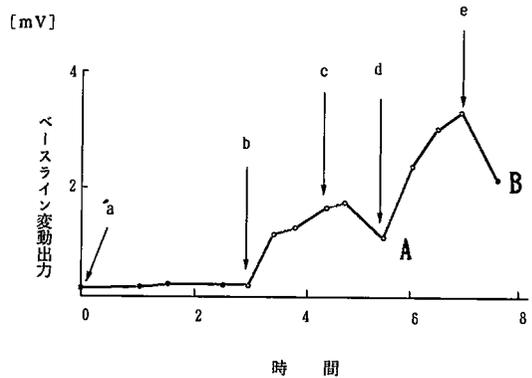
図18 センサ出力と GDH 法との相関

は、検体測定を繰り返すうちにセンサ出力がドリフトし、高濃度のグルコースに対しては十分に反応していないことが疑われる。これを検証するために、グルコース溶液を連続測定し、センサのベースライン変動を調べた。図19と図20にこの結果を示す。図19の実験はセンサ（酵素膜厚1.4μm）を緩衝液に浸してから4時間程度そのまま出力を測定した後、100mg/dl グルコース溶液と3分間反応させた後、5分間洗浄し、これを10回繰り返し、



- a~b 測定前、緩衝液に浸漬中の出力 0.537mV/H
- b~c 100mg/dlグルコース液との反応直前の出力 0.186mV/H
- c~d 緩衝液に浸漬中の出力 -0.116mV/H
- d~e 200mg/dlグルコース液との反応直前の出力 1.098mV/H
- e~ 測定後、緩衝液に浸漬中の出力 0.342mV/H

図19 グルコース測定時のドリフト状況1



- a~b 測定前、緩衝液に浸漬中の出力 0.009mV/H
- b~c 100mg/dlグルコース液との反応直前の出力 0.703mV/H
- c~d 緩衝液に浸漬中の出力 -0.970mV/H
- d~e 200mg/dlグルコースとの反応直前の出力 1.786mV/H
- e~ 測定後、緩衝液に浸漬中の出力 -3.582mV/H

図20 グルコース測定時のドリフト状況2

更に200mg/dl グルコース溶液についても同じ測定を行い、再びその後の緩衝液中での出力を測定した。このグラフからわかるように、100mg/dl, 200mg/dl 各々のグルコース溶液反応時でのベースラインの変動率は、

各々、 $0.186\text{mV}/\text{時間}$ 、 $1.098\text{mV}/\text{時間}$ となり、約6倍の差が認められた。これはグルコースの測定を繰り返すうちに、酵素膜の中にグルコースが完全に除去されないまま残留して行き、本来のベースラインに戻らないうちに次の測定を行っているのでベースラインが通常よりも上昇しているものと考えられる。膜厚が厚くなるとこの現象は顕著である。図20は、図19で使用したセンサよりもアルブミン膜が更に $0.4\mu\text{m}$ 厚いセンサを用いた場合のベースラインの変動を調べた結果である。膜厚が厚いと、グルコースがグルコースオキシダーゼ膜に到達するのに時間がかかり反応が遅くなるため、反応時間6分、洗浄時間20分で反応させて測定を行った。図19の場合よりもベースラインの上昇は大きく、また洗浄を40分行った場合(点A, B)、1つ前の測定点よりもベースラインが大きく低下していることが認められ、洗浄を長時間行うことによって、膜内の残留グルコースが減少したことを証明している。従ってグルコース濃度、並びに膜厚に比例して洗浄時間も長くする必要がある。ベースラインがかなり上昇した後に高濃度のサンプルを測定するとセンサの出力限度を越えるため正確な測定が困難となるのである。図19に示した実験での洗浄時間は5分であるが、図18に示した検体測定では1検体当たりの平均所要時間が約3.8分であり、洗浄時間は1~2分程度であったため、センサのベースラインは30検体測定後、 6mV 以上上昇していた。従って、高濃度の検体に対しては十分な反応が行なわれなかったものと結論づけることができる。また十分な洗浄を行っていれば、図18の点Aはもう少し上に位置するはずである。しかしながら、洗浄時間に5分以上費やすのは現実的でないため、センサ出力が飽和状態に達する前にグルコース濃度

を換算する計測方法を検討する必要がある。

ま と め

ここでは、ISFETで構成された半導体グルコースセンサによってヒト血漿中のグルコース濃度の測定を行い、センサ出力の精度やセンサの受ける影響を調査するとともに、市販の分析装置の測定結果との比較を行うことによって、センサの性能を明らかにした。その内容は次のようにまとめられる。

- (1) グルコース以外に蛋白質や血球など様々な成分を含んだ血漿においても、グルコースの検出が十分可能であることを立証した。
- (2) グルコースを連続測定する場合、十分な洗浄を行わないと、酵素膜の中にグルコースが残留してセンサ出力のベースラインを上昇させて、測定結果に誤差を生じさせることになる。
- (3) 測定に際して、長時間費やすのは実用的ではないので、センサ出力を飽和させないで、グルコース濃度を換算する計測方法を開発する必要がある。

謝 辞

終わりに、ご指導頂いた日本電気(株)マイクロエレクトロニクス研究所・栗山課長、並びに資源環境技術研究所・木村課長に感謝いたします。

文 献

- 1) 蔵田, 三浦, 池田: バイオセンサーを用いた新型簡易血糖測定装置の基礎的検討, 臨床検査機器・試薬 14(3): 409-413, 1991
- 2) 児玉他: バイオセンサー(固定化酵素電極法)を用いた簡易血糖測定器の評価, 新薬と臨床 40(5): 245-251, 1991

- 3) 鈴木, 松岡: 新型測定器グルコカードによる
指尖と腹壁の血糖値比較, 糖尿病 35(7):
569-571, 1992
- 4) 森下, 中根: 酵素センサーの臨床応用臨床病
理 40(5): 470-478, 1992
- 5) 栗山, 木村, 川名: 集積化 SOS/マルチパイ
オセンサ, 電子通信学会 ED84-158, 1985
- 6) 鈴木周一(編): バイオセンサー, 第4刷,
32-34, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1989

受付日: 1992年9月30日

受理日: 1992年11月20日