

FAD グルコース脱水素酵素の発見と、それを応用した新規血糖値センサの開発



①



②



③



④

パナソニックヘルスケア株式会社 バイオ診断ビジネスユニット チームリーダー 中 南 貴 裕①
 パナソニックヘルスケア株式会社 バイオ診断ビジネスユニット 主任技師 中 山 潤 子②
 池田糖化工業株式会社 研究室 部長 小 村 啓 悟③
 池田糖化工業株式会社 第七開発室 課長 眞 田 浩 一④

1. 背 景

糖尿病患者は世界で2億8500万人(2010年)存在すると見られ、その数は今後も増加の一途を辿り2030年には人口の約7%、4億3500万人に達すると推定されている¹⁾。患者数が多いのは西太平洋地域(約7700万人)と南東アジア地域(約5900万人)であり、それぞれ2030年頃に1億人を突破すると予測される。また、現在の有病率でみれば、北米地域(10.2%)、中東・北アフリカ地域(9.3%)が高いとされている。これらの地域・国家では深刻な医療費問題を引き起こしている。

糖尿病患者においては、日に数回血糖値を測定し、血糖値の高さに応じて投薬して血糖値を低下させ、適正な値に日常管理する療法が用いられている。これにより、高血糖状態が続くことによる深刻な合併症(腎症、網膜症、神経障害、壊疽など)の発症を防ぐことが可能となっている。そのような療法において、日々通院するのではなく、日常より自身で血糖値センサを用いて血糖値を測定し、投薬できれば便利である上、細やかな血糖値管理を実現できる。

しかしながら、2003年当時に市販されていた自己測定用の血糖値センサは、点滴を受けた患者が使用した場合、点滴中のマルトースの影響により血糖値が実際より高く測定・表示されてしまう問題があった。日本・米国の国家機関(厚生労働省・米国食品医薬品局(FDA))は本問題を重要視し、偽高値表示に伴う過剰投薬の結果、体内糖分が枯渇して昏睡・時に死に至る危険性を正式通達にて指摘するに至っていた^{2), 3)}。受賞者らは、本問題の根本解決に向けた新規酵素の開発を行い、遂には世界に先駆けた性能の血糖値センサを確立・実用化することに成功した。

2. FAD グルコース脱水素酵素(FAD-GDH)の発見

池田糖化工業(株)に属する受賞者らは、上記問題点を鑑み、グルコース特異性が高く、マルトースに反応しない酵素を求めて研究を開始した。血糖センシングには、血中に含まれる様々な物質の中から血糖(グルコース)を選択・認識する必要がある。高い基質特異性を持つ酵素を認識材料として用いることが正確な測定のために重要である。各種微生物を対象として、酵素スクリーニングを行った結果、*Aspergillus* 属の糸状菌の一種が、基質特異性高くグルコースを酸化する酵素を、菌体外に産生することを発見した。分光学的分析により、本酵素は通常酸化酵素が有するFAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)を補酵素として含むことが判った。特筆すべきことに、本酵素は人工の電子受容体であるフェリシアネートの存在下ではグル

コースの酸化を触媒するが、フラビン酵素であるにも拘わらず、 O_2 を電子受容体としないことが明らかとなった。すなわち、本酵素はグルコースの1位を酸化する「脱水素」酵素、FAD-GDHであった(図1)。従って、従来の血糖センサ用酵素であるピロロキノリンキノン(PQQ)グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH)において最大の特長とされた血中 O_2 濃度によっても影響を受けないという特性と、上記マルトースに反応しないという基質特異性とを併せ持つことが明らかとなった。このことで、FAD-GDHの血糖測定への利用可能性が示され、更に実用規模の培養法・精製法の確立により高純度酵素が得られるようになり(図2)、上記フェリシアネートを組合せ活用した血糖センシングの基礎を築いた⁴⁾。

3. 酵素を用いた血糖値センサプラットフォームの開発

パナソニックヘルスケア(株)に属する受賞者らは、自身の血糖値を「簡便かつ正確に」測定できる血糖値センサのプラットフォームを開発した。図3に示す様に、センサは測定器に挿入して使用する形態で設計し、衛生的な使い捨て型とした。センシング原理は図4に示す通り、①血液を酵素と接触、②血中グルコースを酵素で酸化(電子受容)、③酵素内の電子を電子伝達体に供与、④その電子を電極に供与し、⑤電子を電流として

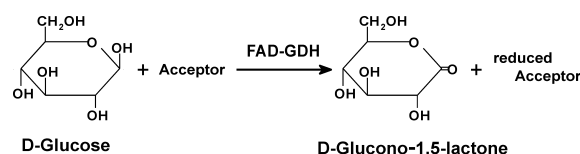


図1 FAD グルコース脱水素酵素の反応式

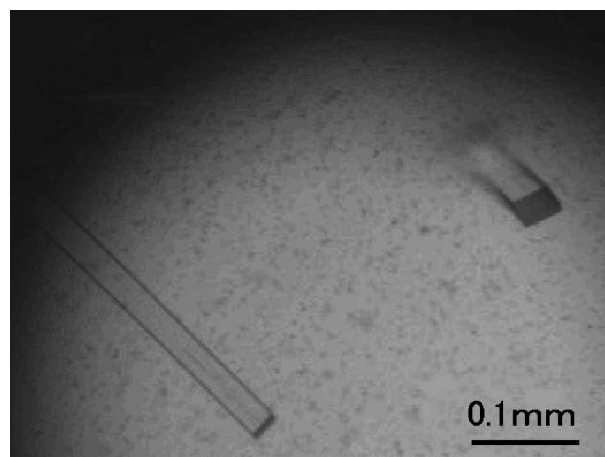


図2 FAD グルコース脱水素酵素の結晶

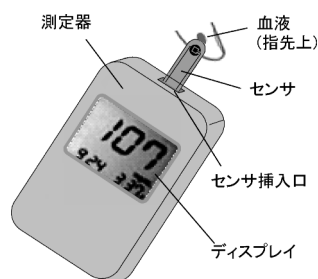


図3 血糖値センサと測定システムの外観イメージ

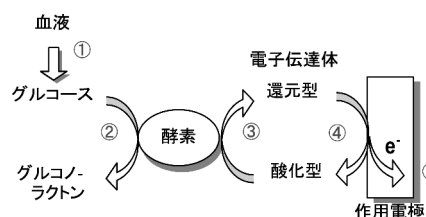


図4 電気化学式血糖センサにおけるセンシングスキーム

捉える電気化学方式を用いた。得られる電流値は血中グルコース濃度と相関する為、血糖値へと換算することが可能である。図5は開発したセンサの写真、図6はその分解斜視図である。絶縁性基板上で分画したパラジウム膜を、電極・測定器接続端子・導線部として利用した。電極上に酵素と酸化型電子伝達体（フェリシアネート）を含む液を滴下・乾燥させることにより試薬層を形成した。この電極と試薬層が配された基板、U字型の切欠部を有するスペーサー、及びカバーを順に接着した。

この様な設計により、スペーサー切欠部の空間において、血液を試薬層と電極に接触させて保持することが可能となった。空間断面積は微小（ 0.17 mm^2 ）である為、血液が空間先端から毛細管現象により空間内へと自動的に吸引・充填され、自発的に図4の反応が進行した。本設計により人為操作に伴う誤差（血液量制御や試薬調製）も排除できるため、一般の人でも正確な測定が実現できる。なお、センシングに要する時間と血液量は5秒、 $0.6\text{ }\mu\text{L}$ である。以上の様に、微量の血液滴を接触させるだけで簡便・正確・迅速に自身の血糖値を知ることができるセンサプラットフォームを確立した⁵⁾。

4. FAD-GDHを搭載した血糖値センサの開発

パナソニックヘルスケア(株)及び池田糖化工業(株)は、上記の各業績を基にパートナーシップを締結し、 O_2 とマルトースの影響を受けない血糖値センサの実現に向けて一体となって開発を推進した。前者の受賞者らは、3節に述べたセンサプラットフォームと2節に述べたFAD-GDHを組合せてセンサの試作を行った。試作したセンサは血糖に対し電流応答したが、その電流値は微弱であり実用には程遠いものであった。そこで、センサ特性の詳細な電気化学解析を行った。これにより、酵素量に応じ増加する電流妨害因子が存在し、それは血液への試薬層の溶解を妨げる物質であることを見出した。

この知見を受け、池田糖化工業(株)の受賞者らは、FAD-GDH蛋白には多数の糖鎖が結合していることを電気泳動等の分析により明らかにし、この糖鎖こそが試薬溶液の粘度を著しく増加させ、溶解を妨げる因子であることを突き止めた。遺伝子組換え技術を用い、糖鎖付加が抑制される宿主細胞を検索した結果、別種の糸状菌にFAD-GDH遺伝子を導入した場合に、

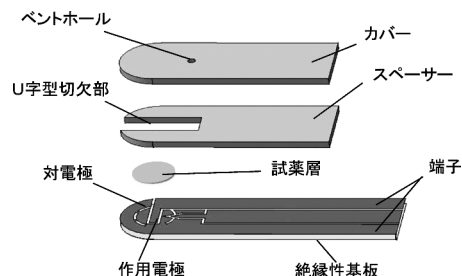
図5 血糖値センサの外観写真と必要血液量イメージ
(センサ： $30\times 7\times 0.7\text{ mm}$ 平板チップ型、血液量： $0.6\text{ }\mu\text{L}$)

図6 血糖値センサの分解斜視図

(カバー、スペーサー、基板は全て絶縁性PET樹脂製)

最も優れた性質のFAD-GDH蛋白が産生されることを明らかにした。更には、均一かつ安定な品質の酵素を大量生産できる培養・精製技術開発に成功し、パナソニックヘルスケア(株)を通じ高品質な血糖値センサを世界の人々に安定提供する為の酵素製造体制を確立した。

一方で、本酵素はセンサ内に乾燥状態で配置した場合、安定に機能維持させることが困難であった。そこで、パナソニックヘルスケア(株)は、酵素の製造法変更に伴う糖鎖含量変化に着目し、糖類が酵素安定化に寄与するとの仮説を立てた。種々の糖類を試薬層に配合して調査したところ、糖アルコールが酵素の安定性を劇的に向上させることを発見した。これにより生体分子である酵素を用いたセンサでありながら、室温で2年間もの安定性を実現した。以上の様なセンサの作製を全自動ライン化することにより、大量生産体制を確立するに至った。

この様にして、学際領域をカバーする農芸化学技術をエレクトロニクスと融合させることにより、マルトース・ O_2 非感受センサの開発に世界に先駆けて成功し、血糖の偽高値表示問題を根本的に解決した本センサを2006年に市販開始した。その頃、指摘されてきた危険性は各社センサで現実のものとなり、過剰投薬による致命的事件が発生していた。それを受け、各社センサは厚生労働省及びFDAにより使用制限を警告されていたが、本開発のセンサは安心して使用できる非制限品となった。以上の様に、点滴を受けている患者様でも安心して使用できるという他社との大きな差別化性能が実現され、占有率向上に貢献し、現在、関連規模9000億円の世界市場において20%弱の占有率がもたらされている。センサは1枚あたり約100円でグローバルに各地域に販売供給され、現在も増加を続ける世界の糖尿病の人々の健康に貢献し続けている。

謝 辞 本開発成果は農芸化学の微生物学、酵素学及び電気化学の分野の諸先生方にご指導賜り得られたものであり、ここに深く感謝の意を表します。また、本成果に携わったパナソニック(株)・バイオ技術開発室、パナソニックヘルスケア(株)、及び池田糖化工業(株)の各部門の関係者の皆様に深謝申し上げます。

文 献

- 1) International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas 4th edition (2009).
- 2) US Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm150453.htm> (posted 2005).
- 3) 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/i-anzen/hourei/dl/050207-1.pdf> (2005).
- 4) S. Tsujimura, S. Kojima, K. Kano, T. Ikeda, M. Sato, H. Sanada, and H. Omura: Novel FAD-dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-insensitive Glucose Biosensor: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 654-659 (2006).
- 5) 中南貴裕: 血糖自己測定システム: バイオ電気化学の実際, 池田篤治 (編), CMC 出版, pp. 172-184 (2007).