

〔重点領域研究開発事業〕

**養殖魚の健康管理モニタリングのための自己発電型グルコースセンサーの開発**

才木常正

**1 目的**

環境の悪化や乱獲などにより、天然魚の漁獲量は年々減少している<sup>1,2)</sup>。故に、今後、養殖業は水産資源の確保において非常に大きな役割を果たす。養殖業での生産量を増やすためには、飼育環境の管理だけではなく、養殖魚の健康管理も重要となる。しかしながら、魚類での健康管理は水族館等での希少魚類（例えば、美うみ水族館のジンベイザメ等）に限られている。少なくとも、我々は養殖魚の定期的な健康診断の事例を見たことがない。更に、精神的ストレスの推定や魚の生理状態（代謝活動など）をリアルタイムで把握においては希少魚においても皆無である。

一方、魚類においても、ヒトと同様に精神ストレスによりコルチゾールの血中への分泌が促進され、それによる糖新生の経路によりグルコースの産生が増えることがわかっている<sup>3,4)</sup>。更に、このグルコースはほぼ全ての細胞の代謝エネルギーの源となっている。

そこで、著者らの研究グループ（近畿大学・農学部水産学科・光永靖、福井大学・工学系部門・坂元博昭）は、魚類の健康管理物質としてグルコースに注目し、これを検出できる酵素反応を利用した血管挿入型の自己発電バイオセンサを開発している。

図1に示すように、本バイオセンサは、グルコースをグルコノラクトンに酸化するアノード（陽極）と、酸素を水に還元するカソード（陰極）で構成される。グルコースと酸素が存在する溶液中、これら電極を接続すると、酸化還元反応により2極間に電子が移動する、つまり、電流が流れる。故に、本センサは外部電源が不必要であり、電流値を計測することでグルコース濃度が把握できる。本稿では、血管に挿入できないマクロサイズの自己発電型グルコースセンサであるが作製することができたので、その特性について報告する<sup>5)</sup>。

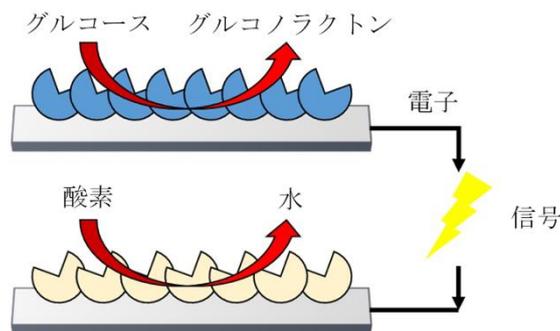


図1 自己発電型バイオセンサの概略図

**2 自己発電型グルコースセンサの製作方法**

図2に自己発電型グルコースセンサのアノード電極の製作手順を示す。まず、グラッシーカーボン電極（GCE：円形の電極部を有し、直径は3 mm）上に0.5 mg/mLの多層カーボンナノチューブ（MWCNT）分散液10  $\mu$ Lを滴下し、自然乾燥させる。その後、1 mg/mLのグルコース酸化酵素（PQQ-ASD）溶液10  $\mu$ L、5 mMのアミノ基反応性PES（AR-PES）溶液10  $\mu$ L、0.1 wt%のナフィオン溶液10  $\mu$ Lの順に電極に滴下と乾燥を繰り返して、アノード電極を作製する。なお、ナフィオンで被覆することで電極表面から酵素の脱離が防がれ、連続的なモニタリング計測が可能とな

る。一方、カソード電極は、GCE 上に、0.5 mg/mL の MWCNT 分散液 10  $\mu$ L、1 mg/mL の酸素還元酵素 (BOD) 溶液 10  $\mu$ L、0.1 wt% のナフィオン溶液 10  $\mu$ L の順に滴下乾燥を繰り返して作製する。最後に、ビーカー上部の電極固定治具に作製したアノードとカソード電極を設置することで、自己発電型グルコースセンサーが完成する (図 3 参照)。

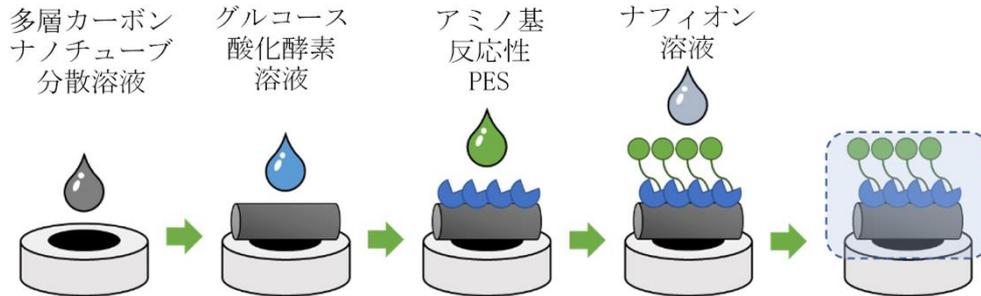


図 2 アノード電極の作製手順

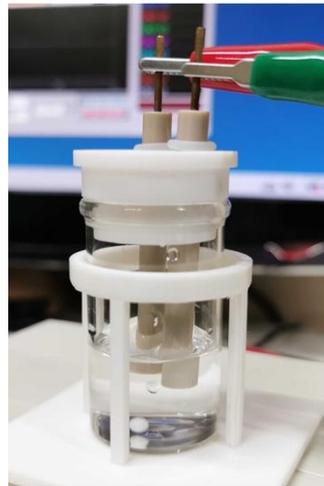


図 3 作製した自己発電型バイオセンサの写真

### 3 自己発電型グルコースセンサの特性

本グルコースセンサのビーカーに 50 mM の HEPES-NaOH 緩衝液 (pH = 7.0) を入れ、その後、1mM のグルコース溶液を滴下した時の 2 極間に流れる電流応答を無抵抗電流計 (シュリンクス製、SACM-50F) で測定した。図 4 (a) に、電流測定開始から 4 分後、10 分後、16 分後にグルコース溶液を滴下したときの電流応答を示す。この図から、1 mM のグルコース溶液に反応して、電流が約 0.6  $\mu$ A 増加していることがわかる。図 4 (b) に、グルコース溶液の滴下量を変えた時に得られた電流増加値から検量線を描いたグラフを示す。これから、グルコース濃度と電流増加値には、良好な比例関係があることがわかった。

図 5 に、1 mM のアラキドン酸 (AA)、尿酸 (UA)、グルコースを次々と滴下したときの電流応答のグラフを示す。この図から、本グルコースセンサーは AA や UA に反応せずにグルコースのみで反応しており、選択性の良さが伺える。

図 6 に、測定開始から 4 分後に 3 mM のグルコースを実際のクロダイの血中に滴下したときの電流応答を示す。この図を見ると、グルコース添加直後から電流の増加が確認された。このことから、本

グルコースセンサは血液中の他の物質に阻害されることなく、グルコースを選択的に検出できることがわかった。

以上のことより、本グルコースセンサを微小化して養殖魚の血管に挿入すれば、精神的ストレスをグルコース濃度と比例関係のある電流増加値として測定できる可能性がある。

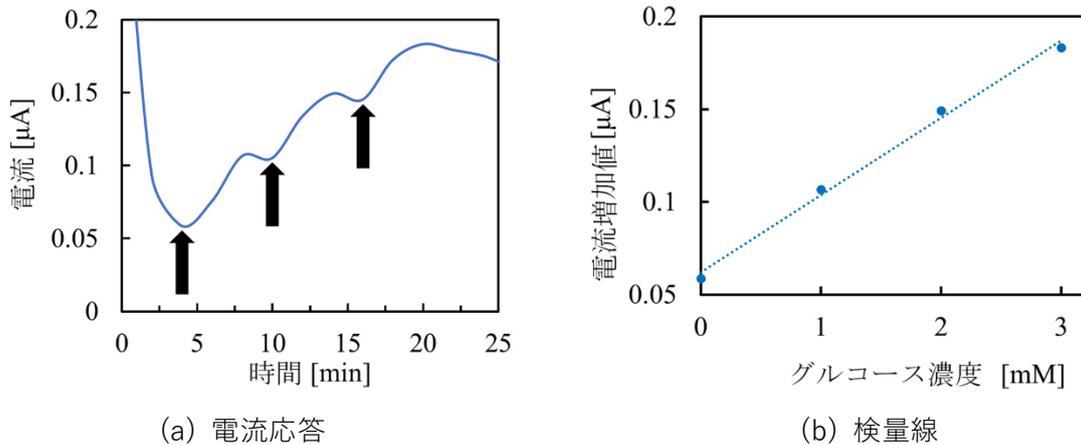


図4 作製したグルコースセンサの基本特性

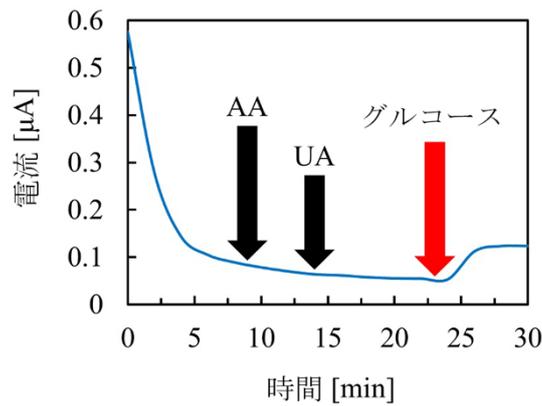


図5 作製したグルコースセンサの選択性

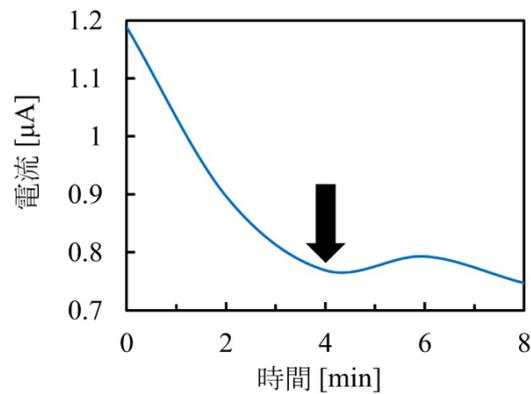


図6 作製したセンサのクロダイ血中でのグルコースに対する電流応答

#### 4 結論

本研究では、養殖魚が精神的ストレスを受けると血中グルコース濃度が上昇することから、グルコースを酸化する陽極と酸素を還元する陰極からなる自己発電型グルコースセンサを作製した。そして本センサ特性を調べた結果、良好なグルコース応答性と選択性を有するセンサであることが明らかになった。

今後、本グルコースセンサを養殖魚の血管に挿入するために電極部を微小化するが、この場合にセンサ感度の低下が懸念される。そこで、電解重合により導電性ポリマーのマイクロ構造体を電極上に生成する等の検討を行う予定である。

#### 参考文献

- 1) Food and Agriculture Organization of the United Nations, “The State of World Fisheries and Aquaculture 2020” (2020)
- 2) Fisheries Agency in Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan “Annual report on fisheries of Japan FY2020” (2020)
- 3) S. E. Fevolden, et al., “Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout,” *Aquaculture*, 118, 205–216 (1993)
- 4) E. K. Silbergeld, “Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish,” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, 20–25 (1974)
- 5) T. Meboso, et al., “Development of Self-powered Biosensor for Fish Health Monitoring,” *Sensors and Materials*, 35, 4491–4500 (2023)

(問合せ先 才木常正)