

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

**特許第3770757号
(P3770757)**

(45) 発行日 平成18年4月26日(2006.4.26)

(24) 登録日 平成18年2月17日(2006.2.17)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/327 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 Q

GO 1 N 27/30 3 5 3 S

GO 1 N 27/30 3 5 3 Z

請求項の数 1 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平11-184273	(73) 特許権者	000005821
(22) 出願日	平成11年6月29日(1999.6.29)		松下電器産業株式会社
(65) 公開番号	特開2000-81408(P2000-81408A)		大阪府門真市大字門真1006番地
(43) 公開日	平成12年3月21日(2000.3.21)	(74) 代理人	100072431
審査請求日	平成16年4月6日(2004.4.6)		弁理士 石井 和郎
(31) 優先権主張番号	特願平10-188799	(72) 発明者	湯川 系子
(32) 優先日	平成10年7月3日(1998.7.3)		大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	吉岡 俊彦
			大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
		(72) 発明者	南海 史朗
			大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に形成された少なくとも酵素および糖類を含む反応層を具備し、

前記酵素がピロロキノリンキノン₂を補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼであり、
前記糖類がトレハロースであり、

前記反応層が、センサチップ当たり前記グルコースデヒドロゲナーゼを5~20ユニット、トレハロースを40~200ナノモル含むことを特徴とするバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することができるバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、次のようなセンサが知られている(特開平2-062952号公報)。

このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で作用極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子

受容体を含む酵素反応層を形成したものである。

【0003】

このようにして作製したバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これに伴い電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。

上記のようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質に対する測定が原理的には可能である。

酵素は、蛋白質を主成分とし、通常、乾燥状態でセンサ内に保持されている。

ところが、空気の温度、湿度などの条件によって、空気中の水分が酵素表面から酵素内に入り出る。そのため、酵素と空気が長時間接すると、酵素内に存在するごくわずかな水分量が変化して酵素が変性し、酵素の活性が低下する。

センサを作製した後、保存中のセンサ内に含まれる酵素の活性が経時的に低下すると、基質と反応する酵素量が不足するようになる。そのため、得られる応答電流値は基質の濃度に比例しなくなるという問題が生じた。

【0004】

この問題を解決するためには、酵素の活性が長期間保持されるような環境を酵素の近傍に整えることが重要である。

また、酵素反応時に電子や基質の移動などを円滑に行い、センサの応答性を高めることも必要である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題に鑑み、保存中のセンサ内に含まれる酵素の活性の低下を抑制して、保存安定性の高いバイオセンサを提供することを目的とする。

本発明は、特に小型で安価な使い捨てタイプのバイオセンサを提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に形成された少なくとも酵素および糖類を含む反応層を具備し、前記酵素がピロロキノリンキノン補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼであり、前記糖類がトレハロースであり、前記反応層が、センサチップ当たり前記グルコースデヒドロゲナーゼを5～20ユニット、トレハロースを40～200ナノモル含むことを特徴とする。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明によるバイオセンサは、上記のように、反応層中に糖類を含有する。酵素溶液に糖類を添加し、この溶液を滴下し乾燥させて反応層を作成すると、酵素表面は糖類によって被覆される。そのため、温度、湿度などの環境の変化から酵素を保護することができ、酵素活性を長期間安定させることができる。

また、糖類は水に容易に溶けるため、試料溶液を反応層に添加すると、反応層は直ちに溶解し、酵素反応と電極反応を円滑に進めることができ都合がよい。

このような効果が期待できる糖類には種々のものがある。また、本発明のバイオセンサに適用できる酵素として、種々のものを選択することができる。

グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼおよびフルクトースデヒドロゲナーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を用いるときは、トレハロース、スクロース、グリセロール、マニトールおよびリボースからなる群より選ばれる少なくとも1種の糖を反応層に含ませるのが好適である。

【0008】

特に、酵素にピロロキノリンキノン補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼを用いる場合は、糖類にトレハロースを用いると、前記酵素の活性維持に著しい効果があり、セ

10

20

30

40

50

ンサを長期間保存した後も、良好なセンサ応答性が得られる。

酵素がピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼであり、糖類がトレハロースである場合、試料液を血液3～4μlとする使い捨てタイプのセンサチップ当たりの前記酵素およびトレハロースの量は、それぞれ1～40ユニットおよび4～400ナノモルが適当であり、より好ましくはそれぞれ5～20ユニットおよび40～200ナノモルである。

【0009】

電子受容体としては、フェリシアン化イオン、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体等が挙げられる。また、試料液中の溶存酸素を電子受容体とした場合にもセンサ応答が得られる。

10

【0010】

本発明によるバイオセンサの反応層には、上記酵素類や糖類および電子受容体のほかに、親水性高分子を含有させてもよい。

反応層中に親水性高分子を添加することにより、電極系表面からの反応層剥離を防ぐことができる。さらに、反応層表面の割れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。

このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸またはその塩の重合体、メタクリル酸またはその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸またはその塩の重合体、アガロースゲルおよびその誘導体が好適に用いられる。

20

【0011】

バイオセンサ内における反応層の配置には、電気絶縁性の基板上に形成された電極系上に形成する以外にも種々の形態がある。例えば、前記基板の電極系上以外の場所や、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材を用い、このカバー部材の試料液供給路に露出する面に配置することができる。

酸化電流の測定方法としては、作用極と対極のみの二極電極方式と、参照極を加えた三極方式があり、三極の方がより正確な測定が可能である。

30

【0012】

【実施例】

以下に、具体的な実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明する。

図1は、本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を取り除いた概略平面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2、3を形成している。次いで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極4を形成している。この作用極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、作用極4の外周部を覆っており、これにより作用極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。

40

図2は、図1のバイオセンサの縦断面図である。図1のようにして作成した電極系上に、親水性高分子層7および少なくとも酵素および糖類を含む反応層8が形成されている。

【0013】

《実施例1》

図1の基板1の電極上に、親水性高分子であるカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩（以下、CMCと略す。）の0.5wt%水溶液を滴下し、50の温風乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層7を形成した。続いて、ピロロキノリンキノン（以下、PQQと略す。）を補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、GDHと略す。）50

50

00 ユニットとトレハロース 20 マイクロモル およびフェリシアン化カリウム 50 マイクロモル を水 1 ml に溶解した混合溶液 4 μ l を CMC 層 7 上に滴下し乾燥して、反応層 8 を形成し、グルコースセンサを作製した。

試料液として、種々の濃度に調整したグルコース水溶液を用意した。そして、この調製した試料液を反応層 8 上に滴下した。グルコースを含む試料液が反応層に供給されると、試料内のグルコースは GDH により酸化される。そして、これと同時に反応層中のフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

【0014】

試料液を滴下した 1 分後に、対極 5 を基準にして作用極 4 に +0.5 V の電圧を印加して、フェロシアン化カリウムを酸化した。そして、5 秒後に対極と作用極の間を流れる電流値を測定した。同様に、種々の濃度のグルコース水溶液に対する電流値を測定し、横軸にグルコース濃度、縦軸に電流値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。その結果を図 3 に示す。

10

また、同様に作製したバイオセンサを 6 ヶ月間保存した後、同様にして応答特性図を作成した。その結果を図 3 に示す。

図 3 より、濃度と電流値との間には、一定の相関性があり、優れた直線性を有した。また、センサ作製直後と 6 ヶ月保存後には変化はなく、良好な保存性を示した。

【0015】

《比較例 1》

反応層 8 中にトレハロースを添加しなかった以外は、実施例 1 と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例 1 と同様にして、センサ作製直後と 6 ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果を図 3 に示す。

20

図 3 より、得られた応答電流値は実施例 1 よりも低かった。また、6 ヶ月間保存後のセンサは、濃度と電流値との間の相関性は低下し、また応答電流値も作製直後のものよりも低下していた。

【0016】

次に、反応層中のトレハロースの量を一定 (80 ナノモル) とし、PQQ を補酵素とする GDH の量を変えてセンサを作製し、6 ヶ月保存後に種々のグルコース濃度の試料液を反応層に供給してセンサ応答を調べた。その結果を図 4 に示す。

また、PQQ を補酵素とする GDH の量を一定 (20 ユニット) とし、トレハロースの量を 4、40、200、および 400 ナノモル としたセンサを作製した。そして、グルコース濃度 10 mM の試料液を供給して各々初度および 6 ヶ月保存後のセンサ応答を調べた。保存後の応答値の初度の応答値に対する割合を図 5 に示す。

30

【0017】

これらの結果から、酵素の量が 1 ユニットの場、グルコース濃度 600 mg/dl 以下でグルコース濃度とセンサ応答とが直線性を示すことがわかる。酵素量が 40 ユニットの超える程多量になるとコスト的に不利である。これらからセンサチップ当たりの酵素量は 1 ~ 40 ユニットが適当であり、より好ましくは 5 ~ 20 ユニットである。一方、トレハロースの量は、4 ナノモル および 400 ナノモル で若干保存性が低下している。従って、4 ナノモル ~ 400 ナノモル の範囲が適当であり、より好ましくは 40 ~ 200 ナノモル の範囲である。

40

【0018】

《実施例 2》

グルコースデヒドロゲナーゼの代わりに、グルコースオキシダーゼを用いた他は、実施例 1 と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例 1 と同様にしてセンサ作製直後と 6 ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。

その結果、グルコース濃度と電流値との間には高い相関性があった。また、6 カ月間保存後も、センサ作製直後のものと差はなく、良好な保存性を示した。

【0019】

《比較例 2》

50

反応層 8 中にトレハロースを添加しなかった以外は、実施例 2 と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例 1 と同様にして、センサ作製直後と 6 ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作製した。

その結果、得られた応答電流値は実施例 2 よりも低かった。また、6 ヶ月間保存後のセンサは、濃度と電流値との間の相関性は低下し、また応答電流値も作製直後のものよりも低下していた。

【0020】

《実施例 3》

グルコースデヒドロゲナーゼの代わりに、フルクトースデヒドロゲナーゼを用いた他は、実施例 1 と同様にしてセンサを作製した。

試料液として、種々の濃度のフルクトース溶液を調製した。そして、この試料液を用い、実施例 1 と同様にして、センサ作製直後と 6 ヶ月間保存後のセンサ応答特性図を作成した。

その結果、フルクトース濃度と電流値との間には高い相関性があった。また、6 カ月間保存後も、そのセンサ作製直後のものと差はなく、良好な保存性を示した。

【0021】

《比較例 3》

反応層 8 中にトレハロースを添加しなかった以外は、実施例 3 と同様にしてセンサを作製した。そして、実施例 3 と同様にして、センサ作製直後と 6 ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作製した。

その結果、得られた応答電流値は実施例 3 よりも低かった。また、6 ヶ月間保存後のセンサは、濃度と電流値との間の相関性は低下し、また応答電流値も作製直後のものよりも低下していた。

【0022】

【発明の効果】

上記のように、本発明によれば、長期保存性の優れたバイオセンサを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた概略平面図である。

【図 2】同バイオセンサの要部の縦断面図である。

【図 3】本発明の実施例および比較例のバイオセンサの応答特性を示す図である。

【図 4】酵素量の異なる反応層を有するセンサの応答特性を示す図である。

【図 5】トレハロースの量の異なる反応層を有するセンサの保存後の応答値の初度の応答値に対する割合を比較した図である。

【符号の説明】

- 1 絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 CMC 層
- 8 反応層

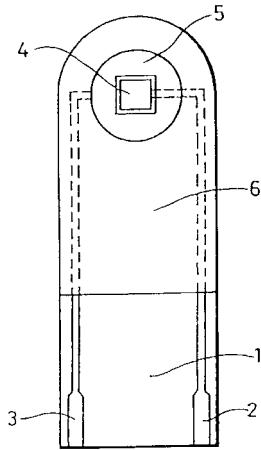
10

20

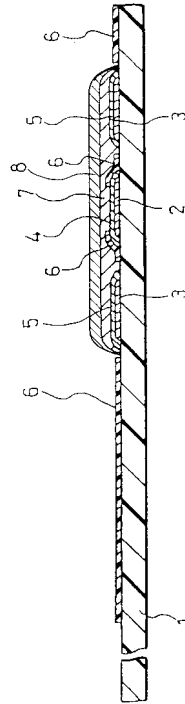
30

40

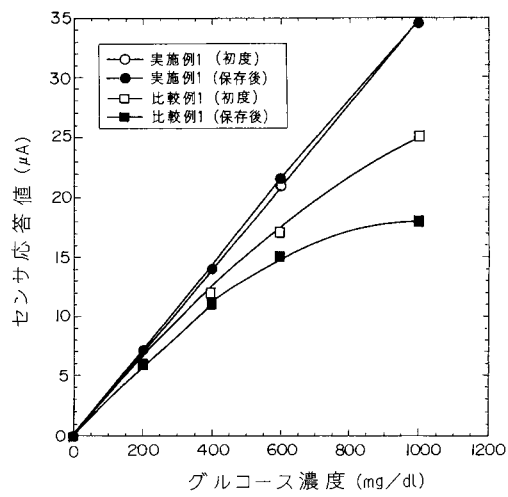
【図1】



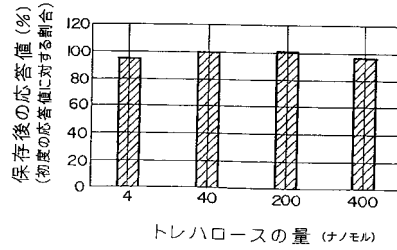
【図2】



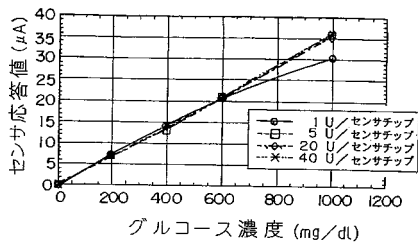
【図3】



【図5】



【図4】



フロントページの続き

審査官 黒田 浩一

- (56)参考文献 特開平05 - 087767 (JP, A)
特表平05 - 505459 (JP, A)
特表2001 - 526388 (JP, A)
国際公開第99 / 030152 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G01N 27/26-27/49