

(43) 国際公開日
2006 年 11 月 23 日 (23.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/123730 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 27/327 (2006.01) C12N 11/08 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2006/309906

(22) 国際出願日:

2006 年 5 月 18 日 (18.05.2006)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2005-148253 2005 年 5 月 20 日 (20.05.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アーク
レイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京
都府京都市南区東九条西明田町 5 7 Kyoto (JP).

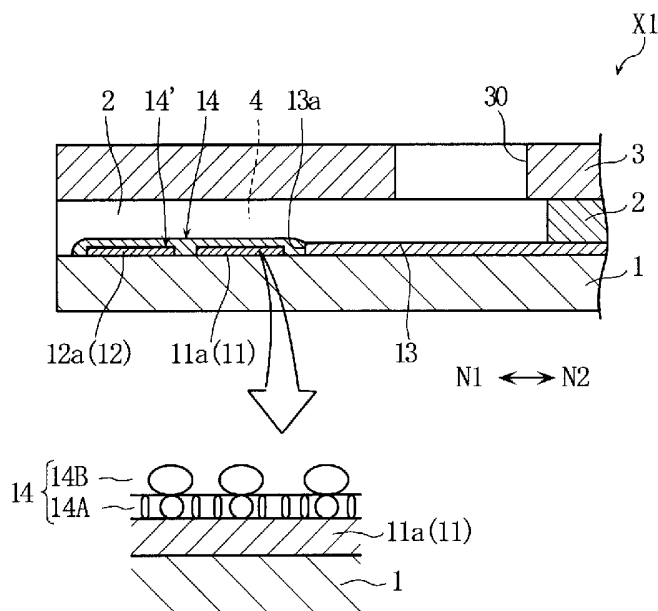
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 勝木 幸治 (KAT-
SUKI, Koji) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
山岡 秀亮 (YAMAOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6018045 京
都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株
式会社内 Kyoto (JP).(74) 代理人: 吉田 稔, 外 (YOSHIDA, Minoru et al.); 〒
5430014 大阪府大阪市天王寺区玉造元町 2 番 3 2 -
1 3 0 1 Osaka (JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN-IMMOBILIZED MEMBRANE, METHOD FOR IMMOBILIZATION OF PROTEIN, ENZYME-IMMO-
BILIZED ELECTRODE, AND BIOSENSOR

(54) 発明の名称: タンパク質固定膜、タンパク質の固定化方法、酵素固定化電極、およびバイオセンサ

(57) Abstract: Disclosed is a protein-immobilized membrane (14) comprising a layer (14A) having a cell membrane-like structure and a protein (14B) which is immobilized onto the layer (14A) and comprises cytochrome or a cytochrome complex. Also disclosed are a method for forming the protein-immobilized membrane (14), and an enzyme-immobilized electrode and a biosensor (X1) having the protein-immobilized membrane (14). The layer (14A) preferably comprises a phospholipid polymer or the like, and the protein (14B) is preferably CyGDH which contains an α -subunit having a glucose dehydrogenase activity and cytochrome C having a function of electron transfer or the like.

[続葉有]



WO 2006/123730 A1



KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 本発明は、細胞膜類似構造層(14A)と、細胞膜類似構造層(14A)に固定化され、かつチトクロムまたはチトクロム複合体を含むタンパク質(14B)と、を含む、タンパク質固定化膜(14)に関するものである。本発明はさらに、タンパク質固定化膜(14)を形成するための方法、タンパク質固定化膜(14)を備えた酵素固定化電極およびバイオセンサ(X1)に関する。好ましくは、細胞膜類似構造層(14A)は、たとえばリン脂質ポリマーを含んだものとされ、タンパク質(14B)は、たとえばグルコース脱水素活性を有する α サブリットおよび電子伝達機能を有するチトクロムCを含むCyGDHである。

明 細 書

タンパク質固定膜、タンパク質の固定化方法、酵素固定化電極、および
バイオセンサ

技術分野

[0001] 本発明は、被固定化材にチトクロムを含むタンパク質を固定化する技術に関する。

背景技術

[0002] バイオセンサとしては、電気化学的手法あるいは光学的手法により試料の分析を行えるように構成されたものが汎用されている。電気化学的手法により試料の分析を行うためのバイオセンサとしては、たとえば本願の図12に示したバイオセンサ9がある（たとえば特許文献1参照）。

[0003] 図示したバイオセンサ9は、作用極90および対極91が形成された基板92に対して、スペーサ93を介してカバー94が接合されたものである。このバイオセンサ9はさらに、基板92、スペーサ93およびカバー94によって規定された流路95を有している。この流路95は、毛細管力により試料を移動させるものであり、その内部に試薬部96が形成されている。

[0004] 試薬部96は、作用極90および対極91の端部どうしを？げるように形成されており、酸化還元酵素を含んでいる。酸化還元酵素は、たとえばグルコースから電子を取り出す反応を触媒するものであり、グルコースから取り出された電子は作用極90に供給される。作用極90に対する電子供給量は、作用極90および対極91を利用して応答電流として測定することができる。

[0005] ここで、試薬部96を形成するための代表的な方法、すなわち酸化還元酵素を固定化するための代表的な方法としては、次に説明するような4つのものがある（たとえば非特許文献1参照）。

[0006] 第1の方法は、酸化還元酵素を含む材料液を対象物の目的部位に点着した後、材料液を乾燥させることにより対象物の目的部位に酸化還元酵素を固定化する方法である。

[0007] 第2の方法は、グルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いて、対象物の目的部位に酸

化還元酵素を固定化する方法である。

[0008] 第3の方法は、カルボメチルセルロース(CMC)などのポリマー中に酸化還元酵素を包括させた状態でポリマーとともに酸化還元酵素を固定化する方法である。

[0009] 第4の方法は、カーボンペーストなどの導電性成分中に酸化還元酵素を分散させたペーストを用い、このペーストを対象物の目的部位に塗り付けて酸化還元酵素を固定化する方法である。

[0010] しかしながら、従来の酸化還元酵素の固定化方法では、酸化還元酵素の活性発現に効率の良い向き(位置)に活性部位が位置するように、個々の酸化還元酵素を固定化できない。すなわち、酸化還元酵素の配向性を制御して固定化できないといった問題がある。たとえば、従来の方法においては、隣接して存在する酸化還元酵素の活性部位が向き合って存在し、あるいはタンパク質どうしが凝集して活性部位が凝集塊の内部に存在するため、効率良く利用できる酸化還元酵素(活性部位)の割合が相対的に低い。そのため、酸化還元酵素が基質と接触できる確率が低くなり、固定化された酸化還元酵素の全体としての活性は低くなる。その結果、固定化された酸化還元酵素によって目的とする機能を発現させるためには、酸化還元酵素の仕込み量を大きくしなければならず、コスト的に不利となる。とくに、酸化還元酵素に高価なものが多いため、酸化還元酵素においては仕込み量を多く必要とすることに起因するコスト的なデメリットは、より顕著に現れる。

[0011] また、酸化還元酵素の配向性を制御できないことから、酸化還元酵素の仕込み量が同じであっても、バイオセンサ毎に実際に利用できる酸化還元酵素の割合にバラつきが生じる。その結果、配向性を制御できない従来の固定化方法では、この固定化方法に起因して測定結果にバラつきが生じる。

[0012] 先に説明したバイオセンサ9ではさらに、酸化還元酵素の活性部位において基質から取り出した電子は作用極90に供給されるが、そのときに酸化還元酵素の配向性がランダムであると、酸化還元酵素から作用極90への電子伝達効率が悪くなる。そのため、酸化還元酵素の配向性がランダムとなる固定化方法を採用する場合には、酸化還元酵素と作用極90との間の電子授受を媒体するための電子伝達物質を添加する必要が生じる。したがって、従来の手法により酸化還元酵素が固定化されたバイ

オセンサ9では、電子伝達物質が必要な分だけコスト的に不利である。また、電子伝達物質としては、フェロシアン化カリウムなどの金属錯体が使用されており、それらの金属錯体の中には人体に悪影響を及ぼすものも存在する。そのため、バイオセンサ9をはじめとする分析用具においては、電子伝達物質を使用するのは好ましくない。

[0013] 特許文献1:特公平8-10208号公報

非特許文献1:水谷文雄,「酵素薄膜修飾電極のセンサーへの応用」,分析化学,日本分析化学学会,1999年9月,第48巻,第9号,p809~821

発明の開示

[0014] 本発明は、酸化還元酵素などのタンパク質を配向性良く固定化し、少ない酵素量で適切かつコスト的に有利に目的とする活性を発現させることを課題としている。

[0015] 本発明はさらに、バイオセンサにおいて、電子伝達物質を使用することなく、適切にグルコースなどの基質の濃度測定を行えるようにすることを課題としている。

[0016] 本発明の第1の側面においては、細胞膜類似構造層と、上記細胞膜類似構造層に固定化され、かつチトクロムまたはチトクロム複合体を含むタンパク質と、を含んでいる、タンパク質固定化膜が提供される。

[0017] 本発明の第2の側面においては、被固定化部材における目的部位に、細胞膜類似構造層を形成する第1ステップと、上記細胞膜類似構造層に対して、チトクロムまたはチトクロム複合体を含むタンパク質を自己組織化させる第2ステップと、を含んでいる、タンパク質の固定化方法が提供される。

[0018] 本発明のタンパク質固定化方法は、第1ステップに先んじて行なわれ、かつ上記目的部位に親水処理を施す行第3ステップをさらに含んでいるのが好ましい。

[0019] 本発明の第3の側面においては、基材と、上記基材に固定化された酵素含有層と、を備えており、かつ、上記酵素含有層は、細胞膜類似構造層と、上記細胞膜類似構造層に対して自己組織化した状態で固定化されたチトクロムをサブユニットとする酵素と、を含んでいる、酵素固定化電極が提供される。

[0020] 本発明の第4の側面においては、基板と、上記基板に固定化された酵素含有層と、を備えており、かつ、上記酵素含有層は、細胞膜類似構造層と、上記細胞膜類似構造層に対して自己組織化した状態で固定化されたチトクロムをサブユニットとする酵

素と、を含んでいる、バイオセンサが提供される。

[0021] 本発明のバイオセンサは、たとえば試料を移動させるための流路と、流路の内部に設けられた試薬部と、をさらに備えたものとされる。

[0022] 本発明のバイオセンサはまた、流路において一部が露出し、かつ試料に電圧を印加するのに利用される作用極および対極をさらに備えたものとされる。この場合、細胞膜類似構造層は、少なくとも一部が上記作用極上に形成される。

[0023] 試薬部はまた、発色剤を含んだものとして形成してもよい。この場合、試薬部は、たとえば発色剤を含む発色層と、細胞膜類似構造層および酵素を含む酵素含有層と、を備えたものとされる。

[0024] 本発明における細胞膜類似構造層は、たとえばリン脂質ポリマーを含んだものとされる。リン脂質ポリマーとしては、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体を用いるのが好ましい。

[0025] 本発明における細胞膜類似構造層はまた、シランカップリング剤を導入させたものであるのが好ましい。シランカップリング剤としては、テトラエトキシシランを用いるのが好ましい。

[0026] 本発明における酵素などのタンパク質は、たとえばグルコース脱水素活性を有する α サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むCyGDHである。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]本発明の第1の実施の形態に係るバイオセンサを示す全体斜視図である。

[図2]図1に示したバイオセンサの分解斜視図である。

[図3]図1のIII-III線に沿う断面図およびその要部拡大図である。

[図4]本発明の第2の実施の形態に係るバイオセンサの全体斜視図である。

[図5]図4のV-V線に沿う断面図およびその要部拡大図である。

[図6]実施例1において、カーボン電極の表面状態を、AFMによって観察した結果を示すAFM像である。

[図7]実施例1において、カーボン電極の表面にリン脂質ポリマー層を形成した状態を、AFMによって観察した結果を示すAFM像である。

[図8]実施例1において、リン脂質ポリマー層の表面にCyGDHを固定化した状態を、

AFMによって観察した結果を示すAFM像である。

[図9]実施例2において用いた電流値測定装置の概略構成を示す模式図である。

[図10]実施例2における応答電流値の測定結果をタイムコースとして示したグラフである。

[図11]実施例2における電流値の測定結果を、グルコース濃度との関係として示したグラフである。

[図12]従来のバイオセンサの一例の要部を示す断面図である。

符号の説明

- [0028] X1, X2 バイオセンサ
- 1, 5 (バイオセンサの)基板
 - 11 (バイオセンサの)作用極
 - 12 (バイオセンサの)対極
 - 14, 51 (バイオセンサの)試薬部
 - 14A, 50B (試薬部の)細胞膜類似構造層
 - 14B, 50C (試薬部の)CyGDH層
 - 4, 8 キャピラリ(流路)
 - 51A (試薬部の)発色層

発明を実施するための最良の形態

- [0029] 以下、本発明の好ましい実施の形態について、第1および第2の実施の形態として、図面を参照して説明する。

- [0030] まず、本発明の第1の形態について、図1ないし図3を参照しつつ説明する。

- [0031] 図1ないし図3に示したバイオセンサX1は、使い捨てとして構成されたものであり、濃度測定装置(図示略)に装着して血糖値を測定するために使用するものである。このバイオセンサX1は、電気化学的手法により血糖値を測定するのに適合したものであり、長矩形形状の基板1に対して、スペーサ2を介してカバー3を積層した形態を有している。バイオセンサX1においては、各要素1～3により、基板1の長手方向(図中のN1, N2方向)に延びるキャピラリ4が規定されている。キャピラリ4は、導入口40から導入された血液を、毛細管現象を利用して基板1の長手方向(図中のN1, N2方向)

に移動させるとともに、導入された血液を保持するためのものである。

- [0032] スペーサ2は、基板1の上面10からカバー3の下面30までの距離、すなわちキャピラリ4の高さ寸法を規定するためのものであり、たとえば両面テープにより構成されている。このスペーサ2には、先端部が開放したスリット20が形成されている。スリット20は、キャピラリ4の幅寸法を規定するためのものであり、スリット20における先端の開放部分は、キャピラリ4の内部に血液を導入するための導入口40を構成している。
- [0033] カバー3は、キャピラリ4の内部の気体を外部に排気するための排気口30を有している。このようなカバー3は、たとえばビニロンや高結晶化PVAなどの濡れ性が高い熱可塑性樹脂により形成されている。
- [0034] 図2および図3によく表れているように、基板1は、たとえばPETなどの絶縁樹脂材料により形成されており、その上面10に、作用極11、対極12、絶縁膜13、および試薬部14が形成されたものである。
- [0035] 作用極11および対極12は、全体としてL字状の形態に形成されている。より具体的には、作用極11および対極12は、大部分が基板1の長手方向(図中のN1, N2方向)に延びているとともに、端部11a, 12aが基板1の短手方向(図中のN3, N4方向)に延びている。一方、作用極11および対極12の端部11b, 12bは、濃度測定装置(図示略)に設けられた端子に接触させるための端子部を構成している。作用極11および対極22は、たとえばカーボンペーストを用いたスクリーン印刷により形成することができる。作用極11および対極12の形成は、カーボン以外の導電性材料を用いて行うことができ、またスピコート、熱転写、カーボンロッドスライス、蒸着、スパッタあるいはCVDによって行うこともできる。
- [0036] 絶縁膜13は、作用極11および対極12の端部11a, 12a, 11b, 12bを露出させるようにして作用極11および対極12の大部分を覆っている。この絶縁膜13は、作用極11および対極12の端部11a, 12aを露出させるための開口部13aを有している。この開口部13aは、試薬部14を形成するための領域を規定するものであり、基板1の長手方向(図中のN1, N2方向)に延びる長矩形状に形成されている。
- [0037] 絶縁膜13は、撥水性の高い材料を含むインクを用いたスクリーン印刷、あるいは感光性樹脂材料を用いたフォトリソグラフィにより形成することができる。

- [0038] 試薬部14は、絶縁膜13の開口部13aにおいて、作用極11および対極12の端部11a, 12aどうしを橋渡すようにして設けられている。この試薬部14は、細胞膜類似構造層14AおよびCyGDH層14Bを有している。
- [0039] 細胞膜類似構造層14Aは、配向性を持たせた状態でCyGDHを固定化するためのものである。この細胞膜類似構造層14Aは、リン脂質ポリマーを含んだ溶液を、基板1、作用極11および対極12における絶縁膜13の開口部13aを介して露出した部分14'（以下「露出部分14'」という）に点着した後に、乾燥させることにより形成することができる。
- [0040] リン脂質ポリマーとしては、たとえば2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)重合体を使用することができる。MPC重合体としては、MPCを単独で重合させ、あるいはMPCをメタクリル酸エステル(たとえばブチルメタクリレート)などの疎水性モノマーと共重合させたものを使用することができる。
- [0041] 細胞膜類似構造層14Aを形成するためのリン脂質ポリマーは、細胞膜を構成するリン脂質と類似の構造を分子内に有するモノマー単位を含む重合体であればよく、MPC重合体以外のポリマーを使用することもできる。
- [0042] また、リン脂質ポリマーとしては、シランカップリング剤を導入したものを使用するのが好ましい。これにより、露出部分14'に対するリン脂質ポリマーの結合性を高めることができる。
- [0043] また、細胞膜類似構造層14Aを形成するに当たっては、露出部分14'を親水処理しておくのが好ましい。これにより、露出部分14'に水酸基やカルボキシル基などの親水基が導入され、この親水基がシランカップリング剤と結合することによって、より強固に露出部分14'にリン脂質ポリマーを固定化することができる。
- [0044] ここで、ポリマーにおけるシランカップリング剤の量は、たとえばポリマー成分100重量部に対して、10～500重量部とされる。シランカップリング剤としては、たとえばテトラエトキシシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリス(2-メトキシエトキシ)シラン、 γ -メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、 β -(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- γ -

アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -クロロプロピルトリメトキシシラン、あるいは γ -メルカプトプロピルトリメトキシシランを挙げることができ、これらのシランカップリング剤は、単独で使用しても、複数種を併用してもよい。

[0045] 一方、露出部分14'の親水処理は、公知の種々の方法により行うことができる。本発明において採用することができる親水処理としては、VUV処理、UV処理、コロナ放電処理、あるいはプラズマ処理などを挙げることができる。

[0046] CyGDH層14Bは、細胞膜類似構造層14Aに対してCyGDHを自己組織的に固定化させたものである。なお、図3においては、細胞膜類似構造層14Aの表面にCyGDHが固定化された様子が描かれているが、これは本案を説明するために便宜的に示した模式図である。すなわち、本発明者らは、細胞膜類似構造層14Aに対してCyGDHが自己組織的に固定化されることは確認しているものの、細胞膜類似構造層14Aに対してCyGDHがどのような状態で固定化されているのかについては現段階では確認しておらず、また、後述するブルクホルデリア・セパシアに属する微生物に由来のCyGDHは膜貫通タンパク質であるために、必ずしも図3に示したようにCyGDHが細胞膜類似構造層14Aの表面にのみ固定化されずに、CyGDHが細胞膜類似構造層14Aを貫通して細胞膜類似構造層14Aに固定化されている可能をも含んでいる。

[0047] 細胞膜類似構造層14Aに対するCyGDHの自己組織的固定化は、たとえば露出部分14'に細胞膜類似構造層14Aを形成した基板1を、CyGDHを含んだ酵素溶液中に浸漬した後に、あるいは細胞膜類似構造層14Aに上記酵素溶液を噴霧した後に乾燥させることにより行うことができる。

[0048] 細胞膜類似構造層14Aに対してCyGDHを自己組織的に固定化した場合には、後述するAFM像(図8参照)から推測できるように、CyGDHが配向性をもった状態で固定化される。すなわち、CyGDHは、 α サブユニットの活性部位が試薬部14の表層に位置した状態とされる一方で、チトクロムCが露出部分14'(作用極11)に近い位置もしくは接触した状態で細胞膜類似構造層14Aに固定化される。

[0049] ここで、本発明において使用されるCyGDHは、少なくともグルコース脱水素活性を有する α サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むものをさし、

α サブユニットおよびチトクロムC以外のサブユニットをさらに有するものも含まれる。このようなCyGDHの例は、国際公開第WO02/36779号パンフレットに開示されている。先の国際出願に記載のCyGDHは、ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物に由来するものであり、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaであり、かつFADを補欠因子としてもつとともに、グルコース脱水素活性を有する α サブユニットと、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaであり、電子伝達機能を有するチトクロムCと、を含むものである。また、本発明のCyGDHには、ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物から採取したCyGDHをコードする遺伝子が移入された形質転換体を利用して得られるものも含まれる。

- [0050] ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物に由来のCyGDHは、膜貫通タンパク質である。すなわち、先の微生物由来のCyGDHは、本来、細胞膜に存在するものであるため、そのようなCyGDHを用いた場合には、細胞膜類似構造層14Aに対して自己組織的に、かつ細胞膜に存在する場合と同様に配向性をもった状態でCyGDHを固定化することができる。このようなCyGDHの自己組織的固定化は、ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物に由来のCyGDHに限らず、本来、細胞膜に存在するCyGDHを用いた場合に達成することができる。
- [0051] このようなバイオセンサX1は、濃度測定装置(図示略)に装着した上で、バイオセンサX1の導入口40を介してキャピラリー4に血液を供給することにより、濃度測定装置(図示略)において血糖値の測定を自動的に行わせることができる。
- [0052] バイオセンサX1に対する血液の供給は、バイオセンサX1を濃度測定装置(図示略)に装着する前、あるいは装着した後のいずれであってよい。通常は、被験者の皮膚を切開して血液を出液させた後、その血液をバイオセンサX1の導入口40に付着させることにより行われる。
- [0053] 濃度測定装置(図示略)に対してバイオセンサX1を装着した場合、バイオセンサX1の作用極11および対極12が濃度測定装置の端子(図示略)に接触する。一方、バイオセンサX1においては、導入口40に付着させられた血液は、キャピラリー4において生じる毛細管現象により排気口30に向けて進行し、キャピラリー4に充填される。

- [0054] キャピラリ4においては、CyGDHが血液中のグルコースと特異的に反応してグルコースから電子が取り出される。その一方、血液に対して作用極11および対極12を利用して電圧を印加した場合には、CyGDHによって取り出された電子が作用極11に供給される。そして、濃度測定装置では、作用極11および対極12に対する電圧印加時に、たとえば作用極11に対する電子供給量を応答電流値として測定することにより、応答電流値に基づいて血糖値を演算することができる。
- [0055] バイオセンサX1では、CyGDHは、 α サブユニットの活性部位が試薬部14の表面に位置するようにCyGDHが配向性をもった状態で固定化される。そのため、試薬部14においては、グルコースから効率良く電子を取り出すことができる。これにより、バイオセンサX1では、目的とする活性発現のために必要とされるCyGDHの量を少なくし、コスト的に有利に目的とする活性を発現させることができる。
- [0056] また、CyGDHが配向性をもって固定化されることから、バイオセンサX1毎に、試薬部14に含まれるCyGDHの量および活性部位の向き(位置)にバラつきが生じること抑制することができる。これにより、バイオセンサX1毎の感度のバラつきが生じること抑制し、適切な血糖値測定を行うことができるようになる。
- [0057] バイオセンサX1ではさらに、CyGDHが配向性をもって固定化されることから、チトクロムCが露出部分14' (作用極11)に近い位置もしくは接触した状態で存在する。そのため、試薬部14においては、グルコースから取り出された電子を効率良く作用極11に供給することができる。これにより、バイオセンサX1では、金属錯体のような電子伝達物質を使用することなく、適切な応答電流を得ることができる。
- [0058] 次に、本発明の第2の実施の形態について、図4および図5を参照しつつ説明する。
- [0059] 図4および図5に示したバイオセンサX2は、光学的手法により血糖値を測定するのに適合したものとして構成されている点において、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)とは異なっている。
- [0060] バイオセンサX2は、長矩形状の基板5に対して、一対のスペーサ6を介してカバー7を積層した形態を有している。バイオセンサX2においては、各要素5～7により、基板5の長手方向(図中のN1, N2方向)に延びるキャピラリ8が規定されている。キャピ

ラリ8は、導入口80から導入された血液を、毛細管現象を利用して基板5の長手方向(図中のN1, N2方向)に移動させ、かつ導入された血液を保持するためのものである。

- [0061] キャピラリ8の内部には、試薬部51が形成されている。この試薬部51は、発色層51A上に、細胞膜類似構造層51BおよびCyGHD層51Cを形成したものである。
- [0062] 発色層51Aは、発色剤を含んだものであり、たとえば発色剤を含む溶液を基板5における目的部位に塗布した後に乾燥させることにより形成することができる。
- [0063] ここで、本発明において使用することができる発色剤としては、たとえばMTT(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)、INT(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride)、WST-4(2-(4-Iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)、および4AA(4-Aminoantipyrine)を挙げることができる。
- [0064] 細胞膜類似構造層51BおよびCyGDH層51Cは、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)の場合と同様にして形成することができる。
- [0065] このバイオセンサX2においても、試薬部51が細胞膜類似構造層51BおよびCyGDH層51Cを含んだものとして、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)の場合と同様にして形成されており、しかも、細胞膜類似構造層51Bが発色層51Aに接触した状態とされている。そのため、試薬部51は、CyGDHが配向性を持った状態、すなわちCyGDHにおける α サブユニットの活性部位が表層に存在する一方で、CyGDHにおけるチトクロムCが発色層51Aに接触し、あるいは発色層51Aの近くに存在した状態で細胞膜類似構造層51Bに固定化される。したがって、バイオセンサX2においても、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)と同様な効果を楽しむことができる。
- [0066] 本発明は、上述の実施の形態には限定されず、種々に変更可能である。たとえば、本発明は、使い捨てとして構成されたバイオセンサに限らず、たとえば少なくとも電極部分を人体に埋め込んで連続的に血糖値を測定するために使用するバイオセンサ、グルコース以外の基質の濃度を測定するためのバイオセンサ、あるいはグルコースなどの基質の濃度を測定するための酵素電極についても適用することができる。

実施例 1

[0067] 本実施例では、PET基材の表面に、カーボン電極、リン脂質ポリマー層およびCyGDH層を形成する一方で、それらの層を形成する前後における表面性状を、原子間力顕微鏡 (AFM) (商品名「D-3100」; デジタル インスツルメンツ社製) を用いて観察した。

[0068] (カーボン電極表面の観察)

カーボン電極は、日本アンチンソン社製のカーボンインクを用いたスクリーン印刷により形成した。カーボン電極のAFM像については、図6に示した。図6から分かるように、カーボン電極層の表面は、カーボン粒子 (平均粒子径が100nm程度) が現れた比較的 to 大きな凹凸面となっていた。

[0069] (リン脂質ポリマー層表面の観察)

リン脂質ポリマー層は、カーボン電極の表面をVUV処理 (親水処理) した後に、カーボン電極の表面にMPC重合体溶液を塗布して乾燥させることにより形成した。なお、VUV処理は、「MECL-M3-750」(エム・ディ・エキシマ社製) を用いて、大気中において、波長が172nmのエキシマレーザ光を、照射距離を1mmとして、カーボン電極層の表面に180秒間照射することにより行った。MPC重合体溶液としては、シランカップリング剤としてのテトラエトキシシランを導入したMPC重合体 (商品名「リピジュア」; 日本油脂社製) を使用した。

[0070] リン脂質ポリマー層を形成した後のAFM像については図7に示した。図7から分かるように、リン脂質ポリマー層の表面には、ポリマーにおけるリン脂質部位が現れているものの、リン脂質部位の直径が2~3nmとカーボン粒子に比べて小さいため、リン脂質ポリマー層の表面はカーボン電極層に比べて滑面となっていた (図6参照)。

[0071] (CyGDH層表面の観察)

CyGDH層は、リン脂質ポリマー層が形成されたカーボン電極を、CyGDH溶液に10分間含浸することにより形成した。CyGDH溶液におけるCyGDHの濃度は、活性基準において100U/ μ Lとした。CyGDH層を形成した後のAFM像については、図8に示した。

[0072] 図8から分かるように、リン脂質ポリマー層の表面には、規則的に並んで配置された

直径6～30nm程度の塊状物(CyGDH)が確認された。すなわち、リン脂質ポリマーに対しては、少なくともCyGDHの一部が表層に現れるようにCyGDHが固定化されていた。また、塊状物が規則的に並んで配置されていることから、CyGDHは、配向性を持ってリン脂質ポリマー層に固定化されているものと推測される。

実施例 2

- [0073] 本実施例においては、リン脂質ポリマー層を介してCyGDHを固定化した電極(本案電極)およびリン脂質ポリマーを介さずにCyGDHを固定化した電極(比較電極)のそれぞれについて、応答性を検討した。
- [0074] 本案電極としては、実施例1と同様に、カーボン電極にリン脂質ポリマー層を形成した後に、CyGDHを固定化したものを使用した。
- [0075] 一方、比較電極は、リン脂質ポリマー層を形成しなかった点を除いては、本案電極と同様にして形成した。
- [0076] 本案電極および比較電極の応答性は、図9に示した電流測定装置Yを構築し、この電流値測定装置Yによってグルコース溶液に電圧を印加したときの応答電流値として評価した。
- [0077] 電流値測定装置Yは、作用極Y1、参照極Y2および対極Y2を備えたものであり、それらの電極Y1～Y3がポテンシオスタットY4に接続されたものである。この電流値測定装置Yでは、電極Y1～Y3をグルコース溶液に浸漬してグルコース溶液に電圧を印加することが可能であり、また電圧印加時の応答電流値を測定することが可能である。ここで、作用極Y1は、先に説明した方法により形成した本案電極または比較電極であり、参照電極Y2は、銀／塩化銀電極(商品名「RE-1B」;BAS社製)であり、対極Y3は白金電極である。
- [0078] (リニアスイープボルタンメトリー)
- 本実施例においては、本案電極および比較電極の応答性を検討する前に、濃度の異なる複数種のグルコース溶液のそれぞれについて、本案電極を作用極Y1として、先に説明した電流値測定装置Yを用いてリニアスイープボルタンメトリー測定を行った。
- [0079] この測定においては、掃引電圧は、100mV/secとし、-400mV～+700mVの

範囲で応答電流値を測定した。グルコース溶液としては、0mg/dL、50mg/dL、100mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、および600mg/dLのものを使用した。その結果、+100～+700mVの範囲において、グルコース溶液の濃度の差に応じた応答電流値の差が見受けられた。この結果を踏まえて、以下に行う応答電流値の測定においては、グルコース溶液に対する印加電圧を+600mVに設定した。

[0080] (応答性)

本案電極および比較電極の応答性は、濃度の異なる複数種のグルコース溶液のそれぞれについて、本案電極または比較電極を作用極Y1として、先に説明した電流値測定装置Yを用いて応答電流値のタイムコースを測定することにより行った。応答電流値測定時の印加電圧は、上述の通り+600mVとし、グルコース溶液としては、0mg/dL、50mg/dL、100mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、および600mg/dLのものを使用した。それぞれのグルコース溶液に対する応答電流値のタイムコースについては、図10に示した。また、測定開始から1秒後の応答電流値について、グルコース濃度の関係として図11に示した。

[0081] 図10および図11から分かるように、本案電極では μ オーダーの応答電流値が測定されている一方で、比較電極ではnオーダーの応答電流値しか測定されていない。すなわち、比較電極では、従来より報告されている金属錯体などの電子伝達物質を使用しない系における応答電流値の測定結果(nオーダー)と同様な結果が得られた。その一方で、本案電極では、従来の報告よりも遥かに大きな μ オーダー応答電流値が得られ、本案電極の応答性(感度)が高いことが確認された。

[0082] また、図10および図11からは、本案電極を用いた場合には、グルコース濃度の相違を応答電流値の相違として適切に反映させることができることも分かる。そのため、本案電極を用いた場合には、少なくとも本実施例において応答電流値を測定したグルコース濃度の範囲(0～600mg/dL)において、適切にグルコース濃度を測定することができる。

[0083] このように、リン脂質ポリマーを介してCyGDHを固定化した本案電極は、金属錯体などの電子伝達物質を用いなくても、グルコース濃度を測定するのに十分な応答性(感度)を有している。そのため、本案電極では、電子伝達物質を用いずとも適切なグ

ルコース濃度(たとえば血糖値)の測定が可能であるばかりか、電子伝達物質を用いる必要がないために、人体に埋め込んで使用しても人体に対する悪影響はない。その結果、本発明は、人体に埋め込んで血糖値を連続的に測定するために使用するバイオセンサに対して問題なく適用することができる。

- [0084] また、本案電極において採用されていたCyGDHの固定化方法、すなわちリン脂質ポリマー溶液の点着およびCyGDH溶液に対する浸漬は、極めて簡易な作業であり、その手法を μ TASに代表される微細流路を有するバイオセンサに対しても適切に適用できる。その場合、微細流路に形成されるリン脂質ポリマー層およびCyGDH層は極めて薄層であるために、それらの層を形成したとしても微細流路における試料の移動が著しく妨げられることもない。そのため、微細流路における大部分において、リン脂質ポリマー層およびCyGDH層からなる試薬部を形成しても何らの問題も生じない。したがって、微細流路に対して広範囲に亘って試薬部を形成することにより、 μ TASの欠点であった感度の低さを改善し、感度の高い μ TASを提供することができるようになる。

請求の範囲

- [1] 細胞膜類似構造層と、
上記細胞膜類似構造層に固定化され、かつチトクロムまたはチトクロム複合体を含むタンパク質と、
を含んでいる、タンパク質固定化膜。
- [2] 上記細胞膜類似構造層は、リン脂質ポリマーを含んでいる、請求項1に記載のタンパク質固定化膜。
- [3] 上記リン脂質ポリマーは、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体である、請求項2に記載のタンパク質固定化膜。
- [4] 上記細胞膜類似構造層は、シランカップリング剤を導入させたものである、請求項1に記載のタンパク質固定化膜。
- [5] 上記シランカップリング剤は、テトラエトキシシランである、請求項4に記載のタンパク質固定化膜。
- [6] 上記タンパク質は、グルコース脱水素活性を有する α サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むCyGDHである、請求項1に記載のタンパク質固定化膜。
- [7] 被固定化部材における目的部位に、細胞膜類似構造層を形成する第1ステップと、
、
上記細胞膜類似構造層に対して、チトクロムまたはチトクロム複合体を含むタンパク質を自己組織化させる第2ステップと、
を含んでいる、タンパク質の固定化方法。
- [8] 上記細胞膜類似構造層は、リン脂質ポリマーを含んでいる、請求項7に記載のタンパク質の固定化方法。
- [9] 上記リン脂質ポリマーは、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体である、請求項8に記載のタンパク質の固定化方法。
- [10] 上記第1ステップに先んじて行なわれ、かつ上記目的部位に親水処理を施す行第3ステップをさらに含んでいる、請求項7に記載のタンパク質の固定化方法。
- [11] 上記第2ステップにおいては、上記細胞膜類似構造層は、シランカップリング剤を

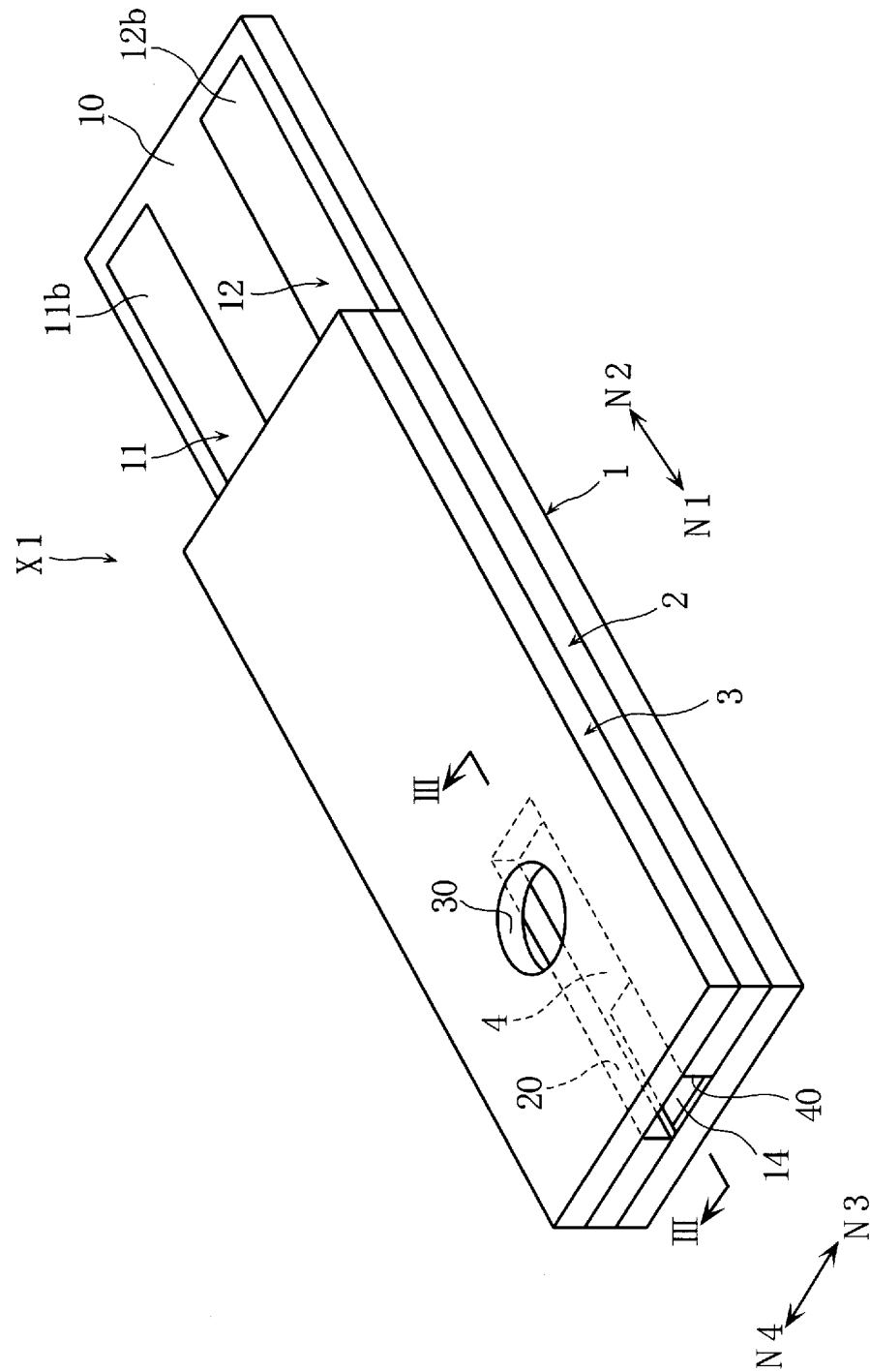
導入させたものとして形成される、請求項10に記載のタンパク質の固定化方法。

- [12] 上記シランカップリング剤は、テトラエトキシシランである、請求項11に記載のタンパク質の固定化方法。
- [13] 上記タンパク質は、グルコース脱水素活性を有する α サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むCyGDHである、請求項7に記載のタンパク質の固定化方法。
- [14] 基材と、上記基材に固定化された酵素含有層と、を備えており、かつ、
上記酵素含有層は、細胞膜類似構造層と、上記細胞膜類似構造層に対して自己組織化した状態で固定化されたチトクロムをサブユニットとする酵素と、を含んでいる、酵素固定化電極。
- [15] 上記細胞膜類似構造層は、リン脂質ポリマーを含んでいる、請求項14に記載の酵素固定化電極。
- [16] 上記リン脂質ポリマーは、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体である、請求項15に記載の酵素固定化電極。
- [17] 上記細胞膜類似構造層は、シランカップリング剤を導入させたものである、請求項14に記載の酵素固定化電極。
- [18] 上記シランカップリング剤は、テトラエトキシシランである、請求項17に記載の酵素固定化電極。
- [19] 上記酵素は、グルコース脱水素活性を有する α サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むCyGDHである、請求項14に記載の酵素固定化電極。
- [20] 基板と、上記基板に固定化された酵素含有層と、を備えており、かつ、
上記酵素含有層は、細胞膜類似構造層と、上記細胞膜類似構造層に対して自己組織化した状態で固定化されたチトクロムをサブユニットとする酵素と、を含んでいる、バイオセンサ。
- [21] 上記細胞膜類似構造層は、リン脂質ポリマーを含んでいる、請求項20に記載のバイオセンサ。
- [22] 上記リン脂質ポリマーは、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体である、請求項21に記載のバイオセンサ。

- [23] 上記細胞膜類似構造層は、シランカップリング剤を導入させたものである、請求項20に記載のバイオセンサ。
- [24] 上記シランカップリング剤は、テトラエトキシシランである、請求項23に記載のバイオセンサ。
- [25] 上記酵素は、グルコース脱水素活性を有する α サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むCyGDHである、請求項20に記載のバイオセンサ。
- [26] 試料を移動させるための流路と、
流路の内部に設けられた試薬部と、
をさらに備えている、請求項20に記載のバイオセンサ。
- [27] 上記流路において一部が露出し、かつ試料に電圧を印加するのに利用される作用極および対極をさらに備えている、請求項26に記載のバイオセンサ。
- [28] 上記細胞膜類似構造層は、少なくとも一部が上記作用極上に形成されている、請求項27に記載のバイオセンサ。
- [29] 上記試薬部は、発色剤を含んでいる、請求項26に記載のバイオセンサ。
- [30] 上記試薬部は、上記発色剤を含む発色層と、上記細胞膜類似構造層および上記酵素を含む酵素含有層と、を備えている、請求項29に記載のバイオセンサ。

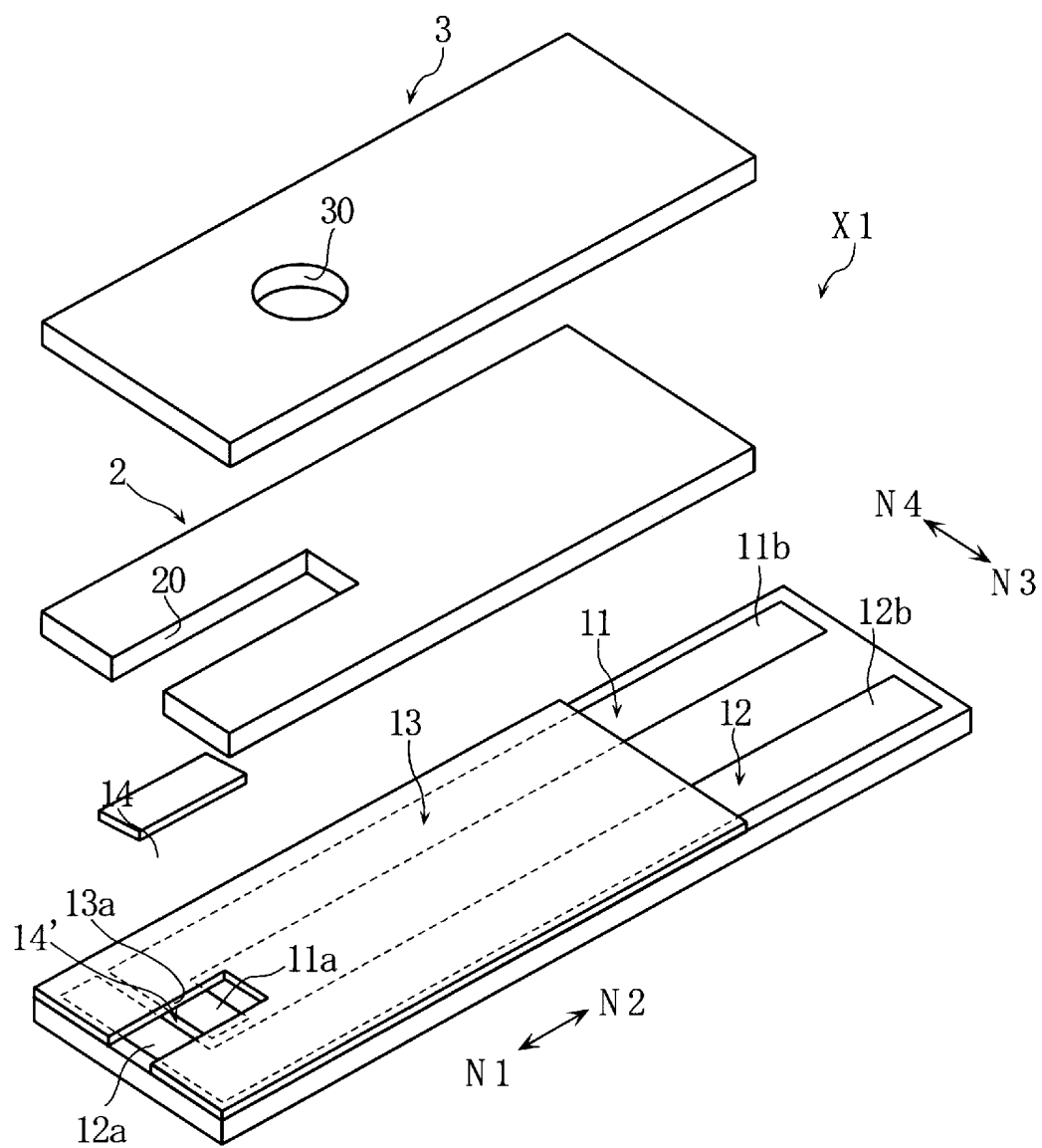
[図1]

FIG. 1



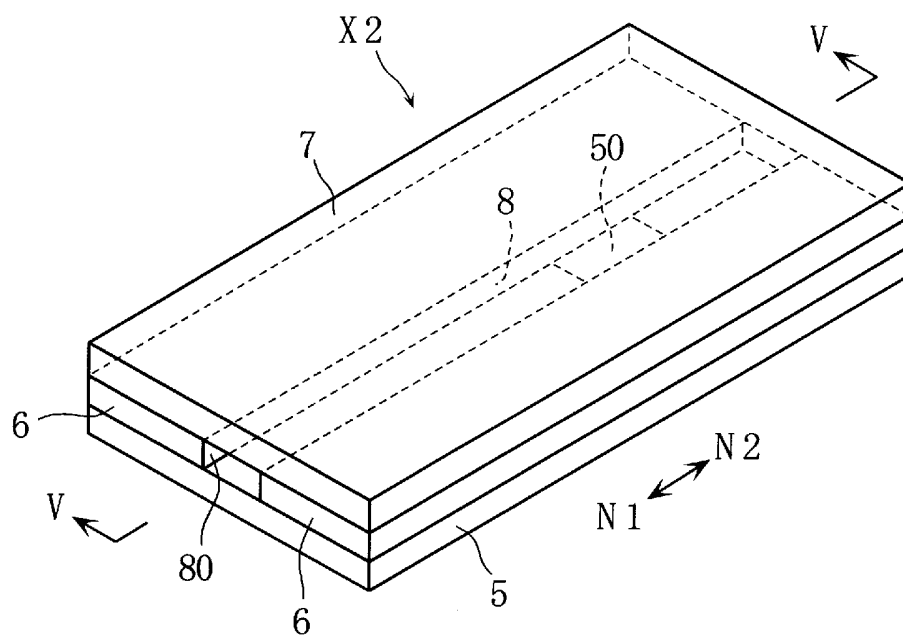
[図2]

FIG. 2



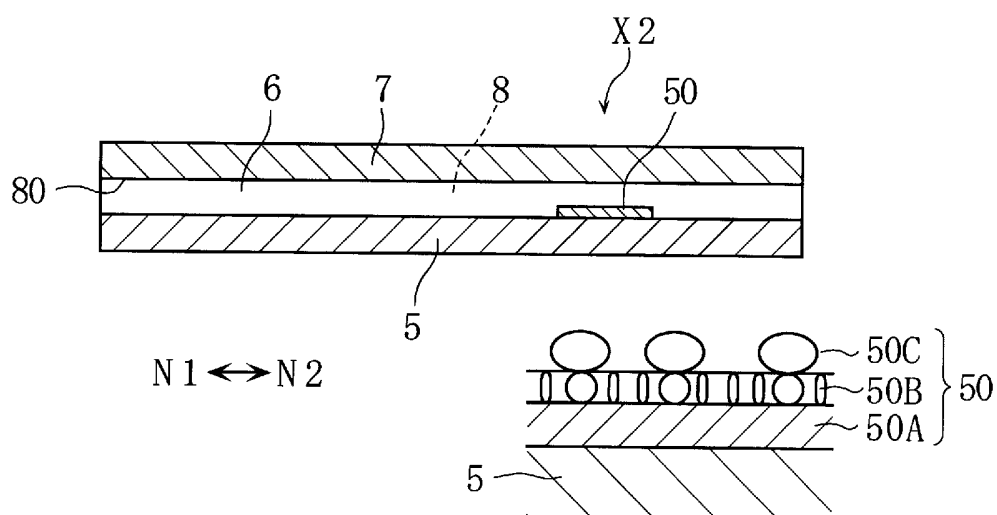
[図4]

FIG. 4



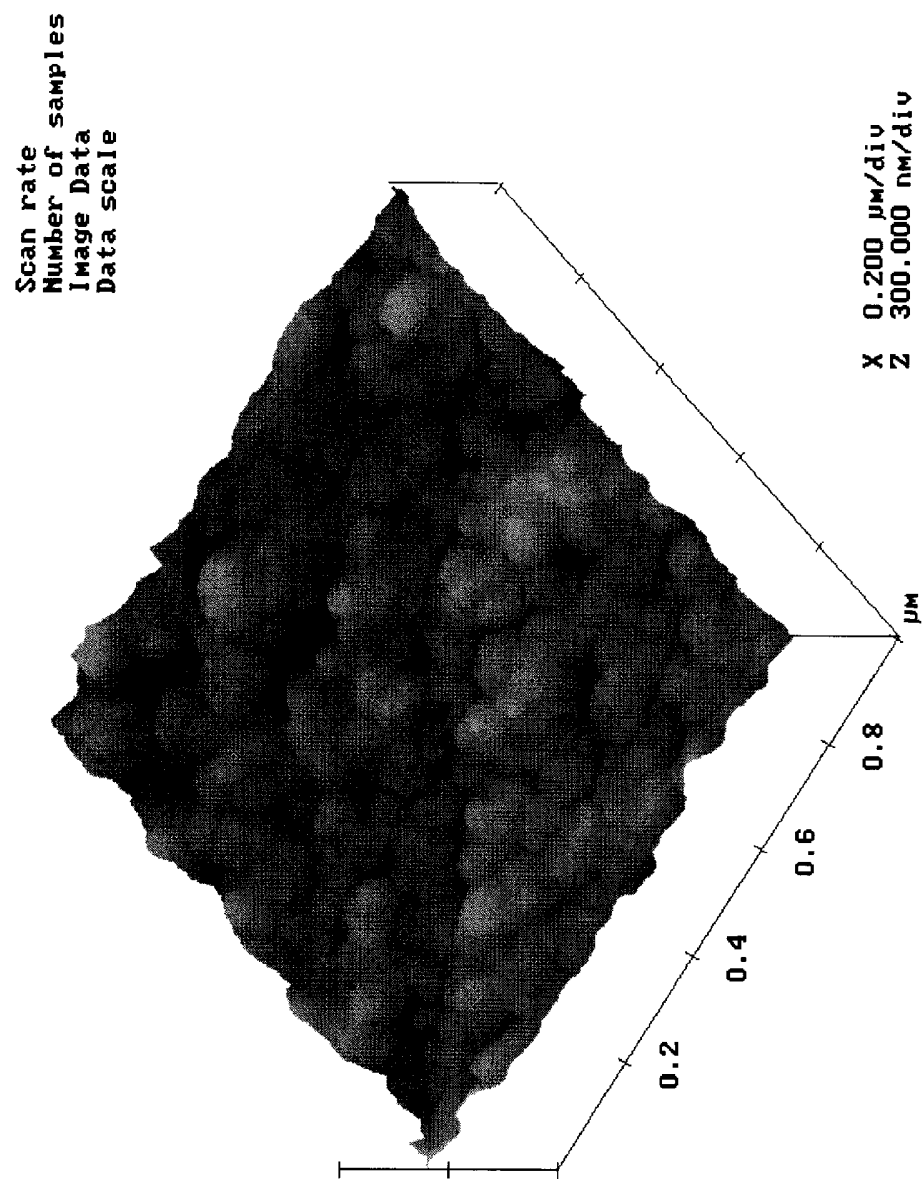
[図5]

FIG. 5

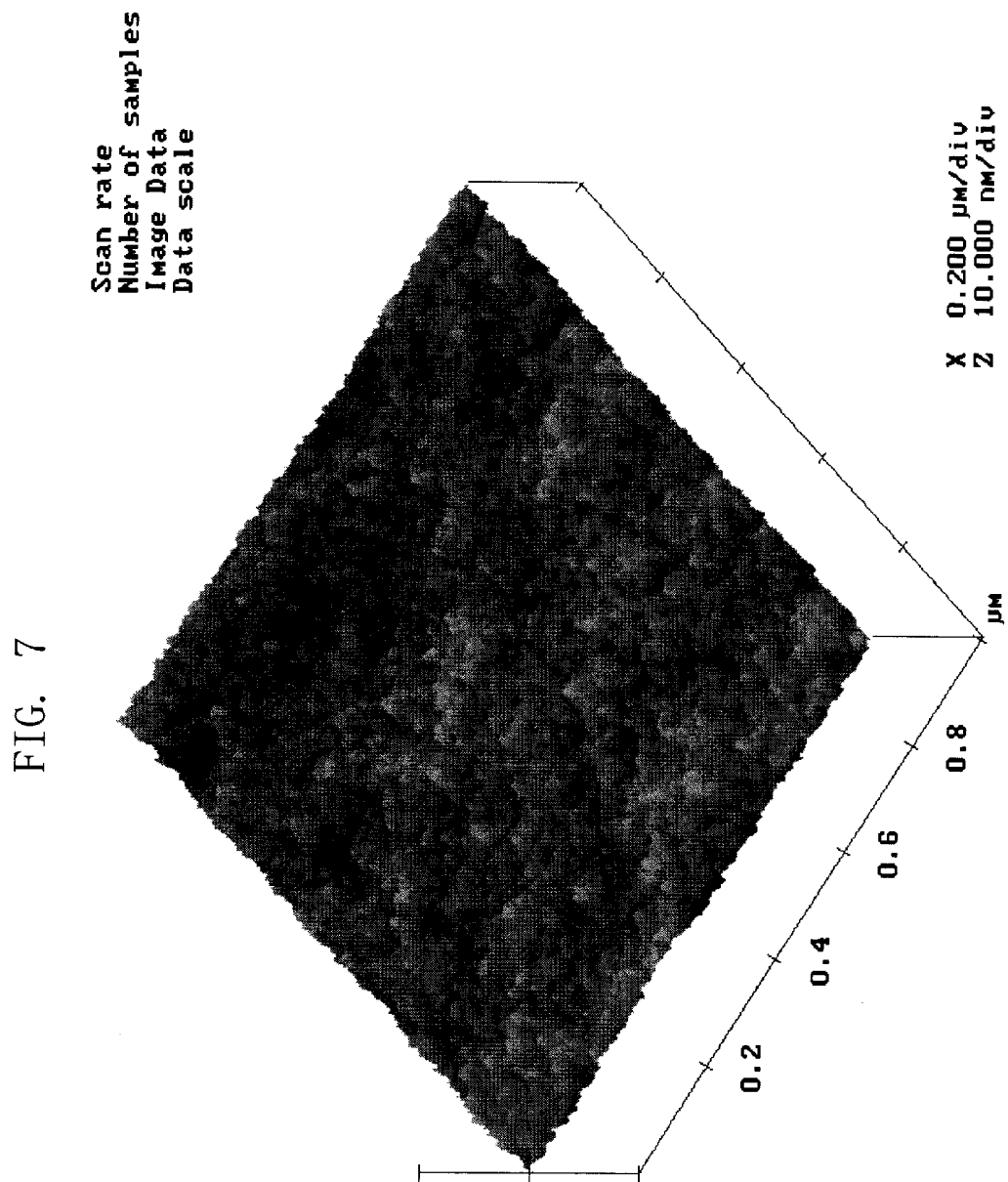


[図6]

FIG. 6

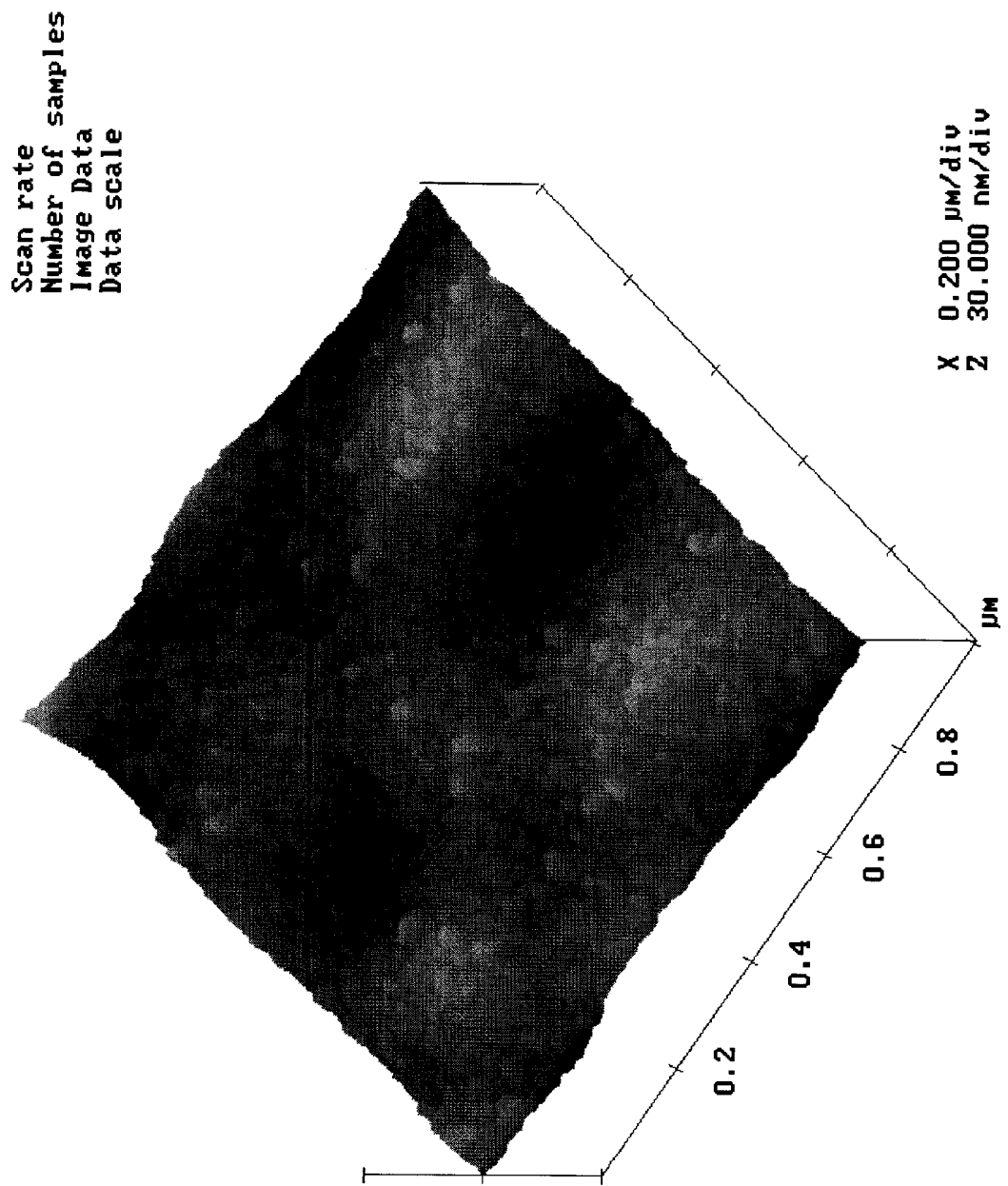


[図7]



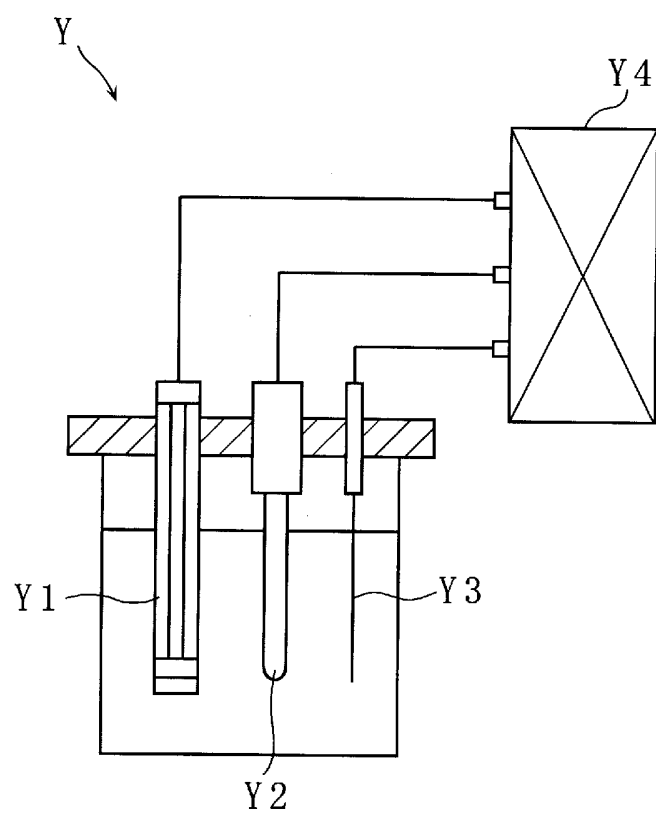
[8]

FIG. 8



[図9]

FIG. 9

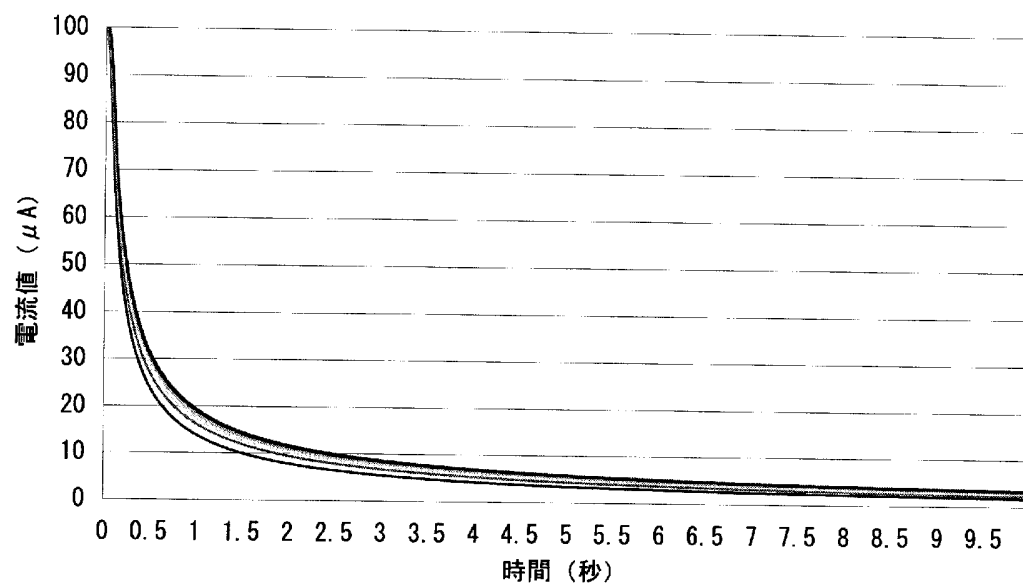


[図10]

FIG. 10

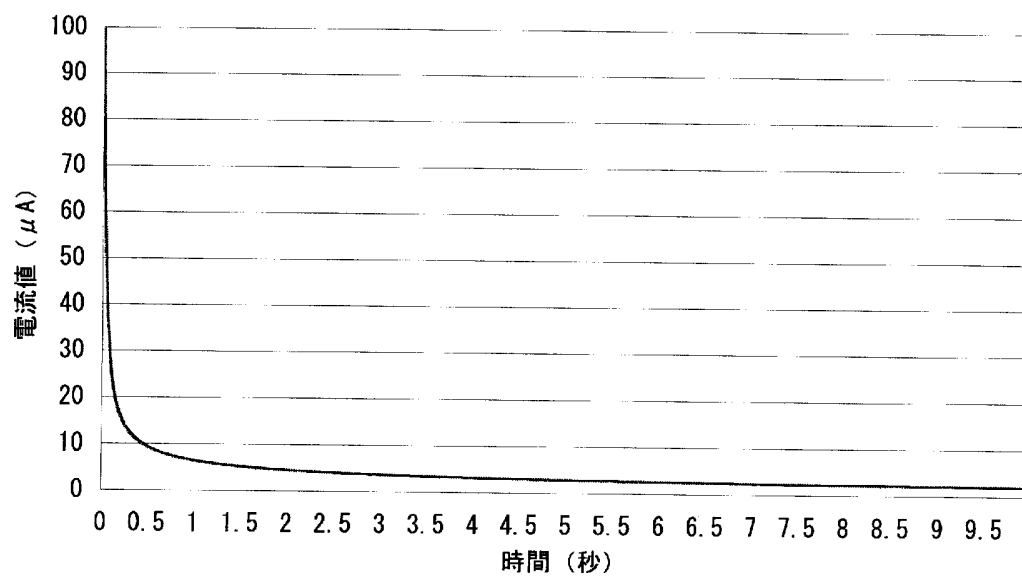
(a)

本案電極



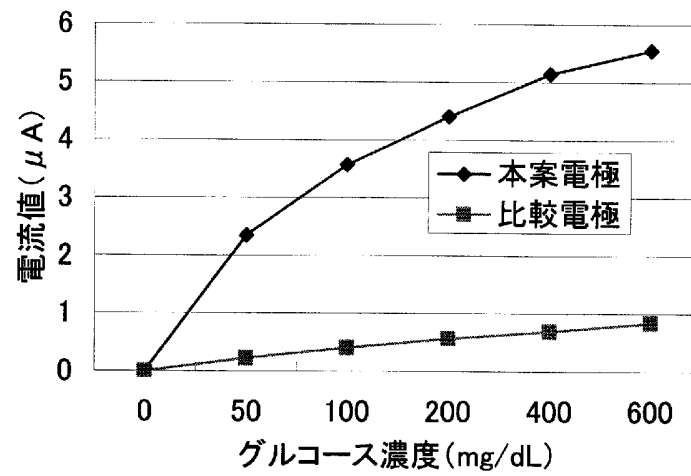
(b)

比較電極



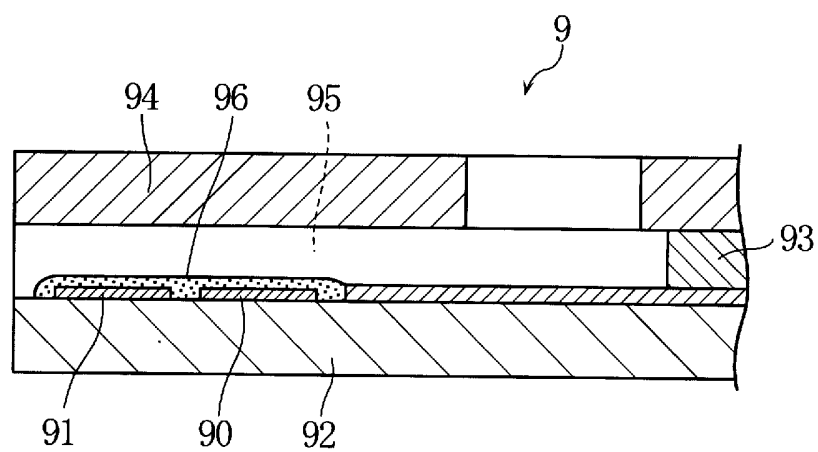
[図11]

FIG. 11



[図12]

FIG. 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/327(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N11/08(2006.01)i, G01N27/416(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/327, C12M1/34, C12N11/08, G01N27/416

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/023111 A1 (Koji HAYADE), 17 March, 2005 (17.03.05), Full text; all drawings (Family: none)	1-30
A	WO 2003/106702 A1 (Arkray, Inc.), 24 December, 2003 (24.12.03), Full text; all drawings (Family: none)	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 August, 2006 (15.08.06)

Date of mailing of the international search report
29 August, 2006 (29.08.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N27/327(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N11/08(2006.01)i, G01N27/416(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N27/327, C12M1/34, C12N11/08, G01N27/416

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2005/023111 A1 (早出広司) 2005.03.17, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-30
A	WO 2003/106702 A1 (アークレイ株式会社) 2003.12.24, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-30

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 0 8 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

2 9 . 0 8 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

2 J

3 4 9 5

柏木 一浩

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2