

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4981225号
(P4981225)

(45) 発行日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)

(24) 登録日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 27/327 (2006. 01)

A 6 1 K 49/00 (2006. 01)

C 1 2 M 1/34 (2006. 01)

C 1 2 M 1/40 (2006. 01)

C 1 2 N 9/04 (2006. 01)

G O 1 N 27/30 3 5 3 Z

G O 1 N 27/30 3 5 3 R

G O 1 N 27/30 3 5 3 D

A 6 1 K 49/00 Z

C 1 2 M 1/34 E

請求項の数 26 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-523790 (P2001-523790)
 (86) (22) 出願日 平成12年9月13日 (2000. 9. 13)
 (65) 公表番号 特表2003-513230 (P2003-513230A)
 (43) 公表日 平成15年4月8日 (2003. 4. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/040888
 (87) 国際公開番号 W02001/020019
 (87) 国際公開日 平成13年3月22日 (2001. 3. 22)
 審査請求日 平成19年9月11日 (2007. 9. 11)
 (31) 優先権主張番号 09/395, 466
 (32) 優先日 平成11年9月14日 (1999. 9. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 509142195
 オキシジェン・バイオセラピューティクス
 、インコーポレイテッド
 Oxygen Biotherapeut
 ics, Inc.
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92
 626、コスタ・メサ、ビルディング シ
 ー、エアウェイ・アベニュー 3189
 3189 Airway Avenue,
 Building C, Costa
 Mesa, CA 92626, U. S
 . A.

(74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体内埋め込み可能なグルコースセンサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有機基質の濃度を検知するための体内埋め込み可能なセンサであって：

導電性電極と；

該導電性電極に接触した安定化された酵素エマルジョンとを具備してなり、該酵素エマルジョンは、

有機基質を定量的に酸化する酵素と；

酸素を与えるために前記酵素に密着して乳化された、水と非相溶性の酸素溶解性物質と；

前記酵素を架橋および不溶化して、架橋されたタンパク質および前記酸素溶解性物質の粒子を含有する安定化されたゲルを形成するためのタンパク質架橋剤とを含んでなるセンサ。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、更に、前記導電性電極を覆う半透膜を備え、該半透膜と前記導電性電極との間に前記酵素エマルジョンがサンドイッチされるセンサ。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酵素エマルジョンは追加のキャリアタンパク質を含むセンサ。

【請求項 4】

10

20

請求項 3 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記追加のキャリアタンパク質が、血清アルブミンおよびゼラチンからなる群から選択されるセンサ。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酸素溶解性物質が、パーフルオロカーボン、シリコン油、フルオロシリコン油、芳香族および脂肪族炭化水素の油または固体、カロテノイドおよびステロイドからなる群から選択されるセンサ。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酸素溶解性物質は、臭化パーフルオロオクチル、パーフルオロジクロロオクタン、パーフルオロデカリン、パーフルオロインダン、パーフルオロフェナントレン、パーフルオロテトラメチルシクロヘキサン、パーフルオロポリアルキルエーテル油、パーフルオロメチルデカリン、パーフルオロジメチルエチルシクロヘキサン、パーフルオロジメチルデカリン、パーフルオロトリメチルデカリン、パーフルオロイソプロピルデカリン、パーフルオロペンタメチルデカリン、パーフルオロジイソプロピルデカリン、パーフルオロジエチルデカリン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロジメチルアダマンタン、パーフルオロ-ジ-キシレタン、およびパーフルオロ-6,7 H-ウンデカ-6-エンからなる群から選択されるパーフルオロカーボン液であるセンサ。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記タンパク質架橋剤は、アルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、ピロカーボネート、エポキシド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドエステルからなる群から選択されるセンサ。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酵素は、コレステロールオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、酸素オキシドレダクターゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコースオキシダーゼからなる群から選択されるセンサ。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、更に、前記パーフルオロカーボン液に溶解された電子輸送化合物を含むセンサ。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記電子輸送化合物はフェロセンを含んでなるセンサ。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酵素エマルジョンは更に酸化剤を含んでなるセンサ。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酵素エマルジョンは更に抗菌剤を含んでなるセンサ。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酵素エマルジョンは、更に、ステロイド、ヒンホカイン、および非ステロイド抗炎症薬からなる群から選択される抗炎症剤を含んでなるセンサ。

【請求項 14】

グルコースの濃度を検知するための体内埋め込み可能なセンサであって：

金属電極と；

該金属電極に接触した安定化された酵素エマルジョンであって、

グルコースを酸化して定量的に過酸化水素を生じるためのグルコース

オキシダーゼタンパク質の溶液；および

グルコースオキシダーゼと共に乳化された酸素溶解性物質

を含んでなる酵素エマルジョンと；

10

20

30

40

50

前記タンパク質を共有結合的に架橋して、架橋されたタンパク質および前記酸素溶解性物質の粒子を含有する安定化されたゲルを形成するための架橋剤とを含んでなるセンサ。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、更に、前記金属電極を覆う半透膜を備え、前記酵素エマルジョンは該半透膜の第一の表面に接触し、また該半透膜と前記金属電極との間にサンドイッチされており、体液または細胞が前記半透膜の第二の表面に接触するセンサ。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酸素溶解性物質が、パーフルオロカーボン、シリコーン油、フルオロシリコーン油、芳香族および脂肪族炭化水素の油または固体、カロテノイドおよびステロイドからなる群から選択されるセンサ。

10

【請求項 17】

請求項 16 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記酸素溶解性物質は、臭化パーフルオロオクチル、パーフルオロジクロロオクタン、パーフルオロデカリン、パーフルオロインダン、パーフルオロフェナントレン、パーフルオロテトラメチルシクロヘキサン、パーフルオロポリアルキルエーテル油、パーフルオロメチルデカリン、パーフルオロジメチルエチルシクロヘキサン、パーフルオロジメチルデカリン、パーフルオロトリメチルデカリン、パーフルオロイソプロピルデカリン、パーフルオロペンタメチルデカリン、パーフルオロジイソプロピルデカリン、パーフルオロジエチルデカリン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロジメチルアダマンタン、パーフルオロ-ジ-キシレタン、およびパーフルオロ-6,7 H-ウンデカ-6-エンからなる群から選択されるパーフルオロカーボン液であるセンサ。

20

【請求項 18】

請求項 14 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、更に、前記パーフルオロカーボン液に溶解された電子輸送化合物を含むセンサ。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の体内埋め込み可能なセンサであって、前記電子輸送化合物はフェロセンを含んでなるセンサ。

【請求項 20】

ポーラログラフィーまたは電流測定によるセンサと共に使用するための安定化された酵素エマルジョンを製造する方法であって：

30

誘起基質を酸化して過酸化水素を生じる水溶性酵素の水溶液を作製するステップと；

ある容積の水非相溶性の酸素溶解物質を水溶液中に乳化して、エマルジョンを形成するステップと；

前記エマルジョンをタンパク質架橋剤と接触させるステップと；

前記タンパク質架橋剤および前記エマルジョンの混合物を均一な層に広げ、それにより前記エマルジョンは架橋されて固体ゲルになるステップとを具備してなる方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法であって、前記エマルジョンは、前記タンパク質架橋剤と接触する前にキャリアタンパク質に接触される方法。

40

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法であって、前記水溶液は前記キャリアタンパク質を含有し、前記水溶性酵素は前記タンパク質架橋剤と接触する前に前記エマルジョンに添加される方法。

【請求項 23】

請求項 21 に記載の方法であって、前記酸素溶解性物質が、パーフルオロカーボン、シリコーン油、フルオロシリコーン油、芳香族および脂肪族炭化水素の油または固体、カロテノイドおよびステロイドからなる群から選択される方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法であって、前記酸素溶解性物質は、臭化パーフルオロオクチル

50

、パーフルオロジクロロオクタン、パーフルオロデカリン、パーフルオロインダン、パーフルオロフェナントレン、パーフルオロテトラメチルシクロヘキサン、パーフルオロポリアルキルエーテル油、パーフルオロメチルデカリン、パーフルオロジメチルエチルシクロヘキサン、パーフルオロジメチルデカリン、パーフルオロトリメチルデカリン、パーフルオロイソプロピルデカリン、パーフルオロペンタメチルデカリン、パーフルオロジイソプロピルデカリン、パーフルオロジエチルデカリン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロジメチルアダマンタン、パーフルオロ-ジ-キシレタン、およびパーフルオロ-6,7 H-ウンデカ-6-エンからなる群から選択されるパーフルオロカーボン液である方法。

【請求項 2 5】

ポーラログラフィーセンサと共に使用するための安定化された酵素エマルジョンを製造する方法であって：

キャリアタンパク質の水溶液を作製するステップと；

ある容積の酸素溶解性物質を水溶液中に乳化して、エマルジョンを形成するステップと；

前記エマルジョンを、誘起基質を酸化して過酸化水素を生じる水溶性酵素と接触させて、混合物を形成するステップと；

前記混合物をタンパク質架橋剤と接触させるステップと；

前記タンパク質架橋剤および前記エマルジョンの混合物を均一な層に広げ、それにより前記エマルジョンは架橋して固体ゲルを形成するステップとを具備してなる方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記酸素溶解性物質は、臭化パーフルオロオクチル、パーフルオロジクロロオクタン、パーフルオロデカリン、パーフルオロインダン、パーフルオロフェナントレン、パーフルオロテトラメチルシクロヘキサン、パーフルオロポリアルキルエーテル油、パーフルオロメチルデカリン、パーフルオロジメチルエチルシクロヘキサン、パーフルオロジメチルデカリン、パーフルオロトリメチルデカリン、パーフルオロイソプロピルデカリン、パーフルオロペンタメチルデカリン、パーフルオロジイソプロピルデカリン、パーフルオロジエチルデカリン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロジメチルアダマンタン、パーフルオロ-ジ-キシレタン、およびパーフルオロ-6,7 H-ウンデカ-6-エンからなる群から選択されるパーフルオロカーボン液である方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、検出および測定のための電気化学的装置の分野に関し、より詳細には、生体埋め込み型の小型ポーラログラフィーグルコースセンサに使用するための酵素エマルジョンに関する。

【0002】

【関連技術の説明】

現在、人間の身体に容易に埋め込むことができ、長期に亘って機能するグルコースセンサについての大きなニーズが存在する。このような装置に関する主要な促進因子は糖尿病であり、現在はインスリン注射によって制御可能なグルコース代謝の潜在的に荒廃的な合併症が、世界的規模で増大している。合衆国においては、1000万人を超える人々が糖尿病を有すると見積もられている。機能障害、失明への進行、四肢切断、腎不全、および心臓血管疾患における人的コストは測定不能であるが、社会に対する瞬間的なコストは、治療費および生産性のロスを反映して数百万ドル程度である。

【0003】

この疾患は主に、膵臓の島細胞もしくはベータ細胞によるインスリンホルモンの不十分な分泌によるものであることが、優に70年に亘って知られている。制御不能であれば、この疾患はしばしば深刻な代謝不均衡をもたらし、グルコースレベルの上昇はケトosisおよび血液pH変動に対する損傷を生じる一方、不十分なグルコースレベルは嗜眠および昏睡に至る。生命を脅かすような血中グルコース変動を制御する目的で、ダイエットおよび毎

10

20

30

40

50

日のインスリン注射が現在使用されている。現在では、損傷は過剰なグルコースによって生じるものであり、直接的にはインスリンの欠乏によって生じるものではないことが確立されている。グルコースは正常な代謝に不可欠な数百のタンパク質と結合し、それによって身体の細胞機構に損傷を与える。

【 0 0 0 4 】

インスリン注射による糖尿病の抑制は、一般には、正常な個体に普通なものよりも、遥かに広い血中グルコースレベルの変動をもたらす。インスリンを随時注射（1日当り7回以下）することによって、適正に機能する膵臓により与えられる厳格な制御を複製できず、膵臓は安定かつ相対的に正常な血中グルコースレベルを維持するのに丁度十分なインスリンを連続的に計量する。血中グルコースの極端なレベルは回避される必要がある。血中グルコースの極端なレベルを回避したとしても、インスリン依存性糖尿病患者は上記で述べた他の一群の疾患に苦しみ、これらは生命の質および長さの両方を減じることになる。糖尿病患者は頻繁に血管疾患を受けるが、損傷された循環は十分な血流を阻害するので、これらは屢々四肢の切断をもたらす。目の中での異常な血管増殖は、眼内出血をおよび漸進的な視野喪失を伴った網膜損傷を生じる可能性がある。神経の変性は、感覚の喪失および他の関連した問題を導く可能性がある。

【 0 0 0 5 】

インスリンの注射によってグルコースの血中レベルを制御するためには、毎日6～8の血液サンプルを分析する必要がある。これは、通常は小さなランセットで指先を穿刺し、光学測定による「家庭用グルコースモニター」で血中グルコースレベルを分析することによって行われる。勿論、これは愉快的な経験ではなく、かなりの技術および意欲を必要とする。家庭用グルコース試験が普通になってきており、その結果、周期的なインスリン注射によって与えられる血中グルコースの制御が比較的乏しいことを示す多くのデータが益々入手可能になった。同時に、増大する臨床研究によって、血中グルコースの厳格な制御は糖尿病関連の疾病の全てではないにしても、その多くを低減することが示された。現在、多くの科学者および医者は、血中グルコースの制御を大きく改善することによって、糖尿病に関連した死亡および罹患率を大幅に削減できることを確信している。

【 0 0 0 6 】

糖尿病治療の最終ゴールは、患者の機能しない膵臓島細胞の代替である。何人かの科学者は、機能する島細胞を糖尿病患者の中に移植して、自然に制御されたインスリン源を与える方法を探究している。他の科学者は、正確な血中グルコース制御を維持するために、必要に応じて外部的にインスリンを供給する自動インシュリン注射システムについて研究している。これらの「治療」の両者が必要とされる可能性が最も高いであろう。移植された島細胞は最適な解決法であろうと思われるが、現時点において、移植に必要な抗拒絶反応薬は糖尿病自身と殆ど同様の多くの否定的な副作用を有する。如何なる症例においても、島細胞移植が完全なものになるまでは、糖尿病によって引き起こされる損傷を制限するための自己調節的な人工的インスリン源が必要とされる。移植が広範に利用可能であったとしても、移植前の患者の維持、並びにおそらくはある種の移植後のサポートのために、自己調節的インスリン源が必要とされるであろう。

【 0 0 0 7 】

多くのタイプの調節された注射システム（体内埋め込み型および外部的の両方）が既に入手可能である。重要な問題は、今なお、これらの注射システムを制御するための正確なグルコースセンサの必要性である。一定に計量されたインスリンの投与を可能にするためにグルコースレベルを継続的にモニターすることの必要性によって、一般に、血液サンプルに依存する方法は排除される。インピボでグルコースレベルを測定する体内埋め込み可能なグルコースセンサが、現実的な回答であることは明らかである。

【 0 0 0 8 】

現代的な装置よりも以前において、血中グルコースの分析には、静脈穿刺での数ミリリットルの血液の採取、沈降、濾過、比色定量グルコース試薬での処理、およびグルコースの分光学的測定が必要とされた。1960年代の本発明者による最初の「酵素電極」およびグル

10

20

30

40

50

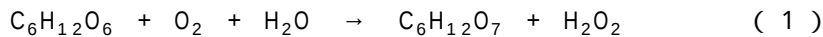
コースセンサは、最初の商業的に成功した血中グルコース分析器の製造に導いた。このクラークのグルコースセンサは、白金陽極、グルコース酸素オキシレダクターゼ（グルコースオキシダーゼ）の層、およびセロファンもしくは酢酸セルロースの膜からなっている。また、銀「参照」電極も該センサに組み込まれた。0.01mLの血液しか必要とされず、最終分析は約1分で完了する。それ以来、文字通り数千万の血液サンプルがこのタイプの器具によって分析されてきた。

【0009】

上記で述べた本発明者のポーラログラフグルコース法は、米国特許第3,539,455号の中で説明されている。このような酵素結合ポーラログラフグルコースセンサに最も共通して使用される化学反応は、大気中の酸素によるグルコースオキシダーゼに媒介された触媒酸化であり、グルコノラクトンおよび過酸化水素を生じる（式1）。

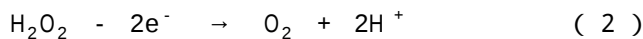
10

【0010】



過剰な酸素の存在において、生成した過酸化水素の量はグルコース濃度の直接的な尺度であろう。この過酸化水素は、適切な陽電圧に維持された電極（アノード）による再酸化によって測定される。

【0011】



従って、グルコース検出プロセスは、式（2）において過酸化水素から除去される電子の測定に依存する。この電極は、通常は金または白金のような貴金属で形成される。このような貴金属が好ましいが、時には炭素、熱分解もしくはガラス状のグラファイト、および他の導電性材料が使用される。

20

【0012】

当業者に周知のように、過酸化水素を産生する他の特定のオキシダーゼ酵素を使用して、他の物質のためのセンサを製造することができ、その数例のみを上げれば、例えばコレステロール（コレステロールオキシダーゼ）、アミノ酸（アミノ酸オキシダーゼ）、アルコール（アルコールオキシダーゼ）、乳酸（乳酸オキシダーゼ）、およびガラクトース（ガラクトースオキシダーゼ）である。

【0013】

この種の酵素に基づくセンサの成功は、同様のセンサが、単純な電源およびグルコースデータを体外に送信する手段と共に、生体内に埋め込み可能であることを多くの人々に示唆した。このような連続的に読み取るための装置は、指を繰り返し穿刺する痛みを除去するだけでなく、グルコースレベルの定常的な読みを与えるであろう。身体の多くの部位におけるグルコースレベルが、血中グルコースレベルを密接に反映することが知られている。このような装置を糖尿病患者に利用可能にするために、多くの試みがなされてきた。しかし、実験装置は十分に長期間に亘っては機能しない。体内に埋め込まれたグルコースセンサの故障は種々の問題に起因するものであるが、それらの多くは解決策がないように思える。例えば、幾人かは、オキシダーゼ反応によって発生した過酸化水素（遊離ラジカル）がオキシダーゼ酵素の変性および不活性化を生じると信じている。これとは別に、より普通の説明では、グルコースセンサが人間の身体と「適合しない」こと、または電極の測定チップの表面が瘢痕様組織の層でコートされるに至り、これはグルコースの拡散を妨害するだけでなく、毛細血管を危険に曝し、もしくは破壊するということである。他の者は、白金電極表面が体液によって「毒される」と考えた。しかし、最近の40年間に本発明者の研究室で行われた体内埋め込み型白金電極の広範な研究によって、「毒された」白金表面の神話は誤りであることが完全に明らかになった。幾つかの埋め込まれた白金電極は、6年まで機能的な状態のままであった。

30

40

【0014】

本発明の目的は、体内埋め込み型グルコース電極の成功に対する他の障害をも同様に扱うことである。グルコースは生物学的液体中で極めて可溶性であるのに対して、酸素はこれらの同じ液体中での溶解性が乏しく、ヘモグロビンのような特殊化された生体分子に

50

よって運ばれなければならない。人間の身体組織は、室素中の約2~5%以下の酸素に等しい酸素圧を有している。その結果、皮下組織液および腹腔液においては、100:1と高いグルコース:酸素比が存在し得る。このことは、電極表面においては、測定目的で利用可能なグルコースを定量的に酸化するグルコースオキシダーゼのために1%の酸素しか存在しない可能性があることを意味している。

【0015】

更に、グルコースセンサにおけるグルコースオキシダーゼは、グルコースオキシダーゼを破壊もしくは阻害し得るプロテアーゼおよび他のマクロ分子から保護されなければならず、過酸化水素を破壊するカタラーゼのような酵素（カタラーゼ、デヒドロゲナーゼ等）から保護されねばならず、該酵素を消化する微生物から保護されねばならず、また酵素反応もしくは電気化学反応を妨害するアスコルビン酸塩およびアセトアミノフェンのような可溶性化合物から保護されなければならない。この保護は、グルコースオキシダーゼを半透膜によって生物学的液体から分離することにより達成することができる。カタラーゼのようなタンパク質を選択的に排除できる一方、グルコースの侵入を許容する最もよく知られた膜は、いわゆる透析膜である。これらの膜は、一般には約5,000ダルトン未満の分子量をもった、中性分子を容易に透過させる「孔」を含んだ疎水性膜である。これら膜の通常の例は、セロファン、再生セルロースの商品名であるスペクトラポア（Spectrapore；登録商標）もしくはキュプロファン（Cuprophane；登録商標）、セルロースエステルのような種々の再生セルロース、およびポリカーボネート膜もしくはポリスルホン膜から製造される。

【0016】

このような半透膜は望ましくないタンパク質を排除し、また必要不可欠なグルコースオキシダーゼを維持する良好な働きをするが、それらは酸素の拡散を妨害する。しかし、ポリテトラフルオロエチレン（テフロン；登録商標；パーフルオロカーボン樹脂の商品名）の膜、またはシリコンゴムの膜のような幾つかの膜は酸素に対して透過性であるが、これらの膜はグルコースに対して実際には不透過性であり、従って、酸素要求性のグルコースセンサを保護するために使用することはできない。Allen et al. に付与された米国特許第5,322,063号は、幾らかのグルコース透過性を可能にする一方、酸素透過性のために好適である新しいタイプのポリウレタン膜を報告している。

【0017】

グルコースの過剰および酸素の不足のために、生体に埋め込まれたグルコースセンサは酸素に律速される傾向があり、従って、グルコースの代りに、またはこれと共に、酸素を効果的に測定する。即ち、理想的条件の下では、グルコース濃度が低いと酸素が十分になり、グルコースの濃度増大は同時に過酸化水素濃度の比例的増大をもたらし、従って電極に電流が測定される。しかし、グルコース濃度が増大するに伴って最終的には酸素が不十分になり、測定される電流はグルコース濃度とは無関係に平坦になる。この平坦部分での電流の変化は、グルコース濃度における変化よりも酸素張力（濃度）における変化を反映する。

【0018】

多くの研究者は、人間の組織における高いグルコース/酸素比を考慮していなかった。この問題を解決するためには、少なくとも二つの方法がある。即ち、グルコースセンサに到達するグルコースの濃度を減少させること、および/またはグルコースセンサにおいて利用可能な酸素量を増大させることを試みることができる。グルコースのレベルは、グルコースに対して透過性バリアを与えることにより、またはグルコースオキシダーゼ以外に、例えばデヒドロゲナーゼのような非過酸化物を発生する追加の酵素系を与えて、過剰なグルコースを消費することにより減少させることができる。上記で述べたポリウレタン膜は、グルコース制限の一例である。

【0019】

第二のアプローチには、利用可能な酸素のレベルを増大させ、または酸素要求性の酵素に対する酸素の利用可能性を最大にするための試みが含まれる。本発明者は以前、本明細書

10

20

30

40

50

の一部をなす参照として本願に援用する米国特許第4,680,268号および同第4,721,677号において、酸素レベルを増大させるための方法を開示した。これらの特許は、シリコーンゴムのような酸素透過性の材料で作製した酸素回収チャンバの使用を教示している。このチャンバは、酸素透過性膜によって酸素要求性の酵素から分離される。該チャンバは酸素を回収し、拡散によって、それを測定電極付近の酵素混合物に供給する。これらの特許はまた、酸素要求性の酵素への酸素の拡散を速めるために、酸素回収チャンバにパーフルオロカーボン液のような酸素溶解性化合物を満たすことを開示している。或いは、エマルジョンが徐々に電極上を流れ、酸素を供給し、酵素を補充するように構成された装置と共に、パーフルオロカーボン液および酵素溶液のエマルジョンを使用して、当該チャンバを満たすこともできるであろう。最近の刊行物 (Wang and Lu, J. American Chem. Soc. 120:1048-50 (1998)) において、このような液体エマルジョン戦略が採用された。しかし、この場合にはグラファイトまたは炭素粉末が加えられたので、当該エマルジョンは電極としても直接機能する。これは、マクロファージが炭素粉末と反応する可能性があるので、埋め込み型電極では困難を生じることがあり得る。

【0020】

また、本発明者の研究室での実験によって、慢性的に埋め込まれたセンサからの電流出力は、アスコルビン酸塩ポンプへのフィードバックループおよび接続された留置カテーテルを使用して、脳内のアスコルビン酸レベルを制御できることが示された。更に、ポーラログラフの陽極は、隣接する毛細血管床における血流を定量的に測定するために使用できることが示されている。数千時間または連続的な記録から、埋め込まれた酸素センサの表面に利用可能な酸素、従って、ここに記載したグルコースセンサに利用可能な酸素は安定ではなく、1分当り6~8サイクルで波状に増減することが分かった。幾つかの場合に、この変動の強さはプラスまたはマイナス30%であり得る。このようなセンサにおける変動は酸素に依存するから、利用可能な酸素のこのような揺らぎを緩衝することは、酸素要求性のグルコースセンサにおいて極めて望ましいであろう。殆どのセンサの経時的な活性は徐々に低下する。これらのデータは、十分な寿命を達成できるであろうことを示したが、幾つかの因子（おそらくは機械的因子）によって活性喪失が起こることをも示した。ここに開示した発明は、酵素の微生物的分解を回避すると共に、遊離ラジカル、プロテアーゼおよび宿主の免疫系による攻撃に抵抗するように設計される。

【0021】

【発明の概要】

本発明者は、酵素に基づくポーラログラフ電極の「酸素感受性」が、酸化酵素と密に接触した酸素容器を設けることによって顕著に低減され、または除去され得ることを発見した。これは、その中で酸素が極めて可溶性であるような、酵素および化合物の安定化されたエマルジョンを作製することによって達成される。例えば、グルコースオキシダーゼ水溶液は、パーフルオロカーボン液で乳化することができ、得られたエマルジョンは、該混合物を化学的に架橋してゲルを形成することにより安定化される。貴金属電極に接触させるための理想的なエマルジョン薄層は、架橋に先立って、該エマルジョンの層を広げることにより製造することができる。架橋剤から酵素活性を保護するために、架橋の前に、アルブミンのような追加のキャリアタンパク質をオキシダーゼに添加することができる。

【0022】

【好ましい態様の詳細な説明】

新規であると思われる本発明の目的および特徴が、特に特許請求の範囲に記載されている。更なる目的および利点と共にその構成および作用について、本発明は、添付の図面に関連して以下の説明を参照することにより最もよく理解することができる。

【0023】

以下の記載は、当業者が本発明を実施および使用できるようにするために提供するものであり、本発明を実施する上で発明者が考えた最良の態様を示すものである。既に、特に埋込み可能な小型センサに用いるための、パーフルオロカーボンを含んだ酵素または不溶化された酵素エマルジョンを提供する本発明の包括的な原理を定義したから、当業者には様

々な改変が容易に明らかであろう。

【 0 0 2 4 】

本発明は、フルオロカーボンを含む酵素懸濁液またはエマルジョンに関する。このようなエマルジョンは様々な埋込み可能な電極に有利に用いることができるが、本明細書の一部をなす参照として援用する同時係属中の米国特許出願第08/769,863号および同第08/779,304に記載の、埋込み可能な小型装置に特に有用である。

【 0 0 2 5 】

上記を参照した同時係属出願に開示されるように、グルコースオキシダーゼポラログラフィー型の埋込み可能な作業センサは、合衆国クォーターよりもそう大きくはない容積を有するように、容易に構成することができる。このような埋込み可能なセンサ18の全体的な形状が図1に示されている。この形状はディスク型であるが、他の多くの構成も可能である。ケース22は印刷回路基板24を保持するキャビティ23を具備し、O-リング25により密閉された頂部26によって閉鎖される。ケース22はまた、照合電極30のための第一の開口部28、および作業電極10のための第二の開口部20を有する。図2に示されるように、この装置の作業電極10は、開口部12を備えた外殻13を具備し、その開口部を通して、酵素混合物14が下地電極16と共に体液と接触する。電極16はプラチナから適切に作製できるが、他の様々な導電性材料を用いることもできる。導電体46は、電極16を回路基板24に接続する。外殻13の殆どは絶縁性のガラスまたはプラスチック15で満たされており、ここを導電体46が通過する。酵素混合物14は半透膜19で被覆されており、この膜は、プロテアーゼ、妨害物質、ならびに細菌および/またはそれらのオキシダーゼ破壊酵素、もしくは他の生成物による攻撃から酵素を保護する。膜19には、グルコースおよび酸素の双方に対して透過性のものが選択される。電極の実際の作業チップは、直径が約10 μm と小さくすることができるであろう。一般的に、開口部12の占有面積は装置18の表面積に比べて小さく、全表面積の僅か1%を形成する。好ましくは、この装置は、開口部12を下地筋肉層に対向させて、皮膚表面の下に埋め込まれる。この位置は、修繕または交換のためにユニットへのアクセスを容易にする。この装置は、開口部12が腹腔に接触するように埋め込むことも可能である。一般的に、この装置は、血栓の形成によって動作が妨害されないように、循環系には直接接触されない。全ての身体組織は極めて迅速に血液との間でグルコースの平衡に至るから、血液と接触した当該装置の配置は現実的には必要とされない。

【 0 0 2 6 】

埋込み可能なグルコースセンサに対して行われた多くの研究は、インサイチューでのセンサキャリブレーションの重要性を理解または認識していない可能性がある。酵素混合物および測定電極は何れも経時的に変化する。また、センサ周囲の微小循環も変化し得るので、酸素の有効濃度または血圧も変化するであろう。これにより、酵素混合物の反応が全ての可能な酸素濃度において同じ勾配を有さない限り、グルコース測定の正確性は顕著に変化するであろう。多くの共通の実験器具に対して既知の濃度の検体を供することによりキャリブレーションを行い、その後、器具の出力を既知の検体の量に整合するように調整する。残念ながら、埋め込んだセンサを容易に既知濃度のグルコースに曝すことは不可能である。

【 0 0 2 7 】

しかし、埋め込んだセンサが血液と平衡状態にある身体区画を測定していることを考慮すると、血中グルコース測定を用いてキャリブレーションを行うことができる。患者または技術者が経時的に一連の血中グルコース測定を行うとすれば、これらはセンサ出力に対してプロットすることが可能であり、センサ反応についての時定数が明らかとなる。その後、手動による血中グルコース測定を使用して自動的にキャリブレーションを行い、または埋め込んだセンサを調整することができる。本発明者はまた、既に、単一電極を用いて酸素および過酸化水素の双方を測定する方法を開示した(本明細書の一部として援用する米国特許5,030,333号を参照されたい)。これは、センサの出力を自動的に調整する方法を提供するものであり、ここでの酵素混合物反応は酸素濃度に依存して変化する勾配を示し、また電極における酸素の利用可能性に関する知識を提供する。

【0028】

既述したとおり、酸素は生物学的流体への溶解性に比較的乏しく、グルコースセンサ10の開口部12を被覆する膜19は、一般的に酸素に対してあまり透過性ではない。しかし、殆どの人体の細胞は機能するために酸素を必要とし、健康時には十分な酸素供給を受けることもまた真実である。酸素は生物学的流体にさほど溶解しないが、ヘモグロビンとの弱い結合を形成することにより、赤血球に大いに「溶解する」。これらの酸素に富む細胞は、身体の実用上全ての細胞に近接して循環し、その結果、必要な酸素は酸素バリア（生物学的流体および細胞膜）を横切って、赤血球のヘモグロビンと組織細胞のような酸素を必要とする箇所との間で拡散する。バリアを通過する酸素拡散の速度は、バリアの厚さおよびバリアの単位厚さに溶解し得る酸素量により制御される。即ち、バリアをより薄くし、またはバリアにより多くの酸素を溶解させることにより、酸素拡散の速度を増大させる。従って、酵素混合物14および膜18は、グルコースセンサ10内への酸素移動の速度を最大にするために、可能な限り薄くされるべきである。

10

【0029】

本発明者は、グルコースセンサ10の「バリア」内での酸素の溶解性を増大させるために、新規なアプローチを採用した。比較的多量の酸素を溶解させるものとして、様々なパーフルオロ化合物の液体が広く知られている。パーフルオロカーボン化学薬品の、エマルジョンおよび代用血液としての使用についての発明者らの特許（米国特許第4,105,798号；同第4,110,474号；同第4,187,252号；同第4,289,499号；同第4,443,480号；同第RE33,451号；同第5,514,720号；同第5,635,539号；同第5,684,050号；同第5,674,913号；同第5,824,703号；および同第5,840,767号）を、本明細書の一部をなす参照として本願に援用する。非常に多数の適切な液体パーフルオロカーボンが存在し、これらには後述の実験の項に記載される物が含まれ、そのリストにはパーフルオロオクチルブロミド、パーフルオロジクロロオクタン、パーフルオロデカリン、パーフルオロインダン、パーフルオロフェナントレン、パーフルオロテトラメチルシクロヘキサン、パーフルオロポリアルキルエーテルオイル、パーフルオロメチルデカリン、パーフルオロジメチルエチルシクロヘキサン、パーフルオロジメチルデカリン、パーフルオロトリメチルデカリン、パーフルオロイソプロピルデカリン、パーフルオロペンタメチルデカリン、パーフルオロジイソプロピルデカリン、パーフルオロジエチルデカリン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロジメチルアダマンタン、パーフルオロ-ジ-キシレチタン（混合異性体）、およびパーフルオロ6,7-H-ウンデカ-6-エンが含まれるが、これらに限定されない。液体パーフルオロカーボンは実質的に水溶液に不溶性であり、グルコースオキシダーゼのようなタンパク質は液体パーフルオロカーボンには完全に不溶性である。パーフルオロカーボン以外に、炭化水素系薬物（例えば副腎皮質ステロイド）、シリコン、シラン、環式シラン、シロキサン、フッ化シリコン、および他の同様の有機シリコン化合物は優れた酸素溶剤であり、本発明において有用である。また、酸素を溶解し、酸素貯蔵器として作用する以外に、最も好ましい化合物は過酸化水素を溶解しない。従ってセンサの過酸化水素濃度および反応性は効果的に増大する。これらの化合物の粒子は、酸素が電極表面に到達するための飛び石の如く作用する。

20

30

【0030】

しかし、液体パーフルオロカーボンおよび水溶液を用いて比較的安定したエマルジョンを製造できることが知られている。グルコースオキシダーゼまたは過酸化水素を生成する他の酵素がエマルジョンとして水相に組込まれると、パーフルオロカーボンは酸素が酵素に達するための経路として、並びに利用可能な酸素の貯蔵器として働く。更に、組成物をグルタルアルデヒド等のアルデヒドのような架橋剤を用いて処理し、タンパク質を化学的に架橋してゲルにすることにより、エマルジョンおよび酵素の双方を安定化できる。次いで、微小なパーフルオロカーボン液滴を、架橋されたタンパク質ゲルにより永久に絡め込む。これらパーフルオロカーボンの蒸気は実質的にタンパク質または水には不溶性であるため、数年に亘ってその場所に残ると予想される。約20%未満の量の酵素を用いるときは、比較的高濃度の追加のキャリアタンパク質をエマルジョン内に組込んで、架橋剤との更な

40

50

る反応部位を提供することにより、このゲルの強度を顕著に増大することができる。更に、グルタルアルデヒドのようなアルデヒド由来の架橋剤に加え、他の多くの有効なタンパク質架橋剤が当該技術において周知であり、これには、カルボジイミド類、ピロ炭酸塩類（例えばピロ炭酸ジエチル）、イミドエステル類、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル類、および多官能エポキシド類（例えばポリエチレングリコールジクリシジルエーテル）が含まれる。

【0031】

従って、本発明は、グルコースオキシダーゼまたは過酸化水素を生成する同様の酵素、パーフルオロカーボン、シリコンオイル、フッ化シリコンオイル、脂肪族系オイル、またはステロイド等の有機化合物のような酸素を酵素に運搬する乳化された酸素結合性/透過性の物質、更にゲル化剤、緩衝剤、および他の酵素および/または防腐剤のような任意の添加剤を含んだゲルを生成させることにより、更に向上したセンサを提供する。必須要件として、酸素を容易に溶解させる材料の微小な固体または液体の粒子が、好ましくは不溶性の形態の酸素利用性酸素と密接な接触状態で保持される。

10

【0032】

この乳化された酸素担体の作用は2倍である。一方では酸素を保持し、酵素と密接に接触することで酵素から電子を受け取る。この物質は酸素透過性なので、必然的に電極における有効酸素濃度を上昇させ、ヒトの循環系のような供給源から酸素をより迅速に拡散させる。同時に、この酸素担体は、グルコースが非常に可溶性であるかなりの水溶液容積をグルコースの溶解性に極めて劣る酸素キャリアの容積で置換するから、グルコースレベルを効果的に減少させる。即ち、グルコース/酸素の比は、親水性のグルコース溶解相を犠牲にして、疎水性の酸素担キャリア相を増大させることにより調整することができる。

20

【0033】

また、酸素透過性粒子は、液体パーフルオロカーボンを比較的高い蒸気圧でタンパク質含有ゲルエマルジョンに組込むことにより、微量のガスバブル（泡状でトラップされたバブル）を具備し得る。パーフルオロカーボンは経時的に蒸発して、ゲル内にトラップされたままのガスバブルを形成するであろう。これらのバブルは多量の酸素供給源を保持し、バブル内でのガス拡散は、同じサイズの液体粒子内での拡散よりも迅速であろう。

【0034】

以下に、本発明による安定化された酵素混合物の一般的な調製方法を述べる。

30

【0035】

安定化されたゲルが架橋されたタンパク質ゲルに基づく場合、アルブミン、即ちウシ血清アルブミン（BSA）もしくはヒト血清アルブミン（HAS）、またはゼラチンのような適切な可溶性のキャリアタンパク質を、約1~15重量%の最終濃度で0.2M 酢酸ナトリウム緩衝剤（pH 5.0）のような適切な緩衝剤中に溶解させ、グルコースオキシダーゼのような過酸化水素生成酵素を、約1%~5重量%の最終濃度で上記混合物中に溶解させる。提示した例では比較的低レベルのグルコースオキシダーゼを用いたが、70%以上の濃度のグルコースオキシダーゼを使用する態様でも有効である。このような高レベルでは、一般的に、ゲル形成を補助するためにアルブミンまたは他のタンパク質を添加することは必要とされない。

【0036】

2.5%水溶液として十分に精製されたグルタルアルデヒドを添加して、タンパク質溶液を正しい最終濃度にまで希釈する。希釈後の最終グルタルアルデヒド濃度は好ましくは0.1~1%であり、より好ましくは約0.6%である。この混合物を簡単に攪拌して混合し、次いでガラスプレート上に注ぎ、ガラスロッドを用いて広げた。アルデヒド蒸気を用いて架橋を生じさせることもできる。数時間以内に酵素ゲルの均一な層が形成される。このゲルは、脱水を避けるために4の加湿雰囲気中で保存することができる。

40

【0037】

液体パーフルオロカーボンのような酸素溶解物質を組込むために、適切な量の酸素溶解液（通常、約5~20容量%）をタンパク質混合物に添加し、氷上で維持しながら15秒間ずつ2回音波破碎した。音波破碎の後、グルタルアルデヒドを添加し、物質を上記のように処理

50

した。得られたゲルは、水およびパーフルオロカーボン蒸気で飽和した雰囲気中に保存して、パーフルオロカーボンの蒸発を防止すればよい。別の調製方法は、音波破碎の間に起こり得る酵素の変性を避けるために、グルタルアルデヒドを添加する前に、活性なグルコース利用酵素を音波破碎されたBSA / パーフルオロカーボンエマルジョンに添加することである。

【 0 0 3 8 】

上記のように調製されたゲルを用いるために、その小片をプラチナ電極上に載置し、キュプロファン (Cuprophane) (商標登録 ; 新品の再生セルロース) の膜を用いて被覆する。別法としては、ゲルを多数の小粒子に分割し、これら小粒子のスラリーを電極表面上に載置し、膜で被覆することもできる。更なる変形例としては、フルオロカーボン / 酵素エマルジョンを膜上に塗布した後、架橋剤によりこの混合物を「硬化」させる。図 3 は、環境 (約 20%) または 5% の酸素の何れかにおける、グルコース濃度範囲に対する通常の安定化酵素混合電極の反応を示している。酵素混合物は上記の方法に従って調製されたものであり、約 0.6% グルタルアルデヒドで安定化された約 4% BSA ゲル中に、約 2% のグルコースオキシダーゼを含んでいた。なお、環境酸素での軌跡 32 は、少なくとも 400 mg% (0.4%) のグルコース濃度において略線型の反応を示す。一方、5% 酸素での軌跡 34 は約 50 mg% のグルコース濃度において水平状態であり、酸素が反応を律速していること示す。

【 0 0 3 9 】

グルコースオキシダーゼに対する BSA の濃度は、より高いおよび / またはより安定した信号を生成するために重要であり得ることが判明した。しかし、これらの要因は、センサが酸素律速のため水平状態になる時点でのグルコース濃度に大きく関与しているとは思われない。埋め込んだグルコース電極は低酸素圧を受けることが予想されるため、概ね酸素とは無関係であるか、または低酸素圧において線型に近い反応を生じる電極応答を達成することが目的である。

【 0 0 4 0 】

図 4 は、乳化された液体パーフルオロカーボンを、安定化された酵素混合物に添加することによる効果を示す。この場合の混合物は、約 0.6% グルタルアルデヒドで架橋された約 13% の BSA、約 3% のグルコースオキシダーゼ、および約 7.5% の乳化された Krytox パーフルオロカーボン (商標登録 ; パーフルオロポリアルキルエーテル合成オイルの商品名、du Pont de Nemours 社の製品) を含む。ここでの目的は、パーフルオロカーボンを、酵素反応のための酸素源として作用させることにある。パーフルオロカーボンは微小粒子に乳化されるため、酸素を運ぶパーフルオロカーボンと、酸素を必要とする酵素との間に密着した結合が存在する。これは、酸素が水のような酸素に乏しい担体を介して拡散しなければならない距離を制限する。パーフルオロカーボンが酸素源として作用することで、低酸素圧においても適切な酵素反応が生じ得るのである。

【 0 0 4 1 】

図 4 では、環境酸素での軌跡 32 は、先に述べた通り少なくとも 400 mg % のグルコース濃度まで線型である。しかし、この場合の 5% 酸素での軌跡 34 は、少なくとも 100 mg% グルコースまで線型である。このグルコース濃度を超えると反応の勾配は変化するが、電極は 350 mg% グルコースに亘って増大反応を示し続けている。電極は、第三の軌跡 36 に示されるように、2% という非常に低い酸素濃度でさえ幾らかの反応を示している。

【 0 0 4 2 】

広範囲の異なるパーフルオロカーボンを用いた実験によれば、パーフルオロカーボンの種類と同様に、その量もまた、安定化された酵素 / パーフルオロカーボン混合物の硬化に対して有意な影響を与え得る。パーフルオロカーボンは H_2O_2 にも H_2O_2 蒸気にも溶解しないため、小さな変化に対する反応はより迅速である。一般的に、少なくとも 15 用量% のパーフルオロカーボンを含む混合物の場合、結果はより良好である。また、沸点がより高い (より低い蒸気圧の) パーフルオロカーボンが、一般的により効果的であると思われる。より低い沸点 (特に約 50 未満の沸点の場合) のパーフルオロカーボンには、顕著な蒸散損失が生じ易い。この損失は、酸素の供給源 / 伝導体として作用するために利用可能なパー

10

20

30

40

50

フルオロカーボンの量を顕著に減少させるのであろう。

【 0 0 4 3 】

図 5 は、0.6% グルタルアルデヒドで架橋された、約12%のBSA、4%のグルコースオキシダーゼ、15%のAP200パーフルオロカーボン（混合されたトリメチルおよびノまたはイソプロピルパーフルオロデカリン）（沸点約200 ）を含んだ安定化された酵素エマルジョンの結果を示している。この場合、環境酸素の場合の軌跡32および5%酸素の場合の軌跡34の双方共、350 mg%のグルコースを越えても比較的線型の反応を示すが、これらの反応の勾配は幾分異なる。2%酸素の軌跡36は非常に浅い反応を示す。これらの結果は、酵素エマルジョンが約7%のAP200のみを含む場合の図 6 と比較されるべきである。注意すべきことは、より低い濃度のパーフルオロカーボンを用いた場合、5%酸素の軌跡34 が約150 mg% グルコースで平坦なことである。

10

【 0 0 4 4 】

図 7 は、AP200の代りに37%のパーフルオロフェナントレン（AP215；沸点約215 ）を用いた点を除き、図 5 と同様のエマルジョンから得られた結果を示している。この結果は図 5 の結果と非常に似ており、約15%を越えてパーフルオロカーボンの量を大きく増加させても、おそらく殆ど利点がないことを示している。パーフルオロカーボンの量が増加すると、全体の信号は減少する。

【 0 0 4 5 】

先に述べた通り、より高い沸点のパーフルオロカーボンを使用するのが有益であることを示す幾らかの示唆が存在する。図 8 は、約15%のAP240（混合ペンタメチルおよびノ又はジイソプロピルパーフルオロデカリン）パーフルオロカーボン（沸点約240 ）、10%のBSA、3%のグルコースオキシダーゼ、および0.6%のグルタルアルデヒドを含んだ安定化された酵素エマルジョンの結果を示す。AP240は、0.75%（最終濃度）の商品名Pluronic F-68の乳化剤を用いて乳化された。安定なパーフルオロカーボンエマルジョンを製造するのに適した他の多くの乳化剤が当業者に周知であり、本発明において容易に用いることができる。更に、架橋反応の際にグルコースオキシダーゼの活性部位を保護するために、0.75%のグルコースを添加した。環境酸素における軌跡32と5% 酸素における軌跡34との比較によれば、この調製品は図 5 に示した調製品よりも幾分活性である。

20

【 0 0 4 6 】

式（ 1 ）および式（ 2 ）の検討によれば、このセンサは、電極における過酸化水素からの電子の移動を測定することにより、グルコース酸化の速度（グルコース濃度に比例する）を示すものである。酵素がグルコース分子を酸化すると、電子がグルコースから除去されて、酵素内の共因子に受け取られる。酸素と反応すると、酸素が酵素の共因子から電子を受け取って過酸化水素を生成し、酵素を再生する。電極の表面では、電子が過酸化水素から除去されて酸素が再生される。この電子は回路中を流れ、電流として測定される。従って、過酸化水素は、単に電子をグルコースから（グルコースオキシダーゼを経て）電極へと移動させるための、電子キャリアとしてのみ作用する。

30

【 0 0 4 7 】

また別の電子キャリアを用いて、電子をグルコースオキシダーゼのレドックス共因子から電極表面へと移動させることも可能である。理論上、正しいレドックス（還元 / 酸化）電位を有する如何なる数の人工的電子キャリアも、酸素および過酸化水素の役割を果たすことが可能であり、従って、全体の反応を酸素非感受性に行うことができる。可能な電子キャリアには、インドフェノール色素類、メチルピオロゲン色素類、および様々な有機金属化合物が含まれる。グルコースオキシダーゼと共に用いるための現在の好ましい電子キャリアは、鉄が実質的な電子キャリアとして作用するフェロセン（ジシクロペンタジエニル鉄）およびその誘導体である。適切な処方においては、フェロセンが十分な電子をグルコースオキシダーゼから電極表面へと輸送し、従って電極表面でのグルコースオキシダーゼ反応は酸素から独立になる（即ち、嫌氣的に起こり得る）。フェロセンは実質的に水溶液に不溶である。また、フェロセンはある種の有機溶媒には可溶性であるが、それらの溶媒は一般的に埋込み可能な電極に用いるには不適切である。しかしフェロセンは特定のパー

40

50

フルオロカーボンには幾らか可溶性である。

【 0 0 4 8 】

図 9 は、約15重量%のBSA、3.3重量%のグルコースオキシダーゼ、および約0.6%のグルタルアルデヒドを含んだ安定化された酵素混合物に、0.4重量%のフェロセンを添加した結果を示す。フェロセンは、グルコースオキシダーゼを溶解させるのに用いる緩衝剤中で拡散するが、認め得るほどには溶解しない。しかし、フェロセンは電極反応に影響を及ぼす。環境酸素における軌跡32および5%酸素における軌跡34の両者は、勾配は異なるが、グルコース濃度の増加に対して概ね良好な線型の反応を示す。重要なことに、0%酸素における軌跡38（実験を窒素下で実施した）もまた、グルコースに対して幾らかの反応を示す。従って、反応は酸素の存在下においてより顕著であるが、フェロセンは少なくとも幾らかの電

10

【 0 0 4 9 】

本発明者は、フェロセン（並びに特定のフェロセン誘導体）が液体パーフルオロカーボン中に僅かに可溶性であることを発見した。従って、フェロセンをパーフルオロカーボン/酵素エマルジョン中に直接組込むことが可能である。図 10 は、フェロセンを含有するパーフルオロカーボンを、安定化された酵素エマルジョンの中に組込んだ結果を示す。ここで、この酵素混合物は約15%のAP215、12%のBSA、4%のグルコースオキシダーゼ、および架橋剤としての約0.6%のグルタルアルデヒドを含んでいた。パーフルオロカーボンを残りの成分の中へ音波破碎する前に、或る量のフェロセン（1重量%未満）をパーフルオロカーボンに添加して、一晩溶解させた。充分なフェロセンがAP215中に溶解され、液体は薄い黄色に着色された。その意図は、パーフルオロカーボンをフェロセンで飽和させることにある。

20

【 0 0 5 0 】

重要なことに、環境酸素での軌跡32、5%酸素での軌跡34、および2%酸素での軌跡36は全て、驚くほど同様の勾配をもった線型反応を示す。0%（窒素）での軌跡38は非常に平坦な反応の勾配を示す。これによれば、混合物に包含された微量のフェロセンは、過酸化水素ほど多量の電子を輸送しないが、フェロセンを加えたパーフルオロカーボンは、フェロセンまたはパーフルオロカーボンの何れかを単独で用いる場合よりも優れた、予期せぬ相乗的な活性を示すことが示唆される。フェロセンは、何らかの未知の方法で、乳化されたパーフルオロカーボン粒子の効果を増強する。

30

【 0 0 5 1 】

本発明のパーフルオロカーボンに不溶性の酵素混合物はまた、長期の安定性および埋込み型センサの有用な寿命を高めるような、他の改変をも可能にする。既述の通り、埋め込まれた電極の初期の故障は、遊離ラジカルまたは酵素に対する酸化的ダメージによるものであった。従って、ビタミンE（トコフェロール類）のような抗酸化剤または遊離ラジカルトラッピング剤を添加することにより、電極の寿命を伸ばすことができる。埋込み型センサについての研究において悩まされてきたもう一つの問題は、埋め込み装置の拒絶反応または埋め込み装置への免疫反応である。既述の通り、線維芽細胞カプセルがインプラントの周辺でしばしば成長する。これはそれ自体で有害ではないが、身体が測定膜19に対して直接的な免疫作用を起こすこともあり得る。これは炎症、および膜19の近傍での白血球大

40

【 0 0 5 2 】

血栓の形成により引き起こされる問題を回避するために、本発明の装置が血液循環から離れた場所に好ましく埋め込まれるとしても、白血球がその循環系から外部に移動して、何等かの「外来物」の周辺に集合する可能性がある。この白血球の蓄積は膜を損傷し、および/又はグルコース読み取りの正確性を低下させる。しかしこの問題は、有効量の抗炎症剤、抗白血球化合物を酵素混合物中に組込むことによって、概ね回避することができる。

50

一つの例は、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンおよびプレドニゾンのような同様の副腎皮質ステロイドを、約0.1~1.0重量%で添加することである。これらのステロイドは、酵素混合物の水相中で徐々に溶解し、膜18を通して極めて徐々に外部へ拡散して、白血球（特にマクロファージ）による攻撃をように周囲の領域を維持する。一つの利点は、パーフルオロカーボンと同様に、ステロイドが水よりも遥かに良好に酸素を溶解することである。

【0053】

図1におけると同様のチタンの埋め込み型装置のラットにおける一連の実験において、酵素混合物に副腎皮質ステロイドを含有させた装置は炎症の証拠を示さないことが分かった。一方、副腎皮質を含まない同じ装置は、6週間後に動物から取出したときに顕著な炎症反応の証拠を示した。

10

【0054】

他の非ステロイド系抗炎症薬（即ち、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキシン、ケトプロフェン等）、または抗炎症性リンホカインもしくは「抗拒絶反応」薬（例えばシクロスポリン）もまた、酵素混合物の中に組込むのが有利である。加えて、細胞複製を妨げる薬剤（例えば「抗新生物」剤）は、炎症および過剰な組織増殖を減少する上で有利な効果を有することが多い。有用な薬剤には、ピンカアルカロイド（ピンクリスチンおよびピンプラスチン）、タキソール誘導体および他の周知の抗腫瘍薬が含まれる。

【0055】

長期に亘るセンサの埋め込みに対するもう一つの深刻な障害は、バクテリアおよび真菌等による微生物汚染である。微生物は、グルコース代謝酵素を直接破壊し得るが、それはまた、それ自身がグルコースおよび酸素を消費することによって、または過酸化水素が電極表面と反応する前にこれを消費する他の酵素、例えばカタラーゼまたはペルオキシダーゼを産生することによって、グルコース測定を混乱させ易い。本発明者は、抗真菌剤または広スペクトル域の抗生物質を酵素混合物中に組込むことによって、微生物の緩衝が概ね防止されることを発見した。例えば、ゲンタマイシンおよび/またはペニシリン、および/または他の広スペクトル域の抗生物質および抗真菌剤（例えばケタコナゾール）を酵素混合物中に組込んで、微生物の増殖を防止することができる。酵素混合物の滅菌性が長期間に亘って補償されるように、比較的高濃度の抗生物質を添加することができる。膜を通しての抗生物質の遅い拡散は、埋め込まれたセンサの周囲の全領域を無感染の状態で維持する。更に、電極は過酸化水素を定常的に生じるが、これは強力な抗感染剤である。

20

30

【0056】

半透膜19は、一般には、グルコースオキシダーゼを種々のプロテアーゼから保護すると考えられている。しかし、本発明に至る実験においては、安定化されたグルコースオキシダーゼは普通のタンパク分解酵素であるトリプシンによって容易に攻撃されないことが発見された。明らかに、酵素を安定化する化学的な架橋はトリプシン感受性部位を破壊する。従って、トリプシンを抗タンパク分解酵素として組込むことにより、微生物などによって産生され得る他のタンパク分解酵素の破壊を補助してもよい。

【0057】

本発明の酵素混合物の安定性は、抗酸化剤および/または遊離ラジカル捕捉剤の添加によっても改善することができる。種々のパラベン、BHT（ブチル化ヒドロキシトルエン）およびその類縁体のような多くの保存剤の何れか、および/またはスーパーオキシドジスムターゼと同様に、酸素溶媒でもあるビタミンE、リコペン、およびカロテンを酵素混合物の中に組込むことができる。更に、センサ近傍の毛細血管増殖および血液循環を保証するために、血管形成因子を添加することができる。アルギニンからチッソ酸化物を発生させるための酵素系の添加を用いて、センサの近傍での微小循環をモニターすることができる。

40

【0058】

特許請求の範囲に記載の要素の均等物に加えて、当業者に現在知られており、または後で知られる自明な置換は、定義された要素の範囲内のものであると決定される。説明した実

50

施例は例示の目的のためにのみ提示されたものであり、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。従って、請求項の範囲内において、本発明はここに特別に記載した以外の態様で実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明のグルコースセンサを示す分解斜視図である。

【図2】 図2は、図1の装置の作業電極の断面図を示している。

【図3】 図3は環境酸素または5%酸素において、変化するグルコース濃度に対する安定化された酵素混合物の反応を示すグラフである。

【図4】 図4は、環境酸素または5%酸素において、約7.5%のKrytoxブランドの液体パーフルオロカーボンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

10

【図5】 図5は、環境酸素または5%酸素において、約15%のAP200フルオロカーボンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

【図6】 図6は、環境酸素または5%酸素において、約7%のAP200フルオロカーボンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

【図7】 図7は、環境酸素または5%酸素において、約37%のAP215フルオロカーボンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

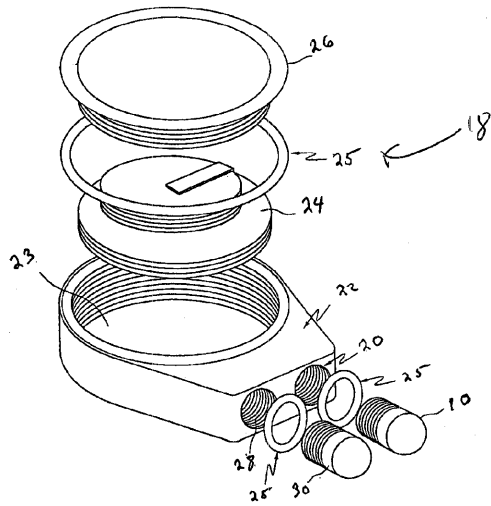
20

【図8】 図8は、環境酸素または5%酸素において、約15%のAP240フルオロカーボンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

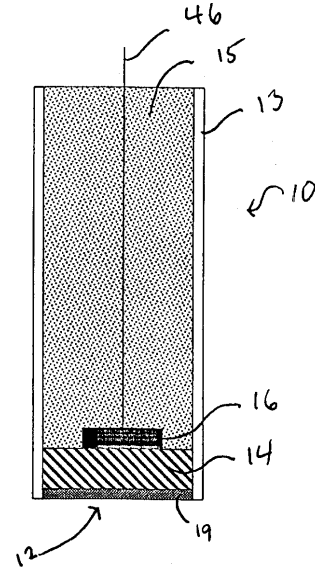
【図9】 図9は、5%酸素および0%酸素（窒素雰囲気）において、約0.4%のフェロセンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

【図10】 図10は、5%酸素、2%酸素および0%酸素（窒素雰囲気）において、15%AP215中に溶解された痕跡量のフェロセンを含む安定化された酵素エマルジョンの、変化するグルコース濃度に対する反応を示すグラフである。

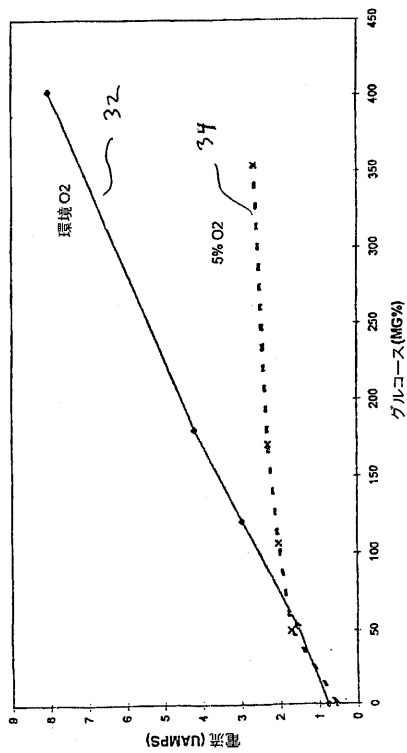
【図 1】



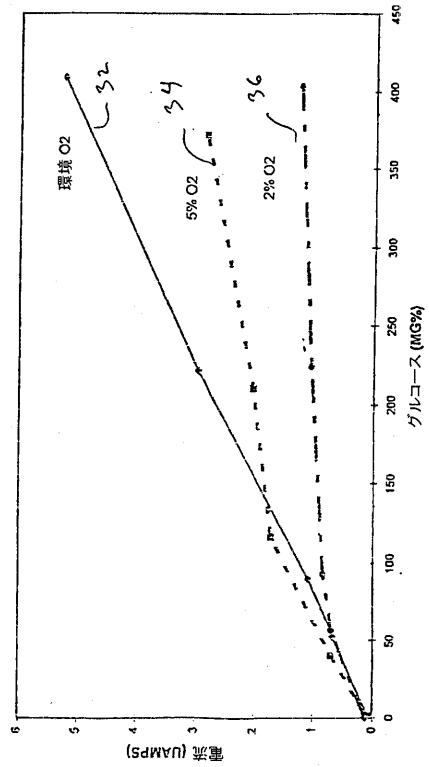
【図 2】



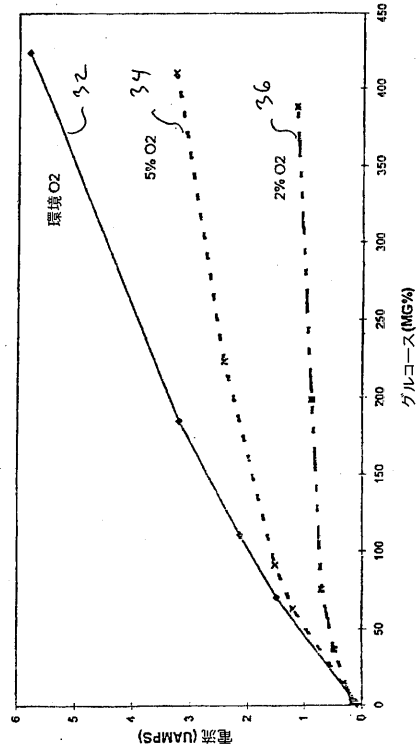
【図 3】



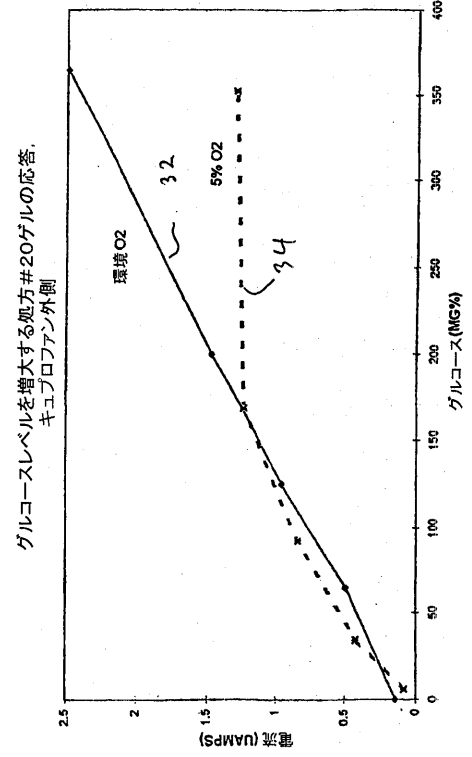
【図 4】



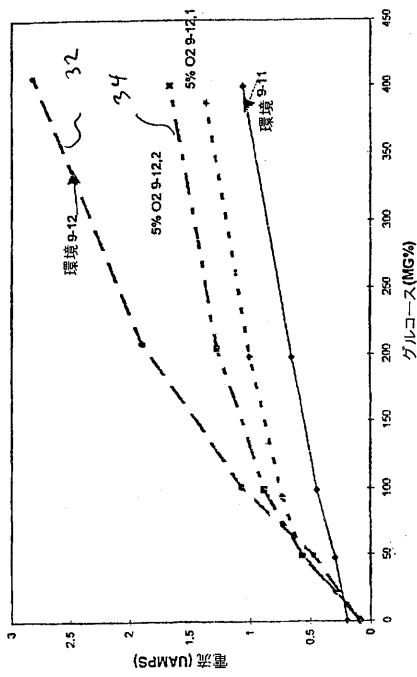
【図 5】



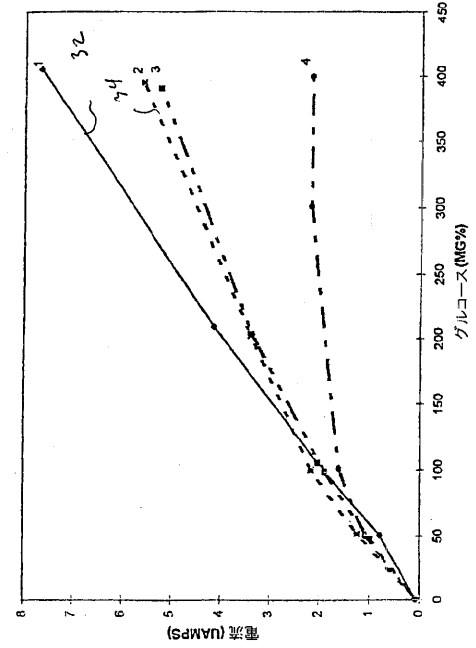
【図 6】



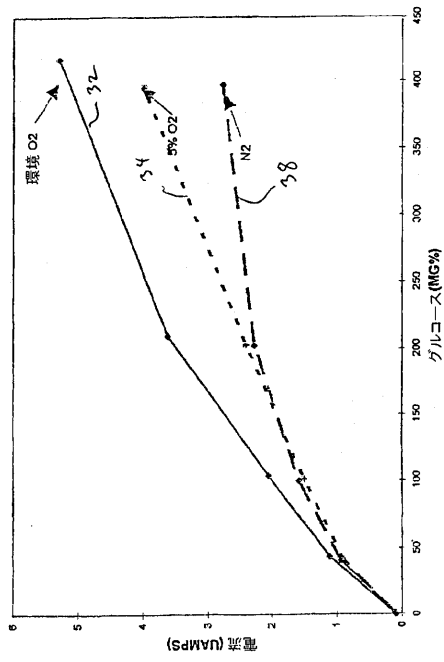
【図 7】



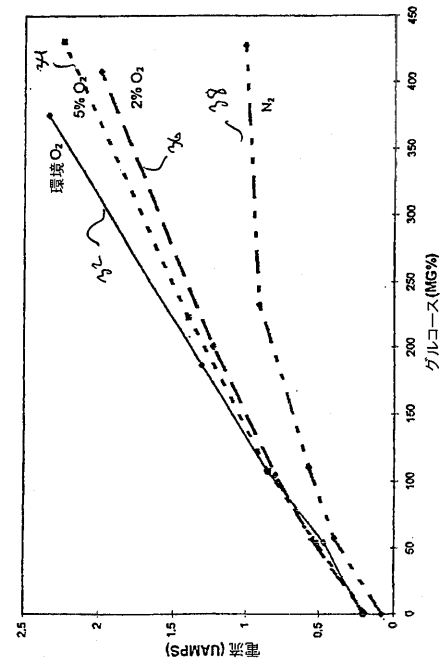
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/483 (2006.01)		C 1 2 M 1/40	B
G 0 1 N 33/66 (2006.01)		C 1 2 N 9/04	D
A 6 1 B 5/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/483	F
A 6 1 B 5/145 (2006.01)		G 0 1 N 33/66	A
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)		A 6 1 B 5/00	N
C 1 2 Q 1/54 (2006.01)		A 6 1 B 5/14	3 1 0
		C 1 2 Q 1/26	
		C 1 2 Q 1/54	

- (74)代理人 100159651
弁理士 高倉 成男
- (74)代理人 100091351
弁理士 河野 哲
- (74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠
- (74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100158805
弁理士 井関 守三
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
- (72)発明者 クラーク、リーランド・シー・ジュニア
アメリカ合衆国、オハイオ州 4 5 2 2 0 シンシナティ、グリーンデイル・アベニュー 2 1 8

審査官 柏木 一浩

(56)参考文献 米国特許第05914026 (US, A)

特開昭 6 2 - 0 8 7 1 3 5 (J P , A)

特開平 0 3 - 1 9 4 4 5 7 (J P , A)

特開平 0 4 - 2 1 5 0 5 5 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 27/327

A61K 49/00

C12M 1/34

C12M 1/40

C12N 9/04

G01N 33/483

G01N 33/66

A61B 5/00

A61B 5/145

C12Q 1/26

C12Q 1/54