

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-239906

(P2004-239906A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/66

C 1 2 Q 1/54

GO 1 N 21/77

GO 1 N 21/78

GO 1 N 33/52

F I

GO 1 N 33/66

C 1 2 Q 1/54

GO 1 N 21/77

GO 1 N 21/78

GO 1 N 21/78

C

B

A

Z

テーマコード (参考)

2 GO 4 5

2 GO 5 4

4 BO 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-26598 (P2004-26598)

(22) 出願日 平成16年2月3日(2004.2.3)

(31) 優先権主張番号 60/444, 414

(32) 優先日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503085274

バイエル・ヘルスケア・エルエルシー

Bayer Healthcare, L L

C

アメリカ合衆国、インディアナ州、465

14、エルクハート、マイルス・アベニュー

1884

(74) 代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74) 代理人 100075225

弁理士 篠田 文雄

(72) 発明者 カレン・エル・マーファート

アメリカ合衆国、インディアナ 4654

5、ミシャウオーカ、キャリッジ・レーン

15525

最終頁に続く

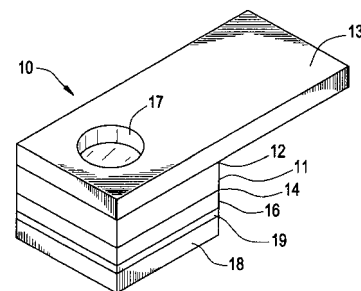
(54) 【発明の名称】 血中グルコースを決定するための方法及び試験片

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 血中グルコース量を決定するための方法及びかかる方法において有用な試験片を提供する。

【解決手段】 全血中のグルコース濃度を決定するための試験片10が、その不透明度を増大させるために少なくともその一つの面12上に重合体16を有し、これによってグルコース決定に関するヘマトクリット効果を減少させることができる。

【選択図】 図1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全血標本中のグルコース濃度を決定するための方法において：

(a) 標本面及び反応面をもち、標本面上に標本を受容しそれを反応面に向けて通過させるのに適合され、標本中のグルコースの存在を表示するように色を変える変色指示薬系を含む試験用試薬を支持しており、さらにその反応面の不透明度を増大させる重合体を少なくとも反応面上に有している試験片を用意する段階；

(b) 試験片の標本面に血液標本を塗布する段階；及び

(c) 血液中のグルコース濃度を決定するように試験面の色の变化を測定する段階、
を含んで成る方法。

10

【請求項 2】

前記重合体が、アクリル系ラテックス重合体、ポリスチレン硫酸ナトリウム重合体及びそれらの組合せから成るグループの中から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記多孔質膜がポリエーテルスルホン及び変成ポリエーテルスルホンから成るグループの中から選択された材料で作られている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

試験用試薬が、PQQ-GDH系、NAD-依存性GDH系、ヘキソキナーゼ還元系及びグルコースオキシダーゼ酸化系から成るグループの中から選択された化学薬品系を含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

指示薬系が、テトラゾリウム化合物及びテトラゾリウム塩化合物から成るグループの中から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

指示薬が 2-チアゾリルテトラゾリウム塩化合物を含んで成る、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

試薬が、置換済み又は未置換 3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン及び 3-フェニルイミノ-3H-フェノキサジンから成るグループの中から選択されたメディエータ化合物を含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

試験片が 0.2 ミクロンから 5.0 ミクロンの範囲内の孔径をもつ、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試験片が等方性である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試験片が非等方性である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

赤血球を含有する全血標本中のグルコース濃度を測定するための試験片において：

(a) 標本面及び反応面をもち、標本面上に標本を受入れそれを反応面に向かって通過させるのに適合されている多孔質膜；

(b) 膜によって支持され、標本中のグルコースの存在を指示するように色を変える変色指示薬系を含んで成る試験用試薬；及び

(c) 膜の反応面の不透明性を増大させる、少なくとも膜の反応面上にある重合体、
を含んで成る試験片。

40

【請求項 12】

前記重合体が、アクリル系ラテックス重合体、ポリスチレン硫酸ナトリウム重合体及びそれらの組合せから成るグループの中から選択される、請求項 11 に記載の試験片。

【請求項 13】

前記多孔質膜がポリエーテルスルホン及び変成ポリエーテルスルホンから成るグル

50

ープの中から選択された材料で作られている、請求項 11 に記載の試験片。

【請求項 14】

試験用試薬が、PQQ-GDH系、NAD-依存性GDH系、ヘキソキナーゼ還元系及びグルコースオキシダーゼ酸化系から成るグループの中から選択された化学薬品系を含んで成る、請求項 11 に記載の試験片。

【請求項 15】

指示薬系が、テトラゾリウム化合物及びテトラゾリウム塩化合物から成るグループの中から選択される、請求項 11 に記載の試験片。

【請求項 16】

指示薬が 2-チアゾリルテトラゾリウム塩化合物を含んで成る、請求項 15 に記載の試験片。 10

【請求項 17】

試薬が、置換済み又は未置換 3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン及び 3-フェニルイミノ-3H-フェノキサジンというグループの中から選択されたメディエータ化合物を含んで成る、請求 11 項に記載の試験片。

【請求項 18】

試験片が 0.2 ミクロンから 5.0 ミクロンの範囲内の孔径をもつ、請求項 11 に記載の試験片。

【請求項 19】

前記試験片が等方性である、請求項 18 に記載の試験片。

20

【請求項 20】

前記試験片が非等方性である、請求項 18 に記載の試験片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標本中の分析物の量を決定するための方法及び試験片に関する。より特定のには、本発明は、血中グルコース量を決定するための方法及びかかる方法において有用な標本片に関する。

【背景技術】

【0002】

医学にとっては、多様な流体特に全血及び尿といったような有色水性生体液及び血清及び血漿といった生物学的誘導体の化学的及び生化学的成分を定量化できることが増々重要になってきている。このような能力は、危険物質、麻酔剤及び治療用薬物に対する露出についての試験及び診断において重要である。いくつかの利用分野では、専門外の者が、実験室環境外で試験を実施し迅速かつ正確な結果を得ることができるということが重要である。例えば、糖尿病患者は、自らの食餌療法及び投薬法を加減するために一日に数回グルコースについて自らの血液標本をテストしなければならない。

30

【0003】

血中グルコースの決定のためのテストキットは、当該技術分野において周知である。かかるテストキットには往々にして、グルコースの存在下で反応して試験片内の色変化をひき起こす単数又は複数の化学物質が含浸された試験片が関与している。試験片内の色変化は、既知の光学検出方法によって測定される。標本の吸光度、透過率又は反射率のいずれかの変化を測定することができるものの、標準的にはグルコース決定のためには、反射率の変化が測定される。一般に、標本中のグルコース濃度が増大するにつれて、条片はより多くの色を生成しより濃くなる。試験片が濃くなればなるほど反射率は低くなり、かくしてより低い反射率レベルは標本のより多くのグルコースを指示することになる。

40

【0004】

血液標本中の赤血球の存在は、グルコース読取りが行なわれているのと同じ波長で検出器に光を反射し戻すか又はグルコースに応答して発生した色を全て読取ることができないように光の透過を遮断することによって、又は光を散乱させることによって、反射率の読 50

取りと干渉し得る。かくして、一部のテストキットでは、標本を試験片に適用する前に標本から赤血球をろ過するか又は溶解させることが必要である。

【0005】

血液中のグルコースの比色決定に関する一連の特許としては、全てカリフォルニアのマウンテインビューにあるLifescan Inc.に譲渡され、全て本書にその全体が参考として内含されている〔特許文献1〕が含まれる。その中で開示されている方法には、不活性両面多孔質マトリクスの1つの表面から反射率読取りを行なうことが関与している。該マトリクスには、分析中の流体が第1の表面に塗布されそのマトリクスを通して第2の表面まで移動するときに吸光性反応生成物を生成するように分析物と相互作用する試薬が含浸されている。第2の表面の反射率測定は、ヘマトクリット変動からの干渉及び一定の与えられた濃度のグルコースに応答して生成される色のクロマトグラフィによって引き起こされる変動を補償する目的で、2つの別々の波長で行なわれる。不活性マトリクスを通過する流体による第2の表面の湿潤化によって引き起こされる反射率の最初の減少によって、タイミング回路がトリガーされる。該方法は、血清又は血漿からの赤血球の分離を必要としない。

10

【0006】

「PQQ-依存性デヒドロゲナーゼを用いた分析物の比色決定方法」という題のBoehringer Mannheim GmbHに譲渡された〔特許文献2〕は、ニトロソ化合物からイミノ化合物への酵素による還元及び色形成によるイミノ化合物の検出による電子富有芳香族ニトロソ化合物グループ由来の電子受容体の存在下でのPQQ依存性デヒドロゲナーゼによる酵素酸化を用いた分析物の比色決定方法を開示している。

20

【0007】

同じくLifescan Inc.に譲渡され本書にその全体が参考として内含されている〔特許文献3〕は、「ヘマトクリットに対する感度が減少した血中グルコース片」という題を有する。この特許は、比較的大きい孔をもつ標本面と比較的小さい孔をもつ試験用面を有する異方性膜を含む試薬片を開示している。テスト標本が標本面に塗布され、試験用面に向かって膜内を通過し、一方比較的大きい赤血球は、血液標本から外にろ過される。膜には、グルコース及び酸素と反応して過酸化水素を作り出す成分、過酸化水素と反応する色指示薬及びグルコース濃度測定に対する赤血球の効果を減少するアクリル酸重合体を含んで成る試験用作用物質が含浸されている。使用されるアクリル酸重合体は比較的高い分子量をもち、標本の粘度及び流量に影響を及ぼすと考えられている。

30

【0008】

光学的検出方法を用いたこのような先行技術のグルコース試験方法においては、検出システムは反射性表面の不透明度に順応しなければならないということが認識されている。反応表面の不透明度が高ければ高いほど赤血球の存在に対する感応性は低くなることが知られている。一部のこのような方法においては、不透明度は、マトリクスの反射性表面内に内蔵された散乱中心を使用することによって調整される。かかる既知の散乱中心には、二酸化チタン、珪藻土、粉末金属、無機質、及びこれらの及びその他の材料のさまざまな組合せが含まれる。不透明度に影響を与えるものとして知られているその他の要因としては、支持媒質の孔径、孔構造及び表面積が含まれる。

40

【特許文献1】U.S.4.935.346, U.S.5.049.487, U.S.5.049.394, U.S.5.179.005及びU.S.5.304.468

【特許文献2】U.S.5.484.708

【特許文献3】U.S.5.789.255

【特許文献4】U.S.5.520.786

【特許文献5】U.S.5.126.275

【特許文献6】U.S.5.322.680

【特許文献7】S.N.60/373.583

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0009】

本発明の1つの目的は、全血標本からの赤血球の分離又は溶解を必要としない、流体の標本を試験するための方法を提供することにある。

【0010】

本発明のさらなる目的は、標準的には1マイクロリットル未満の非常に小さい流体標本を用いて実施することのできる方法を提供することにある。

【0011】

本発明のさらにもう1つの目的は、標本毎のヘマトクリット変動に対し感応性をもたない試験方法を提供することにある。

【0012】

本発明のさらにもう1つの目的は、本発明の方法と共に使用するのに適した試験片を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

以上の目的は、標本中のグルコースの決定方法に、光学的に読取られている表面の透明度を変更するために単数又は複数の重合体を使用される両面試験片の使用が内含されている、本書中の発明によって達成される。1つの好ましい実施形態では、重合体が、同様に、反応部位及び／又は読取り部位に試験用試薬を維持することにより反応生成物のクロマトグラフィを制御することになる。本発明に従うと、全血標本中のグルコース濃度を決定するための方法には：(a) 標本面と反応面とをもち、標本面上に標本を受容しそれを反応面に向けて通過させるのに適合され、標本中のグルコースの存在を表示するように色を変える色指示薬系を含む試験用試薬を支持し、さらに少なくとも反応面上に塗布されて反応面の不透明度を増大させる重合体を有している試験片を用意する段階；(b) 試験片の標本面に血液標本を塗布する段階；及び(c) 血液中のグルコース濃度を決定するように試験面の色の変化を測定する段階、が含まれている。

【0014】

試験片は好ましくは、ポリエーテルスルホン及び変成ポリエーテルスルホンから成るグループの中から選択された材料で作られている多孔質膜を含んで成る。多孔質膜に塗布される単数又は複数の重合体は好ましくはアクリル系ラテックス重合体及びポリスチレン硫酸ナトリウムから成るグループの中から選択されている。

【0015】

本発明は、図面を参照することによってさらに容易に理解される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明の方法は、試験片の第1の面の上に標本を設置し、標本中のあらゆるグルコースを試験片内に含浸された試薬と反応させ、標本が試験片を通過した後試験片の反対側の面の光学的測定を行なうという既知の段階により標本中のグルコースを決定することを含んで成る。本発明に従うと、試験片には、グルコース決定を標本中の赤血球の存在に対しさほど感応性のないものにするような形で試験片の不透明度を変成させる単数又は複数の重合体が備わっている。図1A-Cの各々において、層の厚みは、例示を明確にするように示されており、試験片製品内の層の実際の厚みを表わすことを意図されたものではない。

【0017】

図1Aは、本発明の方法において使用するのに適した試験片10の斜視図である。図1Aに例示されているように、試験片10は、多孔質膜11が接着されている取っ手13を含んでいる。本発明の方法は、光学的測定を行なう前に標本から赤血球をろ過することを必要としないため、孔構造は、試験片内のx、y及びz方向で一定であり得るが、異方性孔径勾配をもつ膜も同様に使用可能である。多孔質膜11は、試験面又は標本面とも呼ばれる第1の面12及び反応面とも呼ばれる第2の面14を有する。取っ手13内の穴17を通して多孔質膜11の試験面12上に標本が被着させられる。標本は膜の孔を通して多孔質膜11の反応面14まで移行する。反射率といったような反応面14の光学的測定値

10

20

30

40

50

は次に、標本内に存在するグルコースの量を決定するようにグルコース濃度と相関される。

【0018】

本発明に従うと、多孔質膜11の反応面14は、標本中のグルコースの存在を指示するように色を変える色指示薬系を含む試験用試薬組成物16で処理され、この試薬組成物16はさらに、多孔質膜11の反応面14の不透明度に影響を及ぼす重合体を含んで成る。重合体を内含する試薬組成物16は、浸漬、コーティング及びストライピングといった方法により試験片に塗布することができる。図1Aに例示された実施形態においては、組成物は、試験片10の反応面14全体にわたりコーティング16として塗布される。もう1つの実施形態においては、組成物はまず最初に浸漬などによって面12に塗布され、面14上に再構成するように条片内を通過させられる。当業者であれば、重合体を内含する所望の組成物層16を達成するように組成物塗布プロセスのパラメータを最適化することができるだろう。試薬内の重合体は同様に、試験片を通した分析物のクロマトグラフィに影響を及ぼす可能性がある。感圧接着剤19の使用及び積層を含めた既知の方法により、組成物16に対し、光学的に透明なウインドウ18を適用することができる。ウインドウ18は、ポリエステル又は光学的に適切なあらゆる材料で作ることができる。

【0019】

図1Bは、本発明に従って作られた試験片の一変形実施形態を例示している。この実施形態において、試験片20は、穴15がカットされた取っ手13を含んでいる。ディスク25は、標本面22と反応面24を有する多孔質膜21を含んで成る。反応面24に塗布されるのは、標本中のグルコースの存在を指示するように色を変える色指示薬系及び多孔質膜21の反応面24の不透明度を変える重合体を含んで成る試験用試薬組成物26である。ディスク25は穴15にはめ込まれ、ディスク25及びそれが収容される取っ手13の部分の上には光学的に透明なウインドウ28が適用される。この実施形態では図1Aの実施形態又は「特許文献3」といったような前述の先行技術特許中に示され記された先行技術のデバイスに比べ少ない処理済み多孔質膜材料しか必要とされないということがわかる。ディスク25はリボンの形又はその他の適切な幾何学的構成をしていてよいということがわかるだろう。

【0020】

図1Cは、本発明で使用するのに適した試験片のさらにもう1つの変形実施形態を例示している。この実施形態においては、試験片30は取っ手33を含んで成る。リボン35は、標本面32と反応面34をもつ多孔質膜31を含む。多孔質膜31には、標本中のグルコースの存在を指示するように色を変える色指示薬系及び多孔質膜31の反応面34の不透明度を変える重合体を含む試験用試薬を含む組成物36が、反応面34に備わっている。毛細管入口38をもつスペーサ37が、接着剤を用いてリボン35及び条片33の上に適用され、かくして毛細管入口38はリボン35の一部分の上に配置されることになる。計器を汚染から保護するように、スペーサ37上に任意にフタが配置される。試験片の反対側にはウインドウが配置されている。

【0021】

例示された実施形態の各々において、多孔質膜は、グルコースの定量的決定を可能にするように光学検出器で測定されうる反応生成物を生成するようにグルコースの存在下で反応する試薬組成物を支持している。反応用の化学薬品は、還元性か又は酸化性である。本発明で使用するのに適した還元化学薬品系は、例えば、PQQ-GDH又はNAD依存性GDH系のいずれかでありうる。グルコースオキシダーゼ酸化系が可能であるように、ヘキソキナーゼ還元系も同じく使用可能である。NAD依存性GDHシステムについては、適切なメディエータとしては、制限的な意味なく、「特許文献4」で開示されているものが含まれる。かかるメディエータには、置換済み又は未置換3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン及び3-フェニルイミノ-3H-フェノキサジンのグループの中から選ばれた化合物が含まれる。適切な指示薬には、制限的な意味なくWST-4ならびに「特許文献5」及び「特許文献6」で開示されている2-チアゾリルテトラゾリウム塩化合物の

一般的クラスが含まれている。以上の特許の各々は、当該譲受人に譲渡され、本書にその全体が参考として内含されている。

【0022】

この研究作業中に、電極ベースのNAD依存性GDH系の中で有用であるものとして〔特許文献4〕中で報告されたメディエータは、すぐ上で記述されているような光学ベースのNAD依存性GDH系ならびに光学ベースのPQQ-GDH還元性系の中では使用可能であることが発見された。この結果は、少なくとも2つの理由から驚くべきことである。すなわち第1に、メディエータは異なる酵素に特異的でありうる。NAD-GDH系で役に立つ全てのメディエータが必ずしもPQQ-GDH系内でも役に立つとはかぎらない。第2に、〔特許文献4〕で開示されたメディエータは有色である。これは、〔特許文献4〕で開示されているような電極ベースの系内では問題あることではないが、本書で開示されているような光学ベースの系ではこれらのメディエータは使用できないと予想されるはずであった。しかしながら、出願人は、これらのメディエータが反応進行中に有色の状態から無色の状態にまで変化することから、最終点では測定値と干渉しないことを発見した。当業者であれば、色発生を測定することが一般に好ましいが、色の消失も同じく測定でき、それでも標準的には前者の方が優れた試験精度を与える、ということ想像できるであろう。かくして〔特許文献2〕に開示されているようなメディエータと共に、及び本書に開示されているような不透明度を制御するための付加的な単数又は複数の重合体と共にPQQ-GDH還元系を使用することは、本発明の範囲内に入る。かかる系のための適切な指示薬としては、Dojindo Laboratoriesから入手可能なWST-4は、上述の〔特許文献5〕及び〔特許文献6〕内で開示されているもののようなテトラゾリウム塩指示薬が含まれる。

【0023】

本発明の方法の中で使用するのに適した多孔質膜材料には、Supor及びPresenseという商品名で販売されPall Corporationから入手可能なものといったポリエーテルスルホン膜及びProdatorという商品名で販売されPall Corporationから入手可能なものといったような変成多孔質ポリエーテルスルホン膜といった市販の材料が含まれる。当業者であれば、本発明の試験片内の膜として使用するのにその他の多孔質膜も適しているということ認識することだろう。

【0024】

膜に塗布される重合体として使用するのに適した材料としては、例えば、UCARという商品名で販売されUnion Carbideから入手可能なもののようなアクリル系ラテックス重合体、Polysciences, Inc.から入手可能なもののようなポレスチレン硫酸ナトリウム及びそれらの組合せが含まれる。

【実施例】

【0025】

例1

本発明に従って調整される試験片のための水溶液及び全血の両方の中のグルコースに対する用量応答は、小孔径及び大孔径の両方の試験片膜について決定された。使用された多孔質膜は、0.2ミクロン及び5.0ミクロンの等方性孔径をもつ、Pall Corporationから購入したSuporブランドのポリエーテルスルホン膜であった。各々の多孔質膜を、表1に記されている組成物中に膜の平滑な反応面を浸漬することによって試薬で処理した。

【0026】

【表 1】

表 1

試薬	最終濃度
0.4M のナトリウム HEPES	0.2M
WST-4	40 mM
40% PSSA, mw=70k	5%
UCAR 455 (45%の固形分)	10.00%
NAD	10 mM
ジアフォラーゼ	1016 U/mL
GDH (グルコースデヒドロゲナーゼ)	1900 U/mL
ムタロターゼ	3370 U/mL
NaOHで pHを 7.3～7.5に調整	-

10

【0027】

高気流オープン内で少なくとも5分間40～50℃で膜を乾燥させた。膜をディスク状にカットし、図1Bの実施形態と関連して上述したとおり、条片にはめ込んだ。Adhesive s Researchから入手可能なArcare7843感圧接着剤を用いて、コーティングされた反応面に透明のポリエステルフィルムウインドウを貼付した。試験片は、反応面を下にして方向づけした。グルコースでスパイクした全血又はグルコース水溶液のいずれか500ナノリットルの標本を次に、試験片内の各ディスクの粗い標本面に適用した。0.15MaのNaHEPESを用いてpH7.5までグルコース溶液を緩衝させた。水性及び全血標本中のグルコース濃度は、0mg/dL、50mg/dL、100mg/dL、250mg/dL、及び600mg/dLであった。全血標本を、指示されたレベルまでスパイクし、Yellow Springグルコースo., Inc. 2300型STATPlusグルコース検出器を用いて血漿グルコースとしてこれを測定した。各々の標本試験片上で各標本溶液について2回のレプリケートをランさせた。2002年4月19日付けの同時係属特許出願〔特許文献7〕の中に記述されている器具を用いて、透明ポリエステルフィルムウインドウにおいて、680nmで各試験片の反射率を測定した。この計器は、直径約0.030インチの小読取り部域反射率読取りヘッドを用いている。測定された反射率値Rを $K/S = (1 - R)^2 / 2R$ という式により線形

20

30

【0028】

例 2

この例は、上述の例1で使用された流入形技術ではなく図1Cに関連して例示され論述された側方流毛細管方式を用いて標本が適用される浸漬式試薬膜技術のフィージビリティを実証している。Pall Corporationから商品名「Presense」で販売されている孔径0.8ミクロンのポリエーテルスルフォン膜の標本を、例1に記述されている通りに処理した。処理済み膜のリボンを、図1Cに例示されている通り毛細管フロー試験片上に取付けた。各試験片には、40%ヘマトクリットの全血中のグルコース又はグルコース水溶液のいずれかの600～800ナノリットルの標本を塗布した。水性試験標本中のグルコースの濃度は、0、50、100、250及び500mg/dLであった。全血標本中のグルコース濃度は、血漿値に変換されて、0、50、100、200、400及び600mg/dLであった。

40

【0029】

例1に記述されている計器を用いて30秒の終点で680nmで反射率を測定した。結果は、図3に例示されている。対応する水性及び全血標本について得られた結果は各々、同

50

じ勾配及び切片をもつ一次関数を生成し、これは、本発明の試験片で得られた反射率値が全血標本のヘマトクリットと無関係であることを表わしていた。

【0030】

例 3

Pall CorporationによりPresenseの商品名で販売されている孔径0.8ミクロンのポリエーテルスルホン多孔質膜材料を用いて、試験片を調製した。使用された試薬組成物は、表1で記述されたものであった。浸漬ではなくむしろ多孔質膜の反応面上へのストライピングにより、試薬組成物を塗布した。次に試験片に、Arcare7843感圧接着剤により固定された透明ポリエステルウインドウを備え、これを、全て以上の例1に記述された通りに試薬リボンと共に積層させた。試験片は、反応面を下にして方向づけした。その後、500ナノリットルのグルコースでスパイクされた全血の試験標本を、各試験片の粗い標本面に塗布した。グルコース全血標本は、Yellow Springs Instrument検出器を用いて血漿グルコースとして測定された場合、0mg/dL、50mg/dL、100mg/dL、200mg/dL、400mg/dL及び600mg/dLであった。各標本試験片上で各標本溶液について2つの複製を走行させた。

10

【0031】

直径約0.030インチの小読取り部域反射率読取りヘッドを用いて、680nmで上述の例1に記述された計器を用いて各々の試験片の反射率を測定した。測定した反射率値Rを、式 $K/S = (1 - R)^2 / 2R$ により線形化関数K/Sに変換した。10、20、30及び40秒で反射率測定を行なった。結果は、図4に例示されている。測定された反射率は、全血標本についてグルコース用量に正比例し、全グルコース範囲にわたり迅速かつ安定した終点が達成されたことがわかり、これはストライピングが本発明に従った有効な試験片を生成できるということを表わしている。

20

【0032】

例 4

この例は、光学ベースのPQQ-GDH還元系における〔特許文献4〕で報告されたメディーエータの有用性を実証している。試薬は、以下のように調製された：

【0033】

【表 2】

表 2

30

試薬	最終濃度
0.4MのナトリウムHEPES	0.2M
WST-4	40 mM
40% PSSA, mw=70k	5%
UCAR 455 (45%の固形分)	10.00%
PQQ-GDH	1245 U/mL
3-(3,5-ジカルボキシフェニル)-3H-フェナジン	6 mM
NaOHでpHを7.3～7.5に調整する	-

40

【0034】

0.8ミクロンのポリエーテルスルホンPresence膜及び0.2及び5.0ミクロンポリエーテルスルホンSupor膜の予めカットされた条片上に、試薬混合物の約1マイクロリットルのアリコートを設置した。室温での空気乾燥の後、0、50、200mg/dLの水性グルコース標本の500nLのアリコートを添加した。色変化、色の均質性、そして色変化の速度を観察した。グルコース標本について、視覚的用量応答を観察した。0.1%のSilwetL-7600表面活性剤を伴い最終処方pHが約7.0である類似の処方のアリコートを同様に、マイクロキュベット（例えば小容積、50ミクロンの経路長）内に設置し、0～500mg/dLの全血グルコースを添加した用量応答を観察した。約25～5パーセントの反

50

射率範囲が観察された。これらの結果は、水性及び全血標本の両方において、3-(3,5-シカルボキシフェニルイミノ)-3H-フェノチアジンがグルコースのPQQ-GDH決定の有効なメディエータであり得ることを表わしている。

【0035】

例5

この例は、本発明の状況下でNAD依存性系において〔特許文献5〕及び〔特許文献6〕に開示されているもののようなテトラゾリウム塩指示薬を用いることのフィジビリティを実証している。WST-4テトラゾリウム塩の代りに40mMの2-(4-ジフルオロメチル-5-クロロチアゾール-2-イル)-3-[2-(3-トリメチルアンモニオプロポキシ)フェニル]-5-(3,4-メチレンジオキシフェニル)テトラゾリウムジメチルスルフォネートテトラゾリウム塩指示薬を用いた。0.8ミクロンのポリエーテルスルホンPresense膜の平滑な面をコーティングするのに試薬ミックスを使用し、次に毛細管充填方式に組立てた。およそ30~10パーセントの反射率の範囲で0~600mg.dLの全血グルコースに対する用量応答を実証した。

10

【0036】

本書に開示された発明力ある方法及び試験片が、先行技術のグルコース決定システムに比べ著しい利点を提供することがわかるだろう。かかる先行技術のグルコース決定システムには、標準的に、標本中の赤血球（ヘマトクリット）により導入される干渉を補正するように2つの異なる波長での標本の光学的読取りが必要とされる。試験片は、膜の孔径とは無関係でかつ標本のヘマトクリットとも実質的に無関係である結果を提供する。このシステムはヘマトクリットと実質的に無関係であることから、2つの異なる波長で反射率を測定し補正率を適用する必要性は全く無い。このことはすなわち、本発明のシステムと共に使用される光学測定デバイスが、2組ではなく1組の光学部品しか必要としないため、先行技術のシステムに比べはるかに単純で安価でありうる、ということを意味している。本発明に関連して用いられるシステムは、同様にクマトクリット又はクロマトグラフィに順応するのに複雑なアルゴリズムを必要としない。本発明は同様に、反射性表面の不透明度に順応するように先行技術のシステムにおいて使用された散乱中心の必要性をも無くする。同様に、標本は、赤血球を分離するためのいかなる手順も受ける必要がないため、標準的におよそ1マイクロリットル以下のはるかに小さい標本サイズを使用することができる。本発明について以上で記述し例示してきた。当業者であれば、本発明の精神及び範囲から逸脱することなくその他の修正及び変更をこれに加えることができる、ということを認識することだろう。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1A】本発明に従って作られた試験片の斜視図である。

【図1B】本発明に従って作られた試験片の変形実施形態の立体分解図である。

【図1C】本発明と共に用いるのに適した試験片のもう1つの変形実施形態の立体分解図である。

【図2】本発明に従って作られた試験片を用いた水溶液及び全血中のグルコースの検出において、大きい及び小さい孔径の膜で達成された結果のグラフである。

40

【図3】水溶液及び全血の両方における異なるグルコース濃度についての本発明に従った毛細管充填方式の試験片の応答を示すグラフである。

【図4】反応化学薬品がストライプとして試験片に適用される本発明に従って作られた試験片の異なる終点における応答を示すグラフである。

【符号の説明】

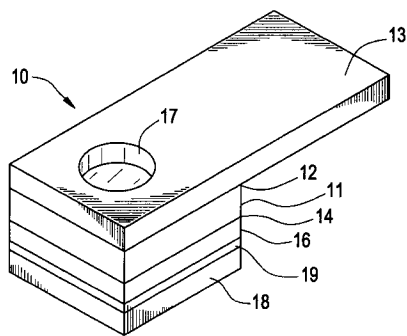
【0038】

- | | |
|----------|-----------|
| 10、20、30 | 試験片 |
| 11、21、31 | 多孔質膜 |
| 12、22、32 | 第1の面（標本面） |
| 13 | 取っ手 |

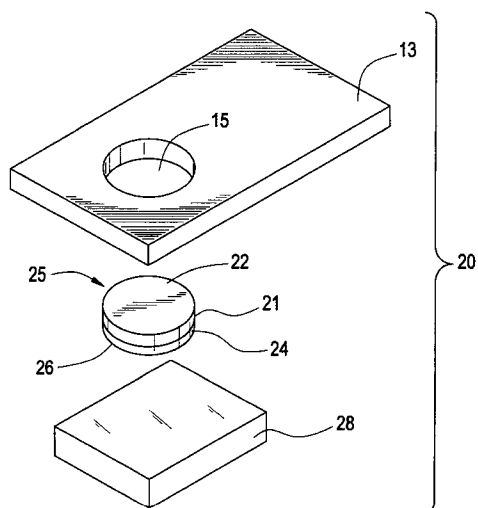
50

- 1 4、2 4、3 4 第 2 の面（反応面）
 1 5 穴
 1 6、2 6、3 6 試験用試薬組成物
 2 5 ディスク
 2 8 ウィンドウ
 3 3 条片
 3 5 リボン
 3 7 スペーサ
 3 8 毛細管入口

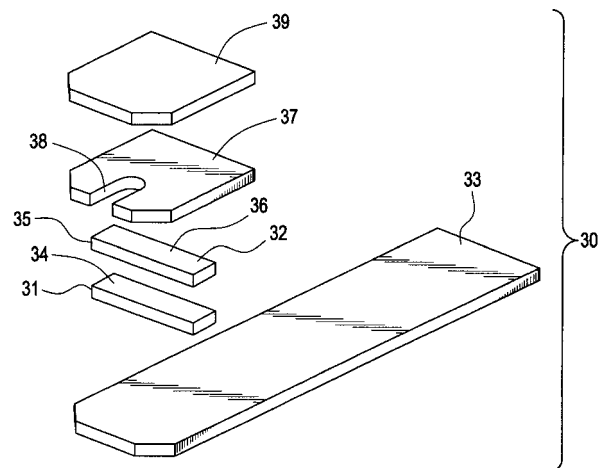
【図 1 A】



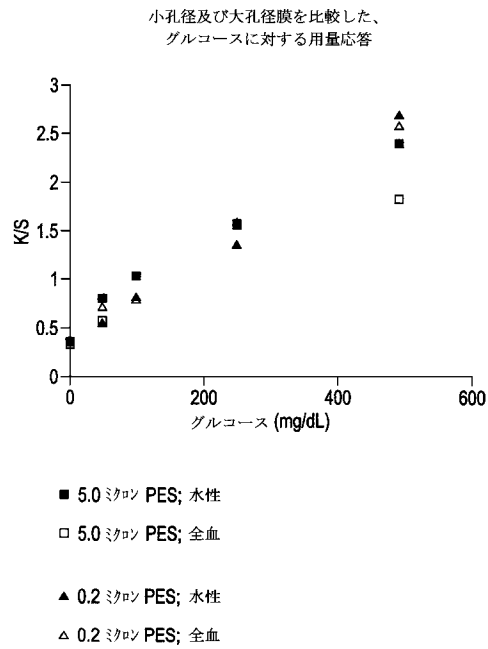
【図 1 B】



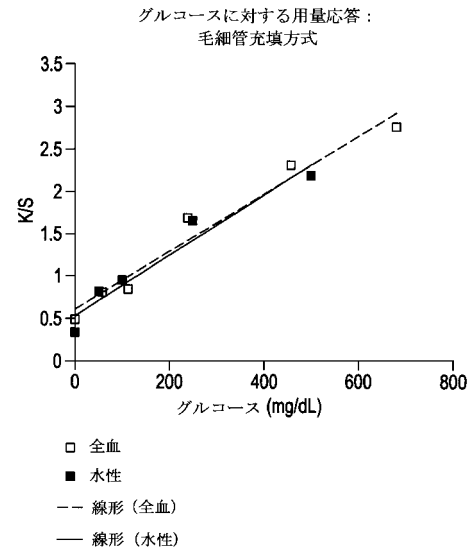
【図 1 C】



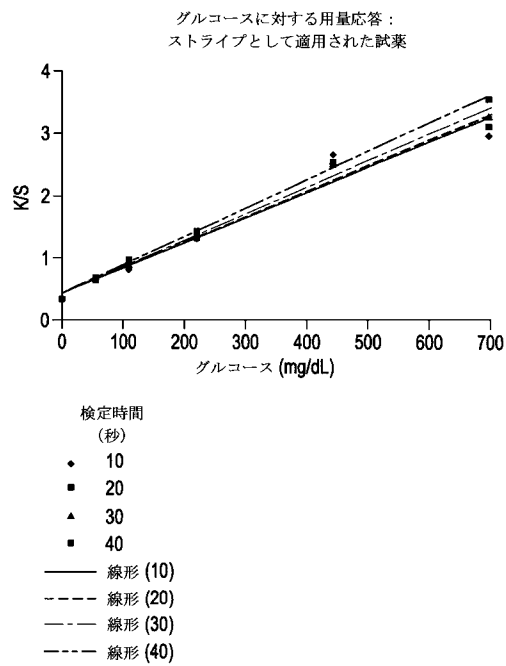
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
G O 1 N 33/52 B

F ターム(参考) 2G045 BB05 BB21 BB51 CA25 DA31 FB01 FB11 FB17 GC11 GC12
2G054 AA07 BB02 BB06 CA25 CD04 CE02 CE08 EA04 EA06 FA21
GE06 GE07 GE08 JA06
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ68 QR03 QR04 QR50 QS26 QS36 QX02