(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2012-198218
(P2012-198218A)
(43)公開日　平成24年10月18日(2012.10.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 27/327	(2006.01)	G01N	27/30	353T	4B029
G01N 27/416	(2006.01)	G01N	27/46	338	
C12M 1/34	(2006.01)	G01N	27/30	353J	
		G01N	27/30	353P	
		G01N	27/30	353Z	

審査請求 有　請求項の数 8　ＯＬ　（全 18 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-96204(P2012-96204)
(22)出願日　平成24年4月20日(2012.4.20)
(62)分割の表示　特願2007-558321(P2007-558321)の分割
原出願日　平成18年3月3日(2006.3.3)
(31)優先権主張番号　60/658,634
(32)優先日　平成17年3月4日(2005.3.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503106111
バイエル・ヘルスケア・エルエルシー
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１
タリータウン・ホワイトプレインズロード
５５５
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100092967
弁理士　星野　修
(74)代理人　100117813
弁理士　深澤　憲広

最終頁に続く

(54)【発明の名称】電気化学的バイオセンサでの酵素活性の安定化

(57)【要約】　（修正有）
【課題】体液中分析目的物の量の測定、特に全血サンプル中のグルコース測定に使用される電気化学的バイオセンサの改良に関し、電気化学的バイオセンサでの酵素活性の安定化の提供。
【解決手段】GDH-PQQを酵素－補助因子として含有し、そして電気化学的バイオセンサの作用電極および対電極上にスクリーン印刷された試薬組成物は、成分の適切な選択により酵素試薬の活性を維持する。好ましい組成物には、親水性ポリマー、アモルファス無処理シリカ、緩衝液、界面活性物質およびメディエータが含まれる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
スクリーン印刷電気化学的バイオセンサに使用されるための：
（a） 生物学的サンプル中のグルコース酸化のためのグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）；
（b） セルロース誘導体、天然ガム、天然ゲルおよび水溶性合成ポリマーからなる群から選択される親水性ポリマー；
（c） アモルファス無処理シリカ粉末、タルク、マイカ、珪藻土、天然クレイおよび修飾クレイからなる群から選択される増粘剤；
（d） pHの範囲を約4.5から約6.5または6.0に維持するのに十分な緩衝液；
（e） 界面活性物質；および
（f） メディエータ
を含む試薬組成物。
【請求項２】
前記緩衝液が酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液またはコハク酸緩衝液である、請求項１の試薬組成物。
【請求項３】
前記界面活性物質がアルキルアリールポリエーテルアルコールである、請求項１の試薬組成物。
【請求項４】
前記メディエータがフェリシアン化カリウムである、請求項１の試薬組成物。
【請求項５】
前記緩衝液のpHが5.0から6.0である、請求項１の試薬組成物。
【請求項６】
前記組成物が約60,000から約180,000 cps（mPa*s)の粘性を持つ、請求項５の試薬組成物。
【請求項７】
前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択されるセルロース誘導体である、請求項１の試薬組成物。
【請求項８】
前記親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロースである、請求項７の試薬組成物。
【請求項９】
前記増粘剤がアモルファス無処理シリカ粉末である、請求項１の試薬組成物。
【請求項１０】
前記アモルファス無処理シリカ粉末が親水性である、請求項９の試薬組成物。
【請求項１１】
前記GDH-PQQが、組成物の全重量のそれぞれ1ミリグラムあたり1-8ユニット存在する、請求項１の試薬組成物。
【請求項１２】
前記緩衝液が約30から約200 mMで存在する、請求項２の試薬組成物。
【請求項１３】
組成物の全重量に基づき、約0.5重量％までの前記ポリエーテルアルコールが存在する、請求項３の試薬組成物。
【請求項１４】
組成物の全重量に基づき、約10から約20重量％までの前記フェリシアン化カリウムが存在する、請求項４の試薬組成物。
【請求項１５】
組成物の全重量に基づき、約2から約10重量％までの前記セルロース誘導体が存在する、請求項７の試薬組成物。

【請求項１６】
組成物の全重量に基づき、約1から約6重量％までの前記アモルファス無処理シリカ粉末が存在する、請求項９の試薬組成物。
【請求項１７】
前記フェリシアン化カリウムが、組成物の全重量に基づき、約5から約50 mMまでの塩化カルシウムをさらに含む、請求項１の試薬組成物。
【請求項１８】
（a） 非多孔性基板；
（b） 前記基板上に配置された作用電極および対電極；
（c） 前記電極上にスクリーン印刷される、前記試薬組成物は：
（1） 前記組成物の全重量のそれぞれ1ミリグラムにつき、生物サンプル中のグルコース酸化のための約1-8ユニットのグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）；
（2） 天然ガム、天然ゲルおよび水溶性合成ポリマーからなる群から選択される親水性ポリマー；
（3） アモルファス無処理シリカ粉末、タルク、マイカ、珪藻土、天然クレイおよび修飾クレイからなる群から選択される増粘剤；
（4） pHの範囲を約4.5から約6.5に維持するのに十分な緩衝液；
（5） 界面活性物質および
（6） メディエータ；および
を含む、前記組成物の試薬組成物；
（d） 前記電極および前記試薬組成物のための保護カバー
を含む電気化学バイオセンサ。
【請求項１９】
前記緩衝液が約30から約200 mMの、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはコハク酸緩衝液である、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２０】
前記界面活性物質が、前記組成物の全重量に基づき、約0.5 ％までのアルキルアリールポリエーテルアルコールである、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２１】
前記メディエータが、前記組成物の全重量に基づき、約10から約20 ％までのフェリシアン化カリウムである、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２２】
スクリーン印刷への使用に適した組成物を供給するために十分な量の成分（c）（2）および（c）（3）を含む、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２３】
前記組成物が約60,000から約180,000 cps（mPa・s）の粘性を持つ、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２４】
前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択される、前記組成物の全重量に基づき、約2 ％から約10重量％のセルロース誘導体である、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２５】
前記親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロースである、請求項２４の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２６】
前記増粘剤が、前記組成物の全重量に基づき、約1から約6重量％のアモルファス無処理シリカ粉末である、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２７】

前記アモルファス無処理シリカ粉末が親水性である、請求項２６の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２８】
前記試薬組成物が約5から50 mMの塩化カルシウムを含む、請求項１８の電気化学的バイオセンサ。
【請求項２９】
試薬組成物をスクリーン印刷することを含む、電気化学的バイオセンサに用いられるスクリーン印刷された試薬組成物中のグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）と補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）の活性を維持するための方法であって：
（a） 生物サンプル中のグルコース酸化のためのグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）；
（b） セルロース誘導体天然ガム、天然ゲルおよび水溶性合成ポリマーからなる群から選択される親水性ポリマー；
（c） アモルファス無処理シリカ粉末、タルク、マイカ、珪藻土、天然クレイおよび修飾クレイからなる群から選択される増粘剤；
（d） pHを約4.5から約6.5の範囲に維持するのに十分な緩衝液；
（e） 界面活性物質；および
（f） メディエータ；
の作用を含む、前記方法。
【請求項３０】
前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択されるセルロース誘導体である、請求項２９の方法。
【請求項３１】
前記増粘剤がアモルファス無処理シリカ粉末である、請求項２９の方法。
【請求項３２】
前記pHが5.0から6.0の範囲で維持される、請求項２９の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の分野
[0001] 本発明は、一般的に、生体液の分析をするのに使用される医療機器の分野に関する。
【０００２】
本発明の背景
[0002] より具体的には、本発明は体液中分析目的物の量の測定、特に全血サンプル中のグルコース測定に使用されるバイオセンサに関する。このような測定を行うためには光学的方法がしばしば使用されるが、本発明は電気化学的バイオセンサの改良に関する。
【０００３】
[0003] 本明細書中に記述された本発明の方法は、他の分析目的物の測定にも適用できるが、全血サンプル中のグルコース測定を特に目的としている。本発明はまた、定電位あるいは変動電位が血液サンプルに接する電極に印加されて生じた電流値を短時間の後に測定する電気化学的機器にも関する。測定された電流値は、サンプル中の分析目的物量に相関する。このような機器を電流測定器という。
【０００４】
[0004] 電流測定機器として使用されるグルコースバイオセンサは多数の試薬システムを使用することができ、それが酵素とサンプル中のグルコースとを反応させ、そしてレドックス化合物の酸化により測定可能な電流を生じる。レドックス化合物は以下に示す一般的な一連のステップのメディエータと呼ばれる。
グルコース + E_{oxid} → E_{red} + 酸化グルコース（グルコノラクトン）

$E_{red} + n\ Med_{oxid} \rightarrow n\ Med_{red} + E_{oxid}$
$n\ Med_{red} \rightarrow Med_{oxid} + n\ e^-$。

【０００５】

[0005] ここで、E_{oxid}とE_{red}はそれぞれ、酵素のレドックス中心の酸化型および還元型で、Med_{oxid}とMed_{red}はメディエータの酸化型および還元型である。グルコースオキシダーゼは、電気化学的バイオセンサの酵素として使用されているが、ごく最近では、グルコースデヒドロゲナーゼが導入されている。これらの酵素は、NAD、FAD、PQQなどの補酵素または補助因子とともに使用される。メディエータは、フェリシアン化物またはテトラゾリウム塩といった、当該分野での当業者によく知られたものであってもよい。

【０００６】

[0006] グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）、その補助因子およびメディエータは配合剤中で結合されて一対の電極、本明細書では作用電極および対電極として記載された電極、に印加される。電位が電極間に印加されるときに、酵素／補助因子はグルコース（分析目的物）を酸化し、メディエータは酵素を再酸化するように還元される。還元されたメディエータは再酸化される場所である作用電極に移動し、この工程で、電子を放出し、それが対電極へ移動することで、サンプル中に存在するグルコース量に比例する電流を生じる。

【０００７】

[0007] 患者が血中グルコース量を検査する場合に、毎回新しいセンサが用いられるため、試薬配合剤はバイオセンサごとに一定した性能を供給しなければならない。明らかなことに、結果が信頼できることが重要である。それは使用者がそれぞれの検査結果に照らして食事あるいは薬物療法を調整するためである。したがって他の必要条件の中でも、酵素が有効期間を通じてその活性を維持する必要がある。本発明は特に、電気化学的バイオセンサに使用される酵素／補助因子システム［すなわち、グルコースデヒドロゲナーゼ－ピロロキノリンキノン（GDH-PQQ）］の活性損失の制限または抑制に関する。

【０００８】

[0008] GDH-PQQの活性を維持する一つの方法は、米国特許第6,656,702号中で示唆されており、その中では試薬配合組成に糖を添加すること、特にGDH-PQQにトレハロースを添加することを教示する。一例として親水性ポリマーである、カルボキシメチルセルロースを電極上に膜形成させ（deposit）、乾燥させる。するとGDH-PQQ、トレハロースおよび電子受容体（メディエータ）としてのフェリシアン化カリウムを含む試薬混合物は、電極上の乾燥したカルボキシメチルセルロース膜に「滴下」されて膜形成させた後、乾燥させて電極上の試薬層を完成させる。この特許はまた、親水性ポリマーがまた試薬を含む層に添加されうることを示唆する。試薬層の「滴下」に言及した米国特許第6,656,702号は、露出した電極を取り囲むウェルへ試薬の液滴を分配することによって膜形成させることを意味すると思われる。

【０００９】

[0009] 他の特許（米国特許第6,270,637号）は、GDH-PQQを含み、またヒドロキシエチルセルロースをも含む電気化学的バイオセンサについての配合剤を記述する。この特許は100から900キロダルトン（kDa）の分子量を持つポリエチレンオキシドを含むことの重要性を強調する。電極上へのこれらの配合剤の印加方法は、詳細には提供されていないが、ポンプシステムによる試薬分配によって行われていると思われる。

【００１０】

[0010] 試薬層のスクリーン印刷は、米国特許第5,708,247号、5,951,836号および6,241,862号に記載された組成物およびバイオセンサに使用された。グルコースオキシダーゼは酵素として用いられ、試薬組成物はまた、ヒドロキシエチルセルロースおよび、赤血球を排除する二次元ネットワークを形成していると提唱された、疎水性および親水性のバランスを保つために選択された処理済シリカを含んだ。

【００１１】

[0011] 試薬配合剤は、含浸、ストライプコーティング、インクジェット印刷または電

磁開閉式液滴吐出装置（micro-solenoid valve drop ejection device）の使用を含んでもよいシリンジポンプを用いたマイクロ膜形成などの、さまざまな方法で膜形成されてもよい。スクリーン印刷はバイオセンサの大規模な製造に効果的でよく適合するため、特に興味深い方法である。この方法は、電極に印加される配合剤（すなわちインク）が、うまく印加されるような特定の物理的特性を持つことが必要とされる。特に、スクリーン印刷により印加されたインクは、基質への接着、粘着、チキソトロピー（シヤスィニング（Shear-thinning））および最適化された粘性および流れのための流体力学という特性が必要である。

【００１２】

[0012] 本発明者は、グルコースオキシダーゼを酵素とした場合にスクリーン印刷のために用いられた組成物が、酵素をGDH-PQQに変えると急速に活性を失うため、使用できないことを示した。研究後、スクリーン印刷に必要な物理的特性の供給のために使用されたある種の成分が、酵素活性の損失を引き起こすことが確かめられた。その結果、GDH-PQQの早発性非活性化の原因とはならないばかりでなく、スクリーン印刷への条件を満たす成分を発見することが必要であった。これらの試薬配合剤は以下に記述される。

【００１３】

本発明の概要

[0013] 本発明の一面は、電気化学的バイオセンサの電極に印可される試薬組成物である。この新しい組成物は、スクリーン印刷されることが出来、またグルコースバイオセンサ中のグルコースの酸化に使用される酵素－補助因子システム（GDH-PQQ）の活性の早発性損失を回避する。好ましい態様では、GDH-PQQは親水性ポリマー、好ましくは、ヒドロキシエチルセルロースと結合され、およびpHを4.5と6.5の間に維持する緩衝液中でのアモルファス親水性シリカ粉末、界面活性物質、ならびにメディエータ、好ましくはフェリシアン化物と結合される。

【００１４】

[0014] 一つの態様では、本発明は上述した反応組成物が作用電極および対電極上にスクリーン印刷された電気化学的バイオセンサである。

[0015] 他の側面として、本発明はスクリーン印刷された試薬組成物中のGDH-PQQの活性を維持するための方法である。

【００１５】

好ましい態様の説明

測定；血中グルコース含有量

[0022] 血中グルコースは様々な方法によって測定できる。特に関心が高いのは、糖尿病患者が自宅で使用する方法である。これらには、光学的方法および電気化学的方法が含まれ、それらの両方は、酵素によるグルコース酸化によって機能することができる。電位が一対の電極間に印加された場合、グルコース存在量は、インディケータによる発色またはレドックスメディエータの酸化によって生じた電流によって計測される。本発明は、全血中グルコース含有量測定の後者の方法に関し、より具体的にはグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）を利用した電気化学的バイオセンサに関する。GDH-PQQは、メディエータ、ポリマー、界面活性物質、緩衝液および増粘剤を含む他の成分と結合され、電極対上に膜形成させる組成物を生成する。電位が電極間に印加される場合、GDH-PQQとグルコースの反応およびメディエータのレドックス反応は、反応組成物に接触する状態の血液サンプル中のグルコース量に比例する電流を生じる。

【００１６】

[0023] 本発明は、これまでに当該技術分野で開示されている多くの中で、特定のバイオセンサ設計に制限されない。使用することができるバイオセンサの例は、図1a、1bで図解する米国特許第6,531,040号で記載される。

【００１７】

[0024] バイオセンサ10は、図1に分解組立図として示した。バイオセンサ10は、基板上に連続的に印刷（通常はスクリーン印刷技術による）された絶縁基板12、伝導体パター

ン14、電極パターン（部品16と18）、絶縁（誘導体）パターン20、反応層22から構成される。バイオセンサはさらに、カバー層28を加えることによって完成する。カバー層28と試薬層22の間に形成されるキャピラリ30は、液体試験サンプルの流路となる。

【００１８】

[0025] 反応層22中の試薬は、液体試験サンプル中の分析目的物（例えば、血中グルコース）と反応し、測定され、そして分析目的物の存在量に相関した電流値を生じる。反応層22は一般的に一種類または複数種類の酵素、および電子受容体を含む。酵素は分析目的物と反応して電子を生じ、その電子が電子受容体またはメディエータによって作用電極の表面に伝達され、それが分析目的物と酵素の反応に応答して還元される。本発明において、酵素はグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）であり、その補助因子はピロロキノリンキノン（PQQ）であり、メディエータはフェリシアン化塩である。

【００１９】

[0026] 電極パターンの二つの部品16および18は作用電極および対電極それぞれに対応しており、それらは分析目的物濃度の電気化学的な測定をするのに必要である。図示された設計の特徴は、対電極の主要部が作用電極16aの露出部分から下流（流路に沿った液流の方向という意味）に位置されるように、作用電極および対電極が形成されることである。

【００２０】

[0027] しかしながら、対電極のサブエレメント18aが、作用電極の上部エレメント16aより上流に位置され、それにより、作用電極を完全にカバーするには不適切な量の試験液体サンプル（例として全血サンプル）がキャピラリスペースに入った場合、全血サンプルの伝導性のために対電極サブエレメント18aと作用電極の露出部との間での電気接続が形成される。しかしながら、全血サンプルによる接触のために利用可能な対電極領域は非常に小さいため、電極間で電流検出器を通して非常に微弱な電流しか流れることができない。電流検出器のプログラミングして、受信したシグナルが一定の予定レベル以下であった場合にエラーシグナルを発することにより、センサ装置は使用者に、センサの供給孔に入れた血液量が不十分であったこと、および再度試験を行うべきか、またはより多くの血液を加えるべきかを使用者に通達する。具体的な電極の寸法は重要ではないが、一般的に対電極サブエレメント18aの領域が、作用電極の領域に比べて約10％小さく、さらに具体的には約6％小さい。このエレメントは可能な限り小さくすべきである。

【００２１】

[0028] 米国特許第6,531,040号でも熟慮されたように、対電極サブエレメント18a上に試薬インクを印刷しないスクリーンを作製することより、反応層22が対電極サブエレメント18aと接触しないようにすることができる。このことはサブエレメントの試薬を枯渇させ、その結果、サブエレメントが対電極としての正確な機能を発揮できないようにし、試験液体サンプルが対電極18の大部分に接触出来ない場合はエラー条件となるようにする。サブエレメント18aが物理的には対電極18と、すなわちその一部と接続する一方、サブエレメント18aは、それ自身のコネクタを有し、そしてセンサが検出器と第三の接触を備えることを条件として、供給された対電極の残りから物理的に切断されてもよい。

【００２２】

[0029] 作用電極および対電極は、一般的に電極インクを使用して印刷され、それは一般的には約14μm（0.00055インチ）厚で、通常電気化学的に活性のあるカーボンを含む。導体インクの成分はカーボンと銀の混合物であってもよく、これは電極およびメーター間の経路の低い耐薬剤性を提供するために選抜されており、電極およびメーターはセンサのフィッシュテール状の伝導体パターン26との接触を通して通電される。対電極は、銀／塩化銀から構成されてもよいが、カーボンが好ましい。メーターによる計測の再現性を高めるため、電極パターン24の中心付近の限定された領域を除き、誘電性パターンは液体試験サンプルから電極を絶縁する。限定された領域はこのタイプの電気化学的な測定には重要である。というのも、測定された電流値は分析目的物濃度と反応層22の領域だけではなく、分析目的物を含む試験サンプルに露出された作用電極の領域16aに依存しているためで

ある。

【００２３】

[0030] 代表的な誘電体層20は、UV硬化型変性アクリレートモノマー、オリゴマーおよびポリマーから構成されており、約10μm（0.0004インチ）厚である。誘電体層はまた湿気硬化可能または加熱硬化可能であってもよい。フタまたはカバー28は基板とかみ合わせ、液体試験サンプルを入れるスペースを形成し、そこに対電極および作用電極が位置する。フタ28は、凹面スペース30を提供し、これは通常、変形可能な材質の平面シートを打ち出すことによって形成される。フタ28は穿刺され、空気孔32をもたらし、封着操作で基板12と接合される。フタと基板は音波溶接により一緒に封着され、その場合は基板12とフタ28は最初に並べ、園とフタの打ち出されていない平面領域のみに接触するように、振動熱接着部品または角と固定ジョーとの間で一緒にプレスされる。打ち出されたフタおよび基板はまた、フタの下側に接着性物質を使用することによって接合されてもよい。フタと基板の接合方法は、さらに十分に米国特許第5,798,031号に記載されている。

【００２４】

[0031] 基板12の絶縁に適した材料には、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、寸法安定性のあるビニル系ポリマーおよび、アクリル系ポリマー、およびポリカーボネート/ポリエチレンテレフタレートなどのポリマー混合物、金属ホイル構造（例えばナイロン/アルミニウム/塩化ビニル薄板）が含まれる。フタは通常、ポリカーボネートまたはポリエチレンテレフタレートの打ち出し可能グレードのもの、グリコール修飾されたポリエチレンテレフタレート、または金属ホイル組成物（例えばアルミホイル構造）などの、変形可能なポリマーシート物質から作製される。

【００２５】

[0032] 他の電気化学的センサが本発明において使用されてもよい。グルコース濃度を測定するのに使用できる電気化学的センサの例として、Bayer HealthCare社のAscensia™ AUTODISC（登録商標）システムおよびAscensia™ ELITE（登録商標）システムがある。このような電気化学的センサに関するさらに詳細な記載は、米国特許第5,120,420号および第5,320,732号で見られる。他の電気化学的センサは、松下電器産業株式会社から入手できる。電流測定モニタリングシステムにおいて使用することができる電気化学的センサに関するさらなる例は米国特許第5,429,735号に開示されている。

【００２６】

[0033] 電気化学的センサは、複数のセンサを搭載した血中グルコースセンサディスペンシング装置という位置づけであってもよい。センサディスペンシング装置に搭載されたセンサパックの一例は、米国特許第5,660,791号に開示されている。

【００２７】

[0034] 電気化学的センサが適切な測定機器にセットされ、血液サンプルが導入された場合、電位は電極間に印加されてサンプル中のグルコース含量に相関する電流値が測定され、使用者に結果が表示される。

【００２８】

[0035] 電流測定センサは、電極間に固定電位を印加してもよく、メディエータの早発性還元のために存在しうるバイアスを補正するため、生じた電流はあらかじめ設定された極めて短時間である5秒から10秒にわたって測定される。この期間は「バーン期間」（burn period）と呼ばれる。電流はピークに上昇した後下降し、一方サンプルが試薬層に再水和し、それにより酸化反応および還元反応が起きることを可能にする。バーン期間の後、印可された電位はゼロにされるか、または少なくとも静止期間中は減少されることで、反応を引き起こすことが可能となる。その後、電位は再印可されて電流はあらかじめ設定された「読み取り」期間（例えば10秒間）測定される。還元メディエータが酵素の同時的な酸化の結果として存在することから、生成された電流は最初は高く、その後漸近的に減退し、定常状態へと達する。短い「読み取り」期間の最後に記録された電流値を使用して、読みとり期間の最後の電流値と既知濃度のグルコースが含まれる試験サンプルに含有されるグルコースとの間の事前に得られた相関により、血液サンプル中のグルコース含有量を

決定する。

【００２９】

反応構成

[0036] 電気化学的バイオセンサ中で血液サンプルと反応する組成物は、一つ一つのセンサが一定した応答性を供給しなければならない。一定の応答性が、食事あるいは薬物療法を調整するために結果に依存する使用者にとっては重要である。バイオセンサの有効期間にわたり試薬の活性の変化は可能な限り小さくあるべきであるが、しかし少なくとも予測可能であるため、結果の調整をすることが出来る。本発明は、酵素－補助因子GDH-PQQがその電極上に反応組成物がスクリーン印刷された電気化学的バイオセンサにおいて使用された場合に見いだされる問題を解決する。発明者は、一般的にスクリーン印刷に使用される成分中のGDH-PQQが、GDH-PQQの活性を失わせる原因であることを見いだした。

【００３０】

[0037] GDH-PQQと、レドックスメディエータとしてのフェリシアン化カリウムとの混合物は、一連の緩衝液中で準備された。GDH-PQQは中性pHが好ましいことが知られていたが、pHが約4.5から約6.5の範囲、より具体的には約5.0から6.0の範囲となるような酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液およびコハク酸緩衝液を含む緩衝液がより望ましいことが見いだされた。これはメディエータであるフェリシアン化物が、酸性pHでより安定であることによる（図2参照）。

【００３１】

[0038] 低いpH緩衝液が使用された場合でも、あるポリマー性物質はまた、活性損失を引き起こすようであることが明らかになった。酵素およびレドックスメディエータ用のキャリアを形成するのに使用される二種類のポリマーは、75 mM酢酸カルシウム緩衝液および75 mMコハク酸ナトリウム緩衝液を用いて試験された。フェリシアン化カリウムは含まれなかった。この結果は、図3に示されており、この中で酵素活性に対する初期効果が示され、また－20℃で2週間置いた後の効果と比較された。試薬インク1ミリグラムあたり8.8ユニットのGDH-PQQおよび10 mMの$CaCl_2$を含むが、フェリシアン化物を含まない溶液中に、コハク酸緩衝液および酢酸緩衝液のみが存在した場合、緩衝液は－20℃で2週間置いた後であっても有意な活性損失を引き起こさないことが明らかになった。酵素活性は、Beckman社のSYNCHRON CX 4（登録商標）Delta機器によって、37℃でフェナジンメトサルフェート（PMS）によるニトロテトラゾリウムブルー（NBT）の還元により形成されるジホルマザン形成の速度を560 nmで測定することで決定された。しかしながら、スクリーン印刷インクを調製するのに使用された添加物が含まれていた場合、明らかな活性損失がみられた。クレイ系増粘剤であるRHEOX社から発売されているベントンは、緩衝液中に1.3重量％で含まれた。図3で示した結果は、酢酸緩衝液中では、ベントンが約10％の酵素活性損失を引き起こし、一方、コハク酸緩衝液中では、新鮮な試薬からおよび－20℃で2週間保存していた試薬から、酵素活性の約90％が失われた。7.4重量％のポリエチレン酸化物を緩衝液中に加えた場合も活性は失われたが、緩衝液の効果の違いは注目すべきものである。ベントンまたはポリエチレン酸化物と組み合わせたGDH-PQQを含む試薬配合剤は、より低い酵素活性を示し、そしてスクリーン印刷可能な試薬インクの増粘剤成分は望ましくないと結論できる。

【００３２】

[0039] ベントンおよびポリエチレン酸化物の適切な代替物となる他の増粘剤の効果についての研究は、特定の物質がGDH-PQQの活性損失を引き起こすことなくスクリーン印刷に適した試薬インクを産生するという発見をもたらした。改良された結果は図4に説明する。図4中に報告された試験では、4から8 u/mgのGDH-PQQ、1.6重量％のCAB-O-SIL M5（登録商標）無処理フュームドシリカ、4.5から6.5重量％のヒドロキシエチルセルロース（HEC）およびいくつかの界面活性物質が、酢酸緩衝液に添加された。酵素活性は37℃でのPMS／NBT酵素アッセイによりベックマン分析計を用いて測定された。CAB-O-SIL M5（登録商標）はHECと組み合わせるのに適した。このCAB-O-SIL M5（登録商標）とHECとの組み合わせが、試験期間のあいだ酵素活性の損失を引き起こさなかったことは明瞭である。

【００３３】

[0040] これまでに示しているように、ヒドロキシエチルセルロースは、酵素活性の過度の損失を引き起こすことなしに、GDH-PQQを使用した電気化学的バイオセンサの反応層中のマトリクス成分として使用することができる。他の関連する親水性ポリマーもまた、スクリーン印刷に適した組成物の粘度を作成するために使用することができる。他のセルロース誘導体には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースが含まれるが、これらに制限されない。他の有用な水溶性ポリマーには、キサンタンガム、グアーガム、ローカストビーンガム、カラギーナン、寒天およびポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどの合成ポリマーが含まれる。

【００３４】

[0041] CAB-O-SIL M5（登録商標）は本発明の試薬層のスクリーン印刷に用いられるインクに対して必要な物性を供給することが示されたアモルファス無処理フュームドシリカである。これまでのいくつかの特許において疎水性および親水性のバランスをとることが示された処理シリカとは、この無処理親水性シリカは区別されるべきである。水に不溶性の増粘化剤に代わるものとしては、タルク（滑石）、マイカ（雲母）、珪藻土、天然および修飾クレイなどが含まれ、例えば、ベントナイトクレイ、ヘクトライトクレイ（例えばIMV Nevada社から発売されているOptigel sH）、セピオライト（例えばIMV Nevada社から発売されているSepiogel F）、モンモリロナイト（例えばIMV Nevada社から発売されているIGB clay）、サポナイト（例えばIMV Nevada社から発売されているSepiogel FおよびIMVITE 1016、Southern clay products社から販売されているLaponite）があるがこれらに制限されない。

【００３５】

[0042] 図4に示すように、界面活性物質の選択もまたGDH-PQQの活性に影響する可能性がある。Sigma社から入手したアルキルアリールポリエーテルアルコールであるTriton x-100は非常に適している。しかしながら、3M社の製品であるFC 170Cや、Air Products and Chemicals社の製品であるSurfynol 485およびBASF社の製品であるPluronic L62Dを含む他の界面活性物質は、本発明の配合剤において有用であると考慮される。

【００３６】

[0043] 本発明に従ったスクリーン印刷バイオセンサ用の好ましい試薬組成物には以下のものが含まれる：

・約30から約200 mM、より具体的には、約50から約150 mMの緩衝液、好ましくは酢酸カルシウム緩衝液
・約5から約50 mMの$CaCl_2$塩化カルシウム
・組成物の全重量に基づき、約0.5重量％までの界面活性物質
・組成物の全重量に基づき、約2から約10重量％のセルロース誘導体、好ましくはヒドロキシエチルセルロース
・組成物の全重量に基づき、約1から約6重量％のアモルファス無処理シリカ
・組成物の全重量に基づき、約10から約20重量％のメディエータとしてのフェリシアン化カリウム
・組成物の全重量1ミリグラムにつき、約1から約8ユニットのGDH-PQQ酵素－補助因子
・約60,000から約180,000 cps（mPa・s）の粘性。

【実施例】

【００３７】

実施例1

[0044] pH 5.3の75 mM酢酸カルシウム緩衝液は、酢酸カルシウムおよび氷酢酸を加えることにより調製された。この緩衝液には、下記の化合物が加えられた：10 mM$CaCl_2$、0.05重量％のTriton X-100界面活性物質、1-3重量％のCabosil M5アモルファス無処理フュームドシリカ粉末および4-8重量％のヒドロキシエチルセルロース。シリカおよびセルロースの水和反応を16時間行った後に、15-20重量％のフェリシアン化カリウム、3から8ユ

ニットのGDH-PQQが試薬インク1ミリグラムあたりに対して加えられた。試薬インクは、約80,000から140,000 cpsの粘性を持つ試薬組成物を作製するため、ブレードミキサーで約10から20分間、600 rpmで混合された。

【００３８】

[0045] 試薬組成物は、電極を含む基材上にスクリーン印刷され、45から50℃で5分間乾燥された。

実施例2

[0046] グルコースセンサは実施例1の試薬組成物を用いて調製され、既知量のグルコースを含み、ヘマトクリット値が40 %の血液サンプルを用いて試験された。200から400ミリボルトの電位が電極に印可され、電位を印可した10秒後に計測された電流値を使用して、サンプル中のグルコース含量を決定した。これらの試験結果は図5に示され、試験時間を10秒間にプログラムされたBayer HealthCare社のAscensia™ AUTODISC（登録商標）グルコースメーターの応答とが、業界基準のYSIグルコース機器によって測定されたグルコース量に対してプロットされる。調査された範囲内では酵素－補助因子濃度には比較的依存せず、直線的な応答が得られたことが明らかになった。

【００３９】

[0047] 本センサはまた、業界基準であるYSI機器によって得られた結果と比較した場合、良好な用量反応性を示した。YSI機器の結果に対するバイアスは図6に示される。バイアスは、400 mg/dLのグルコースを含むサンプルでは±5 %以内、680 mg/dLのグルコースを含むサンプルでは±10 %以内であった。

【００４０】

[0048] 代替態様A

スクリーン印刷電気化学的バイオセンサに使用されるための：

（a） 生物学的サンプル中のグルコース酸化のためのグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）；

（b） セルロース誘導体、天然ガム、天然ゲルおよび水溶性合成ポリマーからなる群から選択される親水性ポリマー；

（c） アモルファス無処理シリカ粉末、タルク、マイカ、珪藻土、天然クレイおよび修飾クレイからなる群から選択される増粘剤；

（d） pHの範囲を約4.5から約6.5または6.0に維持するのに十分な緩衝液；

（e） 界面活性物質；および

（f） メディエータ

を含む試薬組成物。

【００４１】

[0049] 代替態様B

前記緩衝液が酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液またはコハク酸緩衝液である、代替態様Aの試薬組成物。

【００４２】

[0050] 代替態様C

前記界面活性物質がアルキルアリールポリエーテルアルコールである、代替態様Aの試薬組成物。

【００４３】

[0051] 代替態様D

前記メディエータがフェリシアン化カリウムである、代替態様Aの試薬組成物。

[0052] 代替態様E

前記緩衝液のpHが5.0から6.0である、代替態様Aの試薬組成物。

【００４４】

[0053] 代替態様F

前記組成物が約60,000から約180,000 cps（mPa*s)の粘性を持つ、代替態様Eの試薬組成物。

【００４５】
[0054] 代替態様G
前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択されるセルロース誘導体である、代替態様Aの試薬組成物。
【００４６】
[0055] 代替態様H
前記親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロースである、代替態様Gの試薬組成物。
[0056] 代替態様I
前記増粘剤がアモルファス無処理シリカ粉末である、代替態様Aの試薬組成物。
【００４７】
[0057] 代替態様J
前記アモルファス無処理シリカ粉末が親水性である、代替態様Iの試薬組成物。
[0058] 代替態様K
前記GDH-PQQが、組成物の全重量のそれぞれ1ミリグラムあたり1-8ユニット存在する、代替態様Aの試薬組成物。
【００４８】
[0059] 代替態様L
前記緩衝液が約30から約200 mMで存在する、代替態様Bの試薬組成物。
[0060] 代替態様M
組成物の全重量に基づき、約0.5重量％までの前記ポリエーテルアルコールが存在する、代替態様Cの試薬組成物。
【００４９】
[0061] 代替態様N
組成物の全重量に基づき、約10から約20重量％までの前記フェリシアン化カリウムが存在する、代替態様Dの試薬組成物。
【００５０】
[0062] 代替態様O
組成物の全重量に基づき、約2から約10重量％までの前記セルロース誘導体が存在する、代替態様Gの試薬組成物。
【００５１】
[0063] 代替態様P
組成物の全重量に基づき、約1から約6重量％までの前記アモルファス無処理シリカ粉末が存在する、代替態様Iの試薬組成物。
【００５２】
[0064] 代替態様O
前記フェリシアン化カリウムが、組成物の全重量に基づき、約5から約50 mMまでの塩化カルシウムをさらに含む、代替態様Aの試薬組成物。
【００５３】
[0065] 代替態様R
（a） 非多孔性基板；
（b） 前記基板上に配置された作用電極および対電極；
（c） 前記電極上にスクリーン印刷される、前記試薬組成物は：
（1） 前記組成物の全重量のそれぞれ1ミリグラムにつき、生物サンプル中のグルコース酸化のための約1-8ユニットのグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）；
（2） 天然ガム、天然ゲルおよび水溶性合成ポリマーからなる群から選択される親水性ポリマー；
（3） アモルファス無処理シリカ粉末、タルク、マイカ、珪藻土、天然クレイおよび修飾クレイからなる群から選択される増粘剤；

（4） pHの範囲を約4.5から約6.5に維持するのに十分な緩衝液；
（5） 界面活性物質および
（6） メディエータ；および
を含む、前記組成物の試薬組成物；
（d） 前記電極および前記試薬組成物のための保護カバー
を含む電気化学バイオセンサ。

【００５４】
[0066] 代替態様S
前記緩衝液が約30から約200 mMの、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはコハク酸緩衝液である、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００５５】
[0067] 代替態様T
前記界面活性物質が、前記組成物の全重量に基づき、約0.5 %までのアルキルアリールポリエーテルアルコールである、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００５６】
[0068] 代替態様U
前記メディエータが、前記組成物の全重量に基づき、約10から約20 %までのフェリシアン化カリウムである、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００５７】
[0069] 代替態様V
スクリーン印刷への使用に適した組成物を供給するために十分な量の成分（c）（2）および（c）（3）を含む、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００５８】
[0070] 代替態様W
前記組成物が約60,000から約180,000 cps（mPa・s）の粘性を持つ、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００５９】
[0071] 代替態様X
前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択される、前記組成物の全重量に基づき、約2 %から約10重量%のセルロース誘導体である、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００６０】
[0072] 代替態様Y
前記親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロースである、代替態様Xの電気化学的バイオセンサ。

【００６１】
[0073] 代替態様Z
前記増粘剤が、前記組成物の全重量に基づき、約1から約6重量%のアモルファス無処理シリカ粉末である、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００６２】
[0074] 代替態様AA
前記アモルファス無処理シリカ粉末が親水性である、代替態様Zの電気化学的バイオセンサ。

【００６３】
[0075] 代替態様BB
前記試薬組成物が約5から50 mMの塩化カルシウムを含む、代替態様Rの電気化学的バイオセンサ。

【００６４】
[0076] 代替方法CC

試薬組成物をスクリーン印刷することを含む、電気化学的バイオセンサに用いられるスクリーン印刷された試薬組成物中のグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）と補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）の活性を維持するための方法であって：

（a） 生物サンプル中のグルコース酸化のためのグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）および補助因子ピロロキノリンキノン（PQQ）；

（b） セルロース誘導体天然ガム、天然ゲルおよび水溶性合成ポリマーからなる群から選択される親水性ポリマー；

（c） アモルファス無処理シリカ粉末、タルク、マイカ、珪藻土、天然クレイおよび修飾クレイからなる群から選択される増粘剤；

（d） pHを約4.5から約6.5の範囲に維持するのに十分な緩衝液；

（e） 界面活性物質；および

（f） メディエータ；

の作用を含む、前記方法。

【００６５】

[0077] 代替方法DD

前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択されるセルロース誘導体である、代替方法CCの方法。

【００６６】

[0078] 代替方法EE

前記増粘剤がアモルファス無処理シリカ粉末である、代替方法CCの方法。

[0079] 代替方法FF

前記pHが5.0から6.0の範囲で維持される、代替方法CCの方法。

【００６７】

[0080] 本発明は様々な変更および代替の形状の影響を受けやすいが、特定の態様は図面による例によって示されるとともに詳細に説明された。しかしながら本発明は開示された特定の形状に制限されるものではなく、一方で本発明は添付の特許請求の範囲に定義される本発明の真の趣旨および範囲内の全ての変更、同等物および代替手段をカバーすると理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【００６８】

【図１】[0016] 図1a及び1bは、代表的な電気化学的センサの分解図である。

【図２】[0017] 図2は、異なる緩衝液に対する試薬バックグラウンド電流をプロットしたものである。

【図３】[0018] 図3は、試薬配合剤中のある種の成分の酵素活性に対する効果を示した棒グラフである。

【図４】[0019] 図4は、本発明の試薬配合剤の酵素活性に対する効果を示した棒グラフである。

【図５】[0020] 図5は、標準法に対するグルコース測定をプロットしたものである。

【図６】[0021] 図6は、図5の測定値の偏差をプロットしたものである。

【図１】

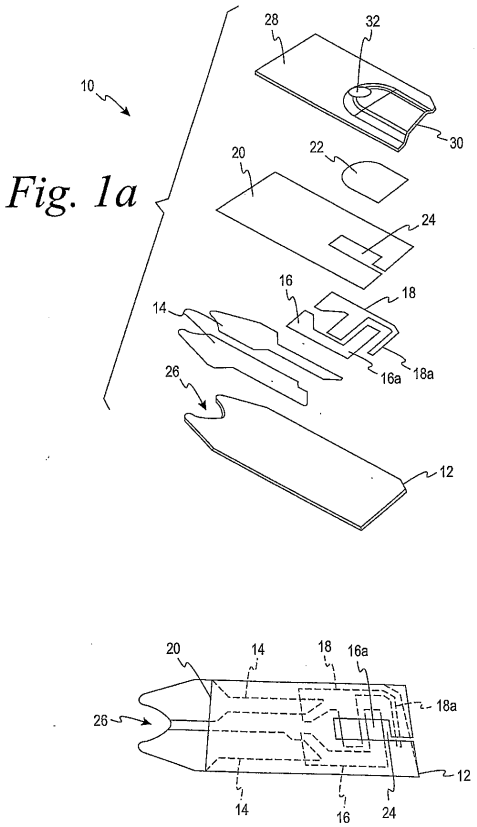
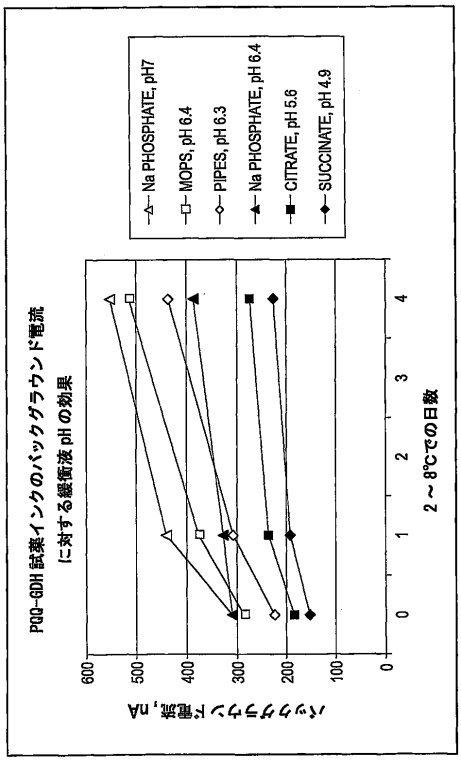


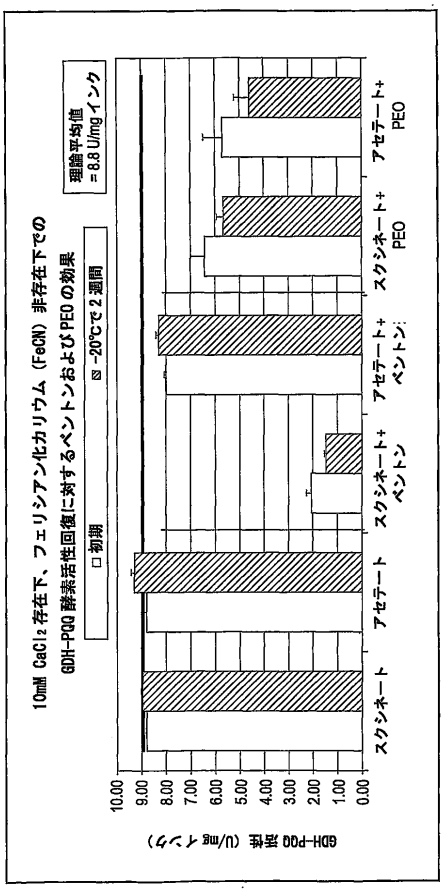
Fig. 1a

Fig. 1b

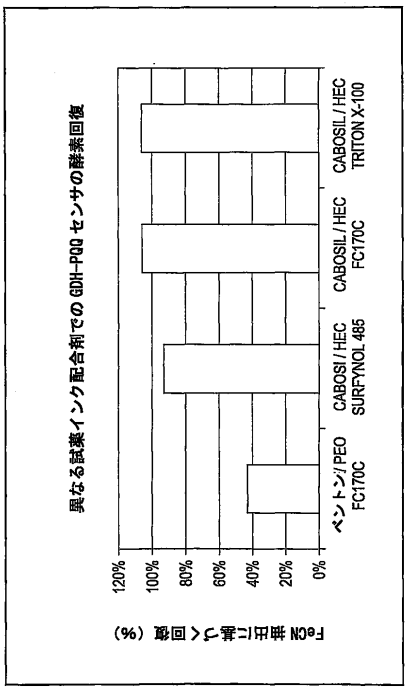
【図２】



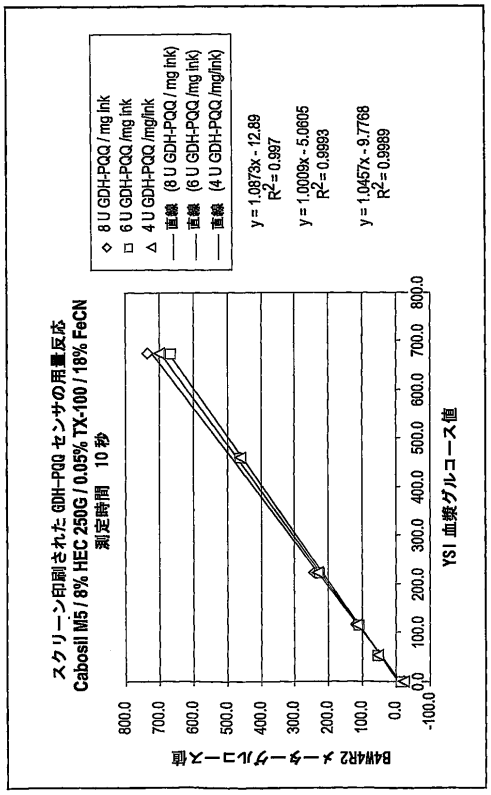
【図３】



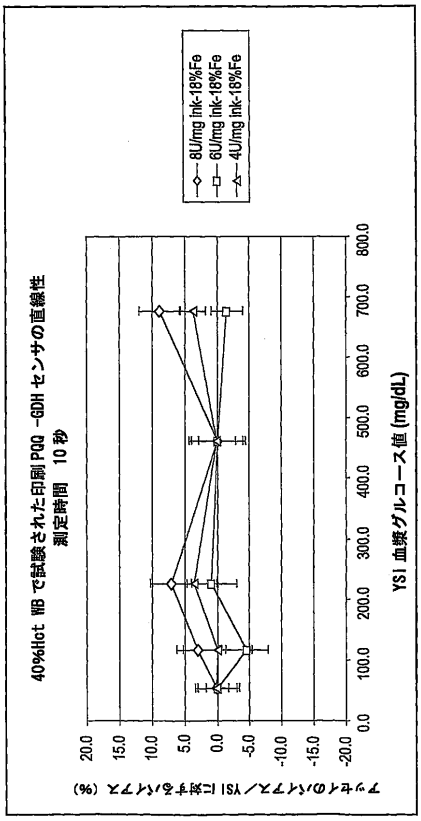
【図４】



【図５】



【図６】



【手続補正書】
【提出日】平成24年5月18日(2012.5.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
電気化学的バイオセンサを製造するための：
（a） グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）；
（b） 組成物の全重量に対して2～10重量％の、セルロース誘導体から選択される親水性ポリマー；
（c） 組成物の全重量に対して1～6重量％のアモルファス無処理シリカ粉末；
（d） pHの範囲を4.5から6.5に維持するのに十分な緩衝液；
（e） 界面活性物質；および
（f） メディエータ；
を含む試薬組成物。
【請求項２】
前記緩衝液が酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液またはコハク酸緩衝液である、請求項1の試薬組成物。
【請求項３】
前記緩衝液のpHが5.0から6.0である、請求項1の試薬組成物。
【請求項４】
前記親水性ポリマーが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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およびヒドロキシプロピルメチルセルロースからなる群から選択されるセルロース誘導体である、請求項1の試薬組成物。
【請求項５】
（a） 非多孔性基板；
（b） 前記基板上に配置された作用電極および対電極；
（c） 前記電極上に配置され：
（1） 前記組成物の全重量のそれぞれ1ミリグラムにつき、グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）；
（2） 組成物の全重量に対して、2～10重量％の、セルロース誘導体から選択される親水性ポリマー；
（3） 組成物の全重量に対して、1～6重量％のアモルファス無処理シリカ；
（4） pHの範囲を4.5から6.5に維持するのに十分な緩衝液；
（5） 界面活性物質および
（6） メディエータ；
を含む試薬組成物；
（d） 前記電極および前記試薬組成物のための保護カバー；
を含む電気化学的バイオセンサ。
【請求項６】
前記緩衝液が30から200 mMの、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはコハク酸緩衝液である、請求項5の電気化学的バイオセンサ。
【請求項７】
前記界面活性物質が、前記組成物の全重量に対して0.5重量％までのアルキルアリールポリエーテルアルコールである、請求項5の電気化学的バイオセンサ。
【請求項８】
（a） グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）；
（b） セルロース誘導体から選択される親水性ポリマー；
（c） 組成物の全重量に対して、1～6重量％のアモルファス無処理シリカ粉末；
（d） pHを4.5から6.5の範囲に維持するのに十分な緩衝液；
（e） 界面活性物質；および
（f） メディエータ；
含む試薬組成物を形成することを含む、電気化学的バイオセンサにおいて用いられる試薬組成物中のグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）の活性を維持するための方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	FI	テーマコード（参考）
	Ｃ１２Ｍ　1/34	Ｅ

(72)発明者　チュー，エイミー・エイチ
アメリカ合衆国インディアナ州４６５１４，エルクハート，カントリー・ロード　１０　２２４６０
(72)発明者　スプラドリン，ホープ・ジー
アメリカ合衆国インディアナ州４６５３０，グレインジャー，アシュリーズ・メドウ・ドライブ　１０２３２

Ｆターム(参考) 4B029 AA07　BB16　CC03　FA09　FA12