

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5166284号
(P5166284)

(45) 発行日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)

(24) 登録日 平成24年12月28日 (2012. 12. 28)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 27/416 (2006. 01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 B
GO 1 N 27/327 (2006. 01)	GO 1 N 27/30 3 5 3 R
GO 1 N 27/26 (2006. 01)	GO 1 N 27/26 3 7 1 D

請求項の数 14 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2008-549361 (P2008-549361)	(73) 特許権者	000004086
(86) (22) 出願日	平成19年12月13日 (2007. 12. 13)		日本化薬株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/074047		東京都千代田区富士見1丁目11番2号
(87) 国際公開番号	W02008/072702	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成20年6月19日 (2008. 6. 19)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成22年12月7日 (2010. 12. 7)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	特願2006-336789 (P2006-336789)		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成18年12月14日 (2006. 12. 14)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100097870
			弁理士 梶原 斎子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法、それに用いるセンサーチップ及び測定キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

全血中の1, 5-アンヒドログルシトールを測定する方法であって、該測定に干渉するグルコース及び／又はその誘導体をあらかじめ消去又は変換する工程と、その後行われる1, 5-アンヒドログルシトールを測定する工程からなり、血球分離をせずに全血のままグルコース及び／又はその誘導体を酵素を用いて消去又は変換し、更に血球を分離することなく1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酸化還元酵素を作用させ、1, 5-アンヒドログルシトールを、少なくとも作用極及び対極を有する電極を用いて電気化学的に測定することを特徴とする、1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項2】

酸化還元酵素がピラノースオキシダーゼ、L-ソルボースオキシダーゼ又は1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼである請求項1に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項3】

酸化還元酵素がシュードモナス属由来又はアグロバクテリウム属由来の1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼである請求項1に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項4】

レドックスメディエータの存在下、電気化学的に測定する請求項1～3のいずれか一項に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

10

20

【請求項 5】

レドックスメディエータがオスミウム錯体、キノン系化合物、フェロセン系化合物、フェノチアジン系化合物、フェノキサジン系化合物、フェナジン系化合物、インドフェノール系化合物、ジフェニルアミン系化合物又はフェノール系化合物である請求項 4 に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 6】

安定化剤の存在下、電気化学的に測定する請求項 1～5 のいずれか一項に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 7】

安定化剤が 2-スルホ安息香酸又は 3-スルホ安息香酸である請求項 6 に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 8】

アンペロメトリー法、クーロメトリー法又はサイクリックボルタンメトリー法により電気化学的に測定する請求項 1～7 のいずれか一項に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 9】

1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが担持されている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、対極を有する電極を用いて電気化学的に測定する請求項 1～8 のいずれか一項に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 10】

差動型電極を用いて電気化学的に測定する請求項 9 に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 11】

差動型電極が、1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが担持されている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と対極、レドックスメディエータが担持されており 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素が担持されていないブランク測定用作用極と対極の 2 対の電極である請求項 10 に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法。

【請求項 12】

あらかじめ測定に干渉するグルコース及び／又はその誘導体を血球分離をせずに全血のままグルコース及び／又はその誘導体を酵素を用いて消去又は変換し、更に血球を分離することなく 1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酸化還元酵素を作用させ、少なくとも作用極及び対極を有する電極を用いて電気化学的な測定に使用するためのセンサーチップであって、1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが担持されている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、対極を有する電極を有し、更に、グルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換するための酵素を含む試薬を有する、全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップ。

【請求項 13】

1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが担持されている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と対極、およびレドックスメディエータが担持されており 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素が担持されていないブランク測定用作用極と対極の 2 対の電極からなる差動型電極を有する請求項 12 に記載の全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップ。

【請求項 14】

あらかじめ測定に干渉するグルコース及び／又はその誘導体を血球分離をせずに全血のままグルコース及び／又はその誘導体を酵素を用いて消去又は変換した後の血液中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定するためのセンサーチップであって、更に血球を分離することなく 1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酸化還元酵素を作用させ、

少なくとも作用極及び対極を有する電極を用いて電気化学的な測定に使用するためのセンサーチップであり、1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが担持されている1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、対極を有する電極を有する、全血中の1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップと、血液採取に使用する穿刺器具と、グルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換するための酵素を含む試薬と、1, 5-アンヒドログルシトール用測定器とを含む、あるいは、請求項12または13に記載のセンサーチップと、血液採取に使用する穿刺器具と、1, 5-アンヒドログルシトール用測定器とを含む、全血中の1, 5-アンヒドログルシトール測定用キット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルコース及び／又はその誘導体の干渉を受ける、血中の1, 5-アンヒドログルシトール測定方法において、検体として全血を使用し、血球分離を必要としないことを特徴とする血中1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定方法、該測定方法に使用するセンサーチップ及び該センサーチップを有する1, 5-アンヒドログルシトールの測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、食生活が豊かになるのに伴い糖尿病患者が増大している。糖尿病患者の合併症発症を予防するためには血糖値を健常者に近いレベルに保つ必要があり、患者自身が自宅で測定する自己血糖測定装置が普及している。しかし、血糖は食事により変動するため、頻回に測定する必要がある患者の負担が大きく、知識の乏しい患者自身では測定値の的確な解釈は難しく、血糖値を厳密にコントロールすることは容易ではない。

20

一方、1, 5-アンヒドログルシトールは食事の影響を受けず、糖尿病患者の過去1週間の血糖コントロール状態を反映するので、自宅で「1週間に1回」測定するだけで、糖尿病患者は自分の血糖コントロール状態を正確に把握できる。1, 5-アンヒドログルシトール自己測定キットができれば患者にとって大きなメリットがあるが、従来の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法は血球分離が必要な血清又は血漿を検体とする方法であり、測定に必要な検体量も多いため自己測定には適さない。従って、微量の全血をそのまま検体として用いるものも含めて1, 5-アンヒドログルシトールの自己測定キットは実現していない。

30

【0003】

特許文献1～9に記載されている1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法は、使用される検体が全血ではなく血清や血漿であり、又、電気化学的な測定方法ではない。

又、和光純薬工業（株）より販売されていた動物用1, 5AGキット（日本化薬（株）製）では、全血検体を使用する場合には精製水又は10mMのEDTA（エチレンジアミン4酢酸）水溶液を加えて溶血し、更に遠心分離後に、その上清液をカラム処理して1, 5-アンヒドログルシトールを色素を用いた比色法で測定している。即ち、血球分離をせずに全血をそのまま検体とする1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定方法ではない。

40

【0004】

従来、検体として全血ではなく血清又は血漿を用いる理由は、血球中にもグルコースが含まれており、全血にグルコースを消去又は変換する試薬を添加しても血球中のグルコースが消去又は変換されずに残り、血中1, 5-アンヒドログルシトール測定工程においてグルコースが細胞膜を通してもれ出てくるためグルコースによる干渉が完全に除去できず、又、血中1, 5-アンヒドログルシトール検出反応で、酸化還元能のある赤血球中のヘモグロビンによる妨害が予想されたためである。今までに、全血を用いて酵素的にグルコースをあらかじめ消去又は変換し、そのまま血球分離することなく血中1, 5-アンヒドログルシトールを測定する方法は知られていない。

50

【0005】

更に、1, 5-アンヒドログルシトールを電気化学的に測定する方法は、非特許文献1、特許文献10及び特許文献11に記載されている。しかしながら、非特許文献1には、過酸化水素電極と酵素固定化した膜から構成される酵素センサーを用いた尿中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定が記載されているが、グルコース等が共存する全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定については記載されていない。特許文献10では脱水素酵素と電子受容体のフェナジンメトサルフェートを用いてアンペロメトリー法で1, 5-アンヒドログルシトールを測定しているが、1, 5-アンヒドログルシトールの標準品についての実施例のみであり、全血中の測定については一切記載がない。又、特許文献11には、1, 5-アンヒドログルシトール酸化能を有する酵素を作用させ、生成する過酸化水素を過酸化水素電極で電気化学的に測定している。しかし、この測定においても血清を使用しており、全血を使用する測定方法ではない。

10

【0006】

ところで、1, 5-アンヒドログルシトールはグルコースの1位の位置が還元された化合物であり、グルコースと極めて似た化学構造をしているため、1, 5-アンヒドログルシトールの測定に使用する多くの酵素はグルコースとも反応する。血中には1, 5-アンヒドログルシトールに比べて20倍以上と遥かに多量のグルコースが含まれており、1, 5-アンヒドログルシトールを測定するためにはグルコースを何らかの方法で1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酵素と反応しないように消去又は変換しなければならない。又、この変換により生成したグルコース誘導体が、更に1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酵素と反応する場合には、その誘導体も消去又は変換しなければならない。

20

【0007】

特許文献1ではグルコースをグルコースオキシダーゼによる酸化又はヘキソキナーゼによるリン酸化をすることにより、特許文献2ではグルコースオキシダーゼとグルコノラクトナーゼ、又は、グルコースデヒドロゲナーゼとグルコノラクトナーゼによる酸化をすることにより、特許文献3又は4では、ヘキソキナーゼ、ホスホヘキソスイソメラーゼ及び6-ホスホフルクトキナーゼ、又は、グルコースイソメラーゼ、フルクトキナーゼ及び6-ホスホフルクトキナーゼによるフルクトース-1, 6-二リン酸への変換により、特許文献5ではグルコキナーゼ又はヘキソキナーゼによるリン酸化をすることにより、特許文献6ではグルコース-6-リン酸化酵素によるリン酸化をすることによりグルコースの消去又は変換を行っており、その後で1, 5-アンヒドログルシトールの測定を行っている。因みに、これらの文献中でグルコースは、グルコノ-1, 5-ラクトン、グルコース-6-リン酸、グルコン酸、フルクトース-6-リン酸やフルクトース-1, 6-二リン酸等に変換されている。しかしながら、現在まで全血を用い酵素によるグルコースの消去又は変換後、全血を用いた1, 5-アンヒドログルシトールの定量を酵素を用い電気化学的に測定することについては知られていない。

30

【0008】

【特許文献1】特許第2983015号公報

【特許文献2】特開2001-78797号公報

40

【特許文献3】特許第3170320号公報

【特許文献4】特許第3217180号公報

【特許文献5】特開2001-116756号公報

【特許文献6】特許第2872983号公報

【特許文献7】特開昭63-185397号公報

【特許文献8】特開平10-191998号公報

【特許文献9】特開平8-70893号公報

【特許文献10】特開平7-67697号公報

【特許文献11】特開昭62-79780号公報

【特許文献12】特開平5-304997号公報

50

【特許文献13】特開昭63-22185号公報

【特許文献14】特開平2-268679号公報

【特許文献15】特開2000-135079号公報

【特許文献16】特開平11-18760号公報

【特許文献17】特開2000-175698号公報

【特許文献18】特開平10-179140号公報

【非特許文献1】Biomed. Chromatogr., vol. 7, p41 (1993)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

最近、臨床検査において、Point of Care Testingと言われるベッドサイドあるいは診察室で種々の検査項目の迅速測定が行われるようになり、又、血糖については患者自身による家庭での測定も行われるようになってきた。その際には血清や血漿を得るための遠心分離機等の使用は煩雑で時間を要するため実際の臨床現場での使用は難しく、特に患者自身による家庭での測定においては、穿刺器具とサンプル採取用器具を用いて採取される数十マイクロリットル以下の微量な血液が検体であり、遠心分離機を使用して血清を得て測定することはできない。従って、全血をそのまま検体として用いることのできる1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法が望まれている。

【課題を解決するための手段】

20

【0010】

本発明者等は前記課題を解決すべく鋭意研究の結果、全血をそのまま検体として用いる血中の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定方法を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

即ち、本発明は、

(1) 全血中の1, 5-アンヒドログルシトールを測定する方法であって、該測定に干渉するグルコース及び／又はその誘導体をあらかじめ消去又は変換する工程と、その後行われる1, 5-アンヒドログルシトールを測定する工程からなり、血球分離をせずに全血のままグルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換し、更に血球を分離することなく1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酵素を作用させ、1, 5-アンヒドログルシトールを電気化学的に測定する、1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

30

(2) 1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酵素が酸化還元酵素である上記(1)に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(3) 酸化還元酵素がピラノースオキシダーゼ、L-ソルボースオキシダーゼ又は1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼである上記(2)に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(4) 酸化還元酵素がシュードモナス属由来又はアグロバクテリウム属由来の1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼである上記(3)に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

40

(5) レドックスメディエータの存在下、電気化学的に測定する上記(1)～(4)のいずれか一項に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(6) レドックスメディエータがオスミウム錯体、キノン系化合物、フェロセン系化合物、フェノチアジン系化合物、フェノキサジン系化合物、フェナジン系化合物、インドフェノール系化合物、ジフェニルアミン系化合物又はフェノール系化合物である上記(5)に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(7) 血球分離をせずに全血のままグルコース及び／又はその誘導体を酵素を用いて消去又は変換する上記(1)～(6)のいずれか一項に記載の1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(8) 安定化剤の存在下、電気化学的に測定する上記(1)～(7)のいずれか一項

50

に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(9) 安定化剤が 2-スルホ安息香酸又は 3-スルホ安息香酸である上記 (8) に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(10) アンペロメトリー法、クーロメトリー法又はサイクリックボルタンメトリー法により電気化学的に測定する上記 (1) ~ (9) のいずれか一項に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(11) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、対極を有する電極を用いて電気化学的に測定する上記 (1) ~ (10) のいずれか一項に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

10

(12) 差動型電極を用いて電気化学的に測定する上記 (11) に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

(13) 差動型電極が、1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、レドックスメディエータが含まれており 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素が含まれていないブランク測定用作用極と、対極を有する電極である上記 (12) に記載の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法；

【0012】

(14) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、対極を有する電極を含む、全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップ；

20

(15) 更に、グルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換するための試薬を含む、上記 (14) に記載の全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップ；

(16) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている 1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、レドックスメディエータが含まれており 1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素が含まれていないブランク測定用作用極と、対極を有する電極からなる差動型電極を含む、上記 (14) 又は (15) に記載の全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップ；

30

【0013】

(17) 上記 (14) ~ (16) のいずれか一項に記載のセンサーチップと血液採取に使用する穿刺器具と 1, 5-アンヒドログルシトール測定用測定器を含む全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用キット；

(18) 更に、グルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換するための試薬を含む、請求項 17 に記載の全血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用キットに関する。

【発明の効果】

【0014】

本発明によって、検体として全血を用いる 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定が可能となり、血球分離を必要としないので遠心分離機等を使うことがなく、測定が簡便となり、患者自身による家庭での測定も可能となる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、グルコースの干渉を受ける血中の 1, 5-アンヒドログルシトール測定において、全血を検体として用い血球分離を必要としないことを特徴とする血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定方法である。即ち、本発明の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法は、血球分離をせずに全血のままグルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換処理し、更に血球を分離することなく 1, 5-アンヒドログルシトール

50

を測定するための酵素を作用させ、1, 5-アンヒドログルシトールを電気化学的に測定することを特徴とする。前述のように1, 5-アンヒドログルシトールを測定するための酵素はグルコースも基質とするため、グルコースの干渉を受けないようにグルコース及び／又はその誘導体を消去又は変換処理する必要がある。

本発明の測定方法におけるグルコース及び／又はその誘導体をあらかじめ消去又は変換する工程と1, 5-アンヒドログルシトールを測定する工程は連続して行っても、他の工程をはさんで順次行ってもよい。

【0016】

本発明が適用される全血とは、血球を分離していない採血した状態のままの血液であり、採血用の採血管等に含まれるヘパリン、フッ化ナトリウム、モノヨード酢酸等の抗凝固剤や解糖阻止剤等を含んでいてもよい。なお、保存した血液の場合には、フッ化ナトリウムとヘパリンを含有する採血管で採血したものが好ましい。又、本発明の全血には採血管等を使用せずに、自己血糖測定に用いられる穿刺器具等により採血した血液等も含まれる。採血部位も指先のほか、前腕外側や腹壁又は上腕外側等特に制限はない。採血量は、例えば、50 μ L以下、好ましくは0.1 μ L～30 μ L、より好ましくは3 μ L～20 μ Lあればよい。

【0017】

本発明におけるグルコース及び／又はその誘導体を該測定に干渉しない物質へ消去又は変換する工程は、目的とする血中1, 5-アンヒドログルシトールの測定に影響を与えなければ特に限定されず、例えば、特許文献1～9等に記載のグルコース及び／又はその誘導体を測定に干渉しない物質へ消去又は変換する方法が挙げられるが、好ましくは酵素を使用する方法が挙げられ、例えば、グルコースを酵素的酸化又は酵素的リン酸化する方法が挙げられる。

全血を用いた酵素によるグルコースの消去又は変換は前記の予想に反して問題なく進行し、後記の実施例にも示すように全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定が可能となった。

【0018】

グルコースの酵素的酸化方法としては、例えば、グルコースオキシダーゼによりグルコースを酸化する方法、グルコースデヒドロゲナーゼ（グルコース脱水素酵素）により補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）若しくはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADP）の存在下にグルコースを酸化する方法等が挙げられ、又、グルコースの酵素的リン酸化する方法としては、例えば、ヘキソキナーゼ若しくはグルコキナーゼによりグルコースをリン酸化してグルコース-6-リン酸とする方法等が挙げられる。1, 5-アンヒドログルシトールの測定に用いる酵素の種類によっては、グルコースをリン酸化して生成したグルコース-6-リン酸を更に変換する必要がある。この場合、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを使用して、補酵素NAD⁺若しくはNADP⁺の存在下にグルコースをグルコノラクトン-6-リン酸に酸化する方法、アデノシン-5'-二リン酸（ADP）やアデノシン-5'-三リン酸（ATP）の存在下、ヘキソキナーゼ、ホスホヘキソスイソメラーゼ及び6-ホスホフルクトキナーゼを作用させてグルコースをフルクトース-1, 6-二リン酸に変換する方法やヌクレオシドリリン酸（NDP）やヌクレオシド三リン酸（NTP）の存在下、グルコースイソメラーゼ、フルクトキナーゼ及び6-ホスホフルクトキナーゼを作用させてグルコースをフルクトース-1, 6-二リン酸に変換する方法等が挙げられる。

【0019】

中でも好ましくは、ヘキソキナーゼ又はグルコキナーゼによるグルコースをリン酸化する方法であり、特に好ましくは、例えば、マグネシウムイオン、ATP、ホスホエノールピルビン酸（PEP）及びピルビン酸キナーゼ（PK）の存在下でヘキソキナーゼ又はグルコキナーゼによって行われる酵素サイクリング法によるグルコースをリン酸化する方法である。

【0020】

上記変換に使用する酵素としては、1, 5-アンヒドログルシトールを基質としない酵素であれば特に制限は無く、例えば、IUPAC-IUBの命名法でグルコースオキシダーゼ：EC 1. 1. 3. 4、グルコースデヒドロゲナーゼ：EC 1. 1. 1. 47、EC 1. 1. 1. 118、EC 1. 1. 1. 119、EC 1. 1. 99. 10、ヘキソキナーゼ：EC 2. 7. 1. 1、グルコキナーゼ：EC 2. 7. 1. 2、ホスホヘキソースイソメラーゼとして、グルコース-6-ホスフェートケトールイソメラーゼ：EC 5. 3. 1. 9、グルコースイソメラーゼ：EC 5. 3. 1. 18、フルクトキナーゼ：EC 2. 7. 1. 4、6-ホスホフルクトキナーゼとして、ホスホヘキソキナーゼ：EC 2. 7. 1. 11に分類されるものが使用でき、市販の酵素も使用し得る。ヘキソキナーゼは、NDP依存性ヘキソキナーゼ、特にADP依存性ヘキソキナーゼ等であっても何ら問題ない。

10

【0021】

又、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼによりグルコースを酸化する方法においては、生成するグルコノ-1, 5-ラク톤を完全にグルコン酸に変換するためグルコノラクトナーゼ（EC 3. 1. 1. 17）を使用することも可能であり、必要に応じてムタロターゼ（EC 5. 1. 3. 3）と組み合わせてもよい。

【0022】

1, 5-アンヒドログルシトールを1, 5-アンヒドログルシトール-6-リン酸に変換し、1, 5-アンヒドログルシトール-6-リン酸に作用する酵素を用いて測定する方法においては、グルコースと1, 5-アンヒドログルシトールを共にリン酸化するヘキソキナーゼ又はグルコキナーゼも本発明の測定方法に使用可能である。

20

【0023】

本発明におけるグルコース及び／又はその誘導体を該測定に干渉しない物質への変換は、例えば、変換試薬と全血を接触させることにより行われる。具体的には、両者をあらかじめ容器中で混合することによって行っても、該変換試薬を後記のセンサーチップ上に担持させて行ってもよい。該変換試薬としては、例えば、ヘキソキナーゼ（HK）及び／又はグルコキナーゼ（GK）、ピルビン酸キナーゼ（PK）、アデノシン-5'-三リン酸（ATP）、ホスホエノールピルビン酸（PEP）、塩化マグネシウム又は硫酸マグネシウム、及び塩化カリウムからなる溶液、又はその溶液を乾燥した剤が挙げられる。

ヘキソキナーゼは酵母由来のものが好ましく、グルコキナーゼはバチルスステアロサーモフィラス由来のものが好ましい。変換試薬にはヘキソキナーゼとグルコキナーゼを両方含有しても、どちらか片方でもよく、ヘキソキナーゼ及び／又はグルコキナーゼの変換試薬溶液中の濃度は1 U/mL～500 U/mL、好ましくは20 U/mL～300 U/mLである。

30

変換試薬溶液中のピルビン酸キナーゼの濃度は1 U/mL～500 U/mL、好ましくは20 U/mL～300 U/mLであり、ATPの濃度は1 mM～200 mM、好ましくは10 mM～80 mMであり、ホスホエノールピルビン酸の濃度は10 mM～1500 mM、好ましくは100 mM～500 mMであり、塩化マグネシウム又は硫酸マグネシウムの濃度は1 mM～200 mM、好ましくは5 mM～50 mMであり、塩化カリウムの濃度は1 mM～200 mM、好ましくは、5 mM～50 mMである。

【0024】

40

更に、変換試薬にアスコルビン酸酸化酵素、尿酸酸化酵素、ビリルビン酸化酵素等の各干渉物質に作用する酵素を加えることは、グルコース以外の干渉物質の測定への妨害を除去するために効果的である。例えば、アスコルビン酸酸化酵素の変換試薬溶液中の濃度は1 U/mL～1000 U/mL、好ましくは5 U/mL～500 U/mLである。

【0025】

次に、全血中の1, 5-アンヒドログルシトールを酵素を用いて電気化学的に測定する工程について説明する。該測定としては、例えば、酵素による酸化還元反応に伴う過酸化水素を直接測定する方法あるいは酸化還元反応に関与する電子の授受の仲立ちを担うレドックスメディエータを使用して測定する方法等が挙げられる。

該酵素としては、1, 5-アンヒドログルシトールを酸化する酵素が挙げられ、酸化還

50

元酵素が好ましく、例えば、IUPAC-IUBの命名法で、ピラノースオキシダーゼ：EC 1. 1. 3. 10、L-ソルボースオキシダーゼ：EC 1. 1. 3. 11、L-ソルボースデヒドロゲナーゼ：EC 1. 1. 99. 12、1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ：EC 1. 1. 99. 13に分類される酵素等が挙げられる。

【0026】

該酸化還元酵素としては、例えば、特許文献12に記載のバシジオマイセタウス フンギ (*Basidiomycetous fungi*) No. 52 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM P-10106) や特許文献7に記載のポリポラス オブツサス (*Polyporus obtusus*) ATCC 26733等の産生するピラノースオキシダーゼ、トラメテス サングイネア (*Trametes sanguinea*) IFO 4923の産生するL-ソルボースオキシダーゼ、特許文献13に記載のグルコノバクター オキシダンス UV-10 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM P-8422) 等の産生するL-ソルボースデヒドロゲナーゼ、特許文献11に記載のシュードモナス属 sp. NK-85001 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM BP-1037) 等の産生する1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ (1, 5-アンヒドログルシトール脱水素酵素)、特許文献14に記載のオイベニシリウム クルスタセウム IFO-8938等の真菌類の産生する1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ、特許文献15に記載のトリコデルマ ロンギブラキアツム KDK 3003 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM BP-6458) 等の産生する1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ、特許文献16に記載のラフネラ アクアティリス 474 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM P-16158)、エンテロバクター クロアカエ 340 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM P-16157) 及びセラチア マルセッセンス 825 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM P-16159) 等の産生する1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ、特許文献6に記載の電子受容体を介さずに1, 5-アンヒドログルシトールを脱水素化できるアグロバクテリウム ツメファシエンス NT 1130株 ((独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター；受託番号 FERM BP-5997) の産生する1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ、特許文献10に記載のサイトファーガ マリフラバ ATCC 19326等の産生するD-グルコシド-3-デヒドロゲナーゼや特許文献17、特許文献18、特許文献12に記載の酵素等が挙げられ、又、その他の市販の1, 5-アンヒドログルシトールを酸化する酸化還元酵素等も使用できる。

中でもピラノースオキシダーゼ、L-ソルボースオキシダーゼ又は1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼが好ましい。

更に、これらの酵素の遺伝子を特定し、通常の遺伝子操作技術により改良・改変した後に、組換え大腸菌等を用いて製造した酵素も1, 5-アンヒドログルシトールを基質とする酸化還元酵素であれば本発明の測定方法に使用可能である。

【0027】

電気化学的測定方法としては、例えば、アンペロメトリー法 (電流測定方法)、クーロメトリー法 (電量測定方法)、電位スイープ法やサイクリックボルタンメトリー法等が挙げられ、中でもアンペロメトリー法あるいはクーロメトリー法が好ましい。

【0028】

電気化学的測定方法に使用する電極としては、絶縁性の基板上に、例えば、金、白金、カーボン、パラジウム又は銀、銀塩化銀で形成することができる。絶縁性の基板の材料は、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート若しくはポリビニルカーボネート等のプラスチック又はガラス等であり、ポリエチレンテレフタレートが好ましい。これらの基板上に、スクリーン印刷法、真空蒸着法、スパッタ法等により電極を形成することができ、中でもスクリーン印刷法が好ましい。即ち、ポリエチレンテレフタレートの基

板に導電性カーボンインク又は銀塩化銀を用いてスクリーン印刷し、100℃～150℃で焼入れすることにより電極を形成するのが好ましい。

【0029】

本発明の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定に使用する電極としては、作用極、対極、参照極を形成する3電極であっても、作用極、対極を形成する2電極であっても、そのどちらも使用可能である。一般的に、3電極を使用する測定では、参照極を基準にして作用極に電位を印加して、作用極と対極間を流れる電流を測定する。2電極を使用する測定では、対極を参照極として併用して対極を基準に作用極に一定の電位を印加して作用極と対極間を流れる電流を測定する。

【0030】

電気化学的測定には種々の方法が考えられるが、本発明においては、発生する過酸化水素を直接過酸化水素電極を用いて測定する方法あるいは酸化還元反応に関与する電子の授受の仲立ちを担うレドックスメディエータを使用して測定する方法等が挙げられる。

該レドックスメディエータとしては、酸化型メディエータ又は還元型メディエータが挙げられ、酸化型メディエータが好ましく、中でもオスミウム錯体、キノン系化合物、フェロセン系化合物、フェノチアジン系化合物、フェノキサジン系化合物、フェナジン系化合物、インドフェノール系化合物、ジフェニルアミン系化合物、フェノール系化合物等が、より好ましい。オスミウム錯体としては、例えば、 $[\text{Os}(\text{I I I})(\text{ビピリジル})_2(\text{イミダゾイル})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ やそのポリマー体；キノン系化合物としては、例えば、ベンゾキノン、2-メチルベンゾキノン、2, 6-ジメチルベンゾキノン、2, 6-ジクロロベンゾキノン、2, 5-ジヒドロキシベンゾキノン、2-ヒドロキシー-1, 4-ナフトキノン、2-メチル-1, 4-ナフトキノン、2, 3-ジメトキシ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン、ピロロキノリンキノン(PQQ)又はユビキノン；フェロセン系化合物としては、例えば、フェロセニルPEG、フェロセニルTMA、N, N-ジメチルアミノメチルフェロセン又はフェロセンメタノール；フェノチアジン系化合物としては、例えば、チオニン、メチレンブルー、メチレングリーン、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3, 7'-ビス(ジメチルアミノ)-フェノチアジンナトリウム塩、トルイジンブルーO、アズールI、アズールC、アズールA、ニューメチレンブルー又はベンゾイルロイコメチレンブルー；フェノキサジン系化合物としては、例えば、メルドラブルー；フェナジン系化合物としては、例えば、フェナジンメトサルフェート、1-メトキシフェナジンメトサルフェート、サフラニン又はフェノサフラニン；インドフェノール系化合物としては、例えば、2-ジクロロフェノール-インドフェノール(DCIP)；ジフェニルアミン系化合物としては、例えば、4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム塩、N-メチル-N-フェニル-1, 4-フェニレンジアミン塩酸塩、又はN-メチル-N-(3-メトキシフェニル)-1, 4-フェニレンジアミン塩酸塩；フェノール系化合物としては、例えば、p-アミノフェノール等が挙げられる。

【0031】

その他、本発明に使用可能なメディエータとしては、フェリシアン系化合物(フェリシアン化カリウム等)、ルテニウム錯体若しくはそのポリマー体、ビピリジン系化合物(メチルビオローゲン等)、トリフェニルメタン系化合物(マラカイトグリーンやTPM-P S等)、ベンゾチアゾリン系化合物(2-ヒドラゾノ-2, 3-ジヒドロ-3-メチル-6-ベンゾチアゾールやそのスルホン酸塩等)、シアニン系化合物(ガロシアニン、フタロシアニンやフィコシアニン等)、アゾ系化合物(マゼンタJ-3GL、イエローC-Y 9やブラックC-BK 4等)、ビピリジルアゾ系化合物(5-Br-PSAA、5-Br-PAPSやTAMSMB等)、アニリン若しくはその誘導体(DAPS、HALPS、ADPS、ALPS、TOOSやALOS等)、ポリアニリン若しくはその誘導体、フェノール系化合物(p-アミノフェノール等)、フェニレンジアミン系化合物(バリアミンブルーBや2, 3, 5, 6-テトラメチル-p-フェニレンジアミン等)、ローダミン系化合物(ローダミンB等)、キサンテン系化合物(ピロニンY、ピロニンBやフルオレセ

10

20

30

40

50

インナトリウム等)、イソアロキサジン系化合物(リボフラビンやFAD等)、インジゴ系化合物(インジゴトリスルホン酸やインジゴカーミン等)、フェナントロリン系化合物(バソクブロインスルホン酸ナトリウムやバソフェナントロリンスルホン酸ナトリウム等)、スルホフタレイン系化合物(メチルチモブルー等)、ベンチジン系化合物(TMBZ、TMBZ・PS、DABやアニシジンブルー等)、テトラゾリウム系化合物(WST-1、MTT、Nitro-TBやXTT等)、チトクロムCやルミクロム、フェレドキシン類、EDTA類、NADやNADP等が挙げられる。

【0032】

本発明の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定において電極に担持させる、前記酵素やレドックスメディエータなどの化合物は、電極試薬として、精製水又は適当な緩衝液に溶解して、電極試薬溶液として、電極に塗布して適用する。

10

該電極試薬に含有される前記のレドックスメディエータの濃度は、例えば、電極塗布時の精製水又は適当な緩衝液に溶解した電極試薬溶液中の濃度として0.01 μ M~1M程度、好ましくは0.1 μ M~200mMであり、前記の酵素の濃度は、例えば、電極塗布時の精製水又は適当な緩衝液に溶解した電極試薬溶液中の濃度として0.1U/mL~5000U/mL程度、好ましくは1U/mL~2000U/mLである。該緩衝液としては、通常の生化学反応で用いられる緩衝液が使用可能であり、例えば、2-モルフォリノエタンスルホン酸(MES)緩衝液、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液等が挙げられる。そのpHは3~10、好ましくは5~9である。緩衝液の濃度は1mM~1M、好ましくは5mM~500mMである。

20

【0033】

電極試薬溶液には、酵素やレドックスメディエータの安定性を高め、長期間にわたる安定した1, 5-アンヒドログルシトールの測定を可能にせしめ、血液の測定において精度よい1, 5-アンヒドログルシトールの測定を可能とする安定剤として、スルホ安息香酸、糖、糖アルコール等の低分子化合物や、アルブミン等のタンパク質、カルボキシルメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等の親水性高分子化合物等を含むことが好ましい。スルホ安息香酸として好ましくは2-スルホ安息香酸又は3-スルホ安息香酸が挙げられる。スルホ安息香酸などの低分子を該安定化剤として使用する場合、その濃度は、例えば、電極塗布時の電極試薬溶液中の濃度として0.1mM~500mM程度、好ましくは1mM~100mM程度である。アルブミンなどの親水性高分子を該安定化剤として使用する場合、その濃度は、例えば、電極塗布時の電極試薬溶液中の濃度として0.01%~20%程度、好ましくは0.02%~10%程度である。

30

【0034】

前記電極には前記電極試薬を担持させることが好ましい。その作成は公知の方法が使用可能であり、例えば、前記電極試薬の一定量をスポットティング、ディッピングやスピンコートにより電極に塗布し、乾燥して作成する。又、このような物理的な吸着法以外に、前記電極試薬を電極上に化学的に結合させて作成してもよい。

40

前記安定化剤は、前記電極試薬溶液に添加した後、塗布・乾燥して電極上に担持させても、前記酵素等が担持されている層の上に積層して担持させてもよい。

【0035】

次に、差動型電極について説明する。

差動型電極とは、例えば、酸化還元型酵素とレドックスメディエータ試薬を担持した作用極(例えば、1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極)と、酸化還元型酵素を含まずレドックスメディエータ試薬を担持した作用極(例えば、ブランク測定用作用極)と、対極を有し、レドックスメディエータ等に関係する干渉物質を含む検体を酸化還元型酵素とレドックスメディエータ試薬を担持した作用極と酸化還元型酵素を含まずレドックスメディエータ試薬を担持した作用極を用いて同時測定し、干渉によるシグナル部分を差し

50

引くことにより干渉物質の影響を除く電極であり、そのような働きをするものであればどのような構造であっても構わない。例えば、後述の実施例に記載した1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極、レドックスメディエータが含まれているブランク測定用作用極と、対極を有する差動型電極が挙げられる。

【0036】

この差動型電極を使用した電気化学的測定方法は差動法と呼ばれ、グルコースを測定対象とする例が知られている。その場合の干渉物質は尿酸とアスコルビン酸であるが、これらの血中濃度は、グルコース； $5500\mu\text{mol/L} \sim 33000\mu\text{mol/L}$ に対して尿酸； $120\mu\text{mol/L} \sim 770\mu\text{mol/L}$ 、アスコルビン酸； $11\mu\text{mol/L} \sim 210\mu\text{mol/L}$ であり、測定対象物であるグルコースの濃度に比べて非常に低い濃度である。

10

一方、1, 5-アンヒドログルシトールの血中濃度は $6\mu\text{mol/L} \sim 300\mu\text{mol/L}$ であり、グルコースに比べて極めて低い。血中の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定においても、同様に尿酸とアスコルビン酸は干渉物質となるが、その濃度は1, 5-アンヒドログルシトールとほぼ同等若しくはそれ以上である。

即ち、測定対象物の濃度より干渉物質の濃度が有意に低い場合の差動法による測定は知られているが、測定対象物の濃度より干渉物質の濃度が同等又は高い場合での差動法による測定についてはこれまで報告がない。従って、1, 5-アンヒドログルシトール（測定対象物）の濃度に対して、同等又はそれ以上の濃度で干渉物質（尿酸、アスコルビン酸）が存在する場合にも差動法が有効で、正確な測定結果が得られるかどうかは知られていなかった。

20

【0037】

本発明の1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップは、絶縁性の支持体上に形成された前記電極、測定器に接続するための接続部、電極と接続部を繋ぐリード部、更に電極の面積を一定にしてリード部を絶縁するためのレジスト（絶縁部）等を含み、更に検体である血液の採取口、血液が入る空間や流路等から形成される。これらの構造はポリエチレンフィルムやポリイミドフィルム等のフィルム剤、ホットメルト等の接着剤、両面テープ等のテーピング剤等により形成される。

【0038】

30

電極に電極試薬を担持せず、あらかじめ検体と該試薬を混合して添加するセンサーチップによっても1, 5-アンヒドログルシトールを測定することはできるが、1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極と、対極を有する電極を含むセンサーチップが好ましく、又、1, 5-アンヒドログルシトール測定用の酸化還元酵素及びレドックスメディエータが含まれている1, 5-アンヒドログルシトール測定用作用極、酸化還元酵素を含まずレドックスメディエータが含まれているブランク測定用作用極と、対極を有する差動型電極を含むセンサーチップが、より好ましい。対極には必要に応じて前記電極試薬を担持させてもよい。

更に、グルコース及び／又はその誘導体を該測定に干渉しない物質へ変換するための工程を行う試薬を含む前処理部を有するセンサーチップであってもよい。

40

【0039】

本発明で使用するセンサーチップの一例の簡略図を図1～図3に示す。

【0040】

本発明には、少なくとも前記センサーチップと血液採取に使用する穿刺器具と1, 5-アンヒドログルシトール測定器を含む全血中の1, 5-アンヒドログルシトール測定用キットも含まれる。穿刺器具は、自己血糖測定装置に付けられている穿刺器具と同様なものでもよい。このキットには、更に、グルコース及び／又はその誘導体を該測定に干渉しない物質へ変換するための工程に使用する試薬が含まれていてもよい。

【0041】

50

更に、この1, 5-アンヒドログルシトール用測定キットにはサンプル採取用器具、前処理用試薬、キャリブレータ等を有していてもよい。サンプル採取用器具としては数十 μ L以下程度の全血を採取できれば特に限定されず、ヘマトクリット測定時に使用するキャピラリーと同様なものでもよい。

【0042】

以下、実施例、参考例により本発明を更に詳細に説明するが、これらは本発明の一態様を示すものであり、本発明を限定するものではない。実施例中の各酵素は文献公知の方法で得たもの又は市販のものを使用した。

すべての実施例と参考例9、10、11における電気化学検出器は、(株)東方技研製 GPIB RS232C付き8CH マルチポテンシオスタット MODEL PS-08を使用し、参考例7、8における電気化学検出器は、(株)東方技研製ファンクションジェネレーターFG-02付き8CH マルチポテンシオスタット MODEL PS-08を使用した。

なお、図中の1, 5AGは1, 5-アンヒドログルシトールを意味する。

【0043】

実施例1

1) グルコース変換試薬

1) グルコース変換試薬

1N水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH7.0に調整した後の組成が、17.6mMの $MgCl_2$ 、17.6mMのKCl、175.7mMのホスホエノールピルビン酸(PEP)、17.6mMのATP、123U/mLのピルビン酸キナーゼ(PK)、75U/mLのグルコキナーゼ、200U/mLのアスコルビン酸酸化酵素、100mMの塩化ナトリウム、0.1%の NaN_3 、0.1mMのEDTA及び0.06%のBSA(牛血清アルブミン)となるように10.0mMのMES緩衝液に各成分を加え、グルコース変換試薬とした。

【0044】

2) 電極試薬溶液

特許第3713049号公報に記載のオスミウム(III)錯体($[Os(III)(\text{ビピリジル})_2(\text{イミダゾイル})Cl]Cl_2$)を23.6mM、ピラノースオキシダーゼ(バシジオマイセタウス・フンギNo.52由来)を930U/mL、3-スルホ安息香酸を50mMの組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0045】

3) センサーチップ

ポリエチレンテレフタレートの基盤に作用極とリード部、対極とリード部をカーボンインク((株)アサヒ化学研究所製、製品名カーボンペーストTU15ST)で、厚さ10 μ mでスクリーン印刷し、150 $^{\circ}C$ で40分焼入れし、次いで電極部と、測定装置との接続部とを除く部分にレジストインク((株)アサヒ化学研究所製、製品名CR18G-KF)を厚さ20 μ mでスクリーン印刷し、130 $^{\circ}C$ で15分焼入れをして、図1に示す電極11を製造した。

上記の2)電極試薬溶液4 μ Lを電極11の検体添加位置1に塗布して、50 $^{\circ}C$ で13分乾燥してセンサーチップを作製した。

【0046】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、血漿に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた5検体(血球分離操作を除いて後記参考例1の操作で求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は3.8、7.8、15.8、31.4、63.9 μ g/mLであった)各20 μ Lをそれぞれグルコース変換試薬10 μ Lとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極11の検体添加位置1に反応液10 μ Lを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15Vで10秒間印加して、5秒後の電流値を電気化学検出器(GPIB RS232C付き8CH マルチポテンシ

ヨスタット MODEL PS-08；（株）東方技研）で測定した。電流値と1，5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。

【0047】

5) 1，5-アンヒドログルシトール測定操作

上記4)の検体と尿酸値のほぼ等しい若しくは測定検体の尿酸値の低い健常人3名の全血各20 μ Lをそれぞれグルコース変換試薬10 μ Lとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極11の検体添加位置1に反応液10 μ Lを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15Vで10秒間印加して、5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。上記4)の検量線を用い、3検体について全血中の1，5-アンヒドログルシトール量を求めた結果を表1に示す。なお、検量線作成用検体は4回測定したその平均値、検体は1回測定した値である。

10

【0048】

参考例1

実施例1の5)で測定したのと同じ健常人3名の全血検体を3000rpmで10分間遠心分離後、その上清（血漿）を1，5-アンヒドログルシトール測定用試薬（ラナ1，5AGオートリキッド；日本化薬（株）製）と自動分析装置7150形（（株）日立製作所製）にて、以下のパラメータで1，5-アンヒドログルシトールを定量測定し、結果を表1に示す。

【0049】

分析法	2ポイント
測定ポイント	24-50
検体量	8 μ L
ラナ1，5AGオートリキッドの前処理液（R1）	240 μ L
ラナ1，5AGオートリキッドの発色液（R2）	120 μ L
温度	37 $^{\circ}$ C
測定波長（副／正）	700／546nm

20

【0050】

【表1】

表1

30

	1，5-アンヒドログルシトール濃度（ μ g/mL）	
	参考例1	実施例1
全血検体1	9.8	10.4
全血検体2	15.6	16.8
全血検体3	17.2	17.2

【0051】

40

全血を用い、これにグルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、電極試薬と反応させて測定した全血中の1，5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例1）は、公知の測定方法による参考例1の測定値とよい一致（相関係数；0.9881）を示し、本発明によって全血中の1，5-アンヒドログルシトールの測定が可能であることを示している。

【0052】

実施例2

1) グルコース変換試薬

1N水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH7.0に調整した後の組成が、17.6mMのMgCl₂、17.6mMのKCl、175.7mMのホスホエノールピルビン酸（P

50

EP)、17.6 mMのATP、123 U/mLのピルビン酸キナーゼ(PK)、97 U/mLのヘキソキナーゼ及び20 U/mLのアスコルビン酸酸化酵素となるように10.0 mMのMES緩衝液に各成分を加え、グルコース変換試薬とした。

【0053】

2) 電極試薬溶液

(i) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用

23.6 mMのオスミウム(III)錯体([Os(III)(ビピリジル)₂(イミダゾイル)Cl]Cl₂)、465.2 U/mLのピラノースオキシダーゼ(バシジオマイセタウス・フンギNo. 52由来)の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

10

(ii) ブランク測定用

23.6 mMのオスミウム(III)錯体([Os(III)(ビピリジル)₂(イミダゾイル)Cl]Cl₂)の組成となるように精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0054】

3) センサーチップ

実施例1の3)と同様に製造した電極11を2個用意し、上記の2)の1, 5-アンヒドログルシトール測定用又はブランク測定用の各電極試薬溶液4 µLをそれぞれの電極の検体添加位置1に塗布して、50℃で13分乾燥して1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用のセンサーチップを作製した。

20

【0055】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、血漿に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた5検体(血球分離操作を除いて参考例1の操作により求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は9.4、18.8、37.5、75.0、150.0 µg/mLであった)各20 µLをそれぞれグルコース変換試薬10 µLとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用の電極11の検体添加位置1に、それぞれ反応液10 µLを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15 Vで10秒間印加して5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップから得られた電流値とブランク測定用センサーチップから得られた電流値との差の値と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。

30

【0056】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

1, 5-アンヒドログルシトールを測定する健常人6名の全血20 µLをそれぞれグルコース変換試薬10 µLとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用の電極11の検体添加位置1に、それぞれ反応液10 µLを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15 Vで10秒間印加して5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップから得られた電流値とブランク測定用センサーチップから得られた電流値との差の値を検量線と対比して、6検体について全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表2に示す。なお、検量線作成用検体は4回測定したその平均値、検体は1回測定した値である。

40

【0057】

参考例2

実施例2の5)で測定したのと同じ全血検体を参考例1の操作方法で1, 5-アンヒドログルシトールを定量測定した。結果を表2に示す。

【0058】

【表 2】

表 2		
1, 5-アンヒドログルシトール濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	参考例 2	実施例 2
全血検体 4	16.4	16.7
全血検体 5	17.5	14.2
全血検体 6	26.2	23.5
全血検体 7	31.5	26.9
全血検体 8	27.2	24.4
全血検体 9	31.4	36.7

【0059】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで電極試薬と反応させて差動法により測定した全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定値は、参考例2の測定値と相関がよく（相関係数；0.8943）、本発明によって全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定が可能であることを示している。

【0060】

実施例 3

1) グルコース変換試薬

実施例1の1)のグルコース変換試薬を使用した。

【0061】

2) 電極試薬溶液

(i) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用

23.6mMのオスミウム(III)錯体($[\text{Os}(\text{III})(\text{ビピリジル})_2(\text{イミダゾイル})\text{Cl}]\text{Cl}_2$)、930U/mLのピラノースオキシダーゼ(バシジオマイセタウス・フンギNo. 52由来)、50mMの3-スルホ安息香酸の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

(ii) ブランク測定用

23.6mMのオスミウム(III)錯体($[\text{Os}(\text{III})(\text{ビピリジル})_2(\text{イミダゾイル})\text{Cl}]\text{Cl}_2$)、50mMの3-スルホ安息香酸の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0062】

3) センサーチップ

上記の実施例2の3)と同様にして1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップを作製した。

【0063】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、血漿に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた5検体(血球分離操作を除いて参考例1の操作により求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は9.5、19.6、39.6、78.5、159.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった)各20 μL をそれぞれグルコース変換試薬10 μL とエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用の電極11の検体添加位置1に、それぞれ反応液1

0 μ Lを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15Vで10秒間印加して5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップから得られた電流値とブランク測定用センサーチップから得られた電流値との差の値と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。

【0064】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

1, 5-アンヒドログルシトールを測定する健常人6名の全血20 μ Lをそれぞれグルコース変換試薬10 μ Lとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用の電極11の検体添加位置1に、それぞれ反応液10 μ Lを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15Vで10秒間印加して5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップから得られた電流値とブランク測定用センサーチップから得られた電流値との差の値を検量線と対比して、6検体について全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表3に示す。なお、検量線作成用検体は4回測定したその平均値、検体は1回測定した値である。

【0065】

参考例3

実施例3の5)で測定したのと同じ全血検体を参考例1と同様の操作方法で1, 5-アンヒドログルシトールを定量測定した。結果を表3に示す。

【0066】

【表3】

表 3		
1, 5-アンヒドログルシトール濃度 (μ g / mL)		
	参考例 3	実施例 3
全血検体 10	9. 8	9. 7
全血検体 11	15. 6	15. 5
全血検体 12	17. 2	17. 3
全血検体 13	24. 6	25. 1
全血検体 14	30. 1	32. 8
全血検体 15	29. 0	30. 8

【0067】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで電極試薬と反応させて差動法により測定した全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例3）は、公知の測定方法による参考例3の測定値とよい一致（相関係数；0.9982）を示し、本発明によって全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定が可能であることを示している。又、先の実施例2（相関係数；0.8943）と比べると更に相関がよいことが明らかである。即ち、安定化剤と差動法を組み合わせることで、全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定において、より精度がよくなることを示している。

【0068】

実施例4

1) グルコース変換試薬

実施例1の1)のグルコース変換試薬を使用した。

【0069】

2) 電極試薬溶液

(i) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用

11.8 mMのオスミウム(III)錯体([Os(III)(ビピリジル)₂(イミダゾイル)Cl]Cl₂)、111.0 U/mLの1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ(シュードモナス sp. NK-85001由来)の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

(ii) ブランク測定用

11.8 mMのオスミウム(III)錯体([Os(III)(ビピリジル)₂(イミダゾイル)Cl]Cl₂)の組成となるように精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

10

【0070】

3) センサーチップ

実施例1の3)と同様に製造した電極11を2個用意し、上記の2)の1, 5-アンヒドログルシトール測定用又はブランク測定用の各電極試薬溶液4 µLをそれぞれの電極の検体添加位置1に塗布して、50℃で8分乾燥して1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用のセンサーチップを作製した。

【0071】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、血漿に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた3検体(血球分離操作を除いて参考例1の操作により求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は24.2、49.3、98.8 µg/mLであった)各20 µLをそれぞれグルコース変換試薬10 µLとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用の電極11の検体添加位置1に、それぞれ反応液10 µLを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15 Vで10秒間印加して、5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップから得られた電流値とブランク測定用センサーチップから得られた電流値との差の値と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。

20

【0072】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

1, 5-アンヒドログルシトールを測定する健常人4名の全血20 µLをそれぞれグルコース変換試薬10 µLとエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用の電極11の検体添加位置1に、それぞれ反応液10 µLを滴下し、80秒後に対極を基準に0.15 Vで10秒間印加して、5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップから得られた電流値とブランク測定用センサーチップから得られた電流値との差の値を、検量線と対比して、4検体について全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表4に示す。なお、検量線作成用検体は4回測定したその

30

40

【0073】

参考例4

実施例4で測定したのと同じ全血検体を参考例1の操作方法で1, 5-アンヒドログルシトールを定量測定した。結果を表4に示す。

【0074】

【表 4】

表 4		
1, 5-アンヒドログルシトール濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	参考例 4	実施例 4
全血検体 1 6	9. 4	10. 0
全血検体 1 7	14. 0	13. 8
全血検体 1 8	27. 8	26. 2
全血検体 1 9	32. 7	32. 6

【0075】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼを含む電極試薬と反応させて差動法により測定した全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例4）は、参考例4の測定値と相関よく（相関係数；0. 9974）、本発明によって全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定が可能であることを示している。

【0076】

参考例5

1) グルコース変換試薬

1N水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH7. 0に調整した後の組成が、17. 6mMの MgCl_2 、17. 6mMの KCl 、175. 7mMのホスホエノールピルビン酸（PEP）、17. 6mMのATP、123U/mLのピルビン酸キナーゼ（PK）及び97U/mLのヘキソキナーゼとなるように10. 0mMのMES緩衝液に各成分を加え、グルコース変換試薬とした。

【0077】

2) 電極試薬溶液

11. 8mMのオスミウム（III）錯体（ $[\text{Os}(\text{III}) (\text{ビピリジル})_2 (\text{イミダゾイル})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ）、930U/mLのピラノースオキシダーゼ（バシジオマイセタウス・フングノ. 52由来）及び50mMの2-スルホ安息香酸（参考例5-1）又は50mMの3-スルホ安息香酸（参考例5-2）の組成となるように各成分を精製水に溶解して、2種類の組成の電極試薬溶液を調製した。スルホ安息香酸を添加しない場合を参考例5-3とする。

【0078】

3) センサーチップ

上記の実施例1の3)と同様にして1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップを作製した。

【0079】

4) 測定操作

上記の3)で作成したセンサーチップを、0日目（作成直後）と室温で湿度約20%にて5日間保存後に、1, 5-アンヒドログルシトール $0\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $50\mu\text{g}/\text{mL}$ の試料 $20\mu\text{L}$ をそれぞれグルコース変換試薬 $10\mu\text{L}$ とエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極11の検体添加位置1に反応液 $10\mu\text{L}$ を滴下し、80秒後に対極を基準に0. 15Vで10秒間印加して、5秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。4回測定しその平均値、標準偏差及び変動比の結果を表5-1及び表5-2に示す。

【0080】

【表 5－1】

表 5－1					
1, 5－アンヒドログルシトール 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$					
1 日目		5 日目		変動比	
平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	5 日目／1 日目	
(μA)		(μA)			
参考例 5－1	0. 7 7	0. 0 6	0. 9 6	0. 0 3	1. 2 4
参考例 5－2	0. 7 4	0. 0 2	1. 0 4	0. 0 4	1. 4 1
参考例 5－3	1. 3 5	0. 0 6	3. 5 8	0. 1 8	2. 6 6

10

【0 0 8 1】

【表 5－2】

表 5－2					
1, 5－アンヒドログルシトール 5 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$					
1 日目		5 日目		変動比	
平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	5 日目／1 日目	
(μA)		(μA)			
参考例 5－1	1. 9 9	0. 0 6	2. 1 6	0. 0 8	1. 0 8
参考例 5－2	1. 8 9	0. 0 2	2. 2 1	0. 0 4	1. 1 7
参考例 5－3	2. 6 8	0. 1 3	4. 7 3	0. 2 2	1. 7 6

20

30

【0 0 8 2】

参考例 5－1 及び参考例 5－2 は、参考例 5－3 に比べて、変動比（5 日目の平均電流値／1 日目の平均電流値）が小さく、電流値の経時的上昇変動を抑制している。更に、標準偏差も小さく、測定の信頼性、即ち測定精度が向上していることを示している。この結果は電極試薬への安定化剤の添加による効果を示しており、全血を使用した 1, 5－アンヒドログルシトールの電気化学的測定にも適用できる。

【0 0 8 3】

実施例 5

40

1) グルコース変換試薬

実施例 1 の 1) のグルコース変換試薬を使用した。

【0 0 8 4】

2) 前処理操作（1, 5－アンヒドログルシトール測定及びブランク測定共通）

1, 5－アンヒドログルシトール検量線作成用として血漿に濃度既知の 1, 5－アンヒドログルシトール標品を加えた 4 検体（血球分離操作を除いて参考例 1 の操作により求めた各検体の 1, 5－アンヒドログルシトール濃度は 3. 8、7. 8、15. 8、31. 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった）又はヒトの全血 4 検体の各 10 μL をそれぞれグルコース変換試薬 10 μL とエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。

【0 0 8 5】

50

3) 電極測定の前操作

(i) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用操作

前記の前処理操作後の溶液に、22.0 mMの2, 6-ジメチルベンゾキノン溶解した100 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0) 5 μ Lと、200 U/mLのピラノースオキシダーゼ(バシジオマイセタウス・フンギNo. 52由来)を溶解した100 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0) 5 μ Lを順次加え、混合して5分間放置した。

(ii) ブランク測定用操作

前記の前処理操作後の溶液に、22.0 mMの2, 6-ジメチルベンゾキノン溶解した100 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0) 5 μ L、100 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0) 5 μ Lを順次加え、混合して5分間放置した。

10

【0086】

4) センサーチップでの測定操作

ポリエチレンテレフタレート基板に作用極とリード部、対極とリード部、参照極とリード部をカーボンインク((株)アサヒ化学研究所製、製品名カーボンペーストTU15ST)で、厚さ10 μ mでスクリーン印刷し、150℃で40分焼入れし、次いで電極部と、測定装置との接続部とを除く部分にレジストインク((株)アサヒ化学研究所製、製品名CR18G-KF)を厚さ20 μ mでスクリーン印刷し、130℃で15分焼入れして、図2に示す電極12を作成した。

電極12の検体添加位置1に上記3)の各反応液15 μ Lを滴下し、参照極を基準に0.5 Vを10秒間印加して、5秒後の電流値を電気化学検出器で1, 5-アンヒドログルシトール測定用とブランク測定用についてそれぞれ測定した。

20

【0087】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール量の算出

上記1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用検体を用いた操作で得られた1, 5-アンヒドログルシトール測定用から得られた電流値から、ブランク測定から得られた電流値を差し引いた電流値と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。

ヒトの全血4検体について同様に1, 5-アンヒドログルシトール測定用から得られた電流値からブランク測定用から得られた電流値を差し引いた電流値と検量線とを対比して、全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表6に示す。なお、検量線作成用検体は4回測定したその平均値、検体も4回測定したその平均値である。

30

【0088】

参考例6

実施例5で測定したのと同じ全血検体を参考例1と同様の操作方法で1, 5-アンヒドログルシトールを定量測定し、結果を表6に示す。

【0089】

【表6】

表6

	1, 5-アンヒドログルシトール濃度 (μ g/mL)	
	参考例6	実施例5
全血検体20	16.7	17.0
全血検体21	29.8	28.0
全血検体22	28.9	28.6
全血検体23	31.7	31.2

40

【0090】

50

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、電極に担持していない電極試薬と反応させて測定した全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例5）は、公知の測定方法による参考例6の測定値とよい一致（相関係数；0.9941）を示し、本発明によって全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定が可能であることを示している。

【0091】

参考例7

Denki Kagaku Vol. 63, No. 10, p906-913 (1995) に記載されている酵素とメディエータの反応速度の評価方法に従い、前記バシジオマイセタウス・フンギ No. 52 由来のピラノースオキシダーゼと表7に示した各レドックスメディエータと1, 5-アンヒドログルシトールとの反応を調べた。

10

【0092】

ポリエチレンテレフタレートの基盤に作用極とリード部、対極とリード部をカーボンインク（（株）アサヒ化学研究所製、製品名カーボンペースト TU15ST）で、参照極とリード部を銀塩化銀インク（アチソン（株）製、製品名 Electrode AgPE-409）で、厚さ10 μm でスクリーン印刷し、150℃で40分焼入れし、次いで電極部と、測定装置との接続部とをのぞく部分にレジストインク（（株）アサヒ化学研究所製、製品名 CR18G-KF）を厚さ20 μm でスクリーン印刷し、130℃で15分焼入れして図3に示す電極13を作成した。

電気化学的な測定は、電気化学検出器（ファンクションジェネレーター FG-02 付き 8CH マルチポテンショスタット MODEL PS-08；（株）東方技研）を使用した。

20

【0093】

ピラノースオキシダーゼ 20 U/mL と、表7に示したそれぞれのレドックスメディエータ 60 μM とを含む水溶液 10 μL を、電気化学検出器に接続した電極13の検体添加位置1に載せ、電極13の参照極を基準に-0.5 V から +1 V まで、1 mV/秒で電位を掃引し、サイクリックボルタンメトリー法を行い、酸化電流値 I_d を測定した。次に、ピラノースオキシダーゼ 20 U/mL、基質（1, 5-アンヒドログルシトール 500 $\mu\text{g/mL}$ ）と、表7に示したそれぞれのレドックスメディエータ 60 μM を含む水溶液 10 μL を電極13の検体添加位置1に載せ、電極13の参照極を基準に-0.5 V から +1 V まで、1 mV/秒で電位を掃引し、サイクリックボルタンメトリー法を行い、キャタリティック電流値 I_k を測定した。キャタリティック電流値 I_k をレドックスメディエータのみの酸化電流値 I_d で割った値 I_k/I_d により、レドックスメディエータと酵素との反応速度を比較した。

30

それぞれのレドックスメディエータについて求めた I_k/I_d の結果を表7に示した。

【0094】

【表 7】

表 7

レドックスメディエータ	I _k / I _d
フェリシアン化カリウム	1. 7
[Os (III) (ビピリジル) ₂ (イミダゾイル) Cl] Cl ₂	14. 0
2, 6-ジメチル-p-ベンゾキノン	6. 9
2-メチル-1, 4-ナフトキノン	2. 3
2, 3-ジメトキシ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン	3. 3
N, N-ジメチルアミノメチルフェロセン	5. 1
フェロセンメタノール	3. 4
チオニン酢酸塩	10. 0
メチレンブルー	5. 3
トルイジンブルーO	4. 1
アズール I	16. 4
アズール C	5. 8
メルドラブルー	1. 8
1-メトキシ-5-メチルフェナジウム メチルサルフェート	2. 8
2-ジクロロフェノール-インドフェノールナトリウム塩 2水和物	2. 8
4, 4'-ビス (ジメチルアミノ) ジフェニルアミン	3. 3
N-メチル-N-(3-メトキシフェニル)-1, 4-フェニレンジアミン塩酸塩	2. 6
N-メチル-N-フェニル-1, 4-フェニレンジアミン塩酸塩	2. 5
ニトロ-TB (注)	1. 9
2, 2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム	1. 5
2-ヒドラゾノ-2, 3-ジヒドロ-3-メチル-6-ベンゾチアゾールスルホン酸	1. 2
ビス- {4- [N-3'-スルホ-n-プロピル-N-n-ブチル] アミノ-2, 6-ジメチルフェニル} メタン	1. 5
ビス- {4- [N-3'-スルホ-n-プロピル-N-エチル] アミノ-2, 6-ジメチルフェニル} メタン	1. 0
p-アミノフェノール	3. 5
N-(3-スルホプロピル)-3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン ナトリウム塩	1. 5

(注) ニトロ-TB: 3, 3'-[3, 3'-ジメトキシ-(1, 1'-ビフェニル)-4, 4'-ジル]-ビス [2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩化物]

【0095】

表7からピラノースオキシダーゼが、オスミウム錯体、フェロセン系化合物、キノン系化合物、フェノチアジン系化合物、フェノキサジン系化合物、フェナジン系化合物、ジフェニルアミン系化合物、インドフェノール系化合物、フェノール系化合物等の種々のレドックスメディエータと速い速度で反応することが明らかとなり、この結果は、これらのレドックスメディエータとピラノースオキシダーゼを使用する、例えば、実施例1~3の方法による全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能となるであろうことを示している。

【0096】

参考例 8

参考例 7 と同様に、前記 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼと表 8 に示したレドックスメディエータとの反応を調べた。

参考例 7 と同様にして電極 13 を作成した。

【0097】

1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ (シュードモナス *s p.* NK-85001 由来) 20 U/mL と、表 8 に示したそれぞれのレドックスメディエータ 60 μ M を含む水溶液 10 μ L を、電気化学検出器に接続した電極 13 の検体添加位置 1 に載せ、電極 13 の参照極を基準に -0.5 V から +1 V まで、1 mV/秒で電位を掃引し、サイクリックボルタンメトリー法を行い、酸化電流値 I_d を測定した。次に、1, 5-アンヒ
10
ドログルシトールデヒドロゲナーゼ 20 U/mL、基質 (1, 5-アンヒドログルシトール 500 μ g/mL) と、表 8 に示したそれぞれのレドックスメディエータ 60 μ M を含む水溶液 10 μ L を電極 13 の検体添加位置 1 に載せ、電極 13 の参照極を基準に -0.5 V から +1 V まで、1 mV/秒で電位を掃引し、サイクリックボルタンメトリー法を行い、キャタリティック電流値 I_k を測定した。キャタリティック電流値 I_k を基質なしでレドックスメディエータのみの酸化電流値 I_d で割った値 I_k / I_d により、レドックスメディエータと酵素との反応速度を比較した。

それぞれのレドックスメディエータについて求めた I_k / I_d 結果を表 8 に示した。

【0098】

【表 8】

表 8

レドックスメディエータ	I _k / I _d
フェリシアン化カリウム	3. 4
[O _s (I I I) (ビピリジル) ₂ (イミダゾイル) C 1] C 1 ₂	1 8. 0
2, 6-ジメチル-p-ベンゾキノン	8. 9
2-メチル-1, 4-ナフトキノン	6 4. 4
2, 3-ジメトキシ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン	1 1. 2
N, N-ジメチルアミノメチルフェロセン	5. 0
フェロセンメタノール	4. 9
チオニンアセテート	5 8. 8
メチレンブルー	1 0. 9
トルイジンブルーO	2 1. 1
アズール I	1 8. 3
アズール C	2 5. 4
ニューメチレンブルー	4. 3
1-メトキシ-5-メチルフェナジウム メチルサルフェート	1. 6
2-ジクロロフェノール-インドフェノールナトリウム塩 2水和物	1 0. 3
4, 4'-ビス (ジメチルアミノ) ジフェニルアミン	3. 6
N-メチル-N- (3-メトキシフェニル) -1, 4-フェニレンジアミン塩酸塩)	1. 4
N-メチル-N-フェニル-1, 4-フェニレンジアミン塩酸塩	2. 2
ビス- {4- [N-3'-スルホ-n-プロピル-N-n-ブチル] アミノ-2, 6-ジメチルフェニル} メタン	1. 3
p-アミノフェノール	3. 2
N- (3-スルホプロピル) -3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン ナトリウム塩	2. 2
マラカイトグリーン	2. 1

【0099】

表 8 から、1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼが、オスミウム錯体、フェロセン系化合物、キノン系化合物、フェノチアジン系化合物、フェノキサジン系化合物、フェナジン系化合物、ジフェニルアミン系化合物、インドフェノール系化合物、フェノール系化合物素等の種々のレドックスメディエータと速い速度で反応することが明らかとなり、この結果は、これらのレドックスメディエータと1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼを使用する、例えば、実施例 4 の方法による全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能となるであろうことを示している。

【0100】

参考例 9

1) グルコース変換試薬

1 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7. 0 に調整した後の組成が、1 4. 8 mM の MgCl₂、9 9. 2 mM の KCl、4 8 mM のホスホエノールピルビン酸 (PEP)、2 mM の ATP、2 0 U/mL のピルビン酸キナーゼ (PK)、1 6 U/mL のグルコキナーゼ、1 0 U/mL のアスコルビン酸酸化酵素、2 0 0 mM の塩化ナトリウム、0. 2 mM の EDTA・2 Na 及び 1. 2 g/L の BSA となるように 5 0 mM の MES 緩衝液に各成分を加え、グルコース変換試薬とした。

【0101】

2) 電極試薬溶液

(a) 0.54 mM フェロセニル PEG (株) 同仁化学研究所製)

(b) 6.25 U/mL 西洋わさびペルオキシダーゼ (東洋紡績 (株) 製)

(c) 50 U/mL ピラノースオキシダーゼ (バシジオマイセタウス・フンギ No. 52 由来)

の組成となるように各成分を 100 mM の MES 緩衝液 (pH 7.0) に溶解して電極試薬溶 (a)、(b)、(c) を調製した。

【0102】

3) センサーチップ

まず、参考例 7 で作成した電極 13 の作用極部位に 0.5 % カルボキシメチルセルロース水溶液 10 μ L を塗布し、50 $^{\circ}$ C で 10 分間乾燥して電極表面を親水化した。次に、上記の 2) の電極試薬溶液 (a) 3 μ L を親水化した部分に滴下・乾燥し、その上に電極試薬溶液 (b) 3 μ L を適下・乾燥し、その後、更に電極試薬溶液 (c) 3 μ L を滴下・乾燥してセンサーチップを作製した。

【0103】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、生理食塩液に濃度既知の 1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた 3 検体 (血球分離操作を除いて参考例 1 の操作により求めた各検体の 1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0、10、50 μ g/mL であった) 各 20 μ L をそれぞれグルコース変換試薬 10 μ L とエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、3) のセンサーチップの電極 13 の検体添加位置 1 に反応液 15 μ L を滴下し、5 分間反応した後に参照極 (銀塩化銀) を基準に 0 V を印加して、5 秒後の電流値を電気化学検出器で測定した。電流値と 1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成し、図 4 に示した。図中の 1, 5 AG は 1, 5-アンヒドログルシトールを表す。

【0104】

得られた検量線は濃度依存性が良好な検量線を示し、この結果は、フェロセニル PEG とピラノースオキシダーゼを使用する、例えば、実施例 1~3 の方法に準じる全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的測定が可能となるであろうことを示している。

【0105】

参考例 10

1) グルコース変換試薬

実施例 1 の 1) のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

表 9 の各濃度の各レドックスメディエータ及び表 9 の各濃度の 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ (シュードモナス sp. NK-85001 由来) の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0106】

3) センサーチップ

参考例 7 で作成した電極 13 に、上記の 2) の電極試薬溶液 2 μ L を電極の作用極に塗布して、50 $^{\circ}$ C で 5 分乾燥してセンサーチップを作製した。

【0107】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、0.38 % クエン酸ナトリウム溶液に濃度既知の 1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた 5 検体 (血球分離操作を除いて参考例 1 の操作により求めた各検体の 1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0、2.5、11.9、24.2、49.3 μ g/mL であった) 各 10 μ L とグルコース変換試薬 5 μ L とをエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、電極 13 の検体添加位置 1 に反応液 10 μ L を滴下し、表 9 記載のそれぞれの電位を参照極 (

銀塩化銀)を基準にして印加し、5秒後の電流値を電気化学検出器で測定して、電流値と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。それぞれの検量線を図5～13に示した。

【0108】

【表9】

表9

試験 No.	レドックスメディエーター	電極試薬 溶液のメ ディエー タ濃度 (μ M)	電極試薬 溶液のAGD H濃度 (U/mL) (注)	電位
No.1	2, 6-ジメチル-p-ベンゾキノン	150	50	0.5
No.2	2-メチル-1, 4-ナフトキノン	150	50	0.1
No.3	チオニクロリド	75	50	-0.1
No.4	メチレンブルー	200	100	-0.2
No.5	トルイジンブルーO	12.5	50	-0.1
No.6	アズールC	75	50	0
No.7	4, 4'-ビス(ジメチルアミノ) ジフェニルアミン	75	50	0
No.8	2-ジクロロフェノール-インド フェノールナトリウム塩2水和物	75	50	0.1
No.9	1-メトキシ-5-メチルフェナ ジウム メチルサルフェート	150	50	0

注) AGDH: 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ

【0109】

得られた検量線はいずれも濃度依存性のあるスムーズな検量線であり、この結果は、各メディエータと1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼを使用する全血中の1, 5-アンヒドログルシトールのアンペロメトリー法による電気化学的な測定が可能となるであろうことを示している。

【0110】

参考例11

1) グルコース変換試薬

実施例1の1)のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

表10の各濃度の各レドックスメディエータ及び表10の各濃度の1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ(シュードモナス sp. NK-85001由来)の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0111】

3) センサーチップ

参考例7で作成した電極13に、上記の2)の電極試薬溶液2 μ Lを電極の作用極に塗布して、50℃で5分乾燥してセンサーチップを作製した。

【0112】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、0.38%クエン酸ナトリウム溶液に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた6検体（血球分離操作を除いて参考例1の操作により求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0、2.5、5.0、11.9、24.2、49.3 $\mu\text{g/mL}$ であった）各10 μL とグルコース変換試薬5 μL とをエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極13の検体添加位置1に反応液10 μL を滴下し、表10記載のそれぞれの第一電位を参照極を（銀塩化銀）基準にして10秒印加し、次いで第2電位を参照極（銀塩化銀）を基準に110秒印加して、第2電位の印加開始から100秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定して、クーロメトリー法を行い、クーロン量と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。それぞれの検量線を図14～27に示した。

【0113】

【表10】

表10

試験 No.	レドックスメディエーター	電極試薬溶液 のメデ イエー タ濃度 (μM)	電極試薬溶液 のAGDH 濃度 (μM)	第一 電位	第二 電位
No. 1	[Os(III)(ビピリジル) ₂ (イミダゾイル)Cl]Cl ₂	300	25	0.15	0.25
No. 2	2, 6-ジメチル-p-ベンゾキノン	150	50	0.5	0.6
No. 3	2, 3-ジメトキシ-5-メチル-1, 4-ベンゾキノン	150	50	0.5	0.6
No. 4	2-メチル-1, 4-ナフトキノン	150	50	0.1	0.2
No. 5	チオニンアセテート	5	50	-0.1	0
No. 6	チオニクロリド	75	50	-0.1	0
No. 7	メチレンブルー	200	100	-0.2	-0.1
No. 8	トルイジンブルーO	12.5	50	-0.1	0
No. 9	アズールI	120	40	0.2	0.3
No. 10	アズールC	75	50	0	0.1
No. 11	メルドラブルー	150	50	0	0.1
No. 12	4, 4'-ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミン	75	50	0	0.1
No. 13	2-ジクロロフェノール-インドフェノールナトリウム塩2水和物	75	50	0.1	0.2
No. 14	1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート	150	50	0	0.1

注) AGDH: 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ

【0114】

10

20

30

40

50

得られた検量線はいずれも濃度依存性のあるスムーズな検量線であり、この結果は、各メディエータと1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼを使用する全血中の1, 5-アンヒドログルシトールのクーロメトリー法による電気化学的な測定が可能となるであろうことを示している。

【0115】

実施例6

1) グルコース変換試薬

実施例1の1)のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

120 μ Mのチオニンアセテート（シグマアルドリッチ（株）製）、40 U/mLの1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ（シュードモナス s p. NK-85001由来）の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0116】

3) センサーチップ

参考例7で作成した電極13に、上記の2)の電極試薬溶液2 μ Lを電極の作用極に塗布して、50℃で5分乾燥してセンサーチップを作製した。

【0117】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、0.38%クエン酸ナトリウム溶液に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた7検体（血球分離操作を除いて参考例1の操作により求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0、2.5、5.0、11.9、24.2、49.3、98.8 μ g/mLであった）各10 μ Lとグルコース変換試薬5 μ Lとをエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極13の検体添加位置1に反応液10 μ Lを滴下し、参照極（銀塩化銀）を基準にして-0.1Vを10秒、次いで0Vを110秒印加し、0Vの印加開始から100秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定して、クーロン量と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。良好な直線性を示した検量線を図28に示した。

【0118】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

1, 5-アンヒドログルシトールを測定する7名のヒトの全血検体各10 μ Lとグルコース変換試薬5 μ Lとをエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極13の検体添加位置1に反応液10 μ Lを滴下し、参照極（銀塩化銀）を基準にして-0.1Vを10秒、次いで0Vを110秒印加し、0Vの印加開始から100秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定して、検量線と対比して7検体について全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表11に示す。なお、結果は4回測定したその平均値である。

【0119】

参考例12

比較のために、実施例6の5)で測定したのと同じ全血検体を参考例1の操作方法で1, 5-アンヒドログルシトールを定量測定した。結果を表11に示す。

【0120】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 1		
1, 5-アンヒドログルシトール濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	参考例 1 2	実施例 6
全血検体 2 4	8. 5	1 0. 1
全血検体 2 5	1 5. 7	1 5. 2
全血検体 2 6	1 2. 9	1 2. 1
全血検体 2 7	2 2. 7	1 9. 0
全血検体 2 8	2 5. 6	2 4. 5
全血検体 2 9	2 6. 8	2 1. 5
全血検体 3 0	2 8. 5	2 6. 3

【0 1 2 1】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、チオニンアセテートを含む電極試薬と反応させて測定した全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例 6）は、公知の測定方法による参考例 1 2 の測定値とよい一致（相関係数；0. 9 7 1 1）を示し、本発明によって全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能であることを示している。

【0 1 2 2】

実施例 7

1) グルコース変換試薬

実施例 1 の 1) のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

(i) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用

5 0 μM メチレンブルー（米山薬品工業（株）製）、1 0 0 U/mL の 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ（シュードモナス sp. NK-8 5 0 0 1 由来）の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

(ii) ブランク測定用

5 0 μM メチレンブルー（米山薬品工業（株）製）の組成となるように精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0 1 2 3】

3) センサーチップ

参考例 7 で作成した図 3 で示される電極 1 3 を 2 個用意し、上記の 2) の 1, 5-アンヒドログルシトール測定用又はブランク測定用の電極試薬溶液 2 μL をそれぞれの電極の作用極に塗布して、5 0 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分乾燥して 1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップを作製した。

【0 1 2 4】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、1, 5-アンヒドログルシトールがほとんど存在しないことが知られている羊血清（日本バイオテスト（株）製）に濃度既知の 1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた 6 検体（血球分離操作を除いて参考例 1 の操作により求めた各検体の 1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0. 6、2. 8、5. 0、1 0. 0、2 4. 7、5 0. 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった）各 2 0 μL とグルコー

ス変換試薬 10 μ L とをエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップの電極 13 の検体添加位置 1 にそれぞれ反応液 10 μ L を滴下し、それぞれのセンサーチップの参照極（銀塩化銀）を基準に -0.2 V を 10 秒、-0.1 V を 110 秒印加し、-0.1 V の印加開始から 100 秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップのクーロン量からブランク測定用センサーチップのクーロン量を差し引いたクーロン量と 1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。良好な直線性を示した検量線を図 29 に示した。

【0125】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

実施例 6 の 7 名の全血各 20 μ L とグルコース変換試薬 10 μ L とをエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップの電極 13 の検体添加位置 1 にそれぞれ反応液 10 μ L を滴下し、それぞれのセンサーチップの参照極（銀塩化銀）を基準に -0.2 V を 10 秒、-0.1 V を 110 秒印加し、-0.1 V の印加開始から 100 秒間のクーロン量を電気化学検出器（GPIB RS232C 付き 8CH マルチポテンショスタット MODEL PS-08; (株) 東方技研）で測定して、1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップのクーロン量からブランク測定用センサーチップのクーロン量を差し引いたクーロン量を求め、検量線と対比して 7 検体について全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの量を求めた。結果を表 12 に示す。なお、結果は 4 回測定したその平均値である。

【0126】

参考例 12

実施例 7 で用いた検体は、実施例 6 と同じ全血検体であるので、実施例 6 の参考例 12 の測定結果を表 12 に示す。

【0127】

【表 12】

表 12

	1, 5-アンヒドログルシトール濃度 (μ g/mL)	
	参考例 12	実施例 7
全血検体 24	8.5	9.6
全血検体 25	15.7	14.5
全血検体 26	12.9	12.9
全血検体 27	22.7	23.7
全血検体 28	25.6	20.9
全血検体 29	26.8	23.9
全血検体 30	28.5	24.1

【0128】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、メチレンブルーを含む電極試薬と反応させて測定した全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例 7）は、公知の測定方法による参考例 12 の測定値と良い一致（相関係数; 0.9658）を示し、本発明によって全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能であることを示している。

【0129】

実施例 8

1) グルコース変換試薬

実施例 1 の 1) のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

120 μ M チオニンアセテート (シグマアルドリッチ (株) 製)、40 U/mL の 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ (シュードモナス s p. NK-8500 1 由来) の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0130】

3) センサーチップ

参考例 7 で作成した電極 13 に、上記の 2) の電極試薬溶液 2 μ L を電極の作用極に塗布して、50℃で 5 分乾燥してセンサーチップを作製した。

【0131】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、羊血清 (日本バイオテスト (株) 製) に濃度既知の 1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた 7 検体 (血球分離操作を除いて参考例 1 の操作により求めた各検体の 1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0.6、2.8、5.0、10.0、24.7、50.2、103.9 μ g/mL であった) 各 10 μ L とグルコース変換試薬 5 μ L とをエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、電極 13 の検体添加位置 1 に反応液 10 μ L を滴下し、参照極 (銀塩化銀) を基準に -0.1 V を印加して 5 秒後の電流値を電気化学検出器で測定し、電流値と 1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。良好な直線性を示した検量線を図 30 に示した。

【0132】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

実施例 6 の 7 名の全血各 10 μ L とグルコース変換試薬 5 μ L とをエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、電極 13 の検体添加位置 1 に反応液 10 μ L を滴下し、参照極 (銀塩化銀) を基準に -0.1 V を印加して 5 秒後の電流値を電気化学検出器で測定し、電流値を求めて検量線と対比することにより 7 検体について全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの量を求めた。結果を表 13 に示す。なお、結果は 4 回測定したその平均値である。

【0133】

参考例 12

実施例 8 で用いた検体は、実施例 6 と同じ全血検体であるので、実施例 6 の参考例 12 の測定結果を表 13 に示す。

【0134】

10

20

30

【表 1 3】

表 1 3

1, 5-アンヒドログルシトール濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	参考例 1 2	実施例 8
全血検体 2 4	8. 5	1 0. 0
全血検体 2 5	1 5. 7	1 4. 7
全血検体 2 6	1 2. 9	1 1. 7
全血検体 2 7	2 2. 7	1 9. 5
全血検体 2 8	2 5. 6	2 5. 4
全血検体 2 9	2 6. 8	2 1. 6
全血検体 3 0	2 8. 5	2 7. 0

【0 1 3 5】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、チオニンアセテートを含む電極試薬と反応させて測定した全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例 8）は、公知の測定方法による参考例 1 2 の測定値と良い一致（相関係数；0. 9 7 0 0）を示し、本発明によって全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能であることを示している。

【0 1 3 6】

実施例 9

1) グルコース変換試薬

実施例 1 の 1) のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

1 2 0 μM チオニンアセテート（シグマーアルドリッチ（株）製）、4 0 U/ mL の 1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ（シュードモナス s p. NK-8 5 0 0 1 由来）の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0 1 3 7】

3) センサーチップ

参考例 7 で作成し、参考例 9 の処理をした電極 1 3 に、上記の 2) の電極試薬溶液 2 μL を電極の作用極に塗布して、5 0 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分乾燥してセンサーチップを作製した。

【0 1 3 8】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、0. 3 8 %クエン酸ナトリウム溶液に濃度既知の 1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた 4 検体（血球分離操作を除いて参考例 1 の操作により求めた各検体の 1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0、5. 0、1 1. 9、2 4. 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった）各 1 0 μL とグルコース変換試薬 5 μL とをエッペンドルフチューブ内で混合して 5 分間放置した。その後、電極 1 3 の検体添加位置 1 に反応液 1 0 μL を滴下し、参照極（銀塩化銀）を基準に 0 V を 1 1 0 秒印加して、印加開始から 1 0 0 秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定し、センサーチップのクーロン量と 1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。良好な直線性を示した検量線を図 3 1 に示した。

【0 1 3 9】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

1, 5-アンヒドログルシトールを測定する6名のヒトの全血各10 μ Lとグルコース変換試薬5 μ Lとをエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、電極13の検体添加位置1に反応液10 μ Lを滴下し、参照極（銀塩化銀）を基準に0Vを110秒印加して、印加開始から100秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定し、クーロン量を求め、検量線と対比して6検体について全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表14に示す。なお、結果は4回測定したその平均値である。

【0140】

参考例13

比較のために、実施例9の5)で測定したのと同じ全血検体を参考例1の操作方法で1, 5-アンヒドログルシトールを定量測定した。結果を表14に示す。

10

【0141】

【表14】

表 1 4		
1, 5-アンヒドログルシトール濃度 (μ g/mL)		
	参考例 1 3	実施例 9
全血検体 3 1	8. 9	1 0. 6
全血検体 3 2	1 6. 2	1 5. 2
全血検体 3 3	1 4. 1	1 4. 0
全血検体 3 4	2 3. 3	2 1. 3
全血検体 3 5	2 5. 9	2 3. 1
全血検体 3 6	3 2. 1	2 4. 7

20

【0142】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、チオニンアセテートを含む電極試薬と反応させて測定した全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例9）は、公知の測定方法による参考例13の測定値と良い一致（相関係数；0. 9855）を示し、本発明による全血中の1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能であることを示している。

30

【0143】

実施例10

1) グルコース変換試薬

実施例1の1)のグルコース変換試薬を使用した。

2) 電極試薬溶液

(i) 1, 5-アンヒドログルシトール測定用

40

100 μ Mメチレンブルー（東京化成工業（株）製）、50 U/mLの1, 5-アンヒドログルシトールデヒドロゲナーゼ（シュードモナス sp. NK-85001由来）の組成となるように各成分を精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

(ii) ブランク測定用

100 μ Mメチレンブルー（東京化成工業（株）製）の組成となるように精製水に溶解して電極試薬溶液を調製した。

【0144】

3) センサーチップ

参考例7で作成した図3で示される電極13を2個用意し、上記の2)の1, 5-アンヒドログルシトール測定用又はブランク測定用の電極試薬溶液2 μ Lをそれぞれの電極の

50

作用極に塗布して、50℃で5分乾燥して1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップを作製した。

【0145】

4) 検量線作成

1, 5-アンヒドログルシトール検量線作成用として、羊血清（日本バイオテスト（株）製）に濃度既知の1, 5-アンヒドログルシトール標品を加えた4検体（血球分離操作を除いて参考例1の操作により求めた各検体の1, 5-アンヒドログルシトール濃度は、0.6、10.0、50.2、103.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった）各20 μL とグルコース変換試薬10 μL とをエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップの電極13の検体添加位置1にそれぞれ反応液10 μL を滴下し、それぞれのセンサーチップの参照極（銀塩化銀）を基準に-0.1Vを110秒印加し、-0.1Vの印加開始から100秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定した。1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップのクーロン量からブランク測定用センサーチップのクーロン量を差し引いたクーロン量と1, 5-アンヒドログルシトール濃度から検量線を作成した。良好な直線性を示した検量線を図32に示した。

【0146】

5) 1, 5-アンヒドログルシトール測定操作

実施例9の6名の全血各20 μL とグルコース変換試薬10 μL とをエッペンドルフチューブ内で混合して5分間放置した。その後、1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップとブランク測定用センサーチップの電極13の検体添加位置1にそれぞれ反応液10 μL を滴下し、それぞれのセンサーチップの参照極（銀塩化銀）を基準に-0.1Vを110秒印加し、-0.1Vの印加開始から100秒間のクーロン量を電気化学検出器で測定し、1, 5-アンヒドログルシトール測定用センサーチップのクーロン量からブランク測定用センサーチップのクーロン量を差し引いたクーロン量を求め、検量線と対比して6検体について全血中の1, 5-アンヒドログルシトール量を求めた。結果を表15に示す。なお、結果は4回測定したその平均値である。

【0147】

参考例13

実施例10で用いた検体は、実施例9と同じ全血検体であるので、実施例9の参考例13の測定結果を表15に示す。

【0148】

【表15】

表15

	1, 5-アンヒドログルシトール濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	参考例13	実施例10
全血検体31	8.9	11.0
全血検体32	16.2	17.2
全血検体33	14.1	15.0
全血検体34	23.3	24.0
全血検体35	25.9	24.5
全血検体36	32.1	31.4

【0149】

全血を用い、グルコース変換試薬を作用させてグルコースを測定に干渉しない物質に変換し、血球を分離しないで、メチレンブルーを含む電極試薬と反応させて差動法により測定した全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの測定値（実施例 10）は、公知の測定方法による参考例 13 の測定値と良い一致（相関係数；0.9964）を示し、本発明によって全血中の 1, 5-アンヒドログルシトールの電気化学的な測定が可能であることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0150】

本発明の 1, 5-アンヒドログルシトールを電気化学的に測定する 1, 5-アンヒドログルシトールの測定方法により、遠心分離機等を使用せずに微量な全血を用いた 1, 5-アンヒドログルシトールの測定が可能となる。従って、本発明の測定方法はベッドサイドあるいは診察室での 1, 5-アンヒドログルシトールの迅速測定や患者自身による家庭での測定に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【0151】

【図 1】本発明で用いる電極 11 を簡略化して示した図である。

【図 2】本発明で用いる電極 12 を簡略化して示した図である。

【図 3】本発明で用いる電極 13 を簡略化して示した図である。

【図 4】参考例 9 で作成した検量線である。

【図 5】参考例 10 の表 9 の試験 No. 1 についての検量線である。

【図 6】参考例 10 の表 9 の試験 No. 2 についての検量線である。

【図 7】参考例 10 の表 9 の試験 No. 3 についての検量線である。

【図 8】参考例 10 の表 9 の試験 No. 4 についての検量線である。

【図 9】参考例 10 の表 9 の試験 No. 5 についての検量線である。

【図 10】参考例 10 の表 9 の試験 No. 6 についての検量線である。

【図 11】参考例 10 の表 9 の試験 No. 7 についての検量線である。

【図 12】参考例 10 の表 9 の試験 No. 8 についての検量線である。

【図 13】参考例 10 の表 9 の試験 No. 9 についての検量線である。

【図 14】参考例 11 の表 10 の試験 No. 1 についての検量線である。

【図 15】参考例 11 の表 10 の試験 No. 2 についての検量線である。

【図 16】参考例 11 の表 10 の試験 No. 3 についての検量線である。

【図 17】参考例 11 の表 10 の試験 No. 4 についての検量線である。

【図 18】参考例 11 の表 10 の試験 No. 5 についての検量線である。

【図 19】参考例 11 の表 10 の試験 No. 6 についての検量線である。

【図 20】参考例 11 の表 10 の試験 No. 7 についての検量線である。

【図 21】参考例 11 の表 10 の試験 No. 8 についての検量線である。

【図 22】参考例 11 の表 10 の試験 No. 9 についての検量線である。

【図 23】参考例 11 の表 10 の試験 No. 10 についての検量線である。

【図 24】参考例 11 の表 10 の試験 No. 11 についての検量線である。

【図 25】参考例 11 の表 10 の試験 No. 12 についての検量線である。

【図 26】参考例 11 の表 10 の試験 No. 13 についての検量線である。

【図 27】参考例 11 の表 10 の試験 No. 14 についての検量線である。

【図 28】実施例 6 で作成した検量線である。

【図 29】実施例 7 で作成した検量線である。

【図 30】実施例 8 で作成した検量線である。

【図 31】実施例 9 で作成した検量線である。

【図 32】実施例 10 で作成した検量線である。

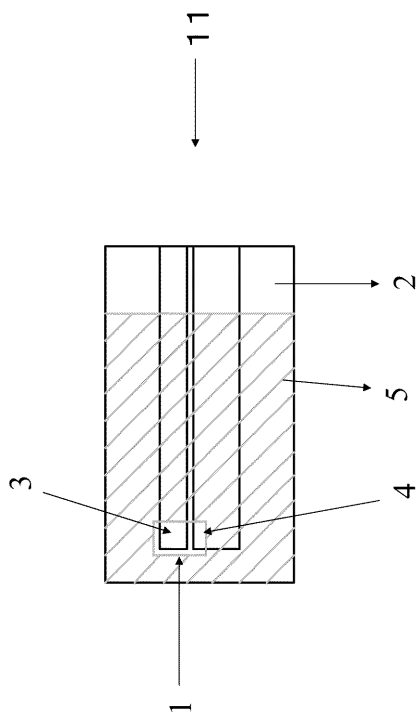
【符号の説明】

【0152】

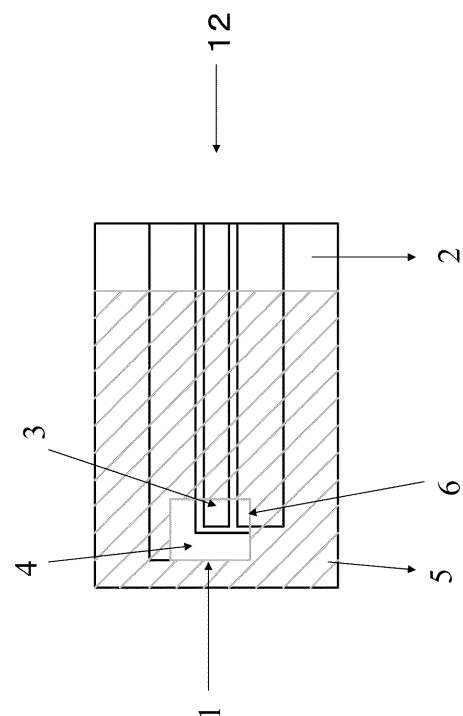
1 検体添加位置

- 2 支持体
- 3 作用極
- 4 対極
- 5 レジスト
- 6 参照極（カーボンインク）
- 6 a 参照極（銀塩化銀インク）
- 1 1 電極
- 1 2 電極
- 1 3 電極

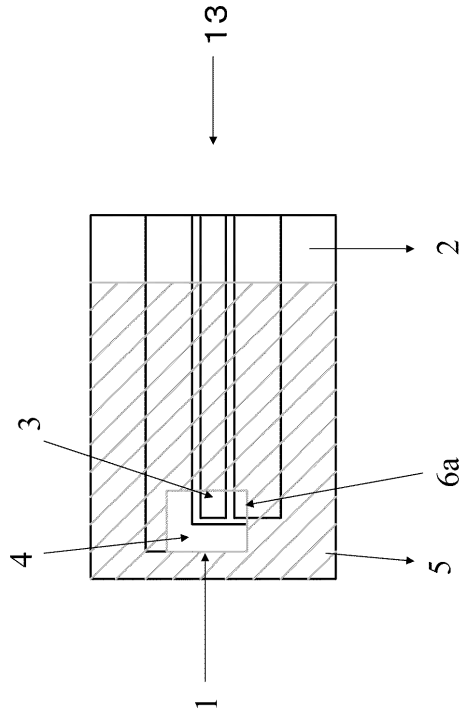
【図 1】



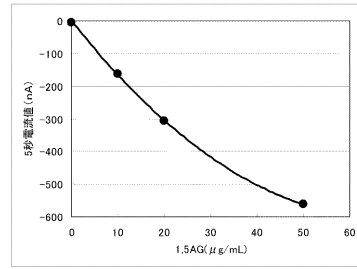
【図 2】



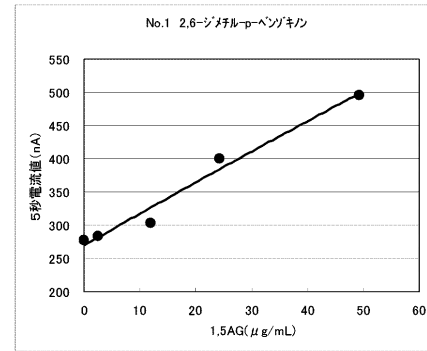
【図 3】



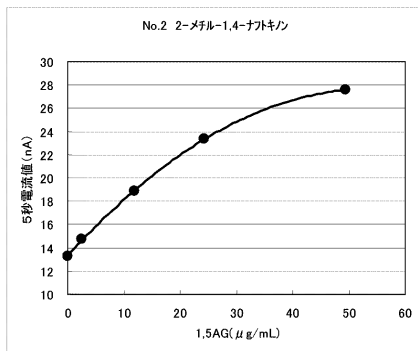
【図 4】



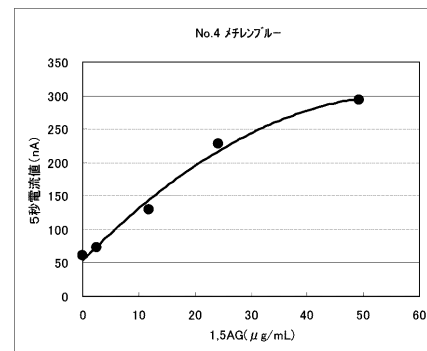
【図 5】



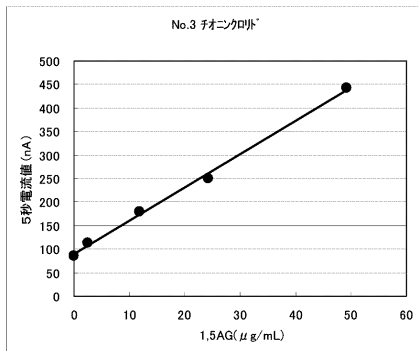
【図 6】



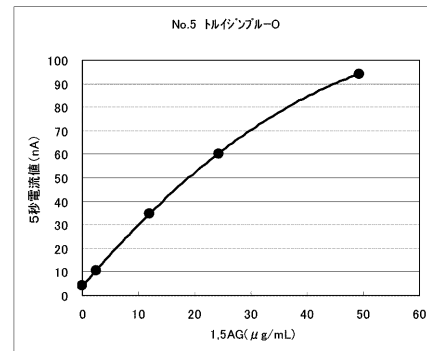
【図 8】



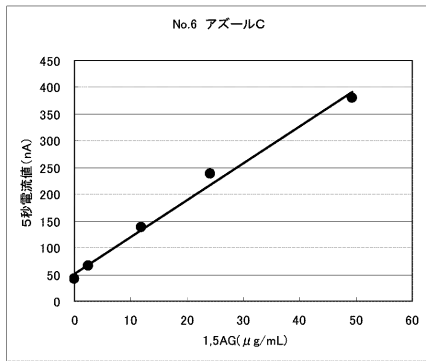
【図 7】



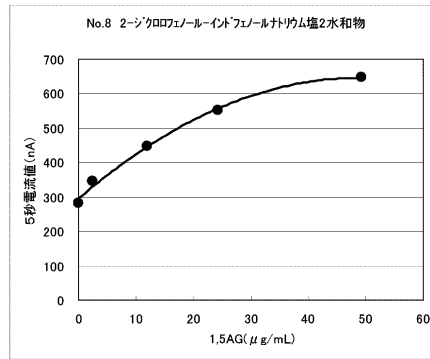
【図 9】



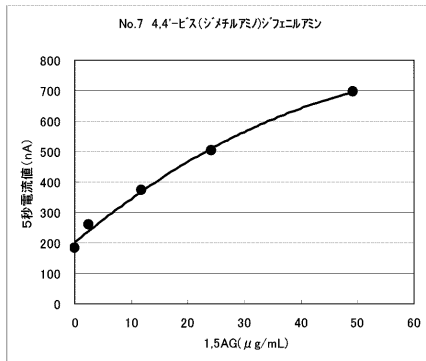
【図 10】



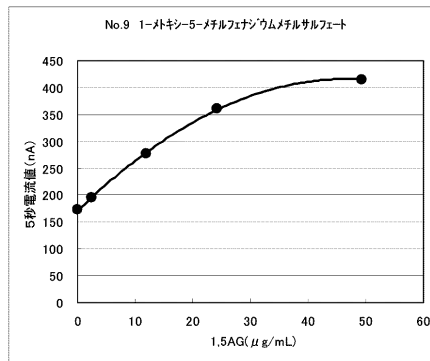
【図 12】



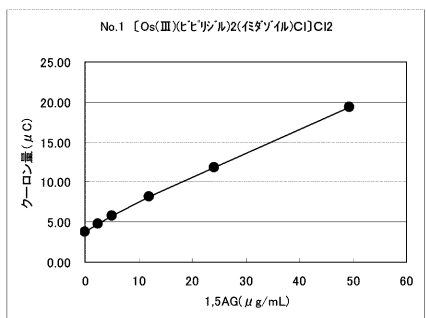
【図 11】



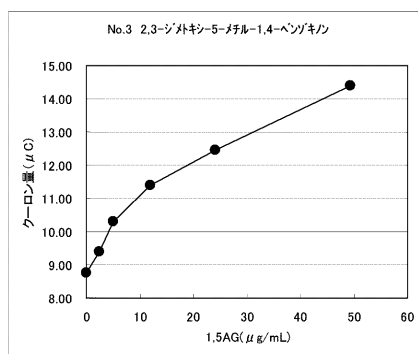
【図 13】



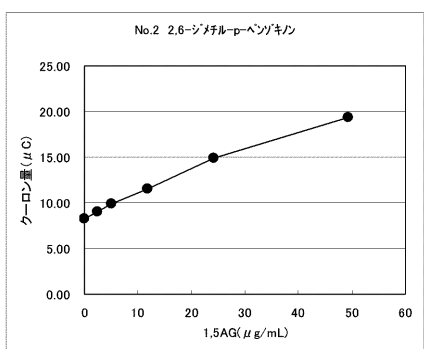
【図 14】



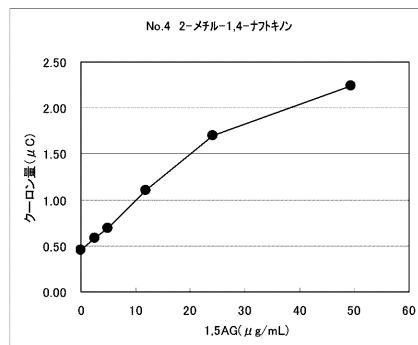
【図 16】



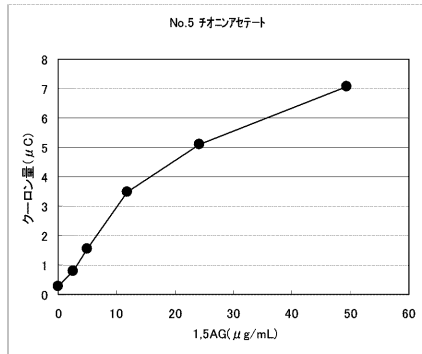
【図 15】



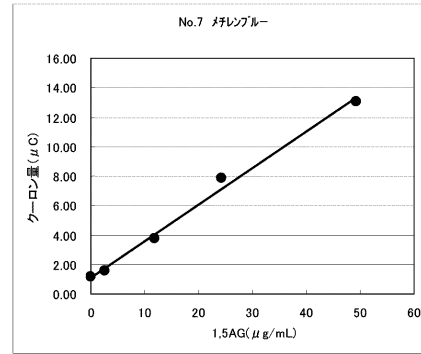
【図 17】



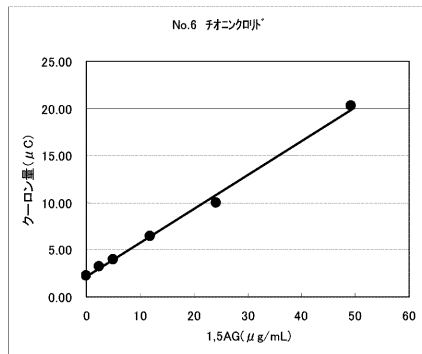
【図 18】



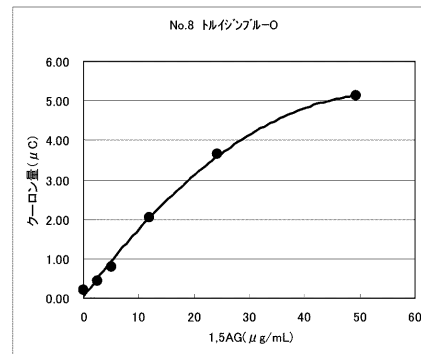
【図 20】



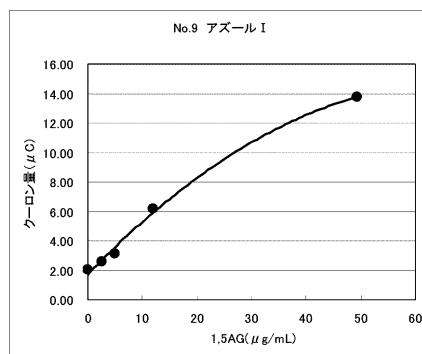
【図 19】



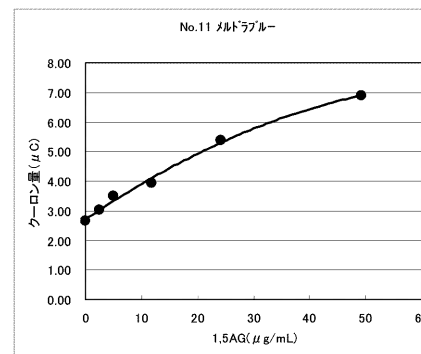
【図 21】



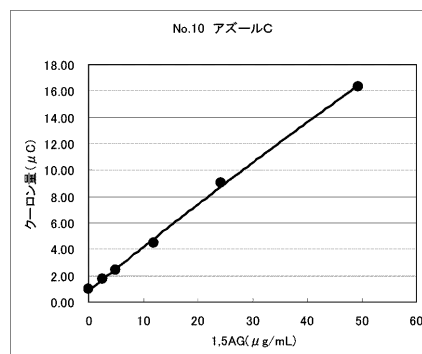
【図 22】



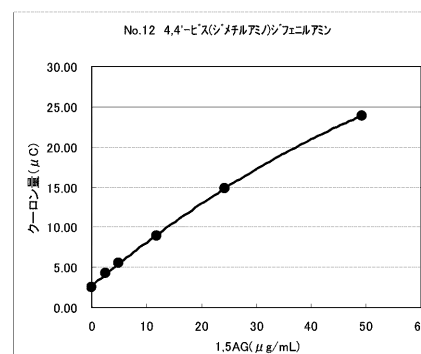
【図 24】



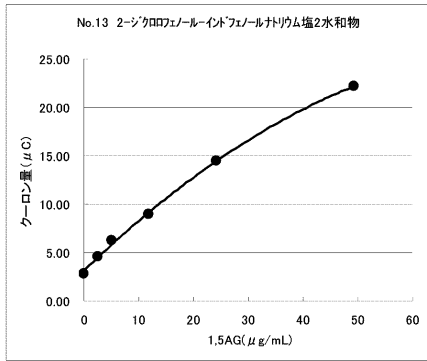
【図 23】



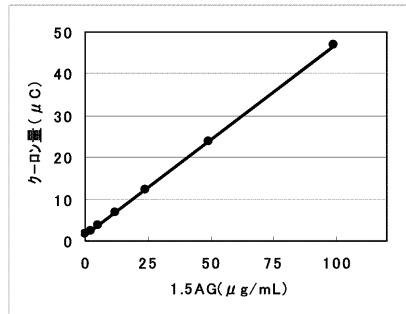
【図 25】



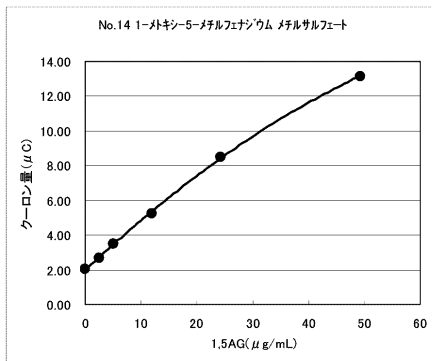
【図 26】



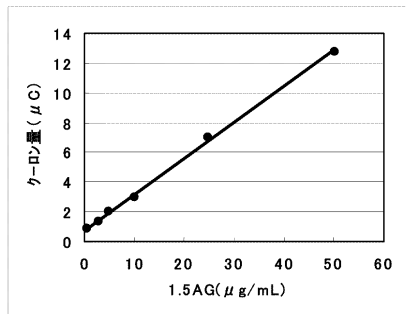
【図 28】



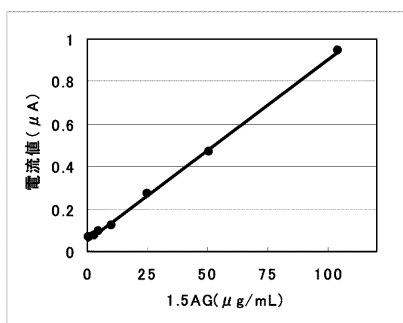
【図 27】



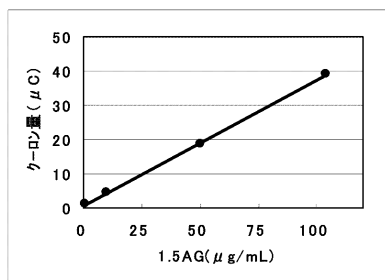
【図 29】



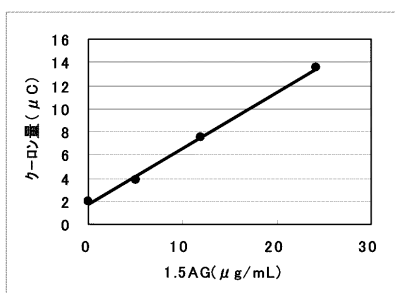
【図 30】



【図 32】



【図 31】



フロントページの続き

- (74)代理人 100140556
弁理士 新村 守男
- (74)代理人 100114719
弁理士 金森 久司
- (74)代理人 100143258
弁理士 長瀬 裕子
- (74)代理人 100124969
弁理士 井上 洋一
- (74)代理人 100132492
弁理士 弓削 麻理
- (72)発明者 梅香家 佳彦
群馬県高崎市岩鼻町239 日本化薬株式会社 医薬研究所内
- (72)発明者 町田 礼子
群馬県高崎市岩鼻町239 日本化薬株式会社 医薬研究所内
- (72)発明者 高木 久子
群馬県高崎市岩鼻町239 日本化薬株式会社 医薬研究所内
- (72)発明者 入江 弥生
群馬県高崎市岩鼻町239 日本化薬株式会社 医薬研究所内
- (72)発明者 横山 貴男
群馬県高崎市岩鼻町239 日本化薬株式会社 医薬研究所内
- (72)発明者 田辺 敏雄
東京都千代田区富士見1丁目11番2号 日本化薬株式会社 医薬事業本部 診断薬室内

審査官 柏木 一浩

- (56)参考文献 特開平08-070893 (JP, A)
特開2002-514744 (JP, A)
特開2005-523443 (JP, A)
特開2001-133430 (JP, A)
特開平10-062402 (JP, A)
特開平05-223773 (JP, A)
特開2006-275819 (JP, A)
特許第2983015 (JP, B2)
特開2001-078797 (JP, A)
特許第3170320 (JP, B2)
特許第3217180 (JP, B2)
特開2001-116756 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/416
G01N 27/26
G01N 27/327