

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4055912号
(P4055912)

(45) 発行日 平成20年3月5日(2008.3.5)

(24) 登録日 平成19年12月21日(2007.12.21)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 27/414 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 O 1 L

GO 1 N 27/416 (2006.01)

GO 1 N 27/46 3 3 8

GO 1 N 27/333 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 3 1 C

GO 1 N 27/327 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 P

請求項の数 31 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平10-527981
 (86) (22) 出願日 平成9年12月17日(1997.12.17)
 (65) 公表番号 特表2001-506365(P2001-506365A)
 (43) 公表日 平成13年5月15日(2001.5.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/023426
 (87) 国際公開番号 W01998/027419
 (87) 国際公開日 平成10年6月25日(1998.6.25)
 審査請求日 平成16年10月21日(2004.10.21)
 (31) 優先権主張番号 08/769,863
 (32) 優先日 平成8年12月19日(1996.12.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

インプラントッド バイオシステムズ、インク
 アメリカ合衆国 オハイオ 45429,
 ケッタリング、カルバー アベニュー 2
 685, ケッタリング リサーチ ビルデ
 イング

(74) 代理人

弁理士 末成 幹生

(72) 発明者

ブルバーク、エルモ、エー、ジュニア
 アメリカ合衆国 オハイオ 45066,
 スプリングボロ、ブネル ヒル ロード
 8346

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルコースセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

繊維化されたポリテトラフルオロエチレンのフィルムにシリコン化合物を塗工することにより、又は、ポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の混合物を延伸することにより、多孔性膜を提供するランダムに繊維化された構造を有するように形成され、酸素輸送を促進する半透過高分子網を備える酵素含有膜であって、上記多孔性膜内には、酵素が入り込んでいることを特徴とする膜。

【請求項 2】

前記シリコン化合物が、架橋されたポリオルガノシロキサンであることを特徴とする請求項 1 に記載の膜。

【請求項 3】

前記ポリオルガノシロキサンが、ポリジメチルシロキサンであることを特徴とする請求項 2 に記載の膜。

【請求項 4】

前記酵素が、グルコースを酸化し、過酸化水素を発生させ得ることを特徴とする請求項 1 に記載の膜。

【請求項 5】

前記酵素が、前記網状組織内に固定されていることを特徴とする請求項 1 に記載の膜。

【請求項 6】

前記酵素が、酵素ゲルとして固定されていることを特徴とする請求項 5 に記載の膜。

【請求項 7】

前記酵素が、オキシダーゼであることを特徴とする請求項 4 に記載の膜。

【請求項 8】

前記オキシダーゼが、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項 6 に記載の膜。

【請求項 9】

前記膜が、25～55%の多孔度を有することを特徴とする請求項 1 に記載の膜。

【請求項 10】

前記膜が、シリコン化合物を体積比で15～40%含有することを特徴とする請求項 9 に記載の膜。

10

【請求項 11】

外膜と、内膜とを備える効果的な酸素輸送が要求されるセンサーに有用な膜システムであって、

上記内膜が、繊維化されたポリテトラフルオロエチレンのフィルムにシリコン化合物を塗工することにより、又は、ポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の混合物を延伸することにより、多孔性膜を提供するランダムに繊維化された構造を有するように形成され、酸素輸送を促進する半透過高分子網を有する酵素含有膜であり、上記多孔性膜内には、酵素が入り込んでいることを特徴とする膜システム。

【請求項 12】

前記外膜が、ポリカーボネートで構成されていることを特徴とする請求項 9 に記載の膜システム。

20

【請求項 13】

前記内膜が、シリコン化合物を体積比で15～40%含有することを特徴とする請求項 10 に記載の膜システム。

【請求項 14】

前記酵素含有膜の前記シリコン化合物が、架橋されたポリオルガノシロキサンであることを特徴とする請求項 13 に記載の膜システム。

【請求項 15】

前記ポリオルガノシロキサンが、ポリジメチルシロキサンであることを特徴とする請求項 14 に記載の膜システム。

30

【請求項 16】

前記酵素含有膜の酵素が、グルコースを酸化し、過酸化水素を発生させ得る酵素の単独または組み合わせであることを特徴とする請求項 9 に記載の膜システム。

【請求項 17】

前記酵素が、前記内膜内に固定されていることを特徴とする請求項 16 に記載の膜システム。

【請求項 18】

前記酵素が、酵素ゲルとして固定されていることを特徴とする請求項 17 に記載の膜システム。

【請求項 19】

前記酵素が、オキシダーゼであることを特徴とする請求項 16 に記載の膜システム。

40

【請求項 20】

前記オキシダーゼが、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項 19 に記載の膜システム。

【請求項 21】

前記酵素含有膜が、25～55%の多孔度を有することを特徴とする請求項 11 に記載の膜システム。

【請求項 22】

外膜と内膜を有する膜システムと、過酸化水素を酸化可能な電極とを備えるグルコースセンサーであって、

50

上記内膜が、繊維化されたポリテトラフルオロエチレンのフィルムにシリコン化合物を塗工することにより、又は、ポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の混合物を延伸することにより、多孔性膜を提供するランダムに繊維化された構造を有するように形成され、酸素輸送を促進する半透過高分子網を備える酵素含有膜であり、
上記多孔性膜内には、酵素が入り込んでおり、
上記外膜が、上記内膜へのグルコースの流通を制限し、
上記内膜が、上記外膜と上記電極の間に配置されていることを特徴とするグルコースセンサー。

【請求項 23】

前記膜システムの前記外膜が、ポリカーボネートで構成されていることを特徴とする請求項 22 に記載のグルコースセンサー。

10

【請求項 24】

前記酵素含有膜の前記シリコン化合物が、架橋されたポリオルガノシロキサンであることを特徴とする請求項 22 に記載のグルコースセンサー。

【請求項 25】

前記ポリオルガノシロキサンが、ポリジメチルシロキサンであることを特徴とする請求項 24 に記載のグルコースセンサー。

【請求項 26】

前記酵素含有膜の酵素が、グルコースを酸化し、過酸化水素を発生させ得る酵素の単独または組み合わせであることを特徴とする請求項 22 に記載のグルコースセンサー。

20

【請求項 27】

前記酵素が、前記酵素含有膜内に固定されていることを特徴とする請求項 1 に記載のグルコースセンサー。

【請求項 28】

前記酵素が、酵素ゲルとして固定されていることを特徴とする請求項 26 に記載のグルコースセンサー。

【請求項 29】

前記酵素が、オキシダーゼであることを特徴とする請求項 25 に記載のグルコースセンサー。

【請求項 30】

30

前記オキシダーゼが、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項 28 に記載のグルコースセンサー。

【請求項 31】

前記酵素含有膜が、25 ~ 55 % の多孔度を有することを特徴とする請求項 22 に記載のグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、グルコースセンサーに係り、特に酵素部位への効果的な酸素輸送が要求されるグルコースセンサーや酵素を用いた他の応用に使用される膜に関する。

40

2. 従来技術

現在、低酸素環境下において正確にグルコースレベルを測定できるグルコースセンサー、特に、人に容易に埋め込め、長期間機能可能なセンサーが大いに必要とされている。このような装置の開発の主な原動力は、一般に糖尿病として知られている病気にある。この病気は、主に、膵臓の局部組織やベータ細胞によるホルモンインシュリンの分泌不全の結果であることが50年以上も前からよく知られている。この病気を抑制できない場合には、グルコースレベルの上昇がケトン症や血液pHの損傷的变化を引き起こすような重大な代謝の不均衡がしばしば引き起こされる。しかしながら、今日では、生命を脅かす程の血中グルコースの変動は、食事療法や毎日のインシュリン投与によってほぼ制御されている。インシュリン投与による糖尿病の制御によって、健常者よりも大きな血中グルコースレベ

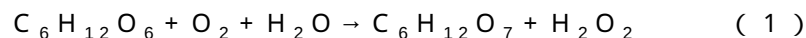
50

ルの変動が生じると数十年間理解されてきた。しかしながら、従来の見識は、極度の血中グルコースレベルを回避するだけのものであった。それにもかかわらず、時々、例えば日に1回から数回のインシュリン投与では、適切に機能する膵臓が比較的長く安定した血中グルコースレベルを維持するために十分なインシュリンを絶えず供給し続けるような血中グルコースの厳密な制御を再現することができない。

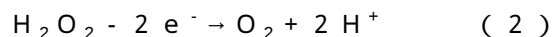
インシュリン依存性糖尿病患者は、極度の血中グルコースレベルを回避しているにもかかわらず、生命の質と量を減少させる他の病気にも悩まされている。糖尿病は、相当の血流を妨げる血行不良のような手足の切断を引き起こす血管病をたびたび併発する。眼内血管の異常成長は、視力の進行性喪失を伴う眼内出血や網膜損傷を引き起こすことがある。神経変質は、感覚の喪失や他の関連問題を引き起こすことがある。家庭内グルコーステストが普及するにつれ、定期的なインシュリン投与によってもたらされる比較的貧弱な血中グルコース制御を説明するより多くのデータが利用できるようになってきた。同時に、増加している臨床研究は、厳密な血中グルコース制御が前述した糖尿病関連病の発生の全てではないがその多くを減少させていることを示している。今日では、多くの科学者や医者が、血中グルコース制御を改善することによって、糖尿病による死亡者数や死亡率を大幅に削減できると信じている。

科学者らは、正確な血中グルコース制御の維持を必要とするような外因性のインシュリン供給から開放される自動インシュリン投与システムの作製に取り組んでいる。自動調製の人工インシュリン源は、糖尿病によって引き起こされる損傷を制限するために必要である。埋め込み可能型や外設型の多くのタイプの調節された投与システムが、すでに利用されている。重大な問題は、これらの投与システムを制御するための正確なグルコースセンサーが必要であることである。血液サンプルに依存する方法は、絶え間なく供給されるインシュリンの調合を行うためにグルコースレベルを連続的に測定する必要性があることから、一般に用いられなくなっている。そのため、生体中のグルコースレベルを測定する埋め込み可能なグルコースセンサーが必要とされているのは明白なことである。

埋め込み可能なグルコースセンサーを潜在的に創作し得る数多くの技術が存在するが、数タイプの電流法が最適な方法であると推察される。酵素と組み合わせたグルコースセンサーで最も普遍的に用いられる化学反応は、グルコースオキシダーゼを触媒として大気中の酸素によって、グルコノラクトンと過酸化水素を生成するグルコースの触媒酸化である（式1）。



過剰の酸素存在下、この反応で生成した過酸化水素の測定は、グルコース濃度の直接測定となる。過酸化水素は、十分な正電位に保たれた電極（陽極）により再酸化されることによって測定される（式2）。



グルコース検出工程は、式2の過酸化水素から取り除かれた電子の測定による。電極は、一般に金や白金のような貴金属によって形成されている。

一般技術として、特異的な過酸化水素を生産するオキシダーゼ酵素が、例えば、コレステロール（コレステロールオキシダーゼ）、アミノ酸（アミノ酸オキシダーゼ）、アルコール（アルコールオキシダーゼ）、乳酸（乳酸オキシダーゼ）、ガラクトース（ガラクトースオキシダーゼ）のような基質に対するセンサーを作製するのに利用可能であることが良く知られている。実験室条件下では、このアプローチがグルコース測定に効果的に作動するが、埋め込み可能なグルコースセンサーに適用するには大きな障害がある。特に、グルコースは、生体流動物に極度に可溶であるのに対し、酸素は難溶であり、ヘモグロビンのような特殊な生体分子によって運搬しなければならない。その結果、人体の多くの組織の酸素濃度は、室素の約2～5%以下である。皮下や腹膜の流動物におけるグルコースと酸素の割合は、100対1である。これは、定量的にグルコースを酸化するグルコースオキシダーゼが測定のために必要とする酸素の僅か1%しかこれらの組織内に含有されていないことを意味している。

さらに、グルコースオキシダーゼを失活または阻害する工程や微小分子、過酸化水素を破

10

20

30

40

50

壊するカタラーゼのような酵素、酵素を消化する微生物、酵素的または電気化学的反応に干渉するアスコルベートのような可溶性化合物から、グルコースセンサーのグルコースオキシダーゼを保護しなければならない。この保護は、半透過膜によって生体流動物からグルコースオキシダーゼを隔離して行われる。グルコースを透過させつつカタラーゼのような蛋白質を選択的に排除可能な膜としては、透析膜と呼ばれるものが最も良く知られている。これらの膜は、一般に、約5000ダルトン以下の分子量の中性分子を容易に透過可能とする孔を備えた親水性膜である。これらの膜の一般的な例としては、スペクトラポアやキュブラファンのような様々な再生セルロース、ポリカーボネート、エステル化セルロース、ポリスルホンにより調製された膜が挙げられる。

あいにく半透過膜は、有害な蛋白質を好適に排除する一方、酸素をも排除してしまう。テフロン（パーフルオロカーボン樹脂）製やシリコンゴム製のいくつかの膜は、酸素を透過するが、グルコースをほとんど透過しない。そのため、グルコースセンサーの保護には利用することができない。Allenらの米国特許第5,322,063号公報には、酸素透過に好適でグルコース透過可能な新しいタイプのポリウレタン膜が報告されている。これは、溶液を人の組織に不適なグルコースと酸素の割合にすることが可能であるかもしれないが、これらの膜は、未だに広く試験されていない。

グルコースの大過剰と酸素不足により、埋め込まれたグルコースセンサーは、酸素に制限され、したがって、グルコースではなく酸素を効果的に測定することとなる。すなわち、グルコース濃度の低い理想条件下では、酸素が十分にあるのでグルコース濃度の増加に伴い過酸化水素、つまり電極で測定される電流の増加が生じる。しかしながら、グルコース濃度が増加するにつれ、酸素が不十分となり、測定された電流の停滞が生じ、グルコース濃度とは関係なくなる。この停滞以上では、測定された電流はグルコース濃度よりもむしろ酸素濃度の変化を反映する。

多くの研究者は、人の組織の酸素に対するグルコースの高い割合を考慮に入れていない。この問題を解決する方法は、少なくとも二通りある。一つは、グルコースセンサーに到達するグルコースの濃度を減少させることであり、もう一つは、グルコースセンサーで利用可能な酸素量を増加させることである。グルコースを阻む透過性のバリアを設けるか、またはグルコースを消費するグルコースオキシダーゼに加えてさらなる酵素システムを設けることにより、グルコースのレベルを減少することができる。上記ポリウレタン膜は、このアプローチの一例である。

したがって、低酸素環境下のグルコースレベルを正確に測定することができるグルコースセンサー、特に、埋め込み可能なグルコースセンサーが必要とされている。

発明の概要

本発明は、低酸素環境下、例えば、酸素濃度が化学量論以下である環境において、分析物レベルの測定が可能であるグルコースセンサーや他の酵素と組み合わせられたセンサーに用いられる膜を提供する。この膜は、繊維化したポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の半透過高分子網を備えた酵素含有膜であり、この網状組織には酵素が入り込んでいる。

本発明のグルコースセンサーは、最小の攪拌効果でグルコース輸送を減少することなく最大の酸素輸送を好適に行う外膜と、繊維化したポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の半透過網を備え、酵素が入り込んだ新規な酵素含有膜である内膜とを用いている。この内膜は、酸素がグルコース酸化反応で制限因子とならないようにグルコース酸化部位への酸素輸送を促進している。本発明の膜は、グルコースの検出に有用であることに加えて、酸素輸送の促進を必要とする酵素を組み合わせた分析に利用することができる。この膜は、促進された酸素輸送が必要である酵素リアクター（バイオリアクター）においても有用であろう。

本発明の他の態様は、グルコースレベルを測定するためにグルコースセンサーを患者の体内に埋め込む工程と、過酸化水素の酸化において測定電極に生成する電流を測定し、グルコースレベルを検出する工程とを具備する患者の体内のグルコースレベルを検出する方法であって、グルコースセンサーは、測定電極、参照電極、外膜・内膜を有する膜システム

10

20

30

40

50

を含み、内膜は、外膜と測定電極の間に配置され、繊維化されたポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の半透過高分子網を備えた酵素含有膜であり、網状組織は、酵素が入り込み、外膜は、内膜へのグルコースの流入を制限し、測定電極は、過酸化水素の酸化を可能としている。

簡単な図面の説明

図 1 は、本発明のグルコースセンサーの模式図の分解組立図である。

図 2 は、本発明の酵素含有膜の一部の模式的説明である。

図 3 は、本発明のグルコースセンサーを利用した埋め込み可能なグルコースセンサー装置の模式図の分解組立図である。

好適な実施例の詳細な説明

以下の記載は、当業者が本発明を製作または利用し得るように、また、彼の発明遂行のために本発明を熟考してベストモードを説明し得るように提供するものである。しかしながら、本発明の本質が、過酸化水素を検出することと、繊維化されたポリテトラフルオロエチレンおよびシリコン化合物の半透過高分子網であり、酵素が入り込んだ膜を備えた酵素含有膜を設けていることに基づいたグルコースセンサー、特に埋め込み可能なグルコースセンサーを提供するものであることが明確に定義されていることから、様々な変更は、当業者に容易に識別されるであろう。

グルコースセンサーは、患者の体組織内のグルコースレベルを測定するために利用される。本発明のグルコースセンサーは、外部からまたは埋め込み可能なセンサーとして内部から用いることができる。非常に低い酸素環境におけるグルコースレベルの正確な測定は、本発明のグルコースセンサーによって獲得することができる。血中グルコースレベルの正確な測定を行うためには、酸素ではなくグルコースが酸化反応の制限因子となるように、グルコース酸化部位での酸素濃度が同部位でのグルコース濃度と同等以上でなければならない。このグルコース酸化部位での化学量論的関係を達成、維持するには、グルコース濃度を制限し、グルコース酸化部位への酸素輸送を促進させなければならない。

図 1 に示すように、本発明によれば、10で示されたグルコースセンサーは、外膜12と酵素含有膜14を含む膜システムと、電極16とを備えている。酵素含有膜14は、外膜12と電極16の間に配置されている。

電極16は、過酸化水素を検出、測定可能な電極であれば、いずれのものでも良い。好ましくは、電極16は貴金属が良く、さらに好ましくは、プラチナ電極が良い。電極16の表面は、グルコースセンサーの有効性を最大限に引き出すために、電気活性が保持されていることが望ましい。さらに、電極16は、過酸化水素に対する感度が経時的に変化しないことが望ましい。

作用としては、まず、患者の体組織に含有されるグルコースと酸素がグルコースセンサー10の外膜12に接触する。外膜12は、酸素よりもグルコースを制限し、したがって、この外膜12を通過することによってグルコース濃度が減少される。外膜12の機能は、グルコースと酸素が外膜12を通過した後の酸素濃度をグルコース濃度と同等以上となるように、グルコースと酸素の濃度に作用する。この作用によって、外膜12は、グルコース酸化反応で要求される化学量論的関係を確立する。

酸素とグルコース間の化学量論的関係が外膜12によって確立された後に、この化学量論的関係は、グルコース酸化部位、すなわち酵素含有膜14中に含まれる酵素においても維持されなければならない。この酵素での化学量論的関係の維持は、半透過高分子網と酸素輸送促進効果によって容易に行われる。さらに、酵素含有膜14は、酵素へのグルコースの流通を制限せずにグルコースが膜中を通過するためのねじれた経路を有する。酸素の局在濃度を形成するような、この付加されたグルコースの制限的制御と促進された酵素への酸素輸送は、酵素での化学量論的関係の維持を確実にしている。したがって、特に酵素において、酵素での酸素濃度が同所でのグルコース濃度と同等以上となる。酵素での酸素とグルコース間の化学量論的関係の結果、酸素はグルコース酸化反応における制限因子として作用しない。それゆえ、グルコース酸化の間に生じる過酸化水素が、酵素で存在するグルコースに相当する。完全な回路を形成するように、陽極での過酸化水素の酸化に対応す

10

20

30

40

50

る電流を参照電極によって測定しなければならない。参照電極は、通常、銀または銀 / 銀塩化物の電極によって、体内の流動物と電氣的接触して設けられている。

外膜 12 は、適切な多孔材や透過材であれば、いずれのものでも構成することができるが、好ましくは、ポリカーボネートが良い。外膜 12 は、通膜する酸素の物質輸送率に干渉することなく通膜するグルコースの物質輸送率を減少させる。したがって、外膜 12 は、グルコースの制限的制御を提供する。また、外膜 12 は、カタラーゼ、過酸化水素を破壊する酵素、他の巨大分子が膜を通過するのを妨げる。外膜の孔径と厚さは、外膜を通過するグルコースの移動が酸素の移動に比べて十分に妨げられるように選択される。一般に、膜が厚いほど、孔径が小さいほど、グルコースの移動が妨げられる。埋め込み可能なグルコースセンサーにおいては、外膜 12 は適切な生体適合材で製造されなければならない。外膜 12 として有用で、市販されている膜の一例としては、カリフォルニア、リバーモアのポレティクス社製のポリカーボネート膜がある。この膜は、孔径 $0.01 \sim 0.1$ ミクロン、孔密度約 $4 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ の範囲のものが利用できる。

酵素含有膜 14 は、繊維化されたポリテトラフルオロエチレン (PTFE) およびシリコン化合物で作られた半透過高分子網で構成されている。この膜は、市販されており、この膜の製造方法は、米国特許第 4,945,125 号公報、米国特許第 4,832,009 号公報、Dillon, Silicone and Poly (tetrafluoroethylene) Interpenetrating Networks, 1994, p. 393 に具体的に記載されている。膜の厚さは、約 $5 \sim 50$ ミクロンの範囲とすることができる。膜には、一般に、体積比で約 $10 \sim 40\%$ のシリコン化合物やエラストマーが含有されている。酵素含有膜の多孔度は、約 $25 \sim 55\%$ である。ここで使用している半透過高分子網とは、Dillon による前記特許公報に記載された方法またはそれと機能的に同等の方法により調製された膜を意味する。米国特許第 4,945,125 号公報に記載された半透過高分子網の製造方法は、次の工程により構成されている。

(1) 大量の非焼結、非繊維化のポリテトラフルオロエチレン微粒子分散樹脂 (デュボン社製の商品名: TEFLOON 6、6C、インペリアル化学工業社製の商品名: FLUON CD1、CD123、CD525) と、少量の (A) 炭化水素溶液および (B) アルケニル不飽和を有するポリジオルガノシロキサン、オルガノハイドロジェンポリシロキサン架橋剤、ポリシロキサンの架橋促進剤、触媒反応阻害剤を実質的に含有する付加硬化可能なシリコン組成物とを混合する。

(2) 混合物を押し出し可能な形に固める。

(3) ランダムに繊維化された構造を有する押し出し成形物を成形型から 2 軸性に押し出す。

(4) 炭化水素溶液を蒸発させ、繊維化成形構造を備えた硬化シリコンエラストマーおよびポリテトラフルオロエチレン半透過高分子網を生成するように触媒を活性化する。米国特許第 4,832,009 号公報に記載の他の半透過高分子網製造方法は、次の工程で構成されている。

(1) ポリオルガノシロキサン (ダウコーニングケミカル社製、商品名: SILASTIC MDX 4-4210) とポリシロキサンの架橋促進触媒を 10:1 の割合で混合する。

(2) 混合物にケロセン (フィッシャー科学製) を混合する。

(3) 伸延されたポリテトラフルオロエチレンフィルム (ペンシルバニア、フェスタービルのテトラテック社製) の基材に、混合物をスプレー装置によって塗工する。

半透過高分子網のシリコン化合物は、架橋されたポリオルガノシロキサンが好ましく、さらに好ましくはポリジメチルシロキサンが良い。シリコン化合物は、グルコース酸化部位への酸素輸送を容易にする。繊維化された PTFE の半透過高分子網は、多孔性膜を具備している。膜の多孔度は、膜中に酵素を 入り込ませ、図 1 の酵素含有膜 14 の、図 2 の模式図により説明される部分を形成可能にしている。図 2 に示すように、17 で示された半透過網は、酵素 21 を染み込まされた節 15 と微細繊維 19 の網である。酸素との非常に高い親和力を有するこの半透過膜を利用することによって、グルコース酸化部位であ

る酵素への酸素輸送により酵素での酸素濃度をグルコース濃度と同等以上に増加させている。膜厚さをより減少させることが、検出速度と反応速度を改善する。本発明に利用することができる市販品の一例としては、バイオメド科学社製の商品名：White Silon #320がある。

半透過網への酵素の入り込みを容易にするためには、半透過高分子膜を界面活性剤と共に取り扱う必要がある。界面活性剤は、膜を親水性にさせる。この界面活性剤は、非イオン性界面活性剤が好ましく、さらに好ましくは末端をメチル化されたポリ（ジメチルシロキサン - b - エチレンオキシド）が良い。しかしながら、他の界面活性剤も使用でき、特に、半シリコーン化、半親水化した界面活性剤を使うことが可能であると期待される。

酵素は、グルコースセンサーの効果を最大限に引き出すために、カタラーゼ活性が無く、比較的長寿命を有し、非常に活性化され、高純度であることが望ましい。酵素は、オキシダーゼが好ましく、より好ましくはグルコースオキシダーゼ（E.C. 1.1.3.4）が良い。他の有用な酵素としては、すでに述べた。また、本発明の範囲以内であれば、複数の酵素を組み合わせたさらに複雑なシステムを用いても良い。例えば、まず、中間体を生成するために第1酵素を分析物と反応させ、次いで、電極で検出される化学種を生成するために第2酵素をこの中間体と反応させるような酵素システムが知られている。

バリアを通過する酸素拡散速度は、バリアの厚さと、バリアの単位厚さに溶解する酸素量とによって制御される。つまり、例えば分析物がより近接するようにバリアをより薄くするか、またはバリアに溶解する酸素をより多くすることによって、酸素拡散率を増大させる。したがって、酵素含有膜14は、グルコースセンサー10への酸素移動率を最大にするために、実行し得る限り薄くすべきである。

この酵素は、多くの技法を用いて透過網に固定することができる。後述するように、この酵素を他の蛋白質と混合し、酵素ゲルを形成するように架橋させることが好ましい。しかしながら、他の固定法においても有用であろう。例えば、シリコーン化合物は、酵素が共有結合で透過網に連結されよう機能することができる。また、この酵素は、高分子、フィルム形成体、バインダーのようなマトリックス形成体に混ぜ合わせることもできる。

本発明の一態様において、酵素含有膜は、0.20Mの酢酸ナトリウム緩衝液（pH = 5.00）のような適切な緩衝液に溶解した、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、ヒトアルブミン等のアルブミンやゼラチンのようなキャリア蛋白質溶液中に酵素を溶解して調製することができる。その酵素濃度は、酵素活性に依存して変化する。グルコースオキシダーゼは、約5 ~ 50重量%で混合物中に溶解される。選択した複数の酵素量は、個々の酵素活性に基づいて経験的に測定することができる。酵素混合物は、膜上に穏やかに広げることにより、または先の丸いへらでこすりつけることによって、半透過網に塗布されて入り込む。酵素が架橋するように塗布された後、半透過膜にグルタルアルデヒド / 酢酸緩衝液が塗布される。

安定化ゲルが架橋蛋白質ゲルに基づいたものであるならば、選択した方法は、半透過膜への酵素の入り込みに有用であろう。この方法においては、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、ヒトアルブミン等のアルブミンやゼラチンのような適切な可溶性キャリア蛋白質が、0.20Mの酢酸ナトリウム緩衝液のような適切な緩衝液に最終濃度約1 ~ 15重量%で溶解され、グルコースオキシダーゼのような酵素が、混合物に最終濃度約1 ~ 5重量%で溶解される。十分に精製されたグルタルアルデヒドの2.5%水溶液は、正確な最終濃度に蛋白質溶液を希釈するために加えられる。希釈後の最終グルタルアルデヒド濃度は、0.1 ~ 1%の範囲が好ましく、より好ましくは約0.6%が良い。この混合物を手短にかき混ぜ、ガラスプレート上に支持された膜上に移し、ガラス棒で広げる。これにより、数時間以内に、酵素ゲルの均一な層が形成される。また、ゲルの脱水を防ぐために、このゲルは、加湿雰囲気下で保存する。

本発明のグルコースセンサー内の新規な酵素含有膜の具体化は、2%という極めて低い酸素環境において正確にグルコースレベルを測定するグルコースセンサーを提供する。また、酵素含有膜は、少なくとも2.5ヶ月間、反応の低下を示さない。実際、酵素含有膜の性能は、年々改良されている。

10

20

30

40

50

本発明のグルコースセンサーは、測定のためにグルコース含有溶液のような水性流動物と接触した測定電極、好ましくは白金電極を備えている。電圧源は、測定電極を適切な電位（ここでは、過酸化水素の酸化のための正電位）に保持する。参照電極も、グルコース溶液と接触している。測定電極で過酸化水素から取り除かれた電子は、水溶液に戻されることによって回路を完全なものとするように、伝導体を通して参照電極に流れる。電子は、導電体を通過する時に、電流計で計測され、これにより、過酸化水素を定量できる。

溶液との全ての電氣的接触が二つの電極によらなければならないのは明らかなことである。もし、他の導電的経路があれば、漏電が偽の電流を発生させ、不適当な測定となる。電極が単純に水溶液に浸されている場合には、回路の残部を空気が絶縁し漏電を防ぐ。埋め込まれた装置においては、漏電のおそれが非常に大きくなる。下記に詳述するように、本発明では、電氣的構成要素は、全て小さな埋め込み可能な容器に密閉されている。この場合、漏電を防ぎ、電子部品の水による損傷を防止するために、水に対する完全な密閉が無条件に必須である。

埋め込まれた電極によるさらなる問題は、参照電極を通る大電流が、銀電極に損害を与える電気化学的副反応を度々引き起こし、装置周辺の生体組織に有害となるおそれがあることである。この問題の解決には、第3のまたは補助的な電極の使用が考えられる。通常、水溶液に電流の大部分を戻す際に、大面積を有した非反応材により製造される第3のまたは補助的な電極が、参照電極の代わりに用いられる。参照電極は、絶えず水溶液に接触しつつも、補助的電極が参照電極の代りに作用するように、ポテンショスタットが溶液に対するこの電極の電位を感知し、この電位で補助的電極を固定する。この配置で参照電流を通過する電流が極めて小さいために、参照電極や周囲の生体組織を害する副反応は生じない。

患者のグルコースレベルは、患者の体内に設置する本発明のグルコースセンサーを用い、測定電極の反応からグルコースレベルを計算することによって、測定することができる。外部での使用としては、患者の血液試料のグルコースレベルを、本発明のグルコースセンサーを使用し、測定電極の反応からグルコースレベルを計算することによって測定することができる。

図3に示すように、18で示された本発明による埋め込み可能なセンサー装置は、様々な形状が可能であるが、中でもディスク状の形態が好ましい。この装置は、図1に示すように、開口20とグルコースセンサー10から構成される。装置18は、開口20とグルコースセンサー10を筋肉の下層に向けて、皮膚表面下に埋め込まれる。この位置では、修理や交換のためのユニットへの接近が容易にできる。また、装置18は、開口20とグルコースセンサー10が腹膜の腔に向くように埋め込むこともできる。凝血形成が作用に干渉しないように、装置18が循環系と直接に接触しないことが比較的重要である。抗凝血剤が、凝血形成を妨げるために使用されている。しかしながら、様々な要因から患者が抗凝血療法を必要とするまでは、埋め込み可能なグルコースセンサー装置に対する抗凝血の要求に慎重でない。全ての体組織のグルコースは、相当迅速に血中のグルコースと均衡をとるので、装置18の配置が血液との接触を必要としない。

さらに、装置18は、例えば、回路基板24のような装置18の電子部品を収容する形状の22で示されたハウジングを備えている。ハウジング22は、Oリングを介してハウジング22内に電子部品を密閉する蓋26を具備している。さらに、ハウジング22には、30で示された参照電極を収容し固定するための第2開口28が設けられている。

装置18は、示していないが、リチウム電池のような小型の電気供給装置や、体外の受信機に測定信号を送信する微小電子部品をも備えている。データ送信は、ラジオ波、音波を介して、あるいは調整光をも介して行うことができる。実際に細い電線で装置18を連結することも可能であるが、電線が皮膚を突き抜ける部分で感染の問題が生じることから好ましくない。適切な電子部品は、当業者に良く知られており、ここではさらに記載しない。

連続的に埋め込み可能なセンサーは、長期間にわたって正確な測定をしなければならず、また、例えば体内への埋め込み物に対する拒絶作用を誘発しないような生体的な適合が必

10

20

30

40

50

要とされる。一般に、生体適合は、センサー装置のハウジングにとって、それほど重要な問題ではない。生体適合材で作られた埋め込み物は、通常、繊維芽細胞の層に包まれるようになり、一般に拒絶の事例はない。既知の多くの生体適合材は、埋め込み可能な装置の製造に好適である。例えば、チタンで作られた小さな埋め込み物は、容易に仕上げられ、上手く体内に受け入れられる。テフロンのようなプラスチック材の広範囲のものも生体適合材である。経験上、405ステンレス鋼のような容易に加工可能な材質としては、チタンが好ましく、これは良好な耐性をも有している。本発明の埋め込み可能な装置を入れるハウジングの材質として、チタンを用いると特に有効であることが分かっている。参照電極に対する補助的電極の電位が一定に維持されるように、ケース内の電子部品に接続された検出システムの補助的なまたは第3の電極として、このチタン表面を使用することができ

10

る。電位の漏電問題は、測定電極と参照電位が補助的電極として作用するチタンケースから電氣的に隔離されない限り、チタンで包まれた装置にも存在する。高真空塗工として独創的に開発されたガラスフィードスルー法によるプラチナが、この目的に利用することができる。簡単に言うと、プラチナとほぼ同等の膨張係数を有する特種ガラスが、アルベロックス社から入手可能である。プラチナワイヤは、そのようなガラスピースを貫通し、そのピースは、防水・防ガスのようにプラチナ上に溶融させても良い。そのような絶縁ピースは、例えばレーザー溶接を用いて、チタンケースに開けた孔に入れることができる。

20

埋め込み可能なグルコースセンサーの多くの研究者らは、センサー校正の重要性を認識していないのかもしれない。酵素混合物と測定電極の両方が、経時的に変化する。センサー周囲の微小循環も変化するであろうし、効果的な酸素濃度も変化するであろう。酵素混合物と測定電極との反応が酸素濃度勾配と全く同様でない限り、グルコース測定の正確性が著しく変化するであろう。実験室器機は、特性の既知である分析物を用い、既知分析物と一致するように機器の出力を調整することによって校正される。あいにく、埋め込まれたセンサーを既知濃度のグルコースに曝すことは、容易なことではない。

埋め込まれたセンサーは、血液と同等の体内成分を測定していることを考慮すれば、血中グルコース測定を校正に利用できる。患者が一連の血中グルコース測定に通常以上の時間をかけて行うならば、これらは、一定の応答時間が判るように、センサー出力に対してプロットすることができる。その後、埋め込まれたセンサーを自動的に校正し、調整するために、血中グルコース測定を利用することができる。

30

本発明の装置は、凝血問題を避けるために血液循環から離れた部位に好適に埋め込んだ場合でさえも、白血球が異物の周囲に集まるように循環系から移動してくる。この白血球の集積は、膜に損傷を与え、グルコース測定の正確性を低下させるであろう。しかしながら、この問題は、酵素混合物に効果的な量の抗炎症剤や抗白血球化合物を混合することにより大幅に回避することができる。一例としては、ヒドロコルチゾンや、コルチゾン、プレドニソロンのようなコルチコステロイド類を約0.1~1.0重量%添加する。これらのステロイドは、酵素混合物の水相に分散することができ、外膜12に次第に溶解し、非常にゆっくりと外膜12の外へ拡散して、周辺領域での白血球の攻撃を防ぐ。

40

長期間のセンサーの埋め込みによる他の重大な障害は、バクテリア、菌類等による微生物汚染である。微生物は、グルコース代謝酵素を直接破壊し、または、電極表面での反応前に過酸化水素を消費してしまうカタラーゼやパーオキシダーゼを生産することによりグルコース測定を混乱させてしまう。しかしながら、この微生物の妨害は、酵素混合物への抗菌剤や幅広い抗生物質の混合によって、大幅に防ぐことができる。例えば、約0.1~0.8重量%のゲンタマイシンおよび/またはペニシリン、および/または他の幅広い抗生物質を、微生物の妨害を防止するために酵素混合物に混合することができる。

外膜12は、一般に様々なプロテアーゼからグルコースオキシダーゼを保護すると思われる。しかしながら、本発明を導く実験において、安定化したグルコースオキシダーゼ

50

は、一般的な蛋白質分解酵素トリプシンによって容易に攻撃されないことが発見された。したがって、微生物等によって生産される他の蛋白質分解酵素を破壊するために、トリプシンを抗蛋白質分解酵素として外膜に混合しても良い。

本発明の酵素混合物の安定性は、抗酸化物質および/またはフリーラジカル捕獲剤の添加によっても、改良することができる。様々なパラベン類、BHT（ブチル化ヒドロキシトルエン）、それらのアナログ、および/またはスーパーオキシドジスムターゼのような多くの防腐剤と同様に、酸素溶剤でもあるビタミンEを酵素混合物に混合することができる。

本発明の他の態様においては、例えば、酵素含有膜を外膜と第3膜の間に挟むように、第3膜が酵素含有膜と電極の間に配置される。第3膜の機能は、分析に干渉するアスコルビン酸やアセトアミノフェンのような化合物を排除するためにある。この第3膜には、酢酸セルロース膜を用いることができる。Newmanによる米国特許第3,979,274号公報、米国特許第4,073,713号公報を参照のこと。

当業者は、ここに記載した好適な態様の様々な適用や改良が本発明の範囲や趣旨から逸脱しない範囲において可能であることを理解するであろう。したがって、本発明は、添付された特許請求の範囲内であれば、本明細書に記載したこと以上に実行しても良い。

実施例 1

酵素含有膜の調製

White Silon #320（バイオメド科学社製）としても知られている市販のポリテトラフルオロエチレンおよびポリジメチルシロキサンの半透過高分子網を、2"×3"のストリップ膜として剥離ライナーからはずし、脱イオン水とエタノールで洗浄した。これらの膜は、酵素研究に使用されるまで、滅菌した70%エタノール/脱イオン水のボトル中に保存した。

この膜を保存ボトルから移し、4"×4"のガラスプレート上に載置した。この膜のストリップをガラスプレート上に広げ、水気を取った。次いで、約10～20滴の非イオン性界面活性剤（ジメチルシロキサン-エタンオキサイド共重合体、20c.s.、ユナイテッド化学技術社製）をストリップ膜上に滴下させ、この界面活性剤をなめらかで、先の丸いへらで膜構造に塗り込んだ。膜の外観は、本来の乳白光とは異なった半透明に変化した。ストリップ膜を容器内に配置し、この容器内に非イオン性界面活性剤の5%水溶液を注ぎ入れ、少なくとも24時間、膜を浸漬した。膜を浸漬溶液から取り出し、膜が滑らなくなるまで、脱イオン水で洗浄した。膜を再びガラスプレート上に載置し、水気を取り、実験室環境下において乾燥させた。

膜に入り込ませる酵素ゲル溶液は、グルコースオキシダーゼ（*Aspergillus Niger*由来タイプVII、EC 1.1.3.4、シグマ化学社製）とウシ血清アルブミン（フラクシオンV粉末、シグマ化学社製）とから構成させた。約0.10gのグルコースオキシダーゼと0.40gのウシ血清アルブミンを、0.20Mの酢酸ナトリウム（pH=5.00、シグマ化学社製）緩衝液7.5mLに、両者とも溶解するまで混合した。分液ビン中で、25%グルタルアルデヒド（グレード1、シグマ化学社製）溶液1.0mLを酢酸緩衝液（pH=5.00）9.0mLと混合し、2.5%グルタルアルデヒド/酢酸緩衝液を調製した。後に修飾したWhite Silon #320膜の孔内で酵素ゲルを架橋するために用いる分として、この2.5%グルタルアルデヒド/酢酸緩衝液の2.5mLを取り分けて保存した。グルコースオキシダーゼ/ウシ血清アルブミン溶液の約2.5mLをピペットにより修飾されたWhite Silon #320膜（ガラスプレート上の2"×3"のストリップ膜の1枚）上に滴下させた。この溶液を膜に入り込ませ、膜に先のなめらかなへらを穏やかに擦り付けることにより、膜中へ溶液を均一に分散させた。グルコースオキシダーゼ/ウシ血清アルブミン（GOD/BSA）を約30分乾燥した後に、膜の視覚的判断を行った。GOD/BSA溶液が膜の孔に入り込み、孔内に一様に分散している場合には、膜は半透明な黄色に見える。空白や入り込み不足がある場合には、膜中に黄色にならないまだらが生じる。この視覚的検査の後、2.5%のグルタルアルデヒド/酢酸緩衝液の約0.8mLを膜に滴下させ、架橋と固定化試薬：グルタルアルデヒドの分布を均一にするために、この溶液を膜全体

10

20

30

40

50

に広げた。G O D / B S A を 入り込ませた White Silon #320膜を支持するガラスプレート
を、開口ピン内の少量の 2 . 5 % グルタルアルデヒド溶液と共にプラスチックジップロッ
クバッグ (グラッド製) 内に移し、プラスチックバッグを密閉して 1 6 時間放置した。十
分に架橋され、固定した酵素ゲル膜をプラスチックバッグから取り出し、綿ガーゼに 入り
込ませた ゴモリ緩衝液を含む他のバッグに移し替え、バッグの上部のチャックを閉めた。
緩衝液を 入り込ませた ガーゼによって、閉じたプラスチックバッグ内における酵素ゲル膜
の湿度を維持させ、閉じたバッグに適切な日付と実験記録を記入して、冷蔵庫で保存した
。

上記のように調製した膜は、湿っていれば、非常に弾性的で、柔軟であった。膜が乾きき
っている場合、非常に明るい色になる。しかしながら、水 (緩衝液) を加えれば、膜は再
び弾性的になる。この乾燥と再水和のサイクルは、酵素活性に失活が示されないことから
、完全に可逆的と考えられる。この酵素含有膜の物理的特性の低下も観測されない。上記
工程により作製された膜の厚さは、約 5 0 ~ 6 5 ミクロンの範囲であった。

10

実施例 2

グルコースセンサーの調製

本発明によるグルコースセンサーは、上記実施例 1 で調製した酵素含有膜の小ディスク (
1 6 針、約 0 . 1 m m) を打ち抜くことによって調製された。このディスクをゴモリ緩
衝液 1 m L と共に小ピンに入れた。溶剤 (メチレンクロライド) によって、ポリカーボネ
ートで作られた外膜を電極のカラーに接着した。外膜を底にするようにしてこの組立部品
を乾燥させた。約 3 0 分後、ゴモリ緩衝液の小滴を電極のカラーのくぼみに滴らせた。酵
素含有膜の小ディスクは、くぼみに配置され、くぼみの底に沈められた。この作業は、忍
耐を要する。つまり、酵素含有膜のディスクは、電極のカラーのくぼみ内で緩衝液の滴の
メニスカスの下に押し付けられる必要があるからである。プラチナ / セラミック電極をチ
タン電極ポートに接着した。この組立部品をくぼみの頂部に配置し、プラチナ / セラミッ
ク電極を電極のカラーに押し込んだ。プラチナ / セラミック電極は、チタン電極ポートの
頂部と同じ高さに設置されるまで、電極のカラーに押し込む。酵素含有膜ディスクは、黄
色いディスクとして外膜の下で明確に確認された。

20

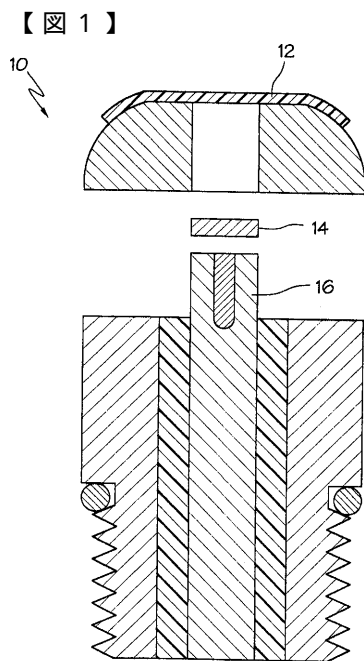


FIG. 1

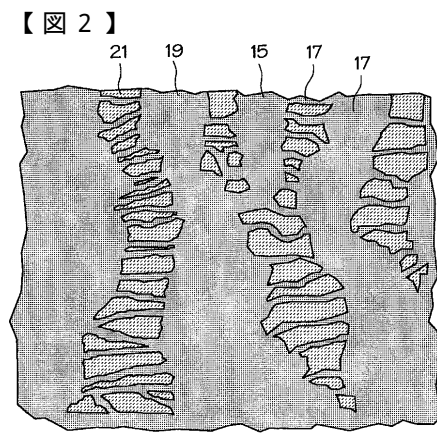


FIG. 2

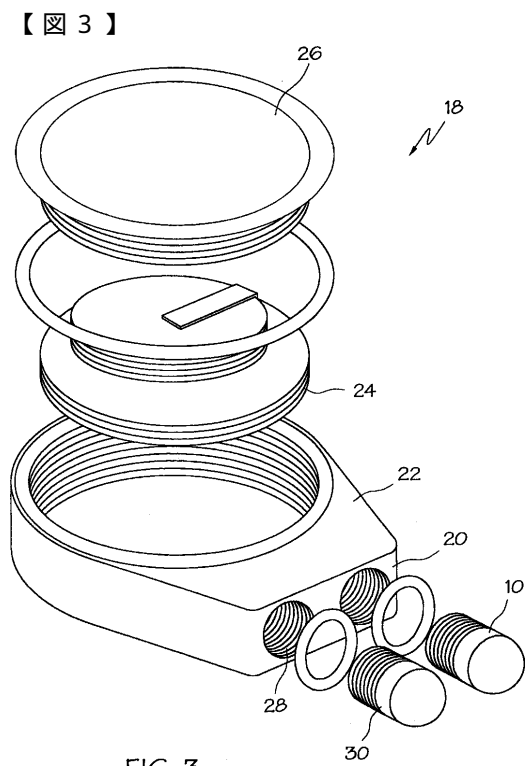


FIG. 3

フロントページの続き

(72)発明者 ブルンスマン, アラン, アール
アメリカ合衆国 オハイオ 45387, イエロー スプリングス, オートン ロード 300

審査官 郡山 順

(56)参考文献 特開平08-304329(JP, A)
William H. Mullen, Fiona H. Keedy & Sephen J. Churchouse, Glucose enzyme electrode with extended linearity, Analytica Chimica Acta, 1986年, vol.183, 59-66

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/414

G01N 27/327

G01N 27/333

G01N 27/416