

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4646475号
(P4646475)

(45) 発行日 平成23年3月9日(2011.3.9)

(24) 登録日 平成22年12月17日(2010.12.17)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 27/327	(2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 3 B	
C 1 2 Q 1/00	(2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 3 R	
GO 1 N 33/92	(2006.01)	C 1 2 Q 1/00	C	
		GO 1 N 33/92	B	

請求項の数 5 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2001-540360 (P2001-540360)	(73) 特許権者	000005821
(86) (22) 出願日	平成12年11月16日(2000.11.16)		パナソニック株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/008100		大阪府門真市大字門真1006番地
(87) 国際公開番号	W02001/038862	(74) 代理人	100072431
(87) 国際公開日	平成13年5月31日(2001.5.31)		弁理士 石井 和郎
審査請求日	平成19年10月31日(2007.10.31)	(72) 発明者	渡邊 基一
(31) 優先権主張番号	特願平11-331219		大阪府交野市天野が原4-28-402
(32) 優先日	平成11年11月22日(1999.11.22)	(72) 発明者	湯川 系子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		奈良県奈良市学園大和町6丁目708-1 -513
		(72) 発明者	南海 史朗
			大阪府枚方市茄子作4-50-12
		審査官	河野 隆一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コレステロールセンサおよびコレステロールの定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

絶縁性の基板、前記基板上に形成された少なくとも作用極と対極を含む電極系、前記電極系を含む前記基板上に形成された酵素層、および前記電極系への試料液供給経路において前記酵素層より上流側に形成された試薬層を具備し、前記酵素層は少なくとも酸化還元酵素および電子伝達体を含み、かつ前記試薬層は、低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白と結合して水溶性の複合体を形成する試薬を含むことを特徴とする低密度リポ蛋白中のコレステロールを定量するためのコレステロールセンサ。

【請求項2】

前記試薬層が、 - シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオン、およびポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテルを含む請求項1記載のコレステロールセンサ。

【請求項3】

前記試薬層が、両性界面活性剤およびカルボキシル基またはスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を含む請求項1記載のコレステロールセンサ。

【請求項4】

前記試薬層が、ポリカチオンを含む請求項1記載のコレステロールセンサ。

【請求項5】

(a) 被検試料を下記(i)、(ii)および(iii)からなる群より選択されるいずれかの試薬または試薬群と反応させる工程、

(i) - シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオン、およびポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテル、

(i i) 両性界面活性剤およびカルボキシル基またはスルホン酸基を有する脂肪族アミン類、

(i i i) ポリカチオン、

(b) 次いで、前記被検試料をコレステロールと特異的に反応する酸化還元酵素および電子伝達体と反応させる工程、および

(c) 前記工程 (b) によって還元された前記電子伝達体を電気化学的に酸化して酸化電流値を得る工程

を有する低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法。

10

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

技術分野

本発明は、血液、血清、血漿などの被検試料中の低密度リポ蛋白に含まれるコレステロールを定量するセンサおよび方法に関するものである。

【 0 0 0 2 】

背景技術

近年、高コレステロール血症の診断を行う際に、低密度リポ蛋白中コレステロールの濃度が重要視されている。

従来、この種の低密度リポ蛋白中コレステロールの定量方法は、超遠心法を用いた分画操作によって行われていた。しかし、この方法では、特殊な装置を必要とし、さらに測定に長時間を要するという問題がある。

20

【 0 0 0 3 】

超遠心を行わない定量方法としては、被検試料中の全コレステロール、高密度リポ蛋白中のコレステロール、およびトリグリセリドの濃度をそれぞれ求め、Friedewaldの式から低密度リポ蛋白中のコレステロールの濃度を算出する方法が一般的である。しかし、この方法では、トリグリセリド値が高い被検試料を用いた場合、再現性および正確性の点で信頼性が低いという問題がある。

さらに近年、トリグリセリド値を必要としない、低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法が提案されている。

30

【 0 0 0 4 】

その第一は、 - シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオン、およびポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテル存在下において、低密度リポ蛋白中のコレステロールのみを酵素によって酸化し、色素の発色度合いから低密度リポ蛋白中のコレステロール濃度を定量するものである (Clinical Chemistry第4巻 (1998年) 第522頁参照)。この方法は、 - シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、およびマグネシウムイオンによって、被検試料中のカイロミクロン中のコレステロール、および超低密度リポ蛋白中のコレステロールに対する酵素の反応性を減少させ、さらに、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテルによって、被検試料中の高密度リポ蛋白中のコレステロールに対する酵素の反応性を減少させる。

40

【 0 0 0 5 】

第二は、両性界面活性剤およびカルボキシル基またはスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下において、低密度リポ蛋白中のコレステロールのみを酵素によって酸化し、色素の発色度合いから低密度リポ蛋白中のコレステロール濃度を定量するものである (特開平10-84997号公報参照)。この方法は、両性界面活性剤存在下において、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるコレステロールに対する酵素の反応性を減少させる。

【 0 0 0 6 】

第三は、被検試料をポリカチオンにより処理することによって、低密度リポ蛋白中のコレステロールのみを酵素によって酸化し、色素の発色度合いから低密度リポ蛋白中のコレス

50

テロール濃度を定量するものである（米国特許第4,185,963号参照）。

【0007】

第四は、高密度リポ蛋白を多孔性のシリカによって吸着し、さらに、ポリアニオン/二価カチオンによって、カイロミクロンおよび超低密度リポ蛋白と不溶性の複合体を形成させ、この複合体を沈殿として溶液中から除去した後、低密度リポ蛋白中のコレステロールのみを酵素によって酸化し、色素の発色度合いから低密度リポ蛋白中のコレステロール濃度を定量するものである（米国特許第5,401,466号参照）。

【0008】

上記第一から第四の方法により、トリグリセリド値が高い被検試料を用いた場合においても、再現性および正確性良く測定することができる。

10

しかし、上記の第一から第四の方法は、いずれも色素の発色度合いからコレステロール値を定量するため、初めから着色している血液が被検試料である場合、定量が不可能である。また、再現性および正確性良く測定するためには、被検試料に対して、酵素を含まない第一試薬と、酵素を含む第二試薬をそれぞれ用意し、まず被検試料に第一試薬を添加し十分に反応が進行した後、第二試薬を添加しなければならず、操作が煩雑であるという問題がある。

【0009】

発明の開示

本発明は、前記従来の問題に鑑みてなされたものであり、その目的は、血液が被検試料である場合にも測定が可能であり、2種類以上の試薬類をそれぞれ別々のタイミングで被検試料に添加することをせず、被検試料を一度供給するだけで、低密度リポ蛋白中のコレステロールを再現性よく、正確に定量することができるセンサを提供することである。

20

【0010】

本発明は、そのような低密度リポ蛋白中のコレステロールを定量する方法を提供することを目的とする。

本発明は、絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を含む電極系、前記電極系を含む前記基板上に形成された酵素層、および前記電極系への試料液供給経路において前記酵素層より上流側に形成された試薬層を具備し、前記酵素層は少なくとも酸化還元酵素および電子伝達体を含み、かつ前記試薬層は、低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白と結合して水溶性の複合体を形成する試薬を含む、低密度リポ蛋白中のコレステロールを定量するためのコレステロールセンサに関する。

30

【0012】

本発明は、(a)被検試料を下記(i)、(ii)および(iii)からなる群より選択されるいずれかの試薬または試薬群と反応させる工程、

(i) - シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオン、およびポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテル、

(ii) 両性界面活性剤およびカルボキシル基またはスルホン酸基を有する脂肪族アミン類、

(iii) ポリカチオン、

(b) 次いで、前記被検試料をコレステロールと特異的に反応する酸化還元酵素および電子伝達体と反応させる工程、および

40

(c) 前記工程(b)によって還元された前記電子伝達体を電気化学的に酸化して酸化電流値を得る工程

を有する低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法を提供する。

【0014】

発明を実施するための最良の形態

本発明による低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法は、

(a) 被検試料を特定の試薬と反応させる工程、

(b) 次いで、前記被検試料をコレステロールと特異的に反応する酸化還元酵素および電子伝達体と反応させる工程、および

50

(c) 前記工程 (b) によって還元された前記電子伝達体を電気化学的に酸化して酸化電流値を得る工程

を有し、前記酸化電流値からコレステロールを定量する。

【0015】

まず、工程 (a) について説明する。工程 (a) においては、被検試料中に含まれるリポ蛋白のうち、低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白を特定試薬と反応させることにより、低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白中のコレステロールが酵素との反応に関与することを抑制する。ここでいう被検試料とは、広く高密度リポ蛋白、低密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白およびカイロミクロンを含みうるもので、例えば血液、血清、血漿などをいう。

【0016】

本発明は、吸光度によらず電気化学的な手法によってコレステロールを測定するから、被検試料が血液や、濁りのある血清または血漿でも、低密度リポ蛋白中のコレステロールを定量することができる。

【0017】

上記の工程 (a) は、被検試料中に含まれる低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白と特定の試薬を結合させて水溶性の複合体を形成させ、低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白中のコレステロールと酵素との反応性を低下させる工程 (a-1)、または被検試料中に含まれる低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白を特定の試薬に吸着および/または凝集させることにより除去する工程 (a-2) である。

【0018】

まず、工程 (a-1) について説明する。

この工程においては、下記 (i)、(ii) および (iii) からなる群より選択されるいずれかの試薬または試薬群を用いる。

【0019】

(i) シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオン、およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテル、

(ii) 両性界面活性剤およびカルボキシル基またはスルホン酸基を有する脂肪族アミン類、

(iii) ポリカチオン。

【0020】

試薬として、ポリカチオンを用いる場合、弱イオン交換体の存在下において、被検試料とポリカチオンを反応させることが好ましい。弱イオン交換体が存在すると、これが試料中の中性脂質を吸着するので、中性脂質が電極表面に吸着して電極反応を阻害するのを抑制することができる。

【0021】

ここで、両性界面活性剤としては、ラウリルベタイン、ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン、ラウリン酸アミドプロピルベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-アルキル-N-カルボキシエチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインなどが用いられる。

【0022】

カルボキシル基またはスルホン酸基を含む脂肪族アミン類としては、アラニン、グルタミン、グルタミン酸、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸、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、2-モルホリノエタンスルホン酸、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸、3-{N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ}-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、3-{4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル}プロパンスルホン酸、2-ヒドロキシ-3-{4-(2-ヒドロ

10

20

30

40

50

キシエチル) - 1 - ピペラジニル}プロパンスルホン酸、3 - モルホリノプロパンスルホン酸、2 - ヒドロキシ - 3 - モルホリノプロパンスルホン酸、ピペラジン - 1, 4 - ビス(2 - ヒドロキシ - 3 - プロパンスルホン酸)、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、2 - ヒドロキシ - 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、N - (2 - アセトアミド)イミノ二酢酸、N, N - ビス(2 - ヒドロキシエチル)グリシン、N - {トリス(ヒドロキシメチル)メチル}グリシンなどが用いられる。

【0023】

前記ポリカチオンは、反応性の調節が容易であることから、アシル化またはアルキル化ポリカチオンであることが好ましい。

工程(a - 1)において、被検試料中に含まれる低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白が試薬と結合して水溶性の複合体を形成することにより、低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白中のコレステロールと酸化還元酵素との反応性が低下する。このため、次の工程(b)において、酸化還元酵素との反応に關与するコレステロールを、低密度リポ蛋白中コレステロールのみとすることができる。

【0024】

次に、工程(a - 2)について説明する。

工程(a - 2)においては、被検試料中に含まれる低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白を試薬に吸着させる、および/または試薬を用いて凝集させることにより、除去する。

【0025】

この工程においては、試薬として、高密度リポ蛋白に対する抗体またはシリカと、ポリアニオンと、二価カチオンとを用いる。高密度リポ蛋白には、アポ蛋白質であるApo A-IおよびApo A-IIが特有に含まれるので、高密度リポ蛋白に対する抗体として、Apo A-IまたはApo A-IIに対する抗体があげられる。この場合、高密度リポ蛋白に対する抗体により、被検試料中の高密度リポ蛋白が凝集する。一方、ポリアニオンおよび二価カチオンの作用により、被検試料中の超低密度リポ蛋白およびカイロミクロンが凝集する。このようにして、被検試料から高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白およびカイロミクロンを分離・除去することができる。

また、高密度リポ蛋白を除くための試薬として、シリカを用いる場合は、被検試料中の高密度リポ蛋白がシリカに吸着して分離・除去される。

【0026】

工程(a - 2)において、凝集した高密度リポ蛋白、超低密度リポ蛋白およびカイロミクロンを被検試料から分離・除去するには、フィルター等の濾過手段を用いるのがよい。ここに用いるポリアニオンは、酵素反応を阻害しないという観点から、デキストラン硫酸、ヘパリン、ホスホタングステン酸、ポリビニル硫酸のいずれかであることが好ましい。

【0027】

また、前記二価カチオンは、酵素反応を阻害しないという観点から、カルシウムイオン、マンガンイオン、マグネシウムイオンのいずれかであることが好ましい。

工程(a - 2)において、被検試料中に含まれる低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白が試薬に吸着し、および/または凝集することにより除去されるため、次の工程(b)において酵素との反応に關与するコレステロールを、低密度リポ蛋白中のコレステロールのみとすることができる。

【0028】

次に、工程(b)について説明する。

工程(b)においては、被検試料中の低密度リポ蛋白のみに含まれるコレステロールが、コレステロールと特異的に反応する酸化還元酵素により酸化され、これに伴い電子伝達体は還元される。

【0029】

ここで用いる酸化還元酵素および電子伝達体は、コレステロールの電気化学的な定量法に用いられている従来公知のものが用いられる。

10

20

30

40

50

次に、工程(c)について説明する。

【0030】

工程(c)においては、工程(b)において還元された前記電子伝達体を電気化学的に酸化して酸化電流値を得る。そして、この酸化電流値より、低密度リポ蛋白中のコレステロールの濃度を求める。

本発明は、電気化学的にコレステロール値を定量するので、初めから着色している血液が被検試料であっても測定可能である。

【0031】

ここで、図1を用いて、本発明によりコレステロール濃度を定量する際の反応原理を説明する。

被検試料に含まれるリポ蛋白中のコレステロールの多くは、脂肪酸とエステル結合したコレステロールエステルとして存在している。そこでまず、コレステロールエステラーゼ4によって、コレステロールエステル1を脱エステル化してコレステロール2とする(過程I)。

【0032】

次に、酸化還元酵素5によって、コレステロール2を酸化し、酸化されたコレステロール3を生成させる(過程II)。この酸化反応は、同時に電子伝達体(酸化型)6の還元を伴う(過程III)。

【0033】

次いで、作用極8と対極9の間に作用極が正となる電圧を印加することによって、作用極8上で電子伝達体(還元型)7が酸化される(過程IV)。このときに流れる電流値は、電子伝達体(還元型)7の濃度に依存し、さらに、電子伝達体(還元型)7の濃度は、コレステロール2の濃度に依存する。したがって、コレステロール2の濃度を知るためには、作用極8と対極9の間に流れる電流量を測定すればよい。

【0034】

以下に、図面を用いて低密度リポ蛋白中のコレステロールを測定するセンサおよび定量方法を説明する。

【0035】

実施の形態1

図2は本発明によるセンサの概略断面図、図3はその分解斜視図である。11はポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板を表す。この基板11上に、銀ペーストをスクリーン印刷し、加熱乾燥することにより2つの電極の下地とそれらに連なるリード12、13を形成してある。次に炭素ペーストをスクリーン印刷することにより作用極14および対極15が形成されている。基板上には、スクリーン印刷により絶縁層16が形成されており、この絶縁層により電極系の露出部分が規定されている。

【0036】

作用極および対極からなる電極系を覆うように水溶性高分子の一種であるカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩を含むインクをスクリーン印刷により印刷し、50℃で15分間乾燥することにより水溶性高分子層21が形成されている。次に、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、およびフェリシアン化カリウムの混合水溶液を、水溶性高分子層21を覆うように滴下して、50℃で15分間乾燥することにより酵素層22が形成されている。

【0037】

なお、電子メディエータとしては、パラペンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体のいずれかを用いることができる。

【0038】

一方、空気孔20を有するカバー19と、スリット18を有するスペーサ17を貼り合わせ、スペーサのスリット18に形成される凹部に、 α -シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオン、およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン

10

20

30

40

50

ロックコポリエーテルの混合水溶液を滴下した後、乾燥して試薬層 2 3 が形成されている。この試薬層 2 3 は、電極系への試料液供給路において、酵素層より上流側に形成される。

【 0 0 3 9 】

上記の水溶性高分子層 2 1 および酵素層 2 2 を形成した基板 1 1 と、試薬層 2 3 を形成したカバー 1 9 とスペーサ 1 7 からなるカバー部材とを接着して、バイオセンサが組み立てられる。このバイオセンサは、スペーサ 1 7 のスリット 1 8 の部分に形成される中空部が試料液供給路を形成している。そして、この試料液供給路の開口部となるスリット 1 8 の開放端 1 8 a の部分が試料供給口となる。この試料供給口に血液等の試料を接触させると、試料は、試料液供給路の毛管現象により空気孔 2 0 側に吸い込まれる。

10

【 0 0 4 0 】

試薬層 2 3 を形成した位置に、ガラスフィルター等の担体を固定して、その担体中または担体表面に上記の試薬の水溶液を滴下し、乾燥することにより試薬を担持させてもよい。そのような担体としては、濾紙、ガラスフィルター、薄層クロマト担体、セルロース繊維、高分子化合物からなる繊維シート、紙、コルク等を用いることができる。これらのなかで、酸化還元酵素の吸着が少ないという理由から、ガラスフィルターまたはセルロース繊維が好ましい。

【 0 0 4 1 】

電子メディエータおよび酸化還元酵素のうち、少なくともいずれか一方が界面活性剤とともに担持されていると、溶解性が向上するので、反応時間の短縮を図ることができる。

20

【 0 0 4 2 】

水溶性高分子層、酵素層、および試薬層のうち、少なくともいずれか一つの層を凍結乾燥によって形成すると、溶解性が向上するため、反応時間を短縮することができる。特に、図示のように、試料液供給路内を塞ぐように試薬層を形成するときは、凍結乾燥によって、多孔性の層として形成するのが好ましい。試料液を試薬層に接すると容易に試料液を溶解して吸収するからである。

【 0 0 4 3 】

次に、このバイオセンサを用いたときの、血液中の低密度リポ蛋白中コレステロール濃度の測定例を説明する。まず、被検試料である血液を試料供給孔に供給する。血液と接触した試薬層がまず溶解し、次に酵素層、および水溶性高分子層が溶解する。すると、試薬層中の β -シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、およびマグネシウムイオンの協働作用によって、血液中の超低密度リポ蛋白、およびカイロミクロンが水溶性の複合体を形成し、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテルの作用によって、血液中の高密度リポ蛋白が水溶性の複合体を形成する。これにより、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白のコレステロールと、酵素との反応性が低下する。

30

【 0 0 4 4 】

ここで、酵素であるコレステロールエステラーゼ、およびコレステロールオキシダーゼを作用させると、低密度リポ蛋白中のコレステロールのみが酵素による触媒反応を受けるので、低密度リポ蛋白中コレステロールの濃度を測定することができる。具体的には、図 3 の反応原理に基づき、酵素層中のコレステロールエステラーゼによって、低密度リポ蛋白中のエステル型コレステロールが、遊離型のコレステロールに変換される。そして、コレステロールエステラーゼによって生じた遊離型コレステロールと、元々低密度リポ蛋白中に存在していた遊離型のコレステロールが、コレステロールオキシダーゼの作用によって、酸化される。そのとき同時に、酵素層中のフェリシアン化カリウムが還元されて、フェロシアン化カリウムが生成する。血液を供給してから一定時間後に、作用極と対極との間に作用極を正にして、例えば 5 0 0 m V の電圧を 5 秒間印加し、5 秒後の電流値を測定する。この電流値を応答値とする。

40

【 0 0 4 5 】

本実施の形態 1 によれば、色素の発色度合いから測定を行わないので、血液のように初めから着色している被検試料であっても、コレステロールを定量できるという利点がある。

50

また、試薬層 2 3 が酵素層 2 2 から空間的に分離して形成されているので、被検試料を試薬層 2 3 に供給すると、被検試料は試薬層 2 3 中の試薬と反応した後、次に酵素層 2 2 に到達して酵素層 2 2 中の酸化還元酵素および電子伝達体等と反応する。このため、被検試料を一度供給するだけで、複数の試薬を各々異なるタイミングで被検試料に添加するという煩雑な操作を行うことなく、被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロール濃度を再現性および正確性良く定量することができる。

【 0 0 4 6 】

本実施の形態 1 において、試薬層 2 3 に含まれる試薬として、 β -シクロデキストリン硫酸、デキストラン硫酸、マグネシウムイオンおよびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリエーテルの組み合わせを用いたが、これらに代えて、両性界面活性剤およびカルボキシル基またはスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を用いてもよい。また、別の例として、試薬は、ポリカチオンであってもよい。ポリカチオンに加え、さらに弱イオン交換体を含ませることが好ましい。ここで、前記ポリカチオンは、アシル化またはアルキル化ポリカチオンであることが好ましい。前記ポリカチオンとしては、ポリエチレンイミンが好ましく用いられる。

10

【 0 0 4 7 】

試薬層 2 3 には pH 緩衝剤を添加してもよい。pH 緩衝剤としては、3-モルホリノプロパンスルホン酸、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、2-モルホリノエタンスルホン酸、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)などのグッド緩衝液、リン酸緩衝液などが用いられる。

20

【 0 0 4 8 】

参考形態

図 4 は本参考形態におけるコレステロールセンサの分解斜視図である。実施の形態 1 との相違点の 1 つは、ガラスフィルターからなるフィルターを設けたことである。

【 0 0 4 9 】

実施の形態 1 と同様に、作用極 1 4 と対極 1 5 からなる電極系上に、水溶性高分子層 2 1 および酵素層 2 2 を形成した基板 1 1 を用いる。この基板 1 1 上に方形の透孔 3 8 を有するスペーサ 3 7、空気孔 4 0 および試料供給口 4 1 を設けたカバー 3 9、並びにフィルター 4 3 を組み合わせてセンサが完成する。

30

【 0 0 5 0 】

フィルター 4 3 は、スペーサ 3 7 の透孔 3 8 のところに形成される試料液供給路において、酵素層 2 2 より上流側に納められ、試料供給口 4 1 から供給される試料液を吸収し、これを毛管現象により試料液供給路内を電極系側へ供給する。フィルター 4 3 には、高密度リポ蛋白に対する抗体、ポリアニオンであるデキストラン硫酸、およびカルシウムイオンが含浸されている。

【 0 0 5 1 】

フィルターとしては、濾紙、セルロース繊維、高分子化合物からなる繊維シート、メンブランフィルター、メッシュ、綿等を用いることができる。フィルターの孔径は、0.05 ~ 0.5 μm のものが好ましい。

次に、このセンサを用いて血液中の低密度リポ蛋白中コレステロール濃度を測定する方法を説明する。

40

【 0 0 5 2 】

まず、被検試料である血液を試料供給口 4 1 からフィルター 4 3 上に供給する。血液は、フィルター 4 3 によって血球が濾過され、血漿成分が空気孔 4 0 側に進行する。同時に、フィルター内の高密度リポ蛋白に対する抗体によって、血液中の高密度リポ蛋白が凝集する。凝集したリポ蛋白は、フィルターの網目に引っかかり、酵素層 2 2 まで到達しない。また、血液中のカイロミクロン、および超低密度リポ蛋白は、フィルター内のデキストラン硫酸、およびカルシウムイオンによって凝集する。凝集したリポ蛋白は、フィルターの網目に引っかかり、酵素層まで到達しない。そのため、酵素層まで到達した血漿成分には、リポ蛋白のうち、低密度リポ蛋白のみが含まれる。

50

【0053】

酵素層22においては、酵素であるコレステロールエステラーゼ、およびコレステロールオキシダーゼが低密度リポ蛋白に作用し、低密度リポ蛋白中のコレステロールが酵素による触媒反応を受ける。こうして、実施の形態1と同様、低密度リポ蛋白中のコレステロール濃度を測定することができる。

【0054】

上記において、高密度リポ蛋白を凝集させる試薬として用いた高密度リポ蛋白に対する抗体の代わりに、高密度リポ蛋白を吸着するシリカを用いてもよい。シリカは、被検試料中の高密度リポ蛋白を吸着するので、高密度リポ蛋白は酵素層まで到達しない。酵素層まで到達した成分には、リポ蛋白のうち、低密度リポ蛋白のみが含まれる。なお、フィルター43にはpH緩衝剤を添加してもよい。

10

【0055】

本参考形態によれば、実施の形態1と同様に、色素の発色度合いから測定を行わないので、血液のように初めから着色している被検試料であっても、コレステロールを定量できる。また、試薬は、フィルター43に担持され、酵素層22とは空間的に分離して形成されているので、被検試料をフィルター上に供給すると、被検試料はフィルター中の試薬と反応し、フィルターを通過した後、酵素層22に到達して酵素層中の酸化還元酵素および電子伝達体等と反応する。このため、被検試料を一度供給するだけで、複数の試薬を各々異なるタイミングで被検試料に添加するという煩雑な操作を行うことなく、被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロール濃度を再現性および正確性良く定量することができる。

20

【0056】

図示の例では、フィルター43に試薬を担持させたが、フィルターと試薬とを別々に設置してもよい。例えば、膜状のフィルターを酵素層22の上に形成し、フィルター43の位置に試薬層を形成するか試薬を担持した担体を設置する。フィルターと試薬を分離するときは、電極系への試料液供給路において試薬をフィルターより上流に設置する。

【0057】

上記の例では、フィルター43に含ませる試薬のポリアニオンとしてデキストラン硫酸を用いているが、これに代えて、ヘパリン、ホスホタングステン酸、またはポリビニル硫酸などを用いてもよい。また、二価カチオンとしてカルシウムイオンを用いているが、これに代えて、マンガンイオン、またはマグネシウムイオンなどを用いてもよい。

30

【0058】

フィルター43に含ませる試薬として、高密度リポ蛋白に対する抗体、ポリアニオン、および二価カチオンの組み合わせを用いたが、これらに代えて、シリカ、ポリアニオン、および二価カチオンの組み合わせを用いてもよい。この場合、被検試料がフィルター43に接触すると、被検試料中の高密度リポ蛋白がシリカに吸着し、酵素層22まで到達しない。また、被検試料中の超低密度リポ蛋白およびカイロミクロンは、前記と同様に凝集し、フィルター43によって濾過されるので、酵素層22まで到達しない。

【0059】

実施の形態1および参考形態において、基板11としてポリエチレンテレフタレートを用いたが、基板11の材質は、電気絶縁性を有し、ある程度の剛性を有していれば特に制限はない。例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、飽和ポリエステルなどの熱可塑性樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、不飽和ポリエステル樹脂などの熱硬化性樹脂などを用いることができる。

40

【0060】

電極は、炭素ペーストを基板11上にスクリーン印刷する方法により形成したが、パラジウムなどの金属を基板11上に蒸着、またはスパッタして形成してもよい。

【0061】

上記の例では、酸化還元酵素としてコレステロールオキシダーゼとコレステロールエステラーゼ、電子伝達体としてフェリシアン化カリウムを用いたが、これらは、従来公知のも

50

のを特に制限なく用いることができる。酸化還元酵素として、例えばコレステロールオキシダーゼの代わりにコレステロールデヒドロゲナーゼなどを用いてもよく、また電子伝達体として、例えばパラベンゾキノンなどを用いてもよい。

【0062】

酵素層22にはコレステロールエステラーゼを含むことが好ましい。また、酵素層22には、リポ蛋白中のコレステロールの溶解を容易にするために、界面活性剤を添加してもよい。

電極系の上部には、電極を保護するための水溶性高分子層を設けたが、これは必須のものではない。

【0063】

実施の形態1における試薬層23および参考形態において試薬をフィルター43と分離する場合においては、試薬を担持させた担体を用いることが好ましい。これにより、被検試料が試薬層を通過する時間が長くなるので、被検試料が酵素層22に到達するまでに、被検試料に含まれる低密度リポ蛋白を除くリポ蛋白と試薬層中の試薬との反応を十分に進行させることができる。そのような担体としては、試薬成分を内部に担持可能であるものならば特に限定されないが、例えばガラスフィルター、濾紙、メンブランフィルター、メッシュ、綿などがあげられる。このとき、担持させる試薬は、乾燥させた固体状態であっても溶液状態またはゲル状態であってもよい。

【0064】

産業上の利用の可能性

本発明によれば、色素の発色度合いから測定しないので、血液のように初めから着色している被検試料であっても、低密度リポ蛋白に含まれるコレステロールを定量することができる。また、一度の被検試料の供給により、低密度リポ蛋白に含まれるコレステロールを再現性および正確性良く定量することができる。本発明は、煩雑な操作を必要としないため、家庭用の低密度リポ蛋白中コレステロール測定キットに適している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明によりコレステロール濃度を定量する際の反応原理を説明するためのフローチャートである。

【図2】 本発明の実施の形態1におけるコレステロールセンサの概略縦断面図である。

【図3】 同センサの分解斜視図である。

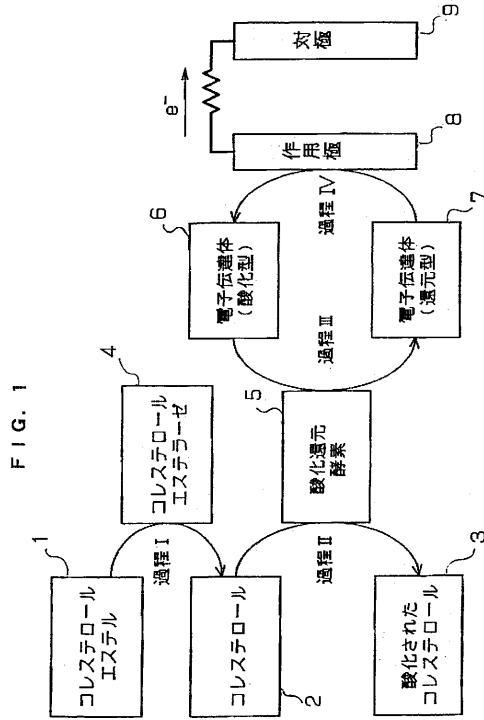
【図4】 参考形態におけるコレステロールセンサの分解斜視図である。

10

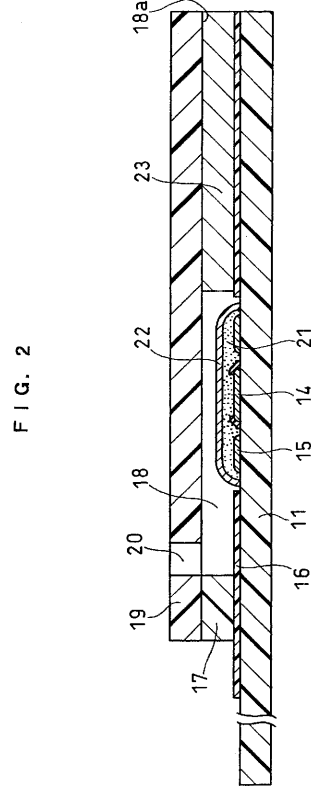
20

30

【図1】

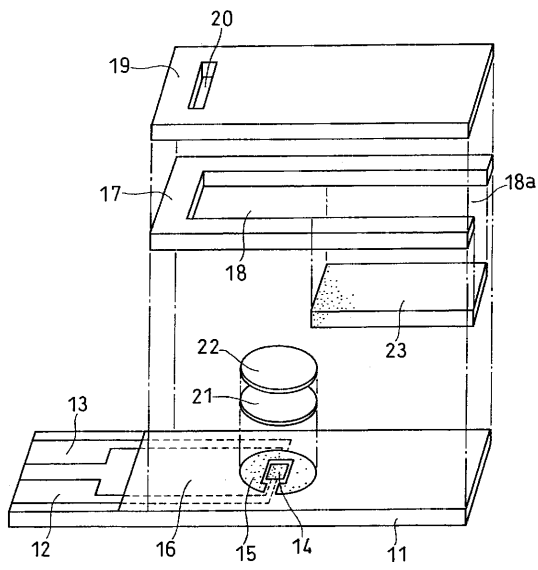


【図2】



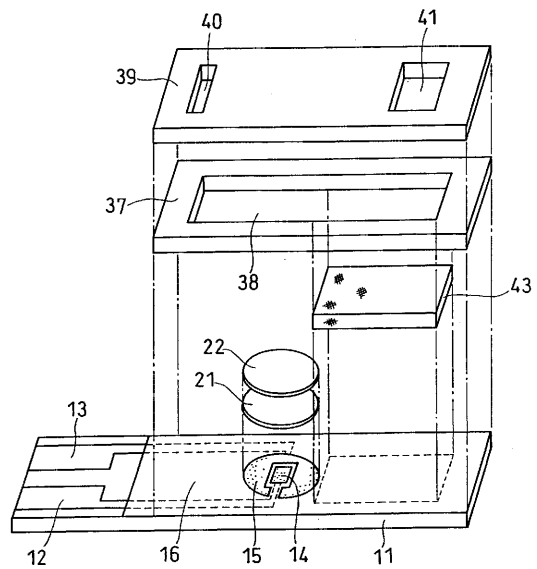
【図3】

FIG. 3



【図4】

FIG. 4



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平09-297121(JP,A)

特開平07-055812(JP,A)

特開平06-213901(JP,A)

特開平10-232219(JP,A)

特開平11-051896(JP,A)

特開平10-221293(JP,A)

特開平10-311833(JP,A)

国際公開第96/029599(WO,A1)

Lorenz Kerscher, Sigbert Schiefer, Brigitte Draeger, Josef Maier, and Joachim Ziegenhorn, Precipitation Methods for the Determination of LDL-Cholesterol, *Clinical Biochemistry*, 1985年4月, Vol.18, No.2, P.118-125

木下 英明, 千々石 武夫, 鳥村 政基, 加納 健司, 池田 篤治, ペルオキシダーゼ固定電極及びポリエチレングリコール修飾酵素を用いる血清中高密度リポタンパクコレステロール及び総コレステロールの直接測定, *分析化学*, 1998年4月5日, Vol.47, No.4, P.233-238

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/327

C12Q 1/00

G01N 33/92

JSTPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)