(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-529212
(P2020-529212A)
(43)公表日　令和2年10月8日(2020.10.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/00	(2006.01)	C12Q	1/00	B	2G045
G01N 33/70	(2006.01)	G01N	33/70		4B029
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68		4B050
G01N 33/49	(2006.01)	G01N	33/49	Z	4B063
C12N 9/06	(2006.01)	C12N	9/06	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 65 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-505873 (P2020-505873)
(86)(22)出願日　平成30年8月3日(2018.8.3)
(85)翻訳文提出日　令和2年4月2日(2020.4.2)
(86)国際出願番号　PCT/GB2018/052231
(87)国際公開番号　WO2019/025815
(87)国際公開日　平成31年2月7日(2019.2.7)
(31)優先権主張番号　1712592.3
(32)優先日　平成29年8月4日(2017.8.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

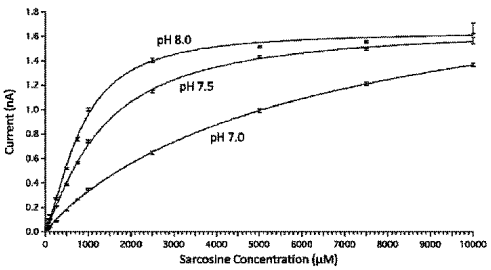
(71)出願人　519014888
アイピー２アイピーオー　イノベーションズ　リミテッド
ＩＰ２ＩＰＯ　ＩＮＮＯＶＡＴＩＯＮＳ　ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス国，ロンドン　イーシー４エヌ　８エーエフ，ウォールブルック　２５，ザ　ウォールブルック　ビルディング，トップ　フロア
Ｔｏｐ　ｆｌｏｏｒ，Ｔｈｅ　Ｗａｌｂｒｏｏｋ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ，２５　Ｗａｌｂｒｏｏｋ，Ｌｏｎｄｏｎ，ＥＣ４Ｎ　８ＡＦ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵素組成物を用いたクレアチンレベルの検出

(57)【要約】
本発明は、特定の溶液中のクレアチニンのレベルの、感度が高い判定を可能にする組成物及び系を提供する。また、クレアチニンを検出する酵素的方法の最適化により、クレアチニンレベル及びクレアチニンクリアランス率のリアルタイム判定が実現されて、腎機能のリアルタイム監視が可能となる。これは、生きた対象の監視、及び移植が意図される単離された臓器、例えば腎臓の監視の双方に有用であると考えられる。

Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
サルコシンオキシダーゼ及び／又はクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ、並びに少なくとも第１のセンサー、場合によっては電流測定センサーを含むセンサー系であって、場合によっては、前記サルコシンオキシダーゼ及び／又はクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼは、組成物の一部である、センサー系。
【請求項２】
前記組成物は、前記酵素、サルコシンオキシダーゼ、クレアチニナーゼ、及びクレアチナーゼのいずれか２つ、又は全てを含む、請求項１に記載のセンサー系。
【請求項３】
サルコシンオキシダーゼ、クレアチニナーゼ、及びクレアチナーゼを含む、請求項１又は２に記載のセンサー系。
【請求項４】
前記酵素の少なくとも１つ、場合によっては２つ、場合によっては全てが固定されておらず、場合によっては、前記酵素の全てが溶液中にある、請求項２又は３に記載のセンサー系。
【請求項５】
前記サルコシンオキシダーゼ、クレアチニナーゼ、及びクレアチナーゼは、溶液中にある、請求項４に記載のセンサー系。
【請求項６】
バッファをさらに含み、場合によっては、前記組成物はバッファを含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項７】
前記バッファは、リン酸バッファでもＰＢＳでもなく、及び／又はトリスバッファではなく、及び／又は四ホウ酸ではなく、及び／又はＨＥＰＥＳではない、請求項６に記載のセンサー系。
【請求項８】
前記バッファは、ＥＰＰＳ、ＨＥＰＢＳ、ＰＯＰＳＯ、ＨＥＰＰＳＯ、及びＭＯＢＳからなる群から選択される、請求項６又は７に記載のセンサー系。
【請求項９】
前記組成物又は前記バッファは、ｐＨが７．０～９．０、場合によっては７．３～８．９５、場合によっては８．５である、請求項１～８のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１０】
前記組成物は、ｐＨ８．０～８．５のＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０～８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、又はｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳを含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１１】
前記組成物はさらに、ウレアーゼ及び／又はウリカーゼ及び／又はシスタチンＣを検出する手段及び／又はアルブミンを検出する手段を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１２】
前記クレアチニナーゼは、SorachimカタログナンバーCNH-311に由来し；及び／又は前記クレアチナーゼは、SorachimカタログナンバーCRH-211に由来し；及び／又は前記サルコシンオキシダーゼは、SorachimカタログナンバーSAO-351に由来する、請求項１～１１のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１３】
前記組成物中のサルコシンオキシダーゼ及び／又はクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼの濃度は、最終反応混合液において、クレアチニナーゼの濃度が少なくとも３００Ｕ／ｍｌとなり、及び／又はクレアチナーゼの濃度が少なくとも１２０Ｕ／ｍｌとなり、且つサルコシンオキシダーゼの濃度が少なくとも１０Ｕ／ｍｌとなるような濃度である

、請求項１～１２のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１４】
前記組成物は、クレアチニン及び請求項１～１３のいずれか一項に記載の組成物を含有するサンプルの混合に由来する最終混合溶液が、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを、１０：５：１～４９：８：１Ｕ／ｍｌの比率にて含むような組成物である、請求項１～１３のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１５】
前記組成物は、クレアチニン及び請求項１～１４のいずれか一項に記載の組成物を含有するサンプルの混合に由来する最終混合溶液が、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを、６００Ｕ／ｍｌ、３００Ｕ／ｍｌ、及び６０Ｕ／ｍｌの量で含むような組成物であり、場合によっては、前記組成物はｐＨ８．５である、請求項１～１３のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１６】
マイクロフルイディック回路、マイクロフルイディックデバイス、及び微小透析プローブのいずれか１つ以上を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１７】
連続流系をさらに含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１８】
前記系はさらに、サンプル、場合によっては患者由来のサンプル、又は閉ループ単離灌流臓器、場合によっては腎臓由来のサンプルをとる手段を含み、
場合によっては、患者由来の前記サンプルは、場合によっては血液、尿、血漿、組織液、髄液由来の、微小透析液である、請求項１～１７のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項１９】
前記サルコシンオキシダーゼ及び／又はクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ、又は請求項１～１８のいずれか一項に記載の組成物がサンプルに、前記サンプルを前記センサーと接触させる前に加えられ、場合によっては、検知試薬が、前記センサーとの接触の１、２、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２５、２５０秒、５、５．５、６、６．５、７．５、８、８．５、９、９．５、又は１０分超前に加えられるように配置された、請求項１～１８のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２０】
前記系は、前記サンプル中の酸素の量を、検知試薬の添加前又は添加後に増大させる手段を含み、場合によっては、酸素の量を増大させる前記手段は：
ミキサーであって、場合によってはバッフル又は蛇行ゾーンを含み、場合によっては高度に浸透性の材料、例えばＰＤＭＳから製造されているミキサー；
Teflonチューブによって連結された複数の混合ステージ；
加圧コンテナ
のいずれか１つ以上から選択される、請求項１～１９のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２１】
前記系は、１０μＭ未満、場合によっては７．５μＭ未満、場合によって５μＭ未満、場合によっては４μＭ未満、場合によっては３μＭ未満、場合によっては２μＭ未満、場合によっては１μＭ未満の濃度のクレアチニンを検出することができる、請求項１～２０のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２２】
前記センサー系は、４０μＭ～１２０μＭのクレアチニンのバックグラウンドレベルに対して、１μＭ未満、又は２μＭ未満、又は３μＭ未満、又は４μＭ未満、又は５μＭ未満、又は７．５μＭ未満、又は１０μＭ未満のクレアチニン濃度の変化を検出することができる、請求項１～２１のいずれか一項に記載のセンサー系。

【請求項２３】
前記系は、前記センサーからデータを収集する手段、場合によってはPowerLab/4SPを含み、場合によっては、前記系はさらに、前記データを送信するワイヤレス送信手段を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２４】
前記系はさらに、データ分析手段、場合によってはコンピュータ又はウェアラブルデバイスを含み、場合によっては、前記データ分析手段は、ワイヤレスで送信されたデータを受信する手段を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２５】
少なくとも１つの廃棄物収集レセプタクルをさらに含み、場合によっては、前記廃棄物収集レセプタクルの容量は、１０ｍｌ未満、例えば９．５ｍｌ未満、例えば９ｍｌ未満、例えば８．５ｍｌ未満、例えば８ｍｌ未満、例えば７．５ｍｌ未満、例えば７ｍｌ未満、例えば６．５ｍｌ未満、例えば６ｍｌ未満、例えば５．５ｍｌ未満、例えば５ｍｌ未満、例えば４．５ｍｌ未満、例えば４ｍｌ未満、例えば３．５ｍｌ未満、例えば３ｍｌ未満、例えば２．５ｍｌ未満、例えば２ｍｌ未満、例えば１．５ｍｌ未満、例えば１ｍｌ未満、例えば０．５ｍｌ未満、例えば０．２５ｍｌ未満である、請求項１～２４のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２６】
前記系は、携帯型の系である、請求項１～２５のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２７】
前記系は、クレアチニンレベル／クレアチニンクリアランス率／糸球体濾過量を算出する手段を含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２８】
剤、場合によっては造影剤若しくは薬物、又はクレアチニン若しくはクレアチン若しくはサルコシンを送達する手段をさらに含み、場合によっては、前記手段は薬物ポンプであり、
場合によっては、前記薬物は、免疫抑制剤；化学療法剤、例えば白金剤；抗菌物質、例えばグリコペプチドバンコマイシン及びテイコプラニン、並びにペニシリン；並びにオピオイド鎮痛薬、例えばモルヒネ、ジアモルフィン、及びコデインからなる群から選択され；
場合によっては、送達される剤の量は、算出した前記クレアチニンレベル／クレアチニンクリアランス率／糸球体濾過量に基づいて調整される、請求項１～２７のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項２９】
前記系はさらに、第２のセンサー、及び場合によっては、第２のサンプルを得る第２の手段を含み、前記第２のサンプルは、前記第２のセンサーでの検出前に、クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含む第２の検知試薬と接触させられ、場合によっては、前記系は、前記第２の検知試薬が、前記センサーとの接触の１、２、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２５、２５０秒、５、５．５、６、６．５、７．５、８、８．５、９、９．５、又は１０分超前に加えられた前記第２のサンプルに加えられるように配置されている、請求項１～２８のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項３０】
前記系は、前記第２のセンサーから得られるデータを、前記第１のセンサーから得られるデータから減算する手段を含む、請求項２９に記載のセンサー系。
【請求項３１】
前記第１のセンサーは、データを継続的に収集する、請求項１～３０のいずれか一項に記載のセンサー系。
【請求項３２】

前記第１のセンサーは、少なくとも２４時間毎に、又は少なくとも２２時間毎に、例えば少なくとも２０時間毎に、例えば少なくとも１８時間毎に、例えば少なくとも１６時間毎に、例えば少なくとも１４時間毎に、例えば少なくとも１２時間毎に、例えば少なくとも１０時間毎に、例えば少なくとも８時間毎に、例えば少なくとも６時間毎に、例えば少なくとも５時間毎に、例えば少なくとも４時間毎に、例えば少なくとも３時間毎に、例えば少なくとも２時間毎に、例えば少なくとも１．５時間毎に、例えば少なくとも１時間毎に、例えば少なくとも５０分毎に、例えば少なくとも４５分毎に、例えば少なくとも４０分毎に、例えば少なくとも３５分毎に、例えば少なくとも３０分毎に、例えば少なくとも２５分毎に、例えば少なくとも２０分毎に、例えば少なくとも１５分毎に、例えば少なくとも１０分毎に、例えば少なくとも５分毎に、例えば少なくとも２分毎に、例えば少なくとも１．５分毎に、例えば少なくとも６０秒毎に、例えば少なくとも４５秒毎に、例えば少なくとも３０秒毎に、例えば少なくとも１５秒毎に、例えば少なくとも１０秒毎に、例えば少なくとも５秒毎に、例えば少なくとも２秒毎に、例えば少なくとも１秒毎に、例えば少なくとも０．５秒毎にデータを収集する、請求項１～３１のいずれか一項に記載のセンサー系。

【請求項３３】

酵素、サルコシンオキシダーゼ、クレアチニナーゼ、及びクレアチナーゼのいずれか２つ、又は全てを含む組成物。

【請求項３４】

サルコシンオキシダーゼ、クレアチニナーゼ、及びクレアチナーゼの全てを含む、請求項３３に記載の組成物。

【請求項３５】

前記酵素の少なくとも１つ、場合によっては２つ、場合によっては全てが固定されておらず、場合によっては、前記酵素の全てが溶液中にある、請求項３３又は３４に記載の組成物。

【請求項３６】

前記サルコシンオキシダーゼ、クレアチニナーゼ、及びクレアチナーゼは、溶液中にある、請求項３５に記載の組成物。

【請求項３７】

前記組成物はバッファを含む、請求項３３～３６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３８】

前記バッファは、リン酸バッファでもＰＢＳでもなく、及び／又はトリスバッファではなく、及び／又は四ホウ酸ではなく、及び／又はＨＥＰＥＳではない、請求項３７に記載の組成物。

【請求項３９】

前記バッファは、ＥＰＰＳ、ＨＥＰＢＳ、ＰＯＰＳＯ、ＨＥＰＰＳＯ、及びＭＯＢＳからなる群から選択される、請求項３７又は３８に記載の組成物。

【請求項４０】

前記バッファは、ｐＫａが７．０～９．０、場合によっては７．３～８．９５、場合によっては８．５である、請求項３７～３９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４１】

前記組成物又は前記バッファは、ｐＨが７．０～９．０、場合によっては７．３～８．９５、場合によっては８．５である、請求項３３～４０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４２】

前記組成物は、ｐＨ８．０～８．５のＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０～８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、又はｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳを含む、請求項３３～４１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４３】

ウレアーゼ及び／又はウリカーゼ及び／又はシスタチンＣを検出する手段及び／又はアルブミンを検出する手段をさらに含む、請求項３３～４２のいずれか一項に記載の組成物

。
【請求項４４】
前記クレアチニナーゼは、Sorachimカタログナンバー CNH-311に由来し；及び／又は前記クレアチナーゼは、Sorachimカタログナンバー CRH-211に由来し；及び／又は前記サルコシンオキシダーゼは、Sorachimカタログナンバー SAO-351に由来する、請求項３３～４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼの濃度は、最終反応混合液において、クレアチニナーゼの濃度が少なくとも３００Ｕ／ｍｌとなり、及び／又はクレアチナーゼの濃度が少なくとも１２０Ｕ／ｍｌとなり、且つサルコシンオキシダーゼの濃度が少なくとも１０Ｕ／ｍｌとなるような濃度である、請求項３３～４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記組成物は、クレアチニン及び請求項３３～４５のいずれか一項に記載の組成物を含有するサンプルの混合に由来する最終混合溶液が、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを、１０：５：１～４９：８：１Ｕ／ｍｌの比率にて含むような組成物である、請求項３３～４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４７】
前記組成物は、クレアチニン及び請求項３３～４６のいずれか一項に記載の組成物を含有するサンプルの混合に由来する最終混合溶液が、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを、６００Ｕ／ｍｌ、３００Ｕ／ｍｌ、及び６０Ｕ／ｍｌの量で含むような組成物であり、場合によっては、前記組成物はｐＨ８．５である、請求項３３～４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
ヒト又は動物の対象由来のサンプル中のクレアチニンのレベルの判定方法であって、前記方法は、請求項１～４７のいずれか一項に記載の組成物又はセンサー系の使用を含み、場合によっては、前記サンプルは、透析液又は微小透析液である、方法。
【請求項４９】
クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量の判定方法であって、前記方法は、請求項１～４７のいずれか一項に記載の組成物又はセンサー系の使用を含み、場合によっては、サンプルは、透析液又は微小透析液である、方法
。
【請求項５０】
ヒト又は動物の対象由来のサンプル中のクレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量のレベルのリアルタイム判定方法であって、前記方法は、請求項１～４７のいずれか一項に記載のセンサー系の組成物の使用を含み、場合によっては、前記サンプルは、透析液又は微小透析液である、方法。
【請求項５１】
対象を、急性腎疾患又は慢性腎疾患と診断する方法であって、前記方法は、請求項４８～５０のいずれか一項に記載の方法に従って、クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量を判定することを含み、場合によってはさらに、急性腎疾患若しくは慢性腎疾患の前記対象を処置すること、又は急性腎疾患若しくは慢性腎疾患において禁忌若しくは危険である薬物による処置の停止を含み、場合によっては、前記薬物は、
免疫抑制剤；化学療法剤、例えば白金剤；抗菌物質、例えばグリコペプチドバンコマイシン及びテイコプラニン、並びにペニシリン；並びにオピオイド鎮痛薬、例えばモルヒネ、ジアモルフィン、及びコデインからなる群から選択される、方法。
【請求項５２】
クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量のレベルの判定は、ある量のクレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンの投

与の後に、場合によっては薬物の投与の前後に判定される、請求項４８～５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
前記方法はさらに、ある投薬量の薬物の投与を含み、前記投薬量は、センサー系によって判定された前記クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量に基づいて決定されている、請求項４８～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
移植用の腎臓を監視する方法であって、前記腎臓を灌流することと、ある量のクレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンを系中に投与することと、請求項１～５３のいずれか一項に記載の組成物及び／又は系及び／又は方法を用いて、前記クレアチニンクリアランス率を判定することとを含む方法。
【請求項５５】
移植のレシピエントにおいて腎機能を監視する方法であって、クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量は、請求項１～５４のいずれか一項に記載の組成物、センサー系、及び／又は方法の使用によって判定される、方法。
【請求項５６】
クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ、若しくは全て；及び／又は
請求項３３～４７のいずれか一項に記載の組成物；
クレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシン；及び／又は
少なくとも１つの廃棄物レセプタクル；
バッファ、場合によっては請求項１～５５のいずれか一項に記載のバッファ；
微小透析プローブ；及び／又は
少なくとも１つ、場合によっては少なくとも２つの精密ポンプ
を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明の分野
本発明は、特定の溶液中でのクレアチニンのレベルの、感度が高い判定を可能にする組成物及び系を提供する。当該組成物及び系を、クレアチニンレベル及びクレアチニンクリアランス速度のリアルタイム判定に用いて、腎機能のリアルタイム監視を可能にする方法もまた提供される。
【背景技術】
【０００２】
背景
腎臓は、多くの異なる構成要素、例えばネフロン及び糸球体を有するが、それらの機能は個々に損なわれ得る。一方、対象の腎機能を判定する現行の方法は、腎臓の性能全体を評価し、そして現在、腎臓のどの正確な部分が罹患しているのかを判定することはできない。腎機能のこの全体的な尺度は、糸球体濾過量（ＧＦＲ）と呼ばれ、血液由来の物質、具体的にはクレアチニンを一掃する腎臓の能力を評価する。これは、臨床環境にルーチン的に用いられる方法である。
【０００３】
ＧＦＲは、多くの場合、１．７３ｍ^{2}の体表面面積に標準化されたｍｌ／分の値として報告される。健康な成人のＧＦＲは、９０ｍｌ／分／１．７３ｍ^2～１３０ｍｌ／分／１．７３ｍ^{2}に収まる。ＧＦＲの悪化は、患者の慢性腎疾患の病期を評価する臨床手段であり、１５ｍｌ／分以下のＧＦＲは、末期腎不全と呼ばれる。
【０００４】
クレアチニンのクリアランスに基づいてＧＦＲを算出するのに用いられる式は、以下の

通りである：
【数１】

$$GFR(ml/分) = 尿流量 \cdot \left(\frac{[尿]}{[血漿]}\right)$$

【０００５】
少量のクレアチニンが遠位尿細管からも分泌されるが、分泌量は、腎機能の衰えに直面しても、一定のままである。
【０００６】
クレアチニンは、ヒト血液中に、マイクロモル濃度で存在する。これは、腎臓による絶え間ない濾過のためである。定常状態系においては、体の骨格筋は、一定量のクレアチニンを血中に放出することとなり、そして腎臓はこれを、濾過及び能動尿細管分泌の組合せにより循環系から除去することとなる。
【０００７】
この能動尿細管分泌は、機能極値が低いほど、クレアチニンクリアランスの割合が大きくなり、糸球体濾過量（ＧＦＲ）の過大評価の原因となる。
【０００８】
臨床診療におけるクレアチニンの測定
現在、３つの主要な技術が、臨床サンプル中のクレアチニン濃度を測定するのに用いられている：（ｉ）ジャッフェ反応、（ｉｉ）酵素的方法、及び（ｉｉｉ）同位体希釈質量分析（ＩＤＭＳ）であり、これは、他の全ての方法が現在比較されている方法である。
【０００９】
ＩＤＭＳ
ＩＤＭＳは、最新の臨床生化学において、注目する分析物を定量化する最も正確な方法であると考えられている。原理は単純で、タグ・アンド・リリース法によって動物の野生集団を推定するのと類似する。量は未知であるが同位体組成が既知のサンプルから始めて、これを、量及び同位体組成が既知の標準で薄めることで、問題の同位体の最終希釈率を測定することによって、元のサンプル内での濃度を求めることができる。この方法は、内部レシオメトリック標準化を、高精度且つ低限界の、最新の質量分光法の検出と組み合わせて、バイアスが低い、高度に正確であり且つ再現性のある結果をもたらす。
【００１０】
残念ながら、当該方法論、並びにこのアッセイを企てるのに必要とされるＧＣ－ＭＳデバイスのサイズ及びコストでは、連続インラインクレアチニンアッセイに組み込むように小型化することはできない。
【００１１】
ジャッフェ反応
クレアチニンを検出するこの方法は、腎機能の重要な指標としてのクレアチニンの認識に先行する。ピクリン酸及び尿クレアチニンの反応生成物のアルカリ化後の、有色の化合物の生成の最初のホルマールの記述が、１８８６年にMax Jaffe（１８４１～１９１１）によって公開された（この検出方法が命名された人物である）。サンプルにおける色変化の強さ、故にクレアチニンの量を、最大吸光度が５２０ｎｍである比色分析又は分光測光法によって迅速に評価することができる。
【００１２】
残念ながら、当該方法は、欠点がないわけではなく、ラボ間での標準化が歴史的に少なからず不足しており、ＩＤＭＳ標準の開発に至った研究業績によって実証されている［３５］。ジャッフェ反応はまた、高度に非特異的であり、ヒトサンプル内でしばしば見出される非常に多くの内因性化合物及び外因性化合物（微量のタンパク質、グルコース、ケトン体、ビリルビン及びある種のアミノグリコシド、並びにセファロスポリン（cefalosporin）抗生物質が挙げられる）による偽陽性又は偽陰性が生じ得る。
【００１３】

これらに対する較正を試みると、実際、正常な機能と異常な機能との境界線にある値に、より大きな不確実性を導入し、そして逆に、尿のクレアチニン濃度を過小評価して、何の内因性干渉も見出せない場合がある［３７］。かなり小さなエラーの影響の実例として、血清クレアチニン濃度の絶対値のほんの２０μｍｏｌの増大でも、正常な機能と初期の腎不全との差を意味する場合がある。

【００１４】

これらの理由で、ジャッフェ法は、先進国世界では、酵素的検出にゆっくり置き換えられている。

【００１５】

３酵素系

この方法は、中間体としてのクレアチン及びサルコシン、並びに中間副産物としての尿素を介した、過酸化水素、ホルムアルデヒド、及びグリシンへの１：１：１のモル比でのクレアチニンの、より複雑な３工程消化に依存する。

【００１６】

この系では、非光学検出用の２つの潜在的標的、尿素及びH_2O_2が生じる。

【００１７】

尿素の検出

尿素の検出は、NH_3及びCO_2の生成を触媒するウレアーゼへの更なるカップリング反応を必要とする。NH_3の検出は、困難により複雑化される一方、CO_2の生成は、一般的なセバリングハウス電極又はよりエキゾチックなドープナノ材料により定量化することができる［５１］。

【００１８】

セバリングハウス電極は、ｐＨが既知の$NaHCO_3$の溶液内に閉じ込められ、且つ気体透過性の膜によってサンプル溶液から分離されているガラスｐＨ電極の特定の内部配置を必要とする。CO_2は、膜を通過するにつれ、$NaHCO_3$溶液中に溶解して、H^+イオンを放出する。これがその後、内部ｐＨ電極にて電位差測定的に検知される。

【００１９】

原理はかなり理解されており、そしてセンサーは、ヒト血液pCO_2の正常範囲にわたって直線的に機能する一方、この三重壁の液体含有センサーは、小型化するのが非常に難しく、そして、微小セバリングハウス型電極の文献において、少数の報告しか存在せず、応答時間が非常に遅い［５２］。

【００２０】

さらに、クレアチニンの完全な消化から放出されるCO_2の量は、せいぜいサブミリモル範囲内となろう。これは、あらゆるCO_2センサー系が、通常の代謝由来のサンプル（当該サンプルが血液から得られるか尿から得られるかを問わない）中に溶解するCO_2のバックグラウンドレベル（４．５～６ｋＰａ、１．７５≡２．３３ｍｍｏｌ）から予想されるシグナルマグニチュードの何十倍ものオフセットに曝されることとなることを意味する。

【００２１】

また、最後に、あらゆる生体サンプルは、クレアチニンよりもはるかに大きいレベルの尿素を含有することとなる。

【００２２】

H_2O_2の検出

H_2O_2は、血液及び尿内で、酸化代謝プロセスの結果として、しかし、カタラーゼ、ヘム、及びアスコルバートを含む血漿内の内因性抗酸化剤の影響下で迅速に減弱する低いマイクロモルレベルにて、生じる［５３］。ゆえに、三重酵素スキームにおけるH_2O_2の測定可能な唯一の源は、サルコシンオキシダーゼを介したクレアチニンそれ自体である。H_2O_2は、電流測定によっても容易に検出可能である。

【００２３】

最後に、三重酵素系の平衡全体は、グルタマートデヒドロゲナーゼ及びグルタマートオ

キシダーゼを介してクレアチニンデイミナーゼを検出するのとは異なり、生成物の生成及び基質の消費により、適切とは程遠い。これは、生成物の電位レベル、故にシグナルが高いほど、少量の基質に起因して、信号対雑音比、及びこの系についての検出限界を向上させることとなることを示している。

【００２４】

微小透析

微小透析は、注目する組織又は溶液から小分子の連続サンプルを得る一方、干渉を最小にする方法であり、元々、１９７０年代に、ラット脳から神経伝達物質をサンプリングするために創始された［５５］。これは、注目する分子を欠く流体により、半透膜の一方側を継続的に灌流することによって、標的分子が、灌流液中に、膜全体にわたって濃度勾配に沿って拡散することとなるように機能する。同時に、膜のカットオフ重量を上回る分子は、又は灌流液により既に平衡状態にあるものは、濃度が変化することはない。膜透析後、標的分子が検出系に引き継がれる。

【００２５】

マイクロフルイディクス

用語「マイクロフルイディクス」は、ナノリットルのスケール以下の液体容量で機能する実施を説明し、流路の直径はほんの数十～数百ミクロンである。伝統的なラボ分析とは異なり、当該スケールでの作動は、サンプル及び潜在的にコストがかさむ試薬の必要とされる容量を引き下げる一方、分析の感度、再現性、及び速度を向上させるという観点から、力強い利益をもたらす［５６］。これは特に、微小透析と同様に、酵素自体が特に高コストであり得る場合、そして少量のみの基質が利用可能であり得る場合、酵素ベースの反応に有用である。

【００２６】

Labsmithプラットフォーム

LabSmith Microfluidic Platformシステム（LabSmith,Inc.、Livermore、California、USA）は、１５０μmの内径不活性ＰＥＥＫ（ポリエーテルエーテルケトン）チューブ（３６０μmの外径）と適合し、ミリリットルスケールのカスタマイズされた基質及び反応物質リザーバ、毎秒　８ナノリットルにまで流量を下げさせる（５００ｎｌ／分）ようにマイクロリットル容量を取り扱うことができる精密マイクロポンプ、及び内部ＰＥＥＫ表面を備える三方又は四方切換弁を有する。これらの構成要素は全て、完全にモジュール式であり、防水マイクロフルイディック連結を生じさせるための一般的なロッキングフェルールフィッティング、及び種々の他の構成要素を適所に保持するためのネジ－嵌合ブレッドボードシステムと交換可能である。

【００２７】

電流測定センサー

電流測定は、ある電位での酸化還元反応によって消費又は生成される電子の数を測定する技術であり、例えば、１９５０年代にLeyland Clark（１９１８～２００５）によって発明された、ＡｇＩＡｇＣｌに対して－０．６Ｖ～－０．７Ｖの電位にて溶液中の酸素の分圧を測定するものがある。

【００２８】

電流測定センサーは、３つの要素（ｉ）注目する基質との酸化還元反応を実行する作用電極、（ｉｉ）酸化還元反応の他方側の均衡を保つ補助電極又は対電極、及び（ｉｉｉ）電気空間内で安定した点にて回路を固定する参照電極を備える。

【００２９】

ポテンショスタット回路は、サーボアンプを用いて、対電極からの電流を自動的に調整して、作用電極の電位を、参照由来の定点に維持して、酸化還元反応を制御し、そしてトランスインピーダンスアンプと組み合わされて、作用電極を通過した電流を、記録及び分析用の電圧シグナルとして測定する。

【００３０】

トランスインピーダンスアンプは、作用電極での酸化還元反応に対するいかなる干渉も

防止する、１０＾１２Ωのオーダーでの適切に高い入力インピーダンス、及び新しい基質の提示による系の酸化還元率の予想される変化にマッチする周波数応答がなければならない。同様に、サーボアンプは、作用電極にて電位の安定性を維持することができるほど十分に低い出力インピーダンス及び応答率がなければならない。

【００３１】

３酵素系は、クレアチニンのレベルを判定するのに先行技術で用いられてきた。

【００３２】

Tsuchida and Yoda［４０］は、３酵素系を用いている。著者らは、自由溶液中のサルコシンオキシダーゼの最適ｐＨがｐＨ７．５であるが、一旦固定されると、ｐＨ１０に増大すると結論した。したがって、自由溶液３酵素系の最適ｐＨは、およそｐＨ７．５であると予想される。

【００３３】

Khue et al［７２］は、固定された酵素を含む電極を用いている。系の最適ｐＨは、ｐＨ６．５～８．５の試験範囲から、ｐＨ８．０であることが見出された。以降の実験は、ＰＢＳバッファ中で生理学的ｐＨにて実行された。

【００３４】

Sakslund et al［７４］は、電極上に固定された３酵素系の最適ｐＨが、ｐＨ７．７であることを見出した。

【００３５】

Madaras［７７］は、３酵素系の酵素が層内に固定されている電極について考察している。この系の検出限界は、ＰＢＳ中ｐＨ７．３～７．４にて実行された３０μＭクレアチニンであった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００３６】

単離した灌流腎臓の血液又は尿中の標準的なクレアチニン濃度を継続的にサンプリング且つアッセイする、ポータブルな低コストの系が必要とされている。

【００３７】

自由溶液中の酵素に３酵素系を利用して、センサー系の最適ｐＨを判定したのは、本発明の研究によるのみであった。

【課題を解決するための手段】

【００３８】

本発明の簡単な概要

腎機能を判定する先行技術の方法は、先で示したように、不十分であり、且つ時代遅れである。本発明者らは、驚くべきことに、少なくとも１つの酵素を電極に埋め込んだ従来のアプローチではなく、自由溶液中に３酵素系を用いたクレアチニンレベルの判定が、腎機能のリアルタイム判定を可能にするほど十分に、驚くほど正確且つ感度が高いリードアウトを示すことを見出した。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、発明者らは、酵素溶液により反応が完了に近づくことで、先行技術のバイオセンサー（酵素は、基質に短時間しか曝されない）によって得られるよりも高いシグナルを生じさせることができるという事実が、少なくとも部分的にこの向上を担うと考える。

【００３９】

加えて、そして先行技術、例えばTsuchida and Yoda［４０］の教示とは反対に、発明者らは、自由溶液中の３酵素系の最適ｐＨが、実際に、相対的に高いｐＨ、すなわちｐＨ８．０～８．６であることを見出した。この最適化は、判定の感度をさらに増強すると考えられる。

【００４０】

電流測定センサーによる、結果として生じるH_2O_2の検出と組み合わせた３酵素自由溶液アプローチは、特に驚くべき感度を示すと考えられ、そして初めて、医学的に関連するレベルでのクレアチニンのリアルタイム検出を可能にする。

【図面の簡単な説明】
【００４１】
図の説明
【図１】１０ｍＭ　ＰＢＳ中３０Ｕ／ｍｌ　ＳＡＯの、５０μｍ電極を用いたｐＨ７．０～８．０での比較。
【図２】ｐＨ７．５の１００ｍＭ　ＰＢＳ、ｐＨ８．０の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、及びｐＨ９．０の５０ｍＭホウ酸（borate）中の３０Ｕ／ｍｌ　ＳＡＯ、８×２５μｍ電極アレイでの比較。ＥＰＰＳ中１ｍＭサルコシンにて３倍近い電流を実証した。
【図３】種々のバッファ中１００μＭサルコシンに対する３０Ｕ／ｍｌ　ＳＡＯの段階希釈実験から得た、標準化した電流応答プロファイル。この系についてのトリスバッファ及びホウ酸バッファの不適切性を確認した。時間は分である。
【図４】最終酵素最適化実験の１つ。１００μＭクレアチニンの酵素的消化からのシグナルの標準化された時間放出を実証した。全ての酵素量はユニット／ｍｌである。なお、小さなパータベーション（＊）は、ｐＨ３．０での非緩衝ＮａＣｌの前縁によって生じた。
【図５】十分に撹拌したＴ１中への標準的な追加によって得た、２μｌ／分での微小透析についてのクレアチニン較正曲線。十分に撹拌した脱線維ウマ血液由来の平行サンプリング曲線を伴う。双方の曲線とも、ヒルの式への自動フィッティングによって得た。
【図６】１２時間にわたる微小透析サンプリング系の安定性についての試験。なお、スパイクは、４０分毎の酵素ポンプ再充填（０．５μｌ／分にて２０μｌ）に由来した。実験は、酵素リザーバが枯渇した場合、１２時間を僅かに越えて終了した。
【図７】アスコルビン酸（Ａｓｃ）、尿酸（Ｕｒｉｃ）、及びパラセタモール（Ｐａｒａ）による干渉を試験。標識下の値は、ランニング総濃度である。尿酸の濃度は、２０℃の水中でのその最大溶解度から推定した。
【図８】溶液中のクレアチニンの様々なレベルでの１００ｍｌ／分クレアチニンクリアランスのシミュレーション。点線は、速度定数及び半減期が由来した指数曲線を示す。
【図９】腎機能不全の様々な程度（１００ｍｌ／分～２５ｍｌ／分のクレアチニンクリアランス率に等しい、ＣＫＤ１～ＣＫＤ４）をシミュレートする希釈実験の結果。
【図１０】外部の膜酸素供給器及び熱交換器（フレーム外）を備える温血灌流（warm blood perfusion）用に構成したWaters RM3低温灌流系。微小透析系は、最初の較正を完了して、腎臓が到達するのを待っている。
【図１１】灰色：RM3のポンプからの規則的な電気スパイクを示す微小透析系由来の生シグナル。黒色：Savitsky-Golay平滑化フィルタをデータに用いた結果。
【図１２】本物の血液灌流ブタ腎臓において試験した系の時系列画像。温灌流実験の結果は、最初のプラトー相に続く、酸素化後のシグナルマグニチュードの安定した低下、及び以降の２つのクレアチニン試験を示す。
【図１３】ＮａＣｌ、ｐＨ３．０中の１００μＭクレアチニンの消化。ランニングバッファとして、ａ）ｐＨ７．５、ｂ）ｐＨ８．０、そしてｃ）ｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ。
【図１４】ＮａＣｌ、ｐＨ３．０中の１００μＭクレアチニンの消化。ａ）クレアチニナーゼ：クレアチナーゼ：サルコシンオキシダーゼ－１５０：３００：６０、ｂ）クレアチニナーゼ：クレアチナーゼ：サルコシンオキシダーゼ－３００：３００：６０、そしてｃ）クレアチニナーゼ：クレアチナーゼ：サルコシンオキシダーゼ－６００：３００：６０。
【図１５】ＮａＣｌ、ｐＨ３．０中のクレアチン消化。ランニングバッファとして、ａ）ｐＨ７．５、ｂ）ｐＨ８．０、そしてｃ）ｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ。
【図１６】ｐＨ３．０でのＮａＣｌ中のクレアチン消化。ａ）クレアチナーゼ対ＳＯＡ比＝１５０：６０、ｂ）クレアチナーゼ対ＳＯＡ比＝１８０：６０、そしてｃ）クレアチナーゼ対ＳＯＡ比＝３００：６０。
【図１７】１００μＭクレアチナーゼを消化した場合のクレアチナーゼ対サルコシンオキシダーゼの様々な濃度についての、時間に対するａ）５０ｍＭ　ＥＰＰＳ中１００μＭサ

ルコシンの消化、及びｂ）シグナル応答。
【図１８－１】溶解度の表。
【図１８－２】溶解度の表。
【図１８－３】溶解度の表。
【図１９】クレアチニンの３酵素電流測定検出についての文献に記載される実験条件の概要。ＣＡ＝クレアチニナーゼ、ＣＩ＝クレアチナーゼ、ＳＯ＝サルコシンオキシダーゼ、予備溶液中Ｕ／ｍｌに標準化、１ユニットは、毎分１μｍｏｌの基質の変換を触媒する。＊電極のＵ／ｃｍ^2。＊＊Ｕ／電極。＊＊＊変換を実行することができない、酵素のｍｇ。
【発明を実施するための形態】
【００４２】
本発明の詳細な説明
本発明の第１の態様は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ又は全てを含む組成物を提供する。
【００４３】
一実施形態において、組成物は、液体である。別の実施形態において、組成物は、固体である。固体とは、例えば、組成物の構成要素が、電極に埋め込まれるのではなく、乾燥粉末として提供されることを意味する。更なる実施形態において、組成物は、ゲルの形態である。
【００４４】
一実施形態において、組成物は、クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼを含む。更なる実施形態において、組成物は、クレアチニナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含む。更なる実施形態において、組成物は、サルコシンオキシダーゼ及びクレアチナーゼを含む。別の実施形態において、組成物は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを含む。
【００４５】
ここで言及する３酵素系は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼの３つ全てを利用する。しかしながら、当業者であれば、使用されることとなる３酵素系について、３つ全ての酵素が同じ組成物内にある必要があるわけではないことを理解するであろう。例えば、クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼを含む本発明の組成物を、基質と反応させてから、サルコシンオキシダーゼが追加されてよく、これにより、センサーによって検出することができる過酸化水素が生じ得る。したがって、本明細書中での３酵素系への言及は、３つ全ての酵素の同時使用、すなわち、同じ組成物中での使用、又は酵素の連続した追加を指し得る。
【００４６】
一部の実施形態において、本組成物の２つ以上の酵素は、例えばグルタルジアルデヒドによって、互いに、又は別の剤、例えばＢＳＡに架橋されるが、好ましい実施形態において、酵素は架橋されない。
【００４７】
したがって、一実施形態において、本発明は、酵素が架橋されておらず、場合によってはグルタルジアルデヒドと架橋されていない、本発明の組成物を提供する。
【００４８】
一実施形態において、本発明は、酵素の少なくとも１つ、場合によっては２つ、場合によっては全てが固定されておらず、場合によっては、全ての酵素が溶液中にある、組成物を提供する。
【００４９】
本組成物の意図される一用途は、クレアチニンのレベルの判定、又はクレアチニンのレベルの、状態が安定したリアルタイム監視での使用であることは勿論である。したがって、一実施形態において、組成物は、実際の反応混合液の要件によって定義される。すなわち、本発明の組成物が、基質、例えばクレアチニンを含むサンプルと混合されると、過酸

化水素が生じる。例えば、組成物は、特定の濃度にて、又は特定のバッファ中で特定の濃度若しくはｐＨにて、酵素を、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する、サンプルの混合に由来する最終混合溶液、例えば透析液において、種々のパラメータが満たされるように含んでもよい。

【００５０】

例えば、希釈の直後に、必要とされる濃度に到達するような、種々の構成要素の濃縮量を含む組成物を供給することが周知である。これは、当業者に周知である。したがって、本明細書中で定義される好ましいあらゆる最終反応濃度又はパラメータを満たすことができるように、本発明の組成物を生成することができる。例えば、一部の実施形態において、本発明の組成物は、微小透析と共に用いられて、酵素混合物は、特定の流量にて微小透析液と混合される。当業者であれば、関与する流量及びパラメータに基づいて、使用時に、必要とされるパラメータを実現する本発明の適切な出発組成物を決定することができるであろう。

【００５１】

一実施形態において、本発明の組成物が液体である場合、液体は、バッファを含む。したがって、本発明の一実施形態は、本発明の組成物の酵素をバッファ中に提供する。

【００５２】

別の実施形態において、本発明の組成物がゲルである場合、ゲルはバッファを含んでもよい。バッファの設定は、本明細書中に記載される通りである。

【００５３】

選択されるバッファは、酵素の活性、及びクレアチニンの検出の結果としての感度に大きな影響を及ぼすと考えられる。３酵素系を用いようとした先行技術の試みは、概して、生理学的ｐＨでの、そしてリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中での酵素の使用に焦点を当ててきた。これらの試みの例が、図１９に記載されている。また、この研究のほとんどは、３酵素系の酵素の少なくとも１つが、電極の１つに組み込まれているバイオセンサーを用いていた。ＰＢＳは、電気化学センサーに用いるのに適したバッファであると考えられていた。なぜなら、好ましい相互作用が、ホスファートと電極との間で生じるからである。

【００５４】

しかしながら、先行技術でのＰＢＳの豊富な使用にも拘わらず、発明者らは、驚くべきことに、ＰＢＳが、本発明に用いるのに最も適したバッファではないことを見出した。これは、ＰＢＳが、二価陽イオン、例えば、Zn^{2+}、Mn^{2+}、及びMg^{2+}を封鎖する能力を有するからかもしれず、これらのイオンは全て、種々の種から単離されるクレアチニナーゼ酵素にとって重要な補因子である。ＰＢＳは、これらのような陽イオンと不溶性の塩を形成すると考えられる。図１８は、種々のバッファ塩の可溶性を一覧にしており、当業者であればそこから、どれが本発明に用いるのに適したバッファであり、そして適していないバッファであるかを、容易に判断することができる。図１８は、例えば、二価陽イオンのリン酸塩の不溶性のレベルを示す。

【００５５】

好ましい実施形態において、バッファは、クレアチニナーゼの補因子、例えば二価陽イオン補因子、例えば、Zn^{2+}、Mn^{2+}、又はMg^{2+}について、クレアチニナーゼと競合しない。別の実施形態において、バッファは、陽イオン、例えば二価陽イオン、例えば、Zn^{2+}、Mn^{2+}、又はMg^{2+}を封鎖しない。

【００５６】

したがって、一実施形態において、バッファは、リン酸バッファでもＰＢＳでもない。

【００５７】

一実施形態において、トリスベースのバッファもまた、本発明の組成物に用いるのに適していると考えられない。したがって、一実施形態において、バッファは、ＰＢＳではなく、及び／又はトリスベースのバッファではない。

【００５８】

３つ全ての酵素（クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼ）を含む反応に最適なｐＨは、およそｐＨ８．０～ｐＨ８．９５であると考えられるので、本発明の一実施形態において、バッファは、ｐＫａが７．０～９．０であるバッファである。一実施形態において、バッファは、ｐＫａが７．０～９．０であるが、ＰＢＳでも四ホウ酸（tetraborate）でもトリスでもない。別の実施形態において、バッファのｐＫａは、７．０５～８．９５、場合によっては７．１～８．９、場合によっては７．１５～８．８５、場合によっては７．２～８．８０、場合によっては７．２０～８．７５、場合によっては７．２５～８．７０、場合によっては７．３０～８．６５、場合によっては７．３５～８．６０、場合によっては７．４０～８．５５、場合によっては７．４５～８．５０、場合によっては７．４０～８．４５、場合によっては７．４５～８．４０、場合によっては７．５０～８．３５、場合によっては７．５５～８．３０、場合によっては７．６０～８．２５、場合によっては７．６５～８．２０、場合によっては７．７０～８．１５、場合によっては７．７５～８．１０、場合によっては７．８０～８．０５、場合によっては７．８５～８．００、場合によっては７．９０～７．９５であり、又はｐＫａは、上述のｐＫａ値の少なくともいずれかであり、若しくは先のｐＫａ値のどれよりも小さい。

【００５９】

一実施形態において、バッファのｐＫａは、７．３～８．９５である。

【００６０】

一実施形態において、バッファのｐＫａは、８．５、又はおよそ８．５である。

【００６１】

先のｐＫａ範囲のいずれかについて、一実施形態において、バッファは、ＰＢＳではなく、及び／又は四ホウ酸ではなく、及び／又はトリスではなく、及び／又はＨＥＰＥＳではない。

【００６２】

当業者であれば、種々のバッファのｐＫａをよく知っており、且つそのリストを利用できるであろう。

【００６３】

一実施形態において、本発明に有用であると考えられるバッファの特定の例として、ＥＰＰＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンプロパンスルホン酸）がある。別の実施形態において、ＨＥＰＢＳ（Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（４－ブタンスルホン酸））も有用であると考えられる。更なる実施形態において、ＰＯＰＳＯ（ピペラジン－１，４－ビス（２－ヒドロキシプロパンスルホン酸））、ＨＥＰＰＳＯ（Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（２－ヒドロキシプロパン－３－スルホン酸））、及びＭＯＢＳ（４－（Ｎ－モルフォリノ）ブタンスルホン酸）も有用であると考えられる。

【００６４】

一実施形態において、バッファは、そのｐＫａの１ｐＨユニット内で用いられるべきであると考えられる。

【００６５】

ｐＫａが９を超えるバッファが用いられてもよい。しかしながら、例えば血液又は尿のクレアチニン濃度を決定する文脈で、９．５を超えるｐＫａは、有用そうでない。しかしながら、そのようなバッファ、すなわち、ｐＫａが９を超える、又は９．５を超えるものは、他の文脈で有用であるかもしれず、そしてまた本発明の一部として含まれる。

【００６６】

様々なバッファの種々の性質に関する詳細な情報（ｐＫａが挙げられる）を容易に見つけることができ、例えば、Sigmaのウェブサイトには、多くのバッファに関する詳細な情報がある（http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html）。

【００６７】

一実施形態において、本発明のバッファは、室温、例えば１８℃～２５℃、例えば、１

８℃、１９℃、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、又は２５℃にて用いられる。バッファは、典型的に、２０℃にて用いられてもよい。更なる実施形態において、本発明のバッファは、室温にて、室温を超えて、例えば、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃、又はそれ以上にて用いられる。更なる実施形態において、バッファは、５５℃以下、例えば、５０℃、４５℃、４０℃、又はそれ以下の温度にて用いられる。更なる実施形態において、バッファは、室温未満の温度にて用いられない。

【００６８】

用いられるバッファのｐＫａに加えて、酵素が実行されることとなる反応混合液のｐＨもまた、非常に重要である。一実施形態において、組成物又はバッファのｐＨは、およそｐＨ８．０～ｐＨ８．９５である。本発明の一実施形態において、組成物又はバッファは、ｐＨが７．０～９．０の組成物又はバッファである。一実施形態において、組成物又はバッファは、ｐＨが７．０～９．０であるが、ＰＢＳでも四ホウ酸でもトリスでもない。別の実施形態において、組成物又はバッファのｐＨは、７．０５～８．９５、場合によっては７．１～８．９、場合によっては７．１５～８．８５、場合によっては７．２～８．８０、場合によっては７．２０～８．７５、場合によっては７．２５～８．７０、場合によっては７．３０～８．６５、場合によっては７．３５～８．６０、場合によっては７．４０～８．５５、場合によっては７．４５～８．５０、場合によっては７．４０～８．４５、場合によっては７．４５～８．４０、場合によっては７．５０～８．３５、場合によっては７．５５～８．３０、場合によっては７．６０～８．２５、場合によっては７．６５～８．２０、場合によっては７．７０～８．１５、場合によっては７．７５～８．１０、場合によっては７．８０～８．０５、場合によっては７．８５～８．００、場合によっては７．９０～７．９５であり、又はｐＨは、上述のｐＫａ値の少なくともいずれかであり、若しくは先のｐＨ値のどれよりも小さい。

【００６９】

一実施形態において、組成物又はバッファのｐＨは、７．３～８．９５である。

【００７０】

一実施形態において、組成物又はバッファのｐＨは、８．５、又はおよそ８．５である。

【００７１】

先のｐＨ範囲のいずれかについて、一実施形態において、バッファは、ＰＢＳではなく、及び／又は四ホウ酸ではなく、及び／又はトリスではなく、及び／又はＨＥＰＥＳではない。

【００７２】

一実施形態において、本発明の組成物は、バッファを、５ｍＭ～１００ｍＭ、場合によっては１０ｍＭ～９０ｍＭ、場合によっては１５ｍＭ～８５ｍＭ、場合によっては２０ｍＭ～８０ｍＭ、場合によっては２５ｍＭ～７５ｍＭ、場合によっては３０ｍＭ～７０ｍＭ、場合によっては３５ｍＭ～６５ｍＭ、場合によっては４０ｍＭ～６０ｍＭ、場合によっては４５ｍＭ～５５ｍＭ、場合によっては５０ｍＭの濃度にて含む。当業者であれば、必要とされるバッファの適切な濃度を決定することが容易にできよう。例えば、当業者であれば、（ｉ）ヘンダーソン－ハッセルバルヒ式を用いて、例えば、正常なヒト血清についてｐＨ７．３５にて算出して、適切な範囲の最下端を得て、例えば、ｐＨ８．５の０．１以内の範囲を、そして次に（ｉｉ）バッファに対する塩基性のｐＫａについて、例えば、ｐＨ８．５の０．１以内の範囲を維持し得る。

【００７３】

本発明の組成物のｐＨは、特定のｐＨであってもよいが、生体サンプル、例えば、血液、尿、又は組織流体サンプルの追加の直後に、結果として生じる混合液のｐＨは、変化し得ることは勿論である。好ましくは、ｐＨの変化は、最低限に維持される。なぜなら、一実施形態において、組成物のバッファのｐＨは、３酵素系に最適なものであると考えられ、そして最適な条件が維持されないならば、T_{90}に達するのにかかる時間が延長され得

るからである。一実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０～０．１ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．１～０．２ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．２～０．３ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．３～０．４ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．５～０．６ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．６～０．７ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．７～０．８ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．８～０．９ｐＨユニット異なる。別の実施形態において、結果として生じる混合液のｐＨは、本発明の組成物のｐＨと０．９～１．０ｐＨユニット異なる。

【００７４】

別の実施形態において、本組成物のバッファのｐＨは、３酵素系に最適なものであると考えられないが、本発明の組成物が、生体サンプル、例えば、血液、尿、又は組織流体サンプルと混合されると、最適なｐＨが得られるように、設計される。

【００７５】

一実施形態において、組成物は、ｐＨ８．０～８．５のＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０～８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、又はｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳを含む。

【００７６】

好ましい実施形態において、組成物は、ｐＨ８．０又はｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳを含む。

【００７７】

先で考察されるように、様々なバッファの、ｐＨを含む種々の性質が当業者に知られており、そして当業者であれば、一般常識と組み合わせた、ここに記載される詳細に基づいて、どのバッファが本発明に用いるのに適しているかを容易に決定することができる。

【００７８】

クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼの溶液と併用した、これらのバッファ性質の組合せは、以前に先行技術において考えられなかった。３酵素反応の最適ｐＨ、及びバッファとしてのＰＢＳの不適切性を確認したのは、本発明者の研究しかなかった。

【００７９】

重要なのは反応混合液のｐＨであるので、酵素を含む組成物は、本明細書中に記載されるように、バッファを含んでもよいが、バッファは、その代わりとして、別個に供給されてもよく、例えば、キットの部品の一部として、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼの１つ以上、又は全てと一緒に供給されてもよいことは勿論である。この場合には、酵素の１つ以上が、反応混合液に、適切なｐＨを維持するバッファとは別に加えられる。

【００８０】

一実施形態において、組成物内の唯一の実体は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼ、並びに、バッファが存在するならば、バッファである。この場合、本発明の組成物は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ、又は全て、並びに、先に記載されるように、存在するならば、バッファからなる、又は本質的になる。勿論、組成物が固体であるならば、組成物は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ、又は全てからのみなることはあり得る。しかしながら、組成物がゲルの液体である場合、組成物は、液体構成要素又はゲル構成要素も含まなければならないが、これは、一実施形態において、本発明の研究に何ら重大な影響を及ぼすと考えられないので、この場合の組成物は、

クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ、又は全てからなる、又は本質的になる。

【００８１】

しかしながら、腎機能を監視する等の状況では、例えば、対象の他の代謝物質又はパラメータを監視することも有用であり得ることは勿論である。したがって、一部の実施形態において、組成物は、他の有用な剤も含む可能性もありながら、先の剤を含む。例えば、組成物がウレアーゼも含むならば、尿素の検出を可能にするのが有用であると考えられるが、当業者であれば、この反応は、電気化学的物質を生成しないこと、そしてアンモニア及びCO_2の生成によってたらされるｐＨの変化を検出する手段が使用される必要があろうことを理解するであろう。組成物は、尿酸を消化して、電気化学的物質を生じるウリカーゼを含んでもよい。更なる実施形態において、組成物は、シスタチンＣ及びアルブミンを検出する手段を含んでもよい。

【００８２】

本組成物の酵素は、クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼの活性を有するならば、いかなる源由来であってもよい。酵素は、野生型酵素、すなわち、特に生物において天然に存在するポリペプチド配列を有する酵素であってもよい。他の実施形態において、酵素の１つ以上は、非天然の配列を有してもよく、例えば、天然に存在する配列と比較して、突然変異を有してもよい。例えば、酵素は、例えば活性又は特異性を増大させる意図的な突然変異を有してもよい。

【００８３】

一実施形態において、クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼは、天然に存在するクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼの酵素と少なくとも２０％の同一性又は相同性を有し、例えば、天然に存在するクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼの酵素と少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９６％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％の同一性又は相同性を有する。

【００８４】

本組成物の酵素は、必要とされる反応を触媒すること、すなわち、クレアチニナーゼが、クレアチニンをクレアチンに変換すること；クレアチナーゼが、クレアチンをサルコシン及び尿素に変換すること；そしてサルコシンオキシダーゼが、サルコシンをグリシン、ホルムアルデヒド、及び過酸化水素に変換することができるならば、いかなる配列を有してもよい。

【００８５】

本組成物の酵素は、組換えタンパク質であってもよいし、合成タンパク質であってもよい。

【００８６】

一実施形態において、クレアチニナーゼは、SorachimカタログナンバーCNH-311由来であり；及び／又はクレアチナーゼは、SorachimカタログナンバーCRH-211由来であり；及び／又はサルコシンオキシダーゼは、SorachimカタログナンバーSAO-351由来である。

【００８７】

一実施形態において、３酵素系内の酵素の相対比は、最適化された反応混合液を生成するのに重要であると考えられる。当業者であれば、あらゆる反応において、速度制限工程が存在すると理解するであろう。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、発明者らは、本明細書中に記載される３酵素系では、サルコシンオキシダーゼ酵素が速度制限工程であると考える。したがって、当業者であれば、どんなに多くのクレアチニナーゼ及びクレアチナーゼが反応に加えられても、一実施形態において、過酸化水素の生成速度は、サルコシンオキシダーゼの量によって制限されることとなると理解するであろう

。

【００８８】

更なる実施形態において、酵素の実際の物理量が重要であることは勿論である。例えば、酵素が最も適切な比率にある場合でさえ、酵素が少な過ぎると、例えば、電極での検出に十分な量の過酸化水素が生じることはない。加えられ得る酵素の量の上限はないと考えられるが、当業者であれば、過剰な酵素は浪費的であり、不必要な支出を被ることを理解するであろう。

【００８９】

したがって、一実施形態において、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中のクレアチニナーゼの濃度は、約５０Ｕ／ｍｌを超えるべきであり、例えば約７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約１００Ｕ／ｍｌ超、例えば約１２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約１５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約１７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約２００Ｕ／ｍｌ超、例えば約２５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約３００Ｕ／ｍｌ超、例えば約３２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約３５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約３７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約４００Ｕ／ｍｌ超、例えば約４２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約４５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約４７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約５００Ｕ／ｍｌ超、例えば約５２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約５５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約５７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約６００Ｕ／ｍｌ超、例えば約６２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約６５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約６７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約８００Ｕ／ｍｌ超、例えば約８２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約８５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約８７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約９００Ｕ／ｍｌ超、例えば約９２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約９５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約９７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約１０００Ｕ／ｍｌ超であるべきであると考えられる。当業者であれば、反応混合液中の必要とされる最終濃度を可能にする、本発明の組成物中でのクレアチニナーゼの適切な出発濃度を決定することができるであろう。

【００９０】

同じ、又は代替の実施形態において、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中のクレアチナーゼの濃度は、約５０Ｕ／ｍｌを超えるであるべきであり、例えば約７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約１００Ｕ／ｍｌ超、例えば約１２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約１５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約１７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約２００Ｕ／ｍｌ超、例えば約２５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約３００Ｕ／ｍｌ超、例えば約３２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約３５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約３７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約４００Ｕ／ｍｌ超、例えば約４２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約４５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約４７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約５００Ｕ／ｍｌ超、例えば約５２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約５５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約５７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約６００Ｕ／ｍｌ超、例えば約６２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約６５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約６７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約８００Ｕ／ｍｌ超、例えば約８２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約８５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約８７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約９００Ｕ／ｍｌ超、例えば約９２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約９５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約９７５Ｕ／ｍｌ超、例えば約１０００Ｕ／ｍｌ超であるべきであると考えられる。当業者であれば、反応混合液中の必要とされる最終濃度を可能にする、本発明の組成物中でのクレアチナーゼの適切な出発濃度を決定することができるであろう。

【００９１】

同じ、又は代替の実施形態において、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中のサルコシンオキシダーゼの濃度は、約１０Ｕ／ｍｌを超えるべきであり、例えば約１５Ｕ／ｍｌ超、例えば約２０Ｕ／ｍｌ超、例えば約２５Ｕ／ｍｌ超、例えば約３０Ｕ／ｍｌ超、例えば約３５Ｕ／ｍｌ超、例えば約４０Ｕ／ｍｌ超、例えば約４５Ｕ／ｍｌ超、例えば約５０Ｕ／ｍｌ超、例えば約５５Ｕ／ｍｌ超、例えば約６０Ｕ／ｍｌ超、例えば約６５Ｕ／ｍｌ超、例えば約７０Ｕ／ｍｌ超であるべきであると考えられる。好ましくは、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中のサルコシンオキシダーゼの量は、少なくとも３０Ｕ／ｍｌである。当業者であれば、反応混合液中の必要とされる最終濃度を可能にする、本発明の組成物中でのサルコシンオキシダーゼの適切な出発濃度を決定することができるで

あろう。

【００９２】

当業者であれば、必要とされる各酵素の量、特に、速度制限であると考えられるサルコシンオキシダーゼ酵素の量は、いくつかの要因によって決まることとなることを理解するであろう。例えば、検出されることとなるクレアチニンの予想される量は、必要とされる酵素の量に影響を与えることとなる。したがって、一実施形態において、クレアチニンの量を判定する反応に用いられる各酵素の量は、サンプル中のクレアチニンの量に従って調整される。

【００９３】

好ましくは、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液は、少なくとも３００Ｕ／ｍｌのクレアチニナーゼを含む。

【００９４】

好ましくは、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液は、少なくとも１２０Ｕ／ｍｌのクレアチナーゼを含む。

【００９５】

好ましくは、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液は、少なくとも１５Ｕ／ｍｌのサルコシンオキシダーゼを含む。

【００９６】

一実施形態において、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液は、少なくとも３００Ｕ／ｍｌのクレアチニナーゼ、１２０Ｕ／ｍｌのクレアチナーゼ、及び少なくとも１５Ｕ／ｍｌのサルコシンオキシダーゼを含む。

【００９７】

クレアチニン、並びに３００Ｕ／ｍｌ未満のクレアチニナーゼ、及び／又は１２０Ｕ／ｍｌ未満のクレアチナーゼ、及び／又は１５Ｕ／ｍｌ未満のサルコシンオキシダーゼを含む本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液は依然として、有用な反応をもたらすと考えられるが、これらの値を上回る酵素濃度により、最終の検出可能な過酸化水素へのクレアチニンの反応のかなり大きな向上が得られると考えられる。

【００９８】

当業者であれば、必要とされる各酵素の量は、反応が、結果として生じる過酸化水素の検出前に進行することができる時間の長さによっても決まることとなることを理解するであろう。例えば、リーディングの頻度が高いことが必要とされない状況（例えば１時間以上毎に１リーディング、例えば２時間以上毎に１リーディング）では、反応は、リーディングが、例えば０．５秒毎又は１秒毎に必要とされるよりも長い時間、進行することができる。後者の場合、例えば、クレアチニンの９０％が、結果として生じる過酸化水素の生成と反応する（T_{90}）ように反応が進行するように、より大量の酵素が必要である一方、先の場合、少量の酵素しか必要とされない。なぜなら、過酸化水素の検出前のより長い時間、反応が進行するままにすることができるからである。

【００９９】

発明者らは、健康な個体内の血漿クレアチニンの低い生理学的レベル、及び腎機能が低下した個体内の血漿クレアチニンレベルの増大を考慮するように、反応条件を最適化した。

【０１００】

好ましい実施形態において、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液内のクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼの比率は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼがそれぞれ１０：５：１～４９：８：１Ｕ／ｍｌである。例えば、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中のそれぞれクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼの比率は、適切なあらゆる比率であってよく、例えば、１０：５：１、１５：５：１、２０：５：１、２５：５：１、３０：５：１、３５：５：１、４０：５：１、４５：５：１、１０：１０：１、１５：１０：

１、２０：１０：１、２５：１０：１、３０：１０：１、３５：１０：１、４０：１０：１、４５：１０：１、５０：１０：１、１０：１５：１、１５：１５：１、２０：１０：１、２５：１５：１、３０：１５：１、３５：１５：１、４０：１５：１、４５：１５：１、５０：１５：１、１０：２０：１、１５：２０：１、２０：２０：１、２５：２０：１、３０：２０：１、３５：２０：１、４０：２０：１、４５：２０：１、５０：２０：１、１０：２５：１、１５：２５：１、２０：２５：１、２５：２５：１、３０：２５：１、３５：２５：１、４０：２５：１、４５：２５：１、５０：２５：１、１０：３０：１、１５：３０：１、２０：３０：１、２５：３０：１、３０：３０：１、３５：３０：１、４０：３０：１、４５：３０：１、５０：３０：１、１０：３５：１、１５：３５：１、２０：３５：１、２５：３５：１、３０：３５：１、３５：３５：１、４０：３５：１、４５：３５：１、５０：３５：１、１０：４０：１、１５：４０：１、２０：４０：１、２５：４０：１、３０：４０：１、３５：４０：１、４０：４０：１、４５：４０：１、５０：４０：１、１０：４５：１、１５：４５：１、２０：４５：１、２５：４５：１、３０：４５：１、３５：４５：１、４０：４５：１、４５：４５：１、５０：４５：１、１０：５０：１、１５：５０：１、２０：５０：１、２５：５０：１、３０：５０：１、３５：５０：１、４０：５０：１、４５：５０：１、又は５０：５０：１であってよい。

【０１０１】

先で考察されるように、クレアチニン及び本発明の酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中のサルコシンオキシダーゼの量は、約１０Ｕ／ｍｌを超えることが好ましいと考えられ、好ましくは少なくとも３０Ｕ／ｍｌである。これは、健康な対象において見出される低いレベルのクレアチニンについて、信頼性が高いシグナルを与えるのに十分な量の当該酵素を可能にすると考えられ、そして４．３μＭもの低いクレアチニンレベルを検出することができ、サンプルからのクレアチニンの回収が向上すると、２μＭもの低さにまで感度が増すと予想される。健康な個体の血清クレアチニン濃度は、６０μＭ～１２０μＭに及ぶので、特許請求される本発明の感度は、血清クレアチニンレベルの正確な判定が可能なほど適切に高いことは明らかである。

【０１０２】

特定の実施形態において、バッファの特定のｐＨ及び／又は組成物のバッファのタイプ及び／又は酵素の比率及び／又は酵素のそれぞれの実際の量の組合せは、特に効果的なセットの反応条件を実現するように考えられる。例えば、一実施形態において、組成物は、酵素及びバッファを、クレアチニン及び酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中で、６００Ｕ／ｍｌのクレアチニナーゼ、３００Ｕ／ｍｌのクレアチナーゼ、及び６０Ｕ／ｍｌのサルコシンオキシダーゼが存在するように含む。更なる実施形態において、組成物は、酵素及びバッファを、クレアチニン及び酵素組成物を含有する透析液の混合に由来する最終混合溶液中で、６００Ｕ／ｍｌのクレアチニナーゼ、３００Ｕ／ｍｌのクレアチナーゼ、及び６０Ｕ／ｍｌのサルコシンオキシダーゼがｐＨ８．５にて存在するように含む。

【０１０３】

一実施形態において、組成物は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及び／又はサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ以上、並びに本明細書中に記載されるバッファ等の他の構成要素を、１００μＭクレアチニンを含む反応のT_{90}が、１０分未満、例えば９．５分未満、例えば９分未満、例えば８．５分未満、例えば８分未満、例えば７．５分未満、例えば７分未満、例えば６．５分未満、例えば６分未満、例えば５．５分未満、例えば５分未満、例えば２５０秒未満、例えば２２５秒未満、例えば２００秒未満、例えば１９０秒未満、例えば１８０秒未満、例えば１７０秒未満、例えば１６０秒未満、例えば１５０秒未満、例えば１４０秒未満、例えば１３０秒未満、例えば１２０秒未満、例えば１１０秒未満、例えば１００秒未満、例えば９０秒未満、例えば８０秒未満、例えば７０秒未満、例えば６０秒未満、例えば５０秒未満、例えば４０秒未満、例えば３０秒未満、例えば２０秒未満、例えば１０秒未満であるように含む。一実施形態において、Ｔ９０は、１

９５秒以下である。別の実施形態において、Ｔ９０は、１５４秒以下である。さらに別の実施形態において、Ｔ９０は、１３５秒以下である。当業者であれば、適切なパラメータを決定することができよう。そして例が、実施例に与えられている。

【０１０４】

本発明の組成物が、追加の構成要素又は剤、例えば対象の健康を判定するのに有用な他の剤を含んでもよいことは、当業者に明らかであろう。例えば、組成物は、尿素のレベルを検出する手段、例えばウレアーゼ及び／又はウリカーゼを含んでもよい。組成物は、シスタチンＣ及びアルブミンを検出する手段を含んでもよい。

【０１０５】

本明細書中で詳述される感度の高い最適化された組成物を用いて、クレアチニンのレベルをいくつかの方法で検出することができることは明らかであろう。

【０１０６】

したがって、更なる態様は、クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼ、並びに少なくとも第１のセンサーを含むセンサー系を提供する。

【０１０７】

一実施形態において、クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼは、本明細書中に記載される、本発明に従う組成物として提供される。別の実施形態において、３つの酵素は別々に提供され、そして反応混合液に順次加えられる。先の設定は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及び／又はサルコシンオキシダーゼの２つ以上を含む組成物に関するが、最適な反応条件は、３つの酵素が加わるあらゆる反応に用いられることは勿論である。例えば、クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼを含む本発明の組成物は、サルコシンオキシダーゼの別個の組成物又はアリコートと一緒に用いられてもよい。好ましい条件として、例えば、ＰＢＳでないバッファ及び／又はｐＨが８．５であるバッファが依然として用いられる。したがって、本発明の組成物に関して記載される先の条件及び設定はまた、３つ全ての酵素が別々に供給される、例えば、反応器に順次導入される状況に用いられる。

【０１０８】

したがって、センサー系は、少なくとも以下の種々の状況を含み得る：

クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼを含み、サルコシンオキシダーゼを含まない組成物；

クレアチニナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含み、クレアチナーゼを含まない組成物；

クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含み、クレアチニナーゼを含まない組成物；

クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼを含み、サルコシンオキシダーゼが別個に供給される組成物；

クレアチニナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含み、クレアチナーゼが別個に供給される組成物；

クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含み、クレアチニナーゼが別個に供給される組成物；並びに

クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼの別々の供給（いずれかの同じ組成物の一部としてではない）。

【０１０９】

先で考察されるように、一実施形態において、センサー系はまた、本明細書中に記載される１つ以上のバッファを含むことで、反応は、最適な条件下で進むことが可能となり得る。

【０１１０】

３酵素系は、尿素及び過酸化水素の双方を生成し、これらは双方とも検出可能である。

【０１１１】

サルコシンオキシダーゼ酵素によって生じる過酸化水素を検出するのが有利であると考

えられる。これにより、感度が高い電気化学的検出が、例えば電流測定センサーによって可能となる。過酸化水素はまた、特殊な膜を用いて、電位差測定的に検出されてもよい。これ以外にも、過酸化水素は、酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、及び染色分子を用いて、光学的に検出されてもよい。したがって、系は、電流測定センサー、及び／又は電位差検知用の特殊な膜、及び／又は更なる酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、及び染色分子を含んでもよい。

【０１１２】

好ましくは、系は、少なくとも電流測定センサーを含む。電流測定センサーは、当該技術において周知である。

【０１１３】

検出電極が、いくつかの剤の１つによって保護されているならば、有用であると考えられる。そのような剤は、当業者に知られており、ｍＰＤ、ポリフェノール、ナフィオン、及びパラ－フェニレンジアミン（ｐＰＤ）が挙げられる。これらの剤は、不所望の分子が電極にアクセスするのを妨げる一方、過酸化水素を通すのを許容すると考えられる。一実施形態において、検出電極は、白金から製造され、これは、過酸化水素の電気化学に最も適した材料であると考えられる。別の実施形態において、検出電極は、例えば、白金がスパッタリングされたシリコーン針であってもカーボンナノチューブであってもよい。

【０１１４】

センサー系は、あらゆるサンプル、例えば、対象から得られるサンプル、例えば、血液、血漿、尿、組織液、若しくは髄液からとられたサンプル；又は、例えば、灌流腎臓からとられたサンプル、例えば、臓器移植が意図される灌流腎臓由来の灌流液のサンプル内のクレアチニンを検出するのに用いることができる。

【０１１５】

センサー系はまた、あらゆる容量のサンプルに用いることができる。有利には、本発明の組成物及び系は、マイクロフルイディクス、例えば、マイクロフルイディック回路及び／又はマイクロフルイディックデバイス及び／又はマイクロフルイディックプローブに用いるのに適している。したがって、一実施形態において、系は、マイクロフルイディック回路及び／又はマイクロフルイディックデバイス及び／又はマイクロフルイディックプローブを含む。マイクロフルイディック回路、マイクロフルイディックデバイス、及びマイクロフルイディックプローブは、当該技術において周知であり、そして詳細な例が、実施例に詳述されている。

【０１１６】

一実施形態において、系は、サンプリングプローブ、例えばマイクロフルイディックプローブを含む。適切なマイクロフルイディックプローブが当該技術において知られており、Brain CMA-70（MDialysis）；Freeflap CMA-70（MDialysis）；MAB9.14.2（Microbiotech SE）；MAB6.14.2（Microbiotech SE）；MAB11.35.4（Microbiotech SE）、又はMDialysisのナンバー６７の静脈内微小透析カテーテルが挙げられる

【０１１７】

別の実施形態において、系はまた、ゾーンを含み、この中で、サンプル、例えば微小透析液は、本発明の組成物と、又はクレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼと混合されて、過酸化水素を生じさせることができる。系はまた、別の実施形態において、セクションを含み、この中で、過酸化水素は、例えば電流測定センサーによって、検出される。

【０１１８】

一実施形態において、系はまた、連続流系を含む。

【０１１９】

別の実施形態において、系は、連続流系を含まない。

【０１２０】

更なる実施形態において、系は、安定した流を維持する手段を含む。これは、腎機能のリアルタイム監視又は連続監視が必要とされる場合に有利であると考えられる。

【０１２１】
別の実施形態において、系は、安定した流を維持する手段を含まない。例えば、系は、直線流アッセイ系に用いられてよい。そのような系は、家庭での使用に適していると考えられ得る。例えば、一実施形態において、系は、本明細書中に記載される検知試薬（例えば適切なｐＨにある適切なバッファと共に）、及びセンサー、例えば電気化学的センサーを含み、系は、単発のポイントオブケアの状況で用いられ、又は家庭試験キット若しくはデバイスであり、サンプル、例えば血液は、検知試薬及びバッファ（存在するならば）と混合されて、混合且つ反応されてから、結果として生じる過酸化水素が、センサー、例えば、電流測定センサー又は電位差検知及び／又は酵素センサー、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ及び色素分子（腎機能の程度の視覚リードアウトを可能にする）で検知される。
【０１２２】
系が較正標準を含んでもよいことは勿論である。したがって、一実施形態において、系は、較正流とサンプル流とをスイッチする手段を含んでもよい。別の実施形態において、系は、較正標準を、平行流の形態で含んでもよい。この後者の実施形態は、ホームシステム又はポイントオブケアシステムの文脈で、特に有用であると考えられる。
【０１２３】
系はまた、患者から、例えば、血液、尿、血漿、組織液、又は髄液からサンプルをとる手段を含んでもよい（適切なあらゆるサンプルが、本発明の利用に適している）。系はまた、閉ループの単離された灌流臓器、例えば腎臓からサンプルをとる手段を含んでもよい。
【０１２４】
一実施形態において、サンプルは、透析液、例えば微小透析液である。
【０１２５】
先で考察されるように、当業者であれば、完了に近づくにつれ、反応が進み得、感度はより高くなると理解するであろう。また、当業者であれば、所望の感度と反応時間との間に到達される妥協点があり得ると理解するであろう。完了又はほぼ完了までかかる時間を少なくするために、酵素の量を増大させてもよい。
【０１２６】
一実施形態において、センサー系は、サンプルをセンサーと接触させる前にサンプルに検知試薬が加えられるように配置される。このようにして、酵素は、検知前に、過酸化水素の測定可能なレベルをもたらすことができる。好ましい実施形態において、反応は、検知前に完了に至った、又は検知前に、少なくとも９５％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも９０％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも８５％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも８０％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも７５％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも７０％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも６５％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも６０％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも５５％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも５０％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも４５％の完了に達した、又は検知前に、少なくとも４０％の完了に達した。
【０１２７】
一実施形態において、センサー系は、検知試薬（先で考察されるように、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及び／又はサルコシンオキシダーゼの２つ以上を含む組成物であってもよいし、別個のアリコート中の３つの酵素全てであってもよい）が、センサーとの接触前にサンプルに加えられるように配置される、例えば、検知試薬をサンプルに加えてからセンサーとの接触までが１０分超であるように配置される。一実施形態において、センサー系は、酵素又は本発明の組成物をサンプルに加えてからセンサーとの接触までが１０分超である、例えば９．５分超である、例えば９分超である、例えば８．５分超である、例えば８分超である、例えば７．５分超である、例えば７分超である、例えば６．５分超である、例えば６分超である、例えば５．５分超である、例えば５分超である、例えば

２５０秒超である、例えば２２５秒超である、例えば２００秒超である、例えば１９０秒超である、例えば１８０秒超である、例えば１７０秒超である、例えば１６０秒超である、例えば１５０秒超である、例えば１４０秒超である、例えば１３０秒超である、例えば１２０秒超である、例えば１１０秒超である、例えば１００秒超である、例えば９０秒超である、例えば８０秒超である、例えば７０秒超である、例えば６０秒超である、例えば５０秒超である、例えば４０秒超である、例えば３０秒超である、例えば２０秒超である、例えば１０秒超である、例えば５秒超である、例えば２秒超である、例えば１秒超であるように配置される。

【０１２８】

一実施形態において、センサー系は、酵素又は本発明の組成物をサンプルに加えてからセンサーとの接触までが１０分未満である、例えば９．５分未満である、例えば９分未満である、例えば８．５分未満である、例えば８分未満である、例えば７．５分未満である、例えば７分未満である、例えば６．５分未満である、例えば６分未満である、例えば５．５分未満である、例えば５分未満である、例えば２５０秒未満である、例えば２２５秒未満である、例えば２００秒未満である、例えば１９０秒未満である、例えば１８０秒未満である、例えば１７０秒未満である、例えば１６０秒未満である、例えば１５０秒未満である、例えば１４０秒未満である、例えば１３０秒未満である、例えば１２０秒未満である、例えば１１０秒未満である、例えば１００秒未満である、例えば９０秒未満である、例えば８０秒未満である、例えば７０秒未満である、例えば６０秒未満である、例えば５０秒未満である、例えば４０秒未満である、例えば３０秒未満である、例えば２０秒未満である、例えば１０秒未満である、例えば５秒未満である、例えば２秒未満である、例えば１秒未満であるように配置される。

【０１２９】

灌流液の流量及び本発明の組成物又は検知試薬（３つの酵素は、同時にではなく順次送達される）は、結果として生じる反応混合液の組成に影響を与える。当業者であれば、本明細書中に記載されるように、最適な反応混合液を達成する適切な流量を決定することができるであろう。一実施形態において、センサー系は、灌流液の流量が０．１～１０μｌ／分、例えば少なくとも０．１μｌ／分、例えば少なくとも０．２５μｌ／分、例えば少なくとも０．５μｌ／分、例えば少なくとも０．７５μｌ／分、例えば少なくとも１．０μｌ／分、例えば少なくとも１．２５μｌ／分、例えば少なくとも１．５μｌ／分、例えば少なくとも１．７５μｌ／分、例えば少なくとも２．０μｌ／分、例えば少なくとも２．２５μｌ／分、例えば少なくとも２．５μｌ／分、例えば少なくとも２．７５μｌ／分、例えば少なくとも３．０μｌ／分、例えば少なくとも３．２５ｌ／分、例えば少なくとも３．５μｌ／分、例えば少なくとも３．７５μｌ／分、例えば少なくとも４．０μｌ／分、例えば少なくとも４．２５μｌ／分、例えば少なくとも４．５μｌ／分、例えば少なくとも４．７５μｌ／分、例えば少なくとも５．０μｌ／分、例えば少なくとも５．２５μｌ／分、例えば少なくとも５．５μｌ／分、例えば少なくとも５．７５μｌ／分、例えば少なくとも６．０μｌ／分、例えば少なくとも６．２５μｌ／分、例えば少なくとも６．５μｌ／分、例えば少なくとも６．７５μｌ／分、例えば少なくとも７．０μｌ／分、例えば少なくとも７．２５μｌ／分、例えば少なくとも７．７５μｌ／分、例えば少なくとも８．０μｌ／分、例えば少なくとも８．２５μｌ／分、例えば少なくとも８．５μｌ／分、例えば少なくとも８．７５μｌ／分、例えば少なくとも９．０μｌ／分、例えば少なくとも９．２５μｌ／分、例えば少なくとも９．５μｌ／分、例えば少なくとも９．７５μｌ／分、例えば少なくとも１０．０μｌ／分であるように配置される。

【０１３０】

好ましい実施形態において、灌流液の流量は、１μｌ／分～２μｌ／分である。一実施形態において、灌流液の流量は、１μｌ／分である。別の実施形態において、流量は２μｌ／分である。

【０１３１】

酵素の流量は、反応混合液中の酵素の濃度及び所望される最終濃度によって決まること

は勿論である。

【０１３２】

例えば、組成物が、ｐＨ８．５のバッファ中に、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼをそれぞれ６００Ｕ／ｍｌ、２００Ｕ／ｍｌ、及び６０Ｕ／ｍｌの量で含む場合、酵素混合液は、１：１～１：１０の酵素混合物／本発明の組成物：透析液の最終容量比を生じさせるように加えられることとなる。一実施形態において、酵素混合物／本発明の組成物は、１：４の酵素混合物／本発明の組成物：透析液の最終容量比を生じさせるように加えられる。そのような実施形態において、灌流液の流量は、２μｌ／分であってよく、そして酵素／本発明の組成物の流量は、０．５μｌ／分であってよい。

【０１３３】

当業者であれば、酵素の濃度が増減すれば、酵素溶液の、灌流液に対する比率は変化することとなることを理解するであろう。

【０１３４】

サルコシンオキシダーゼとサルコシン間の反応は酸素を必要とすることは勿論である。したがって、一実施形態において、系は、反応混合液中の酸素の量を増大させる手段を含む。一実施形態において、当該手段は、反応溶液中の酸素の量を１０μＭ超又はそれ以上に増大させる。例えば、反応溶液中の酸素の量を増大させる手段は、２５μＭ超、例えば５０μＭ超、例えば７５μＭ超、例えば１００μＭ超、例えば１２５μＭ超、例えば１５０μＭ超、例えば１７５μＭ超、例えば２００μＭ超、例えば２２５μＭ超、例えば２５０μＭ超、例えば２７５μＭ超、例えば３００μＭ超、例えば３２５μＭ超、例えば３５０μＭ超、例えば３７５μＭ超、例えば４００μＭ超、例えば４２５μＭ超、例えば４５０μＭ超、例えば４７５μＭ超、例えば５００μＭ超の酸素濃度をもたらす。一実施形態において、酸素の濃度は、約２００μＭ～２５０μＭである。http://www.engineeringtoolbox.com/oxygen-solubility-water-d_841.html上のengineering toolboxは、常圧での生理食塩水中の酸素濃度の範囲（１気圧にて３５％生理食塩水中２２５μｍｏｌのＯ２）を与える。

【０１３５】

反応混合液中の酸素の量は、いくつかの方法によって増大させることができ、それらは全て、本発明の系に含まれてもよい。例えば、系は、バッフル若しくは蛇行ゾーンを順々に含むミキサー、又は例えば溶液の混合を増大させるあらゆるものを含んでもよい。ミキサーは、高度に浸透性の材料、例えばＰＤＭＳから製造されてもよいし、Teflonチューブによって連結されて、減少した酸素レベルを「再チャージする」ことができる複数の混合ステージを有してもよい。当業者であれば、材料の固有の浸透性によって、又は薄い壁若しくは大きな表面積であることによって、或いは全ての組合せによって、浸透性を達成することができると理解するであろう。一実施形態において、反応混合液の酸素含有量を増大させる複数の手段は、例えば、Teflonから製造された複数のミキサー及び複数の連結が用いられる。更なる実施形態において、酸素含有量を増大させる手段、又は複数の手段は、加圧コンテナ内にある。

【０１３６】

先で考察されるように、反応条件の最適化は、非常に感度が高く、且つ正確な、クレアチニンのレベルの判定を可能にする。したがって、一実施形態において、系は、溶液中で４μＭ以下のレベルのクレアチニンを検出することができ、例えば、２μＭ以下又は１μＭ以下のクレアチニンを検出することができる。別の実施形態において、センサー系は、例えば４０μＭ～１２０μＭのクレアチニンのバックグラウンドレベルに対して、１μＭ未満、２μＭ未満、３μＭ未満、４μＭ未満、５μＭ未満、７．５μＭ未満、又は１０μＭ未満のクレアチニンの変化を検出することができる。

【０１３７】

好ましい実施形態において、センサー系は、センサーからデータを収集する手段を含む。そのような手段は、当該技術において周知であり、その一例がPowerLab/4SPである。

【０１３８】
センサー系はまた、一部の実施形態において、データを送信するワイヤレス送信手段、例えばBluetoothトランスミッタ又は他のワイヤレストランスミッタを含んでもよい。
【０１３９】
センサー系はまた、一部の実施形態において、データ分析手段、例えばコンピュータ又はウェアラブルデバイスを含んでもよい。一実施形態において、データ分析手段は、推定糸球体濾過量（ｅＧＦＲ）を算出する。好ましい実施形態において、センサー系は、ワイヤレス送信手段、データ分析手段、及びワイヤレスで送信されたデータを受信する手段を含む。
【０１４０】
一実施形態において、系はまた、少なくとも１つの廃棄物収集レセプタクルを含む。例えば、本発明の一実施形態は、携帯型であってもなくてもよいリアルタイムモニターである。使い易さのために、特に長期環境及び／又はホーム環境において、反応及び過酸化水素の検知後の微小透析液は、廃棄物であると考えられる。好ましい実施形態は、廃棄物レセプタクル内に溜まることとなるこの廃棄産物を見る。レセプタクルは、好ましくは非常に小さく、例えば、サンプル／検知試薬を組み合わせた流量が３μｌ／分であれば、２４時間で４．３ｍｌの廃棄物が生じることとなる。したがって、一実施形態において、廃棄物レセプタクルは、容量が１０ｍｌ未満、例えば９．５ｍｌ未満、例えば９ｍｌ未満、例えば８．５ｍｌ未満、例えば８ｍｌ未満、例えば７．５ｍｌ未満、例えば７ｍｌ未満、例えば６．５ｍｌ未満、例えば６ｍｌ未満、例えば５．５ｍｌ未満、例えば５ｍｌ未満、例えば４．５ｍｌ未満、例えば４ｍｌ未満、例えば３．５ｍｌ未満、例えば３ｍｌ未満、例えば２．５ｍｌ未満、例えば２ｍｌ未満、例えば１．５ｍｌ未満、例えば１ｍｌ未満、例えば０．５ｍｌ未満、例えば０．２５ｍｌ未満である。
【０１４１】
そのような廃棄物レセプタクルは、本発明の範囲の外側で用いられ、そしてあらゆる微小透析処理若しくは分析の文脈において、又は他の携帯型デバイスに用いるのに、有用であり得ることは勿論である。
【０１４２】
一実施形態において、センサー系は携帯型である。例えば、センサー系は、対象が、そのような機械に連結されていなければならない、又はそのような機械への短期間の連結を必要とするのみであってよい大きな機構から、完全に独立していてもよい。
【０１４３】
本明細書中に記載されるセンサー系は、腎臓のリアルタイム機能の正確な判定を可能にする。考察されるように、この情報を用いて、臨床医に、特定の剤、例えば薬物による処置をするか停止するか、又はそれ以外では薬物投薬量を調整するかを知らせることができる。一実施形態において、センサー系は、薬物を送達する手段、例えば薬物ポンプを含む。好ましい実施形態において、センサー系は、薬物ポンプの作動、すなわち、算出されたクレアチニンレベル／クレアチニンクリアランス率／糸球体濾過量に基づいて、送達される薬物の量を自動的に調整する手段を含む。好ましい実施形態において、必要とされる薬物の量の決定は、自動的になされ、臨床医の介入は必要ない。そのような実施形態は、腎機能が低下した、又は腎機能が損なわれる危険に曝されている対象が、センサー系を家で用いて、腎機能を監視して、関連する薬物の適切な量を投与する状況で、特に有用であると考えられる。
【０１４４】
本発明の系を用いて投与が調節されることで有益となろう薬物又は剤の例として、腎臓で一掃される全ての薬物、特に、腎クリアランスを促進し得、若しくは損ない得、又はその生物活性がクリアランス率に依存するものが挙げられる。そのような剤として、画像化研究用のコントラスト剤が挙げられる一方、関連薬物の例として、免疫抑制剤；化学療法剤、例えば白金剤；抗菌物質、例えばグリコペプチドバンコマイシン及びテイコプラニン、並びにペニシリン；並びにオピオイド鎮痛薬、例えばモルヒネ、ジアモルフィン、及び

コデインが挙げられる。

【０１４５】

そのようなアプローチは、薬物の投薬量を、結果が知られる前に、しばらくの間、例えば数時間とられたサンプルに基づく、推定クリアランス測定値ではなくリアルタイムでの実際の腎クリアランス測定値に基づいて、パーソナライズすることができる。

【０１４６】

本発明の組成物又はセンサー系を用いて、対象におけるクレアチニンの定常レベルを監視することができる。このレベルのあらゆる上昇が、腎機能が弱まりつつあることを示し得る。このレベルの低下はまた、他の臨床介入が必要とされることを示し得る。したがって、クレアチニンの定常レベルの読出しは、有用であると考えられる。

【０１４７】

しかしながら、ＧＦＲの「生きた」リーディングを得るために、一実施形態において、対象に、クレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンを投与して、この人工的に誘導されたクレアチニンスパイクのクリアランス率を判定し、そして血液から一掃する腎臓の能力を試験する。そのような方法は有利であると考えられる。なぜなら、定常クレアチニンレベルに影響を与え得る要因に影響されにくいからである。例えば、高いクレアチニンリーディングは、クレアチニンの生成の増大に起因し得、そして腎機能の低下に起因し得ない。サンプル内の剤は、アッセイに干渉し得、又はリーディングは、クレアチニンの尿細管分泌の低下によって影響され得る。血清クレアチニンの増大はまた、調理された肉（調理由来の熱によってクレアチンから変換されたクレアチニンを含有する）の摂取の増大、又は運動性能を増強するためにとられるタンパク質補助剤及びクレアチン補助剤の過剰摂取に起因し得る。激しい運動は、筋肉分解を増大させることによって、クレアチニンを増大させ得る。いくつかの医薬品及びクロモゲンは、アッセイに干渉し得る。尿細管によるクレアチニン分泌は、一部の医薬品によって遮断されて、ここでも、測定されるクレアチニンを増大させ得る。

【０１４８】

したがって、本発明のセンサー系はまた、例えば一定の間隔をおいて、対象にクレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンを投与する手段を含んでもよい。任意の量のクレアチニンを投与してよい。一実施形態において、投与されるクレアチニンの量は、ベースラインレベルを１０％～２５０％、例えば２０％～２３０％、例えば３０％～２１０％、例えば４０％～２００％、例えば５０％～１９０％、例えば６０％～１８０％、例えば７０％～１７０％、例えば８０％～１６０％、例えば９０％～１５０％、例えば１００％～１４０％、例えば１１０％～１３０％、例えば１２０％増大させるのに十分である。

【０１４９】

投与されるクレアチニンの量が当該レベルを、ベースラインクレアチニンレベルの二倍増大させるのに十分であるならば、特に有用であると考えられる。

【０１５０】

当業者であれば、腎機能にひどく障害のある対象は、外因的に投与された少量のクレアチニンでさえ一掃するのに苦労することとなる一方、腎臓が健康な対象は、外因的に投与された大量のクレアチニンを比較的迅速に一掃することができるであろうことを理解するであろう。当業者であれば、対象に投与するクレアチニンの、必要とされる分析をすることができる適切な量を決定することができるであろう。

【０１５１】

先で考察されるように、好ましい実施形態において、クレアチニン、クレアチン、及び／又はサルコシンは、自動的に投与され、臨床医の介入は必要ない。そのような実施形態は、腎機能が低下した、又は腎機能が損なわれる危険に曝されている対象が、センサー系を家で用いて、腎機能を監視して、関連する薬物の適切な量を投与する状況で、特に有用であると考えられる。

【０１５２】

過酸化水素の一部のバックグラウンドレベルは、内因性のクレアチン及びサルコシンによって生じ得る、すなわち、クレアチニンに直接由来し得ないことは勿論である。クレアチニンのレベルの判定の精度を向上させるために、当業者は、これらのバックグラウンドレベルを考慮してもよい。一実施形態において、センサー系は、第２のセンサー、及び第２のサンプルを得るための第２の手段を含むように配置される。この実施形態において、第２のサンプルは、第２のセンサーでの検出前に、クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼ（すなわち、クレアチニナーゼなし）を含む第２の検知試薬と接触させられる。先で考察されるように、反応が進み得る酵素濃度、比率、及び時間は全て、最も高い感度を実現するように最適化されてよい。一実施形態において、センサー系は、検知試薬を第２のサンプルに加えてから第２のセンサーと接触するまで、１０分超であるように配置される。一実施形態において、センサー系は、酵素又は本発明の組成物をサンプルに加えてからセンサーとの接触まで１０分超、例えば９．５分超、例えば９分超、例えば８．５分超、例えば８分超、例えば７．５分超、例えば７分超、例えば６．５分超、例えば６分超、例えば５．５分超、例えば５分超、例えば２５０秒超、例えば２２５秒超、例えば２００秒超、例えば１９０秒超、例えば１８０秒超、例えば１７０秒超、例えば１６０秒超、例えば１５０秒超、例えば１４０秒超、例えば１３０秒超、例えば１２０秒超、例えば１１０秒超、例えば１００秒超、例えば９０秒超、例えば８０秒超、例えば７０秒超、例えば６０秒超、例えば５０秒超、例えば４０秒超、例えば３０秒超、例えば２０秒超、例えば１０秒超、例えば５秒超、例えば２秒超、例えば１秒超であるように配置される。

【０１５３】

一実施形態において、センサー系は、クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを第２のサンプルに加えて第２のセンサーとの接触まで１０分未満、例えば９．５分未満、例えば９分未満、例えば８．５分未満、例えば８分未満、例えば７．５分未満、例えば７分未満、例えば６．５分未満、例えば６分未満、例えば５．５分未満、例えば５分未満、例えば２５０秒未満、例えば２２５秒未満、例えば２００秒未満、例えば１９０秒未満、例えば１８０秒未満、例えば１７０秒未満、例えば１６０秒未満、例えば１５０秒未満、例えば１４０秒未満、例えば１３０秒未満、例えば１２０秒未満、例えば１１０秒未満、例えば１００秒未満、例えば９０秒未満、例えば８０秒未満、例えば７０秒未満、例えば６０秒未満、例えば５０秒未満、例えば４０秒未満、例えば３０秒未満、例えば２０秒未満、例えば１０秒未満であるように配置される。

【０１５４】

好ましい実施形態において、センサー系はまた、第２のセンサーから得られるデータを、第１のセンサーから得られるデータから減算する手段を含む。このようにして、クレアチニンのレベルの真の判定が得られる。しかしながら、内因性のクレアチン及びサルコシンから生じ得る過酸化水素のこのバックグラウンドレベルの判定は、必須であると考えられない。これらのレベルは低くて、概して重要でないと考えられる。また、本発明は、クレアチニンの相対量、及びその変化（すなわち、特定の対象内での）を判定することができる。クレアチニンの実際の物理量は、例えば薬物投与後の、クレアチニンの知覚される量のあらゆる相対変化と同程度に重要であると考えられない。

【０１５５】

また、尿細管クレアチニン分泌が、クレアチニンの総量全体に寄与することも知られている。これをさらに補正するために、系は、クレアチニンレベルを判定する反応の前に、薬物シメチジンも対象に投与されるように配置されてもよい。シメチジンは、クレアチニンの尿細管分泌を阻害すると考えられる。この場合、カイネティクスは、完全に第１の順位であり、血中のクレアチニンの量は、機能ネフロンにのみ依存する。

【０１５６】

本発明の実際的な利益の１つが、腎機能をリアルタイムに監視する能力の実現であることは勿論である。したがって、一実施形態において、センサー系は、データを継続的に収集する。例えば、センサー系がマイクロフルイディクスを含む場合、一実施形態において、本発明のセンサー試薬は、対象由来の微小透析液の流中に継続的に流し込まれる。反応

混合液が（好ましくは、先で考察されるように、反応混合液中の酸素濃度を増大させる１つ以上のミキサー及び／又は１つ以上の構成要素を介して）センサーに達するまでに必要となる経路の長さを変えることによって単純に設定することができる適切な反応時間の後、過酸化水素の量を判定してから、サンプル中のクレアチニンの量を判定し、そして必要とされるならば、ＧＦＲを算出するのに用いる。これは、連続して、対象のクレアチニンレベルの真のリアルタイムの連続リードを与えることができる。

【０１５７】

これ以外にも、クレアチニンレベルの連続リードは、不必要であると考えられ得、そして離散的な異なる時点からのデータで十分であると考えてもよい。分析物の流は連続してもよいが、データのサンプリングは連続しても連続しなくてもよい。データのサンプリングは、連続しないならば、有効な連続流のデータに必要なだけ十分に速く発生させることができる。例えば、センサーからのリーディングは、おおよそ２００Ｈｚにてデジタル化されてもよい。サンプルを、１０Ｈｚと同程度に低い頻度にてデジタル化して、データの有効な連続流を与えることができる。センサーからのリーディングを、２００Ｈｚよりもかなり高速でデジタル化することができる。しかしながら、特定の速度を越えて得られるデータの有用性に対する限界があると考えられる。例えば、データは、代謝物質レベル又は分子レベルの変化を迅速に検出するのに必要なだけ十分に高い速度であるが、データ分析系を圧倒し得る、多過ぎる非有用なデータを生じさせるほどにはおそらく大きくない速度にて、得られるべきである。例えば、１０秒毎のリーディングは、許容可能であると考えてよく、１０秒毎にわたる平均リーディングは、継続的に得られるデータの平均を提供する。

【０１５８】

したがって、一実施形態において、センサー系は、データを少なくとも２４時間毎に、又は少なくとも２２時間毎に、例えば少なくとも２０時間毎に、例えば少なくとも１８時間毎に、例えば少なくとも１６時間毎に、例えば少なくとも１４時間毎に、例えば少なくとも１２時間毎に、例えば少なくとも１０時間毎に、例えば少なくとも８時間毎に、例えば少なくとも６時間毎に、例えば少なくとも５時間毎に、例えば少なくとも４時間毎に、例えば少なくとも３時間毎に、例えば少なくとも２時間毎に、例えば少なくとも１．５時間毎に、例えば少なくとも１時間毎に、例えば少なくとも５０分毎に、例えば少なくとも４５分毎に、例えば少なくとも４０分毎に、例えば少なくとも３５分毎に、例えば少なくとも３０分毎に、例えば少なくとも２５分毎に、例えば少なくとも２０分毎に、例えば少なくとも１５分毎に、例えば少なくとも１０分毎に、例えば少なくとも５分毎に、例えば少なくとも２分毎に、例えば少なくとも１．５分毎に、例えば少なくとも６０秒毎に、例えば少なくとも４５秒毎に、例えば少なくとも３０秒毎に、例えば少なくとも１５秒毎に、例えば少なくとも１０秒毎に、例えば少なくとも５秒毎に、例えば少なくとも２秒毎に、例えば少なくとも１秒毎に、例えば少なくとも０．５秒毎に収集する。

【０１５９】

一実施形態において、得られるデータは、特定の間隔の平均リーディングであり、例えば、少なくとも２４時間毎にわたる、例えば少なくとも２２時間毎、例えば少なくとも２０時間毎、例えば少なくとも１８時間毎、例えば少なくとも１６時間毎、例えば少なくとも１４時間毎、例えば少なくとも１２時間毎、例えば少なくとも１０時間毎、例えば少なくとも８時間毎、例えば少なくとも６時間毎、例えば少なくとも５時間毎、例えば少なくとも４時間毎、例えば少なくとも３時間毎、例えば少なくとも２時間毎、例えば少なくとも１．５時間毎、例えば少なくとも１時間毎、例えば少なくとも５０分毎、例えば少なくとも４５分毎、例えば少なくとも４０分毎、例えば少なくとも３５分毎、例えば少なくとも３０分毎、例えば少なくとも２５分毎、例えば少なくとも２０分毎、例えば少なくとも１５分毎、例えば少なくとも１０分毎、例えば少なくとも５分毎、例えば少なくとも２分毎、例えば少なくとも１．５分毎、例えば少なくとも６０秒毎、例えば少なくとも４５秒毎、例えば少なくとも３０秒毎、例えば少なくとも１５秒毎、例えば少なくとも１０秒毎、例えば少なくとも５秒毎、例えば少なくとも２秒毎、例えば少なくとも１秒毎、例えば

少なくとも０．５秒毎にわたる平均リーディングである。

【０１６０】

現行の臨床実施は、腎機能を１日あたり３回分析するものである。したがって、一実施形態において、センサー系は、１日あたり３回、例えば８時間毎に、データを収集する。

【０１６１】

データ収集は、規則的に生じさせてもよいし、不規則であってもよい。例えば、データ収集は、例えば薬物の投与後の、リスクが増す時間にてより頻繁に生じさせてもよく、そしてリスクがより低い時間にてより頻度が低くてもよい。

【０１６２】

先で考察されるように、センサー系は、データをデータ分析手段に送信するワイヤレストランスミッタを含んでもよい。データ収集と同様に、データの送信は連続してもよいし、規則的な間隔があっても不規則な間隔があってもよい。例えば、データは、少なくとも２４時間毎、例えば少なくとも２２時間毎、例えば少なくとも２０時間毎、例えば少なくとも１８時間毎、例えば少なくとも１６時間毎、例えば少なくとも１４時間毎、例えば少なくとも１２時間毎、例えば少なくとも１０時間毎、例えば少なくとも８時間毎、例えば少なくとも６時間毎、例えば少なくとも５時間毎、例えば少なくとも４時間毎、例えば少なくとも３時間毎、例えば少なくとも２時間毎、例えば少なくとも１．５時間毎、例えば少なくとも１時間毎、例えば少なくとも５０分毎、例えば少なくとも４５分毎、例えば少なくとも４０分毎、例えば少なくとも３５分毎、例えば少なくとも３０分毎、例えば少なくとも２５分毎、例えば少なくとも２０分毎、例えば少なくとも１５分毎、例えば少なくとも１０分毎、例えば少なくとも５分毎、例えば少なくとも２分毎、例えば少なくとも１．５分毎、例えば少なくとも６０秒毎、例えば少なくとも４５秒毎、例えば少なくとも３０秒毎、例えば少なくとも１５秒毎、例えば少なくとも１０秒毎、例えば少なくとも５秒毎、例えば少なくとも２秒毎、例えば少なくとも１秒毎、例えば少なくとも０．５秒毎に送信されてもよい。

【０１６３】

上記のように、現行の臨床実施は、腎機能を１日あたり３回分析するものである。したがって、一実施形態において、センサー系は、１日あたり３回、例えば８時間毎に、データを送信する。

【０１６４】

一実施形態において、尿素のレベルを監視することが有用であると考えられる。したがって、一実施形態において、系は、尿素のレベルを判定する手段を含む。例えば、本発明の組成物は、尿素の検出を可能にするためにウレアーゼも含むことが有用であると考えられるが、当業者であれば、この反応は電気化学的物質を生成しないから、系は、アンモニア及びＣＯ２の生成によってもたらされるｐＨの変化を検出する手段を含んでもよいことを理解するであろう。本発明の組成物はまた、尿酸を消化して、系内の１つ以上のセンサーを用いて検出することができる電気化学的物質を生成するウリカーゼを含んでもよい。更なる実施形態において、系はまた、シスタチンＣ及びアルブミンを検出する手段を含む。

【０１６５】

先で考察されるように、本発明は、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及び／又はサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ以上を含む種々の組成物を、最適な酵素活性のための種々の他の構成要素及びパラメータと共に提供する。本発明はまた、本組成物と同じであってもよいし、その代わりとして、連続して用いる別個のベッセル内にクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを含んでもよい検知試薬に加えて、対象のクレアチニンレベルの実際の判定に有利であると考えられる構成要素を含むセンサー系を提供する。

【０１６６】

本発明はまた、本発明の組成物及びセンサー系を用いる種々の方法を提供する。また、先で考察される本発明の組成物、検知試薬、及びセンサー系の種々の特徴についての設定

を、以下で用いる。

【０１６７】

一実施形態において、本発明は、ヒト又は動物の対象由来のサンプル内のクレアチニンのレベルの判定方法を提供し、当該方法は、本発明の組成物又はセンサー系の使用を含む。好ましい実施形態において、サンプルは、透析液又は微小透析液である。

【０１６８】

クレアチニンのレベルは、糸球体濾過量（ＧＦＲ）を判定するのに用いることができる。したがって、本発明はまた、ヒト又は動物の対象内のＧＦＲの判定方法を提供し、当該方法は、本発明の組成物又はセンサー系の使用を含む。好ましい実施形態において、サンプルは、透析液又は微小透析液である。

【０１６９】

本発明は、クレアチニンのレベルのリアルタイム判定を一意的に可能にするので、本発明はまた、ヒト又は動物の対象由来のサンプル内のクレアチニンのレベル、クレアチニンクリアランス率、又はＧＦＲのリアルタイム判定方法を提供し、当該方法は、本発明のセンサー系の組成物の使用を含み、場合によっては、サンプルは、透析液又は微小透析液である。

【０１７０】

本方法の設定として、本発明の組成物又は本発明のセンサー系に関して先で考察される設定が挙げられる。例えば、本発明の方法のいずれかにおいて、一実施形態において、本発明の組成物又は３つの別個の酵素は、サンプルをセンサーと接触させる前に加えられる。別の実施形態において、対象は、ある量のクレアチニンを投与されて、クリアランス率が判定される。また、先で考察されるように、薬物シメチジンは、クレアチニンレベルの判定前に投与されてもよい。

【０１７１】

本明細書中に記載される方法、組成物、及びセンサー系を診断方法に用いることができることは、当業者に明らかであろう。例えば、一実施形態において、本発明は、対象を、急性腎疾患又は慢性腎疾患と診断する方法を提供し、当該方法は、本明細書中に記載される方法のいずれかに従って、クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量を判定することを含む。

【０１７２】

例えば、クレアチニンの定常レベルが上昇を始めたならば、対象は、腎障害及び腎機能障害に苦しみ始めることとなるかもしれない。加えて、又は代わりに、ある量のクレアチニンの投与後に、クリアランス率が、以前の量のクレアチニンが投与された場合と同程度に高速でなければ、ここでも対象は、腎障害に苦しみ始めることとなるかもしれない。

【０１７３】

そのような診断の後、本方法はまた、急性腎疾患又は慢性腎疾患の対象を処置することを含んでもよい。これは、急性腎疾患又は慢性腎疾患において禁忌又は危険である薬物による処置の停止又はその投薬量の引下げを含んでもよいし、最近投与され、そして腎機能障害を担うと考えられ得る薬物による処置の停止又はその投薬量の引下げを含んでもよい。

【０１７４】

例えば、オピオイド鎮痛薬、特にモルヒネ、ジアモルフィン、コデイン、及び化学療法剤、例えば白金剤は、本発明の方法を用いた腎機能の判定後に投与を調節することができる薬物であると考えられる。他の薬物が当該技術において知られており、例えば、http://www.eastmidlandscancernetwork.nhs.uk/Library/RenalDosageAdjustments.pdfは、いくつかの薬物のＧＦＲに基づく、推奨される投薬量の調整を詳述している。

【０１７５】

例えば、シタラビンは、ＧＦＲが３０ｍｌ／分未満で完全に禁忌（ＣＩ）である。本発明によるクレアチニンレベルの検出の精度及び感度により、これらの患者は、全体として処置を停止するのではなく、この有用な薬物のパーソナライズされた投薬量を受けるだけ

でよい。

【０１７６】

他のそのような薬物として、抗生物質、例えばグリコペプチドバンコマイシン及びテイコプラニン、又は投薬量を増大させたペニシリンが挙げられる。より多くの情報を、以下で見出すことができる：https://www.google.co.uk/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwjQh5v63JDVAhVgOMAKHSnrByUQFggtMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.nuh.nhs.uk%2Fhandlers%2Fdownloads.ashx%3Fid%3D60983&usg=AFQjCNFrkdOqgEItY0E8rSWu4GJmTbRgOQ。

【０１７７】

したがって、本発明はまた、対象に投与されることとなる薬物の用量を決定する方法を提供し、当該方法は、少なくとも薬物の投与前に、そして少なくとも薬物の投与後に、クレアチニンレベル／クレアチニンクリアランス率／糸球体濾過量を判定することを含み、場合によってはさらに、薬物の投与前後に、クレアチニンレベル／クリアランス率／糸球体濾過量を比較することを含む。

【０１７８】

本明細書中に記載されるような薬物の投薬量を調整する方法もまた、薬物治験に有用であると考えられる。

【０１７９】

本発明はまた、対象のベースラインクレアチニンレベルにのみ基づいて、対象に投与されることとなる薬物の用量を決定する方法を提供する。例えば、対象が、高いレベルの血中クレアチニンを有すると考えられるならば、薬物の投薬量が引き下げられてもよいし、まったく投与されなくてもよい。

【０１８０】

これ以外にも、本方法はまた、薬物の投与後にクレアチニンレベルが定常状態を維持するならば、薬物の用量を維持し、又は増大させることを含んでもよい。

【０１８１】

上述の方法は、対象を慢性腎疾患と診断する方法に用いることができる。例えば、慢性腎疾患は、通常、長期間にわたる高いレベルのクレアチニンに基づいて診断される。

【０１８２】

【表１】

ステージ	GFR*	説明	処置ステージ
1	90+	正常な腎機能、しかし腎疾患を指す尿の発見又は構造的な異常又は遺伝的形質	観察、血圧の管理。
2	60～89	腎機能の穏やかな低下、及び腎疾患を指す(ステージ１に関して)他の発見	観察、血圧及びリスク因子の管理。
3A 3B	45～59 30～44	腎機能の中等度の低下	観察、血圧及びリスク因子の管理。
4	15～29	腎機能の激しい低下	末期腎不全用のプランニング。
5	<15 又は 透析中	非常に重度、又は末期腎不全(時折、確立腎不全(established renal failure)と呼ばれる)	処置の選択。

【０１８３】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、繰り返され、例えば、クレアチニンレベル及びＧＦＲの判定は、センサー系に関して先で考察されるように、連続して、又は規則的若しくは不規則な間隔を設けて行うことができる。方法が実行されるべき頻度は、目的によって決まることとなり、そして当業者によって容易に決定することができる。例えば、方法は、対象が腎不全の危険に曝されていると考えられるならば、非常に頻繁に実行されてもよいし、対象が腎不全のリスクの増大の危険に曝されていると考えられない場合、あまり頻繁に実行されなくてもよい。薬物の投薬量は、規則正しく調整することもできるし、生のリアルタイムベースで調整することもできる。

【０１８４】

先で考察されるように、クレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンの「スパイク」を対象に投与して、クレアチニンのクリアランスのカイネティクスを観察でき

るようにすることは、一部の状況で有利である。例えば、クレアチニンレベル（例えば）がベースラインレベルに戻るのにかかる時間は、腎臓の機能を示す。この状況では、クレアチニンの投与の直後にクレアチニンレベル（又は場合によってはクレアチン又はサルコシン）を監視することが有利である。

【０１８５】

先で考察されるように、本発明の方法のいずれかが、対象由来のいかなるタイプのサンプル、例えば血液サンプル、又は血漿若しくは尿サンプル、又は髄液の組織流体に実行されてもよい。一実施形態において、サンプルは、例えば血液、尿、組織液、又は髄液のいずれかに由来する透析液又は微小透析液である。

【０１８６】

本発明の方法を用いて、腎機能、すなわちＧＦＲを、参照サンプル、例えば既知のクレアチニン濃度の参照サンプルから切り離して、本発明によって判定したクレアチニンレベルに基づいて判定することができることは勿論である。一実施形態において、例えば、薬物が投与されるべきか否か、又はどのくらい薬物を投与するべきかを判定するのに、対象の腎機能の相対変化にのみ基づいた、クレアチニンレベル又は算出されるＧＦＲの相対変化を用いることができると考えられる。例えば、ベースラインクレアチニンレベルが増大し始めたならば（又は、クレアチニン、クレアチン、若しくはサルコシンによるスパイクの後に、当該クレアチニン、クレアチン、若しくはサルコシンが一掃される速度は、クレアチニン、クレアチン、若しくはサルコシンが以前の試験において一掃された速度よりも低いならば）、対象は、腎機能障害の徴候を示し始めると考えられる。

【０１８７】

しかしながら、一部の実施形態において、判定したクレアチニンのレベル、又は算出したＧＦＲは、クレアチニン濃度が既知の参照サンプルと比較される。そのため別の実施形態において、本発明は、腎機能を監視する方法を提供し、当該方法は、先の請求項のいずれかで定義されるように、サンプルを組成物又は検知試薬と接触させることを含み、場合によっては、当該方法は、サンプル内のクレアチニンの濃度の判定を含み、場合によってはさらに、参照サンプル又は既知の参照濃度との比較を含み、場合によっては、当該方法は、場合によっては電流測定による、場合によっては電気化学センサーの使用による、H_2O_2のレベルの検出を含む。

【０１８８】

リアルタイム監視（本発明により、今般可能である）がない場合でさえ、本発明は、例えば、実際に現在用いられているようなクレアチニンレベルの単回の測定に有用であると考えられる。この場合において、対象サンプルの、参照サンプルとの、又は対象サンプルと比較して有用な情報を提供することができる既知の他のサンプルセットとの比較は、適切であると考えられる。したがって、一実施形態において、本発明は、サンプル中のクレアチニンの濃度を判定する方法を提供し、当該方法は、先の請求項のいずれかで定義されるように、サンプルを組成物又は検知試薬と接触させることを含む。好ましい実施形態において、当該方法は、例えば電流測定による、例えば電気化学センサーの使用による、H_2O_2のレベルの検出を含む。当該方法はまた、参照サンプル又は既知の参照濃度との比較を含んでもよい。好ましい実施形態において、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼは全て、自由溶液中にある。先で議論されるように、当該酵素は、対象サンプルに別々に（すなわち、先で検知試薬に関して考察されるように）加えられてもよいし、当該酵素の少なくとも２つは、例えば本発明の組成物を用いることによって、同時に加えられてもよい。別の実施形態において、３つの全ての酵素は、同じ組成物の一部であるので、３つの全ての酵素は、対象サンプルに同時に加えられる。先で考察される組成物についての設定は、検知試薬にも用いられ、例えばバッファ（バッファはＰＢＳでない）の選択、ｐＨ及び／又はｐＫａの選択がある（全てがこの（そして、他の全ての）実施形態に用いられる）。

【０１８９】

先で考察されるように、本発明は、クレアチニン濃度の相対変化を判定する方法を提供

し、当該方法は、複数の時点で、先の請求項のいずれかで定義されるように、サンプルを組成物と接触させることを含み、場合によっては、当該方法は、参照サンプル又は既知の参照濃度との比較を含む。

【０１９０】

当業者であれば、本明細書中に記載される組成物、検知系、及び方法はまた、臓器移植の分野で有用性があることを理解するであろう。移植よりも前に単離した腎臓の機能を監視することができて、腎機能が低下し始めれば、種々の介入を適所に施すことができるならば、有益であると考えられる。

【０１９１】

本発明は、本明細書中で、移植用の腎臓に基づいた、概念の証明を支持するデータを提供した。しかしながら、特定の剤を、閉ループ灌流系に加えて、代謝物質のクリアランス又は変換を臓器の機能の指標として監視する方法は、代謝物質が存在するあらゆる臓器に広く適用可能であり、且つ応用することができ、その生成又はその低下を監視することができると考えられる。

【０１９２】

例えば、移植に用いられる肺（すなわち、対象からとられた肺）の機能を、二酸化炭素クリアランスを測定することによって監視することができる。そのような状況では、二酸化炭素のアリコートを灌流系に加えて二酸化炭素のクリアランス率を監視することができる。当業者であれば、本発明の組成物が、二酸化炭素のレベルの判定に有用であると考えられないことを理解するであろうが、当業者であれば、灌流液中の二酸化炭素の検出に直接に用いることができる、例えば血中の、二酸化炭素のレベルを判定する方法をよく知っているであろう。そのようなアプローチが、本明細書中で提示される研究に基づいて機能することとなることは、もっともらしいと考えられる。

【０１９３】

同様に、ヘムを、閉じた環系に加えることによって、肝機能のレベルを判定することができ、そしてビリルビンの生成を監視して、特定の時間での肝臓の機能の直接の指標を与えることができる。

【０１９４】

例えば、一実施形態において、本発明は、移植臓器、例えば、対象から以前にとられた移植臓器を監視する方法を提供し、前記方法は、単離した移植臓器に、健康な臓器によって通常代謝される剤を投与することと、次に前記剤、又は前記剤の代謝物質のレベルを判定することとを含み、場合によっては、前記判定はさらに、本発明の組成物、センサー系、又は方法の使用を含む。好ましくは、臓器は、閉じた環系内にある。

【０１９５】

一実施形態において、臓器は腎臓であるので、本発明は、対象から以前にとられた移植腎臓を監視する方法を提供し、前記方法は、単離した移植腎臓に、クレアチニン、クレアチン、又はサルコシンを投与してから、クレアチニン、クレアチン、又はサルコシンのレベルを判定することを含み、場合によっては、前記判定はさらに、本発明の組成物、センサー系、又は方法の使用を含む。好ましくは、腎臓は、閉じた環系内にある。

【０１９６】

そのような系では、クレアチニン、クレアチン、又はサルコシンが投与されてからクリアランス率が判定される、先で考察される「スパイク」アプローチは、適切であると考えられる。

【０１９７】

本発明の組成物、系、及び方法はまた、遊離皮弁外科手術（free flap surgery）用の移植片の監視に有用であると考えられる。損傷を受けた筋組織は、クレアチニン及びカリウムを漏らすので、本発明は、移植片が悪化していることを示すクレアチニンの何らかの潜在的な増大を監視するのに用いることができる。

【０１９８】

移植臓器に関わる方法、好ましくは、臓器、例えば腎臓の機能の判定に関わる方法の全

てが繰り返され、例えば少なくとも２４時間毎に、例えば少なくとも２２時間毎に、例えば少なくとも２０時間毎に、例えば少なくとも１８時間毎に、例えば少なくとも１６時間毎に、例えば少なくとも１４時間毎に、例えば少なくとも１２時間毎に、例えば少なくとも１０時間毎に、例えば少なくとも８時間毎に、例えば少なくとも６時間毎に、例えば少なくとも５時間毎に、例えば少なくとも４時間毎に、例えば少なくとも３時間毎に、例えば少なくとも２時間毎に、例えば少なくとも１．５時間毎に、例えば少なくとも１時間毎に、例えば少なくとも５０分毎に、例えば少なくとも４５分毎に、例えば少なくとも４０分毎に、例えば少なくとも３５分毎に、例えば少なくとも３０分毎に、例えば少なくとも２５分毎に、例えば少なくとも２０分毎に、例えば少なくとも１５分毎に、例えば少なくとも１０分毎に、例えば少なくとも５分毎に、例えば少なくとも２分毎に、例えば少なくとも１．５分毎に、例えば少なくとも６０秒毎に、例えば少なくとも４５秒毎に、例えば少なくとも３０秒毎に、例えば少なくとも１５秒毎に、例えば少なくとも１０秒毎に、例えば少なくとも５秒毎に、例えば少なくとも２秒毎に、例えば少なくとも１秒毎に、例えば少なくとも０．５秒毎に、規則的に繰り返されてもよい。

【０１９９】

一実施形態において、本発明は、移植用の腎臓を監視する方法を提供し、前記方法は、腎臓を灌流することと、あるクレアチニンの量を系中に投与することと、本発明の組成物及び／又は系を用いてクレアチニンクリアランス率を判定することとを含む。

【０２００】

当業者であれば、当該臓器の転換（translation）後に、対象内の臓器の機能を監視する本発明の有用性を明らかに認識するであろう。したがって、本発明はまた、移植のレシピエントにおいて腎機能を監視する方法を提供し、クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又はＧＦＲ及び／又は腎機能は、本明細書中に記載される組成物、センサー系、及び／又は方法のいずれか１つ以上の使用によって判定される。

【０２０１】

本発明はまた、単離された腎臓の寿命を長くする方法を提供し、前記方法は、先の請求項のいずれかの組成物、センサー系、及び／又は方法の使用によって腎機能を監視することを含み、場合によっては、腎機能が低下し始めれば、パラメータ、例えば、酸素運搬量、温度、血圧、及び流量が、単離された腎臓の寿命を増大させようとするように変更される。移植臓器の寿命を長くする方法の研究は継続中であり、本発明の組成物、系、及び方法は、この研究のエンドポイントをチェックするのに有用であると考えられ、そして寿命を向上させる薬物を開発するのに用いることができる。

【０２０２】

本発明の組成物、センサー系、及び方法は、種々のキットの部品として提供されてよい。例えば、一実施形態において、本発明は、以下を含むキットを提供する：

クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ又は全て；及び／又は

本明細書中に記載される本発明の組成物；及び／又は

クレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシン；及び／又は

少なくとも１つの廃棄物レセプタクル；

バッファ、例えば、本明細書中に記載されるバッファ、例えば、ＰＢＳでないバッファ、及び／又はバッファ

微小透析プローブ；及び／又は

少なくとも１つ、好ましくは少なくとも２つの精密ポンプ。

【０２０３】

本明細書中の明らかに以前に公開された文献のリスト又は考察は、当該文献が当該技術の状態の一部である、又は一般常識であるという認定として必ずしもとられるべきでない。

【０２０４】

本発明の所定の態様、特徴、又はパラメータについての設定及び選択肢は、文脈がそう

でないと示さない限り、本発明の他の全ての態様、特徴、及びパラメータについてのあらゆる全ての設定及び選択肢と組み合わせて開示されているとみなされるべきである。例えば、本発明の方法は、ｐＨ８．５のバッファ、４μｌ／分の灌流液流量、及び０．５μｌ／分の酵素／組成物流量を含んでもよい。

【実施例】

【０２０５】

本発明を、以下の非限定的な実施例によって例示することとする。

【０２０６】

実施例

実施例１　設計要件

全体的な設計概念は、対象、例えば患者の単離した灌流腎臓の血液又は尿中の正常クレアチニン濃度を継続的にサンプリングしてアッセイするための、ポータブルな低コストの、大部分は直ちに作動できるミニチュア系を生じさせることであった。これは、血液について６０μＭ～１２０μＭ、そして尿中で７～１６ｍＭの濃度を検出することができる系を必要とする（以下の表１．１）。なお、当該血中クレアチニン濃度は、血中グルコース濃度のほんの１／２５～１／１５０であり、そして現在、臨床環境における連続リアルタイムクレアチニン監視が可能である系は存在しない［３３］。

【０２０７】

【表２】

血液及び尿中の正常範囲[1, 4-6]			
	構成成分	血清	尿
一般的な性質	容量	約80ml/Kg体重	約1.5 L/24時間
	オスモル濃度	280～295 mOsm/ Kg	450～900 mOsm/ Kg
	pH	7.35～7.45	4.5～8.0
	$[H^+]$	35～45 nmol/L	1～32,000 nmol/L
	タンパク質	60～80 g/L	≤150 mg/ 24時間
イオン	Na^+	135～145 mmol/L	40～220 mmol/ 24時間
	K^+	3.5～5.0 mmol/L	25～120 mmol/ 24時間
	Ca^{2+}	2.0～2.5 mmol/L	2.5～7.5 mmol/ 24時間
	Mg^{2+}	0.6～0.8 mmol/L	3～4.5 mmol/ 24時間
	Cl^-	95～105 mmol/L	100～250 mmol/ 24時間
窒素廃棄物	尿素	1.5～5 mmol/L	420～720 mmol/ 24時間
	クレアチニン	60～120 μmol/L	7～16 mmol/ 24時間
	アンモニア/NH_4^+	10～35 μmol/L	20～70 mmol/ 24時間
	尿酸	180～480 μmol/L	1.4～4.4 mmol/ 24時間
細胞	赤血球	4～5 $x10^{12}$/L	0～3 / HPF†
	白血球	4～9 $x10^9$/L	0～2 / HPF†
その他	グルコース	4～6 mmol/L	不在
	ビリルビン	2～25 μmol/L	不在
	ケトン	不在	不在
	ニトライト	不在	不在

†/HPF = 高倍率顕微鏡視野あたり

表1.1

【０２０８】

発明者らは、経験を通して、設計プロセスにおける早期のステージでの反応生成物の検出方法を考慮することが重要であることを学習した。Tsuchida and Yodaのクレアチニンデイミナーゼ用の反応スキーム及びより複雑にされた３工程プロセスは双方とも、電気化学的定量化又は分光測光的定量化のいずれかに適用可能な種を生成する。これらの２つのうち、電気化学的方法は、比色ベース又は吸収ベースの検出に必要とされる、小スケールでの光路長、並びにモノクロ光源の創設及び安定性の問題のために、小型化により適している。

【０２０９】

実施例２　リアルタイムアッセイ系の開発

発明者らのラボ内で開発したグルコース及びラクタートのサンプリング系は、ロバストな連続流リアルタイムアッセイ系を生じさせる、微小透析、マイクロフルイディクス、及び電流測定的検知の組合せに影響を及ぼす（例えば、国際公開第２０１６１８９３０１号参照）。

【０２１０】

電流測定センサー

発明者らのラボは、以前のＰｈＤ研究員、Chu Wang博士によって設計されたポテンショスタットを用いている［５８］。これは、トランスインピーダンスアンプとしてOPA129（Texas Instruments Inc.、Dallas、Texas、USA）を用いており、これは、最大入力バイア

ス電流が１００ｆＡであり、電流雑音指数が
【数２】

$0.1\ fA/\sqrt{Hz}$

であり、差動入力インピーダンスが$10^{13}\Omega$である。この設計において、電圧設定点を、作用電極での直流バイアスではなくPowerLabデータ収集系由来の対電極へのインバース電圧として印加して、トランスインピーダンスアンプの入力での考えられるあらゆるノイズを最小にする。回路のサーボ部は、OPA140（Texas Instruments Inc.、Dallas、Texas、USA）を用いており、これは、低電圧オフセットが１２０μＮであり、オフセット電圧ドリフトが１μＶ／℃であり、差動入力インピーダンスが$10^{13}\Omega$であり、出力インピーダンスが１６Ωであり、利得帯域幅積が１１ＭＨｚである。

【０２１１】

電解重合ｍ－フェニレンジアミン（ｍＰＤ）による表面保護

針微小電極を調製する場合の最終工程は、作動電極を汚染から保護すること、及びH_2O_2のスケールの分子のみを表面に到達させることである。この技術を、文献中に存在するバイオセンサーを形成するための、電極表面によって酵素をトラップするのに用いられるポリマーフィルム（ナフィオン［６４］、ポリピロール［６５］、及びポリフェノール［６６］のフィルムが挙げられる）の複数の報告から発展させた。

【０２１２】

これらの最も安定し、且つ均一なものは、in-situ電解重合によって形成される。このようにして、最終フィルムの正確な部位、割合、及び厚さを制御することができる。発明者らは、メター－フェニレンジアミン（ｍＰＤ）［６７］を重合させることで、再現性がある薄膜が生じることを見出し、これは、作用電極の表面に密着しており、そして、より大きな干渉酸化還元種（例えば、フェロセン、又は生体系において一般的に見出されるもの（アスコルバート、ウラート、又はパラセタモール（Ｎ－（４－ヒドロキシフェニルアセトアミド））））が電極表面に達するのを妨げるほど十分に高密度である一方、良好な応答時間（＜１秒）を与えるほど十分な速度のH_2O_2をなお可能にする。

【０２１３】

当該方法は簡単である。針微小電極を、ｐＨ７．４の１０ｍＭリン酸緩衝生理食塩水中のｍＰＤの１００ｍＭ溶液内に静止させて、＋０．７Ｖの電圧（対ＡｇＩＡｇＣ１）を、電流が漸近的に低いレベルに減ずるまで、作用電極に２０分間印加する。次に、空気乾燥させる前に電極を、０Ｖにてさらに２～５分間保持してから、dH_2O中でリンスした。次に、ｍＰＤ層の品質を、サイクリックボルタンメトリでチェックする。良好な結果は、シグナルピークのマグニチュードを９５％引き下げ、酸化及び還元プロファイルが等しく、且つ銀汚染の証拠がないものと考える。

【０２１４】

実施例３　３酵素系の最適化

全ての実験は、酵素クレアチニナーゼ（ＣＮＨ－３１１；ＥＣ３．５．２．１０；２５９Ｕ／ｍｇ）、クレアチナーゼ（ＣＲＨ－２２１；ＥＣ３．５．３．３；９．１８Ｕ／ｍｇ）、及びサルコシンオキシダーゼ（ＳＡＯ－３５１；ＥＣ１．５．３．１；１３．３Ｕ／ｍｇ）を用いた。これらは、Toyobo（東洋紡、大阪、日本）由来の酵素を供給するSorachim（Sorachim SA.、Lausanne、Switzerland）から購入した。

【０２１５】

この洗練プロセスは、LabSmithマイクロフルイディック系の酵素混合物、バッファ、及びレイアウトの最適な範囲を探究して、低い濃度でのクレアチニンのロバストな検出を可能にするのに、完了まで何ヶ月もかかった。

【０２１６】

酵素反応の選択及び最適化に関して、文献を再検討すると、３つの顕著な傾向があった。第１に、大部分の研究者は、マトリックス内に埋め込んだ酵素を、電極の種々の形態に

直接用いたバイオセンサーを用いていた。第２に、センサーを生じさせるのに用いた酵素の具体的な量の一貫性が極めて低く、それに由来する検出限界もなかった。第３に、過去３３年にわたるこの系に関する研究は全て、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）をランニングバッファとして用いてきた。図１９参照。

【０２１７】

図１９に示す論文のうち、［７３］及び［７４］のみがバイオセンサーを用いておらず、その代わりとして、一連の酵素反応ベッドによる分光測光分析及びフローインジェクション分析をそれぞれ使用している。

【０２１８】

実施例４　バッファ選択

ＰＢＳ以外のバッファを選択することを所望する理由の１つは、尿又は血液からのサンプリング用の系の使用意図であった。表１．１は、尿ｐＨが、健常な成人における４．５（H^+が３２μｍｏｌ）と同程度に低くあり得ることを示す。重度の虚血に直面しても感度を維持するように、ｐＨ３用の系を過大設計する選択をした。ＰＢＳのpK_aはたった７．２であり、これは、１ｍｍｏｌのH^+を中和して、ｐＨ８．０の０．１ユニット内に透析液のｐＨを維持するのに十分な能力を提供するには、高度に濃縮したバッファが必要とされることとなることを意味する。これは、３．１未満によるヘンダーソン－ハッセルバルヒ式を用いることによって実証される、１００ｍＭのＰＢＳ濃度を必要とすることとなるが、pK_aが８．０のバッファは、ｐＨ変化を±０．１ユニットに阻止するためだけに２０ｍＭの濃度を必要とするはずである。

【数３】

$$8.0 = 7.2 + \log_{10}\left(\frac{\text{酸}}{\text{塩基}}\right)$$

$$10^{0.8} = \left(\frac{\text{酸}}{\text{塩基}}\right)$$

塩基（１＋６．３０９５）＝１００ｍＭ

塩基＝１３．６８ｍＭ

酸＝８６．３２ｍＭ

１ｍｍｏｌのＨ＋の緩衝は、以下のように比率を変えることとなる：

【数４】

$$\left(\frac{86.32}{13.68}\right) \rightarrow \left(\frac{85.32}{14.68}\right)$$

【０２１９】

ヘンダーソン－ハッセルバルヒ式による逆算：

【数５】

$$pH = 7.2 + \log_{10}\left(\frac{85.32}{14.68}\right)$$

$$=7.964$$

広範な代替バッファを調査して、ｐＫａが８．０、低温感受性、そしてカチオン錯体生成がない適切なバッファを探し、これらの基準の全てにマッチする一般的でないピペラジンベースの剤、４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－プロパンスルホン酸（ＥＰＰＳ）を同定した。

【０２２０】

Benchtop試験は、５０ｍＭのＥＰＰＳが、緩衝酵素溶液と１：４の容量比で混合した場合、ｐＨ３．０の食塩水を最終ｐＨ７．７に中和することができることを実証した（１００ｍＭ　ＰＢＳ中の酵素については、ちょうどｐＨ７．５であった）。

【０２２１】

実施例５　最適化実験

ラボでの以前の研究では、２μｌ／分の灌流液流及び０．５μｌ／分の酵素の組合せが、良好な結果をもたらすことを見出した。微小透析実験を実行する前に、サルコシンオキシダーゼからクレアチニナーゼまで遡って研究して、酵素混合物及びｐＨについて順番に各工程を直接試験して最適化することを決めた。

【０２２２】

図１は、８×２５μｍ電極を作る前の、ランした単一の５０μｍ電極の最初の実験セットの結果を示しており、１０ｍＭ　ＰＢＳ中３０Ｕ／ｍｌサルコシンオキシダーゼのシグナルマグニチュードを、２５μＭ～１０ｍＭのサルコシンと比較して、ｐＨを８．０に塩基性化することでシグナルが向上するであろうという疑惑を確認した。これらの結果は、ｐＨ７．５よりも８．０にて感度がより高い２工程混合物及び３工程混合物と類似する。

【０２２３】

ｐＨ７．５の１００ｍＭ　ＰＢＳ、ｐＨ８．０の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、及びｐＨ９．０の５０ｍＭホウ酸バッファ中の３０Ｕ／ｍｌ　ＳＡＯの一対一の比較は、より新規の８×２５μｍ電極アレイを用いて、図２の結果をもたらした。濃度が進むにつれてのＥＰＰＳシグナルの標準偏差の広がりは、基質ポンプの欠陥による可能性が最も高く、これは後の実験においても現れて、その交換の原因となった。

【０２２４】

図３は、これらの段階希釈実験のステップドプロファイルを示しており、これは、本系についての不適切性をさらに確認する、トリスバッファ及びホウ酸バッファに由来する結果に対する、ＰＢＳ及びＥＰＰＳにおいて得られた明らかな結果を実証している。

【０２２５】

その後、酵素の種々の混合に対する応答曲線の時間プロファイルを調査する一連の実験を続けて、最小の向上を知ることができた最も短い時間での最大応答を達成した。これは、酵素比がもはや、単に酵素の量だけを制限しなかったことを示すであろう。系の総酵素含有量（重量／容量）を血清アルブミンの総酵素含有量（４００ｍｇ／ｍｌ）に制限することを決めたが、これを、後の開発においてさらに推進することができた。マイクロフルイディック系内のインクラステーションの可能性、並びに粘性の増大、混合に対する干渉、及びこれらのスケールでのより高いタンパク質濃度での基質拡散に注意した。

【０２２６】

全ての実験を、ｐＨ３．０の標準的な生理食塩水中１００μＭ基質のリザーバで実行した。この中に、酵素混合物を、意図する１：４の容量比で加えてから、２．５μｌ／分にてセンサーを過ぎるようにポンプ輸送して、最終系の総流を再現した。酵素混合物を、ｐＨ７．５、８．０、そして８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ中で緩衝した。広範囲にわたる一連の結果は、最終実験の１つであった図４（ＳＡＯ及びクレアチナーゼ含有量を、１００μＭクレアチンについて最適化し、そしてこの実験は、今般、ｐＨ３．０の標準的な生理食塩水中１００μＭクレアチニンについて、クレアチニナーゼの最適な量を確認しようと試みた）を除いて、ここで再現しないこととする。

【０２２７】

なお、ｐＨを８．０から８．５まで増大させる方法は、クレアチニナーゼ含有量を３００Ｕ／ｍｌから６００Ｕ／ｍｌの二倍にするのと同等であり（青色対赤色のライン）、ｐＨ８．５での６００：３００：６０の混合物による応答は増大した。微小透析実験に選択した最終混合物は、ｐＨ８．０にて５０ｍＭ　ＥＰＰＳ中６００：３００：６０であったが、この実験は、代替の緩衝剤を、将来およそ８．５のより高いｐＫａ（例えばＨＥＰＢＳ（ｐＫａ８．３））に用いる可能性を高めた［９４］。

【０２２８】

以下の表３．４は、混合物の放出を実証する、この実験方法によってｐＨ８．０にて得たＴ$_{90}$レベル（最大値（アップストロークの最初から測定）の９０％に達する時間）の収集を示す。

【０２２９】

【表３】

SAO (U)	T_{90} (秒)	CRH : SAO (U)	T_{90} (秒)	CNH : CRH : SAO (U)	T_{90} (秒)
15	138	150: 60	145	150: 300: 60	195
30	73	180: 60	104	300: 300: 60	154
60	28	300 : 60	77	600 : 300 : 60	**135**

表 3.4: 最小 T_{90} レベルを達成する pH 8.0 での酵素最適化実験の結果。最終混合物の反応時間を太字で強調する。

【０２３０】

これらの結果から、透析液中に酵素を供給するＹ接合部とセンサーとの間で３分の遅延を実行して、十分な混合及び反応時間を提供することによって最大感度を確実にすると決めた。

【０２３１】

実施例６　微小透析実験

１００μＭのレベルにてクレアチニンを検出するのに最適化した酵素量及びバッファにより、シミュレートした最終環境において系を微小透析で試験した。ここで、膜表面積が１８．８ｍｍ^{2}であり、そしてカットオフが２０ｋＤａである、組織ディープサンプリング用に設計したクリニカルグレードCMA 70微小透析プローブ（M Dialysis AB、Stockholm、Sweden）を、十分に撹拌したＴ１溶液（細胞外流体類似体）（発明者らのストック液は、ｄＨ$_2$Ｏ中２．３ｍＭ塩化カルシウム、１４７ｍＭ塩化ナトリウム、及び４ｍＭ塩化カリウムを含有する）中に静止させ、これに、標準添加方法論において、クレアチニンのアリコートを加えた。また、Ｔ１を灌流液として用いて、Harvard Apparatus PHD 2000プログラマブル注入ポンプ（Harvard Bioscience Inc.、Holliston、Massachusetts、USA）によって２μｌ／分にて送達して、透析液をLabSmithボードのＹ接合部中に戻して、０．５μｌ／分にて流れる緩衝酵素混合液と混合して、遅延ループ及びセンサーに続けた。これらの結果から、系の較正曲線を構築することができ、これは、酵素カイネティクスについてのヒルの式とフィットし、Ｋｍが２．３ｍＭ（±１．３ｍＭ）、V_{max}が２．９ｍＭ（±１．０ｍＭ）、そして速度定数が０．９６μＭ／秒（＋０．０５μＭ／秒）であった。興味深いことに、系のＫｍ値は、サルコシンオキシダーゼのＫｍ値（２．８ｍＭのＫｍ）を包含するが、クレアチニン（４．５ｍＭ）又はクレアチニナーゼ（３２ｍＭ）ではそうでなく、これは、たとえ溶液中の酸素の可用性（　２５０μＭ）におそらく起因しても、律速段階であることを示し得る。

【０２３２】

次に、同じセットアップを、十分に撹拌したウマ脱線維血（TCS Biosciences Ltd.、Botolph Claydon、Buckingham、UK）の標準的な追加実験に用いて、生体液中でのクレアチニンのマイクロモル量を検出することができることを立証した。結果を図５に示す。

【０２３３】

Ｔ１において得られた結果は、この微小透析セットアップ（その種で初めてである）は、感度が高く、且つノイズが低いクレアチニン測定方法であり、検出限界は４．３μＭであり、そして試験した上限は５００μＭであることを示す。曲線のＫｍは、この方法が、更なる試験の後、およそ２ｍＭのレベルまで有用であり得、広い有用な作用範囲を提供することを示す。さらに、微小透析サンプリング方法論は、推定回収率がたった４０％であり、このことは、回収率の向上が検出限界を　２μＭにまで押し下げることができたことを意味する。

【０２３４】

十分に撹拌したウマ血中の結果は、ウマの基礎クレアチニンレベルが１８０μＭ～１８６μＭであったことを示す。これは、正常なウマの上限（１００μＭ～１６０μＭ）を僅かに越えているが、これを得たウマの筋肉量も性別も運動状態も知らないことで、レベルは≧２００μＭにまで上昇し得る［９５］。また、サンプルが僅かに溶血して、赤血球クレアチンが酵素カスケード中に供給された可能性もある（以下の表３．５参照）。これらの結果のより広い標準偏差は、間違いなく、流動効果（convection effect）と、除外された拡散経路との組合せに由来し、これは、赤血球量に起因しており、透析膜の全体にわ

たってフラックスを無秩序に変更する。

【０２３５】

実施例７　安定性試験

この微小透析系の長期的な安定性を試験するために、総濃度を１００μＭにするクレアチニン量を加えたＴ１の十分に撹拌したポット内に、プローブを静止させた。図６の標準化した結果は、系が、１２時間の期間にわたって応答性のままであり、感度が、９時間後に元のシグナルの５０～６０％（２５０ｐＡに等しい）のバンドに減少したが、この点以降は一定のままであることを示す。１１と１／２時間のマークからのノイズの増加は、共同研究者が朝に仕事に入った結果であった。スペクトル分析は、３つの主要なノイズピーク（１つは電源由来の５０Ｈｚ、２番目はおそらく磁気スターラ由来の１３Ｈｚ、そしてデータセット全体にわたって可視に重ね合わされたかなりゆっくりとした０．２Ｈｚのシヌソイド（これは、Harvard Apparatus PHD 2000ポンプの液体撹拌又はスクリュードライブ内の流動を反映し得る））を示した。

【０２３６】

実施例８　干渉試験

ＡｇｌＡｇＣ１に対する７００ｍＶのバイアス電圧にて、作用電極は、血中に多くの場合見出される他の化学物質、例えばパラセタモール、尿酸、及びアスコルバートを酸化させることができるが、これらは、重合ｍＰＤ層によって、電極表面に達するのが妨げられるはずである。３酵素系はまた、サルコシン及びクレアチンからH_2O_2を生じさせることができるであろう。

【０２３７】

これらの共通した干渉のレベルを、以下の表３．５に示す。

【０２３８】

【表４】

干渉	濃度	引用文献
アスコルバート	164μm † 228μM †	[77] [81]
尿酸	916μM † 42 — 744μM *	[81] [96]
パラセタモール	164μM † 264μM †	[77] [81]
サルコシン	0.6 — 2.76μM *	[97]
クレアチン	25μM * 38.2 — 68.7μM *	[98] [99]

表 3.5: †センサー試験に用いたレベル。*血清中での正常範囲を実証した

【０２３９】

最終系におけるクレアチン及びサルコシンの干渉を試験しなかった。なぜなら、サルコシンの内在レベルは、低いマイクロモル濃度の範囲内にあり、そしてクレアチンの内在レベルは、大多数が細胞内であるため、広範囲にわたる溶血の場合にしか問題を引き起こさないはずであるからである。これらの２つの物質はまた、酵素混合物が異なる前処理、背景差分、又は平行サンプリング経路によって説明することができた。

【０２４０】

図７は、Ｔ１の十分に撹拌されたコンテナ中への標的物質の追加による干渉試験の結果を示す。アスコルバート及びパラセタモールを、文献中のものを超える量で加えた。

【０２４１】

２回目でないアスコルビン酸の第１の追加に対する応答、及びポンプによる再補充前の尿酸の追加に対する類似の応答に注意されたい。これらは、回収の一時的な低下に起因したのかもしれない。というのも、プローブの先端が、実験に用いた小さなガラスサンプルポットの内側と接触したからである。アスコルバート又はパラセタモールの第２の追加由来の明らかな干渉もないし、総濃度を２００μＭにするクレアチニンの第２のアリコートに対する応答に対していかなる干渉もない。

【０２４２】

これらの良好な結果にも拘わらず、系における潜在的なあらゆる干渉の作用を減じる様々な方法があり得ることも理解した。

【０２４３】
実施例９　クレアチニンクリアランスの測定
応答の絶対マグニチュードの測定に関する問題として、感度のドリフト及びセンサーのオフセットを継続的に説明する必要が挙げられる。というのも、作用電極は、H_2O_2によって毒されるようになり、タンパク質でコーティングされるようになり、又は参照が分解するからである。先の節で考察したような人工的な結果を与え得る系におけるあらゆる潜在的干渉を説明する必要もある。
【０２４４】
クレアチニンが、バックグラウンドを越えて検出可能なままである限り、絶対濃度を測定するのではなく腎機能を速度定数として導き出すことによって、干渉及びセンサードリフトについての全ての潜在的な懸念を回避する、クレアチニンクリアランスそれ自体に対する試験を構築することができるはずであると理解した。閉ループ灌流系が内因性のクレアチニンを含有するはずがないと考えるならば、既知の量のクレアチニンを、一定の間隔をおいて循環容量に加えて、減衰率を監視することができるはずである。というのもクレアチニンは、第１順序のカイネティクスで、機能腎臓によって濾されて尿中に送られるからである。不全を上回るレベルで、クリアランスはＧＦＲを反映するはずである。というのも、能動尿細管分泌による寄与は最小であるからである。
【０２４５】
したがって、連続微小透析サンプリング中のＴ１におけるクレアチニンの既知の量についての様々なクレアチニンクリアランス率をシミュレートするための一連の実験を構築した。例えば、１００ｍｌ／分のクリアランス率は、１リットルのサンプルを１／分の率にて循環させて（健常な成人の血液循環率（５１／分にて５リットルの血液）に等しい）、５分で元の濃度の半分にすることとなる。このクリアランスは、５分にわたって、又は４００μｌ／分にて、既知の量のクレアチニンを含有する２ｍｌの容量のサンプルを着実に二倍することによって、シミュレートすることができる。ＣＫＤ１（ステージ１の慢性腎疾患）からＣＫＤ４の機能不全の種々のステージにおける腎臓のクリアランス率を再現することを選択し、クリアランスはそれぞれ、１００ｍｌ／分、７５ｍｌ／分、５０ｍｌ／分、及び２５ｍｌ／分であった。以下の表１．２は最初に、ＧＦＲとＣＫＤのステージとの一致を導入した。なお、図６に示す安定性試験中のシグナル減衰率は、２ｍｌ／分のクリアランス率に等しいであろう。
【０２４６】
【表５】

ステージ	1	2	3	4	5
GFR (ml/分/1.73m²)	>90	60-89	30-59	15-29	<15

表1.2: CKDの5つのステージ。ステージ1及び2は、機能を保存したが、腎疾患の証拠、例えば瘢痕化、又は尿中のタンパク質若しくは血液が存在する。ステージ5は、末期腎疾患(ESRD)としても知られており、透析又は移植を必要とする。

【０２４７】
図８は、１００ｍｌ／分のシミュレートしたクリアランス率での、クレアチニン（１００μＭ、２００μＭ、及び３００μＭ）の３つの異なる濃度に対する希釈試験の結果を示す。
【０２４８】
２００μＭと３００μＭの実験結果は、非常に類似しており、時定数はそれぞれ、４７６±０．８６秒及び４７１±１．０秒の半減期を与えた。１００μＭのサンプルについての半減期は、６２０±２．８秒でかなり高かった。減衰曲線がAlberyの式［１００］によって説明されるものを思い出させ、透析液中の電極への基質の供給の変動性が、おそらく、これらの実験誤差の根本の原因であることを示すことは、注目する価値がある。というのも、プローブ配置も撹拌速度も温度も制御しなかったからである。
【０２４９】
図９は、ＣＫＤの様々なレベルをシミュレートするための追跡調査実験を示す。各シグ

ナルを１００％にて始まるように標準化して、観察された様々な減衰率を強調した。
【０２５０】
これらの曲線の半減期は、生データの指数フィットに由来し、７５ｍｌ／分、５０ｍｌ／分、及び２５ｍｌ／分のクリアランス率についてそれぞれ、およそ１３分４０秒、１６分３０秒、及び２７分の値をもたらした。これらは、実験設計に直接対応しない一方、得られた値間の一部の比例性により順序付けられたシーケンスに従う。結果は、特に、希釈率が低いほど安定しており、透析回収率及び混合を誤差の源としてさらに意味付けている。
【０２５１】
実施例１０　血液灌流ブタ腎臓による系の試験
最終実験は、単離した灌流腎臓セットアップにおいて、この系の機能を探究した。この目的で、英国の主要な腎移植センターの１つ、Hammersmith Hospitalで勤務する臨床研究員Bynvant Sandhu博士と組んだ。彼女の研究は、RM3灌流装置（Waters Medical Systems LLC、Rochester、Minnesota、USA）を用いたブタ腎臓の温血灌流に関した。大人のブタ腎臓を、すぐ近くの認可屠殺場から収集して、４時間の静的低温貯蔵で維持した。この後、温灌流用の熱交換器及び酸素供給器で再構成したRM3灌流装置中に連結した。再灌流実験用に収集した自己由来血液は、目にみえて溶血しており、大量の血栓を含有しており、これを使用前に濾過して取り除かなければならなかった。
【０２５２】
Ｙ接合部中に直接に注入した１００μＭクレアチニンに対して、そして次に非撹拌１００μＭクレアチニン－Ｔ１溶液中の微小透析プローブを介して、センサー系を較正した後に、腎静脈の断端中に深くプローブの先端を入れて、良好な流を確実にした。図１０は、実験セットアップをより詳細に示す。次に、データを、プローブ膜が再配置中に損傷を受けて実験を放棄しなければならなくなるまで、再灌流の後一時間にわたって収集した。
【０２５３】
データ分析は、最初に、図１１に示すような、RM3の灌流ポンプによって生じた可視電気スパイクを除去するために、Savitsky-Golay平滑化フィルタ（５１３サンプルのウィンドウによる二次多項式）の使用を必要とした。
【０２５４】
これらの結果は、　３００μＭクレアチニンに等しい、系セットアップ及び最初の灌流中の最初のプラトーを示す。この高い系オフセットはおそらく、屠殺プロセス由来の筋肉損傷及び自己由来血液の広範囲にわたる溶血（クレアチンを灌流液中に放出する）の組合せに起因する。灌流を最初に始めたとき、血液は顕著に黒ずんでいた。というのも、腎臓が酸素を消費し始めたからである。膜酸素供給器への酸素供給を開放すると、血液を急速にルビーレッド色に戻して、シグナルマグニチュードの突然の低下を生じさせて、直ぐに高いベースラインに戻った。これは、実際、サルコシンオキシダーゼが正常に機能するのに必要とされる酸素を消費する虚血性腎臓からの突然の酸化バースト、又はセンサーによって検出されたｐＨの迅速な変化を反映したのかもしれない。
【０２５５】
次に、腎臓は、以前の１００ｍｌ／分のクレアチニンクリアランス実験に等しい速度にて、検出可能な代謝物質を排泄しているようであり、半減期は６５２±３．５秒であったが、結果は完全に等価であり得るわけではないという警告が付く。次に、RM3系の動脈リザーバを、１００μモルのクレアチニン（１０ｍｌ×１０ｍＭ）の２つの別個のアリコートでスパイクして、図１２に見られる結果をもたらした。これらの曲線は、半減期がそれぞれ２７秒及び１８秒であり、これらの結果が、クリアランスよりも希釈におそらく起因したことを示している。
【０２５６】
残念ながら、系内の検出可能な代謝物質が、低い定常状態に引き下げられる前に、実験は終わらなければならなかった。想像される最終の再灌流系において、灌流液は、内因性のいかなるクレアチニンもなく、洗浄された赤血球を等張クリスタロイド溶液中に含むの

で、純粋なクリアランス試験が可能となろう。

【０２５７】

結論

プロジェクトのこの部は、微小透析サンプリング、及びクレアチニンの電流測定試験に基づいた自己充足的な系が、４．３μＭの検出限界及び５００μＭの試験した上限を達成することができ、文献（表３．３）に報告されるものとマッチするか、それを超えることを示した。この性能は、ポテンショスタットに施した一連の向上及び最適化、並びにTsuchida and Yoda［４０］の微小電極センサーアレイ及び三重酵素系に起因した。ｍＰＤを作用電極上に電解重合するプロセスはまた、そのような試験を実行している他のグループによって報告されるものをはるかに超えた、干渉レベルからの良好な保護を実現した。

【０２５８】

リアルタイムクレアチニン監視系（反応時間について遅延が３分）の開発に加えて、センサー較正なしで腎機能を監視することによって、あらゆるバックグラウンドノイズ、又はセンサーのオフセット、ドリフト、若しくは感度のロスの経時的な変化を相殺する必要を回避する新規の方法を提唱且つ探究した。これを、クレアチニン排泄の減衰曲線の時定数（又は半減期）を測定することによって達成することができると考えており、そしてこれを、ブタ腎臓を含有する閉ループ灌流系において実験的に実証した。

【０２５９】

リアルタイム監視用のこのマイクロフルイディック系を用いる経済性もまた有利である。分析に用いた酵素の連続浪費にも拘わらず、連続監視の週は、６００：３００：６０の混合物の５ｍｌしか消費しないであろう。２０１６年９月の時点での３つの酵素の現在の市場価格で、これは￡５０／週未満にしか達しないであろう。

【０２６０】

今後の研究は、ｐＫ$_a$がより高いバッファ、例えばＨＥＰＢＳ中で再最適化される酵素、灌流回路内のインライン包含用のモジュラー微小透析サンプリングプローブの作成、及びマイクロチャネル内の微小電極アレイの形成を標準化して、生のクレアチニン監視用の「ホットプラグ可能な」系を提供する試みを調べることとなる。当該系はまた、小滴マイクロフルイディクスを用いて、複数の酵素反応の多重化を、一般的なセンサーと同時に可能にする一方、混合をより良好にし、且つ、３分の遅延ループにおいておそらく起こる、シグナルマグニチュードを引き下げるテイラー分散をより小さくすることから利益を得てもよい。更なる開発により、当該系はまた、集中治療環境においてライブで腎機能を監視するのに試用することができる。

【０２６１】

全体として、本発明は、移植前の最適な条件で臓器を維持する目標により近づいて、１分１秒を争う状況において時間を稼ぐ。

【０２６２】

参考文献

33.Randviir EP,Banks CE.Analytical methods for quantifying creatinine within biological media.Sensors and Actuators B:Chemical.2013;183:239-252.

35.Myers GL,Miller WG,Coresh J,Fleming J,Greenberg N,Greene T,et al.Recommendations for improving serum creatinine measurement:a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program.Clinical Chemistry.2006;52(1):5-18.

37.Panteghini M.Enzymatic assays for creatinine:time for action.Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.2008;68(sup241):84-88.

40.Tsuchida T,Yoda K.Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum.Clinical Chemistry.1983;29(1):51-55.

51.Xu JC,Hunter GW,Lukco D,Liu CC,Ward BJ.Novel carbon dioxide microsensor based on tin oxide nanomaterial doped with copper oxide.IEEE Sensors Journal.2009;9(3):235-236.

52.Suzuki H,Arakawa H,Karube I.Performance characteristics of a urea microsensor employing a micromachined carbon dioxide electrode.Electroanalysis.2000;12(16):1327-1333.
53.Halliwell B,Clement MV,Long LH.Hydrogen peroxide in the human body.FEBS letters.2000;486(1):10-13.
55.Ungerstedt U,Pycock C.Functional correlates of dopamine neurotransmission.Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften.1974;30(1-3):44-55.
56.Whitesides GM.The origins and the future of microfluidics.Nature.2006;442(7101):368-373.
58.Wang C.Development of clinical instruments for traumatic brain injury patients:design,realisation,and performance.Imperial College London;2015.
64.Liu H,Ying T,Sun K,Li H,Qi D.Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide,glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode.Analytica Chimica Acta.1997;344(3):187-199.
65.Guerrieri A,De Benedetto G,Palmisano F,Zambonin P.Electrosynthesized non-conducting polymers as permselective membranes in amperometric enzyme electrodes:a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer.Biosensors and Bioelectronics.1998;13(1):103-112.
66.Nakabayashi Y,Wakuda M,Imai H.Amperometric Glucose Sensors Fabricated by Electrochemical Polymerization of Phenols on Carbon Paste Electrodes Containing Ferrocene as an Electron Transfer Mediator.Analytical Sciences.1998;14(6):1069-1076.
67.Mitchell KM.Acetylcholine and Choline Amperometric Enzyme Sensors Characterized in Vitro and in Vivo.Analytical Chemistry.2004 Feb;76(4):1098-1106.:http://dx.doi.org/10.1021/ac034757vから利用可能.
72.Khue NV,Wolff CM,Seris JL,Schwing JP.Immobilized enzyme electrode for creatinine determination in serum.Analytical Chemistry.1991;63(6):611-614.
73.Weber J,Van Zanten A.Interferences in current methods for measurements of creatinine.Clinical Chemistry.1991;37(5):695-700.
74.Sakslund H,Hammerich O.Effects of pH,temperature and reaction products on the performance of an immobilized creatininase-creatinase-sarcosine oxidase enzyme system for creatinine determination.Analytica Chimica Acta.1992;268(2):331-345.
75.Yamato H,Ohwa M,Wernet W.A polypyrrole/three-enzyme electrode for creatinine detection.Analytical Chemistry.1995;67(17):2776-2780.
76.Schneider J,Gruendig B,Renneberg R,Cammann K,Madaras M,Buck R,et al.Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing.Analytica Chimica Acta.1996;325(3):161-167.
77.Madaras MB,Popescu IC,Ufer S,Buck RP.Microfabricated amperometric creatine and creatinine biosensors.Analytica Chimica Acta.1996;319(3):335-345.
78.Madaras MB,Buck RP.Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatinine assays in human serum.Analytical Chemistry.1996;68(21):3832-3839.
79.Khan G,Wernet W.A highly sensitive amperometric creatinine sensor.Analytica Chimica Acta.1997;351(1):151-158.
80.Kim EJ,Haruyama T,Yanagida Y,Kobatake E,Aizawa M.Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system.Analytica Chimica Acta.1999;394(2):225-231.
81.Shin JH,Choi YS,Lee HJ,Choi SH,Ha J,Yoon IJ,et al.A planar amperometric creat

inine biosensor employing an insoluble oxidizing agent for removing redox-active interferences.Analytical Chemistry.2001 ;73(24):5965-5971.
82.Tombach B,Schneider J,Matzkies F,Schaefer RM,Chemnitius GC.Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients.Clinica Chimica Acta.2001;312(1):129-134.
83.Erlenkoetter A,Fobker M,Chemnitius GC.Biosensors and flow-through system for the determination of creatinine in hemodialysate.Analytical and Bioanalytical Chemistry.2002;372(2):284-292.
84.Stefan RI,Bokretsion RG,van Staden JF,Aboul-Enein HY.Simultaneous determination of creatine and creatinine using amperometric biosensors.Talanta.2003;60(6):1223-1228.
85.Hsiue GH,Lu PL,Chen JC.Multienzyme-immobilized modified polypropylene membrane for an amperometric creatinine biosensor.Journal of Applied Polymer Science.2004;92(5):3126-3134.
86.Berberich JA,Yang LW,Madura J,Bahar I,Russell AJ.A stable three-enzyme creatinine biosensor.1.Impact of structure,function and environment on PEGylated and immobilized sarcosine oxidase.Acta Biomaterialia.2005;1(2):173-181.
87.Berberich JA,Yang LW,Bahar I,Russell AJ.A stable three enzyme creatinine biosensor.2.Analysis of the impact of silver ions on creatine amidinohydrolase.Acta Biomaterialia.2005;1(2):183-191.
88.Berberich JA,Chan A,Boden M,Russell AJ.A stable three-enzyme creatinine biosensor.3.Immobilization of creatinine amidohydrolase and sensor development.Acta Biomaterialia.2005;1(2):193-199.
89.Staden RISv,Bokretsion RG.Simultaneous Determination of Creatine and Creatinine using Monocrystalline Diamond Paste-Based Amperometric Biosensors.Analytical Letters.2006;39(11):2227-2233.
90.Nieh CH,Tsujimura S,Shirai 0,Kano K.Amperometric biosensor based on reductive H2O,detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination.Analytica Chimica Acta.2013;767:128-133.
91.Serafin V,Hernandez P,Aguei L,Yanez-Sedeno P,Pingarron J.Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase,creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode.Electrochimica Acta.2013;97:175-183.
92.Yoshimoto T,Tanaka N,Kanada N,Inoue T,Nakajima Y,Haratake M,et al.Crystal structures of creatininase reveal the substrate binding site and provide an insight into the catalytic mechanism.Journal of Molecular Biology.2004;337(2):399-416.
93.Hall SB,Khudaish EA,Hart AL.Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes.Part IV:phosphate buffer dependence.Electrochimica Acta.1999;44(25):4573-4582.
94.Ferreira CM,Pinto IS,Soares EV,Soares HM.(Un)suitability of the use of pH buffers in biological,biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review.RSC Advances.2015;5(39):30989-31003.
95.Judson G,Frauenfelder H,Mooney G.Biochemical Changes in Thoroughbred Racehorses Following Submaximal and Maximal Exercise.In:Equine Exercise Physiology.Granta Editions Cambridge;1983.p.408-415.
96.Fang J,Alderman MH.Serum uric acid and cardiovascular mortality:the NHANES I epidemiologic follow-up study,1971-1992.JAMA.2000;283(18):2404-2410.
97.Allen RH,Stabler SP,Lindenbaum J.Serum betaine,N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related in

born errors of metabolism.Metabolism.1993 Nov;42(11):1448-1460.http://dx.doi.org/10.1016/0026-0495(93)90198-Wから利用可能.
98.Schedel JM,Tanaka H,Kiyonaga A,Shindo M,Schutz Y.Acute creatine ingestion in human:consequences on serum creatine and creatinine concentrations.Life Sciences.1999;65(23):2463¬2470.
99.Verhelst J,Berwaerts J,Marescau B,Abs R,Neels H,Mahler C,et al.Serum creatine,creatinine,and other guanidino compounds in patients with thyroid dysfunction.Metabolism.1997;46(9):1063-1067.
100.Albery WJ,Haggett BG,Svanberg LR.The development of electrochemical sensors.In:Advanced Agricultural Instrumentation.Springer;1986.p.349-392.

【０２６３】

本発明はまた、以下の番号を付けた実施形態を提供する：

１．酵素、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ、又は全てを含む組成物。

２．酵素の少なくとも１つ、場合によっては２つ、場合によっては全てが固定されておらず、場合によっては酵素の全てが溶液中にある、実施形態１の組成物。

３．組成物はバッファを含む、実施形態１の組成物。

４．バッファは、リン酸バッファでもＰＢＳでもなく、及び／又はトリスバッファではなく、及び／又は四ホウ酸ではなく、及び／又はＨＥＰＥＳではない、実施形態３の組成物。

５．バッファは、ＥＰＰＳ、ＨＥＰＢＳ、ＰＯＰＳＯ、ＨＥＰＰＳＯ、及びＭＯＢＳからなる群から選択される、実施形態３又は４のいずれか１つの組成物。

６．バッファは、ｐＫａが７．０～９．０、場合によっては７．３～８．９５、場合によっては８．５である、実施形態３～５のいずれか１つの組成物。

７．組成物又はバッファは、ｐＨが７．０～９．０、場合によっては７．３～８．９５、場合によっては８．５である、実施形態１～６のいずれか１つに従う組成物。

８．組成物は、ｐＨ８．０～８．５のＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０～８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、場合によってはｐＨ８．０の５０ｍＭ　ＥＰＰＳ、又はｐＨ８．５の５０ｍＭ　ＥＰＰＳを含む、実施形態１～７のいずれか１つに従う組成物。

９．ウレアーゼ及び／又はウリカーゼ及び／又はシスタチンＣを検出する手段及び／又はアルブミンを検出する手段をさらに含む、実施形態１～８のいずれか１つの組成物。

１０．クレアチニナーゼは、SorachimカタログナンバーCNH-311に由来し；及び／又はクレアチナーゼは、SorachimカタログナンバーCRH-211に由来し；及び／又はサルコシンオキシダーゼは、SorachimカタログナンバーSAO-351に由来する、先の実施形態のいずれかの組成物。

１１．クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼの濃度は、最終反応混合液において、クレアチニナーゼの濃度が少なくとも３００Ｕ／ｍｌとなり、及び／又はクレアチナーゼの濃度が少なくとも１２０Ｕ／ｍｌとなり、且つサルコシンオキシダーゼの濃度が少なくとも１０Ｕ／ｍｌとなるような濃度である、先の実施形態のいずれかの組成物。

１２．組成物は、クレアチニン及び先の実施形態のいずれかの組成物を含有するサンプルの混合に由来する最終混合溶液が、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを、１０：５：１～４９：８：１Ｕ／ｍｌの比率にて含むような組成物である、先の実施形態のいずれかの組成物。

１３．クレアチニン及び先の実施形態のいずれかの組成物を含有するサンプルの混合に由来する最終混合溶液が、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼを、６００Ｕ／ｍｌ、３００Ｕ／ｍｌ、及び６０Ｕ／ｍｌの量で含むような組成物であり、場合によっては、組成物はｐＨ８．５である、先の実施形態のいずれかの組成物。

１４．クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼ、並びに少なくとも第１のセンサー、場合によっては電流測定センサーを含むセンサー系で

あって、場合によっては、クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼは、先の実施形態のいずれか１つに従う組成物の一部である、センサー系。
１５．マイクロフルイディック回路、マイクロフルイディックデバイス、及び微小透析プローブのいずれか１つ以上を含む、実施形態１４に従うセンサー系。
１６．連続流系をさらに含む、実施形態１４及び１５のいずれか１つに従うセンサー系。
１７．系はさらに、サンプル、場合によっては患者由来のサンプル、又は閉ループ単離灌流臓器、場合によっては腎臓由来のサンプルをとる手段を含み、
場合によっては、患者由来のサンプルは、場合によっては血液、尿、血漿、組織液、髄液由来の、微小透析液である、実施形態１４～１６のいずれかに従うセンサー系。
１８．クレアチニナーゼ及び／又はクレアチナーゼ及び／又はサルコシンオキシダーゼ、又は先の実施形態のいずれか１つに従う組成物がサンプルに、サンプルをセンサーと接触させる前に加えられ、場合によっては、検知試薬が、センサーとの接触の１、２、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２５、２５０秒、５、５．５、６、６．５、７．５、８、８．５、９、９．５、又は１０分超前に加えられるように配置された、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系。
１９．系は、サンプル中の酸素の量を、検知試薬の添加前又は添加後に増大させる手段を含み、場合によっては、酸素の量を増大させる手段は：
ミキサーであって、場合によってはバッフル又は蛇行ゾーンを含み、場合によっては高度に浸透性の材料、例えばＰＤＭＳから製造されているミキサー；
Teflonチューブによって連結された複数の混合ステージ；
加圧コンテナ
のいずれか１つ以上から選択される、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２０．系は、１０μＭ未満、場合によっては７．５μＭ未満、場合によって５μＭ未満、場合によっては４μＭ未満、場合によっては３μＭ未満、場合によっては２μＭ未満、場合によっては１μＭ未満の濃度のクレアチニンを検出することができる、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２１．センサー系は、４０μＭ～１２０μＭのクレアチニンのバックグラウンドレベルに対して、１μＭ未満、又は２μＭ未満、又は３μＭ未満、又は４μＭ未満、又は５μＭ未満、又は７．５μＭ未満、又は１０μＭ未満のクレアチニン濃度の変化を検出することができる、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系。
２２．系は、センサーからデータを収集する手段、場合によってはPowerLab/4SPを含み、場合によっては、系はさらに、データを送信するワイヤレス送信手段を含む、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２３．系はさらに、データ分析手段、場合によってはコンピュータ又はウェアラブルデバイスを含み、場合によっては、データ分析手段は、ワイヤレスで送信されたデータを受信する手段を含む、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２４．少なくとも１つの廃棄物収集レセプタクルをさらに含み、場合によっては、廃棄物収集レセプタクルの容量は、１０ｍｌ未満、例えば９．５ｍｌ未満、例えば９ｍｌ未満、例えば８．５ｍｌ未満、例えば８ｍｌ未満、例えば７．５ｍｌ未満、例えば７ｍｌ未満、例えば６．５ｍｌ未満、例えば６ｍｌ未満、例えば５．５ｍｌ未満、例えば５ｍｌ未満、例えば４．５ｍｌ未満、例えば４ｍｌ未満、例えば３．５ｍｌ未満、例えば３ｍｌ未満、例えば２．５ｍｌ未満、例えば２ｍｌ未満、例えば１．５ｍｌ未満、例えば１ｍｌ未満、例えば０．５ｍｌ未満、例えば０．２５ｍｌ未満である、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２５．系は、携帯型の系である、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２６．系は、クレアチニンレベル／クレアチニンクリアランス率／糸球体濾過量を算出する手段を含む、先の実施形態のいずれかのセンサー系。
２７．剤、場合によっては造影剤若しくは薬物、又はクレアチニン若しくはクレアチン若

しくはサルコシンを送達する手段をさらに含み、場合によっては、手段は薬物ポンプであり、
場合によっては、薬物は、免疫抑制剤；化学療法剤、例えば白金剤；抗菌物質、例えばグリコペプチドバンコマイシン及びテイコプラニン、並びにペニシリン；並びにオピオイド鎮痛薬、例えばモルヒネ、ジアモルフィン、及びコデインからなる群から選択され；
場合によっては、送達される剤の量は、算出したクレアチニンレベル／クレアチニンクリアランス率／糸球体濾過量に基づいて調整される、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系。
２８．系はさらに、第２のセンサー、及び場合によっては、第２のサンプルを得る第２の手段を含み、第２のサンプルは、第２のセンサーでの検出前に、クレアチナーゼ及びサルコシンオキシダーゼを含む第２の検知試薬と接触させられ、場合によっては、系は、第２の検知試薬が、センサーとの接触の１、２、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２５、２５０秒、５、５．５、６、６．５、７．５、８、８．５、９、９．５、又は１０分超前に加えられた第２のサンプルに加えられるように配置されている、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系。
２９．系は、第２のセンサーから得られるデータを、第１のセンサーから得られるデータから減算する手段を含む、実施形態２８に従うセンサー系。
３０．第１のセンサーは、データを継続的に収集する、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系。
３１．第１のセンサーは、少なくとも２４時間毎に、又は少なくとも２２時間毎に、例えば少なくとも２０時間毎に、例えば少なくとも１８時間毎に、例えば少なくとも１６時間毎に、例えば少なくとも１４時間毎に、例えば少なくとも１２時間毎に、例えば少なくとも１０時間毎に、例えば少なくとも８時間毎に、例えば少なくとも６時間毎に、例えば少なくとも５時間毎に、例えば少なくとも４時間毎に、例えば少なくとも３時間毎に、例えば少なくとも２時間毎に、例えば少なくとも１．５時間毎に、例えば少なくとも１時間毎に、例えば少なくとも５０分毎に、例えば少なくとも４５分毎に、例えば少なくとも４０分毎に、例えば少なくとも３５分毎に、例えば少なくとも３０分毎に、例えば少なくとも２５分毎に、例えば少なくとも２０分毎に、例えば少なくとも１５分毎に、例えば少なくとも１０分毎に、例えば少なくとも５分毎に、例えば少なくとも２分毎に、例えば少なくとも１．５分毎に、例えば少なくとも６０秒毎に、例えば少なくとも４５秒毎に、例えば少なくとも３０秒毎に、例えば少なくとも１５秒毎に、例えば少なくとも１０秒毎に、例えば少なくとも５秒毎に、例えば少なくとも２秒毎に、例えば少なくとも１秒毎に、例えば少なくとも０．５秒毎にデータを収集する、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系。
３２．ヒト又は動物の対象由来のサンプル中のクレアチニンのレベルの判定方法であって、当該方法は、先の実施形態のいずれかに従う組成物又はセンサー系の使用を含み、場合によっては、サンプルは、透析液又は微小透析液である、方法。
３３．クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量の判定方法であって、当該方法は、先の実施形態のいずれかに従う組成物又はセンサー系の使用を含み、場合によっては、サンプルは、透析液又は微小透析液である、方法。
３４．ヒト又は動物の対象由来のサンプル中のクレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量のレベルのリアルタイム判定方法であって、当該方法は、先の実施形態のいずれかに従うセンサー系の組成物の使用を含み、場合によっては、サンプルは、透析液又は微小透析液である、方法。
３５．対象を、急性腎疾患又は慢性腎疾患と診断する方法であって、当該方法は、先の方法のいずれかに従って、クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量を判定することを含み、場合によってはさらに、急性腎疾患若しくは慢性腎疾患の対象を処置すること、又は急性腎疾患若しくは慢性腎疾患において禁忌若しくは危険である薬物による処置の停止を含み、場合によっては、薬物は、

免疫抑制剤；化学療法剤、例えば白金剤；抗菌物質、例えばグリコペプチドバンコマイシン及びテイコプラニン、並びにペニシリン；並びにオピオイド鎮痛薬、例えばモルヒネ、ジアモルフィン、及びコデインからなる群から選択される、方法。

３６．クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量のレベルの判定は、ある量のクレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンの投与の後に、場合によっては薬物の投与の前後に判定される、先の実施形態のいずれかの方法。

３７．方法はさらに、ある投薬量の薬物の投与を含み、投薬量は、センサー系によって判定されたクレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量に基づいて決定されている、先の実施形態のいずれかの方法。

３８．移植用の腎臓を監視する方法であって、腎臓を灌流することと、ある量のクレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシンを系中に投与することと、先の実施形態のいずれかの組成物及び／又は系及び／又は方法を用いて、クレアチニンクリアランス率を判定することとを含む方法。

３９．移植のレシピエントにおいて腎機能を監視する方法であって、クレアチニンレベル及び／又はクレアチニンクリアランス率及び／又は糸球体濾過量は、先の実施形態のいずれかの組成物、センサー系、及び／又は方法の使用によって判定される、方法。

４０．クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、及びサルコシンオキシダーゼのいずれか２つ、若しくは全て；及び／又は

先の実施形態のいずれかに従う組成物；

クレアチニン及び／又はクレアチン及び／又はサルコシン；及び／又は

少なくとも１つの廃棄物レセプタクル；

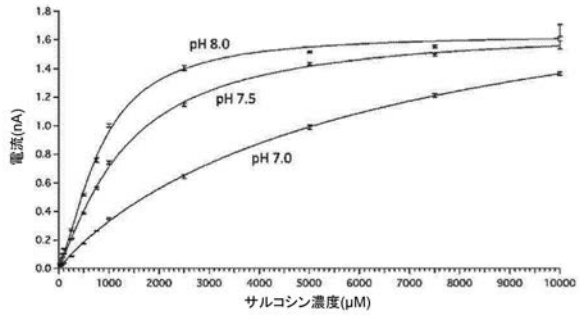
バッファ、場合によっては先の実施形態のいずれかに従うバッファ；

微小透析プローブ；及び／又は

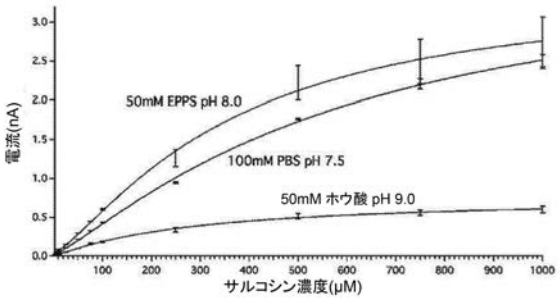
少なくとも１つ、場合によっては少なくとも２つの精密ポンプ

を含むキット。

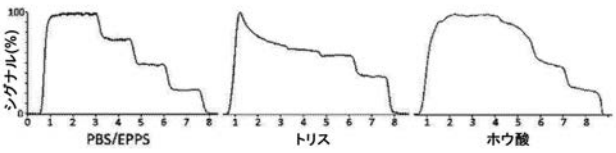
【図１】


pH 8.0
pH 7.5
pH 7.0
電流(nA)
サルコシン濃度(μM)

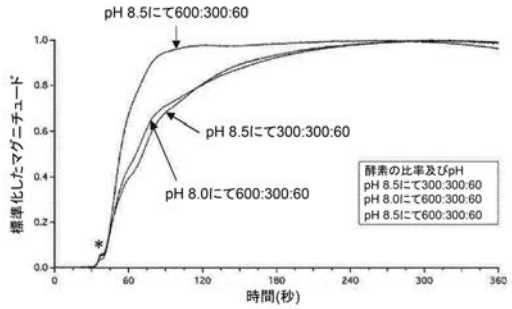
【図２】


50mM EPPS pH 8.0
100mM PBS pH 7.5
50mM ホウ酸 pH 9.0
電流(nA)
サルコシン濃度(μM)

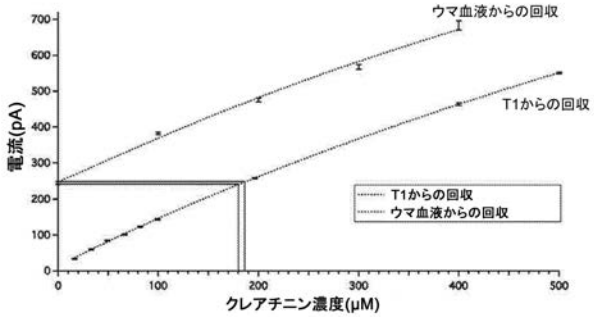
【図３】


シグナル(%)
PBS/EPPS
トリス
ホウ酸

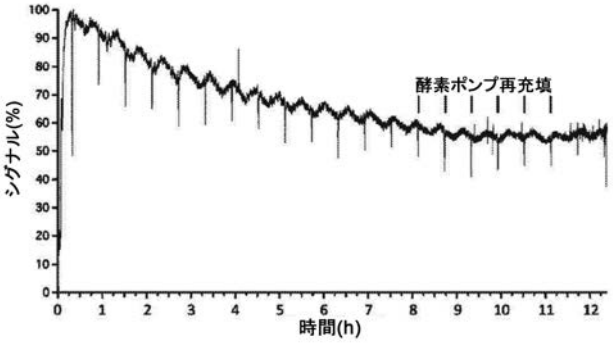
【図４】


pH 8.5にて600:300:60
pH 8.5にて300:300:60
pH 8.0にて600:300:60
酵素の比率及びpH
pH 8.5にて300:300:60
pH 8.0にて600:300:60
pH 8.5にて600:300:60
標準化したマグニチュード
時間(秒)

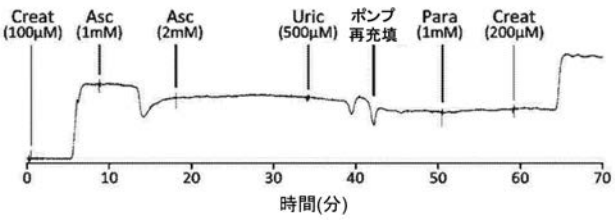
【図５】


ウマ血液からの回収
T1からの回収
電流(pA)
クレアチニン濃度(μM)
T1からの回収
ウマ血液からの回収

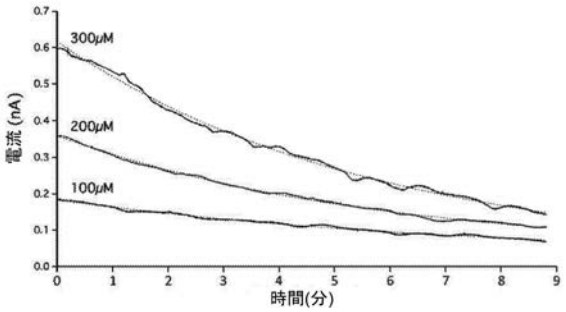
【図６】


酵素ポンプ再充填
シグナル(%)
時間(h)

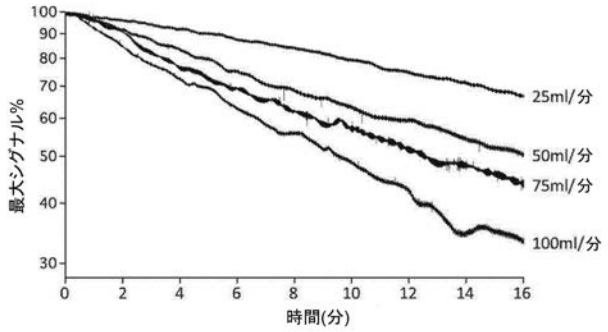
【図７】


Creat (100μM)
Asc (1mM)
Asc (2mM)
Uric (500μM)
ポンプ再充填
Para (1mM)
Creat (200μM)
時間(分)

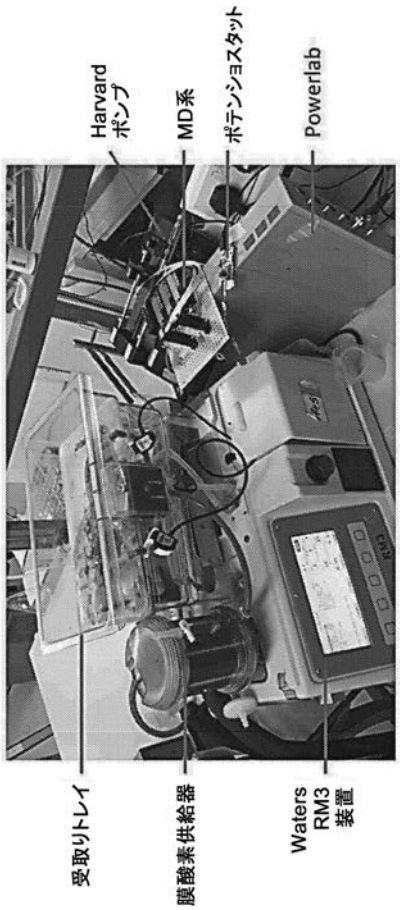
【図８】


300μM
200μM
100μM
電流 (nA)
時間(分)

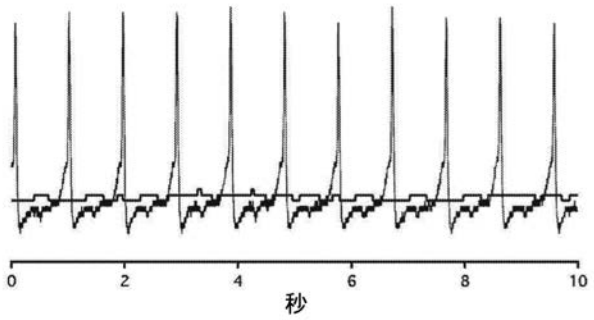
【図９】



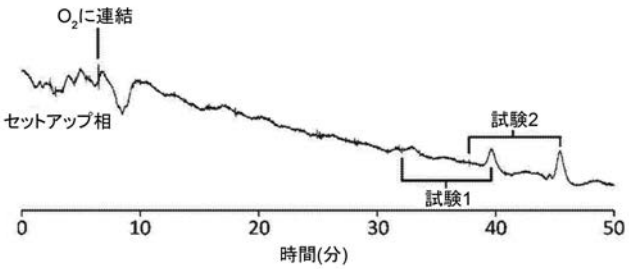
【図１０】



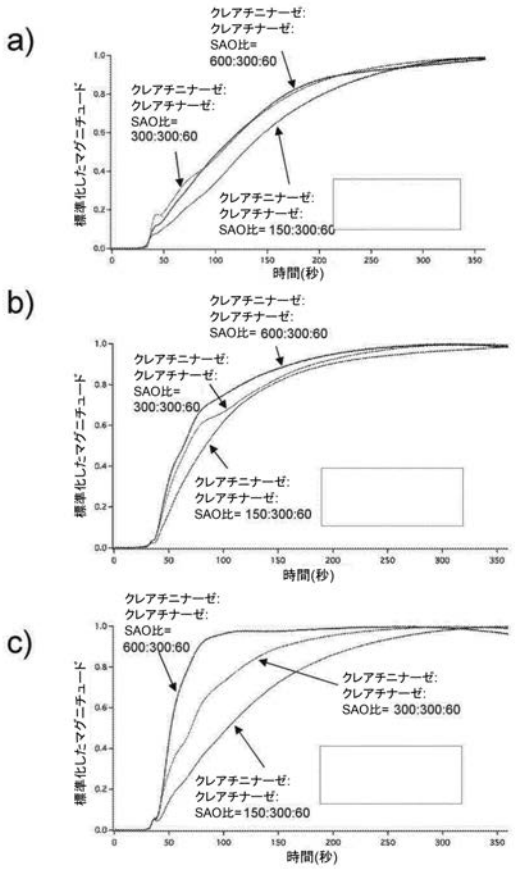
【図１１】



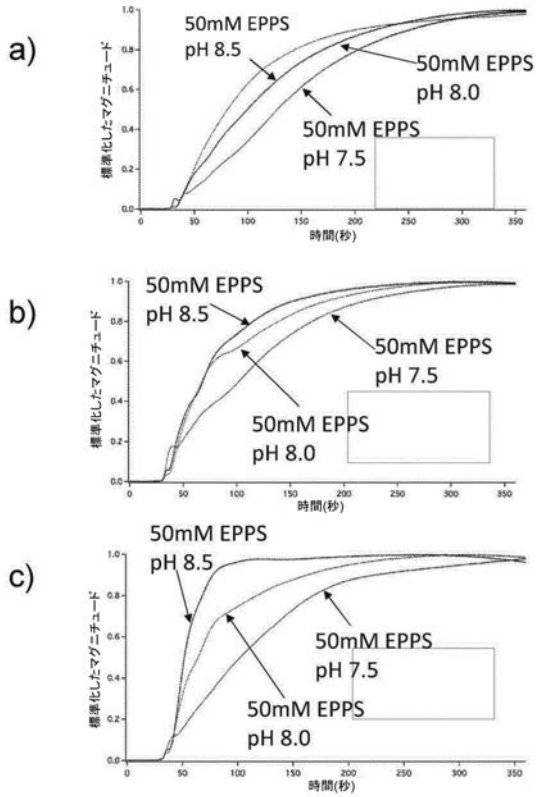
【図１２】



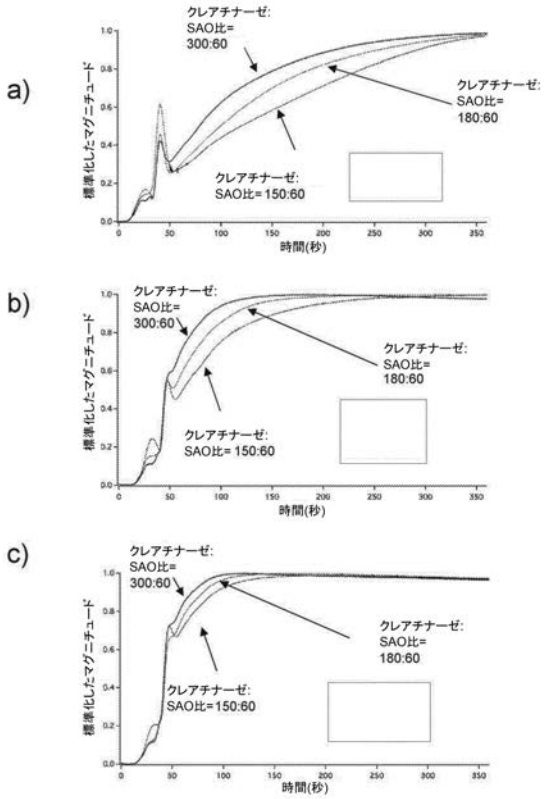
【図１３】



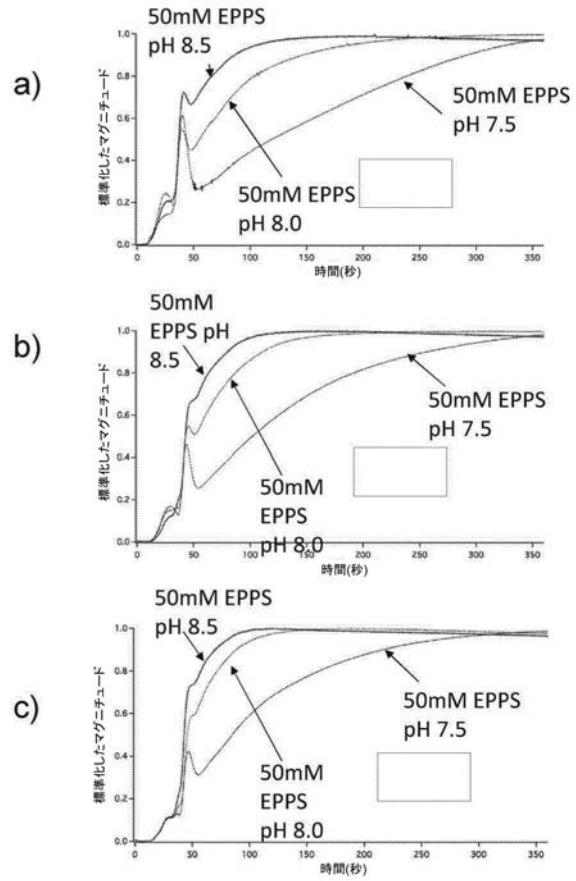
【図１４】



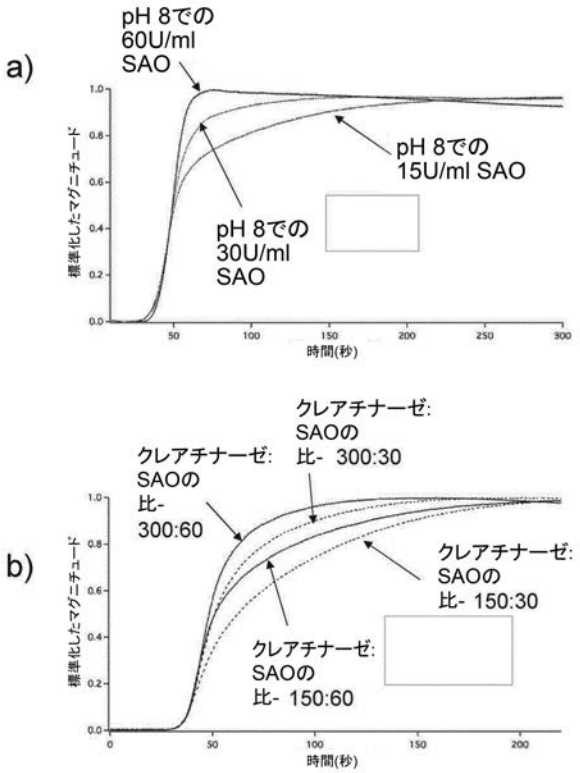
【図１５】



【図１６】



【図１７】



【図１８－１】

(3の部1)

物質	式	K_{sp}	物質	式	K_{sp}
水酸化アルミニウム	$Al(OH)_3$	1.3×10^{-33}	水酸化クロム(III)	$Cr(OH)_3$	6.3×10^{-31}
リン酸アルミニウム	$AlPO_4$	6.3×10^{-19}	炭酸コバルト(II)	$CoCO_3$	1.4×10^{-13}
炭酸バリウム	$BaCO_3$	5.1×10^{-9}	水酸化コバルト(II)	$Co(OH)_2$	1.6×10^{-15}
クロム酸バリウム	$BaCrO_4$	1.2×10^{-10}	水酸化コバルト(III)	$Co(OH)_3$	1.6×10^{-44}
フッ化バリウム	BaF_2	1.0×10^{-6}	硫化コバルト(II)*	CoS	4×10^{-21}
水酸化バリウム	$Ba(OH)_2$	5×10^{-3}	塩化銅(I)	CuCl	1.2×10^{-6}
硫酸バリウム	$BaSO_4$	1.1×10^{-10}	シアン化銅(I)	CuCN	3.2×10^{-20}
亜硫酸バリウム	$BaSO_3$	8×10^{-7}	ヨウ化銅(I)	CuI	1.1×10^{-12}
チオ硫酸バリウム	BaS_2O_3	1.6×10^{-6}	ヒ酸銅(II)	$Cu_3(AsO_4)_2$	7.6×10^{-36}
塩化ビスムチル	BiOCl	1.8×10^{-31}	炭酸銅(II)	$CuCO_3$	1.4×10^{-10}
水酸化ビスムチル	BiOOH	4×10^{-10}	クロム酸銅(II)	$CuCrO_4$	3.6×10^{-6}
炭酸カドミウム	$CdCO_3$	5.2×10^{-12}	フェロシアン化銅(II)	$Cu[Fe(CN)_6]$	1.3×10^{-16}
水酸化カドミウム	$Cd(OH)_2$	2.5×10^{-14}	水酸化銅(II)	$Cu(OH)_2$	2.2×10^{-20}
シュウ酸カドミウム	CdC_2O_4	1.5×10^{-8}	硫化銅(II)*	CuS	6×10^{-37}
硫化カドミウム*	CdS	8×10^{-28}	炭酸鉄(II)	$FeCO_3$	3.2×10^{-11}
炭酸カルシウム	$CaCO_3$	2.8×10^{-9}	水酸化鉄(II)	$Fe(OH)_2$	8.0×10^{-16}
クロム酸カルシウム	$CaCrO_4$	7.1×10^{-4}	硫化鉄(II)*	FeS	6×10^{-19}
フッ化カルシウム	CaF_2	5.3×10^{-9}	ヒ酸鉄(III)	$FeAsO_4$	5.7×10^{-21}
水素カルシウム	$CaHPO_4$	1×10^{-7}	フェロシアン化鉄(III)	$Fe_4[Fe(CN)_6]_3$	3.3×10^{-41}
水酸化カルシウム	$Ca(OH)_2$	5.5×10^{-6}	水酸化鉄(III)	$Fe(OH)_3$	4×10^{-38}
シュウ酸カルシウム	CaC_2O_4	2.7×10^{-9}	リン酸鉄(III)	$FePO_4$	1.3×10^{-22}
リン酸カルシウム	$Ca_3(PO_4)_2$	2.0×10^{-29}	ヒ酸鉛(II)	$Pb_3(AsO_4)_2$	4×10^{-36}
硫酸カルシウム	$CaSO_4$	9.1×10^{-6}	アジド鉛(II)	$Pb(N_3)_2$	2.5×10^{-9}
亜硫酸カルシウム	$CaSO_3$	6.8×10^{-8}	臭化鉛(II)	$PbBr_2$	4.0×10^{-5}
水酸化クロム(II)	$Cr(OH)_2$	2×10^{-16}	炭酸鉛(II)	$PbCO_3$	7.4×10^{-14}

【図１８－２】

(3の部2)

物質	式	K_{sp}	物質	式	K_{sp}
塩化鉛(II)	$PbCl_2$	1.6×10^{-5}	水酸化ニッケル(II)	$Ni(OH)_2$	2.0×10^{-15}
クロム酸鉛(II)	$PbCrO_4$	2.8×10^{-13}	硫化ニッケル(II)*	NiS	3×10^{-19}
フッ化鉛(II)	PbF_2	2.7×10^{-8}	フッ化スカンジウム	ScF_3	4.2×10^{-18}
水酸化鉛(II)	$Pb(OH)_2$	1.2×10^{-15}	水酸化スカンジウム	$Sc(OH)_3$	8.0×10^{-31}
ヨウ化鉛(II)	PbI_2	7.1×10^{-9}	酢酸銀	$AgC_2H_3O_2$	2.0×10^{-3}
硫酸鉛(II)	$PbSO_4$	1.6×10^{-8}	ヒ酸銀	Ag_3AsO_4	1.0×10^{-22}
硫化鉛(II)*	PbS	3×10^{-28}	アジ化銀	AgN_3	2.8×10^{-9}
炭酸リチウム	Li_2CO_3	2.5×10^{-2}	臭化銀	AgBr	5.0×10^{-13}
フッ化リチウム	LiF	3.8×10^{-3}	塩化銀	AgCl	1.8×10^{-10}
リン酸リチウム	Li_3PO_4	3.2×10^{-9}	クロム酸銀	Ag_2CrO_4	1.1×10^{-12}
アンモニウムマグネシウム	$MgNH_4PO_4$	2.5×10^{-13}	シアン化銀	AgCN	1.2×10^{-16}
ヒ酸マグネシウム	$Mg_3(AsO_4)_2$	2×10^{-20}	ヨウ素酸銀	$AgIO_3$	3.0×10^{-8}
炭酸マグネシウム	$MgCO_3$	3.5×10^{-8}	ヨウ化銀	AgI	8.5×10^{-17}
フッ化マグネシウム	MgF_2	3.7×10^{-8}	亜硝酸銀	$AgNO_2$	6.0×10^{-4}
水酸化マグネシウム	$Mg(OH)_2$	1.8×10^{-11}	硫酸銀	Ag_2SO_4	1.4×10^{-5}
シュウ酸マグネシウム	MgC_2O_4	8.5×10^{-5}	硫化銀*	Ag_2S	6×10^{-51}
リン酸マグネシウム	$Mg_3(PO_4)_2$	1×10^{-25}	亜硫酸銀	Ag_2SO_3	1.5×10^{-14}
炭酸マグネシウム(II)	$MnCO_3$	1.8×10^{-11}	チオシアン酸銀	AgSCN	1.0×10^{-12}
水酸化マグネシウム(II)	$Mn(OH)_2$	1.9×10^{-13}	炭酸ストロンチウム	$SrCO_3$	1.1×10^{-10}
硫化マグネシウム(II)*	MnS	3×10^{-14}	クロム酸ストロンチウム	$SrCrO_4$	2.2×10^{-5}
臭化水銀(I)	Hg_2Br_2	5.6×10^{-23}	フッ化ストロンチウム	SrF_2	2.5×10^{-9}
塩化水銀(I)	Hg_2Cl_2	1.3×10^{-18}	硫酸ストロンチウム	$SrSO_4$	3.2×10^{-7}
ヨウ化水銀(I)	Hg_2I_2	4.5×10^{-29}	臭化タリウム(I)	TlBr	3.4×10^{-6}
硫化水銀(II)*	HgS	2×10^{-53}	塩化タリウム(I)	TlCl	1.7×10^{-4}
炭酸ニッケル(II)	$NiCO_3$	6.6×10^{-9}	ヨウ化タリウム(I)	TlI	6.5×10^{-8}

【図１８－３】

(3の部3)

物質	式	K_{sp}
水酸化タリウム(III)	$Tl(OH)_3$	6.3×10^{-46}
水酸化スズ(II)	$Sn(OH)_2$	1.4×10^{-28}
硫化スズ(II)*	SnS	1×10^{-26}
炭酸亜鉛	$ZnCO_3$	1.4×10^{-11}
水酸化亜鉛	$Zn(OH)_2$	1.2×10^{-17}
シュウ酸亜鉛	ZnC_2O_4	2.7×10^{-8}
リン酸亜鉛	$Zn_3(PO_4)_2$	9.0×10^{-33}
硫化亜鉛*	ZnS	2×10^{-25}

*硫化物の平衡型:

$$MS(s) + H_2O(l) \quad M^{2+}(aq) + HS^-(aq) + OH^-(aq)$$

【図１９】

年	バッファ	濃度[a] (mM)	pH	酵素 CA : CI : SO (U/ML)	LOD(μM)	引用文献
1983	PBS	50	7.5	6666 : 700 : 253	8.8	[40]
1991	PBS	50	7.5	1.3 : 0.63: 6.3*	3	72.
1991	PBS	50 - 85	7.9 - 8.1	26 : 16 : 9.8		72.
1992	PBS	100	7.7	300 : 300 : 100	25	72.
1995	PBS	20	7.5	44 : 35 : 28		72.
1996	PBS	50	7.5	2200 : 1800 : 1200	0.3	72.
1996	PBS	50	7.4	2.6 : 3.3 : 3.2*	30	72.
1996	PBS	50	7.4	1316 : 200 : 750	10 - 20	72.
1997	PBS	100	7.0	88 : 70 : 40	1- 2	72.
1999	PBS	100	7.5	446 : 656 : 665	200	72.
2001	PBS	50	7.6	0.3 : 0.3 : 0.3*	0.8	72.
2001	PBS	50	7.5	2200 : 1800 : 1200	5.3	72.
2002	PBS	67 - 335	7.4	4.4 : 0.28: 0.2**	8	72.
2003	PBS	100	7.6	***	13.9	72.
2004	PBS	100	7.0	1185 : 315 : 375	3.2	72.
2005	PBS	50	7.5	150 : 10 : 18		[86-88]
2006	PBS	100	7.6	***		89.
2013	PBS	100	7.0	1.29 : 0.26 : 0.42 **	12	89.
2013	PBS	100	7.4	2340 : 1200 : 1600	3	89.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2018/052231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/00 C12Q1/26 G01N33/70 C12Q1/34
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 1 359 402 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 10 July 1974 (1974-07-10) example 1	1-56
X	JP 2006 349412 A (NAT INST OF ADV IND & TECHNOL) 28 December 2006 (2006-12-28) abstract	1-56
X	WO 2016/135136 A1 (RADIOMETER MEDICAL APS [DK]) 1 September 2016 (2016-09-01) claim 12	1-56
X	US 2010/112599 A1 (RENNEBERG REINHARD [CN] ET AL) 6 May 2010 (2010-05-06) paragraph [0010]	1-56

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 September 2018	28/11/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hinchliffe, Philippe

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2018/052231

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8 618 293 B2 (NEWMAN, PAUL) 31 December 2013 (2013-12-31) claim 1; example 18	1-56
X	US 4 950 609 A (TISCHER WILHELM [DE] ET AL) 21 August 1990 (1990-08-21) example 2	1-56
X	US 2002/119507 A1 (KISHIMOTO TAKAHIDE [JP] ET AL) 29 August 2002 (2002-08-29) paragraph [0218]	1-56
X	EP 2 518 501 A2 (ARKRAY INC [JP]) 31 October 2012 (2012-10-31) paragraphs [0028], [0038]	1-56
X	JP 2002 303631 A (SHINO TEST CORP) 18 October 2002 (2002-10-18) paragraphs [0005], [0039]	1-56

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International application No.
PCT/GB2018/052231

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-56(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2018/052231

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-56(partially)

Sarcosine oxidase and creatinase and a sensor. Composition comprising same. Kit comprising some of the same. Methods of assaying creatinine in a sample.

---

2. claims: 1-56(partially)

Sarcosine oxidase and creatininase and a sensor. Composition comprising same. Kit comprising some of the same. Methods of assaying creatinine in a sample.

---

3. claims: 1-56(partially)

Sarcosine oxidase and creatininase and creatinase and a sensor. Composition comprising same. Kit comprising some of the same. Methods of assaying creatinine in a sample.

---

4. claims: 1-56(partially)

Creatininase and creatinase and a sensor. Composition comprising same. Kit comprising some of the same. Methods of assaying creatinine in a sample.

---

5. claims: 19, 29-32(all partially)

Pre incubation times and second sensor with pre incubation times.

---

6. claims: 16-18, 25(all partially)

Micro fluidic sampling systems

---

7. claim: 20(partially)

Means to increase oxygen content of a sample.

---

8. claims: 23, 24, 27(all partially)

data collection computers.Calculation devices.

---

9. claim: 28(partially)

Drug delivery devices.

International Application No. PCT/GB2018/052231

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

10. claim: 51(partially)

Method of diagnosis

---

11. claims: 51-53(partially)

Administration of a drug to a patient.

---

12. claim: 54(partially)

measuring a kidney for transplant for creatinine production.

---

13. claim: 55(partially)

Measuring kidney function of a kidney transplant patient

---

14. claim: 26(partially)

All previous systems that are ambulatory.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2018/052231

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2518501 A2	31-10-2012	CN 102757893 A	31-10-2012
		EP 2518501 A2	31-10-2012
		JP 5925026 B2	25-05-2016
		JP 2012235771 A	06-12-2012
		US 2012276568 A1	01-11-2012
JP 2002303631 A	18-10-2002	JP 4058475 B2	12-03-2008
		JP 2002303631 A	18-10-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2018/052231

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 1359402 A	10-07-1974	AT 311287 B	12-11-1973
		AT 311288 B	12-11-1973
		AT 315131 B	10-05-1974
		CA 960946 A	14-01-1975
		CA 993386 A	20-07-1976
		CH 572067 A5	30-01-1976
		CH 572522 A5	13-02-1976
		CH 573116 A5	27-02-1976
		DE 2122255 A1	16-11-1972
		DE 2122294 A1	23-11-1972
		FR 2135301 A1	15-12-1972
		FR 2135638 A1	22-12-1972
		FR 2182705 A1	14-12-1973
		GB 1359402 A	10-07-1974
		GB 1359403 A	10-07-1974
		NL 7205995 A	07-11-1972
		NL 7205996 A	07-11-1972
		NL 7206001 A	07-11-1972
		US 3806416 A	23-04-1974
		US 3806420 A	23-04-1974
		US 3907644 A	23-09-1975
		US 3912588 A	14-10-1975
JP 2006349412 A	28-12-2006	NONE	
WO 2016135136 A1	01-09-2016	CN 107257855 A	17-10-2017
		EP 3262182 A1	03-01-2018
		JP 2018509142 A	05-04-2018
		WO 2016135136 A1	01-09-2016
US 2010112599 A1	06-05-2010	CN 101421620 A	29-04-2009
		EP 2016410 A1	21-01-2009
		JP 2009536023 A	08-10-2009
		US 2010112599 A1	06-05-2010
		WO 2007128286 A1	15-11-2007
US 8618293 B2	31-12-2013	CA 2689157 A1	24-12-2008
		CN 101801985 A	11-08-2010
		EP 2155766 A1	24-02-2010
		EP 2481745 A1	01-08-2012
		JP 2010531976 A	30-09-2010
		US 2011262950 A1	27-10-2011
		WO 2008155531 A1	24-12-2008
US 4950609 A	21-08-1990	AT 45979 T	15-09-1989
		DD 244763 A5	15-04-1987
		DE 3515586 A1	06-11-1986
		DE 3665321 D1	05-10-1989
		EP 0201805 A1	20-11-1986
		ES 8802443 A1	16-06-1988
		JP H0236228 B2	16-08-1990
		JP S61249389 A	06-11-1986
		KR 890004090 B1	20-10-1989
		US 4950609 A	21-08-1990
US 2002119507 A1	29-08-2002	EP 1213358 A2	12-06-2002
		US 2002119507 A1	29-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*9/80*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/80	Ｚ	
Ｃ１２Ｍ	*1/40*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	1/40	Ｂ	
Ｃ１２Ｑ	*1/34*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/34		
Ｃ１２Ｑ	*1/26*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/26		

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＥＦＬＯＮ
２．ＢＬＵＥＴＯＯＴＨ

(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口　昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤　和彦
(72)発明者　ラーニー，ロバート　エム．
イギリス国，ロンドン　エスダブリュー７　２エーゼット，エキシビション　ロード，サウス　ケンジントン　キャンパス，インペリアル　カレッジ　ロンドン
(72)発明者　ボウテール，マーティン　ジー．
イギリス国，ロンドン　エスダブリュー７　２エーゼット，エキシビション　ロード，サウス　ケンジントン　キャンパス，インペリアル　カレッジ　ロンドン

Ｆターム(参考)　2G045 AA13 AA16 AA25 BA13 BA20 BB51 CA02 CA25 CA26 CB01
CB03 CB26 CB30 DA16 DA36 DA38 DA42 DA43 DA53 DA72
DB01 FB01 FB05 GA02 GC20 JA01 JA07 JA10
4B029 AA07 BB16 DG08 HA05
4B050 CC08 DD02 JJ10 KK11 LL03
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ84 QQ89 QR03 QR10 QS36 QX05