

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4352153号
(P4352153)

(45) 発行日 平成21年10月28日 (2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年8月7日 (2009.8.7)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/327 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

GO 1 N 27/416 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 Z

GO 1 N 27/30 3 5 3 R

C 1 2 M 1/34 E

GO 1 N 27/46 3 3 6 H

GO 1 N 27/46 3 3 8

請求項の数 14 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2004-564495 (P2004-564495)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月16日 (2003.12.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2003/016132
 (87) 国際公開番号 W02004/061444
 (87) 国際公開日 平成16年7月22日 (2004.7.22)
 審査請求日 平成18年11月14日 (2006.11.14)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-370930 (P2002-370930)
 (32) 優先日 平成14年12月20日 (2002.12.20)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000141897
 アークレイ株式会社
 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
 (74) 代理人 100086380
 弁理士 吉田 稔
 (74) 代理人 100103078
 弁理士 田中 達也
 (74) 代理人 100117178
 弁理士 古澤 寛
 (72) 発明者 山岡 秀亮
 京都府京都市南区東九条西明田町57 ア
 ークレイ株式会社内

審査官 黒田 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薄型分析用具

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料液を保持し、試料液が保持されたときに溶解する試薬部が配置された反応空間を備え、
 上記反応空間の一部は、互いに対面する第1および第2面によって規定され、
 かつ上記第1および第2面の対面距離が45 μm以下に設定されている薄型分析用具であって、

互いに対向した状態で間隔を隔てて配置され、かつ上記反応空間を規定する第1および
 第2板材を備え、
 上記第1および第2面は、上記第1および第2板材の厚み方向に直交する方向に広がりをもつ面であり、

上記第1板材の一面に設けられ、かつ少なくとも一部が上記反応空間に臨むとともに、
 試料液に電圧を印加するために利用される第1および第2電極をさらに備えており、

上記対面距離は、上記第1または第2電極の上面から、上記第2板材における当該電極
 の上面に対面する部分までの最小距離である、薄型分析用具。

【請求項 2】

上記対面距離は、25 ~ 45 μmの範囲である、請求項1に記載の薄型分析用具。

【請求項 3】

上記反応空間は、毛細管力により試料を移動させるように構成されている、請求項1ま
 たは2に記載の薄型分析用具。

【請求項 4】

上記試薬部は、電子伝達物質および酸化還元酵素を含んでいる、請求項1に記載の薄型

10

20

分析用具。

【請求項 5】

上記電子伝達物質は、Ru 化合物である、請求項 4 に記載の薄型分析用具。

【請求項 6】

上記 Ru 化合物は、下記化学式 (1) で示されるものである、請求項 5 に記載の薄型分析用具。



上記化学式 (1) においては、X は、NH₃、ハロゲンイオン、CN、ピリジン、ニコチンアミド、あるいは H₂O であり、n + は X の種類により決定される酸化型 Ru (II) 錯体の価数を表している。

10

【請求項 7】

上記化学式 (1) における X は、NH₃ またはハロゲンイオンである、請求項 6 に記載の薄型分析用具。

【請求項 8】

上記酸化還元酵素は、グルコース脱水素活性を有するものである、請求項 4 に記載の薄型分析用具。

【請求項 9】

上記酸化還元酵素は、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来のグルコース脱水素酵素である、請求項 8 に記載の薄型分析用具。

【請求項 10】

20

上記酸化還元酵素は、グルコース脱水素活性を有し、かつ還元条件下での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 60 kDa である サブユニットを有している、請求項 9 に記載の薄型分析用具。

【請求項 11】

上記酸化還元酵素は、還元条件下での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 43 kDa であるチトクロム C を有している、請求項 10 に記載の薄型分析用具。

【請求項 12】

上記電子伝達物質は、Ru 化合物であり、

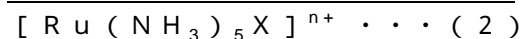
上記酸化還元酵素は、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来のグルコース脱水素酵素である、請求項 4 に記載の薄型分析用具。

30

【請求項 13】

上記 Ru 化合物は、下記化学式 (2) で示されるものであり、

上記酸化還元酵素は、グルコース脱水素活性を有し、かつ還元条件下での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 60 kDa である サブユニットと、還元条件下での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 43 kDa であるチトクロム C と、を有している、請求項 12 に記載の薄型分析用具。



上記化学式 (2) においては、X は、NH₃、ハロゲンイオン、CN、ピリジン、ニコチンアミド、あるいは H₂O であり、n + は X の種類により決定される酸化型 Ru (II) 錯体の価数を表している。

40

【請求項 14】

試料液として、血液、尿、唾液、あるいはこれらの調整液などの生化学的試料を使用し、グルコース、コレステロール、乳酸、あるいはアスコルビン酸を分析できるように構成されている、請求項 1 ないし 13 のいずれかに記載の薄型分析用具。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液などの試料液中の特定成分（たとえばグルコースやコレステロール）の濃度を分析する際に使用される分析用具に関する。

50

【背景技術】

【0002】

糖尿病患者にとっては、血糖値を管理するために日頃から自己の血糖値を把握しておくことは重要である。その一方、頻繁に医療機関に足を運ぶのが煩わしいことから、患者自身が簡易に血糖値の測定を行え、しかも出先などでも血糖値の測定を手軽に行えるように、手のひらに納まるようなサイズの携帯型の簡易血糖値測定装置が用いられている。このような血糖値測定装置を用いての血糖値測定は、酵素反応場を提供するグルコースセンサを血糖値測定装置に装着し、グルコースセンサに対して血液（検体）を供給することにより行われている。

【0003】

グルコースセンサとしては、アンペロメトリー法やクーロメトリー法に代表される電気化学的手法を利用して、簡易血糖値測定装置においてグルコース濃度を測定できるように構成されたものがある。この種のグルコースセンサは、たとえば1対の電極（作用極および対極）と、試薬層と、この試薬層を内部に収容したキャピラリと、を備えたものとして構成されている。

【0004】

アンペロメトリー法を採用する場合には、たとえば作用極および対極は同一平面上に横並びして、あるいは互いに対向して配置され、クーロメトリー法を採用する場合には、一般に、作用極および対極は対向するようにして配置される。試薬層は、酸化還元酵素および電子伝達物質を含んだものとして構成されるが、酸化還元酵素としてはGODが、電子伝達物質としてはフェリシアン化カリウムが汎用されている。このようなグルコースセンサでは、キャピラリを利用して試薬層に検体が供給されたときに、酸化還元酵素によって、たとえばグルコースの酸化反応が触媒される一方で、電子伝達物質の還元反応が触媒される。

【0005】

グルコースセンサに対する血液の供給は、一般に、測定者の皮膚を切開して血液を出液させ、この血液をグルコースセンサに導入することにより行われている。この方法では、血液採取に対する測定者への負担を小さくする観点からは、採取すべき血液量が少ないほうが好ましい。そのため、検体量の低減のために様々な改良が検討されている（たとえば日本国特表2000-509507号公報および米国特許出願公開第2002/0092612号明細書参照）。

【0006】

日本国特表2000-509507号公報には、クーロメトリー法を利用して少ないサンプル量でグルコース濃度を測定できるように、作用極および対極を対向配置し、かつ電極間の離間距離を50 μm 以下としたグルコースセンサが開示されている。このグルコースセンサでは、使用すべき血液量を少なくすることはできるが、クーロメトリー法は殆ど全てのグルコースを反応させる方法であるため、測定時間が著しく長くなってしまうといった問題がある。

【0007】

これに対して、米国特許出願公開第2002/0092612号明細書には、サンプル量を1.5 μL 以下と少なくしつつも、測定時間を10秒と短くしたグルコースセンサが開示されている。このグルコースセンサでは、基板とカバーとの間に、作用極、対極および試薬層を配置したキャビティが形成されており、基板とカバーとの間の距離が200 μm 以下とされている。このグルコースセンサでは、試薬層は、たとえばグルコースオキシダーゼおよびフェリシアン化物を含んだ状態で作用極の表面に固定化され、非水溶性とされている。

【0008】

しかしながら、米国特許出願公開第2002/0092612号明細書に開示されたグルコースセンサにおいても、測定時間の短縮が十分であるとは言い難く、また測定精度の面において未だ改善の余地がある。

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【0009】

本発明は、測定時間を短く維持しつつも、微量の試料液によって精度良く濃度測定を行えるようにすることを目的としている。

【0010】

本発明者は、上記した目的を達成すべく鋭意検討した結果、従来のグルコースセンサにおいて測定時間を短くすることができない原因の1つが試薬層の構成にあることに着目し、本発明をするに至った。

【0011】

すなわち、従来のグルコースセンサの試薬層では、試薬層を作用極の表面に固定化しているために、グルコースとグルコースオキシダーゼとの反応が作用極の表面においてのみ生じ、グルコースとグルコースオキシダーゼの反応に時間を要して測定時間が長くなる。このような不具合を解消するためには、試薬層を試料液（血液）によって溶解しやすい構成とすることが考えられる。この場合、電子伝達物質が試料液（血液）中を拡散することとなるため、電子伝達物質の拡散に影響を与える因子、たとえば試料液の固体成分（血液における血球成分など）の割合の影響、あるいは試料液の温度の影響を排除する必要が生じる。また、フェリシアン化物のように血液に対する溶解性が比較的に小さいものを用いると、溶解時間が長くなって測定時間が長くなる。

【0012】

本発明者はさらに、測定精度をさらに向上させるためには、次に説明する点を改善することが望ましいとの知見も得ている。すなわち、第1に、フェリシアン化物のように血液に対する溶解性が比較的に小さいものを用いると、溶解性のバラツキに起因して測定精度が悪化する虞がある。また、フェリシアン化物は保存安定性が悪く、保存時において容易に還元体へと移行するため、この点においても測定精度が低下することが懸念される。第2に、グルコースオキシダーゼは、グルコースとの反応速度が比較的に小さい（ K_m （ミカエリス定数）が大きい）ため、グルコースオキシダーゼを使用することは測定時間を短縮する上では好ましくない。

【0013】

以上の事情に鑑み、本発明においては、試料液を保持し、試料液が保持されたときに溶解する試薬部が配置された反応空間を備えるとともに、上記反応空間の一部は、互いに対面する第1および第2面によって規定されており、かつ上記第1および第2面の対面距離が45 μm 以下に設定されている薄型分析用具であって、互いに対向した状態で間隔を隔てて配置され、かつ上記反応空間を規定する第1および第2板材を備えるとともに、上記第1および第2面は、上記第1および第2板材の厚み方向に直交する方向に広がりをもつ面であり、上記第1板材の一面に設けられ、かつ少なくとも一部が上記反応空間に臨むとともに、試料液に電圧を印加するために利用される第1および第2電極をさらに備えており、上記対面距離は、上記第1または第2電極の上面から、上記第2板材における当該電極の上面に対面する部分までの最小距離である、薄型分析用具が提供される。対面距離は、好ましくは25～45 μm の範囲とされる。

【0014】

【0015】

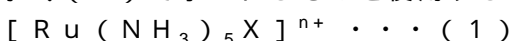
【0016】

【0017】

反応空間は、たとえば毛細管力により試料を移動させることができるように構成される。

【0018】

試薬部は、たとえば電子伝達物質および酸化還元酵素を含んだものとして構成される。電子伝達物質としては、Ru化合物を用いるのが好ましい。Ru化合物としては、下記化学式（1）で示されるものを使用することができる。



10

20

30

40

50

化学式(1)においては、Xとしては、 NH_3 、ハロゲンイオン、 CN 、ピリジン、ニコチンアミド、あるいは H_2O が挙げられるが、Xは NH_3 またはハロゲンイオンであるのが好ましい。化学式(1)におけるn+は、Xの種類により決定される酸化型Ru(III)錯体の価数を表している。

【0019】

酸化還元酵素としては、分析対象成分がグルコースである場合には、グルコース脱水素活性を有するGDHを使用するのが好ましい。GDHとしては、FADを補欠因子とするグルコース脱水素酵素(GDH)を使用するのが好ましい。GDHとしてはさらに、GDHにチトクロムCが結合したGDH(CyGDH)を使用するのが好ましい。CyGDHおよびGDHとしては、国際公開第WO02/36779号パンフレットに開示されているものが挙げられる。GDHとしては、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来のものを使用するのが好ましいが、CyGDHやGDHと同じFADおよびチトクロムCをもつ他属の微生物に由来のGDHを使用することもできる。他属の例としてRastonia属あるいはPseudomonas属の中で病原性を持つグラム陰性菌が挙げられる。

10

【0020】

たとえばGDHは、グルコース脱水素活性を有するサブユニットとして、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaであるGDH活性タンパク質(サブユニット)を含んだものである。一方、CyGDHは、サブユニットと、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaである電子伝達タンパク質(チトクロムC)と、をサブユニットとして含むものである。GDHやCyGDHとしては、サブユニットやチトクロムC以外のサブユニットをさらに有するものを使用することもできる。

20

【0021】

CyGDHは、たとえばブルクホルデリア・セパシアに属する微生物が菌体外に分泌した酵素を精製し、あるいは当該菌体の菌体内酵素を精製することにより得ることができる。一方、GDHは、たとえばブルクホルデリア・セパシアに属する微生物から採取したGDHをコードする遺伝子が移入された形質転換体を形成し、この形質転換体から外部に分泌された酵素を精製し、あるいは当該形質転換体の菌体内酵素を精製することにより得ることができる。

30

【0022】

ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物としては、たとえばブルクホルデリア・セパシアKS1株を使用することができる。このKS1株は、平成12年9月25日に独立特許法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に微生物受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。

【0023】

試料液としては、たとえば血液、尿、唾液およびこれらの調整液などの生化学的試料が挙げられ、分析対象成分としては、たとえばグルコース、コレステロール、乳酸およびアスコルビン酸が挙げられる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本発明を実施するための最良の形態について、図面を参照しつつ具体的に説明する。本実施の形態においては、血糖値を測定するように構成されたグルコースセンサを例にとって説明するが、本発明は、血糖値を測定する場合に限定されず、血液中の他の成分あるいは血液以外の試料液を分析する分析用具に対しても適用することができる。

【0025】

図1ないし図3に示したグルコースセンサ1は、濃度測定装置2に装着して使用するものであり(図4参照)、長矩形の基板3に対して、スペーサ4を介してカバー5を積層した形態を有している。このグルコースセンサ1においては、各要素3~5により反応空

50

間 6 が規定されている。この反応空間 6 は、矩形断面を有する柱状の空間として規定されており、開口部（導入口）6 1 から導入された試料液を毛細管力を利用して移動させ、かつ導入された試料液を保持することができる。

【 0 0 2 6 】

スペーサ 4 は、基板 3 の上面 3 0 からカバー 5 の下面 5 a までの距離、すなわち反応空間 6 の高さ寸法を規定するためのものである。このスペーサ 4 には、先端部が開放したスリット 4 1 が形成されている。スリット 4 1 は、反応空間 6 の幅寸法を規定するためのものであり、スリット 4 1 における先端の開放部は、反応空間 6 の内部に試料液を導入するための導入口 6 1 を構成するためのものである。

【 0 0 2 7 】

カバー 5 は、排気口 5 1 を有している。排気口 5 1 は、反応空間 6 の内部の気体を外部に排出するためのものであり、反応空間 6 の内部と連通している。したがって、導入口 6 1 を介して反応空間 6 内に試料液が導入された場合には、反応空間 6 において生じる毛細管力により、試料液がカバー 5 に形成された排気口 5 1 に向けて反応空間 6 の内部を移動する。

【 0 0 2 8 】

図 3 によく表れているように、基板 3 の上面 3 0 には、作用極 3 1、対極 3 2 および試薬部 3 3 が形成されている。作用極 3 1 および対極 3 2 は、全体として基板 3 の長手方向に延びている。作用極 3 1 および対極 3 2 の端部 3 1 a、3 2 a は、基板 3 の短手方向に延び、かつ長手方向に並んでいる。一方、作用極 3 1 および対極 3 2 の端部 3 1 b、3 2 b は、後述する濃度測定装置 2 の第 1 および第 2 端子 2 0 a、2 0 b（図 4 参照）と接触させるための端子部を構成している。

【 0 0 2 9 】

作用極 3 1 および対極 3 2 は、たとえばスクリーン印刷、メッキ、あるいはスパッタリングにより、厚み寸法 D（図 2 参照）が $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下にされている。好ましくは、作用極 3 1 および対極 3 2 の厚み寸法 D は、 $1\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ に設定される。作用極 3 1 の上面 3 1 c からカバー 5 の下面 5 a までの対面距離 H 1（図 2 参照）は、 $45\text{ }\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $25\sim 45\text{ }\mu\text{m}$ に設定されている。これは、対面距離 H 1 が不当に大きいと、後述するように血液の温度やヘマトクリット値の影響を受け易い反面、対面距離 H 1 が不当に小さいと、反応空間 6 の内部において血液を適切に移動させることができなくなるからである。

【 0 0 3 0 】

試薬部 3 3 は、たとえばメディエータ（電子伝達物質）および相対的に少量の酸化還元酵素を含む固体状に形成されており、図 2 および図 3 によく表れているように、作用極 3 1 および対極 3 2 の端部 3 1 a、3 2 a どうしを橋渡すようにして設けられている。この試薬部 3 3 は、血液に対して容易に溶解するものとされている。したがって、反応空間 6 に血液を導入した場合には、メディエータ、酸化還元酵素およびグルコースを含む液相反応系が構築される。この液相反応系においては、作用極 3 1 の上面 3 1 c のみならず、反応空間 6 における広範囲にわたってグルコースの酸化反応と、メディエータの還元反応が生じる。したがって、作用極の表面にメディエータや酸化還元酵素を固定化する場合に比べて、より短時間でより多くのグルコースを酸化させることができる。これにより、測定時間の短縮を図ることができるようになる。

【 0 0 3 1 】

メディエータとしては、Ru 化合物を使用するのが好ましい。Ru 化合物としては、たとえば Ru 錯体が挙げられる。Ru 錯体としては、電子伝達体として機能すればその配位子の種類は特に限定されないが、試薬部 3 3 に酸化型の状態で含ませるのが好ましく、たとえば酸化型が下記化学式（2）で示されるものが使用される。



化学式（2）における X としては、 NH_3 、ハロゲンイオン、 CN 、ピリジン、ニコチンアミド、あるいは H_2O が挙げられるが、 NH_3 またはハロゲンイオンが好ましい。一

10

20

30

40

50

方、化学式における $n +$ は X の種類により決定される酸化型 (III) 錯体の価数を表している。

【 0 0 3 2 】

Ru 錯体は、還元型 (I) が不安定なために通常は酸化型 (III) として存在する。そのため、グルコースセンサ 1 の試薬部 3 3 に Ru 錯体を混在させた状態で光や水に曝露されたとしても、メディエータが容易に還元してしまうことはない。そのため、メディエータの曝露に起因して測定誤差が生じることを抑制することができるようになる。また、 Ru 錯体は結晶化しにくく、微粉末状態を適切に維持することができるといった特性を有している。そのため、 Ru 錯体を用いれば、保存時に試薬部 3 3 の溶解性が悪化することもない。さらには、 Ru 錯体と GDH や $CyGDH$ との組み合わせについていえば、 Ru 錯体の電子伝達速度が大きいために測定時間を短くすることができるといった利点がある。

10

【 0 0 3 3 】

一方、酸化還元酵素としては、上述した GDH または $CyGDH$ を使用するのが好ましい。これらの酵素は、グルコースオキシダーゼに比べてグルコースに対する反応速度が大きいといった利点がある。この点からも、測定時間の短縮を図ることができるようになる。

【 0 0 3 4 】

図 4 に示したように、濃度測定装置 2 は、第 1 および第 2 端子 2 0 a , 2 0 b 、電圧印加部 2 1 、電流値測定部 2 2 、検知部 2 3 、制御部 2 4 、演算部 2 5 および表示部 2 6 を備えている。

20

【 0 0 3 5 】

第 1 および第 2 端子 2 0 a , 2 0 b は、濃度測定装置 2 に対してグルコースセンサ 1 を装着した場合に、グルコースセンサ 1 における作用極 3 1 および対極 3 2 の端部 3 1 b , 3 2 b に接触させるためのものである。

【 0 0 3 6 】

電圧印加部 2 1 は、第 1 および第 2 端子 2 0 a , 2 0 b を介して、グルコースセンサ 1 の作用極 3 1 と対極 3 2 との間に電圧を印加する際に利用される。電圧印加部 2 1 としては、たとえば乾電池または充電池などの直流電源が使用される。

【 0 0 3 7 】

電流値測定部 2 2 は、作用極 3 1 および対極 3 2 間への電圧印加時における作用極 3 1 とメディエータとの間の電子の授受量を、応答電流値として測定するためのものである。

30

【 0 0 3 8 】

検知部 2 3 は、濃度測定装置 2 にグルコースセンサ 1 を装着した後において、電流値測定部 2 2 によって測定された電流値に基づいて、試薬部 3 3 (図 1 ないし図 3 参照) に試料液が供給されたか否かを確認するためのものである。

【 0 0 3 9 】

制御部 2 4 は、電圧印加部 2 1 を制御し、作用極 3 1 および対極 3 2 の間に電圧が印加される状態 (閉回路) と印加されない状態 (開回路) とを選択するものである。

【 0 0 4 0 】

演算部 2 5 は、電流値測定部 2 2 により測定された応答電流値に応じて、グルコース濃度の演算を行うものである。演算部 2 5 は、たとえばグルコース濃度をアンペロメトリックな手法により演算できるように構成されている。アンペロメトリックな手法を用いれば、クーロメトリックな手法を採用するよりも、短時間で濃度測定を行うことができる。

40

【 0 0 4 1 】

検知部 2 3 、制御部 2 4 、および演算部 2 5 のそれぞれは、たとえば CPU および ROM や RAM などのメモリにより構成されるが、検知部 2 3 、制御部 2 4 、および演算部 2 5 の全てを、1つの CPU に対して複数のメモリを接続することにより構成することも可能である。

【 0 0 4 2 】

50

表示部 26 は、演算部 25 による演算結果の他、たとえばエラーである旨や操作手順などを表示するためのものであり、たとえば液晶表示装置により構成される。

【0043】

次に、グルコースセンサ 1 および濃度測定装置 2 を用いたグルコース濃度の測定の手順について説明する。

【0044】

図 4 に良く表れているように、まずグルコースセンサ 1 を濃度測定装置 2 に装着する。そうすると、グルコースセンサ 1 の作用極 31 および対極 32 の端部 31b, 32b が濃度測定装置 2 の第 1 および第 2 端子 20a, 20b に接触する。この状態では、第 1 および第 2 端子 20a, 20b を介して、作用極 31 および対極 32 の間への電圧の印加が可能とされている。実際の測定においては、濃度測定装置 2 にグルコースセンサ 1 を装着した時点から、作用極 31 と対極 32 との間に定電圧が印加される。Ru 錯体は、低電圧でメディエーションを起こすため、Ru 錯体を用いる場合には、作用極 31 および対極 32 の間に印加する定電圧は、たとえば 100 ~ 500 mV の範囲に設定される。本実施の形態では、作用極 31 および対極 32 の間への定電圧の印加は、グルコース濃度を演算するための応答電流値が測定されるまでは継続して行われているものとする。

【0045】

次いで、グルコースセンサ 1 の導入口 61 を介して反応空間 6 に血液を導入する。血液は、毛細管力により導入口 61 からカバー 5 に形成された排気口 51 に向けて反応空間 6 内を進行する。その過程においては、血液が試薬部 33 を溶解させる。

【0046】

一方、試薬部 33 に血液が供給されれば、酸化還元酵素によりグルコースがグルコノラクトンに酸化されるとともにメディエータが還元型とされる。なお、グルコノラクトンは非酵素的にグルコン酸となる。

【0047】

還元型のメディエータは、作用極 31 および対極 32 の端部 31b, 32b を介して作用極 31 および対極 32 に定電圧を印加した状態では、作用極の端部 31a 側に移動し、この端部 31a に電子を放出して酸化型のメディエータとなる。したがって、電圧印加部 21 により作用極 31 および対極 32 間に定電圧を印加した状態では、還元型メディエータから付与された電子量が作用極 31 および第 1 端子 20a を介して電流値測定部 22 において応答電流として測定される。この応答電流値は、電圧印加によって試薬部 33 を移動した還元型のメディエータに由来する電子量に相関するものであり、いわゆる拡散電流と呼ばれるものである。

【0048】

一方、電流値測定部 22 において測定された応答電流値は、検知部 23 においてモニタリングされており、応答電流値が閾値を越えた時点で、検知部 23 は試薬部 33 に血液が供給され、試薬部 33 が溶解したことを検知する。検知部 23 において血液が供給されたことが検知された場合には、この検知から一定時間経過したか否かが検知部 23 により判断される。

【0049】

検知部 23 において一定時間が経過したと判断された場合には、電流値測定部 22 において応答電流値を測定し、この応答電流値に基づいて、演算部 25 においてグルコース濃度が演算される。グルコース濃度の演算は、応答電流値を電圧値に換算した後に、この電圧値を、予め作成しておいた電圧値とグルコース濃度との関係を示す検量線に当てはめることにより演算される。演算部 25 における演算結果は、たとえば表示部 26 において表示される。

【0050】

作用極 31 に接触している還元型のメディエータは、即座に作用極 31 に対して電子を放出して酸化型となるが、作用極 31 から一定距離離れた還元型のメディエータであっても、作用極 31 に対して電子を放出して酸化型となる。以下、作用極 31 に対して還元型

10

20

30

40

50

のメディエータが電子を放出可能な領域を電子放出領域、作用極 3 1 に対して還元型のメディエータが電子を放出することができない領域を非電子放出領域ということとする。

【 0 0 5 1 】

後述する実施例から推測できるように、電子放出領域における作用極の表面からの距離は、 $45\text{ }\mu\text{m}$ よりも小さくなることはない。したがって、図 5 A に示したように、作用極 3 1 の上面 3 1 c からカバー 5 の下面 5 a までの対面距離 H 1 が比較的に大きい場合、たとえば対面距離 H 1 が $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上の場合には、作用極 3 1 の直上においては、電子放出領域 7 0 の上方に非電子放出領域 7 1 が存在することとなる。

【 0 0 5 2 】

これに対して、本願のグルコースセンサ 1 のように、作用極 3 1 の上面 3 1 c からカバー 5 の下面 5 a までの対面距離 H 1 が $45\text{ }\mu\text{m}$ 以下に設定されている場合には、図 5 B に示したように、電子放出領域 7 0 における作用極 3 1 の直上に位置する部分の厚み寸法（以下、単に「電子放出領域 7 0 の厚み寸法」という）が対面距離 H 1 に一致し、この電子放出領域 7 0 の厚み寸法は、図 5 A に示した場合と同等かもしくはそれよりも小さくなる。

10

【 0 0 5 3 】

このように、対面距離 H 1 が大きい場合（図 5 A 参照）と小さい場合（図 5 B 参照）とでは、作用極 3 1 の直上における様子が異なったものとなる。その結果、後述する本発明の実施例からも推測できるように、対面距離 H 1 の大小により、還元型メディエータが消費される様子が異なったものとなる。

20

【 0 0 5 4 】

ここで、電圧非印加状態において、電子放出領域に存在する還元型のメディエータ（以下、「非拡散メディエータ」という）の濃度と、非電子放出領域に存在する還元型のメディエータ（以下、「拡散メディエータ」という）の濃度とが同一である系を考える。

【 0 0 5 5 】

図 5 A に示した対面距離 H 1 が大きいケースでは、電子放出領域 7 0（点線で囲まれた部分）の厚み寸法が大きいために、電圧印加時に非拡散メディエータの全てが酸化されるわけではない。したがって、非拡散メディエータが一定量ずつ消費され、これに起因して電子放出領域 7 0 と非電子放出領域 7 1 との間に還元型メディエータの濃度差が生じる。これにより、電子放出領域 7 0 に対しては、その上方および側方から、拡散メディエータが拡散してくる。その後は、電子放出領域 7 0 に存在する還元型メディエータの酸化、および電子放出領域 7 0 に対する拡散メディエータの拡散が重疊的に生じる。このため、対面距離 H 1 が大きいケースでは、大きく分けて、初期は非拡散メディエータの消費、中期は非拡散メディエータおよび拡散メディエータの消費、後期は拡散メディエータの消費というプロセスを経ることとなる。

30

【 0 0 5 6 】

ここで、拡散メディエータの拡散速度は、電子放出領域 7 0 と非電子放出領域 7 1 との間における還元型メディエータの濃度差に加えて、拡散媒体（血液）の温度や移動抵抗（血液のヘマトクリット値）の影響を受ける。したがって、対面距離 H 1 が大きいケースでは、血液の温度やヘマトクリット値の影響が経時的に徐々に大きくなる。

40

【 0 0 5 7 】

これに対して、対面距離 H 1 が小さいケース（図 5 B 参照）では、電子放出領域 7 0 の厚み寸法が小さいために、初期において非拡散メディエータが殆ど全て消費され、次いで電子放出領域への拡散メディエータの拡散および消費が生じる。このため、対面距離 H 1 が小さいケースでは、大きく分けて、初期は非拡散メディエータの消費、後期は拡散メディエータの消費というプロセスを経ることとなる。したがって、対面距離 H 1 が小さいケースでは、血液の温度やヘマトクリット値の影響を受けにくい段階と、それらの影響を大きく受ける段階とに分かれることになる。

【 0 0 5 8 】

対面距離 H 1 が電子放出領域の厚み寸法と一致するケースでは、電子放出領域に対する

50

拡散メディエータの拡散は、電子放出領域の側方のみから行われる。そのため、対面距離 H 1 が電子放出領域の厚み寸法よりも大きく、電子放出領域の側方および上方から拡散メディエータが拡散してくる場合に比べれば、対面距離 H 1 が小さい場合には、拡散メディエータの拡散速度などが、測定電流値に与える影響は小さいといえる。とくに、血液の温度やヘマトクリット値の影響を受けにくい段階においては、拡散メディエータの挙動が測定電流値に与える影響は小さい。したがって、対面距離 H 1 を電子放出領域の厚み寸法と同程度、もしくはそれよりも小さくすれば、血液の温度やヘマトクリット値の影響を受けにくく、電圧印加開始からの短い時間範囲（測定時間が短い範囲）における再現性が良好なものとなる。

【 0 0 5 9 】

10

本発明に係るグルコースセンサは、上述した実施の形態には限定されず、種々に設計変更可能である。たとえば作用極 3 1 および対極 3 2 は、少なくとも一部が反応空間 6 の内部に臨んでいればよく、たとえば図 6 A に示した構成を採用することもできる。

【 0 0 6 0 】

図 6 A に示したグルコースセンサ 1 は、基板 3 に凹部 3 5 , 3 6 を形成し、この凹部 3 5 , 3 6 に作用極 3 1 および対極 3 2 を埋設形成したものである。

【 0 0 6 1 】

作用極 3 1 および対極 3 2 の上面 3 1 c , 3 2 c は、図示したように基板 3 の上面 3 0 と面一となるようにしてもよく、また面一でなくてもよい。

【 0 0 6 2 】

20

このグルコースセンサ 1 では、対面距離 H 1 は、作用極 3 1 の上面 3 1 c からカバー 5 の下面 5 a までの距離として定義され、作用極 3 1 および対極 3 2 の上面 3 1 c , 3 2 c が基板 3 の上面 3 0 と面一の場合には、対面距離 H 1 は、基板 3 とカバー 5 との間の距離 H 2 に一致する。

【 0 0 6 3 】

図 6 B に示したグルコースセンサ 1 は、本発明の参考例である。このグルコースセンサ 1 は、基板 3 に作用極 3 1 を形成し、カバー 5 に対極 3 2 を形成したものである。

【 0 0 6 4 】

【 0 0 6 5 】

30

本発明は、スペーサによって反応空間の高さ寸法が規定された分析用具に限らず、反応空間となるべき凹部が形成された基板に対して、カバーを接合した構成の分析用具に対しても適用することができる。

【実施例】

【 0 0 6 6 】

以下においては、本発明に係るグルコースセンサが、応答電流値の測定において、血液中の血球や温度による影響が小さく、短時間で精度良くグルコース濃度を測定することができることについて、実施例 1 ~ 4 を通して実証する。

【 0 0 6 7 】

〔グルコースセンサの作成〕

40

実施例 1 ~ 4 においては、図 1 ないし図 3 に示したのと同様な構成のグルコースセンサを用いて評価した。各実施例において用いたグルコースセンサは、反応空間 6 の長さ寸法 L (図 2 参照)、幅寸法 W (図 1 参照)、作用極 3 1 および対極 3 2 の厚さ寸法 D (図 2 参照)を、それぞれ 3 . 4 mm、1 . 5 mm、1 0 μ m とした。グルコースセンサにおける対面距離 H 1、基板 3 とカバー 5 との間の距離 H 2 (図 2 参照)、および試薬部 3 3 の構成については、下記表 1 に示した通りとした。

【 0 0 6 8 】

【表 1】

	グルコースセンサの構成		
	対面距離 H1	反応空間の 高さ寸法 H2	試薬部の構成
本案グルコースセンサ 1	2 3 μ m	3 3 μ m	酵素含有層/ 電子伝達層
本案グルコースセンサ 2	3 5 μ m	4 5 μ m	酵素含有層/ 電子伝達層
本案グルコースセンサ 3	2 3 μ m	3 3 μ m	液相電子伝達層のみ
本案グルコースセンサ 4	4 4 μ m	5 4 μ m	液相電子伝達層のみ
比較グルコースセンサ 1	4 7 μ m	5 7 μ m	酵素含有層/ 電子伝達層
比較グルコースセンサ 2	4 7 μ m	5 7 μ m	液相電子伝達層のみ

10

【 0 0 6 9 】

本案グルコースセンサ 1, 2 および比較グルコースセンサ 1 については、試薬部 3 3 を、電子伝達層および酵素含有層からなる 2 層構造とした。電子伝達層は、基板 3 上に電子伝達物質を含む第 1 材料液を 0.4 μ L 塗布した後に第 1 材料液を送風乾燥 (30、10% Rh) することにより形成した。酵素含有層は、電子伝達層上に、酸化還元酵素を含む第 2 材料液を 0.3 μ L 塗布した後に第 2 材料液を送風乾燥 (30、10% Rh) することにより形成した。

20

【 0 0 7 0 】

第 1 材料液は、下記表 2 に (1) ~ (4) で示した材料をその番号通りの順序で混合した混合液を、1 ~ 3 日放置した後、この混合液に電子伝達物質を添加することにより調製した。電子伝達物質としては、[Ru(NH₃)₆]Cl₃ (同仁化学研究所「LM722」) を使用した。

30

【 0 0 7 1 】

【表 2】

表 2 : 第 1 材料液の組成 (電子伝達物質を除く)

①SWN 溶液		②CHAPS 溶液		③蒸留水	④ACES 溶液	
濃度	容量	濃度	容量		濃度	容量
1.2%	250 μ L	10%	25 μ L	225 μ L	200mM	500 μ L

【 0 0 7 2 】

表 2 などにおいて、SWN はルーセントライト SWN の略号であり、CHAPS は 3 - [(3 - cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid の略号であり、ACES は N - (2 - acetamido) - 2 - aminoethanesulfonic acid の略号である。SWN としては、コープケミカル (株) 製「3150」を使用し、CHAPS としては同仁化学研究所製「KC062」を使用し、ACES としては同仁化学研究所製「ED067」を使用した。なお、ACES 溶液は pH が 7.5 となるように調製した。

40

【 0 0 7 3 】

一方、第 2 材料液は、酸化還元酵素を 0.1% CHAPS に溶解させることにより調製した。酸化還元酵素としては、CyGDH (グルコース脱水素活性が 800 U/mg) を使用した。CyGDH については、上述した通りである。

50

【 0 0 7 4 】

これに対して、本案グルコースセンサ 3 , 4 および比較グルコースセンサ 2 については、試薬部 3 3 を、フェリシアン化カリウムとフェロシアン化カリウムが共存する構成とした。これは、酸化還元酵素の触媒能、その他の要因の影響を除外し、純粋に、対面距離 H 1 の高さが再現性に与える影響を判断するためである。より具体的には、試薬部 3 3 は、基板 3 上に材料液を保持させることにより液相として形成した。材料液としては、フェリシアン化カリウムが 2 0 m M、フェロシアン化カリウムが 2 4 m M、塩化カリウムが 1 . 5 M となるように調製されたものを用いた。

【 0 0 7 5 】

実施例 1 (ヘマトクリット値の影響の検討)

本実施例においては、本案グルコースセンサ 1 , 2 および比較グルコースセンサ 1 を用いて、ヘマトクリット (H c t) 値が応答電流値に与える影響を評価した。この評価においては、血液としては、グルコース濃度が 4 1 2 m g / d L、H c t 値が 1 9 %、4 2 %、あるいは 6 9 % のいずれかのものを用いた。

【 0 0 7 6 】

作用極 3 1 と対極 3 2 との間への電圧印加は、印加電圧値を 2 0 0 m V として血液の供給と同時に開始し、応答電流値は、電圧印加の開始から 5 s e c、7 s e c、および 1 0 s e c 後に測定した。各 H c t 値の血液については、5 回ずつ応答電流値を測定した。

【 0 0 7 7 】

応答電流値の測定結果は、本案グルコースセンサ 1 については図 7 に、本案グルコースセンサ 2 については図 8 に、比較グルコースセンサ 1 については図 9 にそれぞれ示した。また、図 7 ~ 図 9 においては、横軸を時間 (s e c)、縦軸を B i a s (%) として示してある。B i a s (%) は、H c t 値が 4 2 % のときの応答電流値を基準とし、この基準値に対するずれ量を示すものであり、各図においては、B i a s (%) は 5 回の測定の平均値として示してある。

【 0 0 7 8 】

図 7 ~ 図 9 を比較すれば分かるように、電圧印加時間の如何に拘わらず、対面距離 H 1 が小さいほど B i a s が小さくなる傾向にある。したがって、対面距離 H 1 が小さいほど、血液の H c t 値の影響が小さくなる傾向が伺える。

【 0 0 7 9 】

実施例 2 (温度の影響)

本実施例においては、本案グルコースセンサ 1 , 2 および比較グルコースセンサ 1 を用いて、血液の温度が応答電流値に与える影響を評価した。

【 0 0 8 0 】

この評価においては、血液としては、H c t 値が 4 2 %、グルコース濃度が 1 0 0 . 0 m g / d L、4 2 2 . 0 m g / d L、あるいは 6 3 6 . 0 m g / d L のいずれかで、温度が 5 、 2 5 あるいは 4 5 に調製されたものを用いた。

【 0 0 8 1 】

作用極 3 1 と対極 3 2 との間への電圧印加は、印加電圧値を 2 0 0 m V として血液の供給開始から行い、応答電流値は、電圧印加開始から 5 s e c 後に測定した。各グルコース濃度の血液については、5 回ずつ応答電流値を測定した。

【 0 0 8 2 】

応答電流値の測定結果は、本案グルコースセンサ 1 については図 1 0 に、本案グルコースセンサ 2 については図 1 1 に、比較グルコースセンサ 1 については図 1 2 にそれぞれ示した。また、図 1 0 ~ 図 1 2 においては、横軸を温度 ()、縦軸を B i a s (%) として各グルコース濃度について個別に示した。ここで、B i a s (%) は、温度が 2 5 のときの応答電流値を基準とし、この基準に対するずれ量を示すものであり、各図においては、B i a s (%) は 5 回の測定の平均値として示してある。

【 0 0 8 3 】

図 1 0 ~ 図 1 2 を比較すれば分かるように、グルコース濃度および電圧印加時間の如何

10

20

30

40

50

に拘わらず、対面距離 H_1 が小さいほど $Bias$ が小さくなる傾向にある。したがって、対面距離 H_1 が小さいほど、血液の温度の影響が小さくなる傾向が伺える。

【0084】

実施例3（測定レンジの評価）

本実施例では、本案グルコースセンサ1を用いて、測定レンジを評価した。測定レンジは、グルコース濃度と応答電流値との関係（直線性）により評価した。

【0085】

この評価においては、血液としては、 Hct 値が42%、グルコース濃度が0mg/dL、100mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、610mg/dL、805mg/dLあるいは980mg/dLのものを用いた。作用極31と対極32との間への電圧印加は、印加電圧値を200mVとして血液の供給開始から行い、応答電流値は、電圧印加の開始から3sec後に測定した。各グルコース濃度の血液については、10回ずつ応答電流値を測定した。

【0086】

応答電流値の測定結果は、図13に示した。ただし、図13においては、応答電流値(μA)は、10回の測定の平均値として示してある。

【0087】

図13から分かるように、本案グルコースセンサ1では、グルコース濃度が0~1000mg/dLの範囲で高い直線性を示しており、グルコース濃度が比較的に大きい場合(600mg/dL以上)であっても、適切にグルコース濃度を測定できるといえる。したがって、本案グルコースセンサ1のように、酸化還元酵素としてCygDHを、メディエータとしてRu錯体を使用すれば、対面距離 H_1 を小さくして設定しても、3秒程度の短い測定時間で、0~1000mg/dLの範囲にあるグルコースの濃度を適切に測定できるといえる。

【0088】

実施例4（再現性の評価）

本実施例では、本案グルコースセンサ3、4および比較グルコースセンサ2を用いて、複数回の応答電流値の測定のタイムコースおよび相対標準偏差C.V.(%)のタイムコースに基づいて、応答電流値の再現性を評価した。

【0089】

この評価においては、血液として Hct 値が42%、グルコース濃度が412mg/dLのものを用いた。作用極31と対極32との間への電圧印加は、印加電圧値を200mVとして血液の供給開始から5秒後に開始し、応答電流値は、電圧印加の開始から、50msec毎に経時的に測定した。

【0090】

タイムコースの測定結果については、図14~図16に示した。これらの図においては、5回分の測定の応答電流値のタイムコースを同時に示してあり、図14は本案グルコースセンサ3、図15は本案グルコースセンサ4、図16は比較グルコースセンサ2を用いたときの結果をそれぞれ示している。一方、図17には、C.V.(%)のタイムコースを示した。このタイムコースは、応答電流値のタイムコースを得るための5回の応答電流値の測定に基づいて作成した。

【0091】

図14~図16から分かるように、本案グルコースセンサ3、4では、比較グルコースセンサ2と同様に応答電流値のタイムコースに殆どバラツキが見られず、複数回の測定において良好な再現性が得られた。一方、図17から分かるように、本案グルコースセンサ3では、電圧印加開始初期、すなわち電圧印加開始から0.5~3.0(sec)の時間範囲において、本案グルコースセンサ4や比較グルコースセンサ2に比べてC.V.が小さく、C.V.値が概ね2.5%以下と小さくなっている。本案グルコースセンサ4では、電圧印加開始から3.0~7.0(sec)の時間範囲において、比較グルコースセンサ2に比べてC.V.が小さく、C.V.値が概ね2.5%以下と小さくなっている。こ

これらの結果から分かるように、対面距離 H_1 を小さく設定すれば、電圧印加開始から短い時間範囲において、再現性が良好なものとなっている。したがって、再現性の観点からは、対面距離 H_1 を小さく設定したグルコースセンサは、短い測定時間に適したものであるといえる。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1は、本発明に係るバイオセンサの全体斜視図である。

【図2】図2は、図1のII-II線に沿う断面図である。

【図3】図3は、図1に示したバイオセンサの分解斜視図である。

【図4】図4は、図1ないし図3に示したバイオセンサを濃度測定装置に装着した状態を示すものであり、バイオセンサについては平面図で、濃度測定装置についてはブロック図で示したものである。

【図5】図5Aおよび図5Bは、バイオセンサの作用を説明するためのものであり、バイオセンサの要部断面図である。

【図6】図6Aおよび図6Bは、バイオセンサの他の例および参考例を示す断面図である。

【図7】図7は、本案バイオセンサ1に対する血液のヘマトクリット値の影響を示すグラフである。

【図8】図8は、本案バイオセンサ2に対する血液のヘマトクリット値の影響を示すグラフである。

【図9】図9は、比較バイオセンサ1に対する血液のヘマトクリット値の影響を示すグラフである。

【図10】図10は、本案バイオセンサ1に対する血液の温度の影響を示すグラフである。

【図11】図11は、本案バイオセンサ2に対する血液の温度の影響を示すグラフである。

【図12】図12は、比較バイオセンサ1に対する血液の温度の影響を示すグラフである。

【図13】図13は、本案バイオセンサ1に対する測定レンジの評価結果を示すグラフである。

【図14】図14は、本案バイオセンサ3に対する再現性を、応答電流値のタイムコースとして評価した結果を示すグラフである。

【図15】図15は、本案バイオセンサ4に対する再現性を、応答電流値のタイムコースとして評価した結果を示すグラフである。

【図16】図16は、比較バイオセンサ2に対する再現性を、応答電流値のタイムコースとして評価した結果を示すグラフである。

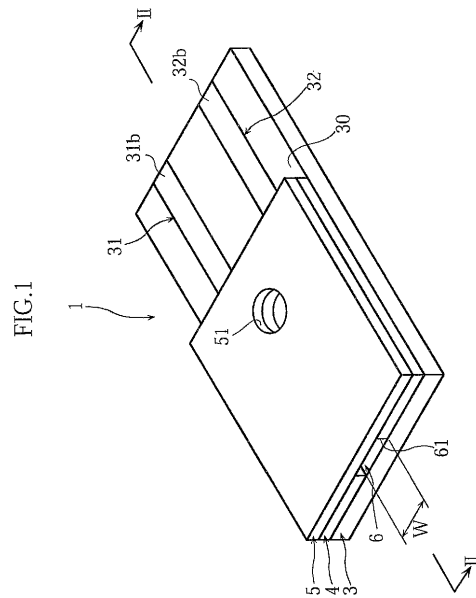
【図17】図17は、本案バイオセンサ3、4および比較バイオセンサ2に対する再現性を、C.V.のタイムコースとして評価した結果を示すグラフである。

10

20

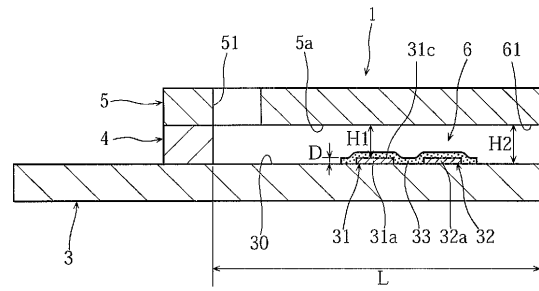
30

【図 1】



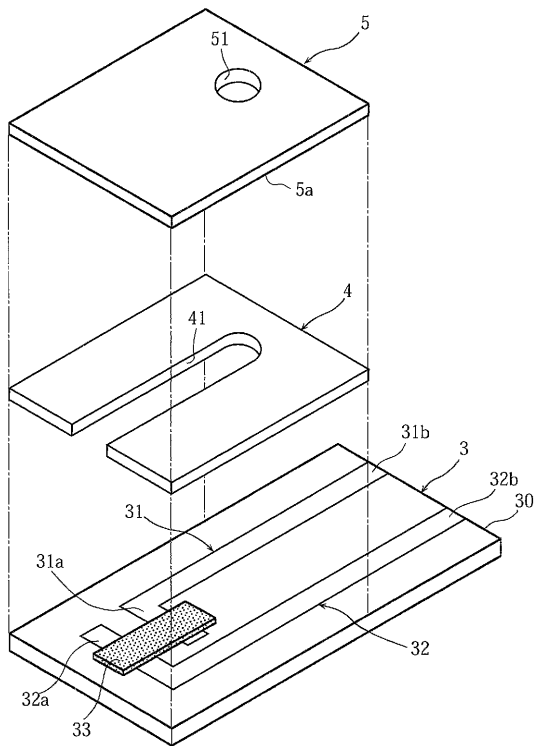
【図 2】

FIG.2



【図 3】

FIG.3



【図 4】

FIG.4

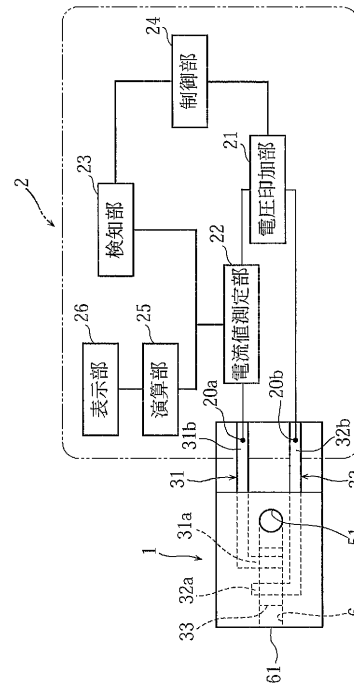


FIG. 5A

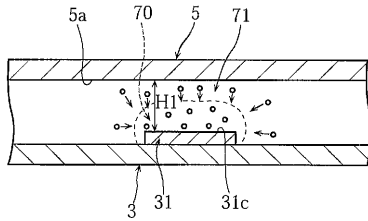


FIG. 5B

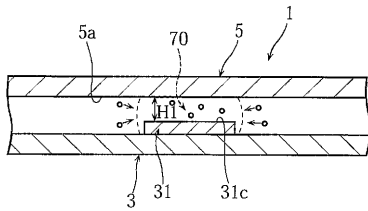


FIG. 6A

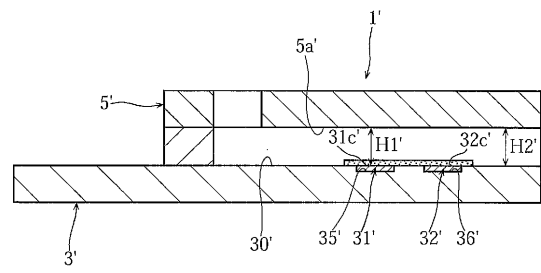
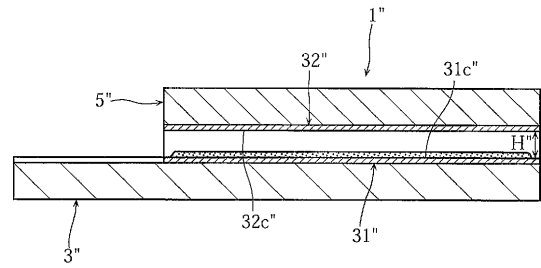
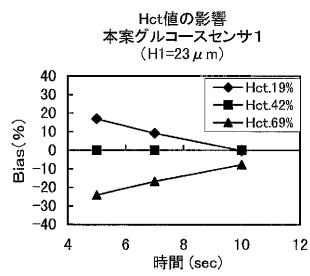


FIG. 6B



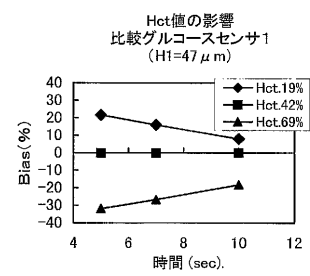
【図 7】

FIG. 7



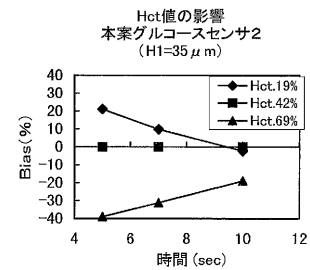
【図 9】

FIG. 9



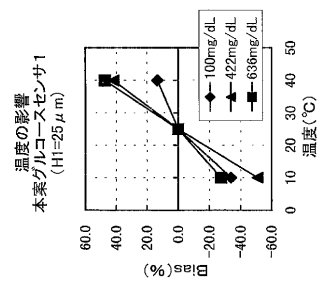
【図 8】

FIG. 8



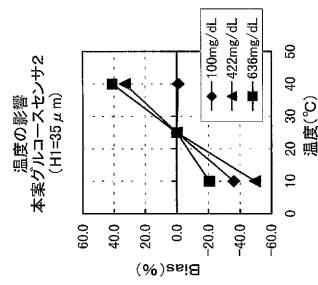
【図 10】

FIG. 10



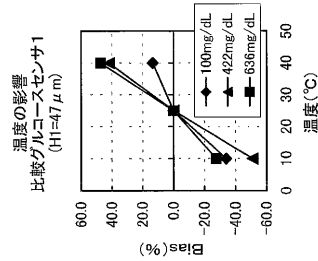
【図 1 1】

FIG. 11



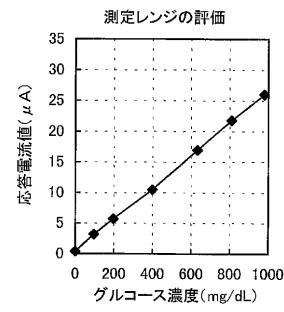
【図 1 2】

FIG. 12



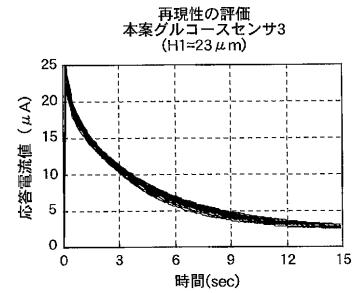
【図 1 3】

FIG.13



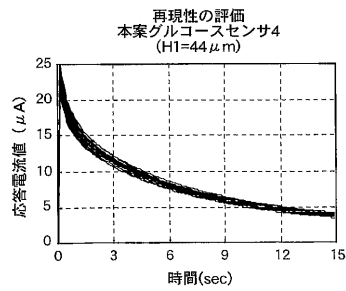
【図 1 4】

FIG.14



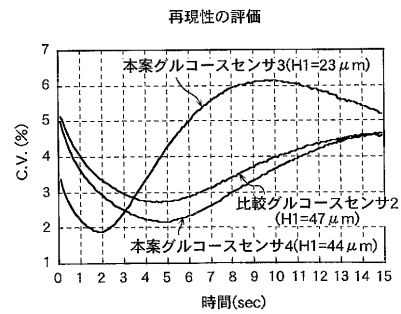
【図 1 5】

FIG.15



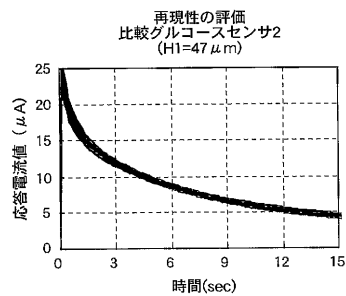
【図 1 7】

FIG.17



【図 1 6】

FIG.16



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平 0 2 - 2 3 1 5 5 8 (J P , A)
国際公開第 0 2 / 0 0 8 7 4 3 (W O , A 1)
国際公開第 0 2 / 0 3 6 7 7 9 (W O , A 1)
特開平 0 5 - 3 1 2 7 6 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 27/327

C12M 1/34

G01N 27/416