

(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2008-505338
(P2008-505338A)

(43) 公表日 平成20年2月21日(2008.2.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/28 (2006.01)	GO 1 N 27/28 3 O 1 Z	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/28 P	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/28 R	
	GO 1 N 27/30 3 5 3 F	
	GO 1 N 27/30 3 5 3 R	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-519866 (P2007-519866)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月29日 (2005.6.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月1日 (2007.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/002558
 (87) 国際公開番号 W02006/000829
 (87) 国際公開日 平成18年1月5日 (2006.1.5)
 (31) 優先権主張番号 0414550.4
 (32) 優先日 平成16年6月29日 (2004.6.29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

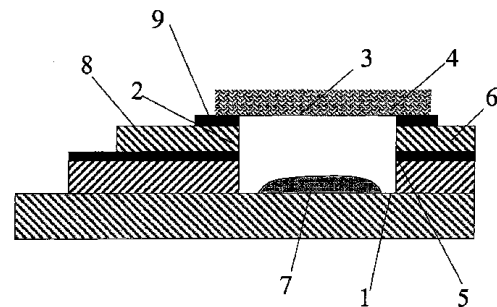
(71) 出願人 500472327
 オックスフォード バイオセンサーズ リミテッド
 イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤートン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気化学的検知方法

(57) 【要約】

レセプタクルの形をした電気化学セル内部に電気活性物質(7)を閉じ込める方法であって、前記方法は、(a)レセプタクルが、レセプタクル内部に試料が進入することができるようにするための第1の開口部(3)と、進入した試料により押しつけられた空気を逃がすことができるようにするための第2の開口部とを有し、電気化学セルが作用電極(5)と対向電極(6)とを有する、レセプタクルの形をした電気化学セルを備えることと、(b)レセプタクル内部に收容される電気活性物質(7)を備えることと、(c)レセプタクルの第1の開口部を覆う、1つ以上の層を含む透過性または半透過性の膜(4)を備えることと、(d)(1)電気活性物質と(2)試料とが互いに、および前記作用電極と接触するように、膜を通してレセプタクル内部に試料を挿入することを含み、ステップ(d)の間に、電気活性物質がレセプタクル内に閉じ込められる。好ましくは、本方法は、セルの両端に電圧を印加してその結果の電気化学的な応答を測定することにより、試料を電気化学的に試験することをさらに含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レセプタクルの形をした電気化学セル内部に電気活性物質を閉じ込める方法であって、
 (a) レセプタクルの形をした電気化学セルであって、レセプタクルが、レセプタクル内部に試料が進入することができるようにするための第1の開口部と、進入した試料により押しつけられた空気を逃がすことができるようにするための第2の開口部とを有し、電気化学セルが作用電極と対向電極とを有する電気化学セルを備えることと、

(b) レセプタクル内部に収容される電気活性物質を備えることと、

(c) レセプタクルの第1の開口部を覆う、1つ以上の層を含む透過性または半透過性の膜を備えることと、

(d) (1) 電気活性物質と(2) 試料とが互いに、および前記作用電極と接触するように、膜を通してレセプタクル内部に試料を挿入することと、

を含み、

ステップ(d) の間に、電気活性物質がレセプタクル内に閉じ込められる方法。

【請求項 2】

電気化学的に試料を試験する方法であって、

(i) 電気化学セルの両端に電位を付与することと、

(i i) その結果の電気化学的応答を測定することと、

をさらに含み、

ステップ(i) および(i i) の間に、電気活性物質がレセプタクル内に閉じ込められる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

電気活性物質が遷移金属塩を含む、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4】

遷移金属塩がコバルト(I I) 塩である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

ステップ(i i) が、遷移金属の電気化学的反応により生成された電流を測定することを含む、請求項 3 または 4 記載の方法。

【請求項 6】

電気活性物質が、

- 電極領域に依存する電流を有する電極領域正常化剤と、

- 塩化物塩または硫酸塩と、

- 湿潤剤と、

から選択された1つ以上の成分をさらに含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

膜が赤血球細胞に対して不透過性であり、試料が血漿または血清である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

電気活性物質が乾燥した形態であり、ステップ(d) が、試料中の電気活性物質の少なくとも一部を懸濁することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

レセプタクル内部への液体試料の挿入に続いて、レセプタクル内に電気活性物質を閉じ込めるための1つ以上の層を含む膜の使用であって、

レセプタクルが、第1の開口部を含み、および電気化学セルの形状であり、

膜が、試料に対して不透過性であり、およびレセプタクルの第1の開口部を覆うように位置付けされ、

試料の挿入前に、電気活性物質がレセプタクル内に収容される膜。

【請求項 10】

電気活性物質が、請求項 3、4、6、または7のいずれか一項に定められたものである

10

20

30

40

50

、請求項 9 記載の使用。

【請求項 1 1】

膜が赤血球細胞に対して不透過性であり、試料が血漿または血清である、請求項 9 または 1 0 記載の使用。

【請求項 1 2】

- レセプタクルの形をした電気化学セルであって、レセプタクルが、レセプタクル内部に試料が進入することができるようにするための第1の開口部と、進入した試料により押しつけられた空気を逃がすことができるようにするための第2の開口部とを有し、電気化学セルが作用電極と対向電極とを有する電気化学セルと、

- 請求項 3、4、6 または 7 のいずれか一項に定められたような電気活性物質であって、レセプタクル内に収容される電気活性物質と、

- レセプタクルの第1の開口部を覆うように位置付けられた、1つ以上の層を含む透過性または半透過性の膜と、

- セルの両端に電圧を印加するための手段と、

- その結果の、セルの両端での電気化学的な応答を測定するための手段と、を含むデバイス。

【請求項 1 3】

作用電極が 5 0 μ m 未満の1つの寸法を少なくとも有する、請求項 1 2 記載のデバイス。

【請求項 1 4】

電気活性物質が乾燥した形態である、請求項 1 2 または 1 3 記載のデバイス。

【請求項 1 5】

実質的に、添付の図面を参照して先に記載したとおりの、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、電気化学的方法、特に、酵素またはその他の電気活性物質の使用を含む電気化学的方法に関する。本発明はまた、そのような方法を用いるための電気化学デバイスに関する。

【0 0 0 2】

発明の背景

電気化学測定は、試料を、酵素またはその他の電気活性物質と反応させ、その後、存在する未反応の電気活性物質の量を電気化学的に測定することにより実行され得る。そのような測定は、試料が電気活性物質と反応した程度、および結果として試料自体の特性についての指標を示す。

【0 0 0 3】

そのような滴定手法の精度は、試料と反応する前に存在する電気活性物質の量の正確な知見に依存する。反応前の電気活性物質の量が正確にはわからない場合、試料と反応した電気活性物質の量を精確に測定することは不可能である。したがって、一般的な手順では、既知である量の電気活性物質が、電気化学セルに配置される。試験される試料はその後、電気活性物質と接触し、反応を進めることができる。その後セルの両端に電位が付与され、未反応の電気活性物質の量が電気化学的に測定される。

【0 0 0 4】

近年、電気化学デバイスは、たとえば医療分野での使用のために開発されてきた。これらのデバイスは、1個以上の電気化学セルが配置された試験片を含む。試験される試料、たとえば血液または血漿は、試験片上に配置されるか、または試験片にわたって流され、測定を提供するために、試験片上の電気化学セル内の電気活性物質と反応する。しかし、セルに接触する血液または血漿の正しい体積は、通常は既知ではない。したがって、セル

10

20

30

40

50

内の電気活性物質が試験片内に取り込まれたとき、その結果の試料中の電気活性物質の濃度は既知ではなく、容易には測定できない。さらに電気活性物質は、試料を通して、電気化学セルから離れて分散することが可能であり、作用電極の領域内の電気活性物質の濃度に、段階的な減少を生じさせる。したがって、反応/電気化学的検出に利用可能である電気活性物質の正確な量は、もはや精確には測定できない。

【0005】

したがって、このタイプのより精確な電気化学的測定を行うことを可能にする、新しい手法が要求される。

【0006】

発明の概要

本発明は、電気化学セルの近傍に、固定された体積内で、酵素またはその他の電気活性物質が閉じ込められる電気化学的反応を実行する方法を開発した。本発明の方法により、試料がセルの近傍に直接導入されることが可能となるが、この領域外での電気活性物質の動きは規制される。このように、本発明の方法では、反応中に存在する電気活性物質の量および電気化学的測定の精確な測定を行うことが可能となり、それに応じて、試料の内容に関する最終的な測定の精度が向上する。

【0007】

このように本発明は、レセプタクルの形をした電気化学セル内部に電気活性物質を閉じ込める方法を提供し、前記方法は、

(a) レセプタクルの形をした電気化学セルであって、レセプタクルが、レセプタクル内部に試料が進入することができるようにするための第1の開口部と、進入した試料により押しのけられた空気を逃がすことができるようにするための第2の開口部とを有し、電気化学セルが作用電極と対向電極とを有する電気化学セルを備えることと、

(b) レセプタクル内部に収容される電気活性物質を備えることと、

(c) レセプタクルの第1の開口部を覆う、1つ以上の層を含む透過性または半透過性の膜を備えることと、

(d) (1) 電気活性物質と(2) 試料とが互いに、および前記作用電極と接触するように、膜を通してレセプタクル内部に試料を挿入することと、

を含み、

ステップ(d)の間に、電気活性物質がレセプタクル内に閉じ込められる。

【0008】

レセプタクルの開口部を覆う膜の使用は、電気化学物質と反応するために利用可能である試料の体積を、本質的に固定するか、または制限する。さらに膜は、いったん試料により取り込まれるとレセプタクルの外に拡散するという電気活性物質の傾向を減少させる。膜は通常、レセプタクルと膜とにより画定された体積内に、試料と反応させて電気化学的測定を行うことが可能となるのに十分な間、電気活性物質を閉じ込める。したがって、膜が存在することにより、試料との反応に利用可能である電気活性物質の量を、より正確に測定することが可能となる。

【0009】

本発明は、レセプタクル内部への液体試料の挿入に続いて、レセプタクル内に電気活性物質を閉じ込めるための1つ以上の層を含む膜の使用をさらに備え、

レセプタクルが、第1の開口部を含み、および電気化学セルの形状であり、

膜が、試料に対して不透過性であり、およびレセプタクルの第1の開口部を覆うように位置付けられ、

試料の挿入前に、電気活性物質がレセプタクル内部に収容される。

【0010】

本発明は、

- レセプタクルの形をした電気化学セルであって、レセプタクルが、レセプタクル内部に試料が進入することができるようにするための第1の開口部と、進入した試料により押しのけられた空気を逃がすことができるようにするための第2の開口部とを有し、電気

10

20

30

40

50

化学セルが作用電極と対向電極とを有する電気化学セルと、

- レセプタクル内部に收容される電気活性物質と、
 - レセプタクルの第1の開口部を覆うように位置付けられた、1つ以上の層を含む透過性または半透過性の膜と、
 - セルの両端に電圧を印加するための手段と、
 - その結果の、セルの両端での電気化学的な応答を測定するための手段と、
- を含むデバイスをさらに提供する。

【0011】

詳細な説明

本発明の方法は、レセプタクルの形または容器の形をした電気化学セルを用いて実行される。レセプタクルは、内部に配置される液体を收容可能である限り、いかなる形状であってもよい。たとえば、レセプタクルは円筒形にすることができる。図1には、レセプタクルの形をした電気化学セルを含むデバイスの一例が図示されている。本実施形態においては、レセプタクルは底面1と、底面を取り囲む1つまたは複数の壁2とを有する。レセプタクルはまた、第1の開口部3を有する。レセプタクルの開口部は、これを通して液体がレセプタクルに進入することができる領域である。

10

【0012】

通常、レセプタクルは、25 ~ 1000 μm の深さ（すなわち、上部から底面まで）を有する。1つの実施形態では、レセプタクルの深さは50 ~ 500 μm であり、たとえば100 ~ 250 μm である。代替的な実施形態では、レセプタクルの深さは50 ~ 1000 μm であり、好ましくは200 ~ 800 μm 、たとえば300 ~ 600 μm である。レセプタクルの縦および横（すなわち、壁から壁まで）、または円筒型レセプタクルの場合はその直径は、通常0.1 ~ 5 mm、たとえば0.5 ~ 2.0 mmであり、たとえば0.5 ~ 1.5 mm、たとえば1 mmである。

20

【0013】

電気化学セルは、作用電極5と、対向電極（図示せず）とを含む。電気化学セルは、少なくとも1つの微小電極を有するのが好ましい。通常、作用電極は微小電極である。本発明の目的のために、微小電極は、少なくとも1つの50 μm を超えない寸法を有する電極である。本発明の微小電極は、大きめなサイズ、すなわち50 μm を超える寸法を有することができる。図1に図示された実施形態では、作用電極5は微小電極である。

30

【0014】

図1に図示されるとおり、作用電極は通常、レセプタクルの壁の中にあるが、代替的に、たとえばレセプタクルの底面内であってもよい。作用電極は、たとえば、レセプタクルの壁を取り巻く、連続的な帯状である。

【0015】

作用電極の厚さは、通常0.01 ~ 25 μm であり、好ましくは0.05 ~ 15 μm 、たとえば0.1 ~ 20 μm であり、より好ましくは0.1 ~ 10 μm である。さらに、より厚みのある作用電極、たとえば、0.1 ~ 50 μm の、好ましくは5 ~ 20 μm の厚さを有する電極が想定される。作用電極の厚さは、レセプタクルが底面上に配置されているとき、その縦方向の寸法である。作用電極は、好ましくは炭素、パラジウム、金、プラチナ、銅、または銀、たとえば導電性のインク状である炭素、パラジウム、金、またはプラチナである。導電性インクは、さらなる材料、たとえばプラチナおよび/またはグラファイトおよび/または電極触媒（たとえば酵素）および/またはメディエータを含む改変されたインクにすることができる。電気活性物質を参照して、好適な電極触媒およびメディエータについて、さらに以下で記載がなされている。作用電極を形成するために、2つ以上の層を用いることができ、各層は同一または異なる材料で形成される。

40

【0016】

セルはさらに、たとえば、レセプタクルの底面内またはレセプタクルの1つまたは複数の壁内に存在させることができる対向電極を含む。対向電極は、その他の材料もまた用いることができるが、通常はAg / AgClから作られている。対向電極として用いるため

50

に好適な材料は、当業者においては既知であろう。

【0017】

対向電極は通常、作用電極5と同様のサイズの、またはより広い、たとえば実質的に広い表面積を有する。通常、作用電極の表面積に対する対向電極の表面積の比率は、少なくとも1:1、たとえば少なくとも2:1または少なくとも3:1であり、好ましくは、少なくとも4:1である。対向電極は、たとえばマクロ電極にすることができる。好ましい対向電極は、0.01mmまたはそれよりも大きい、たとえば0.1mmまたはそれよりも大きい寸法を有する。これは、たとえば0.1mmまたはそれよりも大きい直径にすることができる。対向電極の典型的な面積は、 $0.001\text{mm}^2 \sim 150\text{mm}^2$ 、たとえば 100mm^2 までであり、好ましくは $0.1\text{mm}^2 \sim 60\text{mm}^2$ 、たとえば $1\text{mm}^2 \sim 50\text{mm}^2$ である。作用電極と対向電極との間の最短距離は、たとえば $10 \sim 1000\mu\text{m}$ 、たとえば $10 \sim 300\mu\text{m}$ 、または $400 \sim 700\mu\text{m}$ である。

10

【0018】

セルは、作用電極および対向電極に加え、任意的には1つ以上の参照電極を含むことができる。参照電極が存在しない場合、対向電極が参照電極または擬似参照電極の働きをする。参照電極を作るために好適な材料は、当業者においては既知であろう。Ag/AgClは、好適な材料の一例である。

【0019】

Ag/AgClの対向電極または参照電極が用いられている場合、十分なクロリドが存在しているときには、この電極においてより安定した測定を得ることができる。したがって、本発明の1つの実施形態では、レセプタクルにさらなるクロリドが加えられ、これによりAg/AgCl電極における測定を向上させることができる。通常、クロリドのソースは、試料を挿入する前にレセプタクル内に存在する。たとえば、クロリドのソースは、電気活性物質中に含まれていてもよい。

20

【0020】

クロリドのソースは通常、塩化物塩、たとえばアルカリ金属塩化物、アルカリ土類金属塩化物または塩化アンモニウムである。カリウムおよび塩化ナトリウムは、特に好ましい。通常、試験される試料と混合されたときに、その結果の混合物中の塩化物塩の濃度が $1 \sim 300\text{mmol dm}^{-3}$ 、好ましくは $6 \sim 60\text{mmol dm}^{-3}$ 、より好ましくは $10 \sim 30\text{mmol dm}^{-3}$ となるような量の塩化物塩が加えられる。しかし、特に試料自体が塩化物塩を含有している場合、塩化物塩はより低い濃度で加えられるか、または全くなくてもよい。

30

【0021】

本発明の代替的な実施形態では、対向および/または参照電極は、異なる金属/塩の化合物から作られる。この場合、一般的に組成に加えられるアニオンは、対向/参照電極内で用いられている組成に対応する。たとえば、Ag/Ag₂SO₄対向/参照電極が用いられている場合、一般的には組成に硫酸塩が加えられる。好適な硫酸塩は、アルカリ金属硫酸塩、アルカリ土類金属硫酸塩および硫酸アンモニウム、特にカリウムおよび硫酸ナトリウムを含む。

【0022】

レセプタクルの第1の開口部3は、透過性または半透過性の膜4で覆われている。このように、レセプタクルおよび膜は（一般的には接着剤9で合わせられている）、その内部に試料が挿入される体積を画定する。レセプタクルに進入する試料の体積を知るためには、普通はこの体積が既知である必要がある。好適な体積は、実行される測定および用いられる電極のサイズに依存して変動する。微小電極が使用される好適な体積は、 $0.1\mu\text{l} \sim 25\mu\text{l}$ の範囲内である。

40

【0023】

膜は、少なくとも、試験される試料に対して透過性がある。本発明の目的のために、試料は、作用電極に接触する材料である。1つの実施形態では、試料を含む被検物が、本発明のデバイスに供給される。デバイス内には、被検物が作用電極に接触する前に濾過され

50

るように、フィルタ、たとえば濾過膜が位置付けられている。たとえば、被検物は全血にすることができ、たとえば、血漿のみを通過させることができる血液濾過膜が存在していてもよい。この場合、試料は血漿である。

【0024】

膜に要求される透過性は、たとえば、膜の材料に孔が存在することによるものであってもよく、または膜の材料自体の透過性によるものであってもよい。膜の材料自体が、試料に対して透過性があることが好ましい。膜はさらに、好ましくは低いタンパク結合能力を有する。

【0025】

膜に用いられる材料は、試験される試料の特性に依存して選択される。当業者においては、利用できる膜の材料に関する知識に基づいて、試験される試料に対して透過性のある好適な材料を選択することができるであろう。しかしながら、膜として用いるために好適な材料には、ポリエステル、ニトロセルロース、ポリカーボネート、ポリスルホン、微孔性のポリエーテルスルホンフィルム、PET、綿およびナイロン織布、被覆ガラス繊維およびポリアクリルニトリル織布が含まれる。

【0026】

これらの織布は、任意的には、使用前に親水化または疎水化処理を受けてもよい。また、所望であれば、膜のその他の面の特徴は変更させることができる。たとえば、膜を通して所望する試料の流れを容易にするために、水中での膜の接触角度を変える処理が用いられる。膜は、1つか2つまたはそれ以上の材料の層を含むことができ、それぞれが同一または異なるもの、たとえば2つ以上の膜の複合体にすることができる。たとえば、膜の材料が異なる2つの層を含む従来の二重層膜を用いることができる。

【0027】

さらに、膜を用いて、セルに進入することが望ましくないいくつかの成分を濾過して除去することができる。たとえば、いくつかの血液生成物、たとえば赤血球細胞または赤血球は、これらの粒子がセルに進入しないようなこの方法で分離され得る。血液濾過膜を含む好適な濾過膜は、当技術分野において既知である。血液濾過膜の例としては、Pall Filtration社のPresence 200、およびWhatman VF2、Whatman Cyclopore、Spectral NX、Spectral Xがある。ガラス繊維フィルタ、たとえばWhatman VF2は、全血から血漿を分離させることができ、全血被検物がデバイスに供給され、試験される試料が血漿である場合に用いるために好適である。

【0028】

濾過膜の代替として、または一般的には濾過膜に加えて、展延した膜を用いることができる。このようにして、たとえば膜を展延した膜と濾過膜との複合体にすることができ、展延した膜は通常、最初に被検物に接触する外側の膜である。適切な展延した膜は、当技術分野において周知であり、Petexが一例である。

【0029】

膜は、好ましくは、0.8 ~ 5 μm の、たとえば3 μm までのサイズの孔を有する。孔のサイズがおよそ5 μm よりも大きい場合、きわめて短い間だけ、電気活性物質をレセプタクル内に閉じ込めることができる。しかし、孔のサイズがおよそ0.8 μm よりも小さいと、試料は容易にはレセプタクルに進入することができない。膜の孔のサイズは通常、レセプタクルの外側に曝された面上において、レセプタクルの内側に曝された面よりも広い。この場合、レセプタクルの内側に曝された面の孔のサイズは、通常0.8 ~ 5 μm の範囲、たとえば3 μm までである。

【0030】

膜は通常、接着剤、たとえば両面接着剤を用いてレセプタクルに取り付けられている。好適な接着剤の一例は、Adhesive Research社のArcare 7841である。図1に図示された実施形態では、接着剤9が用いられて、レセプタクルの壁8の上面に膜4を固定させている。このようにして、レセプタクルの体積は、レセプタクル

10

20

30

40

50

の底面 1 および壁 2 のほかに、接着剤 9 および膜 4 により画定される。したがって、接着剤の厚さが変動することは、レセプタクルの総体積を制御するために有用な手法である。対向電極および作用電極は、好ましくは双方ともに、この体積内に収容された試料に曝される。

【 0 0 3 1 】

接着剤 9 は通常、少なくとも $50 \mu\text{m}$ 、および好ましくは $200 \mu\text{m}$ を超えない、たとえば $150 \mu\text{m}$ または $120 \mu\text{m}$ 程度の厚さを有する。試料として血漿が用いられるときに、接着剤が厚すぎる、たとえばおよそ $200 \mu\text{m}$ よりも厚い場合、壁の内部に引き込まれる前に、膜の裏面でゆっくりと血漿の光沢が強まる。したがって、血漿でくぼみを充填する時間が増大し、 $5 \sim 10$ 分間にもなる可能性がある。接着剤の好ましい厚さは、用いられる膜に依存して変動する。Whatman VF2 膜に好ましい接着剤の厚さは、 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ である。

10

【 0 0 3 2 】

セルが働くことができるために、両電極は絶縁材 6 によりそれぞれ分離される必要がある。一般的に、絶縁材はポリマー、たとえばアクリレート、ポリウレタン、PET、ポリオレフィン、ポリエステル、PVC またはその他のあらゆる安定した絶縁材である。1つの実施形態では、絶縁材はアクリレート、ポリウレタン、PET、ポリオレフィンまたはポリエステルである。ポリカーボネートおよびその他のプラスチックおよびセラミックスもまた、安定した絶縁材である。ポリマー溶液から溶媒を蒸発させることにより、絶縁層を形成することができる。また、付与後に固化する液体、たとえばワニスを用いられてもよい。代替的に、たとえば熱または UV に曝されるか、または 2 成分の架橋可能な系の能動部分とともに混合することにより架橋されている架橋性ポリマー溶液が用いられてもよい。さらに、適切であれば、誘電性インクを用いて絶縁層を形成してもよい。代替的な実施形態では、絶縁層はデバイスにラミネートされ、たとえば熱ラミネートされている。

20

【 0 0 3 3 】

電気化学セルの電極は、任意の好適な手段により、任意の求められる測定機器に接続されることができる。電極は通常、求められる測定機器にそれ自体が接続された電気的な導電トラックに接続される。

【 0 0 3 4 】

電気活性物質 7 は、レセプタクル内に収容される。一般には、既知である量の電気活性物質が用いられる。通常、電気活性物質は乾燥した形態である。電気活性物質は、セルに電位が付与されたとき、電流を生成することが可能な任意の物質にすることができる。通常、電気活性物質は、試料中に存在し得る成分と反応することが可能である。その後、電気化学的反応により、反応しない電気活性物質を検出することができる。好適な電気活性物質の一例は、遷移金属塩を含む組成である。

30

【 0 0 3 5 】

電気活性物質 7 は、電極触媒およびメディエータを含むことができる。メディエータは、電極に電子 / 電荷を移動させる可逆機構を可能にする別個の電気活性な電位の、2 以上の酸化状態を有する化学種である。メディエータは電気化学的な反応で試料と反応し、この反応は、電解触媒により触媒される。電解触媒の一般的な例は、酵素、たとえば乳酸オキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール - 3 - リン酸オキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼである。さらに、イオン種および金属イオン、たとえばコバルトを電解触媒として用いることができる。好適なメディエータの例は、フェリシアン化物 / フェロシアン化物およびルテニウム化合物、たとえばルテニウム (III) ヘキサミン塩 (たとえば塩化物塩) である。

40

【 0 0 3 6 】

電気活性物質はまた、試験されている特定の試料について、電気活性物質の pH を最適なレベルに維持する緩衝剤を含むことができる。使用可能である緩衝剤には、リン酸ナトリウム、グッド緩衝剤、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、クエン酸

50

ノリン酸、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン(HEPES)、トリシン、ピシン、ピペラジン-N、N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)、3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸(CAPS)および[(2-ヒドロキシ-1、1-ビス[ヒドロキシメチル]エチル)アミノ]-1-プロパンスルホン酸(TAPS)のほか、その他の生物学的緩衝剤が含まれる。好ましい緩衝剤は、実行される電気化学的な反応と干渉しない緩衝剤である。

【0037】

レセプタクルはさらに、少なくとも1つの第2の開口部を含む。1つまたは複数の第2の開口部は、レセプタクル内部への試料液体の進入を通して押しのけられた空気を逃がすことを可能にする。これにより、レセプタクル内部への試料の進入が容易になり、試料によるレセプタクルの完全な充填が支援される。レセプタクルが完全に充填されない場合、レセプタクル内に存在する試料の体積を、精確に測定することができない。

10

【0038】

第2の開口部は通常、レセプタクルの底面または壁内の小さな空気孔の形状を取る(図1に図示せず)。通常、1つ以上の、たとえば1~4個の空気孔が存在してもよい。1つまたは複数の第2の開口部は通常、毛管の寸法を有し、たとえば、それらはおよそ1~600 μm の、たとえば100~500 μm の直径を有していてもよい。このように、第2の開口部は通常、レセプタクル内部に挿入された試料が、表面張力のために、第2の開口部を通してレセプタクルの外に流れ出さないために十分に小さなサイズである。

20

【0039】

本発明の1つの実施形態では、レセプタクルの底面は、多孔質な親水性または疎水性の膜の形状である。本実施形態では、膜の複数の孔により第2の開口部が形成されている。当技術分野においては、適切な多孔質膜は既知であり、Pall社のVersaporTMはその一例である。

【0040】

本発明の代替的なデバイスが図2に図示されている。本実施形態のデバイスは、下記の記述を除き、図1に図示して上述したデバイスと同一である。本実施形態では、デバイスは試験片5を含む。試験片5はいかなる形状およびサイズでもよいが、通常は、実質的に平坦な第1の面8を有する。試験片は、底面1および壁または複数の壁2により境界が定められるレセプタクル10を含む。本デバイスは、レセプタクルの壁内に作用電極5を有する電気化学セルをさらに含む。作用電極は通常、微小電極である。

30

【0041】

本実施形態のデバイスは、対向電極または参照電極、もしくは参照電極および対向電極の双方の働きをする擬似参照電極である電極11を含む。電極11はこれ以下では、擬似参照電極と呼ぶ。擬似参照電極は、試験片8の第1の面上に存在する擬似参照電極層11を含む。試験片の第1の面は、外面、すなわちレセプタクルの内面に曝された面ではなく、デバイスの外側に曝された面である。通常、擬似参照電極層は、レセプタクルまたは部分的なレセプタクル10を実質的に取り囲む。図2に図示されたとおり、擬似参照電極層は、第1の開口部3の外周部と接触していないことが好ましい。通常、擬似参照電極層は、第1の開口部の外周部から、少なくとも0.1mm、好ましくは少なくとも0.2mmの距離にある。しかし、擬似参照電極の少なくとも一部分が、第1の開口部の外周部から通常は2mm以下、たとえば1mmまたは0.5mm以下、好ましくは0.4mm以下にある。1つの実施形態では、擬似参照電極は、第1の開口部の外周部から0.01~1.0mm、たとえば0.1~0.5mm、または0.2~0.4mmの距離で、レセプタクルまたは部分的なレセプタクルを実質的に取り囲む。代替的に、この距離は0.01~0.3mm、または0.4~0.7mmにすることができる。

40

【0042】

擬似参照電極の厚さは通常、作用電極の厚さと同様であるか、またはそれよりも厚い。

50

好適な最小の厚さは0.1 μm であり、たとえば0.5 μm 、1 μm 、5 μm 、または10 μm である。好適な最大の厚さは50 μm であり、たとえば20 μm または15 μm である。

【0043】

擬似参照電極11は通常、作用電極5の表面積と同様のサイズの、またはより広い、たとえば実質的に広い表面積を有する。通常、作用電極の表面積に対する擬似参照電極の表面積の比率は、少なくとも1:1、たとえば少なくとも2:1または少なくとも3:1であり、好ましくは、少なくとも4:1である。擬似参照電極は、たとえばマクロ電極にすることができる。作用電極の表面積に対する擬似参照電極の表面積の比率が1:1よりも大きい場合、このことは、擬似参照電極で発生する電気化学反応が、電流を制限しないことを確実にする助けとなる。擬似参照電極の実際の面積は、たとえば0.0001 mm^2 ~ 150 mm^2 、たとえば100 mm^2 まで、または0.1 mm^2 ~ 60 mm^2 、たとえば1 mm^2 ~ 50 mm^2 である。

10

【0044】

膜4は、任意の好適な取り付け手段9により、たとえば両面接着テープを用いて、デバイスに取り付けられる。通常、取り付け手段は、試験片の第1の面に、または擬似参照電極層に膜を取り付ける。図2に図示されたとおり、好ましい実施形態では、膜は、レセプタクル自体の外周部から離隔した位置で、擬似参照電極層11に取り付けられる。さらに、取り付け手段は、擬似参照電極層よりも、レセプタクル3の第1の開口部からより離れた距離にあり、擬似参照電極層のレセプタクルに近接したまたは取り囲んでいる面の少なくとも一部が、膜を通過した試料に曝されるようになされている。好ましくは、取り付け手段は、レセプタクルの外周部から少なくとも0.2 mm 、たとえば少なくとも0.3 mm または少なくとも0.4 mm にある。

20

【0045】

図2に図示された実施形態では、反応体積は、レセプタクルの底面1および壁2、試験片8の面の一部分、擬似参照電極層11、取り付け手段9および膜4により画定される。この反応体積は、レセプタクルの体積、擬似参照電極層の位置および厚さ、および取り付け手段9の位置および厚さの変化により変動させることができる。好ましい反応体積は、少なくとも0.05 μl 、たとえば少なくとも0.1または少なくとも0.2 μl である。反応体積が25 μl 以下、好ましくは5 μl 以下、たとえば3 μl 以下または2 μl 以下であることは、さらに好ましい。

30

【0046】

本発明のデバイスで用いることができる電気化学セルに関するさらなる詳細は、WO 03/05319、英国特許出願第0414546.2号およびそれにより優先権を主張する国際出願（発明の名称はELECTRODE FOR ELECTROCHEMICAL SENSORであり、本出願と同日付で出願）に見ることができる。これらの出願の内容は、全体として参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0047】

本発明の方法は、膜を通してレセプタクル内部に液体試料を挿入することを含む。1つ以上の第2の開口部が存在して押しのけられた空気を逃がすことを可能にすることにより、レセプタクル内への試料の流れを助長することができる。レセプタクル内部へ試料が進入することで、反応を起こすことができるような方法で電気活性物質と試料との間での接触が発生する。

40

【0048】

試料と電気活性物質との混合物は、作用電極に接触する。また、接触は通常、対向/参照電極と試料との間で発生する。これらの電極に接触する試料は、任意的には電気活性物質と混合される。

【0049】

試料は、電気化学的試験が実行されるための任意の材料にすることができる。試料は液状、たとえば懸濁液または溶液である。本発明における試料として用いることができる材

50

料の例は、水または水溶液、もしくは懸濁液、たとえば河川水、および生物学的試料、たとえば血液、血漿、血清または尿を含む。試験される試料の好ましい例は、血漿および血清を含む。

【0050】

試料は、膜を通してレセプタクル内部に挿入される。その他の方法、たとえば拡散が想定され得るが、試料は通常、膜を通した毛管流によって進入する。

【0051】

通常、電気活性物質は乾燥した形態であり、レセプタクル内部に試料を挿入するとき、電気活性物質は試料液体中に懸濁している。この再懸濁の段階を助長するために、湿潤剤を存在させてもよい。通常、試料を挿入する前に、レセプタクル内部に任意の湿潤剤が配置される。たとえば、湿潤剤は電気活性物質中に含まれていてもよい。

10

【0052】

レセプタクルの第1の開口部を覆って膜が存在することにより、レセプタクルに進入する試料の体積が実質上決定される。このようにして、試料の懸濁液中の電気活性物質の濃度を測定することができる。膜はさらに、レセプタクルの外への電気活性物質の拡散を規制する。このように、膜が電気活性物質をある時間だけレセプタクル内部に閉じ込める。本発明によれば、“レセプタクル内に閉じ込められる”または“レセプタクルの形をした電気化学セル内に閉じ込められる”の意味は、初期にレセプタクル内に存在する、実質的にすべての電気化学物質が、レセプタクル内部に引き続き収容されているということである。

20

【0053】

本発明の好ましい実施形態では、この方法は、電気化学セルの両端に電位を付与することと、その結果の電気化学的な応答を測定することとをさらに含む。一般的には、電流が測定される。このように、この方法を用いて、レセプタクル内部に挿入された試料に、電気化学的な試験を実行することができる。通常、レセプタクル内部に試料を挿入することと、セルに電位を付与することとの間に、ある時間だけ、すなわちインキュベーション時間を経過させることが可能である。このインキュベーション期間により、電気活性物質が試料中に再度懸濁することができ、さらに試料が電気活性物質と反応することができる。インキュベーション期間は通常、1秒～1分の範囲内であるが、当業者においては、使用される試料および電気活性物質に依存して、この範囲内に入れられるかまたは入れられない好適な期間を選択することが可能であろう。

30

【0054】

セルの両端に電位が付与された後、その結果の電気化学的な応答、通常は電流が、電位が付与された時間から通常は約2分間まで、たとえば約1分間以内までに完了する測定により、1回または複数回測定される。

【0055】

通常、レセプタクル内部に電気活性物質を閉じ込めることは、制限された期間のみ効果がある。しかし、本発明によれば、電気活性物質は、少なくとも試料を挿入している間、レセプタクル内部に閉じ込められる。さらなる実施形態においては、電気活性物質は、試料が挿入されている間、インキュベーション期間の間、および好ましくはセルにより生成された電流を測定している間もまた、レセプタクル内部に閉じ込められる。このように、電気活性物質は好ましくは、レセプタクル内部に試料が挿入されてから少なくとも1分間、好ましくは少なくとも2分間、より好ましくは少なくとも5分間、レセプタクル内部に閉じ込められる。異なる膜であれば、異なる閉じ込め期間を提供することができる。たとえば、Whatman VF2膜は、およそ140秒の閉じ込め時間を提供する。

40

【0056】

絶縁材の2層の間に作用電極材料の層(たとえばグラファイト層)を含む積層構造を形成することにより、本発明のデバイスを作ることができる。その後、この積層を通して孔を打ち抜き、このようにしてレセプタクルの壁を形成する。その後、任意的には対向電極を含む底面が付加される。積層の表面上に好適な材料の層をプリントすることにより、対

50

向電極を代替的に備えることができる。レセプタクルの底面または壁に、1つ以上の第2の開口部が所望される場合、これらは任意の好適な手法により、たとえば孔を開けるかまたは孔を打ち抜くことにより、または多孔質膜を底面として用いることにより形成することができる。

【0057】

その後、このようにして形成されたレセプタクル内部に、任意の好適な手法により電気活性物質が挿入される。通常、作用電極と接触しないような位置で、レセプタクル内部に電気活性物質が挿入される。これにより、作用電極の汚損を最小限にするか、または回避することが確実にできる。電気活性物質は、確実に適所に留まるよう乾燥させることができる。たとえば、電気活性物質は、溶液または懸濁液の形状でレセプタクル内部に挿入され、その後自然乾燥させる。凍結乾燥、真空乾燥またはオープン乾燥（加熱）により、電気活性物質を代替的に乾燥させてもよい。

10

【0058】

本発明の1つの実施形態では、電気活性物質は、レセプタクルの底面を形成する基板にあらかじめ被覆されている。これは、平面基板上に電気活性物質を直接被覆するか、または基板にくぼみを形成してくぼみ内部に電気活性物質を排出することにより行うことができる。通常、電気活性物質はその後、所定の位置で乾燥され、このようにして被覆された基板は、レセプタクルの壁に接合される。電気活性物質が基板のくぼみ内部に挿入された場合、くぼみは通常、最後の電気化学セルの断面と一致する断面を有する。このようにしてくぼみは、電気化学セルにより形成されたレセプタクルの底面部を作る。本実施形態は、セルを作り出す間つねに、電気活性物質が作用電極から離隔した状態に保たれるという利点を有する。したがって、セルが用いられる前に、電気活性物質と作用電極との間の接触は最小限になる。ひいてはこれにより、作用電極の汚損が最小限になる。

20

【0059】

電気活性物質の挿入に続いて、レセプタクルの第1の開口部に膜が取り付けられる。これは、任意の好適な手段により、たとえば両面接着剤を用いてレセプタクルの上面に膜を接着することにより達成することができる。

【0060】

図1に図示されたような、セルを作り出すためのプロセスに関するさらなる詳細は、WO 03/056319、英国特許出願第0414546.2号およびそれにより優先権を主張する国際出願（発明の名称はELECTRODE FOR ELECTROCHEMICAL SENSORであり、本出願と同日付で出願）から得ることができ、これらはそれぞれ上記にて参照されている。

30

【0061】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、体液試料が健康かまたは虚血性かを測定するための電気化学的な滴定試験において用いられる。また、患者から採取された体液試料に対して試験を実行することにより、この試験を患者における虚血の診断に用いることができる。

【0062】

本実施形態では、電気活性物質は、本発明の方法を用いて、虚血性の試料と健康な試料とを電気化学的に判別することが可能である遷移金属塩を含む。当業者においては、(i)健康であることが既知である試料と(ii)虚血性であることが既知である試料とに対して、本発明の方法を実行することにより、遷移金属塩が好適であるかどうかを測定することが可能であろう。好適な遷移金属塩により、試料(ii)について読み取る、試料(i)よりも高い電流が提供される。試料中の、健康なおよび虚血的に変えられたタンパク質（たとえばアルブミン）に対する遷移金属の結合能力の相違は、このタイプの試験の機構において重要であろう。したがって、通常は、遷移金属は、健康なタンパク質、たとえば血液内に存在するタンパク質と結合する能力があるが、虚血性イベントに続くこれらのタンパク質に対しては、より低い結合親和性を有するかまたは結合しない。たとえば、遷移金属は健康なアルブミンと結合する能力を有することができるが、虚血性イベントに続

40

50

いて変えられたアルブミンに対しては、より低い結合親和性を有するかまたは結合しない。しかし本発明は、この理論に制約されるものではない。好適な遷移金属塩の例は、マンガ、鉄、コバルト、銅、およびニッケル塩を含む。コバルト(II)塩が好ましい。

【0063】

塩は一般的に、水中で解離して遷移金属イオンおよびアニオンを与えるものである。したがって、水に溶解して溶解時に解離する塩を提供する、あらゆるアニオンを用いることができる。本発明において用いるために好適な塩の例は、ハロゲン化物、たとえばクロリドを含む。好ましい塩は、塩化コバルト(II)である。

【0064】

この試験は滴定法であるため、試料との反応に利用できる遷移金属塩の量が既知である必要がある。本発明の方法では、セル内に存在する電気活性物質の量の精確な測定が可能となるため、このような状況において特に有用である。

10

【0065】

電気活性物質中に存在する遷移金属塩の好ましい量は、塩および試験される試料の特性の他に、物質が接触しようとする試料の体積に依存する。一般的に、遷移金属がコバルト(II)である場合、試験される試料と混合されたとき(たとえば乾燥した電気活性物質が、試料中に再度懸濁されたとき)、その結果の混合物中のコバルト(II)の濃度が $0.1 \sim 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ になるような量のコバルト(II)塩が存在する。試験される試料が血漿である場合、好ましくは、試験される試料と混合されたとき、その結果の混合物中のコバルト(II)の濃度が $1 \sim 20$ 、好ましくは $4.25 \sim 5.25 \text{ mmol dm}^{-3}$ になるような量のコバルト(II)塩が存在する。混合物中のコバルト(II)塩のもっとも好ましい濃度は、 $4.5 \sim 5.0$ 、たとえばおよそ $4.75 \text{ mmol dm}^{-3}$ である。このような濃度は、たとえば 5.5 mmol dm^{-3} 以上(たとえば $30 \sim 40 \text{ mmol dm}^{-3}$)のコバルト(II)塩を含む電気活性物質を用い、続いて電気活性物質を、試料自体の既知である体積で希釈する(たとえば、電気活性物質：試料を $1:1 \sim 1:20$ 、たとえば $1:5 \sim 1:10$ の比率で用いる)ことで達成することができる。たとえば、 $35.6 \text{ mmol dm}^{-3}$ のコバルト(II)塩の濃度を有する $0.2 \mu\text{l}$ の電気活性物質を、本発明のデバイス内部で、またはその上で乾燥させ、続いて $1.5 \mu\text{l}$ の試料中に再度懸濁させることができ、その結果の混合物中におよそ $4.75 \text{ mmol dm}^{-3}$ の濃度が備えられる。

20

30

【0066】

さらに、電気活性物質は好ましくは、電極領域に依存する電流を有する電極領域正常化剤を含む。通常、電極領域正常化剤は、試料が虚血性であるかどうかに関係なく電流を有する。遷移金属塩により作り出される電流の電気化学的測定は、測定のために用いられる電極の表面積に依存する。したがって、遷移金属により生成される電流の、より正確な測定を得るために、電極領域正常化剤を用いて、測定値を正常化することが望ましい。電極領域正常化剤が、電極領域について測定された電流を完璧および正確に正常化することは、好ましくはあるが本質ではない。しかし、正常化剤は、電極領域での変動の原因となる、ある程度の補正を備える。したがって、本発明の関連では、'正常化する'の意味は、ある程度の補正を備えるということである。

40

【0067】

電極領域の正常化は、電極領域正常化剤と遷移金属電流の測定との、実質的に同時な電気化学的反応により作り出される電流を測定することにより行うことができる。両方の測定のために、同一の電極が用いられる。その後、遷移金属の酸化/還元による電流の測定は、電極領域正常化剤のために得られる測定を用いて、任意の好適な手法により正常化することができる。

【0068】

たとえば、値 I_{TM} / I_{NA} を用いて、より正確な結果を得ることができ、ここで I_{TM} は遷移金属の酸化/還元のために得られる電流であり、 I_{NA} は電極領域正常化剤の酸化/還元のために得られる電流である。遷移金属電流のためのこの正常化された値を用い

50

ることにより、電極領域内での変化による測定結果の誤差を最小限にすることができる。

【0069】

電極領域正常化剤は、遷移金属とは異なる酸化/還元電位を有する。さらに、通常は、タンパク質、たとえばアルブミンを含む血液中のタンパク質とは結合しないか、またはごく弱く結合する。電極領域正常化剤は、たとえばタンパク質により外圏錯体のみを形成することができる。電極領域正常化剤は通常、重金属、たとえばルテニウムまたはオスミウムを含む。したがって、好適な電極領域正常化剤の例は、ルテニウムまたはオスミウムの複合体、たとえばアミノ系リガンドとの複合体を含む。好ましい電極領域正常化剤は、塩化ルテニウムヘキサミンおよび塩化オスミウムヘキサミン、特に塩化ルテニウムヘキサミンを含む。

10

【0070】

一般的に、試験される試料と混合されたとき(たとえば乾燥した電気活性物質が、試料中に再度懸濁されたとき)、その結果の混合物中の電極領域正常化剤の濃度が、 $0.1 \sim 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ 、好ましくは $1 \sim 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ 、より好ましくは $3 \sim 3.5$ 、またはおおよそ 3.2 mmol dm^{-3} になるような量の電極領域正常化剤が存在する。このような濃度は、たとえば 5 mmol dm^{-3} よりも多く(たとえば $20 \sim 30 \text{ mmol dm}^{-3}$)を含む電気活性物質を用い、続いて電気活性物質を、試料自体の既知である体積で希釈する(たとえば、電気活性物質:試料を $1:1 \sim 1:20$ 、たとえば $1:5 \sim 1:10$ の比率で用いる)ことで達成することができる。たとえば、 24 mmol dm^{-3} の電極領域正常化剤の濃度を有する $0.2 \mu\text{l}$ の電気活性物質を、本発明のデバイス内部で、またはその上で乾燥させ、続いて $1.5 \mu\text{l}$ の試料中に再度懸濁させることができ、その結果の混合物中におおよそ 3.2 mmol dm^{-3} の濃度が備えられる。

20

【0071】

本発明の本実施形態の電気活性物質は通常、塩化物塩または硫酸塩、たとえば上記にて例示されたものを含む。カリウムまたは塩化ナトリウム、もしくは硫酸ナトリウムが好ましい。塩は通常、試験される試料と混合されたとき、その結果の混合中の塩の濃度が、 $1 \sim 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ 、好ましくは $6 \sim 60 \text{ mmol dm}^{-3}$ 、より好ましくは $10 \sim 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ であるような量で存在する。

【0072】

また、電気活性物質は通常、湿潤剤、たとえばポリビニルピロリドン(PVP)を含む。PVPは通常、電気活性物質と、試験される試料とが混合されたとき、その結果の混合中のPVPの濃度が、 $0.01 \sim 30\% \text{ w/v}$ 、たとえば $0.2 \sim 5\% \text{ w/v}$ 、好ましくは $0.7\% \text{ w/v}$ であるような量で存在する。電気活性物質自体は、より高い濃度のPVPを有し、この濃度はその後、既知である体積の試料により希釈されて、必要とされる濃度を提供する。ポリビニルピロリドンの濃度が高すぎる場合、再懸濁はゆっくりと発生する。このように、通常は $5\% \text{ w/v}$ 以下の、好ましくは $2\% \text{ w/v}$ または $1.5\% \text{ w/v}$ 以下の、より好ましくは $1\% \text{ w/v}$ 以下のポリビニルピロリドンが存在する。しかし、ポリビニルピロリドンの濃度が低すぎる場合、十分な濡れ性が備えられない。

30

【0073】

ポリビニルピロリドンは通常、 $100,000$ までの平均分子量を有する。好ましい平均分子量は、少なくとも $5,000$ 、より好ましくは少なくとも $7,500$ である。さらに分子量は、好ましくは $50,000$ 以下、より好ましくは $20,000$ 以下、たとえば $15,000$ 以下または $12,500$ 以下である。好ましい平均分子量はおおよそ $10,000$ である。そのような分子量を有するポリビニルピロリドンを用いることは、電気活性物質のより迅速な再懸濁に至るものと考えられてきた。

40

【0074】

電気化学的測定は好ましくは、 $6 \sim 8$ のpHで、たとえば $6.5 \sim 7.5$ 、好ましくは $6.8 \sim 7.2$ のpHで行われる。試験される試料中にいったん再懸濁された電気活性物質のpHが、実質的に $6 \sim 8$ の範囲内に留まることを確実にするために、緩衝剤を電気活性物質中に含むことができる。緩衝剤は、電気活性物質が水中に懸濁されたとき、 $6 \sim 8$

50

の pH を提供するものである必要がある。実行される測定の前位範囲を超えて電気化学的に活性でない、任意の緩衝剤を用いることができる。当業者においては、好適な緩衝剤は既知であり、使用可能な緩衝剤の一例は、(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)である。

【0075】

好ましい電気活性物質は、マンガン、鉄、コバルト、ニッケルまたは銅塩；ルテニウムまたはオスミウムの複合体；湿潤剤；任意的には塩化物塩または硫酸塩；および任意的には緩衝剤を含む。特に好ましい組成は、コバルト塩、ルテニウムまたはオスミウムの複合体；ポリビニルピロリドン；任意的には塩化物塩または硫酸塩；および任意的には緩衝剤を含む。好ましい実施態様では、緩衝剤はこれらの組成中に存在する。電気活性物質に関するさらなる詳細は、英国特許出願第0414551.2号およびそれにより優先権を主張する国際出願(本出願と同日付で出願され、発明の名称はELECTROCHEMICAL SENSOR)に見られる。これらの出願の内容は、全体として参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

【0076】

本発明はまた、上述の滴定式の電気化学的試験に用いることができるデバイスを提供する。本デバイスは、レセプタクルの形をした電気化学セル、たとえば上述のような電気化学セルを含む。任意的には、本発明のデバイスは、2個以上の電気化学セルを含むことができる。本発明のデバイスの電気活性物質は遷移金属塩を含み、好ましい電気活性物質は、上述したものである。

20

【0077】

実施例

実施例 1

電気化学的試験を実行するために、図2に図示されたタイプのデバイスが用いられたが、ここで作用電極は炭素電極であり、擬似参照電極はAg/AgCl電極である。壁、接着剤および膜の底表面により画定されたレセプタクルの体積は1.5 u lであった。デバイス上に膜が取り付けられる前に、35.6 mMのCoCl₂、24 mMの塩化ルテニウムヘキサミンおよび5% w/vのPVP内の150 mMのKCl、ならびにMOPS緩衝剤(pH 7.0を備える)を含む、0.2 u lの試薬混合物が、デバイスのレセプタクル内部に挿入されて乾燥された。使用された膜はWhatman VF2膜であった。

30

【0078】

電気化学セルに、くぼみの体積を充填する1.5 u lの標準的な血漿が付与され、試薬混合物を血漿中に再度懸濁させた。1.5 u lの血漿の体積中におけるCoの最終的な再懸濁の濃度は、4.75 mMであり、対応するRuの濃度は3.2 mMであった。

【0079】

時間により変動する電位をセルに付与し、付与された電位を-0.4 Vまで低下させ、その後1.7 Vまで上昇させた。電位スキャンの間、電流が測定され、その結果は図3に図示されている。

【0080】

実施例 2

本デバイスに70 u lの全血が付与されたことを除き、実施例1の方法が、レセプタクル内部に血漿を通過させるWhatman VF2膜を用いて繰り返された。およそ1.5 u lの体積がセルの体積を充填する。測定電位を付与する前に、100秒の濡れ時間が与えられた。

40

【0081】

実施例1と同様に、測定電位を付与する間、電流が測定され、電極領域に向かう測定された酸化コバルトの電流を正常化するために、I(Co) : I(Ru)の比率がさらに計算された。血漿試料を付加した後、I(Co) : I(Ru)の比率についての同様の測定が、140秒、180秒および220秒の時点で行われ、その結果が図4に図示されている。この図は、I(Co) : I(Ru)の比率をy軸に示し、血漿試料を付加した後の時

50

間を x 軸に示している。この例が実証するとおり、測定期間中にわたり実質的な定電流が達成され、この期間中は、レセプタクルの体積内部の試薬の濃度が実質的に一定であることを示している。

【0082】

各種の特定の実施形態および例を参照して、本発明を説明してきた。本発明は記載された特定の実施形態および例に限るものではないことが理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】本発明の1つの実施形態によるデバイスを図示する。

【図2】本発明の代替的な実施形態によるデバイスを図示する。

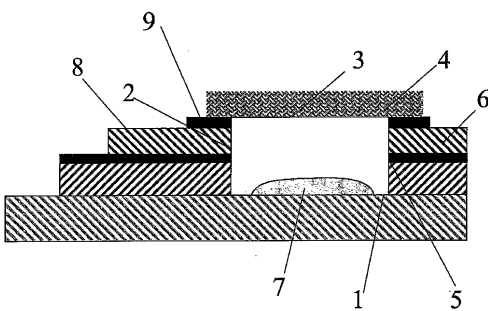
10

【図3】本発明の方法を用いて行われる、試料中の電気化学的に検出可能なコバルトの量を測定するための電気化学的試験に関する、電流 (I) 対電位 (V) のグラフを図示する。

【図4】試料中の電気化学的に検出可能なコバルトの量を測定するための、4分までの間の電気化学的試験に関する、比率 $I(Co) / I(Ru)$ 対時間のグラフを図示する。

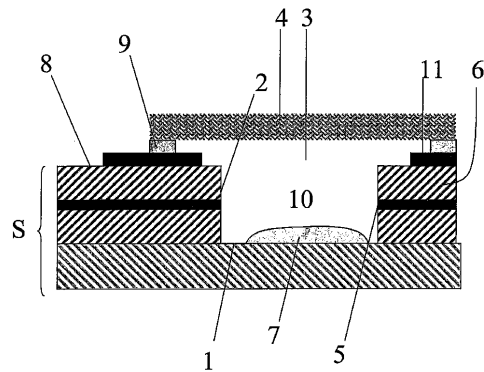
【図1】

FIG. 1



【図2】

FIG. 2



【図3】

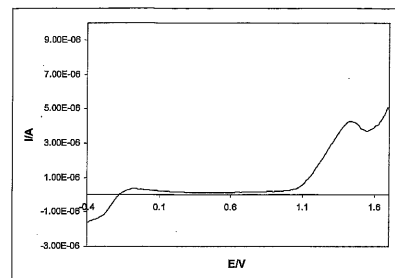
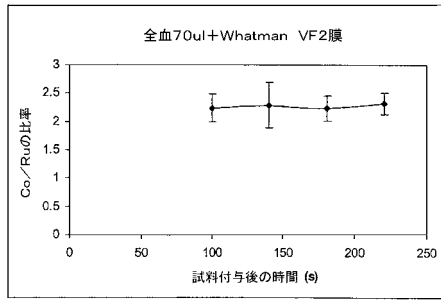


Figure 3

【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2005/002558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N27/30 C12Q1/00		
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) G01N C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/056319 A (OXFORD BIOSENSORS) 10 July 2003 (2003-07-10) cited in the application page 1, line 9 - page 2, line 19 page 6, line 10 - page 11, line 30 figure 1; example 2e	1-14
X	WO 03/074999 A (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL COMPANY) 12 September 2003 (2003-09-12) page 12, line 12 - page 15, line 15 page 18, line 20 - page 22, line 25 figures 5-8	1-3,5-14
P, X	-& EP 1 482 307 A (...) 1 December 2004 (2004-12-01) paragraph '0058! - paragraph '0069! paragraph '0083! - paragraph '0101! figures 5-8	1-3,5-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
14 December 2005	03/01/2006	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Johnson, K	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/002558

Box 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.: 15
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2005/002558

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 15

Rule 6.2(a) PCT: Prohibition of 'omnibus' type claims

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/JP2005/002558

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03056319	A	10-07-2003	AU 2002367214 A1	15-07-2003
			CA 2471132 A1	10-07-2003
			CN 1620604 A	25-05-2005
			EP 1472527 A2	03-11-2004
			JP 2005513500 T	12-05-2005
			US 2005178674 A1	18-08-2005
WO 03074999	A	12-09-2003	CN 1599865 A	23-03-2005
			EP 1482307 A1	01-12-2004
			US 2005072670 A1	07-04-2005
EP 1482307	A	01-12-2004	CN 1599865 A	23-03-2005
			WO 03074999 A1	12-09-2003
			US 2005072670 A1	07-04-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/46 3 3 6 G

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハイランド, マーク
イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤーントン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク、オックスフォード・バイオセンサーズ・リミテッド

(72) 発明者 ブロウホール, ジョン・モートン
イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤーントン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク、オックスフォード・バイオセンサーズ・リミテッド

(72) 発明者 パトラー, ロナルド・ニール
イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤーントン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク、オックスフォード・バイオセンサーズ・リミテッド