(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3839470号
(P3839470)
(45)発行日　平成18年11月1日(2006.11.1)　(24)登録日　平成18年8月11日(2006.8.11)

(51)Int.Cl.　F I
C12Q 1/26 (2006.01)　C12Q 1/26
C12N 9/96 (2006.01)　C12N 9/96

請求項の数 3　(全 7 頁)

(21)出願番号　特願平7-503120
(86)(22)出願日　平成6年6月21日(1994.6.21)
(65)公表番号　特表平8-511942
(43)公表日　平成8年12月17日(1996.12.17)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/007223
(87)国際公開番号　WO1995/000662
(87)国際公開日　平成7年1月5日(1995.1.5)
審査請求日　平成12年12月20日(2000.12.20)
(31)優先権主張番号　08/080,263
(32)優先日　平成5年6月21日(1993.6.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　591186073
ロシュ　ダイアグノスティックス　コーポレーション
アメリカ合衆国　４６２５０－０４５７　インディアナ州　インディアナポリス　ハーグ　ロード　９１１５
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(72)発明者　ベイトソン，ジョセフ　イー．
アメリカ合衆国　４６０３２　インディアナ州　カーネル，セネター　ウェイ　１４８１７番地

最終頁に続く

(54)【発明の名称】診断用試薬安定剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
グルコースオキシダーゼおよびヘキサシアノ鉄(III)酸塩を含有するスラリー組成物を安定化する方法であって、該スラリー組成物を安定化するために18.5ミリモルから55ミリモルの濃度のコハク酸またはその塩を該スラリー組成物に添加することを含む、上記方法。
【請求項２】
コハク酸またはその塩の濃度が、37ミリモルである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
グルコース分析用の組成物であって、
(1)水性溶媒中または乾燥マトリックス中のグルコースオキシダーゼ、
(2)ヘキサシアノ鉄(III)酸塩、および
(3)組成物を安定化するための18.5ミリモルから55ミリモルの濃度のコハク酸またはその塩、
を含有する組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、グルコースオキシダーゼおよび／またはヘキサシアノ鉄（III）酸塩を包含する組成物の安定化に関する。
発明の背景
例えば診断用試薬組成物のような、グルコースオキシダーゼまたはヘキサシアノ鉄（III

）酸塩を包含する組成物は、グルコースオキシダーゼおよびヘキサシアノ鉄（III）酸塩が分解しやすいために安定性に欠ける。
コハク酸およびコハク酸の数種の塩は、以下の文献において安定剤（例えば洗剤組成物を安定化する）またはキレート剤として用いられた：
Boskamp,米国特許第４，５３２，０６４号、１９８４年７月３０日発行；
Thomas，国際特許出願公報、ＷＯ８６／０４６１０、１９８６年８月１４日公開；
Ramachandranら、米国特許第４，９００，４７５号、１９９０年２月１３日発行；
Dormalら、米国特許第４，５２９，５２５号、１９８５年７月１６日発行；
Denny、欧州特許明細書ＥＰＯ　０７２５８１Ｂ１、１９８７年４月８日発行；特開昭６３－２０２３８１号、１９８８年８月２２日公開；および特開昭５７－１３８３８９号、１９８２年８月２６日公開。
上記文献はいずれも、グルコースオキシダーゼおよび／またはヘキサシアノ鉄（III）酸塩を包含する水性または乾燥試薬の安定化のためのコハク酸およびその塩の使用を明示してはいない。

発明の概要

本発明は、液体試料からグルコースを分析するための診断用試薬として有用な物質の安定な組成物、並びにグルコースオキシダーゼおよび／またはヘキサシアノ鉄（III）酸塩を含有する組成物を安定化するための方法に関する。
本発明は、コハク酸またはその塩の含有がグルコースオキシダーゼおよび／またはヘキサシアノ鉄（III）酸塩を含む組成物を安定化するという驚くべき結果に基づく。
コハク酸またはその塩はコハク酸二ナトリウムであることが望ましく、これはバイオセンサーでグルコースを分析するために有用な診断用試薬において利用される。この試薬は、グルコースオキシダーゼ、リン酸カリウム（緩衝液）、フェリシアン化カリウム（酸化還元媒介物質）、AVICEL RC-591Fのような、８８％微晶質セルロースと１２％カルボキシメチルセルロースナトリウム塩との混合である分散剤かつ結晶化阻害剤、少量のヒドロキシエチルセルロース、界面活性剤（TRITON X-100界面活性剤のような、様々なポリオキシエチレンエーテルを包含する）および水を包含する水性スラリー状に調製されることが好ましい。混合した後、得られるスラリーを電気化学バイオセンサーの作用電極と対電極の表面に塗り、乾燥させた後、本文に記載されるような液体試料からのグルコースの測定に利用することができる。
もっと概括的に言えば、コハク酸およびその塩は、グルコースオキシダーゼおよび／またはヘキサシアノ鉄（III）酸塩を利用する様々な種類のグルコーステスト試薬のようにグルコースオキシダーゼおよび／またはヘキサシアノ鉄（III）酸塩を含有する別の組成物を安定化することができる。

【図面の簡単な説明】

第１図は、本発明の安定な組成物を利用したバイオセンサーの略平面図である。
第２図は、第１図のバイオセンサーの、線２－２についての略立面図であり、本発明の安定な組成物およびカバーメッシュを含む。
第３図は、第２図のバイオセンサーの略平面図である。

発明の説明

本発明の特別な実施態様を最初に説明する。この特別な実施態様は、コハク酸二ナトリウムを包含することによって安定性を増した試薬を利用する。この試薬を調製するための実験手順は以下の通りである：
第１段階－　１．２グラム（ｇ）ヒドロキシエチルセルロース（NATROSOL 250 M NFの商標で販売され、Aqualon Companyより入手可能）を０．７４モル（Ｍ）リン酸カリウム水溶液および２６．４ｇリン酸二ナトリウム、ｐＨ６．２５に添加することによって、（メスフラスコ中で）１リットルの緩衝液／NATROSOL混合物を調製する。この緩衝液／NATROSOL混合物を３時間撹拌し膨潤させる。
第２段階－　分散剤かつ結晶化阻害剤である１４ｇ AVICEL RC-591F（FMC Corporationから入手可能）および５０４．８ｇ水を２０分間撹拌することによって、AVICEL混合物を調

製する。
第３段階－　０．５ｇ TRITON X-100界面活性剤を５１４．６ｇの上記緩衝液／NATROSOL混合物に添加し、１５分間撹拌することによって、TRITON混合物を調製する。
第４段階－　撹拌しながら、TRITON混合物の全量を滴下漏斗またはビュレットを用いて滴下して全量のAVICEL混合物に添加する。添加が完了したら、一晩撹拌を続ける。
第５段階－　第４段階で得られた混合物に、撹拌しながら、９８．８ｇのフェリシアン化カリウムを添加する。（添加時にフェリシアン化カリウムが溶解しやすいように、一時に小量のフェリシアン化カリウムを添加する。）
第６段階－　第５段階で得られた混合物を２０分間撹拌する。
第７段階－　水酸化カリウムを添加して第６段階で得られた混合物のｐＨを６．２５に調整する。
第８段階－　第７段階で得られた混合物に９．２ｇグルコースオキシダーゼ（ミリグラム（ｍｇ）当り２１８．５オルトージアニシジンユニット、Biozymeより入手）を添加し、少なくとも２０分間撹拌する。
第９段階－　第８段階で得られた混合物に、１０ｇ（３７ミリモル（ｍｍｏｌ））コハク酸二ナトリウム六水和物を添加し、少なくとも２０分間撹拌する。
第１０段階－　第９段階で得られた混合物を１００ミクロンのふるいバッグに通して濾過し、AVICEL凝集体をすべて除去する。この濾過が、結果として得られた試薬組成物１１（第２図参照）である。この試薬は、電気化学バイオセンサーの電極表面に下記のように添加され、次いで乾燥される。（乾燥前に、この組成物はリン酸緩衝液中０．３７モルである。より好ましい組成物はリン酸緩衝液中０．２５モルに調製される。この組成物におけるグルコースオキシダーゼの最終活性は乾燥前の組成物リットル当り１．５７テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）メガユニットであることが好ましい。）
第１図から第３図に関して、バイオセンサー１は第１および第２の電気的絶縁層２および３をそれぞれ含む。あらゆる有用な絶縁材が利用可能である。典型的には、ビニルポリマーやポリイミドといったプラスチックが、電気的および構造的に好ましい性質を備えている。
第１図から第３図に示したバイオセンサーは、ロール状の材料から大量生産することを意図したものであり、ロール加工するのに十分な柔軟性をもつと同時に完成したバイオセンサーに実用的な堅さを付与するに足る堅い材料の選択を必要とする。
層２および３は、任意の実用的な厚さを有することができる。
好ましい実施態様において、層２は約３６０ミクロンの厚さであり、層３は約２５０ミクロンの厚さである。
作用電極４および対電極５は、ポリイミドのような絶縁材７の裏材に接して配置されることが好ましく、それにより電極を層２に貼付する前にこれを破損する可能性が低くなる。
作用電極４および対電極５は実質的に同じ大きさで、同一の電気伝導物質からつくられる。使用可能な電気伝導物質の例は、パラジウム、プラチナ、金、銀、炭素、チタニウムおよび銅である。貴金属は、より一定で再現性のある電極表面積を与えるので好ましい。パラジウムが特に好ましいが、これは、パラジウムがかなり酸化されにくい貴金属の一つであり、比較的安価な貴金属であるためである。銀は適さないが、これは上記の他の貴金属より容易に酸化されるためである。電極４および５は約０．１ミクロンの厚さで、裏材７は約２５ミクロンの厚さであることが好ましい（カリフォルニアのCourtalls-Andus Performance FilmsおよびSouthwall Technologies, Inc.より市販されている）（第２図）。
一方の電極で起こった電気化学的事象が、他方の電極での電気化学的事象の妨げとならぬよう、電極４および５は十分離さなければならない。電極４と５との間の好ましい距離は約１．２ミリメートル（ｍｍ）である。
好ましい実施態様において、裏材７に貼付された電極４および５は巻き枠から巻き戻されて、熱溶融接着剤（記載せず）を用いて層２に貼り付けられる。また電極４および５は、平行な配置で、層２の一端から他端まで伸びていることが好ましい（第１図）。
絶縁層３は層２並びに電極４および５の上部に、熱溶融接着剤（記載せず）を用いて固定

される。層３は切抜き部分８を含有するが、この切抜き部分が試薬受け穴９を定義し、電極４および５の実質的に等しい表面積を露出する。好ましい実施態様において、切抜き部分８は４ｍｍ×６ｍｍであり、電極４および５はそれぞれ１．５ｍｍ幅である。したがって約６ｍｍ^{2}の表面積が、二つの電極のそれぞれについて露出される。

また、バイオセンサー１は、作用電極および対電極に電気的に接続した電源（記載せず）並びに同様に作用電極および対電極に電気的に接続した電流計（記載せず）を含有する。バイオセンサー試薬１１（第２図）を、電極４および５の露出表面１０の全体を覆うように、好ましくは両電極間に層２の露出表面も覆うように、試薬受け穴９に入れる。

上記の実施態様は液体試料中のグルコース定量に有用であるが、この態様において、上記手順で調製された試薬１１を切抜き８によって作成された受け穴９に６マイクロリットル（μｌ）添加する。この試薬１１の量は二つの電極上の表面積１０（第１および２図）を覆うのに十分であり、またグルコースアッセイ（下記）を行なうために十分な量の試薬を含んでいると考えられる。

つぎに、試薬１１を約５０℃で約３分間加熱することによって乾燥させる。乾燥によって、試薬の水分含量の少なくとも約９０％が除去され、それにより乾燥試薬が得られる。

乾燥後、輸送および出荷時にバイオセンサーからの試薬の損失を防ぐために、また試薬からのヒトの汚染を最小限にするために、ポリエステルまたはナイロンメッシュ１３（第２および３図）を乾燥試薬の上に置くことが好ましい。メッシュ１３は粘着テープ１４でバイオセンサーに取り付けられ、これは穴１５（第２および３図）を含有する。穴１５は、グルコースのような、バイオセンサー（第３図）で測定されるべき被検体を含む試料を添加するための標的領域である。

試薬を乾燥しメッシュを貼付した後、ロール状のバイオセンサーを型抜きで分離して個々のバイオセンサーとし、このバイオセンサーは作用および対電極、並びに電流を測定するための計器に電気的に接続した電源（例えば電池）と接続して使用される。

上記の計器は、通常、アルゴリズムを電流測定に向けて合わせられており、それによって被検体濃度が与えられ、可視的に表示される。このような電源および計器の改良は、共通して課せられた、１９９０年１０月１６日発行の米国特許第４，９６３，８１４号、１９９１年3月１２日発行の米国特許第４，９９９，６３２号、１９９１年3月１２日発行の米国特許第４，９９９，５８２号、および米国特許出願番号第０７／４５１，３０５号（１９８９年１２月１５日出願；１９９３年４月１９日特許査定通知書発行）の主題であり、その開示は参照によりここに組み込むものとする。

電源および計器を容易に電気的に接続するために、作用電極および対電極の一部を露出する別の切抜き部分１２（第１から３図）をバイオセンサー装置に備えることが好ましい。

試薬を含有する上記のバイオセンサー装置を、血液試料のような液体試料からグルコースを測定するために電源および計器と接続して使用することができる。

血液試料（２０マイクロリットル（μｌ）で十分）を試薬受け穴９に添加するとき、試薬１１は再水和され、それによってフェリシアン化カリウム、グルコースオキシダーゼ（ＧＯＤ)、リン酸カリウム緩衝液、コハク酸二ナトリウムおよび界面活性剤が可溶化する。

血液中にグルコースが存在するならば、以下の化学反応が生じる：

$$\text{グルコース} + \text{ヘキサシアノ鉄（Ⅲ）酸塩} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{グルコン酸} + \text{ヘキサシアノ鉄（Ⅱ）酸塩}$$

この反応を終点まで進行させるために、この反応のためのインキュベーション時間（２０秒で十分）が割り当てられ、それによって有意な量のヘキサシアノ鉄（II）酸塩が生成される。つぎに、作用電極と対電極との間に、作用電極表面でヘキサシアノ鉄（II）酸塩の拡散限定電気酸化を起こす（ヘキサシアノ鉄（II）酸塩をヘキサシアノ鉄（III）酸塩に変える）のに十分な電位差をかける。（約３００ミリボルトの電位差が好ましい）。得られた拡散限定電流を血液試料中のグルコース量に関連付けることができる。

上記の好ましい試薬組成物により、上記バイオセンサーストリップを用いて実施されたグルコースアッセイにおいて良好なアッセイ精度に反映されるように、安定性および性能の両者が最善の状態となった。安定性研究が示すところでは、この試薬組成物は２年以上安定性を保持すると考えられる。また、上記プロトコールにより調製された試薬は、コハク酸二ナトリウム六水和物の含量を約０．５％重量／試薬スラリー容量（コハク酸塩として約１８．５ミリモル（ｍＭ）から約１．５％重量／試薬スラリー容量（コハク酸塩として約５５ｍＭ）まで変化させたとき、安定化された。試薬中のコハク酸二ナトリウムの量を約１８．５ｍＭよりさらに低下させると、試薬の安定性も低下すると考えられる。このような試薬の安定性の低下は、「テーリングオフ」効果として説明され、ここで試薬の安定性は、たとえ安定性が存在したとしてもほとんどないところまで低下する。コハク酸二ナトリウム量を約５５ｍＭより増加させると試薬の安定性はさらに増加するであろうが、コハク酸二ナトリウムをこれ以上追加しても試薬の安定性が増加しない幾分高い上限までである。

上記試薬はコハク酸二ナトリウムを含有することによって安定化される。コハク酸二ナトリウムはヘキサシアノ鉄（III）酸塩およびグルコースオキシダーゼの両方を安定化し、それによって上記試薬成分の分解およびその結果として生じる試薬の分解を非常に遅くする。本発明はコハク酸二ナトリウムについて説明したが、ヘキサシアノ鉄（III）酸塩またはグルコースオキシダーゼのいずれかを含む組成物は、他のコハク酸塩を含有させることによっても、またコハク酸自体を含有させることによっても安定化されるはずである。安定化は試薬マトリクスに関わりなく観察されると考えられる。試薬マトリクスは、バイオセンサーストリップ上で試薬を乾燥させる前は上記手順に明記したように水性スラリーであり、水溶液であり、またはバイオセンサーストリップ上で乾燥させた後の上記試薬のように乾燥マトリクスであってよく、あるいはフィルム、メンブラン、またはナイロン不織メッシュのような多孔性マトリクスに取り込まれた試薬であってもよい。

本発明は、グルコースオキシダーゼまたはヘキサシアノ鉄（III）酸塩のいずれか一方、またはグルコースオキシダーゼおよびヘキサシアノ鉄（III）酸塩の両者を包含する非常に様々な分析用および診断用の試薬および装置に応用することができる。コハク酸またはその塩は、以下の文献に記載された試薬および装置に包含されることが可能であり、その開示は試薬安定剤としてここに組み込むものとする：

Nankaiら、米国特許第４，４３１，５０７号、１９８４年２月１４日発行；
Nankaiら、米国特許第５，１２０，４２０号、１９９２年６月９日発行；
Wogoman、米国特許第５，０３０，３１０号、１９９１年７月９日発行；
Sendaら、米国特許第４，８２０，３９９号、１９８９年４月１１日発行；
Nankaiら、米国特許第４，８９７，１７３号、１９９０年１月３０日発行；
Higginsら、米国特許第４，５４５，３８２号、１９８５年１０月８日発行；
Mindtら、米国特許第３，８３８，０３３号、１９７４年９月２４日発行；
Nakamuraら、米国特許第４，２２４，１２５号、１９８０年９月２３日発行；
Hoenesら、米国特許第５，１２２，２４４号、１９９２年６月１６日発行；
Higginsら、米国特許第４，７１１，２４５号、１９８７年１２月８日発行；
Davisら、米国特許第４，７５８，３２３号、１９８８年７月１９日発行；
Nakamuraら、米国特許第４，３９２，９３３号、１９８３年７月１２日発行；
McNeilら、米国特許第４，８３０，９５９号、１９８９年５月１６日発行；
Phillipsら、米国特許第５，０４９，４８７号、１９９１年９月１７日発行；
Takizawaら、米国特許第４，８９４，１３７号、１９９０年１月１６日発行；
Kawaguriら、米国特許第５，１７１，６８９号、１９９２年１２月５日発行；
Freitag、米国特許第４，９２９，５４５号、１９９０年５月２９日発行；および
Phillipsら、米国特許第５，０５９，３９４号、１９９１年１０月２２日発行。

（上記文献の一部において、グルコースオキシダーゼは化学的処理によって（例えばグルタルアルデヒドを用いた処理によって）架橋され、またはグルコースオキシダーゼが電極の表面に共有結合している。このような場合、コハク酸およびその塩の含有が試薬をさら

に安定化することはない。）

本発明は上記の教示および図面によって十分明確かつ簡潔に明らかにされ、これによって当業者は本発明を行い、これを利用して本発明を実施するための最適な方法を知り、本発明を他の発明および旧知のものから区別することができる。本発明の多くの変法および明白な応用が容易に思いつくが、これらは以下に請求される本発明の範囲に含まれるものとみなす。

【図１】

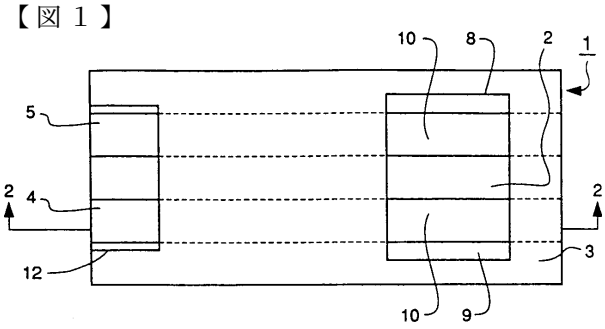

FIG. 1

【図２】

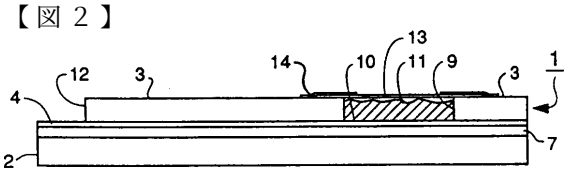

FIG. 2

【図３】

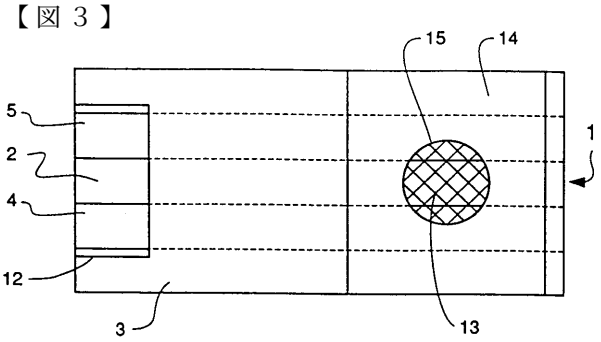

FIG. 3

フロントページの続き

審査官　坂崎　恵美子

(56)参考文献　特開平０３－２０１９９７（ＪＰ，Ａ）
特開昭５７－１３８３８９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５５－０４２５９９（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q 1/26
C12N 9/96
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)