(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5489092号
(P5489092)
(45)発行日　平成26年5月14日(2014.5.14)　(24)登録日　平成26年3月7日(2014.3.7)

(51)Int.Cl.　　F I
G01N 27/327 (2006.01)　　G01N 27/30 353T
G01N 27/416 (2006.01)　　G01N 27/46 338

請求項の数 7　(全 9 頁)

(21)出願番号　特願2008-512147(P2008-512147)
(86)(22)出願日　平成19年4月19日(2007.4.19)
(86)国際出願番号　PCT/JP2007/058526
(87)国際公開番号　WO2007/123178
(87)国際公開日　平成19年11月1日(2007.11.1)
審査請求日　平成22年3月23日(2010.3.23)
(31)優先権主張番号　特願2006-116175(P2006-116175)
(32)優先日　平成18年4月19日(2006.4.19)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　592031097
パナソニックヘルスケア株式会社
愛媛県東温市南方２１３１番地１
(74)代理人　100105050
弁理士　鷲田　公一
(72)発明者　中山　潤子
愛媛県東温市南方２１３１番地１　パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内
(72)発明者　高原　佳史
愛媛県東温市南方２１３１番地１　パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内
(72)発明者　山西　永吏子
愛媛県東温市南方２１３１番地１　パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バイオセンサ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料液のグルコースの濃度を計測するバイオセンサにおいて、
少なくとも作用極と対極を含む電極が形成された絶縁性の基板と、
前記試料液中のグルコースと特異的に反応する試薬を含む試薬層とを有し、
前記試薬層は、少なくとも、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼと、電子伝達体とを含み（ただし、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコースデヒドロキナーゼを含む場合を除く）、
前記試薬層は、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、ゼラチンおよびコラーゲンからからなる群から選ばれる可溶化蛋白質をさらに含有する、バイオセンサ。
【請求項２】
請求項１に記載のバイオセンサにおいて、
前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、前記グルコースデヒドロゲナーゼ１Ｕ当たり０．０００４～０．００８ｍｇの範囲内である、バイオセンサ。
【請求項３】
請求項１に記載のバイオセンサにおいて、
前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、１センサ当たり０．０００７～０．０１４ｍｇの範囲内である、バイオセンサ。
【請求項４】
請求項２に記載のバイオセンサにおいて、

前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、グルコースデヒドロゲナーゼ１Ｕ当たり０．００３５～０．００４ｍｇの範囲内である、バイオセンサ。

【請求項５】

請求項３に記載のバイオセンサにおいて、

前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、１センサ当たり０．００７ｍｇである、バイオセンサ。

【請求項６】

請求項１に記載のバイオセンサにおいて、

前記試薬層は、前記電極上に形成されるか、または前記試薬層の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が配置されるよう形成される、バイオセンサ。

【請求項７】

請求項１に記載のバイオセンサにおいて、さらに、前記絶縁性の基板上に検知電極を設ける、バイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、試料液中の特定成分を分析するバイオセンサに関し、特に、バイオセンサの試薬層を構成する試薬構成に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

バイオセンサは、微生物、酵素、抗体等の生物材料の分子認識能力を利用し、生物材料を分子識別素子として応用したセンサである。すなわち、固定化された生物材料が、目的の特定成分を認識したときに起こる反応、微生物の呼吸による酸素の消費、酵素反応、発光などを利用したものである。

【０００３】

バイオセンサの中でも酵素センサの実用化は進んでおり、例えば、グルコース、乳酸、コレステロール、ラクトース、尿酸、尿素、アミノ酸用の酵素センサは、医療計測や食品工業に利用されている。酵素センサは、検体である試料液に含まれる基質と酵素との反応により生成する電子によって電子受容体を還元し、測定装置がその電子受容体の酸化還元量を電気化学的に計測することにより、検体の定量分析を行う。

【０００４】

このようなバイオセンサの一例として、図５に、３電極方式のバイオセンサの分解斜視図を示す。

【０００５】

図５に示すバイオセンサは、絶縁性の基板１上に、スパッタリング蒸着法やスクリーン印刷法などによって電気伝導層を形成後、レーザなどを用いてスリットを設けることにより、作用極２、対極３、および検知電極４を形成し、これら電極上に、試料液中の特定成分と反応する酵素及び電子伝達体を含む試薬層５を形成してなるものである。さらに、試薬層５、及び電極２、３、４上には、切り欠き部６ａを有するスペーサ６とカバー８とを貼り合わせることにより、試料液が供給されるキャビティ７が形成されている。なお、キャビティ７からバイオセンサへの試料液供給は毛細管現象により実現されるが、キャビティ７内の空気をバイオセンサ外部へ逃がすための空気孔９をカバー８に設けて、試料液のスムーズな供給を実現している。

【０００６】

このような構成のバイオセンサのキャビティ７の入り口に試料液を添加すると、試料液は、キャビティ７の入り口から毛細管現象によりキャビティ７内に供給され、試薬層５の位置に到達すると、試料液中の特定成分が、試薬層５に含まれる試薬と反応する。この反応により生じる電流の変化量を、作用極２、対極３、検知電極４のそれぞれのリード部１０、１１、１２を通じて接続された外部の測定装置により読み取る。読み取った電流値を特定成分の濃度に換算することで、試料液中の特定成分を定量している。

【特許文献１】特開２０００－１７１４２８号公報
【特許文献２】特開２００１－３４３３５０号公報
【特許文献３】特開２００２－２０７０２２号公報
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
しかしながら、従来のバイオセンサは、試料液が血液である場合、ヘマトクリットの影響により、正しい検査結果が得られないという問題があった。特に、グルコース用の酵素センサは、食前のインスリン注射時の測定や、低血糖の評価に使われることが多く、ヘマトクリットの影響によりグルコース濃度が高めに表示されてしまうと、インスリンの過剰投与や低血糖の見逃しを招く恐れがある。そのため、試料液が血液の場合にヘマトクリットの影響を受けない高精度のバイオセンサが望まれる。
【０００８】
また、従来のバイオセンサは、環境温度の影響により、正しい検査結果が得られないという問題があった。この問題を解決すべく、温度制御装置等を用いて検査結果の補正を行っているが、温度制御装置が急激な温度変化に対応できず温度を誤認識してしまった場合には、誤った補正を行うこととなり、正しい検査結果が得られない。そのため、より環境温度の影響を受けにくいバイオセンサが望まれる。
【０００９】
本発明は、上記問題点を解消するためになされたものであり、ヘマトクリットの影響や、環境温度の影響を回避することのできる、高精度のバイオセンサを提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
上記課題を解決するために、本発明の［１］のバイオセンサは、試料液のグルコースの濃度を計測するバイオセンサにおいて、
少なくとも作用極と対極を含む電極が形成された絶縁性の基板と、前記試料液中のグルコースと特異的に反応する試薬を含む試薬層とを有し、
前記試薬層は、少なくとも、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼと、電子伝達体とを含み（ただし、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコースデヒドロキナーゼを含む場合を除く）、
前記試薬層は、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、ゼラチンおよびコラーゲンからからなる群から選ばれる可溶化蛋白質をさらに含有する、バイオセンサである。
【００１１】
また、本発明の［２］のバイオセンサは、［１］のバイオセンサにおいて、前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、前記グルコースデヒドロゲナーゼ１Ｕ当たり０．０００４～０．００８ｍｇの範囲内であることが好ましい。
【００１２】
また、本発明の［３］のバイオセンサは、［１］のバイオセンサにおいて、前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、１センサ当たり０．０００７～０．０１４ｍｇの範囲内であることが好ましい。
【００１３】
また、本発明の［４］のバイオセンサは、［２］のバイオセンサにおいて、前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、グルコースデヒドロゲナーゼ１Ｕ当たり０．００３５～０．００４ｍｇの範囲内であることが好ましい。
【００１４】
また、本発明の［５］のバイオセンサは、［３］のバイオセンサにおいて、前記試薬層における前記可溶化蛋白質の含有量は、１センサ当たり０．００７ｍｇであることが好ましい。
【００１５】

また、本発明の［６］のバイオセンサは、［１］のバイオセンサにおいて、前記試薬層が、前記電極上に形成されるか、または前記試薬層の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が配置されるよう形成されることが好ましい。

【００１６】

また、本発明の［７］のバイオセンサは、［１］のバイオセンサにおいて、さらに、前記絶縁性の基板上に検知電極を設けることが好ましい。

【発明の効果】

【００１９】

本発明のバイオセンサによれば、試料液の特定成分の濃度を計測するバイオセンサにおいて、上記試料液中の特定成分と特異的に反応する試薬を含む試薬層中に、可溶化蛋白質を含有させたことにより、ヘマトクリットの影響、温度の影響を低減した、高精度のバイオセンサを実現可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２０】

以下に、本発明の実施の形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する本発明の各実施の形態では、試料液中の特定成分と特異的に反応する分子識別素子として酵素を用いる酵素センサを例にとって説明する。

【００２１】

（実施の形態１）

本発明の実施の形態１によるバイオセンサについて説明する。

【００２２】

本実施の形態１のバイオセンサは、図５で示したバイオセンサの試薬層５に、可溶化蛋白質を添加したことを特徴とする。ここでは、酵素として、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、ＦＡＤ－ＧＤＨと呼ぶ）を用いた。また、可溶化蛋白質として、ウシ血清アルブミン（以下、ＢＳＡと呼ぶ）を用いた。

【００２３】

以下、本実施の形態１の作用、効果について説明する。

【００２４】

図１は、本実施の形態１のバイオセンサにおいて、試薬層５中にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対するヘマトクリットの影響を示す図である。図１において、縦軸は、ヘマトクリット値４５％のときのセンサ感度からの乖離を示し、横軸は、ヘマトクリット値を示す。

【００２５】

試料液は、グルコース濃度が３５０ｍｇ/ｄＬに調製された全血を用いた。また、ＦＡＤ－ＧＤＨの酵素量は、１センサ当たり２Ｕ（ユニット）とした。

【００２６】

本実施の形態１のバイオセンサを構成する試薬層５中に添加するＢＳＡの濃度は、上記試薬液中に、酵素１Ｕ当たり０～０．００３５ｍｇ、言い換えると１センサ当たり０～０．００７ｍｇに変化させてセンサ応答値を計測した。

【００２７】

計測の結果、ヘマトクリット値が２５～６５％の濃度範囲では、ＢＳＡを添加してもセンサ応答値に変化は見られなかった。一方、ヘマトクリット値が２５％以下の低濃度範囲では、ＢＳＡの添加量に応じて、センサ応答特性に対するヘマトクリットの影響が低減されていた。

【００２８】

このように、試薬層５中にＦＡＤ－ＧＤＨとＢＳＡとを含有させた場合、ヘマトクリット値が２５％以上の濃度範囲では、ＢＳＡの添加効果は認められなかったが、ヘマトクリット値が０～２５％の低い濃度範囲では、ＢＳＡの添加効果が認められた。

【００２９】

図２は、本実施の形態１のバイオセンサにおいて、試薬層５中にＢＳＡを添加した場合

のセンサ応答特性に対する温度の影響を示す図である。図２において、縦軸は、温度２５℃感度からの乖離を示し、横軸は、温度を示す。

【００３０】

試料液は、グルコース濃度が３５０ｍｇ/ｄＬに調製された全血を用いた。また、ＦＡＤ－ＧＤＨの酵素量は、１センサ当たり２Ｕとした。

【００３１】

本実施の形態１のバイオセンサを構成する試薬層５中に添加するＢＳＡの濃度は、上記試薬液中に、酵素１Ｕ当たり０～０．００３５ｍｇ、言い換えると１センサ当たり０～０．００７ｍｇに変化させてセンサ応答特性を計測した。

【００３２】

計測の結果、５～２５℃の温度範囲では、ＢＳＡを添加しても、センサ応答値に変化は見られなかった。一方、２５℃以上の高温度範囲では、ＢＳＡの添加量に応じて、センサ応答特性に対する温度の影響が緩和されていた。

【００３３】

このように、試薬層５中にＦＡＤ－ＧＤＨとＢＳＡを含有させた場合、温度２５℃以下の温度範囲では、ＢＳＡの添加効果は認められなかったが、温度２５℃以上の温度範囲では、ＢＳＡの添加効果が認められた。

【００３４】

以上のことから、試薬層５中に、ＢＳＡを酵素１Ｕ当たり０．００３５ｍｇ、あるいは１センサ当たり０．００７ｍｇ含有させた場合に、ヘマトクリットと温度の両方の特性が向上すると判断できる。

【００３５】

このような実施の形態１のバイオセンサによれば、酵素ＦＡＤ－ＧＤＨを含む試薬層５に、ＢＳＡを多量に含有させたことにより、センサ応答特性に対するヘマトクリットの影響や温度の影響を改善することができる。

【００３６】

（実施の形態２）

本発明の実施の形態２によるバイオセンサについて説明する。

【００３７】

本実施の形態２のバイオセンサは、図５で示したバイオセンサの試薬層５に、可溶化蛋白質を添加したことを特徴とする。ここでは、酵素として、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、ＰＱＱ－ＧＤＨと呼ぶ）を用いた。また、可溶化蛋白質として、ウシ血清アルブミン（以下、ＢＳＡと呼ぶ）を用いた。

【００３８】

以下、本実施の形態２の作用、効果について説明する。

【００３９】

図３は、本実施の形態２のバイオセンサにおいて、試薬層５中にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対するヘマトクリットの影響を示す図である。図３において、縦軸は、ヘマトクリット値４５％のときのセンサ感度からの乖離を示し、横軸は、ヘマトクリット値を示す。

【００４０】

試料液としては、グルコース濃度が３５０ｍｇ/ｄＬに調製された全血を用いた。また、ＰＱＱ－ＧＤＨの酵素量は、１センサ当たり１．７Ｕとした。

【００４１】

本実施の形態２のバイオセンサを構成する試薬層５中に添加するＢＳＡの濃度を、上記試薬液中に酵素１Ｕ当たり０～０．００８ｍｇ、言い換えると１センサ当たり０～０．０１４ｍｇに変化させてセンサ応答値を計測した。

【００４２】

測定の結果、ヘマトクリット値が２５～６５％の範囲では、センサ応答値に対するＢＳＡの添加効果は認められなかった。一方、ヘマトクリット値が２５％以下の低濃度範囲で

は、ＢＳＡの添加量に応じて、センサ応答特性に対するヘマトクリットの影響が緩和されていた。

【００４３】

このように、試薬層５中にＰＱＱ－ＧＤＨとＢＳＡとを含有させた場合、ヘマトクリット値が２５％以上の濃度範囲では、ＢＳＡの添加効果は認められなかったが、ヘマトクリット値が０～２５％の低い濃度範囲では、ＢＳＡの添加効果が認められた。

【００４４】

図４は、本実施の形態２のバイオセンサにおいて、試薬層５中にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対する温度の影響を示す図である。図２において、縦軸は、温度２５℃感度からの乖離を示し、横軸は、温度を示す。

【００４５】

試料液は、グルコース濃度が３５０ｍｇ/ｄＬに調製された血漿を用いた。また、ＰＱＱ－ＧＤＨの酵素量は、１センサ当たり１．７Ｕとした。

【００４６】

本実施の形態２のバイオセンサを構成する試薬層５中に添加するＢＳＡの濃度を、上記試薬液中に酵素１Ｕ当たり０～０．００８ｍｇ、言い換えると１センサ当たり０～０．０１４ｍｇに変化させてセンサ応答特性を計測した。

【００４７】

計測の結果、２５～４５℃の温度範囲では、ＢＳＡを添加しても、センサ応答値に変化は見られなかった。一方、２５℃以下の低温度範囲では、ＢＳＡの添加量に応じて、センサ応答特性に対する温度の影響が緩和されていた。

【００４８】

このように、試薬層中にＰＱＱ－ＧＤＨとＢＳＡを含有させた場合、温度２５℃以上の場合には、ＢＳＡの添加効果は認められなかったが、温度２５℃以下の場合には、ＢＳＡの添加効果が認められた。

【００４９】

以上のことから、試薬層５中に、ＢＳＡを酵素１Ｕ当たり０．０００４～０．００８ｍｇ、あるいは１センサ当たり０．０００７～０．０１４ｍｇ含有させた場合に、ヘマトクリットと温度の両方の特性が向上すると判断できる。また、ＢＳＡを酵素１Ｕ当たり０．００４ｍｇ、あるいは１センサ当たり０．００７ｍｇ以上添加した場合の効果が変わらないことから、その最適値は、酵素１Ｕ当たり０．００４ｍｇ、あるいは１センサ当たり０．００７ｍｇであると判断できる。

【００５０】

このような実施の形態２のバイオセンサによれば、酵素ＰＱＱ－ＧＤＨを含む試薬層５に、ＢＳＡを多量に含有させたことにより、センサ応答特性に対する、ヘマトクリットの影響や温度の影響を改善することができる。

【００５１】

なお、上記実施の形態１、２では、試薬層５中の酵素としてＦＡＤ－ＧＤＨ、ＰＱＱ－ＧＤＨを例に挙げて説明したが、他に、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、リポプロテインリパーゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ウリカーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アスコルビン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼなどの臨床検査に用いられる酵素を用いることができる。

【００５２】

また、上記実施の形態１、２では、可溶化蛋白質としてＢＳＡを用いて説明したが、卵アルブミン、ゼラチン、コラーゲンなどを用いた場合にも、同様の効果が得られる。可溶化蛋白質の添加量は、その最適値が、酵素１Ｕ当たり０．００４ｍｇ、あるいは１センサ当たり０．００７ｍｇであると判断できる。

【００５３】

また、上記実施の形態１、２では、３電極方式のバイオセンサについて示したが、２電極方式のバイオセンサを用いても良い。

【産業上の利用可能性】

【００５４】

本発明のバイオセンサは、ヘマトクリットの影響、温度の影響を緩和することのできる、高精度の酵素センサとして利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

【図１】図１は、本発明の実施の形態１のバイオセンサにおいて、試薬層にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対するヘマトクリットの影響を示す図である。

【図２】図２は、上記実施の形態１のバイオセンサにおいて、試薬層にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対する温度の影響を示す図である。

【図３】図３は、本発明の実施の形態２のバイオセンサにおいて、試薬層にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対するヘマトクリットの影響を示す図である。

【図４】図４は、上記実施の形態２のバイオセンサにおいて、試薬層にＢＳＡを添加した場合のセンサ応答特性に対する温度の影響を示す図である。

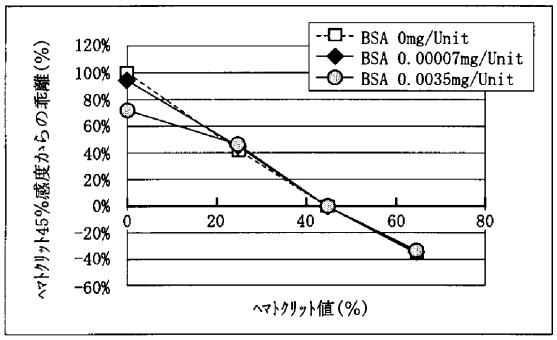
【図５】図５は、従来の３電極方式のバイオセンサの分解斜視図を示している。

【符号の説明】

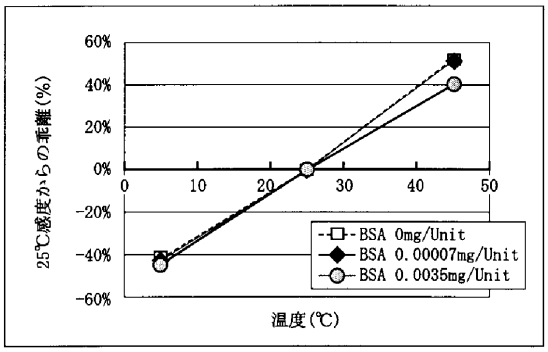
【００５６】

１　基板
２　作用極
３　対極
４　検知電極
５　試薬層
６　スペーサ
６ａ　切り欠き部
７　キャビティ
８　カバー
９　空気孔
１０、１１、１２　リード部

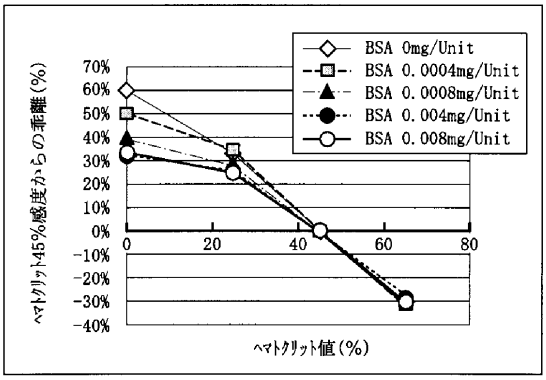
【図１】


BSA 0mg/Unit
BSA 0.00007mg/Unit
BSA 0.0035mg/Unit
ヘマトクリット45%感度からの乖離(%)
ヘマトクリット値(%)

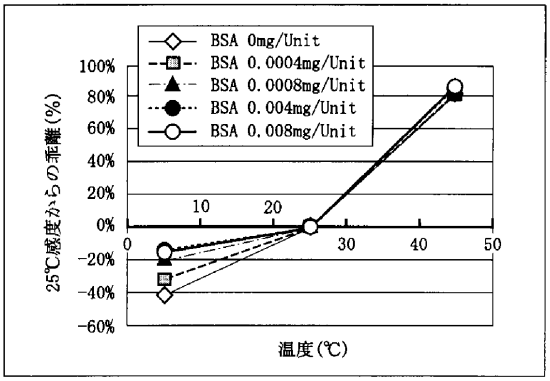
【図２】


BSA 0mg/Unit
BSA 0.00007mg/Unit
BSA 0.0035mg/Unit
25℃感度からの乖離(%)
温度(℃)

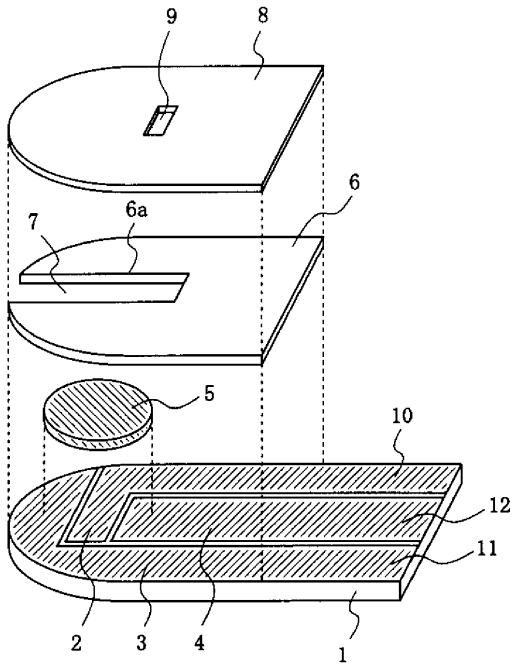
【図３】


BSA 0mg/Unit
BSA 0.0004mg/Unit
BSA 0.0008mg/Unit
BSA 0.004mg/Unit
BSA 0.008mg/Unit
ヘマトクリット45%感度からの乖離(%)
ヘマトクリット値(%)

【図４】


BSA 0mg/Unit
BSA 0.0004mg/Unit
BSA 0.0008mg/Unit
BSA 0.004mg/Unit
BSA 0.008mg/Unit
25℃感度からの乖離(%)
温度(℃)

【図５】


9
8
6
6a
7
5
10
12
11
2
3
4
1

フロントページの続き

(72)発明者　伊藤　佳洋
愛媛県東温市南方２１３１番地１　パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内

審査官　柏木　一浩

(56)参考文献　国際公開第２００４／０５８９５８（WO，Ａ１）
再公表特許第０１／０２５７７６（ＪＰ，Ａ１）
国際公開第２００５／０５４８４０（WO，Ａ１）
特開２００６－０１７７２０（ＪＰ，Ａ）
特開２００３－２７９５２５（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　２７／３２７
Ｇ０１Ｎ　２７／４１６