

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4839219号
(P4839219)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

F 1

G01N 27/30 353R
G01N 27/30 353S
G01N 27/30 353Z

請求項の数 29 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2006-536885 (P2006-536885)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月22日 (2004.10.22)
 (65) 公表番号 特表2007-509355 (P2007-509355A)
 (43) 公表日 平成19年4月12日 (2007.4.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2004/035286
 (87) 國際公開番号 WO2005/040407
 (87) 國際公開日 平成17年5月6日 (2005.5.6)
 審査請求日 平成19年10月18日 (2007.10.18)
 (31) 優先権主張番号 60/513,817
 (32) 優先日 平成15年10月24日 (2003.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503085274
 バイエル・ヘルスケア・エルエルシー
 Bay e r H e a l t h c a r e , L L
 C
 アメリカ合衆国、ニューヨーク 1059
 1、タリータウン、ホワイト・プレインズ
 ・ロード 555
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄
 (72) 発明者 ウ、ホアンーピン
 アメリカ合衆国、インディアナ 4653
 0、グレンジャー、ショアライン・ドライ
 ブ 14374

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酵素的電気化学的バイオセンサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ベースと、

ベース上の第一の電極と、

基質の酸化還元反応を促進することができる酸化還元酵素及び媒介物を含み、第一の可溶性レドックス種を実質的に除外する、第一の電極上の第一の試薬層と、

ベース上の第二の電極と、

媒介物とは異なり、媒介物のレドックス反応を起こすことができる第一の可溶性レドックス種を含み、媒介物及び酸化還元酵素を実質的に除外する、第二の電極上の第二の試薬層と、

を含み、

第二の試薬層が、媒介物とは反対のレドックス反応を起こすことができる第一の可溶性レドックス種と第二のレドックス種を含むレドックス対の種である、電気化学的センサストリップ。

【請求項2】

媒介物が、第二の試薬層に存在せず、第一の可溶性レドックス種が、第一の試薬層に存在しない、請求項1記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項3】

第一の試薬層の媒介物が、電気活性有機分子を含み、第一の可溶性レドックス種が、有機遷移金属錯体、遷移金属配位錯体及びそれらの混合物からなる群より選択される、請求

項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 4】

第一の可溶性レドックス種と第二のレドックス種とのモル比が 1 . 2 : 1 よりも大きい、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 5】

第一の可溶性レドックス種と第二のレドックス種とのモル比が 2 : 1 よりも大きい、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 6】

第一の可溶性レドックス種と第二のレドックス種とのモル比が約 10 : 1 よりも大きい、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

10

【請求項 7】

第二のレドックス種が、1000 分の 1 未満の量で存在する、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 8】

第一の可溶性レドックス種が +0 . 24 ボルト以上の標準還元電位を有する、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 9】

第一の可溶性レドックス種が +0 . 35 ボルト以上の標準還元電位を有する、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 10】

20

第一の試薬層が第二のレドックス種をさらに含む、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 11】

第一の可溶性レドックス種が、ルテニウム (II) ヘキサアミン、ルテニウム (III) ヘキサアミン、フェロシアン化物、フェリシアン化物及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 12】

電気活性有機分子が、補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ)、置換ベンゾキノン類、置換ナフトキノン類、N - オキシド類、ニトロソ化合物、ヒドロキシリアルアミン類、オキシン類、フラビン類、フェナジン類、フェノチアジン類、インドフェノール類、インダミン類、フェナジニウム塩、フェノキサジニウム塩、3 - フェニルイミノ - 3H - フェノチアジン類、3 - フェニルイミノ - 3H - フェノキサジン類及びそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 3 記載の電気化学的センサストリップ。

30

【請求項 13】

電気活性有機分子が、3 - フェニルイミノ - 3H - フェノチアジン、3 - フェニルイミノ - 3H - フェノキサジン及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 3 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 14】

酸化還元酵素が、オキシダーゼ及びデヒドログナーゼからなる群より選択される酵素を含み、第一の可溶性レドックス種が還元性種である、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

40

【請求項 15】

酸化還元酵素がレダクターゼを含み、第一の可溶性レドックス種が酸化性種である、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 16】

ベース上の第三の電極及び第三の電極上の第三の試薬層をさらに含み、第三の試薬層が第三の可溶性レドックス種を含む、請求項 1 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 17】

第三の可溶性レドックス種が、実質的に第一の可溶性レドックス種と同一である、請求項 16 記載の電気化学的センサストリップ。

50

【請求項 18】

第二の電極の作動電圧が、第三の電極の作動電圧とは異なる、請求項 16 記載の電気化学的センサストリップ。

【請求項 19】

請求項 1 記載の電気化学的センサストリップを製造する方法であって、
第一の電極を、ベース上に付着させる工程と、
第二の電極を、ベース上に付着させる工程と、
第一の試薬層を、第一の電極上に適用する工程と、
第二の試薬層を、第二の電極上に適用する工程と、
を含む方法。

10

【請求項 20】

付着が、導電性炭素のパターンをスクリーン印刷することを含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

試料中の分析対象物を定量する方法であって、
第一の電極及び第一の電極上の第一の試薬層を含み、第一の試薬層が電気活性有機分子と基質のレドックス反応を促進することができる酸化還元酵素とを含むものであり、さらに第二の電極及び第二の電極上の第二の試薬層を含み、第二の試薬層が有機遷移金属錯体、遷移金属配位錯体及びそれらの混合物からなる群より選択される、基質とは反対のレドックス反応を行うことができる可溶性レドックス種を含むものであり、第一の試薬層が可溶性レドックス種を実質的に除外し、第二の試薬層が電気活性有機分子及び酸化還元酵素を実質的に除外する、電気化学的センサストリップに、試料を接触させる工程と、

20

第一の電極と第二の電極との間に電位を印加する工程と、
第一及び第二の電極ならびに試料を通過する電流を計測する工程と、
電流を分析対象物の濃度と相關させる工程と
を含む方法。

【請求項 22】

分析対象物が酸化還元酵素の基質である、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

分析対象物が酸化還元酵素の補因子である、請求項 21 記載の方法。

30

【請求項 24】

酸化還元酵素が、オキシダーゼ及びデヒドロゲナーゼからなる群より選択される酵素を含み、可溶性レドックス種が還元性種である、請求項 21 記載の方法。

【請求項 25】

可溶性レドックス種が、フェリシアン化物及びルテニウム(III)ヘキサアミンからなる群より選択される、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

酸化還元酵素がレダクターゼを含み、可溶性レドックス種が酸化性種である、請求項 21 記載の方法。

【請求項 27】

電気活性有機分子が、3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン、3-フェニルイミノ-3H-フェノキサジン及びそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 21 記載の方法。

40

【請求項 28】

電気化学的センサストリップが、可溶性レドックス種を含む第三の電極をさらに含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 29】

第三の電極が第三の電極と第一の電極との間の第二の電位を計測し、計測された第二の電位を使用して第一の電極と第二の電極との間の電位を調節する、請求項 28 記載の方法。
。

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****背景**

医学的状態及び医学的状態を治療する努力に対する患者の応答をモニタする場合には、迅速かつ正確で患者にとって簡便な分析法を使用することが望ましい。体液、特に血液試料中の特定の分析対象物を定量するためには電気化学的方法が有用であった。通常、そのような分析対象物は、特定の酵素と接触すると酸化還元反応を起こし、そのような反応によって発生する電流を分析対象物の濃度と相關させることができる。患者が、健康管理提供者又は臨床技術者を要することなく、特定の分析対象物のレベルを自らモニタすることを可能にする分析用電気化学的セルの小型版が開発されている。典型的な患者操作式電気化学的センサは、必要な回路及び出力系を収容する1個の計測ユニットを使用する。使用中、このユニットは、使い捨て分析ストリップであって、電極及びそのストリップに塗布される試料の電気化学的性質を計測するために必要な試薬を収容するストリップに接続される。これらの小型電気化学的系のもっとも一般的なものは、血糖値の計測を提供するグルコースセンサである。理想的には、グルコース用の小型センサは、血液1滴、通常は1~15マイクロリットル(μL)を分析することによって正確な血糖値の読みを提供すべきである。

10

【0002】

典型的な分析用電気化学的セルでは、系のサイズにかかわらず、分析対象物を伴う酸化又は還元の半電池反応が電子を生成又は消費する。電子が、分析される試料と接触する作用電極と相互作用することができるならば、その電子の流れを計測することができる。電気回路は、同じく試料と接触する対電極を介して完成する。また、対電極では化学反応が起こり、この反応は、作用電極での反応に対して反対のタイプ(酸化又は還元)の反応である。たとえば、Fundamentals Of Analytical Chemistry, 4th Edition, D. A. Skoog and D. M. West; Philadelphia: Saunders College Publishing (1982), pp 304-341を参考すること。

20

【0003】

診断に使用される一部の従来式小型電気化学的系では、統合型の対/参照電極が使用されている。このタイプの統合型電極は、参照電極材料がその不溶性によって分析溶液の反応成分から分離されている場合に可能である。対/参照電極は通常、分析溶液の水性環境でのその成分の不溶性のために安定な電気化学的性質を示す、銀(Ag)と塩化銀(AgCl)との混合物である。使用中にAgとAgClとの比は有意に変化しないため、電極の電気化学的性質も同じく有意には変化しない。

30

【0004】

Ag/AgCl電極は、参照電極としては良好に機能するが、対電極としてのその機能においては理想的とはいえない。Ag/AgCl材料は抵抗率が高く、それが電流を運ぶその能力を阻害する。したがって、センサを作動させるために高い電圧及び/又は電流レベルが必要になりうる。小型電気化学的分析ストリップでは、小さな不確かさ及び変動が計測感度を劇的に低下させるおそれがあるため、これは特に問題になる。分析対象物の反応によって発生する高い電流が対電極によって妨げられるならば、高濃度の分析対象物を含有する試料について誤った結果が生ずるおそれがある。

40

【0005】

一部の従来式小型電気化学的ストリップのもう一つの特徴は、作用電極及び対電極の両方にかぶさる一つの試薬層の存在である。この試薬層の成分は、分析対象物の酸化還元反応を促進する酵素及び酸化還元反応と作用電極との間の電子移動を助長する何らかの媒介物又は他の物質を含む。一つの試薬層の使用は、一つの付着工程だけで電極を材料で被覆することができるため、ストリップの簡単な製造を提供することができる。1層構造の欠点は、装置の使用時に、各電極が同じ環境と接触するということである。したがって、電極機能にとって最適な条件を提供するように各電極の個々の環境を制御することができない。

50

い。この最適化の欠如もまた、系の感度を低下させるおそれがある。

【0006】

患者の試料中の分析対象物の濃度に対する感度が改善された小型電気化学的系が要望される。小型電気化学的ストリップが、高い導電性を有する独立して最適化された電極を含むことが望ましい。

【0007】

概要

本発明の一つの態様で、ベースと、ベース上の第一の電極と、ベース上の第二の電極と、第一の電極上の酸化還元酵素及び媒介物と、第二の電極上の可溶性レドックス種とを含む電気化学的センサストリップが得られる。

10

【0008】

本発明のもう一つの態様で、ベースと、ベース上の第一の電極と、ベース上の第二の電極と、第一の電極上の、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ又はそれらの混合物である酵素と、第一の電極上の媒介物と、第二の電極上の可溶性レドックス種とを含む電気化学的センサストリップが得られる。可溶性レドックス種は、好ましくは、有機遷移金属錯体、遷移金属配位錯体又はそれらの混合物である。

【0009】

本発明のさらに別の態様で、電気化学的センサストリップを製造する方法であって、第一の電極をベース上に付着させることと、第二の電極を前記ベース上に付着させることと、酸化還元酵素及び媒介物を含むものである第一の層を第一の電極に被着させることと、可溶性レドックス種を含むものである第二の層を第二の電極に被着させることとを含む方法が得られる。

20

【0010】

本発明のさらに別の態様で、試料中の分析対象物を定量する方法であって、試料を、第一の電極及び第一の電極上の第一の層を含み、第一の層が酸化還元酵素及び媒介物を含むものであり、さらに第二の電極及び第二の電極上の第二の層を含み、第二の層が可溶性レドックス種を含むものである電気化学的センサストリップと接触させることと、第一の電極と第二の電極との間に電位を印加することと、第一及び第二の電極ならびに試料を通過する電流を計測することと、電流を分析対象物の濃度と相關させることとを含む方法が得られる。

30

【0011】

詳細な説明

本発明は、試料中の物質の存在又は量を測定するための電気化学的バイオセンサに関する。バイオセンサは、それぞれが少なくとも部分的に別々の試薬層で覆われている作用電極及び対電極を含むセンサストリップを含む。作用電極上の試薬層は、酸化還元反応を介して分析対象物と相互作用する酵素を含み、さらに媒介物を含む。対電極上の試薬層は、分析対象物との反応に対して反対のタイプの酸化還元反応を起こすことができる可溶性レドックス種を含む。可溶性レドックス種は、好ましくは、対電極試薬層中、その対応物種のモル量よりも多いモル量で存在し、レドックス種とその対応物種とはいっしょになってレドックス対である。本発明のセンサは、精度、分析の範囲及び貯蔵寿命の改善を提供することができる。

40

【0012】

用語「試料」は、未知の量の分析対象物を含有する組成物と定義される。通常、電気化学的分析の試料は液体形態であり、好ましくは、試料は水性混合物である。試料は、生物学的試料、たとえば血液、尿又は唾液であってもよい。試料は、生物学的試料に由来するもの、たとえば抽出物、希釀物、ろ液又は再構成沈殿物であってもよい。

【0013】

用語「分析対象物」は、その存在又は量が測定される、試料中の物質と定義される。分析対象物は、分析中に存在する酸化還元酵素と相互作用し、その酸化還元酵素の基質、補酵素又は酸化還元酵素とその基質との間の相互作用に影響する別の物質であることができ

50

る。

【0014】

用語「酸化還元酵素」は、基質の酸化又は還元を促進する酵素と定義される。用語酸化還元酵素は、分子酸素が電子受容体である酸化反応を促進する「オキシダーゼ」、分析対象物が還元され、分子酸素が分析対象物ではない還元反応を促進する「レダクターゼ」及び分子酸素が電子受容体ではない酸化反応を促進する「デヒドロゲナーゼ」を包含する。たとえば、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition, A. D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997) pp. 161, 476, 477 and 560を参照すること。

【0015】

用語「酸化還元」反応は、二つの種の間の、一方の種から他方の種への少なくとも1個の電子の移動を伴う化学反応と定義される。このタイプの反応は「レドックス反応」とも呼ばれる。反応の酸化部分は、種の一方による少なくとも1個の電子の損失を伴い、還元部分は、他方の種への少なくとも1個の電子の付加を伴う。酸化される種のイオン電荷は、移動する電子の数に等しい量だけプラスを増す。同様に、還元される種のイオン電荷は、移動する電子の数に等しい量だけプラスを減らす。

【0016】

用語「酸化数」は、化学種、たとえば原子の形式イオン電荷と定義される。高めの酸化数、たとえば(III)はプラスがより大きく、低めの酸化数、たとえば(II)はプラスがより小さい。中性種はゼロのイオン電荷を有する。種の酸化は、その種の酸化数の増大を生じさせ、種の還元は、その種の酸化数の減少を生じさせる。

【0017】

用語「レドックス対」は、異なる酸化数を有する化学物質の二つの種と定義される。高い方の酸化数を有する種の還元が、低い方の酸化数を有する種を生成する。あるいはまた、低い方の酸化数を有する種の酸化が、高い方の酸化数を有する種を生成する。

【0018】

用語「酸化性種」は、レドックス対のうち、低い方の酸化数を有し、したがって、高い方の酸化数を有する種へと酸化されることができる種と定義される。同様に、用語「還元性種」は、レドックス対のうち、高い方の酸化数を有し、したがって、低い方の酸化数を有する種へと還元されることがある種と定義される。

【0019】

用語「可溶性レドックス種」は、酸化又は還元を受けることができ、水(pH 7、25°C)1リットルあたり少なくとも1.0グラムのレベルで可溶性である物質と定義される。可溶性レドックス種としては、電気活性有機分子、有機遷移金属錯体及び遷移金属配位錯体がある。用語「可溶性レドックス種」は、元素金属及び孤立金属イオン、特に水に不溶性又は難溶性であるものを除く。

【0020】

「OTM」錯体とも呼ばれる用語「有機遷移金属錯体」は、遷移金属が結合(遷移金属に結合した炭素原子で-1の形式電荷)又は結合(遷移金属に結合した炭素原子で0の形式電荷)を介して少なくとも1個の炭素原子に結合している錯体と定義される。たとえば、フェロセンは、2個のシクロペンタジエニル(Cp)環を有し、各環がその5個の炭素原子を介して2個の結合及び1個の結合によって鉄中心に結合しているOTM錯体である。OTM錯体のもう一つの例は、6個のシアノ配位子(6個の配位子それぞれ-1の形式電荷)がシアノ基の炭素原子を介して鉄中心に結合しているフェリシアノ化物(III)及びその還元フェロシアノ化物(II)対応物である。

【0021】

用語「配位錯体」は、明確に画定された配位形状、たとえば八面体又は正方形平面形状を有する錯体と定義される。結合によって定義されるOTM錯体とは違い、配位錯体はその形状によって定義される。したがって、配位錯体は、OTM錯体(たとえば前述のフェリシアノ化物)であることもできるし、炭素以外の非金属原子、たとえば窒素、硫黄、酸

10

20

30

40

50

素及びリンをはじめとするヘテロ原子が遷移金属中心に供与結合している錯体であることもできる。たとえば、ルテニウムヘキサアミンは、6個のNH₃配位子（6個の配位子それぞれで0の形式電荷）がルテニウム中心に供与結合している、明確に画定された八面体形状を有する配位錯体である。有機遷移金属錯体、配位錯体及び遷移金属結合のより完全な論述は、CollmanらのPrinciples and Applications of Organotransition Metal Chemistry (1987)及びMiessler & TarrのInorganic Chemistry (1991)に見いだすことができる。

【0022】

用語「媒介物」は、酸化又は還元されることができ、第一の物質と第二の物質との間で1個以上の電子を移動させることができる物質と定義される。媒介物は、電気化学的分析における試薬であり、分析対象物ではない。きわめて単純な系では、媒介物は、酸化還元酵素が適切な基質との接触によって還元又は酸化されたのち、酸化還元酵素とレドックス反応を起こす。そして、この酸化又は還元された媒介物は、電極で反対の反応を起こし、その元の酸化数まで再生される。10

【0023】

用語「電気活性有機分子」は、金属を含有せず、酸化又は還元反応を起こすことができる有機分子と定義される。電気活性有機分子は、レドックス種として挙動することができるし、媒介物として挙動することもできる。電気活性有機分子の例は、補酵素ピロロキノリンキノン（PQQ）、ベンゾキノン類及びナフトキノン類、N-オキシド類、ニトロソ化合物、ヒドロキシルアミン類、オキシン類、フラビン類、フェナジン類、フェノチアジン類、インドフェノール類及びインダミン類を含む。20

【0024】

用語「電極」は、電気化学的分析の間、固定状態にとどまる導電性物質と定義される。電極材料の例は、固体金属、金属ペースト、導電性炭素、導電性炭素ペースト及び導電性ポリマーを含む。

【0025】

用語「非イオン化材料」は、分析対象物の電気化学的分析の間にイオン化しない材料と定義される。非イオン化材料の例は、炭素、金、白金及びパラジウムを含む。

【0026】

用語「上」は、「上方」と定義され、記載されている方向に相対的である。たとえば、第一の要素が第二の要素の少なくとも一部に付着しているならば、第一の要素は、第二の要素の「上に付着している」といわれる。もう一つの例では、第一の要素が第二の要素の少なくとも一部の上方に存在するならば、第一の要素は、第二の要素の「上」にあるといわれる。用語「上」の使用は、記載されている上下の要素の間の物質の存在を排除しない。たとえば、第一の要素がその上面に被覆を有してもよく、その場合でも、第一の要素及びその上面被覆の少なくとも一部の上方の第二の要素は、第一の要素の「上」にあると記載することができる。したがって、用語「上」の使用は、関連する二つの要素が互いに物理的に接觸していることを意味してもよいし、それを意味しなくてもよい。30

【0027】

電気化学的分析センサは、多様な方法で、多様な材料を使用して造ることができる。たとえば、いずれも引用例として本明細書に取り込む米国特許第5,120,420号及び第5,798,031号を参照すること。図1～3及び12～15を参照すると、一般に、電極材料がベース材料10の上に付着している。ベース材料は、好ましくは、電気化学的系をその周囲から絶縁するために、絶縁体である。電極材料は、たとえば導体12及び14を介して外部回路に接続するように構成することができる。これらの接続が、センサの電気化学的応答をモニタ及び/又は操作することを可能にする。好ましくは、電極材料及びセンサ全体が、既存の電気分析用計測装置と適合性であるように構成されている。加えて、電極材料は、分析される試料との接觸を提供するように構成されている。各電極は、適切な分析試薬を含有する材料の層で被覆されている。作用電極20は、酸化還元酵素及び媒介物を含有する第一の層26で被覆されている。対電極30は、可溶性レドックス

40

50

種を含有する第二の層 3 6 で被覆されている。電極は、電極のうち、試薬層と接触する部分を、電極を外部回路に接続する部分から絶縁するため、誘電体層 4 0 、たとえば絶縁性ポリマーによって部分的に覆われてもよい。この誘電体層は、存在する場合、電極を適切な試薬層で被覆する前、最中又はその後に付着させることができる。そして、アセンブリ全体が少なくとも部分的にふた 5 0 で覆われる。好ましくは、試料を付着させ、分析するための空間を提供するため、ふたは、試薬層を覆うが、試薬層と接触はしない。任意の第三の電極 7 0 は、可溶性レドックス種を含有する第三の層 7 6 で被覆されている。任意の第三の電極は、導体 1 3 を介して外部回路と接続するように構成されていてもよい。

【 0 0 2 8 】

各電極は、金属、導電性ポリマー及び導電性炭素をはじめとする導電性物質を含有することができる。導電性材料の例は、金属、たとえば金、銀、白金、パラジウム、銅又はタンクステンの薄い層及び導電性炭素粉末の薄い層を含む。好ましくは、センサの使用中に試料と接触する電極は、分析中に正味の酸化又は正味の還元を受けないよう、不活性材料でできている。より好ましくは、センサの使用中に試料と接触する電極は、非イオン化材料、たとえば炭素、金、白金及びパラジウムでできている。場合によっては、銀のようなイオン化材料は、センサの使用中に系の計測電流又は電位に悪影響を及ぼしかねないレドックス種を形成するおそれがある。

【 0 0 2 9 】

金属は、金属箔の付着、化学蒸着又は金属のスラリーの付着によってベース材料に付着させることができる。導電性炭素は、たとえば、炭素含有材料の熱分解又は炭素粉末のスラリーの付着によって付着させることができる。スラリーは、2種以上の導電性材料を含有することができる。たとえば、スラリーは、パラジウム及び炭素粉末を含有することができる。スラリー付着の場合、米国特許第 5 , 7 9 8 , 0 3 1 号に記載のようにして、液体混合物をインクとしてベース材料に塗布することができる。

【 0 0 3 0 】

図 2 に示す例は、それぞれが主導体 2 2 又は 3 2 及び任意の表面導体 2 4 又は 3 4 を含む作用電極 2 0 及び対電極 3 0 を示す。所与の電極系の構成要素の配置及び数は、試料が分析されているときに起こる電気化学反応に対する電極の電気的応答を最適化するために広く変化させることができる。主導体 (2 2 又は 3 2) が一つの導電性物質の部分の一端であり、接続する導体 (1 2 又は 1 4) がその部分の他端にあることが望ましいことがある。そして、任意の表面導体は、電気化学的シグナルを、導電性物質を介して計測ユニットに伝達される (すなわち、2 2 から 1 2 に流れる) 固体電子流に変換するように機能することができる。一例では、主導体 2 2 及び 3 2 は、接続導体 1 2 及び 1 4 と隣接する金属箔のピースであり、表面導体 2 4 及び 3 4 は、導電性炭素粉末の層である。

【 0 0 3 1 】

図 1 5 に示す例は、それぞれが主導体 3 2 又は 7 2 及び任意の表面導体 3 4 又は 7 4 を含む対電極 3 0 及び第三の電極 7 0 を示す。第三の電極構成要素もまた、センサの全体性能を最適化するために変化させることができる。主導体 7 2 が一つの導電性物質の部分の一端であり、接続導体 1 3 がその部分の他端にあることが望ましいことがある。一例では、主導体 7 2 は、接続導体 1 3 と隣接する金属箔のピースである。任意の表面導体 7 4 は、たとえば、導電性炭素粉末の層である。可溶性レドックス種を含有する第三の層 7 6 は、第二の層 3 6 の組成とは異なる組成を有するものでもよいし、第二の層と第三の層とが同一であってもよい。一例では、第三の層は、導体 3 2 (及び場合によっては 3 4) ならびに 7 2 (及び場合によっては 7 4) を覆うように構成されている第二の層の一部である。

【 0 0 3 2 】

電極が表面電極を含むならば、表面電極は、非イオン化導電性材料であることが好ましい。電極が、その表面に別個の導電層を有しない単なる導電性材料の層であるならば、導電性材料は、非イオン化性であることが好ましい。より好ましくは、主導体とは別個の層であってもよいし、別個の層でなくてもよい対電極の表面は、非イオン化材料である。

10

20

30

40

50

【0033】

作用電極の試薬層と対電極の試薬層とは、互いに異なる組成を有する。この区別が、試薬層を別個に最適化して、改善された電気化学的分析性を有するセンサストリップを提供することを可能にする。作用電極上の層は、分析対象物の反応ならびにその反応の結果の電極及び接続された回路への伝達を促進する成分を含有することができる。対電極上の層は、分析される試料と電極及びその接続された回路との間の電子の自由な流れを促進する成分を含有することができる。系をさらに最適化するため、第三の電極が、分析される試料と電極及びその接続された回路との間の電子の自由な流れを促進する成分を含有する層を有してもよい。各層は、電気化学的セルにおける酸化還元反応に直接的には関与しない不活性成分を独立して含有してもよい。そのような不活性成分の例は、結合剤、たとえばベントーン (bentone)、ポリエチレンオキシド又はカルボキシメチルセルロース、増粘剤、たとえばシリカ又はポリエチレンオキシド及び1種以上の緩衝剤を含む。

【0034】

作用電極上の層は、好ましくは、酸化還元酵素を含有する。酸化還元酵素は、分析対象物である基質に特異的であってもよい。酸化還元酵素は、酸化還元酵素とその基質との反応が分析対象物の存在又は量によって影響されるような基質に特異的であってもよい。酸化還元酵素及びそれらの特異的基質の例を表Iに示す。たとえば、アルコールオキシダーゼを試薬層に使用すると、試料中のアルコールの存在に感度を示すセンサを提供することができる。そのような系は、血中アルコール濃度を計測するのに有用でありうる。もう一つの例では、グルコースデヒドロゲナーゼ又はグルコースオキシダーゼを試薬層に使用すると、試料中のグルコースの存在に感度を示すセンサを提供することができる。この系は、たとえば糖尿病であることがわかっている、又はその疑いのある患者の血糖濃度を計測するのに有用でありうる。二つの異なる物質の濃度が既知の関係によってリンクされるならば、物質の一方の、酸化還元酵素とのその相互作用による計測が、他方の物質の濃度の計算を提供することができる。たとえば、酸化還元酵素が、特定の基質に感度を示すセンサを提供することができると、この基質の計測濃度を使用して分析対象物の濃度を計算することができる。

【0035】

【表1】

表1

酸化還元酵素（試薬層）	基質／分析対象物
グルコースデヒドロゲナーゼ	β グルコース
グルコースオキシダーゼ	β グルコース
コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ	コレステロール
リポタンパク質リパーゼ、グリセリンキナーゼ、グリセリン3-リン酸オキシダーゼ	トリグリセリド
乳酸オキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ	乳酸
ピルビン酸オキシダーゼ	ピルビン酸
アルコールオキシダーゼ	アルコール
ビリルビンオキシダーゼ	ビリルビン
ウリカーゼ	尿酸
グルタチオン還元酵素	NAD (P) H
一酸化炭素酸化還元酵素	一酸化炭素

10

20

30

40

50

【0036】

作用電極上の層は、1種以上の媒介物質を含有することができる。媒介物の存在は、酵素によって促進されたレドックス反応から電極材料への電気シグナルの伝達を増強することができる。解釈の理論によって拘束されることを望まないが、媒介物は、初期酵素反応におけるレドックス補因子として作用することもできるし、反応が起こった後で酵素もしくは他の種から電子を受容する、又は酵素もしくは他の種に電子を供与するためのレドックスコレクタとして作用することもできる。レドックス補因子の状況では、媒介物は、基質のレドックス反応を均衡させる種であると考えられている。したがって、基質が還元されるならば、媒介物は酸化される。レドックスコレクタの状況では、別の種が最初に酸化又は還元されて基質のレドックス反応を均衡させていることがある。この種は、酸化還元酵素そのものであってもよいし、別の種、たとえばレドックス補因子であってもよい。

10

【0037】

酵素的電気化学的セル中の媒介物は、たとえば、引用例として本明細書に取り込む米国特許第5,653,863号に記載されている。場合によっては、媒介物は、酸化還元酵素を再生するように機能することができる。たとえば、酵素が基質を酸化させるならば、酵素そのものは還元される。酵素と媒介物との相互作用は、媒介物の還元とともに、酵素のその元の非反応状態への酸化を生じさせることができる。適切な電位での媒介物と電極との相互作用は、電極への1個以上の電子の放出とともに、媒介物のその元の非反応状態への酸化を生じさせることができる。

20

【0038】

媒介物の例は、フェロセン化合物、たとえば1,1'-ジメチルフェロセンならびに米国特許第5,653,863号に記載されている錯体、たとえばフェロシアン化物及びフェリシアン化物をはじめとするOTM及び配位錯体を含む。また、媒介物の例は、補酵素、たとえば補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)、引用例として本明細書に取り込む米国特許第4,746,607号に開示されている置換ベンゾキノン類及びナフトキノン類、引用例として本明細書に取り込むEP0354441に具体的に開示されているN-オキシド類、ニトロソ化合物、ヒドロキシリルアミン類及びオキシン類、引用例として本明細書に取り込むEP0330517に開示されているフラビン類、フェナジン類、フェノチアジン類、インドフェノール類、置換1,4-ベンゾキノン類及びインダミン類ならびに引用例として本明細書に取り込む米国特許第3,791,988号に開示されているフェナジニウム塩及びフェノキサジニウム塩をはじめとする電気活性有機分子を含む。生物学的レドックス系の電気化学的媒介物の考察は、Analytica Clinica Acta. 140 (1982), pages 1-18に見いだすことができる。電気活性有機分子媒介物の例はまた、引用例として本明細書に取り込む米国特許第5,520,786号に記載されているもの、たとえば3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン(PIPT)及び3-フェニルイミノ-3H-フェノキサジン(PIPO)を含む。

30

【0039】

対電極上の試薬層は可溶性レドックス種を含有する。可溶性レドックス種は、酸化還元酵素の基質の反応に対して反対の反応を起こし、その際、レドックス対のその対応物種へと転換される。たとえば、分析対象物が還元されるならば、可溶性レドックス種は酸化され、分析対象物が酸化されるならば、可溶性レドックス種は還元される。レドックス対の対応物種は、層中に存在することができるが、好ましくは、主レドックス種の濃度よりも低い濃度で存在する。より好ましくは、対電極上の試薬層中のレドックス種は、排他的に、酸化還元酵素の基質の反応に対して反対の反応を起こす可溶性レドックス種である。

40

【0040】

可溶性レドックス種は、電気活性有機分子であってもよいし、有機遷移金属錯体であってもよいし、遷移金属配位錯体であってもよいし、これらのいずれかの混合物であってもよい。たとえば、補酵素ピロロキノリンキノン(PQQ)、置換ベンゾキノン類及びナフトキノン類、N-オキシド類、ニトロソ化合物、ヒドロキシリルアミン類、オキシン類、フラビン類、フェナジン類、フェノチアジン類、インドフェノール類、インダミン類、フェ

50

ナジニウム塩及びフェノキサジニウム塩のような有機分子それぞれが可溶性レドックス種であることができる。

【0041】

可溶性レドックス種は、有機遷移金属錯体又は遷移金属配位錯体であることができる。多くの遷移金属は、水素、酸素、硫黄又は他の遷移金属との化合物として天然に存在し、これらの遷移金属は一般に一つ以上の酸化状態で見られる。たとえば、鉄、クロム及びコバルトは通常、+2（すなわちII）又は+3（すなわちIII）の酸化状態で見いだされる。したがって、鉄（II）及び鉄（III）は、一つのレドックス対の二つの種である。しかし、多くの元素金属又は金属イオンは水性環境に難溶性であり、電気化学的分析系における酸化還元反応を均衡させる際のレドックス種としての用途が制限される。配位子に結合又は配位した金属イオンは、これらの配位子との会合によってより可溶性にすることができる。通常、有機遷移金属錯体又は遷移金属範囲錯体中の金属は、その錯体中の実際に還元又は酸化される部分である。たとえば、フェロセン [$\text{Fe}(\text{II})(\text{C}_5\text{H}_6)_2$] 及びフェロシアン化物イオン [$\text{Fe}(\text{II})(\text{CN})_6$]⁴⁻ 中の鉄中心は+2形式酸化状態にあり、フェリシアン化物イオン [$\text{Fe}(\text{III})(\text{CN})_6$]³⁻ は鉄をその+3形式酸化状態で含有する。フェロシアン化物とフェリシアン化物とがいっしょになってレドックス対を形成し、作用電極上で使用される酸化還元酵素のタイプに依存して、いずれか一方が対電極上の試薬層中の可溶性レドックス種として機能することができる。遷移金属配位錯体を含有するレドックス対の例は、二つのルテニウムヘキサアミン種 [$\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6$]³⁺ 及び [$\text{Ru}(\text{II})(\text{NH}_3)_6$]²⁺ の組み合わせである。

10

【0042】

第一の種と呼ばれる、対電極上の試薬層中に存在するレドックス対の種は、好ましくは、同じレドックス対のその対応物種（すなわち第二の種）よりも大きなモル量で存在する。好ましくは、第一の種と第二の種とのモル比は少なくとも1.2:1である。より好ましくは、第一の種と第二の種とのモル比は少なくとも2:1である。さらに好ましくは、第一の種と第二の種とのモル比は少なくとも10:1である。さらに好ましくは、第一の種と第二の種とのモル比は少なくとも100:1である。さらに好ましくは、レドックス対の第二の種は、分析におけるセンサストリップの使用前で1ppt（1000分の1）以下の量で存在する。さらに好ましくは、レドックス対の第二の種は、分析におけるセンサストリップの使用前で1ppm（100万分の1）以下の量で存在する。

30

【0043】

好ましくは、可溶性レドックス種は、試料中に可溶化され、分析対象物及び他の試料成分と混合する。可溶性レドックス種は時間とともに酵素及び媒介物と混合するが、これは、分析の過程で計測可能な程度には起こらないといえる。可溶性レドックス種は、機械的バリヤによって液体試料から分離されているわけでもなく、液体試料とは異なる別個の相で存在しているために液体試料から分離しているわけでもない。

【0044】

もう一つ的好ましい実施態様では、標準水素電極（SHE）に対して+0.24ボルト以上の標準還元電位を有する可溶性レドックス種が選択される。さらに別の好ましい実施態様では、SHEに対して+0.35ボルト以上の標準還元電位を有する可溶性レドックス種が選択される。さらに別の好ましい実施態様では、SHEに対して約+0.48ボルトの還元電位を有する可溶性レドックス種（0.01M HCl中）が選択される。

40

【0045】

したがって、酸化還元酵素、媒介物及び可溶性レドックス種の多様な組み合わせを使用して電気化学的分析センサを調製することができる。レドックス対中の対応物種に対して高い又は低い酸化数を有する可溶性レドックス種の使用は、作用電極で実施される反応のタイプによって指示される。一例では、分析対象物は、オキシダーゼ又はデヒドロゲナーゼとの相互作用によって酸化を受ける。この場合、対電極上のより高濃度のレドックス種がより高い酸化数を有する。この状況の具体例は、グルコースオキシダーゼ又はグルコースデヒドロゲナーゼを使用するグルコースの分析である。もう一つの例では、分析対象物

50

は、レダクターゼとの相互作用によって還元を受ける。この場合、対電極上のより高濃度のレドックス種がより低い酸化数を有する。これらの例のいずれでも、媒介物は、対電極上のより高濃度のレドックス種と同じ物質であってもよいし、別のレドックス対のレドックス種であってもよい。

【0046】

第三の電極がセンサ中に存在する場合、それはまた、対電極試薬層に関して記載した可溶性レドックス種を含有する試薬層を含む。好ましくは、第三の電極試薬層は対電極試薬層と同一である。第三の電極上の試薬層と対電極上の試薬層とが同一である場合、両方の電極を試薬層組成物の一つの部分で単に被覆することが望ましいかもしれない。

【0047】

電気化学的センサを使用して、作用電極上の酸化還元酵素の基質である分析対象物又は酸化還元酵素とその基質との反応に影響する分析対象物の量を計測することができる。患者によって操作されることになっているセンサの場合、試料は、患者からの少量の体液であることが望ましい。希釀、試薬もしくは他の物質の添加又はろ過もしくは他の試料の精製方法の必要なして試料を直接分析することが望ましい。容易に得ることができる体液の例は、血液、尿及び唾液を含む。図4を参照して、計測ユニットに接続するストリップの端部とは反対側のストリップの入力端60に設けられた開口に1滴の試料を付着させることにより、試料が電極に適用される。試料は、上のふたと下の作用電極及び対電極との間の区域に移動する。ふたが、液体試料を適用したときにストリップの中の空気を抜くための開口54を有することが好都合である。ふたとベースとの間の区域が、液体を保持し、試料及びその内容物を電極の周囲の区域に固定化する物質を含有してもよい。このような物質の例は、水膨潤性ポリマー、たとえばカルボキシメチルセルロース及びポリエチレングリコールならびに多孔質ポリマーマトリックス、たとえばデキストラン及びポリアクリルアミドを含む。

【0048】

試料が酸化還元酵素の基質を含有する場合、ひとたび試薬層と試料とが接触すると、基質と酵素との間のレドックス反応を開始することができる。このレドックス反応から発生又は消費される電子は、作用電極と対電極との間に電位（すなわち電圧）を印加し、電流を計測することによって測定することができる。電気化学的ストリップ系が既知の量の基質を含有する試料で較正されているならば、この電流を試料中の基質の濃度と相關させることができる。計測ユニットは、好ましくは、有用な情報、たとえば試料中の基質の濃度、患者体内の基質の濃度又は計測された基質に関連する別の物質の関連濃度を提供するために必要な回路及びマイクロプロセッサを含む。

【0049】

酸化還元酵素とその基質との反応によって発生又は消費される電子は、対電極によって閉回路が設けられると、計測可能な電流に変換される。対電極で起こる反応は、作用電極で起こる反応と反対である。したがって、対電極は、作用電極で起こるレドックス反応のタイプに依存して、試薬層の1種以上の成分の反応を通じて電子を試料に供与又は受容する。たとえば、作用電極で酸化が起こるならば、対電極では還元が起こる。

【0050】

電圧が印加されたのち所与の時間まで系中の電流の計測を遅らせることが望ましいことがある。試料内での電気化学反応の複雑な力学的性質のために、レドックス反応は、反応速度が1秒の何分の1から数分の期間安定化している「定常状態」に達しないことがある。この定常状態が達成される前又は達成された後の計測は、電流、ひいては分析対象物濃度の誤った計測を提供するおそれがある。好ましくは、電流計測は、試料の塗布の約20秒後に開始する。

【0051】

好ましくは、まず、試料の付着と同時又はその直後に電圧を系に印加する。初期の電圧印加を10秒間維持したのち停止し、10秒の遅延期間、電圧が印加されないようにする。この遅延時間ののち再び電圧を印加し、10秒の読み取り期間に電流をモニタする。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

第三の電極を含むセンサストリップの場合、印加された電圧は、第三の電極を介してモニタすることができる。電位の所期値におけるドリフトが第三の電極を介して回路へのフィードバックを提供して、電圧を適切に調節することができるようとする。

【 0 0 5 3 】

第三の電極の使用は、一部の用途において望ましいことがある。印加電圧における精度の増大が、分析対象物の計測においてより高い精度を提供することができる。また、第三の電極を使用する場合、対電極のサイズを減らしたり、より少量のレドックス種を対電極に被着させたりすることが可能となることがある。図14に示すように第三の電極が対電極の上流に位置するならば、「充填不足」と呼ばれる状況である、不十分な試料しかストリップに適用されていない場合を検出することが可能となることがある。充填不足検出は、作用電極と第三の電極との間に回路を完成するのに十分な試料があるが、対電極を覆うのには十分ではない場合に起こりうる。セル中の電流の欠如は、さらなる試料をストリップに加えるようユーザに指示するユーザへのシグナルへと電子的に変換することができる。
10

【 0 0 5 4 】

作用電極及び対電極のために別々に最適化された試薬層を含有する電気化学的センサストリップは、従来のセンサストリップに対して改善された性能を提供することができる。基質に対して反対のタイプの酸化還元反応を起こす対電極上のレドックス対の種は、通常に使用される1:1の比よりも大きなモル比で存在するべきである。この大きめのレドックス種のモル比は、分析に必要な期間中に作用電極の近くで起こる酸化還元反応に対して有意な干渉を生じさせない。また、高濃度のレドックス種は、対電極にとって比較的安定な電気化学的環境を提供する。レドックス種は消費される（すなわち、その対応物種に転換される）が、分析のタイムスケールで計測電流と分析対象物濃度との間に比較的一定の線形関係が存在するような十分な高さの濃度を維持する。
20

【 0 0 5 5 】

また、対電極上の可溶性レドックス種の大きなモル比は、センサストリップの貯蔵寿命を延ばすことができる。可溶性レドックス種からその対応物種への小さな程度の自然発生的転換が、ストリップの製造と試料を用いてのその使用との間に起こることがある。それでも、相対濃度は高いままであるため、センサは正確な結果を出すことができる。
30

【 0 0 5 6 】**実施例****実施例1 ベース上の電極対の調製**

米国特許第5,798,031号及び第5,120,420号に記載されている技術を使用して、絶縁材料のベース上に電極を形成した。図1を参照して、銀ペーストをスクリーン印刷によってポリカーボネートストリップ10に付着させた。このペーストをパターン12及び14に印刷して電気接点及び電極の下層を形成した。次に、図2を参照して、導電性炭素及び結合剤を含有するインクをスクリーン印刷によってパターン24及び34に塗布して各電極の上層を形成した。図3を参照して、アクリレート改質ポリウレタンを含有する誘電体層をベース及び電極の下層にパターン40に付着させたのち、UV線への露光によって硬化させた。
40

【 0 0 5 7 】**実施例2 対電極上に一つの可溶性レドックス種を有するセンサストリップ**

実施例1に記載したようにして調製したベース上の1対の電極を使用してセンサストリップを製造した。図2を参照して、電極の一方を、酵素グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を1マイクロリットルあたり20単位の補酵素PQQ、24mMの3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン(PIFT)、8mMのフェロシアン化物及び1%CMCポリマーと組み合わせた水性混合物26を電極に付着させることにより、作用電極にした。これらの成分は、pH7.4の100mMリン酸緩衝液に含有されていた。他方の電極は、pH7.4の100mMリン酸緩衝液中200mMのフェリシアン化物及び100mMのNaClの
50

水性混合物 3 6 を電極に付着させることにより、対電極にした。

【 0 0 5 8 】

図 4 を参照して、これらの水性混合物を乾燥させたのち、ベース、誘電体層及び被覆された電極をふた 5 0 に接合してセンサストリップを形成した。ふたの製造は、米国特許第 5 , 7 9 8 , 0 3 1 号に記載されているように実施した。水性ポリウレタン分散系の被覆溶液をポリカーボネートストリップの片側に塗布し、乾燥させた。エンボス加工によって凹部 5 2 を形成し、穴 5 4 を打ち抜くことにより、このストリップをふたに形成した。ふたとベースとを整合させ、接触させたのち、構造の周囲の接触区域に熱を加えることにより、ふたをベースに接合した。

【 0 0 5 9 】

図 5 を参照して、ふたによって覆う前に、電極構造を光学顕微鏡によってイメージングした。作用電極は左側の円であり、対電極は右側の円である。

【 0 0 6 0 】

実施例 3 対電極上にレドックス対の二つの種を有するセンサストリップ

対電極を形成するために付着させた混合物がフェリシアン化物 (1 0 0 mM) 及びフェロシアン化物 (1 0 0 mM) の両方を含有することを除き、実施例 2 のようにしてセンサストリップを造った。

【 0 0 6 1 】

実施例 4 センサストリップのサイクリックボルタントリー実験

実施例 2 ~ 3 のセンサストリップそれぞれをサイクリックボルタントリーによって分析した。ストリップを pH 7 . 4 の 1 0 0 mM リン酸緩衝液で再水和させた。各ストリップを、電圧源及び電流計測装置を含む分析装置に取り付けた。電圧を - 0 . 6 V にセットし、 + 0 . 6 V に上げ、 0 . 0 2 5 V / sec の速度で再び - 0 . 6 V に下げ、電圧サイクルを通して電流を計測した。各センサストリップに関して印加電圧の関数として電流を計測したサイクリックボルタモグラムのプロットを図 6 に示す。各サイクリックボルタモグラムは、 P I P T 媒介物の酸化のため、正電流でピーク（酸化ピーク）を示す。酸化ピークは、実施例 2 のストリップでは - 0 . 2 V 近くで起こり、実施例 3 のストリップでは - 0 . 1 5 V 近くで起こる。これらの酸化ピークは、最大電流応答を得るために特定のストリップを作動させるべきであるところの電位を示す。

【 0 0 6 2 】

実施例 5 センサストリップを使用するグルコースの定量

実施例 2 及び 3 のセンサストリップに関して、試料中のグルコース濃度の関数として発生する電流を研究した。pH 7 . 4 の 1 0 0 mM リン酸緩衝液中に所定の量のグルコースを含有する試料を、実施例 2 又は実施例 3 にしたがって製造した個々のセンサストリップに別々に適用した。 + 0 . 4 V の電位を電極対に 1 0 秒間印加したのち、 1 0 秒間電位を加えなかった。次に、 + 0 . 4 V の電位を再び 1 0 秒間印加し、この 1 0 秒の間に電流を計測した。図 7 は、この計測期間の総電流を実施例 2 及び実施例 3 の場合のグルコース濃度の関数としてプロットしたものである。

【 0 0 6 3 】

実施例 2 のセンサは、 1 デシリットルあたり 0 ~ 4 0 0 ミリグラム (mg/dL) のグルコース濃度について平均電流の線形の増大を示した。実施例 3 のセンサは、 0 ~ 2 0 0 mg/dL のグルコース濃度について平均電流の線形の増大を示した。したがって、線形応答の範囲は、レドックス対の酸化種、この場合はフェリシアン化物の量に依存する。電流応答の非線形性は、対電極におけるレドックス対の酸化種の欠乏によるものと考えられ、そのため、高めのグルコース濃度の場合に作用電極での酸化反応を維持することはできない。実施例 3 のセンサは、レドックス対の酸化種を半分しか含有しないため、実施例 2 のセンサよりもはるかに小さな濃度範囲で線形応答を示す。

【 0 0 6 4 】

実施例 6 作用電極上のフェロシアン化物なしのセンサストリップ

作用電極を形成するために付着させた混合物がフェロシアン化物を含有しなかったこと

10

20

30

40

50

を除き、実施例 2 のようにしてセンサストリップを造った。

【 0 0 6 5 】

実施例 7 作用電極上の可溶性レドックス種の量を減らしたセンサストリップ

作用電極を形成するために付着させた混合物がフェロシアン化物を 4 mM しか含有しなかつたことを除き、実施例 2 のようにしてセンサストリップを造った。

【 0 0 6 6 】

実施例 8 媒介物の影響

実施例 2、6 及び 7 のセンサストリップそれぞれをサイクリックボルタノメトリーによって分析した。分析混合物は、グルコースを含有しない 40% ヘマトクリット全血であった。ストリップを 40% 全血試料で再水和させた。各ストリップを、電圧源及び電流計測装置を含む分析装置に取り付けた。電圧を -0.8 V にセットし、+0.6 V に上げ、0.025 V/sec の速度で再び -0.8 V に下げ、電圧サイクルを通して電流を計測した。各センサストリップに関して印加電圧の関数として電流を計測したサイクリックボルタモグラムのプロットを図 8 に示す。

10

【 0 0 6 7 】

実施例 6 のセンサのボルタモグラム（曲線「a」）は、-0.4 V と +0.4 Vとの間に明りょうな P I P T の酸化ピークを示した。また、実施例 2（曲線「c」）及び 7（曲線「b」）のセンサのサイクリックボルタモグラムでは、-0.3 V 付近で電流の局所的ピークが示された。しかし、これらのセンサの主ピークは 0 V ~ +0.1 V の間で起こった。これらの電位すべては、対電極でのフェリシアン化物の還元のための半電池電位に相対的である。

20

【 0 0 6 8 】

正電位での酸化ピークは、作用電極でのフェロシアン化物の酸化によるものである。実施例 2 のセンサは、実施例 7 のセンサに対して 2 倍のモル量のフェロシアン化物を作用電極上に有したため、実施例 2 のサイクリックボルタモグラムにおけるフェロシアン化物によるピーク電流は、実施例 7 で見られたものおよそ 2 倍である。実施例 6 のセンサのサイクリックボルタモグラムは、フェロシアン化物酸化の証拠を示さなかった。実施例 6 のセンサは作用電極上にフェロシアン化物を含有しなかつたため、これらの結果は、分析のタイムスケールの間には対電極から作用電極までの検出可能なフェロシアン化物の移動がないことを示す。フェロシアン化物は、元から対電極上に付着していたフェリシアン化物の還元によって対電極で生成される。加えて、これらの結果は、本発明の電気化学的バイオセンサが、作用電極上の媒介物及び対電極上のレドックス対の一方の種（媒介物が対電極上のレドックス対のもう一方の種ではない場合）とで作動することができることを実証する。

30

【 0 0 6 9 】

実施例 9 対電極レドックス対の干渉の試験

様々なグルコース濃度を有する 40% ヘマトクリット全血試料を使用して、実施例 6 のセンサのサイクリックボルタモグラムを実施した。電圧を -0.8 V にセットし、+0.6 V に上げ、0.025 V/sec の速度で再び -0.8 V に下げ、電圧サイクルを通して電流を計測した。印加電圧の関数として電流を計測したサイクリックボルタモグラムのプロットを図 9 に示す。約 -0.2 V での酸化ピークで計測したピーク電位は、グルコース濃度の増大とともにによりプラスになった。実施例 8 でグルコースの非存在下で実施したサイクリックボルタノメトリーの場合に観察されたように、対電極で生成されるフェロシアン化物の作用電極への検出可能な移動はない。

40

【 0 0 7 0 】

実施例 10 白血球中のグルコースの定量

実施例 6 のセンサストリップに関して試料中のグルコース濃度の関数として発生した電流を研究した。YSI グルコース分析装置を参照法として使用して、40% ヘマトクリットを有する全血試料をグルコース濃度に関して分析した。様々な試料の実際のグルコース濃度を決定したら、試料を、実施例 6 にしたがって製造した個々のセンサストリップに別

50

々に適用した。+0.4Vの電位を電極対に10秒間印加したのち、10秒間電位を印加しなかった。次に、+0.4Vの電位を再び10秒間印加し、この10秒の間に電流を計測した。図10は、この計測期間の総電流を実施例6の場合のグルコース濃度の関数としてプロットしたものである。実施例6のセンサは、0~約600mg/dLの血糖濃度の関数として電流の線形応答を示した。

【0071】

実施例11 作用電極及び対電極上にP I P Tを有するセンサストリップ

対電極に付着させた混合物がP I P Tを25mM含有したことと除き、実施例1のようにしてセンサストリップを製造した。このようにして製造したセンサストリップを、分析対象物が様々なグルコース濃度を有する場合で、pH7.4の100mMリン酸緩衝液混合物中でサイクリックボルタントリーによって分析した。電位を-0.4Vと+0.6Vとの間で0.025V/secの速度で循環させた。これらのストリップのサイクリックボルタモグラムを図11に示す。

10

【0072】

P I P Tの酸化は対電極でのそれ自体のレドックス電位に対して計測されるため、酸化/還元ピークは中心が0ボルト付近になる。他方、作用電極上のフェロシアン化物の酸化ピークは、P I P Tピークに対してより高い酸化電位にシフトした。これらの実験は、対電極上のレドックス種としてP I P Tを使用する可能性を示した。作用電極は、この実施例で分析したように、P I P Tを含有することもできるし、媒介物としてフェリシアン化物を含有することもできる。

20

【0073】

実施例12 3個の電極を含むセンサストリップの調製

第三の電極をベースに被着させたことを除き、実施例1に記載したようにして絶縁材料のベース上に電極を形成した。図12~14を参照して、銀ペーストをスクリーン印刷によってポリカーボネットストリップ10に付着させた。このペーストをパターン12、13及び14に印刷して電気接点及び電極の下層を形成した。次に、導電性炭素及び結合剤を含有するインクをスクリーン印刷によってパターン24、34及び74に塗布して各電極の上層を形成した。アクリレート改質ポリウレタンを含有する誘電体層を、電極を露出させるようなパターンでベース及び電極の下層に付着させたのち、UV線への露光によって硬化させた。

30

【0074】

電極の一つを、酵素グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を1マイクロリットルあたり20単位の補酵素PQQ、24mMの3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジン(P I P T)及び1%CMCポリマーと組み合わせた水性混合物26を電極に付着させることにより、作用電極にした。これらの成分は、pH7.4の100mMリン酸緩衝液に含有されていた。

【0075】

他の電極の一方を、pH7.4の100mMリン酸緩衝液中200mMのフェリシアン化物及び100mMのNaClの水性混合物36を電極に付着させることにより、対電極にした。残る電極を試薬層76で覆うことによって第三の電極を造った。試薬層76の付着は、第三の水性混合物を用いる別個の工程として実施してもよいし、試薬層76を、対電極を製造するために付着させた同じ水性混合物の一部として被着させてもよい。

40

【0076】

これらの水性混合物を乾燥させたのち、ベース、誘電体層及び電極をふたに接合してセンサストリップを形成した。水性ポリウレタン分散系の被覆溶液をポリカーボネットストリップの片側に塗布し、乾燥させた。エンボス加工によって凹部を形成し、穴を打ち抜くことにより、このストリップをふたに形成した。ふたとベースとを整合させ、接触させたのち、構造の周囲の接触区域に熱を加えることにより、ふたをベースに接合した。

【0077】

本発明を、その特定の例示的な実施態様を参照しながら記載し、例示したが、本発明は

50

、そのような例示的な実施態様に限定されることを意図しない。当業者は、請求の範囲によって定義される本発明の真の範囲及び本質を逸することなく、改変及び変形を加えることができるることを認識するであろう。したがって、請求の範囲及びその均等物の範囲に入るそのような改変及び変形すべてを本発明に含めることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】作用電極及び対電極を含むセンサベースの平面図である。

【図2】図1のセンサベースの端面図である。

【図3】誘電体層の下のセンサベース及び電極の平面図である。

【図4】完全に組み立てられたセンサストリップの斜視図である。 10

【図5】別々の試薬層を有する作用電極及び対電極の顕微鏡写真である。

【図6】対電極上に様々な層を有するセンサストリップに関するサイクリックボルタモグラムのセットである。

【図7】様々な対電極を有するセンサストリップに関する、グルコース濃度の関数としての計測電流のグラフである。

【図8】様々な作用電極を有するセンサストリップに関するサイクリックボルタモグラムのセットである。

【図9】対電極上にフェリシアン化物を有するが、作用電極上にフェロシアン化物を有しないセンサストリップに関する、様々なグルコース濃度でのサイクリックボルタモグラムのセットである。 20

【図10】センサストリップに関する、グルコース濃度の関数としての計測電流のグラフである。

【図11】作用電極及び対電極の両方に3-フェニルイミノ-3H-フェノチアジンを有するセンサストリップに関する、様々なグルコース濃度でのサイクリックボルタモグラムのセットである。

【図12】作用電極、対電極及び第三の電極を含むセンサベースの平面図である。

【図13】作用電極、対電極及び第三の電極を含むセンサベースの平面図である。

【図14】作用電極、対電極及び第三の電極を含むセンサベースの平面図である。

【図15】図13のセンサベースの切欠き図である。

【図 1】

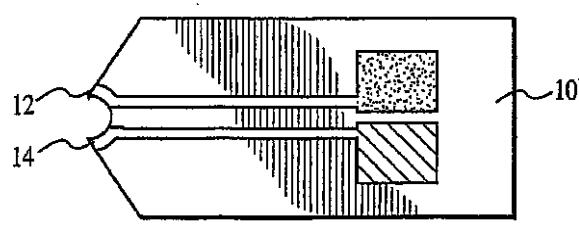


FIG. 1

【図 3】

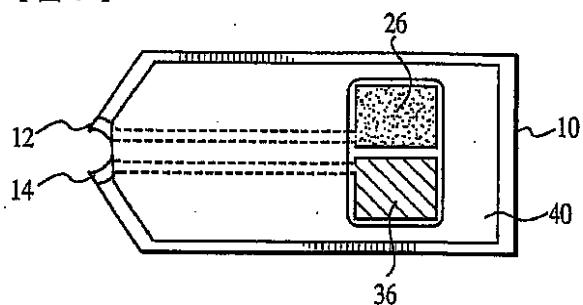


FIG. 3

【図 2】

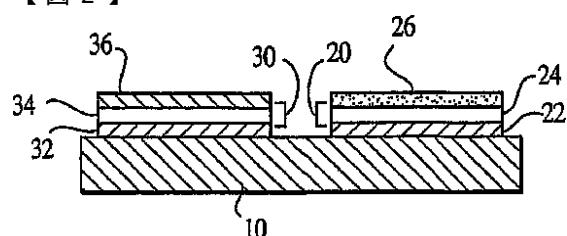


FIG. 2

【図 4】

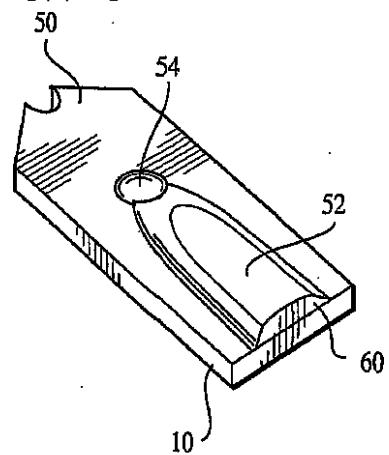


FIG. 4

【図 5】

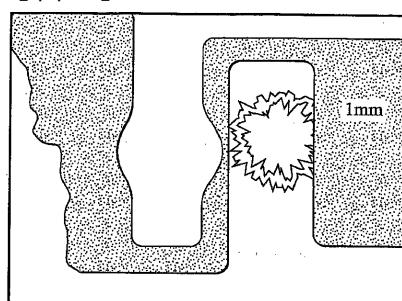
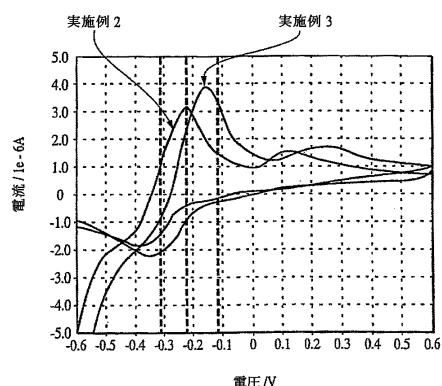
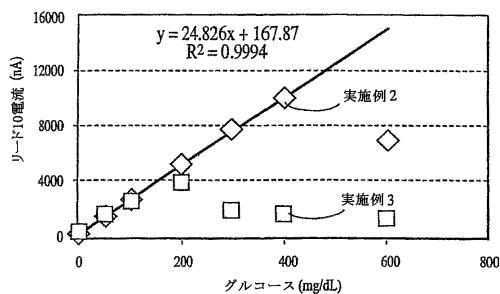


FIG. 5

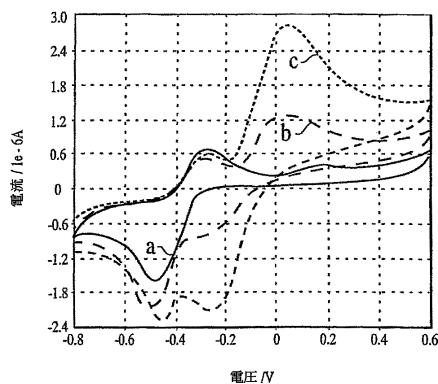
【図 6】



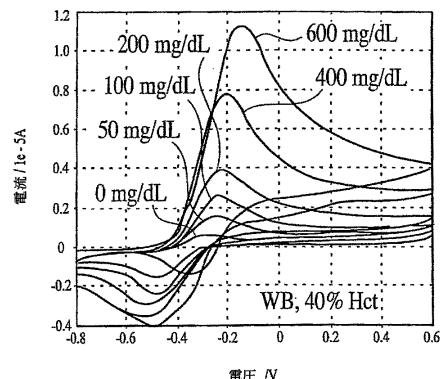
【図7】



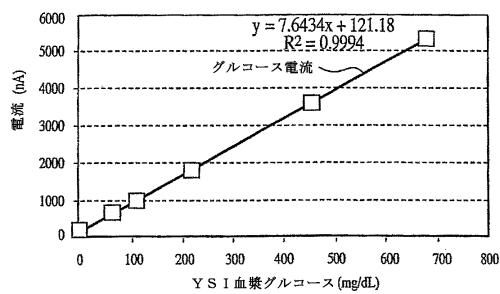
【図8】



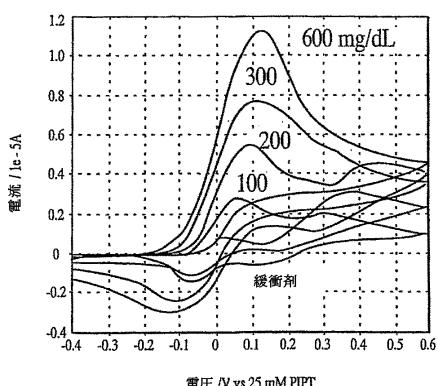
【図9】



【図10】



【図11】



【図12】

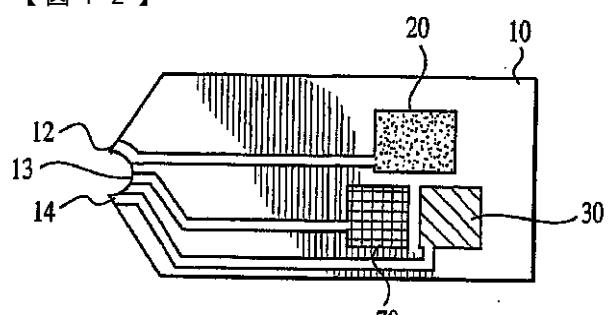
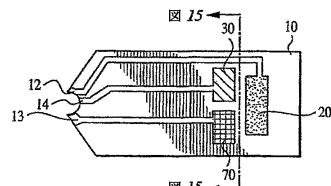


FIG. 12

【図13】



【図14】

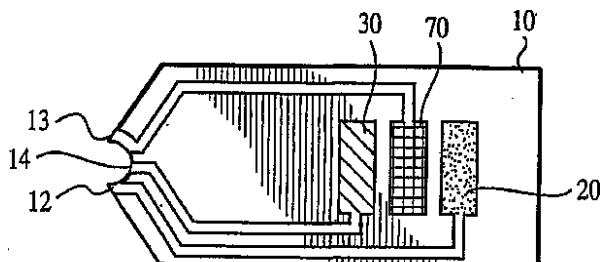


FIG. 14

【図15】

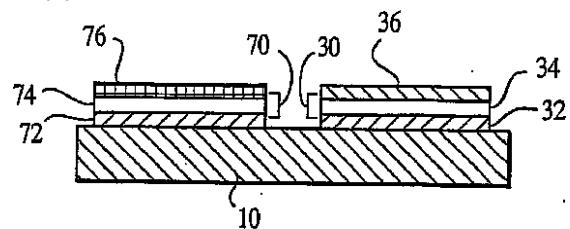


FIG. 15

フロントページの続き

(72)発明者 ピアー , グレッグ・ピー

アメリカ合衆国、ミシガン 49031、カソポリス、パーク・ショア・ドライブ 61684

(72)発明者 ブラーシュカ , クリストイーナ

アメリカ合衆国、ミシガン 49099、ホワイト・ビジョン、ペローズ・ロード 69590

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開2001-249103(JP,A)

特開2001-183330(JP,A)

特表2003-501627(JP,A)

特表2001-516038(JP,A)

国際公開第2005/054839(WO,A1)

特表2004-515784(JP,A)

特開平11-101770(JP,A)

特開平08-334490(JP,A)

特開2000-065778(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/327

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)