

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成20年3月6日(2008.3.6)

【公開番号】特開2006-322889(P2006-322889A)

【公開日】平成18年11月30日(2006.11.30)

【年通号数】公開・登録公報2006-047

【出願番号】特願2005-148253(P2005-148253)

【国際特許分類】

G 0 1 N 27/327 (2006.01)

G 0 1 N 27/416 (2006.01)

C 1 2 N 11/08 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 27/30 3 5 3 A

G 0 1 N 27/46 3 3 8

G 0 1 N 27/30 3 5 3 J

G 0 1 N 27/30 3 5 3 B

C 1 2 N 11/08 C

C 1 2 M 1/34 E

【手続補正書】

【提出日】平成20年1月18日(2008.1.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チトクロムまたはチトクロム複合体が細胞膜類似構造層を有する被固定化部材に固定されたことを特徴とする、タンパク質固定化膜。

【請求項 2】

上記細胞膜類似構造層は、リン脂質ポリマーを含んでいる、請求項 1 に記載のタンパク質固定化膜。

【請求項 3】

上記リン脂質ポリマーは、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体である、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質固定化膜。

【請求項 4】

被固定化部材にチトクロムまたはチトクロム複合体を固定化する方法であって、  
上記被固定化部材における目的部位に、親水処理を施すステップと、  
上記目的部位に、シランカップリング剤を導入させた細胞膜類似構造層を形成するステップと、

上記細胞膜類似構造層に対して、チトクロムまたはチトクロム複合体を自己組織化させるステップと、  
を含んでいることを特徴とする、タンパク質の固定化方法。

【請求項 5】

チトクロムをサブユニットとする酵素が被固定化部材に対して固定化されたバイオセンサであって、

上記酵素は、細胞膜類似構造層に対して自己組織化した状態で上記被固定化部材に固定

化されていることを特徴とする、バイオセンサ。

【請求項 6】

上記酵素は、グルコース脱水素活性を有する サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロム C を含む C y G D H である、請求項 5 に記載のバイオセンサ。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】タンパク質固定化膜および固定化方法、ならびにバイオセンサ

【技術分野】

【0001】

本発明は、被固定化部材にチトクロムを含むタンパク質を固定化する技術に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオセンサとしては、電気化学的手法あるいは光学的手法により試料の分析を行えるように構成されたものが汎用されている。電気化学的手法により試料の分析を行うためのバイオセンサとしては、たとえば本願の図 1 2 に示したバイオセンサ 9 がある（たとえば特許文献 1 参照）。

【0003】

図示したバイオセンサ 9 は、作用極 9 0 および対極 9 1 が形成された基板 9 2 に対して、スペーサ 9 3 を介してカバー 9 4 が接合されたものである。このバイオセンサ 9 はさらに、基板 9 2、スペーサ 9 3 およびカバー 9 4 によって規定された流路 9 5 を有している。この流路 9 5 は、毛細管力により試料を移動させるものであり、その内部に試薬層 9 6 が形成されている。

【0004】

試薬層 9 6 は、作用極 9 0 および対極 9 1 の端部どうしを繋げるように形成されており、酸化還元酵素を含んでいる。酸化還元酵素は、たとえばグルコースから電子を取り出す反応を触媒するものであり、グルコースから取り出された電子は作用極 9 0 に供給される。作用極 9 0 に対する電子供給量は、作用極 9 0 および対極 9 1 を利用して応答電流として測定することができる。

【0005】

ここで、試薬層 9 6 を形成するための代表的な方法、すなわち酸化還元酵素を固定化するための代表的な方法としては、次に説明するような 4 つのものがある（たとえば非特許文献 1 参照）。

【0006】

第 1 の方法は、酸化還元酵素を含む材料液を対象物の目的部位に点着した後、材料液を乾燥させることにより対象物の目的部位に酸化還元酵素を固定化する方法である。

【0007】

第 2 の方法は、グルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いて、対象物の目的部位に酸化還元酵素を固定化する方法である。

【0008】

第 3 の方法は、カルボメチルセルロース（CMC）などのポリマー中に酸化還元酵素を包括させた状態でポリマーとともに酸化還元酵素を固定化する方法である。

【0009】

第 4 の方法は、カーボンペーストなどの導電性成分中に酸化還元酵素を分散させたペーストを用い、このペーストを対象物の目的部位に塗り付けて酸化還元酵素を固定化する方法である。

【0010】

しかしながら、従来の酸化還元酵素の固定化方法では、酸化還元酵素の活性発現に効率の良い向き（位置）に活性部位が位置するように、個々の酸化還元酵素を固定化できない。すなわち、酸化還元酵素の配向性を制御して固定化できないといった問題がある。たとえば、従来の方法においては、隣接して存在する酸化還元酵素の活性部位が向き合って存在し、あるいはタンパク質どうしが凝集して活性部位が凝集塊の内部に存在するため、効率良く利用できる酸化還元酵素（活性部位）の割合が相対的に低い。そのため、酸化還元酵素が基質と接触できる確率が低くなり、固定化された酸化還元酵素の全体としての活性は低くなる。その結果、固定化された酸化還元酵素によって目的とする機能を発現させるためには、酸化還元酵素の仕込み量を大きくしなければならず、コスト的に不利となる。とくに、酸化還元酵素に高価なものが多いため、酸化還元酵素においては仕込み量を多く必要とすることに起因するコスト的なデメリットは、より顕著に現れる。

【 0 0 1 1 】

また、酸化還元酵素の配向性を制御できないことから、酸化還元酵素の仕込み量が同じであっても、バイオセンサ毎に実際に利用できる酸化還元酵素の割合にバラつきが生じる。その結果、配向性を制御できない従来の固定化方法では、この固定化方法に起因して測定結果にバラつきが生じる。

【 0 0 1 2 】

先に説明したバイオセンサ 9 ではさらに、酸化還元酵素における活性部位において基質から取り出した電子は作用極 9 0 に供給されるが、そのときに酸化還元酵素の配向性がランダムであると、酸化還元酵素から作用極 9 0 への電子伝達効率が悪くなる。そのため、酸化還元酵素の配向性がランダムとなる固定化方法を採用する場合には、酸化還元酵素と作用極 9 0 との間の電子授受を媒体するための電子伝達物質を添加する必要があるが生じる。したがって、従来の手法により酸化還元酵素が固定化されたバイオセンサ 9 では、電子伝達物質が必要な分だけコスト的に不利である。また、電子伝達物質としては、フェロシアン化カリウムなどの金属錯体を使用されており、それらの金属錯体の中には人体に悪影響を及ぼすものも存在する。そのため、バイオセンサ 9 をはじめとするバイオセンサにおいては、電子伝達物質を使用するのは好ましくない。

【 0 0 1 3 】

【特許文献 1】特公平 8 - 1 0 2 0 8 号公報

【非特許文献 1】水谷文雄，「酵素薄膜修飾電極のセンサーへの応用」，分析化学，日本分析化学学会，1 9 9 9 年 9 月，第 4 8 巻，第 9 号，p 8 0 9 ~ 8 2 1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 4 】

本発明は、酸化還元酵素などのタンパク質を配向性良く固定化するとともに、少ない酵素量で活性にバラつきを生じさせることなく適切かつコスト的に有利に目的とする活性を発現させることを課題としている。

【 0 0 1 5 】

本発明はさらに、バイオセンサにおいて、電子伝達物質を使用することなく、適切にグルコース濃度の測定を行えるようにすることを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の側面においては、チトクロムまたはチトクロム複合体が細胞膜類似構造層を有する被固定化部材に固定されたことを特徴とする、タンパク質固定化膜が提供される。

【 0 0 1 7 】

本発明の第 2 の側面においては、被固定化部材にチトクロムまたはチトクロム複合体を固定化する方法であって、上記被固定化部材における目的部位に、親水処理を施すステップと、上記目的部位に、シランカップリング剤を導入させた細胞膜類似構造層を形成するステップと、上記細胞膜類似構造層に対して、チトクロムまたはチトクロム複合体を自己

組織化させるステップと、を含んでいることを特徴とする、タンパク質の固定化方法が提供される。

【0018】

本発明の第3の側面では、チトクロムをサブユニットとする酵素が被固定化部材に対して固定化されたバイオセンサであって、上記酵素は、細胞膜類似構造層に対して自己組織化した状態で上記被固定化部材に固定化されていることを特徴とする、バイオセンサが提供される。酵素としては、グルコース脱水素活性を有する サブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むC y G D Hを挙げることができる。

【0019】

好ましくは、細胞膜類似構造層は、リン脂質ポリマーを含むものとして形成される。リン脂質ポリマーとしては、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(M P C)重合体が使用される。

【0020】

本発明のバイオセンサは、たとえば試料を移動させるための流路と、流路の内部に設けられ、かつ上記C y G D Hを含む試薬層と、を備えている。この場合において、C y G D Hは、流路の規定する面に対して固定化される。

【0021】

本発明のバイオセンサは、たとえば流路において一部が露出し、かつ試料に電圧を印加するのに利用される作用極および対極を有するもの、すなわち電気化学的手法によりグルコース濃度を測定するのに適合したものとして形成される。この場合、細胞膜類似構造層は、少なくとも作用極上に形成するのが好ましい。

【0022】

一方、本発明のバイオセンサは、試薬層が発色剤を含んだ発色層を有するもの、すなわち、光学的手法によりグルコース濃度を測定するのに適合したものとして形成される。この場合、細胞膜類似構造層は、発色層を介して、流路を規定する面に固定化するのが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

以下、本発明の好ましい実施の形態について、第1および第2の実施の形態として、図面を参照して説明する。

【0024】

まず、本発明の第1の形態について、図1ないし図3を参照しつつ説明する。

【0025】

図1ないし図3に示したバイオセンサX1は、使い捨てとして構成されたものであり、濃度測定装置(図示略)に装着して血糖値を測定するために使用するものである。このバイオセンサX1は、電気化学的手法により血糖値を測定するのに適合したものであり、長矩形形状の基板1に対して、スペーサ2を介してカバー3を積層した形態を有している。バイオセンサX1においては、各要素1~3により、基板1の長手方向(図中のN1, N2方向)に延びるキャピラリ4が規定されている。キャピラリ4は、導入口40から導入された血液を、毛細管現象を利用して基板1の長手方向(図中のN1, N2方向)に移動させるとともに、導入された血液を保持するためのものである。

【0026】

スペーサ2は、基板1の上面10からカバー3の下面までの距離、すなわちキャピラリ4の高さ寸法を規定するためのものであり、たとえば両面テープにより構成されている。このスペーサ2には、先端部が開放したスリット20が形成されている。スリット20は、キャピラリ4の幅寸法を規定するためのものであり、スリット20における先端の開放部分は、キャピラリ4の内部に血液を導入するための導入口40を構成している。

【0027】

カバー3は、キャピラリ4の内部の気体を外部に排気するための排気口30を有している。このようなカバー3は、たとえばビニロンや高結晶化PVAなどの濡れ性が高い熱可

塑性樹脂により形成されている。

【0028】

図2および図3によく表れているように、基板1は、たとえばPETなどの絶縁樹脂材料により形成されており、その上面10に、作用極11、対極12、絶縁膜13、および試薬層14が形成されたものである。

【0029】

作用極11および対極12は、全体としてL字状の形態に形成されている。より具体的には、作用極11および対極12は、大部分が基板1の長手方向（図中のN1，N2方向）に延びているとともに、端部11a，12aが基板1の短手方向（図中のN3，N4方向）に延びている。一方、作用極11および対極12の端部11b，12bは、濃度測定装置（図示略）に設けられた端子に接触させるための端子部を構成している。作用極11および対極12は、たとえばカーボンペーストを用いたスクリーン印刷により形成することができる。作用極11および対極12の形成は、カーボン以外の導電性材料を用いて行うことができ、またスピコート、熱転写、カーボンロッドスライス、蒸着、スパッタあるいはCVDによって行うこともできる。

【0030】

絶縁膜13は、作用極11および対極12の端部11a，12a，11b，12bを露出させるようにして作用極11および対極12の大部分を覆っている。この絶縁膜13は、作用極11および対極12の端部11a，12aを露出させるための開口部13aを有している。この開口部13aは、試薬層14を形成するための領域を規定するものであり、基板1の長手方向（図中のN1，N2方向）に延びる長矩形状に形成されている。

【0031】

絶縁膜13は、撥水性の高い材料を含むインクを用いたスクリーン印刷、あるいは感光性樹脂材料を用いたフォトリソグラフィにより形成することができる。

【0032】

試薬層14は、絶縁膜13の開口部13aにおいて、作用極11および対極12の端部11a，12aどうしを橋渡すようにして設けられている。この試薬層14は、細胞膜類似構造層14AおよびCyGDH層14Bを有している。

【0033】

細胞膜類似構造層14Aは、配向性を持たせた状態でCyGDHを固定化するためのものである。この細胞膜類似構造層14Aは、リン脂質ポリマーを含んだ溶液を、基板1、作用極11および対極12における絶縁膜13の開口部13aを介して露出した部分14（以下「露出部分14」という）に点着した後に、乾燥させることにより形成することができる。

【0034】

リン脂質ポリマーとしては、たとえば2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）重合体を使用することができる。MPC重合体としては、MPCを単独で重合させ、あるいはMPCをメタクリル酸エステル（たとえばブチルメタクリレート）などの疎水性モノマーと共重合させたものを使用することができる。

【0035】

細胞膜類似構造層14Aを形成するためのリン脂質ポリマーは、細胞膜を構成するリン脂質と類似の構造を分子内に有するモノマー単位を含む重合体であればよく、MPC重合体以外のポリマーを使用することもできる。

【0036】

また、リン脂質ポリマーとしては、シランカップリング剤を導入したものを使用するのが好ましい。これにより、露出部分14に対するリン脂質ポリマーの結合性を高めることができる。

【0037】

また、細胞膜類似構造層14Aを形成するに当たっては、露出部分14を親水処理しておくのが好ましい。これにより、露出部分14に水酸基やカルボキシル基などの親水

基が導入され、この親水基がシランカップリング剤と結合することによって、より強固に露出部分 14 にリン脂質ポリマーを固定化することができる。

【0038】

ここで、ポリマーにおけるシランカップリング剤の量は、たとえばポリマー成分 100 重量部に対して、10～500 重量部とされる。シランカップリング剤としては、たとえばテトラエトキシシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリス(2-メトキシエトキシ)シラン、-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、-メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、-(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、-グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、-アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- -アミノプロピルトリメトキシシラン、-クロロプロピルトリメトキシシラン、あるいは-メルカプトプロピルトリメトキシシランを挙げることができる。これらのシランカップリング剤は、単独で使用しても、複数種を併用してもよい。

【0039】

一方、露出部分 14 の親水処理は、公知の種々の方法により行うことができる。本発明において採用することができる親水処理としては、VUV処理、UV処理、コロナ放電処理、あるいはプラズマ処理などを挙げることができる。

【0040】

CyGDH層 14Bは、細胞膜類似構造層 14Aに対してCyGDHを自己組織的に固定化させたものである。なお、図3においては、細胞膜類似構造層 14Aの表面にCyGDHが固定化された様子が描かれているが、これは本案を説明するために便宜的に示した模式図である。すなわち、本発明者らは、細胞膜類似構造層 14Aに対してCyGDHが自己組織的に固定化されることは確認しているものの、細胞膜類似構造層 14Aに対してCyGDHがどのような状態で固定化されているのかについては現段階では確認しておらず、また、後述するブルクホルデリア・セバシアに属する微生物に由来のCyGDHは膜貫通タンパク質であるために、必ずしも図3に示したようにCyGDHが細胞膜類似構造層 14Aの表面にのみ固定化されずに、CyGDHが細胞膜類似構造層 14Aを貫通して細胞膜類似構造層 14Aに固定化されている可能も含んでいる。

【0041】

細胞膜類似構造層 14Aに対するCyGDHの自己組織的固定化は、たとえば露出部分 14 に細胞膜類似構造層 14Aを形成した基板 1を、CyGDHを含んだ酵素溶液中に浸漬した後に、あるいは細胞膜類似構造層 14Aに上記酵素溶液を噴霧した後に乾燥させることにより行うことができる。

【0042】

細胞膜類似構造層 14Aに対してCyGDHを自己組織的に固定化した場合には、後述するAFM像(図8参照)から推測できるように、CyGDHが配向性をもった状態で固定化される。すなわち、CyGDHは、サブユニットの活性部位が試薬層 14の表層に位置した状態とされる一方で、チトクロムCが露出部分 14(作用極 11)に近い位置もしくは接触した状態で細胞膜類似構造層 14Aに固定化される。

【0043】

ここで、本発明において使用されるCyGDHは、少なくともグルコース脱水素活性を有するサブユニット、および電子伝達機能を有するチトクロムCを含むものをさし、サブユニットおよびチトクロムC以外のサブユニットをさらに有するものも含まれる。このようなCyGDHの例は、国際公開第WO02/36779号パンフレットに開示されている。先の国際出願に記載のCyGDHは、ブルクホルデリア・セバシアに属する微生物に由来するものであり、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であり、かつFADを補欠因子としてもつとともに、グルコース脱水素活性を有するサブユニットと、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43kDaであり、電子伝達機能を有するチトクロムCと、を含むものである。また、本発明のCyGDHには、ブルクホルデリア・セバシアに属する微生物から採取したCyGDHをコードする遺伝子が移入された形質転換体を利用し

て得られるものも含まれる。

【 0 0 4 4 】

ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物に由来の C y G D H は、膜貫通タンパク質である。すなわち、先の微生物由来の C y G D H は、本来、細胞膜に存在するものであるため、そのような C y G D H を用いた場合には、細胞膜類似構造層 1 4 A に対して自己組織的に、かつ細胞膜に存在する場合と同様に配向性をもった状態で C y G D H を固定化することができる。このような C y G D H の自己組織的固定化は、ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物に由来の C y G D H に限らず、本来、細胞膜に存在する C y G D H を用いた場合に達成することができる。

【 0 0 4 5 】

このようなバイオセンサ X 1 は、濃度測定装置（図示略）に装着した上で、バイオセンサ X 1 の導入口 4 0 を介してキャピラリ 4 に血液を供給することにより、濃度測定装置（図示略）において血糖値の測定を自動的に行わせることができる。

【 0 0 4 6 】

バイオセンサ X 1 に対する血液の供給は、バイオセンサ X 1 を濃度測定装置（図示略）に装着する前、あるいは装着した後のいずれであってもよい。通常は、被験者の皮膚を切開して血液を出液させた後、その血液をバイオセンサ X 1 の導入口 4 0 に付着させることにより行われる。

【 0 0 4 7 】

濃度測定装置（図示略）に対してバイオセンサ X 1 を装着した場合、バイオセンサ X 1 の作用極 1 1 および対極 1 2 が濃度測定装置の端子（図示略）に接触する。一方、バイオセンサ X 1 においては、導入口 4 0 に付着させられた血液は、キャピラリ 4 において生じる毛細管現象により排気口 3 0 に向けて進行し、キャピラリ 4 に充填される。

【 0 0 4 8 】

キャピラリ 4 においては、C y G D H が血液中のグルコースと特異的に反応してグルコースから電子が取り出される。その一方、血液に対して作用極 1 1 および対極 1 2 を利用して電圧を印加した場合には、C y G D H によって取り出された電子が作用極 1 1 に供給される。そして、濃度測定装置では、作用極 1 1 および対極 1 2 に対する電圧印加時に、たとえば作用極 1 1 に対する電子供給量を応答電流値として測定することにより、応答電流値に基づいて血糖値を演算することができる。

【 0 0 4 9 】

バイオセンサ X 1 では、C y G D H は、サブユニットの活性部位が試薬層 1 4 の表面に位置するように C y G D H が配向性をもった状態で固定化される。そのため、試薬層 1 4 においては、グルコースから効率良く電子を取り出すことができる。これにより、バイオセンサ X 1 では、目的とする活性発現のために必要とされる C y G D H の量を少なくし、コスト的に有利に目的とする活性を発現させることができる。

【 0 0 5 0 】

また、C y G D H が配向性をもって固定化されることから、バイオセンサ X 1 毎に、試薬層 1 4 に含まれる C y G D H の量および活性部位の向き（位置）にバラつきが生じることを抑制することができる。これにより、バイオセンサ X 1 毎の感度のバラつきが生じることを抑制し、適切な血糖値測定を行うことができるようになる。

【 0 0 5 1 】

バイオセンサ X 1 ではさらに、C y G D H が配向性をもって固定化されることから、チトクロム C が露出部分 1 4 （作用極 1 1）に近い位置もしくは接触した状態で存在する。そのため、試薬層 1 4 においては、グルコースから取り出された電子を効率良く作用極 1 1 に供給することができる。これにより、バイオセンサ X 1 では、金属錯体のような電子伝達物質を使用することなく、適切な応答電流を得ることができる。

【 0 0 5 2 】

次に、本発明の第 2 の実施の形態について、図 4 および図 5 を参照しつつ説明する。

【 0 0 5 3 】

図4および図5に示したバイオセンサX2は、光学的手法により血糖値を測定するのに適合したものとして構成されている点において、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)とは異なっている。

【0054】

バイオセンサX2は、長矩形状の基板5に対して、一对のスペーサ6を介してカバー7を積層した形態を有している。バイオセンサX2においては、各要素5～7により、基板5の長手方向(図中のN1, N2方向)に延びるキャピラリ8が規定されている。キャピラリ8は、導入口80から導入された血液を、毛細管現象を利用して基板5の長手方向(図中のN1, N2方向)に移動させ、かつ導入された血液を保持するためのものである。

【0055】

キャピラリ8の内部には、試薬層50が形成されている。この試薬層50は、発色層50A上に、細胞膜類似構造層50BおよびCyGDH層50Cを形成したものである。

【0056】

発色層50Aは、発色剤を含んだものであり、たとえば発色剤を含む溶液を基板5における目的部位に塗布した後に乾燥させることにより形成することができる。

【0057】

ここで、本発明において使用することができる発色剤としては、たとえばMTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)、INT(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride)、WST-4(2-(4-Iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)、および4AA(4-Aminoantipyrine)を挙げることができる。

【0058】

細胞膜類似構造層50BおよびCyGDH層50Cは、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)の場合と同様にして形成することができる。

【0059】

このバイオセンサX2においても、試薬層50が細胞膜類似構造層50BおよびCyGDH層50Cを含んだものとして、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)の場合と同様にして形成されており、しかも、細胞膜類似構造層50Bが発色層50Aに接触した状態とされている。そのため、試薬層50は、CyGDHが配向性を持った状態、すなわちCyGDHにおけるサブユニットの活性部位が表層に存在する一方で、CyGDHにおけるチトクロムCが発色層50Aに接触し、あるいは発色層50Aの近くに存在した状態で細胞膜類似構造層50Bに固定化される。したがって、バイオセンサX2においても、先に説明したバイオセンサX1(図1ないし図3参照)と同様な効果を楽しむことができる。

【0060】

本発明は、上述の実施の形態には限定されず、種々に変更可能である。たとえば、本発明は、使い捨てとして構成されたバイオセンサに限らず、たとえば少なくとも電極部分を人体に埋め込んで連続的に血糖値を測定するために使用するバイオセンサについても適用することができる。

【実施例1】

【0061】

本実施例では、PET基材の表面に、カーボン電極、リン脂質ポリマー層およびCyGDH層を形成する一方で、それらの層を形成する前後における表面性状を、原子間力顕微鏡(AFM)(商品名「D-3100」; デジタル インスツルメンツ社製)を用いて観察した。

【0062】

(カーボン電極表面の観察)

カーボン電極は、日本アチソン社製のカーボンインクを用いたスクリーン印刷により形成した。カーボン電極のAFM像については、図6に示した。図6から分かるように、カーボン電極層の表面は、カーボン粒子(平均粒子径が100nm程度)が現れた比較的



大きな凹凸面となっていた。

【0063】

(リン脂質ポリマー層表面の観察)

リン脂質ポリマー層は、カーボン電極の表面をVUV処理(親水処理)した後に、カーボン電極の表面にMPC重合体溶液を塗布して乾燥させることにより形成した。なお、VUV処理は、「M E C L - M 3 - 7 5 0」(エム・ディ・エキシマ社製)を用いて、大気中において、波長が172 nmのエキシマレーザ光を、照射距離を1 mmとして、カーボン電極層の表面に180秒間照射することにより行った。MPC重合体溶液としては、シランカップリング剤としてのテトラエトキシシランを導入したMPC重合体(商品名「リビジュア」; 日本油脂社製)を使用した。

【0064】

リン脂質ポリマー層を形成した後のAFM像については図7に示した。図7から分かるように、リン脂質ポリマー層の表面には、ポリマーにおけるリン脂質部位が現れているものの、リン脂質部位の直径が2~3 nmとカーボン粒子に比べて小さいため、リン脂質ポリマー層の表面はカーボン電極層に比べて滑面となっていた(図6参照)。

【0065】

(CyGDH層表面の観察)

CyGDH層は、リン脂質ポリマー層が形成されたカーボン電極を、CyGDH溶液に10分間含浸することにより形成した。CyGDH溶液におけるCyGDHの濃度は、活性基準において100 U /  $\mu$  Lとした。CyGDH層を形成した後のAFM像については、図8に示した。

【0066】

図8から分かるように、リン脂質ポリマー層の表面には、規則的に並んで配置された直径6~30 nm程度の塊状物(CyGDH)が確認された。すなわち、リン脂質ポリマーに対しては、少なくともCyGDHの一部が表層に現れるようにCyGDHが固定化されていた。また、塊状物が規則的に並んで配置されていることから、CyGDHは、配向性を持ってリン脂質ポリマー層に固定化されているものと推測される。

【実施例2】

【0067】

本実施例においては、リン脂質ポリマー層を介してCyGDHを固定化した電極(本案電極)およびリン脂質ポリマーを介さずにCyGDHを固定化した電極(比較電極)のそれぞれについて、応答性を検討した。

【0068】

本案電極としては、実施例1と同様に、カーボン電極にリン脂質ポリマー層を形成した後に、CyGDHを固定化したものを使用した。

【0069】

一方、比較電極は、リン脂質ポリマー層を形成しなかった点を除いては、本案電極と同様に形成した。

【0070】

本案電極および比較電極の応答性は、図9に示した電流値測定装置Yを構築し、この電流値測定装置Yによってグルコース溶液に電圧を印加したときの応答電流値として評価した。

【0071】

電流値測定装置Yは、作用極Y1、参照極Y2および対極Y2を備えたものであり、それらの電極Y1~Y3がポテンシオスタットY4に接続されたものである。この電流値測定装置Yでは、電極Y1~Y3をグルコース溶液に浸漬してグルコース溶液に電圧を印加することが可能であり、また電圧印加時の応答電流値を測定することが可能である。ここで、作用極Y1は、先に説明した方法により形成した本案電極または比較電極であり、参照極Y2は、銀/塩化銀電極(商品名「RE-1B」; BAS社製)であり、対極Y3は白金電極である。

## 【 0 0 7 2 】

( リニアスイープボルタンメトリー )

本実施例においては、本案電極および比較電極の応答性を検討する前に、濃度の異なる複数種のグルコース溶液のそれぞれについて、本案電極を作用極 Y 1 として、先に説明した電流値測定装置 Y を用いてリニアスイープボルタンメトリー測定を行った。

## 【 0 0 7 3 】

この測定においては、掃引電圧は、 $100\text{ mV} / \text{sec}$  とし、 $-400\text{ mV} \sim +700\text{ mV}$  の範囲で応答電流値を測定した。グルコース溶液としては、 $0\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $50\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $100\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $200\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $400\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $600\text{ mg} / \text{dL}$  のものを使用した。その結果、 $+100 \sim +700\text{ mV}$  の範囲において、グルコース溶液の濃度の差に応じた応答電流値の差が見受けられた。この結果を踏まえて、以下に行う応答電流値の測定においては、グルコース溶液に対する印加電圧を  $+600\text{ mV}$  に設定した。

## 【 0 0 7 4 】

( 応答性 )

本案電極および比較電極の応答性は、濃度の異なる複数種のグルコース溶液のそれぞれについて、本案電極または比較電極を作用極 Y 1 として、先に説明した電流値測定装置 Y を用いて応答電流値のタイムコースを測定することにより行った。応答電流値測定時の印加電圧は、上述の通り  $+600\text{ mV}$  とし、グルコース溶液としては、 $0\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $50\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $100\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $200\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $400\text{ mg} / \text{dL}$ 、 $600\text{ mg} / \text{dL}$  のものを使用した。それぞれのグルコース溶液に対する応答電流値のタイムコースについては、本案電極の結果は図 10 ( a ) として、比較電極の結果は図 10 ( b ) としてそれぞれ示した。また、測定開始から 1 秒後の応答電流値について、グルコース濃度の関係として図 11 に示した。

## 【 0 0 7 5 】

図 10 および図 11 から分かるように、本案電極では  $\mu$  オーダーの応答電流値が測定されている一方で、比較電極では  $n$  オーダーの応答電流値しか測定されていない。すなわち、比較電極では、従来より報告されている金属錯体などの電子伝達物質を使用しない系における応答電流値の測定結果 (  $n$  オーダー ) と同様な結果が得られた。その一方で、本案電極では、従来の報告よりも遥かに大きな  $\mu$  オーダー応答電流値が得られ、本案電極の応答性 ( 感度 ) が高いことが確認された。

## 【 0 0 7 6 】

また、図 10 および図 11 からは、本案電極を用いた場合には、グルコース濃度の相違を応答電流値の相違として適切に反映させることができることも分かる。そのため、本案電極を用いた場合には、少なくとも本実施例において応答電流値を測定したグルコース濃度の範囲 (  $0 \sim 600\text{ mg} / \text{dL}$  ) において、適切にグルコース濃度を測定することができる。

## 【 0 0 7 7 】

このように、リン脂質ポリマーを介して  $\text{CyGDH}$  を固定化した本案電極は、金属錯体などの電子伝達物質を用いなくても、グルコース濃度を測定するのに十分な応答性 ( 感度 ) を有している。そのため、本案電極では、電子伝達物質を用いずとも適切なグルコース濃度 ( たとえば血糖値 ) の測定が可能であるばかりか、電子伝達物質を用いる必要がないために、人体に埋め込んで使用しても人体に対する悪影響はない。その結果、本発明は、人体に埋め込んで血糖値を連続的に測定するために使用するバイオセンサに対して問題なく適用することができる。

## 【 0 0 7 8 】

また、本案電極において採用されていた  $\text{CyGDH}$  の固定化方法、すなわちリン脂質ポリマー溶液の点着および  $\text{CyGDH}$  溶液に対する浸漬は、極めて簡易な作業であり、その手法を  $\mu\text{TAS}$  に代表される微細流路を有するバイオセンサに対しても適切に適用できる。その場合、微細流路に形成されるリン脂質ポリマー層および  $\text{CyGDH}$  層は極めて薄層であるために、それらの層を形成したとしても微細流路における試料の移動が著しく妨げ

られることもない。そのため、微細流路における大部分において、リン脂質ポリマー層およびC y G D H層からなる試薬層を形成しても何らの問題も生じない。したがって、微細流路に対して広範囲に亘って試薬層を形成することにより、 $\mu$  T A Sの欠点であった感度の低さを改善し、感度の高い $\mu$  T A Sを提供することができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】本発明の第1の実施の形態に係るバイオセンサを示す全体斜視図である。

【図2】図1に示したバイオセンサの分解斜視図である。

【図3】図1のIII-III線に沿う断面図およびその要部拡大図である。

【図4】本発明の第2の実施の形態に係るバイオセンサの全体斜視図である。

【図5】図4のV-V線に沿う断面図およびその要部拡大図である。

【図6】実施例1において、カーボン電極の表面状態を、A F Mによって観察した結果を示すA F M像である。

【図7】実施例1において、カーボン電極の表面にリン脂質ポリマー層を形成した状態を、A F Mによって観察した結果を示すA F M像である。

【図8】実施例1において、リン脂質ポリマー層の表面にC y G D Hを固定化した状態を、A F Mによって観察した結果を示すA F M像である。

【図9】実施例2において用いた電流値測定装置の概略構成を示す模式図である。

【図10】実施例2における応答電流値の測定結果をタイムコースとして示したグラフである。

【図11】実施例2における電流値の測定結果を、グルコース濃度との関係として示したグラフである。

【図12】従来のバイオセンサの一例の要部を示す断面図である。

【符号の説明】

【0080】

X 1 , X 2    バイオセンサ

1 , 5    ( バイオセンサの ) 基板 ( 被固定部材 )

1 4 A , 5 0 B    細胞膜類似構造層

【手続補正3】

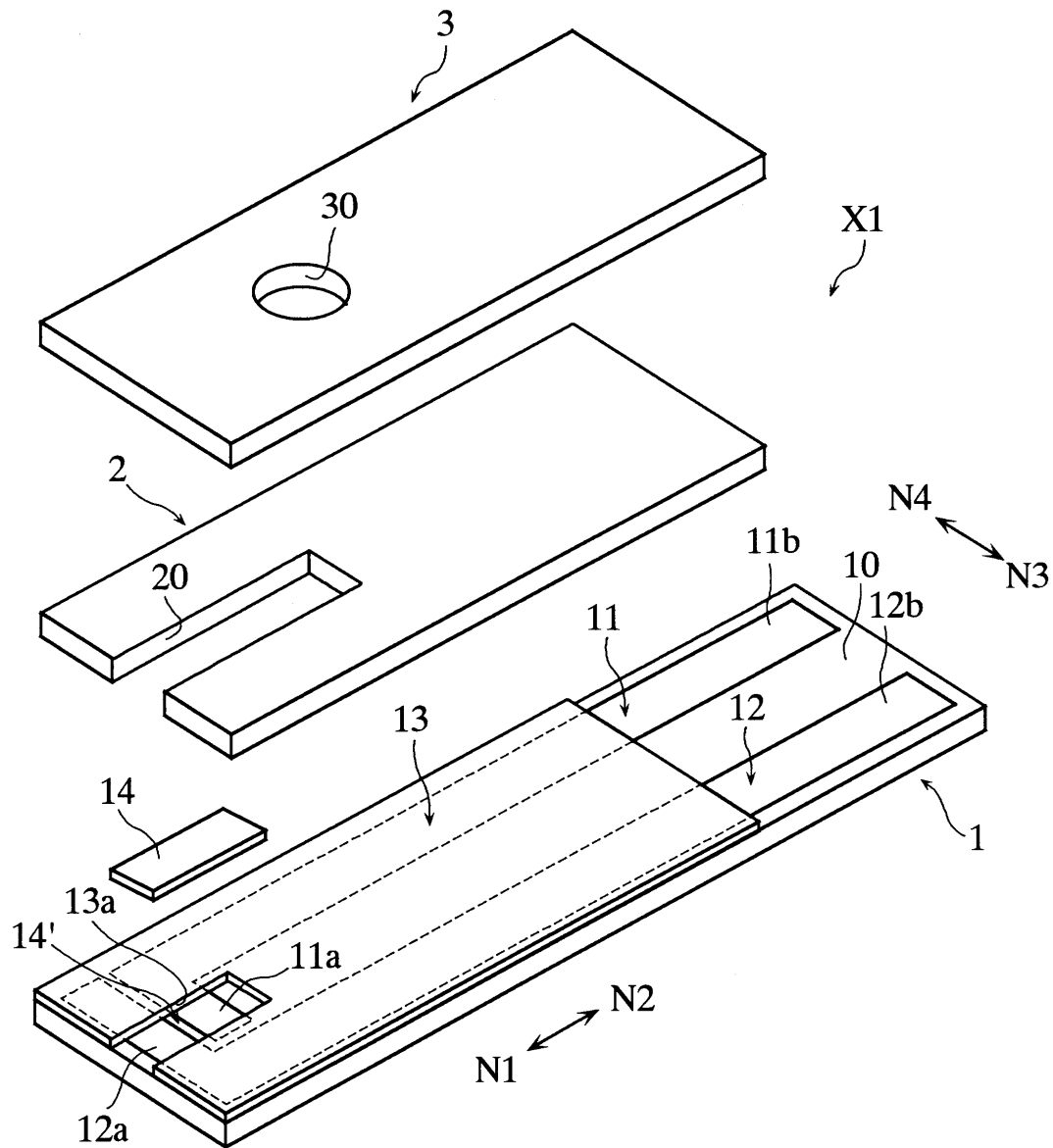
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2】



【手続補正 4】

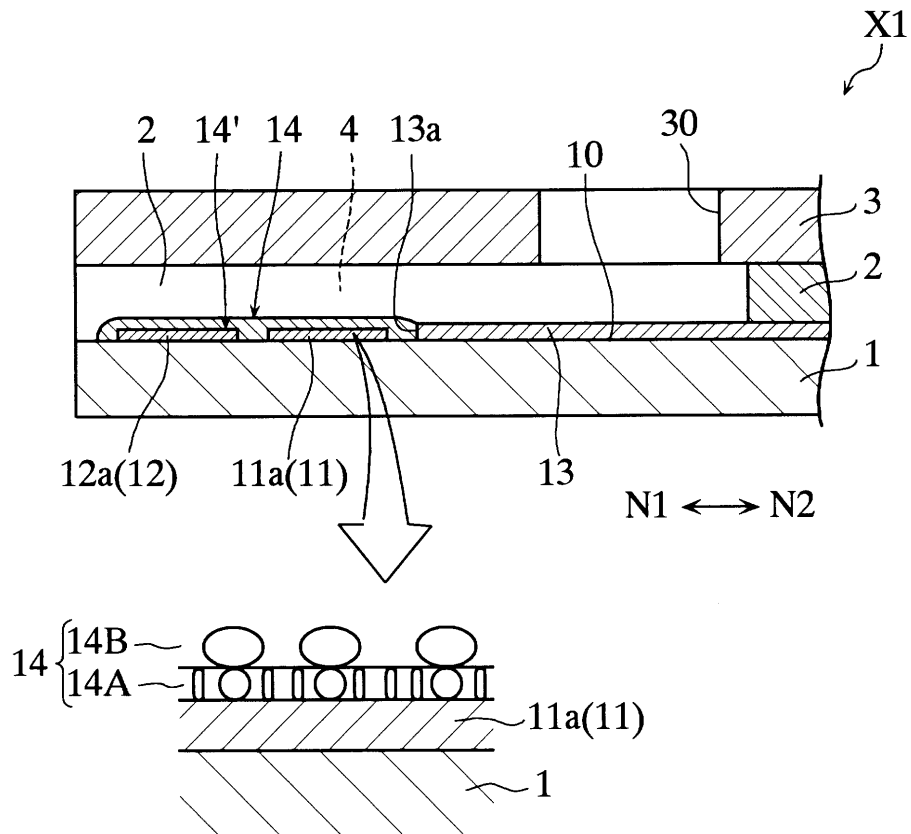
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 3】



【手続補正 5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 5】

