(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4932118号
(P4932118)

(45)発行日　平成24年5月16日(2012.5.16)　(24)登録日　平成24年2月24日(2012.2.24)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 27/416	(2006.01)	G01N	27/46	338
C12M 1/34	(2006.01)	C12M	1/34	E
G01N 27/327	(2006.01)	C12M	1/34	Z
G01N 33/66	(2006.01)	G01N	27/30	353P
		G01N	27/30	353R

請求項の数 11　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-570837 (P2001-570837)
(86)(22)出願日	平成13年3月28日 (2001.3.28)
(65)公表番号	特表2003-529062 (P2003-529062A)
(43)公表日	平成15年9月30日 (2003.9.30)
(86)国際出願番号	PCT/US2001/010101
(87)国際公開番号	WO2001/073124
(87)国際公開日	平成13年10月4日 (2001.10.4)
審査請求日	平成20年3月25日 (2008.3.25)
(31)優先権主張番号	09/537,065
(32)優先日	平成12年3月28日 (2000.3.28)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	0007522.6
(32)優先日	平成12年3月28日 (2000.3.28)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　501278168
ダイアビーティーズ・ダイアグノスティックス・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、０８９３３　ニュージャージー州、ニュー・ブランズウィック、ワン・ジョンソン・アンド・ジョンソン・プラザ
(74)代理人　100088605
弁理士　加藤　公延
(72)発明者　デイビーズ・オリバー・ウィリアム・ハードウィック
イギリス国、インバネス・アイブイ２・４　キューピー、インバネス・サーカス、ドラモンド・サーカス　１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高速応答グルコースセンサ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

液体サンプル中の分析物を検出する使い捨て電気化学式センサであって、サンプル受入れキャビティ内に設けられた作業電極及び基準電極と、作業電極に被着された状態でサンプル受入れキャビティ内に設けられた試薬層とを備え、試薬層は少なくとも、分析物が存在していると電気化学信号を生じさせる酵素を含み、サンプル受入れキャビティの容積は、１．５μｌ未満であり、センサは、１０秒以下の時間内に分析物の量と相関した測定値をもたらすように選択されており、

前記使い捨て電気化学式センサは、基体上に形成された３つの接着剤パッドを更に有し、３つの接着剤パッドのうち第１の接着剤パッドが、試薬層の第１の側部に設けられ、第２の接着剤パッドが、第１の接着剤パッドから見て反対側の試薬層の第２の側部に設けられ、それにより、試薬層及びその下に位置する電極は、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間に配置され、第３の接着剤パッドが、試薬層から分離された状態で第１の側部及び第２の側部とは異なる試薬層の第３の側部に設けられ、前記接着剤パッドは、サンプル受入れキャビティの厚さを定めていることを特徴とするセンサ。

【請求項２】

請求項１に記載のセンサにおいて、試薬層は、電子伝達メディエイタを更に含むことを特徴とする、センサ。

【請求項３】

請求項２に記載のセンサにおいて、分析物は、グルコースであり、酵素は、グルコース

オキシダーゼであり、メディエイタは、フェリシアン化物であることを特徴とする、センサ。

【請求項４】

請求項１～３のいずれか１項に記載のセンサにおいて、試薬層は、シリカを含むことを特徴とする、センサ。

【請求項５】

請求項１～４のいずれか１項に記載のセンサにおいて、基準電極は、フェリ－フェロシアン化物電極であることを特徴とする、センサ。

【請求項６】

請求項１～５のいずれか１項に記載のセンサにおいて、作業電極は、ドープ済み半導体材料から作られていることを特徴とする、センサ。

【請求項７】

請求項１～６のいずれか１項に記載のセンサにおいて、作業電極と基準電極は、サンプル受入れキャビティ内の互いに向かい合った表面上に対面状態で配置されていることを特徴とする、センサ。

【請求項８】

請求項１～７のいずれか１項に記載のセンサにおいて、試薬層は、作業電極と基準電極の両方を覆っていることを特徴とする、センサ。

【請求項９】

液体サンプル中の分析物の電気化学式検出システムであって、

（ａ）サンプル受入れキャビティ内に設けられた作業電極及び基準電極と、作業電極に被着された状態でサンプル受入れキャビティ内に設けられた試薬層とを備えた使い捨て電気化学式センサを有し、試薬層は少なくとも、分析物が存在していると電気化学信号を生じさせる酵素を含み、サンプル受入れキャビティの容積は、１．５μｌ未満であり、センサは、１０秒以下の時間内に分析物の量と相関した測定値をもたらすように選択されており、

（ｂ）使い捨て電気化学式センサを受け入れる検査用計器を有し、計器は、計器内に挿入された検査ストリップへのサンプル塗布の検出後にサンプル中の分析物を表す電流の測定を制御するタイミング回路を有し、タイミング回路は、電流の測定がサンプル塗布の検出後１５秒以下の時点で生じるようにしてあり、

前記使い捨て電気化学式センサは、基体上に形成された３つの接着剤パッドを更に有し、３つの接着剤パッドのうち第１の接着剤パッドが、試薬層の第１の側部に設けられ、第２の接着剤パッドが、第１の接着剤パッドから見て反対側の試薬層の第２の側部に設けられ、それにより、試薬層及びその下に位置する電極は、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間に配置され、第３の接着剤パッドが、試薬層から分離された状態で第１の側部及び第２の側部とは異なる試薬層の第３の側部に設けられ、前記接着剤パッドは、サンプル受入れキャビティの厚さを定めてあることを特徴とするシステム。

【請求項１０】

分析物の検出のための使い捨て電気化学式センサを製造する方法であって、

（ａ）作業電極及び基準電極を基体上に形成する工程を有し、

（ｂ）絶縁層を作業電極及び基準電極上に形成する工程を有し、前記絶縁層には、作業電極及び基準電極の少なくとも一部を露出させる開口部が形成されており、

（ｃ）試薬層を作業電極の少なくとも露出部分上に形成する工程を有し、前記試薬層は少なくとも、分析物が存在していると電気化学信号を生じさせる酵素を迅速水和性マトリックス中に有し、

（ｄ）３つの接着剤パッドを基体上に形成する工程を有し、３つの接着剤パッドのうち第１の接着剤パッドが、試薬層の第１の側部に設けられ、第２の接着剤パッドが、第１の接着剤パッドから見て反対側の試薬層の第２の側部に設けられ、それにより、試薬層及びその下に位置する電極は、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間に配置され、第３の接着剤パッドが、試薬層から分離された状態で第１の側部及び第２の側部とは異な

る試薬層の第３の側部に設けられ、
（ｅ）第１の親水性フィルムを第１の接着剤パッド及び第２の接着剤パッド上に積層する工程を有し、前記第１の親水性フィルムは、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間の空間を跨いでおり、第２の親水性フィルムを第３の接着剤パッド上に積層する工程を有し、
（ｆ）トップカバーを親水性フィルム上に付着させる工程を有し、それにより基体、第１の接着剤パッド、第２の接着剤パッド及び第１の親水性フィルムで画定されるサンプルチャンバが、１．５μｌ未満の容積を有するように形成されることを特徴とする方法。
【請求項１１】
請求項１０記載の方法において、結果的に得られた装置を、試薬層の第３の側部と反対側の試薬層の第４の側部に隣接した位置で第１の接着剤パッド及び第２の接着剤パッドを通って延びる線に沿って切断する工程を更に有していることを特徴とする、方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の分野
本願は、血液中のグルコースレベルをモニターするために糖尿病患者によって使用されるタイプの使い捨て電気化学式グルコースセンサに関する。
【０００２】
発明の背景
使い捨てストリップ形電気化学式グルコースセンサは、１０年以上にもわたって市販されており、米国特許第４，７１１，２４５号明細書および同第５，７０８，２４７号明細書を含む種々の特許文献に記載されている。これらセンサは、酵素と電極との間における電荷交換を容易にするレドックスメディエイタ（redox mediator）を利用している。これら装置は、旧式の光技術と比較して、例えば血液が計器中に入らず、計器それ自体が非常に軽量であって扱いにくさの度合いが低い傾向があるという顕著な利点をもたらすが、これら装置には幾つかの欠点もある。電気化学的検査結果は典型的には、サンプル中に存在する他の電気活性種の影響を受けると共にサンプルの酸素含有量及びヘマトクリットの影響も受ける。
【０００３】
電気活性種による妨害の理由は非常に単純である。化学種の被酸化性が高いと、その結果として電流が増大し、これにより読みが大きくなる。電流の増大は、電極表面のところでの直接的な酸化に起因している場合があり、或いはレドックスの触媒作用により生じる場合がある。或る製造業者は、補助電極を用いてバックグラウンドサブトラクション（減算）を行うことによりこの問題を解決しようとした。この方法は有用ではあるが、これにより余分の製造工程が新たに加わってコストが増すと共に余分の測定が行われ、これと関連した誤差が生じ、それにより精度が低下する。バックグラウンドサブトラクションが原因となって過剰修正が行われることがある。というのは、インターフェラント（interferant）レドックス触媒の効率が分析物濃度に応じて２つの電極で異なる場合があるからである。
【０００４】
酸素の作用効果とヘマトクリットの作用効果は、互いにリンクしている。酸素は、グルコースオキシダーゼの天然コファクター（補因子）であり、したがって、酸素が存在する状態では酸素とレドックスメディエイタは互いに激しく競合することになり、その結果、信号が劣化する。これと同様に、ヘモグロビンは効率の高い酸素伝達媒体なので、サンプルのヘマトクリットが多いと、これによっても信号が劣化することになる。血液細胞を電極表面から遠ざけたままにする排除メンブレンが、ヘマトクリットの影響を軽減するために提案されている（米国特許第５，６５８，４４４号明細書）。この手法により追加の製造工程が新たに生じるが、とにかく、この手法は、酸素に基づく効果の一部について有効であるに過ぎない。
【０００５】

かくして、インターフェラントの存在による影響が最小限に抑えられた血液中の分解物レベル、特にグルコースについての読みをもたらす使い捨て電気化学式装置が要望されている。

【０００６】

発明の概要

本発明によれば、液体サンプル中の分析物、例えばグルコースの検出のための使い捨て電気化学式センサが提供される。このセンサは、サンプル受入れキャビティ内に設けられた作業電極及び基準電極と、作業電極に被着された状態でサンプル受入れキャビティ内に設けられた試薬層とを備え、試薬層は少なくとも、分析物の存在において電気化学信号を生じさせる酵素を含み、サンプル受入れキャビティの容積は、１．５μｌ未満であり、センサは、１０秒以下の時間内に分析物の量と十分に強く（R^2 ＞０．９５）相関した測定値をもたらして分析物の正確且つ高精度の検出及び定量化の際に測定値を利用できるようにする。

【０００７】

センサは、液体サンプル中の分析物の検出のための計器と組み合わせて用いられる。適当な計器が、計器内に挿入された検査ストリップへのサンプル塗布の検出後にサンプル中の分析物を表す電流の測定を制御するタイミング回路を有し、タイミング回路は、電流の測定がサンプル塗布の検出後、１５秒以下の時点で生じるようにする。

【０００８】

実施形態の詳細な説明

電気化学式ストリップの性能を向上させるうえで重要な点は、媒介反応が妨害反応よりも活発になるようにストリップを設計することにある。グルコース検出の場合、分析物の特定の反応は、還元されたメディエイタの酵素生成後の電極表面のところでのメディエイタの酸化を伴う媒介反応である。したがって、本発明者の達した結論によれば、最大集電効率を得るためにこれら反応が電極表面に密接して起こるよう検査を構成すべきである。

【０００９】

検査中に起こる拡散プロセスを考察するのは価値のあることである。サンプルを図１に示すように検査ストリップに塗布した場合を考える。検査ストリップは、その乾燥状態にあり、酵素Ｅ及びメディエイタＭを含む試薬層で覆われた電極を有している。検査サンプルは、グルコースＧ、電気化学インターフェラントＩ及びヘモグロビンＨｂに結合可能な酸素O_2を含んでいる。サンプル塗布の際、電極から離れて検査サンプルに向かうＥ及びＭの正味の拡散束（flux）があり、他方、電極に向かうＧ及びＩの正味の拡散束がある。それ故、サンプル塗布後における非常に短い時点では、酵素の大部分は、依然として電極の近くに位置し、酵素とグルコースの反応の結果として、捕捉されるよう電極の十分近くに位置した還元状態のメディエイタ分子が生成する可能性が高い。長時間経過すると、酵素の大部分はサンプル中に「より深く」拡散し、ここでグルコースと反応する場合がある。これは、２つの作用効果を有している。第１に還元酵素がＭではなくO_2によって酸化される可能性が高い。というのは、Ｍの濃度は、電極から離れるにつれて減少し、O_2の濃度は電極から離れるにつれて増大することになるからである（反応が同一であることに因る）。たとえ還元酵素がＭと反応しても、還元されたＭが拡散して電極に戻って検出可能な信号の付随生成物で再酸化される可能性は低い。第２に、今説明した反応の順序は、内方に拡散するＧを減少させる効果があり、したがって、或る程度の効率をもって検出できる電極の付近に実際に到達するＧの量は減少することになる。これら要因の双方を原因として、サンプル中に酸素が存在していると信号が劣化することは明らかである。

【００１０】

これと同様に、通常のインターフェラントは、容易に酸化されやすい物質、例えば、アスコルビン酸、アセトアミノフェン及び尿酸であり、これらは電極表面に到達すると、存在している可能性のある還元メディエイタと共に酸化される。この効果は、Ｉが電極表面の近くに存在しているときにのみ起こりうるので、電極中へのＩの拡散が生じる前の短い時間ではその最小状態にあるであろう。

【００１１】
この機械学的な説明から明らかなように、インターフェラント及びヘマトクリット／酸素レベルの問題の両方に対する１つの解決策は、極めて短時間で測定を行うことである。別の解決策は、電極の表面積がサンプルの量と比較して非常に大きいようにサンプル量を制限することである。良好な手法は、電極上のサンプル層が非常に薄い（例えば、＜２００ミクロン）ようにすることである。サンプルの量を制限することで得られる１つの利点は、溶液に関する流体力学的挙動が迅速に落ち着くということにある。サンプルの量が多い場合、サンプル中の対流の影響により測定値にノイズが入る。少ないサンプルの量を薄いフィルム（薄膜）の形態で維持することにより、対流による影響が最小限に抑えられる。これが意味することは、サンプルの量が少ないと、測定を容易に行うことができるということである。

【００１２】
実際には、これら解決策は、互いに関連していて、両方とも本発明のバイオセンサで実現される。かくして、本発明は、サンプル中の分析物の量の電気化学的測定を行い、例えば、従来公知のシステムよりも短時間で血液中のグルコースレベルの定量化を行うようになった使い捨て電気化学式センサ及び関連の計器を提供する。本発明のセンサは、優れた性能を達成するために短い測定時間と少ないサンプル量の協働関係を利用する。サンプルの量を少なくすることにより、流体力学的影響が早くおさまるので測定が容易になり、短時間で測定が行いやすくなる。なお、サンプルの量が少ないことにより短時間で測定を行う必要がある。というのは、微弱な信号が長時間で段々小さくなって行き、したがって信頼性のある読みを提供できないからである。この種の構成を選択することにより、メディエイタ濃度のレベルが高く保たれて、メディエイタが酸素と一層効率的に競合し、還元酵素が得られるようになる。

【００１３】
少ないサンプルの量を利用する装置を提供することは、患者の立場から見て非常に好ましい。少ないサンプルの量を利用して分析物濃度について信頼性のある測定値を生じさせる装置を提供することが課題である。このプロセスの第１の部分は、少量のサンプルを受け入れるキャビティを定めることである。このキャビティの容量は、電極の面積と電極相互間のギャップの大きさによって決定される。任意所与の印刷法により達成できる電極の面積には、エッジ解像力及び印刷許容誤差によって定まる下限がある。公知の電極印刷インキを用いる場合のこの精度を向上させる一方法は、共通譲受人の国際公開第ＷＯ　００／４２４２２号パンフレットに記載された印刷法を用いることであり、かかる特許文献を本明細書の一部を形成するものとしてここに引用する。

【００１４】
電極の「面積」をいったん最小限に抑えると、サンプルの量を更に、電極表面相互間のギャップによって定める。主要な目的は、狭いけれども変わらないギャップを得ることにある。しかしながら、少ないサンプルの量が非常に狭いギャップ（即ち、＜２００μｍ）を用いて達成される場合、通常の半無限拡散条件を満たさないことは思い起こされるべきである。このため、拡散層が、ギャップ全体を横切って延びてサンプルを著しく劣化させる場合がある。このような状況下において、装置の精度は、ギャップサイズを決定する組立法の精度という追加の要因の影響を受けるようになる。測定時間と、ギャップサイズの精度が重要になるサイズとの間には或る関係があり、これは次の公式を考察することにより理解できる。

【００１５】
【数１】

$$L = \sqrt{Dt}$$

上式において、Ｌは拡散長さ、Ｄは拡散係数、ｔは時間である。検査時間を１５秒から５秒に短縮すると、拡散長さは１／√（３）倍になる。実際問題としてこれが意味することは、測定時間を短くすることにより、ギャップの精度が装置の精度に関して相当大きな要

因となるような制限条件に陥ることなく、ギャップのサイズを一段と減少させることができるということである。かくして、例えば、拡散係数が$10^{-5}cm^2\ sec^{-1}$であると仮定すると、１５秒間の検査では１２５μｍが必要になるのと比べて５秒間の検査では、ギャップのサイズが７０μｍよりも大きいことが必要である。これらの要因を考慮すると、本発明のセンサについての適当な構成では、サンプル受入れキャビティは容積が１．５μｌ未満である。ギャップサイズについての考察と組み合わせると、これが意味することは、作業電極が望ましくは、その表面積とギャップサイズの比が約０．５ｍｍ乃至１００ｍｍであるように寸法決めされるということである。特定の好ましい構成では、容積が０．５μｌ乃至０．８μｌのサンプル受入れコンパートメントを形成するには、各電極の面積は０．８mm^2であり、ギャップサイズは１００μｌｍ乃至１５０μｍである。

【００１６】

図２は、本発明の第１の実施形態の電気化学式センサ１０を示している図である。電極１１，１２がベース基体１３上に形成されている。ベース基体１３は、スペーサ１４，１５及びトップカバー１６と組み合わさって、電気化学反応が生じるキャビティ１７を形成している。例示の実施形態では、電極の表面積は５mm^2であり、キャビティの容積は、適当には１．５μｌ未満であり、好ましくは１μｌ未満、最も好ましくは０．５μｌ未満である。

【００１７】

図２に示すタイプの装置は、次のようにして製造できる。電極１１，１２を基体１３に被着させる。特定の被着法は、電極の性状によって決定されることになろう。なお、スクリーン印刷法が多くの材料にとって好ましい方法である。チャンバ内のサンプルにさらされる電極の面積は、絶縁マスクを電極に被着させることによって定められる（これについては、共通譲受人の国際公開第ＷＯ　００／４２４２２号パンフレットを参照されたい）。次に、試薬層を被着させる。この層は、電極の両方を覆ってもよく、或いは、作業電極を覆う面積に限定されてもよい。次に、スペーサ１４，１５を電極の周りにパターンをなして形成する。好ましい実施形態では、これらスペーサを形成するのに、乾燥高さが約１５０μｍの接着剤の層を印刷する。このスペーサは、予備成形固体材料を用いる必要なく毛管状ギャップを構成し、かくして本発明の装置の製造が実質的に容易になる。最終工程は、カバー１６を取り付けてチャンバ１７を完成することである。好ましい実施形態では、粘着性スペーサ１４，１５を介してカバー１６を装置に取り付ける。

【００１８】

図９Ａ乃至図９Ｃは、本発明のセンサを製造するための製造法の特定の実施形態を示している図である。単一のセンサが図示されているが、一般に２以上のセンサが調製されることは理解されよう。図９Ａは、カバーの積層前の装置の構造を示している図である。この段階におけるセンサは、基体（図面を分かりやすくするために図示されていない）に被着された２つの電極１１，１２を有している。これら電極への電気的接続部は図示されていない。例えば分析物について適当な酵素を含む試薬パッド１００を両方の電極上に被着させる。接着剤パッド１０１，１０２，１０３を試薬パッドの３つの側部に被着させる。次に、親水性フィルム（例えば、３Ｍ９９６２、即ち、厚さ１００ミクロンの界面活性剤で処理された光学的に透明なポリエステルフィルム）の２つの小片１０４，１０５を、一方が電極及び試薬パッドを覆った状態で接着剤パッド１０１，１０２を跨ぎ、もう一方がカバー１１６を受け入れる一定の高さの支持体となるよう接着剤パッド１０３の一部を覆った状態で２つの場所に配置する（図９Ｂ）。これら親水性フィルム片をこのように配置することにより、２つの電極上に毛管チャンバが形成される。フィルムの親水性コーティングにより、形成されたサンプルチャンバ内への検査液体の毛管作用による運動が促進される。スペーサ又はフィルムが設けられていない領域にギャップ１０６を形成することにより、検査液体が形成されたサンプルチャンバ内に移動すると空気がチャンバの背面から逃げ出ることができる。感圧テープをトップカバー１１６として親水性フィルム上に付着させる。トップカバー１１６は適切にはポリエステルフィルムで作られ、このトップカバーを熱活性化接着剤又は感圧接着剤の何れかで被覆するのがよい。最終工程は、装置を切断

し、例えば図９Ｂの破線Ｃ－Ｃに沿って切断することにより適当に開口したサンプルチャンバを形成することにある。図９Ｃは、このＣ－Ｃ線に沿って切断された後の装置の断面図である。図示のように、サンプルチャンバへの毛管入口１１０が、基体１３、接着剤パッド１０１，１０２及びトップカバー１１６付きの親水性フィルム１０４で構成されている。フィルム１０４，１０５は、接着剤パッド１０１，１０２によって支持されている。

【００１９】

図３は、本発明の第２の実施形態の電気化学式センサ２０を示している図である。電極２１，２２がそれぞれ、ベース基体２３及びトップカバー２６上に形成されている。ベース基体２３は、スペーサ２４，２５及びトップカバー２６と組み合わさって、電気化学反応が生じるキャビティ２７を形成している。センサは、容量が小さいものとして構成されると共にベース基体２３とトップカバー２６との間のギャップが狭い状態、例えば５０μｍ乃至２００μｍとして構成されている。電極の表面積は、折り畳み対面構成になっているので、同一サイズの装置の２倍であることは注目されるべきである。

【００２０】

この構造の装置を製造するには、２０００年３月２８日に出願された共通譲受人の米国特許出願第０９／５３７，５９９号明細書に記載されているようなウェブ印刷技術を用いるのがよく、かかる特許文献の開示内容を本明細書の一部を形成するものとしてここに引用する。この技術は、図４に概略的に示すタイプの装置を利用する。基体３１の走行ウェブを供給ロール３２に巻き付けた状態で準備し、この走行ウェブを複数の印刷ステーション３３，３４，３５上に搬送し、これら印刷ステーションは各々、互いに異なる層を基体上に印刷する。印刷ステーションの数は任意の数であってよく、製造されるべき特定の装置に必要な層の数で決まることになろう。連続して配置された印刷ステーション相互間で、ウェブは好ましくは乾燥装置３６，３７，３８を通って搬送され、それにより次の被着工程に進む前に各層を乾燥させる。最終の乾燥装置３８の通過後、印刷ウェブを巻取りロール上に集め、又は直接処理後装置３９内へ導入する。この装置内で図３に示す構造を持つ装置を製作するため互いに平行な導電性トラック７１，７２、試薬層７３及び絶縁層７４を図５に示すように基体７０に被着させる。次に、基体を２つの導電性トラック相互間に設けられた折り畳み線に沿って折り畳んで２つの対面電極が試薬層によって分離されたセンサを作る。キャビティ内の互いに向かい合った表面上に設けられた電極の電極構成が有利である。というのは、電極を分離する溶液層が薄いことの結果として溶液抵抗に起因した電圧降下が低いからである。

【００２１】

上述の本発明の実施形態の各々に関し、キャビティは絶縁材料で構成される。この目的に適した絶縁材料としては、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート及びポリ塩化ビニルが挙げられる。基体として使用するのに適した材料としては、ポリエステルフィルム、例えば３００ミクロンポリエステルフィルム及び他の絶縁基体材料、例えばポリ塩化ビニル（ＰＶＣ）及びポリカーボネートが挙げられる。絶縁マスクの構成材料とすることができる特定のポリエステルを主成分とする特定の印刷可能な誘電体は、ERCON R488-B(HV)-B2 Blueである。キャビティ内では、作業電極及び基準電極が、導電性材料で形成されている。適当な導電性材料としては、導電性炭素、金、プラチナ、アルミニウム又はドープ済み半導体材料、例えばｎ型SnO_2が挙げられる。好ましい導電炭素材料は、ERCON ERC1, ERCON ERC2, Acheson Carbon Electrodag423である。これらの仕様を持つ炭素は、エルコン・インコーポレイテッド（Ercon, Inc.；米国マサチューセッツ州ウォルソム所在）又はエイクソン・コロイズ（Acheson Colloids；英国プリマス・プリンスロック所在）から入手できる。半導体電極は、試薬層の酵素又は他の成分の表面付着を可能にするよう機能化できるので魅力のある選択肢となる。これにより、不動化と関連した利点が得られると共に試薬と電極との間の直接的な電子の伝達が可能になる。

【００２２】

電極を異種材料で作ってもよく、同種材料で作ってもよい。電極が同一組成物のもの、例えば炭素電極の実施形態には利点がある。具体的に説明すると、単一の電極材料を用いる

ことにより、作業電極及び基準電極を一工程で被着させることができ、かくして電極の印刷を製造工程から省くことができる。２つの電極を互いに非常に密接して印刷するのがよい。というのは、これら相互の離隔距離は、別々の印刷作業相互間で達成できるアライメント（許容誤差は、０．５ｍｍ以上）ではなく、一スクリーン上でのアートワーク（許容誤差は、約２００μｍ）だけで決定されるからである。これにより、反応領域を一層コンパクトにすることができ、かくして、電極を覆うのに必要な血液の量が減少する。

【００２３】

作業電極上には１以上の試薬層が被着されており、かかる被着層は、ターゲット分析物の検出の際に用いられる酵素及びメディエイタを含んでいる。かくして、例えば、グルコースセンサでは、試薬層は、酵素、例えばグルコースオキシダーゼ及びメディエイタ、例えばフェリシアン化物、メタロセン化合物、キノン、フェナジニウム塩、指示薬ＤＣＰＩＰ及びイミダゾール置換オスミウム化合物を含んでいる。試薬層は、酵素とメディエイタの両方を含む単一の層であってもよく、或いは、複数の下層（sub layers）から構成されていてもよく、これら下層の中には、酵素又は酵素とメディエイタを含むものがあれば、メディエイタだけを含むものもある。

【００２４】

本発明の装置は短時間の間隔で用いられるようになっているので、電極の重要な特性は迅速に水和できることである。水和速度は、試薬層の組成によって決まる。米国特許第５，７０８，２４７号明細書及び国際公開第ＷＯ　００／４２４２２号パンフレットに記載されている形式のシリカを主成分とする試薬層を利用した電極システムにより、迅速な湿潤及び水和が可能であり、したがって、本発明のセンサに用いるのに適している。本発明のセンサの電極の試薬層にとって最適の材料は、電極表面と接触状態を保ち、試薬を電極の付近に保持するゲルを形成するよう迅速に水和する材料である。試薬層が水和後に迅速に分散する場合、試薬（及び特に酵素試薬）は、サンプル中の分析物濃度を反映する信号を生じさせるのに最も有利な電極表面の付近から迅速に失われる。

【００２５】

試薬層は、分析物濃度を反映する信号の発生に直ぐに参加できる形態でメディエイタを更に含む必要がある。酵素によって酸化される分析物、例えばグルコースの場合、これはメディエイタが迅速に溶解可能であって酸化された形態で存在しなければならないということを意味している。メディセンス（Medisense）社によってＱＩＤ（登録商標）及びＥＸＡＣＴＥＣＨ（登録商標）として市販されているグルコースストリップでは、メディエイタは実際には、還元形態で存在するので、グルコースモニター反応に参加可能になる前に、現場でこれを酸化させる必要がある。これにより、ストリップの応答時間が制限され、短い検査時間ではその使用ができなくなる。

【００２６】

基準電極の場合、基準電極は、迅速に水和する必要があり、しかも作業電極により瞬時に、即ち水和の２００ミリ秒以内に必要とされる電流を供給するに足るほど十分安定状態になることができる。従来型の銀／塩化銀基準電極は、それほど迅速には安定状態にはならない。他方、フェリ－フェロシアン化物基準電極は、非常に素早く平衡状態になるよう製作できる。この設計では、迅速に可溶化し又は分散するメディエイタ含有層が用いられる。本発明の特徴の実施形態では、試薬層がメディエイタとしてフェリシアン化カリウムを含有した状態でカーボンインキ電極を用いる。グルコースオキシダーゼは、ヒドロキシエチルセルロース－シリカベース中に酵素として用いられ、配合物の親水性を高めるポリマーが添加される。このシステムは、非常に大きな表面積を有し、非常に迅速に濡れる。

【００２７】

作業電極及び基準電極に加えて、本発明の装置は、第３の電極を有するよう構成できる。第３の電極は、バックグラウンド反応を補償するようになったダミー電極又は従来型３電極システムの対向電極であるのがよい。第３の電極は又、同一の作業電極であってもよい。

【００２８】

上述の本発明の実施形態では、全ての層は迅速に可溶化され又は水和される。酸化されたメディエイタの迅速な可溶化又は少なくとも水和がインターフェラントの消費にとって問題でなく、場合によってはこの要件を満たすのに役立つが、上述のように酵素含有層にとって必ずしも良好な特性であるというわけではない。というのは、これにより、最も有利な電極に近い領域から酵素が拡散して離れやすくなるからである。したがって、両方の観点を組み合わせた有益な構成例が、図６に示されている。本発明のこの実施形態では、センサ６０は、底部基体６３、スペーサ６４，６５及びトップカバー６６で形成されたキャビティ６７を有している。２つの炭素電極６１，６２をキャビティ６７内で底部基体６３に被着させる。電極６２を酵素及びメディエイタを含む比較的薄い（例えば、５μｍ）粘性ゲル層６８で被覆する。次に、両方の電極６１，６２をメディエイタを含むが酵素は含まない比較的厚い（例えば、２５μｍ）分散層６９で被覆する。

【００２９】

本発明の別の実施形態では、２つの別々の層がインターフェラントの効果を一段と減少させるよう構成されている。インターフェラントの化学的消費を利用する一方法は、外面に過剰の酸化メディエイタを有する試薬層を提供することにある。特に魅力のある構成例では、電極を酵素及びメディエイタを含む薄い試薬層で被覆し、次にメディエイタだけを含む厚い層で被覆する。両方の層を、拡散を制限するが電流を流すことができるよう迅速に水和されるマトリックスの状態に被着させる。酵素を薄い層に閉じ込めることにより、酵素は大部分が電極に密接して保持され、上述の寄生反応が重要ではないようになる。厚い外側のメディエイタ層は、内方へ拡散するインターフェラントに対してバリヤとなり拡散制限マトリックスにより所望の位置のままである。任意的に用いられる第３の層を、迅速に水和される分散可能なマトリックスの状態でメディエイタを含む第１の層及び第２の層の外部に設けてもよい。この場合も又、サンプルの量が少ないようにすることにより、サンプル中のインターフェラントの総量が最小限に保たれ、再構成の際の酸化メディエイタの濃度は高いので、メディエイタはインターフェラントを効果的に除去するようになる。明らなこととして、メディエイタの局所濃度は、サンプル中へ拡散して出ていくと低下し、妨害が一層重要になるであろう。本発明者の経験によれば、１μｌ未満、好ましくは０．５μｌ未満のサンプル量が理想的である。

【００３０】

本発明に従って製造されたセンサを用いると、公知のセンサを用いて達成された時間よりも非常に短い時間で検査測定を行うことができる。検査時間を短くすることにより、ヘマトクリットの影響を軽減させることができる。センサが或る血液成分、例えば白血球及び赤血球に対して遅延効果を有する試薬層で覆われた電極を有している場合、電極に到達した流体は、長時間で含むこれら血液成分よりも著しく少ない数のこれら成分を短時間で含むことになろう。

【００３１】

図７は、相関係数と検査時間の関係を表すグラフ図である。非常に短い検査時間では、システムはまだ安定化していないので相関関係は弱い。非常に長い検査時間では、これ又相関関係は弱くなり始める。検査時間を短くすることにより妨害を制限することが目的であるとすれば、検査は破線によって指示された期間内に適切に行われることになり、この期間は上述のセンサに関し、１０秒未満、好ましくは約５秒になろう。本発明の使い捨てセンサは、検査計器と組合せ状態で作用し、この期間内にグルコースの正確な測定を行う。かくして、センサは、短時間で正確且つ信頼性の高い情報を提供する信号を生じさせるよう構成され、センサが挿入される計器は、この期間中、情報を収集するようになっている。

【００３２】

図８は、本発明の例示の手持ち計器の外形図である。従来型計器と同様、本発明の計器は、結果を表示するディスプレイ８２及び使い捨てセンサを挿入できるスロット８３を備えたハウジング８１を有している。計器の動作のためにボタン８５及び（又は）スイッチを設けるのがよく、かかる計器の動作としては、記憶された結果の呼び戻し、校正のチェッ

ク等が挙げられる。本発明の計器が従来型計器と異なる点は、ハウジング内のエレクトロニクスにある。従来型計器では、液体サンプル、例えば血液の小滴をハウジング内の使い捨てセンサに加えることにより、測定サイクルが始まり、この間、試薬は溶解し、読みが取られる。このサイクルの開始は、ユーザがボタンを押し下げることによってもトリガできる。但し、これは好ましい方法ではない。計器内のマイクロプロセッサは典型的には、「スリープ」モードにあり、定期的に（例えば、１／２秒毎に）「立ち上がって」割込みをチェックする。割込みフラグが設定されていることをプログラムが検出し、ストリップが計器内に挿入され、或いは開始ボタンが押し下げられていることが分かると、プログラムはＲＵＮモードに入る。このモードでは、代表的には電圧がストリップに印加され、マイクロプロセッサはストリップによって消費される電流のレベルを表すパルス幅モニターの出力（デューティサイクル）をモニターする。サンプルをストリップに塗布するや否や、電流が流れる。というのは、ストリップは既に分極電圧を受けているからである。この開始電流の検出により、タイミングシーケンスが始まる。タイミングは、マイクロプロセッサによって制御される。２つの振動子、即ち、動作機能（即ち、測定の実施）のための４ＭＨｚクロック、及びＯｆｆモードで調子を合わせる３２ｍＨｚクロックがある。タイミングプロセスの開始時に印加された電圧は、（１）一定レベルに維持され、或いは（２）所定のプロフィールに続いて変えられる場合がある。何れの場合においても、電流を所定時間経過後に測定してサンプル中の分析物の量を評価する。例を挙げると、図７に示すデータは、サンプル塗布をｔ＝０で検出し、印加電圧を２秒間０にし、その間ストリップが開回路状態にあり、次に同一電圧を再印加したシステムで集めたものである。電流を多数の時点で測定し、電流と分析物モードの相関関係を各時点で求めた。

【００３３】

当該技術分野で知られている市販の計器では、測定サイクルは、サンプルの検出後２０秒乃至６０秒で電流の測定を行うよう定められている。特に本発明の高速応答ストリップに用いられるようになった本発明の計器では、測定サイクルは、サンプルの検出後１５秒以内の時点で、好ましくはサンプルの検出後５秒乃至１０秒の時点で電流の測定を行うよう定められている。

【００３４】

次に本発明を以下の非限定的な実験例を参照して更に説明する。

【００３５】

実験例１

本発明の高速応答グルコースセンサを、図９Ａ乃至図９Ｃに概略を示した手順及び以下の材料を用いて調製した。

基体：ポリエステルフィルム

カーボンインキ配合物：Ercon 導電炭素

試薬層の組成：以下に記載する。

接着剤：水性アクリル系コポリマー接着剤（Apollo Adhesives）

親水性フィルム：３Ｍ１００ミクロン親水性フィルム９９６２

トップカバー：感圧接着剤被覆ポリエステルストリップ（Tape Specialities）

【００３６】

試薬層を次のように形成した。１００ｍＭ水性くえん酸三ナトリウムのうち１００ｍｌを、１Ｍくえん酸の添加によりｐＨ５に調整した。このため、５ｇのヒドロキシエチルセルロース（ＨＥＣ）、１ｇのポリビニルアルコール、１ｇのＰＶＰ－ＶＡ　Ｓ－６３０ポリ（ビニルピロリドンビニルアセテート）及び０．５ｍｌのＤＣ１５００ダウ・コーニング社製消泡剤を添加し、均質混合した。混合物を一晩寝かせて気泡が分散するようにし、次にこの混合物を被膜組成物の調合のための原液として用いた。７．５ｇのCab-o-Sil TS610を手でＨＥＣ溶液に徐々に加え、ついには総量の４／５が添加されるようにした。残りを均質混合で加えた。次に、混合物を１２時間かけて圧延した。次に、１１ｇのフェリシアン化カリウムを加え、完全に溶解するまで均質混合した。最後に２．８ｇのグルコースオキシダーゼ酵素調製物（２５０ユニット／ｍｇ）を加え、次に徹底的に混合して溶液の

状態にした。その結果得られた調合物は、いつでも印刷できる状態にあり、或いは冷凍貯蔵できる。

【００３７】

センサを用いて標準のグルコース溶液を検査し、センサへのグルコースの添加後の種々の時点で電流を測定した。実際のグルコース濃度と測定したグルコース濃度の相関係数を各時間間隔の間で求めた。図７は、その結果のグラフ図である。図示のように、相関係数は、センサへのグルコースの添加後５秒で最大且つ最高の値を達成している。

【００３８】

実験例２

本発明の高速応答グルコースセンサを実験例１の場合と同様に作製した。これらセンサを利用してグルコースの互いに異なる濃度への暴露後、５秒で電流の大きさを測定した。比較のためメディセンス社のＱＩＤ（登録商標）グルコースセンサを同一条件下で検査した。図１０は、この実験結果をグラフで示しているグラフ図である。図示のように、本発明の高速応答センサの応答の直線性は非常に良好である（R^2 ＝０．９９９）。５秒の時点でのＱＩＤ（登録商標）センサの直線性はそれほど良好ではなかった（R^2 ＝０．８６３）。

なお、本発明の好ましい実施態様は以下の通りである。

（１） 液体サンプル中の分析物を検出する使い捨て電気化学式センサであって、サンプル受入れキャビティ内に設けられた作業電極及び基準電極と、作業電極に被着された状態でサンプル受入れキャビティ内に設けられた試薬層とを備え、試薬層は少なくとも、分析物が存在していると電気化学信号を生じさせる酵素を含み、サンプル受入れキャビティの容積は、１．５μｌ未満であり、センサは、１０秒以下の時間内に分析物の量と相関した測定値をもたらすようになっていることを特徴とするセンサ。

（２） 試薬層は、電子伝達メディエイタを更に含むことを特徴とする実施態様１記載のセンサ。

（３） 分析物は、グルコースであり、酵素は、グルコースオキシダーゼであり、メディエイタは、フェリシアン化物であることを特徴とする実施態様２記載のセンサ。

（４） 試薬層は、シリカを含むことを特徴とする実施態様１から実施態様３のうち何れか１項に記載のセンサ。

（５） 基準電極は、フェリシアン化物から成る電極であることを特徴とする実施態様１から実施態様４のうち何れか１項に記載のセンサ。

（６） 作業電極は、ドープ済み半導体材料から作られていることを特徴とする実施態様１から実施態様５のうち何れか１項に記載のセンサ。

（７） 基体上に形成された３つの接着剤パッドを更に有し、３つの接着剤パッドのうち第１の接着剤パッドが、試薬層の第１の側部に設けられ、第２の接着剤パッドが、第１の接着剤パッドから見て反対側の試薬層の第２の側部に設けられ、それにより、試薬層及びその下に位置する電極は、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間に配置され、第３の接着剤パッドが、試薬層から分離された状態で第１の側部及び第２の側部とは異なる試薬層の第３の側部に設けられ、前記接着剤パッドは、サンプル受入れキャビティの厚さを定めていることを特徴とする実施態様を１から実施態様６のうち何れか１項に記載のセンサ。

（８） 作業電極と基準電極は、サンプル受入れキャビティ内の互いに向かい合った表面上に対面状態で配置されていることを特徴とする実施態様１から実施態様７のうち何れか１項に記載のセンサ。

（９） 試薬層は、作業電極と基準電極の両方を覆っていることを特徴とする実施態様１から実施態様８のうち何れか１項に記載のセンサ。

（１０） 液体サンプル中の分析物の検出及び（又は）定量化のために使い捨て電気化学式センサと組み合わせて用いられる計器であって、計器内に挿入された検査ストリップへのサンプル塗布の検出後にサンプル中の分析物を表す電流の測定を制御するタイミング回路を有し、タイミング回路は、電流の測定がサンプル塗布の検出後１５秒以下の時点で

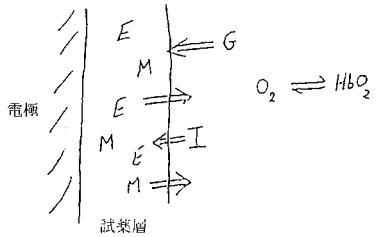
生じるようにすることを特徴とする計器。
（１１） タイミング回路は、電流の測定がサンプル塗布の検出後１０秒以下の時点で生じるようにすることを特徴とする実施態様１０記載の計器。
（１２） タイミング回路は、電流の測定がサンプル塗布の検出後５秒以下の時点で生じるようにすることを特徴とする実施態様１０記載の計器。
（１３） 計器は、タイミング回路が収納された手持ちハウジングを有し、前記ハウジングにはセンサを受け入れる開口部が設けられていることを特徴とする実施態様１０から実施態様１２のうち何れか１項に記載の計器。
（１４） 液体サンプル中の分析物の電気化学式検出システムであって、
（ａ）サンプル受入れキャビティ内に設けられた作業電極及び基準電極と、作業電極に被着された状態でサンプル受入れキャビティ内に設けられた試薬層とを備えた使い捨て電気化学式センサを有し、試薬層は少なくとも、分析物が存在していると電気化学信号を生じさせる酵素を含み、サンプル受入れキャビティの容積は、１．５μｌ未満であり、センサは、１０秒以下の時間内に分析物の量と相関した測定値をもたらすようになっており、
（ｂ）使い捨て電気化学式センサを受け入れる検査用計器を有し、計器は、計器内に挿入された検査ストリップへのサンプル塗布の検出後にサンプル中の分析物を表す電流の測定を制御するタイミング回路を有し、タイミング回路は、電流の測定がサンプル塗布の検出後１５秒以下の時点で生じるようにすることを特徴とするシステム。
（１５） 分析物の検出のための使い捨て電気化学式センサを製造する方法であって、
（ａ）作業電極及び基準電極を基体上に形成する工程を有し、
（ｂ）絶縁層を作業電極及び基準電極上に形成する工程を有し、前記絶縁層には、作業電極及び基準電極の少なくとも一部を露出させる開口部が形成されており、
（ｃ）試薬層を作業電極の少なくとも露出部分上に形成する工程を有し、前記試薬層は少なくとも、分析物が存在していると電気化学信号を生じさせる酵素を迅速水和性マトリックス中に有し、
（ｄ）３つの接着剤パッドを基体上に形成する工程を有し、３つの接着剤パッドのうち第１の接着剤パッドが、試薬層の第１の側部に設けられ、第２の接着剤パッドが、第１の接着剤パッドから見て反対側の試薬層の第２の側部に設けられ、それにより、試薬層及びその下に位置する電極は、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間に配置され、第３の接着剤パッドが、試薬層から分離された状態で第１の側部及び第２の側部とは異なる試薬層の第３の側部に設けられ、
（ｅ）第１の親水性フィルムを第１の接着剤パッド及び第２の接着剤パッド上に積層する工程を有し、前記第１の親水性フィルムは、第１の接着剤パッドと第２の接着剤パッドとの間の空間を跨いでおり、第２の親水性フィルムを第３の接着剤パッド上に積層する工程を有し、
（ｆ）トップカバーを親水性フィルム上に付着させる工程を有し、それにより基体、第１の接着剤パッド、第２の接着剤パッド及び第１の親水性フィルムで画定されるサンプルチャンバが形成されることを特徴とする方法。
（１６） 結果的に得られた装置を、試薬層の第３の側部と反対側の試薬層の第４の側部に隣接した位置で第１の接着剤パッド及び第２の接着剤パッドを通って延びる線に沿って切断する工程を更に有していることを特徴とする実施態様１５記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【図１】 使い捨て電極の付近の反応体としての化学種の拡散運動を示す図である。
【図２】 本発明の第１の実施形態のバイオセンサの断面図である。
【図３】 本発明の第２の実施形態のバイオセンサの断面図である。
【図４】 対面型センサ装置のウェブ印刷装置を示す図である。
【図５】 部分的に構成された対面式センサ装置を示す図である。
【図６】 本発明のセンサの断面図である。
【図７】 相関係数と検査時間のグラフ図である。
【図８】 本発明の計器の外形図である。

【図９Ａ】　本発明のセンサの構造を示す図である。
【図９Ｂ】　本発明のセンサの構造を示す図である。
【図９Ｃ】　本発明のセンサの構造を示す図である。
【図１０】　市販のストリップと本発明の高速応答ストリップの比較グラフ図である。

【図１】



【図２】

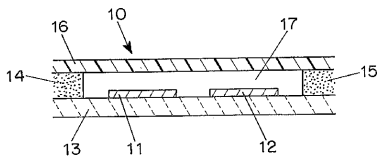


FIG. 2

【図３】

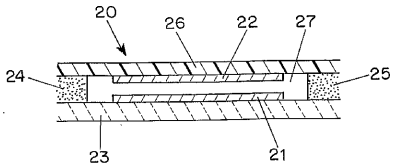


FIG. 3

【図４】

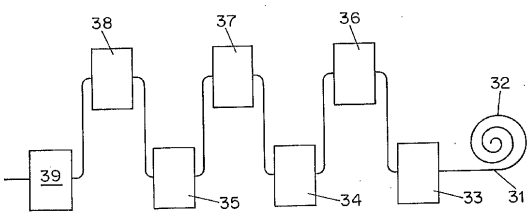
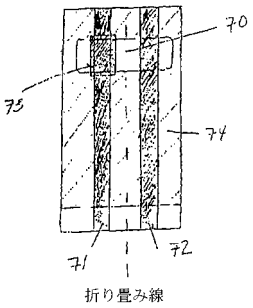


FIG. 4

【図５Ａ】



【図５Ｂ】

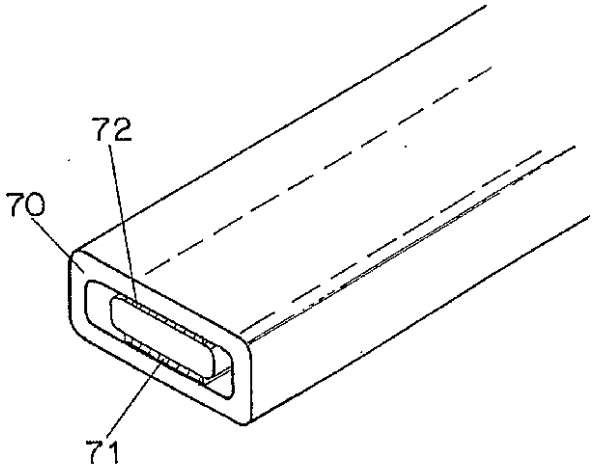


FIG. 5B

【図６】

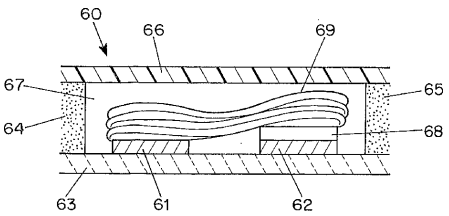
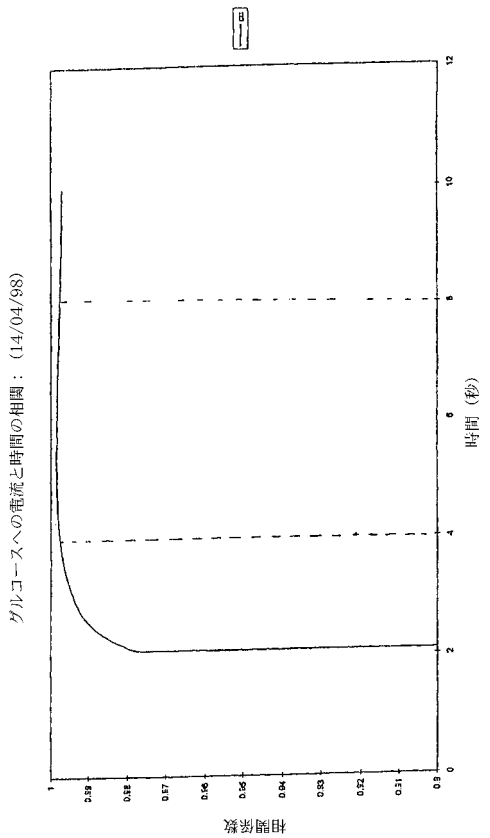


FIG. 6

【図７】



【図８】

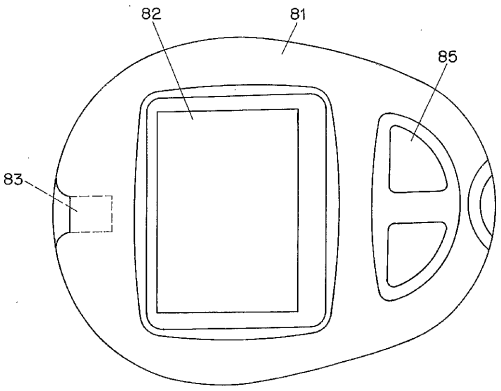


FIG. 8

【図９Ａ】

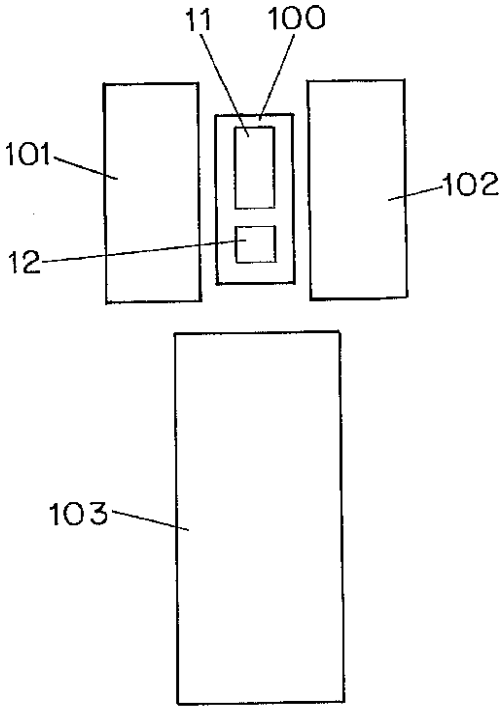


FIG. 9A

【図９Ｂ】

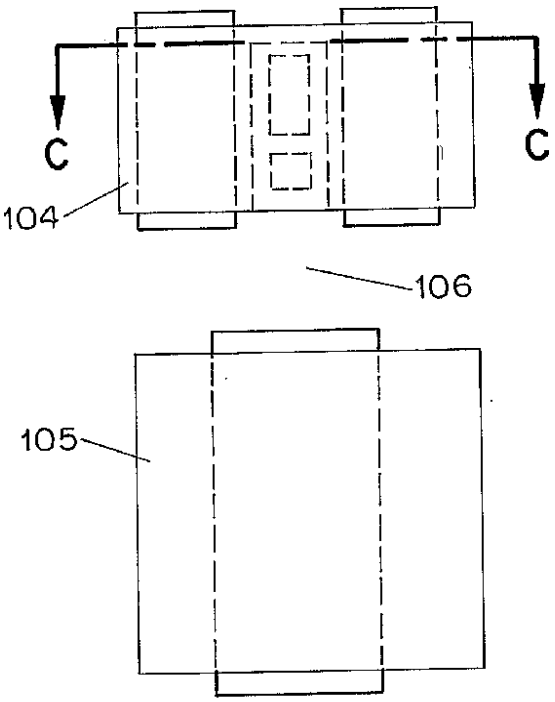


FIG. 9B

【図９Ｃ】

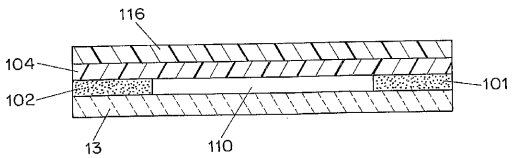
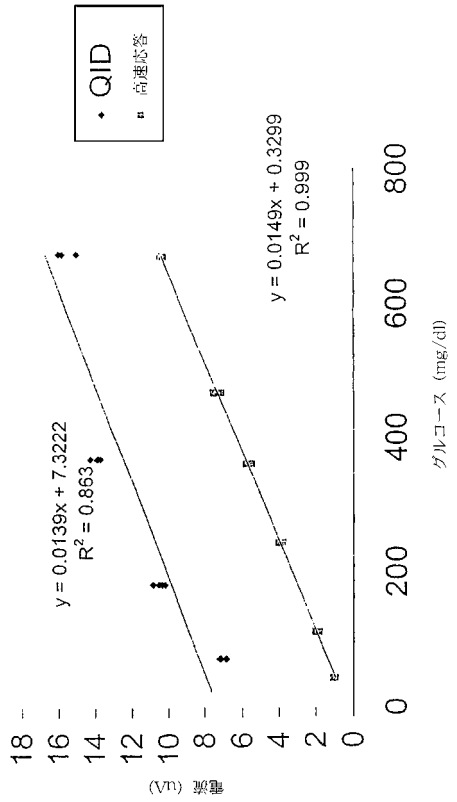


FIG. 9C

【図１０】


QID
高速応答
y = 0.0139x + 7.3222
R2 = 0.863
y = 0.0149x + 0.3299
R2 = 0.999
電流 (uA)
グルコース (mg/dl)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
200
400
600
800

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
G01N 27/30 353Z
G01N 33/66 C

(72)発明者 ベッキンガム・ヘレン・エリザベス
イギリス国、インバネス・アイブイ２・４エスエヌ、ペイトン・ストリート 6
(72)発明者 ホール・ジェフリー・エフ
イギリス国、インバネス・アイブイ２・７エヌエイチ、リソーリー、ブリッジ・ハウス（番地なし）

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開平１１－０９４７９０（ＪＰ，Ａ）
特開平１０－３１８９７０（ＪＰ，Ａ）
特表平０９－５０９７４０（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５２６７８５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９９／０１７１１５（WO，Ａ１）
国際公開第０１／０６７０９９（WO，Ａ１）
米国特許第０５８０２５５１（ＵＳ，Ａ）
特許第５７０８２４７（ＪＰ，Ｂ２）
特開平１１－３３７５１４（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－２５９１５８（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５１８６２０（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０５７０８２４７（ＵＳ，Ａ）
特開平０４－３５７４５２（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－０９４７９１（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－３１２７６１（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－０５１８９５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９８／０３５２２５（WO，Ａ１）
国際公開第００／０７３７７８（WO，Ａ１）
国際公開第０１／０５７５１０（WO，Ａ１）
国際公開第９７／０１８４６５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 27/26-27/49