

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4836699号
(P4836699)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 E
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N 21/78 Z

請求項の数 9 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2006-198173 (P2006-198173)	(73) 特許権者	000003078
(22) 出願日	平成18年7月20日 (2006. 7. 20)		株式会社東芝
(65) 公開番号	特開2008-22763 (P2008-22763A)		東京都港区芝浦一丁目1番1号
(43) 公開日	平成20年2月7日 (2008. 2. 7)	(74) 代理人	100091351
審査請求日	平成21年7月21日 (2009. 7. 21)		弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100075672
			弁理士 峰 隆司
		(74) 代理人	100109830
			弁理士 福原 淑弘
		(74) 代理人	100084618
			弁理士 村松 貞男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学式グルコースセンサチップおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板と、

前記基板の主面に形成され、前記基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一対の光学要素と、

前記光学要素間に位置する前記基板主面に形成され、発色剤、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより前記発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素および非イオン性セルロース誘導体を含むグルコースセンシング膜と

を備え、

前記センシング膜は、緩衝剤を取り込んだ負イオン性ポリマー、ここで前記負イオン性ポリマーがリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含むポリマーである、で前記第1、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が覆われ、かつこれら酵素および発色剤が前記非イオン性セルロース誘導体で保持された構造を有することを特徴とする光学式グルコースセンサチップ。

【請求項 2】

ガラス基板と、

前記ガラス基板の主面に形成され、前記ガラス基板内に光を入射させ、前記ガラス基板外に光を放出させるための一対の光学要素と、

10

20

前記光学要素が形成された前記基板の主面に形成され、前記基板より高屈折率の樹脂からなる光反射路層と、

前記光反射路層上の前記光学要素間に形成され、発色剤、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより前記発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素および非イオン性セルロース誘導体を含むグルコースセンシング膜とを備え、

前記センシング膜は、緩衝剤を取り込んだ負イオン性ポリマー、ここで前記負イオン性ポリマーがリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含むポリマーである、で前記第1、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が覆われ、かつこれら酵素および発色剤が前記非イオン性セルロース誘導体で保持された構造を有することを特徴とする光学式グルコースセンサチップ。

10

【請求項3】

前記第1酵素は、グルコースオキシターゼであり、前記第2酵素はペルオキシターゼであり、前記発色剤は、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンまたはN, N'-ビス(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)トリジンの少なくともいずれか一方であることを特徴とする請求項1または2記載の光学式グルコースセンサチップ。

【請求項4】

前記非イオン性セルロース誘導体は、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロースおよびヒドロキシアルキルアルキルセルロースの群から選ばれる少なくとも1つであることを特徴とする請求項1または2記載の光学式グルコースセンサチップ。

20

【請求項5】

前記センシング膜は、架橋性高分子化合物をさらに含むことを特徴とする請求項1または2記載の光学式グルコースセンサチップ。

【請求項6】

前記架橋性高分子化合物は、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、イオン性官能基から選ばれる少なくとも1つの基を持つ親水性モノマーと疎水性モノマーとの共重合体であることを特徴とする請求項5記載の光学式グルコースセンサチップ。

【請求項7】

前記グルコースセンシング膜は、透水性を付与するためのポリエチレングリコールまたはエチレングリコールをさらに含むことを特徴とする請求項1または2記載の光学式グルコースセンサチップ。

30

【請求項8】

グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素のいずれ一方の酵素をリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含む負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を他方の酵素、発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、または前記第1、第2の酵素をそれぞれ前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、各混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、或いは前記第1、第2の酵素の両方を前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、いずれかによりグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する工程と、

40

基板にこの基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一对の光学要素を形成する工程と、

前記光学要素間の前記基板領域上に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成する工程とを含むことを特徴とする光学式グルコースセンサチップの製造方法。

【請求項9】

50

グルコースを酸化または還元させる第 1 酵素、この第 1 酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第 2 酵素のいずれ一方の酵素をリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも 1 つのアニオン性基を含む負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を他方の酵素、発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、または前記第 1、第 2 の酵素をそれぞれ前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、各混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、或いは前記第 1、第 2 の酵素の両方を前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、いずれかによりグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する工程と、

10

ガラス基板の主面にこの基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一対の光学要素を形成する工程と、

前記光学要素が形成された前記基板の主面に前記基板より高屈折率の樹脂からなる光反射路層を形成する工程と、

前記光反射路層上の前記光学要素間に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成する工程と

を含むことを特徴とする光学式グルコースセンサチップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、光学式グルコースセンサチップおよびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

光学式グルコースセンサチップとしては、例えば皮下組織の体液抽出で血糖値を間接的に調べる低侵襲型血糖測定用のものが開発されている。このセンサチップは、ガラス基板と、この基板表面に形成され、その基板内に光を入射、放出させるための一対のグレーティングと、このグレーティング間に位置する前記基板表面に形成されるグルコースセンシング膜とを備えた構造を有する。このグルコースセンシング膜は、発色剤（例えば 3、3'、5、5' - テトラメチルベンジジン（TMBZ））、グルコースを酸化または還元させる第 1 酵素（例えばグルコースオキシダーゼ（GOD））、この第 1 酵素による生成物と反応して発色剤を発色させる物質を発生する第 2 酵素（例えばペルオキシダーゼ（POD））、および膜形成高分子化合物（例えばヒドロキシエチルセルロース（HEC）のようなセルロース誘導体）を含有する。

30

【0003】

このような構造のグルコースセンサチップにおいて、皮膚と前記センシング膜の間にシート状ゲルを配して電界をかけると、皮下組織液中のグルコースが皮膚からゲルを透過して前記センシング膜に到達する。このとき、前記センシング膜中の発色剤である TMBZ がグルコースと GOD、POD の反応に起因して発色する。この状態で光を前記基板に入射しその基板表面と前記一方のグレーディングで屈折させると、その光は前記基板と発色した TMBZ を含むセンシング膜の界面を伝播し、基板と他方のグレーティングの界面で屈折し、例えば受光素子で受光される。この受光したレーザ光強度は、前記グルコースセンシング膜の発色剤の発色により非発色時に受光素子で受光した光強度（初期強度）に比べて低下した値になり、その低下率から前記グルコースの濃度を検出する。

40

【0004】

しかしながら、前記センシング膜の長期間の保存、使用において、その中の第 1、第 2 の酵素は活性が急激に低下して劣化する。この劣化原因としては、センシング膜の pH 変化、第 1、第 2 の酵素のイオン強度の変化および第 1、第 2 の酵素の加水分解が挙げられる。第 1、第 2 の酵素が劣化されると、第 1 酵素と測定対象であるグルコースとの反応が不十分になる。このグルコースとの反応性の低下は、その後起こる、第 2 酵素との反応による発色剤を発色させる物質の発生を低下させ、結果として発色剤との反応低下、発色

50

度合の低下を生じてグルコースセンサチップの感度低下を招く。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、センシング膜中の第1、第2の酵素の経時的な劣化を抑制ないし防止することが可能な光学式グルコースセンサチップおよびその製造方法を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の第1態様によると、基板と、

前記基板の主面に形成され、前記基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一对の光学要素と、

前記光学要素間に位置する前記基板主面に形成され、発色剤、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより前記発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素および非イオン性セルロース誘導体を含むグルコースセンシング膜と

を備え、

前記センシング膜は、緩衝剤を取り込んだ負イオン性ポリマー、ここで前記負イオン性ポリマーがリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含むポリマーである、で前記第1、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が覆われ、かつこれら酵素および発色剤が前記非イオン性セルロース誘導体で保持された構造を有することを特徴とする光学式グルコースセンサチップが提供される。

【0007】

本発明の第2態様によると、ガラス基板と、

前記ガラス基板の主面に形成され、前記ガラス基板内に光を入射させ、前記ガラス基板外に光を放出させるための一对の光学要素と、

前記光学要素が形成された前記基板の主面に形成され、前記基板より高屈折率の樹脂からなる光反射路層と、

前記光反射路層上の前記光学要素間に形成され、発色剤、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより前記発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素および非イオン性セルロース誘導体を含むグルコースセンシング膜と

を備え、

前記センシング膜は、緩衝剤を取り込んだ負イオン性ポリマー、ここで前記負イオン性ポリマーがリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含むポリマーである、で前記第1、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が覆われ、かつこれら酵素および発色剤が前記非イオン性セルロース誘導体で保持された構造を有することを特徴とする光学式グルコースセンサチップが提供される。

【0008】

本発明の第3態様によると、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素のいずれ一方の酵素をリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含む負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を他方の酵素、発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、または前記第1、第2の酵素をそれぞれ前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、各混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、或いは前記第1、第2の酵素の両方を前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、い

10

20

30

40

50

ずれかによりグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する工程と、

基板にこの基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一对の光学要素を形成する工程と、

前記光学要素間の前記基板領域上に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成する工程と

を含むことを特徴とする光学式グルコースセンサチップの製造方法が提供される。

【0009】

本発明の第4態様によると、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素のいずれ一方の酵素をリン酸エステル、カルボキシレートおよびスルホン酸エステルからなる群から選ばれる少なくとも1つのアニオン性基を含む負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を他方の酵素、発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、または前記第1、第2の酵素をそれぞれ前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、各混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、或いは前記第1、第2の酵素の両方を前記負イオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、いずれかによりグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する工程と、

ガラス基板の主面にこの基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一对の光学要素を形成する工程と、

前記光学要素が形成された前記基板の主面に前記基板より高屈折率の樹脂からなる光反射路層を形成する工程と、

前記光反射路層上の前記光学要素間に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成する工程と

を含むことを特徴とする光学式グルコースセンサチップの製造方法が提供される。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、センシング膜中の第1、第2の酵素の経時的な劣化を抑制ないし防止することによって、グルコースを長期間に亘って高感度かつ安定的に検出することが可能な光学式グルコースセンサチップおよびその製造方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明の実施形態に係る光学式グルコースセンサチップを図面を参照して詳細に説明する。

【0012】

(第1実施形態)

図1は、第1実施形態に係る光学式グルコースセンサチップを示す断面図である。

【0013】

ガラス基板1は、主面に例えば3nm以上の厚さのSiO₂表層2を有する。一对の光学要素、例えば一对のグレーティング3は、前記SiO₂表層2の両端部付近表面にその基板1内に光を入射、あるいは基板1内の光を放出させるためにそれぞれ形成されている。なお、光学要素はプリズムなどで代用してもよい。これらのグレーティング3は、前記SiO₂表層2より高い屈折率を有する例えば酸化チタンから作られる。前記グレーティング3に比べて低屈折率を有する保護膜を、前記グレーティング3を覆うように形成してもよい。この保護膜は、使用する薬液・検体と反応しない材料、例えばフッ素樹脂から作られる。

【0014】

グルコースセンシング膜4は、前記グレーティング3間に位置する前記基板1のSiO₂表層2に形成されている。このグルコースセンシング膜4は、発色剤、グルコースを酸化または還元させる第1酵素、この第1酵素の生成物と反応することにより前記発色剤を発色させる物質を発生する第2酵素および非イオン性セルロース誘導体を含み、前記第1

、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆われ、かつこれら酵素、イオン性ポリマー、緩衝剤および発色剤が前記非イオン性セルロース誘導体で保持された構造を有する。

【0015】

ここで、第1、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素を緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆う基準は、次に説明する経時劣化の大小により決定する。

【0016】

すなわち、第1酵素にグルコースを添加し、反応させることにより生成した生成物を特定の発色剤に作用させて発色させ、このときの吸光度を測定する。第1酵素を一定の温度および湿度の雰囲気中に一定時間曝した後、この第1酵素にグルコースを添加し、反応させることにより生成した生成物を特定の発色剤に作用させて発色させ、このときの吸光度を測定する。前者に対する後者の吸光度の低下率を求める。

10

【0017】

また、グルコースに第1酵素および第2酵素を添加し、第1酵素の生成物と反応することにより生成した物質を特定の発色剤に作用させて発色させ、このときの吸光度を測定する。第2酵素を一定の温度および湿度の雰囲気中に前記第1酵素の吸光度測定と同様な時間曝した後、この第2酵素を第1酵素と共にグルコースに添加し、第1酵素の生成物と反応することにより生成した物質を特定の発色剤に作用させて発色させ、このときの吸光度を測定する。前者に対する後者の吸光度の低下率を求める。

【0018】

20

前記第1酵素の経過劣化に起因する吸光度の低下率と前記第2酵素の経過劣化に起因する吸光度の低下率とを比較し、吸光度の低下率の大きい酵素を選択し、緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆う。また、第1、第2の酵素のいずれにおいても吸光度の低下率の絶対値が大きい場合には両者を緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆うことが好ましい。

【0019】

前記グルコースセンシング膜4中の酵素および発色剤は、例えば下記表1に示す組み合わせにより用いられる。

【表 1】

第 1 酵素		第 2 酵素	発色剤
酸化 酵素	グルコース オキシターゼ	ペルオキシターゼ	3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン N, N'-ビス (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) トリジン 3, 3'-ジアミノベンジジン
	ヘキソキナーゼ	グルコース-6 - リン酸脱水素酵素	3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾリル)-2, 5-ジフェニル -2H-テトラゾリウムブロマイド
			2-(4-ロドフェニル)-3-(2, 4-ジニトロフェニ ル)-5-(2, 4-ジスルホフェニル) -2H-テトラゾリウム
			3, 3'-[3, 3'-ジメトキシ-(1, 1'-ビフェニル)-4, 4'- ジイル]ビス (2, 5-ジフェニル) -2H-テトラゾリウムクロライド
還元 酵素	グルコース デヒドロゲナーゼ	リンモリブデン酸	アミノベンゼン酸塩

【 0 0 2 0 】

前記グルコースセンシング膜 4 に用いる非イオン性セルロース誘導体は、膜形成に関与する高分子化合物である。この非イオン性セルロース誘導体としては、例えばメチルセルロース、エチルセルロースのようなアルキルセルロース；ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのようなヒドロキシアルキルセルロース；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシジエチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロースのようなヒドロキシアルキルアルキルセルロース；およびマイクロフィブロ化セルロース等を挙げることができ、これらは単体または混合物の形態で用いることができる。

【 0 0 2 1 】

前記イオン性ポリマーは、長期間の保存、使用において前記第 1、第 2 の酵素からの塩の析出を抑制する機能を有する。このイオン性ポリマーには、正イオン性ポリマーおよび負イオン性ポリマーがある。正イオン性ポリマーとしては、例えばアミノ基、グアニジノ基、ピグアニド基等のカチオン性基を含むポリマーが挙げられる。正イオン性ポリマーを具体的に例示すると、ポリアリルアミン塩酸塩、ポリビニルピリジン、ポリリジン等が挙げられる。負イオン性ポリマーとしては、例えばリン酸エステル、カルボキシレート、およびスルホン酸エステル等のアニオン性基を含むポリマーが挙げられる。負イオン性ポリマーを具体的に例示すると、ポリスチレンスルホン酸、ポリビニル硫酸、ポリアスパラギン酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリマレイン酸、ポリフマル酸、またはカル

10

【 0 0 2 2 】

前記緩衝剤は、長期間の保存、使用において前記第 1、第 2 の酵素の pH およびイオン強度を制御してそれら酵素の形態、構造の変化を抑制する機能を有する。この緩衝剤としては、例えばリン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤、炭酸緩衝剤等を用いることができる。

【 0 0 2 3 】

このような緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで第 1、第 2 の酵素のうちの少なくとも一方の酵素を覆うことによって、長期間の保存、使用において酵素のからの塩の析出を抑制すると共に、酵素の形態、構造の変化を抑制して高い活性状態を維持することが可能になる。

20

【 0 0 2 4 】

前記グルコースセンシング膜 4 には、架橋性高分子化合物を含むことを許容する。この架橋性高分子化合物としては、例えばヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、イオン性官能基から選ばれる少なくとも 1 つに基を持つ親水性モノマーと疎水性モノマーとの共重合体を挙げることができる。この親水性モノマーと疎水性モノマーとの共重合体は、特に 2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとブチルメタクリレートとの共重合体であることが好ましいことを実験にて確認している。

【 0 0 2 5 】

30

前記架橋性高分子化合物は、前記グルコースセンシング膜にこのグルコースセンシング膜の全組成物に対し $10^{-4} \sim 10$ 重量% 含有されることが好ましい。架橋性高分子化合物の含有量を全組成物に対して 10^{-4} 重量% 未満にすると、加温状態で膜構造が溶解して崩壊したり、膜構造中の空隙に保持している発色剤や酵素等が外部媒体に溶出したりすることを防ぐことが困難になる。一方、架橋性高分子化合物の含有量が 10 重量% を超えると、グルコースセンシング膜中の発色剤や酵素の量が相対的に低下してチップ感度が低下する虞がある。

【 0 0 2 6 】

前記グルコースセンシング膜 4 は、膜構造の空隙中に透水性を付与するためのポリエチレングリコールまたはエチレングリコールをさらに含むことを許容する。これにより親水性が高まり、水をグルコース導入用の媒体にする場合には反応感度が高まる。

40

【 0 0 2 7 】

次に、前述した図 1 に示す光学式グルコースセンサチップの作用を説明する。

【 0 0 2 8 】

検体、例えば人体の皮膚に貫通穴（ウエル）を有するアダプタ（図示せず）を当接させ、このアダプタに前述したセンサチップをそのグルコースセンシング膜 4 がウエル側に位置するように取り付ける。アダプタはグルコースセンシング膜 4 が検体と直接接触するのを回避させ、センシングの再現性を高めることに寄与する。これにより生じる空隙、前記ウエル内に抽出媒体（例えば水、生理食塩水などの液体、検体やセンシング膜と直接的に反応せず、馴染むもの）を満たし、外部から検体に微小電圧を加えることにより、皮下組

50

織液中のグルコースは皮膚から抽出媒体に抽出され、さらに抽出媒体から前記センシング膜 4 に浸透する。グルコースセンシング膜 4 を構成する第 1、第 2 の酵素（酸化または還元酵素）、および発色剤の組み合わせが、例えば前記表 1 に示すグルコースオキシターゼ（GOD）、ペルオキシターゼ（POD）および 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMBZ）である場合、センシング膜 4 に浸透されたグルコースは GOD により分解して過酸化水素を発生し、POD によりこの過酸化水素を分解して活性な酸素を放出し、この活性な酸素により TMBZ を発色させる。つまり、グルコース量に応じて TMBZ の発色度合が変化する。

このような状態で、前記レーザ光源（例えばレーザダイオード）5 からレーザ光を図示しない偏光フィルタを通して前記基板 1 裏面側に入射することにより、そのレーザ光が基板 1 の SiO₂ 表層 2 と左側のグレーティング 3 の界面で屈折し、さらに SiO₂ 表層 2 と発色した発色剤を含むグルコースセンシング膜 4 の界面で屈折して SiO₂ 表層 2 を含む基板 1 を伝播する。この際、伝播する光のエバネッセント波は前記グルコースセンシング膜 4 でのグルコース量に基づく発色度合に応じて吸収される。前記基板 1 を伝播した光は、右側のグレーティング 12 から放出され、受光素子（例えばフォトダイオード）6 で受光される。受光したレーザ光強度は、センシング膜 4 の非発色時に受光した光強度（初期強度）に比べて低下した値になり、その低下率からグルコース量を検出することが可能になる。

【0029】

次に、前述した図 1 に示す光学式グルコースセンサチップの製造方法を説明する。

【0030】

まず、以下の方法でグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する。

【0031】

（1）グルコースを酸化または還元させる第 1 酵素、この第 1 酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第 2 酵素のいずれ一方の酵素をイオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合する。この混合工程において、前記第 1、第 2 の酵素のうちのいずれ一方の酵素は緩衝剤が取り込まれたイオン性ポリマーで被覆される。つづいて、この混合液を他方の酵素、発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加し、混合することにより、前記イオン性ポリマーで覆われた一方の酵素が他方の酵素、前記発色剤と共に膜形成高分子化合物である非イオン性セルロース誘導体に分散されたグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する。

【0032】

（2）前記第 1、第 2 の酵素をそれぞれイオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合する。この混合工程において、前記第 1、第 2 の酵素はそれぞれ緩衝剤が取り込まれたイオン性ポリマーで被覆される。つづいて、これらの混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加し、混合することにより、前記イオン性ポリマーでそれぞれ覆われた第 1、第 2 の酵素が前記発色剤と共に膜形成高分子化合物である非イオン性セルロース誘導体に分散されたグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する。

【0033】

（3）前記第 1、第 2 の酵素の両方をイオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合する。この混合工程において、前記第 1、第 2 の酵素は緩衝剤が取り込まれたイオン性ポリマーで被覆される。つづいて、この混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加し、混合することにより前記イオン性ポリマーで覆われた第 1、第 2 の酵素が前記発色剤と共に膜形成高分子化合物である非イオン性セルロース誘導体に分散されたグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する。

【0034】

次いで、基板にこの基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一対の光学要素、例えばグレーティングを酸化チタン膜の成膜、パターンニングにより形成する。つづいて、これらグレーティング間の前記基板領域上に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成することにより光学式グルコー

10

20

30

40

50

スセンサチップを製造する。

【 0 0 3 5 】

以上、第 1 実施形態の光学式グルコースセンサチップによるグルコース量の検出において、グルコースセンシング膜は第 1、第 2 の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆われているため、長期間の保存、使用において酵素からの塩の析出を抑制すると共に、酵素の形態、構造の変化を抑制して高い活性状態を維持することができる。その結果、検体中のグルコース量を長期間に亘って高感度かつ安定的に検出することが可能な光学式グルコースセンサチップを提供することができる。

【 0 0 3 6 】

また、第 1 実施形態の方法によればグルコースを酸化または還元させる第 1 酵素、この第 1 酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第 2 酵素のいずれ一方の酵素をイオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を他方の酵素、発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、または前記第 1、第 2 の酵素をそれぞれイオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、各混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、或いは前記第 1、第 2 の酵素の両方をイオン性ポリマーおよび緩衝剤の水溶液と予め混合し、この混合液を発色剤および非イオン性セルロース誘導体に添加するか、いずれかによって第 1、第 2 の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が前記緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで予め覆われ、かつ発色剤と共に膜形成高分子化合物である非イオン性セルロース誘導体に分散されたグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製できる。この後、基板に一对のグレーティングを形成し、これらのグレーティング間の前記基板領域上に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成することによって、検体中のグルコース量を長期間に亘って高感度かつ安定的に検出することが可能な光学式グルコースセンサチップを製造することができる。

【 0 0 3 7 】

(第 2 実施形態)

図 2 は、第 2 実施形態に係る光学式グルコースセンサチップを示す断面図である。

【 0 0 3 8 】

ガラス基板 1 1 主面の両端部付近には、光学要素である一对のグレーティング 1 2 がその基板 1 1 に光を入射、放出させるためにそれぞれ形成されている。これらのグレーティング 1 2 は、前記基板 1 1 より高い屈折率を有する例えば酸化チタンから作られている。前記基板 1 1 より高屈折率の熱硬化性または光硬化性の樹脂からなる光反射路層 1 3 は、前記グレーティング 1 2 を含む前記基板 1 1 の主面に形成されている。光反射路層 1 3 の主面は、前記グレーティング 1 2 を含む前記基板 1 1 の主面に平行になるように形成されている。

【 0 0 3 9 】

グルコースセンシング膜 1 4 は、前記グレーティング 1 2 間に対応する前記光反射路層 1 3 部分の上に形成されている。このグルコースセンシング膜 1 4 は、前記第 1 実施形態と同様な構造、すなわちグルコースを酸化または還元させる第 1 酵素、この第 1 酵素の生成物と反応することにより発色剤を発色させる物質を発生する第 2 酵素のうちの少なくとも一方の酵素が緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆われ、かつこれら酵素、イオン性ポリマー、緩衝剤および発色剤が前記非イオン性セルロース誘導体で保持された構造を有する。

【 0 0 4 0 】

ここで、第 1、第 2 の酵素のうちの少なくとも一方の酵素を緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆う基準は、前記第 1 実施形態で説明したのと同様である。

【 0 0 4 1 】

前記光反射路層 1 3 は、表面が平滑で、 $10\mu\text{m}$ 以上、より好ましくは $10\sim 200\mu\text{m}$ の厚さを有することが好ましい。 $10\mu\text{m}$ 以上の厚さを有する光反射路層は、光の伝播時における光強度の減衰を抑えることが可能になり、例えばレーザ光源のほかに LED 光

源を用いることが可能になる。

【 0 0 4 2 】

前記グルコースセンシング膜 1 4 中の第 1、第 2 の酵素および発色剤は、例えば前記表 1 に示す組み合わせで用いられる。

【 0 0 4 3 】

前記グルコースセンシング膜 1 4 中のイオン性ポリマー、緩衝剤および非イオン性セルロース誘導体は、前記第 1 実施形態に挙げたものと同様なものを用いることができる。

【 0 0 4 4 】

前記グルコースセンシング膜 1 4 中には、前記第 1 実施形態で説明したように架橋性高分子化合物をさらに含むこと、ポリエチレングリコールまたはエチレングリコールをさらに含むことを許容する。

【 0 0 4 5 】

次に、前述した図 2 に示す光学式グルコースセンサチップの作用を説明する。

【 0 0 4 6 】

検体、例えば人体の皮膚に貫通穴（ウエル）を有するアダプタ（図示せず）を当接させ、このアダプタに前述したセンサチップをそのグルコースセンシング膜 1 4 がウエル側に位置するように取り付ける。前記ウエル内に水を含む抽出媒体を満たし、外部から微小電圧を加えることにより、皮下組織液中のグルコースは皮膚から媒体に抽出され、さらに前記センシング膜 1 4 に浸透する。グルコースセンシング膜 1 4 を構成する第 1、第 2 の酵素（酸化または還元酵素）および発色剤の組み合わせが、例えば前記表 1 に示すにグルコースオキシターゼ（G O D）、ペルオキシターゼ（P O D）および 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（T M B Z）である場合、センシング膜 1 4 に浸透されたグルコースは G O D によりを分解して過酸化水素を発生し、P O D によりこの過酸化水素を分解して活性な酸素を放出し、この活性な酸素により T M B Z を発色させる。つまり、グルコース量に応じて T M B Z の発色度合が変化する。

このような状態で、前記光源（例えばレーザダイオード）1 5 からレーザ光を図示しない偏光フィルタを通して前記基板 1 1 裏面側に入射することにより、そのレーザ光は基板 1 1 を通してその主面と左側のグレーティング 1 2 の界面で屈折されて光導波路層 1 3 に入射され、さらにこの光導波路層 1 3 と発色した発色剤を含むグルコースセンシング膜 1 4 の界面で屈折されてその光導波路層 1 3 を伝播する。この際、伝播される光のエバネッセント波は前記グルコースセンシング膜 1 4 でのグルコース量に基づく発色度合に応じて吸収される。前記光導波路層 1 3 を伝播した光は、右側のグレーティング 1 2 から放出され、受光素子（例えばフォトダイオード）1 6 で受光される。受光したレーザ光強度はセンシング膜 1 4 の非発色時に受光した光強度（初期強度）に比べて低下した値になり、その低下率からグルコース量を検出することが可能になる。

【 0 0 4 7 】

次に、前述した図 2 に示す光学式グルコースセンサチップの製造方法を説明する。

【 0 0 4 8 】

まず、前述した第 1 実施形態と同様な 3 つの方法のいずれかにより第 1、第 2 の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が前記緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで予め覆われ、かつ発色剤と共に膜形成高分子化合物である非イオン性セルロース誘導体に分散されたグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製する。

【 0 0 4 9 】

次いで、ガラス基板の主面にこの基板内に光を入射させ、前記基板外に光を放出させるための一対の光学要素、例えばグレーティングを酸化チタン膜の成膜、パターニングにより形成する。つづいて、前記グレーティングが形成された前記基板の主面に前記基板より高屈折率の熱硬化性または光硬化性の樹脂からなる光反射路層を形成する。ひきつづき、前記光反射路層上の前記グレーティング間に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成することによって、光学式グルコースセンサチップを製造する。

【 0 0 5 0 】

以上、第2実施形態の光学式グルコースセンサチップによるグルコース量の検出において、グルコースセンシング膜は前述した第1実施形態と同様に第1、第2の酵素の少なくとも一方の酵素が緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで覆われているため、長期間の保存、使用において酵素からの塩の析出を抑制すると共に、酵素の形態、構造の変化を抑制して活性状態を維持することができる。その結果、検体中のグルコース量を長期間に亘って高感度かつ安定的に検出することが可能な光学式グルコースセンサチップを提供することができる。

【 0 0 5 1 】

また、第2実施形態によれば第1実施形態と同様に第1、第2の酵素のうちの少なくとも一方の酵素が前記緩衝剤を取り込んだイオン性ポリマーで予め覆われ、かつ発色剤と共に膜形成高分子化合物である非イオン性セルロース誘導体に分散されたグルコースセンシング膜形成用塗布液を調製できる。この後、ガラス基板の主面に一對のグレーティングを形成し、前記グレーティングが形成された前記基板の主面に前記基板より高屈折率の光反射路層を形成し、前記光反射路層上の前記グレーティング間に前記グルコースセンシング膜形成用塗布液を塗布、乾燥してグルコースセンシング膜を形成することによって、検体中のグルコース量を長期間に亘って高感度かつ安定的に検出することが可能な光学式グルコースセンサチップを製造することができる。

【 0 0 5 2 】

以下、本発明の実施例を説明する。

【 0 0 5 3 】

(実施例 1)

0.67 mg/mL のペルオキシターゼ (P O D) 溶液 (0.01 モル / L のリン酸緩衝液 (p H : 6.0) に溶解) および 5.33 mg/mL のグルコースオキシダーゼ (G O D) 溶液 (0.01 モル / L のリン酸緩衝液 (p H : 6.0) に溶解) の混合液 9 μ L を負イオン性ポリマーである 1 重量 % のカルボキシメチルセルロース (C M C) 水溶液 1 μ L と混合、撹拌した。得られた混合液から 9 μ L をイソプロピルアルコール (I P A) 143.6 μ L と純水 116.6 μ L と 1 体積 % のポリエチレングリコール (P E G) のイソプロピルアルコール溶液 6 μ L と 1 mg/mL の 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (T M B Z) のイソプロピルアルコール溶液 60 μ L と 2 重量 % のヒドロキシエチルセルロース (H E C) 水溶液 64 μ L と 1 重量 % の架橋高分子化合物 (2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとブチルメタクリレートとの共重合体) 水溶液 0.8 μ L とに添加し、混合、撹拌してグルコースセンシング膜生成用塗布液 400 μ L を調製した。

【 0 0 5 4 】

次いで、主面に厚さ 10 nm の S i O₂ 表層を有する屈折率 1.52 の無アルカリガラス基板を用意し、この基板の S i O₂ 表層に屈折率 2.2 ~ 2.4、厚さ 50 nm の酸化チタン膜をスパッタリングにより成膜した。つづいて、この酸化チタン膜の上にレジストの塗付、乾燥、リソグラフィーによりレジストパターンを形成した。ひきつづき、レジストパターンをマスクとしてリアクティブイオンエッチングにより酸化チタン膜を選択的に除去することにより、前記 S i O₂ 表層の両端部付近表面にグレーティングを形成した後、レジストパターンをアッシングにより除去した。

【 0 0 5 5 】

次いで、前記基板を酸素 R I E によりドライ洗浄した後、ダイシングにより 17 mm $\times$ 6.5 mm の寸法に裁断してチップ形状にした。つづいて、前記グルコースセンシング膜生成用塗布液を前記基板のグレーティング間に位置するセンシング膜形成領域の表面に 8 μ L 滴下した。不活性ガスのパージ、真空乾燥により乾燥させて多孔質 (透水性) で厚さ 0.8 μ m のグルコースセンシング膜を形成し、前述した図 1 に示す光学式グルコースセンサチップを製造した。なお、滴下されたグルコースセンシング膜生成用塗布液の液滴は以下の組成を有するものであった。

【0056】

・リン酸緩衝液：0.000525モル/L、
・リン酸緩衝剤：0.0003モル/L、
・PEG：0.15体積%、
・TMBZ：0.15mg/dL、
・POD：0.0015mg/mL、
・GOD：0.012mg/mL、
・CMC（負イオン性ポリマー）：0.0005重量%、
・HEC：0.64重量%、
・2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとブチルメタクリレートとの共重合体：0.002重量%。

【0057】

（参照例1）

実施例1の負イオン性ポリマーであるCMCの代わりに正イオン性ポリマーであるポリリジンをグルコースセンシング膜生成用塗布液の液滴中に0.0008μmg/Lになるように配合した以外、実施例1と同様にセンシング膜を形成し、前述した図1に示す光学式グルコースセンサチップを製造した。

【0058】

（比較例1）

イオン性ポリマーおよびリン酸ナトリウム緩衝剤を含まない以外、実施例1と同様な各種成分を用いて1回の混合でグルコースセンシング膜生成用塗布液を調製し、この塗布液を用いて実施例1と同様にセンシング膜を形成し、前述した図1に示す光学式グルコースセンサチップを製造した。

【0059】

得られた実施例1、参照例1および比較例1の光学式グルコースセンサチップについて、以下の方法により経時的なグルコースの感度（吸光度）変化を測定した。

【0060】

すなわち、貫通穴（ウエル）を有するアダプタを適切な平板（例えばガラス板）に当接させ、このアダプタに各センサチップをそのグルコースセンシング膜がウエル側に位置するように取り付け、ウエルを区画した。ウエルにグルコースを1mg/dLを含む水溶液を満たした形態（温度35℃）において、図1に示すようにレーザダイオード5からレーザ光を偏光フィルタを通して前記基板1裏面側に入射することにより、そのレーザ光を基板1のSiO₂表層2と左側のグレーティング3の界面で屈折させ、さらにSiO₂表層2と発色した発色剤を含むグルコースセンシング膜4の界面で屈折してSiO₂表層2を含む基板1を伝播させ、右側のグレーティング3と基板1の界面での屈折により伝播したレーザ光をフォトダイオード6で受光し、そのレーザ光強度（吸光度）を測定した。

【0061】

同様な操作を実施例1、参照例1ではセンサチップを1日保存後、14日間保存後、40日間保存後、および100日間保存後に行い、比較例1では1日保存後、7日間保存後および90日間保存後に行って吸光度をそれぞれ測定した。

【0062】

これらの結果を図3に示す。

【0063】

図3から明らかのように比較例1のセンサチップは、7日間の保存後でも保存前に比べて感度が低下し、さらに90日間の保存後では保存前に比べて感度が著しく低下することがわかる。

【0064】

これに対し、実施例1、参照例1のセンサチップは100日間の保存後でも保存前に近似した感度を有することがわかる。特に、負イオン性ポリマーを含むグルコースセンシング膜を備えた実施例1のセンサチップは、正イオン性ポリマーを含むグルコースセンシング

膜を備えた参照例 1のセンサチップに比べて保存期間の経過に伴う感度の維持性能が高いことがわかる。

【 0 0 6 5 】

なお、基板より高屈折率の熱硬化性樹脂または光硬化性樹脂からなる光反射路層を有する図 2 に示すグルコースセンサチップにおいても、実施例 1 と同様に長期保存後でも高い感度を維持することが可能であった。

【 0 0 6 6 】

また、前記実施形態・実施例においてはグルコースセンシング膜が保持する第 1 酵素、第 2 酵素、発色剤はそれぞれ一種の材料のみが選択され加えられているが、使用目的に応じて複数の材料を混在させてもよい。

10

【 0 0 6 7 】

さらに、前記実施形態においては基板としてガラスを用いているが、参照光を伝播し透過する特性を有していれば、この材質は限定されない。単結晶による膜体や、熱硬化性樹脂材料、熱可塑性樹脂材料、光硬化性樹脂材料など、種々の樹脂材料を用いることもできる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 8 】

【図 1】第 1 実施形態に係るグルコースセンサチップを示す断面図。

【図 2】第 2 実施形態に係るグルコースセンサチップを示す断面図。

【図 3】実施例 1、参照例 1および比較例 1 のグルコースセンサチップにおける保存期間の経過に伴う吸光度（感度）の変化を示す線図。

20

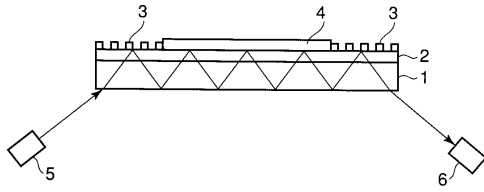
【符号の説明】

【 0 0 6 9 】

1, 11 ... ガラス基板、2 ... SiO_2 表層、3, 12 ... グレーディング、4, 14 ... グルコースセンシング膜、5, 15 ... レーザ光源（レーザダイオード）、6, 16 ... 受光素子（フォトダイオード）。

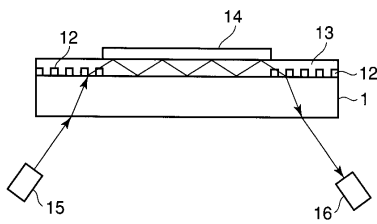
【図 1】

図 1



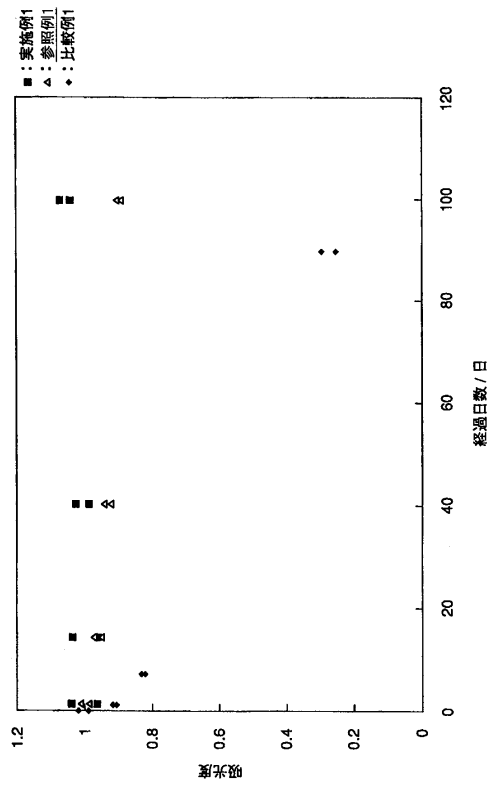
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3



フロントページの続き

- (74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
- (72)発明者 植松 育生
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 平川 雅章
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 大宮 可容子
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 特開2006-153497(JP,A)
特表2001-508176(JP,A)
特開2004-333250(JP,A)
特開2003-279479(JP,A)
特開2003-004689(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M 1/00 - 1/42
G01N 21/78 - 21/81
G01N 21/27
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
医学・薬学予稿集全文データベース