

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-505335

(P2008-505335A)

(43) 公表日 平成20年2月21日 (2008.2.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 B	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 Z	
GO 1 N 27/28 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 5 3 Z	
	GO 1 N 27/30 3 5 3 B	
	GO 1 N 27/46 3 3 6 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

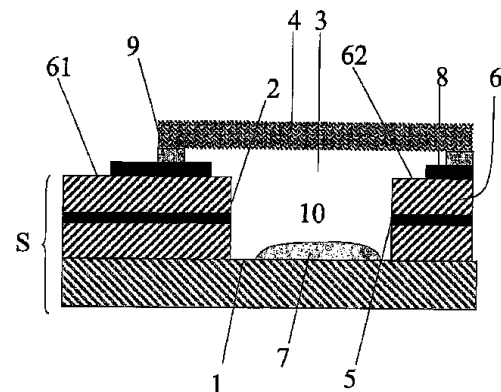
(21) 出願番号	特願2007-519863 (P2007-519863)	(71) 出願人	500472327
(86) (22) 出願日	平成17年6月29日 (2005.6.29)		オックスフォード バイオセンサーズ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年2月28日 (2007.2.28)		イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤーントン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク
(86) 国際出願番号	PCT/GB2005/002544	(74) 代理人	100078662
(87) 国際公開番号	W02006/000823		弁理士 津国 肇
(87) 国際公開日	平成18年1月5日 (2006.1.5)	(74) 代理人	100113653
(31) 優先権主張番号	0414551.2		弁理士 東田 幸四郎
(32) 優先日	平成16年6月29日 (2004.6.29)	(74) 代理人	100116919
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 虚血を検出するための組成物および電気化学センサー

(57) 【要約】

電気化学検出方法での使用に適する組成物が提供される。組成物は、(i) 遷移金属塩と、(ii) 電極面積に依存する電流を有する電極面積規格化剤と、(iii) 湿潤剤とを含んでいる。また、作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルと、本発明による組成物と、セルにわたって電圧を印加するための手段と、それにより電気化学セルにわたる電流を測定するための手段とを含む装置も提供される。この装置は、虚血の電気化学的診断で使用する事ができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

電気化学検出方法での使用に適する組成物であって、

- (a) 遷移金属塩と、
- (b) 電極面積に依存する電流を有する電極面積規格化剤と、
- (c) 湿潤剤と、

を含む組成物。

【請求項 2】

遷移金属塩が、マンガン塩、鉄塩、コバルト塩、銅塩、またはニッケル塩である、請求項 1 記載の組成物。

10

【請求項 3】

遷移金属塩が、コバルト塩である、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 4】

電極面積規格化剤が、ルテニウム錯体またはオスミウム錯体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 5】

湿潤剤が、ポリビニルピロリドンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 6】

ポリビニルピロリドンが、7,500 ~ 12,500 の平均分子量を有する、請求項 5 記載の組成物。

20

【請求項 7】

塩化物または硫酸塩をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 8】

水中に懸濁または溶解されたときに組成物の pH が、pH 6 ~ 8 になるような緩衝剤をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 9】

緩衝剤が、(N - モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)である、請求項 8 記載の組成物。

【請求項 10】

電気化学検出方法における試薬としての、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項で規定された組成物の使用。

30

【請求項 11】

(i) 作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルを提供するステップと、
(ii) (1) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項で規定された組成物および(2) 試料を互いに接触させ、作用電極に接触させるステップと、
(iii) 電気化学セルにわたって電位を印加するステップと、
(iv) それによりセルにわたる電流を測定することにより、遊離遷移金属塩の存在を電気化学的に検出するステップと、
を含む電気化学検出方法。

【請求項 12】

40

電極面積規格化剤の電気化学反応による電流を検出し、電極面積の変化を考慮に入れるためにステップ(iv)で得られた測定値を規格化するステップをさらに含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

試料は、全血、血漿、または血清である、請求項 11 または 12 記載の方法。

【請求項 14】

作用電極が、50 μ m 未満の少なくとも 1 つの寸法を有する、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

組成物が、試料の添加に先立って電気化学セルに供給される、請求項 11 ~ 14 のいずれ

50

れか一項記載の方法。

【請求項 16】

- 作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルと、
- 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項で規定された組成物と、
- 電気化学セルにわたって電圧を印加するための手段と、
- それによりセルにわたる電流を測定するための手段と、

を含む装置。

【請求項 17】

作用電極が、50 μ m未満の少なくとも1つの寸法を有している、請求項 16 記載の装置。

10

【請求項 18】

組成物が、乾燥した形態である、請求項 16 または 17 記載の装置。

【請求項 19】

電気化学セルが、レセプタクルの形態であり、作用電極が、レセプタクルの壁内にあり、組成物が、レセプタクル内に少なくとも部分的に収容される、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項記載の装置。

【請求項 20】

添付図面を参照して本明細書中で実質的に記載したような、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項記載の装置。

【請求項 21】

20

(i) (1) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項で規定された組成物および(2) 試料を互いに接触させ、作用電極に接触させるステップと、

(ii) 電気化学セルにわたって電位を印加するステップと、

(iii) それによりセルにわたる電流を測定することにより遊離遷移金属塩の存在を電気化学的に検出するステップと、
を含む、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項で規定された装置を操作する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電気化学検出方法で使用のための組成物、虚血診断方法、およびその方法での使用に適する装置に関する。

30

【背景技術】

【0002】

虚血は、一般に動脈閉塞を原因とする器官への不十分な血液供給を伴う状態である。特に、心筋虚血は、心臓組織がゆっくりとまたは突然、酸素およびその他の栄養の不足に陥るような、冠動脈疾患における中間状態である。心筋虚血は狭心症を特徴とすることがあり、心臓への血流が完全に遮断されると、虚血が心臓発作につながることもある。あらゆる種類の虚血のマーカーを識別することが、臨床において関心の的となっている。特に、心臓病を早期且つ正確に診断できるように、虚血を検出する正確な方法が望まれている。

【0003】

40

虚血の存在を調べるための提案されている1つの試験は、アルブミン・コバルト結合試験である。この試験は、虚血患者内のアルブミンは、虚血でない正常対照におけるアルブミンに比べ、コバルトへの金属結合能力が低いという知見に基づいている。コバルトは、正常で健康な患者においてアルブミンのN末端に結合すると考えられる。しかし、虚血事象の最中にアルブミン分子に変化が生じて、特にN末端に影響を与えるという主張がなされている。そのような虚血修飾アルブミン分子は、正常なアルブミン分子で予想されるようにはコバルトに結合しない。したがって、アルブミン・コバルト結合試験は、アルブミンに結合するコバルトの程度を定量的にモニタリングすることにより虚血の存在を検出する。通常、既知量のコバルトがアルブミン試料に接触され、染料に結合した後の光学的試験によって、残留遊離コバルトの存在が検出される。

50

【0004】

しかし、当技術分野において提案されたこれらの試験では、残留コバルトの含有量を求めるために比較的長期にわたる検査室での分析が必要である。このため、試験結果の特定に長い時間がかかることが不可避である。したがって、使い勝手が良く、迅速に結果が得られる、改良された試験が求められている。

【0005】

発明の概要

本発明者らは、虚血の存在を検出するための新規の電気化学的試験方法を開発した。この新規の手法は、被検試料を、遷移金属塩、例えばコバルト(II)塩を含む特定の組成物に接触させるステップを含んでいる。次に、混合物内に存在する電気化学的に検出可能な遷移金属塩の量を求めるために、電気化学的測定が実施される。遷移金属塩の一定の開始濃度を基にして、電気化学的に検出可能な遷移金属塩の量は正常な試料に比べ虚血試料の方が多いことが見出されてきた。こうして、簡単な電気化学的試験で、試料が虚血試料であるのか、または正常な試料であるのかが示される。

10

【0006】

この電気化学的検出技術は、非常に簡単で、使いやすい。本発明の一態様においては、この電気化学的試験は持ち運び可能な携帯機器で実施することができ、そのため、医療環境で特に使いやすい。さらに、本発明のこの技術は、短期間で、場合によっては5分で結果を提供する。

20

【0007】

したがって、本発明は、電気化学検出方法での使用に適する組成物を提供するのであって、この組成物は、

- a) 遷移金属塩と、
- b) 電極面積に依存する電流を有する電極面積規格化剤と、
- c) 湿潤剤

を含んでいる。

【0008】

この組成物は、電気化学検出方法における試薬として、特に正常な試料と虚血試料を区別する電気化学的試験における試薬として有用である。遷移金属塩は正常なタンパク質(例えばアルブミン)に結合するが、虚血試料に含まれるタンパク質(例えばアルブミン)には結合できないか、あるいはそれほど強く結合しない、という1つの提案された理論が本発明の裏付けとなっている。このことは、虚血事象の後に生じるタンパク質分子の構造の変化に起因するだろう。例えば、アルブミン分子が虚血事象の後では、そのN末端において変化すると考えられる。

30

【0009】

タンパク質に結合した遷移金属塩は、通常、電気化学検出には利用できない。虚血試料においては正常な試料に比べ、生じる結合の程度が低いため、虚血試料では、電気化学的に検出可能な遷移金属塩の量が多くなる。このため、虚血試料では、より高い電流が検出される。但し、本発明はこの理論に従った作用を発揮すると考えられるものの、本発明は決してこの理論に限定されるものではない。

40

【0010】

この組成物には遷移金属塩だけではなく、電極面積の変動に対して規格化するための薬剤も含まれている。試薬組成物にこの薬剤が存在することは、電気化学的試験で用いられる作用電極の実際の電極面積の別個の測定を実施する必要があることを意味する。1回のポルタンメトリースキャンで、遷移金属の酸化/還元が原因で生じる測定電流と、電極面積規格化剤の酸化/還元が原因で生じる測定電流の両方を求めることができる。このため、迅速な分析によって、電極面積の変化が原因の誤差が最低限に抑えられる結果が得られる。

【0011】

通常の電気化学的方法においては、この組成物が、乾燥した形態のものとして電気化学

50

セルに供給される。次に試料が添加され、測定に先立って組成物がその試料中に再懸濁される。この組成物に湿潤剤が存在することは、再懸濁が迅速に生じるのを助け、そのため、電気化学的測定の実施前に必要とされる時間を短縮できる。

【0012】

また、本発明は、

- (i) 作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルを提供するステップと、
 - (ii) (1) 本発明の組成物および(2) 試料を互いに接触させ、作用電極に接触させるステップと、
 - (iii) 電気化学セルにわたって電位を印加するステップと、
 - (iv) それにより電気化学セルにわたる電流を測定することにより、遊離遷移金属塩の存在を電気化学的に検出するステップと、
- を含む方法も提供する。

10

【0013】

本発明はさらに、

- 作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルと、
 - 通常は、本明細書に規定した本発明の組成物である、遷移金属塩を含む材料と、
 - セルにわたって電圧を印加するための手段と、
 - それにより電気化学セルにわたる電流を測定するための手段と、
- を含む装置を提供する。

20

【0014】

本発明の装置は、使用上ほとんど複雑さはない。使用者は単に被検試料を追加し、セルにわたって電位を印加するだけで済む。このため、遷移金属塩を含む材料を別個に取り扱い処理する必要はない。さらに、この装置は、所定量の遷移金属塩を含むことができるため、使用者が特定量の材料を量り分ける必要がなくなる。

【0015】

本発明はさらに、

- (1) 通常は、本明細書に規定した本発明の組成物である、遷移金属塩を含む材料、および(2) 試料を、互いに接触させ、作用電極に接触させるステップと、
 - 電気化学セルにわたって電位を印加するステップと、
 - それにより電気化学セルにわたる電流を測定することにより遊離遷移金属塩の存在を電気化学的に検出するステップと、
- を含む、本発明の装置を操作する方法を提供する。

30

【0016】

本発明はさらに、体液の試料が虚血性であるかどうかを判定する方法、例えばインビトロ方法であって、

- (i) 作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルを提供するステップと、
 - (ii) (1) 通常は、本明細書に規定した本発明の組成物である、遷移金属塩を含む材料、および(2) 体液の試料を、互いに接触させ、作用電極に接触させるステップと、
 - (iii) 電気化学セルにわたって電位を印加するステップと、
 - (iv) それにより電気化学セルにわたる電流を測定することにより遊離遷移金属塩の存在を電気化学的に検出するステップと、
- を含む方法も提供する。

40

【0017】

虚血試料とは、虚血事象を発症した患者から採取された試料である。したがって、この方法は、体液の試料が採取される患者の虚血を診断する方法として用いることができる。材料(1)において同じ濃度の遷移金属塩を使用した場合に、測定される電流が、正常な試料の場合に予想される電流よりも高い場合、虚血の診断が陽性とされる。一態様においては、この方法は心筋虚血を診断する方法である。

【0018】

上記の装置および方法の遷移金属塩を含む材料は、通常、

50

- (b) 電極面積に依存する電流を有する電極面積規格化剤と、
(c) 湿潤剤と、

から選択される１以上の成分を含んでいる。

【００１９】

好ましくは、遷移金属塩を含む材料は、本明細書に記載した本発明の組成物である。

【００２０】

発明の詳細な説明

本発明の組成物は、試料と混合された場合に正常な試料と虚血試料の間の電気化学的区別が可能になるような試薬の混合物である。したがって、この組成物は本発明の方法および装置で使用するのに適しており、そのため虚血の診断で使用するのに適している。

10

【００２１】

本発明の組成物は、通常、本発明の組成物のほかに、電気化学セル、このセルにわたって電圧を印加する手段、および生成される電流を測定する手段を含む装置で使用される。この試料は、通常、この組成物が試料に接触し、試料と組成物の両方が電気化学セルの作用電極と電気的に接触するように、装置の中または上に配置される。また、この試料および組成物は、通常、擬似参照電極にも電気的に接触する。次にセルにわたって電圧が印加され、それによって、試料／組成物の混合物に存在する遊離遷移金属塩の電気化学反応が発生する。この反応によって生じる電流が測定される。正常な試料においては、虚血試料に比べ、電気化学的に検出可能な遷移金属塩の割合が低い。このため、正常な試料よりも虚血試料の方が高い測定値をあたえる。したがって、電気化学セルの測定される電流にのみ基づいて、正常な試料と虚血試料を区別することが可能である。

20

【００２２】

本明細書で用いる遊離遷移金属塩という用語は、遷移金属を電気化学的に検出することができる遷移金属塩を意味する。

【００２３】

本発明の組成物は、本発明の方法を用いて虚血試料と正常な試料を電気化学的に区別できる任意の遷移金属塩を含んでもよい。当業者であれば、(i) 正常であることが知られている試料および(ii) 虚血性であることが知られている試料に対して本発明の方法を実施することにより、遷移金属塩は、適切であるかどうかを判定できる。適切な遷移金属塩であれば、試料(i)よりも試料(ii)の方で電流測定値が高くなる。通常、遷移金属は正常なタンパク質に、例えば血液中に存在するタンパク質に結合することができるが、虚血事象が起こると、その後ではそれらのタンパク質との結合親和力が低いか、あるいはこれらのタンパク質に結合しない。例えば、遷移金属は正常なアルブミンに結合し得るが、虚血事象の後に修飾されたアルブミンとの結合親和力が低いか、あるいはこれらのアルブミンに結合しない。適切な遷移金属塩の例としては、マンガン塩、鉄塩、コバルト塩、銅塩およびニッケル塩が挙げられる。コバルト(II)塩が好ましい。

30

【００２４】

この塩は、通常、水中で解離して遷移金属イオンおよび陰イオンをもたらすような塩である。したがって、水に溶解時に解離する塩をもたらす任意の陰イオンを使用することができる。本発明での使用に適した塩の例としては、塩素化合物などのハロゲン化合物が挙げられる。好ましい塩は塩化コバルト(II)である。

40

【００２５】

組成物中に存在する遷移金属塩の好ましい量は、塩および被検試料の性質と、組成物が接触させられる試料の体積とに依存する。通常、遷移金属がコバルト(II)である場合、コバルト(II)塩は、被検試料と混合されたときに(例えば、乾燥した組成物が試料中に再懸濁されたときに)、生成される混合物におけるコバルト(II)濃度が $0.1 \sim 100$ ミリモル dm^{-3} になるような量で存在する。被検試料が血漿である場合、コバルト(II)塩は好ましくは、被検試料と混合されたときに、生成される混合物におけるコバルト(II)濃度が $1 \sim 20$ 、好ましくは $4.25 \sim 5.25$ ミリモル dm^{-3} になるような量で存在する。この混合物における最も好ましいコバルト(II)塩の濃度は $4.5 \sim 5.0$ 、例え

50

ば約 4.75 ミリモルdm^{-3} である。これらの濃度は、例えば、 5.5 ミリモルdm^{-3} (例えば $30 \sim 40 \text{ ミリモルdm}^{-3}$) を上回るコバルト (II) 塩を含む組成物を用い、次にこの組成物を既知量の試料自体で希釈 (例えば、組成物：試料の比率を $1:1 \sim 1:20$ 、例えば $1:5 \sim 1:10$ を用いて) することで達成できる。例えば、濃度 35.6 ミリモルdm^{-3} のコバルト (II) 塩を有する $0.2 \mu\text{l}$ の組成物を本発明の装置の中または上で乾燥させ、次に $1.5 \mu\text{l}$ の試料中に再懸濁して、生成される混合物において約 4.75 ミリモルdm^{-3} の濃度を与える。

【0026】

また、本発明の組成物は、電極面積に依存する電流もしくは電流特性を有する電極面積規格化剤も含んでいる。通常、この電極面積規格化剤は、試料が虚血性かどうかに関係なく電流を有している。遷移金属塩によって生成される電流の電気化学的測定は、測定に用いられる電極の表面積に依存する。したがって、遷移金属によって生成される電流のより正確な測定値を得るには、電極面積規格化剤を用いて測定値を規格化することが望ましい。この電極面積規格化剤が電極面積について測定される電流を十分且つ正確に規格化することは、必須ではないが、好ましい。但し、この規格化剤は、電極面積のばらつきを考慮に入れるためにある程度の補正を提供するだろう。したがって、本発明との関連において「規格化」という用語は、ある程度の補正を提供することを意味する。

【0027】

電極面積に対する規格化は、遷移金属電流の測定とほぼ同時に、電極面積規格化剤の電気化学反応によって生成される電流を測定することにより実施できる。同じ電極が両方の測定で使用される。次に、遷移金属の酸化/還元が原因で生じる、測定される電流を、任意の適切な技術によって、電極面積規格化剤について得られた測定値を用いて規格化することができる。

【0028】

例えば、より正確な結果を値 I_{TM} / I_{NA} を用いて得ることができる。ここで、 I_{TM} は遷移金属の酸化/還元が原因で得られる電流であり、 I_{NA} は電極面積規格化剤の酸化/還元が原因で得られる電流である。遷移金属電流のこの規格化された値を用いることで、電極面積の変化が原因で生じる測定結果の誤差を最小限に抑えることができる。

【0029】

電極面積規格化剤は、遷移金属とは異なる還元/酸化電位を有している。さらに、電極面積規格化剤は、タンパク質、例えばアルブミンを含む血液内のタンパク質に、通常、結合しないか、あるいはそれに弱く結合するだけである。電極面積規格化剤は、通常、ルテニウムやオスミウムなどの重金属を含んでいる。

したがって、適切な電極面積規格化剤として、ルテニウム錯体またはオスミウム錯体、例えばアミン系配位子を有する錯体が挙げられる。好ましい電極面積規格化剤としては、塩化ルテニウムヘキサミンおよび塩化オスミウムヘキサミン、特に塩化ルテニウムヘキサミンが挙げられる。

【0030】

通常、電極面積規格化剤は、被検試料と混合されたときに (例えば、乾燥した組成物が試料中に再懸濁されたときに)、生成される混合物における電極面積規格化剤の濃度が $0.1 \sim 100 \text{ ミリモルdm}^{-3}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \text{ ミリモルdm}^{-3}$ 、より好ましくは $3 \sim 3.5$ または約 3.2 ミリモルdm^{-3} になるような量で存在する。これらの濃度は、例えば、 5 ミリモルdm^{-3} (例えば $20 \sim 30 \text{ ミリモルdm}^{-3}$) を上回って含む組成物を用い、ひきつづいてこの組成物を既知量の試料自体で希釈 (例えば、組成物：試料の比率を $1:1 \sim 1:20$ 、例えば $1.5 \sim 1:10$ を用いて) することによって達成できる。例えば、濃度 24 ミリモルdm^{-3} の電極面積規格化剤を有する $0.2 \mu\text{l}$ の組成物を本発明の装置の中または上で乾燥させ、次に $1.5 \mu\text{l}$ の試料中に再懸濁して、生成される混合物において約 3.2 ミリモルdm^{-3} の濃度を与える。

【0031】

一態様においては、本発明の装置は銀/塩化銀の対向電極および/または擬似参照電極

10

20

30

40

50

を含んでいる。安定した測定値を提供するには、十分な塩素化合物が電気化学セル内に存在しなければならない。したがって、本発明の組成物は、必要な量の塩素化合物を提供するのを助けるべく塩化物を含んでもよい。好ましい塩化物は、アルカリ金属塩化物、アルカリ土類金属塩化物、および塩化アンモニウムである。塩化カリウムおよび塩化ナトリウムが特に好ましい。塩化物は、通常、被検試料と混合されたときに（例えば、乾燥した組成物が試料中に再懸濁されたときに）、生成される混合物における塩化物の濃度が $1 \sim 300$ ミリモル dm^{-3} 、好ましくは $6 \sim 60$ ミリモル dm^{-3} 、より好ましくは $10 \sim 30$ ミリモル dm^{-3} になるような量で存在する。但し、特に試料自体が塩化物を含んでいる場合は、塩化物はこれよりも低い濃度で存在してもよいし、全く存在しなくてもよい。

【0032】

本発明の代替的態様においては、対向電極および/または擬似参照電極は様々な金属/塩の組み合わせからなっている。この場合、通常は組成物に追加される陰イオンが、対向電極/参照電極で使用される陰イオンに相当する。例えば、 $\text{Ag} / \text{Ag}_2\text{SO}_4$ の対向電極/参照電極を使用する場合は、通常、硫酸塩が組成物に追加される。適切な硫酸塩としては、アルカリ金属硫酸塩、アルカリ土類金属硫酸塩、および硫酸アンモニウム、特に硫酸カリウムおよび硫酸ナトリウムが挙げられる。

【0033】

本発明の通常の装置においては、組成物が液体の形態で装置内に挿入され、次に所定の位置で乾燥される。電気化学的測定を実施するために、液体試料が組成物に接触せられ、組成物が液体試料中に再懸濁される。この再懸濁ステップを促進するために、本発明の組成物は湿潤剤を含んでいる。この湿潤剤は、乾燥した組成物の再懸濁速度を向上させることができる。

【0034】

好ましい湿潤剤はポリビニルピロリドン (PVP) である。PVP は、通常、組成物が被検試料と混合されたときに、生成される混合物における PVP 濃度が $0.01 \sim 30\%$ w/v、例えば $0.2 \sim 5\%$ w/v、好ましくは 0.7% w/v になるような量で存在する。組成物自体が、より高い濃度の PVP を有していてもよい。この PVP が次に、既知量の試料で希釈されて必要な濃度がもたらされる。ポリビニルピロリドンの濃度が高すぎると、再懸濁が生じるまで時間がかかる。このため、通常は 5% w/v 以下、好ましくは 2% w/v または 1.5% w/v 以下、より好ましくは 1% w/v 以下の濃度のポリビニルピロリドンが存在する。しかし、ポリビニルピロリドンの濃度が低すぎると、湿潤特性が不十分になる。

【0035】

ポリビニルピロリドンは、通常、最大 $100,000$ の平均分子量を有している。好ましい平均分子量は少なくとも 5000 であり、より好ましくは少なくとも $7,500$ である。さらに、この分子量は好ましくは $50,000$ 以下であり、より好ましくは $20,000$ 以下であり、例えば $15,000$ 以下または $12,500$ 以下である。好ましい平均分子量は約 $10,000$ である。そのような分子量を有するポリビニルピロリドンを使用すれば、組成物の再懸濁がより速く進むことがわかっている。

【0036】

電気化学的測定は好ましくは、 $6 \sim 8$ の pH、例えば $6.5 \sim 7.5$ の pH、好ましくは $6.8 \sim 7.2$ の pH で行われる。ひとたび被検試料中に再懸濁された組成物の pH がほぼ $6 \sim 8$ の範囲にとどまることを保証するために、本発明の組成物に緩衝剤を含ませることができる。この緩衝剤は、組成物が水中に懸濁されたときに $6 \sim 8$ の pH をもたらす緩衝剤であることが望ましい。実施される測定の電位範囲全体で電気化学的に活性でない任意の緩衝剤を使用することができる。適切な緩衝剤は当業者にとって公知であり、使用できる緩衝剤の例は (N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) である。

【0037】

本発明の好ましい組成物は、マンガン塩、鉄塩、コバルト塩、ニッケル塩、または銅塩と、ルテニウム錯体またはオスミウム錯体と、湿潤剤と、場合により塩化物または硫酸塩と、場合により緩衝剤とを含んでいる。特に好ましい組成物は、コバルト塩、ルテニウム

10

20

30

40

50

錯体またはオスミウム錯体と、ポリビニルピロリドンと、場合により塩化物または硫酸塩と、場合により緩衝剤とを含んでいる。好ましい態様においては、緩衝剤がこれらの組成物に含まれる。

【0038】

本発明の組成物は、懸濁物質として、例えば水中の懸濁物質として存在することができる。または、組成物は、乾燥した形態のものとして、あるいはゲルとして提供してもよい。

【0039】

本発明による方法においては、遷移金属塩を含む材料が試料に接触させられ、材料と試料の両方が電気化学セルの作用電極に接触させられる。また、通常は、擬似参照電極（および場合により別個の対向電極）と試料の間でも接触が生じる。これらの後者の電極に接触する試料は、場合により、遷移金属塩を含む材料と混合される。通常は、遷移金属塩を含む材料が、試料の添加に先立って電気化学セルに供給される。この材料が乾燥した形態のものである場合、この材料が液体試料における懸濁物質を形成するように、試料が液体の形態のものであることが好ましい。

10

【0040】

遷移金属塩を含む材料は、遷移金属塩からなってもよいし、あるいは追加の成分を含んでもよい。遷移金属塩を含む好ましい材料はさらに、電極面積規格化剤、湿潤剤、および好ましくは緩衝剤から選択される1以上の成分を含んでいる。遷移金属塩、電極面積規格化剤、湿潤剤、および緩衝剤の性質および量は、本発明の組成物に関連して上記で規定したとおりであることが好ましい。遷移金属塩を含む好ましい材料は、上記で規定したおりの本発明の組成物である。

20

【0041】

本発明による測定は、任意の適切な試料に対して実施することができる。好ましい試料は液体の形態のものである。測定は、通常、体液に対して、例えば全血または血液成分に対して、例えば血清または血漿に対して実施される。測定が全血に対して実施される場合、得られる測定値はヘマトクリット値に依存する。したがって、この要因を少なくとも部分的に考慮に入れるように測定値を調整することが理想的である。本発明の方法で用いる好ましい試料は血清および血漿、特に血漿である。

【0042】

本発明の目的において、試料は作用電極に接触する材料である。一態様においては、試料を含む検体が本発明の装置に供給される。作用電極に接触する前に検体がろ過されるように、フィルタ、例えばろ過膜が装置内に配置される。例えば、検体は全血であってもよく、例えば血漿のみ通過できるようにする血液ろ過膜が存在してもよい。この場合、試料は血漿である。

30

【0043】

好ましい態様においては、この方法は、所定量の遷移金属塩を試料に接触させることで実施される。試料中に溶解された遷移金属塩の濃度が既知であるように、試料の量も一定であることが好ましい。この態様においては、遷移金属塩の酸化/還元によって生成される電流の測定値が、利用可能な遊離遷移金属塩の量を直接示すことになる。この態様において、より正確な測定値を提供する技術が、英国出願第0414550、4号およびそれに基づき優先権を主張している国際出願（本出願と同日に出願された「ELECTROCHEMICAL SENSING METHOD」と題する）に記載されており、その内容が全体として参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0044】

本発明の装置は、作用電極および擬似参照電極を有する電気化学セルと、遷移金属塩を含む材料と、セルにわたって電圧を印加する手段と、それにより生じる電流を測定する手段を含んでいる。遷移金属塩を含む材料は液体または固体のいずれの形態で存在してもよいが、好ましくは固体の形態で存在する。通常、遷移金属塩を含む材料が、適切な液体（例えば水）中に懸濁/溶解している形態で装置に挿入されるか、あるいは装置に配置され

50

、次に所定の場所で乾燥される。材料を装置の中／上で乾燥させるこのステップによって、材料が所望の位置に保持されやすくなる。乾燥は、例えば、空気乾燥、真空乾燥、凍結乾燥、またはオープン乾燥（加熱）によって実施することができる。

【0045】

本発明の一態様においては、電気化学セルはレセプタクルの形態で存在する。レセプタクルは、レセプタクルに入れられる液体を収容することができれば任意の形状であり得る。例えば、レセプタクルは円筒状であってよい。一般にレセプタクルは、基部、および基部を取り囲む1以上の壁を含む。この態様においては、遷移金属塩を含む材料は、通常、レセプタクルに配置される。

【0046】

電気化学セルが少なくとも1つのマイクロ電極を有することが好ましい。通常、作用電極がマイクロ電極である。本発明の目的において、マイクロ電極は、50 μm 以下の、少なくとも1つの寸法を有する電極である。本発明のマイクロ電極は、大きい寸法、すなわち50 μm を超える寸法を有してもよい。

【0047】

電気化学セルは、2電極方式または3電極方式のいずれであってもよい。2電極方式は、作用電極および擬似参照電極を含んでいる。3電極方式は、作用電極、擬似参照電極、および別個の対向電極を含んでいる。本明細書で用いる擬似参照電極とは、基準電位を提供することができる電極である。2電極方式では、擬似参照電極は対向電極としても機能し、そのため、基準電位をそれほど混乱させずに電流を渡すことができる。

【0048】

本発明の一態様による装置を図1に示している。この態様においては、作用電極5がマイクロ電極である。セルは、基部1および1以上の壁2を有するレセプタクルまたは容器の形態で存在する。通常、レセプタクルは25 ~ 1000 μm の深さ（すなわち上端から基部まで）を有している。一態様においては、レセプタクルの深さは50 ~ 500 μm 、例えば100 ~ 250 μm である。別の態様においては、レセプタクルの深さは50 ~ 1000 μm 、好ましくは200 ~ 800 μm 、例えば300 ~ 600 μm である。レセプタクルの長さおよび幅（すなわち壁から壁まで）は、あるいは円筒形レセプタクルの場合はレセプタクルの直径は、通常、0.1 ~ 5 mm、例えば0.5 ~ 2.0 mm、例えば0.5 ~ 1.5 mm、例えば1 mmである。

【0049】

レセプタクル3の開口端は、開口端の少なくとも一部が覆われていないか、あるいは半透膜または透過膜などの半透過性材料または透過性材料で覆われる限り、不透過性材料で部分的に覆うことができる。好ましくは、レセプタクルの開口端は実質的に、半透膜または透過膜4で覆われる。膜4はとりわけ、レセプタクルにほこりまたはその他の汚染物質が入るのを防止する役割を果たす。

【0050】

この膜4は、被検試料が通過することができる材料からなることが好ましい。例えば試料が血漿である場合、血漿に対して透過性を有する膜であることが望ましい。また、膜は低いタンパク結合能を有することが好ましい。膜として使用するのに適した材料には、ポリエステル、硝酸セルロース、ポリカーボネート、ポリスルホン、微孔ポリエーテルスルホンフィルム、PET、綿およびナイロン織物、被覆ガラス繊維、ならびにポリアクリロニトリル繊維が含まれる。場合により、使用に先立ってこれらの繊維に親水処理または疎水処理を施してもよい。必要に応じて、膜のその他の表面特性を変更することもできる。例えば、膜を通過する所望試料の流れを促進するために、水における膜の接触角を変更する処理を用いてもよい。膜は1つまたは2つ以上の材料層を含むことができ、各材料層は同じであっても異なってもよい。例えば、2つの層の異なる膜材料を含む従来型の二重層膜を用いることができる。

【0051】

また、膜を用いて、セルに入ることが望ましくない一部の成分をろ過して取り除くこと

10

20

30

40

50

もできる。例えば、赤血球など一部の血液生成物を、これらの粒子がセルに入らないようにこの方法で分離することができる。血液ろ過膜を含め、適切なる過膜は当技術分野で公知である。血液ろ過膜の例は、Pall filtration社のPresence 200、Whatman VF2、Whatman Cyclopore、Spectral NXおよびSpectral Xである。ガラス繊維フィルタ、例えばWhatman VF2は全血から血漿を分離することができ、全血検体が装置に供給され且つ被検試料が血漿である場合に使用するのに適している。

【0052】

本発明のこの態様の電気化学セルは、レセプタクルの壁に位置する作用電極5を含んでいる。この作用電極は、例えば、レセプタクルの1以上の壁の周囲の連続した帯の形態で存在する。作用電極の厚さは、通常0.01~25 μm 、好ましくは0.05~15 μm 、例えば0.1~20 μm 、より好ましくは0.1~10 μm である。例えば0.1~50 μm 、好ましくは5~20 μm の厚さを有する電極のように、より厚い作用電極も考えられる。作用電極の厚さは、レセプタクルが基部に配置されたときの垂直方向における寸法である。作用電極は、好ましくは炭素、パラジウム、金、白金、銀、または銅から、例えば炭素、パラジウム、金、または白金から、例えば導電性インクの形態で形成される。導電性インクは、追加素材、例えば白金および/またはグラファイトを含有する改質インクであってもよい。同じ材料または異なる材料からなる2つ以上の層を用いて作用電極を形成してもよい。

10

【0053】

また、セルは、例えばレセプタクルの基部、レセプタクルの1以上の壁、あるいはレセプタクルの周囲または近くの領域に存在し得る擬似参照電極も含む。この擬似参照電極は、通常、Ag/AgClからなるが、他の材料を用いてもよい。擬似参照電極として用いるのに適した材料は、当業者にとって公知である。この態様においては、セルは、擬似参照電極が対向電極と参照電極の両方として機能する2電極方式である。別個の対向電極が設けられる別の態様も考えられる。

20

【0054】

擬似参照電極は、通常、作用電極5の表面積と同じ大きさの、またはそれよりも大きい、例えばそれよりも大幅に大きい表面積を有している。通常、擬似参照電極の表面積と作用電極の表面積の比率は少なくとも1:1、例えば少なくとも2:1または少なくとも3:1である。好ましい比率は少なくとも4:1である。擬似参照電極は、例えばマイクロ電極であり得る。擬似参照電極は、0.01mm以上、例えば0.1mm以上の寸法を有している。これは、例えば0.1mm以上の直径であり得る。擬似参照電極の通常の面積は、0.001mm²~150mm²、例えば最大100mm²、好ましくは0.1mm²~60mm²、例えば1mm²~50mm²である。作用電極と擬似参照電極の間の最小距離は、例えば10~1000 μm 、例えば10~300 μm または400~700 μm である。

30

【0055】

セルが機能できるようにするには、絶縁材6によって電極をそれぞれ分離する必要がある。この絶縁材は、通常、ポリマー、例えばアクリレート、ポリウレタン、PET、ポリオレフィン、ポリエステル、またはその他の任意の安定した絶縁材である。ポリカーボネートおよびその他のプラスチックならびにセラミックも適切な絶縁材である。絶縁層は、高分子溶液の溶媒蒸発法によって形成することができる。施した後に硬化する液体、例えばワニスを用いてもよい。または、例えば、熱またはUVに暴露することにより、あるいは架橋性二成分系の活性部分と混合することにより架橋結合される、架橋性高分子溶液を用いてもよい。必要に応じて、誘電性インクを用いて絶縁層を形成してもよい。別の態様においては、絶縁層が装置にラミネートされる、例えば熱によってラミネートされる。

40

【0056】

電気化学セルの電極は、任意の適切な手段によって任意の必要な測定装置に接続することができる。通常、電極は、必要な測定装置に接続される、または接続され得る導電トラックに接続される。

50

【0057】

図1において7で示したように、通常、遷移金属塩を含む材料がレセプタクル内に含まれる。通常、遷移金属塩を含む材料が液体の形態でレセプタクルに挿入され、続いて、組成物の固定を促進するために乾燥される。試料がレセプタクルに導入されると、乾燥した材料が再懸濁されて、遷移金属塩および試料を含む液体を形成し、その液体がレセプタクルの壁に配置された作用電極に接触する。この液体は、通常、擬似参照電極とも接触する。このため、セルにわたって電圧が印加されると、電気化学反応が生じて、測定可能な電流が生成されることができる。通常、乾燥した材料を再懸濁できるように、膜がレセプタクルを覆っている、例えば1秒、または1～60秒の湿潤時間が電圧の印加前に設けられる。

10

【0058】

レセプタクルは例えば、その基部またはその1以上の壁に1以上の小さい通気孔を含んでもよい(図1には示していない)。これらの通気孔があるため、試料がレセプタクルに入るときに空気がレセプタクルから逃げることができる。もし、このような通気孔がなければ、試料が開口端を越えて流れるときに試料がレセプタクルに入ることができないか、あるいは試料が辛うじてレセプタクルに入ることができる。通気孔は、通常、毛管のような寸法を有している。例えば、通気孔は約1～600 μm、例えば100～500 μmの直径を有し得る。表面張力が原因で試料が通気孔を通してレセプタクルから出ることが実質的に防止されるように、通気孔は十分小さいことが望ましい。通常、1以上の、例えば1～4の通気孔が存在することができる。

20

【0059】

場合により、セルは、作用電極および擬似参照電極に加えて別個の対向電極を含んでもよい。対向電極を製造するのに適した材料は、当業者にとって公知である。適切な材料の例はAg/AgClである。

【0060】

本発明による別の装置を図2に示している。下記のことを除いて、この態様の装置は、図1に示し、前述した装置と同じである。この態様においては、装置はストリップSを含んでいる。このストリップSは任意の形状および大きさを有してもよいが、通常は、実質的に平坦である第1表面61、62を有している。ストリップは、基部1および壁2に囲まれたレセプタクル10を含んでいる。装置はさらに、レセプタクルの壁に作用電極5を有する電気化学セルを含んでいる。この作用電極は、通常、マイクロ電極である。

30

【0061】

この態様の装置は、参照電極として機能し、場合により対向電極としても機能する擬似参照電極を含んでいる。この擬似参照電極は、ストリップの第1表面61、62に存在する擬似参照電極層8を含んでいる。ストリップの第1表面は外部表面である。すなわち、第1表面は、レセプタクルの内部に露出される表面ではなく、装置の外部に露出される表面である。通常、擬似参照電極層は実質的に、レセプタクルまたは一部のレセプタクル10を囲む。図2に示したように、擬似参照電極層は第1開口部3の周囲に接触しないことが好ましい。通常、擬似参照電極層は第1開口部の周囲から少なくとも0.1 mm、好ましくは少なくとも0.2 mmの距離にある。但し、擬似参照電極の少なくとも一部は、通常、第1開口部の周囲から2 mm以下、例えば1 mmまたは0.5 mm以下、好ましくは0.4 mm以下の距離にある。一態様においては、擬似参照電極は実質的に、第1開口部の周囲から0.01～1.0 mm、例えば0.1～0.5 mm、または0.2～0.4 mmの距離でレセプタクルまたは一部のレセプタクルを囲む。または、この距離は0.01～0.3 mm、または0.4～0.7 mmであり得る。

40

【0062】

擬似参照電極の厚さは、通常、作用電極の厚さと同じであるか、それよりも大きい。適切な最小厚さは0.1 μm、例えば0.5、1、5、または10 μmである。適切な最大厚さは50 μm、例えば20または15 μmである。

【0063】

50

擬似参照電極 8 は、通常、作用電極 5 の表面積と同じ大きさの、またはそれよりも大きい、例えばそれよりも実質的に大きい表面積を有している。通常、擬似参照電極の表面積と作用電極の表面積の比率は少なくとも 1 : 1、例えば少なくとも 2 : 1 または少なくとも 3 : 1、好ましくは少なくとも 4 : 1 である。擬似参照電極は、例えばマイクロ電極であることができる。擬似参照電極の表面積と作用電極の表面積の比率が 1 : 1 を上回れば、擬似参照電極で発生する電気化学反応が電流を制限するものではないことが保証される。擬似参照電極の実際の面積は、例えば $0.001 \text{ mm}^2 \sim 150 \text{ mm}^2$ 、例えば最大 100 mm^2 、または $0.1 \text{ mm}^2 \sim 60 \text{ mm}^2$ 、例えば $1 \text{ mm}^2 \sim 50 \text{ mm}^2$ である。

【0064】

膜 4 は、任意の適切な接着手段 9 によって、例えば両面接着テープを用いて装置に接着することができる。通常、接着手段は、膜をストリップの第 1 表面または擬似参照電極層に接着させる。図 2 に示した好ましい態様においては、膜は、レセプタクル自体の周囲から離れた位置で擬似参照電極層 8 に接着される。さらに、接着手段と擬似参照電極層の距離よりも、接着手段とレセプタクルの第 1 開口部 3 の距離のほうが大きいため、レセプタクルの近くまたは周囲の、擬似参照電極層の表面の少なくとも一部が、膜を通過した試料に暴露されるようになっている。接着手段は、レセプタクルの周囲から少なくとも 0.2 mm 、例えば少なくとも 0.3 mm または少なくとも 0.4 mm 離れていることが好ましい。

【0065】

図 2 に示した態様においては、反応体積は、レセプタクルの基部 1 および壁 2、ストリップの表面 61、62 の一部、擬似参照電極層 8、接着手段 9、ならびに膜 4 によって決まる。この反応体積は、レセプタクルの容積、擬似参照電極層の位置および厚さ、ならびに接着手段 9 の位置および厚さを変えることにより可変にすることができる。好ましい反応体積は少なくとも $0.05 \mu\text{l}$ 、例えば少なくとも 0.1 または少なくとも $0.2 \mu\text{l}$ である。反応体積が $25 \mu\text{l}$ 以下、好ましくは $5 \mu\text{l}$ 以下、例えば $3 \mu\text{l}$ 以下または $2 \mu\text{l}$ 以下であることがさらに好ましい。

【0066】

本発明の装置で利用できる電気化学セルに関する詳細が、国際公開公報第 03 / 05319 号および英国特許第 0414546.2 号およびそれに基づき優先権を主張している国際出願（本出願と同日に出願された「ELECTRODE FOR ELECTROCHEMICAL SENSOR」と題する）に記載されている。これらの出願の内容が、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0067】

本発明の装置は、2 つ以上の電気化学セルを含むことができる。各セルは作用電極を含んでおり、対向電極をさらに含むことができる。または、2 つ以上の隣接するセルが同じ対向電極を利用してもよい。本発明のこの態様によって、同時に複数の測定値を得ることが可能になり、例えば得られた測定値の誤差をなくするのに役立つ。

【0068】

本発明の装置は、2 層の絶縁材の間に作用電極層（例えば、グラファイトの層）を含む積層構造を形成することにより製造することができる。次に、この積層を貫通する穴が開けられて（またはドリル加工あるいは切り抜きされて）レセプタクルの壁が形成される。次に、場合により対向電極を含む基部が追加される。または、レセプタクルの開口部の周囲または近くの絶縁材に適切な材料の層を印刷することにより、対向電極を設けてもよい。レセプタクルの基部または壁に通気孔があることが望ましい場合、任意の適切な手法によって、例えばドリル加工または押し抜きによってこの通気孔を形成することができる。図 1 に示したセルを製造するプロセスに関する詳細は、それぞれ上記で参照した、国際公開公報第 03 / 056319 号または英国特許第 0414546.2 号およびそれに基づき優先権を主張している国際出願（「ELECTRODE FOR ELECTROCHEMICAL SENSOR」と題する）に記載されている。

【0069】

本発明の装置は、試料を装置に供給することと、セルにわたって電圧を印加することと

、遷移金属の電気化学反応によって生成される電流を測定することによって機能する。作用電極において電気化学反応が発生できるようにするには、試料／遷移金属の混合物が作用電極に電氣的に接触することが望ましい。

【0070】

通常、コバルト(II)が遷移金属である場合、セルにわたって印加される電圧が、例えば0 Vから約-0.5 Vまで、次に約1.9 Vまで走査される(本明細書で言及する電圧はすべて、Ag/AgCl参照電極に対して見積られる)。コバルト(II)ピークを検出するには、少なくとも1.7 Vの最大電圧に達することが望ましい。適切な走査速度は、例えば約50 mV s⁻¹である。異なる遷移金属を使用する場合、遷移金属のピークが走査される電圧の範囲内に収まるように、最大電位を変更することができる。また、走査される電圧は、電極面積規格化剤の酸化／還元が観察される電位範囲を包含することが望ましい。ルテニウム錯体の場合、これは、通常、約-0.4 Vである。または、必要に応じて静的電位を印加してもよい。

10

【0071】

一態様においては、電圧の印加に先立って、例えば、その内容が全体として参照により本明細書に組み入れられる、英国特許第0414548.8号およびそれに基づき優先権を主張している国際出願(本出願と同日に出願された「ELECTRODE PRECONDITIONING」と題する)に記載された手法に従って、電極がプリコンディショニングされる。電流の測定は、当技術分野で公知の任意の手法を用いて実施することができる。例えば、1秒～1分間にある回数の測定値を取得することができる。

20

【0072】

実施例

作用電極が炭素電極であり、擬似参照電極がAg/AgCl電極である、図2に示した種類の装置を用いて電気化学的試験を実施した。基部、壁、ストリップ表面、接着剤、および膜の底面によって画定されるレセプタクルの容積は1.5 μlであった。5% w/vのPVP(pH 7.0)を含むMOPS緩衝剤における35.6ミリモルdm⁻³のCoCl₂、24ミリモルdm⁻³の塩化ルテニウムヘキサミン、および150ミリモルdm⁻³のKClを含む試薬混合物を装置のレセプタクルに挿入し、膜を装置上に接着する前に乾燥した。用いた膜はWhatman VF2膜であった。

30

【0073】

ウエルの容量を満たす1.5 μlの正常な血漿が電気化学セルに供給され、試薬混合物が血漿中で再懸濁できるようにした。Coの最終再懸濁濃度は4.75ミリモルdm⁻³であり、Ruの最終再懸濁濃度は3.2ミリモルdm⁻³であった。

【0074】

時変電位をセルに印加し、印加する電位を-0.4 Vに下げ、次に1.7 Vに上げた。電位走査中に電流を測定した。その結果を図3に示している。測定されたコバルト酸化電流を電極面積のために規格化するために、I(Co) : I(Ru)の比率も計算した。

【0075】

(1)正常な血漿と(2)虚血患者から採取された血漿試料を含む、多数の様々な血漿試料について、電流比率I(Co) : I(Ru)(Co/Ru)を求めるために、上記の方法で多数の試験を実施した。米国デンバー市のIschemia Technologies Inc.のABC試験に従って、試料を正常な試料または虚血試料に分類した(Clinical Chemistry, vol 47, pp 464~470(2002))。結果を図4に示している。ここで、正常な試料の結果はx軸上の1に、虚血試料の結果はx軸上の2に示した。y軸はCo/Ru電流比率を示している。これらの結果は、本発明の方法が、正常な試料と虚血患者から採取された試料を区別できる能力を備えていることを実証している。本発明によってもたらされる、正常な試料と虚血試料の区別の程度は、上記のABC試験によってもたらされるものと同等である。

40

【0076】

様々な特定の態様および実施例を参照して本発明について説明してきた。但し当然のこ

50

とながら、本発明は決して、これらの特定の態様および実施例に限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】本発明の一態様による装置を示す図である。

【図2】本発明による別の装置を示す図である。

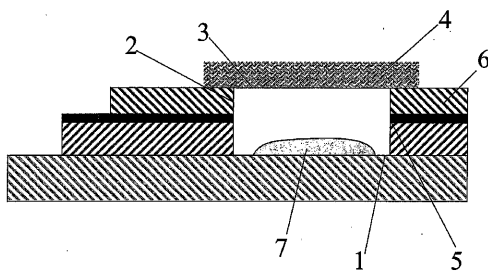
【図3】試料における電気化学的に検出可能なコバルトの量を求めるため、本発明の方法を用いて実施した電気化学的試験における、電流（I）と電位（V）の関係を示す図である。

【図4】一連の正常な試料（x軸の1）および一連の虚血試料（x軸の2）における比率 $I(Co) / I(Ru)$ を示す図である。

10

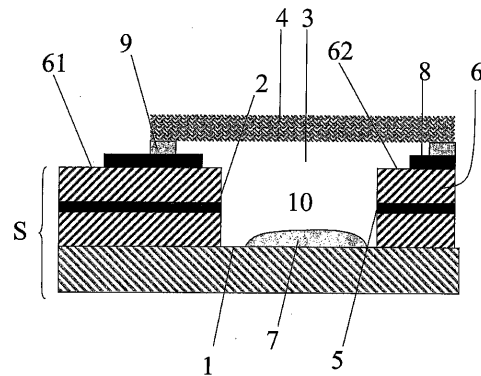
【図1】

FIG. 1



【図2】

FIG. 2



【図3】

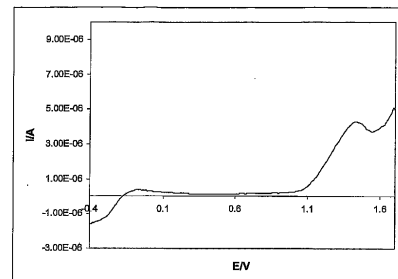
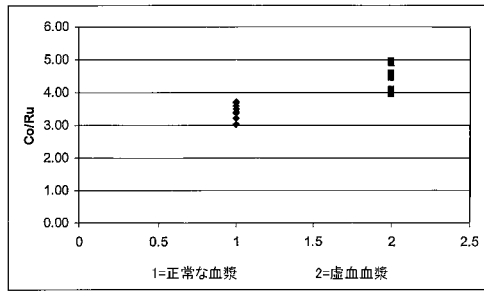


Figure 3

【 図 4 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

.../GB2005/002544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N27/49	G01N27/30	G01N33/487 G01N33/68 G01N33/84
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LIU M ET AL: "Preparation and characterization of polymer-stabilized ruthenium- platinum and ruthenium-palladium bimetallic colloids and their catalytic properties for hydrogenation of o-chloronitrobenzene" JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, vol. 214, no. 2, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 231-237, XP002359419 ISSN: 0021-9797 page 234, right-hand column, paragraph 3 - page 236, right-hand column, paragraph 2; table 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the International search report
15 December 2005		30/12/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Johnson, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional Application No

.../GB2005/002544

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU M ET AL: "Selective hydrogenation of o-chloronitrobenzene over polymer-stabilized ruthenium colloidal catalysts" JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS A:CHEMICAL, vol. 138, 1999, pages 295-303, XP002359420 ISSN: 1381-1169 table 3	1-5,7
Y	WO 03/056319 A (OXFORD BIOSENSORS) 10 July 2003 (2003-07-10) cited in the application	1-11, 13-19,21
A	page 6, line 10 - page 11, line 30 figure 1; example 2e	12
Y	EP 0 506 305 A (FUJITSU LIMITED) 30 September 1992 (1992-09-30) page 4, line 26 - line 48 page 5, line 52 - page 6, line 13 claim 1; figures 2a-2c	1-11, 13-19,21
A	WO 03/046538 A (ISCHEMIA TECHNOLOGIES) 5 June 2003 (2003-06-05) page 10, line 22 - page 17, line 24 figures 1,10	1-3,10, 11,13, 15,16, 19,21
A	CHRISTENSON R H ET AL: "Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 47, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 464-470, XP002961913 ISSN: 0009-9147 cited in the application	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/002544

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2005/002544

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 20

Rule 6.2 PCT: Prohibition of 'omnibus' type claims

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

JP/GB2005/002544

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03056319	A	10-07-2003	AU 2002367214 A1 CA 2471132 A1 CN 1620604 A EP 1472527 A2 JP 2005513500 T US 2005178674 A1	15-07-2003 10-07-2003 25-05-2005 03-11-2004 12-05-2005 18-08-2005
EP 0506305	A	30-09-1992	DE 69222797 D1 DE 69222797 T2 KR 9613687 B1 US 5281323 A	27-11-1997 19-02-1998 10-10-1996 25-01-1994
WO 03046538	A	05-06-2003	AU 2002352959 A1 CA 2468236 A1 EP 1459059 A1 JP 2005510712 T	10-06-2003 05-06-2003 22-09-2004 21-04-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 27/28	3 3 1 Z
	G 0 1 N 27/46	3 3 6 M
	G 0 1 N 27/28	3 0 1 Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,L T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ハイランド , マーク
イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤーントン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク、オックスフォード・バイオセンサーズ・リミテッド

(72)発明者 アスティエ , ヤン
イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス5 1 キューユー、ヤーントン、ミード・ロード、オックスフォード・インダストリアル・パーク、オックスフォード・バイオセンサーズ・リミテッド