

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4796731号
(P4796731)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日(2011.8.5)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 6 J
C 1 2 M 1/40 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 8
C 1 2 N 11/14 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 5 3 Z
GO 1 N 27/30 (2006.01)	C 1 2 M 1/40 B
GO 1 N 27/327 (2006.01)	C 1 2 N 11/14

請求項の数 9 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-583768 (P2001-583768)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成13年5月14日 (2001.5.14)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2003-533679 (P2003-533679A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成15年11月11日 (2003.11.11)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/AT2001/000138		T
(87) 国際公開番号	W02001/087300		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成13年11月22日 (2001.11.22)		グレンツアーヘルストラツセ124
審査請求日	平成20年5月7日 (2008.5.7)	(74) 代理人	110000741
(31) 優先権主張番号	A 853/2000		特許業務法人小田島特許事務所
(32) 優先日	平成12年5月16日 (2000.5.16)	(72) 発明者	シャフアー, ベルンハルト・ペーター・ハラルト
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		オーストリア・アー-8045グラーツ・
			ネボムクガツセ27
		審査官	大竹 秀紀
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クレアチニン・バイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体液中において酵素を作用電極上に固定化しクレアチニンを電流測定法により定量するための、少なくともサルコシン・オキシダーゼ、クレアチナーゼおよびクレアチナーゼを含んで成るバイオセンサーの製造法において、サルコシン・オキシダーゼを水溶液中に含まれる1種またはそれ以上の表面活性物質と共に作用電極に被覆して乾燥させ、次の工程においてクレアチナーゼおよびクレアチナーゼをその上に化学的に固定化することを特徴とする方法。

【請求項2】

表面活性物質として多価アルコール及び/または洗剤を使用することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

洗剤が非イオン性のテンスайдであることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】

クレアチナーゼおよびクレアチナーゼは架橋、共有結合またはマトリックス包接法によって固定化することを特徴とする請求項1~3のいずれか1記載の方法。

【請求項5】

クレアチナーゼおよびクレアチナーゼはグルタルアルデヒドによって固定化することを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】

10

20

固定化の後で保護膜を適用することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 記載の方法によってつくられた作用電極、基準電極および対向電極を含むバイオセンサーにおいて、基準電極は Ag / AgCl 電極であり、対向電極は炭素電極であり、作用電極は炭素、金属、金属酸化物、または炭素と金属または金属酸化物との混合物から成り、電極は非伝導性の基板上に適用されていることを特徴とするバイオセンサー。

【請求項 8】

二つの三電極系からつくられ、第 1 の電極系は酵素のクレアチナーゼ、クレアチナーゼおよびサルコシン・オキシダーゼを含んでいてクレアチニンおよびクレアチンの和を定量する役目をし、第 2 の電極系は酵素のクレアチナーゼおよびサルコシン・オキシダーゼを含みクレアチニンの定量に用いられ、この二つの結果を差し引いてクレアチニンの定量を行うことを特徴とする請求項 7 記載のバイオセンサー。

10

【請求項 9】

電気化学的妨害を除去するさらなる電極系を含んでいることを特徴とする請求項 8 記載のバイオセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は少なくとも 2 種の酵素から成るバイオセンサーの製造法、および酵素を作用電極上で固定化し、酵素により分解し得る物質を生体液中において電流滴定法(amperometric determination)により定量する方法に関する。さらに本発明はバイオセンサー、特にクレアチニンを定量するためのバイオセンサーに関する。

20

【0002】

酵素で分解し得る物質、例えばクレアチニン、グルコース等を、生体液、例えば血液、尿、血漿および髄液中においてセンサーにより定量するには、固定化された酵素を含むバイオセンサーにより行うことが好ましい。文献によれば、これらの物質を決定するいくつかの電気化学的方法および光度測定による方法が知られている。

【0003】

このようにして例えば酵素のクレアチニン・デイミナーゼにより電位滴定法でクレアチニンを定量することができるが、この場合後でアンモニウム含量を決定する過程が含まれる。他の方法では、酵素のクレアチナーゼ、クレアチナーゼおよびサクロシン・オキシダーゼを用いる酵素カスケード法によりクレアチニンの濃度を決定するが、この場合には最後に電流測定法(以下、電流滴定法ということもある)の電極の所で過酸化水素(H₂O₂)を測定する。

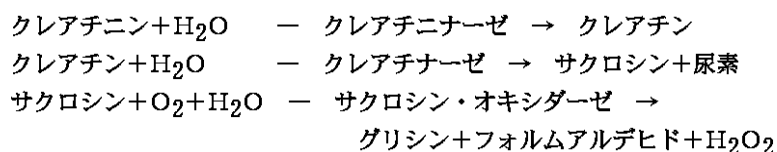
30

【0004】

本発明は、上記の最後に挙げた原理に従って機能するバイオセンサーを製造する方法に関する。これを行う場合、酵素を一緒に固定化し、クレアチニンを電流滴定法により検出し得る分子の過酸化水素に変えなければならない。クレアチニンの過酸化水素への変化は下記の反応過程によって行われる。

40

【0005】



電位滴定法における電極の所で過酸化水素は - 350 mV において Ag / AgCl に対して酸化される。この場合に流れる電流はクレアチニンの濃度に比例する。

【0006】

H₂O₂ - 350 mV 2 個のプロトン + 2 個の電子 + O₂
電極反応で回収された酸素は次にサクロシンの酸化に使用される。

50

【0007】

当業界の現状においては、この3種の酵素を固定化する種々の方法が知られている。T. Tsuchida, K. YodaのClin. Chem.誌、29/1、51頁(1983年)の論文によれば、これら3種の酵素はすべてグルタルアルデヒドで架橋させられる。

【0008】

しかしこの固定化の方法は次のような欠点をもっている。即ちこの方法で固定化されたサクロシン・オキシダーゼはその全体的な活性を殆ど失っているから、このような方法でつくられたセンサーを用いた場合、低い信号の高さしか得られない、即ち僅かな電流の変化しか確認できない。しかし、特にクレアチニンの定量の場合には、最大可能な信号の高さが特に重要である。何故ならクレアチニンの濃度は非常に低く、血液中では特にそうであり(約50 μ M)、またクレアチナーゼは非常に小さい比活性度(最大20 iu/mg)のものしか得られないからである。さらにこのような方法で固定化されたセンサーは長い応答時間を示す。

10

【0009】

米国特許A-5,466,575号においては、光で誘起されて架橋をつくり得る魚のゼラチン中でサクロシン・オキシダーゼおよびクレアチナーゼを固定化し、次いでフィルム生成可能なポリ酢酸ビニル/ビニルアルコール共重合体ラテックス中でクレアチナーゼを重ね合わせる方法が記載されている。

【0010】

しかしこの点に関しては、複雑な光誘起性の架橋反応のためにバイオセンサーを簡単に製造することが妨げられるという欠点がある。

20

【0011】

本発明の目的は、上記の欠点および難点を克服する冒頭に述べた種類の方法を提供することである。特に、本発明方法では短い応答時間および大きな信号の高さが得られるバイオセンサーの簡単な製造法が提供される。特に室温で酵素を固定化することが可能である。

【0012】

本発明に従えば上記目的は、水溶液中において酵素を1種またはそれ以上の表面活性剤と一緒に作用電極に供給して乾燥させ、それ以後の工程において少なくとも第2の酵素をその上に化学的に固定化することによって達成される。

30

【0013】

本発明の説明および特許請求の範囲の目的に対しては、「表面活性剤(surface active substances)」という言葉は表面活性をもった物質、例えば洗剤およびアルコール、例えばグリセリンを包含するものとする。

【0014】

本発明においては、これらの添加剤を加えるにより、3種の同じように固定化された酵素を含むバイオセンサーに比べ、測定される電流は約40倍程度増加する。

【0015】

少なくとも第2の酵素は架橋、共有結合またはマトリックス包接法によって固定化することが適当である。固定化はグルタルアルデヒドを用いて行うことが好ましい。

40

【0016】

好適具体化例においては、酵素を固定化した後に保護膜を適用する。このような膜は例えばナフィオン、PVC共重合体または酢酸セルロースから成り、センサーの直線性を有利に増加させ、また妨害効果を減少させる。

【0017】

本発明のバイオセンサーは作用電極、基準電極および対向電極から成り、その酵素は本発明方法によって固定化されており、基準電極はAg/AgCl電極、対向電極は炭素電極であり、作用電極は炭素、金属、金属酸化物または炭素と金属または金属酸化物との混合物から成り、これらの電極は非伝導性の基板(substrate)の上に適用されていることを特徴している。

50

【0018】

特に、クレアチニン定量用の本発明のバイオセンサーは作用電極上にサルコシン・オキシダーゼが吸着され、クレアチナーゼおよびクレアチナーゼがその上に固定化されていることを特徴としている。

【0019】

好適な具体化例においては、このバイオセンサーは二つの三電極系からつくられ、第1の電極系は酵素のクレアチナーゼ、クレアチナーゼおよびサルコシン・オキシダーゼを含んでいてクレアチニンとクレアチンの和の定量に用いられ、第2の電極系は酵素のクレアチナーゼおよびサルコシン・オキシダーゼを含みクレアチンの定量に用いられる。クレアチニンの定量を行うには第2の電極系の結果を第1の電極系の結果から差し引く。

10

【0020】

本発明のバイオセンサーはさらに電気化学的な妨害を除去するのに用いられるさらに他の電極系を含んでいることが有利である。

【0021】

次に下記実施例を用いて本発明をさらに例示する。

【0022】

実施例 1

実施例1は、本発明に従って表面活性剤を添加すると、従来法とは反対にサルコシン・オキシダーゼの活性の増加によって信号の高さが改善されることを示す。

【0023】

水の中(従来法)、並びに水溶性の表面活性成分(この場合はグリセリン並びに3種の非イオン性テンスайд(Tenside))を含む水の中に溶解したサルコシン・オキシダーゼを電流滴定用のベースセンサーの上に滴下し室温で乾燥させる。電極を分極させ1mMのサルコシンについて電流を測定した。測定結果を表1に示す。

20

【0024】

【表1】

表1

サルコシン・オキシダーゼ(SOx)	添加物	1mMのサルコシンに関する電流
0.5mlのH ₂ O中54.2mgのSOx	なし	2nA
0.5mlのH ₂ O中54.2mgのSOx	5.0%のグリセリン	80nA
0.5mlのH ₂ O中54.2mgのSOx	5.0%のTween20	70nA
0.5mlのH ₂ O中54.2mgのSOx	5.0%のTritonX100	90nA
0.5mlのH ₂ O中54.2mgのSOx	5.0%のBirij35	85nA

30

【0025】

1mMのサルコシンに関する電流は洗剤またはグリセリンによってそれぞれ約40倍増加していることが見出された。

40

【0026】

明らかに、乾燥中添加剤によって酵素が最良の方法で保護され、また添加剤の表面活性特性により過酸化水素電極の多孔性をもった組織に対し良好且つ緊密な結合が生じたため、電流がこのように著しく増加したのである。

【0027】

実施例 2

実施例2は、従来法で製造されたバイオセンサー(T. Tsuchida)に比べ、本発明のバイオセンサーでは信号の高さが改善され、応答時間が短縮されることを示す。

【0028】

二つの完成したクレアチン・センサーをつくったが、第1のセンサーの場合には3種のす

50

すべての酵素をグルタルアルデヒドと一緒に架橋させ、第2のセンサーの場合には先ずベース電極にサルコシン・オキシダーゼを Tween 20 と共に被覆した後、その上にグルタルアルデヒドを用いてクレアチナーゼおよびクレアチナーゼを固定化した。クレアチニン並びにサルコシンを定量するための得られた電流および応答時間をそれぞれ表2に掲げる。

【0029】

【表2】

表2

サルコシン・オキシダーゼ	1mMのクレアチンに関する電流	1mMのサルコシンに関する電流	応答時間 (T90)
グルタルアルデヒド中 (センサー1)	120 nA	140 nA	80秒
Tween 20中 (センサー2)	420 nA	>500 nA	10秒

10

【0030】

本発明に従って酵素を固定化することにより、遥かに強い電流が測定された。また本発明によってつくられたセンサーの応答時間は従来公知のセンサーよりも明らかに短かった。

20

【0031】

実施例 3

実施例3では本発明のクレアチニン・バイオセンサーの製造法を説明する。

【0032】

セリグラフィー (serigraphy) の手法により、基準電極、対向電極および作用電極に対する Ag 片の伝導体を合成材料またはセラミックス材料からつくられた非電気伝導体の基板の上にプリントする。基準電極は少なくともセンサーの区域の中で Ag / AgCl ペーストからつくる。測定区域の内部で対向電極の上に炭素のペーストの層をプリントする。同じ炭素のペーストを用い作用電極の Ag 片の伝導体を測定区域の中へと延長する。作用電極の測定区域において炭素のペーストの中に5%の二酸化マンガンを含む混合物を作用電極としてプリントする。次に後で液と接触する電極の場所および信号の取出口 (タップ) として作用する伝導体の細片以外の全体の系を繰り返し絶縁ワニスで被覆する。その後 Tween 20 溶液中に含まれたサルコシンを作用電極の上に滴下し、乾燥させる。しかる後他の酵素をグルタルアルデヒドで固定化する。直線性を増加し妨害効果を減少させるために保護膜を適用する。

30

【0033】

妨害なしにクレアチニンを定量するためには、少なくとも二つの三電極系が必要であり、その一つの系はクレアチニンおよびクレアチンを定量するための酵素であるクレアチナーゼ、クレアチナーゼおよびサルコシン・オキシダーゼを含み、他の系はクレアチンを定量するための酵素のクレアチナーゼおよびサルコシン・オキシダーゼを含んでいる。クレアチンは血液の中で阻害物質として作用するから、測定されたクレアチンの値をクレアチンおよびクレアチニンから成るクレアチニン電極の測定値から差し引かなければならない。

40

【0034】

さらに他の電気化学的な妨害を除去するためには、サルコシン・オキシダーゼだけを固定化した第3の電極系を使用する (クレアチンは例えばアルブミンのような不活性な蛋白質で置き換える)。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/483	(2006.01)	G 0 1 N 27/30	A
C 1 2 Q 1/00	(2006.01)	G 0 1 N 27/30	B
		G 0 1 N 27/30	3 5 3 A
		G 0 1 N 27/30	3 5 3 B
		G 0 1 N 33/483	F
		C 1 2 Q 1/00	B

- (56) 参考文献 特開 2 0 0 0 - 0 6 5 7 9 1 (J P , A)
 特開平 0 2 - 3 1 0 4 5 7 (J P , A)
 特開 2 0 0 0 - 0 8 1 4 1 0 (J P , A)
 特開平 1 0 - 1 1 3 2 0 0 (J P , A)
 特開平 0 9 - 1 8 9 6 7 7 (J P , A)
 特開平 0 6 - 2 8 1 6 1 4 (J P , A)
 特開平 0 1 - 2 9 6 1 5 7 (J P , A)
 特開昭 5 9 - 1 5 9 0 6 4 (J P , A)
 特開昭 5 8 - 0 6 1 4 5 9 (J P , A)

Marcel B. Madaras (外 3 名) , Microfabricated amperometric creatine and creatinine biosensors , ANALYTICA CHIMICA ACTA , 1 9 9 6 年 2 月 9 日 , vol. 319, No. 3 , p. 335-345
 J. Schneider (外 6 名) , Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing , ANALYTICA CHIMICA ACTA , 1 9 9 6 年 5 月 3 0 日 , Vol. 325 , No. 3 , p. 161-167

- (58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

G01N 27/416

G01N 27/327

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)