

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3924487号
(P3924487)

(45) 発行日 平成19年6月6日(2007.6.6)

(24) 登録日 平成19年3月2日(2007.3.2)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 7
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 B
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 3 B
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/483	F
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
請求項の数 4 (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-94084 (P2002-94084)	(73) 特許権者	591086854 株式会社テクノメデイカ 神奈川県横浜市都筑区仲町台5丁目5番1号
(22) 出願日	平成14年3月29日(2002.3.29)	(73) 特許権者	000250100 湧永製菓株式会社 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号
(65) 公開番号	特開2003-294680 (P2003-294680A)	(74) 代理人	100064388 弁理士 浜野 孝雄
(43) 公開日	平成15年10月15日(2003.10.15)	(74) 代理人	100067965 弁理士 森田 哲二
審査請求日	平成17年2月9日(2005.2.9)	(74) 代理人	100088236 弁理士 平井 輝一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 電気化学式バイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

測定すべき物質の抗体に基質との反応により電気化学的に活性な物質を生成する酵素を結合させた酵素結合抗体を含む酵素結合抗体層と、

前記酵素結合抗体と結合する物質が、少なくとも試液内の測定すべき物質と競合するに十分な量、固定された競合反応層と、

前記酵素との反応により電気化学的に活性な物質を生成する基質を含有する電気化学反応層と、

基板上に形成された電極とを備え、

前記電気化学反応層の上側に前記競合反応層が位置し、前記競合反応層の上側に前記酵素結合体層が位置するように各層を配置し、試液が前記酵素結合体層、前記競合反応層及び前記電気化学反応層の順に流れるようにした電気化学式バイオセンサーであって、

前記電極上に前記電気化学反応層を直接接触するように配置し、

前記競合反応層をラテラルフローメンブレンで形成し、

該競合反応層における試液流れ方向の上流部分に前記酵素結合抗体層を直接接触するように配置し、

競合反応層を、該競合反応層と前記電気化学反応層との間に微細な隙間を開けて電気化学反応層を覆うように電気化学反応層の上方を通過させ、その試液流れ方向下流端を電極が形成されている基板に固定し、

競合反応層の先端から基板上に漏れ出した試液が毛細管現象で電気化学反応層の上方に

10

20

ある隙間に導かれるように構成した
ことを特徴とする電気化学式バイオセンサー。

【請求項 2】

前記酵素が - ガラクトシダーゼであり、
前記基質がパラアミノフェニルガラクトピラノシドである
ことを特徴とする請求項 1 に記載の電気化学式バイオセンサー。

【請求項 3】

前記酵素がグルコースオキシダーゼであり、
前記基質がグルコースである
ことを特徴とする請求項 1 に記載の電気化学式バイオセンサー。

10

【請求項 4】

前記測定すべき物質が尿中に含まれたアルブミンであり、
前記抗体がアルブミン抗体であり、
酵素と基質との反応を介して間接的に尿中のアルブミン量を測定することができるよう
にした
ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の電気化学式バイオセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、電気化学式バイオセンサーに関し、特に、電気化学的に活性な物質を介して間
接的に試液中に存在する測定対象物質の量を測定し得る電気化学式バイオセンサーに関す
る。

20

【0002】

【従来の技術】

アルブミン等のたんぱく質は通常、腎臓で再吸収され尿にはわずかな量しか排泄されない
が、腎不全や腎機能障害になると、腎臓でアルブミンを吸収できなくなるため尿中に排泄
されるアルブミンの量が増加する。このため、腎疾患の診断のために尿中のアルブミンを
測定することは重要である。特に、糖尿病では腎障害を併発する可能性があるため尿中
に排泄されているアルブミンの量の測定は重要である。

上記したアルブミン測定方法としては、アルブミン抗体が固定された膜に、尿を滴下し、
尿中に含まれるアルブミンと膜に固定されたアルブミン抗体との相互作用を、光の強度変
化として検出できる物質とさらにカップリングさせることで検出する光学的測定方法が一
般的に用いられている。

30

しかし、上記した光学的測定方法は、測定システムが煩雑で費用が多くかかるという問題
点があり、より簡便で、より低費用な測定方法の開発が市場では求められている。

簡便で、より低費用な測定方法としては、物質の化学反応を電気信号として取り出す電
気化学的測定方法が挙げられるが、アルブミンは、電氣的に活性な物質ではないので、アル
ブミンそのものを、この電気化学的測定方法を用いて測定することはできないという問題
がある。

上記した問題は、アルブミンに限らず、電気化学的に活性でない物質に共通する問題であ
る。

40

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

出願人は、上記した電気化学的に活性でない物質の測定に関する問題点を解決すべく、鋭
意研究した結果、測定すべき物質の抗体に基質との反応により電気化学的に活性な物質を
生成する酵素を結合させた酵素結合抗体を含む酵素結合抗体層と、前記酵素結合抗体と結
合する物質が、少なくとも試液内の測定すべき物質と競合反応するに十分な量、固定され
た競合反応層と、前記酵素との反応により電気化学的に活性な物質を生成する基質を含有
する電気化学反応層と、電極とを設け、前記酵素結合抗体層から測定すべき物質を含有す
る試液を導入し、酵素結合抗体層に導入された試液が、競合反応層を通過して電気化学反

50

応層に導入され、電気化学反応層での電気化学的な反応を前記電極を介して測定することができるように構成することにより電気化学的に活性でない物質を、電気的に活性な物質を用いて間接的に電気化学的に測定する方法を発明し、その発明を特許出願した(特願2002-93526)。

出願人は、上記した方法の研究をさらに進め、競合反応層において、酵素結合抗体層で試液中に溶解した酵素結合抗体を完全に除去すること、さらに、酵素結合抗体の除去が終了した試液を電気化学反応層に導くことが測定精度の向上につながることに着目し、反応時間を充分にとれ、かつ、試液を縦方向ではなく、横方向に流すことができるようにラテラルフローメンブレンを競合反応層として用いて、図7に示す構成を持った電気化学式バイオセンサーを開発するに至った。

図7において、符号1は酵素結合抗体層を、符号2は競合反応層を、符号3は電気化学反応層を、さらに符号4は電極を示している。酵素結合抗体層1には、アルブミン抗体に酵素としての - ガラクトシダーゼを結合させた酵素結合抗体が含まれており、競合反応層2にはアルブミンが固定されており、電気化学反応層3には基質としてのパラアミノフェニルガラクトピラノシドが含まれている。

酵素結合抗体層1は競合反応層2の上流端に設けられ、電気化学反応層3は競合反応層2の下流端に設けられており、競合反応層2の材料としてラテラルフローメンブレンを採用した。

上記した構成により、酵素結合抗体層1から流入した試液は競合反応層2内で電気化学反応層3に向けて展開された後、電気化学反応層3に入り込むので、競合反応層2における反応時間を充分にとれ、かつ、酵素結合抗体の除去が終了した試液を電気化学反応層3に送ることができるようになる。

しかし、出願人は上記した構成を持つ電気化学式バイオセンサーを用いて、さらなる実験を繰り返した結果、試液が必ずしも競合反応層2内で均一に展開していかないことを発見した。即ち、競合反応層2内で展開していく試液は図8に示すように、必ずしも均一には展開されず偏って展開してく可能性がある。このように、競合反応層2内での試液の展開が偏ると、電気化学反応層3に均一に試液が入らないので、測定結果にバラツキがでるといった問題が生じる。

出願人は、上記した問題点を解決し、反応時間が充分にとれ、かつ、余剰酵素結合抗体を除去した試液を均一に電気化学反応層に送り込むことができる電気化学式バイオセンサーを提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

上記した目的を達成するために、本発明に係る電気化学式バイオセンサーは、測定すべき物質の抗体に基質との反応により電気化学的に活性な物質を生成する酵素を結合させた酵素結合抗体を含む酵素結合抗体層と、前記酵素結合抗体と結合する物質が、少なくとも試液内の測定すべき物質と競合するに十分な量、固定された競合反応層と、前記酵素との反応により電気化学的に活性な物質を生成する基質を含有する電気化学反応層と、基板上に形成された電極とを備え、前記電気化学反応層の上側に前記競合反応層が位置し、前記競合反応層の上側に前記酵素結合抗体層が位置するように各層を配置し、試液が前記酵素結合抗体層、前記競合反応層及び前記電気化学反応層の順に流れるようにした電気化学式バイオセンサーであって、前記電極上に前記電気化学反応層を直接接触するように配置し、前記競合反応層をラテラルフローメンブレンで形成し、該競合反応層における試液流れ方向の上流部分に前記酵素結合抗体層を直接接触するように配置し、競合反応層を、該競合反応層と前記電気化学反応層との間に微細な隙間を開けて電気化学反応層を覆うように電気化学反応層の上方を通過させ、その試液流れ方向下流端を電極が形成されている基板上に固定し、競合反応層の先端から基板上に漏れ出した試液が毛細管現象で電気化学反応層の上方にある隙間に導かれるように構成したことを特徴とするものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下に図 1 ~ 図 5 に示した一実施例を参照しながら本発明に係る電気化学式バイオセンサーの実施の形態について説明していく。

図 1 は電気化学的バイオセンサーの概略上面図、図 2 は図 1 に示した電気化学的バイオセンサーの一部断面概略斜視図、図 3 は図 1 の A - A 断面図、図 4 は図 1 の B - B 断面図を各々示している。

図中符号 10 は絶縁性プラスチックフィルムからなる基板を示しており、この基板 10 上には、導電性ペーストインク材料をスクリーン印刷してなる作用極 11 及び測定極 12 が設けられている。

上記した二つの電極 11 及び 12 は電極部分及び端子部分を除いて絶縁性レジスト膜 13 で被覆されている。

10

【 0006 】

上記したように構成された電極 11 及び 12 の上には、酵素結合抗体層 14、競合反応層 15 及び電気化学反応層 16 が図 2 ~ 図 4 に示すように設けられる。

酵素結合抗体層 14 には、測定すべき物質の抗体に基質との反応により電気化学的に活性な物質を生成する酵素を結合させた物質が含まれている。ここで、基質との反応により電気化学的に活性な物質を生成する酵素とは、例えば、基質がパラアミノフェニルガラクトピラノシド P A P G の場合には、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) であり、また、例えば、基質がグルコースの場合には、グルコースオキシダーゼであり得る。また、本明細書では、この測定すべき物質の抗体に酵素を結合した物質のことを酵素結合抗体と称する。

20

この酵素結合抗体層 14 に含まれる酵素結合抗体の量は、測定すべき物質に応じて適宜変更され得るが、競合反応層での試液の展開中に測定すべき物質と競合反応する量より多くしておく必要がある。例えば、尿中の微量アルブミンを測定する場合には、 $2.5\mu\text{g}$ の酵素結合抗体が酵素結合抗体層 14 に含まれ得る。

競合反応層 15 には、酵素結合抗体層 14 に含まれた酵素結合抗体と結合し得る物質が固定されている。この物質は、測定対象物質と同じ物質であり得るが、これに限定されることなく、酵素結合抗体層 14 に含まれている酵素結合抗体と結合し得る物質であれば任意の物質でよい。

この競合反応層 15 に固定される物質の量は、測定すべき物質の量と、酵素結合抗体層 14 に含まれる酵素結合抗体の量とに応じて、少なくとも、酵素結合抗体層 14 において試液内に溶け込んだが、試液中の測定対象物質とは結合しなかった余剰な酵素結合抗体の全てと結合するのに十分な量に設定される。

30

電気化学反応層 16 には、酵素結合層 14 に含まれた酵素結合抗体における酵素と反応して電気化学的に活性な物質を生成する基質が含まれている。具体的には、例えば、酵素が β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) の場合には基質はパラアミノフェニルガラクトピラノシド P A P G であり、酵素がグルコースオキシダーゼの場合には基質はグルコースになる。

この電気化学反応層 16 に含まれている基質の量は、第一層と同様、電気化学反応層 16 に導入される測定すべき物質の量より多くしておく必要がある。

【 0007 】

40

次に、上記した各層 14 ~ 16 のレイアウトについて説明する。

電気化学反応層 16 は電極 11 及び 12 の上に設けられ、電極部分と直接接触するように構成されている。

競合反応層 15 は、ラテラルフローメンブレンから成り、基板 10 の後方 (図 1 における左側) から基板 10 の前方 (図 1 における右側) に向かって伸び、電気化学反応層 16 の上を微細な隙間 17 をあけて電気化学反応層 16 を覆うように通過して、電気化学反応層 16 より前方で、基板 10 上に形成されているレジスト膜 13 に接触するように湾曲され、その先端が前記レジスト膜 13 に固定される。前記競合反応層 15 は、その露出している上面部分が液密にコーティングされている。また、競合反応層 15 とレジスト膜 13 の結合部分は、外側 (電極の端子側) には液が漏れないが、内側 (電極部分側) には液が漏

50

れ出るようにコーティングされている。

酵素結合抗体層 14 は、競合反応層 15 の上流部分に、競合反応層 15 と直接接触するように設けられる。

尚、図中、符号 18 はスペーサを示している。

【0008】

次に、上記したように構成された電気化学式バイオセンサーの作用について説明する。

始めに、図5を参照しながら、試液の流れについてのみ説明していく。図5は図2の一部断面斜視図に試液の流れを矢印で示した説明図である。

酵素結合抗体層 14 に導入された試液は、競合反応層 15 に流入する。競合反応層 15 はセンサーの前後方向に試液が流れるように配置されたラテラルフローメンブレンで形成されているので、競合反応層 15 に流入した試液は、競合反応層 15 の先端に向かって流れる。

競合反応層 15 の先端に到達した試液は、競合反応層 15 の先端から内側に漏れ出し、毛細管現象により、電極リードを形成することで基板 10 上に生じさせた段部に沿って電極 11 及び 12 の電極部分に向かって流れ、さらに、競合反応層 15 と電気化学反応層 16 との間に形成された微細な間隙 17 に引き込まれ、電気化学反応層 16 の上面から均一に、電気化学反応層 16 に入り込むようになる。

上記したように構成することにより、ラテラルフローメンブレンを使用しているにもかかわらず試液が電気化学反応層 16 により均一に流入するようになる。

【0009】

次に、電気化学式バイオセンサーの化学的作用について説明する。

尚、以下の説明では、一例として、測定対象物質をアルブミン A1b、抗体をアルブミン抗体 Ab、酵素を α -ガラクトシダーゼ (α -Gal)、基質をパラアミノフェニルガラクトピラノシド P A P G として説明していく。

酵素結合抗体層 14 から試液として尿を導入すると、酵素結合抗体層 14 において、尿中にアルブミン抗体と α -ガラクトシダーゼとを結合させた酵素結合抗体 Ab + Gal が溶け出す。

尿中に溶け出した酵素結合抗体 Ab + Gal は、尿中のアルブミン A1b と結合して、 α -ガラクトシダーゼが結合したアルブミン-抗体複合体 (以下、酵素結合型アルブミン-抗体結合体と称する。) となり競合反応層 15 に入る。

競合反応層 15 に入った尿には、酵素結合型アルブミン-抗体結合体と、アルブミン A1b と結合できなかった余剰な酵素結合抗体 Ab + Gal が含まれている。競合反応層 15 には、酵素結合抗体 Ab + Gal と結合する物質としてアルブミン A1b が予め固定されているので、酵素結合抗体 Ab + Gal は、競合反応層 15 に固定されたアルブミン A1b と競合反応し、電気化学反応層 16 には到達しない。

従って、競合反応層 15 で酵素結合抗体 Ab + Gal は尿中から取り除かれ、測定すべきアルブミンから生成された酵素結合型アルブミン-抗体結合体だけが競合反応層 15 の先端から漏れ出して毛細管現象により電気化学反応層 16 の上部の隙間に導かれることになる。

電気化学反応層 16 には、 α -ガラクトシダーゼ (α -Gal) の基質であるパラアミノフェニルガラクトピラノシド P A P G が含まれているので、尿中に含まれている酵素結合型アルブミン-抗体結合体の α -ガラクトシダーゼ (α -Gal) とパラアミノフェニルガラクトピラノシド P A P G との酵素反応によりパラアミノフェノール P A P が生成される。

ここで生成されるパラアミノフェノール P A P は電気化学的に活性な物質なので、それが生成された量を電気信号として取り出すことができる。

従って電極 11 及び 12 で電気化学反応層 16 で生成されたパラアミノフェノール P A P の量を電気信号として取り出し、不図示の測定装置に出力することが可能になる。

そして、この電気化学反応層で生成されるパラアミノフェノール P A P の量は、尿中に含まれているアルブミン A1b の量と比例関係を持つので、測定装置で、パラアミノフェノ

10

20

30

40

50

ールP A Pの量から尿中に含まれているアルブミンA l bの量を算出することが可能になる。

【0010】

上記したように構成された電気化学式バイオセンサーを用いて実際に試液中に含まれるアルブミンの量を測定した結果を図6に示す。

この実験では、

酵素結合抗体層14に、アルブミン抗体と - ガラクトシダーゼ (- G a l) とを結合させた酵素結合抗体A b + G a lを2.5 μ g含ませ、

競合反応層15に、アルブミンA l bを20 μ g/cm²固定し、

電気化学反応層16に、パラアミノフェニルガラクトピラノシドP A P Gを22 μ g含ませ

10

、
 予め1 ~ 1000mg / Lのアルブミンを含ませた試液を酵素結合抗体層14から導入して電極での出力電流量を測定した。

図6に示すように、出力電流量のバラツキが極めて小さく、この結果から、上記したように構成された電気化学式バイオセンサーを用いれば、安定したアルブミン含有量の測定が可能であることが分かる。

【0011】

尚、上記した実施例では、電気化学式バイオセンサーを、酵素結合抗体層、競合反応層及び電気化学反応層の三つの層から形成しているが、必要に応じて、第一層を構成する酵素結合抗体層の上部に、試液中に含まれる電気化学的に酸化されやすい物質を、予め酸化して除去することができる物質を積層してもよい。これにより、試液中に含まれていて電気的に酸化され易いので測定に影響を及ぼす可能性があるアスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェン等の物質を予め除去しておくことが可能になる。

20

この電気化学的に酸化されやすい物質を、予め酸化して除去することができる物質としては、例えば、二酸化鉛や二酸化すず等がある。

【0012】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明に係る電気化学式バイオセンサーは、測定すべき物質の抗体に基質との反応により電気化学的に活性な物質を生成する酵素を結合させた酵素結合抗体を含む酵素結合抗体層と、前記酵素結合抗体と結合する物質が、少なくとも試液内の測定すべき物質と競合するに十分な量、固定された競合反応層と、前記酵素との反応により電気化学的に活性な物質を生成する基質を含有する電気化学反応層と、基板上に形成された電極とを備え、前記電気化学反応層の上側に前記競合反応層が位置し、前記競合反応層の上側に前記酵素結合体層が位置するように各層を配置し、試液が前記酵素結合体層、前記競合反応層及び前記電気化学反応層の順に流れるようにした電気化学式バイオセンサーであって、前記電極上に前記電気化学反応層を直接接触するように配置し、前記競合反応層をラテラルフローメンブレンで形成し、該競合反応層における試液流れ方向の上流部分に前記酵素結合抗体層を直接接触するように配置し、競合反応層を、該競合反応層と前記電気化学反応層との間に微細な隙間を開けて電気化学反応層を覆うように電気化学反応層の上方を通過させ、その試液流れ方向下流端を電極が形成されている基板に固定し、競合反応層の先端から基板上に漏れ出した試液が毛細管現象で電気化学反応層の上方にある隙間に導かれるように構成されているので、酵素結合抗体層において試液中に溶解した余剰酵素結合抗体が電気化学反応層に展開しないために競合反応により除去するための反応時間が充分にとれ、かつ、余剰酵素を除去した試液を均一に電気化学反応層に送り込むことができるようになるという効果を奏し、結果として、測定精度をより高くすることができるようになる。

30

40

また、競合反応層にラテラルフローメンブレンを用いて試液が横方向に展開するように構成しているので、単に、各層を積層して試液が縦方向に流れるようにセンサーを構成した場合に比べて、センサー全体の厚みを薄くすることができ、また、試液を導入し易くなるという効果を奏し、さらに、センサー自体の製造が容易になるという効果を奏する。

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】 電気化学式バイオセンサーの実施例の概略上面図である。

【図 2】 図 1 に示した電気化学的バイオセンサーの一部断面概略斜視図である。

【図 3】 図 1 の A - A 断面図である。

【図 4】 図 1 の B - B 断面図である。

【図 5】 図 2 の一部断面斜視図に試液の流れを矢印で示した説明図である。

【図 6】 本発明に係る電気化学式バイオセンサーを用いて実際に試液中のアルブミン量を測定した実験結果を示すグラフである。

【図 7】 本願発明に至るまでの過程において発明者等が開発した電気化学的バイオセンサーの概略長手方向断面図である。

【図 8】 (a) 及び (b) は、ラテラルフローメンブレンで構成された競合反応層内で試液が展開していくパターンを示す図である。

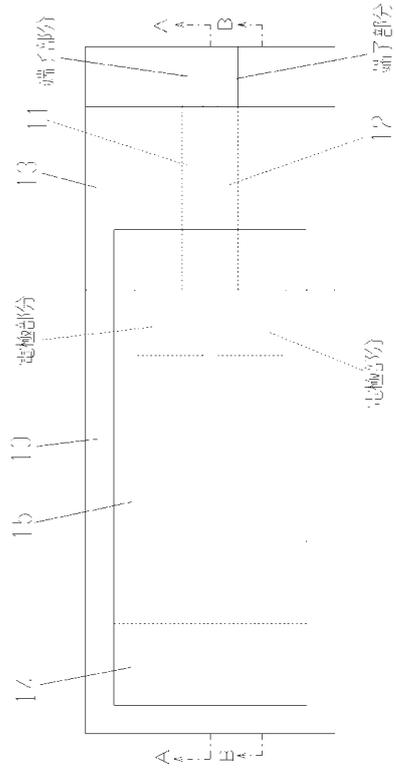
10

【符号の説明】

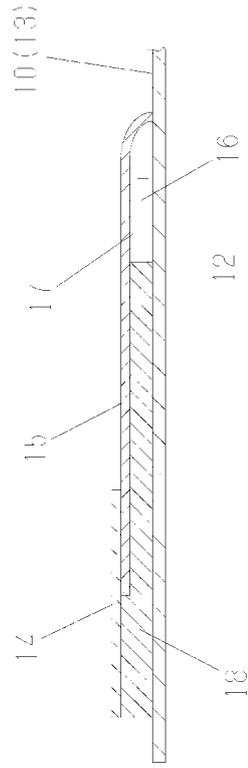
- 1 酵素結合抗体層
- 2 競合反応層
- 3 電気化学反応層
- 4 電極
- 1 0 基板
- 1 1 作用極
- 1 2 測定極
- 1 3 レジスト膜
- 1 4 酵素結合抗体層
- 1 5 競合反応層
- 1 6 電気化学反応層
- 1 7 隙間
- 1 8 スペース

20

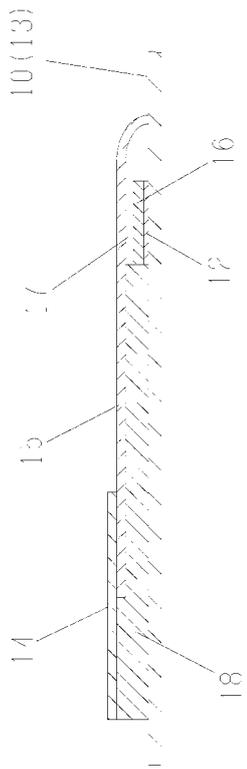
【 図 1 】



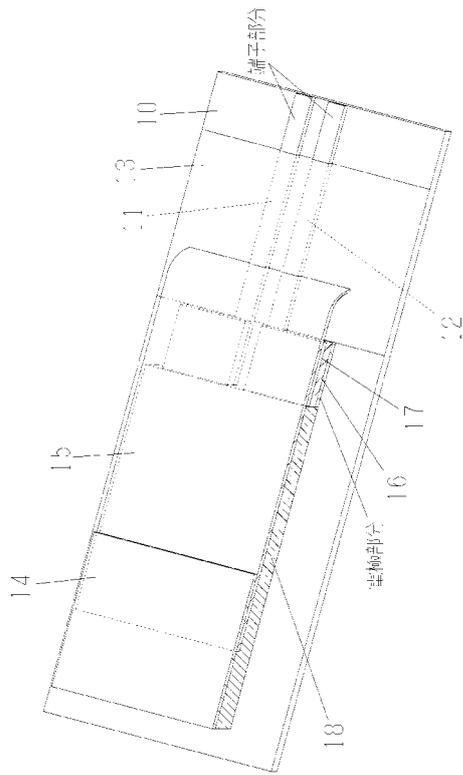
【 図 2 】



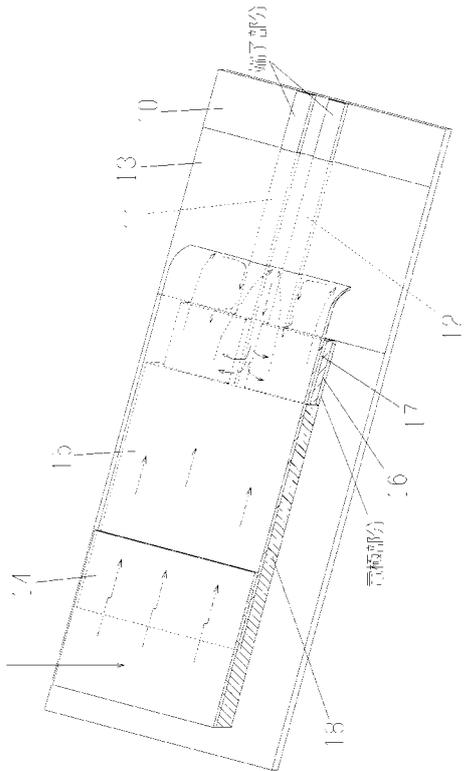
【 図 3 】



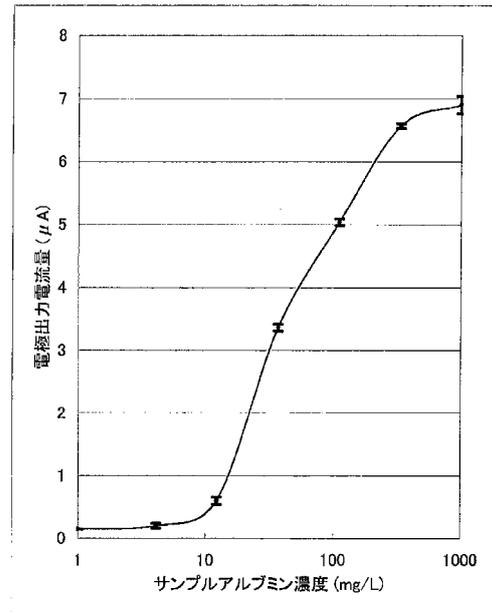
【 図 4 】



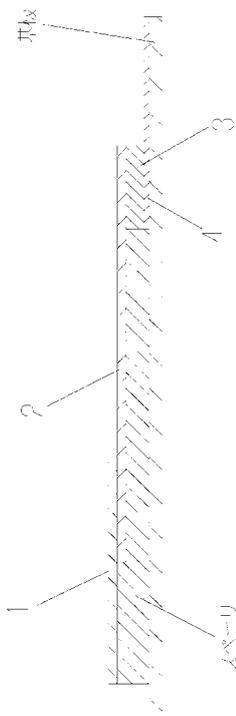
【 図 5 】



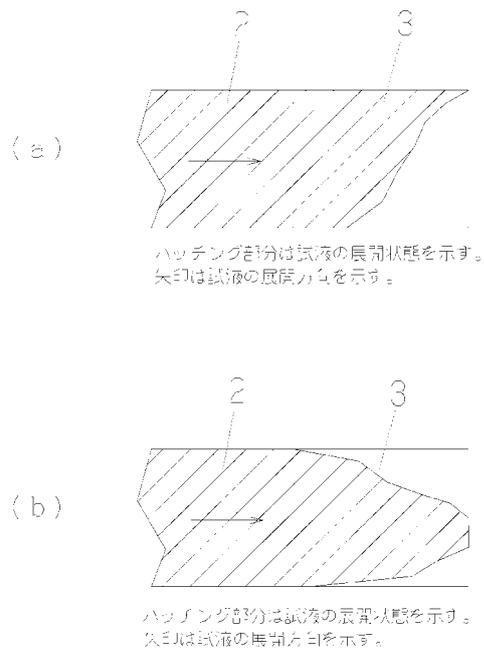
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/543 5 2 1

G 0 1 N 33/543 5 5 1 A

G 0 1 N 33/543 5 5 1 F

(72)発明者 山崎 浩樹

神奈川県横浜市都筑区仲町台5丁目5番1号 株式会社テクノメデイカ内

(72)発明者 織笠 正人

神奈川県横浜市都筑区仲町台5丁目5番1号 株式会社テクノメデイカ内

(72)発明者 鈴木 秀規

広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内

審査官 柏木 一浩

(56)参考文献 特開2000-155122(JP,A)

特開平04-118554(JP,A)

国際公開第01/004614(WO,A1)

特開2001-153838(JP,A)

特開平08-327582(JP,A)

特表2002-509605(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/327