

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3971997号  
(P3971997)

(45) 発行日 平成19年9月5日(2007.9.5)

(24) 登録日 平成19年6月15日(2007.6.15)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 3 R
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 Z
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 G
C 1 2 Q 1/46 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 8
	GO 1 N 27/30	3 5 3 A
請求項の数 13 (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-557998 (P2002-557998)	(73) 特許権者	000005821
(86) (22) 出願日	平成14年1月10日(2002.1.10)		松下電器産業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/000108		大阪府門真市大字門真1006番地
(87) 国際公開番号	W02002/057767	(74) 代理人	100072431
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)		弁理士 石井 和郎
審査請求日	平成16年10月22日(2004.10.22)	(74) 代理人	100117972
(31) 優先権主張番号	特願2001-8473 (P2001-8473)		弁理士 河崎 真一
(32) 優先日	平成13年1月17日(2001.1.17)	(72) 発明者	渡邊 基一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		大阪府豊中市立花町1-12-31-102
		(72) 発明者	山本 智浩
			大阪府枚方市桜丘町45-1-209
		(72) 発明者	長谷川 美和
			兵庫県赤穂郡上郡町光都2-20-1
			サンライフ光都402
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

絶縁性基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を含む電極系、前記基板上に結合されて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材、前記試料液供給路内に配置された少なくともコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤、および電子メディエータを含む試薬系を具備し、前記電子メディエータが前記基板側に設けられ、前記コレステロールオキシダーゼおよび界面活性剤が前記カバー部材側に前記電子メディエータと接触しないように設けられていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】

前記コレステロールオキシダーゼの存在する位置が、これを前記基板上に投影したとき前記電子メディエータの存在する位置と重ならないようにされた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】

界面活性剤が、前記コレステロールオキシダーゼと混合されている請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項4】

電子メディエータ及びコレステロールオキシダーゼの少なくとも一方がその水溶液の凍結乾燥によって形成されている請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項5】

10

20

電子メディエータ及びコレステロールオキシダーゼの少なくとも一方が担体に担持されている請求項 1 記載のバイオセンサ。

【請求項 6】

担体が、濾紙、ガラスフィルター、セルロース繊維、紙、及びコルクからなる群から選択される請求項 5 記載のバイオセンサ。

【請求項 7】

前記コレステロールエステラーゼが前記カバー部材側に設けられた請求項 1 記載のバイオセンサ。

【請求項 8】

前記電子メディエータが親水性高分子層を介して前記電極系上に設けられた請求項 7 記載のバイオセンサ。 10

【請求項 9】

電子メディエータが、フェリシアン化カリウム、パラベンゾキノン及びパラベンゾキノンの誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、並びにフェロセン及びフェロセンの誘導体からなる群から選択される請求項 7 記載のバイオセンサ。

【請求項 10】

測定対象が体液である請求項 1 記載のバイオセンサ。

【請求項 11】

前記体液が血液、血漿、リンパ液、または細胞間質液である請求項 10 記載のバイオセンサ。 20

【請求項 12】

請求項 1 記載のバイオセンサ、前記測定極と対極との間に電圧を印加する電圧印加手段、および前記電圧の印加された測定極と対極との間の電気信号を検出する信号検出手段を有する測定システム。

【請求項 13】

前記信号検出手段の検出した信号を表示する表示手段をさらに有する請求項 12 記載の測定システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野 30

本発明は、血液、血漿、血清等の試料中の基質を定量するためのバイオセンサに関する。

【0002】

背景技術

従来、血液等の試料中の特定成分を定量するバイオセンサとして、様々なものが提案されており、一例として、次のようなセンサが知られている（特開昭 63 - 317096 号公報参照）。

【0003】

このバイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法で作用極、対極及び参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して酸化還元酵素と電子メディエータとを含む反応層を形成したものである。 40

このようにして作製したバイオセンサの反応層上に、基質を含む試料を滴下すると、反応層が溶解して酸化還元酵素と基質が反応し、これにともなって電子メディエータが還元される。一定時間後に、還元された電子メディエータを電極系によって電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質を定量する。

【0004】

上記のような構成のバイオセンサでは、通常、酸化還元酵素及び電子メディエータは、互いに混合された状態で、電極系上に担持される。その目的は、試料を混合または攪拌する手間を省き、さらに酸化還元酵素と電子メディエータの反応を効率よく行わせ、短時間で基質を定量するためである。

【0005】

50

しかし、バイオセンサ内に、酸化還元酵素と電子メディエータとを混合した状態や互いに接触した状態で担持したとき、基質の濃度が0 mg / d l の試料液に対する応答値（以下、ブランク値と呼ぶ）が0ではなく、0以上の高い値を示すという問題があった。さらに、バイオセンサ作製直後（以下、初期と呼ぶ）の応答値と比較して、ブランク値及び同じ濃度の基質を含む試料液に対するそれぞれの応答値が、保存期間が長くなるにしたがって増加するという問題があった。保存により応答値が変化するということは、信頼性が低いという点で問題である。

#### 【0006】

本発明は、上記の問題点に鑑み、ブランク値が低く、保存による応答値、特にブランク値の変化が少ない、簡易な構成のバイオセンサを提供することを目的とする。

10

本発明は、また特にコレステロールの定量に適したバイオセンサを提供することを目的とする。

#### 【0007】

発明の開示

本発明は、絶縁性基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を含む電極系、前記基板上に結合されて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材、前記試料液供給路内に配置された少なくともコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤、および電子メディエータを含む試薬系を具備し、前記電子メディエータが前記基板側に設けられ、前記コレステロールオキシダーゼおよび界面活性剤が前記カバー部材側に前記電子メディエータと接触しないように設けられているバイオセンサを提供する。

20

前記コレステロールオキシダーゼの存在する位置は、これを前記基板上に投影したとき前記電子メディエータの存在する位置と重ならないようにされているのが好ましい。

#### 【0008】

本発明は、また上記のバイオセンサ、前記測定極と対極との間に電圧を印加する電圧印加手段、および前記電圧の印加された測定極と対極との間の電気信号を検出する信号検出手段を有する測定システムを提供する。

測定システムは、前記信号検出手段の検出した信号を表示する表示手段をさらに有することが好ましい。

#### 【0009】

30

発明を実施するための最良の形態

本発明は、絶縁性基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を含む電極系、前記基板上に結合されて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材、前記試料液供給路内に配置された少なくともコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤、および電子メディエータを含む試薬系を具備し、前記電子メディエータが前記基板側に設けられ、前記コレステロールオキシダーゼおよび界面活性剤が前記カバー部材側に前記電子メディエータと接触しないように設けられているバイオセンサに関する。

本発明によれば、簡易な構成により電子メディエータと、前記コレステロールオキシダーゼとが互いに接触することがなくなる。このため、バイオセンサを作製した後、バイオセンサ内において前記コレステロールオキシダーゼと、電子メディエータとが反応することがなく、従ってブランク値を低く抑えることができるとともに、保存による応答値変化を抑制することができる。

40

#### 【0010】

本発明の好ましい態様において、前記コレステロールオキシダーゼの存在する位置は、これを前記基板上に投影したとき前記電子メディエータの存在する位置と重ならないようにされている。

このようにすると、コレステロールオキシダーゼと電子メディエータとを分離した状態を維持しながら、試料液供給路の体積を低減することができる。

#### 【0011】

50

本発明の他の好ましい態様においては、前記試薬系が、さらに前記カバー部材側に設けられた界面活性剤を含んでいる。この場合、界面活性剤が、前記コレステロールオキシダーゼと混合されていることが好ましい。

【0012】

本発明の好ましいバイオセンサは、診断指針としての血清コレステロール値を定量するもので、試薬系は、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼの少なくとも一方、コレステロールエステルをコレステロールに変化させる過程を触媒する酵素であるコレステロールエステラーゼ、および界面活性剤を含む。

血液または血清中のコレステロールは、ミセル構造をとっているリポ蛋白中に含まれる。試薬系が適切な界面活性剤を含んでいると、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼの少なくとも一方、またはコレステロールエステラーゼによる、リポ蛋白中のコレステロールへの反応性が向上する。

10

【0013】

上のような目的に用いる界面活性剤としては、イオン性界面活性剤及び非イオン性界面活性剤のいずれでもよい。例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、コール酸またはその塩、デオキシコール酸またはその塩、脂肪酸塩、アルキル硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、アルキルスルホコハク酸塩、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸塩、アルキルリン酸塩、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物、ポリカルボン酸型高分子界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン誘導体、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルアミン、アルキルアルカノールアミド、アルキルアミン塩、第四級アンモニウム塩、アルキルベタイン、及びアミノオキサイド等が挙げられる。これらの中では、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルが特に好ましい。

20

界面活性剤によりリポ蛋白を加溶化する作用は、界面活性剤の種類によってそれぞれ異なるので、上記界面活性剤のいずれかを2種類以上同時に使用してもよい。

【0014】

本発明の他の好ましい態様においては、電子メディエータ及びコレステロールオキシダーゼのうち、少なくとも一方は、その水溶液の凍結乾燥によって形成されている。

30

凍結乾燥によって形成された電子メディエータおよび/またはコレステロールオキシダーゼの層は、溶解性が向上するので、測定全体にかかる時間を短縮することができる。特に、コレステロールオキシダーゼによる反応が応答値を得る第一ステップであるので、コレステロールオキシダーゼの層を凍結乾燥によって形成すると、試料液を供給したときコレステロールオキシダーゼを速やかに溶解させることができるので好ましい。

【0015】

本発明のさらに好ましい他の態様においては、電子メディエータ及びコレステロールオキシダーゼのうち少なくとも一方は、担体に担持されている。

40

ここに用いる担体としては、担体内部または担体表面に試薬を担持できるものであればよく、例えば、濾紙、ガラスフィルター、セルロース繊維、紙、及びコルク等が挙げられる。ここで、濾紙を用いた場合、試薬は主に濾紙内部に担持され、紙を用いた場合、試薬は紙の表面に担持されるという相違点がある。これらの担体の中では、ガラスフィルターまたはセルロース繊維が、担体に対するコレステロールオキシダーゼの非特異的な吸着量が少ないため好ましい。

【0016】

本発明のバイオセンサにおいて用いることができる電子メディエータとしては、特に限定されないが、例えば、フェリシアン化カリウム、パラベンゾキノン及びパラベンゾキノンの誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、並びにフェロセン及びフェロセンの誘導体等が挙げられる。これらの中では、フェリシアン化カリウムが酸素存在下で

50

も安定であるので好ましい。

絶縁性基板及びカバー部材としては、電気絶縁性を有し、ある程度の剛性を有していればよい。例えば、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、飽和ポリエステル等の熱可塑性樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、不飽和ポリエステル樹脂等の熱硬化性樹脂が挙げられる。

#### 【0017】

本発明の好ましいバイオセンサは、基板上に設けられた電極系の上に電子メディエータ層が形成される。電子メディエータと電極系との直接的な接触を防ぐとともに電子メディエータ層の担持をより確実にするために、電極系上に親水性高分子層を形成し、その上に電子メディエータ層を形成するのがよい。

10

#### 【0018】

また、電極系が、銀ペーストによる下地とその上に形成したカーボンペーストから構成されている場合、試料に溶解した試薬系の界面活性剤の作用により、試料の溶液が電極下地の銀層に浸透する。このため、センサの応答電流測定時に電極に電位を印加すると、銀層が電気化学的反応に関与し、その結果、応答電流値が増加することがある。電極系を親水性高分子層で被覆していると、界面活性剤の銀層への浸透を緩和することができる。

そのような親水性高分子層を構成する親水性高分子としては、その水溶液が粘性を有するものであればよく、例えば、カルボキシメチルセルロース、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、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、及びカルボキシエチルセルロース等のセルロース類、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、並びにポリリジン等のポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチン及びその誘導体、アクリル酸及びその塩の重合体、メタクリル酸及びその塩の重合体、スターチ及びその誘導体、無水マレイン酸及びその塩の重合体、アガロースゲル及びその誘導体等が挙げられる。

20

#### 【0019】

測定極及び対極の材料としては、導電性を有するものであればよく、例えば、炭素、金、パラジウム、及び白金等が挙げられる。

絶縁性基板上に設けられる測定極と対極を含む電極系は、さらに参照極を含んでいてもよい。

#### 【0020】

本発明のバイオセンサが測定する試料としては、体液が挙げられる。体液としては、血液、血漿、リンパ液、細胞間質液、汗のいずれかが挙げられる。それぞれの体液に含まれるコレステロールなどが測定対象となる。

30

#### 【0021】

以下、本発明のバイオセンサの構造を図面を参照して説明する。ここに用いられた構造図は理解を容易にするためのものであって、各要素の相対的大きさや位置関係は必ずしも正確ではない。

#### 【0022】

##### 実施の形態 1

図 1 は本実施の形態におけるバイオセンサの分解斜視図であり、図 2 は同バイオセンサの縦断面図である。

40

絶縁性基板 2 上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極リード 1 3 及び対極リード 1 4 並びに後述する電極系の下地が形成されている。次に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極 3 及び対極 4 からなる電極系が形成されている。さらに、電極系を部分的に覆う絶縁性ペーストをスクリーン印刷により印刷し、加熱乾燥して絶縁層 6 が形成されている。測定極 3 及び対極 4 からなる電極系を覆うように親水性高分子の一種であるカルボキシメチルセルロース（以下 CMC で表す）の水溶液を滴下し、加熱乾燥することにより CMC 層 7 が形成されている。次に、CMC 層 7 を覆うように、電子メディエータの一種であるフェリシアン化カリウムの水溶液を滴下し、加熱乾燥することにより電子メディエータ

50

層 8 が形成されている。図では、CMC 層 7 と電子メディエータ層 8 が相互に独立した形で表されているが、実際には部分的に混じり合っている。

#### 【0023】

次に、上カバー 16 及び中カバー 15 を接合してカバー部材を組み立てる。中カバー 15 は、2つの柱状の部片 15a とその両者をそれらの後部で連結する背の低い部片 15b からなる。カバー部材には、上カバー 16 の下面に部片 15a および 15b によって囲まれた凹部が形成される。カバー部材を逆さにし、前記の凹部に、コレステロールエステラーゼ、酸化還元酵素であるコレステロールオキシダーゼおよび/またはコレステロールデヒドロゲナーゼ、及び界面活性剤を含む混合水溶液を滴下し、これを凍結乾燥することによって酵素層 10 が形成されている。ここで酵素層 10 は、上カバー 16、中カバー 15 及び絶縁性基板 2 の 3つを張り合わせたときにできる試料液供給路 17 内に収まるように形成される。最後に、絶縁性基板 2、カバー部材を図 1 中の一点鎖線で示すような位置関係で張り合わせることににより、バイオセンサ 1 が作製される。

10

#### 【0024】

バイオセンサ 1 において、絶縁性基板 2、中カバー 15、及び上カバー 16 により、絶縁性基板 2 と上カバー 16 との間に、電極系に試料液を供給する試料液供給路 17 が形成されている。バイオセンサ 1 に対して、血液等の試料は試料供給口 11 から供給される。空気孔 12 は、試料を供給したときの空気の逃げ道となり、試料供給を円滑にする機能を担う。

#### 【0025】

上記のような構成のセンサにおいて、試料液供給路 17 のサイズは、幅 0.4 ~ 4 mm、高さ 0.05 ~ 0.5 mm、長さ 2 ~ 10 mm とするのが好ましい。そのようなセンサでは、試料量を 0.04 ~ 20  $\mu$ l とすることができる。さらに好ましい試料液供給路 17 のサイズは、幅 0.5 ~ 2 mm、高さ 0.05 ~ 0.2 mm、長さ 3 ~ 5 mm であり、試料量は 0.075 ~ 2.0  $\mu$ l となる。

20

#### 【0026】

##### 実施の形態 2

図 3 は、本実施の形態におけるバイオセンサの分解斜視図であり、図 4 は同バイオセンサの縦断面図である。

本実施の形態のバイオセンサの実施の形態 1 のそれとの相違点は、酵素層の形成方法とその形成位置である。本実施の形態における酵素層 10a は、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、及び界面活性剤を含む混合水溶液を上カバー 16 の下面にスクリーン印刷し、乾燥することにより形成される。酵素層 10a の位置は、これを基板 2 上に投影したとき、電子メディエータ層 8 と重ならず、層 8 を囲むように設定される。

30

#### 【0027】

本実施の形態のバイオセンサでは、カバー部材の酵素層 10a は、これを基板 2 上に投影したとき、電子メディエータ層 8 と重ならず、層 8 を囲むようにしたので、コレステロールオキシダーゼと電子メディエータとを分離した状態を維持しつつ、試料液供給路の厚みを小さくし、試料液供給路の体積を低減することができる。そのため、測定に必要な試料量を低減することができる。

40

#### 【0028】

また、コレステロールオキシダーゼと電子メディエータとを互いにより近い距離に担持することができるので、試料供給後、速やかにコレステロールオキシダーゼと電子メディエータとが混合し、反応時間を短縮することが可能である。

#### 【0029】

##### 実施の形態 3

図 5 は、上記に示したバイオセンサを用いた測定システムの構成例を示すブロック図である。電圧印加手段 21 は、センサ 1 のリード 13 および 14 から測定極 3 と対極 4 との間に電圧を印加する。電圧印加手段 21 とリード 14 との間に挿入された電流検出手段 22

50

は、測定極 3 と対極 4 との間に流れる電流を検出する。電流検出手段 2 2 に接続された表示手段 2 3 は、電流検出手段 2 2 が検出した電流値またはその電流を電圧に変換した値を表示する。

【0030】

以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明する。バイオセンサの一例として、コレステロールセンサについて説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0031】

実施例 1

実施の形態 1 において、電極系を覆うように CMC の 0.5 wt% 水溶液を 4  $\mu$ l 滴下し、50 で 15 分間乾燥することにより CMC 層 7 を形成した。この CMC 層 7 を覆うように、フェリシアン化カリウムの 75 mM 水溶液を 4  $\mu$ l 滴下し、50 で 15 分間乾燥することにより電子メディエータ層 8 を形成した。一方、コレステロールオキシダーゼを 400 ユニット (U) / ml、コレステロールエステラーゼを 900 U / ml、及び界面活性剤としてのポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルの一種である Triton-X100 を 1.6 wt% 含む混合水溶液をカバー部材の所定の位置に 0.5  $\mu$ l 滴下し、これを凍結乾燥することによって酵素層 10 を形成した。試料液供給路 17 のサイズは、幅 2.0 mm、高さ 0.1 mm、長さ約 5.0 mm であり、測定極 3 の面積は約 1.0 mm<sup>2</sup> である。

【0032】

比較例 1

コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼとを、電子メディエータ層に混合した点以外は実施例 1 と同様にして、比較例 1 のバイオセンサを作製した。

【0033】

次に、実施例 1 及び比較例 1 のバイオセンサを用いて、コレステロールを含まない (コレステロール濃度 0 mg / dl) PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) 緩衝溶液、及びコレステロール濃度が 105 mg / dl のヒト血清について、コレステロール濃度の測定を行った。試料液を試料供給口 11 に接触させることにより試料液供給路 17 に供給し、3 分経過後に対極 4 を基準にして測定極 3 に 500 mV の電圧を印加し、5 秒経過後に測定極 3 と対極 4 の間を流れる電流値 (応答値) を測定した。

【0034】

コレステロール濃度 0 mg / dl の PBS 緩衝溶液に対する応答値の変化を表 1 に、コレステロール濃度 105 mg / dl のヒト血清に対する応答値の変化を表 2 にそれぞれ示す。それぞれの試料液について、バイオセンサの初期における応答値と、同バイオセンサを 30 で 4 週間保存した後における応答値との比較を行った。

【0035】

【表 1】

	初期	保存後
実施例 1	0.19 $\mu$ A	0.22 $\mu$ A
比較例 1	0.56 $\mu$ A	0.89 $\mu$ A

【0036】

【表 2】

	初期	保存後
実施例 1	1.53 $\mu$ A	1.58 $\mu$ A
比較例 1	2.12 $\mu$ A	2.64 $\mu$ A

10

20

30

40

50

## 【0037】

表1からわかるように、実施例1のバイオセンサでは、初期において、コレステロール濃度  $0 \text{ mg/dl}$  に対する応答値は  $0.19 \mu\text{A}$  であり、比較例のバイオセンサと比較して  $0.37 \mu\text{A}$  低い値が得られた。よって、実施例1のバイオセンサにより、コレステロール濃度  $0 \text{ mg/dl}$  に対する応答値、すなわちブランク値を低減する効果が得られた。また、表1からわかるように、比較例では、コレステロール濃度  $0 \text{ mg/dl}$  に対する応答値は、30 に4週間保存することで、 $0.56 \mu\text{A}$  から  $0.89 \mu\text{A}$  へ、 $0.33 \mu\text{A}$  増加した。一方、実施例1では、コレステロール濃度  $0 \text{ mg/dl}$  に対する応答値は、同じ保存条件において、 $0.19 \mu\text{A}$  から  $0.22 \mu\text{A}$  への  $0.03 \mu\text{A}$  の増加にとどまり、保存によるブランク値の上昇が抑制された。

10

## 【0038】

さらに、表2からわかるように、比較例では、コレステロール濃度  $105 \text{ mg/dl}$  に対する応答値は、30 に4週間保存することで、 $2.12 \mu\text{A}$  から  $2.64 \mu\text{A}$  へ、 $0.52 \mu\text{A}$  増加した。一方、実施例1では、コレステロール濃度  $105 \text{ mg/dl}$  に対する応答値は、同じ保存条件において、 $1.53 \mu\text{A}$  から  $1.58 \mu\text{A}$  への  $0.05 \mu\text{A}$  の増加にとどまり、保存による応答値上昇が抑制された。

## 【0039】

## 実施例2

実施の形態2において、酵素層10aを印刷するためのインクに、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、及び Triton-X100を含む混合水溶液を用いた。得られた酵素層10aは、コレステロールオキシダーゼを  $1.0 \text{ U}$ 、コレステロールエステラーゼを  $2.25 \text{ U}$ 、Triton-X100を  $8.0 \mu\text{g}$  含んでいる。酵素層10aは、その厚みは約  $0.7 \text{ mm}$  で、中央の孔の径は、対極4の外形（直径  $3.0 \text{ mm}$  の円形）より若干大きい。一方、CMC層7および電子メディエータ層8は、実施例1と同様にして形成したもので、それらの外形は、対極4の外形とほぼ同じである。

20

## 【0040】

このバイオセンサを用いて、実施例1と同様の手順により試料液中のコレステロール濃度の測定を行ったところ、実施例1と同様の結果が得られた。

## 【0041】

実施例1及び2において、CMC層7及び電子メディエータ層8の形状は円形としたが、四角形、長方形、または楕円形であってもよい。いずれの場合においても、酵素層10または10aの形状は、コレステロールオキシダーゼと電子メディエータとが接触しなければ、いずれの形状でもよい。

30

## 【0042】

また、電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたが、パラベンゾキノン及びその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン及びその誘導体のいずれかを用いてもよい。

## 【0043】

上記実施例においては、電子メディエータを含む層は、その層を形成する位置に電子メディエータの水溶液を滴下した後、加熱乾燥することにより形成したが、電子メディエータを含む水溶液を所定の位置に滴下した後、凍結乾燥により形成してもよい。また、電子メディエータを含む水溶液をスクリーン印刷する方法、または試料液供給路内に設置した担体に、電子メディエータを含む水溶液を含浸させた後、 $30 \sim 70$  において加熱乾燥もしくは凍結乾燥する方法により電子メディエータを含む層を形成してもよい。

40

## 【0044】

コレステロールオキシダーゼを含む層は、その水溶液を所定の位置に滴下した後、凍結乾燥する方法、またはコレステロールオキシダーゼを含む水溶液をスクリーン印刷する方法により形成したが、他の方法によって形成することもできる。例えば、コレステロールオキシダーゼを含む水溶液を所定の位置に滴下した後、 $30 \sim 70$  において加熱乾燥する方法、または試料液供給路内に設置した担体に、コレステロールオキシダーゼを含む水溶

50

液を滴下し、含浸させた後、30～70 において加熱乾燥もしくは凍結乾燥する方法である。

【0045】

産業上の利用の可能性

以上のように、本発明によれば、ブランク値が低く、保存による応答値、特にブランク値の変化が少ない、簡易な構成のバイオセンサを提供することができる。さらに、コレステロールオキシダーゼと電子メディエータとが接触しないような形状にすることで、試料液供給路の厚みを小さくすることができ、血液等の必要な試料量を低減することができる。さらに、コレステロールオキシダーゼと電子メディエータとを互いにより近い距離に担持することができるので、試料供給後、速やかにコレステロールオキシダーゼと電子メディエータが混合するため、反応時間の短縮が可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例におけるバイオセンサの分解斜視図である。

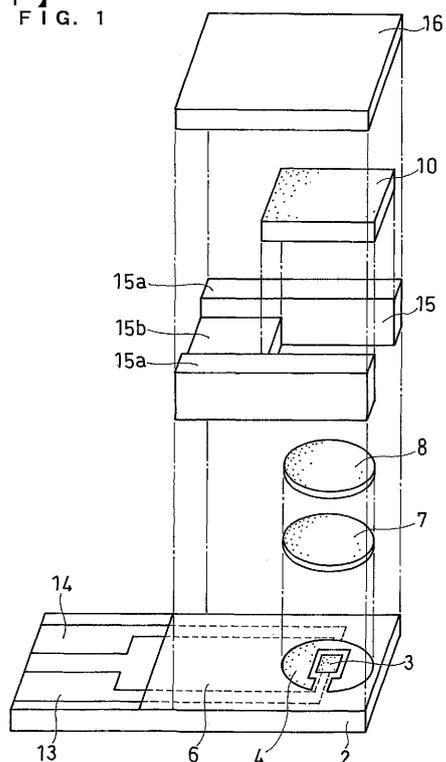
【図2】 同バイオセンサの断面図である。

【図3】 本発明の他の実施例におけるバイオセンサの分解斜視図である。

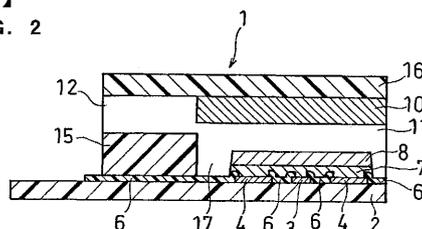
【図4】 同バイオセンサの断面図である。

【図5】 本発明の一実施例における測定システムの回路構成を示すブロック図である。

【図1】  
FIG. 1

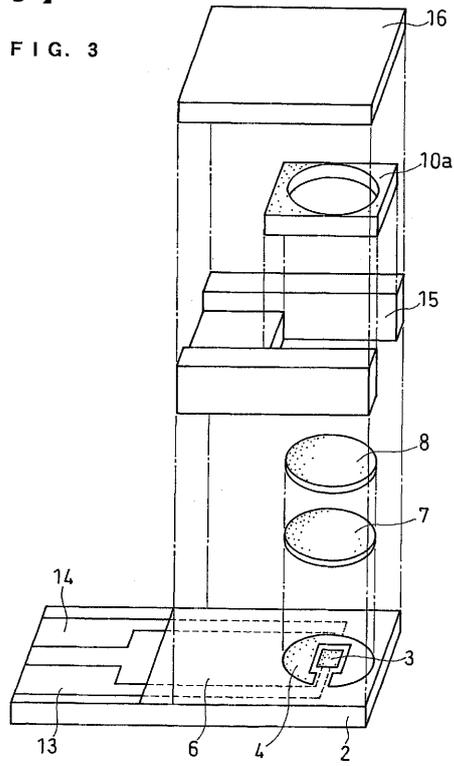


【図2】  
FIG. 2



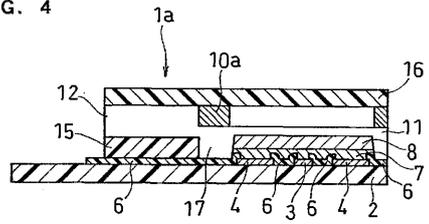
【 図 3 】

FIG. 3



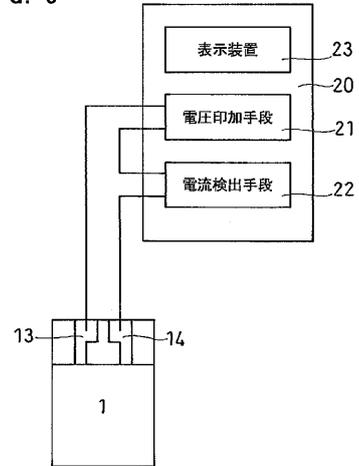
【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 】

FIG. 5



---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
G 0 1 N 27/30 3 5 3 P  
G 0 1 N 27/30 3 5 3 Z  
C 1 2 Q 1/00 B  
C 1 2 Q 1/46

(72)発明者 池田 信  
大阪府交野市藤が尾 2 - 5 - 1 6 - 2 0 5

(72)発明者 南海 史朗  
大阪府枚方市茄子作 4 - 5 0 - 1 2

審査官 郡山 順

(56)参考文献 特開平 1 0 - 1 9 7 4 7 3 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 27/327

G01N 27/416

C12Q 1/00

C12Q 1/46