

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4404433号
(P4404433)

(45) 発行日 平成22年1月27日(2010.1.27)

(24) 登録日 平成21年11月13日(2009.11.13)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 27/416 (2006.01) GO 1 N 27/46 3 8 6 G
GO 1 N 27/327 (2006.01) GO 1 N 27/30 3 5 3 P
GO 1 N 33/62 (2006.01) GO 1 N 27/30 3 5 3 B
 GO 1 N 27/46 3 5 3 A
 GO 1 N 33/62 A

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-53784 (P2000-53784)
 (22) 出願日 平成12年2月29日(2000.2.29)
 (65) 公開番号 特開2001-242133 (P2001-242133A)
 (43) 公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)
 審査請求日 平成19年1月31日(2007.1.31)

(73) 特許権者 591086854
 株式会社テクノメディカ
 神奈川県横浜市都筑区仲町台5丁目5番1号
 (74) 代理人 100064388
 弁理士 浜野 孝雄
 (72) 発明者 檀 金宗
 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ィカ内
 (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ィカ内

審査官 黒田 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 使い捨てBUNセンサー及びその製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

絶縁性フィルムの上に、スクリーン印刷法により、電極層及び電極層の周囲を囲む絶縁層を順次印刷し、カーボン層上に有機系合成物質を滴下乾燥することにより形成されたpH変化を検出するpH電極と、

前記pH電極上に、ウレアーゼ、水膨潤性高分子材料、界面活性剤及び緩衝物質の混合物の水溶液を滴下乾燥することにより形成された酵素層と、

酵素層の表面を覆って、酵素層の酵素の流失を防止し、尿素の拡散を制限し、測定液中の夾雑物質を除去する働きをする高分子物質の溶液を滴下乾燥することにより形成されたフィルター層と

を備えていること

を特徴とする使い捨てBUNセンサー。

【請求項2】

絶縁性フィルムの上に、スクリーン印刷法により、電極層及び電極層の周囲を囲む絶縁層を順次印刷する工程と、

カーボン層上に有機系合成物質を滴下乾燥して、pH変化を検出するpH電極を形成する工程と、

このpH電極上に、ウレアーゼ、水膨潤性高分子材料、界面活性剤及び緩衝物質の混合物の水溶液を滴下乾燥して、酵素層を形成する工程と、

酵素層の表面を覆って、酵素層のウレアーゼの流失を防止し、尿素の拡散を制限し、測

定液中の夾雑物質を除去する働きをする高分子物質の溶液を滴下乾燥して、フィルター層を形成する工程と

から成ることを特徴とする使い捨てBUNセンサーの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、全血、血漿、血清、尿など生体液中の尿素窒素を測定する使い捨てBUNセンサー及びその製造法に関するものである。

【0002】

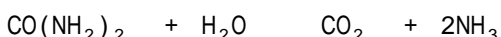
【従来の技術】

近年、検量線の校正や電極の洗浄が不要で小型、使い捨てタイプの酵素センサーが実用に供されている。酵素センサーは、一般的には酵素反応を検知する作用極（酵素電極又は測定極とも言う）と、電気回路を形成する参照極（又は対極）を有する構造を持ち、作用極における酵素反応による物質変化を、それら電極により電気信号の変化として取り出し、その変化からその酵素と特異的に作用する基質の濃度を測定するものである。その中でよく使われている酵素センサーには酸化還元酵素を利用するものがある。例えば生成する過酸化水素、又は消費する酸素を検出物質とするアンペロメトリック型酵素センサーである（例えば特開平のグルコース酵素センサー）。また、酵素の酸化還元をメディエーションする電子伝達物質（メディエーターと呼ばれる）を介して電気信号を検出するアンペロメトリック型酵素センサーもある。更に、水

解酵素を利用し、それと選択的に反応する基質の水解生成物により電極信号の変化をポテンシオメトリックに測定することによって、その基質の濃度を定量することも可能である。

【0003】

例えば、尿素、特に血液中の尿素窒素（BUN）は、肝臓のタンパク中間代謝機能及び腎臓機能を反映する重要な臨床検査項目である為、その測定用酵素センサーの開発は多数報告されている。尿素的測定には一般的に、水解酵素であるウレアーゼが利用されている。その水解反応の反応式を次に示す：



反応は、二酸化炭素（ CO_2 ）及びアンモニア（ NH_3 ）を生成する為、従来技術では PCO_2 電極、即ち CO_2 ガス透過膜を持つpH電極（例えば、G.G.Guilbaultら、Anal.Chem.,44,2161(1972)）、又は NH_3 電極、即ち NH_3 ガス透過膜を持つpH電極（例えば、米国特許明細書第3,926,734号参照）を用いて測定する。又は、水溶液中 NH_3 はアンモニウムイオン（ NH_4^+ ）選択性電極（例えば、米国特許明細書第4,476,005号参照）、電気伝導度変化（例えば、米国明細書特許第5,698,083号参照）又はpH変化（例えば、文献R.M.Iannielloら、Anal.Chim.Acta,146,249（1983））による測定も研究されている。

【0004】

このように、BUNセンサーはバイオセンサーの一種で、この種のセンサーは一般に、測定すべき血液中の尿素窒素とウレアーゼという酵素との間で生じる酵素反応により生成するアンモニウムイオンや重炭酸イオンのような生成物或いはこのようなイオンの生成に伴うpHの変化を検出するように構成され、検出した値から尿素窒素の濃度に換算する。

【0005】

ところで、このようなBUNセンサーはその使用環境からして取扱い者の安全性の観点で使用後は破棄され、つまり使い捨てのものが一般的となってきた。そのため、測定の信頼性を高く維持しながらセンサー自体のコストをできるだけ低く抑えることが要求される。しかしながら、従来のこの種のセンサーの製造には普通、電子回路製造技術、特にエッチングやイオンプレATINGのような薄膜形成技術が使用されており、高価で大規模な製造装置が必要であり、製造工程が複雑となり、製造コストを十分に低減させることができていないのが実情である。

またこの種のセンサーは、センサーの校正及び測定にかかる時間もできるだけ短いことが

10

20

30

40

50

望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従来の尿素測定センサーにおける問題点について説明する。

PCO₂電極及びNH₃電極による尿素測定では、ガス選択透過膜を使う為、pH電極とガス透過膜の間に支持電解質液を保持させておく必要がある。これは使い捨てセンサーにとっては製造上の欠点となる。

また、溶液中長時間保存しておく、pH電極の性能が低下し、溶液の蒸発の問題もあり、センサーの保存寿命が限定される。

また、アンモニウムイオン選択電極による測定方法では、その電極自体の選択性が悪い（他のイオンに対しても反応する）為、実用的ではない。従来のpH測定に基づく尿素センサーでは、ガラスのpH電極とウレアーゼ酵素とを組み合わせたものである為、同様に支持電解質が必要であり、小型化や製造の容易性の面で使い捨てセンサーとして利用するのは困難である。電気伝導度による測定では、検体試料のイオン強度が高いため、酵素反応によるイオン強度の変化量が少なく、実用的には問題が多い。

従って、安価に製造ができ、構造が簡単、さらに支持電解質溶液の不要なドライタイプの使い捨てのポテンシオメトリック型酵素センサーの提供が期待されている。

【0007】

そこで、本発明は、上記のような従来技術に伴う問題点を解決して、低価格でしかも測定時間が短くかつ測定精度が高く、pH変化をpH電極で検出する使い捨てBUNセンサー及びその製造法を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するために、本発明の第1の発明により提供される使い捨てBUNセンサーは、絶縁性フィルムの上に、スクリーン印刷法により、電極層及び電極層の周囲を囲む絶縁層を順次印刷し、カーボン層上に有機系合成物質を滴下乾燥することにより形成されたpH変化を検出するpH電極と、前記pH電極上に、ウレアーゼ、水膨潤性高分子材料、界面活性剤及び緩衝物質の混合物の水溶液を滴下乾燥することにより形成された酵素層と、酵素層の表面を覆って、酵素層の酵素の流失を防止し、尿素の拡散を制限し、測定液中の夾雑物質（例えば、全血中の血球、蛋白質）を除去する働きをする高分子物質の溶液を滴下乾燥することにより形成されたフィルター層とを備えていることを特徴としている。

pH電極は好ましくはトリドデシルアミンのような水素イオンに反応する物質から成り得る。

酵素層は、測定時に測定液が速やかに浸透して酵素が溶けて反応が起こり易く、また酵素層中の界面活性剤は、水分の吸収を助けると共に測定に誤差を生じさせ易い気泡の発生を抑える働きをする。

【0009】

、本発明の第1の発明により提供される使い捨てBUNセンサーでは、スクリーン印刷を利用した低コスト、保存性良好で、構造が簡単なコーテッドワイヤタイプのpH液膜電極を採用した。このpH液膜電極は一定の感度があり、しかも室温保存で半年以上の保存寿命を持つ。また、直接このpH液膜電極の表面に酵素反応層を設けることにより、検体試料を注入する際、検体中水分及びイオンは、酵素反応層を通してpH電極の表面に達し、pH電極が働くようになる。同時に、測定基質も酵素層に拡散し、その中に固定されている酵素（及び補酵素）と反応し、その反応によるpHの変化をその下に設けたpH電極でセンシングする。従って、本発明では、pH電極が働く為の支持電解質溶液の構成は不要である。それに一定な感度を持つコーテッドワイヤ型pH液膜電極を使用する為、従来のポテンシオメトリック型酵素センサーの検量線校正など面倒な手順も省略できる。従って、乾燥状態で保存ができ、安価、安定、使い捨てタイプのポテンシオメトリック型酵素センサーが提供できるようになる。

【0010】

また、本発明の第2の発明による使い捨てBUNセンサーの製造法は、絶縁性フィルムの上に、スクリーン印刷法により、電極層及び電極層の周囲を囲む絶縁層を順次印刷する工程と、カーボン層上に有機系合成物質を滴下乾燥して、pH変化を検出するpH電極を形成する工程と、このpH電極上に、ウレアーゼ、水膨潤性高分子材料、界面活性剤及び緩衝物質の混合物の水溶液を滴下乾燥して、酵素層を形成する工程と、酵素層の表面を覆って、酵素層のウレアーゼの流失を防止し、尿素の拡散を制限し、測定液中の夾雑物質を除去する働きをする高分子物質の溶液を滴下乾燥して、フィルター層を形成する工程とから成ることを特徴としている。

【0011】

好ましくは、酵素層は、酵素（ウレアーゼ）、水膨潤性高分子材料0.01~2mg、界面活性剤0~1 μ l及び緩衝物質50 μ lから成る水溶液を所定量滴下乾燥して形成され得る。pH電極を形成する有機系合成物質は、ポリ塩化ビニル（PVC）を基材としたpH感応物質から成り得る。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、添付図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。図1には、本発明の一実施の形態による使い捨てBUNセンサーを示す。図示BUNセンサーにおいて、1は基体を成すポリエチレンフィルムで、その上に銀ペースト層2、カーボン層3、及び絶縁体層4が設けられ、これらの層はスクリーン印刷法により形成される。カーボン層3上に絶縁体層4で画定された領域には、pH変化を検出するpH電極5が設けられ、このpH電極5はトリドデシルアミンのような水素イオンに反応する有機系合成物質のPVC膜から成る。pH電極5上には、酵素、水膨潤性高分子材料、界面活性剤及び緩衝物質等の混合物から成る酵素層6が設けられ、この酵素層6の径は図示したようにpH電極5の径より小さく形成されている。酵素層6中の水膨潤性高分子材料は水分を吸収して保持する働きをし、また緩衝物質としては、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{HCl}$ 、 $\text{Tris} - \text{HCl}$ などが使用され得る。酵素層6上には、この酵素層6の上面及び側周面を覆って、酵素層6の酵素の流失を防止し、尿素及び窒素の拡散を制限し、測定液中の夾雑物質（血球）を除去するフィルター層7が設けられている。フィルター層の材料としてはNafion、ポリビニルブチラールのような高分子物質が使用され得る。

【0014】

図2には、本発明の使い捨てBUNセンサーの製造法の好ましい実施の形態を示す。図2のAに示す第1の工程では、ポリエチレンフィルム1の上面に銀ペーストがスクリーン印刷法により印刷され、銀ペーストの薄膜層2が形成される。図2のBに示す第2の工程では、銀ペーストの薄膜層2の外表面を覆うようにカーボン層3がスクリーン印刷法により印刷される。図2のCに示す第3の工程において、カーボン層3を囲んで絶縁体から成るレジスト層4がスクリーン印刷法により形成され、このレジスト層4は図示したようにカーボン層3上にpH電極5の形成領域を画定する。

【0015】

図2のDに示す第4の工程において、レジスト層4で画定されたカーボン層3上の凹部に、ポリ塩化ビニルを基材としたトリドデシルアミンのようなpH感応物質の水溶液が滴下され、そして乾燥される。こうしてカーボン層3上にpH電極5が形成される。図2のEに示す第5の工程において、pH電極5上に、酵素（ウレアーゼ）と、水膨潤性高分子材料0.01~2mgと、界面活性剤0~1 μ lと緩衝物質50 μ lとからなる水溶液が滴下され、そして予定の乾燥速度で乾燥される。こうしてpH電極5上に、酵素層6が形成され、酵素層6の周縁部は図示するようにレジスト層4上にのびている。

【0016】

最後の工程において、酵素層6上に、ポリビニルブチラールのような高分子物質の水溶液が滴下され、そして予定の乾燥速度で乾燥される。こうして酵素層6を覆うようにフィ

10

20

30

40

50

ルター層 7 が形成される (図 1 参照) 。 なお、図示実施の形態においては酵素層 6 は、酵素反応によって生じる pH 変化を測定するため初期 pH 値を 7.4 に維持するように構成されている。

【 0017 】

【 実施例 】

次に、本発明の尿素センサーの実施例について具体的に説明する。

実施例 1

生体試料中尿素を測定する為の尿素センサーを下記のように作製した。

(1) pH 電極基板の作製。

まず、図 3 に示したように、絶縁性基板 10 上に銀の指示電極 11 及び参照電極 12 の下地電極を内円及び外環形状に設ける。次に、内円銀の上に銀が露出しないように、また、外環の銀と繋がらないように導電性カーボンペーストを印刷し乾燥してカーボン層 13 を形成した。更に基板の上にレジストを内円カーボン層 13 の露出直径が 1.0mm になるように、また参照電極 12 を被せないように印刷し乾燥してレジスト層 14 を形成し、電極基板を作製した。

10

【 0018 】

(2) コーテッドワイヤ型 pH 液膜の構成。

上記の電極基板の銀参照電極を 0.7M 塩化カリウム中に、1mA の定電流で 10 秒間塩化銀形成処理を行い、洗浄、乾燥して参照電極 12 を完成させた。また、指示電極カーボン層 13 の上に規定組成で調製した pH 液膜溶液を一定容量滴下し、室温で乾燥させて、コーテッドワイヤ pH 液膜電極 15 を作製した。

20

【 0019 】

(3) 酵素反応層の構成。

まず、酵素 - ポリマー溶液を次のように調製した、ウレアーゼ (東洋紡 (株) 製、120 IU / mg) 10mg、PVA (和光純薬 (株) 製、ポリビニルアルコール、n = 500) 1.0g をりん酸塩緩衝液 100ml (0.02M) に溶解し均一に混合した。

次に、上記の溶液 0.5ul を上記の pH 液膜指示電極 15 の上に滴下し、室温で乾燥して酵素反応層 16 を形成した。こうして尿素酵素センサーを作製した。

上記の尿素センサーの酵素反応層 16 の表面に、更に高分子膜でコートした。この高分子膜は、例えば Nafion 溶液 (5%、Wt% in water : n-propanol = 1 : 1) 0.5 ul を上記の酵素反応層の上に滴下し、室温で乾燥して完成した。

30

【 0020 】

試験例 1

次に、実施例 1 に記載した尿素センサーを本発明の例として、試験例にてセンサー性能をテストした。

(1) 尿素標準測定溶液の調製

まず、尿素標準水溶液を次のように調製する。80 で乾燥した尿素 (和光純薬 (株) 製、生化学用品) を 50mM りん酸塩緩衝液 (pH 7.38) に溶かし尿素の終濃度が 40mM になるように調製した。

次に、上記の 40mM の尿素溶液を 50mM のりん酸塩緩衝液 (pH 7.38) で希釈して尿素の終濃度が 0mM から 40mM までの約 15 段階の濃度になるように調製した。

40

【 0021 】

(2) ポテンシオメトリー法による尿素応答

まず、尿素酵素センサーの作用極端子 17 及び参照極端子 18 を Digital Electrometer ((株) アドバンテスト製) の電位差測定端子に接続した。次ぎにそのセンサーを 50mM のりん酸塩緩衝液 (pH 7.38 、以下 blank という) に浸けて、センサーの電位応答を GPIB コネクタを介してコンピュータに 120 秒間取り込んだ。次に、そのセンサーを上記の溶液から取り出し、尿素標準測定溶液の尿素濃度が 2mM の溶液に浸け、60 秒間の電位応答を測定した。更に新しいセンサーを付け替え、新しい濃度の尿素溶液を同じ様な測定で繰り返した。尿素濃度が 0 ~ 40mM までの約 15 段階での測定を全て行った。測定結果は、図 4 及

50

び図5に示した。

【0022】

図4は、尿素酵素センサーのblank及び尿素に対する応答曲線である。尿素とウレアーゼの酵素反応により溶液が、アルカリ性になるため、pH液膜電極の出力電位は低くなる。この電位変化(絶対値)は、尿素濃度の上昇によって大きくなる傾向がある。

図5には、図4に示した様な応答曲線からデータに基づき、尿素濃度とセンサーの電位変化との対数関係を示す。この結果、本発明の尿素センサーは、尿素の濃度が5mM前後で、感度は約55mV/Decadeであった。また、1~20mMの範囲では直線関係があり、十分なダイナミックレンジを示した。

【0023】

(3) 尿素応答のpH依存性

本発明では、pH液膜電極の上に載せた酵素反応層が、測定液の水素イオンの拡散に対してブロックしない為、測定液中の水素イオンが、酵素反応層を通してpH電極へ拡散し、pH電極の応答に直接影響を与える。ここでサンプルのpHから尿素測定への影響を下記のように確認した。

まず、pH 6.2~pH 7.8のりん酸塩緩衝液(50mM)を数種類作った。その中に尿素を一定量溶かして終濃度が8mMになるように調製した。次に、この尿素溶液を(2)に記載したような手順で、ポテンシオメトリーによる測定を行った。測定結果は図6に示した。その結果、尿素の電位応答は、測定液のpHに大きく依存することが分かった。つまり、確認したpH範囲(6.2~7.8)ではpHの上昇に伴い、センサーの電位変化(絶対値)も上昇した。

図6に示したようなpH依存性を解決する為には、測定の時、サンプルのpHも同時に測定し、その測定値に基づき、尿素の測定値に対して補正が必要である。

【0024】

生体サンプル、例えば、血液、尿等中のクレアラチン、クレアニチン等及びその他酵素反応により、溶液中水素イオンの濃度が変わるものであれば、本発明を利用できる。例えば、グルコースデヒドロギナーゼ(Glucose Dehydrogenase)及び補酵素のNAD(P)⁺を利用して、グルコースとの反応から水素イオンを生成する為、本発明によりグルコースの測定もできる。

【0025】

【発明の効果】

以上説明してきたように、本発明による使い捨てBUNセンサーにおいては、絶縁性フィルムの上に、スクリーン印刷法により、電極層及び電極層の周囲を囲む絶縁層を順次印刷し、カーボン層上に有機系合成物質を滴下乾燥することにより形成されたpH変化を検出するpH電極と、前記pH電極上に、ウレアーゼ、水膨潤性高分子材料、界面活性剤及び緩衝物質の混合物の水溶液を滴下乾燥することにより形成された酵素層と、酵素層の表面を覆って、酵素層の酵素の流失を防止し、尿素の拡散を制限し、測定液中の夾雑物質(例えば、全血中の血球、蛋白質)を除去する働きをする高分子物質の溶液を滴下乾燥することにより形成されたフィルター層とを備えているので、使い捨てセンサーとして重要な製造コストを大幅に低減でき、製品が安価になると共に、測定時に校正液がフィルター層に速かに浸透し、酵素層の酵素が溶けて反応し易い状態となり、しかも酵素層に含まれた緩衝物質の働きで酵素層に気泡が生じることがなく、従って、尿素及び窒素の濃度を精度良く測定することができるようになる。

【0026】

また、本発明による使い捨てBUNセンサーの製造法によれば、ポリエチレンフィルムの上にスクリーン印刷法により電極層を形成し、滴下乾燥工程でpH電極と酵素層とフィルター層とをそれぞれ形成することで、BUNセンサーを製造するので、製造コストを大幅に低減でき、使い捨てセンサーとして安価な製品を提供できるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施の形態による使い捨てBUNセンサーを示す概略断面図。

10

20

30

40

50

【図2】 図1に示すBUNセンサーの製造法の各工程態を示す概略断面図。

【図3】 本発明による実施例の尿素酵素センサーの概略図。

【図4】 ポテンシオメトリーで測定した尿素酵素センサーの尿素標準溶液に対する電位応答曲線図であり、測定した尿素溶液の尿素濃度は0、2、5、10、20、30mMである。

【図5】 尿素濃度とセンサーの電位応答の対数関係を示す図。

【図6】 本発明の尿素酵素センサーのpH依存性を示す図。

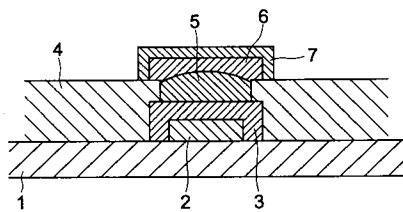
【符号の説明】

- 1：ポリエチレンフィルム
- 2：銀ペーストの薄膜層（電極層）
- 3：カーボン層
- 4：レジスト層
- 5：PH電極
- 6：酵素層
- 7：フィルター層
- 10：絶縁性基板
- 11：銀の指示電極
- 12：参照電極
- 13：カーボン層
- 14：レジスト層
- 15：pH液膜電極
- 16：酵素反応層

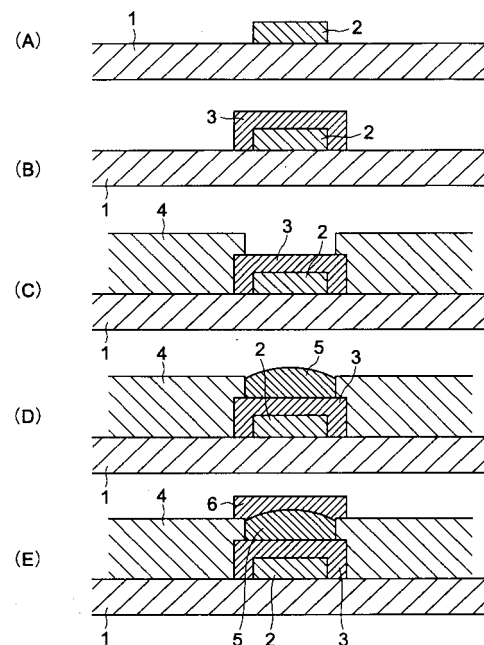
10

20

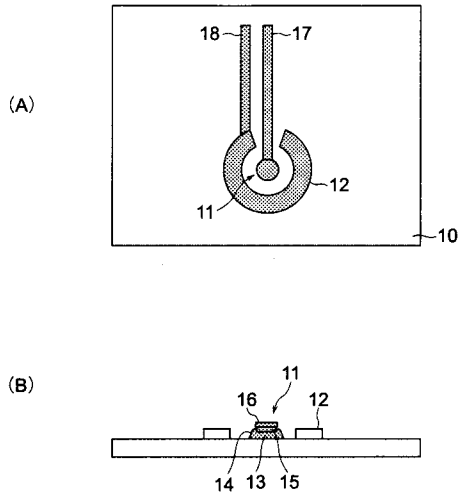
【図1】



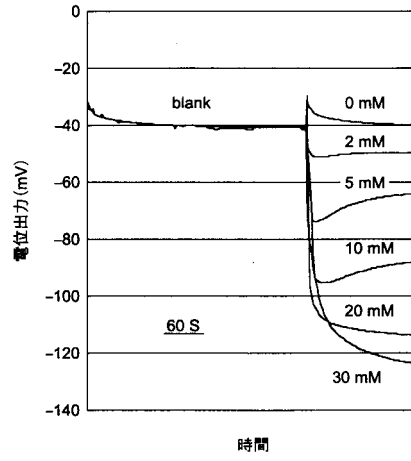
【図2】



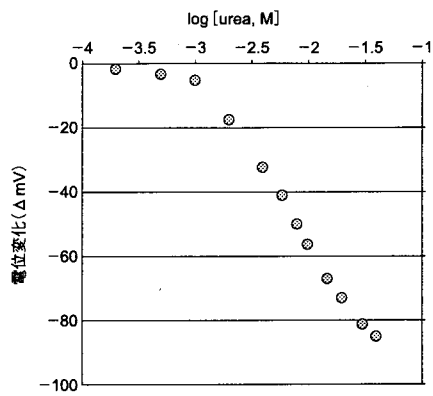
【 図 3 】



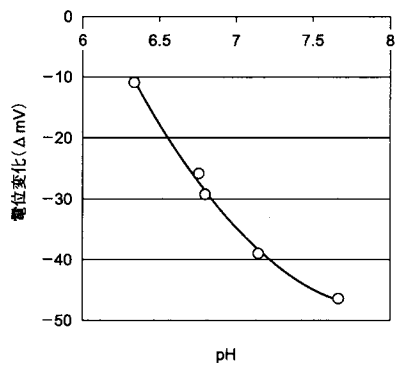
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平06-288964(JP,A)
特開平07-159366(JP,A)
特開平09-311116(JP,A)
特表平09-509740(JP,A)
特開平08-116975(JP,A)
特開平06-229973(JP,A)
特開平01-173860(JP,A)
国際公開第00/060340(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

- G01N 27/416
G01N 27/327
G01N 33/62