

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4627911号  
(P4627911)

(45) 発行日 平成23年2月9日(2011.2.9)

(24) 登録日 平成22年11月19日(2010.11.19)

(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 27/30 3 5 3 J
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 3 8
	GO 1 N 33/483 F

請求項の数 5 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2001-88175 (P2001-88175)	(73) 特許権者	000005821
(22) 出願日	平成13年3月26日(2001.3.26)		パナソニック株式会社
(65) 公開番号	特開2001-343350 (P2001-343350A)		大阪府門真市大字門真1006番地
(43) 公開日	平成13年12月14日(2001.12.14)	(74) 代理人	100081813
審査請求日	平成20年3月25日(2008.3.25)		弁理士 早瀬 憲一
(31) 優先権主張番号	特願2000-90362 (P2000-90362)	(72) 発明者	宮崎 正次
(32) 優先日	平成12年3月29日(2000.3.29)		香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		子工業株式会社内
		(72) 発明者	徳永 博之
			香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電
			子工業株式会社内
		(72) 発明者	藤原 雅樹
			香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電
			子工業株式会社内

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】

絶縁基板上に作用極と対極からなる電極と、少なくとも酵素及び電子伝達体とを含む試薬層とを備え、試料溶液中の特定物質の濃度を計測するバイオセンサにおいて、

前記試薬層は、さらに、アジピン酸、安息香酸のいずれかまたはそれらの組み合わせであるカルボン酸を含むことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】

請求項1に記載のバイオセンサにおいて、

前記試薬層が、前記電極上、または当該試薬層の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が配置されるよう、形成されることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項3】

絶縁基板上に作用極と対極からなる電極と、少なくとも酵素及び電子伝達体とを含む試薬層とを備え、試料溶液中の特定物質の濃度を計測するバイオセンサにおいて、

前記試薬層は、さらに、セリン、プロリン、トレオニン、サルコシン、タウリンのいずれか、またはそれらの組み合わせたものを含むことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項4】

請求項3に記載のバイオセンサにおいて、

前記試薬層が、前記電極上、または当該試薬層の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が配置されるよう、形成されることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項5】

請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載のバイオセンサにおいて、  
前記試薬層が、さらに親水性高分子を含むことを特徴とするバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、液体試料中の特定の成分を分析するバイオセンサに関し、特に、バイオセンサの試薬層を構成する試薬構成に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

バイオセンサは、微生物、酵素、抗体等の生物材料の分子認識能力を利用し、生物材料を分子識別素子として応用したセンサである。すなわち、固定化された生物材料が、目的の特定物質を認識したときに起こる反応、微生物の呼吸による酸素の消費、酵素反応、発光などを利用したものである。

10

【0003】

バイオセンサの中でも酵素センサの実用化は進んでおり、例えば、グルコース、乳酸、コレステロール、ラクトース、尿素、アミノ酸用の酵素センサは、医療計測や食品工業に利用されている。酵素センサは、検体である試料液に含まれる基質と酵素との反応により生成する電子によって電子受容体を還元し、測定装置がその電子受容体の還元量を電気化学的に計測することにより、検体の定量分析を行う。このようなバイオセンサの一例として、例えば、特願平 11 - 324511 号で提案されたようなセンサが知られている。

20

【0004】

図 5 は、2 電極方式のバイオセンサの分解斜視図の一例である。これは、ポリエチレンテレフタレートのような絶縁性基板 5 上に、電気伝導性物質からなる測定電極 1（作用極とも言う）、対電極 2（対極とも言う）が形成されており、これら電極上には試料液中の特定成分と特異的に反応する酵素、及び電子伝達体、親水性高分子を含む試薬層 10 が形成されている。

【0005】

そして、試料液中の特定成分と試薬層 10 中の試薬との反応により生じる電流値を前記電極 1、2 で検出するためのキャビティ 11 を形成するため、電極および試薬層上の部分に細長い切り欠け部 8 を有したスペーサ 7 と、空気孔 9 を形成したカバー 6 とを絶縁基板上に貼りあわせている。

30

【0006】

このような構成のバイオセンサにおいて、試料液は、キャビティ 11 の入り口（試料液吸引口）から毛細管現象によりキャビティ 11 内に供給され、電極 1、2 と試薬層 10 のある位置まで導かれる。そして試料液中の特定成分が試薬層 10 の試薬と反応することにより、電流を生じ、生じた電流をバイオセンサのリード 3、4 を通じて外部の測定装置が読み取ることにより、検体の定量分析が行われる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、上述のような試薬構成のバイオセンサにおいて、熱や水分の介在下、特に、温度が 30 以上で湿度が 80 % 以上の高温多湿環境下においては、試薬層 10 に含まれる酵素蛋白や親水性高分子の一部などと、電子伝達体との還元反応が生じるため、バックグラウンド電流（ノイズ電流）が発生し、経時的にバックグラウンド電流値が上昇することにより、センサ性能が悪化するという問題が顕著に見られる。

40

【0008】

また、これを解決するための手段として、アルミシールや樹脂などの成型容器を用いたバイオセンサ保存容器中に、シリカゲルや活性アルミナのような乾燥剤を封入することによって水分を除去し、センサ性能の悪化を防止するように工夫することができるが、このような乾燥剤だけではバイオセンサに含まれる試薬中に残存する分子レベルの水までを完全に除去することは不可能である。

50

## 【0009】

また、上記保存容器においても、長期間にわたり水分の侵入を皆無（ゼロ）にするのは極めて困難であり、電子伝達体と酵素蛋白、親水性高分子の一部との還元反応は、極微量の水分が介在するだけで進行してしまうため、バックグラウンド電流の経時的な上昇を効果的に抑制することは極めて困難であるという問題点があった。

## 【0010】

また、酵素や電子伝達体など様々な試薬からなる混合試薬層中にフェリシアン化カリウムなどの無機塩が含まれている場合には、試薬溶液の乾燥過程において試薬層が極めて結晶化しやすくなるため、試薬層の表面が粗く不均一な状態になり、センサの基質濃度に対する応答性（直線性、感度）や測定精度などの悪化を招くという問題点があった。

10

## 【0011】

本発明は、前記問題点に鑑みてなされたものであり、水分との接触によるバイオセンサの性能劣化を効率的に防止するとともに、センサの基質濃度に対する応答性（直線性、感度）の高い高精度なバイオセンサを提供することを目的とする。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明のバイオセンサは、試料溶液中の特定物質の濃度を計測するバイオセンサにおいて、試料溶液に溶解され、試料溶液中の特定物質と特異的に反応するように予め設けられる試薬層中に、その分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩を含むことを特徴とするものである。

20

## 【0013】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記特定物質の濃度を、絶縁性基板上に設けられた少なくとも作用極と対極からなる電極を用いて計測することを特徴とするものである。

## 【0014】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記試薬層が、前記電極上、または当該試薬層の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が配置されるよう、形成され、該試薬層が、少なくとも酵素および電子伝達体を含むことを特徴とするものである。

## 【0015】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記有機酸が脂肪族カルボン酸、炭素環カルボン酸、複素環カルボン酸、もしくはそれらの置換体あるいは誘導体であることを特徴とするものである。

30

## 【0016】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記カルボン酸が、グルタル酸、アジピン酸、フタル酸、安息香酸のいずれかまたはそれらの組み合わせであることを特徴とするものである。

## 【0017】

本発明のバイオセンサは、試料溶液中の特定物質の濃度を計測するバイオセンサにおいて、試料溶液に溶解され、試料溶液中の特定物質と特異的に反応するように予め設けられる試薬層中に、その分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有する有機酸もしくは有機酸塩を含むことを特徴とするものである。

40

## 【0018】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記特定物質の濃度を、絶縁性基板上に設けられた少なくとも作用極と対極からなる電極を用いて計測することを特徴とするものである。

## 【0019】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記試薬層が、前記電極上、または当該試薬層の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が配置されるよう、形成され、該試薬層が、少なくとも酵素および電子伝達体を含むことを特徴とするもの

50

である。

【0020】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記有機酸がアミノ酸もしくはそれらの置換体あるいは誘導体であることを特徴とするものである。

【0021】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記アミノ酸が、グリシン、セリン、プロリン、トレオニン、リシン、タウリンのいずれか、またはそれらの組み合わせであることを特徴とするものである。

【0022】

本発明のバイオセンサは、前記バイオセンサにおいて、前記試薬層が、さらに親水性高分子を含むことを特徴とするものである。

10

【0023】

【発明の実施の形態】

(実施の形態1)

【0024】

以下に、本発明の実施の形態1によるバイオセンサについて説明する。なお、以下に説明する本発明の各実施の形態では、試料液中の特定物質と特異的に反応する分子識別素子として酵素を用いる酵素センサを例にとりて説明することにする。

【0025】

図5は、2電極方式のバイオセンサの分解斜視図の一例である。図5において、5は絶縁性の基板であり、この絶縁性の基板5上には、電気伝導性物質からなる測定電極1、対電極2が所定の位置、及び形状をもって形成されている。

20

なお、好適な上記絶縁性基板5の材料としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリイミドなどがある。

【0026】

また、各電極を構成する電気伝導性物質としては、金、白金、パラジウムなどの貴金属やカーボンなどの単体材料、あるいは、カーボンペーストや貴金属ペーストなどの複合材料があげられる。

【0027】

なお、金、白金、パラジウムなどの貴金属やカーボンなどの単体材料、は、スパッタリング蒸着法などで、またカーボンペーストや貴金属ペーストなどの複合材料はスクリーン印刷法などを用いて容易に電気伝導性層を絶縁性基板5に形成することができる。

30

【0028】

また、各電極の形成においては、上述したスパッタリング蒸着法やスクリーン印刷法などにより絶縁性基板5の全面、もしくは一部に前記電気伝導性層を形成した後、レーザなどを用いてスリットを設けることにより電極を分割形成することができる。また、あらかじめ電極パターンの形成された印刷版やマスク版を用いたスクリーン印刷法やスパッタリング蒸着法などでも同様に電極を形成することが可能である。

【0029】

このようにして形成された電極上には、酵素、電子伝達体、親水性高分子、及び分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩を含む試薬層10が形成される。

40

【0030】

本発明の実施の形態1は、試薬層10中に分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩を含むことを特徴とするものであり、この分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩は、電極上に形成された試薬層10中において、酸化型の電子伝達体と、試薬中に含まれる酵素蛋白、及び親水性高分子などに存在する反応性に富んだ一部の官能基などと、が接触して、電子伝達体が酸化型から還元型に変性する(還元される)ことを抑制する働きがある。

【0031】

50

そのため、上述の様な試薬構成のバイオセンサにおいて、熱や水分の介在下、特に温度が30以上で湿度が80%以上の高温多湿環境下において、試薬層10に含まれる酵素蛋白や親水性高分子の一部などと電子伝達体との還元反応により発生し、経時的に上昇するバックグラウンド電流（ノイズ電流）を抑制することができるため、バイオセンサの性能が悪化することを防ぐことができる。

【0032】

また、さらには、分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩を試薬層中に含むことにより、血液中、特に血球に存在する様々な共雑物質との不必要な反応をも併せて抑制することができるため、直線性の良好な（回帰式の傾きが大きく切片が小さい）、かつ、センサ個々のバラツキの少ない、高性能なバイオセンサを提供することができる。

10

【0033】

なお、試薬層10に含まれる分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩としては、脂肪族カルボン酸、炭素環カルボン酸、複素環カルボン酸等や、それらの塩がある。

例えば、脂肪族カルボン酸としては、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸などやそれらの塩があげられる。

【0034】

なお、効果の度合いは直鎖が長く分子量の大きいものほど大きく、炭化水素鎖が3つ以上あるものが特に好ましい。また、バイオセンサに用いる試薬としては水に対する溶解性が高いことが求められるため、分子構造中により多くの親水性官能基を持つものがより好ましい。

20

【0035】

また、炭素環カルボン酸としては、安息香酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸などやそれらの塩があげられ、これらを用いることでも前記と同様の効果を得ることができる。

また、複素環カルボン酸としては、2-フル酸、ニコチン酸、イソニコチン酸などやそれらの塩があげられ、これらを用いることでも前記と同様の効果を得ることができる。

【0036】

なお、上述の脂肪族ならびに炭素環カルボン酸、複素環を有するカルボン酸もしくはカルボン酸塩以外にも、カルボン酸ならびにカルボン酸塩の一部の官能基が別の官能基に置き換えられた、例えばリンゴ酸、オキサロ酢酸、クエン酸、ケトグルタル酸などやそれらの塩においても前記と同様の効果を得ることができる。

30

【0037】

なお、これらの有機酸もしくは有機酸塩のなかで最も好適なものは、グルタル酸、アジピン酸、フタル酸、安息香酸である。

【0038】

また、これらの有機酸もしくは有機酸塩の添加量は試薬溶液濃度として、0.01~100mM範囲が適当であり、より好ましくは0.1~10mMである。

【0039】

なお、図5に示すバイオセンサは、その後、このように形成された試薬層10及び電極1、2上に、切り欠け部8を有するスペーサ7とカバー6とを貼り合わせることにより、試料液が供給されるキャビティが形成される。

40

なお、上記スペーサ7およびカバー6の好適な材料としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリブチレンテレフタレート、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ナイロンなどがあげられる。

【0040】

また、このようなキャビティから構成されたバイオセンサへの試料液供給は毛細管現象により実現されるが、試料液のスムーズな供給を実現するうえでは、キャビティ内にバイオセンサ外部へ空気を逃がすための空気孔9が必要である。

50

なお、空気孔 9 の配置は、試料液の供給を妨げない範囲であればキャビティ内のいかなる位置でもよい。

【 0 0 4 1 】

このようにして形成されたバイオセンサにおいて、試料液中の特定成分と、酵素などを含む試薬層 1 0 との反応で得られた電流値は、測定電極 1、対電極 2 のそれぞれのリード部 3、4 を通じて接続された外部の測定装置により読み取られる。

【 0 0 4 2 】

(実施の形態 2)

以下に、本発明の実施の形態 2 によるバイオセンサについて説明する。

本発明の実施の形態 2 によるバイオセンサは、図 5 で示した試薬層 1 0 が、酵素、電子伝達体、親水性高分子、及び分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有する有機酸もしくは有機酸塩により形成されているものである。なお、他の構成要素は、前述した実施の形態 1 によるバイオセンサと同様であるため説明を省略する。

10

【 0 0 4 3 】

本発明の実施の形態 2 は、試薬層 1 0 に分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有する有機酸もしくは有機酸塩を含むことを特徴とするものであり、この有機酸もしくは有機酸塩を試薬層 1 0 に添加することにより、試薬層 1 0 の表面状態を極めて平滑、且つ均質に形成することができるという効果を得ることができる。

【 0 0 4 4 】

特に、試薬層 1 0 中に電子伝達体として用いられるフェリシアン化カリウムなどの無機塩を含む場合には、試薬溶液の乾燥過程において試薬層が結晶化しやすいが、試薬中に、分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有する有機酸もしくは有機酸塩が含まれることにより、当該無機塩の結晶化を阻害することができる。

20

そして、結晶化を阻害された無機塩は、微少な粒子状態で試薬層中に存在するため、酵素分子と密に、均一に接触することが可能となり、酵素分子との電子伝達効率が良好な試薬層状態が実現できる。

【 0 0 4 5 】

また、試薬層の溶解性を高めることができるため、センサの感度ならびに直線性を飛躍的に高めることが可能となる。

なお、試薬層 1 0 に含まれる、分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有する有機酸もしくは有機酸塩としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、リシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンなどやそれらの塩、あるいはサルコシン、ベタイン、タウリンなどの有機酸もしくは有機酸塩があげられる。

30

【 0 0 4 6 】

また、これらの有機酸もしくは有機酸塩の置換体あるいは誘導体であっても同様の効果を得ることができる。

また、これらの有機酸もしくは有機酸塩の中でも、グリシン、セリン、プロリン、トレオニン、リシン、タウリンは特に結晶化阻害の効果が高く好適である。

なお、これらの有機酸ならびに有機酸塩の添加量は試薬溶液濃度として 0 . 1 ~ 1 0 0 0 m M が適当であり、より好ましくは 1 0 ~ 5 0 0 m M である。

40

【 0 0 4 7 】

なお、本発明の実施の形態 1、2 では、上記試薬層 1 0 中に、分子内に少なくとも一つのカルボキシル基を有する有機酸もしくは有機酸塩、分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有する有機酸もしくは有機酸塩をそれぞれ添加した例を説明したが、さらにはそれらを組み合わせることも可能である。

【 0 0 4 8 】

また、上記実施の形態 1、2 の試薬中に含まれる酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、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、ウリカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、グルコースデヒ

50

ドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼなどを、電子伝達体としてはフェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体などを用いることができる。

【0049】

また、本発明の実施の形態1、2では、試薬層10中に親水性高分子を含むものについて説明したが、このように、試薬層10中に親水性高分子を含むことにより、試薬溶液に粘性を持たせ、電極への試薬形成を容易に均質にするとともに、電極と試薬との密着性を高める効果も得られる。さらに、試薬乾燥後の試薬結晶状態も、親水性高分子を含むことでムラなく均質となり、高精度なバイオセンサを作製することが可能になる。

【0050】

以上のような目的で使用される親水性高分子としては、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、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩、メタクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩、アガロースゲルおよびその誘導体などがあげられる。

【0051】

また、本発明の実施の形態1、2では、前述した試薬層10が、電極上に設けられるものとして説明をしたが、具体的には、電極上の全面もしくは一部に試薬層10を配置することができ、また、それ以外にも、バイオセンサの性能を悪化させることのない範囲内、すなわち、試薬層中の試薬が試料液に溶解して拡散する拡散エリア内に電極が設けられるよう、試薬層10を配置してもよい。

【0052】

【実施例】

(実施例1)

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁基板上に、スクリーン印刷により作用極と対極とからなる電極層を設け、その上に酵素(グルコースオキシダーゼ)、電子伝達体(フェリシアン化カリウム)、親水性高分子(カルボキシメチルセルロース)、および脂肪族カルボン酸(濃度は試薬溶液として5mM)を含んだ試薬層を形成したのち、ポリエチレンテレフタレートからなるスペーサと、同じくポリエチレンテレフタレートからなるカバーとの貼り合わせにより、血液が導かれる毛細管となるキャビティが形成された2電極方式の血糖値測定センサを作製した。

【0053】

なお、ここでは、有機酸として脂肪族カルボン酸であるマロン酸( $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ )、グルタル酸( $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ )、アジピン酸( $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ )の3種類、および脂肪族カルボン酸を含まない従来仕様の計4種類の2電極方式のセンサを作製した。

【0054】

図1はこのようにして作製した4種類のセンサを用いて過酷環境下(温度40℃、湿度80%)でのバックグラウンド電流を測定したものであり、試料液としてはグルコースを含まない精製水を用いた。測定時期はセンサ作製直後(0日目)、7日後、14日後、30日後の計4ポイントである。電流測定条件は試料液(精製水)がキャビティ内に充填された後、25秒間反応を促進し、その後作用極と対極間に0.5Vの電圧を印加し、その5秒後に得られた電流値を測定した。

【0055】

また、測定回数nは各測定ポイントごとにn=10であり、第1図中にはその平均値をプロットしてある。

図1から明らかのように、バックグラウンド電流の上昇は脂肪族カルボン酸を添加したセンサで確実に抑制されており、また、その上昇率はマロン酸、グルタル酸、アジピン酸

10

20

30

40

50

の順に小さくなっており、分子構造が複雑で、直鎖が長く、分子量の大きいもの程、バックグラウンド電流の上昇を抑制する効果が大きいことが示唆された。なお、ここで得られた電流値は、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウム、並びにカルボキシメチルセルロースとフェリシアン化カリウムが反応して生じたフェロシアン化カリウム量に相当する。

#### 【0056】

(実施例2)

実施例1と同様な手順によりバイオセンサを作製し実施例1と同様な評価を実施した。なお、ここでは有機酸として炭素環カルボン酸である安息香酸とフタル酸、およびコハク酸の炭化水素鎖の一部が水酸基に置き換わった構造をもつリンゴ酸(コハク酸の誘導体)の3種類を用いた。

10

図2から明らかなように、安息香酸、フタル酸、リンゴ酸の何れの有機酸を用いても、実施例1同様にバックグラウンド電流の上昇を抑制する効果が確認された。

#### 【0057】

(実施例3)

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁基板上に、スクリーン印刷により作用極と対極とからなる電極層を設け、その上に酵素(ピロキノリンキノン補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼ)、電子伝達体(フェリシアン化カリウム)、親水性高分子(カルボキシメチルセルロース)、脂肪族カルボン酸(フタル酸)およびアミノ酸を含んだ試薬層を形成したのち、ポリエチレンテレフタレートからなるスペーサと、同じくポリエチレン

20

テレフタレートからなるカバーとの貼り合わせにより、血液が導かれる毛細管となるキャビティが形成された2電極方式の血糖値測定センサを作製した。

#### 【0058】

なお、ここでは、有機酸として分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有するアミノ酸であるグリシン(Gly)、セリン(Ser)、プロリン(Pro)、トレオニン(Thr)、リシン(Lys)、サルコシン(グリシンの誘導体)、タウリン、およびアミノ酸を含まない従来仕様の計8種類のセンサを作製した。

#### 【0059】

図3および図4はこのようにして作製した8種類のセンサを用いて、人全血中のグルコースを測定した際のセンサ応答特性を示すものである。なお、ここでは全血中のグルコース濃度が40、80、350、600、700mg/dlのものを用いた。

30

#### 【0060】

電流測定条件は試料液(人全血)がキャビティ内に充填された後、25秒間反応を促進し、その後作用極と対極間に0.5Vの電圧を印加し、その5秒後に得られた電流値を測定した。

#### 【0061】

また、測定回数nは各濃度ごとにn=20であり、図中にはその平均値をプロットしてある。

#### 【0062】

図3、図4から明らかなように、アミノ酸の種類にて若干応答値に差異はあるものの、アミノ酸を含まない従来仕様と比較して、特にグルコース濃度が480mg/dl以上の高濃度域において飛躍的な応答値ならびに直線性の向上が認められる。

40

#### 【0063】

また、表1は、前述のn=20測定時のセンサ応答値のバラツキをCV値で比較したものである。表1から明らかなように、アミノ酸を添加した本発明のセンサにおいては大幅なCV値の良化が認められる。これは、アミノ酸を試薬層中に添加することでフェリシアン化カリウムの結晶化を防ぎ、試薬層を平滑且つ均質に形成することができたため、試薬の溶解性や拡散が均質になり応答バラツキが軽減されたものと推測される。

#### 【0064】

【表1】

50



濃度 (mg/dl)	40	80	350	600	700
従来センサ	3.25%	2.48%	2.05%	2.11%	4.15%
Gly-133mM	2.15%	1.75%	1.55%	1.28%	1.05%
Ser-95mM	2.54%	2.11%	1.75%	1.45%	1.22%
Pro-87mM	2.38%	1.98%	1.69%	1.40%	1.18%
Thr-84mM	2.18%	2.00%	1.65%	1.39%	1.24%
Lys-HC1-55mM	2.48%	1.89%	1.58%	1.41%	1.14%
サルコシン-122mM	2.65%	2.08%	1.68%	1.35%	1.25%
タウリン-80mM	2.18%	1.78%	1.43%	1.22%	1.10%

なお、前記実施例 1 から 3 は血液中のグルコース濃度を測定するバイオセンサについて示したが、測定対象とする試料液、物質、およびバイオセンサの形式はこれに限定されるものではなく、例えば、対象試料液としては血液以外にも生体試料液として唾液、細胞間質液、尿や汗などを、また、食品や飲料水なども用いることができる。また、対象物質としては、グルコース以外にも乳酸、コレステロール、尿酸、アスコルビン酸、ビリルビンなどを用いることができる。また、前記実施例 1 から 3 においては、電流測定方式として、図 5 で示した、測定電極 1、対電極 2 からなる 2 電極方式を用いたが、その他、測定電極、対電極、及び検知電極からなる 3 電極方式などがあり、何れの方式を用いてもよい。なお、3 電極方式の方が 2 電極方式より正確な測定が可能である。

#### 【0065】

また、本実施例では、バイオセンサとして酵素センサを例に挙げて説明したが、本発明は、試料液中の特定物質と特異的に反応する分子識別素子として酵素以外に抗体、微生物、DNA、RNA などをも利用するバイオセンサにも、同様に適応することができる。

#### 【0066】

##### 【発明の効果】

以上のように、本発明のバイオセンサによれば、絶縁性基板上に設けられた少なくとも測定電極と対電極からなる電極を用い、試料液中の測定対象物質と、上記電極上、またはその近傍に形成された少なくとも酵素、及び電子伝達体からなる試薬層との反応により得られる電流値から、該測定対象物質の含有量を計測するバイオセンサにおいて、上記試薬層中に脂肪族カルボン酸、炭素環カルボン酸、複素環カルボン酸などの有機酸あるいは有機酸塩を含むものとしたので、試薬中に脂肪族カルボン酸、炭素環カルボン酸、複素環カルボン酸などの有機酸あるいは有機酸塩を添加するという簡易な手法を用いることで酵素反応等を阻害することなく、経時的なバックグラウンド電流の上昇を抑制することができ、さらには、血液中に存在する様々な共雑物質との不必要な反応も併せて抑制できるため、直線性の良好な、センサ個々のバラツキが少ない高性能なバイオセンサを提供することができるという効果が得られる。

#### 【0067】

また、本発明のバイオセンサによれば、絶縁性基板上に設けられた少なくとも測定電極と対電極からなる電極を用い、試料液中の測定対象物質と、上記電極上、またはその近傍に形成された少なくとも酵素、及び電子伝達体からなる試薬層との反応により得られる電流値から、該測定対象物質の含有量を計測するバイオセンサにおいて、上記試薬層中に分子内に少なくとも一つのカルボキシル基とアミノ基を有するアミノ酸などの有機酸もしくは有機酸塩を含むものとしたので、試薬中にアミノ酸などの有機酸や有機酸塩を添加するという簡易な手法を用いることで、センサの基質濃度に対する応答性（感度、直線性）を飛躍的に高め、センサの性能を向上させる効果が得られる。

#### 【0068】

10

20

30

40

50

また、本発明のバイオセンサによれば、上記試薬層に親水性高分子を含むものとしたので、親水性高分子を含むことで電極面への均質な試薬形成を容易にし、試薬層内において各々の物質が均質な分散状態になることを促進することができる。また、均質な試薬形成を実現できることにより、センサ個々のバラツキが少ない高性能なバイオセンサを提供することができるという効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1において、試料液として精製水を用いた場合の過酷環境下でのバックグラウンド電流の上昇を示す図である。

【図2】実施例2において、試料液として精製水を用いた場合の過酷環境下でのバックグラウンド電流の上昇を示す図である。

10

【図3】実施例3において、試料液として全血を用いた場合の全血応答値を示す図である。

【図4】実施例3において、試料液として全血を用いた場合の全血応答値を示す図である。

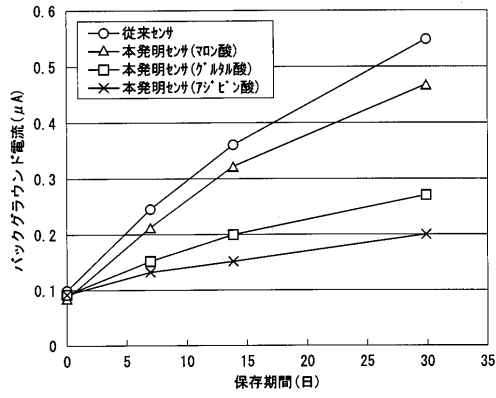
【図5】2電極方式のバイオセンサの分解斜視図の一例である。

【符号の説明】

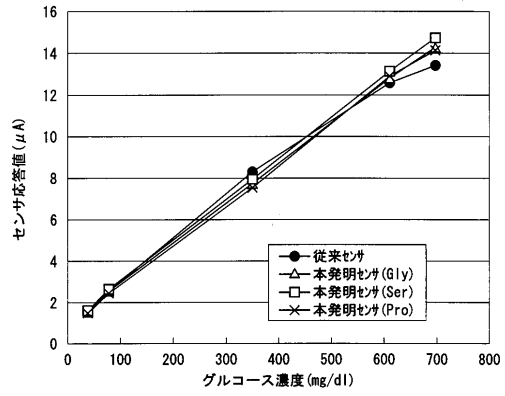
- 1 作用極
- 2 対極
- 3、4 リード
- 5 絶縁基板
- 6 カバー
- 7 スペーサー
- 8 切り欠け部
- 9 空気孔
- 10 試薬層
- 11 キャビティ

20

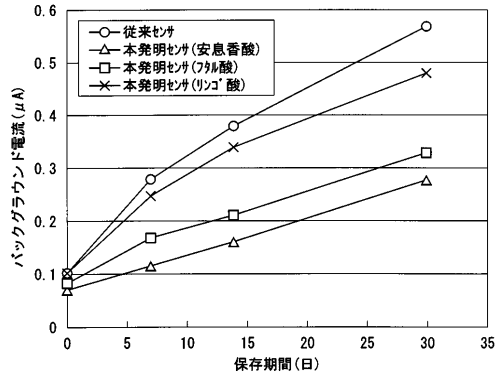
【図1】



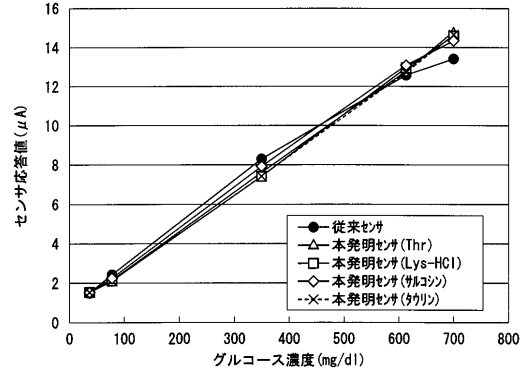
【図3】



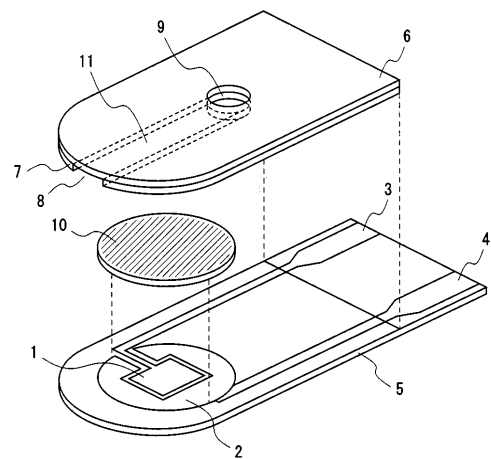
【図2】



【図4】



【図5】



---

フロントページの続き

(72)発明者 中南 貴裕  
香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電子工業株式会社内

審査官 大竹 秀紀

(56)参考文献 特許第3694424(JP, B2)  
特開平11-201932(JP, A)  
特開2000-065778(JP, A)  
特開平11-344462(JP, A)  
特開平09-043189(JP, A)  
特開平09-234097(JP, A)  
特許第3867959(JP, B2)  
特開2000-081408(JP, A)  
特開2000-081407(JP, A)  
特開平10-078407(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 27/327  
G01N 27/416