

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年3月27日 (27.03.2003)

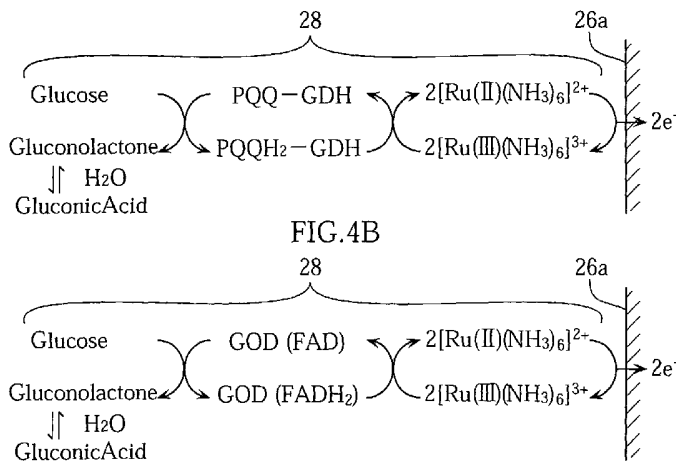
PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/025558 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/327
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08855
 - (22) 国際出願日: 2002年8月30日 (30.08.2002)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ:
特願2001-278966 2001年9月14日 (14.09.2001) JP
 - (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57 Kyoto (JP).
 - (72) 発明者; および
 - (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永川 健児 (NA-GAKAWA, Kenji) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 山岡 秀亮 (YAMAOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
 - (74) 代理人: 吉田 稔, 外 (YOSHIDA, Minoru et al.); 〒543-0014 大阪府大阪市天王寺区玉造元町2番32-1301 Osaka (JP).
 - (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD, TOOL AND DEVICE FOR MEASURING CONCENTRATION

(54) 発明の名称: 濃度測定方法、濃度測定用具および濃度測定装置



(57) Abstract: A method for measuring a concentration of a substance to be measured, wherein a reaction system comprising the substance to be measured, an oxidation-reduction enzyme and an electron mediator is provided, and an electrochemical technique is used, characterized in that use is made of a Ru compound as the electron mediator; and a tool for measuring a concentration having a substrate, at least a first and a second electrodes formed on the substrate, and a reagent layer in a solid form, characterized in that the solid reagent layer comprises an oxidation-reduction enzyme and a Ru compound, and dissolves and forms a liquid reaction system when a sample solution is supplied.

WO 03/025558 A1



(57) 要約:

本発明は、測定対象物、酸化還元酵素、および電子伝達物質を含む反応系を構築し、電気化学的手法を利用して測定対象物の濃度を測定する技術に関する。電子伝達物質として、Ru化合物が使用される。本発明では、基板と、この基板上に形成された少なくとも第1電極および第2電極と、固体状に形成された試薬層と、を備えた濃度測定用具が提供される。試薬層は、酸化還元酵素およびRu化合物を含み、かつ試料液が供給されたときに溶解して液相反応系を構築するものとして構成される。

明 細 書

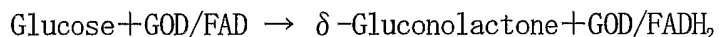
濃度測定方法、濃度測定用具および濃度測定装置

5 技術分野

本発明は、試料液（たとえば血液などの生化学的試料またはこれの調整液）から、測定対象物（たとえばグルコースやコレステロール）の濃度を測定する技術に関する。

10 背景技術

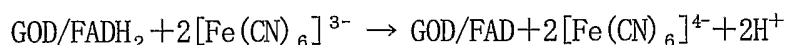
グルコース濃度を定量する方法としては、酵素反応を利用したものがある。その代表的なものとして、酵素としてグルコースオキシダーゼ (GOD) を使用するものがある。GODは、補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) が結合した糖タンパク質であり、GODを使用した場合のグルコースの酵素反応は下記化学式に示したように進行する (式中においては、 FADH_2 は、FADの還元型を表している)。



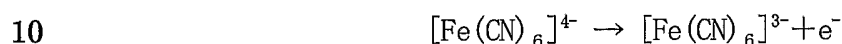
臨床医学的に血糖値を測定する場合には、グルコース濃度の変化による吸光度
20 の変化を測定してグルコース濃度を定量することもあるが、アンペロメトリー法によりグルコース濃度を測定する方法が一般的である。アンペロメトリー法は、携帯型の血糖値測定装置におけるグルコース濃度測定方法として広く採用されているものである。

アンペロメトリー法を利用した血糖値測定手法は、酸化電流を測定する場合を
25 例にとれば次の通りである。まず、第1ステップとして、血液、酵素、酸化型電子伝達体 (メディエータ) を共存させ反応系を構築する。そうすると、上記酵素反応が進行する一方で、この酵素反応により生じた FADH_2 とメディエータとの間の酸化還元反応により、還元型のメディエータが生成される。メディエータとしては、フェリシアン化カリウムが汎用されており、その場合の反応式は下記化学式に示

した通りである。



- 5 次いで、第2ステップとして、一对の電極を用いて反応系に電圧を印加することにより、フェロシアン化カリウムを酸化して(電子を放出させて)、下記化学式に示したようにフェリシアン化カリウムとする。フェロシアン化カリウムに由来する電子は、陽極に供給される。



続いて、第3ステップとして、電圧印加に起因する酸化電流値を測定するとともに、その測定値に基づいてグルコース濃度が演算される。

- 15 携帯型血糖値測定装置を用いて血糖値を測定する場合には、電極間に酵素とメディエータとを含む試薬層が形成されたグルコースセンサを用いるとともに、試薬層に血液を供給することにより電極間に反応系が構成される。このグルコースセンサでは、これを携帯型血糖値測定装置に装着することにより電極間に電圧を印加するとともに酸化電流値を測定し、この酸化電流値に基づいて血液中のグルコース濃度が定量される。

- 20 上述した通り、酵素としてはGODが使用され、メディエータとしてはフェリシアン化カリウムを使用するのが通常である。しかしながら、GODとフェリシアン化カリウムとを組み合わせた反応系において、アンペロメトリー法に代表される電気化学的方法によりグルコース濃度を測定する方法では、次に説明するような問題があった。

- 25 その1つは、還元性物質の影響である。たとえば血液中のグルコース濃度を測定する場合を考えると、血液中にはグルコース以外の還元性物質(たとえばアスコルビン酸、グルタチオン、 $\text{Fe}(\text{II})^{2+}$)が共存している。反応系に電圧を印加するときにフェロシアン化カリウム以外の還元性物質が共存していれば、電極に対してはフェロシアン化カリウムに由来する電子以外に、電圧印加に伴う還元性

物質の酸化に由来する電子も供給されることとなる。その結果、測定される電流値には、還元性物質の電子伝達に由来するバックグラウンド電流(ノイズ)も含まれることとなる。そのため、測定されるグルコース濃度は、実際のグルコース濃度よりも大きくなってしまふ。このような測定誤差は、電極間に印加する電圧値

5 が大きいほど、酸化される還元性物質の種類や量が多くなるため、より顕著に現れる。したがって、メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いる場合には、実測値を補正してから最終的な濃度を決定しなければ、精度良く血糖値の測定を行うことができない。還元性物質の影響は、血糖値を測定する場合に限らず、酸化電流値に基づいて濃度演算を行う場合には、他の成分についても同様に生じ

10 得るものである。

他の問題は、携帯型血糖値測定装置およびグルコースセンサを用いてグルコース濃度を測定する場合において、グルコースセンサの保存安定性の面での問題である。フェリシアン化カリウムは光や水に弱く、これらによる曝露によってグルコース以外から電子を受け取って還元型であるフェロシアン化カリウムになって

15 しまうことがある。このような事態が生じたなら、反応系には、酵素反応により還元型とされたフェロシアン化カリウムと、曝露により還元型とされたフェロシアン化カリウムが共存することとなる。その結果、先に説明した還元性物質の場合と同様に、電圧印加時の酸化電流は、曝露によるフェロシアン化カリウムに由来するバックグラウンド電流をも含むものとなる。そのため、測定されるグル

20 ース濃度は、実際のグルコース濃度よりも大きな値となってしまう。このような不具合を抑制するためには、グルコースセンサの試薬層が曝露しないように、光不透過性の材料により形成された包装袋などにグルコースセンサを封入する必要がある。しかも、グルコースセンサの寿命を長く保つためには、水分による影響を回避するために窒素置換処理などにより湿度を小さくした状態で密封する

25 があり、グルコースセンサを工業的に量産する場合には製造が不便でコスト的に不利である。

発明の開示

本発明は、低コストでバックグラウンド電流による影響を低減し、正確に試料

液中の測定対象物の濃度を測定することができる技術を提供することを目的としている。

本発明の第1の側面により提供される測定対象物の濃度測定方法は、測定対象物、酸化還元酵素、および電子伝達物質を含む反応系を構築し、電気化学的手法
5 を利用して測定対象物の濃度を測定する方法であって、上記電子伝達物質として、Ru化合物を使用することを特徴としている。

上記濃度測定方法は、反応系において、Ru化合物の還元体を生成させる第1ステップと、反応系に対して電圧を印加して還元体を酸化するとともに、そのときに還元体が放出した電子の量に相関する応答電流値を測定する第2ステップと、
10 この第2ステップにおいて測定された応答電流値に基づいて、測定対象物の濃度を演算する第3ステップと、を含んでいるのが好ましい。

本発明の濃度測定方法においては、反応系を非印加状態として第1ステップを行った後に、反応系を印加状態として第2ステップを行ってもよいし、少なくとも測定対象物を含む試料液の供給時から継続して反応系を印加状態として、第1
15 ステップと第2ステップとを同時的に行ってもよい。

第2ステップにおいて第1電極と第2電極との間に付与される電圧は、定電位であるのが好ましく、その値は、還元型Ru(II)錯体と酸化型Ru(III)錯体との間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)以上で、フェロシアン化イオンとフェリシアン化イオンとの間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)よりも小さくするのが
20 好ましい。第1および第2電極間に付与される定電圧は、たとえば100~500mVとされ、さらに好ましくは100~300mVとされる。

第1ステップの時間は0~10秒とし、第3ステップにおいてグルコース濃度の演算の基礎とする演算用電流値として、第2ステップ開始から起算され、かつ3秒以上である定時間経過後に測定された電流値を採用するのが好ましい。さらに
25 好ましくは、第1のステップの時間が0~3秒であり、演算用電流値として上記第2ステップ開始から3~5秒の範囲の定時間に測定された電流値を採用する。

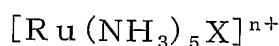
本発明の第2の側面においては、基板と、この基板上に形成された少なくとも第1電極および第2電極と、固体状に形成された試薬層と、を備えた濃度測定用

具であって、上記試薬層は、酸化還元酵素およびRu化合物を含み、かつ測定対象物を含む試料液が供給されたときに溶解して液相反応系を構築するように構成されていることを特徴とする、濃度測定用具が提供される。

5 試薬層は、試料液が供給された場合に、液相反応系において酸化還元酵素とRu化合物とが共存するように構成するのが好ましい。

本発明の第1および第2の側面においては、Ru化合物は、酸化型のRu錯体として反応系に存在させるのが好ましい。Ru錯体は、メディエータ（電子伝達体）として機能すればその配位子の種類はとくに限定されないが、酸化型のものが下記化学式で示されるものを使用するのが好ましい。

10



化学式におけるXとしては、NH₃、ハロゲンイオン、CN、ピリジン、ニコチンアミド、またはH₂Oが挙げられるが、NH₃またはハロゲンイオンが好ましい。化学式に
15 におけるn+は、Xの種類により決定される酸化型Ru(III)錯体の価数を表している。

Ru化合物が酸化型Ru(III)錯体である場合には、たとえば酸化還元酵素により触媒される測定対象物の酸化反応および酸化型Ru(III)錯体の還元反応の2つの反応のみにより、還元型Ru(II)錯体が生成するように電子伝達系統が選択される。

20 反応系は、たとえば相対的に量の多い酸化型Ru(III)錯体に対して、相対的に量の少ない酸化還元酵素を均一または略均一に分散させた均一または略均一な液相反応系として構成される。この場合、反応系の各所において、略均一に還元型Ru(II)錯体が生成される。

測定対象物としては、グルコース、コレステロール、乳酸、アスコルビン酸などが挙げられる。

25 酸化還元酵素は、測定対象物の種類によって選択されるが、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)（後述するαGDHおよびCyGDHを含む）、グルコースオキシダーゼ(GOD)、コレステロールデヒドロゲナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、アスコルビン酸デヒドロゲナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、

フルクトースデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、NADHオキシダーゼ、尿酸オキシダーゼ(ウリカーゼ)、ウレアーゼ、およびジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(ジアホラーゼ) からなる群より選ばれる少なくとも1つを選択するのが好ましい。

5 本発明では、GDHとして、たとえばピロロキノリンキノン(PQQ)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADP)などを補酵素とするものの他、 α GDHやCyGDHなどを使用することができる。GDHとしては、PQQを補酵素とするもの(PQQGDH)、 α GDH、あるいはCyGDHを使用するのが好ましい。

10 α GDHは、グルコース脱水素活性を有するサブユニットとして、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaであるGDH活性タンパク質を含んだものである。一方、CyGDHは、上記GDH活性タンパク質と、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaである電子伝達タンパク質(チトクロムC)と、をサブユニットとして含むものである。
15 GDHとしては、GDH活性タンパク質とチトクロムC以外のサブユニットをさらに有するものを使用することもできる。

CyGDHは、たとえばブルクホルデリア・セパシアに属する微生物が菌体外に分泌した酵素を精製し、あるいは当該菌体の菌体内酵素を精製することにより得ることができる。一方、 α GDHは、たとえばブルクホルデリア・セパシアに属する微生物から採取した α GDHの発現をコードする遺伝子が移入された形質転換体を形成し、この形質転換体から外部に分泌された酵素を精製し、あるいは当該形質転換体の菌体内酵素を精製することにより得ることができる。
20

ブルクホルデリア・セパシアに属する微生物としては、たとえばブルクホルデリア・セパシアKS1株を使用することができる。このKS1株は、平成12年9月25日に
25 独立特許法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に微生物受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。

本発明の第3の側面においては、試薬層、第1電極および第2電極を有し、か

つ上記試薬層が酸化還元酵素とRu化合物を含む濃度測定用具を装着して使用し、上記第1電極および上記第2電極との間に電圧を印加するための電圧印加手段と、上記第1電極と上記第2電極との間に電圧を印加したときの応答電流値を測定する電流値測定手段と、上記応答電流値に基づいて測定対象物の濃度を演算する演算手段と、を備えたことを特徴とする、濃度測定装置が提供される。

濃度測定装置は、電圧印加手段における電圧印加動作を制御し、あるいは電流値測定手段における電流値測定動作を制御するための制御手段をさらに備えているのが好ましい。

制御手段は、たとえば電圧印加手段により印加される電圧を、100～500mVの範囲から、さらに好ましくは100～300mVの範囲から選択される定電圧に制御するように構成される。制御手段はまた、電圧印加手段により印加される電圧を、Ru化合物の酸化体と還元体との間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)以上で、フェロシアン化イオンとフェリシアン化イオンとの間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)よりも小さい範囲から選択される定電圧に制御するように構成してもよい。

本発明の濃度測定装置は、濃度測定用具の試薬層に対して試料液が供給されたことを検知する検知手段をさらに備えたものとして構成するのが好ましい。制御手段は、たとえば検知手段が試薬層に試料液が供給されたことを検知してから0～10秒の第1定時間の間は第1電極と第2電極との間に電圧を印加しないように電圧印加手段を制御するように構成される。この場合、制御手段は、第1定時間経過時点から、電圧印加手段により第1電極と第2電極との間に定電位を印加するように電圧印加手段を制御する。制御手段はさらに、先の定電位の印加開始から起算され、かつ3秒以上である第2定時間経過時点に電流値測定手段において演算手段における濃度演算用の応答電流値を、電流値測定手段に測定させるように構成される。より好ましくは、第1定時間は0～3秒とされ、第2定時間は3～5秒とされる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明に係るグルコース濃度測定装置の一例の概略構成を示す模式図

である。

図2は、図1のグルコース濃度測定装置に用いられるグルコースセンサの一例を示す全体斜視図である。

図3は、図2のグルコースセンサの分解斜視図である。

- 5 図4Aはグルコース、PQQ-GDHおよびRu錯体を含む反応系での電子伝達系統図であり、図4Bはグルコース、GODおよびRu錯体を含む反応系での電子伝達系統図である。

図5は、グルコース濃度の測定において、第1および第2電極間に印加する電圧値、および応答電流値の経時的変化を示すグラフである。

- 10 図6は、本案グルコースセンサ1と比較グルコースセンサのCV波形である。

図7は、印加電圧値の影響を示すグラフである。

図8は、Ru錯体を用いた試薬層に全血を供給してから一定時間開回路とした後に試薬層に電圧を印加したとき(閉回路)の応答電流の経時的変化を示すグラフである。

- 15 図9は、Fe錯体を用いた試薬層に全血を供給してから一定時間開回路とした後に試薬層に電圧を印加したとき(閉回路)の応答電流の経時的変化を示すグラフである。

図10は、グルコース濃度の異なる複数種の全血について、試薬層に全血を供給してから10秒後に500mVの印加電圧を付与したときの電圧印加開始5秒後の応答

- 20 電流値を示すグラフである。

図11は、グルコース濃度の異なる複数種の全血について、試薬層に全血を供給してから10秒後に250mVの印加電圧を付与したときの電圧印加開始5秒後の応答電流値を示すグラフである。

- 25 図12は、図10および図11に示したグラフにおいて、グルコース濃度が0の全血についての応答電流値(バックグラウンド電流)を、Fe錯体およびRu錯体について個別に示した棒グラフである。

図13は、水分による曝露の影響を、試薬層に標準液を供給したときの応答電流値から評価したグラフである。

図14は、Ru錯体の分散能を、試薬層に標準液を供給したときの応答電流値から

評価したグラフである。

図15は、試薬層の処方(酸化還元酵素)の異なるグルコースセンサについて、グルコース濃度と応答電流値との相関性を示すグラフである。

図16は、酸化還元酵素としてGODを使用したグルコースセンサについて、グルコース濃度と応答電流値との相関性を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の好ましい実施の形態について、図面を参照して具体的に説明する。本実施の形態においては、試料液中のグルコース濃度を測定するように構成されたグルコース濃度測定装置およびグルコースセンサを例にとって説明する。ただし、本発明は、グルコース濃度を測定する場合には限定されず、他の成分を測定する場合にも適用できる。

図1に示したように、グルコース濃度測定装置1は、グルコースセンサ2を用いて、血液などのグルコース溶液中のグルコース濃度を測定するものである。このグルコース濃度測定装置1は、電圧印加部3、電流値測定部4、検知部5、制御部6、演算部7および表示部8を備えている。

グルコースセンサ2は、図2および図3に良く表れているように、カバー板20、スペーサ21および基板22を有しており、これらによって流路25が規定されている。

カバー板20には穴部23が設けられており、スペーサ21には穴部23に連通するとともに先端部24aが開放したスリット24が設けられている。流路25は、スリット24の先端開放部24aおよび穴部23を介して外部と連通している。先端開口部24aは試料液導入口25aを構成しており、この試料液導入口25aから供給されたグルコース溶液は、毛細管現象により穴部23に向けて流路25内を進行する。

基板22の上面22aには、第1電極26、第2電極27、および試薬層28が設けられている。

第1および第2電極26、27は、全体として基板22の長手方向に延びている。第1および第2電極26、27の一端部26A、27Aは、基板22の短手方向に延びる作用部26aおよび対部27aを有している。

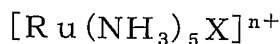
基板22の上面22aは、第1電極26の作用部26a、第2電極27の対部27a、第1

および第2電極26, 27の他端部26 b, 27 bが露出するようにして絶縁膜29により覆われている。第1および第2電極26, 27の他端部26 b, 27 bは、後述するぐうRコース濃度測定装置1の第1および第2接触子3 a, 3 b (図1参照)と接触させるための端子部を構成している。

- 5 試薬層28は、たとえば固形状であり、作用部26 aと対部27 aとの間を橋渡すようにして設けられている。この試薬層28は、たとえば相対的に多量のメディエータ(電子伝達体)および相対的に少量の酸化還元酵素を含んでいる。試薬層28は、たとえばメディエータおよび酸化還元酵素を略均一に分散させた塗布材を第1および第2電極26, 27を橋渡すように塗布し、その後乾燥させることにより形成される。このようにして試薬層28を形成する場合には、メディエータに対して酸化還元酵素が略均一に分散した単一固体層とされ、グルコース溶液の供給により容易に溶解するものとされる。
- 10

- 酸化還元酵素としては、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)またはグルコースオキシダーゼ(GOD)を使用するのが好ましい。GDHとしては、ピロロキノリンキノン(PQQ)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸(NADP)などを補酵素とするもの、 α GDHやCyGDHを使用することができる。これらのGDHのうち、PQQを補酵素とするもの(PQQGDH)、 α GDHおよびCyGDHを使用するのが好ましい。 α GDHおよびCyGDHについては、上述した通りである。
- 15

- 20 メディエータとしては、たとえばRu錯体を使用される。このRu錯体は、電子伝達体として機能すればその配位子の種類はとくに限定されないが、酸化型のものが下記化学式で示されるものを使用するのが好ましい。



25

化学式におけるXとしては、 NH_3 、ハロゲンイオン、CN、ピリジン、ニコチンアミド、あるいは H_2O が挙げられるが、 NH_3 またはハロゲンイオンが好ましい。一方、化学式におけるn+は、Xの種類により決定される酸化型Ru(III)錯体の価数を表している。

Ru錯体は、還元型(II)が不安定なために通常は酸化型(III)として存在する。そのため、グルコースセンサ2の試薬層28にRu錯体を混在させた状態で光や水に曝露されたとしても、容易に還元してしまうことはない。また、Ru錯体は結晶化しにくく、微粉末状態を適切に維持することができるといった特性を有している。

- 5 さらには、Ru錯体とPQQGDHとの組み合わせについていえば、電子伝達速度が大きいといった利点もある。

図1に示した電圧印加部3は、第1電極26の端子部26bと第2電極27の端子部27bとの間に定電圧を印加するものである。電圧印加部3は、グルコースセンサ2をグルコース濃度測定装置1に設けられた装着部(図示略)に装着することにより、第1および第2接触子3a, 3bを介して、グルコースセンサ2の端子部26b, 27bと導通するようになっている。電圧印加部3としては、たとえば乾電池あるいは充電電池などの直流電源が使用される。

15 電流値測定部4は、第1および第2電極26, 27間への電圧印加時に試薬層28の還元型Ru(II)錯体から放出された電子の量に相関する応答電流値を測定するものである。

検知部5は、グルコース濃度測定装置1にグルコースセンサ2が装着された後において、試薬層28にグルコース溶液が供給され、グルコース濃度の測定が可能になったか否かを検知するものである。

20 制御部6は、電圧印加部3を制御し、第1および第2電極26, 27間に電圧が印加される状態(閉回路)と印加されない状態(開回路)とを選択するものである。制御部6はさらに、電流値測定部4における電流値測定タイミングを制御する。

演算部7は、電流値測定部4により測定された応答電流値に応じて、グルコース溶液中のグルコース濃度の演算を行うものである。

25 なお、検知部5、制御部6および演算部7のそれぞれは、たとえばCPUおよびROMやRAMなどのメモリにより構成されるが、検知部5、制御部6および演算部7の全てを、1つのCPUに対して複数のメモリを接続することにより構成することもできる。また、演算部7による演算結果は、表示部8により表示される。表示部8は、たとえばLCDなどにより構成される。

次に、グルコース溶液中のグルコース濃度測定の手順を、図1ないし図3に加えて、図4および図5をも参照しつつ説明する。

- 図1に良く表れているように、まずグルコース濃度測定装置1にグルコースセンサ2をセットする。そうすると、グルコースセンサ2の第1および第2電極26、27の端子部26b、27bがグルコース測定装置1の第1および第2接触子3a、3bと接触する。先にも触れたように、この状態では第1および第2電極26、27が電圧印加部3に導通可能とされている。実際の測定においては、グルコースセンサ2にグルコース溶液を供給する以前から、制御部6の制御に基づいて、電圧印加部3により第1および第2電極26、27間に定電圧が印加されている。
- 5 第1および第2電極26、27間に印加する定電圧は、たとえば100~500mVの範囲に設定される。好ましくは、定電圧は、還元型Ru(II)錯体と酸化型Ru(III)錯体との間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)以上で、フェロシアン化イオンとフェリシアン化イオンとの間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)よりも小さいものとされる。Ru錯体の標準酸化還元電位は、配位子の種類により多少異なるが、概ね+100mVであり、フェリシアン化イオンのそれは+360mVである。したがって、電圧印加部3により第1および第2電極26、27間に印加する定電圧は、たとえば100~350mVの範囲から選択される。Ru錯体としては、酸化型が $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (還元型が $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$)で示されるものが最も好適に使用されるのは上述した通りである。この場合にも、定電圧は100~350mVとするのが好ましく、さらに好ましくは100~300mVとされる。
- 10 20

次いで、グルコースセンサ2の試料液導入口25aを介して血液などのグルコース溶液を供給する。グルコース溶液は、毛細管現象によりグルコースセンサ2の流路25内を進行する。その過程において、グルコース溶液が試薬層28を溶解させる。

- 25 先にも触れたように、Ru錯体は結晶化しにくく微粉末状態を適切に維持できるから、Ru錯体を微粉末の状態を試薬層28に含ませておけば、グルコース溶液の供給時に容易かつ即時に試薬層28の全体が溶解する。試薬層28は、酸化還元酵素にRu錯体を分散させた構成とされているから、試薬層28の各所において均一に酵素反応が起こり、短時間で確実なグルコース濃度の測定が可能となる。

一方、試薬層28にグルコース溶液が供給されれば、酸化還元酵素によりグルコースがグルコンラクトンに酸化されるとともにメディエータが還元型とされる。メディエータは、試薬層28において略均一に分散されているため、試薬層28の各所において略均一に、かつ電圧を印加するまでもなく自発的に還元型のメディエータが生成される。なお、グルコンラクトンは、非酵素的にグルコン酸となる。

ここで、メディエータとして $[\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ を用いるとともに酸化還元酵素としてPQQGDHを用いた場合の電子伝達系統図を図4(a)に、メディエータとして $[\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ を用いるとともに酸化還元酵素としてGODを用いた場合の電子伝達系統図を図4(b)に示した。

図4(a)および(b)に示した例では、2つの端子部26b, 27bを介して第1および第2電極26, 27間に定電圧を印加した状態では、試薬層28に存在する還元型Ru(II)錯体が第1電極26の作用部26a側に移動し、この作用部26aに電子を放出して酸化型Ru(III)錯体となる。したがって、電圧印加部3により第1および第2電極26, 27間に定電圧を供給した状態では、還元型Ru(II)錯体から付与された電子量が第1電極26および第1接触子3aを介して電流測定部4において応答電流として測定される。この応答電流値は、電圧印加によって試薬層28を移動した還元型Ru(III)に由来する電子量に相関するものであり、いわゆる拡散電流と呼ばれるものである。

一方、電流値測定部4において測定された応答電流値は、検知部5においてモニタリングされており、図5に示したように、応答電流値が閾値 I_1 (たとえば2~3 μA)を超えた時点 t_0 で、検知部5は試薬層28にグルコース溶液が供給され、試薬層28が溶解したことを検知する。

検知部5がグルコース溶液が供給されたことを検知した場合には、制御部6が電圧印加部3を制御して、第1および第2電極26, 27間への電圧の印加を中止する。電圧印加を中止した状態では、還元型Ru錯体(II)は酸化されないから、酸化還元酵素によるグルコースの酸化反応およびメディエータの還元反応により、還元型Ru(II)錯体が蓄積されていく。一定時間(たとえば $t_1 - t_0 = 0 \sim 10$ 秒、さらに好ましくは0~3秒)の経過時点 t_1 において、制御部6の制御に基づいて、電圧印加部3により再び第1および第2電極26, 27間に定電位Vを印加する。なお、

検知部5がグルコース溶液が供給されたことを検知してからも電圧の印加を継続し、生成した還元型Ru(II)を逐次、作用部26aに移動させて拡散電流を測定してもよい。

5 このとき、図4(a), (b)に例示したように、還元型Ru(III)錯体が電子 e^- を放出して酸化型Ru(II)錯体となる。グルコース溶液中に還元型Ru(III)錯体の他に還元型物質が共存している場合には、これらの物質も印加電圧の値に応じた成分種

10 還元型Ru(III)錯体および他の還元型物質が放出した電子は、第1電極26の作用部26aに供給され、これが第1接触子3aを介して電流値測定部4において応答電流として測定される。したがって、実際に測定される応答電流値は、電圧印加時に還元型となっていた共存物質に由来する電子によるものを含んでいる。還元型とされた共存物質が電子を放出して酸化型となる確率(割合)は、第1および第2電極26, 27に印加する電圧の大小に依存しており、印加電圧が大きいほど電子を放出する共存物質の種類や個々の共存物質が放出する電子の総量が多くなる。

15 また、還元型Ru(III)錯体には酸化還元酵素との間の酸化還元反応により電子が与えられたものばかりでなく、水や光の曝露により還元型Ru(III)とされたものも含まれ得る。このため、実際に測定される応答電流値は、共存物質によるバックグラウンド電流や酵素反応以外からの電子に由来する還元型Ru(III)に起因したバックグラウンド電流が含まれていることが想定される。

20 これに対して、本実施の形態では、第1および第2電極26, 27に印加される定電位Vは、図5から明らかなように、検知部5が試薬層28にグルコース溶液が供給されたことを検知するまでに印加されていた定電位Vと同じ値である。すなわち、再印加の定電位Vは、フェリシアン化イオンの標準酸化還元電位よりも小さい100~350mVとされ、さらに好ましくは100~300mVとされる。本実施の形態では、

25 第1および第2電極26, 27間(試薬層28)に印加される電圧の値が、メディエータとしてフェリシアン化イオン(カリウム)を使用する場合に比べて小さくされている。このため、グルコース溶液として血液などを使用した場合に含まれるアスコルビン酸やグルタチオンなどといった還元型共存物質が、電圧印加によって酸化(電子を放出)してしまうことを抑制することができるようになる。これ

により、還元型共存物質の影響によるバックグラウンド電流を小さくできる。その結果、還元型共存物質による影響を考慮して実測値を補正しなくとも、精度良く濃度演算を行うことが可能となる。

また、Ru錯体は、還元型(III)に比べて酸化型(II)のほうが著しく安定であるため、5 照射や水分の存在下においても分解しにくく、その大部分は酵素反応により電子が付与されるまでは酸化型(II)として存在する。したがって、酵素反応以外からの電子により還元型とされたRu(III)錯体の割合が著しく小さく、この点からもバックグラウンド電流を小さくできる。このため、グルコースセンサ2を保存する際に水分の影響をさほど考慮する必要がなくなるため、窒素置換処理などを施して10 水分量を低減する必要がなくなる。その結果、グルコースセンサ2を工業的に量産する場合には、その分だけ製造が容易でコストに有利となる。

さらに、本実施の形態では、試薬層28の全体で生成された還元型Ru(II)錯体に基づく拡散電流を応答電流として測定している。つまり、図4(a)および(b)に示したような2つの酸化還元反応の双方が試薬層28の各所において起こるため、15 グルコース溶液を供給してから即時に、グルコース反応が終了する。そのため、グルコース濃度が600mg/dL程度であれば、応答電流値を測定する時点、たとえばグルコースを供給してから5秒も経てば、グルコース濃度に応じた量の酸化型Ru(III)錯体が還元型Ru(II)とされる。したがって、グルコース濃度が100mg/dLレベルであっても、応答電流値が μ Aレベルと相対的に大きいいため、電磁波などのノイズの影響を受けにくい。このため、電極面積を大きく確保するなどの工夫を講じるまでもなく、感度良くグルコース濃度を測定することができる。また、たとえば20 メディエータや酵素を電極に固定化して、電極の表面でのみ酵素の触媒反応を起こさせ、メディエータと電極との間で電子の授受を行って、そのときの電子移動量(触媒電流)を測定する場合には、高濃度の測定が困難となる。つまり、グルコースと電極との間の電子の授受に関する複数の反応のうち、1つでも他の25 反応に比べて反応が遅いものがあれば、その反応が律速段階となり、一定濃度以上のグルコースを供給したとしても、応答電流値が一定以上とはならない。そのため、グルコース濃度が比較的に大きな範囲での応答電流値が一定値に漸近し、高濃度の測定が困難となる。これに対して、拡散電流を測定する場合には、グル

コース反応が事実上終了した時点で応答電流値を測定するため、相対的に高濃度領域においても、適切にグルコース濃度を測定することができるようになる。

- 一方、演算部7では、第1および第2電極26, 27間に電圧を再印加して一定時間（たとえば $t_2 - t_1 = 3$ 秒以上、さらに好ましくは3～5秒）の経過時点 t_2 に
- 5 電流値測定部4において測定された応答電流 I_2 に基づいて、グルコース溶液中のグルコース濃度を演算する。グルコース濃度の演算は、応答電流値を電圧値に換算した後に、この電圧値を、予め作成しておいた電圧値とグルコース濃度との関係を示す検量線に当てはめることにより演算される。検量線は、たとえばデータ
- 10 納されたプログラムをCPUやRAMを利用して実行することによりグルコース濃度の演算が行われる。

実施例

- 以下においては、実施例1～8により、酵素反応を利用したグルコース濃度の
- 15 測定において、メディエータとしてRu錯体を用いた場合に、低電圧かつ短時間でグルコース濃度の測定が可能であること、グルコース溶液中に含まれる還元物質の影響が少ないこと、光や水に対する曝露耐性が高いこと、および試薬層の溶解性が高いことについて実証する。

20 (グルコースセンサの作成)

実施例1～8においては、基板上に図2および図3に示したような第1電極、第2電極、試薬層、および流路が形成されたグルコースセンサを使用した。第1および第2電極は、カーボンペーストを用いたスクリーン印刷により基板上に形成した。

- 25 実施例1～6では、2つのグルコースセンサについて比較した。一方は、本案グルコースセンサ1であり、他方は比較グルコースセンサ1である。これらのグルコースセンサでは、下記表1に示すように試薬層の処方が異なっている。これらの試薬層は、メディエータ、酸化還元酵素およびリン酸カリウム緩衝液からなる試薬1 μL を基板上に点着した後に乾燥させることにより形成した。

表 1

	試薬層の処方		
	メディエータ	酸化還元酵素	緩衝液 (pH7)
本案グルコース センサ 1	300mM [Ru(III) (NH ₃) ₆]Cl ₃	5000U/ml PQQGDH	50mM リン酸カリウム
比較グルコース センサ 1	300mM K ₃ [Fe(III) (CN) ₆]	5000U/ml PQQGDH	50mM リン酸カリウム

- 実施例 7 では、下記表 2 に示すように実施例 1 ~ 6 とは酸化還元酵素の種類
5 異なる 2 つ本案グルコースセンサ 2, 3 を用いた。試薬層以外の構成は、実施例
1 ~ 6 のグルコースセンサと同様である。なお、 α GDH および CyGDH については上
述した通りである。

表 2

	試薬層の処方		
	メディエータ	酸化還元酵素	緩衝液 (pH7)
本案グルコース センサ 2	300mM [Ru(III) (NH ₃) ₆]Cl ₃	600U/ml CyGDH	250mM リン酸カリウム
本案グルコース センサ 3	300mM [Ru(III) (NH ₃) ₆]Cl ₃	600U/ml α GDH	250mM リン酸カリウム

- 10 実施例 8 では、下記表 3 に示すように酸化還元酵素として GOD 使用した本案グル
コースセンサ 4 および比較グルコースセンサ 2 を用いた。試薬層以外の構成は、
実施例 1 ~ 6 のグルコースセンサと同様である。

表 3

	試薬層の処方		
	メディエータ	酸化還元酵素	緩衝液 (pH7)
本案グルコース センサ 4	300mM [Ru(III) (NH ₃) ₆]Cl ₃	5000U/ml GOD	50mM リン酸カリウム
比較グルコース センサ 2	300mM K ₃ [Fe(III) (CN) ₆]	5000U/ml GOD	50mM リン酸カリウム

15

[実施例 1]

本実施例では、CV波形を調べることによりグルコースセンサの電極応答特性を評価した。CV波形は、グルコースセンサの試薬層にグルコース溶液を点着した後に、掃引速度を50mV/secとし、印加電圧が0mV→+800mV→0mV→-800mV→0mV→+800mVとなるように掃引し、掃引時の応答電流を測定することにより調べた。

- 5 グルコース溶液としては、濃度が200mg/dLの標準液(グルコースを生理食塩水(0.9wt%NaCl)で溶解させて調整したもの)を使用した。試薬層へのグルコース溶液の点着量は1 μLとした。CV波形は図6に示した。

- 図6のCV波形からは、印加電圧が2回目に0mV→+800mVとされる範囲では、メ
10 ディエータとして[Ru(III)(NH₃)₆]Cl₃を使用した本案グルコースセンサ1では印加電圧が約100mVで応答電流値が最大となっているのに対して、K₃[Fe(III)(CN)₆]を使用
した比較グルコースセンサ1では印加電圧が300mV弱で応答電流値が最大とな
っていることが分かる。図6のCV波形は、メ
15 ディエータとして[Ru(III)(NH₃)₆]Cl₃を使用する場合には印加電圧を100mV以上に設定すれば還元型の略全てを酸化型に酸化でき、同様にK₃[Fe(III)(CN)₆]を使用する場合には印加電圧を300mV以上にす
る必要があることを意味している。各メ
15 ディエータの応答電流値が最大値となる印加電圧値は、各メ
15 ディエータの標準酸化還元電位に略一致している。

- したがって、メ
20 ディエータとして標準酸化還元電位の小さいRu錯体を用いれば、印加電圧を小さくしても適切なグルコース濃度の測定が可能であり、その場合には還元型共存物質によるバックグラウンド電流を小さくして精度良い測定が可能
20 になるといえる。

[実施例2]

- 本実施例では、低電圧(200mV)でグルコース濃度を正確に測定できるか否か検討
25 した。この検討に際して、本案グルコースセンサ1および比較グルコースセンサ1のそれぞれに対して、グルコース濃度が0mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、600mg/dLの4種類の標準液を用いて、印加電圧を500mVおよび200mVとした場合のそれぞれについて応答電流値を測定した。応答電流値は、第1および第2電極間に電圧を印加した状態を継続し、試薬層に対して標準液1 μLを点着してから5秒経過後に測定した。その結果を図7に示した。

図7から分かるように、印加電圧が500mVの場合には、本案グルコースセンサ1は、プロット点の群が高い直線性を示し、グルコース濃度が高い場合(400mg/dL以上)でも適切にグルコース濃度を測定できることを示している。これに対して、比較グルコースセンサ1では、グルコース濃度が高い場合(400mg/dL以上)に直線性が若干乱れているものの、全体としては直線性に優れている。

一方、印加電圧が200mVの場合には、本案グルコースセンサ1は、グルコース濃度が高い場合(400mg/dL以上)に直線性が若干乱れているものの、プロット点の群が高い直線性を示している。本案グルコースセンサ1の200mVでの直線性の乱れは、比較グルコースセンサ1の500mVの直線性の乱れよりも小さい。

10 このように、メディエータとしてRu錯体を用いた場合には、印加電圧が200mVという低電位でも、少なくともグルコース濃度が0~600mg/dLの範囲で適切にグルコース濃度の測定が行えることが確認された。したがって、メディエータとしてRu錯体を用いれば、濃度測定装置を低電圧を駆動することが可能となって、消費電力を低減してランニングコストの低減を図ることができるようになるといえる。

[実施例3]

本実施例では、グルコース濃度を適切に測定するのに必要な時間について検討した。この検討に当たっては、試薬層にグルコース濃度が400mg/dLの全血を1 μ L 20 点着した後から0秒、1秒、2秒または10秒経過した後に第1および第2電極間に対して500mVの電圧印加を開始し、電圧印加を継続した場合に測定される応答電流の経時的変化を測定した。その結果を図8および図9に示した。

図8からは、本案グルコースセンサ1では、電圧を印加する前の時間(非印加状態の時間)の長短にかかわらず、電圧印加開始から3秒後には個々の測定値が 25 一致していることが分かる。したがって、本案グルコースセンサでは、印加時間を3秒以上とすれば安定した測定結果が得られ、図9をも参照すれば分かるようにメディエータとしてFe錯体を使用する場合よりも印加時間を短くできるといえる。また、非印加状態の時間を余りに大きくしても実益がないことから、図8の結果を勘案すれば、本案グルコースセンサでは非印加状態の時間は10秒以下で足

り、グルコース溶液供給からグルコース濃度演算用の応答電流を測定するまでの時間は10~15秒も確保すれば十分であるといえる。したがって、図8および図9に示した結果からは、メディエータとしてRu錯体を使用した場合には、Fe錯体を使用する場合よりも測定時間が短くてよいことが分かる。

5

[実施例4]

本実施例では、還元型の共存物質の影響（バックグラウンド電流の影響）について検討した。本案グルコースセンサ1および比較グルコースセンサ1のそれぞれに対して、グルコース濃度が0mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、600mg/dLである4種類10の全血（グルコース濃度以外の成分は人血中の平均的な濃度に調整したもの）を用いて、印加電圧を500mVおよび250mVとした場合のそれぞれについて応答電流値を測定した。試薬層に対して全血1 μ Lを点着してから10秒間は非印加状態とし、その後、第1および第2電極間に対する電圧印加を開始してから5秒後に応答電流値を測定した。その結果を図10および図11に示した。

15 図10および図11から分かるように、比較グルコースセンサ1のほうが本案グルコースセンサ1よりも全体的に応答電流値が高くなっている。これは、比較グルコースセンサ1のほうが本案グルコースセンサ1よりも血液中の還元性共存物質の影響を大きく受け、そのバックグラウンド電流により応答電流値が大きくなっているものと考えられる。

20 ここで注目すべき点は、比較グルコースセンサ1についてはグルコース濃度が0mg/dLの場合であっても、応答電流が正の値として測定されていることである。この点からも、比較グルコースセンサ1の応答電流値が大きくなっている理由として、還元性共存物質によるバックグラウンド電流の影響によることが伺える。

25 ここで、グルコース濃度が0mg/dLの場合の応答電流値について、図12に棒グラフを示した。同図から分かるように、比較グルコースセンサ1では、グルコース濃度が0mg/dLでも比較的に大きな応答電流が測定されており、還元性共存物質の影響を大きく受けているものと考えられる。これに対して、本案グルコースセンサ1では、グルコース濃度が0mg/dLの場合には、測定される応答電流が小さく、還元性共存物質による影響が著しく低減されているといえる。したがって、メデ

ィエータとしてRu錯体を使用すれば、還元性共存物質による影響を考慮して補正するまでもなく、精度良く濃度演算を行うことが可能となる。

[実施例 5]

- 5 本実施例では、曝露耐性について評価した。この曝露耐性は、同時期に作成された本案グルコースセンサ 1 および比較グルコースセンサ 1 を相対湿度50%、温度25°Cに維持された恒温恒湿室内に放置した後に、グルコース濃度が 0mg/dLである標準液を用いて応答電流値を測定することにより評価した。応答電流値は、試薬層に標準液を点着してから10秒後に電極間に対する500mVの電圧印加を開始するとともに、電圧印加開始から 5 秒後に測定した。恒温恒湿室内への放置時間は、1 日および4 日とし、また恒温恒湿室内に放置する直前のもの(初期)およびモレキュラーシーブ(除湿剤) 6 g 入りのデシケータ(内容積0. 2L、初期設定相対湿度50 %、温度25°C)に密閉した状態で相対湿度50%、温度25°Cに維持された恒温恒湿室内に4日間放置した後のもの(密閉4日)についても同様な条件で応答電流値を測定した。その結果を図13に示した。
- 10
- 15

- 図13から分かるように、全ての環境設定において、本案グルコースセンサ 1 のほうが比較グルコースセンサ 1 よりも応答電流が著しく小さく、その値は全ての環境設定において同じ程度である。したがって、メディエータとしてRu錯体を使用した場合には、曝露環境下でも試薬層の劣化(還元)が少なく保存安定性に優れ、長期間劣化しにくいものと予想される。したがって、メディエータとしてRu錯体を使用すれば、グルコースセンサの保存するために水分による暴露の影響をさほど考慮する必要がなくなる。そのため、グルコースセンサを工業的に量産し、それを包装する場合には、包装内に窒素置換処理などを施す必要がなくなるために、製造が容易となってコストの低減を図ることができるようになる。
- 20

25

[実施例 6]

本実施例では、試薬層の溶解性を検討した。試薬層の溶解性の検討に際して、本案グルコースセンサ 1 および比較グルコースセンサ 1 のそれぞれに対して、グルコース濃度が 0mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、600mg/dLの4種類の標準液を用い

て、印加電圧を500mVとした場合について応答電流値を測定した。応答電流は、試薬層に対して標準液1 μ Lを点着してから10秒間は非印加状態とし、その後、第1および第2電極間に対する電圧印加開始してから5秒後に測定した。その結果を図14に示した。図14には、比較グルコースセンサ1に対して、分散剤としての無機ゲルをFe錯体100重量部に対して1重量部となるように添加した場合の結果も同時に示した。

図14から分かるように、本案グルコースセンサ1は、グルコース濃度が大きい場合であっても直線性に優れている。このことは、グルコース濃度の如何にかかわらず、標準液の供給から15秒という時間内に試薬層が良好に溶解していることを意味している。

したがって、メディエータとしてRu錯体を使用すれば、試薬層の溶解性に優れ、試薬層全体が均一な反応系を形成することができる結果、グルコース濃度が相対的に高いグルコース溶液についても、分散剤を用いるなどして対応するまでもなく、短時間で精度良くグルコース濃度を測定できるようになる。

15

[実施例7]

本実施例では、上記表2に示した処方で形成された試薬層を有する本案グルコースセンサ2および本案グルコースセンサ3について、濃度の異なる4種類(0 mg/dL、200mg/dL、400mg/dL、600mg/dL)の全血での応答電流値を測定した。その結果を図15に示した。図15には、実施例1～6と同様な構成の本件グルコースセンサ1について、同一の条件により応答電流値を測定した結果を同時に示した。

図15から分かるように、酸化還元酵素としてCyGDHあるいは α GDHを用いた本案グルコースセンサ2および本案グルコースセンサ3においても、200mVという低電圧の印加で、しかも印加開始から5秒という短時間に、比較的到低濃度から高濃度に至るまで適切に濃度測定を行うことができる。また、図15からは、これらのグルコースセンサでは、バックグラウンド電流が小さいことも伺える。したがって、メディエータとしてRu錯体を用いれば、種々のGDHについて、実施例1ないし6で記載した効果を享受できるといえる。

25

[実施例 8]

本実施例では、酸化還元酵素としてGODを用いるとともにメディエータとしてRu錯体を用いた本案グルコースセンサ4と、酸化還元酵素としてGODを用いるとともにメディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いた比較グルコースセンサ2

5 について、実施例7と同様にして応答電流値を測定した。その結果を図16に示した。

図16から分かるように、GODとRu錯体とを組み合わせただけの場合であっても、実施例1ないし6で使用した本案グルコースセンサ1と同様に、比較的グルコース濃度が高い場合であっても直線性に優れ、バックグラウンド電流が小さいといえる。

10 したがって、GODとRu錯体とを組み合わせただけの場合であっても、実施例1ないし6に記載した効果を享受できるといえる。

以上に説明したように、本発明では、短い測定時間で、比較的測定対象物の濃度が低い試料液から比較的濃度が高い試料液に至るまで、還元性共存物質の

15 影響を低減しつつ、試薬層の溶解性を十分に確保して正確に試料液中の測定対象物の濃度を測定できるようになる。

請 求 の 範 囲

1. 測定対象物、酸化還元酵素、および電子伝達物質を含む反応系を構築し、電気化学的手法を利用して測定対象物の濃度を測定する方法であって、
- 5 上記電子伝達物質として、Ru化合物を使用することを特徴とする、測定対象物の濃度測定方法。
2. 上記反応系において、Ru化合物の還元体を生成させる第1ステップと、
上記反応系に対して電圧を印加して上記還元体を酸化するとともに、そのと
10 きに上記還元体が放出した電子の量に相関する応答電流値を測定する第2ステップと、
この第2ステップにおいて測定された応答電流値に基づいて、測定対象物の濃度を演算する第3ステップと、
を含む、請求項1に記載の測定対象物の濃度測定方法。
- 15
3. 上記Ru化合物は、酸化型Ru(III)錯体であり、その還元体は、還元型Ru(II)錯体である、請求項2に記載の測定対象物の濃度測定方法。
4. 上記酸化型Ru(III)錯体は、下記化学式に示すものである、請求項3に記載の
20 測定対象物の濃度測定方法。
- $$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{X}]^{n+}$$
- (上記化学式におけるXは、NH₃またはハロゲンイオンであり、上記化学式におけるn+は、Xの種類により決定される酸化型Ru(III)錯体の価数を表している。)
- 25 5. 上記第1ステップでは、上記酸化還元酵素により触媒される測定対象物の酸化反応および酸化型Ru(III)錯体の還元反応の2つの反応のみにより、上記還元型Ru(II)錯体が生成される、請求項3に記載の測定対象物の濃度測定方法。
6. 上記反応系は、相対的に量の多い上記酸化型Ru(III)錯体に対して、相対的に

量の少ない上記酸化還元酵素を略均一に分散させた均一または略均一な液相反応系である、請求項3に記載の測定対象物の濃度測定方法。

7. 上記測定対象物はグルコースである、請求項1に記載の測定対象物の濃度測定方法。

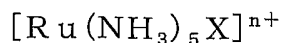
8. 基板と、この基板上に形成された少なくとも第1電極および第2電極と、固体状に形成された試薬層と、を備えた濃度測定用具であって、
上記試薬層は、酸化還元酵素およびRu化合物を含み、かつ測定対象物を含む試料液が供給されたときに溶解して液相反応系を構築するように構成されていることを特徴とする、濃度測定用具。

9. 上記試薬層は、試料液が供給された場合に、上記液相反応系において酸化還元酵素とRu化合物とが共存するように構成されている、請求項8に記載の濃度測定用具。

10. 上記試薬層は、上記Ru化合物を酸化体として含んでおり、かつ、上記試薬層に試料液が供給された場合において、上記酸化還元酵素により触媒される上記測定対象物の酸化反応および上記Ru化合物の還元反応の2つの反応のみにより、上記酸化体から還元体となるように構成されている、請求項8に記載の濃度測定用具。

11. 上記試薬層は、上記液相反応系の各所において略均一に上記還元体が生成されるように構成されている、請求項10に記載の濃度測定用具。

12. 上記Ru化合物は、下記化学式に示すものである、請求項8に記載の濃度測定用具。



(上記化学式におけるXは、NH₃またはハロゲンイオンであり、上記化学式におけ

る $n+$ は、 X の種類により決定される酸化型Ru(III)錯体の価数を表している。)

13. 上記測定対象物は、グルコースである、請求項8に記載の濃度測定用具。
- 5 14. 上記酸化還元酵素は、PQQGDH、 α GDH、およびCyGDHからなる群より選択される少なくとも1つである、請求項13に記載の濃度測定用具。
15. 試薬層、第1電極および第2電極を有し、かつ上記試薬層が酸化還元酵素とRu化合物を含む濃度測定用具を装着して使用し、
- 10 上記第1電極および上記第2電極との間に電圧を印加するための電圧印加手段と、
上記第1電極と上記第2電極との間に電圧を印加したときの応答電流値を測定する電流値測定手段と、
上記応答電流値に基づいて測定対象物の濃度を演算する演算手段と、
- 15 を備えたことを特徴とする、濃度測定装置。
16. 上記電圧印加手段における電圧印加動作を制御するための制御手段をさらに備え、
上記制御手段は、上記電圧印加手段により印加される電圧を、100~500mVの
- 20 範囲から選択される定電圧に制御するように構成されている、請求項15に記載の濃度測定装置。
17. 上記電圧印加手段における電圧印加動作を制御するための制御手段をさらに備え、
- 25 上記制御手段は、上記電圧印加手段により印加される電圧を、上記Ru化合物の酸化体と還元体との間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)以上で、フェロシアン化イオンとフェリシアン化イオンとの間の標準酸化還元電位(vs. 標準水素電極)よりも小さい範囲から選択される定電圧に制御するように構成されている、請求項15に記載の濃度測定装置。

18. 上記電流測定部における電流値測定動作を制御するための制御手段をさらに備え、

- 上記制御手段は、上記演算手段における演算に必要な応答電流値を、上記試
- 5 薬層に試料液が供給されてから3～5秒後の範囲におけるいずれかの時点において上記電流値測定手段に測定させるように構成されている、請求項15に記載の濃度測定装置。

FIG.1

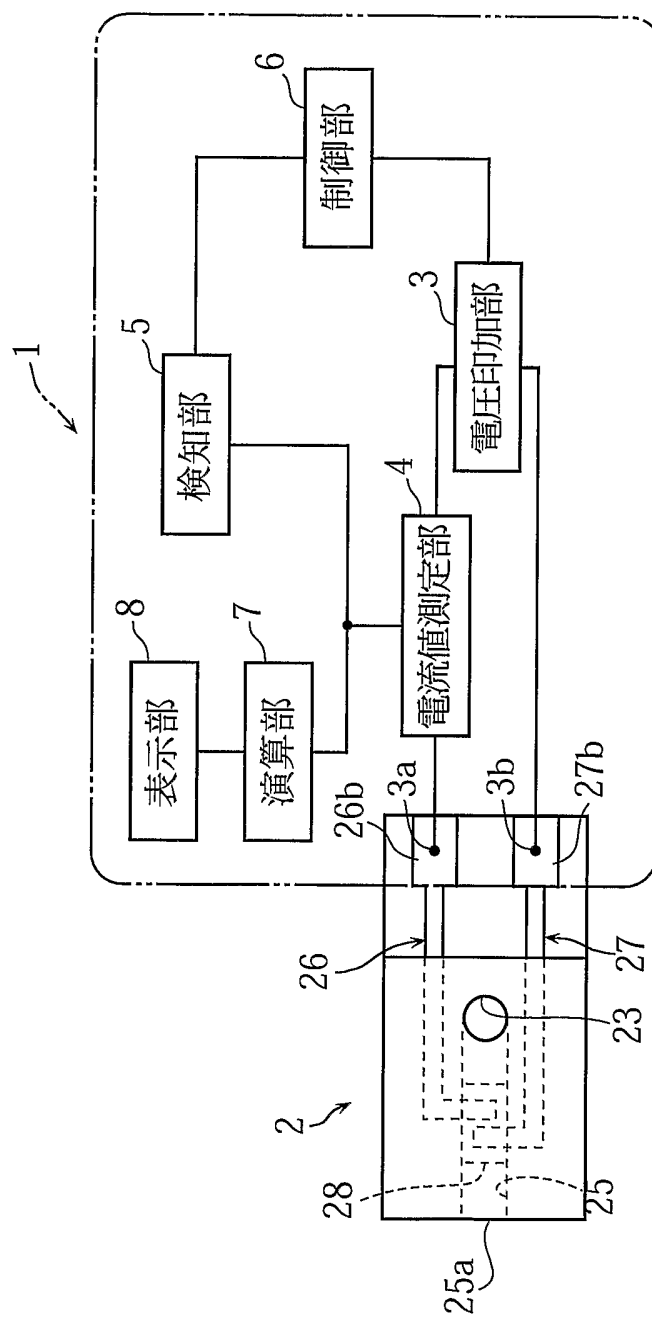


FIG.2

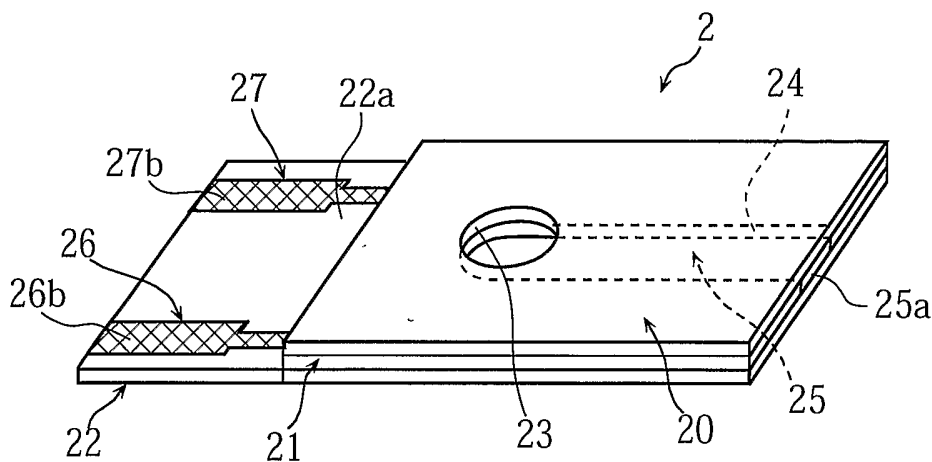


FIG.3

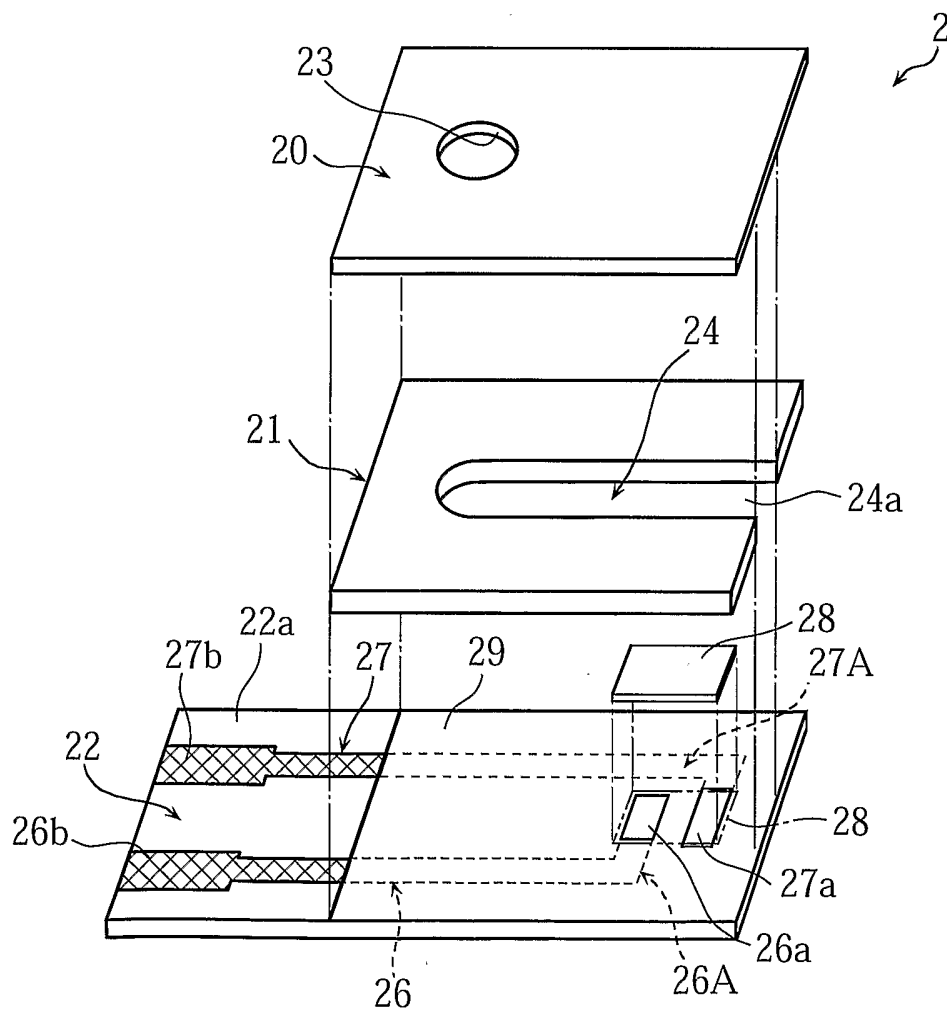


FIG.4A

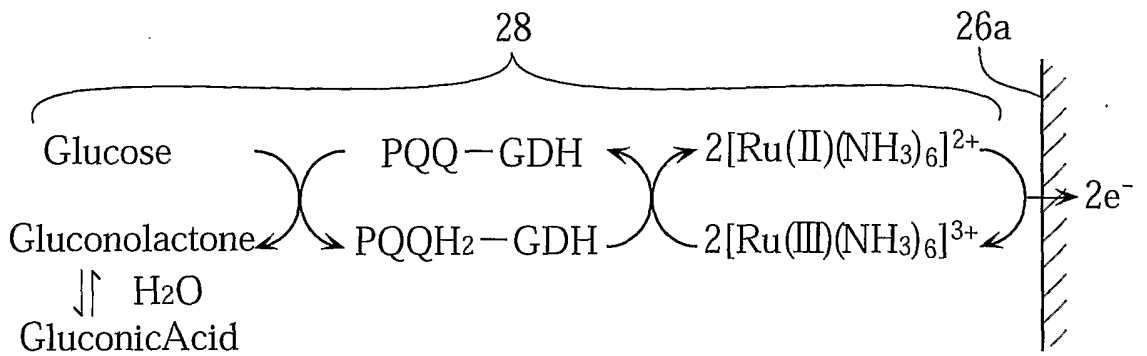


FIG.4B

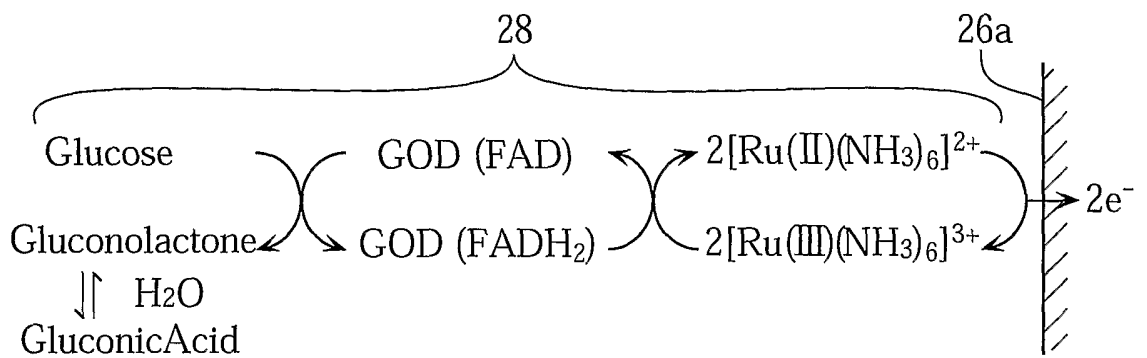


FIG.5

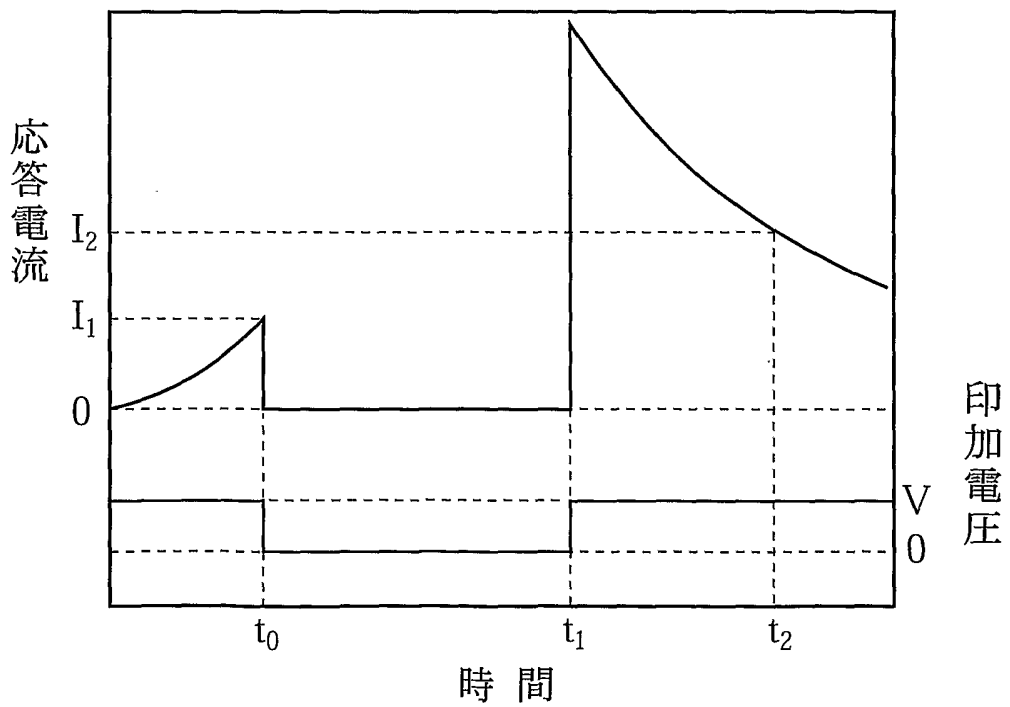


FIG.6

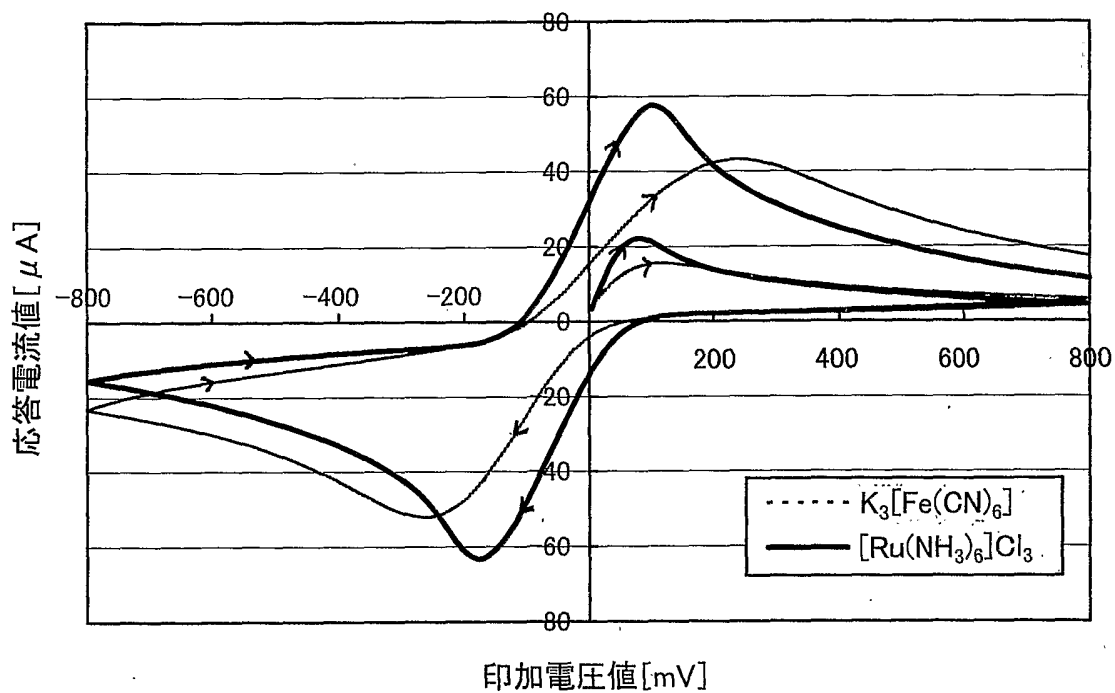


FIG.7

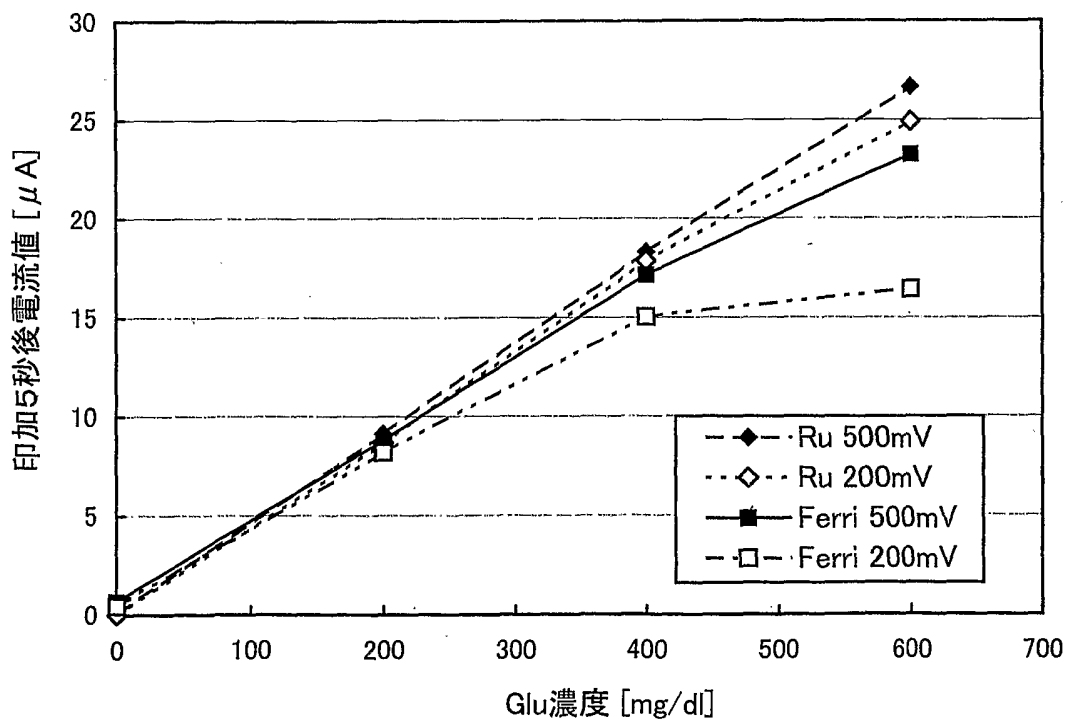


FIG.8

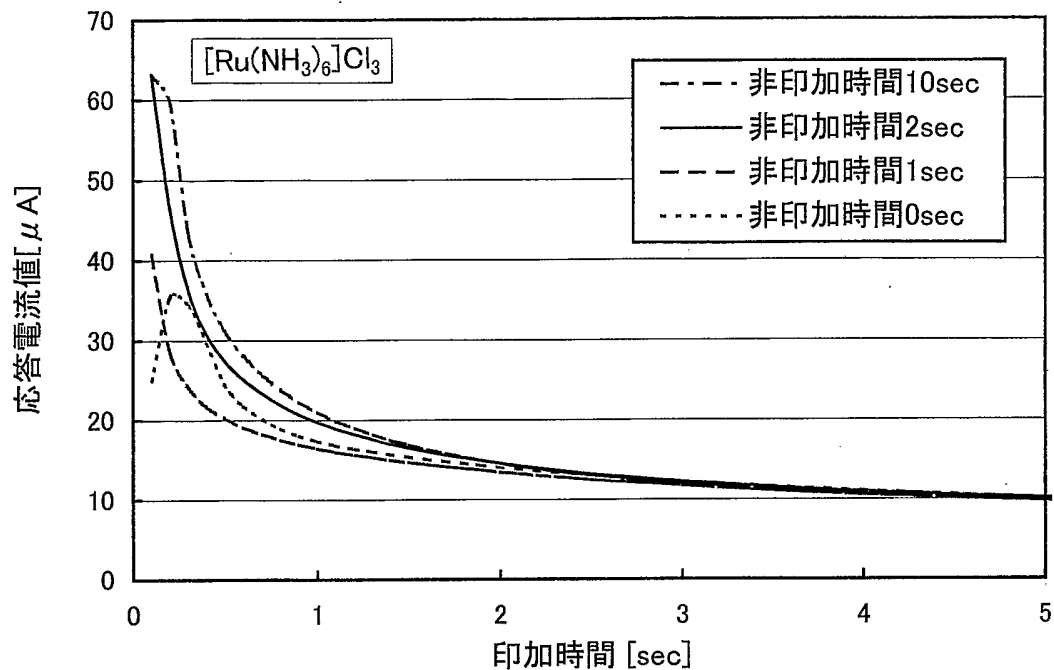


FIG.9

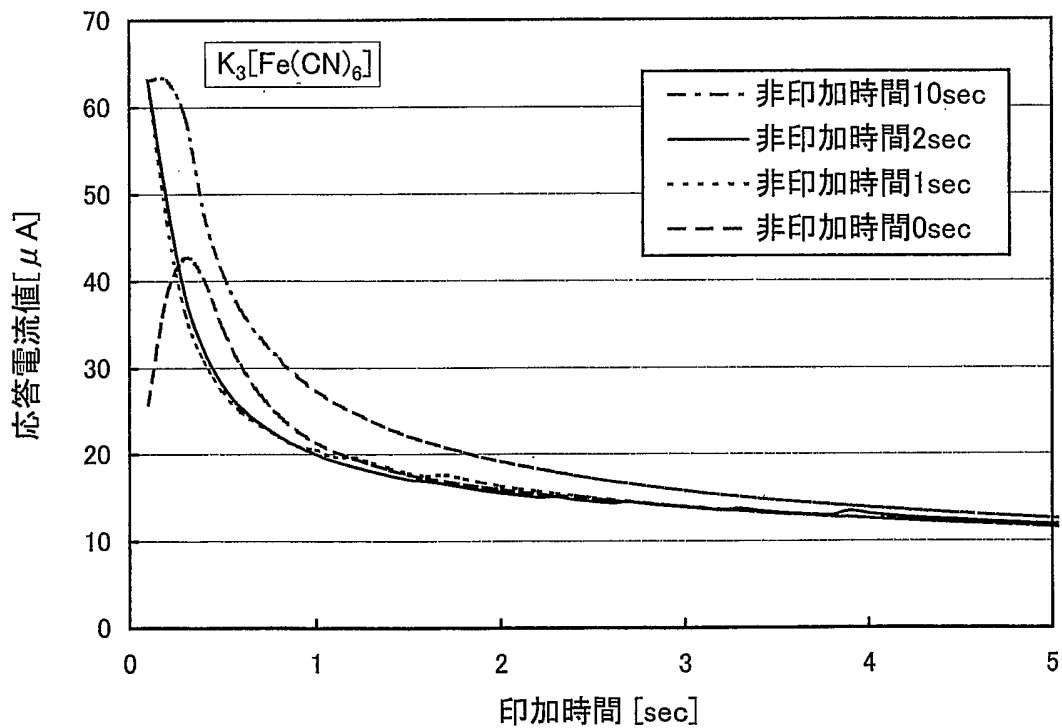


FIG.10

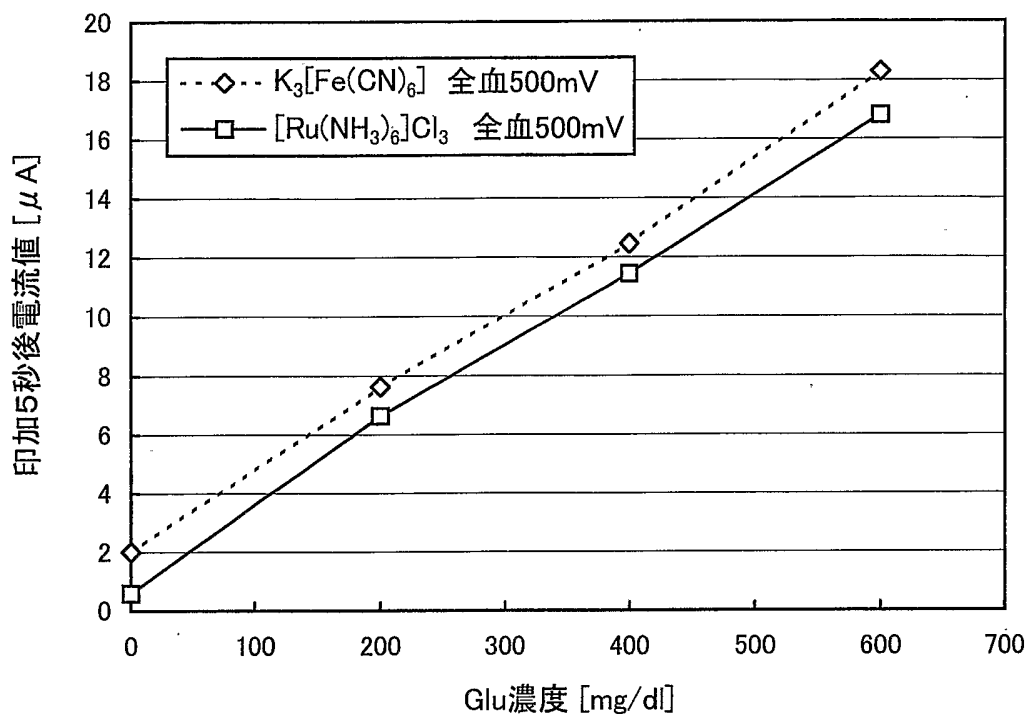


FIG.11

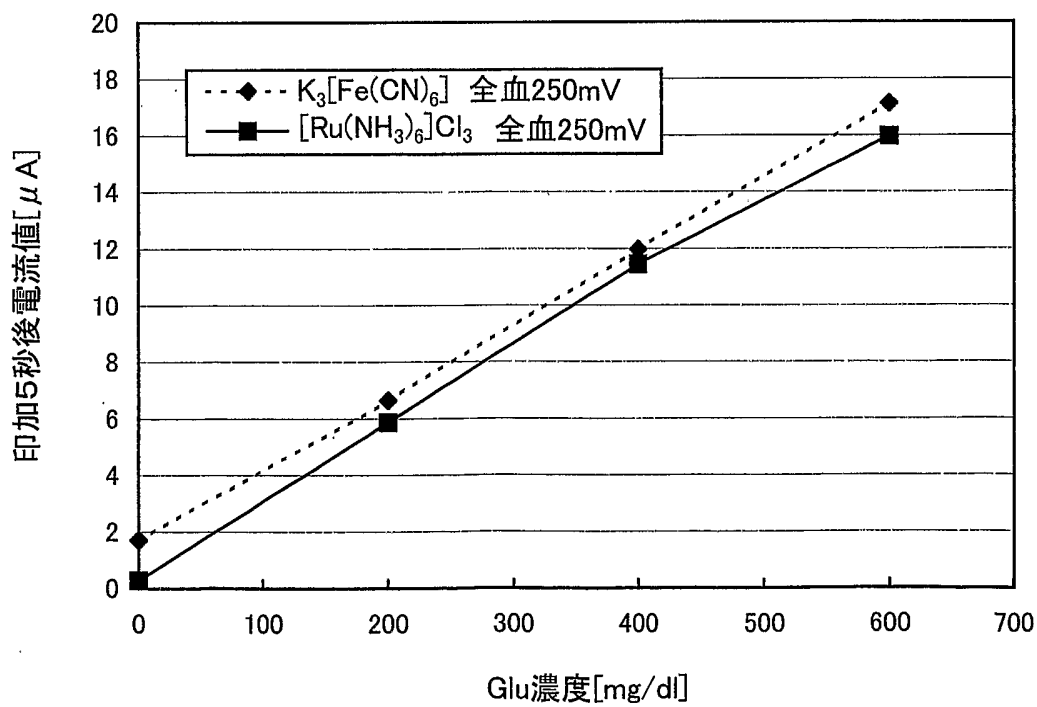


FIG.12

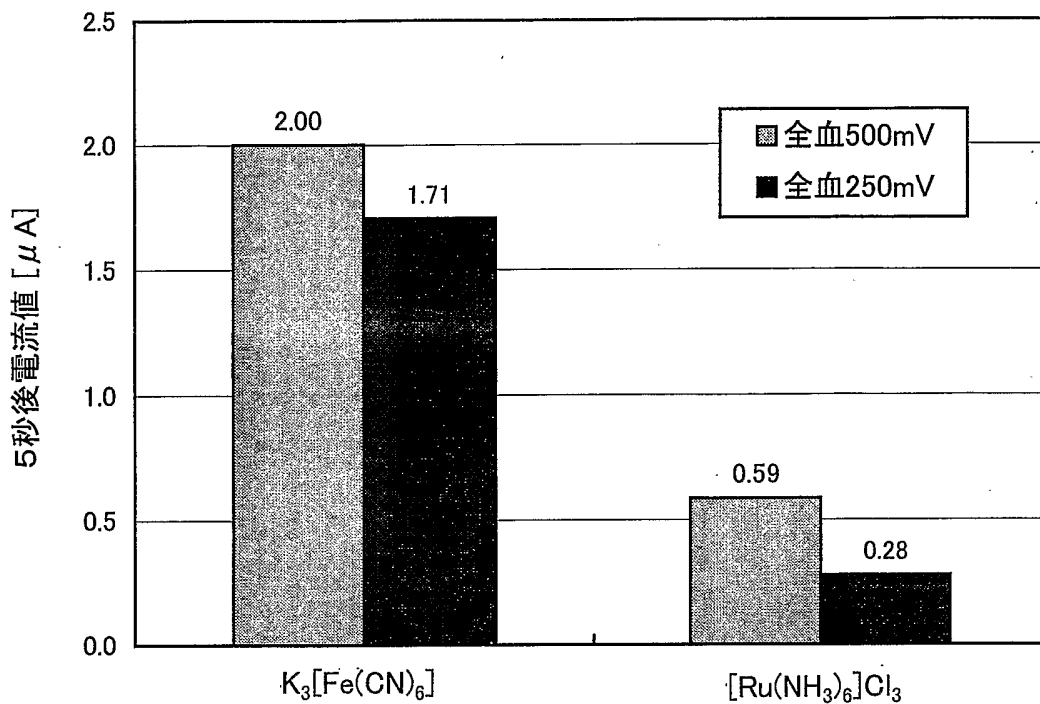


FIG.13

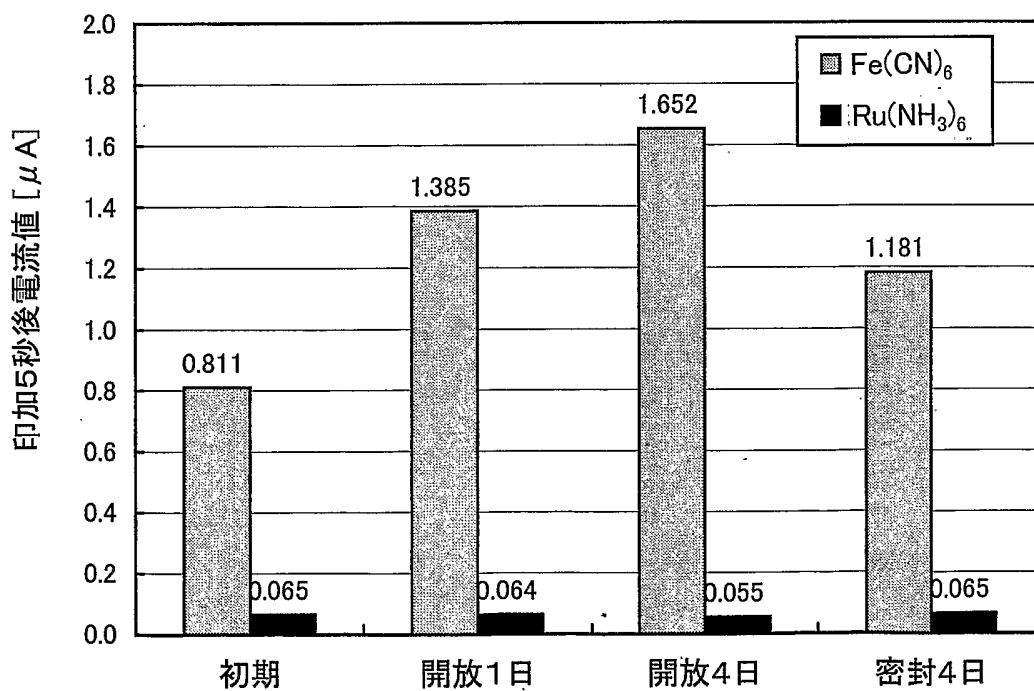


FIG.14

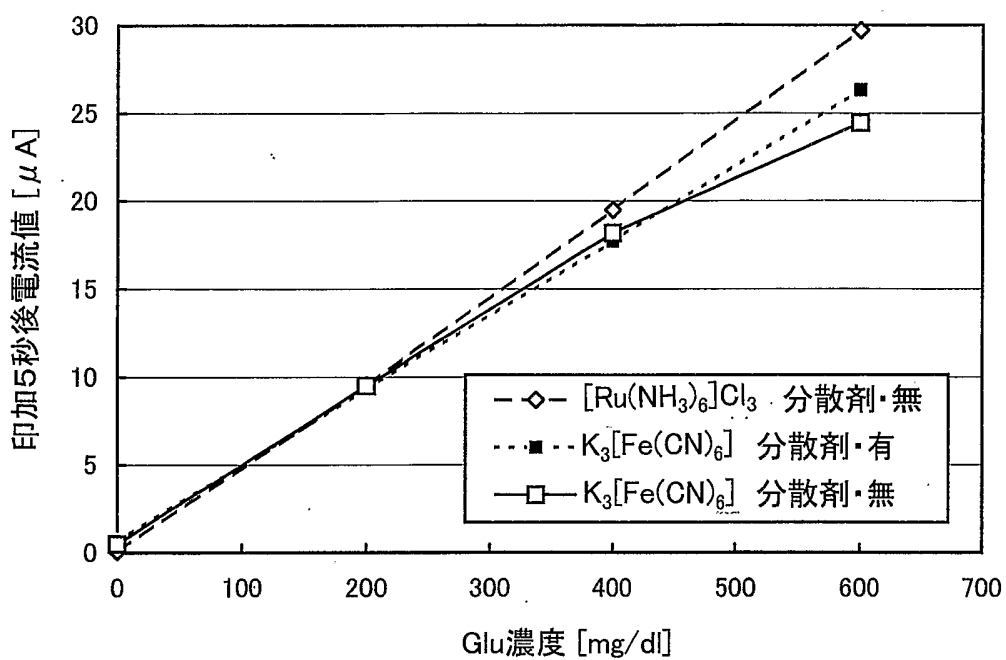


FIG.15

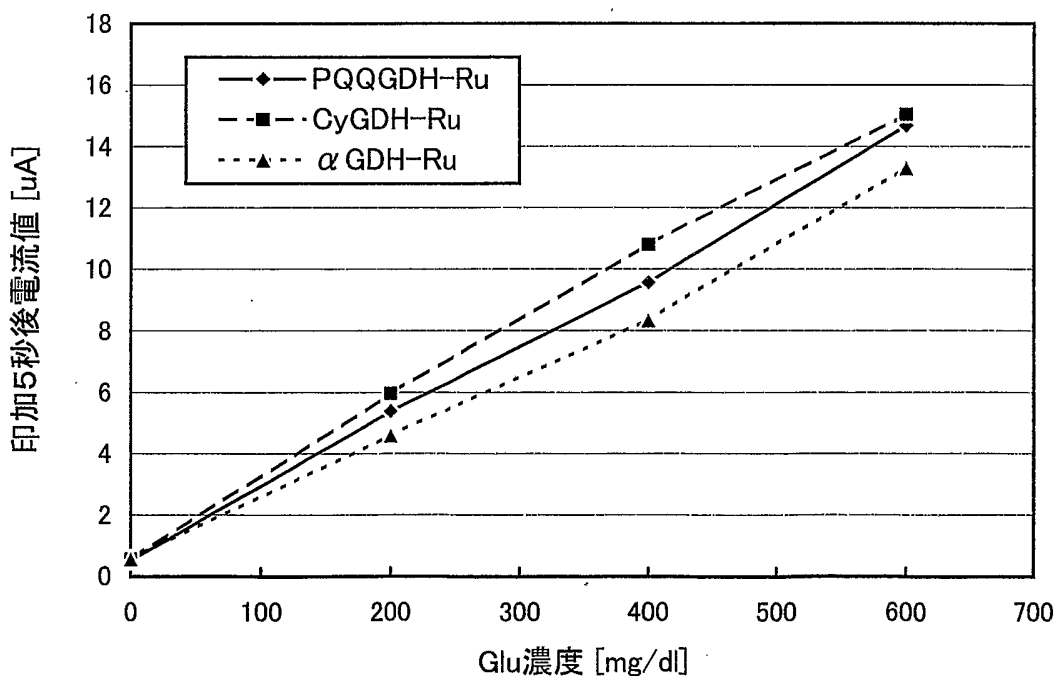
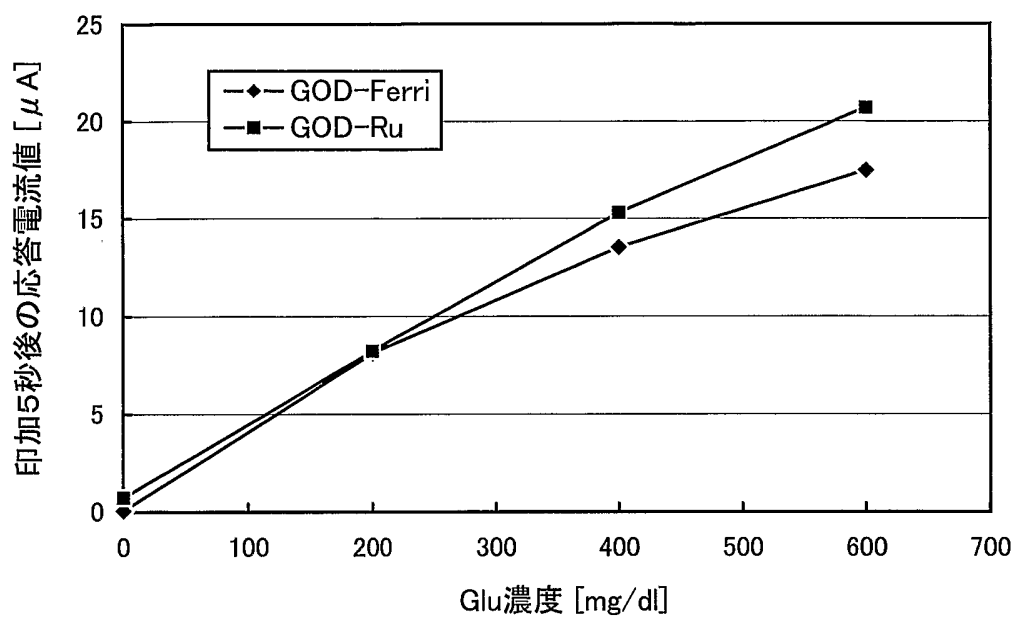


FIG.16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N27/26-27/49, C12Q1/00-3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 62-501932 A (GENETICS INTERNATIONAL INC.), 30 July, 1987 (30.07.87), Table 3 Table 1 Full text; Figs. 1 to 10 & GB 8504522 A & AU 5516686 A & WO 86/4926 A1 & GB 2173313 A & EP 229765 A & CA 1239191 A	1 14 2-7, 8-13, 15-18
X Y A	JP 2000-262297 A (Toyobo Co., Ltd.), 26 September, 2000 (26.09.00), Par. No. [0016] Par. No. [0024] Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	1, 7 14 2-6, 8-13, 15-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 November, 2002 (29.11.02)	Date of mailing of the international search report 17 December, 2002 (17.12.02)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08855

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-312588 A (Koji HAYA'IDE), 14 November, 2000 (14.11.00), Full text; Figs. 1 to 3 & WO 00/66744 A1 & EP 1176202 A	14
X	JP 1-156658 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 20 June, 1989 (20.06.89), Full text; Figs. 1 to 4	1-3,5-7, 8-11,13,15
Y	Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	4,12,14, 16-18
X	N.A. Moris, M.f. Cardosi, B.J. Brich, A.P.F. Turner An Electrochemical Capillary Fill Device for the Analysis of Glucose Incorporating Glucose Oxidase and Ruthenium(III)Hexamine as Mediator. Electroanalysis 1992, Vol.4, No.1, pages 1 to 9 Full text; all drawings	1-13,15
Y	Full text; all drawings	14,16-18
X	JP 9-222410 A (Asulab S.A), 26 August, 1997 (26.08.97), Full text; Figs. 1 to 2	1-3,5-7, 8-11,13
Y	Full text; Figs. 1 to 2 & AU 1018697 A & DE 69700169 C & FR 2744219 A1 & CA 2196391 A & EP 787984 A1 & AU 7079747 B	4,12,14
X	JP 2-231558 A (Terumo Corp.), 13 September, 1990 (13.09.90), Full text; Figs. 1 to 5	1-7
Y	Full text; Figs. 1 to 5 & US 5205920 A1	12
Y	JP 8-320304 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 03 December, 1996 (03.12.96), Par. Nos. [0026] to [0029]; Figs. 1 to 8 & EP 732406 A1 & CA 2153350 A & US 5582697 A & US 5650062 A	16,17
Y	JP 2000-180399 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 30 June, 2000 (30.06.00), Par. Nos. [0020] to [0026] (Family: none)	16,17
Y	JP 3-287064 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 17 December, 1991 (17.12.91), Page 2, lower left column, line 6 to page 3, upper left column, line 4 (Family: none)	16-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08855

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 8-271472 A (Masao KARUBE, Dainippon Printing Co., Ltd.), 18 October, 1996 (18.10.96), Full text; all drawings Full text; all drawings (Family: none)	1-3,5-7 8-11,13,15
P,X	JP 2002-90331 A (A'isensu Inc.), 27 March, 2002 (27.03.02), Full text; all drawings (Family: none)	1-3,5-7, 8-11,13,15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/327

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/26-27/49, C12Q1/00-3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 62-501932 A(ジエネテイツク・インターナショナル・インコーポレーテッド) 1987.07.30	1
Y	第3表	14
A	第1表 全文、第1-10図	2-7, 8-13, 15-18
	& GB 8504522 A & AU 5516686 A & WO 86/4926 A1 & GB 2173313 A & EP 229765 A & CA 1239191 A	

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.11.02

国際調査報告の発送日

17.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

黒田 浩一



2J 9218

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-262297 A (東洋紡績株式会社) 2000. 09. 26 段落番号【0016】	1, 7
Y	段落番号【0024】	14
A	全文、第1-4図 (ファミリーなし)	2-6、8-13、 15-18
Y	JP 2000-312588 A(早出広司) 2000. 11. 14 全文、第1-3図 & WO 00/66744 A1 & EP 1176202 A	14
X	JP 1-156658 A(松下電器産業株式会社) 1989. 06. 20 全文、第1-4図	1-3, 5-7, 8-11, 13, 15
Y	全文、第1-4図 (ファミリーなし)	4, 12, 14, 16-18
X	N. A. Moris, M. f. Cardosi, B. J. Birch, A. P. F. Turner An Electrochemical Capillary Fill Device for the Analysis of Glucose Incorporating Glucose Oxidase and Ruthenium(III)Hexamine as Mediator. Electroanalysis 1992, Vol. 4, No. 1, pages 1-9 全文、全図	1-13, 15
Y	全文、全図	14, 16-18
X	JP 9-222410 A(アスラブ ソシエテ アノニム) 1997, 08, 26 全文、第1-2図	1-3, 5-7, 8-11, 13
Y	全文、第1-2図 & AU 1018697 A & DE 69700169 C & FR 2744219 A1 & CA 2196391 A & EP 787984 A1 & AU 7079747 B	4, 12, 14
X	JP 2-231558 A(テルモ株式会社) 1990. 09. 13 全文、第1-5図	1-7
Y	全文、第1-5図 & US 5205920 A1	12
Y	JP 8-320304 A(松下電器産業株式会社) 1996. 12. 03 段落番号【0026】 - 【0029】、第1-8図 & EP 732406 A1 & CA 2153350 A & US 5582697 A & US 5650062 A	16, 17
Y	JP 2000-180399 A(株式会社京都第一科学) 2000. 06. 30 段落番号【0020】 - 【0026】 (ファミリーなし)	16, 17

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 3-287064 A(松下電器産業株式会社) 1991. 12. 17 第2頁左下欄第6行～第3頁左上欄第4行 (ファミリーなし)	16-18
X	JP 8-271472 A(軽部征夫、第日本印刷株式会社) 1996. 10. 18 全文、全図	1-3, 5-7
Y	全文、全図 (ファミリーなし)	8-11, 13, 15
P X	JP 2002-90331 A(アイーセンス、インコーポレーティッド) 2002. 03. 27 全文、全図 (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 8-11, 13, 15