

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-267059

(P2006-267059A)

(43) 公開日 平成18年10月5日(2006.10.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 3 1 1 K	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 E	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 B	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C	
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-89574 (P2005-89574)
 (22) 出願日 平成17年3月25日 (2005.3.25)

(出願人による申告) 平成16年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究「健康安心プログラム 早期診断・短期回復のための高度診断・治療システム 心疾患治療システム機器の開発」、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 301021533
 独立行政法人産業技術総合研究所
 東京都千代田区霞が関1-3-1
 (72) 発明者 丹羽 修
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 (72) 発明者 佐藤 縁
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 (72) 発明者 栗田 僚二
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 (72) 発明者 松浦 宏昭
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 最終頁に続く

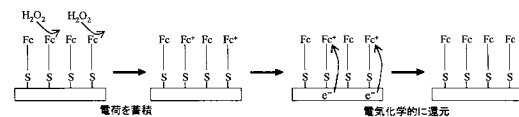
(54) 【発明の名称】 過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法、免疫化学測定法及びこれらの装置

(57) 【要約】

【課題】電気化学法の簡便性を活かし、さらに高感度化を図るものであり、すなわち簡便な汎用の電気化学装置で、従来達成不可能であった高感度な過酸化水素濃度、酸化酵素活性、抗原濃度の測定を可能とすることを目的とする。

【解決手段】電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定することを特徴とする過酸化水素の濃度測定法。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定することを特徴とする過酸化水素の濃度測定法。

【請求項 2】

過酸化水素濃度の検出を行うことにより酸化酵素の活性を測定する方法であって、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定し、該過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定することを特徴とする酵素活性測定法。

10

【請求項 3】

過酸化水素濃度の検出を行うことにより酸化酵素の活性を測定し、該酸化酵素を抗体分子に対する標識酵素として抗原濃度を求める免疫化学測定法であって、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定し、該過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定し、抗原抗体反応後に抗原と結合した又は未結合の抗体量を前記測定された酸化還元酵素活性から求め、それによって抗原濃度を求めることを特徴とする免疫化学測定法。

20

【請求項 4】

過酸化水素の濃度を測定するに際して、過酸化水素含有試料溶液中又は酸化還元活性種の薄膜中に過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質を含有させることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

30

【請求項 5】

過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質が、ヘミン等の金属 - ポルフィリン類化合物、若しくはこれらを含むマイクロペルオキシターゼ等のオリゴペプチド、西洋ワサビペルオキシターゼなどの酵素であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

【請求項 6】

酸化還元活性種の還元型が、フェロセン及びその誘導体若しくは前記構造を含む高分子化合物、ヒドロキノン及びその誘導体若しくはこれらの構造を含む高分子化合物、又はポリビニルピリジンのオスミウム錯体若しくはこの構造を含む高分子であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

40

【請求項 7】

電子伝導体基板上に、自己組織化法、スピンコート法、キャスト法によって酸化還元活性種の薄膜を形成することを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

【請求項 8】

電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液、これを電解質溶液中に移して作用電極とし、該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電

50

電気化学測定セルを備え、該電気化学測定セルは前記作用電極、参照電極、対向電極を有し、各電極が電位を規制するためのポテンシostatに接続されていることを特徴とする過酸化水素の濃度測定装置。

【請求項 9】

電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液を備え、該溶液は測定対象の酸化酵素、過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質及び酵素の基質を含有し、前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とし、その該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを備え、該電気化学測定セルは前記作用電極、参照電極、対向電極を有し、各電極が電位を規制するためのポテンシostatに接続されていることを特徴とする酵素活性測定装置。

10

【請求項 10】

電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液を備え、該溶液は測定対象の酸化酵素、過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質及び酵素の基質を含有し、前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とし、該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを備え、該電気化学測定セルは前記作用電極、参照電極、対向電極を有し、各電極が電位を規制するためのポテンシostatに接続されており、電気化学セル中で測定された過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定し、さらに酸化酵素を標識酵素とする抗体を用いた抗原抗体反応を行い、反応後に抗原と結合した又は未結合の抗体量を酸化還元酵素活性から求め、この抗体量から抗原濃度を求めることを特徴とする免疫化学測定装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、過酸化水素濃度を高感度に測定が可能である、特に過酸化水素を生成物として与える酸化酵素の活性を高感度に測定ができ、免疫化学測定法に有用である過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法、免疫化学測定法及びこれらの装置に関する。

30

【背景技術】

【0002】

過酸化水素の高感度測定法として、現在利用されているものに化学発光法がある。この方法は鉄錯体などの触媒存在下で過酸化水素とルミノールが反応する際に発光することを利用して利用している。しかし、この方法は、発光効率を高くするためにアルカリ性中で反応を行わせねばならず、取り扱い及び廃液の処理等の点で問題を残す。

一方、電気化学法（電流測定法）は簡便であり、比較的高感度であるが、従来の検出下限濃度は、通常 10^{-7} M程度までに留まる。

【0003】

40

過酸化水素の電流測定による分析において、高感度化を図る場合、通常過酸化水素の電極反応に対する触媒活性が高い白金を電極材料として用いることが多い（例えば、特許文献1参照）。他の電極材料を用いる場合、例えばフェロセン等のメディエータを利用して電流の増大、高感度化を図ることが行われる（例えば、特許文献2参照）。

しかし、従来の方法では、電極上での還元電流は過酸化水素濃度と数mMまで正の相関を持つものの、検出下限濃度は $1\mu\text{M}$ ($S/N=3$)程度に留まるという問題があった。

【特許文献1】特開平8-338824号公報

【特許文献2】特開平11-64271号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0004】

本発明は、上記の問題点を解決することを目的とし、電気化学法の簡便性を活かし、さらに高感度化を図るものであり、すなわち簡便な汎用の電気化学装置で、従来達成不可能であった高感度な過酸化水素濃度、酸化酵素活性、抗原濃度の測定を可能とすることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記の課題に鑑み、次の新規発明を提供する。

(1) 電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定することを特徴とする過酸化水素の濃度測定法。

10

(2) 過酸化水素濃度の検出を行うことにより酸化酵素の活性を測定する方法であって、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定し、該過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定することを特徴とする酵素活性測定法。

20

(3) 過酸化水素濃度の検出を行うことにより酸化酵素の活性を測定し、該酸化酵素を抗体分子に対する標識酵素として抗原濃度を求める免疫化学測定法であって、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定し、該過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定し、抗原抗体反応後に抗原と結合した又は未結合の抗体量を前記測定された酸化還元酵素活性から求め、それによって抗原濃度を求めることを特徴とする免疫化学測定法。

(4) 過酸化水素の濃度を測定するに際して、過酸化水素含有試料溶液中又は酸化還元活性種の薄膜中に過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質を含有させることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

30

(5) 過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質が、ヘミン等の金属-ポルフィリン類化合物、若しくはこれらを含むマイクロペルオキシターゼ等のオリゴペプチド、西洋ワサビペルオキシターゼなどの酵素であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

(6) 酸化還元活性種の還元型が、フェロセン及びその誘導体若しくは前記構造を含む高分子化合物、ヒドロキノン及びその誘導体若しくはこれらの構造を含む高分子化合物、又はポリビニルピリジンのオスミウム錯体若しくはこの構造を含む高分子であることを特徴とする上記(1)～(5)のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

40

(7) 電子伝導体基板上に、自己組織化法、スピンコート法、キャスト法によって酸化還元活性種の薄膜を形成することを特徴とする上記(1)～(6)のいずれかに記載の過酸化水素の濃度測定法、酵素活性測定法又は免疫化学測定法。

【0006】

また、本願は、次の新規発明を提供する。

(8) 電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液、これを電解質溶液中に移して作用電極とし、該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又は

50

ステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを備え、該電気化学測定セルは前記作用電極、参照電極、対向電極を有し、各電極が電位を規制するためのポテンシオスタットに接続されていることを特徴とする過酸化水素の濃度測定装置。

(9) 電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液を備え、該溶液は測定対象の酸化酵素、過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質及び酵素の基質を含有し、前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とし、その該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを備え、該電気化学測定セルは前記作用電極、参照電極、対向電極を有し、各電極が電位を規制するためのポテンシオスタットに接続されていることを特徴とする酵素活性測定装置。

10

(10) 電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液を備え、該溶液は測定対象の酸化酵素、過酸化水素の還元を促進する触媒作用を有する物質及び酵素の基質を含有し、前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とし、該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを備え、該電気化学測定セルは前記作用電極、参照電極、対向電極を有し、各電極が電位を規制するためのポテンシオスタットに接続されており、電気化学セル中で測定された過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定し、さらに酸化酵素を標識酵素とする抗体を用いた抗原抗体反応を行い、反応後に抗原と結合した又は未結合の抗体量を酸化還元酵素活性から求め、この抗体量から抗原濃度を求めることを特徴とする免疫化学測定装置。

20

【発明の効果】

【0007】

本発明の方法及び装置によれば、簡便な汎用の電気化学装置で、従来達成不可能であった高感度な過酸化水素濃度、酸化酵素活性、抗原濃度の測定が可能となるという優れた効果を有する。

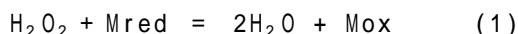
【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の過酸化水素の濃度測定法は、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を過酸化水素含有試料溶液中に一定時間浸漬した後、電解質溶液中に移し、これを作用電極として、その開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するものである。

30

すなわち、本発明は、次のメディエータ反応に着目したものである。



ここで、Mred及びMoxは、それぞれメディエータの還元型及び酸化型を表す。(1)と(2)の反応速度がともに大きければ、過酸化水素の直接電解による電流より大きな電流が与えられ、過酸化水素測定の高感度化が達成される。

40

【0009】

メディエータを電極上に固定化した状態で、前記先ず(1)の反応のみを起こさせてMoxを電極上に蓄積させ、しかる後に蓄積したMoxを電極に負の電位を印可することによって素早く還元させ、そのときの過渡電流応答又はこれを積分した電気量を測定することにより、大きな信号(過渡電流応答)を得、著しく低濃度の過酸化水素の測定を可能とするものである。

この概念図を図1に示す。図1の左図において電荷を蓄積させ、次に右図において電気化学的に還元するものである。これによって、従来達成不可能であった高感度な過酸化水素濃度、酸化酵素活性、抗原濃度の測定が可能となった。

50

【0010】

本発明の、過酸化水素の濃度測定装置の具体的なものとしては、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液とそのための容器、さらに処理した前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とし、その電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルから構成することができる。

この電気化学測定セルには、前記作用電極、参照電極、対向電極を備え付け、各電極には電位を規制するためのポテンシオスタットを接続して構成することができる。

【0011】

このようにして得られた過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定することができる。さらに、この測定された酸化還元酵素活性から抗原抗体反応後に抗原と結合した又は未結合の抗体量を求め、それによって抗原濃度を求めることができる。

酸化酵素を標識酵素とする免疫化学測定システムにおける、このような酵素活性の高感度化は免疫化学測定の高感度化につながり、医療、環境分野などへの寄与に大きく貢献することができる。

【0012】

酵素活性測定装置の具体例としては、過酸化水素の濃度測定装置と同様のものを使用することができる。下記の装置は一例であり、本発明は、この装置の例に限定されないこと

電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液とそれを保持する容器を準備する。

該溶液には、測定対象の酸化酵素、必要に応じて過酸化水素の還元を促進させる触媒及び酵素の基質を含有させる。また、前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とし、その電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを設置する。

該電気化学測定セルには、前記作用電極、参照電極、対向電極を配置する。各電極には、電位を規制するためのポテンシオスタットに接続する。

【0013】

さらに、免疫化学測定装置も前記酵素活性測定装置と同様のものを使用できる。下記の装置は一例であり、本発明は、この装置の例に限定されないことを理解すべきである。

この装置は、電子伝導体基板上に形成した過酸化水素の還元電位より卑な酸化電位を示す酸化還元活性種の薄膜からなる電極を一定時間浸漬させるための過酸化水素含有試料溶液を備える。

また、該溶液は測定対象の酸化酵素、必要に応じて過酸化水素の還元を促進させる触媒及び酵素の基質を含有させ、前記電極を電解質溶液中に移して作用電極とする。さらに、該電極の開放電位から卑な電位に電位を掃引又はステップしたときに得られる還元電流応答から試料中の過酸化水素の濃度を測定するための電気化学測定セルを備える。該電気化学測定セルには、前記作用電極、参照電極、対向電極を配置させ、各電極は電位を規制するためのポテンシオスタットに接続させる。

電気化学セル中で測定された過酸化水素の濃度から過酸化水素を酵素反応生成物とする酸化酵素の活性を測定する。そして、酸化酵素を標識酵素とする抗体を用いた抗原抗体反応を行い、反応後に抗原と結合した又は未結合の抗体量を酸化還元酵素活性から求め、この抗体量から抗原濃度を求める。

【0014】

前記の通り、過酸化水素の濃度を測定するに際しては、過酸化水素含有試料溶液中又は酸化還元活性種の薄膜中に、過酸化水素の還元を促進する触媒を含有させることができる。この触媒としては、ヘミン等の金属 - ポルフィリン類化合物、若しくはこれらを含むマ

10

20

30

40

50

イクロペルオキシターゼ等のオリゴペプチド、ミオグロビンやヘム置換ミオグロビン等の配位子結合性ヘム蛋白質、西洋ワサビペルオキシターゼなどの酵素が有効である。

また、酸化還元活性種の還元型としては、フェロセン及びその誘導体若しくは前記構造を含む高分子化合物、ヒドロキノン及びその誘導体若しくはこれらの構造を含む高分子化合物、又はポリビニルピリジンのオスミウム錯体若しくはこの構造を含む高分子を使用することができる。

また、電子伝導体基板上に酸化還元活性種の薄膜を形成する手段としては、自己組織化法、スピンコート法、キャスト法を使用することができ、有効である。

【実施例】

【0015】

以下、本発明を実施例に基づいて説明する。なお、以下の説明は、本願発明の理解を容易にするためのものであり、これに制限されるものではない。すなわち、本願発明の技術思想に基づく変形、実施態様、他の例は、本願発明に含まれるものである。

【0016】

(実施例1)

(過酸化水素測定電極の作製と高感度測定法)

金ディスク電極(直径1.6 mm、BAS株式会社製、商品名:AUE金電極)をアルミナ研磨、超音波洗浄、硫酸中で定法により電気化学的に洗浄し、1 mMフェロセンウンデカンチオールの無水ヘキサン溶液に2時間浸漬してフェロセン自己組織化単分子膜被覆電極を作製した。この酸化還元電位は+400 mV vs. Ag/AgCl(溶液は75 mM PB + 50 mM NaClO₄, pH 7)と見積もられた。

【0017】

触媒として1 μMのヘミンを加えた上記水溶液(10 mL)に各濃度の過酸化水素を添加し、上記修飾電極を挿入(解放電位の状態)、15時間放置後、解放電位から電位を+100 mV vs. Ag/AgClにステップ、 $H_2O_2 + 2Fc + 2H^+ = 2H_2O + 2Fc^+$ の反応で生成したFc⁺を再還元する電流-時間曲線を計測した(図2参照)。

計測システムとして、ポテンショスタット(北斗電工社製、商品名:HA-150)、デジタルオシロスコープ(IWATSU社製、商品名:DS-8812)を用いた。

【0018】

電流-時間曲線から電気量を求め、これと過酸化水素濃度との関係を求めると、図3に示すように濃度15 nM程度まで濃度増加とともに顕著な電気量の増加が認められた。検出下限濃度は0.5 nM (S/N = 3)と見積もられた。

下記に示す、汎用アンペロメトリー法に比べて、本法では1千分の1以下の濃度の過酸化水素濃度測定が可能となった。

【0019】

(比較例1)

上記と同様の電極を作製、ヘミン存在下で+100mV vs. Ag/AgClで過酸化水素を一定濃度添加しつつ、アンペロメトリックな測定を実施した。

電極上での還元電流は過酸化水素濃度と数mMまで正の相関を持つものの、検出下限濃度は1 μM (S/N = 3)に留まった。

【0020】

(実施例2)

金くし形電極(NTT-AT社製、商品名:くし形電極Au)を使って実施例1と同様な実験を行った。マイクロ電極への過酸化水素/ヘミンの拡散速度の増大により20分の浸漬時間で実施例1と同様な結果が得られた。

【0021】

(実施例3)

実施例2において使用したフェロセンウンデカンチオールに替え、2-メルカプヒドロトキノン(H₂Q)を用いて実施例2と同様な実験を実施した。

但し、 $H_2O_2 + H_2Q = 2H_2O + Q$ の反応で生成したキノンの再還元には-100 mVの電圧を

10

20

30

40

50

印加した。これによって、実施例 2 と同様の結果を得た。

【 0 0 2 2 】

(実施例 4)

1 μ M のヘミンと 10 mM グルコースを加えた実施例 1 の緩衝液 (10 mL) に、グルコース酸化酵素を適量添加後 1 時間放置して、実施例 1 の方法で酵素活性と電気量の相関を解析した。その結果、500 nU/L の活性の酵素まで測定可能であった。汎用のアンペロメトリー法や分光法に比べて 1 千倍の高感度化を達成した。500 nU/L の酵素活性は反応溶液中の酵素量としては 50 fg に相当する。

【 0 0 2 3 】

(実施例 5)

グルコース酸化酵素で修飾した抗 ANP 抗体を用いて ANP との反応させ、ANP 固定化基盤により未反応抗体の除去した後、反応した抗体を含む溶液のみ回収し、このグルコース酸化酵素活性を、実施例 4 と同一の方法で測定し、酵素活性と ANP 濃度との関係を調べた。この結果 0.1 ppt までの ANP の測定が可能であった。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 2 4 】

本発明は、過酸化水素濃度、特にその高感度測定は生物化学分野で特に重要である。例えば、過酸化水素濃度の高感度測定により過酸化水素を生成物として与える酸化酵素の活性の高感度測定が可能となり、酵素分析に必要とされる酸化酵素のスクリーニングの効率化等に資するところが多い。

さらに、酸化酵素を標識酵素とする免疫化学測定システムにおいて、酵素活性の高感度化は、免疫化学測定の高感度化につながり、医療、環境分野などへの寄与が大きい。

【図面の簡単な説明】

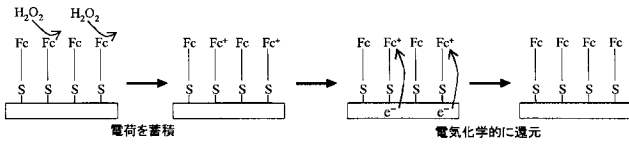
【 0 0 2 5 】

【図 1】本発明の過酸化水素濃度測定のプロット図である。

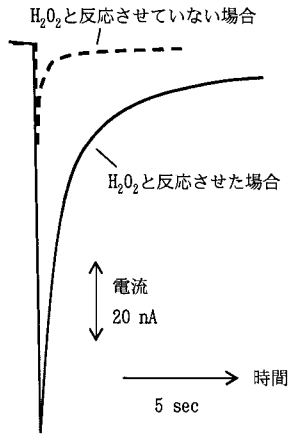
【図 2】実施例 1 において測定した電流 - 時間応答の結果を示す図である。

【図 3】実施例 1 において測定した過酸化水素濃度と測定電気量の関係を示すグラフである。

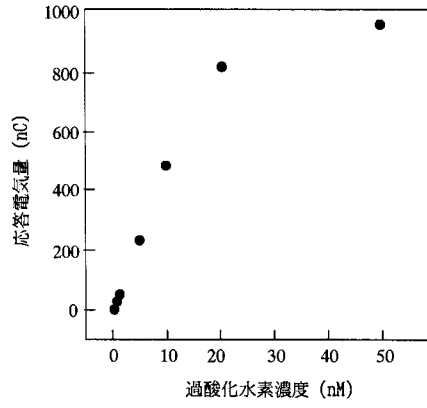
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/46 3 3 6 N
G 0 1 N 27/46 3 3 6 G

(72)発明者 水谷 文雄
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター内

(72)発明者 三重 安弘
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター内

(72)発明者 飴沼 紳一郎
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB16 CC01 FA12 FA13
4B063 QA01 QQ23 QQ89 QR41 QR44 QR51 QR57 QS28 QS36 QS39
QX04

专利名称(译)	过氧化氢浓度测量方法，酶活性测量方法，免疫化学测量方法和这些装置		
公开(公告)号	JP2006267059A	公开(公告)日	2006-10-05
申请号	JP2005089574	申请日	2005-03-25
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	丹羽修 佐藤縁 栗田僚二 松浦宏昭 水谷文雄 三重安弘 飴沼紳一郎		
发明人	丹羽 修 佐藤 縁 栗田 僚二 松浦 宏昭 水谷 文雄 三重 安弘 飴沼 紳一郎		
IPC分类号	G01N27/416 C12M1/34 C12Q1/26 G01N33/53 G01N33/536		
FI分类号	G01N27/46.311.K C12M1/34.E C12Q1/26 G01N33/53.B G01N33/536.C G01N27/46.336.G G01N27/416.311.K G01N27/416.336.G G01N27/416.336.N		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/CC01 4B029/FA12 4B029/FA13 4B063/QA01 4B063/QQ23 4B063/QQ89 4B063/QR41 4B063/QR44 4B063/QR51 4B063/QR57 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX04		
其他公开文献	JP4654411B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：为了利用电化学方法的简单性来获得更高的灵敏度，也就是说，利用简单的通用电化学装置，迄今为止还无法实现高灵敏度的过氧化氢浓度和氧化酶活性。 ，旨在用于测量抗原浓度。 解决方案：将由氧化还原活性物质的薄膜构成的电极浸入含过氧化氢的样品溶液中一段时间，然后将其氧化电位低于在电子导体基板上形成的过氧化氢的氧化电位，然后形成电解质。 样品中过氧化氢的浓度是根据将样品转移到溶液中并用工作电极以将电势从其开放电势扫描或步进到基极电势时获得的还原电流响应来测量的。 测量过氧化氢浓度的方法。 [选型图]图1

