

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年5月2日 (02.05.2002)

PCT

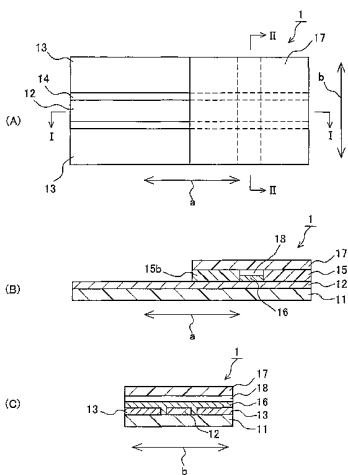
(10) 国際公開番号  
WO 02/35222 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/327
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09367
- (22) 国際出願日: 2001年10月25日 (25.10.2001)
- (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 2000-328130  
2000年10月27日 (27.10.2000) 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番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八木雄次 (YAGI, Yuji) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号 OAPタワー26階 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, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[続葉有]

(54) Title: BIOSENSOR

(54) 発明の名称: バイオセンサ



(57) Abstract: A biosensor by which a target substance in a sample can be measured at a high accuracy is provided. An electrode system involving a working electrode (12) and a counter electrode (13) is provided on a substrate (11). Then a reagent layer (16) containing the above-described reagent and particles is formed thereon to construct a biosensor. Effects of impurities in the sample on the electrode system can be eliminated by the above-described particles. The average particle size of these particles preferably ranges from 0.1 to 45  $\mu\text{m}$ .

(57) 要約:

試料中の測定対象物を高精度で測定できるバイオセンサを提供する。基板 11 上に、作用極 12 と対極 13 とを含む電極系を配置し、この上に前記試薬および微粒子を含有する試薬層 16 を形成してバイオセンサを構成する。前記微粒子により試料中の不純物質の電極系に対する影響を排除できる。前記微粒子の平均粒径は、0.1 ~ 45  $\mu\text{m}$  の範囲であることが好ましい。



WO 02/35222 A1



PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, 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。

## 明 細 書

## バイオセンサ

## 技術分野

本発明は、バイオセンサに関する。

5

## 背景技術

従来、特定の測定対象物を含む試料について、例えば、試料の希釈や攪拌等を行わずに、簡便かつ迅速に前記測定対象物を定量できるバイオセンサが広く使用されている。このようなバイオセンサは、例えば、特許第2517153号公報等

10 許第2517153号公報等が開示されているように、通常、電気絶縁性の基板上に、スクリーン印刷等の方法により作用極（測定極ともいう）と対極とを有する電極系を形成し、その上に、前記測定対象物と反応する酸化還元酵素および電子受容物質等を含む反応層を形成することにより作製できる。この反応層に、前記測定対象物を含む試料を接触させると、前記酸化還元酵素の触媒作用により、前記測定対象物が酸化され、同時に前記電子受容物質が還元される。前記還元された電子受容物質を電気化学的手法により再酸化し、これにより得られた酸化電流値から前記試料中の測定対象物の濃度が算出できる。

しかし、このようなバイオセンサによると、試料の物性等によって測定誤差を生じる場合がある。例えば、試料が全血の場合、血液中に含まれる血球等の固形成分、脂質、タンパク質、糖質等の可溶成分や不溶成分等がバイオセンサの電極表面に吸着するため、正確な測定が困難であった。また、全血に対する赤血球の容積比であるヘマトクリット（Hct）値は、個人差が大きい

20 ため、検体によってバイオセンサに対する前

述のような影響にも差が見られた。このような不純物による影響は、例えば、前記試料を希釈してからバイオセンサに供すること等により緩和できるが、これでは手間がかかり操作が煩雑になる。

そこで、前記不純物による影響を回避するために、以下に示すような方法が提案されている。例えば、電極上に吸水性高分子層を形成する方法（特公平6-54304号公報）、反応層上に非水溶性高分子および水溶性高分子を含有する層を形成する方法（特開平6-213858号公報）、電極上に脂溶性高分子と両親媒性高分子との混合物からなる高分子膜を形成する方法（特開平9-318588号公報）、反応層上に固形成分の透過を抑制するアニオン性フィルターを形成する方法（特開平10-221293号公報）、クエン酸ナトリウム水溶液を封入したマイクロカプセルを、グルコースオキシダーゼを固定化した電極上に固定し、これを作用極とする方法（特開平5-133929号公報）等がある。

## 15 発明の開示

しかしながら、前記アニオン性フィルターを用いる方法では、固形成分のみ有効であり、例えば、タンパク質等の試料中の可溶成分に対しては効果が見られないという問題があった。また、前述のその他の方法では、水溶性高分子等を用いるため吸水性が高く、湿度の影響を受けやすくなり、酵素反応が遅くなる等の問題があった。

そこで、本発明の目的は、試料中の不純物や湿度の影響を受けることなく、前記試料中の測定対象物を高精度で測定できるバイオセンサの提供である。

前記課題を解決するため、本発明のバイオセンサは、基板、試薬を含有する試薬層、および作用極と対極とを含む電極系を備え、前記基板上に電極系が配置され、前記電極系の上に前記試薬層が形成されているバ

イオセンサであって、前記試薬層がさらに微粒子を含有することを特徴とする。

本発明のバイオセンサは、このように前記電極系上に形成された試薬層が前記微粒子を含むことにより、試料中の不純物が前記電極表面に付着することを防止できる。また、前述のような水溶性高分子等を使用する必要があるため、湿度の影響も受けない。このため、前述のような試料の物性に関らず、感度の低下が防止され、測定対象物を高精度で測定することができる。なお、前記微粒子により電極表面への不純物の付着を防止できる理由は不明であるが、前記不純物の前記微粒子への物理的吸着等によると考えられる。

本発明のバイオセンサにおいて、前記試薬層は単層であってもよいし、前記試薬を含有する試薬含有層と前記微粒子を含有する微粒子含有層とを含む積層体であってもよい。

前記試薬層が前記積層体の場合、前記電極上に前記微粒子含有層を介して前記試薬含有層が形成されてもよいが、例えば、より一層、不純物の電極への吸着を排除でき、前記試料中の測定対象物と試薬とが反応し易いことから、前記電極上に前記試薬含有層を介して前記微粒子含有層が形成されることが好ましい。

本発明のバイオセンサにおいて、前記微粒子の平均粒径は、例えば、 $0.1 \sim 45 \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは $0.5 \sim 30 \mu\text{m}$ の範囲、より好ましくは $1 \sim 20 \mu\text{m}$ の範囲、特に好ましくは $3 \sim 15 \mu\text{m}$ の範囲である。前記平均粒子径が $0.1 \mu\text{m}$ 以上であれば、前記試薬層に試料が十分に浸透し易くなり、バイオセンサの感度を向上できる。また、平均粒子径が $45 \mu\text{m}$ 以下であれば、前記試料中の不純物の影響を十分に排除することができる。

前記平均粒径は、例えば、電子顕微鏡を用いて前記微粒子を直接観察

し、その粒径を測定して平均値を算出することにより求めることができる。この際、前記微粒子の測定個数は特に制限されないが、例えば、100個以上、好ましくは100～300個の範囲である。

また、前記微粒子の粒度分布は、特に限定されないが、0.01～1500  $\mu\text{m}$ の範囲であることが好ましく、より好ましくは0.05～60  $\mu\text{m}$ の範囲であり、特に好ましくは平均粒径0.1～40  $\mu\text{m}$ の範囲である。

前記微粒子の形態は、例えば、球状、扁球状でもよいし、微粒子が固まって球状になったもの等も使用できるが、前記微粒子を含む層が、均一かつ適度な疎密性を保持できることから、球状であることが好ましい。

また、前記微粒子は、高分子化合物から形成されることが好ましく、より好ましくは、電解を起こす不純物を含まず、電気化学的に不活性である高分子化合物である。また、前記高分子化合物は、非水溶性であることが好ましい。前記高分子化合物の具体例としては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、マレイン酸、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、マレイン酸エステルおよびスチレン誘導体モノマーのうち少なくとも一つを含む重合体もしくは共重合体等があげられる。前記スチレン誘導体ポリマーとしては、例えば、スチレン、アルキルスチレン等20があげられる。また、例えば、ポリウレタン、ポリウレア等のウレタン化合物、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン系高分子化合物、ポリ塩化ビニル等のポリオレフィン誘導体、およびポリアミド化合物等も使用できる。また、高分子化合物以外に、例えば、シリカゲル、アルミナ、ゼオライト、アパタイト、ガラスやエーライト等に代表さ25れるセラミックス等の無機化合物から形成されてもよい。これらの中でも、電気化学的に不活性であることから、より好ましくは、アクリル酸

、メタクリル酸、マレイン酸、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、マレイン酸エステルおよびスチレン誘導体モノマーのうち少なくとも一つを含む重合体もしくは共重合体、またはポリアミド系高分子化合物である。具体的には、ポリメタクリレート (PMMA)、ポリスチレン (PS)、ポリアミド (PA) 等が特に好ましい。

このような微粒子としては、例えば、市販の商品名テックポリマー bmx-5 (積水化成品工業社製、PMMA、球状、粒径 5  $\mu$ m)、商品名ガンツパール GM-0600 (ガンツ化成社製、PMMA、球状、粒径 6  $\mu$ m)、商品名ガンツパール GS-0805 (ガンツ化成社製、架橋 PS、球状、粒径 8  $\mu$ m)、商品名ガンツパール PS-8F (ガンツ化成社製、PMMA、球状、粒径 0.4  $\mu$ m)、商品名オーガゾル 2002 EXD NAT COS Type S (エルファトケム社製、ナイロン、扁球状、サイズ 10  $\mu$ m)、商品名トレフィル E-506C (東レダウコーニングシリコン社製、架橋シリコン末、球状、粒径 10  $\mu$ m)、商品名サラミックス末 SN-E-02 (宇部興産社製、窒化ケイ素、球状、粒径 1  $\mu$ m)、商品名ゴットボール (鈴木油脂社製、シリカ、球状、粒径 10  $\mu$ m)、商品名ガラスビーズ (ポリサイエンス社製、ライムガラス、球状、粒径 3~10  $\mu$ m) 等が使用できる。

また、前記微粒子は、電氣的に不活性であり、試料中の除去しようとする不純物に応じて粒径を変化させるとともに、微粒子表面の特性を変化させることが望ましい。例えば、微粒子表面の特性を疎水性に設定したい場合は、PS から形成された微粒子が好ましく、PS よりも親水性に設定したい場合は、PMMA や PA 等から形成された微粒子が好ましい。また、前記特性を負電荷を帯びるように設定したい場合は、カルボキシル基を導入した PS 等から形成された微粒子が好ましく、正電荷を帯びるように設定したい場合は、アミノ基を導入した PS 等から形成さ

れた微粒子が好ましい。

また、具体的には、全血中の血球除去を目的とする場合、血球成分の大部分を占める赤血球は、平均直径が約  $7 \mu\text{m}$  であるため、例えば、平均粒径約  $7 \mu\text{m}$  以下の大きさの微粒子を選択すれば、効率よく赤血球の  
5 分離を行うことができる。また、全血中の複数のタンパク質除去を目的とする場合、例えば、PS、カルボキシル基を導入したPS、およびアミノ基を導入したPS等を適宜混合して用いることによって、不特定多数のタンパク質を吸着除去できる。なお、これらの方法には制限されない。

10 本発明のバイオセンサにおいて、前記試薬層がさらに無機ゲルを含んでいることが好ましい。前記無機ゲルを含むことにより、不純物の電極への吸着をより一層防止でき、さらに、試料の拡散を防止できることから、狭い範囲で酵素反応が起こるため、速やかに試薬と測定対象物とが反応できる。

15 また、同様の理由から、前記電極と、前記試薬層との間に、別途、無機ゲルを含有する無機ゲル含有層が形成されてもよい。

前記無機ゲルとしては、粘土鉱物が好ましく、例えば、膨潤性層状ケイ酸塩等があげられる。前記膨潤性層状ケイ酸塩としては、例えば、スメクタイト、膨潤性雲母等が好ましい。前記スメクタイトとしては、例  
20 えば、ヘクトライト、サポナイト、モンモリロナイト等が好ましく、前記膨潤性雲母としては、例えば、ナトリウムフッ化四ケイ素雲母、テニオライト等が好ましい。これらは、いずれか一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

スメクタイトとしては、例えば、市販の合成ヘクトライトである、商  
25 品名ラポナイトXLGおよび商品名ラポナイトXLS（それぞれラポートインダストリー社製）、商品名ルーセントライトSWNおよび商品名ルー



セントライトSWF（コープケミカル社製）ならびに商品名チキソピーW（協和化学工業社製）等、市販の合成サポナイトである商品名スメクトンSA（クニミネ工業社製）、市販の天然モンモリロナイト精製物である商品名クニピアF（クニミネ工業社製）等が使用できる。

- 5       また、膨潤性雲母としては、例えば、市販のナトリウムフッ化四ケイ素雲母である商品名Na-TS（トピー工業製）、市販のテニオライトである商品名Li-TN（トピー工業製）等があげられる。

本発明のバイオセンサにおいて、さらに、前記試薬層の上に界面活性剤を含む界面活性剤含有層が形成されていることが好ましい。このよう  
10       に前記界面活性剤含有層を設ければ、前記試薬層表面に親水化膜が形成されるため、試料と試薬とが素早くかつ均一に混和する。このため、反応が迅速に進み、再現性も向上する。

また、前述のような積層体の場合、前記微粒子含有層上に界面活性剤を含む界面活性剤含有層が形成されていることが好ましい。

- 15       前記界面活性剤としては、例えば、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、天然型界面活性剤等があげられ、この中でも好ましくは、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、天然型界面活性剤であり、より好ましくは非イオン性界面活性剤、天然型界面活性剤である。前記天然型界面活性  
20       剤としては、例えば、リン脂質があげられ、好ましくは、卵黄レシチン、大豆レシチン、水添レシチン、高純度レシチン等のレシチン等が使用できる。また、非イオン性界面活性剤としては、例えば、商品名Twe  
e n 2 0等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、商品名T  
r i r o n X - 1 0 0等のポリオキシエチレンアルキルエーテル、商品  
25       名T r i t o n X - 4 0 5等のポリオキシエチレンフェニルアルキルエ  
ーテル等があげられる。これらの中でも特に好ましくはリン脂質であり

、最も好ましくは、高純度レシチン等のレシチンである。

本発明のバイオセンサにおいて、前記電極としては、測定対象物と試料との反応を電気化学的に検出するのに使用できればよく、例えば、金電極、カーボン電極、銀電極等があげられる。この中でも、電気伝導性  
5 および化学的安定性に優れることから、金電極、カーボン電極が好ましく、より好ましくはカーボン電極である。

本発明のバイオセンサにおいて、前記試薬は、測定対象物と反応し、その反応を電気化学的に検出できるものであれば特に制限されないが、例えば、酵素を含むことが好ましい。前記酵素としては、例えば、酸化  
10 還元酵素等があげられる。

前記酸化還元酵素は、例えば、前記測定対象物の種類により適宜決定でき、具体的には、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ  
15 、コレステロールデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ピリルビン酸オキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、グリセロールデヒドロゲナーゼ、アシル-CoAオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、4-ヒドロキシ安息香酸ヒドロキシラーゼ、マ  
20 レイン酸デヒドロゲナーゼ、サルコシンオキシダーゼ、ウリカーゼ等があげられる。

また、前記酵素が酸化還元酵素の場合、さらに前記酵素の反応における電子受容体を含むことが好ましい。

前記電子受容体としては、例えば、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、インドフェノールおよびその誘導体、 $\beta$ -ナフトキノン-4-スルホン酸カリウム、メチレンブル  
25

一、フェロセンおよびその誘導体、オスニウム錯体、ルテニウム錯体、 $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$ 、ピロロキノリンキノン（PQQ）等が使用できる。この中でも好ましくはフェリシアン化カリウム、フェロセン、オスニウム錯体、 $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$ 等である。

- 5 本発明のバイオセンサにおいて、前記測定試料は特に制限されないが、例えば、前記可溶性成分、不溶性成分、固形成分等の不純物を含む試料に対して有用である。前記不純物としては、例えば、タンパク質、脂質、糖質、血球等があげられる。具体的な測定試料としては、例えば、全血、血漿、血清、唾液、尿、髄液等の生体試料や、ジュース等の飲料
- 10 水、醤油、ソース等の食品類等、排水、雨水、プール用水等が使用でき、この中でも好ましくは全血、血漿、血清、唾液、髄液等であり、より好ましくは全血である。

#### 図面の簡単な説明

- 15 図1は、本発明のバイオセンサの一例を示す図であり、(A)は、その平面図であり、(B)および(C)は、その断面図である。

図2は、本発明のバイオセンサのその他の例を示す図であり、(A)は、その平面図であり、(B)および(C)は、その断面図である。

- 20 図3は、本発明のバイオセンサのさらにその他の例を示す断面図である。

図4は、本発明の一実施例における、電流値と開回路時間との相関を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 25 以下、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

## (実施形態1)

図1に本発明のバイオセンサの一例を示す。同図(A)は前記バイオセンサの平面図であり、同図(B)は前記同図(A)のI-I方向断面図であり、同図(C)は前記同図(A)のII-II方向断面図である。図示のように、このバイオセンサ1では、基板11上に作用極12および対極13から構成される電極系が配置され、この一方の端部上(同図1(A)において右側、図1(B)において右上)に、試薬および微粒子を含む単層の試薬層16が形成されている。2つの対極13は基板11の幅方向(矢印b方向)両端にそれぞれ配置され、作用極12は基板11の幅方向中央に配置され、これらの電極12、13は、基板11の長手方向(矢印a方向)に沿って延びている。また、作用極12と対極13との間には、絶縁部14が形成されている。この電極系の一端の上において、スペーサー15a、15bが、前記電極系と垂直になるように配置され、このスペーサー15a、15bの間に試薬層16が配置されている。そして、試薬層16の上部を覆うようにしてカバー17がスペーサー15a、15b上に配置され、カバー17と試薬層16との間に、幅方向に貫通する孔が形成され、これが試料供給用孔18となる。

このバイオセンサ1の大きさは、特に制限されず、供給する試料の量等により適宜設定できるが、例えば、全体長さ50~10mm、全体幅20~2mm、最大厚み1500~500 $\mu$ m、最小厚み500~300 $\mu$ mであり、好ましくは、全体長さ30~10mmの範囲、全体幅10~2mm、最大厚み1000~500 $\mu$ m、最小厚み400~300 $\mu$ mである。

試薬層16の大きさは、例えば、長さ10~0.2mm、幅20~2mm、厚み400~5 $\mu$ mであり、好ましくは、長さ5~0.2mm、幅10~2mm、厚み200~10 $\mu$ mである。基板11の大きさは、

例えば、長さ50～10mm、幅20～2mm、厚み1000～500μmであり、好ましくは、長さ30～10mm、幅10～2mm、厚み500～500μmである。スパーサー15a、15bの大きさは、例えば、長さ20～1mm、幅20～2mm、厚み500～100μmであり、  
5 好ましくは、長さ10～2mm、幅10～2mm、厚み300～200μmである。カバー17の大きさは、例えば、長さ50～10mm、幅20～2mm、厚み1000～500μmであり、好ましくは、長さ30～10mm、幅10～2mm、厚み500～500μmである。孔18の大きさは、例えば、長さ10～0.2mm、幅20～0.2mm、高さ500～500μmであり、好ましくは、長さ5～0.2mm、幅10～2mm、高さ300～100μmである。なお、各部位の「長さ」とは、バイオセンサの長手方向の長さをいい、「幅」とは、幅方向の長さをいう。

具体的には、試料約2μLを供給する場合、試薬層16の大きさは、例えば、長さ2～0.2mm、幅20～2mm、厚み400～500μmであり、好ましくは、長さ1～0.4mm、幅10～2mm、厚み200～100μmである。孔18の大きさは、例えば、長さ2～0.2mm、幅20～2mm、高さ500～500μmであり、好ましくは、長さ1～0.4mm、幅10～2mm、高さ300～100μmである。

前記試薬層16における微粒子の含有量は、供給する試料の種類やその量等に応じて適宜決定できるが、試料約2μLに対して、例えば、1～0.01mgの範囲であり、好ましくは、0.5～0.05mgの範囲である。

また、前記試薬層16における試薬の含有量は、特に制限されず、試薬の種類、試料の種類やその量等に応じて適宜決定できる。例えば、試薬として酵素を使用する場合、その含有量は、試料約2μLに対して、50～0.05Uが好ましく、より好ましくは20～0.1Uである。

さらに電子受容体を使用する場合、その含有量は、試料約  $2 \mu\text{L}$  に対して、 $100 \sim 0.01 \mu\text{mol}$  が好ましく、より好ましくは  $50 \sim 0.05 \mu\text{mol}$  である。具体的に、酵素として GOD、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを使用する場合、試料約  $2 \mu\text{L}$  に対して、GOD  $20 \sim 0.1 \text{U}$ 、フェリシアン化カリウム  $50 \sim 0.05 \mu\text{mol}$  であることが好ましく、より好ましくは GOD  $10 \sim 0.2 \text{U}$ 、フェリシアン化カリウム  $10 \sim 0.1 \mu\text{mol}$  である。

このようなバイオセンサは、例えば、以下に示すようにして製造できる。まず、前記電極等を形成するための基板 11 を準備する。基板 11 の材料としては、電気絶縁性であることが好ましく、例えば、プラスチック、ガラス、紙、セラミックス等があげられる。前記プラスチックとしては、例えば、ポリエチレンテレフタレート (PET)、PS、PMM A、ポリプロピレン (PP) 等があげられる。

つぎに、前記基板 11 上に、作用極 12 および対極 13 からなる電極系を形成する。前記電極としては、前述のように、金電極やカーボン電極等が好ましく、その種類に応じた公知の方法により形成できる。

前記金電極は、例えば、蒸着法、メッキ法、金箔貼付法等により形成できる。前記蒸着法は、例えば、真空度  $1.33 \times 10^{-4} \text{Pa}$ 、入力パワー  $300 \text{W}$ 、レート  $5 \text{\AA}/\text{秒}$ 、時間 2 分の条件でイオンプレーティング法により行うことができる。これは、例えば、PET などのプラスチックシート上に金を蒸着して、さらにキスカット装置を用いて、前記シート上に蒸着された金箔層に切れ目を入れる方法である。これにより、切れ目部分が絶縁部となり、作用極および対極が形成できる。

また、カーボン電極の場合は、例えば、カーボンインキを前記基板 11 上にスクリーン印刷する手段、コーティングする手段、メッキ手段等により形成できる。

前記電極上に後述する試薬層 16 を形成する前に、前記電極表面を親水化処理することが好ましい。これにより電極表面が疎水性であっても、前記処理によって親水化されるため、後述するように試薬溶液を用いて試薬層を形成する場合に、前記試薬層を均一に形成し易くなる。

- 5 前記親水化処理は、電極の種類に応じて適宜決定できる。前記電極が金電極の場合、例えば、メルカプトエタノール溶液、メルカプトエタノールアミン溶液等の親水化溶液に前記電極を浸漬後、洗浄・乾燥すればよい。

- 前記親水化溶液の溶媒としては、例えば、エタノール、ブタノール、  
10 アセトン、テトラヒドロフラン等の有機溶剤等があげられる。また、前記親水化溶液の濃度は、例えば、 $100 \sim 0.01 \text{ mmol/L}$  の範囲であり、好ましくは  $50 \sim 0.05 \text{ mmol/L}$  の範囲である。また、洗浄には、例えば、エタノール、メタノール、ブタノール、アセトン、テトラヒドロフラン等の有機溶剤、精製水等の洗浄液が使用できる。

- 15 また、電極がカーボン電極の場合は、例えば、界面活性剤に浸漬してから精製水で洗浄する方法等により親水化処理できる。

- 次に、前記電極系を形成した基板 11 上にスペーサー 15 a、15 b を配置する。図示のように、二つのスペーサ 15 a、15 b を、一定間隔において幅方向に平行に配置することによって、後述する試薬層 16 の  
20 形成部を確保できる。前記スペーサー 15 の材料としては、例えば、樹脂製フィルムやテープ等が使用できる。また、両面テープであれば、後述するカバーを容易に接着できる。この他にも、例えば、レジスト印刷等の手段によりスペーサーを形成できる。

- つぎに、前記スペーサー 15 a、15 b の間隙部分に、試薬および微  
25 粒子を含む単層の試薬層 16 を形成する。

前記微粒子および前記試薬としては、前述のようなものが使用できる

。この試薬層は、前記微粒子および各種試薬を含有する溶液を調製し、これを前記スプレー１５の間隙に注入することにより形成できる。

前記溶液は、例えば、試薬を十分に溶解させてから、さらに前記微粒子を分散させて調製することが好ましい。前記溶媒としては、特に制限  
5 されないが、例えば、水、緩衝液、エタノール、メタノール、ブタノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）およびテトラヒドロフラン等の有機溶剤等が使用できる。前記緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等があげられ、そのpHは、4～9の範囲が好ましく、より好ましくは5～  
10 8の範囲である。また、水としては、例えば、精製水、蒸留水、超純水等があげられ、この中でも不純物が極めて少なく高精度のバイオセンサが作製可能であることから超純水が好ましい。

前記溶液中の微粒子の濃度は、特に制限されないが、1000～10  
15 g/Lの範囲が好ましく、より好ましくは500～50g/Lの範囲である。

前記溶液中の試薬の濃度は、特に制限されないが、例えば、酵素の場合、10,000～10KU/Lの範囲が好ましく、より好ましくは5  
20 000～50KU/Lの範囲である。さらに、電子受容体を含む場合、10～0.01mol/Lの範囲が好ましく、より好ましくは5～0.05mol/Lの範囲である。

前記溶液を調製後、この溶液を前記スプレー15a、15bの間隙に注入する。前記注入は、特に制限されず、例えば、自動駆動式分注機等を用いて行うことができる。なお、微粒子の沈殿を防ぐため、前記溶液を攪拌しながら注入することが好ましい。

25 前記溶液の注入量は、形成する試薬層の大きさ、微粒子および試薬の含有量等により適宜決定できるが、形成する面積10mm<sup>2</sup>当たり10



～0.1 μLの範囲が好ましく、より好ましくは5～0.2 μLの範囲である。

前記注入後、これを乾燥させて試薬層を形成する。乾燥の手段は、特に制限されないが、例えば、自然乾燥、風乾、減圧乾燥、凍結減圧乾燥  
5 等の方法が採用できる。また、これらの手段を組合わせてもよい。

温風乾燥の場合、その条件としては、例えば、温度10～60℃の範囲、相対湿度RH5～40%の範囲、時間1～30分の範囲である。

つぎに、前記スプレー15a、15b上に前記試薬層16を覆う状態でカバー17を配置する。これにより、試薬層16とカバー17との  
10 間に形成された細孔が試料供給用の孔18となる。

前記カバー17の材料としては、特に制限されないが、例えば、各種プラスチック等が使用できる。

このようにして作製したバイオセンサ1は、長期間保存する場合、湿気の影響を防ぐため、例えば、モレキュラーシーブ、シリカゲル、酸化カルシウム等の乾燥剤と共に密封保存することが好ましい。  
15

前記バイオセンサ1は、例えば、ある一定の時間で所定の電圧を加える手段、バイオセンサから伝達される電気信号を測定する手段、前記電気信号を測定対象物濃度に演算する演算手段等の種々の手段を備えた測定機器と組み合わせて使用できる。

20 このバイオセンサ1の使用方法について、試料が全血、測定対象物がグルコース、試薬がGODおよびフェリシアン化カリウムである例をあげて説明する、

まず、全血試料をバイオセンサ1の孔18に毛管現象等により吸引させる。すると、前記微粒子の存在により、血球等の全血中の不純物が、  
25 電極へ付着することが防止される。一方、全血中のグルコースは、試薬層16のGODにより酸化され、その酸化反応により移動した電子によ

ってフェリシアン化カリウムが還元されてフェロシアン化カリウムが生成される。そして、全血試料の供給から一定時間経過後、前記電圧を加える手段により対極 1 3 と作用極 1 2 との間に電圧を印加して、前記還元型のフェロシアン化カリウムを電気化学的にフェリシアン化カリウムに酸化し、その際の酸化電流を、前記電気信号を測定する手段等により検出する。この酸化電流のピークの値は、試料中のグルコース濃度に比例するため、この値を前記演算手段によりグルコース濃度に演算すれば、試料中のグルコース濃度を求めることができる。このようなバイオセンサによれば、前述のように試料中の不純物が電極に吸着することがないため、感度の低下が防止され、高精度に測定できる。また、湿度による影響も受けない。

このバイオセンサ 1 は、例えば、前記試薬層がさらに無機ゲルを含有してもよい。前記無機ゲルとしては前述のようなものが使用できる。前記試薬層における無機ゲルの含有量は、無機ゲルの種類、試料の種類やその量等に応じて適宜決定できるが、試料約  $2 \mu\text{L}$  に対して、例えば、 $100 \sim 0.1 \mu\text{g}$  の範囲であり、好ましくは、 $50 \sim 0.5 \mu\text{g}$  の範囲である。このような無機ゲルを含む試薬層の形成は、前記試薬、微粒子および無機ゲルを含む溶液を調製して、前述と同様にして形成すればよい。

20

#### (実施形態 2)

図 2 に本発明のバイオセンサのその他の例を示す。同図 (A) は前記バイオセンサの平面図であり、同図 (B) は前記同図 (A) の III-III 方向断面図であり、同図 (C) は前記同図 (A) の IV-IV 方向断面図である。同図において、図 1 と同一箇所には同一符号を付した。

25

図示のように、このバイオセンサ 2 では、基板 1 1 上に作用極 1 2 お

よび対極 1 3 から構成される電極系が配置され、この一方の端部（同図（A）、（B）において右上）に、無機ゲル含有層 2 1 と試薬層 1 6 と界面活性剤含有層 2 2 とがこの順序で積層された積層体が形成されている。前記試薬層 1 6 は、試薬および微粒子を含んでいる。2 つの対極 1 3  
5 は、基板 1 1 の幅方向（矢印 b 方向）両端にそれぞれ配置され、作用極 1 2 は基板 1 1 の幅方向中央に配置され、これらの電極 1 2、1 3 は、基板 1 1 の長手方向（矢印 a 方向）に沿って延びている。また、作用極 1 2 と対極 1 3 との間には、絶縁部 1 4 が形成されている。この電極系の一端の上において、第 1 のスペーサー 1 5 a、1 5 b が、電極系と垂直になるように配置され、このスペーサー 1 5 a、1 5 b の間に前記積  
10 層体 2 1、1 6、2 2 が配置されている。第 1 のスペーサー 1 5 a、1 5 b の上には、さらに第 2 のスペーサー 2 3 a、2 3 b が配置されている。そして、第 2 のスペーサー 2 3 a、2 3 b 上に、前記積層体 2 1、1 6、2 2 の上部を覆うようにしてカバー 2 4 が配置され、カバー 2 4  
15 と積層体 2 1、1 6、2 2 と間に、幅方向に沿って貫通する孔が形成され、これが試料供給用孔 1 8 となる。なお、このバイオセンサ 2 は、特に示さない限り、前記実施形態 1 のバイオセンサと同様の形態である。

前記無機ゲル含有層 2 1 における無機ゲルの含有量は、供給する試料の種類やその量、無機ゲルの種類等に応じて適宜決定できるが、試料約  
20  $2 \mu\text{L}$  に対して、例えば、 $1000 \sim 0.1 \mu\text{g}$  の範囲であり、好ましくは、 $500 \sim 0.5 \mu\text{g}$  の範囲である。

前記界面活性剤含有層 2 2 における界面活性剤の含有量は、供給する試料の種類やその量、界面活性剤の種類等に応じて適宜決定できるが、  
25 試料約  $2 \mu\text{L}$  に対して、例えば、 $100 \sim 0.01 \mu\text{g}$  の範囲であり、好ましくは、 $50 \sim 0.05 \mu\text{g}$  の範囲である。

このように、無機ゲル含有層 2 1、試薬層 1 6 および界面活性剤含有

層 2 2 が積層されたバイオセンサ 2 は、例えば、以下に示すようにして製造できる。なお、特に示さない限り、前記実施形態 1 と同様に製造できる。

電極が配置された基板 1 1 上に第 1 のスペーサー 1 5 a、1 5 b を配置してから、無機ゲルを含む溶液を調製して前記スペーサー 1 5 a、1 5 b の間隙に注入・乾燥する。続いて、同様にして、試薬および微粒子を含む溶液、界面活性剤を含む溶液をそれぞれ注入・乾燥して、無機ゲル含有層 2 1、試薬層 1 6 および界面活性剤含有層 2 2 を順次積層していく。さらに、前記第 1 のスペーサー 1 5 a、1 5 b の上に第 2 のスペーサー 2 3 a、2 3 b を積層し、この第 2 のスペーサー 2 3 a、2 3 b 上に、界面活性剤含有層 2 2 の上面を覆うようにしてカバー 2 4 を配置する。これにより、界面活性剤含有層 2 2 とカバー 2 4 との間に形成された細孔が試料供給用の孔 1 8 となる。

このように、第 2 のスペーサーを形成すれば、これにより孔 1 8 の高さを調節することもできる。第 2 のスペーサーは、前記第 1 のスペーサーと同様の材料が使用でき、同様にして形成できる。

前記無機ゲルを含む溶液は、無機ゲルの沈降を防ぐために、1 時間以上攪拌することが好ましく、より好ましくは 5 時間以上である。また、同様の理由から、使用時に攪拌を続けることが好ましい。前記溶液中の無機ゲルの濃度は、特に制限されないが、例えば、1 0 ~ 0 . 0 1 重量 % の範囲であり、好ましくは 5 ~ 0 . 0 5 重量 % の範囲である。

### (実施形態 3)

この実施形態は、試薬層が、前記試薬含有層と微粒子含有層との積層体である本発明のバイオセンサの一例である。このバイオセンサを図 3 の断面図に示す。同図において、図 1 と同一部分には同一符号を付して

いる。

図示のように、このバイオセンサ 3 は、電極を配置した基板 1 1 上に試薬含有層 3 1 を介して微粒子含有層 3 2 が積層されている以外は、前記実施形態 1 と同様の構成である。試薬含有層 3 1 および微粒子含有層 5 3 2 は、例えば、試薬を含む溶液と、微粒子を含む溶液とをそれぞれ調製し、スペーサーの間隙に前記試薬を含む溶液を注入・乾燥した後、この上に前記微粒子を含む溶液を注入・乾燥することにより形成できる。

このバイオセンサ 3 は、前記実施形態 2 のバイオセンサと同じように、試薬層（本実施形態では試薬含有層および微粒子含有層）を形成する 10 前に、電極上に無機ゲル含有層を別途形成し、それから前記無機ゲル層上に前記試薬含有層等を形成してもよいし、微粒子含有層の上に、さらに界面活性剤含有層を積層してもよい。

本発明のバイオセンサは、前記各実施形態にはなんら制限されず、例 15 えば、全ての層が微粒子、無機ゲルまたはこれら双方を含有してもよい。

#### 実施例

つぎに、本発明の実施例について、比較例と併せて説明する。

#### 20 (実施例 1)

以下に示すようにして、前記図 2 と同様の金電極バイオセンサを作製した。まず、支持体として、長さ 30 cm、幅 30 cm、厚み 250  $\mu$  m の透明 PET シート（以下、同じ）を準備し、その一方の表面に金蒸着を行った。蒸着条件は、前述と同様である。使用した金の純度は、9 25 9.95% 以上である。

キスカット装置を用いて、前記 PET シートの金蒸着面に深さ 0.1

mm、幅0.1mmの直線の切れ目を、一方向に1mmと5mmの間隔で交互に入れた（以下、「ハーフカット」という）。この切れ目部分が絶縁部14となり、蒸着した金が、作用極12と対極13とに分割される。なお、最終的に、このPETシートを切断してバイオセンサを作成するため、バイオセンサの作用極12の幅は1mm、対極13の幅は2.5mm、絶縁部14の幅は0.1mmとなる。

さらに、前記PETシートを、裁断用機器（KINEMATICS社製、商品名Matrix2360）を用いて、長さ20mm、幅170mmになるように裁断した。この裁断したシートを、10mmφ1/L2-メルカプトエタノール溶液（溶媒：エタノール）に30分間浸漬後、まずエタノール、ついで精製水で洗浄し、これをクリーンベンチ内で室温乾燥することにより、前記金蒸着表面の親水化を行った。

続いて、第1のスペーサー15a、15bとなる2枚のポリアミド製の片面テープ（住友スリーエム社製、商品名Y-5579、厚み42μm）を、前記金蒸着表面の所定位置に貼付した。このとき、スペーサー15aとスペーサー15bとの間隔が1mm、前記スペーサー15a、15bの長さが5mm、幅が170mmとなるようにした。

つぎに、前記スペーサー15a、15bの間隙に無機ゲル含有層21を形成した。まず、無機ゲル（コープケミカル社製、商品名ルーセントライトSWN）150mgと精製水50.0gとをシリコン処理した広ロビンに入れ、室温下で一晩攪拌（10時間以上、500rpm）することにより、無機ゲル含有層21の原料液（以下「A液」という。）を調製した。前記A液は、無機ゲルの沈殿を防ぐために使用直前に調製し、後述の分注時にも前記攪拌を継続した。

前記PETシートの第1のスペーサー15a、15bの間隙部分に、シリンジを用いて前記A液を分注した。前記A液の分注量は、分注表面

面積 6 mm×1 mm (バイオセンサ 1 個相当) に対し、1. 74  $\mu$ L とした。前記分注後、これをクリーンベンチまたはデシケータ内において、室温で 30 分以上静置乾燥させた。さらに、乾燥機を用いて、35  $^{\circ}$ C、相対湿度 10 % 以下の雰囲気中で 30 分間乾燥することにより (以下、  
5、「ハニードライ乾燥」という)、無機ゲル含有層 21 を形成した。

続いて、前記無機ゲル含有層 21 上に微粒子、無機ゲルおよび試薬を含む単層の試薬層 16 を形成した。まず、試薬層 16 の原料液 (以下、「B 液」という。) を調製した。無機ゲル (前記ルーセントライト SWN) 400 mg と精製水 50. 0 g とを、シリコーン処理した広口ビンに入れ、室温下で攪拌 (10 時間以上、500 rpm) した。褐色ビン中に、  
10 前記無機ゲル溶液 1. 0 mL、精製水 3. 0 mL およびフェリシアン化カリウム (ナカライテスク社製) 320 mg を入れて室温で攪拌し、フェリシアン化カリウムを完全に溶解させることにより、フェリシアン化カリウム溶液を調製した。つぎに、別の褐色ビンに、グルコースオキシダーゼ (天野製薬社製) 2. 40 KU および微粒子 (積水化成社製、  
15 商品名 BMX-5、平均粒径 5  $\mu$ m、原料化合物名 PMMA) 500 mg を加え、さらに前記フェリシアン化カリウム溶液 2. 0 mL を加えて、溶液が均一になるまで十分に攪拌し、これを B 液とした。攪拌時には、溶液中に気泡が生じないように十分に注意した。また、前記 B 液は、  
20 微粒子の沈降を防ぐため、攪拌しながら下記分注を行った。

前記シート上の無機ゲル含有層 21 表面に、分注用機器 (Bio Dot 社製、商品名 Dispenser System) を用いて前記 B 液を分注した。前記 B 液の分注量は、分注表面面積 6 mm×1 mm (バイオセンサ 1 個相当) に対し、1. 30  $\mu$ L とした。分注後、これを、  
25 オープン中、50  $^{\circ}$ C、無風状態で 10 分間乾燥し、さらに、前記ハニードライ乾燥を同様にして 10 分間行い、試薬層 16 を形成した。

つぎに、前記試薬層 16 上に界面活性剤含有層 22 を形成した。まず、高純度卵黄レシチン（キューピー食品社製）250 mg とエタノール 50.0 mL とを褐色ビンに入れ、室温下、均一になるまで攪拌して、界面活性剤含有層 22 の原料液（以下、「C 液」という。）を調製した。

- 5     そして、前記シート 11 の試薬層 16 表面に、前記分注用機器を用いて前記 C 液を分注した。前記 C 液の分注量は、分注表面面積 6 mm × 1 mm（バイオセンサ 1 個相当）に対し、0.30  $\mu$ L とした。分注後、これを前記ハニードライ乾燥（乾燥時間 15 分間）して界面活性剤含有層 22 を形成した。ついで、このシートを、モレキュラーシーブと共に
- 10 減圧保存容器に入れ、室温、圧力約 100 Pa の条件下で一晩減圧乾燥した。

- 次に、第 2 のスペーサーとして、PET フィルム中芯両面テープ（大日本インキ社製、商品名ダイダック両面接着テープ、厚み 150  $\mu$ m）を、第 1 のスペーサー 15 a、15 b 上に配置した。一方の第 2 のスペーサー 23 a は、長さ 5 mm、幅 160 mm であり、他方の第 2 のスペーサー 23 b は、長さ 5 mm、幅 160 mm である。そして、さらに、
- 15 前記第 2 のスペーサー 23 a、23 b およびその間隙部分を覆うように長さ 15 mm、幅 160 mm、厚み 188  $\mu$ m の PET 製フィルムを貼付し、これをカバー 24 とした。

- 20 得られたこの積層体を、前記載断用機器により、幅 6 mm となるように裁断して、長さ 20 mm、幅 6 mm の目的のバイオセンサを作製した。なお、このバイオセンサは、使用時まで、褐色ビン中、3 g 以上のモレキュラーシーブと共に保存した。

25     （実施例 2）

前記 B 液の調製において、無機ゲルとして、前記ルーセントタイト SW



Nの代わりに、商品名ラポナイトXLS（ラポルテ社製）を用いる以外は、実施例1と同様にして、バイオセンサを作製した。

（実施例3）

- 5 前記B液の調製において、前記無機ゲル溶液1.0mLの代わりに、精製水1.0mLを用いる以外は、実施例1と同様にしてバイオセンサを作製した。

（実施例4）

- 10 前記A液の調製において、無機ゲルとして、前記ルーセントライトSWNの代わりに、前記ラポナイトXLSを用い、また、前記B液の調製において、前記無機ゲル溶液1.0mLの代わりに精製水1.0mLを用いる以外は、実施例1と同様にしてバイオセンサを作製した。

15 （実施例5）

以下に示すようにして、前記図2と同様のカーボン電極バイオセンサを作製した。なお、特に示さないかぎり、前記実施例1と同様である。

- 20 カーボンインキにより、基板11となる前記透明PETシートの一方向の表面にカーボン印刷を施して、作用極12および対極13を形成した。印刷は、スクリーン印刷機を用い、その条件は、SUS・300メッシュ、スキージ圧3～5MPa、プリントスピード0.5m/s、コートスピード0.5m/s、クリアランス2.0mm、オフコンタクト15度とした。前記シートを、90℃で30分間乾燥した。

- 25 つぎに、前記PETシートの電極側表面に、絶縁性UV硬化樹脂を主成分とするレジストインキによりレジスト印刷を行い、これを乾燥して第1のスペーサー15a、15bを形成した。このレジスト印刷は、ス

クリーン印刷機を用い、その条件は、ポリエステル・250メッシュ、スキージ圧3～5MPa、プリントスピード0.15m/s、コートスピード0.15m/s、クリアランス4.0mm、オフコンタクト15度とした。なお、第1のスペーサーの大きさ等は、前記実施例1と同様に設定し、その厚みは、後述する乾燥後の厚みが10μmとなるように調整した。また、前記乾燥は、UV乾燥機を用いて3.7m/sの条件で行った。

次に、前記スペーサー15a、15bの間に無機ゲル含有層21を形成した。前記A液の調製には、無機ゲルとして前記ルーセントタイトSWMの代わりに前記ラポナイトXLS150mgを用い、前記A液の分注量は、分注表面面積6mm×1mm（センサ1個相当）に対し、1.45μLとした。

次に、前記無機ゲル含有層21上に試薬層16を形成した。原料となるB液は以下のように調製した。褐色ビン中に、精製水3.0mL、前記微粒子750mgおよび前記フェリシアン化カリウム240mgを入れて攪拌し、フェリシアン化カリウムを完全に溶解させることにより、フェリシアン化カリウム溶液を調製した。続いて、別の褐色ビンに前記グルコースオキシダーゼ2.40KUおよび前記フェリシアン化カリウム溶液2.0mLを入れて均一になるまで十分に攪拌し、これをB液とした。前記B液の分注量は、分注表面面積6mm×1mm（センサ1個相当）に対し、1.08μLとした。

以後、前記実施例1と同様にして、界面活性剤含有層22の形成、第2のスペーサー23a、23bおよびカバー24の配置を行うことにより積層体を作製し、これを裁断して、目的のバイオセンサを得た。

(実施例 6)

無機ゲル含有層 21 を形成しない以外は、実施例 5 と同様にしてバイオセンサを作製した。

5 (比較例 1)

以下のようにして、従来のバイオセンサを作製した。まず、前記 PET シート上に実施例 5 と同様にしてカーボン電極を形成し、さらに実施例 1 と同様にしてスペーサーを形成した。そして、3 重量%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液を調製してから、これを前記 PET  
10 T シートの電極系上に分注して乾燥し、CMC 層を形成した。前記 CMC 溶液の分注量は、分注表面面積 6 mm × 1 mm に対して 3 μL とした。つぎに、精製水 4.0 mL にフェリシアン化カリウム 320 mg を入れて攪拌し、完全に溶解させてから、このフェリシアン化カリウム水溶液 2 mL にグルコースオキシダーゼ 2.40 KU を加え、均一になるまで  
15 十分に攪拌した。この試薬液を、前記 CMC 層上に分注して前記実施例 1 と同様にして乾燥することにより、試薬層を形成した。前記試薬液の分注量は、分注表面面積 6 mm × 1 mm に対して 1.30 μL とした。そして、前記実施例 1 と同様にして、第 2 のスペーサーを配置し、カバーを貼付した。

20

前述のようにして得られた各実施例および比較例 1 のバイオセンサについて、以下に示す各種試験を行った。

(金電極バイオセンサに対する Hct の影響)

25 前記実施例 1 ~ 4 の各バイオセンサおよび比較例のバイオセンサについて、それぞれ電流値を測定した。試料としては、前記実施例 1 ~ 4 の

バイオセンサに対しては、生理食塩水（以下、「S a 1」という）、グルコース添加（濃度1000mg/L）生理食塩水（以下、「G S a 1」という）、ヒト全血（以下、「WB」という）およびヒト血漿（以下、「P」という）をそれぞれ用い、比較例のバイオセンサに対しては前記ヒト全血  
 5 （WB）およびヒト血漿（P）を用いた。前記ヒト全血（WB）のH c tは46%であり、ヒト全血（WB）およびヒト血漿（P）の血漿中グルコース濃度は、1270mg/Lであった。

まず、各バイオセンサをポテンシオスタット（BAS社製、商品名C V 1 0 0 W）に接続し、室温で前記試料をバイオセンサ内に吸引した後  
 10 、開回路状態を25秒間保持した。そして、電圧を5秒間印加した時点における電流値を測定した。電圧は、実施例1～4のセンサに対しては250mV、比較例のバイオセンサに対しては500mVに設定した。各バイオセンサおよび各試料について、同条件で前記電流値を3回ずつ測定し、その平均値を求めた。また、各バイオセンサについて、乖離率  
 15 A（%）および乖離率B（%）を、それぞれ下記式（1）および式（2）により求めた。ここで、 $E_{S a 1}$ 、 $E_{G S a 1}$ 、 $E_{W B}$ および $E_P$ とは、前記各試料を用いて測定したときの前記電流値の平均値である。前記乖離率Aおよび乖離率Bは、いずれも試料中の不純物の影響の程度を示す値であり、前記乖離率Aは主として血球の影響に係る値、前記乖離率Bは、  
 20 それに加えて塩類の影響に係る値である。これらの絶対値が小さいほど、前記不純物の影響が小さいと判断できる。

$$\text{乖離率 A (\%)} = [(E_{W B} - E_P) / E_P] \times 100 \quad \dots (1)$$

$$\text{乖離率 B (\%)} = [(E_{W B} - E_P) / (E_P - E_{S a 1})] \times 100 \quad \dots (2)$$

前記電流値の平均値、および前記平均値を用いて前記式（１）と式（２）から算出した乖離率Aと乖離率Bを下記の表１に示す。

5       （表１）

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	比較例
$E_{S_{a1}}$	0.509	0.493	0.293	0.231	—
$E_{G_{S_{a1}}}$	2.125	2.285	1.808	2.173	—
$E_{WB}$	2.868	2.539	2.123	2.059	2.364
10 $E_P$	2.860	2.736	2.395	2.153	2.844
乖離率 A (%)	0.3	-7.2	-11.3	-4.4	-16.9
乖離率 B (%)	0.3	-8.8	-12.9	-4.9	—

前記表１に示すように、実施例のバイオセンサにおける乖離率Aの絶対値は、比較例のバイオセンサにおける乖離率Aの絶対値と比較して小さかった。また、実施例の乖離率Bの絶対値も、実施例の乖離率Aの絶対値とほぼ同様であった。これは、実施例のバイオセンサによれば、Hctによる影響が小さく、血液中の成分を正確に測定できることを示している。

20

（開回路時間の影響確認）

前記実施例４の金電極バイオセンサを用いて、開回路時間の影響を調べるために電流値測定を行った。なお、試料としては、グルコース添加（濃度 5000 mg/L）生理食塩水を使用した。

25   まず、実施例４のバイオセンサを前記ポテンシオスタットに接続し、前記バイオセンサに前記試料を吸引させた後、開回路状態を所定の時間

(0、5、10、15、25秒)保持した。そして、250mVの電圧を5秒間印加後の時点における電流値を測定した。この結果を図4に示す。同図は、開回路時間と電流値との相関関係を示すグラフである。

図4に示すように、電流値は開回路時間による影響をほとんど受けなかった。これは、実施例4のバイオセンサでは、酵素反応が試料を吸引してから短い時間に速やかに進行したことを示している。これから、本発明のバイオセンサは、迅速な測定が可能であり、優れた操作性を有するといえる。

#### 10 (カーボン電極センサに対するHctの影響確認)

前記実施例5のカーボン電極バイオセンサおよび実施例4の金電極バイオセンサ、ならびに比較例のバイオセンサについて、それぞれ電流値を測定した。試料としては、実施例4および5のバイオセンサに対しては生理食塩水(Sa1)、ヒト全血(WB)、ヒト血漿(P)をそれぞれ  
15 用い、比較例のバイオセンサに対しては前記ヒト全血(WB)、ヒト血漿(P)を用いた。前記ヒト全血(WB)のHctは49%であり、ヒト全血(WB)およびヒト血漿(P)の血漿中グルコース濃度は1110mg/Lであった。

まず、実施例4の金電極バイオセンサおよび実施例5のカーボン電極  
20 バイオセンサを、それぞれ前記ポテンシオスタットに接続した。そして、前記試料をバイオセンサ内に吸引した後、電圧を20秒間印加した時点における電流値を測定した。電圧は、金電極センサに対しては250mV、カーボン電極センサに対しては350mVとした。また、比較例のバイオセンサについては、前記ポテンシオスタットに接続して前記試  
25 料をバイオセンサ内に吸引した後、回路状態を25秒間保持し、電圧を5秒間印加した時点における電流値を測定した。各バイオセンサについ

て、同条件で前記電流値を4回ずつ測定し、その平均値を求めた。なお、乖離率A(%)および乖離率B(%)は前述と同様にして求めた。

前記電流値の平均値、および乖離率Aと乖離率Bの結果を下記表2に示す。

5

(表2)

	実施例 5	実施例 4	比較例
$E_{s a 1}$	0.073	0.108	—
$E_{w B}$	0.757	1.075	2.206
10 $E_p$	0.766	1.140	2.404
乖離率 A (%)	-1.0	-6.0	-8.2
乖離率 B (%)	-1.2	-6.2	—

前記表2からわかるように、両実施例のバイオセンサにおける乖離率Aの絶対値は、比較例のバイオセンサにおける乖離率Aの絶対値と比較して小さかった。また、両実施例の乖離率Bの絶対値も、それぞれ乖離率Aの絶対値とほぼ同様であった。これは、実施例のバイオセンサによれば、Hctによる影響が小さく、血液中の成分を正確に測定できることを示している。また、このHctによる影響の回避に関しては、実施例4の金電極バイオセンサでも比較例の従来品より優れた効果が得られるが、実施例5のカーボン電極バイオセンサによると、より一層の効果を示すことがわかる。

(湿度による影響)

25 前記実施例4の金電極バイオセンサと、実施例5および実施例6のカーボン電極バイオセンサと、比較例のバイオセンサについて、湿度によ

る影響を調べるため、以下の方法により電流値を測定した。

まず、十分に乾燥した未使用のバイオセンサを用いて電流値を測定した。試料としては、生理食塩水（S a l）およびグルコース（濃度 1 0 0 m g / L）添加生理食塩水（G S a l）をそれぞれ用いた。バイオセンサを前記ポテンシオスタットに接続し、前記試料をバイオセンサ内に吸引した後、開回路状態を 2 5 秒間保持した。そして、電圧を 5 秒間印加した時点における電流値を測定した。前記電圧は、実施例 4 の金電極バイオセンサに対しては 2 5 0 m V、実施例 5 および 6 のカーボン電極バイオセンサに対しては 3 5 0 m V、比較例のバイオセンサに対しては 5 0 0 m V に設定した。各バイオセンサについて、同条件で前記電流値を 2 回ずつ測定し、その平均値を求めた。他方、温度を 4 0 ° C、相対湿度を 8 5 % に保った密閉容器（ADVANTEC 社製、商品名 A E - 2 1 5）中に、十分に乾燥した未使用のバイオセンサを 3 0 分間放置した。その後、これらのバイオセンサを用いて、前述と同じ条件で前記電流値を 2 回ずつ測定し、その平均値を求めた。

ここで、前記放置前のバイオセンサにおける電流値の平均値を  ${}^1E_{S a l}$ 、 ${}^1E_{G S a l}$  とし、放置後のバイオセンサにおける電流値の平均値を  ${}^2E_{S a l}$ 、 ${}^2E_{G S a l}$  とした。また、前記放置後の電流値の平均値と前記放置前の電流値の平均値との比  $R_{S a l}(\%)$  および  $R_{G S a l}(\%)$  は、それぞれ下記式 (3) および式 (4) により求めた。 $R_{S a l}(\%)$  および  $R_{G S a l}(\%)$  の値は、1 0 0 に近いほど、湿度の影響が小さいと判断できる。前記各バイオセンサについて測定した結果を下記表 3 に示す。

$$R_{S a l}(\%) = ({}^2E_{S a l} / {}^1E_{S a l}) \times 100 \quad \dots (3)$$

$$R_{G S a l}(\%) = ({}^2E_{G S a l} / {}^1E_{G S a l}) \times 100 \quad \dots (4)$$



(表 3)

	実施例 4	実施例 5	実施例 6	比較例
${}^1 E_{S_{a1}}$	0.256	0.212	0.161	0.165
5 ${}^2 E_{S_{a1}}$	0.552	0.283	0.315	4.144
$R_{S_{a1}}$ (%)	216	133	196	2519
${}^1 E_{G_{S_{a1}}}$	2.191	1.614	1.499	2.498
${}^2 E_{G_{S_{a1}}}$	2.357	1.711	1.963	6.164
$R_{G_{S_{a1}}}$ (%)	108	106	131	247

10

前記表 3 に示すように、実施例のバイオセンサは、比較例のバイオセンサと比較して、 $R_{S_{a1}}$  (%) および  $R_{G_{S_{a1}}}$  (%) が 100 に近い結果が得られた。これは、湿度による影響が小さいことを示し、本発明のバイオセンサによれば、湿度の影響をうけていないことがわかる。

15

#### 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明のバイオセンサは、試料中の固形成分や可溶性分、不溶性分等の、測定対象物以外の物質の影響や、湿度の影響を受け

20 反応が速やかに進行するため、操作性にも優れる。

## 請 求 の 範 囲

1. 基板、試薬を含有する試薬層、および作用極と対極とを含む電極系を備え、前記基板上に電極系が配置され、前記電極系の上に前記試薬層が形成されているバイオセンサであって、前記試薬層がさらに微粒子を含有することを特徴とするバイオセンサ。  
5
2. 試薬層が単層である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。
3. 試薬層が、前記試薬を含有する試薬含有層と前記微粒子を含有する微粒子含有層とを含む積層体である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。  
10
4. 電極系上に試薬含有層を介して微粒子含有層が形成されている請求の範囲 3 記載のバイオセンサ。
5. 試薬層が、さらに無機ゲルを含んでいる請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。
- 15 6. 電極系と試薬層との間に、無機ゲルを含有する無機ゲル含有層が形成されている請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。
7. さらに、試薬層の上に界面活性剤を含む界面活性剤含有層が形成されている請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。
8. 微粒子の平均粒径が、 $0.1 \sim 45 \mu\text{m}$ の範囲である請求の範囲  
20 1 記載のバイオセンサ。
9. 微粒子の粒度分布が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。
10. 微粒子が、球状である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。
11. 微粒子が、高分子化合物である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。  
25
12. 高分子化合物が、電解を起す不純物を含まず、電気化学的に不

活性である請求の範囲 1 1 記載のバイオセンサ。

1 3. 高分子化合物が、非水溶性である請求の範囲 1 1 記載のバイオセンサ。

1 4. 高分子化合物が、アクリル酸、メタクリル酸、マレイン酸、ア  
5 クリル酸エステル、メタクリル酸エステル、マレイン酸エステルおよび  
スチレン誘導体モノマーのうち少なくとも一つを含む重合体もしくは共  
重合体、またはポリアミド系高分子化合物である請求の範囲 1 1 記載の  
バイオセンサ。

1 5. 無機ゲルが、粘土鉱物である請求の範囲 5 記載のバイオセンサ  
10 。

1 6. 粘土鉱物が、膨潤性層状ケイ酸塩である請求の範囲 1 5 記載の  
バイオセンサ。

1 7. 電極が、金電極、カーボン電極および銀電極からなる群から選  
15 択された少なくとも一つの電極である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ  
。

1 8. 試薬が、酸化還元酵素を含む請求の範囲 1 記載のバイオセンサ  
。

1 9. 試薬が、酸化還元酵素および前記酵素の反応における電子受容  
体を含む請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。

20 2 0. 測定試料が、血液である請求の範囲 1 記載のバイオセンサ。

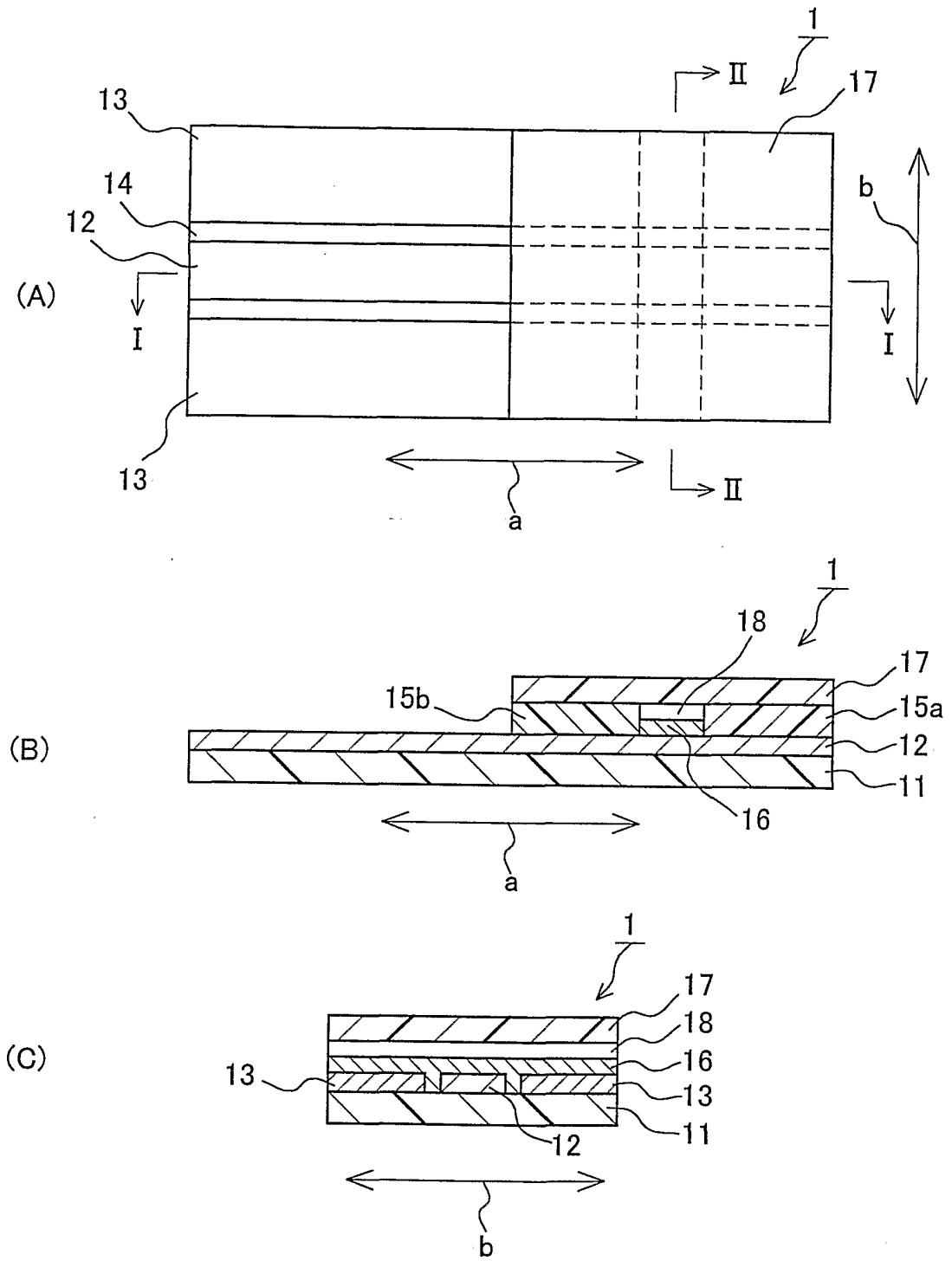


Fig. 1

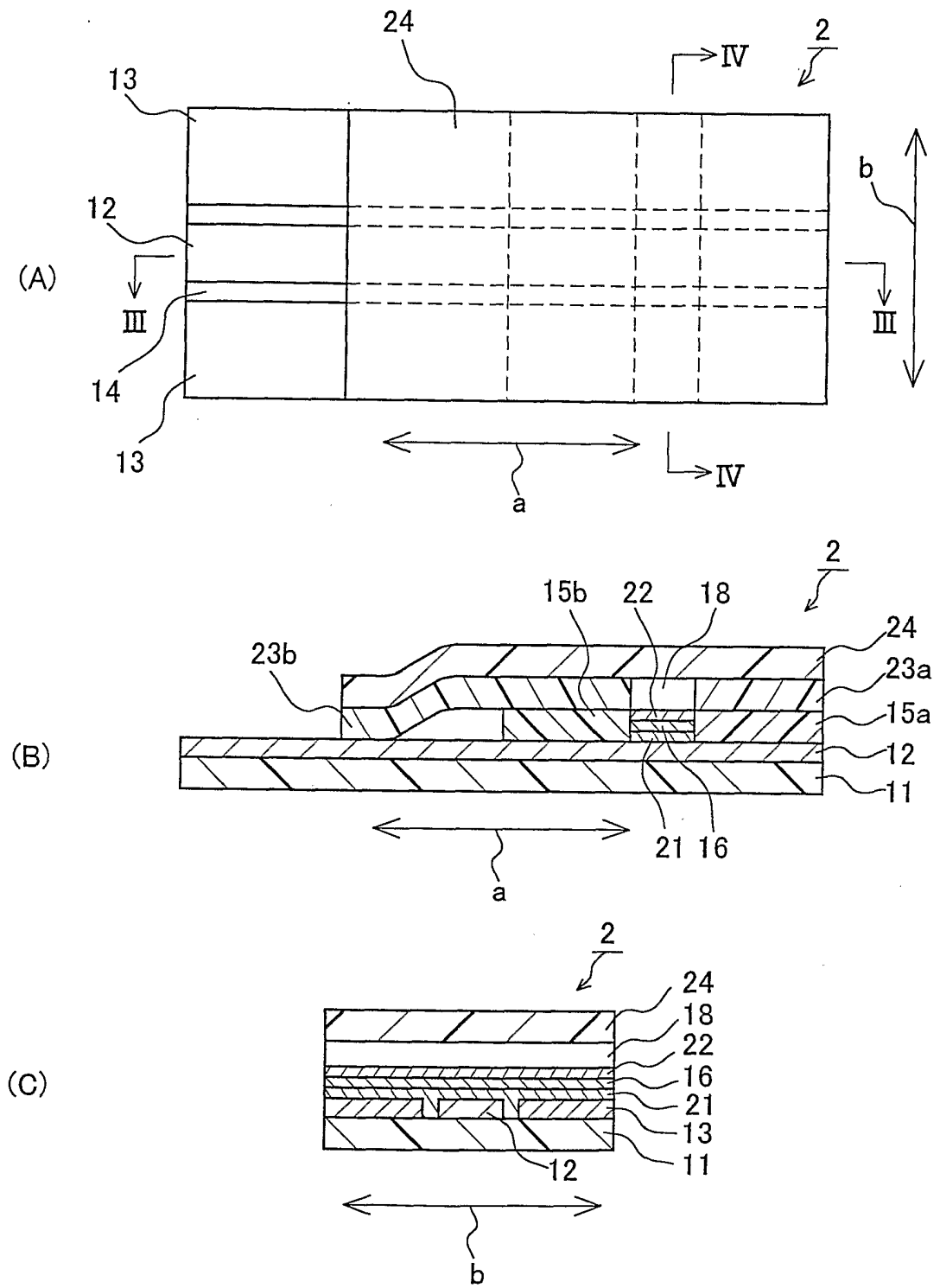


Fig. 2

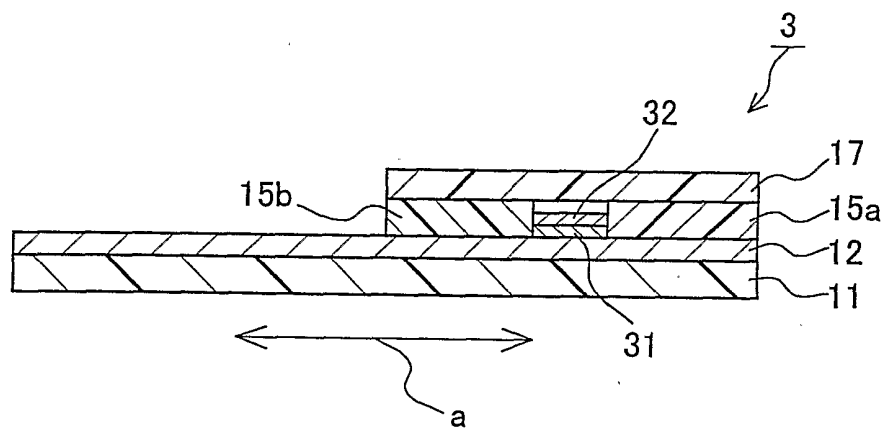


Fig. 3

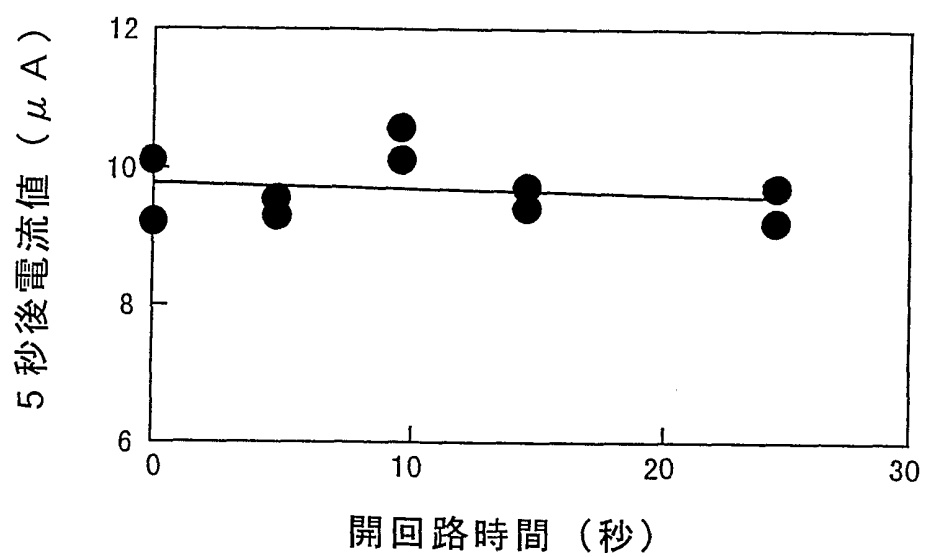


Fig. 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09367

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>7</sup> 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. Cl<sup>7</sup> G01N27/327

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	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-81407 A (Omron Corporation), 21 March, 2000 (21.03.00), Par. Nos. [0054] to [0069], [0137] to [0158] (Family: none)	1-3, 7-13, 17-20
X	JP 8-94574 A (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.), 12 April, 1996 (12.04.96), Full text (Family: none)	1, 3, 4, 7-9, 11-14, 17-20
X	EP 690134 A1 (Ciba Corning Diagnostics Corporation), 03 January, 1996 (03.01.96), page 3, lines 36 to 38; page 4, lines 18 to 19; page 4, lines 57 to 58; page 13, lines 30 to 31; page 14, lines 45 to 53	1, 3-5, 7-9, 11-13, 15-20
A	page 3, lines 36 to 38; page 4, lines 18 to 19; page 4, lines 57 to 58; page 13, lines 30 to 31; page 14, lines 45 to 53 & JP 8-193969 A & US 5494562 A1 & CA 2138856 A	6

 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  
21 November, 2001 (21.11.01)Date of mailing of the international search report  
04 December, 2001 (04.12.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09367

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5696314 A (Chiron Diagnostics Corporation), 09 December, 1997 (09.12.97), column 10, line 56 to column 11, line 6 (Family: none)	1, 3, 4, 8, 9, 11-13, 17-20
A	US 5205920 A (Oyama et al.), 27 April, 1993 (27.04.93), column 10, line 56 to column 11, line 6 & JP 2-231558 A	6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> 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. Cl<sup>7</sup> G01N27/327

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 1971-2001年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2001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)

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 2000-81407 A (オムロン株式会社) 21. 3月. 2000 (2 1. 03. 00) 【0054】 - 【0069】 , 【0137】 - 【0158】 段落 (ファミリーなし)	1-3, 7-13, 17-20
X	JP 8-94574 A (松下電器産業株式会社) 12. 4月. 1996 (1 2. 04. 96) 全文 (ファミリーなし)	1, 3, 4, 7-9, 11-14, 17- 20

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

21. 11. 01

国際調査報告の発送日

04.12.01

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



2 J 3010

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	EP 690134 A1 (Ciba Corning Diagnostics Corp.) 3. 1月. 1996 (03. 01. 96) 第3頁第36-38行, 第4頁第18-19行, 同頁第57-58行, 第13頁第30-31行, 第14頁第45-53行	1, 3-5, 7-9, 11-13, 15-20
A	第3頁第36-38行, 第4頁第18-19行, 同頁第57-58行, 第13頁第30-31行, 第14頁第45-53行 & JP 8-193969 A & US 5494562 A1, & CA 2138856 A	6
X	US 5696314 A (Chiron Diagnostics Corp.) 9. 12月. 1997 (09. 12. 97) 第10カラム第56行-第11カラム第6行 (ファミリーなし)	1, 3, 4, 8, 9, 11-13, 17-20
A	US 5205920 A. (oyama et al.) 27. 4月. 1993 (27. 04. 93) 第10カラム第56行-第11カラム第6行 & JP 2-231558 A	6