

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3952156号

(P3952156)

(45) 発行日 平成19年8月1日(2007.8.1)

(24) 登録日 平成19年5月11日(2007.5.11)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/327 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 J

GO 1 N 27/416 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 A

GO 1 N 33/66 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 B

GO 1 N 27/46 3 3 8

GO 1 N 27/46 3 3 6 H

請求項の数 4 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-67747 (P2002-67747)
 (22) 出願日 平成14年3月13日(2002.3.13)
 (65) 公開番号 特開2003-270198 (P2003-270198A)
 (43) 公開日 平成15年9月25日(2003.9.25)
 審査請求日 平成16年9月15日(2004.9.15)

(73) 特許権者 000010087
 TOTO株式会社
 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号
 (72) 発明者 ▲ルイ▼ 昌生
 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号
 東陶機器株式会社内

審査官 柏木 一浩

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】

過酸化水素電極を有する基体と、過酸化水素生成酵素を含む生体触媒を固定化した酵素膜とを備えたバイオセンサにおいて、前記基体と前記酵素膜との間に、セルロース誘導体、イオン交換樹脂からなる群から選択される物質(物質Aと呼ぶ)と、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基からなる群から選択される官能基を有する高分子物質(高分子Bと呼ぶ)と、からなる混合層が形成されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】

前記混合層と前記酵素膜との接触面における前記混合層の前記高分子Bの露出割合が、表面積の20%以上であることを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。

10

【請求項3】

前記混合層中の高分子Bの含量は、前記酵素膜と接触する最表層部で最も多く、前記酵素膜から離れるにしたがってだんだん少なくなる、傾斜組成を有することを特徴とする請求項1若しくは請求項2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】

前記混合層中の高分子Bの含量は、前記酵素膜および前記基体と接触する最表層部で最も多く、前記酵素膜および前記基体から離れるにしたがってだんだん少なくなる、傾斜組成を有することを特徴とする請求項1若しくは請求項2に記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

20

膜を付けたりする工夫がされている。膜の密着性を確保する別の方法として、特開2000-2683では、選択透過膜を、作用電極の表面のみを被覆する形状に形成し、その上の酵素膜をシランカップリング剤を介して基板表面に接合し、酵素膜によって選択膜を物理的に押し込む方法が開示されている。特公平2-35933では、アルブミン架橋膜を過酸化水素選択透過膜として直接電極表面に形成する方法が、また、特開平7-77509では、アルブミン架橋膜の下にさらに下地高分子膜を塗布する方法が、開示されている。アルブミンからなる選択透過膜は、酵素膜との間の密着性がよい。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

このような従来技術においては、次のような課題が生じている。酢酸セルロース膜などを予め作成して電極表面に装着する場合は、一定の膜強度を得るために膜が厚く、また、電極との密着性が悪い。このため、情報の分散が発生して応答速度や検出感度が低下し、その結果、測定精度が低下する。検出感度を維持するには、面積の大きい電極を必要とする。また、この方式は製造の自動化が難しく、安価に量産するには不適である。

【0010】

一方、酢酸セルロース膜やイオン交換樹脂膜を直接電極表面に形成する場合は、予め膜を作成して電極表面に装着する場合に比べて薄膜化ができ、電極との間の密着性も改良されるが、選択透過膜と酵素膜との密着性が悪いことが課題として残る。その理由は、酢酸セルロースをはじめとする選択透過膜が疎水性であり、基体との密着性は例えば基体表面の疎水化処理などによりある程度向上させることができるが、酵素膜は一般的に親水性であり、疎水性の選択透過膜との密着性がなかなか得られにくいためである。このため、酵素膜を全面的に薄く塗布し、さらにその上に別の膜を設けることにより酵素膜を押しえてセンサの動作安定性を保つなどしている。しかし、このようなセンサは、特に分析の自動化・高速化を進める上で不可欠なフロータイプ測定装置では、キャリア液が流れる時の剪断力による膜剥離および脈流に伴う圧力変化による膜へのダメージが大きな問題になっている。

【0011】

また、特公平2-35933や特開平7-77509で示されたアルブミン架橋膜を選択透過膜とするセンサは、選択透過膜と酵素膜がほとんど同質なため、膜間の密着性がかなり強い。しかし、一定の選択性を達成するには選択透過膜を厚くする必要があり、膜材料が親水性のタンパク質であるため、長期間使用時の安定性に欠けること、などの問題がある。

【0012】

かかる現状を鑑み本発明の目的は、選択透過膜と酵素膜との間や、選択透過膜と電極との間の密着性が高く、高精度でかつ安定性が優れているバイオセンサを提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段及びその作用・効果】

上記目的を達成するために請求項1は、過酸化水素電極を有する基体と、過酸化水素生成酵素を含む生体触媒を固定化した酵素膜とを備えたバイオセンサにおいて、前記基体と前記酵素膜との間に、セルロース誘導体、イオン交換樹脂からなる群から選択される物質（物質Aと呼ぶ）と、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基からなる群から選択される官能基を有する高分子物質（高分子Bと呼ぶ）と、からなる混合層が形成されていることとした。混合層中の物質Aは、主として共存妨害成分を除外し、過酸化水素を選択的にまたは優先的に透過させる役割を担う。一方、混合層中の高分子Bは、主に混合層と酵素膜および/または基体とを接着させる役割を果たす。すなわち混合層は、過酸化水素選択透過膜であると同時に、酵素膜を電極基体に付着させる機能も果たす。これにより、膜付着力の弱さが解消されるため、このバイオセンサは、高精度でかつ安定性が優れている。

【0014】

10

20

30

40

50

請求項 2 は、請求項 1 に記載のバイオセンサにおいて、前記混合層と前記酵素膜との接触面における前記混合層の前記高分子 B の露出割合が、表面積の 20% 以上であることとした。よって、高分子 B と酵素膜との接触機会が確保されるため、混合層と酵素膜との間に必要な付着力を得ることができる。

【0015】

請求項 3 は、請求項 1 若しくは請求項 2 に記載のバイオセンサにおいて、前記混合層中の高分子 B の含量は、前記酵素膜と接触する最表層部で最も多く、前記酵素膜から離れるにしたがってだんだん少なくなる、傾斜組成を有することとした。よって、少量の高分子 B で効率よく混合層と酵素膜の付着力を確保することができる。

【0016】

請求項 4 は、請求項 1 若しくは請求項 2 に記載のバイオセンサにおいて、前記混合層中の高分子 B の含量は、前記酵素膜および前記基体と接触する最表層部で最も多く、前記酵素膜および前記基体から離れるにしたがってだんだん少なくなる、傾斜組成を有することとした。よって、少量の高分子 B で効率よく混合層と酵素膜の付着力および混合層と基体の付着力を確保することができる。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を、図面により詳細に説明する。

【0019】

図 1 は、本発明によるバイオセンサの基本構造を示す図である。図 1 において、6 は過酸化水素電極を有する基体、3 は混合層、1 は過酸化水素生成酵素を含む生体触媒を固定化した酵素膜である。混合層 3 は、セルロース誘導体、イオン交換樹脂からなる群から選択される物質（物質 A と呼ぶ）と、アルデヒド基（-CHO）、アミノ基（-NR₂、R：水素またはアルキル基）、カルボキシル基（-COOH）、エポキシ基からなる群から選択される官能基を有する高分子物質（高分子 B と呼ぶ）と、の 2 成分からなる。

【0020】

物質 A は、主として共存妨害成分を除外し、過酸化水素を優先的に透過させる役割を担う。セルロース誘導体とイオン交換樹脂のいずれを選択するかは、センサの使用目的や、基体材質やその構造などの状況を勘案して決定されてよい。これらの物質は、過酸化水素選択膜の材料として有効であるが、酵素膜や基体との接着性が、一般的に弱い。

【0021】

セルロース誘導体の例としては、アセチル置換基を有する酢酸セルロースまたはその誘導体、ブチル置換基を有する酢酸酪酸セルロースまたは酪酸セルロース、ニトロ置換基を有するニトロセルロース、そしてエチルセルロース、などが挙げられる。中でも、酢酸セルロースを代表とするアセチル置換基を有する誘導体が、各種の膜の材料としての実績が多く、より好ましい。一方、イオン交換樹脂の好ましい例として、パーフルロスルホン酸を含むイオン交換樹脂であるデュボン社製のナフィオン（登録商標）が挙げられる。強いマイナス荷電を有するこの樹脂は、特にマイナスイオン性の妨害成分の除去に適している。なお物質 A は、一般的に反応性に乏しく、疎水性傾向を有する。

【0022】

高分子 B は、主として物質 A の酵素膜または基体との付着力不足を補う役割を担う。高分子 B は、前記したアルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基からなる群から選択される官能基を有する高分子物質であれば、その材質や構造は問わない。好ましい例として、多糖類およびその誘導体、蛋白質などの天然由来高分子、ポリアミノ酸、ポリアミド、ポリイミド、ポリアクリル、エポキシ樹脂、などの合成高分子が挙げられる。これらの高分子は、一般的に反応性に富み、親水性傾向を有する。特に、酵素膜との間に高い親和性を示す。例えば、多糖類誘導体の一種として、アミノ置換基を有する多糖類誘導体であるキトサンがある。

【0023】

図 2 は、キトサンの基本構造を示す図である。図 2 において、R が 100% アセチル基（

10

20

30

40

50

-COCH₃)であるものがキチンであり、キトサンは、キチンの脱アセチル化によって製造される。一般的には、十から数十パーセントのアセチル基が残っている。キトサンは、反応性に富むと同時に、脱アセチル化の度合いに応じて、水と各種の有機溶媒からなる混合溶媒に溶解できることが特徴である。

【0024】

混合層は、過酸化水素選択透過膜として機能すると同時に、酵素膜を基体上に付着させる接着層として機能する。よって、混合層が上記2つの機能を果たす限り、その中に含まれる物質Aと高分子Bの存在形態は特に限定されない。存在形態の好ましい具体例としては、両者が化学的に結合することなく、物理的に混合されて存在する態様、あるいは両者の分子が接触する界面において、イオン結合、共有結合などによって部分的に結合されて存在する態様、が挙げられる。

10

【0025】

図3～図6は、混合層中の物質Aと高分子Bの混合態様の例を示す図である。図中、物質Aを白色の領域または灰色の曲線で、高分子Bを黒色の領域または黒色の曲線で、それぞれ表わす。混合層における物質Aと高分子Bの混合態様の好ましい例として、図3に示すような、物質Aと高分子Bが互いに分散した粒子状になって混在する態様や、図4に示すような、物質Aと高分子Bがポリマー分子のレベルで混合している態様が挙げられる。また、別の好ましい例として、図5に示すような、物質Aと高分子Bがそれぞれの相を形成し相分離した構造や、図6に示すような、互いに相手の相へ侵入し合う、くし状界面構造を有する態様が挙げられる。なお、これらの混合態様は同時に存在してもよい。例えば図6が、図1における混合層3の部分を表わしているとする、図6のC-C断面は、図5の構造を呈する。さらに、相界面のところを拡大して観察すると、図4または図5に示す構造が観察される。このような多様な混合態様により、物質Aと高分子Bが強く連結され、混合層が連続した膜となる。

20

【0026】

高分子Bは、酵素膜と混合層とを接着させる役割を担うので、酵素膜と接触する混合層表面において、高分子Bが露出することが必要である。露出の割合は、要求される膜付着力、物質Aおよび高分子Bの材質、および表面構造など、諸般状況を勘案して適宜決定されてよいが、表面積の20%以上であることが好ましい。これにより、高分子Bと酵素膜との接触機会が確保されるため、混合層と酵素膜との間に必要な付着力を得ることができる。

30

【0027】

一方、酵素膜との界面の場合と違って、基体との界面においては、物質Aだけで満足できる付着力を得るケースが多い。また、センサ膜(ここで、センサ膜とは、基体の上に形成されたすべての膜のことを言う)が一体となった場合、基体との間で密着していれば良く、強く接着を必要としないケースもある。このようなケースにおいては、混合層の基体側に面する表層部において、高分子Bを存在させる必要はなく、むしろ高分子Bが実質的に含まれない構造とすることが望ましい。その理由は、接着剤として機能する高分子Bは、一般的に過酸化水素選択透過性が乏しいので混合層の妨害物質除去機能に対する寄与が少なく、逆に拡散抵抗によりセンサの測定感度を低下させる作用があるからである。ここで「実質的」とは、既存の分析方法で、高分子Bの存在が検出できないレベルであることを意味する。

40

【0028】

図7は、上記のような混合層をもつバイオセンサの構造の例を示す図である。図7に示すように、混合層3の基体6と接触する側には、高分子Bが実質的に含まれない領域(すなわち実質的に物質Aのみの領域)があり、これにより、測定感度の低下を防いでいる。なお、図中「A+B」で示す格子模様の領域は、物質Aと高分子Bが同時に含まれていることを意味するもので、両者の割合を示すものではない。以下も同様である。

【0029】

上記の図7のケースと異なり、物質Aだけで十分な基体密着性を得られるものの付着力が

50

十分ではない場合には、過酸化水素電極の作用電極表面およびその周辺の領域においてのみ高分子Bを実質的に含まないものとし、その他の領域に高分子Bを含ませて、基体に対する混合層の付着力を確保する方法を採ることができる。この態様を有するセンサは、絶縁性基板上に膜状導電体を形成したプレナー型過酸化水素電極の場合、特に望ましい。

【0030】

図8は、上記のような混合層をもつバイオセンサの構造の例を示す図である。図8において、7は絶縁基板、8はその上に形成された作用電極である。なお、対極や参照極が合わせて形成されることも多いが、この図では作用電極8を含む部分のみを表示している。図8に示すように、作用電極8の上方および周辺の混合層3には、高分子Bが実質的に含まれない領域があり、これにより図7の例と同様に測定感度の低下を防いでいる。同時に、高分子Bを有する外の領域では強い基体付着力を持つので、混合層全体の膜基体付着力が保たれる。

10

【0031】

図9は、別のバイオセンサの構造の例を示す図である。図7との違いは、混合層3の基体6と接触する側にも、物質Aと高分子Bが同時に含まれている領域「A+B1」があることである。なお、混合層3の酵素膜1と接触する側の領域は「A+B2」で示し、内部には、高分子Bが実質的に含まれない領域「A」がある。例えば、物質Aだけでは基体接着力が足りないケースなどでは、この態様を採用することで高分子B1により基体6との接着が実現され、基体密着性の強いセンサが得られる。ここで、高分子B1の基体6への露出の割合は、表面積の10%以上であることが好ましい。なお、高分子BをB1、B2と区別している理由は、これらが必ずしも同一成分である必要はないからである。一般的に、基体6と酵素膜1とでは材質などが異なるため、最適な接着性を実現するには異なった高分子を用いた方がよいケースがある。

20

【0032】

図7～図9で示したような、混合層3の中に高分子Bが実質的に含まれない領域を有するセンサにおけるこの領域（「A」）の厚さは、要求されるセンサの性能、使用される膜の材質およびその製造方法、ならびに該部分の厚さ方向の上下部分における物質Aと高分子Bとの混合部分の組成と厚さなど、諸般状況を勘案して適宜決定される。想定される被検試料中の共存妨害成分の濃度が高く、測定精度を確保するには高い妨害成分除去率が要求される場合は、厚めにする。逆に妨害成分の影響よりも測定感度の精度への影響が強くなる場合は、妨害物質除去率と感度との兼ね合いから、該部分を適宜に薄くする。

30

【0033】

混合層を含む膜を基体へその場で直接形成するとともに、妨害成分排除機能の大部分を、高分子Bが実質的に含まれない領域に依存するケースにおいて、一般的に好ましい「A」の厚さの範囲は、その下限が100nmであり、上限は2000nmである。100nm以下では、ほとんどの材質において拡散制限の低下またはピンホールなどにより妨害物質除去率が低下し、尿など高濃度の妨害成分が存在する試料への適用が困難になる。また2000nm以上では、過酸化水素に対しても強い排除作用が出て、かえって測定精度の低下をもたらす。もちろん、「A」の部分の上下の混合部でもかなりの妨害成分機能を果たす場合は、この限りではない。

40

【0034】

すでに述べた通り、接着剤として機能する高分子Bは、一般的に過酸化水素選択透過性が乏しい。したがって、過酸化水素選択透過膜として効率的に機能させるには、必要とされる膜接着性を達成した上で、混合層中における高分子Bの割合をできるだけ小さく抑えた方が好ましい。この視点から、混合層中における高分子Bが表層部に集中的に存在していることが望ましい。このような好ましい態様として、混合層中における高分子Bの含量が一番外側（酵素膜および/または基体と接触する側）でもっとも多く、内部に向かってだんだん少なくなる、傾斜組成を有する態様が挙げられる。

【0035】

図10、図11は、上記のような構造を有する混合層中の表層部の例を示す模式図である

50

。図中、黒い部分は高分子 B を、その他の部分は物質 A を意味する。図 10、図 11 からわかるように、高分子 B は最表層部に最も多く存在しているので、必要な接着力を得るための高分子 B の使用量が少なく済み、また内部においては物質 A の含量が多いので、妨害成分除去性能が高い。さらに、表層部から内部へ組成の変化が徐々に起きるので、物質 A と高分子 B との一体感が保たれ、混合層全体としての強度が効率的に保たれる。なお、図 11 に示すように、最表層部において実質的に物質 A が含まれないものとしてもよい。このような傾斜組成は、混合層の片側または両側に存在するケースが考えられる。特に、基体との間では物質 A だけで十分な密着性または付着力が選られる場合は、傾斜組成は酵素膜と接触する側においてのみ形成すればよい。

【0036】

図 12 ~ 図 15 は、上記のような混合層をもつバイオセンサの構造の例を示す図である。図 12 の混合層 3 は、酵素膜 1 と接触する側で高分子 B の含量が最も多く、基体 6 側に向かってだんだん少なくなる、片方向傾斜組成を有している。図 13 の混合層 3 は、図 12 と同様な片方向傾斜組成を有するが、基体 6 側において高分子 B が実質的に含まれない領域がある。図 14 の混合層 3 は、酵素膜 1 側と基体 6 側の両外側で高分子 B の含量が最も多く、層内部に向かってだんだん少なくなる、両方向傾斜組成を有している。この場合、高分子 B の含量が最も少ない位置は、必ずしも膜厚方向での中心点にある必要はない。もちろん、基体 6 側と酵素膜 1 側とでは最表層部における高分子 B の含量が異なってもよく、また、両側で別々の成分を採用してもよい。さらに、図 15 に示すように、混合層 3 の内部において高分子 B が実質的に含まれない領域があってもよい。なお、以上述べた混合層の構造や、物質 A と高分子 B との混合態様は、電子顕微鏡などの物理的な観察手段、および X 線光電子分光分析、二次イオン質量分析などの分析手段で確認することができる。

【0037】

以上、本発明によるバイオセンサの混合層について説明したが、次に、バイオセンサ全体の構造について説明する。過酸化水素電極を含む基体 6 と過酸化水素生成酵素が含まれる生体触媒を固定化した酵素膜 1 との間に、前記混合層 3 が位置する（図 1 参照）要件を満たせば、その構造については限定されない。図 1 に示した基本構造の他に、酵素膜 1 の上にさらに膜 4 を形成する構造（図 16）が例として考えられる。

【0038】

酵素膜 1 の上に形成される膜 4 の役割としては、酵素膜 1 を外部試料から保護すること、または被測定成分の酵素膜 1 への到達を制限し、より高濃度の試料の測定に対応すること、などが挙げられる。前者の例として、血液中の成分を分析するセンサが考えられる。血液中には酵素膜の表面への付着によりセンサを劣化させるタンパク質などの高分子が多数含まれるので、保護膜を設けてこれらの成分の酵素膜への到達を阻止することによりセンサの測定精度や安定性を向上させることができる。また、後者の例として、尿中成分の測定や工業分野における製造プロセスのオンラインモニタリングの際、被検試料を希釈せずまたは数倍程度の希釈だけで広範囲の濃度測定に対応するためのセンサが挙げられる。

【0039】

また、酵素膜 1 が一層ではなく、複数層の膜からなる構造を有しても良い。図 17 に、酵素膜 1 が二層の例を示す。複数層の酵素膜 1 を設けたセンサの好ましい例としては、複数の酵素を利用して多段階の酵素反応より被測定成分を過酸化水素に変換する反応系を有するセンサの場合、酵素膜を積層した方がより効率よく変換できるケースがある。別の例としては、複数の酵素を利用して複数の成分を同時に検出する多機能バイオセンサが挙げられる。

【0040】

本発明によるバイオセンサは、主に過酸化水素生成酵素の基質になりうる成分、例えばグルコース、乳酸、アミノ酸、アルコールの分析に用いられる。さらに具体的に言えば、電極表面で過酸化水素と同様に酸化され電流信号を与える共存妨害物質が含まれる可能性のある媒体中の、過酸化水素生成酵素の基質になりうる成分の分析に用いられる。これらの媒体の例として、尿、血液、唾液などの生体関連液、産業分野における果汁や飲料水、生

10

20

30

40

50

産プロセスにおける中間媒体などが挙げられる。これらの媒体中に含まれる共存妨害物質としては、アスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンなどが挙げられるが、本発明によるバイオセンサは、これらの成分の影響を無視できる程度に抑えて標的成分を測定することができる。

【0041】

次に、本発明によるバイオセンサの製造方法について説明する。本発明によるバイオセンサは、使用される電極を含む基体、選択される膜の材料、およびセンサ膜構造などにより、様々な製造方法が考えられるが、予め膜を作成してから基体上に装着する方法と、膜材料から直接基体表面に膜を形成する方法に、大別することができる。ここでは、後者の直接基体表面に膜を形成する方法について、以下、詳細に説明する。

10

【0042】

まず、過酸化水素電極を含む基体を準備する。基体の形は問わないが、好ましくは平らな絶縁基板上に、作用電極を含む過酸化水素電極系を形成したものである。絶縁基板としてはガラス板、シリコンウェハー、セラミック板などが考えられる。絶縁基板上の電極系は、作用電極が含まれば良いが、センサの製造コストおよびセンサを利用した測定システムの簡素化の観点から、作用電極と対極（2極系）、あるいは作用極、対極および参照極（3極系）をパターン化して基板上に形成したものが好ましい。図18に、セラミック基板上にスクリーン印刷技術で作成された3極系基体の一例を示す。

【0043】

次に基体への成膜に移るが、必要に応じて基体を前処理する。前処理の主な目的は、基体表面の洗浄および活性化である。洗浄の方法としては、水や酸による洗浄が考えられる。特に酸による洗浄は、汚れの除去と同時に表面の活性化が期待できるので、好ましい。酸種の好ましい例としては、硝酸、硫酸、塩酸などの強酸、または、リン酸、ぎ酸、コエン酸、酢酸などの弱酸が挙げられる。なお、酸で洗浄した後の基体は、水で洗浄する必要がある。洗浄を完了した基体は、必要に応じて乾燥させる。乾燥条件は特に限定されないが、一般的に好ましい温度としては20～80、乾燥時間は5～120分間、などが挙げられる。なお、次の工程が水溶液を用いて処理する工程の場合、乾燥を省略することができる。

20

【0044】

次に、必要に応じて基体の表面処理を行なう。表面処理の主目的は、混合層の基体付着力を向上させるための表面活性化（反応性官能基の導入）またはノおよび基体と混合層との親和性の向上である。処理方法としては、汎用されている種々の方法、たとえばシラン化処理、プラズマ処理、電気化学的処理、またはコーティング材の塗布が利用できる。好ましい例として、シラン化処理が挙げられる。シラン化剤は、基体および選択透過膜の材質と官能基の種類などの状況を勘案して適宜選択されてよいが、一般的に好ましい例として、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、アルケン基、ハロゲン基、ビニル基などの官能基を含むものが望ましく、もっとも望ましくは、アミノ基およびエポキシ基を含むシラン化剤である。

30

【0045】

具体的な例を挙げれば、アリルトリクロロシラン、アリルトリエトキシシラン、アリルトリメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、クロロメチルジメチルクロロシラン、クロロメチルトリメチルシラン、3-クロロプロピルトリメトキシシラン、ジメトキシメチルクロロシラン、ジメチルアミノトリメチルシラン、メチルクロロシラン、エトキシジメチルビニルシラン、エチルジクロロシラン、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、3-グリシドキシプロピルメチルジメトキシシラン、ヒドロキシメチルトリメチルシラン、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン、3-メタクリルオキシプロピルメチルジメトキシシラン、メチルビニルジクロロシラン、トリクロロビニルシラン、トリエトキシビニルシラン、トリメトキシビニルシラン、およびトリメチルビニルシランからなる群から選択される物質が挙げられる。中でも、3-ア

40

50

ミノプロピルトリエトキシシランおよび3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランが、それぞれ基体表面にアミノ基またはエポキシ基を効率的に導入する安価のシラン化剤としてもっとも好ましい。

【0046】

シラン化処理の方法と手順としては、まず、シラン化剤を溶媒で一定濃度に希釈してシラン化溶液を調整する。次に、基体表面をシラン化溶液に一定時間接触させてから、洗浄し又は洗浄せずに乾燥する。別の方法として、スピンコーターなどの成膜装置で、基体表面にシラン化溶液を塗布してから乾燥する方法を用いることもできる。なお、シラン化溶液と接触してから洗浄せず乾燥、あるいは成膜装置で塗布する方法では、基体表面にシラン化剤の薄膜が形成されることになる。

10

【0047】

続いて、混合層の形成に移る。混合層の形成法は、選定される材料および予定構造などの状況を勘案して、周知の膜形成法から選定して適宜決定されて良い。

【0048】

混合層を製造する第一の好ましい方法を、次に示す。まず、物質A（または高分子B）の単独膜を基体上に形成し、次に、物質A（または高分子B）を少なくとも部分的に溶解または膨潤させることができる溶媒の入った高分子B（または物質A）の原液をその上に適用し、一定時間保持してから溶媒を揮発させて乾燥する。例えば、図7や図12、図13に示した、高分子Bが酵素膜と接触する側に集中して存在する構造を有する混合層の場合は、次のように製造される。まず、物質Aの膜を基体上に形成し、次に、物質Aを少なくとも部分的に溶解または膨潤させることができる溶媒（溶媒とする）の入った高分子Bの原液をその上に適用し、さらに、一定時間保持してから溶媒を揮発させて乾燥する。

20

【0049】

その原理は、以下の通りである。高分子Bの原液に含まれる溶媒は、原液の下の物質Aを少なくとも部分的に溶解または膨潤させて、物質Aの少なくとも最表層部を流動性の高い状態に変える。これにより、流動性のある物質Aと高分子Bが互いに拡散し混合する。その後、溶媒が取り除かれるので、両成分が混合した状態で乾燥し、混合層が形成される。混合層の混合部の厚さ、構造および混合程度は、高分子Bの原液中に含まれる溶媒の性質（特に沸点、物質Aに対する溶解性）および量、高分子Bの濃度、物質Aと高分子Bの原液との接触時間、環境要因（特に、気温、湿度）、およびその後の処理法によって制御される。

30

【0050】

その後の処理法とは、一定時間接触させた後、適用された原液をそのまま乾燥する方法、または部分的に取り除いて乾燥する方法、のいずれかを指す。適用された原液をそのまま乾燥する方法としては、高分子Bの原液を滴下した後一定時間かけて乾燥する方法（ドロップ法）や、物質Aの膜が形成された基体を高分子Bの原液の中にディッピングし一定時間経ってから引き上げてそのまま乾燥する方法、などが挙げられる。一方、適用された原液を部分的に除去する方法としては、スピンコート回転による膜の形成法が挙げられる。すなわち、原液を適用して予備回転などで基体物質Aの膜表面全体に広げた後、一定時間保持してから高速回転で余分な原液を除く。以上説明した方法のうち、引き上げ法やスピンコート法は、薄い膜を作成するのに適しており、ドロップ法は、少量の材料から厚い膜を作成するのに適している。なお、これらの膜形成法については後述する。

40

【0051】

また、図9や図14、図15に示した、高分子Bが酵素膜と接触する側および基体と接触する側の双方に集中して存在する構造を有する混合層の場合は、次のように製造される。まず、物質B1の膜を基体上に形成し、次に、高分子B1を少なくとも部分的に溶解または膨潤させることができる溶媒の入った物質Aの原液をその上に適用し、一定時間保持してから溶媒を揮発させて乾燥し、混合層の基体側混合部分を形成する。続いて、同様に高分子B2の原液を適用し、混合層の酵素膜と接触する側の混合部分を形成する。なお、高分子B1とB2が同じ材料であってもよい。

50

【0052】

混合層を製造する第二の好ましい方法としては、基体の上に、物質Aの膜 高分子Bの膜（あるいは高分子B1の膜 物質Aの膜 高分子B2）を順次形成してから、適宜な手段を施して混合層とする方法が挙げられる。この方法は、特に第一の方法では製造困難あるいは混合構造の形成が不十分な場合に、特に有効である。積層された物質Aと高分子Bとを混合させる手段としては、熱処理、加圧処理、両者を部分的に溶解させることができる溶媒と接触させる処理、などが例として挙げられる。

【0053】

熱処理は、物質Aおよび高分子Bの一方または両方の流動性が加熱により増大し、かつ材料自身の化学的性質が所定温度において安定している場合に適用される。この場合、高温で流動性の増した両物質が互いに相手側へ拡散侵入し、混合層が形成される。なお、この場合、温度および加熱時間が混合層の構造を制御する有効な手段となる。物質Aおよび高分子Bの材料としての安定性が保たれていれば、加熱温度は特に限定されないが、一般的に望ましい温度範囲として50 ~ 200 の範囲が挙げられる。一方、加圧処理は、材料に由来する安定性問題の制約をほとんど受けないが、加圧によって膜厚および膜密度に大きな変化が生じるので、具体的な条件は、材料の性質、要求されるセンサ仕様などの状況に応じて適宜決定する必要がある。また、溶媒で処理する方法による混合層の形成は、上記第一の製造方法と原理的に似ている。すなわち、溶媒による溶解または膨潤によって材料の流動性を高めて混合させるのである。なお、加熱、加圧、および溶媒の使用はそれぞれ単独で行なってもよく、組み合わせて行なってもよい。

【0054】

混合層を製造する第三の好ましい方法としては、両者を予め混合材料として一定の割合で調整してから、混合層を形成する方法が挙げられる。この場合、混合材料中の組成比を調整することにより、混合層の組成を制御する。一回の膜形成によって、混合層中の物質Aと高分子Bが層全体にわたって混合しているのが普通であるが、異なった混合比の混合材料を多段階にわたって積層することにより、混合層の構造を制御することができる。例えば、図7に示す構造を有する混合層を製造するには、基体上にまず物質Aのみの膜を形成し、次に物質Aと高分子Bの混合材料を用いて混合部分を作成する。

【0055】

以上、混合層中における物質Aと高分子Bの混合方法について説明したが、いずれの方法についても、バルクの材料から膜を作成する必要があるので、次に具体的な膜形成法について説明する。

【0056】

具体的な成膜法の好ましい例として、材料を溶媒で一定濃度の原液に調整したものを基体表面に層状に展開した後溶媒を蒸発させる方法、材料を溶媒で調整せずそのまま基体表面に成膜する方法、が挙げられる。混合層の主材料が有機物質である本発明においては、前者の、一定濃度の原液に調整してから膜を製造する方法がより好ましい。原液の調整に用いられる溶媒は、混合層材料や混合層を形成する具体的な方法など、種々の状況を勘案して適宜決定されてよい。

【0057】

アセチル基を含むセルロース誘導体を含む材料に適用する溶媒の好ましい例としては、アセトン、酢酸メチル、酢酸エチル、メチルエチルケトン、メチルセロソルブ、メチルセロソルブアセテート、乳酸エチル、4-ヒドロキシ-4-メチル-2-ペンタノン（ジアセトンアルコール）、塩化エチレン、メタノール、エタノール、ホルムアルデヒド、および水などが挙げられる。また、パーフロロスルホン酸を有するイオン交換樹脂に適用される溶媒としては、メタノール、エタノール、1-プロパンノール、2-プロパンノール、ホルムアルデヒド、および水などが挙げられる。これらの溶媒は、単独で又は複数種類を混合して、用いることができる。

【0058】

高分子Bに適用される溶媒は、主に高分子Bおよび物質Aの両方に対する溶解性、混合層

10

20

30

40

50

中における高分子Bと物質Aの両方を有する部分の製造方法、などを考慮して選択される。後述するように溶媒の選択は、混合層の形成方法に関係するだけでなく、混合層の過酸化水素選択膜としての性能や接着性能にも強い影響を与えるので、特に慎重に検討する。

【0059】

また、物質Aと高分子Bとの混合液を調整して混合層を製造する場合、両方の材料に対して溶解性を有する溶媒系の設計が望ましいが、片方が溶解されており、もう一方が分散された粒子の状態、あるいは両者をそれぞれの別の共溶しない溶媒に溶解したエマルジョンの状態にしてもよい。

【0060】

また、原液の濃度は、膜材料、溶液粘度、目標膜厚、塗布方法など、種々の状況を勘案して決定されてよく、特に限定されることはないが、一般的に、他の条件が同じであれば、膜厚は原液濃度と正の相関関係にあるので、原液濃度は膜厚を調整する重要なファクターとして検討されたらよい。一例を挙げると、電極を含む基体表面にスピン回転コート法で直接成膜する場合、原液の濃度が2～10(w/v)%の範囲が望ましい。この例において、膜厚が、濃度と粘度との両方に正の相関関係にある。濃度が上がると、溶液粘度も急激に上がることから、小さな濃度変化で膜厚を大きく調整することが可能である。

【0061】

膜原液を基体表面に層状に展開する方法の好ましい例として、基体が静止状態下での滴下塗布、流延塗布、スピンコーターなどの成膜装置による回転塗布、基体を原液と接触させた後基体を引き上げる方法、などが挙げられる。電極を含む基体表面が平らな基板の場合、スピン回転による方法は、高精度の膜厚制御が可能で、均質の膜を製造するのに適している。別のより好ましい方法として、速度を一定に制御できる引き上げ装置によるディッピング塗布が挙げられる。引き上げ装置によるディッピング塗布は基体表面が平らではない場合でもかなり均一な膜ができる。

【0062】

物質Aや高分子Bの原液調整に使用された溶媒の揮発性が高い場合、塗布作業の完了と同時に膜が完成されることになるが、溶媒に揮発性の低いものが含まれる場合は、膜塗布完了後、乾燥工程に移す。乾燥は、基本的には特に雰囲気制御することなく、室温でもよいが、場合によっては加熱や減圧などの措置を講じてよい。一般的に妥当な乾燥時間として、数分間から数時間の範囲が挙げられる。

【0063】

混合層の製造が終了したら、次に酵素膜の製造に移る。酵素膜も、予め膜を作成してから混合層の表面に装着する方法、およびその場で直接成膜する方法が考えられるが、好ましくはその場で直接成膜する方法である。具体的な製造方法としては、上述した混合層の成膜方法とほぼ同様な方法が適用できる。

【0064】

以上、基体表面上に混合層、酵素膜を順次形成するセンサの製造方法について述べたが、さらに膜4が必要な場合、後工程で続けて製造すればよいことは言うまでもない。なお、混合層を製造する前の基体洗浄や表面処理の一部または全部は、省略できることを改めて記述しておく。

【0065】

以上説明したように、本発明によれば、混合層中の物質Aが過酸化水素を優先的に透過させるとともに、混合層中の高分子Bが混合層と酵素膜や基体とを密着させるので、高精度でかつ安定性が優れたバイオセンサを実現できる。また、膜材料から直接基体表面に膜を形成する場合は、製造コストも低くて済む。

【0066】

【実施例】

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0067】

(実施例1) 硝酸による基体表面の洗浄

ガラス容器に50mlの1Nの硝酸を加え、続いてセラミック電極基体(図18参照)を完全に液に沈めるように入れて、手で数回ゆっくり振蕩してから室温で30分間放置した。続いて、基体を取り出して大量の脱イオン水で洗浄した。

【0068】

(実施例2) 3-アミノプロピルトリエトキシシランによる基体表面のシラン化処理

別のガラス容器に49.5mlの脱イオン水および0.5mlの3-アミノプロピルトリエトキシシランを加えて混合し、1%のアミノシラン溶液を調整した。続いて、実施例1で硝酸処理されたセラミック電極基体を前記溶液に浸すように入れて、手で数回ゆっくり振蕩してから室温で30分間放置した。続いて、基体を取り出して大量の脱イオン水で洗浄した。

10

【0069】

(実施例3) 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランによる基体表面のシラン化処理

別のガラス容器に49.5mlのイソプロピルアルコールおよび0.5mlの3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン(エポキシシラン)を加えて混合し、1%のエポキシシラン溶液を調整した。続いて、容器をフタしてセラミック電極基体と一緒に75のインキューベーターに入れた。20分間保持した後、セラミック電極基体をエポキシシランの溶液に入れて5分間振動攪拌した。次に、電極基体をガラス容器から取り出して同温度雰囲気中で30分間乾燥放置した。最後に電極基体を出してイソプロピルアルコールで洗浄し、室温で乾燥した。

20

【0070】

(実施例4) 酵素膜原液の調整

グルコースオキシダーゼ(EC1.1.3.4、シグマアルドリッチ製)2290ユニットを、0.7mlのリン酸ナトリウム緩衝溶液(100mM、pH6.0)で溶解し酵素溶液とした。また、牛血清アルブミン(BSA)を25mg秤量し、1.0mlの脱イオン水で溶解してBSA溶液を調整した。続いて調整されたBSA溶液0.2mlを取り、前記酵素溶液に加えて、均一に混ぜた。混ぜた後の混合液に2.0(v/v)%のグルタルアルデヒド水溶液を0.1ml加えて攪拌した。こうして酵素膜の原液を調整した。

30

【0071】

(実施例5) 組成の異なった混合層の試作

まず、クロロホルム90対エタノール10(体積比、以下同)の溶媒で、置換度2.4の5(w/v)%酢酸セルロース溶液(溶液A)を調整した。同様に、水50対エタノール50の混合溶媒で、アセチル置換度が1.0でアルデヒド基含量が約4mmol/gの5%のアルデヒド化セルロース溶液(溶液B)を調整した。次に、実施例2の方法でアミノシラン化処理された電極基体をスピンコーターにセットして、上記両液を溶液A:溶液B=19:1の比率で混合し激しく攪拌してから、セットされた基体の上に素早く滴下し、スピンコートで混合層を作成した。同様に、溶液Aと溶液Bの混合比が9:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1の混合層を作成した。比較のために、溶液Aだけの膜も作成した。作成した混合層は、電子顕微鏡で観察したところ、サイズが数十ナノメートルの相分離構造を示すが、混合態様が層全体にわたって均一で、表層における両成分の露出面積は、溶液Aと溶液Bの混合比にほぼ一致していた。

40

【0072】

(実施例6) グルコースセンサの試作 - その1

実施例3でエポキシシラン化処理された電極基体をスピンコーターにセットして、予め調整した置換度2.4の8(w/v)%酢酸セルロース溶液(溶媒アセトン)を原液として、酢酸セルロース膜を作成した。続いて、水60対アセトン40の混合溶媒で調整した3%のキトサン(酢酸0.75%を含む)溶液を、作用電極を覆うように滴下し、1分間保持してからスピンコートでキトサン膜を形成した。その後、実施例4で調整された酵素膜

50

の原液 $10 \mu\text{l}$ を、ピペットで作用電極の上にドロップし、 35°C の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。こうして作成したセンサは、図 7 や図 12、図 13 に示すような、高分子 B が酵素膜と接触する側に集中的に存在する構造を有する。

【0073】

(実施例 7) グルコースセンサの試作 - その 2

実施例 3 でエポキシシラン化処理された電極基体をスピコートにセットして、予め調整した置換度 2.4 の 8 (w/v) % 酢酸セルロース溶液 (溶媒アセトン) を原液として、酢酸セルロース膜を作成した。続いて、 3 % のキトサン (酢酸 0.75 % を含む) 水溶液を作用電極を覆うように滴下し、スピコートでキトサン膜を形成した。その後、基体をアセトン 60 対水 40 の溶媒に入れて 3 分間保持してから取り出して乾燥した。最後に、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 $10 \mu\text{l}$ を、ピペットで作用電極の上にドロップし、 35°C の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。こうして作成したセンサは、図 7 や図 12、図 13 に示すような、高分子 B が酵素膜と接触する側に集中的に存在する構造を有する。

10

【0074】

(実施例 8) グルコースセンサの試作 - その 3

実施例 2 でアミノシラン化処理された電極基体の作用電極の上に、 3 (w/v) % のパーフロスルホン酸イオン交換樹脂 (ナフィオン) 溶液 (溶媒イソプロピルアルコール 85 対水 15) $10 \mu\text{l}$ をピペットで滴下し、ナフィオン膜を作成した。続いてスピコートで、 4 % のポリエチレンイミン水溶液を用いてポリエチレンイミン膜を作成した。次に、イソプロピルアルコール 60 対水 40 の混合液の入ったトレーを準備し、基体を、液面から約 10 cm 離れたトレーの上空に膜の付いた面が下向きになるようにセットして、 80°C の雰囲気中に制御した容器に入れて密閉し、 30 分間保持した。その後、基体を取り出して乾燥した。最後に、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 $10 \mu\text{l}$ を、ピペットで作用電極の上にドロップし、 35°C の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。こうして作成したセンサは、図 7 および図 13 に示すような、高分子 B が酵素膜と接触する側に集中的に存在する構造を有する。

20

【0075】

(実施例 9) グルコースセンサの試作 - その 4

実施例 5 と同様の方法で、溶液 A と溶液 B との混合比が $9:1$ 、 $5:1$ 、 $4:1$ 、 $3:1$ 、 $2:1$ の混合層を電極基体上に作成し、その後、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 $10 \mu\text{l}$ を、ピペット作用電極の上にドロップし、 35°C の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。こうして作成したセンサは、全体にわたって組成がほぼ均一な混合層を有する。

30

【0076】

(実施例 10) グルコースセンサの試作 - その 5

まず、クロロホルム 90 対エタノール 10 の溶媒で、置換度 2.4 の 2 (w/v) % 酢酸セルロース溶液 (溶液 A) を調整した。同様に、水 50 対エタノール 50 の混合溶媒で、アセチル置換度が 1.0 でアルデヒド基含量が約 4 mmol/g の 2 % のアルデヒド化セルロース溶液 (溶液 B) を調整した。また、アセトンで置換度 2.4 の 5 (w/v) % 酢酸セルロース溶液を調整した。次に、実施例 2 でアミノシラン化処理された電極基体をスピコートにセットして、上記溶液 A と溶液 B を混合比 $5:1$ の比率で混合し激しく攪拌してから、セットされた基体の上に素早く滴下し、スピコート膜を作成した。続いて、アセトンで調整した 5 (w/v) % 酢酸セルロース溶液を用いてスピコートした。最後に、溶液 A と溶液 B の混合比が $4:1$ の原液を調整し、スピコートで成膜した。その後、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 $10 \mu\text{l}$ を、ピペットでドロップし、 35°C の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。こうして作成したセンサは、図 9 に示すような混合層を有する。

40

【0077】

(実施例 11) グルコースセンサの試作 - その 6

50

実施例 2 でアミノシラン化処理された電極基体をスピンコーターにセットして、3%のキトサン（酢酸 0.75% を含む）水溶液と、置換度 2.4 の 8 (w/v) % 酢酸セルロース溶液（溶媒アセトン）を原液として、キトサン / 酢酸セルロース / キトサンの三層積層膜を作成した。続いて、基体をアセトン 60 対水 40 の混合溶媒に入れて 3 分間保持してから、取り出して乾燥した。最後に、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 10 μ l を、ピペットで作用電極の上にドロップし、35 の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。こうして、表層部に物質 B の含量が多く、内部に物質 A の含量が多い混合層を有するセンサを製造した。

【0078】

（実施例 12）グルコースセンサの試作 - その 7

実施例 2 でアミノシラン化処理された電極基体をスピンコーターにセットして、3%のキトサン（酢酸 0.75% を含む）水溶液と、置換度 2.4 の 8 (w/v) % 酢酸セルロース溶液（溶媒アセトン）を原液として、キトサン / 酢酸セルロース / キトサンの三層積層膜を作成した。続いて、基体をアセトン 60 対水 40 の混合溶媒に入れて 3 分間保持してから、取り出した。次に、基体を 0.75% の酢酸水溶液に入れて、30 分間振蕩培養した。その後、基体を取り出して乾燥した。最後に、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 10 μ l を、ピペットで作用電極の上にドロップし、35 の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。この実施例で作成したセンサの混合層は、酵素膜と接触する面において物質 A が部分的に露出している構造を有する。

【0079】

（比較例 1）グルコースセンサの試作 < 実施例 6 との比較 >

実施例 3 でエポキシシラン化処理された電極基体をスピンコーターにセットして、予め調整した置換度 2.4 の 8 (w/v) % 酢酸セルロース溶液（溶媒アセトン）を原液として、酢酸セルロース膜を作成した。その後、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 10 μ l を、ピペットで作用電極の上にドロップし、35 の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。

【0080】

（比較例 2）グルコースセンサの試作 < 実施例 8 との比較 >

実施例 2 でアミノシラン化処理された電極基体の作用電極の上に、3 (w/v) % のパーフロスルホン酸イオン交換樹脂（ナフィオン）溶液（溶媒イソプロピルアルコール 85 対水 15）10 μ l をピペットで滴下し、ナフィオン膜を作成した。続いてスピンコートで、4% のポリエチレンイミン水溶液を用いてポリエチレンイミン膜を作成した。最後に、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 10 μ l を、ピペットで作用電極の上にドロップし、35 の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。

【0081】

（比較例 3）グルコースセンサの試作 < 実施例 11 との比較 >

実施例 2 でアミノシラン化処理された電極基体をスピンコーターにセットして、3%のキトサン（酢酸 0.75% を含む）水溶液と、置換度 2.4 の 8 (w/v) % 酢酸セルロース溶液（溶媒アセトン）を原液として、キトサン / 酢酸セルロース / キトサンの三層積層膜を作成した。最後に、実施例 4 で調整された酵素膜の原液 10 μ l を、ピペットで作用電極の上にドロップし、35 の雰囲気中で 30 分間乾燥して酵素膜を作成した。

【0082】

（比較例 4）電極基体への酵素膜の直接成膜

セラミック電極基体を実施例 1 および実施例 2 に準じて処理した後、実施例 4 の方法で調整した酵素膜の原液で、作用電極の上に酵素膜を作成した。

【0083】

（実施例 13）混合層の付着力評価

実施例 5 で作成した、基体に付着したままの混合層について、セロファンテーピング法で膜の基体付着力評価を行なった。普通の市販セロファンテープを、膜および周辺エリアを被覆するように貼り付けて、テープ表面に圧力を加えるように指で押さえて密着性を確か

10

20

30

40

50

めてから、テープを剥がし、膜の剥離状況を目視で確認した。こうした作業を、膜が完全に剥離されるまで又は20回まで、繰り返し行なった。そして、1回のテーピングで膜が無傷のまま残っているものについては2点、部分剥離の場合は1点、完全剥離の場合は0点とし、合計点数を付着力として定量化した。その結果を図19に示す。

【0084】

実施例5ですでに説明したように、混合層の表層および内部での組成はほぼ均一なので、溶液の混合比率と、混合層の物質A：高分子Bの表面組成とは、ほぼ一致する。図19に示すように、アルデヒド化セルロース溶液（高分子B）を含む混合層の基体付着力は、酢酸セルロース溶液（物質A）のみの膜の基体付着力より、はるかに高い。また、混合層中のアルデヒド化セルロース（高分子B）の含量と、付着力の間には、ほぼ正の相関関係がある。ただし、物質A：高分子Bの表面組成が9：1を超えるほど高分子Bの含量が増えたと（すなわち高分子Bの表面露出面積比が10%を超えたと）、この傾向は顕著ではなくなる。

【0085】

（実施例14）センサ膜の観察

実施例6～12、比較例1～3で作成したセンサについて、乾燥後、膜剥離の有無を観察した。剥離していないセンサは、33mMのリン酸二水素カリウムとリン酸一水素ナトリウム（50mMの塩化カリウムを含む、pH6.8）緩衝溶液に入れて、一晚浸してから膜の観察を行なった。その結果を表1に示す。

【0086】

【表1】

	乾燥後	緩衝液中
実施例6	○	○
実施例7	○	◎
実施例8	○	○
実施例9（9：1）	○	△
実施例9（5：1）	○	○
実施例9（4：1）	○	◎
実施例9（3：1）	○	◎
実施例9（2：1）	○	◎
実施例10	○	◎
実施例11	○	◎
実施例12	○	○
比較例1	×	×
比較例2	○	×～△
比較例3	△	—

【0087】

なお、表1における各符号の意味は、次のとおりである。

< 乾燥後 >

×：剥離

○：周辺捲れ

◎：きれいな膜

< 緩衝液中 >

×：すでに剥離か溶液の振蕩で剥離

○：溶液振蕩で剥離しないが、周辺膨潤またはピンセットで簡単に剥離

◎：きれいな膜。ピンセットで引っ掻いた場合、ピンセットとの接触面よりも少し広い幅

10

20

30

40

50

で膜が取れる

ピンセットで引っ掻いた場合、ピンセットと接触した部分だけ膜が取れる

【0088】

表1からわかるように、すべての実施例において、比較例より酵素膜の付着力が向上した。また、実施例9の5つの例の比較から、混合層中の高分子Bの含量が多いほど（すなわち高分子Bの表面露出面積比が大きいほど）、酵素膜の付着力が強いことが判った。より具体的には、高分子Bの比率が20%（物質A：高分子B = 4：1）以上が望ましい。

【0089】

（実施例15）フローインジェクション分析装置によるセンサの評価

実施例6～12で作成したセンサをフローセルに装着し、図20に示すフローインジェクション分析装置で、アスコルビン酸（ASA、100mM）、およびグルコース（10mM）の溶液に対する応答のピーク電流を測定した。測定条件を以下に示す。

・キャリア液：33mMのリン酸二水素カリウムとリン酸一水素ナトリウム、50mMの塩化カリウムを含む緩衝溶液。pH6.8。

・流速：1.0ml/min

・サンプル注入量：10μl

・チューブ：サンプラーのサンプルインジェクターからセンサまでのチューブ長が120cm、内径が0.8mm。

得られた結果を、単位濃度当たりの出力（感度）および選択比にまとめて、表2に示す。

【0090】

【表2】

	ASA 感度 (nA/mM)	グルコース 感度 (nA/mM)	選択比 (ASA/グルコース)
実施例6	1.35	42.3	3.19%
実施例7	3.76	48.5	7.75%
実施例8	1.81	51.4	3.52%
実施例9(9:1)	2.25	47.6	4.73%
実施例9(5:1)	3.45	51.7	6.67%
実施例9(4:1)	6.35	54.8	11.6%
実施例9(3:1)	8.64	62.3	13.9%
実施例9(2:1)	12.5	69.7	17.9%
実施例10	0.25	43.6	0.57%
実施例11	2.03	46.5	4.37%
実施例12	1.65	49.7	3.32%

【0091】

表2から、混合層の材料および作成方法によりASA/グルコース選択比が大きく異なることが分かり、また、選択比が低いと感度も低い傾向が見られた。一般的にいうと、センサの感度が高いほど、また、選択比が低いほど、センサとしては望ましい。選択比の視点からは、混合層の中に確実に物質Aの含量が100%である部分を有するセンサ（例えば実施例10のセンサ）が望ましい。しかし、すでに述べたように、標的成分に比べて共存妨害成分の濃度が比較的低い試料を測定する場合など、選択比がある程度高くてもよいケースもあることから、実際の状況に応じて、適したタイプのセンサを選択すればよい。

【0092】

（比較例5）フローインジェクション分析装置によるセラミック基体電極の評価

上記実施例で用いたセラミック電極基体と同ロットのものを、表面に混合層を付けずにフローセルに装着し、図20に示すフローインジェクション分析装置で、実施例15と同じ条件で過酸化水素（H₂O₂）およびASA（濃度は共通して2mM）に対する応答のピー

ク電流を測定した。その結果を表3に示す。電極はアスコルビン酸と過酸化水素に対して、ほぼ同程度の感度を示した。

【0093】

【表3】

サンプル	HPO	ASA
出力 (nA)	515	548
感度 (nA/mM)	258	274
感度比	—	106%

10

【0094】

(比較例6)フローインジェクション分析装置による混合層無しセンサの評価比較例4で製造したグルコースセンサをフローセルに装着し、図20に示すフローインジェクション分析装置で、実施例15と同じ条件でASAおよびグルコースの溶液(濃度は共通して5mM)に対する応答のピーク電流を測定した。その結果を表4に示す。センサは妨害成分のASAに対して、グルコースよりも2倍以上の応答を示した。

【0095】

【表4】

サンプル	ASA	グルコース
出力 (nA)	798	384
感度 (nA/mM)	160	76.8
ASA/グルコース 選択比	208%	—

20

【0096】

上記の実施例と比較例から明らかなように、本発明により、高精度でかつ安定性が優れたバイオセンサを実現できた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明によるバイオセンサの基本構造を示す図

【図2】 キトサンの基本構造を示す図

【図3】 混合層中の物質Aと高分子Bの混合態様の例を示す図

【図4】 混合層中の物質Aと高分子Bの混合態様の例を示す図

【図5】 混合層中の物質Aと高分子Bの混合態様の例を示す図

【図6】 混合層中の物質Aと高分子Bの混合態様の例を示す図

【図7】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図8】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図9】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図10】 混合層中の表層部の例を示す模式図

【図11】 混合層中の表層部の例を示す模式図

【図12】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図13】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図14】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図15】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図16】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図17】 バイオセンサの構造の例を示す図

【図18】 セラミック基板上に作成した3極系基体の例を示す図

【図19】 混合層の物質A：高分子Bの表面組成と付着力との関係を示す図

【図20】 フローインジェクション分析装置を示す図

【図21】 従来のバイオセンサの基本構造を示す図

【符号の説明】

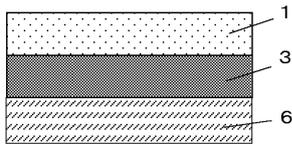
30

40

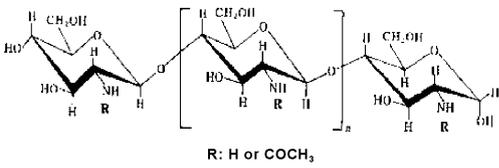
50

- 1 ... 酵素膜
- 2 ... 選択透過膜
- 3 ... 混合層
- 4 ... 膜
- 6 ... 基体
- 7 ... 絶縁基板
- 8 ... 作用電極

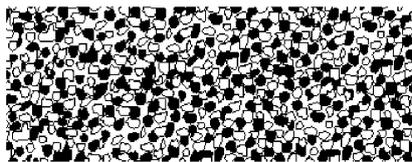
【 図 1 】



【 図 2 】



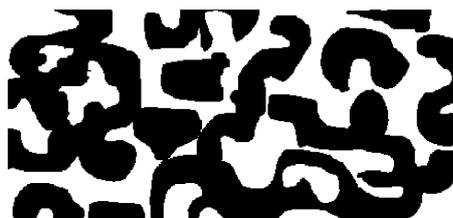
【 図 3 】



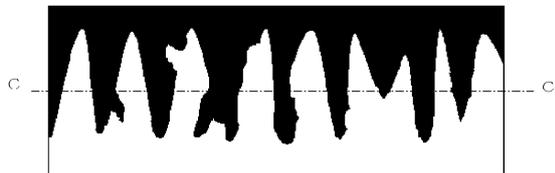
【 図 4 】



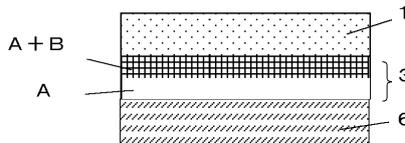
【 図 5 】



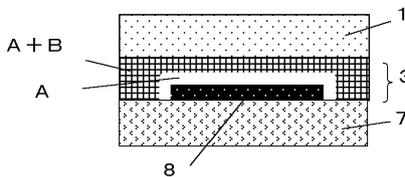
【 図 6 】



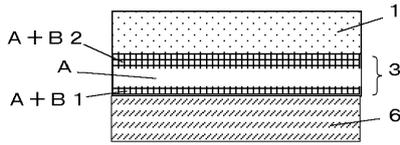
【 図 7 】



【 図 8 】



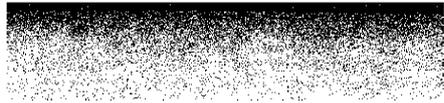
【図9】



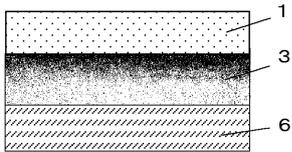
【図10】



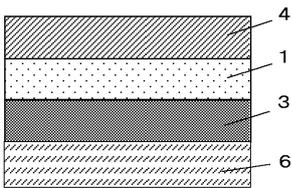
【図11】



【図12】



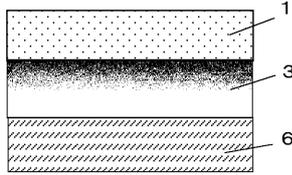
【図16】



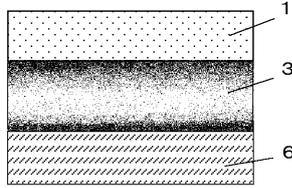
【図17】



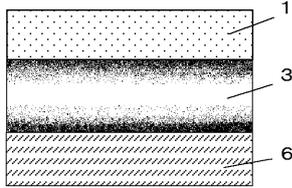
【図13】



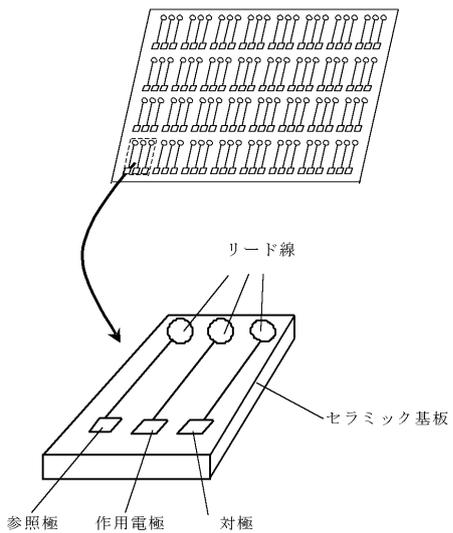
【図14】



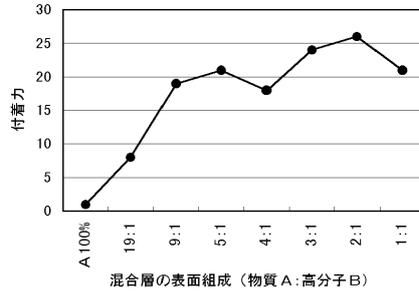
【図15】



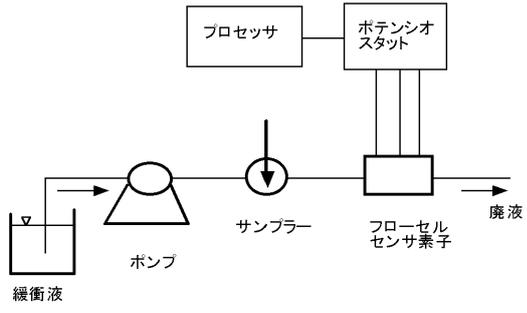
【図18】



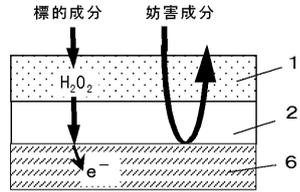
【図19】



【図 2 0】



【図 2 1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/66

D

- (56) 参考文献 特開平 1 0 - 0 2 6 6 0 1 (J P , A)
特開平 0 5 - 1 4 9 9 1 1 (J P , A)
特開平 0 2 - 0 3 5 9 3 3 (J P , A)
特開平 0 7 - 0 7 7 5 0 9 (J P , A)
特開平 0 8 - 0 5 0 1 1 2 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 0 0 2 6 8 3 (J P , A)
特開昭 6 3 - 0 7 8 0 6 2 (J P , A)
特開昭 5 8 - 0 8 6 4 5 0 (J P , A)
特開平 0 2 - 3 0 6 1 5 5 (J P , A)
特開昭 5 9 - 0 4 8 6 5 1 (J P , A)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/66