(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年1月25日(25.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/019017 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/327 (2006.01) *G01N 27/416* (2006.01)
C08F 220/38 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/026089

(22) 国際出願日： 2023年7月14日(14.07.2023)

(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 2022-116519 2022年7月21日(21.07.2022) JP
特願 2022-116522 2022年7月21日(21.07.2022) JP

(71) 出願人：ＰＨＣホールディングス株式会社 (**PHC HOLDINGS CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1058433 東京都港区西新橋２－３８－５ Tokyo (JP).

(72) 発明者：中戸 絢也(**NAKATO, Junya**). 羽田 圭吾(**HANEDA, Keigo**). 矢野 節子(**YANO, Setsuko**).

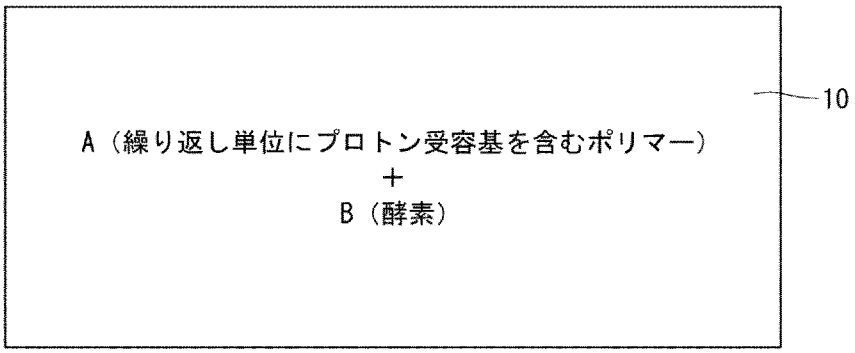
(74) 代理人：山尾 憲人，外(**YAMAO, Norihito** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) **Title:** REAGENT LAYER AND BIOSENSOR COMPRISING REAGENT LAYER

(54) 発明の名称： 試薬層および試薬層を備えるバイオセンサ



10 A (Polymer containing proton acceptor group in repeating unit) + B (Enzyme)

(57) **Abstract:** An embodiment of the present invention provides a reagent layer containing: a polymer that contains a proton acceptor group as a repeating unit and has a pH-buffering capacity; and an oxidoreductase that oxidizes or dehydrogenates an analyte.

(57) 要約：本発明の一実施形態では、繰り返し単位にプロトン受容基を含むと共にｐＨ緩衝能を有するポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層が提供される。

WO 2024/019017 A1

［続葉有］

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 補正された請求の範囲（条約第19条(1)）

明　細　書

発明の名称 ： 試薬層および試薬層を備えるバイオセンサ

技術分野

[0001]　本発明は、試薬層および試薬層を備えるバイオセンサに関する。

背景技術

[0002]　近年、医療分野等の様々な分野で、試料（細胞培養液等）中のアナライトを測定するために、バイオセンサが用いられ得る。アナライトの測定方法としては、例えば電気化学的測定法が用いられ得る。

[0003]　電気化学的測定法におけるバイオセンサとしては、電極（作用極、対極、参照電極）と電極上に設けられた酵素膜を備えたものがある（特許文献１参照）。当該電極および酵素膜を備えるバイオセンサは、ｐＨ緩衝能を有する緩衝液の連続供給と、同緩衝液内への試料注入とを可能とする構造の秤量部に配置され得る。酵素として、測定対象となるアナライトが基質として作用するものを適宜選択することで、種々のアナライトの測定が可能となる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平１０－７８４０５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　ここで、本願発明者らは、従前のバイオセンサの構成について改善可能な事項があることを新たに見出した。具体的には、従前のバイオセンサは、緩衝液の連続供給と同緩衝液内への試料注入とが可能な構造体に配置され得る。しかしながら、かかる従前のバイオセンサでは、緩衝液の連続供給を行うことなく、試料を連続的に直接モニタリングする手法には対応し難い。そのため、バイオセンサの構成要素としての試薬層（特許文献１の酵素膜に対応）がｐＨ緩衝能の性質を有することが望まれる。

[0006]　本発明は、かかる課題に鑑みてなされたものである。すなわち、本発明の

目的は、ｐＨ緩衝能の性質を有する試薬層および同試薬層を備えるバイオセンサを提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 上記目的を達成するために、本発明の一実施形態では、

繰り返し単位にプロトン受容基を含むと共にｐＨ緩衝能を有するポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層が提供される。

[0008] 本発明の一実施形態では、上記試薬層を備えるバイオセンサが提供される。

発明の効果

[0009] 本発明の一実施形態によれば、試薬層自体がｐＨ緩衝能の性質を有することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、本発明の一実施形態に係る試薬を含む試薬層の構成を模式的に示す断面図である。

[図2]図２は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成を模式的に示す断面図である。

[図3]図３は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。

[図4]図４は、本発明の別の実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。

[図5]図５は、実施例１Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示すグラフである。

[図6]図６は、比較例１Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示すグラフである。

[図7]図７は、実施例２Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示すグラフである。

[図8]図８は、比較例２Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示す

グラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明（発明Ａ）の実施形態について具体的に説明する。以下では、まず、バイオセンサの全体的構成について説明する。その後、本発明の特徴部分について説明する。

[0012] ［バイオセンサの全体的構成］

以下、本発明の一実施形態におけるバイオセンサの全体的構成について説明する。図１は、本発明の一実施形態に係る試薬層の構成を模式的に示す断面図である。図２は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成を模式的に示す断面図である。

[0013] 本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００は、基板表面に位置する作用極３０、作用極表面に位置する試薬層１０、および試薬層１０の表面に位置する保護膜２０を備える（図１および図２参照）。なお、本実施形態では、便宜上、電極部の構成要素としての作用極３０については図示し、その他の電極部の構成要素としての対極および参照極については図示を省略していることを確認的に付言しておく。

[0014] 本明細書でいう「バイオセンサ」とは、酵素－基質などの組合せを利用して、基質（アナライトに対応）と酵素（受容体に対応）との間の分子認識反応によって発生する化学的な変化を電気信号に変換し、得られた電気信号の強さに応じてアナライトの代謝速度、濃度等を測定する測定デバイスである。

[0015] 基板としては絶縁性基板を用いることができる。特に限定されるものではないが、基板としては、数百μｍのポリエチレンテレフタレート 、ポリアミド、ポリイミド等の材料から構成され得る。一実施形態では、バイオセンサ１００の電極部は液体試料（細胞培養液等）に挿入可能となっている。その上で、バイオセンサ１００の挿入後、電極部に電圧を印加可能となっている。

[0016] 下記で具体的に述べるが、試薬層１０は少なくとも酵素Ｂを含み得る（図

１参照）。酵素Ｂとしては、測定対象となるアナライトが基質として作用するものが選択され得る。かかる選択により、種々のアナライトの測定が可能となる。酵素Ｂとしては、アナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素であり得る。

[0017] 例えば、酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、および／またはアルコールデヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

[0018] なお、上記試薬層は、メディエータおよび／または導電性粒子を更に含むことができる。導電性微粒子としては、カーボンブラック、カーボンナノチューブが挙げられる。本明細書でいう「メディエータ」とは、広義には電子伝達を仲介する酸化還元物質を意味し、狭義には、下記のバイオセンサにおいてアナライトの酸化還元反応によって生じる電子の伝達を担う物質を指す。

[0019] 特に限定されるものではないが、メディエータとして、金属錯体（例えば、オスミウム錯体、ルテニウム錯体、鉄錯体等）、キノン化合物（例えば、ベンゾキノン、ナフトキノン、フェナントレンキノン、フェナントロリンキノン、アントラキノン、及びそれらの誘導体等）、フェナジン化合物、ビオロゲン化合物、フェノチアジン化合物、及びフェノール化合物が挙げられる。

[0020] より具体的には、メディエータとして、フェリシアン化カリウム、ヘキサアンミンルテニウム、フェロセン、ポリ（１－ビニルイミダゾール）－ビス（ビピリジン）クロロオスミウム、ヒドロキノン、２－メチル－１，４－ベンゾキノン、１，２－ナフトキノン－４－スルホン酸塩、９，１０－フェナ

ントレンキノン－２－スルホン酸塩、９，１０－フェナントレンキノン－２，７－ジスルホン酸塩、１，１０－フェナントロリン－５，６－ジオン、アントラキノン－２－スルホン酸塩、１－メトキシ－５－メチルフェナジニウムメチルサルフェートや１－メトキシ－５－エチルフェナジニウムエチルサルフェート等のフェナジン誘導体、メチルビオロゲン、ベンジルビオロゲン、メチレンブルー、メチレングリーン、２－アミノフェノール、２－アミノ－４－メチルフェノール、及び２，４－ジアミノフェノールからなる群から選ばれる１種以上が用いられる。

[0021] 保護膜２０は、試薬層１０および電極部を覆うように構成され得る。保護膜２０は、培地中の細胞のアナライト（乳酸等）の透過速度を制御しつつ、そのアナライトを作用極側へと浸透可能なように配置されている。又、保護膜２０は、作用極上の試薬層１０内に含まれる成分を保護膜２０の外側へと流出することを抑制可能なように配置されている。即ち、本明細書でいう「保護膜」とは、試薬層に含まれる物質の保護膜外への漏出の抑制に寄与する膜であり、かつ、保護膜外に存在するアナライトが保護膜を介して試薬層側へと移動可能な孔を有する膜である。

[0022] 保護膜は生体適合性を有するポリマーを含むことが望ましい。保護膜については、例えばポリマーおよび架橋剤をアルコール溶媒、例えば緩衝液－アルコール含有溶媒に溶解させて、膜溶液を形成し、この膜溶液を試薬層に塗布、乾燥または膜溶液に電極と試薬層の積層体を浸漬し、引き上げ、乾燥させることで得ることができる。

[0023] 保護膜に含まれるポリマーとしては、生体適合性を有するホスホリルコリン基と重合性基としてのメタクリロイル基又はアクリロイル基を有するものを含むことができる。一例として、２-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）ポリマーが含まれ得る。

[0024] 又、保護膜に含まれるポリマーとしては、複素環式窒素基を有するｔ－ブチルアクリレート等を含むことができる。複素環式窒素基としては、例えば、ピリジル基等を選択することができる。一例として、スチレン－２－ビニ

ルピリジン－ｔｅｒ．ブチルメタクリレートのランダムコポリマー（Ｓ２ＶＰｔＢｕＭＡ）、トリプロピレングリコールメチルエーテルメタクリレート－スチレン－４－ビニルピリジンのランダムコポリマー（ＴＧＭＡＳ４ＶＰ）、および／またはポリ（ｔｅｒ．ブチルメタクリレート－ｂ－４－ビニルピリジン（ｔＢｕＭＡ４ＶＰ））が選択され得る。

[0025] 架橋剤としては、上記の複素環式窒素基と反応可能な反応性基を有するものを用いることができる。一例としては、ポリ（エチレングリコール）ジグリシジルエーテルが挙げられる。

[0026] 以下、上記の構成要素を備えるバイオセンサ１００に基づき供される反応作用のメカニズムについて説明する。図３は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。図４は、本発明の別の実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。

[0027] 本発明の一例では、培地中に電極部を浸した状態で、保護膜２０を介して培地から試薬層１０へと移動するアナライトを、試薬層１０内にて酵素Ｂを触媒とし、溶存酸素を用いて酸化させる。その際に生じる過酸化水素を電気的に検出することで、アナライトの濃度を測定することが可能となる。

[0028] 乳酸を検出する場合を例にとると、保護膜２０を通して培地から試薬層１０へと移動してきた乳酸（図３内のＬａｃに相当）が試薬層１０の酵素（図３内の乳酸オキシダーゼ（ＬＯｘ）に相当）との酵素反応で酸化される。かかる酸化により、ピルビン酸（図３内のＰｙｒｕに相当）、過酸化水素、および電離状態のプロトン（Ｈ＋）の形成がなされ得る。この形成時に生じる過酸化水素を電気的に測定することで、乳酸の濃度を測定することが可能となる。この場合、バイオセンサ１００は乳酸センサとして機能することができる。

[0029] また、図４に示すように、試薬層１０はメディエータを含んでいてもよい。上述のように、メディエータは、バイオセンサ１００においてアナライト（乳酸に対応）の酸化還元反応によって生じる電子の伝達を仲介する酸化還

元物質である。そのため、このメディエータの存在により、発生する電子の伝達が好適になされ得る。

[0030] ［本発明の特徴部分（試薬層）］

以下、本発明の特徴部分について説明する。本発明は、バイオセンサの構成要素である試薬層１０の構成に特徴を有する（図１参照）。

[0031] 本願発明者らは、従前のバイオセンサのように、ｐＨ緩衝能を有する緩衝液の連続供給を行わずとも、細胞培養液等に存在するアナライトを連続的に直接モニタリングするための構成について鋭意検討した。その結果、本願発明者は、バイオセンサ１００の構成要素である試薬層１０が既述の酵素Ｂに加え、「繰り返し単位にプロトン受容基を含む」と共にｐＨ緩衝能を有するポリマーＡを含む構成を案出するに至った。ここでいう「プロトン受容基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、プロトン（H^+）を受容可能な官能基を指す。

[0032] かかるポリマーＡの繰り返し単位がプロトン受容基を含むことで、アナライトが試薬層１０内にて酵素Ｂとの酵素反応で酸化される際に生じ得る電離状態のプロトンを受容することが可能となる。ポリマーＡの試薬層１０外部への脱離を防止する観点からは、ポリマーＡの重量平均分子量（Ｍｗ）は１００００以上であることが好ましい。

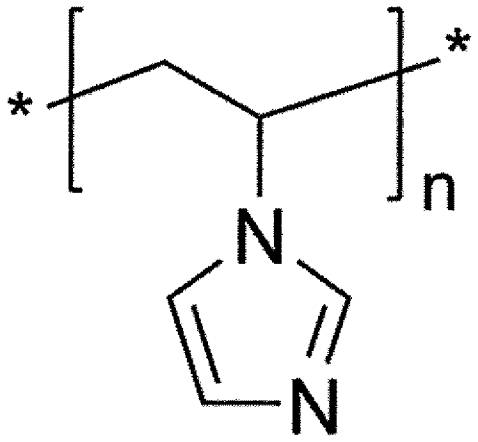
[0033] 以上により、ポリマーＡは試薬層１０内で酵素Ｂの近傍に留まり、反応場のｐＨが酵素Ｂの至適ｐＨから逸脱することを抑制可能となる。即ち、反応場のｐＨを一定範囲に保持することができる。それ故、酵素Ｂの失活を回避することができ、その結果としてバイオセンサ１００の耐久性を向上させることができる。具体的には、培地が供された培養槽内に上記特徴を有する試薬層１０を含むバイオセンサ１００を直接挿入して、アナライトの好適な連続的測定が可能となる。なお、本明細書でいう「センサ耐久性」とは測定期間中のセンサの電流応答値の維持率のことを指す。

[0034] 上記のポリマーＡの繰り返し単位に含まれるプロトン受容基としては、複素環式窒素基を用いることができる。例えば、複素環式窒素基は、イミダゾ

ール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホリル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも１種であることができる。

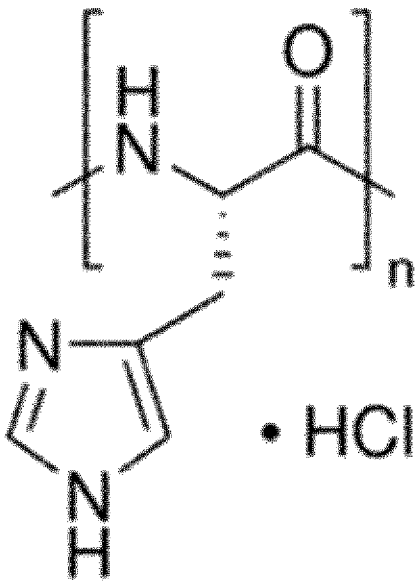
[0035] 繰り返し単位に複素環式窒素基を含むポリマーＡの一例としては、例えば、下記のポリビニルイミダゾールＰｏｌｙＩＭＺであることができる。

[化１]



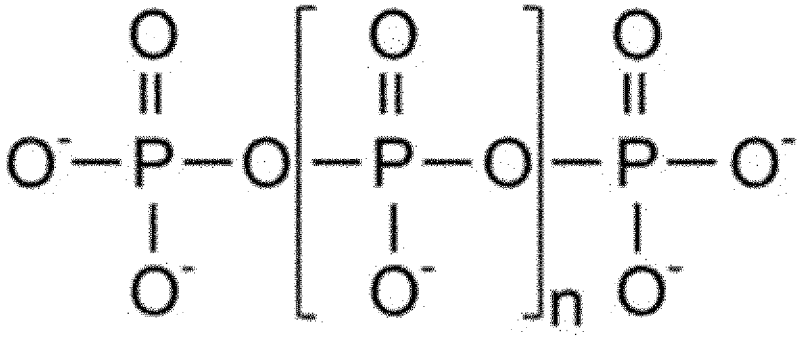
[0036] 繰り返し単位に複素環式窒素基を含むポリマーＡの別例としては、例えば、下記のポリ-Ｌ-ヒスチジン（ＰｏｌｙＨ）であることができる。

[化２]



[0037] 上記のポリマーＡの繰り返し単位に含まれるプロトン受容基としては、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも１種であることができる。繰り返し単位に電離状態の上記官能基を含むポリマーＡの一例としては、例えば、重合度は７００～１０００、重量平均分子量（Ｍｗ）は７００００以上１０００００以下のポリリン酸ナトリウムが使用できる。

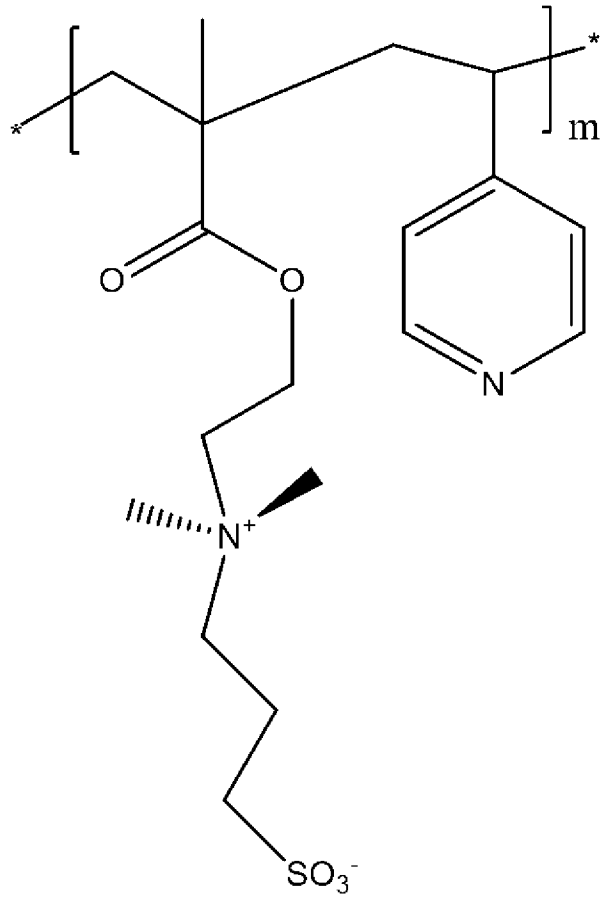
[化３]



[0038] また、上記のポリマーＡとしては、繰り返し単位にプロトン受容基に加え、イオン性基を含むものを用いてもよい。ここでいう「イオン性基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、親水性を供することが可能なイオン状態の官能基を指す。

[0039] 一例として、ポリマーＡは、繰り返し単位が４－ビニルピリジンに由来する部分と３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートに由来する部分を含んでよい。即ち、上記ポリマーＡの繰り返し単位において、イオン性基を備えた第１部分が３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートを含み得る。又、上記ポリマーＡの繰り返し単位において、プロトン受容基を備えた第２部分が４－ビニルピリジンを含み得る。例えば、ポリマーＡは下記の構造を採ってよい。

[化４]



[0040] [バイオセンサの作製方法]

以下、上記バイオセンサの作製方法の一例について説明する。

[0041] まず、絶縁性基板を準備する。絶縁性基板の準備後、絶縁性基板に、カーボンインク等を印刷して、作用極３０、対極および配線を構成する導電性薄膜を形成する。又、Ａｇ／ＡｇＣｌインクを導電性薄膜に印刷し、参照極を形成する。

[0042] または、金、白金またはパラジウムなどの金属から選択される導電性薄膜（作用極に相当）をスパッタ法、蒸着法、またはイオンプレーティングなどにより堆積して形成することもできる。

[0043] この作用極の表面には、フルオロカーボンを主鎖とし、スルホ基を側鎖に含むナフィオンを被覆することができる。導電性薄膜の厚さは、１０ｎｍ～数百ｎｍであり得る。対電極および／または参照電極については、作用極の周縁に配置してよく、例えば基板の裏側に配置してもよい。これら電極形成部分以外については絶縁レジスト層が形成され得る。

[0044] その後、本発明の試薬層を構成する試薬を作用極上に塗布する。試薬は、上記の繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマーＡおよび酵素Ｂを含む。試薬には、これらのポリマーＡおよび酵素Ｂ以外に、導電性付与のためのカーボン粒子などの導電性粒子の懸濁液およびメディエータの水溶液を更に含むことができる。試薬の塗布後、作用極に塗布したこの試薬を乾燥することで試薬層１０を形成することができる。

[0045] 試薬層１０の形成後、試薬層１０の表面に保護膜２０用ポリマー溶液を塗布し、その後室温で乾燥させる。または、試薬層１０付きの電極３０の保護膜２０用ポリマー溶液への浸漬、引き上げおよび乾燥を複数回繰り返す。これにより、試薬層１０および電極部を覆うように保護膜２０を形成することができる。以上により、バイオセンサ１００を作製することができる。

実施例

[0046] 以下、本発明（発明Ａ）の実施例について説明する。

[0047] 実施例１Ａ

［バイオセンサの作製］

以下の工程（１）～工程（６）を経てバイオセンサを作製した。

[0048] ●工程（１）：電極の作製

スクリーン印刷機２５０ＩＰ（セリアコーポレーション社製）を用いて、カーボンインク（藤倉化成社製）を絶縁基板上に印刷し、導電性薄膜を形成した。導電性薄膜は、作用極および配線を構成する。続いて、試薬層の延在範囲を規制するための第１レジスト膜を絶縁基板上に積層した。さらに、陽イオン交換膜および保護膜の延在範囲を規制するための撥水性フィルムを第１レジスト膜上に貼付した。

[0049] ●工程（２）：試薬液の調製

以下に示す各試薬を以下の終濃度となるように混合し、約１時間反応させて試薬液を調製した。

・リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）　終濃度１０ｍＭ

・塩化ナトリウム（富士フイルム和光純薬株式会社製）　終濃度２０ｍＭ

・カーボン分散液　終濃度５ｍｇ／ｍＬ

・ポリマー結合型ＰＮＴ　終濃度４（６０８ｎｍの吸光度）

・ヒドロキシプロピルセルロース（ＮＩＳＳＯ　ＨＰＣ－ＶＨ　日本曹達株式会社製）　終濃度０．０５％（ｗ／ｖ）

・ポリビニルイミダゾール　終濃度６．５９ｍｇ／ｍＬ

・乳酸オキシダーゼ（ＬＯＸ　Ｔ－４７：旭化成ファーマ社製）　終濃度４００Ｕ／ｍＬ

・グルタルアルデヒド２５％溶液（富士フイルム和光純薬株式会社製）　終濃度０．００２％（ｗ／ｖ）

[0050]　なお、リン酸ナトリウム緩衝液は、リン酸水素二ナトリウム(富士フイルム和光純薬株式会社製)と、リン酸二水素ナトリウム(富士フイルム和光純薬株式会社製)とで調製した。

[0051]　カーボン分散液は、ケッチェンブラック（ＥＣ３００Ｊ、ライオン・スペシャリティ・ケミカルズ株式会社製）を５ｍｇ／ｍＬのヒドロキシプロピルセルロース（ＮＩＳＳＯ　ＨＰＣＬ、日本曹達株式会社製）溶液にカーボン濃度１６ｍｇ／ｍＬとなるように混合し、超音波ホモジナイザーで３分以上処理することで得た。

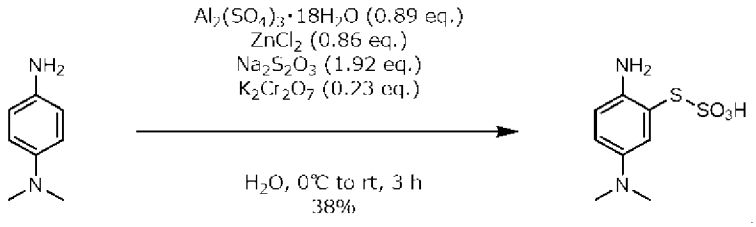
[0052]　カーボン分散液は、使用前に超音波バスで約１０分処理した後に用いた。ポリマー結合型ＰＮＴの濃度は、ポリマー結合型ＰＮＴの溶液を２５倍希釈してマイクロプレートに１００μＬ投入し、プレートリーダーで吸収スペクトルを測定することで溶液におけるＰＮＴの濃度を確認し、その値に基づき調整した。例えば、終濃度４とは、ポリマー結合型ＰＮＴを２５倍希釈したときに０．１６の吸光度を示す濃度のことである。

[0053]　また、上記のポリマー結合型ＰＮＴについては、以下の工程を経て得た。

［Ｉ．ＰＮＴ－７０の合成］

（１）スルホン酸フラグメントの合成

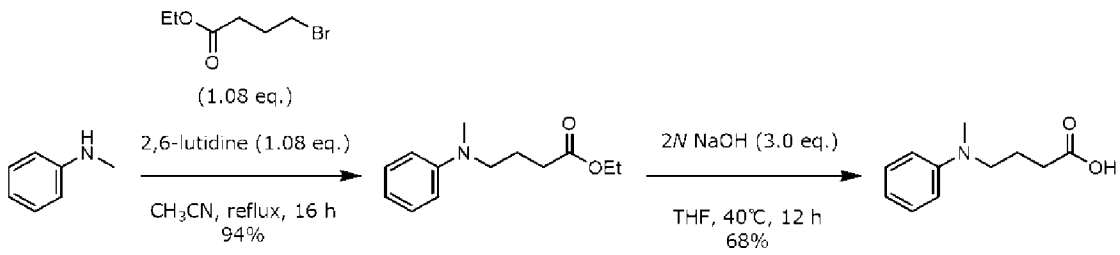
[化５]



上記の反応により、まずスルホン酸フラグメントを合成した。

[0054] （２）カルボン酸フラグメントの合成

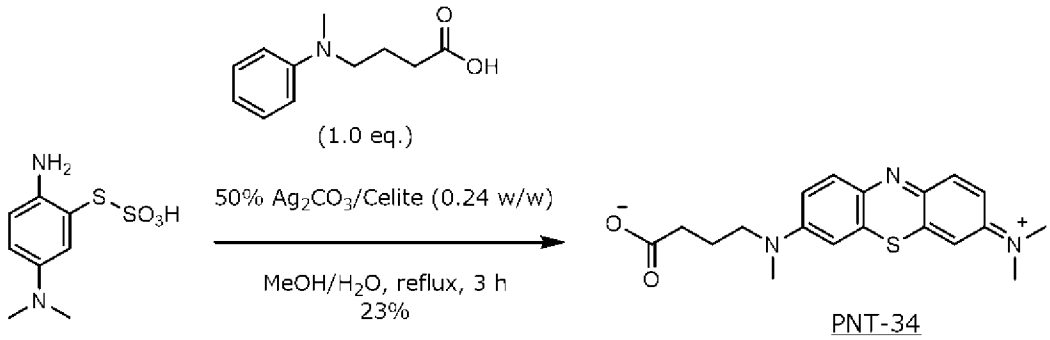
[化６]



上記のようなアセトニトリル中およびテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）中での２段階の反応により、カルボン酸フラグメントを合成した。

[0055] （３）ＰＮＴ－３４の合成

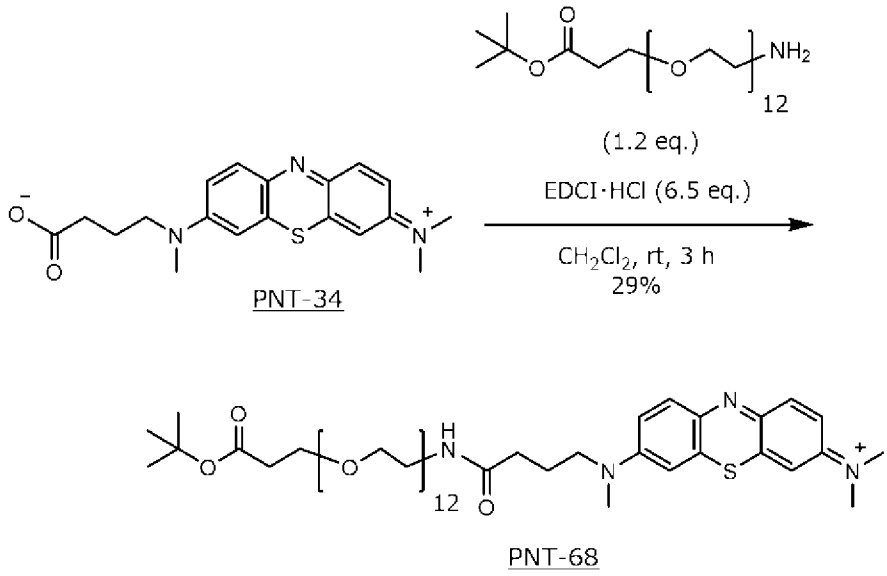
[化７]



上記にて合成したスルホン酸フラグメントおよびカルボン酸フラグメントをＭｅＯＨ／H_2Oに懸濁させ、内温４７℃付近で５０％Ag_2CO_3／セライトを１５分かけて分割添加した。添加後、内温６８℃付近にて２．５時間撹拌した。室温まで放冷後、セライト濾過を行い、濾液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて複数回精製することで、ＰＮＴ－３４を得た。

[0056] （４）縮合体（ＰＮＴ－６８）の合成

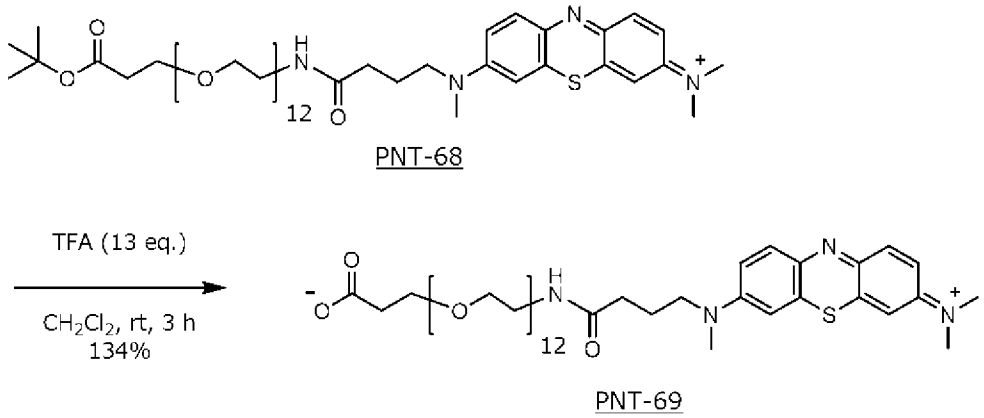
[化８]



Ａｒ雰囲気下、ＰＮＴ－３４をジクロロメタンに溶解させ、アミノ－ＰＥＧ１２－ｔ－ブチルエステルおよび１－エチル－３－(３－ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣＩ・ＨＣＩ）を添加後、室温下で３時間撹拌した。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて３回精製することで縮合体（ＰＮＴ－６８）を得た。

[0057] （５）脱保護体（ＰＮＴ－６９）の合成

[化９]

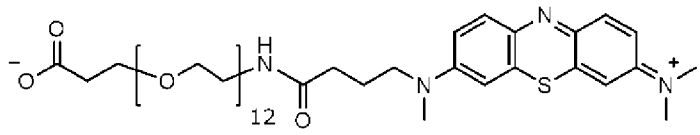


（４）で得られた縮合体（ＰＮＴ－６８）をジクロロメタンに溶解させ、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を添加した後、室温下で３時間撹拌した。反応液を濃縮後、トルエンで数回共沸させることで脱保護体（ＰＮＴ－６９）を

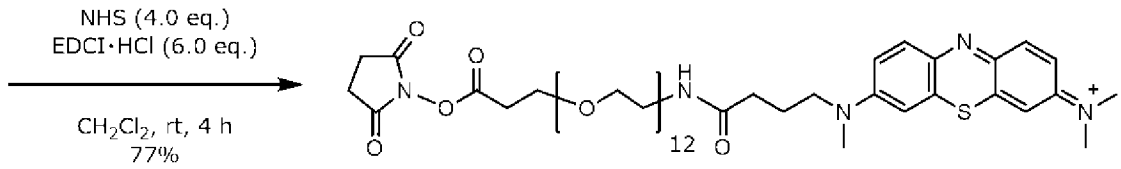
得た。

[0058] （６）ＰＮＴ－６９ＮＨＳ体（ＰＮＴ－７０）の合成

[化１０]



PNT-69

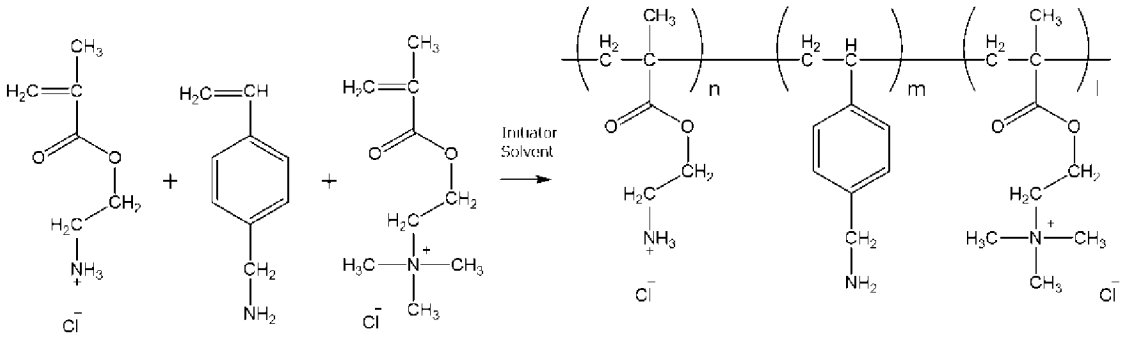


PNT-70

脱保護体（ＰＮＴ－６９）をジクロロメタンに溶解させ、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）およびＥＤＣＩ・ＨＣＩを添加した後、室温下で４時間撹拌した。反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することで、ＰＥＧ鎖（ＰＥＧ１２）の末端のカルボキシ基が活性化（ＮＨＳエステル化）されたＰＮＴ－６９ＮＨＳ体（ＰＮＴ－７０）を得た。

[0059] ［ＩＩ．ポリマーＣの合成］

[化１１]



まず、２－アミノエチルメタクリレート塩酸塩と、（４－ビニルフェニル）メタンアミンと、メタクロイルコリンクロリドとを用意した。そして、４つ口フラスコに２－アミノエチルメタクリレート塩酸塩を０．９７ｍｍｏｌ、（４－ビニルフェニル)メタンアミンを０．９７ｍｍｏｌ、メタクロイルコリン

クロリドを１１．９７ｍｍｏｌ、Ｖ－５０を０．０８ｍｍｏｌ、エタノールを１０．４９ｇ投入した。ポリマーＣは、１Ｈ－ＮＭＲの結果からモル比を算出した結果、ｎ：ｍ：ｌ＝２１．２：８．１：７０．７であるポリマーに相当する。また、ゲル浸透クロマトグラフィー（ＧＰＣ）で測定した結果、当該ポリマーの数平均分子量Ｍｎは３７７７４であり、重量平均分子量Ｍｗは２１４３６７であった。

[0060] ［ポリマー結合型ＰＮＴの合成］

ＰＮＴ－６９ＮＨＳ体（ＰＮＴ－７０）を２１．０５ｍｇ／ｍＬになるようにＭｉｌｌｉＱ水で溶解させた（液(１)）。高分子量ポリマーとして、ポリマーＣを１５ｍｇ／ｍＬになるようにＭｉｌｌｉＱ水で溶解させた（液(２)）。次に、ＷＳＣ（ＤＯＪＩＮＤＯ　Ｗ００１）を２０ｍｇ／ｍＬになるようにＭｉｌｌｉＱ水で溶解させた（液(３)）。液(１)を４０μＬ、液(２)を１４０．３μＬ、液(３)を３８３．４μＬ、別途調製した２５０ｍＭ　２－モルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液（ｐＨ６．０）を９６μＬ混合し、ＭｉｌｌｉＱ水で合計体積１２００μＬになるように調整した。その後、約２０時間、室温にて撹拌しながら反応させた。その後、遠心式限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ－４　５０ｋ；メルクミリポア）を用いて限外ろ過を数回行い、低分子を除いた液を回収した。以上により、ポリマー結合型ＰＮＴを得た。

[0061] ●工程（３）：試薬液の塗布

工程（１）で作製した電極上に工程（２）で調製した試薬を０．９μＬ塗布し、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、作用極上に試薬層を形成した。

[0062] ●工程（４）：保護膜用ポリマー溶液の調製

２-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）ポリマー（Ｌｉｐｉｄｕｒｅ－ＣＭ５２０６　日油株式会社）を４％（ｗ／ｗ）の濃度でエタノールに溶解した。また、スチレン－２－ビニルピリジン－ｔｅｒ．ブチルメタクリレートのランダムコポリマー（以下「Ｓ２ＶＰｔＢｕＭＡ」と

称する）を７％（ｗ／ｗ）の濃度で２－プロパノールに溶解した。

[0063] ●工程（５）：保護膜溶液の塗布

工程（３）において作製した電極上に工程（４）で調製したＬｉｐｉｄｕｒｅ－ＣＭ５２０６溶液を１μＬ塗布し、室温で乾燥させた。その後、Ｓ２ＶＰｔＢｕＭＡ溶液を１μＬ塗布し、室温で乾燥させた。これにより、試薬層上に保護膜を形成した。

[0064] ●工程（６）：電極部の形成

工程（５）により作製したバイオセンサ用電極を作用極とし、対極としての金電極と、参照極としてのＡｇ／ＡｇＣｌ電極（飽和ＫＣｌ）（ビー・エー・エス社製）とを組み合わせて３電極式の電極部を作製した。

[0065] 比較例１Ａ

比較例１Ａは、実施例１Ａと比べて、工程（２）：試薬液の調製において、ポリビニルイミダゾールを添加しない点において異なる。その他の点については、実施例１Ａと同様であるため、記載の重複を避けるため説明を省略する。

[0066] ［バイオセンサを用いた電気化学測定等］

次に、比較例１Ａおよび実施例１Ａにて作製したバイオセンサを用いて電気化学測定を行った。また、比較例１Ａにおける各濃度の乳酸添加時における測定液のｐＨを測定した。

[0067] 上記のバイオセンサを用いた電気化学測定については、ポテンショスタット（ビー・エー・エス社製）を用い、アンペロメトリック法によって、約３７℃に加温したＲＰＭＩ培地中を用いた上で所定時間経過時に乳酸を添加した際の電流値の変化を測定した。

[0068] ＲＰＭＩ培地としては、ＲＰＭＩ－１６４０　Ｍｅｄｉｕｍ（シグマアルドリッチ社製　Ｒ１３８３）を用い、これに対して、CO_2インキュベータ内での緩衝能を模擬するために、緩衝液成分としてＭＥＳ（２－Ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　ｍｏｎｏｈｙｄｒａｔｅ）（同仁化学社製）、ＭＯＰＳ（３－Ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｐｒｏｐａｎ

ｅｓｕｌｆｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）（同仁化学社製）を各々終濃度２５ｍＭになるように加え、かつｐＨ７．４に調整したものを用いた。

[0069] 具体的には、測定開始１０００秒後から５００秒毎に、最終濃度１０ｍＭ、２０ｍＭ、３０ｍＭ、４０ｍＭになるように上記培地に乳酸溶液を添加した際に得られるセンサの電流応答値を継続的に測定した。添加する乳酸溶液としては、Ｌ-乳酸（東京化成工業社製）を０．５ＭのＭＯＰＳ溶液で０．５Ｍに希釈した液を用いた。

[0070] 測定終了後、ＲＰＭＩ培地にセンサを浸漬して３７℃で保存した。その上で、乳酸センサの耐久性を評価するため、上記の電流応答値の測定について、センサの保存前、保存７日後、保存１３日後にそれぞれ行った。

[0071] ［測定結果］

●比較例１Ａにおける各濃度の乳酸添加時における測定液のｐＨ値について

比較例１Ａにおける各濃度の乳酸添加時における測定液のｐＨは以下の通りであった。

下記の表１の結果から、下記の表１の結果から、測定液中の乳酸濃度が高くなるにつれ、測定液のｐＨが低下して至適ｐＨ（６～８）から外れる場合があることが分かった。

（表１）

乳酸濃度 (mM)	0	10	20	30	40
測定液のpH	7.35	6.84	6.45	6.05	5.53

[0072] ●実施例１Ａおよび比較例１Ａの各々における測定経過時間と電流応答値との関係について

実施例１Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を図５に示し、比較例１Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を図６に示す。

[0073] ［センサ応答性］

図５および図６に示すように、ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加した実施例１Ａでは、添加しない比較例１Ａと比べて、各濃度（１０ｍ

Ｍ～４０ｍＭ）の乳酸に対するセンサの電流応答値が段階的に増加し、かつ乳酸添加後の電流値が一定に保たれていることが分かった。

[0074] 一方、比較例１Ａでは、特に高濃度（４０ｍＭ）の乳酸において、乳酸添加後のセンサの電流応答値が著しく減少することが分かった。

[0075] このセンサの電流応答値が減少した要因につき、上記のとおり、乳酸濃度が高濃度の場合に測定液のｐHが酵素の至適ｐHから外れたことに加えて（表１参照）、酵素反応に伴い生じたプロトンによって反応場のｐHが低下したことから、酵素が失活し、好適な活性状態ではなかったことによるものと解され得る。

[0076] これに対して、上記のとおり、実施例１Ａ（ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加した態様）では、比較例１Ａ（ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加しない態様）と比べて、各濃度（１０ｍＭ～４０ｍＭ）の乳酸に対するセンサの電流応答値が安定していたことから、ポリビニルイミダゾールがｐＨ緩衝能の役割を果たし、酵素近傍のｐＨが酵素の至適ｐＨの範囲外になることが好適に抑制されたものと考えられる。

[0077] 即ち、実施例１Ａでは、ポリビニルイミダゾールによるｐＨ緩衝能により、乳酸オキシダーゼの失活の抑制がなされたものと考えられる。

[0078] ［耐久性］

又、比較例１Ａでは、保存期間（センサの保存前⇒保存７日後⇒保存１３日後）の経過とともに、各濃度（１０ｍＭ～４０ｍＭ）の乳酸に対するセンサの応答性が低下していたことが分かった。

[0079] これに対して、実施例１Ａでは、保存期間（センサの保存前⇒保存７日後⇒保存１３日後）が経過しても、各濃度（１０ｍＭ～４０ｍＭ）の乳酸に対するセンサの応答性が維持されていたことが分かった。

[0080] 以上の事から、ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加することにより、センサ耐久性が向上され得ることが分かった。

[0081] 実施例２Ａ

［バイオセンサの作製］

以下の工程（１）～工程（６）を経てバイオセンサを作製した。

[0082] ●工程（１）：電極の作製

絶縁基板上に白金をスパッタリングさせて作製した電極をＮａｆｉｏｎ溶液（富士フイルム和光純薬株式会社製）に浸漬し、引き上げ、乾燥させる作業を複数回繰り返して、白金電極表面にＮａｆｉｏｎを被膜した。

[0083] ●工程（２）：試薬液の調製

以下に示す各試薬を以下の終濃度となるように混合し、約１時間反応させて試薬液を調製した。

・乳酸オキシダーゼ（ＬＯＸ　Ｔ－４７：旭化成ファーマ社製）　終濃度４０Ｕ／ｍＬ

・ウシ血清アルブミン（富士フイルム和光純薬株式会社製）　終濃度１２．５ｍｇ／ｍＬ

・ポリ－Ｌ－ヒスチジン塩酸塩　（シグマアルドリッチ社製）　終濃度１３．７ｍｇ／ｍＬ・グルタルアルデヒド２５％溶液（富士フイルム和光純薬株式会社製）　終濃度０．０３１２５％（ｗ／ｖ）

[0084] ●工程（３）：試薬液の塗布

工程（１）で作製した電極上に工程（２）で調製した試薬を１μＬ塗布し、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、作用極上に試薬層を形成した。

[0085] ●工程（４）：保護膜用ポリマー溶液の調製

以下に示す各試薬を以下の終濃度となるように混合し、保護膜用ポリマー溶液を調製した。

・ポリ（ｔｅｒ．ブチルメタクリレート－ｂ－４－ビニルピリジン）（ポリマーソース社製、以下「ｔＢｕＭＡ４ＶＰ」と称する）　終濃度７．１１％（ｗ／ｖ）

・トリプロピレングリコールメチルエーテルメタクリレート－スチレン－４－ビニルピリジンのランダムコポリマー（ナード社製、以下「ＴＧＭＡＳ４ＶＰ」と称する）　終濃度０．８９％（ｗ／ｖ）

・ポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル（シグマアルドリッチ社製、以下「ＰＥＧＤＧＥ」と称する）　終濃度０．９８％（ｗ／ｖ）

・ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ８．０）　終濃度５ｍＭ

[0086]　なお、ｔＢｕＭＡ４ＶＰ、ＴＧＭＡＳ４ＶＰおよびＰＥＧＤＧＥは、エタノールに溶解して用いた。ＨＥＰＥＳ緩衝液は、２－[４－(２－ヒドロキシエチル)－１－ピペラジニル]エタンスルホン酸（同仁化学社製）をミリＱ水に溶解し、水酸化ナトリウムでｐＨを調節して調製した。

[0087] ●工程（５）：保護膜溶液の塗布

工程（３）において作製した電極を保護膜用ポリマー溶液に浸漬し、引き上げ、乾燥させる作業を複数回繰り返して、各電極上に保護膜を形成した。これにより、試薬層上に保護膜を形成した。

[0088] ●工程（６）：電極部の形成

工程（５）により作製したセンサ用電極を作用極とし、対極としてのパラジウム電極と、参照極としてのＡｇ／ＡｇＣｌ電極を組み合わせて３電極式の電極部を作製した。

[0089] 比較例２Ａ

比較例２Ａは、実施例２Ａと比べて、工程（２）：試薬液の調製において、ポリ－Ｌ－ヒスチジン塩酸塩を添加しない点において異なる。その他の点については、実施例２Ａと同様であるため、記載の重複を避けるため説明を省略する。

[0090] ［バイオセンサを用いた電気化学測定］

次に、比較例２Ａおよび実施例２Ａにて作製したバイオセンサを用いて電気化学測定を行った。

[0091]　上記のバイオセンサを用いた電気化学測定については、３７℃恒温槽内において、ポテンショスタットを用いたアンペロメトリック法によって、２０ｍＭの乳酸溶液を予め添加したＲＰＭＩ培地中での電流応答値を連続的に測定した。

[0092]　具体的には、測定開始後１５０時間経過するまで、乳酸が予め添加された

ＲＰＭＩ培地中の乳酸に対するセンサの電流応答値を継続的に測定した。

[0093] ＲＰＭＩ培地としては、ＲＰＭＩ－１６４０ Ｍｅｄｉｕｍ（シグマアルドリッチ社製 Ｒ１３８３）を用い、これに対して、Ｌ-乳酸（東京化成工業社製）を２０ｍＭ、非働化ウシ胎児血清（サーモフィッシャー社製）を１０％、ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンＢ懸濁液（富士フイルム和光純薬社製）を１％、緩衝液成分としてＭＥＳ（２－Ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ ｍｏｎｏｈｙｄｒａｔｅ）（同仁化学社製）、ＭＯＰＳ（３－Ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｐｒｏｐａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ）（同仁化学社製）を各々終濃度２５ｍＭになるように加え、かつｐＨを７．４および６．５に調整した液を用いた。

[0094] ［測定結果］

●実施例２Ａおよび比較例２Ａの各々における測定経過時間と電流応答値との関係について

実施例２Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を図７に示し、比較例２Ａにおける測定経過時間と電流応答値との関係を図８に示す。

[0095] ［センサ応答性］

図７および図８に示すように、比較例２Ａ（ポリ－Ｌ－ヒスチジンをセンサ試薬液に添加しない態様）では、センサの電流応答値が測定溶液ｐＨによって異なっていたことから、乳酸に対するセンサの応答性がｐＨの影響を受けていることが分かった。

[0096] 一方、実施例２Ａ（ポリ－Ｌ－ヒスチジンをセンサ試薬液に添加する態様）では、測定溶液ｐＨに違いがあった場合にも、乳酸に対するセンサの電流応答値が略同一であることが分かった。

[0097] この測定結果から、ポリ－Ｌ－ヒスチジンがｐＨ緩衝能の役割を果たし、乳酸センサの応答性のｐＨ依存性が抑制されたものと考えられる。即ち、実施例２Ａでは、ポリ－Ｌ－ヒスチジンによるｐＨ緩衝能により、試薬近傍のｐＨ変化が抑制され、ｐＨ低下による乳酸オキシダーゼの活性変化が起きなかったと考えられる。

[0098] ［耐久性］

又、比較例２Ａでは、測定時間の経過とともに、センサの電流応答値の低下が生じていたことが分かった。一方、実施例２Ａでは、測定時間が経過しても、センサの電流応答値が維持されていることが分かった。

[0099] この測定結果から、上述のｐＨ緩衝能の役割を果たすポリ－Ｌ－ヒスチジンが、乳酸オキシダーゼの活性の維持にも貢献し得ることが分かった。

[0100] 以上の事から、ポリ－Ｌ－ヒスチジンをセンサ試薬液に添加することにより、センサ電流応答値のｐＨ依存性が抑制されるとともに耐久性が向上することが分かった。

[0101] 実施例１Ａ、２Ａおよび比較例１Ａ、２Ａの測定結果から総括すると、センサ試薬液に添加されるポリビニルイミダゾールおよびポリ－Ｌ－ヒスチジンは共通的に複素環式窒素基を有すること、即ちプロトン受容基を有することが分かった。

[0102] 以上の事から、最終的に得られるバイオセンサの構成要素としての試薬層が、酵素に加え、繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマーを含む構成を有すると、乳酸（アナライトに相当）が試薬層内にて酵素反応で酸化される際に生じ得る電離状態のプロトンが好適に受容され得ることが分かった。

[0103] すなわち、反応場のｐＨが酵素の至適ｐＨから逸脱することを抑制し、反応場のｐＨを一定範囲に保持できることが分かった。それ故、アナライトの連続測定を行う際にも、酵素の失活を回避することができ、バイオセンサの応答性のｐH依存性を抑制し、耐久性を向上できることが分かった。

[0104] なお、本発明は、例示された実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、種々の改良および設計上の変更が可能である。

[0105] なお、上述のような本発明（発明Ａ）の一実施形態は、次の好適な態様を包含している。

＜１Ａ＞

繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマーおよびアナライトを酸化又

は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層。

＜２Ａ＞

前記ポリマーがｐＨ緩衝能を有する、＜１Ａ＞に記載の試薬層。

＜３Ａ＞

前記ポリマーは、前記酸化還元酵素が活性を維持可能なｐＨ範囲に緩衝能を有する、＜１Ａ＞又は＜２Ａ＞に記載の試薬層。

＜４Ａ＞

前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、＜１Ａ＞～＜３Ａ＞のいずれかに記載の試薬層。

＜５Ａ＞

前記プロトン受容基が、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも１種である、＜１Ａ＞～＜３Ａ＞のいずれかに記載の試薬層。

＜６Ａ＞

前記複素環式窒素基が、イミダゾール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホリル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも１種である、＜４Ａ＞に記載の試薬層。

＜７Ａ＞

前記ポリマーがポリビニルイミダゾールである、＜１Ａ＞～＜４Ａ＞のいずれかに記載の試薬層。

＜８Ａ＞

前記ポリマーがポリ-Ｌ-ヒスチジンである、＜１Ａ＞～＜４Ａ＞のいずれかに記載の試薬層。

＜９Ａ＞

前記ポリマーがポリリン酸ナトリウムである、＜１Ａ＞～＜３Ａ＞、＜５Ａ＞のいずれかに記載の試薬層。

＜１０Ａ＞

前記ポリマーの重量平均分子量が１００００以上である、＜１Ａ＞～＜９Ａ＞のいずれかに記載の試薬層。

＜１１Ａ＞

＜１Ａ＞～＜１０Ａ＞のいずれかに記載の試薬層を備える、バイオセンサ。

＜１２Ａ＞

乳酸センサである、＜１１Ａ＞に記載のバイオセンサ。

産業上の利用可能性

[0106] 本発明の一実施形態にかかる試薬層を備えたバイオセンサは、アナライトの好適な測定に用いることが可能である。

符号の説明

[0107] １０　試薬層

２０　保護膜

３０　作用極

１００　バイオセンサ

Ａ　ポリマー

Ｂ　酵素

[0108] 以下、本発明（発明Ｂ）の一実施形態について説明する。

[0109] [発明の名称]ポリマー、ポリマーを含む試薬、ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサ、およびポリマーの合成方法

[技術分野]

[0110] 本発明は、ポリマー、ポリマーを含む試薬、ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサ、およびポリマーの合成方法に関する。

[背景技術]

[0111] 近年、医療分野等の様々な分野で、細胞等内のアナライト（検出対象物質）を測定するために、バイオセンサが用いられ得る。アナライトの測定方法としては、例えば電気化学的測定法が用いられ得る。電気化学的測定法にお

けるバイオセンサは、電極（作用極に相当）上に設けられた酵素を含む試薬層と、試薬層を覆う保護膜とを備える。この酵素として、測定対象となるアナライトを基質として作用するものを適宜選択することで、種々のアナライトの測定が可能となる。例えば、酵素として乳酸オキシダーゼ（ＬＯ$_X$）を選択することで、アナライトとしての乳酸の濃度測定が可能となる。

[先行技術文献]

[特許文献]

[0112] 特許文献2：特表２０１０－５１７０５４号公報[発明の概要][発明が解決しようとする課題]

[0113] ここで、本願発明者らは、従前のバイオセンサについて改善すべき事項があることを新たに見出した。具体的には、細胞中のアナライトが酵素により化学反応する際にプロトン（H^+）が放出され、これに伴いバイオセンサの試薬層のｐＨが低下し得る。このｐＨ低下を抑制するための手法としては、試薬層が酵素に加えてリン酸緩衝剤を更に含む構成が考えられる。

[0114] しかしながら、上記緩衝剤の分子量は相対的に小さいため、試薬層にとどまりにくい虞がある。そのため、試薬層内に所定量の緩衝剤を確保しにくく、ｐＨの低下を抑制しにくくなる虞がある。バイオセンサにおいて、ｐＨ低下は試薬層に含まれる酵素の劣化につながり得ることから、それによってアナライトの好適な測定が困難となる虞がある。以上の事から、ｐＨ低下を抑制しかつ試薬形成時に水溶性を供することが可能なポリマーが望まれる。

[0115] そこで、本発明は、ｐＨ低下を抑制しかつ水溶性を供することが可能なポリマー、ポリマーを含む試薬、ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサ、およびポリマーの合成方法を提供することを目的とする。

[課題を解決するための手段]

[0116] 上記目的を達成するために、本発明の一実施形態では、

繰り返し単位としてプロトン受容基およびイオン性基 を備える、ポリマーが提供される。

[0117] 本発明の一実施形態では、上記ポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水

素化する酸化還元酵素を含む試薬が提供される。

[0118] 本発明の一実施形態では、上記の試薬を含む試薬層を備える、バイオセンサが提供される。

[0119] 上記目的を達成するために、本発明の一実施形態では、

プロトン受容基を含む第１溶液を準備する第１工程と、

イオン性基を含む第２溶液を準備する第２工程と、

前記第２溶液を前記第１溶液に追加し、混合する第３工程と、

重合開始剤の存在下で、前記第１溶液および前記第２溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う第４工程と

を含む、ポリマーの合成方法が提供される。

［発明の効果］

[0120] 本発明の一実施形態によれば、ｐＨ低下を抑制しかつ水溶性を供することが可能なポリマー、同ポリマーを含む試薬、同ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサを供することが可能である。

［図面の簡単な説明］

[0121] [図９]図９は、本発明の一実施形態に係る試薬を含む試薬層の構成を模式的に示す断面図である。

[図１０]図１０は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００の主たる構成を模式的に示す断面図である。

[図１１]図１１は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００の主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。

[図１２]図１２は、実施例２Ｂおよび比較例２Ｂにおける滴下するＨＣｌと溶液ｐＨとの関係を示すグラフである。

[発明を実施するための形態]

[0122] 以下、本発明（発明Ｂ）の実施形態について具体的に説明する。

[0123] [本発明のポリマー]

まず、本発明の一実施形態に係るポリマーについて説明する。

[0124] 本願発明者らは、ｐＨ低下を抑制しかつ水溶性を供することが可能な新た

なポリマーの構成について鋭意検討した。その結果、ポリマーの繰り返し単位が下記の特徴的な２つの基を併せ持つ場合に、上記のｐＨ低下の抑制と水溶性の供与とが可能となり得ることを新たに見出した。

[0125] 具体的には、本発明の一実施形態に係るポリマーは、繰り返し単位として「プロトン受容基」および「イオン性基」を備えることを特徴とする。本明細書において、「プロトン受容基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、プロトン（H^+）を受容可能な官能基を指す。本明細書において、「イオン性基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、親水性を供することが可能なイオン状態の官能基を指す。

[0126] 本発明の一実施形態では、ポリマーが上記の特徴を有することで、繰り返し単位にプロトン受容基が存在することで、プロトン（H^+）の受容が可能となる。これに加えて、繰り返し単位にイオン性基が存在することで、親水性を好適に供することができ、それによって水溶性の供与が可能となる。ポリマーは多数の繰り返し単位から構成されるため、この繰り返し単位が有するプロトン受容機能と水溶性の供与機能とを効果的に供することが可能となる。

[0127] 後述するように、上記ポリマーおよび酵素を含む試薬層を備えるバイオセンサを用いる場合、上記ポリマーによる効果的なプロトン受容機能により、細胞等内のアナライト（例えば乳酸）が酵素により化学反応する際に放出され得るプロトン（H^+）を好適に受容可能となる。これにより、試薬層におけるｐＨ低下抑制が可能となり、試薬層に含まれる酵素の劣化を抑制可能となる。その結果、アナライトの好適な測定が可能となる。又、上記ポリマーによる効果的な水溶性の供与機能により、酵素を含有する溶液にポリマーを好適に溶かすことが可能となるため、全体として試薬層を好適に形成可能である。

[0128] なお、本発明の一実施形態では、効果的なプロトン受容と水溶性の供与の観点等から、上記ポリマーの重量平均分子量（Ｍｗ）は、１万以上、２万以上、３万以上、４万以上、５万以上、６万以上、７万以上、８万以上、９万

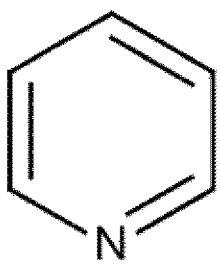
以上、１０万以上、１１万以上であることができ、好ましくは９万以上であり、例えば９．８万であり得る。上記ポリマーの重量平均分子量（Ｍｗ）の上限値は水溶性、粘性の観点から１００万以下であり得る。

[0129] ある好適な態様では、上記のイオン性基が双性イオン型であり得る。本明細書でいう「双性イオン型」とは、本発明のポリマーの繰り返し単位が正電荷（＋）のイオン性基と負電荷（－）のイオン性基の両方を有するものを指す。イオン性基が双性イオン型であることで、繰り返し単位に含まれるイオン性基の数が少なくとも２倍になることから、親水性をより好適に供することができる。これにより、水溶性をより供与しやすくなり得る。例えば、双性イオン型のイオン性基は、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含むことができる。

[0130] ある好適な態様では、上記のプロトン受容基は、非共有電子対を有する原子を含む複素環式窒素基であり得る。本明細書において「複素環式窒素基」は、窒素を含有する環構造を有するものを意味する。窒素は電気陰性度が高く、電子求引性が高いため、プロトンを受容しやすい状態となっている。又、プロトン受容による緩衝機能を好適に供する観点から、本発明のポリマーが含まれる試薬層のｐＨ域を考慮して、複素環式窒素基のｐＫａは４～８であり得る。

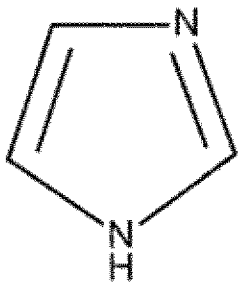
[0131] 一例では、複素環式窒素基はピリジル基であり得る。

[化１２]



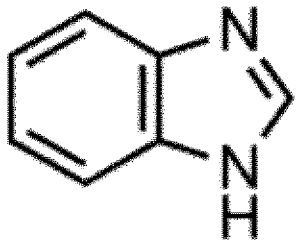
[0132] 別例では、複素環式窒素基はイミダゾール基であり得る。

[化１３]



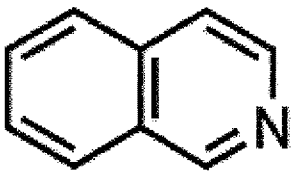
[0133] 別例では、複素環式窒素基はベンゾイミダゾール基であり得る。

[化１４]



[0134] 別例では、複素環式窒素基はイソキノリル基であり得る。

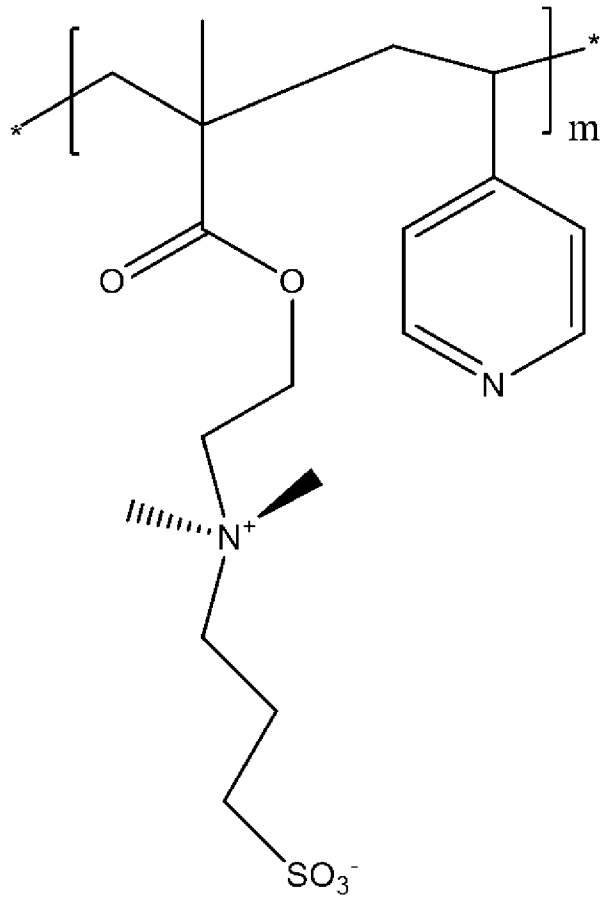
[化１５]



[0135] なお、一実施形態では、複素環式窒素基は、上記のピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも１種であり得る。即ち、複素環式窒素基はこれらから選択される２種以上から成ってよい。

[0136] 具体例を挙げると、本発明の一実施形態に係るポリマーは、下記の構造を採ることができる。

[化１６]



[0137] 上記ポリマーの繰り返し単位において、イオン性基を備えた第１部分は３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートを含み得る。又、上記ポリマーの繰り返し単位において、プロトン受容基を備えた第２部分は４－ビニルピリジンを含み得る。即ち、上記ポリマーの繰り返し単位は、４－ビニルピリジンに由来する部分と３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートに由来する部分を含み得る。この４－ビニルピリジンに由来する部分と３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートに由来する部分とは、上記化５に示すように相互に共有結合した状態で連続する。

[0138] [本発明のポリマーの合成方法]

以下、本発明の一実施形態に係るポリマーの合成方法について説明する。

[0139] 本発明の一実施形態に係るポリマーの合成方法は、

プロトン受容基を含む第１溶液を準備する第１工程と、

イオン性基を含む第２溶液を準備する第２工程と、

前記第２溶液を前記第１溶液に追加し、混合する第３工程と、

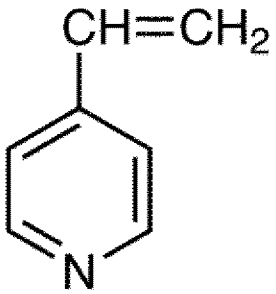
重合開始剤の存在下で、前記第１溶液および前記第２溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う第４工程と

を含む。

[0140]（第１工程）

第１工程では、上述のようにプロトン受容基を含む第１溶液を準備する。一例として、このプロトン受容基として複素環式窒素基を含む第１溶液を準備する。又、プロトン受容による緩衝機能を好適に供する観点から、後刻に形成する試薬層のｐＨ域を考慮して、複素環式窒素基のｐＫａは４～８であり得る。一例として、この複素環式窒素基は、ピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも１種であり得る。例えば、第１溶液については、非プロトン系極性溶媒（例えばジメチルスルホキシド(ＤＭＳＯ)）に、プロトン受容基を含む下記の４－ビニルピリジン（４ＶＰと称し得る）等を混合して得ることができる。

[化１７]



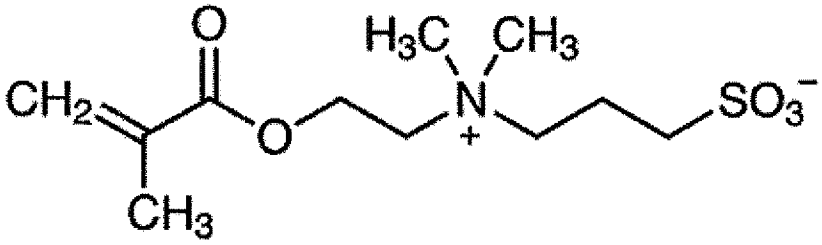
[0141]（第２工程）

第２工程では、上述のようにイオン性基を含む第２溶液を準備する。このイオン性基を含有する物質を、溶媒としての水に数秒間溶解させて、第２溶液を準備する。この第２溶液に含まれるイオン性基は、水溶性を好適に供する観点から双性イオン型であることが好ましい。双性イオン型のイオン性基

としては、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含むものを選択することができる。

[0142] 一例としては、イオン性基を含有する物質として、下記の３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネート（ＭＡＳと称し得る）を、溶媒としての水に追加の上、超音波洗浄機にて３秒以上７秒以下の間に、例えば５秒間溶解させる。これにより、上記の第２溶液を準備する。

[化１８]



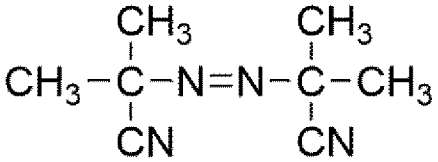
[0143] （第３工程）

第３工程では、上記第２溶液を第１溶液に追加し、混合する。具体的には、第３工程では、上記第２工程にて準備した第２溶液を第１工程にて準備した第１溶液にすみやかに、例えば０．５秒以上４秒以内に追加して、均一な混合を行う。

[0144] （第４工程）

第４工程では、重合開始剤の存在下で、上記第１溶液および第２溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う。重合開始剤については、例えばラジカル反応の開始剤としての、粉末状の下記のアゾビスイソブチロニトリル（ＡＩＢＮとも称し得る）を用いることができる。

[化１９]



[0145] 具体的には、３つ口フラスコ内にて、上記混合物に開始剤を添加し、その

後フラスコ内を窒素環境下に置換の上、重合反応を開始する。所定の反応温度および攪拌速度にて重合反応開始後、所定の反応時間経過後に重合反応を終了する。重合反応終了後、ミリＱ水を加えて重合反応物を溶解させる。その後、重合反応物の精製のため、溶解液をヘキサンに滴下し析出物を形成する。その後、析出物を回収し、エバポレーションを行い、最後に減圧乾燥を行う。以上により、本発明の一実施形態にかかるポリマーを得ることができる。

[0146] [本発明のポリマーを含む試薬]

以下、本発明の一実施形態に係るポリマーを含む試薬について説明する。図９は、本発明の一実施形態に係る試薬を含む試薬層の構成を模式的に示す断面図である。

[0147] 本発明の一実施形態に係るポリマーは酵素を含む試薬にて用いられ得る。即ち、本発明の一実施形態では、試薬は少なくとも上記ポリマーＡおよび酵素Ｂを含み得る。試薬層１０はこの試薬を含む層である（図９参照）。酵素Ｂとしては、アナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素であり得る。本明細書でいう「酸化還元酵素」とは、アナライトの酸化または還元を特異的に触媒することが可能な生化学物質を意味する。

[0148] 例えば、酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、３－ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、および／またはアルコールデヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

[0149] 上記の酸化還元酵素は、グルコース、乳酸、コレステロール、ビリルビン、グルタミン、グルタミン酸などのアミノ酸、糖化アミノ酸、または糖化ペプチド、ケトン体（３－ヒドロキシ酪酸）、アルコール等の検出に利用でき

る。酸化還元酵素の量は、例えば、後述するバイオセンサ１個当り、もしくは１回の測定当り、例えば、０．０１Ｕ～１００Ｕ（μｍｏｌ／分）であり、好ましくは、０．０５Ｕ～１０Ｕであり、より好ましくは、０．１Ｕ～５Ｕである。

[0150] なお、上記試薬は、上記ポリマーおよび酵素に加えて、メディエータおよび／または導電性粒子を更に含むことができる。導電性微粒子としては、カーボンブラック、カーボンナノチューブが挙げられる。

[0151] 本明細書でいう「メディエータ」とは、広義には電子伝達を仲介する酸化還元物質を意味し、狭義には、下記のバイオセンサにおいてアナライトの酸化還元反応によって生じる電子の伝達を担う物質を指す。

[0152] 特に限定されるものではないが、メディエータとして、金属錯体（例えば、オスミウム錯体、ルテニウム錯体、鉄錯体等）、キノン化合物（例えば、ベンゾキノン、ナフトキノン、フェナントレンキノン、フェナントロリンキノン、アントラキノン、及びそれらの誘導体等）、フェナジン化合物、ビオロゲン化合物、フェノチアジン化合物、及びフェノール化合物が挙げられる。

[0153] より具体的には、メディエータとして、フェリシアン化カリウム、ヘキサアンミンルテニウム、フェロセン、ポリ（１－ビニルイミダゾール）－ビス（ビピリジン）クロロオスミウム、ヒドロキノン、２－メチル－１，４－ベンゾキノン、１，２－ナフトキノン－４－スルホン酸塩、９，１０－フェナントレンキノン－２－スルホン酸塩、９，１０－フェナントレンキノン－２，７－ジスルホン酸塩、１，１０－フェナントロリン－５，６－ジオン、アントラキノン－２－スルホン酸塩、１－メトキシ－５－メチルフェナジニウムメチルサルフェートや１－メトキシ－５－エチルフェナジニウムエチルサルフェート等のフェナジン誘導体、メチルビオロゲン、ベンジルビオロゲン、メチレンブルー、メチレングリーン、２－アミノフェノール、２－アミノ－４－メチルフェノール、及び２，４－ジアミノフェノールからなる群から選ばれる１種以上が用いられる。

[0154] 上記塩としては、限定されるものではないが、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リチウム塩等が挙げられる。メディエータの配合量は、特に制限されず、１回の測定当り若しくは下記のバイオセンサ１個当り、例えば、０．１ｐｍｏｌ～１０００μｍｏｌであり、好ましくは、１０ｐｍｏｌ～５００μｍｏｌであり、より好ましくは、５００ｐｍｏｌ～１００μｍｏｌである。

[0155] ［バイオセンサ］

以下、本発明の一実施形態に係るバイオセンサについて説明する。図１０は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００の主たる構成を模式的に示す断面図である。

[0156] 本明細書でいう「バイオセンサ」とは、酵素－基質などの組合せを利用して、基質（アナライトに対応）と酵素（受容体に対応）との間の分子認識反応によって発生する化学的な変化を電気信号に変換し、得られた電気信号の強さに応じてアナライトの代謝速度、濃度等を測定する測定デバイスである。

[0157] 本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００は、基板表面に形成された電極部上に配置された試薬層１０および保護膜２０を備える（図１０参照）。なお、本実施形態では、便宜上、バイオセンサ１００のうちの試薬層１０および保護膜２０を図示し、その他の電極部等については図示を省略していることを確認的に付言しておく。

[0158] 基板としては絶縁性基板を用いることができる。特に限定されるものではないが、基板としては、数百μｍのポリエチレンテレフタレート 、ポリアミド、ポリイミド等の材料から構成され得る。一実施形態では、バイオセンサ１００の電極部は培養槽に供された液体培地（液体試料）に挿入可能となっている。その上で、バイオセンサ１００の挿入後、電極部に電圧を印加可能となっている。

[0159] 上記の電極部は、作用極と、対極および／または参照極とを有する。作用極の表面には、上記の本発明のポリマーおよび酵素を含む試薬を含む試薬層

１０が配置され得る。

[0160] 保護膜２０は、上記の試薬層１０および電極部を覆うように構成され得る。保護膜２０は、培地中の細胞の特定成分（乳酸等）の透過速度を制御しつつ、その特定成分を作用電極側へと浸透可能に構成されている。又、保護膜２０は、作用極上の試薬層１０内に含まれる成分（本発明の上記ポリマーおよび酵素等）を保護膜２０の外側へと流出することを抑制可能に構成されている。即ち、本明細書でいう「保護膜」とは、試薬層に含まれる物質の保護膜外への漏出の抑制に寄与する膜であり、かつ、保護膜外に存在するアナライトが保護膜を介して試薬層側へと移動可能な孔を有する膜である。

[0161] 保護膜は生体適合性を有するポリマー膜であり得る。この保護膜を構成するポリマーとしては、複素環式窒素基を有するｔ－ブチルアクリレートであり得る。複素環式窒素基としては、例えば、ピリジル基、イミダゾール基等を選択することができる。更に、この保護膜を構成するポリマーとしては、フルオロカーボンを主鎖とし、スルホ基、カルボキシル基を側鎖に含むナフィオンが更に含まれ得る。

[0162] 特に限定されるものではないが、例えば、培地として、ＲＰＭＩ－１６４０培地、Ｄ－ＭＥＭ培地、Ｆ１２、ＭＥＭ培地を挙げることができる。なお、本発明では、培地には酵素は含まれない。

[0163] 上記構成下において、培地中に電極部を浸した状態で、保護膜２０を介して培地から試薬層１０へと移動するアナライトを、試薬層１０内にて酵素を触媒とし、溶存酸素を用いて酸化させる。その際に生じる過酸化水素 を 電気的に検出することで、アナライトの濃度を測定することが可能となる。

[0164] 図１１は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００の主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。乳酸を検出する場合を例にとると、保護膜２０を通して培地から試薬層１０へと移動してきた乳酸（図１１内のＬａｃに相当）が試薬層１０の酵素（図１１内のＬＯｘに相当）との酵素反応で酸化され、ピルビン酸（図１１内のＰｙｒｕに相当）、過酸化水素、および電離状態のプロトン（Ｈ＋）の形成がなされ得る

。かかる形成時に生じる過酸化水素を電気的に測定することで、乳酸の代謝速度等を測定することが可能となる。この場合、バイオセンサ１００は乳酸センサとして機能することができる。

[0165] 上述のように、本発明のポリマーによれば、プロトン受容機能と水溶性の供与機能とを効果的に供することが可能である。バイオセンサ１００は、このポリマーＡおよび酵素Ｂを含む試薬層１０を備える。そのため、ポリマーＡによる効果的なプロトン受容機能により、試薬層１０内へ移動したアナライト（図１１では乳酸を対象）が酵素Ｂによる化学反応する際に放出され得るプロトン（H^+）を好適に受容可能となる。これにより、試薬層１０におけるｐＨ低下抑制が可能となり、試薬層１０に含まれる酵素Ｂの劣化を抑制可能となる。その結果、培地が供された培養槽内にバイオセンサ１００を直接挿入して、アナライトを好適に測定することが可能となる。

[0166] 又、上記ポリマーＡによる効果的な水溶性の供与機能により、酵素Ｂを含有する溶液にポリマーＡを好適に溶かすことが可能となるため、全体として試薬層１０を好適に形成可能である。更に、従前でのｐＨ低下抑制のための低分子量の緩衝剤と比べて、本発明のポリマーＡは、高分子量を有するが故、試薬層１０内にとどまりやすく、保護膜２０よりも外側に位置する培地側への流出を好適に抑制することができる。

[0167] なお、従前のバイオセンサでは、上記でいう保護膜に複素環式窒素含有ポリマーが含まれる態様がある。この保護膜はセンサの構成要素である作用電極へのアナライトの拡散を制限するために寄与しているにすぎない。一方、本発明のバイオセンサ１００では、構成要素である試薬層１０（保護膜２０ではなく）にポリマーが含まれ、更にこのポリマーがプロトンの受容に寄与するプロトン受容基と水溶性の提供に寄与するイオン性基の異なる特性を有する基を有する。以上の事から、保護膜に複素環式窒素含有ポリマーが含まれる態様と比べて、本発明のポリマーは、その提供箇所と機能（プロトン受容性と水溶性の両方の機能）とがいずれも相違する。

[0168] [バイオセンサの作製方法]

以下、上記バイオセンサの作製方法の一例について説明する。

[0169] まず、絶縁性基板を準備する。絶縁性基板の準備後、絶縁性基板に、銀、白金またはパラジウムなどの金属から選択される導電性薄膜（作用電極に相当）をスパッタ法、蒸着法、またはイオンプレーティングなどにより堆積して形成する。導電性薄膜の厚さは、１０ｎｍ～数百ｎｍであり得る。対電極および／または参照電極については、作用電極の周縁に配置してよく、例えば基板の裏側に配置してもよい。これら電極形成部分以外については絶縁レジスト層が形成されてよい。

[0170] その後、本発明の上記ポリマーおよび酵素溶液を少なくとも有する試薬を作用電極上に塗布する。試薬は、上記ポリマーおよび酵素以外に、導電性付与のためのカーボン粒子などの導電性粒子の懸濁液およびメディエータの水溶液を更に含んでよい。作用電極に塗布したこの試薬を乾燥することで試薬層１０を好適に形成することができる。最後に、試薬層１０および電極部を覆うように、保護膜２０を形成する。以上により、バイオセンサ１００を作製することができる。

［実施例］

[0171] 以下、本発明（発明Ｂ）の実施例について説明する。

[0172] 実施例１Ｂ

［本発明のポリマーの合成］

[0173] （第１工程の実施）

第１工程として、ジメチルスルホキシド(ＤＭＳＯ)に、４－ビニルピリジン（４ＶＰと称し得る）およびスチレンを混合して第１溶液を準備した。

[0174] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

［使用量］

・ＤＭＳＯ： ２４．８ｍＬ

・４ＶＰ： ３．５３９ｍＬ

・スチレン： ０．０７７ｍＬ

［４ＶＰの濃度］

１２．４５ ｖ/ｖ％

[スチレンの濃度]

０．２７ ｖ/ｖ％

[品番]

・ＤＭＳＯ：０４５－２８３３５(富士フィルム和光純薬社製)

・４ＶＰ：Ｖ０１５０(東京化成工業社製)

[0175] (第２工程の実施)

第２工程として、３－[[２－(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネート(ＭＡＳと称し得る)を、溶媒としての水に追加の上、超音波洗浄機にて５秒間溶解させた。これにより、第２溶液を準備した。

[0176] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

[使用量]

ＭＡＳ：９．３６ｇ

ミリＱ水：５．０ｍＬ

[ＭＡＳ濃度]

６５．２(ｗ/ｗ％)

[品番]ＭＡＳ：Ｍ１９７１(東京化成工業社製)

[0177] (第３工程の実施)

第３工程では、上記第２溶液を第１溶液に追加し、混合した。具体的には、上記第２工程にて準備した第２溶液を第１工程にて準備した第１溶液に１秒以内に追加して、均一な混合を行った。かかる混合において混合比率(モル比)については、スチレン：４ＶＰ：ＭＡＳ＝１：４９：５０とした。

[0178] (第４工程)

第４工程では、重合開始剤の存在下で、上記第１溶液および第２溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行った。具体的には、３つ口フラスコ内にて、上記混合物に開始剤(アゾビスイソブチロニトリル(ＡＩＢＮとも称し得る))を添加した。ＡＩＢＮを追加した際の溶液温度は２４℃であった。そ

の後、同フラスコ内を窒素環境下に置換の上、重合反応を開始した。

[0179] 開始剤の使用量、濃度および品番は以下のとおり。

［使用量］

ＡＩＢＮ：０．０６４ｇ

［ＡＩＢＮの濃度］

粉末のＡＩＢＮを３つ口フラスコに添加。

ＡＩＢＮの濃度：１００％

［品番］

ＡＩＢＮ：０１９－０４９３２(富士フィルム和光純薬社製)

[0180] その後、反応温度８０℃および攪拌速度５００ｒｐｍにて重合反応開始後、４２．５時間の反応時間経過後に重合反応を終了した。重合反応終了後、ミリＱ水を加えて重合反応物を溶解させた。その後、溶解液をヘキサンに滴下し析出物を形成、回収し、エバポレーションを行い、最後に減圧乾燥を行った。以上により、本発明のポリマーを合成することができた。

[0181] 実施例２Ｂ

［本発明のポリマーの特性評価］

上記で合成した本発明のポリマーの特性につき、以下の方法により評価を行った。

[0182] まず、５０ｍＬのＤＷ（蒸留水）に、本発明のポリマー（２５０ｍｇ／ｍＬ）を１ｍＬ追加の上溶解させた。得られた溶液に対して、濃度（０．１ｍｏｌ／Ｌ）のＨＣｌを順次追加した。再現性担保のため、同様のことを再度実施した。その後、ｐＨメーターを用いてｐＨをそれぞれ評価した。

[0183] なお、実施例２Ｂと対比可能な比較例として、５０ｍＬのＤＷ（蒸留水）に、濃度（０．１ｍｏｌ／Ｌ）のＨＣｌを順次追加した。再現性担保のため、同様のことを再度実施した。その後、ｐＨメーターを用いてｐＨをそれぞれ評価した。

[0184] 評価結果１を図１２に示す。

[0185] 図１２に示されるように、本発明のポリマーを用いることなく、ＤＷに濃

度（０．１ｍｏｌ／Ｌ）のＨＣｌを順次追加した比較例では、ＨＣｌの追加開始時のｐＨが５．５付近だった状態からＨＣｌの追加をはじめてすぐさまｐＨが４付近へと低下した。具体的には、追加されたＨＣｌの濃度が０．１４ｍｍｏｌ／Ｌ付近でｐＨが４付近になった。

[0186] 一方、ＤＷに本発明のポリマーを追加した溶液に濃度（０．１ｍｏｌ／Ｌ）のＨＣｌを順次追加した実施例２Ｂでは、ＨＣｌの追加開始時のｐＨが７付近だった状態から、追加されたＨＣｌの濃度が３．４ｍｍｏｌ／Ｌ付近になってようやくｐＨが４付近になった。又、実施例２Ｂにおいて、５０ｍＬのＤＷ（蒸留水）に、本発明のポリマー（２５０ｍｇ／ｍＬ）を１ｍＬ好適に追加することができた。以上の事から、本発明のポリマーがｐＨ低下抑制機能と水溶性の供与機能とを有することが分かった。

[0187] 又、得られた本発明のポリマーにつき、ＧＰＣ（Gel Permeation Chromatography：ゲル浸透クロマトグラフィー）を用いて、重量平均分子量（Ｍｗ）および数平均分子量（Ｍｎ）を測定した。各平均分子量の測定結果は以下のとおりであった。

・重量平均分子量（Ｍｗ）：９．８万

・数平均分子量（Ｍｎ）：１．３万

[0188] 実施例３Ｂ

以下の工程を経て、［１．ポリマーの合成］、［２．合成したポリマーを含むセンサの作製］、および［３．センサの浸漬実験］を行った。なお、実施例１Ｂでの記載内容との重複を避ける観点から、同重複部分の内容については省略して記載する。

[0189] ［１．ポリマーの合成］

（第１工程の実施）

第１工程として、ジメチルスルホキシド(ＤＭＳＯ)に、４－ビニルピリジンおよびスチレンを混合して第１溶液を準備した。この第１工程における第１溶液準備条件は実施例１Ｂと同様である。

[0190] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

[使用量]

・ＤＭＳＯ： ２４．８ｍＬ

・４ＶＰ： ３．５３９ｍＬ（１０５．１４／モル）

・スチレン： ０．０７７ｍＬ（１０４．１５／モル）

[４ＶＰの濃度]

１２．４５ ｖ/ｖ％

[スチレンの濃度]

０．２７ ｖ/ｖ％

[品番]

・ＤＭＳＯ：０４５－２８３３５（富士フィルム和光純薬社製）

・４ＶＰ：Ｖ０１５０（東京化成工業社製）

[0191] （第２工程の実施）

第２工程として、３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートを、溶媒としての水に追加して、第２溶液を準備した。この第２工程における第２溶液準備条件は実施例１Ｂと同様である。

[0192] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

[使用量]

ＭＡＳ：９．３６ｇ（２７９．３５／モル）

ミリＱ水：５．０ｍＬ

[ＭＡＳ濃度]

６５．２（ｗ/ｗ％）

[品番]ＭＡＳ： Ｍ１９７１（東京化成工業社製）

[0193] （第３工程の実施）

第３工程では、上記第２溶液を第１溶液に追加し、混合した。混合比率（モル比）については、スチレン：４ＶＰ：ＭＡＳ＝１：４９：５０とした。この第３工程における第１溶液と第２溶液の追加、混合条件は実施例１Ｂと同様である。

[0194] （第４工程）

第４工程では、重合開始剤の存在下で、上記第１溶液および第２溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行った。この第４工程における重合化反応条件は実施例１Ｂと同様である。

[0195] 重合反応終了後、ミリＱ水を加えて重合反応物を溶解させた。その後、溶解液をヘキサンに滴下し析出物を形成、回収し、エバポレーションを行い、最後に減圧乾燥を行った。以上により、本発明のポリマーを合成することができた。得られたポリマーにおいて、４ＶＰとＭＡＳからなるポリマー基本構成単位の分子量は１９１．６３であった。

[0196] ポリマー合成後、同ポリマーを２５０．０ｍｇ秤量し、ＤＷ（蒸留水）１ｍＬを添加し、ポリマー溶液を調製した。これにより、同ポリマー溶液濃度を２５０ｍｇ／ｍＬ（０．２５ｍｇ／μＬ、１３０４．６ｍｍｏｌ／Ｌ）とした。

[0197] ［２．合成したポリマーを含むセンサの作製］

ポリマーの合成後、以下の工程を経てセンサを作製した。

[0198] ●（１）：作用電極の作製

スクリーン印刷機（セリアコーポレーション製）を用いて、カーボンインクXC-3180（藤倉化成社製）を絶縁基板上に印刷し、導電性薄膜を形成した。絶縁基板としては、ＰＥＴ　Ｗ４００Ｊ（三菱製）を用いた。

[0199] ●（２）：撥水レジスト層の作製

スクリーン印刷機（セリアコーポレーション製）を用いて、レジストインクXB-3342（藤倉化成社製）を作用電極上に印刷し、撥水レジストを形成した。

[0200] ●（３）コロナ放電処理

作用電極に対して、コロナ放電表面改質装置(信光電気計装社製)を用いて表面処理を行った。

[0201] ●（４）：撥水フィルム層の作製

フッ素系の撥水フィルムＳＳ４Ａ（ニッパ社製)を上記の撥水レジスト層の

上に貼付し、撥水フィルム層を作製した。

[0202] ●（５）：ポリマー溶液の塗布

工程（１）で作製した作用電極上に、［１．ポリマーの合成]で形成した２５０ｍｇ／ｍＬのポリマー溶液を１μＬ塗布し、室温で乾燥させ、ポリマー膜を形成した。

[0203] ●（６）：保護膜用溶液の調製および保護膜用溶液の塗布

上記乾燥後、１６．１２５ｗｔ％の被膜用中和ナフィオン溶液０．６ｍｇをポリマー膜上に塗布し、室温で乾燥させ、ナフィオン膜を形成した。続いて、上記乾燥後、被膜用４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ溶液 ０．６ｍｇをナフィオン膜上に塗布し、室温で乾燥させ、４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ膜を形成した。以上により、ポリマー膜上に保護膜を形成した。

[0204] （被膜用中和ナフィオン溶液の調製）

なお、上記の被膜用中和ナフィオン溶液については、以下の工程を経て調製した。具体的には、瓶内にナフィオン分散液２０ｗｔ％ （品番６６３４９２、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）２６２５０．７ｍｇを加えた。次いで、瓶内にエタノール（品番０５７－００４５１、富士フィルム和光純薬社製）７３５５．２ｍｇを加えた。次いで、瓶内に５ｍｏｌ／Ｌの水酸化ナトリウム水溶液（品番１９６－０５３７５、富士フィルム和光純薬社製）１３９４．０８ｍｇを加えた。最後に、ＶＯＲＴＥＸ－ＧＥＮＩＥ ２による撹拌６０秒と超音波処理(ソニケーション)５秒とを繰り返して、析出物を完全に溶解させた。以上により、被膜用中和ナフィオン溶液を調製した。

[0205] （被膜用４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ溶液の調製）

また、上記の被膜用４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ溶液については、以下の工程を経て調製した。具体的には、被膜用４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ溶液の調整に先立ち、瓶に４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ（品番Ｐ４２４８７、[分子量比］４ＶＰ：ｔＢｕＭＡ＝１２万：２７万、Ｐｏｌｙｍｅｒ ｓｏｕｒｃｅ社製）を４．０ｇ加え、その後エタノール（品番０５７－００４５１、富士フィルム和光純薬社製）３６ｇを入れ、ＲＯＴＡＴＯＲ ＶＭＲ－３Ｒを用いて撹拌した。これにより

、１０ｗｔ％の４ＶＰ－ｔＢｕＭＡストック溶液を用意した。これとは別に、瓶にＰＥＧＤＧＥ１０００（品番８０５５０５、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）を１．０ｇ加え、その後エタノール７．８３ｇを入れ、ＲＯＴＡＴＯＲ ＶＭＲ－３Ｒを用いて撹拌した。これにより、１１．３２ｗｔ％のＰＥＧＤＧＥ１０００ストック溶液を用意した。

[0206] その後、瓶に、４９．９８ｍｇのエタノールを加え、次いで上記にて用意した１０６．０２ｍｇのＰＥＧＤＧＥ１０００溶液（０．６ｗｔ％）を加え、その後に１１４４ｍｇのｔＢｕＭＡ－４ＶＰ溶液（５．７２ｗｔ％）を加えた。その後にＶＯＲＴＥＸ－ＧＥＮＩＥ ２にて軽く撹拌した。撹拌後、瓶の開け口をパラフィルムとポリイミドテープで密封し、５３℃恒温槽中で１６時間回転撹拌した。その後、恒温槽から瓶を取り出し、上記の塗布直前まで取り出した瓶をチューブローテーターにて緩やかに回転攪拌した。以上により、被膜用４ＶＰ－ｔＢｕＭＡ溶液を調製した。

[0207] ［３．センサの浸漬実験］

その後、［２．合成したポリマーを含むセンサの作製］にて得られたセンサの浸漬実験を行った。

[0208] 具体的には、得られたセンサを１．５ｍＬの純水に浸け、純水に浸浸されたセンサを３７度の恒温槽で２２時間放置した。その後に、センサからの溶出液を回収し、回収した溶出液中のＭＡＳ濃度を測定した。このＭＡＳ濃度については、紫外可視分光光度計(波長：２５６ｎｍ)（日本分光社製、型式Ｖ－６５０)を用いて測定した。

[0209] 比較例３Ｂ（実施例３Ｂと対比するための例）

比較例３Ｂは、実施例３Ｂと比べて、センサの作製に際して、作用電極上にポリマーではなくリン酸緩衝液を塗布した点で異なる。塗布したリン酸緩衝液については、塗布後に室温で乾燥させた。

[0210] なお、比較例３Ｂでは、作用電極上に塗布するポリマー溶液とリン酸緩衝液の濃度は同一（１３０４．６ｍｍｏｌ／Ｌ）に設定し、塗布量も同一の１μＬとした。又、センサの構成要素である保護膜の構成材料の種類、濃度に

ついては同一とした。

[0211] また、比較例３Ｂでは、センサ作製後のセンサ浸漬実験は実施例３Ｂと同じ手順で実施した。具体的には、得られたセンサを１．５ｍＬの純水に浸け、純水に浸浸されたセンサを３７度の恒温槽で２２時間放置した。

[0212] その後に、センサからの溶出液を回収し、回収した溶出液中のリン酸濃度を測定した。このリン酸濃度については、イオンクロマトグラフィー(サーモサイエンティフィック社製、型式 ＩＣＳ ５０００＋)を用いて測定した。なお、実施例３Ｂでの記載内容との重複を避ける観点から、同重複部分の内容については記載を割愛する。

[0213] ［測定結果］

比較例３Ｂでは、溶出液中のリン酸濃度は１．１２μｍｏｌであり、溶出率が８５．８１％であったのに対して、実施例３Ｂでは、溶出液中のＭＡＳ濃度は０．０４２ｍｇであり、溶出率が１６．６１％であった。

[0214] ［評価］

上記の測定結果から、実施例３Ｂでは、ポリマー膜を構成する８４％のＭＡＳが保護膜で覆われたセンサ内にとどまることができたことが分かった。一方、比較例３Ｂでは、リン酸緩衝膜を構成する１５％のリン酸のみが保護膜で覆われたセンサ内にとどまることができたことが分かった。

[0215] すなわち、実施例３Ｂにおける保護膜を通じた外部へのＭＡＳの溶出は、比較例３Ｂにおける保護膜を通じた外部へのリン酸の溶出と比べて約５．２倍抑制されていることが分かった。

[0216] 以上のことから、比較例３Ｂのような低分子量のリン酸緩衝液を用いる場合と比べて、実施例３Ｂにおけるポリマーはポリマー膜（本発明における試薬層に対応）内にとどまりやすく、保護膜よりも外側に位置する培地側への流出を好適に抑制することが可能であることが分かった。

[0217] なお、本発明は、例示された実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、種々の改良および設計上の変更が可能である。

[0218] なお、上述のような本発明（発明Ｂ）の一実施形態は、次の好適な態様を包含している。

＜１Ｂ＞

繰り返し単位としてプロトン受容基およびイオン性基を備える、ポリマー。

＜２Ｂ＞

＜１Ｂ＞において、水溶性を有する、ポリマー。

＜３Ｂ＞

＜１Ｂ＞又は＜２Ｂ＞において、重量平均分子量が１万以上である、ポリマー。

＜４Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜３Ｂ＞のいずれかにおいて、前記イオン性基が双性イオン型である、ポリマー。

＜５Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜４Ｂ＞のいずれかにおいて、前記イオン性基が、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含む、ポリマー。

＜６Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜５Ｂ＞のいずれかにおいて、前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、ポリマー。

＜７Ｂ＞

＜６Ｂ＞において、前記複素環式窒素基のｐＫａが４～８である、ポリマー。

＜８Ｂ＞

＜６Ｂ＞又は＜７Ｂ＞において、前記複素環式窒素基が、ピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも１種である、ポリマー。

＜９Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜８Ｂ＞のいずれかにおいて、前記イオン性基を備えた第１部分が３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートを含む、ポリマー。

＜１０Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜９Ｂ＞のいずれかにおいて、前記プロトン受容基を備えた第２部分が４－ビニルピリジンを含む、ポリマー。

＜１１Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜１０Ｂ＞のいずれかにおいて、前記繰り返し単位が、４－ビニルピリジンに由来する部分と３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートに由来する部分を含む、ポリマー。

＜１２Ｂ＞

＜１Ｂ＞～＜１１Ｂ＞のいずれかのポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む試薬。

＜１３Ｂ＞

＜１２Ｂ＞の試薬を含む試薬層を備える、バイオセンサ。

＜１４Ｂ＞

＜１３Ｂ＞において、乳酸センサである、バイオセンサ。

＜１５Ｂ＞

プロトン受容基を含む第１溶液を準備する第１工程と、

イオン性基を含む第２溶液を準備する第２工程と、

前記第２溶液を前記第１溶液に追加し、混合する第３工程と、

重合開始剤の存在下で、前記第１溶液および前記第２溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う第４工程と

を含む、ポリマーの合成方法。

＜１６Ｂ＞

＜１５Ｂ＞において、前記第１工程にて、前記プロトン受容基として複素環式窒素基を含む前記第１溶液を準備する、ポリマーの合成方法。

＜１７Ｂ＞

＜１５Ｂ＞又は＜１６Ｂ＞において、前記複素環式窒素基のｐＫａ４～８である、ポリマーの合成方法。

＜１８Ｂ＞

＜１６Ｂ＞又は＜１７Ｂ＞において、前記複素環式窒素基が、ピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも１種である、ポリマーの合成方法。

＜１９Ｂ＞

＜１５Ｂ＞～＜１８Ｂ＞のいずれかにおいて、前記第１溶液が４－ビニルピリジンを含有する溶液である、ポリマーの合成方法。

＜２０Ｂ＞

＜１５Ｂ＞～＜１９Ｂ＞のいずれかにおいて、前記第２工程にて、前記イオン性基が双性イオン型である前記第２溶液を準備する、ポリマーの合成方法。

＜２１Ｂ＞

＜１５Ｂ＞～＜２０Ｂ＞のいずれかにおいて、前記第２溶液の前記イオン性基が、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含む、ポリマーの合成方法。

＜２２Ｂ＞

＜１５Ｂ＞～＜２１Ｂ＞のいずれかにおいて、前記第２溶液が３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートを含有する溶液である、ポリマーの合成方法。

＜２３Ｂ＞

＜１５Ｂ＞～＜２２Ｂ＞のいずれかにおいて、前記第２工程において、前記イオン性基を含有する物質を、溶媒としての水に３秒以上７秒以下の間に溶解させて、前記第２溶液を準備する、ポリマーの合成方法。

＜２４Ｂ＞

＜１５Ｂ＞～＜２３Ｂ＞のいずれかにおいて、前記第３工程において、前

記第２工程にて準備した前記第２溶液を前記第１溶液に０．５秒以上４秒以内に追加する、ポリマーの合成方法。

［産業上の利用可能性］

[0219] 本発明の一実施形態にかかるポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサは、アナライトの好適な測定が可能である。

［符号の説明］

[0220] １０　試薬層

２０　保護膜

１００　バイオセンサ

Ａ　ポリマー

Ｂ　酵素

請求の範囲

[請求項1] 繰り返し単位にプロトン受容基を含むと共にｐＨ緩衝能を有するポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層。

[請求項2] 前記ポリマーは、前記酸化還元酵素が活性を維持可能なｐＨ範囲に緩衝能を有する、請求項１に記載の試薬層。

[請求項3] 前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、請求項１または２に記載の試薬層。

[請求項4] 前記プロトン受容基が、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも１種である、請求項１または２に記載の試薬層。

[請求項5] 前記複素環式窒素基が、イミダゾール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホリル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも１種である、請求項３に記載の試薬層。

[請求項6] 前記ポリマーがポリビニルイミダゾールである、請求項１に記載の試薬層。

[請求項7] 前記ポリマーがポリ-Ｌ-ヒスチジンである、請求項１に記載の試薬層。

[請求項8] 前記ポリマーがポリリン酸ナトリウムである、請求項１に記載の試薬層。

[請求項9] 前記ポリマーの重量平均分子量が１００００以上である、請求項１に記載の試薬層。

[請求項10] 前記ポリマーは、前記繰り返し単位が４－ビニルピリジンに由来する部分と３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートに由来する部分を含む、請求項

１に記載の試薬層。

[請求項11] 請求項１に記載の試薬層を備える、バイオセンサ。

[請求項12] 乳酸センサである、請求項１１に記載のバイオセンサ。

補正された請求の範囲
[2023年11月17日(17.11.2023)国際事務局受理]

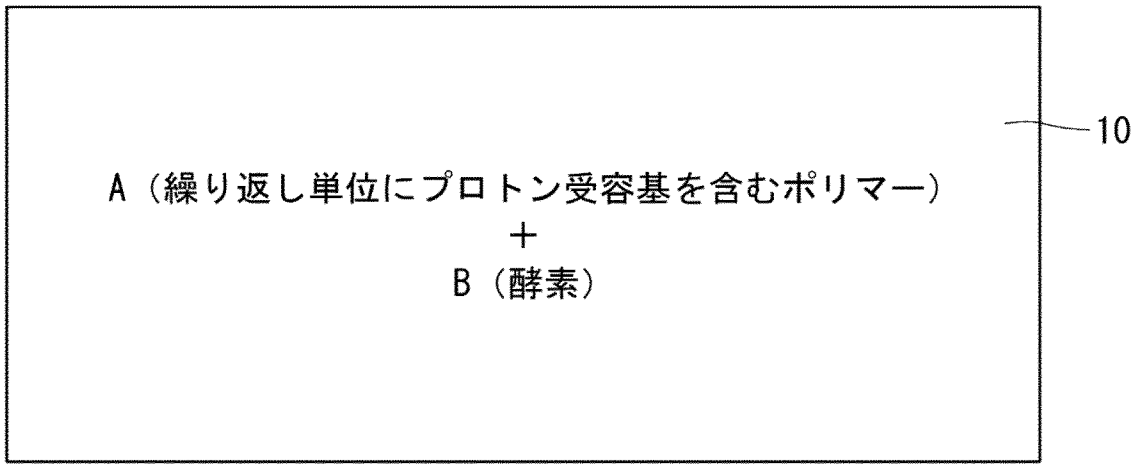
[請求項１]（補正後）
繰り返し単位にプロトン受容基を含むと共にｐＨ６～８の範囲で緩衝能を有する重量平均分子量１００００以上１０００００００以下のポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する前記ｐＨ範囲で活性を維持できる酸化還元酵素を含む、電気化学センサ用の試薬層。
[請求項２]（削除）
[請求項３]（補正後）
前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、請求項１に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項４]（補正後）
前記プロトン受容基が、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも１種である、請求項１に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項５]（補正後）
前記複素環式窒素基が、イミダゾール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホリル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも１種である、請求項３に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項６]（補正後）
前記ポリマーがポリビニルイミダゾールである、請求項１に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項７]（補正後）
前記ポリマーがポリ-Ｌ-ヒスチジンである、請求項１に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項８]（補正後）
前記ポリマーがポリリン酸ナトリウムである、請求項１に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項９]（削除）
[請求項１０]（補正後）
前記ポリマーは、前記繰り返し単位が４－ビニルピリジンに由来する部分と３－[[２－（メタクリロイルオキシ）エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン－１－スルホネートに由来する部分を含む、請求項１に記載の電気化学センサ用の試薬層。
[請求項１１]（補正後）
アナライトを検出又は定量する電気化学センサであって、
作用極、対極、及び前記作用極上に配置された請求項１に記載の試薬層を有し、かつ保護膜を有する、実質的に前記ポリマーが流出しない構成である、電気化

学センサ。

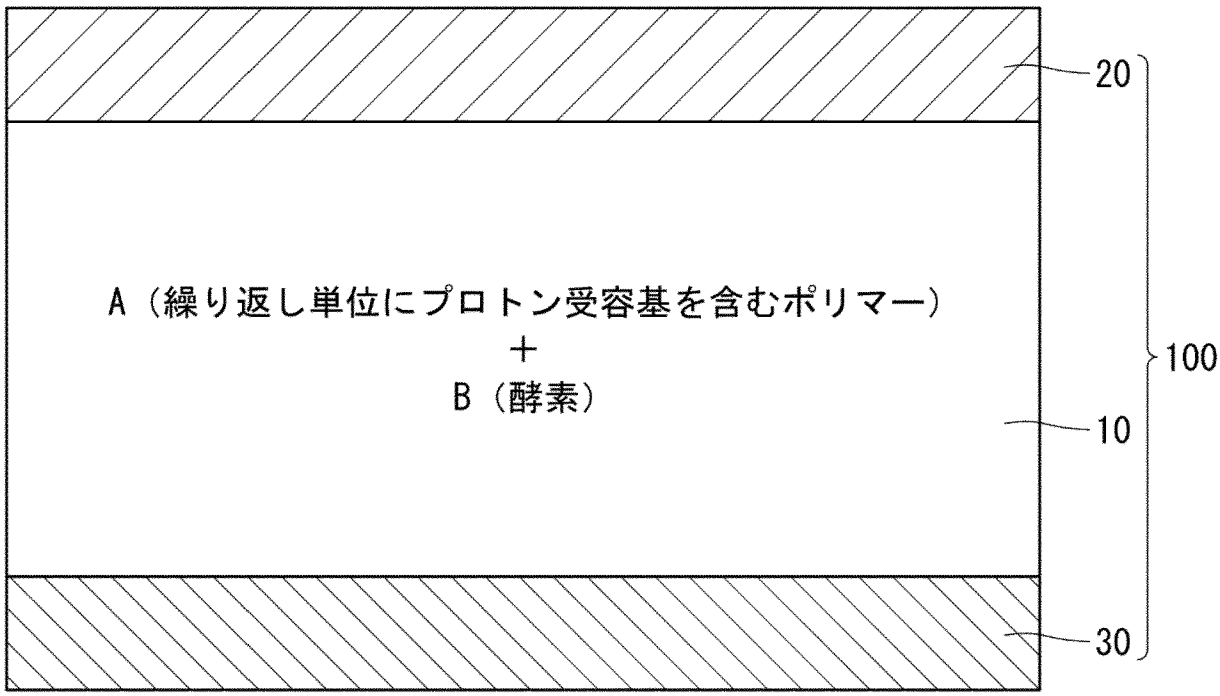
［請求項１２］（補正後）

乳酸センサである、請求項１１に記載の電気化学センサ。

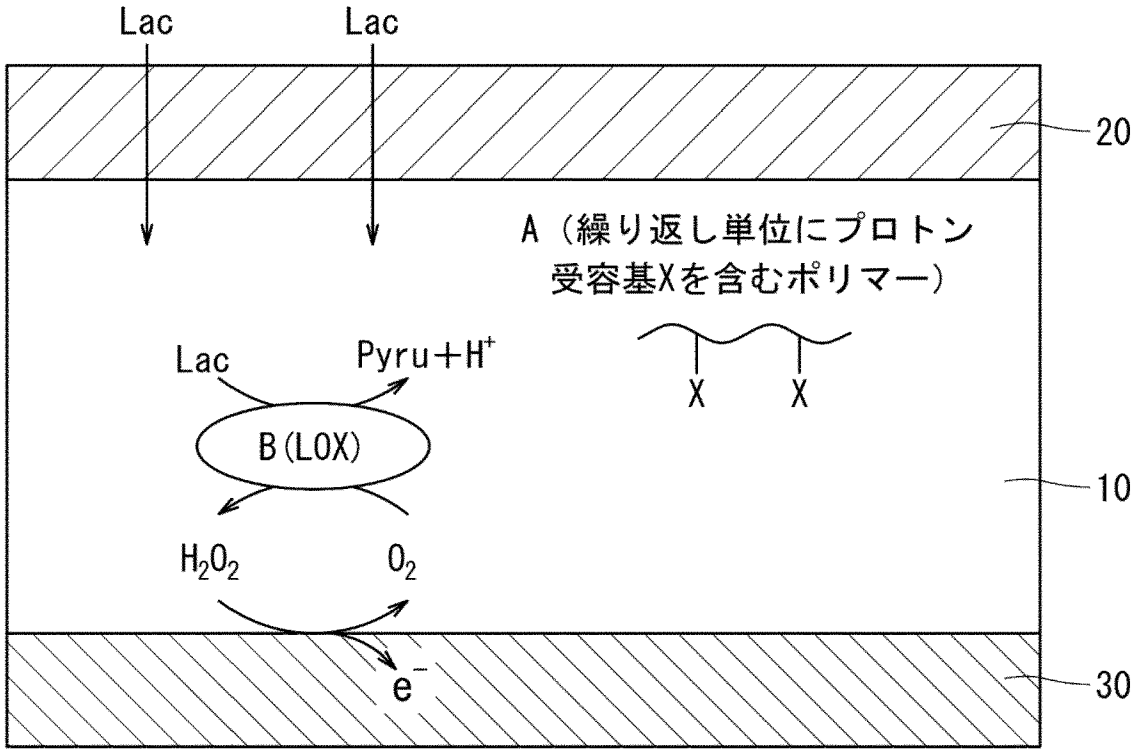
[図1]


A（繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマー）
＋
B（酵素）
10

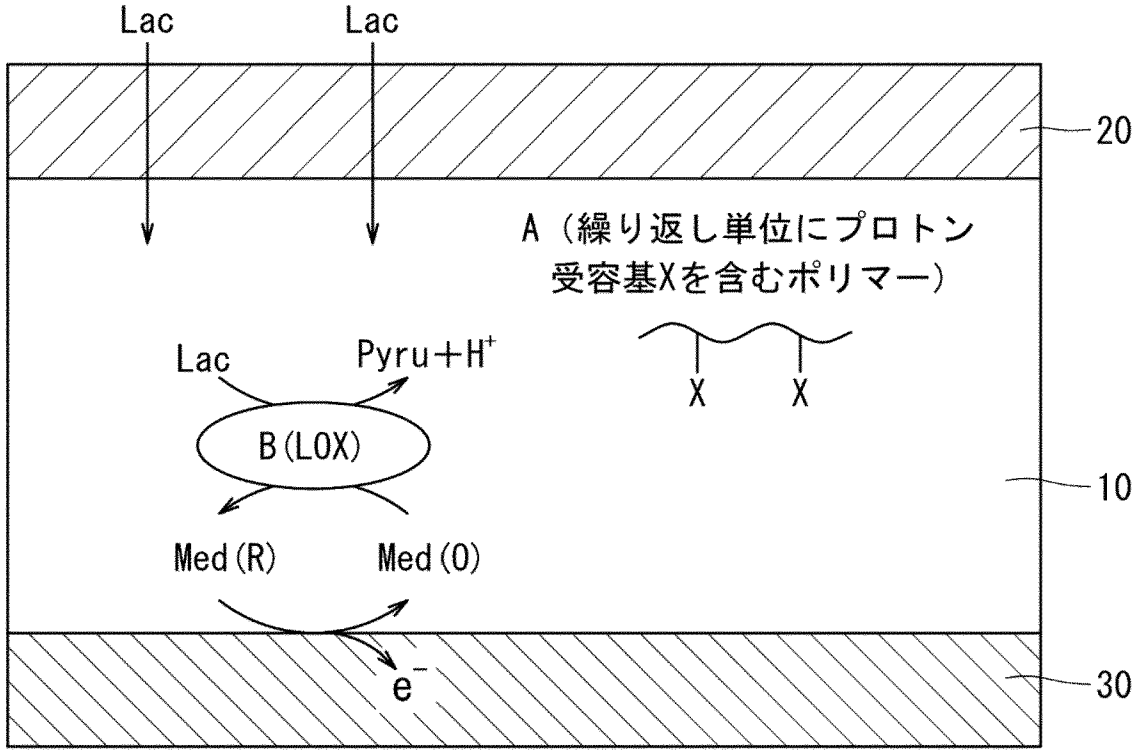
[図2]


20
A（繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマー）
＋
B（酵素）
10
30
100

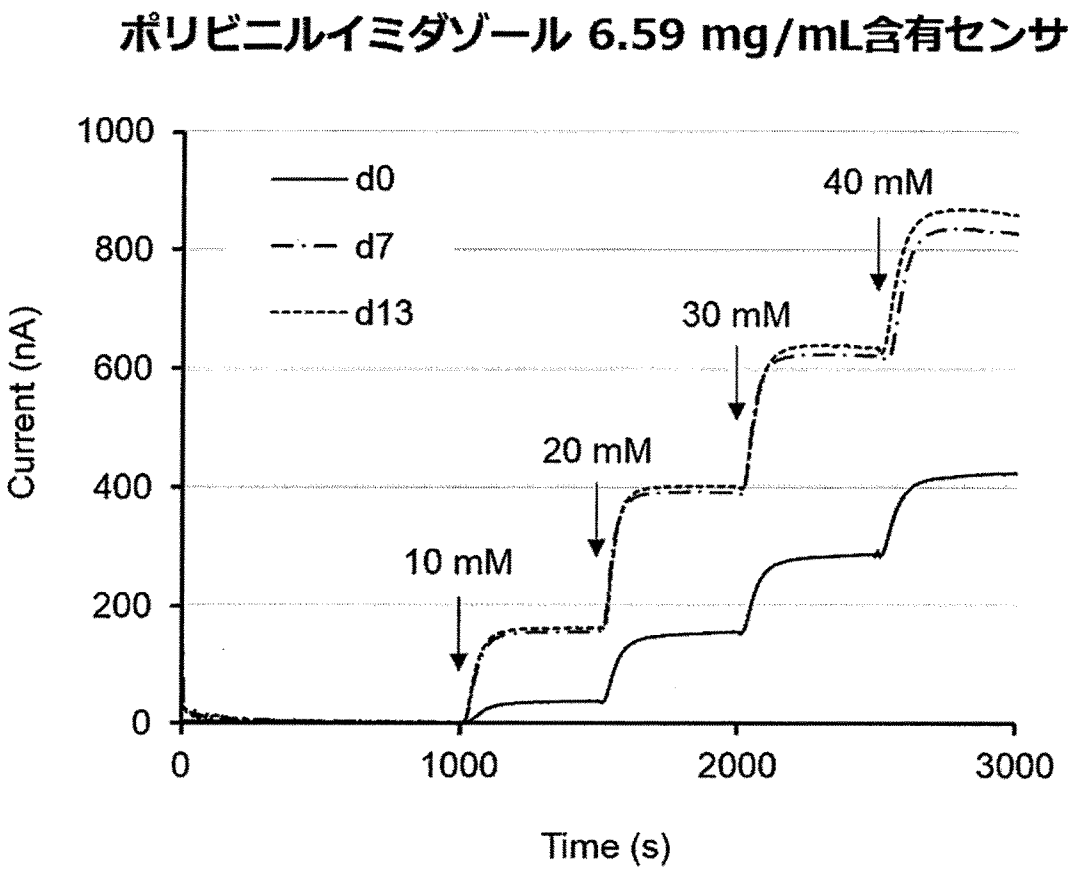
[図3]


Lac
Lac
20
A（繰り返し単位にプロトン受容基Xを含むポリマー）
X
X
Lac
Pyru+H+
B(LOX)
10
H2O2
O2
e−
30

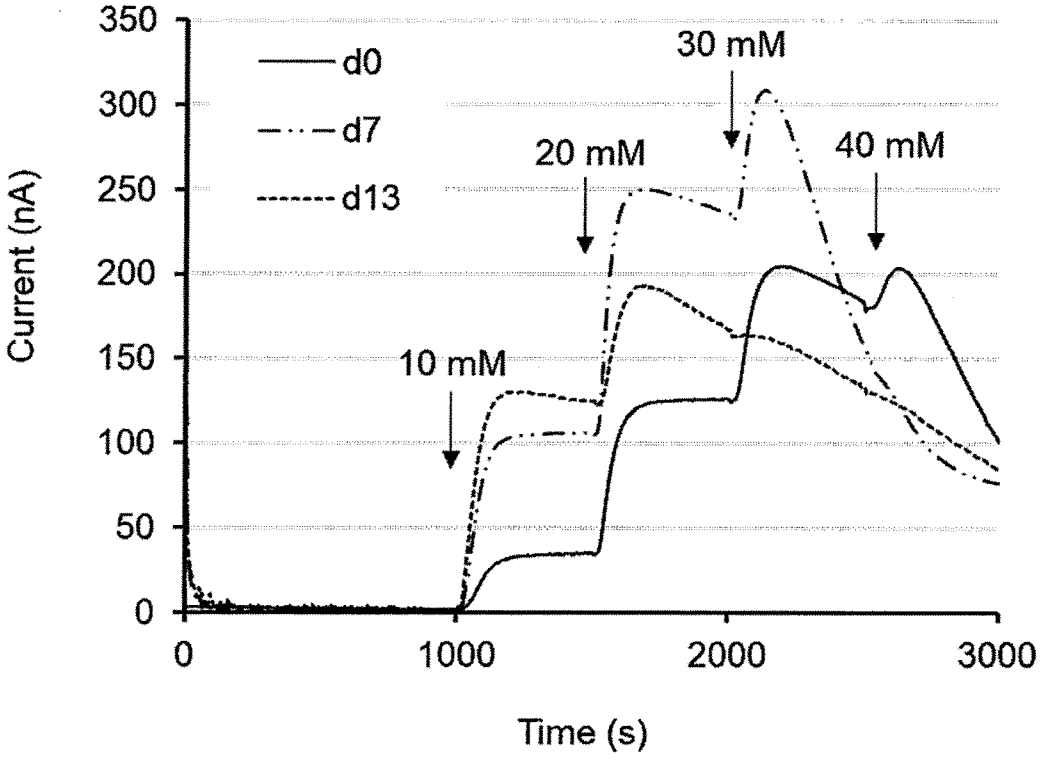
[図4]


Lac
Lac
20
A（繰り返し単位にプロトン受容基Xを含むポリマー）
X
X
Lac
Pyru+H+
B(LOX)
10
Med(R)
Med(O)
e−
30

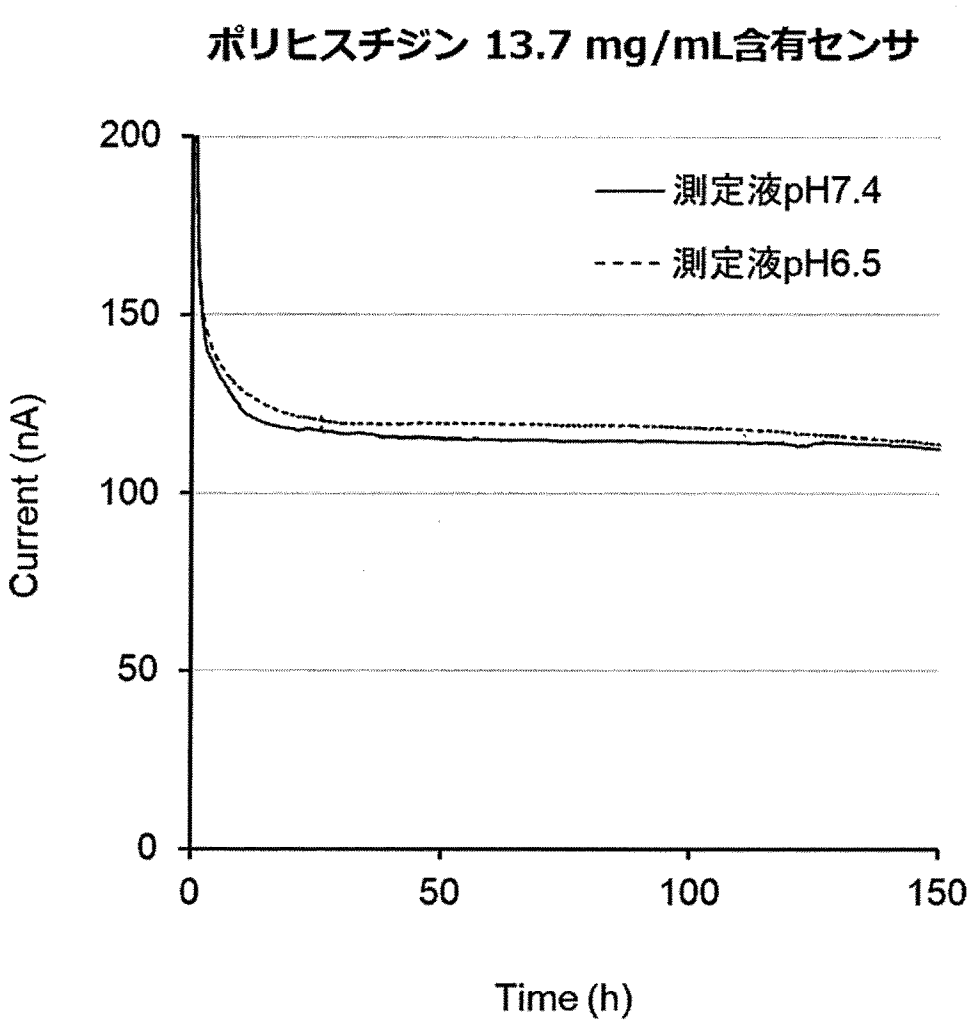
[図5]


ポリビニルイミダゾール 6.59 mg/mL含有センサ
1000
800
600
400
200
0
Current (nA)
d0
d7
d13
10 mM
20 mM
30 mM
40 mM
0
1000
2000
3000
Time (s)

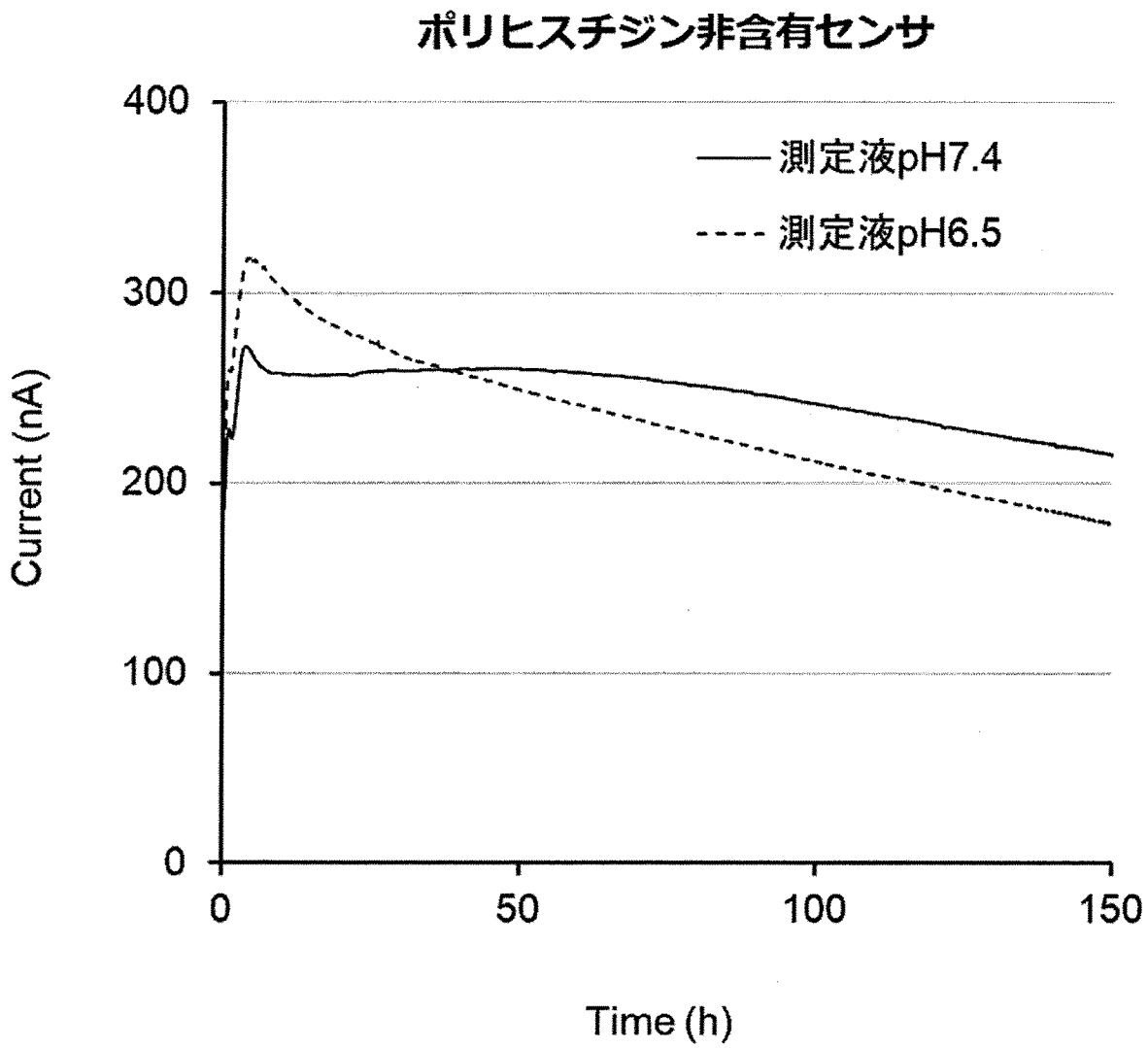
[図6]


ポリビニルイミダゾール 非含有センサ
350
300
250
200
150
100
50
0
Current (nA)
d0
d7
d13
10 mM
20 mM
30 mM
40 mM
0
1000
2000
3000
Time (s)

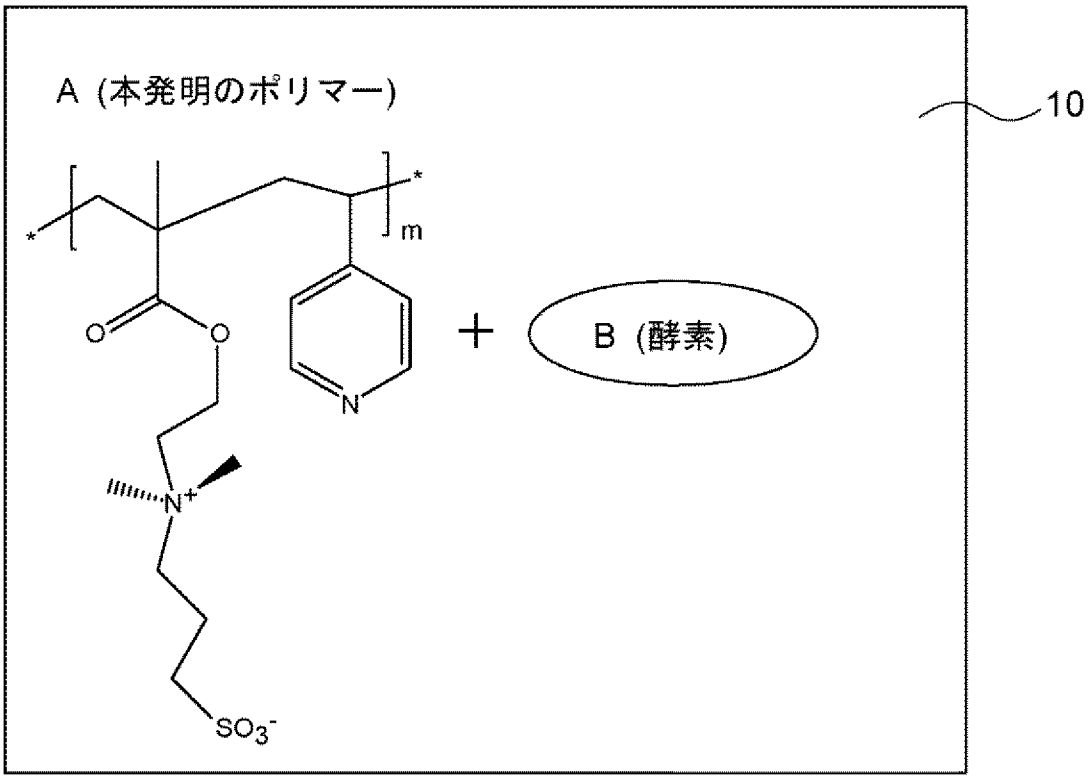
[図7]


ポリヒスチジン 13.7 mg/mL含有センサ
200
150
100
50
0
Current (nA)
0
50
100
150
Time (h)
測定液pH7.4
測定液pH6.5

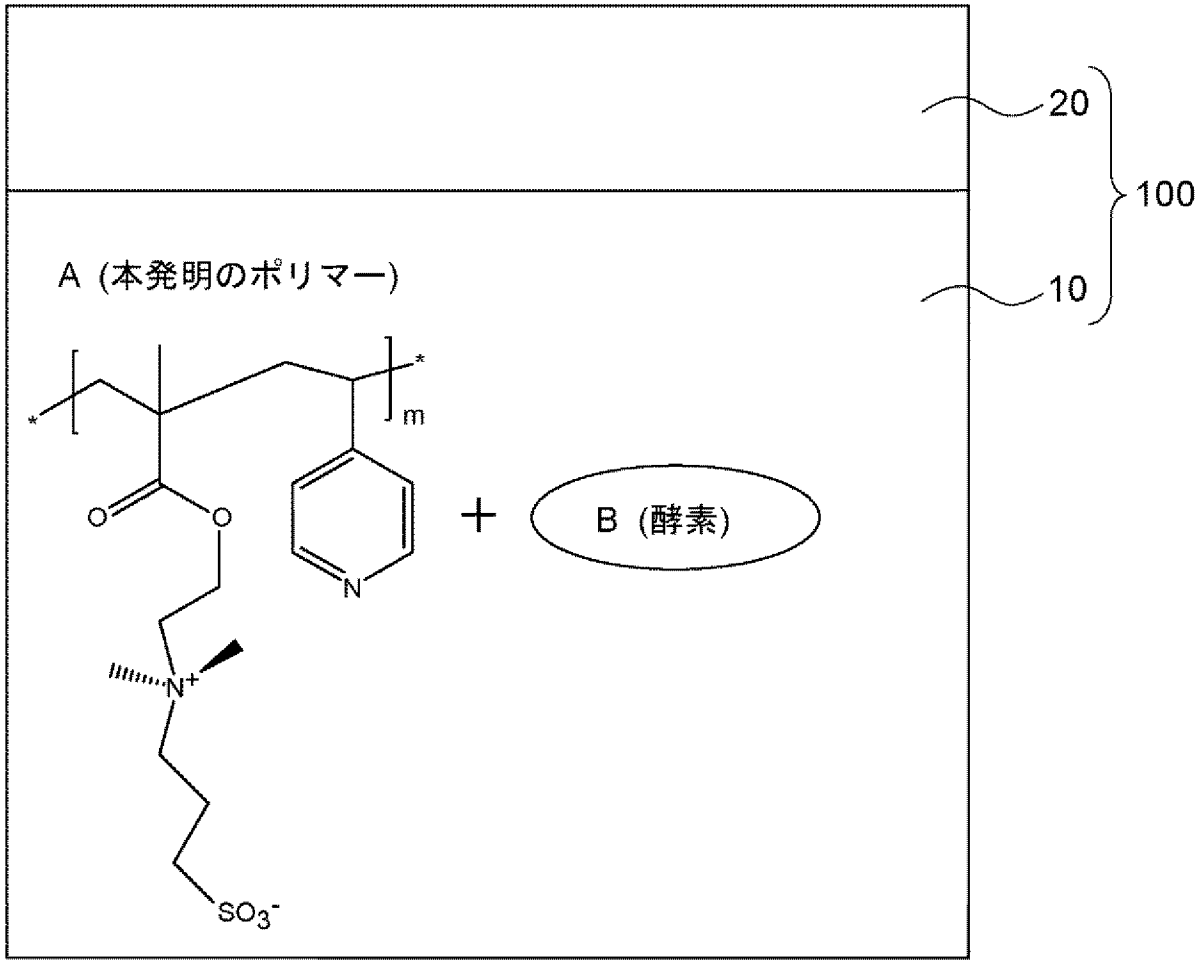
[図8]


ポリヒスチジン非含有センサ
400
300
200
100
0
Current (nA)
0
50
100
150
Time (h)
測定液pH7.4
測定液pH6.5

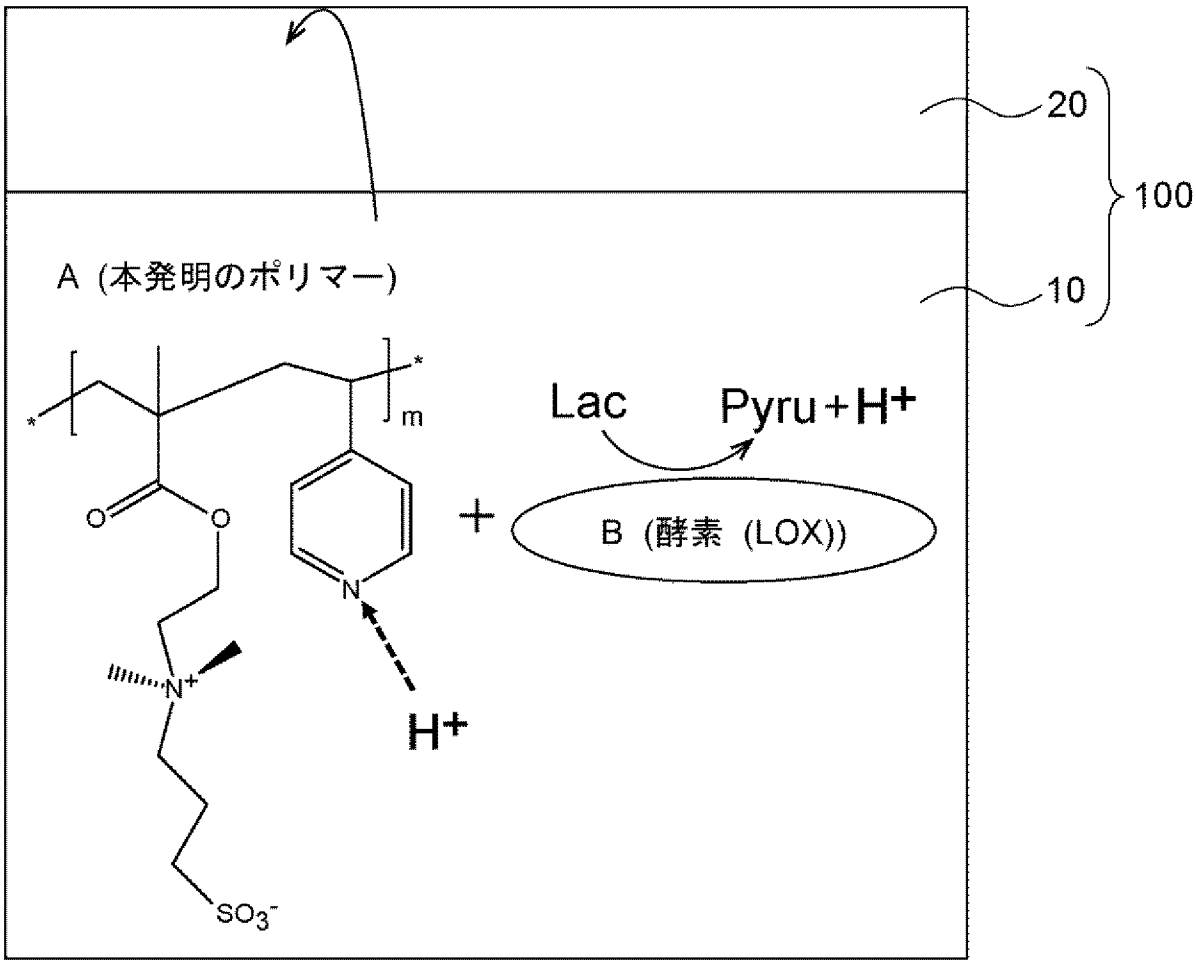
[図9]



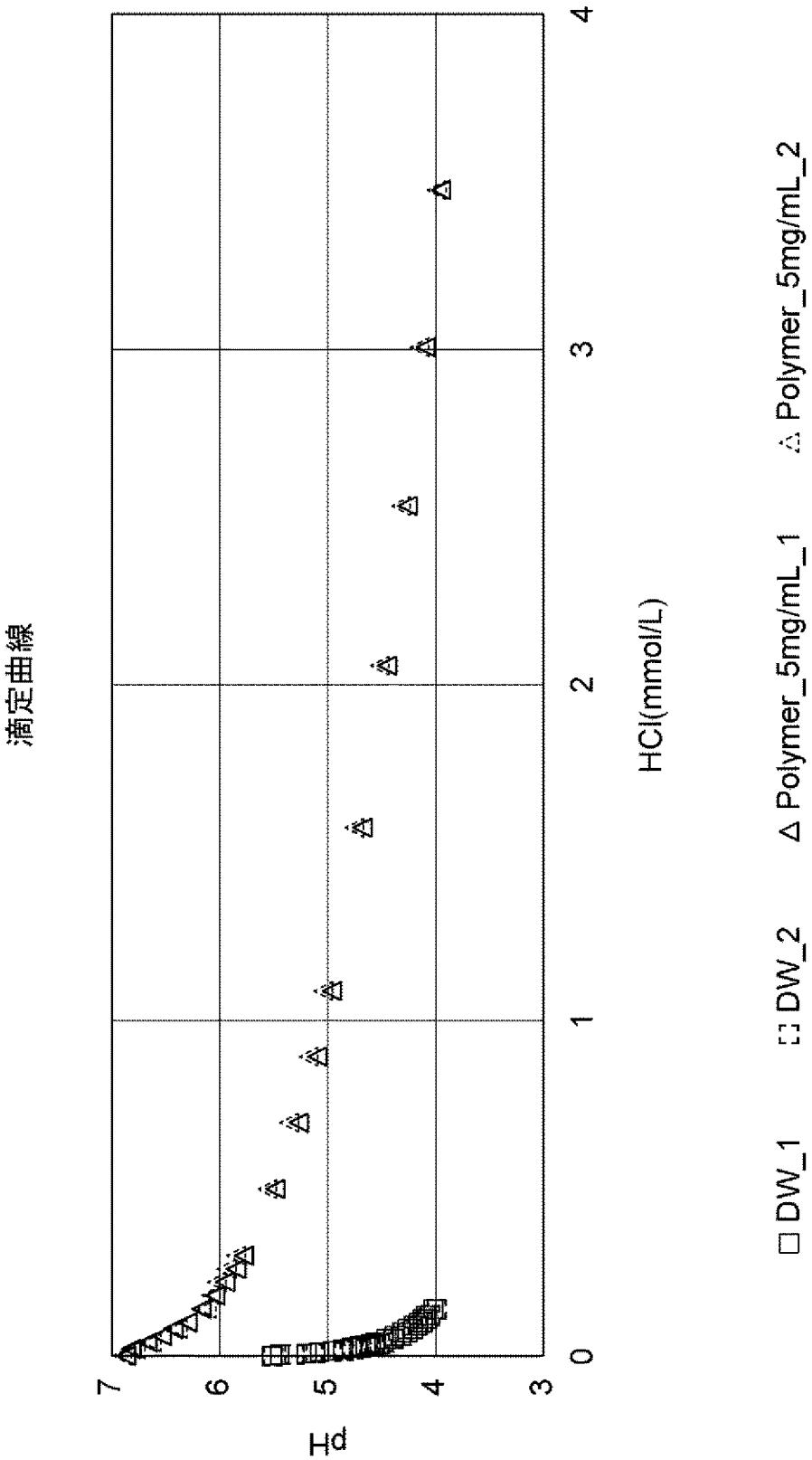
[図10]



[図11]



[図12]


滴定曲線
pH
7
6
5
4
3
0
1
2
3
4
HCl(mmol/L)
□ DW_1
□ DW_2
△ Polymer_5mg/mL_1
△ Polymer_5mg/mL_2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/026089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/327(2006.01)i; ***C08F 220/38***(2006.01)i; ***G01N 27/416***(2006.01)i
FI: G01N27/327 353Z; G01N27/416 336H; C08F220/38

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)

G01N27/327; C08F220/38; G01N27/416

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN); Scopus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2-102455 A (KONICA CORP.) 16 April 1990 (1990-04-16) page 1, right column, fourth paragraph, page 2, lower left column, fourth paragraph, page 5, upper left column, fourth paragraph to upper right column, first paragraph, page 8, lower right column, fourth paragraph, page 9, lower left column, first paragraph, fig. 2	1-3, 5-6, 11
X	JP 2012-11208 A (ABBOTT DIABETES CARE INC.) 19 January 2012 (2012-01-19) paragraphs [0043], [0045], [0104], [0112], [0115], [0117], [0121]	1-3, 5-6, 11-12
X	JP 2019-506910 A (DEXCOM, INC.) 14 March 2019 (2019-03-14) paragraphs [0021], [0039], [0058], [0062], [0080], [0111], [0112], [0117], [0151], [0165], [0180], [0192], [0200], [0255], [0346], fig. 2	1-5, 10-12
X	JP 2015-221872 A (NATIONAL INST. OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 10 December 2015 (2015-12-10) paragraphs [0002], [0014], [0016]	1-3, 5, 7, 9, 11-12
X	WO 2004/112174 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 23 December 2004 (2004-12-23) page 16, fifth paragraph, page 23, fourth paragraph	1-2, 4, 8, 11

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"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
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 September 2023	**26 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/026089

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2-102455 A	16 April 1990	(Family: none)	
JP 2012-11208 A	19 January 2012	US 2010/0204554 A1 paragraphs [0057], [0059], [0119], [0126], [0129], [0131], [0135] WO 1999/045387 A2 EP 2308371 A1	
JP 2019-506910 A	14 March 2019	WO 2017/117469 A1 paragraphs [0036], [0054], [0073], [0077], [0095], [0126], [0127], [0131], [0155], [0169], [0184], [0196], [0204], [0248], [0339], fig. 2 US 2017/0188902 A1	
JP 2015-221872 A	10 December 2015	(Family: none)	
WO 2004/112174 A1	23 December 2004	US 2005/0281729 A1 paragraphs [0103], [0141]	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/026089

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 27/327(2006.01)i; C08F 220/38(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i
FI: G01N27/327 353Z; G01N27/416 336H; C08F220/38

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））

G01N27/327; C08F220/38; G01N27/416

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	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN); Scopus

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	関連する請求項の番号
X	JP 2-102455 A（コニカ株式会社）16.04.1990（1990-04-16） 第1頁右欄第4段落,第2頁左下欄第4段落,第5頁左上欄第4段落-同右上欄第1段落,第8頁右下欄第4段落,第9頁左下欄第1段落,図2	1-3,5-6,11
X	JP 2012-11208 A（アボット ダイアベティス ケア インコーポレイテッド）19.01.2012（2012-01-19） 段落[0043],[0045],[0104],[0112],[0115],[0117],[0121]	1-3,5-6,11-12
X	JP 2019-506910 A（デックスコム・インコーポレーテッド）14.03.2019（2019-03-14） 段落[0021],[0039],[0058],[0062],[0080],[0111]-[0112],[0117],[0151],[0165],[0180], [0192],[0200],[0255],[0346],図2	1-5,10-12
X	JP 2015-221872 A（国立研究開発法人産業技術総合研究所）10.12.2015（2015-12-10） 段落[0002],[0014],[0016]	1-3,5,7,9,11-12
X	WO 2004/112174 A1（松下電器産業株式会社）23.12.2004（2004-12-23） 第16頁第5段落,第23頁第4段落	1-2,4,8,11

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
04.09.2023	26.09.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
小澤　理 2J 1762

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/026089

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2-102455 A	16.04.1990	（ファミリーなし）	
JP 2012-11208 A	19.01.2012	US 2010/0204554 A1 段落[0057],[0059],[0119],[0126],[0129],[0131],[0135] WO 1999/045387 A2 EP 2308371 A1	
JP 2019-506910 A	14.03.2019	WO 2017/117469 A1 段落[0036],[0054],[0073],[0077],[0095],[0126]-[0127],[0131],[0155],[0169],[0184], [0196],[0204],[0248],[0339],図2 US 2017/0188902 A1	
JP 2015-221872 A	10.12.2015	（ファミリーなし）	
WO 2004/112174 A1	23.12.2004	US 2005/0281729 A1 段落[0103],[0141]	