

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成20年11月6日(2008.11.6)

【公開番号】特開2001-281202(P2001-281202A)

【公開日】平成13年10月10日(2001.10.10)

【出願番号】特願2001-18130(P2001-18130)

【国際特許分類】

G 0 1 N 27/327 (2006.01)

G 0 1 N 33/483 (2006.01)

G 0 1 N 27/416 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 27/30 3 5 3 Z

G 0 1 N 33/483 F

G 0 1 N 27/30 3 5 3 B

G 0 1 N 27/30 3 5 3 R

G 0 1 N 27/46 3 3 6 G

【手続補正書】

【提出日】平成20年9月17日(2008.9.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、

前記反応試薬系が、前記電子メディエータを含む反応層と前記酸化還元酵素を含む反応層とからなり、かつ前記電極系上またはその近傍に形成されているバイオセンサの製造方法であって、

前記電子メディエータを含む反応層を、前記電子メディエータの水溶液を温風乾燥することによって形成し、

前記酸化還元酵素を含む反応層を、

昇華性を有する物質からなる溶媒に溶解した前記酸化還元酵素を含む溶液を前記所定の形成位置に配置する工程、

前記酸化還元酵素を含む溶液を凍結する工程、および

前記減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程、を経て形成する、バイオセンサの製造方法。

【請求項 2】

前記基板と対向するカバーがさらに設けられ、

前記電子メディエータを含む反応層が前記基板側に固定され、

前記酸化還元酵素を含む反応層が前記カバー側に形成されている、

請求項 1 に記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 3】

前記電子メディエータを含む反応層および前記酸化還元酵素を含む反応層が積層体を構成している、請求項 1 に記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 4】

前記酸化還元酵素を含む反応層が、カルボキシメチルセルロースを含有している、請求

項 1 に記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 5】

前記酸化還元酵素がコレステロールオキシターゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと、またはコレステロールエステラーゼとの組み合わせである、請求項 1 に記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 6】

前記電子メディエータがフェリシアン化カリウムである、請求項 1 に記載のバイオセンサの製造方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の特定成分について、迅速、高精度、かつ簡便に定量することができるバイオセンサの製造方法に関する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成する本発明に係るバイオセンサの製造方法は、

絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、

前記反応試薬系が、前記電子メディエータを含む反応層 8 a と前記酸化還元酵素を含む反応層 8 b とからなり、かつ前記電極系上またはその近傍に形成されているバイオセンサの製造方法であって、

前記電子メディエータを含む反応層 8 a を、前記電子メディエータの水溶液を温風乾燥することによって形成し、

前記酸化還元酵素を含む反応層 8 b を、

昇華性を有する物質からなる溶媒に溶解した前記酸化還元酵素を含む溶液を前記所定の形成位置に配置する工程、

前記酸化還元酵素を含む溶液を凍結する工程、および

前記減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程、を経て形成する。

前記基板と対向するカバーがさらに設けられ、前記電子メディエータを含む反応層が前記基板側に固定され、前記酸化還元酵素を含む反応層が前記カバー側に形成されていることが好ましい。

前記電子メディエータを含む反応層および前記酸化還元酵素を含む反応層が積層体を構成していることが好ましい。

前記酸化還元酵素を含む反応層が、カルボキシメチルセルロースを含有していることが好ましい。

前記酸化還元酵素がコレステロールオキシターゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと、またはコレステロールエステラーゼとの組み合わせであることが好ましい。

前記電子メディエータがフェリシアン化カリウムであることが好ましい。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 0 7

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 0 8

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 0 9

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 0

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 1

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 2 】

【発明の実施の形態】

電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウムその他、コレステロールオキシダーゼなどの酸化還元酵素との電子伝達能を有するレドックス化合物から選択して用いることができる。電子メディエータは単独でセンサに担持される。

本発明に用いる昇華性を有する物質からなる溶媒としては、電気化学的に不活性であるか、自身が酸化体であり、電子メディエータや酵素を還元することがなく、かつこれらを変質させないものが好ましい。水が最も使いやすいが、電子メディエータの溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、あるいはパラベンゾキノンなどのキノン類などを用いることもできる。酵素の溶媒としては、水またはバッファーが好ましい。ジメチルホルムアミドの 40 % 程度の水溶液あるいはエタノールの 20 % 程度の水溶液などを用いることもできる。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 8

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 11】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

## 【 0 0 1 9 】

図 2 は、実施の形態におけるセンサの縦断面図である。絶縁性基板 1 上の電極系上に、前記と同様にして親水性高分子層 7 が形成されている。この親水性高分子層 7 上、およびカバー 1 2 の試料液供給路に露出する面に、それぞれ反応層 8 a および 8 b が形成されている。

他の実施の形態においては、上記の反応層 8 a、8 b を複数の層の積層体として構成する。

## 【 手 続 補 正 1 2 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 2 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 2 0 】

## 【 実 施 例 】

## 《 実 施 例 1 》

図 2 の構成を有するコレステロールセンサで、反応層 8 a が電子メディエータを含み、反応層 8 b がコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、および界面活性剤を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。

まず、基板 1 の電極系上に、カルボキシルメチルセルロースのナトリウム塩（以下、CMC と略す）の 0.5 wt % 水溶液を 5  $\mu$ l 滴下し、50 の温風乾燥器中で 10 分間乾燥させることにより CMC 層 7 を形成した。次に、フェリシアン化カリウムの 1 M 水溶液 1  $\mu$ l を CMC 層 7 上に滴下し、50 の温風乾燥器中で 10 分間乾燥させることにより、フェリシアン化カリウムを含む反応層 8 a を形成した。

## 【 手 続 補 正 1 3 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 2 2

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 2 2 】

こうして作製したコレステロールセンサに、試料液として、コレステロールおよびコレステロールエステルの一種であるリノール酸コレステロールを含むコレステロール標準液 1  $\mu$ l を試料液供給路の開口部 1 3 より供給し、3 分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ +0.5 V のパルス電圧を印加し、5 秒後の電流値を測定した。その結果を図 3 に示す。

## 【 手 続 補 正 1 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 2 3

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 2 3 】

## 《 実 施 例 2 》

図 2 の構成を有するコレステロールセンサで、反応層 8 a が電子メディエータを含み、反応層 8 b がコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤および 0.125 wt % の CMC を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。

実施例 1 と同様にして、絶縁性基板 1 上の電極系上に CMC 層 7 を形成した。次に、フェリシアン化カリウムを水に溶解させた水溶液を、CMC 層 7 上に 1  $\mu$ l 滴下し、50 の温風乾燥器中で 10 分間乾燥させることによりフェリシアン化カリウムを含む層 8 a を形成した。一方、CHOD、CHE、界面活性剤および CMC を水に溶解させて混合水溶液を調製した。カバーとスパーサを組み合わせたカバー部材のスリット 1 5 により形成される凹部に前記混合水溶液を 2.5  $\mu$ l 滴下し、-196 の液体窒素にて凍結後、梨型

フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、C h O D、C h E、界面活性剤およびC M Cを含む反応層8 bを形成した。なお、ここに用いたフェリシアン化カリウム、界面活性剤、C h O DおよびC h Eの量は、実施例1と同じであり、以下の実施例3、4および比較例においても同じである。

こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図3に示す。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

《参考例1》

図2の構成を有するコレステロールセンサで、反応層8 bが電子メディエータを含み、反応層8 aがコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。

実施例1と同様にして、絶縁性基板1上の電極系上にC M C層7を形成した。次に、C h O D、C h Eおよび、界面活性剤を水に溶解させて混合水溶液を調製し、この混合水溶液2.5  $\mu$  lをC M C層7上に滴下し、-135の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収容して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることによりC h O D、C h Eおよび、界面活性剤を含む層8 aを形成した。一方、フェリシアン化カリウムを水に溶解させた水溶液を、カバーとスペーサを組み合わせたカバー部材のスリット15により形成される凹部に1  $\mu$  l滴下し、-196の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、フェリシアン化カリウムを含む反応層8 bを形成した。

こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図3に示す。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

《参考例2》

図2の構成を有するコレステロールセンサで、反応層8 aが電子メディエータを含み、反応層8 bがコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。

実施例1と同様にして、絶縁性基板1上の電極系上にC M C層7を形成した。次に、フェリシアン化カリウムを水に溶解させた水溶液1  $\mu$  lをC M C層7上に滴下し、-196の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収容して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより層8 aを形成した。一方、C h O D、C h Eおよび、界面活性剤を水に溶解させて混合水溶液を調製した。この混合水溶液2.5  $\mu$  lを、カバーとスペーサを組み合わせたカバー部材のスリット15により形成される凹部に滴下し、-135の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、C h O D、C h Eおよび、界面活性剤を含む層8 bを形成した。

こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図3に示す。

## 【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

《比較例》

実施例 1 と同様にして、絶縁性基板 1 上の電極系上に CMC 層を形成した。次に、フェリシアン化カリウム、界面活性剤、ChOD、および ChE を水に溶解させて混合水溶液を調製した。この混合水溶液 4 . 5  $\mu$  l を CMC 層上に滴下し、50 で 15 分間温風乾燥することにより、フェリシアン化カリウム、界面活性剤、ChOD、および ChE を含む反応層を形成した。

こうして、実施例 1 と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図 3 に示す。

## 【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

【発明の効果】

本発明によれば、基質濃度が高濃度域でも応答特性の優れたバイオセンサを得ることができる。

## 【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた分解斜視図である。

【図 2】

本発明の実施例におけるバイオセンサの要部の縦断面図である。

【図 3】

実施例、参考例、および比較例におけるコレステロールセンサの応答特性を示す図である。

## 【手続補正 20】

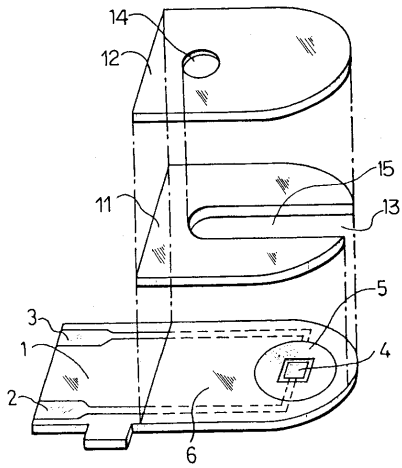
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

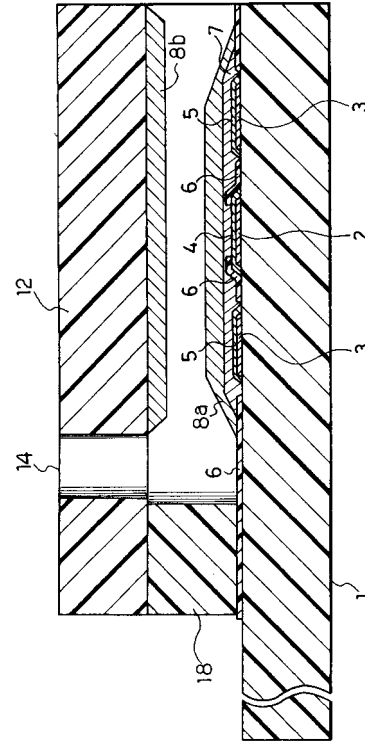
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1】



【図 2】



【図 3】

