

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7671848号
(P7671848)

(45)発行日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(24)登録日 令和7年4月23日(2025.4.23)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 27/327 (2006.01)

G 0 1 N 27/327 3 5 3 B

C 0 8 F 220/34 (2006.01)

G 0 1 N 27/327 3 5 3 R

C 0 8 F 226/02 (2006.01)

G 0 1 N 27/327 3 5 3 J

C 0 8 F 212/14 (2006.01)

C 0 8 F 220/34

C 0 8 F 226/02

請求項の数 10 (全28頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-531831(P2023-531831)
 (86)(22)出願日 令和4年6月21日(2022.6.21)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2022/024652
 (87)国際公開番号 WO2023/276772
 (87)国際公開日 令和5年1月5日(2023.1.5)
 審査請求日 令和5年7月31日(2023.7.31)
 (31)優先権主張番号 特願2021-107307(P2021-107307)
 (32)優先日 令和3年6月29日(2021.6.29)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 314005768
 P H Cホールディングス株式会社
 東京都千代田区有楽町一丁目13番2号
 (74)代理人 100105924
 弁理士 森下 賢樹
 (74)代理人 100109047
 弁理士 村田 雄祐
 (74)代理人 100109081
 弁理士 三木 友由
 (74)代理人 100123102
 弁理士 宗田 悟志
 (72)発明者 羽田 圭吾
 愛媛県東温市南方2131番地1 P H
 C株式会社内
 審査官 三宅 澄也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試薬層およびセンサ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中のアナライトを測定するセンサの試薬層であって、

ポリマーと、

前記ポリマーに結合するとともに前記アナライトに作用するタンパク質と、を備え、

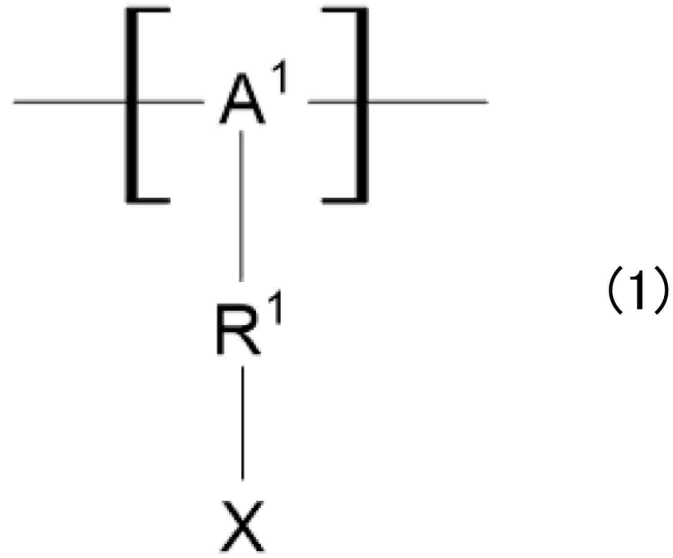
前記ポリマーは、

前記タンパク質と共有結合する第1結合部位と、

前記タンパク質と静電相互作用により結合する第2結合部位と、を備え、

式(1)：

【化 1】



10

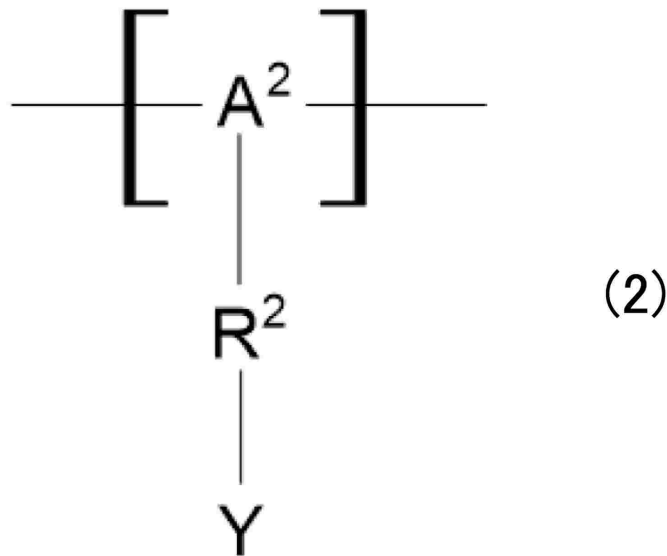
20

〔式(1)中、 A^1 は、スチリル、(メタ)アクリロイルまたはオレフィンに由来する基であり、 R^1 は、アルキレン基であり、 X は、1級アミンおよびその塩から選択される基であり、第1モノマーが複数の場合、各 A^1 、 R^1 および X は同一でも異なってもよい〕で

表される第1モノマー、および

式(2)：

【化 2】



30

40

〔式(2)中、 A^2 は、スチリル、(メタ)アクリロイルまたはオレフィンに由来する基であり、 R^2 は、アルキレン基であり、 Y は、四級アンモニウム基であり、第2モノマーが

50

複数の場合、各 A²、R²および Y は同一でも異なってもよい] で表される第 2 モノマーを構成単位として含み、

前記タンパク質は、酸化還元酵素である、
試薬層。

【請求項 2】

前記酸化還元酵素および前記第 1 結合部位を結合する第 1 架橋剤を備える、
請求項 1 に記載の試薬層。

【請求項 3】

前記ポリマーは、電子伝達能を有するレドックスメディエータと共有結合する第 3 結合部位を備え、

前記試薬層は、前記ポリマーに結合する前記レドックスメディエータを備える、
請求項 1 に記載の試薬層。

【請求項 4】

前記レドックスメディエータおよび前記第 3 結合部位を結合する第 2 架橋剤を備える、
請求項 3 に記載の試薬層。

【請求項 5】

前記酸化還元酵素および前記第 1 結合部位を結合する第 1 架橋剤を備え、
前記第 1 架橋剤および前記第 2 架橋剤は、同じ架橋剤である、
請求項 4 に記載の試薬層。

【請求項 6】

前記試薬層は、複数の前記ポリマーを備え、
各ポリマーは、他の前記ポリマーと共有結合する第 4 結合部位を有し、
前記試薬層は、前記第 4 結合部位どうしを結合する第 3 架橋剤を備える、
請求項 1 に記載の試薬層。

【請求項 7】

前記ポリマーは、電子伝達能を有するレドックスメディエータと共有結合する第 3 結合部位を備え、
前記第 1 結合部位、前記第 3 結合部位および前記第 4 結合部位は、少なくとも 2 つが同じ官能基を有する、
請求項 6 に記載の試薬層。

【請求項 8】

前記ポリマーは、電子伝達能を有するレドックスメディエータと共有結合する第 3 結合部位を備え、
前記試薬層は、前記酸化還元酵素および前記第 1 結合部位を結合する第 1 架橋剤と、前記レドックスメディエータおよび前記第 3 結合部位を結合する第 2 架橋剤と、を備え、
前記第 1 架橋剤、前記第 2 架橋剤および前記第 3 架橋剤は、少なくとも 2 つが同じ架橋剤である、
請求項 6 に記載の試薬層。

【請求項 9】

作用極および対極を含む電極部と、
前記作用極に接するように配置される請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の試薬層と、を備える、
センサ。

【請求項 10】

前記試薬層を被覆する保護膜を備える、
請求項 9 に記載のセンサ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、ポリマー、試薬層およびセンサに関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】**【0002】**

従来、試料中のアナライトにタンパク質を作用させてアナライトを測定するセンサが知られている。このようなセンサとしては、酵素を用いた電気化学センサがある。酵素を用いた電気化学センサの代表例としては、自己血糖測定に用いられる電気化学グルコースバイオセンサが挙げられる。電気化学グルコースバイオセンサには、グルコース酸化還元酵素が用いられている。

【0003】

近年、生体内のアナライトを連続的に測定する、埋め込み型の電気化学センサが開発されている。このような埋め込み型の電気化学センサは、一般的には数日～数週間といった長時間、生体内に埋め込まれる。したがって、酸化還元酵素がセンサ外部に流出することを抑制する必要がある。これに対し、酸化還元酵素を含有する試薬層を保護膜で被覆することで、酸化還元酵素がセンサの外部に流出することを抑制する技術が知られている（例えば、特許文献1参照）。

10

【先行技術文献】**【特許文献】****【0004】**

【文献】 国際公開第2019/146788号

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】**

20

【0005】

保護膜によって酸化還元酵素の流出を抑制することで、電気化学センサの耐久性や測定感度が低下したり、生体等が負の影響を受けたりすることを抑制できる。一方で、電気化学センサの耐久性や測定感度の低下をより抑制したいという要求や、生体等が受ける負の影響をより抑制したいという要求は常にある。また、埋め込み型でないセンサや、酸化還元酵素以外のタンパク質を用いるセンサにおいても、耐久性や測定感度の維持は当然に求められる。したがって、タンパク質のセンサ外部への流出をより抑制することが望まれる。

【0006】

本開示はこうした状況に鑑みてなされたものであり、その目的の1つは、タンパク質のセンサ外部への流出を抑制する技術を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】**【0007】**

上記課題を解決するために、本開示のある態様は、試料中のアナライトを測定するセンサの試薬層に含まれるポリマーである。このポリマーは、アナライトに作用するタンパク質と共有結合する第1結合部位と、タンパク質と静電相互作用により結合する第2結合部位と、を備える。

【0008】

また、本開示の他の態様は、試料中のアナライトを測定するセンサの試薬層である。この試薬層は、上記態様のポリマーと、ポリマーに結合するとともにアナライトに作用するタンパク質と、を備える。

40

【0009】

また、本開示の他の態様は、センサである。このセンサは、作用極および対極を含む電極部と、作用極に接するように配置される上記態様の試薬層と、を備える。

【0010】

以上説明した構成要素の任意の組合せ、本開示の表現を方法、装置、システム等の中で変換したものもまた、本開示の態様として有効である。

【発明の効果】**【0011】**

本開示によれば、タンパク質のセンサ外部への流出を抑制することができる。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 2 】

【図 1】図 1 (A) は、実施の形態に係るセンサの表面側を示す図である。図 1 (B) は、実施の形態に係るセンサの裏面側を示す図である。

【図 2】図 2 (A) ~ 図 2 (D) は、センサの製造工程を示す図である。

【図 3】図 3 (A) ~ 図 3 (D) は、センサの製造工程を示す図である。

【図 4】図 4 (A) ~ 図 4 (C) は、センサの製造工程を示す図である。

【図 5】図 1 (A) に示す A - A 線に沿った断面図である。

【図 6】図 6 (A) は、図 5 に示す B - B 線に沿った断面図である。図 6 (B) は、図 5 に示す C - C 線に沿った断面図である。

【図 7】試薬層内におけるポリマー、タンパク質およびレドックスメディエータの様子を示す模式図である。 10

【図 8】共有結合可能な反応基の組み合わせを示す図である。

【図 9】センサの測定原理を説明するための模式図である。

【図 10】ポリマー A の重合反応を示す図である。

【図 11】ポリマー B の重合反応を示す図である。

【図 12】ポリマー C の重合反応を示す図である。

【図 13】各メディエータ結合ポリマーの吸収スペクトルを示す図である。

【図 14】センサの耐久性評価の結果を示す図である。

【図 15】ポリマー E の重合反応を示す図である。

【図 16】ポリマー F の重合反応を示す図である。 20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

以下、本開示を好適な実施の形態をもとに図面を参照しながら説明する。実施の形態は、本開示を限定するものではなく例示であって、実施の形態に記述されるすべての特徴やその組み合わせは、必ずしも本開示の本質的なものであるとは限らない。各図面に示される同一または同等の構成要素、部材、処理には、同一の符号を付するものとし、適宜重複した説明は省略する。また、各図に示す各部の縮尺や形状は、説明を容易にするために便宜的に設定されており、特に言及がない限り限定的に解釈されるものではない。また、本明細書または請求項中に「第 1」、「第 2」等の用語が用いられる場合には、特に言及がない限りこの用語はいかなる順序や重要度を表すものでもなく、ある構成と他の構成とを 30 区別するためのものである。また、各図面において実施の形態を説明する上で重要ではない部材の一部は省略して表示する。

【 0 0 1 4 】

図 1 (A) は、実施の形態に係るセンサ 1 の表面側を示す図である。図 1 (B) は、実施の形態に係るセンサ 1 の裏面側を示す図である。本実施の形態において、センサ 1 の表面とは、作用極 2 6 および参照極 2 8 が配置される側の面である。センサ 1 の裏面とは、対極 3 0 が配置される側の面である。なお、センサ 1 の表裏は特に限定されない。

【 0 0 1 5 】

本実施の形態に係るセンサ 1 は、試料中のアナライトを測定するためのセンサであり、例えばバイオセンサである。一例としてのセンサ 1 は、電気化学センサであり、センシング部 2 と、端子部 4 とを有する。センシング部 2 は、生体（例えば人体）に挿入される。端子部 4 は、生体の表面に装着される図示しない回路部と、センシング部 2 とを電氣的に接続する。センシング部 2 は、端子部 4 を介して回路部に電気信号を送信する。 40

【 0 0 1 6 】

センシング部 2 が生体に挿入された状態が維持されることで、試料としての血液等におけるアナライトとしてのグルコース等の存在や濃度を連続的に測定することができる。なお、本実施の形態では、埋め込み型の電気化学センサをセンサ 1 の例に挙げて説明するが、センサ 1 は非埋め込み型であってもよいし、電気化学式以外の測定様式であってもよい。また、試料やアナライトの種類は特に限定されない。試料は、例えば培地等であってもよい。また、アナライトとしては、ヘモグロビン；糖化ヘモグロビン；グルタミン、グル 50

タミン酸などのアミノ酸；フルクトシルリジン、フルクトシルバリンなどの糖化アミノ酸；フルクトシルバリンヒスチジンなどの糖化ペプチド；糖化アルブミン；グルコースなどの糖類；ビタミンCなどのビタミン類；アルコール類；コレステロール；乳酸；ピルビン酸；ケトン体（3-ヒドロキシ酪酸）等が例示される。

【0017】

センシング部2は、保護膜6で覆われる。保護膜6は、少なくとも後述する試薬層を被覆する。保護膜6は、試薬層に含まれる物質（例えば酸化還元酵素やレドックスメディエータ）の保護膜6外への漏出を抑制する。また、保護膜6は、保護膜6外に存在するアナライトが保護膜6内に透過可能な孔を有する。埋め込み型のバイオセンサでは、センシング部2が生体内に挿入される。このため、保護膜6は、タンパク質や細胞が吸着し難いことが好ましく、一般的にはそのような性質を有するポリマーで構成される。保護膜6を構成可能なポリマーとしては、例えば、メタクリル酸メチルとヒドロキシエチルメタクリレートとのコポリマー、ブチルメタクリレートとヒドロキシエチルメタクリレートとのコポリマー、ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-*n*-ブチルメタクリレート）等が挙げられる。なお、これらの例示されたポリマーと同様の主鎖を有する（メタ）アクリレート系化合物も使用可能である。

10

【0018】

端子部4の表面には、参照極接続端子8と、作用極接続端子10とが設けられる。端子部4の裏面には、対極接続端子12が設けられる。端子部4における参照極接続端子8、作用極接続端子10および対極接続端子12を除く部分は、絶縁性のレジスト膜14で覆われる。

20

【0019】

図2(A)～図2(D)、図3(A)～図3(D)および図4(A)～図4(C)は、センサ1の製造工程を示す図である。まず、図2(A)および図2(C)に示すように、絶縁基板16が形成される。絶縁基板16は、例えばポリエチレンテレフタレート、ポリエーテルケトン、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリオキシメチレン、モノマーキャストナイロン、ポリブチレンテレフタレート、メタクリル樹脂、ABS樹脂等の樹脂材料、あるいはガラス材料で構成される。好ましくは、絶縁基板16はポリエチレンテレフタレートで構成される。

【0020】

そして、図2(B)に示すように、絶縁基板16の表面に導電性薄膜18が形成される。また、図2(D)に示すように、絶縁基板16の裏面に導電性薄膜18が形成される。導電性薄膜18は、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、スクリーン印刷法等を用いて、金(Au)、白金(Pt)、パラジウム(Pd)、イリジウム(Ir)、カーボン(C)等の導電性材料を絶縁基板16の両面に成膜することで形成できる。

30

【0021】

次いで、図3(A)に示すように、表面側の導電性薄膜18がレーザー描画により分割され、参照極導体20と、作用極導体22とが形成される。そして、図3(B)に示すように、スクリーン印刷法等によって、表側の導電性薄膜18の上にレジスト膜14が形成される。参照極導体20のうちセンシング部2に含まれる一部分と、端子部4に含まれる一部分とは、レジスト膜14が積層されずに露出する。これにより、参照極形成領域24および参照極接続端子8が形成される。また、作用極導体22のうちセンシング部2に含まれる一部分と、端子部4に含まれる一部分とは、レジスト膜14が積層されずに露出する。これにより、作用極26および作用極接続端子10が形成される。続いて、図3(C)に示すように、スクリーン印刷法やインクジェット印刷法等によって、参照極形成領域24に銀/塩化銀(Ag/AgCl)等が成膜されて、参照極28が形成される。

40

【0022】

また、図3(D)に示すように、スクリーン印刷法等によって、裏面側の導電性薄膜18の上にレジスト膜14が形成される。裏側の導電性薄膜18のうちセンシング部2に含まれる一部分と、端子部4に含まれる一部分とは、レジスト膜14が積層されずに露出す

50

る。これにより、対極 30 および対極接続端子 12 が形成される。

【0023】

次いで、図 4 (A) に示すように、作用極 26 の上に試薬液が塗布され、乾燥されて試薬層 32 が形成される。したがって、試薬層 32 は、作用極 26 に接するように配置される。試薬層 32 の組成については、後に詳細に説明する。その後、図 4 (B) および図 4 (C) に示すように、センシング部 2 に当たる部分が保護膜用ポリマー溶液に浸漬され、乾燥されて保護膜 6 が形成される。これにより、試薬層 32 が保護膜 6 で被覆される。本実施の形態の保護膜 6 は、センシング部 2 の全体を被覆している。

【0024】

以上の工程により、保護膜 6 で覆われたセンシング部 2 と、保護膜 6 で覆われずに参照極接続端子 8、作用極接続端子 10 および対極接続端子 12 が露出した端子部 4 とを有するセンサ 1 が得られる。

10

【0025】

図 5 は、図 1 (A) に示す A - A 線に沿った断面図である。なお、図 5 では、センシング部 2 のみを図示している。図 6 (A) は、図 5 に示す B - B 線に沿った断面図である。図 6 (B) は、図 5 に示す C - C 線に沿った断面図である。

【0026】

図 5 および図 6 (A) に示すように、センシング部 2 の先端領域には、中央に絶縁基板 16 が配置される。そして、絶縁基板 16 の表面側には、作用極 26 および試薬層 32 がこの順に積層される。また、絶縁基板 16 の裏面側には、対極 30 が積層される。そして、絶縁基板 16、作用極 26、試薬層 32 および対極 30 は、保護膜 6 で覆われる。

20

【0027】

図 5 および図 6 (B) に示すように、センシング部 2 の先端領域よりも端子部 4 側の領域には、中央に絶縁基板 16 が配置される。そして、絶縁基板 16 の表面側には、参照極導体 20 および作用極導体 22 が積層され、その上にレジスト膜 14 が積層される。また、参照極導体 20 の表面側には、参照極 28 が積層される。また、絶縁基板 16 の裏面側には、導電性薄膜 18 およびレジスト膜 14 がこの順に積層される。そして、絶縁基板 16、参照極導体 20、作用極導体 22、表面側のレジスト膜 14、参照極 28、導電性薄膜 18 および裏面側のレジスト膜 14 は、保護膜 6 で覆われる。

【0028】

作用極 26、参照極 28 および対極 30 は、電極部 34 を構成する。したがって、本実施の形態の電極部 34 は、3 電極式の電極構造を有する。なお、電極部 34 は、作用極 26 および対極 30 を含んでいればよく、作用極 26 および対極 30 のみの 2 電極式であってもよい。

30

【0029】

続いて、試薬層 32 について詳細に説明する。図 7 は、試薬層 32 内におけるポリマー 36、タンパク質 38 およびレドックスメディエータ 40 の様子を示す模式図である。図 7 に示すように、試薬層 32 は、ポリマー 36 と、タンパク質 38 とを備える。タンパク質 38 としては、酸化還元酵素や抗体 (免疫グロブリン) 等が例示される。本実施の形態では、タンパク質 38 は酸化還元酵素である。そして、本実施の形態の試薬層 32 は、電子伝達能を有するレドックスメディエータ 40 を備える。さらに、試薬層 32 は、第 1 架橋剤 42 と、第 2 架橋剤 44 と、第 3 架橋剤 54 とを備える。なお、試薬層 32 は、カーボン粒子等の導電性粒子、緩衝液成分等の他の成分も含んでいてもよい。

40

【0030】

ポリマー 36 は、タンパク質 38 と共有結合する第 1 結合部位 46 と、タンパク質 38 と静電相互作用により結合する第 2 結合部位 48 とを備える。ポリマー 36 とタンパク質 38 とが共有結合および静電相互作用によって互いに結合することで、ポリマー 36 とタンパク質 38 とが強固に結合した高分子量の複合体を形成することができる。これにより、タンパク質 38 が保護膜 6 を透過してセンサ 1 の外部に流出することを抑制できる。なお、図 7 では、第 2 結合部位 48 が正の電荷を有し、タンパク質 38 が負の電荷を有して

50

いるが、逆であってもよい。

【 0 0 3 1 】

また、本実施の形態では、第 1 架橋剤 4 2 がタンパク質 3 8 および第 1 結合部位 4 6 の間に介在し、両者を結合している。これにより、複合体をより高分子量化することができるため、タンパク質 3 8 の流出をより抑制することができる。なお、タンパク質 3 8 および第 1 結合部位 4 6 は、第 1 架橋剤 4 2 を介さずに直に共有結合してもよい。

【 0 0 3 2 】

また、ポリマー 3 6 は、レドックスメディエータ 4 0 と共有結合する第 3 結合部位 5 0 を備える。ポリマー 3 6 とレドックスメディエータ 4 0 とが共有結合によって互いに結合することで、ポリマー 3 6 とレドックスメディエータ 4 0 とが結合した高分子量の複合体を形成することができる。これにより、レドックスメディエータ 4 0 が保護膜 6 を透過してセンサ 1 の外部に流出することを抑制できる。

10

【 0 0 3 3 】

また、本実施の形態では、第 2 架橋剤 4 4 がレドックスメディエータ 4 0 および第 3 結合部位 5 0 の間に介在し、両者を結合している。これにより、複合体をより高分子量化することができるため、レドックスメディエータ 4 0 の流出をより抑制することができる。なお、レドックスメディエータ 4 0 および第 3 結合部位 5 0 は、第 2 架橋剤 4 4 を介さずに直に共有結合してもよい。

【 0 0 3 4 】

また、ポリマー 3 6 にタンパク質 3 8 としての酸化還元酵素と、レドックスメディエータ 4 0 とが結合することで、酸化還元酵素とレドックスメディエータ 4 0 との距離を近づけることができる。これにより、試薬層 3 2 の応答性を高めることができる。また、ポリマー 3 6 がタンパク質 3 8 およびレドックスメディエータ 4 0 の一方のみを結合する場合に比べて、複合体をより高分子量化することができる。これにより、タンパク質 3 8 およびレドックスメディエータ 4 0 の流出をより抑制することができる。

20

【 0 0 3 5 】

また、試薬層 3 2 には、複数のポリマー 3 6 が含まれている。試薬層 3 2 に含まれる複数のポリマー 3 6 は、1 種類のみであってもよいし、複数種類の組み合わせであってもよい。そして、各ポリマー 3 6 は、他のポリマー 3 6 と共有結合する第 4 結合部位 5 2 を有する。各ポリマー 3 6 は、第 4 結合部位 5 2 どうしが共有結合することで、互いに結合することができる。また、本実施の形態では、第 3 架橋剤 5 4 が 2 つの第 4 結合部位 5 2 の間に介在し、両者を結合している。ポリマー 3 6 どうしが互いに結合することで、複合体をさらに高分子量化することができる。また、第 3 架橋剤 5 4 がポリマー 3 6 どうしの間に介在して両者を結合することで、複合体をさらに高分子量化することができる。これにより、タンパク質 3 8 およびレドックスメディエータ 4 0 の流出をより抑制することができる。なお、第 4 結合部位 5 2 どうしは、第 3 架橋剤 5 4 を介さずに直に共有結合してもよい。

30

【 0 0 3 6 】

以下、試薬層 3 2 に含まれる各成分について詳細に説明する。

【 0 0 3 7 】

(ポリマー 3 6)

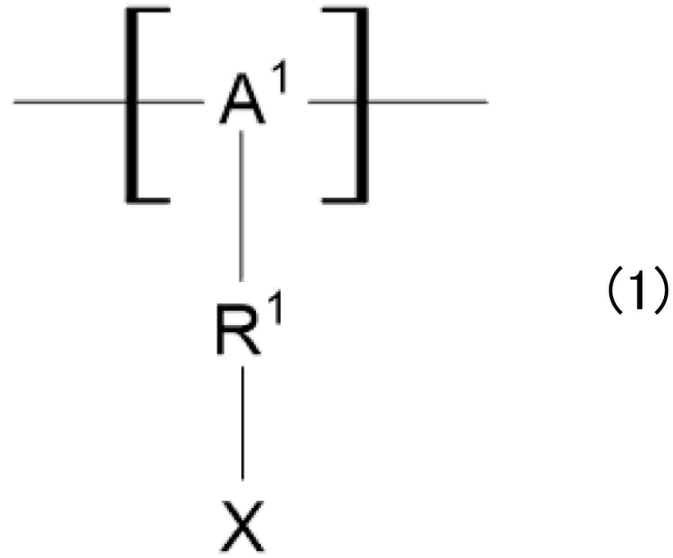
本実施の形態のポリマー 3 6 は、下記式 (1) で表される第 1 モノマー、および下記式 (2) で表される第 2 モノマーを構成単位として含む。

40

【 0 0 3 8 】

50

【化 1】



10

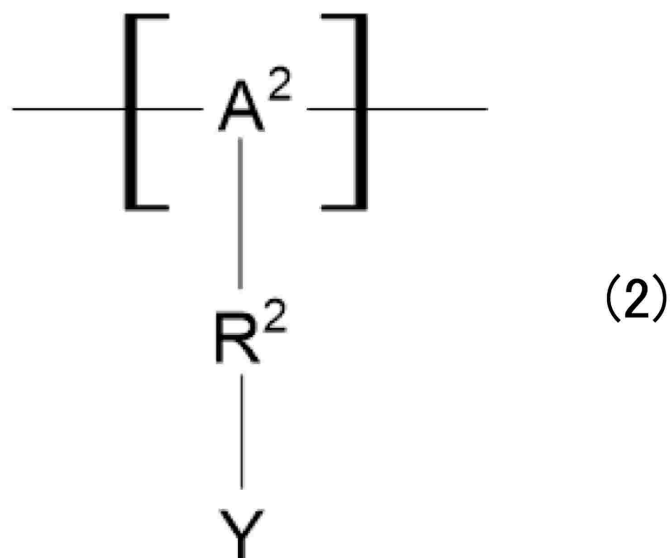
20

[式(1)中、 A^1 は、置換基を有してもよく主鎖にヘテロ原子を含んでもよい炭化水素基であり、 R^1 は、置換基を有してもよい炭化水素基、置換基を有してもよいアシル基、置換基を有してもよいオキシアシル基、または置換基を有してもよいフェニレン基であり、 X は、タンパク質38と共有結合可能な官能基であり、第1モノマーが複数の場合、各 A^1 、 R^1 および X は同一でも異なってもよい]

【0039】

【化 2】

30



40

[式(2)中、 A^2 は、置換基を有してもよく主鎖にヘテロ原子を含んでもよい炭化水素

50

基であり、 R^2 は、置換基を有してもよい炭化水素基、置換基を有してもよいアシル基、置換基を有してもよいオキシアシル基、または置換基を有してもよいフェニレン基であり、 Y は、タンパク質38と静電相互作用により結合可能な官能基であり、第2モノマーが複数の場合、各 A^2 、 R^2 および Y は同一でも異なってもよい]

【0040】

A^1 および A^2 が主鎖に含み得るヘテロ原子は、それぞれ独立に例えば酸素(O)、窒素(N)、ケイ素(Si)である。また A^1 としては、 $-CH_2-CHR^1-$ 、 $-CH_2-C(CH_3)R^1-$ 等が例示される。 A^2 としては、 $-CH_2-CHR^2-$ 、 $-CH_2-C(CH_3)R^2-$ 等が例示される。 R^1 および R^2 としては、それぞれ独立に $-CH_2-$ 、 $-C(=O)O-CH_2-CH_2-$ 、 $-C_6H_5-CH_2-$ 等が例示される。 $-C_6H_5-$ は、ベンゼン環である。

10

【0041】

官能基 X は、アミン、アルコール、フェノール、チオール、カルボン酸、ヒドラジン、アルコキシアミン、ヒドロキシアミン、イミダゾール、ピリジン、アシルアジド、アシルハライド、アルキルハライド、酸無水物、アルデヒド、ケトン、アルキルスルホネート、マレイミド、エポキシド、アジリジン、イソシアネート、イソチオシアネート、イミドエステル、スルホニルハライドおよび活性化エステルからなる群から選択される少なくとも1種から誘導される基であることが好ましい。活性化エステルとしては、スルホ基、ニトロ基もしくはハロ基を含む電子吸引基で置換された、スクシニミジルエステル、ベンゾトリアゾルエステルもしくはアリアルエステル、またはカルボジイミド基を有するカルボン酸エステルが例示される。

20

【0042】

少なくとも一部の官能基 X は、第1結合部位46を構成する。この場合、官能基 X の種類は、結合相手であるタンパク質38の種類に応じて、適宜選択することができる。図8は、共有結合可能な反応基の組み合わせを示す図である。第1結合部位46とタンパク質38とは、いずれか一方が図8に示す第1反応基を有し、他方が図8に示す第2反応基を有すれば、互いに共有結合することができる。また、第1架橋剤42が第1結合部位46およびタンパク質38の間に介在する場合は、第1架橋剤42および第1結合部位46の一方が第1反応基を有し、他方が第2反応基を有するとともに、第1架橋剤42およびタンパク質38の一方が第1反応基を有し、他方が第2反応基を有すればよい。

30

【0043】

好ましくは、官能基 X は、アミン、チオール、カルボン酸、イミダゾールおよびピリジンからなる群から選択される少なくとも1種から誘導される基である。これにより、より入手しやすい架橋剤を第1架橋剤42として選択可能になるため、第1架橋剤42を介したポリマー36とタンパク質38との共有結合をより簡便に実現することができる。また、第1架橋剤42を介した、あるいは介しないポリマー36とタンパク質38との架橋反応において、温度やpH等の反応条件を比較的温和な条件にすることができる。これにより、タンパク質38の失活を抑制することができる。

【0044】

また、少なくとも一部の官能基 X は、第3結合部位50を構成する。この場合、官能基 X の種類は、結合相手であるレドックスメディエータ40の種類に応じて、適宜選択することができる。つまり、第3結合部位50とレドックスメディエータ40とは、いずれか一方が第1反応基を有し、他方が第2反応基を有すれば、互いに共有結合することができる。また、第2架橋剤44が第3結合部位50およびレドックスメディエータ40の間に介在する場合は、第2架橋剤44および第3結合部位50の一方が第1反応基を有し、他方が第2反応基を有するとともに、第2架橋剤44およびレドックスメディエータ40の一方が第1反応基を有し、他方が第2反応基を有すればよい。

40

【0045】

第1結合部位46および第3結合部位50は、同じ官能基を有することが好ましい。つまり、同じ種類の官能基 X が第1結合部位46および第3結合部位50の両方を構成する

50

ことが好ましい。これにより、1種類の第1モノマーでタンパク質38との共有結合とレドックスメディエータ40との共有結合とを実現できる。よって、ポリマー36を構成するモノマーの種類を削減でき、ポリマー36の合成方法の簡略化を図ることができる。

【0046】

また、少なくとも一部の官能基Xは、第4結合部位52を構成する。この場合、官能基Xの種類は、結合相手である他のポリマー36の第4結合部位52の種類に応じて、適宜選択することができる。つまり、2つのポリマー36の第4結合部位52において、いずれか一方が第1反応基を有し、他方が第2反応基を有すれば、互いに共有結合することができる。また、第3架橋剤54が2つの第4結合部位52の間に介在する場合は、第3架橋剤54と各第4結合部位52との間で、第1反応基と第2反応基の組み合わせ条件を満たせばよい。

10

【0047】

第1結合部位46、第3結合部位50および第4結合部位52は、少なくとも2つが同じ官能基を有することが好ましく、3つが同じ官能基を有することがより好ましい。つまり、同じ種類の官能基Xが第1結合部位46、第3結合部位50および第4結合部位52のうち少なくとも2つを構成することが好ましい。これにより、より少ない種類の第1モノマーでタンパク質38との共有結合、レドックスメディエータ40との共有結合、および他のポリマー36との共有結合を実現できる。よって、ポリマー36を構成するモノマーの種類を削減でき、ポリマー36の合成方法の簡略化を図ることができる。

【0048】

官能基Yは、四級アンモニウム、四級ホスホニウム、三級スルホニウムおよび芳香族カチオンからなる群から選択される少なくとも1種から誘導されるカチオン基、またはカルボン酸、ホスホン酸およびスルホン酸からなる群から選択される少なくとも1種から誘導されるアニオン基であることが好ましい。

20

【0049】

四級アンモニウムは、窒素原子に4つの有機置換基 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 が結合した構造を有する。四級ホスホニウムは、リン原子に4つの有機置換基 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 が結合した構造を有する。三級スルホニウムは、硫黄原子に3つの有機置換基 R^2 、 R^3 、 R^4 が結合した構造を有する。 R^2 は上述のとおりである。 $R^3 \sim R^5$ は、例えば、置換基を有してもよい C_{1-6} の直鎖もしくは分岐鎖の飽和もしくは不飽和の炭化水素基、置換基を有してもよいアシル基、置換基を有してもよいアルコキシ基、置換基を有してもよいフェニル基であり、 $R^3 \sim R^5$ は同一でも異なってもよい。

30

【0050】

芳香族カチオンとしては、イミダゾリウム、オキサゾリウム、ピラジニウム、ピラゾリウム、ピリダジニウム、ピロリジニウム、ピリジニウム、ピペリジニウム、チアゾリウムおよびトリアゾリウムが例示される。

【0051】

官能基Yは、第2結合部位48を構成する。官能基Yの種類は、結合相手であるタンパク質38の種類に応じて、適宜選択することができる。第2結合部位48とタンパク質38とは、互いに逆の電荷を有すれば、互いに静電相互作用により結合することができる。一例としての官能基Yは、官能基Xと異なる基である。また好ましくは、官能基Yはカチオン基である。タンパク質38が酸化還元酵素である場合、センサ1が主に用いられる中性付近の条件下では、一般的な酸化還元酵素は負の電荷を有するものが多い。このため、官能基Yをカチオン基とすることで、ポリマー36とタンパク質38との静電相互作用による結合をより簡便に実現することができる。

40

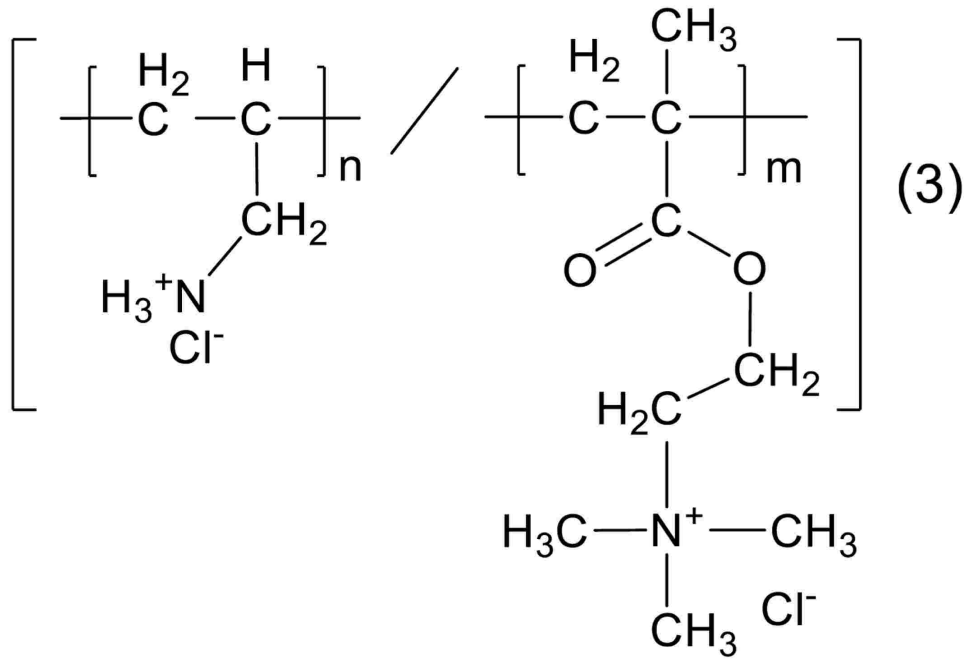
【0052】

ポリマー36の具体例としては、下記式(3)~式(7)に示すものが例示される。式(3)~式(6)におけるmおよびnと、式(7)におけるl、mおよびnとは、各モノマーのモル比を示す。各モノマーのモル比は、適宜設定することができる。また、式(3)~式(7)では、カウンターイオンの一例として Cl^- を示している。

50

【 0 0 5 3 】

【 化 3 】

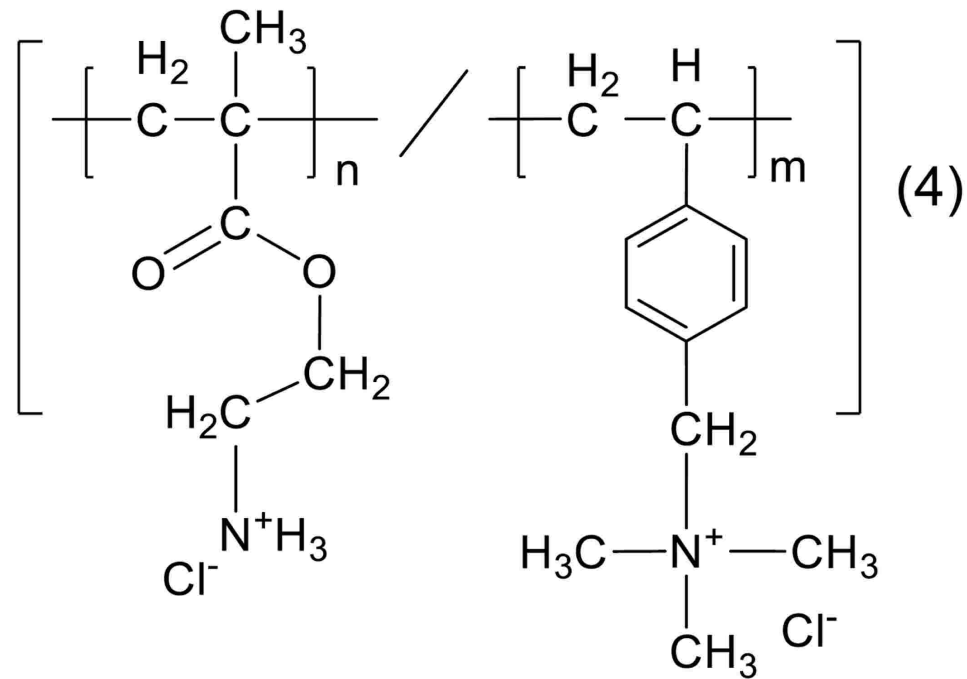


10

20

【 0 0 5 4 】

【 化 4 】



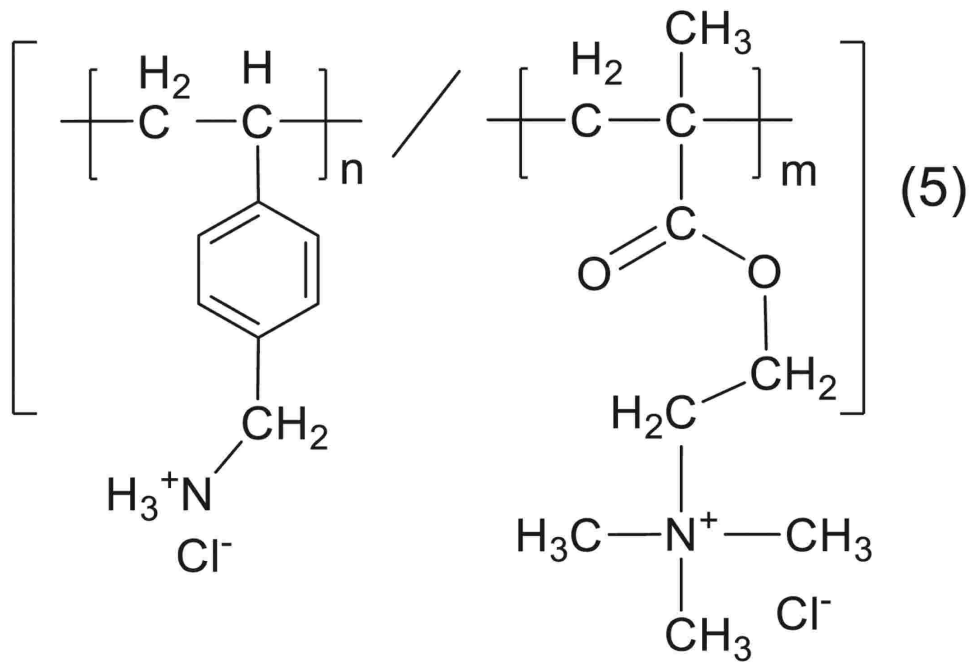
30

40

【 0 0 5 5 】

50

【化5】

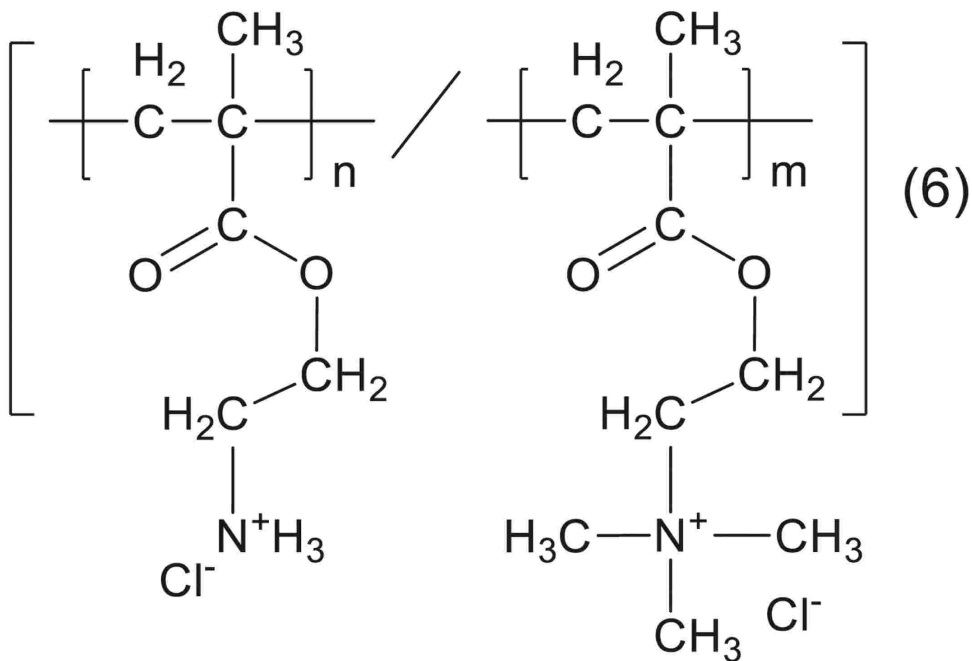


10

20

【0056】

【化6】



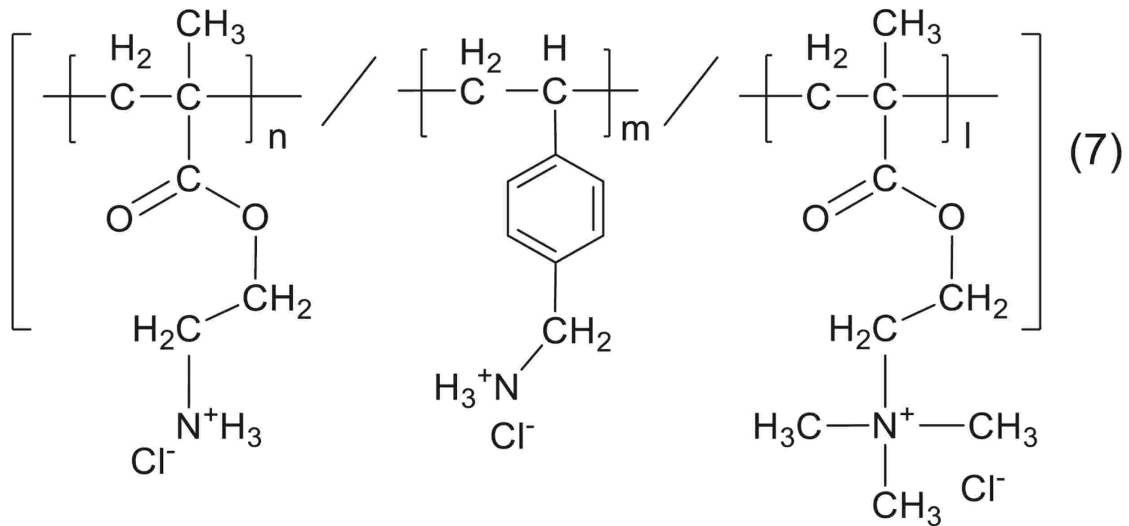
30

40

【0057】

50

【化 7】



10

【0058】

(タンパク質38)

タンパク質38は、ポリマー36の第1結合部位46および第2結合部位48に結合するとともにアナライトに作用する。上述のとおり、タンパク質38としては酸化還元酵素や抗体(免疫グロブリン)等が例示される。本実施の形態における酸化還元酵素とは、アナライトを酸化または脱水素化することができる酵素を指す。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、ピルビン酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、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、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等が例示される。酸化還元酵素は、必要に応じて複数種を組み合わせてもよい。

20

30

【0059】

タンパク質38が酸化還元酵素である場合、典型的には、酸化還元酵素が有するアミノ基が第1結合部位46または第1架橋剤42と共有結合する。また、酸化還元酵素が有するチオール基やカルボキシル基等が第1結合部位46または第1架橋剤42と共有結合することもあり得る。酸化還元酵素の配合量は、例えばセンサ1個当たり、または1回の測定当たり、好ましくは0.01~100U(ユニット)であり、より好ましくは0.05~50Uであり、さらに好ましくは0.1~10Uである。

【0060】

また、タンパク質38は、第2結合部位48との結合部位が正の電荷を有する場合、等電点が使用環境のpH以下であることが好ましい。また、タンパク質38は、第2結合部位48との結合部位が負の電荷を有する場合、等電点が使用環境のpH以上であることが好ましい。タンパク質38の使用環境とは、少なくとも試薬液中を指す。好ましくは、タンパク質38の使用環境とは、試薬液中と、測定対象試料中との両方を指す。一例として、第2結合部位48との結合部位が正の電荷を有する場合、タンパク質38の等電点は好ましくはpH9以下であり、より好ましくはpH7.4以下であり、さらに好ましくはpH5.5以下である。また、第2結合部位48との結合部位が負の電荷を有する場合、タンパク質38の等電点は好ましくはpH5.5以上であり、より好ましくはpH7.4以上であり、さらに好ましくはpH9以上である。

40

【0061】

50

タンパク質 38 としての酸化還元酵素は、好ましくは補酵素結合型酵素である。補酵素としては、ピロロキノリンキノン (PQQ)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸 (NADP)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、チアミンピロリン酸 (TPP)、コエンザイム A (CoA) 等が例示される。

【0062】

例えば、アナライトがグルコースである場合、酸化還元酵素は、グルコースオキシダーゼまたはグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) となる。補酵素結合型のグルコースデヒドロゲナーゼとしては、ピロロキノリンキノン (PQQ) 結合型 GDH やフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 結合型 GDH が例示される。また、生体内のマルトースの影響を考慮すると、GDH は、グルコースに対する酵素活性を 100% とした場合のマルトースに対する酵素活性が 5% 以下であることが好ましく、3% 以下であることがより好ましい。このような酵素活性を有する酵素としては、FAD 結合型 GDH が例示される。また、このような FAD 結合型 GDH としては、アスペルギルス属 (オリゼやテレウス) 由来、ムコール属由来のものが例示される。

10

【0063】

(レドックスメディエータ 40)

レドックスメディエータ 40 は、ポリマー 36 の第 3 結合部位 50 に結合するとともに、可逆的に酸化体および還元体となることができ、物質間における電子の移動を媒介する。レドックスメディエータ 40 としては、オスmium錯体、ルテニウム錯体、鉄錯体等の金属錯体類；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、およびこれらの誘導体等のキノン化合物；フェナジン化合物；ピオロゲン化合物；フェノチアジン化合物；フェノール化合物等が例示される。レドックスメディエータ 40 は、必要に応じて複数種を組み合わせてもよい。

20

【0064】

レドックスメディエータ 40 の具体例としては、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；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；メチルピオロゲン；ベンジルピオロゲン；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；および 2,4-ジアミノフェノールからなる群から選ばれる 1 種以上の化合物の誘導体であって、ポリマー 36 に結合可能な官能基 (図 8 に示す第 1 反応基または第 2 反応基) を有する誘導体が挙げられる。上記の塩 (スルホン酸塩、ジスルホン酸塩) としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リチウム塩等が例示される。

30

【0065】

レドックスメディエータ 40 の配合量は、例えばセンサ 1 個当たり、または 1 回の測定当たり、好ましくは 0.1 pmol ~ 1000 μmol であり、より好ましくは 5 pmol ~ 250 μmol であり、さらに好ましくは 100 pmol ~ 50 μmol である。

40

【0066】

レドックスメディエータ 40 は、第 3 結合部位 50 または第 2 架橋剤 44 との結合部位を有する。上述のとおり、レドックスメディエータ 40 の結合部位は、第 1 反応基および第 2 反応基のうち、第 3 結合部位 50 または第 2 架橋剤 44 が有する反応基の結合対象となる反応基を有する。

【0067】

(第 1 架橋剤 42、第 2 架橋剤 44 および第 3 架橋剤 54)

第 1 架橋剤 42、第 2 架橋剤 44 および第 3 架橋剤 54 としては、グルタルアルデヒド；こはく酸ジスクシンイミジル (Disuccinimidyl Succinate)、スベリン酸ビス (3-

50

スルホ - N - スクシンイミジル) ニナトリウム (Bis(3-sulfo-N-succinimidyl) Suberate Disodium Salt)、4, 7, 10, 13, 16 - ペンタオキサノナデカン二酸ジ (N - スクシンイミジル) (Bis(NHS)PEG5) 等の、両末端に N H S エステルを有する化合物 ; ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル (Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル (Poly(propylene glycol) diglycidyl ether)、1 - 4 - ブタンジオールジグリシジルエーテル (1,4-Butanediol diglycidyl ether) 等の、両末端にエポキシ基を有する化合物 ; 1, 2 - ビス (マレイミド) エタン (1,2-Bis(maleimido)ethane)、1, 11 - ビスマレイミドトリエチレングリコール (1,11-bismaleimido-triethyleneglycol) 等の、両末端にマレイミド基を有する化合物 ; 1, 2 - ビス (2 - アミノエトキシ) エタン (1,2-Bis(2-aminoethoxy)ethane) 等の、両末端にアミノ基を有する化合物 ; マレイミド - P E G 2 - スクシンイミジル (Maleimide-PEG2-NHS Ester)、アミノ - P E G 6 - カルボン酸 (Amino-PEG6-carboxylic Acid) の、両末端が異なる官能基の化合物 ; 4 アーム - P E G 10 K - スクシンイミジル グルタレート (4arm-PEG10K-Succinimidyl Glutarate)、4 アーム - P E G 10 K - マレイミド (4arm-PEG10K-Maleimide)、8 アーム - P E G 10 K - スクシンイミジル スクシネート (8arm-PEG10K-Succinimidyl Succinate) 等の、分岐鎖を有する化合物からなる群から選択される 1 種以上が例示される。

10

【 0 0 6 8 】

試薬層 3 2 に第 1 架橋剤 4 2 および第 2 架橋剤 4 4 の 2 つが含有される場合、第 1 架橋剤 4 2 および第 2 架橋剤 4 4 は、同じ種類の架橋剤であることが好ましい。また、試薬層 3 2 に第 1 架橋剤 4 2 および第 3 架橋剤 5 4 の 2 つが含有される場合、第 1 架橋剤 4 2 および第 3 架橋剤 5 4 は、同じ種類の架橋剤であることが好ましい。また、試薬層 3 2 に第 2 架橋剤 4 4 および第 3 架橋剤 5 4 の 2 つが含有される場合、第 2 架橋剤 4 4 および第 3 架橋剤 5 4 は、同じ種類の架橋剤であることが好ましい。また、試薬層 3 2 に第 1 架橋剤 4 2、第 2 架橋剤 4 4 および第 3 架橋剤 5 4 の 3 つが含有される場合、第 1 架橋剤 4 2、第 2 架橋剤 4 4 および第 3 架橋剤 5 4 は、少なくとも 2 つが同じ架橋剤であることが好ましく、3 つが同じ架橋剤であることがより好ましい。これらにより、架橋剤の種類を削減できるため、試薬層 3 2 の調製方法の簡略化を図ることができる。

20

【 0 0 6 9 】

一例としての試薬層 3 2 は、第 1 結合部位 4 6、第 2 結合部位 4 8、第 3 結合部位 5 0 および第 4 結合部位 5 2 を有するポリマー 3 6 と、タンパク質 3 8 と、レドックスメディエータ 4 0 と、第 1 架橋剤 4 2 と、第 3 架橋剤 5 4 とを備える。第 1 結合部位 4 6、第 3 結合部位 5 0 および第 4 結合部位 5 2 は、少なくとも 2 つが同じ官能基を有する。タンパク質 3 8 は、第 1 架橋剤 4 2 を介して第 1 結合部位 4 6 に結合する。また、タンパク質 3 8 は第 2 結合部位 4 8 に結合する。レドックスメディエータ 4 0 は、第 2 架橋剤 4 4 を介さずに直に第 3 結合部位 5 0 に結合する。2 つのポリマー 3 6 の第 4 結合部位 5 2 どちらも、第 3 架橋剤 5 4 を介して結合する。そして、第 1 架橋剤 4 2 と第 3 架橋剤 5 4 とは、同じ架橋剤である。

30

【 0 0 7 0 】

続いて、センサ 1 によるアナライトの測定原理について説明する。図 9 は、センサ 1 の測定原理を説明するための模式図である。ここでは一例として、センサ 1 が電気化学センサであり、アナライトがグルコースであり、タンパク質 3 8 がグルコースデヒドロゲナーゼ (G D H) である場合を説明する。

40

【 0 0 7 1 】

まず、血液中や皮下間質液中のグルコースが、保護膜 6 を透過して試薬層 3 2 に到達する。次に、グルコースがグルコースデヒドロゲナーゼにより酸化され、グルコノラクトンが生成される。また、これと同時にレドックスメディエータ 4 0 が還元されて、酸化体 (M (O x)) が還元体 (M (R e d)) となる。そして、レドックスメディエータ 4 0 の還元体が作用極 2 6 の表面で酸化されて、還元体 (M (R e d)) が酸化体 (M (O x)) となり、同時に電子が発生する。この電子が作用極 2 6 に受け渡され、電流値として測

50

定される。

【0072】

以上説明したように、本実施の形態に係るポリマー36は、第1結合部位46による共有結合と、第2結合部位48による静電的相互作用とによって、タンパク質38を結合している。これにより、タンパク質38のセンサ外部への流出を抑制することができる。よって、センサ1の耐久性や測定感度の低下をより抑制することができる。また、生体等が受ける負の影響をより抑制することができる。また、ポリマー36は、第3結合部位50による共有結合によってレドックスメディエータ40を結合する。これにより、レドックスメディエータ40のセンサ外部への流出を抑制することができる。よって、センサ1の耐久性や測定感度の低下をより抑制でき、また生体等が受ける負の影響をより抑制することができる。また、ポリマー36は、第4結合部位52による共有結合によって他のポリマー36と結合する。これにより、センサ1の耐久性や測定感度の低下をさらに抑制でき、また生体等が受ける負の影響をさらに抑制することができる。

10

【0073】

さらに、タンパク質38と第1結合部位46との間に第1架橋剤42が介在している。また、レドックスメディエータ40と第3結合部位50との間に第2架橋剤44が介在している。また、2つの第4結合部位52の間に第3架橋剤54が介在している。これらにより、ポリマー36、タンパク質38およびレドックスメディエータ40の複合体をより高分子量化することができる。よって、タンパク質38およびレドックスメディエータ40のセンサ外部への流出をより抑制することができる。

20

【0074】

以上、本開示の実施の形態について詳細に説明した。前述した実施の形態は、本開示を実施するにあたっての具体例を示したものにすぎない。実施の形態の内容は、本開示の技術的範囲を限定するものではなく、請求の範囲に規定された発明の思想を逸脱しない範囲において、構成要素の変更、追加、削除等の多くの設計変更が可能である。設計変更が加えられた新たな実施の形態は、組み合わせられる実施の形態および変形それぞれの効果をあわせもつ。前述の実施の形態では、このような設計変更が可能なる内容に関して、「本実施の形態の」、「本実施の形態では」等の表記を付して強調しているが、そのような表記のない内容でも設計変更が許容される。以上の構成要素の任意の組み合わせも、本開示の態様として有効である。図面の断面に付したハッチングは、ハッチングを付した対象の材質を限定するものではない。

30

【0075】

なお、実施の形態は、以下に記載する項目によって特定されてもよい。

(項目1)

試料中のアナライトを測定するセンサ(1)の試薬層(32)に含まれるポリマー(36)であって、

アナライトに作用するタンパク質(38)と共有結合する第1結合部位(46)と、

タンパク質(38)と静電相互作用により結合する第2結合部位(48)と、を備える、ポリマー(36)。

(項目2)

上記式(1)で表される第1モノマー、および

上記式(2)で表される第2モノマーを構成単位として含む、

項目1に記載のポリマー(36)。

(項目3)

官能基Xは、アミン、アルコール、フェノール、チオール、カルボン酸、ヒドラジン、アルコキシアミン、ヒドロキシアミン、イミダゾール、ピリジン、アシルアジド、アシルハライド、アルキルハライド、酸無水物、アルデヒド、ケトン、アルキルスルホネート、マレイミド、エポキシド、アジリジン、イソシアネート、イソチオシアネート、イミドエステル、スルホニルハライドおよび活性化エステルからなる群から選択される少なくとも1種から誘導される基であり、

40

50

官能基 Y は、四級アンモニウム、四級ホスホニウム、三級スルホニウムおよび芳香族カチオンからなる群から選択される少なくとも 1 種から誘導されるカチオン基、またはカルボン酸、ホスホン酸およびスルホン酸からなる群から選択される少なくとも 1 種から誘導されるアニオン基である、

項目 2 に記載のポリマー (3 6) 。

(項目 4)

タンパク質 (3 8) は、酸化還元酵素である、

項目 1 ないし 3 のいずれかに記載のポリマー (3 6) 。

(項目 5)

ポリマー (3 6) は、電子伝達能を有するレドックスメディエータ (4 0) と共有結合する第 3 結合部位 (5 0) を備える、

10

項目 4 に記載のポリマー (3 6) 。

(項目 6)

第 1 結合部位 (4 6) および第 3 結合部位 (5 0) は、同じ官能基を有する、

項目 5 に記載のポリマー (3 6) 。

(項目 7)

試料中のアナライトを測定するセンサ (1) の試薬層 (3 2) であって、

項目 1 乃至 6 のいずれかに記載のポリマー (3 6) と、

ポリマー (3 6) に結合するとともにアナライトに作用するタンパク質 (3 8) と、を備える、

20

試薬層 (3 2) 。

(項目 8)

タンパク質 (3 8) および第 1 結合部位 (4 6) を結合する第 1 架橋剤 (4 2) を備える、

項目 7 に記載の試薬層 (3 2) 。

(項目 9)

タンパク質 (3 8) は、酸化還元酵素であり、

ポリマー (3 6) は、電子伝達能を有するレドックスメディエータ (4 0) と共有結合する第 3 結合部位 (5 0) を備え、

試薬層 (3 2) は、ポリマー (3 6) に結合するレドックスメディエータ (4 0) を備える、

30

項目 7 または 8 に記載の試薬層 (3 2) 。

(項目 1 0)

レドックスメディエータ (4 0) および第 3 結合部位 (5 0) を結合する第 2 架橋剤 (4 4) を備える、

項目 9 に記載の試薬層 (3 2) 。

(項目 1 1)

酸化還元酵素 (3 8) および第 1 結合部位 (4 6) を結合する第 1 架橋剤 (4 2) を備える、

第 1 架橋剤 (4 2) および第 2 架橋剤 (4 4) は、同じ架橋剤である、

40

項目 1 0 に記載の試薬層 (3 2) 。

(項目 1 2)

試薬層 (3 2) は、複数のポリマー (3 6) を備え、

各ポリマー (3 6) は、他のポリマー (3 6) と共有結合する第 4 結合部位 (5 2) を有し、

試薬層 (3 2) は、第 4 結合部位 (5 2) どうしを結合する第 3 架橋剤 (5 4) を備える、

項目 7 乃至 1 1 のいずれかに記載の試薬層 (3 2) 。

(項目 1 3)

タンパク質 (3 8) は、酸化還元酵素であり、

50

ポリマー(36)は、電子伝達能を有するレドックスメディエータ(40)と共有結合する第3結合部位(50)を備え、

第1結合部位(46)、第3結合部位(50)および第4結合部位(52)は、少なくとも2つが同じ官能基を有する、
項目12に記載の試薬層(32)。

(項目14)

タンパク質(38)は、酸化還元酵素であり、

ポリマー(36)は、電子伝達能を有するレドックスメディエータ(40)と共有結合する第3結合部位(50)を備え、

試薬層(32)は、酸化還元酵素(38)および第1結合部位(46)を結合する第1架橋剤(42)と、レドックスメディエータ(40)および第3結合部位(50)を結合する第2架橋剤(44)と、を備え、

第1架橋剤(42)、第2架橋剤(44)および第3架橋剤(54)は、少なくとも2つが同じ架橋剤である、

項目12または13に記載の試薬層(32)。

(項目15)

作用極(26)および対極(30)を含む電極部(34)と、

作用極(26)に接するように配置される項目7乃至14のいずれかに記載の試薬層(32)と、を備える、

センサ(1)。

(項目16)

試薬層(32)を被覆する保護膜(6)を備える、

項目15に記載のセンサ(1)。

【実施例】

【0076】

以下、本発明の実施例を説明するが、これら実施例は、本発明を好適に説明するための例示に過ぎず、なんら本発明を限定するものではない。

【0077】

(ポリマーAの合成)

図10は、ポリマーAの重合反応を示す図である。まず、2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩(モノマーa)と、(4-ビニルフェニル)メタンアミン(モノマーb)と、メタクロイルコリンクロリド(モノマーc)とを用意した。そして、4つ口フラスコにモノマーaを0.97mmol、モノマーbを0.97mmol、モノマーcを11.97mmol、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(以下V-50と称する)を0.08mmol、エタノールを227mmol投入した。

【0078】

続いて、スターラーチップ、温度計、減圧/Arガスラインを4つ口フラスコにセットした。室温で攪拌しながら、減圧/Arガスラインを用いて4つ口フラスコ内の減圧とArガスの供給とを10回繰り返してフラスコ内の試料を脱気した。脱気処理の後に4つ口フラスコを密閉し、反応温度60で24時間、図10に示す重合反応を行った。重合の進行および終了は、¹H-NMRでモノマーの消失を計測することで確認した。反応終了後、反応液を透析膜(MWCO:3500)に入れ、3日間透析した。その際、1日に2回液を交換した。透析終了後、得られた反応物を凍結乾燥してポリマーAを得た。ポリマーAは、上記式(7)において、n:m:l=21.2:8.1:70.7であるポリマーに相当する。なお、各モノマーのモル比は、NMRスペクトルのシグナルの積分比から算出した。以下のポリマーB, C, E, Fについても同様である。また、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で測定した結果、ポリマーAは、数平均分子量Mnが89642であり、重量平均分子量Mwが502171であった。

【0079】

(ポリマーBの合成)

10

20

30

40

50

図 1 1 は、ポリマー B の重合反応を示す図である。まず、モノマー a と、(ビニルベンジル)トリメチルアンモニウムクロリド(モノマー d)とを用意した。そして、4 つ口フラスコにモノマー a を 7.36 mmol、モノマー d を 7.36 mmol、V-50 を 0.07 mmol、イオン交換水を 616 mmol 投入した。以降はポリマー A の場合と同様の処理を施し、図 1 1 に示す重合反応を行ってポリマー B を得た。ポリマー B は、上記式(4)において、 $n : m = 48.5 : 51.5$ であるポリマーに相当する。

【0080】

(ポリマー C の合成)

図 1 2 は、ポリマー C の重合反応を示す図である。まず、モノマー a と、モノマー c とを用意した。そして、4 つ口フラスコにモノマー a を 1.14 mmol、モノマー c を 10.22 mmol、V-50 を 0.06 mmol、イオン交換水を投入した。以降はポリマー A の場合と同様の処理を施し、図 1 2 に示す重合反応を行ってポリマー C を得た(必要に応じて反応時間は適宜調整した)。ポリマー C は、上記式(6)において、 $n : m = 13.3 : 86.7$ であるポリマーに相当する。

10

【0081】

(比較例としてのメディエータ結合ポリマー D の作製)

メディエータとしてフェナジン、具体的には 5 - { [(2, 5 - ジオキソピリジン - 1 - イル) オキシ] - 5 - オキソペンチル} - 1 - メトキシフェナジニウム硝酸塩(東京化成工業株式会社製)を用意した。このメディエータを 0.47 mg 計り取り、47 μ L の Milli Q 水に溶解させた。また、比較例のポリマー D としてポリ(L-リジン)塩酸塩(PLKC800:アラマンガポリマーズ社製)を用意した。このポリマー D は、後述の試薬調製で用いたグルコースデヒドロゲナーゼに対する第 2 結合部位 48 を有しないポリマーに相当する。ポリマー D を 0.513 mg 計り取り、51.3 μ L の Milli Q 水に溶解させた。また、縮合剤(WSC W001:同仁化学社製)を 9.59 mg 計り取り、479.3 μ L の Milli Q に溶解させた。

20

【0082】

これら 3 つの溶液と、250 mM 2 - モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH 6.0) 96 μ L とを混合するとともに、Milli Q 水で合計体積が 1200 μ L になるように調整した。その後、約 20 時間、室温にて混合液を攪拌しながら反応を進行させた。反応終了後、遠心式限外ろ過フィルター(アミコンウルトラ-4 50k:メルクミリポア社製)を用いて、反応液の限外ろ過を数回行い、低分子を除いた液をメディエータ結合ポリマー D (ポリ(L-リジン)結合フェナジン)の溶液として回収した。

30

【0083】

(メディエータ結合ポリマー A の作製)

ポリマー D に代えてポリマー A を 2.63 mg 計り取り、175.4 μ L の Milli Q 水に溶解させた点を除いて、メディエータ結合ポリマー D の作製と同様の方法でメディエータ結合ポリマー A の溶液を作製した。

【0084】

(メディエータ結合ポリマー B の作製)

ポリマー D に代えてポリマー B を 1.56 mg 計り取り、104.1 μ L の Milli Q 水に溶解させた点を除いて、メディエータ結合ポリマー D の作製と同様の方法でメディエータ結合ポリマー B の溶液を作製した。

40

【0085】

(メディエータ結合ポリマー C の作製)

ポリマー D に代えてポリマー C を 6.08 mg 計り取り、405.2 μ L の Milli Q 水に溶解させた点を除いて、メディエータ結合ポリマー D の作製と同様の方法でメディエータ結合ポリマー C の溶液を作製した。

【0086】

各メディエータ結合ポリマーの溶液を 25 倍希釈し、それぞれをマイクロプレートに 100 μ L 投入した。そして、プレートリーダーを用いて各溶液の吸収スペクトルを測定し

50

た。結果を図13に示す。なお、マイクロプレートには、UV-Star（登録商標）96 Well F-Boden（グライナー・バイオ・ワン社製）を用いた。また、プレートリーダーには、infinite（登録商標）M200 Pro（テカン社製）を用いた。

【0087】

図13は、各メディエータ結合ポリマーの吸収スペクトルを示す図である。図13に示すように、いずれのメディエータ結合ポリマーにおいても、波長230nm～330nmの間と330nm～430nmの間とのそれぞれにピークが見られた。この2つのピークは、フェナジン由来のピークである。このことから、各ポリマーにフェナジンが結合していることが確認された。

10

【0088】

（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。なお、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。

- ・リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）終濃度8mM
- ・FAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH GLD1：BBIインターナショナル社製）終濃度2000U/mL
- ・グルタルアルデヒド25%溶液（和光純薬工業社製）終濃度0.005%（wt/v）
- ・各メディエータ結合ポリマー 終濃度1（386nmの吸光度が1相当）
- ・カーボン分散液 終濃度4mg/mL

20

【0089】

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（和光純薬工業社製）と、リン酸二水素ナトリウム（和光純薬工業社製）とで調製した。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 HPCCL 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。各メディエータ結合ポリマーの濃度は、各ポリマーの溶液を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各ポリマーの濃度を確認し、その値を基に調整した。

【0090】

（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%
- ・ポリプロピレングリコールメチルエーテル-スチレン-4-ビニルピリジンのランダムコポリマー（ポリマーソース社製、以下PGMAS4VPと称する）終濃度0.89%
- ・ポリ（エチレングリコール）ジメチルエーテル（シグマアルドリッチ社製、以下PEGDGEと称する）終濃度0.98%
- ・HEPES緩衝液（pH8.0）終濃度5mM

40

【0091】

なお、tBuMA4VP、PGMAS4VPおよびPEGDGEは、エタノールに溶解して用いた。tBuMA4VPの数平均分子量Mnは、ポリ（ter-ブチルメタクリレート）が80,000、ポリ（4-ビニルピリジン）が77,000である。tBuMA4VPのMw/Mnは1.15である。PGMAS4VPは、ポリプロピレングリコールメチルエーテル：スチレン：4-ビニルピリジン=24：16：60であり、数平均分子量Mnが52,000であり、重量平均分子量Mwが94,000であり、Mw/Mnが1.8である。PEGDGEの数平均分子量Mnは～1,000である。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）を用いて調製した。

50

【 0 0 9 2 】

(センサ用電極の作製)

スパッタリングにより絶縁基板上に金電極を形成した。各メディエータ結合ポリマーを含有する試薬液を別々の金電極に $0.4 \mu\text{L}$ 塗布し、約 15 分乾燥させた。各金電極に再び試薬液を $0.4 \mu\text{L}$ 塗布した後、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、各金電極上に試薬層を形成した。試薬層を形成した各金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た。この作業の完了後に 1 日乾燥させて、各金電極上に保護膜を形成した。以上の工程により、各メディエータ結合ポリマーを含有する試薬層と、試薬層を被覆する保護膜とを備えるセンサ用電極を得た。

【 0 0 9 3 】

(センサの耐久性評価)

作製した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。そして、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、リン酸緩衝生理食塩水中での電流の時間変化を測定した。

【 0 0 9 4 】

具体的には、測定開始 1000 秒後から 500 秒毎に、理論値 $50 \text{ mg} / \text{dL}$ 、 $150 \text{ mg} / \text{dL}$ 、 $300 \text{ mg} / \text{dL}$ 、 $500 \text{ mg} / \text{dL}$ になるようにグルコースを添加し、継続的に電流応答値を測定した。測定後は電極を 37 のリン酸緩衝生理食塩水中に保存した。1 日間保存した後、同様の測定を行った。なお、グルコース濃度 $50 \text{ mg} / \text{dL}$ 、 $150 \text{ mg} / \text{dL}$ 、 $300 \text{ mg} / \text{dL}$ における電流値は、測定対象となるグルコースを添加した後から、次のグルコース添加直前の 5 秒前、10 秒前、15 秒前、20 秒前および 25 秒前の 5 点の測定値から算出した平均値とした。

【 0 0 9 5 】

また、最終濃度の電流値は、グルコース濃度が $500 \text{ mg} / \text{dL}$ になるようにグルコース溶液を添加した後、480 秒後、485 秒後、490 秒後、495 秒後および 500 秒後の 5 点の測定値から算出した平均値とした。なお、各グルコース濃度における電流値は、グルコース濃度 $0 \text{ mg} / \text{dL}$ における電流値を減じるバックグラウンド補正処理を施した後の電流値である。結果を図 14 に示す。

【 0 0 9 6 】

図 14 は、センサの耐久性評価の結果を示す図である。図 14 に示すように、メディエータ結合ポリマー D (比較例) に比べて、メディエータ結合ポリマー A ~ C では、初日と 1 日保存後とで電流値の変化が小さかった。特に、 $300 \sim 500 \text{ mg} / \text{dL}$ の高濃度域において、電流値の減少が顕著に抑えられていた。このことから、メディエータ結合ポリマー A ~ C によれば、酸化還元酵素 (タンパク質) およびレドックスメディエータの流出を抑制でき、よってセンサの耐久性等を向上させられることが確認された。

【 0 0 9 7 】

なお、発明者らは、ポリマー E およびポリマー F についても実際に合成した。以下に各ポリマーの合成手順を説明する。

【 0 0 9 8 】

(ポリマー E の合成)

図 15 は、ポリマー E の重合反応を示す図である。まず、モノマー b と、モノマー c とを用意した。そして、4 つ口フラスコにモノマー b を 0.85 mmol 、モノマー c を 7.61 mmol 、2, 2'-アゾビス (4-メトキシ-2, 4-ジメチルバレロニトリル) (以下 V-70 と称する) を 0.25 mmol 投入した。以降はポリマー A の場合と同様の処理を施し、図 15 に示す重合反応を行ってポリマー E を得た (必要に応じて反応温度、反応時間は適宜調整した)。ポリマー E は、上記式 (5) において、 $n : m = 15 : 85$ であるポリマーに相当する。

【 0 0 9 9 】

(ポリマー F の合成)

10

20

30

40

50

図16は、ポリマーFの重合反応を示す図である。まず、アリルアミン塩酸塩（モノマーe）と、モノマーcとを用意した。そして、4つ口フラスコにモノマーeを92.22 mmol、モノマーcを9.22 mmol、V-50を66.1 mmol、イオン交換水を590 mmol投入した。以降はポリマーAの場合と同様の処理を施し、図16に示す重合反応を行ってポリマーFを得た。ポリマーFは、上記式(3)において、 $n : m = 5.8 : 94.2$ であるポリマーに相当する。

【産業上の利用可能性】

【0100】

本開示は、ポリマー、試薬層およびセンサに利用することができる。

【符号の説明】

【0101】

1 センサ、 6 保護膜、 26 作用極、 30 対極、 32 試薬層、 34 電極部、 36 ポリマー、 38 タンパク質、 40 レドックスメディエータ、 42 第1架橋剤、 44 第2架橋剤、 46 第1結合部位、 48 第2結合部位、 50 第3結合部位、 52 第4結合部位、 54 第3架橋剤。

10

20

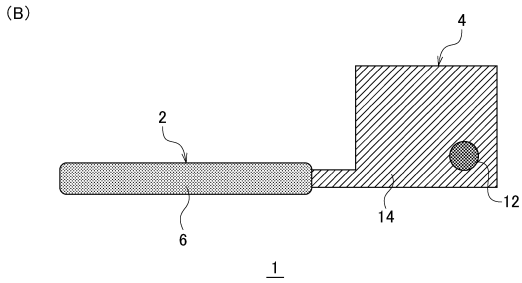
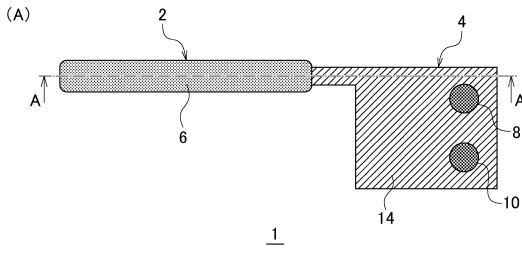
30

40

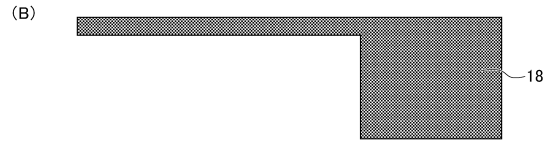
50

【図面】

【図 1】



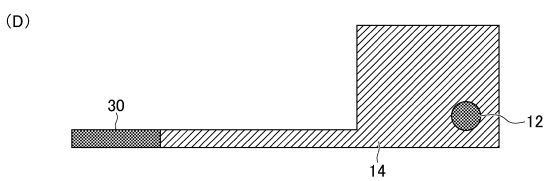
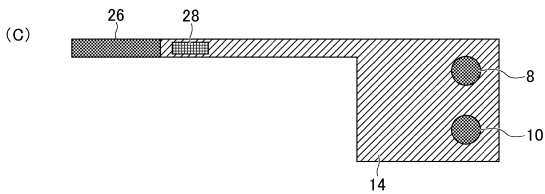
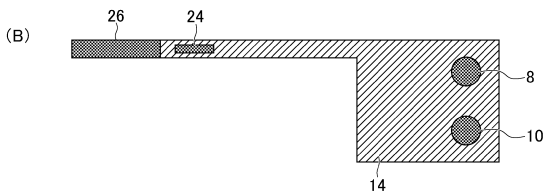
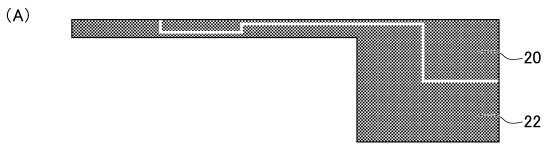
【図 2】



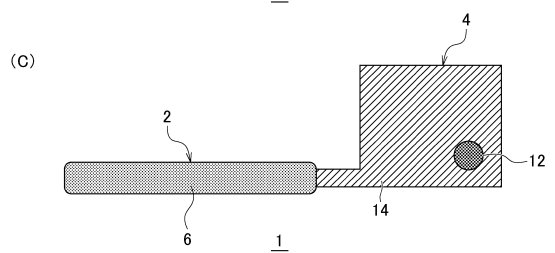
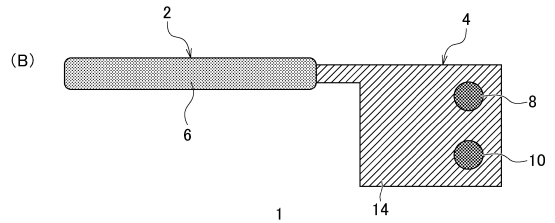
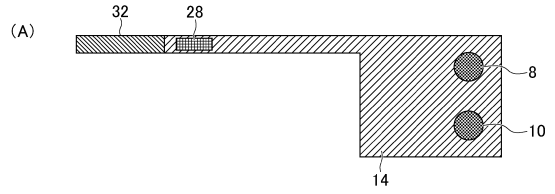
10

20

【図 3】



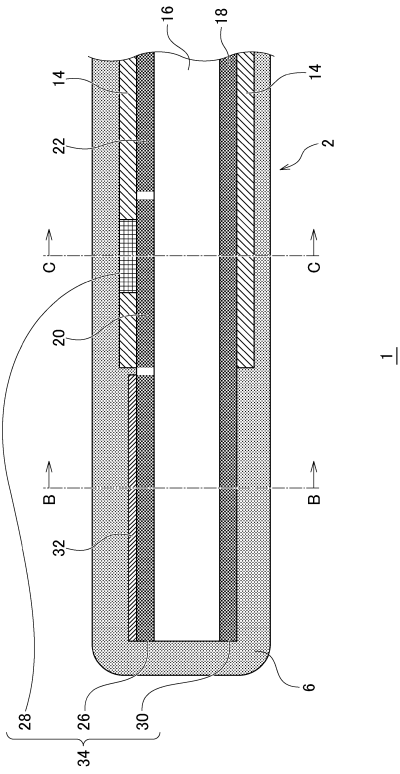
【図 4】



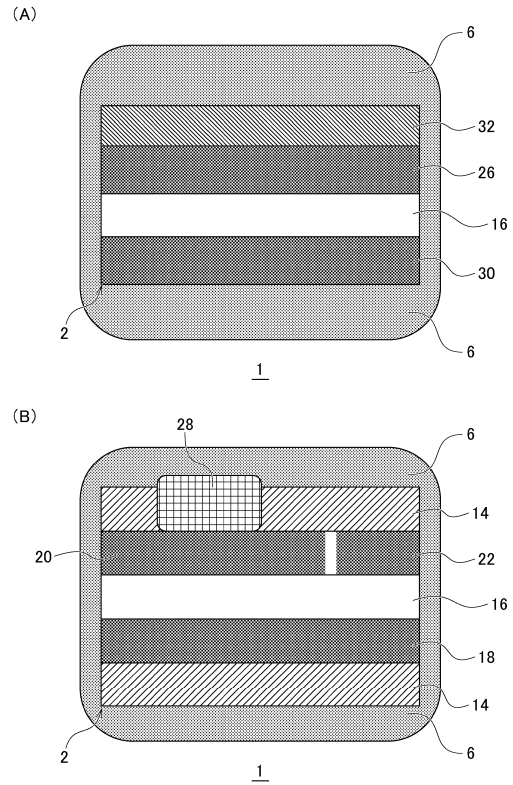
30

40

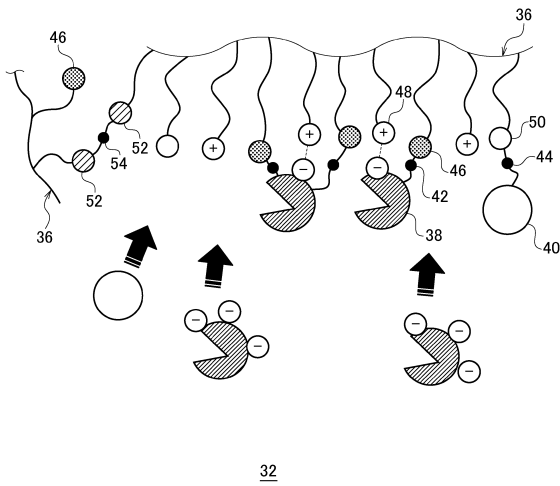
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

第1反応基と第2反応基との結合構造	第1反応基 (下記化合物から誘導される基)	第2反応基 (下記化合物から誘導される基)
アミド	アミン	カルボン酸
	アミン	活性化エステル
	アミン	アシルアジド
	アミン	アシルハライド
	アミン	酸無水物
エーテル	アルコールまたはフェノール	アルキルハライド
	アルコールまたはフェノール	アルキルスルホネート
チオエーテル	チオール	マレイミド
	チオール	エポキシド
	チオール	アルキルハライド
	チオール	アルキルスルホネート
エステル	アルコールまたはフェノール	カルボン酸
	カルボン酸	アルキルハライド
	アルコールまたはフェノール	アシルハライド
	アルコールまたはフェノール	酸無水物
チオエステル	チオール	カルボン酸
ヒドラゾン	ヒドラジン	アルデヒドまたはケトン
尿素	アミン	イソシアネート
チオ尿素	アミン	イソチオシアネート
オキシム	アルコキシアミン	アルデヒドまたはケトン
	ヒドロキシアミン	アルデヒドまたはケトン
アミジン	アミン	イミドエステル
アルキルアミン	アミン	エポキシド
	アミン	アルキルハライド
ウレタン	アルコールまたはフェノール	イソシアネート
イミダゾリウム	イミダゾール	エポキシド
	イミダゾール	アルキルハライド
	イミダゾール	アルキルスルホネート
ピリジニウム	ピリジン	エポキシド
	ピリジン	アルキルハライド
	ピリジン	アルキルスルホネート
スルホンアミド	アミン	スルホニルハライド
スルホン酸エステル	アルコールまたはフェノール	スルホニルハライド
	アミン	アルデヒドまたはケトン

10

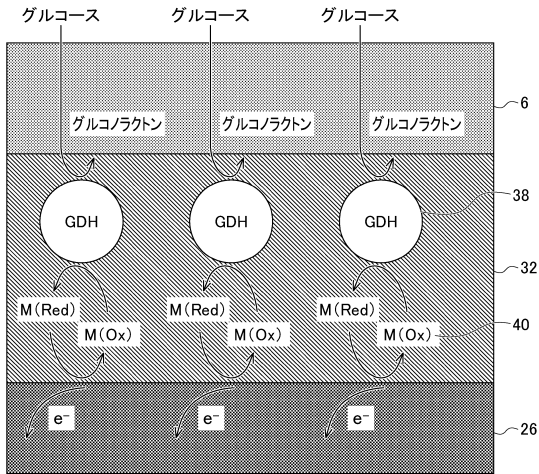
20

30

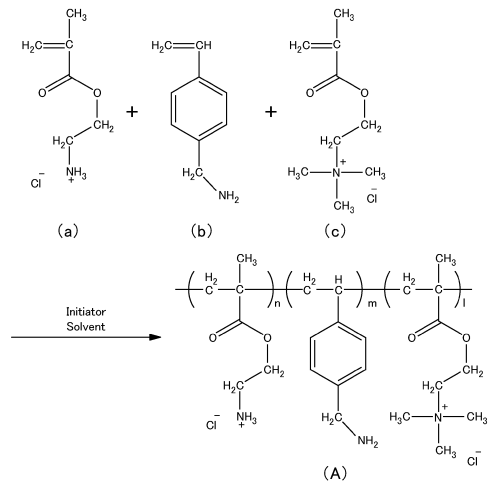
40

50

【図 9】

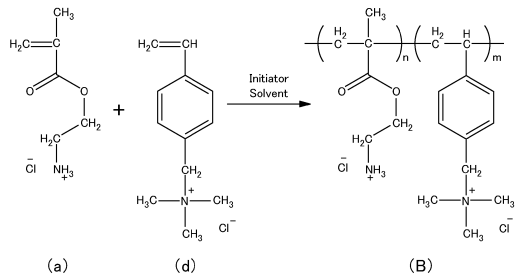


【図 10】

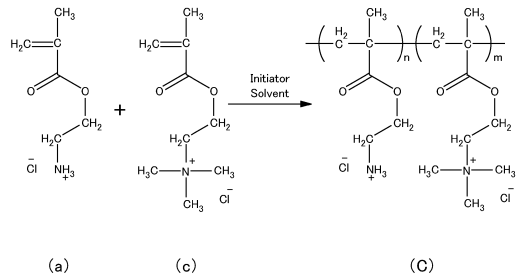


10

【図 11】



【図 12】



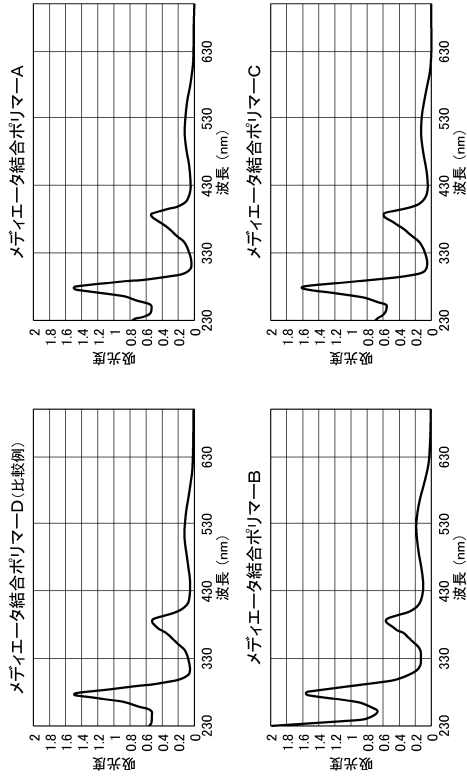
20

30

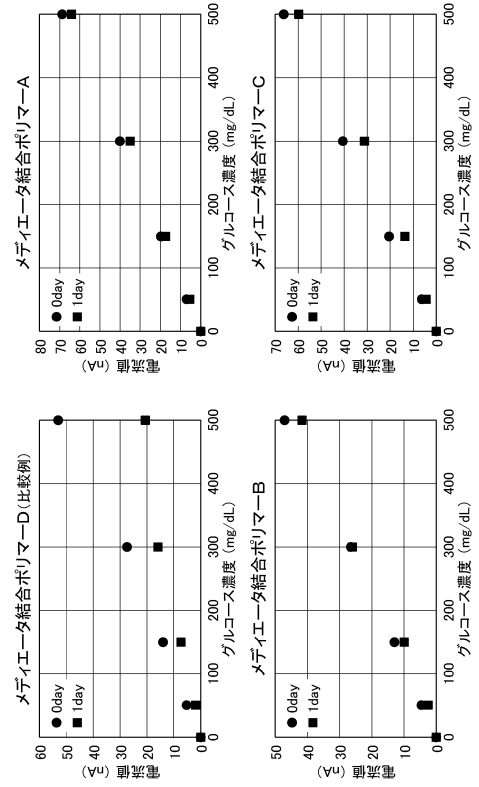
40

50

【図 1 3】



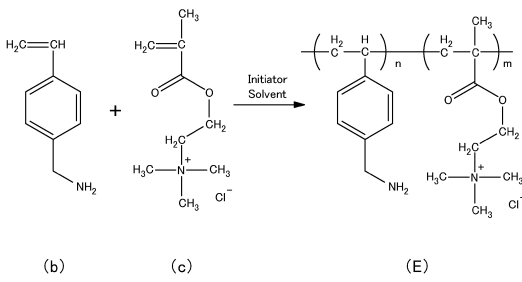
【図 1 4】



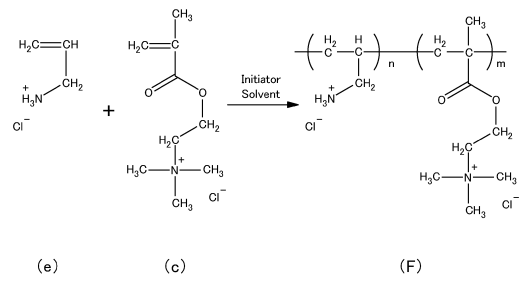
10

20

【図 1 5】



【図 1 6】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 0 8 F 212/14

(56)参考文献

特開2019-038869(JP,A)
特開2006-321829(JP,A)
特表2012-502689(JP,A)
韓国公開特許第10-2018-0084685(KR,A)
国際公開第2019/146788(WO,A1)
特表2019-523787(JP,A)
特開昭58-223739(JP,A)
国際公開第2007/126051(WO,A1)
JOSE,Ramos , Amino functionalized latex particles obtained by a multistep method: Development of a new immunoreagent , Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry , 2003,Vol.41(15) , p.2404-2411 , DOI:10.1002/pola.10782

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 0 8 F
G 0 1 N
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)