

(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
2013年5月23日(23.05.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/073074 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/416 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/004442
- (22) 国際出願日: 2012年7月10日(10.07.2012)
- (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 2011-252765 2011年11月18日(18.11.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社村田製作所(MURATA MANUFACTURING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 大江 秀明(OOE, Hideaki) [JP/JP]; 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号株式会社村田製作所内 Kyoto (JP). 高木 純(TAKAGI, Jun) [JP/JP]; 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号株式会社村田製作所内 Kyoto (JP). 横山 憲二(YOKOYAMA, Kenji) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千

代田区霞が関1丁目3番1号独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 平塚 淳典(HIR-ATSUKA, Atsunori) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 吉田 信行(YOSHIDA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 佐々木 典子(SA-SAKI, Noriko) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 梁瀬 右司, 外(YANASE, Yuji et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満5丁目1番19号高木ビル4階 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR MEASURING SUBSTANCES

(54) 発明の名称: 物質の測定方法

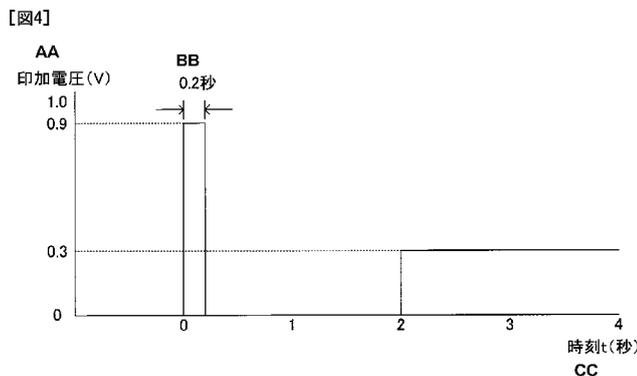


FIG. 4:
AA Applied voltage
BB 0.2 seconds
CC Time t (seconds)

(57) Abstract: Provided is a technique that enables measurement precision to be improved when quantifying a substance to be measured, which is contained in a sample, by decreasing the impact of current components different from the oxidation current resulting from the oxidization of a reducing substance produced by a reaction between enzymes and the substance to be measured in the sample, among the current components in a response current obtained by applying a counter electrode-based measurement potential to a working electrode. Because an adjustment potential with higher potential than a measurement potential is applied in the form of a pulse to the working electrode, among the current components contained in the response current obtained by applying the counter electrode-based measurement potential to the working electrode, the impact of the current components different from the oxidation current resulting from oxidization of the reducing substance produced by the reaction between the substance to be measured and enzymes in the sample can be reduced. Thus, the response current can be stably measured, and measurement precision can be improved when quantifying the substance to be measured, which is contained in the sample.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2013/073074 A1



SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

作用極に対極を基準とする測定電位を印加することにより得られる応答電流に含まれる電流成分のうち、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流と異なる電流成分による影響を低減することにより、検体に含まれる測定対象物質を定量するときの測定精度を向上することができる技術を提供する。測定電位よりも高電位の調整電位が作用極にパルス状に印加されるので、作用極に対極を基準とする測定電位を印加することにより得られる応答電流に含まれる電流成分のうち、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流と異なる電流成分による影響を低減することができるので、応答電流を安定して計測することができ、検体に含まれる測定対象物質を定量するときの測定精度を向上することができる。

明 細 書

発明の名称：物質の測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、バイオセンサを用いて、検体に含まれる測定対象物質の定量を行う物質の測定方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、検体が供給されるキャビティと、作用極および対極を含む電極系と、測定対象物質と特異的に反応する酵素を含む反応層とを有するバイオセンサを用いて、キャビティに供給された検体に含まれる測定対象物質と反応層とが反応することで生成される還元物質を、作用極に対極を基準とする測定電位を印加して酸化することにより得られる酸化電流を計測することで測定対象物質の定量を行う物質の測定方法が知られている。

[0003] バイオセンサは、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板に電極が設けられることによる電極層と、カバー層と、電極層とカバー層とに挟まれて配置されるスペーサ層とが積層されて形成される。また、スペーサ層には、検体が供給されるキャビティを形成するためのスリットが設けられており、電極層にスペーサ層を介してカバー層が積層されて接着されることで、電極層およびカバー層と、スペーサ層のスリットの部分とにより血液試料などの検体が供給されるキャビティが形成され、バイオセンサの側面に検体導入口が形成される。また、検体導入口からキャビティに検体が供給されるが、毛細管現象によりキャビティへ検体が供給されるため、カバー層には、形成されたキャビティの終端部分に連通する空気穴が形成されている。

[0004] また、作用極および対極と、作用極および対極にそれぞれ電気接続される電極パターンとが電極層に設けられることにより、電極系が電極層に形成される。また、作用極および対極は、それぞれバイオセンサに形成されたキャビティにその一部が露出するように電極層に設けられており、作用極および対極のキャビティに露出する部分に反応層が設けられている。したがって、

検体が検体導入口からキャビティに供給されると、キャビティに露出する各電極および反応層に検体が接触すると共に、反応層が検体に溶解する。

[0005] また、作用極および対極上に設けられた反応層には、検体に含まれる、例えばグルコースに特異的に反応するグルコースオキシダーゼと、メディエータ（電子受容体）としてのフェリシアン化カリウムとが含まれている。そして、フェリシアン化カリウムが検体に溶解することによるフェリシアン化イオンは、グルコースがグルコースオキシダーゼと反応してグルコノラクトンに酸化される際に放出される電子により還元体であるフェロシアン化イオンに還元される。したがって、バイオセンサに形成されたキャビティにグルコースを含む検体が検体導入口から供給されると、フェリシアン化イオンはグルコースが酸化されることにより放出される電子により還元されるため、検体に含まれて酵素反応により酸化されるグルコースの濃度に応じた量だけフェリシアン化イオンの還元体であるフェロシアン化イオンが生成される。

[0006] このよう構成されたバイオセンサでは、酵素反応の結果生じたメディエータの還元体を作用極上で酸化することにより得られる酸化電流が検体のグルコース濃度に依存した大きさとなる。したがって、この酸化電流を計測することにより検体に含まれるグルコースの定量を行うことができる。

[0007] ところで、前記酸化電流の測定精度の向上を図るために、バイオセンサのキャビティに露出する作用極および対極に付着したゴミや埃などの不純物を除去することを目的として、作用極に対極を基準とする測定電位が印加される前に、調整電位が作用極に対極を基準として印加される。例えば、特許文献 1 に記載の物質の測定方法では、図 1 2 の従来 of 物質の測定方法の一例を説明するための図に示すように、作用極に対極を基準とする測定電位 E 2 が印加される前に、作用極に測定電位 E 2 よりも低電位の調整電位 E 1 が印加される。

[0008] したがって、前記酸化電流の計測に先立ち作用極に調整電位 E 1 が印加されることで、作用極および対極に付着した不純物が電気化学的に反応して除去されるので、作用極に対極を基準とする測定電位を印加することにより得

られる応答電流に含まれる電流成分のうち、作用極および対極に付着した不純物が電気化学反応することによる電流成分を低減することができ、応答電流に含まれる前記酸化電流の割合を大きくすることができるため、計測対象である酸化電流の計測精度の向上が望める。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特表2009-533690号公報（段落0008～0012、要約書など）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 上記した従来の物質の計測方法では、測定電位よりも低電位の調整電位が作用極に印加されるため、調整電位よりも高電位の測定電位が作用極に印加されたときに電気化学反応する不純物を作用極および対極から除去することができないため、技術の改善が求められていた。
- [0011] 本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、作用極に対極を基準とする測定電位を印加することにより得られる応答電流に含まれる電流成分のうち、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流と異なる電流成分による影響を低減することにより、検体に含まれる測定対象物質を定量するときの測定精度を向上することができる技術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

- [0012] 上記した目的を達成するために、本発明の物質の測定方法は、検体が供給されるキャビティと、作用極および対極を含む電極系と、測定対象物質と特異的に反応する酵素を含む反応層とを有するバイオセンサを用いて、前記キャビティに供給された検体に含まれる前記測定対象物質と前記反応層とが反応することで生成される還元物質を、前記対極を基準とする測定電位を前記作用極に印加して酸化することにより得られる酸化電流を計測し、前記測定

対象物質の定量を行う物質の測定方法において、前記キャビティに前記検体が供給された後、前記測定電位が前記作用極に印加される前に、前記対極を基準にして前記測定電位よりも高電位の調整電位を、少なくとも1回、パルス状に前記作用極に印加することを特徴としている（請求項1）。

[0013] また、前記測定電位は、前記還元物質が酸化される酸化電位以上の大きさであることを特徴としている（請求項2）。

[0014] また、前記調整電位は、水の分解電圧よりも低電位であることを特徴としている（請求項3）。

[0015] また、前記調整電位が前記作用極に印加されるときのパルス幅が30～750ミリ秒であることを特徴としている（請求項4）。

[0016] また、前記調整電位は、前記キャビティへの前記検体の供給が検知されてから1秒経過する前に印加されることを特徴としている（請求項5）。

[0017] また、前記測定電位は、前記キャビティへの前記検体の供給が検知されてから1秒以上経過した後に印加されることを特徴としている（請求項6）。

[0018] また、前記キャビティの容量が0.6 μ lよりも小さいことを特徴としている（請求項7）。

発明の効果

[0019] 請求項1の発明によれば、バイオセンサのキャビティに検体が供給された後、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流を計測するための測定電位が作用極に印加される前に、対極を基準にして測定電位よりも高電位の調整電位が、少なくとも1回、パルス状に作用極に印加されるため、作用極に測定電位が印加されたときに電気化学反応する作用極および対極に付着した不純物は、調整電位が作用極に対極を基準にして印加されることにより電気化学的に反応して作用極および対極から除去される。したがって、作用極に対極を基準とする測定電位を印加することにより得られる応答電流に含まれる電流成分のうち、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流と異なる電流成分による影響を低減する

ことができるので、検体に含まれる測定対象物質を定量するときの測定精度を向上することができる。

[0020] 請求項2の発明によれば、測定電位は、測定対象物質の酵素反応による還元物質が酸化される酸化電位以上の大きさであるため、作用極に測定電位が印加されることによる還元反応により検体に含まれる還元物質の量が増大することがなく、検体中の還元物質の濃度の変動を抑制することができ、還元物質が酸化されることによる酸化電流を安定させることができるので、測定対象物質を定量するときの測定精度の向上を図ることができる。

[0021] 請求項3の発明によれば、調整電位は、水の分解電圧よりも低電位であるため、調整電位が作用極に印加されたときに水が電気分解することにより検体のイオン濃度が増大することを防止することができるので、測定電位が作用極に印加されたときに計測される応答電流に含まれる、水が電気分解されることによるイオン物質による電流成分を低減することができ、酸化電流の計測精度が劣化するのを防止することができる。

[0022] 請求項4の発明によれば、調整電位が作用極に印加される時のパルス幅が30～750ミリ秒であるため、調整電位が作用極に印加されたときに酸化反応する還元物質の量を抑制することができるため、作用極に測定電位が印加されたときに還元物質が酸化されて計測される酸化電流の変動を抑制することができる。

[0023] 請求項5の発明によれば、キャビティに検体が供給されると、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより還元物質が生成されるが、キャビティへの検体の供給が検知されてから1秒経過する前、すなわち、測定対象物質と酵素との酸化還元反応が進むことにより検体中の還元物質の量が増大する前に作用極に調整電位が印加される。したがって、作用極に調整電位が印加されることにより酸化反応する還元物質の量を抑制ことができると共に、作用極への調整電位印加後に、測定対象物質と酵素との酸化還元反応がさらに進むことにより検体中の還元物質の量が増大するため、調整電位が印加されることで、作用極に測定電位が印加されたときに還元物質が酸化さ

れて計測される酸化電流が変動するのを抑制することができる。

[0024] 請求項6の発明によれば、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより還元物質が生成されるが、キャビティへの検体の供給が検知されてから1秒以上経過した後、すなわち、測定対象物質と酵素との酸化還元反応が進むことにより検体中の還元物質の量が十分に増大した後に作用極に測定電位が印加される。したがって、作用極に測定電位が印加されて還元物質が酸化されることによる酸化電流を確実に計測することができる。

[0025] 請求項7の発明によれば、キャビティの容量が0.6 μ lよりも小さく、キャビティに供給される少量の検体により測定対象物質の定量を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明の物質の測定方法において使用されるバイオセンサシステムの一例を示す図である。

[図2]バイオセンサの一例を示す図である。

[図3]計測処理の一例を示すフローチャートである。

[図4]作用極に対極を基準として印加される電位の一例を示す図である。

[図5]作用極に測定電位を印加することにより得られる応答電流の一例を示す図である。

[図6]作用極に測定電位を印加することにより得られる応答電流の比較例を示す図である。

[図7]作用極に印加される調整電位の大きさと計測される応答電流の変動係数との関係を示す図である。

[図8]作用極に印加される調整電位のパルス幅と計測される応答電流の変動係数との関係を示す図である。

[図9]作用極に対極を基準として印加される電位の他の例を示す図である。

[図10]作用極に対極を基準として印加される電位の他の例を示す図である。

[図11]作用極に対極を基準として印加される電位の他の例を示す図である。

[図12]従来の物質の測定方法の一例を説明するための図である。

発明を実施するための形態

[0027] 本発明の物質の測定方法の一実施形態について、図1～図8を参照して説明する。

[0028] 図1は本発明の物質の測定方法において使用されるバイオセンサシステムの一例を示す図である。図2はバイオセンサの一例を示す図であって、(a)は分解斜視図、(b)は斜視図である。図3は計測処理の一例を示すフローチャートである。図4は作用極に対極を基準として印加される電位の一例を示す図である。図5は作用極に測定電位を印加することにより得られる応答電流の一例を示す図である。図6は作用極に測定電位を印加することにより得られる応答電流の比較例を示す図である。図7は作用極に印加される調整電位の大きさと計測される応答電流の変動係数との関係を示す図である。図8は作用極に印加される調整電位のパルス幅と計測される応答電流の変動係数との関係を示す図である。

[0029] <バイオセンサシステム>

バイオセンサシステム1は、図1に示すように、検体が供給されるキャビティ103と、作用極101および対極102を含む電極系と、測定対象物質と特異的に反応する酵素を含む反応層(図示省略)とを有するバイオセンサ100と、バイオセンサ100が着脱自在に装着される測定器2とを備えている。そして、バイオセンサシステム1は、測定器2に装着されたバイオセンサ100の先端側に設けられたキャビティ103に供給された血液などの検体に含まれるグルコースなどの測定対象物質と、バイオセンサ100に設けられた反応層とが反応することで生成される還元物質を、作用極101に対極102を基準とする測定電位を印加して酸化することにより得られる酸化電流を計測することで、検体に含まれる測定対象物質の定量を行う。

[0030] 測定器2は、バイオセンサ100の装着が検出されると自動的に電源が投入されて、バイオセンサ100に血液などの検体が供給されると、検体中のグルコースなどの測定対象物質の測定を開始する。そして、検体中の測定対象物質の定量が完了すれば、測定結果がLCDなどの表示手段により形成さ

れる表示部3に表示されると共に、計測終了を合図するアラームがスピーカ4から出力されて、測定結果がメモリなどの記憶媒体により形成される記憶部5に記憶される。

[0031] また、測定器2は、操作スイッチなどにより形成された操作部6を備えており、操作部6が操作されることにより各種初期設定が実行されたり、記憶部5に記憶されている過去の計測結果などが表示部3に表示される。

[0032] また、測定器2は、シリアルインターフェース7(I/F)を備え、I/F7を介して接続された外部のパーソナルコンピュータとの間で、測定結果などのデータの送受信を行うことができる。なお、記憶部5には、過去の測定結果や、バイオセンサ100の作用極101に所定の測定電位を印加することにより計測される応答電流に基づいて検体に含まれる測定対象物質の定量を行うための換算式、CPU8により実行されることにより各種機能が実現されるプログラムなどが格納されている。

[0033] また、測定器2は、電圧出力部9と、電流電圧変換部10と、A/D変換部11とを備えている。電圧出力部9は、デジタル-アナログ変換機能(D/A変換機能)を有し、CPU8からの制御指令に基づいて、測定器2に装着されたバイオセンサ100の対極102に一定の参照電位を出力するとともに、対極102に印加されている参照電位を基準とする所定電位を作用極101に出力する。

[0034] 電流電圧変換部10は、オペアンプや抵抗素子により形成される一般的な電流電圧変換回路を有し、電圧出力部9によりバイオセンサ100の作用極101に所定の測定電位が印加されることで作用極101と対極102との間に流れる応答電流をCPU8に取込むことができるように電圧信号に変換する。A/D変換部11は、電流電圧変換部10により変換された電圧信号をデジタル信号に変換する。そして、A/D変換部11により変換されたデジタル信号はCPU8に取り込まれ、CPU8において所定の演算が施されることにより、電圧信号から電流信号に変換される。

[0035] CPU8は、記憶部5に記憶された、検体に含まれる測定対象物質を定量

するための各種プログラムを実行することにより以下の機能を備えている。

[0036] 検出部 8 a は、A/D変換部 1 1 を介して CPU 8 に入力された作用極 1 0 1 と対極 1 0 2 との間に流れる電流値を監視することにより、作用極 1 0 1 および対極 1 0 2 間が液体から成る検体により短絡することによる抵抗値の変化を検出して、これにより、バイオセンサ 1 0 0 に設けられたキャビティ 1 0 3 に検体が供給されたことを検出する。計時部 8 b は、図示省略されたクロック回路から出力されるクロック信号に基づいて、例えば、検出部 8 a により検体のキャビティ 1 0 3 への供給が検出されてからの経過時間や、電圧出力部 9 による作用極 1 0 1 への所定電位の印加時間などを計時する。

[0037] 計測部 8 c は、電圧出力部 9 により、作用極 1 0 1 に対極 1 0 2 を基準とする所定の測定電位が印加されたときに作用極 1 0 1 と対極 1 0 2 との間に流れる応答電流を計測する。

[0038] 定量部 8 d は、計測部 8 c により計測された応答電流に基づいて測定対象物質の定量を行う。具体的には、作用極 1 0 1 に対極 1 0 2 を基準とする所定の測定電圧が印加されたときに計測される応答電流と、検体に含まれる測定対象物質の濃度との関係が予め計測されることにより、応答電流から測定対象物質の濃度を換算するための換算式が導出されて予め記憶部 5 に格納されている。そして、記憶部 5 に格納された換算式と、実際に計測された応答電流とに基づいて測定対象物質の定量が行われる。

[0039] 報知部 8 e は、定量部 8 d による定量結果を表示部 3 に表示したり、測定が終了したことを示すアラームをスピーカ 4 から出力することによる報知を行う。

[0040] <バイオセンサ>

バイオセンサ 1 0 0 は、図 2 に示すように、それぞれ、セラミック、ガラス、プラスチック、紙、生分解性材料、ポリエチレンテレフタレートなどの絶縁性材料により形成され、作用極 1 0 1 および対極 1 0 2 が設けられた電極層 1 1 0 と、空気穴 1 0 5 が形成されたカバー層 1 3 0 と、キャビティ 1 0 3 を形成するためのスリット 1 0 4 が形成され、電極層 1 1 0 およびカバ

一層 130 に挟まれて配置されるスペーサ層 120 とが、図 2 (a) に示すように、先端側が揃った状態で積層されて接着されることにより形成されている。そして、後端側から測定器 2 の所定の挿入口に挿入されて装着されることで、バイオセンサ 100 は測定器 2 に装着される。

[0041] この実施形態では、電極層 110 は、ポリエチレンテレフタレートから成る基板により形成されている。また、電極層 110 の基板の上にスクリーン印刷やスパッタリング蒸着法により形成された、白金、金、パラジウムなどの貴金属やカーボン、銅、アルミニウム、チタン、ITO、ZnO などの導電性物質から成る電極膜にレーザ加工やフォトリソグラフィによるパターン形成が施されることにより、作用極 101 および対極 102 と、バイオセンサ 100 が測定器 2 に装着されたときに、作用極 101 および対極 102 のそれぞれと測定器 2 とを電氣的に接続する電極パターン 101a, 102a とが設けられている。

[0042] また、スペーサ層 120 は、ポリエチレンテレフタレートから成る基板により形成されており、基板の先端縁部のほぼ中央にキャビティ 103 を形成するためのスリット 104 が形成されて、図 2 (a) に示すように電極層 110 と先端が揃った状態で積層されて接着される。

[0043] 反応層は、電極層 110 にスペーサ層 120 が積層されて形成されるキャビティ 103 にその一部が露出する作用極 101 および対極 102 に、カバ一層 130 が積層される前に、カルボキシメチルセルロースやゼラチンなどの増粘剤、酵素、メディエータ、アミノ酸や有機酸などの添加物を含有する試薬を滴下することにより形成される。また、キャビティへ 103 に血液などの検体の供給を円滑にするために、界面活性剤やリン脂質などの親水化剤がキャビティ 103 の内壁に塗布される。

[0044] 酵素としては、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、フルクトシルアミンオキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ヒド

ロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、コレステロールエステラーゼ、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、DNAポリメラーゼなどを用いることができ、これらの酵素を検出したい測定対象物質に応じて選択することで種々のセンサを形成することができる。

[0045] 例えば、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を用いれば検体中のグルコースを検出するグルコースセンサを形成でき、アルコールオキシダーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼを用いれば検体中のエタノールを検出するアルコールセンサを形成でき、乳酸オキシダーゼを用いれば検体中の乳酸を検出する乳酸センサを形成でき、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼとの混合物を用いれば総コレステロールセンサを形成できる。

[0046] メディエータとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、フェロセン誘導体、ベンゾキノン、キノン誘導体、オスミウム錯体、ルテニウム錯体などを用いることができる。

[0047] 増粘剤としては、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、ポリエチレンイミン DEAEセルロース ジメチルアミノエチルデキストラン カラギーナン アルギン酸ナトリウムデキストランなどを用いることができる。親水化剤としては、T r i t o n X 1 0 0、T w e e n 2 0、ビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウムなどの界面活性剤、レシチンなどのリン脂質を用いることができる。また、血液などの検体に含まれるイオン濃度のばらつきを低減するために、リン酸などの緩衝剤を設けてもよい。

[0048] カバー層130は、ポリエチレンテレフタレートから成る基板により形成されており、基板にはスペーサ層120に積層されたときにキャビティ103と連通する空気穴105が形成されている。そして、反応層がキャビティ103に露出する作用極101および対極102上に形成された後に、カバー層130がスペーサ層120に積層されて接着されることにより、血液などの検体をキャビティ103に供給するためにキャビティ103に連通する

検体導入口 103 a が先端に形成されたバイオセンサ 100 が形成される。また、バイオセンサ 103 のキャビティ 103 の容量が、約 0.6 μ l よりも小さくなるように、スペーサ層 120 にスリット 104 が形成されている。

[0049] この実施形態では、バイオセンサシステム 1 は、血液中のグルコースの定量を行うことを目的に形成されており、測定対象物質としてのグルコースと特異的に反応する酵素としてグルコースデヒドロゲナーゼを含み、測定対象物であるグルコースとグルコースデヒドロゲナーゼとの反応により生成される電子により還元されて還元物質と成るメディエータとしてフェリシアン化カリウムを含む反応層がキャビティ 103 に露出する作用極 101 および対極 102 に設けられている。

[0050] このように構成されたバイオセンサ 100 では、先端の検体導入口 103 a に検体を接触させることにより、毛細管現象により検体が空気穴 105 に向かって吸引されてキャビティ 103 に検体が供給される。そして、キャビティ 103 に供給された検体に反応層が溶解することにより、検体中の測定対象物質であるグルコースとグルコースデヒドロゲナーゼとの酵素反応により電子が放出され、放出された電子によりフェリシアン化イオンが還元されて還元物質であるフェロシアン化イオンが生成される。

[0051] 測定器 2 は、検体がキャビティ 103 に供給されると、前記酸化電流を計測するための測定電位を印加する前に、対極 102 を基準にして測定電位よりも高電位の調整電位を、少なくとも 1 回、パルス状に作用極 101 に印加することにより、作用極 101 および対極 102 に付着するゴミや埃などの不純物を除去する。また、測定器 2 は、作用極 101 に調整電位を印加した後、反応層が検体に溶解することによる酸化還元反応により生成された還元物質が酸化される酸化電位以上の大きさの測定電位をバイオセンサ 100 の作用極 101 に対極 102 を基準として印加して、還元物質を電気化学的に酸化することにより、作用極 101 と対極 102 との間に流れる酸化電流を計測することで検体中のグルコースの定量を行う。

[0052] なお、この実施形態では、バイオセンサ100は、作用極101および対極102を有する二極電極構造に形成されているが、参照極をさらに設けることによりバイオセンサ100を三極電極構造に形成してもよい。この場合、対極102を接地して電圧出力部9により参照極に参照電位を印加した状態で、作用極101に対極102を基準とする所定の測定電位を印加すればよい。

[0053] また、この実施形態では、作用極101と対極102との間に所定電圧を印加することにより作用極101と対極102との間に流れる電流を監視することで、キャビティ103に検体が供給されたことを検出するように構成されているが、検体検知用電極をさらに設け、対極102と検体検知用電極との間に所定電圧を印加することにより、対極102と検体検知用電極との間に流れる電流を監視することで、キャビティ103に検体が供給されたことを検出するようにしてもよい。また、バイオセンサ100を形成する電極層110、スペーサ層120およびカバー層130のうち、少なくともカバー層130は、キャビティ103に検体が供給されたことを視認できるように透明な部材で形成するのが望ましい。

[0054] <計測処理>

次に、バイオセンサシステム1において実行される計測処理の一例について説明する。バイオセンサ100が測定器2に装着されたことが図示省略された検出回路により検出されると、作用極101と対極102と間にバイオセンサ100のキャビティ103に血液から成る検体が供給されたことを検出するための検体検知用電圧が印加される（ステップS1）。そして、キャビティ103に検体が供給されて作用極101および対極102が検体により液絡すると、作用極101と対極102との間に流れる電流が増大することから抵抗値の変化が検知されるので、これにより、キャビティ103に検体が供給されたことが検出部8aにより検出される（ステップS2）。

[0055] キャビティ103に検体が供給されたことが検出部8aにより検出されると、キャビティ103への検体の供給が検知されてから1秒、望ましくは0

． 5秒経過する前に、電圧出力部9により、作用極101に対極102を基準として調整電位が印加される（ステップS3）。この実施形態では、図4に示すように、キャビティ103に検体が供給されたことが検出部8aにより検出された時刻 $t=0$ から、対極102を基準として約0.9Vの調整電位が約0.2秒のパルス幅で作用極101に印加される。

[0056] そして、作用極101に調整電位が印加された後、キャビティ103への検体の供給が検知されてから1秒以上経過した後に、電圧出力部9により、作用極101に対極102を基準として測定電位が印加される（ステップS4）。この実施形態では、キャビティ103に検体が供給されたことが検出部8aにより検出されてから2秒経過した時刻 $t=2$ から、対極102を基準として約0.3Vの測定電位が作用極101に印加される。

[0057] 続いて、作用極101に測定電位が印加された後、キャビティ103への検体の供給が検知されてから約3～5秒後の応答電流（酸化電流）が計測部8cにより計測される（ステップS5）。そして、計測された応答電流の電流値と、記憶部5に記憶された換算式とに基づいて検体に含まれるグルコースの定量が行われて、測定結果が報知部8eにより報知されることにより処理を終了する（ステップS6）。

[0058] なお、この実施形態では、測定電位は、グルコースの酵素反応の結果生じた還元物質であるフェロシアン化イオンが酸化される酸化電位以上の大きさに設定されており、約0.3Vに設定されている。また、調整電位は、測定電位よりも高電位で、水の分解電圧（約1V）よりも低電位の約0.9Vに設定されている。

[0059] <応答電流の比較>

図5は、上記した「計測処理」における条件と同一の条件で応答電流を3回計測したときの計測結果を示す。また、図6は、調整電位を作用極101に印加しないことの他は、上記した「計測処理」における条件と同一の条件で応答電流を3回計測したときの計測結果を示す。

[0060] 図5に示すように、上記した「計測処理」のように、作用極101に測定

電位が印加される前に、調整電位が作用極 101 に印加された場合には、ほぼ同様の応答電流が安定して計測される。一方、図 6 に示すように、作用極 101 に測定電位が印加される前に、調整電位が作用極 101 に印加されない場合には、計測される応答電流が不安定となる。

[0061] 以上のように、この実施形態によれば、バイオセンサ 100 のキャビティ 103 に検体が供給された後、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流を計測するための測定電位が作用極 101 に印加される前に、対極 102 を基準にして測定電位よりも高電位の調整電位が、少なくとも 1 回、パルス状に作用極 101 に印加されるため、作用極 101 に測定電位が印加されたときに電気化学反応する作用極 101 および対極 102 に付着した不純物は、調整電位が作用極 101 に対極 102 を基準にして印加されることにより電気化学的に反応して作用極 101 および対極 102 から除去される。

[0062] したがって、作用極 101 に対極 102 を基準とする測定電位を印加することにより得られる応答電流に含まれる電流成分のうち、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより生成される還元物質が酸化されることによる酸化電流と異なる電流成分による影響を低減することができるので、応答電流を安定して計測することができ、検体に含まれる測定対象物質を定量するときの測定精度を向上することができる。

[0063] また、測定電位は、測定対象物質の酵素反応による還元物質が酸化される酸化電位以上の大きさであるため、作用極 101 に測定電位が印加されることによる還元反応により検体に含まれる還元物質の量が増大することがなく、検体中の還元物質の濃度の変動を抑制することができ、還元物質が酸化されることによる酸化電流を安定させることができるので、測定対象物質を定量するときの測定精度の向上を図ることができる。

[0064] また、調整電位は、水の分解電圧よりも低電位であるため、調整電位が作用極 101 に印加されたときに水が電気分解することにより検体のイオン濃度が増大することを防止することができるので、測定電位が作用極 101 に

印加されたときに応答電流が計測され、この応答電流に含まれる水が電気分解されることによるイオン物質による電流成分を低減することができ、酸化電流の計測精度が劣化するのを防止することができる。

[0065] 作用極 101 に印加される調整電位の大きさと、作用極 101 に測定電位が印加されたときに計測される応答電流（酸化電流）の変動係数（CV : Coefficient of variation）との関係を計測したところ、次のような結果を得た。すなわち、図 7 に示すように、調整電位の大きさが、酸化電位よりも大きく、水の分解電圧よりも小さい、約 0.5 V ~ 約 0.9 V のときに、作用極 101 に測定電位が印加されたときに計測される応答電流の CV を 3% 以下に抑制することができる。

[0066] また、調整電位が作用極 101 に印加されるときのパルス幅が 0.2 秒であるため、調整電位が作用極 101 に印加されたときに酸化反応する還元物質の量を抑制することができるため、作用極 101 に測定電位が印加されたときに還元物質が酸化されて計測される酸化電流の変動を抑制することができる。

[0067] パルス状に作用極 101 に印加される調整電位のパルス幅は 0.2 秒に限定されるものではない。作用極 101 に印加される調整電位のパルス幅と、作用極 101 に測定電位が印加されたときに計測される応答電流（酸化電流）の変動係数（CV : Coefficient of variation）との関係を計測したところ、次のような結果を得た。すなわち、図 8 に示すように、調整電位のパルス幅が、約 30 ミリ秒 ~ 約 750 ミリ秒のときに、作用極 101 に測定電位が印加されたときに計測される応答電流の CV を 3% 以下に抑制することができる。

[0068] また、キャビティ 103 に検体が供給されると、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより還元物質が生成されるが、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒経過する前、すなわち、測定対象物質と酵素との酸化還元反応が進むことにより検体中の還元物質の量が増大する前に作用極 101 に調整電位が印加される。したがって、作用極 101 に調整

電位が印加されることにより酸化反応する還元物質の量を抑制することができると共に、作用極 101 への調整電位印加後に、測定対象物質と酵素との酸化還元反応がさらに進むことにより検体中の還元物質の量が增大するため、調整電位が印加されることで、作用極 101 に測定電位が印加されたときに還元物質が酸化されて計測される酸化電流が変動するのを抑制することができる。

[0069] また、検体中の測定対象物質と酵素とが反応することにより還元物質が生成されるが、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒以上経過した後、すなわち、測定対象物質と酵素との酸化還元反応が進むことにより検体中の還元物質の量が十分に増大した後に作用極 101 に測定電位が印加される。したがって、作用極 101 に測定電位が印加されて還元物質が酸化されることによる酸化電流を確実に安定して計測することができる。

[0070] また、キャビティの容量が $0.6 \mu\text{l}$ よりも小さく、キャビティ 103 に供給される検体が少量である場合であっても、上記したように、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒経過する前に、還元物質の酸化電位よりも高電位の調整電位が印加されることで、測定対象物質と酵素との酸化還元反応による還元物質が酸化されるのが防止されるため、少量の検体により測定対象物質の定量を行うことができる。

[0071] なお、本発明は上記した実施形態に限定されるものではなく、その趣旨を逸脱しない限りにおいて、上記したもの以外に種々の変更を行なうことが可能であり、例えば、上記したバイオセンサ 100 の反応層に含まれる酵素およびメディエータの組合せを変更することによりエタノールセンサや乳酸センサなどを形成してもよい。また、反応層にはメディエータを必ずしも含まなくともよく、この場合、グルコースなどの測定対象物質の酵素反応により生じる過酸化水素や酵素の還元体などの還元物質が酸化されることによる酸化電流を計測すればよい。

[0072] また、測定電位は、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒以上経過する前に作用極 101 に印加されてもよく、例えば、図 9 に示す

ように、電圧出力部 9 により、作用極 101 に対極 102 を基準として約 0.9 V の調整電位が約 0.2 秒のパルス幅で印加された直後から、作用極 101 に約 0.3 V の測定電位が印加されてもよい。

[0073] また、調整電位は、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてからパルス状に、複数回、作用極 101 に印加されてもよく、例えば、図 10 に示すように、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒、望ましくは 0.5 秒経過する前に、電圧出力部 9 により、対極 102 を基準として 0.9 V のパルス状の調整電位が、複数回、作用極 101 に印加されてもよい。

[0074] また、調整電位は、一定の電位でなくてもよく、例えば、図 11 に示すように、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒、望ましくは 0.5 秒経過する前に、電圧出力部 9 により、対極 102 を基準として電位の異なるパルス状の調整電位が、複数回、作用極 101 に印加されてもよい。なお、図 9～図 11 は、作用極に対極を基準として印加される電位の他の例を示す図である。

[0075] また、調整電位は、必ずしも、キャビティ 103 への検体の供給が検知された直後に作用極 101 に印加しなくともよく、また、調整電位は、キャビティ 103 への検体の供給が検知されてから 1 秒を越えて作用極 101 に印加してもよい。また、パルス幅および電位の異なるパルス状の調整電位が、複数回、作用極 101 に印加されてもよい。また、水の分解電圧以上の調整電位が作用極 101 に印加されてもよい。

[0076] また、上記した実施形態では、対極 102 を基準とする調整電位が作用極 101 に印加された後、作用極 101 および対極 102 間の電圧が 0 V に設定されているが、測定対象物質と酵素との酸化還元反応を促進するために、調整電位が作用極 101 に印加された後、回路を開放してもよい。

[0077] また、バイオセンサ 100 のキャビティ 103 の容量は、より小さく形成するのが望ましい。

産業上の利用可能性

[0078] 本発明は、種々のバイオセンサを用いた物質の測定方法に適用することができる。

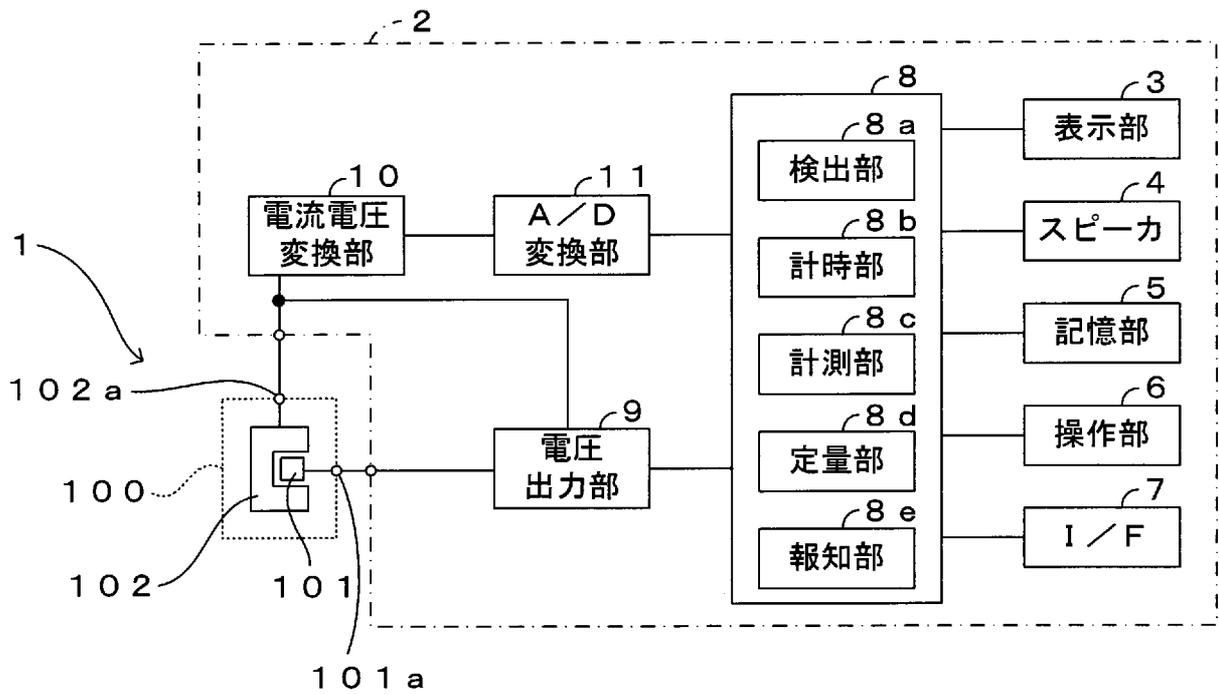
符号の説明

[0079] 100 バイオセンサ
101 作用極
102 対極
103 キャビティ

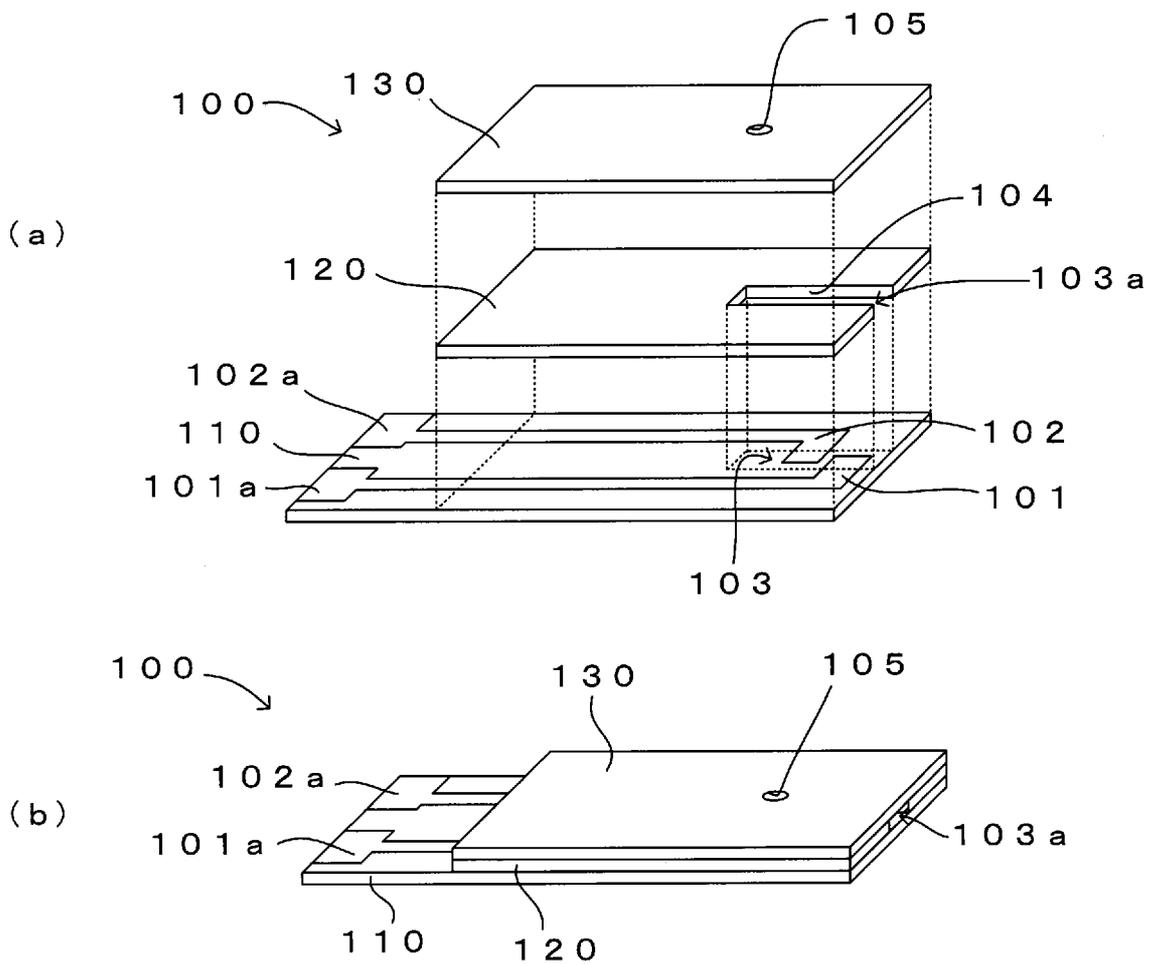
請求の範囲

- [請求項1] 検体が供給されるキャビティと、作用極および対極を含む電極系と、測定対象物質と特異的に反応する酵素を含む反応層とを有するバイオセンサを用いて、前記キャビティに供給された検体に含まれる前記測定対象物質と前記反応層とが反応することで生成される還元物質を、前記対極を基準とする測定電位を前記作用極に印加して酸化することにより得られる酸化電流を計測し、前記測定対象物質の定量を行う物質の測定方法において、
- 前記キャビティに前記検体が供給された後、前記測定電位が前記作用極に印加される前に、前記対極を基準にして前記測定電位よりも高電位の調整電位を、少なくとも1回、パルス状に前記作用極に印加することを特徴とする物質の測定方法。
- [請求項2] 前記測定電位は、前記還元物質が酸化される酸化電位以上の大きさであることを特徴とする請求項1に記載の物質の測定方法。
- [請求項3] 前記調整電位は、水の分解電圧よりも低電位であることを特徴とする請求項1または2に記載の物質の測定方法。
- [請求項4] 前記調整電位が前記作用極に印加されるときのパルス幅が30～750ミリ秒であることを特徴とする請求項1ないし3のいずれかに記載の物質の測定方法。
- [請求項5] 前記調整電位は、前記キャビティへの前記検体の供給が検知されてから1秒経過する前に印加されることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載の物質の測定方法。
- [請求項6] 前記測定電位は、前記キャビティへの前記検体の供給が検知されてから1秒以上経過した後に印加されることを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載の物質の測定方法。
- [請求項7] 前記キャビティの容量が0.6 μ lよりも小さいことを特徴とする請求項1ないし6のいずれかに記載の物質の測定方法。

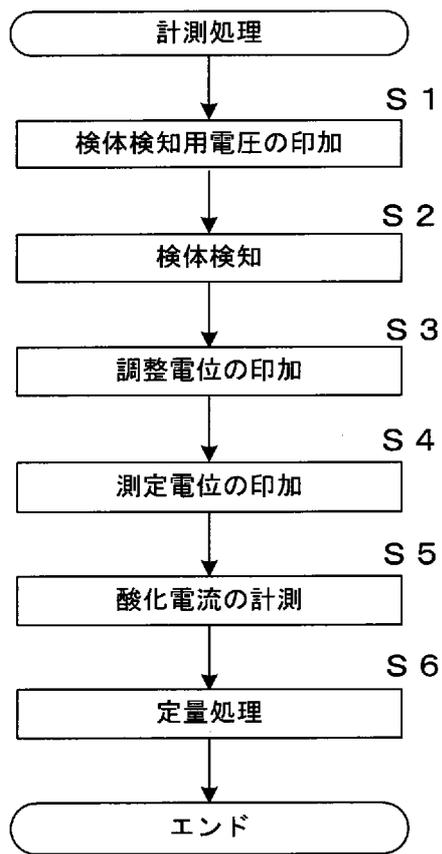
[図1]



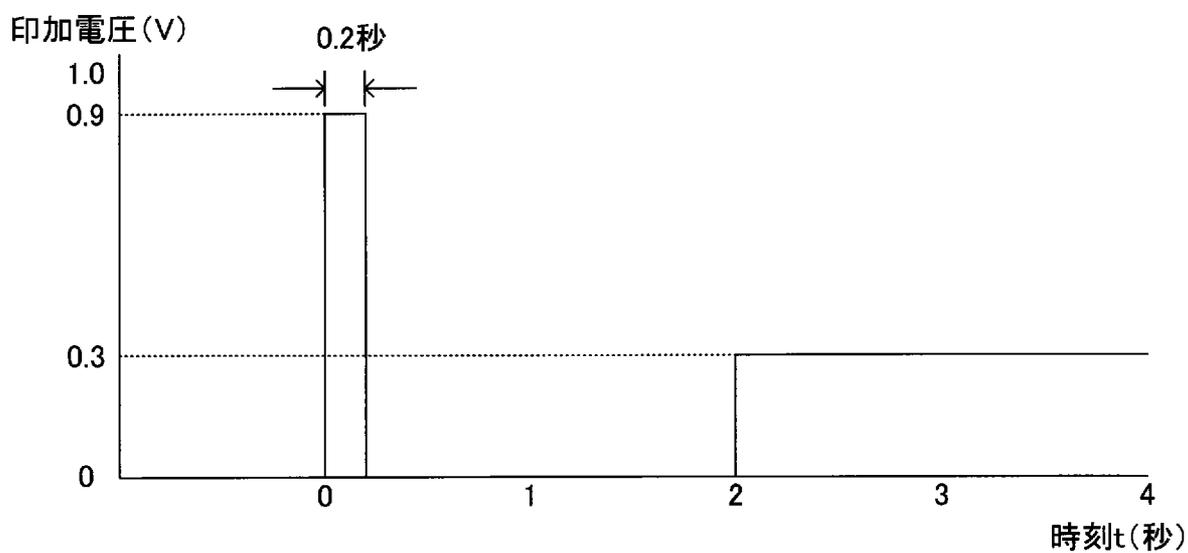
[図2]



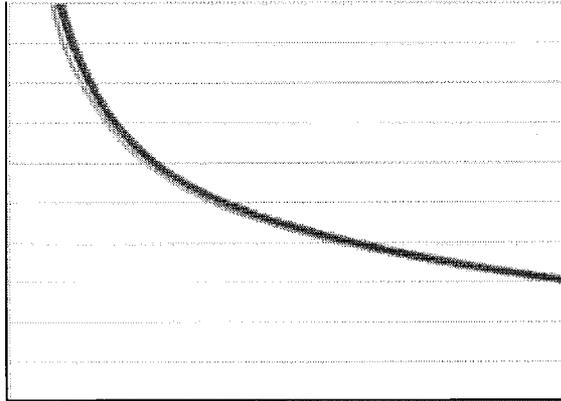
[図3]



[図4]

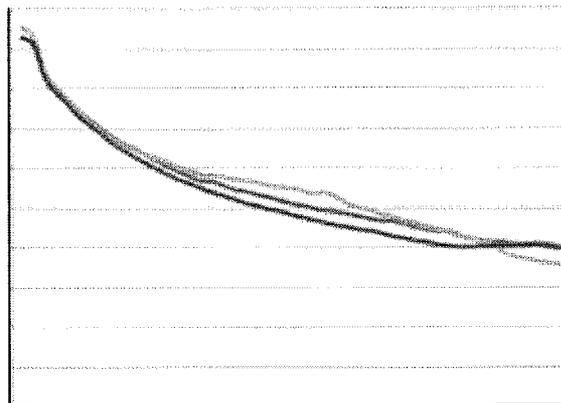


[図5]

応答電流 (μA)

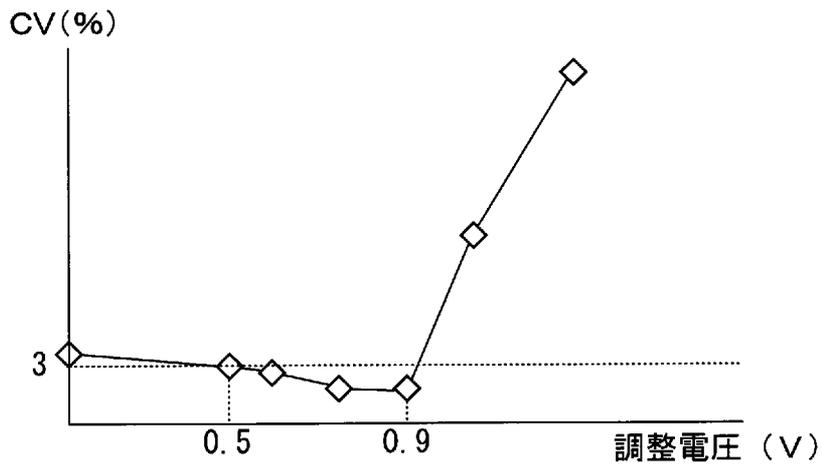
時間(秒)

[図6]

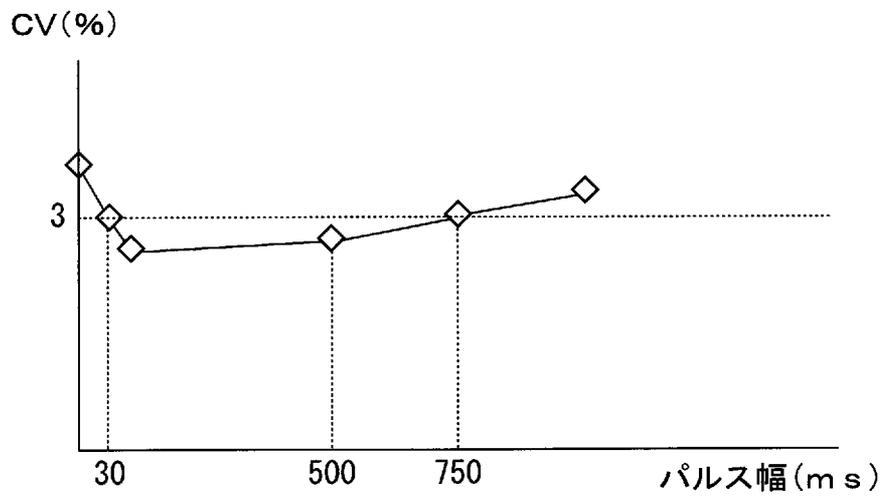
応答電流 (μA)

時間(秒)

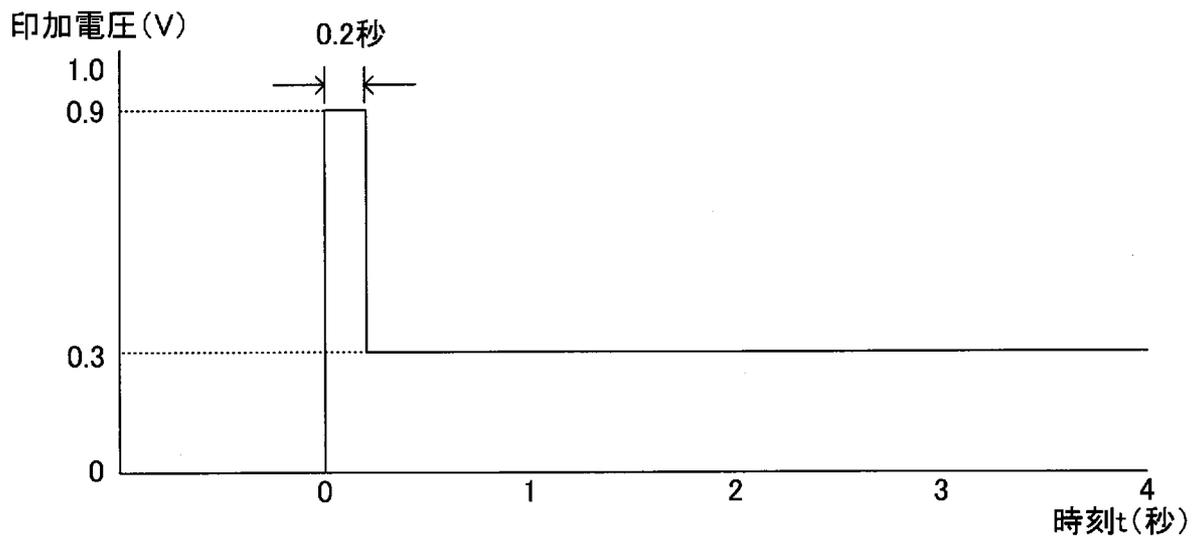
[図7]



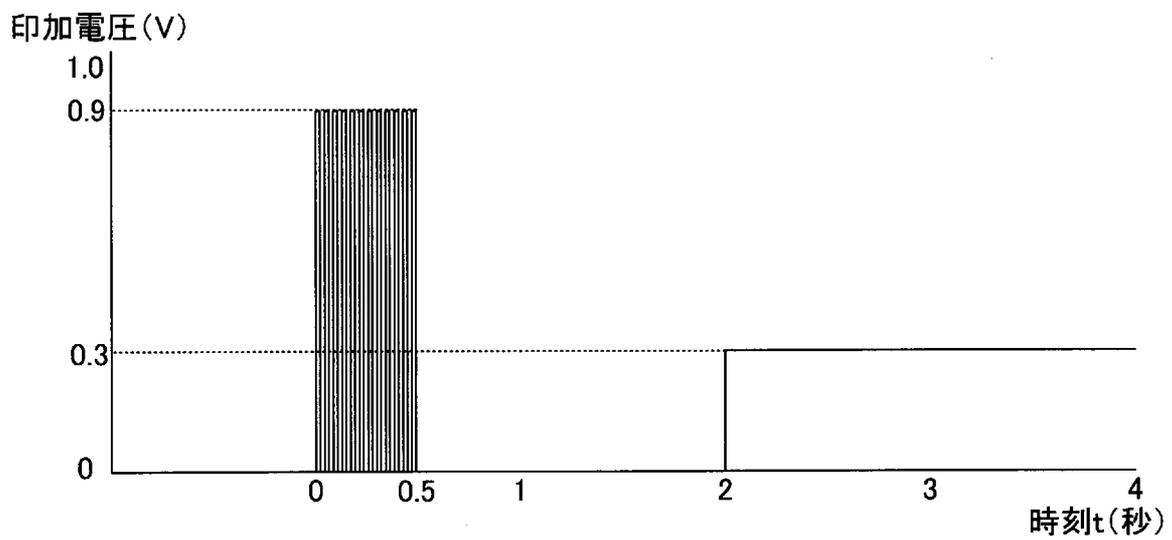
[図8]



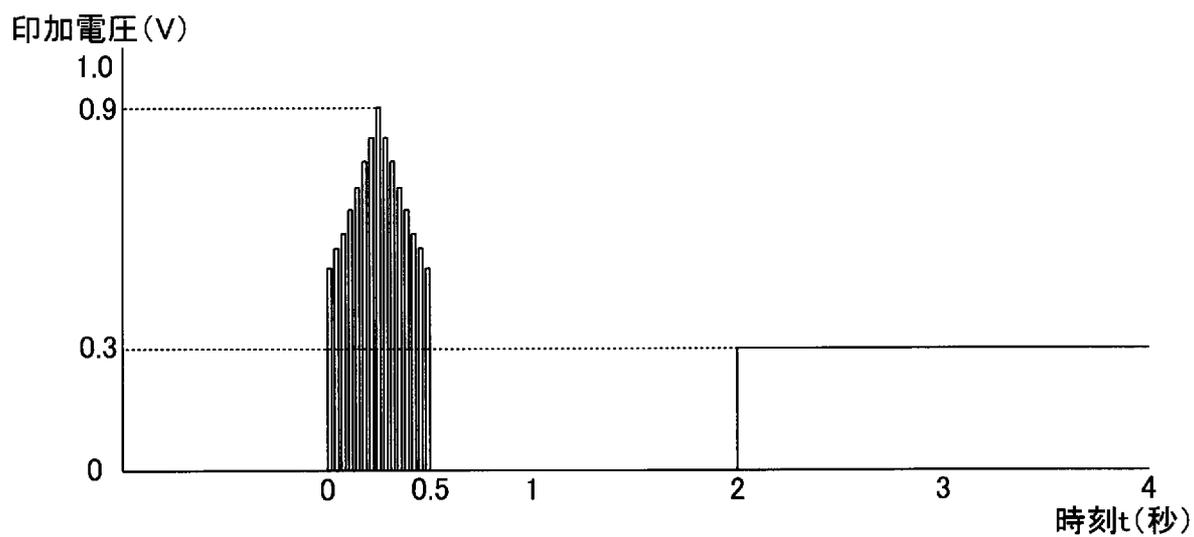
[図9]



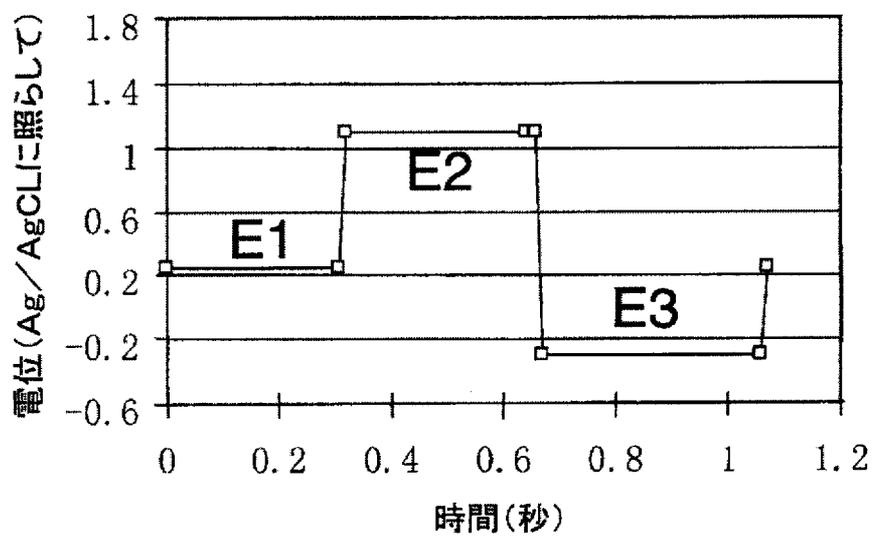
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/004442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/416(2006.01) i, G01N27/327(2006.01) i

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)

G01N27/416, G01N27/327

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/119118 A1 (Panasonic Corp.), 01 October 2009 (01.10.2009), paragraphs [0063] to [0065]; fig. 2 & US 2010/0283488 A1	1-7
X	JP 2007-33459 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 08 February 2007 (08.02.2007), claims; paragraphs [0082] to [0091]; fig. 2, 9 (Family: none)	1-7

 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
09 October, 2012 (09.10.12)Date of mailing of the international search report
23 October, 2012 (23.10.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/004442

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-504524 A (Bayer Healthcare, L.L.C.), 12 February 2010 (12.02.2010), claims 25 to 40; paragraphs [0041], [0068] to [0075]; fig. 1, 2, 4C & US 2008/0156662 A1 & US 2011/0115504 A1 & EP 2089531 A & WO 2008/036516 A1 & CA 2664186 A & NO 20091572 A & CN 101517093 A & RU 2009115202 A & TW 200829214 A & MX 2009002830 A	1-7
A	JP 2009-533690 A (Dionex Corp.), 17 September 2009 (17.09.2009), entire text; all drawings & US 2007/0240998 A1 & EP 2008086 A & WO 2007/121267 A2	1-7
A	JP 2000-162176 A (Omron Corp.), 16 June 2000 (16.06.2000), entire text; all drawings (Family: none)	1-7
A	JP 2011-158483 A (Panasonic Corp.), 18 August 2011 (18.08.2011), entire text; all drawings & JP 2011-33637 A & JP 2011-33638 A & JP 2011-137839 A & US 2007/0138026 A1 & EP 1742045 A1 & WO 2005/103669 A1 & CA 2559297 A & KR 10-2006-0134101 A & CN 1938590 A & KR 10-1108381 B	1-7
A	Shigeru YAMAUCHI et al., "Hakinkoku o Mochiita Micro Bio Sensor", Kagaku Kogyo, 01 October 1993 (01.10.1993), vol.44, no.10, pages 796 to 800	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N27/416(2006.01)i, G01N27/327(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N27/416, G01N27/327

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012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(JDreamII)

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	WO 2009/119118 A1 (パナソニック株式会社) 2009.10.01, [0063] - [0065]、第2図 & US 2010/0283488 A1	1-7
X	JP 2007-33459 A (松下電器産業株式会社) 2007.02.08, 請求の範囲、 【0082】 - 【0091】、第2, 9図 (ファミリーなし)	1-7

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	の日の後に公表された文献
「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	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 09.10.2012	国際調査報告の発送日 23.10.2012
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 黒田 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2010-504524 A (バイエル・ヘルスケア・エルエルシー) 2010.02.12, 請求項 25-40、【0041】、【0068】 - 【0075】、第1, 2図、Fig. 4C & US 2008/0156662 A1 & US 2011/0115504 A1 & EP 2089531 A & WO 2008/036516 A1 & CA 2664186 A & NO 20091572 A & CN 101517093 A & RU 2009115202 A & TW 200829214 A & MX 2009002830 A	1-7
A	JP 2009-533690 A (ダイオネックス コーポレーション) 2009.09.17, 全文、全図 & US 2007/0240998 A1 & EP 2008086 A & WO 2007/121267 A2	1-7
A	JP 2000-162176 A (オムロン株式会社) 2000.06.16, 全文、全図 (フ ァミリーなし)	1-7
A	JP 2011-158483 A (パナソニック株式会社) 2011.08.18, 全文、全 図 & JP 2011-33637 A & JP 2011-33638 A & JP 2011-137839 A & US 2007/0138026 A1 & EP 1742045 A1 & WO 2005/103669 A1 & CA 2559297 A & KR 10-2006-0134101 A & CN 1938590 A & KR 10-1108381 B	1-7
A	山内繁 他, 白金黒を用いたマイクロバイオセンサ, 化学工業, 1993.10.01, 第44巻第10号, p.796-800	1-7