

(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
2014 年 7 月 24 日(24.07.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/112570 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/327 (2006.01) *G01N 27/416* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/050723
- (22) 国際出願日: 2014 年 1 月 16 日(16.01.2014)
- (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 2013-006560 2013 年 1 月 17 日(17.01.2013) JP
- (71) 出願人: 田中貴金属工業株式会社(TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.) [JP/JP]; 〒1006422 東京都千代田区丸の内 2 丁目 7 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 猪瀬 由香(INOSE Yuka); 〒1520013 東京都目黒区南 1-13-16 有限会社アルティザイム・インターナショナル内 Tokyo (JP). 島▲崎▼ 順子(SHIMAZAKI Junko); 〒1520013 東京都目黒区南 1-13-16 有限会社アルティザイム・インターナショナル内 Tokyo (JP). 栗田昌昭(KURITA Masaaki); 〒2540076 神奈川県平塚市新町 2 番 7 3 号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内 Kanagawa (JP). 西森 尚(NISHIMORI Takashi); 〒2540076 神奈川県平塚市

新町 2 番 7 3 号 田中貴金属工業株式会社 技術開発センター内 Kanagawa (JP).

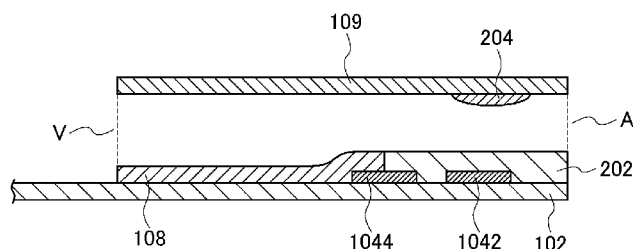
- (74) 代理人: 濱田 百合子, 外(HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルディング 10 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, 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

[続葉有]

(54) Title: BIOSENSOR AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 発明の名称: バイオセンサおよびその製造方法

【図2】



(57) Abstract: Provided is a biosensor with which it is possible to accurately measure a variety of blood components, especially blood-glucose concentration, even if hematocrit levels fluctuate. This problem was addressed by providing a biosensor (10) comprising an electric insulating substrate (102), an electrode system (104) having a working electrode (1042) and an opposing electrode (1044) formed on the electrical insulating substrate (102), and a reagent layer (204) containing an oxidoreductase and a redox mediator, wherein the electrode system (104) is made from metal, a hydrophilic polymer layer (202) is formed on the electrode system (104), and the reagent layer (204) is formed outside the hydrophilic polymer layer (202) in such a manner that the oxidoreductase and the redox mediator shift to the hydrophilic polymer layer (202) after coming into contact with the sample.

(57) 要約: 本発明は、ヘマトクリット値が変動しても、様々な血液成分、とくに血中グルコース濃度を精度よく測定可能なバイオセンサを提供する。電気絶縁性の基板 102 と、前記電気絶縁性の基板 102 上に形成された作用極 1042 および対極 1044 を有する電極系 104 と、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層 204 とを有し、前記電極系 104 は金により形成され、前記電極系 104 上には親水性高分子層 202 が設けられ、前記親水性高分子層 202 に前記酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが前記試料と接触した後に移行するように、前記親水性高分子層 202 外に前記試薬層 204 が設けられているバイオセンサ 10 によって上記課題を解決した。



WO 2014/112570 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, 添付公開書類:
MR, NE, SN, TD, TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： バイオセンサおよびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、バイオセンサおよびその製造方法に関し、とくにグルコースのような血液成分を精度よく測定可能なバイオセンサに関する。

背景技術

[0002] バイオセンサとは、微生物、酵素、抗体、DNA、RNA等の生物材料の分子認識能を利用し、サンプル中の基質含有量を定量するセンサである。各種バイオセンサの中でも酵素を利用したセンサの実用化は進んでおり、例えば、基質中のグルコース、乳酸、コレステロール、アミノ酸等を測定することができる。

[0003] 例えば下記特許文献1には、電気絶縁性の基板と、前記絶縁性の基板上に形成された作用極および対極を有する電極系と、前記電極系上に設けられた試薬層とから構成され、前記試薬層は第1および第2の層を順次積層したものを主体とし、前記第1の層は親水性高分子と酵素と電子受容体を含むものであり、前記第2の層は非水溶性高分子と水溶性高分子を含むものであることを特徴とするバイオセンサが開示されている。

[0004] また、下記特許文献2には、血糖値測定用のバイオセンサとして、主に電気化学的な反応を利用して、例えばフェリシアン化カリウム等の試薬をメディエーターとし、血液中のグルコースとセンサ中に担持されたグルコースオキシダーゼ等の酵素とを反応させ、得られる電流値を計測することにより血糖値を求める手法が開示されている。

[0005] 一方、血液の粘性の指標としてヘマトクリット値が知られている。ヘマトクリット値は血液中に占める赤血球の容積の割合(%)であり、一般的に、健康な成人ではヘマトクリット値は40～50%である。一方、貧血患者はヘマトクリット値が下がり、15%を下回る状態になる場合もある。このようなヘマトクリット値の変動は、バイオセンサを用いた血液成分、とくにグ

ルコース濃度の定量に悪影響を及ぼすことが知られている。しかしながら、従来技術ではいずれも、ヘマトクリット値の変動に対処できず、血中グルコース濃度の測定精度に問題点があった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：日本国特開平6－213858号公報

特許文献2：日本国特表2005－512027号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] したがって本発明の目的は、ヘマトクリット値が変動しても、様々な血液成分、とくに血中グルコース濃度を精度よく測定可能なバイオセンサおよびその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は鋭意研究を重ねた結果、電気化学的な反応を利用したバイオセンサにおいて、電気絶縁性の基板上に形成された作用極および対極を有する電極系上に親水性高分子層を設け、前記親水性高分子層外に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層を設けることにより、上記のような従来の課題を解決できることを見出し、本発明を完成することができた。

[0009] すなわち本発明は、以下の通りである。

1. 試料中の血液成分を酸化還元酵素により酸化し、その反応生成物の酸化電流を電極で検出し、前記血液成分を測定するバイオセンサであって、

前記バイオセンサは、電気絶縁性の基板と、前記電気絶縁性の基板上に形成された作用極および対極を有する電極系と、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層とを有し、

前記電極系は金により形成され、

前記電極系上には親水性高分子層が設けられ、

前記親水性高分子層と前記酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層が分離して配置されていることを特徴とするバイオセンサ。

2. 前記親水性高分子層が、光架橋性ポリマーにより形成されてなることを特徴とする前記1に記載のバイオセンサ。

3. 前記光架橋性ポリマーがポリビニルアルコールを骨格とするポリマーであることを特徴とする前記2に記載のバイオセンサ。

4. 前記親水性高分子層上に前記試薬層が設けられている前記1～3のいずれか1項に記載のバイオセンサ。

5. 電気絶縁性の基板上に、作用極および対極を有する電極系と親水性高分子層とをこの順で設け、これとは別に、カバーフィルム上に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層を設け、前記親水性高分子層と前記試薬層とを向き合わせるようにして前記電気絶縁性の基板、前記電極系および前記カバーフィルムとを一体的に貼り合わせてなることを特徴とする前記1～4のいずれか1項に記載のバイオセンサ。

6. 前記血液成分が、グルコースであることを特徴とする前記1～5のいずれか1項に記載のバイオセンサ。

7. 電気絶縁性の基板上に、作用極および対極を有する電極系と親水性高分子層とをこの順で設ける第1工程と、

カバーフィルム上に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層を設ける第2工程と、

前記親水性高分子層と前記試薬層とを向き合わせるようにして前記電気絶縁性の基板、前記電極系および前記カバーフィルムとを一体的に貼り合わせる第3工程とを有することを特徴とする前記1～6のいずれか1項に記載のバイオセンサを製造する方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、電気化学的反応を利用して試料中の血液成分を測定するバイオセンサにおいて、電気絶縁性の基板上に金からなる作用極および対極を有する電極系と、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試

薬層とを有し、前記電極系上に設けられた親水性高分子層に前記酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが前記試料と接触した後に移行するように、前記親水性高分子層外に前記試薬層が設けられていることを特徴としている。

[0011] このように、電気化学的反応の迅速な検出が可能な金を電極として使用し、かつ、親水性高分子層外に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが配置されていることから、血液成分を含む試料が酸化還元酵素およびレドックスメディエーターの一部又は全部と共に親水性高分子層外で混合され親水性高分子層へ到達し、親水性高分子層が分子篩クロマトグラフィー様に機能し、赤血球や酸化還元酵素などの生体高分子成分が電極に到達する前に、グルコースのような血液成分を測定することができる。これにより、血液中のヘマトクリット値が変動しても、様々な血液成分を精度よく測定可能なバイオセンサおよびその製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本発明のバイオセンサの一例を示す分解斜視図である。

[図2]図2は、本発明のバイオセンサの一例を示す図1におけるB-B断面図である。

[図3]図3は、本発明に用いられる電極を説明するための平面図である。

[図4]図4(a)～(d)は、スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用する方法により、電極を製造する工程を示す図である。

[図5]図5(a)～(g)は、フォトリソグラフィーにより形成したマスクを使用する方法により、電極を製造する工程を示す図である。

[図6]図6(a)～(c)は、実験例1の結果を示す図である。

[図7]図7(a)～(d)は、実験例2の結果を示す図である。

[図8]図8(a)～(d)は、実験例2の結果を示す図である。

[図9]図9(a)～(d)は、実験例2の結果を示す図である。

[図10]図10(a)～(c)は、実験例3の結果を示す図である。

[図11]図11(a)～(c)は、実験例3の結果を示す図である。

[図12]図12(a)～(c)は、実験例3の結果を示す図である。

[図13]図13は、実験例4の結果を示す図である。

[図14]図14(a)～(c)は、実験例4の結果を示す図である。

[図15]図15(a)～(e)は、メタルマスクを使用する方法により、くし型電極を製造する工程を示す図である。

[図16]図16(a)～(d)は、リフトオフ法により、くし型電極を製造する工程を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明をさらに詳細に説明する。

[0014] 図1は、本発明のバイオセンサの一例を示す分解斜視図である（ただし、電極系上の親水性高分子層および試薬層は省略している）。図1において、バイオセンサ10は、血液成分を酸化還元酵素により酸化し、その反応による酸化電流を電極で検出し、血液成分を測定するものであって、具体的には、電気絶縁性の基板102上に作用極1042および対極1044からなる電極系104が形成されている。

[0015] さらにバイオセンサ10は、電気絶縁性の基板102上にスペーサー108およびカバーフィルム109が設けられ、これら部材は一体的に設けられている。また、スペーサー108は、切欠きが設けられ、キャビティCを形成している。

[0016] 血液成分の測定時は、1 μ l未満、例えば0.1～0.25 μ lの血液試料は吸引口Aから毛細管現象によりキャビティC内に導入され、電極系104と下記で説明する試薬層のある位置まで導かれる。そして、電極系104上での血液と試薬層内の試薬との反応により生じる電流値は、図示しないリード112、114を通じて、外部の測定装置によって読みとられる。

[0017] 本発明では、電極系104が金により形成されるとともに、電極上に形成された親水性高分子層と、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層とを有し、かつ、親水性高分子層に前記酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが前記試料と接触した後に移行するように、前記親水

性高分子層外に（分離して）前記試薬層が設けられていることを特徴としている。

[0018] 図2は、本発明のバイオセンサの一例を示す図1におけるB-B断面図である。

[0019] 前記のように本発明のバイオセンサ10は、電気絶縁性の基板102と、その上に形成された作用極1042および対極1044を有する電極系104とを有し、電極系104上には親水性高分子層202が設けられている。また、親水性高分子層202上には、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層204が設けられ、親水性高分子層202に試薬層204中の酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが血液などの試料と接触する前に移行しないようになっている。なお、符号Vは空気孔である。

[0020] 親水性高分子層202を形成するポリマーとしては、本発明の効果の観点、また製造の容易性の観点から、光架橋性ポリマーから形成されるのが好ましく、とくに下記の感光性樹脂組成物から形成されるのがさらに好ましい。

[0021] すなわち、上記形態で使用する感光性樹脂組成物は、水溶性高分子を主成分として含有しかつ感光性基を有する組成物であるが、感光性基を有する水溶性高分子を含有する組成物でもよく、水溶性光架橋剤、すなわち感光性基を有する化合物と、感光性基を有さない水溶性高分子とを含有する組成物でもよい。また、感光性基を有する水溶性高分子と感光性基を有さない水溶性高分子と水溶性光架橋剤とを含有する組成物でもよい。

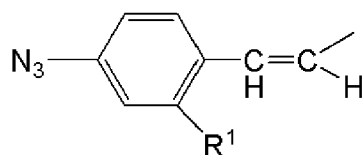
[0022] なお、水溶性高分子の含有率は、感光性樹脂組成物の固形分中70wt%以上であることが好ましく、85wt%以上であることが特に好ましい。

[0023] 親水性高分子層202を形成するための感光性樹脂組成物が有する感光性基は特に限定されず、感光性の基として公知のものでよいが、特にアジド基を有する感光性基が好ましい。

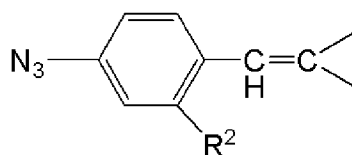
[0024] アジド基を有する感光性基は、下記(1)式または(2)式のいずれかの構造を有していることが特に好ましい。

[0025]

[化1]



(1)



(2)

[0026] なお、(1)式は1価の基を、(2)式は2価の基を示しており、式中 R^1 及び R^2 はそれぞれ水素原子、スルホン酸基またはスルホン酸塩基を示す。スルホン酸塩基は $-SO_3M$ で表されるが、Mとしては例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属等が挙げられる。また、感光性基は水溶性光架橋剤または水溶性高分子と直接結合していてもよく、アルキレンなどのスペーサーやアミド結合を介して結合していてもよい。

[0027] 水溶性高分子としては、感光性樹脂組成物の成分として公知のものを使用することができ、例えば、ポリ酢酸ビニルけん化物（ポリビニルアルコール）、ポリビニルピロリドン、ポリ（メタ）アクリルアミド−ダイアセトン（メタ）アクリルアミド共重合体、ポリN−ビニルホルムアミド、ポリN−ビニルアセトアミドなどが挙げられる。これらのうち、ポリ酢酸ビニルけん化物を好適に使用することができる。ポリ酢酸ビニルけん化物の重合度とけん化度は特に限定されないが、平均重合度200〜5000、けん化度60〜100%のものが好適に使用することができる。平均重合度が200より小さい場合には、十分な感度が得られ難く、また、平均重合度が5000より大きい場合には、感光性樹脂組成物の粘度が高くなり、塗布性が悪くなるという不具合が発生し易く、さらに、粘度を下げるために濃度を低くすると、所望の塗布膜厚を得るのが困難となる。また、けん化度が60%より小さいと十分な水溶性および水現像性が得られ難い。

[0028] 感光性基を有する水溶性高分子を得るには、例えば感光性基を持つ化合物（感光基ユニット）を水溶性高分子と反応させればよい。水溶性高分子に感光性基を導入するための感光性基を持つ化合物としては、例えば、3−（4−アジドフェニル）−N−（4,4′−ジメトキシブチル）−2−フェニルカルボニルアミノ−プロパー−2−エンアミド）、2−（3−（4−アジドフ

エニル) プロパー 2-エノイルアミノ) -N-(4,4'-ジメトキシブチル) -3-(3-ピリジル) プロパー 2-エンアミド)、3-(4-アジドフェニル) -N-(4,4'-ジメトキシブチル) -2-[(3-ピリジル) カルボニルアミノ] -プロパー 2-エンアミドなどの特開 2003-292477 号公報などに記載される感光基ユニットや、3-(2-ジメトキシブチル) -(4-アジドベンジリデン-2-スルホン酸ナトリウム) ロダニン、3-(2-ジメトキシエチル) -(4-アジドベンジリデン-2-スルホン酸ナトリウム) ロダニンなどの特許第 3163036 号明細書などに記載される感光基ユニットなどが挙げられる。

[0029] 水溶性光架橋剤としては、感光性基をもつものであれば特に限定されないが、上述のように、アジド基を感光性基として有することが好ましい。例えば、4,4'-ジアジドスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、4,4'-ジアジドベンザルアセトフェノン-2-スルホン酸、4,4'-ジアジドスチルベン- α -カルボン酸およびこれらのアルカリ金属塩、アンモニウム塩、有機アミン塩などが挙げられる。

[0030] また、感光性樹脂組成物は溶液状態とすることが好ましい。感光性樹脂組成物の溶媒としては、組成物に含有される成分を溶解可能であれば特に限定されないが、水または水と相溶性のある有機溶媒との混合溶液を使用することができる。水と相溶性のある有機溶媒の、非限定的な例として、アセトンなどのケトン類、メタノールなどの低級アルコール類、アセトニトリル、テトラヒドロフランなどが挙げられる。なお、固形分濃度は 10 wt % 以下であることが好ましい。

[0031] さらに、感光性樹脂組成物にその光硬化性を損なわない範囲で添加物を混合することもできる。

[0032] 塗布された感光性樹脂組成物の厚みは塗布可能であれば特に限定されないが、好適な膜厚は 50 μm ~ 300 μm である。膜厚が 50 μm 未満では、ヘマトクリットの影響の抑制が不十分となる場合があり、300 μm を超えると、信号強度が低下してしまう場合がある。

- [0033] 塗布された感光性樹脂組成物は、必要に応じて加熱処理を行ってもよい。加熱処理は任意であり特に条件はないが、通常は30～150℃で1分～10時間程度、好ましくは35℃～120℃で3分～1時間程度である。
- [0034] 露光する際の光源は、使用する感光性基を感光可能な光源であれば特に限定されない。例えば、光源としてX線、電子線、エキシマレーザー（F₂、ArF、KrFレーザーなど）および高圧水銀灯を使用することができる。これらの光源のうち、感光効率のよい波長を適宜選択できる。露光エネルギーは感光性基の構造、使用する光源のエネルギーに応じて適宜設定できる。通常0.1mJ/cm²～10J/cm²であり、1mJ/cm²～1J/cm²程度が好ましい。
- [0035] 露光後は、必要に応じて加熱後、水による洗浄を行ってもよい。加熱処理は任意であり特に条件はないが、通常は30～150℃で1分～10時間程度、好ましくは35～120℃で3分～1時間程度である。
- [0036] 試薬層204は、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む。酸化還元酵素およびレドックスメディエーターは、測定すべき血液成分の種類により適宜選択すればよいが、例えば酸化還元酵素としては、グルコースオキシターゼ、ラクテートオキシターゼ、コレステロールオキシターゼ、コレステロールエステラーゼ、ウリカーゼ、アスコルビン酸オキシターゼ、ビリルビンオキシターゼ、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、ラクテートデヒドロゲナーゼ等が挙げられる。レドックスメディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノンまたはその誘導体、フェナジンメトルサルフェート、メチレンブルー、フェロセンまたはその誘導体等が挙げられる。
- [0037] 本発明のバイオセンサは、血液中のグルコース濃度を測定するのにとくに好ましい。
- [0038] 試薬層204を、親水性高分子層202に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが血液などの試料と接触する前に移行しないように設けるには、例えば次のような方法がある。

- [0039] まず、電気絶縁性の基板 102 上に、作用極 1042 および対極 1044 を有する電極系 104 を設ける。電極系 104 の形成方法は公知の手段の中から適宜選択することができる。さらに電極系 104 上に前記のようにして親水性高分子層 202 を形成する。なお、親水性高分子層 202 は形成後に乾燥することが好ましい。
- [0040] これとは別に、カバーフィルム 109 上に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層 204 を、公知の塗布または印刷手段により設ける。なお、試薬層 204 は形成後に乾燥することが好ましい。
- [0041] 続いて、電極系 104 と試薬層 204 とが向き合おうようにして絶縁性の基板 102、電極系 104 およびカバーフィルム 109 とを一体的に貼り合わせる。
- [0042] このような工程を経てバイオセンサ 10 を製造することにより、親水性高分子層 202 外に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターが配置されていることから、血液成分を含む試料が酸化還元酵素およびレドックスメディエーターの一部又は全部と共に親水性高分子層外で混合され親水性高分子層へ到達し、親水性高分子層が分子篩クロマトグラフィー様に機能し、赤血球や酸化還元酵素などの生体高分子成分が電極に到達する前に、グルコースのような血液成分を測定することができる。これにより、血液中のヘマトクリットが変動しても、様々な血液成分を精度よく測定可能となる。
- [0043] また、本発明の電極系 104 は、一つの作用極 1042 と一つの対極 1044 で構成されているが、複数の作用極と複数の対極からなる電極から構成されてもよい。
- [0044] 図 3 は、本発明に用いられる電極を説明するための平面図である。図 3 において、電極 104' は、作用極 1042 および対極 1044 がそれぞれ平板型形状として形成され、これら作用極 1042 および対極 1044 が隣接して配置された形状を有する。
- [0045] 本発明に用いられる電極 104' は、例えば次の方法により形成することができる。

[0046] (1) スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用する方法

図4は、スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用する方法により、電極104'を製造する工程を示す図である。

[0047] まず、絶縁性基板を準備し[図4(a)]、電極を構成する貴金属をスパッタリング、真空蒸着、めっき等の手段により、絶縁性基板上に貴金属の膜を形成する[図4(b)]。

次に、前記電極膜上にスクリーン印刷法を適用してレジストを平板型形状に印刷し[図4(c)]、エッチングを行なう[図4(d)]。

最後に、レジストを剥離液等により除去することにより、電極が完成する[図4(e)]。

[0048] (2) フォトリソグラフィーにより形成したマスクを使用する方法

図5は、フォトリソグラフィーにより形成したマスクを使用する方法により、くし型電極104'を製造する工程を示す図である。

まず、電気絶縁性の基板を準備し[図5(a)]、電極を構成する貴金属をスパッタリング、真空蒸着、めっき等の手段により、電気絶縁性の基板上に貴金属の膜を形成する[図5(b)]。

次に、前記貴金属の膜上にスピコート、スプレー塗布、スクリーン印刷、ドライフィルム貼付等の手段を適用してレジストを塗布または貼付し[図5(c)]、フォトマスクを介して露光を行なう[図5(d)]。

続いて、電極を形成する部分以外のレジストおよび貴金属の膜をエッチングする[図5(e)および(f)]。

最後に、電極を形成する部分のレジストを剥離液等により除去することにより、電極が完成する[図5(g)]。

[0049] (3) メタルマスクを使用する方法

図15は、メタルマスクを使用する方法により、くし型電極104'を製造する工程を示す図である。

まず、電気絶縁性の基板を準備し[図15(a)]、基板の上に作製したい電極パターンを抜いたテンプレート(メタルマスクと呼ぶ)[図15(b)]

)]を重ね[図15(c)]、電極を構成する貴金属をスパッタリング、真空蒸着、めっき等の手段により処理して電極を形成し[図15(d)]、電気絶縁性の基板の上に貴金属の膜を形成する。

続いて、メタルマスクを除去することにより、電極が完成する[図15(d)]。

[0050] (4) リフトオフ法

図16は、リフトオフ法により、くし型電極104'を製造する工程を示す図である。

まず、絶縁性基板を準備し[図16(a)]、スクリーン印刷法を適用して、電極を形成しない部分にレジストを平板型形状に印刷[図16(b)]、乾燥させる。

次に、レジストを印刷した基板に、電極を構成する貴金属をスパッタリング、真空蒸着、めっきなどの手段により、貴金属の膜を形成する[図16(c)]。

最後に、レジストを剥離液等で除去することにより、レジストとレジスト上に形成された貴金属の膜が除去され、電極が完成する[図16(d)]。

[0051] 複数の作用極と複数の対極の電極系の場合は、所望の形状を精度よく形成できるという観点から、前記(2)のフォトリソグラフィーにより形成したマスクを使用する方法を採用するのが好ましい。

[0052] なお、絶縁性基板102、スペーサー108およびカバーフィルム109を形成するための材料としては、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリエステルアミド、ポリエーテル、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ- p -フェニレンスルフィド、ポリエーテルエステル、ポリ塩化ビニル、ポリ(メタ)アクリル酸エステル等が挙げられる。中でも、ポリエステル、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレン2,6-ナフタレート、ポリブチレンテレフタレート等からなるフィルムが好ましい。

実施例

[0053] 以下、本発明を実施例および比較例によりさらに説明するが、本発明は下記例に制限されない。

[0054] 実験例 1. AWP 濃度の検討

[方法]

スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用し作成した金電極 104 に、

(1) アジド系感光基をポリビニルアルコールにペンダントした化合物とポリ酢酸ビニルけん化物を含む水溶性感光性樹脂組成物（東洋合成株式会社製、製品名：BIOSURFINE-AWP、以下 AWP という）0.5% 水溶液、1 ml

(2) AWP 1% 水溶液、1 ml

(3) AWP 2% 水溶液、1 ml を塗布し、37℃で45分乾燥させ、 $60\text{ mJ}/\text{cm}^2$ の UV (352 nm) 照射 (CHIBI LIGHT model-1 で 30 sec) を行い、シリカゲル入りの箱に入れ室温で保存した。フェリシアン化カリウム 100 mM、グルコース脱水素酵素（以下 GDH）2 unit/ml、100 mM リン酸カリウム緩衝液（以下 PPB という）(pH 7.5)、洗浄した各種ヘマトクリット値（以下 Ht という）の馬赤血球（Ht 0、Ht 20、Ht 40）、 $100\text{ mg}/\text{dL}$ のグルコースの溶液を混合し、(1)～(3)の金電極、または何も載せていない金電極に添加し5秒間閉回路0 mV印加後、各サンプリングタイムで閉回路+200 mV印加し、電流値を測定した。

[0055] [結果]

図6(a)～(c)にHt 40を100%の電流値としたときの各ヘマトクリット値におけるサンプリングタイム1, 5, 20秒の電流値をプロットしたものを示す。AWPの場合は電流値が大幅に低下する(1 secの値で1/10前後)。ヘマトクリットの影響においてはかなりの効果があり、AWPによってヘマトクリットの影響をかなり排除できていることが分かった。AWP濃度は0.5%～2%の範囲ではあまり違いがなかったが0.5%

はややばらつきが大きいことと、塗りやすさを考え１％がよいと分かった。

[0056] 実験例 2

[方法]

スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用し作成した金電極 104 に、AWP 1 % 水溶液、1 ml を塗布し 37℃ で 45 分乾燥させ、 $60 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の UV (352 nm) 照射 (CHIBI LIGHT model-1 で 30 sec) を行い、シリカゲル入りの箱に入れ室温で保存した。これに、フェリシアン化カリウム 100 mM、GDH 1 unit/ml、100 mM PPB (pH 7.5)、洗浄した馬赤血球 HtO, 20, 40, 55 + グルコース 20、100、400、800 mg/dL を添加し、5 秒間閉回路 0 mV 印加後、各サンプリングタイムで閉回路 + 200 mV 印加し、電流値を測定した。

[0057] [結果]

図 7 (a) ~ (d)、図 8 (a) ~ (d) および図 9 (a) ~ (d) に Ht 40 を 100 % としたときの各ヘマトクリット値におけるサンプリングタイム 1, 5, 20 秒の電流値をプロットしたものを示す。グルコースのどの濃度においても AWP の効果はあり、AWP が無いものと比較するとヘマトクリットの影響は少なくなっていた。

[0058] 実験例 3

[方法]

1. スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用し作成した金電極 104 に、(4) AWP 0.5 % 水溶液 + グルコース脱水素酵素 (以下 GDH) を 0.8 ml 復水時に 2 unit/ml となる量、1 ml (5) AWP 1 % 水溶液 + GDH を 0.8 ml 復水時に 2 unit/ml となる量、1 ml (6) AWP 2 % 水溶液 + GDH を 0.8 ml 復水時に 2 unit/ml となる量、1 ml を塗布し、37℃ で 45 分乾燥させ、 $60 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の UV (352 nm) 照射 (CHIBI LIGHT model-1 で 30 sec) を行い、シリカゲル入りの箱に入れ室温で保存した。フェリシアン化カリ

ウム100mM、GDH 2 unit/ml、100mM PPB (pH 7.5)、洗浄した馬赤血球Ht 0、Ht 20、Ht 40、100mg/dLのグルコースの溶液 (GDHについては、すでに電極上に載せてあるセンサーに対しては除いた溶液) を混合し、(4) ~ (6) の金電極、何も載せていない金電極に添加し5秒間閉回路0mV印加、30秒間閉回路+200mV印加し、電流値を測定した。

[0059] 2. スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用し作成した金電極104に、AWP 1%水溶液、1mlを塗布し37℃で45分乾燥させ、60mJ/cm³のUV (352nm) 照射 (CHIBI LIGHT model-1で30sec) を行った後、フェリシアン化カリウム200mM、GDH 2 unit/ml、100mM PPB (pH 7.5)、ルーセントライトSWN0.3%、50mM Sucroseを0.8mlで復水した時にそれぞれの濃度になるように調製したものを1ml、AWPを塗布した電極またはコントロールとして塗布していない電極上に塗布し、37℃で10分、50℃で5分乾燥させたものを、シリカゲル入りの箱に入れ室温で保存した。これに、洗浄した馬赤血球Ht 0、20、40、60+グルコース100mg/dLを添加し、5秒間閉回路0mV印加後、各サンプリングタイムで閉回路+200mV印加し、電流値を測定した。

[0060] 3. スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用し作成した金電極104に、AWP 1%水溶液、1mlを塗布し37℃で45分乾燥させ、60mJ/cm³のUV (352nm) 照射 (CHIBI LIGHT model-1で30sec) を行った後、フェリシアン化カリウム200mM、GDH 2 unit/ml、100mM PPB (pH 7.5)、ルーセントライトSWN0.3%、50mM Sucroseを0.8mlで復水した時にそれぞれの濃度になるように調製したものを1ml、キャピラリーシール上に塗布し、37℃で10分、50℃で5分乾燥させたものを、AWP塗布金電極または塗布していない金電極の電極面にキャピラリーシールへの試薬塗布面が対向するように貼り、シリカゲル入りの箱に入れ室温で保存した。こ

れに、洗浄した馬赤血球Ht 0、20、40、60+グルコース100mg / dLを添加し、5秒間閉回路0mV印加後、各サンプリングタイムで閉回路+200mV印加し、電流値を測定した。

[0061] [結果]

1. 図10(a)～(c)にAWPにGDHを混合し塗布した場合のHt 40を100%の電流値としたときの各ヘマトクリット値におけるサンプリングタイム1, 5, 20秒の電流値を示す。実施例1の結果と比較し全体を通して、ヘマトクリットの影響は、AWPのみ塗布した場合、ほとんどヘマトクリットの影響が見られなかったが、GDHを混合塗布した場合はヘマトクリットの影響が見られていたため、GDH 1.6 unit / mlとAWPの固定可能量を超えた、かなり過剰量が入っているため、赤血球がアクセスする隙間を作っている可能性がある。

[0062] 2. 図11(a)～(c)にHt 40を100%の電流値としたときの各ヘマトクリット値におけるサンプリングタイム1, 5, 20秒の電流値をプロットしたものを示す。AWP膜上に試薬を塗布乾燥すると、膜の状態が悪くなるようで、AWPなしよりかなり影響が大きく見えてしまった。

[0063] 3. 図12(a)～(c)にHt 40を100%の電流値としたときの各ヘマトクリット値におけるサンプリングタイム1, 5, 20秒の電流値をプロットしたものを示す。先の2.のAWP膜上に試薬を塗布した場合はヘマトクリットの影響をより受けるようになってしまっていたが、キャピラリーシールに塗布する方法であれば、測定が可能であり、ヘマトクリットの影響を受けにくくする効果がみられることが分かった。

[0064] 実験例4

[方法]

スクリーン印刷により形成した印刷マスクを使用し作成した金電極104に、AWP 1%水溶液、1mlを塗布し37℃で45分乾燥させ、60mJ / cm²のUV (352nm) 照射 (CHIBI LIGHT model-1で30sec) を行った後、フェリシアン化カリウム200mM、GDH

2 unit/ml、100 mM PPB (pH 7.5)、ルーセントライト SWN 0.3%、50 mM Sucrose を 0.8 ml で復水した時にそれぞれの濃度になるように調製したものを 1 ml、キャピラリーシール上に塗布し、37℃で10分、50℃で5分乾燥させたものを、AWP 塗布金電極の電極面にキャピラリーシールへの試薬塗布面が対向するように貼り、シリカゲル入りの箱に入れ室温で保存した。これに、種々の濃度のグルコース溶液を添加し、5秒間閉回路 0 mV 印加後、各サンプリングタイムで閉回路 +200 mV 印加し、電流値を測定した。

[0065] [結果]

図13に電流値のタイムコース、図14(a)～(c)にサンプリングタイム1, 5, 20秒の電流値の結果を示す。グルコース高濃度ではばらつきが少し大きい、800 mg/dLまで直線性があった。AWPを電極側に塗布し、酵素、メディエーター等の試薬をキャピラリー側に塗布することで測定が可能だった。

[0066] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、2013年1月17日付で出願された日本特許出願（特願2013-006560）に基づいており、その全体が引用により援用される。

符号の説明

- [0067] 10 バイオセンサ
102 絶縁性基板
104 電極系
1042 作用極
1044 対極
108 スペーサー
109 カバーフィルム
202 親水性高分子層

204 試薬層

A 吸引口

C キャビティ

V 空気孔

請求の範囲

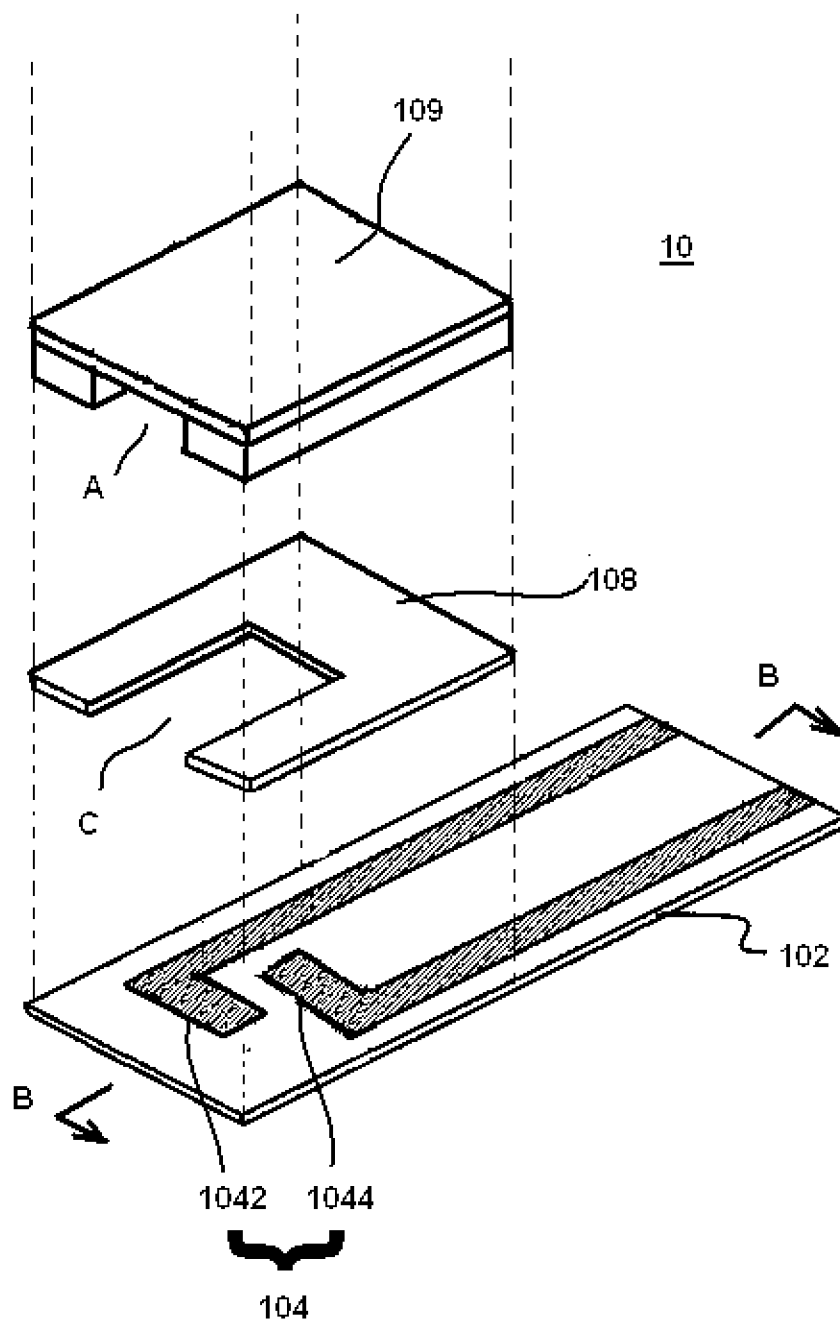
- [請求項1] 試料中の血液成分を酸化還元酵素により酸化し、その反応生成物の酸化電流を電極で検出し、前記血液成分を測定するバイオセンサであって、
- 前記バイオセンサは、電気絶縁性の基板と、前記電気絶縁性の基板上に形成された作用極および対極を有する電極系と、酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層とを有し、
- 前記電極系は金により形成され、
- 前記電極系上には親水性高分子層が設けられ、
- 前記親水性高分子層と前記酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層が分離して配置されていることを特徴とするバイオセンサ。
- [請求項2] 前記親水性高分子層が、光架橋性ポリマーにより形成されてなることを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。
- [請求項3] 前記光架橋性ポリマーがポリビニルアルコールを骨格とするポリマーであることを特徴とする請求項2に記載のバイオセンサ。
- [請求項4] 前記親水性高分子層上に前記試薬層が設けられている請求項1～3のいずれか1項に記載のバイオセンサ。
- [請求項5] 電気絶縁性の基板上に、作用極および対極を有する電極系と親水性高分子層とをこの順で設け、これとは別に、カバーフィルム上に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層を設け、前記親水性高分子層と前記試薬層とを向き合わせるようにして前記電気絶縁性の基板、前記電極系および前記カバーフィルムとを一体的に貼り合わせてなることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のバイオセンサ。
- [請求項6] 前記血液成分が、グルコースであることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のバイオセンサ。
- [請求項7] 電気絶縁性の基板上に、作用極および対極を有する電極系と親水性

高分子層とをこの順で設ける第1工程と、

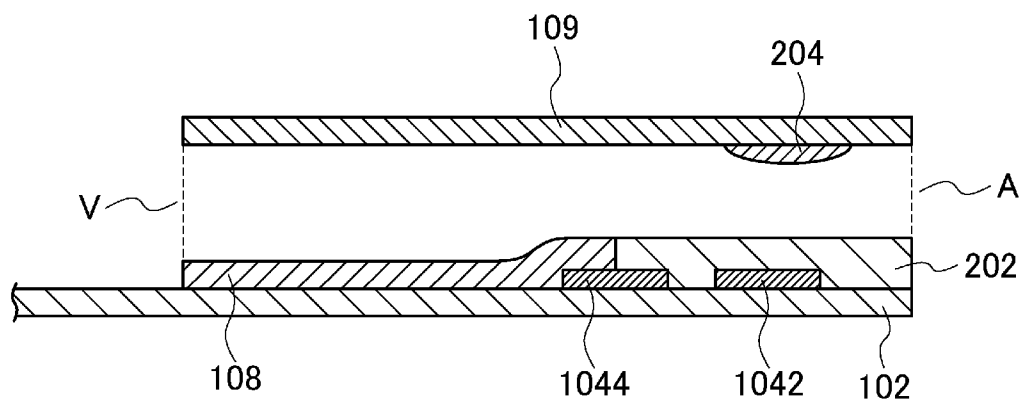
カバーフィルム上に酸化還元酵素およびレドックスメディエーターを含む試薬層を設ける第2工程と、

前記親水性高分子層と前記試薬層とを向き合わせるようにして前記電気絶縁性の基板、前記電極系および前記カバーフィルムとを一体的に貼り合わせる第3工程とを有することを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載のバイオセンサを製造する方法。

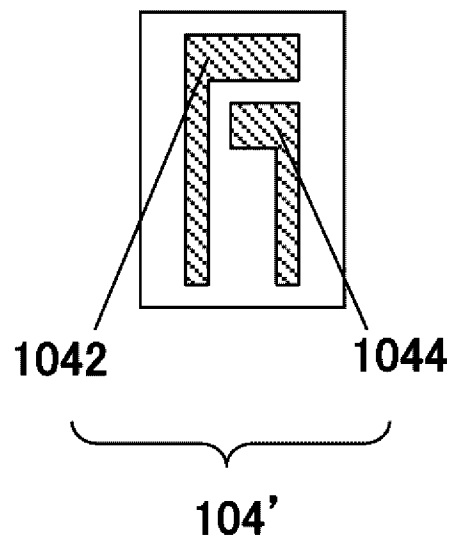
[図1]



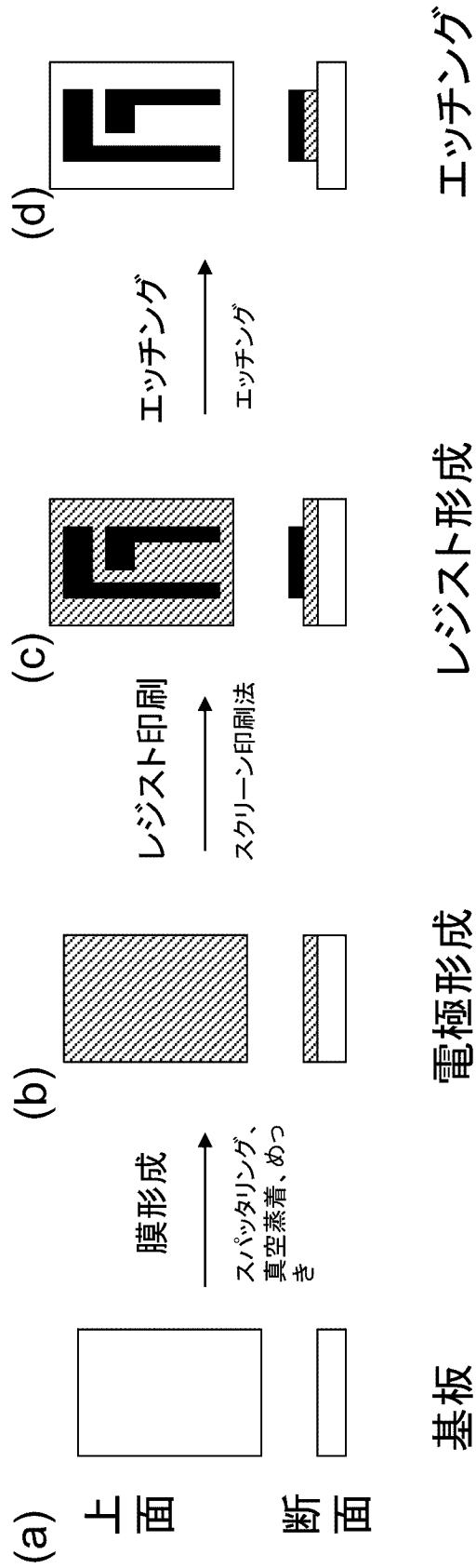
[図2]



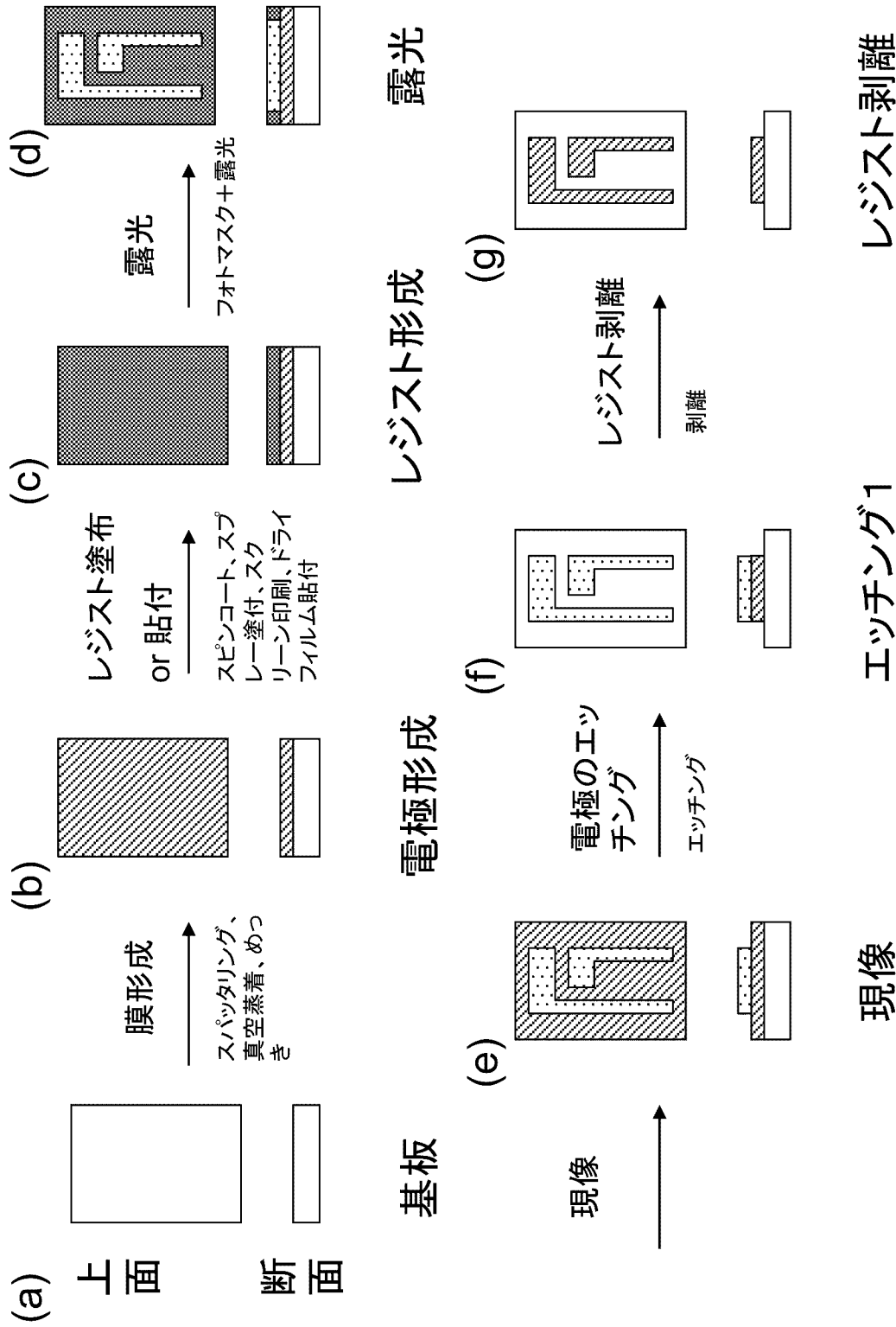
[図3]



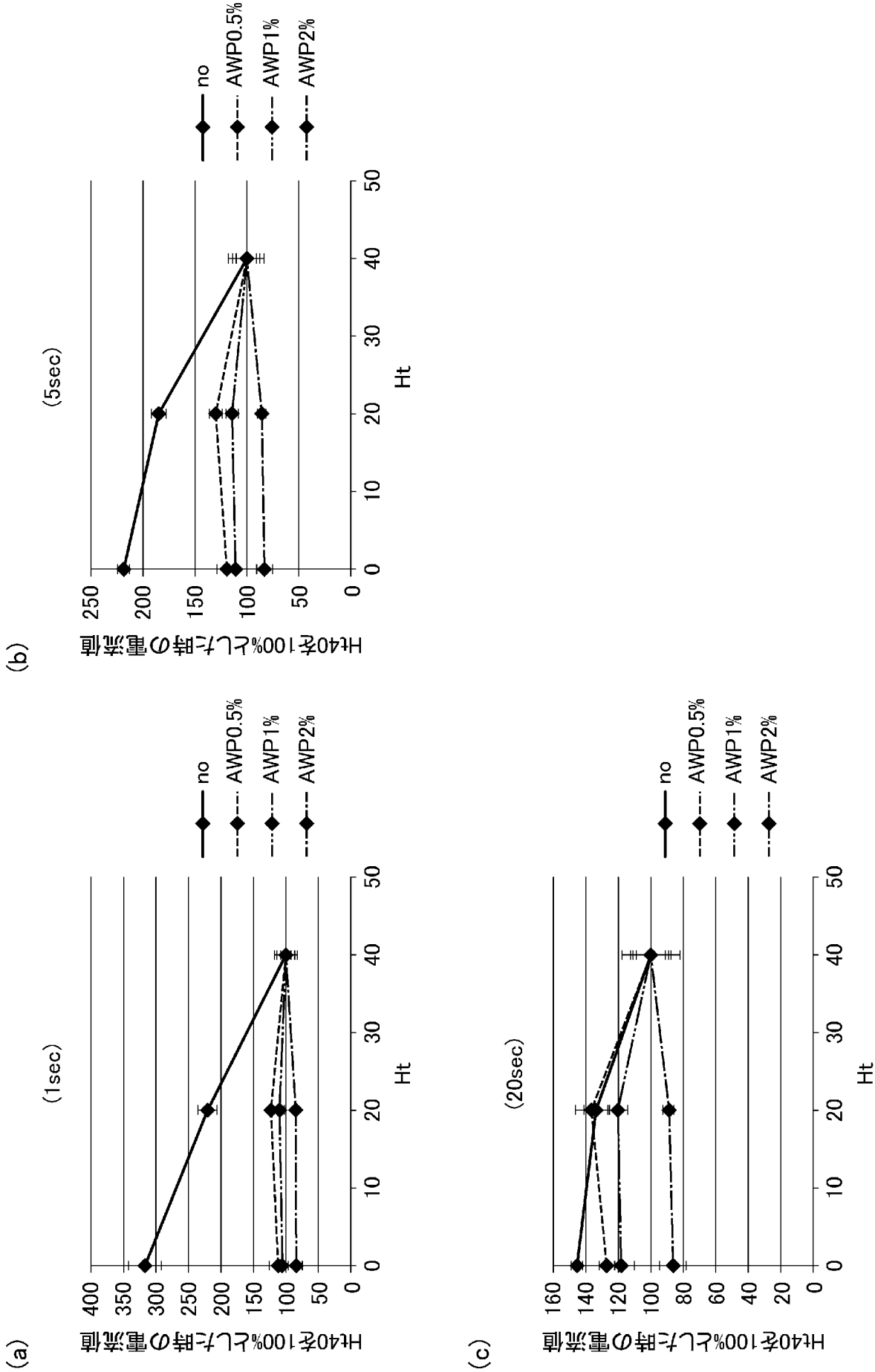
[図4]



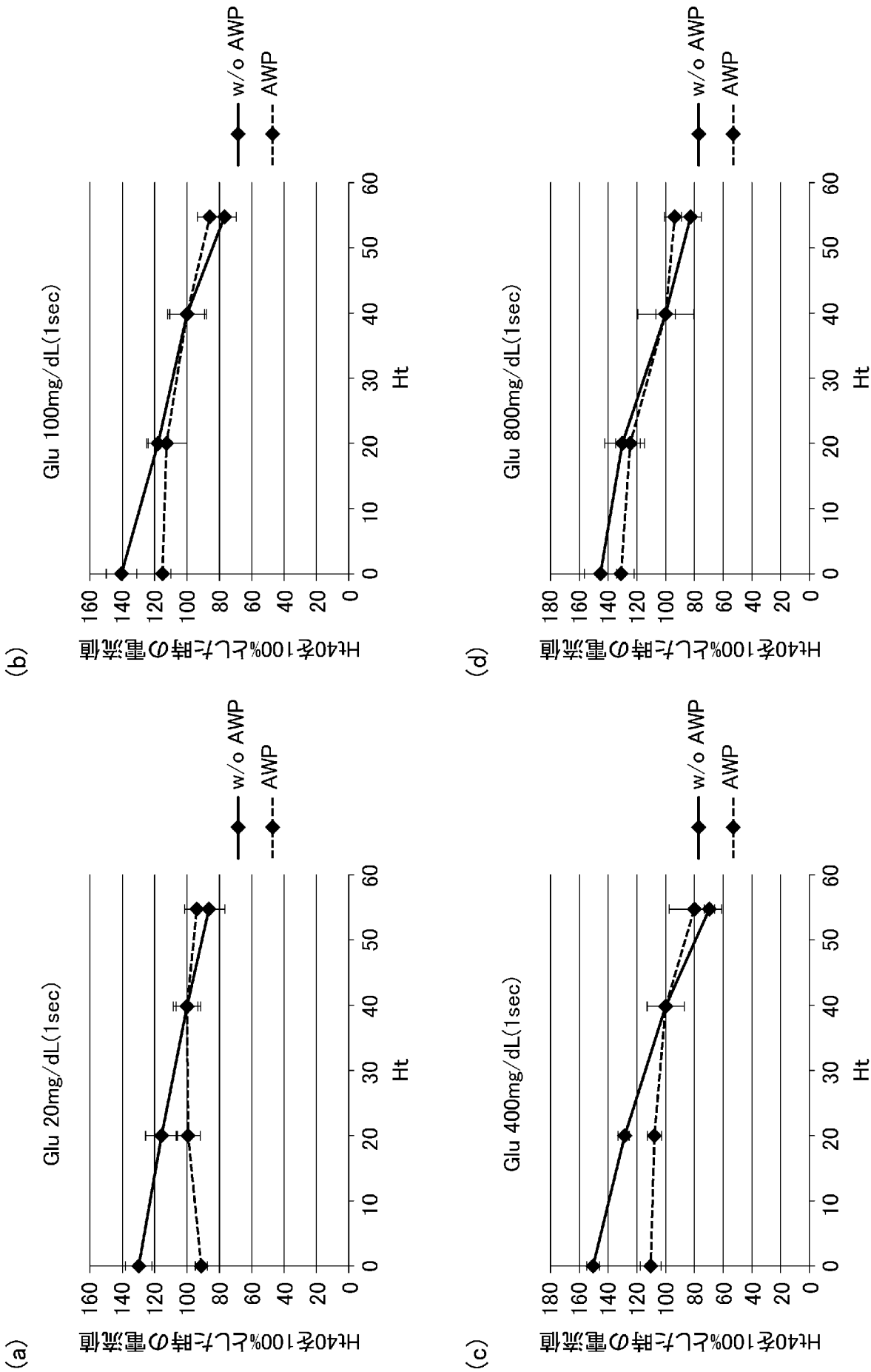
[図5]



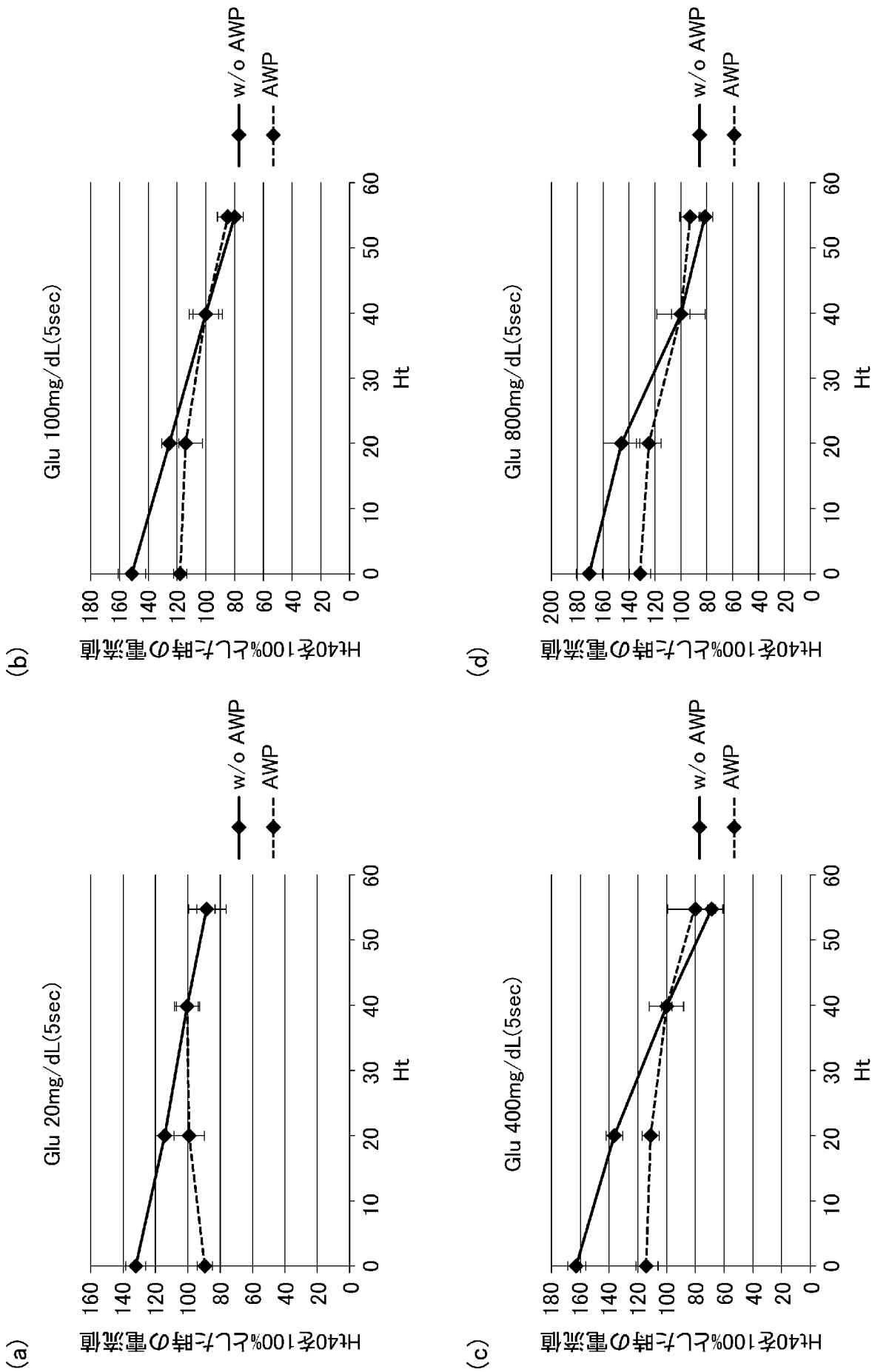
[図6]



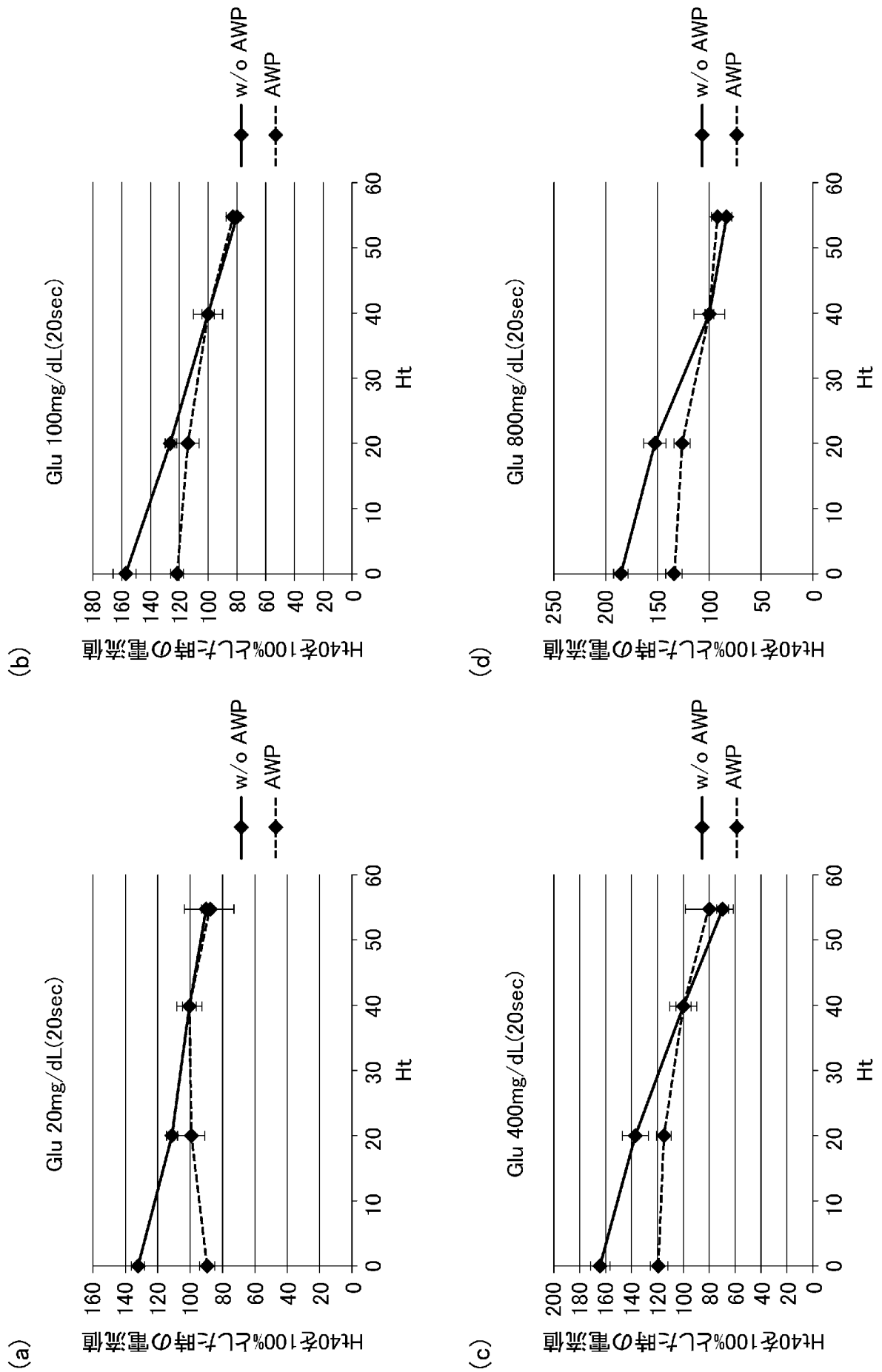
[図7]



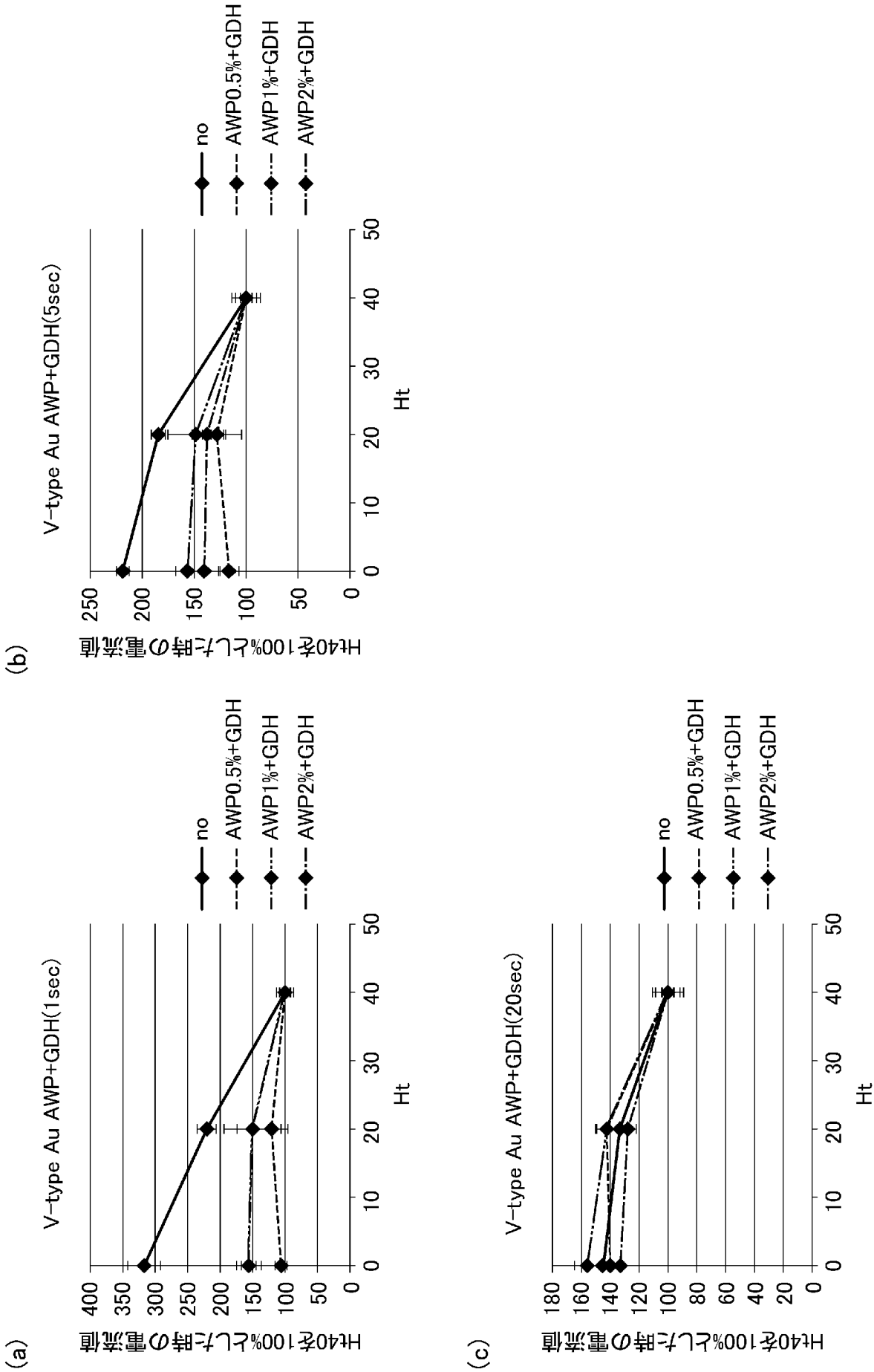
[図8]



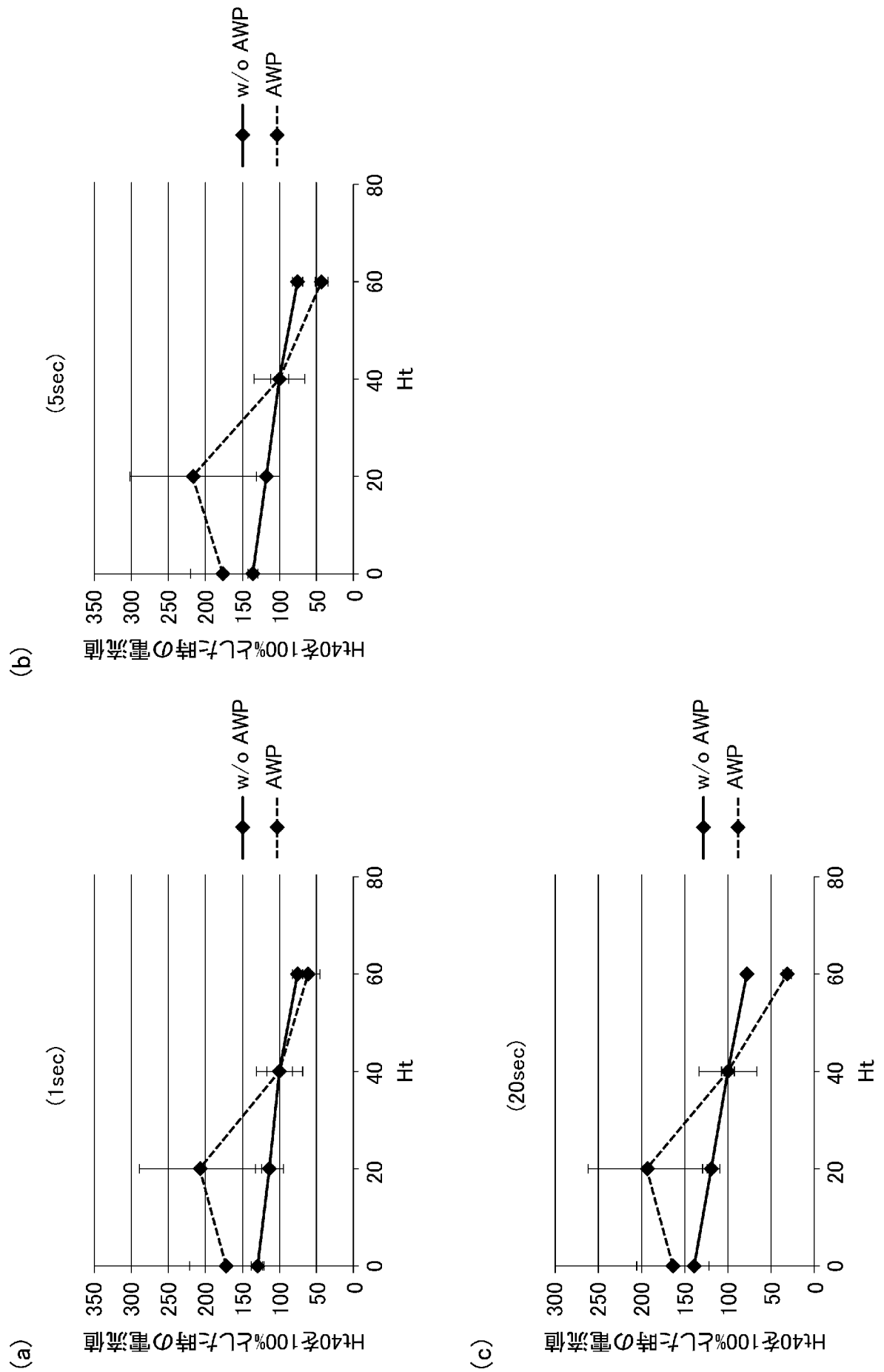
[図9]



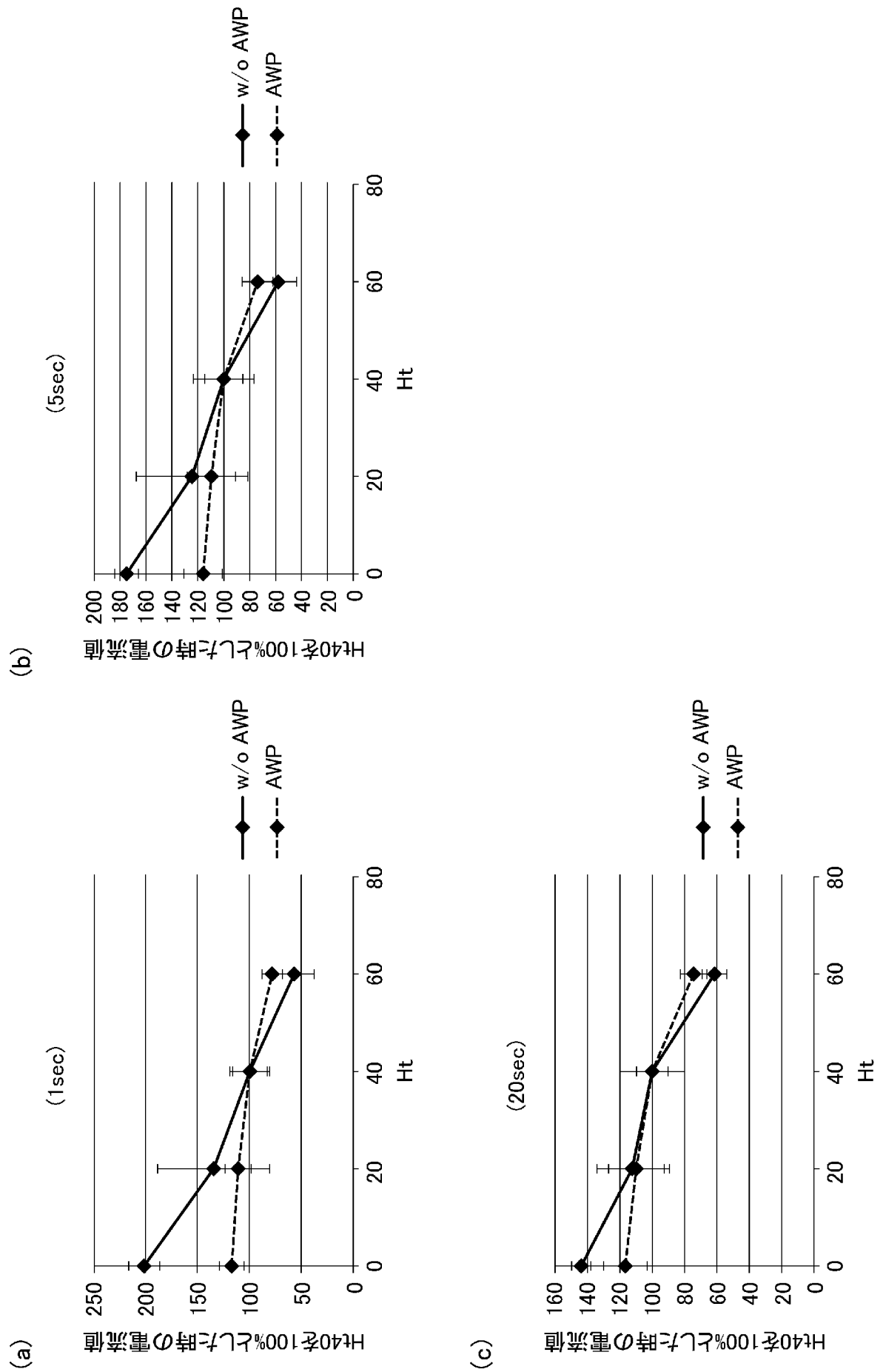
[図10]



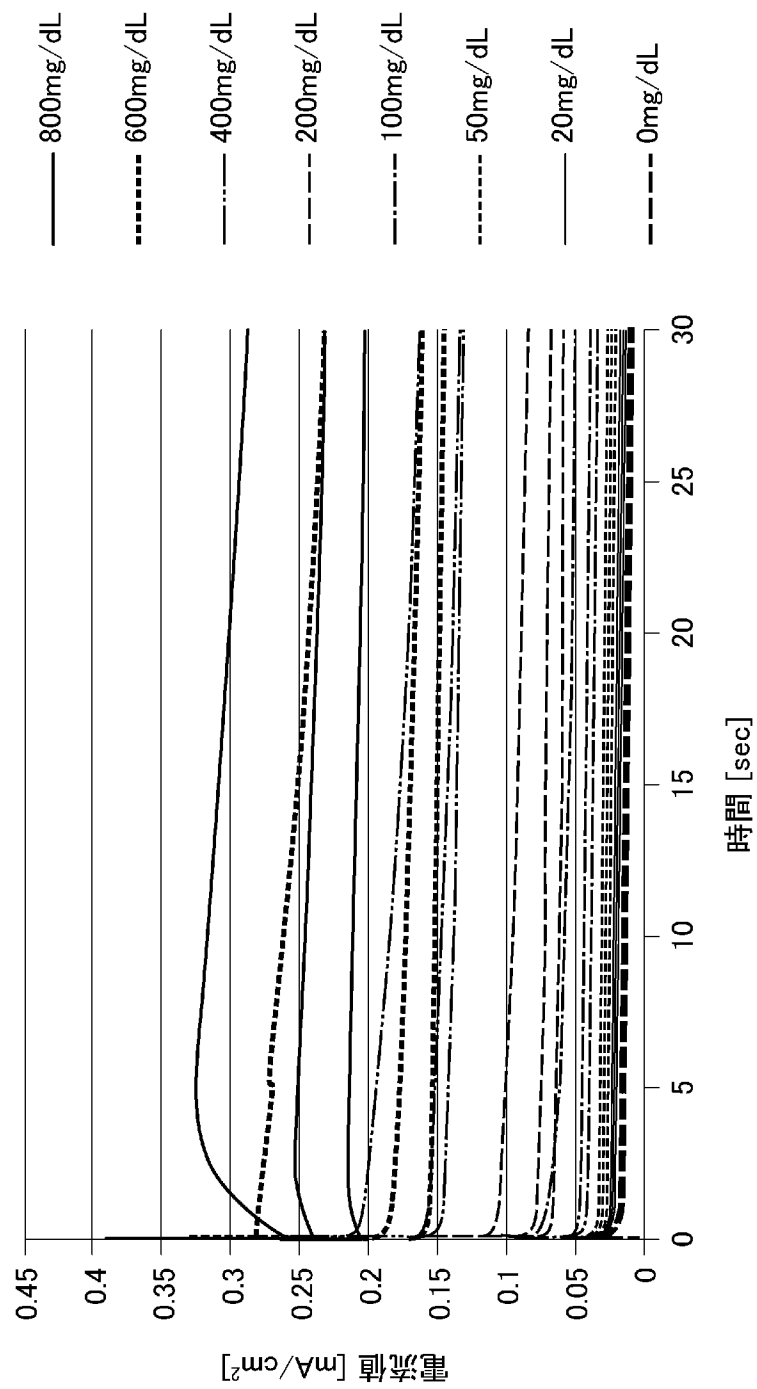
[図11]



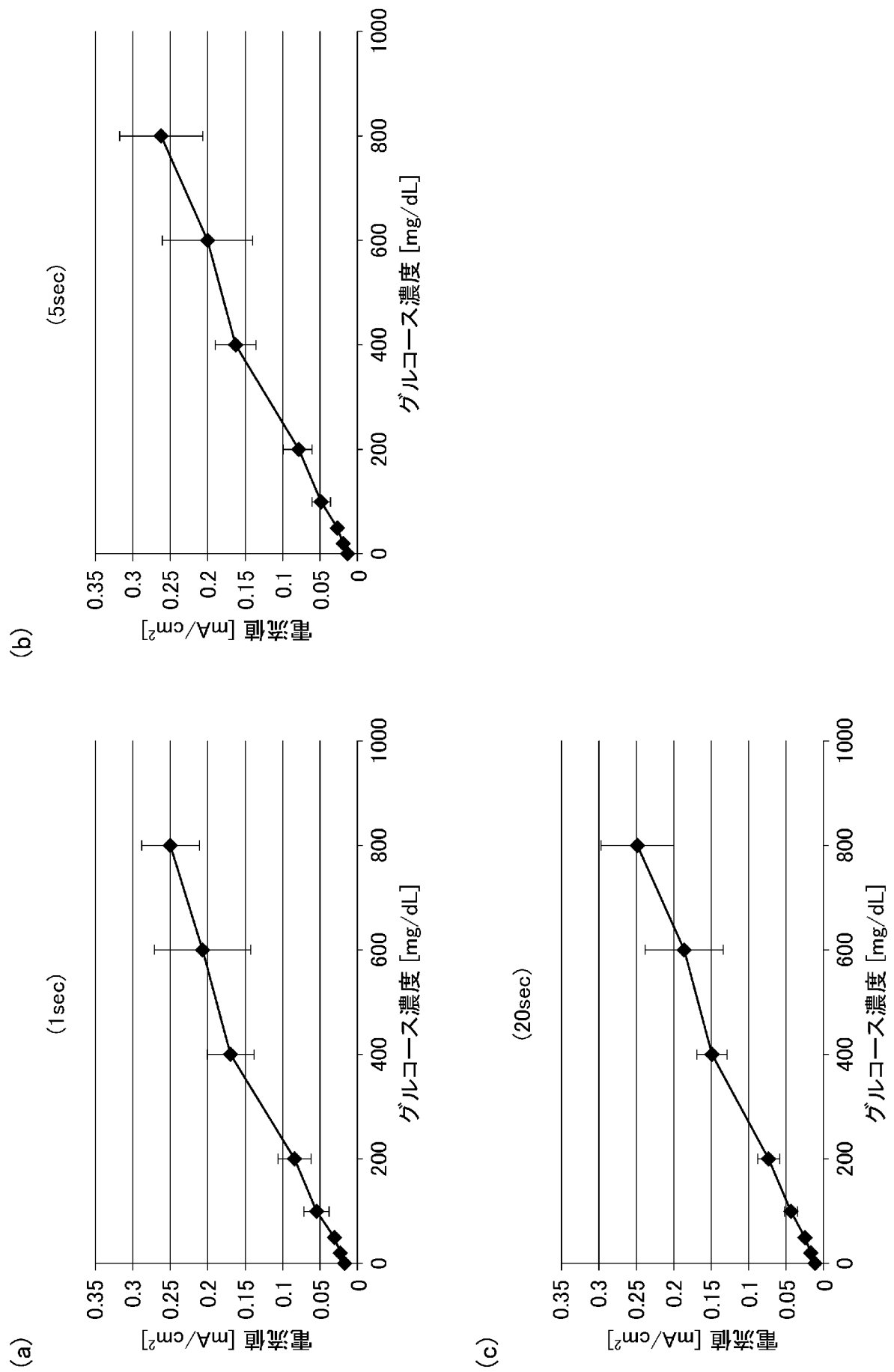
[図12]



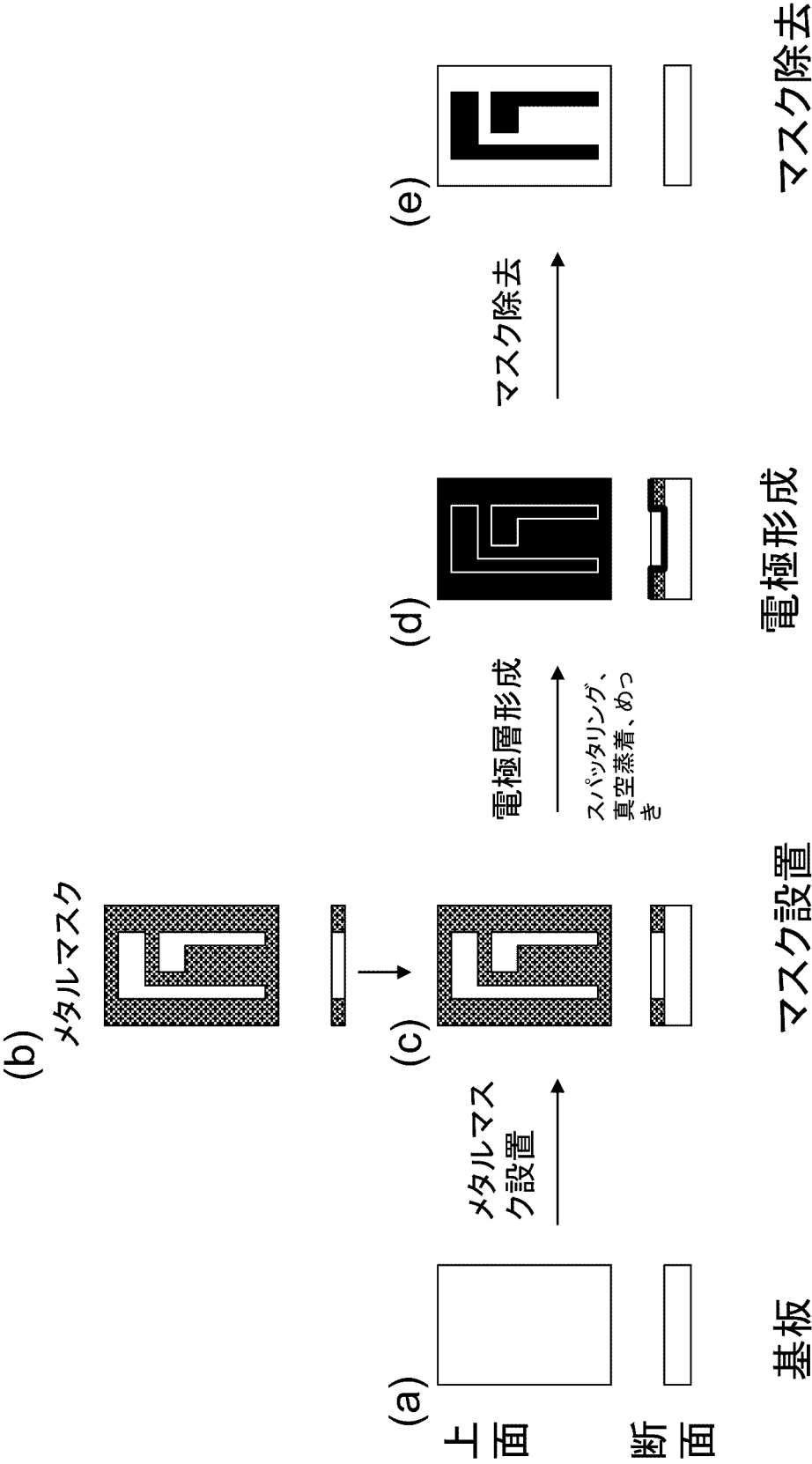
[図13]



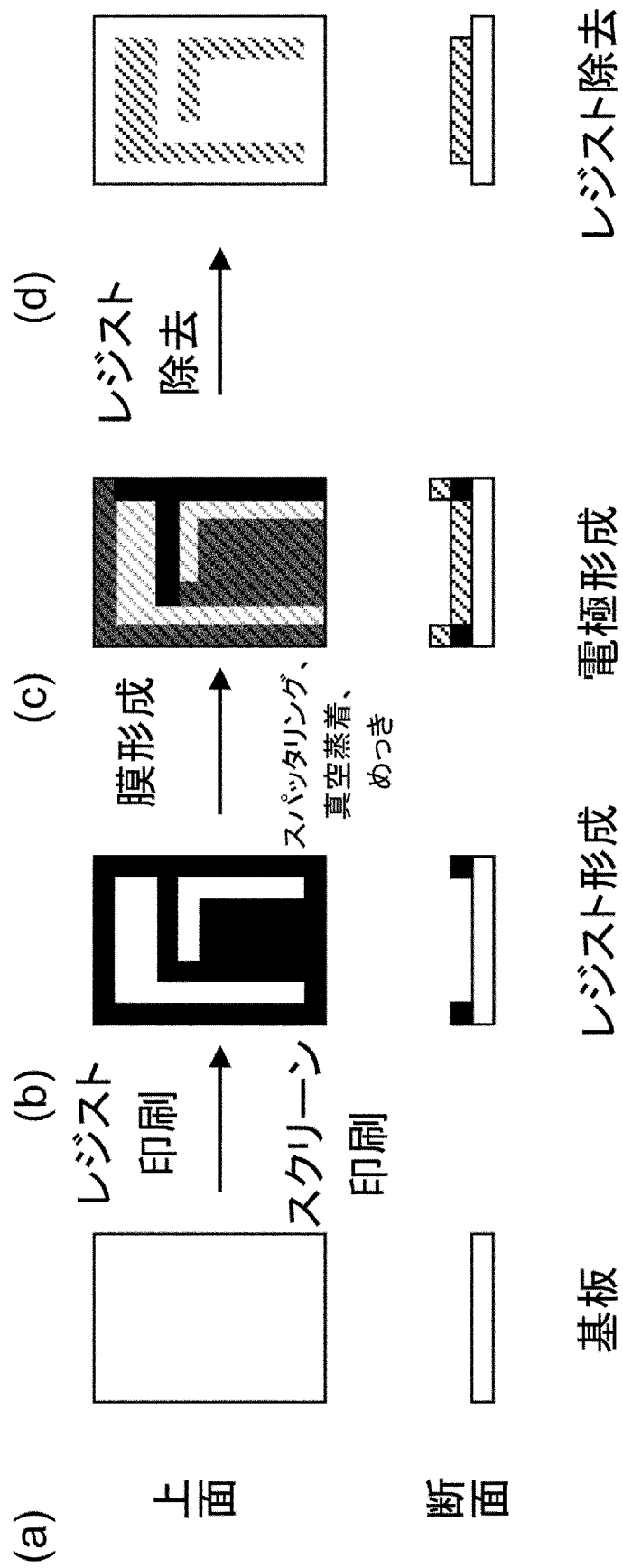
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/050723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

G01N27/327, G01N27/416

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-270197 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 25 September 2003 (25.09.2003), paragraphs [0007] to [0017]; fig. 1 to 3 (Family: none)	1-7
Y	JP 2002-357583 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 13 December 2002 (13.12.2002), paragraphs [0012], [0013] (Family: none)	1-7
Y	JP 2011-214839 A (CCI Corp.), 27 October 2011 (27.10.2011), paragraphs [0046], [0098] (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
08 April, 2014 (08.04.14)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2014 (22.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

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

Int.Cl. G01N27/327, 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	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014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）

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
Y	JP 2003-270197 A（松下電器産業株式会社）2003.09.25, 【0007】－【0017】、第1－3図（ファミリーなし）	1－7
Y	JP 2002-357583 A（松下電器産業株式会社）2002.12.13, 【0012】、【0013】（ファミリーなし）	1－7
Y	JP 2011-214839 A（シーシーアイ株式会社）2011.10.27, 【0046】、【0098】（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

「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

「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 08.04.2014	国際調査報告の発送日 22.04.2014		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A/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	2 J	9 2 1 8
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252		