

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年1月4日(04.01.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/005174 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 27/327 (2006.01) G01N 27/30 (2006.01)  
A61B 5/1473 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01)  
A61B 5/1486 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/024307
- (22) 国際出願日: 2023年6月30日(30.06.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-107217 2022年7月1日(01.07.2022) JP
- (71) 出願人: P H C ホールディングス株式会社 (PHC HOLDINGS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058433 東京都港区西新橋 2-38-5 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 羽田 圭吾 (HANEDA Keigo). 林野直(HAYASHINO Nao).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 丸の内北口ビル 21階 大野総合法律事務所 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: REAGENT LAYER INCLUDING CONDUCTIVE CARBON FILLER, SENSOR HAVING REAGENT LAYER, AND METHOD FOR FORMING REAGENT LAYER

(54) 発明の名称: 導電性炭素フィラーを含む試薬層、当該試薬層を有するセンサ、および当該試薬層の形成方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a reagent layer for preparing an electrochemical sensor which can detect an analyte with high sensitivity and/or is excellent in durability and preferable for measurement (continuous monitoring) over a long period; and a method for forming same. The reagent layer according to the present invention comprises a conductive carbon filler (a), an anionic dispersant (b), and a cationic mediator (c). The method for forming the reagent layer according to the present invention involves: (1) a step for preparing a reagent liquid including (a) a conductive carbon filler, (b) an anionic dispersant, and (c) a cationic mediator; (2) a step for applying the reagent liquid to a reagent layer forming part; and (3) a step for drying the applied reagent liquid to form a reagent layer.

(57) 要約: 本発明は、アナライトを高感度で検出することのできる、かつ/または、長期間にわたる測定(連続モニタリング)にとって好適な耐久性に優れている、電気化学センサを作製するための試薬層およびその形成方法を提供することを課題とする。本発明による試薬層は、導電性炭素フィラー(a)と、アニオン性分散剤(b)と、カチオン性メディエータ(c)とを含む。本発明による試薬層の形成方法は、(1)導電性炭素フィラー(a)と、アニオン性分散剤(b)と、カチオン性メディエータ(c)とを含む試薬液を調製する工程、(2)前記試薬液を試薬層形成部位にアプライする工程、及び(3)アプライされた前記試薬液を乾燥させて、試薬層を形成する工程、を含む。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

## 明 細 書

発明の名称：

導電性炭素フィラーを含む試薬層、当該試薬層を有するセンサ、および当該試薬層の形成方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、導電性炭素フィラーを含む試薬層およびセンサに関する。より詳しくは、本発明は、導電性炭素フィラーの水系溶媒への分散性を向上させるための剤としての導電性炭素フィラー分散剤、当該分散剤、導電性炭素フィラーおよびカチオン性メディエータを含む試薬層、当該試薬層を備えたセンサ、および当該試薬層の形成方法に関する。

### 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、例えば、グルコース酸化還元酵素と、必要に応じてレドックスメディエータ（電子伝達を仲介する酸化還元物質）や、レドックスポリマー（リンカー等を介してレドックスメディエータを結合させたポリマー）などを用いて作製される、グルコースセンサが挙げられる。グルコースセンサは、例えば、血糖値の自己検査のために用いられており、従来は微量の血液を採取して試料とするものが一般的であったが、近年では、生体内に埋め込んで血液中または間質中のグルコースを連続的に測定する、埋め込み型の電気化学式グルコースセンサも開発されている。また、グルコースセンサは、生体物質外の試料、例えば培地中のグルコースを測定するためにも用いられている。このようなグルコースセンサは、一般的には数日～数週間といった長時間、連続的又は半連続的に試料中のグルコース濃度の測定を行う。

[0003] このような電気化学式グルコースセンサに代表されるグルコースセンサや、バイオ燃料電池に用いられている電極には、近年、電極比表面積の向上による高感度化や高出力化を実現する観点から、ナノカーボン材料等の高比表

面積の導電性炭素フィラーが用いられている。例えば、特許文献1には、ヒドロキシプロピルセルロースを用いたカーボンブラック分散液で作製したセンサが開示されており、特許文献2には、バインダーとしてのエチルセルロースと、カーボン粒子とを用いた酵素固定化電極が開示されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0004] 特許文献1：特開2021-082394号公報

特許文献2：WO2013/065581号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0005] 一般的に、導電性炭素フィラーおよびレドックスメディエータまたはレドックスポリマーを含み、必要に応じて酸化還元酵素等をさらに含む試薬層を、作用極（酵素電極）などに形成するためには、水系溶媒中にそれらの必要な成分を分散させた試薬液を調製し、その試薬液を所望の部位にアプライし、乾燥させることが行われている。しかしながら、導電性炭素フィラーは、一般的に疎水性が強いため水系溶媒への分散が難しく、また、ファンデルワールス力により凝集が起きやすいため、分散状態を保持するのは困難である。導電性炭素フィラーが十分に分散していない試薬液を用いて試薬層を形成した場合は、アナライトの検出感度が著しく低下したり、生体内や培地内のような湿潤環境中での長期間にわたる測定（連続モニタリング）において、耐久性に劣ったりする問題が起きる。なお、酸化還元酵素は水系溶媒に溶解させることが適切であり、試薬液を調製するための溶媒として有機溶剤を用いることは適切でない。

[0006] 本発明は、一側面において、アナライトを高感度で検出することのできる電気化学センサを作製するための試薬層およびその形成方法を提供することを課題とする。本発明は、別の側面において、長期間にわたる測定（連続モニタリング）にとって好適な、耐久性に優れた電気化学センサを作製するた

めの試薬層およびその形成方法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、導電性炭素フィラーおよびカチオン性のレドックスメディエータまたはレドックスポリマー（カチオン性メディエータ）と、アニオン性分散剤とを用いて、好ましくは特定の条件で調製した試薬液中では、導電性カーボン粒子の凝集や沈澱が生じず、分散状態が良好なものとなること、そのような試薬液を用いて形成された試薬層は、電極上へ密接にカチオン性メディエータを吸着させることができるため、電気化学センサはアナライトの検出感度が向上し、また連続モニタリングにとっての耐久性に優れたものとなることなどを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は少なくとも下記の事項を包含する。

#### [項1]

導電性炭素フィラー（a）と、アニオン性分散剤（b）と、カチオン性メディエータ（c）とを含む試薬層。

#### [項2]

前記アニオン性分散剤（b）が、重量平均分子量が70000以下のポリマーである、項1に記載の試薬層。

#### [項3]

前記アニオン性分散剤（b）が、側鎖にカルボキシ基および／またはスルホ基を有するポリマーである、項1に記載の試薬層。

#### [項4]

前記アニオン性分散剤（b）が、アクリル酸由来ユニット、マレイン酸由来ユニット、およびスチレンスルホン酸由来ユニットからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むポリマーである、項3に記載の試薬層。

#### [項5]

前記カチオン性メディエータ（c）が、レドックスメディエータ化合物（c1）とカチオン性ポリマー（c2）とが、必要に応じてリンカー部（c3）を介して、結合している化合物である、項1に記載の試薬層。

## [項 6]

前記カチオン性ポリマー（c 2）が、第四級アンモニウムカチオン基を有する、項 5 に記載の試薬層。

## [項 7]

前記導電性炭素フィラー（a）が、カーボンブラックである、項 1 に記載の試薬層。

## [項 8]

アナライトを酸化または還元する酸化還元酵素（e）をさらに含む、項 1 に記載の試薬層。

## [項 9]

前記酸化還元酵素（e）が、補酵素結合型のものである、項 8 に記載の試薬層。

## [項 10]

前記酸化還元酵素（e）が、前記カチオン性ポリマー（c 2）と架橋されている、項 8 に記載の試薬層。

## [項 11]

アナライトを検出又は定量する電気化学センサであって、作用極、対極、および項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の試薬層を有する、電気化学センサ。

## [項 12]

さらに参照極を有する、項 11 に記載の電気化学センサ。

## [項 13]

さらに、少なくとも前記試薬層を被覆する保護膜を有する、項 11 に記載の電気化学センサ。

## [項 14]

（1）導電性炭素フィラー（a）と、アニオン性分散剤（b）と、カチオン性メディエータ（c）とを含む試薬液を調製する工程、

（2）前記試薬液を試薬層形成部位にアプライする工程、及び

(3) アプライされた前記試薬液を乾燥させて、試薬層を形成する工程、を含む、試薬層の形成方法。

[項 15]

前記試薬液の pH が 8.0 以下である、項 14 に記載の試薬層の形成方法。

[項 16]

前記試薬液中の金属イオンの濃度が 200 mM 以下である、項 15 に記載の試薬層の形成方法。

[項 17]

前記試薬液中の前記金属イオンがアルカリ金属イオンであり、その濃度が 100 mM 未満である、項 16 に記載の試薬層の形成方法。

[項 18]

前記アニオン性分散剤 (b) が、重量平均分子量が 70000 以下の、アクリル酸由来ユニット、マレイン酸由来ユニット、およびスチレンスルホン酸由来ユニットからなる群より選ばれる少なくとも 1 つを含むポリマーである、項 14 に記載の試薬層の形成方法。

[項 19]

前記カチオン性メディエータ (c) が、レドックスメディエータ化合物 (c1) と、第四級アンモニウムカチオン基を有するカチオン性ポリマー (c2) とが、必要に応じてリンカー部 (c3) を介して、結合している化合物である、項 14 に記載の試薬層の形成方法。

## 発明の効果

[0009] 本発明により、水系溶媒を含む試薬液中で導電性炭素フィラーを良好に分散させることができるようになる。また、そのような導電性炭素フィラーが分散した試薬液（カーボン分散液）を用いることにより、導電性炭素フィラーを含みながらも高感度化や耐久性（例えば、湿潤環境中での測定において、その測定期間中応答性を維持する性能）の向上を実現した、実用性に優れた電気化学センサを作製することが可能となる。

[0010] なお、本発明において、試薬液中で導電性カーボン材料が「分散」（「再分散」を含む。）しているか、「凝集」（「凝集／沈澱」を含む。）しているかは、大半が目視で判別可能である。例えば、導電性カーボン材料が「凝集」している場合は、浮遊または沈澱している凝集塊を容易に目視で確認することができる。

[0011] 導電性炭素フィラーの分散および凝集を判別する際には、遠心分離処理を利用することもできる。例えば、導電性炭素フィラーが「分散」している試薬液を遠心分離した場合は、導電性炭素フィラーの沈澱は生じないのに対し、導電性炭素フィラーが「凝集」している試薬液を遠心分離した場合は、凝集塊が沈澱し、導電性炭素フィラーの層と透明な水溶液相に分離する。遠心分離の処理条件は、例えば、 $10,000 \times g$ 、5分間とすることができるが、実施形態に応じて、例えば導電性炭素フィラーの種類およびその濃度を考慮して、適宜調節することもできる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本発明の一実施形態におけるセンサの平面図である。図1（A）はセンサ全体を示し、図1（B）はセンサの先端部分を拡大して示す。

[図2]図2は、図1（B）の特定の部分における、センサの断面図である。図2（A）は、図1（B）のAA矢視断面図である。図2（B）は、図1（B）のBB矢視断面図である。図2（C）は、図1（B）のCC矢視断面図である。

[図3]図3は、本発明の一実施形態におけるセンサの表側（作用極及び参照極を有する側）の別の一例を示す上面図である。

[図4]図4は、図3におけるA-A'切断線における断面図である。

[図5]図5は、図4におけるB-B'切断線における断面図である。

[図6]図6は、図4におけるC-C'切断線における断面図である。

[図7]図7は、本発明の一実施形態におけるセンサの平面図である。図7（A）はフィルム（絶縁性レジスト膜）が形成される前の電極パターンを示し、図7（B）は、フィルムが形成された後の電極パターンを示す。

[図8]図8は、試験例1において調製された各種の試薬液サンプルに由来し、カーボンブラックの分散化効果を反映している、回収液サンプルの画像である。[A] 試薬液サンプル1-1~1-8にそれぞれ対応する回収液サンプル。[B] 試薬液サンプル1-9~1-11にそれぞれ対応する回収液サンプル。

[図9]図9は、試験例6におけるセンサの応答性に関する測定結果を示す。[A] 電流応答値の結果。[B] サイクリックボルタンメトリーの結果。

[図10]図10は、試験例7におけるセンサの耐久性に関する測定結果を示す。[A] ポリ(アクリル酸)を用いて作製されたセンサの結果。[B] ヒドロキシプロピルセルロースを用いて作製されたセンサの結果。

### 符号の説明

- [0013] 1 1 センサ (プローブ)
- 2 1 基板
- 2 2 電極
- 2 2 a 作用極
- 2 2 b 参照極
- 2 2 c 対極
- 2 3 試薬層
- 2 4 銀/塩化銀層
- 2 5 フィルム
- X 1 センサ頭部
- X 2 センサの生体への挿入方向
- X 3 対極の、フィルムで被覆されていない領域
- X 4 センサ頭部の、フィルムで被覆されていない領域
- X 5 試薬層が形成されていない領域
- X 6 試薬層および電極 (作用極) が形成されていない (トリミングされている) 領域
- 1 0 1 センサ

- 1 1 1 絶縁性基板
- 1 1 2 導電性薄膜
  - 1 1 2 a 作用極領域
  - 1 1 2 b 参照極領域
  - 1 1 2 c 対極領域
- 1 1 3 溝
- 1 1 4 作用極
- 1 1 5 参照極
- 1 1 6 a 絶縁性レジスト膜（上面）
- 1 1 6 b 絶縁性レジスト膜（下面）
- 1 1 7 対極
- 1 1 8 試薬層
- 1 1 9 保護膜
- 1 2 1 センシング部
- 1 2 2 端子部
- 2 0 1 センサ
- 2 0 2 センシング部
- 2 0 3 端子部
- 2 0 4 切り欠き部
- 2 1 0 基板
- 2 2 0 電極
  - 2 2 1 第1の作用極
    - 2 2 1 a 第1の作用極のセンシング部における露出領域
    - 2 2 1 b 第1の作用極の端子部における露出領域
  - 2 2 2 第2の作用極
    - 2 2 2 a 第2の作用極のセンシング部における露出領域
    - 2 2 2 b 第2の作用極の端子部における露出領域
  - 2 2 3 参照極

2 2 3 a 参照極のセンシング部における露出領域

2 2 3 b 参照極の端子部における露出領域

2 2 4 対極

2 2 4 a 対極のセンシング部における露出領域

2 2 4 b 対極の端子部における露出領域

2 2 5 溝

2 3 0 フィルム（絶縁性レジスト膜）

### 発明を実施するための形態

[0014] — 試薬層 —

本発明の試薬層は、導電性炭素フィラー（a）と、アニオン性分散剤（b）と、カチオン性メディエータ（c）とを含む。本発明の試薬層は、後述するようなカーボン分散液、すなわち導電性炭素フィラー（a）が分散された状態にある試薬液を使用する形成方法により形成することができる層であり、好ましくは導電性炭素フィラー（a）、アニオン性分散剤（b）およびカチオン性メディエータ（c）が均一な状態にある層である。

[0015] （a）導電性炭素フィラー

本発明における「導電性炭素フィラー」は特定の種類に限定されるものではなく、本発明の実施形態（試薬層、電気化学センサの用途等）、作用効果等を考慮して、様々な導電性炭素フィラーを用いることができる。導電性炭素フィラーとしては、球状（粒子状）、鱗片状、繊維状、多孔質状等の様々な形状の導電性カーボン材料を用いることができる。導電性炭素フィラー（a）は、いずれか1種類のみを用いてもよいし、2種類以上を併用しても（例えば混合して用いても）よい。

[0016] 導電性炭素フィラーとしては、例えば、カーボンブラック、黒鉛粉、多孔質炭素材料、ナノカーボン材料等が挙げられる。カーボンブラックの具体例としては、ファーネスブラック、サーマルブラック、アセチレンブラック、ケッチェンブラック、チャンネルブラックが挙げられる。黒鉛粉の具体例としては、熱分解黒鉛、球状黒鉛が挙げられる。多孔質炭素材料の具体例とし

ては、2～50 nmのメソ孔を有する活性炭粉末または活性炭素繊維だけでなく、メソ孔がつながった連通孔を有する炭素材料も挙げられる。ナノカーボン材料の具体例としては、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ、グラフェン、フラーレン、カーボンナノホーン、カーボンナノコイルが挙げられる。導電性炭素フィラー（a）のサイズは適切な範囲にあればよい。例えば、導電性炭素フィラーが球状（粒子状）である場合、その平均粒子径（例えば、電子顕微鏡により所定の数の粒子について測定した平均値）は、一般的に10 nm～20 μmの範囲にある。導電性炭素フィラーのBET比表面積は、例えば10 m<sup>2</sup>/g以上であり、好ましくは30 m<sup>2</sup>/g以上である。本発明における導電性炭素フィラー（a）は、好ましくは球状（粒子状）の炭素フィラー、例えばカーボンブラックである。

[0017] （b）アニオン性分散剤

本発明において「アニオン性分散剤」とは、試薬液中で導電性炭素フィラー（a）を分散させるための本質的な機能を有する化合物であって、かつ分子全体の正味の電荷として負に荷電している（アニオン性である）化合物を指す。アニオン性分散剤（b）は、いずれか1種を単独で用いてもよいし、2種以上を併用しても（例えば混合して用いても）よい。

[0018] ただし、「アニオン性界面活性剤」および「アニオン性多糖類」は、本発明におけるアニオン性分散剤（b）には該当しない。アニオン性界面活性剤としては、例えば、メチルナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物塩（例：メチルナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物ナトリウム塩、製品名「デモールMS」（花王））、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物塩（例：β-ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物ナトリウム塩、製品名「デモールN」（花王））、アルキレンマレイン酸共重合体塩（例：ジイソブチレン・無水マレイン酸共重合体ナトリウム塩、製品名「デモールEP」（花王））、ドデシル硫酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムが挙げられる。アニオン性多糖類としては、例えば、カルボキシメチルセルロース等のアニオン性セルロース誘導体、カルボキシメチル化グアーガ

ム等のアニオン性グアーガム類、キサンタンガム類が挙げられる。このようなアニオン性界面活性剤またはアニオン性多糖類は、本発明のアニオン性分散剤（b）としては用いられない。

[0019] 本発明の特定の実施形態における電気化学センサは、センサ（作用極）に形成された試薬層を被覆する保護膜を有する。このような実施形態では、保護膜外（生体内、培地中等）にアニオン性分散剤（b）が流出することを防止するために、保護膜を形成した後に、そのセンサ（作用極）をあらかじめ水系溶媒に浸すことで、アニオン性分散剤（b）を試薬層から溶出させて除去してもよい。このような処理において、保護膜の有する孔のサイズと分子量の関係によっては、例えば導電性炭素フィラー（a）と結合したアニオン性分散剤（b）は、試薬層から溶出（保護膜外への溶出）されない／され難いが、導電性炭素フィラー（a）と結合していないアニオン性分散剤（b）は、試薬層から溶出（保護膜外への溶出）されることになる。なお、この処理における水系溶媒としては、後述する本発明の試薬層の形成方法で使用される、試薬液を調製するための水系溶媒と同様のものを用いることができる。

[0020] 例えば、試薬液中で導電性炭素フィラー（a）を分散させるための本質的な機能を有するポリマーであって、かつポリマー全体の正味の電荷として負に荷電している（アニオン性である）「アニオン性ポリマー」（アニオン性界面活性剤およびアニオン性多糖類に該当するものを除く。）は、本発明におけるアニオン性分散剤（b）として用いることができる。アニオン性ポリマーは、直鎖状、分岐鎖状、櫛状、いずれの「鎖状の構造」であってもよく、その「鎖状の構造」は、環式化合物（芳香族炭化水素環、非芳香族炭化水素環、芳香族ヘテロ環、非芳香族ヘテロ環等）から誘導される環構造を一つまたは複数含んでいてもよい。アニオン性ポリマーの主鎖（鎖状の構造中、ポリマー長が相対的に長い部分）および側鎖（鎖状の構造中、ポリマー長が相対的に短い部分）は、一般的に炭素原子を主体とし、窒素原子、酸素原子および硫黄原子からなる群から選択される少なくとも1種のヘテロ原子を含

んでいてもよい、換言すれば、途中にエーテル結合、チオエーテル結合、アミド結合などヘテロ原子を含む結合が存在していてもよい。アニオン性ポリマーは、一般的に、複数（多数）の負に荷電する官能基（アニオン性官能基）を側鎖に有し、さらに主鎖の一方または両方の末端にアニオン性官能基を有していてもよい。アニオン性官能基を側鎖および／または末端に有するアニオン性ポリマーとしては様々なものが公知となっており、所望の性状を有するものを購入したり、適切なポリマーを改変して作製したり、適切なモノマーを用いて合成したりすることが可能である。アニオン性ポリマーは、ホモポリマー（単独重合体）、コポリマー（共重合体）、およびそれらが結合および／または混合されたポリマーのいずれであってもよく、またランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマーのいずれであってもよい。

[0021] アニオン性官能基としては、例えば、置換基を有していてもよいカルボキシ基、好ましくは無置換のカルボキシ基であって、水系溶媒中で $\text{-COO}^-$ を生じる基や、置換基を有していてもよいスルホ基、好ましくは無置換のスルホ基であって、水系溶媒中で $\text{-SO}_3^-$ を生じる基が挙げられる。

[0022] アニオン性ポリマーとしては、例えば、エチレン系ポリマーであって、側鎖（および末端）にアニオン性官能基を有するものが挙げられる。エチレン系ポリマーとしては、ラジカル重合が可能なエチレン性炭素-炭素二重結合、例えばビニル基（ $\text{CH}_2=\text{CH}-$ ）、アリル基（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ）、アクリロイル基（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-$ ）、メタクリロイル基（ $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{O})-$ ）などを含むモノマーから選ばれる、1種または2種以上のモノマーから合成される、ホモポリマーおよびコポリマーならびにそれらの修飾物（例えば酢酸ビニルに由来する単位をケン化によりビニルアルコール化したものや、親水性を賦与するような処理をしたもの）が挙げられる。エチレン性炭素-炭素二重結合を含むモノマーとしては、例えば、エチレン、プロピレン、ブタジエン、イソブテン、テトラフルオロエチレン、ビニルアルコール、酢酸ビニル、塩化ビニル、塩化ビニリデン、スチレン、メチルスチレン、アリルアミン、ジアリルアミン、ジアリルジメチルアンモニウム

クロリド、アクリル酸、メタクリル酸、メチルアクリレート（別称アクリル酸メチル）、メチルメタクリレート（別称メタクリル酸メチル）、ブチルアクリレート（別称アクリル酸ブチル）、ブチルメタクリレート（別称メタクリル酸ブチル）、ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリロニトリル等が挙げられる。

[0023] 本発明の一実施形態において、アニオン性分散剤（b）は、アクリル酸由来ユニット、マレイン酸由来ユニット、およびスチレンスルホン酸由来ユニットからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むポリマー、つまり、アクリル酸、マレイン酸およびスチレンスルホン酸（例：4-スチレンスルホン酸）からなる群より選ばれる少なくとも1つのモノマーを用いて合成された、ホモポリマーまたはコポリマーである。なお、当該コポリマーは、アクリル酸、マレイン酸およびスチレンスルホン酸（例：4-スチレンスルホン酸）からなる群より選ばれる少なくとも1つのモノマーと共に、アクリル酸、マレイン酸およびスチレンスルホン酸（例：4-スチレンスルホン酸）からなる群より選ばれる少なくとも1つ以外のモノマーを用いて合成されたものであってもよい。

[0024] 本発明の一実施形態において、アニオン性分散剤（b）は、アニオン性官能基として、側鎖にカルボキシ基および／またはスルホ基を有するポリマーである。

[0025] 上記2つの実施形態のどちらにおいても用いることのできる、本発明のアニオン性分散剤（b）として好ましいポリマーとしては、例えば、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸)、ポリ(スチレンスルホン酸-co-マレイン酸)、ポリ(エチレンオキシド)-b-ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレン)-b-ポリ(アクリル酸)が挙げられる。

[0026] アニオン性分散剤（b）としてのアニオン性ポリマーの重合度、重量平均分子量、その他の性状、特性等は、本発明の実施形態および作用効果や、アニオン性ポリマーの種類に応じて調整することができる。アニオン性ポリマーの重合度は、通常は50以上である。アニオン性ポリマーの平均分子量、

代表的には重量平均分子量は、例えば1,000以上、好ましくは5,000以上である。アニオン性ポリマーの重量平均分子量の上限は、特に限定されるものではないが、例えば100,000以下、好ましくは70,000以下である。

[0027] なお、アニオン性ポリマーの重量平均分子量や分子量分布は、アニオン性ポリマーの種類に応じて公知の手段によって測定することが可能であり、例えば、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）などを用いることができる。また、アニオン性ポリマーとして市販されているものを購入して用いる場合は、そのカタログ等に（例えば「M<sub>w</sub>」、「M<sub>w</sub>」として）示されている数値を重量平均分子量とみなすことができる。

[0028] （c）カチオン性メディエータ

本発明において「カチオン性メディエータ」とは、レドックスメディエータとしての本質的な機能を有する化合物（レドックスメディエータ化合物）自体、またはそのようなレドックスメディエータ化合物に由来する部位を含む化合物であって、かつ分子全体の正味の電荷として正に荷電している（カチオン性である）化合物を指す。なお、「レドックスメディエータ」とは、電子伝達を仲介する酸化還元物質を指し、例えば、酸化還元酵素によるアナライトの酸化還元反応によって生じる電子の伝達を担う物質を指す。カチオン性メディエータは、いずれか1種類のみを用いてもよいし、2種類以上を組み合わせ用いてもよい。

[0029] 本発明の好ましい一実施形態において、カチオン性メディエータ（c）は、「レドックスメディエータ化合物」（c1）と、「カチオン性ポリマー」（c2）とが、必要に応じて「リンカー部」（c3）を介して結合した構造を有する化合物である。本発明における「カチオン性メディエータ」、すなわちそれを構成するための「レドックスメディエータ」、「カチオン性ポリマー」、「リンカー部位」は、特定の種類に限定されるものではなく、本発明の実施形態、作用効果等を考慮して、様々なものを用いることができる。

[0030] （c1）レドックスメディエータ化合物

本発明における「レドックスメディエータ化合物」は特定の種類に限定されるものではなく、本発明の実施形態（試薬層、電気化学センサの用途等）、作用効果等を考慮して、様々なレドックスメディエータまたはその誘導体を用いることができる。

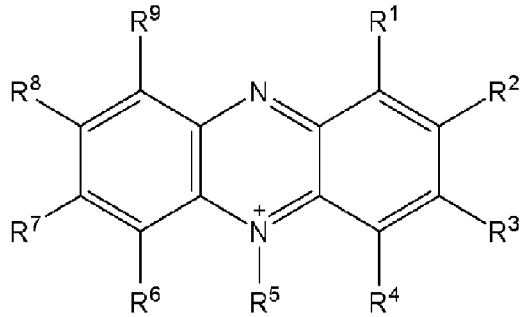
[0031] レドックスメディエータ化合物としては、例えば、フェナジン系化合物、フェノチアジン系化合物、オスミウム錯体、ルテニウム錯体、キノン類化合物、フェロセン類化合物等が挙げられる。

[0032] 本発明の一実施形態において、レドックスメディエータ化合物は、フェナジン系化合物またはフェノチアジン系化合物である。フェナジン系化合物およびフェノチアジン系化合物は、酸化還元電位（vs. Ag/AgCl・飽和KCl）が負であり（0Vよりも低く）、試料中に含まれる電気化学測定に対する夾雑物、例えば生体試料中または培地試料中に含まれる、アナライトとしない、アスコルビン酸（ビタミンC）、尿酸等の易酸化性化合物の影響を受け難いことから、好ましいレドックスメディエータといえる。

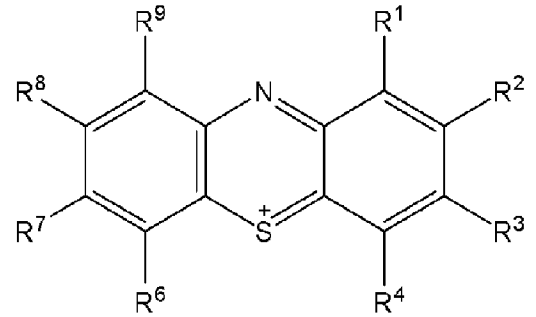
[0033] フェナジン系化合物およびフェノチアジン系化合物はそれぞれ、下記の一般式（1）および（2）で表される、フェナジン骨格またはフェノチアジン骨格を有し、レドックスメディエータとして機能し得る化合物を指す。例えば、一般式（2）で表されるフェノチアジン系化合物において、 $R^3$ が式-N $R^{31}R^{32}$ で表される置換されたアミノ基（式中、 $R^{31}$ および $R^{32}$ 両方が置換基である、またはいずれか一方が置換基、他方が水素原子である。）である場合、そのフェノチアジン系化合物は、下記の一般式（2-1）および（2-2）の共鳴構造を有する、単独でカチオン性メディエータとなる化合物となる。

[0034]

[化1]

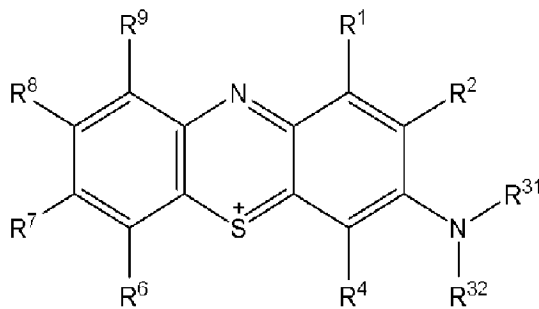


(1) フェナジン系化合物

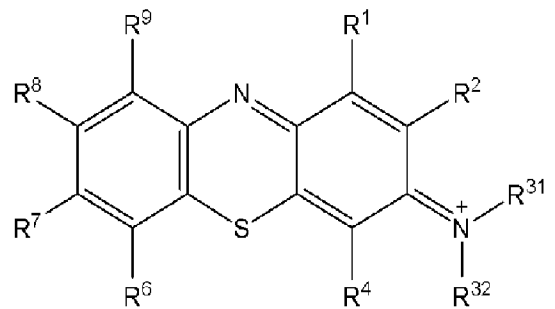


(2) フェノチアジン系化合物

[0035] [化2]



(2-1)



(2-2)

[0036] 一般式 (1) および (2) において、 $R^1 \sim R^9$  は、それぞれ独立して、下記 (i) ~ (ix') のいずれかの基または原子を表す (ただし、(ix') は、カチオン性メディエータ (c) は、「レドックスメディエータ化合物」(c1) と、「カチオン性ポリマー」(c2) とが、必要に応じて「リンカー部」(c3) を介して結合した構造を有する化合物である場合、つまり、(ix') が、レドックスメディエータ化合物 (c1) としてのフェナジン系化合物またはフェノチアジン系化合物の特定反応基 (詳細は後述する。) として、カチオン性ポリマー (c2) の特定反応基またはリンカー化合物の特定反応基と反応する場合に限る。) :

- (i) 水素原子 ;
- (ii) ハロゲン原子 ;
- (iii) 置換基を有していてもよいヒドロキシ基 ;
- (iv) 置換基を有していてもよいアミノ基 ;

(v) 置換基を有していてもよい飽和もしくは不飽和の炭化水素基（例えば、 $C_{1-15}$ アルキル基、好ましくは $C_{1-6}$ アルキル基）；

(vi) 置換基を有していてもよいアシル基（例えば、 $C_{1-6}$ アシル基、すなわち $C_{1-6}$ アルキル-カルボニル基）；

(vii) 置換基を有していてもよいフェニル基；

(viii) 第4級アンモニウムカチオン基；

(ix) 活性エステル化されたカルボキシ基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性エステル化されたカルボキシ基）；

(ix') カルボキシ基。

[0037] 上記 (iii) ~ (vii) の置換基が有していてもよい置換基としては、例えば、(a) ハロゲン原子、(b) ヒドロキシ基、(c) アミノ基、(d) 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（例えば、 $C_{1-15}$ アルキル基、好ましくは $C_{1-6}$ アルキル基、より好ましくは $C_{1-3}$ アルキル基）、(e) アシル基（例えば $C_{1-6}$ アシル基、好ましくは $C_{1-3}$ アシル基）、(f) グアニジノ基、(g) メシル基、(h) フェニル基、(i) チオール基、(j) ホルミル基（アルデヒド基）、(k) エポキシ基、(l) マレイミド基、(m) 活性エステル化されたカルボキシ基、(m') カルボキシ基、(n) オキシエチレン基の少なくとも1つを含む基が挙げられる。ただし、(m') は、カチオン性メディエータ (c) が、「レドックスメディエータ化合物」(c1) と、「カチオン性ポリマー」(c2) とが、必要に応じて「リンカー部」(c3) を介して結合した構造を有する化合物である場合、つまり、(m') が、レドックスメディエータ化合物 (c1) としてのフェナジン系化合物またはフェノチアジン系化合物の特定反応基（詳細は後述する。）として、カチオン性ポリマー (c2) の特定反応基またはリンカー化合物の特定反応基と反応する場合に限る。上記 (iii) ~ (vii) の置換基が有していてもよい置換基は、上記 (a) ~ (n) のいずれかが単独で構成される基であってもよいし、上記 (a) ~ (n) から選ばれる2つ、または3つ以上で構成される基、例えば、(c) アミノ基、(i) チオール基、(j) ホルミル基、(k) エポキシ基

、(l) マレイミド基、(m) 活性エステル化されたカルボキシ基、または(n) オキシエチレン基でさらに置換されている、(d) 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のような基であってもよい。当業者であれば、上記(iii)～(vii)それぞれに対して化学的に適切な置換基を(a)～(n)から選択したり、(a)～(n)から化学的に適切な2つまたは3つ以上の置換基を選択して連結したりすることで、本発明を実施することができる。上記(iii)～(vii)それぞれが有していてもよい置換基の数は特に限定されるものではなく、例えば1個、2個または3個であってもよく、また一つの原子(例えば、アルキル基の炭素原子、アミノ基の窒素原子)に複数の置換基が結合していてもよい。

[0038] なお、第4級アンモニウムカチオン基(viii)は、 $-R^A-N^+(R^B)(R^C)(R^D)$ で表される基(式中、 $R^A$ 、 $R^B$ 、 $R^C$ および $R^D$ はそれぞれ置換基を有していてもよい飽和炭化水素基(例えば、 $C_{1-15}$ アルキル基、好ましくは $C_{1-6}$ アルキル基))を指す。また、(n)オキシエチレン基については、(c3)リンカー部(リンカー様親水部)との関係で記載するオキシエチレン基(例えばポリエチレングリコール鎖(PEG鎖))と同様である。

[0039]  $R^1$ ～ $R^9$ の少なくとも1つは、レドックスメディエータ化合物を正に荷電させるための基であってもよい。例えば、フェナジン系化合物またはフェノチアジン系化合物は、当該化合物単独の荷電を正とする(カチオン性とする)ために、 $R^1$ ～ $R^9$ の少なくとも1つとして、(iv)置換基を有していてもよいアミノ基、好ましくは無置換のアミノ基であって、水系溶媒中で $-NH_3^+$ を生じる基や、(viii)第四級アンモニウムカチオン基のように、正に荷電する官能基(本明細書において「カチオン性官能基」と呼ぶ。)を有していてもよい。

[0040] また、カチオン性メディエータ(c)がレドックスメディエータ化合物(c1)と、カチオン性ポリマー(c2)とが、必要に応じてリンカー部(c3)を介して結合した構造を有する化合物である場合、 $R^1$ ～ $R^9$ の少なくとも1つは、カチオン性ポリマー(c2)または必要に応じて用いられるリン

カー部（c 3）もしくはそれを形成するためのリンカー化合物が有する基との結合性を有する反応基（本明細書において「レドックスメディエータ化合物（c 1）の特定反応基」と呼ぶ、ただし文脈上レドックスメディエータ化合物（c 1）のものであることが明らかなきときは単に「特定反応基」と呼ぶこともある。）であってもよい。

[0041]  $R^1 \sim R^9$ の少なくとも1つは、その他の、レドックスメディエータとしての性能に関係する基または試薬層の製造に関係する基であってもよい。例えば、フェナジン系化合物またはフェノチアジン系化合物は、親水性を向上させるために、 $R^1 \sim R^9$ の少なくとも1つとして、(iii) 置換基を有していてもよいヒドロキシ基、好ましくは無置換のヒドロキシ基、(iv) 置換基を有していてもよいアミノ基、好ましくは無置換のアミノ基、(viii) 第四級アンモニウムカチオン基など、いわゆる「親水基」と呼ばれる官能基自体や、そのような親水基から誘導される基であって親水性を有するもの（好ましくは(n) オキシエチレン基またはその他の親水基で置換されている親水基）、あるいは(v) 置換基を有していてもよい飽和もしくは不飽和の炭化水素基、(vi) 置換基を有していてもよいアシル基、(vii) 置換基を有していてもよいフェニル基のうち、置換基として(n) オキシエチレン基またはその他の親水基を有することにより基全体として親水性となっているものなどを有していてもよい。

[0042] なお、本発明において「親水性」とは、水に対して親和性が高く、水またはその他の極性溶媒、例えば、カチオン性メディエータを合成する際にレドックスメディエータ化合物とカチオン性ポリマーを反応させるための溶媒や、電気化学センサにおける所定の層を形成する際にカチオン性メディエータを溶解させるための溶媒などに対して、目的を達成できる程度に溶解または混和する性質をいう。極性溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノール、2-メチル-2-プロパノール、ギ酸、酢酸、テトラヒドロフラン、アセトン、ジオキサン、メチルエチルケトン、

酢酸エチル、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドが挙げられる。

[0043] (c 2) カチオン性ポリマー

「カチオン性ポリマー」は、ポリマー全体の正味として正の電荷を有するポリマーの総称である。本発明におけるカチオン性ポリマー (c 2) は、レドックスメディエータ化合物 (c 1) を担持できる構造、すなわちレドックスメディエータ化合物 (c 1) 自体が有する基または必要に応じて用いられるリンカー部 (c 3) が有する基と反応可能な基を有し、かつ所望の部位、例えば作用極上にアプライし、試薬層を形成することのできるものであればよい。カチオン性ポリマーの種類は特に限定されるものではなく、いずれか 1 種類を単独で用いても、2 種類以上を組み合わせ用いてもよい。

[0044] カチオン性ポリマーは、直鎖状、分岐鎖状、楕状、いずれの「鎖状の構造」であってもよく、その「鎖状の構造」は、環式化合物（芳香族炭化水素環、非芳香族炭化水素環、芳香族ヘテロ環、非芳香族ヘテロ環等）から誘導される環構造を一つまたは複数含んでいてもよい。カチオン性ポリマー (c 2) の主鎖および側鎖は、一般的に、炭素原子を主体とし、窒素原子、酸素原子および硫黄原子からなる群から選択される少なくとも 1 種のヘテロ原子を含んでいてもよい、換言すれば、途中にエーテル結合、チオエーテル結合、アミド結合などヘテロ原子を含む結合が存在していてもよい。カチオン性ポリマー (c 2) は、一般的に、複数（多数）の正に荷電する官能基（カチオン性官能基）を側鎖に有し、さらに主鎖の一方または両方の末端にカチオン性官能基を有していてもよい。また、1 分子のカチオン性ポリマー (c 2) に、必要に応じてリンカー部 (c 3) を介して、複数（多数）のレドックスメディエータ化合物 (c 1) を担持できるようにする観点から、カチオン性ポリマー (c 2) は、レドックスメディエータ化合物 (c 1) 自体が有する基または必要に応じて用いられるリンカー部 (c 3) もしくはそれを形成するためのリンカー化合物が有する基との結合性を有する反応基（本明細書において「カチオン性ポリマー (c 2) の特定反応基」と呼ぶ、ただし文脈上

カチオン性ポリマー（c2）のものであることが明らかなきときは単に「特定反応基」と呼ぶこともある。）を側鎖に有することが適切であり、さらに主鎖の一方または両方の末端も特定反応基を有していてもよい。カチオン性官能基および特定反応基を側鎖および／または末端に有するカチオン性ポリマー（c2）としては様々なものが公知となっており、所望の性状を有するものを購入したり、適切なポリマーを改変して作製したり、適切なモノマーを用いて合成したりすることが可能である。カチオン性ポリマー（c2）は、ホモポリマー（単独重合体）、コポリマー（共重合体）、およびそれらが結合および／または混合されたポリマーのいずれであってもよく、またランダムポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマーのいずれであってもよい。

[0045] カチオン性ポリマー（c2）としては、例えば、エチレン系ポリマー、イミン系ポリマー、アミノ酸系ポリマーなどであって、側鎖（および末端）にカチオン性官能基および特定反応基を有するものが挙げられる。また、アミノ酸をモノマーとするポリマーといえる（但し、概念として、人工的に合成されるアミノ酸系ポリマーとは区別される）、天然のアミノ酸配列または改変された（置換、欠失、付加等された）アミノ酸配列を有する、タンパク質やポリペプチドであって、側鎖（および末端）にカチオン性官能基および特定反応基を有するものも、カチオン性ポリマー（c2）に包含される。特定反応基およびカチオン性官能基を元来有する、または導入された、多糖類系ポリマーも、カチオン性ポリマー（c2）に包含される。

[0046] エチレン系ポリマーとしては、ラジカル重合が可能なエチレン性炭素-炭素二重結合、例えばビニル基（ $\text{CH}_2=\text{CH}-$ ）、アリル基（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ）、アクリロイル基（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-$ ）、メタクリロイル基（ $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{O})-$ ）などを含むモノマーから選ばれる、1種または2種以上のモノマーから合成される、ホモポリマーおよびコポリマーならびにそれらの修飾物（例えば酢酸ビニルに由来する単位をケン化によりビニルアルコール化したものや、親水性を賦与するような処理をしたもの）が

挙げられる。エチレン性炭素-炭素二重結合を含むモノマーとしては、例えば、エチレン、プロピレン、ブタジエン、イソブテン、テトラフルオロエチレン、ビニルアルコール、酢酸ビニル、塩化ビニル、塩化ビニリデン、スチレン、メチルスチレン、アリルアミン、ジアリルアミン、ジアリルジメチルアンモニウムクロリド、アクリル酸、メタクリル酸、メチルアクリレート（アクリル酸メチルともいう。）、メチルメタクリレート（メタクリル酸メチルともいう。）、ブチルアクリレート（アクリル酸ブチルともいう。）、ブチルメタクリレート（メタクリル酸ブチルともいう。）、ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリロニトリル等が挙げられる。また、一般的に生体適合性ポリマーとして知られている、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-*c o - n*-ブチルメタクリレート)などの(メタ)アクリル系ポリマーや、ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル系ポリマーも、好ましいエチレン系ポリマーとして挙げられる。

[0047] カチオン性ポリマー(c2)として好ましいエチレン系ポリマーとしては、例えば、ポリアリルアミン塩酸塩、アリルアミン塩酸塩・ジアリルアミン塩酸塩共重合体、アリルアミン・ジアリルジメチルアンモニウムクロリド共重合体などが挙げられる。側鎖(および末端)に第四級アンモニウムカチオン、アミノ基等を有する(メタ)アクリル系ポリマーも、好ましいエチレン系ポリマーとして挙げられる。より具体的には、2-アミノエチルメタクリレート、(ビニルベンジル)トリメチルアンモニウムクロリド、メタクリロイルコリンクロリドなどに由来する構成単位を含む単独共重合体または共重合体や、ポリ(塩化ジアリルジメチルアンモニウム)、ポリ(アリルアミン塩酸塩)、アリルアミン塩酸塩・ジアリルアミン塩酸塩共重合体、アリルアミン・塩化ジアリルジメチルアンモニウム共重合体などが、カチオン性ポリマー(c2)として好ましく用いることができる。

[0048] イミン系ポリマーとしては、例えば、ポリ(エチレンイミン)が挙げられる

。ポリ(エチレンジアミン)は、側鎖に $-(CH_2)_2-NH_2$ 、 $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$ 、 $-(CH_2)_2-N((CH_2)_2-NH_2)_2$ などの構造を有し、当該構造中のアミノ基： $-NH_2$ が当該カチオン性ポリマー(c2)の特定反応基となり、それに対応する適切な特定反応基(例えば、活性エステル化されたカルボキシ基)を有するレドックスメディエータ化合物(c1)またはリンカー部(c3)と結合することができる。

[0049] アミノ酸系ポリマーとしては、例えば、ポリ(L-リジン)、ポリ(L-アルギニン)、ポリ(L-オルニチン)が挙げられる。ポリ(L-リジン)は、側鎖に $-(CH_2)_4-NH_2$ の構造を有する。ポリ(L-アルギニン)は、側鎖に $-(CH_2)_2-NH-C(=NH)-NH_2$ の構造を有する。これらのアミノ酸系ポリマーの側鎖に含まれるアミノ基： $-NH_2$ (またはグアニジノ基： $-NH-C(=NH)-NH_2$ )などが当該カチオン性ポリマー(c2)の特定反応基となり、対応する適切な特定反応基(例えば、活性エステル化されたカルボキシ基)を有するレドックスメディエータ化合物(c1)またはリンカー部(c3)と結合することができる。なお、アミノ酸系ポリマーは、例えばポリ(L-アルギニン塩酸塩)のように、塩を形成していてもよい。

[0050] 多糖類系ポリマーとしては、例えば、キトサン等のセルロース誘導体が挙げられる。キトサンは、キチンを加水分解することにより得られる多糖類であり、側鎖(糖構造中)にアミノ基を有する。このような多糖類系ポリマーの側鎖に含まれるアミノ基などが当該カチオン性ポリマー(c2)の特定反応基となり、対応する適切な特定反応基(例えば、活性エステル化されたカルボキシ基)を有するレドックスメディエータ化合物(c1)またはリンカー部(c3)と結合することができる。

[0051] カチオン性ポリマー(c2)の重合度、重量平均分子量、その他の性状、特性等は、本発明の実施形態および作用効果や、カチオン性ポリマー(c2)の種類に応じて調整することができる。カチオン性ポリマー(c2)の重合度は、通常は100以上である。カチオン性ポリマー(c2)の平均分子量、代表的には重量平均分子量は、通常10,000以上、好ましくは50

、000以上、より好ましくは100,000以上である。カチオン性ポリマー(c2)の重量平均分子量の上限は、特に限定されるものではないが、通常10,000,000未満、好ましくは1,000,000未満である。

[0052] なお、カチオン性ポリマー(c2)の重量平均分子量や分子量分布は、カチオン性ポリマー(c2)の種類に応じて公知の手段によって測定することが可能であり、例えば、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)などを用いることができる。また、カチオン性ポリマー(c2)として市販されているものを購入して用いる場合は、そのカタログ等に(例えば「Mw」、「M.W.」として)示されている数値を重量平均分子量とみなすことができる。

[0053] (c3) リンカー部

リンカー部(c3)は、必要に応じて存在する、レドックスメディエータ化合物(c1)とカチオン性ポリマー(c2)との結合を仲介するための構造である。リンカー部(c3)は、一般的に、両端にある反応前の反応基または反応後の結合構造を除く部分が、炭素原子を主体とし、窒素原子、酸素原子および硫黄原子からなる群から選択される少なくとも1種のヘテロ原子を含んでいてもよい鎖状の構造、換言すれば、途中にエーテル結合、チオエーテル結合、アミド結合などヘテロ原子を含む結合が存在していてもよい、鎖状の構造を有する部位である。リンカー部(c3)の「鎖状の構造」は、直鎖状であっても、分岐鎖状であってもよい。また「鎖状の構造」は、環式化合物(芳香族炭化水素環、非芳香族炭化水素環、芳香族ヘテロ環、非芳香族ヘテロ環等)から誘導される環構造を一つまたは複数含んでいてもよい。

[0054] 本発明の一実施形態において、リンカー部(c3)は、カチオン性メディエータ(c)の親水性を向上させるための部位(親水部)としての機能を兼ね備えたものであり、「リンカー様親水部」と呼ぶこともできるものである。リンカー部(c3)がリンカー様親水部である場合、親水性の観点から、直鎖状であること、また環式化合物から誘導される環構造を一つも含まないことが好ましい。

- [0055] 本発明の好ましい一実施形態において、リンカー様親水部は、式： $-(OC_2H_4)_q-$ で表されるオキシエチレン基を含む。式中の $q$ は、例えば1～80の整数、好ましくは3～36の整数を表す。なお、当該式で表されるオキシエチレン鎖のうち $q$ がある程度大きいものは、一般的に「ポリエチレングリコール鎖（PEG鎖）」などと呼ばれている。
- [0056] 本発明の一実施形態において、リンカー様親水部は、式： $-(CH_2)_p-$ で表される炭化水素鎖を含む。本発明の一実施形態において、リンカー様親水部の主鎖は、上記式： $-(CH_2)_p-$ で表される炭化水素鎖と、上記式： $-(OC_2H_4)_q-$ で表されるオキシエチレン鎖の両方を含む。炭化水素鎖を表す式中の $p$ は、リンカー様親水部の親水性を考慮して、オキシエチレン鎖を表す式中の $q$ とのバランスが取れるよう、適宜調節することができる。
- [0057] リンカー部（c3）は、レドックスメディエータ化合物（c1）が有する基（特定反応基）およびカチオン性ポリマー（c2）が有する基（特定反応基）それぞれとの結合性を有する少なくとも2つの反応基（本明細書において「リンカー化合物の特定反応基」と呼ぶ、ただし文脈上リンカー化合物のものであることが明らかなき場合は単に「特定反応基」と呼ぶこともある。）を有する化合物（本明細書において「リンカー化合物」と呼ぶ。）から誘導することができる。例えば、リンカー化合物をレドックスメディエータ化合物（c1）と反応させ、次にレドックスメディエータ化合物（c1）と結合した状態のリンカー化合物（換言すれば「レドックスメディエータ化合物（c1）-リンカー化合物反応物」）をカチオン性ポリマー（c2）と反応させることにより、レドックスメディエータ化合物（c1）とカチオン性ポリマー（c2）とがリンカー部（c3）を介して結合している化合物としてのカチオン性メディエータ（c）が生成する。また、リンカー化合物をカチオン性ポリマー（c2）と反応させ、次にカチオン性ポリマー（c2）と結合した状態のリンカー化合物（換言すれば「カチオン性ポリマー（c2）-リンカー化合物反応物」）をレドックスメディエータ化合物（c1）と反応させることによっても、レドックスメディエータ化合物（c1）とカチオ

ン性ポリマー（c 2）とがリンカー部（c 3）を介して結合している化合物としてのカチオン性メディエータ（c）が生成する。

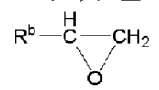
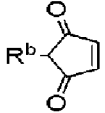
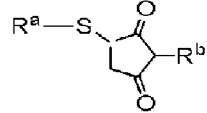
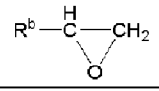
[0058] <特定反応基>

本発明における特定反応基、すなわちレドックスメディエータ化合物（c 1）の特定反応基、カチオン性ポリマー（c 2）の特定反応基、およびリンカー化合物の特定反応基としては、それぞれ公知の様々な反応基を採用し、様々な組み合わせとすることができる。本発明における所定反応基同士は、共有結合により結合するものであってもよいし、非共有結合（例えば静電的相互作用）により結合するものであってもよいが、例えば結合の安定性の観点から、共有結合により結合するものが好ましい。

[0059] 本発明における特定反応基は、それぞれ「カルボキシ基またはその活性エステル体、アミノ基、チオール基、ホルミル基（アルデヒド基）、エポキシ基およびマレイミド基からなる群」（本明細書において「好ましい特定反応基群」と呼ぶ。）より選ばれる少なくとも1種が好ましい。なお、好ましい特定反応基としてのアミノ基、チオール基、ホルミル基（アルデヒド基）、エポキシ基およびマレイミド基はそれぞれ、レドックスメディエータ化合物（c 1）に関する一般式（1）および（2）中の $R^1 \sim R^9$ としての置換基（i）～（vii）がさらに有していてもよい置換基として例示した、置換基（c）、（i）、（j）、（k）および（l）に相当し、カルボキシ基およびその活性エステル体は、それぞれ置換基（m'）および（m）に相当する。好ましい特定反応基群に含まれる反応基それぞれが反応することのできる基を表1に示す。本発明における特定反応基の一方として、好ましい特定反応基群に含まれる反応基を選択した場合、それと反応させる相手の基は、好ましい特定反応基群に含まれる他の反応基（表中の下線を引いたもの）であってもよいし、好ましい特定反応基群に含まれない反応基（表中の下線を引いていないもの、または表中に含まれないもの）であってもよい。

[0060]

[表1]

反応基A	反応基B	形成される結合等
カルボキシ基 R <sup>a</sup> -COOH またはその活性エステル体	アミノ基 R <sup>b</sup> -NH <sub>2</sub>	アミド結合 R <sup>a</sup> -CO-NH-R <sup>b</sup>
	アルコール性またはフェノール性 ヒドロキシ基 R <sup>b</sup> -OH	エステル結合 R <sup>a</sup> -CO-O-R <sup>b</sup>
	チオール基 R <sup>b</sup> -SH	チオエステル結合 R <sup>a</sup> -CO-S-R <sup>b</sup>
	アルキルハライド基 R <sup>b</sup> -X	エステル結合 R <sup>a</sup> -CO-O-R <sup>b</sup>
アミノ基 R <sup>a</sup> -NH <sub>2</sub>	カルボキシ基 R <sup>b</sup> -COOH またはその活性エステル体	アミド結合 R <sup>a</sup> -NH-CO-R <sup>b</sup>
	アシルアジド基	アミド結合
	アシルハライド基	アミド結合
	イソシアネート基	尿素結合
	イソチオシアネート基	チオ尿素結合
	イミドエステル	アミジン結合
	エポキシ基 	アミド結合 R <sup>a</sup> -NH-CO-R <sup>b</sup>
	アルキルハライド基	アルキルアミド結合
	スルホンハライド基	スルホンアミド結合
チオール基 R <sup>a</sup> -SH	カルボキシ基 R <sup>b</sup> -COOH またはその活性エステル体	チオエステル結合 R <sup>a</sup> -S-CO-R <sup>b</sup>
	マレイミド基 	チオエーテル結合 
	エポキシ基 	チオエーテル結合
	アルキルハライド基	チオエーテル結合
	アルキルスルホネート基	チオエーテル結合
	アジリジン基	チオエーテル結合
	ホルミル基(アルデヒド基) R <sup>a</sup> -CHO	アルコキシアミノ基 R <sup>b</sup> -O-NH <sub>2</sub>
アミノ基 R <sup>b</sup> -NH <sub>2</sub>		シッフ塩基 R <sup>a</sup> -CH=N-R <sup>b</sup>
ヒドラジン基 R <sup>b1</sup> R <sup>b2</sup> N-NH <sub>2</sub>		ヒドラゾン結合 R <sup>a</sup> -CH=N-NR <sup>b1</sup> R <sup>b2</sup>

[0061] 本発明の好ましい一実施形態において、レドックスメディエータ化合物（

c 1) の特定反応基またはリンカー化合物の特定反応基と、カチオン性ポリマー (c 2) の特定反応基は、いずれか一方が表 1 の「反応基 A」で、他方が「反応基 B」である。同様に、本発明の好ましい一実施形態において、レドックスメディエータ化合物 (c 1) の特定反応基と、リンカー化合物の特定反応基は、いずれか一方が表 1 の「反応基 A」で、他方が「反応基 B」である。

[0062] 本発明のより好ましい一実施形態において、レドックスメディエータ化合物 (c 1) の特定反応基またはリンカー化合物の特定反応基と、カチオン性ポリマー (c 2) の特定反応基は、いずれか一方がアミノ基で、他方がカルボキシ基またはその活性エステル体である。同様に、本発明のより好ましい一実施形態において、レドックスメディエータ化合物 (c 1) の特定反応基と、リンカー化合物の特定反応基は、いずれか一方がアミノ基で、他方がカルボキシ基またはその活性エステル体である。例えば、特定反応基として活性エステル化されたカルボキシ基を有するレドックスメディエータ化合物 (c 1) ; 第 1 の特定反応基としてアミノ基を有し、第 2 の特定反応基として活性エステル化されたカルボキシ基 (例えば NHS で活性エステル化されたカルボキシ基) を有するリンカー化合物 ; および特定反応基としてアミノ基を有するカチオン性ポリマー (c 2) を用いる場合、まず当該レドックスメディエータ化合物 (c 1) の活性エステル化されたカルボキシ基と当該リンカー化合物のアミノ基の反応 (第 1 のアミド結合) によりリンカー様親水部導入型レドックスメディエータ化合物が得られ、得られたリンカー様親水部導入型レドックスメディエータ化合物の活性エステル化されたカルボキシ基と当該カチオン性ポリマー (c 2) のアミノ基の反応 (第 2 のアミド結合) によりカチオン性メディエータ (c) が得られる。

[0063] 本発明の試薬層は、典型的には、本発明の電気化学センサにおいて、作用極上に配置されるものである。試薬層は、いずれか 1 種類のみを用いてもよいし、2 種類以上を組み合わせ用いても (例えば、導電性炭素フィラー (a)、アニオン性分散剤 (b) およびカチオン性メディエータ (c) の組成

(種類および／または含有量) が異なる 2 種類以上の試薬層を積層してもよい。

[0064] 試薬層は、例えばバイオセンサの形態をとる電気化学センサのように、アナライトに対応した種類の「酸化還元酵素」を含んでいてもよいし、バイオセンサ以外の電気化学センサ、あるいは電気化学センサ以外のセンサ（例えば光学センサ）の形態をとる場合のように、酸化還元酵素を含まなくてもよい。

[0065] 試薬層は、必要に応じて導電性炭素フィラー (a)、アニオン性分散剤 (b) およびカチオン性メディエータ (c) 以外の成分をさらに含んでいてもよい。そのような任意の成分としては、例えば「酸化還元酵素」(d) が挙げられる。

[0066] (d) 酸化還元酵素

酸化還元酵素 (d) は、電気化学センサ等が対象とするアナライトを酸化 (脱水素化を含む。) または還元することができる酵素を指す。本発明の電気化学センサは、典型的には、試薬層中に酸化還元酵素を含む電気化学センサ (バイオセンサ) の形態をとるが、これに限定されるものではなく、試薬層中に酸化還元酵素を含まない、バイオセンサ以外の電気化学センサ、あるいは電気化学センサ以外のセンサ (例えば光学センサ) の形態をとることもできる。電気化学センサ等の用途に応じて、試薬層が酸化還元酵素 (d) を含むかどうか、またアナライトの種類に応じて、どのような種類の酸化還元酵素 (d) を含むかを、選択することができる。

[0067] 酸化還元酵素 (d) としては、例えば、オキシダーゼ系の酵素 (グルコースオキシダーゼ (Gox)、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、ビリルビンオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼなど) およびデヒドロゲナーゼ系の酵素 (グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH)、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、アルデヒドデヒドロゲナーゼ)が挙げられる。酸化還元酵素(d)は、いずれか1種を単独で用いてもよいし、必要に応じて2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0068] 本発明の一実施形態において、酸化還元酵素(d)は、補酵素結合型のものである。補酵素還元型の酸化還元酵素(d)としては、例えば、ピロロキノリンキノン(PQQ)結合型GDH、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)結合型GDHが挙げられる。グルコースをアナライトとする実施形態において、アナライトではないマルトースに対する反応性が低い(例えば、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を5%以下、好ましくは3%以下とすることができる)という観点からは、FAD結合型GDHが好ましい。FAD結合型GDHの例としては、アスペルギルス属(オリゼ、テレウス等)由来のもの、ムコール属由来のものが挙げられる。

[0069] 本発明の一実施形態において、酸化還元酵素(d)は、カチオン性メディエータ(c)、特にそれを構成しているカチオン性ポリマー(c2)と架橋されていてもよい。例えば、架橋剤(e)を使用することで、酸化還元酵素(d)とカチオン性メディエータ(c)、特にカチオン性ポリマー(c2)とを架橋することができる。架橋剤(e)としては、例えば、グルタルアルデヒドが挙げられる。架橋剤(e)が、タンパク質である酸化還元酵素(d)が有する反応基(例:アミノ基)と、カチオン性メディエータ(c)が有する反応基、例えば、カチオン性ポリマー(c2)が、レドックスメディエータ化合物(c1)もしくはリンカー部(c2)とは反応しなかった反応基として、またはレドックスメディエータ化合物(c1)もしくはリンカー部(c2)との反応用のものとは異なる種類の反応基として有する反応基(例:アミノ基)のそれぞれと反応することで、架橋剤(e)を介して酸化還元酵素(d)とカチオン性メディエータ(c)を結合させることができる。こ

のような架橋により分子量のより大きな複合体を形成することで、酸化還元酵素（d）およびカチオン性メディエータ（c）、特にそれを構成しているレドックスメディエータ化合物（c1）の保護膜外への流出をより抑制することができる。なお、架橋剤（e）を使用する場合は、酸化還元酵素（d）の2つの分子それぞれが有する反応基と反応することで、架橋剤（e）を介して酸化還元酵素（d）同士を結合することもある。すなわち、架橋剤（e）を使用した場合、試薬層において、酸化還元酵素（d）はカチオン性メディエータ（c）、特にカチオン性ポリマー（c2）と架橋されるのと同時に、酸化還元酵素（d）同士が架橋されていてもよい。

[0070] ー 試薬層の形成方法 ー

本発明の試薬層の形成方法は、少なくとも下記工程（1）を含み、通常はさらに（2）および（3）を含む：

（1）導電性炭素フィラー（a）と、アニオン性分散剤（b）と、カチオン性メディエータ（c）とを含む試薬液を調製する工程（本明細書において「試薬液調製工程」と呼ぶことがある）；

（2）前記試薬液を試薬層形成部位にアプライする工程（本明細書において「アプライ工程」と呼ぶことがある。）；

（3）アプライされた前記試薬液を乾燥させて、試薬層を形成する工程（本明細書において「試薬層形成工程」と呼ぶことがある。）。

[0071] （1）試薬液調製工程

試薬液調製工程（1）は、試薬層を構成する主な成分、すなわち少なくとも導電性炭素フィラー（a）、アニオン性分散剤（b）およびカチオン性メディエータ（c）を含み、必要に応じてさらにその他の成分、例えば酸化還元酵素（d）、架橋剤（e）などを含んでもよい試薬液を調製する工程である。

[0072] 試薬液は一般的に、水系溶媒（水、または水と相溶性のある溶媒と水との混合溶媒）に、上記成分（a）～（e）のうち必要なものを添加することで、試薬液を調製することができる。水系溶媒は、必要に応じて、pH調整剤

、緩衝剤（液）、その他の化合物等を添加することにより、適切なpHを有するよう調整することができる。

[0073] 本発明の一実施形態において、試薬液のpHは、8.0以下である。試薬液のpHが8.0以下となるような量で緩衝液を用いることにより、導電性炭素フィラー（a）の分散性を向上させる効果が奏されやすくなる。なお、試薬液が酸化還元酵素（d）を含む場合は、その試薬液のpHは、その酸化還元酵素（d）の活性が維持される範囲とすることが適切である。

[0074] 試薬液のpHは通常、緩衝液を用いて調節される。緩衝液としては様々な緩衝液を用いることができるが、例えば、酢酸緩衝液（酢酸および酢酸ナトリウム）、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、Tris緩衝液（トリスヒドロキシメチルアミノメタン、別称トロメタモール）、Bis-Tris緩衝液（ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン)、HEPES緩衝液（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）、MES（2-モルホリノエタンスルホン酸モノヒドレート）、MOPS（3-モルホリノプロパンスルホン酸）、PBS（リン酸緩衝生理食塩水、一般的に、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素カリウム）などが挙げられる。適切な緩衝液（緩衝剤）を用いることで、試薬のpHを所望の値（範囲）とすることができる。

[0075] 本発明の一実施形態において、試薬液中の金属イオンの濃度は200mM以下である。試薬液の金属イオンの濃度が高い場合、金属イオンの種類によっては、導電性炭素フィラーの分散性が阻害され、凝集が発生するおそれがあるため、試薬液の金属イオンの濃度は低い方がよい傾向にある。試薬液のpHの調製のために、金属イオンを含む化合物（緩衝剤）またはそれにより調製された緩衝液を用いる場合は、所望のpHとするために必要な当該緩衝剤または当該緩衝液の量に基づいて試薬液中の金属イオンの濃度を算出し、それが200mM以下となるようにすること、逆に言えば200mM以下にすることができる緩衝剤または緩衝液を選択することが好ましい。金属イオ

ンを含まない化合物（緩衝剤）またはそれにより調製された緩衝液を用いる場合は自ずと、試薬液中の金属イオンの濃度を200 mM以下とすることができる。試薬液中の金属イオンの濃度は、金属塩がアルカリ金属イオンである場合は、100 mM未満、例えば80 mM以下とすることが好ましい。

[0076] 試薬液中の金属イオンは、試薬液の調製に用いられる様々な物質に由来するものであるため、金属イオンの濃度が適切な範囲となるよう、試薬液の組成や、各成分等の種類および使用量を調節することができる。例えば、試薬液中の金属イオンは緩衝液に由来する場合があるので、試薬液のpHを調整するために用いる緩衝液の組成（緩衝液に含まれる化合物の種類および濃度）を適切なものとするればよい。また、試薬液中の金属イオンは、アニオン性分散剤（b）として塩を形成しているものに由来する場合もあるので、必要に応じてそのような塩を形成しているアニオン性分散剤（b）の量も考慮に入れればよい。

[0077] 試薬液に含まれる成分の添加順番は適宜調整することができるが、例えば、下記の工程（1-1）および（1-2）の順で行うことが好ましい。

（1-1）少なくともアニオン性分散剤（b）を含む水溶液中に、導電性炭素フィラー（a）を分散させ、分散液を得る工程。

（1-2）得られた分散液に、カチオン性メディエータ（c）を添加して、試薬液を得る工程。

[0078] 試薬液中の導電性炭素フィラー（a）、アニオン性分散剤（b）およびカチオン性メディエータ（c）、ならびに必要なに応じて用いられる酸化還元酵素（d）それぞれの濃度、あるいは互いの濃度の比は、本発明の実施形態、作用効果等を考慮して、適切に調節することができる。

[0079] 試薬液中の導電性炭素フィラー（a）の濃度は、例えば0.1～30 w/v %（mg/mL）の範囲内である。

[0080] 試薬液中のアニオン性分散剤（b）の濃度は、例えば0.01～30 w/v %（mg/mL）の範囲内である。

[0081] 試薬液調製工程（1）では、試薬液に対して物理的なエネルギーを与える

ことにより、試薬液中の導電性炭素フィラー（a）の分散性を向上させるための処理（本明細書において「分散処理」と呼ぶことがある。）を行ってもよい。分散処理は、例えば、前記工程（1-1）と前記工程（1-2）の間に行うことができ、それに代えて、またはそれに加えて、前記工程（1-2）の後に（次のアプライ工程（2）の前に）行うこともできる。

[0082] 「物理的なエネルギー」を与えるための手段（方法およびその条件、用いる装置等）は、試薬液中の導電性炭素フィラー（a）の分散性を向上させることができるものであれば、特に限定されるものではない。本発明の代表的な実施形態では、上記の手段として超音波処理を用いるが、その他の手段を用いることも可能である。超音波処理の条件（出力、時間等）は適宜調節することができる。超音波処理のための装置も適宜選択することができ、例えば超音波ホモジナイザーを用いることができる。

[0083] 酸化還元酵素（d）は、物理的なエネルギーの影響を受けないよう、試薬液調製工程（1）において、分散処理を終えた段階で添加することが好ましい。酸化還元酵素（d）を、カチオン性メディエータ（c）と架橋させたり、酸化還元酵素（d）同士を架橋させたりするための架橋剤（e）、例えばグルタルアルデヒドは、酸化還元酵素（d）を添加した後に添加することが好ましい。

[0084] また、レドックスメディエータ化合物（c1）とカチオン性ポリマー（c2）とが、必要に応じてリンカー部（c3）を介して結合している化合物を、カチオン性メディエータ（c）として用いる場合は、当該カチオン性メディエータ（c）は、分散処理により、例えば超音波処理等により物理的なエネルギーを試薬液に与えて導電性炭素フィラー（a）の分散性を良化させてから、添加することが好ましい。

[0085] （2）アプライ工程

アプライ工程（2）は、試薬液調製工程（1）により得られた試薬液を、試薬層形成部位、例えば作用極の少なくとも一部にアプライ（滴下、塗布等）する工程である。

[0086] 「アプライ」のための手段（方法およびその条件、用いる装置等）は、試薬液から試薬層を形成することができるものであれば、特に限定されるものではなく、従来の試薬層の形成方法（または電気化学センサの製造方法）における試薬液のアプライ工程に準じた手段を採用することができる。本発明の代表的な実施形態では、試薬液調製工程（1）により得られた試薬液の適量を、作用極の少なくとも一部（試薬層を形成する部分）に滴下することにより、アプライ工程を行う。アプライする面積および試薬液の量は、目的とする試薬層の厚さに応じて調節することができる。

[0087] （3）試薬層形成工程

試薬層形成工程（4）は、アプライ工程（2）により試薬層形成部位（例えば作用極の少なくとも一部）にアプライされた試薬液を乾燥させて、塗膜層を形成する工程である。

[0088] 「乾燥」のための手段（方法およびその条件、用いる装置等）は、アプライされた試薬液から（好ましくは均一な）試薬層を形成することができれば、特に限定されるものではなく、従来の電気化学センサの製造における試薬液の乾燥工程に準じた手段を採用することができる。本発明の代表的な実施形態では、試薬液がアプライされた作用極を室温で静置することにより、試薬層形成工程を行い、試薬層を形成する。

[0089] ー 電気化学センサ ー

本発明のアナライトを検出又は定量する電気化学センサは、作用極、対極、および作用極上に配置された、上述したような本発明の試薬層を有し、必要に応じてさらに、少なくとも試薬層を被覆する保護膜を有する。

[0090] 「保護膜」は、試薬層に含まれる物質（導電性炭素フィラー（a）、カチオン性メディエータ（c）、必要に応じて用いられる酸化還元酵素（d）等）の保護膜外の環境中（生体内、培地中等）への漏出を防止又は抑制するための膜状の部材である。試薬層を被覆する保護膜は、保護膜外の環境中に存在するアナライトが試薬層と接触できるよう、保護膜内に透過可能な孔を有することが適切である。このような保護膜は、例えば、電気化学センサが持

続的な測定に使用される場合に形成することが好ましく、電気化学センサが単発的な測定に使用される場合には形成しなくてもよい。

- [0091] 試薬層が形成されている作用極（それを備えたプローブ）は、生体内に挿入して使用されたり、培地中に浸漬して使用されたりするため、その表面を被覆する保護膜は、タンパク質や細胞が吸着しない又はし難い生体適合性を有すること、一般的にはそのような性質を有する生体適合性ポリマーによって形成されることが好ましい。生体適合性ポリマーとしては、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-*co*-*n*-ブチルメタクリレート)等が挙げられる。
- [0092] 保護膜は、保護膜を形成するための原料を含む溶液（保護膜溶液）を調製し、保護膜を形成したい領域、例えば作用極の少なくとも試薬層が形成されている領域を浸漬し、引き上げて乾燥させること、必要に応じてそのような工程を複数回繰り返すことにより、形成することができる。
- [0093] 本発明の電気化学センサは、必要に応じて参照極をさらに含んでもよい。つまり、本発明の電気化学センサは、作用極および対極により構成される二電極式とすることもできるし、作用極、対極および参照極により構成される三電極式とすることもできる。
- [0094] 本発明の一実施形態において、電気化学センサは、埋め込み型の電気化学センサ、例えば血液中または間質液中のグルコース濃度を連続的または半連続的、例えば数日から数週間にわたって測定する自己血糖測定用のCGM（Continuous Glucose Monitoring）のためのバイオセンサとして作製することができる。一方で、本発明の一実施形態において、電気化学センサは、非埋め込み型の電気化学センサ、例えば培地中のグルコース等の濃度を連続的または半連続的に測定するためのバイオセンサとして作製することもできる。
- [0095] 以下、図面を参照しながら、本発明の電気化学センサが埋め込み型である

場合の実施形態について説明する。ただし、図面および以下の記載は例示的なものであり、本発明の技術的範囲はそれらによって開示された実施形態に限定されるものではなく、本発明の課題を解決できる範囲で、また本発明の作用効果が奏される範囲で、様々に改変された実施形態を含んでいることが理解されるべきである。

[0096] 以下の記載において、図1(A)および(B)、図3ならびに図7の紙面手前方向、図2(A)～(C)および図4～図6の紙面上方向にある面を「上面」と呼び、図1(A)および(B)、図3ならびに図7の紙面奥方向、図2(A)～(C)および図4～図6の紙面下方向にある面を「下面」と呼び、図1(A)および(B)、図2(A)～(C)、図5～図7の紙面左右いずれかの方向、ならびに図4の紙面手前側または奥側いずれかの方向にある面を「側面」と呼ぶことがある。また、図1(A)の紙面の上下方向、すなわち生体へのセンサの挿入方向を示す矢印X2に対して平行な方向の寸法、ならびに図3および図7の紙面の上下方向の寸法を「長さ」と呼び、図1(A)の紙面の左右方向、すなわち矢印X2に対して垂直な方向の寸法、ならびに図3および図7の紙面の上下方向の寸法を「幅」と呼ぶことがある。

[0097] 図1は、本発明の一実施形態における、センサ11の平面図である。図1(A)は、センサ11の全体を示す。図1(B)には、図1(A)に示されているセンサ11の先端部分（センシング部分）を拡大して示す。センサ11は、例えば血糖値の自己検査のために生体に装着して使用される、埋め込み型バイオセンサのシステムを構築する場合に好適であり、その場合のセンサ11は、本体（図示せず）からの突出部分（プローブ）として、生体内に挿入することができる。また、センサ11は、例えば培地中のアナライトの濃度を測定するためのシステムを構築する場合にも使用することができる。

[0098] 図1(A)に示されている、センサ11の領域X1（頭部）は本体（図示せず）に収容され、センサ11の先端部分（センシング部分）は本体から突出している。矢印X2は、例えばセンサ11を生体へ挿入する場合の挿入方向を示す。センシング部分の寸法は、長さは例えば20～3mm、好ましく

は10～3mmであり、幅は例えば1～50 $\mu$ m、好ましくは500～500 $\mu$ mである。

[0099] 図1において、センサ11は、基板21と、電極22と、試薬層23と、銀／塩化銀層（参照層と呼ばれることもある。）24と、フィルム25を有する。電極22は、基板21上に一様に形成されており、作用極22a、参照極22bおよび対極22cを含んでいる。作用極22aおよび参照極22bは、溝A1によって物理的かつ電氣的に分離されており、参照極22bおよび対極22cは、溝A2によって物理的かつ電氣的に分離されている。試薬層23は作用極22a上に形成されている。銀／塩化銀層24は参照極22b上に形成されている。フィルム25は、電極22の一部（頭部の領域X1のうち領域X4の部分、対極22cの領域X3の部分等）および試薬層23の部分を除いて（それらを露出させる開口を備えることにより）、センサ11の上面を被覆している。なお、電極22の露出している領域X4は、本体11の回路と接続される。

[0100] なお、図1（B）の領域X5によって示されているように、センサ11の先端には（先端から所定の距離にわたって）試薬層23は形成されないことが好ましい。別言すれば、試薬層23は、センサ11の先端から離されて形成されることが好ましい。そのようにすることで、センサ11が生体内に挿入されるときに、試薬層23がセンサ11から剥がれる（めくれる）のを抑制できるからである。

[0101] 図2（A）は、図1（B）のAA矢視断面図である。センサ11の試薬層23が形成されている部分には、基板21、電極22（作用極22a）および試薬層23がこの順に積層されている。11aおよび11bの部分において、電極22（作用極22a）、試薬層23およびフィルム25は積層されておらず（トリミングされており）、基板21は露出している。

[0102] 図2（B）は、図1（B）のBB矢視断面図である。溝A1に対して右側の、銀／塩化銀層24が形成されている部分には、基板21、電極22（参照極22b）、銀／塩化銀層24、およびフィルム25が積層されている。

溝 A 1 に対して左側の、参照極 2 2 b とは物理的および電氣的に分離されている部分には、基板 2 1、電極 2 2（作用極 2 2 a）およびフィルム 2 5 が積層されている。銀／塩化銀層 2 4 の側面（図 2（B）の右側側面）は、フィルム 2 5 は配置されず、露出している。本実施形態において、銀／塩化銀層 2 4 の上面はフィルム 2 5 で被覆されているが、フィルム 2 5 で被覆されず、露出しているもよい。

[0103] 図 2（C）は、図 1（B）の C C 矢視断面図である。溝 A 2 に対して右側の部分には、基板 2 1 および電極 2 2（対極 2 2 c）が積層されている。対極 2 2 c の上面はフィルム 2 5 で被覆されず、露出している。溝 A 1 と溝 A 2 に挟まれた部分には、基板 2 1、電極 2 2（参照極 2 2 b）およびフィルム 2 5 が積層されている。溝 A 1 の左側の部分には、基板 2 1、電極 2 2（作用極 2 2 a）およびフィルム 2 5 が積層されている。

[0104] 基板 2 1 は、典型的にはシート状の合成樹脂である。基板 2 1 の材料は、柔軟性、易加工性、および耐熱性の少なくとも一つ以上の特徴を有するプラスチック材料（合成樹脂）のような樹脂材料であれば特に限定されない。そのような基板 2 1 の樹脂材料の代表例としては、ポリエチレンテレフタレート（PET）が挙げられるが、他にもポリエチレン、ポリプロピレン、およびポリエチレンナフタレートなどの汎用プラスチックが挙げられる。また、高い耐熱性が必要な場合は、ポリイミドが好ましい。

[0105] 電極 2 2 は、基板 2 1 上に形成されている薄膜（薄層）である。電極 2 2 の材料は、導電性および安定性（例えば、耐酸化性または耐塩性）を有する金属または炭素材料であれば特に限定されない。そのような電極 2 2 の材料の代表例としては金が挙げられるが、他にも白金、パラジウム、カーボンなどが挙げられる。なお、センサ 1 1 の上面および下面の一方に作用極 2 2 a（試薬層 2 3）を形成し、他方に対極 2 2 c を形成するようにする場合は、互いに異なる電極材料を用いてもよい。

[0106] 作用極 2 2 a には、酸化還元酵素によるアナライト（例えばグルコース）の反応によって還元されたメディエータを酸化させるのに十分な電位（参照

極 2 2 b を基準とした電位) が与えられる。グルコース濃度は、作用極 2 2 a と対極 2 2 c との間を流れる電流をモニタすることによって、測定される。試薬層 2 3 は、センサ 1 1 の先端部分における作用極 2 2 a の上面に形成される。

[0107] 銀／塩化銀層 2 4 は、必要に応じて、センサ 1 1 の先端部分における参照極 2 2 b の上面に形成される。本実施形態では、より精度のよい測定を実現するよう、作用極 2 2 a、参照極 2 2 b および対極 2 3 c からなる 3 電極構成の例を示しているが、参照極 2 2 b を含まず、作用極 2 2 a および対極 2 3 c からなる 2 電極構成とすることも可能である（例えば、現在市販されている SMBG（血糖自己測定器）は、そのような 2 電極構成が主流である）。参照極は、本実施形態に示したように、銀／塩化銀（Ag / AgCl）層 2 4 を形成した銀／塩化銀電極とすることができるほか、水素電極や、カロメル電極等の水銀を含む層を形成したものとすることができる。

[0108] フィルム 2 5 は、基板 2 1 上に形成された電極 2 2（作用極 2 2 a、参照極 2 2 b および対極 2 2 c）の所定の部分ならびに銀／塩化銀層 2 4 の上に形成（積層）されている、絶縁性を有するシート状の部材である。フィルム 2 5 の厚さは、通常 1  $\mu$ m 以上 150  $\mu$ m 以下、好ましくは 3  $\mu$ m 以上 50  $\mu$ m 以下、より好ましくは 5  $\mu$ m 以上 30  $\mu$ m 以下である。フィルム 2 5 は、センサ 1 1 の先端にある試薬層 2 3 に対応する部分、および対極 2 2 c の一部に対応する部分に開口を有しており、その部分の試薬層 2 3 および対極 2 2 c は露出している。

[0109] フィルム 2 5 は、例えば、基板 2 1 と同じ樹脂材料のシートに、粘着シート（例えば、アクリル系、ゴム系、またはホットメルト系）を貼り付けたものとすることができる。上記の樹脂材料のシートは、基板 2 1 と同じ樹脂材料のシートであってもよいし、異なる樹脂材料のシートであってもよい。粘着シート単体をフィルム 2 5 として用いてもよい。熱もしくは光可塑性レジストフィルム、またはレジストインキから形成された層を、フィルム 2 5 として用いることも可能である。

[0110] 試薬層 23 を形成するための試薬液は、フィルム 25 の対応する部分にある開口から、電極 22（作用極 22 a）の表面に滴下して塗布することができる。そのような工程の作業性等の観点から、フィルム 25 の表面に対する試薬液の接触角（ $\alpha$ ）は、フィルム 25 の開口部、すなわち露出している作用極 22 a の表面に対する試薬液の接触角（ $\beta$ ）よりも高いことが好ましく、その差（ $\alpha - \beta$ ）は大きいほど好ましい。例えば、 $\alpha$  は  $90^\circ$  以上であり、かつ  $\beta$  は  $50^\circ$  以下であることが好ましい。なお、ここでいう「接触角」は、「 $\theta/2$ 法」により測定される「静的接触角」である。フィルム 25 を形成する材料自体および／または露出している作用極 22 a を形成する材料自体が上記のような接触角の条件を満たさないとしても、適切な表面処理により、例えばフィルム 25 に対する撥水処理および作用極 22 a に対する親水処理の少なくとも一方を行うことにより、上記のような接触角の条件を満たすことが可能である。

[0111] 図 1（A）および（B）には図示していないが、センサ 11 の少なくとも試薬層 23 を含む部分は保護膜で被覆されていてもよい。つまり、図 2（B）の試薬層 23 の上面には保護膜が形成（積層）されていてもよい。試薬層については、それが図示されている図 4～図 6 を参照しながら後述する。

[0112] センサ 11 の製造方法は特に限定されるものではなく、上述したような構成を所定の部位に有するセンサ 11 を製造できる方法を適宜選択して用いることができる。例えば、センサ 11 は下記の工程（i）～（viii）を行うことにより製造することができる：

- （i）基板 21 の上面に電極 22 を形成（積層）する工程；
- （ii）電極 22 を作用極 22 a、参照極 22 b および対極 22 c の 3 つの領域に物理的かつ電氣的に分離する、溝 A1 および A2 を形成する工程；
- （iii）電極 22（参照極 22 b）の上面に、銀／塩化銀層 24 を形成する工程；
- （iv）電極 22 および銀／塩化銀層 24 の上面に、フィルム 25 を形成（積層）する工程；

- (v) 電極 2 2 (作用極 2 2 a) の上面に、試薬層 2 3 を形成する工程；
- (vi) 試薬層 2 3 および電極 2 2 の一部 (領域 X 6) を除去する工程；
- (vii) 基板 2 1 からセンサ 1 1 を切り出す工程；
- (viii) 保護膜を形成する工程。

[0113] 上記工程 (i) について、電極 2 2 の形成 (積層) 方法は、電極 2 2 の材料と基板 2 1 の材料の組み合わせ等を考慮して、適宜選択し調整することができる。例えば、基板 2 1 の材料が P E T 等の合成樹脂であり、電極 2 2 の材料が金属である場合、蒸着 (スパッタリングを含む。) により、その金属材料からなる電極 2 2 を基板 2 1 の表面に形成することができるが、他にも印刷、メッキ、スピコート等を用いることもできる。基板 2 1 の材料が P E T 等の合成樹脂であり、電極 2 2 の材料が炭素である場合は、例えば、基板 2 1 の表面にカーボンペーストを印刷することにより炭素からなる電極 2 2 を形成することができる。なお、この工程における基板 2 1 は、あらかじめセンサ 1 1 の形状を有している必要はなく、後に行われる工程 (vii) によりセンサ 1 1 を切り出すことができるよう、センサ 1 1 よりも大きな寸法を有する基板 2 1 を用いることができる。

[0114] 上記工程 (ii) について、溝 A 1 および A 2 を形成する手段としては、例えばレーザートリミングを用いることができる。

[0115] 上記工程 (iii) について、銀/塩化銀層 2 4 の形成方法は、銀/塩化銀層 2 4 の材料と電極 2 2 の材料の組み合わせ等を考慮して、適宜選択し調整することができる。例えば、銀/塩化銀ペースト (インク) を用いて、金属または炭素を材料とする電極 2 2 の上面にスクリーン印刷法、インクジェット法などにより印刷または塗布した後、乾燥することにより、電極 2 2 の上面に銀/塩化銀層 2 4 を形成することができる。また、電極 2 2 の上面に銀 (A g) を印刷、塗布、メッキ等をした後、その表面を塩化処理することにより、銀/塩化銀層 2 4 を形成することもできる。

[0116] 上記工程 (iv) について、フィルム 2 5 の形成 (積層) 方法は、フィルム 2 5 の材料と電極 2 2 および銀/塩化銀層 2 4 の材料の組み合わせ等を考慮

して、適宜選択し調整することができる。例えば、樹脂シートおよび粘着シートの積層体からなる、または粘着シート単体からなるフィルム25に、試薬層23の寸法に対応した（少なくとも試薬層23の寸法よりも大きな）開口を形成しておく。そのようなフィルム25を、その開口が電極22（作用極22a）の試薬層23を形成する部分を取り囲むよう、電極22の上面に配置し、粘着シートにより固定する。一方、レジストフィルムまたはレジストインキを用いて、上述したような所定の位置および寸法の部分を除去することで、所定の開口を有するフィルム25を形成（積層）することもできる。

[0117] なお、電極22のうち対極22cの一部（領域X3）の上面にはフィルム25は形成されず、対極22cが露出している。したがって、例えば、上記のようにして一旦対極22cの上面も含めてフィルムを形成した後、カッティング等によりフィルム25に切り欠き形状の開口を形成するようにしてもよい。

[0118] 上記工程(v)では、例えば、所定の開口を有するフィルム25と、あらかじめ調製された試薬液とを用いて、その試薬液を上記工程(iv)により形成（積層）されているフィルム25の開口の部分に滴下することで、作用極22aの少なくとも一部にアプライすることができる。そして、そのアプライされた試薬液を乾燥させることで、作用極22aの上面に試薬層23が形成される。

[0119] なお、フィルム25の開口は、例えば、センサ11（図1(B)に示す先端部分）の幅よりも大きな幅の試薬層が形成される寸法および形状を有していてもよい。その場合、アプライされた試薬液から、センサ11の幅より大きく形成された試薬層は、次の工程(vi)によって、所定の幅および形状を有するものとなるよう整形される。

[0120] 上記工程(vi)における、試薬層23および電極22の除去（トリミング）は、センサ11（先端部分）の幅方向の端部において、センサ11の長さ方向（例えば生体への挿入方向）の所定の長さになら行われる。このよ

うな工程 (vi) におけるトリミングにより、試薬層をある程度の面積にわたって形成した後に、適切な部分（好ましくは均一の部分）を選択して、センサ間で揃えられた所定の面積の試薬層を形成すること、あわせて次の工程 (vii) において、形成された試薬層を割ることなく、センサ 11 を外形に沿って基板 21 から切り出すことができる。試薬層 23 および電極 22 の除去方法は、試薬層 23 の材料（試薬液の組成）および電極 22 の材料等を考慮して、適宜選択し調整することができる。例えば、試薬層 23 および電極 22 は、レーザートリミングにより除去することができる。

[0121] 上記工程 (vii) について、センサ 11 を基板 21 から切り出す（カッティングする）方法は、基板 21 の材料や切り出されるセンサの形状等を考慮して、適宜選択し調整することができる。例えば、基板 21 の材料が樹脂である場合は、一般的なカッティング技術を用いることができる。

[0122] なお、カッティング位置には工程 (vi) によりトリミングされた部分が含まれ、例えば、レーザートリミングによる凹部の底部分の中央線付近をカッティング位置とすることができる。換言すれば、トリミングされた試薬層 23 および作用極 22 a から多少離れた位置においてカッティングされる。

[0123] 上記工程 (viii) は、本発明の電気化学センサとの関係で記載した保護膜の形成方法を参照できるほか、保護膜の材料すなわち保護膜溶液の組成および被覆される部分の材料（主に試薬層 23 の材料すなわち試薬液の組成）の組み合わせ、被覆される部分の形状や面積等を考慮して、適宜選択し調整することができる。例えば、保護膜溶液に作用極 22 a（少なくとも試薬層 23 が形成されている部分）を浸し、引き上げて乾燥することにより、その部分を保護膜で被覆することができる。

[0124] 図 3 は、本発明の他の実施形態におけるセンサ 101 を表す平面図である。センサ 101 は、センシング部（生体内に挿入したり、培地中に浸漬したりする先端部分）121、および本体（図示せず）の内部回路と電氣的に接続するための端子部 122 から構成される。

[0125] 図 4 は、図 3 の A-A' 切断線でのセンサ 101 の断面図を示す。絶縁性

基板 111 の両面に導電性薄膜 112 を備える。絶縁性基板 111 の一方の面（表側）の導電性薄膜 112 は、レーザー描写によって絶縁性基板 111 の表面に達する深さの溝 113 を形成し、電氣的に絶縁することで、作用極領域 112 a と参照極領域 112 b に分離されている。

[0126] 絶縁性基板 111 の上面は、参照極領域 112 b の所定の位置に、参照極 115 を形成するための開口を有する絶縁性レジスト膜 116 a で被覆され、絶縁性基板 111 の下面は、絶縁性レジスト膜 116 b で被覆されている。一方、センシング部分 121 の端部から一定距離離れた部分までは、上面、下面とも絶縁性レジスト膜 116 a、116 b で被覆されておらず、その表側の領域 112 a が作用極 114 となり、裏側の領域 112 c が対極 117 となる。試薬層 118 は、作用極 114 上に形成されている。

[0127] 図 5 は、図 4 における B-B' 切断線における断面図を示し、図 6 は、図 4 における C-C' 切断線における断面図を示す。図 5 に示すように、B-B' 切断線では、上面から下面に向けて順に（図中の矢印方向）、保護膜 119、試薬層 118、作用極 114、絶縁性基板 111、対極 117 及び保護膜 119 が形成されている。また、図 6 に示すように、C-C' 切断線では、上面から下面に向けて順に（図中の矢印方向）、保護膜 119、参照極 115（絶縁性レジスト膜 116 a）、作用極領域 112 a、絶縁性基板 111、対極領域 112 c、絶縁性レジスト膜 116 b 及び保護膜 119 が形成されている。なお、図 6 に示す作用極領域 112 a 及び対極領域 112 c は、その上面側に絶縁性レジスト膜 116 a、116 b を備えているため、作用極及び対極として機能しないこととなる。

[0128] 図 7 は、本発明の他の実施形態におけるセンサ 201 を表す平面図である。センサ 201 は、アナライトを電気化学的に測定するための構成を備えたセンシング部 202、本体（図示せず）の内部回路と電氣的に接続するための構成を備えた端子部 203、および端子部の近傍に設けられた切り欠き部 204 を含む。センサ 201 は、例えば培地中のアナライト測定用のシステムを構築する場合に好適な実施形態であり、センシング部 202 は、液量の

少ない培地中にも浸漬可能なような構造を有し、切り欠き部204は、培養容器にセンサ201を設置するのに適した構造を有する。図7(A)は、フィルム(絶縁性レジスト膜)230が形成される前の電極パターンを示し、図7(B)は、フィルム230が形成された後の電極パターンを示す。

[0129] 図7(A)に示すように、センサ201は、基板210上に電極220が形成されており、電極220は、溝225によって物理的かつ電氣的に、第1の作用極221、第2の作用極222、参照極223および対極224に分離されている。図7(B)に示すように、フィルム230で被覆されることにより、第1の作用極221は、センシング部202における露出領域221aと、端子部203における露出領域221bを有する。同様に、第2の作用極222、参照極223および対極224も、それぞれ、センシング部202における露出領域222a、223aおよび224aと、端子部203における露出領域222b、223bおよび224bを有する。センシング部202には、第1の作用極の露出領域221aおよび第2の作用極の露出領域222aが、面積が最大化されるように横並びで配置されると共に、参照極の露出領域223aおよび対極の露出領域224aも配置される。第1の作用極の露出領域221aおよび第2の作用極の露出領域222aには、それぞれ異なるアナライトを測定するための、異なる種類の試薬層(図示せず)を形成することができる。第1の作用極、第2の作用極、参照極および対極それぞれの端子部203における露出領域221b、222b、223bおよび224bは、例えば電極パット(図示せず)により本体(図示せず)と電氣的に接続することができる。

## 実施例

[0130] 本実施例(試験例を含む。)で用いた材料は以下の通りである。

(a) 導電性炭素フィラー

(a-1) カーボンブラック…Sigma-Aldrich「05-1530」

[0131] (b) アニオン性分散剤

(b-1A) ポリ(アクリル酸)100,000…Sigma-Aldrich「523925」、Average Mw~100,000

(b-1B) ポリ(アクリル酸)25,000…富士フィルム和光純薬株式会社「162-18581」、平均分子量：約25,000

(b-1C) ポリ(アクリル酸)5,000…富士フィルム和光純薬株式会社「165-18571」、平均分子量：約5,000

(b-2A) ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム塩)…Sigma-Aldrich「81609」、Average Mw~16,800

(b-2B) ポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)…Sigma-Aldrich「243051」、Average Mw~70,000

(b-3) ポリ(4-スチレンスルホン酸-cο-マレイン酸)ナトリウム塩…Sigma-Aldrich「434558」、Average Mw~20,000

(b-4) ポリ(エチレンオキシド)-b-ポリ(アクリル酸)…Polymer Source社「P6348-EOAA」、Mn (POA-b-PA A) : 2-b-2.4 (10<sup>3</sup>g/mol)

(b-5) ポリ(スチレン)-b-ポリ(アクリル酸)…Polymer Source社「P2397-SAA」、Mn (PS-b-PAA) : 1.5-b-44 (10<sup>3</sup>g/mol)

[0132] (非b) 非アニオン性分散剤

(非b-1) ヒドロキシプロピルセルロース…日本曹達株式会社「NIS SO HPC」

[0133] (c) カチオン性メディエータ

(c-1) ポリマー結合型PNT1…レドックスメディエータ化合物(c1)としてのフェノチアジン系化合物NHS体(PNT-70)と、カチオン性ポリマー(c2)としての、2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩、(4-ビニルフェニル)メタンアミン、およびメタクリロイルコリンクロリドの共重合体(以下「ポリマーC」と呼ぶ。)とが結合した構造を有する。

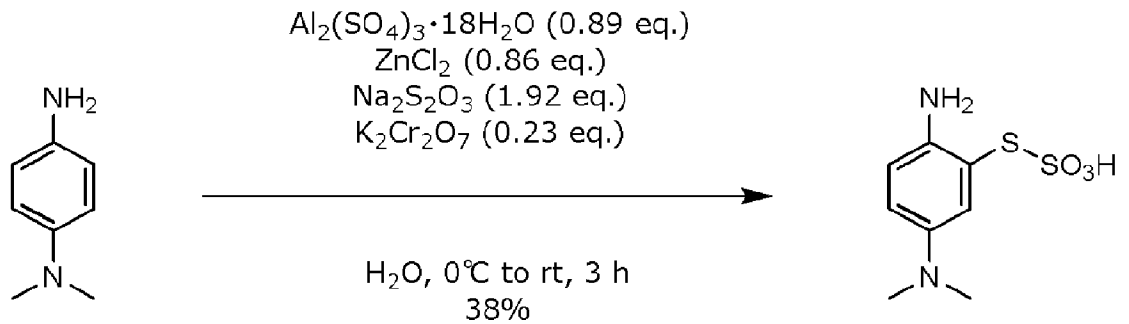
(c-2) ポリマー結合型PNT 2…レドックスメディエータ化合物 (c 1) としてのフェノチアジン系化合物 (PNT-70) と、カチオン性ポリマー (c 2) としての、ポリ(L-リジン)塩酸塩 (ALAMANDA POLYMERS社「PLKC800」) (以下「PLL」と呼ぶ。) とが結合した構造を有する。

上記PNT-70、ポリマーC、ポリマー結合型PNT 1、ポリマー結合型PNT 2の合成方法は、それぞれ下記のとおりである。

[0134] [合成例1] PNT-70の合成

[0135] (1) スルホン酸フラグメントの合成

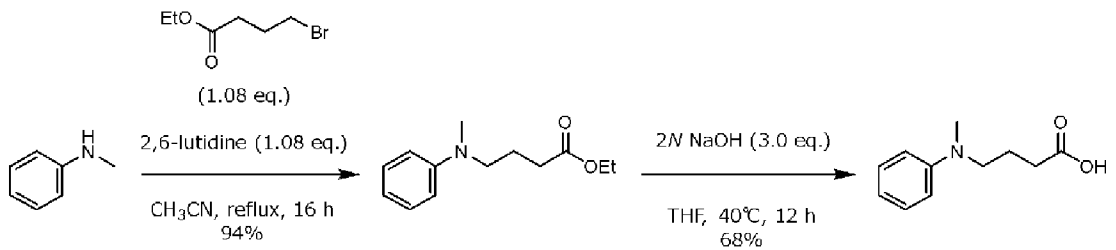
[化3]



[0136] 上記の反応により、スルホン酸フラグメントを合成した。

[0137] (2) スルホン酸フラグメントの合成

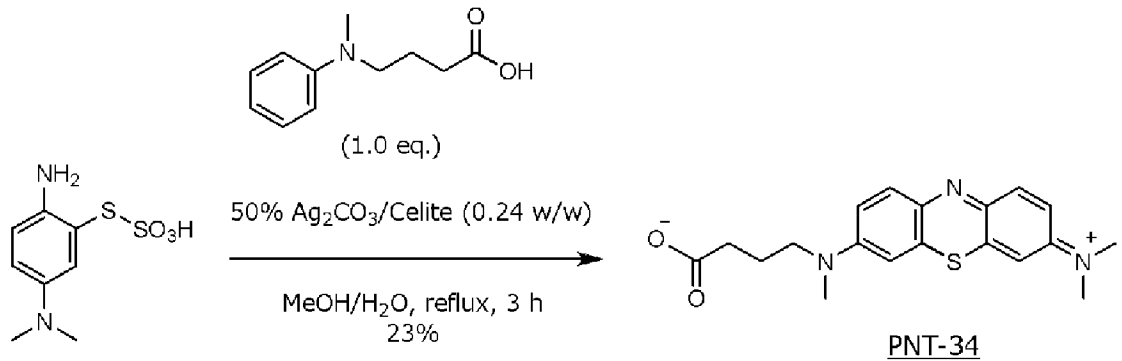
[化4]



[0138] 上記のようなアセトニトリル中およびテトラヒドロフラン (THF) 中での2段階の反応により、カルボン酸フラグメントを合成した。

[0139] (3) PNT-34の合成

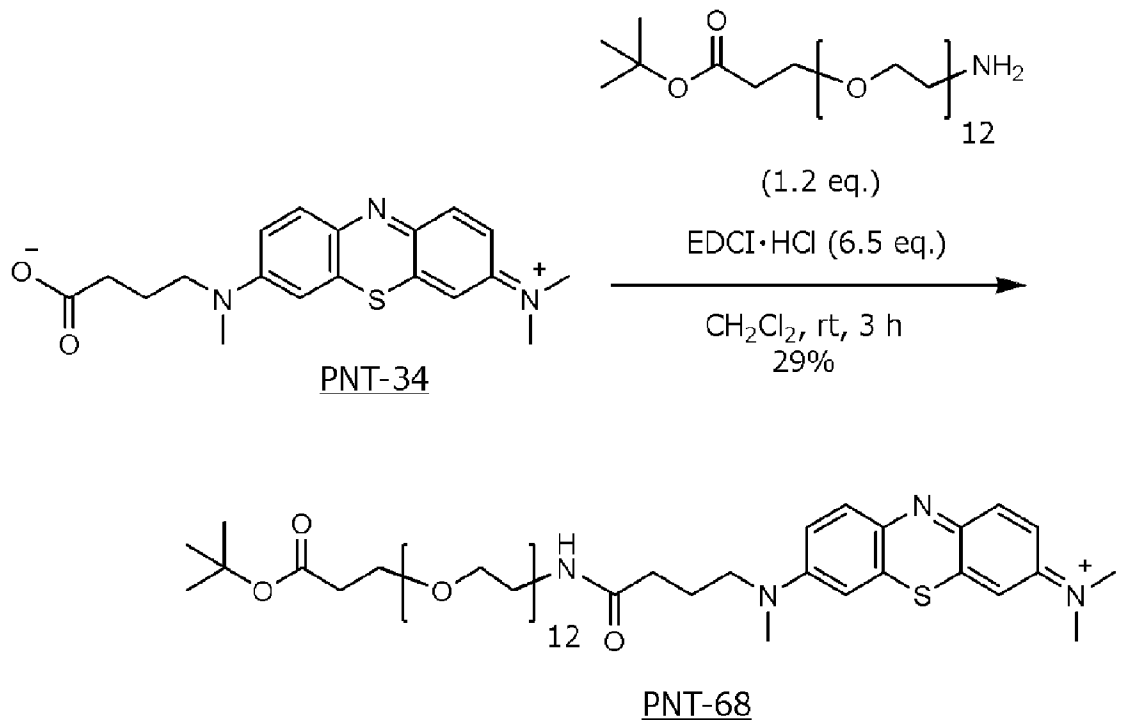
[化5]



[0140] 上記のようにして合成したスルホン酸フラグメントおよびカルボン酸フラグメントをMeOH/H<sub>2</sub>Oに懸濁させ、内温47℃付近で50%Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/セライトを15分かけて分割添加した。添加後、内温68℃付近にて2.5時間攪拌した。室温まで放冷後、セライト濾過を行い、濾液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて複数回精製することで、PNT-34を得た。

[0141] (4) 縮合体 (PNT-68) の合成

[化6]

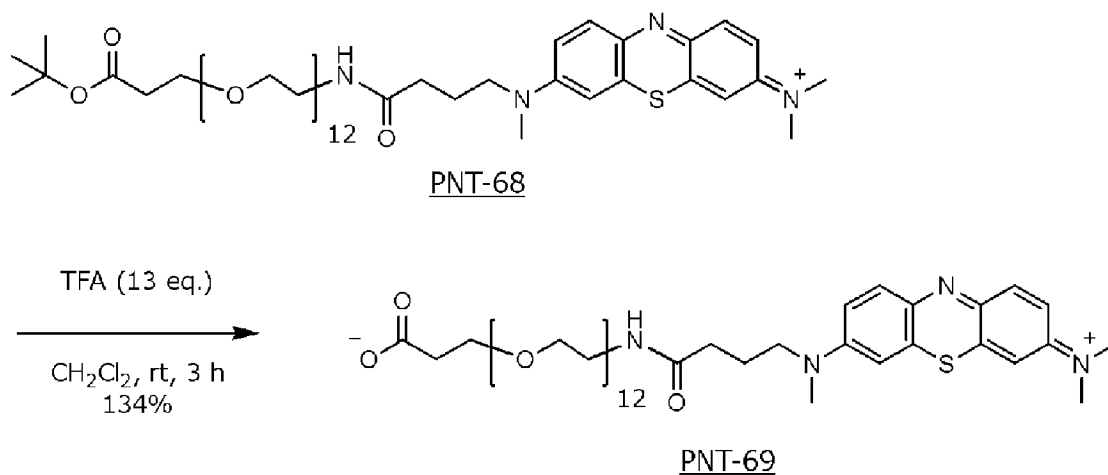


[0142] Ar雰囲気下、PNT-34をジクロロメタンに溶解させ、アミノ-PE

G12-*t*-ブチルエステルおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDCI·HCl) を添加後、室温下、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて3回精製することで縮合体 (PNT-68) を得た。

[0143] (5) 脱保護体 (PNT-69) の合成

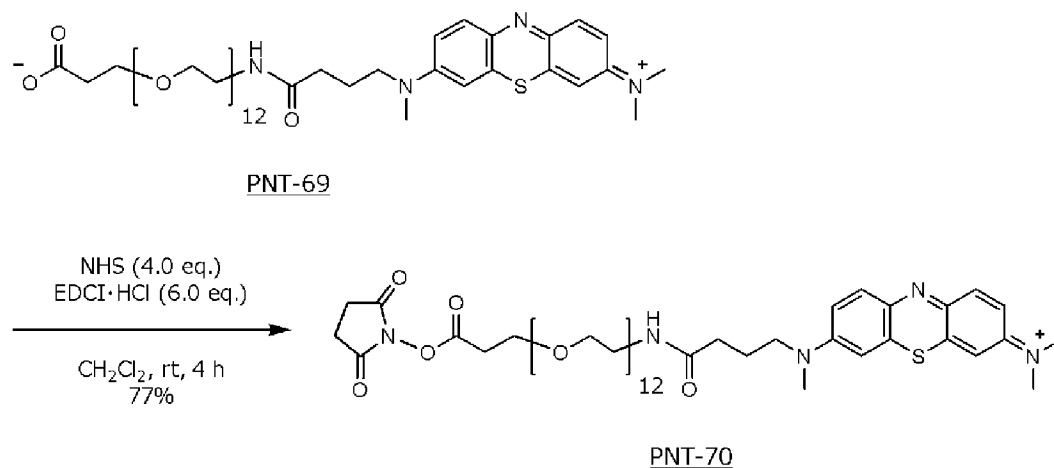
[化7]



[0144] (4) で得られた縮合体 (PNT-68) をジクロロメタンに溶解させ、トリフルオロ酢酸 (TFA) を添加した後、室温下、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、トルエンで数回共沸させることで脱保護体 (PNT-69) を得た。

[0145] (6) PNT-69 NHS体 (PNT-70) の合成

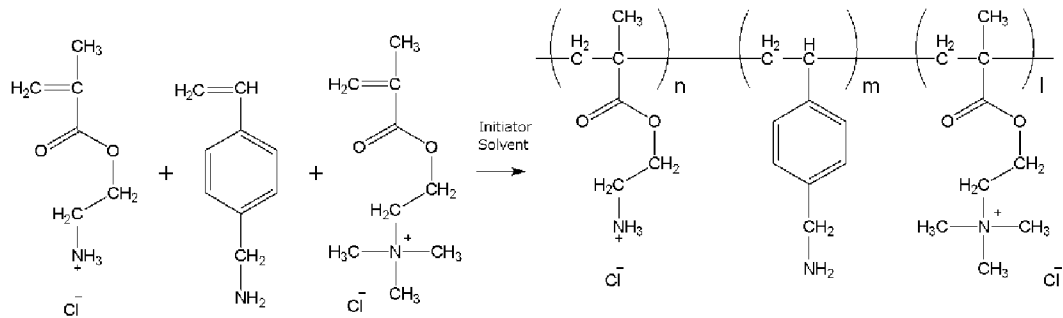
[化8]



[0146] 脱保護体 (PNT-69) をジクロロメタンに溶解させ、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および EDCI・HCl を添加した後、室温下、4 時間攪拌した。反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することで、PEG 鎖 (PEG12) の末端のカルボキシ基が活性化 (NHS エステル化) された PNT-69 NHS 体 (PNT-70) を得た。

[0147] [合成例 2] ポリマー C の合成

[化 9]



[0148] まず、2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩と、(4-ビニルフェニル)メタンアミンと、メタクロイルコリンクロリドとを用意した。そして、4 つ口フラスコに 2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩を 0.97 mmol、(4-ビニルフェニル)メタンアミンを 0.97 mmol、メタクロイルコリンクロリドを 11.97 mmol、V-50 を 0.08 mmol、エタノールを 10.49 g 投入した。以降はポリマー A の場合と同様の処理を施し、ポリマー C を得た。ポリマー C は、<sup>1</sup>H-NMR の結果からモル比を算出した結果、 $n : m : l = 21.2 : 8.1 : 70.7$  であるポリマーに相当する。また、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で測定した結果、当該ポリマーの数平均分子量  $M_n$  は 37,774 であり、重量平均分子量  $M_w$  は 214,367 であった。

[0149] [合成例 3] ポリマー結合型 PNT 1 の合成

PNT-69 NHS 体 (PNT-70) を 21.05 mg/mL になるように MilliQ 水で溶解させた (液(1))。高分子量ポリマーとして、ポリマー C を 15 mg/mL になるように MilliQ 水で溶解させた (液(2))。次に、WSC (DOJINDO W001) を 20 mg/mL になるよう

にMilliQ水で溶解させた（液(3)）。液(1)を40 $\mu$ L、液(2)を140.3 $\mu$ L、液(3)を383.4 $\mu$ L、別途調製した250mM 2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）緩衝液（pH6.0）を96 $\mu$ L混合し、MilliQ水で合計体積1200 $\mu$ Lになるように調整した。その後、約20時間、室温にて攪拌しながら反応させた。その後、遠心式限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-4 50k；メルクミリポア）を用いて限外ろ過を数回行い、低分子を除いた液を回収した。

[0150] [合成例4] ポリマー結合型PNT2の合成

PNT-69NHS体（PNT-70）を15mg/mLになるようにMilliQ水で溶解させた（液(1)）。高分子量ポリマーとして、ポリ（レリジン）塩酸塩（ALAMANDA POLYMERS PLKC800）を10mg/mLになるようにMilliQ水で溶解させた（液(2)）。次に、WSC（DOJINDO W001）を20mg/mLになるようにMilliQ水で溶解させた（液(3)）。液(1)を43.7 $\mu$ L、液(2)を51.3 $\mu$ L、液(3)を479.3 $\mu$ L、別途調製した250mM 2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）緩衝液（pH6.0）を96 $\mu$ L混合し、MilliQ水で合計体積1200 $\mu$ Lになるように調整した。その後、約20時間、室温にて攪拌しながら反応させた。その後、遠心式限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-4 50k；メルクミリポア）を用いて限外ろ過を数回行い、低分子を除いた液を回収した。

[0151] (d) 酸化還元酵素

(d-1) 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

[0152] (e) 架橋剤

(e-1) グルタルアルデヒド…グルタルアルデヒド25%溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）

[0153] (f) 緩衝液

(f-1) Bis-Tris : (ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノ)トリス

(ヒドロキシメチル)メタン)…同仁化学社製

(f-2A) Tris-HCl pH7.5…Invitrogen UltraPure 1M Tris-HCl pH7.5、ThermoFisherSCIENTIFIC社

(f-2B) Tris-HCl pH8.0…Invitrogen UltraPure 1M Tris-HCl pH8.0、ThermoFisherSCIENTIFIC社

(f-2C) Tris-HCl pH8.5…1M Tris-HCl (pH8.5)、富士フィルム和光純薬(製造元株式会社ニッポンジーン)

[0154] (g) 金属塩

塩化ナトリウム (NaCl) …富士フィルム和光純薬株式会社 (製品コード: 191-01665)

塩化カリウム (KCl) …ナカライテスク株式会社 (製品コード: 28514-75)

臭化ナトリウム (NaBr) …富士フィルム和光純薬株式会社 (製品コード: 192-09412)

臭化カリウム (KBr) …富士フィルム和光純薬株式会社 (製品コード: 164-03472)

臭化マグネシウム (MgBr<sub>2</sub>) 六水和物…富士フィルム和光純薬株式会社 (製品コード: 138-09192、純度99.9%)

硫酸カリウム (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) …富士フィルム和光純薬株式会社 (製品コード: 169-13552、純度99.9%)

[0155] [試験例1] 分散性試験

<試薬液サンプルの調製>

表2に示す配合に従って、1mg/mLまたは2mg/mLの濃度の各種のアニオン性分散剤(b)の水溶液に、カーボン濃度が20mg/mLとなるようにカーボンブラック(a-1)を添加した後、超音波ホモジナイザーで3分間以上処理することにより、試薬液サンプルを調製した。

[0156] [表2]

試薬液 サンプル	(a) 導電性炭素フィラー	(b) アニオン性分散剤	
1-1	(a-1) カーボンブラック 20 mg/mL	(b-1A) ポリ(アクリル酸)100,000	1 mg/mL
1-2		(b-1B) ポリ(アクリル酸)25,000	1 mg/mL
1-3		(b-1C) ポリ(アクリル酸)5,000	1 mg/mL
1-4		(b-2A) ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム塩)	1 mg/mL
1-5		(b-2B) ポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)	1 mg/mL
1-6		(b-3) ポリ(4-スチレンスルホン酸-co-マレイン酸) ナトリウム塩	1 mg/mL
1-7		(b-4) ポリ(エチレンオキシド)-b-ポリ(アクリル酸)	1 mg/mL
1-8		(b-5) ポリ(スチレン)-b-ポリ(アクリル酸)	1 mg/mL
1-9		(b-1A) ポリ(アクリル酸)100,000	2 mg/mL
1-10		(b-4) ポリ(エチレンオキシド)-b-ポリ(アクリル酸)	2 mg/mL
1-11		(b-5) ポリ(スチレン)-b-ポリ(アクリル酸)	2 mg/mL

## [0157] &lt;試薬液のフィルター処理&gt;

上記のようにして得られた試薬液サンプルを、使用時に超音波バスで約10分間処理した。得られた再分散液サンプルを、0.8  $\mu$ mのフィルター（ADVANTEC、DISMIC 25CS080AN）で濾過し、回収された濾液をMilli-Q水で10倍希釈し、回収液サンプルとした。

[0158] 回収液サンプルの撮影画像を図8に示す。回収液サンプルの色が薄いほど、フィルターを通過したカーボンブラック（a-1）が少なく、凝集したカーボンブラック（a-1）であってフィルターに捕捉されたものが多いこと、つまり分散性が小さいことを意味している。しかしながら、試薬液（回収液）サンプル1-1～1-11いずれのアニオン性分散剤（b）であっても、程度の差はあるが、導電性炭素フィラー（a）を水系溶媒中に分散化させ

る効果を有することが示されている。また、アニオン性分散剤（b）として、平均分子量の異なるポリ(アクリル酸)を同濃度（1 mg/mL）で用いている試薬液（回収液）サンプル1-1～1-3の結果から、ポリ(アクリル酸)のようなアニオン性ポリマーをアニオン性分散剤（b）として用いる場合、その平均分子量が大きくなると、導電性炭素フィラー（a）の分散化効果が小さくなることが示唆されている。

[0159] [試験例2] pHおよび金属イオン濃度依存性試験 その1

表3に示す配合に従って、所定の濃度の各種の成分を含む試薬液サンプルを調製した。緩衝液は、所定の量で用いたときに試薬液のpHが所定の値となるよう、調製したものをを用いた。なお、この試験例2は、金属イオン（金属塩）を含まない緩衝液を用いてpHを調節した上で、すべて同濃度の金属イオン（金属塩）を含有する試薬液サンプルの分散性を比較するものである。

[0160] ポリマー結合型PNTの濃度は、まず各ポリマー結合型PNTのストック溶液を25倍希釈してマイクロプレートに100 $\mu$ L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、ストック溶液における濃度を確認し、その値を元に各試薬サンプルにおける濃度の調整を行った。「吸光度3相当」という値は、25倍希釈時に608nmの吸光度において約0.12であることを示す。ここで、マイクロプレートには、グライナー・バイオ・ワン社製のUV-Star（登録商標）96Well F-Bodenを用いた。また、プレートリーダーには、テカン社製のinfinite（登録商標）M200 Proを用いた。

[0161]

[表3]

試薬液 サンプル	(a) 導電性 炭素フィラ ー	(b) アニオン性 分散剤	(c) カチオン性 メディエータ	(f) 緩衝液			(g) 金属塩	分散性 評価※
				pH	(f-1) Bis-Tris	40 mM		
2-1	(a-1) カーボン ブラック  3 mg/mL	(b-1C) ポリ(アクリル 酸)5,000  0.15 mg/mL	ポリマー 結合型 PNT1  吸光度 3相当	pH 6.0	(f-1) Bis-Tris	40 mM	Na 50 mM  (NaCl 50mM 由来)	○
2-2				pH 6.5	(f-1) Bis-Tris	40 mM		○
2-3				pH 7.0	(f-1) Bis-Tris	40 mM		○
2-4				pH 7.5	(f-2A) Tris-HCl	40 mM		○
2-5				pH 8.0	(f-2B) Tris-HCl	40 mM		○
2-6				pH 8.5	(f-2C) Tris-HCl	40 mM		X

※ ○:凝集なし X:凝集発生

[0162] 試薬液サンプルの調製は次のように行った。まず、アニオン性分散剤（b）の水溶液に導電性炭素フィラー（a）を添加して超音波ホモジナイザーで3分間以上処理し、そこに緩衝液（f）および金属塩（g）を添加した。次に、その処理液にカチオン性メディエータ（c）を添加して超音波ホモジナイザーで約30秒間処理した。得られた試薬液サンプルにおける凝集の有無を目視で確認した。結果を表3にあわせて示す。

[0163] [試験例3] pHおよび金属イオン濃度依存性試験 その2

表4に示す配合に従って、所定の濃度の各種の成分を含む試薬液サンプルを調製した。なお、この試験例3は、金属イオン（金属塩）を含まない緩衝液を用いてpHを調節した上で、異なる濃度の金属イオン（金属塩）を含有する試薬液サンプルの分散性を比較するものである。

[0164]

[表4]

試薬液 サンプル	(a) 導電性 炭素フィラ ー	(b) アニオン性 分散剤	(c) カチオン性 メディエータ	(f) 緩衝液	(g) 金属塩		分散性 評価※
3-1	(a-1) カーボン ブラック 3 mg/mL	(b-1C) ポリ(アクリル 酸)5,000 0.15 mg/mL	ポリマー 結合型 PNT1 吸光度 3相当	pH 6.5 (f-1) Bis-Tris 40 mM	Na (NaCl)	0 mM	○
3-2					Na (NaCl)	20 mM	○
3-3					Na (NaCl)	50 mM	○
3-4					Na (NaCl)	70 mM	○
3-5					Na (NaCl)	80 mM	○
3-6					Na (NaCl)	100 mM	X

※ ○:凝集なし X:凝集発生

[0165] 試薬液サンプルの調製は次のように行った。まず、アニオン性分散剤 (b) の水溶液に導電性炭素フィラー (a) を添加して超音波ホモジナイザーで3分間以上処理し、そこに緩衝液 (f) および金属塩 (g) を添加した。次に、その処理液にカチオン性メディエータ (c) を添加して超音波ホモジナイザーで約30秒間処理した。得られた試薬液サンプルにおける凝集の有無を目視で確認した。結果を表4にあわせて示す。

[0166] [試験例4] pHおよび金属イオン濃度依存性試験 その3

表5に示す配合に従って、所定の濃度の各種の成分を含む試薬液サンプルを調製した。なお、この試験例4は、金属イオン (金属塩) を含まない緩衝液を用いてpHを調節した上で、異なる種類および濃度の金属塩 (金属イオン) を含有する試薬液サンプルの分散性を比較するものである。

[0167]

[表5]

試薬液 サンプル	(a) 導電性炭 素フィラー	(b) アニオン性 分散剤	(c) カチオン性 メディエータ	(f) 緩衝液	(g) 金属塩		分散性 評価※
4-1	(a-1) カーボン ブラック	(b-1C) ポリ(アクリル 酸)5,000	ポリマー 結合型 PNT1  吸光度 3相当	pH 6.5  (f-1) Bis-Tris  40 mM	K (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	40 mM (20 mM)	○
4-2					Na (NaCl)	50 mM	○
4-3					K (KCl)	50 mM	○
4-4					Na (NaBr)	50 mM	○
4-5					K (KBr)	50 mM	○
4-6					Mg (MgBr <sub>2</sub> )	50 mM	○
4-7					K (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	100 mM (50 mM)	X
4-8					Na (NaCl)	100 mM	X
4-9					K (KCl)	100 mM	X
4-10					Na (NaBr)	100 mM	X
4-11					K (KBr)	100 mM	X
4-12					Mg (MgBr <sub>2</sub> )	100 mM	○
4-13					Mg (MgBr <sub>2</sub> )	200 mM	○

※ ○:凝集なし X:凝集発生

[0168] 試薬液サンプルの調製は次のように行った。まず、アニオン性分散剤 (b) の水溶液に導電性炭素フィラー (a) を添加して超音波ホモジナイザーで3分間以上処理し、そこに緩衝液 (f) および金属塩 (g) を添加した。次に、その処理液にカチオン性メディエータ (c) を添加して超音波ホモジナイザーで約30秒間処理した。

[0169] 得られた試薬液サンプルにおける凝集の有無を目視で確認した。結果を表5にあわせて示す。試験例2~4の結果について、まず試験例2の結果から、試薬液のpHが高い場合には (pHの調整のための緩衝液由来の金属塩の濃度による影響ではなく、pH自体の影響により) 凝集が発生することもあるが、試薬液の組成に応じた適切なpHの範囲において、導電性炭素フィラーの分散性を向上させ、凝集を抑制できることが分かった。また、試験例3および4の結果から、試薬液中に含まれる金属イオンの種類によって凝集の発生状況は異なるが、概して、金属イオンの濃度が高い場合に凝集が生じやすい傾向にあること、例えば、金属イオンの濃度が100mM未満であれば

、多くの金属イオンにとって凝集の発生を抑制できることが示唆されること、一方でマグネシウムイオンのように、濃度が50mMより高くても（例えば200mM程度であっても）凝集の発生を抑制できる場合もあること、したがって金属イオンの種類に応じた適切な濃度の範囲において、導電性炭素フィラーの分散性を向上させ、凝集を抑制できることが分かった。

[0170] [試験例5] アニオン性分散剤（b）の試験

表6に示す配合に従って、所定の濃度の各種の成分を含む試薬液サンプルを調製した。

[表6]

試薬液 サンプル	(a) 導電性 炭素フィ ラー	(b) アニオン性 分散剤	(c) カチオン性 メディエータ		(d) 酸化還 元酵素	(e) 架橋剤	(f) 緩衝液			分散性 評価※	
				吸光度			pH	(f-1)			
5-1	(a-1) カーボン ブラック	(b-1C) ポリ(アクリ ル酸)5,000	(c-1) ポリマー 結合型 PNT1	吸光度 3相当	FAD依 存性グル コースデ ヒドロゲ ナーゼ  4000 U/mL	グルタ ルアル デヒド  0.01% (wt/v)	pH 5.3	(f-1) Bis-Tris	40 mM	○	
5-2				吸光度 3相当			pH 6.0	(f-1) Bis-Tris	40 mM	○	
5-3				吸光度 4相当			pH 5.3	(f-1) Bis-Tris	40 mM	○	
5-4				吸光度 4相当			pH 6.0	(f-1) Bis-Tris	40 mM	○	
5-5			0.15 mg/mL	(c-2) ポリマー 結合型 PNT2			吸光度 3相当	pH 5.3	(f-1) Bis-Tris	40 mM	X
5-6							吸光度 3相当	pH 6.0	(f-1) Bis-Tris	40 mM	X
5-7							吸光度 4相当	pH 5.3	(f-1) Bis-Tris	40 mM	○
5-8							吸光度 4相当	pH 6.0	(f-1) Bis-Tris	40 mM	X

※ ○:凝集なし X:凝集発生

[0171] 試験液サンプルの調製は次のように行った。まず、アニオン性分散剤（b）の水溶液に導電性炭素フィラー（a）を添加して超音波ホモジナイザーで3分間以上処理し、そこに緩衝液（f）を添加した。次に、その処理液にカチオン性メディエータ（c）を添加して超音波ホモジナイザーで約30秒間処理し、最後に、その処理液に酸化還元酵素（d）および架橋剤（e）を添加した。

[0172] 得られた試験液サンプルにおける凝集の有無を目視で確認した。結果を表 6 にあわせて示す。カチオン性ポリマー (c) として所定の共重合体を用いて合成されたポリマー結合型 PNT 1 と、カチオン性ポリマー (c) として PLL を用いて合成されたポリマー結合型 PNT 2 とでは、その試験液中の濃度や試験液の pH によって導電性炭素フィラー (a) の分散性の改善効果に相違が見られるが、いずれのカチオン性ポリマー (c) であっても導電性炭素フィラー (a) の分散性の改善効果が認められる条件が存在する。

[0173] [試験例 6] 応答性評価試験

<試験液の調製>

表 7 に示す配合に従って、所定の濃度の各種の成分を含む試験液サンプルを調製した。

[表7]

試薬液 サンプル	(a) 導電性 炭素 フィラー	(b) アニオン性 分散剤 またはその対照物		(c) カチオン性 メディエータ	(d) 酸化還元 酵素	(e) 架橋剤	(f) 緩衝液	分散性 評価※
6-1	(a-1) カーボン ブラック  3 mg/mL	(b-1C) ポリ(アクリル 酸)5,000	0.15 mg/mL	ポリマー 結合型 PNT1  吸光度 7 相当	FAD依存 性グルコー スデヒドロ ゲナーゼ  4000 U/mL	グルタル アルデヒド  0.01% (wt/v)	pH 6.0  リン酸ナ トリウム 緩衝液  20 mM	○
6-2		(b-2A) ポリ(スチレン スルホン酸ナ トリウム塩)	0.15 mg/mL					○
6-3		(b-3) ポリ(4-スチレ ンスルホン酸- co-マレイン酸 )ナトリウム塩	0.15 mg/mL					○
6-4		(b-4) ポリ(エチレン オキシド)-b-ポ リ(アクリル酸)	0.15 mg/mL					○
6-5		(b-5) ポリ(スチレン) -b-ポリ(アクリ ル酸)	0.15 mg/mL					○
6-6		(非b) ヒドロキシプロ ピルセルロー ス	0.43 mg/mL					○

※ ○:凝集なし X:凝集発生

[0174] 試験液サンプルの調製は次のように行った。まず、アニオン性分散剤 (b) またはその対照物の水溶液に導電性炭素フィラー (a) を添加して超音波ホモジナイザーで3分間以上処理し、そこに緩衝液 (f) を添加した。次に、その処理液にカチオン性メディエータ (c) を添加して超音波ホモジナイザーで約30秒間処理し、最後に、その処理液に酸化還元酵素 (d) および架橋剤 (e) を添加した。

[0175] <センサ用電極の作製>

絶縁基板の上にスクリーン印刷法で作製したカーボン電極上に、上記のように調製した各試薬液サンプル0.6  $\mu$ L塗布し、オーバーナイトで乾燥させ

、センサ用電極を得た。

[0176] <RPMI培地の調製>

RPMI-1640 Medium (シグマアルドリッチ社製 R1383) で作製した溶液に、緩衝液成分として2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES、同仁化学社製)、3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS、同仁化学社製) を各々終濃度25 mMになるように加え、かつpH7.4に調整した。このようにして得られた培地を、以下の実施例における「RPMI培地」として用いた。

[0177] <応答性に関するセンサ評価>

上記のように作製したセンサ用電極を作用極とし、対極としての白金電極と、参照極としてのAg/AgCl電極(飽和KCl)(ビー・エー・エス社製)とを組み合わせた3電極式の測定系について、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、約37℃、RPMI培地中での電流の時間変化(電流応答値)を測定した。具体的には、測定開始100秒後から100秒毎に、理論値3 mM、15 mMまたは30 mMになるようにグルコースを添加し、電流応答値を測定した。電流応答値は、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。また、最終濃度の電流値は、グルコース濃度が30 mMになるようにグルコース溶液を添加した後、80秒後、85秒後、90秒後、95秒後および100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 mM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。

[0178] また、同様の3電極式の測定系について、RPMI培地中でサイクリックボルタンメトリーを行った。スキャン速度は10 mV/sで行った。なお、電流応答値、サイクリックボルタンメトリー、どちらの結果もセンサ2本の測定値の平均である。

[0179] 電流応答値の結果を図9 [A]、サイクリックボルタンメトリーの結果を図9 [B] に示す。電流応答性について、ヒドロキシプロピルセルロースを用いたセンサ（試薬液サンプル6-6）よりも、各アニオン性分散剤（アニオン性ポリマー）を用いたセンサ（試薬液サンプル6-1～6-5）の方が高い応答性を示した。同様に、サイクリックボルタンメトリーの結果についても、ヒドロキシプロピルセルロースを用いたセンサよりも各アニオン性分散剤（アニオン性ポリマー）を用いたセンサの方が高い酸化還元ピーク値が得られた。これは、アニオン性分散剤（アニオン性ポリマー）を用いることで、電極上へ密接にメディエータを吸着できたためと推察される。

[0180] [試験例7] 耐久性（応答維持率）評価試験

<試薬液の調製>

試験例7では、試験例6における試薬液サンプル6-1および6-6を再度調製して用いた。

[0181] <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(t e r, 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「t B u M A 4 V P」と称する。) 終濃度：7. 1 1 % (w t / v)

・トリプロピレングリコールメチルエーテルメタクリレート-スチレン-4-ビニルピリジンのランダムコポリマー (ナード社製、以下「T G M A S 4 V P」と称する。) 終濃度：0. 8 9 % (w t / v)

・ポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル (シグマアルドリッチ社製、以下「P E G D G E」と称する。) 終濃度：0. 9 8 % (w t / v)

・H E P E S 緩衝液 (p H 8. 0) 終濃度：5 m M

[0182] なお、t B u M A 4 V P、T G M A S 4 V PおよびP E G D G Eは、エタノールに溶解して用いた。t B u M A 4 V Pの数平均分子量M nは、ポリ(t

er. ブチルメタクリレート)が87,000、ポリ(4-ビニルピリジン)が74,000である。tBuMA4VPの $M_w/M_n$ は1.16である。TGMA S4VPは、トリプロピレングリコールメチルエーテルメタクリレート:スチレン:4-ビニルピリジン=6.6:20.3:73.0であり、数平均分子量 $M_n$ が60,704であり、重量平均分子量 $M_w$ が120,095であり、 $M_w/M_n$ が1.98である。PEGDGEの数平均分子量 $M_n$ 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。

[0183] <センサ用電極の作製>

絶縁基板上にスパッタリングにて作製した金電極上に、上記のように調製した試薬液サンプルを0.5 $\mu$ L塗布し、15分間乾燥させ、これを2回繰り返す、計3回塗布を行った。その後、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、各金電極上に各試薬液サンプルに対応する試薬層を形成した。試薬層を形成した各金電極を、上記のように調製した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す、各金電極上に保護膜を形成した。以上の工程により、センサ用電極を得た。

[0184] <耐久性(応答維持率)に関するセンサ評価>

上記のように作製したセンサ用電極を作用極とし、対極としての白金電極と、参照極としてのAg/AgCl電極(飽和KCl)(ビー・イー・エス社製)とを組み合わせた3電極式の測定系について、ポテンショスタット(ビー・イー・エス社製)を用い、アンペロメトリック法によって、約37 $^{\circ}$ C、RPMI培地中での電流の時間変化を測定した。具体的には、測定開始1500秒後から1000秒毎に、理論値5mM、15mMまたは30mM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 $^{\circ}$ CのRPMI培地中に保存した。また、保存後1日目、2日目および3日目に同様の測定を行った。なお、グルコース濃度5mMおよび15mM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である。また、最終濃度の電流値は、グルコース濃度が30 mMになるようにグルコース溶液を添加した後、980秒後、985秒後、990秒後、995秒後および1000秒後の5点の測定値から算出した平均値である。各グルコース濃度における電流値は、グルコース濃度0 mM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。

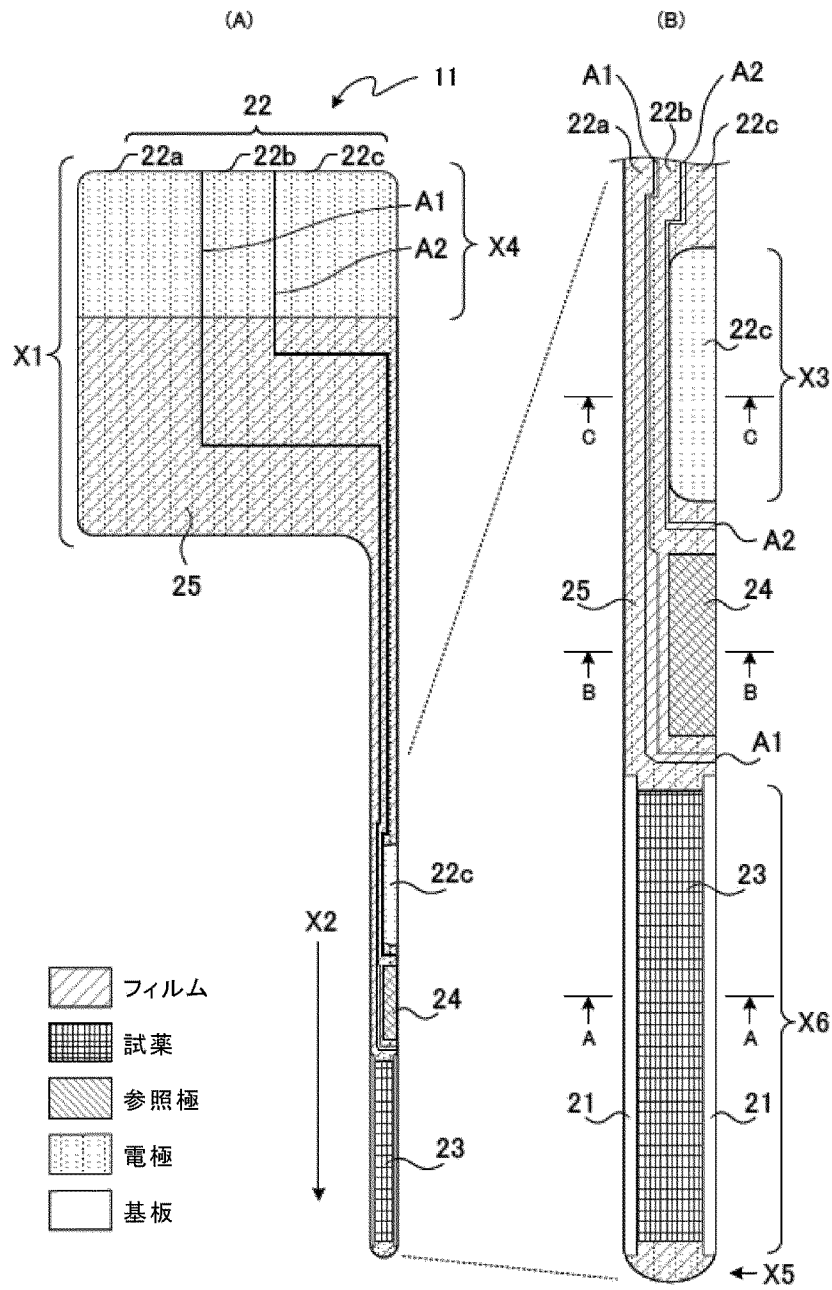
[0185] 結果を図10に示す。保護膜被膜後についても、電流応答性はヒドロキシプロピルセルロース（試薬液サンプル6-6）を用いたセンサよりも、ポリ（アクリル酸）（試薬液サンプル6-1）を用いたセンサの方が高い値を示した。また、3日後のセンサ耐久性（初日に対する電流維持率）についても、ポリ（アクリル酸）（試薬液サンプル6-1）を用いたセンサがより高い値を示した。これは、メディエータがより強固に電極上に吸着しているためと推察される。

## 請求の範囲

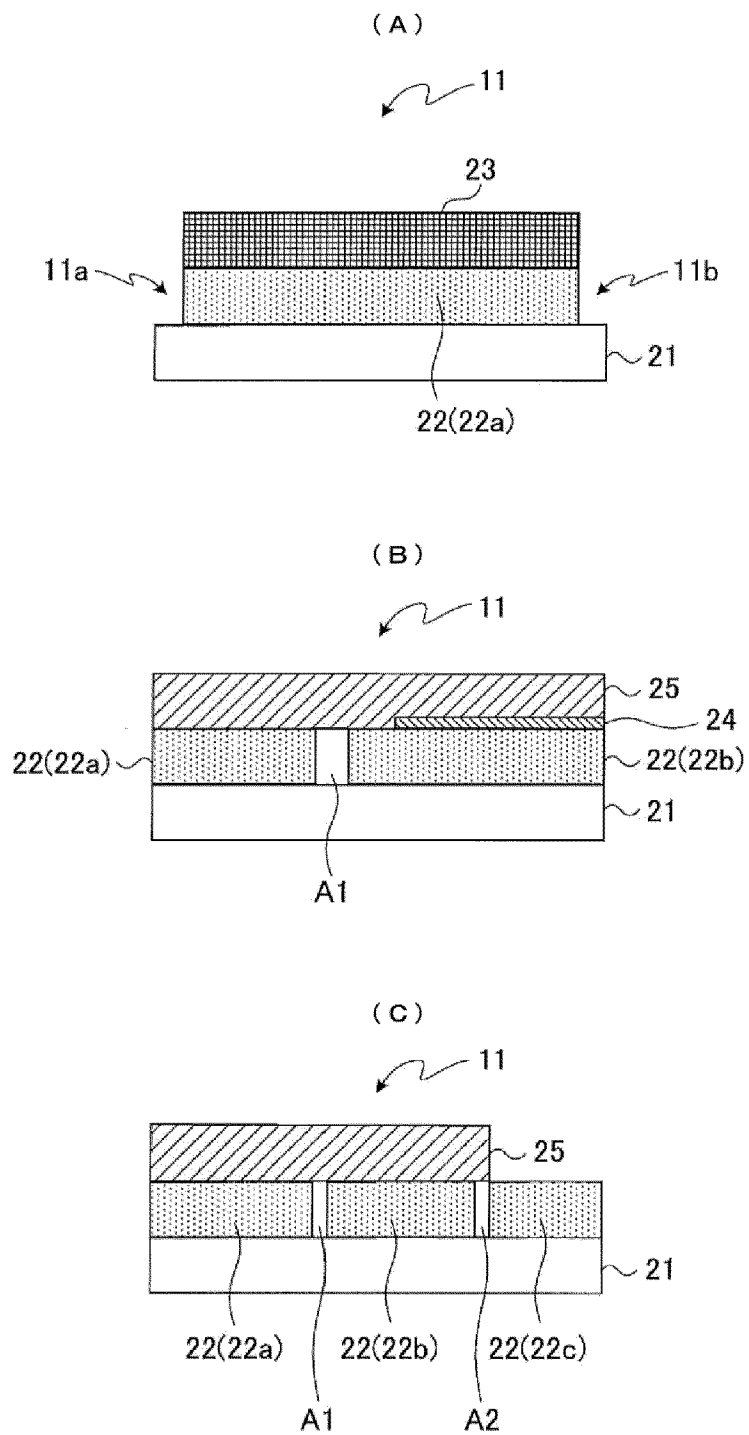
- [請求項1] 導電性炭素フィラー（a）と、アニオン性分散剤（b）と、カチオン性メディエータ（c）とを含む試薬層。
- [請求項2] 前記アニオン性分散剤（b）が、重量平均分子量が70000以下のポリマーである、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項3] 前記アニオン性分散剤（b）が、側鎖にカルボキシ基および／またはスルホ基を有するポリマーである、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項4] 前記アニオン性分散剤（b）が、アクリル酸由来ユニット、マレイン酸由来ユニット、およびスチレンスルホン酸由来ユニットからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むポリマーである、請求項3に記載の試薬層。
- [請求項5] 前記カチオン性メディエータ（c）が、レドックスメディエータ化合物（c1）とカチオン性ポリマー（c2）とが、必要に応じてリンカー部（c3）を介して、結合している化合物である、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項6] 前記カチオン性ポリマー（c2）が、第四級アンモニウムカチオン基を有する、請求項5に記載の試薬層。
- [請求項7] 前記導電性炭素フィラー（a）が、カーボンブラックである、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項8] アナライトを酸化または還元する酸化還元酵素（e）をさらに含む、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項9] 前記酸化還元酵素（e）が、補酵素結合型のものである、請求項8に記載の試薬層。
- [請求項10] 前記酸化還元酵素（e）が、前記カチオン性ポリマー（c2）と架橋されている、請求項8に記載の試薬層。
- [請求項11] アナライトを検出又は定量する電気化学センサであって、作用極、対極、および請求項1～10のいずれか一項に記載の試薬層を有する、電気化学センサ。

- [請求項12] さらに参照極を有する、請求項11に記載の電気化学センサ。
- [請求項13] さらに、少なくとも前記試薬層を被覆する保護膜を有する、請求項11に記載の電気化学センサ。
- [請求項14] (1) 導電性炭素フィラー(a)と、アニオン性分散剤(b)と、カチオン性メディエータ(c)とを含む試薬液を調製する工程、  
(2) 前記試薬液を試薬層形成部位にアプライする工程、及び  
(3) アプライされた前記試薬液を乾燥させて、試薬層を形成する工程、  
を含む、試薬層の形成方法。
- [請求項15] 前記試薬液のpHが8.0以下である、請求項14に記載の試薬層の形成方法。
- [請求項16] 前記試薬液中の金属イオンの濃度が200mM以下である、請求項15に記載の試薬層の形成方法。
- [請求項17] 前記試薬液中の前記金属イオンがアルカリ金属イオンであり、その濃度が100mM未満である、請求項16に記載の試薬層の形成方法。
- [請求項18] 前記アニオン性分散剤(b)が、重量平均分子量が70000以下の、アクリル酸由来ユニット、マレイン酸由来ユニット、およびスチレンスルホン酸由来ユニットからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むポリマーである、請求項14に記載の試薬層の形成方法。
- [請求項19] 前記カチオン性メディエータ(c)が、レドックスメディエータ化合物(c1)と、第四級アンモニウムカチオン基を有するカチオン性ポリマー(c2)とが、必要に応じてリンカー部(c3)を介して、結合している化合物である、請求項14に記載の試薬層の形成方法。

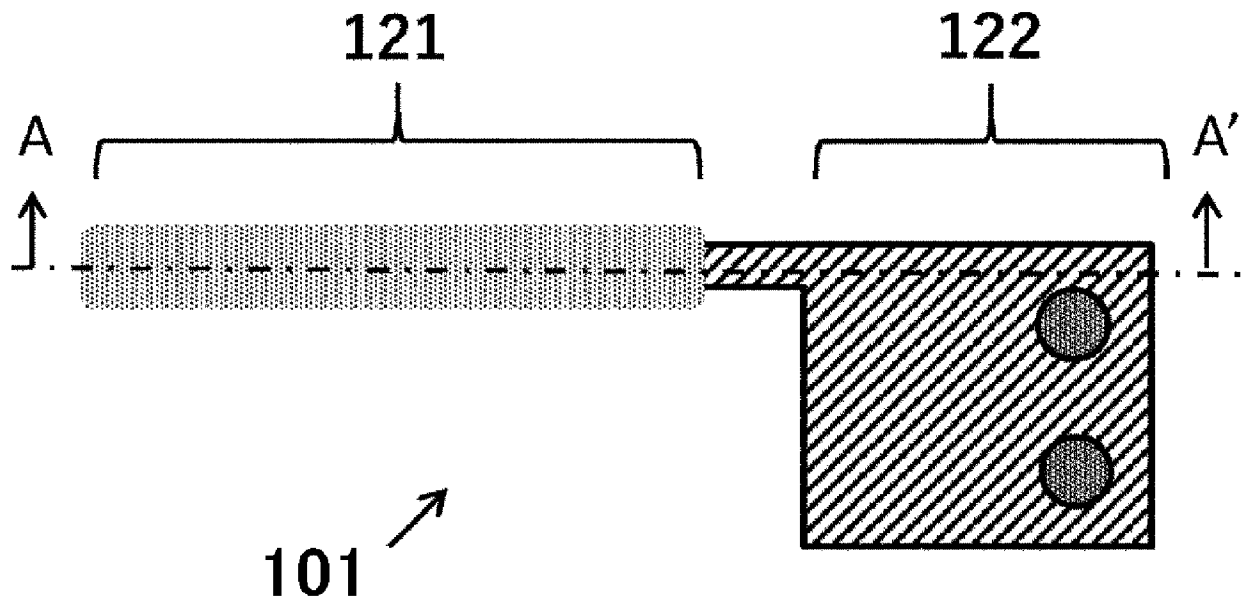
[図1]



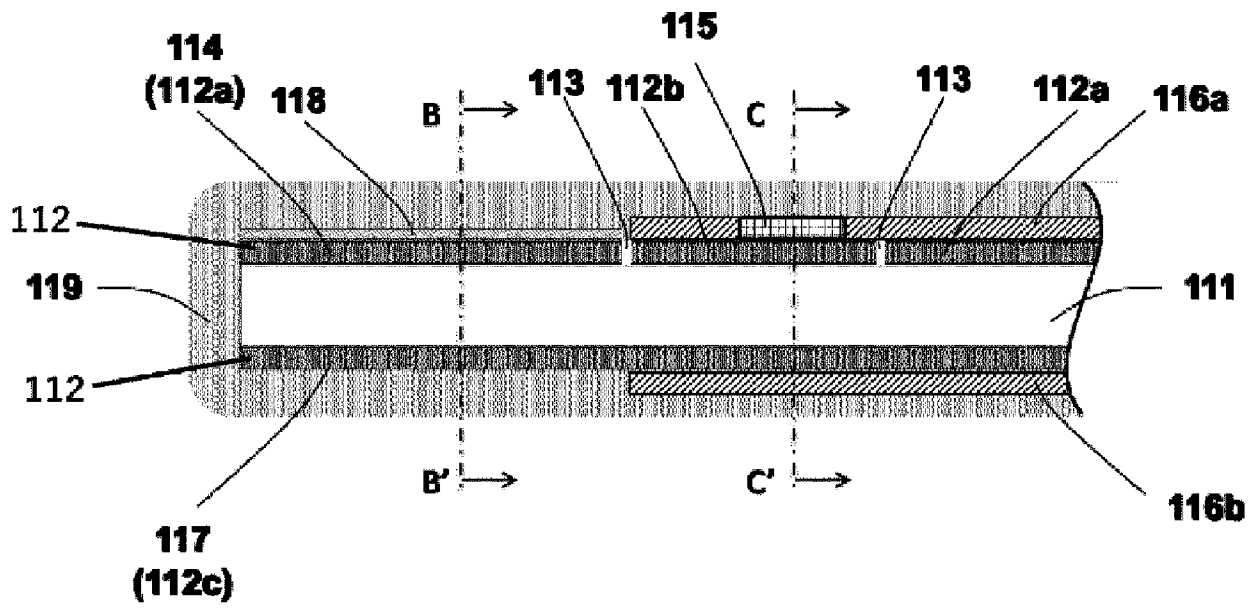
[図2]



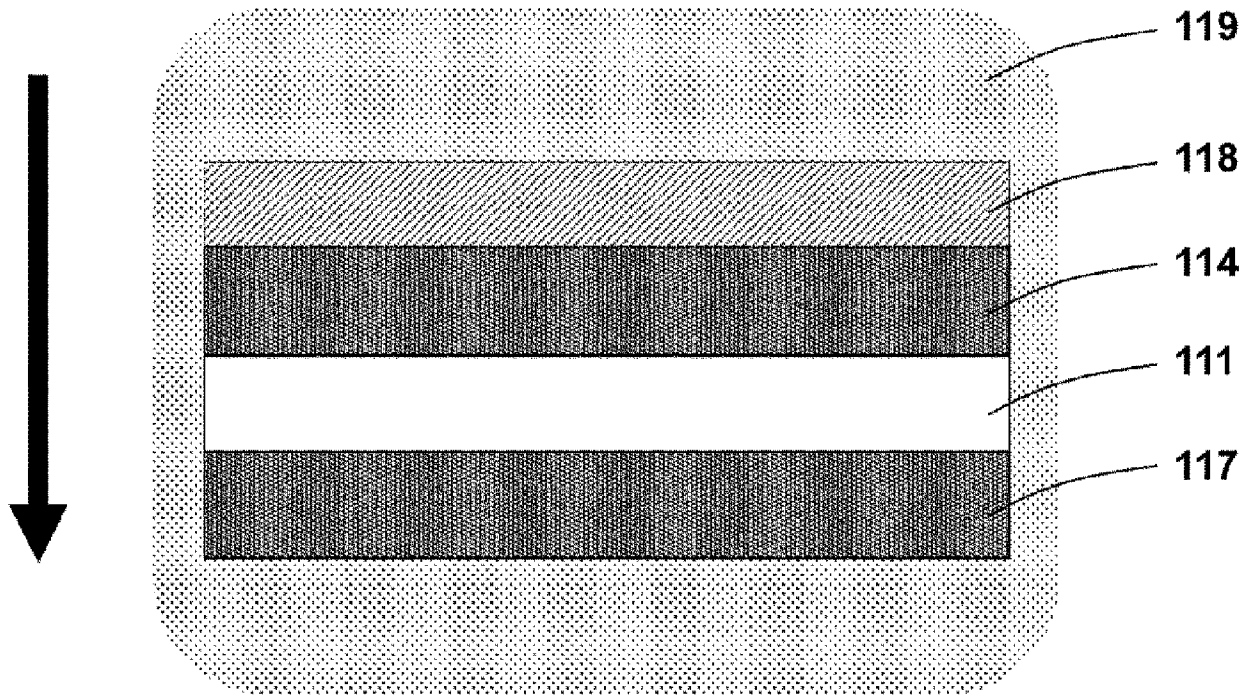
[図3]



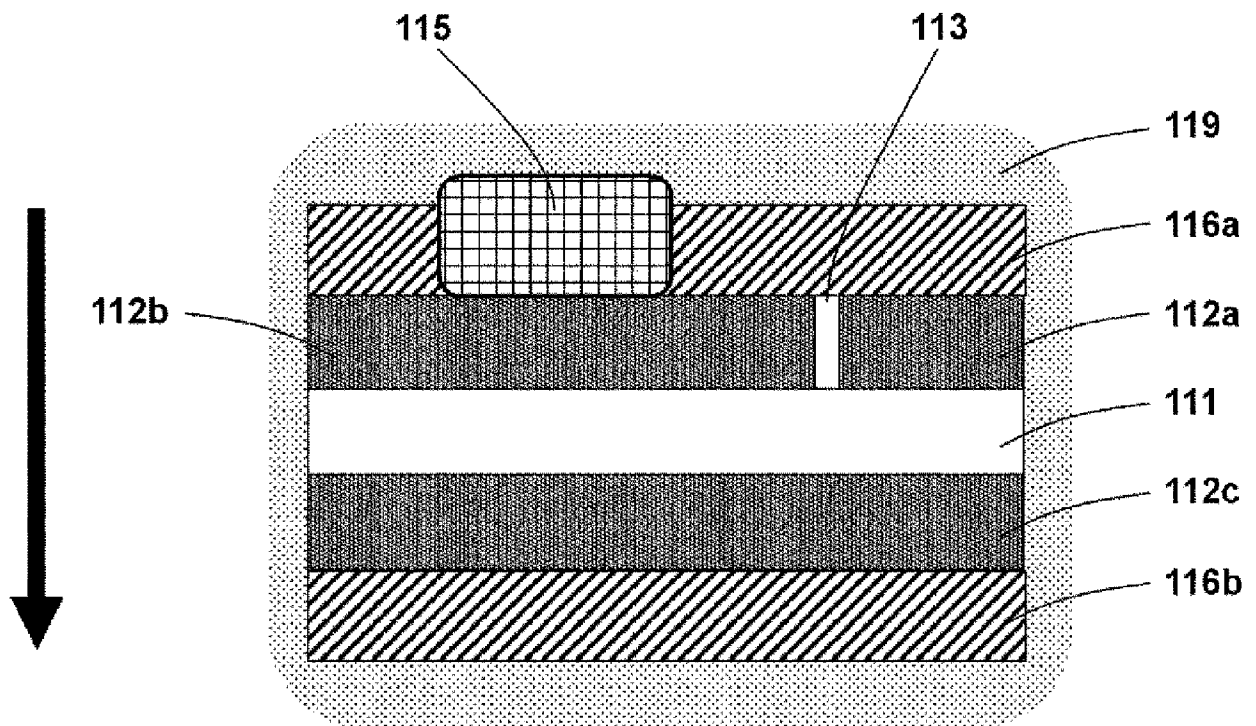
[図4]



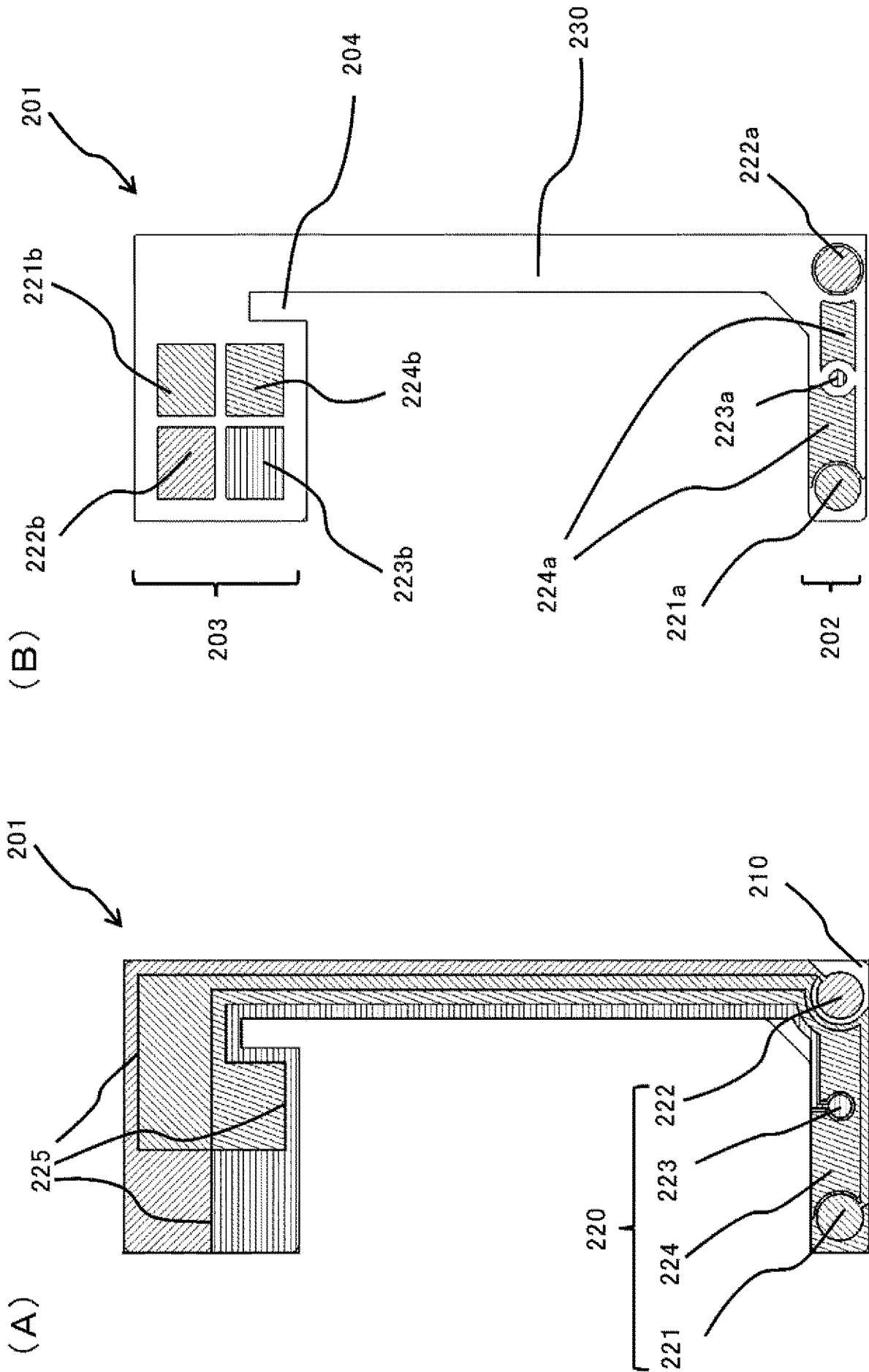
[図5]



[図6]



[7]



[図8]

[A]

1-1

1-2

1-3

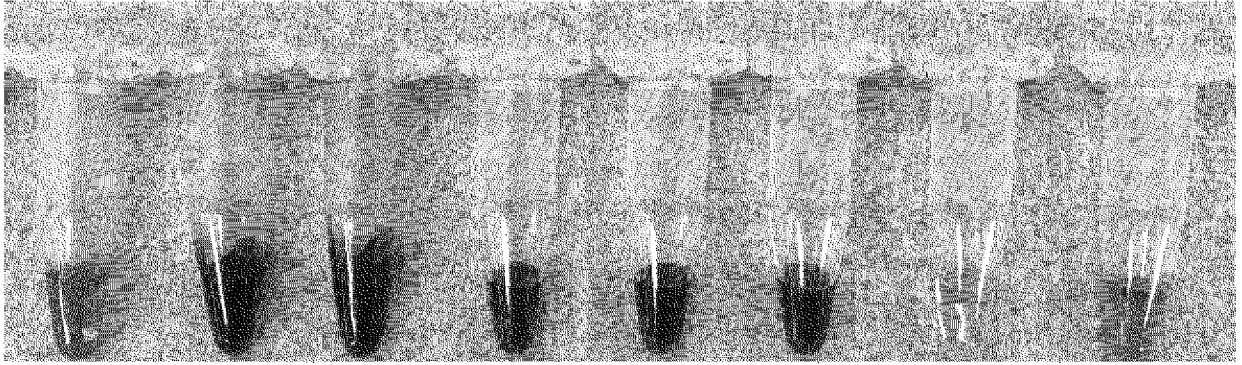
1-4

1-5

1-6

1-7

1-8

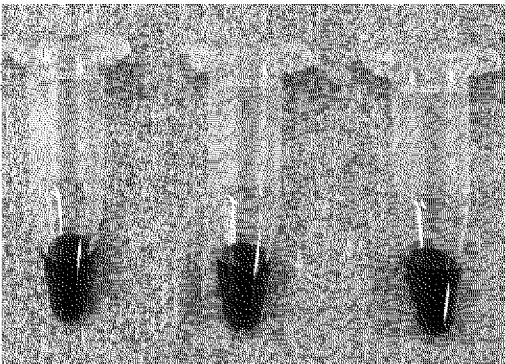


[B]

1-9

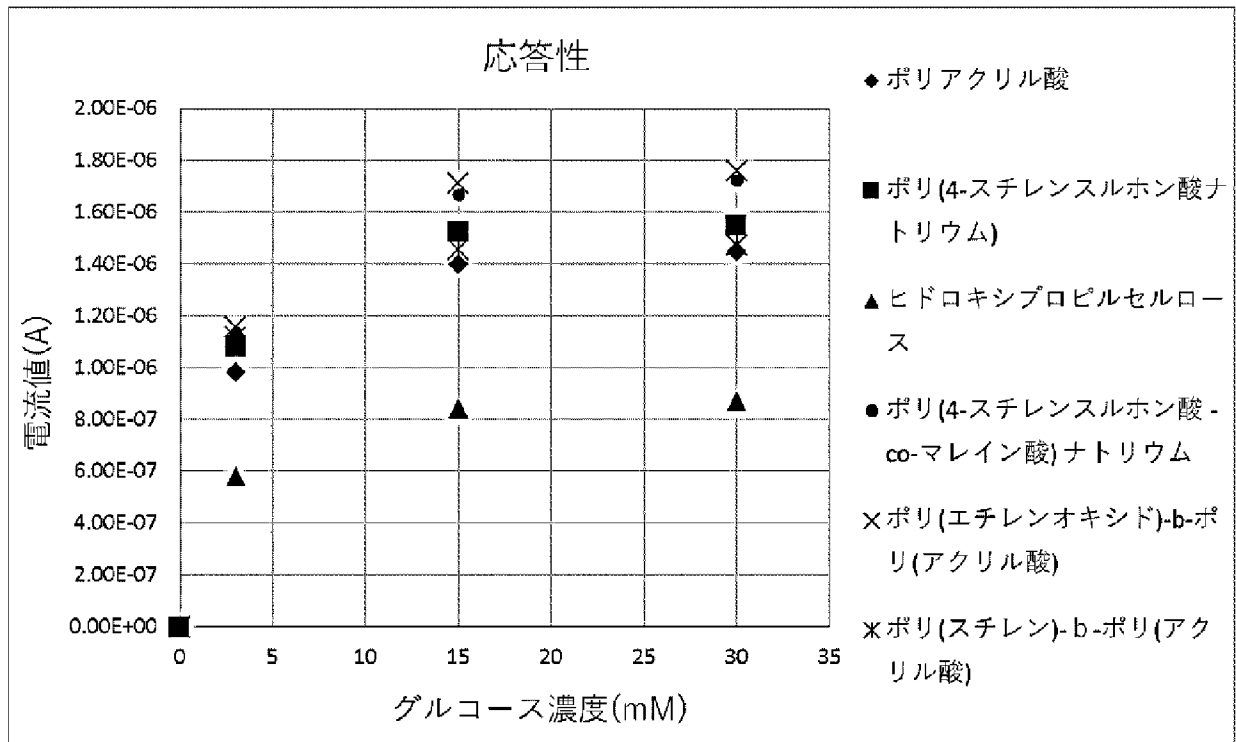
1-10

1-11

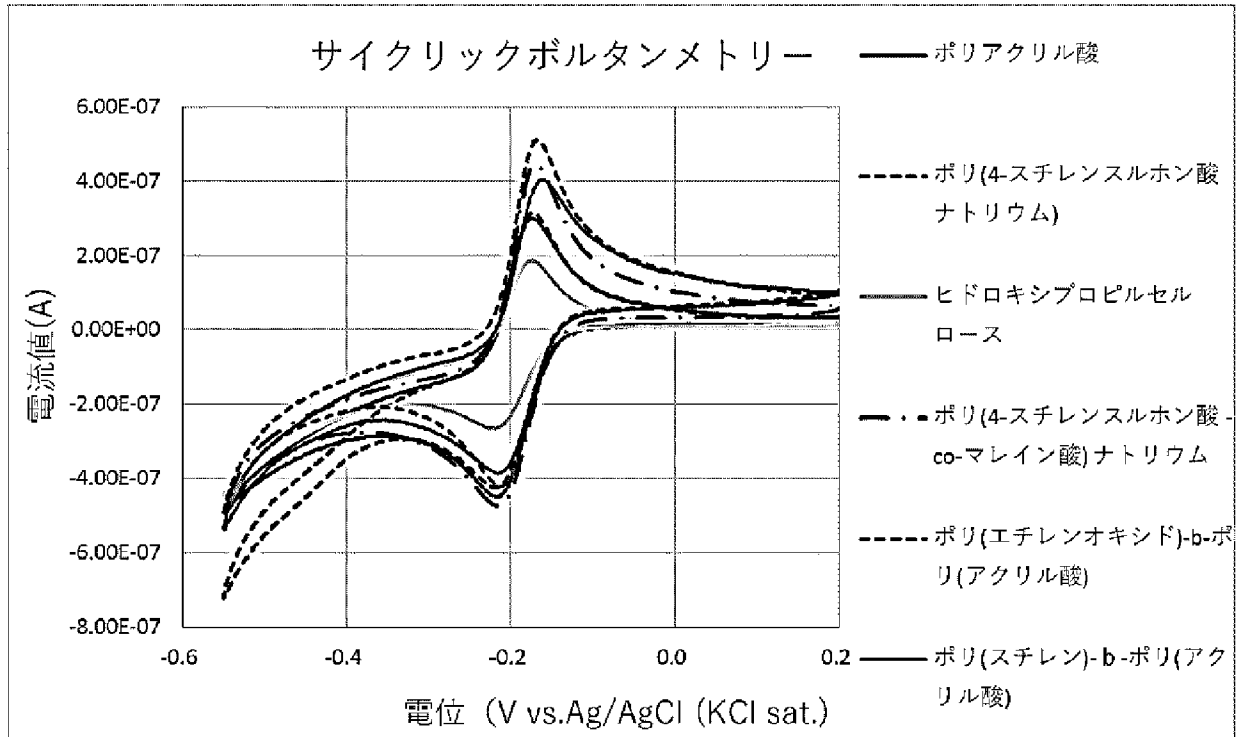


[図9]

[A]

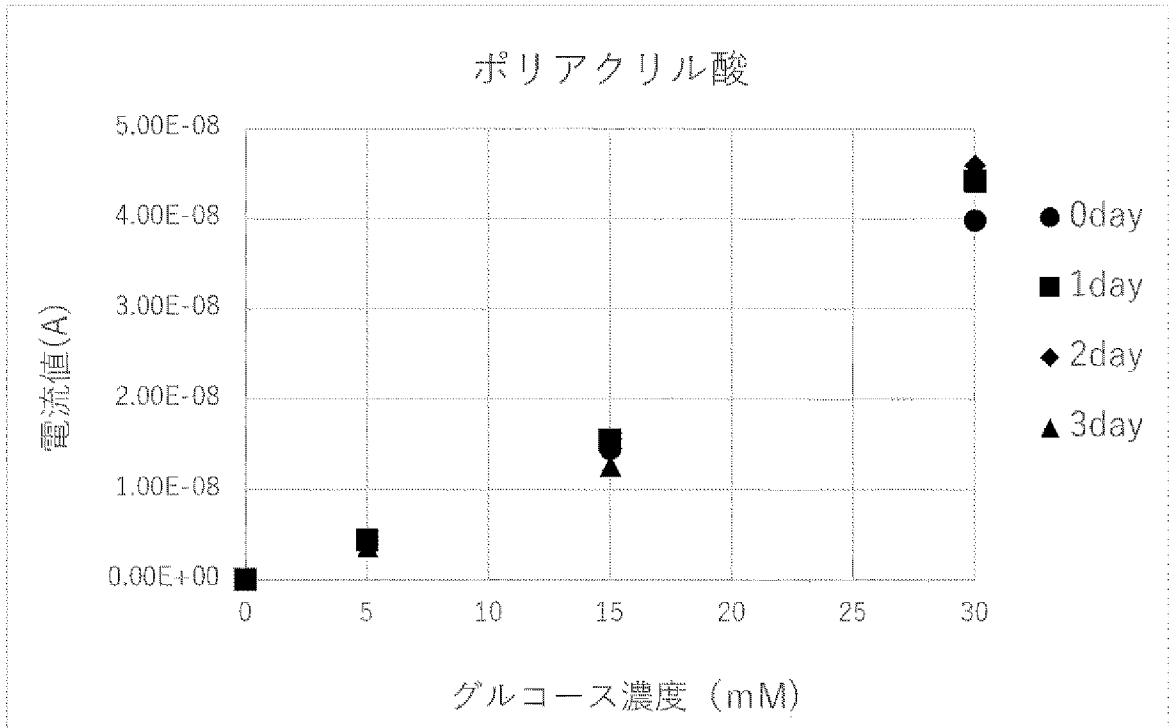


[B]

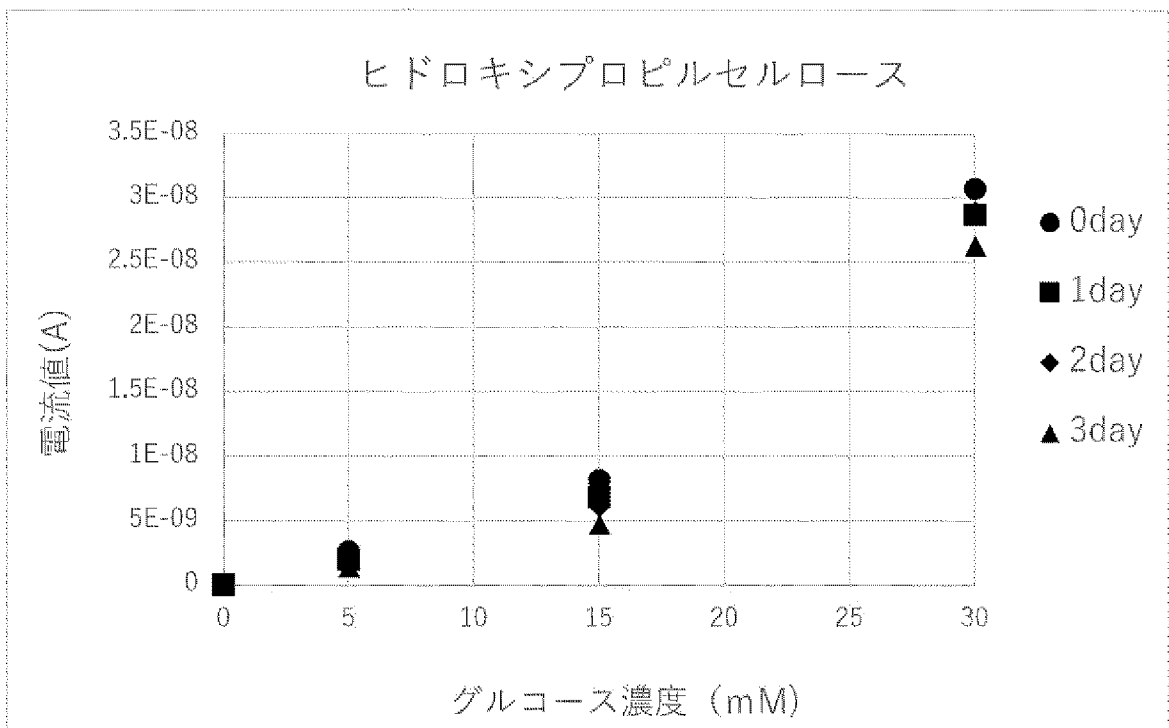


[図10]

[A]



[B]



	ポリアクリル酸	ヒドロキシプロピルセルロース
初日の電流値 (A)	3.98E-08	3.07E-08
3日後の電流値 (A)	4.41E-08	2.63E-08
電流維持率 (%)	110.8	85.7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024307

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 27/327</i> (2006.01)i; <i>A61B 5/1473</i> (2006.01)i; <i>A61B 5/1486</i> (2006.01)i; <i>G01N 27/30</i> (2006.01)i; <i>G01N 27/416</i> (2006.01)i FI: G01N27/327 353T; A61B5/1473; A61B5/1486; G01N27/30 A; G01N27/327 353B; G01N27/416 338		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N27/327; A61B5/1473; A61B5/1486; G01N27/30; G01N27/416; H01M8/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2021-82394 A (PANASONIC HEALTHCARE HOLDINGS CO LTD) 27 May 2021 (2021-05-27) claims, examples	1-3, 5, 7-18
Y		1-5, 7-18
A		6, 19
Y	JP 2014-028935 A (TORAY IND INC) 13 February 2014 (2014-02-13) claims 11-12	2
Y	JP 2006-292495 A (TORAY IND INC) 26 October 2006 (2006-10-26) claims 1-4, 19-24, paragraphs [0083], [0086]-[0090]	1-5, 7-18
Y	WO 2013/073259 A1 (TOSOH ORGANIC CHEMICAL CO., LTD.) 23 May 2013 (2013-05-23) claims 1-2, 8	1-5, 7-18
Y	JP 2015-128006 A (KAO CORP) 09 July 2015 (2015-07-09) claims	1-5, 7-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>08 August 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>19 September 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024307

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2019-118861 A (KAO CORP) 22 July 2019 (2019-07-22) claims	1-5, 7-18
A	JP 2018-36201 A (TOYO INK SC HOLDINGS CO LTD) 08 March 2018 (2018-03-08) claims, examples	1-19
A	JP 2018-170092 A (TOYO INK SC HOLDINGS CO LTD) 01 November 2018 (2018-11-01) claims, examples	1-19
A	JP 2009-294038 A (FUNAI ELECTRIC ADVANCED APPLIED TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE INC) 17 December 2009 (2009-12-17) claims	1-19
P, X	JP 2022-113982 A (PANASONIC HEALTHCARE HOLDINGS CO LTD) 05 August 2022 (2022-08-05) claims, paragraphs [0036], [0108]	1-5, 7-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2023/024307</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-82394 A	27 May 2021	(Family: none)	
JP 2014-028935 A	13 February 2014	US 2015/0111025 A1 claim 1 WO 2014/002885 A1 EP 2865645 A1 TW 201410600 A CN 104411632 A KR 10-2015-0028780 A	
JP 2006-292495 A	26 October 2006	(Family: none)	
WO 2013/073259 A1	23 May 2013	CN 103958552 A claims 1-2, 8 TW 201335125 A	
JP 2015-128006 A	09 July 2015	(Family: none)	
JP 2019-118861 A	22 July 2019	(Family: none)	
JP 2018-36201 A	08 March 2018	(Family: none)	
JP 2018-170092 A	01 November 2018	(Family: none)	
JP 2009-294038 A	17 December 2009	(Family: none)	
JP 2022-113982 A	05 August 2022	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 27/327(2006.01)i; A61B 5/1473(2006.01)i; A61B 5/1486(2006.01)i; G01N 27/30(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i FI: G01N27/327 353T; A61B5/1473; A61B5/1486; G01N27/30 A; G01N27/327 353B; G01N27/416 338		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） G01N27/327; A61B5/1473; A61B5/1486; G01N27/30; G01N27/416; H01M8/16 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）		
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 Y A	JP 2021-82394 A（PHCホールディングス株式会社）27.05.2021（2021-05-27） [特許請求の範囲],[実施例]	1-3,5,7-18 1-5,7-18 6,19
Y	JP 2014-028935 A（東レ株式会社）13.02.2014（2014-02-13） [請求項11]-[請求項12]	2
Y	JP 2006-292495 A（東レ株式会社）26.10.2006（2006-10-26） [請求項1]-[請求項4],[請求項19]-[請求項24],[0083],[0086]-[0090]	1-5,7-18
Y	WO 2013/073259 A1（東ソー有機化学株式会社）23.05.2013（2013-05-23） [請求項1]-[請求項2],[請求項8]	1-5,7-18
Y	JP 2015-128006 A（花王株式会社）09.07.2015（2015-07-09） [特許請求の範囲]	1-5,7-18
Y	JP 2019-118861 A（花王株式会社）22.07.2019（2019-07-22） [特許請求の範囲]	1-5,7-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
08.08.2023	19.09.2023	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  大瀧 真理 2J 9812  電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
A	JP 2018-36201 A (東洋インキ S Cホールディングス株式会社) 08.03.2018 (2018 - 03 - 08) [特許請求の範囲],[実施例]	1-19
A	JP 2018-170092 A (東洋インキ S Cホールディングス株式会社) 01.11.2018 (2018 - 11 - 01) [特許請求の範囲],[実施例]	1-19
A	JP 2009-294038 A (株式会社船井電機新応用技術研究所) 17.12.2009 (2009 - 12 - 17) [特許請求の範囲]	1-19
P, X	JP 2022-113982 A (PHCホールディングス株式会社) 05.08.2022 (2022 - 08 - 05) [特許請求の範囲],[0036],[0108]	1-5,7-18

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/024307

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-82394 A	27.05.2021	(ファミリーなし)	
JP 2014-028935 A	13.02.2014	US 2015/0111025 A1 [請求項1] WO 2014/002885 A1 EP 2865645 A1 TW 201410600 A CN 104411632 A KR 10-2015-0028780 A	
JP 2006-292495 A	26.10.2006	(ファミリーなし)	
WO 2013/073259 A1	23.05.2013	CN 103958552 A [請求項1]-[請求項2],[請求項8] TW 201335125 A	
JP 2015-128006 A	09.07.2015	(ファミリーなし)	
JP 2019-118861 A	22.07.2019	(ファミリーなし)	
JP 2018-36201 A	08.03.2018	(ファミリーなし)	
JP 2018-170092 A	01.11.2018	(ファミリーなし)	
JP 2009-294038 A	17.12.2009	(ファミリーなし)	
JP 2022-113982 A	05.08.2022	(ファミリーなし)	