PCT

世界知的所有権機関
国 際 事 務 局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 4
G01N 27/30, A61B 5/14

A1

(11) 国際公開番号 WO 89/07262

(43) 国際公開日 1989年8月10日(10.08.89)

(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00085
(22) 国際出願日 1989年1月27日(27. 01. 89)
(31) 優先権主張番号 特願昭63-17414
特願昭63-81419
(32) 優先日 1988年1月29日(29. 01. 88)
1988年4月4日(04. 04. 88)
(33) 優先権主張国 JP

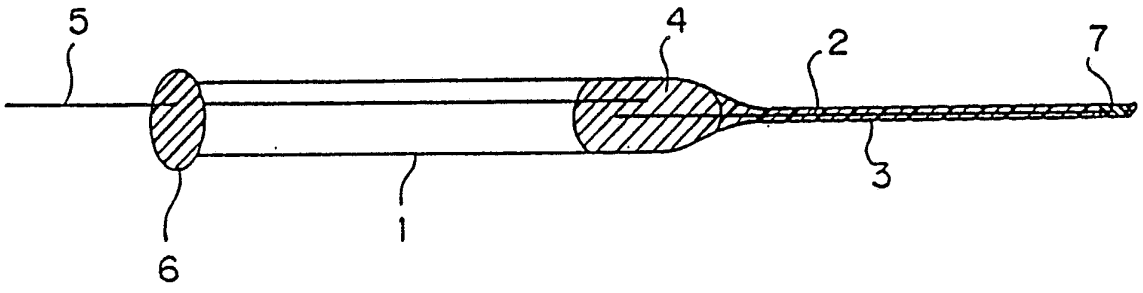
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
テルモ株式会社(TERUMO KABUSHIKI KAISHA)〔JP/JP〕
〒151 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
山口秀一郎(YAMAGUCHI, Shuichiro)〔JP/JP〕
内田直人(UCHIDA, Naoto)〔JP/JP〕
笠井 哲(KASAI, Satoru)〔JP/JP〕
下村 猛(SHIMOMURA, Takeshi)〔JP/JP〕
〒417 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
Shizuoka, (JP)
小山 昇(OYAMA, Noboru)〔JP/JP〕
〒417 東京都府中市新町3丁目5番地24 Tokyo, (JP)

(74) 代理人
弁理士 大塚康徳(OHTSUKA, Yasunori)
〒105 東京都港区虎ノ門2-5-21 寿ビル4F Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AU, BE(欧州特許), DE(欧州特許), DK, FR(欧州特許),
GB(欧州特許), IT(欧州特許), KR, NL(欧州特許),
SE(欧州特許), US.
添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: FILM-COATED SENSOR

(54) 発明の名称 膜 被 覆 セ ン サ



(57) Abstract

There is disposed a conductive substrate (2) which is connected to a lead (5) at one of the ends of a thin insulating pipe (1), is inscribed with the thin pipe (1) and has a sectional area of up to 10^{-5} cm^2, and a coating film (7) is disposed at the other open end of the thin pipe (1) by electrolytic polymerization, thereby forming a film-coated sensor. In the resulting film-coated sensor, the surface is uniform and film formation can be controlled easily. Since the sensor is hardly susceptible to fluidization of a sample liquid, drift is small and response is high. Since the sensor is very small, it can be used for the measurement of a minute sample or can be directly inserted into a living body or into a tissue for measurement. When covered with immobilized enzyme, the film-coated sensor can be used as an oxygen sensor.

(57) 要約

絶縁性細管（１）の一端側でリード線（５）と接続され、前記細管（１）に内接する断面積10^{-3} cm以下の導電性基体（２）を設け、前記細管（１）の開口する他端側において電解重合法により被覆膜（７）を設けて膜被覆センサを形成する。

得られた膜被覆センサは表面が均一で膜被覆制御がし易く、被検液の流動を受けにくいためドリフトが少なく、又、応答も速い。さらに、小型であるために微少サンプルの測定や生体内や組織内に直接挿入して測定できる。

なお、膜被覆センサの表面を固定化酵素膜で被覆して酵素センサとしても使用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CM カメルーン
DE 西ドイツ
DK デンマーク
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
HU ハンガリー
IT イタリー
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリー
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウエー
RO ルーマニア
SD スーダン
SE スウエーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャード
TG トーゴ
US 米国

明　細　書

発明の名称

膜被覆センサ

技術分野

本発明は膜被覆センサ、特に生体内に挿入して使用される固体膜型で微小な膜被覆センサに関するものである。

背景技術

従来から、医用分野，食品分野において固体膜型の膜被覆センサが望まれている。最近、白金電極上に直接高分子膜（例えばセルロース膜）を被覆した被覆線電極（coated wire electrode ）型の膜被覆センサが上市されているが、これらセンサは耐久性に問題がある。

例えば、固体膜型の酸素センサについて見ると、被検溶液中の酸素が内部感応電極に到達する速度が律速となる。そこで、ガス透過膜の膜厚を小さくし、センサの感応部分の面積を大きくすればこの問題の解決になるが、被検液の流動の影響を受け易くなりドリフト発生の原因となる。従つて、少量の被検液（１μℓのオーダー）で測定する場合に、センサの形態は酸素

還元機能を有する面積が極小（平方ミクロンのオーダー）であることが好ましい。特に、微小センサを直接生体中に挿入して被還元物質が存在する溶液中の酸素分圧を連続的に測定する場合には、共存物質を排除して酸素のみが酸素還元膜で効率的に酸素還元反応を受けることが出来る、特に共存物質排除という点からも微小面積を有する酸素センサが好ましい。

又、酸素センサのガス透過膜を更に酵素固定化膜で被覆した酵素センサでは、酸素ガスの透過に時間がかかり、応答時間（９０％応答）は１分以上であつた。

このように最近益々、表面が均一で固体膜被覆が制御し易く、ドリフトが少なく応答の速い微小の膜被覆センサの需要が高まつている。

又、血液成分中での測定では、白金電極表面へのタンパク質の付着などにより、正確な測定が不可能となる。

発明の開示

本発明の目的は、上記従来技術の問題点を解決し、表面が均一で膜被覆が制御し易く、被検液の流動の影響を受けにくいためドリフトの少ない微小の膜被覆センサを提供することにある。

又、応答が速く溶存する被測定物質外の電極活性物の影響を受けにくい膜被覆センサを提供することにある。特に、応答が１０秒以内の迅速な膜被覆センサを提供することにある。

このようにして、微小量サンプル（１０μℓ以下）の測定や生体内や組織内に直接に挿入して測定ができる膜被覆センサを提供する。

この課題を解決するために、本発明の膜被覆センサは、細管と、該細管の一端側でリード線と接続され、前記細管に内接する導電性基体と、前記細管の開口する他端側の該導電性基体の端面を所定の厚さで被覆する固体被覆膜とを備える。

又、導電性基体は、炭素繊維，炭素棒状物，金線又は金属酸化物である。

又、導電性基体の断面積は、$10^{-5}cm^2$ 以下である。

又、固体被覆膜は、血液又は関連生体液中の活性物から、目的とするガス又は電解質のみと感応する膜を有する。

本発明により、表面が均一で膜被覆が制御し易く、披検液の流動の影響を受けにくいためドリフトの少ない微小の膜被覆センサを提供できる。

又、応答が速く溶存する被測定物質外の電極活性物の影響を受けにくい膜被覆センサを提供できる。特に、応答が１０秒以内の迅速な膜被覆センサを提供できる。

このようにして、微小量サンプル（１０μℓ以下）の測定や生体内や組織内に直接に挿入して測定ができる膜被覆センサを提供できた。更に、本発明の膜被覆センサは、センサ特性が一様であるため大量生産が可能である。

更に詳細には、本発明を酸素センサに適用した場合、

(i)炭素電極の$Fe(CN)_6^{3-/4-}$の電気化学的挙動（酸化

還元反応応答）は該電極感応部断面積$10^{-5}cm^2$以下、好ましくは$2.83\times10^{-7}cm^2$である時、酸化還元波が対称的で且つ電極表面積によらず電流値がほぼ一定である。

（ii）そして、この炭素電極ベース上に酸素ガス応答還元膜を直接被覆した膜被覆酸素電極を使用した結果、ドリフトはほとんど見られない。

（iii)酸素分圧対電流密度から算出される残余電流値は炭素電極ベース面積が小さくなるに従つて大きくなるが、断面積が$10^{-5}cm^2$以下では残余電流1×10^{-4}（A／cm^2）のオーダーで一定である。

（iv）炭素電極上に酸素ガス応答還元膜を被覆する時の膜被覆電解条件、例として電解反応時間制御が、電極感応部断面積$10^{-5}cm^2$以上の場合は、10秒以内と著しく短時間の制御に限定されるが、$10^{-5}cm^2$以下であれば60秒以上の長時間（1分以上）にわたつて電解膜被覆制御が可能である。

一方、酵素センサに適用した場合、電極面積を超微小化したものであるので、

（1）生体内あるいは組織内の基本濃度測定が可能であり、

（2）もちろん、μℓオーダの微小量サンプルの測定ができる。

（3）また、センサ基体を超微小化したため、応答が3秒程度と高速であり迅速な測定が可能である。

（4）安価なカーボンファイバ等を用いることができるため低コストである。

（５）微小感応面積のため反応による濃度の変化を無視できる。

（６）また、溶液の流動・流れの影響を無視できる。

尚、他の目的・効果は、以下の図面を参照した実施例の説明から明かとなる。

図面の簡単な説明

第１Ａ図は実施例１のガラスキヤピラリを示す図、

第１Ｂ図は実施例１のカーボンフアイバ電極の構造を示す図、

第１Ｃ図は実施例１の酸素センサの構造を示す図、

第２図は電解重合膜作成中の定電位電解の電流変化を示す図、

第３Ａ図～第３Ｃ図は実施例１の微小カーボンフアイバ電極の酸化還元反応のサイクリツクボルタモグラムを示す図、

第４図は、電極感応部面積を変化させた場合の、実施例１の酸素センサの電流密度と酸素分圧との関係をプロツトした図、

第５Ａ図は実施例１の酸素センサの流動の影響による電極上のドリフトを示す図、

第５Ｂ図は実施例１の酸素センサの表面濃度と電極面積を示す図、

第５Ｃ図は実施例１の酸素センサのピーク電流濃度と電位掃引速度の関係を示す図、

第６図は実施例２で作成した酸素センサの構造模式図、

第７Ａ図，第７Ｂ図は実施例２で作成した酸素センサの応答を示す図、

第８図は実施例２で作成した酸素センサの応答速度を示す図、

第９図は比較例１で作成した酸素センサの応答速度を示す図、

第１０Ａ図，第１０Ｂ図は実施例２及び比較例１で作成した酸素センサの液の流動による影響を示す図、

第１１図は実施例４、５の酵素センサの構成を表わす模式図、

第１２図は実施例３の酵素還元触媒膜を被覆した電極の酵素還元に対するサンクリツクボルタンメトリ応答を表わす図、

第１３図は実施例４及び５のグルコースセンサのグルコース濃度変化に対する電流応答について示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、添付図面を参照しながら、本発明の実施例を説明する。本実施例では膜被覆センサとして酸素センサ及びこれを使用する酵素センサで代表させるが、他の膜被覆センサにおいても本発明が同様に適用される。

まず、本実施例の酸素センサは、炭素繊維材料を含む炭素材料の棒状断面を$10^{-5}cm^2$以下にし、さらに、酸素ガス

応答還元膜を直接被覆した微小の酸素センサである。本実施例では、感応部断面積が$1\times10^{-5}cm^2$以下（炭素繊維１本の径を６μｍとして３～４本分に相当する）、好ましくは$2.83\times10^{-7}cm^2$（炭素繊維１本相当）である。

導電性基体としては、導電性炭素が好適であり、ベーサル・プレーン・ピロリテイツク・グラファイト、グラツシーカーボン等があげられる。この中でも、特にグラファイト結晶構造を持つものが好ましい。

＜実施例１＞

（カーボンファイバ電極の作製法）

外径３ｍｍ、長さ５ｃｍのガラス管を微小電極作製装置を用いて延伸し、第１Ａ図に示す本体部１ｂと細管部１ａとから成る形状の細管１を２本作製した。該細管１の内の１本の毛細管部分１ａ（延伸部）にカーボンファイバ２（ベスファイト：東邦レーヨン社製）を挿入し、毛細管とのすき間に絶縁性接着剤としてエレクトロンワックス３（宗電子工業社製）を充填して絶縁した。他端から導電性接着剤として銀ペースト４を注入し、さらにリード線５を挿入して導通を取り、銀ペースト４が漏れないように絶縁性接着材６で端を封じ固定した。さらに、毛細管先端部を研磨（０．５μｍ研磨紙ＰＲ１－２４：３Ｍ社製）してカーボンファイバ電極１０を完成した。

当該カーボンファイバ電極１０の模式図を第１Ｂ図に示す。ここでは、細管１としてガラス管を用いたが、絶縁性を有し加熱あるいは延伸により毛細管が得られるものであれば、

ガラス管に限られるものでなく、ポリ塩化ビニル，ポリプロピレン，ポリスチレンなどを用いることもできる。

（微小酸素センサの作製）

以下に示す方法で、上記のカーボンファイバ電極１０のカーボンファイバ２の表面を、メソーテトラ（ｏ－アミノフエニル）コバルトポルフィリン（Ｃｏ －ＴＡＰＰと略す）の電解重合膜７で被覆した。

電解重合膜７は、該カーボンファイバ電極１０を作用極、市販のＡｇ／ＡｇＣℓ電極を参照極、白金巻線を対極とする３電極セルを用い、次の組成の電解液中で＋１．８Ｖ（ｖｓ．Ａｇ／ＡｇＣℓ）の定電位で６０秒間電解して被着を完成した。

電解液組成　１ｍＭ　　Ｃｏ －ＴＡＰＰ
　　０．１Ｍ　　$NaC\ell O_4$
　　溶媒　　アセトニトリル

この時の定電位電解の電流変化は第２図で示され、一定電流に収束する時間は凡そ６０秒、比較としてカーボン繊維２本（断面積５．６５２×10^{-7}ｃｍ^2）では４０秒、５本（断面積１．４１３×10^{-6}ｃｍ^2）では２０秒で電流値が一定となり、この順に薄膜が形成され、膜制御時間も短くなる。

このように製造された酸素センサの模式図を第１Ｃ図に示す。

＜実験例１＞

実施例１の第１Ｂ図に示す微小カーボンファイバ電極を作用

極、基準極に飽和塩化ナトリウムカロメル電極、対極に白金網を使用した電極セルを用い、

次の電解液中で

２０ｍＭ　Ｆｅ（ＣＮ）$_6^{3-}$

０．１Ｍ　ＮａＣℓＯ$_4$

微小酸素電極表面上のＦｅ（ＣＮ）$_6^{3-}$ とＦｅ（ＣＮ）$_6^{4-}$ の酸化還元反応のサイクリツクボルタンメトリの測定をおこなつた。

結果を第３図（ａ）に示す。同時に、カーボンフアイバの断面積が１．４１３×１０$^{-6}$ｃｍ^2（５本束），２．８２６×１０$^{-5}$ｃｍ^2（１００本束）の時のサイクリツクボルタモグラムを比較例として第３Ｂ図，第３Ｃ図に示す。

この結果、酸化還元電流値は第３Ａ図ではほぼ一定になるが、カーボンフアイバの断面積が１．４１３×１０$^{-6}$ｃｍ^2（カーボンフアイバ５束以上）では、電位値変化と共に酸化還元電流値が変化することが確認された。

したがつて、一定電流値を得ようとする場合には、カーボン電極の面積は凡そ１０$^{-5}$ｃｍ^2 以下、好ましくは２．８３×１０$^{-7}$ｃｍ^2（カーボンフアイバ１本相当）が好適である。

＜実験例２＞

実施例１で作成した酸素センサを使用して、電極感応部面積を２．８２６×１０$^{-7}$ｃｍ^2 ～２．８２６×１０$^{-5}$ｃｍ^2 と変化させた場合の、電流密度（Ａ／ｃｍ^2）と酸素分圧（ｍｍＨｇ）の関係は、表１及びこの関係をプロツトした第４図に

示される。尚、不活性ガスのN_2ガス使用して、酸素分圧を２０，６０，８５，１２８ｍｍＨｇと換えて測定した。この電流密度とpO_2分圧の関係より残余電流を求めると表１の残余電流の欄のようになる。

表１

カーボンファイバー		電流密度 (A/cm²)				残余電流 (A/cm²)
本数（本）	面積 (cm²)	PO_2 (mmHg)				
		２０mmHg	６０mmHg	８５mmHg	１２８mmHg	
１	2.826×10^{-7}	1.305×10^{-4}	1.491×10^{-3}	2.269×10^{-3}	2.994×10^{-3}	1.484×10^{-4}
１０	2.826×10^{-6}	1.789×10^{-3}	5.315×10^{-3}	8.185×10^{-3}	$1.189\times10^{-}$	1.542×10^{-4}
３０	8.478×10^{-6}	1.011×10^{-3}	2.998×10^{-3}	4.329×10^{-3}	6.395×10^{-3}	1.770×10^{-4}
１００	2.826×10^{-5}	5.987×10^{-4}	2.265×10^{-3}	3.154×10^{-3}	4.604×10^{-3}	0.652×10^{-4}

この結果、電極感応部の面積が８．４７８×１０$^{-6}$ｃｍ^{2}（５束）以下である場合、残余電流は１．４８４×１０$^{-4}$Ａ／ｃｍ^{2}～１．７７０×１０$^{-4}$Ａ／ｃｍ^{2}の間に収束する。

＜実験例３＞

実験例２と同様に本実施例の酸素センサを使用して、電解質溶液（リン酸塩緩衝溶液ｐＨ7.4)で、温度を３７±０．０５℃に調節した酸素濃度１４０ｍｍＨｇ一定条件下で、被検液の流動の影響による電極上のドリフト（電流密度のバラツキ）を検討した。被検溶液を攪拌する攪拌子の攪拌速度を変化させて、流量を２５０ｍℓ／分並びに１２００ｍℓ／分に変化させた場合の結果を第５Ａ図に示す。

電極面積が２．８２６×1.0^{-7}ｃｍ^{2}，２．８２６×１０$^{-6}$ｃｍ^{2}，８．４７８×１０$^{-6}$ｃｍ^{2}，２．８２６×１０$^{-5}$ｃｍ^{2}と大きくなるに従つて、ドリフトが大きくなる傾向を示す。従つて、電極面積が２．８２６×１０$^{-7}$ｃｍ^{2}（カーボンフアイバ１本）～２．８２６×１０$^{-6}$ｃｍ^{2}（カーボンフアイバ１０本）の間、好ましくは、２．８２６×１０$^{-7}$ｃｍ^{2}（カーボンフアイバ１本）がドリフトが小さく本目的には良いと思われる。

このように、本実施例の酸素センサは、

（ｉ）炭素電極のＦｅ（ＣＮ）$_{6}^{3-/4-}$の電気化学的挙動（酸化還元反応応答）は該電極感応部断面積１０$^{-5}$ｃｍ^{2}以下、好ましくは２．８３×１０$^{-7}$ｃｍ^{2}である時、酸化還元波が対称的で且つ電極表面積によらず電流値がほぼ一定である。

（ii）そして、この炭素電極ベース上に酸素ガス応答還元膜を直接被覆した膜被覆酸素電極を使用した結果、ドリフトはほとんど見られない。

（iii)酸素分圧対電流密度から算出される残余電流値は炭素電極の断面積が小さくなるに従つて大きくなるが、断面積が$10^{-5}cm^2$以下では残余電流1×10^{-4}（A／cm^2）のオーダーで一定である。

（iv）炭素電極上に酸素ガス応答還元膜を被覆する時の膜被覆電解条件、例として電解反応時間制御が、電極感応部断面積$10^{-5}cm^2$以上の場合は、10秒以内と著しく短時間の制御に限定されるが、$10^{-5}cm^2$以下であれば60秒以上の長時間（1分以上）にわたつて電解膜被覆制御が可能である。

＜実験例4＞

実施例1で作成した酸素センサを用いて、電極感応部面積を$7.85\times10^{-7}cm^2$，$7.85\times10^{-6}cm^2$，$7.85\times10^{-5}cm^2$とした時の電極面積に対する、電解重合膜（Co－TAPP膜）の表面濃度を測定した。

第5図（b）に示すように、$7.85\times10^{-6}cm^2$以上では電極面積が大きくなるに従いCo-TAPPの表面濃度が増加したが、$7.85\times10^{-6}cm^2$以下では殆ど変化しない。このことは、センサ特性の一様化を容易とし、膜被覆センサの大量生産を可能にする。

尚、測定は、室温、電解質溶液（リン酸塩緩衝溶液：PH7.4）中で酸素濃度0mm Hg（N_2でバブリング）の下で

測定した。

＜実験例５＞

実施例１で作成した酸素センサを用い、電極感応部面積を７．８５×１０$^{-7}$cm^2，３．１４×１０$^{-6}$cm^2，７．８５×１０$^{-6}$cm^2 とした時のボルタモグラムのピーク電流の密度と電位掃引速度｛v$^{1/2}$＝（mV／秒）$^{1/2}$｝の関係を調べた。

第５Ｃ図から明らかなように、広い範囲でピーク電流は一定となり、微小電極として十分な特徴を有することが解る。

尚、測定は、室温、酸素飽和（５００mmHg）した電解質溶液（リン酸塩緩衛溶液pH７．４）中で行つた。

又、本実施例では、本体部１ｂと細管部１ａとを一体化させて作製したが、ポリフツ化エチレンチユーブ，エナメルなどの絶縁材でカーボンフアイバーの両端部以外を被覆絶縁し、一端を電解重合膜７で被覆し、他端を導電性接着剤６を介してリード線に接続することにより、本体部１ｂと細管部１ａとを別々に作成して合体することもできる。

次に説明する実施例の膜被覆センサは、カーボンフアイバのフイラメント１本を導電性基体とし、この表面に電解重合法を用いて酸素還元触媒機能をもつコバルトーポルフイリン重合体膜を被覆した構成の超微少酸素センサである。μℓオーダの微少量のサンプル測定や細胞内、神経系等の酸素濃度を測定するために、先端外径を１０～５０μｍにすることが可能である。導電性基体に１０μｍ以下のカーボンフアイバを用いるため応答速度が非常に速くなり、９０％応答が１秒以内の酸素

濃度測定が可能である。また、脈流の影響をほとんど受けない。

＜実施例２＞

本実施例で作成した酸素センサの構造を第６図に模式的に示した。以下にその作成手順を述べる。

（１）カーボンファイバ１１（ユニオンカーバイト社製、１０μｍφ）の一端に導線１２を導電性接着剤１３により接続する。該ファイバを、ガラスキヤピラリ１４中に入れ、まわりをエポキシ系接着剤１５により絶縁して電極を完成する。

（２）当該電極を作用極、市販のＡｇ／ＡｇＣℓ電極を基準極白金巻線を対極とする３電極セルを用い、以下の電解液中でメソーテトラ（ｏ－アミノフエニル）コバルトポルフイリン（Ｃｏ－ＴＡＰＰ）の電解酸化重合を行なう。

電解液　　1 mmoℓ／ℓ　Ｃｏ－ＴＡＰＰ
　　0.1 moℓ／ℓ　$NaC\ell O_4$
　　溶媒　　アセトニトリル

上記電解液中で０から＋１．８Ｖ（vsＳＳＣＥ）まで５０ｍＶ／ｓｅｃで電位掃引した後、＋１．８Ｖで１０分間定電位電解を行ない、Ｃｏ－ＴＡＰＰ膜１６の被着を完了する。

このときのCo-TAPP 膜１６の膜厚は０．５μｍであつた。膜厚は４００Å～５０μｍが好ましく、特に１～１０μｍが好ましい。４００Å以下ではセンサ特性が不充分であり、５０μｍ以上では膜の剝離が生じやすい。

＜実験例６＞

実施例２で作成した酸素センサ及び、市販のＡｇ／ＡｇＣℓ電極を５０ mmoℓ／ℓのリン酸塩緩衝液（ｐＨ７．４）中に浸漬し、Ａｇ／ＡｇＣℓ電極に対して、該センサに－０．６Ｖの電位をかけ、該液中に通じるガスのO_2濃度を変えて、その時流れる電流値を測定した。その結果を第７Ａ図にプロツトした。尚、－０．６Ｖの電圧は、第７Ｂ図に示す電圧対電流の測定結果から決定した。

酸素濃度（pO_2）と電流値との間には、広い範囲にわたつて良い直線関係が成り立ち、酸素センサとして作用することが見い出された。

＜実験例７＞

実験例６と同様の方法で、酸素濃度一定の溶液中で測定を行ない、そこに酸素ガスで飽和させた溶液を加えて、電流値の変化を調べた。そのグラフを第８図に示す。液を加えると即座に応答し、その応答速度は１～２秒と、非常に速いことがわかる。

＜比較例１＞

直径０．１mmのカーボン電極を用い、実施例２と同様の方法でＣｏ－ＴＡＰＰ膜を電極表面に被覆し（膜厚０．５μｍ）、大面積の酸素センサを作成した。

＜実験例８＞

比較例１のセンサを実施例２で作成したセンサと比較するため、実験例６と同様の測定をおこなつた。その結果を第９図に示す。電流の立ち上がりが遅く、応答するのに５～１０秒

かかつていることがわかる。

＜実験例９＞

実施例２及び比較例１で作成した酸素センサを、基準電極と共にリン酸塩緩衝液に浸漬し、基準極に対して－０．６Ｖの電位をかけた時の電流値を、溶液を攪拌した場合と攪拌しない場合とで比較し、液の流動の影響の受けやすさを評価した。その結果を第１０Ａ図，第１０Ｂ図に示す。実施例２の酸素センサでは、第１０Ａ図のように攪拌してもしなくても電流値に変化はないが、比較例１のセンサは、第１０Ｂ図のように攪拌した場合には電流がゆれ、攪拌を止めた時には、ゆれはなくなるが電流値が減少することがわかる。この結果から、実施例２で作成したセンサは、液の流動の影響を受けず、正確な測定ができることが確認された。

以上詳述したように、カーボンファイバの断面という微小面積の電極を用い、その上を酸素還元機能膜で被覆することによつて９０％応答が１秒以内という速い酸素センサが得られるという効果がある。また、当該酸素センサは、溶存する他の化学物質の影響を受けず、また、液の流動の影響も受けずに酸素濃度が測定できる。また、電極部分が微小なため、微小量のサンプルあるいは微小部位での測定が可能である。

次に示す実施例では、微小化と高速応答を実現し、生体内（組織内）や微小量サンプル中の基質濃度を測定するため、超微小型酵素センサをカーボンファイバのフイラメント１本を用いて超小型化し、電解重合法を用いて微小部分に薄膜を形成

することにより提供する。応答速度は９５％応答は３秒以内であり、センサ先端外径１００μｍ以下のもの（但し感応部は１０μｍ以下）を提供する。

酵素反応に関与して生成・消費される化学種で電極活性であるものの例としては、O_2, H_2O_2, CO_2 などがある。O_2の還元触媒膜としてはコバルトポルフイリン重合体膜が、H_2O_2の酸化触媒膜としてはポリ（４，４′－ビフエノール）膜が、CO_2 の還元触媒としてはポリチオフエン膜／銀／レニウムから成る膜などが好ましく、これらの被覆方法としては電解重合法が好ましい。

＜実施例３＞

第１１図に本実施例の超微小酵素センサの構成模式図を示す。図中、第６図と同じ参照番号は同一構成物質を示す。カーボンフアイバ１１の一端を導電性接着剤１３を用いてリード線１２に接続し、先端部を細かく引き伸したガラスキヤピラリ１４に挿入したのち絶縁性接着剤１５を充鎮して電気的絶縁を行う。次にこのキヤピラリ電極の先端の一部を切断し、研磨して超微小酵素センサ用の炭素デイスク電極を作成した。

この超微小デイスク電極を作用電極，飽和塩化ナトリウムカロメル電極（ＳＳＣＥ）を基準電極，白金線を対向電極とした３電極式とポテンシオスタツトを用い、以下に示す電解条件下げ電解を行い、電解重合膜（酸素還元触媒膜）１６の被着形成をした。電解液として、１ mmoℓ／ℓのメソーテトラ

（ o－アミノフエニル）コバルトポルフイリン（以下Ｃｏ－ＴＡＰＰと略す）と０．１mol／ℓ過塩素酸ナトリウムを含むアセトニトリルを用い、０Ｖから１．８Ｖ（対ＳＳＣＥ）まで５０ｍＶ／ｓｅｃで電位掃引したのち、１．８Ｖで１０分間定電位電解を行い、膜厚０．５μｍのＣｏ－ＴＡＰＰ重合体膜を形成した。

＜実験例１０＞

このように作製をした電極は、溶存酸素の電解還元反応を触媒することが、第１２図に示すサイクリツクボルタモグラムからわかる。即ちカーボンフアイバ電極のみに比較して、－５００～－６００ｍＶ電位で酸素還元反応が生起し、５０ｍＶ／秒の掃引速度でも定常電流は得られた。

またこの電極を用い、電解電位を－０．６Ｖ（ｖｓ．ＳＳＣＥ）に保つて溶存酸素濃度をPO_2＝１５０mmHgから３００mmHgまで変化したときの応答時間は１秒以内と、超微小酵素センサ用電極として十分な特徴を示すことが分つた。この酸素還元触媒膜電極は、高速応答の酸素センサとして機能することがわかる。

＜実施例４＞

次に電解重合膜（酸素還元触媒膜）１６の表面に下記の方法で酵素固定化膜１７を被覆した。

ＰＨ８．０のリン酸塩緩衛衝溶液中にグルコース・オキシダーゼを１００ｍｇ／ｍℓ、牛血清アルブミンを１５％重量の割合で溶解した溶液中に、酸素還元触媒膜電極を５回程度浸漬

し乾燥したのち、５０％グルタルアルデヒト溶液のグルタルアルデヒド蒸気中で１２時間架橋反応を生起し、２０％グリシン溶液で洗浄した。

このようにして、グルコースオキシダーゼ固定化膜を形成して（膜厚２０μｍ）、超微小酵素センサを作製した。

＜実験例１１＞

実施例４の超微小酵素センサ（カーボンファイバ断面：７．８５×１０$^{-7}$cm^2）を作用電極とし、飽和塩化ナトリウム飽和カロメル電極（ＳＳＣＥ）を基準電極、白金線を対向電極とする３電極式セルで－０．６Ｖ vs ＳＳＣＥで定電位電解した。このときの電流応答を溶液中のグルコース濃度に対してのプロツトを第１３図に示した。グルコース濃度が０～１０５ｍｇ／ｄℓの範囲で、電流応答の直線領域が得られた。また、このときの応答時間は９５％応答が２秒以内であり、非常に高速応答をしていることが分つた。試料溶液は、５ mMリン酸塩緩衝溶液(pH6.2) を用い、２５℃でスターラで緩やかに攪拌して測定を行つた。

＜実施例５＞

実施例４と同様にして超微小酵素センサを作製したのち、５％酢酸セルロールのジクロロメタン溶液中に３回浸漬・乾燥をくり返して、グルコース透過膜１８（２０μｍ）を形成した。尚、酵素固定化膜は４００Å～５０μｍが好ましく、１～１０μｍが特に好ましい。４００Å以下では酵素を十分に固定せず寿命が短くなり、１００μｍを越える応答速度が遅くな

る。

＜実験例１２＞

実施例５の超微小酵素センサを実験例９と同様にしてグルコース濃度に対する電流応答を調べた結果、電流の直線領域が０～２４０ｍｇ／ｄℓの範囲まで広大することが分つた。このときの応答時間は９５％応答が３秒以内であり、グルコース透過膜による応答遅れが小さいことが分つた。

以上詳述したように、本実施例の酵素センサにおいては、電極面積が超微小化したものであるので、

（１）生体内あるいは組織内の基本濃度測定が可能であり、

（２）もちろんμℓオーダの微小量サンプルの測定ができる。

（３）また、センサ基体を超微小化したため、応答が３秒程度と高速であり迅速な測定が可能である。

（４）安価なカーボンファイバ等を用いることができるため低コストである。

（５）微小感応面積のため反応による濃度の変化を無視できる。

（６）また、溶液の流動・流れの影響を無視できる。

尚、導電性基体としては、細型炭素材料の他、金属（例えば金）や金属酸化物（イリジムオキサイド、インジウム酸化錫；ＩＴＯ）を使用してもよい。

更に、実施例の欄の最初でも述べた如く、本実施例では酸素センサ及び酵素センサで膜被覆センサを代表させたが、他の膜被覆センサにおいても本発明を同様に適用できる。

尚、以下の請求の範囲を離れることなく、本実施例の変形・置換・変更が可能である。

請 求 の 範 囲

1．細管と、

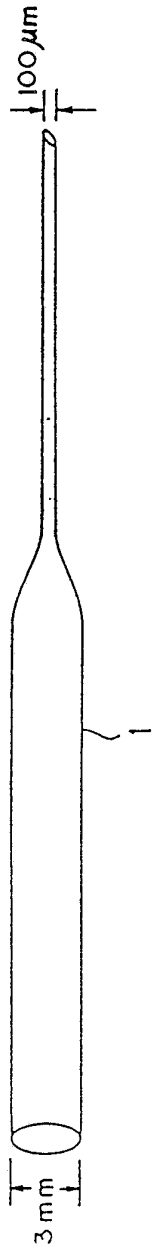
該細管の一端側でリード線と接続され、前記細管に内接する導電性基体と、

前記細管の開口する他端側の該導電性基体の端面を所定の厚さで被覆する固体被覆膜とを備えることを特徴とする膜被覆センサ。

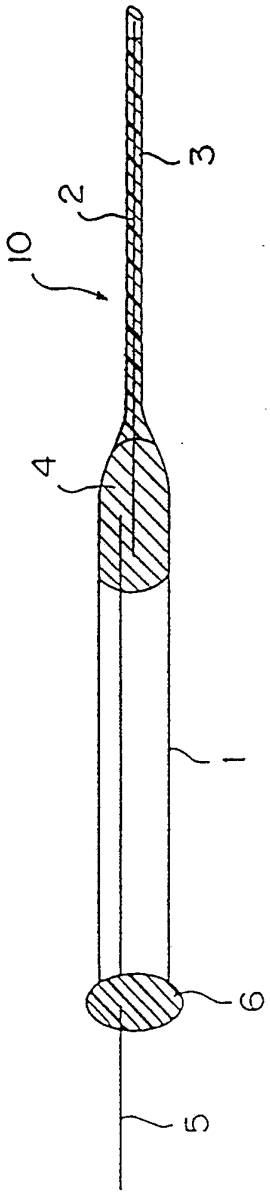
2．導電性基体は、炭素繊維，炭素棒状物，金線又は金属酸化物であることを特徴とする請求項第1項記載の膜被覆センサ。

3．導電性基体の断面積は、$10^{-5}cm^2$ 以下であることを特徴とする請求項第1項記載の膜被覆センサ。

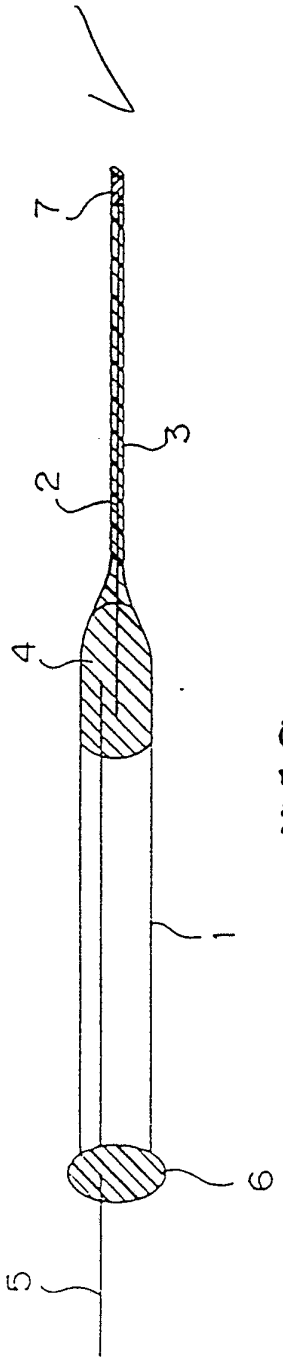
4．固体被覆膜は、血液又は関連生体液中の活性物から、目的とするガス又は電解質のみと感応する膜を有することを特徴とする請求項第1項記載の膜被覆センサ。



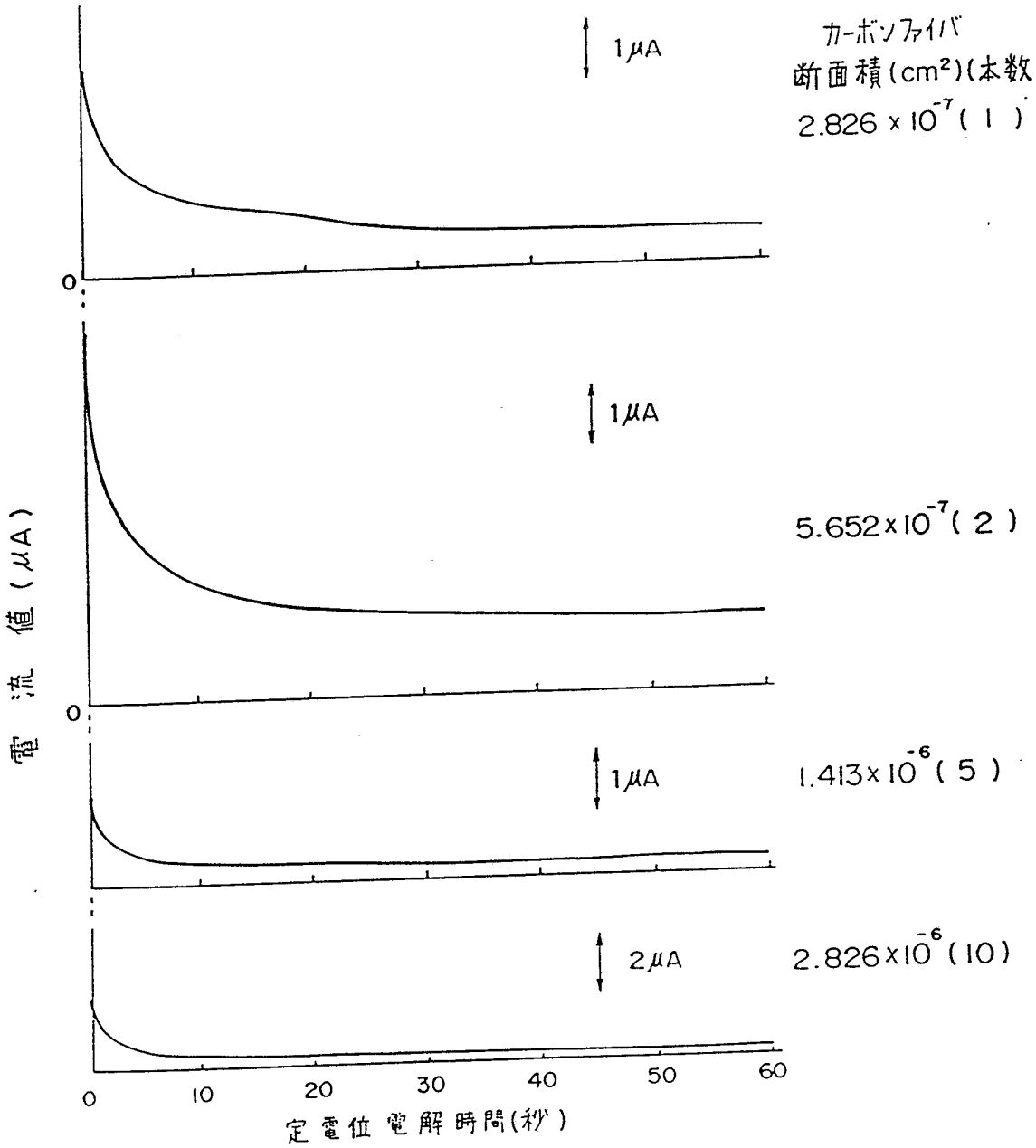
第1A図



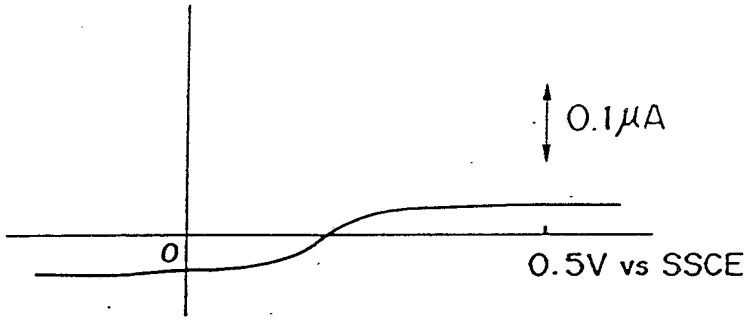
第1B図



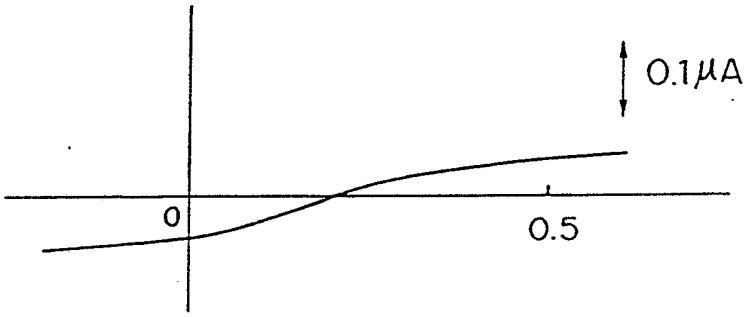
第1C図


1μA
カーボンファイバ
断面積(cm²)(本数)
2.826 x 10⁻⁷ (1)
0
1μA
5.652x10⁻⁷(2)
0
電流値(μA)
1μA
1.413x10⁻⁶(5)
2μA
2.826x10⁻⁶(10)
0
10
20
30
40
50
60
定電位電解時間(秒)

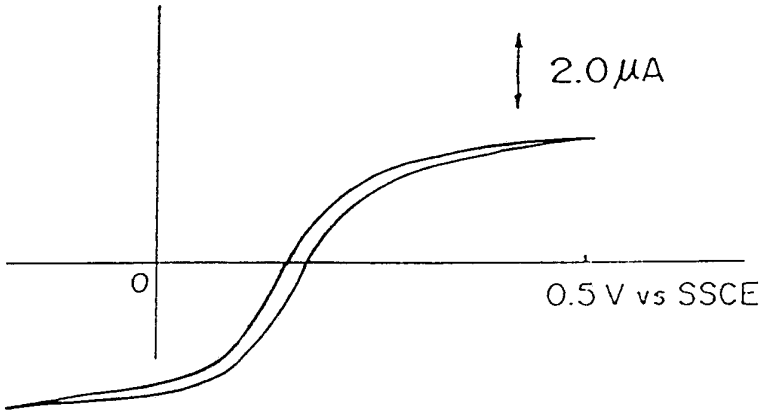
第2図



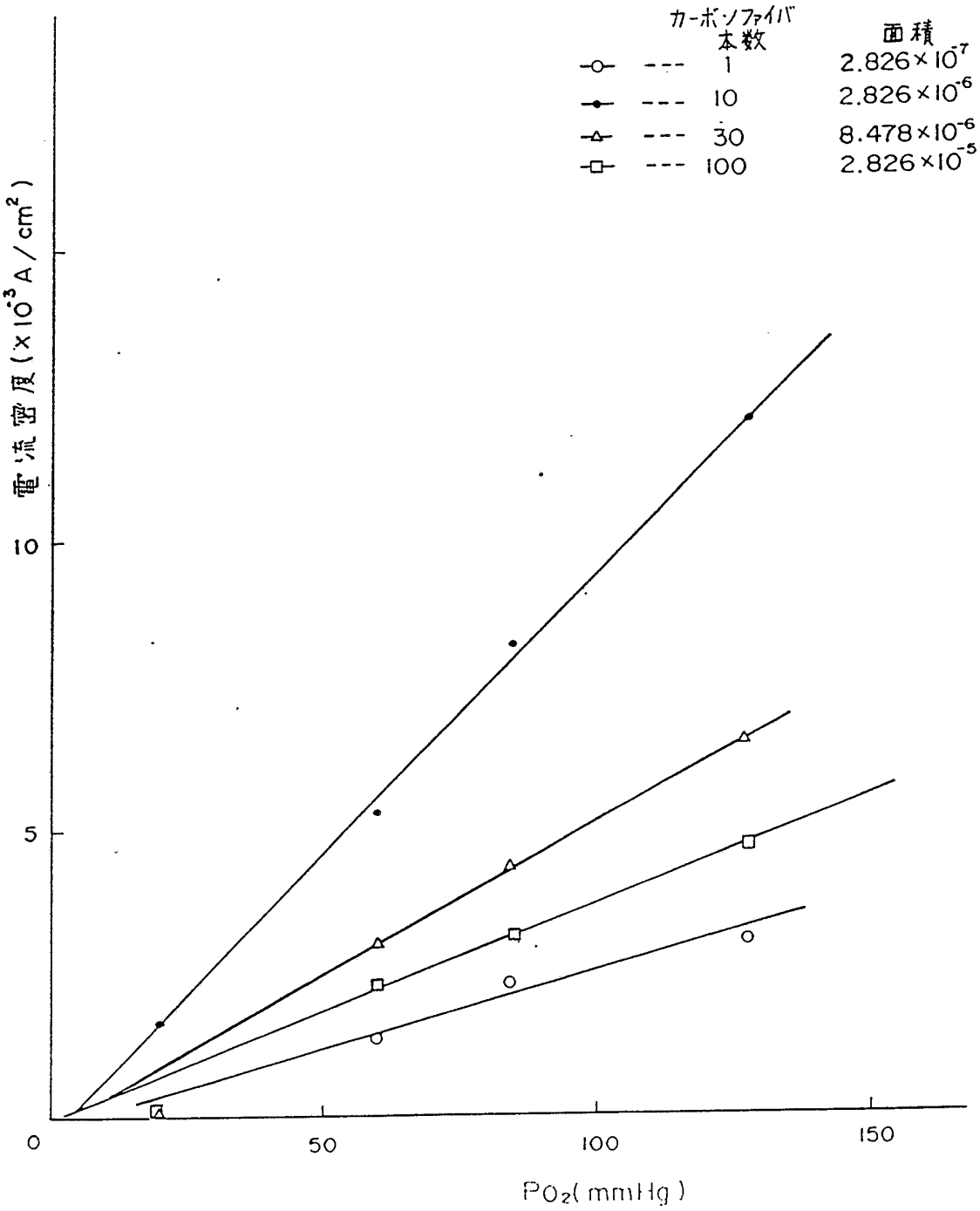
第3A図



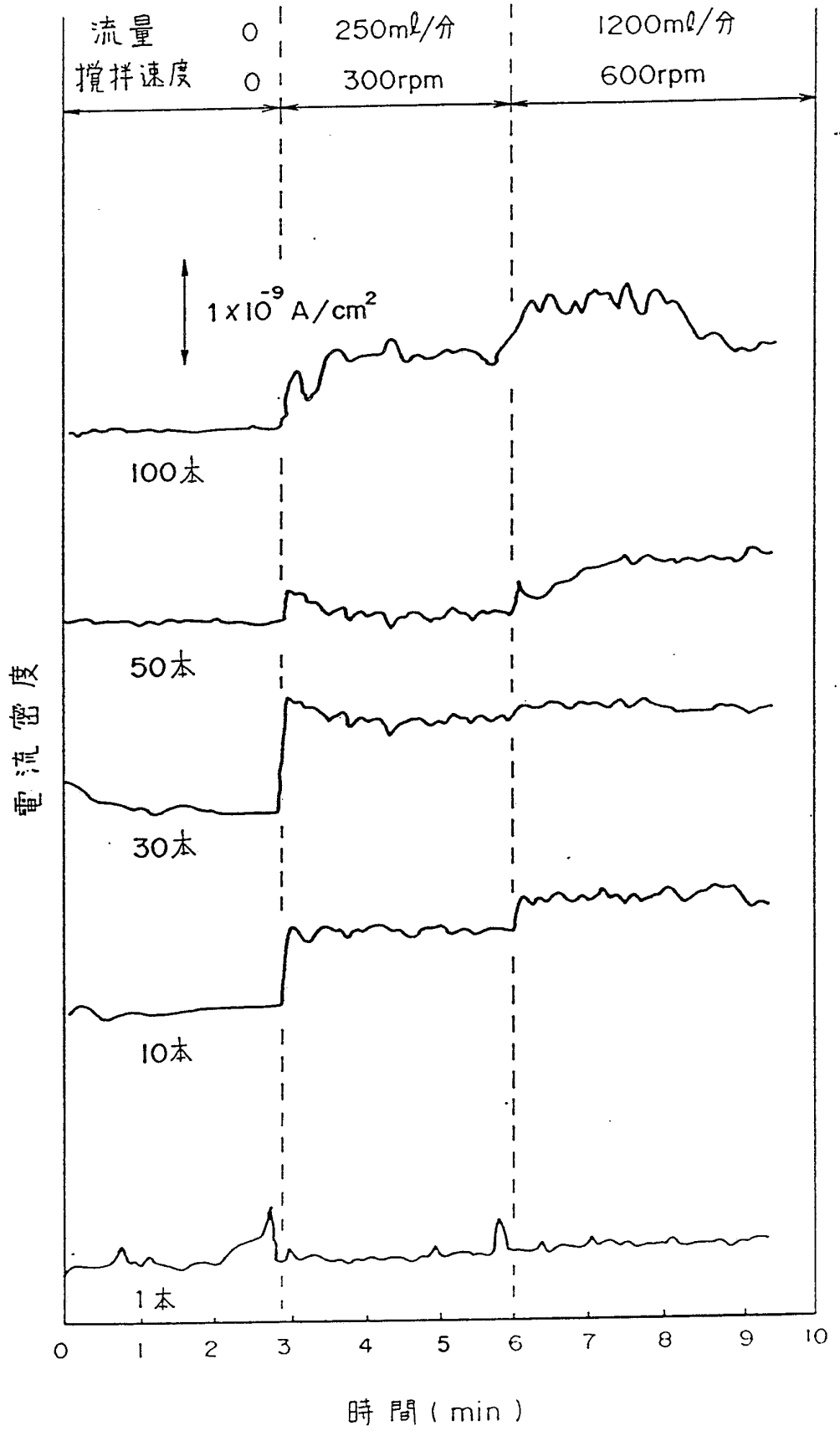
第3B図



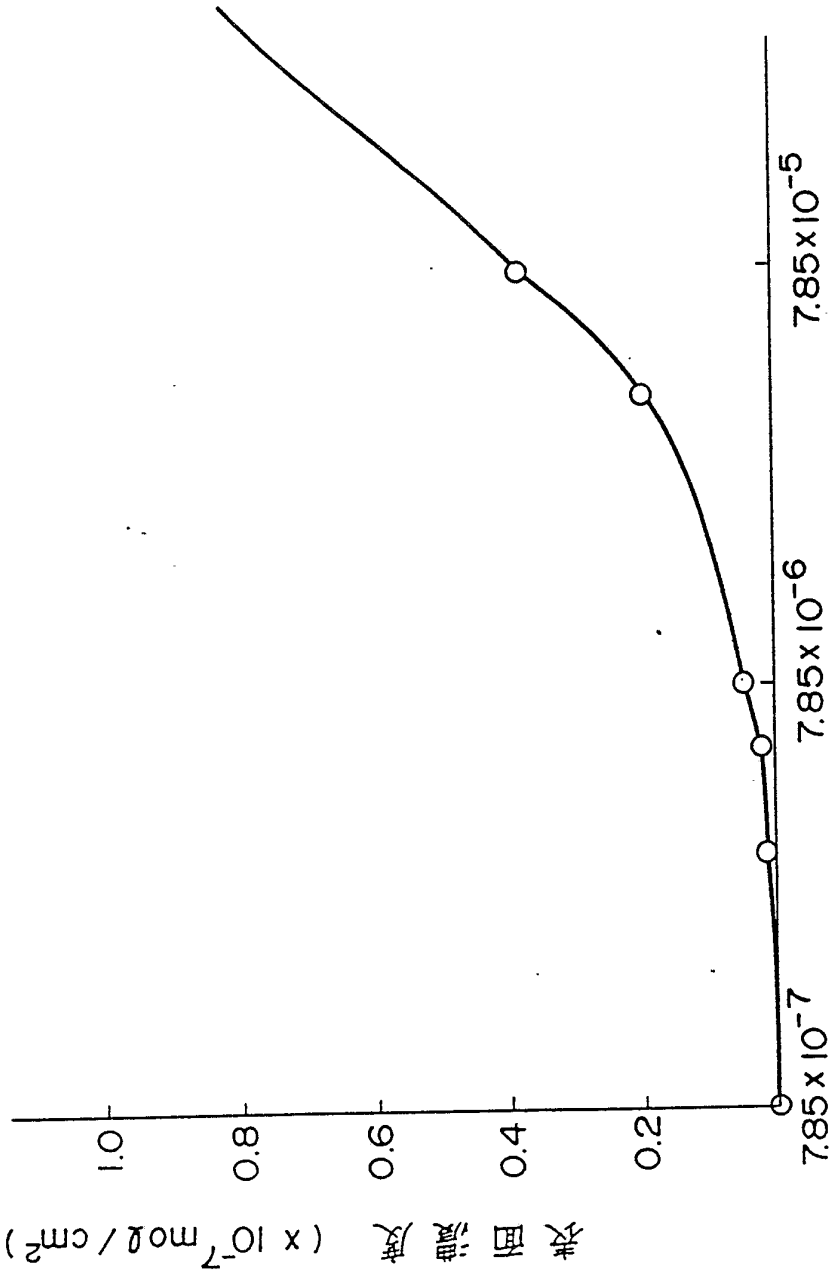
第3C図


カーボンファイバ本数
面積
1 --- 2.826×10⁻⁷
10 --- 2.826×10⁻⁶
30 --- 8.478×10⁻⁶
100 --- 2.826×10⁻⁵
電流密度 (×10⁻³ A/cm²)
10
5
0
50
100
150
PO₂ (mmHg)

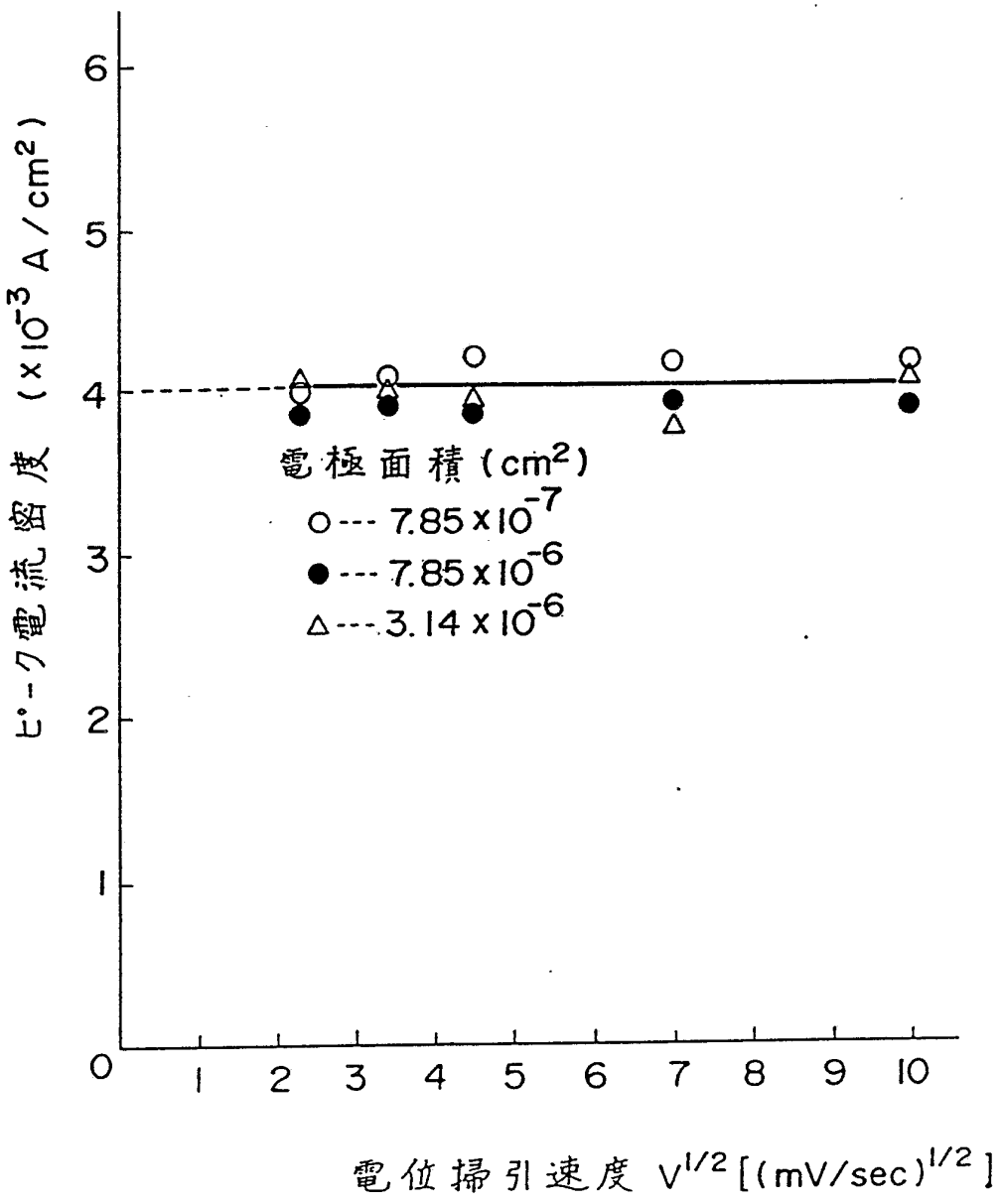
第4図


流量 0 250mℓ/分 1200mℓ/分
攪拌速度 0 300rpm 600rpm
1x10⁻⁹ A/cm²
100本
50本
30本
10本
1本
電流感度
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
時間(min)

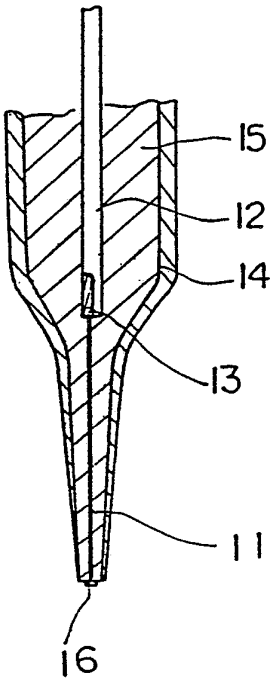
第5A図


表面濃度 (x 10⁻⁷mol/cm²)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
7.85x10⁻⁷
7.85x10⁻⁶
7.85x10⁻⁵
電極面積 (cm²)

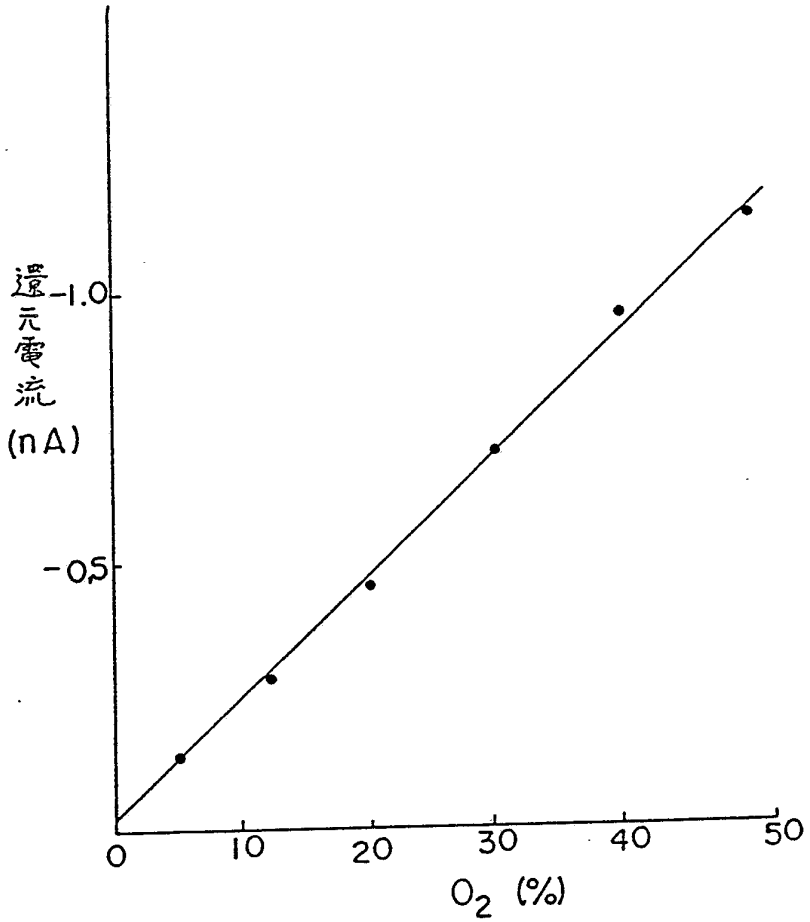
第5B図


ピーク電流密度 (×10⁻³ A/cm²)
0
1
2
3
4
5
6
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
電極面積 (cm²)
○--- 7.85×10⁻⁷
●--- 7.85×10⁻⁶
△--- 3.14×10⁻⁶
電位掃引速度 V^1/2 [(mV/sec)^1/2]

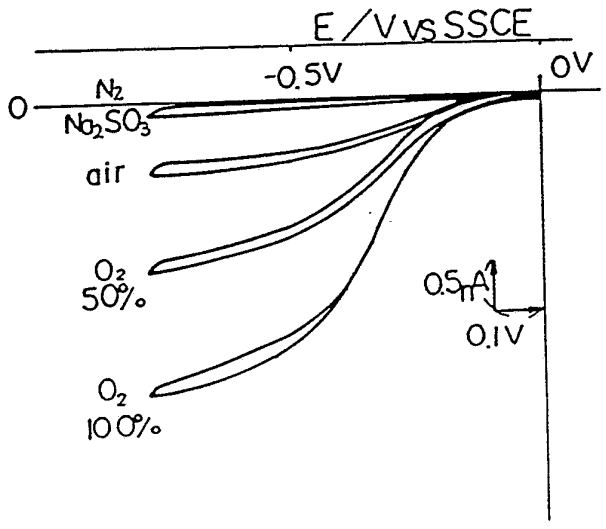
第5C図



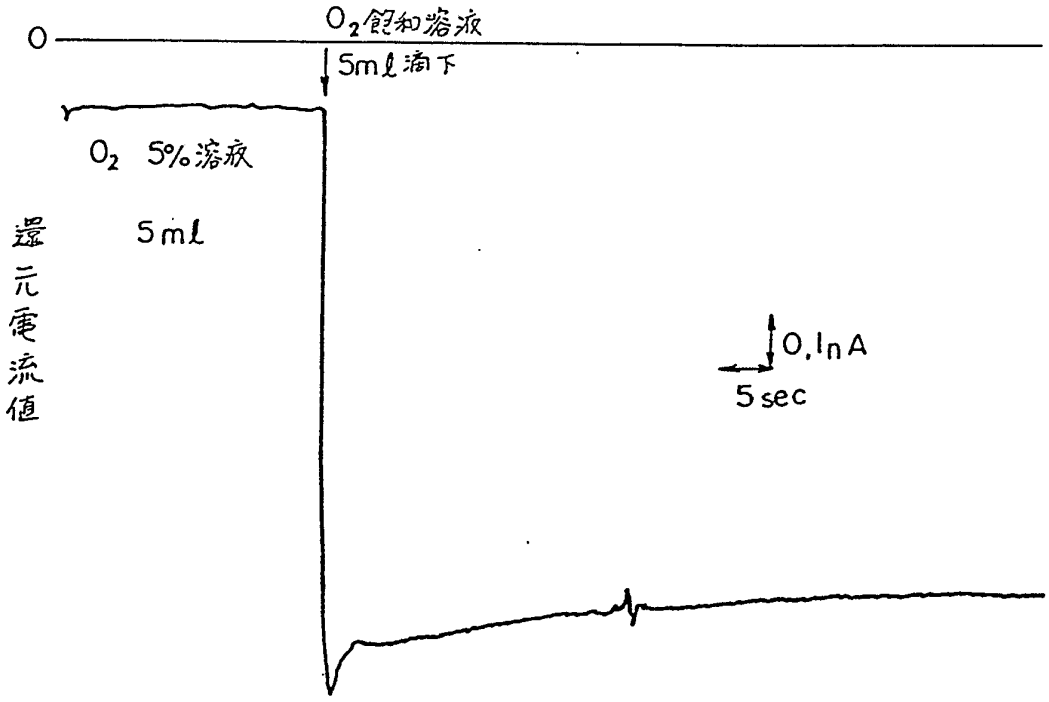
第6図


還元電流
(nA)
-1.0
-0.5
0
10
20
30
40
50
O_2 (%)

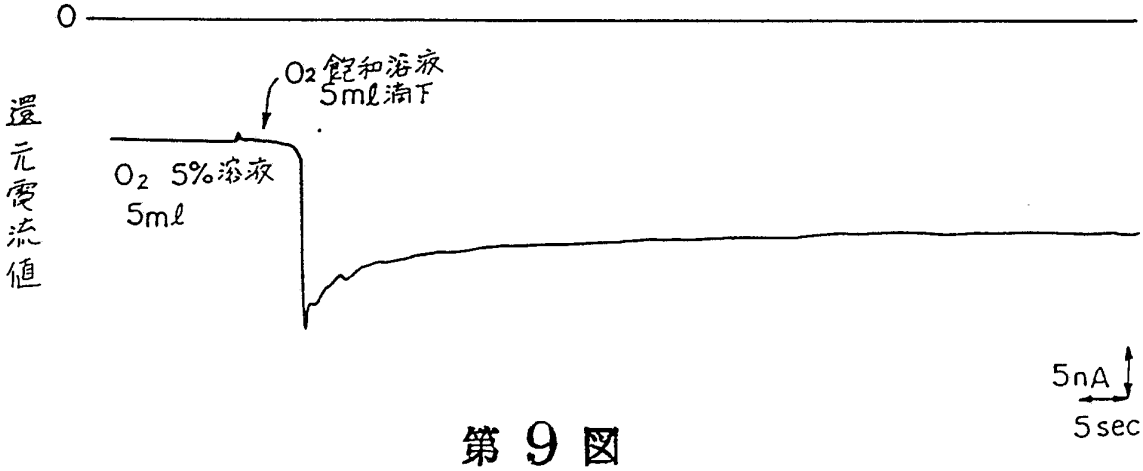
第7A図


E/V vs SSCE
-0.5V
0V
0
N_2
Na_2SO_3
air
O_2
50%
O_2
100%
0.5nA
0.1V

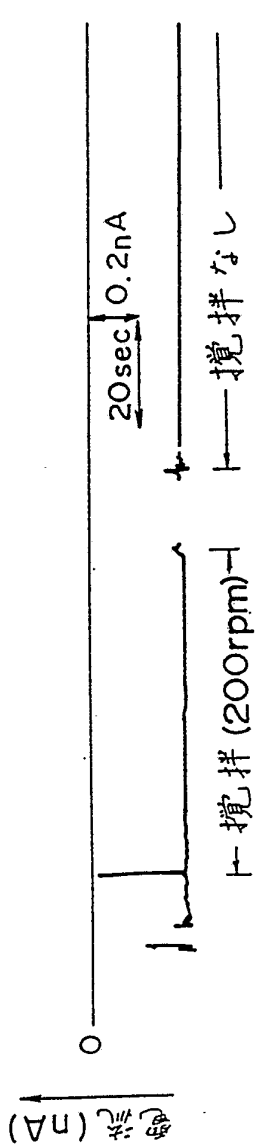
第7B図


0
O2飽和溶液
5mℓ滴下
O2 5%溶液
5mℓ
還元電流値
0.1nA
5sec

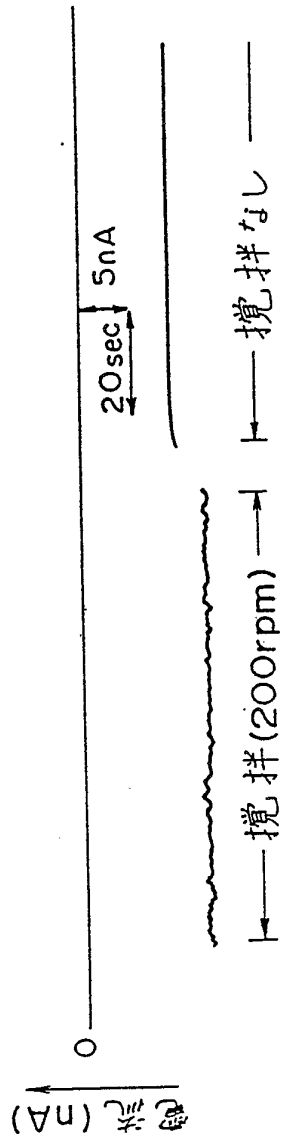
第8図


0
O2飽和溶液
5mℓ滴下
O2 5%溶液
5mℓ
還元電流値
5nA
5sec

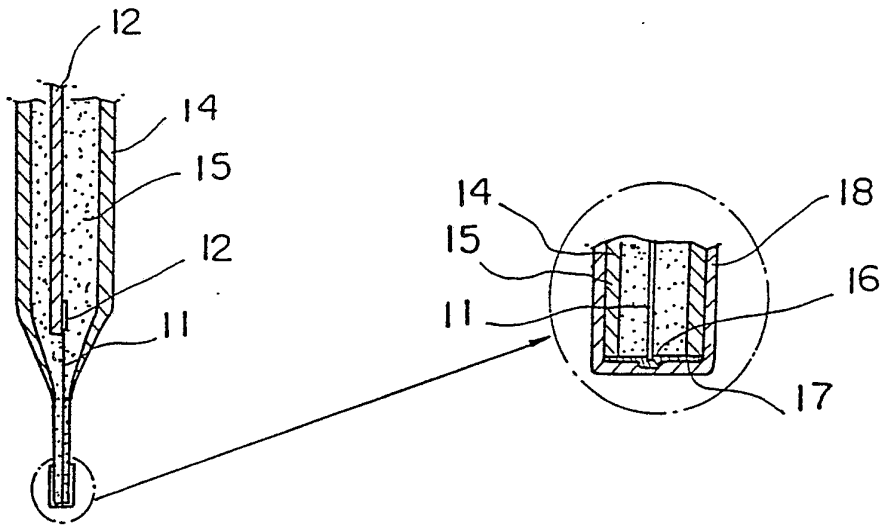
第9図


電流 (nA)
0
20sec
0.2nA
撹拌 (200rpm)
撹拌なし

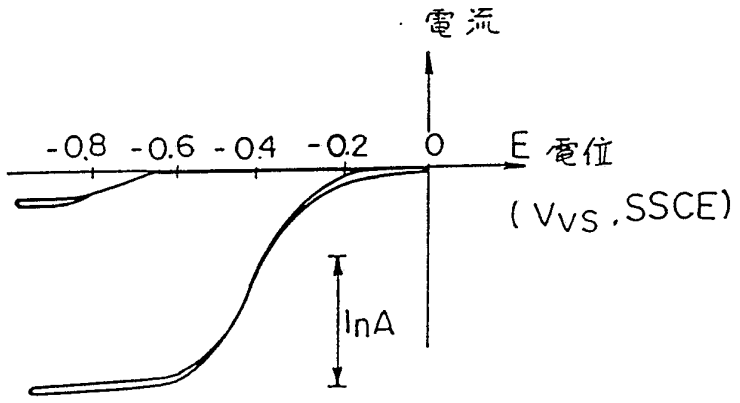
第10A図


電流 (nA)
0
20sec
5nA
撹拌 (200rpm)
撹拌なし

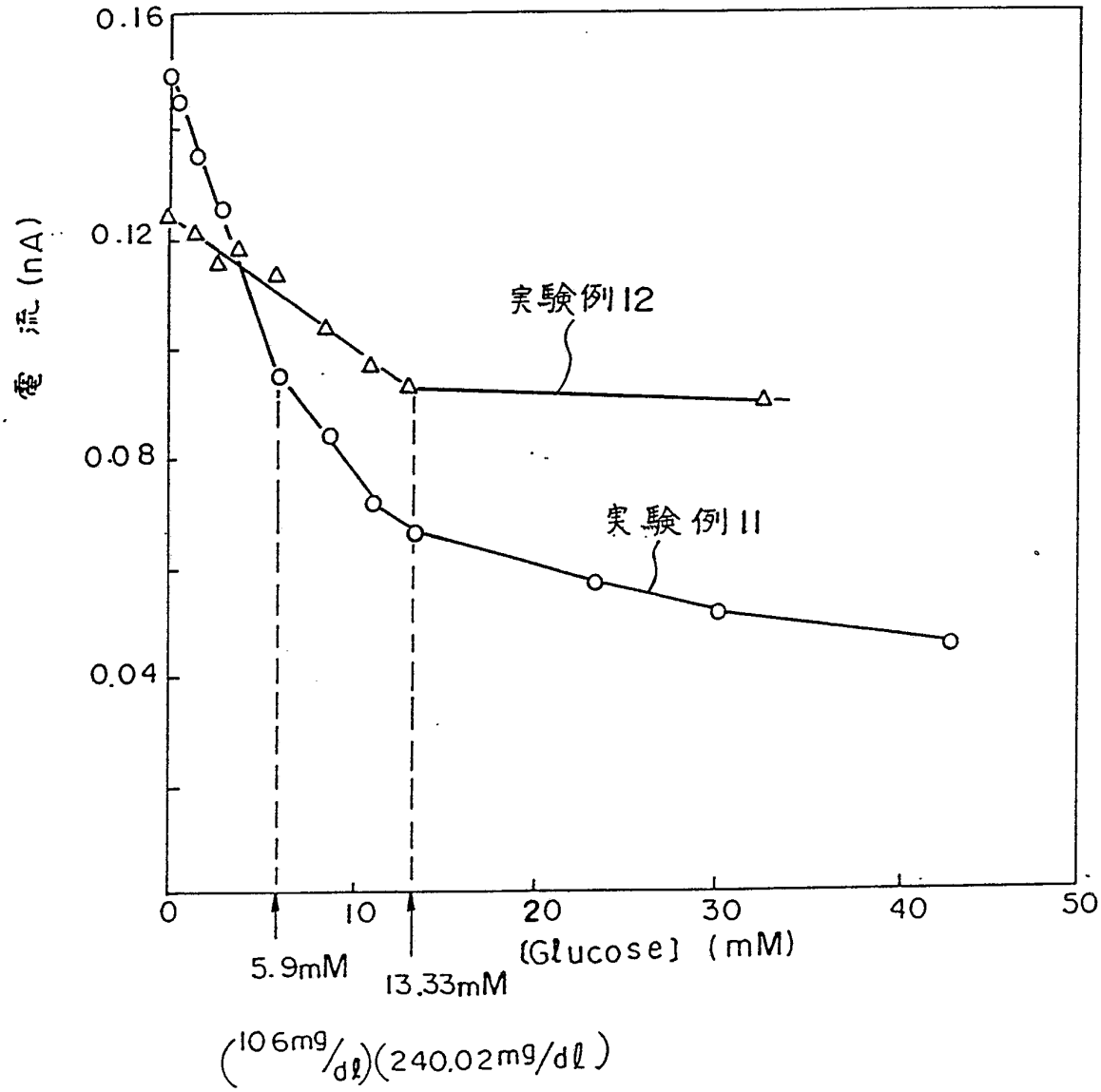
第10B図



第11図



第12図


0.16
0.12
0.08
0.04
電流 (nA)
実験例12
実験例11
0
10
20
30
40
50
(Glucose) (mM)
5.9mM
13.33mM
(106mg/dl)(240.02mg/dl)

第13図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00085

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl[4] G01N27/30, A61B5/14

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
IPC	G01N27/30, 27/46-27/56, A61B5/14

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [8]

Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1989
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1989

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category *	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
X	JP, A, 54-148593 (FMC Corporation) 20 November 1979 (20. 11. 79) & US, A, 4,134,798	1-4
X	JP, A, 61-33644 (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.) 17 February 1986 (17. 02. 86) (Family: none)	1-4
X	US, A, 3,476,670 {The Agriculture Secretary (U.S.A.)} 4 November 1969 (04. 11. 69) (Family: none)	1-4
Y	JP, U, 60-106609 (Shionogi & Co., Ltd.) 20 July 1985 (20. 07. 85) (Family: none)	1-4

* Special categories of cited documents: [10]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document 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

"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

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
April 21, 1989 (21. 04. 89)	May 15, 1989 (15. 05. 89)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
Japanese Patent Office	

国　際　調　査　報　告

国際出願番号PCT/JP 89/ 00085

Ⅰ．発明の属する分野の分類

国際特許分類（IPC）　Int. Cl⁴
G01N27／30，A61B5／14

Ⅱ．国際調査を行った分野

調　査　を　行　っ　た　最　小　限　資　料

分類体系	分類記号
IPC	G01N27／30，27／46－27／56，A61B5／14

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

日本国実用新案公報　　1926－1989年
日本国公開実用新案公報　　1971－1989年

Ⅲ．関連する技術に関する文献

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	請求の範囲の番号
X	JP，A，54－148593（エフ・エム・シー・コーポレーション） 20．11月．1979（20．11．79） &US，A，4,134,798	1－4
X	JP，A，61－33644（三菱レイヨン株式会社） 17．2月．1986（17．02．86）（ファミリーなし）	1－4
X	US，A，3,476,670｛The Agriculture Secretary（U.S.A）｝ 4．11月．1969（04．11．69）（ファミリーなし）	1－4
Y	JP，U，60－106609（塩野義製薬株式会社） 20．7月．1985（20．07．85）（ファミリーなし）	1－4

※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」先行文献ではあるが、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の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の文献

Ⅳ．認　　証

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
21．04．89	15.05.89

国際調査機関	権限のある職員
日本国特許庁（ISA/JP）	2G 7363 特許庁審査官　能美知康