

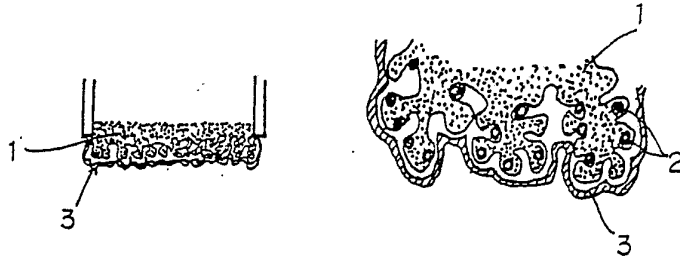


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類<sup>4</sup> G01N 27/30, 27/46</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 88/ 07193</p> <p>(43) 国際公開日 1988年9月22日 (22.09.88)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP88/00256 (22) 国際出願日 1988年3月11日 (11. 03. 88) (31) 優先権主張番号 特願昭62-55387 特願昭62-304524 (32) 優先日 1987年3月12日 (12. 03. 87) 1987年12月3日 (03. 12. 87) (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) 国立身体障害者リハビリテーションセンター総長が代表する日本国 . JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF NATIONAL REHABILITATION CENTER FOR THE DISABLED, (JP/JP) 〒359 埼玉県所沢市並木4丁目1番地 Saitama, (JP) 生友セメント株式会社 (SUMITOMO CEMENT CO., LTD. (JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田美土代町1番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 旋山義人 (IKARIYAMA, Yoshihito) (JP/JP) 〒359 埼玉県所沢市並木4丁目1番地 Saitama, (JP) 山内 繁 (YAMAUCHI, Shigeru) (JP/JP) 〒102 東京都千代田区一番町2-7-205 Tokyo, (JP)</p>	<p>行足智明 (IKUASHI, Tomoaki) (JP/JP) 〒275 千葉県習志野市習志野台5丁目25番4号 Chiba, (JP) (74) 代理人 弁理士 倉持 裕, 外 (KURAMOCHI, Yutaka et al.) 〒101 東京都千代田区神田須田町1-2 日邦西園ビル3F Tokyo, (JP) (81) 指定国 DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: IMMOBILIZATION OF BIOFUNCTIONAL MATERIAL, ELEMENT PREPARED THEREFROM AND MEASUREMENT USING THE SAME

(54) 発明の名称 生体機能物質の固定化法、それにより調製された素子及びそれを用いた測定法



(57) Abstract

Fine particles (1) of an electrically conductive material such as platinum black are precipitated on the surface of an electrically conductive material such as platinum and are immersed in a solution of a biofunctional material such as an enzyme or the solution is applied to the fine particles (1) for impregnation. Next, a bio-element is prepared by directly cross-linking the biofunctional materials (2) with one another or by forming a thin polymer film (3) on the surface of the fine particles (1) of the electrically conductive material. This bio-element is compact in size and moreover, since the apparent surface area of the fine particles (1) of the electrically conductive material is large and a considerable amount of the biofunctional material (2) is contained and immobilized in the electrically conductive fine particles (1), the intended component can be measured quickly and with high sensitivity by use of a trace amount of sample.

(57) 要約

白金等の導電性物質の表面に白金黒等の導電性物質微粒子(1)を析出させ、この導電性物質微粒子(1)を酵素等の生体機能物質の溶液に浸漬、あるいはそれを塗布することにより含浸せしめ、次いで直接生体機能物質(2)同志を架橋するかあるいは前記導電性物質微粒子(1)表面に高分子薄膜(3)を形成して被覆してバイオ素子を作製する。

このバイオ素子は、小型であり、しかも導電性物質微粒子(1)の見かけの表面積が大きく、かつ生体機能物質(2)はかなりの量が導電性微粒子(1)中に包括固定化されているので、目的とする成分を微量な試料で迅速に高感度に測定することができる。

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

## 01

## 明 細 書

生体機能物質の固定化法、それにより調製された素子及びそれを用いた測定法

## 技 術 分 野

5 本発明は、生体機能物質の固定化法、それにより調製された素子及びそれを用いた測定法に関する。特に、特定の物質を迅速に、高感度かつ連続的に測定するための電極素子の微小化技術とこの技術で得られる測定素子に関する。

また、更に本発明は、それを用いた分析装置及びその分析方法  
10 法に関する。特に、本発明による新規なマイクロ電極素子を用い、流体中の特定の物質を迅速にかつ高感度に測定する分析装置と分析方法に関する。

## 背 景 技 術

白金や炭素表面に酵素や抗体、微生物等を固定化したバイオ  
15 センサが種々の化学物質、生体物質を迅速かつ連続的に測定できることは既に知られている。バイオセンサにおいては生体機能物質は、一つは生体機能物質を含有した膜を別途調整しておき、これを電極上に貼り付ける、他は表面を化学処理した電極に酵素等を塗布し、酵素等と表面との間に共有結合を形成せし  
20 める方法によって固定化されてきた。然し乍ら、バイオセンサの性能は、再現性、耐久性、高感度、応答速度等によって評価されるが、前者の方法では応答速度の点で難があり、後者の方法では固定化密度を大きくすることが困難であった。また、いずれの方法においても、固定化には数段階の複雑な工程を必要  
25 とし、また、一つのセンサ上に数種類の生体機能物質電極を取り付けた多機能センサとするには困難があった。

また、従来の固定化酵素電極は平板状の白金表面に酵素固定化膜が装着させた構造を有している。その作製法としては、別

## 02

途調製した固定化酵素膜を白金電極に貼り合わせる方法、表面を化学処理した平滑な白金電極に酵素を塗布し固定化する方法などがある。然し乍ら、このような方法では微小化が困難である。一方、この微小化技術として最近注目されているものが半

5 導体集積化技術がある。この半導体技術を用いる方法では、数皿のサイズの酵素電極も作製できるが、電位検出法であるために、感度及び応答などの面で満足のゆく結果が得られないもので、現在得られるサイズ以下のマイクロ化もかなり困難視されている。

10 従来、例えば、フロー方式酵素分析方法は、分析対象が流路にそって流れるようにし、その流路に沿って電気化学的センサと酵素センサを設け、相互作用を避けながら、測定分析するものである（特開昭59年133455号）。また、流路にそって測定妨害物質検知用の作用電極を設けて、バイオセンサで測

15 定分析するものが提案されている（特開昭61年3047号）。然し乍ら、これらに使用されるバイオ電極は、従来使用されてきた下記に説明するような電極であり、従来のバイオ電極の下記に説明する基本的な欠点を有するものであり、基本的な問題を解決した電極は見当たらないものであった。

20 即ち、白金や炭素表面に酵素や抗体、微生物等を密着固定化したバイオセンサが種々の化学物質、生体物質を迅速且つ連続的に測定できることは既に知られているが、このようなバイオセンサにおいては、生体機能物質は一つの方法では生体機能物質を含有した膜を別途調整しておき、これを電極上に貼り付け

25 るものであり、他の方法では表面を化学処理した電極に酵素等を塗布し、酵素等と表面との間に共有結合を形成せしめるなどの方法によって固定化されてきた。

また、従来の固定化酵素電極は、クラーク型酸素電極、或いは平板状の白金表面に酵素固定化膜を装着した構造を有してい

## 03

る。そして、その作製法としては、別途調製した固定化酵素膜を電極に貼り合わせる方法、表面を化学処理した平滑な白金電極に酵素を塗布し固定化する方法などがある。然し乍ら、このような方法では微小化が困難である。一方、この微小化技術として最近注目されているものが半導体集積化技術がある。この半導体技術を用いる方法では、数mmのサイズの酵素電極も作製できるが、電位検出法であるために、感度及び応答などの面で満足のゆく結果が得られていない上に、現在得られるサイズ以下のマイクロ化もかなり困難視されている。

## 10 発 明 の 開 示

上記のような状況において、本発明者らは、従来のセンサ電極構造と異なり、上記の従来のバイオセンサの欠点を克服することを目的に、微小化できる生体機能物質固定化素子の作製法を見出し、それにより迅速かつ高感度の測定が可能なバイオセンサ電極を提供できた。また、本発明のマイクロバイオ電極素子は、微小電極表面を微粒子化することにより電極表面を見掛けの電極表面積より数百倍以上にしたものであり、見掛けは微小電極であるにもかかわらず検出感度を上げることのできるバイオセンサ素子を作製できたものである。更に、本発明のマイクロバイオ素子は、電極表面が微粒子状であるために充分量の生体機能物質を電極の深部まで浸漬固定化でき、そのために迅速な応答性を有するバイオ素子が提供できた。

本発明者は、酵素や抗体に代表される生体機能物質を導電性物質内部及び表面に固定化する方法において、微粒子層よりなる多孔性導電性物質表面を、該生体機能物質の溶液に浸漬し附着せしめた後、高分子薄膜を形成して被覆することにより前記生体機能物質の固定化を行なう方法を見出したものである。更に、本発明によると、多孔性導電性物質の微粒子層を表面に形成した電極上に、該微粒子を生体機能物質の溶液に浸漬し、微

## 04

粒子内部に取り込んだ後、高分子薄膜で被覆することにより、前記生体機能物質の固定化した表面層を有する高感度で分子識別能力を持つマイクロバイオ素子が得られた。

5 更に、従来のフローインジェクション分析やバッチ方式分析と異なり、本発明の新規なマイクロバイオ素子をフローセル中の作用電極として用いると、従来のバイオセンサの有する難点を克服することのでき、迅速かつ高感度で測定できるフローインジェクション分析装置或いはバッチ式分析装置並びに分析方法を可能とするものである。

10 本発明のマイクロバイオ素子においては、微小電極表面に微粒子を形成することにより電極表面を見掛けの電極表面の数千倍にした結果、高い分解能を有し、且つ、応答速度が非常に速いにもかかわらず、S/N比のすぐれた出力を示し、その結果検出感度を容易に上げることのできるバイオセンサ電極素子をフ  
15 ローセル及びバッチセル中の作用電極として用いることにより、広い濃度範囲にわたり、高い分解能を有するバイオ分析方式を確立できたものである。

即ち、本発明は、電極表面が微粒子状であるために充分の量の生体機能物質を電極の深部まで浸漬固定化でき、導電性微  
20 粒子物質の空隙に生体機能物質を直接固定化したマイクロ電極素子を利用しているために、高い分析精度と、すぐれた使用安定性とセンサ保存安定性を有するバイオ分析システムを可能にした。更に、本発明は、極めて高速の生体成分の計測が可能になるバイオ分析システムであり、また、本発明は、白金黒化の技  
25 術を用いているので、マイクロ電極は、円板状、球状、チューブ状などの多様な形状にできるので、測定対象に合ったバイオ計測システムにすることが可能である。本発明のマイクロバイオ素子は極めて小さいために、試料量も少なくすみ、分析装置全体も小型にでき、そのために連続測定では1時間に数百検体以

上の処理もできる分析装置を得ることができる。更に、本発明は電極のアレイ化、多機能化が容易で多成分系のバイオ分析などにも適用できる。また、本発明の分析装置は、ポテンシオメトリ方式の測定にも使用できるものである。

- 5 本発明による生体機能を有するマイクロ電極素子は、白金などからなる微小な電極（例えば、径：1～500 $\mu\text{m}$ ）の表面に酵素などの生体機能物質を含浸させた導電性物質微粒子層を有する構造の電極である。特に、白金の電解析出による白金黒表面層を有する電極は、水素還元触媒活性が高いことで知られているが、本発明のように、白金黒を生体機能物質の担体とする
- 10 ことは、従来行なわれていない。白金板を腐食により多孔質にしてそれに酵素などを架橋剤でつなぐ固定化法があるがこの方法で作製した多孔体は比表面積が数 $\text{m}^2/\text{g}$ 程度にしか達しないのが普通である。更に本発明による白金黒微粒子のサイズを
- 15 コントロールして、生体機能物質を包括し、固定化する方法は、従来なかったものである。本発明において、被覆に用いられる高分子薄膜は酵素溶出の完全防止、及び生体適合性の付与のために主として用いられる。微粒子内部の酵素を架橋剤で連結すると酵素は完全に溶出しなくなるため、この場合は表面の
- 20 薄膜化は生体適合性の付与が主目的となる。

本発明の酵素などの生体機能物質の固定化方法は、例えば白金黒などの導電性微粒子層中に、その生体機能物質を固定化するものである。具体的には、該微粒子層を持つ金属電極を、生体機能物質の水溶液中に浸漬し、或いは、それを塗布すること

25 により含浸せしめ、次に、生体機能物質のわずかな溶出を防止し、かつ抗血栓性を付与するために、アルブミンやヘパリンなどの高分子物質をその上に含浸せしめ、これを架橋剤により不溶性化し、不溶性高分子薄膜を形成することにより為されるものである。このような本発明の固定化方法は、酵素をゲルや高

## 06

分子中に包括固定化する、所謂、包括法を金属電極系に適用したものと考えることができるが、形成する高分子膜は、厚さ数百Å程度以下の薄膜に仕上げることができ、高分子膜の存在が、生体機能物質の生体機能の発現の阻害要因になることはな  
5 いものである。

ここにおいては、「生体機能物質」とは、酵素、抗体に代表されるもので、各種の酵素、微生物菌体、増殖微生物、オルガネラ、抗原、抗体、ハプテンなどを含むものである。また、本発明において、白金の代わりに、ロジウム、金、炭素、ルテニ  
10 ウムオキシド( $\text{RuO}_2$ )、パラジウム、イリジウムなどの「導電性物質」を使用出来、「導電性物質」の微粒子層を該導電性物質表面に形成することができるものは、他に障害のない限り、好適に本発明において使用できる。

また、本発明で使用できる高分子物質には、アルブミンなどの  
15 の蛋白質、或いはヘパリンなどの多糖類などが挙げられる。架橋剤としては、使用した高分子に対して適する架橋剤があり、例えば、アルブミンに対しては、グルタルアルデヒド、また、カルボジイミド、マレイミド架橋剤などが用いられる。

本発明により得られるマイクロバイオ素子は、測定用のバイオ  
20 電極及び変換素子或いは反応触媒用のバイオリアクターを含むものであり、これらの用途のための素子に使用でき、これらの用途の装置に組み込み、使用できるものである。

本発明の生体機能物質の固定化方法は、バイオセンサのマイクロ化、多機能化などの多項目計測が要求される臨床化学分析、  
25 携帯型の健康監視システムの開発に、極めて重要な技術の一つである。即ち、最近、集積回路技術を用いた各種のマルチバイオセンサが創案されているが、この点でも本発明による微小電極表面に酵素などを固定化する方法が重要なものである。更に、本発明で得られた酵素電極は高感度で、しかも迅速な応答を示



すことが明らかである。

また、フェロセン等のメデイエーターを生体機能物質の微粒子と一体化させることもできる。これにより通常測定対象液中に酸素が溶解している必要があったものが、溶存酸素のない、  
5 或いは少ない状態でも測定対象物質を測定することが可能となるうえ、センサの駆動電位が著しく低下できるものである。

即ち、本発明により生体機能物質を固定化した導電性物質層（即ち、本発明のマイクロバイオ素子）の構造は、第1図に示されるものである。生体機能物質が図示のように、微粒子導電性  
10 微粒子の中に均一に取り込まれているものである。例えば、基板上に電析された白金粒子は、電析条件によりかさ高い黒色の粒子として析出し、電析された白金黒層は水溶液中で強く攪拌しても簡単に剥離するものでなく、基板白金と同様に電極の一部となり、言わば、電極内に酵素などの生体機能物質が一体化  
15 された形状のものである。白金黒層は、アルブミンなどの高分子を含浸させ、架橋剤例えばグルタルアルデヒドなどで架橋して酵素などが溶出しないようにできる。

このように高密度に生体機能物質を固定化した導電性物質を利用すれば、高感度のバイオセンサ用電極素子が得られる。即ち、例えば、白金黒の表面層を有する白金電極の白金黒微粒子  
20 内部或いは微粒子表面に酵素などを固定化して作製した電極素子は、後記の実施例に示すように、アンペロメトリ法によるバイオセンサ用電極素子として、高い感度を有するものとなる。また、以上の本発明による固定化法を用いると、微小電極系よ  
25 りなるバイオセンサシステムを構成することもできる。

本発明に従って生体機能物質を固定化すべき基板は、導電性物質であり、その微粒子を表面で形成し、その微粒子間に生体機能物質を包含せしめるものであるが、その導電性物質微粒子のサイズ或いは粒子間距離は、形成条件を変えることにより、

## 08

コントロールすることができる。

このような導電性物質電極としては、白金以外に、ロジウム、金、炭素即ち、グラファイト、ルテニウムオキシド( $\text{RuO}_3$ )、パラジウム、イリジウムなどを基板として、その上にロジウム微粒子、金微粒子、白金黒、炭素、グラファイト微粉、或いは、導電性金属酸化物、ルテニウムオキシド( $\text{RuO}_3$ )、パラジウム、イリジウムなどの微粒子の微粒子層を形成したもので、その微粒子層中に生体機能物質を固定化したものである。

本発明によれば、生体機能物質を、導電性物質の微粒子と一体化させることにより製作された微粒子導電性物質表面層を有する生体機能物質固定化微小電極を、フローインジェクション分析或いはバッチ式分析の作用電極として用い、測定対象流体の流れる流路のフローセルに沿い、或いはバッチセル中に参照電極と対極とともに設けたバイオ測定或いは分析装置が得られるものである。また、本発明によると、生体機能物質を、導電性物質の微粒子と一体化させることにより製作された微粒子導電性物質表面層を有する生体機能物質固定化マイクロ素子を、バイオ分析のフローセル或いはバッチセル中に作用電極として用い、所定電位をかけておき、発生する電流値を観察することにより対象物質の濃度を決定できる測定装置が容易にかつ低コストで作製できるものである。

生体機能物質を、導電性物質の微粒子と一体化させる処理方法は、導電性微粒子物質を、該生体機能物質の溶液に浸漬し、該生体機能物質を微粒子内部に取り込んだ後、或いは表面に附着せしめた後、直接該生体機能物質同志を架橋するか或いは微粒子表面に高分子薄膜を形成することにより被覆することで該生体機能物質の溶出を防止するという2工程処理で成される。この該生体機能物質と導電性物質との一体化により作製されたバイオ電極素子は、非常に微細なサイズででき、且つ、その機

## 09

能は大きなバイオ電極と同じ能力を有することのできるもので、その構造は微粒子導電性物質表面層を有し、生体機能物質の固定化された微小電極である。このバイオ電極を、本発明ではマイクロ電極或いはマイクロ素子と称する。即ち、本発明はこの

5 ような生体機能物質固定化マイクロ電極をフローインジェクション分析或いはバッチ分析の作用電極として利用し、フローセル中或いはバッチセル中に設け、それに一定電位をかけておき、対象微量反応物質が流れてきたときに、応答性よく発生する電

10 流値を測定し、対象微量物質の濃度を高速度、且つ高精度で決定することができることを見出したものである。

本発明者らは、白金黒化技術と酵素の電気化学的吸着技術を利用することにより、多孔質導電性物質と生体機能物質を一体化することに成功したものであり、これにより作製したマイクロ

15 バイオ電極は、高速応答性を有し、高感度のものである。

本発明者らは、更に研究を進めて、このすぐれた特性のマイクロ電極を利用して、極微量の試料中の微量成分をフローイン

20 ジェクション法或いはバッチ法で分析できるバイオ分析システムと分析方法を見出したものである。

本発明の分析方法に利用するこのマイクロ電極は、電極自身と

25 酵素分子が一体化した構造のものである。即ち、白金黒粒子層は酵素の固定化担体であるだけでなく、トランスジェーサとしても役割するものである。即ち、このマイクロ電極においては、トランスジェーサの表面積を数百倍以上にできるために、このマイクロ電極は、電極サイズはマイクロの範疇に入り、分解能にすぐれているが、同時に、微粒子電極の巨大な表面積を利用することにより、S/N比の高いマクロ電極としての特性も有することのできたものである。

本発明のマイクロ電極素子においては、電極と酵素が一体化された構造のために、所定電位をかけて生成する過酸化水素を効

## 10

率よく酸化することができる。そのために、このマイクロ電極をバッチ式でテストをすると、マイクロ電極によるセンサは、定常電流値に達するまでに3秒以内と速い応答性を有し、グルコース濃度1  $\mu$ M程度から10 mM程度の広い範囲にわたり優れた直線性を有することが明らかにされた。

従って、本発明者らはこのすぐれた特性の本発明のマイクロ電極を利用して、フローインジェクション法又はバッチ法で、微量対象物質を分析するバイオ分析装置と分析方法を見出したものである。即ち、このマイクロ電極を作用電極として、フローセル又はバッチセル中に設置し、微量対象物質を適当な液の含有させて、或いは、液中に存在する微量特定物質を、極めて迅速に測定できるバイオセンシングシステムが得られたものである。

本発明に利用する生体機能を有するマイクロ電極は、白金などからなる微小な平板電極（例えば、径：1  $\mu$ m ~ 500  $\mu$ m）の表面に酵素などの生体機能物質を含浸させた導電性物質微粒子層を有する構造の電極である。特に、白金の電気化学析出による白金黒表面層を有する電極は、水素還元触媒活性が高いことで知られているが、本発明のように白金黒を生体機能物質の担体とすることは、従来行なわれておらず（白金板を腐食により多孔質にしてそれに酵素などを架橋剤でつなぐ固定化法があるが）、更に本発明による白金黒微粒子のサイズをコントロールして、生体機能物質を包括し、固定化する方法は従来なかったものである。

本発明に利用するマイクロ電極の作製方法は、2段階処理によって、マイクロ電極を作製するものであり、例えば、細い白金線（一般的には、導電性物質）の上に白金黒などの導電性微粒子層を作製し、その中に生体機能物質を固定化するものである。具体的には、導電性物質微粒子層を形成された電極を、生

## 11

体機能物質の水溶液中に浸漬し、或いは、それを塗布することにより含浸せしめ、次に生体機能物質のわずかな溶出を防止し、かつ抗血栓性を付与するために、アルブミンやヘパリンなどの高分子物質をその上に含浸せしめ、これを架橋剤により不溶性化し、不溶性高分子薄膜を形成したものである。このようにして作製したマイクロ電極は、酵素を高分子中に包括固定化されており、所謂、包括法を金属電極系に適用したものと考えることができるが、形成高分子膜は、厚さ数百Å程度以下の薄膜に仕上げることができ、高分子膜の存在が、生体機能物質の生

5  
10

従って、上記のように作製されるマイクロ電極のサイズは、白金線の直径に依存し細い白金線を用いると、従来考えられない程度の極小サイズのバイオ電極が得られる。マイクロオーダーのサイズのバイオ電極の作製も容易であり、この場合、医療などの応用、例えば身体内に埋め込んで使用する場合、都合が良く、また、極小サイズの電極では、サンプル室の非常に小さい分析装置を作製でき、微量サンプルの分析が可能になり、また、迅速測定、高い応答性の分析装置が得られる。更に、比較的

15  
20

このマイクロ電極において、白金黒電極は、円板状、球状、チューブ状などの多様な形状に形成でき、測定対象、測定状況及び条件に応じて、適宜に最も適する形状にすることができるものである。

25

マイクロ電極において、電極として利用する物質は、白金以外に、金、他の貴金属、或いは炭素即ち、グラッシイ炭素、グラファイト等を基板として、その上に白金黒、金微粒子、貴金属微粒子、導電性金属酸化物微粒子の微粒子層を生体機能物質とともに形成したのも利用できる。

## 12

即ち、以上のマイクロ電極の作製において、最初の導電性物質と、その上に析出すべき微粒子の（即ち多孔質の）導電性物質、即ち、微粒子金属とは同じ材料である必要はなく、例えば、グラファイトの上に白金黒の析出を行なわせた構造のものでもよい。また、白金の代わりに、金、ロジウム、ルテニウム

5 オキサイド( $\text{RuO}_3$ )、パラジウム、イリジウムなどの「導電性物質」を多孔質導電性物質として使用出来、「導電性物質」の微粒子層を導電性物質表面に形成することができるものは、他に障害のない限り、好適に本発明において使用できる。

10 更に、本発明により利用するマイクロ電極は、蛋白質、多糖類などの高分子物質を塗布し架橋剤で架橋した薄膜を形成し、生体適合性の付与、性能の維持、生体機能物質の溶出を最少にすることもできる。

ここにおいては、「生体機能物質」とは、酵素、抗体に代表されるもので、各種の触媒、微生物菌体、増殖微生物、オルガネラ、抗原、抗体、ハプテンなどを含むものである。

15

また、本発明に利用するバイオ電極を被覆するために付加的に使用できる高分子物質には、アルブミンなどの蛋白質、イオン交換樹脂、或いはヘパリンなどの多糖類などが挙げられる。

20 架橋剤としては、使用する高分子物質に対して適する架橋剤があり、例えば、アルブミンに対しては、グルタルアルデヒド、また、カルボジイミド、マレイミド架橋剤などが用いられる。

以上において、マイクロ電極における多孔質（微粒子）導電性物質の析出法は、電解析出で説明したが、無電解法で行なうこともできることは明らかである。

25

本発明による得られるマイクロ酵素電極に、電気化学的酸化処理或いは化学的酸化処理を施すことによって、測定の際の選択性を向上することができる。この酸化処理によって白金黒等の著

## 13

しい非特異的活性を減殺せしめ、酵素の活性のみを発揮せしめることができる。

本発明による分析法は、高速応答で、高感度、且つ、小型のバイオセンシングシステムが実用化されたものであり、バイオ  
5 センサのマイクロ化、多機能化などの多項目計測が要求される臨床化学分析、携帯型の健康監視システムの開発に、極めて重要な技術となろう。

本発明の生体機能物質の固定化方法とそれを利用して作製されたマイクロバイオ素子は、第1に感度よく検出できる電極であり、第2に酵素など生体機能物質を容易に包括固定化でき、生  
10 体機能物質を傷つけずに固定化できるために活性がほとんど失われていない生体機能物質固定化電極であり、また、第3に高密度の生体機能物質の固定化ができ、迅速な応答性が得られる電極であるなどの顕著な技術的効果が得られた。

本発明によるバイオ分析装置及びそれによる分析方法は、第1に、測定対象微量物質を高速に応答性よく、感度よく分析できるフロー計測が可能になり、第2に、酵素など生体機能物質を安定して包括固定化したマイクロ電極を用いることにより、分析精度が極めて高く使用安定性のよいバイオ分析システムが得  
20 られ、第3に、更に生体機能物質の固定化が高いマイクロ電極を用いるために、酵素の保存安定性の極めてすぐれたフローインジェクション分析システムを提供でき、第4に、グルコース濃度50  $\mu$ Mから50 mMという広い範囲ですぐれた直線性を示す分析を可能にし、第5に、使用のマイクロ電極は白金黒化技術  
25 で製作可能であるので、円板状、球状、チューブ状などの多様な形状にでき、そのために、バイオセンサ素子としてもその他のバイオ機能手段にも利用でき、第6に、使用安定性の極めてすぐれ、酵素センサの保存性、安定性のきわめてすぐれたバイオ分析装置が得られ、また、マイクロ電極は極めて小さいため

に、サンプル量も少なくすみ、分析装置全体を小型化でき、更にそのために、連続測定では1時間当り数百検体以上の処理も容易にでき、そして、電極のアレイ化、多機能化が容易で多成分系のフロー分析又はバッチ分析などにおいて威力を発揮するシステムを提供できるものである。

第4図は、微小酵素(グルコース・オキシダーゼ)電極11で、直径が例えば、約 $1\mu\text{m}$ ~ $500\mu\text{m}$ にできるマイクロ電極を作用電極11とし、白金線の対極12と銀・塩化銀を参照電極13に用いる構成のマイクロデバイス16を示す。以上の三電極系、即ち、マイクロ電極11、対極12と参照電極13は、PTFE(ポリテトラフルオロエチレン)樹脂5の穴の中に樹脂4で固められ、固定されたものである。このようなマイクロデバイス16は、細い金属線を3本封入固定しただけ構造であるから、非常に微小なサイズのデバイスにできる。

このマイクロ電極を用いると、例えば、微量、例えば $1\mu\text{l}$ の試料でも測定可能である。即ち、微量試料を滴下した後に電位を印加し、このときに発生する電流値を検知する方式によって、微量試料中の物質を検知できるものである。

従って、本発明ではマイクロ電極内部で生体機能物質例えば酵素分子によって生産された電極内の活性物質を直接に検知するためにリアルタイムで計測ができる。

更に、以上の構造の電極で種々のポルタンメトリ検出法を適用できるので試料は、静止状態でもかまわずに測定可能である。

また、電極内での活性物質検出法であるので、酸化酵素や脱水素酵素などの重要な生体機能物質にも適用できるバイオ分析システムである。

本発明の生体機能物質の固定化方法とそれを用いて作製したバイオ素子(電極)により、第1に、応答性よく、感度よく検



## 15

出でき、第2に、酵素など生体機能物質を容易に包括固定化でき、生体機能物質を傷つけずに固定化できるために活性のほとんど失われていない生体機能物質電極が得られること、第3に、高密度の生体機能物質の固定化ができ、迅速な応答性が得られる電極を提供できること、第4に、酵素など生体機能物質を微小電極表面に化学処理なしで簡単に固定化できる方法を提供できること、第5に、複数の酵素を微小電極表面に固定化した多機能酵素センサができることなどの顕著な技術的効果が得られた。また本発明の微小化生体機能物質電極素子で、迅速かつ高感度で測定することのできるバイオセンサ電極を提供でき、微小電極表面に微粒子を形成することにより電極表面を見掛けの電極表面の数千倍にした結果、見掛けは微小電極であるにもかかわらずマクロな挙動をし、その結果検出感度を上げることのできるバイオセンサ電極を提供できる。

15 更に、本発明の分析システム及び方法は、第1に、応答が非常に迅速で、感度よく、静止試料でも測定検出できる高性能バイオセンシングが提供できる。第2に、微小な酵素電極（即ち、マイクロ電極）、対極及び基準電極を微小表面に配置できるのでサンプル量を極めて少なくすることができ、従って、非常に微量な試料でも迅速に、応答性よく測定できる。第3に、内部の酵素分子のよって生産された電極活性物質を直接に検知するためにリアルタイムで計測でき、第4に、種々のボルタンメトリ検出法を適用できるのでサンプルは静止状態でも感度よく、検出できる。第5に、電極活性物質検出法なので、酸化酵素や脱水素酵素などの重要な酵素、生体機能物質にも適用でき、第6に、体内バイセンシングシステム、或いは携帯型バイオセンサーとしても利用できるバイオ分析システムを提供できる。また、本発明の分析装置は、ポテンシオメトリ方式の測定にも使用できる。更に、デバイス化したセンシングシステム

10

20

25

## 16

ムとして展開できる。

## 図面の簡単な説明

第1図Aは、本発明の生体機能物質固定化法により作製したバイオ素子の構造を示す断面図である。また第1図Bは、第1  
5 図Aの一部を拡大した断面図であり、生体機能物質を含浸させた微粒子表面の構造を示す。

第2図は、本発明によるバッチ式バイオ素子の応答性を示すグラフである。

第3図は、本発明のバイオセンサ電極素子で測定したバッチ  
10 法での応答出力とグルコース濃度の関係を示すグラフである。

第4図は、本発明による第1図A、B図で示すバイオ素子電極を用いた三電極系の（パルス法による測定に用いる）マイクロデバイスの構造を説明する斜視図である。

第5図は、本発明により第4図に示すマイクロデバイスに定電  
15 位をかけた時の発生電流を示すグラフである。

第6図は、本発明のパルス法によるマイクロ分析システムによるグルコース濃度と発生電流値の関係を示すグラフである。

第7図は、本発明のパルス法による分析システムによるグルコース試料の容量とピーク電流値の関係を示すグラフである。

第8図は、第5図に示す電流応答の過渡状態を示すグラフである。

第9図は、第8図に示す2  $\mu$ m後の電流値の差とグルコース濃度との関係を示すグラフである。

第10図は、第8図に示す2  $\mu$ m後の電流値の差でグルコース濃度を測定するときのグルコース試料量と電流値の差との関係を示すグラフである。

第11図は、本発明によるバイオ素子を用いたフローインジェクション分析装置の検出部の構造を示す説明図である。

第12図は、第11図の本発明のフローインジェクション分

析装置で、グルコース含有試料を測定した結果をその応答性で示すグラフである。

第13図は、本発明によるバイオ素子を用いたフローインジェクション分析装置で測定されるときにグルコース濃度と応答出力の関係を示すグラフである。

第14図は、本発明による酸化処理したバイオ電極素子を用いて測定したときの測定対象の選択性の向上を示すグラフである。

第15図は、酸化処理していないバイオ電極素子を用いたときの測定対象の測定選択性を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明により作製されるバイオセンサ電極の構造を、第1図の断面図及びその拡大模式図に示す。ここにおいて、導電性物質微粒子1、生体機能物質2及び高分子薄膜3を有するマイクロ電極が得られる。

第4図は、微小酵素(グルコース・オキシダーゼ)電極1で、直径が例えば、約 $1\mu\text{m}$ ~ $500\mu\text{m}$ にできるマイクロ電極を作用電極11とし、白金線の対極12と銀・塩化銀を参照電極13に用いる構成のマイクロデバイス16を示す。以上の三電極、マイクロ電極11、対極12と参照電極13は、PTFE(ポリテトラフルオロエチレン)樹脂15の穴の中に樹脂14で固められ、固定されたものである。このようなマイクロデバイス16は、細い金属線を3本封入固定しただけ構造であるから、非常に微小なサイズのデバイスにできる。

このマイクロ電極に対して、例えば、微量、例えば $1\mu\text{l}$ の試料でも測定可能である。即ち、微量試料を滴下した後に電位を印加し、このときに発生する電流値を検知する方式によって、微量試料中の物質を検知できるものである。

従って、本発明ではマイクロ電極内部で生体機能物質例えば酵

## 18

素分子によって生産された電極内の活性物質を直接に検知するためリアルタイムで計測ができる。

更に、以上の構造の電極で種々のボルタンメトリ検出法を適用できるので試料は、静止状態でもかまわずに測定可能である。

5 第11図は、フローインジェクション法による本発明の分析装置を断面図で示すものである。測定対象の微量物質を含有する測定液21を、入口22から注入し、マイクロ電極23を備える流路25を通り、参照電極26と対極27を備える流路を通り、  
10 流体試料21の微量成分を分析するものである。本発明によるマイクロ電極は、細い白金線上に生体機能物質と白金黒を一体化形成した構造のものであるから、非常に微小なサイズのデバイスにでき、例えば、マイクロオーダーのサイズにできるために、図示のフローセルも非常に微細なものにできる。

15 即ち、本発明のバイオセンシングシステムは、生体機能物質電極、例えば酵素電極として利用するとき、試料量も少なくすみ、分析装置自体を小型化できる。更に、連続測定では、1時間に数百検体以上の処理ができるものである。

20 また、本発明におけるバイオ分析システムでは、ポテンシオメトリ方式の測定もできる。

本発明によるバッチ分析法及びフローインジェクション分析法は、バイオセンサのマイクロ化、多機能化などの多項目計測が要求される臨床化学分析、携帯型の健康監視システムの開発に役立つ極めて重要な技術の一つである。即ち、高速応答性、高  
25 感度を有するバイオ検出装置が、困難視されてきたが、本発明により、それが可能になったものである。即ち、本発明で得られたバイオ分析システム及び分析方法は高感度で、しかも迅速な応答を示すことが明らかである。更に、バイオセンサデバイスを用いた測定では微量の静止試料のリアルタイム計測も行な

## 19

える。

次に、本発明について実施例により更に詳細に説明するが、本発明はそれによって限定されるものではない。

[ 実施例 1 ]

5 生体機能物質の固定化とマイクロ電極の作製及びバッチ法による分析結果

グルコースはグルコースオキシダーゼの存在下でグルコン酸と過酸化水素に分解されるが、酵素と白金電極を組合わせて、グルコース濃度に対応した過酸化水素の酸化電流を測定することにより、グルコース濃度を決定できる。この点から、本発明  
10 により作製した電極を用いて、実験を行なった。

先ず、直径 100  $\mu$  m の白金線をソーダガラス管に封入した。この白金線を研磨し、微小白金電極を得た。次いで 0.5 M 硫酸水溶液中で銀/塩化銀電極を参照電極として、該白金電極に電位 + 1.3 V から - 0.25 V の範囲で 100 mV/秒  
15 の走査速度で電位走査を 30 分間行なった。上記の電極を 300 ppm の酢酸鉛含有の 3% 塩化白金酸溶液中に浸し、電流値 - 50  $\mu$  A で 10 分間白金黒の電気析出を行なった。析出した白金黒層の厚さは、約数  $\mu$  m であった。次に、得られた白金黒析出電極を 25  $^{\circ}$ C で 60 秒間風乾を行なった。その後、0.5 M 硫酸水溶液中で銀/塩化銀電極を参照電極として該白金黒析出電極を - 0.3 V に 30 分間保ち、白金黒析出電極から水素を発生させた。  
20

この白金黒電極を 20  $^{\circ}$ C で 60 秒間風乾させた後に 5500 単位のグルコースオキシダーゼを含む燐酸緩衝液 (pH 6.8) 1 ml に 20 分間浸漬した。次いで 10% のアルブミン含有燐酸緩衝液 (pH 6.8) 1 ミリリットルに 10 分間浸漬した。更に 2% のグルタルアルデヒド含有燐酸緩衝液 (pH 6.8) 1 ミリリットルに 10 分間浸漬した。得られたグルコース  
25

## 20

オキシダーゼ固定化電極を 0.1 M 燐酸緩衝液中で一昼夜攪拌洗淨した。

得られた酵素固定化微小電極を用いて、燐酸緩衝液中でブドウ糖濃度を測定した。即ち、参照電極（基準電極）、対極（白金）、作用極即ち、本発明により作製したグルコースオキシダーゼ固定化白金黒電極を用いてグルコースを測定した。各電極をポテンシオスタットに各々接続し、参照電極に対して作用極を +0.6 V に保持した状態で、グルコースを注入し、対極と作用極間に流れた過酸化水素による酸化電流値を測定した。その結果、この電極は 100% 応答は 3 秒以内で、しかもグルコースを第 2 図に示すように、0.01 mg/dl の濃度でも測定でき、測定範囲も、0.01 mg/dl ~ 100 mg/dl の範囲で直線性が示された。

グルコース (0.9 mg/dl) の添加に伴う本発明のセンサ出力即ち、過酸化水素の酸化電流の変化は、第 3 図に示す如く、非常に応答性のよいものであった。前述のように 100% 応答まで 3 秒以内であった。センサの応答は極めて速く、直ちに定常値に達した。以上のように本発明による生体機能物質の固定化法によるバイオセンサは、迅速な応答を示し、かつ高感度であり、簡単な方法でマイクロバイオセンサが作製できることが明らかにされた。

## [ 実施例 2 ]

パルス法によるバイオ分析法及び装置

100  $\mu$ m 径の範囲の種々の微小白金線、200  $\mu$ m 径の対極用の白金線、そして 500  $\mu$ m 径程度の銀線を樹脂 14 で封入した後、微小白金線表面をアルミナパウダーで研磨した。この研磨白金表面に対し、酵素の固定化は次の方法で行なった。

前記のように処理した白金線を 300 ppm の酢酸鉛含有の

## 2 1

3 %塩化白金酸溶液中に浸し、電流値  $-50 \mu\text{A}$  で10分間白金黒の電気析出を行い、厚さ約数  $\mu\text{m}$  の白金黒を得た。次に、得られた白金黒析出電極を  $25^\circ\text{C}$  で60秒間乾燥した後に、 $0.5\text{M}$  硫酸水溶液中で  $-0.3\text{V}$  に30分間保持し、白金黒析出電極から水素を発生させた。次に、 $20^\circ\text{C}$ 、60秒間風乾した後に、5500単位のグルコースオキシダーゼ含有燐酸緩衝液 (pH 6.8)  $1\text{ml}$  に20分間浸漬し、再度風乾した。

次に、以上のようにして得られた第4図に示されるマイクロ電極を有するマイクロデバイス16において、銀線を銀・塩化銀参照電極とした後に、このようにして作製した三電極よりなるマイクロデバイス16を、 $0.1\text{M}$  燐酸緩衝液中で一昼夜攪拌し洗浄し、本発明に用いる三電極系マイクロデバイスを得た。第5図において、作用極(マイクロ電極)11、対極12、参照電極13、樹脂14、PTFE(ポリテトラフルオロエチレン)15、マイクロデバイス16を有する。

本発明による電極を用いたグルコース濃度の測定

第4図に示す三電極系マイクロデバイスにグルコース試料  $20 \mu\text{l}$  を滴下した後、 $0.6\text{V}$  の電位を印加した。この時発生するピーク電流値とグルコース濃度との関係を調べた。次に、 $10\text{mM}$  のグルコースを含む試料の液量を変えて、ピーク電流値と液量との関係を調べた。即ち、各種濃度のグルコース試料を滴下し、 $0.6\text{V}$  の電位を印加した。その結果は、第5図に示すような応答が見られた。

即ち、 $0.6\text{V}$  の電位をかけると、第5図のごとき電流を発生した。グルコースを含有しないときは、第5図の左図に示すような電流が生じ、 $10\text{mM}$  グルコースを含むリン酸緩衝液 ( $50\text{mM}$ 、pH 7.0、 $50\text{mM NaCl}$ ) を標準試料とした時は、第5図の右図に示すような応答電流が生じた。

即ち、第5図から明らかのように、電位印加にともない直ちに応答電流が発生し、急速に減衰することが分かる。このこと

## 22

は、電極内部のグルコース酸化酵素によって生成された過酸化水素が電位印加にともない直ちに酸化されることを示している。電位印加を繰り返すと数回目からピーク電流が一定になることが分かった。

- 5 一方、リン酸緩衝液でも同様の挙動が観測されたものの、ピーク電流値は小さかった。そこで各種グルコース濃度に対するピーク電流値を測定し、グルコース含有なしのリン酸緩衝液で得られたピーク電流値（即ち、ブランク値）との差をとり、グルコース濃度との関係を調べた。その結果は、第6図に示すものである。即ち、グルコース濃度が1～100 mMの範囲に変化するとき、ピーク電流値との間に第6図に示すような測定曲線が得られることが分かった。

- 10 また、本発明による酵素分析システムでは、微量の静止試料に対しては、リアルタイムで濃度を計測できることを示された。
- 15 た。

#### 本発明によるデバイスの液量依存性試験

- 10 mMのグルコース標準試料を各々2、5、10、15、20  $\mu$ lを取りマイクロバイオセンサーシステムに滴下した後、電位0.6 Vの定電位を印加したときの、発生電流を測定した。その結果、第7図に示すものが得られた。即ち、得られるピーク電流は、試料の液量に依存しないことが分かった。

#### パルス法での過渡応答測定法による選択的濃度測定

- 第5図右図のパルスを詳細に測定するために、0.6 V電位印加に伴うパルス電流をトランジェントメモリで記録した結果、第8図に示すものが得られた。その結果、ブランク試料（燐酸緩衝液）及びフルクトース含有燐酸緩衝液のいずれの試料に対しても、グルコース含有燐酸緩衝液では大きな応答が得られた。このグルコース含有試料とブランク試料の電位印加後の2マイクロ秒時における電流値差を取って各種のグルコース



## 23

含有試料の濃度に対してプロットし、第9図を得た。その結果、グルコース濃度と出力との間に1～100 mMの範囲で直線性が認められた。次に、グルコース濃度を一定(20 mM)として、試料の液量とセンサ出力との関係を調べたところ、第10図のグラフが得られた。これによりセンサ出力は液量に依存しないことが確認された。

以上のように本発明による分析システム及び方法では、試料を攪拌する必要がなく、そのために、体内バイセンシングシステム、或いは携帯型バイオセンサーとして利用できる可能性を示している。

本発明のよるバイオ分析システムでは、対流方式のバッチ式でも、静置式と同様に高速応答で迅速に高感度で測定できることは言うまでもない。

## [ 実施例 3 ]

15 フローインジェクション法による分析方法及び分析装置

本発明に用いる酵素固定化電極(マイクロ電極)の作製方法を示す。まず、直径10  $\mu\text{m}$ ～3000  $\mu\text{m}$ の6種の微小白金線の面を、アルミナパウダーで研磨し、微小白金電極とした。次に、0.5 M硫酸水溶液中で銀/塩化銀電極を参照電極として、該白金電極に電位+1.3 Vから-0.25 Vの範囲で100 mV/秒の走査速度で電位走査を30分間行なった。この電極を300 ppmの酢酸鉛含有の3%塩化白金酸溶液中に浸し、電流値-50  $\mu\text{A}$ で10分間白金黒の電気析出を行なった。析出した白金黒層の厚さは、約数  $\mu\text{m}$ であった。次に、25 0.5 M硫酸水溶液中で銀/塩化銀電極を参照電極として該白金黒析出電極を-0.3 Vに30分間保持し、白金黒析出電極から水素を発生させた。

この白金黒電極を20  $^{\circ}\text{C}$ で60秒間風乾された後に、5500単位のグルコースオキシダーゼを含有する燐酸緩衝液(pH

## 24

6.8) 1 ml に 20 分間浸漬した。次いで 10% のアルブミン含有燐酸緩衝液 (pH 6.8) 1 ミリリットルに 10 分間浸漬した。更に 2% のグルタルアルデヒド含有燐酸緩衝液 (pH 6.8) 1 ミリリットルに 10 分間浸漬した。得られたグルコースオキシダーゼ固定化電極を 0.1 M 燐酸緩衝液中で一昼夜攪拌洗浄し、マイクロ電極を得た。

このマイクロ電極を作用電極として用い、第 11 図のごとき構造のマイクロデバイスを作製した。即ち、フローインジェクション測定系において、測定対象液 21 は入口 22 より流れ込み、  
10 ミクロ電極 23 を備える通路 25 を通る。参照電極 26 として銀/塩化銀電極を用い、対極 27 としてステンレスブロック電極を用いて構成した。

グルコース濃度の測定

第 11 図に示すようなフローインジェクション測定システム  
15 に対して、エルマ社製のシングルポンプ (ER-8711 タイプ) を用いて、測定対象流体を流す。利用マイクロ電極は、最小直径 10  $\mu\text{m}$  から最大直径 3 mm の範囲で 6 種類の電極を用いた。対極としてステンレスブロック電極を用い、参照電極としては銀/塩化銀電極を用いた。マイクロ電極に 0.6 V の電位を  
20 印加し、生成する過酸化水素を酸化する。移動相溶液としては、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 6.8) を用い、各種の濃度のグルコース含有試料 (5  $\mu\text{l}$ ) を注入した。流速は 0.4 ml / 分から 1.8 ml / 分の範囲とした。

直径 100  $\mu\text{m}$  の白金線上に形成した白金黒グルコースオキシ  
25 シダーゼ電着マイクロ電極を用いて、グルコース (10 mM) を注入したときの応答を第 12 図に示す。図示のように、試料注入後 3 秒で電流がピーク値を示す、10 秒以内で元の電流値に戻った。即ち、1 分間に 9 個の試料の割合で連続的に注入したところ、個々の試料注入に対するピーク電流は、他の試料に対

## 25

する応答ピークから完全に分離されていることが分かった。即ち、1試料の測定が約7秒間で完了することが分かった。このように一試料の測定の完了に要する時間を応答時間として、各種サイズのマイクロ電極に対する応答時間を測定した。この結果を第1表に示す。

その結果、グルコース測定に要する時間は、マイクロ電極の大きさに密接に関係することが示された。即ち、白金線直径10  $\mu\text{m}$  から3 mmの範囲のものの上にグルコースオキシダーゼ含有白金黒を形成した各種のサイズのマイクロ電極を用いて応答速度を調べたところ、下記の第1表に示すような結果が得られた。

第1表      マイクロ電極の特性

白金線径	変動係数	応答時間	回数
<u><math>\mu\text{m}</math></u>	<u>%</u>	<u>秒</u>	
10	0.61	5	20
50	0.59	6	20
100	0.73	7	20
200	0.40	8	20
500	0.61	9	20
3000	1.1	30	10

第1表からマイクロ電極の直径が小さい程、測定所要時間が短いことが明らかである。例えば、直径500  $\mu\text{m}$  のマイクロ電極では、グルコースの測定に要する時間が10秒であったのに対して、直径10  $\mu\text{m}$  のマイクロ電極では5秒に短縮されることが分かった。以上の結果は、マイクロ電極の直径を小さくすることにより、高速の測定が可能であることを示している。

次に、移動相溶液の流速を変えてグルコース濃度の測定に要する時間及びピーク電流を観察した。その結果、グルコース濃度測定に要する時間は、その流速が速い程短くなること、及びピーク電流の大きさは、流速が速い程小さくなることが明らか

にされた。

観測されたグルコース濃度とピーク電流との関係を第13図に示す。第13図から、 $50\ \mu\text{M}$ ～ $20\ \text{mM}$ の範囲のグルコース濃度に対して、ピーク電流とグルコース濃度は比例関係があることが明らかにされた。

#### 本発明の分析システムの安定性試験及び保存性試験

上記のように製作されたマイクロ電極を繰り返し使用して、その結果を観察した。1時間に約600個の試料を連続的に注入したところ、測定初期のピーク電流と1時間後即ち、600回試料注入した後のピーク電流とがほとんど同一の値を示した。本発明によるフローインジェクション分析システムでは、グルコースに対する応答出力が安定していることが明らかである。

次に、本発明のフローインジェクション分析システムを用いてグルコース濃度を測定した時の変動係数を求めてみた。その結果を上記の第1表に示した。マイクロ電極の径が3mmの場合を除いて、変動係数は1%以内であり、極めて精度の良好な測定ができることが分かった。

また、本発明によるフローインジェクション分析装置の安定性を1ヶ月にわたり調べた結果、1ヶ月後もピーク電流値の低下がほとんど認められなかった。

#### [ 実施例 4 ]

##### アノード処理の結果

直径 $100\ \mu\text{m}$ の白金線をアクリル樹脂ブロック中に封入し、ブロック端面を $30\ \mu\text{m}$ から $0.05\ \mu\text{m}$ の研磨材で研磨した。次に、この平滑白金電極を $500\ \text{ppm}$ の酢酸鉛を含有する3%の塩化白金酸溶液中に浸漬し平滑白金表面上に白金微粒子の電析を行なった。この電析は、 $-0.08\ \text{V}$ で5分間で行なった。白金微粒子電極は6本作製し、このうち3本に酸化処理を施し、残りの3本は酸化処理を施さなかった。酸化処理

## 27

は、リン酸緩衝液中に白金微粒子電極を浸漬し、この白金微粒子を作用電極とし、銀／塩化銀電極を参照電極とする三電極系で行ない、この白金微粒子電極に1.2 Vを印加し、50秒間この電位に保持した。次に、酸化処理した電極と未処理電極をグルコースオキシダーゼを固定化した。固定化は、先ず電極を5500単位のグルコースオキシダーゼ含有リン酸緩衝液(pH 6.8)1ミリリットルに10分間浸漬した。次いで10%のアルブミン含有リン酸緩衝液(pH 6.8)1ミリリットルに10分間浸漬した。更に2%のグルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液(pH 6.8)1ミリリットルに10分間浸漬した。得られたグルコースオキシダーゼ固定化電極を0.1 Mリン酸緩衝液中で一昼夜攪拌洗浄した。このグルコースオキシダーゼ固定化電極を作用電極として用い、第11図のフロー測定装置に組み込んで作製した。第11図に示すフローインジェクション測定システムに対して、日本精密社製のシングルポンプ(SPY-2502U)を用いて、各種糖類の溶液を流し、これらの溶液による酸化電極を測定した。対極としてはステンレススチールブロック電極を用いた。移動相溶液としては0.1 Mのリン酸緩衝液(pH 6.8)を用いた。グルコースオキシダーゼ固定化電極には、0.6 Vの電位を印加した。酸化処理したグルコースオキシダーゼ固定化電極を用いたときの応答曲線を第14図に示す。これに対して未処理グルコースオキシダーゼ固定化電極を用いた場合の応答曲線を第15図に示す。

通常、用いたグルコース、ガラクトース、フルクトース等の糖類はそれ自体0.6 Vの電位では酸化されない。この実験では、グルコースオキシダーゼ固定化電極があるために、グルコースについては、グルコースオキシダーゼの触媒作用を受け、その結果グルコース量に応じた酸化電流が観察される。然し乍ら、他の糖類についてはグルコースオキシダーゼの影響は受け

ないため、その溶液を流しても電流変化は生じないはずである。然し乍ら、未処理グルコースオキシダーゼ固定化電極の場合、グルコース以外のガラクトース、フルクトース注入による電流が生じている。一方酸化処理グルコースオキシダーゼ固定化電極の場合、グルコース以外の糖類に対する電流変化は見られない。

#### 産業上の利用可能性

以上のように、本発明にかかる生体機能物質の固定化方法、それにより調製される素子及びその素子を使用する測定方法は、生体機能物質を利用して測定する種々の測定方法及び測定装置ばかりでなく、トランジューサー、反応素子などとしても、利用できるものであり、その極小のサイズと著しい高速応答性と高感度且つ高出力を利用する測定方法と装置に適するものである。

## 29

## 請 求 の 範 囲

(1) 酵素や抗体に代表される生体機能物質を導電性物質に固定化する方法において、

導電性微粒子物質を、該生体機能物質の溶液に浸漬し、該生  
5 体機能物質を該微粒子内部に取り込んだ後、或いは該微粒子表面に付着せしめた後、直接生体機能物質同志を架橋するか或いは該微粒子表面に高分子薄膜を形成することにより被覆することにより該生体機能物質の溶出を防止することを特徴とする前記生体機能物質の固定化方法。

10 (2) 該導電性物質微粒子は、酸化処理したものを利用することを特徴とする請求の範囲第1項記載の生体機能物質の固定化方法。

(3) 導電性物質の微粒子層を表面に形成した電極上に、該微粒子  
15 表面層を生体機能物質の溶液に浸漬し、該生体機能物質を該微粒子内部及び該微粒子表面に取り込んだ後、生体機能物質同志の架橋或いは高分子薄膜化処理により該微粒子を被覆して、前記生体機能物質を固定化した該微粒子表面層を有することを特徴とする分子識別能力を持つ生体機能物質固定化バイオ微小素子。

20 (4) 該導電性物質微粒子は酸化処理されたものを利用する請求の範囲第3項記載のバイオ微小素子。

(5) 請求の範囲第3項記載の該生体機能物質固定化バイオ微小素子を作用電極とし、電位印加手段及び発生電流を測定する電流  
25 測定装置を備え、発生電流の測定から対象物質を測定することを特徴とする分析装置。

(6) 請求の範囲第4項記載のバイオ微小素子を作用電極として、電位印加手段及び発生電流を測定する電流測定装置を備え、発生電流の測定から対象物質を測定することを特徴とする分析装置。

## 30

(7) 請求の範囲第3項記載のバイオ微小素子を作用電極とし、所定電位をかけたときに、発生する電流値を測定し、対象物質の濃度を決定することを特徴とするバイオ分析方法。

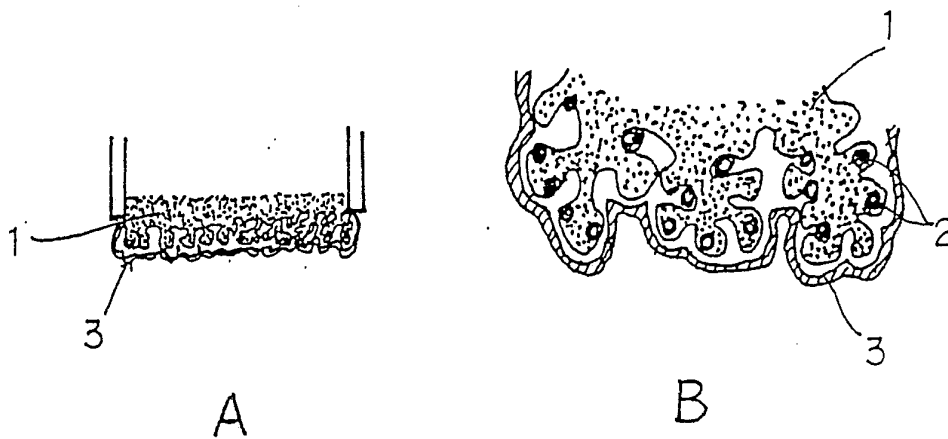
(8) 請求範囲第4項記載のバイオ素子を作用電極とし、所定電位  
5 をかけたときに、発生する電流値を測定し、対象物質の濃度を決定することを特徴とするバイオ分析方法。

10

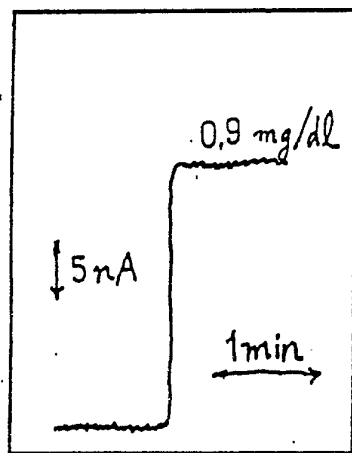
15

20

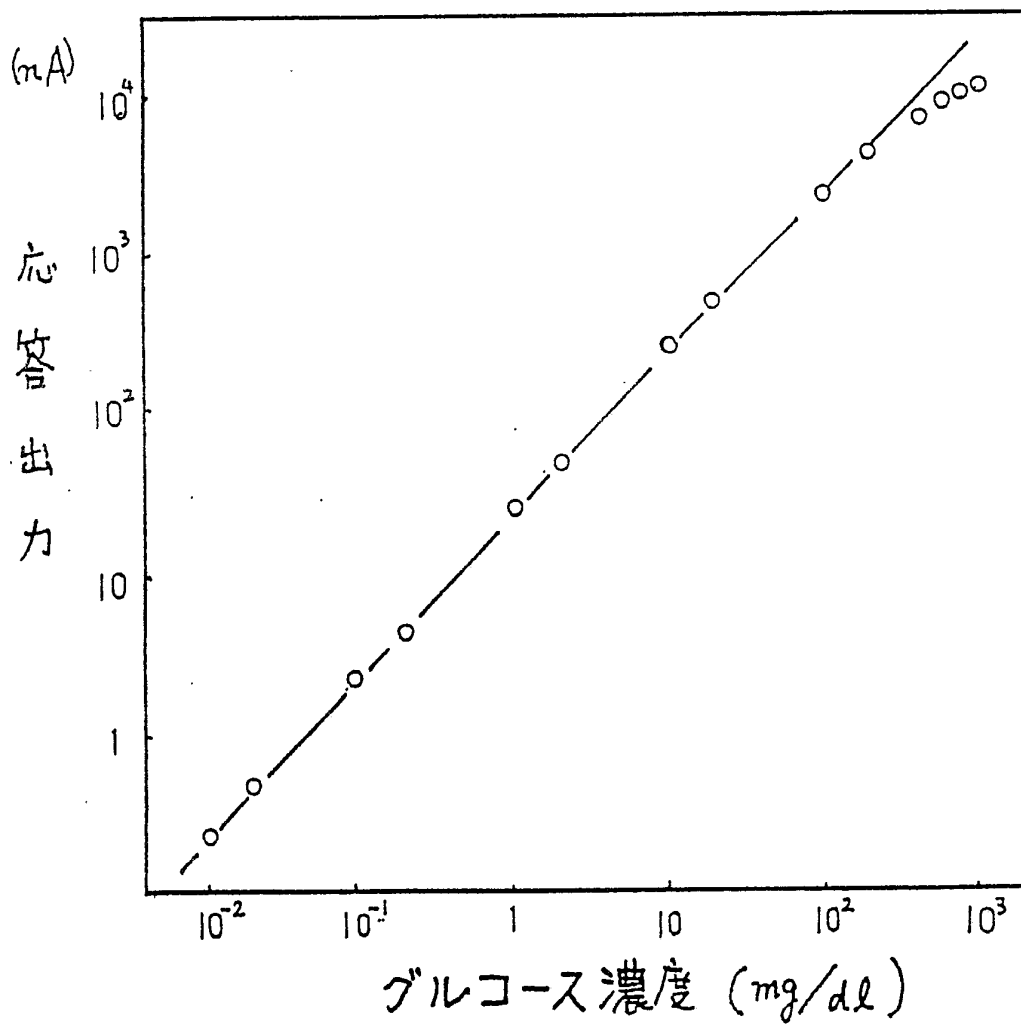




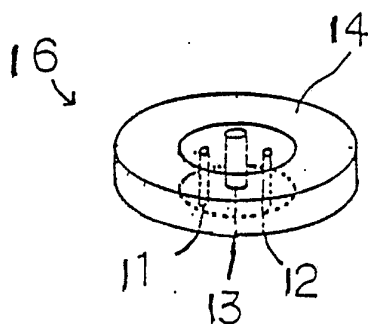
第 1 図 ✓



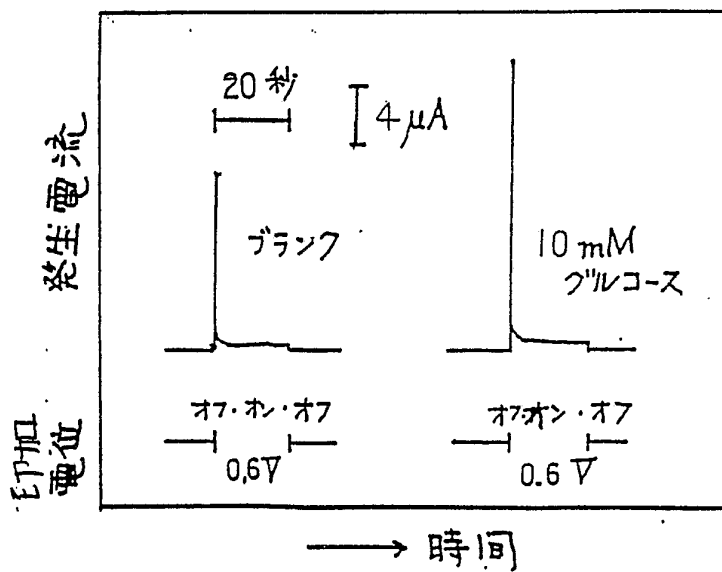
第 2 図



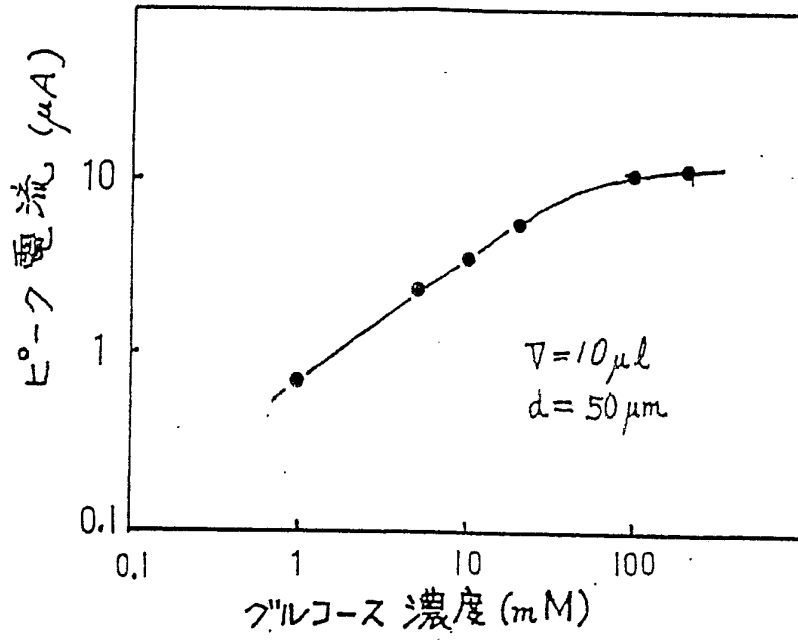
第 3 図



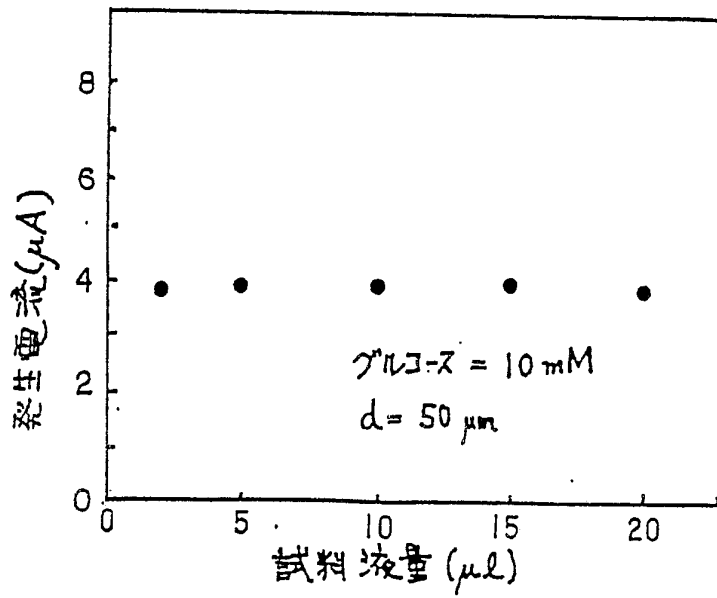
第 4 図



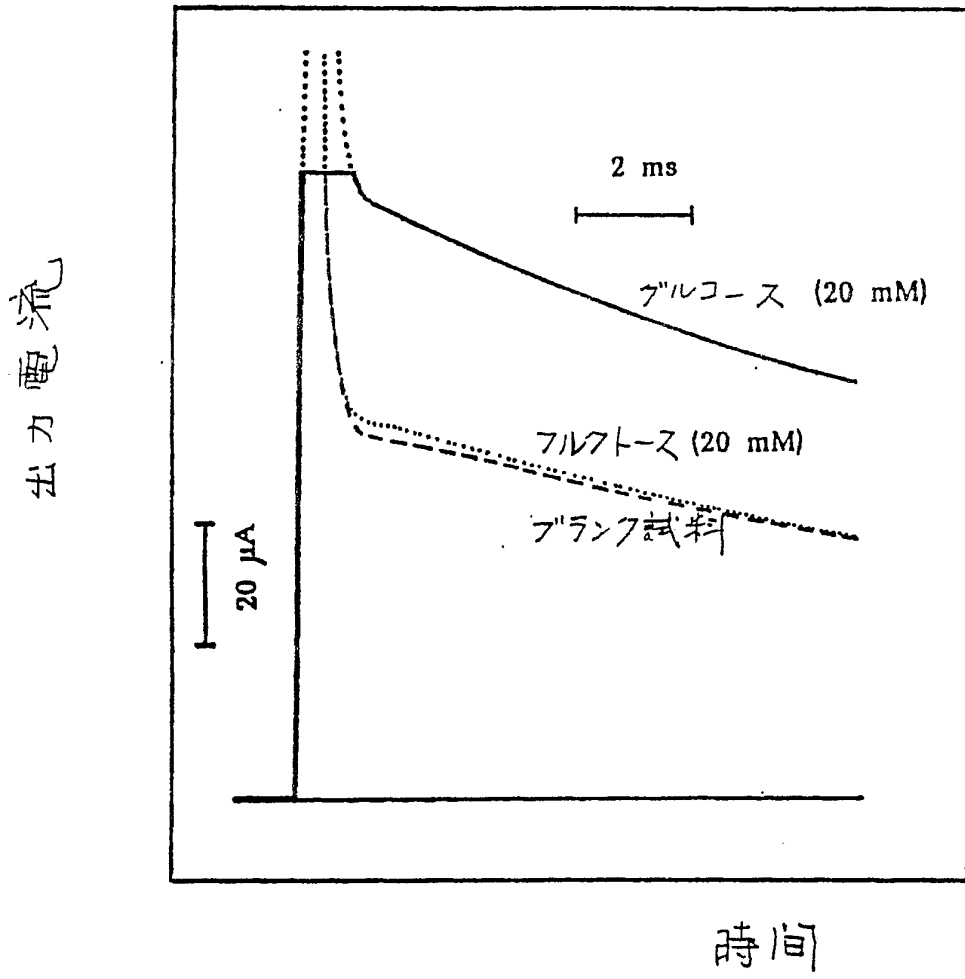
第 5 図



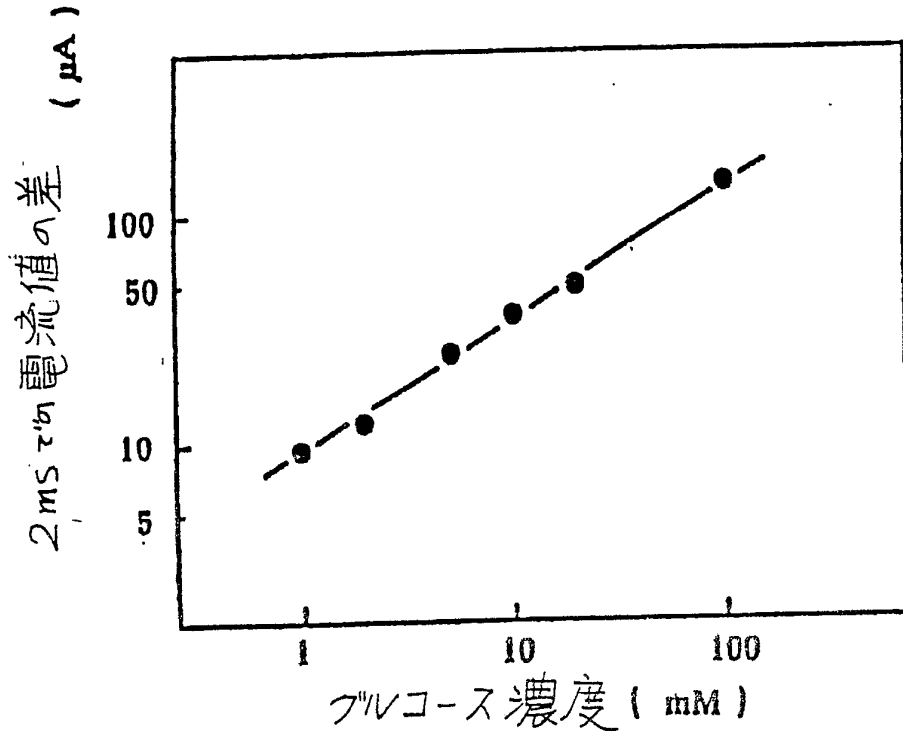
第 6 図



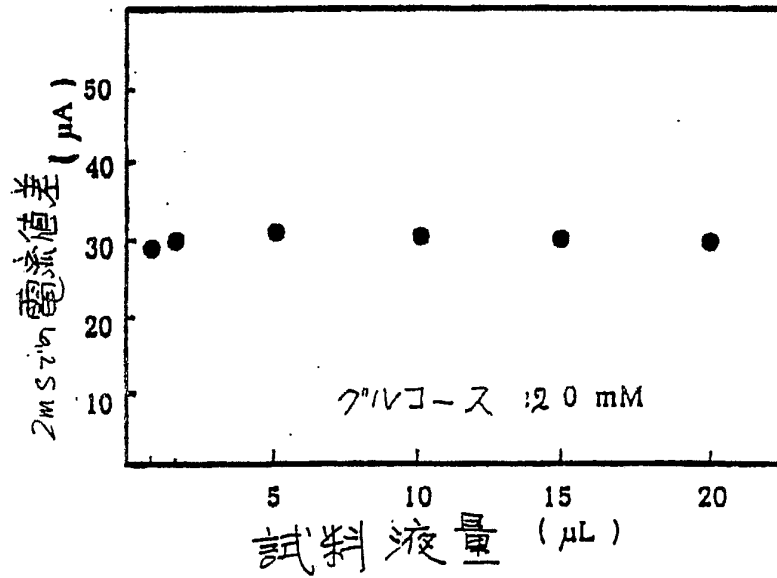
第 7 図



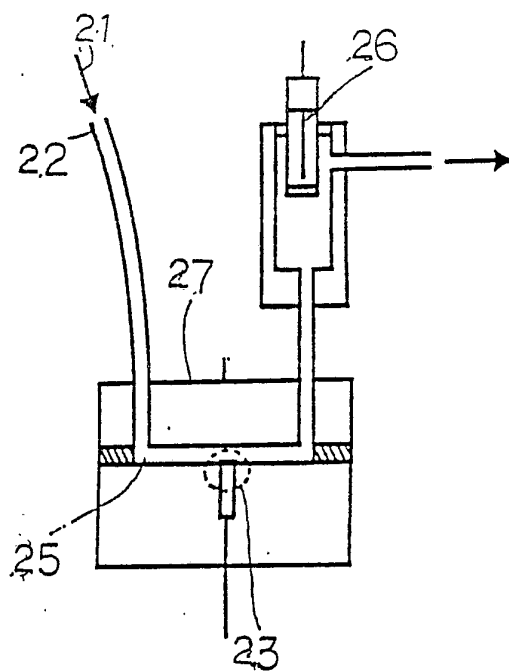
第 8 図



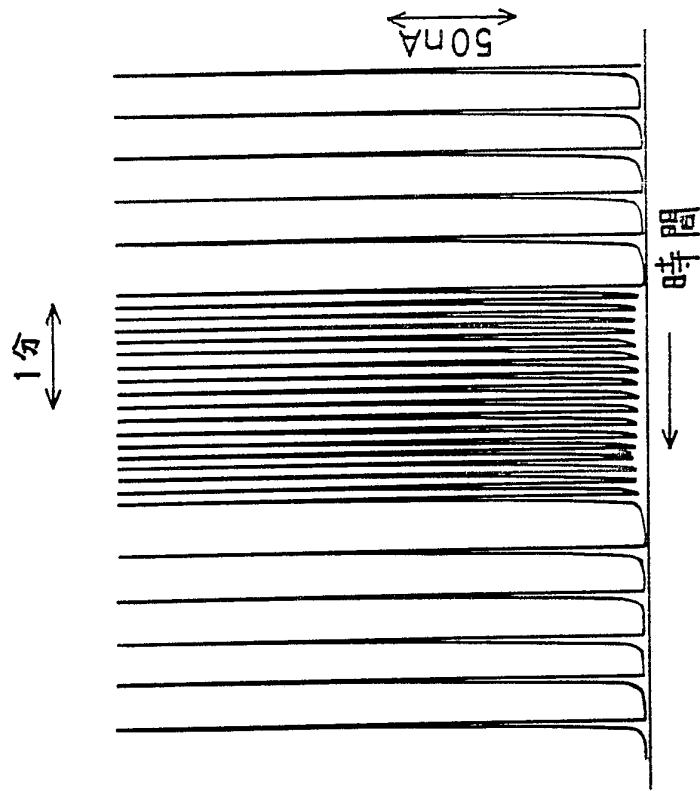
第 9 図



第 10 図

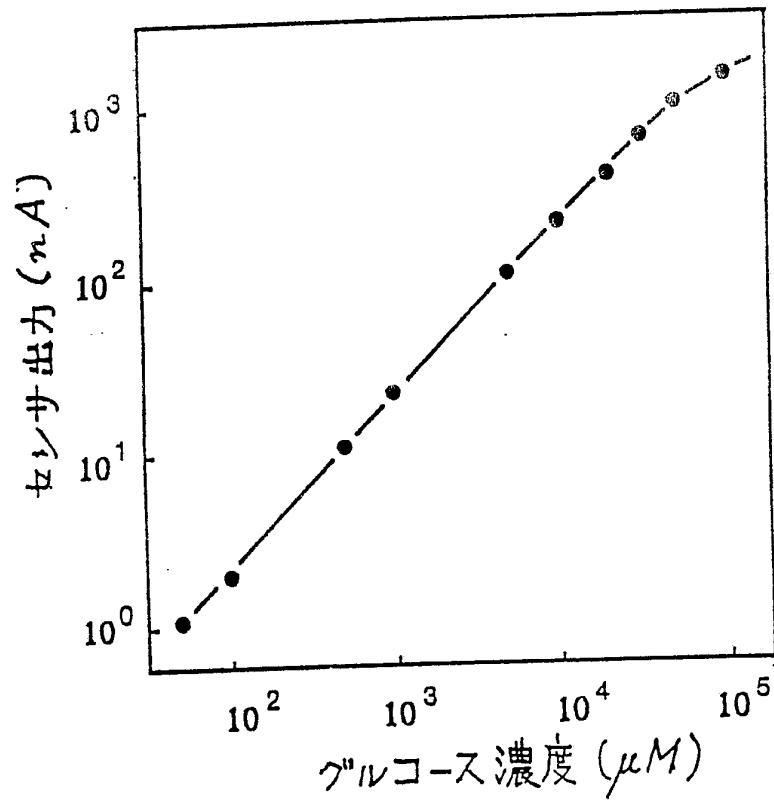


第 11 图

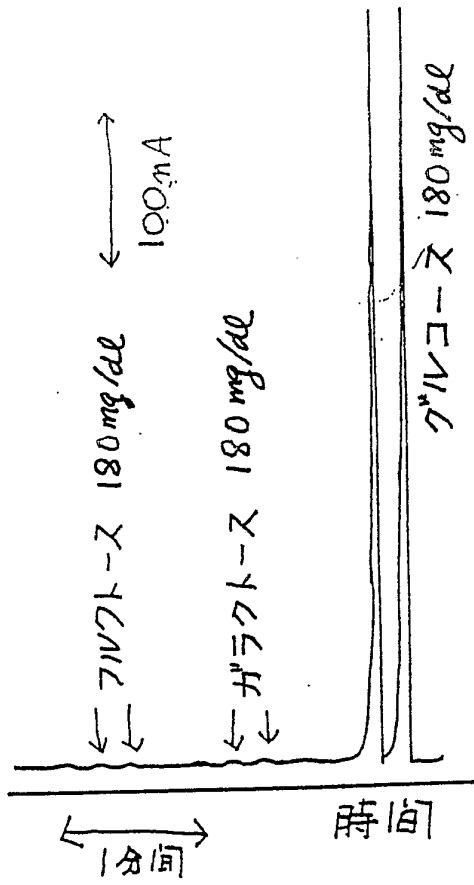


第12図

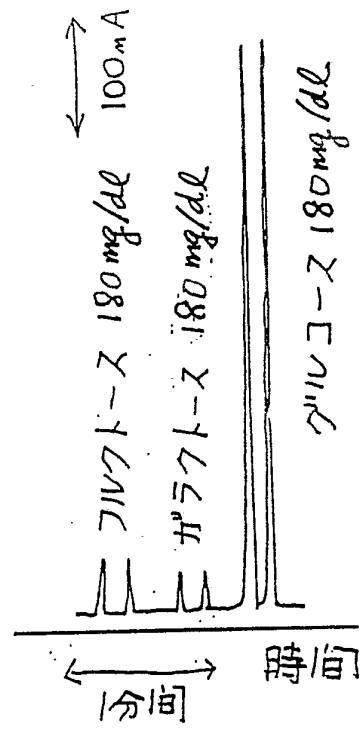




第13図



第14図



第15図

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP88/00256

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC	
Int.Cl <sup>4</sup> G01N27/30, G01N27/46	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>	
Classification System <sup>1</sup>	Classification Symbols
IPC	G01N27/30, G01N27/46
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>	
Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1988
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1988
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>	
Category * <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup> ; Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	JP, A, 54-50396 (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.) 20 April 1979 (20. 04. 79) & US, A, 4,224,125
X	JP, A, 54-51595 (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.) 23 April 1979 (23. 04. 79) (Family: none)
X	JP, A, 61-61049 (Shimadzu Corporation) 28 March 1986 (28. 03. 86) (Family: none)
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>	
<b>IV. CERTIFICATION</b>	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
June 1, 1988 (01. 06. 88)	June 13, 1988 (13. 06. 88)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 88/00256

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. G 0 1 N 2 7 / 3 0, G 0 1 N 2 7 / 4 6		
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	G 0 1 N 2 7 / 3 0, G 0 1 N 2 7 / 4 6	
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	1926-1988年	
日本国公開実用新案公報	1971-1988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, 54-50396 (松下電器産業株式会社) 20. 4月. 1979 (20. 04. 79) & US, A, 4,224,125	1-8
X	JP, A, 54-51595 (松下電器産業株式会社) 23. 4月. 1979 (23. 04. 79) (ファミリーなし)	1-8
X	JP, A, 61-61049 (株式会社 島津製作所) 28. 3月. 1986 (28. 03. 86) (ファミリーなし)	3-8
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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  「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
01.06.88	13.06.88	
国際調査機関	権限のある職員	2 G 7 3 6 3
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	能 美 知 康