

明 細 書

発明の名称：

電子受容体、ならびにそれを用いた試薬層およびセンサ

技術分野

[0001] 本開示は、電子受容体、ならびにそれを用いた試薬層およびセンサに関する。より詳しくは、本発明は、フェノチアジン構造を有する化合物である電子受容体（レドックスメディエータ）、および当該電子受容体を含む試薬層や、当該試薬層を有するセンサに関する。

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連続モニタリングセンサには、長時間の測定が必要となるため、用いるセンサ材料（酵素、メディエータ等）は安定性が高いことが望ましい。こういった要望に対し、酵素自体の安定性を向上させる技術として、例えば特許文献1には、従来用いられていたグルコースオキシダーゼよりも保存安定性（長期安定性）に優れた

、つまり体内等での長時間経過後の残存酵素活性が高い、特定のアミノ酸配列を有するFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ変異体や、それを用いた連続グルコースモニタリングデバイス記載されている。また、レドックスメディエータおよびレドックスポリマーの安定性の向上に関する技術として、例えば特許文献2には、使用時および保存時の安定性の高い遷移金属錯体からなるレドックスメディエータおよびそれが結合したポリマーが例示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2018-201486号公報

特許文献2：米国特許第8,444,834号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、一側面において、長期間にわたる測定（連続モニタリング）のための使用にとって好適な、安定性に優れた電気化学センサ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、上記のような電気化学センサの試薬層を形成するためのレドックスポリマーまたはそれを構成するレドックスメディエータ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

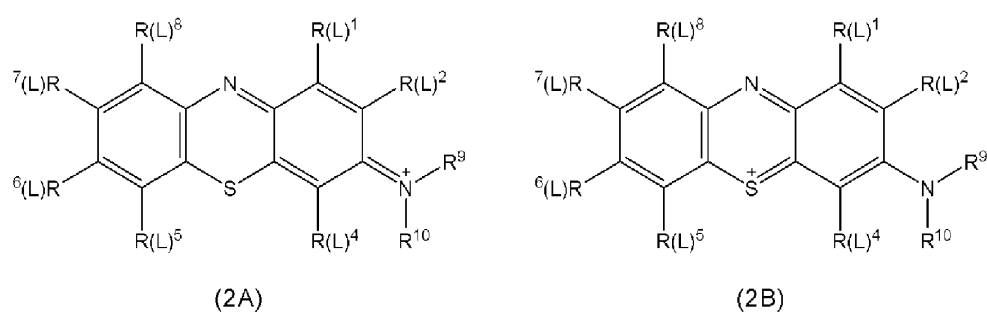
[0006] 本発明者らは、フェノチアジン骨格の3位にイミニウムカチオンを有するフェノチアジン系化合物は、当該骨格の他の位置（例えば6位）に、親水部（例えばポリエチレングリコール鎖を含む構造）を結合させた場合や、高分子量ポリマーを結合させた場合であっても、電子授受の機能の安定性に優れ、生体内や培地内のような湿潤環境中での長期間にわたる測定に使用される電気化学センサを作製するためのレドックスメディエータとして好適であることを見出した。

[0007] すなわち、本発明は少なくとも下記の事項を包含する。

[1]

一般式 (2 A) または (2 B) で表される、親水部導入型フェノチアジン系化合物 :

[化 1]



式中、

R^9 および R^{10} は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基、他方が水素原子であり、

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ はそれぞれ、[A] 置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数 1 ～ 6 の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基、[B] 前記 [A] から選ばれる結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、あるいは [C] 水素原子またはハロゲン原子である。

ただし、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも 1 つは、前記 [B] の基である。

[2]

R^9 および R^{10} における置換基が、炭素数 1 ～ 6 のアルキル基である、項 1 に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[3]

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも 1 つが、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する結合性置換基に、親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である、項1または2に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[4]

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、 $-NR^{11}R^{12}$ （式中、 R^{11} および R^{12} は、いずれか一方が反応性N置換基であり、他方が水素原子または非反応性N置換基である。）で表される、置換基を有するアミノ基である結合性置換基に、親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である、項1～3のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

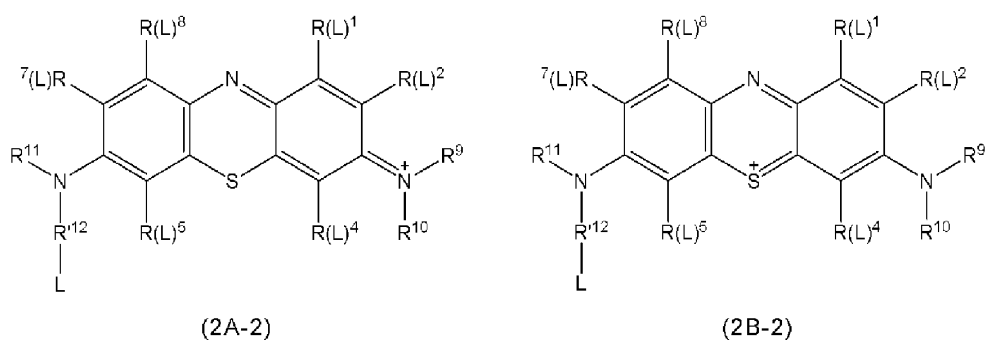
[5]

少なくとも $R(L)^6$ が、結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である、項1～4のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[6]

一般式(2A-2)または(2B-2)で表される、項1～5のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物：

[化2]



式中、 R^{11} は水素原子または非反応性N置換基であり、 R^{12} は反応性N置換基から誘導される基であり、Lは親水部導入用化合物に由来する親水部で

あり、それ以外の記号は一般式（２Ａ）および（２Ｂ）と同義である。

[7]

親水部導入用化合物に由来する親水部が、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホ基、第四級アンモニウムカチオン、およびそれらから誘導される基からなる群より選ばれる少なくとも一つを含む、項1～6のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[8]

親水部導入用化合物に由来する親水部が、オキシエチレン鎖を含む、項 1～7 のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

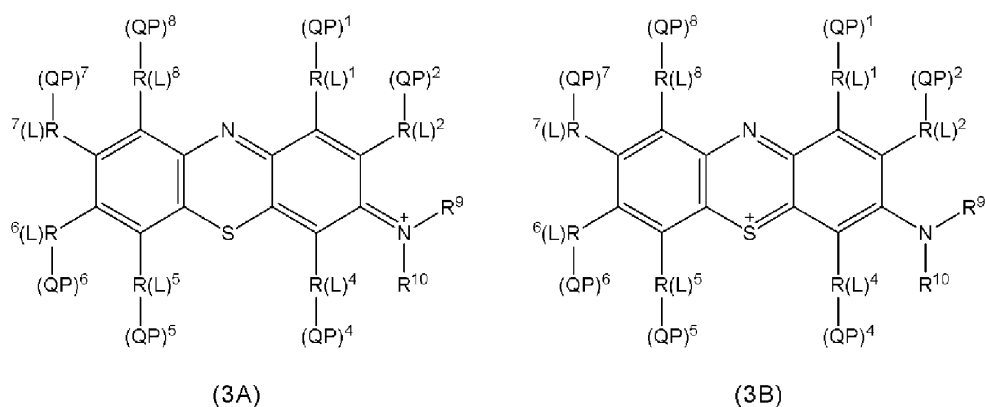
[9]

親水部導入用化合物に由来する親水部が、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する、項1～8のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[1 0]

一般式（３Ａ）または（３Ｂ）で表される、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物：

[化3]



式中、

R⁹およびR¹⁰は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基、他方が水

素原子であり、

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ はそれぞれ、[A]置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数1～6の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基、[B]前記[A]から選ばれる結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、[C]水素原子またはハロゲン原子、あるいは[D]前記[A]から選ばれる結合性置換基または前記[B]の基のいずれかから誘導される基であり、

$(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ はそれぞれ、対応する $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ が前記[D]の基である場合に存在する、高分子量ポリマーに由来する高分子構造である。

ただし、 $(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ の少なくとも1つが存在する。

[11]

R^9 および R^{10} における置換基が、炭素数1～6のアルキル基である、項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[12]

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する結合性置換基、または当該結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である、項10または11に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[13]

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、 $-NR^{11}$
 R^{12} (式中、 R^{11} および R^{12} は、いずれか一方が反応性N置換基であり、他

方が水素原子または非反応性N置換基である。)で表される、置換基を有するアミノ基である結合性置換基、または当該結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である、項10～12のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[14]

少なくとも、 $R(L)^6$ が、結合性置換基、または当該結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である、項10～13のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

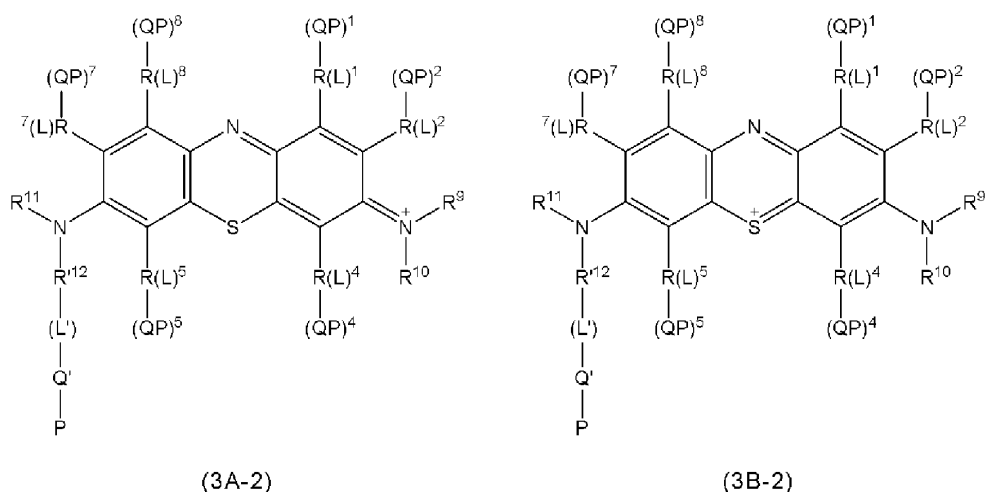
[15]

少なくとも、 $R(L)^6$ が、結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成された基から誘導される基である、項10～14のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[16]

一般式(3A-2)または(3B-2)で表される、項10～15のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物：

[化4]



式中、 R^{11} は水素原子または非反応性N置換基であり、 R'^{12} は反応性N置

換基から誘導される基であり、(L') は、任意で存在する、親水部導入用化合物から誘導される基であり、Q' は高分子量ポリマーの反応基から誘導される基であり、P は高分子量ポリマーの主鎖であり、それ以外の記号は一般式(3A)および(3B)と同義である。

[17]

親水部導入用化合物に由来する親水部が、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホ基、第四級アンモニウムカチオン、およびそれらから誘導される基からなる群より選ばれる少なくとも一つを含む、項10～16のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[18]

親水部導入用化合物に由来する親水部が、オキシエチレン鎖を含む、項10～17のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[19]

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、結合性置換基に、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基から誘導される基である、項10～18のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[20]

高分子量ポリマーが、アミノ酸系ポリマー、イミン系ポリマー、エチレン系ポリマーおよびタンパク質からなる群より選ばれる少なくとも1種である、項10～19のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[21]

高分子量ポリマーが、カチオン性の高分子量ポリマーである、項10～20のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[22]

項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物、または項 10 ～ 21 のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物を含む、試薬層。

[2 3]

アナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素をさらに含む、項 22 に記載の試薬層。

[2 4]

前記酸化還元酵素が、前記ポリマー結合型フェノチアジン系化合物と架橋されている、項 22 または 23 に記載の試薬層。

[2 5]

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、及び前記作用極上に配置された項 22 ～ 24 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。

[2 6]

さらに参照電極を有する、項 25 に記載の電気化学センサ。

[2 7]

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 25 または 26 に記載の電気化学センサ。

発明の効果

[0008] 本開示によるポリマー結合型フェノチアジン系化合物や親水部導入型フェノチアジン系化合物は、電子授受の機能の安定性、例えば生体内または培養環境における安定性などに優れる。そのようなポリマー結合型フェノチアジン系化合物や親水部導入型フェノチアジン系化合物を、レドックスポリマーまたはレドックスメディエータとして用いることにより、長期間にわたる測定（連続モニタリング）のための使用にとって好適な、耐久性に優れた電気化学センサを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [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（作用極及び参照電極を有する側）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、参考比較例1-1および1-2のPNT化合物、ならびにそれらの光学試験の吸光スペクトルおよび酸化還元反応試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図9]図9は、参考実施例1-1～1-3のPNT化合物、ならびにそれらの光学試験の吸光スペクトルおよび酸化還元反応試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図10]図10は、参考実施例1-4および1-5のPNT化合物、ならびにそれらの光学試験の吸光スペクトルおよび酸化還元反応試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図11]図11は、実施例2-1のPNT化合物、ならびにその光学試験の吸光スペクトルおよび酸化還元反応試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図12]図12は、実施例2-2のPNT化合物、ならびにその光学試験の吸光スペクトルおよび酸化還元反応試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図13]図13は、実施例2-3のPNT化合物、ならびにその光学試験の吸光スペクトルおよび酸化還元反応試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図14]図14は、実施例3-1～3-4のポリマー結合型PNT化合物の、PBS中での光学試験の吸光スペクトルである。

[図15]図15は、実施例3-2～3-4のポリマー結合型PNT化合物の、リン酸ナトリウム緩衝液（pH6またはpH8）中での光学試験の吸光スペクトルである。

[図16]図16は、実施例3-2～3-4のポリマー結合型PNT化合物の、電気化学応答性試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図17]図17は、実施例3-2～3-4のポリマー結合型PNT化合物の、電気化学応答性・耐久性試験のサイクリックボルタモグラムである。

[図18]図18は、実施例3-3および3-4のポリマー結合型PNT化合物の、センサ耐久性試験におけるセンサ応答性を示す図である。

符号の説明

- [0010]
- | | |
|-----|------------------------|
| 11 | センサ（プローブ） |
| 21 | 基板 |
| 22 | 電極 |
| 22a | 作用極 |
| 22b | 参照極 |
| 22c | 対極 |
| 23 | 試薬層 |
| 24 | 銀／塩化銀層 |
| 25 | フィルム |
| X1 | センサ頭部 |
| X2 | センサの生体への挿入方向 |
| X3 | 対極の、フィルムで被覆されていない領域 |
| X4 | 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 参照電極領域
- 1 1 2 c 対極領域
- 1 1 3 溝
- 1 1 4 作用極
- 1 1 5 参照電極
- 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

[0011] 本発明におけるフェノチアジン系化合物、親水部導入型フェノチアジン系化合物、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物、試薬層、電気化学センサ等の実施形態について、以下さらに詳細に説明する。

[0012] 本明細書において、下記の用語はそれぞれ次のような意味を有する。

- ・「化合物（N）」（Nは、例えば、1 A、1 B等）…一般式（N）で表される化合物。
- ・「イミニウムカチオン」…一般式（1 A）等のフェノチアジン骨格の3位に導入されている、 $=N^+R^9R^{10}$ で表される置換基。
- ・「 C_{n-m} 」…（置換基等の）炭素数がn～mであること。
- ・「反応性N置換基」…共有結合または非共有結合を形成できる反応基を有する、アミノ基の窒素原子に対する置換基。
- ・「非反応性N置換基」…共有結合または非共有結合を形成できる反応基を有さない、アミノ基の窒素原子に対する置換基。
- ・「結合性置換基」…化合物が有する置換基（本明細書においては特に、フェノチアジン系化合物が有する、フェノチアジン骨格に対する置換基）であって、結合対象物（本明細書においては特に、親水部導入用化合物または高

分子量ポリマー) が有する反応基と反応可能な基を有することにより、当該化合物と当該結合対象物の結合を可能とする基。

・「フェノチアジン系化合物の特定結合性置換基」…フェノチアジン系化合物が有する、フェノチアジン骨格に対する置換基(式(1A)および(1B)中の R^1 、 R^2 、 $R^4 \sim R^8$)であって、親水部導入用化合物または高分子量ポリマーと結合可能な基。

・「フェノチアジン系化合物(特定結合性置換基)の特定反応基」…フェノチアジン系化合物が有する、特定結合性置換基の一部または全体によって構成される、親水部導入用化合物の第1特定反応基または高分子量ポリマーの特定反応基と反応可能な基。

・「親水部導入用化合物の第1特定反応基」…親水部導入用化合物が有する、フェノチアジン系化合物(特定結合性置換基)の特定反応基と反応可能な基。

・「親水部導入用化合物の第2特定反応基」…親水部導入用化合物が任意で有していてもよい、高分子量ポリマーの特定反応基と反応可能な基。親水部導入用化合物がフェノチアジン系化合物と結合し、親水部としてフェノチアジン系化合物に導入されることにより、その親水部導入用化合物の第2特定反応基は、親水部の特定反応基になる。

・「高分子量ポリマーの特定反応基」…高分子量ポリマーが側鎖(および末端)に有する、親水部導入用化合物の(フェノチアジン系化合物に導入された親水部が有する)第2特定反応基またはフェノチアジン系化合物の特定結合性置換基が有する特定反応基と反応可能な基。

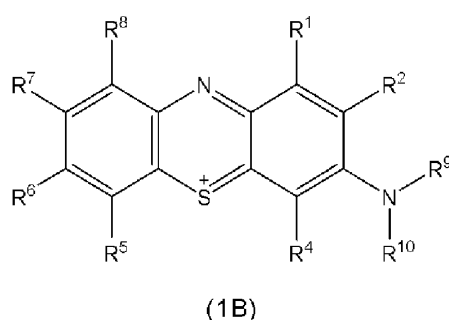
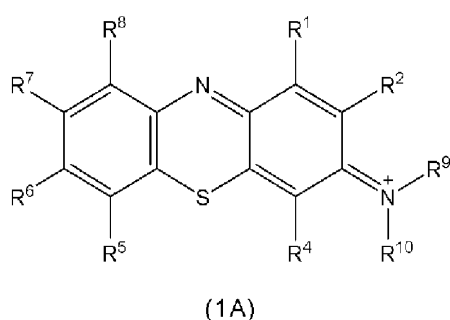
[0013] — フェノチアジン系化合物 —

本発明におけるフェノチアジン系化合物は、「レドックスメディエータ」として使用することができるものである。「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意味し、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。レドックスメディエータとしては、フェリシアン化物やフェロセン等の種々の

化合物が知られているが、フェノチアジン系化合物は、酸化還元電位（ $v.s. Ag/AgCl \cdot$ 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。

[0014] 本発明におけるフェノチアジン系化合物は、一般式（1A）または（1B）で表される化合物である。一般式（1A）で表される化合物、すなわち化合物（1A）は、フェノチアジン骨格の3位に $=N^+R^9R^{10}$ で表される置換基（イミニウムカチオン）が導入されている。また、一般式（1B）で表される化合物、すなわち化合物（1B）は、化合物（1A）と共鳴構造の関係にある。一般式（1A）で表される化合物は、一般式（1B）で表すこともできる化合物であり、一般式（1B）で表される化合物は、一般式（1A）で表すこともできる化合物であると解される。本明細書において、特に断らない限り、一般式（1A）で表される化合物に関する記載事項は、一般式（1B）で表される化合物に関する記載事項として適用でき、一般式（1B）で表される化合物に関する記載事項は、一般式（1A）で表される化合物に関する記載事項としてできる。

[0015] [化5]



[0016] 一般式（1A）および（1B）中の各記号の定義は次の通りである。

[0017] R^9 および R^{10} は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基で他方が水素原子である（ R^9 および R^{10} の両方が水素原子であることはない）。

[0018] R^9 および R^{10} としての「置換基」は、本発明のフェノチアジン系化合物が所定の位置にイミニウムカチオンを有する化合物（1 A）か、その共鳴構造を有する化合物（1 B）を形成できるものであれば特に限定されるものではないが、例えば（vi）「置換基を有していてもよい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」が挙げられる。当該炭化水素基としては、例えば、炭素数1～6の（ C_{1-6} ）炭化水素基が好ましく、メチル基が特に好ましい。

[0019] R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ は、それぞれ独立して、下記（i）～（viii）のいずれかの基または原子を表す：

- （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カルボキシ基；
- （v）置換基を有していてもよいアミノ基；
- （vi）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）；
- （vii）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）；
- （viii）置換基を有していてもよいフェニル基。

[0020] 上記（iii）～（viii）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）カルボキシ基もしくはその活性エステル体（例えばN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（NHS））、（d）アミノ基、（e）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）、（f）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）、（g）グアニジノ基、（h）メシル基、（i）フェニル基、（j）チオール基、（k）ホルミル基（アルデヒド基）、（l）エポキシ基、（m）マレイミド基の少なくとも1つを含む基が挙げられる。つまり、

上記 (iii) ~ (viii) の置換基が有していてもよい置換基は、上記 (a) ~ (m) のいずれか単独で構成される基であってもよいし、上記 (a) ~ (m) 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) カルボキシ基もしくはその活性エステル体、(d) アミノ基、(j) チオール基、(k) ホルミル基、(l) エポキシ基または (m) マレイミド基でさらに置換されている、(e) 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) ~ (viii) それぞれに対して化学的に適切な置換基を (a) ~ (m) から選択したり、(a) ~ (m) 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。

[0021] 上記 (iii) ~ (viii) 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。

[0022] R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ は、特定の化合物またはポリマーとの結合性を有する基であってもよいし、そのような結合性を有さない基であってもよい。例えば、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ は、「親水部導入型フェノチアジン系化合物」の作製において、親水部導入用化合物との結合性を有する、フェノチアジン系化合物に親水部を導入するための置換基であってもよい。また、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ は、高分子量ポリマーとの結合性を有する置換基であってもよく、その場合は上述したような親水部を介さずに、フェノチアジン系化合物と高分子量ポリマーとが直接結合した「ポリマー結合型フェノチアジン系化合物」を作製することができる。一方、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ は、それ自体で（親水部導入用化合物と結合しなくても）フェノチアジン系化合物の親水性を向上させることに寄与する親水基であってもよい。さらに、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ は、レドックスメディエータとしての性能に関係する基であってもよい。

[0023] <フェノチアジン系化合物の特定結合性置換基>

本発明のフェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ のいずれか1つ以上は、親水部導入用化合物または高分子量ポリマーとの結合性を有する置換基（本発明におけるフェノチアジン系化合物の「特定結合性置換基」）である。この実施形態において、少なくとも R^6 が、特定結合性置換基であることが特に好ましい。 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ のうち特定結合性置換基であるもの以外は、例えば全て水素原子であってもよいし、水素以外の特定結合性置換基とはならない原子または置換基であってもよい。

[0024] 特定結合性置換基は、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ の具体例として示した上記(iii)～(viii)の中から選ばれる、親水部導入用化合物または高分子量ポリマーとの結合に適したものの、つまり親水部導入用化合物の第1特定反応基または高分子量ポリマーの特定反応基と適切な条件下で反応可能な基を有するものとすることができる。上記(iii)～(viii)のうち、親水部導入用化合物または高分子量ポリマーと実質的に結合できないもの、または結合することが産業上困難なもの（例えば無置換のフェニル基）は、本発明の特定結合性置換基から除外される。上記(iii)～(viii)は、それぞれの基自体（置換基を有さない状態のもの）が、親水部導入用化合物の第1特定反応基または高分子量ポリマーの特定反応基と反応可能な基（本発明におけるフェノチアジン系化合物（特定結合性置換基）の「特定反応基」）となるものであってもよいし、上記(iii)～(viii)それぞれの基が有する置換基の一部または全体が、特定反応基となるものであってもよい。上記どちらの実施形態であっても、フェノチアジン系化合物（特定結合性置換基）は特定反応基を「有する」といえる。

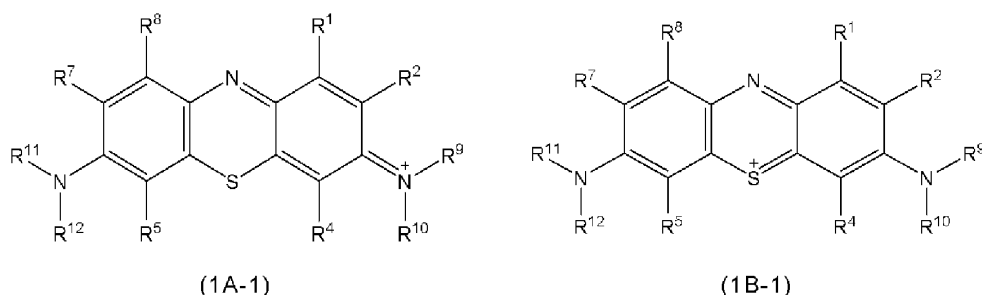
[0025] <フェノチアジン系化合物（特定結合性置換基）の特定反応基>

「フェノチアジン系化合物（特定結合性置換基）の特定反応基」は、親水部を導入するための親水部導入用化合物が有する第1特定反応基または高分子量ポリマーが有する特定反応基と反応可能なものであれば特に限定されるものではなく、公知の様々な反応基から選択することができる。

- [0026] フェノチアジン系化合物の特定反応基としては、例えば、「カルボキシ基またはその活性エステル体（例えばNHS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より選ばれる少なくとも1種」が好ましい。このようなフェノチアジン系化合物の特定反応基は、特定結合性置換基が有する反応基であること、つまり前記 (iii) ~ (viii) の基が、特定反応基として、前記 (c)、(d)、(j)、(k)、(l)、(m) などの置換基を有することが好ましい。また、フェノチアジン系化合物の特定反応基は、必要に応じて保護基が結合していてもよく、フェノチアジン系化合物と親水部導入用化合物または高分子量ポリマーとを結合させるための反応前に脱保護してもよい。
- [0027] 本発明のフェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、 R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ のいずれか1つ以上、特に好ましくは少なくとも R^6 は、特定結合性置換基としての、前記 (v) 「置換基を有していてもよいアミノ基」、つまり式： $-NR^{11}R^{12}$ （式中、 R^{11} および R^{12} は、それぞれ水素原子または置換基を表す。）で表わされる基である。この実施形態において、特定結合性置換基となる $-NR^{11}R^{12}$ で表される基が「置換基を有するアミノ基」であって、 R^{11} および R^{12} は、いずれか一方または両方、好ましくはいずれか一方が、特定反応基を有する置換基（反応性N置換基、例えば、カルボキシ基で置換された C_{1-6} アルキル基： $-(CH_2)_{1-6}-COOH$ ）であり、他方は水素原子または特定反応基を有さない置換基（非反応性N置換基、例えば、 C_{1-6} アルキル基）であることが好ましい。一方、 R^{11} および R^{12} は、両方とも水素原子である、つまり $-NR^{11}R^{12}$ が無置換のアミノ基を表し、当該無置換のアミノ基を特定結合性置換基（フェノチアジン系化合物の特定反応基）とすることも可能である。一例として、本発明のフェノチアジン系化合物は、下記の一般式（1A-1）および（1B-1）で表すことができる。

[0028]

[化6]



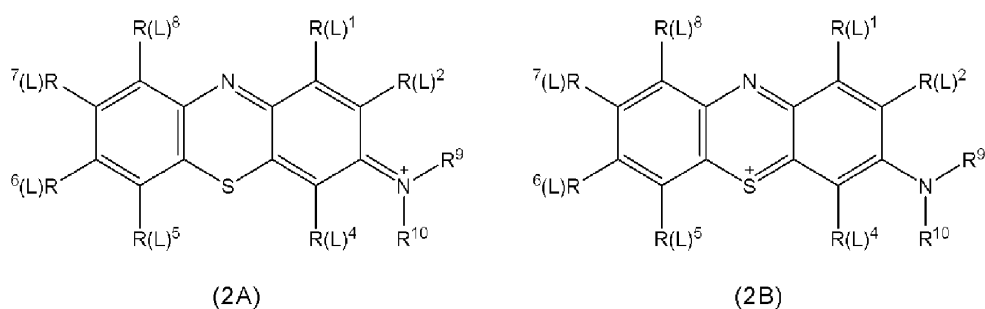
[0029] 一般式（１Ａ－１）および（１Ｂ－１）において、 R^{11} は水素原子または非反応性Ｎ置換基であり、 R^{12} は反応性Ｎ置換基であり、それ以外の記号は、前述した、一般式（１Ａ）および（１Ｂ）と同義である。

[0030] 本発明におけるフェノチアジン系化合物（親水部導入型フェノチアジン系化合物およびポリマー結合型フェノチアジン系化合物を含む。）は、塩を形成していてもよい。本発明のフェノチアジン系化合物が正に荷電している部分（陽イオン）を含む場合、負に荷電したイオン（陰イオン種）との塩を形成することができ、本発明のフェノチアジン系化合物が負に荷電している部分（陰イオン）を含む場合、正に荷電したイオン（陽イオン種）との塩を形成することができる。陰イオン種としては、例えば、ハロゲンイオン、ハロゲンを含む化合物のイオン、水酸化物イオン、カルボン酸イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、ギ酸イオン、酢酸イオン、プロピオン酸イオン、酪酸イオン、炭酸水素イオン、リン酸二水素イオン、硫酸水素イオン、アルキルスルホン酸イオン、硫化水素イオン、シュウ酸水素イオン、シアン酸イオン、及びチオシアン酸イオンなどが挙げられる。陽イオン種としては、例えば、ナトリウムイオン、カリウムイオン等のアルカリ金属イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、バリウムイオン等のアルカリ土類金属イオン、アルミニウムイオン等の金属イオン、コリンイオン等の第四級アンモニウムカチオン、アンモニウムイオン、アミノ基または置換アミノ基を含む化合物のイオン、ピリジニウムイオン、ピリジル基または置換ピリジル基を含む化合物のイオンなどが挙げられる。

[0031] — 親水部導入型フェノチアジン系化合物 —

本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物は、上述した本発明におけるフェノチアジン系化合物に「親水部」が導入された化合物、すなわち一般式（１Ａ）または（１Ｂ）における R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ のいずれか１つ以上の部位に親水部（Ｌ）が導入されている化合物である。そのような化合物は、一般式（２Ａ）または（２Ｂ）で表すことができる。

[0032] [化7]



[0033] 一般式（２Ａ）および（２Ｂ）中の各記号の定義は次の通りである。

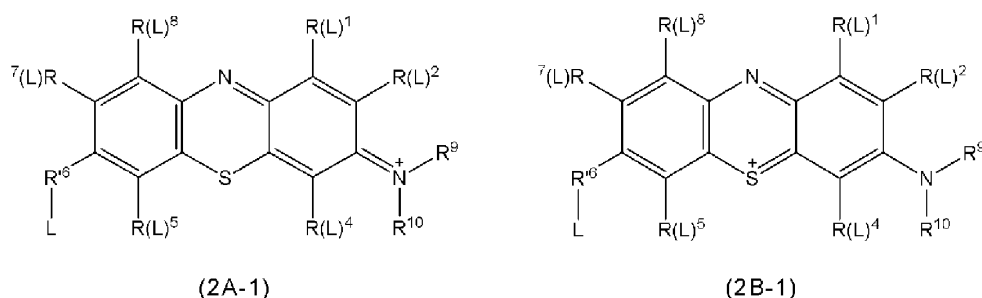
[0034] R^9 および R^{10} は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基、他方が水素原子である。（一般式（１Ａ）および（１Ｂ）中の定義と同義である。）

[0035] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ はそれぞれ、〔Ａ〕置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数１～６の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基、〔Ｂ〕前記〔Ａ〕から選ばれる結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、あるいは〔Ｃ〕水素原子またはハロゲン原子である。つまり、置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数１～６の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基のそれぞれに、さらに親水部導入用化合物が結合していても

(つまり親水部が導入されていても)よいし、結合していなくても(つまり親水部が導入されていなくても)よい。ただし、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つは、前記[B]の基、すなわち前記[A]の基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている(つまり親水部が導入されている)基である。 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の2つ以上がそのような基である場合は、それぞれの親水部は、同じであっても異なってもよい。

[0036] 本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、少なくとも $R(L)^6$ において、親水部が導入されており、必要に応じてさらに、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ 、 $R(L)^4$ 、 $R(L)^5$ 、 $R(L)^7$ および $R(L)^8$ の1つ以上において、親水部が導入されていてもよい。この実施形態の親水部導入型フェノチアジン系化合物は、一般式(2A)および(2B)において、少なくとも $R(L)^6$ が、親水部導入用の特定反応基を有する、親水部導入用の特定結合性置換基に、親水部導入用化合物が結合することにより形成される基であるものに相当する。なお、「特定結合性置換基」および「特定反応基」の詳細は、本発明におけるフェノチアジン系化合物との関係で本明細書に記載したとおりである。一例として、 R^6 の部位に親水部が導入されている本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物は、下記の一般式(2A-1)および(2B-1)で表すことができる。

[0037] [化8]

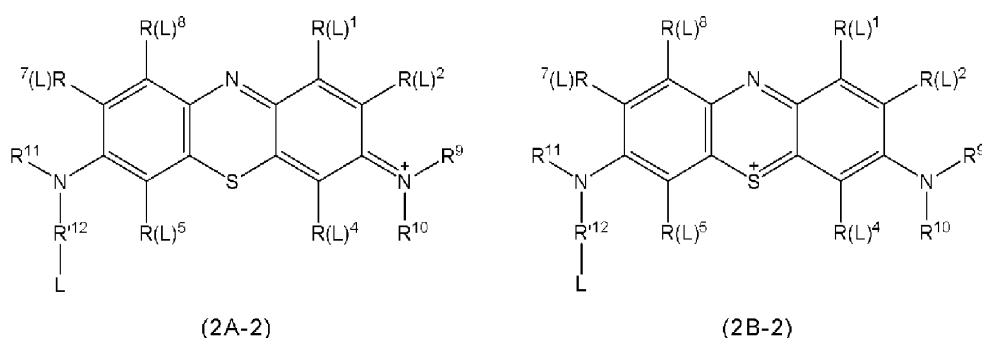


[0038] 一般式(2A-1)および(2B-1)において、 R'^6 は特定結合性置換基から誘導される基を表し、Lは親水部を表し、それ以外の各記号の定義は

一般式（２Ａ）および（２Ｂ）と同義である。

[0039] 本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ のいずれか１つ以上、特に好ましくは少なくとも $R(L)^6$ は、式： $-NR^{11}R^{12}$ で表される特定結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である。なお、式： $-NR^{11}R^{12}$ の詳細は、本発明のフェノチアジン系化合物との関係で本明細書に記載したとおりである。一例として、 $R(L)^6$ が、 $-NR^{11}R^{12}$ で表される特定結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である、本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物は、下記の一般式（２Ａ－２）および（２Ｂ－２）で表すことができる。

[0040] [化9]



[0041] 一般式（２Ａ－２）および（２Ｂ－２）において、 R^{11} は、水素原子または非反応性Ｎ置換基であり、 R^{12} は、反応性Ｎ置換基から誘導される基であり、 L は親水部導入用化合物に由来する親水部であり、それ以外の記号は、前述した、一般式（２Ａ－１）および（２Ｂ－１）と同義である。

[0042] <親水部>

本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物における「親水部」とは、フェノチアジン系化合物に「親水性」を賦与するための部分（化学的構造）であって、実施形態によっては、高分子量ポリマーとフェノチアジン系化合物を連結するために好適な部分にもなり得るものである。親水部は、少なくともその一部（例えば、第１の末端またはその近傍）に、親水部導入用化合物が有していた第１特定反応基に由来し、フェノチアジン系化合物（特定結

合性置換基)の特定反応基との反応により形成された結合構造を有する。親水部は、他の部位(例えば、第2の末端またはその近傍)に、高分子量ポリマーの特定反応基と反応可能な基として、親水部導入用化合物が有していた第2特定反応基を有していてもよいし、高分子量ポリマーの特定反応基と反応可能な基は有していなくてもよい。

[0043] 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、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物を合成する際に親水部導入型フェノチアジン系化合物と高分子量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ポリマー結合型フェノチアジン系化合物(レドックスポリマー)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。

[0044] 本発明における親水部は特に限定されるものではなく、様々な親水部から選択することができる。化学的構造上のサイズ(分子長等)が比較的小さな親水部としては、例えば、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホ基、第四級アンモニウムカチオンなど、いわゆる「親水基」と呼ばれる官能基自体や、そのような親水基を含む分子から誘導される基であって、親水性を有するものが挙げられる。一方、化学的構造上のサイズが比較的大きな親水部としては、例えば、いわゆる「リンカー基(部)」と呼ばれる構造のうち、親水性を有するもの(本明細書において「リンカー様親水部」と呼ぶ。)が挙げられる。

[0045] <リンカー様親水部>

リンカー様親水部は、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、鎖状の構造である部位である。「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が、親水性の観点からは直鎖状のものが好ましい。また、「鎖状の構造」は、親水性の観点からは、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も含まないものが好ましいが、所望の親水性を有する範囲で、一つまたは複数の環構造を含むものであってもよい。

[0046] 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： $-(O C_2 H_4)_q-$ で表されるオキシエチレン鎖を含む。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「ポリオキシエチレン（PEG鎖）」などと呼ばれている。

[0047] 本発明の一実施形態において、リンカー様親水部は、式： $-(C H_2)_p-$ 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： $-(C H_2)_p-$ で表される炭化水素鎖と、上記式： $-(O C_2 H_4)_q-$ 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の中の 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の中の 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。

[0048] <親水部の特定反応基（親水部導入用化合物の第2特定反応基）>

親水部の特定反応基、すなわち親水部導入用化合物が有していてもよい、高分子量ポリマーとの結合用である反応基（親水部導入用化合物の「第2特定反応基」）は、高分子量ポリマーの特定反応基と反応可能なものであれば特に限定されるものではなく、公知の様々な反応基から選択することができる。そのような親水部の特定反応基（親水部導入用化合物の第2特定反応基）としては、例えば、「カルボキシ基またはその活性エステル体（例えばNHS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より選ばれる少なくとも1種」が好ましい。また、ポリマー結合用反応基は、必要に応じて保護基が結合していてもよく、親水部導入型フェノチアジン系化合物と高分子量ポリマーとの結合のための反応前に脱保護してもよい。

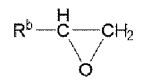
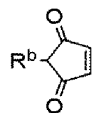
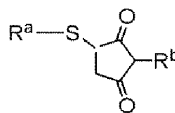
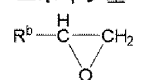
[0049] <反応基全般>

本発明における所定の反応基、すなわちフェノチアジン系化合物の特定反応基と、それと結合する親水部導入用化合物の第1特定反応基または高分子量ポリマーの特定反応基、ならびに親水部導入用化合物（親水部）の第2特定反応基と、それと結合する高分子量ポリマー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の反応基同士は、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。

[0050] 本発明における所定の反応基は、それぞれ「カルボキシ基もしく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。好ましい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。本発明における所定の反応基の一方として、好ましい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。

[0051]

[表1]

反応基A	反応基B	形成される結合等
カルボキシ基 $R^a\text{-COOH}$ またはその活性エステル体	アミノ基 $R^b\text{-NH}_2$	アミド結合 $R^a\text{-CO-NH-R}^b$
	アルコール性またはフェノール性 ヒドロキシ基 $R^b\text{-OH}$	エステル結合 $R^a\text{-CO-O-R}^b$
	チオール基 $R^b\text{-SH}$	チオエステル結合 $R^a\text{-CO-S-R}^b$
	アルキルハライド基 $R^b\text{-X}$	エステル結合 $R^a\text{-CO-O-R}^b$
アミノ基 $R^a\text{-NH}_2$	カルボキシ基 またはその活性エステル体 $R^b\text{-COOH}$	アミド結合 $R^a\text{-NH-CO-R}^b$
	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 $R^a\text{-NH-CO-R}^b$
	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 $R^a\text{-SH}$	カルボキシ基 またはその活性エステル体 $R^b\text{-COOH}$	チオエステル結合 $R^a\text{-S-CO-R}^b$
	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) $R^a\text{-CHO}$	アルコキシアミノ基 $R^b\text{-O-NH}_2$	オキシム結合 $R^a\text{-CH=N-O-R}^b$
	アミノ基 $R^b\text{-NH}_2$	シッフ塩基 $R^a\text{-CH=N-R}^b$
	ヒドラジン基 $R^b1R^b2\text{N-NH}_2$	ヒドラゾン結合 $R^a\text{-CH=N-NR}^b1\text{R}^b2$

[0052] 本発明の好ましい一実施形態において、親水部導入用化合物（親水部）の「第2特定反応基」または「フェノチアジン系化合物の特定反応基」と、「高分子量ポリマーの特定反応基」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、親水部導入用化合物の「第1特定反応基」と、「フェノチアジン系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。

[0053] 本発明のより好ましい一実施形態において、親水部導入用化合物（親水部）の「第2特定反応基」または「フェノチアジン系化合物の特定反応基」と、「高分子量ポリマーの特定反応基」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、親水部導入用化合物の「第1特定反応基」と、「フェノチアジン系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、特定反応基としてカルボン酸活性エステル体を有するフェノチアジン系化合物；第1特定反応基としてアミノ基を有し、第2特定反応基としてカルボン酸活性エステル体（例えばカルボン酸NHSエステル体）を有する親水部導入用化合物；および特定反応基としてアミノ基を有する高分子量ポリマーを用いる場合、まず当該フェノチアジン系化合物のカルボン酸活性エステル体と当該親水部導入用化合物のアミノ基の反応により、第1のアミド結合で結合した親水部導入型フェノチアジン系化合物が得られ、得られた親水部導入型フェノチアジン系化合物のカルボン酸活性エステル体と当該高分子量ポリマーのアミノ基の反応により第2のアミド結合で結合したポリマー結合型フェノチアジン系化合物が得られる。

[0054] <親水部導入用化合物>

本発明における「親水部導入用化合物」は、上述したような「親水部」を導入する（追加的に形成する）ために、フェノチアジン系化合物が有する特定結合性置換基と結合させるための化合物である。親水部導入用化合物とし

ては、例えば、親水部との関係で説明したリンカー様親水部に相当する構造と、その一部（例えば、第1の末端またはその近傍）にフェノチアジン系化合物との結合用の第1特定反応基を有し、必要に応じて他の部分（例えば、第2の末端またはその近傍）に高分子量ポリマーとの結合用の第2特定反応基を有していてもよい化合物を用いることができる。また、親水部を形成することのできるよりサイズ（分子量）の小さい化合物を、親水部導入用化合物として用いることもできる。これらのような親水部導入用化合物は特に限定されるものではなく、公知の様々な親水部導入用化合物から選択することができる。

[0055] <親水部導入用化合物の第1特定反応基>

親水部導入用化合物が有する第1特定反応基は、フェノチアジン系化合物の特定反応基と反応可能なものであれば特に限定されるものではなく、公知の様々な反応基から選択することができる。そのような親水部導入用化合物の第1特定反応基としては、例えば、「カルボキシ基またはその活性エステル体（例えばNHS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より選ばれる少なくとも1種」が好ましい。また、親水部導入用化合物の第1特定反応基は、必要に応じて保護基が結合していてもよく、親水部導入用化合物とフェノチアジン系化合物との結合のための反応前に脱保護してもよい。なお、親水部導入用化合物が有していてもよい第2特定反応基は、親水部が有していてもよい特定反応基に相当する反応基であり、その技術的事項は前述した通りである。

[0056] <親水部導入型フェノチアジン系化合物の製造方法>

親水部導入型フェノチアジン系化合物は、所望の化学的構造を有するフェノチアジン系化合物と、所望の化学的構造を有する親水部導入用化合物とを、適切な条件（温度、時間、補助剤等）の下で反応させることにより合成することができる。合成された親水部導入型フェノチアジン系化合物は、必要に応じてゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過等により精製してもよい。

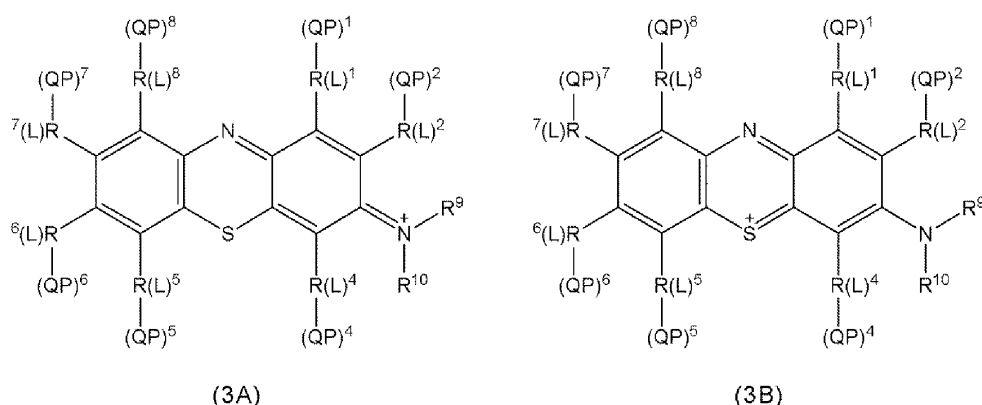
[0057] 親水部導入型フェノチアジン系化合物は、一般式（2A）および（2B）

における $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ ならびに R^9 および R^{10} それぞれの構造により様々な種類のを製造し、使用することができる。本発明では、親水部導入型フェノチアジン系化合物は、例えば後述するようなポリマー結合型フェノチアジン系化合物を合成するための原料として、いずれか1種類を単独で使用することもできるし、2種類以上を組み合わせ使用することもできる。

[0058] — ポリマー結合型フェノチアジン系化合物 —

本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、上述した本発明のフェノチアジン系化合物または親水部導入型フェノチアジン系化合物と高分子量ポリマーとが結合した構造、つまり、本発明のフェノチアジン系化合物に、親水部を介してもしくは介さずに、高分子量ポリマーとが結合した構造を有する、フェノチアジン系化合物である。逆の見方をすれば、本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、フェノチアジン系化合物または親水部導入型フェノチアジン系化合物が結合した、レドックスポリマーとして使用することのできる高分子量ポリマーである。レドックスメディエータとしてのフェノチアジン系化合物または親水部導入型フェノチアジン系化合物を高分子量ポリマーと結合させることにより、保護膜からの流出を防止または抑制することができる。ポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、例えば一般式(3A)または(3B)のように表すことができる。

[0059] [化10]



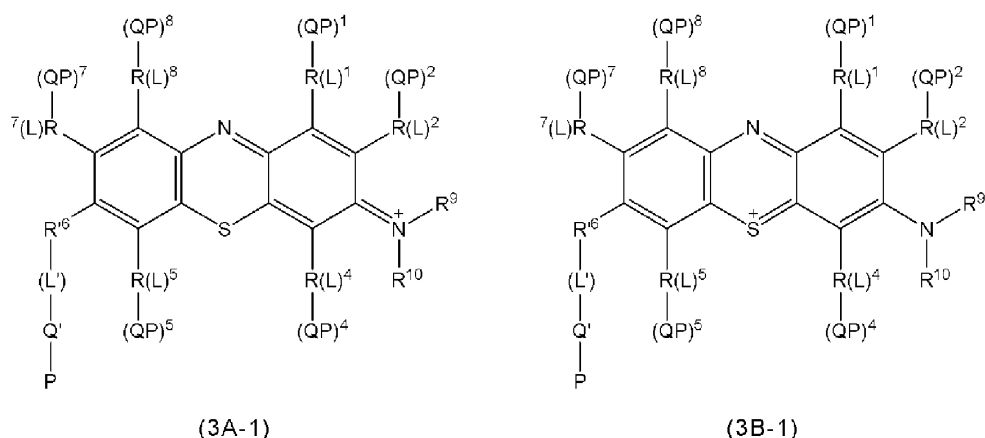
- [0060] 一般式 (3 A) および (3 B) 中の各記号の定義は次の通りである。
- [0061] R^9 および R^{10} は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基、他方が水素原子である。(一般式 (1 A) および (1 B)、ならびに (2 A) および (2 B) 中の定義と同義である。)
- [0062] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ はそれぞれ、[A] 置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数 1～6 の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基、[B] 前記 [A] から選ばれる結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、[C] 水素原子またはハロゲン原子、あるいは [D] 前記 [A] から選ばれる結合性置換基または前記 [B] の基のいずれかから誘導される基である。
- [0063] $(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ はそれぞれ、対応する $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ が前記 [D] の基である場合に存在する、高分子量ポリマーに由来する高分子構造である。つまり、 $(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ によって表される高分子量ポリマーに由来する高分子構造は、親水部が導入されている場合の $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ に結合していてもよいし、親水部が導入されていない場合の $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ 、すなわち R^1 、 R^2 および $R^4 \sim R^8$ で表される特定結合性置換基そのものに結合していてもよい。
- [0064] ただし、 $(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ の少なくとも 1 つが存在するものとする。 $(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ の 2 つ以上が存在する場合は、それぞれの高分子量ポリマーは、同じであってもよいし、異なってもよい(つまり複数の高分子量ポリマーの分子が親水部導入型フェノチアジン系化合物によって架橋されていてもよい)。また、 $(QP)^1$ 、 $(QP)^2$ および $(QP)^4 \sim (QP)^8$ の 2 つ以上に対応する、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の 2 つ以上が、親水部が導入された特定結合性置換基

である場合は、それぞれの親水部は同じであっても異なってもよい。

- [0065] 本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つは、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の特定反応基を有する特定結合性置換基、または当該特定結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である。
- [0066] 本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つは、特定結合性置換基に、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の特定反応基を有する親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基から誘導される基である。
- [0067] 本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、フェノチアジン系化合物の特定結合性置換基は、少なくとも $R(L)^6$ (QP)⁶において、親水部を介してもしくは介さずに、高分子量ポリマーと結合しており、必要に応じてさらに、 $R(L)^1(QP)^1$ 、 $R(L)^2(QP)^2$ 、 $R(L)^4(QP)^4$ 、 $R(L)^5(QP)^5$ 、 $R(L)^7(QP)^7$ および $R(L)^8(QP)^8$ の1つ以上において、親水部を介してもしくは介さずに、高分子量ポリマーと結合していてもよい。この実施形態のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、一般式(3A)および(3B)において、少なくとも $R(L)^6$ が、特定結合性置換基、または親水部が導入された特定結合性置換基から誘導される基、のいずれかから誘導される基である場合に相当する。なお、「特定結合性置換基」、「特定反応基」および「親水部」の詳細は、本発明のフェノチアジン系化合物および親水部導入型フェノチアジン系化合物との関係で本明細書に記載したとおりである。一例として、 $R(L)^6(QP)^6$ において、特定結合性置換基に親水部導入用化合物が結合し、その結合により導入された親水部

を介して高分子量ポリマーが結合している、本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、下記の一般式（3A-1）および（3B-1）で表すことができる。

[0068] [化11]

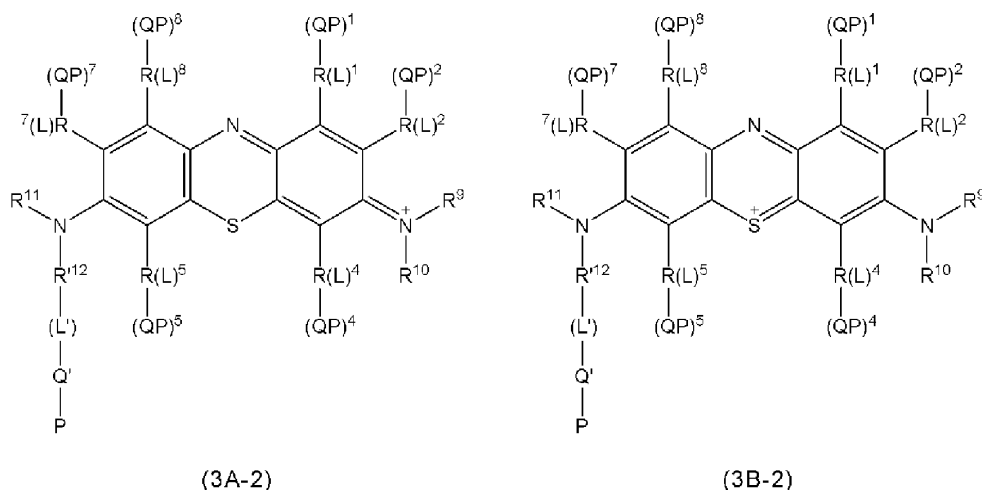


[0069] 一般式（3A-1）および（3B-1）において、 R'^6 は特定結合用置換基（R）から誘導される基であり、 (L') は、任意で存在する、親水部導入用化合物（L）から誘導される基であり、 Q' は高分子量ポリマーの反応基（Q）から誘導される基であり、Pは高分子量ポリマーの主鎖であり、それ以外の各記号の定義は一般式（3A）および（3B）と同様である。高分子量ポリマーの主鎖（P）および反応基（Q）、ならびにそれらを有する高分子量ポリマーの詳細は後述する。

[0070] 本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ のいずれか1つ以上、特に好ましくは少なくとも $R(L)^6$ は、式： $-NR^{11}R^{12}$ で表される置換基を有するアミノ基である特定結合性置換基、または当該特定結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である。なお、式： $-NR^{11}R^{12}$ の詳細は、本発明のフェノチアジン系化合物との関係で本明細書に記載したとおりである。一例として、 $R(L)^6$ が、親水部導入用化合物が結合していても結合していなくても（つまり親水部が導入されていてもされていなくても）よい、特定結合性置換基とし

ての $-NR^{11}R^{12}$ で表される基であり、そこに親水部を介してまたは介さずに高分子量ポリマーがさらに結合している、本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、下記の一般式(3A-2)および(3B-2)で表すことができる。

[0071] [化12]



[0072] 一般式(3A-2)および(3B-2)において、 R^{11} は、水素原子または非反応性N置換基であり、 R^{12} は、反応性N置換基から誘導される基であり、それ以外の記号は、前述した、一般式(3A-1)および(3B-1)と同義である。

[0073] なお、一般式(3A-1)および(3B-1)、(3A-2)および(3B-2)等は見かけ上、1つの高分子量ポリマーの主鎖(P)に対して、1つの反応基(Q)から誘導される基(Q')を介して、1分子の(親水部導入型)フェノチアジン系化合物が結合しているように表されている。しかしながら、本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物はそのように限定的に解釈されるものではなく、1つの高分子量ポリマーの主鎖に対して、通常は複数(多数)の(親水部導入型)フェノチアジン系化合物が、当該高分子量ポリマーの複数(多数)の側鎖(および末端)を介して結合していると解釈されるべきものである。

[0074] また、本明細書において後述するような、(親水部導入型)フェノチアジ

ン系化合物と高分子量ポリマーとを反応させる工程を含むレドックスポリマーの製造方法では、1分子の高分子量ポリマーに対する（親水部導入型）フェノチアジン系化合物の結合数について分布を有する、高分子量ポリマー組成物が得られる。高分子量ポリマー組成物が有する（親水部導入型）フェノチアジン系化合物の結合数についての分布の仕方や、1分子の高分子量ポリマーに対して結合する（親水部導入型）フェノチアジン系化合物の数（の平均）は特に限定されるものでなく、用途や性能などを考慮しながら、またレドックスポリマーを製造する際の原料（高分子量ポリマーまたはそれを構成しているモノマー）や反応条件などによって、適宜調整することができる。例えば、（1）高分子量ポリマーの原料として用いるモノマー1分子中に含まれる反応基の数を増減させたり、（2）モノマー全体に含まれる反応基のうち、（親水部導入型）フェノチアジン系化合物に含まれる反応基と実際に反応させるものの割合を、反応条件によって調節したりすることによって、1分子の高分子量ポリマーに対する（親水部導入型）フェノチアジン系化合物の結合数（平均値）を増減させたり、その分布の仕方を変化させたりすることができ、所望の性状を有する高分子量レドックスポリマー（の組成物）を製造することができる。

[0075] 典型的にはレドックスポリマーとして使用される、本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、親水性を有すること好ましい。「親水性」の詳細については、親水部との関係で前述したとおりである。ポリマー結合型フェノチアジン系化合物において、親水部、高分子量ポリマー、あるいはそれら両方が、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物に親水性を賦与していることが好ましい。本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、例えば、親水部（一例として、PEG鎖またはその他のリンカー様親水部）を介して高分子量ポリマーがフェノチアジン系化合物に結合していることが好ましく、その高分子量ポリマー自体も親水性を有していることがより好ましい。

[0076] <高分子ポリマー>

高分子量ポリマーは、一定の水準以上の分子量（重量平均分子量）を有するポリマーであり、レドックスメディエータとしての（親水部導入型）フェノチアジン系化合物と結合してそれを担持できる構造、すなわち親水部導入型フェノチアジン系化合物の親水部が有する特定反応基またはフェノチアジン系化合物の特定結合性置換基が有する特定反応基と反応可能な反応基（本発明における、高分子量ポリマーの「特定反応基」）を有し、かつ作用極上に試薬層を形成することのできるものであればよい。高分子量ポリマーの種類（主鎖および側鎖の構造等）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。

[0077] 高分子量ポリマーの分子量（重量平均分子量）は、通常は10000以上、好ましくは50000以上、より好ましくは100000以上の重量平均分子量を有するポリマーを指す。高分子量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、通常1000000未満、好ましくは1000000未満である。

[0078] 高分子量ポリマーの重量平均分子量や分子量分布は、高分子量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）や、高分子量ポリマーがタンパク質であればSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法などを用いることができる。また、高分子量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_w」、「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。

[0079] 高分子量ポリマーの主鎖は、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、鎖状の構造である。また、1分子の高分子ポリマーに複数（多数）の（親水部導入型）フェノチアジン系化合物を担持できるようにする観点から、高分子量ポリマーは、側鎖に（親水部導入型）フェノチアジン系化合物と結

合するための特定反応基を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。そのような主鎖および特定反応基（側鎖および／または末端）を有する高分子量ポリマーとしては様々なものが公知となっており、また適切なモノマーを用いることで合成することが可能である。高分子量ポリマーは、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又はブロックポリマーのいずれであってもよい。

[0080] <高分子量ポリマーの特定反応基>

本発明における高分子量ポリマーが有する特定反応基は、親水部導入型フェノチアジン系化合物と結合させる場合（つまり親水部を介してフェノチアジン系化合物と結合させる場合）はその親水部の特定反応基と反応可能なものであればよく、親水部を介さずにフェノチアジン系化合物と結合させる場合はフェノチアジン系化合物自体が有する特定反応基と反応可能なものであればよい。そのような反応基は特に限定されるものではなく、公知の様々な反応基から選択することができる。高分子量ポリマーの特定反応基としては、例えば、「カルボキシ基またはその活性エステル体（例えばNHS体）、アミノ基、チオール基、ホルミル基（アルデヒド基）、チオール基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種」が好ましい。また、高分子量ポリマーの特定反応基は、必要に応じて保護基が結合していてもよく、高分子量ポリマーと（親水部導入型）フェノチアジン系化合物とを結合させるための反応前に脱保護してもよい。

[0081] 高分子量ポリマーの特定反応基は、高分子量ポリマーの合成に用いられたモノマーが元来有するものであってもよいし、後から導入されたもの、例えば高分子量ポリマーを合成するためのモノマーが元来有する反応基に、さらなる反応性置換基を導入することによって付加されたものであってもよい。なお、後者のような実施形態における「反応性置換基」は、フェノチアジン系化合物との関係で前述した、(iii) ~ (viii) の置換基が有していてもよ

い、(a) ~ (m) の少なくとも1つを含む基と同様である。上記どちらの実施形態であっても、高分子量ポリマーは特定反応基を「有する」といえる。

[0082] 高分子量ポリマーの具体例としては、アミノ酸系ポリマー、イミン系ポリマー、エチレン系ポリマーなどであって、側鎖（および末端）に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も高分子量ポリマーに包含される。適切な反応基を有する、または適切な反応基が導入された多糖類系ポリマーも、高分子量ポリマーに包含される。

[0083] 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）、メチルメタクリレート（メタクリル酸メチル）、ブチルアクリレート（アクリル酸ブチル）、ブチルメタクリレート（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。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。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－コ－ 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。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。

[0084] 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(エチレンイミン)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： $-NH_2$ が当該高分子量ポリマーの特定反応基となり、それに対応する適切な特定反応基（例えばカルボキシ基）を含む（親水部導入型）フェノチアジン系化合物と結合することができる。

[0085] 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)、ポリ(Ｌ－グルタミン酸)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。ポリ(Ｌ－グルタミン酸)は、側鎖に $-COOH$ 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： $-NH-C(=NH)-NH_2$ ）、カルボキシ基： $-COOH$ などが当該高分子量ポリマーの特定反応基となり、対応する適切な特定反応基（例えば、カルボキシ基またはアミノ基）を有する（親水部導入型）フェノチアジン系化合物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)、ポリ(Ｌ－グルタミン酸ナトリウム)のように、塩を形成していてもよい。

[0086] 多糖類系ポリマーとしては、例えば、キトサンや、カルボキシメチルセルロース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。カルボキシメチルセルロースは、例えば、セルロースをアルカリ処理した後、モノハロ酢酸と反応させることにより得られるセルロース誘導体であり、側鎖にカルボキシメチル基を有する。これらの多糖類系ポリマーの側鎖に含まれるアミノ基やカルボキシ基などが当該高分子量ポリマーの特定反応基となり、対応する適切な特定反応基（例えば、カルボキシ基またはアミノ基）を有する（親水部導入型）フェノチアジン系化合物と結合することができる。

[0087] タンパク質としては、例えば、本発明において酸化還元酵素として用いられるグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）、グルコースオキシダーゼなどの酵素や、ブロッキング剤として周知慣用のウシ血清アルブミン（BSA）などが挙げられる。これらのタンパク質に含まれるアミノ酸残基のうち、例えば、リジン、アルギニンおよびヒスチジンは側鎖にアミノ基（またはグアニジノ基）を含み、アスパラギン酸およびグルタミン酸は側鎖にカルボキシ基を含み、システインは側鎖にチオール基（スルファニル基）を含む。したがって、そのようなアミノ酸残基を含むタンパク質は、対応する適切な特定反応基（例えばカルボキシ基またはアミノ基）を含む（親水部導入型）フェノチアジン系化合物と結合することができる。

[0088] 本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物の好ましい一実施形態において、高分子量ポリマーは「カチオン性ポリマー」である。「カチオン性ポリマー」は、上述したような高分子量ポリマーのうち、ポリマー全体の正味として正の電荷を有するものの総称である。一般的に、正に荷電する官能基を側鎖に有する高分子量ポリマー、すなわち主鎖の形成に関与しない部位に正に荷電する官能基を有するモノマーを用いて合成された高分子量ポリマーは、カチオン性ポリマーとなる。正に荷電する官能基としては、例えばアミノ基や、第四級アンモニウムカチオンが挙げられ、化学的安定性を有する第四級アンモニウムカチオンが好ましい。例えば、実施例のポリマーA、BおよびCとして開示した、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、ポリ(エチレンイミン)などが、カチオン性ポリマーとして挙げられる。また、側鎖にアミノ基(またはグアニジノ基)を有する、ポリ(L-リジン)、ポリ(L-アルギニン)などのアミノ酸系ポリマーや、キトサンなどの多糖類系ポリマーも、カチオン性ポリマーとして挙げられる。

[0089] <ポリマー結合型フェノチアジン系化合物の製造方法>

本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、所望の化学的構造を有する(親水部導入型)フェノチアジン系化合物と、所望の化学的構造を有する高分子量ポリマーとを、特にフェノチアジン系化合物の特定反応基または親水部導入型フェノチアジン系化合物の親水部の特定反応基と高分子量ポリマーの特定反応基の反応を考慮して、適切な条件(温度、時間、補助剤等)の下で反応させることにより合成することができる。合成されたポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、必要に応じてゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、透析等により精製し、低分子化合物を除去するようにしてもよい。

[0090] ポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、一般式(3A-1)および(3B-1)における $R(L)^1(QP)^1$ 、 $R(L)^2(QP)^2$ 、 $R(L)^4(QP)^4 \sim R(L)^8(QP)^8$ ならびに R^9 および R^{10} それぞれの構造により様々な種類のものを製造し、使用することができる。本発明では、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物は、例えば後述するような電気化学センサを製造するための、試薬層に含まれるレドックスポリマーとして、いずれか1種類を単独で使用することもできるし、2種類以上を組み合わせ使用することもできる。

[0091] — 試薬層 —

本発明の試薬層は、本発明の親水部導入型フェノチアジン系化合物または

ポリマー結合型フェノチアジン系化合物（以下「本発明のフェノチアジン系化合物等」と総称する。）を含む層である。この試薬層は、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。フェノチアジン系化合物（親水部導入型フェノチアジン系化合物、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物を構成している状態のものを含む。）はレドックスメディエータとして機能し、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物はレドックスポリマーとして機能する。本発明のフェノチアジン系化合物等の詳細（具体的な実施形態、好ましい実施形態、一般式等）は、本明細書において前述した通りである。試薬層は、いずれか1種類のフェノチアジン系化合物等を単独で含んでもよいし、2種類以上のフェノチアジン系化合物等を組み合わせて（例えば、2種類以上のフェノチアジン系化合物等の混合物として、または各フェノチアジン系化合物等を含む層を積層した状態で）含んでもよい。

[0092] 試薬層は、必要に応じて、アナライトに対応した「酸化還元酵素」を含んでもよい。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を含むかを、選択することができる。

[0093] 試薬層は、必要に応じてその他の成分をさらに含んでもよい。その他の成分としては、例えば、カーボン粒子等の導電性粒子や緩衝液成分などが挙げられる。

[0094] 「酸化還元酵素」は、電気化学センサ等が対象とするアナライトを酸化または脱水素化することができる酵素を指す。酸化還元酵素としては、例えば、オキシダーゼ系の酵素（グルコースオキシダーゼ、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、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。

[0095] 酸化還元酵素は、本発明のポリマー結合型フェノチアジン系化合物と架橋していてもよい。例えば、架橋剤（例：グルタルアルデヒド）を、タンパク質である酸化還元酵素が有する反応基（例：アミノ基）と、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物を構成している高分子量ポリマーが（（親水部導入型）フェノチアジン系化合物とは反応しなかった（親水部結合用）反応基として、または（親水部導入型）フェノチアジン系化合物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）の双方と反応させることにより、架橋剤を介して酸化還元酵素とポリマー結合型フェノチアジン系化合物を結合させることができる。酸化還元酵素を結合させることにより、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物および酵素が分子量のより大きな複合体となり、フェノチアジン系化合物（レドックスメディエータ）および酵素の保護膜外への流出をより抑制することができる。また、架橋剤を用いることにより、酸化還元酵素同士が架橋することもある。ポリマー結合型フェノチアジン系化合物と架橋させない場合は、酸化還元酵素は、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物と混合した状態で、試薬層中に含まれていればよい。

[0096] 試薬層は、試薬層を形成するための原料を含む試薬液を調製した後、基板上に塗布し、乾燥させることにより形成することができる。試薬液は、少なくとも本発明のフェノチアジン系化合物等を含み、必要に応じて酸化還元酵

素、架橋剤、その他の成分（例えば導電性カーボンブラック）を含むことができ、これらの原料を混合し、必要に応じて分散処理（例えば、酸化還元酵素を添加する前に行われる、導電性カーボンブラック等の超音波処理）をすることにより調製することができる。試薬液を塗布する基板は、典型的には、電気化学センサの作用極であり、例えば、絶縁性基板の両面に、炭素又は導電性金属材料（金、銀、白金、パラジウム等）を用いて、スクリーン印刷、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティングなどにより形成された、導電性薄膜を備えるものである。この導電性薄膜の表面に試薬液を塗布し、乾燥させることにより、導電性薄膜の上面に試薬層が形成された作用極が得られる。試薬液の組成や、塗布面の面積および塗布量を調節することにより、所望の厚さの試薬層を形成することができる。

[0097] — 電気化学センサ —

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。

[0098] 「保護膜」は、試薬層に含まれる物質（レドックスメディエータとしての（親水部導入型）フェノチアジン系化合物、酸化還元酵素等）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。

[0099] 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。なお、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物との関係で前述した、高分子量ポリマーの具体例として言及した生体適合性ポリマーを、保護膜を形成するために利用することもできる。

[0100] 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。

[0101] 本発明の電気化学センサは、必要に応じて参照電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、対極および参照電極により構成される三電極式とすることもできる。

[0102] 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。

[0103] 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。

- [0104] 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。
- [0105] 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。
- [0106] 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 μ m、好ましくは500～50 μ mである。
- [0107] 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と、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 2 2 b および対極 2 2 c を含んでいる。作用極 2 2 a および参照極 2 2 b は、溝 A 1 によって物理的かつ電氣的に分離されており、参照極 2 2 b および対極 2 2 c は、溝 A 2 によって物理的かつ電氣的に分離されている。試薬層 2 3 は作用極 2 2 a 上に形成されている。銀／塩化銀層 2 4 は参照極 2 2 b 上に形成されている。フィルム 2 5 は、電極 2 2 の一部（頭部の領域 X 1 のうち領域 X 4 の部分、対極 2 2 c の領域 X 3 の部分等）および試薬層 2 3 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 1 1 の上面を被覆している。なお、電極 2 2 の露出している領域 X 4 は、本体 1 1 の回路と接続される。

[0108] なお、図 1（B）の領域 X 5 によって示されているように、センサ 1 1 の先端には（先端から所定の距離にわたって）試薬層 2 3 は形成されないことが好ましい。別言すれば、試薬層 2 3 は、センサ 1 1 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 1 1 が生体内に挿入されるときに、試薬層 2 3 がセンサ 1 1 から剥がれる（めくれる）のを抑制できるからである。

[0109] 図 2（A）は、図 1（B）の A A 矢視断面図である。センサ 1 1 の試薬層 2 3 が形成されている部分には、基板 2 1、電極 2 2（作用極 2 2 a）および試薬層 2 3 がこの順に積層されている。1 1 a および 1 1 b の部分において、電極 2 2（作用極 2 2 a）、試薬層 2 3 およびフィルム 2 5 は積層されており（トリミングされており）、基板 2 1 は露出している。

[0110] 図 2（B）は、図 1（B）の B B 矢視断面図である。溝 A 1 に対して右側の、銀／塩化銀層 2 4 が形成されている部分には、基板 2 1、電極 2 2（参照極 2 2 b）、銀／塩化銀層 2 4、およびフィルム 2 5 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、露出していてもよい。

[0111] 図2 (C) は、図1 (B) のCC矢視断面図である。溝A2に対して右側の部分には、基板21および電極22 (対極22c) が積層されている。対極22cの上面はフィルム25で被覆されず、露出している。溝A1と溝A2に挟まれた部分には、基板21、電極22 (参照極22b) およびフィルム25が積層されている。溝A1の左側の部分には、基板21、電極22 (作用極22a) およびフィルム25が積層されている。

[0112] 基板21は、典型的にはシート状の合成樹脂である。基板21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21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。

[0113] 電極22は、基板21上に形成されている薄膜 (薄層) である。電極22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22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11の上面および下面の一方に作用極22a (試薬層23) を形成し、他方に対極22c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。

[0114] 作用極22a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22b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22aと対極22c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23は、センサ11の先端部分における作用極22aの上面に形成される。

[0115] 銀/塩化銀層24は、必要に応じて、センサ11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 S M B G 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（A g / A g C l）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。

[0116] 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 $1\ \mu\text{m}$ 以上 $150\ \mu\text{m}$ 以下、好ましくは $3\ \mu\text{m}$ 以上 $50\ \mu\text{m}$ 以下、より好ましくは $5\ \mu\text{m}$ 以上 $30\ \mu\text{m}$ 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。

[0117] 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。上記の基板 2 1 と同じ樹脂材料のシートは、基板 2 1 とは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。

[0118] 試薬層 2 3 を形成するための試薬液は、フィルム 2 5 の対応する部分にある開口から、電極 2 2（作用極 2 2 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 2 5 の表面に対する試薬液の接触角（ α ）は、フィルム 2 5 の開口部、すなわち露出している作用極 2 2 a の表面に対する試薬液の接触角（ β ）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、 α は 90° 以上であり、かつ β は 50° 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 22a 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 22a 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。

[0119] 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。

[0120] 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 22a、参照極 22b および対極 22c 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 22b) 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 22 (作用極 22a) の上面に、試薬層 23 を形成する工程

(vi) 試薬層 23 および電極 22 の一部 (領域 X6) を除去する工程

(vii) 基板 21 からセンサ 11 を切り出す工程

(viii) 保護膜を形成する工程

[0121] 上記工程 (i) について、電極 22 の形成 (積層) 方法は、電極 22 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。

[0122] 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、例えばレーザトリミングを用いることができる。

[0123] 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。

[0124] 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 2 5 に、試薬層 2 3 の寸法に対応した（少なくとも試薬層 2 3 の寸法よりも大きな）開口が形成しておく。そのようなフィルム 2 5 を、その開口が電極 2 2 （作用極 2 2 a）の試薬層 2 3 を形成する部分を取り囲むよう、電極 2 2 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。

[0125] なお、電極 22 のうち対極 22 c の一部（領域 X 3）の上面にはフィルム 25 は形成されず、対極 22 c 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 22 c の上面も含めてフィルムを形成した後、カットイ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。

[0126] 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 22 a 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 22 a の上面に試薬層 23 が形成される。

[0127] なお、フィルム 25 の開口は、例えば、センサ 11（図 11（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。

[0128] 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）の所定の長さにわたって行われる。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 2 3 の材料（試薬液の組成）および電極 2 2 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 2 3 および電極 2 2 は、レーザートリミングにより除去することができる。

[0129] 上記工程 (vii) について、センサ 1 1 を基板 2 1 から切り出す（カッティングする）方法は、基板 2 1 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 2 1 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。

[0130] 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 2 3 および作用極 2 2 a から多少離れた位置においてカッティングされる。

[0131] 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 2 3 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 2 2 a（少なくとも試薬層 2 3 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。

[0132] 図 3 は、本発明の他の実施形態におけるセンサ 1 0 1 を表す平面図である。センサ 1 0 1 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）1 2 1、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 1 2 2 から構成される。

[0133] 図 4 は、図 3 の A-A' 切断線でのセンサ 1 0 1 の断面図を示す。絶縁性基板 1 1 1 の両面に導電性薄膜 1 1 2 を備える。絶縁性基板 1 1 1 の一方の面（表側）の導電性薄膜 1 1 2 は、レーザー描写によって絶縁性基板 1 1 1 の表面に達する深さの溝 1 1 3 を形成し、電氣的に絶縁することで、作用極領域 1 1 2 a と参照電極領域 1 1 2 b に分離されている。

[0134] 絶縁性基板 1 1 1 の上面は、参照電極領域 1 1 2 b の所定の位置に、参照

電極 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 112 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。

[0135] 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、参照電極 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。

[0136] 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）の内部回路と電気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）220 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 220 が形成された後の電極パターンを示す。

[0137] 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 220 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

[0138] 以下、実施例および比較例を通じて、本発明の実施形態をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は本実施例に開示されている実施形態によって限定的に解釈されるのではなく、本実施例に開示されている実施形態と同様に本発明の作用効果を奏する他の実施形態を包含するものと解釈されるべきである。

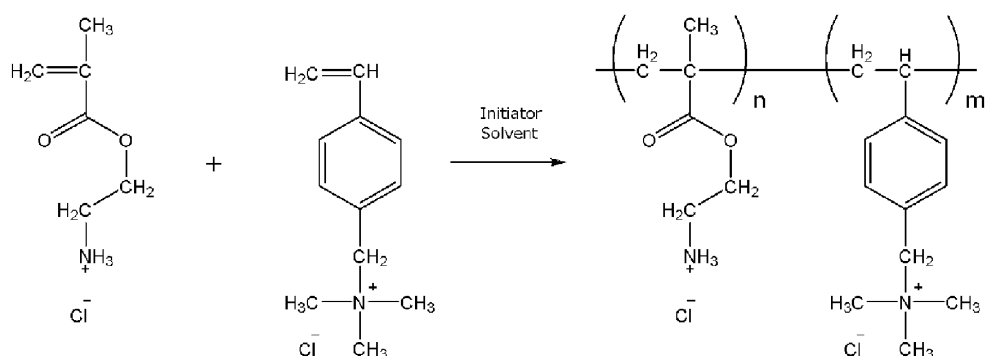
[0139] 以下の実施例および比較例では、フェノチアジン系化合物として、3-(4'-カルボキシフェニル)イミノ-3H-フェノチアジン (Glanren 社製)、チオニン (富士フイルム和光純薬株式会社製)、アズール A (富士フイルム和光純薬株式会社製)、アズール B (富士フイルム和光純薬株式会社製)、アズール C (MP Biomedicals 社製または富士フイルム和

光純薬株式会社製）、メチレンブルー（MP Biomedicals 社製）およびトルイジンブルー（東京化成工業株式会社製）を用いた。これらのフェノチアジン系化合物は「PNT 化合物」と総称する。

[0140] 以下の実施例および比較例で用いた、ポリマー A、ポリマー B およびポリマー C は、それぞれ下記の手順に従って得られたポリマーである。

〔0141〕 「ポリマーAの合成」

[化,13]

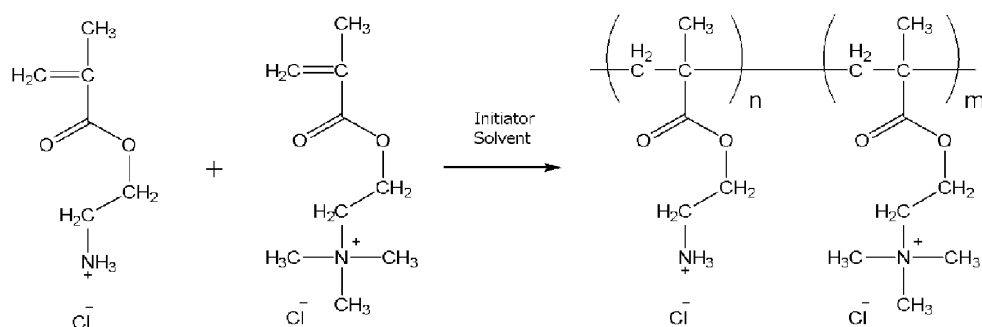


[0142] まず、2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩と、(ビニルベンジル)トリメチルアンモニウムクロリドとを用意した。そして、4つ口フラスコに2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩を7.36 mmol、(ビニルベンジル)トリメチルアンモニウムクロリドを7.36 mmol、2, 2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩（以下「V-50」と称する。）を0.07 mmol、イオン交換水を11.11 g投入した。続いて、スターラーチップ、温度計、減圧／Arガスラインを4つ口フラスコにセットした。室温で攪拌しながら、減圧／Arガスラインを用いて4つ口フラスコ内の減圧とArガスの供給とを10回繰り返してフラスコ内の試料を脱気した。脱気処理の後に4つ口フラスコを密閉し、反応温度60℃で24時間（必要に応じて反応時間は適宜調整した。）、重合反応を行った。重合の進行および終了は、¹H-NMRでモノマーの消失を計測することで確認した。反応終了後、反応液を透析膜（MWCO：3500）に入れ、3日間透析した。その際、1日に2回液を交換した。透析終了後、得られた反応物を凍結乾燥

してポリマーAを得た。ポリマーAは、 $^1\text{H-NMR}$ の結果からモル比を算出した結果、 $n : m = 48.5 : 51.5$ であるポリマーに相当する。

[0143] [ポリマーBの合成]

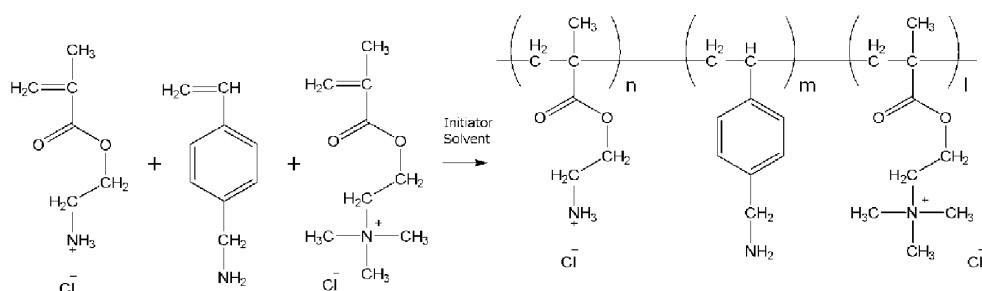
[化14]



[0144] まず、2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩と、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1.14 mmol、メタクロイルコリンクロリドを10.22 mmol、V-50を0.06 mmol、イオン交換水を8.71 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Bを得た。ポリマーBは、 $^1\text{H-NMR}$ の結果からモル比を算出した結果、 $n : m = 13.3 : 86.7$ であるポリマーに相当する。

[0145] [ポリマーCの合成]

[化15]



[0146] 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、¹H-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37774であり、重量平均分子量M_wは214367であった。

[0147] [参考実施例1-1~1-5および参考比較例1-1~1-2]

PNT化合物として、3-(4'-カルボキシフェニル)イミノ-3H-フェノチアジン(参考比較例1-1)、チオニン(参考比較例1-2)、アズールA(参考実施例1-1)、アズールB(参考実施例1-2)、アズールC(参考実施例1-3)、メチレンブルー(参考実施例1-4)およびトルイジンブルー(参考実施例1-5)を用いて、下記の手順に従って、光学試験および酸化還元反応試験を行った。

[0148] <光学試験>

各PNT化合物を、100 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.4)で0.01~0.2 mMの範囲で適した濃度になるようにして水溶液を調製し、ビオラモ紫外線透過型ディスプレイ セミマイクロタイプとAgilent 8453紫外可視分光光度システムを用いて吸光スペクトルを測定した。測定後、各PNT化合物の水溶液を40℃環境下で保存し、その後は随時取り出して測定を行い、14日目または15日目まで経時変化を確認した。

[0149] <酸化還元反応試験>

サイクリックボルタンメトリーによる酸化還元反応の測定を行った。測定は、100 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.4)で0.1 mMに調製した各PNT水溶液を用いて、作用極にガラス状カーボン電極、対極に白金ワイヤー、参照電極にAg/AgCl電極(飽和KCl)を使用して、ポテンショスタットにより行った。掃引速度は0.1 V/Sec.に設定し

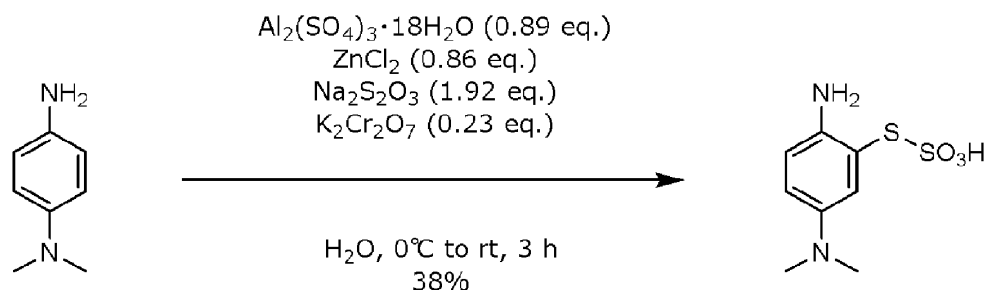
た。各種電極及びポテンシostatは、電気化学で一般的に用いられるものとして、ビー・エー・エス社製のものを使用した。測定後、各PNT化合物の水溶液を40℃環境下で保存し、その後は随時取り出して測定を行い、所定の日数まで経時変化を確認した。

[0150] 上記試験の結果を図8、図9および図10に示す。経時的に測定した吸光スペクトルとサイクリックボルタモグラムから、フェノチアジン骨格の3位にイミニウムカチオンを有するPNT化合物（参考実施例1-1～1-5）は、同位置にイミノ基を有するPNT化合物（参考比較例1-1）やアミノ基を有するPNT化合物（参考比較例1-2）と比較して、高い保存安定性を有することが明らかとなった。

[0151] [実施例2-1] 特定結合性置換基に結合した、親水部導入用化合物に由来する親水部（ $-\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{NH}-\text{PEG}3-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ ）を有するPNT化合物（PNT-66）

[0152] (1) スルホン酸フラグメントの合成

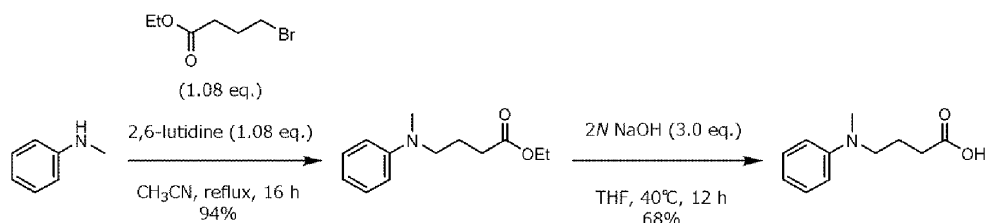
[化16]



上記の反応により、スルホン酸フラグメントを合成した。

[0153] (2) スルホン酸フラグメントの合成

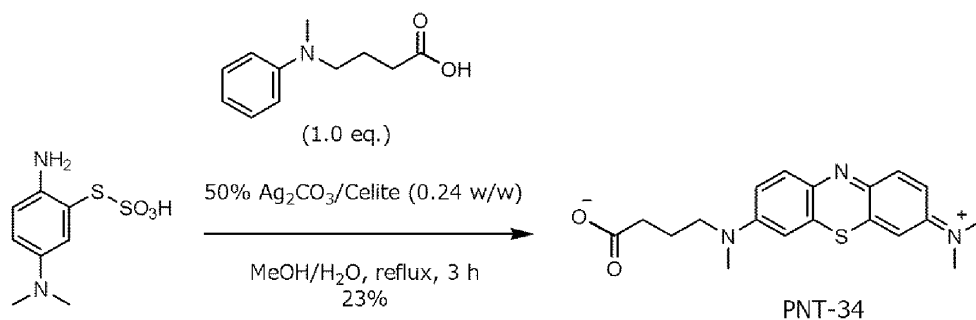
[化17]



上記の反応により、カルボン酸フラグメントを合成した。

[0154] (3) PNT-34の合成

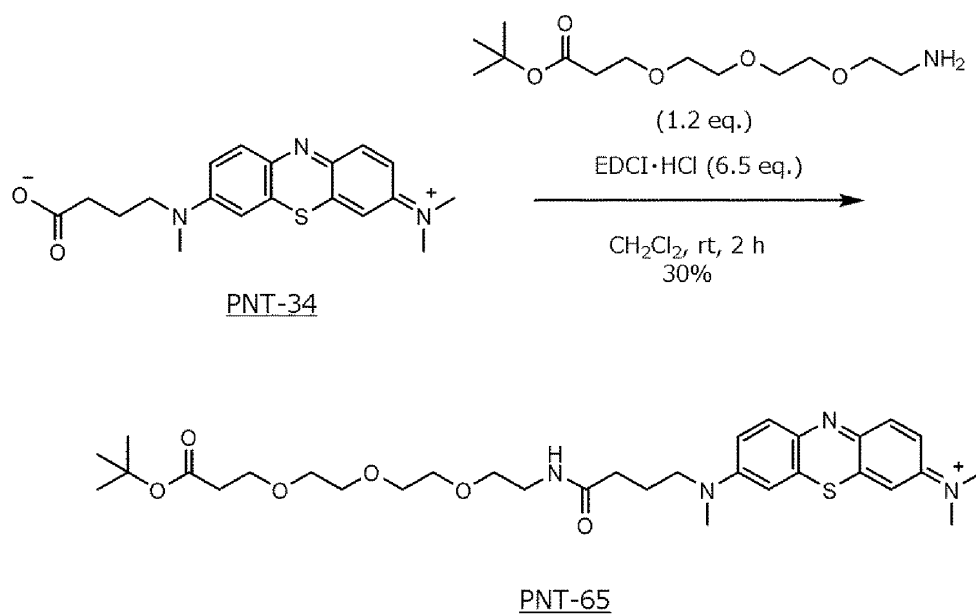
[化18]



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_2O に懸濁させ、内温 47°C 付近で50% Ag_2CO_3 /セライトを15分かけて分割添加した。添加後、内温 68°C 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。

[0155] (4) 縮合体 (PNT-65) の合成

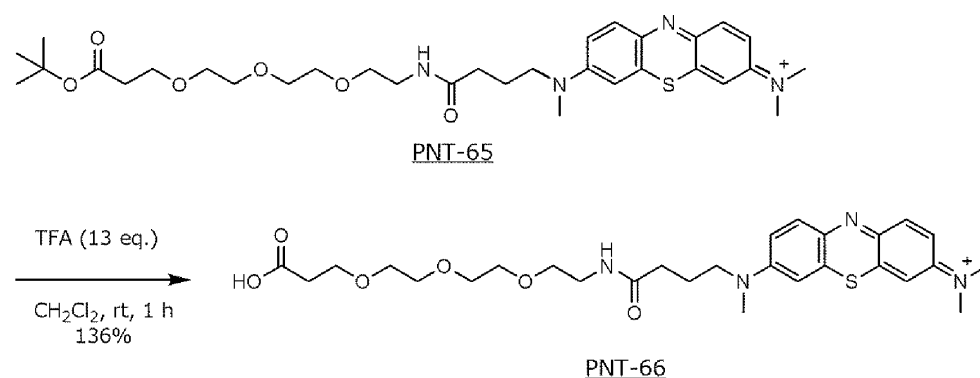
[化19]



PNT-34 をジクロロメタンに溶解させ、溶液 (1) を調製した。アミノPEG3-*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) をジクロロメタンに懸濁させ、懸濁液 (2) を調製した。懸濁液 (2) を溶液 (1) に添加し、室温下、2 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2回精製することで縮合体 (PNT-65) を得た。

[0156] (5) 脱保護体 (PNT-66) の合成

[化20]

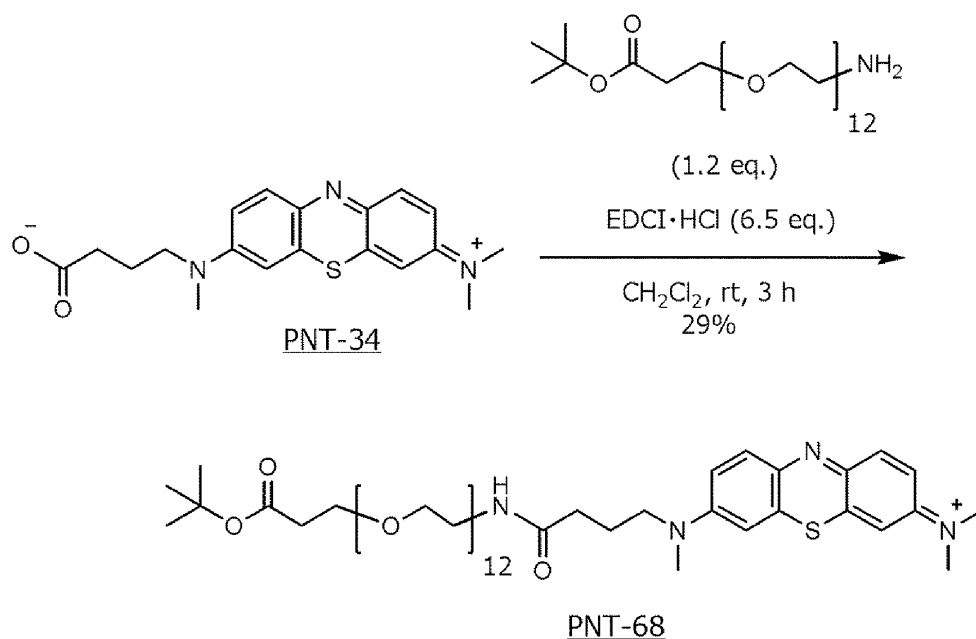


縮合体 (PNT-65) をジクロロメタンに溶解させ、TFA を添加した後、室温下、1 時間攪拌した。反応液を濃縮後、トルエンで数回共沸させることで脱保護体 (PNT-66) を得た。

[0157] [実施例 2-2] 特定結合性置換基に結合した、親水部導入用化合物に由来する親水部 (−N(CH₃)(CH₂)₃−CO−NH−PEG12−(CH₂)₂−COOH) を有する PNT 化合物 (PNT-69)

(1) 縮合体 (PNT-68) の合成

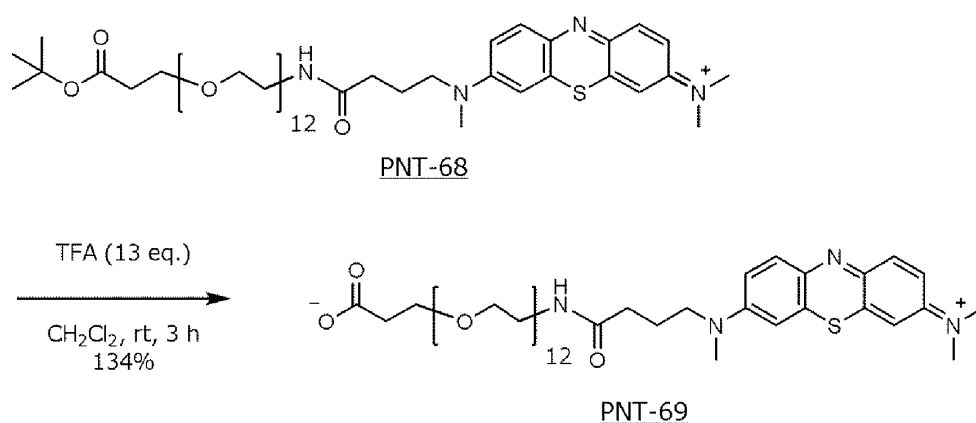
[化21]



Ar雰囲気下、PNT-34（実施例2-1参照）をジクロロメタンに溶解させ、アミノPEG12-tertブチルエステルおよび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。

[0158] (2) 脱保護体（PNT-69）の合成

[化22]



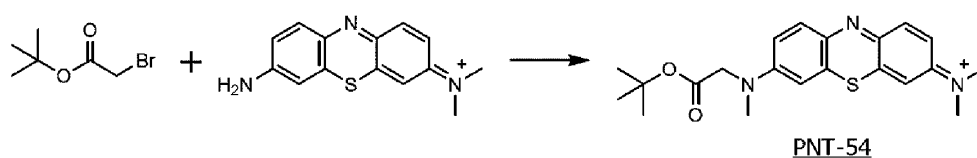
(1) で得られた縮合体（PNT-68）をジクロロメタンに溶解させ、

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。

[0159] [実施例2-3] 特定結合性置換基に結合した、親水部導入用化合物に由来する親水部（ $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{PEG}12-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ）を有するPNT化合物（PNT-63）

[0160] （1）工程1：アルキル化反応によるフェノチアジン系化合物の合成

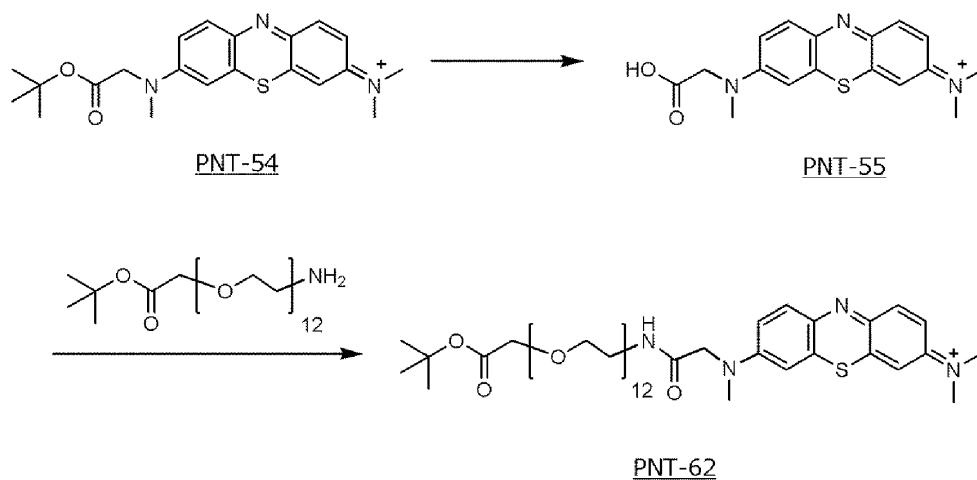
[化23]



アズールA 100mg（343.57 μmol ）をDMF 2mLに溶解（懸濁）し、*t*-ブチルブロモアセテート 355mg（1,710.9 μmol ）に続き、炭酸カリウム（ K_2CO_3 ） 226mg（1,635 μmol ）を加え、室温で3時間攪拌した。ヨウ化メチル 244mg（1,718 μmol ）を加えて室温で2時間攪拌した。濾過して不溶物を除去後、シリカゲルカラム（メタノール／クロロホルム、ステップワイズ）に続いてODSカラム（0.1%TFA／メタノール、リニアグラジエント）により生成して、PNT-54を40mg得た。

[0161] （2）工程2：親水部導入用置換基の脱保護およびアミド化反応による親水部の導入

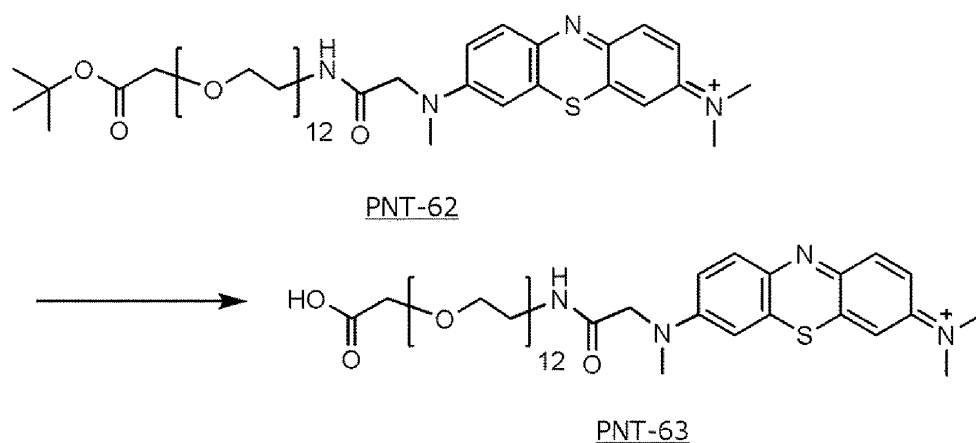
[化24]



PNT-54 53 mg に TFA 1 mL を加え、室温で 1 時間攪拌した。減圧で TFA を除去した後、 $\text{NH}_2\text{-PEG}13\text{-COOtBu}$ 40.5 mg ($96.4 \mu\text{mol}$) と WSC 123 mg ($642.6 \mu\text{mol}$) を溶解した DMF 溶液を一気に加えた。室温で 1 時間攪拌した後に減圧濃縮して DMF を除去し、ODS カラムに続き HPLC カラムにより (0.1% TFA / 水、アセトニトリルリニアグラジエント) 精製し、PNT-62 を 17.7 mg 得た。

[0162] (3) 工程 3 : 親水部の脱保護

[化25]



PNT-62 21 mg に TFA 1 mL 室温で 1 時間攪拌した。減圧で T

F Aを除去し、そのまま減圧乾燥して、目的物であるPNT-63を20mg得た。

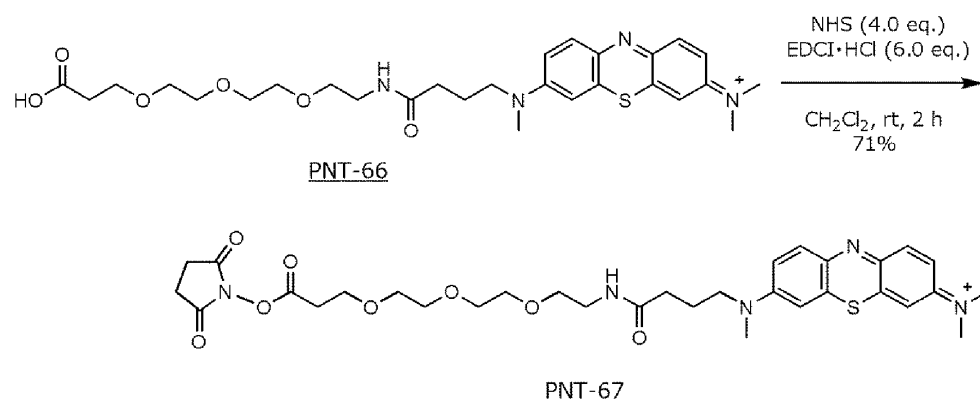
[0163] <光学試験および酸化還元反応試験>

実施例2-1～2-3それぞれの脱保護体について、pH7.4のリン酸ナトリウムバッファーに加えて、pH6.2およびpH8.0のリン酸ナトリウムバッファーも用いて試験したこと以外は、前述した参考実施例および参考比較例における手順と同様にして、光学試験および酸化還元反応試験を行った。結果を図11、図12および図13に示す。経時的に測定した吸光スペクトルとサイクリックボルタモグラムから、フェノチアジン骨格の3位にイミニウムカチオンを有すると共に、フェノチアジン骨格の他の部位（6位）に親水部（PEG鎖）が導入されたPNT化合物も、高い保存安定性を有することが明らかとなった。

[0164] [実施例3-1] ポリ(L-リジン)と結合したPNT-66の作製

(1) PNT-66 NHS体 (PNT-67) の合成

[化26]



脱保護体 (PNT-66) 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、2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2回精製することで、PEG鎖 (PEG3) の末端のカルボキシ基が活性化 (NHSエステル化) されたPNT-66 NHS体 (PNT-67) を得た。

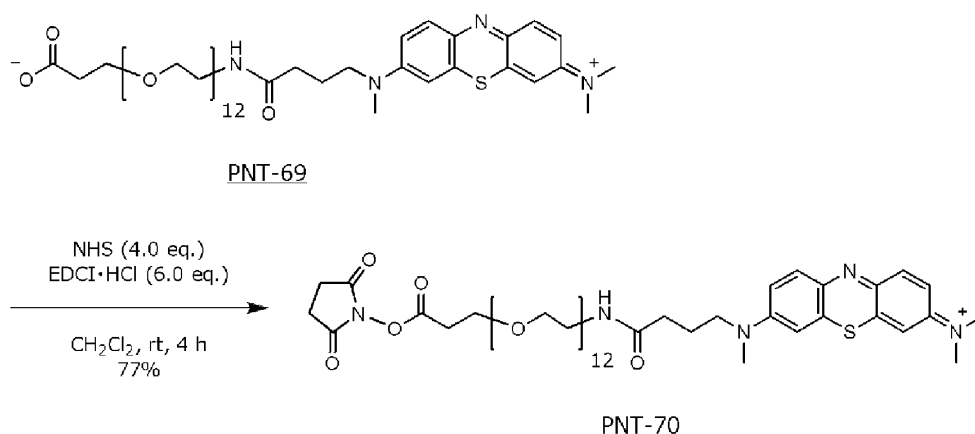
[0165] (2) ポリ(L-リジン)との結合

(1) で得られた PNT-66 NHS 体 (PNT-67) を 15 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(1))。高分子量ポリマーとして、ポリ(Ｌ-リジン)塩酸塩 (ALAMANDA POLYMERS PLKC800) を 10 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(2))。次に、WSC (DOJINDO W001) を 20 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(3))。液(1)を $43.7 \mu\text{L}$ 、液(2)を $51.3 \mu\text{L}$ 、液(3)を $479.3 \mu\text{L}$ 、別途調製した 250 mM ２-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) を $96 \mu\text{L}$ 混合し、Milli Q 水で合計体積 $1200 \mu\text{L}$ 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 50 k ; 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。

[0166] [実施例 3-2] ポリマー A と結合した PNT-69 の作製

(1) PNT-69 NHS 体 (PNT-70) の合成

[化27]



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 (PEG 12) 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。

[0167] (2) ポリマーAとの結合

PNT-69 NHS体 (PNT-70) を 21.05 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(1))。高分子量ポリマーとして、ポリマーAを 15 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(2))。次に、WSC (DOJINDO W001) を 20 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(3))。液(1)を $50 \mu\text{L}$ 、液(2)を $104.1 \mu\text{L}$ 、液(3)を $479.3 \mu\text{L}$ 、別途調製した 250 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 (pH 6.0) を $96 \mu\text{L}$ 混合し、Milli Q 水で合計体積 $1200 \mu\text{L}$ 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 50 k ; 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。

[0168] [実施例3-3] ポリマーBと結合したPNT-69の作製

PNT-69 NHS体 (PNT-70) を 21.05 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(1))。高分子量ポリマーとして、ポリマーBを 15 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(2))。次に、WSC (DOJINDO W001) を 20 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(3))。液(1)を $50 \mu\text{L}$ 、液(2)を $405.2 \mu\text{L}$ 、液(3)を $479.3 \mu\text{L}$ 、別途調製した 250 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 (pH 6.0) を $96 \mu\text{L}$ 混合し、Milli Q 水で合計体積 $1200 \mu\text{L}$ 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 50 k ; 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。

[0169] [実施例3-4] ポリマーCと結合したPNT-69の作製

PNT-69 NHS体 (PNT-70) を 21.05 mg/mL になるように Milli Q 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 Milli Q 水で溶解させた (液(2))。次

に、WSC (DOJINDO W001) を 20 mg/mL になるように Milli Q 水で溶解させた (液(3))。液(1)を $40\text{ }\mu\text{L}$ 、液(2)を $140.3\text{ }\mu\text{L}$ 、液(3)を $383.4\text{ }\mu\text{L}$ 、別途調製した 250 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) を $96\text{ }\mu\text{L}$ 混合し、Milli Q 水で合計体積 $1200\text{ }\mu\text{L}$ 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 50 k ; 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。

[0170] <光学試験>

実施例 3-1 ~ 3-4 それぞれの、高分子量ポリマーと結合した PNT-66 または PNT-69 (ポリマー結合型 PNT) について、回収したポリマー結合型 PNT の溶液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (タカラバイオ PBS Tablets T9181) で所定の濃度に調整し、マイクロプレートに $150\text{ }\mu\text{L}$ 投入し、プレートリーダーを用いて吸収スペクトルを測定した。また測定後には、 37°C 下で保存し、7 日目、14 日目に取り出して再度測定を行った。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) 96 Well Flat Bottom 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。

[0171] 結果を図 14 に示す。測定結果より、 37°C 保存後 14 日目においても、スペクトル形状に顕著な変化がないことから、種々のポリマー結合後の PNT は高い保存安定性を有することが示された。

[0172] また、実施例 3-2 ~ 3-4 で作製した各ポリマー結合型 PNT (高分子量ポリマー A、B または C と結合した PNT-69) については、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の代わりに、 $\text{pH} 6$ または $\text{pH} 8$ のリン酸ナトリウム緩衝液 (リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムで調製) を用いたこと以外は上記と同様にして、吸収スペクトルを測定した。結果を図 15 に示す。これら 3 種類のポリマー結合型 PNT は、 $\text{pH} 6$ または $\text{pH} 8$ の

リン酸ナトリウム緩衝液中でも、PBS中と同様に、37℃保存後14日目においてもスペクトル形状に顕著な変化がなく、高い保存安定性を有することが示された。

[0173] <電気化学応答性試験>

(1) ポリマー結合型PNTの試薬の調製

実施例3-2～3-4で作製した各ポリマー結合型PNTおよびカーボン分散液の各試薬を表2に示す組成となるように混合し、約1時間反応させて、試薬を調製した。カーボン分散液はケッチェンブラックEC300J（ライオン・スペシャリティ・ケミカルズ株式会社）を5mg/mLのヒドロキシプロピルセルロース（NISSO HPC-L）溶液にカーボン濃度16mg/mLになるように混合し、超音波ホモジナイザーで3分以上処理することにより調製した。また、分散液の調製後および試薬の調製の際の使用前には、超音波バスで約10分処理した。各ポリマー結合型PNTの濃度は、各溶液を25倍希釈してマイクロプレートに100μL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、ストック溶液の濃度を確認し、その値を元に調整を行った。

[0174] [表2]

試薬名	終濃度	
カーボン分散液	5	mg/mL
各ポリマー結合型PNT	2	608nmの吸光度

[0175] (2) センサの作製

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(1)で調製した試薬を0.4μL塗布し、約15分乾燥させた。再度0.4μLの試薬を塗布後、オーバーナイトで乾燥させ、ポリマー結合型PNTを含む試薬層を備えた電極（ポリマー結合型PNT被覆電極）を得た。

[0176] (3) 評価

上記(2)で作製したポリマー結合型PNT被覆電極を作用極とし、対極に金電極、参照電極にAg/AgCl電極（飽和KCl）（ビー・エー・エ

ス社製)を用いる三電極式にて、ビー・エー・エス社製のポテンショスタットを用いてPBS中でサイクリックボルタメトリーを行った。スキャン速度は10 mV/sで行うとともに、各スキャン速度における酸化、還元ピーク電流値の測定も行った。

[0177] 結果を図16に示す。得られたサイクリックボルタモグラムより、酸化還元電流が観察されていることから、PNTはポリマー結合後にもメディエータとしての機能を有していることがわかる。また、酸化ピーク電流値(I_{pa})、還元ピーク電流値(I_{pc})がスキャン速度に比例することから、ポリマー結合後のPNTは電極上に吸着していることが示唆される。

[0178] <電気化学応答性・耐久性試験>

(1) ポリマー結合型PNTの試薬の調製

前述した「電気化学応答性試験」のときと同様にして、ポリマー結合型PNTの試薬を調製した。

[0179] (2) センサの作製

前述した「電気化学応答性試験」のときと同様にして、センサを作製した。

[0180] (3) 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(ter, ブチルメタクリレート- β -4-ビニルピリジン)(ポリマーソース社製、以下「tBuMA4VP」と称する) 終濃度7.11% (wt/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「TGMA4VP」と称する) 終濃度0.89% (wt/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「PEGDGE」と称する) 終濃度0.98% (wt/v)

・HEPES緩衝液(pH8.0) 終濃度5 mM

[0181] なお、tBuMA4VP、TGMA4VPおよびPEGDGEは、エタノールに溶解して用いた。tBuMA4VPの数平均分子量 M_n は、ポリ(ter, 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。TGMA4VP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。

[0182] (4) 保護膜用ポリマー溶液の被膜

上記(2)において作製した電極（ポリマー結合型PNT被覆電極）を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して、各電極上に保護膜を形成した。

[0183] (5) 評価

上記(4)において作製した電極を作用極とし、対極に金電極、参照電極にAg/AgCl電極（飽和KCl）（ビー・エー・エス社製）を用いる三電極式にて、ビー・エー・エス社製のポテンショスタットを用いてPBS、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10mV/sで行った。また、測定ではサイクリックボルタンメトリーで複数回周回させて得られたものを最終的なサイクリックボルタモグラムとした。測定後は電極を37℃の各溶液（測定溶液と同様）中に保存した。保存後1、4、7、19日目に同様の測定を行った。なお、RPMI培地は、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MES（2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate）（同仁化学社製）、MOPS（3-Morpholinopropanesulfonic acid monohydrate）（同仁化学社製）を用いた。

nic acid) (同仁化学社製) を各々終濃度 25 mM になるように加え、かつ pH 7.4 に調整した液を用いた。

[0184] 結果を図 17 に示す。37℃で保管後 19 日目、PBS 中、RPMI 培地中のどちらにおいても、大きな酸化還元ピークの減少が見られていない。このことから、ポリマー結合型 PNT の顕著な失活及び電極上からの流出が起きていないことがわかる。

[0185] <センサ評価試験>

(1) 試薬液の調製

以下に示す各試薬を以下の終濃度となるように混合し、約 1 時間反応させて試薬液を調製した。なお、カーボン分散液は、使用前に超音波バスで約 10 分処理した後に用いた。

- ・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 終濃度 5 mM
- ・カーボン分散液 終濃度 5 mg/mL
- ・各ポリマー結合型 PNT 終濃度 2 (608 nm の吸光度)
- ・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) 終濃度 2000 U/mL
- ・グルタルアルデヒド 25% 溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社製) 終濃度 0.01% (wt/v)

[0186] なお、リン酸ナトリウム緩衝液は、リン酸水素二ナトリウム (富士フイルム和光純薬株式会社製) と、リン酸二水素ナトリウム (富士フイルム和光純薬株式会社製) とで調製した。カーボン分散液は、ケッチェンブラック (EC300J : ライオン・スペシャリティ・ケミカルズ株式会社製) を 5 mg/mL のヒドロキシプロピルセルロース (NISSO HPCL 日本曹達株式会社製) 溶液にカーボン濃度 16 mg/mL となるように混合し、超音波ホモジナイザーで 3 分以上処理することで得た。各ポリマー結合型 PNT の濃度は、各ポリマー結合型 PNT の溶液を 25 倍希釈してマイクロプレートに 100 μ 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溶液における各 PNT の濃度を確認し、その値を基に調整した。

[0187] (2) 保護膜用ポリマー溶液の調製

前述した「電気化学応答性・耐久性試験」のときと同様にして、センサを作製した。

[0188] (3) センサ用電極の作製

スパッタリングにより絶縁基板上に金電極を形成した。各ポリマー結合型PNTを含有する試薬液を別々の金電極に0.4 μ L塗布し、約15分乾燥させた。この作業を計3回繰り返し、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、各金電極上に試薬層を形成した。試薬層を形成した各金電極を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し、各金電極上に保護膜を形成した。以上の工程により、各ポリマー結合型PNTを含有する試薬層と、試薬層を被覆する保護膜とを備えるセンサ用電極を得た。

[0189] (4) センサ評価

上記(3)により作製したセンサ用電極を作用極とし、対極としての金電極と、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、3電極式の電極部を作製した。そして、ポテンシヨスタット(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℃、PBSまたは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1000秒後から500秒毎に、理論値50 mg/dL、150 mg/dL、300 mg/dL、500 mg/dL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℃のPBSまたはRPMI培地中に保存した。また、保存後2日目、3日目に同様の測定を行った。なお、グルコース濃度50 mg/dL、150 mg/dL、300 mg/dL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とした。また、最終濃度の電流値は、グルコース濃度が500 mg/dLになるようにグルコース溶液を添加した後、480秒後、485秒後、490秒後、495

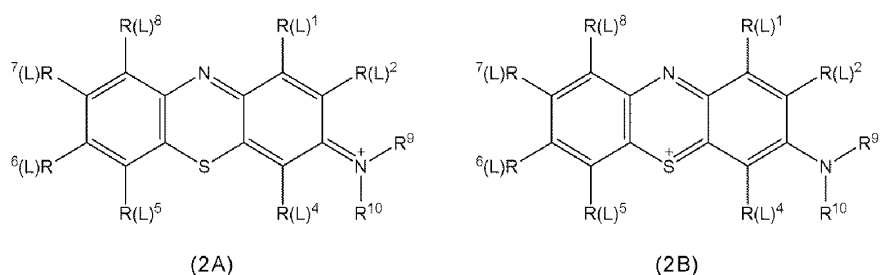
秒後および500秒後の5点の測定値から算出した平均値とした。なお、各グルコース濃度における電流値は、グルコース濃度0 mg/dLにおける電流値を減じるバックグラウンド補正処理を施した後の電流値である。

[0190] 結果を図18に示す。PBS中、RPMI培地中のどちらにおいても、グルコース濃度依存的な電流応答値の上昇が観測されている。このことから、ポリマー結合型PNTが酵素との反応性を有し、グルコースセンサとして機能することがわかる。また、保存3日目においても顕著な電流値の低下は観測されず、ポリマー結合型PNTと酵素の反応性が維持されていることが理解できる。

請求の範囲

[請求項1] 一般式（2A）または（2B）で表される、親水部導入型フェノチアジン系化合物：

[化1]



式中、

R^9 および R^{10} は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基、他方が水素原子であり、

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ はそれぞれ、[A] 置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数1～6の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基、[B] 前記[A]から選ばれる結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、あるいは[C] 水素原子またはハロゲン原子である。

ただし、 $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つは前記[B]の基である。

[請求項2] R^9 および R^{10} における置換基が、炭素数1～6のアルキル基である、請求項1に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項3] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する結合性置換基に、親水部導入用化合物

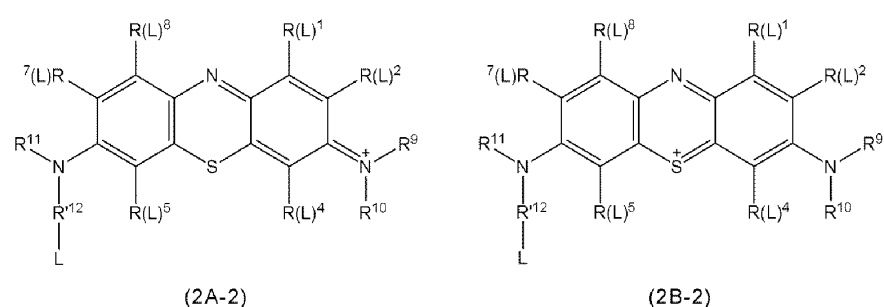
が結合することにより形成されている基である、請求項 1 に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項 4] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも 1 つが、 $-NR^{11}R^{12}$ (式中、 R^{11} および R^{12} は、いずれか一方が反応性 N 置換基であり、他方が水素原子または非反応性 N 置換基である。) で表される、置換基を有するアミノ基である結合性置換基に、親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である、請求項 1 に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項 5] 少なくとも $R(L)^6$ が、結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基である、請求項 1 に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項 6] 一般式 (2A-2) または (2B-2) で表される、請求項 1 に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物：

[化 2]



式中、 R^{11} は水素原子または非反応性 N 置換基であり、 R^{12} は反応性 N 置換基から誘導される基であり、 L は親水部導入用化合物に由来する親水部であり、それ以外の記号は一般式 (2A) および (2B) と同義である。

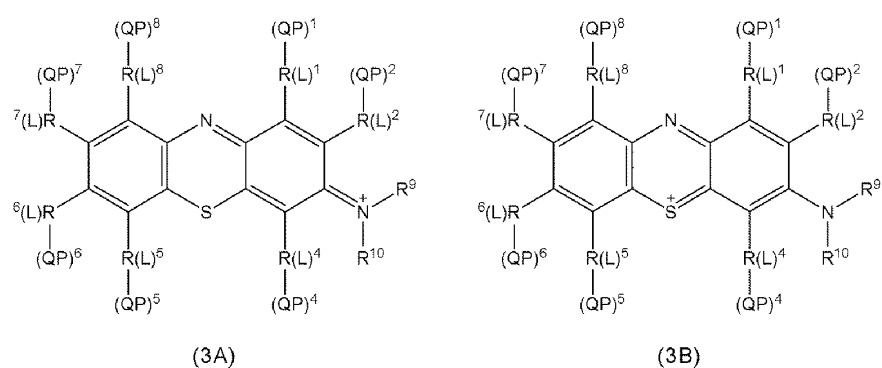
[請求項 7] 親水部導入用化合物に由来する親水部が、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホ基、第四級アンモニウムカチオン、およびそれらから誘導される基からなる群より選ばれる少なくとも一つを含む、請求項 1 に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項8] 親水部導入用化合物に由来する親水部が、オキシエチレン鎖を含む、請求項1に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項9] 親水部導入用化合物に由来する親水部が、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する、請求項1に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物。

[請求項10] 一般式(3A)または(3B)で表される、ポリマー結合型フェノチアジン系化合物：

[化3]



式中、

R^9 および R^{10} は、両方が置換基、またはいずれか一方が置換基、他方が水素原子であり、

$R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ はそれぞれ、[A]置換基を有していてもよいヒドロキシ基、置換基を有していてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい炭素数1～6の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、置換基を有していてもよいアシル基、または置換基を有していてもよいフェニル基、[B]前記[A]から選ばれる結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、

[C]水素原子またはハロゲン原子、あるいは[D]前記[A]から選ばれる結合性置換基または前記[B]の基のいずれかから誘導され

る基であり、

$(Q P)^1$ 、 $(Q P)^2$ および $(Q P)^4 \sim (Q P)^8$ はそれぞれ、対応する $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ が前記 [D] の基である場合に存在する、高分子量ポリマーに由来する高分子構造である。

ただし、 $(Q P)^1$ 、 $(Q P)^2$ および $(Q P)^4 \sim (Q P)^8$ の少なくとも1つが存在する。

[請求項11] R^9 および R^{10} における置換基が、炭素数1～6のアルキル基である、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項12] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する結合性置換基、または当該結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項13] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、 $-NR^{11}R^{12}$ （式中、 R^{11} および R^{12} は、いずれか一方が反応性N置換基であり、他方が水素原子または非反応性N置換基である。）で表される、置換基を有するアミノ基である結合性置換基、または当該結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

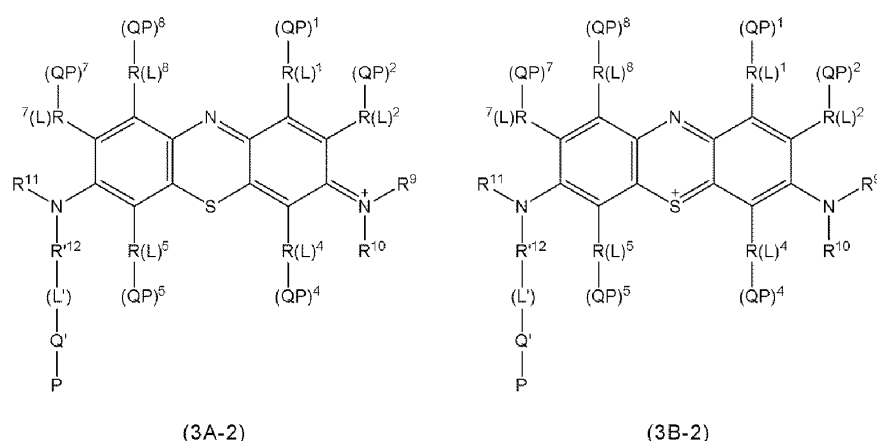
[請求項14] 少なくとも、 $R(L)^6$ が、結合性置換基、または当該結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成されている基、のいずれかから誘導される基である、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項15] 少なくとも、 $R(L)^6$ が、結合性置換基に親水部導入用化合物が結合することにより形成された基から誘導される基である、請求項10

に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項16] 一般式(3A-2)または(3B-2)で表される、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物：

[化4]



式中、 R^{11} は水素原子または非反応性N置換基であり、 R'^{12} は反応性N置換基から誘導される基であり、 (L') は、任意で存在する、親水部導入用化合物から誘導される基であり、 Q' は高分子量ポリマーの反応基から誘導される基であり、 P は高分子量ポリマーの主鎖であり、それ以外の記号は一般式(3A)および(3B)と同義である。

[請求項17] 親水部導入用化合物に由来する親水部が、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基、スルホ基、第四級アンモニウムカチオン、およびそれらから誘導される基からなる群より選ばれる少なくとも一つを含む、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項18] 親水部導入用化合物に由来する親水部が、オキシエチレン鎖を含む、請求項10に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項19] $R(L)^1$ 、 $R(L)^2$ および $R(L)^4 \sim R(L)^8$ の少なくとも1つが、結合性置換基に、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、エポキシ基およびマレイミド基からなる群より選ばれる少なくとも1種の反応基を有する親水部導入用化合物

が結合することにより形成されている基から誘導される基である、請求項 10 に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項20] 高分子量ポリマーが、アミノ酸系ポリマー、イミン系ポリマー、エチレン系ポリマーおよびタンパク質からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 10 に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項21] 高分子量ポリマーが、カチオン性の高分子量ポリマーである、請求項 10 に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物。

[請求項22] 請求項 1～9 のいずれか一項に記載の親水部導入型フェノチアジン系化合物、または請求項 10～21 のいずれか一項に記載のポリマー結合型フェノチアジン系化合物を含む、試薬層。

[請求項23] アナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素をさらに含む、請求項 22 に記載の試薬層。

[請求項24] 前記酸化還元酵素が、前記ポリマー結合型フェノチアジン系化合物と架橋されている、請求項 22 に記載の試薬層。

[請求項25] 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、及び前記作用極上に配置された請求項 22 に記載の試薬層を有する、電気化学センサ。

[請求項26] さらに参照電極を有する、請求項 25 に記載の電気化学センサ。

[請求項27] 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 25 に記載の電気化学センサ。