

## 明 細 書

発明の名称： 試薬層および試薬層を備えるバイオセンサ

### 技術分野

[0001] 本発明は、試薬層および試薬層を備えるバイオセンサに関する。

### 背景技術

[0002] 近年、医療分野等の様々な分野で、試料（細胞培養液等）中のアナライトを測定するために、バイオセンサが用いられ得る。アナライトの測定方法としては、例えば電気化学的測定法が用いられ得る。

[0003] 電気化学的測定法におけるバイオセンサとしては、電極（作用極、対極、参照電極）と電極上に設けられた酵素膜を備えたものがある（特許文献1参照）。当該電極および酵素膜を備えるバイオセンサは、pH緩衝能を有する緩衝液の連続供給と、同緩衝液内への試料注入とを可能とする構造の秤量部に配置され得る。酵素として、測定対象となるアナライトが基質として作用するものを適宜選択することで、種々のアナライトの測定が可能となる。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：特開平10-78405号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0005] ここで、本願発明者らは、従前のバイオセンサの構成について改善可能な事項があることを新たに見出した。具体的には、従前のバイオセンサは、緩衝液の連続供給と同緩衝液内への試料注入とが可能な構造体に配置され得る。しかしながら、かかる従前のバイオセンサでは、緩衝液の連続供給を行うことなく、試料を連続的に直接モニタリングする手法には対応し難い。そのため、バイオセンサの構成要素としての試薬層（特許文献1の酵素膜に対応）がpH緩衝能の性質を有することが望まれる。

[0006] 本発明は、かかる課題に鑑みてなされたものである。すなわち、本発明の

目的は、pH緩衝能の性質を有する試薬層および同試薬層を備えるバイオセンサを提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0007] 上記目的を達成するために、本発明の一実施形態では、
- 繰り返し単位にプロトン受容基を含むと共にpH緩衝能を有するポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層が提供される。
- [0008] 本発明の一実施形態では、上記試薬層を備えるバイオセンサが提供される。

### 発明の効果

- [0009] 本発明の一実施形態によれば、試薬層自体がpH緩衝能の性質を有することが可能となる。

### 図面の簡単な説明

- [0010] [図1]図1は、本発明の一実施形態に係る試薬を含む試薬層の構成を模式的に示す断面図である。
- [図2]図2は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成を模式的に示す断面図である。
- [図3]図3は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。
- [図4]図4は、本発明の別の実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。
- [図5]図5は、実施例1Aにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示すグラフである。
- [図6]図6は、比較例1Aにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示すグラフである。
- [図7]図7は、実施例2Aにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示すグラフである。
- [図8]図8は、比較例2Aにおける測定経過時間と電流応答値との関係を示す

グラフである。

### 発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明（発明 A）の実施形態について具体的に説明する。以下では、まず、バイオセンサの全体的構成について説明する。その後、本発明の特徴部分について説明する。

[0012] [バイオセンサの全体的構成]

以下、本発明の一実施形態におけるバイオセンサの全体的構成について説明する。図 1 は、本発明の一実施形態に係る試薬層の構成を模式的に示す断面図である。図 2 は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成を模式的に示す断面図である。

[0013] 本発明の一実施形態に係るバイオセンサ 100 は、基板表面に位置する作用極 30、作用極表面に位置する試薬層 10、および試薬層 10 の表面に位置する保護膜 20 を備える（図 1 および図 2 参照）。なお、本実施形態では、便宜上、電極部の構成要素としての作用極 30 については図示し、その他の電極部の構成要素としての対極および参照極については図示を省略していることを確認的に付言しておく。

[0014] 本明細書でいう「バイオセンサ」とは、酵素－基質などの組合せを利用して、基質（アナライトに対応）と酵素（受容体に対応）との間の分子認識反応によって発生する化学的な変化を電気信号に変換し、得られた電気信号の強さに応じてアナライトの代謝速度、濃度等を測定する測定デバイスである。

[0015] 基板としては絶縁性基板を用いることができる。特に限定されるものではないが、基板としては、数百  $\mu\text{m}$  のポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、ポリイミド等の材料から構成され得る。一実施形態では、バイオセンサ 100 の電極部は液体試料（細胞培養液等）に挿入可能となっている。その上で、バイオセンサ 100 の挿入後、電極部に電圧を印加可能となっている。

[0016] 下記で具体的に述べるが、試薬層 10 は少なくとも酵素 B を含み得る（図

1 参照)。酵素Bとしては、測定対象となるアナライトが基質として作用するものが選択され得る。かかる選択により、種々のアナライトの測定が可能となる。酵素Bとしては、アナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素であり得る。

[0017] 例えば、酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、および／またはアルコールデヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

[0018] なお、上記試薬層は、メディエータおよび／または導電性粒子を更に含むことができる。導電性微粒子としては、カーボンブラック、カーボンナノチューブが挙げられる。本明細書でいう「メディエータ」とは、広義には電子伝達を仲介する酸化還元物質を意味し、狭義には、下記のバイオセンサにおいて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。

[0019] 特に限定されるものではないが、メディエータとして、金属錯体（例えば、オスミウム錯体、ルテニウム錯体、鉄錯体等）、キノン化合物（例えば、ベンゾキノン、ナフトキノン、フェナントレンキノン、フェナントロリンキノン、アントラキノン、及びそれらの誘導体等）、フェナジン化合物、ピオロゲン化合物、フェノチアジン化合物、及びフェノール化合物が挙げられる。

[0020] より具体的には、メディエータとして、フェリシアン化カリウム、ヘキサアンミンルテニウム、フェロセン、ポリ（1-ビニルイミダゾール）-ビス（ピピリジン）クロロオスミウム、ヒドロキノン、2-メチル-1, 4-ベンゾキノン、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸塩、9, 10-フェナ

ントレンキノン-2-スルホン酸塩、9, 10-フェナントレンキノン-2, 7-ジスルホン酸塩、1, 10-フェナントロリン-5, 6-ジオン、アントラキノ-2-スルホン酸塩、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェートや1-メトキシ-5-エチルフェナジニウムエチルサルフェート等のフェナジン誘導体、メチルピオロゲン、ベンジルピオロゲン、メチレンブルー、メチレングリーン、2-アミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、及び2, 4-ジアミノフェノールからなる群から選ばれる1種以上が用いられる。

[0021] 保護膜20は、試薬層10および電極部を覆うように構成され得る。保護膜20は、培地中の細胞のアナライト（乳酸等）の透過速度を制御しつつ、そのアナライトを作用極側へと浸透可能なように配置されている。又、保護膜20は、作用極上の試薬層10内に含まれる成分を保護膜20の外側へと流出することを抑制可能なように配置されている。即ち、本明細書でいう「保護膜」とは、試薬層に含まれる物質の保護膜外への漏出の抑制に寄与する膜であり、かつ、保護膜外に存在するアナライトが保護膜を介して試薬層側へと移動可能な孔を有する膜である。

[0022] 保護膜は生体適合性を有するポリマーを含むことが望ましい。保護膜については、例えばポリマーおよび架橋剤をアルコール溶媒、例えば緩衝液-アルコール含有溶媒に溶解させて、膜溶液を形成し、この膜溶液を試薬層に塗布、乾燥または膜溶液に電極と試薬層の積層体を浸漬し、引き上げ、乾燥させることで得ることができる。

[0023] 保護膜に含まれるポリマーとしては、生体適合性を有するホスホリルコリン基と重合性基としてのメタクリロイル基又はアクリロイル基を有するものを含むことができる。一例として、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマーが含まれ得る。

[0024] 又、保護膜に含まれるポリマーとしては、複素環式窒素基を有するt-ブチルアクリレート等を含むことができる。複素環式窒素基としては、例えば、ピリジル基等を選択することができる。一例として、スチレン-2-ビニ

ルピリジン-*ter*、ブチルメタクリレートのランダムコポリマー (S 2 V P t B u M A)、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 (T G M A S 4 V P)、および/またはポリ(*ter*、ブチルメタクリレート-*b*-4-ビニルピリジン (t B u M A 4 V P))が選択され得る。

[0025] 架橋剤としては、上記の複素環式窒素基と反応可能な反応性基を有するものを用いることができる。一例としては、ポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテルが挙げられる。

[0026] 以下、上記の構成要素を備えるバイオセンサ100に基づき供される反応作用のメカニズムについて説明する。図3は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。図4は、本発明の別の実施形態に係るバイオセンサの主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。

[0027] 本発明の一例では、培地中に電極部を浸した状態で、保護膜20を介して培地から試薬層10へと移動するアナライトを、試薬層10内にて酵素Bを触媒とし、溶存酸素を用いて酸化させる。その際に生じる過酸化水素を電気的に検出することで、アナライトの濃度を測定することが可能となる。

[0028] 乳酸を検出する場合を例にとると、保護膜20を通して培地から試薬層10へと移動してきた乳酸(図3内のL a cに相当)が試薬層10の酵素(図3内の乳酸オキシダーゼ(L O x)に相当)との酵素反応で酸化される。かかる酸化により、ピルビン酸(図3内のP y r uに相当)、過酸化水素、および電離状態のプロトン(H<sup>+</sup>)の形成がなされ得る。この形成時に生じる過酸化水素を電氣的に測定することで、乳酸の濃度を測定することが可能となる。この場合、バイオセンサ100は乳酸センサとして機能することができる。

[0029] また、図4に示すように、試薬層10はメディエータを含んでいてもよい。上述のように、メディエータは、バイオセンサ100においてアナライト(乳酸に対応)の酸化還元反応によって生じる電子の伝達を仲介する酸化還

元物質である。そのため、このメディエータの存在により、発生する電子の伝達が好適になされ得る。

[0030] [本発明の特徴部分（試薬層）]

以下、本発明の特徴部分について説明する。本発明は、バイオセンサの構成要素である試薬層 10 の構成に特徴を有する（図 1 参照）。

[0031] 本願発明者らは、従前のバイオセンサのように、pH 緩衝能を有する緩衝液の連続供給を行わずとも、細胞培養液等に存在するアナライトを連続的に直接モニタリングするための構成について鋭意検討した。その結果、本願発明者は、バイオセンサ 100 の構成要素である試薬層 10 が既述の酵素 B に加え、「繰り返し単位にプロトン受容基を含む」と共に pH 緩衝能を有するポリマー A を含む構成を案出するに至った。ここでいう「プロトン受容基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、プロトン ( $H^+$ ) を受容可能な官能基を指す。

[0032] かかるポリマー A の繰り返し単位がプロトン受容基を含むことで、アナライトが試薬層 10 内にて酵素 B との酵素反応で酸化される際に生じ得る電離状態のプロトンを受容することが可能となる。ポリマー A の試薬層 10 外部への脱離を防止する観点からは、ポリマー A の重量平均分子量 ( $M_w$ ) は 10000 以上であることが好ましい。

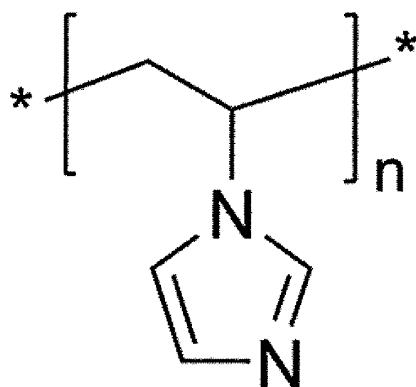
[0033] 以上により、ポリマー A は試薬層 10 内で酵素 B の近傍に留まり、反応場の pH が酵素 B の至適 pH から逸脱することを抑制可能となる。即ち、反応場の pH を一定範囲に保持することができる。それ故、酵素 B の失活を回避することができ、その結果としてバイオセンサ 100 の耐久性を向上させることができる。具体的には、培地が供された培養槽内に上記特徴を有する試薬層 10 を含むバイオセンサ 100 を直接挿入して、アナライトの好適な連続的測定が可能となる。なお、本明細書でいう「センサ耐久性」とは測定期間中のセンサの電流応答値の維持率のことを指す。

[0034] 上記のポリマー A の繰り返し単位に含まれるプロトン受容基としては、複素環式窒素基を用いることができる。例えば、複素環式窒素基は、イミダゾ

ール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも1種であることができる。

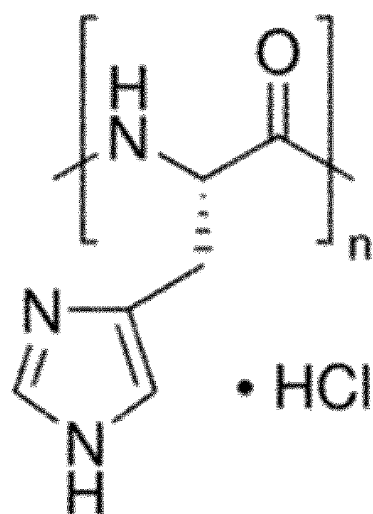
[0035] 繰り返し単位に複素環式窒素基を含むポリマーAの一例としては、例えば、下記のポリビニルイミダゾール P o l y I M Z であることができる。

[化1]



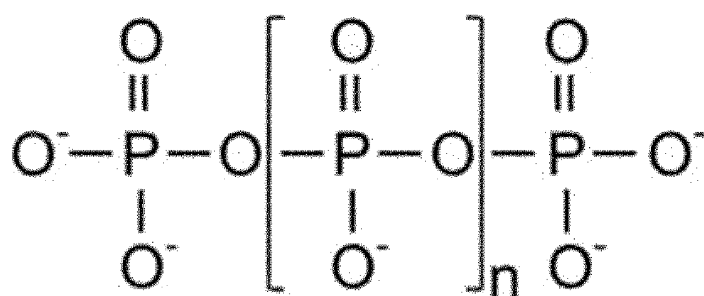
[0036] 繰り返し単位に複素環式窒素基を含むポリマーAの別例としては、例えば、下記のポリ-L-ヒスチジン (P o l y H) であることができる。

[化2]



[0037] 上記のポリマーAの繰り返し単位に含まれるプロトン受容基としては、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも1種であることができる。繰り返し単位に電離状態の上記官能基を含むポリマーAの一例としては、例えば、重合度は700～1000、重量平均分子量（Mw）は70000以上100000以下のポリリン酸ナトリウムが使用できる。

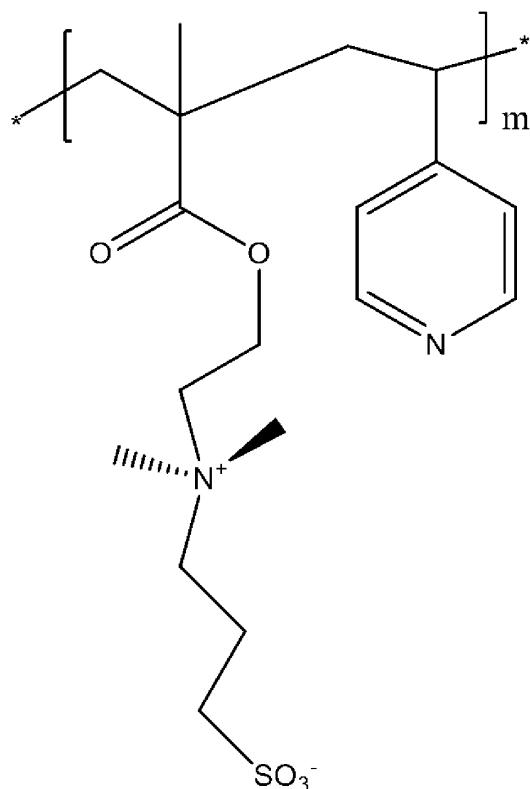
[化3]



[0038] また、上記のポリマーAとしては、繰り返し単位にプロトン受容基に加え、イオン性基を含むものを用いてもよい。ここでいう「イオン性基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、親水性を供することが可能なイオン状態の官能基を指す。

[0039] 一例として、ポリマーAは、繰り返し単位が4-ビニルピリジンに由来する部分と3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートに由来する部分を含んでよい。即ち、上記ポリマーAの繰り返し単位において、イオン性基を備えた第1部分が3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートを含み得る。又、上記ポリマーAの繰り返し単位において、プロトン受容基を備えた第2部分が4-ビニルピリジンを含み得る。例えば、ポリマーAは下記の構造を採ってよい。

[化4]



[0040] [バイオセンサの作製方法]

以下、上記バイオセンサの作製方法の一例について説明する。

[0041] まず、絶縁性基板を準備する。絶縁性基板の準備後、絶縁性基板に、カーボンインク等を印刷して、作用極 30、対極および配線を構成する導電性薄膜を形成する。又、Ag/AgCl インクを導電性薄膜に印刷し、参照極を形成する。

[0042] または、金、白金またはパラジウムなどの金属から選択される導電性薄膜（作用極に相当）をスパッタ法、蒸着法、またはイオンプレーティングなどにより堆積して形成することもできる。

[0043] この作用極の表面には、フルオロカーบอนを主鎖とし、スルホ基を側鎖に含むナフィオンを被覆することができる。導電性薄膜の厚さは、10 nm ～ 数百 nm であり得る。対電極および／または参照電極については、作用極の周縁に配置してよく、例えば基板の裏側に配置してもよい。これら電極形成部分以外については絶縁レジスト層が形成され得る。

[0044] その後、本発明の試薬層を構成する試薬を作用極上に塗布する。試薬は、上記の繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマーAおよび酵素Bを含む。試薬には、これらのポリマーAおよび酵素B以外に、導電性付与のためのカーボン粒子などの導電性粒子の懸濁液およびメディエータの水溶液を更に含むことができる。試薬の塗布後、作用極に塗布したこの試薬を乾燥することで試薬層10を形成することができる。

[0045] 試薬層10の形成後、試薬層10の表面に保護膜20用ポリマー溶液を塗布し、その後室温で乾燥させる。または、試薬層10付きの電極30の保護膜20用ポリマー溶液への浸漬、引き上げおよび乾燥を複数回繰り返す。これにより、試薬層10および電極部を覆うように保護膜20を形成することができる。以上により、バイオセンサ100を作製することができる。

### 実施例

[0046] 以下、本発明（発明A）の実施例について説明する。

#### [0047] 実施例1A

[バイオセンサの作製]

以下の工程（1）～工程（6）を経てバイオセンサを作製した。

#### [0048] ●工程（1）：電極の作製

スクリーン印刷機250IP（セリアコーポレーション社製）を用いて、カーボンインク（藤倉化成社製）を絶縁基板上に印刷し、導電性薄膜を形成した。導電性薄膜は、作用極および配線を構成する。続いて、試薬層の延在範囲を規制するための第1レジスト膜を絶縁基板上に積層した。さらに、陽イオン交換膜および保護膜の延在範囲を規制するための撥水性フィルムを第1レジスト膜上に貼付した。

#### [0049] ●工程（2）：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。

- ・リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5） 終濃度10mM
- ・塩化ナトリウム（富士フイルム和光純薬株式会社製） 終濃度20mM

- ・カーボン分散液 終濃度 5 mg/mL
- ・ポリマー結合型 PNT 終濃度 4 (608 nm の吸光度)
- ・ヒドロキシプロピルセルロース (NISSO HPC-VH 日本曹達株式会社製) 終濃度 0.05% (w/v)
- ・ポリビニルイミダゾール 終濃度 6.59 mg/mL
- ・乳酸オキシダーゼ (LOX T-47: 旭化成ファーマ社製) 終濃度 400 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 0.002% (w/v)

[0050] 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。

[0051] 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 HPC-L、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。

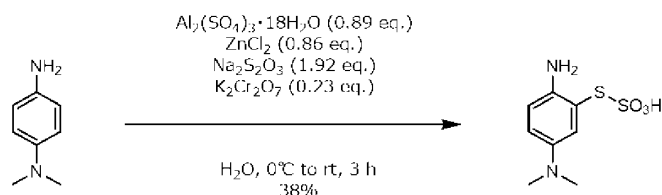
[0052] カーボン分散液は、使用前に超音波バスで約 10 分処理した後に用いた。ポリマー結合型 PNT の濃度は、ポリマー結合型 PNT の溶液を 25 倍希釈してマイクロプレートに 100  $\mu$ L 投入し、プレートリーダーで吸収スペクトルを測定することで溶液における PNT の濃度を確認し、その値に基づき調整した。例えば、終濃度 4 とは、ポリマー結合型 PNT を 25 倍希釈したときに 0.16 の吸光度を示す濃度のことである。

[0053] また、上記のポリマー結合型 PNT については、以下の工程を経て得た。

[I. PNT-70 の合成]

(1) スルホン酸フラグメントの合成

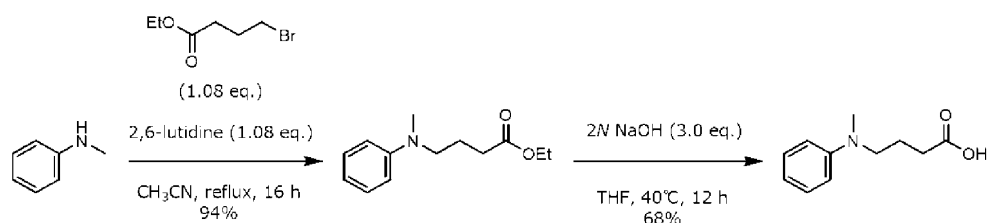
[化5]



上記の反応により、まずスルホン酸フラグメントを合成した。

[0054] (2) カルボン酸フラグメントの合成

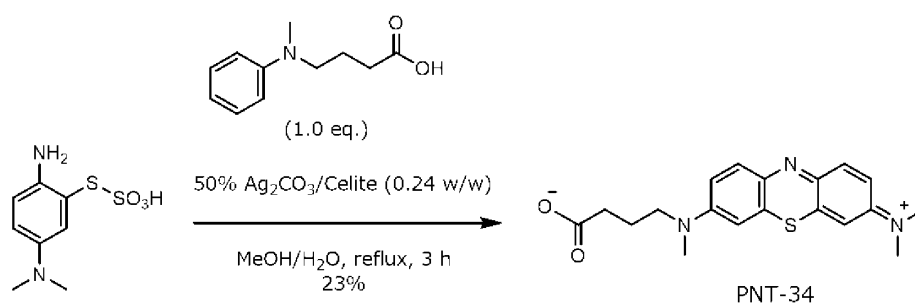
[化6]



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

[0055] (3) PNT-34の合成

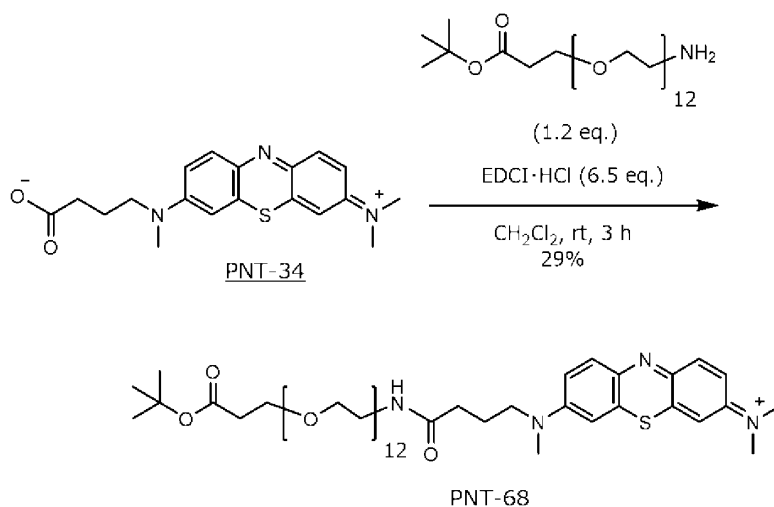
[化7]



上記に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  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  に懸濁させ、内温  $47^\circ\text{C}$  付近で  $50\% \text{Ag}_2\text{CO}_3$  / セライト  
を15分かけて分割添加した。添加後、内温  $68^\circ\text{C}$  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-3  
4を得た。

[0056] (4) 縮合体 (PNT-68) の合成

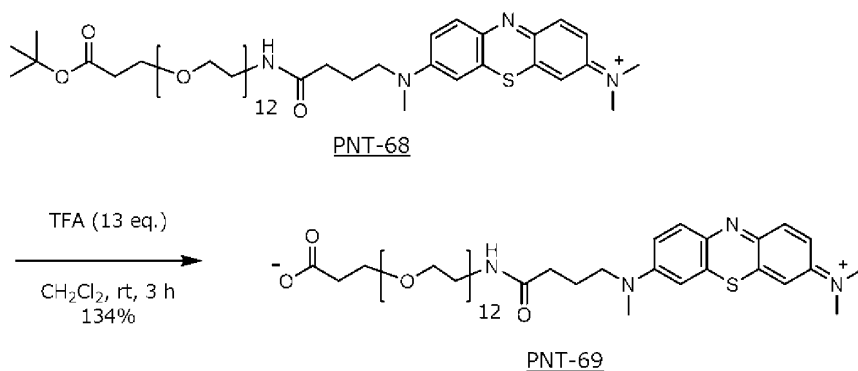
## [化 8]



Ar雰囲気下、PNT-34をジクロロメタンに溶解させ、アミノPEG 12-tertブチルエステルおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDCI·HCl)を添加後、室温下で3時間撹拌した。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。

## [0057] (5) 脱保護体(PNT-69)の合成

## [化 9]

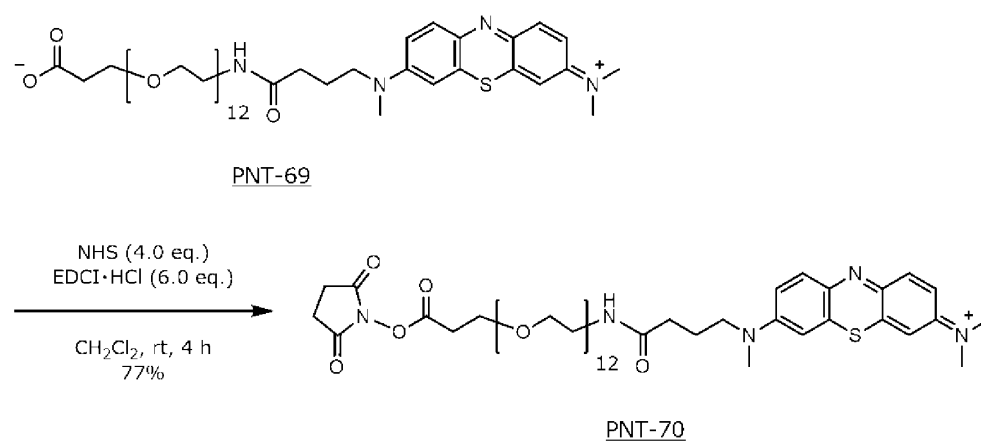


(4)で得られた縮合体(PNT-68)をジクロロメタンに溶解させ、トリフルオロ酢酸(TFA)を添加した後、室温下で3時間撹拌した。反応液を濃縮後、トルエンで数回共沸させることで脱保護体(PNT-69)を

得た。

[0058] (6) PNT-69 NHS 体 (PNT-70) の合成

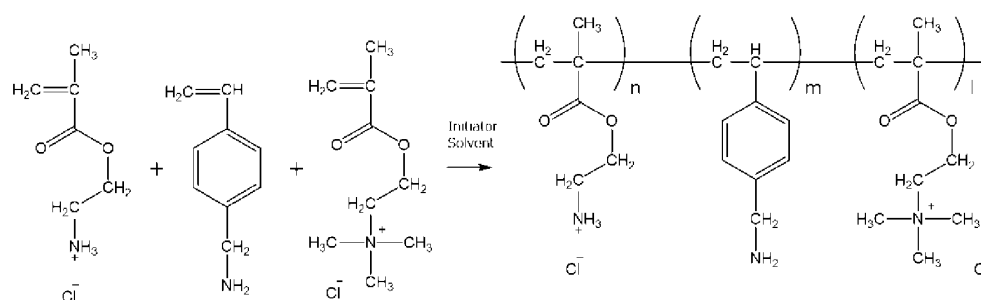
[化 10]



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、室温下で 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。

[0059] [I I. ポリマー C の合成]

[化 11]



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。ポリマーCは、<sup>1</sup>H-NMRの結果からモル比を算出した結果、n : m : l = 21.2 : 8.1 : 70.7であるポリマーに相当する。また、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）で測定した結果、当該ポリマーの数平均分子量M<sub>n</sub>は37774であり、重量平均分子量M<sub>w</sub>は214367であった。

[0060] [ポリマー結合型PNTの合成]

PNT-69NHS体（PNT-70）を21.05 mg/mLになるようにMilliQ水で溶解させた（液（1））。高分子量ポリマーとして、ポリマーCを15 mg/mLになるようにMilliQ水で溶解させた（液（2））。次に、WSC（DOJINDO W001）を20 mg/mLになるようにMilliQ水で溶解させた（液（3））。液（1）を40 μL、液（2）を140.3 μL、液（3）を383.4 μL、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 μL混合し、MilliQ水で合計体積1200 μLになるように調整した。その後、約20時間、室温にて攪拌しながら反応させた。その後、遠心式限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-4 50k；メルクミリポア）を用いて限外ろ過を数回行い、低分子を除いた液を回収した。以上により、ポリマー結合型PNTを得た。

[0061] ●工程（3）：試薬液の塗布

工程（1）で作製した電極上に工程（2）で調製した試薬を0.9 μL塗布し、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、作用極上に試薬層を形成した。

[0062] ●工程（4）：保護膜用ポリマー溶液の調製

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマー（Lipidure-CM5206 日油株式会社）を4%（w/w）の濃度でエタノールに溶解した。また、スチレン-2-ビニルピリジン-ter、ブチルメタクリレートランダムコポリマー（以下「S2VPtBuMA」と

称する)を7%(w/w)の濃度で2-プロパノールに溶解した。

[0063] ●工程(5):保護膜溶液の塗布

工程(3)において作製した電極上に工程(4)で調製したLipidure-CM5206溶液を1 $\mu$ L塗布し、室温で乾燥させた。その後、S2VPtBuMA溶液を1 $\mu$ L塗布し、室温で乾燥させた。これにより、試薬層上に保護膜を形成した。

[0064] ●工程(6):電極部の形成

工程(5)により作製したバイオ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。

[0065] 比較例1A

比較例1Aは、実施例1Aと比べて、工程(2):試薬液の調製において、ポリビニルイミダゾールを添加しない点において異なる。その他の点については、実施例1Aと同様であるため、記載の重複を避けるため説明を省略する。

[0066] [バイオセンサを用いた電気化学測定等]

次に、比較例1Aおよび実施例1Aにて作製したバイオセンサを用いて電気化学測定を行った。また、比較例1Aにおける各濃度の乳酸添加時における測定液のpHを測定した。

[0067] 上記のバイオセンサを用いた電気化学測定については、ポテンショスタット(ビー・エー・エス社製)を用い、アンペロメトリック法によって、約37℃に加温したRPMI培地中を用いた上で所定時間経過時に乳酸を添加した際の電流値の変化を測定した。

[0068] RPMI培地としては、RPMI-1640 Medium(シグマアルドリッチ社製 R1383)を用い、これに対して、CO<sub>2</sub>インキュベータ内の緩衝能を模擬するために、緩衝液成分としてMES(2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate)(同仁化学社製)、MOPS(3-Morpholinopropan

esulfonic 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 に調整したものを用いた。

[0069] 具体的には、測定開始 1000 秒後から 500 秒毎に、最終濃度 10 mM、20 mM、30 mM、40 mM になるように上記培地に乳酸溶液を添加した際に得られるセンサの電流応答値を継続的に測定した。添加する乳酸溶液としては、L-乳酸 (東京化成工業社製) を 0.5 M の MOPS 溶液で 0.5 M に希釈した液を用いた。

[0070] 測定終了後、RPMI 培地にセンサを浸漬して 37℃ で保存した。その上で、乳酸センサの耐久性を評価するため、上記の電流応答値の測定について、センサの保存前、保存 7 日後、保存 13 日後にそれぞれ行った。

[0071] [測定結果]

●比較例 1 A における各濃度の乳酸添加時における測定液の pH 値について  
比較例 1 A における各濃度の乳酸添加時における測定液の pH は以下の通りであった。

下記の表 1 の結果から、下記の表 1 の結果から、測定液中の乳酸濃度が高くなるにつれ、測定液の pH が低下して至適 pH (6~8) から外れる場合があることが分かった。

(表 1)

| 乳酸濃度 (mM) | 0    | 10   | 20   | 30   | 40   |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 測定液の pH   | 7.35 | 6.84 | 6.45 | 6.05 | 5.53 |

[0072] ●実施例 1 A および比較例 1 A の各々における測定経過時間と電流応答値との関係について

実施例 1 A における測定経過時間と電流応答値との関係を図 5 に示し、比較例 1 A における測定経過時間と電流応答値との関係を図 6 に示す。

[0073] [センサ応答性]

図 5 および図 6 に示すように、ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加した実施例 1 A では、添加しない比較例 1 A と比べて、各濃度 (10 m

M～40 mM) の乳酸に対するセンサの電流応答値が段階的に増加し、かつ乳酸添加後の電流値が一定に保たれていることが分かった。

[0074] 一方、比較例 1 A では、特に高濃度 (40 mM) の乳酸において、乳酸添加後のセンサの電流応答値が著しく減少することが分かった。

[0075] このセンサの電流応答値が減少した要因につき、上記のとおり、乳酸濃度が高濃度の場合に測定液の pH が酵素の至適 pH から外れたことに加えて (表 1 参照)、酵素反応に伴い生じたプロトンによって反応場の pH が低下したことから、酵素が失活し、好適な活性状態ではなかったことによるものと解され得る。

[0076] これに対して、上記のとおり、実施例 1 A (ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加した態様) では、比較例 1 A (ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加しない態様) と比べて、各濃度 (10 mM～40 mM) の乳酸に対するセンサの電流応答値が安定していたことから、ポリビニルイミダゾールが pH 緩衝能の役割を果たし、酵素近傍の pH が酵素の至適 pH の範囲外になることが好適に抑制されたものと考えられる。

[0077] 即ち、実施例 1 A では、ポリビニルイミダゾールによる pH 緩衝能により、乳酸オキシダーゼの失活の抑制がなされたものと考えられる。

[0078] [耐久性]

又、比較例 1 A では、保存期間 (センサの保存前⇒保存 7 日後⇒保存 13 日後) の経過とともに、各濃度 (10 mM～40 mM) の乳酸に対するセンサの応答性が低下していたことが分かった。

[0079] これに対して、実施例 1 A では、保存期間 (センサの保存前⇒保存 7 日後⇒保存 13 日後) が経過しても、各濃度 (10 mM～40 mM) の乳酸に対するセンサの応答性が維持されていたことが分かった。

[0080] 以上の事から、ポリビニルイミダゾールをセンサ試薬液に添加することにより、センサ耐久性が向上され得ることが分かった。

[0081] 実施例 2 A

[バイオセンサの作製]

以下の工程（１）～工程（６）を経てバイオセンサを作製した。

[0082] ●工程（１）：電極の作製

絶縁基板上に白金をスパッタリングさせて作製した電極をNa f i o n溶液（富士フイルム和光純薬株式会社製）に浸漬し、引き上げ、乾燥させる作業を複数回繰り返して、白金電極表面にNa f i o nを被膜した。

[0083] ●工程（２）：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。

- ・乳酸オキシダーゼ（L O X T-47：旭化成ファーマ社製） 終濃度40 U / m L
- ・ウシ血清アルブミン（富士フイルム和光純薬株式会社製） 終濃度12.5 m g / m L
- ・ポリ－Ｌ－ヒスチジン塩酸塩（シグマアルドリッチ社製） 終濃度13.7 m g / m L
- ・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0.03125％（w / v）

[0084] ●工程（３）：試薬液の塗布

工程（１）で作製した電極上に工程（２）で調製した試薬を1 μ L塗布し、オーバーナイトで乾燥させた。これにより、作用極上に試薬層を形成した。

[0085] ●工程（４）：保護膜用ポリマー溶液の調製

以下に示す各試薬を以下の終濃度となるように混合し、保護膜用ポリマー溶液を調製した。

- ・ポリ（t e r, ブチルメタクリレート－b－4－ビニルピリジン）（ポリマ－ソース社製、以下「t B u M A 4 V P」と称する） 終濃度7.11％（w / v）
- ・トリプロピレングリコールメチルエーテルメタクリレート－スチレン－4－ビニルピリジンのランダムコポリマー（ナード社製、以下「T G M A S 4 V P」と称する） 終濃度0.89％（w / 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%(w/v)

・HEPES緩衝液(pH8.0) 終濃度5mM

[0086] なお、tBuMA4VP、TGMA4VPおよびPEGDGEは、エタノールに溶解して用いた。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)をミリQ水に溶解し、水酸化ナトリウムでpHを調節して調製した。

[0087] ●工程(5): 保護膜溶液の塗布

工程(3)において作製した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。これにより、試薬層上に保護膜を形成した。

[0088] ●工程(6): 電極部の形成

工程(5)により作製したセンサ用電極を作用極とし、対極としてのパラジウム電極と、参照極としてのAg/AgCl電極を組み合わせる3電極式の電極部を作製した。

[0089] 比較例2A

比較例2Aは、実施例2Aと比べて、工程(2): 試薬液の調製において、ポリ-L-ヒスチジン塩酸塩を添加しない点において異なる。その他の点については、実施例2Aと同様であるため、記載の重複を避けるため説明を省略する。

[0090] [バイオセンサを用いた電気化学測定]

次に、比較例2Aおよび実施例2Aにて作製したバイオセンサを用いて電気化学測定を行った。

[0091] 上記のバイオセンサを用いた電気化学測定については、37℃恒温槽内において、ポテンショスタットを用いたアンペロメトリック法によって、20mMの乳酸溶液を予め添加したRPMI培地中での電流応答値を連続的に測定した。

[0092] 具体的には、測定開始後150時間経過するまで、乳酸が予め添加された

RPMI 培地中の乳酸に対するセンサの電流応答値を継続的に測定した。

[0093] RPMI 培地としては、RPMI-1640 Medium (シグマアルドリッチ社製 R1383) を用い、これに対して、L-乳酸 (東京化成工業社製) を 20 mM、非働化ウシ胎児血清 (サーモフィッシャー社製) を 10 %、ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (富士フィルム和光純薬社製) を 1 %、緩衝液成分として MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate) (同仁化学社製)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic 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 を 7.4 および 6.5 に調整した液を用いた。

[0094] [測定結果]

●実施例 2 A および比較例 2 A の各々における測定経過時間と電流応答値との関係について

実施例 2 A における測定経過時間と電流応答値との関係を図 7 に示し、比較例 2 A における測定経過時間と電流応答値との関係を図 8 に示す。

[0095] [センサ応答性]

図 7 および図 8 に示すように、比較例 2 A (ポリ-L-ヒスチジンをセンサ試薬液に添加しない態様) では、センサの電流応答値が測定溶液 pH によって異なっていたことから、乳酸に対するセンサの応答性が pH の影響を受けていることが分かった。

[0096] 一方、実施例 2 A (ポリ-L-ヒスチジンをセンサ試薬液に添加する態様) では、測定溶液 pH に違いがあった場合にも、乳酸に対するセンサの電流応答値が略同一であることが分かった。

[0097] この測定結果から、ポリ-L-ヒスチジンが pH 緩衝能の役割を果たし、乳酸センサの応答性の pH 依存性が抑制されたものと考えられる。即ち、実施例 2 A では、ポリ-L-ヒスチジンによる pH 緩衝能により、試薬近傍の pH 変化が抑制され、pH 低下による乳酸オキシダーゼの活性変化が起きなかったと考えられる。

## [0098] [耐久性]

又、比較例 2 A では、測定時間の経過とともに、センサの電流応答値の低下が生じていたことが分かった。一方、実施例 2 A では、測定時間が経過しても、センサの電流応答値が維持されていることが分かった。

[0099] この測定結果から、上述の pH 緩衝能の役割を果たすポリーレーヒスチジンが、乳酸オキシダーゼの活性の維持にも貢献し得ることが分かった。

[0100] 以上の事から、ポリーレーヒスチジンをセンサ試薬液に添加することにより、センサ電流応答値の pH 依存性が抑制されるとともに耐久性が向上することが分かった。

[0101] 実施例 1 A、2 A および比較例 1 A、2 A の測定結果から総括すると、センサ試薬液に添加されるポリビニルイミダゾールおよびポリーレーヒスチジンは共通的に複素環式窒素基を有すること、即ちプロトン受容基を有することが分かった。

[0102] 以上の事から、最終的に得られるバイオセンサの構成要素としての試薬層が、酵素に加え、繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマーを含む構成を有すると、乳酸（アナライトに相当）が試薬層内にて酵素反応で酸化される際に生じ得る電離状態のプロトンが好適に受容され得ることが分かった。

[0103] すなわち、反応場の pH が酵素の至適 pH から逸脱することを抑制し、反応場の pH を一定範囲に保持できることが分かった。それ故、アナライトの連続測定を行う際にも、酵素の失活を回避することができ、バイオセンサの応答性の pH 依存性を抑制し、耐久性を向上できることが分かった。

[0104] なお、本発明は、例示された実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、種々の改良および設計上の変更が可能である。

[0105] なお、上述のような本発明（発明 A）の一実施形態は、次の好適な態様を包含している。

## &lt; 1 A &gt;

繰り返し単位にプロトン受容基を含むポリマーおよびアナライトを酸化又

は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層。

< 2 A >

前記ポリマーがpH緩衝能を有する、< 1 A >に記載の試薬層。

< 3 A >

前記ポリマーは、前記酸化還元酵素が活性を維持可能なpH範囲に緩衝能を有する、< 1 A >又は< 2 A >に記載の試薬層。

< 4 A >

前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、< 1 A >～< 3 A >のいずれかに記載の試薬層。

< 5 A >

前記プロトン受容基が、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも1種である、< 1 A >～< 3 A >のいずれかに記載の試薬層。

< 6 A >

前記複素環式窒素基が、イミダゾール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホリル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも1種である、< 4 A >に記載の試薬層。

< 7 A >

前記ポリマーがポリビニルイミダゾールである、< 1 A >～< 4 A >のいずれかに記載の試薬層。

< 8 A >

前記ポリマーがポリ-L-ヒスチジンである、< 1 A >～< 4 A >のいずれかに記載の試薬層。

< 9 A >

前記ポリマーがポリリン酸ナトリウムである、< 1 A >～< 3 A >、< 5 A >のいずれかに記載の試薬層。

<10A>

前記ポリマーの重量平均分子量が10000以上である、<1A>~<9A>のいずれかに記載の試薬層。

<11A>

<1A>~<10A>のいずれかに記載の試薬層を備える、バイオセンサ。

<12A>

乳酸センサである、<11A>に記載のバイオセンサ。

### 産業上の利用可能性

[0106] 本発明の一実施形態にかかる試薬層を備えたバイオセンサは、アナライトの好適な測定に用いることが可能である。

### 符号の説明

[0107]     10   試薬層  
          20   保護膜  
          30   作用極  
          100   バイオセンサ  
          A     ポリマー  
          B     酵素

[0108] 以下、本発明（発明B）の一実施形態について説明する。

[0109] [発明の名称]ポリマー、ポリマーを含む試薬、ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサ、およびポリマーの合成方法

[技術分野]

[0110] 本発明は、ポリマー、ポリマーを含む試薬、ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサ、およびポリマーの合成方法に関する。

[背景技術]

[0111] 近年、医療分野等の様々な分野で、細胞等内のアナライト（検出対象物質）を測定するために、バイオセンサが用いられ得る。アナライトの測定方法としては、例えば電気化学的測定法が用いられ得る。電気化学的測定法にお

けるバイオセンサは、電極（作用極に相当）上に設けられた酵素を含む試薬層と、試薬層を覆う保護膜とを備える。この酵素として、測定対象となるアナライトを基質として作用するものを適宜選択することで、種々のアナライトの測定が可能となる。例えば、酵素として乳酸オキシダーゼ（ $\text{LO}_x$ ）を選択することで、アナライトとしての乳酸の濃度測定が可能となる。

〔先行技術文献〕

〔特許文献〕

[0112] 特許文献2：特表2010-517054号公報[発明の概要][発明が解決しようとする課題]

[0113] ここで、本願発明者らは、従前のバイオセンサについて改善すべき事項があることを新たに見出した。具体的には、細胞中のアナライトが酵素により化学反応する際にプロトン（ $\text{H}^+$ ）が放出され、これに伴いバイオセンサの試薬層のpHが低下し得る。このpH低下を抑制するための手法としては、試薬層が酵素に加えてリン酸緩衝剤を更に含む構成が考えられる。

[0114] しかしながら、上記緩衝剤の分子量は相対的に小さいため、試薬層にとどまりにくい虞がある。そのため、試薬層内に所定量の緩衝剤を確保しにくく、pHの低下を抑制しにくくなる虞がある。バイオセンサにおいて、pH低下は試薬層に含まれる酵素の劣化につながり得ることから、それによってアナライトの好適な測定が困難となる虞がある。以上の事から、pH低下を抑制しかつ試薬形成時に水溶性を供することが可能なポリマーが望まれる。

[0115] そこで、本発明は、pH低下を抑制しかつ水溶性を供することが可能なポリマー、ポリマーを含む試薬、ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサ、およびポリマーの合成方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

[0116] 上記目的を達成するために、本発明の一実施形態では、  
繰返し単位としてプロトン受容基およびイオン性基を備える、ポリマーが提供される。

[0117] 本発明の一実施形態では、上記ポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水

素化する酸化還元酵素を含む試薬が提供される。

[0118] 本発明の一実施形態では、上記の試薬を含む試薬層を備える、バイオセンサが提供される。

[0119] 上記目的を達成するために、本発明の一実施形態では、  
プロトン受容基を含む第1溶液を準備する第1工程と、  
イオン性基を含む第2溶液を準備する第2工程と、  
前記第2溶液を前記第1溶液に追加し、混合する第3工程と、  
重合開始剤の存在下で、前記第1溶液および前記第2溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う第4工程と  
を含む、ポリマーの合成方法が提供される。

[発明の効果]

[0120] 本発明の一実施形態によれば、pH低下を抑制しかつ水溶性を供することが可能なポリマー、同ポリマーを含む試薬、同ポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサを供することが可能である。

[図面の簡単な説明]

[0121] [図9]図9は、本発明の一実施形態に係る試薬を含む試薬層の構成を模式的に示す断面図である。

[図10]図10は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ100の主たる構成を模式的に示す断面図である。

[図11]図11は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ100の主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。

[図12]図12は、実施例2Bおよび比較例2Bにおける滴下するHClと溶液pHとの関係を示すグラフである。

[発明を実施するための形態]

[0122] 以下、本発明（発明B）の実施形態について具体的に説明する。

[0123] [本発明のポリマー]

まず、本発明の一実施形態に係るポリマーについて説明する。

[0124] 本願発明者らは、pH低下を抑制しかつ水溶性を供することが可能な新た

なポリマーの構成について鋭意検討した。その結果、ポリマーの繰り返し単位が下記の特徴的な2つの基を併せ持つ場合に、上記のpH低下の抑制と水溶性の供与とが可能となり得ることを新たに見出した。

- [0125] 具体的には、本発明の一実施形態に係るポリマーは、繰り返し単位として「プロトン受容基」および「イオン性基」を備えることを特徴とする。本明細書において、「プロトン受容基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、プロトン ( $H^+$ ) を受容可能な官能基を指す。本明細書において、「イオン性基」とは、ポリマーの繰り返し単位に含まれる、親水性を供与することが可能なイオン状態の官能基を指す。
- [0126] 本発明の一実施形態では、ポリマーが上記の特徴を有することで、繰り返し単位にプロトン受容基が存在することで、プロトン ( $H^+$ ) の受容が可能となる。これに加えて、繰り返し単位にイオン性基が存在することで、親水性を好適に供与することができ、それによって水溶性の供与が可能となる。ポリマーは多数の繰り返し単位から構成されるため、この繰り返し単位が有するプロトン受容機能と水溶性の供与機能とを効果的に供与することが可能となる。
- [0127] 後述するように、上記ポリマーおよび酵素を含む試薬層を備えるバイオセンサを用いる場合、上記ポリマーによる効果的なプロトン受容機能により、細胞等内のアナライト（例えば乳酸）が酵素により化学反応する際に放出され得るプロトン ( $H^+$ ) を好適に受容可能となる。これにより、試薬層におけるpH低下抑制が可能となり、試薬層に含まれる酵素の劣化を抑制可能となる。その結果、アナライトの好適な測定が可能となる。又、上記ポリマーによる効果的な水溶性の供与機能により、酵素を含有する溶液にポリマーを好適に溶かすことが可能となるため、全体として試薬層を好適に形成可能である。
- [0128] なお、本発明の一実施形態では、効果的なプロトン受容と水溶性の供与の観点等から、上記ポリマーの重量平均分子量 ( $M_w$ ) は、1万以上、2万以上、3万以上、4万以上、5万以上、6万以上、7万以上、8万以上、9万

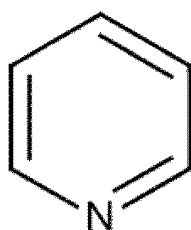
以上、10万以上、11万以上であることができ、好ましくは9万以上であり、例えば9.8万であり得る。上記ポリマーの重量平均分子量(Mw)の上限値は水溶性、粘性の観点から100万以下であり得る。

[0129] ある好適な態様では、上記のイオン性基が双性イオン型であり得る。本明細書でいう「双性イオン型」とは、本発明のポリマーの繰り返し単位が正電荷(+)のイオン性基と負電荷(-)のイオン性基の両方を有するものを指す。イオン性基が双性イオン型であることで、繰り返し単位に含まれるイオン性基の数が少なくとも2倍になることから、親水性をより好適に供することができる。これにより、水溶性をより供与しやすくなり得る。例えば、双性イオン型のイオン性基は、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含むことができる。

[0130] ある好適な態様では、上記のプロトン受容基は、非共有電子対を有する原子を含む複素環式窒素基であり得る。本明細書において「複素環式窒素基」は、窒素を含有する環構造を有するものを意味する。窒素は電気陰性度が高く、電子求引性が高いため、プロトンを受容しやすい状態となっている。又、プロトン受容による緩衝機能を好適に供する観点から、本発明のポリマーが含まれる試薬層のpH域を考慮して、複素環式窒素基のpKaは4~8であり得る。

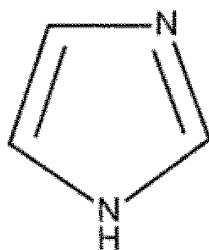
[0131] 一例では、複素環式窒素基はピリジル基であり得る。

[化12]



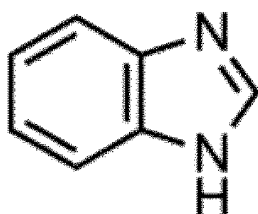
[0132] 別例では、複素環式窒素基はイミダゾール基であり得る。

[化13]



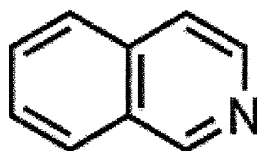
[0133] 別例では、複素環式窒素基はベンゾイミダゾール基であり得る。

[化 1 4]



[0134] 別例では、複素環式窒素基はイソキノリル基であり得る。

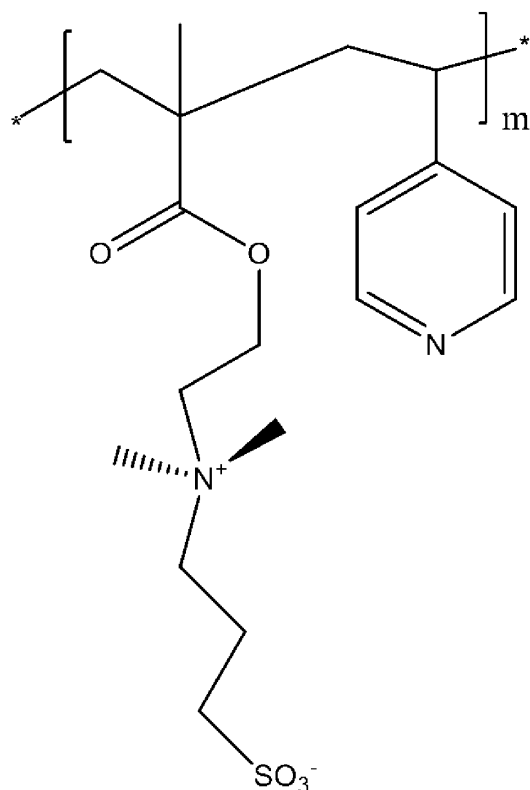
[化 1 5]



[0135] なお、一実施形態では、複素環式窒素基は、上記のピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも1種であり得る。即ち、複素環式窒素基はこれらから選択される2種以上から成ってよい。

[0136] 具体例を挙げると、本発明の一実施形態に係るポリマーは、下記の構造を採ることができる。

[化 1 6]



[0137] 上記ポリマーの繰り返し単位において、イオン性基を備えた第1部分は3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートを含み得る。又、上記ポリマーの繰り返し単位において、プロトン受容基を備えた第2部分は4-ビニルピリジンを含み得る。即ち、上記ポリマーの繰り返し単位は、4-ビニルピリジンに由来する部分と3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートに由来する部分を含み得る。この4-ビニルピリジンに由来する部分と3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートに由来する部分とは、上記化5に示すように相互に共有結合した状態で連続する。

[0138] [本発明のポリマーの合成方法]

以下、本発明の一実施形態に係るポリマーの合成方法について説明する。

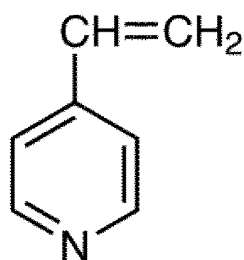
[0139] 本発明の一実施形態に係るポリマーの合成方法は、

プロトン受容基を含む第1溶液を準備する第1工程と、  
イオン性基を含む第2溶液を準備する第2工程と、  
前記第2溶液を前記第1溶液に追加し、混合する第3工程と、  
重合開始剤の存在下で、前記第1溶液および前記第2溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う第4工程とを含む。

[0140] (第1工程)

第1工程では、上述のようにプロトン受容基を含む第1溶液を準備する。一例として、このプロトン受容基として複素環式窒素基を含む第1溶液を準備する。又、プロトン受容による緩衝機能を好適に供する観点から、後刻に形成する試薬層のpH域を考慮して、複素環式窒素基のpKaは4～8であり得る。一例として、この複素環式窒素基は、ピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも1種であり得る。例えば、第1溶液については、非プロトン系極性溶媒（例えばジメチルスルホキシド(DMSO)）に、プロトン受容基を含む下記の4-ビニルピリジン(4VPと称し得る)等を混合して得ることができる。

[化17]



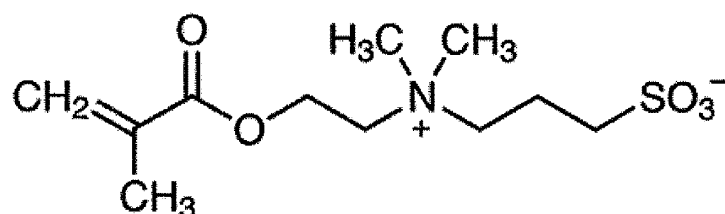
[0141] (第2工程)

第2工程では、上述のようにイオン性基を含む第2溶液を準備する。このイオン性基を含有する物質を、溶媒としての水に数秒間溶解させて、第2溶液を準備する。この第2溶液に含まれるイオン性基は、水溶性を好適に供する観点から双性イオン型であることが好ましい。双性イオン型のイオン性基

としては、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含むものを選択することができる。

[0142] 一例としては、イオン性基を含有する物質として、下記の3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネート(MASと称し得る)を、溶媒としての水に追加の上、超音波洗浄機にて3秒以上7秒以下の間に、例えば5秒間溶解させる。これにより、上記の第2溶液を準備する。

[化18]



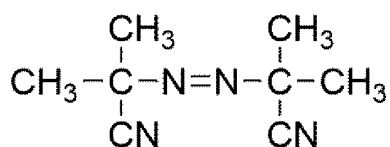
[0143] (第3工程)

第3工程では、上記第2溶液を第1溶液に追加し、混合する。具体的には、第3工程では、上記第2工程にて準備した第2溶液を第1工程にて準備した第1溶液にすみやかに、例えば0.5秒以上4秒以内に追加して、均一な混合を行う。

[0144] (第4工程)

第4工程では、重合開始剤の存在下で、上記第1溶液および第2溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う。重合開始剤については、例えばラジカル反応の開始剤としての、粉末状の下記のアゾビスイソブチロニトリル(AIBNとも称し得る)を用いることができる。

[化19]



[0145] 具体的には、3つ口フラスコ内にて、上記混合物に開始剤を添加し、その

後フラスコ内を窒素環境下に置換の上、重合反応を開始する。所定の反応温度および攪拌速度にて重合反応開始後、所定の反応時間経過後に重合反応を終了する。重合反応終了後、ミリQ水を加えて重合反応物を溶解させる。その後、重合反応物の精製のため、溶解液をヘキサンに滴下し析出物を形成する。その後、析出物を回収し、エバポレーションを行い、最後に減圧乾燥を行う。以上により、本発明の一実施形態にかかるポリマーを得ることができる。

[0146] [本発明のポリマーを含む試薬]

以下、本発明の一実施形態に係るポリマーを含む試薬について説明する。図9は、本発明の一実施形態に係る試薬を含む試薬層の構成を模式的に示す断面図である。

[0147] 本発明の一実施形態に係るポリマーは酵素を含む試薬にて用いられ得る。即ち、本発明の一実施形態では、試薬は少なくとも上記ポリマーAおよび酵素Bを含み得る。試薬層10はこの試薬を含む層である（図9参照）。酵素Bとしては、アナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素であり得る。本明細書でいう「酸化還元酵素」とは、アナライトの酸化または還元を特異的に触媒することが可能な生化学物質を意味する。

[0148] 例えば、酸化還元酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アミノ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、および／またはアルコールデヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

[0149] 上記の酸化還元酵素は、グルコース、乳酸、コレステロール、ビリルビン、グルタミン、グルタミン酸などのアミノ酸、糖化アミノ酸、または糖化ペプチド、ケトン体（3-ヒドロキシ酪酸）、アルコール等の検出に利用でき

る。酸化還元酵素の量は、例えば、後述するバイオセンサ1個当り、もしくは1回の測定当り、例えば、0.01U~100U ( $\mu\text{mol}/\text{分}$ )であり、好ましくは、0.05U~10Uであり、より好ましくは、0.1U~5Uである。

[0150] なお、上記試薬は、上記ポリマーおよび酵素に加えて、メディエータおよび/または導電性粒子を更に含むことができる。導電性微粒子としては、カーボンブラック、カーボンナノチューブが挙げられる。

[0151] 本明細書でいう「メディエータ」とは、広義には電子伝達を仲介する酸化還元物質を意味し、狭義には、下記のバイオセンサにおいて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。

[0152] 特に限定されるものではないが、メディエータとして、金属錯体（例えば、オスミウム錯体、ルテニウム錯体、鉄錯体等）、キノン化合物（例えば、ベンゾキノン、ナフトキノン、フェナントレンキノン、フェナントロリンキノン、アントラキノン、及びそれらの誘導体等）、フェナジン化合物、ピオロゲン化合物、フェノチアジン化合物、及びフェノール化合物が挙げられる。

[0153] より具体的には、メディエータとして、フェリシアン化カリウム、ヘキサアンミンルテニウム、フェロセン、ポリ(1-ビニルイミダゾール)-ビス(ピピリジン)クロロオスミウム、ヒドロキノン、2-メチル-1,4-ベンゾキノン、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸塩、9,10-フェナントレンキノン-2-スルホン酸塩、9,10-フェナントレンキノン-2,7-ジスルホン酸塩、1,10-フェナントロリン-5,6-ジオン、アントラキノン-2-スルホン酸塩、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェートや1-メトキシ-5-エチルフェナジニウムエチルサルフェート等のフェナジン誘導体、メチルピオロゲン、ベンジルピオロゲン、メチレンブルー、メチレングリーン、2-アミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、及び2,4-ジアミノフェノールからなる群から選ばれる1種以上が用いられる。

[0154] 上記塩としては、限定されるものではないが、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リチウム塩等が挙げられる。メディエータの配合量は、特に制限されず、1回の測定当り若しくは下記のバイオセンサ1個当り、例えば、 $0.1 \text{ pmol} \sim 1000 \mu\text{mol}$ であり、好ましくは、 $10 \text{ pmol} \sim 500 \mu\text{mol}$ であり、より好ましくは、 $500 \text{ pmol} \sim 100 \mu\text{mol}$ である。

[0155] [バイオセンサ]

以下、本発明の一実施形態に係るバイオセンサについて説明する。図10は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ100の主たる構成を模式的に示す断面図である。

[0156] 本明細書でいう「バイオセンサ」とは、酵素－基質などの組合せを利用して、基質（アナライトに対応）と酵素（受容体に対応）との間の分子認識反応によって発生する化学的な変化を電気信号に変換し、得られた電気信号の強さに応じてアナライトの代謝速度、濃度等を測定する測定デバイスである。

[0157] 本発明の一実施形態に係るバイオセンサ100は、基板表面に形成された電極部上に配置された試薬層10および保護膜20を備える（図10参照）。なお、本実施形態では、便宜上、バイオセンサ100のうちの試薬層10および保護膜20を図示し、その他の電極部等については図示を省略していることを確認的に付言しておく。

[0158] 基板としては絶縁性基板を用いることができる。特に限定されるものではないが、基板としては、数百 $\mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、ポリイミド等の材料から構成され得る。一実施形態では、バイオセンサ100の電極部は培養槽に供された液体培地（液体試料）に挿入可能となっている。その上で、バイオセンサ100の挿入後、電極部に電圧を印加可能となっている。

[0159] 上記の電極部は、作用極と、対極および／または参照極とを有する。作用極の表面には、上記の本発明のポリマーおよび酵素を含む試薬を含む試薬層

１０が配置され得る。

[0160] 保護膜２０は、上記の試薬層１０および電極部を覆うように構成され得る。保護膜２０は、培地中の細胞の特定成分（乳酸等）の透過速度を制御しつつ、その特定成分を作用電極側へと浸透可能に構成されている。又、保護膜２０は、作用極上の試薬層１０内に含まれる成分（本発明の上記ポリマーおよび酵素等）を保護膜２０の外側へと流出することを抑制可能に構成されている。即ち、本明細書でいう「保護膜」とは、試薬層に含まれる物質の保護膜外への漏出の抑制に寄与する膜であり、かつ、保護膜外に存在するアナライトが保護膜を介して試薬層側へと移動可能な孔を有する膜である。

[0161] 保護膜は生体適合性を有するポリマー膜であり得る。この保護膜を構成するポリマーとしては、複素環式窒素基を有するｔ－ブチルアクリレートであり得る。複素環式窒素基としては、例えば、ピリジル基、イミダゾール基等を選択することができる。更に、この保護膜を構成するポリマーとしては、フルオロカーบอนを主鎖とし、スルホ基、カルボキシル基を側鎖に含むナフイオンが更に含まれ得る。

[0162] 特に限定されるものではないが、例えば、培地として、RPMI－１６４０培地、D－MEM培地、F１２、MEM培地を挙げることができる。なお、本発明では、培地には酵素は含まれない。

[0163] 上記構成下において、培地中に電極部を浸した状態で、保護膜２０を介して培地から試薬層１０へと移動するアナライトを、試薬層１０内にて酵素を触媒とし、溶存酸素を用いて酸化させる。その際に生じる過酸化水素を電気的に検出することで、アナライトの濃度を測定することが可能となる。

[0164] 図１１は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサ１００の主たる構成に基づき供される作用メカニズムを模式的に示す断面図である。乳酸を検出する場合を例にとると、保護膜２０を通して培地から試薬層１０へと移動してきた乳酸（図１１内のLacに相当）が試薬層１０の酵素（図１１内のLoxに相当）との酵素反応で酸化され、ピルビン酸（図１１内のPyruに相当）、過酸化水素、および電離状態のプロトン（H<sup>+</sup>）の形成がなされ得る。

。かかる形成時に生じる過酸化水素を電氣的に測定することで、乳酸の代謝速度等を測定することが可能となる。この場合、バイオセンサ１００は乳酸センサとして機能することができる。

[0165] 上述のように、本発明のポリマーによれば、プロトン受容機能と水溶性の供与機能とを効果的に供することが可能である。バイオセンサ１００は、このポリマーＡおよび酵素Ｂを含む試薬層１０を備える。そのため、ポリマーＡによる効果的なプロトン受容機能により、試薬層１０内へ移動したアナライト（図１１では乳酸を対象）が酵素Ｂによる化学反応する際に放出され得るプロトン（ $H^+$ ）を好適に受容可能となる。これにより、試薬層１０におけるｐＨ低下抑制が可能となり、試薬層１０に含まれる酵素Ｂの劣化を抑制可能となる。その結果、培地が供された培養槽内にバイオセンサ１００を直接挿入して、アナライトを好適に測定することが可能となる。

[0166] 又、上記ポリマーＡによる効果的な水溶性の供与機能により、酵素Ｂを含有する溶液にポリマーＡを好適に溶かすことが可能となるため、全体として試薬層１０を好適に形成可能である。更に、従前でのｐＨ低下抑制のための低分子量の緩衝剤と比べて、本発明のポリマーＡは、高分子量を有するが故、試薬層１０内にとどまりやすく、保護膜２０よりも外側に位置する培地側への流出を好適に抑制することができる。

[0167] なお、従前のバイオセンサでは、上記でいう保護膜に複素環式窒素含有ポリマーが含まれる態様がある。この保護膜はセンサの構成要素である作用電極へのアナライトの拡散を制限するために寄与しているにすぎない。一方、本発明のバイオセンサ１００では、構成要素である試薬層１０（保護膜２０ではなく）にポリマーが含まれ、更にこのポリマーがプロトンの受容に寄与するプロトン受容基と水溶性の提供に寄与するイオン性基の異なる特性を有する基を有する。以上の事から、保護膜に複素環式窒素含有ポリマーが含まれる態様と比べて、本発明のポリマーは、その提供箇所と機能（プロトン受容性と水溶性の両方の機能）とがいずれも相違する。

[0168] [バイオセンサの作製方法]

以下、上記バイオセンサの作製方法の一例について説明する。

[0169] まず、絶縁性基板を準備する。絶縁性基板の準備後、絶縁性基板に、銀、白金またはパラジウムなどの金属から選択される導電性薄膜（作用電極に相当）をスパッタ法、蒸着法、またはイオンプレーティングなどにより堆積して形成する。導電性薄膜の厚さは、10 nm～数百 nmであり得る。対電極および／または参照電極については、作用電極の周縁に配置してよく、例えば基板の裏側に配置してもよい。これら電極形成部分以外については絶縁レジスト層が形成されてよい。

[0170] その後、本発明の上記ポリマーおよび酵素溶液を少なくとも有する試薬を作用電極上に塗布する。試薬は、上記ポリマーおよび酵素以外に、導電性付与のためのカーボン粒子などの導電性粒子の懸濁液およびメディエータの水溶液を更に含んでよい。作用電極に塗布したこの試薬を乾燥することで試薬層10を好適に形成することができる。最後に、試薬層10および電極部を覆うように、保護膜20を形成する。以上により、バイオセンサ100を作製することができる。

[実施例]

[0171] 以下、本発明（発明B）の実施例について説明する。

[0172] 実施例1B

[本発明のポリマーの合成]

[0173] （第1工程の実施）

第1工程として、ジメチルスルホキシド(DMSO)に、4-ビニルピリジン(4VPと称し得る)およびスチレンを混合して第1溶液を準備した。

[0174] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

[使用量]

- ・ DMSO : 24.8 mL
- ・ 4VP : 3.539 mL
- ・ スチレン : 0.077 mL

[4VPの濃度]

12.45 v/v%

[スチレンの濃度]

0.27 v/v%

[品番]

・DMSO: 045-28335 (富士フィルム和光純薬社製)

・4VP: V0150 (東京化成工業社製)

[0175] (第2工程の実施)

第2工程として、3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネート(MASと称し得る)を、溶媒としての水に追加の上、超音波洗浄機にて5秒間溶解させた。これにより、第2溶液を準備した。

[0176] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

[使用量]

MAS: 9.36 g

ミリQ水: 5.0 mL

[MAS濃度]

65.2 (w/w%)

[品番] MAS: M1971 (東京化成工業社製)

[0177] (第3工程の実施)

第3工程では、上記第2溶液を第1溶液に追加し、混合した。具体的には、上記第2工程にて準備した第2溶液を第1工程にて準備した第1溶液に1秒以内に追加して、均一な混合を行った。かかる混合において混合比率(モル比)については、スチレン:4VP:MAS=1:49:50とした。

[0178] (第4工程)

第4工程では、重合開始剤の存在下で、上記第1溶液および第2溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行った。具体的には、3つ口フラスコ内にて、上記混合物に開始剤(アゾビスイソブチロニトリル(AIBNとも称し得る))を添加した。AIBNを追加した際の溶液温度は24℃であった。そ

の後、同フラスコ内を窒素環境下に置換の上、重合反応を開始した。

[0179] 開始剤の使用量、濃度および品番は以下のとおり。

[使用量]

AIBN: 0.064 g

[AIBNの濃度]

粉末のAIBNを3つ口フラスコに添加。

AIBNの濃度: 100%

[品番]

AIBN: 019-04932 (富士フィルム和光純薬社製)

[0180] その後、反応温度80℃および攪拌速度500rpmにて重合反応開始後、42.5時間の反応時間経過後に重合反応を終了した。重合反応終了後、ミリQ水を加えて重合反応物を溶解させた。その後、溶解液をヘキサンに滴下し析出物を形成、回収し、エバポレーションを行い、最後に減圧乾燥を行った。以上により、本発明のポリマーを合成することができた。

[0181] 実施例2B

[本発明のポリマーの特性評価]

上記で合成した本発明のポリマーの特性につき、以下の方法により評価を行った。

[0182] まず、50mLのDW（蒸留水）に、本発明のポリマー（250mg/mL）を1mL追加の上溶解させた。得られた溶液に対して、濃度（0.1mol/L）のHClを順次追加した。再現性担保のため、同様のことを再度実施した。その後、pHメーターを用いてpHをそれぞれ評価した。

[0183] なお、実施例2Bと対比可能な比較例として、50mLのDW（蒸留水）に、濃度（0.1mol/L）のHClを順次追加した。再現性担保のため、同様のことを再度実施した。その後、pHメーターを用いてpHをそれぞれ評価した。

[0184] 評価結果1を図12に示す。

[0185] 図12に示されるように、本発明のポリマーを用いることなく、DWに濃

度（ $0.1 \text{ mol/L}$ ）のHClを順次追加した比較例では、HClの追加開始時のpHが5.5付近だった状態からHClの追加をはじめてすぐさまpHが4付近へと低下した。具体的には、追加されたHClの濃度が $0.14 \text{ mmol/L}$ 付近でpHが4付近になった。

[0186] 一方、DWに本発明のポリマーを追加した溶液に濃度（ $0.1 \text{ mol/L}$ ）のHClを順次追加した実施例2Bでは、HClの追加開始時のpHが7付近だった状態から、追加されたHClの濃度が $3.4 \text{ mmol/L}$ 付近になってようやくpHが4付近になった。又、実施例2Bにおいて、50mLのDW（蒸留水）に、本発明のポリマー（ $250 \text{ mg/mL}$ ）を1mL好適に追加することができた。以上の事から、本発明のポリマーがpH低下抑制機能と水溶性の供与機能とを有することが分かった。

[0187] 又、得られた本発明のポリマーにつき、GPC（Gel Permeation Chromatography：ゲル浸透クロマトグラフィー）を用いて、重量平均分子量（ $M_w$ ）および数平均分子量（ $M_n$ ）を測定した。各平均分子量の測定結果は以下のとおりであった。

- ・重量平均分子量（ $M_w$ ）：9.8万
- ・数平均分子量（ $M_n$ ）：1.3万

[0188] 実施例3B

以下の工程を経て、[1. ポリマーの合成]、[2. 合成したポリマーを含むセンサの作製]、および[3. センサの浸漬実験]を行った。なお、実施例1Bでの記載内容との重複を避ける観点から、同重複部分の内容については省略して記載する。

[0189] [1. ポリマーの合成]

（第1工程の実施）

第1工程として、ジメチルスルホキシド(DMSO)に、4-ビニルピリジンおよびスチレンを混合して第1溶液を準備した。この第1工程における第1溶液準備条件は実施例1Bと同様である。

[0190] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

## [使用量]

- ・ DMSO : 24.8 mL
- ・ 4VP : 3.539 mL (105.14 / モル)
- ・ スチレン : 0.077 mL (104.15 / モル)

## [4VPの濃度]

12.45 v/v%

## [スチレンの濃度]

0.27 v/v%

## [品番]

- ・ DMSO : 045-28335 (富士フィルム和光純薬社製)
- ・ 4VP : V0150 (東京化成工業社製)

## [0191] (第2工程の実施)

第2工程として、3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートを、溶媒としての水に追加して、第2溶液を準備した。この第2工程における第2溶液準備条件は実施例1Bと同様である。

## [0192] なお、使用量、濃度および品番は以下のとおり。

## [使用量]

MAS : 9.36 g (279.35 / モル)  
ミリQ水 : 5.0 mL

## [MAS濃度]

65.2 (w/w%)

[品番] MAS : M1971 (東京化成工業社製)

## [0193] (第3工程の実施)

第3工程では、上記第2溶液を第1溶液に追加し、混合した。混合比率 (モル比) については、スチレン : 4VP : MAS = 1 : 49 : 50とした。この第3工程における第1溶液と第2溶液の追加、混合条件は実施例1Bと同様である。

[0194] (第4工程)

第4工程では、重合開始剤の存在下で、上記第1溶液および第2溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行った。この第4工程における重合化反応条件は実施例1Bと同様である。

[0195] 重合反応終了後、ミリQ水を加えて重合反応物を溶解させた。その後、溶解液をヘキサンに滴下し析出物を形成、回収し、エバポレーションを行い、最後に減圧乾燥を行った。以上により、本発明のポリマーを合成することができた。得られたポリマーにおいて、4VPとMASからなるポリマー基本構成単位の分子量は191.63であった。

[0196] ポリマー合成後、同ポリマーを250.0mg秤量し、DW(蒸留水)1mLを添加し、ポリマー溶液を調製した。これにより、同ポリマー溶液濃度を250mg/mL(0.25mg/μL、1304.6mmol/L)とした。

[0197] [2. 合成したポリマーを含むセンサの作製]

ポリマーの合成後、以下の工程を経てセンサを作製した。

[0198] ●(1): 作用電極の作製

スクリーン印刷機(セリアコーポレーション製)を用いて、カーボンインクXC-3180(藤倉化成社製)を絶縁基板上に印刷し、導電性薄膜を形成した。絶縁基板としては、PET W400J(三菱製)を用いた。

[0199] ●(2): 撥水レジスト層の作製

スクリーン印刷機(セリアコーポレーション製)を用いて、レジストインクXB-3342(藤倉化成社製)を作用電極上に印刷し、撥水レジストを形成した。

[0200] ●(3) コロナ放電処理

作用電極に対して、コロナ放電表面改質装置(信光電気計装社製)を用いて表面処理を行った。

[0201] ●(4): 撥水フィルム層の作製

フッ素系の撥水フィルムSS4A(ニッパ社製)を上記の撥水レジスト層の

上に貼付し、撥水フィルム層を作製した。

[0202] ●（５）：ポリマー溶液の塗布

工程（１）で作製した作用電極上に、〔１．ポリマーの合成〕で形成した 250mg/mL のポリマー溶液を 1  $\mu$ L 塗布し、室温で乾燥させ、ポリマー膜を形成した。

[0203] ●（６）：保護膜用溶液の調製および保護膜用溶液の塗布

上記乾燥後、16.125wt% の被膜用中和ナフィオン溶液 0.6mg をポリマー膜上に塗布し、室温で乾燥させ、ナフィオン膜を形成した。続いて、上記乾燥後、被膜用 4VP-tBuMA 溶液 0.6mg をナフィオン膜上に塗布し、室温で乾燥させ、4VP-tBuMA 膜を形成した。以上により、ポリマー膜上に保護膜を形成した。

[0204] （被膜用中和ナフィオン溶液の調製）

なお、上記の被膜用中和ナフィオン溶液については、以下の工程を経て調製した。具体的には、瓶内にナフィオン分散液 20wt% （品番 663492、Sigma-Aldrich 社製）26250.7mg を加えた。次いで、瓶内にエタノール（品番 057-00451、富士フィルム和光純薬社製）7355.2mg を加えた。次いで、瓶内に 5mol/L の水酸化ナトリウム水溶液（品番 196-05375、富士フィルム和光純薬社製）1394.08mg を加えた。最後に、VORTEX-GENIE 2 による攪拌 60 秒と超音波処理（ソニケーション）5 秒とを繰り返して、析出物を完全に溶解させた。以上により、被膜用中和ナフィオン溶液を調製した。

[0205] （被膜用 4VP-tBuMA 溶液の調製）

また、上記の被膜用 4VP-tBuMA 溶液については、以下の工程を経て調製した。具体的には、被膜用 4VP-tBuMA 溶液の調整に先立ち、瓶に 4VP-tBuMA （品番 P42487、[分子量比] 4VP:tBuMA = 12 万 : 27 万、Polymer source 社製）を 4.0g 加え、その後エタノール（品番 057-00451、富士フィルム和光純薬社製）36g を入れ、ROTATOR VMR-3R を用いて攪拌した。これにより

、10wt%の4VP-tBuMAストック溶液を用意した。これとは別に、瓶にPEGDGE1000（品番805505、Sigma-Aldrich社製）を1.0g加え、その後エタノール7.83gを入れ、ROTATOR VMR-3Rを用いて攪拌した。これにより、11.32wt%のPEGDGE1000ストック溶液を用意した。

[0206] その後、瓶に、49.98mgのエタノールを加え、次いで上記にて用意した106.02mgのPEGDGE1000溶液（0.6wt%）を加え、その後に1144mgのtBuMA-4VP溶液（5.72wt%）を加えた。その後にVORTEX-GENIE 2にて軽く攪拌した。攪拌後、瓶の開け口をパラフィルムとポリイミドテープで密封し、53℃恒温槽中で16時間回転攪拌した。その後、恒温槽から瓶を取り出し、上記の塗布直前まで取り出した瓶をチューブローターにて緩やかに回転攪拌した。以上により、被膜用4VP-tBuMA溶液を調製した。

[0207] [3. センサの浸漬実験]

その後、[2. 合成したポリマーを含むセンサの作製]にて得られたセンサの浸漬実験を行った。

[0208] 具体的には、得られたセンサを1.5mLの純水に浸け、純水に浸漬されたセンサを37度の恒温槽で22時間放置した。その後に、センサからの溶出液を回収し、回収した溶出液中のMAS濃度を測定した。このMAS濃度については、紫外可視分光光度計（波長：256nm）（日本分光社製、型式V-650）を用いて測定した。

[0209] 比較例3B（実施例3Bと対比するための例）

比較例3Bは、実施例3Bと比べて、センサの作製に際して、作用電極上にポリマーではなくリン酸緩衝液を塗布した点で異なる。塗布したリン酸緩衝液については、塗布後に室温で乾燥させた。

[0210] なお、比較例3Bでは、作用電極上に塗布するポリマー溶液とリン酸緩衝液の濃度は同一（1304.6mmol/L）に設定し、塗布量も同一の1μLとした。又、センサの構成要素である保護膜の構成材料の種類、濃度に

については同一とした。

[0211] また、比較例 3 B では、センサ作製後のセンサ浸漬実験は実施例 3 B と同じ手順で実施した。具体的には、得られたセンサを 1.5 mL の純水に浸け、純水に浸漬されたセンサを 37 度の恒温槽で 22 時間放置した。

[0212] その後、センサからの溶出液を回収し、回収した溶出液中のリン酸濃度を測定した。このリン酸濃度については、イオンクロマトグラフィー(サーモサイエンティフィック社製、型式 ICS 5000+)を用いて測定した。なお、実施例 3 B での記載内容との重複を避ける観点から、同重複部分の内容については記載を割愛する。

[0213] [測定結果]

比較例 3 B では、溶出液中のリン酸濃度は  $1.12 \mu\text{mol}$  であり、溶出率が 85.81% であったのに対して、実施例 3 B では、溶出液中の MAS 濃度は 0.042 mg であり、溶出率が 16.61% であった。

[0214] [評価]

上記の測定結果から、実施例 3 B では、ポリマー膜を構成する 84% の MAS が保護膜で覆われたセンサ内にとどまることができたことが分かった。一方、比較例 3 B では、リン酸緩衝膜を構成する 15% のリン酸のみが保護膜で覆われたセンサ内にとどまることができたことが分かった。

[0215] すなわち、実施例 3 B における保護膜を通じた外部への MAS の溶出は、比較例 3 B における保護膜を通じた外部へのリン酸の溶出と比べて約 5.2 倍抑制されていることが分かった。

[0216] 以上のことから、比較例 3 B のような低分子量のリン酸緩衝液を用いる場合と比べて、実施例 3 B におけるポリマーはポリマー膜(本発明における試薬層に対応)内にとどまりやすく、保護膜よりも外側に位置する培地側への流出を好適に抑制することが可能であることが分かった。

[0217] なお、本発明は、例示された実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、種々の改良および設計上の変更が可能である。

[0218] なお、上述のような本発明（発明B）の一実施形態は、次の好適な態様を包含している。

<1 B>

繰り返し単位としてプロトン受容基およびイオン性基を備える、ポリマー。

<2 B>

<1 B>において、水溶性を有する、ポリマー。

<3 B>

<1 B>又は<2 B>において、重量平均分子量が1万以上である、ポリマー。

<4 B>

<1 B>～<3 B>のいずれかにおいて、前記イオン性基が双性イオン型である、ポリマー。

<5 B>

<1 B>～<4 B>のいずれかにおいて、前記イオン性基が、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含む、ポリマー。

<6 B>

<1 B>～<5 B>のいずれかにおいて、前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、ポリマー。

<7 B>

<6 B>において、前記複素環式窒素基のpKaが4～8である、ポリマー。

<8 B>

<6 B>又は<7 B>において、前記複素環式窒素基が、ピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも1種である、ポリマー。

<9 B>

<1 B>～<8 B>のいずれかにおいて、前記イオン性基を備えた第1部分が3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートを含む、ポリマー。

<10 B>

<1 B>～<9 B>のいずれかにおいて、前記プロトン受容基を備えた第2部分が4-ビニルピリジンを含む、ポリマー。

<11 B>

<1 B>～<10 B>のいずれかにおいて、前記繰り返し単位が、4-ビニルピリジンに由来する部分と3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートに由来する部分を含む、ポリマー。

<12 B>

<1 B>～<11 B>のいずれかのポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む試薬。

<13 B>

<12 B>の試薬を含む試薬層を備える、バイオセンサ。

<14 B>

<13 B>において、乳酸センサである、バイオセンサ。

<15 B>

プロトン受容基を含む第1溶液を準備する第1工程と、  
イオン性基を含む第2溶液を準備する第2工程と、  
前記第2溶液を前記第1溶液に追加し、混合する第3工程と、  
重合開始剤の存在下で、前記第1溶液および前記第2溶液を含む混合物を用いて重合化反応を行う第4工程と  
を含む、ポリマーの合成方法。

<16 B>

<15 B>において、前記第1工程にて、前記プロトン受容基として複素環式窒素基を含む前記第1溶液を準備する、ポリマーの合成方法。

## &lt;17B&gt;

<15B>又は<16B>において、前記複素環式窒素基の $pK_a$  4～8である、ポリマーの合成方法。

## &lt;18B&gt;

<16B>又は<17B>において、前記複素環式窒素基が、ピリジル基、イミダゾール基、ベンゾイミダゾール基、およびイソキノリル基から成る群から選択される少なくとも1種である、ポリマーの合成方法。

## &lt;19B&gt;

<15B>～<18B>のいずれかにおいて、前記第1溶液が4-ビニルピリジンを含む溶液である、ポリマーの合成方法。

## &lt;20B&gt;

<15B>～<19B>のいずれかにおいて、前記第2工程にて、前記イオン性基が双性イオン型である前記第2溶液を準備する、ポリマーの合成方法。

## &lt;21B&gt;

<15B>～<20B>のいずれかにおいて、前記第2溶液の前記イオン性基が、陽イオン状態の第四級アンモニウム基および陰イオン状態のスルホ基又はカルボキシ基を含む、ポリマーの合成方法。

## &lt;22B&gt;

<15B>～<21B>のいずれかにおいて、前記第2溶液が3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートを含む溶液である、ポリマーの合成方法。

## &lt;23B&gt;

<15B>～<22B>のいずれかにおいて、前記第2工程において、前記イオン性基を含む物質を、溶媒としての水に3秒以上7秒以下の間に溶解させて、前記第2溶液を準備する、ポリマーの合成方法。

## &lt;24B&gt;

<15B>～<23B>のいずれかにおいて、前記第3工程において、前

記第2工程にて準備した前記第2溶液を前記第1溶液に0.5秒以上4秒以内に追加する、ポリマーの合成方法。

[産業上の利用可能性]

[0219] 本発明の一実施形態にかかるポリマーを含む試薬層を備えたバイオセンサは、アナライトの好適な測定が可能である。

[符号の説明]

[0220]      10 試薬層  
            20 保護膜  
            100 バイオセンサ  
            A     ポリマー  
            B     酵素

### 請求の範囲

- [請求項1] 繰り返し単位にプロトン受容基を含むと共にpH緩衝能を有するポリマーおよびアナライトを酸化又は脱水素化する酸化還元酵素を含む、試薬層。
- [請求項2] 前記ポリマーは、前記酸化還元酵素が活性を維持可能なpH範囲に緩衝能を有する、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項3] 前記プロトン受容基が複素環式窒素基である、請求項1または2に記載の試薬層。
- [請求項4] 前記プロトン受容基が、電離状態のリン酸基、スルホ基、およびカルボキシ基から成る群から選択される少なくとも1種である、請求項1または2に記載の試薬層。
- [請求項5] 前記複素環式窒素基が、イミダゾール基、ピリジル基、インドリル基、キノリル基、イソキノリル基、テトラヒドロキノリル基、チアゾール基、インドリジル基、イミダゾピリジル基、アクリジニル基、テトラゾール基、トリアゾール基、ピラジル基、モルホルル基、およびピペラジル基から成る群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の試薬層。
- [請求項6] 前記ポリマーがポリビニルイミダゾールである、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項7] 前記ポリマーがポリ-L-ヒスチジンである、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項8] 前記ポリマーがポリリン酸ナトリウムである、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項9] 前記ポリマーの重量平均分子量が10000以上である、請求項1に記載の試薬層。
- [請求項10] 前記ポリマーは、前記繰り返し単位が4-ビニルピリジンに由来する部分と3-[[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチルアンモニオ]プロパン-1-スルホネートに由来する部分を含む、請求項

1 に記載の試薬層。

[請求項11] 請求項 1 に記載の試薬層を備える、バイオセンサ。

[請求項12] 乳酸センサである、請求項 1 1 に記載のバイオセンサ。