

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5932781号  
(P5932781)

(45) 発行日 平成28年6月8日(2016.6.8)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl. F I  
GO 1 N 21/76 (2006.01) GO 1 N 21/76

請求項の数 11 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2013-513719 (P2013-513719)	(73) 特許権者	313006843
(86) (22) 出願日	平成23年6月10日 (2011.6.10)		クルマラ, サカリ
(65) 公表番号	特表2013-531790 (P2013-531790A)		K U L M A L A, S a k a r i
(43) 公表日	平成25年8月8日 (2013.8.8)		フィンランド国 キルッコヌンミ エファ
(86) 国際出願番号	PCT/FI2011/000032		イ-02480, アアムルスコンクジャ
(87) 国際公開番号	W02011/154590		1 1
(87) 国際公開日	平成23年12月15日 (2011.12.15)		A a m u r u s k o n k u j a 1 1,
審査請求日	平成26年6月9日 (2014.6.9)		F I - 0 2 4 8 0 K i r k k o n u m m
(31) 優先権主張番号	20100253		i ( F I )
(32) 優先日	平成22年6月16日 (2010.6.16)	(73) 特許権者	505171573
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		コルペラ・ティモ カレビ
(31) 優先権主張番号	20100251		フィンランド、F I N - 2 0 6 1 0、トル
(32) 優先日	平成22年6月15日 (2010.6.15)		ク、クラータリンカツ-1 D- 42、
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 統合炭素電極チップによるランタニドキレートの電気的励起及びこれらのチップを用いた分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

電解質の溶液内でランタノイドのキレートを電気的に励起する方法であって、  
その励起は、二つの炭素ペーストの電極を有する電気化学電池内で1 ns から1000 s の持続時間、0.001 Hz から1200 MHz の周波数と1 V から400 V の振幅を持つ電圧パルスで行われ、

二つの炭素ペーストの電極の両方が陽極又は陰極として使用されることができ、  
ランタノイドのキレートが陰極の電極上で励起されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

電極の極性が測定期間に少なくとも1度は変わり、その結果測定中に、両方の電極が陽極と陰極として機能することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

連続した励起パルスは両極性であり、その結果電極はパルス発信中に交互に陽極と陰極として機能することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

炭素ペーストの電極が、印刷、噴霧又は塗装されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

炭素ペーストの電極は金属フィルムの表面、伝導性を持つインク又は伝導性を持つポリマーからなる他の導電体上にあることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

20

## 【請求項 6】

電解質の溶液内で請求項 3 の方法により両極性の励起パルスで T b ( I I I ) のキレート  
を励起する電極チップであって、

前記チップは、抵抗材料上に印刷、噴霧又は塗装された二つの炭素ペーストの電極からなる電気化学電池を有することを特徴とする電極チップ。

## 【請求項 7】

電解質の溶液内で請求項 3 の方法により両極性の励起パルスで T b ( I I I ) のキレート  
を励起する電極チップであって、

前記チップは、抵抗材料上の銀インクのフィルム上に印刷、噴霧又は塗装された二つの炭素ペーストの電極からなる電気化学電池を有することを特徴とする電極チップ。

10

## 【請求項 8】

電解質の溶液内で請求項 3 の方法により両極性の励起パルスで T b ( I I I ) のキレート  
を励起する電極チップであって、

前記チップは、カリパス 0 . 0 1 mm - 5 mm の厚さの薄い抵抗体材又は絶縁体材の層で分けられた二つの金属片又は箔片の上に印刷、噴霧又は塗装された二つの炭素ペーストの電極からなる電気化学電池を有することを特徴とする電極チップ。

## 【請求項 9】

アルカリ金属水酸化物とアルカリ土類金属水酸化物からなる群から選ばれる化学物質での  
処理により改善された陰極 E C L の特性を有する請求項 6 に記載の電極チップ。

20

## 【請求項 10】

硫酸、塩酸、燐酸又は酢酸からなる群から選ばれる酸での処理により改善された陰極 E C L の特性を有する請求項 6 に記載の電極チップ。

## 【請求項 11】

前記ランタノイドのキレートが T b ( I I I ) のキレートである請求項 1 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この発明は電気化学発光の検出に適した分析方法と機器に関係する。具体的には、特に安価な電極材料、セル、使い捨て診断チップ及びカセットが必要な場合の分散した分析の素早い定量診断に関わる。

30

## 【0002】

発明の背景

診断を目的とした、高速で、高感度、定量的な技術の商業的な需要は長らく存在した。これらの技術は医療、研究、農業、環境保全、獣医医療、工業生産の一部等から成る幅広い分野への応用に適している。これらの診断技術により、高感度、高処理能力、使いやすさ、耐久性やテスト当たりの低コストが実現され、新たな応用領域が生まれる。

## 【0003】

一部の診断技術は高い感度を実現しているものの、コストが高い。他の技術は商業的に競争力があっても他の分野に広く適用することができない。高感度と商業的な実現性、幅広い適用性を兼ね備えた技術が将来的に診断技術市場で重要な位置を持つことになる。

40

## 【0004】

現在、診断の応用には多くの異なる分析方法が使用されている。(例：放射活性標識、酵素結合免疫測定法、比色定量、蛍光光度に基づく分析、化学発光、陽極又はホットエレクトロン誘発電気化学発光 (ECL) ホットエレクトロンによって誘起される電気化学発光 (HECL) については米国特許 6 2 5 1 6 9 0、クルマラ . S . に詳細記載。これらの技術はそれぞれ感度、使いやすさ、耐久性、スピード及び実用コスト等、商業性を左右する特徴がある。技術ごとの特徴は物理的制限による。例として、多くの放射活性標識の応用のデメ

50

リットは放射性核分裂による標識の経年劣化、及び放射性廃棄物に関する安全、環境保全にかかる追加費用である。多くの分散型診断における高感度技術の応用についてはその高い複雑性と計装によって限られており、専門家による測定が必要である。測定の複雑性は通常、計装及びテスト自体のコストと直接関係がある。例として、商業的に人気のある陽極電気化学発光 (ECL) があげられる。陽極ECLに必要な計装は複雑な機能を備えた実験室ロボットであり、使用に専門的な知識が必要となる。又、測定の手順に度重なる複雑な洗浄、準備が含まれる。上記すべてが測定のコストを上げ、廃棄物の量を増やす要因であり、分析方法を分散型分析の実用的ニーズに対応できない原因となっている。

**【 0 0 0 5 】**

商業的に重要な測定技術は、標識化合物を用いた混合物中の分析物の識別と測定に基づく。免疫測定法など、生体分子の特質に基づく測定においては、測定される分析物 (X) を異なる分子との混合物から固相の抗体に選択的に付着させ、付着した分子を他の分子 (マークされた化合物 (X) に特異した抗体。例：適当な標識化合物で標識されるなど) の力を借りて測定することができる。標識化合物の例として放射性同位元素、酵素、光吸収分子、蛍光又は燐光分子、特定の金属キレートなどが挙げられるがこの限りではない。これらの標識は化学結合によって抗体に付着する。精製された化合物 (X) を標識し、競争的反応によって未知のサンプル中の標識されていない (X) を識別することもできる。DNA及びRNAの測定技術も選択的な生物親和性に基づいており、その為に類似した方法で測定することができる。他にも多くの化学、生化学分析を同様の方法で実行する事ができる。

**【 0 0 0 6 】**

最近では、サンプルからいくつかのパラメータを同時に測定し、過去よりもさらにコストを下げたり、測定精度を上げたりすることが望まれている。同時測定を実現させる一つの方法として、異なる波長で発光するか異なる寿命を持つ標識 (蛍光性又は燐光性) を使用することが挙げられる。免疫診断で使用することができる他の測定方法や技術については、デビッド ワイルド編、免疫測定ハンドブック、ストックマン プレス リミテッド、ニューヨーク、1994、1から618ページに記載されている。当然、溶液中の標識化合物を "あるがまま" に測定する (標識として使用されていない時の化合物のみを分析) ことが可能である。

**【 0 0 0 7 】**

以前より、分析時の標識化合物としての使用に適している有機化合物及び金属キレートを光又は電気化学的に励起させ、標識化合物特有の発光を生成させられることが知られている。光ルミネセンス又は電気化学発光に基づく手法は通常非常に高感度であり、標識化合物の励起によく適している。しかし、測定濃度が非常に低いため、ケース固有の障害が生じる。蛍光の使用は特にチンダル、レイリー、ラマン散乱によって複雑化される。生体サンプルを測定する際、励起パルス後にほぼ確実に強く短命なバックグラウンド蛍光が発生する。液相では、燐光は主にランタニドイオンが特別に合成された有機化合物キレートと共に使用されている場合のみ使用可能となる。これら標識化合物の長寿命な光ルミネセンスに基づく技術における問題点は、その複雑性と計装のコストである。

**【 0 0 0 8 】**

一般的にECLの特別な利点は、電氣的励起の低いコストと、複雑な励起光学系を必要としないより単純な構造 (光ルミネセンスと比較して) である。さらに、上記の光ルミネセンスにおける問題点が避けられるという利点もある。不活性金属電極が使用されている、通常のいわゆる陽極電気化学発光は、非水系溶媒中の比較的簡単な装置で有機発光団の標識と共に使用することができる。しかし、商業的に関心の高い生体親和性分析の大部分は水溶液でしか使用できない。生体親和性分析のサンプルはほぼ全て水溶液であり、従って標識の測定手段は水、又は最悪でもミセル水溶液中で使用できなければならない。さらに、水性又はミセル水溶液中の陽極ECLでは、特定の遷移金属しかECL 標識として機能することができない。

**【 0 0 0 9 】**

分析化学で使用される陽極ECLの応用でこれまでのところ最も商業的に重要な位置を占め

10

20

30

40

50

るのは、Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>キレート誘導体の誘導体を標識として利用し、標識をミセル水溶液中より検出する手法である。ミセル溶液はミセル平衡の制御不能な複雑さによって常に多様な攪乱要因に敏感である。

#### 【0010】

すなわち、ミセルに依存しないホットエレクトロン誘発ECLは陽極ECLと比較して多くの重要な利点を有する。従ってこの発明の例は主に陰極ECLを利用する。陽極を使用する方法も、免疫測定法、DNAハイブリダイゼーション分析両方において使用可能である。(ブラックバーン Gら著、1991年、クリンケム 37: 1534~1539ページ; ケンテン Jら著、1992年、クリンケム 33: 837~879ページ)この手法は現在ロシアダイアグノスティックにおいて商業利用されている。免疫測定及びDNA又はRNAプローブの応用のため、実験室ロボットが磁性粒子を移動させ、分析物の定量測定の標識が金の連続使用作用電極に転写される。(マッシー、リチャード Jら著、米国特許番号5746974; レランド ジョナサンら著、米国特許番号5705402)磁性ラテックス粒子の反復処理は多くの点から困難であるため、この手法は複雑で正確な液体処理能力を持つ高価な実験室ロボット(例: Elecsys 1010及び2010)を用いてのみ可能である。さらに、巨大な金の連続使用作用電極は分析ごとに煩わしい洗浄及び前処理を必要とする。(エレクス サービスマニュアル、70ページ)

10

#### 【0011】

特許 JJS 5705402 が示すように、標識物質の励起は金電極と接触する微粒子の表面で起こるため、電界発光に微粒子を用いる事は必ずしも最適ではない。微粒子は非常に小さい(例: 直径2800nm)が、球状の粒子のほんの僅かな部分以外電極に接する事ができない。従って、微粒子によって運ばれる標識の僅かな部分のみが励起可能である。光子の一部のみを(光学的に非透過な)作用電極と反対方向の検出器で検出することができるため、ラテックス粒子を含む磁性物質の乏しい光透過性によって作業効率は更に減少する。この方向は主に、検出器が従来型の分析器で発見する。

20

#### 【0012】

従来の電気化学に基づく陽極ECLは通常、作用電極として不活性金属(例: 白金又は金)又は炭素を要する。しかし、これらの電極材料の使用は水の分解(陽極で酸素、陰極で水素が生成される)によるその狭い電位窓のために限られている。すなわち、ECL標識としての使用に適した発光団は限られた電位窓のために励起反応に必要な陽極、陰極電位に達することができず、通常の不活性電極に使用される方法で電氣的に励起することができない。これは、陽極ECLが多パラメータ分析に必要な同時励起、及び複数の標識の時間分解検出を実現することができない理由でもある。陽極ECLは非常に大規模な集中研究室のニーズにのみ適している。測定装置の高コストと極端な複雑さにより、従来から存在する陽極装置及び技術は、分散分析の市場(例: 診療所、小規模な病院、患者の自宅等)での使用には適していない。

30

#### 【0013】

上記以外の陽極ECL、生体親和性分析におけるHECLの両方の特別な欠点として、分析の精度を最適化するため、反応性分子を運動平衡に到達させられるだけの長いインキュベーション時間が必要な事がある。この問題は多孔性のディスク装置を用いて比較的効率的に解消することができる。(米国特許番号2009178924 (AI), アラクレメ, Tら)これらの装置の問題点として、今のところ作用電極しか含まれておらず、対電極が電子科学照度計の連続使用セルの内部に存在するという点がある。セルの入念な洗浄が必要でかつ時に非常に困難であり、特に対電極上に形成する陽極皮膜の除去は難しいうえに時間がかかる。代替案として、対電極を測定力セット中、作用電極の近くに設置することができるがこれもそもそも困難な上、光が電極に到達するのを妨げないようにしなければならない。

40

#### 【0014】

ホットエレクトロン電気化学は絶縁体で覆われたシリコン電極又は同じく絶縁体で覆われたアルミニウム電極を作用電極(FI 20100246, クルマラ Sら)として、導体を陽

50

極として平面上で利用されてきた。ホットエレクトロン電気化学の問題点として、同じ電極材料を用いて酸化物で覆われたシリコン又はアルミニウム陰極と同レベルの結果を出すことのできる平面統合陽極/陰極システムを実現する事のできる電極が存在しないことが挙げられる。シリコン及びアルミニウムの問題としては、これらの材料で作られた平面統合陰極/陽極チップでは標識が初期の一部の励起パルスでしか励起されないため、多用することができない点がある。その後、非常に速い陽極酸化皮膜の形成がセルに流れる電流を阻止し、同時に酸化皮膜形成中に非常に高強度な個体電界発光(電流蛍光とも呼ばれる)が発生する。残念なことに、電流蛍光はまた、長寿命の発光成分を含み、従ってランタニドキレート標識として時間分解電気化学発光測定を実行することができない。アルミニウム及びシリコン陰極/陽極チップの表面を有機ポリマーで保護する事によって上記の問題は軽減されるが、生体親和性分析における標識化合物の励起及び平面陰極/陽極チップに使用出来る電極材料を発見することは不可能に思える。

10

**【0015】**

私達が陰極/陽極チップの開発に取り組む中、陽極酸化防止のためにアルミニウム電極ガラス製チップの陽極部分がカーボンペーストで覆われていなければならないのにも関わらず、ミスによって陽極、陰極部分の両方がカーボンペーストで覆われたことがあった。チップが作られてから、測定でテストされたが、驚くことに、TB(iii)キレートが高振幅電気パルスを光らせた。私達は、このホットエレクトロン電気化学が原因だったと考えた。たとえ炭素電極や、その他の導線のトンネル排出が可能ではないとしてもである。比較のために、有機蛍光体(8-ヒドロキシキノロン剤と7-アミノ酸4-メチルクマリン)を励起にしようとしたが、炭素電極に測定可能なECLを与えなかった。従って、以前に発見されていなかった炭素電極に関連する現象が見つかったと考えられ、それは電気励起や炭素電極の組み合わせに適している、

20

**【0016】**

フラーレンと、カーボンナノチューブ、これらに似た現在の新しい炭素技術の基礎は、最近になって発見されており、炭素化学にはまだ発見も研究もされていない領域が多くある。私達が記載した励起は、リガンドで発生した励起ではなく、電極表面のテルビウムイオンとの直接接触が原因である可能性がある。電極表面に(水素、酸素、特に原子の形態で)形成されたガスが、反応メカニズムの重要な役割を果たしていると推測することもできる。いずれの場合もこの発明による電気化学発光は、反応のメカニズムはまだ不明な点があるが、効率的な生体親和性アッセイに使用できる。

30

**【0017】**

この発明によると、陰極/陽極チップの代替として電極/電極チップ(EEチップ)が生成可能である。EEチップでは、二つの電極のチップのうちどちらを、陰極として或いは陽極として使用しても問題がない。印刷によるカーボンペースト電極の生産は、考えられる電極の生産技術で最も安く、これは、使い捨て電気化学発光ベースの診断チップとカセットで画期的な発明である。このため(HECLをベースとした手法と比較して)、非常に競争力がある電気化学発光が、発明で記載したEEチップの類を使用して実現可能である。これは、HECLで使用されていたものよりも大幅に安い。上記を可能にする方法と機器は、1-10の特許要件に記載している。

40

**【0018】**

また、この発明に記載されている注目すべき炭素電極の組み合わせは、直接ポリマーカセットの半分で生産することが可能で、通常のEEチップのそれ自体の半分よりも大きい。加えて、半分を、統合された流体的な操作と、サンプルを取り、加え、フィルターにかけ、試薬に加える操作にすることが可能です。この半分は、光学的に透明である必要はない。炭素電極を含まない半分は、光学的に透明であることが望ましいが、光学的にのみ透明なウィンドウ部分が含まれる。必要に応じて、このウィンドウ形成は、材料に応じて選択されている場合、光フィルターとして機能する。

**【図面の簡単な説明】****【0019】**

50

図 1 簡単な E E チップベースは、電極(2)と(3)の上で、両面テープで接着され、ブラシでペイント、若しくは印刷されている 19 mm x 10 mm のガラスまたはプラスチックチップ(1)。乾燥された電極の上には、穿孔された接着性のプラスチックシートで接着されたリング(4)がある。このリングは、それ自体がもつ接着剤によってチップ上に接着され、7 mm 内側直径セル部分(5)が形成される。80 ~ 150 のサンプルや他の溶液がセルの中にピペットされる。

図 2 プラスチックセルベース(a)。アルミや銀インク層上に炭素電極が形成されカーボンペーストなしで、電極の電気接触表面が残る E E チップ(b)。穿孔から、保護フィルムでテーピングする(c)。四角いテープ用の穿孔ツールと粘着ラベル(d)、サンプルのピペット前に測定セルの中に置かれた E E チップ。

図 3 Tb(iii)は異なる方法で製造されたカーボンペースト電極のキレートキャリブレーションカーブ'(a)例 2 の電極(b)例 3 電極 (c)例 4 の電極、および(d)例 5 の電極

図 4 電気化学発光の強さに対する過硫酸塩の効果

図 5 E E チップに接続されている PDM チップ(1)ポリマー、紙、ダンボールやガラス、または任意の組み合わせで通常生成された基本部分。(2)と(3)別のコートティングが可能同一炭素電極。(4)インキュベーションチェンバーと測定チェンバーの PDM チップ(5)の下の方と、サンプル入力と、試薬の追加の為にチップから到達するオープンチェンバー(6)、細流路(7)、インキュベーションエリアへの導入、空気除去のチャンネル(8)。PDM チップと E E チップは一緒に小さなクランプで押されている。カセットにも同様に接着されていたが、細流路の遮断を防止する可能性があるため、ジャンクションクランプが使用された。クランプの代わりに、チップを固定するため、プラスチックのフレームを使用することが可能であった。

図 6 カセットの免疫測定法が E E チップと PDM チップを生成

図 7 E E チップ上のハイブリダイゼーションのアッセイ

図 8 E E チップ上での 2 つ同時の免疫測定

【0020】

発明の詳細説明

この発明は、前に記載した複雑な計装と同様の効率性で、いかに簡単で安い装置が、異なる分析に使用できるかを示している。免疫測定法または DNA ハイブリダイゼーションが、使い捨ての E E チップ上か、E E チップ上の多孔質層を併用した場合である。この両方の測定デバイスと測定セルは、分散した分析のニーズに対して十分に安い。

【0021】

この発明は、安い材料の上に、E E セルを作成するさまざまな方法について記載している。これらの材料には、他にも色々材料がある中で、各種のプラスチックや、高分子材料、紙、各種のコートティングを行った紙、ダンボールがある。これらのような材料は、マイクロ分析システムやカセットとの組み合わせが簡単で、分析に必要な他のすべての機能を網羅している。大量生産で、高品質の商品を低価格で製造するためには、印刷という手法が生産方式として非常に良い選択肢である。この発明に記載している電極は、印刷技術による生産に適しており、市場で競争優位性を大幅に向上させることができる。

以前から、炭素電極が、ルテニウムの電気化学発光の文脈で(FI 9 8 1 5 6 8、クルマラ、Sら)、使い捨て陽極として使用することが知られているが、単一の炭素陽極はテルビウム錯体の励起に使用できない。この領域の専門家は、1 対の炭素プラチナ電極の 1 つのプラチナ電極を、炭素電極で置き換えることで、すくなくとも電極が同一レベルかお互いに近接している(今のところ別の幾何学の経験はない)時に、特別な動きをする特別な電極システムを達成することができるであろうとは想像していなかった。電極の機能が陽極性をもつか、陰極性をもつか、若しくは別の極性で生成された中間体の影響で反応が生じた場合に、まだ完全な光源を生成できるかどうか、私達にはまだ確信がない。実験の結果から、ティリタットティーの主要部分は陰極で生成されるようである。

【0022】

この発明は、計測の大幅な強化と、分散した分析の市場を対象とした方式を提供し、安く

10

20

30

40

50

、定量的で高速なテストを可能にする。上記は、セル領域の疎水性のリングに適した最も簡単方式か、より複雑な解析カセットで統合された要素として、EEセルを使用して実現される。

【0023】

この発明の目的は、生体親和性アッセイの標識を、直接、EEチップの表面からか、EEチップデバイスの多孔質層(多孔質膜)によって、励起するための方式と装置である、この方式は、免疫化学とDNAプローブの高速アッセイに使用することができる。EEチップとこの発明で記載した方式でテルビウム錯体以外の標識を励起することがやがて可能となる。

【0024】

この発明は、主要部分がEEチップの装置で構成されている。EEチップの電極の表面は、抗体やDNAで知られている方法でコーティングすることができ、コーティングに付着した標識分子は電気パルスで励起させることができる。この発明によれば、電極(または、電極部分に接触した任意に追加した多孔質層の表面)は、ラングミュアープロジェクトフィルムや特別な優位性がある他の簡単に作られたフィルムでコーティングすることができる。

生体親和性アッセイの多孔質膜を使用している場合にしばしば大きな優位性が生じる。多孔質層によって、サンプルは、抗体にコーティングされた部分に均一に分散される。多孔質層は、液体の流れの同型遺伝子性の補償として機能し、マイクロフルイディクスシステムの泡生成や、温度の拡散、表面張力を回避し、それらのマイクロフルイディクスのフローやマイクロ層のセルが引き起こした問題を解消するように所見される。

【0025】

電極の表面について発明に使用されるフィルム(多孔性層、aka 多孔質膜)は、その微細孔性と100 μm以下の薄さが特徴である。これらの種類の材料は商業的にMilliporeや、MSI、Sartorius、Pall、Sigma、DuPont社など多くの会社から入手可能である。膜は、等方性でも異方性にでも良い。フィルムの製造技術は様々で、プレス加工や延引加工の場合があり、気孔は、化学的か物理的に生成され、異方性フィルムは相転移による。PTFEや、ポリビニリデンフッ化物、ポリカーボネート、ポリスルホン、ナイロン、セルロースエステルなどが適切な材料である。これらは、異なる細孔サイズや、厚さ、異なる物理化学的特性で、商業的に入手可能である。ファイバー フィルター、ろ過紙、ろ過布などの繊維状材料が使用可能である。

【0026】

製造上の理由で、EEチップは乾燥した状態での保管が好ましい。液体サンプルやEEチップやチップでの多孔質層のバッファソリューションを加えて装置を稼働状態に設定する。したがって、直接電極上や膜と電極間で、生体親和性反応に適した条件となる。

【0027】

この発明が記載したEEチップには、代替する選択肢がたくさんある。基本的に必要なのは、十分に導電性のあるカーボンペーストを直接、チップ上の電極チップの製造に使うことである。通常それは、プラスチックや、紙、ガラスチップやストリップであり、印刷技術で製造されるのが最も典型的である。

【0028】

カーボンペーストのコンダクタンスが不足する場合は、カーボンペーストの下に例えば、シルバーインクや、薄い金属層のような、導電性の高い層を生成することができる。そして、それらは、カーボンペーストで強力に覆う。従って、抵抗性をもったカーボンペーストフィルムの中に、長距離があり、潜在的なドロップが発生しないので、ECLを生成するには、すでに比較的到低電圧で十分となる。

【0029】

EEチップは、さまざまな異なる手法で、異なる材料の最適な特徴を利用して、通常の診断カセットの一部として接続される。例えば、通常、チャンネルやセルのような高分子材料で作られたカセットの一部分とするのが目的であり、乾燥化学で試薬を加えた後、診断測

10

20

30

40

50

定の必要なすべての機能を発揮させるので、一般的に、使い捨てのカセットは使用後、使用中に決して開けない。

【 0 0 3 0 】

次の図では、発明について、図や例（応用はこれに限らない）と例に関連した数値でより詳しく説明する。

例 1 セル領域にカーボンペーストのみを使用した電極材料の E E チップ電極の製造

図 1 に示す 1 対の電極は、10 x 19 mm のプラスチック製チップ上にテンプレートを用いて、カーボンペースト (Creative Materials 1 1 0 - 0 4 Carbon Ink, Tyngsboro, MA, USA) を塗布している。高さ 0.2 mm、幅 0.5 mm のルート面をチップの中央に残し、ミリングで製造した。このルート面が両電極間の抵抗として用いられた。(図 2) カーボンペーストが乾燥した後に、追加の層がシルバーインク (Bison electro G-2 2, Bison Inc, Netherlands) で塗られ、シルバー層がセル領域に殆ど到達している。(図 2) セル領域は、穿孔されたテフロン (登録商標) テープ (Irpola Oy, Turku, Finland) か、一般的な穿孔テープ (7 mm か 8 mm の穴が真ん中についている図 1 のように丸型ではなく四角型) を、電極の左端に図 1 に示すように接着させて形成する。Tb-2, 6-bis[N,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]-4-ベンジンフェノールキレートと Tb(III)-N'-4-イソチオシアナートベンジル)ジエチレントリアミン-N,N,N,N-テトラアセテートキレートの両方が励起し、このセルの中で時間分解能で測定される。しかしながら、例 2 の E E チップでは、はるかに高い強度が他のランタノイドイオンの対応するキレートがテルビウムよりも大幅に低い強度で与えている。

【 0 0 3 1 】

例 2 カーボンペーストを覆うシルバーインクによる E E チップの製造

図 1 に示す 1 対の電極は、10 x 19 mm のプラスチック製チップ上にテンプレートを用いて、シルバーインク (Bison electro G-2 2, Bison Inc, Netherlands) を塗布している。高さ 0.2 mm、幅 0.5 mm のルート面をチップの中央に残し、ミリングで製造した。このルート面が両電極間の抵抗として用いられた。(図 2) カーボンペーストが乾燥した後 (5 時間) に、上層にカーボンペースト (Creative Materials 1 1 0 - 0 4 Carbon Ink, Tyngsboro, MA, USA) をその上部に加え、一晩、室温に放置した。セル領域は、穿孔されたテフロン (登録商標) テープ (Irpola Oy, Turku, Finland) か、一般的な穿孔テープを、電極の左端に図 1 に示すように接着させて形成する。Tb-2, 6-bis N,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]-4-ベンジルフェノールキレートのキャリアレーションカーブが図 3 (a) に示されている。白丸。測定器は、スタンフォードリサーチ SR400 フォトンカウンタで、クワースタティックパルスジェネレータと黒のプラスチック E E le3/4r e ^{harb}e \*、パーキンエルマーチャンネル光電子増倍管モジュールと接続されている。測定値のパラメータは以下の通り。パルス電圧 -6.7 V、パルス充電  $\mu / i 5 3 0$ 、パルス周波数 20 Hz ECL 強度は 1000 以上の励起サイクルに設定、遅延時間 0.05 ms、測定ウィンドウ 6.0 MS 0.05 m ナトリウムテレボレート、バッファ、pH 9.2、が使用された。

【 0 0 3 2 】

例 3 カーボンペーストから紙の上の E E チップの製造。

まず、オープンペーパー (対油性の紙) にシルバーインク (Bison electro G-2 2, Bison Inc, Netherlands) をコーティングし、カーボンペースト (Creative Materials 1 1 0 - 0 4 Carbon Ink, Tyngsboro, MA, USA) の層をシルバーの上にコーティングする。シルクスクリーン印刷のようにテンプレートをコーティングで使用。カーボンペーストが室温で 2 時間乾燥された後に、図 2 のベースにストリップを使用して紙から切り離す。、用紙の端のベースのルート面に、カーボンペーストを塗布し、シルバーが電解液と直接の触れ合わないようにする。最後に、紙をプラスチックベースに両面テープ (3M) で接着し、セル領域を形成するテープリングをチップに接着する。

## 【 0 0 3 3 】

Tb- 2 , 6 -bis[N,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]- 4 -ベンジンフェノール キレート のキャリブレーションカーブが図 3 (a)に示されている。白丸。測定パラメータは例 2 と同じ。

## 【 0 0 3 4 】

例 4 カーボンペーストを塗布した金属フォイルのストリップによる E E チップの製造。まず、10 x 19 mmのプラスチックチップの上にアルミフォイルのストリップを接着して、1対の電極を作る。高さ0.2mm(或いは、別の選択として0.3mmか0.4mm)で幅0.5mmのルート面を、両電極間の抵抗として機能するよう、ミリングでチップの中央に残す。(図2)アルミフォイルのストリップにカーボンペースト(Creative Materials 110-04 Carbon Ink, Tyngsboro, MA, USA)のコーティングを行い、スプリングスタッド/ピン(装置のパルスジェネレーターにチップを接続)の接触部分の右端が覆われないようにする。セル領域は、穿孔されたテフロン(登録商標)テープ(Irpola Oy, Turku, Finland)か、一般的な穿孔テープを、電極の左端に図1に示すように接着させて形成する。Tb- 2 , 6 -bisr ,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]^b^zoylp"hen0l" キレート のキャリブレーションカーブが図 3 (a)に示されている。白丸。例 8 に示された通り、同様な電極も蒸着で生成されたアルミ板から始めて生成することができる。測定パラメータは例 2 と同じ。

10

## 【 0 0 3 5 】

例 5 カーボンペーストに覆われた市販メタルステッカーからの E E チップの製造。まず、10 x 19 mmのプラスチックチップの上に、銅製のフォイルスステッカー(S cr E En House, Turku, Finland)を接着して、1対の電極を作る。高さ0.3mmで幅0.5mmのルート面を、両電極間の抵抗として機能するよう、ミリングでストリップの中央に残す。(図1)銅製フォイルのストリップにカーボンペースト(Creative Materials 110-04 Carbon Ink, Tyngsboro, MA, USA)のコーティングを行い、ストリップの右端のスプリングピンとパルスジェネレーターの接触部分が塗布されないようにする。セル領域は、穿孔されたテフロン(登録商標)テープ(Irpola Oy, Turku, Finland)か、一般的な穿孔テープを、電極の左端に図1に示すように接着させて形成する。Tb- 2 , 6 -bis N,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]- 4 -ベンジンフェノール キレート のキャリブレーションカーブが図 3 (d)に示されている。黒丸。例 8 に示された通り、同様な電極も蒸着で生成されたアルミ板から始めて生成することができる。測定パラメータは例 2 と同じ。

20

30

## 【 0 0 3 6 】

例 6 ECLの強度に対する過硫酸塩の効果

まず、例 2 の手順で十分な E E チップを生産する。様々な添加剤の電気化学発光への影響の研究をする際に、過硫酸塩を加えることで電気発光が増加したことに気づいた。過硫酸塩が、硫酸根を生成する過程で減少している可能性があることを示している。硫酸根は水溶液中のTb(III)イオンとキレートから化学発光を生じさせることで知られている。(S . クルマラら, アナル チム アクタ 294 ページ (1994年) 13-25.) .

## 【 0 0 3 7 】

カリウム過硫酸の濃縮の信号強度への効果の研究がさらに進み、過硫酸の濃縮が増加すると、研究した濃縮範囲(図4)を通して、Tb(III)キレート(1 x 10<sup>-6</sup> M Tb- 2 , 6 -bis[N,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]- 4 -ベンジンフェノール)のECLの強度を大幅に増加させることに気づいた。

40

## 【 0 0 3 8 】

強度の増加がカリウム過硫酸塩の最も高い溶解量(約50mM)にまで続き、より高い濃縮が過硫酸ナトリウムで達成できる可能性がある。測定パラメータは例 2 と同じ。

## 【 0 0 3 9 】

例 7 酸とベースのトリートメントの効果。

電極の安定性が酸性条件と基本的な条件の下で研究され、電極が2度目に使用されたとき

50

にパフォーマンスが向上したことが判明した。このため、例2で記載した手順で製造されたEEチップを15分間、1M NaOH溶液、1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液、1M HCl溶液でインキュベートし比較した。インキュベーションの後で、電極を蒸留水で洗浄し、 $\mu$ Tb-2,6-bis[N,N-bis(カルボキシメチル)アミノメチル]-4-ベンジンフェノールキレートで測定された。測定パラメータは例2と同じ。結果は、下記の表の通りで、酸によるトリートメントと基本のトリートメントの双方で明確に電極の効率性が向上した。

【表1】

ECLの強度／光子				
$\mu$ Tb (III) キレート	未処理	1M NaOH で処理	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> で処理	1M HCL で処理
測定値	337532	956184	697300	538215
再測定値	317307	921739	615300	481643

10

範例8 PDMSチップにより一個の電池に形成されたEEチップでの免疫測定

20

## 【0040】

例8 .

PDMS (ポリメチルシロキサン) のチップはペトリ皿上のシリコン・エラストマー (硬化剤 1 : 10) の鋳型によって作成された。濡れたPDMSは真空内でガス抜きされ50°Cの温度で2時間かけて硬化された。固まったPDMSは型から外されて小さな断片に切断された。

## 【0041】

PDMSのチップには左辺にサンプルと試剤を投入する空間 (図5の6) があり、そこで分析前に生物親和性の分析に必要な試剤が乾燥された。このサンプル投入空間はマイクロチャンネル (図5の7) で培養及び測定の空間 (図5の5) に接続されていた。毛管力と静水圧が液体を培養 / 測定の空間に運び、空気は空間よりマイクロチャンネル (図5の8) を通して排気された。培養 / 測定の空間にはPDMSのチップの空間を一定のサイズに保ち、圧縮されないための小さな支柱を置いた。培養 / 測定の空間の高さは0.35mm、体積はカリパス 15  $\mu$ iでPDMSチップ全体の厚さは5mmであった。

30

## 【0042】

最初にガラス・チップ (19.00mm x 10.00mm) の上面がプラズマで簡単に処理された。それから、カリパス0.3mmの厚さのアルミニウム層がマスクの下に装着されたガラスチップ上のマスクを通して真空蒸着された ; チップの両電極 (図1の2と3) が形成された。この後アルミニウムの電極は炭素ペースト (Creative Material 110-04 Carbon Ink, Tyngsboro, MA, USA) でストリップの右辺のバネ懸架式のピンの接触箇所が塗られないように包括的に塗られた。

40

## 【0043】

hTSH (人体甲状腺刺激ホルモン) がモデル被分析物として使用され、反TSH (MOAB、ロット番号 : M-21310、カタログ番号 MIT0406、円錐 6.87mg/mL ; Medix Inc, USA) に接続した亜粒子が主要 (捕獲) 抗体とされ、そして二次的な (標識マーク付き) 抗体は 亜粒子特定の反TSH (クローン5404、ロット番号 SPC099、円錐 5.5mg/mL、Medix Biochemica Oy Ab Finland) とされました。人体TSHの測定目盛基準はWallacの濃縮貯蔵溶液 (DELFLIA hTSH kit、324mIU/mL TSH

50

)を希釈して生成された。

【0044】

標識マーク付きの二次抗体(反hTSH、クローン5404、5.5mg/ml、Medix Biochemica Oy Ab)はTbキレートのイソチオシアナート派生物を抗体と80倍のモル過剰体積内で反応させて生成する。反応をそのままpH9.5で一晩進行させた。標識マークされた抗体は高さ52cmのサファローズ6Bの上に5.5cmのセファデックスが重なっている直径1cmの円柱内で分離された。

【0045】

炭素ペーストが乾燥した後、電極は以下の手順に従ってEEチップ上の測定セルのエリアにあるテープによって形成された槽内の抗体で塗られた。

【0046】

150個の30ng/mLの捕獲抗体(0.1MES、0.2M ほう酸塩、0.025%ウシガンマグロブリン pH 6.5)を含む溶液が培養槽に加えられ、台の下のアジ化物を含んだ水が底に入っている密閉したプラスチックの箱で3時間培養された。塗装が終了後、セルのエリアは洗浄溶液(0.05M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> バッファー、pH 7.75、0.1%ウシ・アルブミン、0.1%Tween 20 及び0.1% NaN<sub>3</sub>)で洗われた。

【0047】

次にPDMSチップ(25mm x 14mm、厚さ5mm; 図5の4)がEEチップに適度の堅さで圧着するように留め金で取り付けられた。この後、溶液の $\mu$ iがPDMS-EEのカセットの左辺にあるサンプルの取り口の空間に加えられた。溶液は0.05M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>のバッファー(pH 7.75、0.1%ウシ・アルブミン、0.1% Tween 20 及び0.1% NaN<sub>3</sub>)内の標識マーク付きの二次抗体を含んでいた。

【0048】

0.2Mのテトラほう酸ナトリウムのバッファー(pHはH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で7.8に設定; 0.5%ウシ・アルブミン、0.05%ウシ・ガンマグロブリン、0.01% Tween 20 及び0.1% NaN<sub>3</sub>)が免疫性分析と測定バッファーに使用された。最初に25 $\mu$ lの標準hTSHが175の免疫性分析と測定のバッファーに加えられた。混合物は標識マークが既に乾燥していたサンプルの取り口空間(図5の6)にピペットで加えられた。サンプルが標識マークを溶解し、混合物は毛管力と静水圧でマイクロチャンネル(図5の7)を通して培養/測定の空間(図5の5)に運ばれ、空気は他のマイクロチャンネル(図5の8)を通して排気された。

1.

15分間の培養後以下の測定機器を使用して各PDMS-EEカセットからECLの強度が測定された: ラボ製のクーロスタティック・パルス発生器、スタンフォード リサーチ機器のSR400プロトンカウンター、Nucleus MCS-IIのマルチチャンネル・カード及び黒色のプラスチックで作られ、パーキン・エルマーのチャンネル光電子増倍管のチューブ・モジュール(パルス振幅-45V、パルス充電 15 $\mu$ ^、パルス周波数 20Hz; 0.05msのデイレートと6msの測定期間を伴う200以上の刺激の周期のECLの強度の測定値が統合された)を伴う閉塞されたセルの測定空間。測定の結果は図6に表示されている。

【0049】

例9 EEチップスの交配

EEチップは例6と同様に蒸発したアルミニウムと炭素ペーストから生成されました。チップのセルのエリアは範例1と同様にテープで形成された。

【0050】

決めるべきシーケンスは人体のエンテロ及びライノウイルスに共通な120ヌクレオチドの断片でした。断片はRT-PCR法(Lonrotその他、J. Med. Vir. 56 (1999) 378-84.)によってコピーされていた。このシーケンスは集中化した

10

20

30

40

50

診断ラボでエンテロとライノウイルスを特定するために日常的に使用されている。

【0051】

決めるべきシーケンスの5'末端に補足的なプローブ1 (TTA - GCC - GCA - TTC - AGG - GGG - CGA - AAA - AA - C6 - NH<sub>2</sub>; Med Probe AB, Sweden) が炭素ペーストの電極に塗られた。塗装には (APTES) のアミノ・グループが (3アミノプロピル) トリエトキシランでのシラン処理によって酸化物の層で覆われている電極に加えられた。プローブ1の3'の末端にポリ -、テール -、硫化 - カarbonの脂肪族カarbon・チェーンと末端のアミノ・グループが加えられました。最終的な共有結合性のボンディングがDSSの二重試剤 (スベリン酸ジオクシンイミジル) で生産者の指示に従って行われた。

10

【0052】

第二のプローブ (プローブ2) ((NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - GA - AAC - ACG - GAC - ACC - CAA - AGT - A) にはプローブを80倍過剰なキレートと共に0.5Mの炭素塩バッファ (pH9.5) で一晩培養することによってTbキレート (Tb - 2, 6 - bis [N, N - bis (カーボキシメチル) アミノメチル] A - 4 - ベンゾイルフェノール) のイソチオシアナート派生物で標識マークが付けられました。培養後標識マークが付けられたプローブはセファデックスG50の円柱で洗浄された (NAP - 5の円柱、GEヘルスケア)。

【0053】

交配は以下の方法で行われた。1he ~ K1 : | ' CR ~ 倍加されたDNAのサンプル (20 μi ^、希釈率1 : 50、1 : 100、1 : 1000) が180 μi、NaOH (50 mmol / L) で変性され37 で5分間培養された。サンプルは200 μiの中性バッファ (6xSSC, 0.3% Tween20、20 mmol / Lのクエン酸) を加えたことにより中性化した。中性化されたサンプルと標識マークが付けられたプローブ2 (0.6 ng / μE、50 mmol / L Tris - HCLバッファ pH7.8、600 mmol / L NaCl、1% Triton x100及び1% 遮断剤 (Roche)) の双方が10 μE新たな一つの試験管に移された。混合後、混合物の3.5 μiがテスト・ストリップの膜の部分にピペットで移された。交配後 (5分) シリコンの電極から膜が外され、EEチップが3回洗浄されてECLが測定された。簡単なサンプルの希薄化のグラフが図7に表示されています。測定パラメーターは範例8と同じである。

20

30

【0054】

例10 一つのEEチップ上での二つの被分析物の免疫性の分析判定

一つの電極がCRP捕獲の抗体で塗られ、他の電極がTSH捕獲の抗体で塗られた故にC反応性タンパク (CRP) と甲状腺刺激ホルモン (TSH) は同時に判定されました。EEチップの電極はテープで作られた長方形の槽内の捕獲抗体で塗られた。テープには長方形の複数の穴が雛形を使ってナイフで開けられた。各槽は図1に示されるようにもう一つの丸い穴の付いたテープを加えることで作られた事前の処理の終わりに作られた最終の丸いセルのエリアより少し大きな符合する電極の範囲をカバーした。

【0055】

双方の抗体は同時にそれぞれのテープの槽内にある電極に塗られた。反TSH (反hTSH、MIT0406、Medix Biotech Inc. USA) は抗体 (25 ng / mL, 150 μi,) を室温で0.1M MES, 0.03M H3B03, 0.5mMクエン酸カリウム、0.025% グルタルアルデヒド及び0.05% ウシガンマグロブリンを含む洗浄溶液に2時間培養することによって電極に塗られました。培養後、テープ槽は洗浄溶液 (50mM Tris - HCL バッファ pH7.8で0.9%のNaCl、0.09% NaN<sub>3</sub>及び0.05% Tween20) で3回洗われました。洗浄後、塗られた電極は飽和溶液 (50mM Tris - HCL 0.05% NaN<sub>3</sub>、0.9% NaCl、0.1% BSA及び6% D - ソルビットでpH7.8) をテープ槽で30分培養して飽和させました。飽和後、テープ槽は電極のエリアから (反CRP塗装のテープ槽と同時に) 取り除かれEEチップは30°Cで2時間半乾燥された。

40

50

## 【0056】

同様な方法で反CRPは抗体(20 ng/mL、150  $\mu$ i、50 mM Tris-HClのバッファー付き)を(他の電極上のテープ槽内で)室温で2時間培養することによって塗られました。培養後、テープ槽は洗浄液(50 mM Tris-HClバッファー0.0%のNaCl、0.09%のNaN<sub>3</sub>及び0.05%のTEEt20)で3回洗われました。洗浄後、塗られた電極は飽和溶液(50 mM Tris-HCl 0.05% NaN<sub>3</sub>、0.9% NaCl、0.1% BSA、6% D-ソルビット及びCaCl<sub>2</sub>でpH 7.8)をテープ槽で30分培養して飽和させました。飽和後、テープ槽は電極のエリアから(反TSH塗装のテープ槽と同時に)取り除かれEEチップは30°Cで2時間半乾燥された。

10

## 【0057】

標識マーク付きの抗体は膜内で以下の如く乾燥させられた。Tb(III)キレート(Tb<sub>2</sub>-6-bis「N,N-bis(カーボキシメチル)アミノメチル」-4-ベンゾイルフェノール)で標識マークが付けられた反hCRP抗体(74 ng/mL、Medix Biochemica Oy Ab 反hCRPクローン6404)と同じTb(III)キレートで標識マークが付けられた反hTSH抗体(80 ng/mL、クローン5404、Medix Biochemica Oy Ab)は50 mM Tris-HClのバッファー(pH 7.7、0.05% NaN<sub>3</sub>、0.9% NaCl、0.5% BSA、0.05% ウシガンマグロブリン、0.01% Tween 20、1 mM CaCl<sub>2</sub>\*20)内で溶解された。抗体のバッファー溶液の0.5が膜(10 x 10 m、ニュークポア膜)の中心にピペットに注入され室温と室内の気体で一晩乾燥された。免疫性分析(CRP内容 1、10及び100 ng/mL)に必要なhCRPの標準サンプルは試験管内でCRPの標準溶液(Scrrips、カタログ番号C0124)を50 mMのTris-HClバッファー(pH 7.7、0.05% NaN<sub>3</sub>、0.9% NaCl、0.5% BSA、1 mM CaCl<sub>2</sub>\*20)で希釈して作られました。同様にTSHの標準サンプル(1、10及び1100 mIU/mL)はTSHの標準(324 mIU/mL、Wallac、DELFLIA hTSHキット)を50 mMのTris-HClバッファー(pH 7.7、0.05% NaN<sub>3</sub>、0.9% NaCl)で希釈して作られた。

20

## 【0058】

免疫性分析はEEチップと浸透性のある膜が始めに乾燥していた状態で行われた。膜はテープ槽が特定したEEチップのセルのエリアにぴったり合わせて置き、テープで固定した。免疫性分析は両方の標準3.5 Tの被分析体を浸透性のある膜(CRP 0 ng/mLとTSH 0 mIU/mL; CRP 1 ng/mLとTSH 1 mIU/mL; CRP 10 ng/mLとTSH 10 mIU/mL; CRP 100 ng/mLとTSH 100 mIU/mL)の上に加えることによって開始された。室温で10分間の培養後、膜が取り除かれ、EEチップのセルのエリアが測定バッファーで洗浄され測定バッファー(0.05 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>と2 x 10<sup>-4</sup> MK2320 g)の $\mu$ iが加えられた。両方の被分析体は最初の10回の刺激周期に反TSHの電極を陰極として測定し、次の10回の刺激周期で極性を変えて反CRPの電極を陰極として測定した。測定は5回繰り返され両方の電極からの信号が加算された。結果から、発光は主に陰極から発生するようである。なぜなら、TSHからの反応は左の電極から受信されており、このような二重の分析は作動するようだが、これらの化合物、TSHとCRPを同じサンプルとして測定するのは必ずしも賢明ではないかも知れない。測定の結果は図8に表示され、パラメーターは例8と同じである。

30

40

< 出願時の請求の範囲の写し >

< 請求項1 > 電解質の溶液内でランタノイドのキレートを電氣的に刺激する方法はその刺激が炭素ペー ストから作られた二つの電極がある電子科学電池内で1 nsから1000 sの持続時間、0.001 Hzから1200 MHzの周期と1 Vから400 Vの振幅を持つ電圧パルスで行われると云うことで特色付けられている。

50

<請求項2> 請求項1による方法は電極の極性が測定期間に少なくとも1度は変わり、その結果測定中に 両法の電極が陽極と陰極として機能したであろうことで特色付けられています。

<請求項3> 請求項1による方法は連続した刺激パルスは2電極であり、その結果電極はパルス発信中に交互に陽極と陰極として機能することで特色付けられている。

<請求項4> 請求項1から3のどの方法も炭素ペーストの電極は印刷技術、噴霧又は塗装によって作られることで特色付けられている。

<請求項5> 請求項1から4のどの方法でも炭素ペーストの電極は金属フィルムの表面、伝導性を持つインク又は伝導性を持つポリマーからなる他の伝導体上に作られることで特色付けられている。

10

<請求項6> 電極/電極チップは陰極と陽極の両方が同時に50 / cm<sup>2</sup>以下の望ましい抵抗を持つ炭素ペーストから形成され、チップの電極がmet K o 3 s “ i h ”の請求項-5の如何なるものにも従ったT b ( I I I )のキレート刺激に適するように電極が抵抗体材上に印刷技術、噴霧又は塗装によって作られることで特色付けられている。

<請求項7> 電極/電極チップは陰極と陽極の両方が上の層として同時に1000 / cm<sup>2</sup>以下の望ましいフィルムの抵抗を持つ炭素ペーストから形成され、チップの電極が請求項1-5の如何なる方法にも従ったT b ( I I I )のキレートの刺激に適するように電極が抵抗体材上又は絶縁体材上に印刷技術、噴霧又は銀のインク、乾燥後に炭素ペーストによる塗装によって作られることで特色付けられている。

<請求項8> 電極/電極チップは陰極と陽極の両方が同時に1000 / cm<sup>2</sup>以下の望ましいフィルムとしての抵抗を持つ炭素ペーストから形成され、チップの電極が請求項1-5の如何なる方法にも従ったT b ( I I I )のキレートの刺激に適するように電極が薄い(カリパス 0.01mm-5mmの厚さ)の抵抗体材又は絶縁体材の層で分けられた二つの金属片又はフォリオ片から作られ、金属片は印刷技術、噴霧又は塗装で塗られることで特色付けられている。

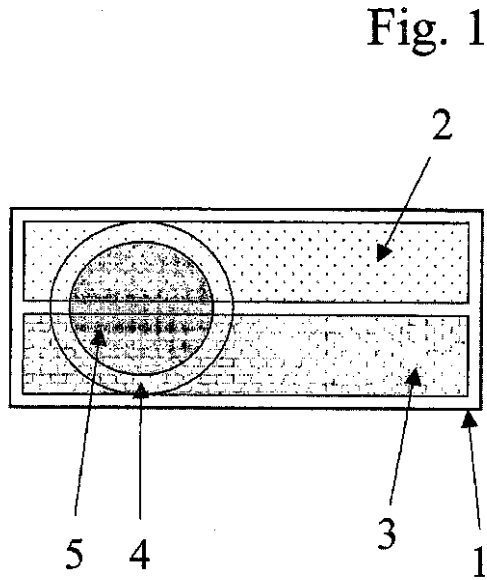
20

<請求項9> 1から8の如何なる請求項に従った電極/電極チップでもそのE C Lの特性がその表面を望ましいアルカリ金属水酸化物とアルカリ性の土壘金属水酸化物からなる化学物質で処理することによって改善されることで特色付けられている。

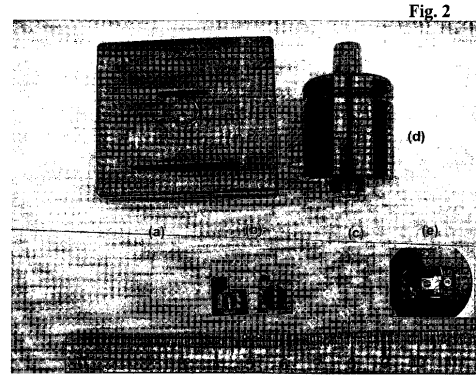
<請求項10> 1から8の如何なる請求項に従った電極/電極チップでもそのE C Lの特性がその表面を望ましい硫酸、塩酸、燐酸又は酢酸からなる酸で処理することによって改善されることで特色付けられている。

30

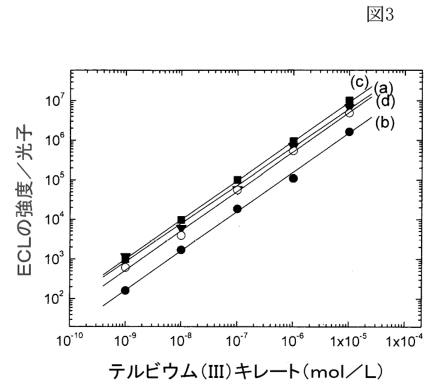
【 図 1 】



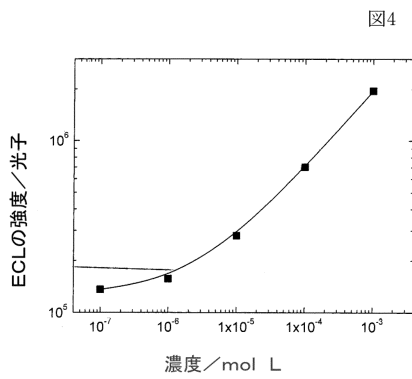
【 図 2 】



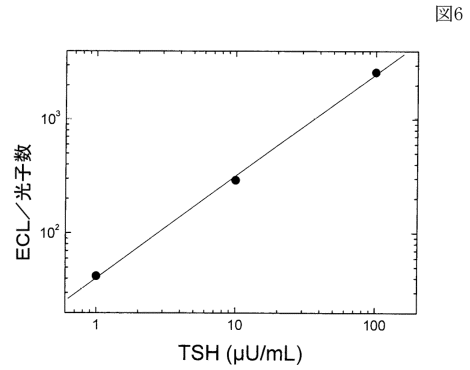
【 図 3 】



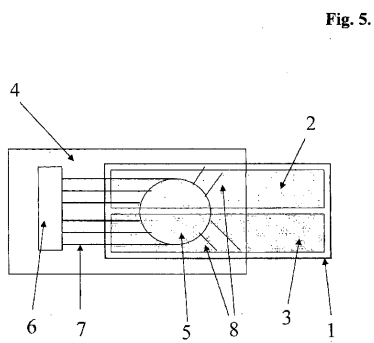
【 図 4 】



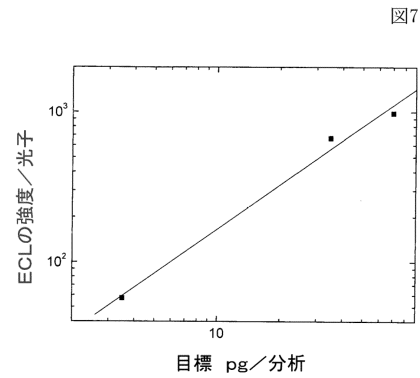
【 図 6 】



【 図 5 】

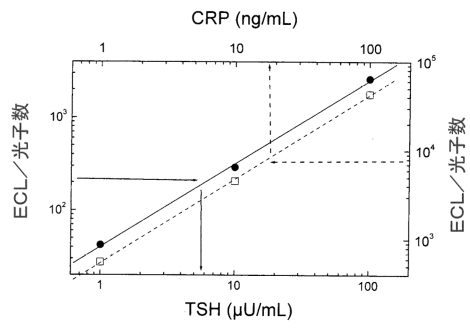


【 図 7 】



【 図 8 】

図8



## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 20100246

(32)優先日 平成22年6月11日(2010.6.11)

(33)優先権主張国 フィンランド(FI)

(73)特許権者 313006854

エスコラ, ジャルコ, ウオレビ  
ESKOLA, Jarkko, Uolevi  
フィンランド国 トゥルク エフアイ - 20610, ペイッポセンクジャ 2 アール 195  
Peipposenkuj a 2 R 195, FI - 20610 Turku (FI)

(73)特許権者 313006865

ラアクソネン, テッポ, タパニ  
LAAKSONEN, Teppo, Tapani  
フィンランド国 トゥルク エフアイ - 20520, クレルコンカツ 31  
Kullerconkatu 31, FI - 20520 Truku (FI)

(73)特許権者 313006876

スオミ, ジョハンナ  
SUOMI, Johanna  
フィンランド国 ヘルシンキ エフアイ - 00930, バルコブオコンポルク 6シー  
Valkovuokonpolku 6c, FI - 00930 Helsinki (FI)

(73)特許権者 313006887

ハカンソン, マルクス  
HAKANSSON, Markus  
フィンランド国 エスポー エフアイ - 02110, ラダルバゲン 5シー  
Radarvagen 5C, FI - 02110 Espoo (FI)

(74)代理人 100105131

弁理士 井上 満

(72)発明者 クルマラ, サカリ

フィンランド国 キルッコヌンミ エフアイ - 02480, アアムルスコンクジャ 11

(72)発明者 コルペラ, ティモ, カレビ

フィンランド国 トゥルク エフアイエヌ - 20610, クラアタリンカツ 1ディー 42

(72)発明者 エスコラ, ジャルコ, ウオレビ

フィンランド国 トゥルク エフアイ - 20610, ペイッポセンクジャ 2 アール 195

(72)発明者 ラアクソネン, テッポ, タパニ

フィンランド国 トゥルク エフアイ - 20520, クレルコンカツ 31

(72)発明者 スオミ, ジョハンナ

フィンランド国 ヘルシンキ エフアイ - 00930, バルコブオコンポルク 6シー

(72)発明者 ハカンソン, マルクス

フィンランド国 エスポー エフアイ - 02110, ラダルバゲン 5シー

審査官 横井 亜矢子

(56)参考文献 米国特許第06251690(US, B1)

米国特許第07005108(US, B1)

特開平01-302144(JP, A)

国際公開第96/041177(WO, A1)

米国特許第07494820(US, B1)

特表2011-518321(JP, A)

特開2009-204375(JP, A)

特表2006-517652(JP,A)  
特開2009-222636(JP,A)  
特開2008-256494(JP,A)  
国際公開第2005/103695(WO,A1)  
特開2006-337351(JP,A)  
特開2009-075131(JP,A)  
特開2009-115828(JP,A)  
特表2008-534943(JP,A)  
特表2005-534696(JP,A)  
特開2004-232998(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/01  
G01N 21/17 - 21/61  
G01N 21/75 - 21/83  
G01N 33/48 - 33/98  
G01N 31/00 - 31/22