

イムノアッセイのための電気化学 センサの基礎的検討

出 川 久 雄
山 岸 裕 明
目 利 明
林 秀 知 佳

A Report on an Electrochemical Sensor for Immunoassay

Hisao DEGAWA
Hiroaki YAMAGISHI
Toshiaki SAKKA
Hidechika HAYASHI

In order to develop a biosensor suitable for clinical uses in doctors' offices, we preliminarily investigated a biosensor based on the enzyme immunoassay. Our method of determination of enzyme employs an electrochemically inactive substrate which converts into electroactive species when an enzyme exists. The electroactive species are alternately anodized and cathodized by using alternating step voltages; the rate of increase of cathodic and/or anodic current is a direct measure of the enzyme activity.

Our experiments using arbutin (hydroquinone- β -D-glucoside) as the substrate and β -glucosidase as the enzyme showed that the lower detection limit of the concentration of the enzyme was approximately 4.7 nM. The method using alternating step voltages and monitoring the cathodic current effectively removed the interference of ascorbic acid from the determination of the electroactive species.

1. はじめに

従来より化学、医学、食品工業、環境分析などの分野において、生体物質を素子として用いる酵素センサや免疫センサなどのバイオセンサが提案され、利用されてきた¹⁾。これらのバイオセンサは、特定の化学物質を特異的に識別するレセプタと、識別のための相互作用の結果生じた化学的変化あるいは物理的変化を電気信号に変換

するトランスデューサとから構成される。酵素センサ²⁾では、レセプタとしての酵素とトランスデューサとしての電極を組み合わせ、酵素反応による基質の減少あるいは生成物の増加をポテンシオメトリックにあるいはアンペロメトリックに検出する。電位測定式免疫センサ^{3,4)}では、抗原または抗体を電極表面に固定化し、抗原-抗体反応の結果生じる表面電位変化を検出することが可能であるが、電位変化が小さいうえ、非特異的な吸着によ

って表面電位が変化しやすいという欠点をもっている。

一方、液体試料中の微量成分を特異的に測定する方法として酵素免疫測定法⁵⁾が知られている。この方法は、測定対象物質を抗原とするならば、これに特異的に結合する固相化抗体と酵素標識抗体(サンドイッチ法の場合)または酵素標識抗原(競争法の場合)を用い、これらの抗原抗体反応ののちに、複合体を形成した酵素標識物質または遊離の酵素標識物質を検出することによって間接的に測定対象物質を定量することを基本とする。

酵素免疫測定法と電気化学的検出法を結びつけた技術がいくつか報告されている⁶⁾。これらの技術では、酵素反応生成物または基質の増減を電気化学的に検出することによって標識酵素を定量する。電気化学的検出法は、試料の濁りに妨害されず、測定プローブ(電極)を小型で安価に製造することができるので酵素免疫センサを実現するのに好適である。

しかしながら現在までに報告されている酵素免疫センサの問題点は、短時間で感度よく測定できるものが少ないということである。そのため、酵素の高感度測定法の開発が重要な課題となっている。

酵素的サイクリングにより酵素を高感度に測定する方法が報告されている⁷⁻⁹⁾。この方法は、酵素反応生成物を直接検出するのではなく、つぎに図示するメカニズムによりこれを化学増幅して検出する。酵素反応生成物である生成物Aは、生成物Bに可逆的に転化することによって、別に用意した電子供与系および電子受容系をリンクし、両者間の電子移動を仲介するトリガー物質としてはたらく。例えば電子供与系に第2の酵素と過剰の還元剤を用い、電子受容系に可逆的電気化学活性種の酸化体を用いると、電子受容系の還元体の酸化電流は生成物Aの増幅信号すなわち標識酵素によって生成された生成物Aをさらにサイクリング増幅した信号を与える。

上に述べた電子供与系または電子受容系の一方を酸化還元酵素とこれに対応する基質によって構成し、他方を電気化学的検出系によって構成した電気化学的酵素測定法が公開されている^{10,11)}。電極の電位は、標識酵素の基質が酸化あるいは還元を受けず、生成物だけが酸化ある

いは還元を受ける電位に設定する。標識酵素として、アルカリ性ホスファターゼ、その基質としてリン酸エステル化フェノール誘導体が例示されている。アルカリ性ホスファターゼの酵素活性によりその基質から生成したフェノール誘導体のサイクリックボルタモグラムの酸化ピーク電位は180 mV (SCE) となっている。180 mV という低い酸化ピーク電位は、試料中に共存する被酸化性物質による妨害が起こりにくいことを意味する。第2の酵素/基質系としてグルコースオキシターゼ/グルコースを供給すると、酵素的サイクリングが起こり、180 mV におけるピーク電流が約40%増加する。15分間の酵素反応の後にサイクリックボルタモグラムの180 mV におけるピーク電流を測定することにより、アルカリ性ホスファターゼを濃度1.2 pM まで十分に検出できることが示されている。

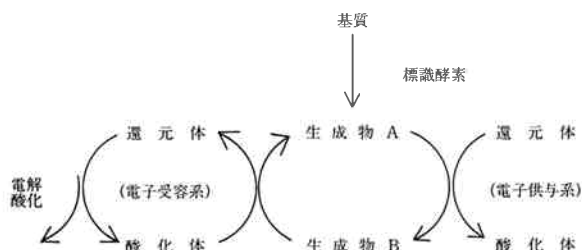
酵素的サイクリングをおこなわせるためには、電子供与系または電子受容系の少なくとも一方に、標識酵素とは別に第2の酵素/基質系を用意しなければならない。医療検査の現場から要望の強い、低コストでメンテナンスの容易な検査装置を提供しようとする立場からは、多種類の生化学試薬を用いることによって引き起こされる装置の複雑化とコストの上昇は重要な問題点である。また、酵素的サイクリングなしで通常酵素免疫測定法に匹敵する測定感度を得るためには電気化学活性種の蓄積が必要であり、これには一定の酵素反応時間を必要とする。

上に紹介した電気化学活性種であるフェノール誘導体は酸化電位が低くなるように設計されているので、電気化学的な妨害物質の数は少ない。一方、電気化学的酵素測定法の適用範囲を広げるために、比較的高い酸化電位をもつ電気化学活性種の選択的な測定法を開発することもまた有益である。また実試料においては、バックグラウンドの原因となる特定しにくい酸化還元性の不純物の存在も無視することはできない。

著者らは、低コストで、短時間に正確な測定結果が得られ、かつ酸化還元性の妨害物質の影響が少ないドクターズオフィス向けの酵素免疫センサの開発を目標として、標識酵素の電気化学的測定法を中心に検討し、基本的な性能が確認できたので報告する。

2. 酵素の電気化学的測定法

著者らは、酵素反応に起因して生じた酵素反応生成物の電解電流を、作用電極電位をプログラム可能な3極式ポテンシオスタットを用いて測定することに基づく標識



酵素の測定方法を考案した。それ自体電気化学的に不活性で、酵素によって、可逆的ないし準可逆的な電気化学活性種に転化する基質を使用する。ここで、電気化学活性種を矩形波電圧によって繰り返し電解酸化/電解還元し、電解電流の増加速度に基づいて酵素を定量することを特徴とする。

上記のように、電解酸化する電位と電解還元する電位とを作用電極に与えることによって以下にあげる効果が得られると考えた。

1) 電気化学信号を与える例えば還元体の不可逆的の消耗が避けられる。このため、計測信号の時間的変化率の測定すなわちレート測定による酵素の定量が可能になる。

2) 不可逆的な酸化還元性物質であるアスコルビン酸を含む系において、酸化電流はアスコルビン酸の電気化学的妨害効果を含むが、還元電流はアスコルビン酸および酸化型アスコルビン酸の電気化学的妨害効果を含まない。

3) 可逆的に酸化還元されやすい不純物が存在しても、それらは酸化還元電流に一定の影響を及ぼすが、酸化還元電流の増加速度には影響しない。

著者らは、電解酸化および電解還元させる電位を、電気化学活性種のサイクリックボルタモグラムの酸化ピーク電位および還元ピーク電位の付近に設定した。また、電位を一定に保持する時間の設定を、バックグラウンドとなる電位切り替えの際の充電電流の時間特性と、信号となる電気化学活性種の酸化電流および還元電流の時間特性を考慮し、信号対バックグラウンド比が大きくなるように決めた。酸化還元物質を含まない溶液を用いて充電電流を測定したところ、充電電流の半減期は0.05秒以下であった。したがって、電位保持時間を0.1~5秒とした。

矩形波電圧を用いることは、以下に述べるようにアスコルビン酸による電気化学活性種の酸化体の溶液相還元(後続化学反応)の妨害効果を避けるのに有効である。アスコルビン酸を含む系において、電解酸化する電位と電解還元する電位とを作用電極に交互に与え、還元電流によって目的の電気化学活性種(還元体として生じた酵素反応生成物)を定量しようとする今の場合、比較的遅い通常の掃引速度の三角波電圧を加えるとつぎの不都合が生じる。すなわち、式1に示すようにアスコルビン酸(AsA)が、電気化学活性種(R)の電解酸化生成物(O)を溶液相中で化学的に再還元するため、触媒電流(catalytic current)の発生および還元電流の減少をもたらす。



n 電荷数; e 電子の電荷

このような後続化学反応が顕著になるのは、後続化学反応の速度が電極反応の速度すなわち電位掃引の速度よりも速いときである。したがって、後続化学反応の影響を受けないようにするためには、通常の三角波電圧の電位掃引の速度を後続化学反応の進行が無視できるくらい速くすればよい。しかし、矩形波電圧の方が電解酸化と電解還元の時間をそれぞれ自由に設定できること、および電位切り替えの際の充電電流が十分に減衰してから電解電流を測定すれば、速い三角波電圧と異なって充電電流の妨害なしに正確な測定が可能になることにより矩形波電圧を用いることにした。

酵素の定量は酵素活性すなわち酵素反応速度の測定によっておこなわれる。酵素反応速度は生成物の濃度の増加速度によって測定される。周期的な矩形波電圧を加える場合、各サイクルの特定の位相における電流値の増加速度を測定することにより酵素反応速度を求めることができる。このように、酵素を定量するために矩形波電圧の各サイクルの特定の位相における

- 1) 酸化電流値、
- 2) 還元電流値、および
- 3) 酸化電流値と還元電流値の和

のいずれかの増加速度を利用する。さらに同じ目的で、各サイクルの特定の時間範囲内の

- 1) 酸化電流の積分値、
- 2) 還元電流の積分値、および
- 3) 酸化電流と還元電流の和の積分値

のいずれかの増加速度を利用することもできる。電流の積分値を用いるのは、測定精度を向上させるためである。

Fig. 1 に、酸化電流または還元電流の積分値の時間的变化率と酵素濃度との関係を得るための信号の処理方法の基本的な構成を示す。種々の酵素濃度に対して測定した電流データはコンピュータの外部記憶装置にシーケンシャルデータとして蓄えられ、データ処理のとき読み出される。矩形波電圧に応答する電流データは、電位の切り替えの瞬間にオーバーレンジするのがふつうである。このため、すべての酵素濃度に対するデータをチェックし、オーバーレンジしたデータを含まないように積分範囲を固定する。つぎに、この積分範囲に基づいて各サイクルの電流を積分する。各サイクルの積分値とそのサイクルを代表する時間との関係をプロットし、このプロットの傾きを最小2乗法によって算出する。これら積

分計算から最小2乗法までの操作を種々の酵素濃度についておこなうことによって、プロットの傾きすなわち積分値の増加速度と酵素濃度との関係を求めることができ

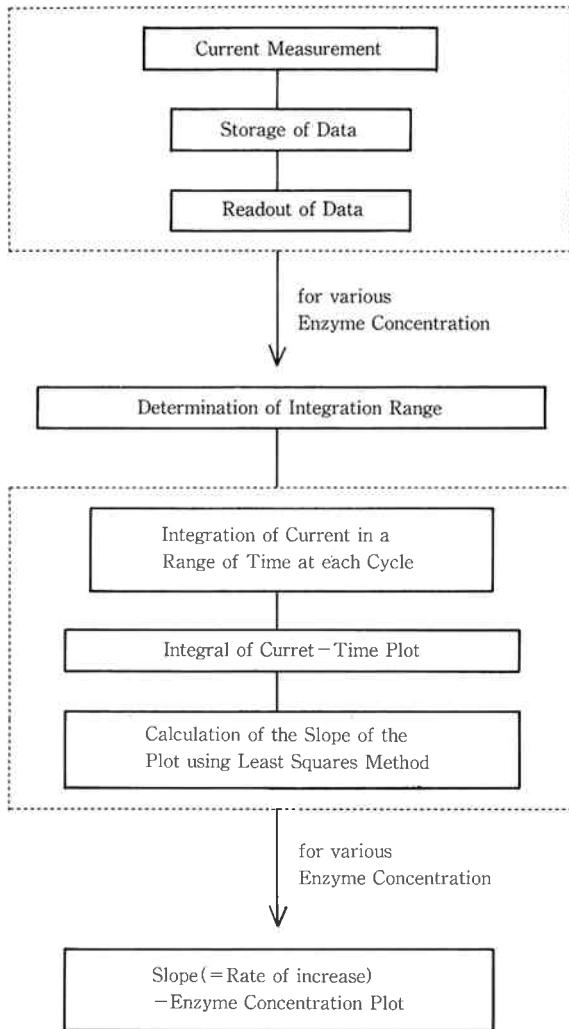


Fig. 1 Flow chart of Data Processing.

る。

3. 実 験

使用した電気化学測定系の基本的な構成を Fig. 2 に示す。電位の制御と電流の測定、ならびにデータの保存と解析のために、通常の電気回路をもつ自作のポテンシオスタットと市販のパーソナルコンピュータ (PC-9801VX41, 日本電気株) を使用し、DA 変換器 (98DA12(4)-H, 株インタフェース) および AD 変換器 (AB98-05A, 株アドテックシステムサイエンス) は、ともに12ビットのものを使用した。作用電極は、ガラス基板の上にクロムを 100 nm, その上に金を 200 nm の厚さで真空蒸着し、フォトリソグラフィ¹²⁾ で形成した電極パターン (Fig. 3) の一つを使用した。対極は、白金線 (直径 0.5 mm, 日本電球工業株), グラシーカーボン (直径 3.0 mm, GC10, 東海カーボン株), 金線 (直径 1.0 mm, 三津和化学薬品株), または上記作用電極と同一基板にある金の薄膜を使用した。参照電極は、銀塩化銀電極 (内部液 3.3 M KCl) または上記作用電極と同一基板にある金の薄膜を使用した。参照電極として金の薄膜を使用するのは、微量の試料を測定するための便法であり、擬似参照電極 (quasi-reference electrode¹³⁾) としての使用を意味する。

測定はすべて室温 (24°C) でおこなった。

酵素として、 β -グルコシダーゼ (Sigma G0395) を使用した。この試薬の酵素活性は 5.3 U/mg である。ここで 1 U は 37°C, pH 5.0 においてサリシン (=サリコシド) からグルコースを 1.0 $\mu\text{mol}/\text{min}$ の割合で遊離させる活性の単位であると定義されている。

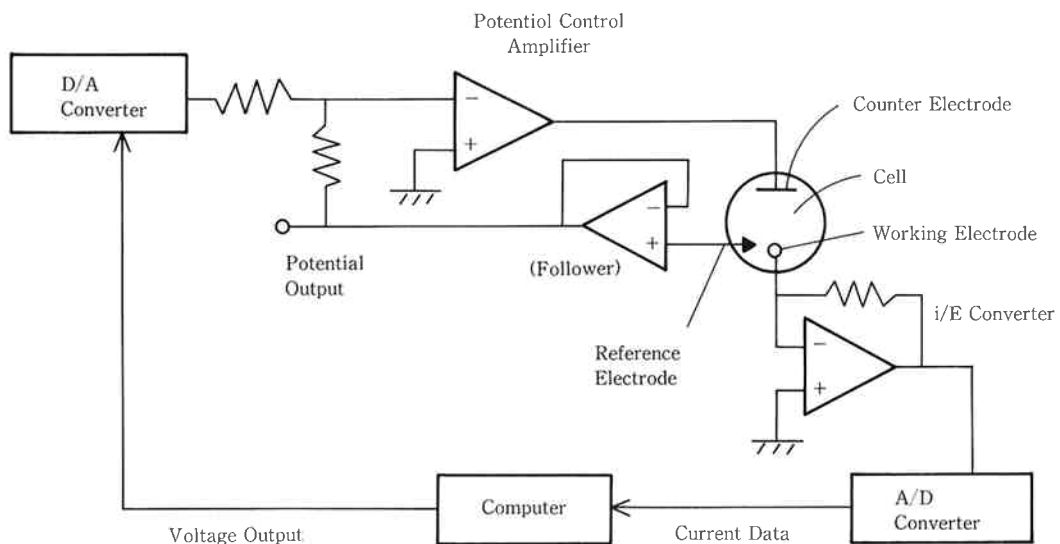


Fig. 2 Schematic arrangement including circuit of potentiostat for electrochemical measurements.

基質として、アルブチン（ヒドロキノン-β-D-グルコシド、東京化成）を使用した。アルブチンはβ-グルコシダーゼによってヒドロキノンを遊離する。

緩衝溶液として、0.2 M の硫酸ナトリウムと 0.01 M

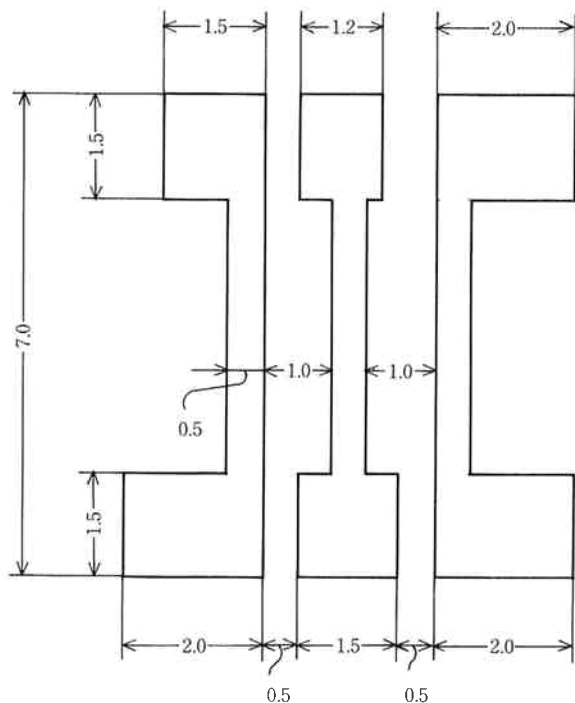


Fig. 3 Surface geometry of metal film electrodes. unit: mm

のリン酸水素ナトリウムを含む溶液に水酸化ナトリウムを加えて pH 5.0に調整した水溶液を使用した。

4. 結果と考察

Fig. 4(a), (c) は電気化学活性種である 0.2 mM ヒドロキノンを含む溶液のサイクリックボルタモグラムであり、掃引速度はそれぞれ 0.04 V/s, 0.64 V/s である。Fig. 4(b), (d) は0.2 mM ヒドロキノンおよび 0.5 mM アスコルビン酸を含む溶液のサイクリックボルタモグラムであり、掃引速度はそれぞれ 0.04 V/s, 0.64 V/s である。参照電極は銀塩化銀電極、対極はグラシーカーボン電極を使用した。遅い掃引速度に対応する Fig. 4(a), (b) と速い掃引速度に対応する (c), (d) とをアスコルビン酸の影響という観点で比較する。遅い掃引速度では、アスコルビン酸によって顕著な触媒（酸化）電流が発生し、還元電流は明らかに減少している。Fig. 4(a) に対する (b) の酸化ピーク電流の比および還元ピーク電流の比はそれぞれ2.08および0.39であった。これに対して、速い掃引速度では触媒電流の増加率が小さくなり、還元電流はあまり減少していない。Fig. 4(c) に対する (d) の酸化ピーク電流の比および還元ピーク電流の比はそれぞれ1.45および0.91であった。なお、Fig. 4(b) の 0.4 V 付近でわずかにみられるショルダーがアスコルビン

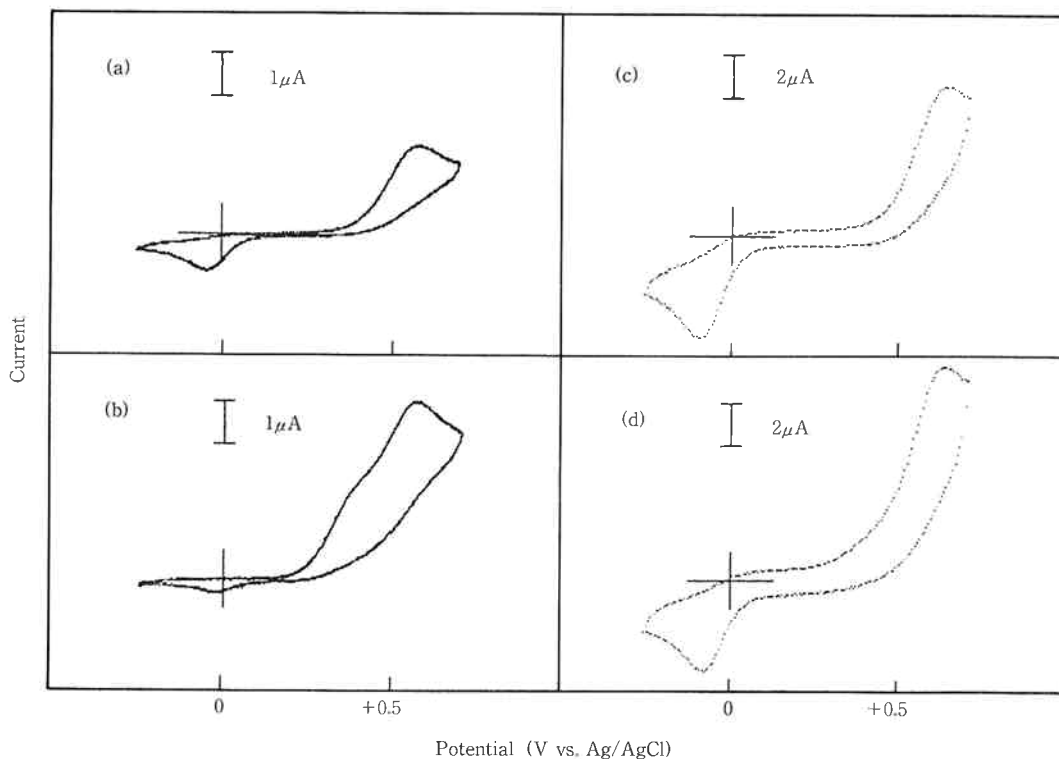


Fig. 4 Effect of scan rate and ascorbic acid on cyclic voltammograms of 0.2 mM hydroquinone. (a) scan rate is 0.04 V/s, without ascorbic acid; (b) scan rate is 0.04 V/s, with 0.5 mM ascorbic acid; (c) scan rate is 0.64 V/s, without ascorbic acid; (d) scan rate is 0.64 V/s, with 0.5 mM ascorbic acid.

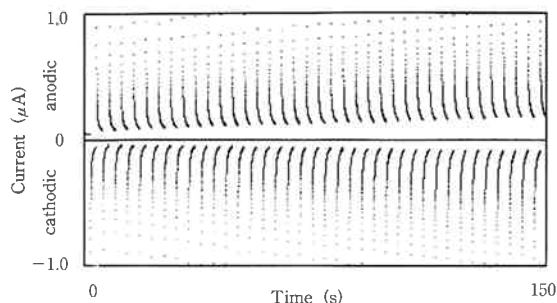


Fig. 5 Current-time response to alternating step voltage for monitoring hydroquinone generated by enzyme reaction involving 2.5 U/ml β -glucosidase and 5 mM arbutin.

酸の電解酸化によるものであることは、アスコルビン酸だけを含むサイクリックボルタメトリによって確認した。

掃引速度を増加させることによって還元電流の減少の割合を0.39から0.91にできたことは、速い掃引速度が再還元電流の損失を防止するために有効であることを示している。しかし、掃引速度をこのように極端に増加しても触媒電流がなくなるわけではなく、アスコルビン酸があるときとないときの酸化ピーク電流の比が2.08から1.45になった程度である。このことは、電解酸化の最中に拡散層内でのアスコルビン酸による化学的再還元反応が、無視できないほどの反応速度で進行していることを示唆している。

Fig. 5 は、われわれの電気化学的酵素測定法によって得られた典型的な測定結果であり、矩形波電圧に応答する電流の時間的変化を表している。緩衝溶液に溶かした5 mMのアルブチン溶液2 mlをサンプル瓶に入れ、同一ガラス基板の上に形成された金の薄膜電極からなる作用電極、参照電極、対極の3極を挿入した。銀塩化銀電極を用いたときにくらべて、金の薄膜電極からなる擬似参照電極の、参照電極としての安定性および基準電位の差については、標準物質としてヒドロキノンまたはフェロシアン化カリウムを用いて確認した。金の薄膜を用いたときの基準電位は、銀塩化銀電極のそれよりも0.20 V高く、サイクリックボルタモグラムの形はまったく同じであった。

前記のアルブチン溶液をマグネチックスターラーで攪拌しながら、濃度2.5 U/mlの β -グルコシダーゼの溶液1.33 mlを添加(β -グルコシダーゼの最終濃度1.0 U/ml)したのち、すぐに攪拌を止めて10秒後に測定を開始した。Fig. 6 に示すように、電解酸化する電位を0.405 V、電解還元する電位を-0.303 Vとした矩形波電圧を加えて電流を測定した。電位を一定に保持する時間は、この場合それぞれ2秒とした。電解酸化の電位

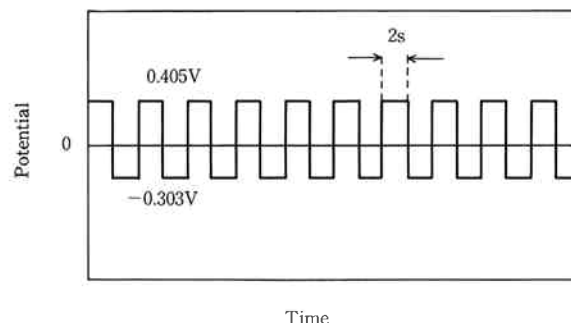


Fig. 6 Potential waveform composed of alternating step voltage.

(0.405 V)は0.2 M ヒドロキノンのサイクリックボルタメトリ(掃引速度0.64 V/s)の酸化ピーク電位(0.434 V)に比べてやや低めに設定した。これは、過剰に存在するアルブチンの酸化電流がこのあたりから急に上昇するからである。電解還元する電位(-0.303 V)は、ヒドロキノンの同じサイクリックボルタメトリの還元ピーク電位(-0.290 V)よりも負電位側に設定した。Fig. 5において、電位の切り替えの瞬間に大きな電流(充電電流を含む)が流れ、オーバーレンジしたのち、急激に減衰するのが観察される。電流の減衰のうち、ミリ秒以下の時間領域の減衰は充電電流の減衰が支配的で、図にみられる秒の時間領域の減衰は電極表面層における電解の進行によるものと考えられる。矩形波電圧に反応して発生する電流の個々のサイクルにみられる減衰のパターンは、全体的な時間の経過とともに電流増加の方向に移っていく。これは、酵素反応の進行につれてヒドロキノンの濃度が増加することによる。ヒドロキノン分子は電解酸化ののち、2個の水素イオンを溶液中に放出してキノン分子に変換される。そのキノン分子は今度は電解還元ののち、2個の水素イオンを溶液中から取り込んでヒドロキノンに再変換される。

比較のため、電解酸化の電位に固定した以外はFig. 5と同じ条件で測定した定電位電解の結果をFig. 7に示す。電流および時間のスケールはFig. 5と同じである。電流が時間とともにわずかに増加しているのが観察されるが、Fig. 5と比べて全体として電流の増加速度は明らかに小さいことがわかる。これは、電極付近で酵素によって新たに生成したヒドロキノンが電極表面で消費され、溶液バルクからの補充速度が遅いため、ヒドロキノンの蓄積が起こらないからである。じっさい、酵素濃度250 mU/ml以下では電流の増加が見られず、定電位測定法を用いたときの測定感度が著しく低いことがわかった。

Fig. 5 から、各サイクルの特定の位相における電流値の増加速度または各サイクルの特定の時間範囲内の電流の積分値の増加速度を読みとることにより、酵素反応速度に比例する量を求めることができる。

Fig. 8 は、Fig. 1 に示した方法に基づいて Fig. 5 で測定した各サイクルの電流値を、酸化電流のばあい電位切り替え後0.05秒から2秒までの間、還元電流のばあい電位切り替え後0.06秒から2秒までの間積分し、積分値対時間プロットの直線部分から増加速度をよみとって縦軸にとり、酵素の濃度を横軸にとり作成した酵素の定量のためのプロットである。Fig. 8(a) は酸化電流のデータから、(b) は還元電流のデータから算出したものである。両方とも酵素濃度 2.5 mU/ml (4.7 nM に相当) まで検出可能であることがわかった。

電気化学活性種であるヒドロキノンに矩形波電圧を加えたときのアスコルビン酸の影響を調べ、Fig. 9 にま

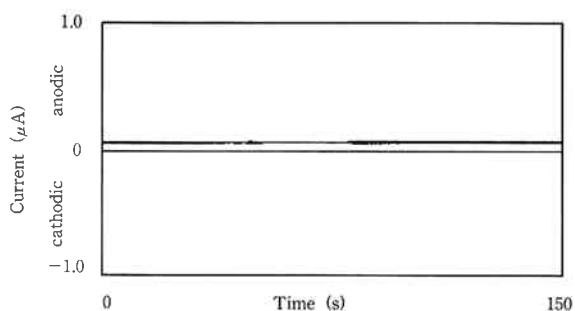


Fig. 7 Current-time response to constant voltage for monitoring hydroquinone generated by enzyme reaction involving 2.5 U/ml β -glucosidase and 5 mM albumin. Each scale of current axis and time axis is the same as Fig. 4.

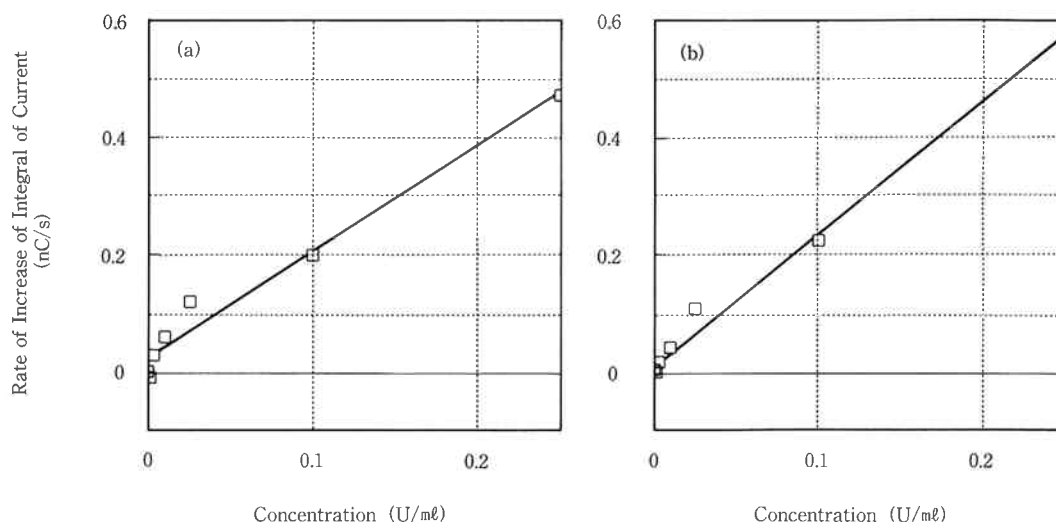


Fig. 8 Plot showing relationship between the rate of increase of integral of current and the concentration of β -glucosidase. (a) Using anodic current. (b) Using cathodic current.

とめた。電解酸化は 0.730 V (Ag/AgCl) を0.5秒、電解還元は -0.170 V を0.5秒と設定し、それぞれ60回繰り返す矩形波電圧を加えた。20 μ M のヒドロキノンと 0.1 mM のアスコルビン酸を含む試料における電流応答の例を Fig 10 に示す。 Fig. 9 の縦軸は電位切り替え後0.14秒から0.5秒までの電流の積分値であり、これには60サイクル目のデータを用いた。アスコルビン酸の濃度が 0.1 mM, 0.5mM のときの影響をみると、酸化方向ではヒドロキノンの定量に対する妨害が顕著であった。しかし、還元方向では 0.5 mM のアスコルビン酸存在下でも検量線の傾きは低下せず、ヒドロキノン 0.2 μ M まで検出可能であることがわかった。

これらの実験では酵素を含んでいないので、各サイク

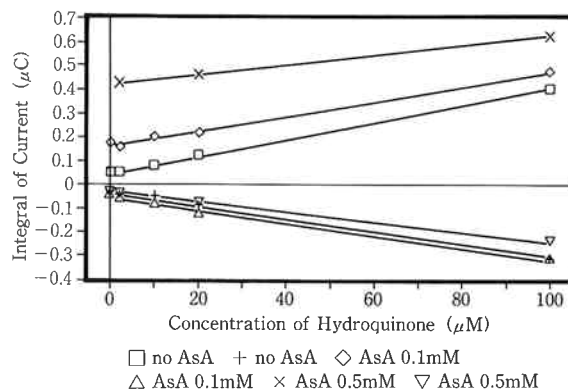


Fig. 9 Plot showing relationship between the integral of current from $t=0.14$ s to 0.50 s at the 60th cycle of square wave and the concentration of hydroquinone. Effects of concentrations of ascorbic acid (AsA) on cathodic current are negligible, while those on anodic current are remarkable.

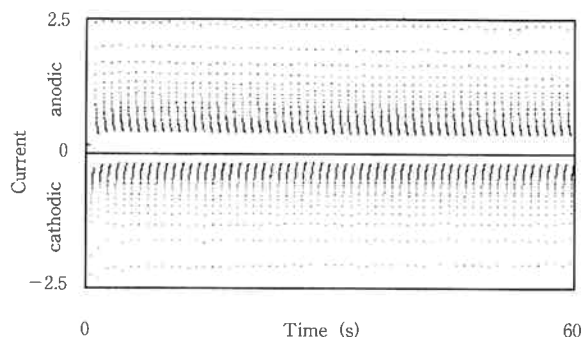


Fig. 10 Current-time response to alternating step voltage for sample without enzyme. Sample contains 20 μ M hydroquinone and 0.1 mM ascorbic acid.

ルの電流パターンは Fig. 10 に示すようにほぼ一定である。じっさいは、Fig. 10 における各サイクルの還元電流の積分値（各積分範囲0.14~0.5秒）の変化率を計算してみると 0.03 nC/s という値となったが、アスコルビン酸の濃度に対する依存性はみられなかった。しかし、酸化電流の方は、その積分値の増加速度がアスコルビン酸の濃度によって大きく変動する傾向を示した。

アスコルビン酸の血中濃度は最も高い場合で 0.1 mM 程度である。三角波電圧を用いた上の実験結果のところで見たとおり、矩形波電圧を利用し、還元電流を測定することによってアスコルビン酸の妨害を効果的に除去することができた。

5. 結 論

われわれの電気化学的酵素測定法は、酵素反応で生じた電気化学活性種を電気化学的計測方法によって直接定量しようとするものであり、第2の酵素/基質によるサイクリック反応を必要としない。

電解酸化する電位と電解還元する電位とを作用電極に交互に与えることによって、レート測定による酵素反応の測定が可能になった。アルブチンと β -グルコシダーゼを用いた実験により、2.5 mU/ml（約4.7 nM）まで酵素の定量ができることが示された。検出下限が 250 mU/ml 程度の定電位法に比べると、感度の優位性は明らかである。

酵素免疫センサの検出下限として、抗原濃度 10 pM を目標としている。酵素濃度が抗原濃度に等しくなるような酵素免疫法を組むとすると、4.7 nM では感度不足である。ここで用いた β -グルコシダーゼのターンオーバー数は 530分子/min 以下であるが、酵素反応により電気化学活性種を遊離する基質として、いろいろな酵素に対応するものが合成可能である。活性の高い酵素¹⁴⁾

たとえばアルカリ性ホスファターゼ (4×10^4 分子/min) や β -ガラクトシダーゼ (2×10^5 分子/min) とそれらに対応する基質を用いれば、75倍~400倍程度の高感度化を見積もることができる。すなわち、63~12 pM の測定が可能になる。したがって、これらの酵素の利用に関する技術的問題を克服し、上に述べた電気化学的酵素測定法にさらに検討を加えることによって、酵素免疫センサを実用化することが可能であると思われる。

電気化学活性種を電解酸化する電位と電解還元する電位とを短い周期で作用電極に交互に与えることによって、後続化学反応の妨害を効果的に除去することができた。目的の電気化学活性種を電解酸化したのち還元電流によって定量しようとする場合、比較的遅い通常の掃引速度をもった三角波電圧を用いると、強い還元剤であるアスコルビン酸による化学的再還元反応のために測定すべき還元電流が低下する。じっさい、溶液中にアスコルビン酸を含まないヒドロキノン還元ピーク電流に対するアスコルビン酸を含むヒドロキノンの還元ピーク電流の比は、掃引速度を遅くすると明らかに減少することが実験によって確かめられた。化学的再還元反応の影響をうけないようにするためには、掃引速度を速くすることと電位保持時間を短くすることが必要であり、電位保持時間を短くした矩形波電圧がこの条件を満たしたものと考える。

以上の基礎的検討により、電気化学的酵素測定法が、電気化学的酵素免疫センサの中核的技術となり得ることが示された。さらに、この方法は酵素免疫センサだけでなく、酵素標識 DNA プローブを用いたセンサにも適用可能であると思われる。

文 献

- 1) A. P. F. Turner, I. Karube, and G. S. Wilson (eds.); "Biosensors: Fundamentals and Applications", (Oxford Univ. Press), London and New York, (1987)
- 2) L. C. Clark, Jr. in Ref. 1, p. 3
- 3) J. Janata; *JACS*, **97**, 2914 (1975)
- 4) N. Yamamoto, Y. Nagasawa, M. Sawai, T. Sudo and H. Tsubomura; *J. Immunol. Methods*, **22**, 309 (1978)
- 5) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔 (編); "酵素免疫測定法" (第3版), (医学書院), (1987)
- 6) M. J. Green in Ref. 1, p. 60.
- 7) A. Johansson, D. H. Ellis, D. L. Bates, A. M.

- Plum and C. J. Stanley; *J. Immunol. Methods*, **87**,
7 (1986)
- 8) 特開昭 57-152899
- 9) 特開昭 62-501171
- 10) 特開昭 62- 167465
- 11) C. J. McNeil, I. J. Higgins and J. V. Bannister;

- Biosensors*, **3**, 199 (1987/88)
- 12) 尾上洋一, 森泉豊栄; 電学論A, **107**, 97 (1987)
- 13) D. T. Sawyer, J. R. Roberts, Jr.; "Experimental
Electrochemistry for Chemists", p. 50, (John
Wiley & Sons) (1974)
- 14) R. H. Yolken, *Rev. Infect. Dis.*, **4**, 35 (1982)



著 者

氏名 出 川 久 雄
Hisao DEGAWA
入社 昭和61年9月1日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第3研究室



著 者

氏名 山 岸 裕 明
Hiroaki Yamagishi
入社 昭和60年4月1日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第3研究室



著 者

氏名 目 利 明
Toshiaki SAKKA
入社 昭和63年4月1日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第3研究室



著 者

氏名 林 秀 知 佳
Hidechika HAYASHI
入社 昭和54年10月16日
所属 研究本部
 生物学研究所
 第3研究室
 第3研究室長