

総説

# ユニークな感応素子を有する電気化学的バイオセンサーに関する最新の開発動向

小西敦子, 武上茂彦\*

京都薬科大学 薬品分析学分野

バイオセンサーは、分子認識部位に酵素-基質反応や抗原-抗体反応といった生体関連物質による反応を利用した化学センサーであり、これらの反応によって計測できる分析対象物質に対し、優れた特異性と選択性を有する。バイオセンサーは、分子認識部位に用いる感応素子と、認識した情報を電気信号に変換する信号変換部位を適切に組み合わせることで多種多様な分析対象物質を簡便迅速に計測できるため、近年、その開発は目覚ましい発展を遂げている。バイオセンサーの分子認識能は主として電極表面上に固定化される感応素子に影響される。本総説では、感応素子として、生体関連物質である、酵素（又は基質）や抗体（又は抗原）、DNA、および人工抗体とよばれる分子インプリントポリマー、に着目し、これらを用いたユニークな電気化学的バイオセンサーの最新の開発動向について概説する。

キーワード：バイオセンサー、電気化学、感応素子、信号変換部位

受付日：2021年8月6日、受理日：2021年9月30日

## 1. はじめに

医療分野や環境分野、食品衛生分野など、種々の分野において、化学物質の定性分析および定量分析がおこなわれている。目的とする分析対象物質や測定試料の性質、測定環境および分析目的等を考慮し、適切な分析手法を選択することが重要である。汎用される分析手法としては、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法、ガスクロマトグラフィー/質量分析法、酵素免疫測定法、蛍光光度法、化学センサー等が挙げられる。化学センサー以外の分析手法は、分析対

象物質を比較的高感度に測定することが可能であるが、分析機器が高価であることや In-situ (その場) 分析が困難であることが課題として挙げられる。

一方、化学センサーは、目的対象物質を特異的に認識する感応素子を有する分子認識部位と、認識した情報を電気信号に変換する信号変換部位の2つの要素のみから構成される単純な構造を有する分析装置である (図1)。すなわち化学センサーは、分子認識部位において分析対象物質を特異的に認識することにより生じた物理的変化や化学的変化を、信号変換部位において検出可能な物理的シグナルに変換することで、分析対象物質の種類および量をリアルタイムに測定できる<sup>1)</sup>。そのため、化学センサーは安価かつ簡便に作製・利用可能、小型化も容易

\*連絡先：  
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5  
京都薬科大学 薬品分析学分野

であるという特徴を有しており, In-situ 分析のために持ち運びのできる検査機器として期待されている。化学センサーの中でも特に, 生体関連物質を用いたバイオセンサーは, 酵素-基質反応や抗原-抗体反応といった生体内における極めて物質識別能力の高い反応を利用することから, 分析対象物質に対する優れた特異性と選択性を有する<sup>2,3)</sup>。感応素子としては, 酵素<sup>4,5)</sup>を代表として, 抗原もしくは抗体<sup>6)</sup>, 細胞や組織<sup>7)</sup>, ペプチド<sup>8)</sup>, 核酸<sup>9)</sup>, 糖鎖<sup>10)</sup>, 受容体<sup>11)</sup>などが用いられる。また, 信号変換方法としては, 電気化学的計測<sup>12)</sup>, 光学特性変化の計測<sup>13,14)</sup>, 熱量測定<sup>15)</sup>, 質量変化計測<sup>16-18)</sup>等が挙げられる。これら感応素子および信号変換方法を適切に組み合わせることで, 様々なバリエーションのバイオセンサーが開発されている。電気化学的検出法を用いたセンサー(電気化学的センサー)は, 感応素子が分析対象物質を認識したときに電極近傍で生じる電極電位や電流の変化といった電気化学的シグナルを検出するシンプルな装置である。このため電気化学的センサーは, 1) 少量のサンプル量で迅速に定量可能, 2) 高感度の検出限界, 3) 広い線形応答範囲, 4) 高い安定性, 5) 安価で作製可能, 6) 高い再生産性, といった多くの利点を有する。本総説では, 電気化学的バイオセンサーに焦点を当て, 特に感応素子として酵素, 抗体, DNA, 分子インプリントポリマー(MIP)を用いたバイオセンサーについて, 近年の開発例を中心に紹介する。

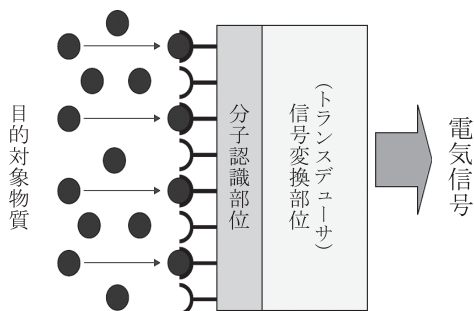
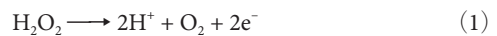
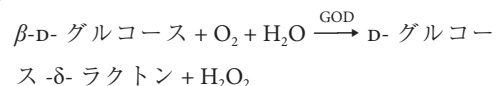


図1 化学センサーの構造

## 2. 酵素センサー

感応素子として酵素を用いた酵素センサーは, バイオセンサーの中でも最も古くから開発されてきた。酵素センサーの物質検出メカニズムは, 試料中の分析対象物質である基質とセンサーに固定化された酵素の触媒反応により生成した物質や減少した物質の量, pHの変化を電極で検出することに基づいている。酵素は基質に対する特異性が高いことから, 酵素反応をモニタリングすることで, 間接的ではあるが試料中の基質濃度を測定することができる。利用される酵素は, 主に酸化還元酵素であり, その代表例が酸化酵素を用いたグルコースセンサーである。1962年にClark<sup>19)</sup>らによってグルコース酸化酵素(GOD)を用いた酸素電極が提案され, 後にUpdike<sup>20)</sup>らによってグルコースセンサーが作製された。グルコースセンサーは, 酸素電極もしくは過酸化水素電極上に, GODを固定化した構造を有している。グルコースセンサーの検出メカニズムに関する化学反応式を以下に示す。GODが基質であるグルコースを認識し生じる触媒反応により, 消費される酸素もしくは生成される過酸化水素の量(式(1))を測定し, 試料中のグルコース濃度を間接的に算出する。



近年は主として, センサー感度の向上に取り組む研究開発例が報告されている。電気化学的酵素センサーでは, 酵素による触媒反応により生じた電子が酵素から電極へ移動し, 電気信号として検出される。したがって, この酵素-電極間の電子移動効率を高めることができれば, センサーの感度の向上を達成することができる。そこで電極への電子移動効率を促進する目

的で、しばしばフェロセン<sup>21)</sup>やルテニウム錯体<sup>22)</sup>等の電子移動を仲介するメディエータ（電子伝達メディエータ）を、電極や酵素に修飾する方法が用いられている（図2）。電子伝達メディエータの利用により、低い印加電圧でも十分な感度のセンサーが得られる、触媒反応に酸素や過酸化水素が関与しない酵素の利用も可能である、といった利点が得られる。キトサンおよび後述するMXene（Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub>）を用いてコレステロールオキシダーゼを固定化したグラッシーカーボン電極（GCE）に、電子伝達メディエータとして[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>を用いることで、電極への電子移動を促進し、試料中コレステロール濃度に対する直線的な応答、良好な選択性および安定性を示した例が報告されている<sup>23)</sup>。MXeneとは、前周期遷移金属（チタンやバナジウムなど）と軽元素（炭素または窒素）による複合原子層化合物で、グラフェンに似た結晶構造を有する<sup>24)</sup>。大きな表面積と生体適合性、高い電気伝導性、水層への良好な分散性を有することがMXeneの特徴である。MXeneは、電極に酵素を固定化する支持体として働くだけでなく、電気伝導性の向上に寄与する材料としても注目されている。この他にもセンサーの電気伝導性を向上させるために種々の材料が検討されている。その1つとして窒素ドープgraphdiyne

がある。窒素ドープgraphdiyneを固定化酵素の支持体として用いたGCEは、窒素ドープgraphdiyneを用いないGCEと比較して、検出感度を約2倍向上させることが報告されている<sup>25)</sup>。窒素ドープgraphdiyneは、大きな表面積と高い電気伝導性に加え、ドープされた窒素により電極への基質の吸着と蓄積を促進することで、センサー性能の向上に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

また上述した観点とは別に、電極に固定化する酵素量を増加させることで、センサー感度の向上を図る研究もおこなわれている。例えば、白金電極表面にナノ構造の白金ナノクラスターを被覆することで電極の表面積を増大させ、電極に固定化できる酵素量を大幅に増加させた研究が報告されている<sup>26)</sup>。本センサーの過酸化水素電極には、コレステロールから過酸化水素が発生する化学反応の過程で関係している、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼの3つの酵素が固定化され、コレステロールを基質とし測定された。白金ナノクラスターと固定化する酵素量がセンサーの性能に影響し、これらの量を最適化することにより、本センサーではコレステロールに対して線形範囲2～486 μM、検出限界2 μMと、低濃度の基質の検出が可能となった。

上述してきたように、酵素センサーは酵素と基質の高親和性により高い選択性を示し、比較的感受度良く基質（目的対象物質）を定量できることから、これまでに数多くの研究が報告されている。一方で、感応素子である酵素には、安定性の低さ、使用環境の厳重な管理の必要性、センサーの性能を維持できるpHや温度が限定される、といった欠点がある。今後、グルコースセンサー以外にも酵素センサーの実用化を促進させる上では、これらの課題を解決していくことが求められる。

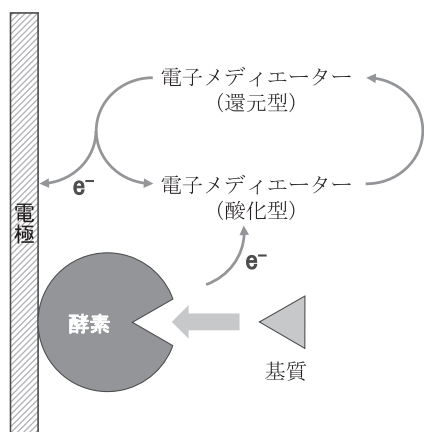


図2 電子伝達メディエータを用いた酵素センサー

### 3. 免疫センサー

感応素子として抗原もしくは抗体を用いたセンサーを免疫センサーという。抗原と抗体の相互作用を利用することで、極めて高い特異性が得られる。電極には抗原もしくは抗体のいずれかを固定化することで、それに対応する試料中の抗体もしくは抗原が結合し、その結果として定量的な測定が可能となる。免疫センサーでは、抗原-抗体複合体は極めて安定で、かつ一旦結合すると容易には解離しないことから、目的対象物質が極微量しか存在しない分析においても、高い特異性と選択性をもって物質を定量することが可能である。また、信号変換部位であるトランスデューサの小型化技術の発展に伴い、生化学分野や電子工学分野において、著しい技術的進歩を遂げている。

現在研究されている電気化学的免疫センサーは、非標識法と標識法の2つに大別される。非標識法による電気化学的免疫センサーは、抗原もしくは抗体を固定化した電極に、試料中の抗体もしくは抗原が結合することで電極に生じる膜電位の変化や電流の変化を直接計測する方法である<sup>27)</sup>。本センサーは、測定時間が短縮でき

るといった利点を有するものの、それほど高い感度は期待できないという欠点も有する。非標識法による電気化学的免疫センサーの開発例として、腫瘍マーカータンパク質である p53 測定に応用した研究を紹介する<sup>28)</sup>。本研究では、キトサンとカーボンブラックを修飾した酸化インジウムスズ (ITO) 電極に抗 p53 抗体を固定化している。本研究で開発した電気化学的免疫センサーは、簡便かつ低コストで作製可能で、かつ効果的に抗体を電極に固定化できる上、センサーの電気伝導性を向上させ、p53 に対し検量線の線形範囲が 0.01 ~ 2 pg/mL、検出限界が 3 fg/mL と良好な感度を有しており、加えて十分な安定性と再現性を併せもつことが報告されている。

一方、標識法による電気化学的免疫センサーは酵素等を標識した抗原や抗体を用いて、酵素反応により生じる生成物量を測定する方法である(図3)。酵素による信号増幅があるため、非標識法によるそれと比較して高感度である。標識法はさらに、競合法とサンドイッチ法に分けられる。競合法による電気化学的免疫センサーを用いた熱ショックタンパク質 (HSP70) の検出に関する研究例を紹介する<sup>29)</sup>。HSP70 を固定化した GCE に、HSP70 を含有する試料お

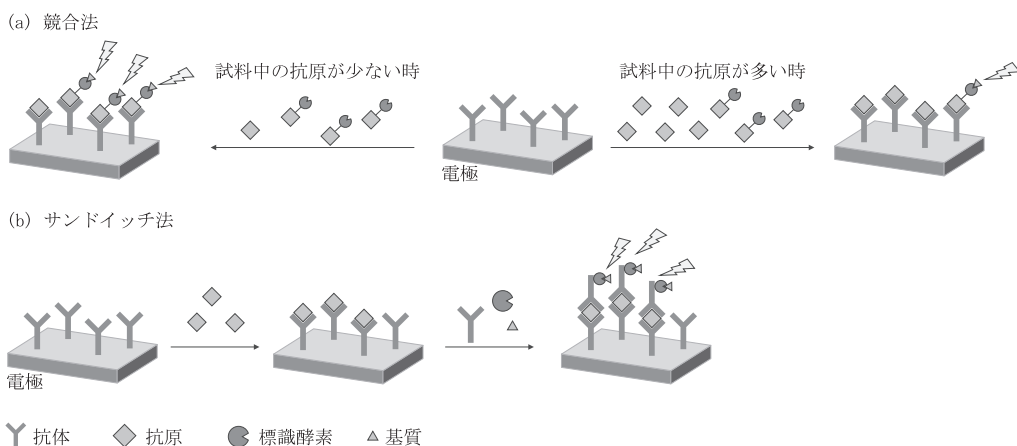


図3 免疫センサー (a) 競合法, (b) サンドイッチ法。

よびビオチン標識抗体を添加することで、HSP70 が競合的に標識抗体と結合する。電極上の HSP70 に結合した標識抗体に対して、ストレプトアビジンで標識した西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させた後、過酸化水素および *o*-フェニレンジアミンを添加することにより進行する酵素反応を進行させ、その結果生じる電流が測定された。得られた電流値は、電極上の HSP70 と競合する試料中 HSP70 量の増加にしたがって直線的に減少した。また本センサーは、表面積の増大および電気伝導性の向上を目的として、ポラスグラフェンを GCE 上に被覆することで、検量線の線形範囲が 0.0448 ~ 100 ng/mL、検出限界が 0.02 ng/mL で得られ、他の HSP と比較して HSP70 に対して高い選択性を示すことが明らかにされている。

一方、サンドイッチ法による電気化学的免疫センサーを用いた 3 種のがんマーカー（前立腺特異抗原、ヒト  $\alpha$ -フェトプロテイン、炭水化物抗原 125）の同時検出に成功した例が報告されている<sup>30)</sup>。GCE に還元型酸化グラフェン/金ナノ粒子を修飾し、そこに 3 種のがんマーカーに対する抗体を固定化した免疫センサーを作製した。本免疫センサーにターゲットとなるがんマーカーを結合させた後、抗体および電子伝達メディエータを修飾したポリ（スチレン無水マレイン酸）プローブを結合させることで生じる電流が測定された。本免疫センサーでは、酸化グラフェンにより高い電気伝導性が付与され、高分子ポリマーにより抗体および電子伝達メディエータの蓄積量を増大させたことで、簡便かつ高感度に検出が可能であった。また、酸化還元電位がそれぞれ異なる 3 種の電子伝達メディエータを用いることにより、3 種のがんマーカーの同時定量が可能となり、早期がんの検出に利用できることが報告されている。

---

## 4. DNA センサー

---

DNA センサーは、DNA および RNA 鎖中の核酸塩基が水素結合を介して相補的に結合することを利用して、特定の DNA を特異的に検出する。電極には、検出したい DNA に相補的な配列を有する DNA プローブを固定化する。酵素や電子伝達メディエータで修飾したサンプル中 DNA が、電極上の DNA プローブとハイブリダイゼーションし、2 本鎖 DNA を形成する。この形成情報を酵素反応や電子伝達メディエータを利用して、電流や電位の変化として検出するものである。まずは、ターゲットとなるヘリコバクターピロリ菌の DNA に対して相補的な配列を有する 2 種の一本鎖 DNA を用いて、ターゲット DNA を挟む形でハイブリダイゼーションさせたサンドイッチ構造の DNA センサーについて紹介する<sup>31)</sup>。Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> および金ナノ粒子で修飾した GCE に、ターゲット DNA に相補的な塩基配列を有する DNA プローブを固定化し、そこにターゲット DNA をハイブリダイゼーションさせる。通常、Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> および金ナノ粒子を修飾した GCE は、電気伝導性の向上により、サイクリックボルタムメトリーにおいて大きなピーク電流を示すが、そこへ DNA プローブおよびターゲット DNA が結合することで、電気伝導性が低下しピーク電流が低下する。本研究では、ターゲット DNA の塩基配列に対して、異なる部分で相補的な塩基配列をもつ 2 つの DNA プローブ (cpDNA と rpDNA) を用いた。まず、cpDNA を、Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> および金ナノ粒子を修飾した GCE 上に固定化する。次いで、ターゲット DNA を添加すると、cpDNA の相補的塩基配列部分にターゲット DNA が結合する。そこに、rpDNA を添加すると、ターゲット DNA の残った相補的塩基配列部分に rpDNA が結合することで、ターゲット DNA を 2 つの DNA

プローブでサンドイッチすることができる。その結果、電気化学的シグナルの減少量は、2つのDNAプローブを組み合わせることで顕著に増大した。本DNAセンサーでは、 $10^{-11} \sim 10^{-14}$  Mの線形範囲、 $1.6 \times 10^{-16}$  Mの検出限界を示し、DNAセンサーの感度を向上させることに成功している。

また、特定の分子と特異的に結合する合成DNA/RNA分子として、アプタマーがある。アプタマーは抗体と比較して、化学的に安価に全合成できる、熱安定性が高い、化学修飾が容易である、といった特徴を有していることから、近年アプタマーを感応素子としたセンサーの開発が盛んにおこなわれている。短鎖ステムループ構造を形成するアプタマーを用いた、簡便かつ再利用可能な電気化学的アプタマーセンサーの開発例が報告されている<sup>32)</sup>。ここでは、アプタマーの一方の端を電子伝達メディエータであるメチレンブルーで標識し、もう一方の端を金電極表面に固定化した。アプタマーが分析対象物質であるアフマトキシンB1を認識すると、アプタマーがステムループ構造に折りたたまれ、メチレンブルーが電極近傍に近づくことで、電気化学的シグナルが増強するというユニークな物質計測メカニズムに基づいている。

一方、電極へのDNAの固定化の手段として、4本の自己相補的なオリゴヌクレオチドにより形成される四面体DNAプローブがある(図4)<sup>33)</sup>。四面体DNAプローブは、3つの頂点がチオール基で修飾されており、電極(主として金電極)と素早くかつ強固に結合することができる。また、残りの1つの頂点からは、ターゲットDNAを認識するための1本鎖DNAプローブが付属している。このような特徴的な構造により、四面体DNAプローブは規則正しく電極表面に固定化することができ、DNAプローブに一定の方向性をもたせることができる、といった特徴を有する。この特徴を生かした、3

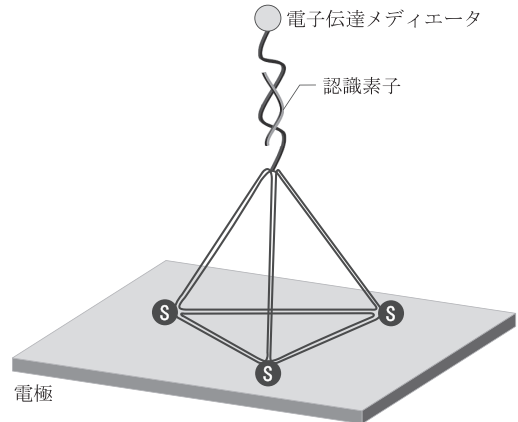


図4 四面体DNAプローブ (Hao Pei ほか<sup>33)</sup>を参考に作成)

本鎖を形成することができるオリゴヌクレオチドを結合させた四面体DNAプローブを用いたユニークな電気化学的DNAセンサーの開発例を紹介する<sup>34)</sup>。四面体DNAプローブのうちの1辺の電極近傍には、3本鎖構造を形成可能なオリゴヌクレオチドが固定化され、頂点から付属するDNAプローブの先端は電子伝達メディエータであるメチレンブルーを修飾した3本鎖構造を形成可能な短鎖オリゴヌクレオチドとした。さらにDNAプローブには、ターゲットDNAと親和性の高い認識素子を結合させることで、DNAプローブが測定試料中にさらされるように突き出す構造が設計されている。これは、電子伝達メディエータを電極表面から遠ざける役割を果たし、妨害となるバックグラウンドシグナルの抑制に効果的であった。ここに、ターゲットDNAが認識素子と相補的に結合すると、認識素子がDNAプローブから解離する。電極から離れた場所に固定化されていたDNAプローブのオリゴヌクレオチドは、電極近傍の3本鎖形成オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションをおこない、3本鎖を形成する。その結果、電子伝達メディエータが電極表面に近接することで、電気化学的シグナルが増強するという仕組みである。本センサーは、酵素を用

いた四面体 DNA プローブによるセンサーと比較して、ワンステップで測定可能、迅速な応答、簡単にセンサーの再生が可能、感応素子の変更が可能、といった利点を有する。加えて、ハイブリダイゼーション連鎖反応のようなシグナル増幅法を用いることでさらなるセンサーの感度の向上も期待できる。

## 5. 分子インプリントポリマーを用いたセンサー

酵素や抗体を用いたバイオセンサーは、分析対象物質に対する特異性が極めて高く、優れた選択性を発揮する。しかし、上述してきたようなバイオセンサーは、感応素子に用いる生体関連物質が高価である、生体物質であるため熱や pH の変化に不安定、長期安定性に欠ける、分析対象は抗原-抗体や酵素-基質といった特定の組み合わせがある物質に制限される、といった欠点を有する。

一方、分子インプリントポリマー (MIP) は、生体における物質識別能力を模倣した人工抗体とも言われており、上述したバイオセンサーの欠点を克服する新たな感応素子として注目されている。1990 年代に Mosbach らが本技術を確立して以降<sup>35,36)</sup>、種々の物質を鑄型分子とした MIP の開発例や応用例が検討されている。目的物質である鑄型分子には、環境汚染物質<sup>37)</sup>、除草剤<sup>38)</sup>、低分子医薬品<sup>39,40)</sup>、ペプチド<sup>41)</sup>、タンパク質<sup>42,43)</sup>、核酸<sup>44)</sup> など多様な物質が用いられ、それらの MIP の開発例が報告されている。また、MIP の応用例としては、混合溶液から目的物質を選択的に抽出する分離媒体として、液体クロマトグラフィー<sup>45,46)</sup> や固相抽出<sup>47-50)</sup> のカラム充填剤への利用が多く報告されている。

MIP は、分析対象物質の鑄型を内部に包含した高架橋性ポリマーで、その合成手順を図 5 に示す。まず、分析対象物質である鑄型分子と機能性モノマーの複合体を形成させる。鑄型分子と機能性モノマーの複合体は、互いが有する官

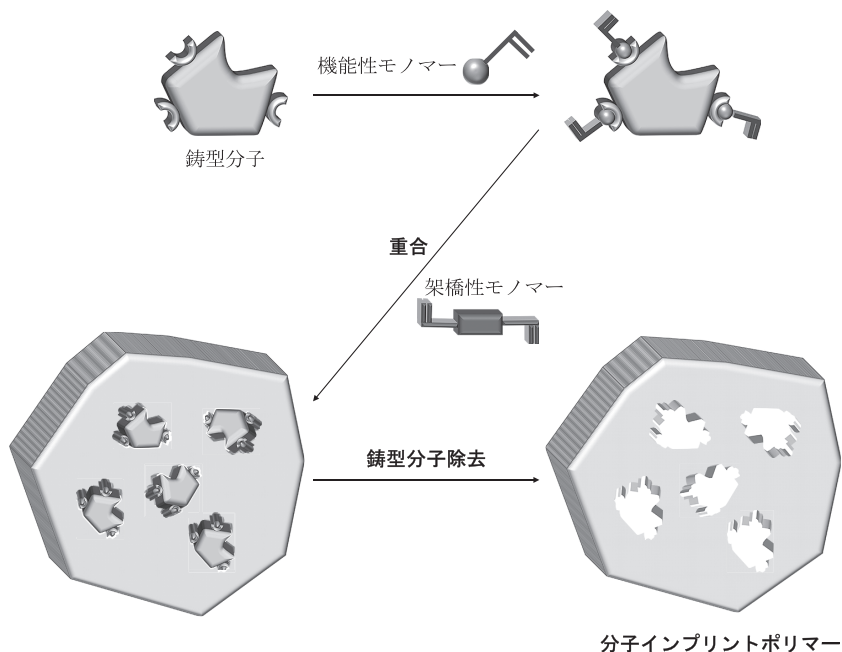


図 5 分子インプリントポリマー

能基同士の相互作用により形成され、可逆的共有結合や水素結合のような非共有結合が用いられる。そこに架橋性モノマーを加え、熱重合法や紫外線照射法を用いて重合する。最終的に、得られたポリマーから鑄型分子を除去することでMIPが作製できる。このように作製したMIPは、鑄型分子の化学構造や官能基の位置を三次元的に記憶していることから、鑄型分子のみを特異的に認識し結合させることができる。したがって、MIPは、広範囲な物質に対してテラーメイドな作製が可能、機械的強度に優れている、熱やpHの変化に対して安定、繰り返し利用可能、安価かつ簡便に作製可能、といった利点を有する。

電気化学的センサーの感応素子としてMIPを利用する場合、MIPがポリマーであることが問題となる。すなわち、MIPはプラスチックであるため電気不導体である。したがって、MIP上で生じた電気化学シグナルを検出するためには創意工夫が必要となる。その手段として、イオン選択性電極の感応膜であるポリ塩化ビニル膜に、可塑剤に分散させたMIP粒子を埋め込む方法が一般的に利用されている<sup>51)</sup>。

一方、当分野では白金薄膜をコーティングしたガラス板を電極として、白金薄膜表面に蒸着したプラズマ重合薄膜内部にMIPを含浸固定化することで、不導体であるMIPに導電性を付与する方法を開発した<sup>52)</sup>。本センサーは、鑄型分子がMIPと結合することで生じるセンサーの表面電位の変化を直接計測する電位検出型センサーであり、わずかな電位の変化も素早く検出できることを報告している。本センサーの特徴は、電極表面にMIPを直接固定化するため、上述の方法と比較して構造がより単純で微小化が容易な点にある。しかし、本センサーは電極に用いた白金による酸化還元反応の触媒作用により、共存物質の酸化還元反応の影響を受けることがわかった。そこで著者らは、棒状

炭素電極にプラズマ重合薄膜をコーティングし、そこへMIPを含浸固定化する電極を開発した。著者らがおこなった研究例として、グルタチオンセンサーとヒスタミンセンサーについてそれぞれ紹介する。還元型グルタチオンを鑄型分子とし、機能性モノマーとしてメタクリル酸、架橋性モノマーとしてエチレングリコールジメタクリレートを用いてMIPを形成した電位検出型センサーは、還元型グルタチオンに対する高い特異性を有し、 $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ の還元型グルタチオン濃度と電位変化量の間で直線性を有していることを示した<sup>53)</sup>。また、ヒスタミンを鑄型分子として作製したヒスタミンセンサーでは、ヒスタミン濃度と電位変化量との間の回帰直線について、ネルンスト応答に近い応答を示した<sup>54)</sup>。さらに、既知濃度のヒスタミンを添加したウシ血清を測定試料とし、本ヒスタミンセンサーで定量を試みた結果、添加したヒスタミン濃度に対して100%に近い良好な回収率を得ることができた。以上より、MIPを感応素子とした電位検出型センサーは、ウシ血清を試料とした場合においても、血清の影響を受けることなくヒスタミンの定量が可能であることを報告した<sup>55)</sup>。本センサーの今後の課題はさらなる感度の向上である。

MIPを用いた電位検出型センサーの応答性の向上の手段として、GCEをカーボンナノチューブで修飾した後、MIPを重合する研究例が報告されている<sup>56)</sup>。本センサーは、シアル酸を鑄型分子としたMIPを用いて作製され、大きな表面積と優れた電子移動特性を有するカーボンナノチューブの修飾により、センサーの安定性および応答性の向上が見られた。

また、センサーの応答性の向上には、MIPの分子認識能の向上も重要である。MIPの分子認識能の向上の手段として、ゾルゲル法を用いたMIPの調製がある<sup>57)</sup>。従来MIPを構成する架橋性モノマーとしてはアクリルモノマーが主



流であった。アクリルモノマーは市販されているものでも膨大な種類があり、必要とする機能に応じて適切なモノマーを選択できる上、重合方法も柔軟に選択が可能であることから、頻繁に使用されてきた。その反面、ポリマー表面に対する物質の非特異的吸着や水系における目的物質に対する特異性の低さが課題となっている。一方、ゾルーゲル法による MIP は、低温かつ穏和な条件で迅速かつ容易に重合できるため、鑄型分子と機能性モノマーの相互作用を維持しながら調製することができる。加えて、ゲルネットワークは高い気孔率と表面積を有するため、物質に対する選択性や拡散性に優れるといった特徴を有する。3-アミノプロピルトリエトキシシラン、テトラエトキシシランを、鑄型分子である Sudan I およびキトサン、金ナノ粒子と共に共重合させ調製した分子インプリントゾルーゲルポリマーは、線形範囲が  $0.1 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、検出限界が  $2.0 \times 10^{-9} \text{ M}$  で、Sudan I に対する高い感度と選択性を示したことが報告されている<sup>58)</sup>。

さらに、ポリピロールなどの導電性ポリマーを MIP の架橋性モノマーとして利用することで、MIP 自身に導電性を付与する取り組みもおこなわれている。ポリピロールは、電解重合により合成され、膜厚のコントロールが容易である他、良好な半導体特性を有する。この特性により、ポリピロールは効果的な電気化学特性と安定性を示すため、電気化学的センサーのトランスデューサとして広く利用されている。ゾルーゲル法にポリピロールを組み合わせることで、ゾルーゲル法による導電性の低さをカバーし、テオフィリンに対する検出限界が  $0.66 \text{ nM}$  と優れた感度のセンサーの開発に成功している<sup>59)</sup>。

電極表面に固定化する MIP の量を増大させることも、センサー感度の向上に有用である。還元型酸化グラフェンをコーティングした ITO

電極に、テトラクロリド金(Ⅲ)酸からなるナノ/マイクロアイランドと称される粗い突起を有するナノ構造を蒸着し、そこへ MIP を電解重合させた研究例がある<sup>60)</sup>。本研究では、結果としてセンサーの電極の表面積が増大し、心臓由来脂肪酸結合蛋白に対して検出限界  $2.29 \text{ fg/mL}$ 、 $1 \text{ fg/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$  の広い線形応答範囲を達成したことが報告されている。

MIP の分子認識は、鑄型分子と MIP における官能基間の相互作用と鑄型へのはまり込みによりおこなわれる。それに対し、抗体や酵素などの生体関連分子による分子認識はより複雑な認識機構から成り立っている。両者の分子認識能と比較すると、MIP の分子認識能は生体関連分子のそれには残念ながら及ばないのが現状である。しかし、作製の簡便さや安定性、再利用が容易、広範囲な物質に対してテーラーメイドに応用可能、という MIP の利点を生かせば、環境中における種々の物質の In-situ 測定や、臨床検査での簡易測定など、簡便な測定法が求められる場において、MIP を用いた電気化学的センサーは有益な測定手段となることが期待できる。

---

## 6. おわりに

---

本総説では、電気化学的バイオセンサーについて、種々の分子認識機構を感応素子としたユニークな開発例を紹介した。いずれのバイオセンサーにおいても、センサーの感度の向上が鍵となっていることがわかる。多くの研究において、センサーの感度の向上には、電極への電子移動効率の向上、電極表面積の増大、感応素子の電極への固定化量の増大に焦点が当てられている。本総説においても電子移動効率を高めるための材料として、数種の電子伝達メディエータを紹介したが、ユニークな電気化学的特性を

有する新素材の開発は目覚ましい進歩を遂げている。今後も種々の材料を用いたセンサーの開発例が報告されると予想される。信号増幅により今後もセンサー性能が向上することで、医療分野のみならず種々の領域における簡便な測定法として、実用化されるセンサーが増加することを期待したい。

#### 【謝辞】

本総説で紹介した著者らの研究は、京都薬科大学薬品分析学分野でおこなわれたものであり、本研究にあたりご指導ご鞭撻を賜りました京都薬科大学北出達也名誉教授をはじめ、研究にご協力いただいた研究室の学生に厚く御礼申し上げます。

#### 【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

#### 【引用文献】

- 1) 清山哲郎, 塩川二朗, 鈴木周一, 笛木和雄 編. 化学センサー—その基礎と応用—. **1982**, 講談社, 東京.
- 2) 軽部征夫 監修. バイオセンサ・ケミカルセンサ事典. **2007**, テクノシステム, 東京.
- 3) Aigou Wu, Waheed S. Khan Ed. *Nanobiosensors: From Design to Applications*. **2020**, wiley-VCH, Weinheim.
- 4) Francesca Costantini, Roald Tiggelaar, Simona Sennato, Francesco Mura, Stefan Schlautmann, Federico Bordi, Han Gardeniers, Cesare Manetti. Glucose level determination with a multi-enzymatic cascade reaction in a functionalized glass chip. *Analyst*. **2013**, 138(17), 5019–5024.
- 5) Saranya Shanmugam, Kavitha Thandavan, Sakthivel Gandhi, Swaminathan Sethuraman, John B. B. Rayappan, Uma M. Krishnan. Development and evaluation of a highly sensitive rapid response enzymatic nanointerfaced biosensor for detection of putrescine. *Analyst*. **2011**, 136(24), 5234–5240.
- 6) Ponnath J. Jandas, Jingting Luo, Aojie Quan, Chong Li, Chen Fu, Richard Y. Q. Fu. Graphene oxide-Au nano particle coated quartz crystal microbalance biosensor for the real time analysis of carcinoembryonic antigen. *RSC Adv*. **2020**, 10(7), 4118–4128.
- 7) Insu Kim, Young I. Kim, Sang W. Lee, Hyo G. Jung, Gyudo Lee, Dae S. Yoon. Highly permselective uric acid detection using kidney cell membrane-functionalized enzymatic biosensors. *Biosens. Bioelectron*. **2021**, 190, 113411.
- 8) Qian Wen, Si-Li Yi, Qin-Lu Lin, Li-Juan Tang, Jian-Hui Jiang. Terminal protection of peptides by interactions with proteins: A “signal-on” peptide-templated gold nanocluster beacon for label-free protein detection. *Talanta*. **2021**, 233, 122566.
- 9) Dezhi Feng, Jing Su, Yi Xu, Guifang He, Chenguang Wang, Xiao Wang, Tingrui Pan, Xianting Ding, Xianqiang Mi. DNA tetrahedron-mediated immunosandwich assay for rapid and sensitive detection of PSA through a microfluidic electrochemical detection system. *Microsyst. Nanoeng*. **2021**, 7, 33.
- 10) András Hushegyi, Dominika Pihiková, Tomas Bertok, Vojtech Adam, René Kizek, Jan Tkac. Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor. *Biosens. Bioelectron*. **2016**, 79, 644–649.
- 11) Jennifer McLeod, Chankyu Park, Alexandra Cunningham, Lynne O'Donnell, R. Stephen Brown, Fiona Kelly, Zhe She. Developing a toll-like receptor biosensor for Gram-positive bacterial detection and its storage strategies. *Analyst*. **2020**, 145(18), 6024–6031.
- 12) Yujie Liu, Rocío Cánovas, Gastón A. Crespo, María Cuartero. Thin-layer potentiometry for creatinine detection in undiluted human urine using ion-exchange membranes as barriers for charged interferences. *Anal. Chem*. **2020**, 92(4), 3315–3323.
- 13) Takumi Komikawa, Masayoshi Tanaka, Kentaro Yanai, Benjamin R. G. Johnson, Kevin Critchley, Takeshi Onodera, Stephen D. Evans, Kiyoshi Toko, Mina Okochi. A bioinspired peptide matrix for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Biosens. Bioelectron*. **2020**, 153, 112030.
- 14) Sang H. Lee, Yae E. Park, Ji E. Lee, Hye J. Lee. A surface plasmon resonance biosensor in conjunction with a DNA aptamer-antibody bioreceptor pair for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 concentrations in colorectal cancer plasma solutions. *Biosens. Bioelectron*. **2020**, 154, 112065.
- 15) Maria Yakovleva, Sunil Bhand, Bengt Danielsson. The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. *Anal. Chim. Acta*. **2013**, 766, 1–12.
- 16) Farabi Temel. One novel calix[4]arene based QCM sensor for sensitive, selective and high performance-

- sensing of formaldehyde at room temperature. *Talanta*. **2020**, 211, 120725.
- 17) Kazuya Matsumoto, Brylee D. B. Tiu, Akifumi Kawamura, Rigoberto C. Advincula, Takashi Miyata. QCM sensing of bisphenol A using molecularly imprinted hydrogel/conducting polymer matrix. *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **2016**, 48(4), 525–532.
- 18) Veli C. Ozalp, Gulay Bayramoglu, Zehra Erdem, Mehmet Y. Arica. Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core-shell type magnetic separation. *Anal. Chim. Acta*. **2015**, 853, 533–540.
- 19) Leland C. Clark, Champ Lyons. Electrode Systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, 102(1), 29–45.
- 20) Stuart J. Updike, George P. Hicks. The enzyme electrode. *Nature*. **1967**, 214(5092), 986–988.
- 21) Qinghua Yan, Na Zhi, Li Yang, Guangri Xu, Qigao Feng, Qiqing Zhang, Shujuan Sun. A highly sensitive uric acid electrochemical biosensor based on a nano-cube cuprous oxide/ferrocene/uricase modified glassy carbon electrode. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 10607.
- 22) Mika Hatada, Wakako Tsugawa, Eri Kamio, Noya Loew, David C. Klonoff, Koji Sode. Development of a screen-printed carbon electrode based disposable enzyme sensor strip for the measurement of glycosylated albumin. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 88, 167–173.
- 23) Tianzi Xia, Guangyan Liu, Junjie Wang, Shili Hou, Shifeng Hou. MXene-based enzymatic sensor for highly sensitive and selective detection of cholesterol. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, 183, 113243.
- 24) Ankita Sinha, Dhanjai, Huimin Zhao, Yujin Huang, Xianbo Lu, Jiping Chen, Rajeev Jain. MXene: An emerging material for sensing and biosensing. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2018**, 105, 424–435.
- 25) Kai Niu, Juan Gao, Lingxia Wu, Xianbo Lu, Jiping Chen. Nitrogen-doped graphdiyne as a robust electrochemical biosensing platform for ultrasensitive detection of environmental pollutants. *Anal. Chem.* **2021**, 93(24), 8656–8662.
- 26) Kyu S. Eom, Yi J. Lee, Hye W. Seo, Ji Y. Kang, Joon S. Shim, Soo H. Lee. Sensitive and non-invasive cholesterol determination in saliva via optimization of enzyme loading and platinum nano-cluster composition. *Analyst*. **2020**, 145(3), 908–916.
- 27) José A. Ribeiro, Maria G. F. Sales, Carlos M. Pereira. Electrochemistry-assisted surface plasmon resonance biosensor for detection of CA 15 - 3. *Anal. Chem.* **2021**, 93(22), 7815–7824.
- 28) Elif B. Aydın, Muhammet Aydın, Mustafa K. Sezgentürk. Electrochemical immunosensor based on chitosan/conductive carbon black composite modified disposable ITO electrode: An analytical platform for p53 detection. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 121, 80–89.
- 29) Bolu Sun, Jinying Cai, Wuyan Li, Xiaodan Gou, Yuqiang Gou, Dai Li, Fangdi Hu. A novel electrochemical immunosensor based on PG for early screening of depression markers-heat shock protein 70. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 111, 34–40.
- 30) Na Wang, Jing Wang, Xiaoqing Zhao, Hou Chen, Hui Xu, Liangjiu Bai, Wenxiang Wang, Huawei Yang, Donglei Wei, Baiqing Yuan. Highly sensitive electrochemical immunosensor for the simultaneous detection of multiple tumor markers for signal amplification. *Talanta*. **2021**, 226, 122133.
- 31) Luyan Wang, Kaili Cui, Pengxiang Wang, Meishan Pei, Wenjuan Guo. A sensitive electrochemical DNA sensor for detecting *Helicobacter pylori* based on accordion-like  $Ti_3C_2T_x$ : a simple strategy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, 413(16), 4353–4362.
- 32) Chao Wang, Liying Liu, Qiang Zhao. Low temperature greatly enhancing responses of aptamer electrochemical sensor for aflatoxin B1 using aptamer with short stem. *ACS Sens.* **2020**, 5(10), 3246–3253.
- 33) Hao Pei, Xiaolei Zuo, Dan Zhu, Qing Huang, Chunhai Fan. Functional DNA nanostructures for theranostic applications. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47(2), 550–559.
- 34) Yucai Yang, Yue Huang, Chao Li. A reusable electrochemical sensor for one-step biosensing in complex media using triplex-forming oligonucleotide coupled DNA nanostructure. *Anal. Chim. Acta*. **2019**, 1055, 90–97.
- 35) Dario Kriz, Klaus Mosbach. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta*. **1995**, 300(1–3), 71–75.
- 36) Dario Kriz, Olof Ramström, Anders Svensson, Klaus Mosbach. Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements. *Anal. Chem.* **1995**, 67(13), 2142–2144.
- 37) Abhijit C. Roy, V. S. Nisha, Chetna Dhand, Md. Azahar Ali, Banshi D. Malhotra. Molecularly imprinted polyaniline-polyvinyl sulphonic acid composite based sensor for para-nitrophenol detection. *Anal. Chim.*

- Acta*. **2013**, 777, 63–71.
- 38) Silke Kröger, Anthony P. F. Turner, Klaus Mosbach, Karsten Haupt. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes. *Anal. Chem.* **1999**, 71(17), 3698–3702.
- 39) Qiaohui Luo, Neng Yu, Chunfei Shi, Xiaoping Wang, Jianmin Wu. Surface plasmon resonance sensor for antibiotics detection based on photo-initiated polymerization molecularly imprinted array. *Talanta*. **2016**, 161, 797–803.
- 40) Shirinaz I. Khan, Rakesh R. Chillawar, Kiran K. Tadi, Ramani V. Motghare. Molecular imprinted polymer based impedimetric sensor for trace level determination of digoxin in biological and pharmaceutical samples. *Curr. Anal. Chem.* **2018**, 14(5), 474–482.
- 41) Lucia Cenci, Maddalena Bertolla, Andrea Anesi, Emmanuele Ambrosi, Graziano Guella, Alessandra M. Bossi. Micro-versus nano-sized molecularly imprinted polymers in MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409(26), 6253–6261.
- 42) Suticha Chunta, Roongnapa Suedee, Peter A. Lieberzeit. High-density lipoprotein sensor based on molecularly imprinted polymer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410(3), 875–883.
- 43) Wei Li, Qi Zhang, Yijia Wang, Yanyan Ma, Zhanchen Guo, Zhen Liu. Controllably prepared aptamer – molecularly imprinted polymer hybrid for high-specificity and high-affinity recognition of target proteins. *Anal. Chem.* **2019**, 91(7), 4831–4837.
- 44) Olena Slinchenko, Alexandre Rachkov, Hirotaka Miyachi, Masayo Ogiso, Norihiko Minoura. Imprinted polymer layer for recognizing double-stranded DNA. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20(6), 1091–1097.
- 45) Yukari Nakamura, Shizuka Masumoto, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka. Molecularly imprinted polymer for glutathione by modified precipitation polymerization and its application to determination of glutathione in supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 144, 230–235.
- 46) Yan Zhang, Jiandu Lei. Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymeric microspheres for chloramphenicol by aqueous suspension polymerization as a high performance liquid chromatography stationary phase. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, 34(6), 1839–1844.
- 47) Ivona Lhotská, Aneta Kholová, Andrea Machyřáková, Katarína Hroboňová, Petr Solich, František Švec, Dalibor Šatínský. Preparation of citrinin-selective molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 411(11), 2395–2404.
- 48) Sijia Tan, Hailong Yu, Yahui He, Miao Wang, Guiqiao Liu, Sihui Hong, Feiyan Yan, Yanli Wang, MengQiang Wang, Tengfei Li, Jing Wang, Ei-Aty A. M. Abd, Ahmet Hacımüftüoğlu, Yongxin She. A dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for selective determination of four pyridine carboxylic acid herbicides in milk. *J. Chromatogr. B.* **2019**, 1108, 65–72.
- 49) Manal Bitar, Philippe Cayot, Elias Bou-Maroun. Molecularly imprinted polymer solid phase extraction of fungicides from wine samples. *Anal. Methods.* **2014**, 6(16), 6467–6472.
- 50) Javier L. Urraca, José F. Huertas-Pérez, Guillermo A. Cazorla, Jesus Gracia-Mora, Ana M. García-Campaña, María C. Moreno-Bondi. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408(11), 3033–3042.
- 51) Ayman H. Kamel, Abd E.-G. E. Amr, Nashwa H. Ashmawy, Hoda R. Galal, Abdulrahman A. Almehezia, Teraze A. Youssef, Mohamed A. Al-Omar, Ahmed Y. A. Sayed. Validation of a novel potentiometric method based on a polymeric PVC membrane sensor integrated with tailored receptors for the antileukemia drug cytarabine. *Polymers.* **2020**, 12(6), 1343.
- 52) Tatsuya Kitade, Keisuke Kitamura, Tomoyuki Konishi, Shigehiko Takegami, Takayoshi Okuno, Michie Ishikawa, Manabu Wakabayashi, Kayoko Nishikawa, Yoko Muramatsu. Potentiometric immunosensor using artificial antibody based on molecularly imprinted polymers. *Anal. Chem.* **2004**, 76(22), 6802–6807.
- 53) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade. A molecularly imprinted polymer-modified potentiometric sensor for the detection of glutathione. *Anal. Sci.* **2019**, 35(10), 1111–1115.
- 54) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade. Construction and studies of histamine potentiometric

- sensors based on molecularly imprinted polymer. *Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16(6), 788–794.
- 55) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Yoko Idosaki, Tatsuya Kitade. Application of molecularly imprinted polymer-modified potentiometric sensor for quantitative determination of histamine in serum. *Anal. Sci.* **2020**, 36(12), 1561–1563.
- 56) Fuhui Huang, Bengao Zhu, Haochen Zhang, Yue Gao, Chunmei Ding, Hong Tan, Jianshu Li. A glassy carbon electrode modified with molecularly imprinted poly(aniline boronic acid) coated onto carbon nanotubes for potentiometric sensing of sialic acid. *Microchim. Acta.* **2019**, 186(5), 270
- 57) Guilin Xu, Yu Chi, Lu Li, Shouhua Liu, Xianwen Kan. Imprinted propyl gallate electrochemical sensor based on graphene/single walled carbon nanotubes/sol-gel film. *Food Chem.* **2015**, 177, 37–42.
- 58) Shizhen Chen, Dan Du, Jing Huang, Aiqing Zhang, Haiyang Tu, Aidong Zhang. Rational design and application of molecularly imprinted sol-gel polymer for the electrochemically selective and sensitive determination of Sudan I. *Talanta.* **2011**, 84(2), 451–456.
- 59) Tian Gan, Jiebin Li, Aixia Zhao, Jiahui Xu, Dongyun Zheng, Haibo Wang, Yanming Liu. Detection of theophylline using molecularly imprinted mesoporous silica spheres. *Food Chem.* **2018**, 268, 1–8.
- 60) Alireza Sanati, Roozbeh S. Moakhar, Imman I. Hosseini, Keyvan Raeissi, Fathallah Karimzadeh, Mahsa Jalali, Mahshid Kharaziha, Sara Sheibani, Laleh Shariati, John F. Presley, Hojatollah Vali, Sara Mahshid. Gold nano/micro-islands overcome the molecularly imprinted polymer limitations to achieve ultrasensitive protein detection. *ACS sens.* **2021**, 6(3), 797–807.

## Recent trends in development of electrochemical biosensors with unique sensing elements

Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami

Kyoto Pharmaceutical University, Department of Analytical Chemistry

The biosensor which is one of the chemical sensors has specificity and selectivity for the analytes, because it utilizes some biological reactions for the molecular recognition unit; for example, enzyme-substrate reaction and antigen-antibody reaction, etc. The biosensors which suitably combine with the molecular recognition unit for the sensing element and the signal conversion unit (transducer) that converts the recognized information into an electrical signal can easily and rapidly measure a wide variety of analytes. In recent years, the development of biosensor among chemical sensors has specially made remarkable progress. The molecular recognition ability of biosensors is mainly influenced by the sensing elements immobilized on the electrode surface. In this review, as the sensing elements, we focused on some biomolecules such as enzymes (or substrates), antibodies (or antigens), DNA, and molecularly imprinted polymers (MIP) called artificial antibodies, and outlined the recent trends in development of electrochemical biosensors with their unique sensing elements.

**Keywords:** biosensor, electrochemistry, sensing element, transducer