

## バイオセンサーによる有機リン剤等の検知

安齊 順一

## Use of Biosensors for Detecting Organophosphorus Agents

Jun-ichi ANZAI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received July 26, 2006)

The present paper reviews the use of electrochemical biosensors for detecting organophosphorus pesticides and nerve agents. Acetylcholine esterase (AChE)-immobilized electrodes have been used for detecting AChE inhibitors including organophosphorus and carbamate pesticides. The sensors are composed of AChE and choline oxidase (ChOx) for converting the AChE-generated choline into betaine and hydrogenperoxide ( $H_2O_2$ ), which is electrochemically oxidized at the electrode surface to produce the output signal of the sensor. In the presence of AChE inhibitors, the suppressed output signal of the sensor can be observed. If the sensors are operated in the presence of acetylthiocholine as a substrate of AChE, one can eliminate ChOx from the sensor design because enzymatically generated thiocholine is electrochemically active and thus directly oxidized at the electrode without using ChOx. Electron-transfer mediators such as tetracyanoquinodimethane have often been used for catalytically oxidizing thiocholine at the electrode set at less positive potential, which is effective in circumventing possible interference arising from oxidizing compounds in the sample solution. One of the drawbacks of the AChE-based biosensors in detecting organophosphorus pesticides and nerve agents arises from the fact that the sensors indirectly detect the signal based on the inhibition of the AChE-catalyzed reaction. On the other hand, for directly obtaining the output signal, organophosphorus hydrolase (OPH) is immobilized on the electrode surface to prepare amperometric biosensors. OPH catalyzes the hydrolysis reaction of organophosphorus compounds to produce electrochemically active compounds such as *p*-nitrophenol and thiols from parathion and VX, respectively. Thus OPH-based sensors can be used for detecting these compounds directly. These biosensors would be useful for in-site measurements of organophosphorus pesticides and nerve agents because portable-type biosensors are easily fabricated at relatively low cost.

**Key words**—biosensor; electrode; organophosphorus pesticide; nerve agent

## 1. はじめに

有機リン剤はコリンエステラーゼ阻害により人体に重篤な影響を与えることは周知のことである。環境汚染の防止という意味からもまた犯罪防止の観点からも、これらの物質を簡便にその場で検出することが重要である。小型電極を用いたバイオセンサーは操作が簡便で携帯することも可能であり、この目的には最適な装置である。本稿では、始めに酵素と電極を組み合わせて作製されたバイオセンサーの構造や測定原理と装置について解説し、次にバイオセンサーによる有機リン剤や神経剤など危険物の検出

法についてこれまでの研究例を紹介する。

## 2. バイオセンサーの構造と作動原理

バイオセンサーは電極などのトランスジューサーと生体材料を組み合わせて作製される小型計測装置であり、酵素、抗体、細胞、DNAなどの生体由来の材料を装置の一部に含むためにバイオセンサーと称される。測定対象物質は千差万別であるが、環境計測や医療計測などに幅広く応用されている。<sup>1-3)</sup> Figure 1 にバイオセンサーの概念と汎用されるトランスジューサー及び生体材料の例をまとめた。バイオセンサーは、測定対象物質が存在する試料溶液（又は試料ガス）と接触すると、酵素などの生体材料が対象物質と何らかの化学反応を起こす（酵素ならば基質の触媒反応、抗体ならば抗原の結合）。この化学反応は電極表面で起きるので、化学反応の種類に適した方式で電気信号を発生させることができ

東北大学大学院薬学研究科（〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3）

e-mail: junanzai@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウム S38 で発表したものを中心に記述したものである。

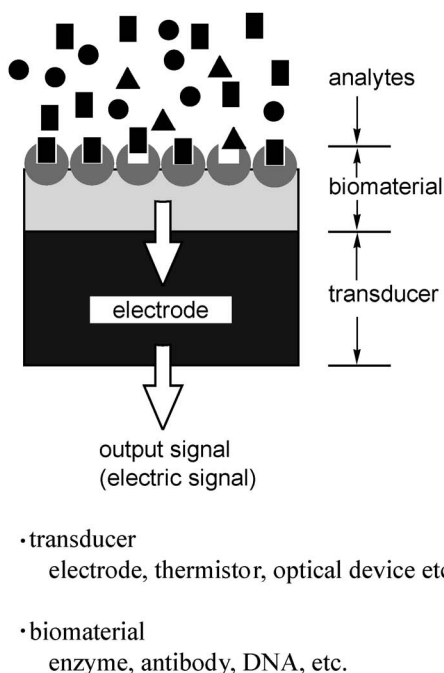


Fig. 1. A Schematic Illustration of Biosensors

る。このとき発生した電気信号の大小は試料中に存在する測定対象物質の濃度に依存するので、対象物質の濃度を電気信号（通常は電流）として検出することができる。Figure 1 に示した種々のセンサー材料のうち、電極に酵素を固定化したバイオセンサーが従来から最も広く研究されており、既に市販されているバイオセンサーもある。本稿で紹介する有機リン剤等を測定するバイオセンサーも、金属又は炭素を材料とする電極の表面にコリンエステラーゼ等を固定化した構造になっている。バイオセンサーは市販されているものはかならずしも多くないので、しばしば測定する目的に応じて自作する必要がある。その際に、適切な電極や生体材料を選択することはもちろん大切であるが、生体材料を電極表面に効果的に固定化することも重要であり、固定化法の適否によりバイオセンサーの性能は著しく左右される。そのため、電極等への生体材料（主に酵素や抗体などのタンパク質）の固定化法はそれ自体広範に研究されて今日まで種々の方法が確立されているが、一長一短があり現在でもすべての要求を満たす固定化法はないのが実状である。

バイオセンサーの装置は電極に酵素などを固定化したものなので、一般の分析装置に比べて簡便である。また、センサーのサイズを微小化することも可

能で、例えば髪の毛程度の太さの金属の細線を用いて作製したセンサーは、単一細胞に突き刺して細胞内部の測定に使用するということもできる。通常環境計測や医療計測では常に極端な微小化が要求される訳ではないので、研究室における実験では直径が 3—5 mm 程度の白金や金（あるいは炭素）の細い線をプラスチックの棒の中心に埋め込んで、円盤状に露出した先端をディスク電極として使用することが多い。しかし、個々のセンサーを微小化すれば同一の装置に多量の微小センサーを集積化することが可能となるので、センサーを微小化する研究が活発に行われている。一般には、電極が微小化されて表面積が小さくなると得られる電流値は低下し必然的にノイズも増大するので、微小化されたセンサーにより有効な信号を観測するのはかならずしも容易ではない。

Figure 2 に電極を用いたバイオセンサーの測定装置を模式的に示した。電極部分と電流を測定する電流計の部分に大別できるが、バイオセンサーとして重要なのは電極部分である。後者の電流計などは優れた装置が市販されており適宜選択すれば問題はない。電極部分は、三本又は二本の電極から構成される。すなわち、酵素等が固定化された作用電極、電流を流すための対極、及び作用電極の電位を設定する際の基準となる参照電極である。これらの電極を別々に試料液に挿入して測定することもできるし、必要に応じてみかけ上は一本の電極に一体化することもできる。また、微小化などの都合があるときには、参照電極は除外して二電極系として、対極を疑似参照電極として用いることもある。Figure 2 に示したのは、個別の試料にセンサーを挿入して測定する方式（いわゆるバッチ方式）であるが、流れ分析系を組んで試料溶液の流路に電極を装備させるように設計すれば、センサーによる連続測定ができる。このような方式は、既にクロマトグラフィーの電気化学検出器として広く利用されている。

本稿では以下に、有機リン剤等を検出するバイオセンサーについて、作動方式の違いに着目しながら測定原理や性能についてこれまでの研究例を紹介する。

### 3. コリンエステラーゼ・コリンオキシダーゼ複合酵素型センサー

当初はアセチルコリンを測定する目的で、アセチ

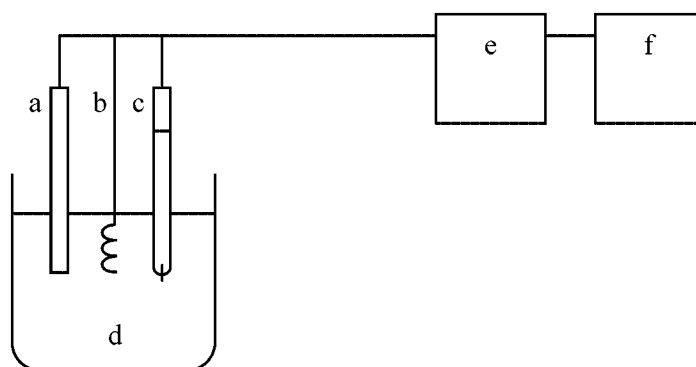
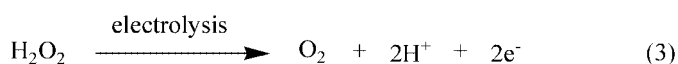
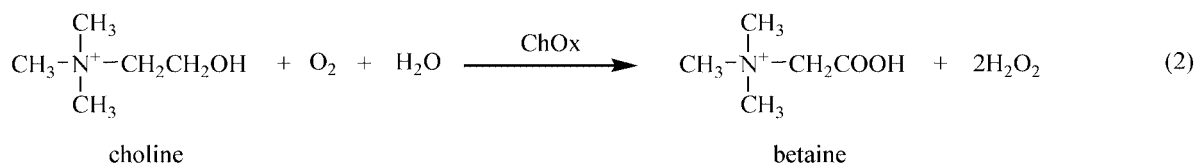
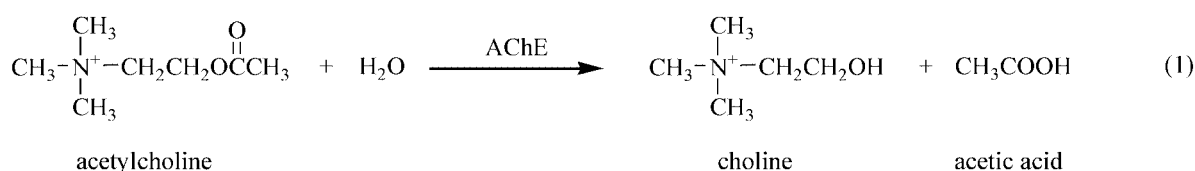


Fig. 2. An Apparatus for Electrochemical Measurements Using Biosensors

a: working electrode (sensor), b: reference electrode, c: counter electrode, d: sample solution, e: electrometer, f: recorder.



Scheme 1. Enzyme and Electrochemical Reactions Involved in AChE/ChOx-based Organophosphorus Agent Sensors

ルコリンエステラーゼ (Acetylcholine esterase, AChE) とコリンオキシダーゼ (Choline oxidase, ChOx) の2種類の酵素を1つの電極に固定化したバイオセンサーが開発された。<sup>4,5)</sup> このアセチルコリンセンサーでは, Scheme 1 に示すように Eqs. (1) と(2)の AChE と ChOx の逐次反応及び Eq. (3) の電気化学反応に基づいて電気信号が発生する。すなわち, AChE の触媒反応により生成したコリンが ChOx によりベタインに酸化される際に, 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) が生成される。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は易酸化性物質なので +0.6 V 程度に設定された電極の表面で電解酸化され, その際の酸化電流の値はアセチルコリンの濃度に依存し, 電流値からアセチルコリン濃度を求めることができる。なお Eq. (2) の反応では O<sub>2</sub> が

消費されるので, Eq. (3) の電解反応により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量を求める代わりに, 市販の酸素電極にこれらの酵素を固定化してセンサーとし, 酸素濃度の変化からアセチルコリン濃度を求める方法もある。筆者らは, 電極表面に固定化される AChE と ChOx の触媒活性の比を最適化することを試みて, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 測定方式のアセチルコリンセンサーの高性能化を達成した。<sup>6)</sup>

ところで, 有機リン剤は AChE に不可逆的に結合して触媒反応を阻害するので, アセチルコリンが存在する溶液中に有機リン剤が共存すれば Eq. (1) の反応は部分的に阻害されて, コリンの生成速度は低下する。このため, Eqs. (2) 及び(3) の反応速度も低下するので, センサーの電流応答は減少する

(Fig. 3). その結果, 試料液中の有機リン剤の AChE 阻害物質の濃度が増大すれば Fig. 3 における  $-\Delta I$  は大きくなる. この関係を用いて, AChE 阻害物質を検出することができる (なお, Fig. 3 はセンサーの一般的な応答性を示したものであり, ある一定の条件下でセンサーを用いて実測した応答曲線ではない). この原理に基づいたバイオセンサーによる有機リン剤等の測定が広範に報告されているが, 報告例を Table 1 にまとめた.<sup>7-11)</sup> Table 1 にまとめたセンサーは多くは有機リン系及びカルバメート系農薬の検出を目的としたものである. 筆者らもこの方法により, pM レベルのトリクロルフォーン (Fig. 4) が測定できることを報告している.<sup>12)</sup> なお, AChE の代わりにブチルコリンエステラーゼ (BuChE) が使用されることもある. この場合には, 酵素の基質としてアセチルコリンではなくブチルコリンが用いられる.

Figure 3 に示したように, 測定対象とする試料に AChE 阻害物質が含まれれば電流の減少が観察されるので, 定性的判断には長い時間は必要としない. しかし, 阻害物質の濃度を定量するためにはセンサーの検量線をあらかじめ作成することが必要なので迅速性には劣る.

#### 4. コリンエステラーゼ型センサー

上述のセンサーで Scheme 1 中の Eq. (1) の AChE の反応阻害が応答電流の減少を引き起こすためには, Eq. (1) が Eqs. (1)–(3) の反応全体の律速段階にならなければならない. したがって, 2 種類の酵素のうち AChE に対して ChOx を過剰に固定化して Eq. (2) の反応速度を速くするのが普通である. Equation (3) の電極反応は速いので, このような条件にすれば Eq. (1) の反応速度が相対的に遅くなり, 全体の律速段階になって AChE 阻害物質の濃度を測定することができる. このように, AChE と ChOx を同時に用いるセンサーの設計にはやや煩雑な面がある. さらに, AChE と ChOx の単位重量当たりの触媒活性はかなり異なることが多いので, 固定化する AChE と ChOx の比を最適化する必要があることも煩雑さを増している. ところで AChE と ChOx の 2 種類の酵素を用いるのは, Eq. (1) の反応で生成するコリンは酸化還元電位が非常に高いので電極で直接酸化できないためである. もし, Eq. (1) の反応生成物が電極で酸化できれば,

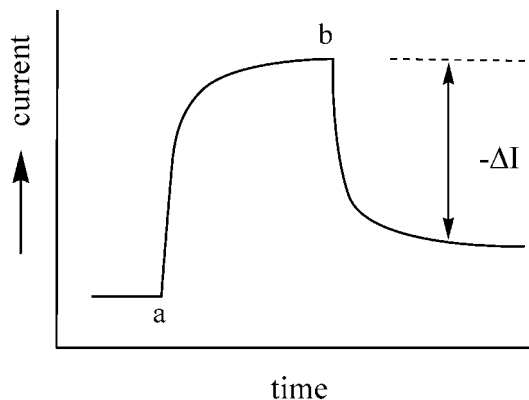


Fig. 3. A Typical Response of AchE/ChOx-based Biosensors to Organophosphorus Agents

a: addition of acetylcholine, b: addition of organophosphorus agent.

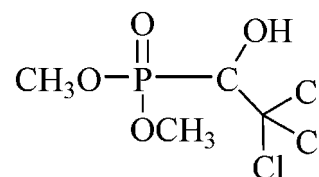


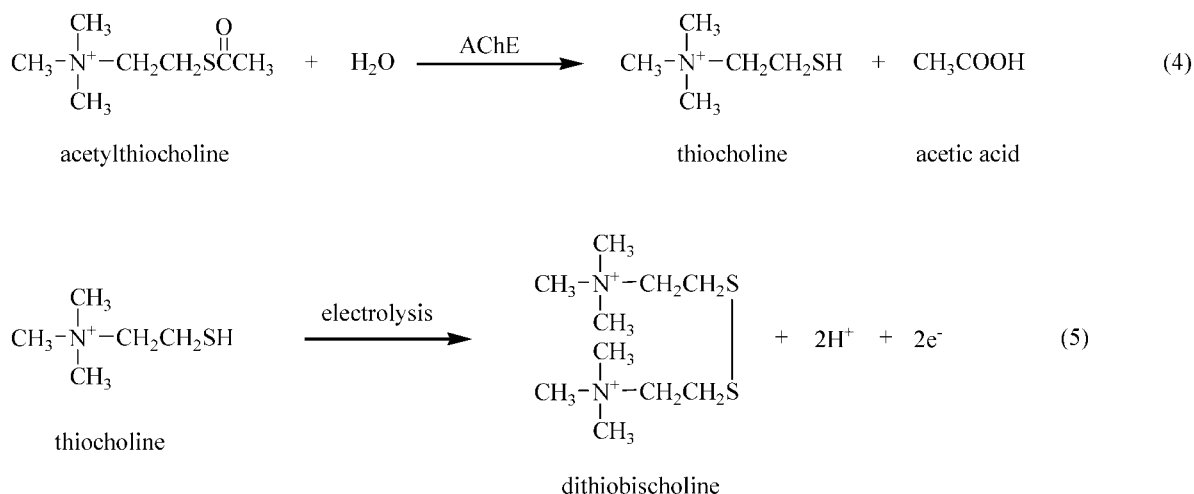
Fig. 4. The Chemical Structure of Trichlorfon

Table 1. AChE-ChOx Bienenzyme-based Biosensors for Detecting Organophosphorus Compounds

Electrode	Organophosphorus compound (Lower detection limit)	Reference
Carbon paste	Paraoxon (0.1 nM)	7)
	Carbofuran (0.1 nM)	
Oxygen electrode	Aldicarb (50 nM)	8)
	Carbofuran (2 nM)	
	Carbaryl (19 nM)	
Dendrimer-coated gold electrode	Dichlorvos (5 μM)	9)
	Carbofuran (50 μM)	
Screen-printed carbon electrode	Methyl parathion (50 nM)	10)
Screen-printed carbon electrode	Paraoxon (19 nM)	11)
	Chlorpyrifos ethyl oxon (1 nM)	
Gold electrode	Trichlorfon (4 μM)	12)

Eqs. (2) 及び (3) の反応を用いるまでもなく電気信号を得ることができる. このような観点から, Eq. (1) の AChE の基質としてアセチルチオコリンを用いることにより, AChE だけを固定化したセンサーを開発することが検討された (Scheme 2).

アセチルチオコリンが Eq. (4) に従って AChE に



Scheme 2. Enzyme and Electrochemical Reactions Involved in AChE-based Sensors Using Acetyl Thiocholine

より加水分解されて生成するチオコリンは、電極で酸化されて2量体のジチオビスコリンとなる (Eq. 5). このときの酸化電流はチオコリンの濃度に依存するので、もし試料中に AChE 阻害物質が共存して AChE の触媒活性が低下すれば、電極表面で生成されるチオコリンの濃度が減少して酸化電流値は低下する。この電流値の低下から AChE 阻害物質を検出することができる。Table 2 にチオコリンの電解酸化に基づくセンサーの研究例をまとめた。<sup>13–16</sup> 電極材料や酵素固定化法が種々検討されているが、いずれも nM レベルの有機リンあるいはカルバメート類が検出されている。Table 2 の中には、チオコリンを電極で直接酸化して電流信号を得ているセンサーもあるが、多くは電子メディエーター (Med) を用いて低い酸化電位で検出する方法を採用している。この方法は、チオコリンよりも低い電位で酸化還元反応が進む Med の酸化型によりチオコリンを酸化して、その結果還元型になった Med を電極で再酸化して触媒的に使用するものである。このようにすると、より低い電位でチオコリンを検出できるので、試料液中に含まれる可能性のある妨害物質の影響を受けずに測定ができるので有用である。Med を用いる測定原理を Fig. 5 に示した。Table 2 に示した例ではテトラシアノキノジメタン (TCNQ) が Med として使用されている。

最近、チオコリンを酸化して信号を得るセンサーの電極材料としてカーボンナノチューブが優れていることが見出された。炭素電極の表面に AChE とカーボンナノチューブを薄膜状に被覆して作製した

Table 2. AChE-based Biosensors Using Acetylthiocholine

Electrode	Organophosphorus compound (Lower detection limit)	Reference
Screen-printed carbon electrode	Dichlorvos (10 nM)	13)
Screen-printed carbon electrode (TCNQ) <sup>a)</sup>	Carbaryl (10 nM) Carbofuran (0.8 nM)	14)
Screen-printed carbon electrode (TCNQ) <sup>a)</sup>	Carbaryl (55 nM) Methy parathion (100 nM)	15)
Carbon nanotube electrode	Paraoxon (0.4 pM)	16)

<sup>a)</sup> TCNQ: tetracyanoquinodimethane was used as electron transfer mediator.

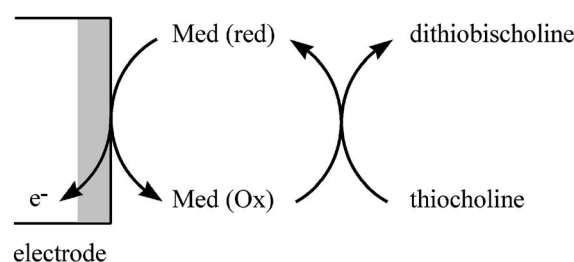


Fig. 5. A Schematic Illustration of Mechanism for an Electron Mediator-based Sensors

センサーでは、チオコリンの検出限界は  $0.3 \mu\text{M}$  と報告されている。<sup>17)</sup> カーボンナノチューブは表面積が広いので電流応答が大きいことやコストも比較的低いことなど利点が多く、バイオセンサー用の電極材料として有望である。<sup>18,19)</sup>

4- アミノフェニル酢酸を AChE の基質として用

いと、生成物の4-アミノフェノールは Med を使用しなくても 0.1 V 程度の低い電位で酸化されるので、共存物による妨害を考慮する必要がないので有用である。<sup>20)</sup> また、4-アミノフェニル酢酸は油溶性が高いので有機溶剤を含む系の有機リン類の検出にも適している。しかし、アセトニトリルやエタノールなどが 20% を超えると AChE の活性が著しく低下するので、使用する有機溶剤の含量には注意を要すると報告されている。<sup>20)</sup>

AChE を電極以外のトランスジューサーと組み合わせて、AChE 阻害物質を検出することも可能である。Equations (1) と (4) から分かるように、AChE の触媒反応では加水分解生成物として酢酸が生成する。したがって、固定化酵素の近傍では局部的に pH が酸性になるので、適切な pH 応答色素を用いると AChE の酵素反応を色の変化として検出することができる。中性付近で色調が変化するブロムクレゾールパープルと AChE を光ファイバーの先端に固定化して作製した携帯型センサーは、効果的に有機リンやカルバメート類を検出できると報告されている。<sup>21)</sup>

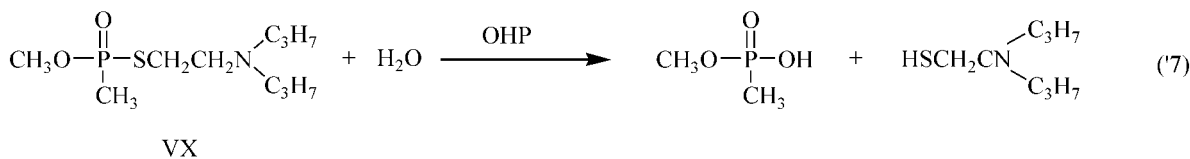
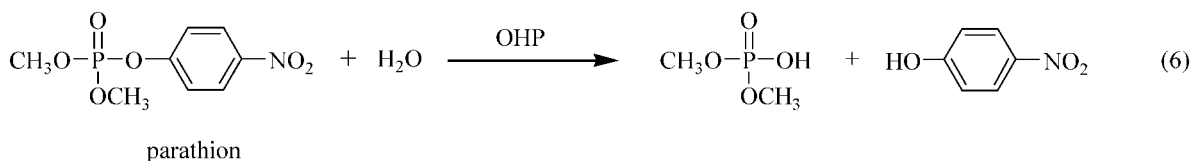
これまで述べた AChE を用いたセンサーは、AChE に不可逆的に結合した阻害物質をプラドキシム (PAM) により除いて再活性化すれば繰り返し使用することが可能である。しかし一般には、炭素プリント電極など安価な電極材料を用いてディスプレイ型センサーとすることが得策であろう。

### 5. 有機リンヒドロラーゼを用いるセンサー

AChE を用いて作製したセンサーの最大の弱点は、酵素阻害の程度を指標として間接的に信号を得

ていることである。このため、測定する試料溶液に AChE の本来の基質であるアセチルコリンやアセチルチオコリンなどを試薬として添加しなければならない煩雑さがある。実際の測定操作では、試薬を加える段階と試料を測定する段階の二段操作になる。さらに、AChE に対する有機リン剤等の阻害は不可逆であることが多く、センサーの再使用には再生の操作が必要とされる。このような弱点を回避するために、有機リン剤を分解する酵素の探索が行われ、土壌細菌から有機リンヒドロラーゼ (organophosphorus hydrolase, OPH) が見出された。OPH は基質特異性が高くないので、パラチオンを始めとする多くの有機リン農薬やサリン、ソマン、VX など化学剤を加水分解することができる。また、OPH は AChE とは異なりカルバメート類は加水分解しないので、有機リン剤だけを検出することができる。

Scheme 3 に、パラチオン及び VX の OPH による加水分解反応を示した。パラチオンでは加水分解により *p*-ニトロフェノールが生成するので、これを電極で酸化して電流信号を得ることができる。また、VX ではチオールが生成するので酸化電流を得ることができる。このように、OPH を電極に固定化すると酵素の直接反応により信号を得ることができるので、AChE を用いるセンサーと比べると操作が一段階なので簡便である。Wang らの研究によれば、OPH を電極に固定化したセンサーで 0.1 μM 程度のパラチオンやメチルパラチオンが検出できる。<sup>22)</sup> また、長さ 16 m のケーブルの先端に電極を装着したりリモート操作型のセンサーを作製すると、VX や RVX が μM レベルまで検出することが可能



Scheme 3. OPH-catalyzed Hydrolysis Reactions of Parathion and VX

であったと報告されている。<sup>23)</sup> OPH を固定化したセンサーでもカーボンナノチューブの利用が有効であることが示された。<sup>24)</sup> さらに、OPH を pH 電極と組み合わせたセンサーや pH 変化に伴う色調の変化を信号とする光学センサーなども作製することができる。<sup>25)</sup>

## 6. 結 論

以上のように、AChE や OPH などの酵素を利用したバイオセンサーが有機リン剤など化学剤の検出に有効に機能することが示されている。現場に携帯できる小型バイオセンサーも容易に作製でき、また、屋外の定点へ恒常的に設置して自動連続測定することもできる。さらに、製造コストも他の計測装置に比較して安価であること、操作が簡便で熟練技術は必要としないことなど、利点が多い。ただし、クロマトグラフィー法や質量分析法などに比べると、超微量の検出や化学成分の厳密な識別などには弱点を有している。また、酵素を使用するので長期安定性に劣ることが多い。このような特性を十分考慮して他の計測装置と併用すれば、バイオセンサーが危険物の検出に効果的に活用されるものと思われる。

なお、AChE や OPH を利用したバイオセンサーの最近の研究動向をまとめた総説が発表されているので参照されたい。<sup>26,27)</sup> また本稿では触れなかったが、爆発物やシアン類などの危険物を検出することを目的としたセンサーの研究も進展している。<sup>28-30)</sup>

## REFERENCES

- 1) Rogers K., Mulchandani A., Zhou W., "Biosensor and Chemical Sensor Technology," American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- 2) Mirsky V. M., "Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors," Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2004.
- 3) Gorton L., "Biosensors and Modern Bio-specific Analytical Techniques," Elsevier B. V., Amsterdam, 2005.
- 4) Guerreri A., Palmisano F., *Anal. Chem.*, **73**, 2875-2882 (2001).
- 5) Navera E. N., Sode K., Tamiya E., Karube I., *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 675-680 (1991).
- 6) Chen Q., Kobayashi Y., Takeshita H., Hoshi T., Anzai J., *Electroanalysis*, **10**, 94-97 (1998).
- 7) Ciucu A. A., Negulescu C., Baldwin R. P., *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 303-310 (2003).
- 8) Kok F. N., Hasirci V., *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 661-665 (2004).
- 9) Snejdarkova M., Svobodova L., Nikolelis D. P., Wang J., Hianik T., *Electroanalysis*, **15**, 1185-1191 (2003).
- 10) Lin Y.-H., Lu F., Wang J., *Electroanalysis*, **16**, 145-149 (2004).
- 11) Andreescu S., Noguer T., Magearu V., Marty J.-L., *Talanta*, **57**, 169-176 (2002).
- 12) Shi H., Zhao Z., Song Z., Huang J., Yang Y., Anzai J., Osa T., Chen Q., *Electroanalysis*, **17**, 1285-1290 (2005).
- 13) Shi M., Xu J., Zhang S., Liu B., Kong J., *Talanta*, **68**, 1089-1095 (2006).
- 14) Bucur B., Fournier D., Danet A., Marty J.-L., *Anal. Chim. Acta*, **562**, 115-121 (2006).
- 15) Carlo M. D., Mascini M., Pepe A., Diletti G., Compagnone D., *Food Chem.*, **84**, 651-656 (2004).
- 16) Liu G., Lin Y., *Anal. Chem.*, **78**, 835-843 (2006).
- 17) Liu G., Lee S., Consuelo M., Lin Y., *Electrochem. Commun.*, **7**, 1163-1169 (2005).
- 18) Gooding J. J., *Electrochim. Acta*, **50**, 3049-3060 (2005).
- 19) Merkoci A., Pumera M., Llopis X., Perez B., del Valle M., Alegret S., *Trend Anal. Chem.*, **24**, 826-838 (2005).
- 20) Andreescu S., Noguer T., Magearu V., Marty J. L., *Talanta*, **57**, 169-176 (2002).
- 21) Andreou V. G., Clonis Y. D., *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 61-69 (2002).
- 22) Mulchandani A., Mulchandani P., Chen W., Wang J., Chen L., *Anal. Chem.*, **71**, 2246-2249 (1999).
- 23) Wang J., Chen L., Mulchandani A., Mulchandani P., Chen W., *Electroanalysis*, **11**, 866-869 (1999).
- 24) Joshi K. A., Prouza M., Kum M., Wang J., Tang J., Haddon R., Chen W., Mulchandani A., *Anal. Chem.*, **78**, 331-336 (2006).
- 25) Arribas A. A., Vazquez T., Wang J., Mulchandani A., Chen W., *Electrochem. Commun.*, **7**, 1371-1374 (2005).
- 26) Andreescu S., Marty J.-L., *Biomol. Eng.*, **23**, 1-15 (2006).

- 
- 27) Mulchandani A., Chen W., Mulchandani P., Wang J., Rogers K. R., *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 225–230 (2001).
- 28) Wang J., *Anal. Chim. Acta*, **507**, 3–10 (2004).
- 29) Fu X., Benson R., Wang J., Fries D., *Sens. Actuat. B*, **106**, 296–301 (2005).
- 30) Shankaran D. R., Matsumoto K., Toko K., Miura N., *Sens. Actuat. B*, **114**, 71–79 (2006).