

電気化学バイオセンサーの機能デザイン

Functional Design of Electrochemical Biosensors

立 間 徹*・渡 辺 正*

Tetsu TATSUMA and Tadashi WATANABE

バイオセンサーは、生体を持つ高度な物質認識機能を応用した化学物質測定手法の一つであるが、分子デバイス、バイオデバイスにつながるワンステップとしても注目されてきている。このような観点からバイオセンサーの高機能化を目指した研究について、現在に至る流れと将来への方向性について解説する。

1. はじめに

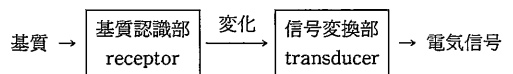
近年ますます重要視されてきているバイオテクノロジーは、生体の持つきわめて高い機能を応用しようという技術である。物質認識に関しても、生体が非常に高い能力を持っていることは言うまでもない。バイオセンサーとはこの優れた物質認識機能を利用または模倣した物質センサーのことであり、その基質選択性、感度、簡便性などから特に注目されている。バイオセンサーにより測定できる物質は、その原理上、生体関連物質がほとんどである。したがって医療、食品分野などへの応用が期待されており、事実、これらの分野ではすでに実用化が始まっている。今日のバイオセンサー研究についても、このような実用化を意識したものがその主流となりつつあるが、しかし、それとは別の流れも存在する。ここでは、バイオセンサーの延長線上に“分子デバイス”や“バイオデバイス”を思い描く研究者たちが中心となって活躍している。分子デバイスの概念は1980年代初頭、F. L. Carterにより初めて積極的に唱えられた¹⁾。現在、一般には“分子単位で機能するデバイス”という意味で受け入れられている。バイオデバイスになるとその概念はさらに抽象的で多様性をもつが、やはりその根底には生物模倣という観点があり、その意味ではバイオセンサーもこれに含まれるだろう。これらのデバイスは電子デバイスの未来形として期待されている。ここでは、このような分子デバイス、バイオデバイスへつながる一段階としてのバイオセンサー研究について、これまでの流れと今後の方向性を概観してみたい。

バイオセンサーは、基質（測定対象物質）を認識し化学変化を起こす基質認識部（レセプター）と、その変化を最終的に電気信号に変換する信号変換部（トランスデューサー）からなる（図1）。基質認識部となるのはお

もに酵素、抗体、細胞、微生物などである。信号変換部としては電極、FET、サーミスター、圧電素子、光検出素子などが用いられ、それぞれ物質変化（電極とFET）、熱変化、重量変化、発光や色の変化を検出する。これらの中でも、基質認識部として酵素、信号変換部として電極を用いた“酵素電極”は現在のバイオセンサーの主流をなす。これは測定対象の幅広さ、取り扱いの容易さ、応用範囲の広さなどの理由によると考えられるが、本解説でも紙面の都合上、酵素電極を中心に話を進める。

2. 酵 素 電 極

酵素を電気化学系と結び付け、グルコースなど生体関連物質の分析を行おうとする考えは、1960年代の初め頃から報告され始めた²⁾。しかしこの時点では、酵素は被検溶液中に溶解して用いられており、測定にかかる手間や経費（酵素は通常の試薬に比べ非常に高価である）の点で、従来からの分光的手法に優るものではなかった。1962年にClarkとLyonsは、酵素を膜によって電極近傍に封じ込め、酵素の再利用を可能にすることにより測定の手間と経費を大幅に削減した“酵素電極”を初めて考案した³⁾。彼らは酵素としてグルコースオキシダーゼ（GOD）を用い、これがグルコースと反応する際のpH変化をガラス電極で捉えることにより、グルコースセンシングを



酵 素	物 質…電極, FET
抗 体	熱 …サーミスター
細 胞	重 量…圧電素子
微 生 物	光, 色…光検出素子
etc.	etc.

図1 バイオセンサーの構成

*東京大学生産技術研究所 第4部

決できる。筆者らは、初めての酵素二分子層化学修飾電極としてGOD/POD二分子層電極を作製し、GOD単分子層電極の10倍という、厚いGOD架橋膜を載せた電極に匹敵する感度を達成した¹⁰⁾。複合酵素系の詳細については次節で述べる。

酵素単分子層修飾法としては化学修飾法のほかに、Langmuir-Blodgett (LB)法を用いた方法が考えられる。LB法は、両親媒性分子を気-水界面上に展開し、可動バリアーを用いて圧縮して密な単分子膜を得、それを基板上に移し取る方法である¹³⁾。これは機能分子の密度制御や配向制御、あるいは異なる機能の結合を比較的容易に行えるので、分子デバイス構築へのアプローチの一つとしても注目されている¹⁴⁾。

LB法を用いて酵素を固定化する手法として、まず、酵素をそのまま水面上に展開し、基板上に移し取る方法があげられる(図4a)。この方法は酵素の配向制御を行いやすいという特長はあるものの、展開時に失活が起こりやすく、また水溶性の酵素は単分子として展開するのが難しいという問題がある。Fromherzは、脂質分子を水面上に展開し、水相に溶解したタンパク分子をその脂質膜上に吸着させることによって、タンパクの単分子層を作製した(図4b)¹⁵⁾。尾上と森泉は、この手法を用いて作製した酵素電極について報告している¹⁶⁾。このFromherzの方法によって得た単分子膜が密なタンパク分子二次元結晶となり得ることは電子顕微鏡等で確認されているが¹⁷⁾、同法では、タンパク分子密度を制御するのは容易ではない。ステアリン酸LB膜をまずイオン選択性FETの上に累積してから酵素を吸着させる安斉らの方法(図4c)¹⁸⁾についても事情は変わらない。岡畑らは、GODと脂質分子の複合体を形成させて水面上に展開し、これを電極上に採取してGOD電極を作製した(図4d)¹⁹⁾。この方法では酵素密度の制御が比較的容易であり、酵素活性も保ちやすい。筆者らのグループでは、両親媒性アミンをマトリックス分子(両親媒性アルコール)と共に水面上に展開して電極上に採取し、LB膜のもつアミノ基に酵素を共有結合により固定化する酵素電極について報告した(図4e)²⁰⁾。この方法では、アミン密度を操作することにより容易に酵素密度を制御することができる。

以上に述べた方法は岡畑らのものにしても筆者らのものにしても、密度制御という点以外、LB法の特長をあまり活かしているとはいえなかった。筆者らは上に述べたアミンマトリックス法を応用し、LB分子としてさらに両親媒性フェロセンを加えることによって、酵素固定化担体としての機能と電極表面の電気化学的活性化の機能との二つを合わせ持つLB膜を作製した²¹⁾。そしてこれを電極表面に採取し、GODを固定化して作製したグルコースセンサーが、フェロセンを含まない場合に比べ2倍の感度をもつことを示した。この感度向上は、フェロセン

が過酸化水素-電極間の電子メデイエーションをすることによる(図5)。このように、LB法を用いることによって、分子次元でバイオセンサーの高機能化を図ることができる。

今後、分子レベルデバイスを目指した酵素電極の開発を進めて行く際、酵素固定化法として注目されるのはやはり、化学修飾法またはLB法による単分子層固定化法であろう。さらにこれからは、酵素の配向制御に期待が集まるだろう。この配向制御を行うことができれば、単分子層相当量の酵素でも、さらに高い感度、効率を引き出すことができるからである。その方法としては、酵素の一部に特異的に結合するスパーサー分子の使用などが考えられるが、それよりもまず、電極上での配向を決定するための測定手段の確立が緊急の課題である。

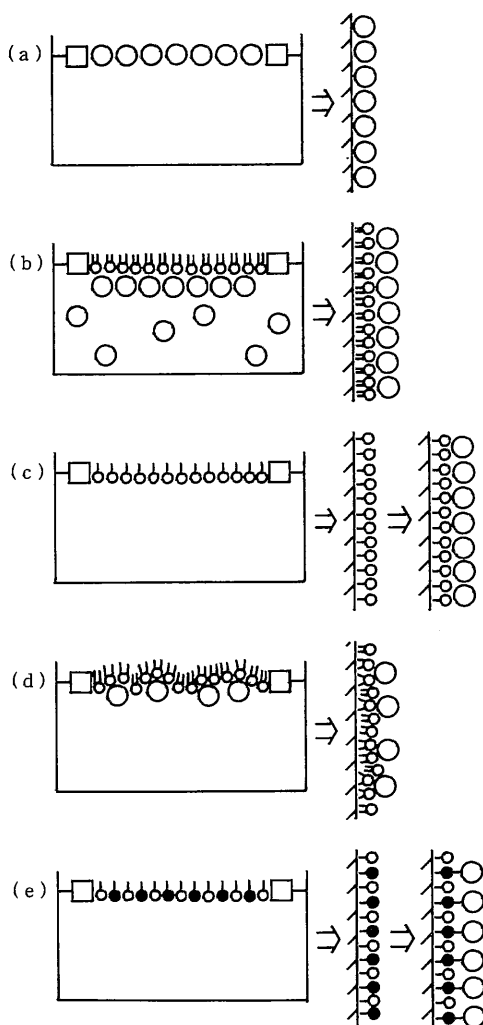
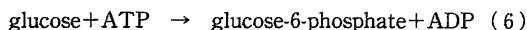


図4 Langmuir-Blodgett法による酵素固定化法

hexokinase



製した²⁹⁾。この方法によって、反応物質も生成物質も電気化学的に不活性なヘキソキナーゼの反応に基づいた電気化学センサーが実現されたわけである。

複合酵素系としてはほかにも、ある酵素反応の妨害となる物質を別の酵素で除去するような系²⁹⁾なども考えられている。

これらの複合酵素電極のほとんどは、酵素混合溶液あるいは混合膜により作製されてきた。すでに述べたように筆者らは、GOD/POD二分子層修飾電極を作製し、酵素単分子層電極の利点を保ったまま、異なる二種の酵素の機能を結び付けた¹⁰⁾。このことは、系をうまくデザインすれば、わずかな量の酵素によっても高い感度を引き出せることを示す。同様の原理、手法に基づいてその他各種のオキシゲナーゼ/POD二分子層電極³⁰⁾、デヒドロゲナーゼ/ジアホラーゼ二分子層電極²⁵⁾を作製することもでき、酵素二分子層系の応用範囲の広さが示された。

複合酵素系に関するアイディアはすでに多く発表されているが、今後は、生体系にない機能を持った人工の分子等と組み合わせることによってどのような協奏効果が得られるか、といった点に興味が集まるであろう。また、分子デバイス化の観点からは特に、幾何学的にどのような形で結び付けるか、どのように配置の制御を行うかという点が注目される。ヘテロ累積による縦方向の制御のほかに、累積化等の観点から、横方向の制御も注目されるであろう。特に、分子次元でこれを行うことは、分子デバイスの実現には欠かすことのできない課題である。

5. 酵素—電極間の電子伝達

ここまで述べた酵素電極はおもに、酵素としては酸化還元酵素を用い、この酵素と電極の間で行われる電子授受の頻度、すなわち電流から基質の濃度をアンペロメトリックに求めるといったものであった。ただし、酵素は一般に分子量数万以上の巨大な分子であり、その反応中心は厚いポリペプチド層の中に埋もれているため、電極と反応中心との間で直接電子授受を行うことはかなり困難である。そのためアンペロメトリック酵素電極では、この電子授受を媒介する電子メディエーターを溶存させている場合が多い(図7a)。例えばGOD電極では、本来の電子アクセプターである $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ がメディエーターとしてよく用いられる。これ以外にはキノン類³¹⁾、フェロセン類³²⁾などがその電気化学活性の高さからよく用いられる。すでに述べたように、より電気化学活性の高いメディエーターの利用は、共存する電気化学活性種からの妨害の減少につながる。

しかし、これらのセンサーは被検溶液にメディエー

ターを添加しなければならず、操作が煩雑になるうえ、生体への植え込み型センサーとして用いることは困難である。また、分子レベルデバイス化を考える上でも、メディエーターの添加は解決したい問題の一つである。そこで、メディエーターの固定化や、あるいは酵素と電極の直接電子移動によって、添加試薬の不要なセンサーを実現しようとする動きがでてくる。以下にはこのような観点に基づく一連の研究を挙げるが、そこで述べる酵素—電極間の電子移動は、特にことわった場合以外、酵素の活性が保たれており、基質の測定が可能であるものに限った。

メディエーターを電極表面に固定化し、これと酵素の間の電子移動を観測した(図7b)、という報告はこれまでもいくつかある^{33,34)}。しかし、Janataも指摘しているように³⁵⁾、電子授受が本当に固定化されているメディエーターによるのか、固定化されずに電極表面に吸着していたメディエーターによるのかは、明らかでないものが多い。ほかに同様なものとして、メディエーターのポリマーを用い、メディエーター間の電子リレーによって酵素—電極間の電子授受をおこなったものもある^{36,37)}。NarasimhanとWingardは電極にメディエーターを固定し、これにさらにGODを結合させた化学修飾電極を作製し、溶存メディエーターを必要としないセンサーの実現を試みているが(図7c)^{38,39)}、現在のところ、GODの触媒能を保ったままの電子授受は観測されていないようである。

また、酵素自身にメディエーターを固定化しようとする考えもある(図7d)。Torstenssonらは、アルコールデヒドロゲナーゼに、補因子であるNADを結合させた⁴⁰⁾。そのNADを介した酵素—電極間の電子伝達は、1サイクルのみ観測できたが、以後繰り返しての電子伝達は起こらなかった。DeganiとHellerはGODをフェロセン誘導体で、1分子あたり数ヶ所修飾し、このフェロセン間の電子リレーによって電極からGODへの電子伝達をおこなった⁴¹⁾。また彼らは、GODがアニオン性のタンパクである点に注目し、これとカチオン性のメディエーターのポリマーとの複合体を形成、あるいはさらにこれらを共有結合させて、同様の原理によって電極との電子授受を観測した⁴²⁾。

FouldsとLoweは導電性高分子のポリピロールによって酵素を包括した酵素電極を作製したが、これは過酸化水素検出型であった⁴³⁾。そこで彼らはピロールをフェロセンで修飾し、それを重合させたポリマーを介してGOD—電極間の電子移動を観測した⁴⁴⁾。矢吹らは、GOD存在下でピロールを重合させ、これを介した電極との電子授受について報告した(図7e)⁴⁵⁾。この電極では、メディエーターの種類によって電子受容(あるいは供与)ポテンシャルが決ってしまうのではなく、電極への印加電位によって決めることができるためそのコントロールが容易であ

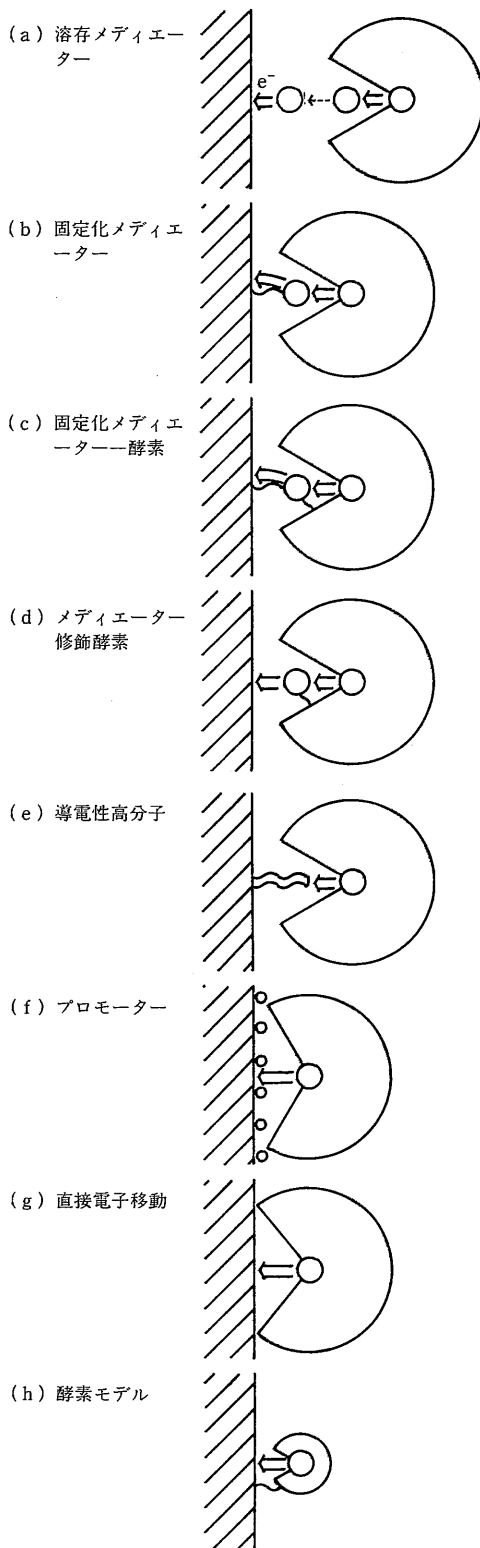


図7 各種の酵素-電極間電子伝達系

り,したがって見かけ上の酵素活性も操作しやすいという長所がある。

酵素-電極間の直接電子移動に関する報告も増えてきている。その初期の頃のものとして, Kulysら⁴⁶⁾やAlberyら⁴⁷⁾による, TCNQ-NMP⁺などの有機電荷移動錯体電極とGODなどの酵素との電子授受がある。しかし,これが本当に直接電子移動によるものなのかということには疑問が投げかけられている^{41,48)}。Kulysらは後に, GODについては, 分子状の電荷移動錯体が拡散し, メディエーターとしての働きをすることによって電子移動がおきていることを正式に認めた⁴⁹⁾。

一般の電極材料を用いて, 酵素の活性を保ったまま直接電子授受を行わせることは, 前述のように困難である。それを解決する方法の一つとして, プロモーターの利用が挙げられる(図7f)。ここでいうプロモーターとは, それ自体は酸化還元活性はない(したがってメディエーターにはなりえない)ものの, 電子伝達の効率を高める機能を持つ分子のことである。ArmstrongとLannonは, gentamycin Cなどの溶存プロモーターを用い, チトクロームcペルオキシダーゼ(CCP)とエッジ面のパイロリティックグラファイト(EOPG)との間の電子移動を確認した⁵⁰⁾。この方法は一般にプロモーター-酵素間の親和性を利用するため, 酵素の配向制御に結び付く可能性もある。しかしプロモーターは溶存状態で用いられている場合が多く, デバイス化のためにも, 酵素と共に固定化されることが望まれる。

プロモーターを利用しない酵素-電極間直接電子移動も可能である。KulysとSamaliusは, 西洋ワサビペルオキシダーゼとグラファイト電極⁵¹⁾, PaddockとBowdenはCCPとEOPGの間の電子授受を観測した(図7g)⁵²⁾。しかし, これらの直接電子移動においては酵素が溶存状態であるので, デバイス化に直接は結び付かない。そのまま固定化したとしても, 固定化用のスペーサーが電子移動の妨害になる可能性が強い。そこで筆者らは, 酵素よりもかなり小さい酵素モデル(人工酵素など)を利用した(図7h)。ペルオキシダーゼをモデルの対象に選び, その反応中心であるヘムの近傍を電極上に再現してペルオキシダーゼモデル電極を作製し, 酵素モデルの電極への固定化スペーサーがあるにもかかわらず, メディエーターやプロモーターを必要としないH₂O₂センサーとなることを示した⁵³⁾。バイオセンサーの長寿命化を目的とした人工酵素電極はHoとRechnitzによって報告されているが⁵⁴⁾, 直接電子移動のために用いたのはこれが初めてであろう。

以上のように, メディエーターなどの添加試薬を必要としないアンペロメトリック酵素電極もすでにいくつかの種類が報告されているが, 酵素を完全に固定化したものについての目立った報告はない。分子レベルデバイス

化を進めるためには、この点をいかに克服するかが鍵となろう。我々の提案した酵素モデル電極は、そのアプローチの一つを示したものと考える。しかしこれについても、酵素モデルの合成の困難なものはどうすればよいのか、活性を高めるにはどうするべきか、といった課題を解決しなければならない。

6. 応答解析, シミュレーションによる機能設計

バイオセンサーの諸性能, すなわち感度, 濃度レンジ, 応答速度等々を向上させるためには各パラメーターの最適化が必要である。この観点からみると, そのセンサーの応答機構を解析し, 各パラメーターに基づいて応答のシミュレーションを行い, 定量的予測を行うことは非常に有効なことである。これを一步進めれば, センサー構築に関するエキスパートシステムの実現にもつながる。

アンペロメトリックバイオセンサーの分野において, 応答解析, シミュレーションについての先駆的研究を行ったのは Mell と Maloy である⁵⁵⁾。彼らは, 高分子包括 GOD 膜電極の定常応答解析を行い, グルコースの拡散律速下では見かけ上の K_M (Michaelis-Menten 定数) 値が高くなることなどを示した。しかし彼らは, GOD のもう一つの基質である溶存酸素の拡散については考慮しなかった。また, いくつかの仮定のもとにはあるが過渡応答解析も行い, 酵素膜が薄いほど応答が速くなることなどを示した。Gough らは GOD 膜電極について, 酸素の拡散についても考慮した定常応答⁵⁶⁾および過渡応答⁵⁷⁾の解析を行った。

応答解析についての研究を全般的にみると, 定常応答解析に比べ, 過渡応答解析の例はやはり少ない。上記のほか例え, Bergel と Comtat⁵⁸⁾は半透膜内に酵素を封入したアンペロメトリック酵素電極, Tran-Minh と Broun⁵⁹⁾や Carr⁶⁰⁾はポテンシオメトリック酵素電極, Caras⁶¹⁾は酵素 FET の過渡応答解析を行った。筆者らも酵素単分子層¹²⁾, 二分子層⁶²⁾修飾電極について, 定常応答および過渡応答の解析を行い, 電極上におけるメディエーターの酸化還元反応が速いほど応答を速めることなどを示した。また, この酸化還元反応が十分速いという理想的状況下では, 酵素と電極の間の電子伝達効率がほぼ 100% になることがわかった。

バイオセンサーの応答解析においては, 酵素などによる基質認識反応の解析はもちろんであるが, 基質の輸送現象の解析も重要である。例えば, 酵素架橋膜電極などでは基質の拡散が律速しやすく, そのため, 酵素量が減少したり活性が落ちても, すぐにセンサー感度の減少としては現れないことが多い⁶³⁾。しかしこの現象が, 酵素は固定化することによって安定化される, と誤って認識されている場合も, いまだに少なくない。このように拡散律速下では固定化酵素のキャラクタリゼーションも難し

くなるが, 酵素単分子層電極では基質の拡散が律速しにくいために, これを比較的容易に行うことができる。また, 前述のアミンマトリックス法などの LB 法を用いれば, 拡散律速にならないように酵素密度をコントロールすることも可能であろう。

センサー研究全般の中にあつて, 応答解析, シミュレーションに関するものは, 傍流に甘んじているというのが現状である。確かに, 複雑に絡み合う現象をときどきすだけでもかなりの困難がつきまとうが, バイオセンサーの機能化をさらに進めて行くためにも, これらの研究を活性化させることが重要であろう。

7. おわりに

以上, 分子デバイス化, バイオデバイス化に関連したバイオセンサー研究のこれまでの展開と, 今後の展望について解説した。

分子デバイスという観点でみた場合, バイオセンサーは他の電子デバイスと同じく, まだ遠くその範囲には入らない。しかし, 分子レベルデバイスという枠を設けて見ると, もうすでにその中で歩を進め始めているといえよう。今後とも, バイオセンサーのさらなる機能化を目指した研究が進められてゆくであろうが, それによってバイオデバイス, 分子デバイスの実現も近づくものと信ずる。

(1990年8月13日受理)

参考文献

- 1) Carter, F. L. (Ed.), "Molecular Electronic Devices", Marcel Dekker, New York (1982).
- 2) Malmstadt, H. V., Pardue, H. L., Anal. Chem., 33, 1040 (1961).
- 3) Clark, L. C., Jr., Lyons, C., Ann. N. Y. Acad. Sci., 102, 29 (1962).
- 4) Updike, S. J., Hicks, G. P., Nature, 214, 986 (1967).
- 5) Blaedel, W. J., Olson, C., Anal. Chem., 36, 343 (1964).
- 6) Weetall, H. H., Anal. Chem., 46, 602A (1974).
- 7) Ikariyama, Y., Yamauchi, S., Yukiashi, T., Ushioda, H., J. Electrochem. Soc., 136, 702 (1989).
- 8) Wang, J., Varughese, K., Anal. Chem., 62, 318 (1990).
- 9) Okawa, Y., Tsuzuki, H., Yoshida, S., Watanabe, T., Anal. Sci., 5, 507 (1989).
- 10) Tatsuma, T., Okawa, Y., Watanabe, T., Anal. Chem., 61, 2352 (1989).
- 11) Moody, G. J., Sanghera, G. S., Thomas, J. D. R., Analyst, 111, 1235 (1986).
- 12) Tatsuma, T., Watanabe, T., unpublished results.
- 13) 小宮山 真, 渡辺 正, 大川祐輔, "新素材100・LB膜", 冬樹社 (1990).
- 14) 伊藤公紀, 本多健一, 膜, 11, 147 (1986).
- 15) Fromherz, P., Biochim. Biophys. Acta, 225, 382 (1971).

- 16) 尾上洋一, 森泉豊栄, 電気学会論文誌, 107-A, 97 (1987).
- 17) Fromherz, P., *Nature*, 231, 267 (1971).
- 18) Anzai, J., Hashimoto, J., Osa, T., Matsuo, T., *Anal. Sci.*, 4, 247 (1988).
- 19) Okahata, Y., Tsuruta, T., Ijiro, K., Ariga, K., *Langmuir*, 4, 1373 (1988).
- 20) Tsuzuki, H., Watanabe, T., Okawa, Y., Yoshida, S., Yano, S., Koumoto, K., Komiyama, M., Nihei, Y., *Chem. Lett.*, 1988, 1265.
- 21) Tatsuma, T., Tsuzuki, H., Okawa, Y., Watanabe, T., unpublished results.
- 22) Nagy, G., von Storp, L. H., Guilbault, G. G., *Anal. Chim. Acta*, 66, 443 (1973).
- 23) Hahn, Y., Olson, C. L., *Anal. Chem.*, 51, 444 (1979).
- 24) Comtat, M., Galy, M., Goulas, P., Soupe, J., *Anal. Chim. Acta*, 208, 295 (1988).
- 25) Tatsuma, T., Watanabe, T., unpublished results.
- 26) Davies, P., Mosbach, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 370, 329 (1974).
- 27) Mizutani, F., Yamanaka, T., Tanabe, Y., Tsuda, K., *Anal. Chim. Acta*, 177, 153 (1985).
- 28) Scheller, F., Pfeiffer, D., *Anal. Chim. Acta*, 117, 383 (1980).
- 29) Nagy, G., Rice, M. E., Adams, R. N., *Life Sci.*, 31, 2611 (1982).
- 30) Tatsuma, T., Watanabe, T., *Anal. Chim. Acta*, in press.
- 31) Williams, D. L., Doig, A. R., Korosi, A., *Anal. Chem.*, 42, 118 (1970).
- 32) Cass, A. E. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., Plotkin, E. V., Scott, L. D. L., Turner, A. P. F., *Anal. Chem.*, 56, 667 (1984).
- 33) Yao, T., Musha, S., *Anal. Chim. Acta*, 110, 203 (1979).
- 34) Preneta, A., Turner, A. P. F., *Soc. Gen. Microbiol. Quart.*, 11, M11 (1984).
- 35) Janata, J., *Anal. Chem.*, 62, 33R (1990).
- 36) Hale, P. D., Inagaki, T., Karan, H. I., Okamoto, Y., Skotheim, T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3482 (1989).
- 37) Gregg, B. A., Heller, A., *Anal. Chem.*, 62, 258 (1990).
- 38) Narasimhan, K., Wingard, L. B., Jr., *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 283 (1985).
- 39) Narasimhan, K., Wingard, L. B., Jr., *Anal. Chem.*, 58, 2984 (1986).
- 40) Torstensson, A., Johansson, G., Mansson, M. -O., Larsson, P. -O., Mosbach, K., *Anal. Lett.*, 13, 837 (1980).
- 41) Degani, Y., Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2615 (1988).
- 42) Degani, Y., Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2357 (1989).
- 43) Foulds, N. C., Lowe, C. R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 82, 1259 (1986).
- 44) Foulds, N. C., Lowe, C. R., *Anal. Chem.*, 60, 2473 (1988).
- 45) Yabuki, S., Shinohara, H., Aizawa, M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 945.
- 46) Cenas, N. K., Kuly, J. J., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8, 103 (1981).
- 47) Albery, W. J., Bartlett, P. N., Craston, D. H., *J. Electroanal. Chem.*, 194, 223 (1985).
- 48) Hill, H. A. O., *Pure Appl. Chem.*, 59, 743 (1987).
- 49) Kuly, J. J., *Biosensors.*, 2, 3 (1986).
- 50) Armstrong, F. A., Lannon, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7211 (1987).
- 51) Kuly, J. J., Samalius, A. S., *Electrokhimiya*, 20, 637 (1984).
- 52) Paddock, R. M., Bowden, E. F., *J. Electroanal. Chem.*, 260, 487 (1989).
- 53) Tatsuma, T., Watanabe, T., unpublished results.
- 54) Ho, M. Y. K., Rechnitz, G. A., *Anal. Chem.*, 59, 536 (1987).
- 55) Mell, D. L., Maloy, J. T., *Anal. Chem.*, 47, 299 (1975).
- 56) Leyboldt, J. K., Gough, D. A., *Anal. Chem.*, 56, 2896 (1984).
- 57) Tse, P. H. S., Gough, D. A., *Anal. Chem.*, 59, 2339 (1987).
- 58) Bergel, A., Comtat, M., *Anal. Chem.*, 56, 2904 (1984).
- 59) Tran-Minh, C., Broun, G., *Anal. Chem.*, 47, 1359 (1975).
- 60) Carr, P. W., *Anal. Chem.*, 49, 799 (1977).
- 61) Caras, S. D., Petelenz, D., Janata, J., *Anal. Chem.*, 57, 1920 (1985).
- 62) Tatsuma, T., Watanabe, T., *Biosensors '90, Singapore*, May (1990).
- 63) Bowers, L. D., *Anal. Chem.*, 58, 513A (1986).