

ISFET 半導体センサーを用いた環境・微生物計測システムの開発

加工技術グループ バイオチーム 泊 直宏, 廣岡 青央, 和田 潤, 高阪 千尋, 山本 佳宏
京都府立大学大学院生命環境科学研究科 渡部 邦彦
京都電子工業株式会社 高木 陽子 日向野桂一
株式会社バイオエックス 谷 敏夫

要 旨

プロトンの増減を計測することにより、酵素活性測定に利用可能である ISFET センサを利用して、有害化合物及び微生物を検出する測定系の構築を試みた。検出に用いる機器として、従来の ISFET 計測装置 (AMIS-101S) より小型化した装置を試作し、測定条件を検討する一方で、測定の安定性向上・自動分析化を目標としたフロー測定系の検討も合わせて行った。

検出対象物の抗体、または二次抗体にアルカリホスファターゼ (ALP)、グルコースオキシダーゼ (GOD)、ウレアーゼ (URH) の3種の酵素を標識し、酵素の測定系を構築することで、ISFET センサを利用した有害化学物質及び微生物の検出を行うことが可能であった。

1 はじめに

現代社会の人類の健康を取り巻く環境において、国内では食品偽装や異物混入事件等が大きくとりあげられ、食の安全や健康に対して注目が高まってきている。さらにはアジア地域等の国外に目を向けると、化学物質、疾患を生ずるような微生物等に汚染されている飲料水などのリスクは深刻で、安全面からの対応が求められている。

これら環境汚染や有害微生物を検出する手段として利用されているものは、クロマトグラフで分離した成分の質量分析装置を用いた一斉分析や、汚染源や有害微生物に対する抗体を作製し、ELISA 法と呼ばれる、特異性の高い抗原抗体反応を利用した酵素反応に基づく、発色・発光をシグナルに用いて検出するイムノアッセイ系が一般的であり、信頼性の高い技術として確立されている。

しかしながら、先進国で使用されるこれらの分析システムは電気、高純度水、空調など高度なインフラを必要とするものが多く、発展途上国では経済的に対応できないほど高価なものも多い。このため、電源すらない現場で、安価に、迅速に、かつ簡便に測定が可能なシステムが要求されている。

一方で ISFET センサはプロトンの増減を計測することにより、酵素活性を測定することが可能であるため¹⁾²⁾、ELISA 法で確立されているように検出対象物の抗体に標識された酵素活性を測定する系を、構築することが可

能であると考えられた。そこで本研究においては、産学公連携によりこの半導体 ISFET をベースに、自動サンプル注入、計測、データ解析機能を実装し、オンサイトで電池駆動で簡便に分析可能な装置を試作することを最終目標とし、その道筋を立てるべくポータブル型の ISFET 計測装置を試作した。さらには自動サンプル分析を行うフロー系の分析システムへ向けての検討し、試作機でのデータ採取を実施した。

2 実験方法

2.1 標識用酵素の検討

ISFET センサで出力を検出するための抗体標識用酵素を検討した。測定用酵素としてアルカリホスファターゼ (ALP)、グルコースオキシダーゼ (GOD)、ウレアーゼ (URH) を選抜し、それぞれの酵素で、ISFET での活性測定系を最適化した。

2.2 抗体標識酵素の作成

抗体標識酵素については市販の ALP 標識抗体を用いるか、2.1 で選抜した酵素を、以下に述べる方法により抗体に結合させる系を構築した³⁾⁴⁾。

2.2.1 還元型抗体の調製

抗体 500 μ g に対して、50mM 2-メルカプトエチルア

ミン (2-MEA) /phosphate buffer pH7.0,5mM EDTA を 90 分作用させ、抗体の重鎖ヒンジ領域の SS 結合を選択的に還元させた。この結果、抗体の重鎖と軽鎖の間の SS 結合が保存されることになる。その後、ゲルろ過による余剰の 2-MEA を除去し、20mM Tris-HCl buffer pH7.0/5mM EDTA で平衡化し、タンパク濃度を測定した (図 1 (A))。

2.2.2 酵素のマレイミド化

アミノ基に反応するスクシイミド (NHS) 基と SH 基に反応するマレイミド (Mal) 基を有する架橋試薬である GMBS を 10mg/ml に調製し、20mM リン酸バッファー、pH7.0 に溶解させた酵素 1mg に対して、10 μ l を加え 40 分室温でインキュベートし、マレイミド化タンパク質を調製した。その後ゲルろ過により過剰の GMBS の除去し、タンパク質濃度を測定した (図 1 (B))。

2.2.3 酵素標識抗体の調製

重鎖ヒンジ領域還元化抗体とマレイミド化酵素を混合し、4°C で O/N インキュベートした。精製に用いるバッファーで希釈後、エチルマレイミドで残りの還元型抗体のスルホ基をマスクした (図 1 (C))。

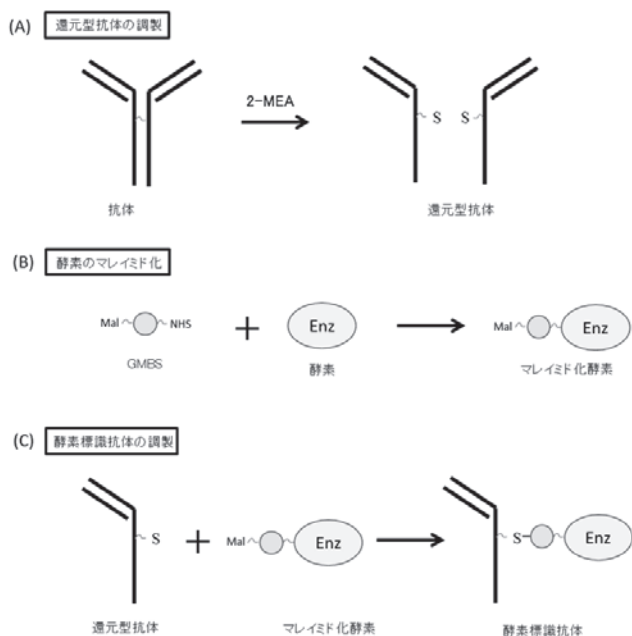


図 1 抗体 - 酵素コンジュゲート調製法

2.2.4 カラムでの精製

GE ヘルスケア社製の AKTA explorer 10S を使用して Mono Q カラムで抗体 - 酵素複合体が含まれるフラクションを回収し、酵素標識抗体サンプルとした。

2.3 小型 ISFET 測定装置の開発と測定の検討

試作型ポータブル型 ISFET 装置は、電池駆動で測定時に付属 PC を必要とせず、iPhone や iPod などの iOS を搭載した機器で利用可能である (図 2)。また、wifi 環境下、または 3G 回線下で接続しデータ採取を行い、測定データはメールにて外部 PC 等に送信することができる。本研究においては、2.1 にて検討した結果、URH 尿素反応系をモデルとし、試作機にて測定を行った。



図 2 試作型ポータブル型 ISFET 装置

2.4 ISFET センサによる有害化学物質の検出

有害化学物質の検出として内分泌かく乱物質のひとつであるポリ塩化ビフェニル (PCB) を対象とし、京都電子工業(株)が作成した PCB 抗体を用いた間接競合法による検出系を構築した。

方法は、まず PCB の疑似抗原を固定したビーズが入った溶液に、ALP を標識した PCB 抗体と PCB を添加し、疑似 PCB と PCB 間で抗体への結合を競合させる。ビーズを洗浄後、ビーズに結合した酵素標識抗体の酵素反応センサ出力を測定し PCB 結合量を検出するものである。添加する PCB の濃度を増加させるより、ビーズ上の疑似抗原に結合する標識抗体の量が減少するため、ビーズ上の酵素反応を見るセンサ出力も減少する (図 3)。

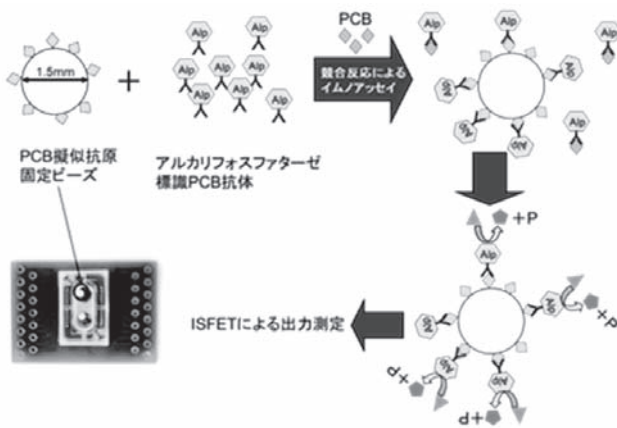


図3 間接競合法を用いた PCB 検出法

2.5 ISFET センサによる微生物の検出

微生物の検出モデルとして大腸菌 IFO3972 株を対象とし、京都電子工業(株)が作成した大腸菌抗体を用いた検出系を構築した。

まず大腸菌を含む培養液に一次抗体を加え、37℃で20分インキュベート後遠心・洗浄し、ALP 標識の二次抗体を作用させた。37℃で15分インキュベート後、遠心して菌体を沈殿させ上清の未反応の二次抗体の ALP 活性のセンサ出力を測定することにより、大腸菌の検出を行った (図4)。ISFET センサ測定条件は 1mM Tris-HCl pH8.0 50mM NaCl ,1mM ATP,0.002% Tween で実施した。

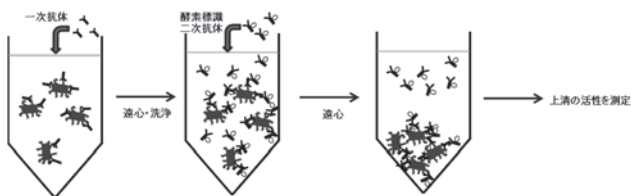


図4 大腸菌検出法

2.6 フロー系試作

ISFET 測定系の自動フロー化には、サンプルの吸出・攪拌・送液・検出をコンピューター制御下で行う必要があるが、その検討を行ううえでシステムインストルメント(株)製フローインジェクタ (KMT-100V) を利用してフロー測定系の試作を検討した。

まず、装置上の結合として KMT-100V の基盤を一部変更し、装置庫内に ISFET センサを組み込んだ。(図5)

また装置プログラムを変更することにより、装置庫内にセットしたセンサ信号を AMIS - 101S のソフトウェアで検出することを試みた。



図5 試作型フロー系計測システム

3 結果と考察

3.1 適正酵素の選択

3種の酵素について ISFET センサにより活性測定を行った結果を図6 (A) (B) (C) に示す。いずれの酵素についても、直線性の良い希釈段階に応じた出力を得ることができた。測定に対する酵素の適正については、出力感度と測定 pH 条件の微生物汚染を考慮すると、高アルカリ性で活性が一番高い ALP が最も良好であったが、アルカリ性側での測定は炭酸ガス等の外部環境の影響を大きく受け、測定系が不安定になるため、現時点での開放系の測定系においては最適ではない。これを最適化するうえでも、密封系での自動サンプル注入を備えたフロー系の開発を行っていく必要がある。

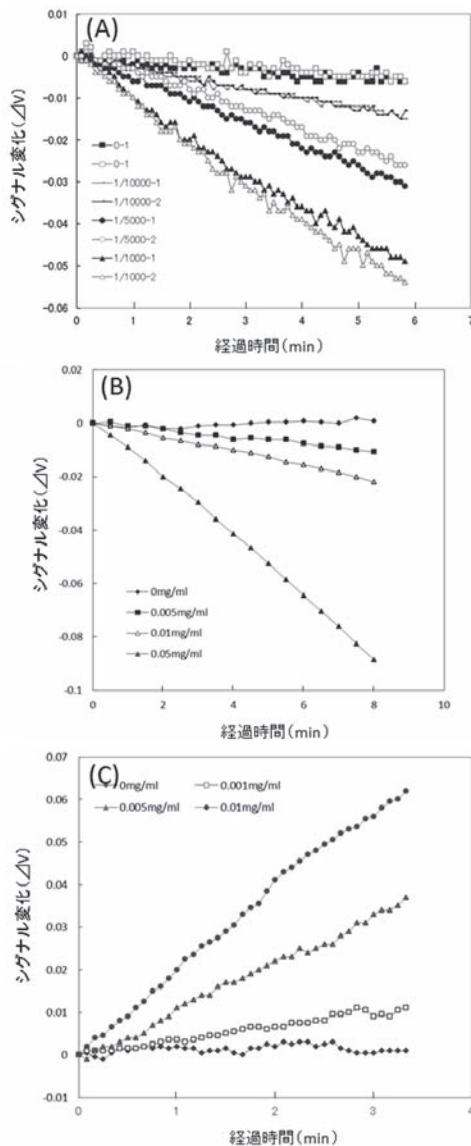


図6 選抜酵素の活性測定 アルカリホスファターゼ (A), グルコースオキシダーゼ (B), ウレアーゼ (C)

3.2 抗体標識酵素の作成

選抜した酵素 (ALP, GOD, URH) において 2.2 の方法に従い, 酵素標識抗体を作製した。抗体に標識した 3 種の酵素を比較した結果, センサ容量 $20\ \mu\text{l}$ あたりの感度は URH が $9.5\ \text{f mol}$ ともっとも感度良く, また反応速度も $0.035\ \text{V}/\text{min}$ (ALP: $0.0105\ \text{V}/\text{min}$, GOD: $0.0054\ \text{V}/\text{min}$) と 3 種の酵素の中でもっとも早かった。また, 重鎖ヒンジ部分に結合させる標識抗体が酸・アルカリ側で不安定であることを考えると, 標識操作及び ISFET 酵素反応測定は中性付近で行うことが好ましく (反応 pH ALP:9.5, URH:7.0, GOD:7.0), これらの結果より URH 標

識抗体が最適であると判断した。また, 再現性を示す Cv 値は出力安定後の測定後半において 10% 以下の結果を得ることができた (図 7)。

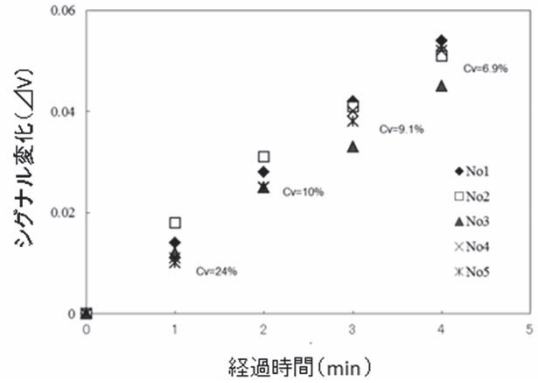


図7 抗体標識酵素 (ウレアーゼ) 活性測定時の ISFET センサシグナル

3.3 小型 ISFET 測定装置での測定

URH-尿素酵素反応系をモデルとして測定を実施した。現段階においては温度制御機構が不十分であったが, センサ出力を検出することができた (図 8)。また, バッテリーについても不安定な部分が多く測定が, 途中で終了してしまうエラーが頻発したため, 今後は温調とバッテリーの安定性を向上させることが, 安定した結果を求めるうえで必須となってくる。

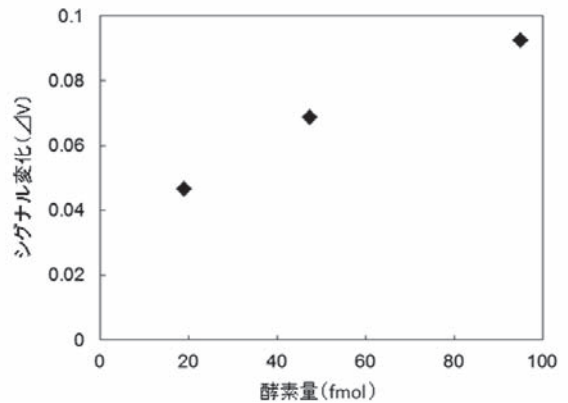


図8 試作型ポータブル型 ISFET 装置を用いてのウレアーゼ活性測定時の ISFET センサシグナル

3.4 有害物質への利用

2.4 の方法に従い出力の測定を行った。添加する PCB の濃度を $0\sim 500\ \text{ng}/\text{ml}$ の範囲で振り, 出力の測定を行っ

た結果、0.5ng/ml以上の濃度のPCBを検出することが可能であり、有害物質検出のモデルを構築することができた(図9)。

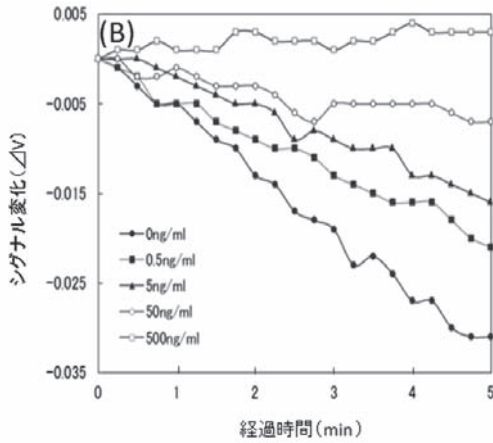


図9 間接競合法を用いたPCB検出のISFETセンサシグナル

3.5 微生物への利用

2.5の方法に従い、センサAに大腸菌と二次抗体、センサBに大腸菌と一次抗体を作用させたものに二次抗体を加え、遠心による菌体を沈殿させたのち、上清の出力を測定した。その結果 10^8 cell濃度以上の菌体の検出を行うことが可能であった。今回使用した本抗体の検出性能は 10^6 cell以上であるため、抗体・測定系の改良をさらに進め検出感度を向上させる必要がある(図10)。

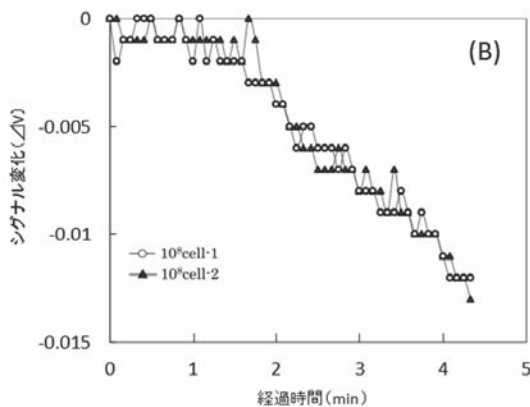


図10 大腸菌検出のISFETセンサシグナル

3.6 フロー系試作

フローインジェクター(KMT-100V)庫内に設置した

センサにおいて、酵素活性のシグナルを検出することができ、インジェクターとAMIS-101Sの接続が成功した(図11)。しかし、現段階においては温度制御等がなされない環境下であるため、酵素活性のシグナルは検出できたが、再現性を示すバラツキの値Cv値は依然として35%程度と大きく、温度制御も含め安定性の向上が今後の課題となる。また、インジェクターのフロープログラムを改良することにより、フローセンサを設置して、サンプルの吸い出しから攪拌、送液、出力の検出までの一連の測定系を検討していく。

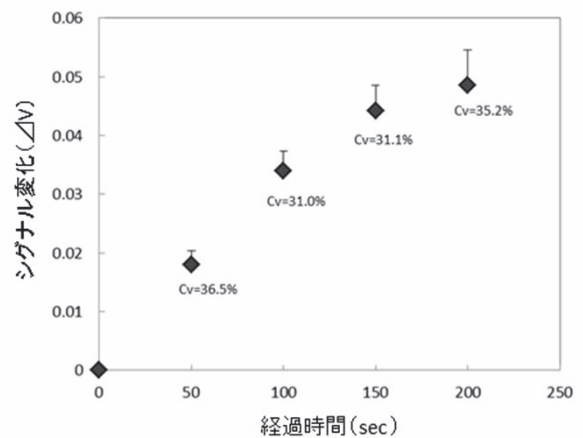


図11 フローインジェクター(KMT-100V)庫内に設置したセンサを使用したウレアーゼ活性測定時のISFETセンサシグナル

4 まとめ

本研究において、微生物及び有害化学物質の検出法として抗原-抗体反応と、ISFETセンサを組み合わせたモデル検出系を、抗体へ標識する酵素の選抜及び、測定系の最適化を行うことにより構築することができた。

今後は、本研究で構築した検出測定系を試作した小型装置へ組み込むことにより、有害物質をオンサイトで測定する系へ発展させるとともに、現在は測定環境に影響を受けることが多いバッチ測定システムを、酵素の注入から攪拌、シグナルの検出までを自動で行う卓上フローシステムへと、応用発展させていく検討を実施していく予定である。

謝辞

本研究は、平成22-23年度「SBIR技術革新事業デジタルLSI免疫センサによる極微量有害物質測定装置の研

究開発」及び平成 25 年度パイロット研究「ISFET 半導体センサを用いた環境・微生物計測システムの開発」において取り組んだ内容の一部である。本紙面をお借りして、ご支援、ご助言及び語指導をいただいた方々に心から謝意を表します。

参考文献

- 1) 廣岡青央, 山本佳宏, 谷敏夫, 友杉充宏, 市原謙一: 京都市産業技術研究所工業技術センター研究報告 No37, p47 (2008)
- 2) 西矢芳昭, 谷敏夫, 廣岡青央, 泊直宏, 高阪千尋, 山本佳宏: 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによるクレアチニンの新規測定法, 生物試料分析第 32 卷・第 3 号 (2009), 別冊
- 3) 泉美治ほか: “生物化学実験のてびき 1 生物試料調製法”, 化学同人 (1985)
- 4) 高津聖志ほか: “改訂版抗体実験マニュアル 実験医学別冊”, 羊土社 (2008)