

ISFET フロー計測システムの試作と開発

バイオ系チーム 泊 直宏, 山本 佳宏

要 旨

イオン感応性電界効果トランジスタ (ISFET) センサは、酵素活性により生じる微小なプロトン変化を測定することで、酵素反応をノンラベル・リアルタイムで計測できる測定ツールであり、我々はこれまでさまざまな酵素を用いた計測アプリケーションを検討、開発してきた。しかし、現行の測定方法はシグナルの安定化、出力測定、測定後の洗浄を1サンプルずつ手作業で行うバッチ測定であるため、本センサを食品分析の品質管理でのルーチン分析に利用するには分析効率の向上が必要不可欠となっていた。そこで我々は連続分析に対応するため、自動サンプル注入、計測、データ解析機能の実装を想定したフロー系ISFET計測システムの試作・検討をこれまで実施し、酵素反応による微小なプロトン変化をフロー系にて検出してきた。

本研究では測定系を改良するためのさらなる検討を実施し、流路内で酵素-基質反応を行い、かつ連続分析を想定した多サンプル測定系モデルの構築を試みた。結果、オートサンプラーを導入し反応系を検討することで酵素反応液によるプロトン変化を連続的に測定することが可能となった。また、攪拌機構の導入による流路中出の酵素反応のモデルを構築することができた。

1. はじめに

近年、「食の安全・安心」に対する消費者及び事業者の意識は高く、食品偽装や異物混入事件、さらには有害微生物・ウイルスによる食中毒等がひとたび起こると情報媒体で大きく取りあげられ、その結果、当該事業者は事業体の存続が揺らぐほどの社会的・行政的な制裁を受けることはもちろんのこと、風評等で関連・類似製品を扱う企業にもその被害が波及する。そのため食品業界などでは、自社製品の安全性を担保する品質管理が非常に重要であり、自主的な検査を実施するなどの対策を行っている。

これら食品の品質管理を行っていくうえで、脅威の原因となる有害微生物及び有害汚染物質を検出する手段としては、寒天培地を用いた一般細菌試験のほか、農薬分析に代表されるような質量分析装置を利用した一斉分析、また微生物を含む有害物質に対する抗体を作製し、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ELISA法に代表され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^{1) 2) 3)}。しかしながら、これらの分析法では分析結果が出るのに最短でも半日程度を要するうえに質量分析装置においては機器導入・メンテナンス費用とも非常に高価であることが課題となっており、これらの分析を安価で簡便に計測する手法に対するニーズは高い。

一方、本研究で扱う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り、ELISA法と同様に検出したい対象物の抗体に標識された酵素活性を測定するという検出系を構築することが可能である。さらに、酵素反応は20分前後で終了し、測定系を最適化することによりその分析時間を飛躍的に短縮することが可能となるため^{4) 5)} 時間が勝負の食品の品質管理にとって最適な分析手法となる可能性がある。

しかし、現段階では1分析あたりの測定時間は短時間であるものの、1測定あたり1サンプルずつしか処理できないためサンプル処理能力は高いものではない。また解放系でのバッチ測定であるため外部環境の影響を受けやすいという課題もある。

そこで、本研究においては、バッチ式測定に利用しているISFETセンサを品質管理などのルーチン分析へ活用することを目的に、自動サンプル注入、計測、データ解析機能を実装した密封系の短時間フロー分析システムの構築を検討した。

2. 実験方法

2.1 モデル酵素反応サンプルの作成

サンプルの作成に用いた酵素は、ISFETを利用した酵素反応の出力検出で実績のあるUrease (TOYOBO URH201) でUreaの分解反応系を利用し、作成した⁶⁾。

2.2 目視による酵素反応確認法

酵素反応を目視で確認できる、ELISA等の抗原抗体反応の検出にもよく用いられる Horseradish Peroxidase (TOYOBOPEO-301) -2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) + 過酸化水素の反応系を利用した。

3. 結果と考察

3.1 切り替えバルブによるサンプル注入の検討

これまで酵素反応液をシリンジポンプに充填し直接センシング部に送りこんできたが⁷⁾, 本研究では図1の様なサンプル注入機構を組み込んだ出力検出の条件検討を行った。その結果, 1.0U/μl Ureaseと22.5mg/ml Ureaの反応済みのサンプルを手動切り替え6方バルブ (FLOM VH-V200) に手動でサンプルループにインジェクトし, バルブを切り替えることにより緩衝液が流れている流路内に送り込むことでUrease反応によるプロトンの変化をセンシング部で検出することができた。送液には1mM MOPS buffer, pH6.5, 50mM NaClを用いた。

出力の検出が可能となった一方で, 本システムでこれまでも課題となっていた電気ノイズが切り替え時に電気信号としてセンシング部で検出された。しかし, このノイズはバルブに直接手で触れている間のみの検出であったため, サンプルがセンシング部を通過する際の出力変化に影響はなかった (図2)。

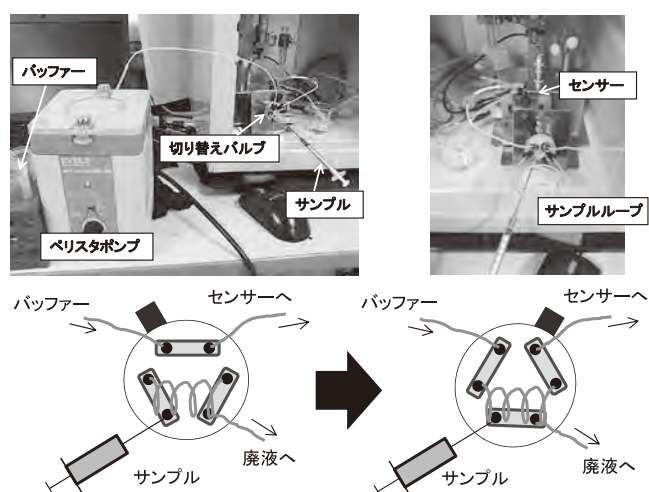


図1 手動切り替えバルブを導入したISFETフロー計測システム

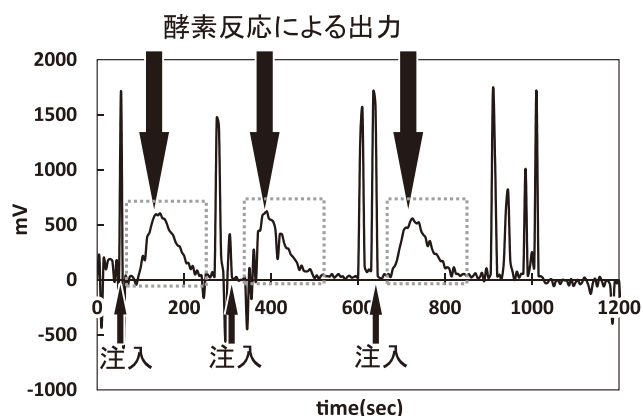


図2 手動切り替えバルブを導入した測定系において計測された酵素反応出力
注入サンプル (1.0U/μl Urease, Urea 22.5mg/ml, 1mM MOPS pH6.5, 50mM NaCl)

3.2 オートサンプラーを利用した連続測定の検討

フローでの連続分析を行うため, 図3の様にシリンジポンプとセンシング部の間にオートサンプラー (SHOWA DENKO KMT-100V) を組み込み, サンプルボックスに2.1と同様のサンプルをセットし, オートサンプラーのプログラムによりサンプルを順次流路内に送り込み連続測定を実施した。オートサンプラーのサンプルボックスには最大で56サンプルをセットすることができる。今回の検討においては最大で3サンプルをボックスにセットし, オートサンプラーのプログラムを利用して順次サンプルの送液を行い, センシング部での酵素反応出力の検出を試みた。測定条件を検討した結果, サンプルのインジェクションボリュームを10μl, 流速を100μl/min, サンプル測定間のインジェクションのタイムラグを5分に設定することで, サンプラー内に設置されているバルブの切り替え時にノイズが検出されるという問題はあるものの, サンプルの酵素反応によるプロトン変化の出力を連続的に検出することができた (図4)。

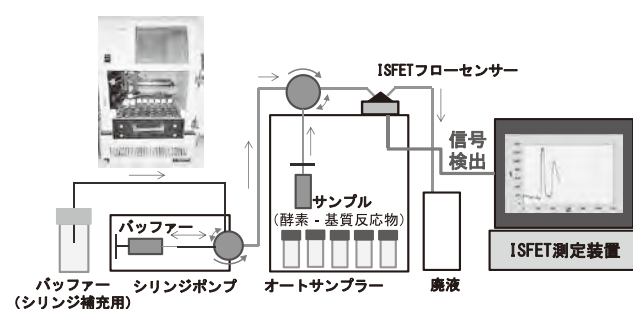


図3 オートサンプラーを使用したISFETフロー計測システム

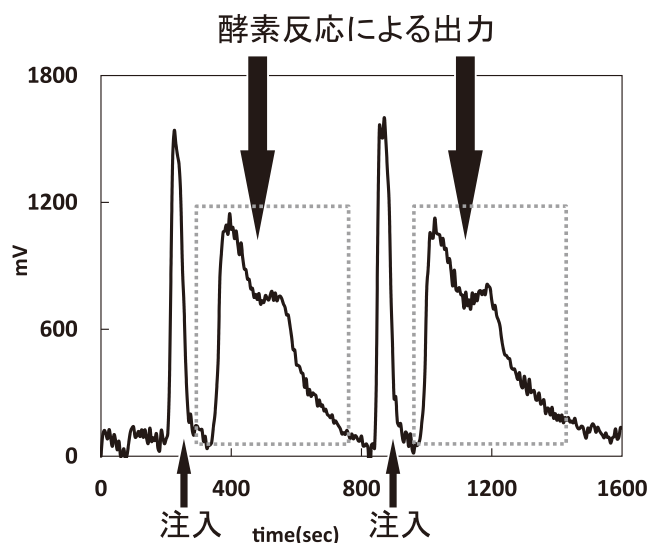


図4 オートサンプラーを利用した測定系で計測された酵素反応出力
注入サンプル (1.0U/μl Urease, Urea 4.5mg/ml, 10μl inject, 100μl/min, 1mM MOPS pH6.5, 50mM NaCl)

3.3 攪拌による酵素 - 基質反応の出力検出の検討

オートサンプラーからの酵素溶液とシリンジポンプ (YMC YSP-202) からの基質溶液を流路中でミキサーによりミキシングし、センサ部へ送り込む機構を検討した (図5)。

ミキシングによる溶液の攪拌により流路中で酵素反応が進んでいるかどうかについては、酵素に Peroxidase、基質に ABTS+ 過酸化水素を用いて目視により確認を行った。その結果、酵素反応により流路中の溶液が緑色を呈し、確認を行うことはできたが、本酵素反応で生じるアンモニウムイオンによるプロトンの変動をセンシング部において検出することはできなかった。今後はセンシング部において出力の検出が可能な測定条件を検討・最適化していく必要がある。

また、ミキシング機構の導入により再びノイズの問題が生じデータ採取が困難になるほど測定に影響が出

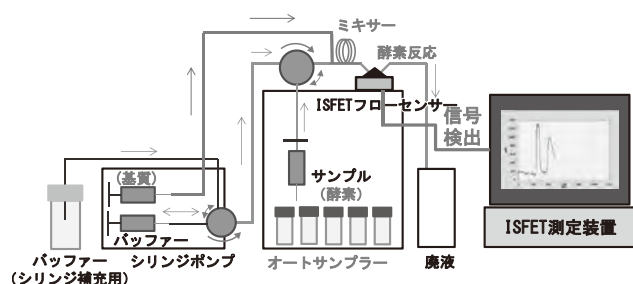


図5 ミキシングを導入したISFETフロー計測システム

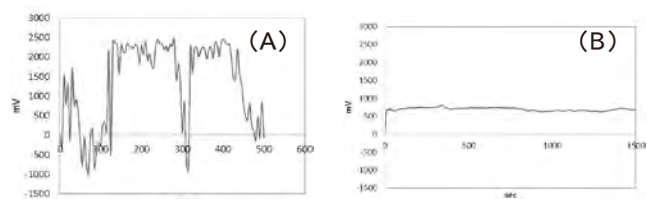


図6 オートサンプラーの切り替えバルブとミキシング機構の導入による測定中のノイズの発生 (A) とノイズ遮断機構導入後の出力 (B)

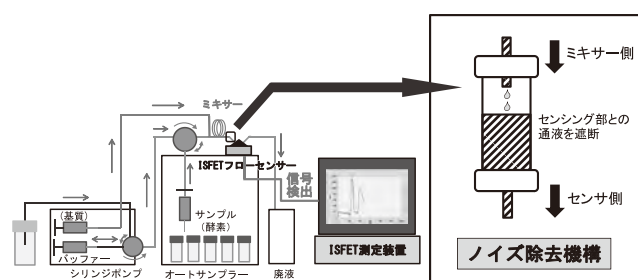


図7 ミキサーとセンシング部に導入したノイズ除去の検討

ため (図6 A), センシング部とサンプラーとの間の溶液を部分的に遮断する機構を試作し (図7), ノイズの除去を試みた。その結果、ノイズが解消された (図6 B)。

4. まとめ

今回検討したISFETのフロー連続測定系の構築においては、バルブの導入によりサンプルを流路内に導入することができた。さらにオートサンプラーを導入することにより、ISFETセンサを用いたフロー連続測定の計測モデルを構築するとともに攪拌機構を検討することで流路内での酵素反応を検出するモデルが形成され、ISFET測定で課題となっていたサンプルの自動連続測定への道筋を得ることができた。

また同時に本システムの試作開始から課題となっている電気信号ノイズについては、本測定系を組むうえであらゆる場面で発生する、避けては通れない問題であることが判明し、今回実施したノイズ除去により、実際の測定系を組むうえでのトラブルシューティングデータを蓄積することができた。

本研究で得られたこれらの知見、課題をもとに新規高機能高分析効率フロー系ISFET測定のさらなる改良を行い、食品分析の品質管理に利用可能な分析システムの開発に繋げるために、今後は、流路中の攪拌に

よる酵素反応で生じるプロトン変化のシグナル検出を目指した反応系の最適化を検討する。

今回使用した Peroxidase は抗原抗体反応の検出に用いられる代表的な酵素反応系であり、また酵素反応を目視で確認できるというメリットがあるため、測定系を構築するうえでは適しているが、一方で生物の細胞にも内在する酵素であり、実際のサンプルを扱う場合には偽反応を検出してしまう可能性もあるため、内在性の酵素反応の影響を受けにくい塩基性領域で活性を有する酵素を利用した測定についても検討を実施していく予定である。

参考文献

- 1) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解”，p1491，金原出版 (1995)．
- 2) Fumiko Okazaki et al：Food Hygiene and Safety Science, 55, [2], 65 (2014)．
- 3) Fillion, J. et al：Journal of AOAC INTERNATIONAL., 83, 698 (2000)．
- 4) 廣岡青央他：京都市産業技術研究所工業技術センター研究報告 No.37, p47 (2008)．
- 5) 泊直宏他：京都市産業技術研究所研究報告 No.4, p39 (2013)．
- 6) Naohiro Tomari et al：Journal of Bioscience and Bioengineering, 119, 247 (2013)．
- 7) 泊直宏他：京都市産業技術研究所研究報告 No.5, p93 (2015)．