

〈短報〉

信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタおよび コレステロールエステラーゼを利用した コレステロールエステル簡易測定法

西矢 芳昭^{1),2)}、廣岡 青央³⁾、谷 敏夫⁴⁾、泊 直宏³⁾、高阪 千尋³⁾、山本 佳宏³⁾

A simple cholesterol ester assay method using a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor and cholesterol esterase

Yoshiaki Nishiya^{1),2)}, Kiyoo Hirooka³⁾, Toshio Tani⁴⁾, Naohiro Tomari³⁾,
Chihiro Kohsaka³⁾ and Yoshihiro Yamamoto³⁾

Summary A simple analytical method for the measurement of cholesterol ester has been developed using a signal accumulation type of ion-sensitive field effect transistor (ISFET). Only one enzyme, cholesterol esterase, is used in this method, whereas a conventional enzymatic assay needs at least three species of enzymes and a chromogen. Cholesterol ester in a sample solution was hydrolyzed by cholesterol esterase, and the increased enhanced H⁺ quantity was detected by the signal accumulation type ISFET as altered potentials. The method produced a linearity of ~250 mg/dl when the potential signals were accumulated ten-fold.

Key words: Ion-sensitive field effect transistor, Signal accumulation type, Biosensor,
Cholesterol ester, Cholesterol esterase

I. 緒言

生体内のコレステロールには、遊離型コレステロール (free cholesterol, FC) とコレステロールエステル (cholesterol ester, CE) がある。FC

は、主に細胞膜の構成成分や胆汁酸の原料として重要な役割をもっている。一方、CEは貯蔵型で内皮下マクロファージや平滑筋細胞によって蓄積され、泡沫細胞を形成すると考えられている。そのため、動脈硬化症等の基礎研究におい

¹⁾摂南大学理工学部生命科学科
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8

²⁾東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所
〒914-0047 福井県敦賀市東洋町10-24

³⁾京都市産業技術研究所
〒600-8815 京都府京都市下京区中堂寺栗田町91

⁴⁾株式会社バイオエックス
〒601-8205 京都府京都市南区久世殿城町102

受領日 平成23年2月21日

受理日 平成23年3月8日

¹⁾Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University,
17-8 Ikedanaka-machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

²⁾Tsuruga Institute of Biotechnology, Toyobo Co., Ltd., 10-24 Toyo-cho, Tsuruga, Fukui 914-0047, Japan

³⁾Kyoto Municipal Industrial Research Institute, 91 Chudouji Awata-cho, Shimogyo-ku, Kyoto 600-8813, Japan

⁴⁾Bio-X Inc., 102 Kuze Tonoshiro-cho, Minami-ku, Kyoto 601-8205, Japan

Correspondence to: Yoshiaki Nishiya
Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University,
17-8 Ikedanaka-machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

て、動物組織中あるいは培養細胞中のCE量を測定することは重要な意味を持つ。

現在、CE量の測定は酵素法にて行われており、一般に総コレステロール (total cholesterol, TC) 量とFC量とをそれぞれ測定し、TC量からFC量を引き算することによって間接的に求められている。体液中のTC量の定量法としては、コレステロールエステラーゼ[EC.3.1.1.13] (cholesterol esterase, ChE)、コレステロールオキシダーゼ[EC1.1.3.6] (cholesterol oxidase, ChO)、ペルオキシダーゼ[EC1.11.1.7]の3酵素連続反応系を用いた方法が日常的に実施されている³⁾。本法は干渉物質の影響を受け難い、分析機器中で安定であるなどの利点がある。しかし、使用する酵素数が多く、幾つもの酵素を同じ試薬で反応させるには、それぞれの酵素の最適条件での使用をあきらめねばならない。さらに、幾つもの酵素を使用した方法では、試薬のコストダウンにも限界がある。

また、一回の測定でCE量を直接測定可能な簡便で精度の高い方法として、FC及びCEを含有する試料に、第一試薬でChO及びカタラーゼ[EC1.11.1.6]を作用させFCを酸化した後に、第二試薬でChE及びChOを作用させ、生じた過酸化水素量を測定するCE量の測定方法が開発された³⁾。しかしながら、この方法でも複数の酵素種

を使用する。したがって、より少ない酵素種、できれば1酵素で簡便にCEを測定できる方法が望まれている。

一方、医療分野や分析化学、食品工学などの分野において、酵素センサを用いた電気化学的計測が盛んに実施されている³⁾。電気化学センサとして電流検出型の酵素センサが一般的であるが、われわれはイオン感応性電界効果トランジスタ (ion-sensitive field effect transistor, ISFET) を用いた電位検出を検討している。ISFETセンサは、ゲート上のイオン感応膜に溶液が接すると、溶液中のイオン活量に応じて界面電位が発生するしくみを利用している⁴⁾ (図1A)。用途のひとつとして、ISFETはセンシング部にて水素イオンに感応し、pHセンサになる。ゲート膜と試料間の界面電位の変化は、pH依存性の出力電圧として計測される。ISFETを利用したバイオセンサは集積回路の製造工程により製造されるので、小型化及び規格化、大量生産が可能であるという利点があり、その潜在力が期待されている。しかし、感度が低くイオン濃度を高精度に検出できないという問題があり、ISFETバイオセンサは電流検出型のバイオセンサに比して普及していない。

われわれは、ISFETの欠点を克服するため、信号累積型ISFETを用いたバイオセンサを開発

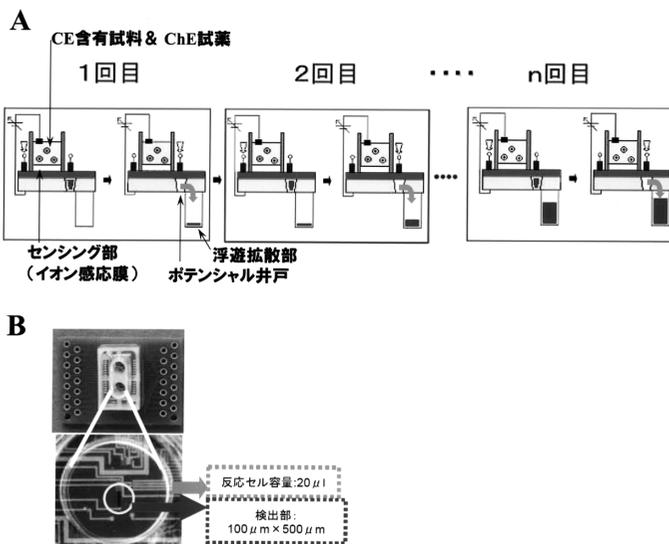


図1 測定原理およびセンサ。A：本法の測定原理，B：信号累積型ISFETセンサ

した (図 1 B)。信号累積型ISFETセンサは、ISFETのセンシング部の表面電位の変化に基づくポテンシャル井戸の深さの変化を浮遊拡散部に電荷として転送することを繰り返し、浮遊拡散部に電荷が累積されるべく構成したことにより、センシング部の表面電位の変化が微量であっても確実に検出し、高感度にイオン濃度の変化を検出することができる⁹⁾ (図 1 A)。

今回、信号累積型ISFET及びChEを用いた酵素センサによるCEの新規測定法を考案し、1酵素にて簡便にCEを測定可能な系の基礎的検討を行ったので報告する。

II. 材料及び方法

1. 測定原理および装置

信号累積型ISFETセンサを使用した測定法の原理は、以前に報告した⁹⁾。センサのセンシング部に、バッファー、CE含有試料及びChE試薬を添加混合する。その結果、酵素反応により微小なpH変化が生じ、センシング部に作用する水素イオン濃度に応じて電位リセット後の浮遊拡散部が蓄積する電荷量を電位変化として検出する (図 1)。

信号累積型ISFETセンサを利用した測定装置は、AMIS-101 ((株)バイオエックス、京都)を用いた。ISFETは、以前の報告と同じものを用いた⁹⁾。信号累積型ISFETセンサの累積回数は、現状で最適と思われる10回に設定した (これ以上

上の回数はノイズの影響が無視できないため)。

2. 試薬及び試料

バッファーは、1.0 mMリン酸緩衝液 (pH7.0)を用い、ChE試薬として1.0 mg/ml (133 U/ml)のChE (COE-311: 東洋紡績(株)、大阪)、1.0 mMリン酸緩衝液 (pH7.0) から成る酵素試薬を調製し、使用した。CE試料溶液として、50-300 mg/dlコレステロールリノレート (ナカライテスク(株)、京都) を含む1.0 mMリン酸緩衝液 (pH7.0) を使用した。

3. 測定条件

以下の測定条件にて、試料中のCE量を測定した。

センサのセンシング部Aにバッファーを16.2 μ l、CE濃度50-300 mg/dlの測定試料を1.8 μ l添加、混合した。センシング部B (対照用)には、バッファーのみ18 μ l添加した。30°Cで5分間の予備加温を実施し温度を安定化した後、50秒間シグナルを計測し、センサの状態を確認した。そして、両センシング部にChE試薬を2 μ l添加、混合した。シグナルが安定した後 (約6分後) に、30°Cにてシグナル (対照シグナルに対するシグナル変化分) を5秒毎に6分間計測した。

III. 結果及び考察

まず、本測定法にてCE濃度0、100、200 mg/dl

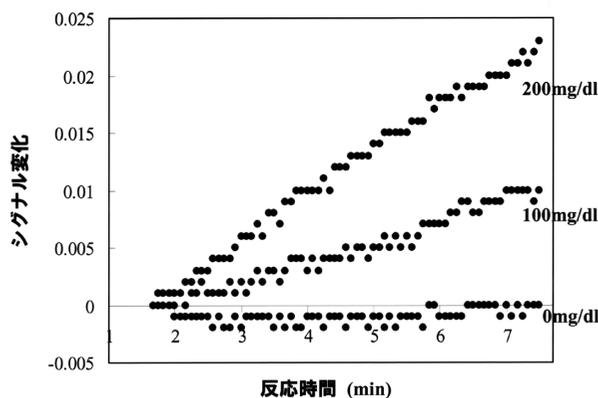


図2 本法でのシグナル変化のタイムコース
酵素反応により水素イオン濃度は増加し、シグナルは減少する。
本図では、シグナル変化の絶対値をプロットしている。

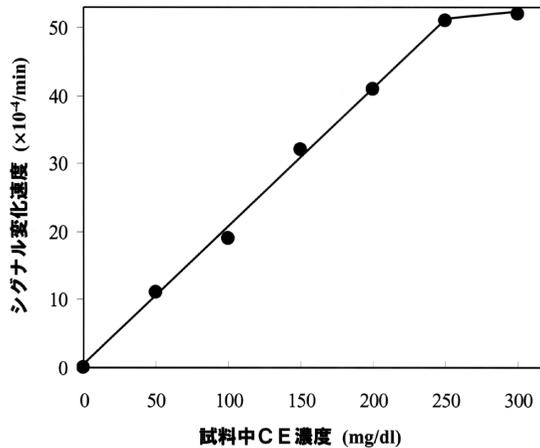


図3 CE濃度と計測値の直線性 (0-250 mg/dlの近似式 $y=0.205x+0.0952$, 寄与率 $R^2=0.998$)

の各測定試料について計測を実施し、各々のシグナル変化のタイムコースを測定した。結果を図2に示す。試薬中のChEが試料中のCEと反応することにより水素イオン濃度が増加し、CE濃度に応じたシグナル変化が見られた。

次に、CE濃度50-300 mg/dlの各測定試料について計測を実施した。各々のシグナル変化を測定後、変化速度（1分間当たりのシグナルの変化量）を算出した。CE濃度と計測値の直線性をみたところ、250 mg/dlまで非常に良好な相関が見られた（図3）。

本試薬における測定値の信頼性を確認したところ、CE濃度100 mg/dl試料の計測におけるCV値（ $n=8$ ）は、4.0%とバイオセンサとしてほぼ満足できる値を示した。

IV. 結語

本測定法は、現行の方法、システムと対比して、極めて単純な試薬組成にてCEを定量できる。現行の酵素法では、主反応だけでも3種の酵素が必要で、色原体も必須となる。本法では、ChE単独での測定が可能である。条件を至適化することにより、信頼性も必要十分なレベルに持っていけるものと考えている。

ただし、現時点は測定法としての基礎的評価を終えた段階であり、実試料測定のための感度を議論できるレベルに至っていない。また、本法はレートアッセイであり、データ処理プログ

ラムの開発も今後の課題となる。

謝辞

本研究は、近畿経済産業局から委託された地域新生コンソーシアム研究開発事業の一部として実施したものであり、御指導頂いたプロジェクトリーダー：京都大学大学院農学研究科・植田充美教授に心より御礼申し上げます。また、様々なアドバイスを頂きました本事業実施者の皆様、及び、管理法人である（財）京都高度技術研究所の皆様へ深謝致します。

文献

- 1) 西矢芳昭: 微生物利用の大展開, 監修: 今中忠行, NTS, 1046-1051, 2002.
- 2) 溝口俊美, 枝野敏行, 古志朋之: コレステロールエステル量の測定方法, 特開2005-80559号
- 3) Ikeda Y and Tsuruoka A: Self-monitoring of blood glucose, as a means of self-management. *Diabetes Res, Clin Pract*, 24: S269-S271, 1994.
- 4) van der Schoot BH and Bergveld P: ISFET based enzyme sensors. *Biosensors*, 3: 161-186, 1988.
- 5) 内山正克, 澤田和明: FET型センサと、そのセンサを用いたイオン濃度検出方法及び塩基配列検出方法, 特許第4195859号
- 6) 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应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*, 32: 240-243, 2009.