

〈原著〉

## 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる 生理活性反応測定装置の開発

谷 敏夫<sup>1)</sup>、西矢 芳昭<sup>2)</sup>

### Development of a bioactivity analyzer using a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor

Toshio Tani<sup>1)</sup> and Yoshiaki Nishiya<sup>2)</sup>

**Summary** A simple, compact-sized, and real-time bioactivity analyzer has been developed using the biosensor equipped with a signal accumulation type of ion-sensitive field effect transistor (SA-ISFET sensor). The H<sup>+</sup> quantities increased or decreased by enzyme reactions with small amount of samples were directly detected by the SA-ISFET sensor as altered potentials, whereas conventional enzymatic assays required labeling process or coloring process. The biosensor was further improved with built-in reference electrodes and capacities optimized reaction chambers. In future, this analyzer can be applied to various measurement systems based on enzyme reactions.

**Key words:** ISFET, Signal accumulation, Biosensor, Electrode, Bioactivity

#### I. 緒言

バイオセンサと言えば糖尿病患者が用いる血糖自己測定センサがその代表であり<sup>1)</sup>、他にコレステロール、乳酸、尿酸用のものなどがある。これらは電流検出タイプで、酵素反応を利用しているが、基質の酸化より得た電子をメディエーター物質を介して電極にて検出するため、適用できる酵素反応が限られている。一方、イオ

ン感応型電界効果トランジスタ (ISFET) は化学反応で生じるプロトンの増減を直接電気信号として取り出すことができるため、幅広い種類の酵素反応の計測に応用できるバイオセンサとなり得る<sup>2)</sup>。では、なぜこのISFETがこれまで普及してこなかったのであろうか。

ISFETは1970年にオランダのBergveldが不完全ながらその概念を導き出し<sup>3)</sup>、その後東北大学の松尾らによって現在のISFETの原型が提案され

<sup>1)</sup>株式会社バイオエックス  
〒610-0121 京都府城陽市寺田今堀121-17

<sup>2)</sup>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

受領日 平成27年3月13日

受理日 平成27年4月9日

<sup>1)</sup>Bio-X Inc.,  
121-17 Imahori-Terada, Joyo, Kyoto 610-0121, Japan

<sup>2)</sup>Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University,  
17-8 Ikedanaka-machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, 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  
E-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

た<sup>9)</sup>。以来、ISFETの応用については長期にわたり数多くの研究がなされ、バイオセンサとしても一時脚光を浴びたが、結局pHセンサとして部分的に実用化されている以外には際立った応用例は見当たらない。その理由は、バイオセンサとして応用するにはISFETの感度が十分でなく、信号レベルが低くてノイズに埋もれてしまうため、微小な変化に対応できないとされてきたからである。

この点を改良するために、われわれは信号累積型ISFETプロトンセンサ (SA-ISFETセンサ)を開発した<sup>9)</sup>。これは、ISFETをCMOSベースにし、電荷がセンサ内に蓄積できるように改良されており、測定を瞬時に複数回繰り返してデバイス内に信号を累積させ、増幅した後に信号を取り出すという画期的なものである。これにより信号/ノイズレベル比 (S/N比) が飛躍的に向上し、微小変化の検出を要求される高感度バイオセンサとしての応用が可能になった<sup>9)</sup>。

本報告ではSA-ISFETセンサを用いた、主とし

て酵素活性反応を簡便に効率良く測定できる「生理活性反応測定装置」の開発および改良について記載する。本システムはメディエーター等の仲介物質、あるいは光学検出法に要求される発色反応や蛍光標識を用いないので、測定対象が広範囲であり、前処理が簡単なものとなり簡便に測定することができる。また、光路長を必要とする光学測定系を使用しないので装置の小型化に向いており、かつ液体クロマトグラフィー、質量分析等の大型機器に比べコストが低く、測定に高い技術力を必要としないといった数多くの特長を有している。既にわれわれはSA-ISFETの技術に基づく基礎検討装置を開発し、クレアチニン<sup>6)</sup>、コレステロールエステル<sup>7)</sup>、ATPアーゼ<sup>8)</sup>、ガラクトース<sup>9)</sup>、ポリフェノール<sup>9)</sup>、尿素<sup>10)</sup>などの定量的測定を実証した。尿素測定においては、食品サンプルの分析と従来法との相関を確認した<sup>10)</sup>。今回、より実用的なコンパクトサイズ測定装置の開発およびセンサの改良を実施したので報告する。

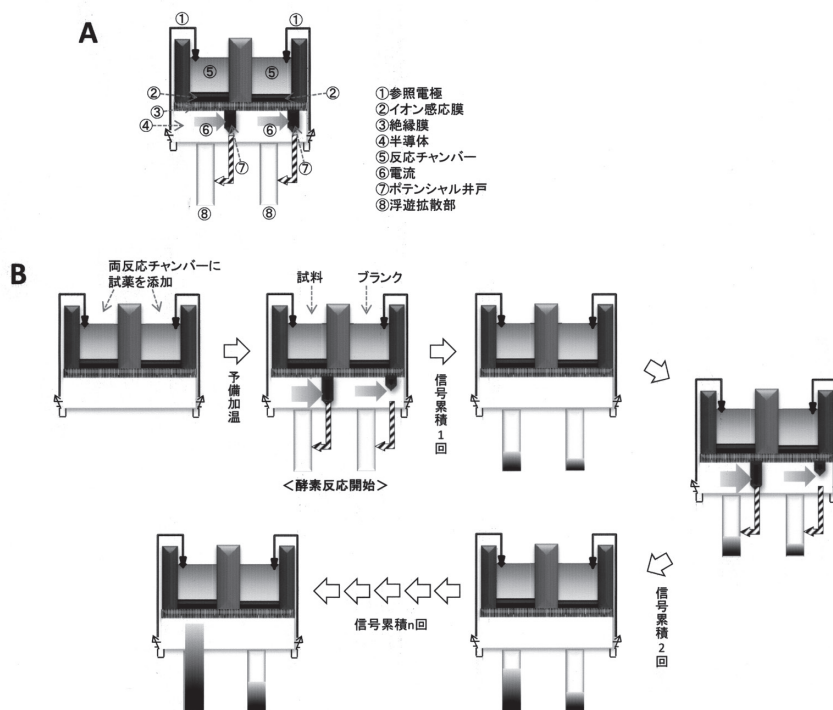


図1 SA-ISFETセンサによる信号累積測定の原理  
A: SA-ISFETセンサの構造, B: SA-ISFETセンサによる累積測定の仕組み

## II. 材料及び方法

### 1. 測定原理とセンサ

SA-ISFETセンサを使用した測定法の原理を図1に示す。本センサは、半導体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(図1A)。SA-ISFETセンサは、ISFETのセンシング部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、センシング部表面電位の変化が微量であってもセンサ内で増幅されるため確実に検出し、高感度にイオン濃度の変化を検出することができる(図1B)。

### 2. 電極

基礎検討装置(図2)では、参照電極に一般的なガラス電極を使用した(図3A)。コンパクトサイズ測定装置(図2)には銀塩化銀固体電極を新たに作成、参照電極として採用した(図3B)。さらに、参照電極内蔵型センサを新たに開発した(図3C)。

### 3. 測定方法

生理活性反応測定装置による分析は、以下のように実施した。

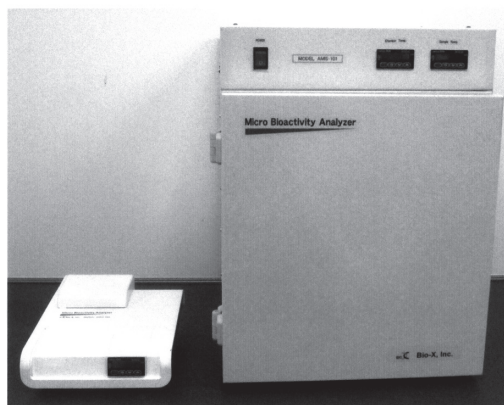


図2 SA-ISFETセンサを使用した生理活性反応測定装置  
左：コンパクトサイズ測定装置(外寸：縦22.5 cm×横19.5 cm×高さ9.0 cm)、右：基礎検討装置(外寸：縦39.0 cm×横36.5 cm×高さ47.5 cm)

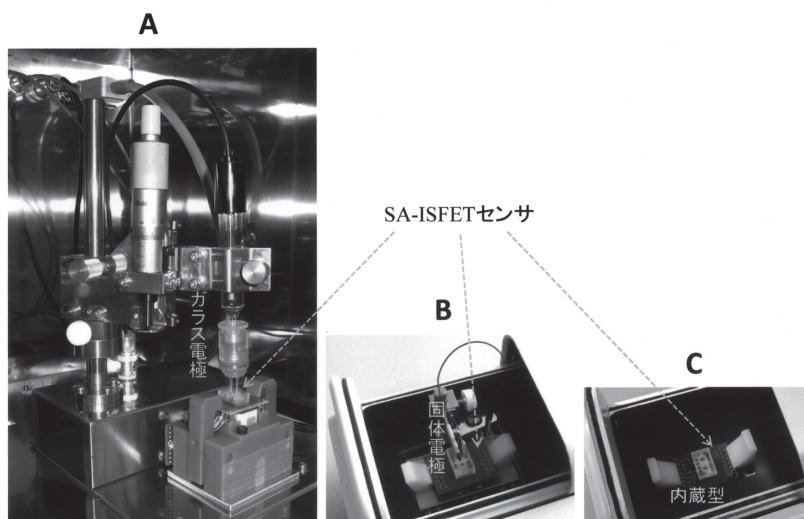


図3 電極の改良  
A：従来型参照電極、B：固体参照電極、C：内蔵型センサ参照電極

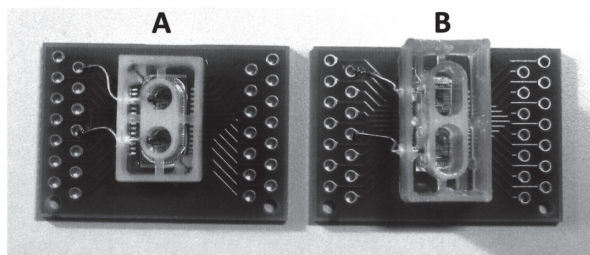


図4 反応チャンパー容量の変更  
 A：従来型（反応チャンパー内寸：開口面積7 mm<sup>2</sup>×深さ3 mm）、  
 B：容量拡大型（反応チャンパー内寸：開口面積14.5 mm<sup>2</sup>×深さ7.5 mm）

SA-ISFETセンサの反応チャンパーに、試薬および試料を添加混合する。その結果、試薬または試料に含まれる酵素と基質との反応により微小なプロトン濃度（水素イオン濃度、pH）の変化が生じ、センシング部に作用するプロト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)。

SA-ISFETセンサの信号累積回数は、現状で最適と思われる10回に設定した（これ以上の回数はノイズの影響が無視できない）。

#### 4. 試薬

基質（没食子酸）、酵素（ポリフェノールオキシダーゼ）、バッファー（リン酸）、塩化ナトリウムなど試薬類は、ナカライテスク株式会社（京都）より購入した。

### Ⅲ. 結果及び考察

#### 1. コンパクトサイズ測定装置の開発

実用的なコンパクトサイズの測定装置（図2）を開発するにあたり、最大の課題は参照電極のサイズであった。銀塩化銀参照電極は、周囲に塩素イオンが無い条件では原理的に機能しない。このことを考慮し、基礎検討装置には汎用のガラス電極を導入し、塩化カリウム水溶液に電極を浸して使用した（図3A）。しかしながら、ガラス電極を使用した状態ではコンパクトな設計が困難で、小型化装置を開発することができない。われわれは、種々の測定方法検討の過程で、安定な測定のためには塩化ナトリウムや塩化カリウムを50~100 mM含有する試薬が効果的であることを確認した<sup>10)</sup>。したがって、試薬中に塩

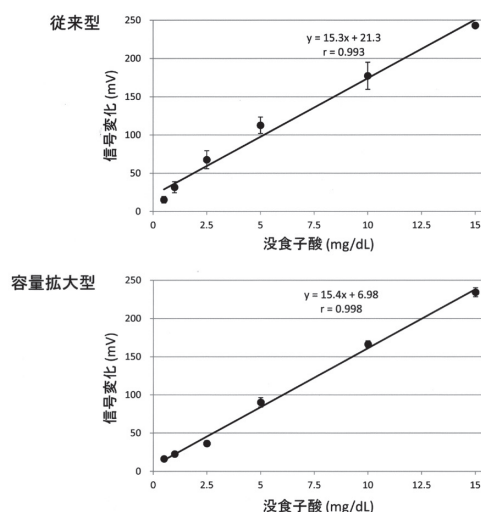


図5 反応チャンパー容量と希釈直線性  
 以下の測定条件にて、試料中の没食子酸量を測定した。反応チャンパーAに試薬（0.56 U/mLポリフェノールオキシダーゼ、50 mM NaCl含有1 mMリン酸バッファー溶液）を反応チャンパーB（対照用）にはバッファーのみを各15/75 μL（従来チャンパー/容量拡大チャンパー）添加し、25℃で5分間の予備加温を実施し温度を安定化した後、反応チャンパーABに濃度0-15 mg/dLの測定試料を各5/25 μL添加、混合し、対照信号に対する信号変化を5秒毎に5分間計測して変化量を計測した。各プロットはn=3の平均値であり、標準誤差をバーで示した。また、相関係数rもグラフ内に示した。

素イオンが存在することを前提とした装置設計が可能であると判断し、参照電極として銀塩化

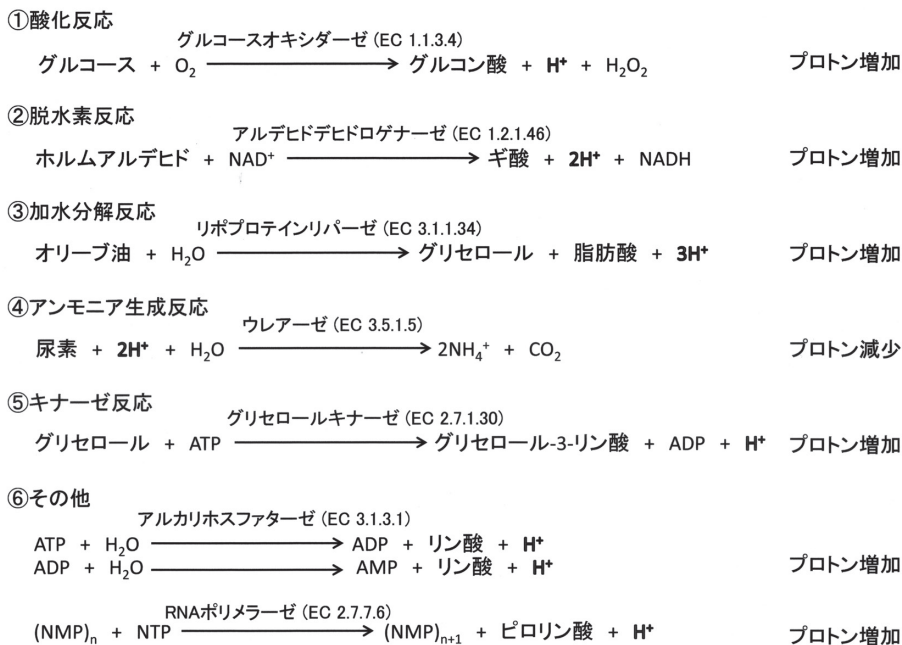


図6 本測定装置にて分析可能な生理活性反応

銀固体電極を作成し、導入した。結果として、図3Bに示すように固体参照電極の採用により装置の大幅な小型化を実現した。さらに、電子回路を見直し、表面実装部品を使用することによって制御基板を小型化することや、温度制御部、測定端子部を見直すこと等により、コンパクトサイズ測定装置の開発に成功した(図2)。そして、本生理活性反応測定装置が尿素-ウレアーゼ、ポリフェノールなど従来の基礎検討装置における測定項目に対し、同様の測定条件・方法にて分析が可能であることを確認した(データ示さず)。

## 2. SA-ISFETセンサの改良

これまでSA-ISFETセンサでは、外部の参照電極を試薬中に設置する必要があった。これは簡単な操作ではあるが、バイオセンサとしての簡便性を高めるため、操作の更なる簡略化を検討した。結果として、銀塩化銀固体電極を小型化してセンサの反応チャンバー内に設置し、導線をセンサ基板に接続してセンサと一体化することにより参照電極内蔵型のSA-ISFETセンサを開

発し、課題を解決した(図3C)。

参照電極内蔵型とすることで、それまでセンサと電極を別々に洗浄していたものが同時に洗浄することができるようになった。またセンサの上部空間が大きく広がり、試料添加が容易になった(図3BC)。さらに、反応チャンバー上部に蓋を設けることができるため、細胞や微生物などの生理活性を対象とした反応時間が比較的長い測定にも対応できると考えている。

## 3. 反応チャンバー容量の変更

従来型のSA-ISFETセンサの反応チャンバーは、容量の上限が約20μLとなっている。これは、主として微量試料での測定を対象としているためである。しかしながらマニュアルハンドリングでは、小容量のため必要とするレベルの精度を得ることができない場合が想定された。そこで反応チャンバー形状変更をすることにより、5倍容量の反応チャンバーを有するSA-ISFETセンサを新たに作成し(図4)、測定の希釈直線性について従来型と比較検討した。

反応チャンバーの容量と分析精度との関係を、



図5に示す。ポリフェノールオキシダーゼを用いた没食子酸の定量を行い、両SA-ISFETセンサの希釈直線性を検討したところ、容量を増すことによる分析精度の向上を確認した。この容量拡大は主に食品関連分野など、試料が比較的多く確保できる測定には極めて有効であると考えている。

最後に事例として、本測定装置により分析可能な生理活性反応を図6に示す。酸化反応や脱水素反応はもとより、加水分解反応、アンモニア生成反応、キナーゼ反応、ホスファターゼ反応、ポリマーゼ反応などさまざまな酵素反応を測定することが可能である。

#### IV. 結語

本測定装置は、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種々の酵素反応を検出できる。現行の酵素法に比べ、使用酵素の種類も単純化することが可能である。例えば、尿素測定ではウレアーゼの反応を直接検出することができ、各種キナーゼ反応、リパーゼなどの加水分解反応等も直接検出が可能である。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。また、装置のさらなる改良として、多検体多項目測定への対応なども視野に入れて検討を進める予定である。

#### 謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費課題番号13251655の助成を受けたものである。

#### 文献

- 1) Ikeda Y and Tsuruoka A: Self-monitoring of blood glucose, as a means of self-management. *Diabetes Res Clin Pract*, 24: S269-S271, 1994.
- 2) van der Schoot BH and Bergveld P: ISFET based enzyme sensors. *Biosensors*, 3: 161-186, 1988.
- 3) Bergveld P: Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans Biomed Eng*, BME-17, 70, 1970.
- 4) Matsuo T, Esashi M and Iimura K: Digest of Joint Meeting of Tohoku Sections of IEEJ, October, 1971.
- 5) 特許第4195859号
- 6) 西矢芳昭, 谷 敏夫, 廣岡青央, 泊 直宏, 高坂千尋, 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*, 32: 240-243, 2009.
- 7) 西矢芳昭, 廣岡青央, 谷 敏夫, 泊 直宏, 高坂千尋, 山本佳宏: 信号累積型イオン感受性電界効果トランジスタによるコレステロールエステルの新規測定法, *生物試料分析*, 34: 247-250, 2011.
- 8) 西矢芳昭, 谷 敏夫: 信号累積型のイオン感応性電界効果トランジスタによる腎臓疾患マーカーおよびトランスポーターの測定法, *BioClinica*, 26: 62-67, 2011.
- 9) Sasaki Y, Ogawa J and Tani T: Simple and convenient measurement of enzyme reaction by high sensitive signal accumulation ISFET biosensor (AMIS Sensor) and Micro Bioactivity Analyzer. *Biocatal Agric Biotechnol*, 1: 259-261, 2012.
- 10) Tomari N, Kawasaki A, Yamamoto Y and Nishiya Y: A simple and reliable urea assay method based on a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor. *J Biosci Bioeng*, 119: 247-250, 2015.