

<短報>

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

西矢 芳昭¹⁾、谷 敏夫²⁾、廣岡 青央³⁾、泊 直宏³⁾、高阪 千尋³⁾、山本 佳宏³⁾

A novel creatinine assay method using a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor

Yoshiaki Nishiyama¹⁾, Toshio Tani²⁾, Kiyoo Hirooka³⁾, Naohiro Tomari³⁾,
Chihiro Kohsaka³⁾ and Yoshihiro Yamamoto³⁾

Summary A novel analytical method for the measurement of creatinine has been developed using a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor (ISFET). The method is remarkably simple. Only one enzyme, creatinine deiminase, is used, where as a conventional enzymatic assay needs at least four species of enzymes and a chromogen. Creatinine in a sample solution was converted to NH_4^+ by creatinine deiminase, and the increased enhanced NH_4^+ quantity was detected by the signal accumulation type ISFET as altered potentials. The method produced a linearity of 1.0-10 mg/dl when the potential signals were accumulated ten-fold.

Key words: Ion-sensitive field effect transistor (ISFET), Signal accumulation type ISFET, Biosensor, Creatinine, Creatinine deiminase

I. 緒言

血中および尿中のクレアチニンの定量は、腎臓疾患、特に腎機能障害の診断において利用されている。また、透析移行の指標としても利用されている。クレアチニンの定量法としては、酵素法が近年広く用いられるようになった。具体的には、クレアチナーゼ[EC3.5.2.10]、クレ

アチナーゼ[EC3.5.3.3]、サルコシンオキシダーゼ[EC1.5.3.1]の作用により導き出される過酸化水素をペルオキシダーゼ[EC1.11.1.7]と色原体により発色検出し、クレアチニンを定量する¹⁻³⁾。酵素法は特異性に優れ、干渉物質の影響も受け難いため、現在では臨床検査の場での主流として日常的に実施されている。

しかしながら、この方法は使用する酵素数が

¹⁾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

²⁾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

³⁾京都市産業技術研究所工業技術センター
〒600-8813 京都府京都市下京区中堂寺南町134
受領日 平成21年2月10日
受理日 平成21年3月3日

¹⁾Tsuruga Institute of Biotechnology, Toyobo Co., Ltd.,
10-24 Toyo-cho, Tsuruga, Fukui 914-0047, Japan

²⁾Bio-X Inc., 102 Kuze Tonoshiro-cho, Minami-ku, Kyoto
601-8205, Japan

³⁾Industrial Technology Center, Kyoto Municipal
Industrial Research Institute, 134 Chudouji Minami-
machi, Shimogyo-ku, Kyoto 600-8813, Japan

多く、いずれかの酵素が試料中の物質によって影響を受けると反応系全体が左右されて正確な測定に支障をきたす可能性がある⁴⁾。したがって、使用酵素の適正を高めるための種々の改良に多くのエネルギーが費やされた。また、酵素の最適な使用条件は個々の酵素によって異なるため、幾つもの酵素を同じ反応液中で反応させるには、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。

より少ない酵素種でクレアチニンを測定する試みとして、別の酵素群を用いた方法も開発されている。これは、クレアチニンデイミナーゼ[EC3.5.4.21]をクレアチニンに作用させ、生じたNH₄⁺をグルタミン酸脱水素酵素[EC1.4.1.2]に作

用させることにより、NH₄⁺量に対応したNADの還元型から酸化型への酵素的変換を紫外部吸光の減少により測定する方法である⁵⁾。しかし、この方法は減少系のため本質的に低感度であり、実用の場で普及していない。

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⁶⁾。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 (ISFET) を用いた電位検出を検討している。ISFETセンサは、ISFET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⁷⁾。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。

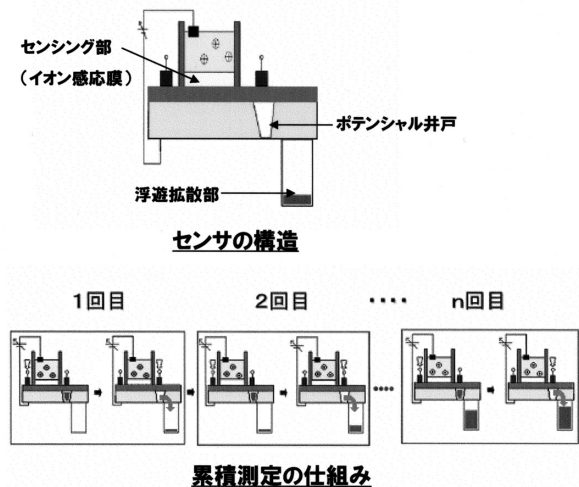


図1 信号累積型ISFETセンサを使用した測定法の原理

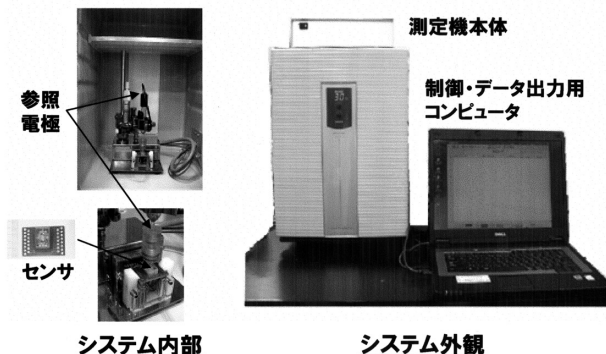


図2 信号累積型ISFETセンサ測定装置

ゲート絶縁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るため、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全く普及していない。

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している。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⁾。

今回、信号累積型ISFET及びクレアチニンデイミナーゼを用いた酵素センサによるクレアチニンの新規測定法を検討し、単一酵素にて簡便にクレアチニンを測定可能な系を開発したので報告する。

II. 測定原理及び装置

1. 測定原理

信号累積型ISFETセンサを使用した測定法の原理を図1に示す。センサのセンシング部に、クレアチニンデイミナーゼ試薬及びクレアチニン含有試料を添加混合する。その結果、酵素反応により NH_4^+ が生じ、センシング部に作用する NH_4^+ 濃度に応じて変化したポテンシャル井戸の深さと、そのポテンシャル井戸からの汲み出し回数に応じ、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。

2. 装置

図2に、信号累積型ISFETセンサ (AMIS: バイオエックス) を利用した測定装置を示す。本装置は、センサと参照電極を含む測定機本体、及び制御コンピュータから構成される。ISFETのゲート上のイオン感応膜は Ta_2O_5 を使用し、センシング部の表面積は 0.05 mm^2 とした。さらに、

信号累積型ISFETセンサの累積回数は、浮遊拡散部の蓄積量から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。

III. 材料及び方法

1. 試薬及び試料

クレアチニンデイミナーゼ試薬として、1.4 U/mlクレアチニンデイミナーゼ (CNI-311: 東洋紡績)、1.0 mMトリス塩酸 (pH 7.5) から成る酵素試薬を調製し、使用した。試料溶液として、0-10 mg/dlクレアチニンを含む1.0 mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を使用した。

2. 測定条件

以下の測定条件にて、試料中のクレアチニン量を測定した。

センサのセンシング部Aにクレアチニンデイミナーゼ試薬を $18\ \mu\text{l}$ 添加し、センシング部B (対照用) にはクレアチニンデイミナーゼを含まない対照用試薬を $18\ \mu\text{l}$ 添加した。37℃で5分間の予備加温を実施後、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、センシング部A及びBの試薬にクレアチニン濃度0-10 mg/dlの測定試料を各 $2\ \mu\text{l}$ 添加、混合し、シグナルが安定した後 (1-2分後) に37℃にてシグナル (対照シグナルに対するシグナル増加分) を5秒毎に4-5分間計測した。

IV. 結果及び考察

まず、本測定法にてクレアチニン濃度0、1、5 mg/dlの各測定試料について計測を実施し、各々のシグナル増加のタイムコースを測定した。結果を図3に示す。試薬中のクレアチニンデイミナーゼが試料中のクレアチニンと反応することにより NH_4^+ 濃度が増加し、クレアチニン濃度に応じたシグナル増加が見られた。

次に、クレアチニン濃度0-10 mg/dlの各測定試料について計測を実施した。各々のシグナル増加を245秒間測定し、エンドポイントでのクレアチニン濃度と計測値の直線性をみたところ、クレアチニン濃度と計測値との間には、非常に良好な相関が見られた (図4)。

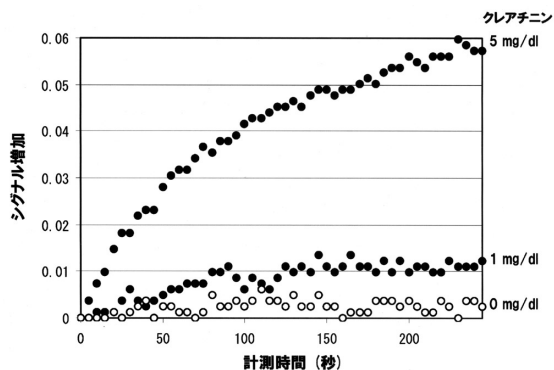


図3 本法でのシグナル増加のタイムコース

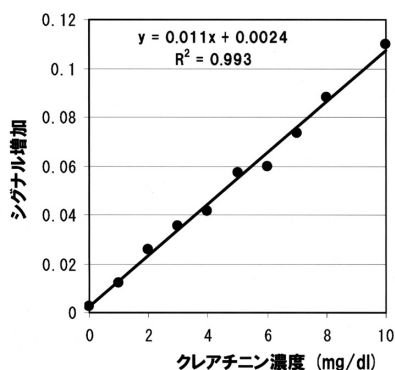


図4 クレアチニン濃度と計測値の直線性

本試薬における測定値の信頼性を確認したところ、クレアチニン濃度 2 mg/dl 試料の計測における CV 値 (n = 5) は、4.6% とバイオセンサとしてほぼ満足できる値を示した。ただし、信頼性については更なる改善を要する。

V. 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クレアチニンを定量できる。現行の酵素法では、主反応だけでも 4 種の酵素が必要で、色原体も必須となる。本法では、クレアチニンデイミナーゼ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、測定感度も必要十分なレベルに持ってい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。クレアチニンの日常臨床検査は血清や尿を試料として測定しており、血清試料では 10^2 mg/dl オーダーの感度が要求される。本法における感度向上が今後の継続研究課題であり、装置の改良と共に、実試料での測定条件や前処理条件等、応用に向けた検討を進めていく必要がある。

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) Kinoshita T and Hiraga Y: A fluorophotometric determination of serum creatinine and creatine using a creatinine amidohydrolase-creatine amidinohydrolase-sarcosine oxidase-peroxidase system and diacetyldichlorofluorescein. *Chem. Pharm. Bull.*, 28: 3501-3506, 1980
- 2) Tsuru D: On the catabolism of creatinine, and the related enzymes in microorganisms. *Nucleic Acids Amino Acids*, 35: 31-37, 1977
- 3) Nishiya Y, Yamamoto K, Kawamura Y and Emi S: Development of creatinine-degrading enzymes for application to clinical assays[Jpn]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 75: 857-862, 2001
- 4) 大澤 進, 武藤 透, 真々田賢司, 飯田真司, 吉田俊彦, 米満 博: クレアチニン測定酵素法液状試薬の評価. *生物試料分析*, 17: 332-337, 1994
- 5) Tabata M, Kido T, Totani M and Murachi T: Automated assay of creatinine in serum as simplified by the use of immobilized enzymes, creatinine deiminase, and glutamate dehydrogenase. *Anal. Biochem.*, 134: 44-49, 1983
- 6) Ikeda Y and Tsuruoka A: Self-monitoring of blood glucose, as a means of self-management. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 24: S269-S271, 1994
- 7) van der Schoot BH and Bergveld P: ISFET based enzyme sensors. *Biosensors*, 3: 161-186, 1988
- 8) 特許第4195859号