

# マイクロチップを用いたバイオマーカー解析コア技術の開発

## — POCTデバイスとしてのマイクロチップ基板の可能性を探る —

片岡 正俊\*、八代 聖基、山村 昌平、田中 正人、大家 利彦

近年、「医療現場での臨床検査」Point of care testing (POCT) つまり患者の傍らでの即時検査が求められている。そして疾患関連バイオマーカーの迅速・省サンプルな測定デバイスの構築に向け、各種ナノバイオデバイスを用いたPOCTへの応用研究が多数なされている。我々は、臨床経験を踏まえた生物系ユーザーの立場から、市販のマイクロチップ電気泳動による血液中に存在する糖を対象とした解析への応用や、マイクロ流体を利用したマイクロ流路上での抗原抗体反応による迅速な血中タンパク質検出系の構築を行っている。これらの知見をもとに、本論文ではマイクロチップ基板を用いたPOCTデバイス実用化への可能性を検討した。

**キーワード:** 臨床検査、バイオマーカー、POCT、マイクロチップ電気泳動、マイクロチップ基板、多項目解析

### Biomarker analysis on microchips

#### – Development of POCT device for multi-marker analysis –

Masatoshi Kataoka\*, Shouki Yatsushiro, Shouhei Yamamura,  
Masato Tanaka and Toshihiko Ooie

Point of care testing (POCT), the analysis of biomarkers at patient's beside, is a continuously expanding trend in the practice of laboratory diagnosis. Although some POCT devices for the analysis of blood glucose and/or several infectious diseases have been developed, many laboratory tests in almost all hospitals are contracted out to laboratory diagnosis companies. However, outsourcing of biomarker analysis is time-consuming, high in cost, and requires much blood and reagents. Consequently we are constructing a biomarker analysis system on microchips for the POCT device. In this paper, we show the core technology for the analysis of biomarkers on microchips, and describe the problems and its solutions in the application of microchips for POCT device.

**Keywords:** Laboratory testing, biomarker, POCT, microchip electrophoresis, microchip, multi-marker analysis

### 1 緒言

健康長寿を達成し質の高い生活を実現するためには、糖尿病などの生活習慣病を中心とする各種疾患の発症を早期、あるいは予知診断して有効な予防を講じる必要がある。このためには、各種疾患に関連する複数のバイオマーカーを日常的に個人レベルでモニタリングし、得られたデータのネットワーク化と診断システムを確立することが必要になる。これらの実現に向けて、我々は個人で使うことができる複数のバイオマーカー測定デバイスの構築を目指している。そのため究極的には、各個人の日常生活つまり家庭などで血液などの体液中に存在する複数のバイオマーカーの検出技術の確立が必要になってくる。その実現には、血液採取とその前処理・分離・反応・検出を一体化し、一般家庭でも設置・使用できるよう操作が簡単でコンパクトな、さらに正確な診断のために複数のバイオマーカー解析が一

度に行えるデバイスが必要になる。ところで、ここで行われる血液中のタンパク質、糖、脂質など生体内での生物学的あるいは生化学的变化を把握するためのバイオマーカー解析は、病院受診時に行われている臨床検査にほかならない。

近年、臨床検査の分野では「患者の傍での臨床検査」Point of care testing (POCT)、つまり患者の傍らでの即時検査が求められている<sup>[1]</sup>。現状の臨床検査では、受診当日に検査の結果が得られることは少なく、結果判定に数日必要であり迅速な診断と治療が難しいことが多い。これはバイオマーカー測定自体に時間が必要な場合があるほかに、測定に大型・高価な精密測定機器が必要になることに加えて臨床検査技師などの人件費など医療機関への経済的負担が大きいため、多くの医療機関で検体検査などの臨床検査が外部の臨床検査会社に外注されているこ

産業技術総合研究所 健康工学研究センター 〒761-0395 高松市林町 2217-14

Health Technology Research Center, AIST 2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu 761-0395, Japan \* E-mail: m-kataoka@aist.go.jp

Original manuscript received September 1, 2009, Revisions received January 18, 2010, Accepted January 20, 2010

とが原因である。この臨床検査の外部委託の模式図を図1にLundbergらにより提唱されたBrain to brain loopモデルをもとに示す<sup>[2][3]</sup>。一方、POCTでは医療現場において患者の傍らで検体採取・検査法の選択を行い、その検査から直接検査結果が得られる。これによって患者の最初の医療機関への受診時に確定診断が可能になり、迅速な治療の開始・治療効率の向上・通院負担の軽減、医療費の低減など患者自身と医療機関に、さらには社会にとって大きなメリットがあると考えられる。また臨床医側のメリットとして、緊急の外科処置が必要な場合などで、患者の感染症や全身疾患の有無あるいはその病態の把握など、処置方法を決定するのに有用な情報がその場で獲得可能になることである。現在は、心筋梗塞やインフルエンザ感染診断キットなど、特に急性の疾患や感染症など短時間で診断を要するもの、血糖値測定や手術室での血液ガス測定などを対象にPOCTデバイスが開発され臨床現場へ導入されつつあるが、特定の疾患関連バイオマーカーのみを解析対象としており、さらに定性的検出法が多いなどの問題がある。現状のこれらPOCTの問題点を解決して、複数のバイオマーカーを定量解析できるPOCTデバイスを開発することは、将来の個人レベルでの複数バイオマーカーモニタリングのための基盤技術になる。また、POCT技術を確立して医療現場でその有用性が認められてこそ、社会に対して個人の健康モニタリング技術を認識させようとする(図2)。そのためにもできるだけ早期に定量性を示す複数バイオマーカーの解析が可能なPOCTデバイスを実現させる必要がある。一方、最近のナノテクノロジーを利用した分析技術により、検査技術の迅速・省サンプル・高感度・機器の小型化が種々図られており、その典型的な技術開発の対象として各種マイクロチップを利用したデバイス開発がある。このデバイスは次章で述べるようにPOCT、ひい

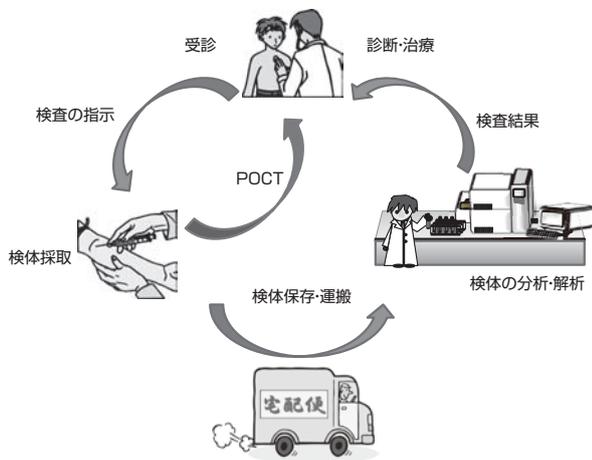


図1 現状の臨床検査会社に依存した検査の流れ。

ては個人レベルでのバイオマーカーデバイスとしてのメリットが多い。そこで上記の目標達成に向けたステップとして、この既存のマイクロチップ基板技術の組合せ、つまり市販の核酸解析用のマイクロチップ電気泳動装置を用いた糖解析や微小流体を取り扱うマイクロフルイディクスを利用したマイクロ流路上での抗原抗体反応系の構築など、POCTデバイス開発に向けたナノバイオデバイスの応用例を示す。さらに臨床経験を踏まえた生物系のユーザーの立場から残された課題について記載する。

## 2 POCTデバイスの必要要件

POCT デバイスには診察室や病室の患者の傍らで迅速にバイオマーカーの測定が可能になることが必須であり、30分以内での解析<sup>[1]</sup>、臨床診断に利用可能な検出感度と再現性を有して、現状の臨床検査法と同等ないしそれ以上に正確な測定、診察室などへの設置が可能なコンパクト性、医師が問診時にでも操作できることが求められている。一方、通常の血液検査では一検査項目あたり数 ml 単位の血液が必要で、患者自身に大きなストレスを与えたとともに、試験管レベルでの解析では大量の検査試薬が必要になるためにコストがかかる問題がある。そのため、POCTに限らず臨床検査では微量サンプルでの解析系が求められている。また血液などを検査対象とすることから、検査終了後は滅菌操作が簡単に行える材質であることなどが求められる。さらに複数の検査項目を一つのデバイスで検出可能とするニーズも考慮に入れて、我々はこれらの要件を満たす技術として、微細加工技術に基づくマイクロ化学チップ技術、つまり解析しようとするサンプルの前処理・分離・反応・検出などの化学や生化学分析のための操作を数センチ角のマイクロチップ上に集積化するマイクロ化学分析システムに注目した。そしてPOCTデバイスへの応用を

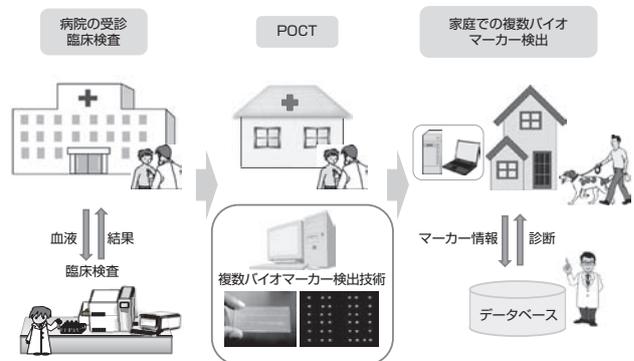


図2 POCTに必要な要件と集積化マイクロチップ基板の模式図。マイクロチップ基板上に血漿分離機構が組込まれ、マイクロチップ電気泳動とマイクロフルイディクス系の流路を有する。

目指して、すでに市販されているマイクロチップ電気泳動やマイクロフルイディクスを用いた個々のバイオマーカーの最適な検出のための条件を明らかにして、バイオマーカー検出系のオンチップ化を行っている。

### 3 マイクロチップ基板のPOCTデバイスへの応用

#### 3.1 マイクロチップ電気泳動による糖解析を利用したバイオマーカー測定法の構築

##### 3.1.1 マイクロチップ電気泳動の生物学・生化学的解析への応用

半導体作製技術に基づく微細加工技術を用いて、数センチ角のプラスチックやガラスを材料とするマイクロチップ上に  $\mu\text{m}$  単位の幅と深さでマイクロ流路を形成し、この流路上で電気泳動を行うマイクロチップ電気泳動装置が開発・市販されている。主に核酸やタンパク質の分離分析を行う従来の電気泳動法と比較して、マイクロ流路を用いることで省サンプル化されるとともに、流路内の体積に比較して表面積が大きくなることによる電気泳動時の熱発生・放出効率の上昇が可能になるため、マイクロチップ電気泳動は高電圧の印加による高い分離能を有する。さらに LED 励起の蛍光検出系を利用することなどによる高感度化が認められる。しかしながら、これらの装置は主なユーザーと考えられる大学などの生物学・生化学系の研究室に十分普及しているとはいえない。これは使用用途が主に核酸などの分離分析に限られる上に、既存のアガロース電気泳動などと比べて泳動装置本体価格が高価なこと、サンプルあたりの解析に必要なマイクロチップやゲルの価格が約 200 倍程度高くなることが主な原因と考えられる。そこで我々は、泳動用チップや泳動装置・解析装置と解析ソフトの変更を全く行わずに、泳動用ゲルや泳動用緩衝液組成の条件検討を行って泳動条件の最適化を図ることで、核酸などの分離分析以外への適用を試みた。そして日常的に生物学・生化学分野の研究室で行われている種々の実験法について、サンプルリザーバーを反応場として利用するオンチップ制限酵素処理に引き続いて電気泳動による解析を行なうことで、 $\text{Mg}^{2+}$  イオンなど制限酵素活性に必須のイオンや酵素などタンパク質の存在が電気泳動に影響しないことを明らかにした。この結果をもとにオンチップ制限酵素処理法を設計し、迅速な制限酵素切断断片長多型解析を行った。そのほかミトコンドリア膜電位測定、さらに合成 RNA 解析や DNA の Ligation 反応の解析などへの応用が、泳動装置本体や付属解析ソフトの変更を必要とせずに生物系の研究者でも簡単にできる泳動条件を変更するだけで可能となることを報告した。そして核酸の分離分析のみならず、各種酵素処理とその解析が迅速・省サンプル・高感度に行えるなど、マイクロ

チップ電気泳動の長所を生かした生物学・生化学的解析への応用性の高さを報告した<sup>[4]-[8]</sup>。これらの成果は、種々の実験操作にマイクロチップ電気泳動法が応用可能であることを示しており、結果的にコストダウンが期待される。

##### 3.1.2 マイクロチップ電気泳動の血糖値解析への応用

これらの知見をもとに、我々は POCT への応用を見据えて、市販のマイクロチップ電気泳動装置とマイクロチップを用いて血中バイオマーカー解析への応用を行った。各リザーバーの容量が  $10 \mu\text{l}$  であることからピペットマンによる溶液ハンドリングが簡単に行え、泳動ゲルや泳動用緩衝液の変更が容易な日立 SV1100 をマイクロチップ電気泳動装置として利用した。さらにマイクロチップ基板としては付属のチップを使用した。図 3 に SV1100 上で用いる付属のポリメタアクリレート (PMMA) 製 *i*-チップを示す。*i*-チップには幅  $100 \mu\text{m}$ 、深さ  $30 \mu\text{m}$  のマイクロ流路が 3 本形成されており 3 サンプルの同時解析が可能になる (図 3A)。泳動操作も簡単であり、ゲルリザーバー (GR) から添付のゲルを充填後、サンプルリザーバー (SR) に内部標準用 DNA を含む計  $10 \mu\text{l}$  のサンプル溶液を加えて導入泳動と分離泳動を行い、蛍光検出により DNA の分離・解析を行う (図 3B)。このマイクロチップ電気泳動では、従来のアガロース電気泳動に比べて省サンプルでありながら検出感度は約 10 倍、泳動開始から数分以内に解析結果が得られ、わずかな数塩基の誤差で DNA の分離分析が可能になる。我々はこのマイクロチップ電気泳動において糖構造を含む DNA の分離分析能の高さに注目し、付属の DNA 解析ソフトをそのまま利用して、血中バイオマーカーの中で糖構造を有するもの、あるいは酵素基質として糖を利用するものとして血糖やアミラーゼに注目し解析を行った<sup>[9][10]</sup>。

血糖測定では、血漿に蛍光色素 2-aminoacridone (AMAC) を加えてグルコースを直接蛍光標識した後、泳動用緩衝液としてホウ酸緩衝液を使用してグルコースにマイナス荷電を加え電気泳動時のドライビングフォースとして利

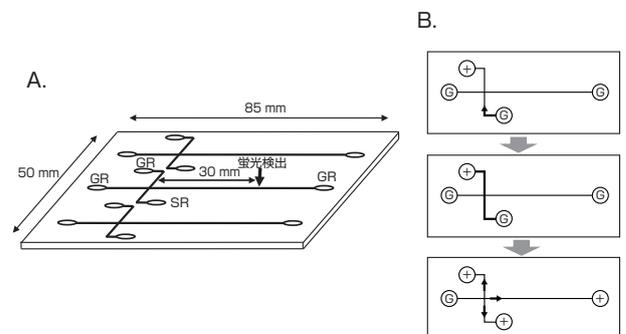


図 3 日立 *i*-チップの模式図 (A) とクロス流路におけるサンプル分離 (B)。+は陽極を、G はグラウンドを示し、矢印はサンプル DNA の泳動方向を示す。

用することで、特異的に血中グルコースが検出可能なことを報告した(図 4A)<sup>[8]</sup>。そして、種々雑多なタンパク質などが存在する血漿サンプル中で、蛍光標識されたグルコースの電気泳動による分離・分析が可能になったことが明らかになった。この検出法では検出限界は 0.92  $\mu\text{M}$ 、1 ~ 300  $\mu\text{M}$  の範囲で定量的検出が可能で、従来の臨床検査で得られる血糖値と全く遜色なく正確に血中グルコースの検出が可能であった。さらに同日再現性および日間再現性においても高い再現性を有しており、マイクロチップ電気泳動による血糖値測定の実用化の可能性が認められた。一方、既存の臨床検査で用いられる hexokinase-G-6-P-dehydrogenase 法では、輸液に含まれる 2 糖のマルトースの存在により実際より高血糖に測定されるという大きな問題があるが、マイクロチップ電気泳動を用いることで泳動時間の違いから容易に単糖のグルコースと 2 糖のマルトースの識別が可能になる<sup>[11]</sup>。その結果、マルトース含有輸液等投与患者での血糖測定における偽高値表示によって実際には低血糖になってしまう危険が防止される。

### 3.1.3 マイクロチップ電気泳動による血中アミラーゼ活性の測定

血中アミラーゼは膵炎や唾液腺炎などの診断に用いられるバイオマーカーであるが、アミラーゼはグリコシド結合を加水分解することで、デンプンをグルコース、マルトースおよびオリゴ糖に変換する。既存の臨床検査ではオリゴ糖を酵素基質として利用し、比色法で定量的測定が行われている<sup>[12]</sup>。アミラーゼはオリゴ糖であるマルトヘキサオース (G6) をマルトトリオース (G3) に加水分解することが既に知られていることから、血糖測定で明らかになったマイクロチップ電気泳動による蛍光標識されたグルコースの高い

分離分析能に注目して、8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) で蛍光標識した APTS-G6 を基質として利用し、分解産物 APTS-G3 をマイクロチップ電気泳動で分離して、アミラーゼ活性を定量的に測定した(図 4B)<sup>[10]</sup>。ここでは、血糖分離と同様に、泳動用緩衝液としてホウ酸緩衝液を用いてドライビングフォースとした。本法では、検出限界 4.38 U/L で、5 ~ 500 U/L の範囲で血中アミラーゼ活性の定量的検出が可能になる。血中アミラーゼとして膵臓および唾液腺由来の 2 種類のアイソザイムが存在するが、膵臓疾患の鑑別診断では抗唾液腺由来アミラーゼ抗体で血漿の前処理を行うことで、特異的に膵臓由来アミラーゼ活性の測定が可能になった。血漿サンプルを用いた場合、高い再現性をもって既存の臨床検査法と同等に正確なアミラーゼ活性測定が可能であることが示され、マイクロチップ電気泳動によるアミラーゼ活性測定への実用化の可能性が認められた。

上述した血糖およびアミラーゼ測定では血中グルコースの標識や APTS-G6 の酵素処理に 1 時間程度必要で、POCT へ応用するには処理時間の短縮が必要である。したがって、蛍光物質あるいは検出系を変更することで高感度化による検出時間の短縮が必要になる。しかし、市販のマイクロチップ電気泳動装置と付属の泳動用チップを用いて血漿を蛍光標識して泳動した後、あるいは蛍光標識オリゴ糖を血漿と混ぜて泳動した後、付属の DNA 鎖長解析ソフトをそのまま使用して血糖や血中アミラーゼ活性が測定される。このように極めて簡単に定量的検出が行える点に大きなメリットがあり、さらに既存の臨床検査法と同等な正確性と再現性を有する。そして  $\mu\text{l}$  単位の血漿を使用するだけで解析ができる省サンプルであること、本体お

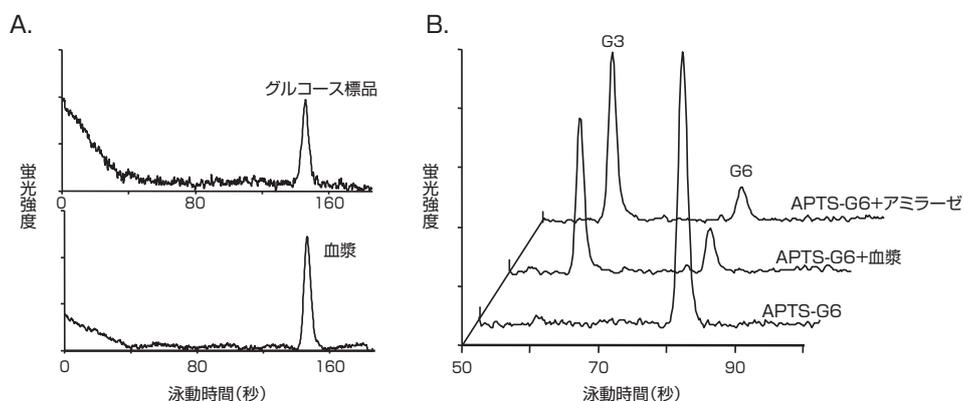


図 4 マイクロチップ電気泳動を用いた血中グルコース (A) とアミラーゼ活性測定 (B)。

(A) グルコース標品と同じ移動時間に血漿中グルコースのピークを認める。既知濃度のグルコース標品の蛍光強度から検量線を作製し、血中グルコース濃度 (血糖値) を測定した。

(B) APTS-G6 単独の電気泳動で、単一ピークを認める。APTS-G6 を、精製アミラーゼと反応させることで、APTS-G6 とその分解産物である APTS-G3 の単一ピークを認める。APTS-G6 を血漿と反応させることで、血漿中アミラーゼにより APTS-G3 に分解される。既知濃度のアミラーゼと APTS-G6 を反応させ、APTS-G3 に相当する蛍光強度から検量線を作成することで、血中アミラーゼ活性が測定される。

よび解析装置がコンパクトであること、プラスチック基板はオートクレーブなどでの滅菌が可能であることなどを総合すると、血糖値やアミラーゼなどのマーカー解析へのマイクロチップ電気泳動のポテンシャルの高さを示している。ただし、血糖値やアミラーゼ測定は保険での検査費用が110円と比較的安価であり、マイクロチップ電気泳動を用いた単一項目としての検査適応では経済的メリットは低い。しかしながら、後述する各種血中タンパク質の検出など複数の項目検査と組合せた疾患別チップの1項目として測定することで十分な採算性が見込める。

### 3.2 マイクロチップ基板上での抗原抗体反応系構築

#### 3.2.1 マイクロ流路上でのサンドイッチELISA法の構築

血中に存在するバイオマーカーの多くが各種代謝産物やタンパク質であり、夾雑物が多数存在する血液の中であっても特異的検出が可能で、電気泳動による分子ふるいの必要がない抗原抗体反応系を用いた検査法が既存の臨床検査法では汎用されている。既存の臨床検査では96穴プレートを用いた抗原抗体反応が一般的であるが、その反応時間としては1時間以上必要であり、サンプル量としても数十 $\mu\text{l}$ を要する。そこでマイクロ空間の利用による分子拡散効果による抗原抗体反応時間の短縮、さらに省サンプル化を期待して、マイクロチップ基板上に形成したマイクロ流路上での抗原抗体反応系の構築を試みた。この際、バイオマーカー検出に広く利用され定量性に優れた Sandwiches Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay 法 (サンドイッチ ELISA 法、図 5A) の検討を行った。

測定モデルとして、特異性の高い抗体が市販されている骨粗鬆症や癌転移のバイオマーカーである血中 I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP) を選択した。サンド

イッチ ELISA 法では、一次抗体を固相に固定を行う<sup>[13]</sup>。固相としては、従来の検査法では96穴プレート(図 5B)が主に用いられているが、これに対して、ここではマイクロチップ基板(図 5C)を固相として用いた。抗体の固定をしてから、ブロッキング<sup>[14]</sup>を行った後、血漿サンプルあるいは既知濃度の精製 PICP とペルオキシダーゼ標識二次抗体を加え、標識二次抗体に結合した PICP の一次抗体への結合を介して固相への固定を行う。抗原と結合していない標識二次抗体を洗浄後、ペルオキシダーゼの基質を加え化学発光を CCD カメラで検出する。POCT デバイスとして利用する場合は、ユーザーはブロッキング操作以降の操作を行う。従来法である96穴プレートでは、20 $\mu\text{l}$ の血漿を用いた抗原抗体反応時間としては3時間が必要になる。マイクロチップ基板としては1枚のマイクロチップ上にマイクロ流路3本を有して、表面にタンパク質固定用の表面処理が施された環状ポリオフィン (COC、住友ベークライト社製) 基板を使用した。以降の操作で、マイクロ流路への $\mu\text{l}$ 単位の各溶液導入はピペットマンを用いて行った。サンプルウェル①から②の方向に一次抗体を導入して固定した後にブロッキングを行い、③から②の方向に抗原およびペルオキシダーゼ標識二次抗体を導入する。抗原抗体反応後に洗浄し、①から②の方向に酵素基質を加えて化学発光を検出している。1本のマイクロ流路あたりに必要な血漿量は1 $\mu\text{l}$ 以下で、抗原抗体反応時間は30分であり、従来法に比べ大幅な検出時間の短縮と省サンプル化が実現された。

マイクロ空間での抗原抗体反応としては、直径数 $\mu\text{m}$ のマイクロビーズ表面に抗体を固定して、ビーズをマイクロ流路に導入・固定する方法が既に報告されている。ビーズ法では、ビーズをマイクロ流路内に保持するための複雑な形

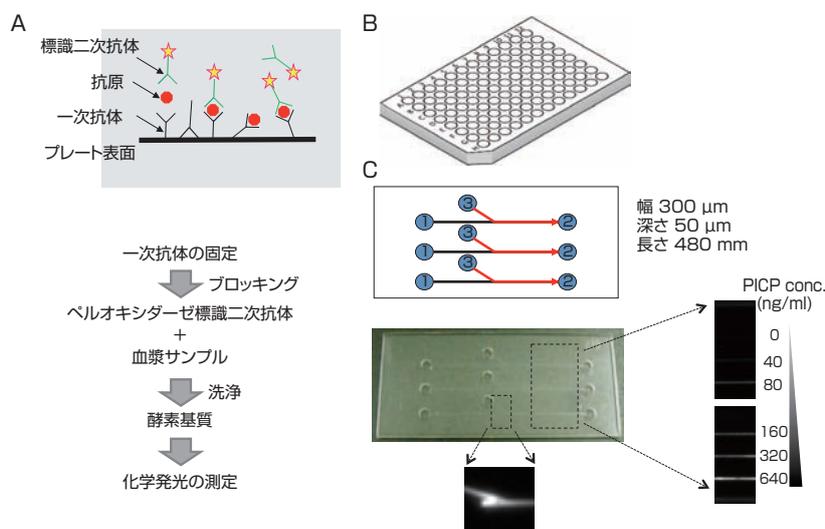


図 5 サンドイッチ ELISA 法による抗原抗体反応。サンドイッチ ELISA 法の原理と実験手順 (A)、96 穴マイクロプレート (B)、マイクロ流路上での PICP 検出 (C)。

状のマイクロ流路の設計が必要になるなどの問題があることから、我々は、直接マイクロ流路表面への抗体固定法を選択した。図 5C に示すように精製 PICP の濃度に依存して化学発光強度の増加を認めたが、同一流路内での発光の不均一性が認められており、定量性が確保されていないことが分かる。これは、1) 流路表面での不均一な一次抗体の固定や、2) ブロッキング、各段階での不十分な洗浄あるいは標識二次抗体の部分的な残留の可能性などが考えられる。今回用いた Y 字形の流路 (図 5C) では特にマイクロ流路分岐部において化学発光の増強傾向が認められ、より洗浄が容易な流路設計の必要性が認められた。そこで、1) についてはインクジェットを用いたマイクロ流路上で特定部分への一次抗体の固定、2) については流路設計変更による洗浄効率を高めることで、定量性の改善を試みた。

### 3.2.2 微細化インクジェットによるマイクロ流路表面への抗体固定の応用

一定量の抗体をマイクロ流路上の任意の部分に一定面積で固定するため、プログラムにより pL 単位の極微量の溶液の任意部分への吐出が可能で微細化インクジェットの利用を行った。微細化インクジェットは、ピエゾ駆動であるクラスターテクノロジー社製のパルスインジェクターを用いた (図 6)。このインクジェッターからは、65 pL の希釈した抗 PICP 一次抗体が 1 液滴容量として吐出が可能である。これを用いて 100 液滴の一次抗体を吐出・固定すると、ほぼ流路幅に相当する液滴直径となり、これによって抗 PICP 一次抗体の固定化を行った (図 6)。前述のように分岐部を有するマイクロ流路設計では、分岐部分で強く化学発光が求められるなどの

洗浄などの問題から非特異的的化学発光<sup>用語2</sup>が認められ、定量性の確保が困難であった。そこで容易にマイクロ流路の洗浄が行える直線状マイクロ流路 4 本を 1 枚の COC マイクロチップ上に形成して (図 7A)、定量的検出系の構築を行った。マイクロ流路表面へ一次抗体のインクジェットによる吐出・固定の後、①から②の方向にブロッキング、洗浄を行うことで抗体の非特異的吸着や残留を防止し、30 分間の抗原抗体反応の後に化学発光を CCD カメラで検出した (図 7B)。この反応系では 1 本のマイクロ流路あたり必要な血漿量は 1.8  $\mu$ l で、抗原抗体反応は 30 分であり、従来法の 96 穴プレート法と比較してそれぞれ 1/10 以下と 1/6 になり、省サンプル・高感度な検出系が構築された。ネガティブコントロールとして PICP を認識しない心筋梗塞マーカー Heart type Fatty Acid Binding Protein (H-FABP) に対する抗体をインクジェットにてマイクロ流路表面へ吐出固定を行ったが、非特異的な発光は認めず、0 ~ 600 ng/ml の濃度範囲で良好な定量性が認められる (図 7B、C)。血漿サンプルを用いた場合は、既存の 96 穴プレートによるサンドイッチ ELISA 法と同等に正確な測定が可能で、迅速・省サンプルで正確な検出系が構築された。このように、マイクロ流路上で抗原抗体反応を行うことで、POCT 技術への適用可能な血中タンパク質検出技術を構築することができた。

微細化インクジェットを用いて抗体をマイクロ流路上に吐出・固定する方法では、任意の部分に任意の量の抗体を吐出・固定化が可能になる (図 7D)。サンドイッチ ELISA 法による血中タンパク質の検出の原理は、バイオマーカーの種類にかかわらず基本的には同じであり、抗体溶液を含む

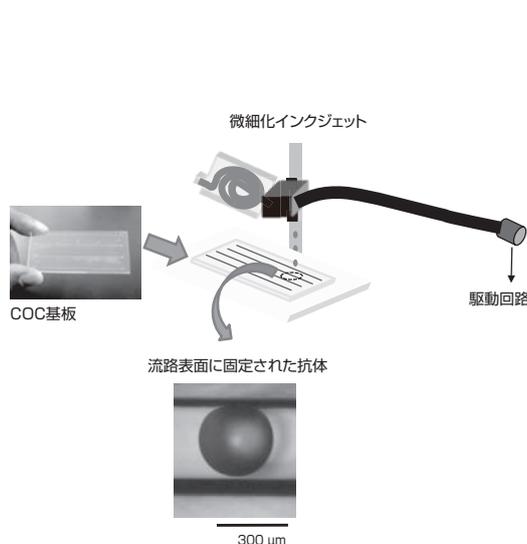


図 6 微細化インクジェットによるマイクロ流路上への抗体固定の模式図と流路表面に固定された抗体。

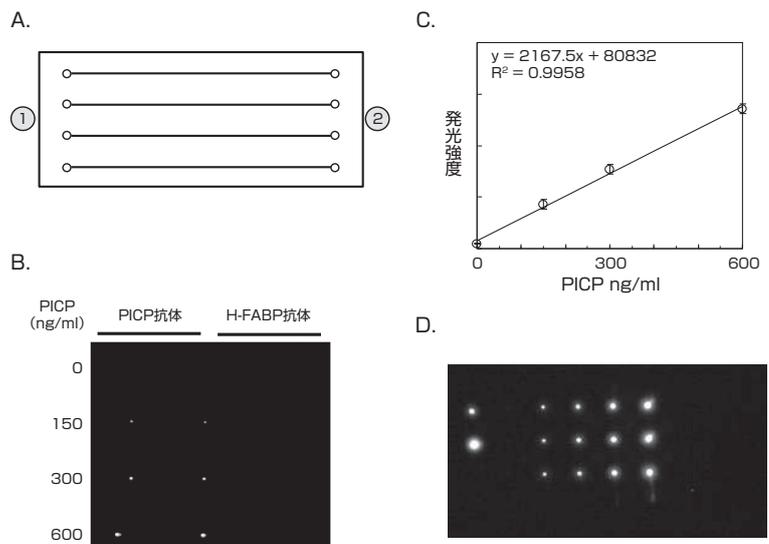


図 7 マイクロ流路を有するマイクロチップ基板の模式図 (A) と、これを用いた PICP 検出像 (B)。検量線 (C) と各流路へ任意量の抗体固定を行った際の化学発光像 (D)。

インクジェットのヘッド部分を交換するだけで複数種類の抗体溶液の吐出が可能になり、1本のマイクロ流路上でわずか1.8 µlの血漿サンプルから複数のバイオマーカー検出が可能になる。現在、我々は複数種類の血中バイオマーカーを同一マイクロ流路上で定量的に検出できる抗原抗体反応系の最適条件としての各種一次抗体や二次抗体濃度の洗い出しを行っており、マルチマーカー検出マイクロチップの構築、特に生活習慣病として注目される糖尿病や骨粗鬆症の診断チップの作製を目指している。糖尿病診断では、血糖値に加え、抗原抗体反応での検出が可能なインスリンや高感度CRP測定をオンチップ化することで、正確な診断が極微量の血液で可能になる。また骨粗鬆症では骨形成マーカーPICPと吸収マーカーNTxの双方を同時に測定することで、詳細な病態が明らかになる。さらにコスト面での長所を考えると、現状の検査ではインスリン検査に2640円、CRP測定に1560円が必要であり、血糖値測定を合わせ3項目で計4310円となる。また、骨粗鬆症ではPICP測定で1700円、NTx測定で2900円の計4600円が必要とされる。抗原抗体反応検出系のコストは、試薬としての抗体費用が占める部分が多い。したがって、インクジェットによる抗体固定法を用いれば、96穴プレート法に比べ、PICPの場合では抗体使用量は約1/10000となり、抗体費用は桁違いに削減できる。そのほか1本のマイクロ流路上に複数種類の抗体固定を行うことで、使用する検出試薬量も大幅に節約され、材料費の安価なプラスチック基板との併用により十分な採算性が見込める。

#### 4 今後の課題

我々は、生物系ユーザーの立場から前述のようにマイクロチップ電気泳動やマイクロチップ基板など、既存の技術を基礎にしてバイオマーカー検出系の構築を行ってきた。マイクロチップ電気泳動などでは、新たに装置やソフト開発に時間と労力をかけずに、市販のチップと泳動装置、解析ソフトをそのまま利用するだけでその生物学・生化学系の実験への適用や臨床検査への応用性を示すなど、比較的短期間で個々の既存技術のポテンシャルの高さを明らかにできたと考える。しかしながらPOCTデバイスの実現に向けては、以下に述べるように生物学的アプローチのみならず、微細加工を中心とする工学系や医学系、さらには将来のデータベース化などには情報系など、幅広い分野を超えた技術者・研究者による連携が必要と考える。

糖やタンパク質を対象としてマイクロチップ基板上でのバイオマーカー解析のコア技術は構築できたと考えるが、さらにこれをPOCTデバイスとして臨床の現場で実際に用いるには以下の課題が残されている。上述のマイクロチッ

プ基板では従来どおりの遠心分離による血球分離を行った後、血漿成分をマイクロチップに添加して解析を行っている。したがって、臨床の現場で医師が問診中に血液検査が行えるようにするには、血球分離の簡易化が必要となる。そのために、全血をマイクロチップに添加するだけで、血球分離を含めて解析できることが求められる。µl単位の極微量の血液で検査を可能にするため、既存のディスプレイな微量採血針によって採血された全血から血球成分を取り出すフィルターを組み込んだ、マイクロ流路上での血漿分離システムのオンチップ化を目指している。さらに、マイクロチップ電気泳動流路やマイクロフルイディクス流路のサンプルウェルへ自動的・定量的に必要な量の血漿を送り込むためのマイクロポンプによる送液系の構築が必要になる。また多項目バイオマーカー検出チップの実現には、1枚のマイクロチップ上に、物質の電荷、大きさ、形状による移動速度の違いで物質の分離を行う電気泳動系と、極微量の液体の送液を行い抗原抗体反応系で利用するマイクロポンプ<sup>用語3</sup>系という原理の異なる分離・分析系を併存させる必要から、複雑なマイクロ流路設計が求められており、プラスチック成型を含む微細加工技術に長けた企業などとの連携が必要と考えている。

上述の技術課題を含め、検出系や解析ソフトの開発など周辺技術の統合・構築を行い、POCTデバイスとして早期に医療用検査機器として試作機を製作する。この際、まずは対象疾患としては日本の成人の中で数百万人から一千万人に及ぶ患者が存在する糖尿病や骨粗鬆症などの疾患別診断チップを構築する。そして大学病院や専門病院との共同研究の中で既存の臨床検査データとの比較からPOCTデバイスとしての有効性の検証を行う。そして医療検査機器として薬事法に基づく厚生労働省の認可を得るようにデータ収集を進め、POCTデバイスとしての開発を進める予定をしている。POCTデバイスとして医療現場へ導入を行った後、家庭レベルでの健康モニタリングのバイオマーカー測定デバイスの基盤として導入を図る。

#### 用語説明

用語1: ブロッキング: 抗原タンパク質以外のタンパク質や固相表面に対する抗体の非特異的結合を防ぐことを意味する。ブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミンやゼラチン、スキムミルクなどが用いられる。

用語2: 非特異的発光: ブロッキングや洗浄操作が不十分なために、ペルオキシダーゼ標識二次抗体が非特異的にタンパク質や固相面に結合後、ペルオキシダーゼの酵素基質を分解して発光すること。バックグラウンドノイズとなる。

用語3: マイクロポンプ: 微量液体を駆動するための圧力発生を目的とする液体制御素子のこと。

参考文献

- [1] G. D. Lundberg: How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical world, *Clin. Chim. Acta* 280, 3-11 (1999).
- [2] M. Plebani: Pre and Post examination aspects, *eJIFCC* 15, 1-5 (2004) <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol15no4/150412200404.htm> (2004).
- [3] J. M. Hicks, R. Haeckel, C. P. Price, K. Lewandrowski and A. H. Wu: Recommendations and opinions for the use of point-of-care testing for hospitals and primary care: summary of a 1999 symposium, *Clin. Chim. Acta* 303, 1-17 (2001).
- [4] M. Kataoka, S. Inoue, K. Kajimoto, Y. Shinohara and Y. Baba: Usefulness of microchip electrophoresis for reliable analyses of nonstandard DNA samples and subsequent on-chip enzymatic digestion, *Eur. J. Biochem.* 271, 2241-2247 (2004).
- [5] M. Kataoka, Y. Fukura, Y. Shinohara and Y. Baba: Analysis of mitochondrial membrane potential in the cells by microchip flow cytometry, *Electrophoresis* 26, 3025-3031 (2005).
- [6] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, M. Watanabe, J. Kido, R. Kakuhata, Y. Shinohara and Y. Baba: Sequential analysis of RNA synthesis by microchip electrophoresis, *Anal. Biochem.* (in press).
- [7] R. Akamine, S. Yatsushiro, S. Yamamura, J. Kido, Y. Shinohara, Y. Baba and M. Kataoka: Direct endonuclease digestion and multi-analysis of restriction fragment length polymorphisms by microchip electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (in press).
- [8] Y. Umemoto, M. Kataoka, S. Yatsushiro, S. Yamamura, T. Ooie, J. Kido, T. Yamamoto, Y. Shinohara, and Y. Baba: Analysis of DNA ligation by microchip electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (in press).
- [9] E. Maeda, M. Kataoka, M. Hino, K. Kajimoto, N. Kaji, M. Tokeshi, J. Kido, Y. Shinohara and Y. Baba: Determination of human blood glucose levels using microchip electrophoresis, *Electrophoresis* 28, 2927-2933 (2007).
- [10] E. Maeda, M. Kataoka, S. Yatsushiro, K. Kajimoto, M. Hino, N. Kaji, T. Tokeshi, M. bando, J. Kido, M. Ishikawa, Y. Shinohara and Y. Baba: Accurate quantitation of salivary and pancreatic amylase activities in human plasma by microchip electrophoretic separation of the substrates and hydrolysates coupled with immunoinhibition, *Electrophoresis* 29, 1902-1909 (2008).
- [11] E. Maeda, K. Hirano, Y. Baba, H. Nagata and M. Tabuchi: Conformational separation of monosaccharides of glycoproteins labeled with 2-aminoacrydone using microchip electrophoresis, *Electrophoresis* 27, 2002-2010 (2006).
- [12] 河合 忠、伊藤喜久、櫻林郁之介、屋形 稔、三國龍彦、木村 聡、櫻井晃洋、鴨井久司、杉田 収: 異常値の出るメカニズム、287-290、医学書院、東京 (2005)。
- [13] P. R. Ebeling, J. M. Peterson and B. L. Riggs: Utility of type I procollagen propeptide assay for assessing abnormalities in metabolic bone diseases, *J. Bone Miner. Res.* 7, 1243-1250 (1992).

執筆者略歴

片岡 正俊 (かたおか まさと)

1990年徳島大学大学院歯学研究科修了。歯学博士。1990-2002

年徳島大学歯学部にて歯周病専門医として臨床に従事すると同時に歯周病病原因子の遺伝子解析の研究に従事。その後同ゲノム機能研究センター遺伝子発現分野助教授として2004年までマイクロチップ電気泳動の生物学的解析研究に従事。2006年から産業技術総合研究所健康工学研究センターに主任研究員として入所。2007年より同センターバイオマーカー解析チーム研究チーム長。電気泳動を含めマイクロチップ基板のバイオマーカー解析への応用研究に従事している。本論文では主にマイクロチップ基板を用いた生物学的解析法の構築と全体構想のとりまとめを行った。



八代 聖基 (やつしろ しょうき)

2001年岡山大学自然科学研究科博士後期課程修了。博士(薬学)。日本学術振興会特別研究員(PD)、就実大学薬学部助手を経て、2007年より産業技術総合研究所健康工学研究センター研究員。現在、感染症のバイオマーカー探索とマイクロチップを用いた感染症迅速診断デバイスの研究に従事。本論文では主に抗体選択とその最適な標識法の構築に従事。



山村 昌平 (やまむら しょうへい)

2002年北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士後期課程修了。博士(材料科学)。文部科学省知的クラスター創成事業:とやま医薬バイオクラスター博士研究員、北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科助教。2008年より産業技術総合研究所健康工学研究センター研究員。現在、感染症をはじめとする各種疾患の診断システムの構築を目指した細胞チップの研究開発に従事。本論文ではマイクロ流路設計および抗体固定法の構築に従事。



田中 正人 (たなか まさと)

1988年通商産業省工業技術院四国工業技術試験所入所。機械システムの制御、超音波利用計測技術などの研究に従事。2001年から独立行政法人産業技術総合研究所主任研究員。2002年博士(工学)(徳島大学)。2005年から健康工学研究センターバイオデバイスチーム主任研究員。現在バイオデバイスの構築に関わる微細加工技術、微量液滴操作技術の研究に従事。本論文では微細化インクジェットを用いた抗体吐出・固定法の構築に従事。



大家 利彦 (おおいえ としひこ)

1993年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士(工学)。同年通商産業省工業技術院四国工業技術試験所に研究員として入所。1997年主任研究官。2001年より独立行政法人産業技術総合研究所主任研究員。2005年より同健康工学研究センターバイオデバイスチーム長。専門はレーザーを用いた微細加工。人間の健康状態を数値表現できるデバイスの実現に向け、血液による多項目診断ができるプラスチック製ディスプレイチップ、集積化チップ用組み込みユニットなどを開発中。本論文ではマルチマーカー解析に向けた微細化インクジェットを用いた抗体吐出・固定法の構築に従事。



## 査読者との議論

### 議論1 実用化

質問 (中村 和憲:産業技術総合研究所評価部)

筆者は、「さらにこれを POCT デバイスとして臨床の現場で実際に用いるには多くの課題が残されている」と述べているように、実際の利用にはまだまだ距離のある技術と考えます。その点が読者に理解されるように、論文タイトルおよび論文の導入部での工夫が望まれます。

そして、多くの残された課題の解析と、解決方法の整理、具体的な取り組みと今後の方向について取りまとめてください。また、実際に臨床検査機器、方法として認可されるまでには、定量性や信頼性のみならずコストも含めて厚生省の認可が必要となります。認可に当たっては保険点数が決まることから、既存の方法に比べてコスト面での優位性を確保することが重要となりますが、この点についての見解はいかがでしょうか。

回答 (片岡 正俊)

今後の課題を第4章に記載しました。技術的内容として①血球分離システムのオンチップ化、②マイクロポンプによる送液系の構築、③マイクロ流路設計があり、その後医療用検査機器として試作機作製後、臨床検査装置としての有用性を証明する。さらに業事法による医療用検査機器の認証の必要性などを記載しました。具体的なコストの問題は、保険点数も含め現状の検査費用と比較して十分な採算性が見込めることを記載しました。

タイトルについてはコア技術の開発を強調するように変更しました。

### 議論2 既存技術との比較

コメント (中村 和憲)

血糖やアミラーゼ活性の測定に応用していますが、特に血糖に関しては、既に患者が日常的に使用できる血糖センサーが広く利用されています。したがって、既存の方法の問題点の整理、それを解決するために行ったことなどを明記してください。また、本研究で開発された方法が既存の臨床検査法と同等の性能を有していると述べられていますが、既存の臨床検査にとって代わる方法となり得るのか、さらには POCT デバイスとして普及する可能性があるのか、コスト面も含めた実用化への道筋など、今後の展開についての記述が望まれます。

回答 (片岡 正俊)

ご指摘のように POCT デバイスとして既に血糖値センサーが市販されていますが、hexokinase-G-6-P-dehydrogenase 法による血糖値測定法では、二糖のマルトースを単糖のグルコースとして認識し実際よりも高血糖と表示してしまいます。これはマルトースを含む輸液を受けている場合、大きな問題となります(実際、低血糖のため死亡例があります)。このような際には、電気泳動による単糖と二糖を泳動時間で識別することは臨床的に大きな利点になります。

アミラーゼ測定については、定量性・易操作性・省サンプル・デバイスのコンパクト性・チップがオートクレーブできるなど、POCT デバイスとして必要とされる条件を具備していることを明示しました。コスト面については、マイクロチップ電気泳動装置の各種実験操作への汎用性の高さから結果的に泳動装置としてのコストが安くなること、さらに臨床検査においては血糖やアミラーゼ測定では保険での検査費用が安いので、これら単体の検査としてはコスト的に無理があるが、他の検査項目と組み合わせるとマルチ解析チップとして実用化することで十分なコスト面での競争性が確保されることを記載しました。

### 議論3 個々の技術の性能

コメント (中村 和憲)

現在用いられている、サンドイッチ ELISA の問題点は指摘されていますが、骨粗鬆症という長期疾患の診断に、開発手法の測定時間の短縮がどの程度有効であるのか必ずしも明確になっていません。反応時間が従来法の3時間から30分に短縮できるとしては、

測定原理が抗原抗体反応と酵素反応を利用した手法であり、基本的に同じ原理を利用しているにもかかわらず短縮できることの説明が不十分です。

コメント (赤松 幹之:産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門)

従来のアガロース電気泳動と比べてマイクロチップ電気泳動では少サンプルで済んで、検出感度が高い理由を簡単に結構ですので記述してください。

回答 (片岡 正俊)

抗原抗体反応系を構築する場合、抗体の抗原認識能の高さが問題になります。我々は、生活習慣病として罹患患者が多く社会的に問題になっている疾患(骨粗鬆症による骨折は寝たきり老人の原因になることが多い)で、さらに特異性の高い抗体が手に入りやすい(抗体単独で市販されている)、その他として健康人でも一定の血中濃度が測定可能なマーカー(血液サンプルから必ずデータが取れること、炎症性サイトカインなどでは健康人で測定限界以下が多くデータ解析が困難→実験系が成り立ちにくい)ということで PICP を選択しました。この点について記載しました。

抗原抗体反応の原理は基本的に対象とするマーカーの種類に限らず同じため、PICP であろうが他のマーカーであろうが基本は同じです。このためにも、特異性の高い抗体が市販されている骨粗鬆症のマーカーである PICP を対象に選択しました。3時間から30分への時間短縮は、POCT に要求される診察室などでの30分での解析に応用可能となります。抗原抗体反応は、抗体と抗原の空間内での衝突により特異的結合が始まりますが、マイクロ空間では分子拡散効果により拡散時間が短縮され結果的に抗原抗体反応時間の短縮が起こったと考えられ、これについても記載しました。

電気泳動については、「従来の電気泳動法と比較してマイクロ流路を用いることで省サンプル化、流路内の体積に比較して表面積が大きくなり電気泳動時の熱発生・放出効率の上昇が可能になるため、高電圧の印加による高い分離能を有する。さらに LED 励起の蛍光検出系を利用することなどによる高感度化が認められる」と記載しました。

### 議論4 臨床経験に基づいたアプローチ

コメント (赤松 幹之)

臨床経験を持つ生物系研究の立場からのアプローチは、大変有益なことと理解していますが、どの点が臨床経験に基づいた視点なのか明記されていません。例えば、処理時間やサイズなどは臨床経験に基づかなくても解決すべき課題であることは容易に分かると思います。したがって、臨床の立場からみたときのポイントを明記されることを期待します。

回答 (片岡 正俊)

家庭などでの個人レベルの健康モニタリングシステムの構築にあたり、日常生活で利用可能な血中バイオマーカーデバイスの構築に向けて、まず POCT デバイスの開発からアプローチを考えています。このため、既存技術であるマイクロチップ基板を用いてできるだけ早い実現を目指しています。さらに臨床の立場からの緊急の外科処置が必要な場合などで、患者の感染症や全身疾患の有無あるいはその病態の把握など、処置方法を決定するのに有用な情報がその場で獲得可能になるとの意見を加えました。

### 議論5 既存技術の組み合わせというアプローチ

コメント (赤松 幹之)

個別の技術はオリジナルではなく、その組み合わせ技術に本研究のオリジナリティがあると理解していますが、組み合わせ技術のオリジナリティを主張する時には、他の(採用しなかった)要素技術をなぜ選択しなかったのか、といった議論が論文に記載されていることを期待します。全体として、結果として採用した技術を用いて行なったことが書

かれています。シンセシオロジーの論文としては、どのように技術の選択をしたかについて記述していただきたいと思います。

回答 (片岡 正俊)

ご指摘のように、市販のマイクロチップ電気泳動装置の本体や付属のチップ、解析ソフトをそのまま利用して、各種生物学的実験法へ応用可能なためコストダウンが期待されると考えます。この点について記載しました。要素技術の選択について、マイクロチップの選択についても既存技術の組合せに言及しました。また、日立 SV1100 形を選択した理由として、泳動ゲルや緩衝液の変更が簡単なことから選択したと記載しました。アミラーゼ測定で G6 と G3 の加水分解に注目した理由は電気泳動で容易に分離できるためです。PICP 選択の理由として、疾患特異性 (骨粗鬆症やがん転移マーカー) が高く、特異性の高い (良い抗体) 抗体が市販されているためですが、抗体特異性は重要で、この点を重視しました。そのほか、マイクロ流路などマイクロ空間での抗原抗体反応における抗体固定法としては、ビーズ法を比較検討した文章を追加しました。

また、既存技術を利用することで、そのメリットとして時間をかけずに個々の既存技術のポテンシャルを証明できたこと、逆に今後のデバイスとしての製品化には工学・医学などの分野との連携が必要なことを記載しました。

## 議論6 膵臓由来と唾液腺由来のアミラーゼ

質問 (赤松 幹之)

3.1.2. において膵臓由来のアミラーゼと唾液腺由来のアミラーゼを分離する必要性が述べられていますが、実際の臨床においては膵炎と唾液腺炎では、現れる症状が全く異なる (腫れる場所が違う) ので、診断を間違える可能性は低いと思います。それでも両者を分離する必要があるのでしょうか? もちろん、症状が出る前に検知することができるメリットはありますが、実際の患者についてみると、炎症が起きる前に検知する必要性がある人は少ないような気がしますが、いかがでしょうか?

回答 (片岡 正俊)

ご指摘のように膵炎、唾液腺炎では部位が全く違います。そのため腫脹や炎症などの臨床症状から簡単に鑑別診断は可能ですが、各々の疾患の病態を把握するためのマーカーとして血中アミラーゼを測定します。本文中にも記載しましたが、血中アミラーゼは膵臓と唾液腺由来の2種類があり、その約 40 % は膵臓由来、60 % が唾液腺由来になります。この比率は年齢、性差など個人差があることが知られています。そのため、病態の把握、治療効果の判定にはそれぞれの臓器由来アミラーゼ活性を正確に測定する必要があります。急性膵炎、慢性膵炎、膵臓癌での経過観察においても膵臓由来アミラーゼはマーカーとして利用されます。