

# 新しい抗体固定化法を用いたマイクロチップ免疫アッセイの開発

Development of Microchip Immunoassay Using a Novel Antibody Immobilization Method



マイクロ化学技研(株)  
渡慶次 学  
Manabu  
Tokeshi



マイクロ化学技研(株)  
角田正也  
Masaya  
Kakuta



新事業本部  
技術部  
宮川堅次  
Kenji  
Miyagawa

## 1. はじめに

血液に代表されるような生体内から採取した試料中には、多種多様のタンパク質が含まれており、医療診断の現場ではその中から特定のタンパク質を選択的に定量する必要がある。通常の化学分析法では、大量の夾雑物の中から目的のタンパク質のみを選択的に定量することは極めて困難で、多くの場合は酵素免疫検定法 (ELISA) に代表されるような免疫アッセイ(免疫分析法、免疫検定法ともいう)によって分析が行われている。免疫アッセイは抗体(特定の相手(抗原)とだけ一対一の反応性を持って結合するタンパク質)の持つ高い分子認識能を利用した分析法で、通常はマイクロタイプレートと呼ばれるポリマー製容器の表面に抗体あるいは抗原(測定対象物)を固定化して分析する。そのため反応の場が試料に接している容器表面に限定されてしまい、それが分析時間を長くする原因になっている。特にタンパク質は巨大分子であるため、拡散によって壁面に移動するのに長時間を要する。

筆者らは上記の問題点を解決するために、マイクロチップ内に作製された微細流路(マイクロチャネル)にポリマー製の微粒子(ビーズ)を導入し、その表面で抗原-抗体反応を行わせる、マイクロチップ免疫アッセイを構築した<sup>1), 2)</sup>。反応場の空間サイズを小さくすることで、拡散に要する時間を短縮すると同時に、ビーズを用いることで固相表面の比表面積を大きくした。これによって大幅な分析時間の短縮を実現した。この方法は、試料や試薬類をポンプやバルブ操作で順次チャネル内に導入していくことで、煩雑なピペティングなどを省略でき、人的誤差の低減と操作性の向上も同時に実現した。

今回、上記のマイクロチップ免疫アッセイをさらに発展させた新しい方法を開発したので紹介する。

## 2. 従来のビーズ充填型マイクロチップ免疫アッセイ

図1と図2に従来のビーズ充填型マイクロチップ免疫アッセイ用のマイクロチップの概略と写真を示す。マイクロチップは70mm×30mmのガラス製で、マイクロチャネルの中

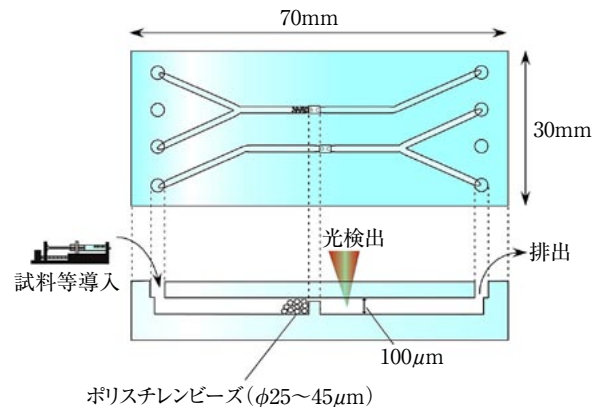
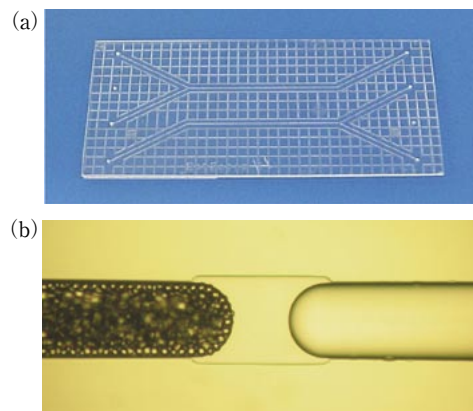


図1 ビーズ充填型マイクロチップ免疫アッセイ用のマイクロチップの概略



(a) 全体写真 (b) ビーズ堰き止め部分の拡大写真

図2 ビーズ充填型マイクロチップ免疫アッセイ用のマイクロチップの写真

中央部にビーズを堰き止めるためのダム状の構造が作製されている。図3に操作手順を示す。最初に、あらかじめ測定対象物に対する抗体を固定化したポリスチレンビーズを導入する(図3①)。続いて分析対象物(抗原)を含む血清などの試料を導入して(図3②)、一定時間ビーズと接触させて反応させた後、バッファーによって洗浄し、続いて2次抗体(酵素で標識した抗体)溶液を導入して、一定時間反応させる(図3③)。最後にバッファーで洗浄した後、基質溶液を導入

し、基質の色の変化を光検出することで測定対象物を定量する(図3④)。試料等の導入は、マイクロシリンジとマイクロチップをキャピラリー管を介して接続して、ポンプの切り替えによって簡単に制御することができるため、手作業による煩雑なピペッティング操作は不要である。また、分析終了後はバッファーを逆流させることにより容易にビーズを取り出せるので、チップ自体は洗浄後何度でも繰り返し利用できる。

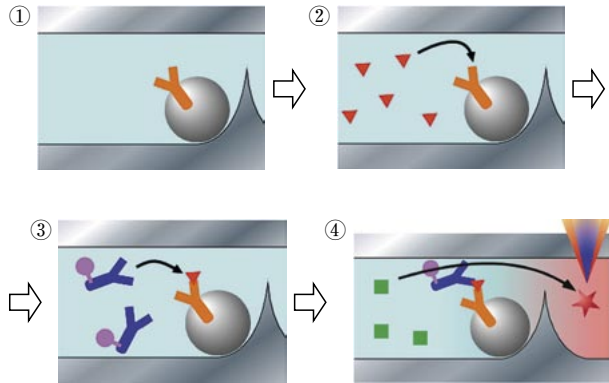


図3 ビーズ充填型マイクロチップイムノアッセイの操作手順

この方法によってこれまで測定した例を表1に示す<sup>1), 3), 4)</sup>。いずれの試料も15~30分の分析時間で測定することができており、従来数時間~1日程度要していた分析時間が大幅に短縮されている。現在は、ビーズを取り出さずに繰り返し測定できる方法<sup>5)</sup>や小型自動装置の開発(図4)<sup>6)</sup>など、実用化を目指した開発が進められている。

表1 ビーズ充填型マイクロチップイムノアッセイの測定例

測定対象	方法*	定量限界
s-IgA	サンドイッチ法	1 μg/mL
CEA	サンドイッチ法	30 pg/mL
インターフェロン-γ	サンドイッチ法	100 pg/mL
BNP	サンドイッチ法	0.1 pg/mL
AFP	サンドイッチ法	1 ng/mL
エストラジオール	競合法	1 pg/mL
メタンフェタミン	競合法	0.1 ng/mL
フェノバルビタール	競合法	0.1 ng/mL
アミカシン	競合法	10 ng/mL
トブラマイシン	競合法	10 pg/mL

分析時間：約15~30分

\*サンドイッチ法：固定化した抗体と標識抗体で対象物質を挟み込むイムノアッセイ  
競合法：抗体に対して対象物質と標識抗原を競合的に結合させるイムノアッセイ



図4 小型自動分析装置

### 3. 光硬化性樹脂を利用した新しいマイクロチップイムノアッセイ

前述したビーズ充填型マイクロチップイムノアッセイは、高性能な光検出器と組み合わせることで、迅速かつ高感度な測定が可能である。しかし、この方法は専用の送液システム(ポンプ、バルブ、試料・試薬導入用キャピラリーチューブなど)や検出システムが必要なため、病院などに設置する小型分析装置としては実現できても、妊娠検査キットのように個人レベルの検査を実現するには、簡易な取扱いと更なる小型・軽量化が必要である。

そこで今回、ポンプやバルブ、キャピラリーチューブなどが要らない新しいマイクロチップイムノアッセイを開発したので、その技術内容を紹介する。

#### 3.1 マイクロチップの作製

図5に光硬化性樹脂を利用した新しいマイクロチップイムノアッセイ用のマイクロチップの作製法を示す。1次抗体が固定化されたポリスチレンビーズ(直径:0.1~10 μm)と開発した特殊光硬化性樹脂(関西ペイント社製)の混合液をストレート型マイクロチャネルに導入する(図5①)。これにフォトマスク(あるパターンが形成されている)を通してUV光を照射することで、マスクパターンを反映した構造物がチャネル中に構築される(図5②)。最後に未反応の樹脂を洗い流すことでチップが完成する(図5③)。図6にマイクロチップ(ガラス製)と流路部の拡大写真を示す。写真のチャネルは、幅1 mm、深さ100 μmで、光硬化により作製された円柱状の構造体の直径は約400 μmである。構造体の表面および内部には、1次抗体が固定化されたビーズが大量に存在している。光硬化により作製された構造体は、チャネル中に疎らにあるが、ビーズ径がビーズ充填型の場合よりも小さいので、比表面積はほとんど変わらない(図6の場合)。また、構造体のサイズやパターンは目的に応じて自由に設定することができる。

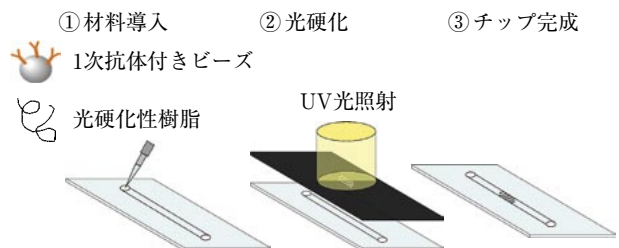


図5 光硬化性樹脂を利用したマイクロチップイムノアッセイ用のマイクロチップの作製法

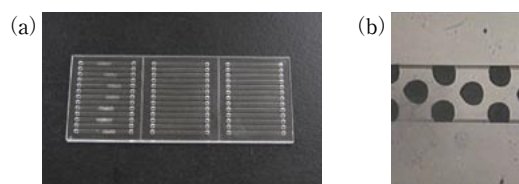


図6 光硬化性樹脂を利用したマイクロチップイムノアッセイ用のマイクロチップの写真

(a) 全体写真 (b) チャンネル部分の拡大写真

### 3.2 測定の操作手順

図7に測定の操作手順を示す。基本的には前述のビーズ充填型の場合と同じである。試料や洗浄液等は、ピペットで導入口に1滴滴下すると毛細管現象で導入できる。導入された試料・洗浄液等は、排出口からピペットで吸引することもできるが、遠心力による排出や、吸水性の材料で吸い取ることもできる。新しく開発されたこの方法は、ポンプ等の送液システムが一切要らず、非常に簡便な方法である。また、ビーズ充填型の場合は、試料の入ったマイクロシリンジとマイクロチップを接続するためにキャピラリーチューブ等を用いていたため、測定に必要な試料および試薬量は、実際の分析に必要な量の10倍以上必要であったが、本法は試料および試薬類は全て1滴で分析が可能である。

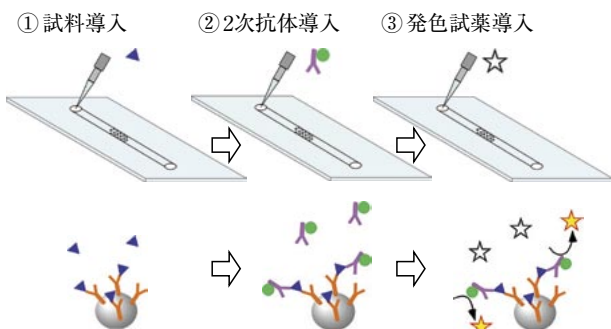


図7 光硬化性樹脂を利用したマイクロチップイムノアッセイの操作手順

### 3.3 性能評価

開発した新しいマイクロチップイムノアッセイの性能を評価するために、代表的な腫瘍マーカー（肝炎、肝臓がん）である $\alpha$ -フェトプロテイン（AFP）を用いて試験した。図8にAFPの検量線を示す。この検量線の測定点1点当たりの測定時間は、数時間を要したのに対し約10分（図7の工程に要する時間）である。短時間の測定にもかかわらず、検出下限値は1ng/mL程度を達成している。従来のビーズ充填型マイクロ

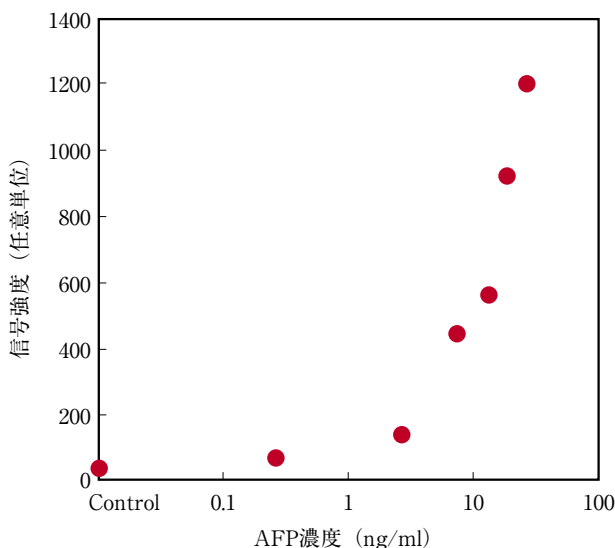


図8 AFPの検量線

チップイムノアッセイの場合のAFPの検出下限値（表1）も1ng/mLであり、感度も従来法と比較して遜色がない。むしろ分析時間は本法のほうが従来法よりも若干短くなっている。これらの結果より、今回開発した光硬化性樹脂を利用したマイクロチップイムノアッセイは、簡便性と迅速性を兼ね備えていることが確認できた。また、AFP以外にも心筋梗塞の診断に役に立つBNP（利尿ペプチド）等による分析が可能であることを確認した。

## 4. 新しいマイクロチップイムノアッセイの特長

今回開発した新しいマイクロチップイムノアッセイの特長について下記にまとめた。

### 4.1 高い反応効率

分析対象（疾病マーカーなど）を捕捉するタンパク質（抗体）を光硬化性樹脂で固定化し、微細流路内部に高密度に任意の形状で任意の場所に集積化することが可能である。抗体を高密度に集積化することで微量試料での迅速分析が実現できた。

### 4.2 目視検査

従来、検出器が必要だった低濃度領域においても、目視にて分析可能になった。

### 4.3 複数項目同時検査

微細流路内に複数の反応領域を構築することで、複数の分析対象を同時に分析可能である。

### 4.4 安定性

高い反応性を保持し、実用化に耐えうる安定性を持つことを確認している。

## 5. 今後の展開

今回開発された光硬化性樹脂を利用したマイクロチップイムノアッセイは、超微量試料を簡便かつ迅速に測定することが可能である。光硬化樹脂によって構築される構造物（1次抗体固定化ビーズを含む）は、プラスチック製のマイクロチップやガラス製キャピラリーチューブでも作製できることを確認しており、コストおよび操作性からも十分実用化できる技術である。また、複数検査項目を1本のチャンネルで検査することや、目視検査も可能である。

イムノアッセイをベースにした検査は、臨床検査のみならず、食品分析や環境分析などに用いられており、本開発技術がそれらの簡易迅速検査法として実用化することを期待している。

## 参考文献

- 1) K.Sato, M.Tokeshi, T.Odake, H.Kimura, T.Ooi, M.Nakano, T. Kitamori: *Analytical Chemistry*, **72**, 1144-1147 (2000)
- 2) 北森武彦監修: “インテグレートド・ケミストリー—マイクロ化学チップが拓く科学と技術—”, p.125-143 シーエムシー出版 (2004)
- 3) K.Sato, M.Tokeshi, H.Kimura, T.Kitamori: *Analytical Chemistry*, **73**, 1213-1218 (2001)
- 4) K.Sato, M.Yamanaka, T.Hagino, M.Tokeshi, H.Kimura, T.Kitamori: *Lab Chip*, **4**, 570-575 (2004)
- 5) M.Kakuta, H.Takahashi, S.Kazuno, K.Murayama, T.Ueno, M.Tokeshi: *Measurements Science and Technology*, **17**, 3189-3194 (2006)
- 6) 渡慶次学: *ケミカルエンジニアリング*, **51**, 40-44 (2006)