[シンポジウム：キャピラリー電気泳動と質量分析計を用いた研究の新戦略]

イムノアッセイシステムのマイクロチップへの集積化

佐藤記一*・渡慶次学*・木村博子**・北森武彦****

SUMMARY

An immunoassay system was integrated into a glass microchip. Polystyrene beads were introduced into a microchannel, and then human secretory immunoglobulin A (s-IgA) adsorbed on the bead surface was reacted with anti-s-IgA antibody-colloidal gold conjugate, and detected using a thermal lens microscope. The integration reduced the time necessary for the antigen-antibody reaction by 1/90, thus shortening the overall analysis time from 24 h to about 45 min. The scale merits of liquid microspace on the molecular behavior remarkably contributed to reduced assay time. Moreover, troublesome operations required for conventional immunosorbent assays could be replaced by simple operations. This integrated immunosorbent assay system will be useful to be put into practical use including clinical diagnosis and biochemical researches.

Key words: immunoassay, microchip, μ -TAS, thermal lens microscope.

緒 言

イムノアッセイ（免疫分析法）は目的分子の認識に抗体分子を用いた分析法であり、抗体の持つ優れた分子認識能を利用しているために極めて特異性が高いという特徴があり、生化学的分析においては必須の分析法となっている。しかし ELISA に代表される多くのイムノアッセイにおいては、個々の抗原抗体反応に通常数時間から半日に及ぶ長い反応時間が必要であるため、分析に要する時間が長くなるという欠点がある。それは通常のイムノアッセイでは反応の場が溶液と接触している固相の表面のみに限定されるため、溶液体積あたりの反応の場が少ないことや、溶液中の分子が反応の場に到達するまでに移動しなければいけない距離が長くなり、分子拡散によって系全体が平衡に達するまでに要する時間が長くなるためである。

この欠点を改善するためには、体積あたりの反応固相表面積を大きくする形で系全体を縮小することが有効であると考え、我々はマイクロチップを用い、従来の固相化イムノアッセイと同様の原理に基づく独自の集積化イムノアッ

セイシステムを構築することを試みた¹⁾。従来のイムノアッセイで反応固相として用いられているポリスチレンをビーズ状にして、ガラスマイクロチップに作製した微細流路（マイクロチャネル）内に固定し、測定試料および金コロイド標識抗体などの反応試薬を順次チャネル内に導入することによってポリスチレンビーズ上に抗原抗体複合体を固定して、その量を測定することとした（Fig. 1）。

マイクロチップ内の微小空間におけるスケールメリットを生かした一例として、マイクロチップ内での効率的な溶媒抽出があげられる²⁾。すなわちチップ内の微小空間では分子拡散が容易に短時間に起こることを利用し、水層と有機溶媒層をチップ内で接触させることのみによって機械的振盪なしに短時間のうちに溶媒抽出することに成功し、このことを利用して我々は金属イオンのキレート抽出分析に成功している。同様に分子拡散が律速となっているイムノアッセイもチップに集積化することによって同様の効果が期待できる。

これまでに報告されているマイクロチップイムノアッセイはそのほとんどがキャピラリー電気泳動法の応用であ

Integration of immunoassay system into a microchip.

* Kiichi Sato, Manabu Tokeshi; 神奈川科学技術アカデミーインテグレートドケミストリープロジェクト

** Hiroko Kimura; 順天堂大学医学部

*** Takehiko Kitamori; 東京大学大学院工学系研究科

Correspondence address: Takehiko Kitamori, Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan.

略号一覧: s-IgA, 分泌型免疫グロブリン A.

第 50 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

Fig. 1. Procedure of the integrated immunoassay.

る³⁻⁵⁾。すなわち試料溶液に蛍光標識された抗体もしくは抗体と蛍光標識された標準物質を添加して反応させ、生じた抗原抗体複合体と未反応物をチップ電気泳動で分離して試料中の分析対象物の量を求める方法であり、抗原抗体反応は多くの場合チップ外で行われている。この方法ではタンパク質などの高分子の分析では抗原抗体複合体が沈殿してしまう、低分子では複合体と未反応抗体の分離 (B/F 分離) が困難である、標識標準物質を用いた競合法では適応濃度の範囲が狭いなどといった欠点が知られており、さらに分析時間や操作の簡便化などの点でも通常のキャピラリー電気泳動法と大差なく、微小化・集積化のメリットを生かしきれていないと言える。それに対して我々が考案したシステムは従来の固相化アッセイ法をそのまま集積化しているため、より汎用性が広く、B/F 分離が容易に明確にできる点で優れていると言える。

一方、微小空間で超微量成分の分析を行うには、優れた空間分解能と高い検出感度を持った検出法が不可欠である。我々はこれまでに光熱変換分光法を利用して金コロイド標識した抗体の検出に成功しており⁶⁻⁹⁾、なかでも我々の開発した熱レンズ顕微鏡は感度だけではなく空間分解能の点でも優れており、本システムにおける検出に最適であると考えた。

そこで我々はマイクロチップ内でイムノアッセイに必要なすべての反応を行い、熱レンズ顕微鏡を用いて検出を行うシステムを作製することを目標とした。

実 験

1. ガラスマイクロチップの作製

チップの概要を Fig. 2 に示す。本システムではマイクロチップ内にビーズを止める必要があるため、チャンネル中央部に溝の深さを浅くした部分を作製した。チップは下板、チャンネル部分を加工した中板、溶液の導入排出口をあけた上板の 3 枚の石英板 (3 cm×7 cm) を貼り合わせる

Fig. 2. Layout of a microchip for immunoassay.

ことにより作製した。まず、中板の中央部浅い溝の部分を除いた深い溝の部分をレーザー加工により貫通させた。次にこれを光学接着により下板と合わせ、1150°C に加熱することにより貼り合わせた。次にできあがったものの中央部浅い溝を作製する部分に高速原子線加工 (SF₆, 5 kV, 8 時間) を行うことにより、10 μm の深さの溝を作製した。溝が完成したものに、溶液導入排出口 (直径 500 μm) をあけた上板を同様の方法で貼り合わせた。チップ内壁に試料および抗体が非特異的に吸着するのを防ぐため、0.2% カゼイン水溶液でブロッキングを行ってから使用した。

2. 試薬および試料

溶液はすべて超純水を用いて作製した 1/15 M リン酸バッファー pH 7.4 を 0.2 μm のシリンジフィルターでろ過した溶液に溶解して用いた。ポリスチレンビーズ (Duke Scientific, 直径 45.6 μm) はバッファーで洗浄後使用した。

測定対象試料として、局所免疫に関与する物質として知

られ、精神的ストレスによって分泌量が変化するとされているヒト分泌型免疫グロブリン A (s-IgA) (Cappel Lab.) を選定し、抗体としては抗ヒト s-IgA ヤギ抗血清 (Cappel Lab.) を用いた。抗体の金コロイド標識は既報^{10,11)} に準じて行った。作製した金コロイド標識抗体溶液は 525 nm に吸収最大を持ち、4°C で 1 週間保存可能であった。

3. 装置

熱レンズ顕微鏡の詳細については既報¹²⁾ に譲る。励起光としてアルゴンイオンレーザー (514.5 nm, 200 mW) を、プローブ光としてヘリウムネオンレーザー (632.8 nm, 15 mW) をそれぞれ用いた。この 2 つのレーザー光を熱レンズ顕微鏡内で同軸に合わせて対物レンズから試料に照射して透過したプローブ光の信号変化を観測し、ロックインアンプを用いて励起光に同期する信号のみを取り出して記録した。

チップへの送液はすべてマイクロシリンジポンプによって行った。またチップへの接続には溶融シリカキャピラリー管を用い、必要に応じてバルブやコネクタを用いた。

4. 分析手順

マイクロチャンネルの導入孔にポリスチレンビーズ懸濁液 0.5 μ l を滴下し、そこに溶融シリカキャピラリー管を接続してバッファを 20 μ l/ml で送液することにより、ビーズをせき止め部位に送り込んだ。この状態のまま切り替えバルブを切り替えることにより、各種反応溶液やバッファを導入し、反応および洗浄を行った。一連の反応が終了した後、バッファで洗浄したビーズ表面に抗原抗体複合体を介して吸着している金コロイドの量を熱レンズ顕微鏡で測定した。測定はチャンネル内のビーズから任意の 5 つを選択して、それぞれの頂点に顕微鏡の焦点を合わせることで行い、その平均を取った。測定終了後、逆向きに送液することによりビーズを取り出すことが可能なので、チ

ップは洗浄後何度でも再利用可能であった。

結果および考察

1. 抗原抗体反応

前述のとおり、微小空間で抗原抗体反応を行うと反応が効率よく起こり、反応時間の短縮が期待できる。そこで抗原抗体反応の時間変化について検討した。あらかじめ s-IgA 溶液 (10 μ g/ml) と室温で 1 時間、続けて 4°C で一晩反応させて試料を吸着させ、カゼイン溶液でブロッキングを行ったビーズをチップに導入した。ここに金コロイド標識抗体溶液を 2 μ l/min で送液して抗原抗体反応を行い、反応終了後バッファで洗浄して熱レンズ測定した。このときの反応時間と信号強度の関係を Fig. 3 に示す。通常の 96 穴マイクロタイタープレートで同様の反応を行った場合は反応が平衡に達するまでにおよそ 15 時間程度必要であったが、チップ内ではおよそ 10 分程度で値は一定になった。このことから、チップ内では抗原抗体反応に必要な時間は通常のスケールの場合の 90 分の一にあたる 10 分であることが明らかとなった。

マイクロタイタープレートを用いてイムノアッセイを行った場合、抗原抗体反応に長い時間が必要となるのは、反応が壁面という限られた空間でのみ起こっていることに原因がある。マイクロチャンネル内の微小空間で反応させた場合に、反応速度が向上する理由としては、集積化によって溶液の体積に対する反応の場である固相表面の面積 (比界面積) が大きくなったことと、液相空間が小さくなり、分子拡散に要する時間が大幅に短縮されたことがあげられる。すなわち直径 6.5 mm のマイクロタイタープレートのウェルに 50 μ l の溶液を加えた場合、比界面積は 13 cm^{-1} であるのに対し、ビーズの詰まったチャンネル内におけるポリスチレンビーズの比界面積はおよそ 480 cm^{-1} であり、明らかにチップ内のほうが反応の場が多く用意され

Fig. 3. Time course of antigen-antibody reaction.

(A) Conventional microtiter plate assay, (B) integrated immunoassay.

ていることがわかる。また溶液中の抗体が反応のため壁面に移動してくるのは分子拡散によっているが、チップ内では溶液内の分子が最も近くの固相表面まで移動するのに必要な距離がマイクロタイタープレートの場合と比べておよそ100分の1になっており、そのことは拡散時間が10,000分の1になることを意味している。これら2つの理由によって反応時間が大幅に短縮されたものと思われる。

2. オンチップイムノアッセイ

チップ内では抗原抗体反応に必要な時間が大幅に短縮され、わずか10分でよいことが明らかになったので、このシステムを用いてイムノアッセイによるs-IgAの定量を試みた。まずチップに新しいポリスチレンビーズを導入し、ここに試料(s-IgA)溶液を2 $\mu\text{l}/\text{min}$ で送液して20分間ビーズ表面への吸着を行った。吸着後洗浄した後、カゼイン溶液を導入して10分間ブロッキングし、再び洗浄してから金コロイド標識抗体溶液を10分間2 $\mu\text{l}/\text{min}$ で送液することにより抗原抗体反応させた。反応終了後、洗浄してから熱レンズ顕微鏡を用いて測定を行った。すべての操作に要した時間は45分程度であり、同様のアッセイをマイクロタイタープレートで行った場合には丸一日程度は必要であるため、大幅な分析時間の短縮が達成できた。

本システムによって作製した検量線をFig. 4に示す。従来法では検出できなかった1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試料についても明らかに対象とは異なる信号が得られ、感度の面でも十分に実用可能であることが明らかとなった。なお通常唾液中に分泌されるs-IgA量はおよそ200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であるため、10~100倍程度希釈しても十分に測定可能であることがわかった。

Fig. 4. Calibration curves of human secretory immunoglobulin A.

Solid circle: the microchip assay (left scale), open square: the conventional assay (right scale).

前述した反応時間の短縮と高感度化のほかにも、マイクロチップのシステムに集積化することにより、いくつかの点で改善が見られた。まず、操作性の向上があげられる。従来法ではマイクロタイタープレートにマイクロピペットを用いて何回も溶液を添加しては溶液を捨てるといった煩雑な操作が必要であり、この操作の正確さが結果に大きく寄与していたが、チップシステムでは溶液の添加はすべてマイクロシリンジポンプと切り替えバルブで行えるため、操作性は大きく向上していると言える。さらに将来の機械化も容易であると考えられる。そのほかサイズが小さくなったことにより、必要とする試料および高価な抗体試薬の量を大幅に低減できるほか、廃棄物量や必要なエネルギー量も同時に少なくすることが可能であった。

結 論

現在我々は、分析対象物の捕捉にも抗体を用いたサンドイッチ法や、同時に複数の試料の測定が行えるマルチチャンネル型のチップを用いたイムノアッセイに取り組んでおり、血清中の腫瘍マーカーの定量による癌の診断など、実用化のための研究を続けている。サンドイッチ法を用いることにより、これまでに血清中の腫瘍マーカーCEAの定量に成功しており、従来法では数時間から1日程度必要であった検定をわずか40分程度で終わることができた上、検出感度も従来法に比べ1桁以上改善されている。

さまざまな長所を持った集積化イムノアッセイ法は今後医療診断の分野ではもちろん、生化学研究の分野でも幅広く利用されることが期待される。

文 献

- 1) Sato K, Tokeshi M, Odake T, Kimura H, Ooi T, Nakao M, Kitamori T. Integration of an immunosorbent assay system: Analysis of secretory human immunoglobulin A on polystyrene beads in a microchip. *Anal Chem* 2000; 72: 1144-7.
- 2) Tokeshi M, Minagawa T, Kitamori T. Integration of a microextraction system on a glass chip: Ion-pair solvent extraction of Fe(II) with 4,7-diphenyl-1, 10-phenanthrolinedisulfonic acid and tri-n-octylmethylammonium chloride. *Anal Chem* 2000; 72: 1711-4.
- 3) Koutny LB, Schmalzing D, Taylor TA, Fuchs M. Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal Chem* 1996; 68: 18-22.
- 4) von Heeren F, Verpoorte E, Manz A, Thormann W. Micellar electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure. *Anal Chem* 1996; 68: 2044-53.
- 5) Chiem N, Harrison DJ. Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays: Analysis of monoclonal antibodies and theophylline. *Anal Chem* 1997; 69: 373-8.

- 6) Matsuzawa S, Kimura H, Tu CY, Kitamori T, Sawada T. Quantitation of IgE and carcinoembryonic antigen (CEA) by optical beam deflection (OBD) measurement of dot-immunobinding assay patterns visualized by an ELISA technique. *J Immunol Methods* 1993; 161: 59-65.
- 7) Tu CY, Kitamori T, Sawada T, Kimura H, Matsuzawa S. Ultrasensitive heterogeneous immunoassay using photothermal deflection spectroscopy. *Anal Chem* 1993; 65: 3631-5.
- 8) Kimura H, Matsuzawa S, Tu CY, Kitamori T, Sawada T. Ultrasensitive heterogeneous immunoassay using photothermal deflection spectroscopy. 2. Quantitation of ultratrace carcinoembryonic antigen in human sera. *Anal Chem* 1996; 68: 3063-7.
- 9) Kimura H, Mukaida M, Kitamori T, Sawada T. Quantitation of drug concentration by photothermal microscopy in a renal tubule of fixed kidney. *Anal Sci* 1997; 13: 729-34.
- 10) Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys Sci* 1973; 241: 20-2.
- 11) Chakraborty UR, Black N, Brooks HG, Jr., Campbell C, Gluck K, Harmon F, Hollenbeck L, Lawler S, Levison S, Mochnal D, O' Leary P, Puzio ED, Tien W, Venturini A. An immunogold assay system for the detection of antigen or antibody. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990; 48: 403-8.
- 12) 北森武彦. 熱レンズ顕微鏡. *ぶんせき* 1998; 847-53.

要 旨

イムノアッセイシステムをガラスマイクロチップ内に集積化した。チップの微細流路内に導入したポリスチレンビーズ表面に分泌型免疫グロブリン A を吸着させ、金コロイド標識した抗体を反応させた後、生じた複合体量を熱レンズ顕微鏡で測定した。集積化により反応が従来法の 90 分の 1 の時間で終了したため、合計の分析時間が 24 時間から 45 分程度へと短縮できた。微小空間のスケールメリットによって反応が効率よく起こり、時間の短縮につながったものと思われる。さらに従来法で必要であった煩雑な操作が簡便な操作に置き換えられ、操作性も向上した。作製した集積化イムノアッセイシステムは医療診断や生化学研究において有効な分析手法であると思われる。