

「臨床分析のダウンサイズ化・集積化」

大庭 義史

医療技術の進歩に伴い臨床分析の検査項目は増加し、対象となる試料も血液、尿、胃液、胆汁、腓液、関節液、脳脊髄液、水疱液、羊水等の体液、肝臓、腎臓、筋肉等の組織、赤血球、白血球、血小板、線維芽細胞等の細胞、結石など多岐にわたっている。また最近は、遺伝子も対象となってきている。遺伝子診断は、疾病の診断としての利用に加えて、薬剤の効果や副作用を事前に判定し、患者個人の病状に合わせた最適な薬剤投与などの治療を行う「テーラーメイド医療」のための情報を提供できる可能性があり、今後測定対象となる遺伝子の増加が予想される。このような検査の多項目化は、医療現場における「3時間待ちの3分間医療」と呼ばれる状況の一因となっている。従って、多様化する測定対象・項目に対して、試料採取から解析までの時間の短縮化、患者から採取できる試料量には限界があることから、検査に必要な試料の微量化、測定の高感度化及び検査の低コスト化が、今後の臨床分析において強く求められている。

近年、Micro-Total Analysis System (μ -TAS : マイクロ総合分析システム) あるいは Lab-on-a-chip (チップ上の実験室) と呼ばれる研究領域に関心が集まっている。これはコンピュータの半導体製造技術を発展させた Micro Electro Mechanical System (MEMS : 微小電気機械システム) 技術を用い、数センチ角のガラス、シリコン、プラスチックなどの基板表面上に、数十〜数百ナノメートルの微小な流路や試料や試薬などのリザーバーを形成し、その基板 (マイクロチップ) 上で化学反応や分析を行うシステムである (図1)。マイクロチップ内部の微小空間での物理的・化学的特性は、従来のフラスコや試験管中での化学反応とは異なる。

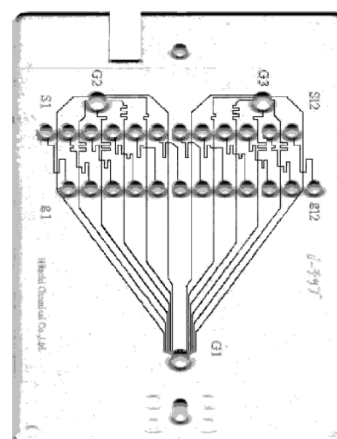


図1 12サンプルを同時測定可能なマイクロチップ

(プラスチック製。外形寸法：縦 92 mm、横 66 mm、厚さ、1.4 mm、溝形状：幅 100 μ m、深さ 30 μ m。溝を可視化するため黒線で描画している。)

日立化成テクニカルレポート No. 40 (2003-1).

り、極微量で高速かつ効率よく化学反応や分析を行うことが可能である。

ここでは、マイクロチップの作製法、特長及び実試料分析への適用例を紹介する。

(1) マイクロチップの歴史

半導体微細加工技術を用いた基板上への化学分析システムの構築は、1979年 S.C.Terry らが、ガスクロマトグラフィーのキャピラリーカラム、インジェクター及び検出器を直径 75 mm のシリコンウエハー上に作製したものが最初である。その後、フローインジェクション (FIA)、高速液体クロマトグラフィーなどのシリコンやガラス基板上への集積化が行われている。μ-TAS の分野で最も実用化の進んでいるマイクロチップ電気泳動については、1993 年に A.Manz らにより、サンプル・緩衝液の導入口、分離カラム及び検出セルをガラス基板上に集積化したものが報告されて以降、精力的に開発・研究が進められており、現在はマイクロチップ電気泳動装置も市販されるに至っている。

(2) マイクロチップの作製法

マイクロチップは、チップのデザイン、流路の作製、流路を形成したプレートにカバープレートを貼り合わせる工程で作製される。流路の作製法を、ガラス製マイクロチップの作製を例に紹介する (図 2)。

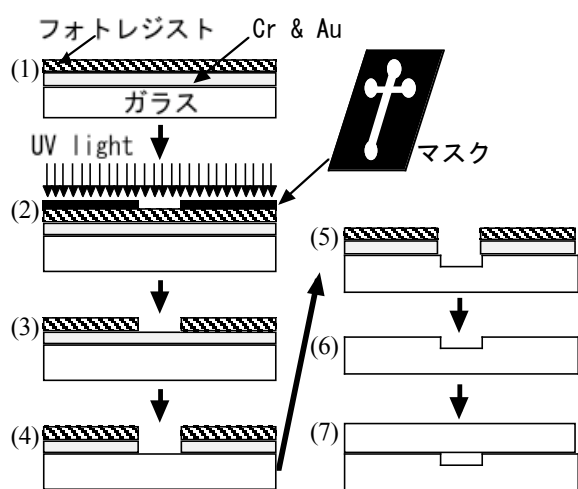


図 2 ガラス製マイクロチップ作製手順

ガラス表面をクロムと金の合金によりマスクし、フォトリソ (感光性樹脂) でコーティングする(1)。流路がデザインされたフォトマスクを、フォトリソがコーティングされたガラス基板に密着させ、マスク上から紫外光を照射する(2)。光が当たった部分のフォトリソを可溶化し、合金部分を露出させる(3)。露出した合金を王水 (硝酸+塩酸) で溶かし(4)、ガラス基板上にフッ

化水素で流路を作成する(5)。フォトレジスト層及び合金層を除き(6)、カバープレートを接合する(7)。

シリコン製、石英製マイクロチップについても、ガラス製マイクロチップとほぼ同様の過程で作製することができる。しかしながらこの方法は、作製に時間がかかり高価である。簡便かつ安価なマイクロチップ作製法としてプラスチックを基材とする作製法が考案されている。流路パターンを鋳型をプラスチックプレートに押しつけて鋳造する方法で、安価で再現性のよいマイクロチップの量産が可能である。

(3) 分析手順

最も実用化の進んでいるマイクロチップ電気泳動における分析手順を、図3に示す。リザーバーIに一定量の分析試料を導入する。リザーバーIとIIの間に電位差を与えリザーバーI内の試料をリザーバーIIへ移動させ、試料を十字路部分に満たす。リザーバーIIIとIVの間に電位差を与え、十字路内の分析試料をリザーバーIVに向かって移動させる。試料は、分離部に充填したゲル内でサイズの違いにより分離される。検出は、リザーバーIVの手前に設置した検出窓で行う。分離部全体をリアルタイムで検出可能な機種もある。

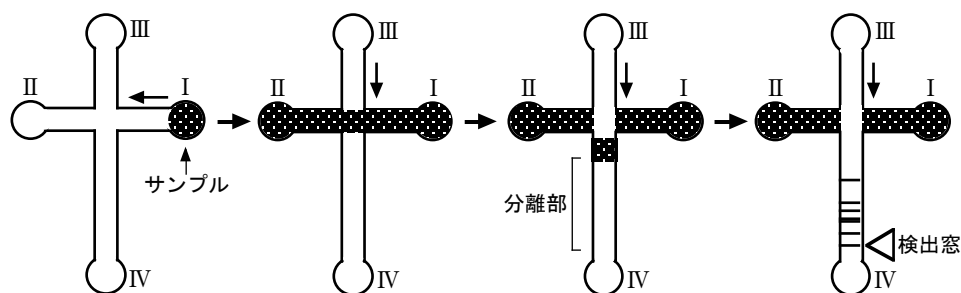


図3 マイクロチップ電気泳動の原理

マイクロチップ電気泳動では、流路に高電圧を印可することにより生じる電気浸透流を駆動力として用いているのでポンプは不要である。一方、マイクロFIAチップなどでは、一般に試料及び試薬の送液は外付けのポンプにより行われる。チップに比べポンプのサイズが大きいため、現在、小型で微量を安定かつ高精度に送液可能な送液系の開発が進められている。

(4) マイクロチップの特徴

マイクロチップ化により以下のようなメリットがある。

- ・ 試料・試薬量の低減 微量の試料及び試薬でよいため、測定コストが低減する。高価な試薬や貴重な試料を用いる研究に適する。廃棄物・廃液量も低減し、環境にやさしい。
- ・ 測定時間の短縮 マイクロチップ電気泳動においては、他の電気泳動法と比べ放熱特性が優れる。このため電界を強くすることができるため、高速分離が可能である。
- ・ 反応効率の上昇 微細流路中では物質の拡散による反応、分子間の相互作用が顕著となり、極めて効率の高い反応が期待できる。
- ・ 装置の小型化・軽量化 持ち運びが可能となり、オンサイト分析（現場分析）に有用である。実験スペースが狭くてよい。
- ・ 反応や分析の並列化・自動化 基板上の流路を自由にデザインできる。マルチ流路化により前処理ー反応ー検出までの複雑な工程の集積化、分析システムの並列化することで、多試料の同時あるいは連続分析が可能となる。分析の自動化により、人為的な誤差が排除できるため再現性が向上する。

マイクロチップの応用として、細菌の検出及び肝機能診断への適用例を紹介する。

マイコプラズマ菌検出システム（(株) 日立ハイテクノロジーズ）

マイコプラズマ肺炎は、マイコプラズマ・ニューモニア (*Mycoplasma pneumoniae*) を病原菌とし、激しく乾いた咳、発熱、全身倦怠感を症状とする。主として患者の咳による飛沫感染で、1歳までに40%、5歳までに65%、成人までには約97%が感染を受ける (WB Saunders, Textbook of Pediatric infectious, 1998)。

診断は、咳や熱などの臨床症状に加え、胸部 X 線、マイコプラズマ菌に対する血清抗体価の測定により行われる。培養検査は最も確実な確定診断となるが、マイコプラズマ菌の培養には専用培地で一週間程度の期間を必要とするため、ほとんど行われていないのが現状である。

培養検査に代わる迅速診断法として、PCR 法 (Polymerase Chain Reaction: ぽ

リメラーゼ連鎖反応) を用いてマイコプラズマ菌の特定の遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動により分離・検出する方法が報告されている。この分離・検出をマイクロチップ電気泳動装置 (日立コスモアイ SV1210 + i-チップ(図1)) で行った。

検出までの手順は以下の通りである。被検液を培地中に絞り出し (5 分)、遠心 (5,000 rpm x 5 分) し上清に Lysis 液 (溶菌液) を加える (60°C, 20 分、94°C, 5 分)。PCR によりマイコプラズマの特定の DNA 断片を増幅し (70 分)、マイクロチップ電気泳動で分析する。図4に解析結果を示す。PCR により増幅されたマイコプラズマ菌の DNA 断片 225 bp が検出されている。検査材料の処理から解析結果を得るまでの時間は約 2 時間であった。アガロースゲル電気泳動での解析までの時間は約 2.5 時間であるが、マイクロチップ電気泳動法ではゲル作製、染色や写真撮影といった手間を必要としないため、極めて簡便かつ迅速な診断・菌の同定が可能である。

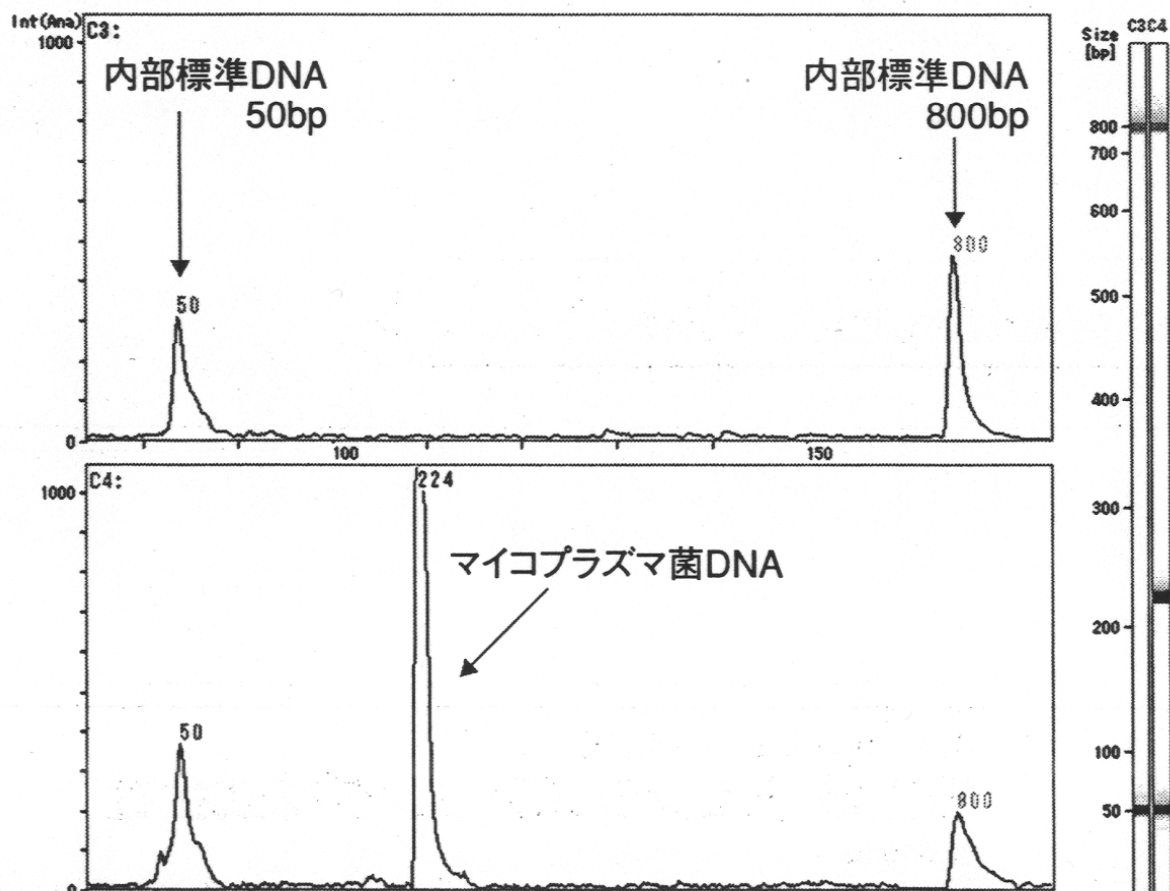


図4 マイクロチップ電気泳動装置による解析

(日立肺炎マイコプラズマ菌検出システム HITACHI information #10)

肝機能チップ（独立行政法人 物質・材料検査機構、ローム（株））

肝臓は、栄養素の処理、貯蔵、分解、排泄、胆汁の産生による栄養素の消化吸収、各種抱合による解毒、血液の凝固など、その機能は多方面に及び重要な役割を果たしている。また肝臓は「沈黙の臓器」とも呼ばれ、病気になっても重症化するまで自覚症状が現れにくい。このため定期的な肝機能検査は肝疾患の診断に極めて重要である。現在、肝機能検査は主に自動分析装置により行われているが、検査結果がわかるまでに数時間～数週間が必要である。また注射器での採血は有資格者でなければ行うことができないため、日常的な検査目的には用いにくい。

このような背景から、手軽な肝機能診断を可能とするチップ（図5）が開発された。採血は、長さ0.5 mmほどのシリコン針のついた2 cm角のチップ（A）をセットした採血用治具（B）を皮膚に押しつけて行う。皮膚の毛細血管からにじみ出る極微量の血液を、針と針の間にある穴（0.1 mm）から採取する（A）。採取した血液をPET（ポリエチレンテレフタレート）チップ内で遠心分離し、血球と測定に用いる血漿に分ける。肝機能検査チップ（c）で血漿と試薬をマ

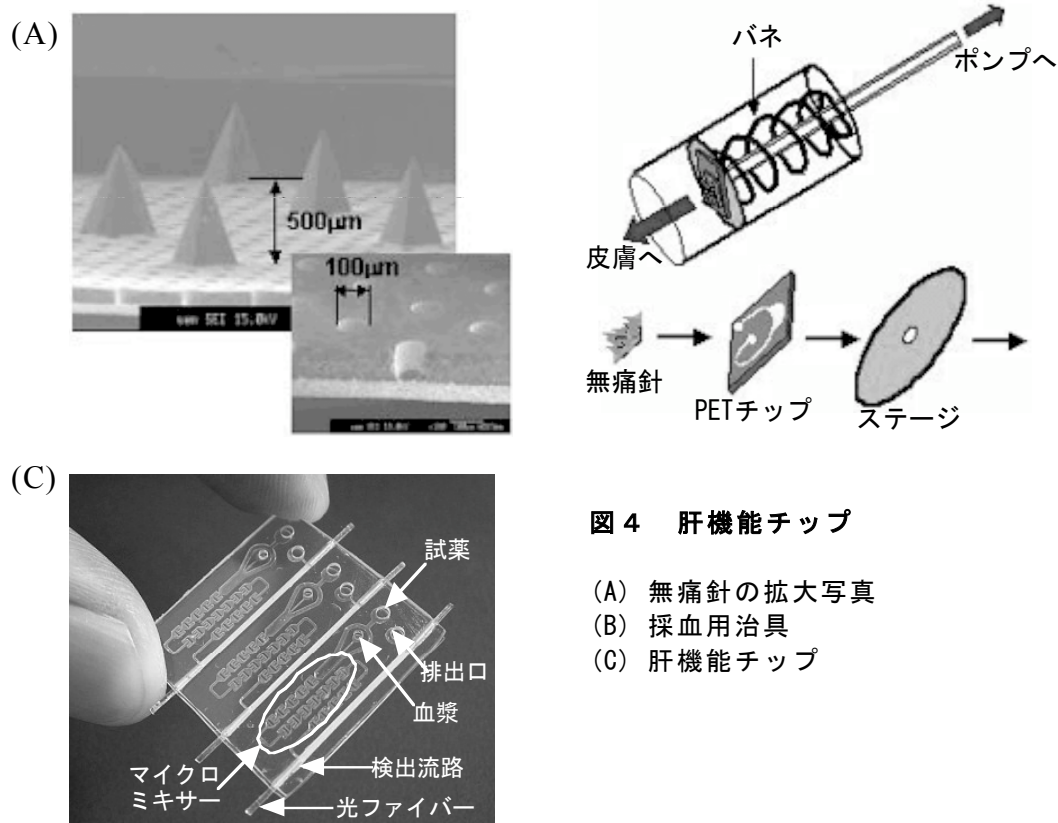


図4 肝機能チップ

- (A) 無痛針の拡大写真
- (B) 採血用治具
- (C) 肝機能チップ

イクロミキサーで混合し、比色法により血漿中の酵素活性を検出する。

無痛針の使用でほとんど痛みを感じることなく採血でき、また検査に必要な血漿は約 0.1 μl で、従来法の 1/50～1/100 程度であった。検査に必要な試薬も微量でよく低コストである。検査時間は 5 分程度であり従来法と比べ大幅に短縮された。チップの基板材料にはシリコン及びプラスチックを用いているため、安価で使い捨て可能である。 γ -GTP、GOT、GPT などの肝機能検査に加え、グルコース、尿酸の測定がチップ化できることを確認している。

現在、腎機能検査、循環器検査などのチップ化及び多項目の同時診断が可能なチップの開発が進められており、問診中の検査や在宅検査による日常的な健康管理や病気の早期発見に有用な装置としての利用が期待される。

まとめ

従来の分析システムをマイクロチップ化することにより、試料及び試薬量の微量化、測定の迅速化・高感度化、装置の小型化・軽量化が達成できる。臨床分析においては、多検体の短時間分析が可能となり、検体採取から結果報告までの時間が大幅に短縮される。微量試料でも検査ができるので、検体採取の際の患者への負担が少ない。検査コストも低く、現在我が国で問題となっている少子化・高齢化に伴う医療費の高騰を抑えるという点においても有用である。装置の小型化・軽量化による携帯性の高さは、臨床分析における POC (Point-of-care: 患者のそばで行う検査) 検査に威力を発揮し、問診時、ベッドサイドあるいは在宅での即時検査による適正な治療を実現する。

今後、更なるチップ及び周辺機器のダウンサイズ化、複数の分析システムを組み込んだチップ、前処理～検出までが完全に統合したチップ、一つの細胞から取り出した生体物質を増殖し分析するチップなどの開発が進展していくものと思われ、本分野の発展が期待される。

参考文献・ホームページ：

「特集 バイオチップの研究・開発・応用の最新動向」OHM、10月号(2003)。

「特集 マイクロチップを用いる分析化学」ぶんせき、5月号, 227, (2002)。

「マイクロチップ電気泳動:装置の作成、特徴、応用」、*Chromatography*, Vol. 22(2), 69 (2001).

(株) 日立ハイテクノロジーズ「マイクロチップ電気泳動システム」

URL: <http://www.hitachi-hitec.com/science/bio/cos1210.html>

ローム(株)「肝機能診断チップ」URL: <http://www.rohm.co.jp/news/biochip-j.html>