

〈特集：新しいテクノロジー・イムノアッセイ〉

マイクロフリュイディスク技術を用いた 全自動免疫蛍光測定装置ミュータスワコーi30

横山 和則¹⁾、黒澤 竜雄¹⁾、渡辺 光雄²⁾

Development of a fully-automated microfluidic immunoassay system " μ TAS Wako i30" Utilizing disposable microchips

Kazunori Yokoyama¹⁾, Tatsuo Kurosawa¹⁾ and Mitsuo Watanabe²⁾

Summary Applications of the micro Total Analysis System (μ TAS) have been evolving over the last 20 years, including in the field of clinical diagnostics, in expectation of totally miniaturized system providing a reduction of reagent/sample consumption, a shortening of reaction time, and other microfluidics benefits. We have developed such a fully automated immunoassay system by employing the LBA-EATA method which utilizes isotachopheresis (ITP) followed by capillary gel electrophoresis (CGE) in microfluidic channels, allowing sandwich immuno-complex formation and detection of the complex by Laser-Induced Fluorescence (LIF). By incorporating *L. culinaris* agglutinin (LCA) lectin in the CGE buffer, the LCA reactive isoform of AFP (AFP-L3), which is specifically produced by hepatocellular carcinoma (HCC) cells, can be separated from non-LCA reactive AFP-L1 and measured. AFP-L3% can be calculated as a ratio of AFP-L3 / total AFP (AFP-L1+AFP-L3) concentrations. The resulting AFP-L3% assay exhibited effective assay performance, including high detection sensitivity, high within-run reproducibility and low instrument-to-instrument variation.

Key words: Micro Total Analysis System (μ TAS), AFP-L3, Immunoassay

I. 緒言

近年、分析に必要な混合・攪拌・洗浄・分離・検出等の操作を数cmほどのチップ上で行う

μ TAS (micro Total Analysis System) 技術が開発され、DNAやRNAをはじめ蛋白質を分離・分析するシステムが研究されている。この技術は、サンプルや試薬の微量化、反応時間の短

¹⁾和光純薬工業株式会社 臨床検査薬事業部 開発本部 臨床検査薬研究所

〒661-0963 兵庫県尼崎市高田町6番1号

²⁾和光純薬工業株式会社 臨床検査薬事業部 臨床検査薬開発部

〒540-8605 大阪府中央区道修町3丁目1番2号

¹⁾Diagnostics Research Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

6-1 Takada-cho, Amagasaki, Hyogo 661-0963, Japan

²⁾New Diagnostic Business & Technology Development Department, Diagnostic Division,

1-2 Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan

縮、装置の小型化が目論めることから、各分野に応用が期待されている^{1)~3)}。

一方、臨床検査の分野においては、来院される患者様の利便性を考え、来院当日に検査結果を報告すること、ドクターの治療方法判断を早めるために診療前検査・緊急検査が望まれている。そこで、POCTや迅速検査の必要性が増し、ベッドサイド等で測定できる小型装置の開発が進んでいる。

免疫測定方法は、これまでサンドイッチイムノアッセイを基本として、一般に測定対象物質に特異的に結合する物質（抗体、抗原等）をビーズ等の粒子に固相化し、測定物質を固相で採取した後に、測定対象物に結合する物質に酵素、蛍光等を標識した物質をさらに反応させ、標識物質のシグナルを検出する固相法が主流となっている。固相法の利点は感度が高いこと、自動化が容易であったことから、現在最も汎用的な測定方法として知られている。しかしながら、B/F分離のための洗浄ステップが必要で煩雑な操作が多いため、固相と液相の不連続な界面での反応であることから、反応時間を要する、検量線が一次式にならないので、複雑な解析プログラムが必要である等の問題点があった（図1）。また、固相への非特異吸着に起因する問題（偽陽性など）等もあることが知られている。これまで我々は、Liquid-phase Binding Assay (LBA法) という抗原抗体反応を液相系で行い、免疫反応物をイオン交換カラムで分離する方法を開発し、自動分析装置LiBASysを商品化した。更なる性

能の向上を目指して、イオン交換カラムではなく液相中で免疫反応物を分離するために、マイクロチップ上でのCapillary Gel Electrophoresis (CGE) に注目した。

マイクロチップを用いた免疫反応法は、現在まで多数報告されているが、腫瘍マーカーのような高感度測定を実現したシステムはなかった⁴⁾。最近、我々はDNAで標識した抗体（DNA抗体）を流路内で等速電気泳動（Isotachopheresis : ITP）し、DNA抗体と抗原および蛍光標識抗体を反応させ、複合体を流路内で移動させながら濃縮とB/F分離を行い、その後のCGEで免疫複合体を分離してレーザー誘起蛍光法（Laser-Induced Fluorescence : LIF）で測定する方法（LBA-EATA法 : Liquid-phase Binding Assay and Electokinetic Analyte Transport Assay）を構築した⁵⁾。我々は、この測定法を原理とした全自動蛍光免疫測定装置ミュータスワコーi30を開発した⁶⁾。本システムは、卓上型のランダムアクセス可能な小型免疫測定装置であり、測定時間9分という迅速測定を可能とした。本稿では、本システムと本システム用に開発したミュータスワコーAFP-L3の測定性能について報告する。

II. 方法と材料

1. ミュータスワコー i30

ミュータスワコーi30は、本体520mm (W) × 595mm (D) × 546mm (H) のコンパクトサイズで、検体の分注から電気泳動、測定値の算出

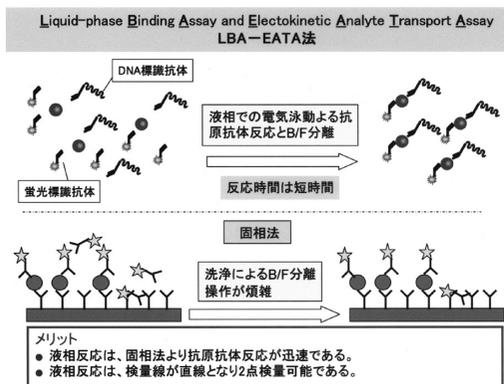


図1 液相法と固相法の比較



図2 ミュータスワコーi30

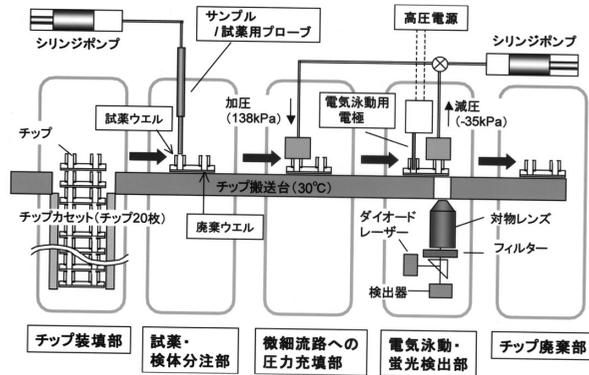


図3 装置概要図⁸⁾

キャピラリーゲル電気泳動でのAFP-L1とAFP-L3の分画

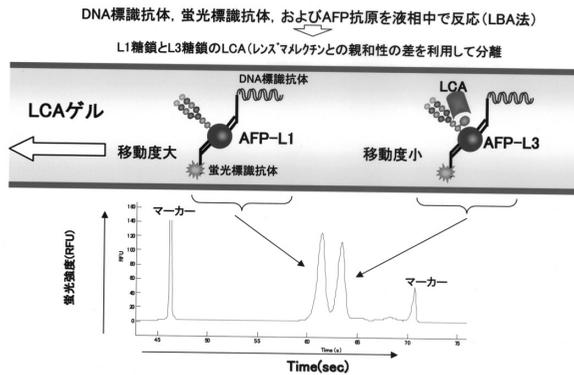


図4 電気泳動像

までを全自動で行う (図2)。

本装置では、各測定工程を①チップ装填部、②試薬・検体分注部、③微細流路への試薬の圧力充填部、④電気泳動・LIF検出部、⑤チップ廃棄部に分けてライン状に最適配置している (図3)。マイクロチップは、チップ20個入りのカセットからチップ搬送台に自動的に供給される。チップ搬送台は30°Cに温度設定されており、密着させたチップ内の微細流路内温度を30°Cに保持している。装置には、チップ20枚入りカセットを4個、最大80枚のチップが設置できる。試薬・検体の分注は、1本のプローブで行う。そこで、プローブによるキャリアオーバーを防ぐために、アルカリ性の洗浄液と精製水によるプローブ洗浄を行っている。圧力充填部では、試薬/検体ウエルに圧力を加え、ウエル内の試薬と抗原+蛍光標識抗体を微細流路に充填する。

電気泳動直前には、廃液ウエルを陰圧にして、チップ流路内に分注した各試薬と検体が各々接している界面を整える。電気泳動用電極は、3本のピン形状で試薬ウエル内の電気泳動用試薬に接するよう挿入される。電気泳動では、ITP時2k~4kV、CGE時1k~1.5kVの高電圧をかける。ITPによる微細流路内の電気伝導度分布の変化を連続的にモニターし、一定のシグナルが得られた時点で自動的にITPからCGEの切替えを行う⁷⁾。光学系は、微細流路の終端で蛍光を測定できるように配置されている。CGE時にレーザー照射し、電気泳動により流路内を通過する蛍光を連続的に検出する。また、CGE流路のバッファー中にLCA (レンズマメレクチン) を添加することにより、親和性電気泳動を行うことができ、肝細胞癌マーカーであるAFP-L3を測定することができる (図4)。さらに、試薬には免

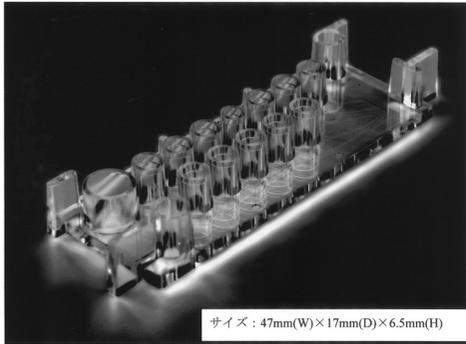


図5A マイクロチップ

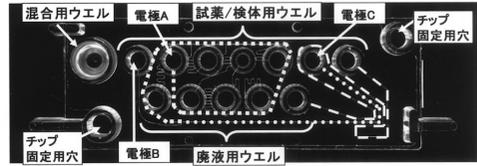


図5B マイクロチップのウエルと流路の説明
 ■■は、ITPゾーン。このゾーンには、陰極の泳動緩衝液、DNA標識抗体、混合液等の泳動緩衝液が分注される。●●は、CEゾーンで陽極の泳動緩衝液（または、LCA添加泳動緩衝液）が分注される。――は、Focus用の蛍光試液が分注される。



図6 試薬ボトルとキャリブレーター・コントロール

疫複合体ピークを同定するために免疫複合体ピーク（AFP-L1とAFP-L3）の前後に泳動される内部標準ピーク（マーカー）を添加している。

ピーク解析では、得られた電気泳動像から、はじめに内部標準ピークを同定し、その結果からターゲットとする免疫複合体の検出位置を補正したのち、免疫複合体ピークの同定を行う。内部標準を使用したピーク同定方法により、電気泳動に若干のズレが発生した場合でもピークの同定が可能となり測定の実験性に貢献している。次に、免疫複合体ピークの面積を算出し、予め測定したキャリブレーターのピーク面積から検体の測定値を算出する。

2. マイクロチップ

マイクロチップ（図5A）は、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）樹脂を射出成型で微細流路付き基板にし、その流路面をフィルムで封止して作製した。本チップは、1測定/チップのディスプレイサブルチップである。チップには、7つの試薬/検体用ウエル、5つの廃液用ウエル、1つの試薬/検体混合用ウエルがあり、光学位置

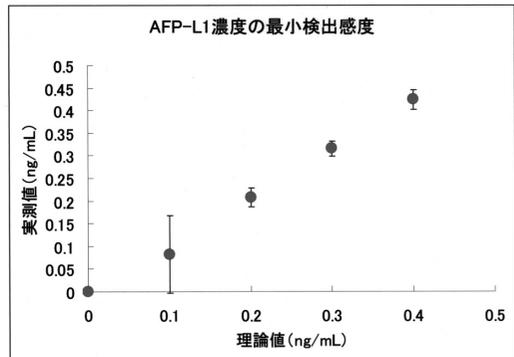


図7 最小検出感度
 0.2ng/mLと0.3ng/mLが重ならないことから最小検出感度を0.3ng/mLとした。

調整用と測定用の2系統の微細流路が配置されている（図5B）。試薬/検体用ウエルと廃液用ウエルは微細流路で接続され、試薬/検体用ウエル側を加圧して流路内を試薬/検体で満たす。オーバーフローした試薬は廃液用ウエルにたまる構造となっている。微細流路のデザインは、試薬

や検体を正確に圧力導入できるように最適化されている。精密射出成型技術によりチップ間の寸法差も最小となるようにコントロールされており、良好な測定再現性に寄与している。

3. ミュータスワコー測定試薬

試薬は、7種の電気泳動用試薬を一体型試薬ボトルに100回分充填・密封している。ボトル側面のRF-ICタグには、項目情報や分析条件はもとより開封日時や使用回数を記録し個々の試薬の管理に使用している。キャリブレーター・コントロールも用意している（図6）。

4. 検体

① キャリブレーターには、ミュータスワコーAFP-L3用キャリブレーターセットを用いた。

② 最小検出感度評価用の検体は、リン酸緩衝液をベースに一定濃度（0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ng/mL）のAFP-L1を添加して作製した。

③ 試薬の再現性評価用の検体は、プール血清を用いた。

④ 装置間差は、4台で確認した。検体には、ミュータスワコーAFP-L3用コントロールL、コントロールHを用いた。

Ⅲ. 結果

1. 0.3 ng/mLの±2 SDのエラーバーからもわかるように、AFP濃度低値でも非常に再現性良く測定でき、また、0.2 ng/mL、0.3 ng/mLのエラーバーがともに重ならないことから、0.3 ng/mLを最小検出感度とした（図7）。

2. 試薬の再現性は、総AFP濃度2-924.5 ng/mLの間で、再現性0.5-5.0%と良好であった。L3%についても、L3%9-80%の間で再現性が0.3-2.7%と良好であった（表1A）。

表1A 再現性

	検体I		検体II		検体III		検体IV		検体V	
	AFP (ng/mL)	AFP-L3 (%)								
1	2.1	19.6	9.2	121.0	49.9	380.3	76.0	920.4	48.4	
2	2.0	20.2	9.4	123.4	49.9	383.9	75.4	925.6	48.2	
3	2.1	19.8	9.9	119.4	50.2	376.7	75.4	919.0	48.4	
4	1.9	19.9	9.5	122.5	50.6	378.7	76.0	930.1	48.5	
5	1.9	20.1	9.4	123.5	51.3	375.3	75.6	927.3	48.6	
平均	2	19.92	9.48	121.96	50.38	378.98	75.68	924.48	48.42	
再現性 (CV)	5.0%	1.2%	2.7%	1.4%	1.2%	0.9%	0.4%	0.5%	0.3%	

表1B 装置間差

	装置1		装置2		装置3		装置4	
	AFP (ng/mL)	AFP-L3 (%)						
1	47.9	31.4%	50.5	30.8%	51.5	30.6%	50.0	30.3%
2	48.6	31.3%	50.3	30.3%	51.2	30.5%	50.3	30.2%
3	48.9	31.1%	50.7	30.9%	50.4	29.9%	50.5	30.1%
平均	48.5	31.3%	50.5	30.7%	51.0	30.3%	50.3	30.2%
再現性 (CV)	1.1%	0.6%	0.4%	1.0%	1.1%	1.3%	0.5%	0.3%

	装置1		装置2		装置3		装置4	
	AFP (ng/mL)	AFP-L3 (%)						
1	198.5	21.7%	208.3	22.1%	208.4	22.1%	197.8	21.0%
2	201.3	22.0%	208.7	22.0%	205.8	22.0%	199.0	21.0%
3	198.8	22.1%	208.2	22.1%	210.2	21.8%	195.7	21.2%
平均	199.5	21.9%	208.4	22.1%	208.1	22.0%	197.5	21.1%
再現性 (CV)	0.8%	0.9%	0.1%	0.5%	1.1%	0.9%	0.8%	0.5%

検体は、コントロールを使用した。

装置間差	コントロールL		コントロールH	
	AFP (ng/mL)	AFP-L3 (%)	AFP (ng/mL)	AFP-L3 (%)
mean	50.1	30.6%	203.4	21.8%
SD	1.1	0.005	5.3	0.004
CV	2.1%	1.6%	2.6%	2.0%
max	51.5	31.4%	210.2	22.5%
min	47.9	29.9%	195.7	21.0%
range	3.6	1.5%	14.5	1.5%

3. 装置間差は、CV 2 %程度で、試薬再現性の範囲内であり、問題ないと考えた (表 1 B)。

IV. 考 察

今回、開発した装置では、マイクロチップのセットをはじめ、試薬・サンプルの分注、微細流路への試薬の導入、ITPとCGEの電気泳動、測光、波形解析、測定値算出までを全自動化した。これまでの μ TAS技術では、サンプルや試薬の微量化、反応時間の短縮、装置の小型化が目論める反面、微細流路内での測定に供されるサンプル量自体が極微量であるため、腫瘍マーカーのように高感度測定が必要とされる分野で実用化された例は無かった。我々は今回、 μ TAS技術に独自のLBA-EATA法を組み合わせることで、標識抗体と抗原との免疫複合体を高度に濃縮させながら反応させ、再現性よく分離分析する技術を確認した。これによりAFPとAFP-L3%の測定感度、再現性ともに非常に良好なシステムを実現した。また、免疫複合体の形成反応とB/F分離を液相中で同時に進行させるため、従来の固相法で必要であった洗浄ステップを省くことを可能とし、測定時間は約9分、サンプル処理能力は約25サンプル/時間の迅速測定を可能とした。洗浄ステップが不要となったことで、装置構造を簡略化でき、装置サイズを卓上型に抑えることに大きく寄与できたと考えている。現在、AFPとAFP-L3%の同時測定以外にも、肝細胞癌の腫瘍マーカーPIVKA IIの測定が可能である。他の測定項目への適応も可能であり、今後の測定項目の拡大が期待される。特に、迅速で精度の高い測定結果を臨床に報告することが本装置を用いることで可能であり、感染症分野や心疾患領域での展開が考えうる。

V. 結 語

本システムは、小型、迅速、高感度であり、診療前診断や緊急検査に有用であると考えている。

また、本システムはAFP-L3測定で示したように今までのシステムとは異なり測定対象物の濃度(量)だけではなく、糖鎖の違いなど測定対象物の質も分析可能なシステムを有する装置である。糖鎖解析は、ポストゲノム研究後のターゲットとして注目されており、癌化した細胞が生産するタンパク質の糖鎖が変化することはよく知られており、臨床検査においても将来重要となってくると考えられる。さらに、本システムが用いている分離分析システムは、DNAの解析も可能であり、本システムにより、診療に新たな流れを作り出すことが期待できる。

文 献

- 1) Koutny LB, Schmalzing D, Taylor TA, et al.: Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal Chem*, 68: 18-22, 1996.
- 2) Chiem N, Harrison DJ: Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays: analysis of monoclonal antibodies and theophylline. *Anal Chem*, 69: 373-378, 1997.
- 3) Reyes DR, Iossifidis D, Auroux PA, et al.: Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal Chem*, 74: 2623-2636, 2002.
- 4) Sato K, Tokeshi M, Odake T, et al.: Integration of an immunosorbent assay system: analysis of secretory human immunoglobulin A on polystyrene beads in a microchip. *Anal Chem*, 72: 1144-47, 2000.
- 5) Kawabata T, Wada HG, Watanabe M, et al.: "Electrokinetic Analyte Transport Assay" for alpha-Fetoprotein immunoassay integrates mixing, reaction and separation on-chip. *Electrophoresis*, 29: 1399-1406, 2008.
- 6) Kagebayashi C, Yamaguchi I, Akinaga A, et al.: Automated immunoassay system for AFP-L3% using on-chip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. *Anal Biochem*, 388: 306-311, 2009.
- 7) Park C, Kazakova I, Kawabata T, et al.: Controlling data quality and reproducibility of a high-sensitivity immunoassay using isotachopheresis in a microchip. *Anal Chem*, 80: 808-814, 2008.
- 8) 山口 勲: マイクロチップ電気泳動を用いたイムノアッセイ. *Medical Technology*, 10: 1089-1094, 2009.