
演題名 全自動マイクロチップ電気泳動イムノアッセイシステムの開発

氏名 黒澤竜雄、影林千晶、大坪拓真、山口勲、渡辺光雄、里村慎二

所属 和光純薬工業株式会社 臨床検査薬事業部 事業開発部

「緒言」

キャピラリー電気泳動は、理論段数の高さ、分離時間の短さ、試料の微量化の点から、様々な分析に利用されている。この技術は、1990年代には、反応や混合を行った後に電気泳動で分離する分析システム全体を半導体技術により数センチ角のチップ上に集積化してマイクロ化させた μ -TAS (Micro Total Analysis System) へと発展している。特に、免疫分野では、試薬やサンプル液量の低減、測定迅速化、システムの小型化などが期待され注目されている。

一方、免疫分野の一つであるイムノアッセイは、臨床検査に用いられる重要な測定法である。現在のイムノアッセイ法の多くは B/F 分離の必要性から抗原抗体反応を固相で行っており、迅速化、高感度化、試料の微量化への対応は難しかった。

今回、我々はマイクロチップ上で、液相反応法 (Liquid-phase Binding Assay : LBA) により抗原抗体反応を行い、等速電気泳動 (ITP) で抗原抗体反応物を濃縮し、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) により分析する、高感度かつ迅速なマイクロチップ電気泳動イムノアッセイ装置を開発した。

「方法」

本測定系は、4 から 5 種類の試薬で構成される。まず、B/F 分離と検出の役割を持つ 2 種類の標識抗体がある。B/F 分離を担う抗体の標識には、マイクロチップの短い微細流路で迅速に B/F 分離を行うために、強い陰性電荷を持ち、単一な鎖長を作製できる DNA 断片を採用した。一方、検出用抗体の標識には、高感度化を目的にレーザー励起蛍光測定法を利用できる蛍光色素を採用した。次に、電気泳動のための緩衝液として 3 種類ある。陰極に

使用するトレーリング緩衝液、陽極側に配置するリーディング緩衝液、等速電気泳動部の濃縮に用いる濃縮用の緩衝液の 5 種類である。

マイクロチップは、チップ上面に試薬をためるウェルを 6 つ配置しており、試薬・サンプルを適量入れる。適量で良いのは、試薬量のメータリングはチップ内のチャンネルで行うからである。微細流路への試薬・サンプルの導入は、空気圧で行われ、抗原抗体反応、濃縮、分離、検出の各ゾーンに配置される。これらの試薬を微細流路上で安定的に保持するため、微細流路とウェル位置の最適化を図った。電気泳動では、ITP での反応液の濃縮と CZE での分離分析を連続的に実施し、ノイズを低減でき、高感度化を実現した。また、電気泳動中に電気伝導度変動を連続的にモニタして ITP から CZE への切り替えタイミングを制御し、チップ内での抗原抗体反応、B/F 分離と検出を連続的に約 2 分で行うことを可能にした。さらに、自動化のために、A) マイクロチップの自動供給、B) マイクロチップへの試薬分注、C) 患者検体の自動供給、D) チップに分注した試薬と試料の微細流路への導入、E) 電気泳動濃縮・分離・検出の各機能を開発した。このシステムで肝細胞癌マーカーの AFP-L3、PIVKA II 測定系の検討を行った。

「結果」

AFP-L3、PIVKA II 測定系の構築を行った結果、反応時間約 2 分、全測定時間約 9 分で AFP 0.3 ng/mL、PIVKA II 5mAU/mL まで検出可能であった。再現性は、AFP 濃度 20-1000ng/mL で 0.8 ~ 1.6%、AFP-L3% 8-80% で 0.1-2.9%、PIVKA II 10-40000mAU/mL で 11.1-1.2% であった。迅速、微量な試料、高感度を特長とする全自動マイクロチップ電気泳動イムノアッセイ装置を開発した。