
総 説

臨床検査分野へのマイクロチップ電気泳動の応用

片岡 正俊

キーワード：臨床検査, Point of Care Testing, マイクロチップ電気泳動

Application of Microchip Electrophoresis for Clinical Laboratory

Masatoshi KATAOKA

Abstract : Microfabricated devices are forecast to be fundamental to the postgenome era, especially in the field of genetics and medicine. Microchip electrophoresis has recently attracted much attention in the field of nuclear acid analysis due to the high efficiency, low consumption of sample and reagent, relatively low costs, and ease of operation. DNA fragments are separated by capillary electrophoresis in a microchip with microfabricated channels, with automated detection as well as on-line data evaluation. However, although there are many reports of the use of these instruments to evaluate standard DNA, DNA ladders, PCR products, and commercially available plasmid digests, little information is available their use with biological material. In this report, we showed the accuracy of sizing and quantification of endonuclease-digested pUC118. We also showed the feasibility of on-chip endonuclease treatment of pUC118 and subsequent analysis as an additional application for DNA analysis. Furthermore, to evaluate the possibility of microchip electrophoresis for clinical laboratory, the results of the examination of blood glucose in human plasma and mitochondrial membrane potential were shown.

序 論

臨床検査は、各種の計測技術を用いて生体の形態・機能変化を鋭敏に捉え、各種疾患の病態を正確に把握し、的確な診断および治療に必要な不可欠である。しかしながら現在の臨床検査、特に血液を中心とする体液中のバイオマーカー測定などの場合では、ml単位の採血量、高コスト、検査法の違いなどによる検査値の差、さらに多くの検査項目が結果判定まで数時間から数日の日時を要し迅速な判定が困難なことなど問題点も多い。最近ではポイント・オブ・ケア・テストイング (POCT) の観点から小型・簡易な検査装置による臨床現場即時検査の実現が求められているが、現状では血糖、血算やインフルエンザ感染の有無など特定の疾患を対象とする検査キットが実用化されている程度である。これらの問題点を解

決しさらに POCT を実現するために、生体分子のハイスループットな解析が可能でさらに装置自体がコンパクトなデバイスの臨床検査分野への応用が期待されている。

マイクロチップ電気泳動は、半導体作製技術を応用した超微細加工技術を用いてガラスやプラスチックを基板としてミクロンオーダーの微小流路を形成し、その流路中で電気泳動を行いキャピラリー電気泳動の利点を生かした迅速、省サンプル、高感度な電気泳動で主に DNA 解析に応用されてきた¹⁾。最近では DNA の解析のみならず RNA、タンパク質²⁾、糖鎖³⁾、細胞機能解析⁴⁾ などその適用範囲は拡大している。また装置自体がコンパクト化されること、操作が簡単で術者の熟練度の差による解析結果の誤差も少なく臨床検査の分野でオンサイト分析、特に POCT への応用の可能性が注目される。現在で

はディスプレイ可能なマイクロチップ基板を用いたマイクロチップ電気泳動装置が数社から市販されており利用可能となっている。我々は、既に DNA 解析のみならずマイクロチップ上での DNA 制限酵素処理とその解析⁵⁾、合成 RNA、DNA 結合タンパク質、およびミトコンドリア膜電位の測定など細胞機能の解析⁴⁾がマイクロチップ電気泳動で可能なことを報告しており、その生物学的解析への応用性の高さを明らかにしている。現在はこれらの結果を踏まえて臨床検査への応用として、市販のマイクロチップ電気泳動装置を用いて血糖値測定など血中のバイオマーカー検出・評価を行っている。

本稿では市販されているマイクロチップ電気泳動装置を用いた DNA 解析における基本的特徴と制限酵素処理の解析、さらに血糖値などの血中バイオマーカー測定への応用性についても言及したい。

1. マイクロチップ電気泳動の基本

マイクロチップ電気泳動は、ガラス、石英、poly-methyl methacrylate (PMMA)、polydimethylsiloxane (PDMS) あるいはポリカーボネートをチップの材質として利用し、数センチ角のマイクロチップ上に半導体作製技術による超微細加工技術により、幅10~100 μm 、深さ5~50 μm のマイクロ流路を形成して、このマイクロ流路上で電気泳動を行う方法である。マイクロチップ上にマイクロチャンネルを形成して分離用支持体を充填後、サンプルの導入・分離・検出を行う。さらに複数のマイクロチャンネルをマイクロチップ上に並列化することで、多数のサンプルを一枚のチップで同時に電気泳動可能となり、High throughput な解析が可能になる⁶⁾。

マイクロチップ電気泳動による DNA 解析では、非架橋ポリアクリルアミド、セルロース誘導体、ポリエチレンオキシド等のポリマー溶液が分離用支持体として利用されることが多く、対象となる DNA サイズなどの違いでさまざまな最適条件が報告されている⁷⁾。メチルセルロースをはじめとするポリマー溶液は一定の濃度を超えた場合、ポリマー分子同士が絡み合い動的ポアを形成する。この場合、ポアは従来の電気泳動に用いられているゲルのように固定されたサイズを形成してはいないが、平均的なメッシュサイズはポリマー濃度に依存する。そして DNA はポリマー溶液中を電気泳動中に従来のゲルの場合と同様に分子ふるい効果を受けて、アガロース電気泳動の場合と同じくその分子サイズに依存して分離される。形成されるマイクロチャンネルの形状としては、T型⁸⁾、ダブルT型⁹⁾、ダブルクロス型¹⁰⁾などがあるが、本稿では通常多く用いられているクロス型チャンネルマイクロチップ¹¹⁾を用いた DNA サンプルの解析法の概略を示す(図1)。マイクロチャンネルと各リザーバーに分離用支持体を充填後、サンプルリザーバーに DNA 試料を添加する(図1 A)。その後、図1 Bのように電圧を印加することで、数十秒で試料導入

溝は DNA 試料で満たされる(図1 C)。次に、図1 Dのように分離泳動溝に試料が流入するように電圧を印加して、試料導入溝と分離泳動溝の交差部に存在する数十 pL 単位の DNA 溶液が分離泳動溝に流入し、それぞれの DNA サイズに従って分離される。この際、試料導入溝ではサンプルおよびゲルリザーバーにも電圧を印加して戻し泳動を行い、試料導入溝からの余分な試料の分離泳動溝への流入を防ぐ。泳動・分離された DNA は検出部分において、発光ダイオードなどによる蛍光検出、あるいは UV 検出等の方法で検出される。従来のアガロース電気泳動とエチジウムブロマイド染色による DNA の検出感度は1.0 ng/ μl であるが、市販されているマイクロチップ電気泳動装置での検出感度は0.1 ng/ μl 以上と非常に感度が高い。さらに電気泳動により得られた情報は、装置に附属したソフトウェアで数分以内に解析され、電気泳動パターンの表示、DNA 鎖長の解析さらに擬似ゲルイメージ等の表示が行われる。

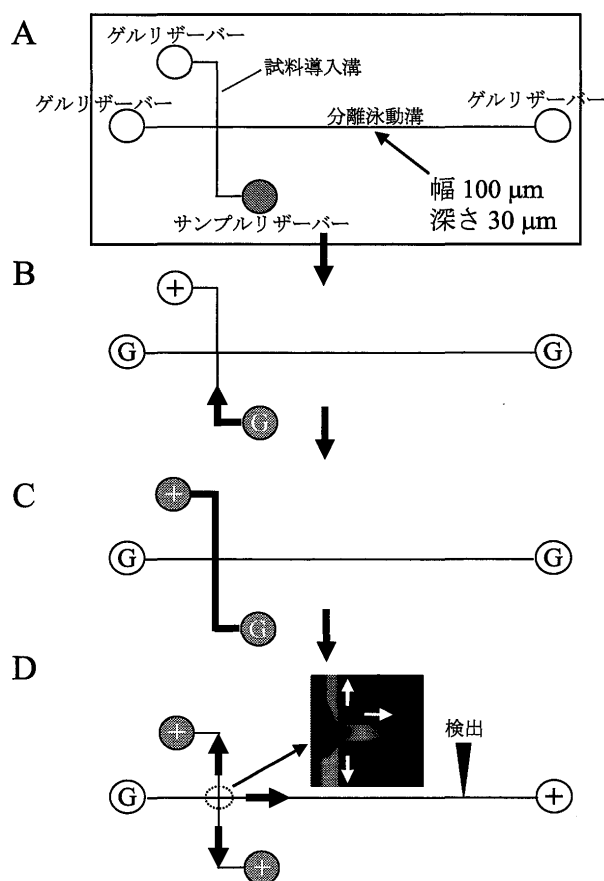


図1 マイクロチップへの試料導入と分離
サンプルリザーバー (A) に DNA 試料を加え、電圧を印加して試料導入溝に試料を導入する (B, C)。次に分離泳動溝に試料が流入するように電圧を印加して、交差部に存在する試料を分離溝に流入させ分離を行う (D)。この時、戻し泳動を行い余分な試料の分離溝への流入を防ぐ。

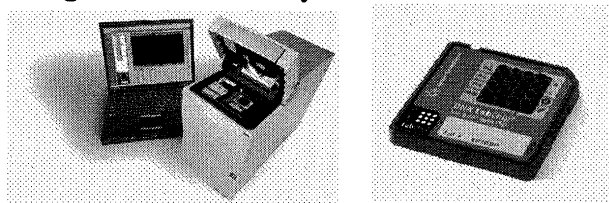
2. 市販のマイクロチップ電気泳動装置とマイクロチップ

アジレント社, 島津製作所, 日立化成工業などからマイクロチップ電気泳動装置とマイクロチップが市販されている(図2)。アジレント社製 Agilent 2100 Bioanalyzer (図2 A) では DNA¹²⁾, RNA¹³⁾, タンパク質¹⁴⁾, および基本的なフローサイトメトリー機能を利用した細胞機能解析⁴⁾ が可能となっている。マイクロチップの材料としては石英が用いられており, 電気泳動後の検出にはレーザー誘起分光検出(LIF)が利用され, 30分間で12サンプルの解析が可能となっている。島津社製マイクロチップ電気泳動装置 MCE-2010 LIF (図2 B) は石英チップを使用して, DNA, RNA およびタンパク質の解析が可能で, 試料の検出には LIF が用いられている。試料の導入を含めて完全オートメーション化・自動化がなされており, 96サンプルの連続自動解析が可能である。日立化成工業からは3サンプルの同時解析が数分以内で可能な SV1100 形(図2 C) と12サンプルを同時解析可能な SV1210 形が発売され, それぞれ DNA および RNA の解析が可能である。マイクロチップの材料としては PMMA が使用され, DNA の分離用支持体として水溶性セルロースが利用され, 試料の検出には蛍光検出が用いられている。

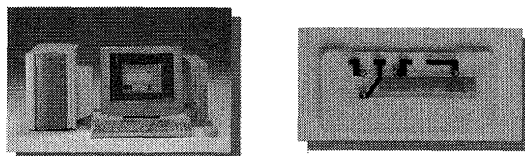
3. 日立 SV1100形を用いた DNA 解析

日立 SV1100形の DNA 解析では, 各々 2.0 ng/ μ l の100 bp と800 bp の DNA 断片を内部標準として, 100 bp から800 bp の範囲で DNA サイズの決定が可能となっている。そこで100 bp から800 bp 断片長の DNA サイズマーカーを用いてマイクロチップ電気泳動を行い, DNA サイズとその移動時間について検討した(図3)。DNA マーカーを用いた電気泳動のエレクトロフェログラムか

A. Agilent 2100 Bioanalyzer



B. 島津MCE-2010 LIF



C. 日立SV1100形

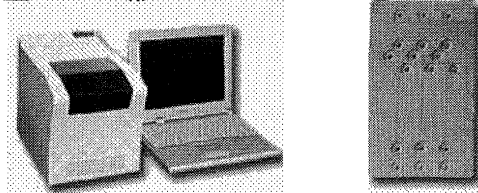
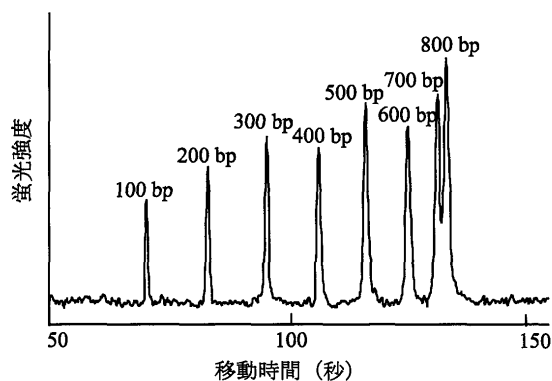


図2 市販されているマイクロチップ電気泳動装置とマイクロチップ

Agilent 2100 Bioanalyzer (A), 島津 MCE-2010 LIF (B), 日立 SV1100形 (C)

ら, 100 bp から800 bp の各 DNA 断片は明瞭に分離され(図3 A), その移動時間とサイズの相関では100 bp から600 bp のサイズで直線関係が認められる(図3 B)。これら市販されているマイクロチップ電気泳動装置については, DNA マーカーや PCR 産物などを用いた DNA 解析の報告が多くなされている¹⁵⁾。しかしながら, デバイスとして一般のユーザーの立場から鑑みて, 生物学, 生

A.



B.

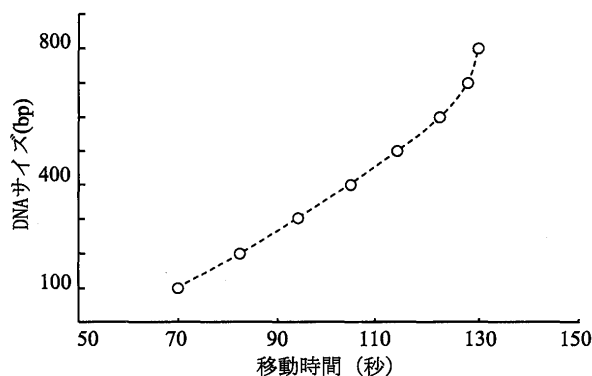


図3 日立 SV1100形による DNA マーカーの分離

DNA マーカー 100~800 bp を日立 SV1100形を用いてマイクロチップ電気泳動した時のエレクトロフェログラム (A)。各々の DNA は明確に分離される。各 DNA 断片の移動時間とサイズの相関 (B)。100~600 bp では, ほぼ直線的な関係が認められる。

化学あるいは臨床検査医学の分野で用いられる生物由来のDNAを用いた解析例の報告は少ない。そこで大腸菌から分離・精製した、一般的な研究室レベルで使用される純度のプラスミドDNAとしてpUC118を用いてDNA解析した例を示す⁵⁾。3162 bpのpUC118は制限酵素 *Pvu* II 処理により2840 bpと322 bpに切断される(図4 A)。従来のアガロース電気泳動では(図4 B)、各DNA断片のサイズ、濃度はDNAマーカーと比較することで大まかな判定ができる程度である。マイクロチップ電気泳動でのエレクトロフェログラム(図4 C)では、内部標準の他に2本のピークが認められ、解析データからそれぞれ320 bpと1451 bpのDNA鎖と判定された(図4 D)。DNA鎖の測定が可能とされる内部標準間にある322 bp DNA断片は320 bpと判定され、その誤差はわずか2 bpであったが、範囲外である2840 bp DNA断片は1451 bpと解析されDNA鎖長測定の誤差は大きい。解析データには内部標準のピーク強度を基準として、測定された各DNA断片の濃度も計算される。本実験では20 ng/μl pUC118を制限酵素処理しており、322 bpおよび2840 bpのDNA断片の濃度はそれぞれ2.0 ng/μlと18 ng/μlになり、解析結果の誤差はそれぞれ25.5%と20.7%であった。これらの結果、制限酵素処理したプラスミドDNA断片を用いても内部標準DNA間のサイズでは正確なDNA鎖長測定が可能で、さらにある程度の定量性も期待できる

ことが分かった。また従来のアガロース電気泳動では、電気泳動と引き続きエチジウムブロマイドによる染色の過程でそれぞれ1時間、計2時間の処理が必要になるがマイクロチップ電気泳動では図4 Dに示す解析結果が得られるまでに電気泳動開始から10分以内であり、高効率・迅速な解析が可能であることが明らかになった。

次に解析するDNA濃度がサイズ測定、濃度測定にどのような影響を与えるかを検討した。2~320 ng/μlのpUC118を制限酵素 *Pvu* II で切断してマイクロチップ電気泳動で解析した。この場合、322 bp断片は0.2~32.6 ng/μlになり2840 bp断片は1.8~287.4 ng/μlの濃度になる。エレクトロフェログラムから、322 bp断片は移動時間がほぼ一定であるのに対して、2840 bp断片はDNA濃度が上がるに従い移動時間が短くなる。そして100~800 bpの内部標準間ではDNAサイズ測定の正確性が認められるが、高濃度のDNAになるに従いその定量性が低下する傾向を認めた。このマイクロチップ電気泳動で測定範囲外とされる2840 bp断片は濃度依存的に移動時間の短縮が認められ、DNAサイズは短く見積もられる。従来のアガロース電気泳動でも、予めゲルにエチジウムブロマイドを加えて電気泳動を行うと、DNA量が多い場合には分子量の大きいDNAはその移動時間は相対的に早くなることが知られている。このマイクロチップ電気泳動では、予め分離用支持体と泳動用緩衝液には

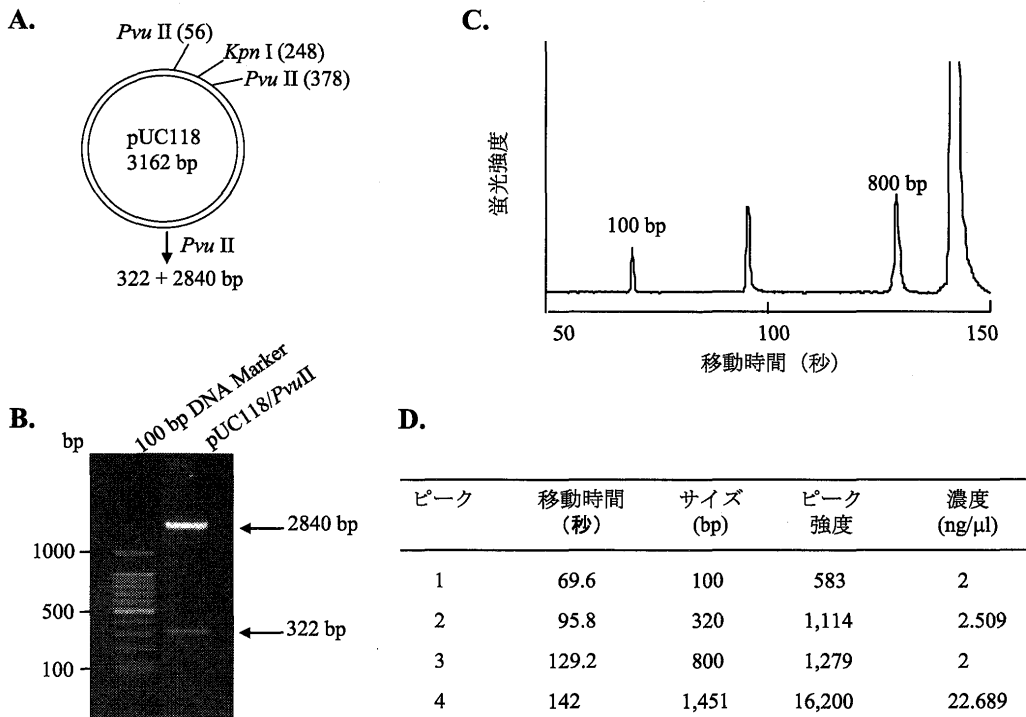


図4 pUC118/*Pvu* II断片のマイクロチップ電気泳動による解析
 pUC118は *Pvu* II 処理で322 bpと2840 bp DNA断片に切断される (A)。pUC118/*Pvu* II断片のアガロース電気泳動像 (B)。pUC118/*Pvu* II DNA断片の日立 SV1100形を用いたマイクロチップ電気泳動によるエレクトロフェログラム (C)。内部標準100 bpと800 bp以外に2本のピークを認める。マイクロチップ電気泳動の解析結果 (D)。322 bpと2840 bpに相当するDNA断片はピーク2と4として解析され、サイズと濃度が示される。

エチジウムブロマイドが含まれており、このためにアガロース電気泳動と同様の現象が認められると考えられる。

4. マイクロチップ上での DNA の制限酵素処理とその解析

マイクロチップ電気泳動による DNA 解析では、従来のアガロース電気泳動に比較して高速・高感度・省サンプルな電気泳動が可能となり、単に電気泳動装置として考えても利用価値は高い。しかしその特徴を生かしてさらに分子生物学の分野での利用価値を高めることができないか、その応用性、発展性について検討した。

前述の pUC118をはじめプラスミド DNA は分子生物学の分野で一般的に使用されるベクターの一つであるが、このプラスミドを制限酵素処理して切断することは日常の実験操作で最も頻繁に行われる操作といっても過言ではない。従来、この DNA の制限酵素処理には通常一時間の処理時間を要し、さらに電気泳動と染色を行って DNA の切断を確認している。そこで、この制限

酵素処理をマイクロチップ上で直接行い、さらにマイクロチップ電気泳動することで DNA の切断を確認することが可能かを検討した。マイクロチップのサンプルウェルには 10 μ l の溶液を加えることができるが、そこで図 5 に示すように DNA サンプルとして pUC118/Pvu II 断片と制限酵素の活性に不可欠な MgCl₂、そして制限酵素 Kpn I を 1.0 μ l、さらに内部標準を加え計 10 μ l としてサンプルウェルに添加した (図 5 A)。このマイクロチップを電気泳動装置にセットして、そのまま室温にて酵素処理とともに電気泳動による解析を行った。DNA 試料として Pvu II 切断済み pUC118 を用いているが、Pvu II と Kpn I の二重消化により 130 bp、192 bp および 2840 bp の 3 個の DNA 断片に切断される (図 5 B)。アガロース電気泳動では分子量マーカーから各 DNA 断片の大きかなサイズは推定されるが、正確な DNA 鎖長の判定は期待できない (図 5 C)。

ところでマイクロチップ電気泳動では、一回の解析で分離泳動溝に流れる試料はピコリッター単位であり、殆どの試料溶液はサンプルウェルに残ることになる。そ

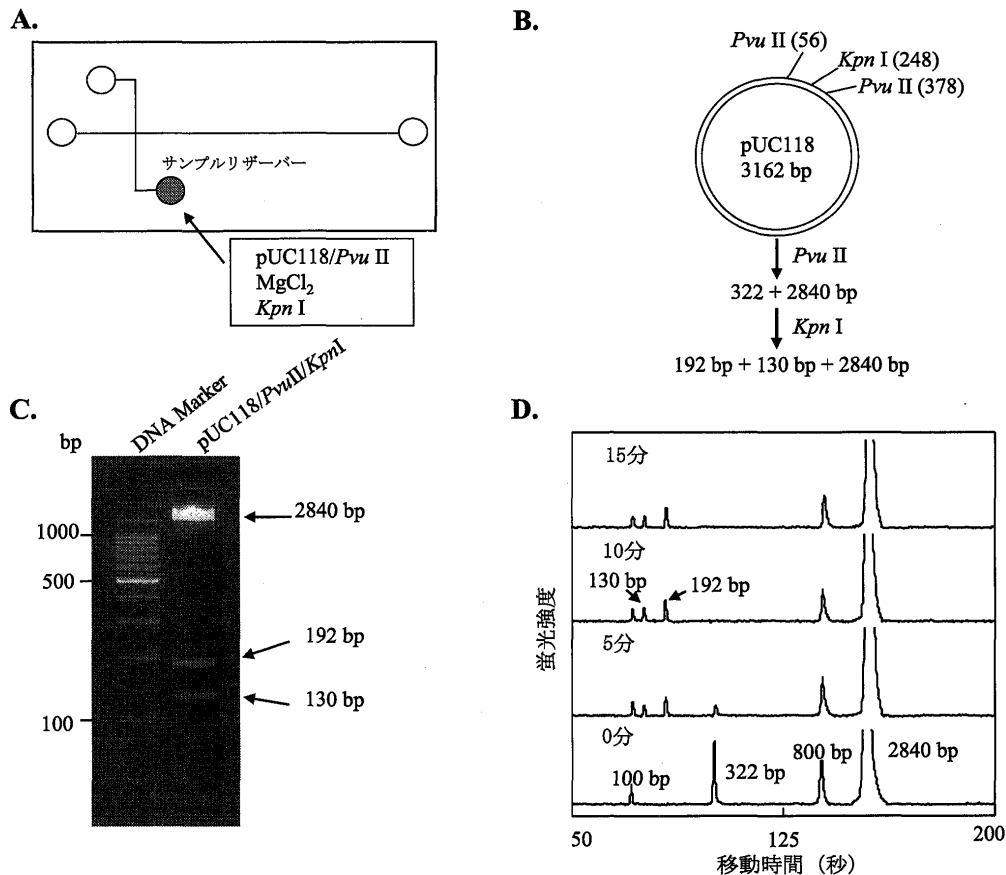


図 5 マイクロチップ上での DNA の制限酵素処理とその解析

マイクロチップのサンプルウェルに pUC118/Pvu II DNA、MgCl₂ および制限酵素 Kpn I を加え、チップ上で酵素処理を行う (A)。pUC118/Pvu II DNA は制限酵素 Kpn I 処理により、130 bp、192 bp および 2840 bp の 3 つの DNA 断片に切断される (B)。pUC118/Pvu II/Kpn I のアガロース電気泳動像 (C)。3 本の DNA を認めるが、正確なサイズや濃度は判定されない。pUC118/Pvu II/Kpn I のマイクロチップ電気泳動によるエレクトロフェログラム像 (D)。5 分で 322 bp の部分消化が認められ、10 分では完全に消化されていることが認められる。

ここで、図5Aの条件で、マイクロチップを電気泳動装置にセットしたまま0, 5, 10, 15分後に電気泳動のスタートボタンを押すだけで系時的なDNA制限酵素処理の解析を行った。エレクトロフェログラム(図5D)からも明らかのように、0分では内部標準のほかpUC118 *Pvu* II断片である322 bp断片と2840 bp断片に相当するピークが認められる。5分後には322 bp断片の大部分は*Kpn* Iで消化されており、その消化産物である130 bpと192 bpに相当するピークが観察され、10分後には322 bp DNA断片は完全に消化されることが確認された。解析データから、10分後では130 bpと192 bp DNA断片の各々のサイズは127 bpと183 bpと解析され、その誤差はわずか3および9塩基対であった。定量性については、それぞれ40%と37%の誤差を認めたが、酵素処理開始後20分以内でこれらの解析結果を得ることができた。以上のように、マイクロチップのサンプルウェルを酵素反応の場として利用することで、直接DNA試料を制限酵素処理して引き続き系時的に電気泳動を行うことで、ほぼリアルタイムにDNAの消化を確認することができる。これらの特徴を利用することで、制限酵素のkinetic analysisやライブラリー作成時の染色体DNA切断への応用が可能となる。また検査医学の分野では、ハイスループットな制限酵素切断断片長多型の解析への応用なども考えられる。

5. 臨床検査分野への応用性について

マイクロチップ電気泳動は核酸やタンパク質の解析を目的として利用されてきたが、最近では糖などの解析への応用も報告されている¹⁶⁾。我々は、ヒト血液を用いて、血中グルコースを2-aminoacridone (AMAC)で蛍光標識し、標準グルコースを対象とすることで血糖値の測定が可能であることを確認した(図6)。またオリゴ糖を基質とすることで、血中アミラーゼの測定がマイクロチップ電気泳動で可能であることも認めている。その他として、基本的なフローサイトメトリー機能を有する

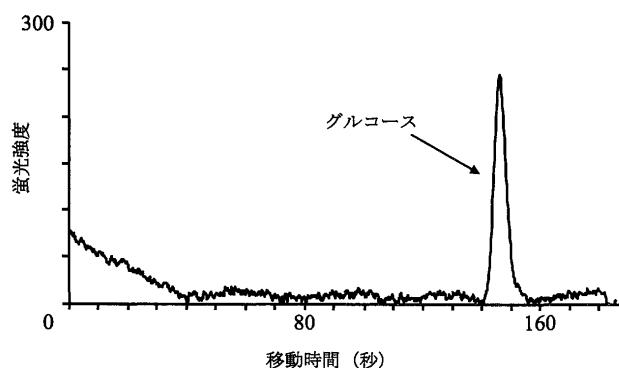


図6 マイクロチップ電気泳動による血中グルコースの検出
血漿成分を蛍光標識することで、血中グルコースを明確に検出することが可能。

Agilent Bioanalyzer 2100を用いて、細胞のミトコンドリア膜電位の測定が可能であり⁴⁾、このミトコンドリア膜電位測定を介して細胞のアポトーシス測定が可能であることを報告している。臨床的にはミトコンドリア病などのミトコンドリア機能異常を伴う疾患では、ミトコンドリア膜電位を測定することで確定診断を行っている。従来はミトコンドリア膜電位の測定にはフローサイトメーターなどを用いていたが、測定には大量の細胞が必要なこと、機器が高価でその操作が比較的煩雑であるなどの短所があった。一方、マイクロチップ電気泳動を利用することでフローサイトメーターと比較して、解析に必要な細胞数は1/10以下、廉価で操作が簡単という特徴があり、今後は臨床診断の面からも注目されると予想される。

これらの結果を踏まえ、マイクロチップ電気泳動はDNAなどの核酸を中心とする解析のみならず、酵素反応の解析、さらには血中のバイオマーカー測定などへの応用性が認められる。そしてマイクロチップ電気泳動の高速・高感度・易操作性・省サンプル・コンパクト性の特徴からPOCTへの応用が期待され、今後益々その適応範囲は拡大されると考えられる。

引用文献

- 1) Zhang L, Dang F and Baba Y: Microchip electrophoresis-based separation of DNA. *J Pharm Biomed Anal* 30, 1645-1654 (2003)
- 2) Tabuchi M, Kuramitsu Y, Nakamura K and Baba Y: A 15-s protein separation employing hydrodynamic force on a microchip. *Anal Chem* 75, 3799-3805 (2003)
- 3) Dang F, Zhang L, Javasin M, Kaji N and Baba Y: Characterization of electrophoretic behavior of sugar isomers by microchip electrophoresis coupled with videomicroscopy. *Anal Chem* 75, 2433-2439 (2003).
- 4) Kataoka M, Fukura Y, Shinohara Y and Baba Y: Analysis of mitochondrial membrane potential in the cells by microchip flow cytometry. *Electrophoresis* 26, 3025-3031 (2005)
- 5) Kataoka M, Inoue S, Kajimoto K, Shinohara Y and Baba Y: Usefulness of microchip electrophoresis for reliable analyses of nonstandard DNA samples and subsequent on-chip digestion. *Eur J Biochem* 271, 2241-2247 (2004)
- 6) Kan C W, Fredlake C P, Doherty E A S and Barron A: DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems. *Electrophoresis* 25, 3564-3588 (2004)
- 7) 馬場嘉信：“マイクロデバイスシステム”。バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル。小原収, 谷口寿章, 市川哲生編。東京, 共立出版, 2005, 1924-1929.
- 8) Harrison DJ, Manz A, Fan Z, Ludi H and Widmer M: Capillary electrophoresis and sample injection systems

- integrated on a planar glass chip. *Anal Chem* 64, 1926-1932 (1992)
- 9) Koutney LB, Schmalzing D, Taylor TA and Fuchs M: Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal Chem* 68, 18-22 (1996)
 - 10) Fu LM, Yang RJ and Lee GB: Electrokinetic focusing injection methods on microfluidic devices. *Anal Chem* 75, 1905-1910 (2003)
 - 11) Xu F, Jabasini M and Baba Y: DNA separation by microchip electrophoresis using low-viscosity hydroxypropylmethylcellulose-50 solutions enhanced by polyhydroxy compounds. *Electrophoresis* 23, 3608-3614 (2002)
 - 12) Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ and Wilding P: Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 bioanalyzer. *Clin Chem* 46, 1851-1853 (2000)
 - 13) Miller CL, Diglisic S, Leister F, Webster M and Yolken RH: Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue. *Biotechniques* 36, 628-633 (2004)
 - 14) Ohashi R, Ostero JM, Chwistek A and Hamel JFP: Determination of monoclonal antibody production in cell culture using novel microfluidic and traditional assay. *Electrophoresis* 23, 3623-3629 (2002).
 - 15) Zhang L, Dang F and Baba Y: Stepwise gradient of linear polymer matrices in microchip electrophoresis for high-resolution separation of DNA. *Electrophoresis* 25, 2341-2346 (2002)
 - 16) Maeda E, Hirano K, Baba Y, Nagata H and Tabuchi M: Conformational separation of monosaccharides of glycoprotein labeled with 2-aminoacridone using microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 27, 2002-2010 (2006)