

Product Introduction

新製品紹介

μTAS技術を用いた遠心方式血液分析装置 Yumizen M100 Banalystの開発

Development of Centrifugal Blood Analyzer Yumizen M100 Banalyst
Using μTAS Technology

横川 昭徳

YOKOGAWA Akinori

平田 克樹

HIRATA Katsuki

糖尿病の指標であるヘモグロビンA1cや炎症マーカーであるCRPを微量の血液で簡便に測定できる検査装置を開発した。μTAS技術を応用して設計された使い捨てのプラスチック製チップを使用しており、検査室にある大型装置で一般的に行われている血液の遠心分離から試薬との反応、光学測定までの一連の分析操作をチップ内で実現している。これにより装置は小型だが高精度な測定が可能となっている。本稿では、チップと装置の構造やユニークな測定原理、μTAS化がもたらす利点を紹介する。

A blood analyzer has been developed that can easily measure hemoglobin A1c, an indicator of diabetes, and CRP, an inflammatory marker, with a small amount of blood. Disposable plastic chip designed based on μTAS technology is used, a series of analysis operations from blood centrifugation to reaction with reagents and optical measurement, which are generally performed in large instruments in a laboratory, are realized in a chip. As a result, the analyzer is small but high precision measurement is possible. This paper introduces the structure of the chip and the analyzer, its unique measurement principle, and the advantages of using μTAS.

キーワード

μTAS, POCT, HbA1c, CRP, CysC

はじめに

検体検査は被験者から採取した血液や尿などに含まれる成分の濃度や活性を測る検査であり、健康状態を把握し病気の発見や治療を行う上で欠かすことができない。近年ベッドサイドや診療所など患者のいるその場所でそのときに検査を行うPOCT (point of care testing)が広く普及してきている。POCT対応機器を用いることで、医師は患者の健康状態を常日頃からモニタリングすることができ、異常が見られた場合には検査結果に基づいた治療方針を即座に決めることができる。このようにPOCT対応機器は医療の質の向上に大きく貢献しているが、一方で検査センター等で使用される大型機器と比較してデータの精度が低いことを指摘されることがあった^[1-2]。そのため小型で取り扱いが簡便かつより精度の高いPOCT対応機器が求められており、この要望に応えるべくMicro Total Analysis System (以下μTAS)技術を用いた遠心方式血液分析装置Yumizen M100 Banalyst(以下YM-100)を開発した(Figure 1)。

μTASとは

μTASとは、微細加工によって形成されたマイクロメートルオーダーの流路と空間を使って液体や気体の分析を行う分析デバイスである。微小な機能部位がデバイス内に集積されマイクロメートルオーダーの流路で連結されており、それらが相互に連動して動作することで試料の分離・精製



Figure 1 Yumizen M100 Banalyst

から計量、試薬との混合、成分の検出といった分析に必要な一連の操作を実現する。微小空間で操作が行われるため極微量の検体や試薬で検査を行うことが可能であるが、微小空間では我々の日常空間とは異なる物理現象が支配的であり古くから研究が行われてきた。μTASの概念を提唱したのはMantzであり、1990年にMiniaturized Total Analysis Systems(μTAS)のコンセプトを打ち出すとともに^[3]、5 mm角のシリコン基板上で高速液体クロマトグラフィーを実現している^[4]。この時期を境に、それまで研究

が進められてきたMEMS (Micro Electro Mechanical System)やマイクロポンプ、マイクロバルブ、ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor)などの要素技術を集積したデバイスが出現している^[5-9]。以降、様々な分析方法が微小空間で検討されるとともに分析対象もDNA、タンパク質、細胞と拡大しており、今日μTASは医療やヘルスケア、創薬、環境分析、食品分析といった様々な分野に应用が期待されている^[10]。

YM-100の測定原理

YM-100は臨床化学分析装置であり、μTAS技術を応用して設計された専用の試薬チップ(40×50×4.5 mm, **Figure 2**)を使用する。**Figure 3**は装置の内部構造を示している。測定室内に回転テーブルが設けられており、回転テーブル上に試薬チップがセットされるステージと balanser用ステージが設けられている。回転テーブルは連結されたモーターにより最大3000 rpmで回転し、発生する遠心力が試薬チップ内を液体が移動するための駆動力となる。ステージの回転で試薬チップの方向を切り替えて試薬チップ内で液体が流れる方向を制御している。測定室内の温度は37℃に制御されている。また、測定室に取り付けられた光源基板のLEDと受光基板のフォトダイオードにより吸光度測定のための光学系を形成している。投光用のLEDの波長は630 nmであり、ステージ上にセットされたチップの光学測定部位を透過した光はミラーにより反射され、フォトダイオードで受光される。測定室上面に配置したカメラでチップ表面に貼り付けられた2Dコードの読み取りを行い、項目情報や試薬ロットごとの検量線情報に基づいて濃度演算が行われる。



Figure 2 Reagent Chip

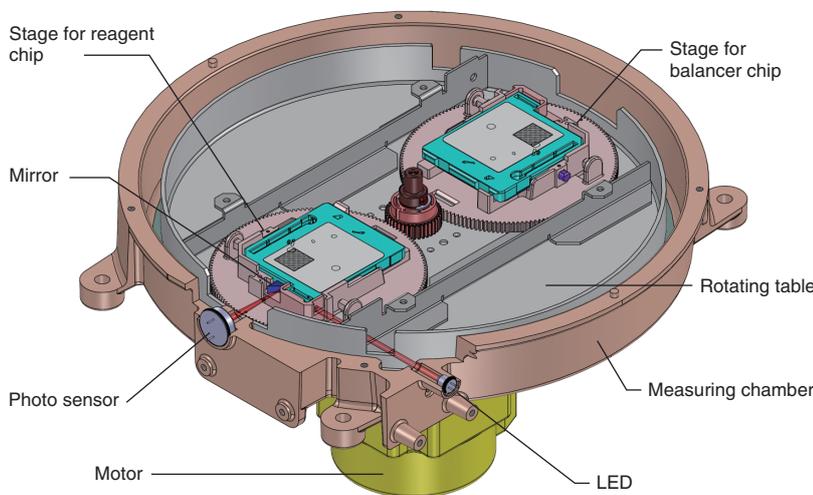


Figure 3 Structure of YM-100



Figure 4 Functional sites of CRP reagent chip

試薬チップの構造

試薬チップは、糖尿病のマーカであるヘモグロビンA1c (以下HbA1c)、炎症マーカーであるC反応性蛋白質 (以下CRP)、CRPの低濃度域の分解能を高めた高感度CRP (以下hsCRP)、腎症マーカーであるシスタチンC (以下CysC)の4項目を展開している。**Figure 4**はCRP試薬チップ内の各機能部位を示しており、血球分離部、計量部などが、回転テーブ

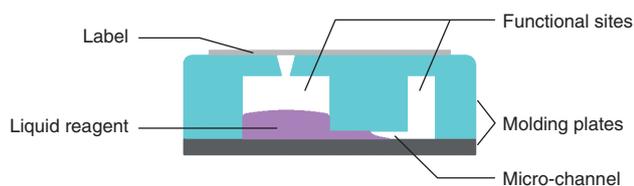


Figure 5 Cross section structure of reagent chip

ルの回転による遠心力とステージの回転による方向切り替えで機能を果たすように形状設計および配置されている。**Figure 5**は試薬チップの断面構造の模式図である。射出成型法で製造した2枚の樹脂基板の一方は表面に凹部を有しており、もう一方は平板である。これらの基板を貼り合わせることで貼り合わせ面に機能部位となる空間とそれを連結するマイクロ流路を形成している。試薬はチップ上面の試薬注入口から注入され、ラベルにより封止されている。

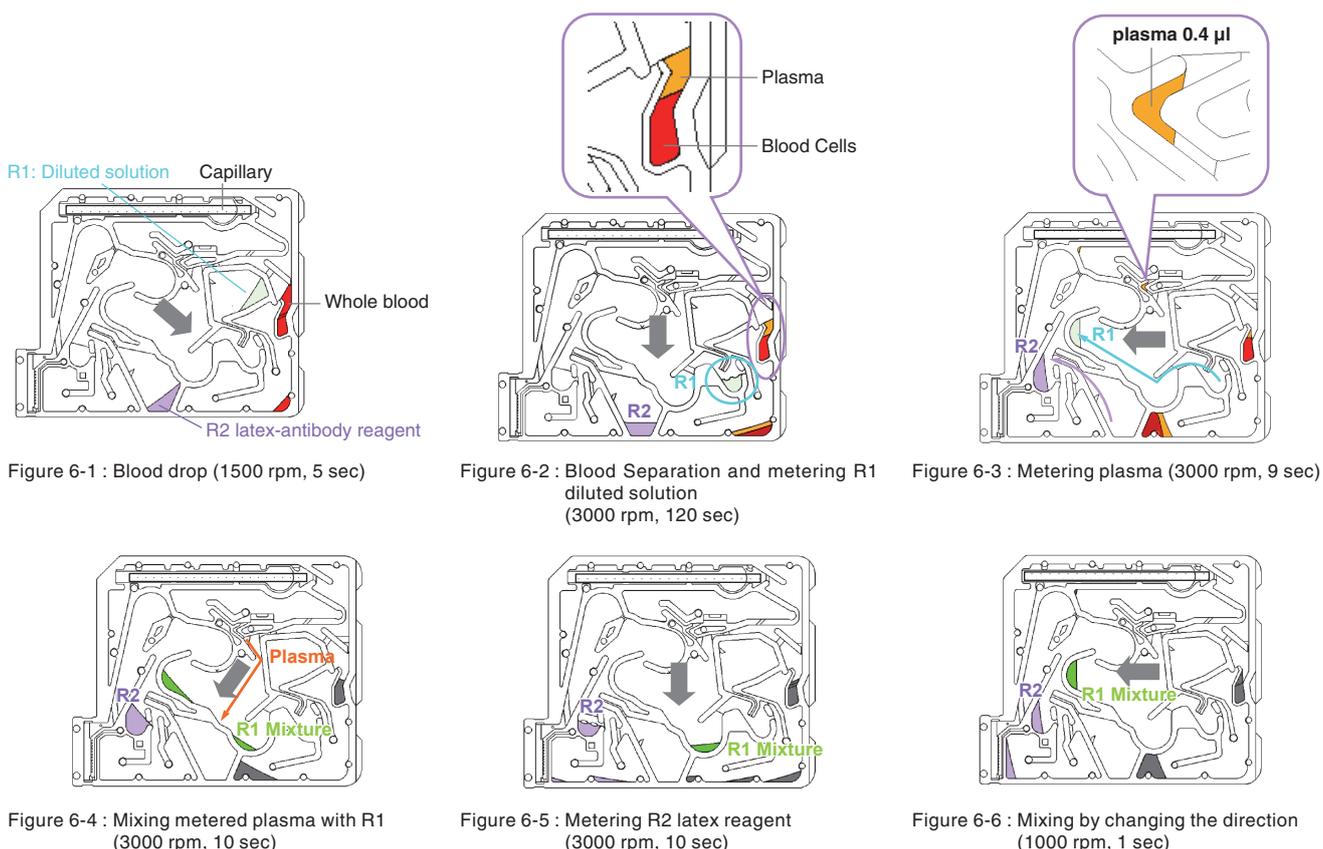
試薬チップ内の試料処理手順

CRP測定用チップを例にチップ内部での試料処理の手順を説明する(**Figure 6**)。検体を吸い上げたキャピラリーを**Figure 4**のキャピラリー挿入部からチップ内に挿入する。遠心力によりキャピラリー内の全血検体が血球/血漿分離部に導入される(**Figure 6-1**)。全血検体は遠心分離により血漿成分と血球成分に分離される(**Figure 6-2**)。上澄みである血漿のみが下流に送液され0.4 μLが計量される

(**Figure 6-3**)。血漿計量部は**Figure 6-3**に示すようなV字形形状をしており、遠心力により送液された血漿はV字形流路の一端から入り、余剰分が廃液として他端から送液され、V字部分の容積を利用して一定量が計量される。また、同様の計量構造により血漿計量と同時に第一試薬も10 μL計量される。次に、計量された血漿と第一試薬が一次混合部に送液され(**Figure 6-4**)、ステージの方向切り替えと回転テーブルの回転を繰り返すことで混合される(**Figure 6-5**~**Figure 6-6**)。同様に第二試薬も10 μL計量される(**Figure 6-5**)、二次混合部で混合される(**Figure 6-7**~**Figure 6-9**)。最終的に混合液は光学測定部に送液される(**Figure 6-10**)。混合液中では、第二試薬に含まれる抗ヒトCRPマウスモノクローナル抗体感作ラテックスを血漿中のCRPが架橋することで凝集塊が形成され、そのときの濁度増加に伴う吸光度の増加速度からCRP濃度が算出される(ラテックス凝集免疫比濁法)。

このような微量溶液のハンドリングには流路内で発生する毛細管現象を防止する必要があるため、マイクロ流路には表面処理が施されている。特に血漿計量のばらつきは測定結果のばらつきに直結するため、血漿計量部は毛細管現象によって血漿が移動しないように構造的な工夫がされており0.4 μLという極微量の計量でもばらつきを抑制している。また、微量溶液の光学測定では、温度変化により溶液中の溶存気体が気泡となり光路にかかることで正確な測定が妨害される。**Figure 6-10**は試薬チップの光学測定部とそこに

Figure 6 Sample handling procedure inside reagent chip
Arrow diagram located at the center of the chip shows the direction of centrifugal force.



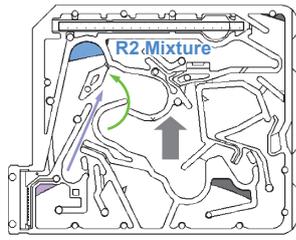


Figure 6-7 : Mixing with R2 latex-antibody reagent (3000 rpm, 5 sec)

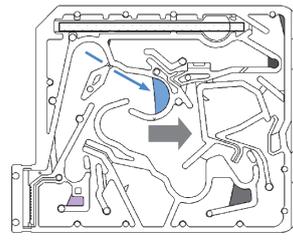


Figure 6-8 : Mixing (3000 rpm, 9 sec)

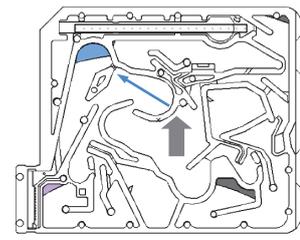


Figure 6-9 : Mixing and change the direction (3000 rpm, 5 sec)

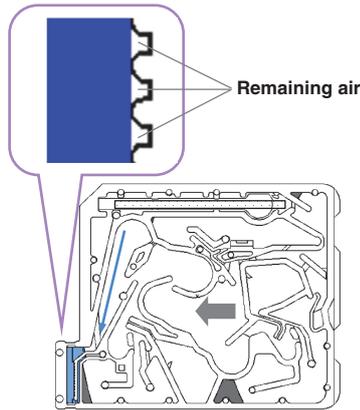


Figure 6-10 : Introduction to the optical sensing site (2000 rpm, 5 sec)

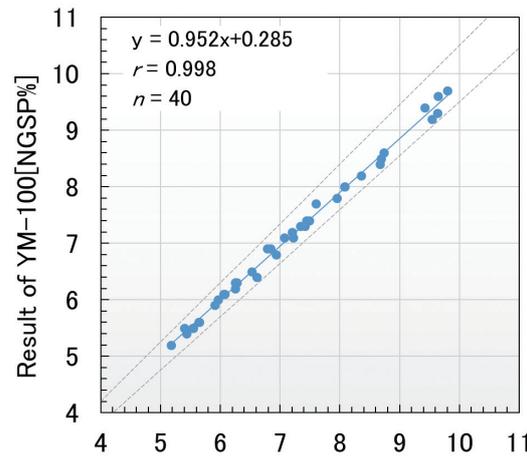
送液された混合液を模式的に示したものである。光学測定部に設けられた複数の凹部は回転の中心側に設けられているため凹部に気泡が閉じ込められる。光学測定中に析出する溶存気体は界面エネルギーを最小化するように閉じ込められた気泡を核として成長する。これにより光軸上に気泡が発生するのを抑止しており、光学測定部の容積は14 μLと微量での光学測定が実現されている^[11]。

YM-100の使用法

実際にユーザーが行う操作は以下のとおりである。付属の専用キャピラリーで全血(CRPの場合4.4 μL, HbA1cの場合4.0 μL, hsCRPの場合9.8 μL, CysCの場合は6.0 μL)を採取し、そのキャピラリーを試薬チップに挿入する。次に試薬チップを装置にセットし、カバーを閉め、スタートボタンを押すことで測定が開始される。CRP, hsCRP, HbA1cの場合1測定当たり約7分40秒で結果が出力される。

性能評価

HbA1cは糖尿病患者の重要な血糖コントロール指標として日常診療で利用されており、開業医での需要が増し、迅速、簡便かつ高精度な測定機器が強く求められている。HbA1cについて、同時再現性、正確性、基準施設との相関性を評価した。



Result at the secondary reference laboratory[NGSP%]

Figure 7 Result of NGSP certification for HbA1c
The dotted line shows the ± 5% of the result at the secondary reference laboratory.

1. 同時再現性, 正確性

Table 1は、HbA1c認証実用標準物質JCCRM423-10bの3濃度の試料について各10チップで測定を行った結果である。変動係数(CV値)は、濃度5.59%の試料では1.07%, 7.70%の試料では0.92%, 10.57%の試料では0.75%であった。HbA1cのPOCT対応機器に要望されるCV値が3.0%以内であることから、同時再現性は低濃度領域から高濃度領域まで良好と言える。また、基準値に対するバイアスは5.59%

Table 1 Reproducibility and accuracy of HbA1c NGSP%

Chip No.	Level M (Certified value 5.59±0.14)	Level H (Certified value 7.70±0.19)	Level HH (Certified value 10.57±0.25)
1	5.6	7.5	10.6
2	5.6	7.6	10.8
3	5.6	7.6	10.6
4	5.5	7.7	10.6
5	5.5	7.6	10.6
6	5.6	7.6	10.6
7	5.6	7.7	10.8
8	5.6	7.7	10.7
9	5.6	7.7	10.6
10	5.7	7.7	10.7
Mean	5.59	7.64	10.66
S.D.	0.06	0.07	0.08
C.V.	1.07	0.92	0.75
Bias	0.00	0.06	-0.09

の試料で0.00%, 7.70%の試料で0.06%, 10.57%の試料で-0.09%であった。

2. 相関性

HbA1cの国際標準法とのトレースを確認するための試験であるNGSP認証試験に参加し、二次基準測定施設との相関性を確認した。認証機関より送付される認証試験試料40検体を5日間に分けてYM-100で測定した。Figure 7は、YM-100での測定値と後日に公表された二次基準測定施設の測定値との相関性である。NGSP認証取得のためには36検体以上で二次基準測定施設での測定値に対し±5%以内であることが求められている。YM-100は全検体で±5%以内の結果が得られ、乖離が小さく高い相関性が確認された。

μTAS化の利点

まず、検査に必要な検体量が少なく済むことが挙げられる。患者の採血の負担を軽減でき指先からランセットを使って採血しても検査が可能である。次に、検査の迅速性がある。全血を血球・血漿分離する機能が搭載されているため、遠心分離機での検体の前処理が不要でありその場ですぐに検査が可能となる。また、測定とメンテナンスの簡便性も利点である。血球・血漿分離から光学測定までの一連の処理がチップ内で自動的に行われるため、機械操作に習熟していないユーザーでも簡単に使用できる。廃液もチップ内で処理するため、廃液廃棄や洗浄のようなメンテナンスが要らない点でも取り扱いが簡単である。大型の自動分析装置と同じ試薬、同じ測定原理(ラテックス凝集免疫比濁法と吸光光度法)を使用できることから項目の拡張性も高い。

おわりに

YM-100ではμTAS技術を用いることで、微量検体で迅速、簡便かつ高精度なPOCT対応機器を実現できた。診療所や小病院など身近な医療機関での検体検査が一層普及し、病気の早期発見や予後の経過観察に貢献できれば幸いである。本稿では紹介できなかったが、NICU(新生児集中治療室)で注射器のシリンジに残ったわずかな血液でCRPを測定して低体重児の感染症予防を行っている施設があり、低体重児の採血の負荷軽減と検査機会の提供に一役を買っているとの報告がある。このような予想もしていなかったところで有用性を見いだされ使用されていることが嬉しい。今後は、医療現場でPOCT化が望まれている検査項目の開発に取り組みたい。また、試料の分離・精製、計量、試薬との混合といった溶液操作は血液分析に限らずバイオライフサイエンス分野で広く行われる。μTASを使った新たな分析ツールの可能性も探りたい。

*編集局注：本内容は特段の記載がない限り、本誌発行年時点での自社調査に基づいて記載しています。

参考文献

- [1] Lenters-Westra E.; Slingerland, R. J.; Six of Eight Hemoglobin A1c Point-of-Care Instruments Do Not Meet the General Accepted Analytical Performance Criteria. *Clinical Chemistry*, **56**(1), 44-52(2010).
- [2] Lenters-Westra E.; Slingerland, R. J.; Three of 7 Hemoglobin A1c Point-of-Care Instruments Do Not Meet Generally Accepted Analytical Performance Criteria. *Clinical Chemistry*, **60**(8), 1062-1072(2014).
- [3] Manz, A.; Graber, N. Widner H.M.; Widmer, H. M.; Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B*, **1**(1-6), 244-248(1990).
- [4] Manz, A.; Miyahara, Y.; Miura, J.; Watanabe, Y.; Miyagi, H.; Sato, K.; Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. *Sensors and Actuators B*, **1**(1-6), 249-255(1990).
- [5] U.S. Pat. No. 4,883,763, issued November 28, 1989 to Holen, et al. Sample processor card for centrifuge.
- [6] Schembari, C. T.; Ostoich, V.; Lingane, P. J.; Burd, T. L.; Buhl, S. N.; Portable Simultaneous Multiple Analyte Whole-Blood Analyzer for Point-of-Care Testing. *Clinical Chemistry*, **38**(9), 1665-1670(1992).
- [7] Schembari, C. T.; Burd, T. L.; Kopf-Sill, A. R.; Shea L. R.; Braynin, B.; Centrifugation and capillarity integrated into a multiple analyte whole blood analyzer. *Journal of Automatic Chemistry*, **17**(3), 99-104(1995).
- [8] David C. D.; Heather L. G.; Joe L.; Norman F. S. Jr.; Gregory J. K.; Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems: Characterization and Multiple Enzymatic Assays. *Analytical Chemistry*, **71**, 4669-4678(1999)
- [9] U.S. Pat. No. 5,919,711, issued July 6, 1999 to Boyd, et al. Analytical cartridge.
- [10] 金子修一, 堀池靖浩. バイオチップ実用化ハンドブック. NTS, 147-610p(2010). ISBN978-4-86043-270-6.
- [11] 百瀬俊. 特許公開公報, 特開2006-239538特許第4637610(2005年出願)[JP4637610]



横川 昭徳

YOKOGAWA Akinori

株式会社 堀場製作所
医用事業本部 開発部 副部長
Deputy Department Manager
R&D Dept.
Medical Business Division
HORIBA, Ltd.



平田 克樹

HIRATA Katsuki

株式会社 堀場製作所
医用事業本部 開発部 博士(情報科学)
R&D Dept.
Medical Business Division
HORIBA, Ltd.
Doctor of Information Science