

Feature Article

堀場雅夫賞 受賞者論文

Masao Horiba Award

レーザー分光法とマイクロデバイスを組み合わせた 超高感度迅速分析法の研究 Development of Ultrasensitive and Rapid Analysis Methods by Combining Laser Spectroscopy and Microdevices

渡慶次 学

Manabu TOKESHI

レーザー分光法(非蛍光性物質は熱レンズ検出法, 蛍光性物質は蛍光法)をベースにした超高感度検出技術の開発と, 極微量試料を迅速・高感度に分析・計測することを可能にするマイクロデバイス技術の開発を行ってきた。両者を組み合わせることにより, 極微量の生体由来物質(NOなどの低分子, タンパク質, DNA, 細胞など)を超高感度かつ迅速に分析・計測することが可能となる。

Both ultrasensitive detection methods based on laser spectroscopy, (thermal lens spectroscopy for non-fluorescent molecules and fluorescence spectroscopy for fluorescent molecules) and microdevices that can rapidly measure ultra low-volume samples have been developed. By combining both technologies, high sensitive detection and rapid analysis of ultra low-volume biological samples (ex. nitric oxide, proteins, DNA, cells, and so forth) has successfully demonstrated.

はじめに

生体由来物質(シグナル伝達物質, タンパク質, DNA, 細胞)は, 極微量で生体機能を精密に制御しているため, 極微量の生体由来物質を超高感度で測定する技術の開発は重要である。これらの測定により得られた情報は, 基礎生物学のみならず, 臨床診断応用においても極めて重要である。微量物質を高感度に測定するためには, 高性能な検出器の開発と微量物質を精密に扱える実験システムの開発が必要である。

著者らは, 極微量の生体由来物質の高感度計測・迅速分析を目的として, 熱レンズ顕微鏡の高感度化・小型化・多機能化と, マイクロデバイスを用いた極微量生体由来物質の迅速・高感度計測技術の開発に取り組んできた。本稿では, これらのいくつかの例について概説する。

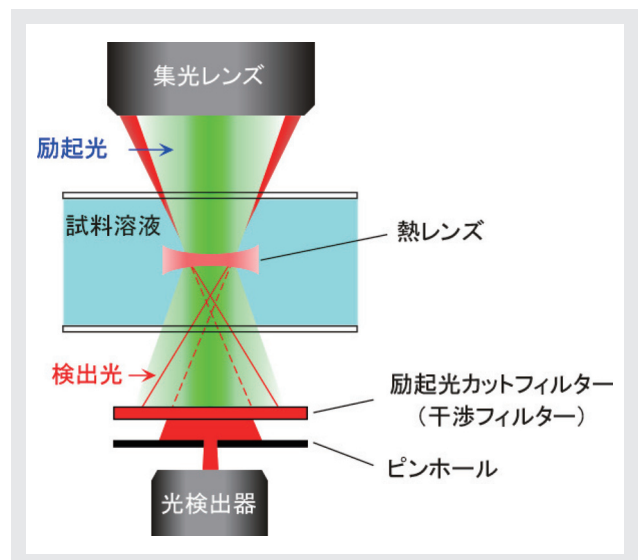


図1 熱レンズ検出法の原理
実線は熱レンズが無い場合の検出光の軌跡。破線は熱レンズがある場合の検出光の軌跡。

熱レンズ顕微鏡の高感度化・多機能化・小型化

従来、生体由来物質の高感度計測には、蛍光法が用いられるが、蛍光法は蛍光分子のみを対象としており、測定対象が限定される。そこで著者らは、東京大学で独自に開発された非蛍光物質の高感度検出器である熱レンズ顕微鏡(Thermal Lens Microscope: TLM)に着目し^[1]、その高感度化^[2]、^[3]、多機能化^[4-7]、小型化^[8-11]に取り組んできた。TLMは、熱レンズ検出法を顕微鏡下で実現したものである^[12]。熱レンズ検出法には、1つの光源を用いるシングルビーム法と波長の異なる2つの光源を用いるダブルビーム方式があるが^[13]、一般には感度の高いダブルビーム方式が広く用いられている。ダブルビーム方式では、測定対象を励起するための励起光と、測定対象が励起・緩和により放出した熱を検出するための検出光の2つの光源を用いる。測定対象が溶液中の溶質である場合を例にして、ダブルビーム方式の熱レンズ検出法の原理を説明する(図1)。励起光を集光して測定対象に照射すると、焦点近傍で溶質による光吸収が起こり、吸収された光エネルギーは熱エネルギーとして溶媒へ放出され、焦点近傍に熱分布(屈折率分布)が形成される。この熱分布、つまり、屈折率分布は通常溶液中では光学的な凹レンズ(熱レンズ)として作用する。そこに溶質と溶媒が吸収しない光(検出光)を導入すると、検出光は熱レンズによるレンズ効果(熱レンズ効果)を受けて屈折する。この屈折の程度をフォトダイオードなどの光検出器で検出するのが熱レンズ検出の原理である。形成された熱レンズの度は、溶質の濃度に比例するので定量が可能となる。原理から明らかなように、熱レンズ検出法は物質の光吸収に基づく分光法であり、吸光光度法と同様に励起光の波長を変えることで広い範囲の物質を測定対象とすることができる。また、吸光光度法とは異なり、熱レンズ検出法の検出感度は光路長(試料厚み)にあまり依存しないため、極微量の非蛍光性物質の高感度計測法として有用である。

TLMの高感度化・多機能化

次に、TLMによるいくつかの測定例を紹介する。TLMは、最適条件下では非蛍光性分子の1分子レベルの定量が可能である。図2にTLMによって測定したポルフィリン錯体の検量線を示す^[2]。グラフの横軸は、検出体積を考慮して分子数に変換してあり、可算個レベルで定量が

できていることがわかる。この結果は、世界で初めて溶液中の非蛍光性分子を1分子レベルで定量した例であり、TLMの感度の高さを示すものである。

熱レンズ検出法は、蛍光法のように比較的広い範囲に励起光を照射して、画像を取得する(イメージング)には不向きであるが、試料を走査することで非蛍光性物質のイメージングが可能となる。

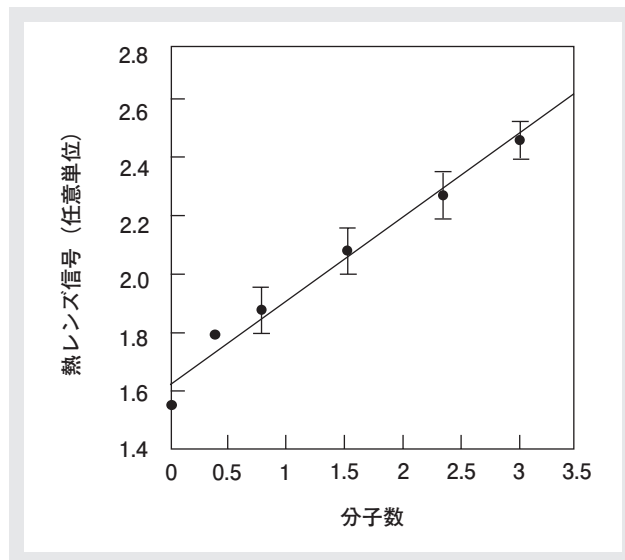


図2 ポルフィリン錯体の検量線

図2は培養細胞のアポトーシス前後でのシトクロムcの分布をTLMで測定した例である^[14]。生細胞内ではシトクロムcは、ミトコンドリアに局在していることが知られており、取得した画像(図3左)はそれと良く対応している。一方、アポトーシス後(図3右)では、ミトコンドリアや細胞が壊れ、シトクロムcが非局在化しているのがわかる。これは細胞の生化学過程を無標識で測定したユニークな例である。さらに、TLMは装置構成を若干変更することで円二色性測定も可能である^[5]。従来の円二色性測定は、測定原理が吸光光度法と同じなので、微量試料(低濃度)の測定は困難である。それに対して、TLMを利用すれば微量試料でも高感度な円二色性測定が可能になる。

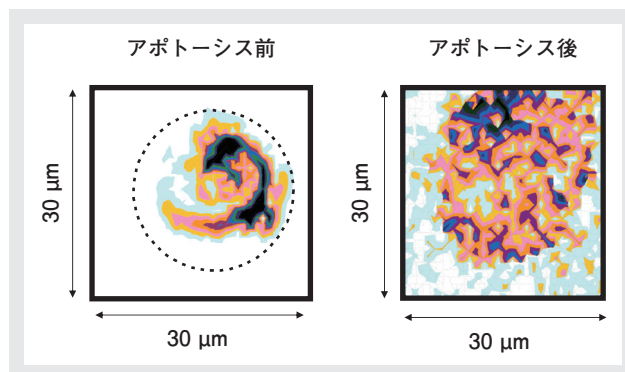


図3 TLMによる培養細胞のイメージング
アポトーシス前後でのシトクロムcの分布。

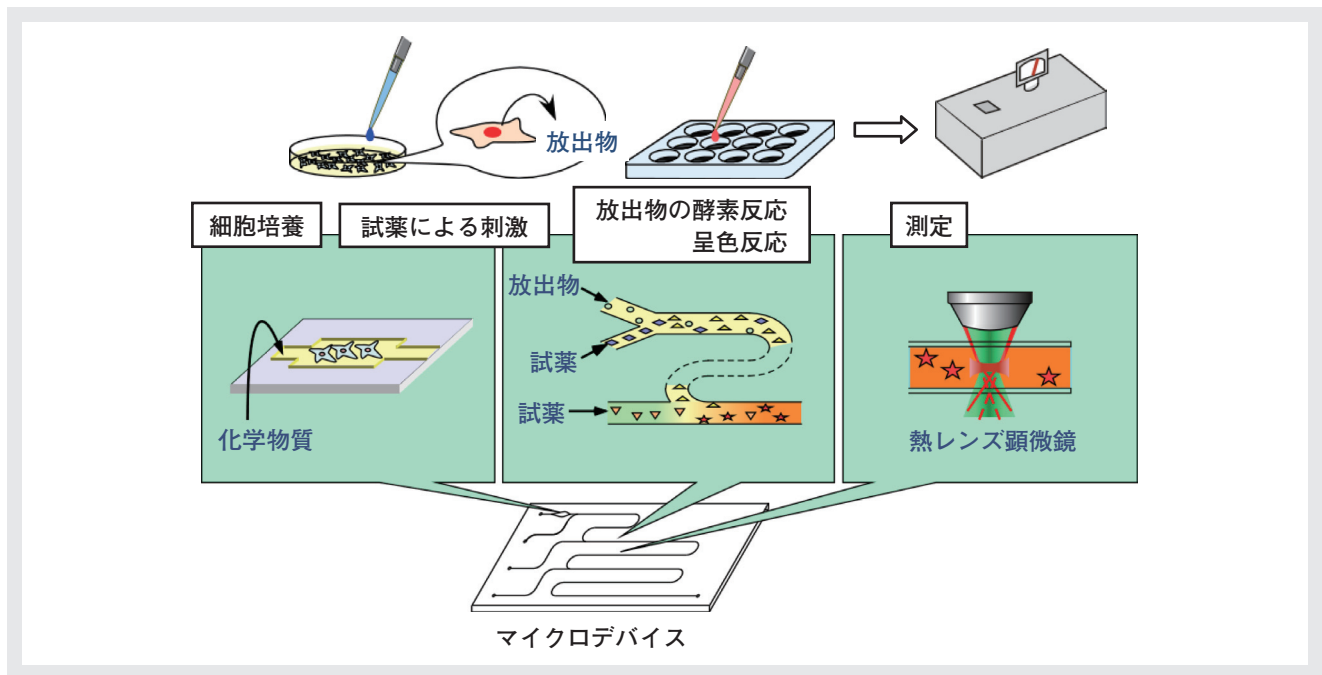


図4 細胞アッセイシステムの概略

TLMの小型化

従来のTLMは、光学防振台上に顕微鏡筐体と光源(レーザー)、光学部品(レンズ等)を配置して組み上げられた測定システムであったため、かなり大がかりなシステムであった。そこでTLMを小型化するために、必要な構成部品を顕微鏡筐体に組み込んだデスクトップサイズのTLMを開発した^[8]。さらに、光通信技術に用いられている光ファイバーと合波器などの光学系を利用した手のひらサイズの小型熱レンズ検出デバイスも開発した^{[9], [11]}。また、この小型熱レンズ検出デバイスの多機能化(熱レンズと蛍光の同時検出デバイスや多点同時検出デバイスなど)にも成功した^{[4], [15]}。

マイクロデバイスを用いた極微量生体由来物質の迅速・高感度測定

近年、マイクロタス(Micro Total Analysis Systems: μ TAS)と言われる微量試料を迅速に分析することを可能とするマイクロデバイスの研究が注目されている。 μ TASは文字通り従来システムをマイクロ化(小型化)することで、分析の効率化(試料量・試薬量の低減や分析時間の短縮など)を図ることを目的としている。しかし、試料量が減るということは、検出という観点からは大きな

問題となる。したがって、従来システムと同等あるいはそれ以上の性能を持つマイクロシステムを開発するためには、高感度検出器を用いるか、あるいはマイクロデバイスそのものに何らかの高感度計測を可能とする工夫が必要となる。

マイクロデバイスと熱レンズ検出法の組み合わせ

前述したようにTLMは、検出感度が光路長にあまり依存しないので、マイクロデバイスの検出器として優れている^[16]。また、マイクロデバイスとTLMを組み合わせることで、従来システムでは得ることができなかった情報を得ることも可能となることがある。例えば、従来の細胞アッセイは、①シャーレに細胞を培養する、②培養した細胞に試薬を作用させる、③細胞から放出された化学物質を測定する、という一連の流れである。この場合、細胞から放出された化学物質は、どのタイミングで細胞から放出されたのか分からないうえに、放出された化学物質はシャーレ全体に拡散するために主成分以外の微量成分の測定は困難である。細胞培養が可能なマイクロデバイスを用いれば、①～③の一連の操作を1枚の基板上に集積することができる^[17]。図4にマイクロデバイスを利用した細胞アッセイシステムの概略を示す。このシステムは、

マクロファージ様細胞株をデバイス内に培養し、リポ多糖を作用させ、マクロファージ様細胞株から放出される一酸化窒素(NO)をリアルタイム測定することができる。これを用いることにより、従来システムの分析時間を1/25に短縮し、NOの検出下限値を1/15に下げることができるのに加えて、従来システムでは不可能なNOのリアルタイム測定が可能となった。また、アッセイに必要な細胞数を従来システムの 10^5 から 10^3 に減らすことができた。貴重な細胞を用いたアッセイにおいては、この細胞数の低減は非常に大きなメリットとなる。

マイクロデバイスの微量試料の迅速分析という特徴と、TLMの高感度検出という特徴を組み合わせた好例に免疫分析がある。免疫分析は、バイオ系の基礎研究のみならず、臨床診断や食品分析など幅広い分野で用いられている重要な分析法の1つである。しかし、抗原-抗体反応に基づく免疫分析法は、特異性は極めて高いが、分析時間が長いという問題点があった。そこで著者らは、微細流路にポリスチレンビーズ(直径: 20~45 μm)を充填したビーズ充填型のマイクロデバイスを開発した。このデバイスは、ビーズの表面を抗原-抗体反応の反応場とすることで、反応効率(反応時間)を飛躍的に向上させることができる。ビーズの表面を反応場とすることで、単位体積当たりの抗体量が増える。さらに、ビーズが微細流路内にカラム状に充填されているため、抗原がビーズ表面の抗体と反応するために移動しなければならない距離(拡散距離)が短くなり、反応時間(拡散時間)が短くなる。このビーズ充填型マイクロデバイスとTLMを組み合わせることで、これまでに疾病マーカーなどの迅速・高感度分析を実現した^[18-22]。また、このデバイスと上記の小型熱レンズ検出器を組み込んだ全自動小型免疫分析装置も開発した^[23]。

マイクロデバイスと蛍光法の組み合わせ

蛍光法は、その感度の高さから微量物質の高感度計測に広く用いられている。しかし、蛍光法も物質の光吸収に基づく分光法であり、試料量が減少する(光路長が短くなる)と原理的に高感度計測は困難となる。したがって、マイクロデバイスと蛍光法を組み合わせ高感度計測を実現する場合にも、マイクロデバイスそのものに何らかの工夫が必要となる。前に述べたビーズ充填型デバイスのように、蛍光法においても、測定体積中に測定対象の量が増えるように工夫すれば良い。最も単純な例は、試料の濃縮である。マイクロデバイスを利用した電気泳動法

は、DNAやタンパク質などの生体由来物質を高速に分離できるという利点があるが、試料体積が小さいために濃度感度が低いという問題があった。そのため、さまざまな試料濃縮法が報告されているが、著者らは過度的等速電気泳動(Isotachopheresis)による新しい試料濃縮法を開発した。この手法により約800~20,000倍の試料濃縮が可能となり、ヒト血清アルブミンの免疫反応生成物(検出下限値: 7.5 pM)を僅か25秒^[24]、ウシ血清アルブミンの免疫反応生成物(検出下限値: 1 nM)を150秒^[25]、DNA-トロンビン複合体(検出下限値: 1 nM)を120秒^[26]、で分離分析することを可能とした。

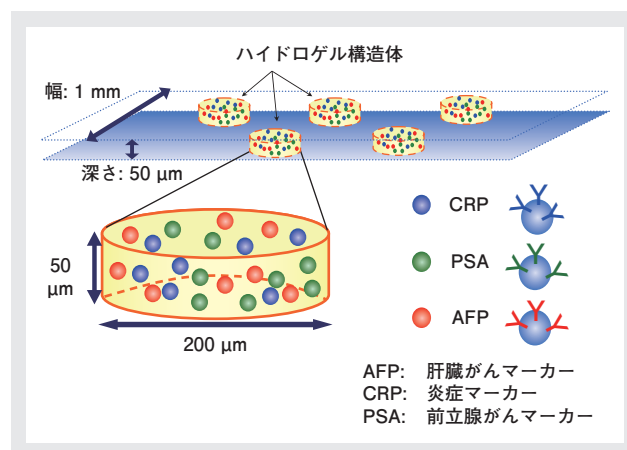


図5 光硬化性樹脂を利用した免疫分析デバイスの概略
ビーズ表面のYは抗体。

次に、マイクロデバイスと蛍光法を組み合わせ免疫分析の例を紹介する。上記のビーズ充填型デバイスを用いた免疫分析では、ビーズサイズを小さくすればするほど単位体積当たりの抗体量が増える。したがって、高感度な免疫分析を実現するためにはサイズの小さなビーズを用いれば良い。しかし、クロマトグラフィーのカラムと同様にビーズサイズが小さくなると送液に高圧が必要になるため、ビーズ充填型デバイスでは直径が数十 μm 以下のビーズを使うのは困難であった。そこでビーズを流路に充填するのではなく、光硬化性樹脂を利用して、流路内に円柱状のハイドロゲル構造体(直径: 200 μm , 高さ: 50 μm)を作製した^[27]。この構造体内部には、抗体を固定化した直径1 μm のポリスチレンビーズが多数包埋されている。図5に示したようにハイドロゲル構造体は、流路内部に間隔を空けて配置されており、流路内部への送液はほとんど圧力を必要としない。また、構造体内部には約30,000個のビーズが包埋されており、単位体積当たりの抗体量はビーズ充填型とほぼ同等である。このハイドロゲルは、大きな網目構造をしており、抗原-抗体反応が極めて効率的に進行する。さらに、このデバイスは、図5

に示したように固定化する抗体の種類を変えて、測定対象ごとに蛍光波長の異なる蛍光色素が標識された二次抗体*1を用いれば、複数種類の同時分析も可能である。これにより、3種類の疾病マーカー(図5参照)を試料量0.25 μ Lで、分析時間4分で従来法と同等の感度、分析時間8分では従来法よりも2桁高感度で測定することに成功した。

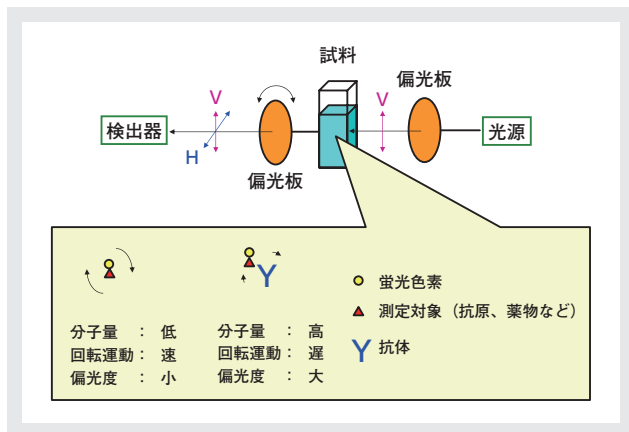


図6 蛍光偏光(免疫分析)法の原理

最後に、マイクロデバイスと蛍光偏光法を組み合わせた免疫分析の例を紹介する。血中の薬物濃度モニタリング(Therapeutic Drug Monitoring: TDM)は、副作用の強い薬物や有効治療濃度領域の狭い薬物では重要である。従来は、患者から採血した血液を血球分離し、血清を試料として免疫分析やクロマトグラフィー分析により分析を行っている。従来法では、採血量が多いため患者負担が大きいことや、分析時間が長いなどの問題点があった。そこで、蛍光偏光法とマイクロデバイスを組み合わせて、微量かつ迅速にTDMが可能なシステムを開発した。検出に蛍光偏光法*2を用いることで、抗体を固相に固定化することなく、溶液中で抗体と結合した薬物を直接検出することができる。図6に蛍光偏光(免疫分析)法の原理を示す。抗体と結合した薬物と未反応の薬物は分子量が大きく異なるため、薬物に蛍光色素を標識してあれば、それらの蛍光偏光度は大きく異なる。このシステムを用いることで、血清中のテオフィリン(呼吸器系疾患の治療薬)濃度を僅か65秒で測定することに成功した^[28]。さらに、名古屋大学医学部附属病院と協力して、このシステムを用いて実際の患者検体による臨床試験を行い、良好な結果を得ることに成功した^[29]。

*1: ここではサンドイッチ法を用いているため、ビーズ表面に固定化さ

れた抗体が抗原と反した後に、さらに蛍光標識された抗体(二次抗体)を反応させ、タンパク複合体(抗体-抗原-二次抗体)を形成させて、二次抗体に標識されている蛍光色素の量を定量する。

*2: 分子量の小さな薬物に蛍光標識し、偏光した励起光を照射すると、ブラウン運動により偏光が解消される。一方、それが抗体と結合すると分子量が大きくなり、ブラウン運動が抑制されることで蛍光の偏光度が維持される。したがって、蛍光偏光度を測定することで溶液中の抗体と結合した薬物を直接検出することが可能となる。

終わりに

極微量の生体由来物質の高感度・迅速分析技術は、バイオ系の基礎科学研究のみならず、臨床診断などの分野においても、今後ますます重要になっていくことは間違いない。そのためには、本稿で紹介したような高感度検出技術の開発と、マイクロデバイスのような高感度・迅速分析が可能な分析プラットフォームの開発が重要である。その他にも信号の増幅技術や信号強度の増強技術の開発なども重要である。さらなる高感度化・迅速化を実現するためには、これら技術開発を複合的に取り組んでいくことが必要であろう。

謝辞

ここで紹介した研究は、参考文献にあげた研究論文の共著者の協力により初めて実現したものです。ご協力いただきました共著者の先生方と学生達に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] K. Uchiyama, A. Hibara, H. Kimura, T. Sawada, T. Kitamori, Thermal Lens Microscope, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39**, 5316 (2000).
- [2] M. Tokeshi, M. Uchida, A. Hibara, T. Sawada, T. Kitamori, Determination of Subyoctomole Amounts of Nonfluorescent Molecules Using a Thermal Lens Microscope: Subsingle-Molecule Determination, *Anal. Chem.*, **72**, 2112 (2001).
- [3] M. A. Proskurnin, M. N. Slyadnev, M. Tokeshi, T. Kitamori, Optimisation of Thermal Lens Microscopic Measurements in a Microchip,

- Anal. Chim. Acta*, **480**, 79 (2003).
- [4] M. Yamauchi, M. Tokeshi, J. Yamaguchi, T. Fukuzawa, A. Hattori, A. Hibara, T. Kitamori, Miniaturized Thermal Lens and Fluorescence Detection System for Microchemical Chip, *J. Chromatogr. A*, **1106**, 138 (2006).
- [5] M. Yamauchi, K. Mawatari, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori, Circular Dichroism Thermal Lens Microscope for Sensitive Chiral Analysis on Microchip, *Anal. Chem.*, **78**, 2646 (2006).
- [6] S. Hiki, K. Mawatari, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori, UV Excitation Thermal Lens Microscope for Sensitive and Nonlabeled Detection of Nonfluorescent Molecules, *Anal. Chem.*, **78**, 2859 (2006).
- [7] 比企伸一郎, 渡慶次学, 角田正也, 馬渡和真, 菊谷善国, 佐藤記一, 火原彰秀, 志村清仁, 内田直行, 北森武彦, 紫外励起型熱レンズ顕微鏡/液体クロマトグラフィを用いたペプチドの無標識高感度検出, *分析化学*, **56**, 1 (2007).
- [8] 比企伸一郎, 渡慶次学, 火原彰秀, 北森武彦, デスクトップ熱レンズ顕微鏡の開発, *分析化学*, **52**, 569 (2003).
- [9] M. Tokeshi, Y. Yamaguchi, A. Hattori, T. Kitamori, Thermal Lens Micro Optical Devices, *Anal. Chem.*, **77**, 626 (2005).
- [10] R. Anraku, K. Mawatari, M. Tokeshi, M. Nara, T. Asai, A. Hattori, T. Kitamori, Numerical Analysis of Thermal Lens Effect for Sensitive Detection on Microchips, *Electrophoresis*, **29**, 1895 (2008).
- [11] K. Mawatari, T. Ohashi, T. Ebata, M. Tokeshi, T. Kitamori, Thermal Lens Detection Device, *Lab Chip*, **11**, 2990 (2011).
- [12] 日本分光学会編, 分光測定入門シリーズ10: 顕微分光法 ナノ・マイクロの世界を見る分光法, 77-90, 講談社サイエンティフィック (2009).
- [13] S. E. Bialkowski, *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis*, John-Wiley & Sons (1996).
- [14] E. Tamaki, K. Sato, M. Tokeshi, K. Sato, M. Aihara, T. Kitamori, Single-Cell Analysis by a Scanning Thermal Lens Microscope with a Microchip: Direct Monitoring of Cytochrome c Distribution during Apoptosis Process, *Anal. Chem.*, **74**, 1560 (2002).
- [15] 渡慶次学, *化学と工業*, **61**, 1044 (2008).
- [16] M. Tokeshi, T. Kitamori, Flow Analysis in Microfluidic Devices, in *Advances in Flow Analysis* (ed. M. Trojanowicz), Chapter 6, 146-166, Wiley-VCH (2008).
- [17] M. Goto, K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi, T. Kitamori, Development of a Microchip-Based Bioassay System Using Cultured Cells, *Anal. Chem.*, **77**, 2125 (2005).
- [18] K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori, Integration of an Immunosorbent Assay System: Analysis of Secretory Human Immunoglobulin A on Polystyrene Beads in a Microchip, *Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000).
- [19] K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, Determination of Carcinoembryonic Antigen in Human Sera by Integrated Bead-Bed Immunoassay in a Microchip for Cancer Diagnosis, *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).
- [20] K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, Microchip-Based Immunoassay System with Branching Multichannels for Simultaneous Determination of Interferon- γ , *Electrophoresis*, **23**, 734 (2002).
- [21] K. Sato, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, Microchip-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Micro ELISA) System with Thermal Lens Detection, *Lab Chip*, **4**, 570 (2004).
- [22] M. Kakuta, H. Takahashi, S. Kazuno, K. Murayama, T. Ueno, M. Tokeshi, Development of the Microbeads-Based Repeatable Immunoassay System for Clinical Diagnosis, *Meas. Sci. Tech.*, **17**, 3189 (2006).
- [23] T. Ohashi, K. Mawatari, K. Sato, M. Tokeshi, T. Kitamori, A Micro-ELISA System for the Rapid and Sensitive Measurement of Total and Specific Immunoglobulin E and Clinical Application to Allergy Diagnosis, *Lab Chip*, **9**, 991 (2009).

- [24] M. R. Mohamadi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Online Preconcentration by Transient Isotachophoresis in Linear Polymer on a Poly(methyl methacrylate) Microchip for Separation of Human Serum Albumin Immunoassay Mixtures, *Anal. Chem.*, **79**, 3667 (2007).
- [25] J. Wang, Y. Zhang, M. R. Mohamadi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Exceeding 20000-fold Concentration of Protein by the Online Isotachophoresis Concentration in Poly(methyl methacrylate) Microchip, *Electrophoresis*, **30**, 3250 (2009).
- [26] J. Wang, Y. Zhang, Y. Okamoto, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Online Transient Isotachophoresis Concentration by the Pseudo-Terminating Electrolyte Buffer for the Separation of DNA-Aptamer and Its Thrombin Complex in Poly(methyl methacrylate) Microchip, *Analyst*, **136**, 1142 (2011).
- [27] M. Ikami, A. Kawakami, M. Kakuta, Y. Okamoto, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Immuno-Pillar Chip: a New Platform for Rapid and Easy-to-Use Immunoassay, *Lab Chip*, **10**, 3335 (2010).
- [28] T. Tomoya, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Microchip-Based Homogeneous Immunoassay Using Fluorescence Polarization Spectroscopy, *Lab Chip*, **9**, 996 (2009).
- [29] T. Tomoya, T. Hase, Y. Okamoto, N. Kaji, T. Arima, H. Matsumoto, M. Kondo, M. Tokeshi, Y. Hasegawa, Y. Baba, A Clinical Trial for Therapeutic Drug Monitoring Using Microchip-Based Fluorescence Polarization Immunoassay, *Anal. Bioanal. Chem.*, DOI 10.1007/s00216-011-5304-9 (2011).



渡慶次 学

Manabu TOKESHI

名古屋大学大学院工学研究科 准教授
工学博士