

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
研究期間： 2006～2009
課題番号： 18550079
研究課題名（和文） 不妊症診断・治療のための迅速簡便なホルモニー斉分析システムの開発
研究課題名（英文） Development of a System of Total Analysis of Hormones in Saliva for
Diagnostics and Treatment of Sterility
研究代表者
荒井 健介（ARAI KENSUKE）
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号： 10266885

研究成果の概要（和文）： 1000 分の 1 ミリメートルの精度で微細加工するための技術（MEMS）を利用して化学分析マイクロチップを設計・作成し、多項目の内分泌検査を一つの装置内で一斉、迅速、簡便、高感度かつ高精度で行うことができる実用分析システムを構築した。これまで不妊症治療の臨床現場で 1 週間程度かかっていた内分泌検査がわずか数分間のうちに完結できる分析システムの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）： A rapid, simple, sensitive practical method for simultaneous endocrine tests was developed by creating chemical analysis microchannel chips using a microfabrication technique called MEMS to an accuracy of 1 micrometer. Hormonal inspections, which take about a week in clinical practice of treatment sterility by conventional methods, proved to be successfully completed in a few minutes by the proposed method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,700,000	630,000	4,330,000

研究分野：薬品分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：マイクロナノデバイス、マイクロアレイ、蛍光検出、ELISA、ホルモン、マイクロチャンネル、唾液、診断

1. 研究開始当初の背景

近年急増している不妊症への対策は、QOL の向上のみならず、人口減少抑制の観点から深刻かつ緊急な国家的課題である。不妊症の主な原因である体内の性ホルモンバランス不調の診断・治療のためには内分泌検査が不可欠である。従来の内分泌検査では通常、採

血試料を専門検査機関へ送って検査を依頼しているが、(1) 個々の性ホルモン検出には長時間と高価な装置が必要、(2) そのため常時変動している性ホルモン濃度を正確には把握しにくい、(3) 大量の採血によるストレスが原因でホルモン濃度自体が変わってしまい正確な検査値が得られにくい、など実用

上きわめて問題が多い。

臨床においてその場で簡単に、ストレスフリーで、迅速・高精度で結果が得られるような検査手法が強く望まれている。このような分析法が提供されれば、不妊症治療・診断のための画期的な検査手段となり得ると期待された。

2. 研究の目的

高感度検出試薬固定化マイクロチップ技術を応用して、多項目の内分秘検査を一つの装置内で(1)一斉、(2)迅速、(3)簡便、(4)高感度、(5)高精度で行うことができる実用分析システムの開発を目指す。

3. 研究の方法

本分析システムの原理はマイクロチャンネル技術に基づくマイクロ反応場でのイムノアッセイ法に基づく。複数の抗体試薬を一つのマイクロチャンネル内にあらかじめ固定化し、微量の試料がチャンネル内を通過する際に複数の抗体とわずか数分の間に反応完結し、高感度蛍光検出系によって検出する。マイクロチャンネル内の多項目試薬固定化技術は申請者独自に確立したもので、本システムの核となる部分である。

マイクロチャンネル技術を複数のホルモン検査に応用するという独創的な手法により従来の血液検査方法と比べて、複数の検査を一斉に（多種類のホルモン検査を1回で）、短時間で、微量の試料で、前処理が不要で、高感度で、かつ小さな環境負荷で行えるという、革新性の極めて高い実用的な内分秘検査技術が実現すると期待される。

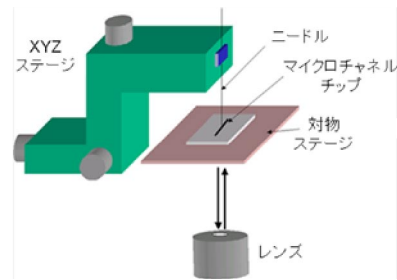
本分析システムの原理は、複数の抗体試薬を一つのマイクロチャンネル内にあらかじめ固定化し、微量の試料がチャンネル内を通過する際に複数の抗体とわずか数分の間に反応完結し、高感度蛍光検出系によって検出するというものである。これに基づいて研究計画を以下の7項目に分類し、研究を段階的に遂行した。

- (1)分離・発色系の検討（抗原抗体反応、酵素反応、蛍光反応、感度・精度・再現性）
- (2)蛍光検出技術の検討（光源・レンズ・フィルター・CCDなど光学系の選択、データ処理法）
- (3)マイクロチャンネル設計・作製（材質、サイズ、エッチング、固定化技術、インターフェイス）
- (4)試料導入方法（採取チップ、前処理、送液）
- (5)試作機の作製（モジュール結合、小型化の試み）
- (6)実証実験・評価（従来機との比較、実際試料への応用）

4. 研究成果

(1) 分離・発色系の検討：検査対象ホルモンとして、排卵や月経など卵巣機能に密接に関連している卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体化ホルモン(LH)、黄体化ホルモン放出ホルモン(LH-RH)、プロラクチン(PRL)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、テストステロン、エストロゲン、プロゲステロンを選び、生体成分の分析法として汎用されている、市販 96 穴マイクロウェルプレート ELISA キットを用いた分離検出系により原理検証を行い、試薬の種類や濃度、および溶液の pH など反応効率を左右する諸条件を最適化し、ホルモンを蛍光検出によって高感度に分離定量できることを確かめた。検出試薬としては、汎用性の高い酵素である Horse Radish Peroxidase による酵素反応により高い傾向収率が望める Amplex Red が最適であった。

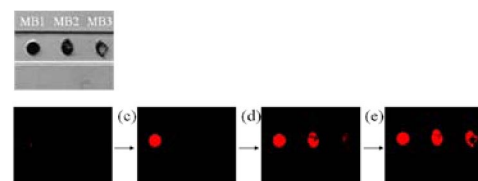
(2) 蛍光検出技術の検討：蛍光試薬を非常に狭いチャンネル内の任意の位置にスポットするための技術を開発した（図1）。



(図1 顕微鏡下におけるマイクロチャンネル内への検出試薬スポットティング装置)

さらに、Amplex Red の酵素反応により生じた Resorufin の蛍光をマイクロチャンネル内で効率・精度良く捕捉するために、倒立型蛍光顕微鏡と高感度 CCD カメラを組み合わせた測定系を構築した。チャンネルの蛍光画像を精度良く撮影するための諸条件を決定できた。

(1)と(2)の技術に基づき、ホルモンへの応用に先立って多種類の生体関連物質を一つのチャンネル内で検出できることを確かめるために、ここでは塩基配列の異なる DNA1, 2, 3 の逐次検出を試みた。各 DNA に特異的に応答する蛍光検出試薬をチャンネル内壁にスポット上に固定化しておき、DNA1~3 を逐次チャンネル内に導入して逐次検出を行えることを明らかにした（図2）。



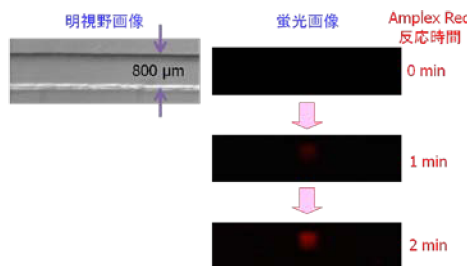
(図2 マイクロチャンネル内における塩基配列の異なる3種類のDNAの蛍光検出)

計画当初段階では、シグナルの検出系として主に蛍光発光系の活用を考えていたが、研究が進行し実用化への段階に移行するにあたり、デバイスの小型化を考慮した場合、一般に蛍光検出に用いられる光学系では物理的なサイズが大きく不向きな面があることも分かってきた。したがって、高感度性を重視する蛍光系を利用する検出の他に、デバイスの小型化が容易な電極反応を利用する電気化学検出についても併せて検討した。その結果、微小な電極をチャンネルに配置することが有効なことが分かった。微小電極のテスト段階では、高純度炭素からなるシャープペンシル芯の活用がコストや取り扱いの点で有用であった。将来的には電気化学検出とマイクロチャンネルとの融合が実用化に有利となることが示唆された。

(3) マイクロチャンネルの設計・作製： マイクロチャンネルの材質や形状を設計し、エッチングの諸条件を最適化することで、任意の流路のマイクロチャンネルを作成できた(図3)。マイクロチャンネルを組み込んだガラスとPDMSとの複合チップに試料溶液、反応試薬溶液、洗浄液を逐次送液するためのインターフェイスについて検討し、高精度のマイクロシリンジポンプにより最適な送液条件を明らかにした。さらに、蛍光標識したタンパク質をモデル化合物として、すでに開発済みの反応試薬固定化手法によって、マイクロチャンネル内に固定された蛍光標識試薬を精度良く検出できることを確認した(図4)。



(図3 試作した5 cm 5 cm PDMA-ガラスハイブリッド型マイクロチャンネルチップ)

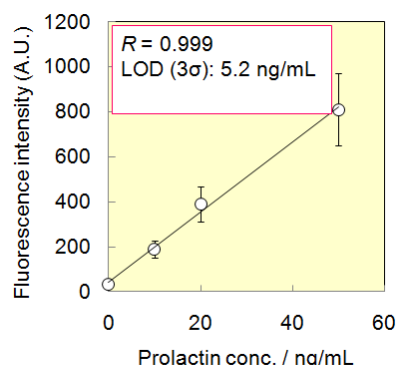


(図4 試作マイクロチャンネル内におけるプロラクチンの蛍光検出)

(4) 試料導入方法： 多項目検査チップとのインターフェイスの容易な唾液採取法について検討したが、市販の唾液採取用器具により試料を回収する方法が最も簡便かつ有望であることが分かった。Sarstedt製(商品名 Salivette)と Filtrona Fibertec製(商品名 Transorb)の製品について比較検討したところ、これまで唾液中成分の研究にて汎用されてきた前者に比べて、後者の方が特異的吸着の少なさの点で優れていることが分かった。

(5) 試作機の作製： 個々に開発したマイクロチャンネルチップ、試料採取チップ、光学系、送液系などの機能モジュールを組み合わせた分析システムを試作した。唾液試料を検出部に導いて高感度に蛍光検出を行うための流路条件を確立できた。

(6) 実証実験・評価： ヒューマンインターフェイスを意識したシステム化について検討したが、実際の製品化を念頭に置いた試作化までには、データの電子処理装置の設計・作成、得られた数値データに関する評価方法の確立、試料の粘度や気泡の蛍光検出・定量に及ぼす影響の除去など、まだまだ解決すべき課題が多いことが分かり、計画当初の予想をはるかに上回る労力と時間がかかることが判明したため、本項目の完全な達成までには至らなかったが、(5)で作成した試作機を用いたモデル検証実験を行った。内分泌物質モデルとしてプロラクチンなど数種類を取り上げ、ヒト試料への応用について検討した。比較検証にはELISA法を用いた。その結果、唾液および血清中に含まれる内分泌物質の検出・定量が可能であることを明らかにした。例として、プロラクチンの検量線を作成し、10~50 ng/mLの定量範囲($r=0.999$)を得た。検出感度は5.2 ng/mLであった(図5)。したがって、本モデルはプロラクチンをはじめとする内分泌物質を含む実際試料の迅速かつ高感度な定量に有用であることが示唆された。



(図5 プロラクチンの検量線)

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 荒井健介、ストレスを「化学的に」はかる、
埼玉県薬剤師会雑誌、35(5), pp.16-18
(2009).
- ② 荒井健介、シャープペンシル芯で化学計測、
埼玉県薬剤師会雑誌、35(11), pp.16-18
(2009).

[学会発表] (計4件)

- ① 荒井健介、ホルモン一斉分析のためのマイクロチャンネルチップの作製、日本薬学会第130年会、平成21年3月29日、岡山(ハイライト講演)。
- ② 久保光志、荒井健介、窪田洋子、齋藤義人、加藤一良、渡邊泰雄、II型糖尿病あるいは脂質異常症で治療中の患者における酸化コレステロールの変動(1)、日本薬学会第130年会、平成22年3月28日、岡山。
- ③ 荒井健介、シャープペンシル芯を作用電極とするAs(III)の簡易定量法、第3回日本分析化学会関東支部大会、平成21年9月5日、東京(依頼講演)。
- ④ 久保光志、荒井健介、久保博昭、吉村吉博、ジヒドロローダミン123を用いた生体中の過氧化物由来フリーラジカルの簡易分析法の開発、第76回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会、平成21年6月4日、大宮。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 健介 (ARAI KENSUKE)
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：10266885

(2) 研究分担者

吉村 吉博 (YOSHIMURA YOSHIHIRO)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00147894
(H18)

久保 光志 (KUBO KOSHI)
日本薬科大学・薬学部・助手
研究者番号：80399774
(H18)

(3) 連携研究者