

行える集積化マイクロチップデバイスの開発を中心に行ってきた。今回、オンラインデバイスの試作とその評価について紹介する。

## 2

1 )。市販のマイクロチップ電気泳動では、効率よく、試料導入から電気泳動分離までがマイクで嘉子と積集料効なもののバ網遺網遺ソのバ遺解プ上に集積化、嘉マイ信ソの解オートメーの範囲外である。この煩雑な操作により、検体数が多くなればなるほどハイスループット化が困難になってくる。マイクロチップ電気泳動によって分離時間が大幅に短縮化されているものの、これらの前処理段階が実際には律速になっており、タンパク質の研究が面倒なものと敬遠されてきた。そこで筆者らは、細胞培養からタンパク質の電気泳動分離までを一体化させたオンラインで、遠心操作やピペッティングが不要で、簡易に

離可能), これらの前処理段階にさらに1~2時間を要しているのが実情である。その上, 長時間かかる処理の間に細胞のダメージやタンパク質の分解を受けかねない。

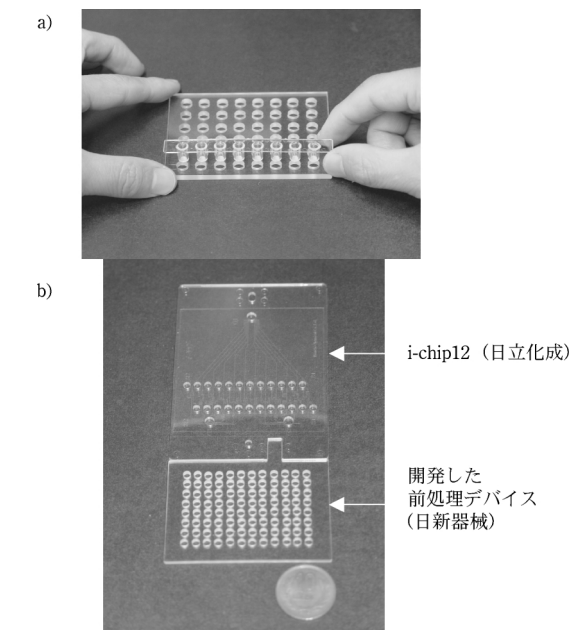
近年, 種々のメーカーより様々なアッセイキットが市販されているが, タンパク質のアッセイすべてに対してオールマイティなものや, 電気泳動に供するための前処理チップを含んだオンラインデバイス形式のものは今までにない。また, 様々な研究機関で一分子または数個の細胞を用いたマイクロチップ上での解析の試みがなされているが, 筆者らは高密度を好む細胞にも適応可能なオンラインマイクロデバイスを試みた。

### 3 オンラインデバイスの開発

筆者らは, 図2のようなハンドメイドの前処理マイクロデバイスを含む細胞培養から電気泳動分離までのインテグレイテッドマイクロデバイスを開発した(日新器械<sup>(株)</sup>協力)。既存の各メーカーのマイクロチップ電気泳動に対応用の前処理チップ(図2a)と日立電子SV1210測定用i-チップ12(日立化成)に接続用のタイプ(図2b)の2種類である。いずれのタイプもウェルと8~12個が連なったインナーカップ(インナーカップの内側はメンブラン)からなる簡易なものであり, 一列ごとにそれぞれの工程(培地交換, 洗浄, タンパク質抽出等)が8~12サンプル一度に行える。これらのデバイスにより, 細胞の回収も遠心操作も不要である。従来法によるものと本マイクロデバイスを用いた場合について, 前処理段階から電気泳動分離までのトータル分析時間, 必要細胞数, ピーク強度等を比較した。マイクロチップ電気泳動装置として, 日立電子SV1210およびアジレントテクノロジー2100バイオアナライザーを用いた。細胞としてジャルカット細胞を用いた。

### 4 結果

本オンラインデバイスを用いて細胞の回収から電気泳動分離

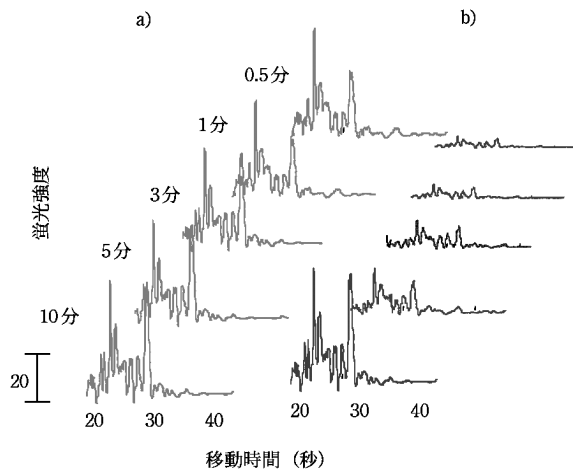


a) 万能型, b) 日立電子SV1210対応用

図2 試作した新規オンラインデバイス(日新器械<sup>(株)</sup>協力)

までを行った場合と, 既存の方法による結果を比較する。新規デバイスでは, 細胞数の減少は2%以内, 細胞数の各ウエルのばらつき相対標準偏差RSDは4%, これに対し従来法では細胞数の減少は最大20%, RSD 18%という結果であった。従来法ではそれぞれの工程段階により, 細胞の減少がみられるのに対し, 本デバイスでは, 前処理工程を通して細胞数をほぼ一定に保つことができる。このことは, 本デバイスを用いれば, 検体間のばらつきが少なくなり, 精度を向上させることが可能であることを示す。またオンラインチップ上でのタンパク質の抽出は良好であり, 30秒で充分抽出可能であった(図3)。既存のタンパク質抽出方法では, 用いた試薬のメーカー推奨法で10分を要している。

筆者らは先に, マイクロチップ電気泳動上で変性処理工程を省く手法を開発しており<sup>2)</sup>, この手法により検出感度の向上を達成した。このほかにも12サンプルを15秒で測定可能という新しい分離方法(圧力負荷法)を先に開発した<sup>3)</sup>。これらの手法を併用して新規デバイスでは, 細胞回収から電気泳動分離までのトータル分析時間が12サンプルあたり1分で可能であった(表1)。一方従来法では12サンプルあたり80分を要した。これらの結果より, 本新規デバイスの有効性が示唆され



a) 開発したデバイスを用いたもの, b) 従来法

図3 抽出時間の高速化

表1 従来法と新規法の分析時間の比較

工程	マイクロデバイス	従来法
[1] 前処理工程		
1. 培地交換	2 s	10 min
2. 洗浄	1 s	5 min
3. タンパク抽出	30 s	20 min
4. 変性処理	0 s	10 min
小計	33 s	45 min
[2] 電気泳動分離工程	15 s <sup>注1)</sup>	30 min <sup>注2)</sup>
トータル分析時間	1 min	80 min
細胞密度(細胞数/mL)	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
必要最少細胞密度(細胞数/mL)	$1 \times 10^3$	$5 \times 10^4$

<sup>注1)</sup> 文献2)3)記載の既開発手法を併用

<sup>注2)</sup> アジレント2100バイオアナライザー(プロテイン200プラスアッセイキット)による。

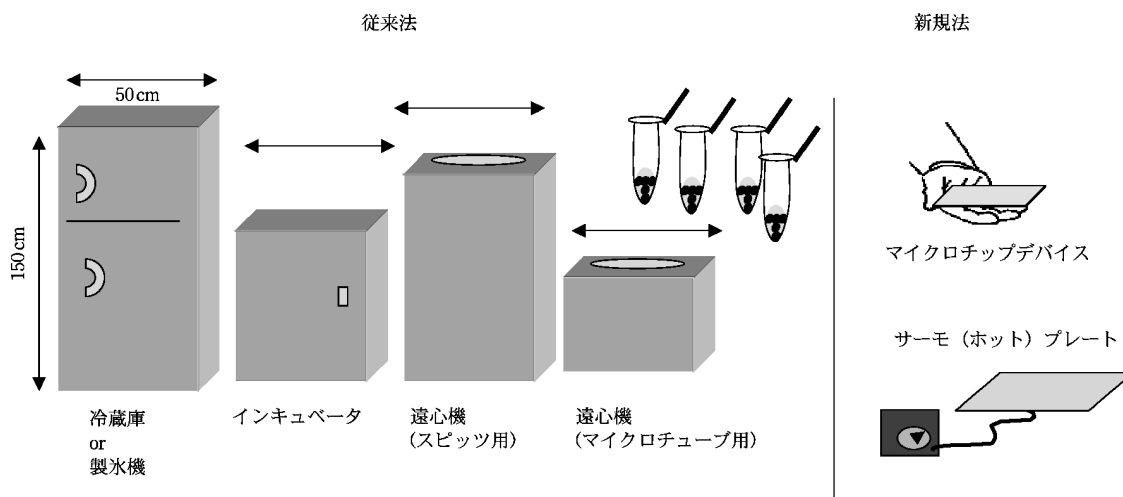


図4 従来法と新規法に必要な装置の比較

た。従来法と比較して1/80の高速化が達成されたことになる。筆者らはこのほかに、本デバイスをリアクションデバイスとして用いて、細胞を使った種々の反応実験（ストレス評価や薬効評価等）に応用できることを示した<sup>4)</sup>。

## 5 将来の展望

これらのデバイスにより筆者らは、以下の点を達成可能とした。1) 遠心やピペティングが不要であり分析が大幅に簡略化可能である。2) 遠心機、ピペットやポンプが不要であり、省スペース、省エネルギーである。3) 分離時間の高速化のみならず、トータル分析時間の高速化が達成可能である。4) 細胞数のロスが減少し、細胞数の変化によるデータのばらつきが少なくなり、データ精度の向上が可能である。5) 細胞の取り扱いが迅速にできるため細胞のダメージが減少する。これまでの従来法では、図4に示す一連の装置を一分析室あたり必要としていたものが、新規法ではわずか本デバイスとサーモプレート（細胞を扱う際の温度管理のために使用）があればよく、あとはマイクロチップ電気泳動装置によって解析できる。これならば、臨床等の現場でも各診療室への設置が容易にもなるであろう。

筆者らは現在、21世紀COEプログラムにおいて、ストレス制御をめざす栄養科学を視点に研究を行っているが、本開発デバイスをスクリーニングに用いた実験を行い、ある種の食品成分がジャルカット細胞のアポトーシスを有意に誘導することを見いだした<sup>4)</sup>。今後プロテオーム解析のハイスループットスクリーニングのために威力を発揮でき、そのことによりプロテオームの研究を加速できれば幸いである。

謝辞 本研究は、徳島大学21世紀COEプログラムおよび独立行政

法人科学技術振興機構（JST）のCRESTの助成金を得て行われた。謝意を表します。また、本デバイスの試作・製作に多大なるご協力を下さいました日新器械株式会社・八田耕志氏に深謝します。

## 文 献

- 1) M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba: *Nature Biotechnol.*, **22**, 337 (2004).
- 2) M. Tabuchi, Y. Kuramitsu, K. Nakamura, Y. Baba: *J. Proteome Res.*, **2**, 431 (2003).
- 3) M. Tabuchi, Y. Kuramitsu, K. Nakamura, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **75**, 3799 (2003).
- 4) M. Tabuchi, Y. Baba: *J. Proteome Res.*, **3**, 877 (2004).



田淵真理 (Mari TABUCHI)  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 (〒770-8505 徳島市庄町1-78)。  
◀趣味▶ スキー、水泳、ピアノ。  
E-mail: tabuchi@ph.tokushima-u.ac.jp



馬場嘉信 (Yoshinobu BABA)  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 (〒770-8505 徳島市庄町1-78)、現名古屋大学。九州大学大学院理学研究科博士課程修了、理学博士。◀現在の研究テーマ▶ ナノバイオデバイスの創製と次世代医療への応用。◀主な著書▶ “基礎化学コース 分析化学III” (丸善)。  
E-mail: ymттbaba@ph.tokushima-u.ac.jp