HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マイクロチップイムノアッセイ
Author(s)	舘, 知也; 加地, 範匡; 渡慶次, 学 他
Citation	分析化学, 56(7), 521-534 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.56.521
Issue Date	2007-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71685
Type	journal article
File Information	bunseki,56.521.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

BUNSEKI KAGAKU Vol. 56, No. 7, pp. 521–534（2007）
© 2007 The Japan Society for Analytical Chemistry

分析化学総説

マイクロチップイムノアッセイ

舘　知也[1]，加地　範匡[1,2]，渡慶次　学®[1,2]，馬場　嘉信[1,2,3,4]

マイクロチップ上で免疫化学反応を行うマイクロチップイムノアッセイは，試料・試薬の微量化，短時間測定，操作の簡便性等の利点により，様々な分野での利用が試みられており，既に多くの種類のイムノアッセイが開発されている．マイクロチップイムノアッセイを実施するには，マイクロチップの材質や表面修飾，サンプルの導入・搬送，検出系といった項目を検討しなければならない．また，マイクロチップ上でイムノアッセイの種類に応じた系を構築する必要もある．本稿では，イムノアッセイの種類と分類について説明するとともに，マイクロチップイムノアッセイを開発する際の要点を論述する．更に，最近の論文で報告されたマイクロチップイムノアッセイの実施例についても紹介する．

1　はじめに

ナノテクノロジー・バイオ micro electro mechanical system（MEMS）を活用した分離・計測技術の開発が，急速に展開されてきている．特に，micro total analysis system（μ-TAS），つまりマイクロ空間における化学分析システムの集積化については，数多くの研究・開発が行われている．その結果として，マイクロチップ上での分析技術及びその集積化技術は著しい発展を遂げており，様々な分野においてその実用化が期待されている．マイクロチップ上で分析を行う利点として，主に試料・試薬量の微量化，超短時間での測定，集積化・自動化による携帯性や簡便性が挙げられる．これらマイクロチップ分析技術によって社会が受ける恩恵は計り知れないほどであり，医療・環境・食品・工業等の様々な分野で応用化そして実現化されてきている[1)〜9)]．例えば，医療分野では超短時間で血液1滴にて検査ができるマイクロチップ，環境分野では採取現場においてダイオキシンのような毒物を安全にかつ簡便に測定可能なマイクロチップが既に考案・開発されている．これらの中でも，抗原・抗体反応を利用したイムノアッセイは，バイオ・医療・環境などの幅広い領域で応用可能であるため，イムノアッセイをマイクロチップ上に集積化するという研究は，世界中で開発競争が行われている[6)8)10)〜14)]．本稿では，このマイクロチップイムノアッセイについて，マイクロチップ化の基本事項と多数のイムノアッセイ実施例を中心に紹介し，研究開発の現状を概観する．

[1] 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻：464‐8603 愛知県名古屋市千種区不老町
[2] 名古屋大学予防早期医療創成センター：464‐8603　愛知県名古屋市千種区不老町
[3] 名古屋大学プラズマナノ工学研究センター：464‐8603　愛知県名古屋市千種区不老町
[4] 産業技術総合研究所健康工学研究センター：761‐0395　香川県高松市林町 2217‐14

2　イムノアッセイとそのマイクロチップ化

イムノアッセイとは，抗原と抗体の親和性を利用して定量分析を行う免疫学的測定法である．その特徴としては，抗原抗体反応を利用するため感度及び特異性が高く，サンプル中に含まれる微量の目的物質を測定することが可能である．そのため，バイオ・医療・環境・食品などの様々な分野で，確立した分析手法の一つとして多用されている．また，イムノアッセイのキットが数多く販売されており，専門的な分析技術を習得していない人でも簡単に利用できるようになっている．しかし，イムノアッセイでは抗体のような生化学物質を利用することから，試薬の保存法及び実験手法には注意が必要である．

既にイムノアッセイには数多くの測定法が開発されており，主な測定法について Table 1 にまとめた．測定法の詳細については専門書や文献等をご覧いただきたい[15)]．

次に，イムノアッセイは，測定原理あるいは反応系により分類されることが多く，その分類について説明する．まず，測定原理による分類では，競合法と非競合法に分けられる．競合法では，一定量の抗体に対して標識抗原と非標識抗原とが競合的に結合することを利用して測定する．一般的に，抗原の量が増えれば抗体と結合する標識抗原の量が減るため，標識抗原・抗体複合体を検出するときのシグナルは減少する．そのシグナルを検出することにより抗原量を測定するのである．一方，非競合法は，競合反応を利用しない測定法で，十分量の抗体に対して結合させた抗原を標識抗体で認識させるというサンドイッチ結合を利用する手法がその一つである．この方法においては，抗原の量

Table 1 Types of immunoassay

Assay type	Representative assay
EIA; Enzyme immunoassay	EIA; Enzyme immunoassay FEIA; Fluorescence-enzyme immunoassay MEIA; Microparticle enzyme immunoassay
FIA; Fluorescence immunoassay	FIA; Fluorescence immunoassay FPIA; Fluorescence polarization immunoassay TR-FIA; Time-resolved fluorescence immunoassay
CLIA; Chemiluminescent immunoassay	CLIA; Chemiluminescent immunoassay CLEIA; Chemiluminescent enzyme immunoassay ECLIA; Electro chemiluminescent immunoassay
RIA; Radio immunoassay	RIA; Radioimmunoassay IRMA; Immunoradiometric assay
Hemagglutination	PHA; Passive hemagglutination test RPHA; Reversed passive hemagglutination test HI; Hemagglutination inhibition test
Latex agglutination	LPIA; Latex photometric immunoassay CIA; Counting Immunoassay RPLA; Reversed Passive Latex Agglutination Test
PA; Particle agglutination	
TIA; Turbidimetric immunoassay	
NIA; Nepherometric immunoassay	
Immunochromatography	
Colloidal gold immunoassay	

が増えれば抗原と結合する標識抗原の量が増えるためシグナルは上昇する．そのシグナルを検出すれば抗原量を測定できる．また，反応系による分類では，不均一系測定と均一系測定に分けられる．不均一系測定では，固相化した抗体を利用して測定が行われる一方，均一系測定では，測定は終始溶液状態で行われる．不均一系測定では，抗体を固相担体に結合させる必要があるため固相化抗体の作製法を考慮しなければならないという点や，操作の煩雑性や低分子の測定には不向きであるという点もあるが，感度がよく超微量分析に適しているため使用頻度が高い．おおよそのイムノアッセイがこの不均一系の測定法により行われている．一方，均一系での測定は，一般に操作が簡便であり，ある程度高濃度の低分子の化合物には重宝するが，超微量成分を測定する際には適していない．例として，蛍光偏光免疫測定法[16]や時間分解蛍光免疫測定法[17]が挙げられる．また，電気泳動を利用したイムノアッセイは，反応後に電気泳動による分離分析を行う方法であり，不均一系及び均一系の両方で測定が可能でそれらの特徴とは少し異なるため，本稿では反応系にかかわらず別の項目として述べることにする．その特徴として，例えばキャピラリー電気泳動を利用したイムノアッセイは，短時間で測定ができ，均一系イムノアッセイでも超微量分析を行うことができるという長所を有する一方，試料注入量が少ないため注入方法や定量性の問題があるという短所がある[18]．

イムノアッセイをマイクロチップ上で実施するためには，様々な点について考慮しつつ，分析物質やその測定法にあった分析の設計を行わなければならない．マイクロチップ側の検討項目として，マイクロチップの基板材料・マイクロチャネルの表面修飾・マイクロチャネルや粒子担体への抗体の固相化といった項目がある．また，試料側の検討項目として，試料のチャネル中への導入やチャネル中の移動，そして試料中の目的物質の検出といった項目がある．そこで，イムノアッセイをマイクロチップ中で実施するに当たり，① 基板材料，② 表面修飾・抗体固相化，③ 試料導入・搬送，④ 検出の項目について検討する必要があり，これらについて順に説明する．更に，マイクロチップイムノアッセイの実施例についても後述する．

3 基板材料

イムノアッセイに限らず様々な分析を行う上で利用されているマイクロチップ基板には，利用用途により平板型やCD型，センサー型，そして立体型の様々な型のものが存在する．また，材質に関しても，単結晶シリコン，合成石英やパイレックスガラス等のガラス，polymethylmetaacrylate（PMMA）やpolydimethylsiloxane（PDMS）等のプラスチックといったものが現在利用されている．これらの材料を基板として利用する際には，利用用途に応じて幾つかの加工工程を施す．現在，基板材料に対して行われる加工には，除去，付加，変形，表面修飾の4種類の加工がある．これらの加工操作とフォトリソグラフィーのような平

Table 2　Comparisons of microchip materials

	Silicon	Glass	Plastic (Lithography)	Plastic (Injection molding)
Microfabrication	◎	△	○	○
Precision of fabrication	◎	×	○	○
Cost of fabrication	△	○	○	◎
Deversity of available fabrication	◎	△	△	△
Integration of sensors and actuators	◎	×	×	×
Trasnparency	×	◎	○	○
Chemical modification	○	○	△	◎

面基板上で囲う領域を限定するパターニング技術を組み合わせることにより基板を加工するといういわゆる複合微細加工が現在一般的となっている．この複合微細加工を経て集積化分析チップの作製が行われるのである．この複合微細加工技術に関する詳細については専門書や文献等をご覧いただきたい[4)19)]．

既にマイクロチップの基板材料について述べられた専門書や文献等が存在するため[3)4)19)]，詳細はそちらをご覧いただくとよいが，ここでは，単結晶シリコン・ガラス・プラスチックの基板材料の性質・特徴について簡単に述べておく．集積化チップに利用されているこれらの基板には一長一短があり，利用用途に応じて使い分けを行っている．各基板について，微細加工度，加工精度，加工コスト，利用できる微細加工法の多様性，センサー・アクチュエーターの集積化，基板の可視光・紫外光などに対する透過性，サンプルに接する部分の化学的修飾の容易性の観点で比較したものを Table 2 に示す．ただし，各評価項目に対する 4 種類の基板の優位性を 4 段階で相対的に評価した結果であり，絶対的優劣を示すものではない．単結晶シリコンは多様な微細加工法を駆使して微細度・精度共に優れた微細加工が行える．また，MEMS 分野で提案された各種センサーやアクチュエーターを 1 枚のチップ上に集積化できるというメリットもある．しかし，紫外光・可視光領域において光の透過性が悪く分光学的手法を利用する際には不便であり，その電気伝導特性から電気泳動には不向きであるというデメリットがある．ガラスは化学的・熱的に安定な材料であるため，特に表面処理をしなくてもチップ内で多様な化学反応を行うことが可能である．また，光の透過性に優れているため分光学的手法も実施しやすく，電気泳動も可能であるというメリットもある．ただ，加工については，精度のよい技術も提案されてきてはいるが，ガラスで最も利用されているウエットエッチングのように微細度と精度が低いという問題があるため，アスペクト比（加工深さと加工パターン幅の比）の高い微細加工を行う際には適していない．プラスチックは，通常の実験室条件で加工可能であるため研究室レベルにおける短期間での試作に非常に適している．中でも PDMS はその汎用性からマイクロチップの基板材料として広く用いられている材質であり，分析例も多い[20)]．射出成型したプラスチックチップは最も低コストである．また，多様な高分子表面の化学的修飾技術を用いることによって，表面を高機能化することができることもメリットである．デメリットとしては，化学的・熱的安定性や光学的特性についてはガラスには及ばない点が挙げられる．

基板材料とそれにあわせた微細加工法を使い分けると同時に，異種基板を一つのプラットホーム基板に組み合わせたハイブリッド型集積化チップを作製することにより，マイクロチップを利用した分析の範囲はかなり広がってくるであろう．

4　表面修飾・抗体固相化

ここでは，イムノアッセイをマイクロチップ上で行う際に問題となる試薬・試料中の物質の非特異的吸着を抑制するための表面修飾や抗体の固相担体への結合方法について説明する．マイクロ空間では，表面/体積比が大きいため，物質のチャネルへの非特異的吸着の影響を受けやすい．特にイムノアッセイにおいては，試薬中の抗原・抗体・酵素や試料中の夾雑タンパク質等の疎水性チャネル壁面への吸着が起こり，分析能の低下が問題となる．そこで，このような非特異的吸着を避けるために，ウシ血清アルブミン（BSA）やカゼインのようなタンパク質，その他ブロッキング剤により表面処理が行われている．ブロッキング剤による表面処理で十分である場合が多いが，この表面修飾は永久的なものでなく，更に修飾されたチャネル壁が不均一な表面となってしまうという問題も残る．そこで，通常は，物質の非特異的吸着を防ぐためにマイクロチャネル表面を修飾・機能化することが行われている．

前章にて PDMS がマイクロチップに頻繁に利用されることは述べたが，その疎水性のために表面への非特異的吸着が問題になる．これまでに，プラズマ処理[21)]，PDMS のシラン化[22)]，ポリマーグラフティング[23)]，多価電解質の吸着[24)]，界面活性剤等の吸着[25)]，タンパク質によるコーティング[26)]等の手法による非特異的吸着防止が試みられているが，その表面修飾も徐々に劣化してくるという問題が残る．最近，その欠点を克服するために，Lahann らは，化学蒸着により PDMS 表面に薄膜を形成することにより，その表

面特性を付与することに成功している[27]．その表面には，プローブや抗体を結合させることも可能である．また，Linderらは，TERACOATと呼ぶ方法にてPDMSの表面修飾を行うことにより表面への吸着を制御することを可能とした[28]．この方法では，biotin化したImmunoglobulin G（IgG）を表面に結合させ，それに対しneutravidin更にbiotin化したdextranを結合させることにより，表面を親水化させる．この操作によりPDMS表面へのタンパク質の吸着が抑制される．この方法では，biotin化したdextranの代わりに，biotin化したプローブや抗体等を使用することで，表面の機能化を行うことも可能である．

次に，イムノアッセイにおいて行われる抗体の固相化について述べる．不均一系での測定では，抗原を固相化抗体に結合させることにより抗原のみを分離するという過程を経て分析が行われるため，あらかじめ抗体を固相担体に結合させておくという操作が必要となる．固相担体として，マイクロチップ基板表面あるいはマイクロビーズと呼ばれる粒子担体の2種類が一般的に利用される．

1番目に挙げた基板表面に抗体を結合する方法として，チャネル表面に直接吸着させる手法，チャネル表面の官能基と反応させて共有結合させる手法，マイクロコンタクトプリンティングなどが考案されている[12]．例えば，抗体を基板表面に直接吸着させる手法においては，疎水性相互作用による吸着が一般的であり，疎水性の高いプラスチック表面への吸着，またシラン処理により疎水化した単結晶シリコン・ガラス表面への吸着がある．ただ，この疎水性相互作用を利用した吸着により固相化した抗体は，その構造変化の可能性が指摘されており，抗原との反応性の低下が危惧される．また，非特異的吸着を防ぐためのブロッキング剤を使用するときも，その影響が問題となってくる．Yakovlevaらは，シリコンのチャネル表面を修飾し，修飾された官能基と抗体を共有結合させる方法を考案し，マイクロチップイムノアッセイを行っている[29]．彼らは，glutaraldehyde-activated 3-aminopropyltriethoxysilane（APTES-GA）表面，glutaraldehyde-activated branched poly(ethyleneimine)（BPEI-GA）表面，3-glycidoxypropyltrimethoxysilaneに結合したBPEI-GA（GOPS-BPEI-GA）表面，glutaraldehyde-activated linear poly(ethyleneimine)（LPEI-GA）表面，LPEI表面にて5種類の抗体の固相化法を報告している．

2番目に挙げたマイクロビーズを利用する方法については，マイクロビーズがマイクロチップに封入可能なサイズであることから，あらかじめ抗体あるいは抗原を担持したマイクロビーズをチップ内に導入する[14]．この方法では，抗原抗体反応が行われる担体表面の増大により反応時間の短縮化や感度上昇が可能であること，そしてチップ中に新しいマイクロビーズを容易に封入することができる上更に何度でも続けて分析を行えることの利点が挙げられる．ただし，マイクロチップ中のチャネルや微小電極への吸着やチャネルの目詰まりが起こる可能性も存在する．また，マイクロビーズに抗体などを修飾・固定化しやすいように，アミノ基のような反応基を持つビーズやストレプトアビジンコーティングしてあるビーズが開発されている．一方，マイクロビーズを封入するためのチップ側の設計も重要になってくる．既にマイクロビーズをチップ中に封入する方法として，マイクロチップ内に物理的にマイクロビーズをせき止める構造の構築が考案されている．例えば，Anderssonらはピラー状のせき止め構造を考案しその部分で反応を行えるマイクロチップを作製している[30]．また，Satoらは，マイクロビーズをダム状のせき止め構造でトラップし，イムノアッセイを行っている[31]．一方，物理的なせき止め構造ではなく，磁気を利用してマイクロビーズをトラップする方法も考案されており，Groverら[32]やZaytsevaら[33]が報告している．

5 試料導入・搬送

マイクロチップ内に試料を導入し，更には試料を搬送するには，外部圧力源を利用する方法，電気泳動による電気浸透流を利用する方法，毛細管現象を利用する方法が挙げられる．外部圧力源を利用する方法は汎用性が高く，シリンジポンプのような駆動装置により試料を送り出したり試料を吸引したりして，試料を導入・搬送する．更に遠心力を利用してチャネル中の試料を移動させる方法も幾つか報告されている[34)～36]．また，電気泳動も古くから利用されている方法で報告例も多く[18)25)37)～41]，電場による測定分子の移動を利用した手法である．毛細管現象を利用する場合は，試料をリザーバーに置いた後に移動が始まるので制御が難しく，遠心力による手法と組み合わせて試料の搬送を制御する方法が報告されている[34)～36]．

また，最近はMEMS技術を用いてマイクロポンプ・マイクロバルブ・マイクロミキサー・マイクロリアクターのようなマイクロ流体素子の開発が進んできている．イムノアッセイに限らず総合的なマイクロシステムを実用化する場合は，このようなマイクロ流体素子を駆使して流体の制御を行うことが重要となる．マイクロ流体素子が組み込まれた分析の全工程を包括する総合的なイムノアッセイチップも近い将来実現するであろう．マイクロ流体素子の詳細については専門書をご覧いただきたい[3)4)20]．

6 検　　出

イムノアッセイには様々な検出手法が利用されている．イムノアッセイでは試料中の目的物質を検出するために，抗原や抗体等のラベル化が行われており，蛍光・放射性同位元素ラベル等の光学ラベル，酸化還元ラベル，酵素ラベ

ルなど様々なものがある．光学ラベルは光シグナルを，酸化還元ラベルは電気シグナルを検出する．酵素ラベルは試料中の基質を検出物質に変化させることで，検出物質の量を光シグナルとして検出することが多い．酵素ラベルの利点としては，多量の基質を検出物質に変化させることができる，つまり測定抗原の量が少なくてもシグナルを増大させることが可能である．マイクロチップイムノアッセイでは，光学ラベルとして，例えば fluorescein isothiocyanate[38]，Cy5[42]，tetramethylrhodamine isothiocyanate（TRITC）[43]，alexafluor[44]等の蛍光ラベルや金コロイド[31)45)46)]といった熱レンズ顕微鏡に利用されているラベルがある．酵素ラベルとして alkaline phosphatase[47)~49)]や horseradish peroxidase[29)50)]，酸化還元ラベルとして ferrocene monocarboxylic acid[51)]が例として挙げられる．また，非ラベル化法として，従来から行われている凝集法，最近では表面プラズモン共鳴（SPR）分析を利用したイムノアッセイも開発されてきている．

イムノアッセイにおける検出系は，蛍光，化学発光，光散乱，熱レンズ顕微鏡，SPR 等の光学的検出法と，ボルタンメトリー，ポテンシオメトリー，電気伝導度測定の電気化学的検出法に分類できる．これら検出法について順に例を挙げながら説明していく．

最初に，光学系測定を利用したマイクロチップ分析の応用例について述べる．最も利用されている方法として，蛍光検出がある．蛍光検出は高感度でありラベル化も容易である．光源としては水銀ランプやレーザー等が利用されており，検出側としては CCD カメラや光電子増倍管が利用されている．目的や測定法に応じてこれらは使い分けがされている．蛍光検出を利用したマイクロチップ分析は，最も一般的である[12)]．蛍光自体を測定するだけでなく蛍光偏光を利用する方法も報告されている[43)52)]．一方，化学発光検出については，蛍光検出ほどは実施されていないが，光を吸収することなく発光するため外部光源が必要ないことや蛍光検出に比べて検量線の直線部分が広いため定量分析に適していること等の利点がある．化学発光検出を利用したマイクロチップイムノアッセイの実施例としては，Yakovleva らの不均一系における競合法[29)53)]，Tsukagoshi らの電気泳動を利用した競合法[54)]がある．光散乱を利用したイムノアッセイ法は，抗原・抗体及び担体の凝集反応を利用した光散乱により凝集の程度を検出する方法で，定量分析よりもむしろ定性分析に利用されている．臨床的にはかなり実施されているが，感度や定量性の問題によりマイクロチップではあまり応用化されていない．Pamme らは，ラテックス凝集反応を利用したレーザーによる光散乱にて C 反応性タンパク質（CRP）の定量分析をマイクロチップ上で行っている[55)]．CRP の量が増えれば，抗体結合ラテックス粒子の凝集の程度が大きくなり光の散乱も増えるという原理を利用している．近年，マイクロチップ分析に応用されるようになった検出手法として，熱レンズ顕微鏡分析や表面プラズモン分析がある．熱レンズ顕微鏡分析は，測定物質の光吸収で発生した熱により入射光の光路に対してレンズを作ったような屈折率を示すという現象を利用する．測定物質の量が多くなれば，より多くの熱を発生しレンズの屈折率が高くなるため，入射光の屈折を検出すれば測定物質の定量を行うことができるのである．熱レンズ顕微鏡を利用したマイクロチップイムノアッセイの例として，Sato らのコロイド金粒子でラベル化した二次抗体によるインターフェロン γ の測定[45)]，carcinoembryonic antigen（CEA）の測定[46)]，イムノグロブリン A の測定[31)]，Kakuta らの brain natriuretic peptide（BNP）の測定[56)]がある．表面プラズモン共鳴は，ラベル化を要することなく分析可能な手法である．表面プラズモン共鳴測定は，金属表面での抗原抗体反応において金属表面での屈折率が変化するという現象を利用した分析手法である．表面プラズモン共鳴を利用したマイクロチップイムノアッセイについても，Kurita ら[57)]，Fitzpatrick ら[58)]，Kanda ら[59)]，Akimoto ら[60)]，Choi ら[61)]により報告されている．

次に電気化学的測定を利用したマイクロチップ分析の応用例について述べる．電気化学測定は電流を計測するアンペロメトリーと電位（電圧）を計測するポテンシオメトリーに分類される．電気化学測定の長所として，高感度計測や局所領域の計測が可能であると同時に，光源や検出器等の大型機器が必要でなく，光学測定に比較して小型化が容易である点がある．一方，短所として，測定において光学測定より精密性を要することと対照電極が必要であることが挙げられる．微細加工技術の進展によりマイクロメーターあるいはナノメーターオーダーの電極やプローブ型や基板型の種々の微小電極が開発され，実際にイムノアッセイでの応用化が試みられている．Farrel らはマイクロ電極を利用したイムノアッセイを実施している[62)]．マイクロ電極の利用により，マイクロ空間における微量試料の電気化学的測定が可能となった．電気化学的手法を利用したマイクロチップイムノアッセイについては，Choi ら[47)]，Lim ら[51)]，Rossier ら[63)]，Soo Ko ら[64)]，Wang ら[48)]が報告している．

7　アッセイ種類

現在までに実施されているマイクロチップイムノアッセイの実施例を Table 3 に示した．本文ではなく Table 3 のみで紹介する文献についても後述の文献一覧に示した[65)~82)]．

2 でイムノアッセイを反応系の観点から，均一系と不均一系での測定に分類した．最初に不均一系測定，次に均一系測定について，実施例を紹介しつつ説明する．その後にマイクロチップキャピラリー電気泳動を利用した測定法について紹介する．

Table 3 Examples of microchip-based immunoassay

Analyte	Assay type	Detection	Substrate	Flow	Reference
CRP	Agglutination	Light scattering	PMMA	Pressure	55)
BNP	Heterogeneous	SPR	Glass/PDMS	Pressure	56)
Anti-bovine IgG	Heterogeneous	SPR	PDMS	Pressure	59)
Atrazine	Heterogeneous, competitive	Chemiluminescence	Silicon	Pressure	53)
Human serum albumin IAP	Electrophoretic, competitive	Chemiluminescence	Quarts	Electrokinetic	54)
Cortisol	Electrophoretic	Fluorescence	Fused silica	Electrokinetic	40)
Phenytoin	Homogeneous, competitive	Fluorescence	Hybrid	Pressure	84)
Anti-estradiol	Electrophoretic	Fluorescence	Glass	Electrokinetic	74)
Insulin	Electrophoretic	Fluorescence	Glass	Electrokinetic	41)
TNT	Electrophoretic	Fluorescence	Glass/hybrid PDMS	Electrokinetic	37) 38)
Theophylline	Electrophoretic	Fluorescence	Glass	Electrokinetic	75)
Inflammatory cytokines	Electrophoretic	Fluorescence	Glass	Electrokinetic	44)
Parathyroid hormone	Heterogeneous	Fluorescence	Fused silica	Pressure	76)
Atrazine Isoproturon Estrone	Heterogeneous	Fluorescence	Glass/hybrid	Pressure	42)
Cholera toxin Staphyloccal enterotoxin B Ricin *Bacillus globigii*	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	PDMS/glass	Pressure	77)
CRP	Heterogeneous	Fluorescence	PDMS/silicon	Capillary	78)
Rabbit IgG	Heterogeneous, electrophoretic	Fluorescence	Glass	Electrokinetic	39)
Sheep IgM	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	PDMS	Pressure	50)
Staphyloccal enterotoxin B	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	Hybrid	Pressure	79) 30)
Rat IgG	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	Plastic CD	Centrifugal/capillary	34)
E. coli	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	Glass/hybrid	Pressure	83)
Guinea pig IgG	Heterogeneous	Fluorescence	PDMS/silicon	Pressure	87)
HbA_{1c}	Heterogeneous	Fluorescence	Plastic CD	Centrifugal/capillary	35)
AFP IL-6 CEA	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	Plastic CD	Centrifugal/capillary	36)
Anti-streptavidin antibody	Heterogeneous	Fluorescence	PDMS	Pressure	65)
Tacrolimus	Heterogeneous	Fluorescence	PDMS	Pressure	66)
Cholera toxin	Heterogeneous	Fluorescence	PDMS	Pressure	67)
IgA	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	PDMS	Pressure	68) 82)
Dioxine	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	Glass/silicon	Pressure	69)
Digoxine	Heterogeneous, competitive	Fluorescence	PET (polyethylene terephthalate)	Pressure	70)
Tumor necrosis factor a	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	PDMS	Capillary	71)
Anti-rabbit IgG	Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	PDMS	Pressure	80)
Anti-rabbit IgG CRP	Heterogeneous, competitive Heterogeneous, sandwich	Fluorescence	PDMS	Capillary	72)
Co-PCB	Heterogeneous	Fluorescence	PDMS	Pressure	73)

continued on p. 527

Table 3　Examples of microchip-based immunoassay (continued)

Analyte	Assay type	Detection	Substrate	Flow	Reference
PSA Lead ion	Heterogeneous, sandwich	Light scattering Fluorescence	PDMS/silicon	Pressure	88)
Concanavalin	Homogeneous	Fluorescence	PDMS	Pressure	43)
Insulin	Electrophoretic	Electrochemical	Glass	Electrokinetic	81)
Mouse IgG	Electrophoretic	Electrochemical	Glass	Electrokinetic	48)
Histamine	Heterogeneous	Electrochemical	PMMA	Pressure	51)
D-dimer	Heterogeneous, sandwich	Electrochemical	PET (polyethylene terephthalate)	Pressure	63)
Mouse IgG	Heterogeneous	Electrochemical	Glass	none	62)
Mouse IgG	Heterogeneous, sandwich	Electrochemical	Glass	Pressure	47)
Interferon g	Heterogeneous, sandwich	Thermal lens microscope	Glass	Pressure	45)
CEA	Heterogeneous, sandwich	Thermal lens microscope	Glass	Pressure	46)
IgA	Heterogeneous, sandwich	Thermal lens microscope	Glass	Pressure	31)

最も一般的に利用されている不均一系測定はサンドイッチアッセイである．原理は固相化抗体に抗原を結合させ，更にその抗原に対し標識抗体を結合させることにより，標識抗体を検出するというものである．この測定の利点は，抗原の2つのエピトープに対し異なる抗体が結合することによりこの測定法が成立するため，極めて特異性が高いということであろう．しかしながら，この手法では抗体の抗原結合後及び標識抗体結合後の2回にわたり洗浄を行う必要があるため，操作が煩雑になる．また，抗原は2つのエピトープ部分で2つの抗体に結合しなければならないため，一般に分子量の小さい化合物（1000 Da以下）についてこの測定法を利用することは難しいという問題点も存在する．Table 3にこの測定法を利用したマイクロチップイムノアッセイの例が多数示されている．Table 3より明らかなように，この測定法では蛍光を利用して検出を行うことが多い．また，反応・洗浄時間の短縮による測定の迅速化が可能となっている．検出限界については，タンパク質でfmol/Lレベル[48]，バクテリアで20個[83]との報告があり，極めて精度の高いものとなっている．また，サンドイッチ法では難しいとされる低分子化合物について，不均一系における競合法イムノアッセイにより測定した報告例もある[29]．

次に，均一系測定について述べる．均一系測定は，抗原抗体複合体の形成後の標識ラベルの強度変化を検出するため分離工程を必要としない．この測定法の長所として，抗体の固相化や洗浄工程が不要な点，担体への非特異的吸着を考慮する必要がない点，サンドイッチアッセイに不向きな低分子化合物の測定も可能であるという点が挙げられる．短所として，不均一系と比較すると検出限界や感度の低さがある．そのため，不純物や干渉物質を含む試料の中の比較的高濃度の物質を測定する場合にこの測定法が利用されることが多い．例えば，血液・食物等の試料や環境測定における水系試料などが挙げられる．この測定法のマイクロチップへの応用例は，Hatchらのdiffusion immunoassayと呼ばれる手法が報告されている[84]．

最後に，キャピラリー電気泳動を利用したイムノアッセイについて述べる．キャピラリー電気泳動は，電気泳動の移動度の差を利用して抗原抗体複合体を分離することで測定を行う方法である．マイクロチップを利用することにより，電気泳動により発生する熱の拡散性が高くより高い電場をかけることができるため，測定時間の短縮と分解能の向上が可能となる．例えば，Brombergらはマイクロチップキャピラリー電気泳動を利用することによりイムノアッセイ測定を1分以内で行っている[38]．しかしながら，マイクロチップキャピラリー電気泳動の欠点として，感度が低下すること及び開発やアッセイの最適化に時間がかかるということがある[18]．この手法を利用した測定は既に数多く報告されており，例えば，Dodgeら[39]，Qiuら[85]，Brombergら[37)38)]，Roperら[41]，Kawabataら[86]の報告がある．

8　マイクロチップイムノアッセイの設計と実施例

イムノアッセイをマイクロチップ上で行うに当たり，用途に応じてマイクロチップ自体の型やマイクロチャネルの設計を行わなければならない．設計において，マイクロポンプ・マイクロバルブなどのマイクロ流体素子を流路中に構築することも考慮に入れると，マイクロチップに多くの機能を付与し，いわゆる多機能集積化チップを作製することも可能である．実際，マイクロチップ上で様々な反応を一度に行うための複雑な型の多機能集積化チップも既に開発されてきている．この章では，現在開発されているマイクロチップイムノアッセイの代表的なものについて紹介する．

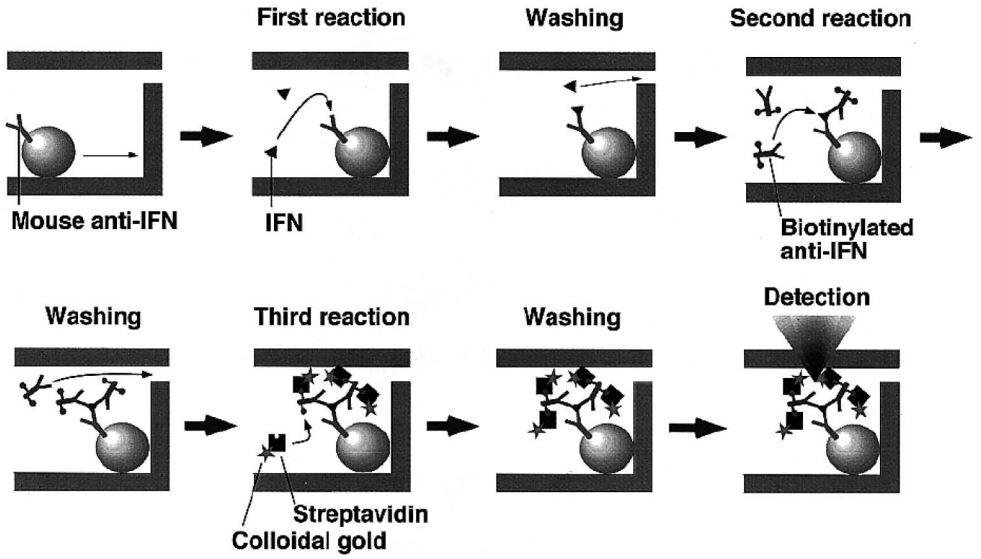


Fig. 1 Immunoassay with microbeads

Reprinted with permission from *Electrophoresis*, **23**, 734～739 (2002). Copyright 2002 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

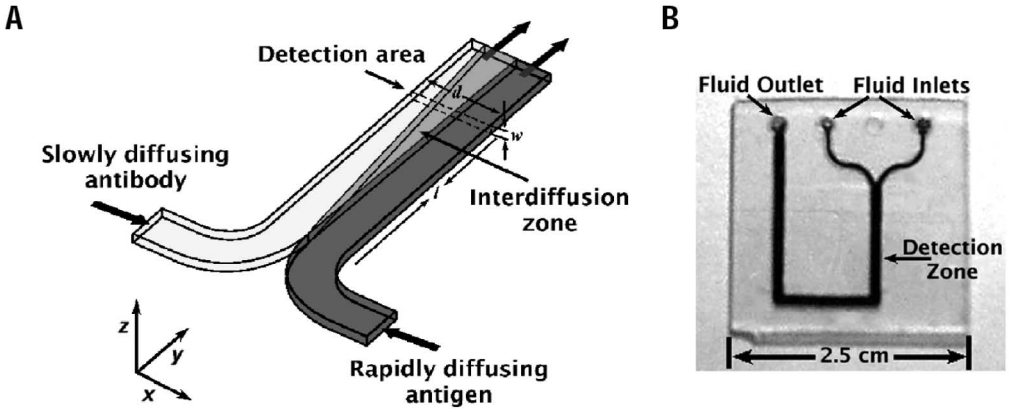


Fig. 2 Diffusion immunoassay

Reprinted with permission from *Nat. Biotechnol.*, **19**, 461～465 (2001). Copyright 2001 Nature Publishing Group.

8・1 マイクロビーズ・熱レンズ顕微鏡を利用したイムノアッセイ

Sato らは，マイクロビーズをダム状のせき止め構造でトラップし，サンドイッチイムノアッセイを行っている[45]．検出方法として，金コロイドラベルで標識した二次抗体を利用し熱レンズ顕微鏡にて測定を行っている．Fig. 1 のように，抗原のインターフェロンγに対する抗体をマイクロビーズに結合させたものをあらかじめマイクロチップ内に封入しておく．ダム状のせき止め構造のため，ビーズがチップ外に流出することはない．次にインターフェロンγを流し，洗浄後，ビオチン化二次抗体を流し，更に洗浄を行う．そしてストレプトアビジン化した金コロイドを流すと，二次抗体は金コロイドで標識された状態になる．最後に，また洗浄し，熱レンズ顕微鏡により検出するという実験手順である．結果として，検出限界は 0.01 ng/mL 以下，変動係数は 10% 以下となった．また，測定時間は 1 試料で 35 分，4 試料で 50 分となった．彼らは，更に carcinoembryonic antigen（CEA）や immunoglobulin A でも類似の測定を行っている[31]．

8・2 Diffusion immunoassay（DIA）

DIA は Hatch らによって開発された方法で，抗原・抗体及び抗原抗体複合体の拡散速度の差を利用したユニークなイムノアッセイである[84]．更に，この方法は均一系で抗原抗体反応が行われるため，煩雑な操作が必要なく極めて短時間に測定が可能である．Fig. 2 のように，拡散速度の

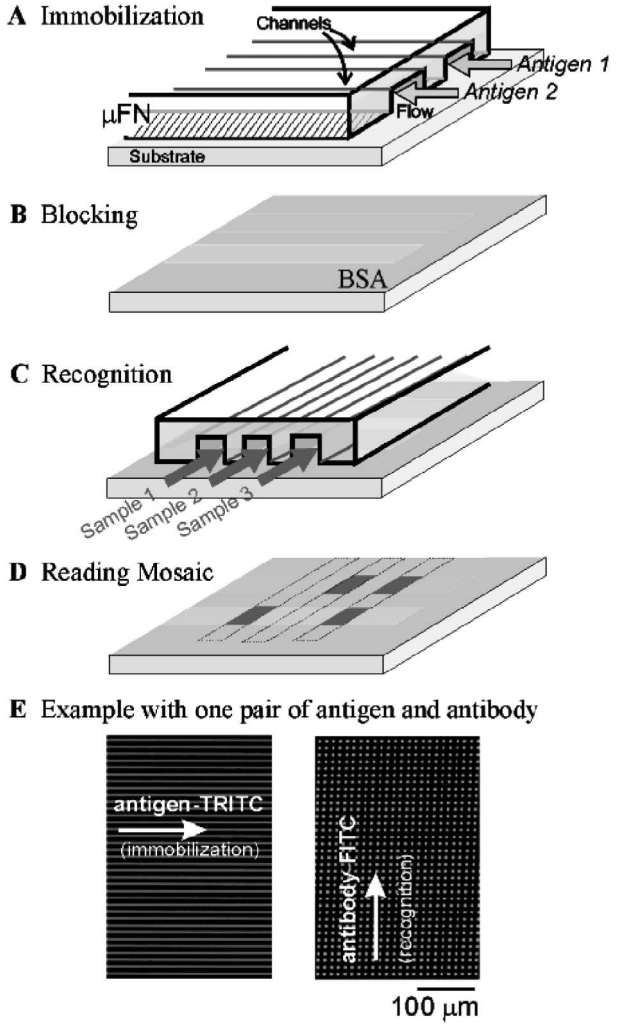


Fig. 3　Micromosaic immunoassay
Reprinted with permission from *Anal. Chem.*, **73**, 8～12 (2001). Copyright 2001 American Chemical Society.

大きい抗原と拡散速度の小さい抗体を T-senser チップ（T 字型の流路）の両チャネルから流し，合流点で拡散速度の大きい抗原が抗体と結合することにより拡散速度が小さい抗原抗体複合体になるため，抗原抗体複合体が合流部分付近で蓄積する．蛍光標識抗原を抗原中に混ぜておけば，競合反応により抗原の定量が行えるという原理である．実験では抗原として薬物のフェニトインを用い，1 μL 以下の試薬と試料を用いて 1 分以内で測定を行うことが可能としている．

8･3　マイクロモザイクイムノアッセイ

Bernard らは，マイクロ流体ネットワークを利用することによりマイクロモザイクイムノアッセイを開発している[87]．Fig. 3 のように，各チャネル内に各標識抗原を流し，各抗原を基板に固定化する．BSA によるブロッキング後，各標識抗体を流し，基板上で抗原抗体反応を起こさせる．

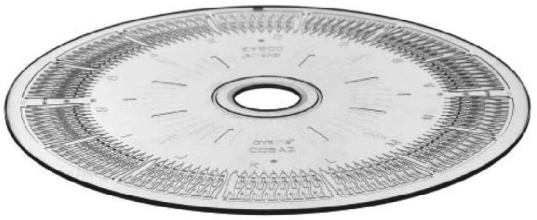


Fig. 4　Compact disc-shaped microchip
Reprinted with permission from *Clin. Chem.*, **51**, 1955～1961 (2005). Copyright 2005 American Association for Clinical Chemistry.

このとき，抗原を流す方向と抗体を流す方向は直角になるようにするのがこの手法のポイントである．最後にチップ表面のモザイク上の各抗原抗体複合体を検出する．これがこのマイクロモザイクイムノアッセイの原理である．Fig. 3 では抗原を固定化してあるが，もちろん抗体を固定化しても構わない．また，標識についても目的に応じて抗原あるいは抗体のどちらにラベル化を行ってもよい．この手法の長所は，一度に多くの種類・濃度の抗原抗体反応を，つまり抗原と抗体の相互作用を検出できるということである．

8･4　コンパクトディスク（CD）型マイクロチップ

コンパクトディスク（CD）を模した樹脂製の円盤上に微小な流路を形成し，回転を与えることで発生する遠心力を利用した送液方式が提案されている．マイクロ空間において顕著となる表面力（毛管力や表面張力）と遠心力を組み合わせることにより，チャネル内の流体制御が実現されている．Honda らは，CD 型マイクロチップを用いて α-fetoprotein（AFP），interleukin-6（IL-6），carcinoembryonic antigen（CEA）を分析している[36]．Fig. 4 にこの分析で利用された CD 型マイクロチップを示す．あらかじめマイクロチップ中に封入したストレプトアビジン化ビーズに各物質に対するビオチン化抗体を結合させた後，各試料をマイクロチップに通す．そして Alexa 647 で蛍光標識した二次抗体をマイクロチップに通し，蛍光検出する．結果として，AFP，IL-6，CEA の検出限界はそれぞれ 0.15，1.25，1.31 pmol/L で，変動係数は 20% 以下であった．また，試料はわずか 200 nL で測定可能であるうえに，わずか 50 分で一連の測定を完了した．

8･5　キャピラリーアレイ電気泳動チップ

Bromberg らは 96 レーンの放射状に広がった円状のキャピラリー電気泳動チップを開発している[38]．このマイクロチップにより多種の微量試料を同時に電気泳動が行える．Fig. 5 のように，陽極が中心に，陰極が周囲に存在し，また試料投入口は周囲の部分に存在する．彼らは，2,4,6-

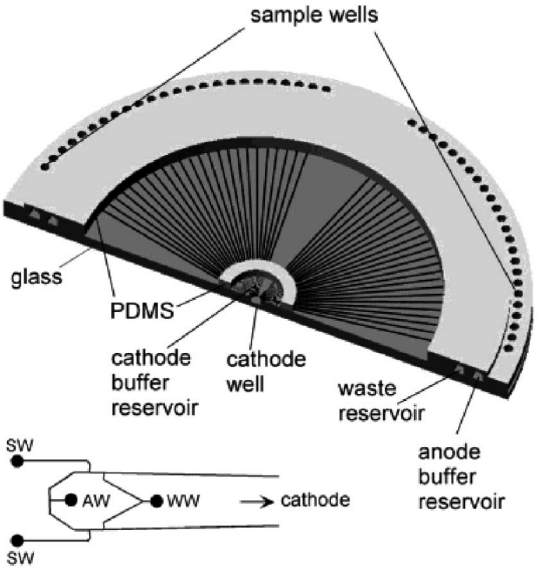


Fig. 5 Capillary array electrophoresis chip
Reprinted with permission from *Electrophoresis*, **25**, 1895～1900 (2002). Copyright 2002 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

trinitorotoluene（TNT）を均一系イムノアッセイにより電気泳動にて分離・検出している．手順としては，あらかじめ TNT を含む試料と TNT 抗体と fluorescein で蛍光標識した TNT をチップ外で混合し，マイクロチップにて電気泳動を行い，レーザーによる蛍光検出を行う．検出限界は 1 ng/mL，測定範囲は 1～300 ng/mL で測定が可能であった．

8･6 立体型（3 次元）マイクロ流体チップ

Shaikh らは，立体型（3 次元）のマイクロ流体チップを構築することにより，prostate-specific antigen（PSA）のイムノアッセイを実施している[88]．Fig. 6 に示したように，シリコンと PDMS を組み合わせることにより，バルブ・ポンプ・ミキサーを有する立体的な集積化マイクロチップを作製している．このチップでは圧力バルブにて流体を制御することにより試薬の反応や混合が可能となっている．検出は，このチップに接続した別のマイクロチップ内で行っている．

8･7 多機能集積化診断チップ

最後に，最近 Nature で紹介された集積化使い捨て診断チップについて触れておく[5]．Fig. 7 のように，バルブ・ミキサーのようなマイクロ流体子や複雑なチャネル構造を有する多機能集積化マイクロチップとなっている．このチップ内で 1 度に分離・混合・反応・検出が行える構造になっている．このマイクロチップによりポイントオブケア（Point-of-care，POC）で生体試料を即時に分析可能とな

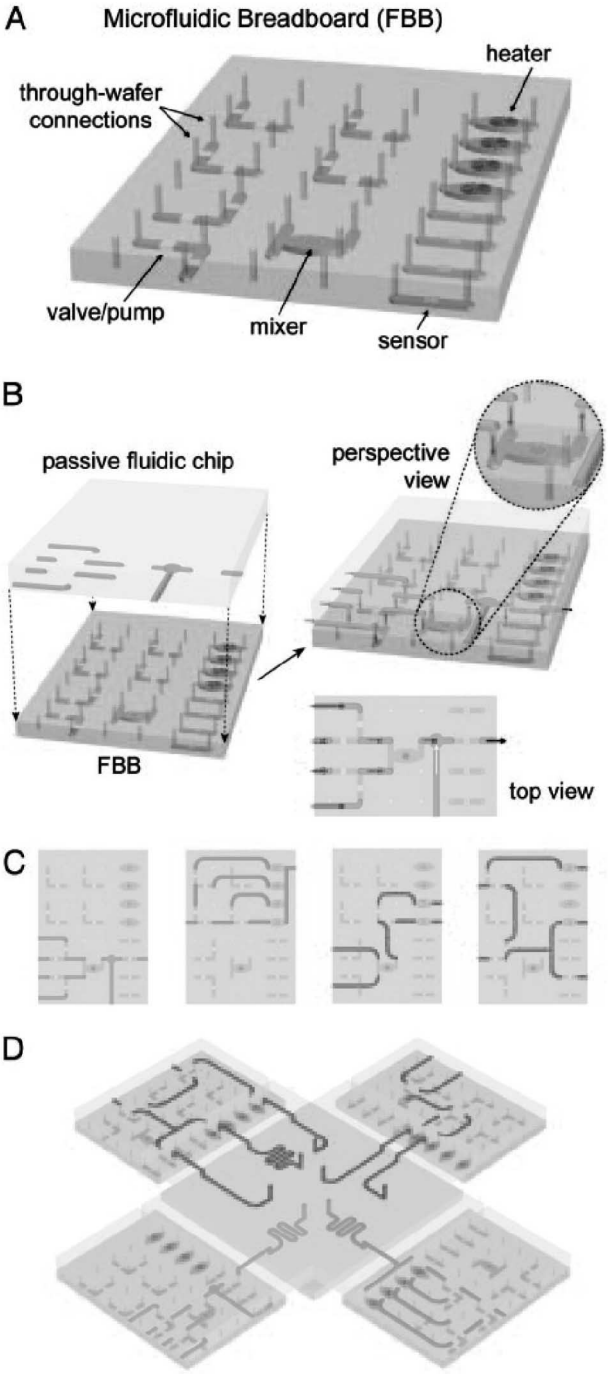


Fig. 6 3 D-type microfluidic chip
Reprinted with permission from *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **102**, 9745～9750 (2005). Copyright 2005 The National Academy of Sciences.

り，医療診断領域で画期的なデバイスとなるであろう．

9 おわりに

1 でも述べたように，ナノテクノロジー・バイオ MEMS の進展に伴い，マイクロ空間における化学分析システムの集積化について数多くの研究・開発が行われてきた．試料・試薬量の微量化，超短時間での測定，集積化・自動化

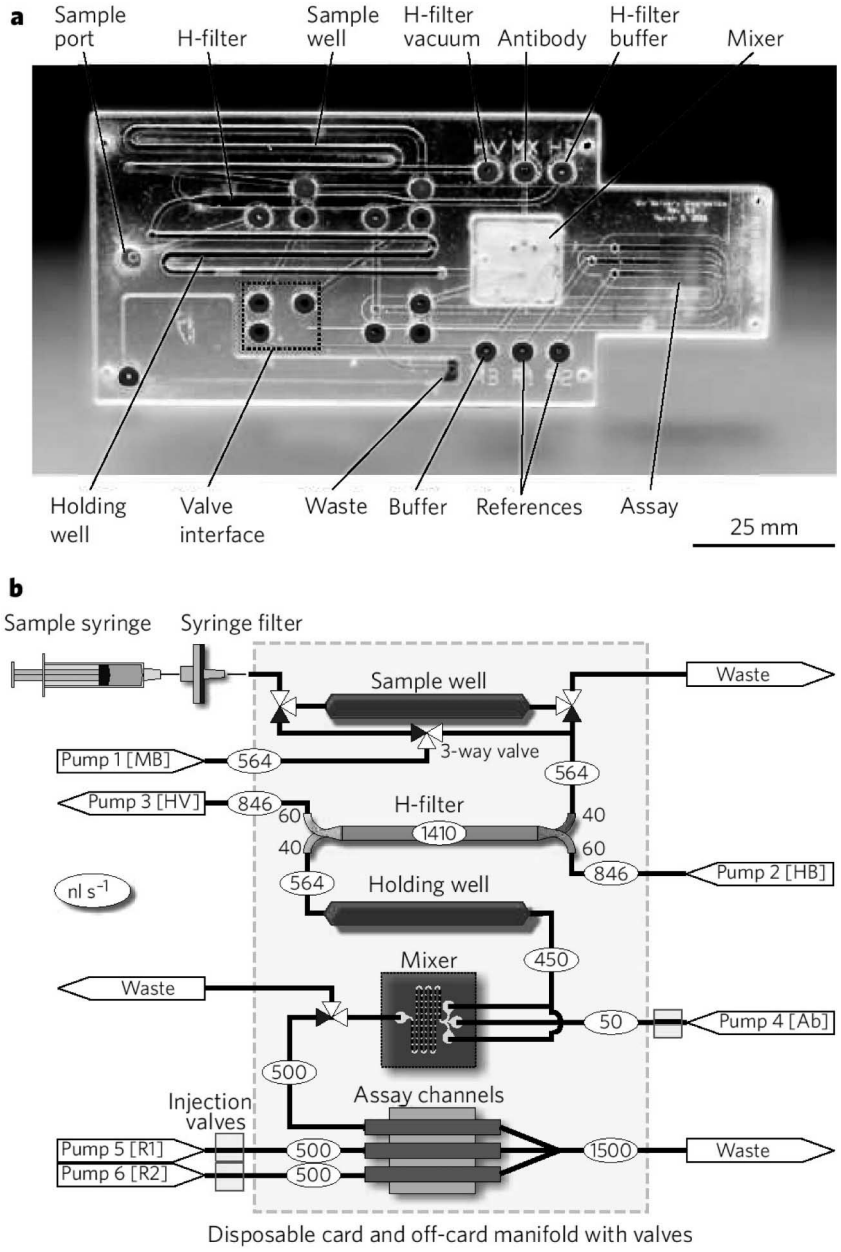


Fig. 7　Multi-integrated diagnosis microchip

Reprinted with permission from *Nature*, **442**, 412～418 (2006). Copyright 2006 Nature Publishing Group.

による携帯性や簡便性のような特徴を有するマイクロチップは劇的な勢いで世の中に広まりつつある．特にイムノアッセイについては医療・環境等の様々な分野にて活用されているため，その応用化・実用化は全世界のほとんどの人にその恩恵を与えることになるであろう．そのため，イムノアッセイをマイクロチップ上で行うという試みは，この数年の間に数多くの研究者により実施されてきた．それだけでなく，イムノアッセイ以外の反応や分離などの工程を含む総合的な集積化チップについても研究開発が進んでいるのが現状である．このようにイムノアッセイだけでなくマイクロチップを利用した分析法に関する研究開発が様々な角度から行われているが，まだそのマイクロチップの最適化は十分ではない．本稿で述べたマイクロチップの基板材料・マイクロ流体素子や表面修飾・抗体固相化の手法そしてマイクロ空間での分析・検出手法について更なる研究・開発を行い，それらを総合的に構築する技術を磨いていくことにより，最適化は完全なものに近づいてくるのであろう．

最後に，マイクロチップイムノアッセイの市場規模についても触れておこう．現在，イムノアッセイは幅広い分野で利用されている．富士経済による調査（2006 年度）によると，2004 年の医療診断におけるイムノアッセイ市場

は日本では1460億円と見積もられており，医療分野だけでもかなり大きな市場であるといえる[89]．医療分野での救急医療検査・簡易キット測定，環境分野での現場における安全かつ迅速測定，食品分野での検疫現場における迅速測定などに応用されることを考慮すると，更に大きな市場に膨れ上がることも十分予測できる．

マイクロチップイムノアッセイが各家庭で使用されている日は実はそう遠くはないかもしれない．

文　献

1) M. Toner, D. Irimia: *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **7**, 77 (2005).
2) A. J. DeMello: *Nature*, **442**, 394 (2006).
3) 馬場嘉信: "ナノテク・バイオ MEMS 時代の分離・計測技術", (2006), (シーエムシー出版).
4) 北森武彦，庄子習一，馬場嘉信，藤田博之: "マイクロ化学チップの技術と応用", (2004), (丸善).
5) P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, B. H. Weigl: *Nature*, **442**, 412 (2006).
6) P. von Lode: *Clin. Biochem.*, **38**, 591 (2005).
7) J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen: *Nature*, **442**, 403 (2006).
8) G. H. W. Sanders, A. Manz: *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **19**, 364 (2000).
9) P. S. Dittrich, A. Manz: *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **5**, 210 (2006).
10) D. Erickson, D. Sinton, D. Li: *Lab Chip*, **4**, 87 (2004).
11) K. Sato, A. Hibara, M. Tokeshi, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **55**, 379 (2003).
12) A. Bange, H. B. Halsall, W. R. Heineman: *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2488 (2005).
13) M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Electrophoresis*, **24**, 3583 (2003).
14) C. T. Lim, Y. Zhang: *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1197 (2007).
15) 大沢利昭，奥村　康，矢田純一，永井克孝: "新生化学実験講座 12 分子免疫学 III 抗原・抗体・補体", (1992), (東京化学同人).
16) W. B. Dandliker, R. J. Kelly, J. Dandliker, J. Farquahar, J. Levin: *Immunochemistry*, **10**, 219 (1973).
17) E. Soini, I. Hemmila: *Clin. Chem.*, **25**, 353 (1979).
18) W. S. Yeung, G. A. Luo, Q. G. Wang, J. P. Ou: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **797**, 217 (2003).
19) H. Becker, L. E. Locascio: *Talanta*, **56**, 267 (2002).
20) S. K. Sia, G. M. Whitesides: *Electrophoresis*, **24**, 3563 (2003).
21) D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides: *Anal. Chem.*, **70**, 4974 (1998).
22) B. A. Grzybowski, R. Haag, N. Bowden, G. M. Whitesides: *Anal. Chem.*, **70**, 4645 (1998).
23) S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C. E. Sims, G. P. Li, N. Allbritton: *Anal. Chem.*, **74**, 4117 (2002).
24) S. L. R. Barker, M. J. Tarlov, H. Canavan, J. J. Hickman, L. E. Locascio: *Anal. Chem.*, **72**, 4899 (2000).
25) G. Ocvirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, K. Westra, D. J. Harrison: *Electrophoresis*, **21**, 107 (2000).
26) T. Yang, S. Y. Jung, H. Mao, P. S. Cremer: *Anal. Chem.*, **73**, 165 (2001).
27) J. Lahann, M. Balcells, H. Lu, T. Rodon, K. F. Jensen, R. Langer: *Anal. Chem.*, **75**, 2117 (2003).
28) V. Linder, E. Verpoorte, W. Thormann, N. F. de Rooij, H. Sigrist: *Anal. Chem.*, **73**, 4181 (2001).
29) J. Yakovleva, R. Davidsson, A. Lobanova, M. Bengtsson, S. Eremin, T. Laurell, J. Emneus: *Anal. Chem.*, **74**, 2994 (2002).
30) H. Andersson, W. van der Wijngaart, P. Enoksson, G. Stemme: *Sens. Actuators, B*, **67**, 203 (2000).
31) K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000).
32) W. H. Grover, R. A. Mathies: *Lab Chip*, **5**, 1033 (2005).
33) N. V. Zaytseva, V. N. Goral, R. A. Montagna, A. J. Baeumner: *Lab Chip*, **5**, 805 (2005).
34) S. Lai, S. Wang, J. Luo, L. J. Lee, S. T. Yang, M. J. Madou: *Anal. Chem.*, **76**, 1832 (2004).
35) M. J. Pugia, G. Blankenstein, R. P. Peters, J. A. Profitt, K. Kadel, T. Willms, R. Sommer, H. H. Kuo, L. S. Schulman: *Clin. Chem.*, **51**, 1923 (2005).
36) N. Honda, U. Lindberg, P. Andersson, S. Hoffmann, H. Takei: *Clin. Chem.*, **51**, 1955 (2005).
37) A. Bromberg, R. A. Mathies: *Anal. Chem.*, **75**, 1188 (2003).
38) A. Bromberg, R. A. Mathies: *Electrophoresis*, **25**, 1895 (2004).
39) A. Dodge, K. Fluri, E. Verpoorte, N. F. de Rooij: *Anal. Chem.*, **73**, 3400 (2001).
40) L. B. Koutny, D. Schmalzing, T. A. Taylor, M. Fuchs: *Anal. Chem.*, **68**, 18 (1996).
41) M. G. Roper, J. G. Shackman, G. M. Dahlgren, R. T. Kennedy: *Anal. Chem.*, **75**, 4711 (2003).
42) S. Rodriguez-Mozaz, S. Reder, M. L. de Alda, G. Gauglitz, D. Barcelo: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 633 (2004).
43) V. K. Yadavalli, M. V. Pishko: *Anal. Chi. Acta*, **507**, 123 (2004).
44) T. M. Phillips: *Electrophoresis*, **25**, 1652 (2004).
45) K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori: *Electrophoresis*, **23**, 734 (2002).
46) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).
47) J. W. Choi, K. W. Oh, J. H. Thomas, W. R. Heineman, H. B. Halsall, J. H. Nevin, A. J. Helmicki, H. T. Henderson, C. H. Ahn: *Lab Chip*, **2**, 27 (2002).
48) J. Wang, A. Ibanez, M. P. Chatrathi, A. Escarpa: *Anal. Chem.*, **73**, 5323 (2001).
49) H. Mao, T. Yang, P. S. Cremer: *Anal. Chem.*, **74**, 379 (2002).
50) E. Eteshola, D. Leckband: *Sen. Actuators, B*, **72**, 129 (2001).
51) T. K. Lim, H. Ohta, T. Matsunaga: *Anal. Chem.*, **75**, 3316 (2003).
52) T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba: In "*Micro Total Analysis Systems 2006*", p.816 (2006), (T. Kitamori, H. Fujita, S. Hasebe, Eds., Society for Chemistry and Micro-Nano Systems, Tokyo).
53) J. Yakovleva, R. Davidsson, M. Bengtsson, T. Laurell,

J. Emneus: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 21 (2003).
54) K. Tsukagoshi, N. Jinno, R. Nakajima: *Anal. Chem.*, **77**, 1684 (2005).
55) N. Pamme, R. Koyama, A. Manz: *Lab Chip*, **3**, 187 (2003).
56) M. Kakuta, H. Takahashi, S. Kazuno, K. Murayama, T. Ueno, M. Tokeshi: *Meas. Sci. Technol.*, **17**, 3189 (2006).
57) R. Kurita, Y. Yokota, Y. Sato, F. Mizutani, O. Niwa: *Anal. Chem.*, **78**, 5525 (2006).
58) B. Fitzpatrick, R. O'Kennedy: *J. Immunol. Methods*, **291**, 11 (2004).
59) V. Kanda, J. K. Kariuki, D. J. Harrison, M. T. McDermott: *Anal. Chem.*, **76**, 7257 (2004).
60) T. Akimoto, K. Ikebukuro, I. Karube: *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 1447 (2003).
61) J. W. Choi, K. W. Park, D. B. Lee, W. Lee, W. H. Lee: *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2300 (2005).
62) S. Farrell, N. J. Ronkainen-Matsuno, H. B. Halsall, W. R. Heineman: *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 358 (2004).
63) J. S. Rossier, H. H. Girault: *Lab Chip*, **1**, 153 (2001).
64) J. Soo Ko, H. C. Yoon, H. Yang, H. B. Pyo, K. Hyo Chung, S. Jin Kim, Y. Tae Kim: *Lab Chip*, **3**, 106 (2003).
65) M. Herrmann, T. Veres, M. Tabrizian: *Lab Chip*, **6**, 555 (2006).
66) Y. Murakami, T. Endo, S. Yamamura, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya: *Anal. Biochem.*, **334**, 111 (2004).
67) K. S. Phillips, Q. Cheng: *Anal. Chem.*, **77**, 327 (2005).
68) H. Nakajima, M. Yagi, Y. Kudo, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama: *Talanta*, **70**, 122 (2006).
69) K. Uchiyama, M. Yang, T. Sawazaki, H. Shimizu, S. Ito: *Sens. Actuators, B*, **103**, 200 (2004).
70) N. Malmstadt, A. S. Hoffman, P. S. Stayton: *Lab Chip*, **4**, 412 (2004).
71) S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger, E. Delamarche: *Lab Chip*, **4**, 563 (2004).
72) K. Hosokawa, M. Omata, K. Sato, M. Maeda: *Lab Chip*, **6**, 236 (2006).
73) T. Endo, A. Okuyama, Y. Matsubara, K. Nishi, M. Kobayashi, S. Yamamura, Y. Morita, Y. Takamura, H. Mizukami, E. Tamiya: *Anal. Chim. Acta*, **531**, 531 (2005).
74) S. B. Cheng, C. D. Skinner, J. Taylor, S. Attiya, W. E. Lee, G. Picelli, D. J. Harrison: *Anal. Chem.*, **73**, 1472 (2001).
75) N. Chiem, D. J. Harrison: *Anal. Chem.*, **69**, 373 (1997).
76) M. A. Hayes, T. N. Polson, A. N. Phayre, A. A. Garcia: *Anal. Chem.*, **73**, 5896 (2001).
77) J. B. Delehanty, F. S. Ligler: *Anal. Chem.*, **74**, 5681 (2002).
78) M. Wolf, D. Juncker, B. Michel, P. Hunziker, E. Delamarche: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 1193 (2004).
79) K. D. King, G. P. Anderson, K. E. Bullock, M. J. Regina, E. W. Saaski, F. S. Ligler: *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 163 (1999).
80) V. Linder, S. K. Sia, G. M. Whitesides: *Anal. Chem.*, **77**, 64 (2005).
81) J. Wang, A. Ibanez, M. P. Chatrathi: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8444 (2003).
82) 中嶋　秀，増田祐紀，石野智美，中釜達朗，下坂琢哉，荒井健介，吉村吉博，内山一美：分析化学 (*Bunseki Kagaku*)，**54**, 817 (2005).
83) D. L. Stokes, G. D. Griffin, T. Vo-Dinh: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **369**, 295 (2001).
84) A. Hatch, A. E. Kamholz, K. R. Hawkins, M. S. Munson, E. A. Schilling, B. H. Weigl, P. Yager: *Nat Biotechnol.*, **19**, 461 (2001).
85) C. X. Qiu, D. J. Harrison: *Electrophoresis*, **22**, 3949 (2001).
86) T. Kawabata, M. Watanabe, K. Nakamura, S. Satomura: *Anal. Chem.*, **77**, 5579 (2005).
87) A. Bernard, B. Michel, E. Delamarche: *Anal. Chem.*, **73**, 8 (2001).
88) K. A. Shaikh, K. S. Ryu, E. D. Goluch, J. M. Nam, J. Liu, C. S. Thaxton, T. N. Chiesl, A. E. Barron, Y. Lu, C. A. Mirkin, C. Liu: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 9745 (2005).
89) "2006 イムノアッセイ市場", (2005), (富士経済).

Microchip-Based Immunoassay

Tomoya TACHI[1], Noritada KAJI[1,2], Manabu TOKESHI[1,2] and Yoshinobu BABA[1,2,3,4]

[1] Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603
[2] MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603
[3] Plasma Nanotechnology Research Center, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603
[4] Health Technology Research Center National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2217-14, Hayashi-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-0395

(Received 25 January 2007, Accepted 15 March 2007)

Microchip-based immunoassay, which is immunoassay performed on a microchip, has recently been used in various fields owing to its advantages, such as reduction in sample and reagent consumption, short analysis time and simple operation. Different types of immunoassay have been applied to the miniaturization on a microchip. Material and surface modifications of a microchip, introducing and moving samples and detection must be taken into consideration in order to realize a microchip-based immunoassay. Also, the microchip system should be designed according to a type of immunoassay. In the present review article, we explain the types and classifications of immunoassays and describe important points for developing a microchip-based immunoassay. We then introduce several examples of microchip-based immunoassay.

Keywords **:** immunoassay; microchip; μ-TAS; antigen; antibody.