

体分子を直接マイクロアレイすること（1995年にスタンフォード大学のBrownらがDNAマイクロアレイを初めて作成したためスタンフォード型と呼ばれる）も行われるようになり、現在のマイクロアレイバイオチップの二大作成法になっている。マイクロアレイ固定化方法はさまざまな方法が考案されており、通常のマイクロピッチングの延長のものから、ペン法、インクジェット法、キャピラリー法、ペン&リング法、さらにエレクトロスプレー法などが開発され自動化が進められている（図13.9）。さらに同じペンでも、先割れペン、ソリッドペンなどと工夫も凝らされている。

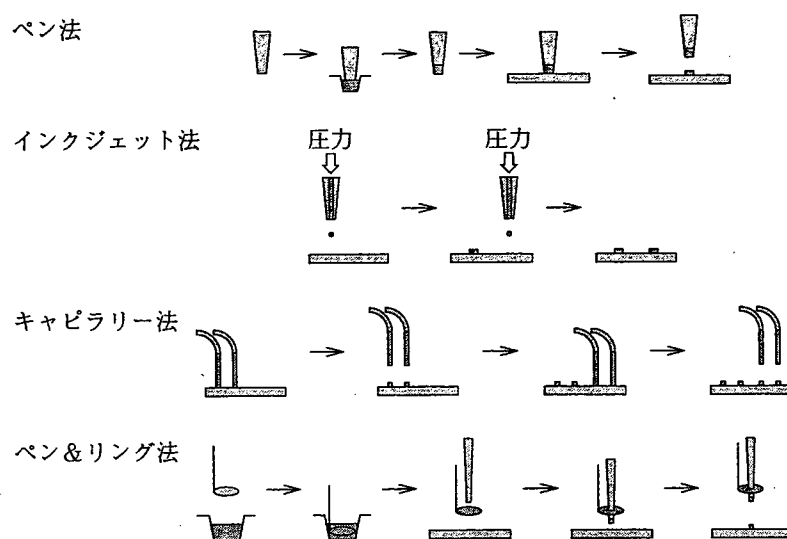


図13.9 マイクロアレイ作成方法

ナノレベルのアレイとしては、Dip-penを用いたナノリソグラフィ（Dip-pen nanolithography: DPN）が注目を集めている¹⁰⁾。これは、原子間力顕微鏡（atomic force microscope: AFM）のチップを用いて、化学物質をサブミクロン領域へ直接書き込むものである。当初は、マイクロコンタクトプリンティング法と同様、自己集積性のあるアルカンチオールを金基板上にパターンニングしたものであったが、最近ではさまざまな化合物が、さまざまな基材上にパターンニングされ、多元パターンニングすなわちマイクロアレイ（ナノアレイ）にまで発展してきている。

13.4 生体成分のマイクロパターン化とその応用

マイクロパターン化は当初、凹凸や親水・疎水のような物理的あるいは物理化学的パターン化だけであったが、1990年代後半からはさまざまな分子のマイクロパターン化が一般的に行われるようになってきた³⁾。特にマイクロアレイチップは、いまや生命科学研究になくしてはならない存在になってきている。

13.4.1 核酸固定化

図 13.10 に、一般に用いられる生体分子の固定化の方法を示す。スタンフォード型は、当初は正電荷をもつ基板表面に DNA の負電荷を使って DNA を静電的に固定化するだけであったが、DNA 末端に官能基を導入して、「立った」状態を保って共有結合で固定化できるようになった。これにより、DNA どうしのハイブリダイゼーション効率が高まり、分析の正確性が向上した。

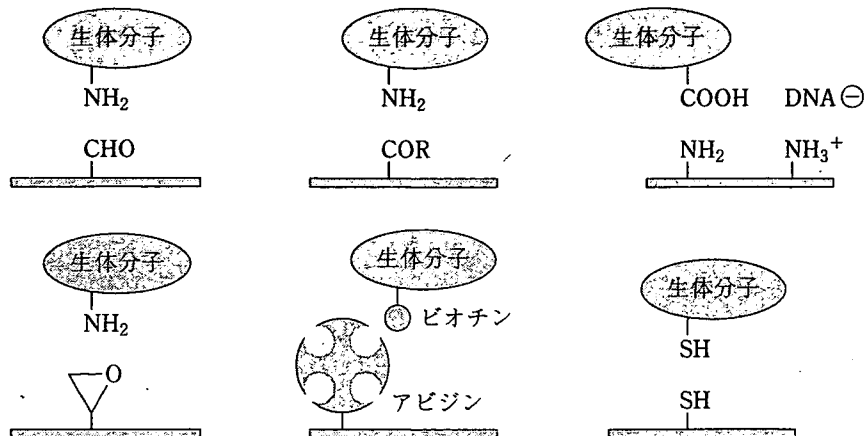


図 13.10 生体分子の化学的固定化法の例

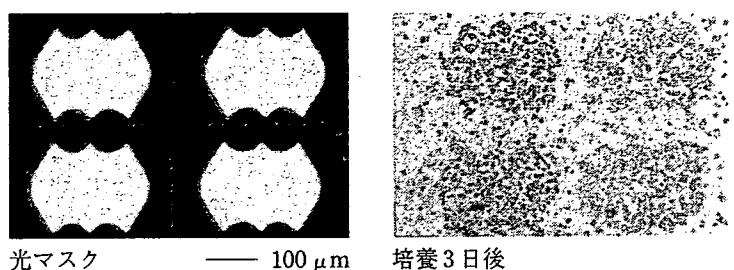
DNA マイクロアレイでは、アレイされている DNA のサンプル中の DNA が、調べたいサンプルから作成した溶液中の DNA とハイブリッドしたかどうかを調べて、どのような遺伝子がサンプル中で発現されているかと調べる。最も一般的な例は、サンプルとなる核酸を蛍光ラベル化し、チップ上の核酸とハイブリッドしたかどうかをレーザースキャニングで検出する方法である。チップ上のあらかじめ配列のわかっている、どの核酸に結合したかを調べることによりサンプルにどのような DNA が発現されているか調べることができる。このほかにも微細加工した電極に DNA を固定化して、二重らせん構造形成に伴う電気信号の変化を検出する方法も考案されている。少数のある程度決まった種類の DNA を固定化して検出を行う場合には、電気化学的分析が有効と考えられている。また、非標識で DNA 検出が効率よく行うことができれば、利便性も高い。

これまでは、DNA マイクロアレイはゲノミクスのような学術研究に用いられるだけであったが、2004 年に初めてヨーロッパで診断用チップが認可を受け、日本でも臨床応用へ向けた取組みが積極的に行われている。

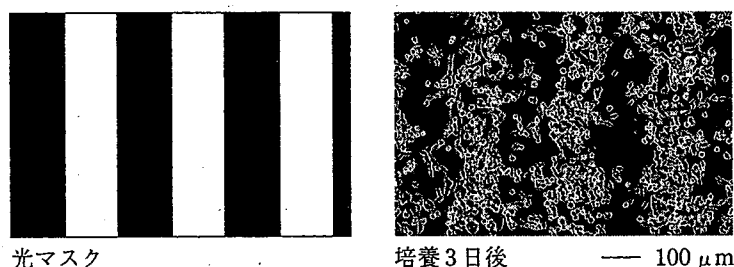
また、核酸固定化は、ハイブリダイズによる相補鎖検出用ばかりでなく、抗体のように分子認識能をもつ核酸アプタマーにも応用でき、開発が進められている。これは、捕捉するタンパク質と核酸を別々に染色することができ、新しいタイプの抗体マイクロアレイとして注目されている。

13.4.2 タンパク質固定化

タンパク質のマイクロパターン化の先駆的な研究は、光リソグラフィを用いて行われた¹¹⁾。細胞接着性のゼラチンに直接光反応性基を導入することで光反応性高分子として、光リソグラフィでのマイクロパターン化が行われ、ゼラチンをマイクロパターン状に固定化した表面で細胞のマイクロパターン接着が可能となった。この方法は、細胞成長因子の固定化にも用いられ、マイクロパターン化基板で細胞の成長や分化を制御できることが示された(図 13.11)。この光リソグラフィ法は、有機分子であればどのような分子の固定化も可能となり、これからのマイクロアレイチップ調製全般に有用な方法となることが期待される。



(a) 光マスクの白部分にインシュリンを固定化しインシュリンレセプター過剰発現細胞を培養すると、インシュリン固定化領域でのみ細胞の増殖を観測できた。



(b) 光マスクの白部分にエリスロポエチンを固定化しエリスロポエチン依存性細胞を培養すると、エリスロポエチン固定化領域でのみ細胞増殖が観察され、そのほかの領域の細胞はアポトーシスを受けた。

図 13.11 固定化成長因子上での細胞培養

そして、タンパク質の基材上への多元固定化は、2000年から報告されるようになってきた。固定化されたタンパク質と溶液中のタンパク質の相互作用を調べることで、生体内での複雑なタンパク質間相互作用を一つひとつ明らかにするために用いられる。固定化には、最初アルデヒド基導入基板が行われた。また一方で、固定化されるタンパク質に基材接着性を付与(タンパク質にポリヒスチジンタグをつけるとニッケルへ結合する性質を利用)するタンパク質工学的手法も応用されるようになっている。

ポストゲノム解析は、プロテオーム解析ということで、タンパク質マイクロアレイ基板を

用いたタンパク質相互作用解析が盛んに研究されている。2003年には、約500種類の抗体をマイクロアレイしたチップ、2004年には約5000種類のタンパク質をマイクロアレイしたチップなどが開発され市販されるようになってきている。また、研究用のチップしかないものの、疾病の診断には、患者自身がそのとき発現しているタンパク質を調べることが必要となるため、将来はさまざまなプロテインチップが実現されてくるものと思われる。

13.4.3 そのほかの分子のパターニング

ペプチド、糖、低分子化合物などさまざまな分子の固定化についても数々の方法が開発されている。低分子化合物固定化法としても上述の光固定化法が用いられ、従来は固定化が困難であった分子が固定化可能となり、注目を集めている。

そのほかに、温度や光に応答して性質が変化する材料をマイクロパターン化して、細胞の接着や脱着をマイクロパターン状に制御することも報告されている。自由自在にマイクロレベルの細胞シートを作ることができる（後述）。

研究用も含めDNA以外では、まだ実用的なマイクロアレイチップは開発されていないが、図13.12に示すように、さまざまなプローブキャプチャーをマイクロアレイして、分析物（アナライト）との相互作用を調べる研究がこれまでに行われている。

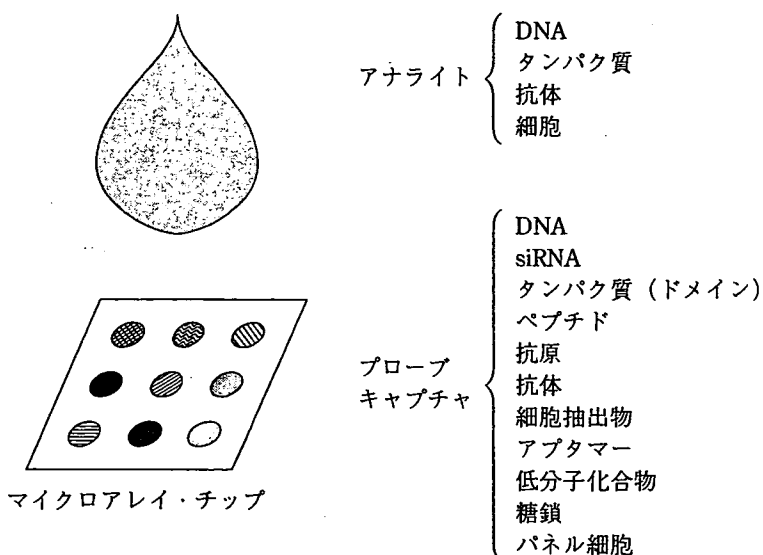


図 13.12 マイクロアレイによる分析例

図13.13に、マイクロアレイチップの歴史を示す。コンピュータチップの集積度の上昇は、「ムーアの法則」と呼ばれるが、マイクロアレイバイオチップも、それに劣らない集積度の向上がなされている。今後さまざまなマイクロアレイバイオチップが上市され、ハイスループットスクリーニング（HTS）が展開されてくるものと期待される。

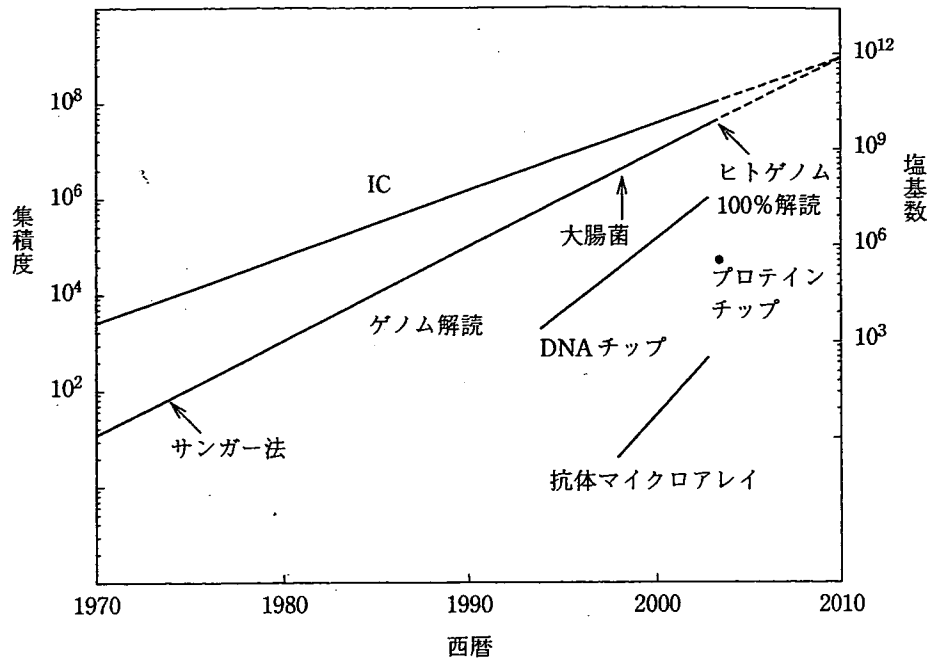


図 13.13 マイクロアレイの集積度

13.4.4 細胞マイクロパターン

(1) マイクロパターン上での細胞

さまざまにマイクロパターン化された表面での細胞挙動の観察は、比較的古くから行われている^{12)~14)}。細胞は、中程度の親水性表面に接着しやすく、表面が負電荷を帯びているため、正電荷をもつ基材に接着しやすいこと、さらに、細胞外基質として知られるタンパク質が接着因子としてはたらくことが知られている。そこで、表面にマイクロメートルサイズの親水・疎水、正電荷・負電荷のパターン、接着因子タンパク質のパターンを形成させると、細胞接着がマイクロパターン状に起こることが知られており、数々の例が報告されている。

そしてこのマイクロパターンで、細胞接着より高次の機能が顕著に制御されることもいくつか知られている。最も有名な報告例は、海（疎水性領域）に島（親水性領域）を形成させるようなマイクロパターン上で細胞を培養すると、細胞が十分に伸展しないような島サイズでは、アポトーシスが誘起されることである。最近ではナノメートルサイズの凹凸が、細胞内部の細胞骨格系タンパク質に影響を与え、細胞の接着や伸展、さらに運動性などが変化することが明らかにされてきている。

細胞より小さいパターン化の細胞への効果は、細胞への局所的な層流刺激や局所的な放射線刺激、あるいは成長因子を固定化した微小領域や微小粒子による刺激によっても検討されている。例えば、上皮成長因子（EGF）を固定化して細胞を刺激すると、刺激された領域でのみ EGF レセプターを含む情報伝達タンパク質が活性化されることが示されている（図13.14）。

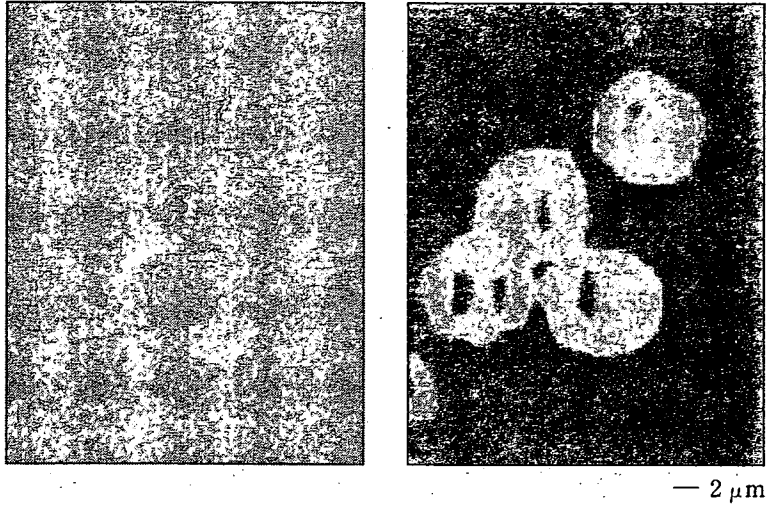


図 13.14 細胞より微細な領域に EGF を固定化し、EGF レセプター過剰発現細胞を培養し、抗体チロシンリン酸化抗体で染色すると、固定化 EGF で活性化された領域のみ (2 マイクロメートルのストライプ) と細胞周辺 (輪郭) でのみリン酸化が観察され、情報伝達が部位特異的に起こっていることがわかる (口絵 15 参照)

刺激応答性表面での細胞挙動もマイクロパターンで観察すると、その効果を顕著に観察することができる。温度応答性や光応答性の高分子でマイクロパターンを形成し、その上で細胞を培養するとまんべんなく増殖するが、温度変化や光照射を加えることにより、刺激応答性高分子上の細胞だけが脱着することが報告されている (図 13.15)。

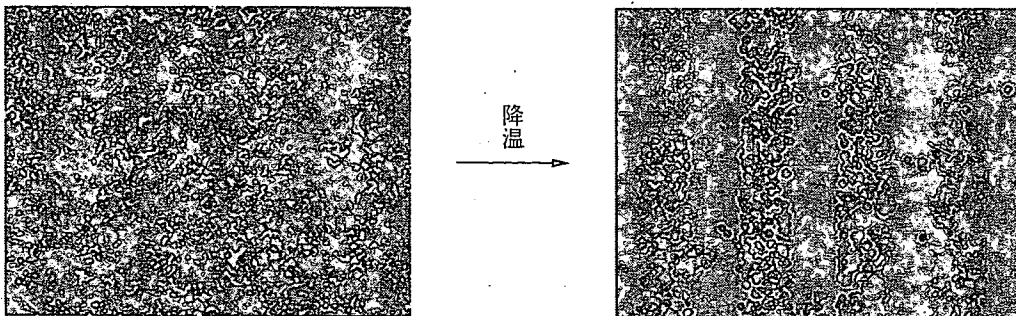


図 13.15 温度感受性高分子をマイクロパターン (ストライプ) 状に固定化し、その上で細胞を培養して満杯にしたあと降温すると感受性高分子固定化領域の細胞だけが脱着する。

一方、タンパク質をマイクロパターン固定化した表面での細胞の挙動を観察する研究手法が開発されている。抗体をマイクロアレイしてその上への細胞の接着をもとに、フローサイトメトリーの代わりに細胞表面の抗原性のプロファイリングを行う方法が報告されている。フローサイトメトリーでは、数種類の抗原へ蛍光ラベル化抗体を反応させて調べるのが限度であるが、抗体マイクロアレイを用いれば原理的には、マイクロアレイしただけの抗体に対する抗原性を一度に検索可能になる。多元系マイクロパターンでは、固定化した DNA ではなく、徐放性の DNA マイクロアレイを作成し、その上で細胞を培養し、遺伝子の細胞への

作用を調べるトランスフェクションマイクロアレイシステムがいくつかのグループで開発されてきている。

〔2〕 細胞のマイクロパターン化 細胞そのものを直接マイクロパターン化する例も報告されている。ここでは、細胞プリンティング法として、DNAのパターニングとして使われるインクジェットプリンティングが細胞に応用される。これまでに、普通のサーマルプリンターを改造して生きた細胞をプリントできることが報告されている¹⁵⁾。複数の細胞をおのおのプリントすることも可能であることから、この技術を展開すればコンピュータ制御で臓器の形を模倣できるのではないかと期待されている。

一方、細胞をマイクロアレイ固定化してタンパク質（おもに抗体）との相互作用を研究する例が報告されている。細胞の固定化方法としては、細胞表面が負に帯電していることを利用して、正に荷電した表面（例えば、ポリ-L-リシン吸着表面）に静電的相互作用に固定化して、抗体を反応させて解析を行うものである¹⁶⁾。

〔3〕 細胞マイクロパターンの応用 このような細胞のマイクロパターン化により、いくつかの応用研究も行われている。まず一つは、マイクロレベルからの組織再生を目指した研究がいくつか行われている。バイオエレクトロニクス、あるいはバイオセンサーとして神経細胞のニューロサイトの方向づけを行うものである。また、直接の応用が開発されているわけではないが、潜在的な用途が考えられている。

また、生体組織は何種類もの細胞が組織立って機能している。そこで、2種類以上の細胞をマイクロパターン化して、より生体組織に近い構造を得ようとする試みもある。最初は線維芽細胞と肝臓細胞で行われ、現在では血管細胞をマイクロパターン化して毛細血管様に構築し、その間に肝臓細胞を培養して培養組織全体に血管を張り巡らし、栄養や酸素の補給ができるような組織作りも研究されている。

細胞アレイは、薬物のハイスループットスクリーニングの一環としても注目を集めている。動物実験の回避、環境に配慮した研究のために、少量で短時間でより多くの結果を得ようとする培養細胞を用いたマイクロシステムは必須である。

そのほか、多種類の細胞を基板上に固定化したマイクロアレイを作成し、血液型抗体検査を行う方法も考案されている¹¹⁾。ABO型のパネル血球を固定化して、血液を反応させると、A型血球にはA型血清は反応しないが、B型血球には反応する。これにより血液型抗体の検出が可能になる。組織マイクロアレイもすでに広く用いられるようになってきている。このようにマイクロアレイ（マイクロパターン化）されるのは、もはや分子だけでなく、細胞やさらには組織にまでも展開が始まっている。

13.5 立体的パターンニングの応用例

いわゆるバイオチップは、上述の生体分子パターン化マイクロアレイ型のほかに、2元系の代表的なパターンである凹凸マイクロパターンを形成させた基材があり、これはマイクロ流路を作成したチップとして、現在広く研究されている¹⁷⁾。このデバイスを用いた分析法は、マイクロ総合分析システム (micro total analysis system: μ TAS) あるいは、Lab-on-a-chip と呼ばれ、すべての分析過程を1チップ上でできるように設計することを目標としている。例えば、① 生体組織を分解して核酸を抽出し、② PCRで核酸を増幅し、③ 核酸の配列解析を行う、という一連の過程が1チップ上でできるように工夫される。このシステムにより、少量の試料から短時間で分析ができるようになる。また、チップ内で肝臓細胞を組織的に培養して、人工肝臓モジュールを作成しようとする試みも行われている。

分析のほかに、化学反応を行う容器、マイクロリアクターとしても期待されている。化学反応をマイクロ領域で行うことにより、体積当りの接触界面が大きくなり、界面を介した物質移動や熱交換の効率が高くなり、反応速度を高め、爆発性の化学反応も制御しながら行うことが可能になる。

システムの設計のためには、50~200 μ m 幅のマイクロチャネルを流れる層流を操作できるマイクロポンプ、マイクロコネクタ、マイクロバルブ、マイクロミキサーが必要となる。これらのコンポーネントは、初期はシリコンで、のちにガラスを微細加工して用いられるようになり、現在では水系反応や分析には高分子材料を用いることも可能になってきており、応用範囲は拡大している。

13.6 おわりに

マイクロパターンニング技術は半導体加工の2元系から、マイクロアレイバイオチップの多元系へと進歩してきた。工学と生命科学をつなぐ典型的な研究手段であったのが、現在では生命科学にはなくてはならない技術となっている。ただ、まだ現状では、研究用に用いられるのが主で、産業として社会で用いられるまでには至っていない。しかし、今後は、まずは臨床診断などの分野で大きな発展が期待される。そして、再生医工学においても重要な技術として、展開していくものと思われる。

引用・参考文献

- 1) Ito, Y. : Surface micropatterning to regulate cell functions, *Biomaterials*, **20**, pp.2333-2342 (1999)
- 2) 伊藤嘉浩 : 細胞工学材料, 高分子材料・技術総覧, 高分子材料・技術総覧編集委員会, p.615-622, 産業技術サービスセンター (2004)
- 3) 伊藤嘉浩 : マイクロアレイ概説, マイクロアレイ作成法, コンピナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線, 植田充美 監修, p.252-272, シーエムシー出版 (2004)
- 4) Voldman, J., Gray, M. L., Schmidt, M. A. : Microfabrication in biology and medicine, *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **1**, pp.401-425 (1999)
- 5) Park, T. H., Shuler, M. L. : Integration of cell culture and microfabrication technology, *Biotechnol. Prog.*, **19**, pp.243-253 (2003)
- 6) Whitesides, G. M., Otsuni, E., Takayama, S., Jiang, X. and Ingber, D. E. : Soft lithography in biology and biochemistry, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **3**, pp.335-373 (2001)
- 7) Shim, J., Bersano-Begey, T. F., Zhu, X., Tkaczyk, A. H., Linderman, J. J. and Takayama, S., Micro- and nanotechnologies for studying cellular function, *Curr. Top. Med. Chem.*, **3**, pp.687-703 (2003)
- 8) Li, N., Tourovskaja, A. and Folch, A. : Biology on a chip : microfabrication for studying the behavior of cultured cells, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **31**, pp.423-488 (2003)
- 9) マイクロマシン技術総覧編集委員会 : マイクロマシン技術総覧, 産業技術サービスセンター (2003)
- 10) Ginger, D. S., Zhang, H. and Mirkin, C. A. : The evolution of dip-pen lithography, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, pp.30-45 (2004)
- 11) 伊藤嘉浩, 山内哲也, 大村 馨 : 光固定化法を用いたマイクロアレイ・チップの創製, 高分子論文集, **61**, 11, pp.501-510 (2004)
- 12) Folch, A., Toner, M. : Microengineering of cellular interactions, *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, pp.227-246 (2000)
- 13) Jung, D. R., Kapur, R., Adams, T., Giuliano, K. A., Mrksich, M., Craighead, H. G. and Taylor, D. L., Topological and physicochemical modification of material surface to enable patterning living cells, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **21**, pp.111-154 (2001)
- 14) Curtis, A. S. G. : Small is beautiful but smaller is the aim : review of a life of research, *Euro. Cells Mater.*, **8**, pp.27-36 (2004)
- 15) Xu, T., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J. L. and Boland, T. : Inkjet printing of viable cells, *Biomaterials*, **26**, pp.93-99 (2005)
- 16) Schwenk, J. M., Stoll, D., Templin, M. E. and Joos, T. O. : Cell microarrays : an emerging technology for the characterization of antibodies, *Biotechniques*, **33**, S 54-S 61 (2002)
- 17) 北森武彦 : インテグレートド・ケミストリー —— マイクロ化学チップが拓く科学と技術 ——, シーエムシー出版 (2004)

第1章 マイクロアレイ・バイオチップの基礎

伊藤嘉浩*

マイクロアレイ・バイオチップは、歴史は十数年と浅いものの、コンピュータ・チップの発展で知られる「ムーアの法則」のように、微細化が進み集積度が増してきた¹⁾。マイクロアレイ・バイオチップを含むバイオテクノロジー技術は、複合化され、生体情報を指数関数的に増やし、その応用の可能性をますます広げている²⁾。このような中、最近、DNAチップ、プロテインチップ、ナノバイオに関する書籍や解説・総説が多く出版され^{3~13)}、その中でマイクロアレイ・バイオチップも解説されているが、基礎から応用までを広く網羅した書籍はなかった。そこで、基礎編第1~5章では、マイクロアレイ・バイオチップの簡単な歴史について述べた後、製造のための、チップ材料と形状、マイクロアレイ技術、生体分子固定化技術、検出技術について、詳しい内容や各技術に関するトピックスについて各章で述べる。

1 マイクロアレイ・チップのはじまり

マイクロアレイ・バイオチップの基本的な要素技術の一つとなる、バイオ分子の相互作用による分析技術は古くから知られており、抗原・抗体反応によるイムノアッセイはその代表例である。EkinsとChuらが1980年代後半、マイクロアレイ・マルチ-アナライト・イムノアッセイの可能性を述べている^{14,15)}。プロテイン・マイクロアレイ、特に抗体マイクロアレイのアイデアはここになると思われる。

一方、核酸のハイブリダイゼーションを利用したRNAの検出法は、30年以上前にオックスフォード大学のSouthernらによって開発されサザン・プロット法と呼ばれ、これも代表的な分子生物学分析法の一つとなっている。このサザン・プロット法を多数のオリゴヌクレオチドを結合したアレイへ拡張するDNAマイクロアレイの基本特許はOxford Gene Technologies社から1998年に出願された(第2章第3節)。そして本格的な高密度化/小型化は、Fodor(現在はAffymetrix社長)らが、1991年の*Science*誌に光保護基を用いて光リソグラフィによる生体分子マイクロアレイを報告したことに始まる(特許出願は1989年)。これが現在のAffymetrix

* Yoshihiro Ito (独)理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

社のジーンチップあるいは「アフィメトリクス型」となっている。固相法による逐次合成法で、塩基数にして数十の長さのオリゴヌクレオチドが、網羅的にスライドガラス上に配列されている。現在販売されているジーンチップには、数万種以上もの遺伝子と遺伝子断片がアレイされ、オリゴヌクレオチドを用いているため遺伝子発現解析のほか、ジェノタイピング（遺伝子配列解析）などに应用することができる。現在では、このジーンチップの他に様々な DNA マイクロアレイが作られ、学術研究を中心に広く用いられている。

ジーンチップをはじめとする DNA マイクロアレイが飛躍的に展開されるきっかけは、1995年にスタンフォード大学の Brown らが、長い DNA をそのまま正電荷高分子を吸着したガラス板上にスポット状に貼り付ける方法を考案し、遺伝子発現を大量かつ同時並行的に検討する研究に用いてからになる。そして、ゲノム科学の急激な進展ともあいまって非常に急速に発展した。この「スタンフォード型」そのものは、点突然変異の検出には不向きであるが、調製が容易なため、比較的長い DNA 鎖を固定化して、遺伝子発現を調べる目的で使用されている。

このように遺伝子解析から始まったマイクロアレイ・バイオチップであるが、一つには基礎編で紹介するような様々な要素技術やシステムが開発され高性能化するとともに、応用編で述べるようにタンパク質をはじめとする様々な生体分子や細胞にまで応用が展開され、その範囲が広がってきている。

2 マイクロアレイの要素技術

2.1 基板素材^{16,17)}

当初、シリコン板に始まり、続いてスライドガラス上への生体分子のマイクロアレイ固定化が行われるようになった。特に DNA マイクロアレイでは、電気化学的にハイブリダイゼーションを検知する場合もあり、半導体酸化シリコンや非酸化シリコン、シリコン・ナイトライドが多く用いられている。しかし、現在最も一般的なものは、ガラス基板を様々な有機化処理してその上に生体分子や細胞を固定化している例が多い。これは、ガラス基板が様々な溶媒に耐性があり、機械的にも安定で、低蛍光性で、しかも安価に修飾できることによっている。無機材料としてはダイヤモンド基板なども使用されるようになってきている（第2章第2節）。また無機材料だけでなく、第2章第1節で述べられるようなプラスチック基板もあり、それぞれ特徴ある使用方法が考えられている。

基材表面処理としては表面の官能基量を高めるために3次元化が行われ、そのためにアガロース、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、ナイロン、ポリフッ化ビニリデン、ポリジメチルシロキサンなどが用いられることが多い。また、 dendrogram や dendron を表面に形成す

る報告もある。固定化物とアナライトとの相互作用を促進するためにポリエチレングリコールのようなスペーサー分子を導入することが有効であることも多く報告されている。

2.2 形状

当初は平らな基板が用いられたが、アナライトとの相互作用をできるだけ多くするために表面積や固定化するプローブ分子の密度を高める方策がとられた。多孔性やフィルター状の担体を用いたり、基板表面に凹凸を形成させたり、生体分子固定化ビーズを光ファイバーの束に配置したり、固相合成した多孔性ガラス担体をそのまま基板上に固着したり、中空糸内で架橋ゲルを形成したり、糸の上に物理的に固定化したりと、特にDNAマイクロアレイ・バイオチップに関してメーカー各社が様々な独自技術を開発している。このことは、第2章第3節に詳しく述べられている。

2.3 マイクロアレイ技術^{18,19)}

接触型と非接触型に分類することができ、様々な会社から販売されている。接触型は、さらにピン型とスタンプ型に分類できる。前者のピンには様々な形状がある。キャピラリーチューブ、ソリッドピン、スプリットピン（先割れピン）、シリコンピン（メタルピンより低コストで微細加工可能）などが知られている。スタンプ型は、ピン型を複数個束ねたような形となり、弾性スタンプを用いたソフトリソグラフィがよく知られている。この他、実用化レベルには達していないものの、原子間力顕微鏡（AFM）を用いたディップ・ペン・リソグラフィはナノ・レベルのマイクロアレイに有効な方法である。

非接触型には光化学法、電界プリント法、液滴ディスペンス法と、レーザー・アブレーション法がある。光化学法としては、光リソグラフィがあげられ、その代表例は、On chip 合成で用いられ、ジーンチップ（Affymetrix 社製）が有名である。ナノチップ（Nanogen 社製）は、電界プリント型を利用している。マイクロ電極で基板を正に帯電し、負電荷をもつDNAやRNAを吸着させている。液滴ディスペンス法の主な方法はインクジェット型、マイクロポンプ型と、エレクトロスプレー・デポジション型で、これらは各々第3章第1節、第2節、第3節に解説がある。レーザー・アブレーション法では、直接法と間接法がある。直接法では、生体分子とグリセロール、緩衝剤を石英板に被覆し、そこにパルス・レーザーを照射し、被覆したなかの一部領域を蒸発させ基板上へ沈着させる方法である。間接法では、基板に予めレーザー処理をしてから生体分子を固定化する。

マイクロアレイした液滴が乾燥する際に、不均一な分布が生じ、特に円周辺部に生体分子（ペプチドや抗体のようなタンパク質で顕著）が局在する現象がよく観察されるが、これは界面活性

剤の添加で解消できることが最近報告されている²⁰⁾。プロテオーム解析の分野では、二次元電気泳動したゲル板をナチュラルプロテインアレイとして用いられることが多く、この自動作成も可能になってきている（第3章第4節）。このような従来の方法とは全く別に第3章第5節で紹介があるように、網羅的なプロテオーム解析のために二次元電気泳動をチップ型に発展させたケミカルプリンタが開発されている。

2.4 固定化法²¹⁾

固相法で合成可能な核酸やペプチドの On chip 合成から始まったマイクロアレイ技術であるが、その技術の発展とともに、様々な生体分子の固定化が行われるようになり、従来の酵素固定化法で養われた技術を含め、様々な固定化法が考案されてきている。第4章第1節では、固定化法として、物理固定化法、イオン結合法、包埋法、共有結合法（生体分子をそのまま固定化する場合と、修飾してから固定化する場合）、生体親和性を用いて固定化する方法などについて詳述した。第4章第2節では、特にハイドロゲルを用いた最近の包埋法での固定化についての解説がある。

2.5 検出技術

マイクロアレイ固定化した生体分子と溶液中の生体分子（分析対象物、アナライト）を相互作用させて検出する方法は、標識法と非標識法に分類される。前者には、蛍光法、発色法、化学発光法、放射性同位元素法がある。後者には、電気化学法、表面プラズモン共鳴（SPR）法、水晶発振子マイクロバランス（QCM）法、マス・スペクトル（MS）法などがある。蛍光法は第5章第1節に解説があるようにDNAマイクロアレイでは最も一般的に用いられている方法で、より高感度な測定を目指して様々な蛍光分子や分光検出装置の開発が行われている。化学発光法は励起光源が不要のため廉価で検出装置ができることから、タンパク質マイクロアレイでよく利用される。電気化学法が第5章第2節に、非標識型のSPR法、MS法が第5章第3節、第4節に各々解説されている。

その他にも、様々な方法が開発されている。標識法としては、金ナノ粒子でDNAを標識して銀(I)の還元反応によって感度を2桁向上した例が報告されている。また、プロテインチップなどにおいては、DNAのように容易に増幅することができないため、シグナルの増幅の方法として、ローリングサークル増幅（RCA）法が考案されている。これは、DNAプライマーを結合した抗体を用いて、環状一本鎖DNAを鋳型にしたDNA鎖の増幅・伸長を行うもので、伸張されたDNA鎖に蛍光標識した多数のオリゴDNA相補鎖をハイブリッド形成させ、蛍光色素をチップ上の微小スポットに集積化するものである。非標識法としては原子間力顕微鏡による測定が知られてい

自動化	方法	工程						販売会社	解析対象	
		採取	抽出	増幅	反応	検出	解析		DNA	RNA
全自動	PCR	lab-in-a-tube方式、一体型						IQuum社	○	△
一部自動	チップ	系型DNAアレイ、一体型						Precision System Science社	○	-
		Lab-on-Chip、一体型						STMicroelectronics社	○	-
		数種の発現解析ツール						Affymetrix社*	○	○
		ビーズアレイ						Illumina社*	○	○
		電流検出、一体型						東芝	○	-
		デュアルモードアレイ						Agilent社**	○	○
		ケミルミネッセンス検出						AppliedBiosystems社**	-	○
	PCR	キャピラリー電気泳動検出、一体型						BeckmanCoulter社	-	○

*: 多検体対応の増幅工程付加オプションあり
 **: 複数の機器で試料調製から解析まで対応

○: 実施例プロトコルあり
 △: 用途記載のみ
 -: 用途記載なし

(財) 化学技術戦略推進機構提供 (株式会社ダイヤリサーチマーテック調べ)

図1 DNA マイクロアレイ・バイオチップを用いた全自動システムの現状 (2007年)

る。

3 マイクロアレイ・バイオチップを使用した分析システム

マイクロアレイ・バイオチップを使った自動化システムも研究開発されるようになってきている。DNA マイクロアレイの現状を図1に示す。遺伝子分析には、細胞からの遺伝子の抽出過程が必要となり、まだ全工程を自動で行う装置はチップ型では製品はない。後述するように、現在重要課題になっているマイクロアレイの標準化のためには、サンプル調製段階からの標準化が必須であることから、全工程自動化システムの開発は今後のマイクロアレイ・チップのさらなる発展のためには重要な要素になると考えられる。

一方タンパク質解析ではすでに ELISA など自動化装置が汎用されており、それを利用した自動化装置の開発が進められてきている²²⁾。我々のグループでも、アレルギー診断や自己免疫疾患診断用のマイクロチップのための分析システムを開発している²³⁾。これは、マイクロ流路型チップとマイクロアレイを融合させたもので、エッペンドルフ・チューブに入れた血清を装填すれば自動的に吸い取り、チップ上を流し、自動的にインキュベーション、洗浄、二次抗体反応、洗浄をし、最終的に化学発光試薬を加えて化学発光量を定量し、パソコン画面上に血清中に含まれる抗体量を表示できるようになっている (図2)。

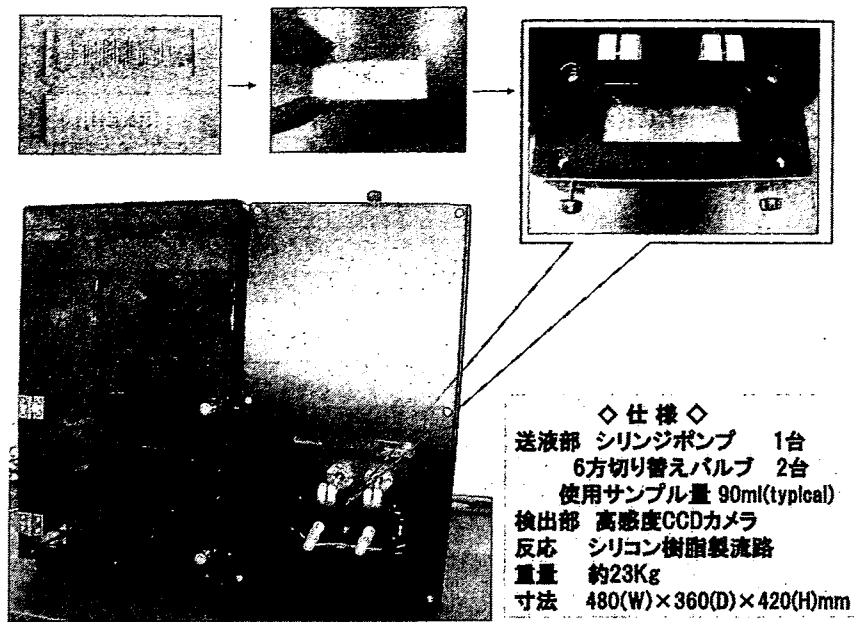


図2 プロテイン・マイクロアレイのための全自動測定システムの例
 マイクロ流路とマイクロアレイ・チップを複合化してバイオチップを構成。バイオチップとサンプルを装填すると自動で測定し、データをパソコン画面に表示する。

4 マイクロアレイの標準化

DNA マイクロアレイは研究で広く用いられるようになったが、いろいろな種類のプラットフォームが市販されるようになると、それぞれでデータが異なるという結果が明らかになってきた。そこで、数年前からデータを公的に管理・保存するシステムが学術分野において整備されるようになってきた。そしてさらに、マイクロアレイを医療診断に利用するために、どのような検討を行い、データを取り揃える必要があるかという検討が、世界的に進められている。代表的なものとして、米国食品医薬品局 (FDA) がイニシアチブをとり、米国立衛生研究所 (NIH), 米環境保護局 (EPA), 米農務省 (USDA), 米国の遺伝子発現解析プラットフォーム製造会社などが参加したDNAチップの遺伝子発現解析の品質管理検定プロジェクト (micro array quality control, MAQC) で、その成果が2006年9月にまとまった²³⁾。MAQCプロジェクトでは、6社のDNAマイクロアレイのプラットフォームとオベロン社のオリゴヌクレオチドで作成したマイクロアレイ、そしてマイクロアレイ以外の定量的な遺伝子発現解析プラットフォーム (Applied Biosystems社のTaqmanアッセイ, Panomics社のQuantiGeneアッセイ, Gene Express社のStaRT-PCRアッセイ) とを比較した。その結果、すべてのプラットフォームにおいて、得られた結果に大差がなく、DNAマイクロアレイで得られたデータの精度が他の定量的なアッセイにより確認されたと結論付けた²⁴⁾。しかし、結果については議論の余地が指摘されるところもあり²⁵⁾、今後

のさらなる展開が望まれるところである。

MAQC プロジェクトについては第二期がはじまっており、「臨床」「生物統計学」「トキシコゲノミクス」「MAQC Titration (混合試料の解析)」の四つのワーキンググループで、DNA マイクロアレイの研究の品質向上、医療応用への可能性について検証を進めている。日本でも産業界が中心となって、米国をはじめとする国外団体と国際協調を図りながら、バイオチップの産業化に向けた標準化を推進して市場を確立することを目標に、2007年10月にバイオチップ・コンソーシアムが発足した。

5 マイクロアレイ・バイオチップのこれから

欧米では、DNA マイクロアレイは既に認可を得て臨床応用のために販売されるようになってきている(第6章)。日本でも販売が始まっているものの、保険は適用されておらず、今後どのように展開していくか未知の部分もある。ただ、個の医療の基盤となるバイオマーカーが続々実用化のプロセスに入ってくることを考えると、将来は、臨床診断分野で欠かせない技術になると予測される。本書で紹介するように、様々な生体分子の分析を目指して、新しいバイオチップの開発はもちろんのこと、その製造装置、検出装置なども研究開発されている。このようなハードの発展とともに、解析データが膨大になるため、その解析法もバイオインフォマティクスの発展とともに進歩している。このような技術の進歩により、より詳細な生体情報が得られるようになると、創薬分野での研究開発に応用できるとともに、病気の予防や診断、投薬管理、予後管理などが精密に行えるようになり、バイオチップ化することでデータの送受信も容易になり、遠隔医療への貢献も大きくなる可能性があり、QOL (Quality of Life, 生活の質) の向上が進むものと考えられる。また、医療への応用ばかりでなく、環境モニターへの応用へも期待がかかる。マイクロアレイ・バイオチップ技術が大いに発展することを期待したい。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩, 大村馨, バイオニクス, 2, 70-71 (2005)
- 2) R. Carlson, *Biosec. Biotero. Biodiff. Str. Prac. Sci.*, 1, 1-12 (2003)
- 3) 伊藤嘉浩, 「バイオテクノロジー総覧」, 日本能率協会総合研究所編, 通産省資料出版会 (2005)
- 4) 山本重夫監修, 「バイオ解析・診断技術のテーラメイド医療への応用」, シーエムシー出版

(2006)

- 5) 山根恒夫, 松永是, 民谷栄一監修, 「ナノバイオ大事典」, テクノシステム (2007)
- 6) 三原久和・小島英理・馬場嘉信編, 「ナノバイオ計測の実際」, 講談社 (2007)
- 7) 軽部征夫監修, 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」, テクノシステム (2007)
- 8) 久原哲監修, 「DNA チップ活用テクノロジーと応用」, シーエムシー出版 (2007)
- 9) 関根光雄編, 「新しい DNA チップの科学と応用」, 講談社 (2007)
- 10) A. Kožarova, S. Petrinac, A. Ali, J. W. Hudson, *J. Proteome Res.*, **5**, 1051-1059 (2006)
- 11) L. Bonetta, *Nat. Methods*, **3**, 571-577 (2006)
- 12) H.-J. Mueller, T. Roeder, "Microarrays", Elsevier Academic Press (2006)
- 13) S. F. Kingsmore, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 310-320 (2006)
- 14) R. Ekins, F. W. Chu, *TIBTECH*, **17**, 217-218 (1999)
- 15) M. G. Weller, *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 15-17 (2003)
- 16) S.-y. Seong, C.-y. Choi, *Proteomics*, **3**, 2176-2189 (2003)
- 17) S. J. Oh, B. J. Hong, K. Y. Choi, J. W. Park, *OMICS J. Integr. Biol.*, **10**, 327-348 (2006)
- 18) I. Barulovic-Nad, M. Lucente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **26**, 237-259 (2006)
- 19) R. Mukhopadhyay, *Anal. Chem.*, September 1, 5969-5972 (2006)
- 20) Y. Deng, X.-Y. Zhu, T. Kienlen, A. Guo, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2768-2769 (2006)
- 21) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, **8**, 1775-1789 (2006)
- 22) B. G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Martlbauer, R. Niessner, M. G. Weller, *Anal. Chem.*, **76**, 646-654 (2004)
- 23) 伊藤嘉浩, 大村馨, バイオインダストリー, **23**, 27-34 (2006)
- 24) MAQC Consortium, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1151-1161 (2006) など同月号に 6 報
- 25) *Nat. Biotechnol.* **25**, 25-29 (2007)

第4章 固定化技術

1 生体分子のマイクロアレイ固定化法

伊藤嘉浩*

1.1 はじめに

生体分子のマイクロアレイ固定化法は、これまで「固定化酵素」として展開されてきた方法論がそのまま採用される一方で、最近新たな固定化法も開発されてきている。マイクロアレイのための生体分子固定化法については、核酸、タンパク質、糖ごとに、いくつかの解説や総説が発表されている¹⁻¹¹⁾。本節では、これらをまとめて解説する。

一般に、生体分子の固定化法には、非特異的な物理吸着による方法 (図1 a)、イオン結合による方法 (図1 b)、ヒドロゲルなどによる包埋による方法 (図1 c)、生体分子に何も修飾を加えずに共有結合による固定化法 (図1 d) などがある。さらに生体分子を、On chip 合成したり (図1 e)、共有結合用に新しい官能基で修飾して基板の官能基に反応させたり (図1 e)、ビオチン・アビジン結合に代表されるような生体親和性結合のために修飾してから固定化する方法がある (図1 f)。

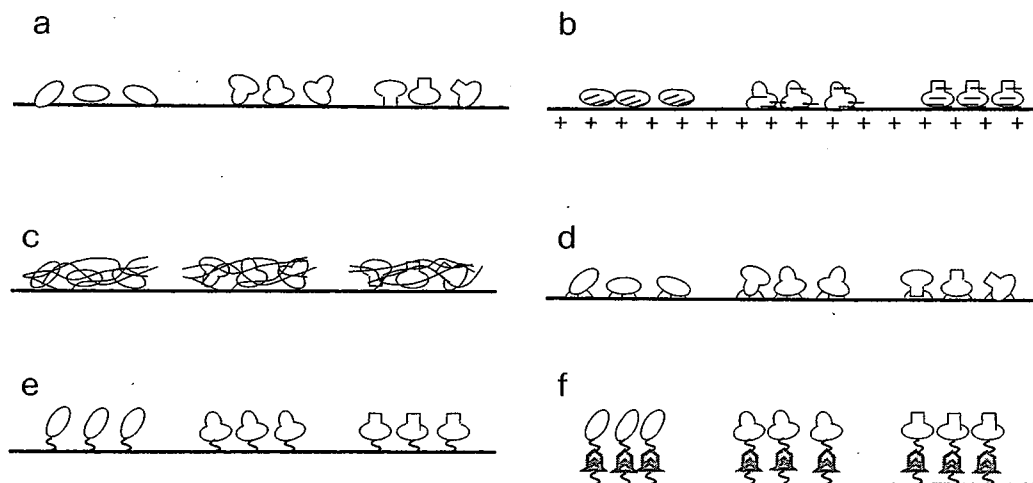


図1 生体分子の固定化法

a) 物理吸着固定化法, b) イオン結合固定化法, c) 包埋固定化法, d) 生体分子を未修飾のまま共有結合固定化する方法, e) 生体分子を部位特異的に修飾して共有結合固定化する方法, f) 生体分子を修飾して生体親和性により固定化する方法。

* Yoshihiro Ito (独)理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

表1 様々なマイクロアレイ固定化法とその特徴

生体成分の修飾	固定化法	安定性	作成の簡便性	アッセイ時のバックグラウンド	固定化物の活性	固定化分子の配向性
無	物理吸着法	低	高	高	低	低
	イオン結合法	中程度		低	高	
	包埋法	高				
	共有結合法			中程度	中程度	
有	共有結合法	中程度	低	中程度	高	高
	生体親和性結合法					

固定化法は、固定化された生体分子の活性と密接に関連し、バイオチップの性能と深くかかわる(表1)。固定化が不完全では、固定化の意味がなくなるが、固定化の方法によっては配向性の問題が起きたり、構造変形により活性が失われる場合も多い。生体分子が生物活性を維持するためには、できるだけコンフォメーションや機能(分子認識)部位に影響なく固定化が行われる必要がある。一方では、マイクロアレイには、様々な生体分子を同じ方法で固定化する要求があり、単なる固定化とは異なり、一朝一夕にいかない。最適の固定化方法を求めて検討が行われている¹²⁾。

1.2 物理吸着固定化法^{10,11)}

最も簡単な固定化法は物理吸着固定化法である。生体分子は一般的に疎水性相互作用により固体表面に吸着することが知られている。ただし、その吸着様式は生体分子や基材表面によって様々に異なり、生物活性も様々である。表面への吸着量を多くするために基材の3次元化が行われることが多い。基材には、ニトロセルロース膜、ポリフッ化ビニリデン膜、ナイロン膜、ポリスチレン基板などが広く利用されている^{13~15)}。特にニトロセルロース膜をガラス基板に貼り付けたスライドガラスは吸着能が高く、長期間安定だとしてマイクロアレイには多用されている。一方、糖鎖のように親水性が高く固体表面に吸着しにくいものは、生体分子側に疎水性基を導入してから固定化することも行われている^{16~19)}。

欠点としては、強く固定化されないことがあげられる。固定化したつもりが生体分子が、緩衝液や界面活性剤ですぐに除去されてしまえば、アッセイには使えない。また、もともと非特異的な吸着によっているため、アッセイの際に、生体分子が固定化されていない領域にアナライト以外の様々な分子が吸着してバックグラウンドが上がってしまうことも大きな欠点である。さらに、主として疎水性相互作用で結合するため固定化分子の変性(コンフォメーション変化)が大きい場合も報告されている。

1.3 イオン結合固定化

DNA マイクロアレイが生物学研究に用いられる大きなきっかけとなったのが、スタンフォード大学の Brown らが報告したカチオン性にした基材表面に、負に帯電した核酸をイオン相互作用で吸着させる方法である²⁰⁾。この方法はその簡便さから多くの研究者に用いられ、カスタムメイドや in-house 調製で広く用いられている^{21~26)}。そして核酸ばかりでなくタンパク質マイクロアレイでも用いられている²⁷⁾。カチオン性のポリマーにはポリアニリンやポリリシンが用いられている。イオン結合固定化は物理吸着固定化と同様、簡便な方法であるが、固定化の不安定性、バックグラウンドの高さなどの問題がある。

1.4 包埋固定化法

ヒドロゲル中に包埋する方法で、第4章第2節に述べられているような自己集合分子のほか、古くからは、ポリアクリルアミド・ゲルやアガロース・ゲルへの包埋が報告されている^{28,29)}。この方法は、生体分子を3次元の架橋体の中に入れるため、多くの場合セミウェット状態が保たれており、生体分子が水中に近い状態でトラップされている利点があるが、一方で、アッセイの際、ゲルがバリアーとなり、アナライトとの相互作用を減じる可能性が高い。このような問題点を解決する方法として、ナノレベルで高分子イオン錯体を積層して生体分子を固定化する方法が報告されている³⁰⁾。

1.5 共有結合固定化法

共有結合法は3つに分類される。第1は、生体分子に修飾を加えずに、固有の官能基を用いて基板の官能基へ反応させる場合、第2は、ヌクレオチドやペプチド、およびそれらの誘導体だけに適応できる On chip 合成法、第3は、生体分子に修飾を加えて新たな官能基を導入し、基板の官能基と反応させる方法である。

1.5.1 生体分子固有の官能基を用いて固定化する方法

マイクロアレイの歴史は On chip 合成で始まったが、固相法で合成可能なオリゴ核酸やオリゴペプチドに限られ、高分子量の生体分子をマイクロアレイ固定化するためには、他の方法が必要となる。核酸以外の生体分子にはいくつかの官能基があるため、それらを利用して固定化が行われる。核酸の場合は官能基が限られるため固相合成の際に導入されて用いられる場合が多い。表2には生体分子内の固定化用の官能基と基板表面の官能基を示す。通常、生体分子の固定化反応は、水溶液中で進行することが必要になるが、低分子化合物のマイクロアレイでは、この制約はない。