

研究事業評価調書(平成19年度)

作成年月日	平成19年11月13日
主管の機関・科名	工業技術センター 食品・環境科

研究区分	経常研究(事後評価)
研究テーマ名	オンカラムキャピラリー電気泳動免疫測定法の開発

研究の県長期構想等研究との位置づけ

ながさき夢・元気づくりプラン (長崎県長期総合計画 後期5か 年計画)	重点目標: 競争力のあるたくましい産業の育成 重点プロジェクト: 5 明日を拓く産業育成プロジェクト 主要事業: 今後成長が期待できる産業の集積・育成
長崎県科学技術振興ビジョン	(2) 活力ある産業社会の実現のための科学技術振興
長崎県新産業創造構想	4. 地域特性を活かし世界をめざす『ナガサキ型新産業』の創造と集積 (2) 新エネルギー・環境産業(環境改善に寄与する産業の創出)

研究の概要

1. 研究開発の概要

抗原抗体反応を利用した免疫手法は簡易分析法の一つであり、用途や適応範囲の拡大が進んでいる。

抗原と、抗原と抗体(抗原と結合する特異的なタンパク質)が結合した免疫複合体をキャピラリー電気泳動法を用いて分離、検出するキャピラリー電気泳動免疫測定法は、ELISA(酵素固定化免疫測定法)で代表される他の免疫手法と比較して、

抗体の固定化が不要で、必要な試料量が少ない

複数の試料の同時検出が可能

分析に要する時間が短い

自動化しやすい

等の利点を有する。

しかしながら、キャピラリー電気泳動免疫測定法は、キャピラリーの内径が数十・ μm と小さいため、光路長が短く、濃度感度が低いことが課題である。

また、測定前にキャピラリーカラム外で抗原と抗体を反応させる(オフカラム分析)必要があるため、ピペットを用いて抗原溶液、抗体溶液を採取、混合する作業を要する。

そこで、本研究では、抗原抗体反応をカラム内(オンカラム)で行う新規の手法を提案する。

オンカラム分析は、抗原と抗体を逐次的にキャピラリーカラム内に注入し、カラム内で抗原と抗体を反応させる手法である。

したがって、事前に抗原抗体反応を行う必要がない。

また、ある条件下でオンカラム分析を行うと、試料の濃縮が起こることを既に明らかにしており、アルブミンについては、ppb(10億分の1)レベルまでの濃縮を達成している。

しかしながら、環境汚染物質のオンサイト分析には、ppt(1兆分の1)レベル、十数分の分析を目指す必要があるため、本研究では、高倍率の濃縮システムを構築し、広範囲な濃度域の検量線作成を目指す。

初年度は、フルオレセインとその抗体を用いてオフカラム分析、オンカラム分析を行い、抗原

抗体の反応性について検証する。

次年度は、注入方式の検討を行い、濃縮メカニズムを解明する。さらに、多量試料注入による検量線を作成し、問題点の抽出と解決を行う。

最終年度は、前年度までに得られた結果を基に試料の注入、濃縮システムの設計を行い、実験機の製作、評価、改良を行う。

また、作製した装置を用いて、実試料の測定を行い、再現性、精度について検証する。

研究の必要性

1 背景・目的

【社会的、経済的情勢から見た必要度】

環境ホルモン等に代表される化学物質による環境汚染は、現代が抱える深刻な問題であり、県民の不安も大きい。

これらの化学物質の分析にはガスクロマトグラフ/質量分析装置（GC-MS）が一般的に用いられるが、コストが高い、分析に長時間要する、等の理由により簡便に利用できない。

選択性を持つタンパク質（抗体）を用いた免疫測定法は簡易な分析法であり、近年、環境分析への適応が進んでいるが、感度や迅速性は依然不足しており、より高性能な分析法の開発が要望されている。

【研究開発成果の想定利用者】

本研究により開発された装置は、環境分析を行う民間分析業者、公の研究機関での利用を想定している。

【どのような場所で使われることをも想定しているか】

河川等を想定し、ホルモン（エストロゲン）作用を有する有機物質を分析対象とする。

ホルモン様物質は低濃度での毒性が確認されており、エストロゲン作用を有する化学物質の存在は、水環境に棲息する野生生物、特に魚類への影響が懸念されている。

【どのような目的で使われることを想定しているか】

本装置は、汚染の有無やその程度を迅速に把握する目的で使用される。

これにより、試料採取直後の状態で分析でき、汚染物質をサイト外へ持ち出さずに分析できる（オンサイト分析）。

また、迅速、簡易な分析手法であるので、汚染範囲の特定など、広範囲な分析に有利である。

【緊急性・独自性】

本手法の独自性は、特定物質との抗原抗体反応、分離、検出を微小なカラム（キャピラリー）内で一連の流れにより行うことにある（査読付論文で掲載済）。

また、本手法はカラム内の抗原抗体反応により生じる物質の移動速度差を利用して試料を濃縮することができ、注入により検出感度の制御を可能とする新規な発想に基づく。

2 ニーズについて

【今利用されている技術・商品には、何が足りないのか】

免疫測定法は、簡易な分析法として、環境汚染物質の分析に利用されるようになってきたが、一般的な免疫測定であるELISAは、抗体を微粒子またはプレート上に固定するため、反応に時間がかかる。

また、洗浄、反応等、多段階の操作を必要とする。また、測定対象によっては感度が不足しているなどの問題がある

【想定利用者は、現在どのようなニーズを抱えているか】

環境計測分野では、分析時間の短縮、試料の微量化、分析操作の簡便化（自動化）が要望されている。

3 県の研究機関で実施する理由

本研究テーマは、県の研究開発ビジョンである、健康で安全な社会の実現に寄与するものであ

る。

環境ホルモン等の化学物質は、県民の安全な生活を脅かす一因であり、これらの物質を簡便に分析できる装置の開発は、環境対策技術として期待される。

また、長崎県では、特定の業種に工業が集中しており、経済の活性化を行うには、新規産業の創出が望まれる。簡易分析、オンサイト分析の需要は今後も増加すると見込まれており、技術の蓄積を行い、県内産業への還元を目指す。

効率性

1. 研究手法の合理性・妥当性について

主要な研究段階と期間、各段階での目標値（定性的、定量的目標値）とその意義

研究項目	活動指標名	期間(年度 ~年度)	目標値	実績値	目標値の意義
オフカラム分析 実験条件の最適化	分離度*	H16	1以上	1以上	実験条件の最適化により試料を分離（検出）する。
オンカラム分析 実験条件の最適化	分離度	H16	1以上	1以上	実験条件の最適化により試料を分離（検出）する。
濃縮効果の検証	濃縮率	H16 ~H17	10倍以上	10倍以上	濃縮率により感度の向上、および測定濃度範囲の拡大を達成する。
多量試料の注入時の 検量線作成	検量線の作成数	H17	1	1	注入量を変化させて検量線を作成する。
試料注入方式の開 発	標準偏差	H16 ~H17	7%内	5-7%	再現性が高い方式を開発する。
測定装置の製作、評 価、改良	免疫測定装置の 設計、製作数	H18	1	1	免疫装置に特化したキャピラリー型の分析装置が完成する。
環境汚染部物質の オンカラム分析	検出感度、分析 時間	H18	10ppt 10数分	10ppt 15分	迅速、高感度な分析を達成する。

* 分離度は2成分（物質1及び物質2）のピークの分かれやすさを表す指標であり、
分離度 $R = (t_{r2} - t_{r1}) / 0.5(t_{w1} + t_{w2})$ と定義される

$t_{r1}(t_{r2})$: 物質1(2)の保持時間、 $t_{w1}(t_{w2})$: 物質1(2)のピーク幅

2. 従来技術・競合技術との比較について

従来技術では、抗体の固定化が必要であり、分析に数時間必要とする。

また、反応、洗浄など、多段階の操作が必要である。

本研究では、抗原と抗体を微小なキャピラリーカラム内で、液-液反応により分析を行うことにより、注入操作のみで、検出感度、定量範囲の制御が可能となり、操作の簡略化、分析の迅速化、試料の微量化が図れる。

従って、この手法では、微小なカラム内で反応、分離、検出と目的が異なる複数の操作を同一の実験条件で行う必要があり、実験条件の最適化（抽出）が特に重要となる。

本研究の主担当者は、タンパク、アミノ酸の電気泳動分析及び免疫反応に関する技術蓄積があり、的確な実験条件の絞り込みにより、課題の解決を図る。また、九州大学との連携により研究の効率化を推進する。

3. 研究実施体制について

工業技術センターと九州大学で研究開発を行う。

反応性の検証、注入方式の開発など、基本技術の確立は工業技術センターで行う。

電気泳動を利用したカラム内の抗原抗体反応のメカニズムについては、多くのデータを必要とするため、九州大学の協力により実施する。

構成機関と主たる役割

- (1) 工業技術センター：抗原抗体反応性についての検証。注入方式の開発、装置の製作、評価。
(2) 九州大学：反応性、濃縮メカニズムの解明。

4. 予算

研究予算 (千円)	計	人件費	研究費	財源			
				国庫	県債	その他	一財
				全体予算	26,924	8,300	18,624
16年度	14,993	2,734	12,259				14,993
17年度	4,747	2,747	2,000				4,747
18年度	7,184	2,819	4,365				7,184

有効性

1 期待される成果の得られる見通しについて

近年、微小な空間内での物質反応は、通常より迅速に反応が進行することが知られるようになり、これらの技術への関心が高まっている。

オンカラムキャピラリー電気泳動を用いた免疫測定法は、キャピラリーカラム内の微小空間で抗原抗体反応を行うとともに、反応による電気泳動移動度差に基づき濃縮を行う新規な手法であり、迅速及び高感度分析を同時に達成することを可能とする。

2. 成果の普及、又は実用化の見通しについて

本研究により、基本的な原理の確立、要素技術の蓄積を行い、免疫測定法の迅速化、高感度化を達成する。

濃縮、注入システムについての特許を取得し、競合技術との差別化を図る。

また、得られた成果を元に、次のステップとして実用化を目指し、小型化（マイクロチップ化）、低コスト化の検討を行う予定である。

キャピラリー電気泳動は、マイクロチップ化による装置の集積化が容易であり、これにより環境モニタリング市場への進出を目指す。

また、本手法は医療等への展開が可能であり、将来的に医療診断などの市場への展開が期待される。

その他 【研究開発の進捗についての補足】

分離分析分野の近年の技術動向と実用性の観点から、実験装置製作の際、将来的に志向していたマイクロチップの設計、製作を早めて、平成18年度に実施した。

マイクロチップは、キャピラリーの内径に相当する幅の流路をガラスや高分子の基板上に形成したもので、目的に応じた流路形成、装置の集積化が可能である。

そこで、本研究によって開発した手法を基に、免疫分析に特化したマイクロチップを作製した。

このマイクロチップに関する技術の特許は平成19年度に出願する。

成果項目	成果指標名	期間(年度 ～年度)	目標値	実績値	目標値の意義
装置製作	キャピラリー型免疫装置の製作、評価 免疫分析用マイクロチップの製作、評価	H18	1	1	実用化に向けた性能評価
特許	特許出願	H18	1	0	競合技術との差別化 (平成19年度に持ち越し)

【研究開発の途中で見直した内容】

特になし

研究評価の概要

種類	自己評価	研究評価委員会
事前	(15年度) 評価結果 (評価段階： 数値で) ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価	(15年度) 評価結果 (評価段階： 数値で) ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価
	対応	対応
途中	(16年度) 評価結果 (評価段階： 数値で) ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価	(16年度) 評価結果 (評価段階： 数値で) ・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価
	対応	

事後	<p>(19年度) 評価結果 (評価段階: A)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性: 化学物質の迅速、高感度で簡易な分析法の開発が要望されている。また、本研究では微量分析も達成でき、廃棄試薬や溶媒量の低減が可能になるなど、環境負荷を考慮した取り組みである。 ・効率性: 現在までに蓄積した技術を基に、迅速な免疫測定技術の開発を目指し、計画に掲げた目標数値を達成した。また、実用化を考慮して、当初計画から一歩進めてマイクロチップ化を実施した。 ・有効性: 蓄積した研究成果をもとに、実験用装置の製作を行った。また、実用的な装置としての開発、展開を目指して、将来的に実施を予定していたマイクロチップの試験を早めて行った。 ・総合評価: 新規の簡易分析法を開発し、その有効性を実証できた。蓄積されたデータを基に、マイクロチップ化を行い、小型化が可能であることを示せた。 	<p>(19年度) 評価結果 (評価段階: A)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性: 化学物質の迅速、高感度で簡易な分析法の開発が要望されている。また、本研究では微量分析も達成でき、廃棄試薬や溶媒量の低減が可能になるなど、環境負荷を考慮した取り組みである。 ・効率性: 現在までに蓄積した技術を基に、迅速な免疫測定技術の開発を目指し、計画に掲げた目標数値を達成した。 また、実用化を考慮して、当初計画から一歩進めてマイクロチップ化を実施した。 ・有効性: 蓄積した研究成果をもとに、実験用装置の製作を行った。また、実用的な装置としての開発、展開を目指して、将来的に実施を予定していたマイクロチップの試験を早めて行った。 ・総合評価: 新規の簡易分析法を開発し、その有効性を実証できた。蓄積されたデータを基に、マイクロチップ化を行い、小型化が可能であることを示せた。
	<p>対応</p> <ul style="list-style-type: none"> ・簡易分析法のニーズはさらに高まると予測される。本技術は、環境負荷低減、省力化にも貢献する。また、環境分析のみならず、臨床分析等への展開も検討する。 ・外部の競争的資金(科学技術振興機構、H19年度シーズ発掘試験)に「迅速、高感度な臨床検査用電気泳動マイクロチップの開発」として応募中。 ・本技術の特許取得を平成19年度に行う。また、より高性能なマイクロチップの開発を行い、本技術の実用化を目指す。 ・今後、実用化を目指し、高性能マイクロチップ開発を行う。また、外部資金の獲得、特許取得をはかる。 	<p>対応</p> <ul style="list-style-type: none"> ・簡易分析法のニーズはさらに高まると予測される。本技術は、環境負荷低減、省力化にも貢献する。また、環境分析のみならず、臨床分析等への展開も検討する。 ・本技術の特許取得を平成19年度に行う。また、より高性能なマイクロチップの開発を行い、本技術の実用化を目指す。 ・今後、実用化を目指し、高性能マイクロチップ開発を行う。また、外部資金の獲得、特許取得をはかる。

総合評価の段階

平成19年度以降

(事前評価)

- S = 着実に実施すべき研究
- A = 問題点を解決し、効果的、効率的な実施が求められる研究
- B = 研究内容、計画、推進体制等の見直しが求められる研究
- C = 不相当であり採択すべきでない

(途中評価)

- S = 計画を上回る実績を上げており、今後も着実な推進が適当である
- A = 計画達成に向け積極的な推進が必要である
- B = 研究計画等の大幅な見直しが必要である
- C = 研究費の減額又は停止が適当である

(事後評価)

- S = 計画以上の研究の進展があった
- A = 計画どおり研究が進展した
- B = 計画どおりではなかったが一応の進展があった
- C = 十分な進展があったとは言い難い

平成18年度

(事前評価)

- 1 : 不相当であり採択すべきでない。
- 2 : 大幅な見直しが必要である。
- 3 : 一部見直しが必要である。
- 4 : 概ね適当であり採択してよい。
- 5 : 適当であり是非採択すべきである。

(途中評価)

- 1 : 全体的な進捗の遅れ、または今後の成果の可能性も無く、中止すべき。
- 2 : 一部を除き、進捗遅れや問題点が多く、大幅な見直しが必要である。
- 3 : 一部の進捗遅れ、または問題点があり、一部見直しが必要である。
- 4 : 概ね計画どおりであり、このまま推進。
- 5 : 計画以上の進捗状況であり、このまま推進。

(事後評価)

- 1 : 計画時の成果が達成できておらず、今後の発展性も見込めない。
- 2 : 計画時の成果が一部を除き達成できておらず、発展的な課題の検討にあたっては熟慮が必要である。
- 3 : 計画時の成果が一部達成できておらず、発展的な課題の検討については注意が必要である。
- 4 : 概ね計画時の成果が得られており、必要であれば発展的課題の検討も可。
- 5 : 計画時以上の成果が得られており、必要により発展的な課題の推進も可。