

令和 2 年 4 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15439

研究課題名（和文）高機能化マイクロチップを用いるバイオ医薬品の超高速分析システムの開発

研究課題名（英文）High-speed microchip electrophoresis analysis system for biopharmaceuticals utilizing acrylamide gel

研究代表者

山本 佐知雄（Yamamoto, Sachio）

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：10707954

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：高機能化マイクロチップを用いるバイオ医薬品の超高速分析システムの開発では短時間酵素消化法のオンラインマイクロチップ酵素消化法の開発、オンライン試料濃縮・標識マイクロチップ電気泳動法の開発、細胞培養や輸送に適したフォトリソグラフィフリー多分岐流路を有するマイクロチップの作製、および多分岐流路を有するマイクロチップを用いて開発した方法を含め異なる機能をもつ複数のゲル層を流路上に配し、濃縮、反応、粗分画、特異的抽出の一連の過程を実現するための研究を遂行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロチップ電気泳動の多機能化に関する研究は世界中で盛んに行われており、特にここ数年では臨床応用に向けた研究も報告されているが、これらの報告では基盤となるマイクロチップを作製するために非常に高価な装置、あるいは卓越した技術が必要となっている。今回開発した技術は、特定成分の抽出・濃縮・分離・検出など分析に必要な一連の操作をチップ上で行うことができる。これらの開発した方法をさらに発展させることにより、医薬品の開発現場で実施されている糖鎖含量試験のようなルーチン分析の負担軽減や、生体成分の作用解析の迅速化、さらに血中抗体医薬品の詳細な体内動態の解明が可能なデバイスの開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：I conducted the following experiments according to the theme. Development of on-line microchip enzymatic digestion method for short-time enzymatic digestion, development of on-line sample concentration and labeling microchip electrophoresis method, fabrication of microchip with photolithography-free multi-branch channel suitable for cell culture and transport. In order to realize a series of processes of concentration, reaction, crude fractionation and specific extraction, multiple gel layers with different functions including the method developed using a microchip with a multi-branch channel are arranged on the channel.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロチップ電気泳動 高分子ゲル 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロチップ電気泳動は、一辺が数 cm の基盤上に幅 50-200 μm 、深さ 5-150 μm の様々な形状の流路を構築し、試料の導入と分離を一度に行えるようにしたものが主流である。マイクロチップ電気泳動の多機能化に関する研究は世界中で盛んに行われており、特にここ数年では臨床応用に向けた研究も報告されている。しかしながらこれらの報告では基盤となるマイクロチップを作製するために非常に高価な装置、あるいは卓越した技術が必要となっているため現状では一般的に普及することは難しいと考えられる。また、分析時間が数十秒で完了するような分析方法でも、実際の試料溶液を高感度に分析するための前処理には数日を要していた。

2. 研究の目的

マイクロチップ電気泳動における試料調製の問題を解決するために、我々が既に開発した光硬化性アクリルアミドゲル層をマイクロチップの流路内にピンポイントで作製する技術を用いて試料測定までに必要な前処理をマイクロチップの流路中で実施することによる真のハイスループット分析法の開発を目指した。本法が開発されれば、採取した試料から様々な成分を短時間で簡単、かつ網羅的に解析することが可能になると考えられ、広く臨床分析にも応用することが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

高機能化マイクロチップを用いるバイオ医薬品の超高速分析システムの開発に向け、試料調製の工程をマイクロチップで達成できる以下の研究を実施した。オンライン酵素消化マイクロチップ電気泳動法の開発。オンライン試料標識化反応、および濃縮・分離を一度に達成できる電気泳動法の開発。細胞培養や輸送に適したフォトリソグラフィフリーの多分岐流路マイクロチップの作製に関して研究を行い、開発した方法を組み合わせることで分析対象に応じて必要となる一連の操作(濃縮, 特異的抽出, 粗分画, 反応)をマイクロチップ内で実現するために流路の一部に機能性修飾を施した、糖タンパク質糖鎖の自動分離分析法の開発を目指した。

4. 研究成果

オンライン酵素消化マイクロチップ電気泳動法の開発では酵素含有ゲルに向かって電圧を印加し、試料がゲルを通過したのち、逆向きに電圧を切り替えることを繰り返し実施することで酵素消化を達成できると考えたが、酵素消化は達成されているものの、その反応効率は、ばらつきが大きかった。現在、この電圧印加プログラムの再現性を向上させるための実験を実施している。ところで、この研究を進める過程においてアクリルアミドゲルによる酵素消化の有用性については十分に評価できたことから本法の応用として、この PNGase F 含有ゲルを市販のピペットチップ内に封入し、酵素消化を試みた。その結果、通常のマイクロチューブで行うよう手法で 2 日かかっていた工程を 20 分に短縮することが出来た。また、その糖鎖の回収量は既存の方法と比較しても、ほぼ定量的に酵素消化が起こっていることを示唆していた。開発した方法の手順と、実際のアクリルアミドゲルチップを Fig. 1 に示す。オンライン試料標識化反応、および濃縮・分

離を一度に達成できる電気泳動法の開発では弱イオン性の光重合アクリルアミドゲルをマイクロチップ流路交差部にピンポイントで作製し、このゲル近傍で、試料の濃縮と蛍光標識化を同時に行うことが可能な分析法の開発を行った。まず、本法における蛍光試薬の検討を行った。試料にアミノ酸を用い fluorescein isothiocyanate, 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein などのアミノ基の標識試薬を用い反応時間に関する検討を行ったところ 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein を用いることでアミノ酸を 5 分以内に標識

できることが分かった。また、この時、マイナスに電荷を帯びているアミノ酸ではオンライン濃縮が起こった。この方法の汎用性を高めるため、試料の電荷に関わらず一定のオンライン濃縮を実現できる条件に付いて検討を行っている。細胞培養や輸送に適したフォトリソグラフィフリーの多分岐流路マイクロチップの作製ではナイロンモノフィラメント縫合糸を鋳型に用いることでリソグラフィフリーのマイクロチップを作製することが出来た。作製したフォトリソグラフィフリーのマイクロチップを用いて、8-aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonate 標識化イソマルトオリゴ糖の電気泳動分離を試みた。その結果、少なくとも単糖から 15 糖までのピークを検出することができ、作製したマイクロチップでも十分に分離・検出が行えることが分かった。結

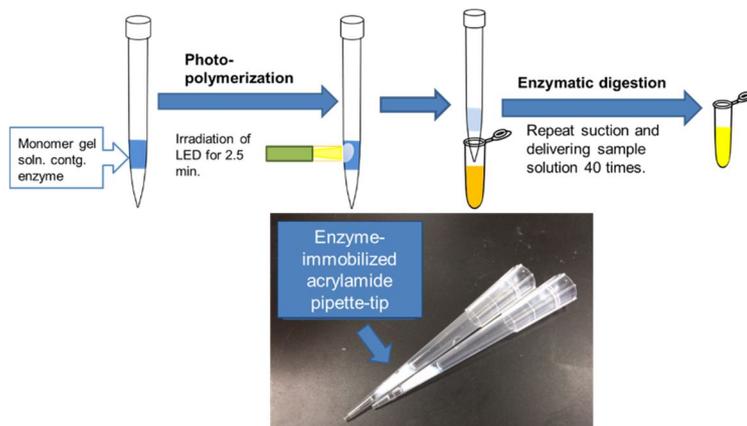


Fig. 1 酵素含有アクリルアミドゲルチップによる試料調製手順と実際のアクリルアミドゲルチップの写真

いて 6-8 kD の半透膜を用いた 3 次元マイクロチップを用い、分子量が 80 kD のヒト血清トランスフェリンのオンライン濃縮を試みた。その結果、時間経過とともに流路交差部でタンパク質が濃縮される様子が確認できた。また、導入時間 240 秒における濃縮効率を算出した結果、透析膜を配置しなかった場合と比べ、感度が約 70 倍向上した。また、この方法では過剰試薬を含む標識直後の試料を濃縮することが可能であり、煩雑な過剰試薬の除去作業を必要としないオンライン濃縮法であることが分かった。次に、濃縮した試料の分離を検討したところ、3 分付近に単一のピークが検出された。以上の結果から作製したサイズ排除型 3 次元マイクロチップでは、濃縮と同時に過剰試薬の除去が達成されることが分かった。作製した 3 次元型マイクロチップの概略図と試料濃縮の様子を Fig. 2 に示す。

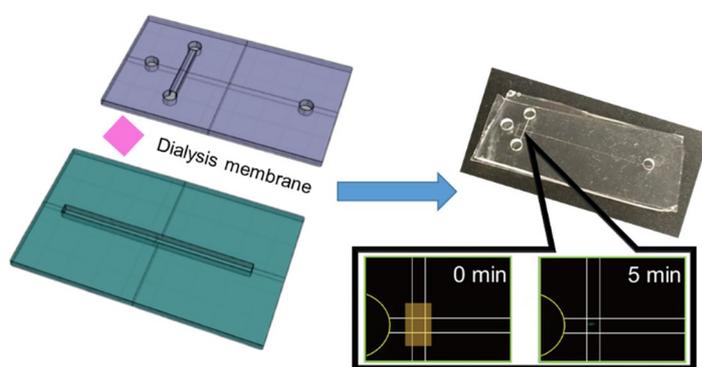


Fig. 2 作製した 3 次元型マイクロチップの概略図と試料濃縮の様子

以上、濃縮した試料の分離を検討したところ、3 分付近に単一のピークが検出された。以上の結果から作製したサイズ排除型 3 次元マイクロチップでは、濃縮と同時に過剰試薬の除去が達成されることが分かった。作製した 3 次元型マイクロチップの概略図と試料濃縮の様子を Fig. 2 に示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kinoshita Mitsuhiro, Yamamoto, Sachio, Suzuki Shigeo	4. 巻 63
2. 論文標題 High-throughput analysis of glycoprotein-derived glycans by using automated microchip electrophoresis system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) Doi:10.2198/electroph.63.47	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Sachio, Ueda Maki, Kasai Masataka, Ueda Yusuke, Kinoshita Mitsuhiro, Suzuki Shigeo	4. 巻 179
2. 論文標題 A fast and convenient solid phase preparation method for releasing N-glycans from glycoproteins using trypsin- and peptide-N-glycosidase F (PNGase F)-impregnated polyacrylamide gels fabricated in a pipette tip	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 112995 ~ 112995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 YAMAMOTO Sachio, HAYASHI Yuki, MATSUNAGA Hiroko, OKADA Fuka, KINOSHITA Mitsuhiro, SUZUKI Shigeo	4. 巻 40
2. 論文標題 Analysis of 2-Aminobenzoic Acid-Labeled Monosaccharides and Glycoprotein-Derived Oligosaccharides by Online Cleanup Liquid Chromatography in the Reversed-Phase and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Modes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 65 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.15583/jpchrom.2019.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 UTAMURA Naonori, YAMAMOTO Sachio, KINOSHITA Mitsuhiro, SUZUKI Shigeo	4. 巻 68
2. 論文標題 A New Separation Mode for Non-aqueous Capillary Electrophoresis Using Excess Adsorption of Cationic Species Electrolytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 859 ~ 864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.68.859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YAMAMOTO Sachio, FUJIWARA Haruka, MARUYAMA Katsushi, TANAKA Yoshihide, KINOSHITA Mitsuhiro, SUZUKI Shigeo	4. 巻 35
2. 論文標題 Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Cations in Water and Biological Samples by Capillary Electrophoresis with a Capacitive Coupled Contactless Conductivity Detector Using Capillary Filling Method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 295 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2116/analsci.18P422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Sachio, Okada Fuka, Kinoshita Mitsuhiro, Suzuki Shigeo	4. 巻 143
2. 論文標題 On-line microchip electrophoresis-mediated preconcentration of cationic compounds utilizing cationic polyacrylamide gels fabricated by in situ photopolymerization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 4429 ~ 4435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8AN01159A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 YAMAMOTO Sachio, NISHIDA Noriaki, KINOSHITA Mitsuhiro, SUZUKI Shigeo	4. 巻 39
2. 論文標題 On-Line Derivatization and Concentration of Aspartic Acid Using <i>In Situ</i> Photopolymerized Carboxylic Acid Type Polyacrylamide Gels as a Permselective Preconcentrator	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 125 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2018.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Sachio, Kinoshita Mitsuhiro, Ikegami Toru, Suzuki Shigeo	4. 巻 1566
2. 論文標題 High-performance liquid chromatographic separation of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid labeled N-glycans using a functional tetrazole hydrophilic interaction liquid chromatography column	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 44 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NISHIDA Noriaki、KOKAJI Yasuko、YAMAMOTO Sachio、KINOSHITA Mitsuhiro、SUZUKI Shigeo	4. 巻 66
2. 論文標題 HPLC analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins released by Alkaline -elimination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 909 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.66.909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Sachio、Himeno Miyuki、Kobayashi Masaya、Akamatsu Miki、Satoh Ryosuke、Kinoshita Mitsuhiro、Sugiura Reiko、Suzuki Shigeo	4. 巻 142
2. 論文標題 Microchip electrophoresis utilizing an in situ photopolymerized Phos-tag binding polyacrylamide gel for specific entrapment and analysis of phosphorylated compounds	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 3416 ~ 3423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7an00836h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NAGATOMO Yoshie、HASHIMOTO Shinichi、KISHIMOTO Yuka、HAYAKAWA Takao、YAMAMOTO Sachio、KINOSHITA Mitsuhiro、SUZUKI Shigeo	4. 巻 38
2. 論文標題 Online Cleanup Liquid Chromatography for the Analysis of Glycoprotein-Derived Oligosaccharides Labeled with 7-Amino-4-methylcoumarin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 23 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.15583/jpchrom.2016.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamagami Maki、Matsui Yurie、Hayakawa Takao、Yamamoto Sachio、Kinoshita Mitsuhiro、Suzuki Shigeo	4. 巻 1496
2. 論文標題 Plug-plug kinetic capillary electrophoresis for in-capillary exoglycosidase digestion as a profiling tool for the analysis of glycoprotein glycans	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 157 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本佐知雄, 矢野祥子, 増田誠子, 木下充弘, 鈴木茂生
2. 発表標題 Phos-tag結合型光硬化性アクリルアミドによるリン酸化化合物のオンライン特異的濃縮・標識とマイクロチップ電気泳動分離
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本佐知雄, 前谷一仁, 辰巳凱, 木下充弘, 鈴木茂生
2. 発表標題 サイズ排除型マイクロチップの作製とタンパク質の特異的オンライン濃縮への応用
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本佐知雄・中住智典・宮脇直久・川上夏海・田中冬馬・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動とHPLCを組み合わせた8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid標識化ガン細胞由来糖鎖の二次元解析
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本佐知雄
2. 発表標題 ピンポイント重合アクリルアミドゲルによる特異的高感度検出マイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本佐知雄・矢野祥子・増田誠子・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 ピンポイント重合Phos-tagアクリルアミドによる リン酸化化合物のオンライン特異的濃縮・標識 マイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 10.Sachio Yamamoto, Kazuhito Maetani Gai Tatsumi, Fuka Okada, Mitsuhiro Kinoshita, Shigeo Suzuki
2. 発表標題 Fabrication of nylon monofilament mold microfluidic chips for size selective microchip electrophoresis and application to specific on-line preconcentration of proteins
3. 学会等名 HPLC2019, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本佐知雄・岡田風花・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 4級アンモニウム化光重合性アクリルアミドゲルを用いる陽イオン性試料のオンライン濃縮 マイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本佐知雄・中住智典・宮脇直久・須田暁・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 CE、HPLC、MSを用いる8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid標識化ガン細胞 由来糖鎖の網羅的解析
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本佐知雄・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 Phos-tag結合型光硬化性アクリルアミドによる リン酸化化合物のオンライン特異的濃縮と マイクロチップ電気泳動分離
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 佐知雄 ・ 矢野 祥子 ・ 増田 誠子 ・ 姫野 美幸 ・ 木下 充弘 ・ 鈴木 茂生
2. 発表標題 Phos-tag結合型光硬化性アクリルアミドによる リン酸化化合物のオンライン特異的濃縮と マイクロチップ電気泳動分離
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本佐知雄・矢野祥子・岡田風花・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 光重合性高機能化ポリアクリルアミドゲル層を用いる オンライン特異的濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 BMAS2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本佐知雄
2. 発表標題 機能性光重合型ポリアクリルアミドゲルを用いる オンライン濃縮マイクロチップ電気泳動の開発
3. 学会等名 SCE2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本佐知雄・中住智典・宮脇直久・須田暁・木下充弘・鈴木茂生
2. 発表標題 部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動、HPLC、MSを組み合わせた8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid標識化ガン細胞由来糖鎖の網羅的解析
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本佐知雄
2. 発表標題 ピンポイント重合アクリルアミドゲルによる 特異的高感度検出マイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本佐知雄，岡田風花，木下充弘，鈴木茂生
2. 発表標題 4級アンモニウム化光重合性アクリルアミドゲルを用いる陽イオン性試料のオンライン濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発
3. 学会等名 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sachio Yamamoto, Mitsuhiro Kinoshita, Shigeo Suzuki
2. 発表標題 HPLC separation of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid labeled N-glycans released from glycoproteins using tetrazole functional HILIC column
3. 学会等名 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本佐知雄, 中住智典, 木下充弘, 鈴木茂生
2. 発表標題 部分導入キャピラリー電気泳動法を用いるガン細胞由来糖鎖の解析
3. 学会等名 分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本佐知雄, 植田麻希, 葛西優貴, 木下充弘, 鈴木茂生
2. 発表標題 :酵素固定化アクリルアミドゲルチップを用いる糖タンパク質糖鎖調製法の開発
3. 学会等名 第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 22.山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生
2. 発表標題 糖タンパク質糖鎖の高感度かつ網羅的な解析技術の開発
3. 学会等名 第78回分析化学討論会(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考