

平成30年 5月25日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05527

研究課題名(和文) 生体試料のマイクロチップ電気泳動分析における超高感度化技術の開発

研究課題名(英文) Development of Highly-sensitive Technique in Microchip Electrophoretic Analysis of Biomolecules

研究代表者

北川 文彦 (Kitagawa, Fumihiko)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20362452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロチップ電気泳動において、極めて簡便な表面修飾法と電気浸透流制御に基づくオンライン試料濃縮法を組み合わせることで、生体試料を高効率に濃縮してから電気泳動分離を行うマイクロ分析法を開発した。真空乾燥法によるポリマー修飾を利用し、マイクロチャンネル全体に注入した試料溶液を濃縮したうえで、試料リザーバーから目的成分を供給しながら濃縮を行う2段階オンライン試料濃縮法をクロス型チャンネルチップ上で行う技術を確立した。従来法に比して最大で38,000倍の高感度化に成功し、生体試料もアミノ酸、ペプチド、アミンなどを120～4800倍に濃縮し、混合試料の分離にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In microchip electrophoresis, the microanalytical technique for highly efficient preconcentration and separation of biomolecules by the combination of two online sample concentration techniques, large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) and field-amplified sample injection (FASI). By utilizing the vacuum-drying method for modifying the coating polymers onto the channel surface, it was successfully achieved that analytes injected throughout a microchannel were concentrated by LVSEP, followed by the electrokinetic introduction of concentrated analytes from a sample reservoir by FASI. In the LVSEP-FASI analysis, up to 38,000-fold sensitivity increase was obtained, which was 245-times higher than normal LVSEP. In the analyses of biomolecules, amino acid enantiomers, peptides and amines were enriched with the concentration factors ranging from 120 to 4800.

研究分野：分析化学

キーワード：分離分析 マイクロチップ 電気泳動分析 オンライン試料濃縮 高感度分析

### 1. 研究開始当初の背景

近年のオミクス分析の進展に伴い、キャピラリー電気泳動 (CE) やマイクロチップ電気泳動 (MCE) による生体分析の高性能化・高感度化はますます重要な課題となっている。特に CE や MCE においては、感度不足が微量な生体試料の分析において問題となることが多く、高感度化を実現するための様々なオンライン試料濃縮技術が開発されてきた。しかし、どの手法も一長一短を有しており、改良の余地を残している。なかでも、分離キャピラリーやマイクロチャンネル全長に充填した試料を濃縮・分離できる large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP) と呼ばれる濃縮法は、高効率な濃縮に基づく高感度検出と反転泳動に基づく高分離性能を実現できるが、濃縮できる試料量が分離カラム全体の体積までに限られるため、高感度化にも限界がある。そこで本研究では、この LVSEP 法の限界を克服し、超高効率な濃縮による生体試料の検出感度向上を目指し、電気伝導度の低い試料溶液で満たした液溜め (リザーバー) に電圧を印加し続けることで、チャンネル内に試料成分を濃縮しながら注入を行う電氣的試料注入 (FASI) と LVSEP 法を結合した LVSEP-FASI 法の MCE 分析への適用を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、クロス型チャンネルチップならびにチャンネル内表面に対する修飾ポリマーの真空乾燥固定化法を基にした LVSEP-FASI-MCE 法を開発し、MCE 分析の超高感度化を目指した。図 1 に示すように、試料溶液リザーバーの液面高さにより印加圧力を調整し、電気浸透流 (EOF) と圧力が釣り合って濃縮ゾーンの移動が停止する地点がクロス部になるようにすることで、FASI による高効率な濃縮と電圧切り替えによる試料の分離が効率よく行えるものと期待されるが、分析の度に EOF 速度が変化してしまうと濃縮ゾーンの停止位置がクロス部からずれるので、濃縮・分離の再現性の確保が難しくなる。したがって、LVSEP-FASI-MCE の実現のためには、安定性の高い EOF が得られるチャンネルを再現性よく作製する技術が必要となる。この目的にあたり、我々が新たに見出したチャンネルに対する修飾ポリマーの真空乾燥固定化法の適用について検討を行った。この

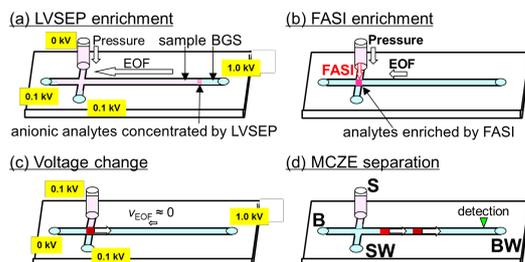


図 1. LVSEP-FASI-MCE 法

真空乾燥固定化法は、ポリジメチルシロキサン (PDMS) チャンネルに対し、修飾ポリマーの水溶液を充填し、そのまま真空乾燥を行うだけで、耐久性に優れた修飾層が固定化できる技術であるが、修飾層形成の機構や修飾ポリマー・基板の応用範囲などについては不明な点が多く、これらを明らかにすることで、様々な生体試料に適用可能な LVSEP-FASI-MCE 法への発展を目的とした。

### 3. 研究の方法

クロス型マイクロチャンネルにおける LVSEP-FASI-MCE 法の開発においては、濃縮機構の解明および分析条件の検討を通して、分離の高性能化と高感度化を図った。

#### (1) 真空乾燥ポリマー修飾の検討

真空乾燥法によるチャンネル内表面のポリマー修飾の安定性について検討した。チャンネル前処理の効果や修飾条件について網羅的に検討を行い、EOF 速度の安定性の向上を目指した。

#### (2) 濃縮機構の解明

本手法における濃縮現象の解明にあたり、EOF と印加圧力が釣り合い、濃縮ゾーンが停止して FASI を連続的に実行可能な位置の解析を行うことは非常に重要である。この濃縮位置の制御にあたり、濃縮ゾーンの停止位置に及ぼす因子を、蛍光イメージングにより網羅的に調査した。さらに LVSEP-FASI による生体成分の濃縮・分離においては、試料マトリクスならびに泳動緩衝液の塩濃度、塩の種類、pH、添加剤に加え、印加する電場強度、電圧プログラム、FASI 注入時間や真空乾燥法による修飾したポリマー層の固定化・表面状態などが濃縮・分離性能ならびにその再現性を決定するものと予想されたため、これらの因子について最適化を行った。

#### (3) MCE 分析への応用

明らかにした濃縮機構ならびに確立した真空乾燥法に基づき、アミノ酸光学異性体やペプチドなどの生体試料を MCE 分析へ応用した。さらに、カチオン種の LVSEP-FASI 分析を目指し、表面が正に帯電した修飾層を作製し、生体活性アミンの分析へ応用した。

### 4. 研究成果

#### (1) 真空乾燥ポリマー修飾の検討

チャンネル全体に注入した試料溶液を濃縮 (LVSEP) したうえで、試料リザーバーから目的成分を供給しながら濃縮 (FASI) を行う MCE 分析において、濃縮に影響を及ぼす因子である電気浸透流 (EOF) 速度の安定性を向上させるため、真空乾燥法によるポリビニルアルコール (PVA) 修飾について最適化を行ったところ、EOF 速度を  $+8.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  まで抑制し、その相対標準偏差 (RSD) も 2.3% に向上させることに成功した。さらに真空乾燥後に加熱乾燥を組み合わせることで、

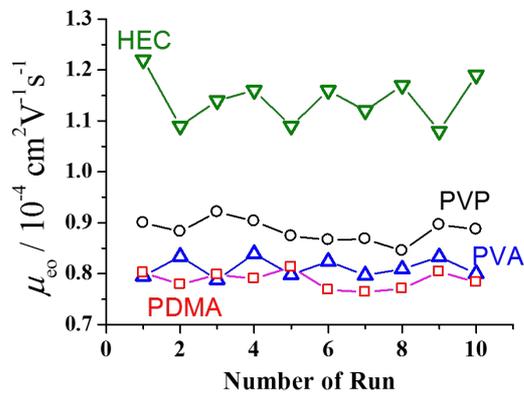


図2 種々の修飾チップにおける EOF 安定性

$+7.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  とさらに抑制され、RSD も 1.1% とさらに向上できることが明らかとなった。

さらにポリビニルアルコール (PVA) に加え、ポリビニルピロリドン (PVP) やポリ *N,N*-ジメチルアクリルアミド (PDMA) など種々の中性ポリマーでも安定な修飾が得られることがわかった (図 2)。このことから、様々な生体試料に適した表面修飾剤を安定に固定化できるものと期待される。一方、種々のポリマー基板チップに対して真空乾燥法を適用したものの、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 以外の材質では安定な修飾が得られないことがわかった。これは PDMS の高い気体透過性によるものと考えられ、今後、気体透過性の低い基板への適用について検討を進める必要がある。

一方、カチオン性の試料成分を濃縮するためにカチオン性ポリマー修飾について検討を行ったところ、ポリブレンでは修飾層が不安定で EOF 速度が遅いことがわかった。そこで修飾層の安定性をよくするために、PVA とポリアリルアミン (PAA) の混合ポリマーを修飾したところ、EOF 速度が増加し、安定性も向上することがわかった。

## (2) 濃縮機構の解明

PVA 修飾を施したマイクロチップにおける濃縮位置の制御について検討を行ったところ、試料リザーバーに印加する圧力が重要であることが確認された。試料液面を 1.25 mm 高くして 12 kPa の圧力印加したときにちょうどクロス部の位置で濃縮が進行することがわかったが、濃縮率は 1600 倍程度に留まったのに対し、1.50 mm の液面差で 15 kPa 印加時にはクロス部よりも 50  $\mu\text{m}$  ほど試料リザーバーよりの位置で濃縮が進行 (図 3) し、濃縮率は 4500 倍ほどまで増加した。これは、濃縮位置をクロス部としてしまうと、泳動液リザーバーからの流れの影響を大きく受け、濃縮された試料が希釈され、濃縮率が低下したものと考えられる。また、試料の電荷により FASI による濃縮位置が異なることもわかった。 $-1$  価の標準色素では圧力を 20 Pa 印加したときに最も鋭いピークが観測され、濃縮

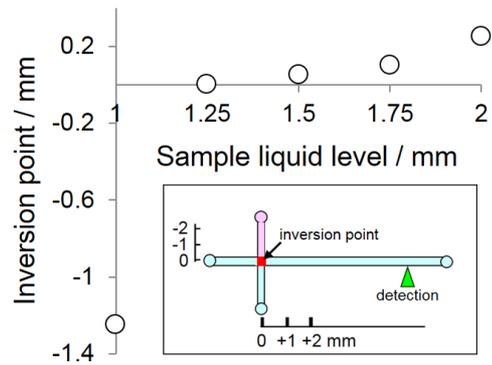


図3. 試料液面差が濃縮位置に与える影響

率は 10000 倍に達したのに対し、 $-3$  価の色素では圧力を 40 Pa 印加すると濃縮率 13000 倍と最大となった。この結果より、価数の大きく異なる成分を含む試料の分析の際には、印加圧力の設定に注意が必要であることが示唆された。一方、電場強度も分析性能に大きく影響し、最適化することで濃縮率を 6000 倍までに、泳動時間の RSD を 11% から 1.2% までに向上することに成功した。さらに試料リザーバー直径を 4.0 mm から 6.0 mm にして、注入できる試料量を増加させたところ、濃縮率を 8100 倍までに向上させることができた。

さらに、チャンネル幅が重要な因子であることも明らかとなった。チャンネル幅を 150, 100, 75  $\mu\text{m}$  と細くしていくと、標準試料の濃縮率は 1400, 6400, 38000 倍と劇的に増加することがわかった。これは、チャンネル幅を細くすることにより、濃縮初期における EOF 速度が増加し、濃縮した試料のバンド広がりを抑制できたために、ピーク幅が狭くなったことを反映しているものと考えられる。この 38000 倍という濃縮率は従来の LVSEP 法に比しても 275 倍の高感度化を達成しており、生体試料の超高感度 MCE 分析の基盤となる技術を確認できたと言える。

## (3) MCE への応用

確立した LVSEP-FASI 法をアミノ酸のキラル分析へ応用した。通常の MCE 分析 (図 4a) ではピークが太く、Leu の分離度は 0.75 に留まったのに対し、LVSEP-FASI 分析を行ったところ、非常に細いピークが得られたために Leu の分離度は 1.37 に向上した上に、ピーク強度も大きく増強され、濃縮率は 2900 倍に達した (図 4b)。さらにペプチドを LVSEP-FASI 分析したところ、angiotensin I と angiotensin II に由来する鋭い 2 本のピークが観測され、濃縮率はそれぞれ 550, 1540 倍となり、分離度も 1.56 と良好な分離を達成した。以上の結果より、本手法が生体試料の MCE 分析の高感度化のみならず、分離の向上にも役立つことが確認できた。

一方、カチオン性成分の分析を行うため、PVA/PAA 修飾チップを用いて標準試料であ

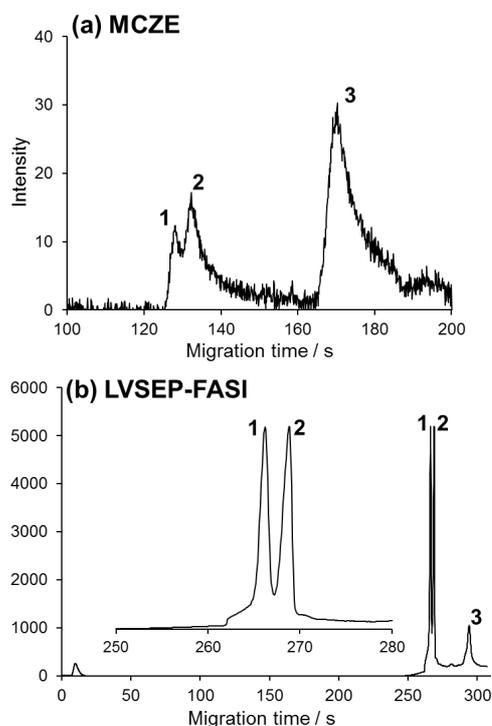


図4. アミノ酸のLVSEP-FASI-キラル分離

るローダミン色素のLVSEP分析を行ったところ、濃縮率は100倍程度と良好であった。さらに生理活性アミンの分析に応用できるか確認するために、NBD-Fで蛍光ラベルしたヒスタミンを分析したところ、濃縮率は最大120倍に達し、ヒスチジンとの混合した際にはピーク分離が確認された。したがってLVSEP-FASI法により、アミン類に代表される生体内カチオン種を簡易な操作で超高感度に分離分析できることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Sample Preconcentration Protocols in Microfluidic Electrophoresis, *Methods in Molecular Biology*, **2018**, 印刷中。(査読あり)

Kitagawa, F.; Ishiguro, T.; Tateyama, M.; Nukatsuka, I.; Sueyoshi, K.; Kawai, T.; Otsuka, K.: Combination of large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump with field-amplified sample injection on cross-channel chips, *Electrophoresis*, **2017**, *38*, 2075-2080。(査読あり)

Kitagawa, F.; Kinami, S.; Takegawa, Y.; Nukatsuka, I.; Sueyoshi, K.; Kawai, T.; Otsuka, K.: On-line coupling of sample preconcentration by LVSEP with gel electrophoretic separation on T-channel chips, *Electrophoresis*, **2017**, *38*, 380-386。(査読あり)

Kitagawa, F.; Nakagawara, S.; Nukatsuka, I.; Hori, Y.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: Simple and

Rapid Immobilization of Coating Polymers on Poly(dimethyl siloxane)-glass Hybrid Microchips by a Vacuum-Drying Method, *Anal. Sci.*, **2015**, *31*, 1171-1175。(査読あり)

[学会発表](計10件)

北川文彦, 舘山美咲, 石黒達也, 糠塚いそし: LVSEP-FASI法によるマイクロチップ電気泳動キラル分析の高感度化, 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2017), 東北大学青葉山新キャンパス, 仙台; 2017年11月28-30日。

北川文彦, 舘山美咲, 石黒達也, 糠塚いそし: LVSEP-FASI法によるマイクロチップ電気泳動キラル分析の高感度化, 第28回クロマトグラフィー科学会議, 京都大学吉田キャンパス, 京都; 2017年11月15-17日。

北川文彦: LVSEP-FASI法による電気泳動分析の高感度化, 日本分析化学会第66年会, 東京理科大学葛飾キャンパス, 東京; 2017年9月9-12日。(依頼講演)

北川文彦, 石黒達也, 中川原翔, 糠塚いそし: LVSEP-FASI法によるマイクロチップ電気泳動分析の高感度化, 第27回クロマトグラフィー科学会議, 慶應義塾大学芝共立キャンパス, 東京; 2016年11月16-18日。

北川文彦, 石黒達也, 中川原翔, 糠塚いそし: LVSEP-FASI法によるマイクロチップ電気泳動分析の高感度化, 第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2016), 徳島大学常三島キャンパス, 徳島; 2016年11月9-11日。

石黒達也, 舘山美咲, 米倉貴弘, 糠塚いそし, 北川文彦: LVSEP-FASI法によるマイクロチップ電気泳動分析の高感度化, 日本分析化学会第65年会, 北海道大学工学部, 札幌, 北海道; 2016年9月14-16日。

北川文彦, 石黒達也, 中川原翔, 糠塚いそし: 生体分析への応用を目指した簡易操作型マイクロチップ電気泳動法の開発とさらなる高感度化, 第67回日本電気泳動学会総会, 釧路市観光国際交流センター, 北海道; 2016年8月26-27日。(依頼講演)

北川文彦, 中川原翔, 小林涉, 加藤亮, 糠塚いそし: 簡易操作型マイクロチップ電気泳動による生体試料の高感度分析, 第26回クロマトグラフィー科学会議, 九州大学医系キャンパス, 福岡; 2015年11月11-13日。(依頼講演)

北川文彦, 中川原翔, 小林涉, 加藤亮, 糠塚いそし: 簡易操作型マイクロチップ電気泳動による生体試料の高感度分析, 第35回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2015), 岡山大学津島キャンパス, 岡山; 2015年11月4-6日。

若城慎一郎, 小林涉, 糠塚いそし, 北川文彦: Highly-sensitive Electrophoretic Analysis of Chiral Compounds by LVSEP-FASI, 平成27年度化学系学協会東北大会, 弘前大学文京キャンパス, 弘前; 2015年9月12-13日。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北川 文彦 (KITAGAWA FUMIHIKO)  
弘前大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：20362452