

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350039

研究課題名(和文)キャピラリー/マイクロチップ分離検出システムによる高性能バイオ分析法の開発

研究課題名(英文)Development of high performance bioanalytical techniques by capillary/microchip separation and detection systems

研究代表者

大塚 浩二(Otsuka, Koji)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70183762

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文):キャピラリー電気泳動(CE)及びマイクロチップ電気泳動(MCE)を基礎とする高性能バイオ分離分析システムの開発について、オンライン試料濃縮法及び質量分析法(MS)検出の適用による高性能分離検出システムの構築と、タンパク質や糖鎖分析のための新規分離場の創成についての拡張的検討を中心とした検討を行った。高性能オンライン試料濃縮法の確立、分離チャンネル-インターフェース一体型マイクロチップによるMCE-MSの高性能化、オンライン試料濃縮適用CE/MCE-MSの実現、高機能微粒子等を利用する選択的分離場の創成によるCE/MCEの高性能化を重点課題として検討し相当の成果を収めた。

研究成果の概要(英文):Development of high performance bio-separation and analysis systems based on capillary electrophoresis (CE) and microchip electrophoresis (MCE) was investigated, where developments of high performance separation and detection systems using online sample concentration techniques and mass spectrometry (MS) and novel separation fields for separations of proteins and carbohydrates were mainly carried out. Following four categories were most important issues: 1) progress of high performance online sample concentration techniques; 2) improvement of the performance of MCE-MS using an interface integrated microchip with a separation channel for MCE; 3) development of CE/MCE-MS using online sample concentration techniques; 4) improving the performance of CE/MCE with novel selective separation fields.

研究分野：分析化学

キーワード：分離科学 キャピラリー マイクロチップ 電気泳動 クロマトグラフィー バイオ分析

1. 研究開始当初の背景

キャピラリー電気泳動 (CE) 及びマイクロチップ電気泳動 (MCE) は、いずれも微小領域における高性能分離分析法として着実に進歩し、様々な領域において基礎・応用研究が行われている優れた手法である。分析操作に必要とされる試料量は前者ではおよそ数 nL、後者では pL 程度と極めて少量で、分析所要時間はそれぞれ数分～十数分及び数十秒～数分程度と高速分析が可能であるなど優れた特徴を有しているため、これらバイオ分離分析領域における中核的手法となり得る分析法である。半面、極微量の試料、また検出セルの光路長が非常に短いことに起因する濃度検出感度の低さが欠点として指摘されている。実際、質量検出感度は数 pg から数 fg と極めて優れているものの、濃度感度はいずれも μM 程度と不十分である。したがって、CE / MCE が高性能分離分析法としてさらに発展し、その優れた特徴がバイオ分析分野において活かされるためには検出感度の向上が不可欠の要件である。

2. 研究の目的

バイオ分析領域において高性能分離分析手法の中核となり得る CE / MCE について、オンライン試料濃縮法を適用することによる分離段階での高感度化と、主に質量分析法 (MS) 検出の適用による高性能検出システムの構築を図ると共に、タンパク質や糖鎖分析のための新規分離場の創成について微粒子を分離及び検出機構の中核的反應場として利用する新たなマイクロ/ナノスケールの電気泳動手法の構築とその基礎的性質の解明と応用とを通して、従来手法に比べて飛躍的な検出感度の向上を実現するシステムの創成を目指した。

特に、高性能オンライン試料濃縮法の確立、分離チャンネル-インターフェース一体型マイクロチップによる MCE-MS の高性能化、オンライン試料濃縮適用 CE/MCE-MS の実現、高機能微粒子等を利用する選択的分離場の創成による CE/MCE の高性能化を重点課題として研究を進めた。

3. 研究の方法

CE 及び MCE におけるペプチド、タンパク質、糖鎖をはじめとする生体関連化合物試料の高性能分離分析法の確立を目指し、高感度検出実現のためにオンライン試料濃縮法の適用に加え MS 検出システムの構築を図った。また、磁気微粒子や金ナノ粒子を分離場、検出場とする分離システムの創製を目指し、磁気微粒子 (磁性流体) のチャンネル内自己組織化によるナノピラー構造を利用する DNA 等巨大分子のサイズ分離や、生体特異的認識能を有するアフィニティリガンドを表面に結合させた磁気微粒子を用いるアフィニティ電気泳動による高選択的分離分析システムの構築を図るべく検討を進めた。

4. 研究成果

CE 及び MCE を基礎とする高性能バイオ分離分析システムの開発について、オンライン試料濃縮法及び MS 検出の適用による高性能分離検出システムの構築と、タンパク質や糖鎖分析のための新規分離場の創成についての拡張的検討を中心とした検討を行った。特に、高性能オンライン試料濃縮法の確立、分離チャンネル-インターフェース一体型マイクロチップによる MCE-MS の高性能化、オンライン試料濃縮適用 CE/MCE-MS の実現、高機能微粒子等を利用する選択的分離場の創成による CE/MCE の高性能化を重点課題として設定した。

(1) ミセル動電クロマトグラフィーに適用可能なオンライン試料濃縮法であるトランジエント-トラッピング (tr-trapping) について、検出法に MS を用いるための詳細な条件設定を行い、キャピラリーモードでの tr-trapping-MEKC-MS の構築を実現した。

(2) 他のオンライン試料濃縮法である large volume sample stacking with an electroosmotic flow pump 法 (LVSEP) について、これまでアニオン性物質に限られていた対象試料範囲の拡大を企図した検討を行い、分離キャピラリー内表面をカチオン性ポリマーで修飾することで電気浸透流の向きを逆転させ、同法のカチオン性試料への適用に成功した。また、不斉識別剤を分離溶液に添加することで、LVSEP 法をカチオン性光学異性体試料に適用して高感度キラル分離の実現に成功した。

(3) MCE-MS の実現のため、シクロオレフィンポリマーを材料として利用するエレクトロスプレーイオン化 (ESI) インターフェース一体型集積化マイクロチップを設計・製作し、その基礎的な性能評価を行った。その結果、安定したエレクトロスプレーの実現と、低分子量モデル化合物試料の電気泳動分離並びにそれぞれの成分の MS 検出に成功した。

(4) CE-MS における高感度検出実現のため、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) インターフェースを利用する LVSEP-CE-MS について、基礎的検討と種々の分析条件の最適化を行って分離検出性能の向上を実現した。試料に生体由来の糖鎖やペプチド等を用い、数種のモデル試料のオンライン試料濃縮電気泳動分離並びにそれぞれの成分の MS 検出に成功した。

(5) 官能基間距離固定化法を利用した分子インプリント技術を用いることで、環境水中に存在する特定汚染物質の選択的濃縮分離を可能にする新規分離媒体の開発に成功した。

(6) 高選択性分離場開発を目指し、C60 フラ

ーレンをシリカモノリスなどの分離基剤表面に修飾し、 π - π 相互作用を利用した特異性を有する新規液体クロマトグラフィー用固定相の開発に成功した。また、CE の泳動液にキノリンポロン酸を添加することで、糖を誘導体化することなくラベルフリーで分離検出するシステムの開発に成功した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

- 1) Kubo, T.; Arimura, S.; Tominaga, Y.; Naito, T.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Lysozyme and Cytochrome c Using a PEG-Based Hydrogel: Selective Recognition for Different Conformations due to pH Conditions, *Macromolecules* **2015**, in press. (査読有) [DOI: 10.1021/acs.macromol.5b00834]
- 2) Kubo, T.; Kanemori, K.; Kusumoto, R.; Kawai, T.; Sueyoshi, K.; Naito, T.; Otsuka, K.: Simple and Effective Label-Free Capillary Electrophoretic Analysis of Sugars by Complexation Using Quinoline Boronic Acids, *Anal. Chem.* **2015**, in press. (査読有) [DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00998]
- 3) Naito, T.; Kaji, N.; Tokeshi, M.; Kubo, T.; Baba, Y.; Otsuka, K.: Hydrodynamic Nonadhesive Cell Retaining in a Microfluidic Circuit for Stress-less Suspension Culture, *Anal. Methods* **2015**, in press. (査読有) [DOI: 10.1039/c5ay00485c]
- 4) Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1335*, 43-60. (査読有) [DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.066]
- 5) Kitagawa, F.; Nojiri, M.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: Sensitivity Enhancement by Sweeping via Borate Complexation in Capillary Electrophoretic Analysis of Glycoproteins, *Chromatography* **2014**, *35*, 125-129. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2014.020]
- 6) 北川文彦, 甲斐美奈子, 大塚浩二: アルカリ金属イオンおよびアンモニウムイオンの蛍光センシングのための量子ドットの作製, *分析化学* **2014**, *63*, 943-949. (査読有) [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/63/12/63_943/_pdf]
- 7) Kubo, T.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Molecularly Imprinted Adsorbents for Selective Separation and/or Concentration of Environmental Pollutants, *Anal. Sci.* **2014**, *30*, 97-104. (査読有) [DOI: 10.2116/analsci.30.97]
- 8) Kubo, T.; Oketani, M.; Tominaga, Y.; Naito, T.; Otsuka, K.: Tunable Molecular Sieving in Gel Electrophoresis Using a Poly(ethylene glycol)-Based Hydrogel, *Chromatography* **2014**, *35*, 81-86. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2014.009]
- 9) Fukushima, Y.; Naito, T.; Sueyoshi, K.; Kubo, T.; Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Quantitative Ligand Immobilization Using Alginate Hydrogel Formed in a Capillary: Application for On-line Affinity Concentration, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5977-5982. (査読有) [DOI: 10.1021/ac501039j]
- 10) Kawai, T.; Watanabe, M.; Uetani, K.; Fukushima, Y.; Sueyoshi, K.; Kubo, T.; Kitagawa, F.; Yano, H.; Otsuka, K.: Hydrophilic Interaction Electrokinetic Chromatography Using Bio-based Nanofillers, *Electrophoresis* **2014**, *35*, 2229-2236. (査読有) [DOI: 10.1002/elps.201300558]
- 11) Kubo, T.; Im, J.; Wang, X.; Whitten, J. E.; Otsuka, K.; Yan, M.: Solvent induced nanostructure formation in polymer thin films: the impact of oxidation and solvent, *Colloids Surf. A* **2014**, *444*, 217-225. (査読有) [DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.052]
- 12) Kubo, T.; Murakami, Y.; Tominaga, Y.; Naito, T.; Sueyoshi, K.; Yan, M.; Otsuka, K.: Development of a C60-fullerene bonded open-tubular capillary using a photo/thermal active agent for liquid chromatographic separations by p-p interactions, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1323*, 174-178. (査読有) [DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.097]
- 13) Kubo, T.; Kuroda, K.; Tominaga, Y.; Naito, T.; Sueyoshi, K.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Effective determination of a pharmaceutical, sulphiride, in river water by online SPE-LC-MS using a molecularly imprinted polymer as a preconcentration medium, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *89*, 111-117. (査読有) [DOI: 10.1016/j.jpba.2013.10.040]
- 14) Kitagawa, F.; Kawai, T.; Otsuka, K.: On-line sample preconcentration by large volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) in microscale electrophoresis, *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 1129-1139. (査読有) [DOI: 10.2116/analsci.29.1129]
- 15) Kubo, T.; Tanigawa, T.; Tominaga, Y.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Rapid Separations on Liquid Chromatography Using Ion Exchangeable Media Based on a Spongy Monolith, *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2813-8. (査読有) [DOI: 10.1002/jssc.201300392]
- 16) Tominaga, Y.; Kubo, T.; Sueyoshi, K.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Synthesis of Poly(ethylene glycol)-Based Hydrogels and Their Swelling/Shrinking Response to Molecular Recognition, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 3153-3158. (査読有) [DOI: 10.1002/pola.26700]
- 17) Kubo, T.; Yasuda, K.; Tominaga, Y.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Hybridization of a Macroporous Sponge and Spherical Microporous Adsorbents for High Throughput Separation of Ionic Solutes, *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 417-421.

- (査読有) [DOI: 10.2116/analsci.29.417]
- 18) Kubo, T.; Yasuda, K.; Tominaga, Y.; Otsuka, K.; Hosoya, K.: Antibacterial activities effectuated by co-continuous epoxy-based polymer materials *Colloids Surf. B* **2013**, *107*, 53-58. (査読有)
[DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.043]
- 19) Kawai, T.; Ueda, M.; Fukushima, Y.; Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Towards 10,000-fold Sensitivity Improvement of Oligosaccharides in Capillary Electrophoresis Using Large-volume Sample Stacking with an Electroosmotic Flow Pump Combined with Field-amplified Sample Injection, *Electrophoresis* **2013**, *34*, 2303-2310.1 (査読有)
[DOI: 10.1002/elps.201200615]
- 20) Watabe, Y.; Kubo, T.; Tanigawa, T.; Hayakawa, Y.; Otsuka, K.; Hosoya, K.: Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water with automated pretreatment HPLC, *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 1128-1134. (査読有)
[DOI: 10.1002/jssc.201201096]
- 21) Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Effect of a low-conductivity zone on field-amplified sample stacking in microchip micellar electrokinetic chromatography, *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 133-138. (査読有)
[DOI: 10.2116/analsci.29.133]
- 22) Kitagawa, F.; Sudaki, H.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: Open-tubular electrochromatographic chiral separation of amino acids using organic nanocrystals immobilized capillary, *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 107-112. (査読有)
[DOI: 10.2116/analsci.29.107]
- 23) Nii, K.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.; Takai, M.: Zone electrophoresis of proteins in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchip coated with physically adsorbed amphiphilic phospholipid polymer, *Microfluid. Nanofluid.* **2013**, *14*, 951-959. (査読有)
[DOI: 10.1007/s10404-012-1102-8]
- 24) Sueyoshi, K.; Hori, Y.; Otsuka, K.: Inner surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannel for electrophoretic analysis of proteins, *Microfluid. Nanofluid.* **2013**, *14*, 933-941. (査読有)
[DOI: 10.1007/s10404-012-1100-x].
- 25) Kobayashi, A.; Kubo, T.; Sato, T.; Kitahara, Y.; Amita, S.; Mori, M.; Suzuki, S.; Otsuka, K.; Hosoya, K.: Efficient total analyses for bromine type flame retardants by simple NI-Cl-GC/MS, *Anal. Methods* **2013**, *5*, 866-873. (査読有) [DOI: 10.1039/c2ay25983d]
- 26) Sueyoshi, K.; Koino, H.; Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Sensitive enantioseparation by transient trapping-cyclodextrin electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1269*, 366-371. (査読有)
[DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.065]
- 27) Kawai, T.; Ito, J.; Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Electrophoretic analysis of cations using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump using capillaries coated with neutral and cationic polymers, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1267*, 65-73. (査読有)
[DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.077]
- [学会発表] (計 48 件)
- 1) Otsuka, K.: Strategies for Improving Analytical Performance in Microscale Electrophoresis, 4th International Conference on Microfluidic Chip and Micro/NanoScale Bioseparation Analysis, Wuhan (China); 30 October-02 November 2014. (招待講演)
- 2) 大塚浩二: アフィニティリガンド内包ヒドロゲル部分充填キャピラリーを用いる電気泳動分析, 第 65 回日本電気泳動学会総会, 横浜情報文化センター(神奈川県・横浜市)2014 年 10 月 24-25 日.(依頼講演)
- 3) 大塚浩二: ミクロスケール電気泳動の高機能化, 日本分析化学会第 63 年会, 広島大学東広島キャンパス(広島県・東広島市)2014 年 9 月 17-19 日.(依頼講演)
- 4) Otsuka, K.: Novel Separation Media for Microscale Electrophoresis and Liquid Chromatography, 30th International Symposium on Chromatography (ISC2014), Salzburg (Austria); 14-18 September 2014. (招待講演)
- 5) Otsuka, K.: Development of C60-Fullerene Bonded Capillaries for LC, 2014 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry (CJK2014), Shenyang (China); 22-25 August 2014. (招待講演)
- 6) Otsuka, K.: Development of Novel Separation Media for Microscale Analysis (Invited), 38th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC2014), Riva del Garda (Italy); 18-23 May 2014. (招待講演)
- 7) Otsuka, K.: Novel Separation Media and Materials for Microscale Separations, 41st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2014 New Orleans), New Orleans (USA); 11-15 May 2014. (招待講演)
- 8) Otsuka, K.: Strategies for Improving Detectability of Capillary Electrophoresis, 30th International Symposium on Microscale Bio-separations (MSB2014), Pecs (Hungary); 27 April-01 May 2014. (招待講演)
- 9) Otsuka, K.: Strategies for improving analytical performance of microscale electrophoresis, 40th International Symposium on Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC2013 Hobart), Hobart (Australia); 18-21 November 2013. (招待講演)
- 10) Otsuka, K.: Development of Novel Separation Media for LC and SPE: C60-fullerene Coated Capillary and Molecularly Imprinted Adsorbent, 13th Asia Pacific Symposium on Mi-

- croscala Separations and Analysis (APCE2013), Jeju (Korea); 3-6 November 2013. (招待講演)
- 11) Otsuka, K.: Towards highly selective and sensitive analysis in microscale electrophoresis, 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2013), Puerto de la Cruz (Spain); 6-9 October 2013. (招待講演)
 - 12) Otsuka, K.: High Performance Microscale Electrophoresis for Bioanalysis, International Symposium on Interdisciplinary Research and Education on Medical Device Developments (IREMD2013), 弘前大学(青森県・弘前市) 2013年9月12-13日. (招待講演)
 - 13) Otsuka, K.: Novel separation media in microscale electrophoresis for selective analysis, 9th Balaton Symposium, Siófok (Hungary); 4-6 September 2013. (招待講演)
 - 14) Otsuka, K.: Towards high-sensitive detection in microscale electrophoresis using on-line sample concentration, 39th International Symposium on Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC2013 Amsterdam), Amsterdam (The Netherlands); 16-20 June 2013. (招待講演)
 - 15) Otsuka, K.: Combination of on-line sample concentration and mass spectrometric detection in microscale electrophoresis, 37th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC2013), Palm Springs (USA); 12-16 May 2013. (招待講演)
 - 16) Otsuka, K.: Strategies for high-sensitive detection in microscale electrophoresis, 12th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis (APCE 2012), Singapore (Singapore); 16-19 December 2012. (招待講演)
 - 17) Otsuka, K.: Development of a microchip 2-dimensional electrophoretic technique for bioanalysis, 7th International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-7), 東京大学(東京都・文京区)2012年11月18-19日. (招待講演)
 - 18) 大塚浩二: ミクロスケール電気泳動の開発と進歩, 第32回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2012), 産総研関西センター(大阪府・池田市)2012年11月7-9日. (特別講演)
 - 19) Otsuka, K.: Strategies for high-sensitive detection in microscale electrophoresis, 28th International Symposium on Microscale Bio-separations (MSB2012 Shanghai), Shanghai (China); 21-26 October 2012. (招待講演)
 - 20) Otsuka, K.: Strategies for improving detectability in microscale electrophoresis, 19th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques (ITP 2012), Baltimore (USA); 30 September - 3 October 2012. (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 浩二 (OTSUKA, Koji)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号：70183762

(2) 研究分担者

久保 拓也 (KUBO, Takuya)
京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号：20374994

内藤 豊裕 (NAITO, Toyohiro)
京都大学・工学研究科・助教
研究者番号：10711806