光重合性アクリルアミドを利用したマイクロチップ電気泳動における 新規オンライン濃縮電気泳動法の開発

山本佐知雄

In Situ Photopolymerization of Polyacrylamide-based Preconcentrator on a Microfluidic Chip for Capillary Electrophoresis

Sachio Yamamoto

Faculty of Pharmacy, Kinki University; 3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka, Osaka 577-8502, Japan.

(Received May 22, 2012)

Microchip electrophoresis is widely used for microfluidics and has been studied extensively over the past decade. Translation of capillary electrophoresis methods from traditional capillary systems to a microchip platform provides rapid separation and easy quantitation of sample components. However, most microfluidic systems suffer from critical scaling problems. One promising solution to this problem is online sample preconcentration of all analytes in a sample reservoir before the separation channel. Herein, the following three techniques for online preconcentration during microchip electrophoresis are proposed: (1) *in situ* fabrication of an ionic polyacrylamide-based preconcentrator on a simple poly(methyl methacrylate) microfluidic chip for perm-selective preconcentration and capillary electrophoretic separation of anionic compounds, (2) simultaneous concentration enrichment and electrophoretic separation of weak acids on a microchip using an *in situ* photopolymerized carboxylate-type polyacrylamide gels as the perm-selective preconcentrator, and (3) microchip electrophoresis of oligosaccharides using lectin-immobilized preconcentrator gels fabricated by *in situ* photopolymerization. These techniques are expected to be powerful tools for clinical and pharmaceutical studies with on-line preconcentration during microchip electrophoresis.

Key words—microchip electrophoresis; on-line sample preconcentration; perm-selective

1. はじめに

マイクロチップ電気泳動 (ME) 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。¹⁾ 分離系全体が微小化されており、1 回の分析に要する試料量、泳動液量がナノリットルからマイクロリットルオーダーであり、分析時間も数秒から数分というハイスループットな分析法として利用されている。²⁾ 今後はバイオマーカー測定など、臨床診断への応用が求められている³⁾が、ME では導入する試料溶液の体積がピコリットルからナノリットルと極めて微量であるため、必然的に高濃度の試料が必要とな

る。しかも現状のように電氣的に試料を導入すると、泳動速度に差がある試料では定量性に問題がある。これらの試料導入の問題を解決するため、マイクロチップ用の様々なオンライン濃縮法が開発されている。中でも流路上に特殊な濃縮系を構築する perm-selective 濃縮法^{4–9)}は、極めて濃縮効率が高い。しかし、濃縮系の構築には、複雑な流路デザインや微細で精度の高い加工技術が必要とされており、¹⁰⁾ 特に臨床診断のように汎用性が求められる分野に応用するには、技術面、コスト面で問題がある。筆者らは、この汎用性の問題を解決するため、市販の単純な十字型流路を持つマイクロチップの流路の一部に、ピンポイントで光重合することにより作製したアクリルアミドゲル層を構築し、perm-selective 法を応用した抽出や濃縮などの付加機能を加える、新規オンライン濃縮電気泳動法の開発を試みた。本稿ではこれまでに得られた知見について紹介する。

The author declares no conflict of interest.

近畿大学薬学部医療薬学科 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1)

e-mail: sachio.yamamoto@gmail.com

本総説は、平成 23 年度日本薬学会近畿支部賞 (物理系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

2. ポリメチルメタクリレート製マイクロチップにおける酸性試料の導入挙動

本実験で用いた市販のマイクロチップのレイアウトを Fig. 1 に示す。本マイクロチップはポリメチルメタクリレート製で、標準的な十字型流路を持つ極めてシンプルな構造であり、DNA 分析用に開発されたものである。図中の“Separation channel”で示した流路は幅 $100\ \mu\text{m}$ 、深さ $30\ \mu\text{m}$ の矩形断面を持つ。流路長は流路交差部から試料入口 (SI) 及び試料出口 (SO) までの長さがそれぞれ $4.75\ \text{mm}$ 、泳動液入口 (BI) までが $5.75\ \text{mm}$ 、泳動液出口 (BO) までが $37.5\ \text{mm}$ である。

通常のマイクロチップ電気泳動では、試料の導入などの操作を電気的に行っているため、泳動時間に幅のある試料では、導入時間によって分析結果が異なり、定量性が損われる可能性がある。¹¹⁾ この問題を解決するには、SI に導入したすべての試料をマイクロチップの交差部に集めるとよい。このアイデアが実現すれば、定量性が解決されると同時に、大幅な感度の向上が望めることは明白である。

3. 光硬化ゲルのイオン排除効果を利用した試料前濃縮法と新マイクロチップ電気泳動法の開発¹²⁾

ナノメートルサイズの空間では壁面の電荷が空間全体に及ぶので、同符号のイオンには斥力が働く。¹³⁾ この原理に基づくイオン濃縮は perm-selective 濃縮と呼ばれている。前述の定量性と高感度化の問題を同時に解決するために、より汎用性の高い perm-selective 法の開発を検討した。本実験で作製した光硬化ゲルはアクリルアミドとビスアクリルアミドからなる骨格に、スルホン酸基を持つ 2-acryl-

amide-2-methylpropanesulfonic acid を共重合させたポリマーである。重合開始剤としては、検出用のアルゴンレーザーの発振波長である $488\ \text{nm}$ で励起可能なリボフラビンを用いた。今回開発した濃縮法の具体的な操作手順を Fig. 2 に示す。

2-Acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid を添加したアクリルアミドモノマー溶液で流路を満たし、流路交差部から $500\ \mu\text{m}$ 離れた位置から SO 側に向けてアルゴンレーザーを照射し、直径 $500\ \mu\text{m}$ ゲル層を構築した。試料を SI に満たし、ゲル層に向けて電圧を印加すると、ゲルと試料成分の電荷反発によってゲル層との境界部に試料が濃縮される。酸性蛍光性試料 (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid: APTS) を用いてゲル近傍での蛍光強度の変化を測定したところ、時間経過とともに蛍光強度が増大し、およそ 3 分の濃縮操作で感度が 100000 倍上昇した (Fig. 3)。

試料溶液が $10\ \mu\text{L}$ に対して交差部の体積が $1\ \text{nL}$ 以下であることを考えると、試料のほとんどが 3 分程度で交差部に濃縮されたことになる。本法を APTS 化イソマルトオリゴ糖の分離に適用したところ 10^5 倍に及ぶ感度上昇が達成され、分離度の低下はみられなかった。

Fig. 1. Schematic Diagram of the Microchip

SI=sample inlet, SO=sample outlet, BI=buffer inlet, BO=buffer outlet.

Fig. 2. Procedure for Photopolymerization of Anionic Acrylamide Gel and Perm-selective Concentration

(a) Introduction of an acrylamide solution to all channels of a microchip. (b) Irradiation of the SO channel with an argon laser near where the channels cross. (c) Removal of the gel solution by washing with buffer. (d) Pouring the sample solution to the sample inlet and apply voltage to SO. The sample is concentrated by the repulsion of the electric charge with anionic polyacrylamide gel layer.

Fig. 3. Time-sequence Images of APTS Concentration at the Channel Cross in the Microchip with *In Situ* Formation of the Permselective Gel

4. 弱酸特異的光硬化アクリルアミドゲルを用いる選択的オンライン濃縮法の開発¹⁴⁾

前述した技術を生体試料に応用することを考えると、試料の常成分として塩化ナトリウムなどの無機塩中の陰イオンも同時に濃縮されるため、特に弱酸性生体成分の濃縮が阻害されることが予想される。弱酸への特異性を目的として 2-acrylamidoglycolic acid を共重合させたカルボン酸型アクリルアミドゲル層を流路交差部近傍に作製し、弱酸性試料を特異的に濃縮する方法の開発を試みた。弱酸特異的濃縮ゲル層を作製後、流路交差部における濃縮の様子を確認したところ、弱酸性の fluorescein はゲル層直近に濃縮され、強酸性の APTS は濃縮されずゲルに吸着した。また、強酸性である 10^{-9} M の 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) と 10^{-10} M の fluorescein を混合させた試料溶液では、fluorescein のみの特異的な濃縮が確認できた (Fig. 4)。

10^{-13} M となるように調製した FITC で標識したアミノ酸を試料に選び、 10^{-7} M の塩化ナトリウムを添加した試料溶液を調製して濃縮と分離を行った。得られた結果を Fig. 5 に示す。

10^{-13} M、絶対量としてわずか 10^{-18} mole 量の FITC 標識化アミノ酸を特異的かつ、感度よく分析することが可能であった。したがって、本法を用いると、弱酸性試料成分の特異的な分析が可能であり、血中に微量に存在する医薬品や、その代謝物、マーカー分子の検出などに応用できる可能性が示唆された。

5. レクチン固定化アフィニティーマイクロチップ電気泳動¹⁵⁾

より選択性の高い濃縮法としてアフィニティー濃縮に光重合ゲルの利用を検討した。そのために、糖

Fig. 4. Time-sequence Images of 10^{-9} mol/L ANTS and 10^{-10} mol/L Fluorescein at the Channel Cross with *In Situ* Formation of the Permselective Carboxylate-type Gel

Fig. 5. Preconcentration and Electrophoretic Separation of 10^{-13} mol/L FITC-labeled Amino Acids in the Presence of 10^{-7} mol/L NaCl

A=aspartic acid, B=glycine, C=histidine, R=FITC reagent.

Fig. 6. Time-course of the Concentration of APTS Oligosaccharides Derived from Bovine Ribonuclease B at the Channel Crossing Point in the Con A-impregnated Polyacrylamide Gel

SI was filled with 10^{-6} mol/L APTS-ribonuclease B, and 150 V was applied between SI and SO for 0 s (a) or 3 min (b).

鎖の部分構造を認識するレクチン含有ポリアクリルアミドゲルを流路交差部に作製し、糖鎖の特異的濃縮と分析への応用を試みた。レクチンの濃度が 5 mg/mL となるように調製したアクリルアミドゲル層を流路交差部に作製した。ハイマンノースタイプの糖鎖を認識する Concanavalin A (Con A)¹⁶⁾ を封

Fig. 7. Separation of a 1 : 2 Mixture of Sialylated and Asialylated Oligosaccharides Derived from Human Transferrin Preconcentrated with a SSA Impregnated Gel (b) and a Concentrated (25 times) Sample by Pinched Injection without Preconcentration (a)

入したゲルを用い APTS で標識した 10^{-6} M のリボヌクレアーゼ B (RNase B) 由来糖鎖の濃縮を検討した。RNase B は、ハイマンノース型糖鎖のみを有しているため、導入したすべての糖鎖誘導体は Con A との親和性を有する。流路交差部では試料導入後 20 秒から濃縮が始まり、およそ 3 分後に極大に達した (Fig. 6)。

濃縮した試料は、BI に強酸性のリン酸緩衝液 (pH 2.0)、BO に強塩基性のホウ酸緩衝液 (pH 11.0) を用いた過渡的濃縮を適用した結果、レクチンからの試料の溶出と、高分離能分離が達成された。試料に $39 \mu\text{g/L}$ (10^{-9} M) のトランスフェリン (TRF) から調製した APTS 糖鎖を用いて、 α -2,6 結合シアル酸を認識するレクチン、SSA を用い濃縮を行ったところ、検出下限に相当する 10^{-7} M と同程度のピークが得られた。また、TRF の糖鎖にシアル酸切断酵素であるノイラミニダーゼを作用させて得られたアシアロ糖鎖を 1 : 1 で添加して、同様の条件で実験を行ったところ α -2,6 結合シアル酸を有する糖鎖のみが特異的に濃縮・検出された (Fig. 7)。

6. 考察

光重合性アクリルアミドゲル層を用いた様々なオンライン濃縮法を開発した。酸性の官能基を有するアクリルアミドを流路内で重合させることで、陰イオン性試料を、ほぼ完全に交差部に濃縮することができた。また、レクチン含有アクリルアミドゲルを用いるとレクチンの認識に応じて特異的な濃縮と分離が達成された。

本法は、専用の装置を必要とせず高い濃縮効率を得ることができる。また、ゲルの作製に検出用光源を用いるので、単純なマイクロチップと装置があれば簡単に濃縮が可能となる。今後は、本濃縮法とマイクロデバイスの創成技術を組み合わせてバイオマーカー測定などの高度な臨床分析が可能なデバイ

スの開発に応用したいと考えている。

謝辞 本総説の研究に対し、懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました、近畿大学薬学部 鈴木茂生教授に深謝いたします。本研究を進めるにあたり、御協力、御支援頂きました平川真吾氏、渡邊裕樹氏、鈴木 翔氏、西田憲晃氏を始めとする共同研究者の皆様感謝申し上げます。本研究は文部科学省ハイテクリサーチ・センター整備事業、並びに文部科学省科学研究費補助金を賜ることにより遂行されたものであり、併せて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Kitagawa F., Kawai T., Sueyoshi K., Otsuka K., *Anal. Sci.*, **28**, 85–93 (2012).
- 2) Breadmore M. C., *J. Chromatogr. A*, **1221**, 42–55 (2012).
- 3) Verpoorte E., *Electrophoresis*, **23**, 677–712 (2002).
- 4) Khandurina J., Jacobson S. C., Waters L. C., Foote R. S., Ramsey J. M., *Anal. Chem.*, **71**, 1815–1819 (1999).
- 5) Dhopeshwarkar R., Sun L., Crooks R. M., *Lab Chip*, **5**, 1148–1154 (2005).
- 6) Hatch A. V., Herr A. E., Throckmorton D. J., Brennan J. S., Singh A. K., *Anal. Chem.*, **78**, 4976–4984 (2006).
- 7) Sommer G. J., Singh A. K., Hatch A. V., *Anal. Chem.*, **80**, 3327–3333 (2008).
- 8) Kelly R. T., Li Y., Woolley A. T., *Anal. Chem.*, **78**, 2565–2570 (2006).
- 9) Kim S. M., Burns M. A., Hasselbrink E. F., *Anal. Chem.*, **78**, 4779–4785 (2006).
- 10) Wang Y. C., Stevens A. L., Han J., *Anal. Chem.*, **77**, 4293–4299 (2005).
- 11) Yamamoto S., Oshiro H., Suzuki S., *Physico-Chem. Biol.*, **52**, 127–131 (2008).
- 12) Yamamoto S., Hirakawa S., Suzuki S., *Anal.*

-
- Chem.*, **80**, 8224–8230 (2008).
- 13) Pu Q., Yun J., Temkin H., Liu S., *Nano Lett.*, **4**, 1099–1103 (2004).
- 14) Yamamoto S., Watanabe Y., Nishida N., Suzuki S., *J. Sep. Sci.*, **34**, 2879–2884 (2011).
- 15) Yamamoto S., Suzuki S., Suzuki S., *Analyst*, **137**, 2211–2217 (2012).
- 16) Honda S., Suzuki S., Nitta T., Kakehi K., *J. Chromatogr.*, **438**, 73–84 (1988).