

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615008

研究課題名(和文) 光重合性ポリマーを用いる環境および医療分析用高機能マイクロチップ作製技術の開発

研究課題名(英文) Development for the Fabrication of Multifunctional Photopolymerized Gels on Electrophoresis Microchips for Environmental and Medical Analysis

研究代表者

鈴木 茂生 (SUZUKI, Shigeo)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：00154542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：環境や医療の分野では、様々な検査をリアルタイムで測定する必要がある。現在の検査方法の多くは、比色や免疫反応などを利用したものに限られている。複数の成分を調査する必要がある場合には、検体から分析したい目的成分を分離し、それぞれの量を正確に捉える必要がある。本研究ではマイクロチップ電気泳動とゲルのピンポイント光重合技術を使って生体試料を分単位で分離するために高感度分離分析技術の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Previously most of the environmental and clinical examinations have been conducted on-site in real time. They could be realized by applying simple methods based on colorimetric examinations using specific chemical reactions or immunological assays using a simple apparatus. This situation makes difficult for the analysis of a series of compounds in complex mixture. Here we applied photopolymerization chemistry on microchip separation techniques to provide novel methods and devices for the evaluation of such complex examinations.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：安全環境計測

キーワード：環境分析 マイクロ・ナノデバイス 分析科学 光重合ポリマー 電気泳動

1. 研究開始当初の背景

マイクロデバイスを用いた総合分析システム(μ TAS)の目標は、微細な半導体加工技術を使って、複雑な液体流路系を構築し、反応・分離・検出を一つの基盤上に凝縮し、環境分析や医療診断など、現場で使える技術を提供することにある。現在の方法は大がかりな装置と高度な技術を用いてマイクロチップを作成しており、その利用は大量生産が可能なニーズの高い分野に限られている。

我々はマイクロチップ電気泳動の高速性に着目し、様々な分析法を開発してきたが、微細流路を用いるために、分析に供される試料量がナノリットル以下と非常に少ないことに気づき、光重合性イオン交換ゲルを流路の一部に構築し、その電荷反発を利用して濃縮する perm selective 法を新たに開発した。この方法では、先ず単純な流路をもつ市販の DNA 分析用マイクロチップの流路内にスルホン酸を官能基にもつアクリルアミド混合物溶液を注入し、検出光源であるアルゴンレーザーを照射して、試料濃縮部の近傍にイオン交換ゲル層を作成するというものである。アクリルアミドゲルの重合反応は速やかに進行し、レーザー照射後、数分内で完了した。また、レーザー光の照射範囲は、顕微鏡の対物レンズを交換することで、任意に変更できるので、様々なサイズのゲルを作成できるという特徴を有する。

糖タンパク質糖鎖を強酸性レーザー蛍光色素である 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid で誘導体化して得られた酸性誘導体を用いて、電圧を印加した際の濃縮効率を調べたところ、数万倍、すなわち試料槽(10 μ L)に加えた試料成分のほぼ全量がゲルの直前に濃縮されることを見だし、実際の分離分析に適用可能であることを示した。この方法ではゲルに様々な官能基を導入できるばかりではなく、タンパク質のような高分子はゲルに添加して重合させることで効果的に封止することができる。この方法を応用すれば試料成分の特異的な捕捉、抽出や反応場の提供が可能となる。したがって、この技術が完成すれば、単純な流路をもつチップを測定現場で利用目的に応じたゲルをチップ上で合成し、カスタマイズすることが可能となるので、環境や臨床などの分野で幅広く利用できると考えた。

2. 研究の目的

マイクロチップ電気泳動を環境や臨床分野におけるオンサイト検査に適用すれば、今まで不可能であった複雑な成分の分離分析などの検査を秒単位で実施できる。しかも、装置のミクロ化によって野外のような電源の届かない場所でも、PC の USB 端子から供給される電源を利用して駆動させることができる。マイクロチップは大量生産が可能であるが、試料に応じた前処理や濃縮過程をチップ上で実現するには、それぞれの目的に合

った専用の流路をデザインしなければならず、コストがかかるために普及が妨げられている。既に報告者らは陰イオン性モノマー溶液にレーザー光を照射することで電気泳動用マイクロチップの分析流路の特定の部位に μ m サイズのゲル層を構築する方法を考案し、陰イオン性試料成分を十万倍という高い効率でチップ流路内に濃縮できる技術を開発し、生体試料の分離に応用した。本研究ではこの機能性ゲルの *in situ* 合成技術を抽出や精製、さらには標識化のオンライン化に応用する。本法では共通した単純な流路をもつ電気泳動チップをベースとして、それぞれの現場で検出光源を使って機能性ポリマーを流路上に構築し、複雑な試料にも対応できる高機能な分析を実現することが本研究の目的である。そのために、以下の3つについて検討した。

(1) 試料の電荷による濃縮

(2) 生物学的、物理的な親和性を用いた特異的抽出

(3) 誘導体化と誘導体化後の過剰試薬の除去

3. 研究の方法

本研究を開始するにあたっては、まずマイクロチップ電気泳動の原型であるキャピラリー電気泳動(CE)や液体クロマトグラフィー(LC)といった汎用型の分析装置を使って、抽出、標識あるいは濃縮など実験系を検証し、その有用性が確立された段階でマイクロチップへ移行させるという二段階の研究方法を採用した。以下に具体的な研究テーマと実験方法について列記する。

(1) 弱陰イオン性ポリマーを用いる酸性化合物の濃縮と分析：既に硫酸基を官能基に用いた perm-selective 濃縮法を開発したが、試料や泳動液に含まれる強酸性成分が試料の濃縮効率に影響を与えた。これはスルホン酸の強い負電荷によって、すべての陰イオンを排除するためと考えられる。そこで、カルボン酸のような弱酸性のゲルを *in situ* 合成し、その特性を調査する。

(2) 親和性に基づく捕捉と分析への応用：タンパク質にはリガンド分子を特異的に捕捉する性質をもつものがある。そこで、糖類を特異的に認識し結合するタンパク質群であるレクチンを用いた糖鎖構造特異的な分離や構造解析への応用について検討する。さらに、得られた結果はマイクロチップ電気泳動に応用する。

(3) 加水分解酵素を用いる *in capillary* 消化法：加水分解酵素を用いる *in capillary* 消化法について CE 法を使って調査し、構造解析への応用を検討する。

(4) 蛍光標識化後のオンライン精製： 微量の生体成分を定量的かつ網羅的に解析する目的で、様々な蛍光標識化法が用いられるが、その多くは誘導体化後に過剰試薬の除去が必要となる。そこで、過剰試薬の除去をオンライン化する的方法について検討する。

4. 研究成果

今回の助成を得て達成されたプロジェクトを以下にまとめる。

(1) 弱陰イオン性ポリマーを用いる酸性化合物の濃縮と電気泳動分析： カルボン酸のような弱酸性の官能基をもつゲルを電気泳動の試料導入流路に *in situ* 合成し、弱酸性および強酸性物質の本ゲルを介した電気泳動挙動とその特性を調査した。試料に強酸性の蛍光試薬である APTS と弱酸性蛍光試薬である fluorescein の混合液をゲルを介して電氣的に導入した結果、図 1

下段に示すように弱酸性の fluorescein だけが特異的に捕捉されることを見いだした。試料溶液の濃度は 10^{-13} M という低濃度の試料でも濃縮後は 10^{-8} M を分析した場合と同様の感度で測定できた。すなわち弱酸を特異的に 100000 倍濃縮し、分析することが可能であった。すなわち、試料成分が強酸性ならばスルホン酸型ゲル、弱酸ならばカルボン酸ゲルを使うと特異的に濃縮できることが判明した (Yamamoto 2011, 2013)。

(2) 親和性に基づく捕捉と分析への応用： タンパク質にはリガンド分子を特異的に捕捉する性質をもつものがある。レクチンの補足能が十分に高いことを利用して、限外濾過膜とレクチンを使って糖鎖や糖ペプチドの構造特異的な分画が可能であることを示した (Yodoshi 2011)。

さらにキャピラリー電気泳動において、レクチンを溶液のまま、試料に先立って少量加える partial filling 法(図 2)を考案した (Yamamoto 2011, Fukushima 2012)。結果の一例を図 3 に示す。これは 4 種類のレクチン

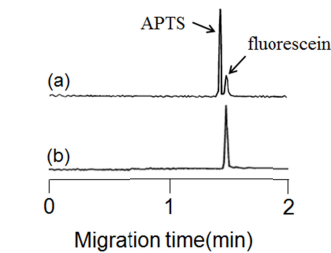


図 1 強酸性 APTS および弱酸性 fluorescein の permselective 濃縮と分離。(a) 10^{-8} M を通常通りマイクロチップ電気泳動した。下段は 10^{-13} M 溶液をゲルで濃縮し分離した。

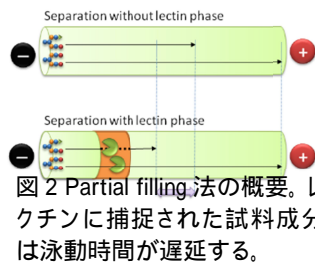


図 2 Partial filling 法の概要。レクチンに捕捉された試料成分は泳動時間が遅延する。

を順次導入した後、複雑な糖鎖混合物を導入

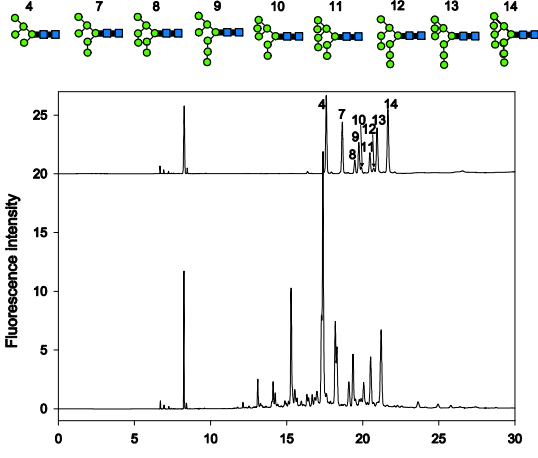


図 3 Partial filling CE による複雑な糖鎖混合物から高マンノース型糖鎖だけを特異的に分析した例。18 分までのシグナルが消失した。

したものであるが(図 3 下)、多くの糖鎖がレクチンに捕捉され高マンノース型と呼ばれる糖鎖だけが特異的に検出された(図 3 上)。さらに、この方法の応用とレクチンを使ったマイクロチップ電気泳動にも応用した。十字型チップの公差部にレクチン含有ゲルを作

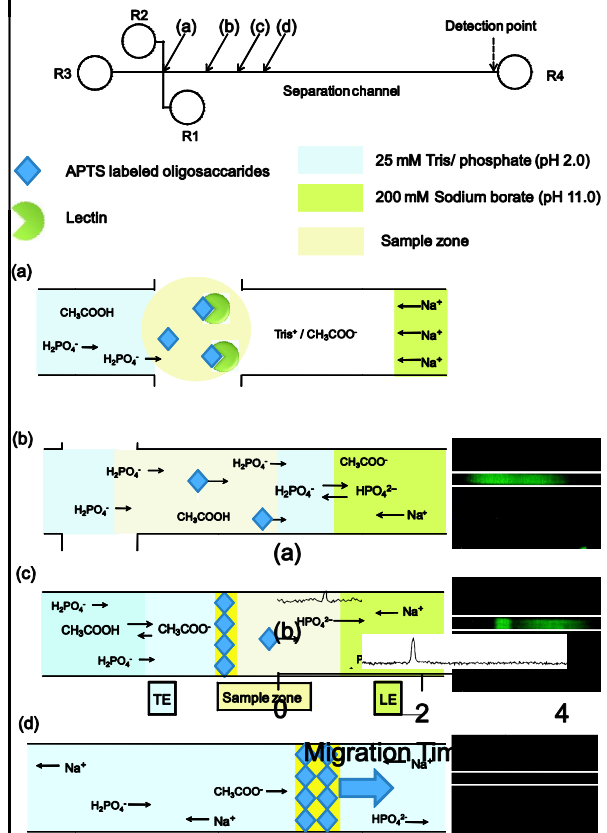


図 4 マイクロチップの公差部にレクチン含有ゲルを作成し、糖鎖誘導体の濃縮を行った。ゲルからの糖鎖の遊離が困難であったために過渡的濃縮法を適用した

成し、糖誘導体の濃縮と遊離・分離を行った(図 4)。分析例を図 5 に示すが、糖鎖の数百倍程度の濃縮と、構造特異的な分離が可能であった。これらの方法は複雑な試料に対しても、ゲルに目的成分群に特異的な捕捉分子を

有させたゲルを用いることで、様々な特異的濃縮が可能となることを示したものであり、応用範囲は広いと考える (Yamamoto 2012)。

(3) 加水分解酵素を用いる *in capillary* 消化法：(2)の PFACE 法の応用として加水分解酵素を導入して *in capillary* で消化する方法について調査し

た。試料に抗体医薬品を用いた。図 5 レクチン含有ゲルで糖鎖混合物(a)からシアル酸含有糖鎖だけを検出できた(b)

いノイラミダーゼなどを使って解析したところ、人体に有害な N-グリコリルノイラミン酸や -Gal 含有糖鎖の存在を確認できることを報告した(Yagi, 2011, 2012)。

(4) 蛍光標識化後のオンライン精製：微量の生体成分を定量的かつ網羅的に解析する目的で、様々な蛍光標識化法が用いられるが、その多くは誘導体化後に過剰試薬の除去が必要となる。そこで、過剰試薬の除去をオンライン化する方法について検討した(Yodoshi 2013)。

これにより、大幅な操作の短縮と分析精度の向上が達成できた。またオンライン精製に応用した結果についても本年中に公表する予定である。

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 15 件)

1. Yuki Yagi, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Shigeo Suzuki, Application of Microchip Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate for the Evaluation of Change of Degradation Species of Therapeutic Antibodies in Stability Testing, *Anal. Sci.*, 査読有, **30** (2014) 483-488.

2. Masahiro Yodoshi, Natsumi Ikeda, Naoko Yamaguchi, Mana Nagata, Noriaki Nishida, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Shigeo Suzuki, A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents, *Electrophoresis*, 査読有, **34** (2013) 3198-3205.

3. Sachio Yamamoto, Yumi Nakatani Shigeo Suzuki, Application of online preconcentration affinity capillary electrophoresis method to glycans labeled with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid using blue light emitting diode-induced fluorescence detection, *Anal. Sci.*, 査読有, **29** (2013) 831-835.

4. Yoshihide Tanaka, Seira Okuda, Ayumi Sawai, and Shigeo Suzuki, Development of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) Assay on

a Centrifugal Lab-on-a-compact-disc (Lab-CD) Platform, *Anal. Sci.*, 査読有, **28** (2012) 33-38.

5. Eriko Fukushima, Yuki Yagi, Sachio Yamamoto, Yumi Nakatani, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Shigeo Suzuki, Partial filling affinity capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump for sensitive profiling of glycoprotein-derived oligosaccharides, *J. Chromatogr. A*, 査読有, **1246** (2012) 84-89.

6. Sachio Yamamoto, Sho Suzuki, Shigeo Suzuki, Microchip Electrophoresis of Oligosaccharides Using Lectin-Immobilized Preconcentrator Gels Fabricated by *In Situ* Photopolymerization, *Analyst*, 査読有, **137** (2012) 2211-2217.

7. Yuki Yagi, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Yukihito Ohya, Shigeo Suzuki, Specific detection of N-glycolylneuraminic acid and Galα1-3Gal epitopes of therapeutic antibodies by partial-filling capillary electrophoresis, *Anal. Biochem.* 査読有, **431** (2012) 120-126.

8. Masahiro Yodoshi, Tomoko Ikuta, Yuki Mouri, Shigeo Suzuki, Specific Extraction of Sialic Acid containing Glycans and Glycopeptides Using Serotonin-bonded Silica, *Anal. Sci.*, 査読有, **27** (2011) 395-400.

9. Sachio Yamamoto, Chikayo Shinohara, Eriko Fukushima, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Shigeo Suzuki, Parial filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid, *J. Chromatogr. A*, 査読有, **1218** (2011) 4772-4778.

10. Yuki Yagi, Sachio Yamamoto, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Takehiro Ohya, Shigeo Suzuki, Application of partial filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases to the characterization of oligosaccharides in therapeutic antibody, *Electrophoresis*, 査読有, **32** (2011) 2979-2985.

11. Sachio Yamamoto, Yuki Watanabe, Noriaki Nishida, Shigeo Suzuki, Simultaneous Concentration Enrichment and Electrophoretic Separation of Weak Acids on a Microchip, Using *in situ* Photopolymerized Carboxylate-type Polyacrylamide Gels as the Permselective Preconcentrator, *J. Sep. Sci.*, 査読有, **34** (2011) 2879-2884.

12. Takehiro Oyama, Masahiro Yodoshi, Ayako Yamane, Kazuaki Kakehi, Takao Hayakawa, Shigeo Suzuki, Rapid and Sensitive Analyses of Glycoprotein-derived Oligosaccharides by Liquid

Chromatography and Laser-induced Fluorometric Detection Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 査読有, **879** (2011) 2928-2934.

以下総説

13. Shigeo Suzuki, Focusing Review -Highly Sensitive Methods Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis for Quantitative Analysis of Glycoprotein Glycans, *Chromatography* 査読有, **35** (2014) 1-22.

14. Yuki Yagi, Shigeo Suzuki, Focusing Review - Characterization of oligosaccharides in therapeutic antibodies, *Chromatography*, 査読有, **34** (2013) 83-88.

15. Shigeo Suzuki, Review -Recent Development in Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis for the Analysis of Glycoprotein Glycans, *Anal. Sci.*, 査読有, **29** (2013) 1117-1128.

〔学会発表〕(計 32 件)

1. 山本佐知雄, 浅田夕紀, 長井絵里子, 鈴木茂生 (2014) マイクロチップ電気泳動と 7-amino-4-methylcoumarin を用いる糖の簡易分析法の開発薬学会第 133 年会, 横浜, 28-30, March.

2. 鈴木茂生, 吉年昌宏, 池田奈津美, 山口奈緒子, 永田真菜, 西田憲章 (2013) 過剰標識試薬除去を必要としない還元的アミノ化糖タンパク質糖鎖のキャピラリー電気泳動用新規分離モードの開発. 薬学会第 133 年会, 横浜, 28-30, March. 横浜, 28-30, March.

3. 山本佐知雄, 西田憲晃, 鈴木茂生 (2013) 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高感度標識法の開発. 薬学会第 133 年会, 横浜, 28-30, March.

4. 鈴木茂生, 吉年昌宏, 池田奈津美, 山口奈緒子, 永田真菜, 西田憲章 (2013) 過剰試薬の除去を必要としない還元的アミノ化蛍光標識糖のキャピラリー電気泳動法. 第 73 回分析化学討論会, 函館, 18-19, May.

5. 山本佐知雄, 小林正弥, 西田憲晃, 鈴木茂生 (2013) 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高感度標識法の開発. 第 73 回分析化学討論会, 函館, 18-19, May.

6. 西田憲晃, 小鍛治靖子, 堀内悠, 山本佐知雄, 鈴木茂生 (2013) 糖タンパク質 O-結合型糖鎖の化学的遊離法の比較. 第 20 回クロマトグラフィーシンポジウム, 神戸大, 5-7,

June.

7. 鈴木茂生 (2013) サラシア属植物含有スルホニウム塩類の定量に関する研究. 第 6 回サラシア属植物シンポジウム, 東京, 18, Sep.

8. 岩田智之, 山本佐知雄, 鈴木茂生 (2013) 四級アンモニウム化セルロースコーティングキャピラリーの離への応用. 第 63 回近畿支部総会, 同志社女子大, 12, Oct.

9. 宇多村尚典, 林優花, 竹田悠人, 鈴木茂生 (2013) 化学修飾型シリカナノ粒子を用いたキャピラリー電気泳動法の開発. 第 63 回近畿支部総会, 同志社女子大, 12, Oct.

10. 竹田悠人, 林優花, 宇多村尚典, 鈴木茂生 (2013) シリカナノ粒子を固定相とするキャピラリー電気クロマトグラフィー法の開発. 第 63 回近畿支部総会, 同志社女子大, 12, Oct.

他 22 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 鈴木茂生, 対象別試料分析法, 有機化合物〔糖質〕分析化学便覧 改定六版(渡會仁編集) 丸善出版

2. 鈴木茂生, 糖質分析(分担)他 試料分析講座 全 13 巻 日本分析化学会 編 丸善出版 2013 年.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/analche2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木茂生 (SUZUKI, Shigeo)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号: 154542