

マイクロチップ電気泳動におけるイオン濃度分極効果によるオンライン試料濃縮



山本 佐知雄

1 はじめに

マイクロチップ電気泳動は分析までに必要なすべての工程を数センチメートル角のマイクロチップ上で実現する micro total analysis system (μ -TAS)¹⁾の駆動力として利用されている。電気泳動をマイクロ流体チップの駆動力として用いれば、流路内における試料の輸送と分離を同時に行うことが可能となる。またマイクロチップ電気泳動では、スタッキング法や等速電気泳動法に代表される、キャピラリー電気泳動で使用されているオンライン濃縮法を適用することが可能である。さらに微細化された流路では試料や試薬、溶媒の消費量や分析に必要な時間を抑えることができ、自動化や並列化も他の分析装置に比べて容易である。しかしながらほとんどのマイクロ流体デバイスと同様に、マイクロチップ電気泳動では導入する試料量に対して検出できる試料量が少なくなってしまうため、高濃度の試料溶液が必要となる。これはマイクロ流体デバイスの応用が最も望まれている臨床現場での使用にとって大きな障害となる。この試料濃度の問題を解決するため、2000年の初頭には物理的あるいは化学的手法を応用した様々なオンライン濃縮法が考案され、マイクロチップ電気泳動の欠点であった濃度感度の問題が改善されている。初期に開発されたオンライン濃縮法はキャピラリー電気泳動の濃縮法をベースに開発されたものが多く、これに該当するものとして、高濃度の泳動液を用いて試料成分を濃縮する電場増強スタッキング法、試料成分をリーディング液とターミナル液の間に入れて濃縮する過渡的等速電気泳動法²⁾、イオン性ミセルへの分配を利用して濃縮を行う sweeping 法³⁾、オンラインでの固相抽出法などがあげられる。その後、先のオンライン濃縮法とは異なり、流路上に特殊な濃縮系を構築するマイクロチップ電気泳動に特化した濃縮法が考案された。これらはイオン濃度分極 (ion concentration polarization, ICP) あるいは perm-selective 濃縮法と呼ばれる高効率な濃縮法である。

本稿ではマイクロチップ電気泳動において、特に高効

Online Sample Preconcentration in Microchip Electrophoresis Utilizing Ion Concentration Polarization Effects.

率な濃縮を実現できる ICP について紹介する。

2 ICP 濃縮法の原理と応用

ICP または perm-selective 濃縮法は、薄膜やナノメートルサイズの間隙を使って、試料成分の電荷に応じた濃縮を行うマイクロチップ電気泳動に特化した極めて効率の高い方法である。その原理を図1に示す。ガラス製マイクロチップのように表面が負に帯電しているマイクロ流路中に陽イオン交換タイプのナノチャンネルを作製し、図1(a)のように電圧を印加すると、ナノメートルサイズの空間では壁面表面の負電荷が隙間全体に及ぶため陰イオンは電荷反発によりナノチャンネルを通過することができなくなる。一方、陽イオンはナノチャンネルを通過することができるため陰極へと泳動される。電圧を更に印加し続けると、流路内でのイオン分布の不均一性を解消するためにナノチャンネルの近傍にイオン欠乏領域が生成する (図1(b))。イオンがほとんど含まれていないこの領域では、電気伝導度が極端に低くなり電場が集中する。陰イオンは、この領域に到達すると速く電気泳動して、イオン欠乏領域との境界面外側に高効率に濃縮される。一方、ナノチャンネルの陰極側では陽イオンが大量に輸送されるためイオン欠乏領域とは対照的にイオンが大量に存在する領域が形成される (図1(c))⁴⁾。1999年に Khandurina は、ガラス製マイクロチップの分離チャンネル上に非常に細かいシリカ膜を構築して DNA の濃縮を行い、電圧を切り替えることで、その濃縮した DNA を分離した。この際に、250 秒の濃縮で約 100 倍の感度向上を達成した⁵⁾。その後、濃縮効率は飛躍的に上昇し、Wang らが精密な工作技術により作製したマイクロチップを用いて少なくとも 10^6 という濃縮効率を得

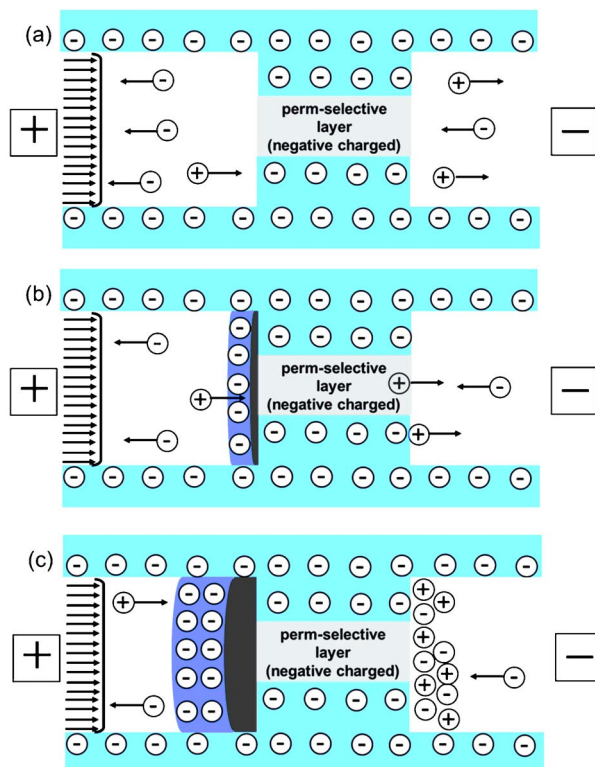


図1 ICP 効果による試料濃縮の模式図

た例などがある⁶⁾。この方法で用いたナノチャネルはチップ表面の負電荷とフォトリソグラフィとエッチング技術で作製された幅5~50 μm、深さ40 nmの均一なナノ細孔膜によるICP効果で濃縮を行っている。彼らが作製したナノ細孔膜は非常に頑丈であり、1~2時間程度連続して試料を濃縮することが可能となっており、マイクロチップに導入したすべての試料を濃縮部に集めることが可能になると考えられる。この高い濃縮効率の利用により、UV検出あるいは非接触型電気伝導度検出などを用いて目的物質の高感度検出ができる可能性があり、本手法がバイオマーカー検出、環境分析などにとって理想的なプラットフォームになると考えられる。

一般に、流路中に濃縮層を形成させるうえで、フォトリソグラフィやエッチングを行うための専用の装置や設備が用いられる。特にnmサイズの流路を作製する場合などには卓越した技術が必要となる。一方で、このナノチャネルの作製を簡便に達成するため、ICP濃縮層(荷電層)の作製にイオン性のハイドロゲルを用いて、濃縮を達成した例が報告されている⁷⁾。一般的にハイドロゲルの作製は比較的容易で、ゲルの組成となるモノマーの溶液を流路に導入し、意図する場所(濃縮位置)のモノマー溶液にpH変化や温度変化、もしくは光照射などの刺激を与えることによって局所的に溶液をゲルに変化させる。ゲルを流路に作製後は余分なゲル溶液を緩衝液で置換・洗浄し、通常マイクロチップ電気泳動が行える条件に復帰させる。微細加工技術の代わりにハイドロゲルによる濃縮層を形成することは設備や技術などを考慮すると簡便であると考えられるが、現時点では微細加工技術により作製された濃縮層に比べてハイドロゲルの濃縮効率は低く、再現性も悪い。

ICP濃縮法に関する研究は、現在でも盛んにおこなわれている。例えば、原理面では印加電圧、緩衝液のイオン強度、pHとICPの濃縮位置の関係が示され⁸⁾、実用化の面では、持ち運びの可能なバイオセンサーデバイス⁹⁾や紙製のデバイスでICP濃縮を達成した例¹⁰⁾などが報告されている。このようにICPは濃縮効率が非常に高く様々な試料の感度を向上させたとの報告がなされている。ただし、タンパク質標品や蛍光試薬に適用した例が多く、濃縮時間によるベースラインの乱れ、分離への影響も報告されている。これらの改善には現状では非常に高精細な微細加工技術が要求されるのかもしれない。しかし、この微細加工技術に代わる方法で濃縮層が簡便に構築できれば、マイクロチップ電気泳動の応用範囲をさらに広げることができる。今後、微細加工技術とハイドロゲルの長所を活かし、試料の特異的高感度検出が可能なマイクロチップの開発が期待される。

3 終わりに

微細加工技術が日々進化し、成熟期に移行するにつれて、この技術を応用したマイクロ流体デバイスが生化学、医学、薬学の分野などに、様々な用途で用いられている。これらのデバイスは従来の装置に比べて、低コスト、試料や溶媒消費量の削減、スルーputの向上、持

ち運び/移動の容易さなど様々な利点がある。特にポリジメチルシロキサンなどポリマー系チップは大量生産が可能であり、しかも壁面の均一性が高く、安価であることから、今後は臨床分析用キットとして利用される可能性が高い。一方で、マイクロ流体デバイスが、広く既存の方法の代替になるには検出感度と選択性を改善することが求められる。そのためには、目的試料に選択的な、オンライン濃縮法や検出法を指向することが有効だろう。マイクロチップ電気泳動では前述のキャピラリー電気泳動で開発されたオンライン濃縮法をマイクロチップ用に改良した方法などが報告されており、圧力流駆動のマイクロ流体チップと異なる原理での試料の特性に応じた濃縮法を選択できる可能性がある。また、ここで紹介したICP効果を利用したオンライン濃縮法では、他の濃縮法を凌駕する濃縮効率が報告されており、マイクロチップ電気泳動での劇的な濃度感度の向上が期待できる。一方で、ICP濃縮法の克服しなければならない課題も多い。通常、濃縮効率は濃縮時間に比例するが、濃縮時間が長くなる場合、サンプルの分散を抑制する手段が必要である。また、ICP濃縮法を含め、現行のオンライン濃縮法の多くは、試料マトリックス物質の干渉を受けやすく、実分析では前処理法の検討が必要である。マイクロチップシステムの開発面では、微細加工技術の向上とともに、別のアプローチからも「濃縮層」を構築できるシステムをさらに追及していくことになるだろう。

文 献

- 1) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer: *Sens. Actuators B Chem.*, **1**, 244 (1990).
- 2) M. R. Mohamad, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **79**, 3667 (2007).
- 3) K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka: *Anal. Chem.*, **80**, 1255 (2008).
- 4) L. M. Fu, H. H. Hou, P. H. Chiu, R. J. Yang: *Electrophoresis*, **39**, 289 (2018).
- 5) J. Khandurina, S. C. Jacobson, L. C. Waters, R. S. Foote, J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **71**, 1815 (1999).
- 6) Y. C. Wang, A. L. Stevens, J. Han: *Anal. Chem.*, **77**, 4293 (2005).
- 7) R. Dhopeswarkar, L. Sun, R. M. Crooks: *Lab. Chip*, **5**, 1148 (2005).
- 8) R. Kwak, J. Y. Kang, T. S. Kim: *Anal. Chem.*, **88**, 988 (2016).
- 9) Y. J. Fan, M. Z. Huang, Y. C. Hsiao, Y. W. Huang, C. Z. Deng, C. Yeh, R. A. Husain, Z. H. Lin: *Nano Energy*, **69**, 104407 (2020).
- 10) X. Li, L. Luo, R. M. Crooks: *Anal. Chem.*, **89**, 4294 (2017).



山本佐知雄 (Sachio YAMAMOTO)
 近畿大学薬学部創薬科学科 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江3-4-1)。近畿大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。博士(薬学)。<現在の研究テーマ>高機能化マイクロチップ電気泳動システムを用いるタンパク質翻訳後修飾の網羅的解析。<趣味>家事、育児。
 E-mail: yamamoto@phar.kindai.ac.jp