

分析化学総説

マイクロチップ電気泳動における高感度検出法

北川 文彦^{®1}, 大塚 浩二¹

Highly Sensitive Detection Methods in Microchip Electrophoresis

Fumihiko KITAGAWA¹ and Koji OTSUKA¹¹ Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 615-8510

(Received 29 June 2005, Accepted 27 July 2005)

Microchip electrophoresis (MCE) can achieve faster analysis with small sample volumes. However, the concentration sensitivity is generally insufficient due to the small sample mass injected and the detection volume. To improve the detection sensitivity limitations of MCE, several detection schemes for high sensitivity and/or high performance have been introduced. In the early stage of developing MCE, laser-induced fluorescence (LIF) spectrometry was mainly employed as a detection scheme. Recently, other detection methods, *e.g.*, UV absorption, electrochemical detection, conductometry, mass spectrometry and so forth, have been introduced in MCE. In the present article, the principles and features of the detection schemes applied to MCE are presented and the advantages of these methods are reviewed based on recent papers.

Keywords : microchip electrophoresis; laser-induced fluorescence spectrometry; electrochemical detection; mass spectrometry.

1 はじめに

1990年に微小統合化学分析システム (micro total analysis system, μ -TAS) の概念が提唱されて以来¹⁾²⁾, 微小な基板上における分析技術及びその集積化技術は著しい発展を遂げている. 数 cm 角のガラス基板上に作製した微細な流路 (マイクロチャンネル) の中でキャピラリー電気泳動 (CE) の原理に基づく分離を行うマイクロチップ電気泳動 (MCE) は, 1992年に Manz らによって最初に報告され^{3)~5)}, μ -TAS における重要な分離技術として認知されるようになった. MCE は, 従来の CE が有する特徴である微量分析, 高分離能に加え, 分析の高速化 (数秒~数十秒) やチャンネルの並列化⁶⁾⁷⁾による分析のハイスループット化などの利点を兼ね備えており, 特にバイオ関連の分析に重要な役割を果たすことが期待されている^{8)~24)}. 最も一般的な MCE 分析においては, クロス型のチャンネルパターン

を有するマイクロチップに対して泳動液を満たし, 試料を分離チャンネルに導入後, 分離流路の終点近傍で試料成分の検出を行う. 基本的には CE の検出法をそのまま MCE に転用することが可能であり, 高感度なレーザー励起蛍光 (LIF) 法が最も一般的な検出法として用いられてきたが, タンパク質のアミノ酸配列や相互作用の解析, 糖鎖構造の解析などにおいては質量分析の導入が求められており, MCE との結合が急務である. また, 電気化学検出は高感度かつ装置の小型化が容易な検出法として, MCE への導入が検討されている. 本稿では MCE における特徴的な検出技術及びその発展について, 最近の成果を中心に紹介する.

2 光を利用した検出法

MCE のような微小領域における検出を行う際には, 非接触での分析が可能な光学的な検出法を適用することが最も容易である. CE においても利用されてきた蛍光・紫外 (UV) 吸収・化学発光に基づく検出法を利用した MCE デ

¹ 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻: 615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂

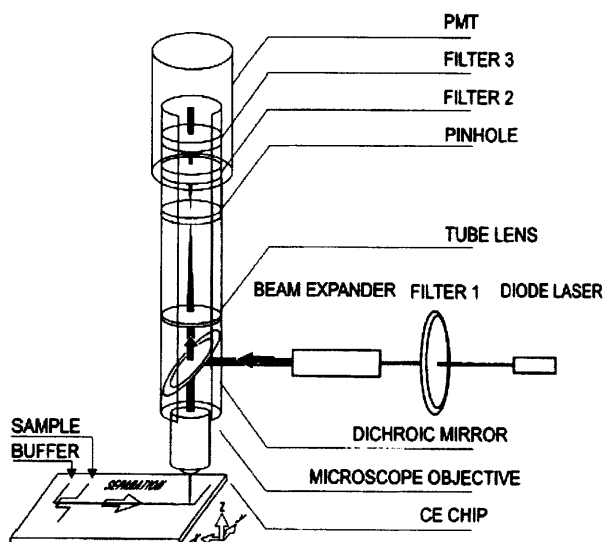


Fig. 1 Confocal epifluorescence setup for MCE-LIF detection

Reprinted with permission from *Biosens. Bioelec.*, **14**, 861~869 (2000). Copyright 2000 Elsevier B.V.

バイスの開発が多く報告されている。

2.1 LIF 及び蛍光検出

LIF は最も高感度な検出法であり、MCE の研究、開発における有力な検出法として初期の段階から利用されてきた^{3)~5)}。基本的にはレーザーと蛍光検出器があれば高感度な測定ができる手法であり、励起光源には、He-Ne レーザー、Ar イオンレーザー、半導体レーザー、発光ダイオード (LED) などが、検出には光電子増倍管、CCD カメラ、フォトダイオードアレイなどが使用されている。最近ではイメージ・インテンシファイア内蔵の CCD カメラなどによる高感度な蛍光画像測定も容易に行われるようになった²⁵⁾²⁶⁾。より高感度な測定が要求される場合には、共焦点型蛍光顕微鏡を組み合わせることが多い (Fig. 1)²⁷⁾²⁸⁾。最も基本的な光学配置においては、レーザーを顕微鏡の光軸に対して同軸に導入し、励起光を反射し蛍光を透過するようなダイクロイックミラーを通して対物レンズへ導く。対物レンズとしては開口数 (NA) 0.5~1.0、 $\times 10 \sim 40$ 程度のものが利用されている。チャンネル内の試料からの蛍光は同じ対物レンズにより集光し、ダイクロイックミラー及びピンホールを通過して検出器へと導かれる。このピンホールのサイズにより空間分解能が決定され、サイズが小さすぎると十分な検出体積が得られず、大きすぎるとチャンネル以外の部分からのバックグラウンドノイズの影響が大きくなるため、最適ピンホールサイズの設定が重要となる。ピンホールサイズのほかに、ダイクロイックミラーの種類、レーザーのスポットサイズや焦点

位置を最適化することにより、nM~pM の蛍光性試料を検出することが可能となる。なお、最近では励起光源を 10 mW 程度の半導体レーザーとした場合でも、フルオレセイン、ローダミン、シアニン誘導体などの蛍光量子収率の高い試料であれば、この程度の検出限界は容易に得ることができる。一方、MCE における検出部の小型化を目指し、LED を光源とした蛍光検出法の開発が進んでいる。例えば、フルオレセイン誘導体化した糖類の MCE 分析においては、LED 光源を用いることにより ~1 nM の検出限界が得られている²⁹⁾。また、ポリマー製チップに対して LED と光ファイバーを直接埋め込むことで、励起光照射面及び検出窓とチャンネルとの距離を最小限にし、光の損失を抑制することで、高感度かつ検出部も小型化された MCE チップも開発されている³⁰⁾³¹⁾。

LIF の性能を更に高めるために、複数回の試料導入や複数位置での検出を行い、結果を数学的に解析することで S/N 比を改善するアプローチが幾つか報告されている。Fister らは相互相関解析法を利用した手法による S/N 比の向上について検討を行っている³²⁾。相互相関解析においては、試料導入の有無をランダムに n 回繰り返すことにより得られたフェログラムの相互相関を解析することで、理論的には $n = 7$ であれば S/N 比は 5.6 倍向上することが期待される。この手法は、以前から高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や CE において検討がなされてきたが、1 回の分析に ~10 分の時間を要するため、これを ~10 回にわたり繰り返す同手法の適用はデメリットのほうが大きい。これに対し、MCE では 1 回の分析に ~10 秒しか時間を要さないことから、10 分以内の分析で十分な感度向上が得られる。実際に 1 回注入による分析では全くピークが観測されなかった試料に対し、試料注入時間 0.25 秒で相互相関解析に基づく 7 bit のランダム注入を行うと、明瞭なピークが観測されるようになった。12 回の連続測定により更なる S/N 比の向上が達成されており、7 分という比較的短い分析時間で S/N 比の向上に成功している。また、同様の多重注入を利用した手法として、アダマール変換法に基づく LIF 検出の高感度化が報告されている。アダマール変換法は $n \times n$ の正方行列の擬似ランダムコード (アダマールコード) に従って、繰り返し注入を行い、得られた結果 (蛍光強度) を逆アダマール変換することによって、S/N 比の高いエレクトロフェログラムが得られる手法である。Hata らはダイオードレーザーを光源とした LIF 検出に対し、アダマール変換を適用し高感度化を図っており、 255×255 のアダマールコードに基づいた多重注入により S/N 比を 8 倍向上させることに成功している³³⁾。一方、シャー (くし形) 関数に基づいた多点検出による S/N 比の向上についても報告がなされている³⁴⁾。長さ 66 mm の分離チャンネルに対し 1 mm おきに 300 μm 幅

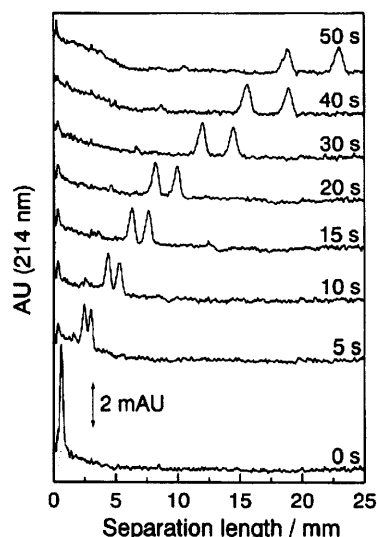


Fig. 2 Separation length-based electropherograms obtained by entire separation channel detection in the analysis of 1-aminoindan racemic mixture

Reprinted with permission from *Anal. Sci.*, **21**, 61~65 (2005). Copyright 2005 The Japan Society for Analytical Chemistry.

の光学スリットを55箇所設けたチップを作製し、分離チャンネル全体にレーザー光を照射してチャンネル全体からの蛍光を検出することで、くし形波形のフェログラムが得られる。これをフーリエ変換し、 x 軸を周波数としたフェログラムとすることで、目的の試料を単一のピークとして検出することに成功している。前述の方法では、複数回の分析を要するので分析時間が長くなってしまふのに対し、この手法では1回の分析で済むため分析時間を大幅に短縮できる。更にこの手法の利点は、目的のピークがベースラインの変動やラインノイズなどの妨害を受けないことであり、多成分試料の分離検出にも適用可能である。また、得られるピーク周波数は試料の泳動速度に対応するため、微粒子の泳動速度測定にも応用されている。これらの数学的な解析による感度向上のアプローチはLIFのみならず他の検出法への応用が可能であり、特に感度は低いものの試料の適用範囲が広い紫外-可視吸光検出などへの適用が期待される。

2・2 紫外・可視吸光 (UV-VIS) 検出

MCEにおけるUV検出は、光路長が短いために十分な感度が得られないことや、マイクロチップ基板の材質（ポリマー、パイレックスガラスなど）によっては紫外域の波長を利用できないなどの問題点がある。しかしながら、CEにおいて最も一般的な検出法であるUV検出は、誘導体化等の操作を必要とせず大部分の試料の検出が可能であるため、その利用価値は高い。1990年代にはMCEに

UV検出を適用した報告はほとんどなされていなかったが、2000年にUV検出によるマイクロチップ電気泳動装置が市販された³⁵⁾³⁶⁾。同装置ではリニアフォトダイオードアレイ検出器により、分離流路全体におけるUV吸収を測定できることが特徴である。また、光学スリットを組み込んだ石英チップを使用することにより、検出感度の向上が図られている。実際に分離流路にポリアクリルアミドゲルを充填したチップ上において、DNAのゲル電気泳動分離が行われた例が報告されている³⁶⁾³⁷⁾。吸光度による定量測定が可能であるため、スラブゲル電気泳動と同様の分離結果をUV吸収測定により定量化し、マーカーとの比較により分子量に関する情報を得ることができる。また、同装置を利用することにより、ゾーン電気泳動モードによる単糖類³⁸⁾、炭水化物³⁹⁾⁴⁰⁾、代謝物⁴¹⁾の分離やシクロデキストリン動電クロマトグラフィー (CDEKC) モードによる光学異性体⁴²⁾⁴³⁾や神経伝達物質⁴⁴⁾の分離が1分以内に達成された例が報告されている。

著者らはCDEKCによる光学異性体分離について、UVリニアイメージング検出器を用いて検討を行っている (Fig. 2)⁴⁴⁾。試料としてはアルツハイマー病やパーキンソン病の特効薬の基本骨格を成す1-アミノインダン、キラルセクターとしては硫酸化- β -シクロデキストリンを用い、キラル分離の過程をその場観測した。Fig. 2は通常のエレクトロフェログラムと異なり、横軸が分離流路の検出位置に対応しており、0秒に導入された試料が5秒後には既に分離し始め、15秒後にはベースライン分離する様子が観測されている。分離流路の終点に到達するころには分離度は3.4に達し、効率のよいキラル分離が達成されている。通常のCEにおけるCDEKCではキラルセクターの濃度を高くしすぎると、検出時間が遅くなりピーク広がりをもたらしてしまうため、キラルセクターの濃度を極力抑える必要があった。これに対し、UVリニアイメージング検出によるMCE分析では、キラルセクターの濃度を高くするとより短い分離長で分離が達成される場合が多く、分析時間の短縮化にもつながるため、非常に有効な手法である。実際にFig. 2の例では、従来の分離流路の終端における1点検出では泳動時間が52秒であったのに対し、リニアイメージング検出を用いることにより分析時間を14秒までに短縮化することができる。ただし、試料とキラルセクターの組み合わせによっては、セクター濃度が高くなりすぎると異性体間の電気泳動速度差が減少し、分離能が低下する場合があるので注意が必要である。

2・3 化学発光 (CL) 検出

CLは、化学反応（酸化・還元反応など）により生じた励起種が、発光を伴って基底状態へと失活する現象で、試料と化学発光試薬を混合するだけで強い発光が観測され

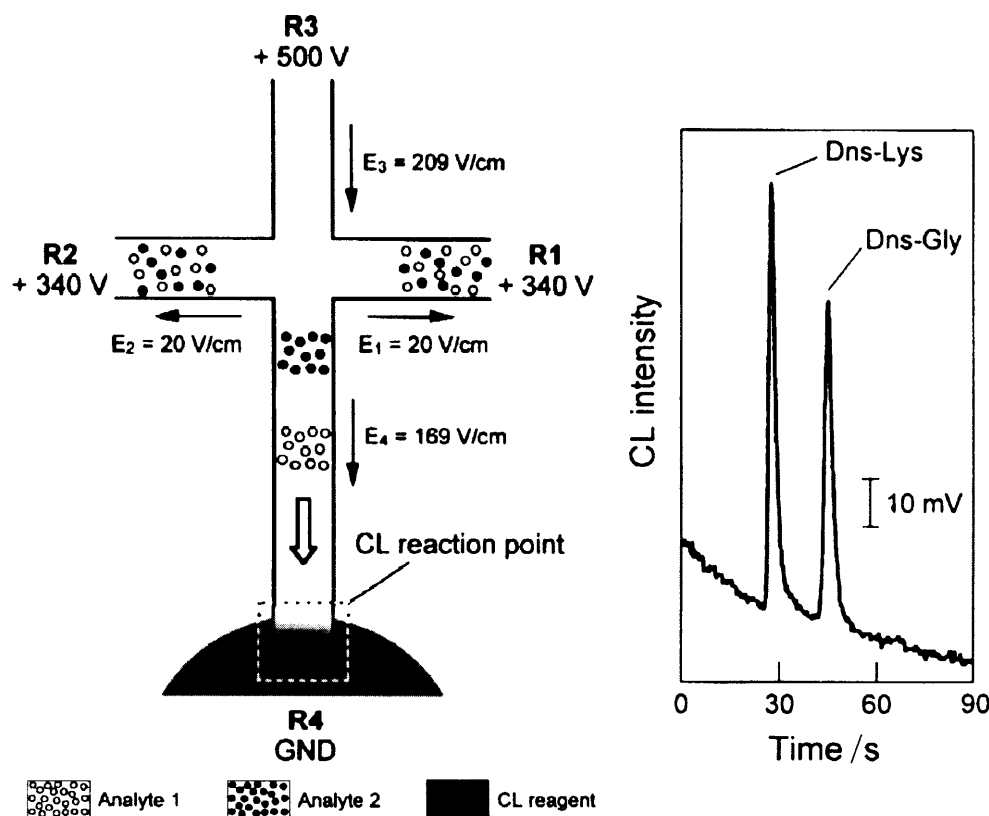


Fig. 3 Schematic layout and separation of dansyl-lysine and -glycine in MCE-CL analysis

Reprinted with permission from *J. Chromatogr. A*, **867**, 271 ~ 279 (2000). Copyright 2000 Elsevier B.V.

る。したがって、励起光源（レーザーなど）は必要なく、光電子増倍管などの光検出器のみで高感度検出が可能となるため、装置の小型化が容易であるという特徴を有している。MCEにおけるCL検出においては、分離した試料と化学発光試薬との混合及びそれに伴うデッドボリュームが分離能及び検出感度に大きく影響を及ぼす。

Harrisonらはガラス基板上にMCE分離用のチャンネルとCL反応槽を集積化したデバイスを作製し、マウス免疫グロブリンG (IgG) の分析への適用について検討を行っている⁴⁵⁾。CL反応槽の底面をアルミニウムでコーティングすることで発光の捕捉率を高めているのが特徴で、フルオレセインを結合した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) によるCLをモデル反応としてデバイスの評価を行ったところ、チャンネル深さが10 μm のチップでは検出限界 (LOD) は35 nMであったのに対し、40 μm 深さのデバイスではLODは7 nMまでに向上した。更にHRPを触媒としたルミノールのCLによるIgG分析に適用したところ、0~60 ppmの範囲で直線関係が得られている。

また、市販の石英製クロス型マイクロチップをCL検出に適用した例も報告されている (Fig. 3)⁴⁶⁾。Tsukagoshiらはダンシル化アミノ酸の分析において、過シュウ酸エステルによるCL検出を適用している。CL試薬を分離流路

終端の液だめに満たしておき、特別な混合装置等を用いずに10 μM のLODを達成している。しかしながら、この手法ではCL検出部の液だめに泳動液が流入するため、連続測定には不向きであると考えられ、実際に5回以上の分析を行った際にはピーク高さの減少が観測されている。更に同様のチップを用いて、イムノアッセイによる腫瘍マーカーの検出に用いた例も報告されている⁴⁷⁾。イソルミノールを結合した免疫抑制酸性タンパク質 (IAP) を試料とし、試料液だめに抗IAPを表面に固定化したガラスビーズを満たし、ビーズ表面で競合的イムノアッセイを行った試料を分離流路に導入することで選択的検出を達成している。IAPの直線定量範囲は0.1 μM から5 μM であり、コントロール血清中のIAPの濃度を3%以下の誤差範囲で決定することに成功している。

様々な流路パターンのポリジメチルシロキサン (PDMS) チップにおけるCL検出を金属イオンやアミノ酸の光学異性体分離に適用した例が報告されている⁴⁸⁾。Liuらは試料とCL試薬の混合法がLODや分析の再現性に及ぼす影響を詳細に検討し、V字型の混合流路を用いた場合に最も高いピーク強度が得られることを見いだした。ダンシル化グリシンのLODは0.39 μM であり、再現性も相対標準偏差5%以内に抑えることが可能であった。更にダンシル化フ

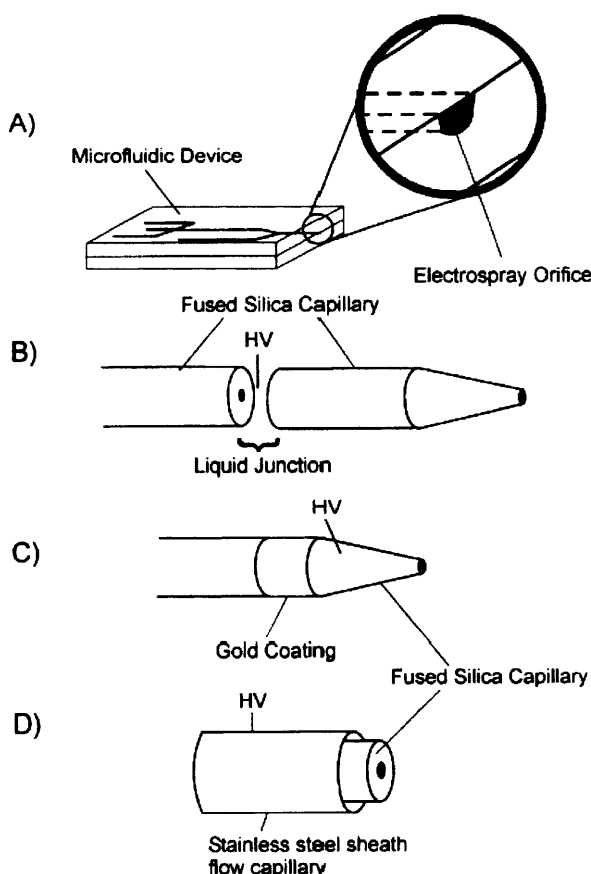


Fig. 4 Schematic diagram of different electrospray interfaces that have been developed for chip-ESI-MS: (A) spraying directly from an exposed channel at the edge of a chip; (B) liquid junction capillary interface; (C) gold-coated capillary interface; and (D) coaxial sheath flow configuration

HV denotes points to which the electrospray voltage is applied. Reprinted with permission from *Trends Anal. Chem.*, 19, 379~388 (2000). Copyright 2000 Elsevier B.V.

エニルアラニンの光学異性体分離についても検討を行っているが、分離長 30 mm で分離度は 0.8 程度であり、混合の際に生じるデッドボリュームが分離能の低下を招いている可能性がある。

3 質量分析法 (MS)

MCE と MS 検出をオンラインで結合した MCE-MS は、MCE の微量の試料を高速分析できる特徴と MS の試料の構造情報が得られる特徴を併せ持った分析法であり、特に生体関連物質 (代謝物、ペプチド、タンパク質、糖鎖など) の分析に有用な手段である。また、MS は一般に高感度な分析法であり、CE-MS においては $\sim \text{amol}$ ($\sim \text{nM}$) レベルの検出限界が達成されている。MCE-MS においては、四重極型質量分析計、飛行時間型 (TOF) 質量分析計、四重極イオントラップ型質量分析計などが検出器として利

用されているが、MCE によりチャンネル内で分離した試料を効率よくイオン化し、MS 検出器に導入するインターフェースの開発が重要な課題である。MCE-MS のインターフェースとしては、HPLC や CE-MS で一般的に使用されているエレクトロスプレーイオン化 (ESI) に基づいた例が多い。CE-MS においては ESI のみならず、大気圧化学イオン化やマトリックス支援レーザー脱離イオン化の適用が報告されているが、ESI は装置構成が単純であり、ESI 電圧を印加する電極を電気泳動用の電極としても利用できるため、MCE への適用が容易であるという利点を有している⁴⁹⁾⁵⁰⁾。

3.1 開口型 ESI インターフェース

MCE-MS インターフェースのプロトタイプとして、複数のチャンネルを有するガラス製チップとエレクトロスプレー型の MS 検出器を直接結合したインターフェースが Karger らによって最初に報告されている⁵¹⁾。このチップは 9 本のチャンネル (幅 $60 \mu\text{m}$ 、深さ $25 \mu\text{m}$) が 6 mm 間隔で作製されており、チャンネル上流部に泳動液だめ及び試料溶液だめが、チャンネル下流部のチップ端面に MS への導入口となる開口部が設けられている。なお、チップ端面にはシラン剤による疎水処理が施されており、出口側のチャンネル間での試料の混入を防いでいる。このチップにおいて、試料だめに対し 4.2 kV の ESI 電圧を印加しただけでは、チップ端面において溶液が液滴とならず、MS 検出は達成されない。そこで、シリンジポンプによりインレット側から溶液を注入しながら、分析を行ったところ、アウトレット側のチップ端面に微小な液滴が形成し、ESI-MS 検出が達成されている。このインターフェースにより 60 nM のミオグロビンの検出に成功しており、MS スペクトルの解析から得られる分子量も 0.02% 程度の誤差範囲という十分な定性能力を示している。また、Ramsey らはクロス型のチャンネルパターンに分離流路の終端から 4 mm の位置にサイドチャンネルを設けたガラスチップを作製し、チップ端面に開口部を設け MS へのインターフェースとしている (Fig. 4A)⁵²⁾。このチップにおいては、サイドアーム終端の液だめに ESI 電圧を印加し、電気浸透流 (EOF) により開口部へ試料を導いている。この際、未修飾のチャンネルを用いた場合には、サイドアームへと全試料が流れ込むため MS 検出は達成されないが、サイドアーム部をポリアクリルアミド修飾して EOF を抑制することで、開口部へと試料が導かれるようになり、ESI-MS による 4 級アンモニウムイオンの検出に成功している。しかしながら、いずれのインターフェースにおいても試料の分離は達成されていない。安定な ESI を達成したとは言いがたい。これはチップ開口部に形成される液滴が比較的大きく、EOF ではスプレーするのに十分な流量が得られないことが要因とな

っている。また、大きな液滴部分がデッドボリュームとなり、ピーク広がりが生じる点も指摘されている。そこで CE-MS のインターフェースと同様にネブライザーガスの導入により安定な ESI を目指した例なども報告されているが⁵³⁾、ESI 用のエレクトロスプレーチップを開口部に接続する手法が検討されている。

3・2 ESI チップ接続型インターフェース

エレクトロスプレーチップのマイクロチャンネルへの接続においては、先細キャピラリーを接続し液絡を介して ESI 電圧を印加するインターフェース (Fig. 4B)⁵⁴⁾⁵⁵⁾、導電性材料をコーティングした先細キャピラリーを接続しスプレーチップに直接 ESI 電圧を印加するインターフェース (Fig. 4C)^{56)~58)}、シース液及びネブライザーガスをフローするインターフェース (Fig. 4D)^{59)~63)} などが報告されている。先細キャピラリーは、内径 50 μm のキャピラリーの先端を 10 μm 程度まで細くしたものが使われている。先細キャピラリーをチップ端面に接続しスプレーチップとして利用する手法の利点としては、前述の開口部から直接スプレーする方法よりも小さな液滴ができるため、イオン化効率すなわち検出感度や分離能が向上する点や、チップ先端に印加する電圧を液絡や金属コーティングを通して制御できる点が挙げられる。また、先細のスプレーチップを使用する場合には、ほこりや結晶・沈殿などによる詰まりが問題となることがあるため、スプレーを交換することが可能なインターフェースはコストの面からも優れている。

先端内径 10 μm ほどの先細フューズドシリカキャピラリーを ESI チップとして石英製マイクロチップ端面に接続し、液絡を介して ESI 電圧を印加するインターフェースが開発されている⁵⁴⁾⁵⁵⁾。このインターフェースにおいては、キャピラリーの接続口の底面を平面加工し、デッドボリュームを最小限にすることにより、ピーク広がりや抑制を試みがなされた。実際に従来の加工法で作製した底面が完全な平面ではないマイクロチップを用いた場合には、4 nl のデッドボリュームが生じ、標準試料の理論段数も 900 であったのに対し、平面加工を施した場合には理論段数は 2600 まで向上することが確認されている。更にインターフェースの直前における蛍光検出で得られるピークの理論段数とインターフェースを経由した MS 検出における理論段数の比較から、分離長が分離効率に与える影響について検討がなされており、短い分離流路 (22.9 mm) のチップではピークの広がり方が理論式の予測よりも大きいことが明らかとなった。これは、MS 検出部の陰圧の影響により、流れが層流になっていることに起因するものと考えられ、長い分離流路 (58.9 mm) のチップを用いると、陰圧の効果は軽減されることが分かった。この分離長の長いチップを用いて、アミノ酸、ペプチドやタンパク質のトリプシン

消化物の分析について検討が行われており、アミノ酸の分離については 75 秒以内に 20 種すべての検出に成功し、ペプチドの分析では理論段数は最大で 8600 と良好な分離を達成している。

導電性コーティングを施した先細キャピラリーをチップの端面に接続し、キャピラリー先端に直接 ESI 電圧を印加するインターフェースについては、Harrison らが金コーティングしたエレクトロスプレーチップを用い、TOF-MS により検出を行った例を報告している⁵⁶⁾⁵⁷⁾。分離流路の終点近傍でサイドチャンネルからシリンジポンプにより内部標準溶液を送液し合流させた後、ESI スプレーチップに試料を導いている。この送液が流量不足を補うため、安定な ESI が達成され、また内部標準の導入により、より正確な定量分析が可能となっている。また、チップ上において 2 種類の濃縮法を組み合わせることによる高感度化について検討しており、スタッキングによるオンライン試料濃縮の適用では 0.3 nM の、疎水性膜を利用した固相抽出の適用では 1.8 nM のペプチドの検出に成功している。しかしながら、このタイプのインターフェースでは金コーティングナノスプレーの寿命が短いなどの欠点も指摘されている。そこで Dahlin らは、表面にグラファイトを固定化したポリマー製 ESI チップの作製について検討を行っている⁵⁸⁾。作製した ESI チップの寿命は 180 時間以上であり、ペプチドの分析においても 2 分以内に良好な MCE 分離・MS 検出を達成している。

CE-MS において一般的なシースフローとネブライザーガスを利用した ESI インターフェースを MCE 用に改良して用いた例が報告されている^{59)~63)}。Henion らは二重構造のチューブと T 型のアダプターを組み合わせた液絡型 ESI インターフェースを開発した。このインターフェースにおいては、分離溶液をマイクロチップの端面に接続した細いチューブに導き、その周りを覆うステンレスチューブを経てシース液を合流させることで流量不足を補っており、更にインターフェースの終端でネブライザーガスを導入することで安定な ESI を達成している^{60)~63)}。シース液を用いることで試料の希釈が生じるが、分離用のマイクロチップにおいて試料導入部のチャンネルをダブル T 型として試料体積を大きくすることで感度の低下を補っている。このインターフェースを用いた MCE-MS 分析においては、4 種のカルニチン類の分離を 48 秒で達成し、その検出限界は 10 ppm と報告されている。

3・3 減圧型インターフェース

Karger らは MS 検出器のイオン化室とエレクトロスプレーチップの間にクロス型のジョイントを接続したインターフェースについて報告している (Fig. 5)⁶⁴⁾⁶⁵⁾。クロス型ジョイントに圧力計とガスリストリクターを接続し、ジョ

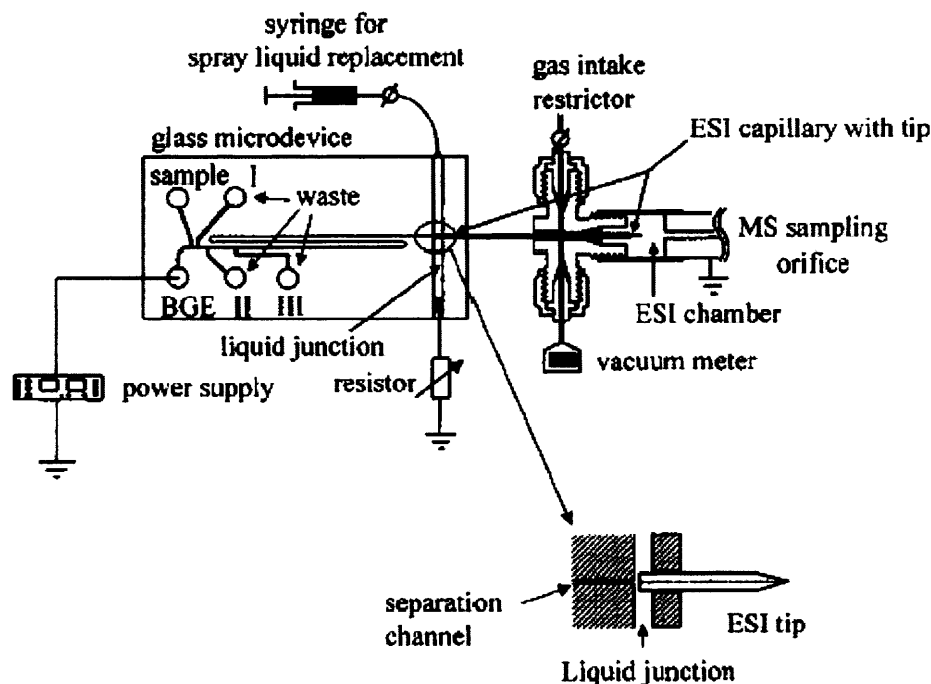


Fig. 5 Diagram of the microchip device with a subatmospheric electrospray interface

Reprinted with permission from *Anal. Chem.*, **72**, 1015–1022 (2000). Copyright 2000 American Chemical Society.

イント内の圧力を一定 (78 kPa) の減圧状態に保つことで、100 nl/min の流量でシース液を引き込むことができるため、流量不足を補い安定なイオン化を達成している。12 種のペプチド混合試料の分析においては、最大 31000 の理論段数でピークが検出され、CE-MS とほぼ同程度の分離性能であったことから、インターフェース部におけるバンド広がり等の影響は最小限であると結論している。なお、ウシ血清アルブミン (BSA) のトリプシン消化物の分析においても、最大理論段数 40000 で 10 本のピークを検出、データベース検索による構造の同定に成功し、検出限界 $\sim 10^{-7}$ M が達成されている。一方、MCE においては電気的に試料を導入することが多く、試料溶液の組成が変化してしまうことが問題として指摘されているが、彼らは圧力による試料導入についても検討を行い、従来の電気的注入法と同等の分離性能を得ることに成功している。

同様の ESI インターフェースを利用した MCE-MS 分析の自動化についても検討されている。96 穴のマイクロウェルプレート中の試料をオートサンプラーにより採取し、圧力注入により分離チャンネルへ導入後、電気泳動分離した試料を減圧型 ESI インターフェースにより MS 検出器へ導くシステムが開発されている⁶⁶⁾。この MCE-MS システムにおいて、チトクロム c のトリプシン消化物を分析したところ、全体の 97% のアミノ酸配列を MS スペクトルから読み出すことができた。また、開発されたシステムにおいては、試料導入のみならず、チップの洗浄もオートメシ

ョン化されており、ハイスループット分析への展開が期待される。

4 電極を利用した検出法

マイクロチップ上に電極を作製し、電気化学反応に伴う電流変化、電気化学活性種との反応による発光や電気伝導度変化を検出する手法は、微小電極の加工技術の進展とともに MCE の検出法として広く利用されるようになった。電気化学反応を誘起する際には、電気泳動分離用の電圧と検出用電極の電圧との分離が重要な因子となるが、このような MCE における特有の問題の解決法を中心に電極を利用した検出法を概観する。

4.1 電気化学検出

電気化学検出は試料の誘導体化を必要とせず、測定対象によっては LIF 検出に匹敵する検出感度が得られる。一方で、酸化還元されやすい試料に測定対象が限定されることが問題となるが、分光測定に比べて装置の小型化が容易であるという利点を有している⁶⁷⁾。マイクロチャンネル内に 3~4 本の微小電極 (作用電極, 参照電極, 対電極) を配置し、アンペロメトリー^{68)~72)}やボルタンメトリー⁷³⁾⁷⁴⁾による検出が行われている。アンペロメトリーは MCE への適用が最も多く研究されてきており、作用電極に一定電圧を印加した際の電流値をモニターする手法である。印加電圧が試料の酸化還元電位よりも十分に大きければ (>180

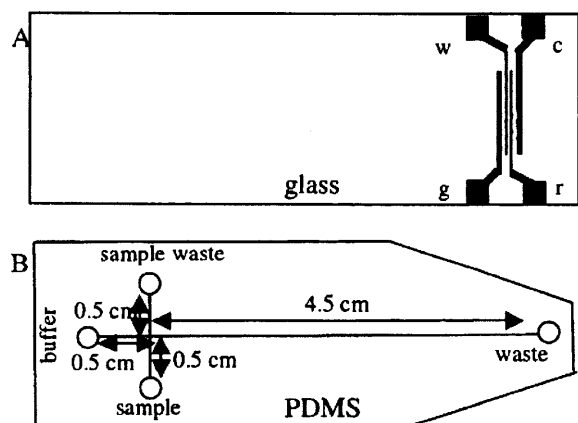


Fig. 6 Top view of a microchip used for capillary electrophoresis with electrochemical detection

(A) Electrode layout on glass and (B) the injection and separation channel made from PDMS: (c) counter electrode, (g) ground electrode, (r) reference electrode, and (w) working electrode. Reprinted with permission from *Anal. Chem.*, **75**, 947–952 (2003). Copyright 2003 American Chemical Society.

mV), エレクトロフェログラム上のピーク面積は試料の酸化還元に伴う電気量に比例するため, 検出したモル数を直接測定することができる。また, バックグラウンドレベルが他の電気化学検出法よりも低く, 印加電圧の設定により対象とする試料のピークのみを検出することが可能になるなどの利点を有している。電極材料としてはカーボンインク⁷⁵⁾, グラッシーカーボン⁷⁶⁾, 金^{77)~79)}, 白金⁸⁰⁾, 銅⁷⁸⁾, パラジウム⁸¹⁾, ダイヤモンド⁸²⁾などが利用されている。

貴金属 (金, 白金等) 微小電極は, 市販の金属細線をポリマー製マイクロチップに埋め込む方法⁸³⁾で容易に作製することができることから, MCE における電気化学検出の研究初期から頻繁に利用されてきた。これらの貴金属電極を用いることにより, カテコール類⁷⁸⁾, 神経伝達物質⁷⁹⁾, 炭水化物⁸⁰⁾などの検出が達成されている。また, 蒸着やスパッタなどによりチップ基板一面に金属を固定化した後, フォトリソグラフィにより任意の電極パターンを作製することもできるため, 様々な機能の電極を集積化したマイクロチップへの応用が期待される。一方, カーボン電極は過電圧及びバックグラウンドノイズが低く, 酸化側の電位窓が広いなどの利点を有しており, カテコール類⁸⁴⁾, アスコルビン酸類⁸⁵⁾, アミノ酸⁸⁶⁾, フェノール類⁷⁵⁾, ニトロ化合物⁸⁶⁾などの検出に応用されている。また, カーボン材料の特徴として, ペーストやインクのような形状として市販されているため, 加工が容易であることが挙げられる。カーボンインクを利用した加工法として, 任意のパターンのチャンネルを作製した PDMS チップを基板にはり付け, チャンネルにカーボンインクを満たしてから加熱することによ

り, カーボン微小電極を基板上に作製する方法が報告されている⁸⁵⁾。また, コンタクトプリンティング⁸⁷⁾のような簡易な微細加工技術を適用することもできるため, 使い勝手のよい電極材料であるといえる。しかしながら, カーボン電極は貴金属電極に比して電子移動速度が遅いことが知られており, 電極表面での反応が律速となるような試料では感度が低下する恐れがある。

MCE において電気化学検出を適用する際には, 電気泳動を行うための電圧と電気化学検出のための電圧を分離する必要がある。そこで, 検出用電極の配置について様々な報告がなされてきた。最もよく使われる電極配置としては, 分離流路の直後に電極を作製するもので, チャンネル出口から数十 μm ほど離れた位置で検出を行うことで, 検出用電圧と泳動用電圧とをほぼ分離することができる^{88)~91)}。しかしながら, 分離された成分のゾーンが広がってしまい感度・分離能ともに低下してしまうことや, 泳動用の電圧の影響により検出用電圧が設定値から大きくずれてしまうことなどが問題となる。この問題を解決するため, 分離チャンネルの終端部に 2 本のサイドチャンネルが合流するチップにおいて, 分離された試料バンドをサイドチャンネルからのシースフローにより強制的に検出用電極へ到達させることで検出感度を高める試みがなされている⁹¹⁾。Ertl らの作製した検出デバイスでは, シースフローにより 10 倍ほどの感度向上を達成し, 分離能も大きく向上した。一方, 分離流路内にデカップラーとなる電極と検出用電極を配置したデバイスにより, バンド広がりを低減させる試みも行われている (Fig. 6)^{81)92)~94)}。デカップラー電極を泳動用電圧のグラウンドとすることで直後に配置された検出用電極の電圧との分離を図り, 直前までの EOF により試料が押し出されるようにして電極上へ運ばれることで, 電気化学検出を可能にしている。Wu らの作製した MCE デバイスでは, 白金電極をデカップラーとして用いることでバックグラウンドを 0.05 pA 以下までに抑制し, $\sim 100 \text{ nM}$ のドーパミンの検出に成功している⁹³⁾。

4・2 電気化学発光 (ECL) 検出

ECL 検出は, 電極上で酸化還元されて生成する化学種と ECL 試薬との反応により生じる励起状態からの発光を検出する方法である。ルテニウム錯体 $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{2+}$ を ECL 試薬, アミン類を試料とした例では, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を電極上で還元して生成した $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ とアミン類が反応してアミンラジカルが生成する。再び $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ はアミンラジカルと反応して励起状態の $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を生成するため, 発光を伴って基底状態へと失活する⁹⁵⁾。分離流路終端の ECL 用電極を備えた液だめにこのような ECL 試薬を満たしておき, 分離した試料が液だめに到達したときの発光を光電子増倍管などにより検出する。CE においてはブ

ロリン, ヒスチジンなどのアミノ酸⁹⁶⁾⁹⁷⁾やリドカインのような塩基性薬物⁹⁸⁾の検出に応用されている。

酸化インジウムスズ (ITO) 微小電極を作製したガラス基板上と電気泳動用のチャンネルを作製した PDMS 基板をはり合わせた簡易な MCE デバイスにおいて, プロリンの ECL 検出を行った例が報告されている⁹⁹⁾。このデバイスにおいては, 1 μM のプロリンを検出することが可能であるが, 理論段数がおおよそ 5000 とピーク幅が非常に広がっており, 分離流路出口から電極に到達する間の拡散の影響が大きいものと考えられる。一方, Manz らは MCE により分離したルテニウム錯体の ECL 検出について検討している¹⁰⁰⁾。彼らが作製したデバイスは, 電気泳動用の高電場が印加された溶液中に U 字型の金属線を浸すと, 金属線の両端が陽極及び陰極として働くことを利用しており, 電気化学検出の項で述べたような泳動用電圧と検出用電圧の分離を行う必要がない点が特徴である。このデバイスにおけるルテニウム錯体の検出限界は 5 μM であり, 更には間接法によるアミノ酸分析も検討されているが, この例においてもピーク幅が広く, 検出部の更なる改良が必要であると考えられる。

4.3 電気伝導度検出

MCE における検出法としての電気伝導度測定は, 最近その報告例が増えている⁷²⁾¹⁰¹⁾。UV 検出や LIF 検出においては試料は発色団を有する化合物に, 電気化学検出においては電気化学活性な部位を有する化合物に限られるが, この検出法では泳動液と試料ゾーンとの電気伝導度の差を検出するため, 試料の適用範囲が限定されないことが特徴として挙げられる。伝導度検出においては, 2 本以上の電極間に交流電圧を印加した際の電流値から溶液のモル電気伝導度を測定するが, 電極が泳動液に接触する形式¹⁰²⁾¹⁰³⁾と, 静電結合による非接触型の測定形式¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾の 2 種類に分類される。

接触型の伝導度検出においては, 微細加工技術により分離流路内に 2 本の電極を作製したチップが用いられているが, 電極の配置が検出感度や分離能に大きく影響を及ぼすことが報告されている¹⁰²⁾。チャンネルの幅方向の両端に電極を作製したマイクロチップでは, 電極幅を小さくしたほうが感度, 分離性能ともに向上しており, 感度の向上はバックグラウンドノイズの減少を, 高分離能は検出体積の減少を反映したものと考えられる。

非接触型の伝導度測定は, 接触型検出に比べてバックグラウンドが低いことや, 電極上での気泡の発生が起こらないことなどの長所を有する。検出においては分離チャンネルの終端付近に 2 本の電極を対面に配置したデバイスが利用されるが, チャンネル部以外での静電結合を防ぐために隣接した位置に作製した 2 本の電極をシールドとして使用

することが多い (Fig. 7)。Lichtenberg らの報告した MCE デバイスでは, 100 μM のアルカリ金属イオンの分離検出に成功し, K^+ イオンの LOD は 18 μM であった¹⁰¹⁾。このような電気伝導度検出を利用することにより, 前述の無機金属イオンをはじめとして, 有機酸¹⁰³⁾やアミノ酸・ペプチド・タンパク質・DNA などの生体関連物質¹⁰³⁾の分離検出が達成されている。

5 その他の検出法

第 2 章において, 既に MCE への適用がなされている光学的な検出法について概観したが, 本章では CE への適用例が報告されており, 今後 MCE における検出法としての利用が期待される手法について紹介する。

5.1 X 線蛍光検出

X 線蛍光¹⁰⁶⁾¹⁰⁷⁾や誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS)¹⁰⁸⁾¹⁰⁹⁾は試料に含まれる元素の同定が可能な検出法であり, CE においては多くの適用例が報告されているが, MCE に適用した例は報告されていない。ICP-MS は高感度かつ選択的な検出法であるが, 試料が破壊されるほどの強力なイオン化がなされるうえに, Ar 気流下のプラズマでイオン化を行うため, インターフェースが複雑なものになってしまうことから MCE への適用が困難である。一方, X 線蛍光検出は Rh-X 線光源を試料に照射し, 発せられた蛍光 X 線を半導体検出器等で検出するため, 特殊なインターフェースを必要としないが, MCE へ適用された報告はなされていない。Miller らは 12.0 $\times$ 8.5 $\times$ 6.0 cm の箱に分離用キャピラリーを固定し, X 線蛍光の検出部を設けた CE 装置を開発しており (Fig. 8), $\sim 10^{-4}$ M の Co^{2+} , Cu^{2+} , ビタミン B12 の CE 分離・選択的検出に成功している¹⁰⁷⁾。感度がそれほど高くなくことやデータ取得速度が ~ 10 Hz と遅いことなどが問題点となるが, 定性能力を有する検出法として MCE への適用が期待される。

5.2 ラマン分光検出

ラマン分光法は試料の構造に関する情報が得られる有用な振動分光検出法であるが, スペクトルの積算に時間を要すること, 及び検出感度が必ずしも高くなくことから, MCE への適用はほとんどなされていない。Walker らはラマン顕微鏡のステージ上にマイクロチップを設置し, 除草剤の等速電気泳動分離・ラマン分光検出について検討を行っているが¹¹⁰⁾, 8 cm^{-1} という低波数分解能にもかかわらず, 1 つのラマンスペクトルを得るのに 200 $\sim$ 500 ms も要しており, ピーク上のポイント数が少なくなるため, 高速分析を要求される MCE には不利であるように思われる。なお, 等速電気泳動による濃縮を組み合わせた条件で 230 nM の除草剤成分の検出に成功している。今後, 表面

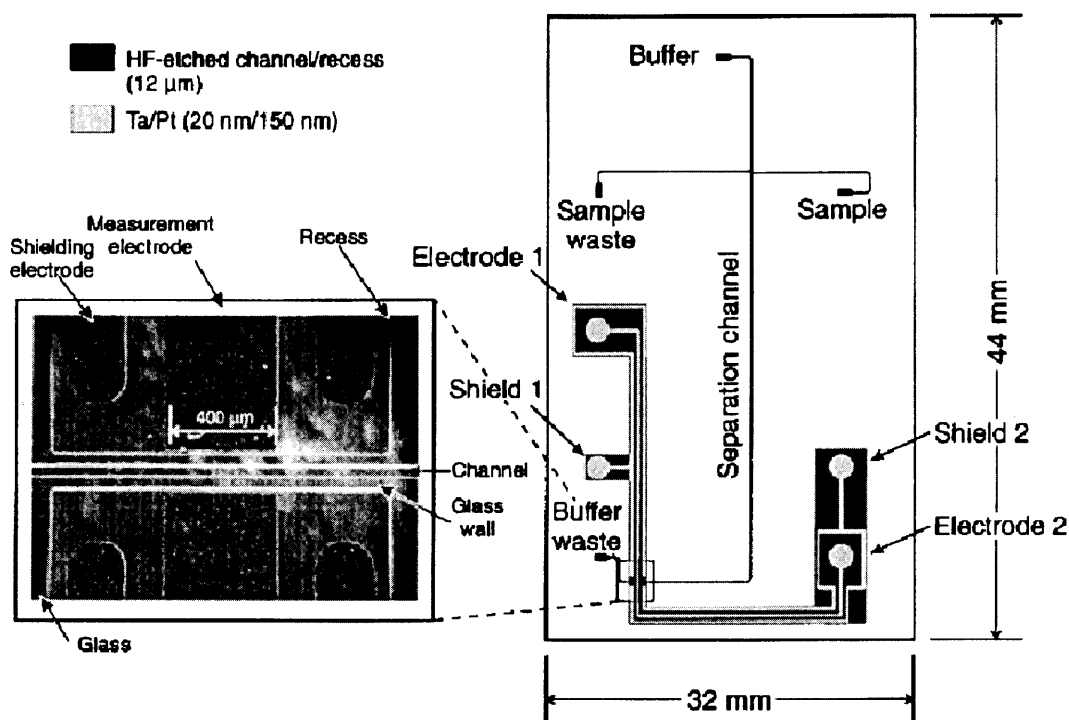


Fig. 7 Layout of the CE chip with contactless conductivity detector

Reprinted with permission from *Electrophoresis*, **23**, 3769 ~ 3780 (2002). Copyright 2002 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

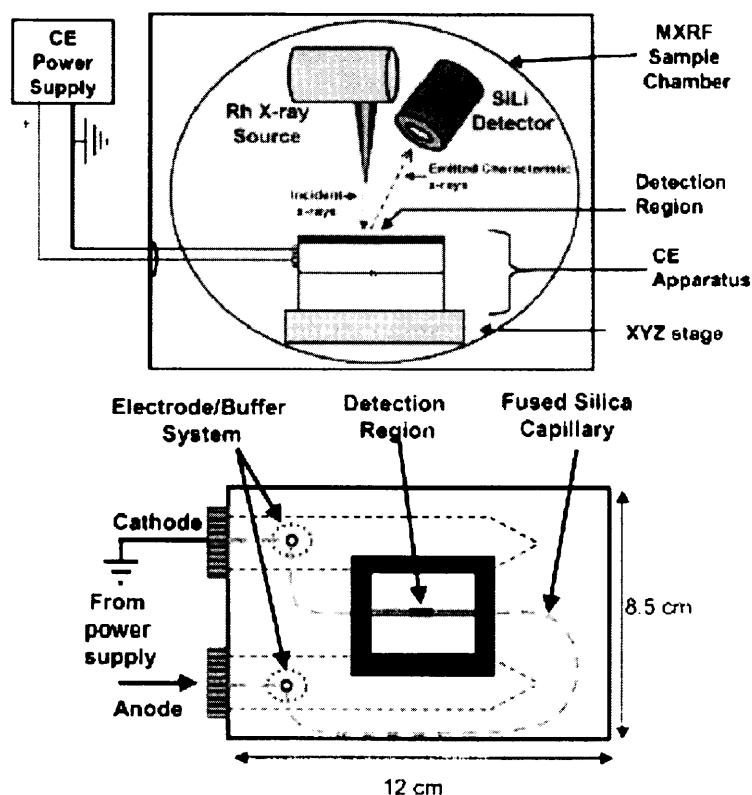


Fig. 8 Capillary electrophoresis-micro X-ray fluorescence apparatus

Reprinted with permission from *Anal. Chem.*, **75**, 2048 ~ 2053 (2003). Copyright 2003 American Chemical Society.

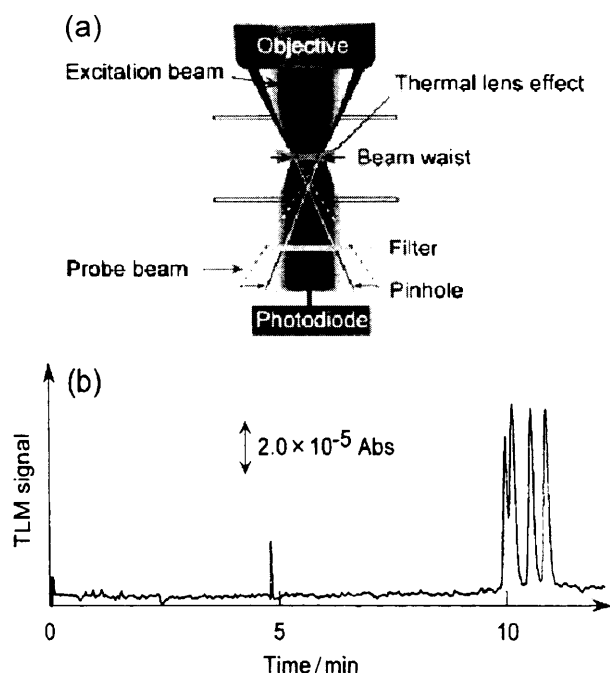


Fig. 9 (a) Principle of the TLM. (b) Electropherogram of 600 nM DABSYL glycine, methionine, alanine and proline detected by CE-TLM

Reprinted with permission from *Electrophoresis*, **24**, 179–184 (2003). Copyright 2003 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

増強ラマンなどの適用による高感度化並びにデータ取得の高速化が望まれる¹¹¹⁾.

5.3 光熱変換分光検出

光熱変換分光法は光励起された試料から発せられる熱を光学的に検出する手法で、ほとんどの化合物は熱を発しながら基底状態へ失活するため、本質的に LIF よりも適用可能な化合物が広範な検出法であると言える。光熱変換分光の測定においては、励起用と熱発生モニター用の 2 本のレーザー光が必要であり、従来型の装置では非常に複雑な光学系となってしまうことが問題とされていた¹¹²⁾。Kitamori らは顕微鏡をベースとした光熱変換分光測定装置である熱レンズ顕微鏡 (TLM) 検出器を開発し¹¹³⁾、非蛍光性試料の CE 分析への適用について検討を行っている。TLM においては、顕微鏡の対物レンズに対して 2 種類の波長のレーザーを導入し、試料分子が励起レーザーの焦点付近に存在すると、熱発生により溶液の温度が上昇し、レーザーの強度分布に従って、温度勾配が形成されるため、屈折率の勾配すなわち擬似的な凹レンズ (熱レンズ効果) が焦点付近に形成される (Fig. 9a)。励起レーザーと同軸に導入されたプローブレーザーは、熱レンズにより光軸が変化するため、ピンホールを通して観測されるプローブ光強度も変化することになり、この変化量は試料分子が

ら発生した熱量の大きさに依存するため、試料分子の検出・定量が可能となる。また、レーザー光を対物レンズにより絞り込むため、高い空間分解能を有し、単分子検出が可能なほどの高感度が得られる検出法である。

TLM 検出の CE への適用においては、キャピラリー表面でのレーザー光の屈折に伴う感度及び再現性の低下が問題となるが、Uchiyama らは流路形状が半円形のマイクロチップを分離用のキャピラリーに接続し、チップ上で TLM 検出を行うことでこの問題を解決している¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。アミノ酸 4 種混合試料の分析において、約 40000 の理論段数で分離を達成し、検出限界は ~ 10 nM となった (Fig. 9b)。この検出限界は吸光度換算で ~ 100 nAU となり、UV 検出に比べて 100 倍以上の高感度検出が達成されている。以上は TLM 検出を CE に適用した例であるが、MCE へ適用も容易であり、非蛍光性試料の高速分離・高感度検出が期待される¹¹⁶⁾。

6 総 括

MCE における種々の検出法に関して、光、質量分析計、電極を利用した検出法を中心に紹介した。MCE の研究初期ではほとんどの報告例が LIF 検出に基づくものであり、微小なチップ上における検出を大型の顕微鏡・レーザー・検出器を用いて行うという矛盾を引き起こしていたが、近年では本稿で紹介したような多様な検出法の適用が MCE になされ、検出部の小型化についても大きく進展している。LIF における発光ダイオード及び光ファイバーの利用に基づいた検出部の小型化、微小電極作製技術の進歩に伴う電気化学的検出の多様化などにより、検出部を含めた手のひらサイズの分析装置の作製が実現可能になってきており、在宅診断・携帯型分析キットなどへの応用が期待される。一方、質量分析検出はプロテオミクスやメタボロミクスにおける重要な検出法として認知されており、CE においては実用段階に到達している。チャンネルの並列化によるハイスループット MCE 分離と質量分析法を組み合わせることにより、生命科学分野の急速な進展が成し遂げられるものと期待される。

文 献

- 1) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer: *Sens. Actuators B1*, **1**, 244 (1990).
- 2) A. Manz, D. J. Harrison, E. Verpoorte, H. M. Widmer: *Adv. Chromatography*, **33**, 1 (1993).
- 3) D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H. M. Widmer: *Anal. Chem.*, **64**, 1926 (1992).
- 4) C. S. Effenhauser, A. Manz, H. M. Widmer: *Anal. Chem.*, **65**, 2637 (1993).
- 5) D. J. Harrison, K. Fluri, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz: *Science*, **261**, 895 (1993).
- 6) S. Liu, H. Ren, Q. Gao, D. J. Roach, R. T. Loder, Jr., T. M. Armstrong, Q. Mao, L. Blaga, D. L. Barker, S.

- B. Jovanovich: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 5369 (2000).
- 7) B. M. Paegel, C. A. Emrich, G. J. Wedemayer, J. R. Scherer, R. A. Mathies: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 574 (2002).
- 8) J. P. Landers, Ed.: "*Handbook of Capillary Electrophoresis*", p. 827 (1997), (CRC Press LLC, Boca Raton).
- 9) A. Manz, H. Becker, Eds. "*Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*", (1998), (Springer-Verlag, Berlin).
- 10) J. P. Kutter: *Trends Anal. Chem.*, **19**, 352 (2000).
- 11) G. J. M. Bruin: *Electrophoresis*, **21**, 3931 (2000).
- 12) G. H. W. Sanders, A. Manz: *Trends Anal. Chem.*, **19**, 364 (2000).
- 13) L. J. Jin, J. Ferrance, Z. Huang, J. P. Landers: "*Separation Science and Technology*", Vol. 3, p. 529 (2001), (Academic Press, San Diego).
- 14) J. M. Ramsey, A. van der Berg, Eds., "*Micro Total Analysis Systems*", (2001), (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht).
- 15) L. Mitnik, M. Novotny, C. Felten, S. Buonocore, L. Koutny, D. Schamlzing: *Electrophoresis*, **22**, 4104 (2001).
- 16) D. R. Reyes, D. Iossifidis, P. Aurox, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2623 (2002).
- 17) P. Aurox, D. Iossifidis, D. R. Reyes, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2637 (2002).
- 18) J. Khandurina, A. Guttman: *J. Chromatogr. A*, **943**, 159 (2002).
- 19) J. P. Landers: *Anal. Chem.*, **75**, 2919 (2003).
- 20) L. Zhang, F. Dang, Y. Baba: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1645 (2003).
- 21) T. Vilkner, D. Janasek, A. Manz: *Anal. Chem.*, **76**, 3373 (2004).
- 22) T. B. Stachowiak, F. Svec, J. M. J. Frechet: *J. Chromatogr. A*, **1044**, 97 (2004).
- 23) C.-W. Kan, C. P. Fredlake, E. A. S. Doherty, A. E. Barron: *Electrophoresis*, **25**, 3564 (2004).
- 24) Y.-W. Lin, M.-F. Huang, H.-T. Chang: *Electrophoresis*, **26**, 320 (2005).
- 25) S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **66**, 1107 (1994).
- 26) M. Vazquez, McKinley, L. Mitnik, S. Desmarais, P. Matsudaira, D. Ehrlich: *Anal. Chem.*, **74**, 1952 (2002).
- 27) G. Ocirk, T. Tang, D. J. Harrison: *Analyst*, **123**, 1429 (1998).
- 28) G. Jiang, S. Attiya, G. Ocirk, W. E. Lee, D. J. Harrison: *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 861 (2000).
- 29) F. Dang, L. Zhang, H. Hagiwara, Y. Mishina, Y. Baba: *Electrophoresis*, **24**, 714 (2003).
- 30) K. Uchiyama, H. Nakajima, T. Hobo: *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 375 (2004).
- 31) H.-F. Li, J.-M. Lin, R.-G. Su, K. Uchiyama, T. Hobo: *Electrophoresis*, **25**, 1907 (2004).
- 32) J. C. Fister, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **71**, 4460 (1999).
- 33) K. Hata, Y. Kichise, T. Kaneta, T. Imasaka: *Anal. Chem.*, **75**, 1765 (2003).
- 34) H. J. Crabtree, M. U. Kopp, A. Manz: *Anal. Chem.*, **71**, 2130 (1999).
- 35) 中西博昭, 阿部浩久, 西本尚弘, 荒井昭博: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **47**, 361 (1998).
- 36) H. Nakanishi, T. Nishimoto, A. Arai, H. Abe, M. Kanai, Y. Fujiyama, T. Yoshida: *Electrophoresis*, **22**, 230 (2001).
- 37) Z. Xu, T. Nishine, A. Arai, T. Hirokawa: *Electrophoresis*, **25**, 3875 (2004).
- 38) S. Suzuki, Y. Ishida, A. Arai, H. Nakanishi, S. Honda: *Electrophoresis*, **24**, 3828 (2003).
- 39) S. Honda, S. Suzuki, A. Taga: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1689 (2003).
- 40) S. Suzuki, S. Honda: *Electrophoresis*, **24**, 3577 (2003).
- 41) E. Guihen, J. D. Glennon: *J. Chromatogr. A*, **1071**, 223 (2005).
- 42) M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder: *Electrophoresis*, **24**, 3233 (2003).
- 43) F. Kitagawa, S. Aizawa, K. Otsuka: *Anal. Sci.*, **21**, 142 (2005).
- 44) A. R. Stettler, M. A. Schwarz: *J. Chromatogr. A*, **1063**, 217 (2005).
- 45) S. D. Mangru, D. J. Harrison: *Electrophoresis*, **19**, 2301 (1998).
- 46) M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, R. Nakajima, K. Kondo, A. Arai: *J. Chromatogr. A*, **867**, 271 (2000).
- 47) K. Tsukagoshi, N. Jinno, R. Nakajima: *Anal. Chem.*, **77**, 1684 (2005).
- 48) B.-F. Liu, M. Ozaki, Y. Utsumi, T. Hattori, S. Terabe: *Anal. Chem.*, **75**, 36 (2003).
- 49) R. D. Oleschuk, D. J. Harrison: *Trends Anal. Chem.*, **19**, 379 (2000).
- 50) E. Gelpi: *J. Mass Spectrom.*, **37**, 241 (2002).
- 51) Q. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevski, P. M. Zavracky, N. E. McGruer, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **69**, 429 (1997).
- 52) R. S. Ramsey, J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **69**, 1174 (1997).
- 53) B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger, F. Foret: *Anal. Chem.*, **71**, 3258 (1999).
- 54) Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki, S. Nakamura: *J. Chromatogr. A*, **1011**, 181 (2003).
- 55) Y. Tachibana, K. Otsuka, S. Terabe, A. Arai, K. Suzuki, S. Nakamura: *J. Chromatogr. A*, **1025**, 287 (2004).
- 56) J. Li, C. Wang, J. F. Kelly, D. J. Harrison, P. Thibault: *Electrophoresis*, **21**, 198 (2000).
- 57) J. Li, T. Tremblay, P. Thibault, C. Wang, S. Attiya, D. J. Harrison: *Eur. J. Mass Spectrom.*, **7**, 143 (2001).
- 58) A. P. Dahlin, M. Wetterhall, G. Liljegren, S. K. Bergström, P. Andrén, L. Nyholm, K. E. Markides, J. Bergquist: *Analyst*, **130**, 193 (2005).
- 59) J. Li, P. Thibault, N. H. Bing, C. D. Skinner, C. Wang, C. Colyer, D. J. Harrison: *Anal. Chem.*, **71**, 3036 (1999).
- 60) Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang, D. J. Harrison: *Anal. Chem.*, **73**, 639 (2001).
- 61) T. Wachs, J. Henion: *Anal. Chem.*, **73**, 632 (2001).
- 62) Y. Deng, H. Zhang, J. Henion: *Anal. Chem.*, **73**, 1432 (2001).
- 63) J. Kameoka, H. G. Craighead, H. Zhang, J. Henion: *Anal. Chem.*, **73**, 1935 (2001).
- 64) B. Zhang, F. Foret, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **72**, 1015 (2000).
- 65) F. Foret, H. Zhou, E. Gangl, B. L. Karger: *Electrophoresis*, **21**, 1363 (2000).
- 66) B. Zhang, F. Foret, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **73**,

- 2675 (2001).
- 67) F.-M. Matysik: *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 33 (2003).
 - 68) J. Wang: *Talanta*, **56**, 223 (2002).
 - 69) D. P. Manica, Y. Mitsumori, A. G. Ewing: *Anal. Chem.*, **75**, 4572 (2003).
 - 70) H. D. Willauer, G. E. Collins: *Electrophoresis*, **24**, 2193 (2003).
 - 71) C. D. Garcia, C. S. Henry: *Anal. Chim. Acta*, **508**, 1 (2004).
 - 72) W. R. Vandaveer IV, S. A. Pasas-Farmer, D. J. Fischer, C. N. Frankenfeld, S. M. Lunte: *Electrophoresis*, **25**, 3528 (2004).
 - 73) R. Tantra, A. Manz: *Anal. Chem.*, **72**, 28752 (2003).
 - 74) R. Ferrigno, J. N. Lee, X. Jiang, G. M. Whitesides: *Anal. Chem.*, **76**, 2273 (2004).
 - 75) G. Chen, J. Wang: *Analyst*, **129**, 507 (2004).
 - 76) T.-K. Lim, H. Ohta, T. Matsunaga: *Anal. Chem.*, **75**, 3316 (2003).
 - 77) J. Wang, B. Tian, E. Sahlin: *Anal. Chem.*, **71**, 3901 (1999).
 - 78) J. Yan, Y. Du, J. Liu, W. Cao, X. Sun, W. Zhou, X. Yang, E. Wang: *Anal. Chem.*, **75**, 5406 (2003).
 - 79) M. A. Schwarz, P. C. Hauser: *Anal. Chem.*, **75**, 4691 (2003).
 - 80) H. Ernst, B. Ross, M. Knoll: *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 758 (2002).
 - 81) N. A. Lacher, S. M. Lunte, R. S. Martin: *Anal. Chem.*, **76**, 2482 (2004).
 - 82) J. Wang, G. Chen, M. P. Chatrathi, A. Fujishima, D. A. Tryk, D. Shin: *Anal. Chem.*, **75**, 935 (2003).
 - 83) C. D. Garcia, C. S. Henry: *Anal. Chem.*, **75**, 4778 (2003).
 - 84) Z. Chen, Y. Goa, J. Lin, R. Su, Y. Xie: *J. Chromatogr. A*, **1038**, 239 (2004).
 - 85) M. L. Kovarik, N. J. Torrence, D. M. Spence, R. S. Martin: *Analyst*, **129**, 400 (2004).
 - 86) J. Wang, G. Chen, M. P. Chatrathi, M. Musameh: *Anal. Chem.*, **76**, 298 (2004).
 - 87) T. K. Whidden, D. K. Ferry, M. N. Kozicki, E. Kim, A. Kumar, J. Wilbur, G. M. Whitesides: *Nanotechnol.*, **7**, 447 (1996).
 - 88) Z. Huang, R. N. Zare, S. Sloss, A. G. Ewing: *Anal. Chem.*, **63**, 189 (1991).
 - 89) S. R. Wallenborg, L. Nyholm, C. E. Lunte: *Anal. Chem.*, **71**, 544 (1999).
 - 90) R. S. Martin, K. L. Ratzlaff, B. H. Huynh, S. M. Lunte: *Anal. Chem.*, **74**, 1136 (2002).
 - 91) P. Ertl, C. A. Emrich, P. Singhal, R. A. Mathies: *Anal. Chem.*, **76**, 3749 (2004).
 - 92) D. M. Osbourn, C. E. Lunte: *Anal. Chem.*, **75**, 2710 (2003).
 - 93) C.-C. Wu, R.-G. Wu, J.-G. Huang, Y.-C. Lin, H.-C. Chang: *Anal. Chem.*, **75**, 947 (2003).
 - 94) C.-C. Lai, C.-H. Chen, F.-H. Ko: *J. Chromatogr. A*, **1023**, 143 (2004).
 - 95) Y. Zu, A. J. Bard: *Anal. Chem.*, **72**, 3223 (2000).
 - 96) X. Wang, D. R. Bobbitt: *Anal. Chim. Acta*, **383**, 213 (1999).
 - 97) M.-T. Chiang, C.-W. Huang: *J. Chromatogr. A*, **934**, 59 (2001).
 - 98) W.-D. Cao, J.-F. Liu, X.-R. Yang, E.-K. Wang: *Electrophoresis*, **23**, 3683 (2002).
 - 99) H.-B. Qiu, J.-L. Yan, X.-H. Sun, J.-F. Liu, W.-D. Cao, X.-R. Yang, E.-K. Wang: *Anal. Chem.*, **75**, 5435 (2003).
 - 100) A. Arora, J. C. T. Eijkel, W. E. Morf, A. Manz: *Anal. Chem.*, **73**, 3282 (2001).
 - 101) A. J. Zemann: *Electrophoresis*, **24**, 2125 (2003).
 - 102) B. Grab, D. Siepe, A. Neyer, R. Hergenroder: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**, 228 (2001).
 - 103) M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S. M. Ford, S. S. Llopis, R. L. McCarley, S. A. Soper: *Anal. Chem.*, **74**, 2407 (2002).
 - 104) J. Lichtenberg, N. F. de Rooij, E. Verpoorte: *Electrophoresis*, **23**, 3769 (2002).
 - 105) J. Wang, M. Pumera: *Anal. Chem.*, **75**, 341 (2003).
 - 106) S. E. Mann, M. C. Ringo, G. McCarthy, J. E. Penner-Hahn, C. E. Evans: *Anal. Chem.*, **72**, 1754 (2000).
 - 107) T. C. Miller, M. R. Joseph, G. J. Havrilla, C. Lewis, V. Majidi: *Anal. Chem.*, **75**, 2048 (2003).
 - 108) A. R. Timerbaev, O. A. Shpigun: *Electrophoresis*, **21**, 4179 (2000).
 - 109) V. Majidi, N. J. Miller-Ihli: *Electrophoresis*, **123**, 803 (1998).
 - 110) P. A. Walker III, M. D. Morris, M. A. Burns, B. N. Johnson: *Anal. Chem.*, **70**, 3766 (1998).
 - 111) W. F. Nirode, G. L. Devault, M. J. Sepaniak, R. O. Cole: *Anal. Chem.*, **72**, 1866 (2000).
 - 112) D. J. Bornhop, N. J. Dovichi: *Anal. Chem.*, **59**, 1632 (1987).
 - 113) T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, K. Sato: *Anal. Chem.*, **76**, 53A (2004).
 - 114) K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Electrophoresis*, **24**, 179 (2003).
 - 115) K. Uchiyama, M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hattori, T. Kitamori: *Anal. Sci.*, **21**, 49 (2005).
 - 116) F. Kitagawa, K. Sueyoshi, J. Mizuno, Y. Wada, S. Shoji, K. Otsuka: In "Micro Total Analysis Systems 2004", p. 67 (2004), (T. Laurell, J. Nilsson, J. Jensen, D. J. Harisson, J. P. Kutter, Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge).

要 旨

微小基板上に作製した微細な流路内で電気泳動分離を行うマイクロチップ電気泳動 (MCE) は、高速分析・微量分析などの特徴を有しており、ハイスループット分析への適用が期待されている。MCE における問題点として、検出感度が十分ではないことが指摘されており、様々な高感度検出手法の導入が検討されている。MCE の研究初期においては、蛍光に基づいた検出法を適用した例がほとんどであったが、微細加工技術の進展に伴い微小電極をチップ上に作製することが可能となり、高感度な電気化学検出や試料の適用範囲の広い電気伝導度検出等の MCE への適用が進んでいる。また、MCE チップと質量分析計との結合を可能にするインターフェースの開発も進展しており、タンパク質のアミノ酸配列や相互作用の解析、糖鎖構造の解析などへの応用が期待されている。本稿では、MCE への適用が検討されている検出法の原理及び特徴的な技術について、最近の成果を中心に紹介する。