

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08234

研究課題名(和文)微量生体分子のマイクロ化学分析システムの開発

研究課題名(英文)Development of micro total analysis system for biological compounds

研究代表者

角田 誠 (Tsunoda, Makoto)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：10323453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高性能オンチップ液体クロマトグラフィー分離媒体としてのピラーアレイカラムの微量生体分子定量を可能にする技術開発を行った。これまでに、ピラーアレイカラムの生体分子分離に向けた基盤技術を確立してきた。本研究において、定量分析に向けた要素技術の一つとして試料注入部の検討を行った。再現性良く試料を注入するために、試料自動注入システムを開発した。血中アミノ酸の再現性良い定量が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オンチップ液体クロマトグラフィー技術を用いた生体試料中低分子化合物定量への応用は、これまで、限定されていた。本研究成果により、オンチップ液体クロマトグラフィーの中でも高性能な分離が可能であるピラーアレイカラムを用いた生体分子定量が可能となった。ピラーアレイカラムは高分離能を有することから、生体分子の迅速分析による疾病診断等への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A technology to enable quantification of trace amounts of biological compounds using pillar array columns as a high-performance on-chip liquid chromatography separation medium was developed. So far, fundamental technologies for separation of biological compounds on pillar array columns have been established. In this study, the sample injection part was investigated as one of the fundamental technologies for quantitative analysis. An automated sample injection system was developed with good reproducibility. Reproducible quantification of amino acids in plasma samples has become possible.

研究分野：生体分析化学

キーワード：クロマトグラフィー マイクロ流体デバイス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低分子代謝産物分析には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離が広く用いられている。しかしながら、HPLCには分離能の限界があることが理論的に知られており、さらなる高性能化のためには、従来技術を超越する分離媒体の開発が必要とされていた。そこで、ピラー構造を有するオンチップ液体クロマトグラフィー(ピラーアレイカラム、図1)に着目した。ピラーアレイカラムは、チップ上に規則正しいピラー構造を有する分離媒体であり、試料の拡散が最小限に抑えられる。このため、従来 HPLC の分離能を超越することが理論的に示されており、従来技術以上の高性能化を可能にすると考えられたからである。これまでに、ピラーアレイカラムの生体分子分離に向けた基盤技術を確立してきた。しかし、多成分生体分子の分離には、ピラーアレイカラムのさらなる高性能化が必須であった。

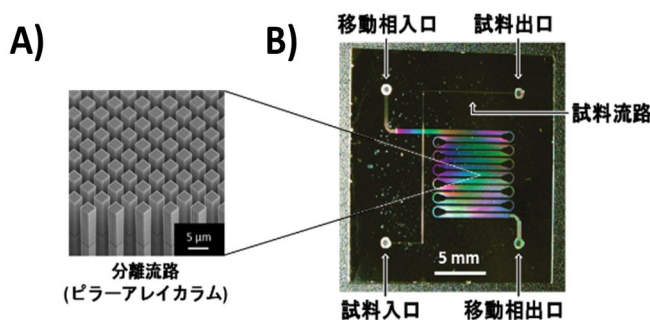


図1. A) ピラーアレイカラム、B) 本研究で使用した LC チップの外観

### 2. 研究の目的

ピラーアレイカラムを用いて、生体試料中の微量生体分子定量分析を行う際、試料の注入量が 1 nL 程度と極めて微量であるにも関わらず、試料注入が手動によって行われていた。そのため、注入量を正確に制御することが出来ず、定量分析を行う事が困難であった。これまでに、内標準法を適用することでピラーアレイカラムによる生体試料中分岐鎖アミノ酸の定量分析を可能にした。しかし、分析する試料毎に内標準物質を選ぶ必要があることに加え、適切な内標準物質が見つからない可能性もある。そこで本研究では、ピラーアレイカラムによる簡便な定量分析を目指し、試料の注入量を一定にする事の出来るシステム(試料自動注入システム)の開発を行った。

### 3. 研究の方法

ピラーアレイカラムは、半導体微細加工技術(UV フォトリソグラフィ、ウェットエッチング、深掘り反応性イオンエッチングによりシリコン基板上に流路を作製した後、陽極接合によりガラスと貼り合わせた)により、一辺 2 cm のシリコン基板上に作製した。分離流路表面を C18 修飾した。クマリン色素の分離には水とアセトニトリルの混合溶液、蛍光誘導体化試薬 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) により誘導体化したアミノ酸の分離には水とアセトニトリルの混合溶液にトリフルオロ酢酸を加えたものを移動相として用いた。検出は蛍光顕微鏡により行った。

### 4. 研究成果

従来の試料注入システムは、シリンジとバルブにより構成されており(図2A)、全て手動で操作されていた。ポンプから移動相が常に流れており、バルブは Position A の状態となっている。試料を分離流路へと注入するためには、バルブを Position B に切り替え、シリンジを押し、試料を LC チップまで運ぶ。試料が分離流路と試料流路とのクロス部分に到達したところで、バルブを切り替えて Position A にすることで試料が分離流路へと注入される。この方法においては、シリンジを押し加減やバルブの開閉時間にバラつきが生じ、ピラーアレイカラムへの試料注入量(約 1 nL)を正確に制御することが出来なかった。そのため、ピーク高さの再現性が悪く、定量分析への利用が困難であった。

そこで、オートサンプラー、試料送液ポンプ、移動相ポンプ、六方バルブを用いて、試料自動注入システムを構築した。試料送液ポンプによって試料を LC チップ内のサンプル流路に導入し、バルブを切り替えることで分離流路に注入した。上記操作を PC から制御することにより試

料の自動注入を可能にした。従来の手動による試料注入の場合、試料の送液流量とバルブを開閉させる時間にバラつきが生じるために再現性が悪かった(保持時間とピーク高さの相対標準偏差がそれぞれ約 3%と約 25%)。本システムでは、試料送液ポンプの流量制御とバルブの開閉時間を制御することで再現性の向上を試みた。試料自動注入システムを用いて、クマリン色素 2 種 (C525 と C545) を試料として試料送液ポンプの流速とバルブの切替時間の最適化を行った。最適条件下において、良好な再現性を得ることに成功した。

しかしながら、低濃度の試料を上記試料自動注入システムを用いて分析したところ、良好な再現性を得ることができなかった。これはオートサンプラーから導入した試料がピラーアレイカラムへ到達するまでの間に移動相によって希釈され、この希釈具合が毎回異なり、注入される試料の濃度自体がバラついてしまっていたためではないかと考えた。そこで、この考えに基づき、試料自動注入システムに改良を加えた。

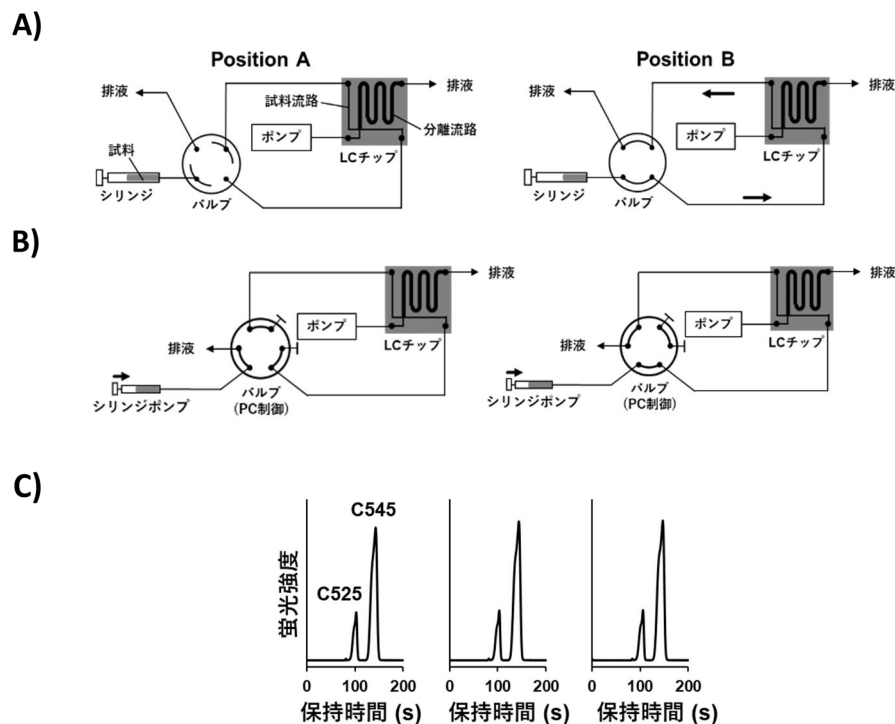


図 2. A) 手動による試料注入システム、B) 改良試料自動注入システム、C) 改良試料自動注入システムによる 2 種クマリン色素の 3 回分析のクロマトグラム (移動相: water/acetonitrile = 65/35 (v/v), 流速: 1.0  $\mu$ L/min)

試料希釈の問題を解決するために、シリンジポンプと PC による制御が可能な六方バルブを用いて試料自動注入システムを構築した (図 2B)。構築したシステムでは、シリンジポンプによりシリンジを一定の速さで押すこと、また、バルブを PC で制御することにより、毎回同じ注入動作を再現し、試料の注入量を一定に出来るのではないかと考えた。分析条件の最適化を行った後に、クマリン色素 2 種 (C525 と C545) を用いて再現性の評価を行った (図 2C)。その結果、ピーク高さの相対標準偏差が 1.8%以内という良好な再現性を得ることに成功した。次に、5 種 NBD-アミノ酸を用いて検量線を作成したところ、良好な直線性が得られた。最後に、本システムを用いてヒト血漿中 5 種アミノ酸 (Pro, Val, Ile, Leu, Phe) の定量分析を行った。定量結果の相対標準偏差は 5.6-12.2%となり、本システムが生体試料の定量分析へ適用可能であることが示された。

開発したピラーアレイカラムのための試料自動注入システムを用いることにより、様々な微量生体分子の定量分析への応用が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takuya Fujiwara, Ayuna Hattori, Takahiro Ito, Takashi Funatsu, Makoto Tsunoda	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of intracellular $\alpha$ -keto acids by HPLC with fluorescence detection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anal. Methods	6. 最初と最後の頁 2555-2559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0ay00556h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takuya Fujiwara, Ryoto Inoue, Takuma Ohtawa, Makoto Tsunoda	4. 巻 25
2. 論文標題 Liquid-Chromatographic Methods for Carboxylic Acids in Biological Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25214883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 KUROKI Hiroshi, KOYAMA Hirotaka, NAKATANI Yusuke, FUNATSU Takashi, HORIIKE Shigeyoshi, TSUNODA Makoto	4. 巻 41
2. 論文標題 Development of an Automated Sample Injection System for Pillar Array Columns	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 59 ~ 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15583/jpchrom.2019.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chang Chunfang, Isokawa Muneki, Funatsu Takashi, Tsunoda Makoto	4. 巻 5
2. 論文標題 Optimization of tris(2-carboxyethyl) phosphine reduction conditions for fast analysis of total biothiols in mouse serum samples	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01598 ~ e01598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e01598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Li X, Kuroki H, Funatsu T, Tsunoda M	4. 巻 34
2. 論文標題 Retention of Fluorescent Amino Acid Derivatives in Ion-pairing Reversed-phase Liquid Chromatography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Science	6. 最初と最後の頁 1209-1212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.18N008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki R, Funatsu T, Tsunoda M	4. 巻 410
2. 論文標題 Identification of methylated tubulin through analysis of methylated lysine.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4189-4194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-018-1068-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Ayuna, Tsunoda Makoto, Konuma Takaaki, Kobayashi Masayuki, Nagy Tamas, Glushka John, Tayyari Fariba, McSkimming Daniel, Kannan Natarajan, Tojo Arinobu, Edison Arthur S., Ito Takahiro	4. 巻 545
2. 論文標題 Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 500 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nature22314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 SUMIDA Yuko, TSUNODA Makoto, FUNATSU Takashi	4. 巻 38
2. 論文標題 Amino Acid Analysis Using a Cartridge-Type Monolithic Silica Column	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 135 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2017.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HATTORI Ayuna、ITO Takahiro、TSUNODA Makoto	4. 巻 38
2. 論文標題 Analysis of Branched-Chain Keto Acids in Cell Extracts by HPLC-Fluorescence Detection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 129 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2017.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 藤原 拓哉、船津 高志、角田 誠
2. 発表標題 オンチップLCによる $\alpha$ -ケト酸の迅速分析法の開発
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Tsunoda
2. 発表標題 Analysis of Branched-Chain Amino Acids Using On-chip Liquid Chromatography
3. 学会等名 Analyticon-2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒木 啓志、船津 高志、角田 誠
2. 発表標題 LC チップにおける定量分析に向けた試料自動注入システムの開発
3. 学会等名 第32回 バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kuroki, Takashi Funatsu, Makoto Tsunoda
2. 発表標題 Development of automated sample injection system for pillar array columns
3. 学会等名 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木 啓志、船津 高志、角田 誠
2. 発表標題 ピラーアレイカラムのための試料自動注入システムの開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第9回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Tsunoda
2. 発表標題 Chip-Based Liquid Chromatography Analysis for Biological Compounds
3. 学会等名 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Tsunoda
2. 発表標題 Chip-Based Liquid Chromatography Analysis for Biological Compounds
3. 学会等名 32nd International Symposium on Chromatography (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田誠
2. 発表標題 オンチップ液体クロマトグラフィーの開発と生体分子分析への応用
3. 学会等名 日本薬学会東海支部講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Tsunoda
2. 発表標題 Analysis of biological compounds by hydrophilic interaction chromatography
3. 学会等名 The 7th Symposium of the Division of Pharmaceutical Analysis for the Pharmaceutical Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Tsunoda, Muneki Isokawa, Kanki Nakanishi, Takashi Funatsu, Shuichi Shoji
2. 発表標題 One-minute separation of five biothiols using amide-modified liquid chromatography chip
3. 学会等名 HPLC2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Tsunoda
2. 発表標題 HILIC Analysis of Biological Compounds
3. 学会等名 HPLC2017 Jeju (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Makoto Tsunoda
2. 発表標題 On-chip Liquid Chromatography for Analysis of Biological Compounds
3. 学会等名 The 6th Winter Symposium of the Division of Pharmaceutical Analysis for the Pharmaceutical Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------