

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790041

研究課題名(和文) オンチップ液体クロマトグラフィーによる微量生体分子の分析システムの開発

研究課題名(英文) Development of analytical method for biological compounds using on-chip liquid chromatography

研究代表者

角田 誠 (Tsunoda, Makoto)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10323453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生体試料分析に必須の分離手段である高速液体クロマトグラフィーにおける高分離能を達成した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における生体試料への応用を指向した研究を行った。具体的には、生体試料中の分岐鎖アミノ酸の高速定量分析と、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におけるグラジエント溶離システムの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：High-performance liquid chromatography is an important separation technique used for bioanalysis. In this study, we used pillar array column, which has high separation efficiency. We performed fast and quantitative analysis of branched-chain amino acids in biological samples using a pillar array column and integration of pillar array columns into a gradient elution system for pressure-driven liquid chromatography.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：マイクロ化学チップ アミノ酸 グラジエント溶離 ミキサー

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト全遺伝子解読が終了し、遺伝子の表現形態として機能するタンパク質に関する研究、さらに、タンパク質の具体的な機能解析という観点から、タンパク質以外の細胞内低分子を解析する研究が重要視されている。そのような研究においては、メタボローム研究に代表されるように、微量生体分子の分離・定量が重要である。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、その簡便性と精度の高さから、生体試料の分析において最も汎用されている分離分析法である。しかしながら、通常のHPLCにおいて用いられている粒子充填型カラムにおいては、分離性能に限界があることが知られており、必ずしも生体化合物の分析における高速分析の要求を満たしていなかった。

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に着目した。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は、シリコンを基板としたマイクロ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ため、従来のカラムクロマトグラフィーの分離能を超越することが理論的に示されており、従来技術以上の高速化・高性能化を可能とすると考えられたからである。

実際に、チップ流路内にピラー構造を作製したオンチップ液体クロマトグラフィーによる分離媒体の開発を行い、汎用されているカラムクロマトグラフィーの3倍の高性能化に成功した。さらに、拡散を最小限に抑えた低拡散型曲線流路を用いることにより、チップ上に長い分離流路を作製できることを明らかにした。このように、申請者は、オンチップ液体クロマトグラフィーによる高性能な分離媒体を開発してきた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、更なる高性能な分離媒体の開発を行い、微量生体成分のためのマイクロ化学分析システムを構築することを目的とした。具体的には、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を用いた生体試料中の分岐鎖アミノ酸の高速定量分析と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におけるグラジエント溶離システムの開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 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を用いた生体試料中の分岐鎖アミノ酸の高速定量分析

MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) における代表的な技術であるフォトリソグラフィとドライエッチングにより、シリコン基板に分離媒体としてピラーアレイを作製した。流路表面に酸化膜を成膜した後、シ

リコンとガラスの陽極接合を行った。作製したピラーにオクタデシルシリル基を表面修飾することで分離用チップとした。

分岐鎖アミノ酸(バリン、イソロイシン、ロイシン)は、4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)により蛍光誘導体化した。

(2) 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におけるグラジエント溶離システムの開発

(1)と同様に、ピラー構造を有する分離媒体を作製した。一枚のチップ上に、グラジエント溶離のためのテスラ構造を有する混合流路(長さ18 mm)、サンプル注入用流路とピラーアレイカラム(長さ58 mm)を作製した。

## 4. 研究成果

(1) 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を用いた生体試料中の分岐鎖アミノ酸の高速定量分析

背景において述べたように、これまでの研究により、低拡散型曲線流路を用いて一枚のチップ上に長い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を作製することにより、高い理論段数を得て、蛍光誘導体化アミノ酸の分離が可能となった。

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が、生体試料への適用可能か否かを確かめるために、慢性肝臓病、糖尿病、心臓病などの病態マーカーとして有用であることが知られている分岐鎖アミノ酸を例にとり、血中濃度の定量を試みた。

はじめに、NBD-分岐鎖アミノ酸の高速分析のための条件検討を行った。最適化の結果、移動相は、水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸(92/8/0.02, v/v/v)、流速は0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、蛍光顕微鏡による検出をカラム末端部で行うこととした。本条件下、NBD-分岐鎖アミノ酸を100秒で分離、検出することが可能となった(図1(A))。

LCにおける定量分析を行うためには、精度の高さが求められる。しかしながら、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におけるサンプルの注入量は1 nL程度であり、精度良く注入量を制御することは出来ない。そこで、内標準法を採用することにした。内標準物質として6-アミノカプロン酸を採用し、相対ピーク高さの再現性を算出したところ、CV値3.23%と良好な再現性が得られた。NBD-分岐鎖アミノ酸の検量線は、0.4  $\mu\text{M}$ から2 mMの範囲において良好な直線性が得られた。そこで、実試料、スポーツ飲料とヒト血漿サンプルへの応用を試みた。それぞれに内標準物質を加え、NBD-Fにより誘導体化後、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に注入した。試料中の分岐鎖アミノ酸は、良好に分離、検出された(図1(B), (C))。血中分岐鎖アミノ酸濃度は、

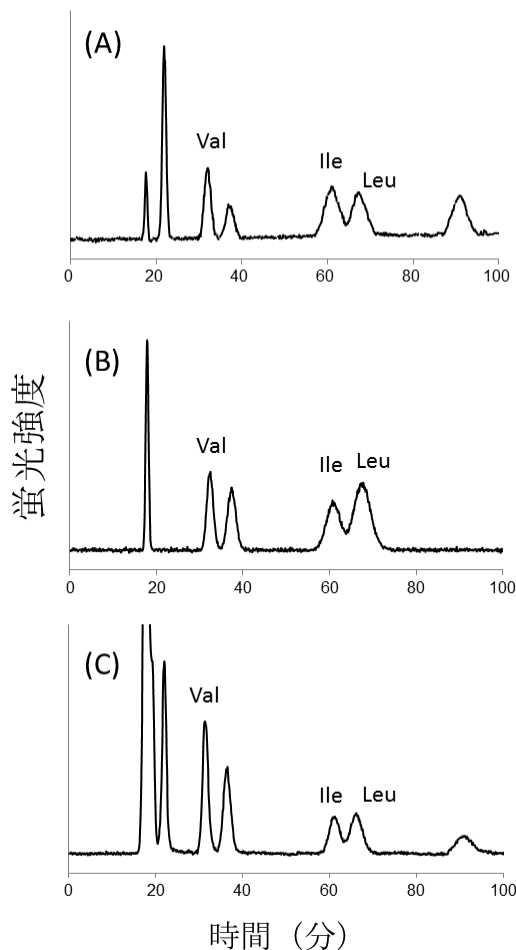


図1 分岐鎖アミノ酸のクロマトグラム。  
(A) 標品、(B) スポーツ飲料、(C) ヒト血漿サンプル

バリン  $191 \pm 4.0 \mu\text{M}$ 、ロイシン  $111 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 、イソロイシン  $72.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$ であった。日内、日間変動は、5%以下と良好であり、accuracyは、90.2-99.6%の範囲であった。同じ試料をHPLCシステムにて測定し濃度を算出したところ、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による定量値と一致した。

## (2) 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におけるグラジエント溶離システムの開発

通常逆相HPLCにおいては、極性の異なる化合物を一分析で分離するために、高極性と低極性の2つの移動相を混合し、その濃度を連続的に変化させるグラジエント溶離を行う。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において高速分析を行う際、通常のグラジエント溶離を行うと、流速が遅いためにポンプからカラムまでの遅延時間が生じてしまう。遅延時間を短くするためには、移動相の混合からカラムまでの距離を短くすれば良い。そのために、2種の移動相を混合するためのミキサーをチップ上に開発した。

幅が数百マイクロン程のマイクロ流路にお

いては、2種の異なる溶液は簡単には混合しない。そこで、オンチップにおける効率的な混合流路の設計を行った。流体力学シミュレーションにより、攪拌部の構造としてテスラ構造が最適であることが明らかとなった。実際に、テスラ構造を有するチップを作製し、混合効率を調べたところ、3 mmの流路長さで十分な混合効率を得られることが明らかとなった。

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にテスラ構造を組み込んだチップを作製した。はじめに、グラジエント溶離システムが機能するかどうかを検討した。移動相として、蛍光色素を含むメタノール溶液と水の2種溶液を用いて、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の入口における蛍光強度を計測した。グラジエント溶離プログラムを開始後わずか7秒で蛍光強度の上昇が見られ、その後、直線的に蛍光強度が上昇した(図2)。この結果より、遅延時間が非常に短く、また、2種溶液のグラジエント溶離が十分に行えることが明らかとなった。

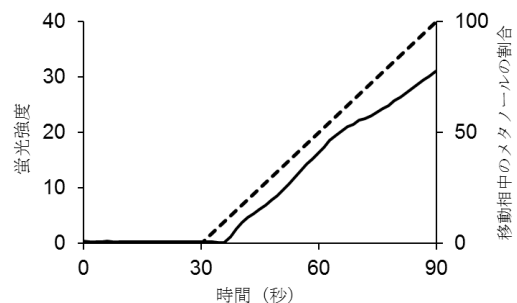


図2 ピラー構造を有するオンチップ液体クロマトグラフィーにおけるグラジエント溶離。実線、蛍光強度の変化；破線、グラジエント溶離プログラムの変化。

続いて、2種の蛍光色素(クマリン525とクマリン545)を用いて分離を行った。アイソクラティック溶離においては、55秒で十分な分離が得られた。グラジエント溶離条件下においては、グラジエント溶離時間を短くするにつれ、分析時間は短くなった。グラジエント溶離時間を30秒にした時には、分析時間は30秒となり、アイソクラティック溶離の半分の時間で分離が可能となった。また、クマリン545のピーク幅は、アイソクラティック溶離においては6.9秒であったのに対して、グラジエント溶離においては2.1秒となり、グラジエント溶離により、分離効率が改善することが明らかとなった。

さらに、4種脂肪族アミンのNBD-Fによる誘導体の分離を行った(図3)。アイソクラティック溶離においては、最後に溶出すべきNBD-オクチルアミンのピークが1300秒以内

に溶出されなかった。グラジエント溶離を用いることにより、NBD-ヘキシルアミンのピークが溶出し、4種脂肪族アミンが110秒以内に良好に分離された。また、クマリン色素分析のときと同様に、グラジエント溶離を用いることにより、アイソクラティック溶離時と比べて、鋭いピークを得た。以上の結果より、グラジエント溶離システムを有する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システムは、複雑な組成の生体試料の分離分析を可能にすると考えられる。

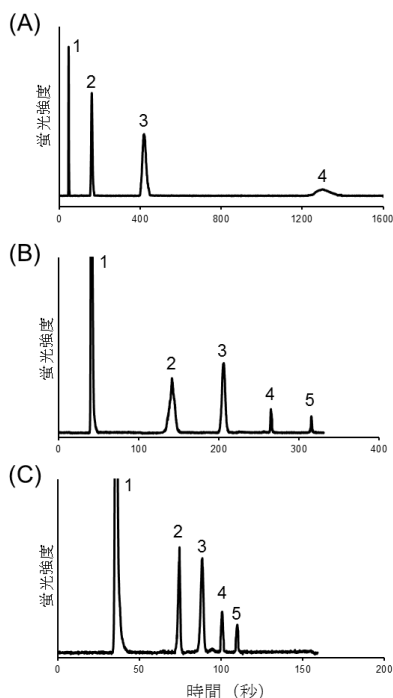


図3 脂肪族アミンのクロマトグラム。(A) アイソクラティック溶離条件、(B) グラジエント溶離条件(グラジエント時間450秒)、(C) グラジエント溶離条件(グラジエント時間90秒)。ピーク：1, NBD-OH; 2, NBD-pentylamine; 3, NBDhexylamine; 4, NBD-heptylamine; 5, NBD-octylamine。

#### 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 4 件)

1. Y. Song, K. Takatsuki, M. Isokawa, T. Sekiguchi, J. Mizuno, T. Funatsu, S. Shoji, M. Tsunoda, Fast and quantitative analysis of branched-chain amino acids in biological samples using a pillar array column. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, 査読有, 405, 2013, 7993-7999. DOI 10.1007/s00216-013-7034-7.
2. Y. Song, T. Funatsu, M. Tsunoda, Amino

acid analysis using core-shell particle column. *Journal of Chromatography B*, 査読有, 927, 2013, 214-217. DOI 10.1016/j.jchromb.2012.09.005.

3. Y. Song, M. Noguchi, K. Takatsuki, T. Sekiguchi, J. Mizuno, T. Funatsu, S. Shoji, M. Tsunoda, *Analytical Chemistry*, 査読有, 84, 2012, 4739-4745. DOI 10.1021/ac3001836.
4. Y. Song, T. Funatsu, M. Tsunoda, Amino acids analysis using a monolithic silica column after derivatization with NBD-F. *Journal of Chromatography B*, 査読有, 879, 2011, 335-340. DOI 10.1016/j.jchromb.2010.12.018.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 磯川宗生、宋彦延、高月克也、関口哲志、水野潤、船津高志、庄子習一、角田誠、ピラーアレイカラムを用いたヒト血漿中分岐鎖アミノ酸の定量分析、第3回新アミノ酸分析研究会、2013年12月2日、東京都文京区
2. 磯川宗生、青山千顕、野口真男、水野潤、庄子習一、船津高志、角田誠、高分解能オンチップ液体クロマトグラフィーの開発、第24回クロマトグラフィー科学会議、2013年11月12日、東京都文京区
3. Y. Song, K. Takatsuki, M. Isokawa, T. Sekiguchi, J. Mizuno, T. Funatsu, S. Shoji, M. Tsunoda, Quantitative determination of branched-chain amino acids in human plasma using on-chip chromatography with pillar array. RSC (Royal Society of Chemistry) Tokyo International Conference, 2013年9月5日、千葉県千葉市
4. 角田 誠、青山千顕、野口真男、水野潤、庄子習一、船津高志、オンチップ液体クロマトグラフィーによる高性能分離媒体の開発、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、神奈川県横浜市
5. M. Tsunoda, Gradient elution on-chip chromatography, Pittcon 2013, 2013年3月19日、Philadelphia USA
6. M. Tsunoda et al., Pillar Array Columns with Low Dispersion Turns for Pressure-Driven Reversed-Phase Liquid Chromatography. Pittcon2012, 2012年3月13日、Orland USA
7. M. Tsunoda, et al., Pillar Array Column with Low Dispersion Turns for Pressure-Driven Liquid Chromatography. 37th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2011年10月9日、中国・大連

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角田 誠 (TSUNODA, Makoto)  
東京大学・大学院薬学系研究科・講師  
研究者番号：10323453