

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460033

研究課題名(和文)ピラーアレイカラムを用いた生体分子の高感度分析システムの開発

研究課題名(英文)Development of analytical methods for biological compounds using pillar array columns

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)・講師

研究者番号：10323453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の分離分析法として、液体クロマトグラフィーが広く用いられている。しかしながら、これまでのクロマトグラフィーにおいては、分離能に限界があることが知られていた。そこで、本研究においては、理論的に高分離能を有することが知られてい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(ピラーアレイカラム)に着目し、研究を行った。本研究においては、ピラーアレイカラムの高性能化について検討した結果、圧力損失の小さい新規低拡散曲線構造の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Liquid chromatography is widely used for analysis of biological compounds. However, it is known that conventional chromatography has limitation of separation efficiency. Hence, I focused on pillar array column, which is theoretically proven to have higher separation ability. In this study, Low pressure-drop and low-dispersion turn was successfully developed.

研究分野：生体分析化学

キーワード：クロマトグラフィー アミノ酸 マイクロ化学チップ

1. 研究開始当初の背景

生体分子の分析には、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、更なる高速化を含めた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。研究代表者は、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(ピラーアレイカラム)に着目した。ピラーアレイカラムは、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。このため、従来の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。研究代表者は、実際に、ピラーアレイカラムの開発を行い、汎用されているHPLCの3倍の高性能化に成功した。開発した分離媒体を用いて、ヒト血中分岐鎖アミノ酸の高速分離・定量を行い、生体試料への応用が可能であることを明らかにした。さらに、チップ上に2溶液の混合流路を作製し、ピラーアレイカラムと組み合わせることにより、多成分化合物の高速グラジエント分離が可能であることを明らかにした。このように、申請者は、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。しかしながら、多成分生体分子の分離をピラーアレイカラムを用いて行うためには、更なる高性能化が必須であった。

2. 研究の目的

現在までのピラーアレイカラムを用いた研究の中心は分離の基礎的検討にあり、生体試料の分析については報告されていない。この理由の一つとして、現在のピラーアレイカラムは、その多くが高極性分子である生体分子に対する保持能力が低いことが挙げられる。そこで、その保持能力を向上させるために、本研究においては、圧力損失の小さい新規低拡散曲線構造の開発による長い流路の作製について検討する。

3. 研究の方法

(1) 計算流体力学シミュレーションを用いた分布制御型低拡散ターンにおけるピラー配置の決定

分布制御型低拡散ターンのコンセプトは、「ターンの流路幅を一定にしたまま、ピラーの密度を調整することで、ターン内外の移動相線速度分布を制御することにより、ターンにおける試料バンド形状の崩壊を防ぐ」ことである。このコンセプトを達成するピラー配置を決定するために、理論的計算によりピラー配置を算出し、その後、計算流体力学シミュレーション(computational fluid dynamics analysis, CFD分析)を用いてその配置の最適化を行った。理論式の導出は、Hagen-Poiseuilleの式に基づいて行った。

(2) 分布制御型低拡散ターンにおける試料拡散の観察

用いたデバイスは2本の直線中空流路と、それらを繋ぐ180°ターン、試料注入用流路から構成されている。このデバイスの作製は、既報におけるピラーアレイカラムの作製法に従い、紫外線フォトリソグラフィと深掘り反応性イオンエッチングによりシリコン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るにより行った。

(3) 分布制御型低拡散ターンを有するピラーアレイカラムにおける圧力損失の評価

(2)の手法と同じ作製法にて、分布制御型低拡散ターン、比較対象である等流路長低拡散ターン、単純ターンを有するピラーアレイカラムをそれぞれ作製した。これらのピラーアレイカラムをマイクロポンプに接続して移動相を送液し、流速に対するカラムの背圧を調べた。

(4) 分布制御型低拡散ターンを有するピラーアレイカラムにおける試料拡散の評価

ターン構造が試料拡散に及ぼす影響を検討するために、既報の等流路長低拡散ターンにおける試料拡散の評価と同様の実験を行った。各ターンを有するピラーアレイカラムを用いて蛍光色素2種(クマリン525: C525, クマリン545: C545)の分離を行い、ピラーアレイカラム上の6点(インレットの付近, 第1ターンの前, 第1ターンの後, 第2ターンの前, 第2ターンの後, アウトレット付近)で理論段高さを算出し、比較した。なお、色素の分離は、C18基で表面修飾したピラーアレイカラムにて逆相クロマトグラフィー条件にて行った。

4. 研究成果

(1) 計算流体力学シミュレーションを用いた分布制御型低拡散ターンにおけるピラー配置の決定

理論式に基づいたピラー配置を有するターンについて、CFD 分析による試料拡散シミュレーションを行ったところ、予想していたよりターン内側で試料バンドの進行が遅く、ターンを通過した試料バンドが流路に対して大きく傾いてしまった。この結果を受け、ターンの内側の密度がより低くなるようにピラーの再配置を行った。

図1に、単純ターンと、ピラー配置を最適化した分布制御型低拡散ターンにおける試料拡散シミュレーションの結果を示す。単純ターンでは、ターン通過後に試料バンドが流路に対して大きく傾いた（流路方向に対して拡散が大きい）のに対し（図1A）、最適化した分布制御型低拡散ターンではその拡散が抑制されるという結果を得た（図1B）。

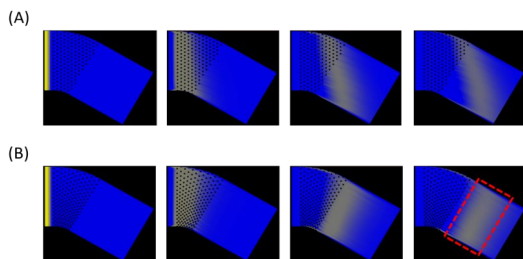


図1 CFD 分析による試料拡散シミュレーション (A) 単純ターン、(B) 最適化後の分布制御型低拡散ターン

(2) 分布制御型低拡散ターンにおける試料拡散の観察

(1)の検討により、分布制御型低拡散ターンにおけるピラー配置が決定された。続いて、このターンを有する流路を搭載したデバイスを作製し、実際に分布制御型低拡散ターンが試料バンド拡散を抑制可能であるか検討した。

図2に、単純ターンと、分布制御型低拡散ターンにおける試料の動きの結果を示す。(1)のシミュレーションの結果と同様に、単純ターンではターン通過後に試料先端の形状が流路に対して大きく傾いたのに対し（図2A）、分布制御型低拡散ターンではその形状が維持されるという結果を得た（図2B）。この結果から、分布制御型低拡散ターンは実際に試

料拡散を抑制可能であることが示唆された。

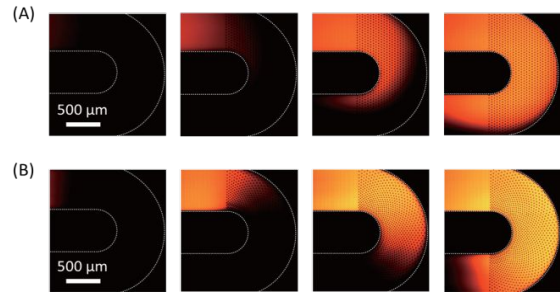


図2 実際に作製したターンにおける試料拡散の様子 (A) 単純ターン、(B) 分布制御型低拡散ターン

(3) 分布制御型低拡散ターンを有するピラーアレイカラムにおける圧力損失の評価

次に、分布制御型低拡散ターンを有するピラーアレイカラムを作製し、その圧力損失を評価した。

図3にその結果を示した。等流路長低拡散ターンと比較して、分布制御型低拡散ターンでは圧力損失が1/6程度に低減されることが明らかとなった。また、分布制御型低拡散ターンの流路幅は単純ターンと等しいため、両ターンでは圧力損失がほぼ等しいという結果が得られた。実際には、分布制御型低拡散ターンの方が単純ターンよりも圧力損失が小さい傾向が見られ、これはターンのピラー間隔の差に由来すると考えられた。

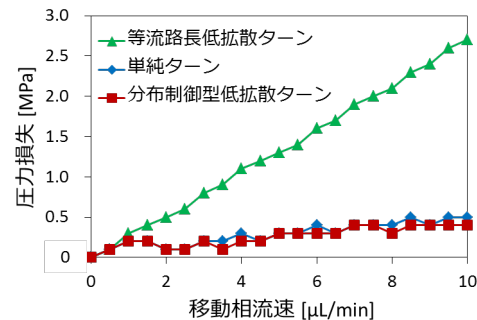


図3 各ターンを有するピラーアレイカラムの圧力損失

(4) 分布制御型低拡散ターンを有するピラーアレイカラムにおける試料拡散の評価

(3)において、分布制御型低拡散ターンが実際に低圧力損失であることが示されたので、続いてターンにおける試料拡散の評価を行った。

全てのピラーアレイカラムにおいて、C525とC545の分離に成功した。また、単純ターンを有するピラーアレイカラムでは、その他の低拡散ターンを有するピラーアレイカ

ムに比べて、各ピークの幅が広く、分離能力が低かった。これらのクロマトグラムから理論段高さを算出し、各検出点に対してプロットした。単純ターンでは大きな試料拡散が起こるのに対し、分布制御型低拡散ターンは等流路長低拡散ターンと同等に試料拡散を抑制することが明らかとなった。

以上、本研究では、「低拡散かつ低圧力損失ターンを有するピラーアレイカラムの開発」に成功した。低拡散かつ低圧力損失という性質を有する新規ターン構造として、分布制御型低拡散ターンの検討を行い、このターンが等流路長低拡散ターンと同等の試料拡散抑制効果を有しながらも、圧力損失はその1/6倍と、非常に低圧力損失であることを示した。本研究で開発した分布制御型低拡散ターンは、ピラーアレイカラムの更なる流路の延長や、ピラーアレイカラムへの高流速の適用を可能にする、非常に有用な新規ターン構造であるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. M. Isokawa, K. Kobayashi, Y. Miyoshi, M. Mita, T. Funatsu, K. Hamase, M. Tsunoda, Quantification of Biological Thiols in the Plasma of a Homocystinuria Model with Cystathionine β -synthase Deficiency Utilizing Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Chromatography* 37 (2016) 147-151. DOI: 10.15583/jpchrom.2016.015 査読有
2. Y. Song, K. Takatsuki, T. Sekiguchi, T. Funatsu, S. Shoji, M. Tsunoda, Retention and Bandwidth Predictions by Fast Gradient Elution Chromatography Using a Pillar Array Column. *Chromatography* 37 (2016) 111-116. DOI: 10.15583/jpchrom.2016.008 査読有
3. Y. Song, K. Takatsuki, T. Sekiguchi, T. Funatsu, S. Shoji, M. Tsunoda, Rapid quantitative method for the detection of phenylalanine and tyrosine in human plasma using pillar array columns and gradient elution. *Amino Acids* 48 (2016) 1731-1735. DOI: 10.1007/s00726-016-2248-6 査読有
4. M. Isokawa, K. Takatsuki, Y. Song, K. Shih, K. Nakanishi, Z. Xie, D. Yoon, T. Sekiguchi, T. Funatsu, S. Shoji, M. Tsunoda, Liquid Chromatography Chip with Low-Dispersion and

Low-Pressure-Drop Turn Structure Utilizing a Distribution-Controlled Pillar Array. *Anal. Chem.* 88 (2016) 6485-6491. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01201 査読有

5. M. Isokawa, T. Shimosawa, T. Funatsu, M. Tsunoda, Determination and characterization of total thiols in mouse serum samples using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1019 (2016) 59-65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.11.038 査読有

6. T. Kanamori, T. Funatsu, M. Tsunoda, Evaluation of the Effects of Sample Solutions and Injector Wash Solutions on Separation Efficiency in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Chromatography* 36 (2015) 123-126. DOI:10.15583/jpchrom.2015.028 査読有

7. T. Kanamori, M. Isokawa, T. Funatsu, M. Tsunoda, Development of analytical method for catechol compounds in mouse urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 985 (2015) 142-148. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.01.038 査読有

8. M. Isokawa, T. Funatsu, M. Tsunoda, Evaluation of the effects of sample dilution and volume in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chromatographia* 77 (2014) 1553-1556. DOI: 10.1007/s10337-014-2748-z 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. M. Tsunoda “DEVELOPMENT OF PILLAR ARRAY COLUMNS WITH LOW-DISPERSION TURNS” 16th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, 2016年11月9日, Johor Bahr, Malaysia
2. M. Tsunoda, M. Isokawa, K. Takatsuki, T. Sekiguchi, T. Funatsu, S. Shoji “Development of pillar array columns with low dispersion and low pressure drop turns” 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2016年6月21日, San Francisco, USA
3. 磯川宗生, 中西完貴, Yoon Dong Hyun, 関口哲志, 船津高志, 庄子習一, 角田誠「アミド修飾ピラーアレイカラムを用いた生体チオールのオンチップ分離」第14回次

世代を担う若手のためのフィジカル・フォーラム、2016年8月28日、ロジ舞洲（大阪府大阪市）

4. 角田誠「オンチップ液体クロマトグラフィーの開発と生体試料への応用」第26回クロマトグラフィー科学会議、2015年11月12日、九州大学（福岡県）
5. M. Tsunoda “Analysis of biological compounds using a pillar array column” 21st International Symposium on Separation Sciences、2015年7月2日、Ljubljana, Slovenia
6. 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 pillar array columns” 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques、2015年6月22日、Geneva, Switzerland
7. 金森貴宏、船津高志、角田誠「親水性相互作用液体クロマトグラフィーによるカテコールアミン類の分析法の開発」第25回クロマトグラフィー科学会議、2014年12月11日、京都大学（京都府）
8. M. Tsunoda, Y. Song, K. Takatsuki, T. Sekiguchi, J. Mizuno, T. Funatsu, S. Shoji “Quantitative determination of branched-chain amino acids in human plasma using pillar array columns” 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, 2014年12月7日、京都大学（京都府）
9. 角田誠「微量生体分子の高性能分離・高感度分析法の開発とその応用」第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日、昭和薬科大学（東京都）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：ピラーアレイミキサー及びこれを使用した試料処理装置

発明者：角田誠 他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-018648

出願年月日：2017年2月3日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

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（薬学部）・

講師

研究者番号：10323453