

博士論文

論文題目 生体分子分析のためのマイクロ流体デバイスの開発

氏 名 磯川 宗生

# 目次

略語集	3
<b>第1章 序論</b>	
1.1. 本研究の背景	5
1.2. 本研究の目的と研究内容	8
1.3. 図表	9
1.4. 引用文献	12
<b>第2章 低拡散かつ低流路抵抗なターン構造を有するピラーアレイカラムの開発</b>	
2.1. 背景と目的	15
2.2. 試薬, 装置及び実験方法	16
2.3. 結果と考察	
2.3.1. 分布制御型ターンにおけるピラー配置の決定	21
2.3.2. 分布制御型ターンにおける溶液の流れの観察	23
2.3.3. 分布制御型ターンの流路抵抗の評価	23
2.3.4. 分布制御型ターンにおける試料拡散の評価	23
2.3.5. 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを用いたアミノ酸誘導体の分離	24
2.4. 小括	25
2.5. 図表	26
2.6. 引用文献	35
<b>第3章 親水性相互作用液体クロマトグラフィーを用いた生体分子分析法に関する検討</b>	
3.1. 背景と目的	37
3.2. 試薬, 装置及び実験方法	39
3.3. 結果と考察	
3.3.1. 生体チオールの親水性相互作用液体クロマトグラフィー分析に適した 蛍光誘導体化試薬の検討	44
3.3.2. アミドカラムと SBD-F を用いた生体チオールの分離分析検討	46
3.3.3. ホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの分析	49
3.4. 小括	51
3.5. 図表	52

3.6. 引用文献	62
<b>第4章 高極性官能基修飾ピラーアレイカラムの開発による親水性分子の親水性相互作用液体クロマトグラフィー分離</b>	
4.1. 背景と目的	65
4.2. 試薬, 装置及び実験方法	66
4.3. 結果と考察	
4.3.1. ピラーアレイカラムの表面修飾官能基としてのアミド基の選択	72
4.3.2. ピラーアレイカラムの素材に対するアミド修飾反応の確認	72
4.3.3. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける親水性分子の保持の評価	73
4.3.4. アミド修飾法の再検討	74
4.3.5. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける親水性分子の保持の再評価	75
4.3.6. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける蛍光誘導体化生体チオールの分離	76
4.4. 小括	77
4.5. 図表	78
4.6. 引用文献	85
<b>第5章 誘導体化反応ユニットの開発による成分分離－誘導体化－検出の自動化</b>	
5.1. 背景と目的	87
5.2. 試薬, 装置及び実験方法	89
5.3. 結果と考察	
5.3.1. ポストカラム誘導体化反応ユニットとしてのピラーアレイ構造の選択	95
5.3.2. 数値流体力学解析によるピラーアレイミキサーの評価	95
5.3.3. マイクロ流体デバイスを用いたピラーアレイミキサーの評価	96
5.3.4. マイクロ流体デバイスを用いたオンチップ成分分離－誘導体化－検出	98
5.4. 小括	99
5.5. 図表	100
5.6. 引用文献	108
<b>第6章 総括及び今後の展望</b>	
6.1. 総括	109
6.2. 今後の展望	110
6.3. 引用文献	112
<b>謝辞</b>	113

## 略語集

ABAP	2,2'-azobis(2-methylamidinopropane)dihydrochloride	
ABD-F	4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole	
Aca	6-aminocaproic acid	
APS	ammonium persulfate	
C525	coumarin 525	
C545	coumarin 545	
CA	cysteamine	
CBS	Cystathionine $\beta$ -synthase	
CE	capillary electrophoresis	(キャピラリー電気泳動)
CFD	computational fluid dynamics	(数値流体力学)
Cys	cysteine	
CysGly	cysteinylglycine	
DMOS	dimethyloctadecylchlorosilane	
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N,N</i> -tetraacetic acid	
EGH	Exponential-Gaussian hybrid	
ESI	electrospray ionization	
FWHM	full width at half maximum	(半値全幅)
$\gamma$ GluCys	$\gamma$ -glutamylcysteine	
GSH	glutathione	
Hcy	homocysteine	
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography	(親水性相互作用液体クロマトグラフィー)
IEC	ion-exchange chromatography	(イオン交換クロマトグラフィー)
LC	liquid chromatography	(液体クロマトグラフィー)
Leu	leucine	
MPG	<i>N</i> -(2-mercaptopropionyl) glycine	
MPTMS	methacryloxypropyltrimethoxysilane	
MS	mass spectrometry	(質量分析)
NAC	<i>N</i> -acetylcysteine	
NBD-F	4-fluoro-7-nitro-2,1,3- benzoxadiazole	
NDA	naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde	
NPLC	normal-phase liquid chromatography	(順相液体クロマトグラフィー)
Phe	phenylalanine	

Pro	proline	
q-Orbitrap-MS	quadrupole-Orbitrap mass spectrometer	(四重極-オービトラップ型質量分析器)
R123	rhodamine 123	
RPLC	reversed-phase liquid chromatography	(逆相液体クロマトグラフィー)
RSD	relative standard deviation	
SBD-F	ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid	
SD	standard deviation	
SEC	size-exclusion chromatography	(サイズ排除クロマトグラフィー)
SPE	3-(2-( <i>N</i> -methacryloyloxyethyl)- <i>N,N</i> -dimethylammonio)propane sulfonate	
STPE	sodium 2-(2-thiobenzoylsulfanyl propionylamino) ethanesulfonate	
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine	
TFA	trifluoroacetic acid	
6TMR	6-carboxy-tetramethylrhodamine	
Val	valine	
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy	(X線光電子分光)

# 第 1 章 序論

## 1.1. 本研究の背景

### 1.1.1. 生体分子の簡便・迅速な分析を目指して：マイクロ流体デバイス

生命現象や病態の詳細な解析を行うためには、代謝や特定の機能に関連のある生体分子の量的関係を明らかにすることが重要である。医療分野においては、特定の生体分子の量的変動や異常値が、健康診断や疾病診断などの指標として用いられている。例えば、血液中の糖、尿酸の高値はそれぞれ糖尿病、高尿酸血症の診断に用いられているほか<sup>1-3</sup>、血液中アミノ酸、有機酸、脂肪酸等の濃度が先天性代謝異常のスクリーニングの指標として採用されている<sup>4,5</sup>。また現在では、point-of-care 診断や個別化医療が推進されており、これを実現するためには、一般の医療機関においても生体試料分析ができるようになる必要があると考えられる。疾病診断法や検査法の低侵襲化を図りつつ、一般の医療機関において多数の検体の分析を行っていくためには、分析法の必要試料量の低減、分析操作の簡略化や自動化、分析の高速化を実現しなければならない。

一方、研究分野においては、生体分子の量的関係の評価を一細胞レベルで行う試みが始まっている<sup>6-9</sup>。細胞集団の平均値としてではなく細胞ごとの情報を得ることで、疾患などに関与する細胞を集団の中から見つけ出し、その詳細な機能解析を行うためである。このための生体分子分析法は、必要試料量を細胞容積レベル(pL~nL)まで低減させることを要求されている。また、一細胞分析を行う場合には、その細胞群の特徴づけを行うために多数の細胞を分析する必要があるため、point-of-care 診断等における分析法と同様に、分析操作の自動化、分析の高速化が求められている。

これらの要請に応える新たな分析機器として、近年、マイクロ流体デバイスの研究開発が盛んに行われている(図 1.1)<sup>10-15</sup>。マイクロ流体デバイスは、 $\mu\text{m}$  オーダーの流路や構造を有するチップのことを指し、その微小流路を分析操作の場(ユニット)として利用する。このユニットの体積は非常に小さい(pL~ $\mu\text{L}$ )ことから、汎用分析法(必要試料量： $\mu\text{L}$ ~mL)と比べて必要試料を大きく低減することができる。また、微小流路内ではスケール効果(例えば、流路幅が  $1/x$  になると拡散時間は  $1/x^2$  になることや、比表面積の増大など)により、化学反応や酵素反応、熱交換などの高効率化が可能になるため<sup>16</sup>、分析の高速化が見込まれる。さらに、様々な分析機能をもつユニットを 1 枚のチップに集積化することで、分析の自動化が可能になる。これらの特徴を有することから、マイクロ流体デバイスは、一細胞分析や point-of-care 診断を達成するための重要な技術として、注目を集めている。

生体分子分析を 1 枚のマイクロ流体デバイス上で行うためには、試料前処理、成分分離、誘導体化反応、検出等を行うユニットの開発、統合が必要である(図 1.1)。この中でも分離部は、目

的分子に応じた分離媒体の採用が必要であり、その分離能力がマイクロ流体デバイス全体の性能を左右する、重要な機能部位である。例えば、DNA や RNA を標的とした場合には、ハイブリダイゼーションを利用した DNA アレイが多く用いられ、またタンパク質を標的とした場合には、抗体-抗原反応を利用したデバイスが多く開発されてきた<sup>11,12,17,18</sup>。核酸やタンパク質などの巨大分子に対しては、上記のような目的分子-分離部間の構造特異的な相互作用が利用可能である。一方で生体低分子は、一連の代謝物間で構造が非常に類似しているため、その分離にはより一般的な相互作用を有し、かつ分離能力の高い手法が必要となる。

### 1.1.2. 生体低分子のための成分分離ユニット：ピラーアレイカラムを用いた液体クロマトグラフィー(liquid chromatography, LC)ユニット

一般的な生体低分子の分離分析法としては、キャピラリー電気泳動(capillary electrophoresis, CE)や液体クロマトグラフィー(liquid chromatography, LC)が汎用されている。CE ユニットを搭載したマイクロ流体デバイスについては、CE が非常に高い分離能力を有していることや、チップ上における送液操作が電氣的に容易に行えることから、その開発が盛んに行われてきた<sup>19-22</sup>。しかしながら CE は、電荷のない分子の分析が難しい、再現性が低いなどの問題を有している。これに対して LC は、広範な生体分子の分析が可能であり、高い再現性を有しているにも関わらず、LC ユニットを搭載したマイクロ流体デバイスの報告は多くない。その要因として、汎用 LC カラム構造をチップに導入しても十分な分離能力を得られないことが挙げられる<sup>23</sup>。しかしながら、一細胞分析や point-of-care 分析では様々な生体分子の分析を再現良く行うことが求められることから、マイクロ流体デバイスのための高分離能な LC ユニットの開発は重要である。

汎用 LC カラム構造は、粒子充填型とモノリス型に大別される。粒子充填型カラムは、内径 0.1~5 mm、長さ 50~250 mm の筒に、直径 1.5~5  $\mu\text{m}$  のシリカ粒子(カラムごとに決まった粒子径をもつ)を充填したものであり、モノリスカラムは同様の筒の中に、化学反応によって作製された網目構造を有するものである。LC カラムの分離性能は理論段高さ( $H$ )によって評価でき、この理論段高さは van Deemter 式によって表される(式 1.1)。

$$H = A + B/v + Cv \quad (1.1)$$

$v$  は移動相の流速、 $A, B, C$  は定数である。 $A$  項は多流路拡散、 $B$  項は流れ方向の自由拡散、 $C$  項は移動相と固定相の間での物質移動に由来する項である。 $A$  項はカラム内部構造の不均一性(粒子径、粒子の配置、網目構造の太さや配置等のばらつき)に由来しており、汎用 LC カラムにおいては、この不均一性を完全に除くことが出来ないため、その分離効率に限界があることが示されている<sup>23</sup>。さらにマイクロ流路では、作製方法の問題で流路断面を円形にすることが困難であり、またその断面積が非常に小さいことから、充填剤やモノリス構造を導入した場合、汎用 LC カラムと比較して壁面付近の不均一性が大きくなってしまいうという問題があった(図 1.2)<sup>24-26</sup>。

これまでに、内部構造の不均一性が LC カラムの分離効率に限界を与えていることを述べてきたが、これは同時に、均一な内部構造を有するカラムを作製すれば、その分離効率を格段に向上させることが出来る、ということを示唆している。1998 年に Regnier らにより、半導体微細加工

技術を用いてマイクロ流路中に支柱状の構造体を規則的に並べ（ピラーアレイ構造）、その表面を相互作用面として利用した電気クロマトグラフィーが報告された（図 1.3）<sup>27</sup>。半導体微細加工技術によるマイクロ流体デバイスの作製は、設計した流路構造をフォトマスクに描画し、これを転写したシリコン基板を掘り下げることにより行う。この技術を用いることで設計図通りの構造を精密に作製できるため、非常に規則性の高い流路構造を得ることが可能となった。所属研究室や Desmet らはこのピラーアレイ構造に着目し、LC ユニットとしてのピラーアレイ構造（ピラーアレイカラム）の開発を行ってきた<sup>28,29</sup>。これまでの研究によって、ピラーアレイカラムはその内部構造の均一性により式 1.1 の  $A$  項を低減できることから、汎用 LC カラムよりも優れた分離性能を有していることが、理論的にも実験的にも示されている（図 1.4）<sup>23,28,29</sup>。

### 1.1.3. ピラーアレイカラムを搭載したマイクロ流体デバイスの課題

以上に述べたように、所属研究室では、マイクロ流体デバイスへの成分分離ユニットとして、高分離能な LC が可能であるピラーアレイカラムを採用し、その研究を行ってきた。しかしながら、ピラーアレイカラムは高い分離効率を有しながらも、生体分子の分析にはほとんど応用されてこなかった。その主な要因としては、1) ピラーアレイカラムは無孔質であり、相互作用面積が小さく分子保持が弱いこと、2) 生体低分子はその多くが親水性分子であるにも関わらず、親水性分子の保持が弱い逆相 LC (reversed-phase LC, RPLC) による分離を行っていたこと、が挙げられる。

1) を解決するために、既にピラーアレイカラム表面の多孔質化が報告されてきた<sup>30-34</sup>。しかしながら、作製法上の問題により、シリコン基板上に作製できる直線流路は 10 cm 未満であるため、汎用 LC カラムのカラム長（一般的なものは 15, 25 cm）と同等のものを作製するためにはターン構造の開発が必須であった。そこで所属研究室では、ターンにおける試料拡散を抑制した等流路長低拡散ターンを開発し、ピラーアレイカラムに導入してきた（図 1.5）<sup>28</sup>。さらに、このピラーアレイカラムを用いて、ヒト血漿試料中の分岐鎖アミノ酸の分析にも成功している<sup>35,36</sup>。しかしながら、等流路長低拡散ターンはターンにおける流路幅が狭く、流路抵抗が大きいという問題があった。高い流路抵抗は送液時に過度な背圧を生むため、デバイス自体の破損を招くほか、マイクロ流体デバイス上で他のユニットと統合した際の圧力調節を困難にする。このことから、ピラーアレイカラムのターン構造として、低拡散かつ低流路抵抗な新規ターン構造の開発が望まれている。一方、2) に対する解決策は親水性分子の保持に適した RPLC 以外の分離モードを採用することであるものの、これについては未だに報告がない。

また、ピラーアレイカラムに限らず、LC ユニートを搭載したマイクロ流体デバイスの課題として、LC 分離ユニット以外のユニット（試料前処理、誘導体化反応、検出）のうち、誘導体化反応ユニットとの統合の報告がないことが挙げられる。誘導体化反応ユニットは、分析対象分子の検出器に対する応答を増強させることを目的に、対象分子の誘導体化を行うユニットである。LC ユニートを搭載したマイクロ流体デバイスを用いた先行研究では、試料の誘導体化は、デバイスに試料を導入する前に手動で行われてきた<sup>28,35-38</sup>。しかしながら、一細胞分析や point-of-care 診断へ



の応用を考慮すると、この誘導体化をマイクロ流体デバイス上で行うことが望ましい。

## 1.2. 本研究の目的と研究内容

本研究では「生体分子分析のためのマイクロ流体デバイスの開発」を目的とし、これを達成するために、1) 低拡散かつ低流路抵抗なターン構造を有するピラーアレイカラムの開発、2) 高極性官能基修飾ピラーアレイカラムの開発による親水性分子の親水性相互作用液体クロマトグラフィー(hydrophilic interaction LC, HILIC)分離、3) 誘導体化反応ユニットの開発による成分分離—誘導体化—検出の自動化、を行った。具体的には、下記の研究を行った。

1) 低拡散かつ低流路抵抗な新規ターン構造として、分布制御型ターンの開発を行った。分布制御型ターンの性能の検討と、このターンを有するピラーアレイカラムを用いたアミノ酸の分離について、第2章で述べる。

2) ピラーアレイカラムの分離モードを、RPLC から HILIC へと変更するための検討を行った。HILIC は主に親水性分配によって親水性分子を強く保持する分離モードである。まずは、汎用 LC カラムを用いた予備検討として行った、生体チオールを HILIC 分離する際の誘導体化試薬や流路表面官能基の探索と、HILIC による生体試料の分析について、第3章で報告する。また、ピラーアレイカラム流路表面の HILIC 官能基（アミド基）修飾法の開発と、ピラーアレイカラムを用いた生体チオールの HILIC 分離について、第4章で述べる。

3) LC ユニットの downstream で誘導体化反応を行うための、ポストカラム誘導体化反応ユニットとして、ピラーアレイミキサーの開発を行った。ピラーアレイミキサーの性能の検討と、ピラーアレイミキサーとピラーアレイカラムを搭載したマイクロ流体デバイスを用いた、試料成分のオンチップ成分分離—誘導体化—検出について、第5章で報告する。

### 1.3. 図表

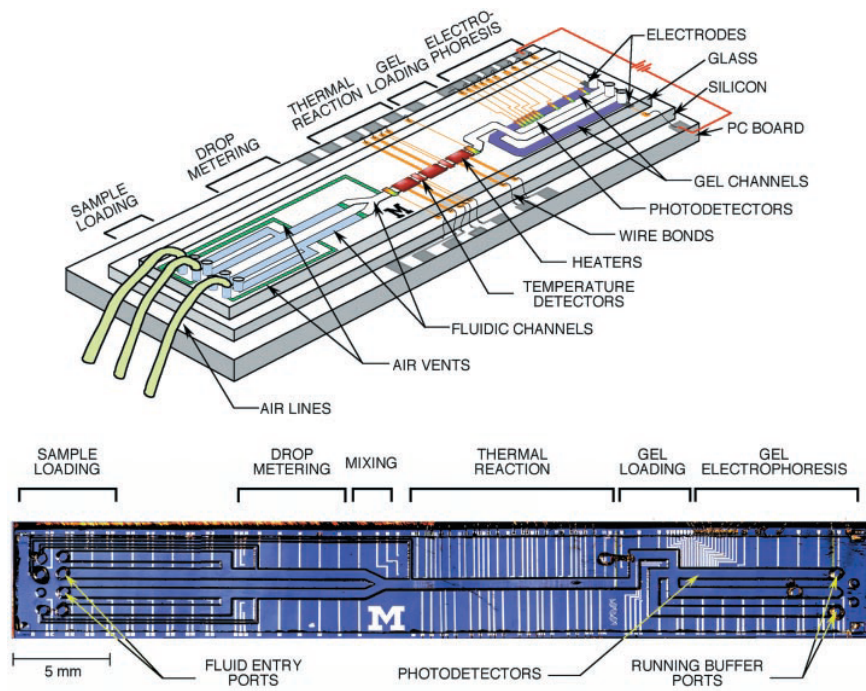


図 1.1. 生体分子分析のためのマイクロ流体デバイスの例：DNA 分析デバイス<sup>11</sup>. 上：デバイスの概念図. 下：デバイスの写真.

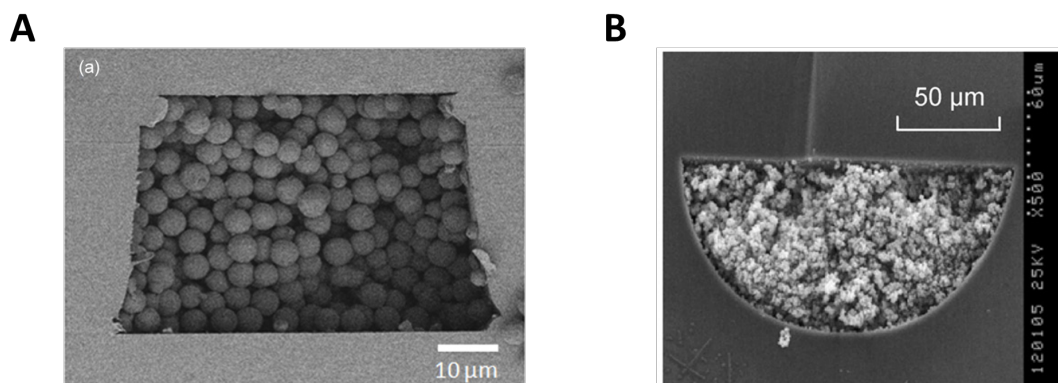


図 1.2. マイクロ流体デバイスの LC カラム断面の電子顕微鏡画像. (A) 粒子充填型カラム<sup>24</sup>. (B) モノリスカラム<sup>26</sup>.

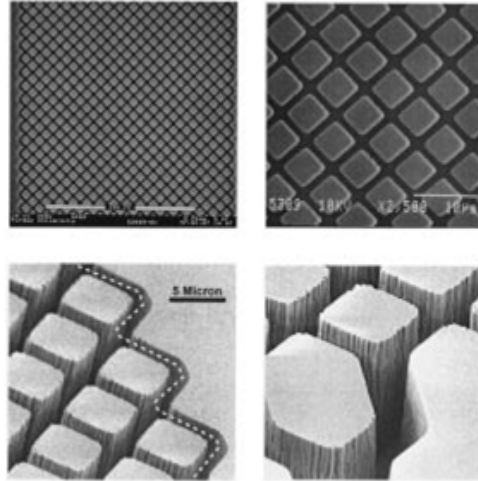


図 1.3. マイクロ流体デバイス上に作製されたピラー構造<sup>27</sup>.

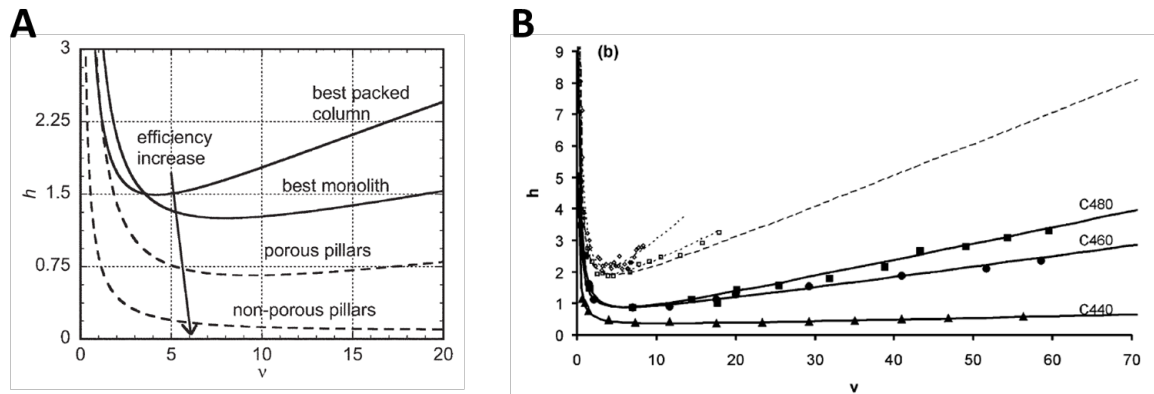


図 1.4. (A) 流体力学解析により得られた誘導型の van Deemter プロット<sup>23</sup>. 縦軸は規格化された理論段高さ( $h$ ), 横軸は規格化された移動相線速度( $v$ ). (B) ピラーアレイカラムを用いて蛍光色素を分離した際の, 誘導型の van Deemter プロット<sup>29</sup>. 点線が汎用 LC カラムを用いた際の  $h$ - $v$  曲線, 実線がピラーアレイカラムを用いた際の  $h$ - $v$  曲線.

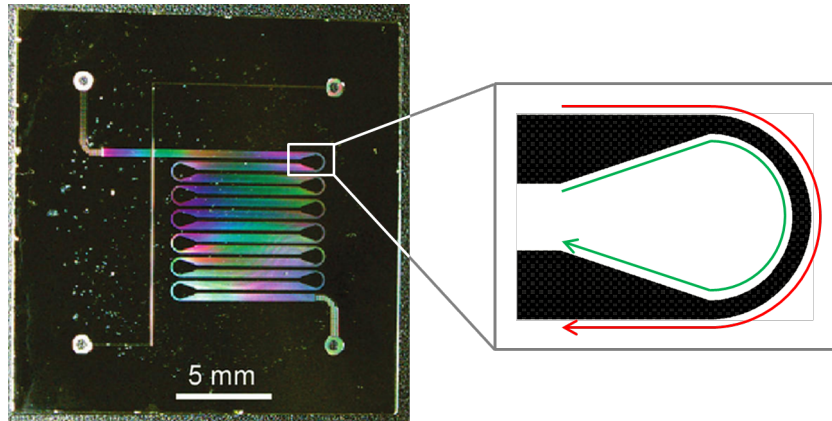


図 1.5. 等流路長ターンを有するピラーアレイカラム<sup>28</sup>. ターンの外周と内周の距離収差が無くなるように設計されている.

## 1.4. 引用文献

- (1) Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z. *Diabet. Med.* **1998**, *15*, 539-553.
- (2) Bardin, T.; Richette, P. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2014**, *26*, 186-191.
- (3) Sattui, S. E.; Gaffo, A. L. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2016**, *8*, 145-159.
- (4) Almannai, M.; Marom, R.; Sutton, V. R. *Curr. Opin. Pediatr.* **2016**, *28*, 694-699.
- (5) Lavin, L. R.; Higby, N.; Abramo, T. *Pediatr. Emerg. Care* **2015**, *31*, 661-666.
- (6) Baslan, T.; Hicks, J. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 557-569.
- (7) Krasnitz, A.; Kendall, J.; Alexander, J.; Levy, D.; Wigler, M. *Trends Mol. Med* **2017**, *23*, 594-603.
- (8) Otte, J.; Wruck, W.; Adjaye, J. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 2226-2240.
- (9) Tritschler, S.; Theis, F. J.; Lickert, H.; Böttcher, A. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 974-990.
- (10) Akyazi, T.; Basabe-Desmonts, L.; Benito-Lopez, F. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1001*, 1-17.
- (11) Burns, M. A.; Johnson, B. N.; Brahmasandra, S. N.; Handique, K.; Webster, J. R.; Krishnan, M.; Sammarco, T. S.; Man, P. M.; Jones, D.; Heldsinger, D.; Mastrangelo, C. H.; Burke, D. T. *Science* **1998**, *282*, 484-487.
- (12) Kang, C.-C.; Yamauchi, K. A.; Vlassakis, J.; Sinkala, E.; Duncombe, T. A.; Herr, A. E. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1508-1530.
- (13) Kraly, J. R.; Holcomb, R. E.; Guan, Q.; Henry, C. S. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *653*, 23-35.
- (14) Murphy, T. W.; Zhang, Q.; Naler, L. B.; Ma, S.; Lu, C. *Analyst* **2018**, *143*, 60-80.
- (15) Song, J.; Ryu, H.; Chung, M.; Kim, Y.; Blum, Y.; Lee, S. s.; Pertz, O.; Jeon, N. L. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *104*, 58-64.
- (16) Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. *Sens. Actuator B-Chem.* **1990**, *1*, 244-248.
- (17) Ferguson, B. S.; Buchsbaum, S. F.; Swensen, J. S.; Hsieh, K.; Lou, X.; Soh, H. T. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6503-6508.
- (18) Gerver, R. E.; Herr, A. E. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10625-10632.
- (19) Gilliland, W. M.; Mellors, J. S.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 13320-13325.
- (20) Li, M. W.; Martin, R. S. *Analyst* **2008**, *133*, 1358-1366.
- (21) Pagaduan, J. V.; Sahore, V.; Woolley, A. T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 6911-6922.
- (22) Ruige, W.; Fung, Y. S. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 907-922.
- (23) Eijkel, J. *Lab Chip* **2007**, *7*, 815-817.
- (24) Ehlert, S.; Trojer, L.; Vollmer, M.; van de Goor, T.; Tallarek, U. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 313-320.
- (25) Grinias, J. P.; Kennedy, R. T. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *81*, 110-117.
- (26) Wang, X.-L.; Zhu, Y.; Fang, Q. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1246*, 123-128.
- (27) He, B.; Tait, N.; Regnier, F. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3790-3797.
- (28) Aoyama, C.; Saeki, A.; Noguchi, M.; Shirasaki, Y.; Shoji, S.; Funatsu, T.; Mizuno, J.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1420-1426.
- (29) De Malsche, W.; Eghbali, H.; Clicq, D.; Vangeloooven, J.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5915-5926.

- (30) Callewaert, M.; De Beeck, J. O.; Maeno, K.; Sukas, S.; Thienpont, H.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *Analyst* **2014**, *139*, 618-625.
- (31) De Malsche, W.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5391-5400.
- (32) Detobel, F.; De Bruyne, S.; Vangelooven, J.; De Malsche, W.; Aerts, T.; Terryn, H.; Gardeniers, H.; Eeltink, S.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7208-7217.
- (33) Futagami, S.; Hara, T.; Ottevaere, H.; Baron, G. V.; Desmet, G.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1523*, 234-241.
- (34) De Malsche, W.; De Bruyne, S.; Op De Beeck, J.; Eeltink, S.; Detobel, F.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 2010-2017.
- (35) Song, Y.; Takatsuki, K.; Isokawa, M.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7993-7999.
- (36) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Amino Acids* **2016**, *48*, 1731-1735.
- (37) Song, Y.; Noguchi, M.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4739-4745.
- (38) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 111-116.

## 第2章 低拡散かつ低流路抵抗なターン構造を有する ピラーアレイカラムの開発<sup>1</sup>

### 2.1. 背景と目的

ピラーアレイカラムにおける分子の保持能力を向上させるための手段の一つとして、ターン構造の導入による流路の延長が挙げられる。このターン構造のうち最も単純なものとして、流路幅が一定のターン（単純ターン、図 2.1A）が考えられる。しかしながらこの構造では、ターンの内側と外側で分子の通過時間が異なるため、ターンにおいて試料バンドの大きな拡散が起これり、カラム全体の分離効率の著しい低下を招くことが分かっていた。この試料拡散を防ぐターン構造として、所属研究室では既に、等流路長ターン（図 2.1B）の開発が行われた<sup>2</sup>。等流路長ターンは、ターンにおける流路外周と内周の距離が等しくなるように設計され、実際に試料バンドの拡散が抑制されることが示されている。また、その他の低拡散ターン構造として、単純にターン流路を細くし、外周と内周の距離差による試料拡散を無視できる程度まで小さくしたもの（狭幅ターン）が報告されている<sup>3,4</sup>。しかしながら、これらのターン構造では、その流路幅が直線流路の約 1/4（等流路長ターン）、1/8（狭幅ターン）と非常に狭くなっているため、ターンにおける流路抵抗が大きいという問題があった。高い流路抵抗が生む過度な背圧は、ピラーアレイカラム自体の損傷を引き起こすため、等流路長ターンや狭幅ターンは、より長い分離流路の作製や、高流速条件での高速分離への応用においては限界があった。これに加えて、ピラーアレイカラムの流路抵抗が大きすぎる場合、マイクロ流体デバイス上で他の機能を有するユニットと統合する際に、その圧力調整が困難になると考えられる。

そこで本研究では、低拡散かつ低流路抵抗という性質を有する新規ターン構造を開発し、これを有するピラーアレイを用いて高流速にて生体分子の高速分離を達成することを目的とした。この新規ターン構造として、「ターンの流路幅を一定にしたまま、ピラーの密度を調節することで、ターン内外の移動相線速度分布を制御する」分布制御型ターンの開発を行った（図 2.1C）。分布制御型ターンでは、ターンの流路幅が一定であることから、流路抵抗の増大は起こらないと考えられる。また、このターンにおいては、ピラーの密度勾配によって流路抵抗に勾配が形成された結果、移動相線速度にも勾配（分布）が生じるため、ピラー配置の調節によって、ターンの内側と外側で分子の通過時間が同じになるような移動相線速度分布の調整ができ、試料拡散の抑制が可能になると考えられた。

本章では、はじめに、分布制御型ターンにおけるピラーの配置について、理論式による初期配置の決定を行った。次に、数値流体力学(computational fluid dynamics, CFD)解析を用いてピラー配置を最適化した。さらに、分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを作製し、これを用いて流路抵抗と試料拡散を評価した後、蛍光誘導体化アミノ酸の分離を行った。

## 2.2. 試薬, 装置及び実験方法

### 2.2.1. 試薬

DL-Proline (Pro)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DL-Valine (Val)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DL-Leucine (Leu)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DL-Lysine (Lys)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DL-Phenylalanine (Phe)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
6-Aminocaproic acid (Aca)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Acetonitrile (HPLC grade)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rhodamine B	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Coumarin 525 (C525)	Exciton (Dayton, OH, USA)
Coumarin 545 (C545)	Exciton (Dayton, OH, USA)
Methanol (HPLC grade)	和光純薬工業 (大阪)
Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade)	和光純薬工業 (大阪)
Dichloromethane	和光純薬工業 (大阪)
Ethylacetate (HPLC grade)	関東化学 (東京)
4-Fluoro-7-nitro-2,1,3- benzoxadiazole (NBD-F)	同仁化学 (熊本)
Dimethyloctadecylchlorosilane (DMOS)	東京化成工業 (東京)
Water	Milli-Q reagent system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) により精製した超純水を使用

### 2.2.2. 装置

#### 2.2.2.1. ピラーアレイカラムを用いた実験の装置

シリンジポンプ	KDS 101 Legacy Dual Syringe	KD Scientific (Holliston, MA, USA)
マイクロポンプ	MP711V	GL Sciences (東京)
4方バルブ	VICI Model C4-0004-.01	Valco Instruments (Houston, TX, USA)
倒立型顕微鏡	IX70	オリンパス (東京)
対物レンズ	UPlan Apo, 10× (N.A. 0.40)	オリンパス (東京)
EMCCD カメラ	iXon3	Andor Technologies (South Windsor, CT, USA)
蛍光顕微鏡フィルターセット		
	Excitation filter BP460-490	オリンパス (東京)
	Dichroic mirror 505DRLP	Omega Optical (Brattleboro, VT, USA)
	Emission filter HQ535/50	Chroma Technology (Rockingham, VT, USA)



Xe ランプ	U-RX-T	オリンパス（東京）
制御ソフト	Andor SOLIS	Andor Technologies (South Windsor, CT, USA)

## 2.2.3. 実験方法

### 2.2.3.1. ターン構造の CFD 解析

CFD 解析は共同研究先（早大院理工・庄子研究室）にて行った。

#### 2.2.3.1.1. CFD 解析に用いたターン構造

図 2.2 に示す設計の単純ターン，分布制御型ターン（理論式に従ったピラー配置のもの，ピラー配置最適化後のもの）に対して，CFD 解析を行った。この CFD 解析は共同研究先（早大院理工・庄子研究室）にて行った。流路構造は，中空流路 1，ターン構造，中空流路 2 からなる。流路やピラーの寸法は以下の通りである。

中空流路 1	740 $\mu\text{m}$ wide $\times$ 30 $\mu\text{m}$ deep $\times$ 100 $\mu\text{m}$ long
ターン構造	740 $\mu\text{m}$ wide $\times$ 30 $\mu\text{m}$ deep $\times$ 30° turn
-ピラーサイズ	Octagonal pillars with a diameter of 20 $\mu\text{m}$
中空流路 3	740 $\mu\text{m}$ wide $\times$ 30 $\mu\text{m}$ deep $\times$ 740 $\mu\text{m}$ long

分布制御型ターン（理論式に従ったピラー配置のもの，ピラー配置最適化後のもの）におけるピラー配置（ピラー間距離）については，表 2.1 に示した。中空流路のピラーについては，その本数を分布制御型ターンと同じにし，格子状に設置した（格子間隔は 43.9  $\mu\text{m}$ ）。

#### 2.2.3.1.2. ターンにおける試料バンド形状変化のシミュレーション

初期状態において，ターン構造の中空流路 1 に分子が存在する直方体(sample structure: 740  $\mu\text{m}$  wide  $\times$  30  $\mu\text{m}$  deep  $\times$  50  $\mu\text{m}$  long)区画（試料バンド）を配置し，シミュレーション開始とともにインレット 1 から水を流入させる条件にて CFD 解析を行った。具体的な条件を以下に示す。

Software	: COMSOL Multiphysics (ver. 5.0: COMSOL AB, Stockholm, Sweden).
Wall condition	: no slip
Inlet 1	: water @ 3.33, $16.67 \times 10^{-11}$ $\text{m}^3/\text{s}$ (= 2.00, 10.00 $\mu\text{L}/\text{min}$ )
Initial value in sample structure	: 1 $\text{mol}/\text{m}^3$ (= 1 mM) (diffusion coefficient, $10^{-9}$ $\text{m}^2/\text{s}$ )

### 2.2.3.2. ピラーアレイカラムの作製

ピラーアレイカラムは既報に基づき，半導体加工技術を用いて，設計図通りにシリコン基板を掘り下げることによって作製した（図 2.3）<sup>2,5-8</sup>。このデバイスは共同研究先（早大院理工・庄子研究室）に作製を依頼した。以下にその作製法の概略を述べる。

まず，20  $\times$  20 mm のシリコン基板（表裏両面に 270 nm の酸化膜を有す）の片面に photoresist（感光性樹脂）を塗布した（図 2.3A）。この面に対し，マスク（分離流路の設計図）を通して露光し，

続けて現像の操作を行う(photolithography)ことで、シリコン基板上に樹脂のパターン形成を行った(図 2.3B)。この基板をバッファードフッ酸に浸し、樹脂に覆われていない部分のシリコン酸化膜の掘り下げを行った(wet etching, 図 2.3C)。更に photolithography と wet etching を行い、試料用流路のパターンニングを行った(図 2.3D)。基板上に残存した樹脂をレジストとして、deep-reactive ion etching (deep-RIE)を行うことで、試料用流路を掘り下げた(図 2.3E)。更に、残存樹脂を除去し、今度は酸化膜をレジストとして deep-RIE を行い、分離流路と試料用流路を掘り下げた(図 2.3F)。流路面と反対の面に対しても photolithography と dry etching を行うことで、貫通穴を作製した(図 2.3G, H)。この後、一旦 wet etching により残存酸化膜を除去したのち(図 2.3I, このとき etching で生じたゴミを同時に除去できる)、O<sub>2</sub> プラズマによるシリコン基板表面の再酸化を行った(後に行う表面修飾反応のため)。最後に、陽極接合により、この基板とガラス基板との貼り合わせを行った(図 2.3J)。

作製したピラーアレイカラムは、単純ターン(図 2.4A)、等流路長ターン(図 2.4B)、分布制御型ターンを有するピラーアレイカラム(図 2.4C)の3種類である。作製したピラーアレイカラムの寸法を以下に、分布制御型ターンにおけるピラー配置を表 2.1 の「最適化配置」に示す。

基板の大きさ	20 × 20 mm
分離流路	740 μm wide × 30 μm deep × ~27 mm long (2 turns)
試料用流路	93 μm wide × 60 μm deep
ピラーアレイ (分離流路)	3-μm-square pillars with 2 μm of inter-pillar distance
(単純ターン)	同上
(等流路長ターン)	同上
(分布制御型ターン)	Octagonal pillars with a diameter of 20 μm

また、上記単純ターン、分布制御型単純ターンを有するピラーアレイカラムと同様の設計の流路で、分離流路部分にピラーがないデバイスも作製した。単純ターンを有するデバイスについては、ターンにおけるピラーを CFD 解析に用いた流路と同様に正八角形(対角線長 20 μm)とした。

### 2.2.3.3. ピラーアレイカラムを用いた実験の装置構成

ピラーアレイカラムは、専用の圧着型締め込み式コネクタを用いて、4 か所の貫通穴をキャピラリー(内径 100 μm, 外径 375 μm)と接続した(図 2.5A)。それぞれの貫通穴の接続先は以下とした：移動相インレット、マイクロポンプ；移動相アウトレット、開放；試料インレット、4 方バルブ；試料アウトレット、4 方バルブ(図 2.5B)。ピラーアレイカラムをコネクタにはめ込んだ際の写真を図 2.5C に示した。ピラーアレイカラムを用いて試料を分離し、クロマトグラムを取得する際には、コネクタを倒立型顕微鏡のステージに設置した。

### 2.2.3.4. ピラーアレイカラム表面の C18 修飾

ピラーアレイカラムを用いて RPLC 条件で分離を行うために、既報に基づきピラーアレイカラムの分離流路表面を C18 基で修飾した<sup>2,5-8</sup>。ピラーアレイカラムの C18 修飾の手順を以下に示す。

反応溶液等の通液は移動相アウトレットから行ない、その流速は 2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした（反応液はシリンジポンプ、洗浄液はマイクロポンプで送液）。

#### [C18 修飾法]

- 1) dimethyloctadecylchlorosilane (DMOS) / toluene (0.2/5.0, v/v)を  
室温で 0.5 h 送液後, 1 day 浸漬 …C18 修飾反応
- 2) ethyl acetate を 40°C で 2 h 送液 …洗浄
- 3) acetonitrile を室温で 0.5 h 送液 …洗浄

#### 2.2.3.5. アミノ酸の蛍光誘導体化

既報の方法を参考にし、5 種アミノ酸(proline (Pro), valine (Val), leucine (Leu), phenylalanine (Phe), 6-aminocaproic acid (Aca))をそれぞれ 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)で蛍光誘導体化した (図 2.6) <sup>2,5-10</sup>。その手順を以下に示す。

- 40  $\mu\text{L}$  of 10 mM amino acid aq.
- + 360  $\mu\text{L}$  of 200 mM borate buffer (pH 9.0)
- + 80  $\mu\text{L}$  of 10 mM NBD-F in acetonitrile
- ↓ Reaction at 60°C, 5 min …蛍光誘導体化
- + 30  $\mu\text{L}$  of 1 M HCl aq.

#### 2.2.3.6. 分離流路にピラーがないデバイスを用いたターンにおける溶液の流れの観察

分離流路にピラーがないデバイス（表面修飾なし）の流路を ethanol で満たした後に、下記の条件で蛍光溶液を送液した。蛍光顕微鏡を用いて、ターン部分における蛍光溶液の界面を撮影することにより、溶液の流れの観察を行った。

- 蛍光溶液 rhodamine B aq.
- 流速 2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$

#### 2.2.3.7. ピラーアレイカラムを用いた分離実験

C18 修飾したピラーアレイカラムを用いて、RPLC 条件にて分離実験を行った。試料の分離中は、蛍光顕微鏡を用いて固定視野にて動画を撮影した（露光時間: 100 ms/frame）。この動画から、流路上の一部分の蛍光強度の時間変化を Andor SOLIS (ver. 4.28.30001.0: Andor Technologies, South Windsor, CT, USA)を用いてプロットすることで、クロマトグラムを得た。また、送液時の背圧は、マイクロポンプの表示値に従い記録した。

Ccoumarin 525 (C525)と coumarin 545 (C545) (図 2.7) の分離については既報に従い、以下の条件で行った<sup>2</sup>。

- 移動相 water / acetonitrile = 65/35 (v/v)
- 流速 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$

注入試料 0.25 mM C525, 0.5 mM C545 in acetonitrile / dichloromethane (92.5/7.5, v/v)  
検出位置 試料注入部直後, 第1ターン前, 第1ターンと第2ターンの間,  
第2ターンの後 (試料注入部から検出位置までの長さは表 2.2 を参照)

NBD-アミノ酸の分離については既報を参考にし, 以下の条件で行った<sup>2,6</sup>.

移動相 water / acetonitrile / trifluoroacetic acid (TFA) = 98/2/0.1 (v/v/v)  
流速 0.1-6.0  $\mu\text{L}/\text{min}$   
注入試料 mixture of NBD-amino acids in aqueous solution / acetonitrile  
検出位置 分離流路後端 (試料注入部から検出位置までの長さは表 2.2 を参照)

### 2.2.3.8. 理論段高さの算出

Kaleida graph (Ver. 3.6, Synergy Software, Reading, PA, USA)を用いて, クロマトグラムのピークを正規分布にフィッティングし, この正規分布の平均( $t_{R,x}$ ,  $t_{R,x=0}$ )と標準偏差( $\sigma_{R,x}^2$ ,  $\sigma_{R,x=0}^2$ )の値を得た. 理論段高さ( $H$ )は, 既報に従い次式により求めた<sup>2,11,12</sup>.

$$H = \frac{\sigma_x^2 - \sigma_{x=0}^2}{(t_{R,x} - t_{R,x=0})^2} L \quad (2.1)$$

$t_{R,x}$ ,  $\sigma_x^2$ は任意の位置で取得したクロマトグラムのピークの保持時間と分散,  $t_{R,x=0}$ ,  $\sigma_{x=0}^2$ は試料注入部直後の位置で取得したクロマトグラムのピークの保持時間と分散である. ピラーアレイカラムなどを用いたオンチップ LC は, 従来 LC と比較して, 分離流路長に対して注入時の試料バンド幅が広い. 従って, カラムの分離効率を正しく評価するためには, この試料注入直後のバンド幅を考慮する必要があるため, 式(2.1)が用いられる.

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1. 分布制御型ターンにおけるピラー配置の決定

分布制御型ターンでは、ピラー配置に密度勾配をつけることによって移動相線速度分布を制御し、試料拡散の抑制を行うため、このピラーの配置が重要である。最適なピラー配置を得るために、本 2.3.1.項において、まず理論式に基づくピラー初期位置を決定し、続けて CFD 解析によるピラー配置の最適化を行った。

#### 2.3.1.1. 理論式によるピラー初期位置の決定

分布制御型ターンでは、ピラー配置の密度勾配、すなわちピラー間距離の勾配が、流路抵抗の勾配を生むことにより低拡散ターン構造として機能する。そこで、このピラー間距離を決定するための簡易モデルとして、隔壁で分割された流路からなるターン構造 (図 2.8) を想定し、理論式の導出に用いた。

まず、円筒型流路を流れる流体について、流路抵抗と線速度の関係は Hagen-Poiseuille 式を用いて次式のように表される。

$$\Delta P = \frac{128\mu l}{\pi D^4} Q = \frac{32\mu l}{D^2} v \quad \text{with} \quad v = \frac{4Q}{\pi D^2} \quad (2.2)$$

$\Delta P, l, D$  は順に、流路における圧力損失、流路長さ、流路直径であり、 $\mu, Q, v$  は順に、流体の動粘性係数、流量、線速度である。流路抵抗は  $32\mu l/D^2$  に相当する。実際に作製するデバイスにおいて、流路形状は矩形であることから、式 2.4 の  $D$  として相当直径を用いた (式 2.3)。

$$D = 2 \frac{wh}{w+h} \quad (2.3)$$

$w, h$  はそれぞれ矩形流路の幅と高さである。

隔壁で分割された流路モデル (図 2.8) において、隔壁間の矩形流路の幅を  $w_i$  とすると、式 2.2, 2.3 より、次式が導出される。

$$\Delta P_i = 8\mu l_i \frac{(w_i + h)^2}{w_i^2 h^2} v_i \quad (2.4)$$

$\Delta P_i, l_i, w_i, v_i$  は順に、それぞれの隔壁間の矩形流路の圧力損失、流路長さ、流路幅、線速度である。

ここで、分布制御型ターンが満たすべき要件は以下の 2 条件となる。1) すべての隔壁間流路について、圧力損失が等しいこと (式 2.5)。ターンに接続する直線流路では、流路幅方向の位置によらず、圧力損失、流路抵抗、線速度は一定である。ターンにおいては流路抵抗と線速度が変化する一方で、圧力損失は一定にしなければならない。2) 全ての隔壁間流路を流れる分子について、その通過時間が等しいこと (式 2.6)。これが低拡散なターン構造としての条件である。

$$\Delta P_i = \text{const.} \quad (2.5)$$

$$\frac{l_i}{v_i} = \frac{r_i \theta}{v_i} = \text{const.} \quad (2.6)$$

$r_i$  はターンの中心点から矩形流路の内周までの距離,  $\theta$  はターンの角度である. 式 2.4-2.6 より,  $w_i$  は次式のように導出される.

$$w_i = \frac{h}{\frac{r_0}{r_i} \left( \frac{h}{w_0} + 1 \right) - 1} \quad (2.7)$$

$r_0, w_0$  はそれぞれ, ターンの中心点からターンの最も内側の矩形流路の内周までの距離と, その矩形流路の流路幅である (図 2.8). 式 2.7 から, 定数  $h, w_0, r_0$ , 変数  $r_i$  によって  $w_i$  が決定できる. ここで, 図 2.8 における隔壁の幅 (ピラーの幅に相当) を一定とし ( $W$ ),  $w_0, r_0$  の値を決めると,  $r_i$  が次式で算出される.

$$r_i = r_0 + \sum_{j=0}^{i-1} w_j + (i-1)W \quad (1 \leq i \leq n-1) \quad (2.8)$$

ピラー初期位置の決定には, この式 2.8 を用いた. なお, ピラーの幅が  $W$ , ピラー間距離が  $w_i$ , ターンの中心点とピラーの距離が  $r_i$ , 流路幅方向のピラーの本数が  $n$  に相当する.

ピラーの初期位置を決定する際には, 図 2.2B に示したように, ピラーを流路幅方向の直線上に配置し, 奇数列と偶数列で  $r_0$  が異なる配置とし, 隣り合う列同士が為す角度は  $2.5^\circ$  とした. また, ピラー本数  $n$  を 15 とし, これに合わせた  $w_0$  を決定した. 表 2.1 に, 決定した初期配置における  $r_0$  と  $w_i$  の値を示す.

このモデルは実際に作製する予定のターンと異なり, ターンが隔壁で完全に分割されているため, 式 2.8 により算出したピラー配置は修正の余地があると考えられた. 従って, 次項において CFD 解析を用いたピラー配置の最適化を行った.

### 2.3.1.2. CFD 解析によるピラー配置の最適化

ターンにおける試料拡散を評価するために, CFD 解析を用いて, ターンの通過に伴う試料バンドの形状変化のシミュレーションを行った. 単純ターンではターン通過後の試料バンドが流路に対して斜めに傾いており, 試料拡散が大きいことが確認された (図 2.9A). これに対して, 2.3.1.1. 項で算出したピラー配置を有するターン構造においては, ターンの外側では試料バンド形状が良好であったものの, 内側では試料の通過に時間がかかっており, 全体としては歪んだ試料バンド形状となっていた (図 2.9B). この原因として, ターン内側のピラー間距離が狭すぎることが考えられたため, ターン内側のピラー間距離を広げつつ全体のピラー配置を調節することにより, ピラー配置の最適化を行った.

最適化後の分布制御型ターンにおけるピラー間隔を表 2.1 に, 試料拡散シミュレーションの結果を図 2.9C に示す. 図 2.9C において試料バンドがターンを通過後もその形状を維持していたことから, 実際にこのピラー配置を有するターン構造を作製すれば, 試料拡散が抑制されると予測された. さらに, 流速が分布制御型ターンの低拡散性に与える影響を検討するために, 高流速条

件にて同様のシミュレーションを行った (図 2.9D). 図 2.9D に示した高流速条件(10  $\mu\text{L}/\text{min}$ )において, 試料バンドはターン通過後も非常に良好な形状を維持しており, 図 2.9C の流速条件(2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , ピラーアレイカラムの実験で通常用いる流速)の結果と比べて大きな違いは見られなかった. この結果から, 分布制御型ターンの低拡散性は, 流速にほとんど依存しないことが予測された.

### 2.3.2. 分布制御型ターンにおける溶液の流れの観察

実際に分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを作製する前に, 中空流路 (分離流路からピラーを除いた流路構造) と 180°のターン構造を有するデバイスを作製し, ターン構造における溶液の流れの観察を行った. 用いたターン構造は, 単純ターン, ピラー配置を最適化後の分布制御型ターンの 2 つである.

溶液の流れの観察は, ethanol で満たした流路に蛍光色素(rhodamine B)水溶液を流し, その色素溶液の先端の形状を見ることにより行った. 単純ターンの結果を図 2.10A に, 分布制御型ターンの結果を図 2.10B に示す. 単純ターンでは色素溶液の先端が大きく曲がってしまったのに対し, 分布制御型ターンでは, 色素溶液の先端が流路に対してほぼ垂直を保っていた. このことから, 実際に作製した分布制御型ターンにおいて, 移動相線速度が望みどおりに制御できており, 試料拡散が抑制されることが示された.

### 2.3.3. 分布制御型ターンの流路抵抗の評価

新規ターン構造である分布制御型ターン, 比較対象である等流路長ターン, 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 (図 2.4). 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(water / acetonitrile = 65/35, v/v)を送液し, その背圧を調べた.

各ターン構造を有するピラーアレイカラムについて得られた, 移動相流速と背圧の関係を図 2.11 に示す. それぞれのプロットに対して原点を通る 1 次関数でフィッティングを行い, その傾き (流路抵抗) を算出したところ, 等流路長ターン, 分布制御型ターン, 単純ターンの順に 0.27, 0.047, 0.054 MPa/( $\mu\text{L}/\text{min}$ )という結果が得られた. 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムの流路抵抗は, 単純ターンを有するピラーアレイカラムと同等であり, 等流路長ターンを有するピラーアレイカラムの 1/6 程度であることが分かった. 以上の結果から, 分布制御型ターンが低流路抵抗なターン構造であることが示された.

### 2.3.4. 分布制御型ターン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, 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(C525, C545)の分離を行った. 各ピラーアレイカラムにおけるクロマトグラムを図 2.12 に示す. 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムでは, 各ピークの幅が等流路

長ターンを有するピラーレイカラムと同等であり、単純ターンを有するものと比べて明らかに細くなっていることが見て取れる。

図 2.12 のクロマトグラムから、試料ピークの理論段高さを算出し、その比較を行った(図 2.13)。理論段高さはカラムの分離効率の尺度であり、その値が小さいほど分離効率が高いことを示す。また、カラムのどの部分においても分離効率が同じ場合、理論段高さはカラム長（本実験においては試料注入部と検出点の距離）に依らず一定となる。従って、検出点をターンの前から後に変えた時に理論段高さが増加した場合、そのターン構造で分離効率が低下しており、大きな試料拡散が起きていると考えることが出来る。単純ターンでは、C525, C545 が第 1 ターンを通過することで理論段高さがそれぞれ 7 倍, 4 倍となっており、非常に大きな試料拡散が起きることが確認された。一方で、分布制御型ターンと等流路長ターンでは、両試料の理論段高さの増加率は 1.5 未満と算出された。この結果から、分布制御型ターンは等流路長ターンと同等に試料拡散を抑制することが示された。

なお、単純ターンについて、第 2 ターンを通過することで理論段高さが変わらない (C525, 図 2.13A)、または減少している (C545, 図 2.13B) という結果が得られた。これは、直線流路において分子は流路幅方向に大きく移動せず、第 1 ターンで外周を通過した分子が第 2 ターンでは内周を通過するため、試料バンドの形状が第 1 ターンを通過する前に近い状態に戻ったことを反映している。従って、単純ターン構造をピラーレイカラムに導入した場合、理論段高さは奇数ターンの通過後に増加し、偶数ターンの通過後では不変または減少すると考えられる。

### 2.3.5. 分布制御型ターンを有するピラーレイカラムを用いたアミノ酸誘導体の分離

分布制御型ターンを有するピラーレイカラムの生体分子分離への応用として、NBD-F で蛍光誘導体化したアミノ酸の分離を行った。先行研究では、110 mm のピラーレイカラムを用いて、Pro, Val, Leu, isoleucine, Phe, Aca の 6 種 NBD 誘導体の分離に成功している<sup>2,6,7</sup>。本研究で用いたピラーレイカラムは、分離流路が 27 mm と短いため、構造が類似している NBD-Leu と NBD-Ile は分離困難であると考え、NBD-Ile を除いた 5 種 NBD-アミノ酸の分離を試みた。

その結果のクロマトグラムを図 2.14 に示す。分布制御型ターンを有するピラーレイカラムを用いて 5 種 NBD 化アミノ酸とその副生成物 1 種(NBD-OH)の分離に成功した。図 2.14A に示すように、汎用 LC で一般的な移動相線速度(1 mm/s)に近い流速(1.0  $\mu$ L/min, 1.25 mm/s)では、6 本のピークの分離に 140 秒を要した。分布制御型ターンは低圧力損失であることから、高流速の応用が可能である。そこで、移動相流速を段階的に上げていったところ、2.0  $\mu$ L/min (7.5 mm/s)にて最も良い分離が見られ(図 2.14B)、6.0  $\mu$ L/min (7.5 mm/sec)では 5 種 NBD-アミノ酸をわずか 24 秒で分離可能であった(図 2.14C)。また、図 2.14C においても良好なピーク形状が維持されていたことから、分布制御型ターンは高流速条件下でも低拡散性を保持していることが示された。以上の結果から、低拡散かつ低流路抵抗な分布制御型ターンの導入により、ピラーレイカラムを用いて生体分子の高速分離が可能になることが示された。



## 2.4. 小括

本章では、ピラーレイカラムを用いた生体分子の高速分離を目指して、低拡散かつ低圧流路抵抗なターン構造の開発を行った。この性質を有する新規ターン構造として、「ターンの流路幅を一定にしたまま、ピラーの密度を調節することで、ターン内外の移動相線速度分布を制御する」分布制御型ターンの開発を行った。ターンにおけるピラーの配置は、Hagen-Poiseuille 式に従って算出した後、CFD 解析を用いて最適化を行った。分布制御型ターンを有するピラーレイカラムを作製し、流路抵抗を測定したところ、等流路長ターンを有するピラーレイカラムの 1/6 まで低減されることが示された。また、蛍光色素の分離によりターンにおける試料拡散について検討し、分布制御型ターンが等流路長ターンと同等に試料拡散を抑制することを示した。さらに、分布制御型ターンを有するピラーレイカラムを 5 種 NBD-アミノ酸の分離に応用したところ、高流速の適用が可能となったことから、24 秒以内の迅速分離を達成した。

本章で開発した分布制御型ターンは、ピラーレイカラムの更なる流路の延長や、ピラーレイカラムへの高流速の適用を可能にするという点で非常に有用な新規ターン構造である。例えば、より複雑な試料を高速分析する際には、流路を延長するとともに高い流速を用いる必要がある。汎用 LC カラムと同等の 250 mm の長さのピラーレイカラムは、 $30 \times 30 \text{ mm}^2$  のチップ上に 14 ターンを導入することにより作製可能になる。このチップに対して  $10 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$  の流速を適用する際の背圧は、ターン構造が分布制御型ターンであるときに 4 MPa 程度、等流路長ターンであるときに 15 MPa 程度となると予測される。現在用いているシステムの耐圧が 7 MPa 程度であることを考えると<sup>2</sup>、分布制御型ターンによる流路抵抗の低減が必須であるといえる。これに加えて、分布制御型ターンの採用によりピラーレイカラムにかかる背圧の抑制が可能となるため、マイクロ流体デバイス上で他の機能を有するユニットと統合する際に、その圧力調整がより容易になると考えられる。

## 2.5. 図表

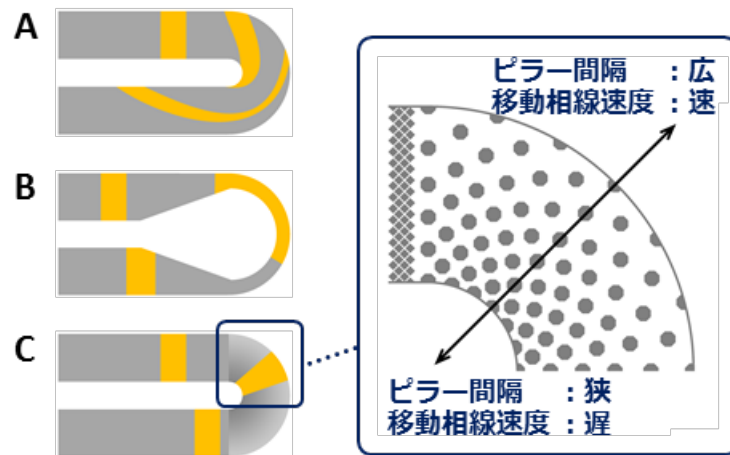


図 2.1. ターン構造の概観とコンセプト. (A) 単純ターン. (B) 等流路長ターン. (C) 分布制御型ターン. 黄色部分は試料バンドを示す. 移動相は各ターン構造の左上から流入し, 左下から流出する.

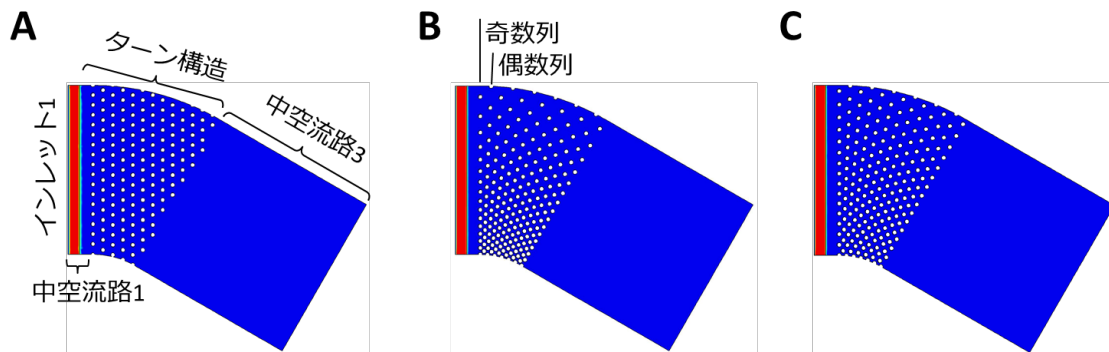


図 2.2. CFD 解析に用いた流路構造. (A) 単純ターン. (B) 理論式により算出したピラー配置を有するターン. (C) ピラー配置を最適化後の分布制御型ターン. 流路幅:  $740 \mu\text{m}$ . 流路深さ:  $30 \mu\text{m}$ . ピラー: 正八角形 (対角線長  $20 \mu\text{m}$ ). 赤い部分: 初期状態において分子が存在する部分 (試料バンド) (2.2.3.1.2.項, 2.3.2.1 項を参照).

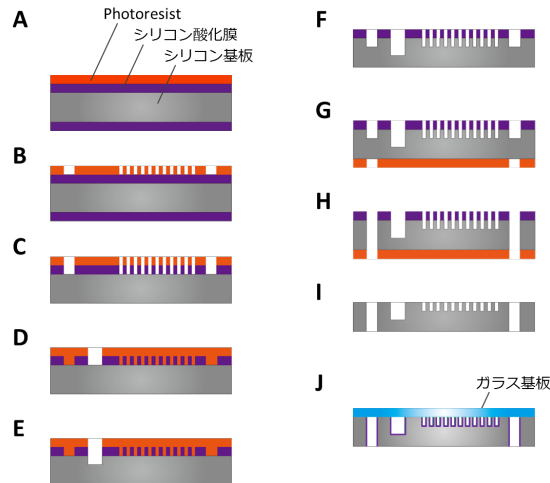


図 2.3. ピラーアレイカラムの作製手順。(A) 酸化膜を有するシリコン基板に photoresist を塗布。(B) マスクを通した露光による、分離流路のパターン形成。(C) 酸化膜の wet etching。(D) 試料用流路のパターン形成と wet etching。(E) シリコン露出部の dry etching。(F) Photoresist の除去に続く、シリコン露出部の dry etching。(G) 貫通穴のパターン形成と wet etching。(H) 貫通穴の dry etching。(I) Photoresist と酸化膜の除去。(J) シリコン表面の再酸化と、陽極結合によるガラス平板への貼りあわせ。

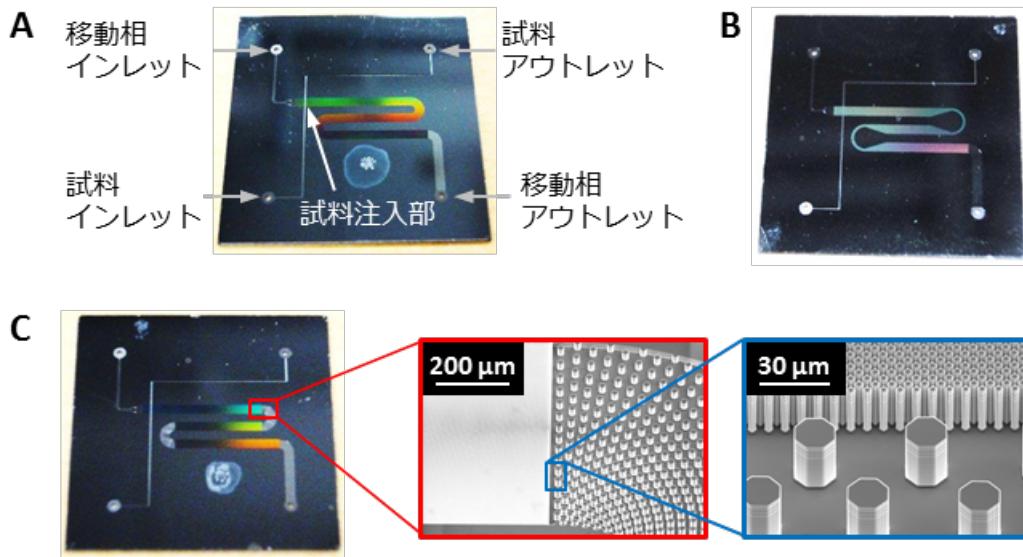


図 2.4. 作製した(A) 単純ターン, (B) 等流路長ターン, (C) 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラム。チップサイズ：20 × 20 mm<sup>2</sup>。分離流路：幅，740 μm；深さ，30 μm；長さ 27 mm。分離流路と(A, B)のターンにおけるピラー：3-μm-square pillars with 2 μm of inter-pillar distance。(C) のターンにおけるピラー：Octagonal pillars with a diameter of 20 μm。

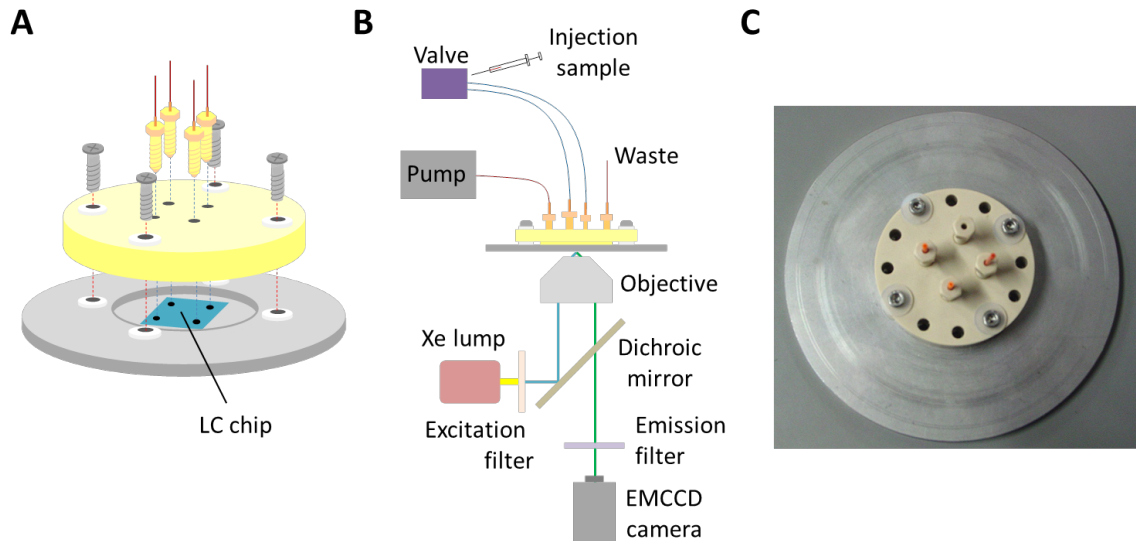


図 2.5. ピラーアレイカラムを用いた実験の装置構成. (A) ピラーアレイカラムの圧着型締め込み式コネクタへのはめ込み. (B) ピラーアレイカラムの周辺装置への接続. (C) (A)の写真.

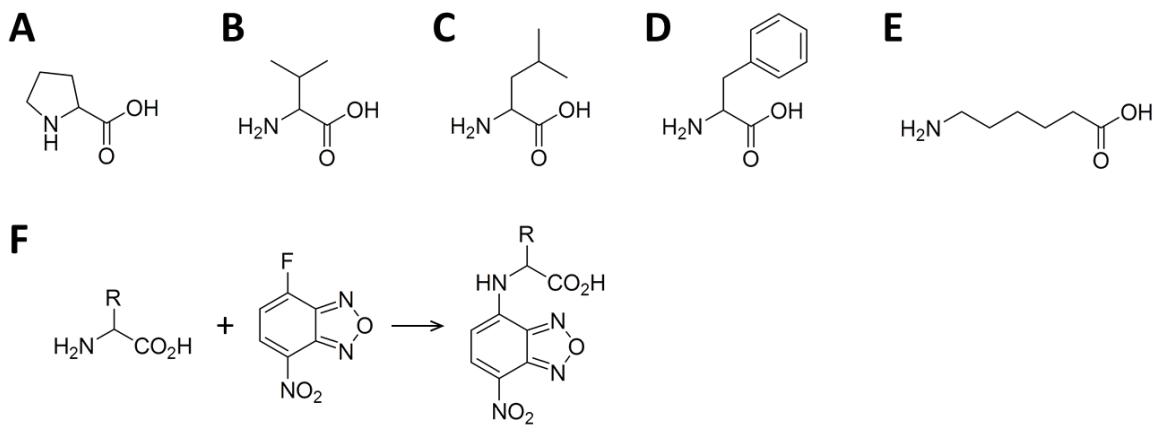


図 2.6. (A-E) 分離試料として用いたアミノ酸と, (F) アミノ酸の NBD-F による蛍光誘導体化反応. (A) Pro, (B) Val, (C) Leu, (D) Phe, (E) Aca.

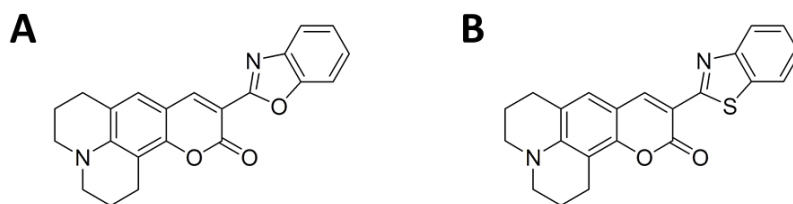


図 2.7. 分離試料として用いた蛍光色素. (A) coumarin 525 (C525), (B) coumarin 545 (C545).

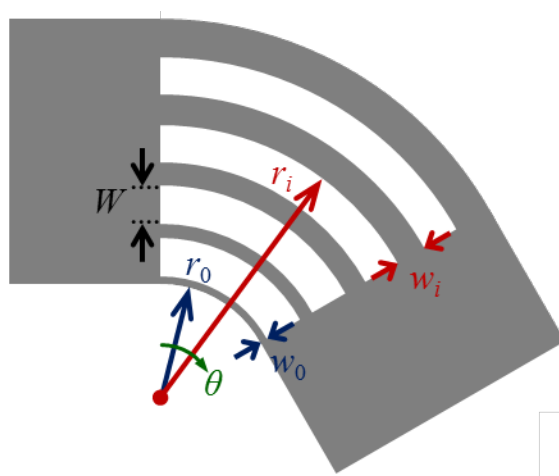


図 2.8. ピラー間距離の初期配置を決定するための理論式の導出に用いたモデル流路. 灰色部分が流路を, 白色部分が構造物 (隔壁, 外壁) を示す.  $w$ , 隔壁 (ピラー) の幅;  $w_i$ , 流路幅 (ピラー間距離);  $r_i$ , ターンを中心点と隔壁 (ピラー) の距離;  $w_0$ , 最もターン内側の流路幅 (ピラー間距離);  $r_0$ , ターンを中心点と最も内側の隔壁 (ピラー) の距離;  $\theta$ , ターンの角度.

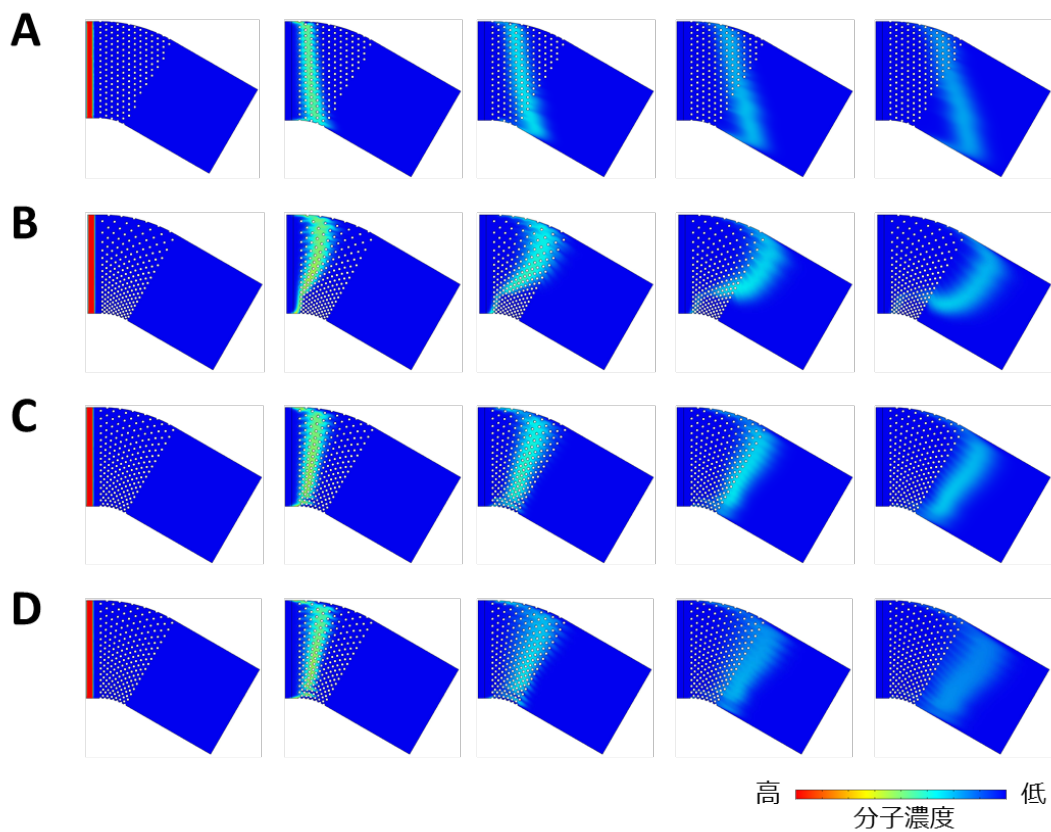


図 2.9. (A) 単純ターン, (B) 理論式により算出したピラー配置を有するターン, (C, D) ピラー配置を最適化後の分布制御型ターンにおける, 試料バンド拡散の CFD シミュレーション. 流速: (A-C) 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , (D) 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . (A-C) 左から, 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 s の結果. (D) 左から, 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 s の結果.

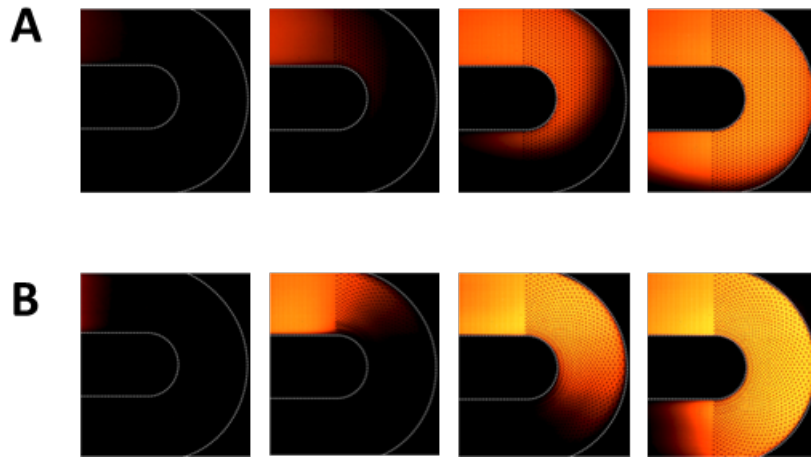


図 2.10. (A) 単純ターン, (B) 分布制御型ターンにおける溶液の流れの観察. 分離流路部分にピラーがないデバイスを用いた. 流路表面修飾: 無し. 流路幅:  $740\ \mu\text{m}$ . 流路深さ:  $30\ \mu\text{m}$ . ターンにおけるピラー: octagonal pillars with a diameter of  $20\ \mu\text{m}$ . 蛍光溶液: rhodamine B. 流速:  $2.0\ \mu\text{L}/\text{min}$ .

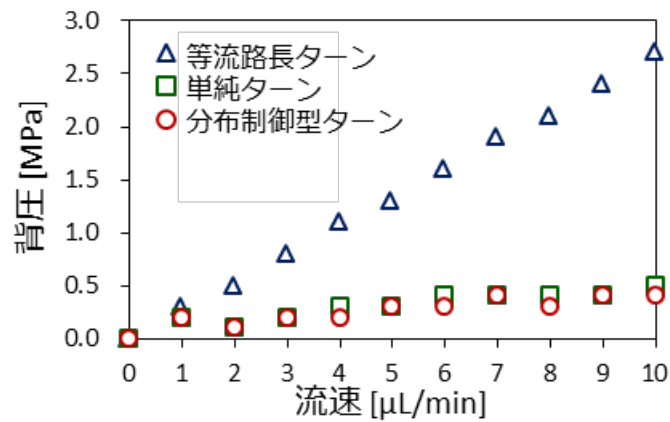


図 2.11. 各ターン構造を有するピラーアレイカラムにおける背圧. ピラーアレイカラム: 図 2.4 のもの. 移動相: water / acetonitrile = 65/35 (v/v).

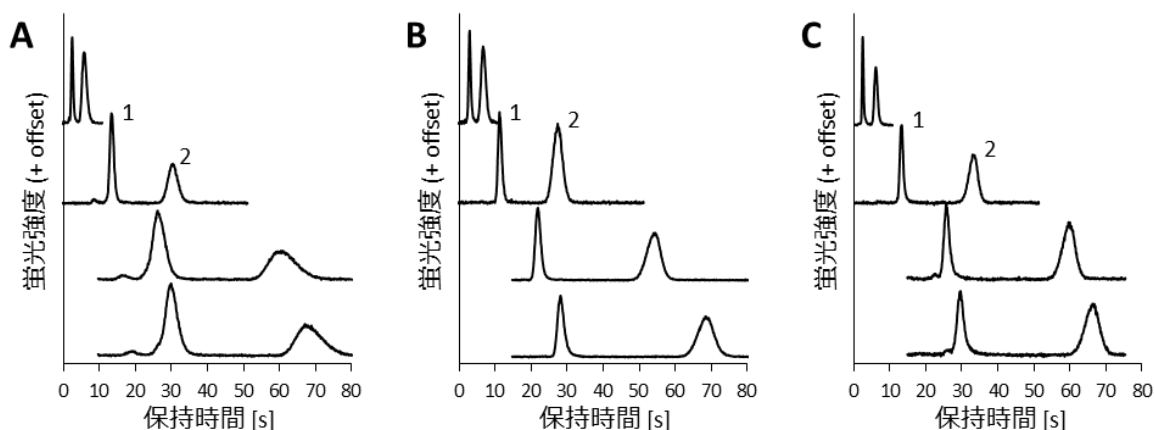


図 2.12. (A) 単純ターン, (B) 等流路長ターン, (C) 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを用いた蛍光色素の分離. ピラーアレイカラム: 図 2.4 のもの (C18 修飾). 移動相: water / acetonitrile = 65/35 (v/v). 流速: 2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 検出位置: 上から順に, 試料注入部直後, 第 1 ターン前, ターン間, 第 2 ターン後. ピーク: 1, C525; 2, C545.

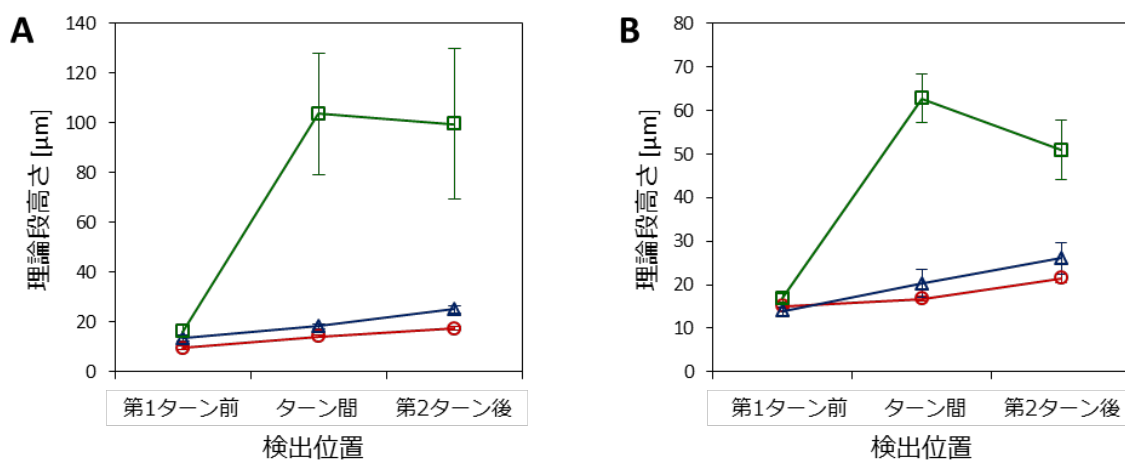
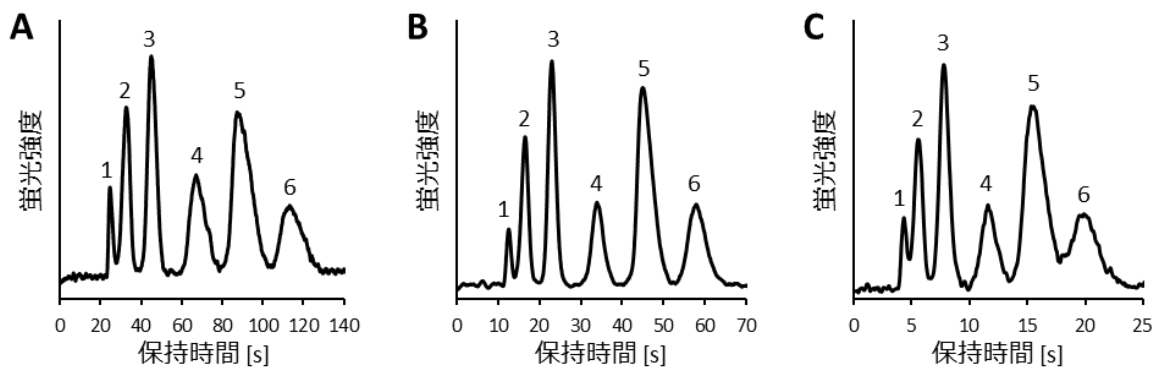


図 2.13. 各ターン構造を有するピラーアレイカラムにおける(A) C525, (B) C545 の理論段高さ. 緑: 単純ターン, 青: 等流路長ターン, 赤: 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラム. 理論段高さは図 2.12 の実験結果から算出した.  $n \geq 5$ . Error bars: SD.





**図 2.14. 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを用いた NBD-アミノ酸の分離.** ピーク : NBD-derivatives of 1, water; 2, Pro; 3, Val; 4, Aca; 5, Leu; 6, Phe. ピラーアレイカラム : 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラム (C18 修飾). 移動相 : water / acetonitrile / TFA = 98/2/0.1 (v/v/v). 流速 : (A) 1.0, (B) 2.0, (C) 6.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 検出位置 : 分離流路最後端.

表 2.1. 分布制御型ターンにおける，理論式により導出したピラー配置（初期配置）と，CFD 解析を用いた最適化後のピラー配置（最適化配置）。パラメータは図 2.8 を参照。奇数列，偶数列については，図 2.2B を参照。

奇数列		ピラー間隔 ( $w_i$ ) [ $\mu\text{m}$ ]														
ピラー配置	ターン中心点からの距離 ( $r_0$ ) [ $\mu\text{m}$ ]	$w_0$	$w_1$	$w_2$	$w_3$	$w_4$	$w_5$	$w_6$	$w_7$	$w_8$	$w_9$	$w_{10}$	$w_{11}$	$w_{12}$	$w_{13}$	$w_{14}$
初期配置	376.8	10.8	12.0	13.2	14.7	16.3	18.1	20.2	22.5	25.3	28.6	32.7	37.8	44.4	53.5	67.2
最適化配置	391.1	27.6	27.8	26.9	26.7	25.2	24.4	25.0	25.6	26.2	28.2	30.3	33.0	35.3	38.1	40.5

偶数列		ピラー間隔 ( $w_i$ ) [ $\mu\text{m}$ ]														
ピラー配置	ターン中心点からの距離 ( $r_0$ ) [ $\mu\text{m}$ ]	$w_0$	$w_1$	$w_2$	$w_3$	$w_4$	$w_5$	$w_6$	$w_7$	$w_8$	$w_9$	$w_{10}$	$w_{11}$	$w_{12}$	$w_{13}$	$w_{14}$
初期配置	376.8	11.3	12.5	13.9	15.4	17.1	19.0	21.2	23.8	26.8	30.4	34.8	40.5	48.1	58.9	75.9
最適化配置	391.1	11.0	27.8	28.2	27.3	27.1	25.5	24.7	25.3	25.9	26.4	28.8	39.4	33.3	35.6	38.5

表 2.2. 各ターン構造を有するピラーアレイカラムにおける，クロマトグラムの取得位置と試料注入部からの距離。

各ターンを有する ピラーアレイカラム	試料注入部からの距離 [mm]				
	試料注入部直後	第1ターン前	ターン間	第2ターン後	分離流路後端
単純ターン	1.3	8.1	17.0	20.1	26.6
分布制御型低拡散ターン	1.3	8.1	17.0	20.1	26.6
等流路長低拡散ターン	1.3	6.5	16.4	23.5	28.4

## 2.6. 引用文献

- (1) Isokawa, M.; Takatsuki, K.; Song, Y.; Shih, K.; Nakanishi, K.; Xie, Z.; Yoon, D. H.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6485-6491.
- (2) Aoyama, C.; Saeki, A.; Noguchi, M.; Shirasaki, Y.; Shoji, S.; Funatsu, T.; Mizuno, J.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1420-1426.
- (3) De Malsche, W.; De Bruyne, S.; Op De Beek, J.; Sandra, P.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; Lynen, F. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1230*, 41-47.
- (4) De Malsche, W.; Op De Beek, J.; De Bruyne, S.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1214-1219.
- (5) Song, Y.; Noguchi, M.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4739-4745.
- (6) Song, Y.; Takatsuki, K.; Isokawa, M.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7993-7999.
- (7) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Amino Acids* **2016**, *48*, 1731-1735.
- (8) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 111-116.
- (9) Song, Y.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 335-340.
- (10) Song, Y.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2013**, *927*, 214-217.
- (11) De Malsche, W.; Clicq, D.; Verdoold, V.; Gzil, P.; Desmet, G.; Gardeniers, H. *Lab Chip* **2007**, *7*, 1705-1711.
- (12) De Malsche, W.; Eghbali, H.; Clicq, D.; Vangeloooven, J.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5915-5926.

## 第3章 親水性相互作用液体クロマトグラフィーを用いた 生体分子分析法に関する検討<sup>1-3</sup>

### 3.1. 背景と目的

ピラーアレイカラムを用いたLCの先行研究では、RPLCによる分離が中心に行われてきた<sup>4-22</sup>。RPLCでは、C8基、C18基等の低極性官能基で修飾した流路表面を固定相として、水溶液と有機溶媒の混合液（一般に水溶液の混合比率が高い）を移動相として用い、主に疎水性分配によって低極性分子が強く保持される。一方で、生体低分子に多い高極性分子の保持は弱いため、その保持や分離には適していないという問題があった。

生体分子の分離に適當であると考えられる分離モードとして、近年盛んに研究が行われている、HILICが挙げられる<sup>23-27</sup>。HILICでは、アミド基、スルホペタイン基等の高極性官能基で修飾したシリカ粒子やモノリス構造を固定相として、水溶液と有機溶媒の混合液（有機溶媒の体積比が70%以上）を移動相として用いる。HILICの保持機構は、固定相官能基周囲に固定化された水リッチな層と移動相との間での親水性分配や、固定相官能基との静電相互作用や水素結合であることから、高極性分子が強く保持される<sup>23-27</sup>。これまでに、糖、アミノ酸、リン脂質、カテコール化合物、薬物等の分離において、HILICモードが採用されてきた<sup>23,28-35</sup>。以上のことから、ピラーアレイカラムを用いて高極性分子分析を行うには、HILICモードが適していると考えられた。

そこで本章では、ピラーアレイカラムでHILIC分離を試みる前に、汎用LCを用いてHILICによる高極性生体分子の分離検討を行うこととした。実際にHILICモードで高極性生体分子が分離可能であることを確認するため、また、適切な表面修飾官能基や分離条件等を探索するためである。

HILIC分離を検討する生体分子として、生体チオールを選択した（図3.1）。Cysteine (Cys), homocysteine (Hcy), glutathione (GSH)などに代表される生体チオールは、チオール基(R-SH)を有する一連のアミノ酸代謝物である。これらの分子は生体内で酸化還元反応の中核を担っているほか、有害な化合物の解毒にも関与しているため、生体チオール濃度の異常と、心血管疾患、神経変性疾患、癌などの疾患との関連が示唆されている<sup>36-40</sup>。この関連を詳細に解析するためには、Cys, Hcy, GSHに加えて、その代謝物である $\gamma$ -glutamylcysteine ( $\gamma$ GluCys), cysteinylglycine (CysGly)等を同時に定量する必要がある。生体チオールの分析では一般的に、チオール基を誘導体化した試料に対してRPLCによる分離分析が行われてきた<sup>41-44</sup>。しかしながら、その誘導体化チオールは分子内にアミノ基とカルボキシル基を有することから極性が高く、RPLCでの多成分分離が困難であった。

既に、私は本学学士課程において、HILICカラムとしてスルホペタイン基を有するカラム（表3.1）を、チオール選択的な蛍光誘導体化試薬として ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid (SBD-F)（図3.2A）を採用することで、生体チオールのHILICによる分離分析が可能

であることを示してきた<sup>45-47</sup>。SBD-チオールの蛍光強度が acetonitrile 含量の高い HILIC 移動相中で増強されることで検出感度が向上したこと、分離に適切な HILIC カラムを選択したことで、ヒト血漿試料において、これまで定量の報告がなかった  $\gamma$ GluCys を含む 6 種生体チオールの定量を達成した(Cys, Hcy, GSH,  $\gamma$ GluCys, CysGly, *N*-acetylcysteine (NAC))。この研究において、表 3.1 に示す HILIC カラムに対して、SBD-チオールの保持を比較し、特にスルホベタイン基、アミド基、ホスホリルコリン基を有するカラムで SBD-チオールの保持が強いことを明らかにした (図 3.3)。

以上で述べたように、これまでの HILIC 分離の検討は、蛍光誘導体化試薬として SBD-F を、HILIC カラムとして SBD-チオールの保持が最も強かったスルホベタイン基を有するカラムを用いて行ってきた。しかしながら、SBD-F 以外の誘導体化試薬については検討していないため、HILIC 分離に適した試薬が他にも存在する可能性がある。また、ピラーアレイカラムのスルホベタイン修飾が上手く行かなかった場合に備えて、それ以外の官能基を有するカラムにおいても誘導体化チオールの分離条件の最適化を行っておくことが望ましい。そこで本章では、ピラーアレイカラムで生体チオールの HILIC 分離を試みる前の予備検討として、1) チオールの HILIC 分離に適した蛍光誘導体化剤の探索、2) SBD-チオールの保持や分離に適した HILIC 官能基の探索、3) HILIC 分離分析により生体試料中チオール濃度と病態との解析が可能であるかについての検討を行った。具体的には、1) については 4-aminosulfonyl-7- fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F) (図 3.2B) で誘導体化したチオールの HILIC カラムにおける分離の検討を、2) についてはマウス血清試料を対象に SBD-チオールのアミドカラムにおける分離の検討を、3) については SBD-F とアミドカラムを用いたホモシスチン尿症モデルマウス (cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS)欠損マウス) の血漿試料の分析を、それぞれ行った。

## 3.2. 試薬, 装置及び実験方法

### 3.2.1. 試薬

L-Cysteine (Cys)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DL-Homocysteine (Hcy)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
L-Glutathione (reduced form, GSH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cysteinylglycine (CysGly)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
$\gamma$ -Glutamylcysteine ( $\gamma$ GluCys)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Human plasma	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Acetonitrile (HPLC grade)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)	和光純薬工業 (大阪)
Cysteamine (CA)	和光純薬工業 (大阪)
Trichloroacetic acid	和光純薬工業 (大阪)
Formic acid	和光純薬工業 (大阪)
Boric acid	和光純薬工業 (大阪)
Methanol (HPLC grade)	和光純薬工業 (大阪)
Tiopronin ( <i>N</i> -(2-mercaptopropionyl) glycine, MPG)	和光純薬工業 (大阪)
Ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid (SBD-F)	同仁化学 (熊本)
4-Aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F)	同仁化学 (熊本)
Ethylenediamine- <i>N,N,N,N</i> -tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA)	同仁化学 (熊本)
Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	関東化学 (東京)
Ammonium formate	関東化学 (東京)
Water	Milli-Q reagent system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) により精製した超純水を使用

### 3.2.2. 装置

#### 3.2.2.1. 汎用 LC 装置

ポンプ	PU-2080 Plus	日本分光 (東京)
カラムオーブン	860-CO	日本分光 (東京)
	CO-1560	日本分光 (東京)
分離カラム	ZIC-HILIC (150 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 5 $\mu$ m)	Merck (Darmstadt, Germany)
	Inertsil Amide (150 mm $\times$ 3.0 mm i.d., 5 $\mu$ m)	GL Sciences (東京)
	PC HILIC (150 mm $\times$ 2.0 mm i.d., 5 $\mu$ m)	資生堂 (東京)

蛍光検出器	RF-20A	島津製作所（京都）
	FP-1520S	日本分光（東京）
インテグレーター	807IT	日本分光（東京）
データアキュイジションユニット	Marina	ランタイムインスツルメンツ（神奈川）
解析ソフト	Chromato-Pro (Ver. 4.00, 5.00)	ランタイムインスツルメンツ（神奈川）

### 3.2.2.2. LC-質量分析(mass spectrometry, MS)装置

ポンプ	LC-30AD	島津製作所（京都）
カラムオープン	CTO-20A	島津製作所（京都）
デガッサー	DGU-20A5R	島津製作所（京都）
オートサンプラー	SIL-30AC	島津製作所（京都）
分離カラム	Inertsil Amide (150 mm × 3.0 mm i.d., 5 μm)	GL Sciences（東京）
蛍光検出器	RF-20Axs	島津製作所（京都）
質量分析器	Q-Exactive Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- ion source	heated electrospray ionization source II (HESI II)	
制御ソフト	Xcalibur 3.0.63	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
解析ソフト	Xcalibur Qual Browser	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

### 3.2.2.3. 蛍光測定装置

蛍光分光光度計	FP-6500	日本分光（東京）
---------	---------	----------

## **3.2.3. 実験方法**

### 3.2.3.1. 血液試料の取得

ヒト血漿試料は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入したものをを用いた。

3.3.2.項のマウス血液試料中の不明チオール分析に用いたマウス血清試料，血漿試料は東京大学医学部附属病院の下澤達雄教授に供与頂いた（129SV マウス，オス，16 週齢）。

3.3.3.項のホモシスチン尿症モデルマウスのチオール分析に用いた血漿試料は，九州大学大学院薬学研究院の濱瀬健司教授に供与頂いた。CBS (EC 4.2.1.22)ヘテロ欠損マウス (B6.129P-2Cbstm1Unc/J : C57BL/6 系統の変異マウス) を交配し，ホモ欠損マウス(CBS-KO)，ヘテロ欠損マウス(CBS-Hetero)，野生型マウス(CBS-WT)を得た。15-18 日齢にて血漿を採取するとともに，遺伝子型を判定した。

### 3.2.3.2. ABD-F を用いた試料前処理

3.3.1.項における標品試料の ABD-F による誘導体化 (図 3.2B) は, 先行研究を参考にして以下の通り行った<sup>48</sup>.

- 50  $\mu$ L of standard solution
- + 125  $\mu$ L of 100 mM borate buffer (pH 9.3)
  - with 5 mM ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA)
- + 50  $\mu$ L of 3.0 g/L ABD-F in the borate buffer with EDTA
- ↓ Reaction at 60°C for 5 min …蛍光誘導体化
- + 25  $\mu$ L of 1.0 M HCl aq. …反応の終結

### 3.2.3.3. ABD-チオールの蛍光強度測定

反応後の ABD-チオール溶液を 100 mM ammonium formate buffer (pH 2.5, 3.0, 3.5)で希釈し, 蛍光分光器により最大吸収波長/最大蛍光波長における蛍光強度を測定した. 測定溶液の ABD-チオール濃度は 2  $\mu$ M とした.

### 3.2.3.4. ABD-チオールの HILIC 分離条件

HILIC カラムにおける ABD-チオールの保持の比較は, 以下の条件で行った.

移動相	acetonitrile /10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 80/20 (v/v)
移動相線速度	1 mm/s
カラム温度	35°C
カラム	ZIC-HILIC, Inertsil Amide, PC HILIC
蛍光検出	Ex. 380 nm / Em. 510 nm
注入試料	5 $\mu$ L (aqueous-acetonitrile solution (10/90, v/v))

最適な分離条件では, 上記条件のうち下記の変更を行った.

移動相	acetonitrile /50 mM ammonium formate buffer (pH 2.5) = 82/18 (v/v)
流速	0.2 mL/min
カラム	ZIC-HILIC (150 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 5 $\mu$ m)

### 3.2.3.5. SBD-F を用いた試料前処理

3.3.2.項, 3.3.3.項におけるヒト血漿試料または標品試料の前処理は, 先行研究をもとにし<sup>45</sup>, ジスルフィドの還元, 除蛋白, SBD-F による蛍光誘導体化 (図 3.2A) の順に行った. ジスルフィドはチオール(R-SH, R'-SH)が酸化され, ジスルフィド結合(R-SS-R')を有する化合物を指す. 本 3.2.3.5.項に示す前処理では, 生体試料に対してジスルフィドの還元を行った後に SBD-F による誘導体化



を行っていることから、チオールの定量値は total thiol (= thiol + disulfide)として算出される。具体的な操作を以下に示す。

- 25  $\mu$ L of standard solution, mouse serum, mouse plasma, or human plasma
- + 25  $\mu$ L of 8  $\mu$ M *N*-(2-mercaptopropionyl) glycine (MPG) aq. (as an internal standard)
- + 5  $\mu$ L 120 g/L tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) aq.
  - ↓ Reaction at room temperature for 30 min …ジスルフィドの還元
- + 25  $\mu$ L of 100 g/L trichloroacetic acid with 1 mM EDTA
  - ↓ Centrifugation at 15,000 $\times$ g at 4°C for 10 min …除蛋白
- 50  $\mu$ L of the supernatant
- + 2  $\mu$ L of 5 M NaOH aq.
- + 123  $\mu$ L of 125 mM borate buffer (pH 9.5) with 4 mM EDTA
- + 50  $\mu$ L of 3.0 g/L SBD-F in the borate buffer with EDTA
  - ↓ Reaction at 60°C, 60 min …蛍光誘導体化
- + 25  $\mu$ L of 1.0 M HCl aq. …反応の終結

### 3.2.3.6. アミドカラムを用いた SBD-チオールの HILIC 分離条件

HILIC 分離の初期条件と、最適化後の条件を以下に示す。

移動相 (初期条件)	10 mM ammonium formate (pH 3.0) /acetonitrile = 25/75 (v/v)
(最適条件)	40 mM ammonium formate (pH 3.0) /acetonitrile = 25/75 (v/v)
流速	0.4 mL/min
カラム	Inertsil Amide (150 mm $\times$ 3.0 mm i.d., 5 $\mu$ m)
カラム温度	35°C
蛍光検出	Ex. 375 nm / Em. 510 nm
注入試料	5 $\mu$ L (aqueous-acetonitrile solution (20/80, v/v))

HILIC-MS 分析における MS 条件を以下に示す。

Ionization method	electrospray ionization (ESI) negative		
Spray voltage	2.5 kV	Capillary temperature	270°C
Sheath gas flow rate	50 [a.u.]	Auxiliary gas flow rate	15 [a.u.]
Sweep gas flow rate	3 [a.u.]	S-Lens RF level	55 [a.u.]

HILIC-MS/MS 分析における MS/MS 条件を以下に示す。

Collision energy	typically 30 eV	Collision / damping gas	nitrogen
------------------	-----------------	-------------------------	----------

### 3.2.3.7. SBD-F とアミドカラムを用いた生体チオール分析法のバリデーション

検量線の作成は内標準法にて行い、それぞれの SBD-チオールに対して、2 オーダー以上の範囲

で 8 点を取った。それぞれの濃度範囲は、LC 装置への注入試料中の SBD 誘導体の濃度として、5-750 nM (NAC, Hcy, CysGly), 46-6900 nM (Cys), 10-1500 nM (GSH), 15-2250 nM ( $\gamma$ GluCys)とした。

回収率は、ヒト血漿試料に既知濃度の各 SBD-チオール標品を加えたものを注入試料とし、(添加試料の測定値 - 無添加試料の測定値) / 添加量  $\times 100$  [%]として算出した。添加した標品試料の濃度は 3 点とした。

日内変動は、同日内に、回収率算出に用いた 4 試料 (マウス血清試料とその添加試料 3 つ) を各 5 回ずつ測定し、その relative standard deviation (RSD) [%]として求めた。日間変動は、マウス血清試料の測定を 5 日間行い、その RSD [%]として求めた。

なお、チオールの定量処理は、クロマトグラムのピーク高さを用いて行った。

### 3.3. 結果と考察

#### 3.3.1. 生体チオールの親水性相互作用液体クロマトグラフィー分析に適した

##### 蛍光誘導体化試薬の検討<sup>1</sup>

生体チオールは生体試料中濃度が比較的低い（ヒト血漿中の GSH 濃度は 1~5  $\mu\text{M}$ ）<sup>36</sup>ことから検出を高感度に行う必要があるため、その分析には LC-蛍光検出法が汎用されている<sup>43</sup>。これまでの研究では、チオールの誘導体化に適當、かつ HILIC と相性の良い蛍光誘導体化試薬として、1) チオール選択的に反応する、2) チオールとの反応生成物のみが蛍光を発する（発蛍光誘導体化試薬）、3) 誘導体化試薬自体のかさが小さい、4) 誘導体化試薬自体の極性が高い、といった特性を持つ、SBD-F を採用していた（図 3.2A）<sup>45-47</sup>。チオール分析において SBD-F の他によく用いられている蛍光誘導体化試薬としては、ABD-F が挙げられる（図 3.2B）<sup>49</sup>。ABD-F は上記 1)-3) を満たしており、その極性も比較的高い発蛍光誘導体化試薬である。本 3.3.1.項では、ABD-チオールの HILIC カラムにおける保持、分離の検討を行うことで、ABD-F の HILIC 分離への適合性を評価した。

##### 3.3.1.1. ABD-チオールの HILIC カラムにおける保持の評価

3.1 項で述べたように、SBD-チオールの保持が強い HILIC カラムはスルホベタイン基、アミド基、ホスホリルコリン基を有するものであった（表 3.1, 図 3.3）。そこで、ABD-チオールの保持について、この 3 種カラムを用いて検討した。試料としたチオールは、Cys, Hcy, GSH, CysGly,  $\gamma\text{GluCys}$ , NAC, cysteamine (CA), MPG の 8 種である（図 3.1）。

その結果を図 3.4 に示した。同じ移動相条件を用いたときの SBD-チオールの結果（図 3.2B）と比較すると ABD-チオールの保持は 1/3 程度となったものの、十分な保持が確認された。また、SBD-チオールの保持には検討したカラム間で大きく差があった一方で、ABD-チオールの保持はカラム間であまり差がないことが明らかとなった。この要因は、チオール誘導体と固定相官能基との静電相互作用の差にあると考えられる。スルホン酸基を有する SBD 骨格は、移動相条件(pH 3.0)において陰イオンとなっているのに対し、ABD 骨格はスルホン酸基がアミノ化された構造をもつので分子型として存在する。また、スルホベタインカラムとホスホリルコリンカラムは固定相官能基が双性イオン性であり（表 3.1）、SBD-チオールとは親和的（スルホベタインカラム）、または排除的（ホスホリルコリンカラム）な相互作用が起こったのに対し、ABD-チオールとはこの相互作用が起らないため、電荷を持たないアミドカラムと同等の保持を示したものと推測された。

以上の検討において、ABD-チオールの HILIC カラムへの保持が確認されたことから、ピラーアレイカラムでチオールの HILIC 分離を行う際には、誘導体化試薬の選択肢の一つとして ABD-F を用いることができると考えられた。そこで以降では、ABD-F で誘導体化したチオールの HILIC 分離条件を検討し、8 種誘導体化チオールの完全な分離（分離度  $R_s > 1.5$ ）を目指した。

### 3.3.1.2. スルホベタインカラムにおける ABD-チオールの分離条件検討

3.3.1.1.項で述べた通り、HILIC カラムの種類は ABD-チオールの保持に大きく影響しなかった。そこで、先行研究の SBD-チオールの分離法<sup>45</sup>に合わせて、ABD-チオールの分離検討を行うカラムにはスルホベタイン基を有するカラムを選択した。

まず、初期移動相を acetonitrile / 100 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 80/20 (v/v)として、移動相 pH の検討を行った。図 3.5A に、pH を 2.5, 3.0, 3.5 と変化させた際のクロマトグラムを示す。pH 2.5, 3.5 の条件において、8 種 ABD-チオールの良好な分離が見られた。最も近接していた ABD-GSH と  $\gamma$ -GluCys の分離度は、pH 2.5 で 1.3, pH 3.5 で 1.7 となり、分離の点では pH 3.5 の移動相が優れていた。一方で、ABD-チオールのピーク高さについては、pH の増加に伴い、減少することが分かった。

このピーク高さの変動が、溶媒 pH に依存した ABD-チオールの蛍光強度変化に由来することを確かめるために、ABD-チオールの蛍光強度測定を行った。表 3.2 に示すように、溶媒 pH が 3.5 から 2.5 に減少するのに伴い、ABD-チオールの蛍光強度が増大することが明らかになった。特に、ヒト血漿中で検出される生体チオールのうち濃度が薄く、蛍光強度も小さな  $\gamma$ -GluCys (ヒト血漿中では 1  $\mu$ M 程度)<sup>45</sup>の蛍光強度が、溶液 pH を 3.5 から 2.5 に変更することで約 2 倍となっていた。従って、将来的に ABD-F を用いて生体試料の分析を行うことを想定し、より検出感度が高くなる pH 2.5 を移動相 pH として選択した。

続けて、ABD-GSH と  $\gamma$ -GluCys の分離度  $R_s$  を 1.5 以上とすることを目指して、移動相緩衝液の塩濃度と、移動相 acetonitrile 含量の検討を行った。緩衝液濃度が ABD-チオールの保持に与える影響を図 3.5B に示す。ABD-GSH と  $\gamma$ -GluCys の  $R_s$  は、10, 30, 50, 100, 200 mM の濃度条件に対してそれぞれ、1.0, 1.4, 1.4, 1.3, 1.3 となった。30 mM では SBD-CA と -Hcy が非常に近接していたため ( $R_s = 1.1$ )、緩衝液濃度は 50 mM とした。最後に、移動相 acetonitrile 含量が ABD-チオールの保持に与える影響を調べた (図 3.5C)。ABD-GSH と  $\gamma$ -GluCys の  $R_s$  は、移動相 acetonitrile 含量が 82% (v/v)のとき 1.5 となり、それ以外では 1.4 となった。以上の検討から、最適移動相を acetonitrile / 50 mM ammonium formate buffer (pH 2.5) = 82/18 (v/v)とした。図 3.6 にクロマトグラムを示したように、最適条件下では ABD-チオール 8 種全ての良好な分離を達成した。

### 3.3.1.3. ABD-F を用いた生体チオールの HILIC 分析：まとめ

本 3.3.1.項では、チオール選択的な蛍光誘導体化試薬である ABD-F について、生体チオールの HILIC 分析に利用可能であるかを検討した。SBD-チオールと比較すると、HILIC カラムにおける ABD-チオールの保持は弱かったものの、ABD-チオールは十分に HILIC 分離可能であることが示された<sup>1</sup>。従って ABD-F を、ピラーアレイカラムでチオールの HILIC 分離を試みる際の誘導体化試薬の候補の一つとした。

### 3.3.2. アミドカラムと SBD-F を用いた生体チオールの分離分析検討<sup>2</sup>

3.1 項で述べたように、SBD-チオールの保持が最も強かった HILIC カラムはスルホベタイン基を有するものであった。本 3.3.2.項では、SBD-チオールの保持、分離に適した HILIC 官能基を探索するために、スルホベタインカラム以外の HILIC カラムを用いて SBD-チオールの分離検討を行うこととした。検討する HILIC カラムとして、スルホベタインカラムに次いで保持の強かったアミドカラムを選択した(図 3.3)。分析対象の試料としては、マウス血清試料中の生体チオールを選択した(Cys, Hcy, GSH, CysGly,  $\gamma$ GluCys, NAC, 内標として MPG)。また、チオールの定量値は、(還元型)チオールとジスルフィド(酸化によりチオール基同士が結合した状態(RS-SR'))の分子の合計値として算出した(3.2.3.5.項)。以降では、アミドカラムを用いた分離条件の検討、マウス血清試料中の生体チオールの定量、HILIC-質量分析(mass spectrometry, MS)を用いた不明チオールの分子量推定について順に述べる。

#### 3.3.2.1. アミドカラムにおける SBD-チオールの分離条件検討

初期移動相として、スルホベタインカラムを用いた SBD-チオール分析に用いた最適移動相(acetonitrile / 10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 75/25 (v/v))を選択し<sup>45</sup>、SBD-F による誘導体化反応を行ったマウス血清試料を用いて移動相の検討を行った。

初期移動相条件では、既知 SBD-チオールのピークに加えて大きな不明ピークが 2 本(SBD-不明チオール 1, 2 (SBD-UK1, -UK2)) 検出され、その分離が不十分であった。この分離を改善するために、まずは緩衝液の塩濃度を検討した。図 3.7 に緩衝液濃度 10-100 mM における各ピークの保持時間変化を示した。この図から分かるように、最も良い分離が得られた 40 mM を緩衝液濃度として決定し、これを最適移動相として用いた(acetonitrile / 40 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 75/25 (v/v))。最適条件下でのクロマトグラムを図 3.8 に示す。マウス血清試料のクロマトグラム(図 3.8B) に示すように、内標を含めた 7 種既知 SBD-チオールと、SBD-UK1, -UK2 の良好な分離を達成した。また、先行研究のスルホベタインカラムを用いた分析法と同様に<sup>45</sup>、RPLC を用いた従来の分析法では困難であった、 $\gamma$ GluCys の検出が可能であった。

なお、この SBD-UK1, -UK2 のピークは供与頂いたマウス血清試料、マウス血漿試料(3.2.3.1. 項)だけでなく、購入品のマウス血漿試料で検出されることが確認された一方で、ヒト血漿試料では検出されなかった(図 3.8C)。また、試料前処理操作(3.2.3.5.項)のうち、ジスルフィドの還元操作を行わなかった場合には、SBD-UK1, -UK2 は検出されなかった。SBD-F がチオール選択的な発蛍光誘導体化試薬であることを合わせて考えると、UK1, UK2 はチオールである可能性が高いこと、マウス血液中でジスルフィドとして存在していること、ヒトとマウスの硫黄代謝の違いを反映している分子であることが示唆された。UK1, UK2 の情報を得るために行った HILIC-MS 分析については、3.3.2.3.項にて後述する。

### 3.3.2.2. SBD-F とアミドカラムを用いた生体チオール分析法のバリデーション

3.3.2.1.項で得た分離条件にて、既知生体チオール(NAC, Hcy, Cys, CysGly, GSH,  $\gamma$ GluCys)の定量に対して分析法のバリデーションを行った。

表 3.3 には検出限界(signal-to-noise ratio (S/N) = 3), 定量限界(S/N = 10)を示した。これらの値は既に開発した SBD-F とスルホベタインカラムを用いた分析法と同等であり<sup>45</sup>, SBD-F と RPLC を採用した分析法と比較すると 30-250 倍高感度であった<sup>50-52</sup>。RPLC 法と比較して高感度化したことの一つの要因は、SBD-チオールの蛍光強度は水溶液中よりも acetonitrile 中で高いこと<sup>45</sup>, 移動相 acetonitrile 含量が RPLC (< 5% v/v)<sup>50-52</sup> よりも HILIC (75% v/v)で非常に高いことにあると考えられる。

本分析法の日内変動と回収率を表 3.4 に示す。日内変動は 3%未満, 回収率は 95-109%と, 良好な値を得た。定量値の日間変動は, Hcy, Cys, CysGly, GSH,  $\gamma$ GluCys の順に 4, 7, 15, 6, 10%以内であった。また, 生体チオール濃度は, Hcy, Cys, CysGly, GSH,  $\gamma$ GluCys の順に, マウス血清試料では  $6.7 \pm 0.3, 227.7 \pm 16.9, 1.2 \pm 0.4, 77.5 \pm 29.2, 8.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$  mice), マウス血漿試料では  $5.8 \pm 0.8, 179.3 \pm 7.5, 1.3 \pm 0.4, 80.2 \pm 40.9, 7.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$  mice)と定量された。この値は先行研究とよく一致していたことから, 本法による生体チオール定量の妥当性が示された (マウス血漿試料において, Hcy, Cys, CysGly, GSH の順に, 12, 124, 3, 35  $\mu\text{M}$ )<sup>53</sup>。

ここまでの検討で, アミドカラムを用いて実際に生体チオールの分離分析が可能であることが確かめられた。以降では更に, HILIC-MS を用いて不明ピークである SBD-UK1, -UK2 の分子量の推定を行った。

### 3.3.2.3. HILIC-MS 分析によるマウス血清試料中不明チオールの分子量測定

マウス血清試料中の UK1, UK2 の分子量を推定するために, HILIC-MS 分析, HILIC-MS/MS を行った。質量分析器として, 四重極-オービトラップ型 MS (q-Orbitrap-MS)を使用した。この q-Orbitrap-MS は 70,000 を超える分解能を有するため, 分子の精密質量を測定でき, その精密質量から分子の組成式予測が可能となる。本研究が SBD-チオールを HILIC-q-Orbitrap-MS 分析する初めての報告だったため, まずは標品チオールの SBD 誘導体の分析を行った。

標品 SBD-チオール(SBD-Hcy, -Cys, -CysGly, -GSH, - $\gamma$ GluCys)について, イオン化法を ESI negative として HILIC-MS 分析を行ったところ, 全ての標品 SBD-チオールの検出が可能であった (図 3.9A)。また, 検出された  $m/z$  とモノアイソトピック質量 (理論値) が小数第 3 位まで一致することが確かめられた。続いて, これら SBD-チオールに対して HILIC-MS/MS 分析を行ったところ, 全ての SBD-チオールに共通するプロダクトイオン  $m/z$  230.954 が得られた (図 3.9B)。この値は SBD-チオール(SBD-S-R)の SBD 基から遠い方の S-C 結合で切断が起こった構造である[SBD-SH]のモノアイソトピック質量 230.954 と一致したため, プロダクトイオン  $m/z$  230.954 の構造は[SBD-SH]であると推定した (図 3.9B)。この構造はチオール基由来の S 元素を有していることから, このプロダクトイオンが検出されれば, そのプリカーサーイオンは SBD 化されたチオール基を有する構造であると推定できる。

続いて、SBD-F で誘導体化したマウス血清試料に対して HILIC-MS 分析を行った。図 3.10A-E に示すように、マウス血清試料においても、既知チオールの SBD 誘導体の検出に成功した。さらに、SBD-UK1, -UK2 の精密質量を得るために HILIC-MS, HILIC-MS/MS 分析を行ない、以下に述べる 3 条件を満たす  $m/z$  を探索した：1) ピークの溶出時間と形状が蛍光クロマトグラムと MS クロマトグラムで一致すること；2) SBD-F で処理したマウス血清試料において検出され、SBD-F で処理していない試料において検出されないこと；3) HILIC-MS/MS 分析においてプロダクトイオン  $m/z$  230.954 ([SBD-SH]<sup>-</sup>)が確認されること。まず、HILIC-MS 分析にて条件 1), 2)の条件を満たす  $m/z$  を探索したところ、[SBD-UK1]<sup>-</sup>として 1184.519, [SBD-UK2]<sup>-</sup>として 800.281 が見つかった (図 3.10G, H)。なお、SBD-UK1 は 2 価イオン[SBD-UK1]<sup>2-</sup> ( $m/z$  591.756)としても検出された (図 3.10F)。これらの  $m/z$  に対して HILIC-MS/MS 分析を行い、条件 3)を満たすかどうかを確認した。その結果の MS/MS スペクトルを図 3.11 に示す。両スペクトルから  $m/z$  230.954 のプロダクトイオンが観察されたことから、[SBD-UK1]<sup>-</sup>の精密質量は 1184.519, [SBD-UK2]<sup>-</sup>の精密質量は 800.281 であり、UK1, UK2 はチオール基を有すると推定した。なお、SBD-UK1 の MS/MS スペクトル (図 3.11A) において、 $m/z$  952.557 のシグナルは[SBD-UK1]<sup>-</sup>から SBD-S 部分が脱離した構造に対応すると考えられる ( $952.557 + 230.954$  [SBD-SH]<sup>-</sup> +  $1.008$  [H]<sup>+</sup> =  $1184.519$  [SBD-UK1]<sup>-</sup>)。本研究で分析対象とした既知の生体チオール中で最も大きな分子である GSH の分子量は 307 ([SBD-GSH]<sup>-</sup>として  $m/z$  504) であり、UK1, UK2 はその 2, 3 倍程度の分子量を有していることが分かった。

最後に、Xcalibur Qual Browser (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA)を用いて、得られた精密質量から SBD-UK1, -UK2 の組成式の推定を行った。このソフトウェアによる組成式の推定では、測定された精密質量に近い分子量を有する組成式が、その一致度の高い順に提示される。組成式推定のための計算の拘束条件として、SBD-S 構造を有していること(元素数の条件： $100 \geq C \geq 6$ ,  $150 \geq H \geq 2$ ,  $30 \geq O \geq 4$ ,  $30 \geq N \geq 2$ ,  $10 \geq S \geq 2$ 。不飽和度条件： $100 \geq \text{double-bond equivalents} \geq 7$ )を設定した。この条件下では、既知 SBD-チオールに関しては、一致度が 1 番目または 2 番目の組成式として、正しい組成式が提示された。SBD-不明チオールについては、分子量の一致度が最も高い組成式として、SBD-UK1 では  $C_{48}H_{92}O_4N_{14}S_8$  が、SBD-UK2 では  $C_{44}H_{52}O_4N_2S_4$  が得られた。しかしながら、SBD-UK1 と SBD-UK2 は精密質量が比較的大きいことから、精密質量に対して 5 ppm 以内の一致度で候補となる組成式が 30 以上提示されており、組成式の決定は困難であった。

### 3.3.2.4. アミドカラムと SBD-F を用いた生体チオールの分離分析：まとめ

本 3.3.2.項では、アミドカラムと SBD-F を用いた生体チオールの HILIC 分析法の開発を通して、ピラーアレイカラムの表面修飾基としてアミド基が適していることを示した。さらに、HILIC-MS 分析を行ない、マウス血清中に存在した SBD-不明チオールの精密質量を明らかにした<sup>2</sup>。本 3.3.2.項で得た SBD-チオールの HILIC-MS 分析に関する知見は、将来的にピラーアレイカラムを搭載したマイクロ流体デバイスの検出法として MS を採用する際に、活かすことができると考えられる。

また、汎用 LC を用いた生体チオール分析法として見た際の本法の利点のひとつは、RPLC を用いた従来の分析法では困難であった  $\gamma$ GluCys を含めた生体チオールの一斉分析が可能なる点にある。これまでの報告では、ある病態の評価をチオール分析により行うとき、その分析対象を Cys, Hcy,

GSH の中に限ったものがほとんどであった<sup>36</sup>。しかしながら、生体内においてチオールは Hcy→Cys→ $\gamma$ GluCys→GSH→CysGly という一連の流れで代謝されていることから (図 3.1), この一連の構成要素を同時分析することによってこそ、生体内の酸化還元状態等と病態との詳細な解析が可能になると考えられる。

### 3.3.3. ホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの分析<sup>3</sup>

3.3.2.項において、アミドカラムと SBD-F を用いた生体チオール分析法を開発した<sup>2</sup>。この分析法を用いて病態解析が可能であることを示すために、本 3.3.3.項では、病態モデルマウスの血漿中チオール分析を行った。

本 3.3.3.項で取り扱う病態として、ホモシスチン尿症を取り上げた。ホモシスチン尿症は、Hcy が血中に異常に蓄積する常染色体潜性遺伝性疾患であり、その酸化体 (homocystine : 2 分子の Hcy がジスルフィド結合した分子) が血中や尿中で高値を示す<sup>54,55</sup>。ホモシスチン尿症の原因は多くの場合において、Hcy を cystathionine に変換する酵素である CBS の欠損にある (図 3.1)。未治療の場合には知的障害、骨粗鬆症、水晶体亜脱臼、血栓症等の重い症状が生じるため、ホモシスチン尿症は新生児マススクリーニングの対象疾患となっている<sup>54,55</sup>。

ホモシスチン患者またはモデル動物におけるチオール分析を行った先行研究では、分析対象が Cys, Hcy, GSH のみに限られていたため、一連の生体チオールの濃度バランス変化は不明であった<sup>56-58</sup>。そこで本 3.3.3.項では、ホモシスチン尿症と一連の生体チオール濃度との関係を明らかにすることで、その病態解析を行うことを目的とし、CBS 欠損マウスの血漿に存在する Hcy, Cys,  $\gamma$ GluCys, GSH, CysGly の一斉定量を行った。

#### 3.3.3.1. CBS 欠損マウスの血漿試料中チオールの分析

CBS のヘテロ欠損マウスを交配することで、CBS ホモ欠損(CBS-KO), ヘテロ欠損(CBS-Hetero), 野生型(CBS-WT)のマウスを得た (3.2.3.1.項)。これらマウスの血漿試料に対して、SBD-F とアミドカラムを用いて、生体チオールの HILIC-蛍光検出による分析を行った。図 3.12 にそのクロマトグラムを示す。全てのマウス試料に対して、SBD-Hcy, -Cys, -CysGly, -GSH, - $\gamma$ GluCys のピークが確認された。またこれらの SBD-既知チオールに加えて、3.3.2.項で解析した SBD-UK1, -UK2 のピークも検出された。

既知チオールの定量値と、SBD-UK1, -UK2 のピーク高さを、CBS-KO, -Hetero, -WT マウス間で比較した結果を、図 3.13 に示す。血漿試料中 Hcy の定量値は、CBS-WT, -Hetero, -KO マウスの順に、 $24.7 \pm 7.4$  ( $n = 5$  mice),  $29.3 \pm 2.8$  ( $n = 4$  mice),  $237.7 \pm 52.3$   $\mu$ M ( $n = 3$  mice) (mean  $\pm$  SD)であった。先行研究で定量された Hcy 濃度 (同順で、 $6.1 \pm 0.8$ ,  $13.5 \pm 3.2$ , and  $203.6 \pm 65.3$   $\mu$ M) と比較すると<sup>58</sup>, 本研究では CBS-WT, -Hetero 試料における Hcy 濃度が比較的高めに算出された。この理由として、マウスの日齢の差 (本研究 : 15-18 日齢, 先行研究 : 21 日齢) や、育成環境の差が挙げられる。Cys, GSH 濃度については、先行研究とよく一致していた<sup>56,57</sup>。



### 3.3.3.2. CBS 欠損による血漿試料中チオール濃度変化の評価

図 3.13 に示した結果に対して、群間の差の検定を Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った(one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test). CBS は Hcy を cystathionine に変換する酵素であるため(図 3.1), その欠損により Hcy の濃度増加と, cystathionine の下流のチオール(Cys,  $\gamma$ GluCys, GSH, CysGly)の濃度減少が見られると予測された. 実際に, CBS-KO マウスの結果を CBS-WT マウスと比較すると, Hcy の有意な増加と, Cys,  $\gamma$ GluCys, CysGly の有意な減少が見られた. 一方で, GSH の濃度変化は見られなかった. また, CBS-Hetero マウスでは, CBS-WT マウスと比べて, Cys の有意な濃度減少と, CysGly の有意な濃度増加が見られた.

これらのことから生体内では, CBS の機能が一定程度低下している場合には, CysGly の生成 (GSH の分解) が抑制されることで, 生体内の中心的な還元剤である GSH の濃度を維持する仕組みがあることが示唆された. また, CBS-Hetero において濃度やピーク高さが最も高くなるという傾向が GSH, CysGly に加えて, SBD-UK1, -UK2 にも見られたことから, UK1 や UK2 は GSH や CysGly に関連のある分子 (例えば, GSH や CysGly がジスルフィド結合以外で他のアミノ酸と結合した, 低分子量のペプチド) である可能性が考えられる.

### 3.3.3.3. ホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの HILIC 分析: まとめ

本 3.3.3.項では, SBD-F とアミドカラムを用いて, ホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの分離分析を行い, CBS 欠損に伴うチオール濃度変化について, 従来分析が行われてこなかった CysGly や  $\gamma$ GluCys を含めて評価した<sup>3</sup>. これにより, CBS 欠損時に GSH 濃度を一定に保つための機構として, CysGly 生成 (GSH 分解) の抑制が存在することが推測された. 以上の結果より, アミドカラムと SBD-F を用いた生体チオール分析法を用いて病態解析が可能であることが示されたといえる. 従って, アミド修飾ピラーアレイカラムを開発することができれば, 同様の病態解析が可能になると考えられる.

### 3.4. 小括

本章では、ピラーアレイカラムで生体チオールの HILIC 分離を試みる前の予備検討として、1) チオールの HILIC 分離に適した蛍光誘導体化剤の探索、2) SBD-チオールの保持や分離に適した HILIC 官能基の探索、3) HILIC 分離分析により生体試料中チオール濃度と病態との解析が可能であるかについての検討を行った。

3.3.1.項では、HILIC カラム（表面修飾官能基：スルホベタイン基、アミド基、ホスホリルコリン基）における ABD-チオールの保持は SBD-チオールと比べると弱いものの、その保持や分離が十分可能であることを明らかにした<sup>1</sup>。このことから、ピラーアレイカラムでチオールの HILIC 分離を行う際には、ABD-F は蛍光誘導体化試薬の候補となると結論づけた。

3.3.2.項では、アミドカラムと SBD-F を用い生体チオールの HILIC 分析法を開発し、ピラーアレイカラムの表面修飾基としてアミド基が利用可能であることを示した。さらに、HILIC-MS 分析を行ない、マウス血清中に存在した SBD-不明チオールの精密質量を明らかにした<sup>2</sup>。MS を用いて SBD-チオールの検出が可能であることを示したことから、ピラーアレイカラムと SBD-F を用いた生体チオールの分析を行う場合にも、検出器として MS が適用可能であることが示唆された。

3.3.3.項では、SBD-F とアミドカラムを用いて、ホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの分離分析を行なった。CysGly や  $\gamma$ GluCys を含む一連の生体チオールの一斉分析が可能であったことから、CBS 欠損時において GSH 濃度を維持する機構について推察が可能となった<sup>3</sup>。従って、アミド修飾ピラーアレイカラムを開発することができれば、同様の病態解析が可能になると考えられる。

### 3.5. 図表

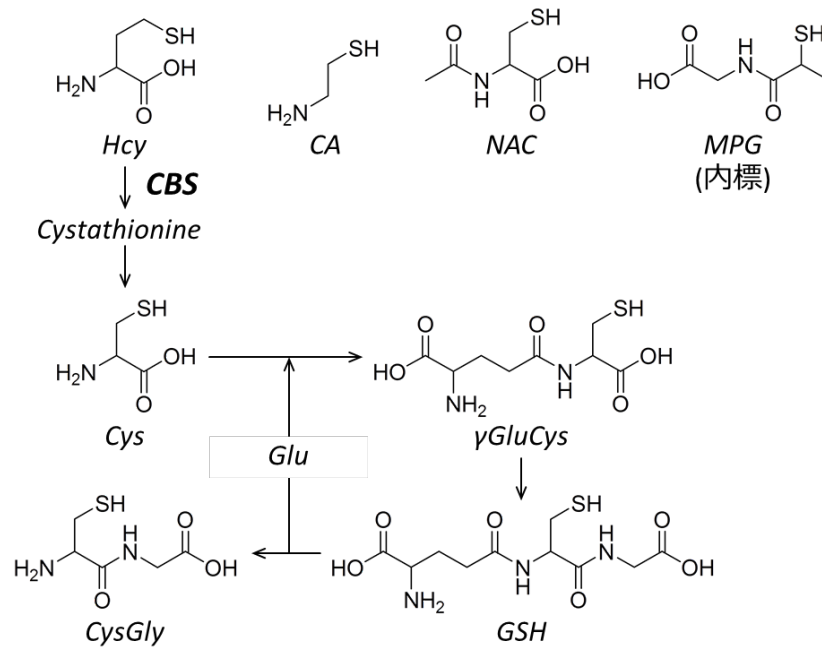


図 3.1. 生体チオールの構造と代謝. Hcy, homocysteine; Cys, cysteine;  $\gamma$ GluCys,  $\gamma$ -glutamylcysteine; GSH, glutathione; CysGly, cysteinylglycine; CA, cysteamine; NAC, N-acetylcysteine, MPG, N-(2-mercaptopropionyl) glycine; Glu, glutamic acid; and CBS, cystathionine  $\beta$ -synthase. Cystathionine はチオール基を持たない分子.

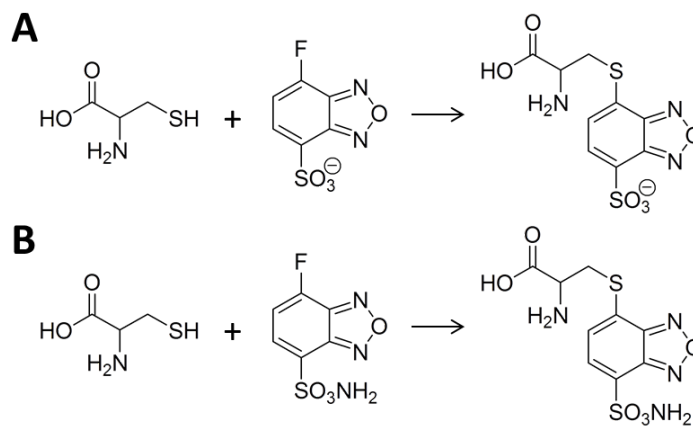


図 3.2. Cys と蛍光誘導体化試薬(A) SBD-F, (B) ABD-F との反応.

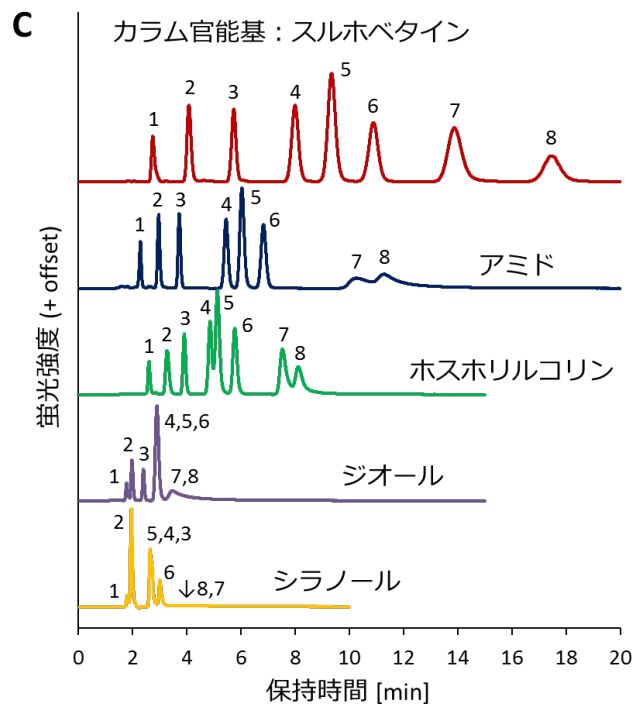
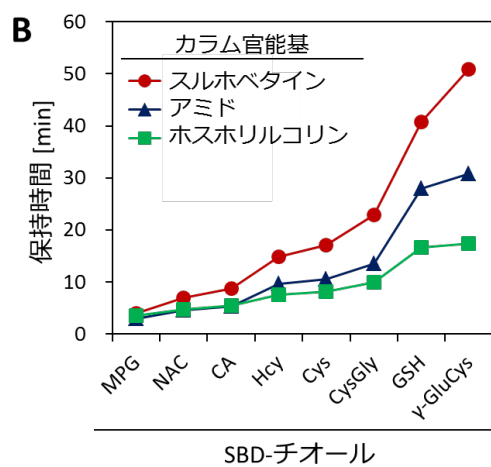
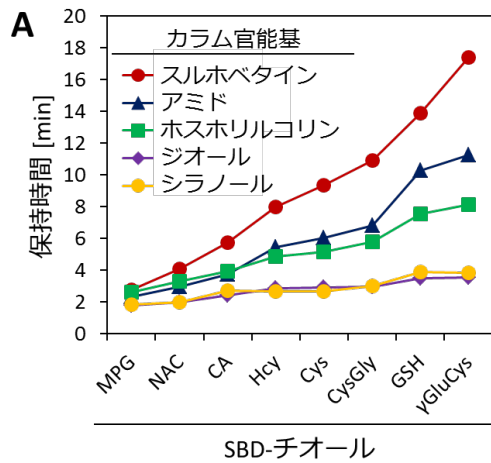


図 3.3. 様々な固定相官能基を有する HILIC カラムにおける SBD-チオールの保持(A, B)と分離(C)<sup>45</sup>. 移動相：acetonitrile / 10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = (A, C) 75/25 (v/v), (B) 80/20 (v/v). 移動相線速度：1 mm/s. (C) ピーク：SBD-derivatives of 1) MPG, 2) NAC, 3) CA, 4) Hcy, 5) Cys, 6) CysGly, 7) GSH, and 8) γGluCys.

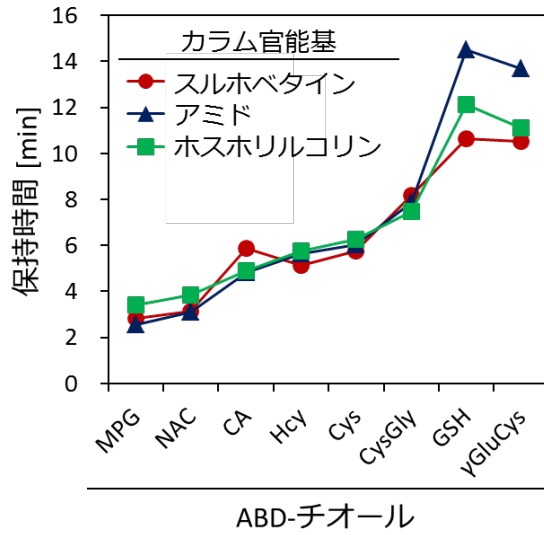
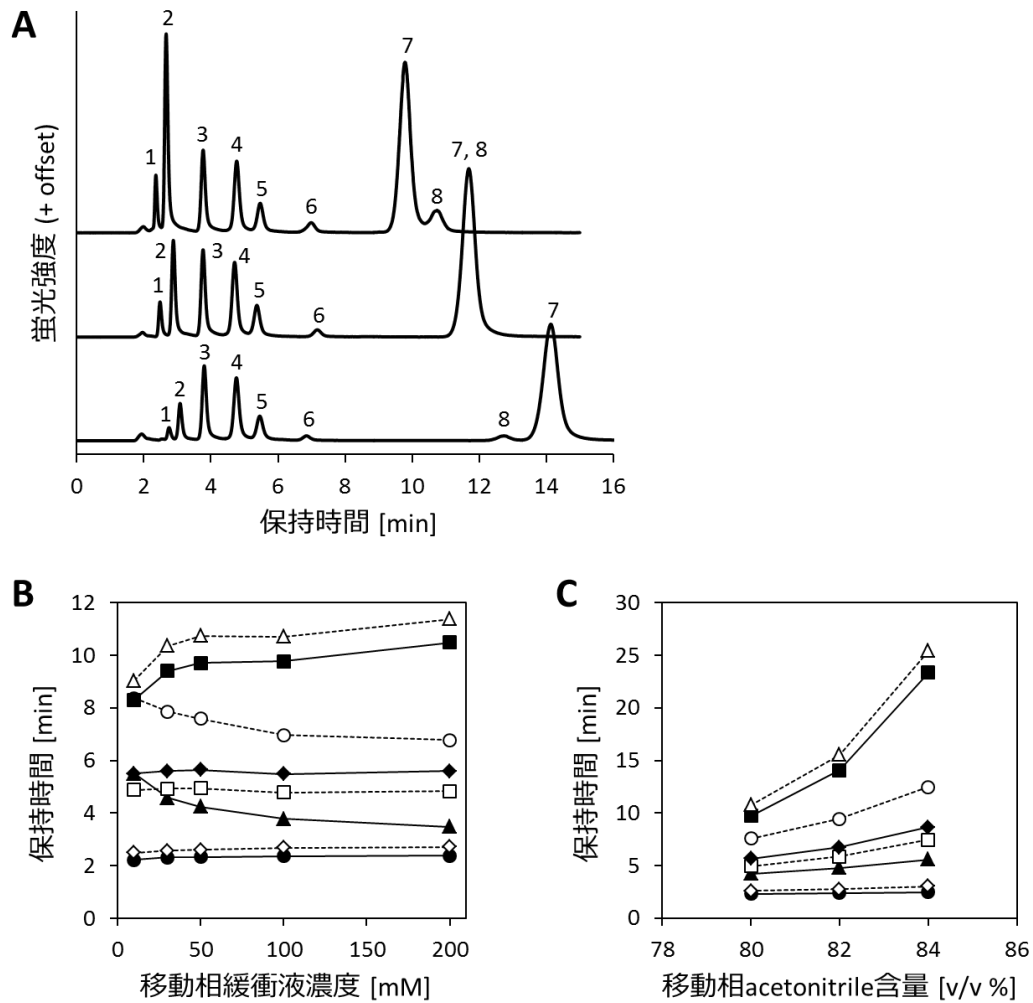


図 3.4. 様々な固定相官能基を有する HILIC カラムにおける ABD-チオールの保持. 移動相 : acetonitrile / 10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 80/20 (v/v). 移動相線速度 : 1 mm/s.



**図 3.5. スルホベタインカラムを用いた ABD-チオールの分離条件検討.** カラム : ZIC-HILIC (150 mm  $\times$  2.1 mm i.d., 5  $\mu$ m). 流速 : 0.2 mL/min. **(A) 移動相 pH がクロマトグラムに与える影響.** 移動相 : acetonitrile / 100 mM ammonium formate buffer (from top to bottom, pH 2.5, 3.0, and 3.5) = 80/20 (v/v). ピーク : ABD-derivatives of 1) MPG, 2) NAC, 3) CA, 4) Hcy, 5) Cys, 6) CysGly, 7) GSH, and 8)  $\gamma$ GluCys. **(B) 移動相緩衝液濃度が ABD-チオールの保持時間に与える影響.** シンボル : ABD-derivatives of ●, MPG; ◇, NAC; ▲, CA; □, Hcy; ◆, Cys; ○, CysGly; ■, GSH; and △,  $\gamma$ GluCys. 移動相 : acetonitrile / ammonium formate buffer (pH 2.5) = 80/20 (v/v). **(C) 移動相 acetonitrile 含量が ABD-チオールの保持時間に与える影響.** シンボル : (B) と同じ. 移動相 : acetonitrile / 50 mM ammonium formate buffer (pH 2.5).

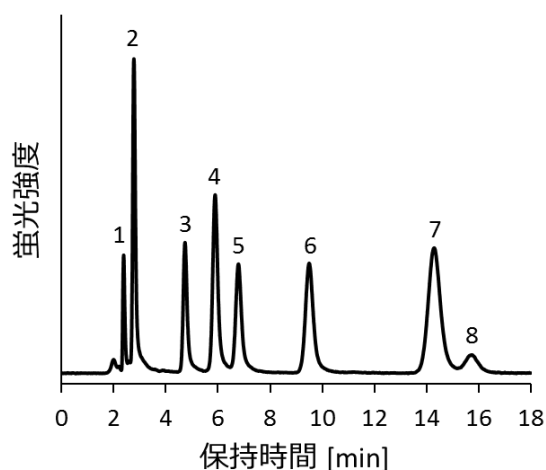


図 3.6. 最適条件における ABD-チオール分離のクロマトグラム. 移動相 : acetonitrile / 50 mM ammonium formate buffer (pH 2.5) = 82/18 (v/v). 流速 : 0.2 mL/min. カラム : ZIC-HILIC (150 mm × 2.1 mm i.d., 5 μm). ピーク : ABD-derivatives of 1) MPG, 2) NAC, 3) CA, 4) Hcy, 5) Cys, 6) CysGly, 7) GSH, and 8) γGluCys.

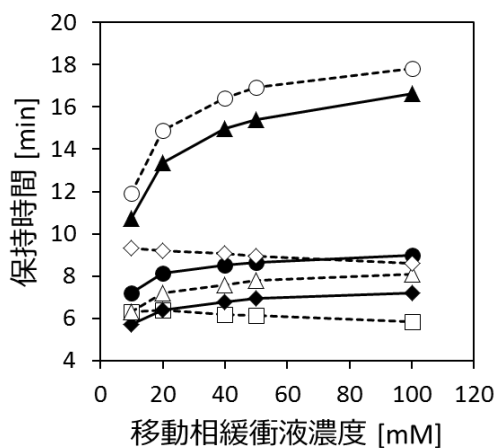


図 3.7. 移動相緩衝液濃度がアミドカラムにおける SBD-チオールの保持に与える影響. シンボル : SBD-derivatives of □, UK1; ◆, Hcy; △, Cys; ●, CysGly; ◇, UK2; ▲, GSH; and ○, γGluCys. 移動相 : acetonitrile / ammonium formate buffer (pH 3.0) = 75/25 (v/v). 流速 : 0.4 mL/min. カラム : Inertsil Amide (150 mm × 3.0 mm i.d., 5 μm).

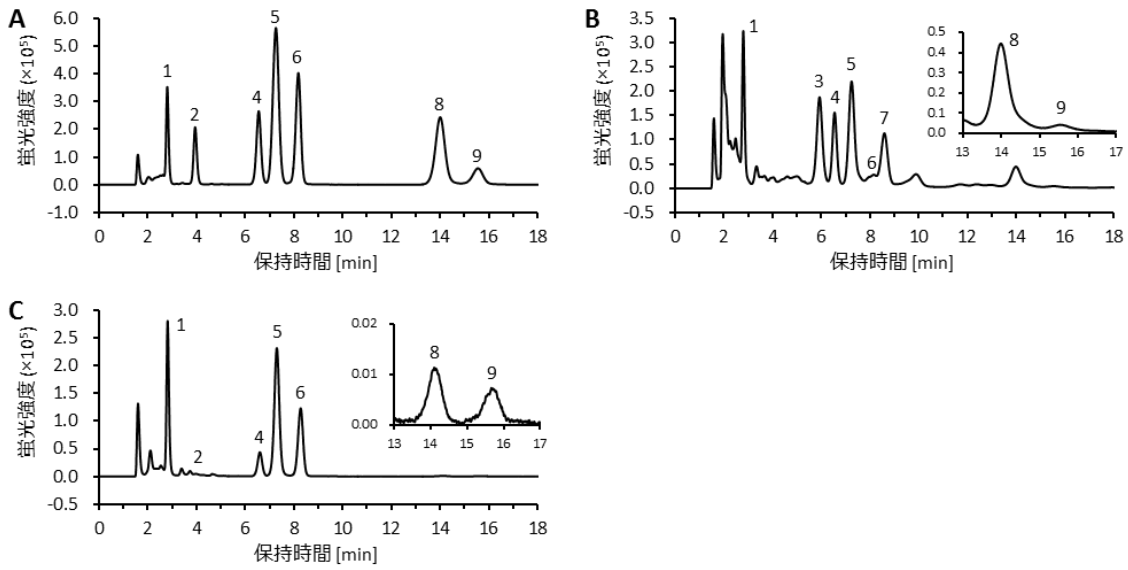


図 3.8. SBD-F とアミドカラムを用いた際の(A)標品試料, (B)マウス血清試料, (C)ヒト血漿試料のクロマトグラム. 移動相: acetonitrile / 40 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 75/25 (v/v). 流速: 0.4 mL/min. カラム: Inertsil Amide (150 mm  $\times$  3.0 mm i.d., 5  $\mu$ m). ピーク: SBD-derivatives of 1) MPG, 2) NAC, 3) UK1, 4) Hcy, 5) Cys, 6) CysGly, 7) UK2, 8) GSH, and 9)  $\gamma$ GluCys.

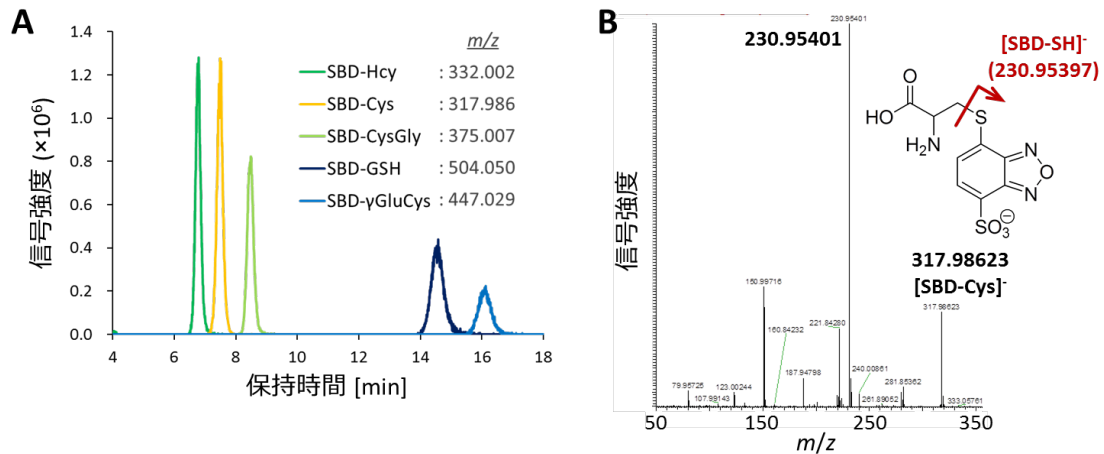


図 3.9. SBD-F とアミドカラムを用いた際のチオール標品試料の(A) 抽出 MS クロマトグラム, (B) SBD-Cys 標品の MS/MS スペクトル. 分離条件は図 3.8 と同一. SBD-チオール濃度: それぞれ 2  $\mu$ M.



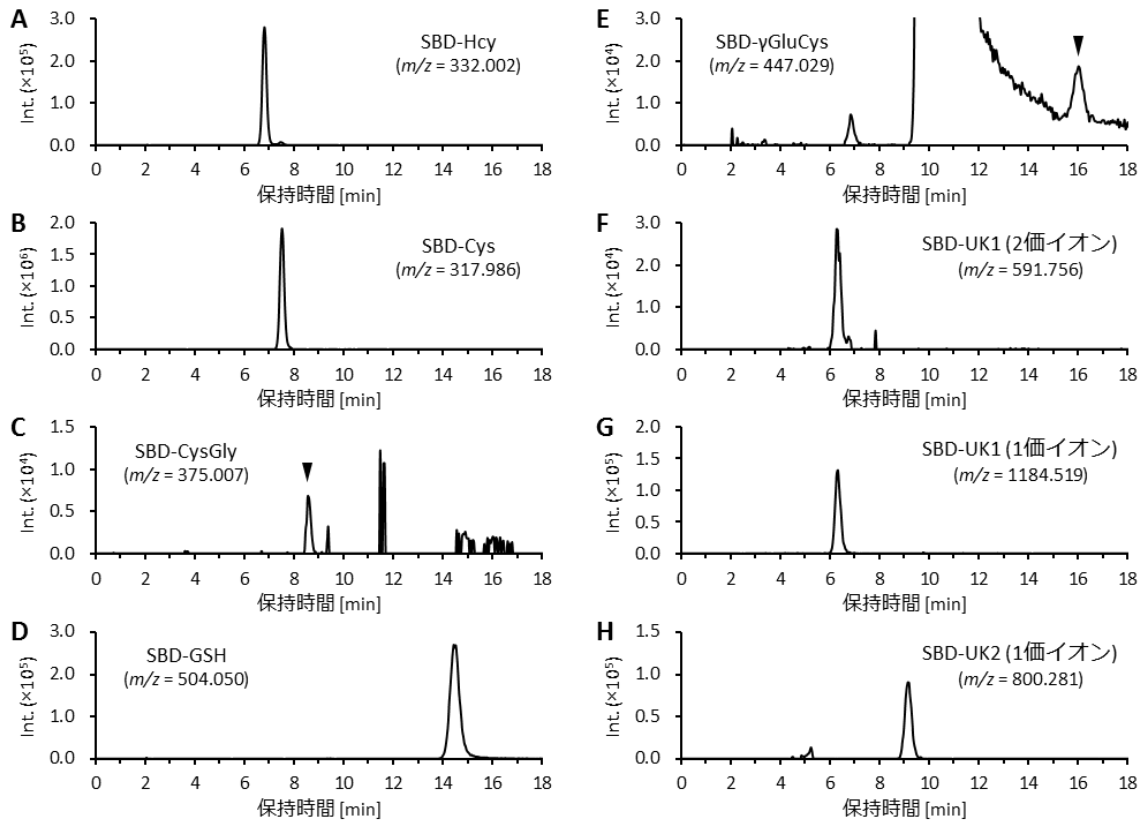


図 3.10. SBD-F とアミドカラムを用いたマウス血清試料中チオールの HILIC-MS 分析. (A) SBD-Hcy, (B) SBD-Cys, (C) SBD-CysGly, (D) SBD-GSH, (E) SBD- $\gamma$ GluCys, (F) SBD-UK1 (2 価イオン), (G) SBD-UK1 (1 価イオン), (H) SBD-UK2 (1 価イオン)の抽出 MS クロマトグラム. 分離条件は図 3.8 と同一.

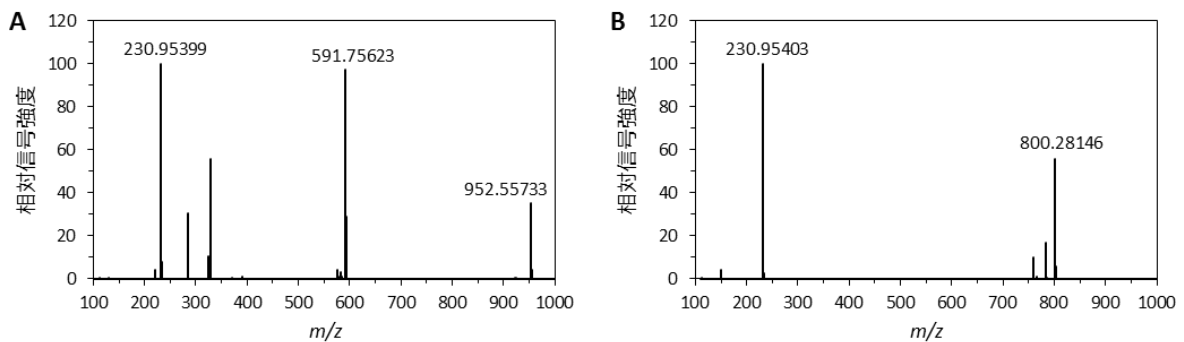


図 3.11. SBD-F とアミドカラムを用いたマウス血清試料の不明チオールの HILIC-MS/MS 分析. (A) SBD-UK1, (B) SBD-UK2 の MS/MS スペクトル. 分離条件は図 3.8 と同一.

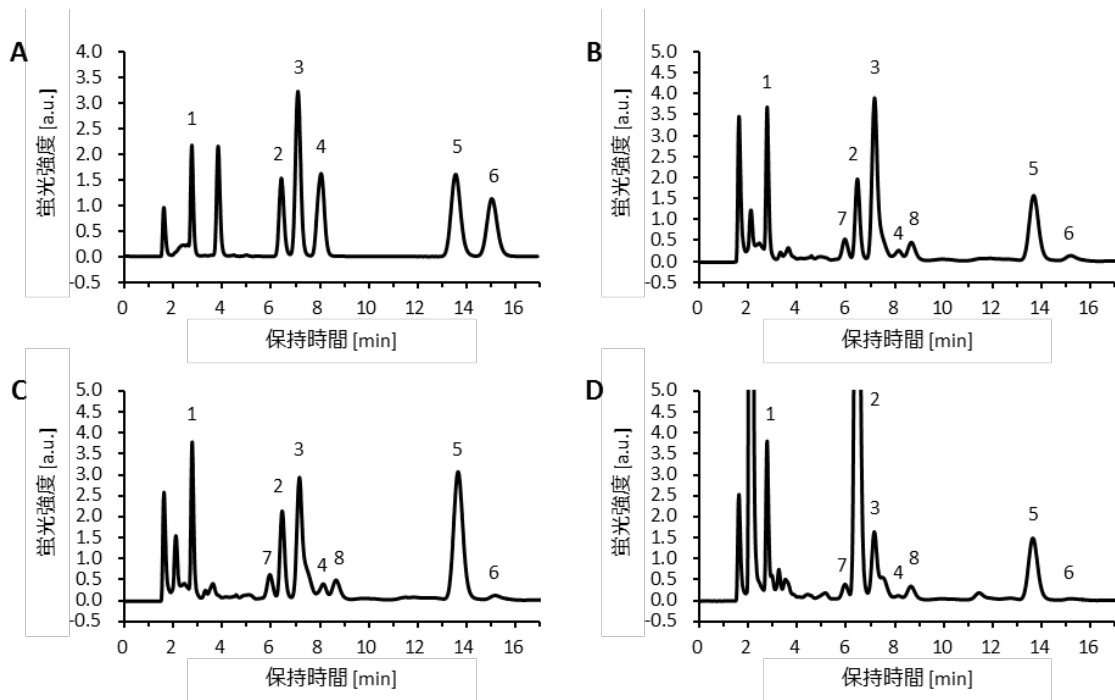


図 3.12. SBD-F とアミドカラムを用いた際の、(A) 標品チオール、(B) CBS-WT、(C) -Hetero、(D) -KO マウスの血漿料中チオールのクロマトグラム。ピーク：SBD-derivatives of 1) MPG, 2) Hcy, 3) Cys, 4) CysGly, 5) GSH, 6)  $\gamma$ GluCys, 7) UK1, and 8) UK2. 分離条件は図 3.8 と同一。

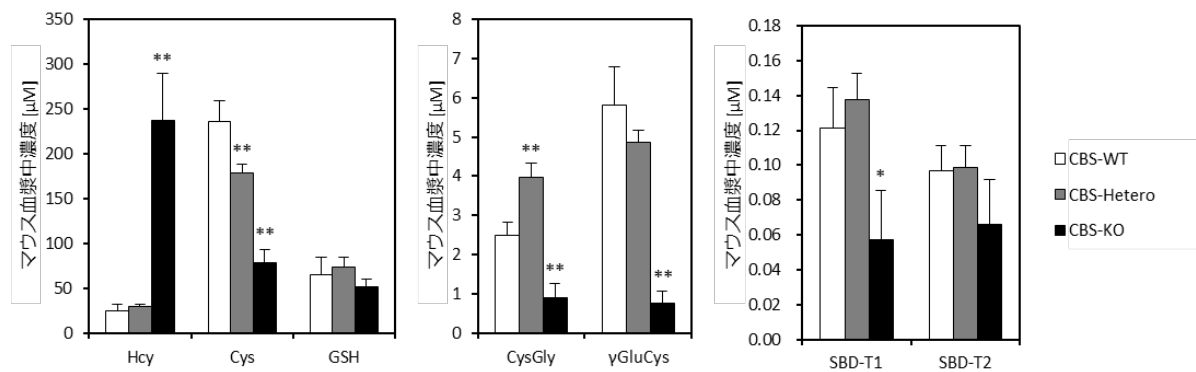


図 3.13. SBD-F とアミドカラムを用いたチオール分析法による、CBS-WT、-Hetero、-KO マウス間での血漿中チオールの定量値比較。試料数： $n = 5$  (CBS-WT),  $n = 4$  (CBS-Hetero),  $n = 3$  (CBS-KO)。エラーバー：SD。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : statistical significance vs CBS-WT by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

表 3.1. HILIC カラムの固定相官能基.

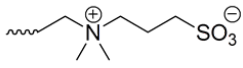
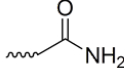
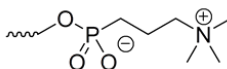
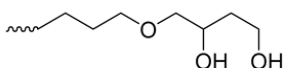

HILICカラム	固定相官能基	構造式
ZIC-HILIC	Sulfobetaine	
Inertsil Amide	Amide	
PC HILIC	Phosphorylcholine	
Inertsil Diol	Diol	
Inertsil SIL	Bare silica	

表 3.2. 溶液の pH が ABD-チオールの蛍光強度に与える影響.

pH	ABD-チオールの蛍光強度 [a.u.]							
	MPG	NAC	CA	Hcy	Cys	CysGly	GSH	γGluCys
2.5	288	120	425	113	101	314	243	118
3.0	235	89	395	108	93	278	233	81
3.5	218	58	390	97	91	246	218	57

表 3.3. SBD-F とアミドカラムを用いた生体チオール分析法の検出限界, 定量限界, 直線性.

チオール	検出限界 [nM] S/N = 3	定量限界 [nM] S/N =10	線形範囲 [nM] $r^2 > 0.9999$
NAC	0.4	2	5-750
Hcy	0.6	2	5-750
Cys	2	7	46-6900
CysGly	0.2	0.7	5-750
GSH	0.9	3	10-1500
$\gamma$ GluCys	4	12	15-2250

表 3.4. SBD-F とアミドカラムを用いた生体チオール分析法の日内変動と回収率

チオール	添加濃度 [ $\mu$ M]	測定値 (mean $\pm$ SD) [ $\mu$ M]	日内変動 [%]	回収率 [%]
Hcy	0	7.0 $\pm$ 0.07	0.9	-
	15	23.3 $\pm$ 0.10	0.4	108
	30	39.5 $\pm$ 0.11	0.3	108
	60	71.7 $\pm$ 0.22	0.3	108
Cys	0	203.2 $\pm$ 2.09	1.0	-
	75	275.8 $\pm$ 1.45	0.5	97
	150	347.5 $\pm$ 1.61	0.5	96
	300	497.1 $\pm$ 1.34	0.3	98
CysGly	0	1.3 $\pm$ 0.03	2.2	-
	1.25	2.5 $\pm$ 0.04	1.7	95
	2.5	3.7 $\pm$ 0.04	1.1	97
	5	6.2 $\pm$ 0.12	2.0	97
GSH	0	43.3 $\pm$ 0.52	1.2	-
	10	54.3 $\pm$ 0.15	0.3	109
	20	63.8 $\pm$ 0.27	0.4	102
	40	84.9 $\pm$ 0.39	0.5	104
$\gamma$ GluCys	0	7.6 $\pm$ 0.13	1.8	-
	5	12.9 $\pm$ 0.06	0.5	107
	10	18.2 $\pm$ 0.11	0.6	106
	20	28.9 $\pm$ 0.18	0.6	106

### 3.6. 引用文献

- (1) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2014**, *35*, 169-172.
- (2) Isokawa, M.; Shimosawa, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1019*, 59-65.
- (3) Isokawa, M.; Kobayashi, K.; Miyoshi, Y.; Mita, M.; Funatsu, T.; Hamase, K.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 147-151.
- (4) Aoyama, C.; Saeki, A.; Noguchi, M.; Shirasaki, Y.; Shoji, S.; Funatsu, T.; Mizuno, J.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1420-1426.
- (5) Callewaert, M.; De Beeck, J. O.; Maeno, K.; Sukas, S.; Thienpont, H.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *Analyst* **2014**, *139*, 618-625.
- (6) Callewaert, M.; Desmet, G.; Ottevaere, H.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 75-84.
- (7) De Malsche, W.; De Bruyne, S.; Op De Beek, J.; Sandra, P.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; Lynen, F. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1230*, 41-47.
- (8) De Malsche, W.; Eghbali, H.; Clicq, D.; Vangeloooven, J.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5915-5926.
- (9) De Malsche, W.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5391-5400.
- (10) De Malsche, W.; Op De Beeck, J.; De Bruyne, S.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1214-1219.
- (11) De Malsche, W.; Zhang, L.; Op De Beeck, J.; Vangeloooven, J.; Majeed, B.; Desmet, G. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 3613-3618.
- (12) Desmet, G.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; De Malsche, W. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7382-7388.
- (13) Detobel, F.; De Bruyne, S.; Vangeloooven, J.; De Malsche, W.; Aerts, T.; Terryn, H.; Gardeniers, H.; Eeltink, S.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7208-7217.
- (14) Futagami, S.; Hara, T.; Ottevaere, H.; Baron, G. V.; Desmet, G.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1523*, 234-241.
- (15) Isokawa, M.; Takatsuki, K.; Song, Y.; Shih, K.; Nakanishi, K.; Xie, Z.; Yoon, D. H.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6485-6491.
- (16) De Malsche, W.; De Bruyne, S.; Op De Beeck, J.; Eeltink, S.; Detobel, F.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 2010-2017.
- (17) Op De Beeck, J.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5207-5212.
- (18) Op De Beeck, J.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1367*, 118-122.
- (19) Song, Y.; Noguchi, M.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4739-4745.
- (20) Song, Y.; Takatsuki, K.; Isokawa, M.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7993-7999.

- (21) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Amino Acids* **2016**, *48*, 1731-1735.
- (22) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 111-116.
- (23) Isokawa, M.; Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Bioanalysis* **2014**, *6*, 2421-2439.
- (24) Dinh, N. P.; Jonsson, T.; Irgum, K. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5880-5891.
- (25) Guo, Y.; Gaiki, S. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5920-5938.
- (26) Kawachi, Y.; Ikegami, T.; Takubo, H.; Ikegami, Y.; Miyamoto, M.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5903-5919.
- (27) Periat, A.; Debrus, B.; Rudaz, S.; Guillarme, D. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1282*, 72-83.
- (28) D'Apolito, O.; Paglia, G.; Tricarico, F.; Garofalo, D.; Pilotti, A.; Lamacchia, O.; Cignarelli, M.; Corso, G. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 1391-1395.
- (29) Dugo, P.; Fawzy, N.; Cichello, F.; Cacciola, F.; Donato, P.; Mondello, L. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1278*, 46-53.
- (30) Hubert, C.; Houari, S.; Lecomte, F.; Houbart, V.; De Bleye, C.; Fillet, M.; Piel, G.; Rozet, E.; Hubert, P. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3275-3281.
- (31) Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Analyst* **2016**, *141*, 2568-2573.
- (32) Kanamori, T.; Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2015**, *985*, 142-148.
- (33) Karlsson, G.; Hinz, A. C.; Winge, S. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 361-365.
- (34) Liu, A.; Tweed, J.; Wujcik, C. E. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1873-1881.
- (35) Losito, I.; Patruno, R.; Conte, E.; Cataldi, T. R. I.; Megli, F. M.; Palmisano, F. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6405-6413.
- (36) Isokawa, M.; Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2014**, *964*, 103-115.
- (37) Kemp, M.; Go, Y.-M.; Jones, D. P. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *44*, 921-937.
- (38) Moriarty-Craige, S. E.; Jones, D. P. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 481-509.
- (39) Stipanuk, M. H. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 539-577.
- (40) Townsend, D. M.; Tew, K. D.; Tapiero, H. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 47-55.
- (41) Kuśmierk, K.; Chwatko, G.; Głowacki, R.; Bald, E. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3300-3308.
- (42) Kuśmierk, K.; Chwatko, G.; Głowacki, R.; Kubalczyk, P.; Bald, E. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1290-1307.
- (43) McMenamin, M. E.; Himmelfarb, J.; Nolin, T. D. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3274-3281.
- (44) Toyooka, T. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3318-3330.
- (45) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Analyst* **2013**, *138*, 3802-3808.
- (46) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Chromatographia* **2014**, *77*, 1553-1556.
- (47) Kono, Y.; Iizuka, H.; Isokawa, M.; Tsunoda, M.; Ichiba, H.; Sadamoto, K.; Fukushima, T. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 589-593.
- (48) Santa, T.; Aoyama, C.; Fukushima, T.; Imai, K.; Funatsu, T. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 656-661.
- (49) Peng, H.; Chen, W.; Cheng, Y.; Hakuna, L.; Strongin, R.; Wang, B. *Sensors* **2012**, *12*, 15907-15946.

- (50) Ferin, R.; Pavão, M. L.; Baptista, J. *J. Chromatogr. B* **2012**, *911*, 15-20.
- (51) Ichinose, S.; Nakamura, M.; Maeda, M.; Ikeda, R.; Wada, M.; Nakazato, M.; Ohba, Y.; Takamura, N.; Maeda, T.; Aoyagi, K.; Nakashima, K. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 935-939.
- (52) Valente, A.; Bronze, M. R.; Bicho, M.; Duarte, R.; Costa, H. S. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 3427-3433.
- (53) Zhang, L.-Y.; Tu, F.-Q.; Guo, X.-F.; Wang, H.; Wang, P.; Zhang, H.-S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 6723-6733.
- (54) Kumar, T.; Sharma, G. S.; Singh, L. R. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *458*, 55-62.
- (55) Mudd, S. H. *Am. J. Med. Genet. C* **2011**, *157*, 3-32.
- (56) Akahoshi, N.; Kamata, S.; Kubota, M.; Hishiki, T.; Nagahata, Y.; Matsuura, T.; Yamazaki, C.; Yoshida, Y.; Yamada, H.; Ishizaki, Y.; Suematsu, M.; Kasahara, T.; Ishii, I. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2014**, *306*, F1462-1476.
- (57) Gupta, S.; Kruger, W. D. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27598.
- (58) Watanabe, M.; Osada, J.; Aratani, Y.; Kluckman, K.; Reddick, R.; Malinow, M. R.; Maeda, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1585-1589.

## 第4章 高極性官能基修飾ピラーアレイカラムの開発による 親水性分子の親水性相互作用液体クロマトグラフィー分離

### 4.1. 背景と目的

第3章で述べたように、ピラーアレイカラムを用いた LC の先行研究では、低極性分子の保持が強い RPLC による分離が中心に行われてきた<sup>1-19</sup>。しかしながら RPLC は生体低分子に多い高極性分子の保持は弱いため、その保持や分離には適していないという問題があった。実際に、C8 基、C18 基修飾ピラーアレイカラムを用いた際の分離対象は、蛍光色素の他には、ピオベルジン<sup>20</sup>、長鎖 DNA<sup>9</sup>、蛍光誘導体化した疎水性アミノ酸<sup>1,13,17,18</sup>に限られていた。

ピラーアレイカラムを用いた高極性分子の分離は、分離モードの変更によって達成可能であると考えられる。LC における代表的な分離モードとして、上述の RPLC に加えて、順相 LC (normal-phase LC, NPLC)、サイズ排除クロマトグラフィー(size-exclusion chromatography, SEC)、イオン交換クロマトグラフィー(ion-exchange chromatography, IEC)が挙げられる<sup>21</sup>。しかしながら、NPLC では移動相として用いる有機溶媒に分析対象である高極性分子が溶解しないこと、SEC は分子量の近い分子の分離が困難であることから、これらの分離モードは生体低分子の分離に適さない。また、IEC では陽イオンと陰イオンを同時に分離するのが難しいことから、様々なイオンが共存する生体低分子を一斉に分析するには適していない。

生体分子の分離に相当であると考えられる分離モードとして、近年盛んに研究が行われている、HILIC が挙げられる<sup>22</sup>。HILIC では、アミド基、スルホペタイン基等の高極性官能基で修飾したシリカ粒子等を固定相として用い、主に親水性分配や水素結合、静電相互作用によって高極性分子が強く保持される。私はこれまでに、HILIC モードにて生体チオールが多成分分析が可能となることを明らかにしてきた(第3章)<sup>23-27</sup>。ピラーアレイカラムを用いた HILIC 分離の報告については、化学修飾を行っていない流路表面(SiO<sub>2</sub>, SiOH 基が存在)を用いた核酸塩基4種の分離のみに限られていた<sup>5</sup>。汎用 LC で生体分子分析に用いられている HILIC カラムの約半数が高極性官能基で修飾されたものであること、HILIC 分離において最も重要な点が、カラム選択(表面修飾官能基の選択:官能基によって保持される分子の選択性が異なる)であることを考慮すると<sup>22</sup>、生体分子分析をピラーアレイカラムで行っていくためには、その高極性官能基修飾法の開発が必須である。

そこで本章では、高極性官能基で表面修したピラーアレイカラムを開発し、HILIC モードにて親水性生体低分子の分離を達成することを目的とした。第3章での検討の結果を踏まえて、修飾官能基としてアミド基を、分離対象として SBD-F で蛍光誘導体化した生体チオールを選択した。



## 4.2. 試薬, 装置及び実験方法

### 4.2.1. 試薬

L-Cysteine (Cys)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
DL-Homocysteine (Hcy)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
L-Glutathione (reduced form, GSH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
Cysteinyglycine (CysGly)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
Acetonitrile (HPLC grade)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)	和光純薬工業 (大阪)	
Cysteamine (CA)	和光純薬工業 (大阪)	
Boric acid	和光純薬工業 (大阪)	
Methanol (MeOH, HPLC grade)	和光純薬工業 (大阪)	
Pyridine	和光純薬工業 (大阪)	
Ammonium persulfate (APS)	和光純薬工業 (大阪)	
Acrylamide	和光純薬工業 (大阪)	
Rhodamine 123 (R123)	和光純薬工業 (大阪)	
Tiopronin ( <i>N</i> -(2-mercaptopropionyl) glycine, MPG)		和光純薬工業 (大阪)
Ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid (SBD-F)		同仁化学 (熊本)
4-Fluoro-7-nitro-2,1,3- benzoxadiazole (NBD-F)		同仁化学 (熊本)
Disodium ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetate (EDTA)		同仁化学 (熊本)
Ammonium formate	関東化学 (東京)	
Ethyl acetate (HPLC grade)	関東化学 (東京)	
Methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMS)	信越化学工業 (東京)	
L-Aspartic acid (Asp)	協和発酵工業 (東京)	
Coumarin 545 (C545)	Exciton (Dayton, OH, USA)	
Rhodamine 123 (R123)	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)	
6-Carboxy-tetramethylrhodamine (6TMR)	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)	
Water	Milli-Q reagent system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)	により精製した超純水を使用

### 4.2.2. 装置

#### 4.2.2.1. 接触角測定装置

接触角測定器	Drop Master DM500	協和界面科学 (埼玉)
解析ソフト	FAMAS (interFAce Measurement & Analysis System)	協和界面科学 (埼玉)

#### 4.2.2.2. X線光電子分光(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)装置

XPS 装置                    JPS-9010TR                    日本電子（東京）

#### 4.2.2.3. 吸光度測定装置

紫外可視近赤外分光光度計    V-670                    日本分光（東京）

#### 4.2.2.4. ピラーアレイカラムを用いた実験の装置

第2章と同じものを用いた(2.2.2.1.項)。ただし、蛍光顕微鏡のフィルターセットは以下のものを用いた。

検出対象：rhodamine 123 (R123), 6-carboxy-tetramethylrhodamine (6TMR)

Excitation filter 520DF40                    オリンパス（東京）

Dichroic mirror 560DCLP                    Omega Optical (Brattleboro, VT, USA)

Emission filter Semrock593DF40 Chroma Technology (Rockingham, VT, USA)

検出対象：C545, NBD-aspartic acid (NBD-Asp)

Excitation filter BP460-490                    オリンパス（東京）

Dichroic mirror 505DRLP                    Omega Optical (Brattleboro, VT, USA)

Emission filter HQ535/50                    Chroma Technology (Rockingham, VT, USA)

検出対象：チオールの ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid (SBD-F)誘導体

Excitation filter FF01-390/40-25                    Semrock, Inc. (Rochester, NY, USA)

Dichroic mirror Di01-R442-25×36                    Semrock, Inc. (Rochester, NY, USA)

Emission filter FF01-510/84-25                    Semrock, Inc. (Rochester, NY, USA)

#### 4.2.2.5. 汎用 LC 装置

第3章と同じものを用いた(3.2.2.1.項)。ただし、分離カラムとして Inertsil Amide (150 mm × 3.0 mm i.d., 5 μm: GL Sciences（東京）)を用いた。

### **4.2.3. 実験方法**

#### 4.2.3.1. ピラーアレイカラムの作製

ピラーアレイカラムは、第2章の方法に従い作製した(2.2.3.2.項)。使用したピラーアレイカラムの寸法は、以下の2つの通りである(上：図4.1A, 下：図4.1B)。

基板の大きさ	20 × 20 mm
分離流路	740 μm wide × 30 μm deep × ~27 mm long (2 × 分布制御型ターン)
試料用流路	93 μm wide × 60 μm deep
ピラーアレイ (分離流路)	3-μm-square pillars with 2 μm of inter-pillar distance
(分布制御型ターン)	Octagonal pillars with a diameter of 20 μm

または,

基板の大きさ	20 × 20 mm
分離流路	400 μm wide × 30 μm deep × ~110 mm long (12 × 等流路長ターン)
試料用流路	100 μm wide × 60 μm deep
ピラーアレイ	3-μm-square pillars with 2 μm of inter-pillar distance

#### 4.2.3.2. ピラーアレイカラムを用いた実験の装置構成

ピラーアレイカラムは、第 2 章の方法に従い、専用の圧着型締め込み式コネクタを用いて、4 か所の貫通穴をキャピラリー（内径 100 μm, 外径 375 μm）と接続した（2.2.3.3.項）。

#### 4.2.3.3. ピラーアレイカラム表面のアミド修飾

ピラーアレイカラムやシリコン平板，ガラス平板のアミド修飾は，汎用 LC カラムのアミド化手法に基づき行った（図 4.2A）<sup>28</sup>。反応溶液等の通液は移動相アウトレットから行ない，その流速は 2.0 μL/min とした（反応液はシリンジポンプ，洗浄液はマイクロポンプで送液）。アミド修飾後のピラーアレイカラムは，acetonitrile を 90% (v/v)以上含む水溶液中で保管した。初期のアミド修飾法（アミド修飾法 A）について，具体的な手順を以下に示した。

[アミド修飾法 A]

- 1) methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMS)/pyridine (1/1, v/v)を  
60°C で 1 h 送液後，3 h 浸漬 ...リンカーの結合
- 2) ethyl acetate を室温で 1 h 送液 ...洗浄
- 3) acetonitrile, water を順に室温で 0.5 h ずつ送液 ...洗浄
- 4) 48 g/L acrylamide + 30 g/L ammonium persulfate (APS)水溶液を  
60°C で 1 h 送液 ...アクリルアミド重合
- 5) water を室温で 1 h 送液 ...洗浄

反応条件再検討後のアミド修飾法（アミド修飾法 B）の具体的な手順を以下に示した。なお，通液する際の流速は，基本的に 2.0 μL/min とした（反応液はシリンジポンプ，洗浄液はマイクロポンプで送液）。

[アミド修飾法 B]

- 1) MPTMS/pyridine (1/1, v/v)を 60°C で 1 h 送液後，3 h 浸漬 ...リンカーの結合
- 2) ethyl acetate を室温で 1 h 送液 ...洗浄
- 3) acetonitrile, water を順に室温で 0.5 h ずつ送液 ...洗浄

- 4) 4.8 g/L acrylamide + 15 g/L APS 水溶液 (氷上で調製) を  
60°C で 1 h 送液後, 3 h 浸漬 ...アクリルアミド重合
- 5) 0.2 M phosphate buffer (pH 6.5), water を順に室温で 0.5 h ずつ送液 ...洗浄

#### 4.2.3.4. アミド修飾ガラス平板に対する XPS 測定

無処理のガラス平板と, アミド修飾法 A (ただし, MPTMS の結合反応は 8 h, アクリルアミド重合反応は 1 h とした) によりアミド修飾を行ったガラス平板に対して, 以下の条件で XPS 測定を行った.

X-ray source	: MgK $\alpha$ (1253.6 eV)
Applied power	: 100 W (10 kV and 10 mA)
Photoelectron take-off angle	: fixed at 90°
Pass energy	: 10 eV (high resolution)
Pressure	: $2.2 \times 10^{-7}$ Pa

#### 4.2.3.5. 水の接触角測定

アミド修飾法 A またはアミド修飾法 B (ただし, MPTMS の結合反応の時間, アクリルアミド重合反応の時間は結果と考察項にて後述) にてアミド修飾を行ったガラス平板またはシリコン平板について, 水 2  $\mu$ L に対する接触角を測定した.

#### 4.2.3.6. 吸光度測定によるアクリルアミド重合反応の進行確認

48 mg/L acrylamide + 30 mg/L APS 水溶液を基準にし, acrylamide, APS をそれぞれ希釈した条件 (具体的な濃度は 4.3.4.1.項で後述) で, 60°C にてチューブ内で反応させた. Acrylamide 溶液と APS 溶液を混合した瞬間を反応時間 0 h とし, 反応開始後 0, 0.5, 1, 2 h に反応を停止させた試料を得た. なお, 反応の停止は試料を氷上に置くことにより行った. 得られた試料に対して 200-400 nm の範囲で吸収スペクトルを取り, 270 nm における吸光度変化をアクリルアミド重合反応の進行の指標とした.

#### 4.2.3.7. アスパラギン酸(Asp)の蛍光誘導体化

既報の方法を参考にし, Asp を NBD-F で蛍光誘導体化した<sup>1,13,16-19</sup>. ただし, 水と NBD-F の反応物である NBD-OH の生成を低減するために, NBD-F に対して Asp を過剰量加えた.

- 200  $\mu$ L of 20 mM aspartic acid in 0.2 M borate buffer (pH 9.0)  
+ 200  $\mu$ L of 10 mM NBD-F in acetonitrile  
↓ Reaction at 60°C, 5 min ...蛍光誘導体化  
+ 100  $\mu$ L of 1 M HCl aq. ...反応の終結

#### 4.2.3.8. チオールの蛍光誘導体化

既報の方法を参考にし、チオール(cysteine (Cys), homocysteine (Hcy), cysteinylglycine (CysGly), glutathione (GSH), *N*-(2-mercaptopropionyl) glycine (MPG), *N*-acetylcysteine (NAC), cysteamine (CA))を SBD-F で蛍光誘導体化した<sup>23,24,26,27</sup>.

80  $\mu$ L of 10 mM thiol aq.  
+ 200  $\mu$ L of 125 mM borate buffer with 4 mM EDTA (pH 9.5)  
+ 80  $\mu$ L of 3.0 g/L SBD-F in the borate buffer  
↓ Reaction at 60°C, 1 h ... 蛍光誘導体化  
+ 40  $\mu$ L of 1 M HCl aq. ... 反応の終結

#### 4.2.3.9. ピラーアレイカラムを用いた分離実験

ピラーアレイカラムのそれぞれの貫通穴の接続先は以下とした：移動相インレット，マイクロポンプ；移動相アウトレット，開放；試料インレット，4方バルブ；試料アウトレット，4方バルブ。試料の分離中は，蛍光顕微鏡を用いて固定視野にて動画を撮影した（露光時間: 100 ms/frame）。この動画から，流路上の一部分の蛍光強度の時間変化を Andor SOLIS (ver. 4.28.30001.0: Andor Technologies, South Windsor, CT, USA)または Image J (ver. 1.50e: National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)を用いてプロットすることで，クロマトグラムを得た。

R123 (図 4.3A) と 6TMR (図 4.3B) の分離は，図 4.1A のピラーアレイカラム（アミド修飾法 A にてアミド修飾したもの，無修飾のもの）を用いて以下の HILIC 条件で行った。

移動相 acetonitrile / 10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0)  
= 94/6, 95/5, 97/3, 98/2, 99/1 (v/v)  
流速 2.0  $\mu$ L/min  
注入試料 R123 + 6TMR in 90% (v/v) acetonitrile  
検出位置 第 1 ターンの手前

C545 (図 4.3C) と NBD-Asp (図 4.3D) の分離は図 4.1A のピラーアレイカラム（アミド修飾法 B にてアミド修飾したもの，無修飾のもの）を用いて以下の HILIC 条件で行った。

移動相 acetonitrile / 100 mM ammonium formate solution  
= 90/10, 92/8, 94/6, 98/2 (v/v)  
流速 1.0  $\mu$ L/min  
注入試料 C545 + NBD-Asp in 96% (v/v) acetonitrile  
検出位置 第 1 ターンの手前

SBD-チオール (図 4.4) の分離は以下の 2 条件で行った。

図 4.1A のピラーアレイカラム（アミド修飾法 A にてアミド修飾したもの，無修飾のもの）を用いた，HILIC モードでの分離条件を以下に示す。

移動相     acetonitrile/100 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 93/7 (v/v)  
流速        2.0  $\mu$ L/min  
注入試料   SBD-thiols in 93% acetonitrile  
検出位置   インジェクション部直後，及び第 2 ターンの手前

図 4.1B のピラーアレイカラム（アミド修飾法 B にてアミド修飾したもの）を用いた，HILIC モードでの分離条件を以下に示す。

移動相     acetonitrile/100 mM ammonium formate buffer (pH 2.5) = 92/8 (v/v)  
流速        2.0  $\mu$ L/min  
注入試料   SBD-thiols in 90% acetonitrile  
検出位置   分離流路最後端

#### 4.2.3.10. 汎用 LC を用いた R123, 6TMR の分離

移動相                   acetonitrile / 10 mM ammonium formate (pH 3.0) = 80/20 (v/v)  
流速                    0.4 mL/min  
カラム                   Inertsil Amide (150 mm  $\times$  3.0 mm i.d., 5  $\mu$ m)  
カラム温度               35°C  
蛍光検出                Ex. 510 nm / Em. 575 nm  
注入試料                5  $\mu$ L (25 nM R123, 25 nM 6TMR in aqueous-acetonitrile solution)

## 4.3. 結果と考察

### 4.3.1. ピラーアレイカラムの表面修飾官能基としてのアミド基の選択

第3章で述べたように、SBD-Fで蛍光誘導体化したチオール(SBD-チオール)の保持や分離は、スルホベタインカラムやアミドカラムで良好に達成されたため<sup>23,24,26,27</sup>、これらの官能基がピラーアレイカラムの修飾官能基として適していると考えられた。汎用LCカラムにおいては、スルホベタイン基についても<sup>29,30</sup>、アミド基についても<sup>28</sup>、その修飾法の報告がある。両修飾法では、まず第1反応として ethacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMS)をシリカ粒子またはモノリス表面に結合させた後、第2反応として、スルホベタイン修飾法では 3-(2-(*N*-methacryloyloxyethyl)-*N,N*-dimethylammonio)propane sulfonate の重合反応が(図 4.2B)、アミド修飾法ではアクリルアミド重合反応が行われている(図 4.2A)。スルホベタイン修飾法については、第2反応に関する報告が少なく、試薬の入手も難しいという問題点があった。そこで、本研究では、ピラーアレイカラムでHILIC分離を行うための表面修飾官能基としてアミド基を選択し、その修飾法の開発を試みた。

### 4.3.2. ピラーアレイカラムの素材に対するアミド修飾反応の確認

アミド修飾反応は、既報を参考にして、リンカーとしてのMPTMSの流路表面への結合(第1反応)、アクリルアミド重合反応(第2反応)により行った(図 4.2A)<sup>28</sup>。このとき、第2反応に用いた試薬濃度(48 g/L acrylamide, 30 g/L ammonium persulfate (APS))は既報と同一の条件とした(アミド修飾法A:4.2.3.3項)。ピラーアレイカラムへアミド修飾反応を行う前に、まずはピラーアレイカラムの素材である平板に対して想定した反応が進行することの確認を行った。ピラーアレイカラムの素材はガラスとシリコンである。シリコン表面には酸化膜(SiO<sub>2</sub>, SiOHが存在)が形成されているため、その表面状態はシリコンとガラスでほぼ同一であると考えられた。従って、本4.3.2項ではガラス平板を用いて検討を行った。

#### 4.3.2.1. XPS分析による窒素元素導入の確認

アミド修飾法A(4.2.3.3項:ただし、第1反応は8h、第2反応は1h)の条件で処理したガラス平板に対し、XPSによる表面分析を行った。XPSは、超高真空中でX線を物質に照射した時に放出される光電子の運動エネルギーを測定し、表面を構成する原子や分子、その化学結合状態に関する情報を得る技術である。次式より、軌道電子の結合エネルギーが求められる。

$$E_k = hv - E_b \quad (4.1)$$

ここで、 $E_k$ は放出された電子の運動エネルギー、 $hv$ は照射X線の固有エネルギー、 $E_b$ は軌道電子の結合エネルギー)である。既知の $hv$ 、測定値 $E_k$ から $E_b$ を求める。

図4.5に、窒素元素の1s軌道電子の結合エネルギー範囲のXPSスペクトルを示した。無処理のガラス平板からはシグナルが検出されなかったのに対し、アミド修飾処理を行ったガラス平板で

は検出されることが分かった。このことから、採用したアミド修飾反応によって、窒素元素がガラス平板に導入されていること、すなわち、アミド基が導入されていることが確認された。

#### 4.3.2.2. 水の接触角測定による平板表面の親水化の確認

アミド修飾法 A (4.2.3.3.項) によって処理したガラス平板に対して、水の接触角測定を行った。測定対象の表面が親水的であるほど水の接触角 (図 4.6A) が小さくなるため、接触角の測定により、アミド修飾による表面親水化の度合いを半定量的に評価することが可能となる。本 4.3.2.2.項では、第 1 反応と第 2 反応の反応時間に対する水の接触角変化から、各反応が終結するのに必要な時間を算出した。

第 2 反応の時間を固定し、第 1 反応の時間を変化させた際の接触角変化を図 4.6B に、第 1 反応の時間を固定し、第 2 反応の時間を変化させた際の接触角変化を図 4.6C に示す。両図において、反応に伴って水接触角が大きく減少していることから、アミド修飾によりガラス平板表面が親水化されることが確認された。第 1 反応については、反応時間 4 h までは接触角が減少し、その後ほとんど変化しなくなったことから、MPTMS 結合反応は 4 h で終結することが示唆された (図 4.6B)。また、第 2 反応については、反応時間 1 h 以降で接触角の変化がほとんどなくなったことから、アクリルアミド重合反応は 1 h で終結することが示された (図 4.6C)。以上から、アミド修飾反応の反応時間は、第 1 反応は 4 h、第 2 反応は 1 h で十分であると考え、ピラーアレイカラムの修飾にもこの反応条件を用いた (アミド修飾法 A : 4.2.3.3.項)。

#### 4.3.3. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける親水性分子の保持の評価

アミド修飾法 A (4.2.3.3.項) による処理を行ったピラーアレイカラム (図 4.1A の設計のもの) を作製し、蛍光色素や蛍光誘導体化チオール<sup>1)</sup>の保持、分離を評価した。

##### 4.3.3.1. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける蛍光色素の保持の評価

保持マーカーとしての蛍光色素として、R123 と 6TMR を採用した (図 4.3A, B)。MarvinSketch (ver. 15.12.14.0: ChemAxon, Budapest, Hungary) を用いて分配係数  $\text{Log}D$  を算出したところ、R123 が -1.45、6TMR が -1.67 となり (計算条件 : 1 mM NaCl, pH 3.0)、6TMR の方が親水的な分子であると予測された。実際に汎用 LC を用いた実験を行い、HILIC 条件では R123 が先に溶出することを確認した (図 4.7A)。

R123 と 6TMR の HILIC 条件での保持を、アミド修飾ピラーアレイカラムと無修飾ピラーアレイカラムで比較した結果を図 4.7B-E に示す。両チップにおいて、R123 が先に溶出しており (図 4.7B, C)、また移動相 acetonitrile 含量の増加に伴い 6TMR の保持が強くなるという HILIC に特徴的な保持挙動が見られた (図 4.7D, E)。また、R123 については、アミド修飾ピラーアレイカラムにおいてのみ、移動相 acetonitrile 含量が多い条件で保持時間の顕著な増加が見られた。以上の結果から、アミド修飾ピラーアレイカラムを用いることで HILIC 分離が可能であること、また、ア



ミド修飾により保持される分子の選択性が変化することが示された。

#### 4.3.3.2. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける蛍光誘導体化チオールの分離

アミド修飾ピラーアレイカラムの生体分子分離への応用として、チオールの HILIC 分離を試みた。試料は CA, NAC, Cys, CysGly, GSH を SBD-F で誘導体化したものとした (図 4.4)。

アミド修飾ピラーアレイカラムでの分離結果を図 4.8A, B に、無修飾ピラーアレイカラムでの分離結果を図 4.8C に示す。アミド修飾ピラーアレイカラムにおいては、上記 5 種の SBD-チオールの分離が可能であったのに対し、無修飾ピラーアレイカラムでは全く分離が出来ないという結果が得られた。従って、アミド修飾により、ピラーアレイカラムを用いて高極性な生体分子の HILIC 分離が可能であることが示された。

本 4.3.3.2.項で分離したチオールには、ヒトやマウスの血中に存在が確認されている Hcy が含まれていない。血液分析を目的とした際には、汎用 LC で多くの場合に分析対象となっている Cys, Hcy, CysGly, GSH の分離を達成することが望まれる<sup>31</sup>。Cys と Hcy は構造が非常に類似していることから、これらを分離するためには、長い分離流路を有するピラーアレイカラムをアミド修飾する必要がある。そこで、以降では図 4.1B の設計のピラーアレイカラムに対してアミド修飾を行ない、Cys, Hcy, CysGly, GSH を含むチオールの HILIC 分離を試みた。

#### 4.3.4. アミド修飾法の再検討

ピラーアレイカラム (図 4.1B の設計のもの) に対し、アミド修飾法 A (4.2.3.3.項) によりアミド修飾を試みたところ、修飾中に分離流路が頻繁に詰まるという問題が生じた。詰まりが生じるのは第 2 反応 (アクリルアミド重合反応) 後であることが多かったため、参考にした汎用 LC カラムのアミド修飾法<sup>28</sup> ではアクリルアミド重合反応における試薬濃度が高すぎており (48 g/L acrylamide, 30 g/L APS), 流路内で反応溶液がゲル化してしまっているのではないかと考えた。そこで、本 4.3.4.項ではこのアクリルアミド重合反応の試薬濃度について再検討し、ピラーアレイカラムを修飾した際に分離流路の詰まりが抑えられ、かつ HILIC 分離が可能になるような反応条件を探索した。

##### 4.3.4.1. 吸光度測定によるアクリルアミド重合反応条件の再検討

アクリルアミド重合反応において、acrylamide はモノマー、APS はラジカル重合開始剤としての役割を有する。本 4.3.4.1.項では、先述の詰まりを解消するために両試薬の濃度を小さくしていきながら、重合反応が進行する濃度を探索した。

アクリルアミド重合反応の進行の確認は、既報に従い、反応溶液の吸光度変化を観察することにより行った<sup>32</sup>。この手法は、acrylamide モノマーが持つ C=C 結合が、重合により C-C 結合に変化するため (図 4.2A), 重合反応の進行に伴い 260 nm 付近における吸光度が減少することを利用したものである。本研究では、用いた試料に対して測定値が飽和に達していなかった 270 nm の吸

光度を、評価値として採用した。

まずはアミド修飾法 A (4.2.3.3.項) の試薬濃度である 48 g/L acrylamide, 30 g/L APS を基準とし、両試薬濃度を 1/10 倍, 1/100 倍, 1/1000 倍とした試料について、吸光度の経時変化を記録した (図 4.9A)。1 倍濃度, 1/10 倍濃度の条件では、反応時間の増加に伴う吸光度の減少が見られたことから、少なくとも 1/10 倍濃度条件(4.8 g/L acrylamide, 3.0 g/L APS)までは、重合反応が進行していることが分かった。また、1 倍濃度条件では 2 h 後には反応溶液がゲル化しており、このゲル化がピラーアレイカラムの流路が詰まらせる原因であると考えられた。

次に acrylamide 濃度を 4.8 g/L で固定し、APS 濃度を 0-30 g/L の間で変化させて吸光度を測定した (図 4.9B)。APS が 15, 30 g/L の試料では、反応 0 h における吸光度がその他の試料と比較して大きく増加していたことから、270 nm における吸光度は acrylamide モノマーの残存量だけでなく APS の残存量も反映することが分かった。しかしながら、反応開始後 1, 2 h においては、15, 30 g/L APS の試料の吸光度が、その他の試料の水準以下になっていたため、これら 2 条件では重合反応が進行しているものと考えられる。また、4.8 g/L acrylamide, 3.0 g/L APS の試料については、図 4.9A の実験では反応が進行していたのに対し、図 4.9B の実験では反応進行が確認されなかった。従って 3.0 g/L APS 条件では反応の再現性が取れないと考え、APS 濃度は 15 g/L を選択した。

最後に、APS 濃度を 15 g/L で固定し、acrylamide 濃度を 0.48-4.8 g/L の間で変化させて吸光度を測定した (図 4.9C)。全ての試料において反応時間の増加に伴う吸光度の減少が観察され、かつ溶液のゲル化が起こらなかったため、これらの条件ではピラーアレイカラムを詰まらせることなくアクリルアミド重合反応を行うことが出来ると考えられた。流路表面のアミド基量を担保するため、最終的な試薬濃度は 4.8 g/L acrylamide, 15 g/L APS とした (アミド修飾法 B : 4.2.3.3.項)。

#### 4.3.4.2. 水の接触角測定による平板表面の親水化の確認

アミド修飾法 B (4.2.3.3.項) によって処理したシリコン平板に対して、水の接触角測定を行った。アクリルアミド重合反応 (試薬濃度 : 4.8 g/L acrylamide, 15 g/L APS. 第 2 反応) の時間を固定し、MPTMS の結合反応 (第 1 反応) の時間を変化させた際の接触角変化を図 4.10A に、第 1 反応の時間を固定し、第 2 反応の時間を変化させた際の接触角変化を図 4.10B に示す。両図において、反応に伴って水接触角が大きく減少していることから、再検討後のアミド修飾法 B を用いても、シリコン平板表面が親水化されることが確認された。また、第 1 反応は 1 h で、第 2 反応は 3 h で終結することが示唆された。ピラーアレイカラムのアミド修飾では、第 1 反応、第 2 反応ともに 4 h とした (アミド修飾法 B : 4.2.3.3.項)。

#### **4.3.5. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける親水性蛍光分子の保持の再評価**

アミド修飾法 B を用いることにより、長い分離流路を有するピラーアレイカラム (図 4.1B) においても、流路が詰まることなくアミド修飾が可能となった。まず NBD-F で蛍光誘導体化した Asp の保持を確認した。

4.3.3.1.項で保持マーカーとして用いた R123 と 6TMR は、それぞれカチオン性分子、双性イオ

ン性分子であった。無処理ピラーアレイカラムと比較して、アミド修飾ピラーアレイカラムでは、これらカチオン、双性イオンの保持が同等か大きくなっていることが示された。そこで、本 4.3.5.1 項では、アニオン性分子である NBD-Asp (図 4.3D) を保持マーカーとして採用し、アニオンに対するアミド修飾ピラーアレイカラムの保持を評価することとした。

保持マーカーである NBD-Asp に加えて、非保持マーカーとして C545 (図 4.3C) を採用した。両色素の保持時間から次式(4.1)に示す保持係数  $k$  を算出することで、デバイス間の構造の微小な差を排除して、分子の保持を比較可能にするためである。

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4.1)$$

ただし、 $t_R$  は NBD-Asp の保持時間、 $t_0$  は C545 の保持時間である。

アミド修飾ピラーアレイカラム、無処理ピラーアレイカラム (図 4.1A の設計のもの) のそれぞれにおける HILIC 条件での NBD-Asp の保持を、図 4.11 に示す。両ピラーアレイカラムにおいて、移動相 acetonitrile 含量の増加に伴う NBD-Asp の保持の向上が見られた。また、両者の比較から、アミド修飾により、アニオン性分子である NBD-Asp の保持が増強されることが明らかになった。

4.3.3.1 項の結果を合わせると、アミド修飾ピラーアレイカラムでは、無修飾のもの比べて、R123 (カチオン) と NBD-Asp (アニオン) の保持が向上し、6TMR (双性イオン) の保持は同等であった。本 4.3.3.5 項のように無修飾ピラーアレイカラムで中性移動相を用いた場合、シラノール基(SiOH)が電離することで流路表面が負電荷を帯びるため、静電反発によりアニオンの保持が弱くなると考えられる。アミド修飾ピラーアレイカラムでは、シラノール基の層を覆うようにポリアクリルアミドが結合していることからこの静電反発が抑制され、その結果として NBD-Asp の保持が 3 倍以上向上したと考えられる。また、4.3.3.1 項では酸性移動相を用いたため、シラノール基の電離が抑制されていたと予測される。この結果、アミド修飾の有無による親水性分配や水素結合等の相互作用の差が、R123 の保持の差に現れたものと考えられる。

#### 4.3.6. アミド修飾ピラーアレイカラムにおける蛍光誘導体化生体チオールの分離

アミド修飾法 B による処理を行った、長い分離流路を有するピラーアレイカラム (図 4.1B の設計のもの) を用いて、SBD-F で誘導体化した生体チオールの分離を試みた。分離対象としたチオールは、ヒト血液中に存在が確認されている Cys, Hcy, CysGly, GSH に加え、生体チオール分析において内標準として汎用される MPG と、生体チオールの分解物である NAC である (図 4.4)。

分離結果を図 4.12 に示す。アミド修飾した長い分離流路を用いて HILIC を行ったことにより、上記 6 種 SBD-チオールの良好な分離に成功した。ピークの溶出順序は汎用 LC のアミドカラムの結果とほぼ一致したことから (第 3 章 3.3.2.1 項)<sup>26,27</sup>、アミド修飾ピラーアレイカラムは汎用 LC カラムと同様に、高極性な生体分子の分離に適用可能であると考えられる。

#### 4.4. 小括

本章では、アミド修飾ピラーレイカラムを開発することで、HILIC モードにて高極性な生体分子の分離に成功した。汎用 LC カラムにおける修飾反応をもとにして、ピラーレイカラムの素材であるシリコンやガラスの平板がアミド修飾可能であることを、XPS 測定や水の接触角測定で示した。また、上記のアミド修飾法ではピラーレイカラムの分離流路が頻繁に詰まるという問題に対して、吸光度測定を用いたアミド修飾法の改善を行った。実際にアミド修飾したピラーレイカラムでは、無修飾ピラーレイカラムと比較して、HILIC 条件におけるアニオン性、カチオン性分子の保持が向上し、双性イオン性分子の保持は同等であるという結果を得た。さらに、アミド修飾ピラーレイカラムを用いることにより、ヒト血液中に存在する Cys, Hcy, CysGly, GSH を含む 6 種チオールの蛍光誘導体の HILIC 分離に成功した。

本研究でピラーレイカラムのアミド修飾法を開発したことにより、ピラーレイカラムを HILIC モードで利用する際に、固定相官能基としてシラノール基（無修飾）だけでなくアミド基が選択可能となり、より広い種類の分子の分離が可能になったと考えられる。また本研究は、ピラーレイカラムを低極性官能基(C8 基, C18 基)以外で化学修飾した初めての研究である。特に、C8 基, C18 基の修飾は 1 段階の反応（シランカップリング）にて行われていたのに対し、本研究で開発したアミド修飾法は 2 段階の反応（シランカップリング, アクリルアミド重合反応）であることから、ピラーレイカラムに対しても複数回の反応による表面修飾が可能であることを示した。また、汎用 LC カラムの表面修飾法のように、第 2 反応のモノマーを変更することで、様々な官能基を有するピラーレイカラムが作製可能となることを示唆した。

今後は、開発したアミド修飾ピラーレイカラムを用いて、生体チオール以外の生体分子の分離（アミノ酸, カテコラミン, 糖類等）や、生体試料中（ヒト血漿等）の生体チオールの分析を試みたい。また、アミド修飾以外の官能基（スルホベタイン基等）の修飾法の開発も行っていきたい。

#### 4.5. 図表

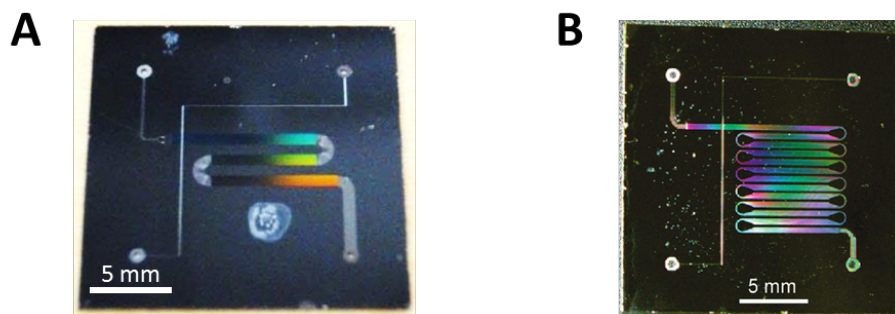


図 4.1. 実験に用いたピラーアレイカラム. (A) 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラム. 分離流路長：27 mm. (B) 等流路長ターンを有するピラーアレイカラム. 分離流路長：110 mm.

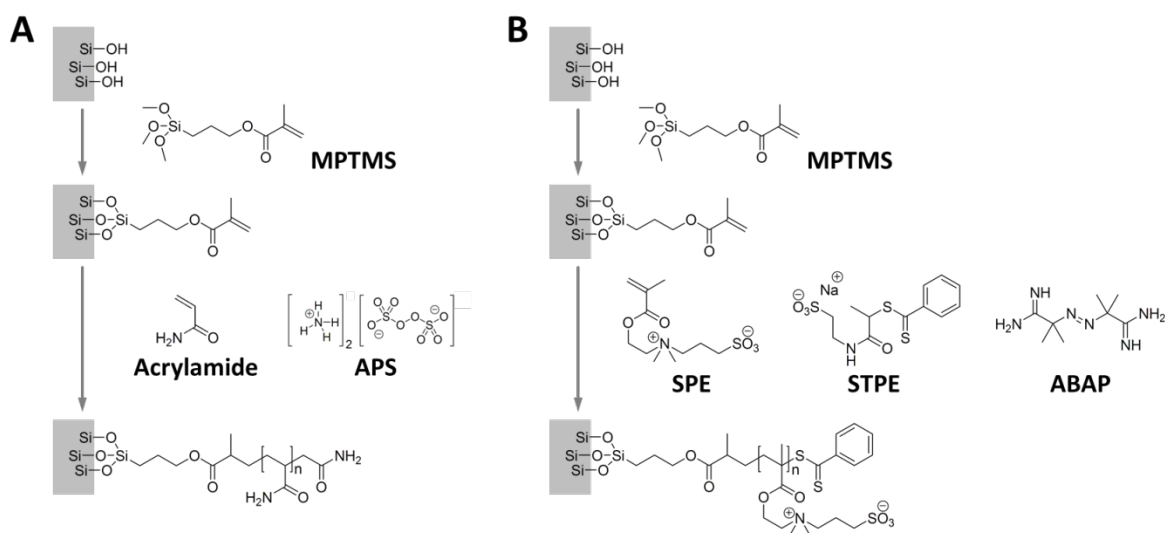


図 4.2. (A) アミド修飾法の概略<sup>28</sup>. MPTMS, methacryloxypropyltrimethoxysilane; APS, ammonium persulfate (initiator). (B) スルホベタイン修飾法の概略<sup>30</sup>. SPE, 3-(2-(*N*-methacryloyloxyethyl)-*N,N*-dimethylammonio)propane sulfonate (monomer); STPE, sodium 2-(2-thiobenzoylsulfanyl propionylamino) ethanesulfonate (chain transfer agent); ABAP, 2,2'-azobis(2-methylamidinopropane)dihydrochloride (initiator).

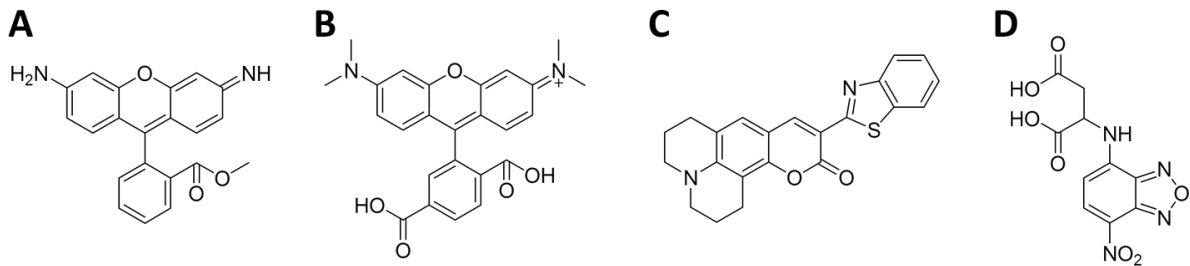


図 4.3. 分離実験に用いた蛍光分子. (A) R123, (B) 6TMR, (C) C545, (D) NBD-Asp.

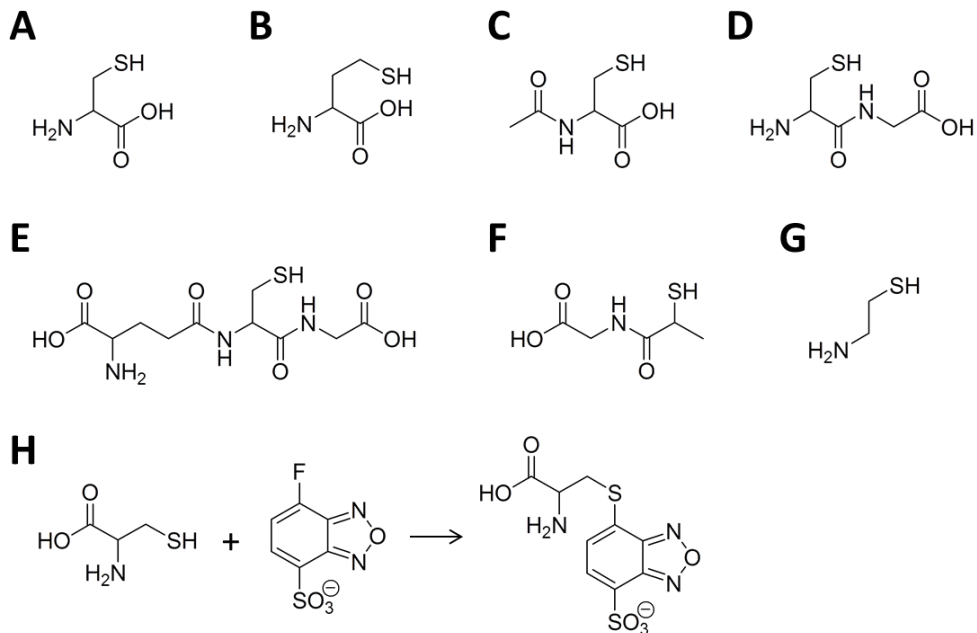


図 4.4. 分離対象としたチオール. (A) Cys, (B) Hcy, (C) NAC, (D) CysGly, (E) GSH, (F) MPG, (G) CA. ヒト血液中での存在が報告されているのは, A, B, D, E. (H) Cys と SBD-F との反応.

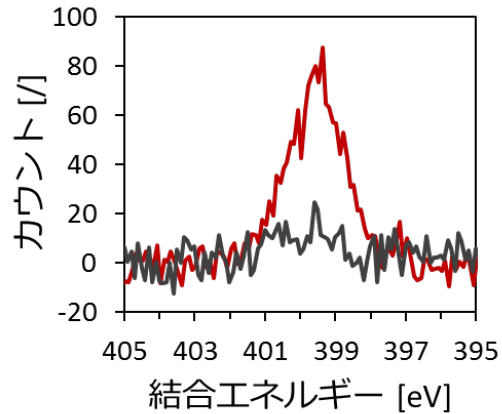


図 4.5. アミド修飾を行ったガラス平板に対する XPS 測定の結果。窒素元素 1s 軌道電子の結合エネルギー範囲の XPS スペクトル。試料：赤線，アミド修飾法 A の処理を行ったガラス平板；黒線，無処理のガラス平板。

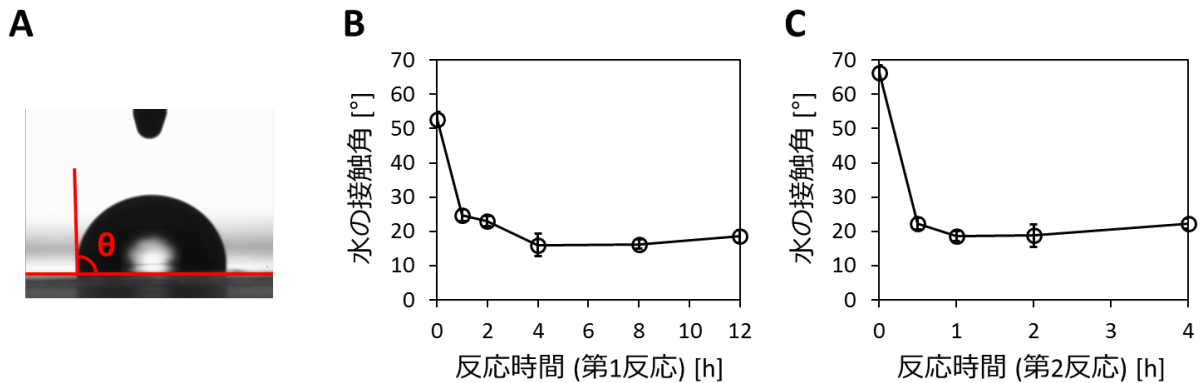
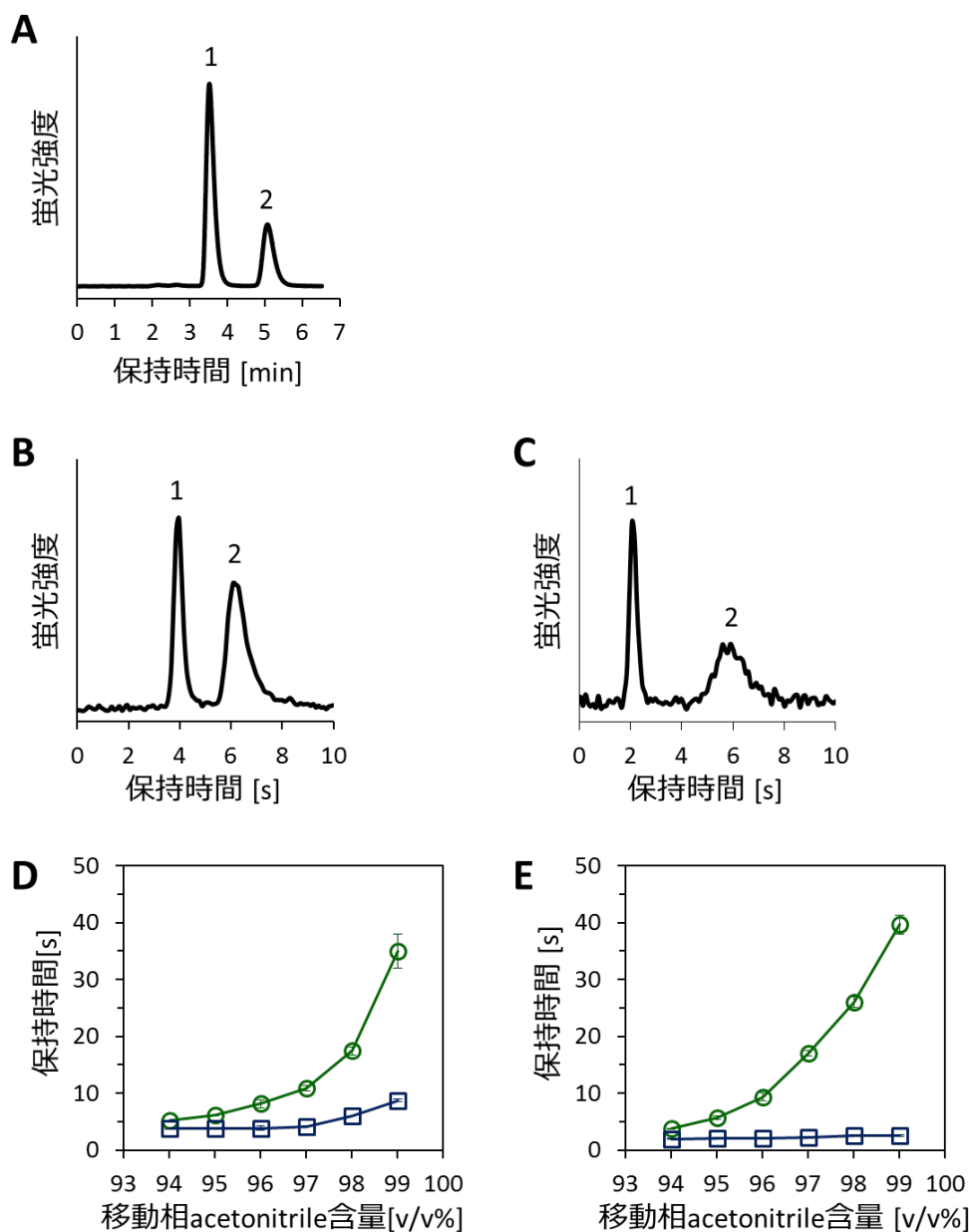


図 4.6. アミド修飾を行ったガラス平板に対する水の接触角測定。(A) 測定に用いた画像の例。図中の $\theta$ が接触角。(B, C) アミド修飾法 A の処理を行ったガラス平板の、水の接触角。  $n \geq 3$ , error bars: SD. 第1反応 (MPTMS の結合) の条件：MPTMS/pyridine (1/1, v/v), at 60°C. 第2反応 (アクリルアミド重合反応) の条件：48 g/L acrylamide + 30 g/L APS aq., at 60°C. (B) 第2反応を1hに固定したときの、第1反応の反応時間に対する水接触角の変化。0hの点は、無処理のガラス平板に対する水接触角。(C) 第1反応を12hに固定したときの、第2反応の反応時間に対する水接触角の変化。0hの点は、第1反応のみを行ったガラス平板に対する水接触角。



**図 4.7. (A) 汎用 LC を用いた蛍光色素の HILIC 分離のクロマトグラム。** ピーク：1, R123; 2, 6TMR。  
 移動相：acetonitrile / 10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 80/20 (v/v)。流速：0.4 mL/min。カ  
 ラム：Inertsil Amide (150 mm × 3.0 mm i.d., 5 μm)。 **(B-E) ピラーアレイカラムを用いた HILIC 条件に  
 における蛍光色素の分離結果。** (B) アミド修飾ピラーアレイカラムと (C) 無修飾ピラーアレイカラム  
 を用いた際のクロマトグラム。ピーク：1, R123; 2, 6TMR。 **(D) アミド修飾ピラーアレイカラムと (E)  
 無修飾ピラーアレイカラムにおける蛍光色素の保持時間。** 青線：R123, 緑線：6TMR。ピラーア  
 レイカラム：図 4.1A の設計 (アミド修飾は, アミド修飾法 A により行った)。移動相：acetonitrile / 10  
 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 94/6, 95/5 (A, B), 96/4, 97/3, 98/2, and 99/1 (v/v)。流速：2.0  
 μL/min。検出点：第 1 ターンの手前。n ≥ 7, error bars: SD.



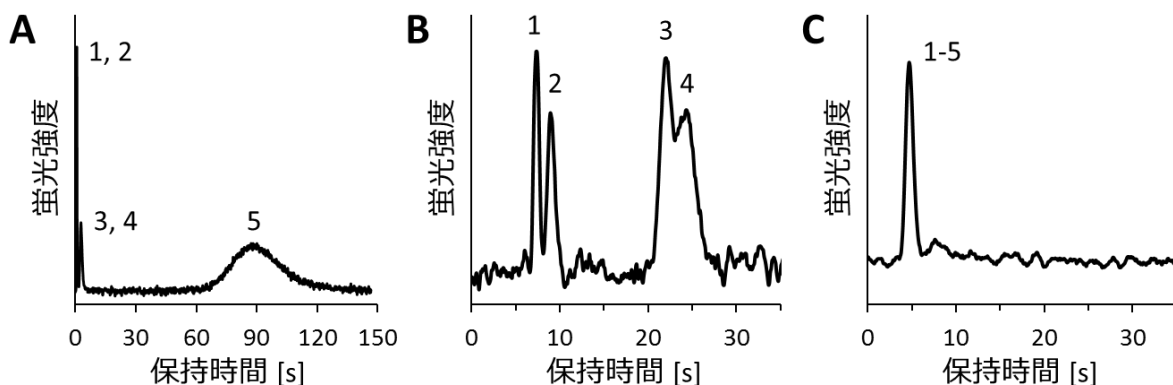


図 4.8. ピラーアレイカラムを用いた HILIC 条件における SBD-チオールの分離結果. (A, B) アミド修飾ピラーアレイカラムを用いた際のクロマトグラム. 検出点: (A) 試料注入部直後, (B) 第 2 ターンの手前. (C) 無修飾ピラーアレイカラムを用いた際のクロマトグラム. 検出点: 第 2 ターンの手前. ピーク: SBD-derivatives of 1, CA; 2, NAC; 3, Cys; 4, CysGly; and 5, GSH. ピラーアレイカラム: 図 4.1A の設計 (アミド修飾は, アミド修飾法 A により行った). 移動相: acetonitrile / 100 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) = 93/7 (v/v). 流速: 2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

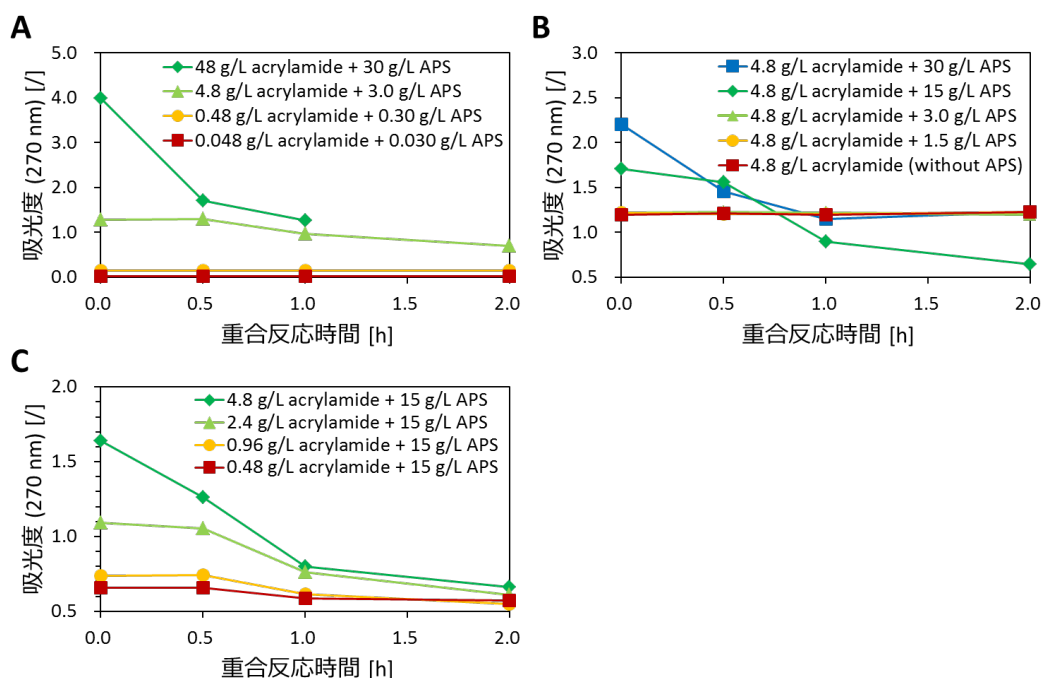


図 4.9. 270 nm における吸光度測定によるアクリルアミド重合反応の進行の確認. 様々な acrylamide, APS の濃度条件で重合反応を行った (チューブ内, 60°C). (A) Acrylamide, APS 濃度をともに変化させた際の結果. (B) Acrylamide 濃度を固定し, APS 濃度を变化させた際の結果. (C) APS 濃度を固定し, acrylamide 濃度を变化させた際の結果.

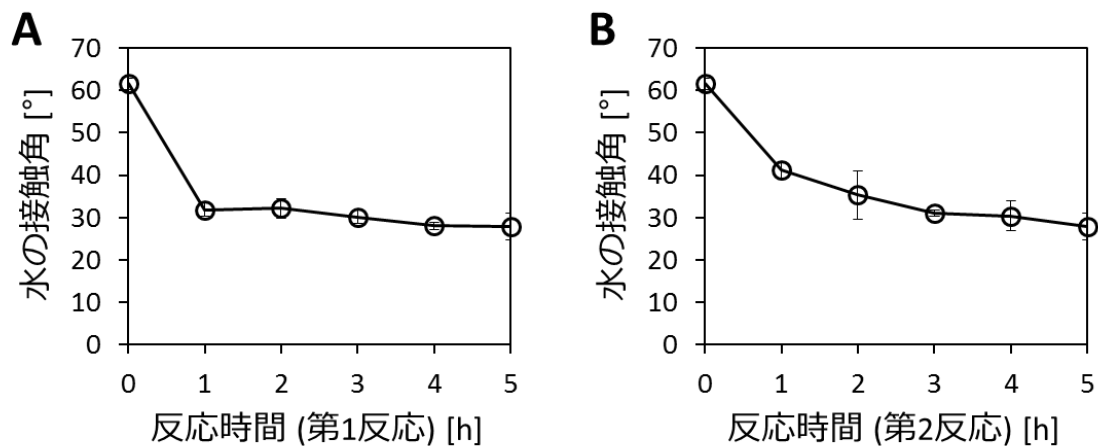


図 4.10. アミド修飾法 B の処理を行ったシリコン平板に対する水の接触角. 第 1 反応条件 : MPTMS/pyridine (1/1, v/v), at 60°C. 第 2 反応の条件 : 4.8 g/L acrylamide + 15 g/L APS aq., at 60°C.  $n \geq 3$ , error bars: SD. (A) 第 2 反応を 5 h に固定したときの, 第 1 反応の反応時間に対する水接触角の変化. 0 h の点は, 無処理のシリコン平板に対する水接触角. (B) 第 1 反応を 5 h に固定したときの, 第 2 反応の反応時間に対する水接触角の変化. 0 h の点は, 無処理のシリコン平板に対する水接触角.

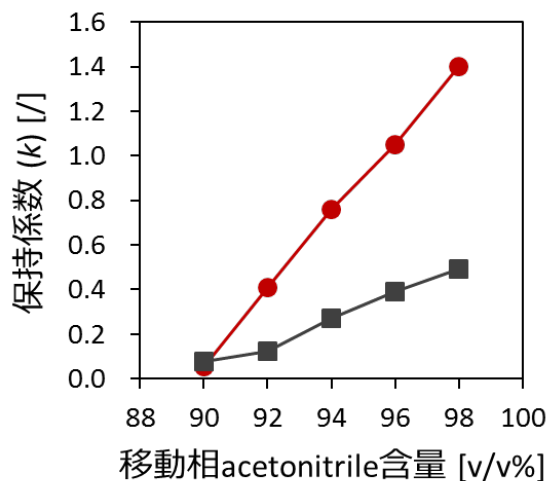
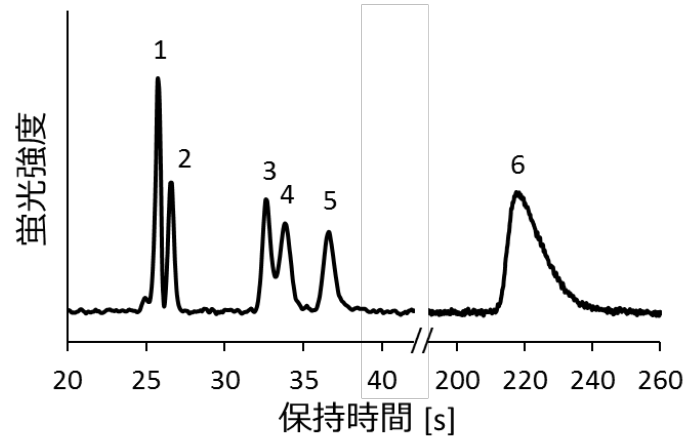


図 4.11. ピラーアレイカラムを用いた HILIC 条件における NBD-Asp の保持. 赤線 : アミド修飾法 B の処理を行ったピラーアレイカラムの結果, 黒線 : 無修飾のピラーアレイカラムの結果. ピラーアレイカラム : 図 4.1A の設計. 移動相 : acetonitrile / 100 mM ammonium formate solution = 90/10, 92/8, 96/4, and 98/2 (v/v). 流速 : 1.0  $\mu$ L/min. 検出点 : 第 1 ターンの手前.



**図 4.12. アミド修飾ピラーレイカラムを用いた HILIC 条件における SBD-チオールの分離.** ピーク：SBD-derivatives of 1, MPG; 2, NAC; 3, Cys; 4, Hcy; 5, CysGly; and 6, GSH. ピラーレイカラム：図 4.1B の設計 (アミド修飾は, アミド修飾法 B により行った). 移動相: acetonitrile / 10 mM ammonium formate buffer (pH 2.5) = 92/8 (v/v). 流速: 2.0  $\mu$ L/min. 検出位置: 分離流路最後端.

#### 4.6. 引用文献

- (1) Aoyama, C.; Saeki, A.; Noguchi, M.; Shirasaki, Y.; Shoji, S.; Funatsu, T.; Mizuno, J.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1420-1426.
- (2) Callewaert, M.; De Beeck, J. O.; Maeno, K.; Sukas, S.; Thienpont, H.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *Analyst* **2014**, *139*, 618-625.
- (3) Callewaert, M.; Desmet, G.; Ottevaere, H.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 75-84.
- (4) De Malsche, W.; De Bruyne, S.; Op De Beeck, J.; Eeltink, S.; Detobel, F.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 2010-2017.
- (5) De Malsche, W.; De Bruyne, S.; Op De Beek, J.; Sandra, P.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; Lynen, F. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1230*, 41-47.
- (6) De Malsche, W.; Eghbali, H.; Clicq, D.; Vangeloooven, J.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5915-5926.
- (7) De Malsche, W.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5391-5400.
- (8) De Malsche, W.; Op De Beeck, J.; De Bruyne, S.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1214-1219.
- (9) De Malsche, W.; Zhang, L.; Op De Beeck, J.; Vangeloooven, J.; Majeed, B.; Desmet, G. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 3613-3618.
- (10) Desmet, G.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; De Malsche, W. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7382-7388.
- (11) Detobel, F.; De Bruyne, S.; Vangeloooven, J.; De Malsche, W.; Aerts, T.; Terryn, H.; Gardeniers, H.; Eeltink, S.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7208-7217.
- (12) Futagami, S.; Hara, T.; Ottevaere, H.; Baron, G. V.; Desmet, G.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1523*, 234-241.
- (13) Isokawa, M.; Takatsuki, K.; Song, Y.; Shih, K.; Nakanishi, K.; Xie, Z.; Yoon, D. H.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6485-6491.
- (14) Op De Beeck, J.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5207-5212.
- (15) Op De Beeck, J.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; Gardeniers, H.; Desmet, G.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1367*, 118-122.
- (16) Song, Y.; Noguchi, M.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4739-4745.
- (17) Song, Y.; Takatsuki, K.; Isokawa, M.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7993-7999.
- (18) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Amino Acids* **2016**, *48*, 1731-1735.
- (19) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 111-116.

- (20) Eghbali, H.; Matthijs, S.; Verdoold, V.; Gardeniers, H.; Cornelis, P.; Desmet, G. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8603-8611.
- (21) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed. ed.; Wiley, 2009, p 20-24.
- (22) Isokawa, M.; Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Bioanalysis* **2014**, *6*, 2421-2439.
- (23) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Analyst* **2013**, *138*, 3802-3808.
- (24) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Chromatographia* **2014**, *77*, 1553-1556.
- (25) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2014**, *35*, 169-172.
- (26) Isokawa, M.; Kobayashi, K.; Miyoshi, Y.; Mita, M.; Funatsu, T.; Hamase, K.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 147-151.
- (27) Isokawa, M.; Shimosawa, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1019*, 59-65.
- (28) Ikegami, T.; Fujita, H.; Horie, K.; Hosoya, K.; Tanaka, N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 578-585.
- (29) Moravcová, D.; Planeta, J.; Kahle, V.; Roth, M. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1270*, 178-185.
- (30) Wikberg, E.; Verhage, J. J.; Viklund, C.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2008-2016.
- (31) Isokawa, M.; Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2014**, *964*, 103-115.
- (32) Dasgupta, B. R.; Weitz, D. A. *Phys. Rev. E* **2005**, *71*.

## 第5章 誘導体化反応ユニットの開発による 成分分離－誘導体化－検出の自動化

### 5.1. 背景と目的

ある分子の分析を行う際には、目的分子を何らかの方法で検出する必要がある。LCによる分離分析において広く用いられる検出法として、紫外・可視検出、蛍光検出、電気化学検出、質量分析器を用いた検出等が挙げられる<sup>1</sup>。しかしながら、ほとんどの生体分子はこれらの検出器に対する応答が弱く、そのままの状態では感度良く検出することが困難である。このため、生体分子の分析においては、検出器に対する応答を増強させるような試薬と目的分子を反応させる、誘導体化反応が広く行われている<sup>2</sup>。

一般的な分析系における誘導体化法は、その反応を分離操作の前に行うプレカラム誘導体化法と、分離操作の後に行うポストカラム誘導体化法に大別される<sup>2</sup>。プレカラム法は、試薬そのものや副生成物が検出器に反応してしまうような誘導体化試薬でも利用できるという利点を有する。その後の分離操作によって、誘導体化された目的分子が副生成物等から分別されるためである。プレカラム法の欠点としては、誘導体化反応の時間を一定にするための操作（反応停止剤の混合等）が必要であるため、その自動化が困難であることが挙げられる。一方で、ポストカラム法は利用できる誘導体化試薬が比較的制限されるものの、分離ユニット下流の誘導体化反応ユニットの体積と溶液の流量によって反応時間が規定できることから、分離－誘導体化－検出の自動化が容易であることに利点がある。

LCユニットを有するマイクロ流体デバイスを用いた先行研究では、ほとんどの場合において、プレカラム法にて試料の誘導体化が行われてきた<sup>3-8</sup>。この誘導体化反応は試料をデバイスに導入する前に手作業で行われており、プレカラム法をデバイス上で自動化した報告はない。その要因として、先述した一般的な分析系の場合と同様に、誘導体化反応の時間を調節するシステムをデバイスに組み込む必要があるため、デバイスの設計、作製、操作が非常に複雑になってしまうことが挙げられる（図 5.1A）。一方、ポストカラム法をデバイス上で行うためには、分離ユニットの下流に誘導体化反応ユニットを作製するだけで良いことから、簡素なデバイス設計で分離－誘導体化の自動化が可能になる（図 5.1B）。ポストカラム誘導体化反応ユニットをCEユニットと統合したデバイスはこれまでに報告されてきた一方で<sup>9-11</sup>、LCユニットと統合したデバイスは開発されていない。

そこで本章では、ポストカラム誘導体化反応ユニットを開発し、ピラーアレイカラムと統合することによって、マイクロ流体デバイス上で成分分離－誘導体化－検出の自動化を達成することを目的とした。生体試料分析を念頭に置いた場合、目的成分の濃度が低いことが多いため、検出系は高感度である方が望ましい。このため本研究では、反応ユニットにて発蛍光誘導体化反応を

起こし、蛍光顕微鏡を用いてオンチップ検出を行うことによって、検出の高感度化を図った。

ポストカラム誘導体化反応ユニットが満たすべき要件は、分離成分と誘導体化試薬が並行に合流したとき、1) 流れに対して垂直方向には混合を促進（溶液混合促進）し、かつ 2) 流れ方向の混合を抑制（試料拡散抑制）することである（図 5.2A）。マイクロ流路内では層流条件で溶液が流れており、溶液の混合は自由拡散によってのみ起こる<sup>12</sup>。誘導体化反応は分離成分と試薬が混合されなければ起きないこと、誘導体化反応に必要な反応ユニットの流路長は短い方が望ましいことから、ポストカラム誘導体化反応ユニットはミキサー構造（ポストカラムミキサー）である必要がある（要件 1）。また、上流の LC ユニットで分離された試料成分について、それぞれを区別して分析するためには、反応ユニットにおいてもその分離状態が保たれなければならない（要件 2）。特に、本研究で LC ユニットに採用しているピラーアレイカラムの分離性能を分析結果に反映させるためには、ポストカラムミキサー構造は要件 2 を十分に満たしていなければならない。

これまでに様々なオンチップミキサーが開発されてきたものの<sup>5,13,14</sup>、ポストカラム誘導体化反応ユニットとして適当な構造は報告されていない。これらのミキサー構造は単純に溶液混合を促進することだけを目的としており、溶液混合の方向性を考慮していない（要件 2 を満たさない）ためである。先述の CE 分離-誘導体化反応を自動化したデバイスでは、単純な中空流路を反応ユニットとして採用している<sup>10,11</sup>。このデバイスでは電気浸透流による送液を行っており、栓流（流路を流れる溶液の線速度が均一な流れ）が流れているため反応ユニットにおける試料拡散が非常に小さい一方で、溶液混合は自由拡散によってのみ行われるため、溶液混合効率は低いと考えられる。さらに、圧力駆動の送液を行う必要がある LC 分離-誘導体化デバイスにおいて、中空流路をポストカラムミキサーとして採用した場合には、放物線流（流路を流れる溶液の線速度プロファイルが 2 次関数に従う流れ：線速度が流路中心で大きく、壁面に近づくほど小さい）により、CE デバイスの場合と比較して試料拡散が大きくなってしまうと考えられた。従って、LC 分離-誘導体化の自動化を達成するためには、新規ミキサー構造を開発する必要がある。

近年、所属研究室における基礎的な検討によって、溶液混合促進と試料拡散抑制を同時に達成する新規ミキサー構造としてピラーアレイ構造（ピラーアレイミキサー）が適する可能性が示されている（図 5.2B）<sup>15</sup>。この研究では、ピラーアレイミキサー（ピラーサイズ：10  $\mu\text{m}$ 、ピラー間距離：5  $\mu\text{m}$ ）において、溶液混合が促進されること（図 5.3A）、ピラーアレイカラムとピラーアレイミキサーを搭載したデバイスで試料成分の分離-誘導体化-検出が可能であることが明らかにされた（図 5.3B）。しかしながら、ピラーアレイミキサーのピラーサイズが溶液混合と試料拡散に与える影響については検討されておらず、その最適化は行われていなかった。そこで本章では、異なるピラーサイズ(5, 10, 20, 40  $\mu\text{m}$ )のピラーアレイミキサーの性能について定量的な評価を行い、その最適化を行った。

## 5.2. 試薬, 装置及び実験方法

### 5.2.1. 試薬

Acetonitrile (HPLC grade)	Simga-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol (MeOH, HPLC grade)	Simga-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Mercaptoethanol	Simga-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Disodium hydrogenphosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	和光純薬工業 (大阪)
Sodium dihydrogenphosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	和光純薬工業 (大阪)
Sodium acetate	和光純薬工業 (大阪)
Acetic acid	和光純薬工業 (大阪)
Fluorescein	和光純薬工業 (大阪)
Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA)	和光純薬工業 (大阪)
Ethylamine	和光純薬工業 (大阪)
Water	Milli-Q reagent system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) により精製した超純水を使用

### 5.2.2. 装置

#### 5.2.2.1. マイクロ流体デバイスを用いた実験の装置

第2章と同じものを用いた (2.2.2.1 項). ただし, 蛍光顕微鏡のフィルターセットは以下のものを用いた.

検出対象: ethylamine の naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA)誘導体, fluorescein

Excitation filter	BP460-490	オリンパス (東京)
Dichroic mirror	505DRLP	Omega Optical (Brattleboro, VT, USA)
Emission filter	HQ535/50	Chroma Technology (Rockingham, VT, USA)

### 5.2.3. 実験方法

#### 5.2.3.1. ミキサー構造のCFD解析

CFD解析は共同研究先 (早大院理工・庄子研究室) にて行った.

##### 5.2.3.1.1. CFD解析に用いたミキサー流路

図5.4に示す設計のピラーアレイミキサーと中空流路に対して, CFD解析を行った. 流路構造は, 流路1, 流路2, これらに接続したミキサー流路 (ピラーアレイミキサー, または中空流路),



これに続く中空流路 3 から構成した。流路やピラーの寸法は以下の通りである。

流路 1, 2*	110 $\mu\text{m}$ wide $\times$ 30 $\mu\text{m}$ deep $\times$ 100 $\mu\text{m}$ long
	*流路 1, 2 の下流 50 $\mu\text{m}$ には, 整流用のピラーアレイ構造を配置 (3- $\mu\text{m}$ -square pillars with 2 $\mu\text{m}$ of inter-pillar distance)
ミキサー流路	$\sim$ 225 $\mu\text{m}$ wide $\times$ 30 $\mu\text{m}$ deep $\times$ $\sim$ 500 $\mu\text{m}$ long
-ピラーサイズ	5, 10, 20, or 40- $\mu\text{m}$ -square pillars with 2 $\mu\text{m}$ of inter-pillar distance または, ピラー無し (中空流路)
中空流路 3	$\sim$ 225 $\mu\text{m}$ wide $\times$ 30 $\mu\text{m}$ deep $\times$ $\sim$ 50 $\mu\text{m}$ long

#### 5.2.3.1.2. ミキサー構造における溶液混合の評価：シミュレーション条件

図 5.4 に示すミキサー流路のインレット 1 からは低分子が溶解した水溶液を, インレット 2 からは水を流入させる条件にて, CFD 解析を行った (図 5.5A)。具体的な条件を以下に示す。

Software	: COMSOL Multiphysics (ver. 5.2a: COMSOL AB, Stockholm, Sweden).		
Model	: variable	Dimension	: 3D
Fluid property	: incompressible flow	Temperature	: 293.15 K
Wall condition	: no slip	Transport mechanics	: convection
Inlet 1	: molecules in water @ $1.67 \times 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s}$ (= 1.00 $\mu\text{L}/\text{min}$ ) (concentration, 1 $\text{mol}/\text{m}^3$ (= 1 mM); diffusion coefficient, $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ )		
Inlet 2	: water @ $1.67 \times 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s}$ (= 1.00 $\mu\text{L}/\text{min}$ )		

#### 5.2.3.1.3. ミキサー構造における溶液混合の評価：溶液混合の指標の算出

既報に基づき<sup>14</sup>, あるミキサー長さ  $y$  におけるミキサー断面について, 溶液の流れの垂直方向 (流路幅方向) の位置  $x$  ( $x = 1, 2, \dots, n$ :  $n$  はミキサーの流路幅に相当する値) に対して, 分子の規格化濃度  $C_x$  ( $0 \leq C_x \leq 1$ : 0 mM = 0, 1 mM = 1 として規格化) のプロットを作製し (図 5.5A), そのプロットの標準偏差  $\sigma$  ( $0 \leq \sigma \leq 0.5$ ) を次式により算出した。

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{x=1}^n (C_x - \bar{C})^2}{n}}, \quad \bar{C} = \frac{\sum_{x=1}^n C_x}{n} = 0.5 \quad (5.1)$$

この  $\sigma$  は, あるミキサー長さ  $y$  において,  $x$  方向の溶液濃度の不均一さを表す値であることから, 溶液混合の指標として用いることが出来る。なお, 2 溶液が完全に混合されたとき  $\sigma = 0$  となり, 全く混合されていないとき  $\sigma = 0.5$  となる。

#### 5.2.3.1.4. ミキサー構造における試料拡散の評価：シミュレーション条件

初期状態において, 図 5.4 に示すミキサー流路のインレット 1 付近に分子が存在する直方体 (sample structure: 110  $\mu\text{m}$  wide  $\times$  30  $\mu\text{m}$  deep  $\times$  50  $\mu\text{m}$  long) 区画 (試料バンド) を配置し, シミュレーション開始とともにインレット 1, インレット 2 から水を流入させる条件にて CFD 解析を行った (図 5.6A)。具体的な条件を以下に示す。

Software	: COMSOL Multiphysics (ver. 5.2a: COMSOL AB, Stockholm, Sweden).		
----------	--	--	--

Model	: variable	Dimension	: 3D
Fluid property	: incompressible flow	Temperature	: 293.15 K
Wall condition	: no slip	Transport mechanics	: convection
Inlet 1	: water @ $1.67 \times 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s}$ (= 1.00 $\mu\text{L}/\text{min}$ )		
Inlet 2	: water @ $1.67 \times 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s}$ (= 1.00 $\mu\text{L}/\text{min}$ )		
Initial value in sample structure	: 1 mol/m <sup>3</sup> (= 1 mM) (diffusion coefficient, $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ )		

### 5.2.3.1.5. ミキサー構造における試料拡散の評価：試料拡散の指標の算出

図 5.6A に示すミキサー流路の中空流路 3 部分における，時間に対する分子の濃度変化のプロット（クロマトグラム）を Image J (ver. 1.4.3.67: National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) で作成した．クロマトグラムのピークに対し，KaleidaGraph (ver. 3.6: Synergy Software, Reading, PA, USA) を用いて 5.2 式に示す Exponential-Gaussian hybrid (EGH) 関数<sup>16</sup> でフィッティングを行った．

$$f_{\text{egh}}(t) = \begin{cases} H \cdot \exp\left\{\frac{-(t - t_R)^2}{2\sigma_g^2 + \tau(t - t_R)}\right\} + b, & 2\sigma_g^2 + \tau(t - t_R) > 0 \\ b, & 2\sigma_g^2 + \tau(t - t_R) \leq 0 \end{cases} \quad (5.2)$$

ここで， $H$  はピーク高さ， $t$  は時間（変数）， $t_R$  はピークの溶出時間， $\sigma_g$  は合成前の Gaussian 関数の標準偏差， $\tau$  は合成前の Exponential 関数の時定数， $b$  はベースラインである．フィッティングにより得られたパラメータから，ピーク幅(full width at half maximum, FWHM) を次式より算出した．

$$\text{FWHM} = \sqrt{\tau^2(\ln 2)^2 + \sigma_g^2 \cdot 8 \ln 2} \quad (5.3)$$

この CFD 解析では，初期状態における分子の分布幅がミキサー流路構造によらず同一であることから，ミキサー構造を通過した後の分子の分布幅に相当するピーク幅 FWHM を，試料拡散の指標として用いることができる．

### 5.2.3.2. マイクロ流体デバイスの作製

ピラーアレイカラムとピラーアレイミキサー（または中空流路）を搭載したマイクロ流体デバイスは，第 2 章の方法に基づき作製した（図 5.7）（2.2.3.2.項）．ただし，本章で扱うデバイスは流路深さを 30  $\mu\text{m}$  で一定とした設計であるため，シリコンチップの流路の掘り下げは 1 回のみ行った．使用したデバイスの寸法は，以下の通りである．

基板の大きさ	20 × 20 mm
分離流路	400 $\mu\text{m}$ wide × 30 $\mu\text{m}$ deep × ~17.6 mm long (2 × 等流路長ターン)
試料用流路	50 $\mu\text{m}$ wide × 30 $\mu\text{m}$ deep
ミキサー流路	225 $\mu\text{m}$ wide × 30 $\mu\text{m}$ deep × 8 mm long
ピラーアレイ（分離流路）	3- $\mu\text{m}$ -square pillars with 2 $\mu\text{m}$ of inter-pillar distance
	（ミキサー） 5, 10, or 20- $\mu\text{m}$ -square pillars with 2 $\mu\text{m}$ of inter-pillar distance
	または，ピラー無し（中空流路）

### 5.2.3.3. マイクロ流体デバイスを用いた実験の装置構成

ピラーアレイカラムは、第 2 章の方法に従い、専用の圧着型締め込み式コネクタを用いて、5 か所の貫通穴をキャピラリー（内径 100  $\mu\text{m}$ 、外径 375  $\mu\text{m}$ ）と接続した（2.2.3.3.項）。

### 5.2.3.4. ミキサーにおける溶液混合の評価

#### 5.2.3.4.1. 実験系

マイクロ流体デバイスのそれぞれの貫通穴の接続先は以下とした：移動相インレット，マイクロポンプ；移動相アウトレット，開放；試料インレットと試料アウトレットを接続（閉鎖）；試薬インレット，シリンジポンプ（図 5.8A）。移動相インレットからは水を，試薬インレットからは蛍光水溶液を流した状態，つまり 5.2.3.1.2.項の CFD 解析と同様の状態を作った。具体的な送液条件等を以下に示す。

マイクロポンプ（移動相インレット） water を 0.5 or 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液

シリンジポンプ（試薬インレット） 2.5  $\mu\text{M}$  fluorescein aq. を 0.5 or 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液

両溶液の送液が安定した後，蛍光顕微鏡を用いてミキサー上の 5 点（ミキサー長が 0, 1, 3, 5, 7 mm の点）の蛍光画像を取得した（露光時間: 100 or 500 ms/frame）。

#### 5.2.3.4.2. 解析法

Image J (ver. 1.50e: National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて，前 5.2.3.4.1.項で得られた蛍光画像それぞれから，ミキサー幅方向の位置  $x$  ( $x = 1, 2, \dots, n$ :  $n$  はミキサーの流路幅に相当する値) に対する蛍光強度（シグナル強度） $F_x$  のプロット（5.2.3.1.3.項の CFD 解析結果の処理における，位置  $x$  に対する規格化濃度  $C_x$  のプロットと同様のもの）を得た。このプロットに対し，以下の規格化処理を行った。

位置  $x$  におけるシグナル強度  $F_x$  は，ベースラインのシグナル強度  $B$ ，蛍光色素由来のシグナル強度  $f_x$  の合成値である（式 5.4）。

$$F_x = f_x + B \quad (5.4)$$

$F_x$  と  $B$  は画像解析によって得られる情報である（ $F_x$ : ミキサー内部のシグナル強度， $B$ : ミキサー外部におけるシグナル強度）。

ここで，プロットの最大値が 1，最小値が 0 となるような規格化後のシグナル強度  $f_{\text{norm},x}$  を，係数  $A$  を導入して次式のように定義する。

$$f_{\text{norm},x} = A \cdot f_x \quad (5.5)$$

本 5.2.3.4.項の実験では，water（無蛍光）と fluorescein aq.（蛍光）が流量比 1:1 になるように送液しており，この流量比は蛍光画像を取得した時間によらず固定した。従って，理想的には，蛍光画像を取得した点（ミキサー長さ  $y$ ）によらず， $f_{\text{norm},x}$  プロットの曲線下面積は一定となる（式 5.6）。

$$\sum_{x=1}^n f_{\text{norm},x} = \text{constant} \quad (5.6)$$

本 5.2.3.4.項の実験条件において 2 溶液が全く混合されていないとき（理想的な  $y = 0$  の状態）， $f_{\text{norm}}$ ,

$x$  は式 5.7 で表され、その曲線下面積は式 5.8 となる。

$$f_{\text{norm},x}^{y=0} = \begin{cases} 0, & 1 \leq x \leq n/2 \\ 1, & n/2 < x \leq n \end{cases} \quad (5.7)$$

$$\sum_{x=1}^n f_{\text{norm},x}^{y=0} = \frac{n}{2} \quad (5.8)$$

式 5.5, 5.6, 5.8 より、次式が導出される。

$$\sum_{x=1}^n A \cdot f_x = \frac{n}{2} \quad (5.9)$$

先述の通り  $n$  はミキサーの流路幅に相当する値（既知）である。式 5.9 を用いて係数  $A$  を算出した後、式 5.5 より規格化したシグナル強度である  $f_{\text{norm},x}$  が求められる。

位置  $x$  に対する  $f_{\text{norm},x}$  のプロットから、式 5.1 に従って溶液混合の指標である  $\sigma$  を算出した（式 5.1 において、 $C_x = f_{\text{norm},x}$  と代入）。

#### 5.2.3.5. ミキサーにおける試料拡散の評価

マイクロ流体デバイスのそれぞれの貫通穴の接続先は以下とした：移動相インレット，マイクロポンプ；移動相アウトレット，開放；試料インレット，4 方バルブ；試料アウトレットを 4 方バルブ；試薬インレット，シリンジポンプ（図 5.9A）。移動相インレット，試薬インレットからは水を流した状態で試料を注入した（5.2.3.1.4.項の CFD 解析と同様の状態）。具体的な送液条件等を以下に示す。

マイクロポンプ（移動相インレット）	water を 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液
シリンジポンプ（試薬インレット）	water を 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液
注入試料	100 $\mu\text{M}$ fluorescein in water/methanol (98/2, v/v)

蛍光顕微鏡を用いて、ミキサー先端と後端の 2 点（ミキサー長が 0, 8 mm の点）にて動画を取得した（露光時間: 100 ms/frame）。

得られた動画から、Image J (ver. 1.50e: National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)を用いてクロマトグラムを作成した。このクロマトグラムのピークに対して、Fityk (ver. 0.9.8)<sup>17</sup>を用いて、Constant 関数と SpiltGaussian 関数でフィッティングし、ピーク幅 FWHM を算出した。ミキサー通過によるピーク幅の増加率（ミキサー後端で検出したピーク幅／ミキサー先端で検出したピーク幅）を、試料拡散の指標とした。

#### 5.2.3.6. マイクロ流体デバイスを用いたオンチップ成分分離 – 発蛍光誘導体化 – 蛍光検出

マイクロ流体デバイスのそれぞれの貫通穴の接続先は以下とした：移動相インレット，マイクロポンプ；移動相アウトレット，開放；試料インレット，4 方バルブ；試料アウトレットを 4 方バルブ；試薬インレット，シリンジポンプ（図 5.10A）。移動相インレットからは移動相を，試薬インレットからは発蛍光誘導体化試薬を流した状態で試料を注入した。具体的な送液条件等を以下に示す。

マイクロポンプ (移動相インレット)

移動相 acetonitrile / 10 mM sodium acetate solution = 90/10 (v/v)

流速 0.5  $\mu$ L/min

シリンジポンプ (試薬インレット)

移動相 5 mM naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) + 50 mM mercaptoethanol  
in acetonitrile / 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) = 50/50 (v/v)

流速 0.5  $\mu$ L/min

注入試料 5  $\mu$ M fluorescein + 50 mM ethylamine in mobile phase

蛍光顕微鏡を用いて、ミキサー後端 (ミキサー長が 8 mm の点) にて動画を取得した (露光時間: 100 ms/frame). 得られた動画から, Image J (ver. 1.50e: National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)を用いてクロマトグラムを作成した.

## 5.3. 結果と考察

### 5.3.1. ポストカラム誘導体化反応ユニットとしてのピラーアレイ構造の選択

5.1.項で述べたように、ポストカラム誘導体化反応ユニットが満たすべき要件は、分離成分と誘導体化試薬が並行に合流したとき、1) 流れに対して垂直方向には混合を促進（溶液混合促進）し、かつ 2) 流れ方向の混合を抑制（試料拡散抑制）することである（図 5.2A）。

上記要件を満たしうる流路構造として、ピラーアレイ構造に着目した。ピラーアレイ構造においては、ピラー間の微小流路が溶液の流れ方向を誘導するとともに、この微小流路の合流部、分岐部において対流が生じることによって、溶液混合が促進されると予測された（図 5.2B）。実際に、流路内に支柱構造が存在することにより、流路幅方向の分子拡散が大きくなることが示されている<sup>12,18</sup>。また、圧力駆動の送液により微小流路内には放物線流が流れるものの、流路全体では線速度分布が均一な栓流状の流れと見ることができると考えられる（図 5.2B）。

所属研究室において、このピラーアレイ構造のポストカラム誘導体化反応ユニットとしての基礎的な評価が既に行われている<sup>15</sup>。この研究では 1 つのピラーアレイ構造（ピラーサイズ： $10\ \mu\text{m}$ 、ピラー間距離： $5\ \mu\text{m}$ ）に対して、CFD 解析が行われ、ピラーアレイミキサーにおいて溶液混合促進と試料拡散抑制が起こることが示された。また、実際に作製したデバイスを用いて、ピラーアレイミキサーでは溶液混合が促進されることに加え（図 5.3A）、試料成分の分離－誘導体化－検出が可能であることが報告された（図 5.3B）。しかしながらこの研究において、ピラーアレイミキサーのピラーサイズが溶液混合と試料拡散に与える影響については検討されておらず、その最適化は行われていなかった。

そこで本 5.3.項では、異なるピラーサイズを有するピラーアレイミキサーの性能について定量的な評価を行い、その最適化を行った。ピラーサイズは  $5, 10, 20, 40\ \mu\text{m}$  とし、ピラー間距離は LC ユニットのピラーアレイ構造と同じ  $2\ \mu\text{m}$  とした。ピラー間距離を  $2\ \mu\text{m}$  としたのは、ピラー間距離が LC ユニットと誘導体化反応ユニットで異なると、作製法上の問題で流路深さが変わってしまうという問題を避けるためである。なお、ピラーアレイミキサーの比較対象としては、5.1 項において述べた CE 分離－誘導体化デバイスの誘導体化反応ユニットとして採用されていた、中空流路を採用した<sup>10,11</sup>。また、本研究では高感度な検出を行うために、誘導体化反応として発蛍光誘導体化反応を採用し、蛍光顕微鏡を用いた検出を行った。

### 5.3.2. 数値流体力学解析によるピラーアレイミキサーの評価

2 つの流路が並行に合流し、合流後にミキサー構造（幅： $\sim 225\ \mu\text{m}$ 、深さ： $30\ \mu\text{m}$ 、長さ： $500\ \mu\text{m}$ ）を設置した流路（図 5.4：寸法は 5.2.3.1.1.項）を設計した。これらの流路構造に対して、実際の実験条件に即した条件で CFD 解析を行い、溶液混合と試料拡散を評価した。

### 5.3.2.1. ミキサー構造における、流れに対して垂直方向の溶液混合の評価

設計した流路構造において、一方のインレットからは水を、もう一方のインレットからは低分子が溶解した水を等流量で送液する条件でシミュレーションを行ない、低分子の流路幅方向の濃度分布から溶液混合の評価を行った (図 5.5A)。CFD 解析により得られたミキサー構造内における濃度分布の概観を図 5.5B に示す。中空流路と比較してピラーアレイミキサーでは溶液混合が進行していること、ピラーのサイズが大きくなるほど溶液混合が促進されることが分かった。

溶液混合状態を定量的に評価するための評価値として、分子の規格化濃度  $C_x$  の流路幅方向の位置  $x$  のプロファイルに対する標準偏差  $\sigma$  を採用した<sup>5,14</sup> (図 5.5A)。この  $\sigma$  は、あるミキサー長さ  $y$  において、 $x$  方向の溶液濃度の不均一さを表す値であり、2 溶液が完全に混合されたとき  $\sigma = 0$ 、全く混合されていないとき  $\sigma = 0.5$  となる。なお、 $\sigma$  は式 5.1 (5.2.3.1.3.項) を用いて算出した。ミキサー長さに対する  $\sigma$  のプロットを図 5.5C に示す。図 5.5B の概観から予測された通り、中空流路と比較してピラーアレイミキサーでは  $\sigma$  の値が小さいこと、またピラーサイズが大きいかほど  $\sigma$  の値が小さくなることが分かった。この結果から、ピラーアレイミキサーは流れに対して垂直方向 (流路幅方向) の溶液混合を促進することが示唆され、ピラーサイズが大きいかほどこの促進の度合いが大きくなると予測された。

### 5.3.2.2. ミキサー構造における、流れ方向の試料拡散の評価

設計した流路構造において、2 つのインレットから等流量で水を送液する条件下で、初期状態において一方のインレット付近に低分子が存在するバンド区画 (試料バンド) を設置してシミュレーションを行い、ミキサー通過後の試料バンドの形状から試料拡散の評価を行った (図 5.6A)。中空流路、ミキサー流路を通過中の試料バンドの形状を図 5.6B に示す。5.1 項、5.3.1.項で述べたように、中空流路上では試料バンドが放物線状の形状をとってしまったのに対し、ピラーアレイミキサー上では試料バンドが矩形状に維持されることが確認された。ミキサー通過後の中空流路で取得した、時間に対する分子の濃度変化 (クロマトグラム) を図 5.6C に示す。中空流路では幅の大きなピークが観測されたのに対し、ピラーアレイミキサーでは鋭い形状のピークが得られた。

流れ方向の試料拡散を定量的に評価するために、得られたクロマトグラムに対して EGH 関数<sup>16</sup> でフィッティングを行ったのち、ピーク幅 FWHM を算出した。図 5.6D に示すように、ピラーアレイミキサーを通過後のピーク幅は、中空流路と比較して 1/2.5~1/3 程度となった。ピラーサイズが 40  $\mu\text{m}$  のミキサーでは、他のピラーアレイミキサーと比べてピーク幅が大きかった一方で、ピラーサイズが 5, 10, 20  $\mu\text{m}$  のものでは、ピーク幅の差は 6.4%であり、ほとんど同程度であった。以上の結果から、ピラーアレイミキサーは流れ方向の試料拡散を抑制することが示唆され、ピラーサイズは 10-20  $\mu\text{m}$  程度が良いと予測された。

### 5.3.3. マイクロ流体デバイスを用いたピラーアレイミキサーの評価

LC 分離ユニットとしてピラーアレイカラムを、誘導体化反応ユニットとしてピラーアレイミキ

サー（流路長：8 mm）を搭載したマイクロ流体デバイスを作製した（図 5.7：寸法は 5.2.3.2.項）。これらのデバイスを用いて CFD 解析と同様の条件設定にて実験を行い、ピラーアレイミキサーの溶液混合と試料拡散を評価した。

### 5.3.3.1. ミキサー構造における、流れに対して垂直方向の溶液混合の評価

ミキサーに接続する一方の流路からは水を、もう一方の流路からは蛍光色素 fluorescein を送液し、蛍光顕微鏡を用いてミキサー部分の蛍光画像を撮影した（図 5.8A）。得られた画像から取得したミキサー上における流路幅方向の蛍光強度分布に対して、5.2.3.4.2.項で述べた規格化を行なった後、溶液混合の指標である  $\sigma$  を式 5.1（5.2.3.1.3.項）を用いて算出した。

ミキサー長さに対する  $\sigma$  のプロットを図 5.8B, C に示す。流量の条件によらず、ピラーアレイミキサーにおける  $\sigma$  の値は中空流路よりも小さいこと、また、ピラーサイズが大きくなるに従って、 $\sigma$  が減少することが確認された。以上の結果から、ピラーアレイミキサーは実際に、流れに対して垂直方向（流路幅方向）の溶液混合を促進することが示された。これらの結果は 5.3.2.1.項の CFD 解析の結果と一致していたことから、CFD 解析の妥当性が確認されたといえる。

以上の結果は、同じ混合状態（ $\sigma$  の値）を得るのに必要な流路長は、中空流路に比べてピラーアレイミキサーで短くなることを示している。誘導体化反応ユニットの流路長の低減は、デバイスにおける当該ユニットの占有面積の増大を避けられるだけでなく、流れ方向の試料拡散を最小限に留められるという点で重要である。また、今回用いたピラーアレイミキサーの流路長はわずか 8 mm であったことから、 $\sigma$  は 0.18-0.28 が限界であった。より完全な混合状態を達成するためには、今後はミキサー長を延長していく必要がある。

なお、ピラーサイズが 20  $\mu\text{m}$  のデバイスでは背圧が高く（流路抵抗が大きく）、図 5.8C の流量条件では明らかな溶液漏れが生じてしまったため、データを取ることはできなかった（図 5.8B の 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  における背圧：中空流路，0.5 MPa；5  $\mu\text{m}$  ピラー，1.0 MPa；10  $\mu\text{m}$  ピラー，1.4 MPa；20  $\mu\text{m}$  ピラー，2.2 MPa）。このデバイスについては、溶液漏れを防ぐことが困難であったことから、以降の検討から除外した。

### 5.3.3.2. ミキサー構造における、流れ方向の試料拡散の評価

作製したデバイスを用いて、移動相インレットと試薬インレットから水を送液した状態で、fluorescein 試料を注入し、蛍光顕微鏡を用いてミキサー先端と後端における蛍光動画を撮影した（図 5.9A）。得られた動画からクロマトグラムを取得し、蛍光色素のピーク幅 FWHM を算出した。ミキサー通過によるピーク幅の増加率（ミキサー後端で検出したピーク幅／ミキサー先端で検出したピーク幅）を、試料拡散の指標とした。

図 5.9B に、算出されたピーク幅を示す。中空流路を通過することで、fluorescein のピーク幅は約 1.8 倍となり、大きな試料拡散が確認された。一方で、ピラーアレイミキサーでは、ピラーのサイズによらずピーク幅の増加率は 1.0 となり、試料拡散が非常に小さい（ほとんど見られない）ことが示された。以上の結果から、ピラーアレイミキサーは実際に、流れ方向の試料拡散を抑制



することが示唆された。

#### 5.3.4. マイクロ流体デバイスを用いたオンチップ成分分離－誘導体化－検出

作製したマイクロ流体デバイス（図 5.7）を用いて、成分分離－誘導体化－検出の自動化を試みた。移動相インレットからは移動相を、試薬インレットからは NDA + mercaptoethanol 溶液を等流量で流した状態で試料（蛍光色素 fluorescein と、無蛍光な ethylamine）を注入した（図 5.10A）。蛍光顕微鏡を用いることでミキサー後端において蛍光動画を撮影し、得られた動画からクロマトグラムを作成した。NDA は無蛍光分子であり、チオール（本実験では mercaptoethanol）存在下でアミン（本実験では ethylamine）と反応し、その生成物のみが蛍光を有する（図 5.10B）。なお、LC ユニットにおける fluorescein と ethylamine の分離は、無修飾の流路表面を用いた HILIC 条件で行った。

結果のクロマトグラムを図 5.10C-E に示す。中空流路（図 5.10C）、ピラーサイズが 5  $\mu\text{m}$  のピラーアレイミキサー（図 5.10D）を搭載したデバイスでは、fluorescein から分離され、かつ NDA で誘導体化された ethylamine (NDA-ethylamine) のピークが検出された。中空流路を有するデバイスの結果と比較して、5  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサーを搭載したデバイスでは、試料拡散の抑制により NDA-ethylamine のピーク幅が小さいまま保たれたことからピークの分離が良好であり、また、溶液混合が促進されたことで NDA-ethylamine のピーク高さは約 2 倍となった結果が得られた。

一方で、ピラーサイズ 10  $\mu\text{m}$  のピラーアレイミキサーを搭載したデバイスにおいては、NDA-ethylamine のピークは明瞭には観察されなかった（図 5.10E）10  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサーでは空隙率  $\varepsilon$ （ミキサー体積に占める、空隙体積の割合）が非常に小さく、分離成分がミキサーを通過する時間（滞留時間）が短いために、誘導体化反応がほとんど進行しなかに原因があると考えられる。各流路構造における空隙率  $\varepsilon$  は、中空流路で 1.00、5  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサーで 0.49、10  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサーで 0.31 であり、本実験条件における試料成分の滞留時間はそれぞれ 3.2、1.6、1.0 s と計算される。5  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサーの場合、滞留時間は中空流路の半分であるが、溶液混合促進により誘導体化反応が促進されたこと、試料拡散抑制によりピーク形状が良好に保たれたことから、NDA-ethylamine のピークが中空流路の場合よりも高く検出されたのだと考えられる。10  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサーについては、ミキサー長を増加させることにより、NDA-ethylamine のピークが検出可能になると予測される。

以上の結果から、ピラーサイズ 5  $\mu\text{m}$  のピラーアレイミキサーが、ポストカラム誘導体化反応ユニットとして最も適した構造であることが示された。

## 5.4. 小括

本章では、ポストカラム誘導体化反応ユニットとしてピラーアレイミキサーを開発することで、マイクロ流体デバイス上において試料成分の分離－誘導体化－検出の自動化に成功した。CFD 解析により、5, 10, 20  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサー構造が、ポストカラム誘導体化反応ユニットが満たすべき 2 要件（溶液混合促進，試料拡散抑制）を満足しうることを示した。この結果を受けて、LC ユニットとしてピラーアレイカラムを、ポストカラム誘導体化反応ユニットとしてピラーアレイミキサー（ピラーサイズ：5, 10, 20  $\mu\text{m}$ ）を搭載したマイクロ流体デバイスを作製した。これを用いた実験により、5, 10  $\mu\text{m}$  のピラーを有するミキサー構造が、ミキサーにおける溶液混合効率が高く、試料拡散性が小さいことに加えて、現状の装置構成で使用可能な流路抵抗を有していることが分かった。さらに、ピラーアレイミキサー（ピラーサイズ 5  $\mu\text{m}$ ）を搭載したデバイスを採用することで、ethylamine の fluorescein からの分離、NDA による発蛍光誘導体化、蛍光顕微鏡によるオンチップ検出を、良好に達成した。

本研究で開発したピラーアレイミキサーは、マイクロ流体デバイスの構成要素の一つとしての利用だけでなく、汎用キャピラリーLC 等のポストカラム誘導体化反応のために、これ単独でポストカラムミキサーとして利用することも期待される。また、ピラーアレイミキサーは、ポストカラム誘導体化反応だけでなく、試料成分の分離後の溶液組成の調整にも適していると考えられる。例えば、質量分析器による検出を行う際に、成分分離後の溶液に acetonitrile 等の有機溶媒を混合することで検出感度を向上させることが可能になる<sup>19,20</sup>。

開発したピラーアレイミキサーの問題として、中空流路と比較して、流路抵抗が大きくなること（5.3.3.1.項）、ミキサー流路における試料成分の通過時間が短いこと（5.3.4.項）が残っており、今後はこれらの課題の解決を図っていく予定である。両課題は空隙率  $\epsilon$  が小さいことに起因するため、ピラー間距離を大きくすることで解決可能である。しかしながら、単純にピラー間距離を広くするだけでは、試料拡散の増大を引き起こす可能性が高い（放物線流の影響）。そこで、ピラー間距離を拡大しつつ、流れの垂直方向（流路幅方向）に長いピラーを採用することによって、上記の課題の解決を試みる予定である。流路幅方向に長いピラーを有するピラーアレイ構造中では、見かけの試料拡散が抑制されるとの報告があるためである<sup>21,22</sup>。また、ピラーアレイカラムとピラーアレイミキサーを搭載したデバイスを用いて、アミノ酸等の生体分子のオンチップ分離－誘導体化－検出を行いたい。

## 5.5. 図表

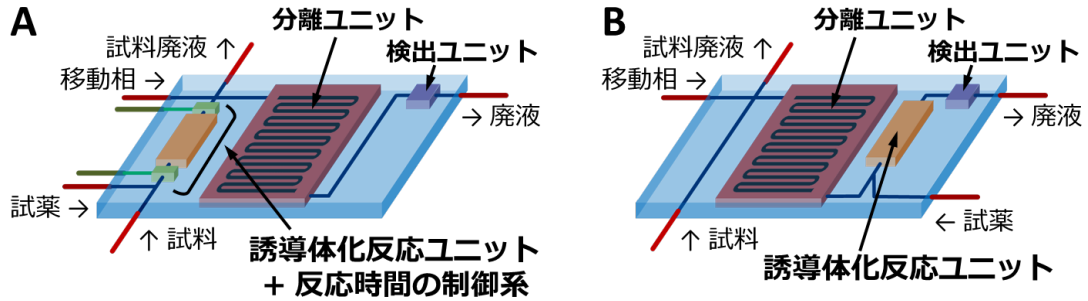


図 5.1. 成分分離 – 誘導体化 – 検出の自動化を可能にするマイクロ流体デバイス. (A) プレカラム誘導体化法を採用したデバイス. (B) ポストカラム誘導体化法を採用したデバイス.

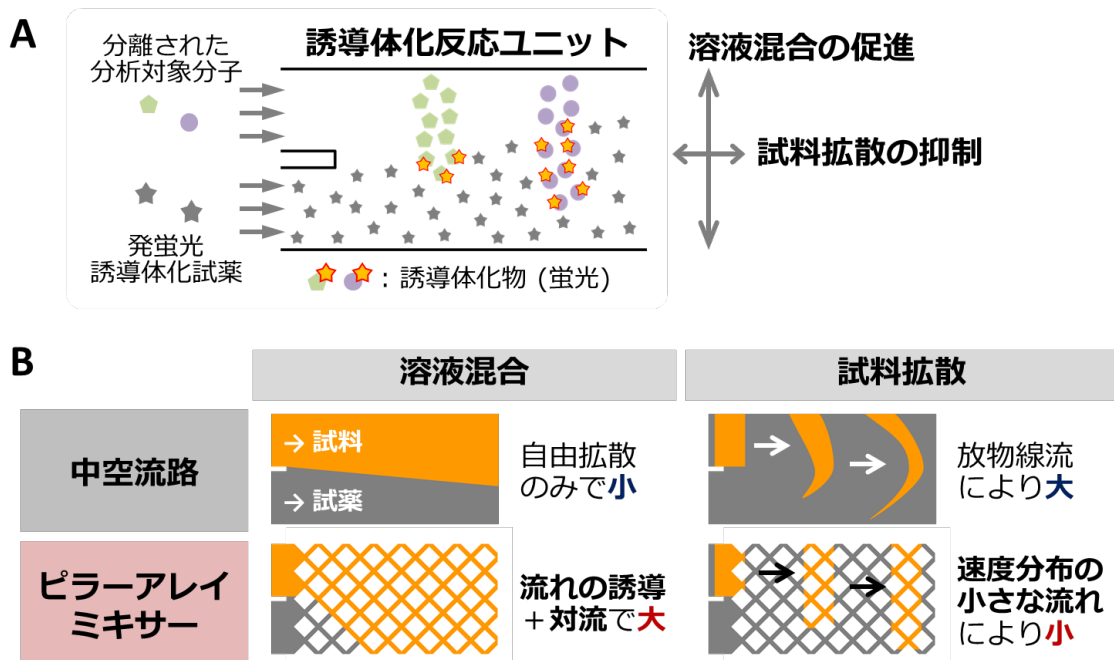
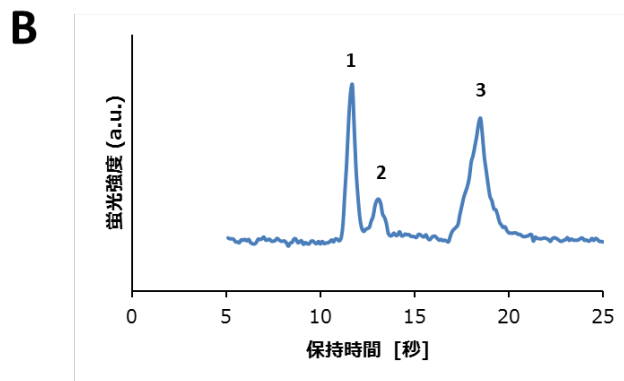
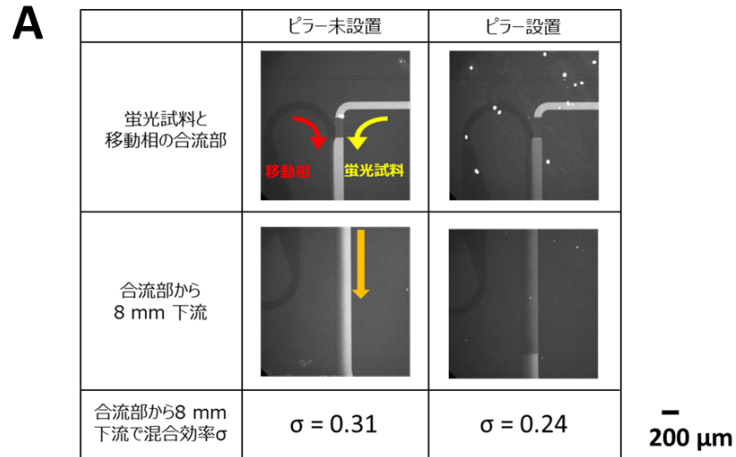


図 5.2. (A) 誘導体化反応ユニットの概念図と満たすべき要件. (B) ピラーアレイミキサーのコンセプト.



**図5.3. ピラーアレイカラムとピラーアレイミキサーを搭載したマイクロ流体デバイスを用いた先行研究の結果<sup>15</sup>.** ミキサーにおけるピラーサイズ: 10  $\mu\text{m}$ . ミキサーにおけるピラー間距離: 5  $\mu\text{m}$ .  
**(A) ミキサー構造における流れの垂直方向の溶液混合の評価.** 移動相: acetonitrile / water = 90/10 (v/v), 1.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 試薬: 10  $\mu\text{M}$  fluorescein in acetonitrile / water / methanol = 57/29/4 (v/v/v), 1.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .  $\sigma$  は式 5.1 により算出 (5.2.1.3.項). **(B) 試料成分のオンチップ分離 – 発蛍光誘導体化 – 蛍光検出.** 移動相: acetonitrile / 10 mM ammonium acetate buffer (pH 4.7) = 90/10 (v/v), 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 試薬: 500  $\mu\text{M}$  NDA + 10 mM 2-mercaptoethanol in acetonitrile / 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) = 50/50 (v/v), 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 試料: 50 mM butylamine + 50 mM 1,3-propanediamine in acetonitrile / 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) = 50/50 (v/v). ピーク: 1, unknown; 2, NDA-butylamine; 3, NDA-1,3-propanediamine.

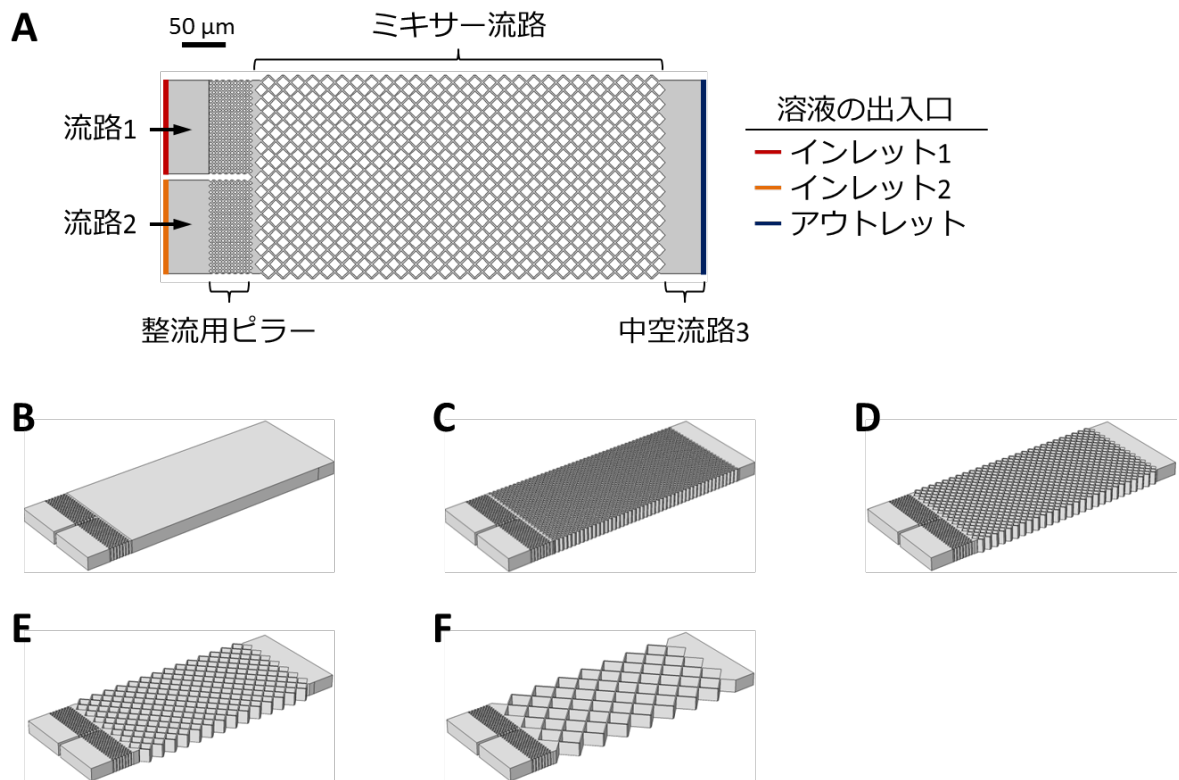


図 5.4. CFD 解析に用いたミキサー流路. (A) ミキサー流路の 2 次元的な設計図. 詳細な寸法は 5.2.3.1.1.項に記載. この図におけるミキサー流路中のピラーのサイズは  $5 \mu\text{m}$ . (B) 中空流路と, (C)  $5 \mu\text{m}$ , (D)  $10 \mu\text{m}$ , (E)  $20 \mu\text{m}$ , (F)  $40 \mu\text{m}$  のピラーを有するミキサー流路の鳥瞰図.



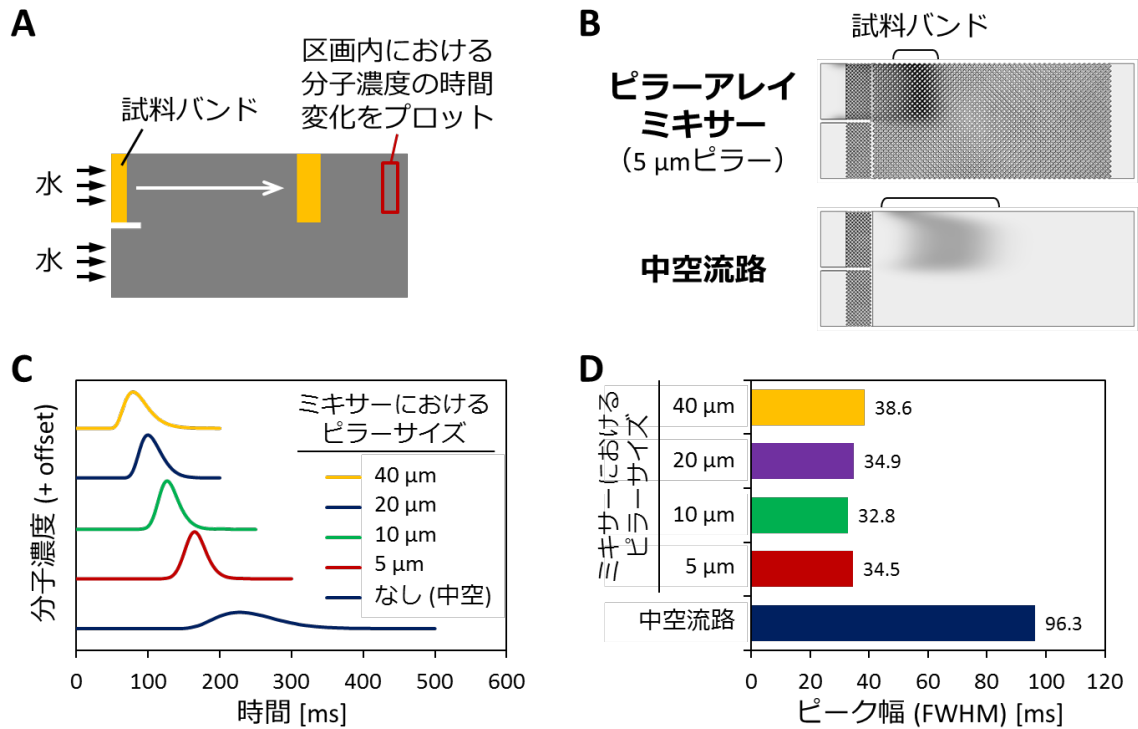


図 5.6. CFD 解析によるミキサー構造における流れ方向の試料拡散の評価。(A) シミュレーション条件の概要。詳細は 5.2.3.1.4.項に記載。(B) ミキサー流路を通過中の試料バンド形状の比較。(C) ミキサー構造ごとに得られた流路後端部 (図 5.6A の赤枠内) における試料分子濃度の時間変化 (クロマトグラム)。(D) 図 5.6C から得られた試料ピーク幅 FWHM の比較。ピーク幅が小さいほど、試料拡散が抑制されたことを示す。

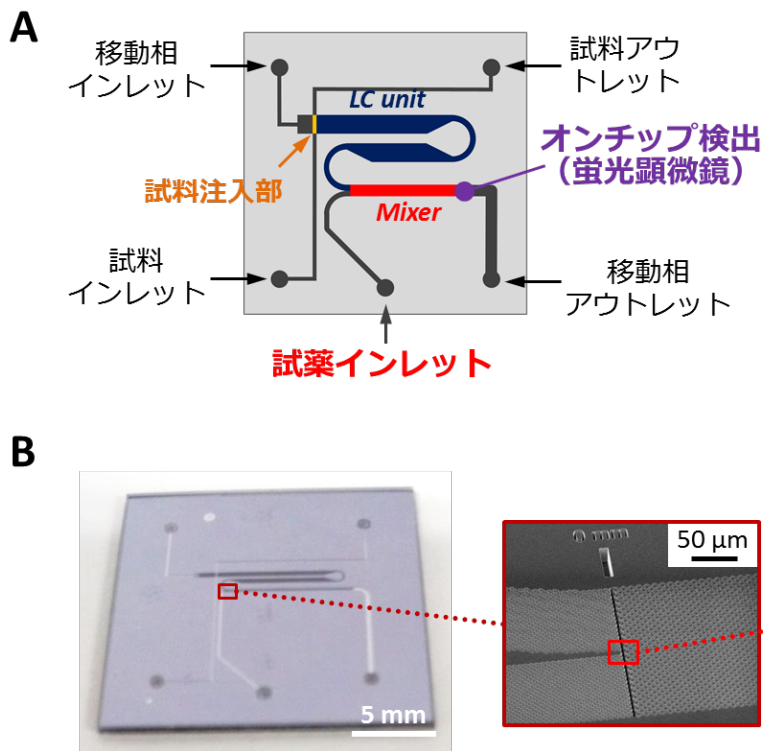


図 5.7. LC ユニットとしてピラーアレイカラムを、ポストカラム誘導体化ユニットとしてピラーアレイミキサーを搭載したデバイス. (A) デバイス設計の概観図. (B) 実際に作製したデバイスの写真と、電子顕微鏡像. この図におけるミキサー流路中のピラーのサイズは 5  $\mu\text{m}$ .



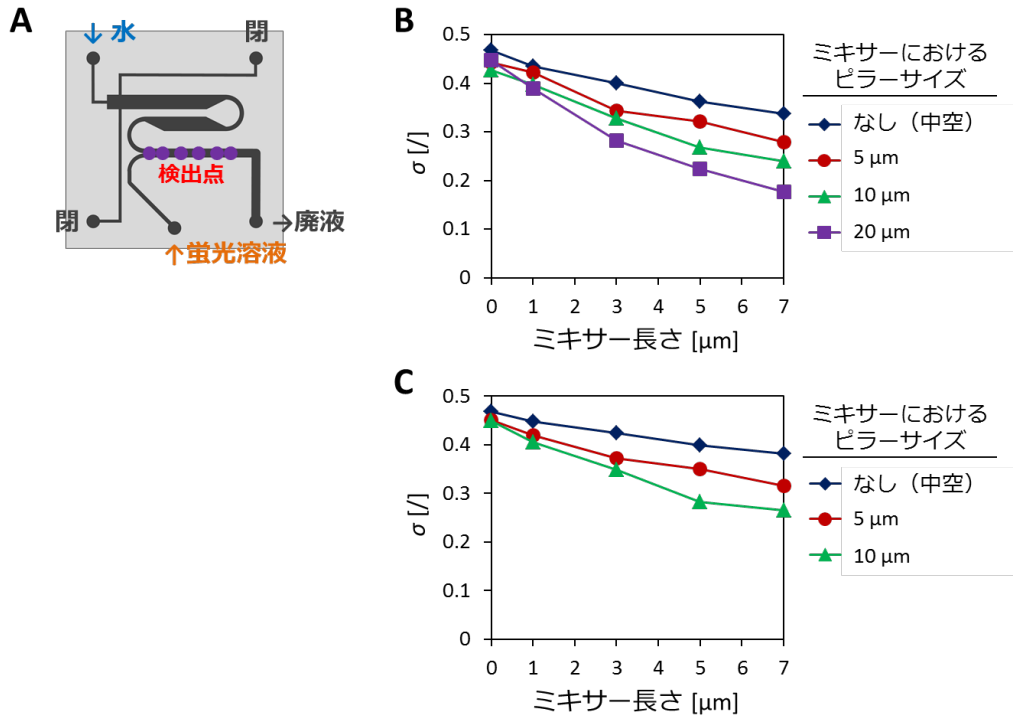


図5.8. 作製したマイクロ流体デバイスを用いたミキサー構造における流れの垂直方向の溶液混合の評価。(A) 実験条件の概要。蛍光溶液：2.5  $\mu\text{M}$  fluorescein aq. 水と蛍光溶液の流速をそれぞれ(B) 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , (C) 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  となるように設定した際のミキサー長さに対する $\sigma$ のプロット。

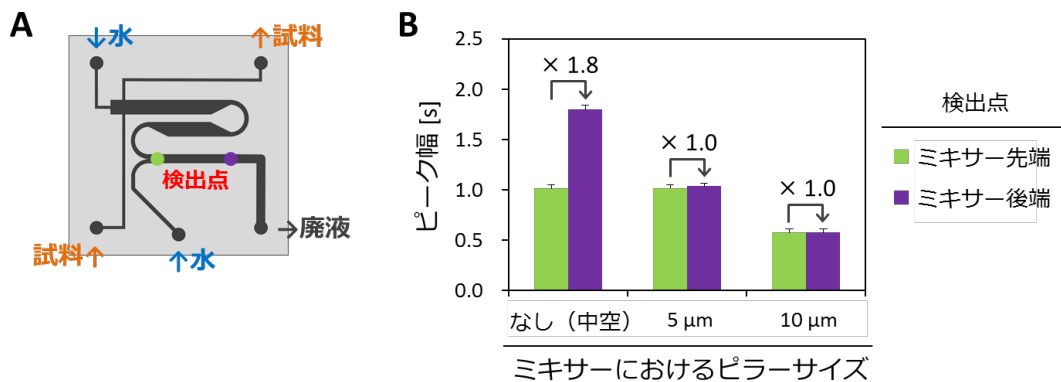
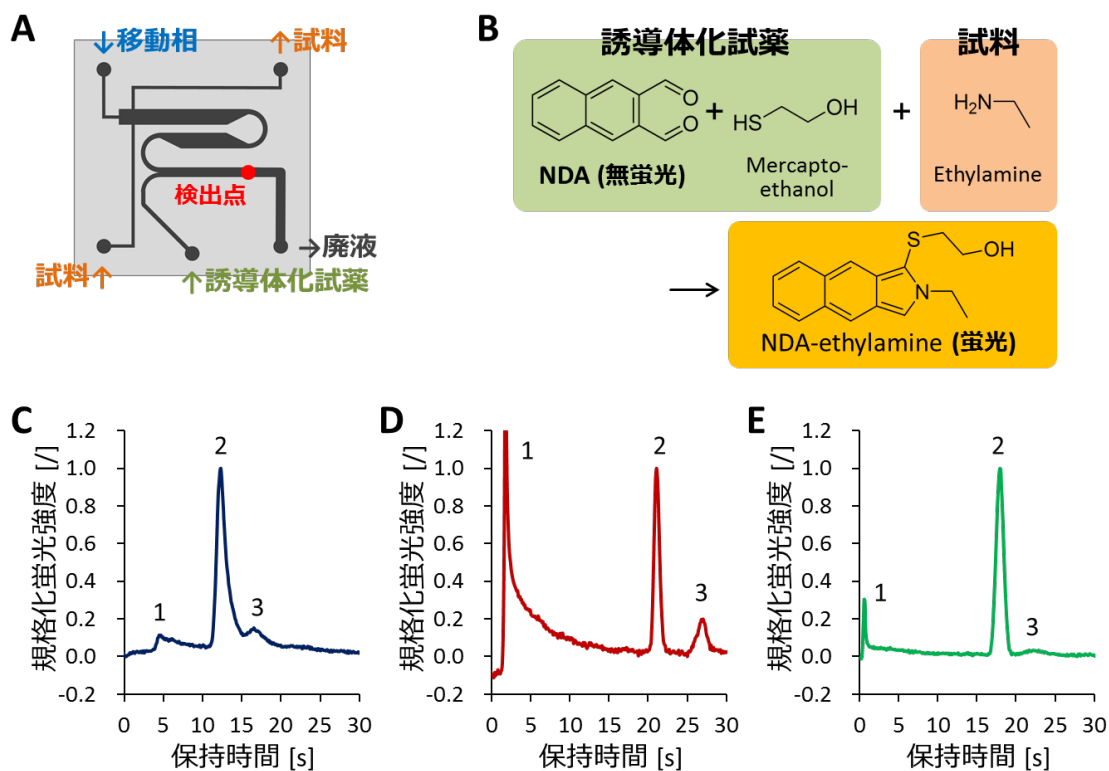


図5.9. 作製したマイクロ流体デバイスを用いたミキサー構造における流れ方向の試料拡散の評価。(A) 実験条件の概要。試料：100  $\mu\text{M}$  fluorescein in water/methanol (98/2, v/v). 流速：2つのインレットそれぞれにおいて、1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ . (B) ミキサー構造間でのピーク幅の比較。図中の数字は、ミキサー構造の通過に伴うピーク幅の増加率を示す。



**図 5.10. 作製したマイクロ流体デバイスを用いた試料成分のオンチップ分離 - 発蛍光誘導体化 - 蛍光検出.** (A) 実験条件の概要. 移動相: acetonitrile / 10 mM sodium acetate solution = 90/10 (v/v). 移動相流量: 0.5 μL/min. 試料: 5 μM fluorescein + 50 mM ethylamine in mobile phase. 誘導体化試薬: 5 mM NDA + 50 mM mercaptoethanol in acetonitrile / 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) = 50/50 (v/v). 試薬流量: 0.5 μL/min. (B) NDA と ethylamine の反応. Fluorescein は NDA と反応しない. (C) 中空流路と, (D) 5 μm ピラー, (E) 10 μm ピラーを有するピラーアレイミキサーを搭載したデバイスで得られたクロマトグラム. ピーク: 1, injection shock; 2, fluorescein; 3, NDA-ethylamine. 注入された試料料を補正するために, fluorescein のピーク高さが 1 となるように蛍光強度を規格化した.

## 5.6. 引用文献

- (1) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed. ed.; Wiley, 2009, p 160.
- (2) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed. ed.; Wiley, 2009, p 194-196.
- (3) Aoyama, C.; Saeki, A.; Noguchi, M.; Shirasaki, Y.; Shoji, S.; Funatsu, T.; Mizuno, J.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1420-1426.
- (4) Isokawa, M.; Takatsuki, K.; Song, Y.; Shih, K.; Nakanishi, K.; Xie, Z.; Yoon, D. H.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6485-6491.
- (5) Song, Y.; Noguchi, M.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4739-4745.
- (6) Song, Y.; Takatsuki, K.; Isokawa, M.; Sekiguchi, T.; Mizuno, J.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7993-7999.
- (7) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Amino Acids* **2016**, *48*, 1731-1735.
- (8) Song, Y.; Takatsuki, K.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 111-116.
- (9) Effenhauser, C. S.; Bruin, G. J.; Paulus, A. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2203-2213.
- (10) Fluri, K.; Fitzpatrick, G.; Chiem, N.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4285-4290.
- (11) Li, M. W.; Martin, R. S. *Analyst* **2008**, *133*, 1358.
- (12) De Bruyne, S.; De Malsche, W.; Deridder, S.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2947-2954.
- (13) Hessel, V.; Löwe, H.; Schönfeld, F. *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 2479-2501.
- (14) Stroock, A. D.; Dertinger, S. K.; Ajdari, A.; Mezic, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. *Science* **2002**, *295*, 647-651.
- (15) Kanamori, T. *Master thesis*. The Univ. of Tokyo 2016.
- (16) Lan, K.; Jorgenson, J. W. *J Chromatogr A* **2001**, *915*, 1-13.
- (17) Wojdyr, M. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 1126-1128.
- (18) Smirnov, K. N.; Shpigun, O. A. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1375*, 27-32.
- (19) Isokawa, M.; Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Bioanalysis* **2014**, *6*, 2421-2439.
- (20) Periat, A.; Boccard, J.; Veuthey, J.-L.; Rudaz, S.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1312*, 49-57.
- (21) Callewaert, M.; Desmet, G.; Ottevaere, H.; De Malsche, W. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 75-84.
- (22) Desmet, G.; Callewaert, M.; Ottevaere, H.; De Malsche, W. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7382-7388.

## 第 6 章 総括および今後の展望

### 6.1. 総括

本研究では「生体分子分析のためのマイクロ流体デバイスの開発」を目的とし、これを達成するために、1) 低拡散かつ低流路抵抗なターン構造を有するピラーアレイカラムの開発、2) 高極性官能基修飾ピラーアレイカラムの開発による親水性分子の HILIC 分離、3) 誘導体化反応ユニットの開発による成分分離－誘導体化－検出の自動化、を行った。

1) については、第 2 章において、新規ターン構造として「ターンの流路幅を一定にしたまま、ピラーの密度を調節することで、ターン内外の移動相線速度分布を制御する」分布制御型ターンの開発について報告した<sup>1</sup>。ターンにおけるピラーの配置は、Hagen-Poiseuille 式に基づき理論的に算出した後、CFD 解析によるシミュレーションを用いて最適化した。分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを用いた検討により、このターン構造が、既に開発されていた等流路長ターンと同等に試料拡散を抑制することに加え、その流路抵抗を約 1/6 倍に低減することを示した。また、分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを蛍光誘導体化アミノ酸 5 種の分離に応用したところ、高流速条件においてその 24 秒以内の迅速分離が可能であった。これらの結果から、分布制御型ターンが低拡散かつ低流路抵抗なターン構造であることが示された。このターン構造はピラーアレイカラムの更なる流路の延長や、高流速の適用を可能にするという点で有用であるといえる。

2) については、生体分子分析に適した分離モードとして HILIC を採用し、ピラーアレイカラムを用いた生体チオールの HILIC 分離を行った。まず第 3 章では、汎用 LC カラムを用いて、生体チオールの HILIC 分離に適当な蛍光誘導体化試薬や HILIC 官能基の探索と、HILIC による生体試料中チオールの分析について報告した。はじめに、誘導体化したチオールの HILIC カラムにおける保持を確認することで、蛍光誘導体化試薬として SBD-F に加えて ABD-F が適しており、HILIC 官能基としてはスルホペタイン基やアミド基が適していることを明らかにした<sup>2</sup>。さらに、SBD-F とアミドカラムを用いてマウス血清中生体チオールの分析法を確立し<sup>3</sup>、これを用いてホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの分離分析が可能であることを報告した<sup>4</sup>。

続いて、第 4 章において、アミド修飾ピラーアレイカラムの開発と、これを用いた SBD-チオールの分離を報告した。まず、XPS 測定、水の接触角測定によって、ピラーアレイカラムの素材であるガラスとシリコンに対し得てアミド修飾反応が進行することを確認した。次に、実際にアミド修飾したピラーアレイカラムを用いて親水性蛍光色素を分離し、その保持挙動から HILIC 分離が行われていることを示した。さらに、このピラーアレイカラムを用いて、SBD-F で蛍光誘導体化した 6 種チオールの分離に成功した。以上の結果から、アミド修飾ピラーアレイカラムを利用することにより、生体分子の分離が可能になることが示された。

3) については、第 5 章において、LC 分離ユニットの下流で誘導体化反応を行うためのポスト

カラム誘導体化反応ユニットとして、ピラーアレイミキサーの構造最適化について報告した。ポストカラム誘導体化反応ユニットが満たすべき要件は、流れの垂直方向における溶液混合促進と、流れ方向の試料拡散抑制である。CFD 解析により、ピラーアレイミキサー（ピラーサイズ：5, 10, 20, 40  $\mu\text{m}$ ）が上記 2 要件を満たしうることを確認した。LC ユニットとしてピラーアレイカラムを、ポストカラム誘導体化反応ユニットとしてピラーアレイミキサーを搭載したマイクロ流体デバイスを作製し、ピラーアレイミキサー（ピラーサイズ：5, 10  $\mu\text{m}$ ）が実際に 2 要件を満たすことを示した。さらに、ピラーサイズが 5  $\mu\text{m}$  のデバイスを用いて、ethylamine の fluorescein からの分離、NDA による発蛍光誘導体化、蛍光顕微鏡によるオンチップ検出を、良好に達成した。ポストカラム誘導体化反応ユニットに適した構造として、ピラーサイズを 5  $\mu\text{m}$  に最適化したピラーアレイミキサーを開発したことで、試料成分のオンチップ分離-誘導体化-検出が可能になった。

## 6.2. 今後の展望

今後は、より長い分離流路を有するピラーアレイカラムの作製、ピラーアレイカラムの表面修飾官能基の変更による分離対象分子の拡大、試料前処理ユニットの開発、検出ユニットとしての MS の採用、マイクロ流体デバイス进行操作するための周辺装置の小型化等を行っていききたい。

ピラーアレイカラムを用いた成分分離ユニットについては、まず、低流路抵抗という特性を有する分布制御型ターンを導入して、より長い分離流路の作製を行う。本研究で用いたピラーアレイカラムの分離流路長（カラム長）は 27 mm と 110 mm のものであったが、汎用 LC カラムは 15-25 cm であり、プロテオミクスに用いられるキャピラリーカラムには 2 m 超の長さを有すものもある<sup>5</sup>。分析対象分子を限定した場合には 15, 25 cm 程度のカラム長を有するピラーアレイカラムを作製し、生体分子分析に高流速を適用することで、その高速分離を試みたい。また、分離流路長が 3 m のピラーアレイカラム（狭幅ターンを搭載）は既に報告されているものの、流路抵抗が高く扱いが難しいと考えられる（移動相線速度 3 mm/s において、背圧は 16 MPa）<sup>6</sup>。そこで、ターン構造として分布制御型ターンを採用することで、流路抵抗が小さく、分離能力の高いメートル長ピラーアレイカラムを作製し、オミクス解析への応用を行いたい。

これに加えて、ピラーアレイカラムについては、その表面修飾を C18 基、アミド基以外の官能基でも行うことで分析対象分子を拡大していく。例えば、C4 修飾によりタンパク質の疎水性相互作用クロマトグラフィーによる分離が<sup>7</sup>、キラル修飾により光学異性体の分離が達成されると考えられる<sup>8</sup>。RPLC や HILIC に加えて、これらの分離モードが利用可能になった後には、オンチップ 2 次元クロマトグラフィーの開発も検討していききたい。

LC ユニットの搭載したマイクロ流体デバイスの試料前処理ユニットとしては、試料濃縮ユニットが既に報告されている<sup>9</sup>。この研究では、固相抽出による試料濃縮ユニットと、粒子充填型の LC ユニットの組み合わせたマイクロ流体デバイスが報告されている。この報告に基づいて試料濃縮ユニットを開発することで、生体試料中の微量成分の分析が可能になると考えられる。また、固相抽出に分子選択性を持たせることで、ある程度は濃縮対象を選ぶことが可能になると考えら

れる（例えば、陰イオン交換樹脂をユニットに充填することで、陰イオンのみが濃縮される）。この固相抽出による試料濃縮ユニット、ピラーアレイカラム（成分分離ユニット）、ピラーアレイミキサー（ポストカラム誘導体化反応ユニット）を統合したマイクロ流体デバイスを開発し、生体試料中の微量生体分子の濃縮－成分分離－誘導体化－検出の自動化を達成したい。

本研究では、高感度な検出を可能にするために検出ユニットとして蛍光顕微鏡を用いた。上述のように将来的にオミクス解析を行う場合には、MS を検出ユニットとして採用する必要がある。このためには、マイクロ流体デバイス上に MS のイオン化部との接続に適したインターフェースを作製しなければならない。既に、粒子充填型 LC ユニットの有するデバイスにおいてこのインターフェースが開発されていることから<sup>9</sup>、この技術を参考にしてメートル長ピラーアレイカラムと MS インターフェースを搭載したデバイスを開発したい。

最後に、point-of-care 診断を念頭に、一般の医療機関において生体試料の分析を行っていくためには、マイクロ流体デバイスそのものの開発だけでなく、その周辺装置の小型化や自動化を進める必要がある。現状では、周辺装置が比較的大型であり（汎用 LC の装置や、蛍光顕微鏡を用いている）、操作の全自動化も達成されていない。これら周辺装置の小型化、操作の自動化について、工学系の研究室や企業との共同研究を通して進めていきたい。

### 6.3. 引用文献

- (1) Isokawa, M.; Takatsuki, K.; Song, Y.; Shih, K.; Nakanishi, K.; Xie, Z.; Yoon, D. H.; Sekiguchi, T.; Funatsu, T.; Shoji, S.; Tsunoda, M. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6485-6491.
- (2) Isokawa, M.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2014**, *35*, 169-172.
- (3) Isokawa, M.; Shimosawa, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1019*, 59-65.
- (4) Isokawa, M.; Kobayashi, K.; Miyoshi, Y.; Mita, M.; Funatsu, T.; Hamase, K.; Tsunoda, M. *Chromatography* **2016**, *37*, 147-151.
- (5) Horie, K.; Kamakura, T.; Ikegami, T.; Wakabayashi, M.; Kato, T.; Tanaka, N.; Ishihama, Y. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3817-3824.
- (6) De Malsche, W.; Op De Beeck, J.; De Bruyne, S.; Gardeniers, H.; Desmet, G. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1214-1219.
- (7) Baca, M.; De Vos, J.; Bruylants, G.; Bartik, K.; Liu, X.; Cook, K.; Eeltink, S. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1032*, 182-188.
- (8) Hamase, K.; Nakauchi, Y.; Miyoshi, Y.; Koga, R.; Kusano, N.; Onigahara, H.; Naraoka, H.; Mita, H.; Kadota, Y.; Nishio, Y.; Mita, M.; Lindner, W. *Chromatography* **2014**, *35*, 103-110.
- (9) Yin, H.; Killeen, K.; Brennen, R.; Sobek, D.; Werlich, M.; van de Goor, T. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 527-533.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，多大なる御指導，御鞭撻を賜りました，東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の船津高志教授に，謹んで感謝致します。

懇切なる御指導，御助言を賜りました，東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の角田誠准教授に，謹んで感謝致します。

ピラーアレイカラムの設計と作製，数値流体力学解析を行って頂くと共に，本研究に貴重な御指導，御助言を頂きました，早稲田大学理工学術院基幹理工学研究科の庄子習一教授，尹棟鉉氏，中西完貴氏，高月克也氏，笠原崇史氏，施凱齡氏，高野正範氏，山崎颯氏，菅谷拓央氏，並びに早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の関口哲志教授に心より感謝致します。

実験試料を供与，実験機器を貸与して頂くと共に，本研究に貴重な御助言を頂きました，九州大学大学院薬学研究院創薬育薬産学官連携分野の濱瀬健司教授，小林健太郎氏，国際医療福祉大学三田病院臨床検査科の下澤達雄教授，株式会社資生堂の三次百合香氏，三田真史氏，並びに味の素株式会社の宮野博氏，中山聡氏，山田尚之氏，岩畑大悟氏，水越利巳氏，野村健三氏，上林弥生氏に心より感謝致します。

実験方法や機器操作法など，多くの的確な御助言を頂いた，宋彦廷氏に深く感謝致します。

本研究に関して，御指導，御助言を頂きました，東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の皆様に感謝致します。

最後に，ここまでの歩みを支えてくださった，家族をはじめ多くのお世話になった方々に感謝致します。

2018年 1月  
東京大学大学院薬学系研究科  
生体分析化学教室  
磯川 宗生