

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

【序論】

生命現象や病態の詳細な解析を行うためには、代謝や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おり、現在ではそのための分析を臨床現場で行う **point-of-care** 診断が推進されている。一般の医療機関における生体試料分析を実現するためには、分析法の必要試料量の低減による疾病診断法や検査法の低侵襲化を図りつつ、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。

これらの要請に応える新たな分析機器として、近年、 μm オーダーの流路や構造を有するチップである、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。チップ上に作製した微小流路を、成分分離、誘導体化等の分析操作の場（ユニット）として利用することで、分析機器としての使用が可能となる。マイクロ流体デバイスを分析に用いる利点として、ユニットの小型化による試料量や試薬量の低減、ユニットの高性能化による分析の高速化、複数ユニットをチップ 1 枚に集積化することによる分析の自動化が挙げられる。これらの特徴は、**point-of-care** 診断等で行われる分析の要請に一致しており、試料前処理、分離、誘導体化、検出等のユニットを統合したマイクロ流体デバイスの開発が切望されている。そこで本研究では、図 1 に示したような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指して、1) 分離ユニットの高性能化と、2) 誘導体化反応ユニットの開発を行った。

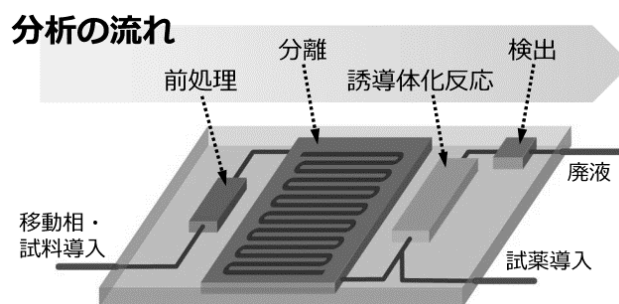


図 1. 生体分子分析のためのマイクロ流体デバイス

【本論】

1. 分離ユニットの高性能化：ピラーアレイカラムの性能向上

本研究では、分離ユニットとしてピラーアレイカラムを採用した。ピラーアレイカラムは「 μm サイズの柱（ピラー）が規則的に並んだ流路（図 2A）」を分離流路として用いる液体クロマトグラフィー(LC)ユニットであり、その内部構造の均一性から、汎用 LC カラムを超える分離効率を

有す. しながらピラーアレイカラムは, 1) 分離流路長が短く相互作用面積が小さいこと, 2) 表面を疎水性修飾して逆相 LC (RPLC)が行われてきたことから, 極性の高い生体分子の保持や分離が難しいという問題を有していたため, 本研究においてその解決を図った.

1.1. 低拡散かつ低流路抵抗なターン構造の開発: 分布制御型ターン

限られた大きさのチップ上により長い分離流路を作製するためには, ターン構造が必須となる. 単純なターン構造で起こる大きな試料拡散 (図 2B) を抑制するために, これまでに, 低拡散なターン構造として, ターンの内外で流路長を等しくした等流路長ターン (図 2C) が開発された. しかし, このターンは流路幅が狭く流路抵抗が大きいので, 高流速を適用した高速分離が困難であるという問題があった. そこで本研究では, 「低拡散かつ低流路抵抗な」性質を有する新規ターン構造の開発を行った.

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, ピラーの密度を調整することで, ターン内外の移動相線速度分布を制御する」分布制御型ターン (図 2D) の開発を行った. ターンにおけるピラーの配置は, 理論式に基づき算出した後, 数値流体力学解析により最適化した. 次に, 半導体微細加工技術によりデバイスを作製し (図 2A), 流路表面を C18 基で修飾したものを分離実験に用いた. RPLC 条件での疎水性蛍光色素の分離実験から, 分布制御型ターンは低拡散 (等流路長ターンと同等) であることが示された (図 2E). また, 背圧測定の結果から, 分布制御型ターンは低流路抵抗 (等流路長ターンの 1/6) であることが確認された. 最後に蛍光誘導体化アミノ酸 5 種の分析を試みた. 分布制御型ターンは低流路抵抗であることから高流速を適用できたため, その 24 秒以内の迅速分離を達成した (図 2F). 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開発に成功し, このターンを LC ユニットに導入したことにより高流速での成分分離が可能になったといえる[1].

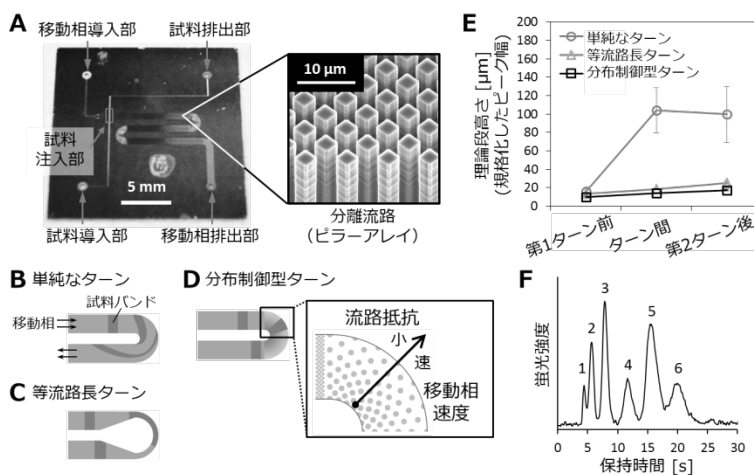


図 2. A) 分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムの概観. B) 単純なターン, C) 等流路長ターン, D) 分布制御型ターンのコンセプト. E) 様々な検出点における試料ピークの理論段高さ (規格化したピーク幅). F) 蛍光誘導体化アミノ酸の分離. Peaks: fluorescent derivatives of 1, water; 2, proline; 3, valine; 4, 6-amino-caproic acid; 5, leucine; and 6, phenylalanine.

1.2. 生体低分子の保持に適した流路表面修飾: アミド修飾ピラーアレイカラムの開発

高極性化合物に対する保持が強い分離モードとして, 高極性官能基で修飾した固定相を用いる

親水性相互作用 LC (HILIC)が挙げられる[2]. 本研究では、高極性生体分子の HILIC 分離を行うために、流路を高極性官能基で修飾したピラーレイカラムの開発を行い、生体チオール[3]の分離を試みた。

はじめに、ピラーレイカラムで HILIC を試みる前の予備検討として、汎用 LC カラムを用いて生体チオールの HILIC 分離に適した蛍光誘導体化試薬, 固定相官能基, 分離条件を検討した[4-8]. その結果, 誘導体化試薬として ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid (SBD-F)と 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F)が, 固定相官能基としてスルホベタイン基とアミド基が適していることを明らかにした。

続いて、ピラーレイカラムにおいて生体チオールの HILIC 分離を試みた。誘導体化試薬として SBD-F を、表面修飾官能基としてアミド基を採用した。まず、ピラーレイカラムの素材であるガラスやシリコンの平板に対して、3-(methacryloyloxy)propyltrimethoxysilane 処理とアクリルアミド重合反応によりアミド修飾反応を行った。X 線光電子分光(XPS)測定と水の接触角測定の結果, N 元素の存在と表面親水化が確認されたことから(図 3A, B), 平板表面のアミド化が確認された。続いて、ピラーレイカラムをアミド修飾し、高極性蛍光色素の分離を行ったところ、無修飾のものに比べて 3 倍程度の保持の向上が認められた。最後に、SBD-チオール 6 種の分離を試み、実際に分離が達成されることを示した(図 3C)。以上の結果から、アミド修飾により、ピラーレイカラムにおける高極性化合物の保持向上が達成され、生体分子の分離が可能になったといえる。

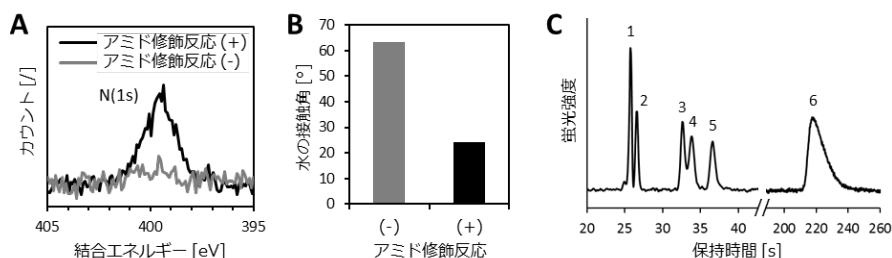


図 3. アミド修飾反応の有無が A) ガラス平板の XPS 分析結果 (N 元素 1s 軌道電子の結合エネルギー範囲), B) シリコン平板の水の接触角に与える影響. C) アミド修飾ピラーレイカラムによる SBD-チオールの分離. Peaks: SBD-derivatives of 1, *N*-(2-mercaptopropionyl)glycine; 2, *N*-acetylcysteine; 3, cysteine; 4, homocysteine; 5, cysteinylglycine; and 6, glutathione.

2. 誘導体化反応ユニットの開発 : ピラーレイミキサーの開発

生体試料中に微量に存在する生体分子を分析するためには、その誘導体化により検出感度を向上させる必要がある。Point-of-care 診断等への応用を考えると、この誘導体化反応や成分分離を 1 枚のチップ上で行うことが望ましい。そこで、成分分離後に誘導体化を行うためのポストカラム誘導体化反応ユニットを開発し、マイクロ流体デバイスに搭載することで、試料成分の分離—誘導体化—検出の自動化を図った。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し、かつ 2) 流れ方向の混合を抑制することである(図 4A)。既に所属研究室において、ピラーレイ構造(ピラーサイズ: 10 μm のみ検討)が上述の 2 つの要件を満たすことが明らかになっていた。

本研究では、ピラーレイミキサーのピラーサイズが上記要件に与える影響を定量的に評価することで、ピラーサイズの最適化を行った。はじめに、数値流体力学解析により、ピラーサイズ

は 5, 10, 20 μm が適していることを明らかにした. 次に, LC ユニットとミキサーユニットを搭載したデバイス (図 4B) を作製した. 蛍光色素を用いて溶液混合実験, 試料拡散実験を行ったところ, ピラーアレイミキサー (ピラーサイズ: 5, 10 μm) は中空流路と比較して溶液混合効率が高く (図 4C, 要件 1), 試料拡散がほとんどない (図 4D, 要件 2) ことが示された. 最後に, フルオレセインとエチルアミンの混合試料の分析を試みた. 5 μm のピラーを有するミキサーにおいて, もともと無蛍光だったエチルアミンが誘導体化され蛍光を発したことにより良好に検出され, かつフルオレセインと分離されていた (図 4E). 以上の結果から, ピラーアレイミキサーのピラーサイズは 5 μm が適切であり, 開発したデバイスを用いて分離-誘導体化-検出の自動化が可能になることが実証された.

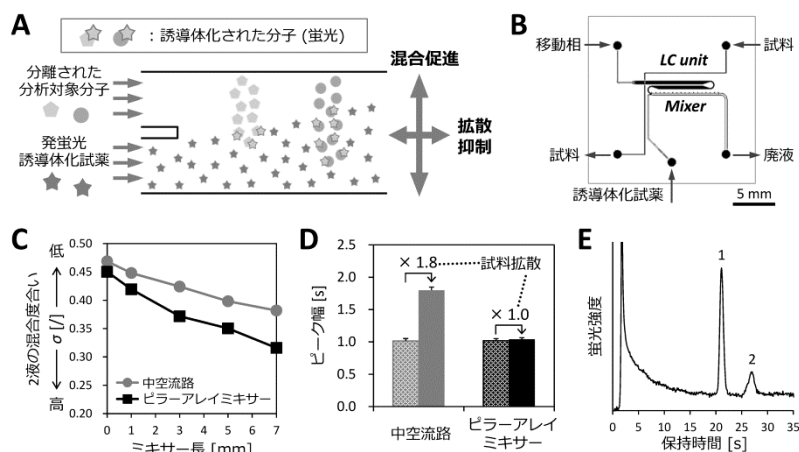


図 4. A) ポストカラムミキサーのコンセプト. B) 作製したデバイスの流路図. C) ミキサーにおける溶液混合効率. σ が小さいほど 2 液の混合が進んでいることを表す. D) ミキサー通過前後の試料ピーク幅の変化. Detection points: meshed bars, tip of mixer; and filled bars, end of mixer. E) 蛍光色素とエチルアミンのオンチップ分離-誘導体化-検出. Peaks: 1, fluorescein; and 2, ethylamine derivatized with fluorogenic reagent. (C-E) ピラーアレイミキサーの結果は, ピラーサイズが 5 μm のミキサーのものを示した.

【結論】

本研究では, マイクロ流体デバイスの 1) LC ユニットについて分布制御型ターンと流路表面のアミド修飾法を開発し, 2) 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した. 開発した機能ユニットを組み合わせることで, 生体分子分析の自動化, 高速化が可能になると考えられる. 今後は, 試料前処理ユニットとして試料濃縮ユニットの開発を行い, 生体試料中の微量成分の高感度分析を実現したい. また, 一般の医療機関における生体分子分析の実現を目指し, マイクロ流体デバイスを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.

【引用文献】

- [1] M. Isokawa, K. Takatsuki, Y. Song, K. Shih, K. Nakanishi, Z. Xie, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Funatsu, S. Shoji, and M. Tsunoda, *Anal. Chem.* **88**, 6485-6491 (2016); [2] M. Isokawa, T. Kanamori, T. Funatsu, and M. Tsunoda, *Bioanalysis* **6**, 2421-2439 (2014); [3] M. Isokawa, T. Kanamori, T. Funatsu, and M. Tsunoda, *J. Chromatogr. B* **964**, 103-115 (2014); [4] M. Isokawa, T. Funatsu, and M. Tsunoda, *Analyst* **138**, 3802-3808 (2013); [5] M. Isokawa, T. Funatsu, and M. Tsunoda, *Chromatographia* **77**, 1553-1556 (2014); [6] M. Isokawa, T. Funatsu, and M. Tsunoda, *Chromatography* **35**, 169-172 (2014); [7] M. Isokawa, T. Shimosawa, T. Funatsu, and M. Tsunoda, *J. Chromatogr. B* **1019**, 59-65 (2016); [8] M. Isokawa, K. Kobayashi, Y. Miyoshi, M. Mita, T. Funatsu, K. Hamase, and M. Tsunoda, *Chromatography* **37**, 147-151 (2016)