

生体試料の微量分析前処理のためのシリカモノリス担体の開発  
(Development of the monolithic silica carrier for microanalysis of biological samples)

2021 年 3 月

山口大学大学院創成科学研究科

太田 茂徳

## 目次

学位論文要旨	1
第1章 緒論	5
第2章 生体試料前処理用のシリカモノリスピンカラムの作製	
2-1 イオン交換基修飾シリカモノリスピンカラムの作製と生体試料の前処理	13
2-2 血液からの薬物抽出に適したモノスピカラムの開発と中毒事例への応用	23
第3章 微量前処理用固相抽出チップの作製	
3-1 トリプシンモノリスチップの作製とタンパク質の迅速消化への適応	34
3-2 親水性基を導入したシリカモノリスチップの作製と、糖鎖精製への適応	48
第4章 親水性ポリマー修飾モノリスの調製とアフィニティ担体への応用	
4-1 親水性ポリマー修飾モノリスディスクの作製及びタンパク質に対する非特異吸着	60
4-2 親水性ポリマー修飾モノリスディスクへの Protein A の固定化及び抗体の回収	71
4-3 親水性ポリマー修飾モノリスディスクへのトリプシンの固定化及びタンパク質の迅速消化	80
4-4 親水性ポリマー修飾モノリスディスクへのボロン酸の固定化及びカテコールアミンの回収	89
第5章 Protein A 固定化シリカモノリスを利用した多検体前処理用システムの開発	
5-1 96 ウェルプレートへのシリカモノリスの固定化及び特性解析	100
5-2 迅速抗体精製システムの構築	105
5-3 96 ウェルプレートシリカモノリスへの抗体の固定化及び免疫沈降への応用	116
総括	121
略語表	123
発表論文リスト	126
謝辞	

# 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目  
(Dissertation Title)

生体試料の微量分析前処理のためのシリカモノリス担体の開発

氏 名 (Name)

太田 茂徳

生体試料中の分析では、試料マトリクスに応じた適切な前処理が必要となる。近年は、質量分析計等分析機器の感度向上に伴い、試料の前処理において、より簡便な前処理を採用するケースが増えている。また、クロマトグラフィーにおける分析時間の短縮に伴い、前処理に対しても迅速性、微量、微小容量、多検体サンプルへの適応といった、新しいニーズが増えている。これらのニーズに対応した前処理担体を開発するためには材料の選択と形状の最適化が重要である。固相抽出をはじめとする前処理用カラムの担体を選択する際、スチレン系の合成ポリマー、シリカ等の無機担体、アガロースゲルなどの天然高分子が挙げられる。いずれの担体においても、使用時にはカラム等のハウジングへの充填作業が必要であるが、特に微小スケールのカラムを作製しようとした場合において、担体を均一にハウジングへ充填することは非常に困難な作業であり、再現性良くカラムを作製することは難しい。また微小容量カラムの場合において、使用するフリットの体積は、カラム内部体積に占める割合に対して大きくなる傾向にあり、デットボリュームが大きくなる為、高性能化を行うことは非常に困難な作業であった。本研究では、生体試料の前処理用担体としてシリカモノリスに着目し、微量生体試料の前処理に適切なデバイスの開発を目指し、ディスク型に成形したシリカモノリスを各種前処理に適応するための化学処理及び特性解析を行った。更に、開発したシリカモノリスデバイスの性能を引き出すことが可能な自動分抽システムを構築し、超高速試料前処理手法の提案を行った。

最初に1章では、緒論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

第2章では、生体試料中の医薬品の回収を迅速に行うためのシリカモノリスの構造体の最適化、各種官能基の導入の検討を行った。シリカモノリスの構造は、低分子医薬品向けに適したスルーポア、メソポアの設計を行った。スピнкаラムへのディスクの設置、実際の使用時の遠心力の最適化を行った。試料による目詰まりが懸念される血清、全血からの回収手法についてまとめ、迅速試料前処理法を考案した。

第3章では、モノリスディスクをスピнкаラム以外のデバイスに固定し、より微量なサンプルの前処理に適応することを検討した。ピペットチップの先端にシリカモノリスを固定化、各種化学修飾を行うことで、微量サンプルの前処理が可能になった。トリプシンを固定化することにより、ピペッティング作業によりタンパク質を消化するデバイスを開発した。その際、スルーポアを最適化することで、スムーズな溶液の通過が可能になった。またNHS 活性基を導入することで、アミノ基を有するリガンドをピペッティングにより固定化が可能になるアフィニティデバイスの作製も行った。使用しているゲルの担体量としては2  $\mu\text{L}$  であり、微量、微小容量のアフィニティデバイスを作製することが可能になった。

第4章では、3章で作製したアフィニティデバイスの作製において、使用したシリカモノリスの表面を親水性ポリマーで被覆することで、対象成分以外の非特異吸着の軽減を試みた。各種親水性ポリマーの配合を検討することで、非特異吸着の軽減を行うことができ、対象成分に対して選択なアフィニティ

担体の作製を行うことができた。また、対象成分が抗体のようなタンパク質に適したゲルの設計を行い、回収量の増加も検討、実現した。

第5章では作製したシリカモノリスディスクを96ウェルプレートへ導入し、全自動分抽装置による抗体の迅速精製デバイスを開発した。サンプルの処理においては、既存の装置において60分以上要する工程に対して、開発したデバイスでは15分で作業を実施することができた。

最後に結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。

# 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目  
(Dissertation Title)

Development of the monolithic silica carrier for microanalysis of biological samples

氏 名(Name)

Shigenori OTA

Analysis in a biological sample requires appropriate pretreatment according to the sample matrix. In recent years, the sensitivity of analytical instruments has improved. As a result, there are an increasing number of cases where simple pretreatment is adopted.

In addition, as a result of shortening the analysis time in chromatography, new needs such as quickness for pretreatment, small amount, small volume, and adaptation to a large number of samples are increasing. For the column for solid-phase extraction, a styrene-based synthetic polymer, an inorganic carrier such as silica, or a natural polymer such as agarose gel is used. However, it is difficult to uniformly fill the small column with a particle carrier to prepare a column with reproducibility. In this research, we focused on silica monolith as a carrier for pretreatment of biological samples, developed a device suitable for pretreatment of trace biological samples, and chemically treated silica monolith molded into a disk shape for various pretreatments.

First, in Chapter 1, the background and purpose of this research were described as an introduction, and the structure of the paper was shown.

In Chapter 2, the optimization of the silica monolith structure and the modification method of various functional groups were investigated in order to quickly recover the drug in the biological sample. For the structure of the silica monolith, we designed through-pores and mesopores suitable for small molecule drugs. The disc was fixed to the spin column and the centrifugal force during actual use was optimized. We devised a method for recovering serum and whole blood that causes column clogging, and a rapid sample pretreatment method for highly viscous serum and whole blood.

In Chapter 3, I developed a pretreatment tool for trace samples by a monolith disc fixed on the pipette tip with various chemical modifications. I have developed a device that digests proteins by pipetting by immobilized trypsin. The size of the through pores has been optimized to allow smooth passage of the solution. An affinity device with an amino group or immobilization of a ligand by pipetting was produced. The volume of carrier used in the gel was 2  $\mu$ L, and it means possibility to produce a small amount and minute volume of affinity device.

In Chapter 4, we developed an affinity device with reduced nonspecific adsorption by coating the surface of the silica monolith with a hydrophilic polymer. By examining the formulation of various hydrophilic polymers, non-specific adsorption was reduced, and it was possible to develop an

affinity carrier suitable for treatment with a small amount of sample. We designed a gel suitable for proteins and realized an increase in recovery.

In Chapter 5, the prepared silica monolith disk was immobilized on a 96-well plate, and a rapid antibody purification system using an automatic extraction device was developed. The new system could complete the process within 15 minutes that the current previous system needs over 60 minutes.

Finally, in conclusion, the findings obtained from this research were summarized, and future prospects and issues were described.

## 第1章 緒論

生体試料の分析では、試料マトリクスに応じた適切な前処理が必要となる。近年は、検出器、特に質量分析計の分析感度の向上に伴い、試料前処理に対するユーザーの要望も変化している。有機溶媒を適量添加することによる簡便な除タンパク法の採用[1-3]や、固相抽出においても、ターゲット化合物を固相充填剤へ吸着後に、溶出する手法ではなく、ターゲット化合物を素通りさせる、クリーンナップによる処理を採用するケースも増えている[4、5]。また、クロマトグラフィーにおける分析時間の短縮に伴い、前処理に対しても迅速性、微量、微小容量、多検体サンプルへの適応といった、新しい要望を受けるケースが増えている[6-8]。本研究では、これら新しいニーズに対応する新たな固相、分析カラムの開発を目的とした。

液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにおいて、対象成分に対して特異的に親和性を有するリガンドを化学修飾した担体はアフィニティクロマトグラフィーと呼ばれ、幅広い分野において活用されている[9-11]。タンパク質間の相互作用を利用したタンパク質の分離精製だけではなく、近年では、高感度分析が必要な微量分析の分野においてもアフィニティクロマトグラフィーは利用されている。質量分析計を用いた分析において、サンプルマトリクス中の成分がターゲット物質とカラムから共溶出することにより、異常感度を起こしてしまうイオンサプレッションが、分析精度に影響を与えることが報告されている。イオンサプレッションを軽減する方法としては、通常分析に用いられる C18 分析用カラムとは異なる保持機構による前処理、例えばイオン交換基が修飾された担体やアフィニティ担体により対象成分のみを選択的に回収、精製する必要がある。例えば、発がん性物質であるアフラトキシンの食品分析において、試料中のアフラトキシンを選択的に保持、精製することが可能なイムノアフィニティーカラムが前処理に使用されている[12、13]。C18 等の逆相とイオン交換の混合型固相による前処理法も報告されているが、加工食品等マトリクスの複雑なサンプルから夾雑成分を排除することは困難である。イムノアフィニティーカラムを用いることで、試料中の夾雑成分を効果的に除去することができ、高精度に分析を行うことが可能になる。

プロテオミクスの分野においては、数十万を超えるバリエーション、濃度も数百万の範囲で異なるタンパク質やペプチドの中から、分析対象となるリン酸化あるいは糖化されたペプチドを回収し、分析を行う必要がある[14、15]。リン酸化ペプチドや糖化ペプチドはイオン化効率が低い為、他のペプチドが共存する場合には、夾雑ペプチドが優先的にイオン化を起こしてしまい、検出することが困難である。そのため、リン酸基に特異的に吸着が可能な二酸化チタン樹脂や、糖鎖に対して選択的なレクチンを固定化した樹脂を用いて精製することが報告されている[16]。目的成分に対して夾雑成分が 100 万倍以上存在する場合において、対象成分に対する選択性は限りなく高める必要がある。そのためには親和性を有するリガンド、もしくは母体に対する非特異的吸着を抑えることも重要である。リン酸化ペプチドの回収においても、アフィニティ担体として使用される二酸化チタンの充填剤は、リン酸基以外に、ペプチド鎖が有するカルボキシル基に対しても弱いながら親和性を有する。そのため、リン酸化ペプチドに対する選択性を向上させることを目的として、二酸化チタンの表面を、ヒドロキシ酸を有する化合物であらかじめマスクングする方法が報告されている

[17]。二酸化チタンに対しての親和性がカルボキシル基よりもヒドロキシ酸は強く、一方でリン酸基に対してよりは弱い。この特性を利用して、ヒドロキシ酸をコートした状態でサンプルをロードすると、親和性の強いリン酸基を有するペプチドのみが、二酸化チタン表面で置換され優先的に吸着するため、飛躍的に精製度を上げることが可能になる。このように、対象成分に対してより選択性を高め、吸着を可能にすることは、アフィニティクロマトグラフィーを成功するための重要な要素の一つである。

一方、アフィニティクロマトグラフィー用の担体の種類は、アガロースゲルなどの天然高分子、メタクリレートやスチレン系の合成高分子、シリカなどの無機担体が挙げられる。いずれの担体においても、使用時にはカラム等のハウジングへの充填作業が必要であるが、特に微小スケールのカラムを作製しようとした場合において、均一にハウジングへ担体を充填することは非常に困難な作業であり、再現性良くカラムを作製することは難しい。担体があらかじめ充填されたカラムを用いて、アフィニティカラムを作製することも可能であるが、カラム容積が小さい場合には注意が必要である。例えば使用するフリットの体積が、カラム内部体積に占める割合に対して大きくなる傾向にあり、結果としてデッドボリュームが大きくなり、高性能化を行うことが非常に困難な作業となる。

ポリマーやシリカを用いた多孔質体であるモノリス構造体は、フリットを用いることなくカラムを作製可能であるため、これまで様々な分野において使用されてきた[18-21]。フューズドシリカキャピラリー中でシリカモノリスを作製することで、キャピラリーLC用のカラムとして活用し、粒子充填タイプと比較し、低圧、高理論段数を有するカラムへの応用検討が行われている[22、23]。モノリスキャピラリーカラムは溶液の通過に対して高い透過性を有していることから、カラム長さが1mを超える分離用カラムの調製も可能である。キャピラリーLCと質量分析計とを組み合わせたワンショットプロテオミクスも広く使用されている[24]。通常長さ(例えばカラム長 150 mm)キャピラリーカラムではペプチド同定数が十分に得られないサンプルにおいても、長時間、カラム長さが長いカラムを使用することで、多くの同定数を得ることが可能になる[25、26]。その他、通常のロットタイプ(1~4.6 mm 内径)のモノリスを収縮チューブ等、熱収縮が可能なチューブで被覆しカラム化した、セミマイクロ分析用のカラムも販売されている。

メタクリレートやスチレンジビニルベンゼンを用いたポリマーモノリスは、酸及び、アルカリに対しての耐久性が高い。バイオ医薬品の製造でのCIP(cleaning-in-place(定置洗浄))においては、高濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いての洗浄が必要である。そのため、優れた耐アルカリ性を示すポリマーモノリスは一部のバイオ医薬品の製造に適した精製用カラムとして用いられている[27]。修飾官能基としては、モノリス作製時にエポキシ基を有するモノマーを導入したり、母体のモノリスを直接化学修飾することで、各種官能基に置換することもでき、様々なタンパク質を固定化したアフィニティ担体についても検討されている[27]。構造体としてはメソポアを有しないスルーポアによって形成された単一ポアによって形成されており、分離速度の律速である拡散の影響を小さくすることが可能である。対象成分に対しての有効表面積はスルーポアの大きさによって構成される。そのため、スルーポアが小さいモノリスほど、吸着容量は向上するが、通液時の通液圧力もそれに伴い増加してしまう問題点がある。その点を解決する方法としては、モノリスを円筒状に成形し、専用



の通液流路を設計することで、ラジアルフロー型のモノリスカラムも開発されている[28]。これにより、通液時の断面積を増大させることで、優れた通液性と負荷量を有するモノリスカラムの作製が可能になり、バイオ医薬品の大量精製に用いられている。一方で、微量サンプル処理用の小型カラムに対しては、専用の流路設計を行うことが難しい為、通常のディスクタイプのモノリスによるカラム設計が主であり、微量サンプルに対して、高速処理、低圧処理を実現することは困難である。

シリカモノリスは流体が流れるスルーポアと分離に関わるメソポアを独立に制御可能であるため、ポリマーモノリスに比べ担体の構造選択の自由度が高く、また単位表面積も大きい担体の構築が可能である。シリカモノリスへ形成可能なメソポアの大きさとしては数 nm から数百 nm まで構築することが可能である。

近年 100 MPa を超える高圧にも耐えうる HPLC 装置が販売され、使用するカラムに充填する粒子径も 2  $\mu\text{m}$  以下と、微粒子を充填したカラムを用いることで、超高分離能が達成されている[29]。微粒子を用いることで高分離能は得られるものの、粒子構造体に形成可能な穴の大きさは 30 nm 程度が限界であり、それ以上の穴のサイズを全多孔粒子で作製しようとした場合、粒子の機械的強度が保てない問題点がある。そのため、数百 nm の細孔を構造体にもつ粒子充填剤を調製し、高分離用充填カラムを作製することは非常に困難な作業である。その点シリカモノリスは、スルーポアを数ミクロンメートルに保ちつつ数十～数百 nm の穴を形成することができるため、巨大分子に対してのクロマトグラフィー担体を作製する母体として注目されている[30]。

一方でシリカモノリスは、担体がシリカゲルであるために特有の吸着性を示す。シラノールは陽イオン交換能を示し、シラノールが脱水縮合したシロキサンは弱い疎水性相互作用を示すため、巨大タンパク質をサンプルとして用いた際は、非特異吸着を起こしてしまう。また、酸には比較的安定だが、高塩濃度を含む溶液や、アルカリに対しての耐久性は低い[31、32]。

そのため、シリカモノリスをアフィニティ担体として用いる場合にはこの表面特性を改変し、非特異吸着を減らす、耐久性を向上させることが必須である。この点が改善可能であれば、シリカモノリスはアフィニティクロマトグラフィーにおいて有効な担体の一つとなりえる。

現状の知見では、様々な表面処理法によってシリカモノリス、もしくはポリマーモノリスをアフィニティ担体に用いる試みがされているが、その多くはメタクリレート等の有機ポリマーを用いたアフィニティ担体であり、シリカモノリスを利用し、幅広くタンパク質、リガンドに適応した報告は行われておらず、また製品化もされていない。効果的な処理法が見つかっていない点も原因として考えられる。

これまでに、シリカモノリスを様々な前処理へ適応する試みを行っており、ディスク型に使用したシリカモノリスを C18 修飾基で修飾することで、疎水性相互作用により対象成分を吸着させるスピナカラム (MonoSpin C18) について検討を行ってきた。容易かつ短時間に尿中の覚せい剤[33]、血清中の麻酔薬や血管収縮剤[34]、血清中の農薬とその代謝物の抽出[35]に応用してきた。また、二酸化チタンをシリカゲル表面にコートした MonoSpin TiO を用いて、尿中のリン酸含有アミノ酸除草剤の抽出[36]なども報告されている。一方で、HPLC 分析用カラムにおいて使用される充填剤の修飾基はオクタデシル基が大多数を占めているが、前処理に使用される固相抽出の製品ラインナップとしては、オクタデシル基の他、イオン交換、順相、アフィニティと様々な修飾基が施されてい

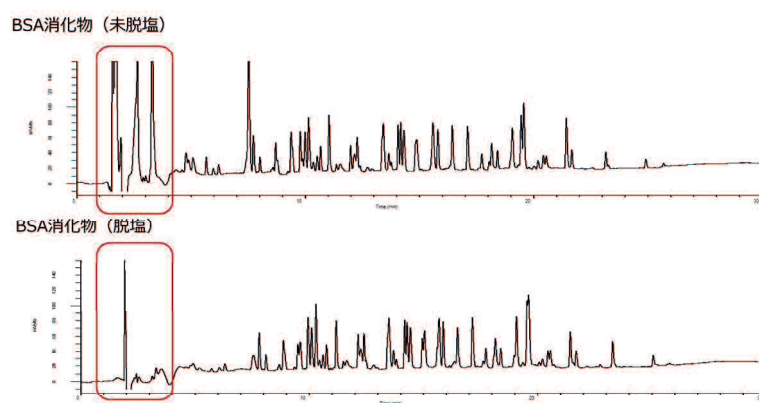
る。HPLCへサンプルを導入する際、目的成分に対して効果的な前処理の選択の幅を広げるためのラインナップの数の多さであり、またサンプルのマトリクスに応じた充填剤の粒子の大きさなども様々ラインナップされている。検討しているモノリススピカラムにおいても同様に、様々な分離に適応できるよう、ラインナップの追加は必須である。

本研究においてはシリカモノリスの効果的な表面改質方法の検討と、スルーポア、メソポア等モノリスの構造特性を検討することで、新たな官能基、構造体を有するシリカモノリス前処理デバイスを作製、性能評価を行うことを目的とした。また、シリカモノリスのタンパク質に対しての非特異吸着を軽減することで、アフィニティクロマトグラフィー担体として利用し、様々なリガンド、タンパク質への応用の可能性を検討することを目的とした。また、シリカモノリスの特性を考慮し、特に微量、多検体を処理可能なアフィニティデバイスおよび、それらデバイスを効果的に運用可能な、自動処理システムの開発を目的として研究を行った。

以上のような背景に基づき、本研究で行った検討を以下に示す

第1章では、緒論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

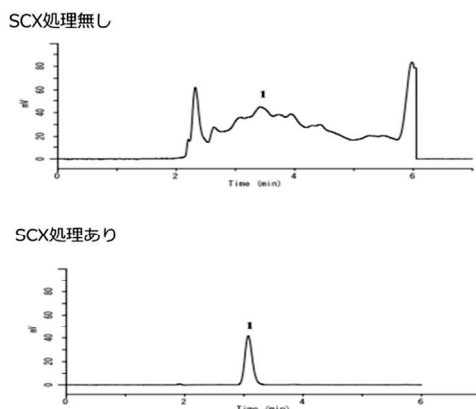
第2章では、前処理用シリカモノリスカラムの表面処理及び、メソポア、スルーポア等物性値を変更することで、様々な生体試料中の医薬品の回収を迅速に行うための最適化を行った。クロマトグラフィーの分析用カラムは主にオクタデシル基等、疎水性相互作用により対象成分を分離するカラムが用いられる。そのため、前処理においてもC18等の疎水性相互作用による前処理を行うと、分析用カラムと特性が近いため、夾雑成分の除去としては、塩や巨大な分子に限られる(Fig.1)。そのため、分析用カラムとは異なる保持挙動を有する前処理カラムが望まれている。



疎水性相互作用による前処理では、分析カラムへ悪影響を与える塩や巨大なタンパク質を除去効果はあるが、選択性は同じであるため、クリーンナップ効率を望むのは難しい。

Fig.1 疎水性前処理担体と、疎水性分析カラムの組み合わせ

イオン交換カラムは、対象成分のイオン性を対象にした前処理が可能であるため、疎水性相互作用とは異なる精製度を期待できる(Fig.2)。



イオン性前処理カラムを用いることで、疎水性相互作用とは異なる相互作用により対象成分を保持できるため、高いクリーンアップ効率が期待できる。

Fig.2 イオン性 (SCX)前処理担体と、疎水性分析カラムの組み合わせ

イオン交換修飾シリカモノリスとして、陽イオン交換 (SCX)、陰イオン交換 (SAX) を修飾したカラムを調製、検討を行った。使用時の遠心力、溶出液量の最適化を行った。また、試料による目詰まりが懸念される、全血からの医薬品の回収のために、シリカモノリスの構造を変更し、通液性に優れたスピнкаラムを作製、迅速試料前処理法を考案した。

第3章では、モノリスディスクをスピнкаラム以外の形状に固定し、より微量なサンプルの前処理に適応することを検討した。ピペットチップの先端にシリカモノリスを固定化、各種化学修飾を行うことで、微量サンプルの前処理方法の検討を行った(Fig.3)。

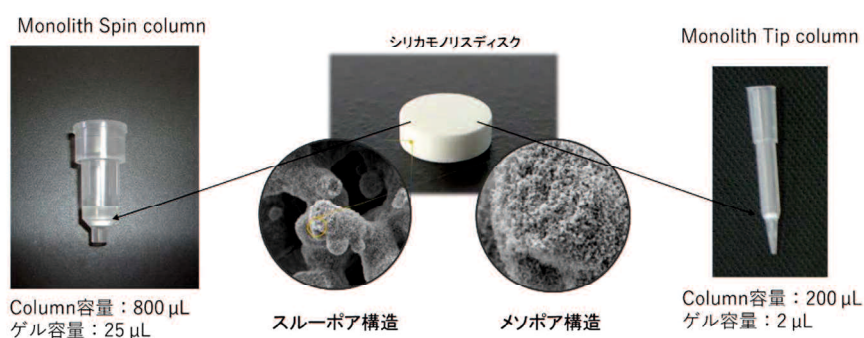


Fig.3 シリカモノリスを装着したデバイス

スピнкаラムに固定しているシリカモノリスゲルの容量 25  $\mu\text{L}$  と比較してもさらに小さい 2  $\mu\text{L}$  のゲル容量を有するモノリスゲルを固定したピペットチップ型固相抽出チップは、より微量サンプルに対しての前処理を行うことが可能になる。

作製したチップに対してトリプシンを固定化することにより、ピペッティング作業によりタンパク質を消化するデバイスを構築し、またピペッティングによりリガンドの固定化が可能になるアフィニティデバイスの作製の検討を行った。また、アミノ基、アミド基等、親水性相互作用による糖鎖精製用チップの作製も行った。

第4章では、3章で作製したアフィニティデバイスの作製において、使用したシリカモノリスの表面に存在するシラノール等、対象成分及び、対象成分以外に対しての非特異吸着起こす部位をマスクングするための親水性の高いポリマーでシリカモノリスを被覆することを試みた。また、親水性ポリマーだけではなく、各種リガンドを導入することで、選択性の高いアフィニティ担体を作製することを試みた(Fig.4)。

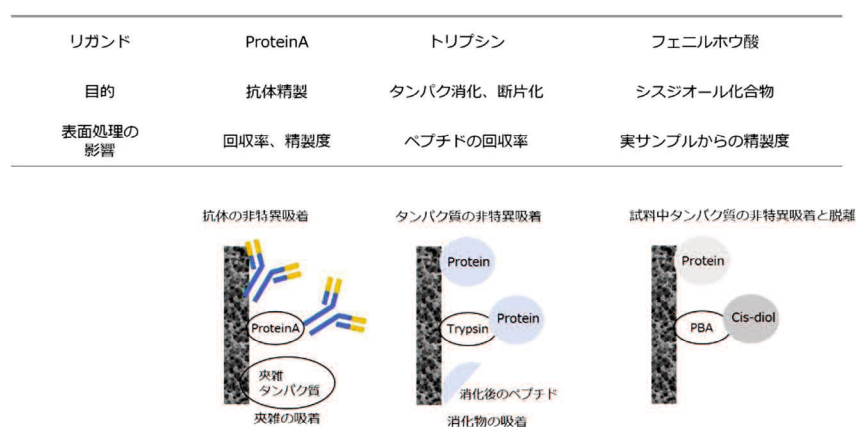


Fig.4 リガンド固定化担体としての利用と用途

Protein A やフェニルホウ酸などのアフィニティリガンドを固定化する場合には、抗体や、カテコールアミンなどの対象成分以外のタンパク質などの夾雑成分が、シリカモノリスへ非特異吸着することを抑制しないと、回収溶液の精製度は低下する。また、対象成分が、修飾されたリガンドではなく、母体であるシリカモノリスそのものに吸着してしまうと、溶出時に回収することができず、回収率が低下する。一方トリプシンなどの酵素を固定し、リアクターとして利用する場合には、消化対象であるタンパク質、もしくは消化後のペプチドがシリカモノリス表面に吸着すると、消化後のペプチドの回収量が低下してしまう。これらの点を改善するために、シリカモノリス表面の非特異吸着を軽減することは重要である。第4章では、これらの点を改善する目的で各種修飾方法を検討し、シリカモノリスをアフィニティ担体として利用するための修飾方法の検討を行った。

第5章では作製したシリカモノリスディスクを 96 ウェルプレートへ導入し、全自動分抽装置による抗体の迅速精製デバイスを開発、検証を行った。既存の抗体精製スクリーニングシステムが1度の処理時間に60分以上を要していたところ、シリカモノリスを用いることで、15分以内での処理が完結可能なシステムの構築を試みた。

## 引用文献

- [1] R. Kong, *Separation Science and Technology*, **2005**, 6, 413
- [2] J. Stone, *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, **2017**, 37-62
- [3] P. Novák, V. Havlíček, *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, **2016**, 51
- [4] E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J. R. Mazzeo, *Journal of Chromatography B*, **2007**, 852, 22
- [5] C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, D. A. Volmer, *Analyst*, **2014**, 139, 2265
- [6] T. Khezeli, A. Daneshfar, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, **2017**, 89,99
- [7] H. Piri-Moghadam, F. Ahmadi, J. Pawliszyn, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, **2016**, 85, 133
- [8] M. Sajid, *Anal. Chim. Acta*, **2017**. 965, 36
- [9] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, *Proc Natl Acad. Sci*, **1968**, 61, 636
- [10] D. B. McCormick, *Anal. biochem.*, **1965**, 13, 194
- [11] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen, *Proceedings of the National Academy of sciences of the U. S. A.*, **1968**, 61, 636
- [12] M. Uchigashima, M. Saigusa, H. Yamashita, S. Miyake, K. Fujita, M. Nakajima, M. Nishijima, *J. Agric. Food Chem.*, **2009** 57, 8728
- [13] N. Lee, S. Wang, R. D. Allan, I. R. Kennedy, *J. Agric. Food. Chem.*, **2004**, 52, 2746
- [14] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, *Nature Protocols* **2007**, 2, 1896
- [15] Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1067, 73
- [16] M. R. Larsen, T. E. Thingholm, O. N. Jensen, P. Roepstorff, T. J. D. Jørgensen, *Molecular & Cellular Proteomics*, **2005**, 4, 873
- [17] N. Sugiyama, T. Masuda, K. Shinoda, A. Nakamura, M. Tomita, Y. Ishihama, *Mol. Cel. Proteo.*, **2007**, 6, 1103
- [18] K. Nakanishi, *J. Porous Materials*, **1997**, 4, 67
- [19] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3498
- [20] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 797, 121
- [21] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.*, **2001**. 73, 420
- [22] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 961, 53
- [23] N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 960, 85
- [24] K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Núñez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 8741
- [25] V. V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6737

- [26] A. Podgornik, A. Štrancar, *Biotech. Annual Review*, **2005**, 11, 281
- [27] L. G. Berruex, R. Freitag, T. B. Tennikova, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, 24, 95
- [28] Igor Mihelic, T. Koloini, A. Podgornik, M. Barut. A. Strancar, *Acta Chim. Slov.*, 2001, 48, 551
- [29] N. Wu, J. A. Lippert, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 911, 1
- [30] H. Morisaka, K. Kobayashi, A. Kirino, M. Furuno, H. Minakuchi, K. Nakanishi, M. Ueda, *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 15
- [31] L. S. Wang, L. C. Wu, S. Y. Lu, L. L. Chang, I. T. Teng, C. M. Yang, J. A. Ho, *ACS Nano*, **2010**, 8, 4371
- [32] Z. Zhao, A. Malik, M. L. Lee, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2747
- [33] A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Yahata, M. Yashiki, M. Nagao, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1208, 71
- [34] T. Saito, T. Yamagiwa, Y. Yui, S. Miyazaki, A. Nakamoto, A. Namera, S. Inokuchi, *J. Health Sci.*, 2010, 56, 598
- [35] T. Saito, T. Fukushima, Y. Yui, S. Miyazaki, A. Nakamoto, A. Namera, S. Inokuchi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 25
- [36] T. Saito, A. Namera, T. Tsuji, W. Noguchi, *Acta Chromatographica*, 2018, 32, 1

## 2 章 生体試料前処理用のシリカモノリススピнкаラムの作製

### 2-1 イオン交換基修飾シリカモノリススピнкаラムの作製と生体試料の前処理

#### 2-1-1 緒言

新しい分離媒体として、シリカモノリスは分析化学分野、特にクロマトグラフィーにおける利用が図られている[1]。シリカモノリスは、相分離を伴うゾル-ゲル法によって調製された一体型のシリカ素材であり、3次元網目構造をとっており、 $\mu\text{m}$  サイズのマクロ孔と  $\text{nm}$  サイズのメソ孔を有している。多孔性に基づく大きな表面積と高い液体の浸透率により、高効率な物質移動を可能にしている。

これまでに、オクタデシル基を結合したシリカモノリスディスクをスピнкаラムへ固定化した **MonoSpin C18** を用いて遠心分離機によって、容易に短時間に尿中の覚せい剤[2]、血清中の麻酔薬や血管収縮剤[3]、血清中の農薬とその代謝物の抽出[4]に応用してきた。また、二酸化チタンをシリカゲル表面にコートした **MonoSpin TiO**[5]を用いて、尿中のリン酸含有アミノ酸除草剤の抽出なども報告している[6]。粒子シリカゲルをカートリッジに充填した従来の固相抽出では溶出時にベツトボリュームの 3~4 倍量の液量が必要になり、目的成分の希釈が生じるため、固相抽出後に濃縮などの工程が必要になる場合が多い。一方シリカモノリスは支持体と抽出相が一体型の為、スピнкаラムを作製する際、従来の固相カラムのようにフィルターで分離剤を挟み込む必要がなく、厚さもわずか数  $\text{mm}$  と極めて薄い。更に遠心機で抽出を行うため同時に多数の検体処理が可能になるほか、抽出溶媒も少量で行え、濃縮操作も省略可能となり、従来の固相抽出より抽出操作の簡略化が可能になった。一方で、固相抽出における前処理は、処理後のサンプルを HPLC や GC などのクロマトグラフィーでの分析を行うケースが多い。HPLC における分析カラムの多くは C18 を修飾したシリカゲルカラムを使用する。そのため、前処理において逆相系の前処理カラムである **MonoSpin C18** により処理したサンプルを、HPLC においても C18 カラムで分析することになるため、夾雑成分も同様の保持挙動で分析されてしまう。そのため、分析における夾雑成分の除去が十分ではなく、逆相担体以外の前処理カラムの開発が求められてきた。イオン交換固相カラムは、逆相固相カラムとは異なる保持挙動を示すため、高いクリーンナップ効果が得られる固相として使用されている。

本章においては、シリカモノリスへ強カチオン交換基と強アニオン交換基を化学結合させたモノリススピнкаラムを用いたイオン性薬物の固相抽出について検討した結果を報告する。

## 2-1-2 実験

### 2-1-2(1) 試薬

試料、試薬及び溶媒はいずれも東京化成工業、関東化学、キシダ化学、林純薬、ナカライテスクの HPLC グレード、特級または一般試薬を用いて、水はイオン交換水を用いた。

### 2-1-2(2) シリカモノリスの調製

テトラエトキシシランを原料として、既報に準じ[7]、ゾル-ゲル法により直径 4.3 mm、厚さ 1.5 mm のシリカモノリスを調製した。モノリスゲルの物性値は表面積 340 m<sup>2</sup>/g、スルーポアサイズは 2~5 μm、メソポアサイズ 9 nm であった。日立製走査型電子顕微鏡 S-3000、Micromeritics Tristar 3000 窒素吸着装置により[8]、物性値の測定を行った。

### 2-1-2(3) 化学処理

SCX 結合型シリカモノリスは、10% 2-(4-クロロスルホンルフェニル)エチルクロロシランを昼夜乾燥後のシリカモノリスゲルに加え、トルエン中にて 12 時間還流を行った。乾燥後に 100 mM 酢酸ナトリウム水溶液を加え、10 時間静置し、加水分解処理を行った。アセトンで洗浄後、70°C で減圧乾燥を行い、プロピルベンゼンスルホン酸基結合型シリカモノリスゲルを調製した。

SAX 結合シリカモノリスは、N-トリメトキシシリルプロピル-N、N、N トリメチルアンモニウムクロライドを用い、トルエン中で 12 時間還流を行った。メタノールで洗浄後、70°C で減圧乾燥し、トリメチルアミノプロピル基結合シリカモノリスゲルを調製した。

### 2-1-2(4) スピнкаラムによるサンプル前処理

化学処理によって得られたシリカモノリスゲルをスピンへ固定化した。遠心操作は全て日立製遠心分離機 CF-16RX、ローターは T15A23、遠心時の温度設定は行わずに(室温 20~25°C において)実施した。SCX 結合型スピнкаラム(以後 MonoSpin SCX)を使用した固相抽出法は、下記の手順により行った。

- I. 平衡化: MonoSpin SCX へ 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を 100 μL 添加し、1 分遠心後ろ液を捨てた。
- II. サンプルアプライ: 平衡化した MonoSpin SCX へ試料 100 μL を添加し、1 分遠心後、ろ液をチューブへ残したまま、次の工程を続けた。



- III. 洗浄: 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 300  $\mu$ L を入れ 1 分遠心し、前工程のろ液と合わせた。
- IV. 溶出I: 5% アンモニアメタノール溶液 300  $\mu$ L を入れ、1 分遠心し、ろ液を回収した。
- V. 溶出II: 100 mM 水酸化ナトリウム-メタノール溶液 300  $\mu$ L を入れ、1 分遠心し、ろ液を回収した。

下記条件で各溶液を LC/UV で分析し、面積値から回収率を算出した。

HPLC はカラム: Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. x 150 mm, 5  $\mu$ m, ジーエルサイエンス製)、移動相: 48% アセトニトリル (0.7%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0.17% SDS (pH 4.5) 各 wt/v、流量: 1 mL/min、検出: 230 nm、オープン: 40°C、注入量: 5  $\mu$ L の条件で分析を行った。

HPLC 機器は、ジーエルサイエンス製 GL-7400 ポンプ、GL-7450 UV/VIS 検出器、GL-7420 オートサンプラー、GL-7430 カラムオープンを用いた。データ処理はアジレントテクノロジーズ製 Ezchrom Elite chromatography Data System ver.3.1.7 を用いた。

SAX 結合型スピンカラム (以後 MonoSpin SAX) を使用した固相抽出法は、下記の手順により行った。

- I. 平衡化: MonoSpin SAX へ 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を 400  $\mu$ L 添加し、1 分遠心後、ろ液を捨てた。
- II. サンプルアプライ: 平衡化した MonoSpin SAX へ試料 100  $\mu$ L を添加し、1 分遠心後、ろ液をチューブへ残したまま、次の工程を続けた。
- III. 洗浄: 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 200  $\mu$ L を入れ 1 分遠心し、前工程のろ液と合わせた。
- IV. 溶出I: 5% NaCl 水溶液 300  $\mu$ L を入れ、1 分遠心し、ろ液を回収した。
- V. 溶出II: 5% NaCl 水溶液: メタノール=1:1 溶液 300  $\mu$ L を入れ、1 分遠心し、ろ液を回収した。

下記条件で各溶液を LC/UV で分析し、面積値から回収率を算出した。

HPLC はカラム: Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. x 150 mm, 5  $\mu$ m, ジーエルサイエンス製)、移動相: 40% アセトニトリル (0.1% リン酸)、流量: 1 mL/min、検出: 215 nm、オープン: 40°C、注入量: 10  $\mu$ L の条件で分析を行った。

### 2-1-3 結果及び考察

#### 2-1-3(1) 化学処理の再現性

実験方法に記載した、SCX 型、SAX 型シリカモノリスゲルは、化学修飾をそれぞれ3回行い、それぞれのゲルについて、TG-DTA 測定(MAC Science 製)によりカーボン量の測定を行った。SCX 結合型ゲルは、平均カーボン量 9.53%、相対標準偏差(RSD) 0.69%、SAX 結合型ゲルは、平均カーボン量 23.8%、RSD 値 0.62%であった。再現性も高く、適切な化学処理であることが確認された。

#### 2-1-3(2) 遠心加速度の影響(SCX)

MonoSpin SCX は塩基性を含む 8 成分(アセトアミノフェン、ピリジン、フェノール、ヘキソバルビタール、プロプラノロール、ベルベリン、ドキセピン、アミトリプチリン)を各 0.125 mg/mL になるように混合しサンプルとした。抽出手順は、上記方法に従い、II、IIIの回収液を合わせた画分、IVの画分、Vの画分をそれぞれ分析し、回収率を求めた(Table 2-1)。10,000xg では塩基性を示すプロプラノロール、ベルベリン、ドキセピン、アミトリプチリンで高い回収率が得られたが、4,000xg では全体の回収率が落ち、また溶出も全体に広がることから、カラムの性能を十分に発揮できなかった。10,000xg では、1 分の遠心時間で、操作時間の短縮が可能であることが分かった。一方、弱酸性化合物であるフェノール、ヘキソバルビタール、弱塩基性化合物であるピリジンは、保持されなかった。ベルベリンについては、0.1 N NaOH-メタノール画分で回収が多かった。

SCX はプロピルベンゼンスルホン酸基結合型であることから、疎水性が高い為、水に溶解したサンプルでは、コンディショニングでアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を流す必要がある。遠心加速度が低い場合にはシリカモノリスのメソ孔を十分に使用できないために、II、IIIの回収液でロスが出ていると考えられる。一度水で満たされたメソ孔を溶出液で置換する場合にも、十分な遠心加速度が必要となるため、4,000xg で全体の回収率が 100%に満たなかったと考えられる。

Table 2-1 Effect of centrifugal acceleration on the recovery of 7 medicines on MonoSpin SCX

4,000xg 5 min	Pyridine	Phenol	Hexobarbital	Propranolol	Berberine	Doxepin	Amytryptiline
II, III	30	43	39	19	18	18	18
IV	3	0	2	24	5	30	32
V	4	0	2	7	13	6	6
total	37	43	43	50	36	54	56
10,000xg 1 min							
II, III	96	102	103	0	0	0	0
IV	8	0	1	94	0	100	99
V	5	0	0	18	66	16	16
total	109	102	104	112	66	116	115

### 2-1-3(3) 溶出液量の影響

手順IV、Vで用いる溶出液量をそれぞれ 25、50、100、150  $\mu\text{L}$  で行い、回収に必要な溶出液量を検討した (Table 2-2) 遠心速度は、10,000 $\times g$ 、1分とした。

溶出液量 25  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$  では、プロプラノロール、ベルベリン、ドキシセピン、アミトリプチリンが 5% アンモニアメタノールのみで、回収しきれていなかった。100  $\mu\text{L}$  溶出では、5%アンモニアメタノール溶液でプロプラノロール、ドキシセピン、アミトリプチリンがほぼ 100%回収でき、またベルベリンが 0.1 M 水酸化ナトリウムメタノール溶液で 50%以上回収できることから、100  $\mu\text{L}$  以上の溶出液量が必要であることが示された。

Table 2-2 Effects of the eluate on the recovery of 7 medicines on MonoSpin SCX

		Pyridine	Phenol	Hexobarbital	Propranolol	Berberine	Doxepin	Amytriptyline
II, III		96	102	102	6	6	7	6
IV	25 $\mu\text{L}$	4	0	1	0	0	50	50
V		4	0	0	6	6	23	23
total		104	102	103	12	12	80	79
II, III		96	101	102	0	0	0	0
IV	50 $\mu\text{L}$	3	0	1	0	0	81	79
V		4	0	0	31	31	20	21
total		103	101	103	31	31	101	100
II, III		96	102	103	0	0	0	0
IV	100 $\mu\text{L}$	8	0	1	0	0	100	99
V		5	0	0	66	66	16	16
total		109	102	104	66	66	116	115
II, III		96	104	105	0	0	0	0
IV	150 $\mu\text{L}$	10	0	1	0	0	111	110
V		5	0	0	84	84	7	8
total		111	104	106	84	84	118	118

#### 2-1-3(4) 血清中の塩基性薬物の抽出

プロプラノロールを 15  $\mu\text{g/mL}$  となるように調製し、プロプラノロール : 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) : 血清 = 1:1:1 となるように混合し、サンプルとした。

MonoSpin SCX によって、実験方法に記載の手順に従い、塩基性薬物を含む血清サンプルからの抽出結果を Figure 2-1 に示す。プロプラノロールは保持時間 9 分に検出され、抽出前のクロマトグラム(A)には、血清由来のタンパク質が見られたが、抽出後のクロマトグラム(B)には血清由来のタンパク質が含まれておらず、効果的にタンパク質が除去できていることが示された。また、抽出による回収率は 113%、RSD 値 4.6%(n=6)であったため、塩基性化合物の抽出には MonoSpin SCX が有効であることが示された。

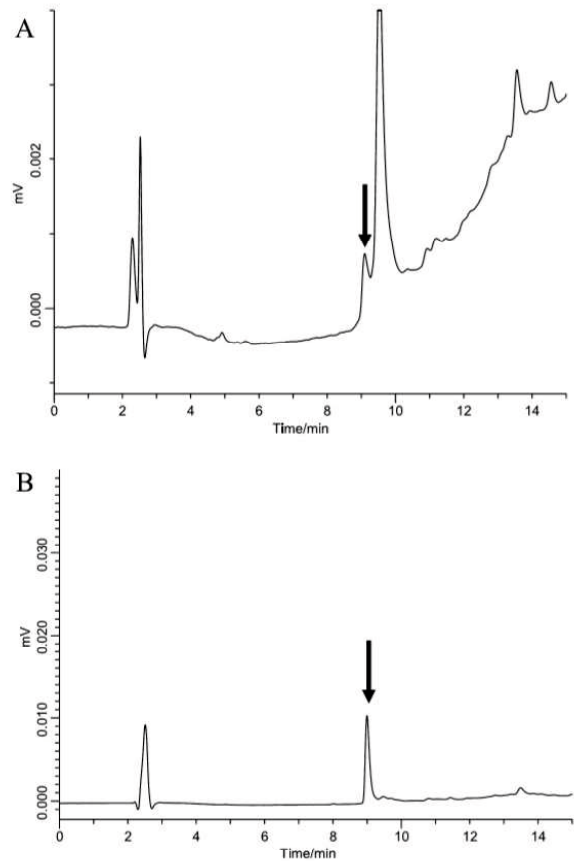


Figure 2-1 Chromatograms of propranolol extracted from the serum on MonoSpin SCX

### 2-1-3(5) 遠心加速度の影響(SAX)

7成分(ウラシル、ベンジルホスホン酸、サリチル酸、エチル安息香酸、イブプロフェン、4-トルエンスルホン酸、ヘキシルフェノール)を各 0.143 mg/mL になるように混合しサンプルとした。2,000xg 4分、10,000xg 1分で各化合物の回収率に大きな差は見られなかった(Table2-3)。このことは、遠心回転数に関わらず、イオン交換能を発揮できることを示しており、短時間での処理を可能にする。SAXはSCXに比べ疎水性が低い為、コンディショニング時に有機溶媒が必要ないと考えられる。pKa=9.4付近のウラシルはカラムへ保持されなかった。またSAXがCl型であるため、相対的に選択性の低いリン酸イオンを構造に有しているベンジルホスホン酸も保持されなかった。リン酸イオンなどの相対的選択性の低い官能基を有する化合物を保持させるためには、Cl型からOHへの変換を検討する必要がある。

イブプロフェン、ヘキシルフェノールは、5%アンモニア水溶液で溶出しないことから、トリメチルアミノプロピル基のイオン交換能だけではなく、疎水性相互作用も保持に寄与していると考えられる。

Table 2-3 Effect of centrifugal acceleration on the recovery of 7 medicines on MonoSpin SAX

2,000xg 5 min	Uracil	Benzylphosphonic acid	Salicylic acid	4-Ethylbenzoic acid	Ibuprofen	p-Toluenesulfonic acid	Hexylphenol
II, III	114	81	0	0	0	0	0
IV	0	30	48	94	0	100	0
V	0	0	51	8	98	0	72
total	114	111	99	102	98	100	72
10,000xg 1 min							
II, III	84	102	0	0	0	0	0
IV	1	0	68	102	0	103	0
V	0	0	37	6	104	5	98
total	85	102	105	108	104	108	98

### 2-1-3(6) 溶出液量の影響(SAX)

手順IV、Vで用いる溶出液量をそれぞれ 50、100、150  $\mu\text{L}$  で行い、回収に必要な溶出液量を検討した(Table 2-4)。溶出液量 50  $\mu\text{L}$  では、サリチル酸、イブプロフェン、ヘキシルフェノールの回収率が低い傾向となった。それぞれの化合物で良好な回収率を得るには、100  $\mu\text{L}$  以上の溶出液量が必要であることが示された。

Table 2-4 Effect of the eluate on the recovery of 7 medicines on MonoSpin SAX

		Uracil	Benzylphosphonic acid	Salicylic acid	4-Ethylbenzoic acid	Ibuprofen	p-Toluenesulfonic acid	Hexylphenol
II, III		102	78	0	0	0	0	0
IV	50 $\mu\text{L}$	0	0	3	29	0	53	0
V		0	0	52	60	54	43	7
total		102	78	55	89	54	96	7
II, III		105	68	0	0	0	0	0
IV	100 $\mu\text{L}$	0	0	0	53	0	70	0
V		0	0	64	45	97	29	110
total		105	68	64	98	97	99	110
II, III		103	82	0	0	0	0	0
IV	150 $\mu\text{L}$	0	0	9	63	0	88	0
V		0	0	121	58	115	18	98
total		103	82	130	121	115	106	98

### 2-1-3(7) 尿中の酸性薬物の抽出

MonoSpin SAX によって、酸性薬物(イブプロフェン)を含む尿サンプルの抽出を行った。尿中の酸性薬物の抽出試験は、イブプロフェンを 15  $\mu\text{g/mL}$  になるように調製し、イブプロフェン溶液:20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0):尿=:1:1:1 で混合した。前処理手順は、実験方法に従い、溶出液は、5%NaCl:メタノール溶液を用いた。MonoSpin SAX を用いた尿からのイブプロフェンの回収結果を Figure 2-2 に示す。抽出前の尿サンプルを分析したクロマトグラム A には、多くの尿中化合物が検出されている。イブプロフェンは保持時間 9.1 分に検出された。MonoSpin SAX による抽出後のサンプル分析結果を B に示す。抽出後もイブプロフェン以外の尿中化合物が検出された。尿中からのイブプロフェンの回収率は 106%、RSD 値 6.5% (n=6)であり、MonoSpin SAX は酸性化合物の抽出に有効であることが示された。今回、洗浄液に 20 mM リン酸カリウム緩衝液を用いた。5% NaCl 水溶液で洗浄すると尿由来の夾雑成分の除去が可能であったが、イブプロフェンの回収率も低下する傾向にあり、洗浄工程にはさらなる検討が必要であった。

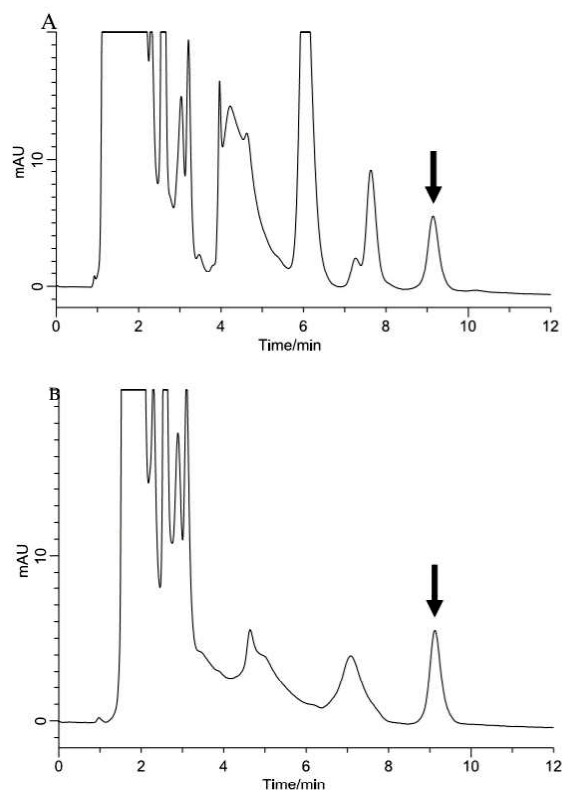


Figure 2-2 Chromatograms of ibuprofen extracted from the serum on MonoSpin SAX

### 2-1-4 結言

イオン交換型シリカモノリスピンカラムを用いたサンプル前処理は、生体試料中のイオン性化合物の抽出に有効であることが示された。各工程は 10,000xg、1 分の遠心操作で行え、10 分以内に前処理が完了した。スピнкаラムによる抽出は、簡便な操作法に加え、一度に多検体の処理、少量の溶媒で吸着した薬物の溶出が可能であることから、分析のハイスループットが可能になると期待される。



## 2-2 血液からの薬物抽出に適したモノスピнкаラムの開発と中毒事例への応用

### 2-2-1 緒言

法医学分野においては、血液中薬物濃度を定量して死因との関連を吟味する必要がある。全血を試料とした簡便な抽出・精製法が様々検討されているものの[9-12]、抽出時のエマルジョン形成、固相カラムの目詰まりが問題になる場合が多い[13]。市販の SPE カートリッジでは、小さな粒子または不規則な粒子が、シリンジバレル、カートリッジ、ピペットチップへ埋め込まれている。シリンジもしくはマニホールドを使用してサンプルを通過する際、試料をスムーズに通過させるには減圧もしくは、加圧処理が必要になる。全血などの高い粘性を示すサンプルにおいては、通常 SPE カートリッジへアプライする前に、粘度を下げるために水もしくは、緩衝液で希釈される。しかし、希釈された全血サンプルであっても、SPE カートリッジを詰まらせる可能性がある[13, 14]。これらの問題点を改善し、全血からの簡便な薬物抽出を目的にモノスピнкаラムの最適化を行い、これら薬物の使用が疑われた事例へ応用した。

既報で使用しているモノスピンスピнкаラムに用いているシリカモノリスのスルーポアは、対象成分に対して効率よく吸着する目的で、2~5  $\mu\text{m}$  と小さく設計している。しかしながら、全血等のマトリクスの複雑なサンプルを処理する際、モノリスにおいてもサンプルによる目詰まりが生じてしまう懸念がある。そこで本検討では、シリカモノリスゲルのスルーポアを大きく設計し、更に、メソポアサイズとオクタデシル基の修飾率を変えた 6 種類のシリカモノリスを作製し、抽出時の回転数、全血からの回収率、再現性などを検討し、全血からの薬物抽出に適したシリカモノリスの検討を行った。

### 2-2-2 実験

#### 2-2-2(1) 試薬

Amitriptyline、Chlorpromazine、Clotiazepam、Desipramine、Diazepam、Imipramine、Lidocaine、Nortriptyline、Phenacetin、Andphenytoin は和光純薬株式会社より購入した。Lidocaine-d10、Diazepam-d5 はシグマアルドリッチ社から購入した。テトラエトキシシラン、3-メタクリロキシロピルトリメトキシシラン、オクタデシルトリメトキシシランは信和化工から購入した。Drug-free whole blood は Biopredic International から購入した。MonoSpin C18 はジーエルサイエンス社製を使用した。そのほかの分析に使用した試薬は和光純薬より購入した試薬を使用した。

#### 2-2-2(2) シリカモノリスの調製

テトラエトキシシランを原料として、既報に準じ[15]、ゾル-ゲル法により直径 4.3 mm、厚さ 1.5 mm のシリカモノリスを調製した。アルカリ処理を変更することで、異なるメソポアサイズのモノリスを作製した。血液サンプルを通過するために市販の MonoSpin よりもスルーポアの大きいモノリスを作製し、検討を行った(市販 MonoSpin スルーポアサイズは 2~5  $\mu\text{m}$ 、血液用としては 20  $\mu\text{m}$  を使用した)。物性値測定は日立製走査型電子顕微鏡 S-3000、micromeritics 製 Tristar 3000 窒素吸着装置により行った。

#### 2-2-2(3) 化学処理

ODS 結合型シリカモノリスは重量比率として 200%になるようにオクタデシルトリメトキシシランをシリカモノリスに加え、200°C 12 時間反応を行った。シラン剤修飾のシリカモノリスの他に、メタクリロキシプロピルトリメトキシシランで修飾したモノリス表面において、2 重結合を有する ODS モノマーを重合させることで、ODS ポリマーのコーティングを行ったモノリスゲルの調製を行った。ODS 修飾を行ったシリカモノリスゲルに対して、ジメチルジメトキシシランによりエンドキャップ処理を行い、ヘキサン、アセトンの順で洗浄後、70°Cで減圧乾燥を行うことで、ODS 修飾シリカモノリスゲルの調製を行った。

#### 2-2-2(4) スピнкаラムによる血液サンプル前処理

化学処理によって得られたシリカモノリスゲルをスピンへ固定化した。

ODS 修飾型スピнкаラム(以後 MonoSpin C18)を使用した固相抽出法は、下記の手順により行った。

サンプル調製: 全血サンプル 0.3 mL に対して Sorensen 緩衝液(pH10)を 1.2 mL、標準溶液 10  $\mu\text{L}$  を混合し、12,100xg で 5 分遠心後の上清 1 mL をサンプルとして用いた。

平衡化: MonoSpin C18 へメタノールを 200  $\mu\text{L}$  添加し、1 分遠心後ろ液を捨てた。その後 Sorensen 緩衝液を加え、1 分遠心後ろ液を捨てた。

サンプルアプライ: 上記調製したサンプル 1 mL を添加し、2 分遠心後、ろ液を捨てた。

洗浄: Sorensen buffer を 300  $\mu\text{L}$  加え遠心を行った。

溶出: メタノールを 100  $\mu\text{L}$  を入れ、2 分遠心し、ろ液を回収した。

下記条件で各溶液を LC/MS で分析し、面積値から回収率を算出した。

HPLC はカラム: InertSustain Swift C18(2.1 mm I.D. x 150 mm、3  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス製)、

移動相：60%メタノール-40%-10 mM ギ酸アンモニウム (0.1%ギ酸 (pH3.3))、流量：0.2 mL/min  
カラム温度：40°C、注入量：2  $\mu$ L、検出：ESI/MS. Drying gas (nitrogen) temperature : 350°C、  
drying gas flow at 13 L /min、ネブライザー：50 psi、CV: 2500 V、FV: 150 V、定量イオン： m/z 180  
(Phenacetin)、235(Lidocaine)、245 (Lidocaine-d10)、253 (Phenytoin)、264 (Nortriptyline)、267  
(Desipramine)、278 (Amitriptyline)、281 (Imipramine)、285 (Diazepam)、290 (Diazepam-d5)、319  
(Clotiazepam and Chlorpromazine)、でそれぞれ検出を行った。

HPLC 機器は、Agilent LC-MS system(LC1100/MSD SL)を用い、データ処理は LC-MSD ChemStation を用いた。

### 2-2-3 結果及び考察

#### 2-2-3(1) シリカモノリスゲルの作製及び物性評価

作製したシリカモノリスゲルの電顕写真を Figure 2-3 に記載する。市販のシリカモノリス[17、18]と比べ、スルーポアを大きく設計することで、通液性の向上を期待した。作製したシリカモノリスのスルーポアは約 20  $\mu$ m であった。

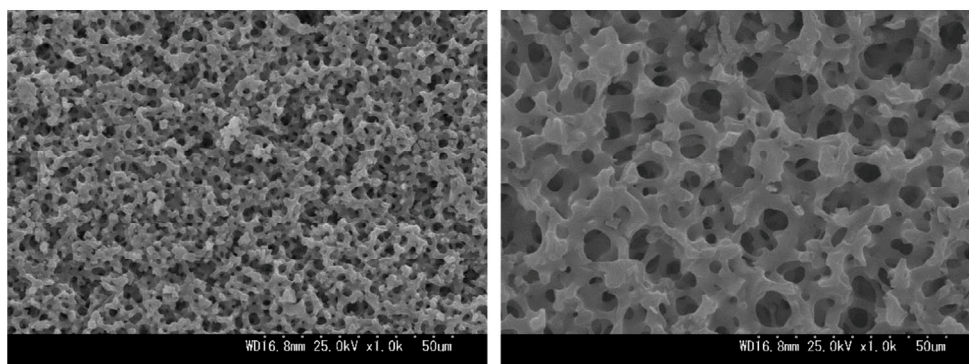


Figure 2-3 Scanning electron micrograph of monolithic silica used for extraction.

Left: Commercial monolithic silica (through pore size: 2-5  $\mu$ m)

Right: monolithic silica used in this study (through pore size: 20  $\mu$ m)

作製したシリカモノリスゲルの ODS 修飾量、表面積、メソポアサイズを Table 2-5 に示す。表面積は固相抽出において、対象成分を抽出するための重要な要素の一つである。高い回収率を得るためには、大きい表面積を有する担体を用いることで、対象成分と抽出担体との接触確率を向上させることが重要である[18]。作製したカラムは表面積の値が大きいモノリス程、C18 の修飾量が多かった。表面重合法により修飾した ODS 修飾ゲルのカーボン量は細孔径、表面積に依存せず 28% 近い値を示した。

Table 2-5 Characteristics of silica monolith used in this study

	カーボン含量 (%)	表面積 (m <sup>2</sup> /g)	メソポアサイズ (nm)
M16 200	17.3	318	104
M16 P	28.3	318	104
M18-200	14.2	210	140
M18-P	28.8	210	140
M17-200	9.2	97	275
M17-P	28.3	97	275

## 2-2-3(2) 化合物の回収に対する回転速度の関係

作製したシリカモノリスゲルをスピнкаラムへ固定化し、サンプルの希釈率とカラム通液性の関係を確認した。サンプル通過時の流量は分析対象物を回収するのに影響を与えることが知られている[19-21]。Figure 2-4 は、各希釈率で調製した血液サンプルが各回転数において通過可能な溶液量を示したグラフである。血液を 5 倍希釈し、1,000rpm で通過させると、スルーポアの小さい市販の MonoSpin C18 では 400  $\mu$ L のサンプルを通過させるのに 100 秒以上の時間を要した。スルーポアの大きいモノリス 6 種においては、通液時間に差はあるものの、1 mL のサンプルを処理することが可能であった。ポリマーコート処理を施した (M16-P、M17-P、M18-P) はメソポアの大きさの違いにより、通過速度が大きく異なった。シラン剤で修飾したモノリスの場合には通液性は多く変わらなかった。

サンプルの希釈率が低くなると、処理に要する時間が長くなり、1,000rpm では 1 mL のサンプルを通過させるのに約 2 分の時間を要した。回転数を 1,000rpm から 3,000rpm に上げることで、通過に必要な時間が短くなった。スルーポアの大きい試作カラムにおいては、約 1 分以内に通過が完了した。3 倍希釈のサンプルでは、市販の MonoSpin ではサンプルは目詰まりを起こしてしまうため、適応することはできなかった。

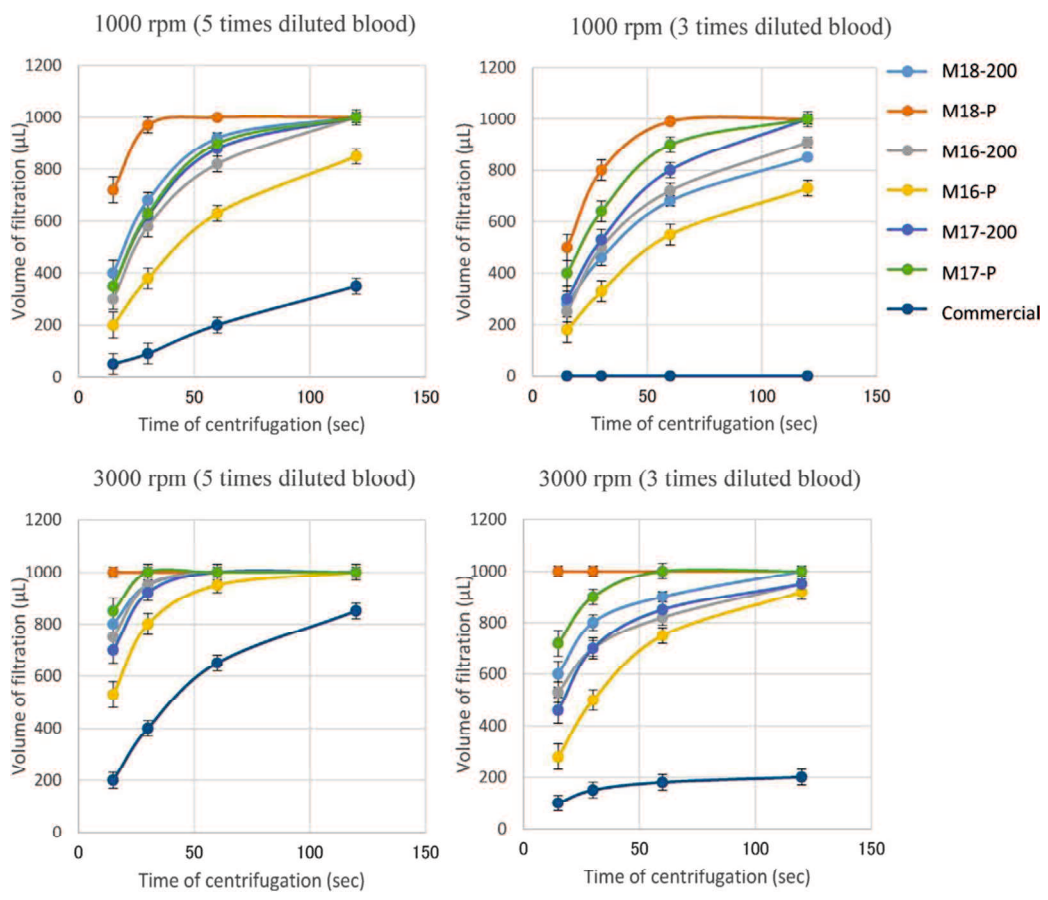


Figure 2-4 Effect of mesopore size on the filtration volume of diluted whole blood samples.

各サンプルに対してのモノリスカラムの回収率を Figure 2-5 に示す。回転数としては、1,000rpm、3,000rpm を用いて検討をおこなった。回転数が 1,000rpm から 3,000rpm に上げることで、どのカラムにおいても回収率は低下した。至適回転数としては 1,000rpm であると考えられた。薬物に対して最も高い回収率を示したカラムは、表面積が大きい M18 (318 m<sup>2</sup>/g) を使用することで得られた。一方で、M17 (97 m<sup>2</sup>/g) は最低であった。この結果は各薬物の回収率がメソポアサイズ(表面積)に依存していることを示している。分析対象物と吸着剤が接触する確率は、吸着剤の表面積が大きくなるにつれて増加するため、表面積が増えると、サンプルから吸着剤への分析対象物の移動が容易になるため、高い回収率を示したと考えられる。

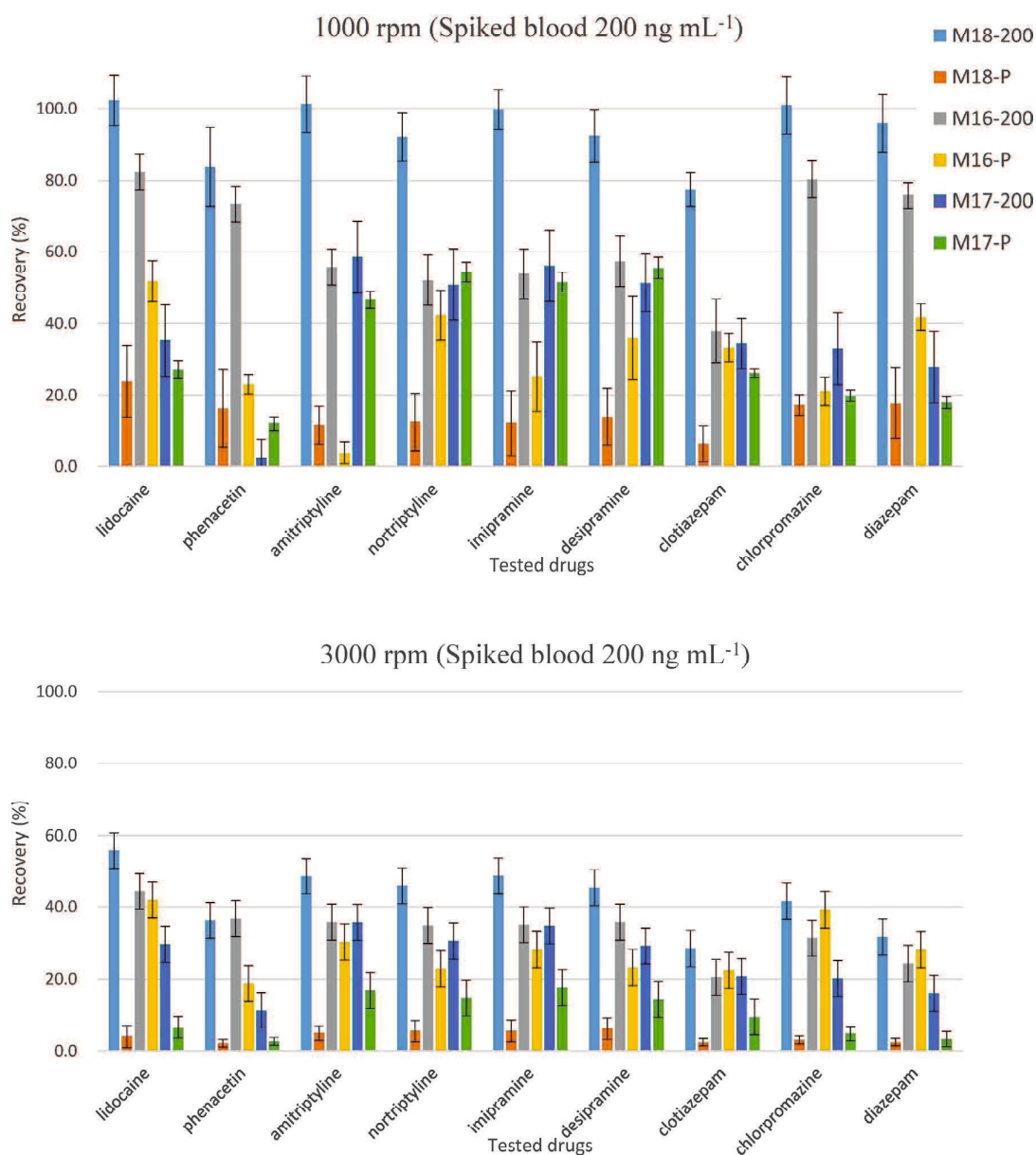


Figure 2-5 Effect of mesopore size and rotation speed on the recovery of the target drugs from spiked whole blood samples

The assay was performed in triplicate (n=3). The targets were spiked to whole blood at the final concentration of 200 ng/mL

### 2-2-3(3) 化合物の回収に対する検出感度と再現性

下記に試作した M18-200(M-200)を用いて確認した検出下限値と、検量線データを Table 2-6 に示す。S/Nとして10倍以上、RSDにおいて15%以下を与える LODとしては0.5~1 ng/mLであり、測定範囲としては2~1,000 ng/mLにおいて測定することが可能であった。

Table 2-6 LOD and calibration data in this method.

Name	LogP <sup>a</sup>	pKa <sup>a</sup>	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )	Slope	Intercept	Correlation (r <sup>2</sup> )
Lidocaine	2.44	8.0	1.0	2.0-1000	0.00220	0.01339	0.999
Phenacetin	1.58	2.2	1.0	2.0-1000	0.00188	-0.00296	0.998
Amitriptyline	4.92	9.4	0.5	2.0-1000	0.00278	0.00488	0.999
Nortriptyline	4.51	10.1	1.0	2.0-1000	0.00164	0.00173	0.998
Imipramine	4.81	9.4	0.5	2.0-1000	0.00235	0.00150	0.999
Desipramine	4.90	10.4	0.5	2.0-1000	0.00180	0.00661	0.999
Chlorpromazine	5.41	9.2	1.0	2.0-1000	0.00166	-0.01401	0.999
Clotiazepam	3.58	2.4	1.0	2.0-1000	0.00232	-0.00464	0.999
Diazepam	2.63	2.9	1.0	2.0-1000	0.00211	0.00379	0.999

対象成分に対して、5、50、500、800 ng/mLにおける回収率、日内、日間再現性の結果について Table 2-7 に記載する。血液サンプルからの回収率は78~108%であり、日内日間再現性は1.1~14.3%を示した。LC/MS分析におけるマトリクス効果は89~107%であり、対象成分に分析に対して大きな影響を与えなかった。

Table 2-7 Intra and inter day coefficients of variation for determination of the tested medicines in diluted whole blood extracted by M18-200.

Name (ng mL <sup>-1</sup> )	Recovery <sup>a</sup> (%)	Matrix effect <sup>b</sup> (%)	Intraday <sup>c</sup>		Interday <sup>c</sup>	
			Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
Lidocaine						
5	107.5 ± 1.5	89.4 ± 4.6	97.5	12.8	100.7	12.6
50	105.8 ± 5.6	100.4 ± 2.9	97	4.5	101.7	6.2
500	101.6 ± 7.2	85.9 ± 4.3	99.7	5.7	99.9	5.1
800	100.4 ± 3.7	99.7 ± 1.3	98.5	5	101.2	5.9
Fluoxetine						
5	92.4 ± 8.5	90.1 ± 7.6	99.8	3.1	100.9	6.3
50	88.4 ± 6.9	100.9 ± 3.4	96.8	3.7	99.9	2.2
500	92.1 ± 6.9	87.9 ± 1.9	100.6	5.4	101.2	1.9
800	87.2 ± 6.0	85.8 ± 1.9	101.1	5.5	100.7	6
Amitriptyline						
5	100.4 ± 1.9	105.1 ± 1.7	97.1	6.7	96	6.5
50	98.9 ± 1.1	107.4 ± 1.7	97.7	1.9	97.9	1.6
500	100.6 ± 4.4	100.1 ± 2.8	98.4	6	98.9	5.3
800	94.4 ± 4.7	87.2 ± 1.4	101.1	5.7	100.1	4.5
Nortriptyline						
5	95.6 ± 7.4	100.2 ± 4.5	91.5	6.4	96.8	5.9
50	90.4 ± 5.2	106.2 ± 5.9	100.2	2.8	98.2	4.4
500	92.3 ± 4.7	97.8 ± 1.5	99	6	100.5	4.3
800	86.4 ± 2.6	98.6 ± 1.8	101.5	4.7	99.7	4.5
Imipramine						
5	102.4 ± 4.7	101.4 ± 4.5	95.4	9.1	96.2	7.3
50	99.6 ± 3.2	99.3 ± 0.5	99.3	3	99.6	3.1
500	100.3 ± 6.8	97.3 ± 2.1	98.1	6	99.4	6.4
800	96.4 ± 4.3	100.8 ± 1.6	100.9	5.3	98.4	5.5
Desipramine						
5	91.4 ± 2.1	80.9 ± 2.3	104.2	6.3	101.2	12.6
50	93.2 ± 6.6	100.4 ± 5.7	101.9	2.1	99	3.1
500	92.2 ± 6.6	87.1 ± 3.4	100.4	5.5	100.4	5.1
800	90.3 ± 2.9	100.4 ± 2.1	101.1	5.5	101.3	5
Clonazepam						
5	77.2 ± 2.7	85.3 ± 1.5	98.5	7.6	106.2	14.3
50	78.3 ± 7.2	80.0 ± 1.6	90.9	8.8	98.3	9.8
500	75.9 ± 4.8	80.4 ± 1.1	94.7	6.2	99	11.4
800	76.3 ± 4.3	85.2 ± 4.4	100	3.8	99.5	7.4
Chlorpromazine						
5	107.5 ± 5.4	97.5 ± 2.4	97.9	4.6	100.9	4.8
50	106.8 ± 7.6	100.3 ± 0.8	98.3	2.6	99.7	2.5
500	100.6 ± 6.8	99.4 ± 1.1	98.8	4.3	98.6	2.8
800	98.2 ± 5.0	103.3 ± 4.8	100.1	2.9	100.6	3.3
Diazepam						
5	98.3 ± 4.7	100.4 ± 2.0	98.6	2.2	101	1.8
50	97.4 ± 4.9	104.1 ± 8.5	99	1.8	100.2	1.3
500	96.2 ± 6.5	101.2 ± 6.1	98	2.5	100.4	2.3
800	99.3 ± 2.4	102.4 ± 0.7	99.7	1.2	100.8	1.1

Recovery and matrix effect analysis was performed in triplicate on a single day (n=3),

Intraday precision analysis was performed on a single day (n=5)

Interday precision analysis was performed in triplicate over three consecutive days (n=9)

サンプルスパイク血液から MonoSpin C18 (M18-200)を用いて薬物を回収したクロマトグラム及び、ブランク血液からの処理後のクロマトグラムを Figure 2-6 に示す。血液を含まないサンプルからはピークは確認されず、マトリクス由来の夾雑は分析に影響しないことが示唆された。実際の患者サンプルを前処理、分析したデータを右のクロマトグラムに示す。実際の患者のサンプルからは、Amitriptyline とその代謝物、 Nortriptyline、 Diazepam、 Chlorpromazine Lidocaine が検出された。検出の際、カラムの目詰まりは起きず、薬物を抽出することができた。血液中の検出された薬物の濃度は 15~582 ng/mL であった。



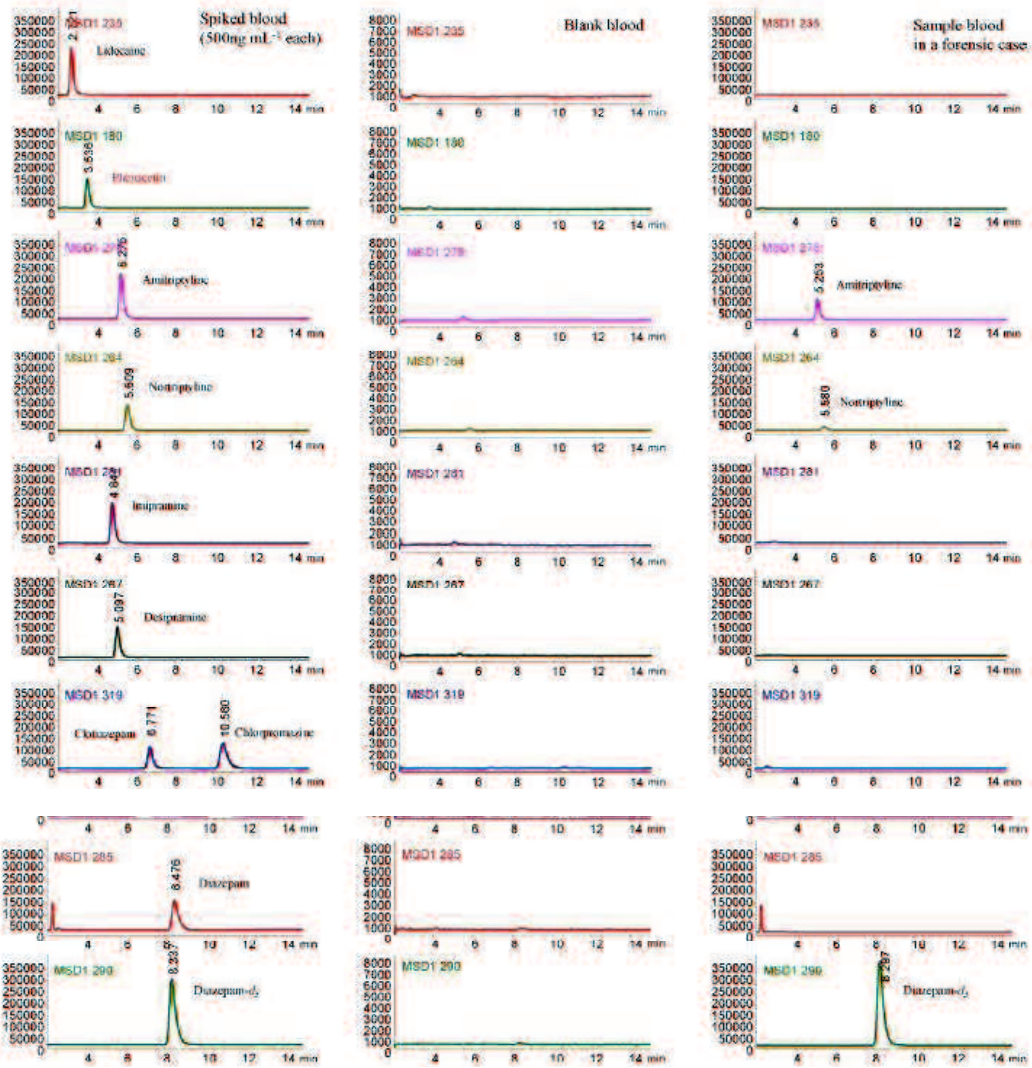


Figure 2-6 Typical chromatograms of the tested drugs extracted from blank and spiked whole blood samples using MonoSpin (M18-200).

#### 2-2-4 結言

サンプルマトリクスとして複雑な全血サンプルから薬物が回収可能な前処理用モノリススピニングカラムの作製を行った。シリカモノリスのスルーポアを大きく設計したことで、サンプルによる目詰まりを回避することが可能であった。使用時回転数は 1,000rpm が最適であり、LOD としては 0.5~1 ng/mL のであり、測定範囲としては 2~1,000 ng/mL において測定することが可能であった。迅速に血液を処理し、分析を行うための前処理手法として期待される。

引用文献

- [1] K.Morisato, S.Miyazaki, M. Ohira, M. Furuno, M. Nyudo, H. Terashima, K. Nakanishi, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1215, 44
- [2] A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Yahata, M. Yashiki, M. Nagao, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1208, 71
- [3] T. Saito, S. Morita, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, M. Nagao, S. Inoguchi, *J. Chromatogr. B*, **2008**, 872, 186
- [4] T. Saito, R. Yamamoto, S. Inoue, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, *J. Chromatogr. B*, **2008**, 867, 99
- [5] S. Miyazaki, M. Y. Miajh, K. Morisato, Y. Shintani, T. Kuroha, K. Nakanishi, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 39
- [6] 太田彦人、渡邊大助、数井優子、大津留修、宮崎翔太、大平真義、 *Abstract of 14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Association of Forensic Sci. Tech.*, **2008**, 37
- [7] S. Miyazaki, K. Morisato, N. Ishizuka, H. Minakuchi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Nakanishi, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1043, 19
- [8] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, **1998**, 797, 121
- [9] A.E. Steuer, A.M. Forss, A.M. Dally, T. Kraemer, *Forensic Sci. Int.* **2014**, 244, 92
- [10] L. Zhang, Z. H. Wang, H. Li, Y. Liu, M. Zhao, Y. Jiang, W.S. Zhao, *J. Chromatogr. B*, **2014**, 955, 10
- [11] D.J. Christoffersen, C. Brasch-Andersen, J.L. Thomsen, M. Worm-Leonhard, P. Damkier, K. Brøsen, *Forensic Sci. Med. Pathol.* **2015**, 11, 193
- [12] L. Truta, A. L. Castro, S. Tarelho, P. Costa, M. G. Sales, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 128, 496
- [13] Y. Sakamoto, Y. Jinno, I. Shinodzuka, Y. Iwasaki, R. Ito, K. Saito, *Anal. Sci.* **2014**, 30, 271
- [14] R. Jain, R. Singh, *Anal. Chem.* **2016**, 80, 156
- [15] K. Nakanishi, *J. Porous Mat.*, **1997**, 4, 67
- [16] A. Namera, S. Yamamoto, T. Saito, S. Miyazaki, H. Oikawa, A. Nakamoto, M. Nagao, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, 2232
- [17] A. Namera, A. Takeuchi, T. Saito, S. Miyazaki, H. Oikawa, T. Saruwatari, M. Nagao, *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35, 2506
- [18] C. Uhlschmied, C. Krieg, G. Abel, M. Popp, C. W. Huck, *G. K. Open Anal. Chem. J.*, **2013**, 7, 12
- [19] B. A. Bidlingmeyer, *LC Magazine*, **1984**, 2, 578.
- [20] M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856, 3
- [21] M. Tuzen, M. Soylak, L. Elci, *Anal. Chim. Acta* **2005**, 548, 101

### 3 章 微量前処理用固相抽出チップの作製

#### 3-1 トリプシンモノリスチップの作製とタンパク質の迅速消化への適応

##### 3-1-1 緒言

プロテオミクス分野において、タンパク質の機能及び構造解析をする場合、低濃度低容量のサンプルを迅速に分析する必要がある。分析手法としては、2次元ゲル電気泳動法[1]によって分離したアクリルアミドゲルを切り出し、タンパク質のゲル内消化後、質量分析器によって分析する手法[2]や、LC/MS/MSを用いたペプチドシーケンススタグ法が挙げられる[3、4]。いずれの手法においても分析時にはトリプシンのようなタンパク質消化酵素によって、タンパク質をペプチドに消化し、質量分析器において測定される[5]。

しかしながら、トリプシンによる消化反応は反応温度 37°Cにおいて長時間サンプルを処理する必要がある[6]。また一般にサンプル内のタンパク質量に対して 50 分の 1 から 100 分の 1 量のトリプシンを加えて消化を行うため、微量なサンプルを消化しようとした場合、消化効率が低下する。これらをふまえ、微量タンパク質を迅速に消化するための試みが行われている。一つの方法として、キャピラリーLCにトリプシン固定化カラムを用いてカラムスイッチングとの併用により、サンプル消化後直接分析する報告がされている[7]。固定化カラムを用いるメリットとして、サンプルに対するトリプシンの比率を大きくできることによる消化効率の向上や、得られるペプチド量の再現性の向上、また、トリプシンの自己消化によるペプチドのコンタミを軽減可能な点が挙げられる。しかしながらトリプシンの反応効率が流速に影響を受けたり[8]、分離に関わるカラムも近年多次元化されたりしているため、トリプシンカラムと組み合わせたシステムの最適化が複雑化する問題が挙げられる。

一方、シリカモノリスを分離メディアとして用いることが近年注目されており[9]、キャピラリーLCや電気泳動、LCチップなどに幅広く応用されている[10]。宮崎らはこれまでに、ODS修飾やチタニアをコートしたシリカモノリスをピペットチップに装着したピペットチップ型前処理ツールについて報告している[11、12]。ODS修飾をしたモノリスチップはサンプルの脱塩や濃縮、チタニアをコートしたモノリスチップはリン酸化ペプチドの選択的な捕集をすることが可能であった。しかし、このピペットチップでは、各リガンドを修飾後チップへ熱溶着により固定化しているため、タンパク質などの変性しやすいサンプルを固定することは困難である。また、既にリガンド固定用のゲルを詰めたカラムが市販されているが、固定化には多量のサンプルと、スキルが必要であり、簡便で低容量に対応したアフィニティツールが望まれている。

そこで本章では微量のサンプル中のタンパク質を、ピペッティングにより迅速に固定化し、アフィニティチップや、バイオリクターを作製する方法について報告する。今回はそのモデルとして、トリプシンを用い固定化と微量タンパク質の迅速消化への応用を試みた。

### 3-1-2 実験

#### 3-1-2(1) 試薬

テトラエトキシシラン (TEOS)は信越化学、D-glucitol はナカライ社からそれぞれ購入した。TPCK 処理トリプシン(牛膵臓由来) は Worthington 社から購入した。トランスフェリン(ヒト)、牛血清アルブミン、N-a-benzoyl-dl-arginine ethyl ester、polyethylene oxide (PEO:Mw=100,000)、トリス緩衝液を作製するのに使用した TIMA base は、Sigma-Aldrich より購入した。Disuccinimidyl suberate、HPLC グレードトリフルオロ酢酸は和光純薬株式会社より購入した。リン酸緩衝液を作製するのに使用したリン酸水素 2 ナトリウム 2 水和物、リン酸 2 水素ナトリウム、HPLC 移動相を作製するのに使用したアセトニトリルはキシダ化学より購入した。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値 18.3 MΩ/cm のものを使用した。

#### 3-1-2(2) 装置・器具

HPLC システムはジーエルサイエンス社製 PU611 ポンプ、UV702 UV/VIS 検出計、DM-22AP 小容量用ミキサー、705 カラムオープンを用いて行った。サンプルインジェクターはモデル 8125(レオダイン社製)を用いた。分析用カラムとして、Inertsil WP300 C8 (4.6 mm I.D. x 150mm, 5 μm、ジーエルサイエンス社製)を用いて実施した。装置の流速は 1 mL/min を用い、溶離液は 0.1% TFA を含むアセトニトリルと、0.1% TFA を含む水溶液を用いて、グラジエント分析により分析を行った。キャピラリーHPLC システムは、ジーエルサイエンス社製 capillary HPLC system (MP711、MP710 Micropump)を用い、インジェクターはバルコ社製 Model C4、分析用カラムは MonoCap for FastFlow (0.2 mm I.D. 150 mm )を用いた。質量分析計は日本電子社製 Accu TOF JMS-T100LC を用いて実施した。スキャン分子量範囲としては、300-1,500 m/z の範囲での測定を行った。

### 3-1-2(3) アミノ基修飾モノリスシリカの調製

2章の情報を基に、シリカモノリスゲルの作製を行った[13]。得られたシリカモノリス、ゲル径 2.8 mm の棒状モノリスを厚さ 1 mm になるようにダイヤモンドカッターにより調製した。細孔径、骨格系、表面積は Autosorb-3B 窒素吸着システム Quantachrome(社)を用いて確認した。

作製したシリカモノリスディスクへ、3-アミノプロピルトリメトキシシランを用いてアミノ基を修飾した[14]。アミノ基修飾モノリスディスクは、トリプシン固定用のディスクとして使用した。カラム容量 200  $\mu$ L のチップの先端へ超音波溶接により、アミノ基修飾モノリスディスクを固定化した。開発したシリカモノリスチップの画像および固定化したディスクの電子顕微鏡の写真を Figure 3-1 に示す。

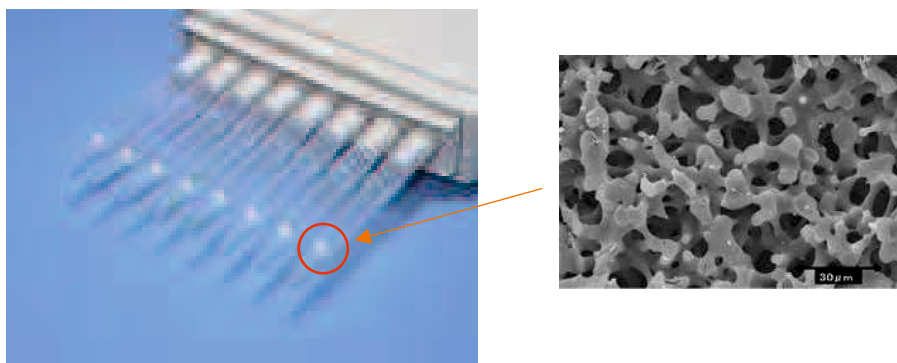


Figure 3-1 Photograph of the monolithic silica fixed in pipette tips.  
Monolithic silica gel was fixed into 200  $\mu$ L tip.

シリカモノリスへのアミノ基の修飾量測定は MAC Science 社製の Thermal analysis システムを用いて実施された。

### 3-1-2(4) アミノ基修飾シリカモノリスへのトリプシンの固定化とタンパク質消化

下記に、タンパク質固定方法の概念図(Figure 3-2)を記載する。シリカ表面において NHS 基を用いたアミノ基の修飾は、SPR 表面のチップへのリガンド固定化方法として知られている[15]。本章の研究においては、Disuccinimidyl suberate(DSS)をトリプシン固定化のための二価架橋試薬として用いた。トリプシン固定化モノリスは下記フローに従って修飾された。まずアミノ基修飾モノリスを 200  $\mu$ Lチップの先端に固定化した。そして、10 mg/mL DSS 溶液 200  $\mu$ L アセトニトリル溶液を 10 回吸引吐出することで、DSS を修飾した。その後、200  $\mu$ Lアセトニトリルを 5 回吸引吐出することでチップを洗浄した。最後に 200  $\mu$ L の 5 mg/mL トリプシン溶液を吸引吐出することで、トリプシンを固定化した。残存する DSS の官能基を 500 mM Tris-HCl (pH7.5) 200  $\mu$ Lを吸引吐出することでブロッキングを行った。固定化されたトリプシンの量は、固定化後の溶液中のトリプシン量を確認することで算出した。固定化されたトリプシンの活性測定は BAEE の消化率を確認することで行われた。

Immobilization of Trypsin by pipetting procedure

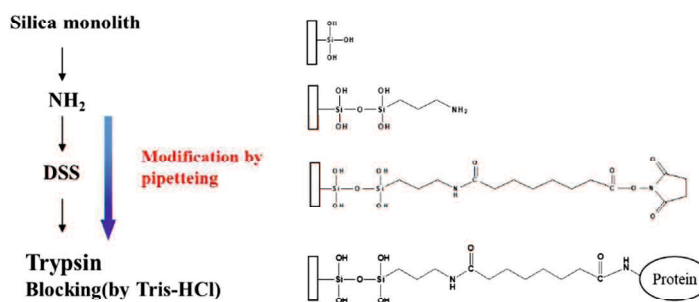


Figure 3-2 Immobilization of trypsin by pipetting procedure.

### 3-1-3 結果及び考察

前項によって作製したトリプシン固定化チップについて、チップへのトリプシンの固定化量、作製したチップの活性を評価した。

#### 3-1-3(1) バッチ処理によるモノリスへのトリプシンの固定化

モノリス表面へのトリプシンの固定化効率は開発したトリプシンチップの評価において重要な要素の一つである。もし十分な固定化量が得られない場合には、消化時において十分に対象タンパク質と反応を行うことができないため、高い固定化効率が望まれる。一般的な手法の一つとして、エポキシ基を導入した担体を用いた固定方法が挙げられるが、固定化にはアルカリ条件下で 24 時間近くの反応時間を要する為、アルカリ溶液に耐久性が低いシリカゲルであるシリカモノリスには適していない。一方で本報告ではアミノ基及び二架橋性試薬である DSS を用いることで、短時間での固定化を試みた。

Table 3-1 にバッチ処理により固定したモノリス表面へのトリプシンの固定化量を示す。アミノ基、DSS、トリプシンと処理を重ねるごとに、表面に修飾される炭素量が増加した。しかしながら、バッチ処理によりトリプシンやタンパク質のリガンドを固定化するには、多くの溶液量を必要とするため、微量のサンプルの固定、低コストで固定化することは困難である。またチップへのモノリスの固定化は超音波溶着などチップに熱をかけて固定化を行うため、熱に不安定なタンパク質の固定化には適していない。トリプシン以外の熱に対して不安定なタンパク質に対して適応を考慮すると、この点は改善しなければならない点である。

Table 3-1 Carbon contents of silica monolith on each process of trypsin immobilization by batch method.

functional group on the surface of monolith	carbon content (%)
amino group	2.43
DSS-treated	4.32
trypsin-immobilized	5.12

TG-DTA Data



### 3-1-3(2) シリカモノリス固定化チップへのトリプシンの固定化

予めアミノ基修飾モノリスを固定化したチップに対しての溶液を通過させることでのトリプシンの固定化を検討した。Table 3-2 には固定化されたトリプシンの量を示した。異なる濃度を有するトリプシン溶液をピペッティングによりモノリスに通過させ、固定化量を算出した結果、10~500  $\mu\text{g}$  のトリプシンを用いた際約 80%以上の固定化効率が得られた。用いたシリカモノリスの表面積が 100  $\text{m}^2/\text{g}$  と非常に大きいモノリスを用いた結果、大きな固定化量が得られたと考えられる。

Table 3-2 Amount of trypsin on the surface of silica monolith via on-flow immobilization with pipetting.

concentration of trypsin reagent ( $\mu\text{g}$ )	amount of immobilized trypsin ( $\mu\text{g}$ )	R.S.D (%) (n=4)	yield (%)
10	8.20	3.8	82
25	21.2	2.0	85
50	43.5	1.9	87
100	89.3	0.6	89
500	433	0.5	87
1000	716	0.4	72

バッチ処理による固定化とは異なり、強制的に溶液を通過させることで、高い固定化効率と少ない溶液量での固定化が可能になった。またアガロースゲルなどの機械的強度が低いゲルの場合には、試験に用いたアセトニトリルなどの有機溶媒は用いることができず、活性試薬が加水分解しやすい水溶液中での修飾が求められるため、結果として固定化効率が低下する場合がある。更にシリカゲルやポリマーゲルを詰めたチップの場合にも、安定した通液を行うためには粒子の大きいゲルを詰める必要があり、結果としてチップへの修飾には数十回の溶液の通過が求められる。ビーズをバッチ内で修飾する場合、再現良く修飾するには多量のサンプルが必要である。またビーズの洗浄や遠心などのハンドリングにおいて、ビーズが損失してしまう原因になる。モノリスを用いたピペッティングによる固定化方法を用いることで、微量容量のサンプルに対しても再現良く固定化することが可能であることが示された。

本手法によるリガンドの固定方法は、たとえば Protein A やレクチンなどのアフィニティ精製のタンパク質も同様の操作で固定可能なが示唆される。さらに、縮合剤である DSS を修飾する時点からピペッティングにより修飾しているため、スパーサーの長さや活性基の種類もタンパク質の種類に応じて選択して修飾することが可能である。それゆえ、本手法は幅広いアフィニティツールの作製に応用可能である。

### 3-1-3(3) トリプシン固定化モノリスチップの活性測定

トリプシンの活性は BAEE の消化効率を確認することで行った[16]。Figure 3-3 に BAEE の消化について示す。Figure 3-2(a)は消化前のサンプルのクロマトグラムのパークである。図 2(b)はトリプシンチップを用いて、室温 10 回のピペッティング後のサンプルのパークである。アルギニンエステルの消化に伴い消化物を確認することができた。活性値は約 2.5 unit/tip であり、高い活性を示した。この高い活性は、固定化したトリプシンの量に依存すると考えられる。

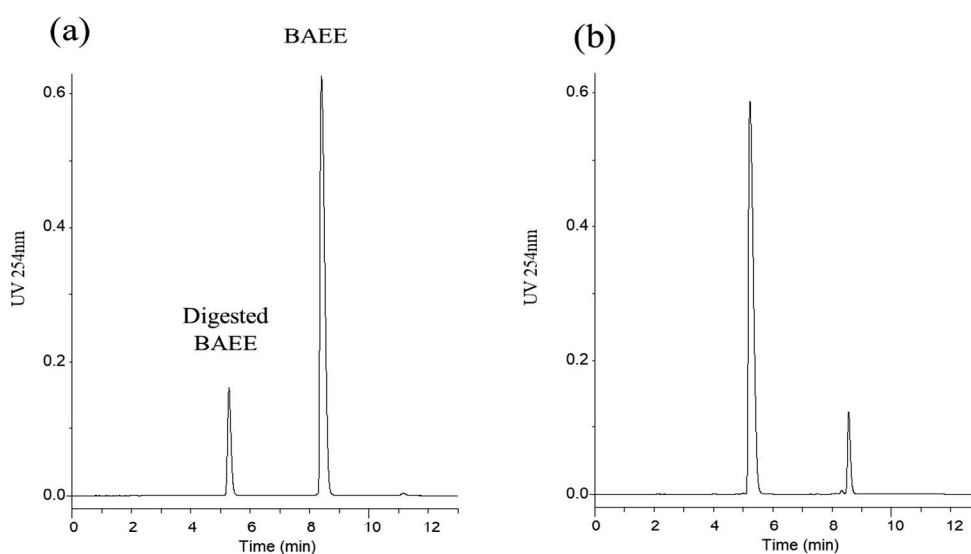


Figure 3-3 Chromatograms of the tryptic digestion of BAEE.

Without digestion of BAEE, (b) with digestion of BAEE utilizing Monolith Tip. The chromatographic conditions are as the follows: eluent. (A) 0.1% trifluoroacetic acid in aqueous, (B) 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile: flow rate 1mL/min, Gradient program, 0-5 min 10% B to 30%, Detection: UV 254 nm. Temperature: 35°C, Column: Inertsil WP300 C8

### 3-1-3(4) シリカモノリス固定化チップの安定性

本チップにおけるトリプシンの固定化量は 100  $\mu\text{g}$  以上が固定化されている為、溶液中の基質に対する酵素の割合を増加させることが可能である。そのため、短時間での消化が可能である。

作製したトリプシンチップの保存安定性について Figure 3-4 に示す。作製したチップは 37°C での保存においてもほとんど活性の低下が見られず、20 日後も高い活性を示していた。担体へ固定化することにより、酵素の活性が保たれた状態で保存可能であることが示された。

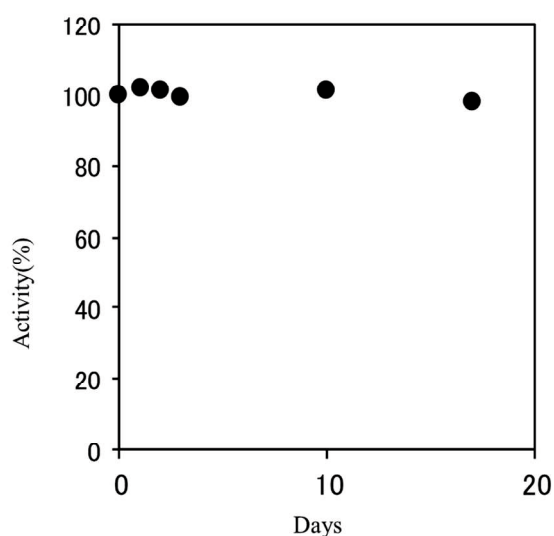


Figure 3-4 Stability of the MonoTip Trypsin activity.

Hydrolysis activity of MonoTip Trypsin calculated as % initial activity (digested BAEE area). Stored at 37°C

### 3-1-3(5) トリプシン固定化チップを用いたタンパク質の迅速消化

作製したトリプシンチップを用いてタンパク質の消化を試みた結果、未変性状態の BSA はほとんど消化されなかった。タンパク質の立体構造は、ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合等によって構造を安定化している。ピペッティングなどの短い消化時間においては、ポリペプチド鎖内のトリプシンによって認識される部位が外部に露出せず、トリプシンの活性サイトが接触できないために、消化反応が起きず、ペプチドが得られないと考えられた。ポリペプチド鎖内のジスルフィド結合などが少ないタンパク質においては、ピペッティングによる消化ペプチドを確認することができるが、完全な消化反応は起こらなかった。トリプシンカラムを用いたオンライン消化反応においても、塩酸グアニジン添加したサンプルを用いるなど、タンパク質の立体構造を変性することにより、消化効率を上げている報告がある。一方で、プロテオーム解析におけるタンパク質の消化は、タンパク質を還元アルキル化した状態のタンパク質を消化して解析をする。このことにより正確な配列情報と、ト

トリプシンによって得られる消化ペプチドの再現性が向上する。

Figure3-5 に還元アルキル化後の BSA を消化した結果を示す。左図は消化前のピークであり、室温 (20 度) 10 回のピペッティングにより、右図の通りペプチドを得ることができた。サンプルの代わりに、バッファーのみをピペッティングした際はこのようなピークが見られなかったことから、トリプシンは安定に固定化されていると考えられる。

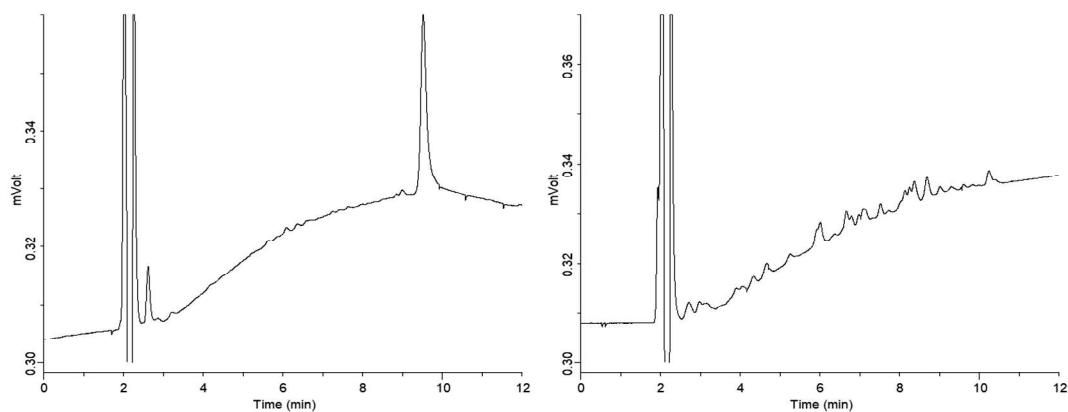


Figure 3-5 Chromatogram about digestion of denatured BSA by using MonoTip Trypsin.

(a) Before digestion of BSA (b) After digestion of BSA by MonoTip Trypsin

Mobile phase A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, B: 0.1% TFA in acetonitrile.

Flow rate: 1 ml/min. Linear gradient program: 0 min 20% B, 10 min 60 % B hold 10min.

Detection, absorbance at 210 nm, temperature, 35°C. Column Inertsil WP300 C8

Figure 3-6 に 100  $\mu\text{g}$  の BSA とトランスフェリンを消化した結果を示す。通常バッチ法において 100  $\mu\text{g}$  のタンパク質を消化する際、トリプシンの自己消化物のペプチドの混入の影響を減らすため、1~2  $\mu\text{g}$  のトリプシンを用いて 10 時間以上の時間を掛けて消化反応を行う。今回作製したチップでは、10 回のピペッティングにおいてほぼ完全にタンパク質を消化することができた。これは、基質に対する酵素の比を上げることができたことによるものと考えられる。

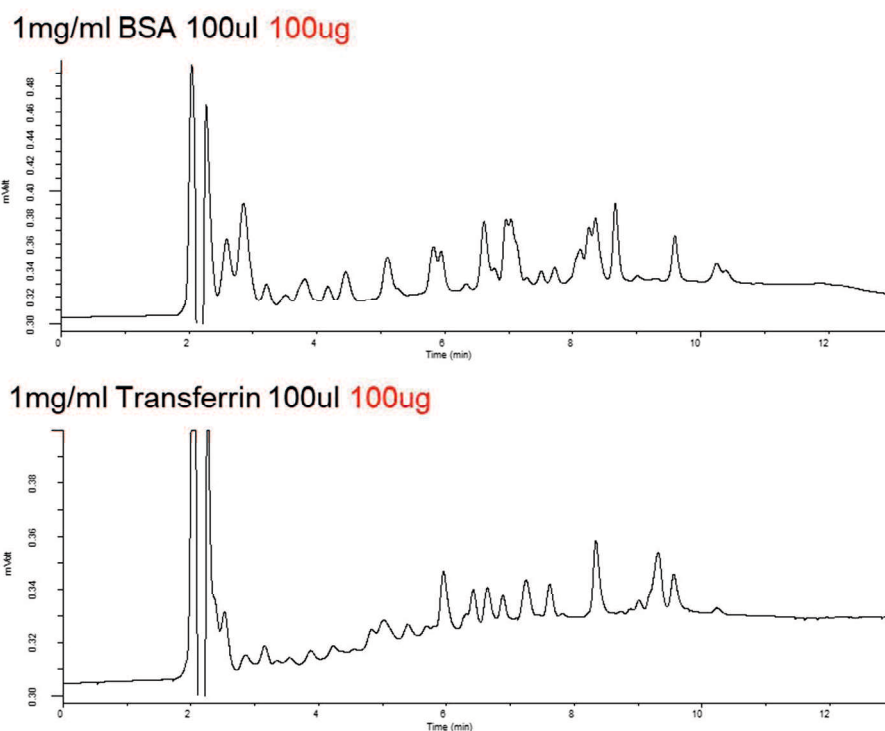


Figure 3-6 Chromatogram about digestion of high concentration denatured BSA and Transferrin by using MonoTip Trypsin.

(a) After digestion of 100ug BSA (b) After digestion of 100ug Transferrin

Mobile phase A: 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA), B: 0.1% TFA in acetonitrile.

Flow rate: 1 ml min. Linear gradient program: 0 min 20% B, 10 min 60 % B hold 10min.

Detection, absorbance at 210 nm; temperature, 35°C. Column Inertsil WP300 C8

宮崎らがこれまでに報告した C18 を固定したピペットチップと今回作製したトリプシン固定化チップを用いることで、プロテオミクスにおける前処理をピペッティングにより行うことが可能である。つまり、還元アルキル化後のサンプルをトリプシンチップで消化後、C18 チップで脱塩し、LC/MS/MS 解析に用いるサンプル調製が可能になった。

### 3-1-3(6) トリプシン固定化チップを用いたタンパク質の迅速消化とLC/MS 分析

作製したトリプシン固定化チップを用いて、各種タンパク質の消化を行った後、LC/MS による分析を行った。Figure 3-7 は  $\beta$  カゼインの消化結果を示す。比較としてバッファのみを分析した結果、バッファ溶液をトリプシンチップでピペッティングを 20 回行った結果を掲載する。トリプシンは共有結合により、シリカモリスへ結合している為、バッファをピペッティングしても脱離することなく、バッファ溶液と同じパターンが見られた。

一方で、 $\beta$  カゼイン溶液を 20 回ピペッティングした溶液中には、多量のペプチドが検出された。トリプシンによって  $\beta$  カゼインが消化され、結果としてペプチドが得られたと考えられる。

#### $\mu$ LC-MS analysis

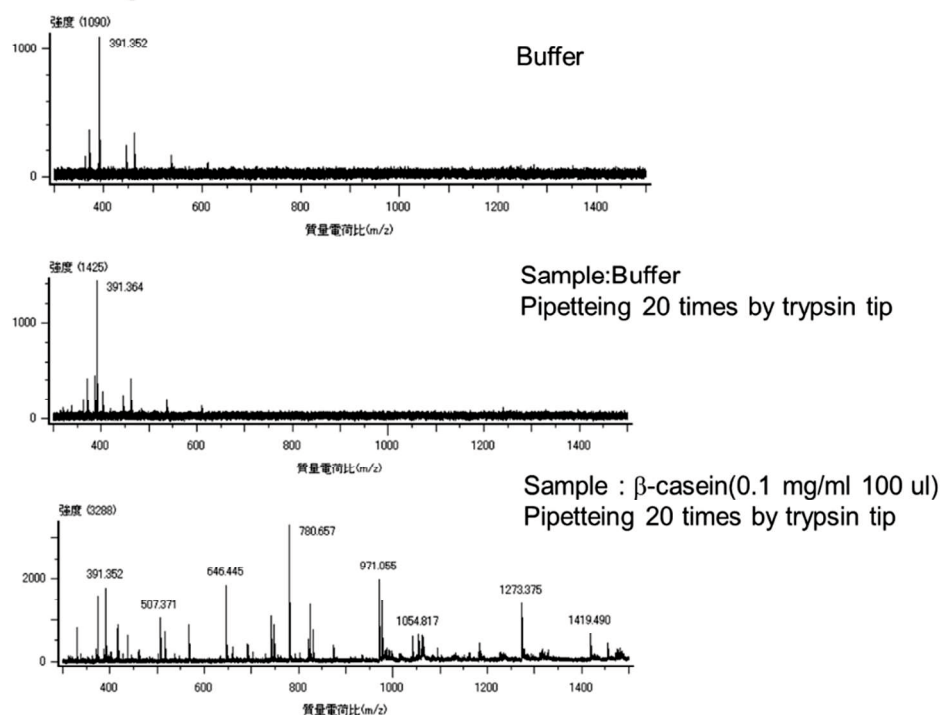


Figure 3-7 ESI ion trap MS of the digestion products using MonoTip Trypsin

作製したトリプシンチップを用いて、 $\beta$  カゼイン、BSA、トランスフェリンを消化したパターンを Figure 3-8 に示す。各タンパク質に応じたパターンが得られ、いずれのタンパク質においてもトリプシンの認識部位が機能し消化されていることが分かった。

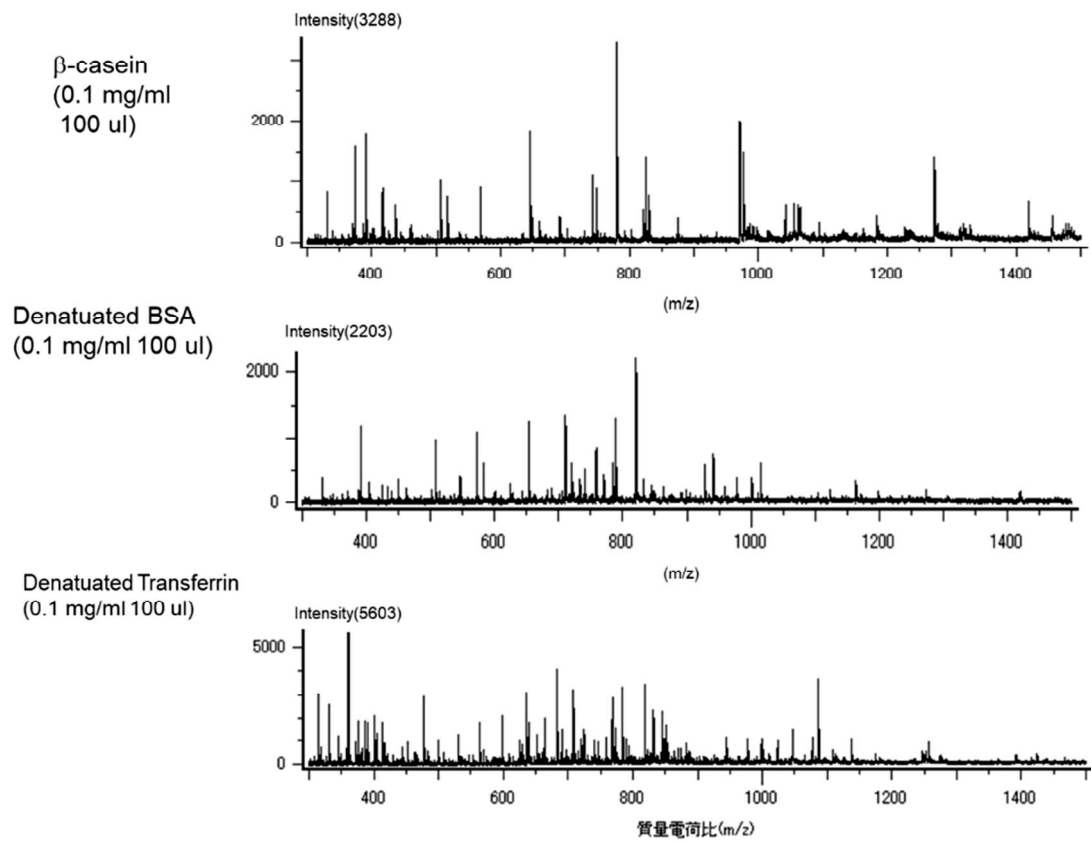


Figure 3-8 ESI ion trap MS of the digestion products using MonoTip Trypsin

Table 3-2 及び Figure3-9 は、 $\beta$  カゼインの消化時に得られるペプチド配列と、実際に得られたペプチド配列について記載する。 $\beta$  カゼインに帰属されるペプチドが多数検出されており、トリプシンの消化における選択性が保たれた状態で固定化できていることが分かった。

Table 3-2 Peptide masses, sequences obtained by MonoTip Trypsin digestion of a 1 mg/ml  $\beta$ -casein sample

Detected mass [M + H] <sup>+</sup>	Peptide mass [M + H] <sup>+</sup>	Position	Sequence
-	3122.95	17-40	ELEELNVPGEIVESLS(P)S(P)S(P)EE S(P)ITR
1093.77	2186.17	199-217	DMPIQAFLLYQEPVLPVVR
-	2061.83	48-63	FQS(P)EEQQQTEDELQDK
830.67	830.45	192-198	AVPYPQR
780.71	780.50	185-191	VLPVPQK
748.58	748.37	123-128	EMPFPK
742.64	742.45	218-224	GPFPIIV
646.32	646.32	115-120	EAMAPK

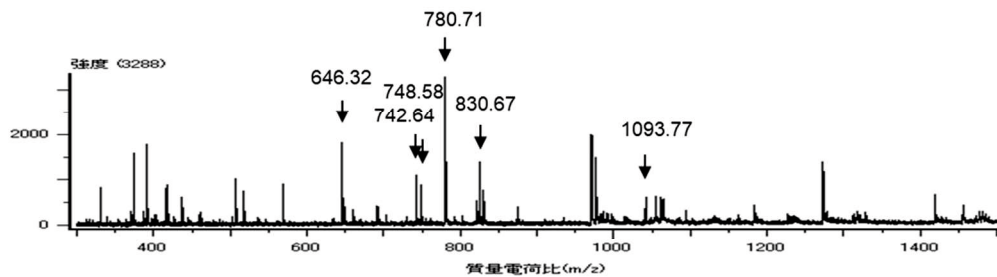


Figure 3-9 ESI ion trap MS of the  $\beta$ -casein digestion products using trypsin tip



Figure 3-10 はトリプシン固定化チップ及び、15 時間、37°Cでバッチ消化を行った BSA サンプルを LC/MS 分析した際のクロマトグラムである。消化ペプチドをそれぞれの消化法において得られていることが分かるが、完全に一致は見られなかった。これはトリプシンの消化効率の違いだけではなく、消化したペプチドがモノリス表面へ吸着していることが考えられ、非特異吸着を軽減する必要があると考えられた。

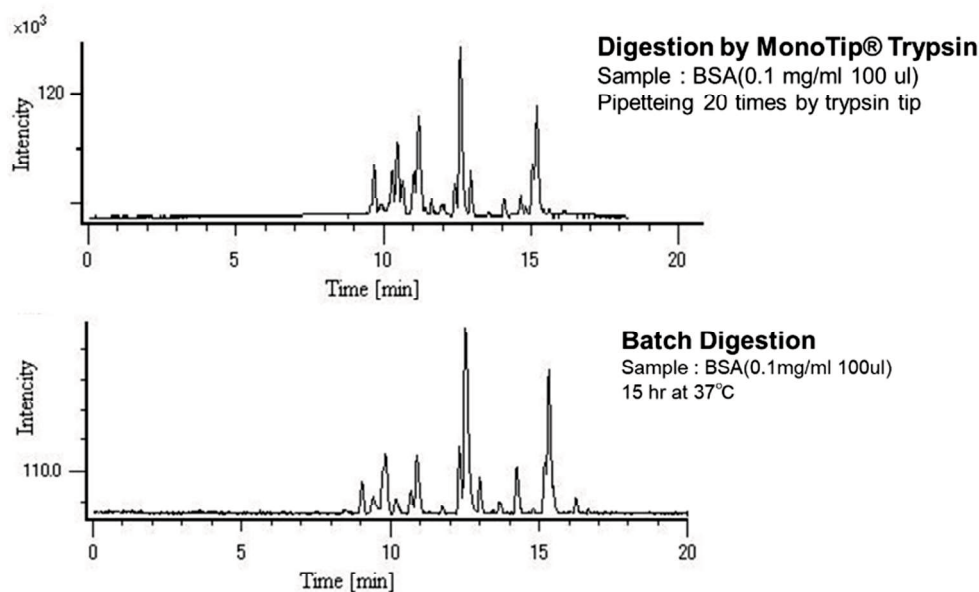


Figure 3-10 ESI ion trap MS of the BSA digestion products using trypsin tip

#### 3-1-4 結言

シリカモノリスへトリプシンを固定化したタンパク質消化用チップの作製、評価を行った。モノリスの修飾は、バッチ法もしくはピペッティングにより行うことが可能であった。チップ 1 本あたり 100 µg 以上のトリプシンを固定化可能であり、還元アルキル化後のタンパク質をピペッティング処理により消化を行うことが可能であった。また、10 分以内でタンパク質の迅速消化が可能になった。本手法を用いると、トリプシン以外のタンパク質に対してもピペッティングによる固定化が可能であり、より少ないサンプル中のタンパク質を固定化可能なアフィニティチップの作製が可能になると考えられる。

## 3-2. 親水性基を導入したシリカモノリスチップの作製と、糖鎖精製への適応

### 3-2-1. 緒言

オミックス解析における対象成分として、ペプチド以外にタンパク質に結合した糖鎖構造も挙げられる。生体試料中の約 6 割のタンパク質は糖鎖が結合した糖タンパク質として存在していると言われており、糖鎖構造は極めて種類が多い[17-21]。この糖鎖の構造分布がその機能発現との関係性が指摘されており、近年では診断用マーカーとしても注目されている[22-24]。そのため、糖鎖の構造変化を迅速かつ高感度に分析することができれば、診断薬や治療薬の開発につながることを期待される。近年では様々な手法により、糖鎖解析、グライコプロテオミクスが行われている[25-29]。しかしながら、糖鎖は親水性が高く、一般的に用いられる C18 やスチレンジビニルベンゼン等の疎水性担体カラムにより保持、精製を行うことができない。

一方で、糖鎖は UV 吸収を持たないケースがほとんどであり、蛍光標識物質などで誘導体化後、蛍光 HPLC 法や、質量分析法で分析される[30-32]。糖化タンパク質からの糖鎖の切り出し、誘導体化後の精製、LC/FL 分析、分取後の精製と、様々な工程において、精製が必要であり、様々な手法が提案されている (Figure 3-11)。グラファイトカーボンを用いた方法により、C18 や SDB ポリマーと比べ、より強い相互作用により糖鎖を吸着、精製する手法も報告されている[33]。ボロン酸はシスジオールを有する化合物と可逆的に環複合体を形成し、精製に用いることができると報告されている[34、35]。糖に対して特異的に結合するタンパク質であるレクチンを固定した担体を用いた精製も提案されており、例えばコンカナバリン A (ConA) はグルコースやマンノース認識レクチンであるが、ConA は高マンノース型や分岐マンノース側鎖を持つ混成型糖鎖に強い親和性を示し、複合型では、2 本鎖糖鎖に対してのみ弱い結合性を示す[36-40]。

アミノ基やアミド基が修飾された親水性の高い担体と、水-アセトニトリルの混液により、高極性化合物を保持する親水性相互作用クロマトグラフィー (Hilic) が近年利用されており、例えば結晶セルロースやセファロースを用いて、吸着用としてブタノール、エタノール、水の混液を用いた回収についても報告されている[41]。本章では、シリカモノリスへ親水性基としてアミド基、アミノ基、ジオール基を導入し、糖鎖の精製に適応し、その結果についてまとめて報告する。

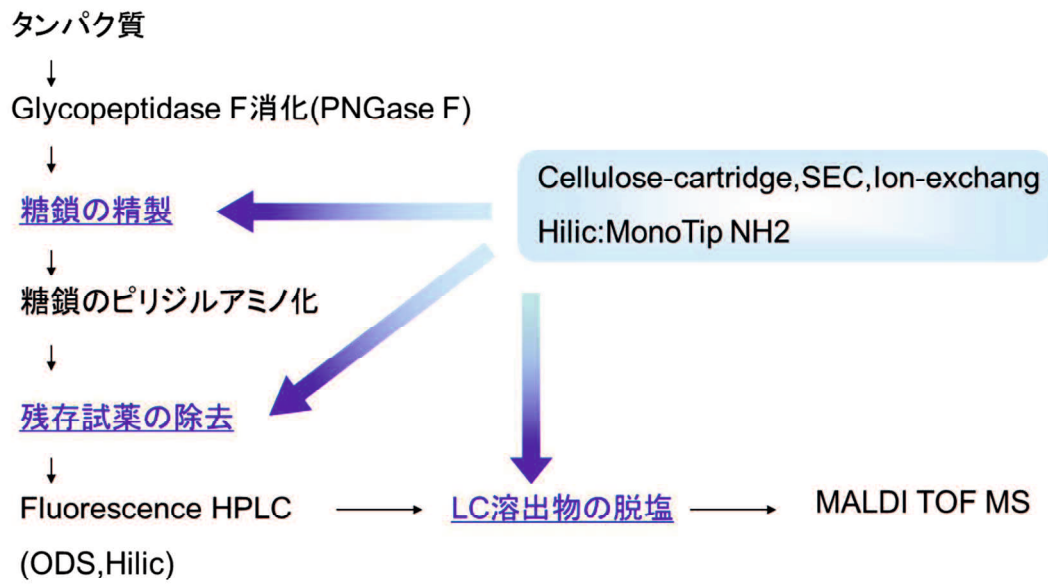


Figure 3-11 Purification of sugar chains using several hydrophilic modified tools.

### 3-2-2 実験

#### 3-2-2(1) 試薬

Tetraethoxysilane (TEOS)は信越化学、D-glucitol はナカライ社からそれぞれ購入した polyethylene oxide (PEO: Mw=100,000)、リボヌクレアーゼ B、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIIIは、Sigma-Aldrich より購入した。HPLC グレードトリフルオロ酢酸は和光純薬株式会社より購入した。1-20mer グルコースオリゴマー、酢酸アンモニウム、ブタノール、ギ酸、2-アミノピリジン、アセトニトリルはキシダ化学より購入した。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値、18.3 MΩ/cm のものを使用した。

#### 3-2-2(2) 装置・器具

HPLC システムはジーエルサイエンス社製 PU611 ポンプ、UV702 UV/VIS 検出計、DM-22AP 小容量用ミキサー、705 カラムオーブンを用いて行った。サンプルインジェクターはモデル 8125(レオダイン社製)を用いた。分析用カラムとして、親水性相互作用による糖鎖の分析には Asahipak NH2P50 (4.6 mm I.D. x 250 mm、5 μm、昭和電工製)、Hilic モードでの移動相は酢酸、トリエチルアミンとアセトニトリルの混液を用いて分離を行った。検出は蛍光検出器 FL7510 を用い、励起波長 310 nm、蛍光波長 380 nm を用いた。酸性糖鎖の分離には Inertsil ODS-3(4.6 mm I.D. x 150 mm、5 μm) を用いて、酢酸アンモニウムとブタノールの混液を用いて検出は蛍光検出機を用いて、励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm で実施した。

#### 3-2-2(3) 親水性基修飾モノリスシリカの調製

3-1-2(3)の実験手法を参考に、アミノプロピル基を導入したシリカモノリスディスク及び、作製したモノリスディスクを固定化したチップカラムを作製した。ジオール基修飾シリカモノリスディスクは 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランを用いてエポキシ基を導入した後、硝酸により開環反応を行うことで、ジオール修飾モノリスを調製し、チップカラムを作製した。

アミド基修飾モノリスシリカは、3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシランをポリマーのアンカーとして修飾し、アクリルアミド、重合開始剤としてペルオキシ 2 硫酸アンモニウムを用いて、シリカモノリス表面に親水性ポリマーであるアクリルアミドを修飾した。

### 3-2-2(4) 親水性基修飾モノリスシリカを用いた糖鎖の精製

アミノ基、ジオール基、アミド基修飾モノリスチップを用いた糖鎖の精製方法について、下記に記載する。まず、100  $\mu\text{L}$  の 50%アセトニトリル溶液を吸引し、吐出し、チップを洗浄した。次に 100  $\mu\text{L}$  の 90%アセトニトリル水溶液を吸引吐出し、平衡化を行った。PA 化糖鎖を 90%アセトニトリルに溶解し、平衡化済みのチップで調製したサンプルを 5 回吸引吐出を行った、洗浄は 100  $\mu\text{L}$  の 90%アセトニトリルで同様に 5 回吸引吐出を行った後、最後にチップから溶出する為、50%アセトニトリル水溶液で 5 回吸引吐出を行った。

#### 親水性基導入MonoTipによるサンプル精製

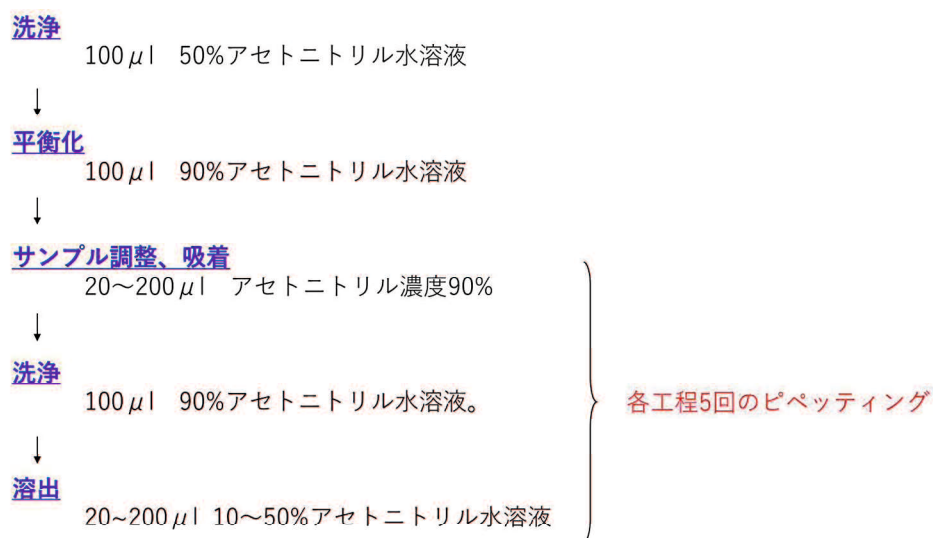


Figure 3-12 Extraction procedure using hydrophilic modified MonoTip

### 3-2-3 結果及び考察

#### 3-2-3(1) 親水性官能基修飾チップを用いた PA 化糖鎖の結合能の検証

糖鎖解析に使用できるサンプル量は非常に微量である場合が多い。例えば、食品中の糖サンプル量が多い場合と比較し、数  $\mu\text{g}$  以下のサンプルから効果的に糖鎖を回収するには、微量サンプルに適した前処理ツールが求められる。

モノリスを固定したチップのゲル容量は  $2 \mu\text{L}$  であり、チップカラムからの対象成分の溶出には、 $50 \mu\text{L}$  以下での回収が可能であり、微量サンプルに適した試験が可能になる。

Figure 3-13 に糖鎖の精製結果を示す。タカラバイオ社製 糖鎖 PA001 の回収において、サンプル濃度  $1\sim 100 \text{ pmol}$  の濃度範囲において、90%以上の回収率が得られた。用いたチップ  $\text{NH}_2$ 、Diol 修飾それぞれにおいて高い回収率を示した。

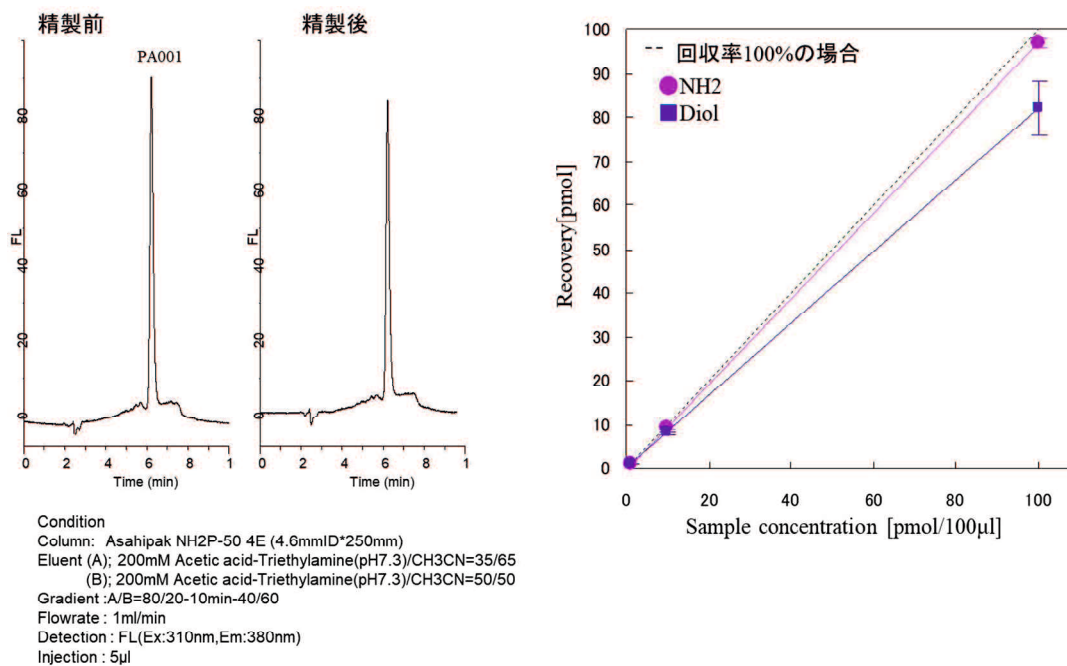


Figure 3-13 Purification of Sugar chain using the hydrophilic residues modified monolithic silica tip

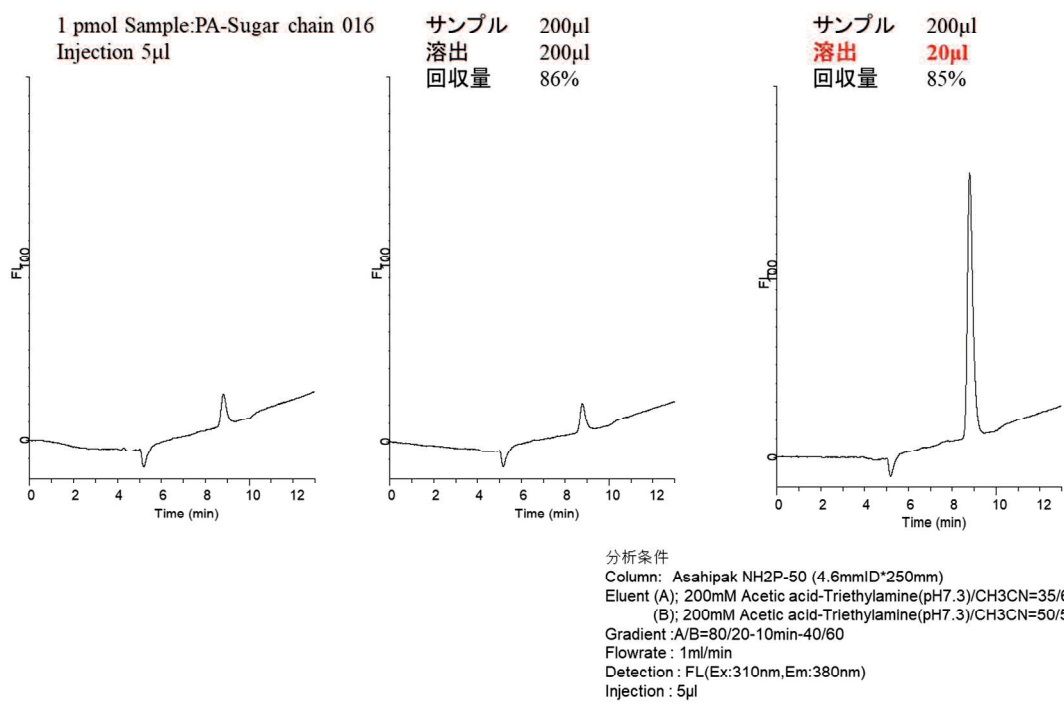


Figure 3-14 Effective concentration of PA-sugar chain using monolithic silica tip

溶出時に必要な液量について確認した結果を Figure 3-14 に示す。サンプルを 200 µL 用いて処理を行い、溶出液量を 20 µL と 1/10 量に減らすことで、効果的に濃縮することが可能であった。溶出液量を減らすと樹脂全体に溶液を十分に満たすことが難しくなるため、回収率は低下する傾向にある。本チップにおいては 20 µL でも十分な回収率を得ることが可能であった。

### 3-2-3(2) 糖鎖回収におけるサンプル中の有機溶媒濃度の影響

親水性相互作用クロマトグラフィーにおいて、サンプル中の有機溶媒濃度は、対象成分の保持に大きな影響を与える。一般的にアセトニトリルの濃度が高くなるほど担体への保持が強くなる傾向にあり、今回作製したチップの使用時における、有機溶媒濃度と回収率の関係を示した (Figure 3-15)。アミノ基を修飾したチップにおいては、80~95%の有機溶媒濃度において、糖鎖の回収率が向上した。ジオール、アミド基の修飾チップではアミドは80~90%、ジオールは90%において高い回収率を示した。一方で中性担体であるジオール、アミドにおいては、有機溶媒濃度が95%になると、極端な保持の減少が見られた。担体表面に対して安定な水和相が形成できない結果、回収率が低下した可能性が考えられた。

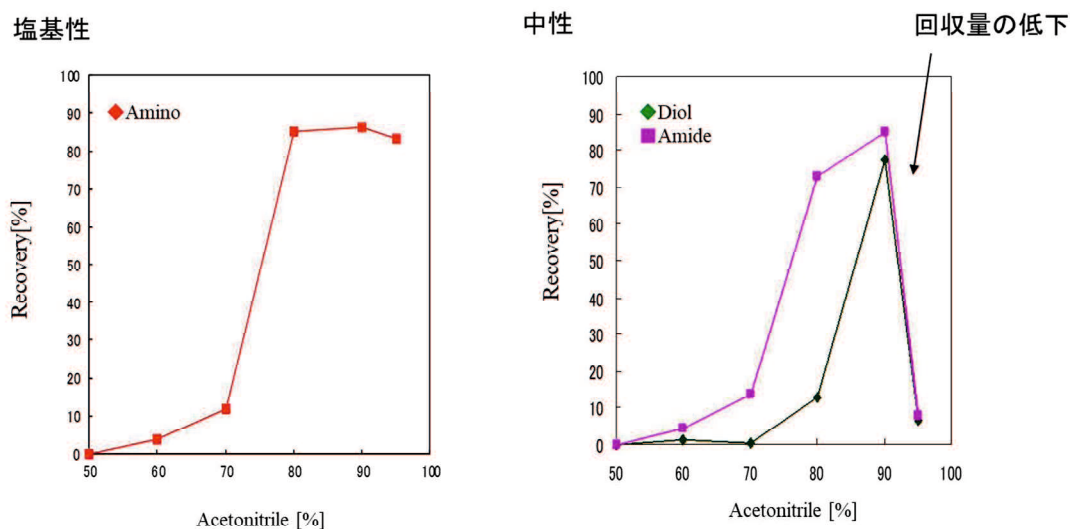


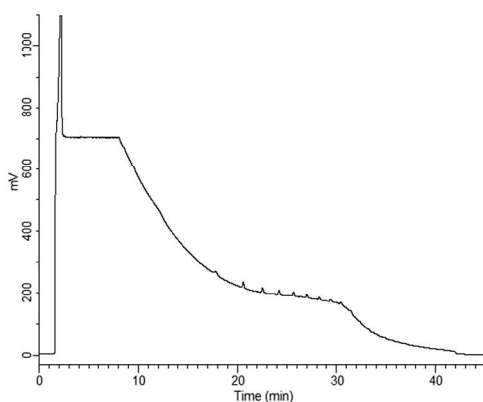
Figure 3-15 Effect of solution component on recovery of sugar chains using hydrophilic residues modified silica monolith



### 3-2-3(3) 親水性官能基修飾チップを用いた PA 化糖鎖の精製

2-アミノピリジンは還元糖の誘導体化において用いられる試薬の一つである。標識された糖鎖は蛍光検出機により検出することが可能であり、これまでに広く利用された修飾方法である。モノリスアミノチップを用いて誘導体化後のサンプルを精製した結果、Figure 3-16 のようなクロマトグラムが得られた。左図の精製前の溶液において使用した誘導体化試薬である 2-アミノピリジンが高濃度に検出され、20 分近くに検出される糖鎖由来のピークに重なっていることが分かる。アミノ基修飾モノリスチップを用いることで、2-アミノピリジンを除去し、高純度な誘導体化糖鎖の回収を行うことが可能であった。

#### 精製前



#### Amino Tipで精製後

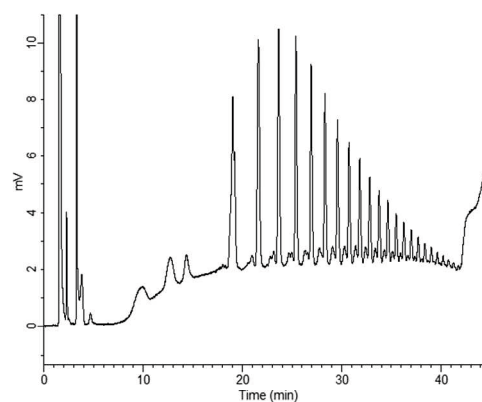


Figure. 3-16 Purification of 2-aminopyridine derivatized sugar chain using amino modified monolithic tip

Conditions. Column:Asahipak NH2P50 5 $\mu$ m (4.6 x 250 mm)

Eluent: (A) MilliQ/CH<sub>3</sub>CN =5/95 0.1 % formic acid, (B) MilliQ/CH<sub>3</sub>CN=95/5 0.1 % formic acid

Gradient: A/B=90/10-10min-90/10-40min-60/40, Flow rate: 1 ml/min

Detection: FL Em 320nm, Ex 400nm, Injection: 5 $\mu$ L

アミノ基修飾モノリスチップを用いて PA 化糖鎖を精製する際、回収溶液の種類を変更することで、糖鎖の種類による分画が可能である。Figure 3-17 には中性糖鎖、酸性糖鎖の混合溶液の精製結果を示す。シアル酸などを有する酸性糖鎖はアミノ基に対して強く吸着する為、溶出液の組成を中性の溶液を用いた場合には回収されない。溶出液の pH をアルカリ性に傾けることで、酸性糖鎖の回収も可能になる。網羅的な解析をする場合には、サンプルの吸着、洗浄後にアルカリ溶液を通過させることで、酸性、中性糖鎖の同時回収が可能である。

それぞれ分けて回収する場合には、中性溶液によりまず中性糖鎖を回収し、アルカリ溶液を通過させることで酸性糖鎖を回収することが可能である。

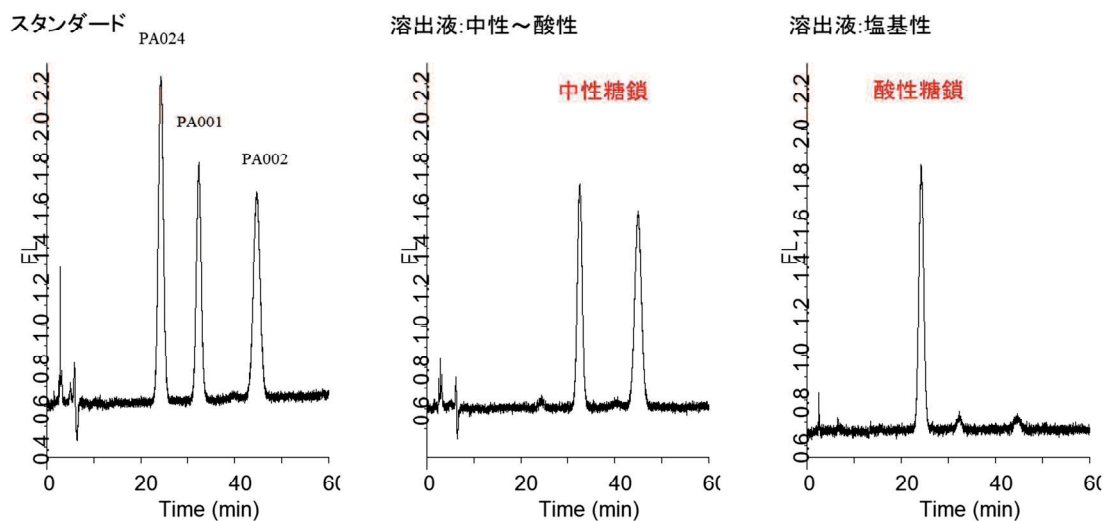


Figure 3-17 Selective purification of sugar chains using the amino modified monolith tip

Conditions Column:Inertsil ODS-3 (4.6 x 150 mm, 5 μm), Eluent: 50 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>-0.3% butanol

Flow rate: 1 ml/min, Detection: FL Em 320 nm, Ex 400 nm, Injection: 5 uL

### 3-2-3(4) 親水性官能基修飾チップを用いたペプチドの精製

ジオール、アミノ基、アミド基、3種類モノリスチップを用いて糖タンパク質、回収を検討した。Figure3-18 に糖タンパク質としてリボヌクレアーゼ B、ペプチドとしてアンジオテンシンII、アンジオテンシンIIIを用いた際の回収率を示す。中性担体であるジオール基、アミド基は各タンパク質、ペプチドに対して高い回収率を示した。一方でアミノ基修飾チップでは、塩基性ペプチドであるアンジオテンシンII、アンジオテンシンIIIは回収できなかった。モノリス表面上でのイオニックな反発により、保持ができなかったものと考えられる。

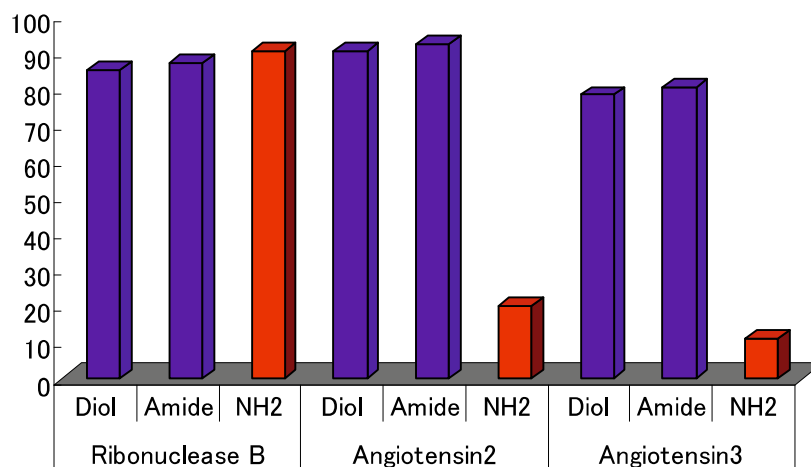


Figure 3-18 Recovery of peptides using hydrophilic residues modified monolith tip.

ジオール修飾モノリスチップを用いたアンジオテンシンII、IIIの回収に対して、サンプル中の有機溶媒濃度を変更した時の影響を確認した(Figure3-19)。糖鎖の精製においては有機溶媒濃度90%で高い回収率を示し、95%では極端に回収率が低下したのに対して、塩基性ペプチドの回収においては、有機溶媒が高い程、回収率も高くなる傾向があった。この現象を利用すると、保持もしくは脱離の時の有機溶媒濃度を変化させることで、糖鎖及びペプチドの分離が可能になるかもしれない。具体的には、サンプルの保持において、90%のアセトニトリルに溶解したサンプルをアミドチップへアプライする。溶出溶媒に95%アセトニトリルを使用すると糖鎖が、その後50%アセトニトリルを用いるとペプチドが回収可能になると考えられる。

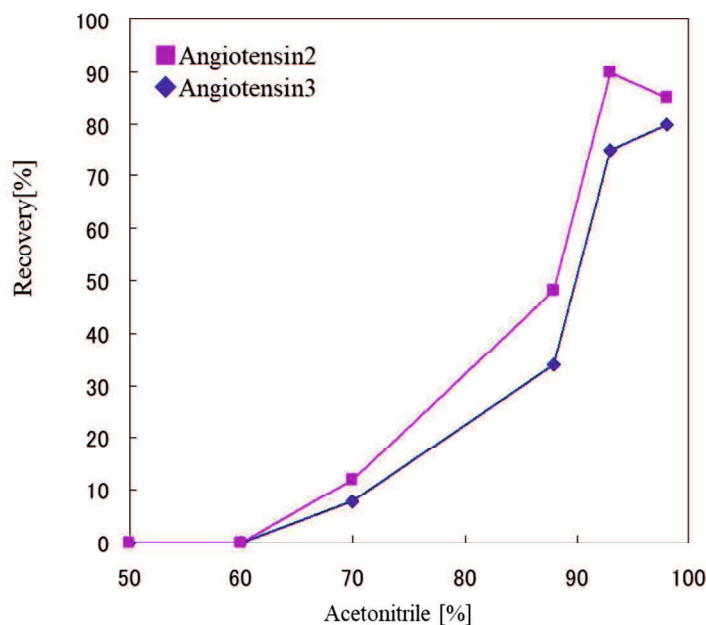


Figure 3-19 Effect of solution component for recovery of sugar chains using hydrophilic residues modified silica monolith

## 結言

親水性基修飾モノリスチップを作製し、糖鎖、タンパク質の回収に適応した。ピペッティング処理により試料中の糖鎖、タンパク質が回収可能であり、微量のサンプルへの適応が可能になった。溶液量は20  $\mu$ Lから適応可能であった。修飾の種類を変更することで、より選択的な精製の可能性が示された。

## 引用文献

- [1] A. Görg, W. Weiss, M. J. Dunn, *Proteomics*, **2004**, 12, 3665
- [2] E. P. Romijn, J. Krijgsveld, A. J. R. Heck, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 589
- [3] A. L. McCormack, D. M. Schieltz, B. Goode, S. Yang, G. Barnes, D. Drubin, J. R. Yates, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 767
- [4] J. D. Williams, M. Flanagan, L. Lopez, S. Fisher, L. A. D. Miller, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1020, 11
- [5] J. Leia, D. A. Chenb, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 808, 121
- [6] D. S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 4081
- [7] J. Samskog, D. Bylund, S. P. Jacobsson, K. E. Markides, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 998, 83
- [8] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J. L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045, 99
- [9] K. Nakanishi, *J. Porous Materials*, **1997**, 4, 67
- [10] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 420A
- [11] Y. Shintani, X. Zhou, M. Furuno, H. Minakuchi, K. Nakanishi, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 185, 351
- [12] S. Miyazaki, K. Morisato, N. Ishizuka, H. Minakuchi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Nakanishi, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1043, 19
- [13] K. Nakanishi, N. Soga, *J. Non-Gryst. Solids*, **1992**, 139, 1
- [14] D. M. Wonnacott, *J. Chromatogr.*, **1987**, 389, 103
- [15] J. He, X. Liu, S. Zhang, G. Liu, D. J. Hnatowich, *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, 1098
- [16] G. W. Schwert, Y. A. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **1955**, 16, 570
- [17] G. W. Hart, R. J. Copeland, *Cell* **2010**, 143, 672
- [18] A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, 291, 2364
- [19] K. W. Moremen, M. Tiemeyer, A. V. Nairn, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, 13, 448
- [20] P. M. Rudd, R. J. Woods, M. R. Wormald, G. Opdenakker, A. K. Downing, I. D. Campbell, R. A. Dwek, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1248, 1
- [21] P. M. Rudd, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, M. Huang, N. Mattsson, J. A. Speir, DiGennaro, J. S. Fetrow, R. A. Dwek, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 351.
- [22] C. A. Cooper, M. J. Harrison, M. R. Wilkins, N. H. Packer, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, 332
- [23] P. M. Rudd, R. A. Dwek, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 32, 1
- [24] P. M. Rudd, G. R. Guile, B. Ku"ster, D. J. Harvey, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Nature*, **1997**, 388, 205
- [25] R. K. T. Kam, T. C. W. Poon, *Clin. Proteom.*, **2008**, 4, 67
- [26] Z. Shriver, S. Raguram, R. Sasisekharan, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2004**, 3, 863
- [27] V. S. Sierpina, R. K. Murray, *Explore (NY)*, **2006**, 2, 488
- [28] N. Taniguchi, *Proteomics*, **2008**, 8, 3205

- [29] J. W. Dennis, M. Granovsky, C. E. Warren, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 21
- [30] K. Kobata, V. Ginsburg, *J. Biol. Chem.*, **1972**, 247, 1525
- [31] S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1978**, 85, 257
- [32] S. Hase, *Methods in Molecular Biology.*, **1993**, 14, 69
- [33] N. H. Packer, M. A. Lawson, D. R. Jardine, J. W. Redmond, *J. Glycoconj.*, **1998**, 15, 737
- [34] Q. Zhang, N. Tang, J. W. Brock, H. M. Mottaz, J. M. Ames, J. W. Baynes, R. D. Smith, T. O. Metz, *J. Proteome. Res.*, **2007**, 6, 2323
- [35] Y. Xu, Z. Wu, L. Zhang, H. Lu, P. Yang, P. A. Webley, D. Zhao, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 503
- [36] S. Ogata, T. Muramatsu, A. Kobata, *J. Biochem*, **1975**, 78, 687
- [37] T. Krusius, *J. Finne, FEBS Lett.*, **1976**, 71, 117
- [38] K. Kornfeld, M. L. Reitman, R. Kornfeld, *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 6633
- [39] R. D. Cummings, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 11235
- [40] P. O. Larsson, *Methods Enzymol.*, **1984**, 104, 212
- [41] Y. Shimizu, M. Nakata, Y. Kuroda, F. Tsutsumi, N. Kojima, T. Mizuochi, *Carbohydr. Res.*, **2001**, 332, 381

## 第4章 親水性ポリマー修飾モノリスの調製とアフィニティ担体への応用

### 4-1 親水性ポリマー修飾モノリスディスクの作製及びタンパク質に対する非特異吸着

#### 4-1-1 緒言

シリカベースのアフィニティクロマトグラフィー担体を作製する時の一つの重要な問題点は、担体への生体試料(タンパク質、DNA など)の吸着である。吸着の原因として挙げられるのが母体中の酸性シラノールに対する塩基化合物の吸着や、表面電荷の問題、アッセイに用いる中性 pH においては、修飾によって生じた表面疎水部にタンパク質が疎水吸着しやすい等が報告されている。近年、人工臓器のコーティング材料などに用いられる水溶性高分子の研究が種々行われており、興味深い報告がされている[1-5]。臓器コーティングに用いられるポリマーはタンパク質に対して低吸着性でなくてはならない。タンパク質に対して吸着性を示すと管内で堆積してしまい詰まりの原因となる。このような問題を解決する方法として用いられる代表的な親水性化合物としてヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)やヒドロキシエチルアクリレート(HEA)などが挙げられる(Figure4-1)。これら水溶性のモノマー重合体である水溶性ポリマーをコーティングした担体はタンパク質に対する高い低吸着を示す。そのため、多方面においてこのような水溶性ポリマーをコーティングした材料の開発が行われている。そこで本研究では、シリカモノリスに対して同ポリマーをコーティングし、吸着を低減させたモノリスを作製することを目的とした。今回のコーティング法のスキーム(Figure4-2)を下記に記載する。

モノリスへコーティングを行う際、重合ポリマーの溶解性が重要なファクターになる。高濃度、高分子量においても沈殿することなく、溶媒に分散された状態をキープできるほどきれいなコーティング膜が作製可能であると考えられる。そこで、HEMA、HEA 両モノマーを重合によって得られる高分子(PolyHEMA、PolyHEA)の各種溶媒に対する溶解性を確認した。

比較として、これまでにタンパク質固定化用に用いていたグリシジルメタクリレート(GMA)を用いて実験を行った。

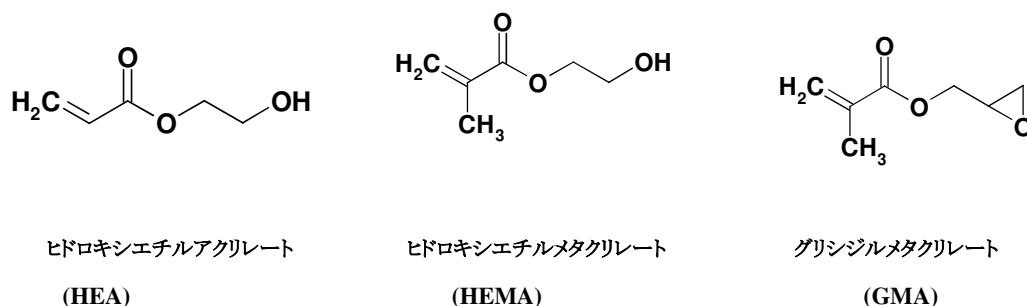


Figure 4-1 ポリマーコーティング材料

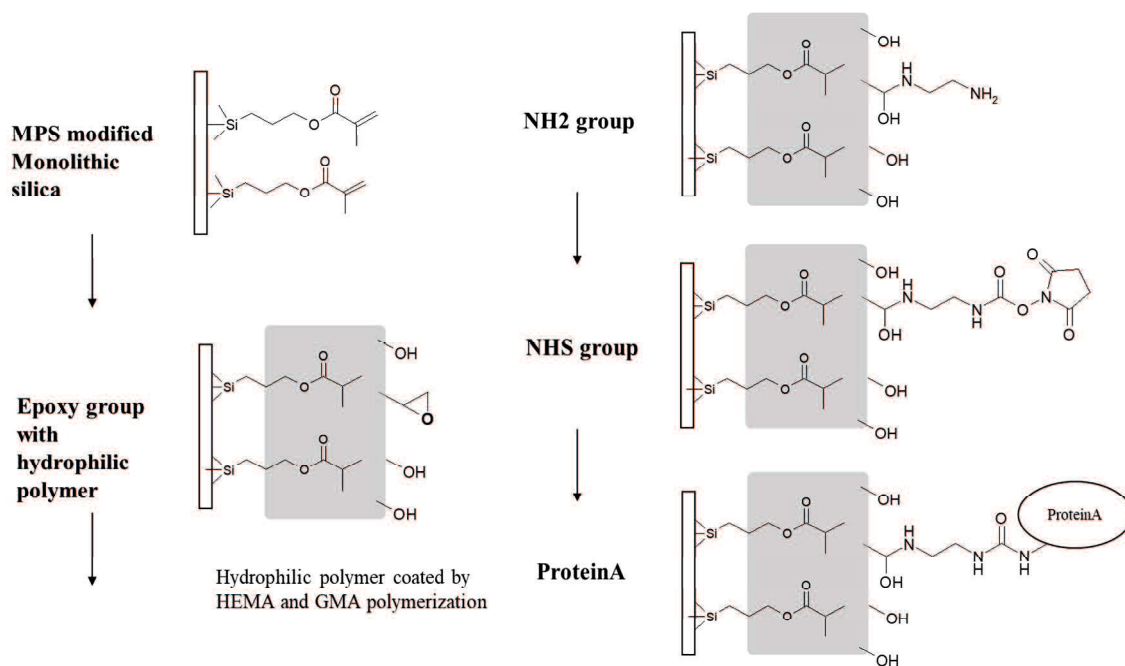


Figure 4-2 Schematic drawing of the preparation of an affinity monolith produced by polymerization with hydrophilic monomer.

#### 4-1-2 実験

##### 4-1-2(1) 試薬

ヒドロキシアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、グリシジルメタクリレートは東京化成より購入した。ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、クロロホルム、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、アセトニトリル、2、2-アゾビスイソブチルバレロニトリルはキシダ化学から購入した。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値 18.3 MΩ/cm のものを使用した。

##### 4-1-2(2) 各モノマー重合条件の確認

各種溶媒 4 ml に対して、モノマー (HEMA、HEA、GMA) を 1ml 添加し、重合開始剤として AIBN を 10 mg 添加後 70°C で 1 時間、40°C で 10 時間静置した。

#### 4-1-2(3) 修飾時のアンカー濃度の確認

120°Cで減圧乾燥したシリカモノリス(比表面積 390 m<sup>2</sup>/g 平均細孔 80Å 4.2 mm×1.5 mm) 25 個に対して、メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン(5、10、20、50% トルエン溶液)を 5 ml 加えた。減圧、超音波処理(10分)を2回繰り返した後、40°Cで減圧濃縮(乾固)した後、ステンレスチューブ中 200°Cで 10 時間反応させた。メタノールにより超音波洗浄を 4 回繰り返し、75°Cにおいて 3 時間減圧乾燥を行った。

#### 4-1-2(4) 修飾時の水酸基を有するモノマー濃度の確認

ヒドロキシエチルメタクリレート-ジメチルスルホキシド溶液(10%、20%、40%(v/v))に対して、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を(10%の場合には 10mg、20%:20mg、40%:30mg)溶解し、先の検討で調製した MPS 修飾シリカモノリス(MPS 仕込み濃度 10%(v/wt)) 20 個が入ったガラスバイアルに 10 ml 加え、超音波、脱気後、密栓をし、オープン中で 70°C、10 時間反応させた。上澄み液を捨て、DMSO 20 ml で分散、超音波洗浄を行った。この操作を 4 回繰り返した後、メタノール 20 ml により 2 回洗浄、75°Cで減圧乾燥を行った。得られた修飾モノリスの TG 値を測定後、MPS 修飾モノリスとの固定化量の差より、HEMA 分子の修飾量を測定した。

#### 4-1-2(5) 修飾時の水酸基、エポキシ基を有するモノマー濃度の確認

2-ヒドロキシエチルメタクリレート-グリシジルメタクリレートを含む DMF 溶液(HEMA:GMA=9:1 合計 10%)に対して、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を 10 mg 溶解し、先の検討で調製した MPS 修飾シリカモノリス(濃度 10%) 20 個が入ったガラスバイアルに 10 ml 加え、超音波、脱気後、密栓し、オープン中で 70°C、10 時間反応した。上澄み液を捨て、DMF 20 ml で分散、超音波洗浄を行った。この操作を 4 回繰り返した後、メタノール 20 ml により 2 回洗浄、75°Cで減圧乾燥を行った。得られた修飾モノリスの TG 値を測定後、MPS 修飾モノリスとの固定化量の差より、HEMA-GMA 分子の修飾量を見積もった。

#### 4-1-2(6) 水酸基修飾シリカモノリスに対するタンパク質の非特異吸着能の検討

各修飾を施したモノリスシリカディスクをスピンカラムへ固定化し、タンパク質に対しての非特異吸着能を評価した。モデルタンパク質として、ヒト IgG 溶液(0.1 mg/mL 500 µL 10 mM リン酸緩衝液(pH7.0))を用い、カラムへアブライ後 2,300xg で 30 秒遠心を行い、通過液に含まれる抗体濃度を算出することで非特異吸着の率を評価した。比較として、アミノ基、エポキシ基、メタクリル基を有するシランカップリング剤で修飾したモノリスディスクに対しての吸着能を評価した。



### 4-1-3 結果と考察

#### 4-1-3(1) 各モノマー重合条件の確認

得られた溶液の様子を目視にて確認することで各種溶媒に対する溶解性と粘性を確認した。下記に各種溶媒にて重合を行った結果を示す。

Table 4-1 Solubility of the polymers in each solvent

物性	比誘電率	溶媒	溶解性		
			HEMA	HEA	GMA
プロトン性極性溶媒	33	メタノール	○	○	×
	24	エタノール	○	○	×
	18	イソプロパノール	○	○	×
非プロトン性極性溶媒	21	アセトン	×	×	○
	37	アセトニトリル	×	×	○
	38	DMF	○	○	○
	47	DMSO	○	○	○
低極性溶媒	7.5	THF	×	×	○
	4.8	クロロホルム	×	×	○

#### プロトン性極性溶媒

メタノール、エタノール、イソプロパノールを使用した。水酸基を有する Poly-HEMA、Poly-HEA に対して高い溶解性を示した。重合後の溶液の粘性は、Poly-HEMA においては誘電率の低いイソプロパノールが最も高い粘性を示した。一方 Poly-HEA はメタノールにおいて最も高い粘性を示した。Poly-GMA に対しては、ほとんど溶解性を示さなかった。

#### 非プロトン性極性溶媒

アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)を使用した。PolyHEMA、PolyHEA はアセトン、アセトニトリルには溶解せず沈殿した。DMF、DMSO に対しては高い溶解性を示した。粘性は DMSO を用いたときが一番高かった。GMA は使用した全ての非プロトン性溶媒に高い溶解性を示した。この溶液を 70°Cにて 2 日間静置したところ、GMA を重合した DMF 溶液は褐色に変色していた。熱により DMF が分解されたか、不純物が GMA 中のエポキシ基に反応したためと考えられた。

#### 低極性溶媒

THF、クロロホルムを使用した。Poly-HEMA、Poly-HEA はほとんど溶解性を示さず沈殿した。一方で GMA に対しては高い溶解性を示し、重合後の溶液の粘性も非常に低かった。

以上の結果より、得られるポリマーの溶解性を考慮した場合、今回用いた3種類のモノマーを混合して重合する場合はDMF、DMSOを用いる必要があると考えられた。水酸基を有するモノマーのみを重合する際はメタノール、DMF、DMSOが適していると考えられる。

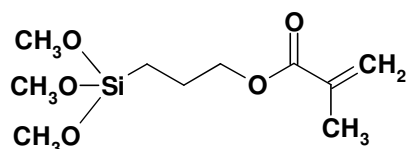
GMA(疎水性モノマー)を重合する場合は、DMF、DMSO、THF、クロロホルム、が適している(クロロホルム、THFは揮発しやすいので反応温度には注意が必要である。DMFは重合時間が長いと褐色変化する可能性があるため注意が必要である。)

DMF、DMSOを用いて重合して得られたポリマー溶液はDMSOのほうが高い粘性を示し、DMFは用いた3種のモノマー全てを重合した場合も非常に低い粘性を示した。

ポリマーの重合しやすさだけでなく、用いる母体(今回はシリカモノリス)と溶媒との馴染みも注意する必要性が考えられた。

#### 4-1-3(2) 修飾時のアンカー濃度の確認

ポリマーコーティングをする際用いるアンカー(メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン:MPS)の修飾率は均一なコーティング膜を作成するために必要なパラメーターであると考えられる。修飾時に用いるアンカー濃度と修飾効率の相関について検討した。



メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン(MPS)

修飾されるMPS量と試薬の量と関係を検討した(Table 4-2)。シリカゲルを使用した場合と結果を比較するため、タンパク質固定化用(300Å 100 m<sup>2</sup>/g)のモノリスではなく、低分子用(80Å 390 m<sup>2</sup>/g)モノリスを用いて実験を行った。シリカゲルへの場合は使用量が 5%から 50%まで相関が見られていたが、今回の結果では 10%で修飾量が飽和した。修飾量の飽和点は 2.5~2.7 μmol/m<sup>2</sup>であり、この値はシリカゲルを用いた場合(2.5 μmol/m<sup>2</sup>)と同等であった。モノリスを用いた場合の反応はシリカゲルを用いたときよりも低い濃度の仕込み量で十分飽和すると考えられる。

Table 4-2 MPS contents of the monolithic silica

Monomer [%]	Modified MPS		
	[%]	[mmol/g]	[μmol/m <sup>2</sup> ]
5	13.4	0.862	2.1
10	17.4	1.063	2.6
20	17.8	1.100	2.7
50	15.4	0.98	2.5

#### 4-1-3(3) 修飾時の水酸基を有するモノマー濃度の確認

先の検討で調製した MPS 修飾シリカモノリス(MPS 仕込量 10%)を用いてヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)の重合を行った。得られた HEMA グラフトモノリスのTG結果と計算した固定化量を Table 4-3 に示す。

Table 4-3 HEMA contents of the monolithic silica

HEMA conc. [%]	MPS [%]	poly-HEMA [%]	Coated polymer [%]
10	17.4	31.5	14.1
20	17.4	35.2	17.8
40	17.4	32.1	14.7

使用した HEMA 濃度が高いほど修飾される量も高い値を示した。10～40%で飽和点が見られ、40%になると若干低下していた。通常のスランカップリング剤で修飾する場合と比較しても、修飾量は非常に高いため、モノリスのメソ孔がかなりつぶれている可能性が考えられた。今回の検討では、小さいメソ孔を用いたが、大きいメソ孔のモノリスを用いたときの影響も確認する必要があると考えられた。重合後の溶液に沈殿は見られなかったものの、40%重合は非常に粘性の高い溶液であった。

#### 4-1-3(4) 修飾時の水酸基、エポキシ基を有するモノマー濃度の確認

先の検討で調製した MPS 修飾シリカモノリス(MPS 仕込み量 5、10、20、50%)を用いて HEMA と GMA の共重合を行った。得られた HEMA-GMA グラフトモノリスのTG結果と計算した固定化量を下の表に示す。

Table 4-4 HEMA-GMA polymer contents of the monolithic silica

MPS 仕込み	MPS [%]	MPS-Poly-HEMA-GMA [%]	Poly-HEMA-GMA [%]
5%	13.4	31.51	18.12
10%	17.4	31.26	14.75
20%	17.8	33.64	16.56
50%	15.4	30.57	15.33

1 種類のモノマーを用いて重合を行ったのに比べ、2 種類の共重合体では若干 TG の値が低くなった。各モノマーの静電的な反発により、重合が阻害された可能性がある。

TG 測定における各燃焼ピークを Table 4-5 に示す。バラツキが見られるものの、HEMA は 310°C 付近、GMA は 300°C 付近、HEMA-GMA 共重合はその間に収まるような燃焼温度を示した。

Table 4-5 Combustion temperature of the polymer coated monolithic silica

	TG peak (°C)
MPS (5%)	274.7
MPS (10%)	271.6
MPS (20%)	269.1
MPS (50%)	267.6
HEMA (10%) MPS (10%)	308.1
HEMA (20%) MPS (10%)	312.1
HEMA (40%) MPS (10%)	310.0
HEMA (9%) GMA (1%) MPS (5%)	314.1
HEMA (9%) GMA (1%) MPS (10%)	304.0
HEMA (9%) GMA (1%) MPS (20%)	304.5
HEMA (9%) GMA (1%) MPS (50%)	289.1
MPS (5%) GMA (10%)	307.7
MPS (10%) GMA (10%)	306.1
MPS (20%) GMA (10%)	302.9
MPS (50%) GMA (10%)	295.6

#### 4-1-3(5) 異なるメソポアを有するモノリスへの親水性ポリマーの修飾

ポリマーコーティングを行う際、メソ孔の大きさが修飾率に与える影響を検討するため、表面積、メソ孔の異なる3種類のモノリスに対して、4-1-2(4)の手法と同様の処理を行い、炭素減少量を測定した。結果を Table 4-6 に示す。モノリス中のメソポアの大きさが大きくなるほど、表面積は小さくなった。MPS (使用量 10%) の修飾量は、表面積に依存して増加した。修飾された HEMA 量は、トータルカーボン量は表面積に依存して増加したが、実際に修飾されたポリマーの量だけを比較すると、むしろポアの大きいモノリスのほうが修飾された。修飾時に MPS が多い場合、ポリマー重合の立体障害となる結果、表面積の大きい(=ポアの小さい)モノリスのコーティング量が減ったものと考えられる。

Table 4-6 Poly-HEMA contents and pore structures of different silica monoliths

Monolith	Surface Area [m <sup>2</sup> /g]	Pore size [nm]	MPS [%]	poly-HEMA [%]	Coated polymer [%]
AF29-H10	390	8	17.4	31.5	14.1
AF30-H10	98	32	5.4	26.2	20.8
AF32-H10	36	58	2.1	20.0	17.9

#### 4-1-3(6) 水酸基修飾シリカモノリスに対するタンパク質の非特異吸着能の検討

タンパク質の非特異吸着を軽減させる目的でポリマーコートを行ったモノリスをスピнкаラムの先端へ固定化した。下記に使用したモノリスの電顕写真とスピнкаラムの模式図を示す(Figure4-3)。

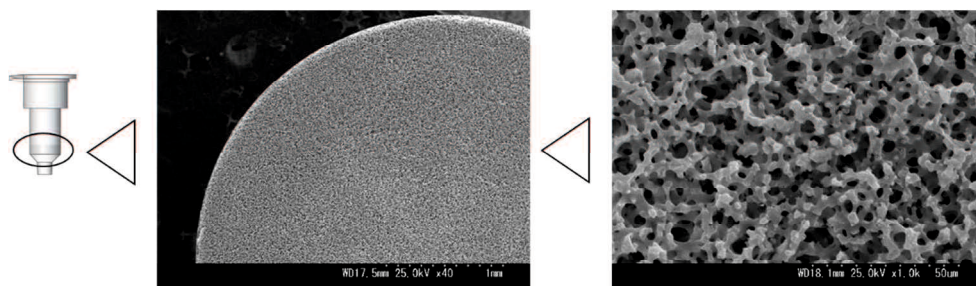


Figure 4-3 Scanning electron microscopy analysis of monolithic silica disks for the spin column for extraction. Monolithic silica (4.3 mm I.D. × 1.5 mm), consisting of continuous mesoporous silica skeletons of 32 nm with through-pores of 2 μm and a surface area of 98 m<sup>2</sup>/g.

Protein A アフィニティクロマトグラフィーにおいて、抗体が Protein A を介さずにシリカ母体へ直接吸着すると、酸を流しても抗体を回収することはできない。そのため、シリカ母体への吸着を軽減しなければならない。全頁にて各種調製したシリカモノリスディスクに対しての抗体の非特異吸着能を確認し、ポリマーコートをしたモノリスにおいて抗体の吸着が軽減されたと報告した。今回の報告では、コーティングの条件を各種検討した(Table 4-7)。

Table 4-7. Effect of modification reagent on the non-specific adsorption of IgG by modified monolithic silica

Monolith	modification	Ratio of reagent : silica (%)	Carbon content (%)	Non-specific adsorption to modified monolith silica	
				%	CV(%)
AF30-H1	Poly HEMA	1	17.8	18.3	5.1
AF30-H10	Poly HEMA	10	26.2	9.3	3.2
AF30-H20	Poly HEMA	20	30.2	11.1	4.0
AF30-H40	Poly HEMA	40	28.5	20.5	6.4
AF30-M	Metacrylate silane	10	5.4	91.6	3.2
AF30-E	Epoxy silane	10	6.2	75.8	6.7
AF30-A	Amino silane	10	7.1	72.8	5.3

Mesopore size of monolithic silica: 32 nm, IgG solution: 0.1 mg/mL 500 μL in 10 mM potassium phosphate buffer (pH7.0)

Poly-HEMA を各モノマー濃度で作製したモノリスディスク及び、メタクリレート、エポキシ、アミノそれぞれの官能基を有するシラン剤で修飾したモノリスディスクを用いて評価を行った。IgG に対する非特異吸着は、シラン剤修飾シリカにおいては非常に強く吸着していることが確認された。アミノ基、エポキシ基を開環させたジオール基を修飾したモノリスには約 70~75%の抗体が吸着した。メタクリレートのみを修飾したシリカには 90%以上の抗体が吸着した。一方で HEMA を重合したカラムでは抗体の非特異吸着は大きく軽減された。モノマー濃度としては、1%から高い吸着抑制効果が確認され、10%量においては 90%以上の抗体を回収することができた。それ以上のモノマー濃度になると若干吸着が見られるようになったため、至適濃度比率としては 10%であると考えられた。

#### 4-1-4 結言

親水性ポリマーを重合する際の使用溶媒及び、使用アンカー量、ポリマー比率の最適化を行った。修飾されたモノリスディスクをスピнкаラムへ固定化し、抗体に対する吸着能の検討を行った。通常のシランカップリング剤を用いた固定に比べ、コーティングにより優れた低吸着性を示した。



## 4-2 親水性ポリマー修飾モノリスディスクへの Protein A の固定化及び抗体の回収

### 4-2-1 緒言

モノクローナル抗体生産のためのマスター細胞株の構築と製造プロセスの研究開発には、抗体を迅速に定量、分離、精製する方法と、多数のサンプルを短時間で分析するシステムが必要である[5-10]。

Protein A アフィニティクロマトグラフィーは複雑なマトリクス溶液からの抗体を回収するツールとして使用されてきた。Protein A を固定化する担体としては、アガロースゲルやポリマー、シリカが用いられてきた[11-17]。これらの充填剤をスピンカラムに充填した抗体精製ツールも様々報告されているが、粒子への抗体の吸着速度が遅いため、処理には非常に長い時間を要する[18-20]。さらに、アガロースゲルは耐圧性が低い為、高速処理には適した担体とは言えない。

一方で前処理に対してモノリスを適応したカラムによる検討が様々行われている[21、22]。ポリメタクリレートやポリスチレンによって作製されるポリマーモノリスは、優れた構造安定性と、溶媒耐久性によりバイオクロマトグラフィーの分野において広く使用されてきた[23、24]。ポリマーモノリスの構造はシングルポア構造であるため、移動相の通液性と、サンプルの負荷量の両方をコントロールして作製することが難しい。通液性を上げようとした結果、対象成分に対しての負荷量は低下する傾向にある[25]。

シリカモノリスは、対象成分に対する表面積と、通液性に影響を与えるスルーポアを独立して制御することが可能であるため、高い通液性と、負荷量を実現できる担体として注目されている[26、27]。奈女良らは様々な化学修飾を施したシリカモノリススピンカラムを用いて、生体試料中からの迅速前処理について報告している[28、29]。

しかしながら、シリカモノリスはタンパク質に対して非特異吸着を示し、低濃度抗体サンプルからの回収率の低下の原因になる。アミノ基や、エポキシ基を有するシラン剤とシリカモノリスカラムを用いたアフィニティカラムについての報告も行われている[30、31]。しかしながら、シラン剤による表面処理ではシリカ表面全体をコーティングすることができないため、タンパク質の非特異吸着を軽減することができない[32、33]。

本章においては、4-1 において検討を行ったシリカモノリスの表面処理を用いて、タンパク質に対して優れた低吸着性を示しつつ、化学修飾により Protein A を固定化したアフィニティ担体について検討した結果を報告する。

## 4-2-2 実験方法

### 4-2-2(1) 試薬

ヒドロキシエチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート、炭酸ジスクシミジル (DSC)、エチレンジアミン、2,2-アゾビスイソブチルバレロニトリルは東京化成から購入した。ジメチルホルムアミド、はキシダ化学より購入した。リン酸2水素ナトリウム、リン酸水素 2 ナトリウムは関東化学から購入した。Protein A は Sigma-Aldrich から購入した。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値 18.3 MΩ/cm のものを使用した。

### 4-2-2(2) HPLC カラム条件

HPLC システムはジーエルサイエンス社製 GL7400 を使用し、抗体の分離には Inertsil WP300 Diol (4.6 mm x 250 mm, 5 μm ジーエルサイエンス社製)を用い、カラム温度は 40°C、流速は 1 mL/min、移動相は 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7)を用い、分析時間は 10 分で行った。

### 4-2-2(3) シリカモノリスゲルの作製と、Protein A の固定化

4-1-2(5)の手法を参考に、シリカモノリスへ親水性ポリマーとして HEMA-GMA をコーティングしたモノリスディスクを作製した。調製したモノリス 20 個に対して、エチレンジアミン-アセトニトリル溶液を 30 ml 添加し、超音波 (10 分)、脱気を繰り返した後、6 時間 65°Cにおいて反応した。反応後、アセトニトリルにより洗浄を 4 回行い、70°Cにおいて 24 時間減圧乾燥を行った。得られた乾燥モノリスに対して、DSC アセトニトリル溶液を 30 ml 添加し、超音波 (10 分)脱気後、25°Cにて 24 時間振とう機により、50 ml バイアルごと振とうした。反応後、アセトニトリルにより洗浄を 4 回行い、25°Cにおいて 24 時間減圧乾燥を行った。

得られた乾燥モノリスに対して、10 mg/ml Protein A(50m リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5))を添加後、脱気、超音波(10 min)処理後、24 時間 4°Cにて振とうした。反応後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄後、500 mM エタノールアミンを含む 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)により洗浄 3 回、ミリQにより洗浄 2 回後、4°Cにて保存した。作成したシリカモノリスをスピнкаラムへ固定化した。

固定化された Protein A は固定前、後の溶液中の Protein A 量を測定することで算出された。

#### 4-2-2(4) シリカモノリスピンカラムを用いた抗体の精製

Protein A 固定化シリカモノリスピンカラムへ 0.4 mL PBS をアプライし、2,300xg で 30 秒遠心した。IgG を含むサンプル溶液をコンディショニングしたカラムへ通過し、0.5 mL の PBS でカラムを洗浄した。カラムからの抗体の回収は 0.2 mL の酸性緩衝液(pH3.5)を用いておこなった。抽出液の 5  $\mu$ L を HPLC で分析をした。

### 4-2-3 結果と考察

#### 4-2-3(1) シリカモノリスゲルの作製と、Protein A の固定化

4-1 にて検討した親水性ポリマーコートを利用し、HEMA と GMA 各組成比で修飾したシリカモノリスに対しての Protein A の固定化量を算出した (Table 4-8)。固定化に用いたシリカモノリスのメソポアは 32 nm を使用した。HEMA に対する GMA の量が増えるほど、Protein A の固定化量は増加した。シリカ表面に修飾されたポリマーの総量は各モノマー比において大きな差は見られなかったが、Protein A と反応するための GMA の量が多いほど、固定化量が増える結果となった。HEMA:GMA が 10:1 において、Protein A の固定化量は約 230  $\mu\text{g}$  となった。GMA の導入量がそれ以上増えても Protein A の固定化量に変化は見られなかった。Protein A の固定においては、ポリマー中の GMA の距離が 10:1 で十分な感覚が保つことができていると考えられる。

Table 4-8 Effect of the ratio of monomer HEMA to GMA on Protein A immobilization

Monolith	Ratio of monomer HEMA: GMA	Carbon content [%]	Amount of immobilized Protein A	
			[ $\mu\text{g}/\text{monolith disk}$ ]	CV[%]
AF30-HG100	100:1	26.5	121	10
AF30-HG10	10:1	27.6	234	8
AF30-HG5	5:1	29.4	247	13
AF30-HG2	2:1	27.6	253	14
AF30-HG1	1:1	25.5	262	20

Amount of monomer in the reaction solution: 10% (v/wt) of the silica

#### 4-2-3(2) シリカモノリスゲルのメソポアの大きさと Protein A の固定化量の関係

シリカモノリス中のマクロポアは溶液の通液性を、メソポアは総表面積を形成するのに重要な役割を担っている。使用するシリカモノリスのメソポアの大きさを変更し、Protein A の固定化量の変化を観察した (Table 4-9)。固定化方法は全く同じ方法を用いて検討した。MPS の修飾量は表面積が大きいモノリス程高い値を示したが、ポリマーの修飾量は表面積の一番大きい 8 nm のシリカモノリスに比べ、32 nm のモノリスの方が高い値を示した (8 nm モノリスへのポリマー修飾量 13.8%、32 nm モノリスへのポリマーの修飾量 22.2%)。固定化された Protein A の量は表面積の大きい 8 nm のモノリスに対して一番高い値を示した。

Table 4-9 Effect of the mesopore size on Protein A immobilization

Monolith	Surface Area [m <sup>2</sup> /g]	Meso pore size [nm]	Modified MPS [%]	Modified Poly- HEMA-GMA [%]	Amount of immobilized ProteinA	
					[μg/monolith disk]	CV[%]
AF29-HG10	390	8	17.4	31.2	283	8
AF30-HG10	98	32	5.4	27.6	234	10
AF32-HG10	36	58	2.1	18.2	182	6

Amount of monomer in the reaction solution: 10% (v/wt) of the silica

#### 4-2-3(3) 溶出液量と抗体の回収率の関係

抗体を回収率に対する溶出液量の関係を検討する為、溶出液量 20~400 μL における抗体の回収率を確認した。酸性緩衝液による抗体の回収率を Figure 4-4 に示す。クエン酸の量が 20 から 50 μL に増加するにつれ、抗体の回収率は増加した。開発したスピнкаラムにおいては、100 μL の溶出液が最適であると考えられた。アガロースゲルを充てんしたカラムにおいては、安定した回収率を得るためには 800 μL の回収溶液が必要であり、抗体サンプルの濃縮が難しいことが示された。

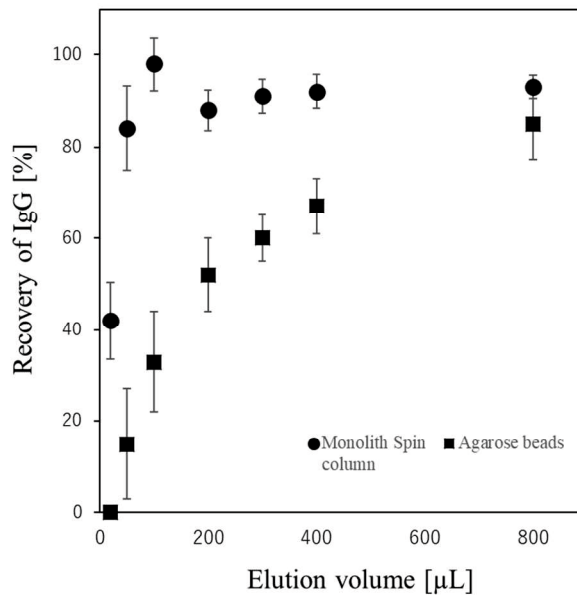


Figure 4-4. Optimization of the eluent volume.

Spiked IgG: 100 μg/mL, sample volume: 500 μL,

Centrifugal speed: 2,300 × g, eluent: 100 mM Tris-HCl buffer (pH 3.5)

Monolith AF30-HG10

#### 4-2-3(4) メソポアの大きさと抗体の回収率の関係

Figure 4-5 には、作製した各スピんカラムに対しての吸着容量を示す。500 μL の各濃度の抗体溶液をカラムへアプライし、洗浄後、回収した抗体溶液を SEC 分析することで回収量を確認した。最大吸着量は 32 nm のメソポアを有するモノリスは、10 nm のメソポアを有するモノリスに比べて約 3 倍以上の回収量を示した。小さいメソポアのモノリスに対しては、分子量の大きい抗体が物理的にアクセスしにくい結果として、Protein A の固定量が多いにもかかわらず、抗体の回収量が少なくなったと考えられる。32 nm と 58 nm のメソポアを持つモノリスにおいて、58nm モノリスの回収量が少ないのは、固定化した Protein A の量が少ないことが影響していると考えられる。

32 nm のメソポアを有するモノリスに対しての抗体の回収は 10~300 μg/mL において直線性を示した ( $R > 0.999$ )

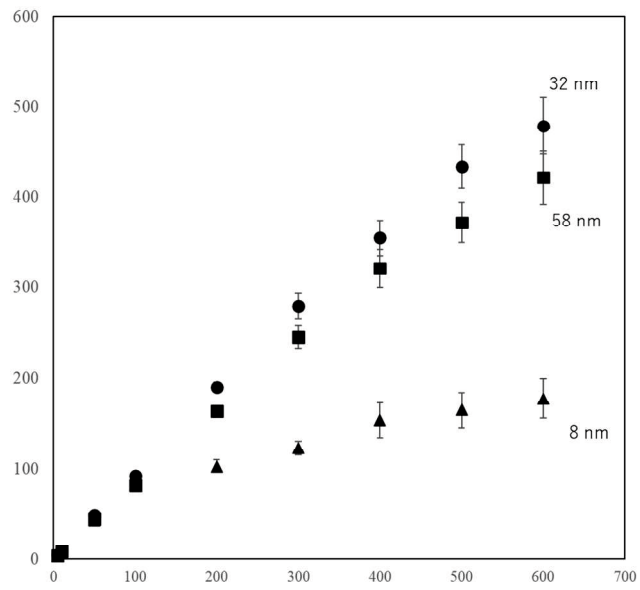


Figure 4-5. Effect of mesopore size on the recovery of IgG,  
Sample volume: 500  $\mu$ L, centrifugal speed: 2,300  $\times$  g,  
Eluent: 100 mM citric acid buffer (pH 3.5)

#### 4-2-3(5) CHO 細胞培養液からの抗体の回収

遠心分離によってチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を除去した培養液の上清を本作製したカラム(AF30-HG10)の精製評価に使用した。CHO 細胞培養液中のモノクローナル抗体は、4-2-3(4)において作製したキャリブレーションカーブを用いて、濃度の算出を行った。

0.2 mL の培養液を 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、スピнкаラムへ溶液をアプライし、2,300xg で遠心した。その後カラムは洗浄され、吸着した抗体は 0.2 mL の酸性溶液で回収された。SEC により分析したクロマトグラムを Figure 4-6 に示す。回収された抗体溶液の濃度は、1.2 mg/mL であった。

抗体を産生するマスターセルのスクリーニングにおいて、少ない溶液からの効果的な抗体の回収、精製は非常に重要であるが、アガロースゲルを用いた精製では抗体を溶出するためには 0.8 mL 以上の溶出液量を必要とするため、結果として回収された抗体溶液は希釈されてしまう。そのため HPLC 測定における感度が低下してしまう。開発したカラムは 100  $\mu\text{L}$  の溶出液においても高い回収率を示すため、少量、低濃度の抗体の回収に適していると考えられる。

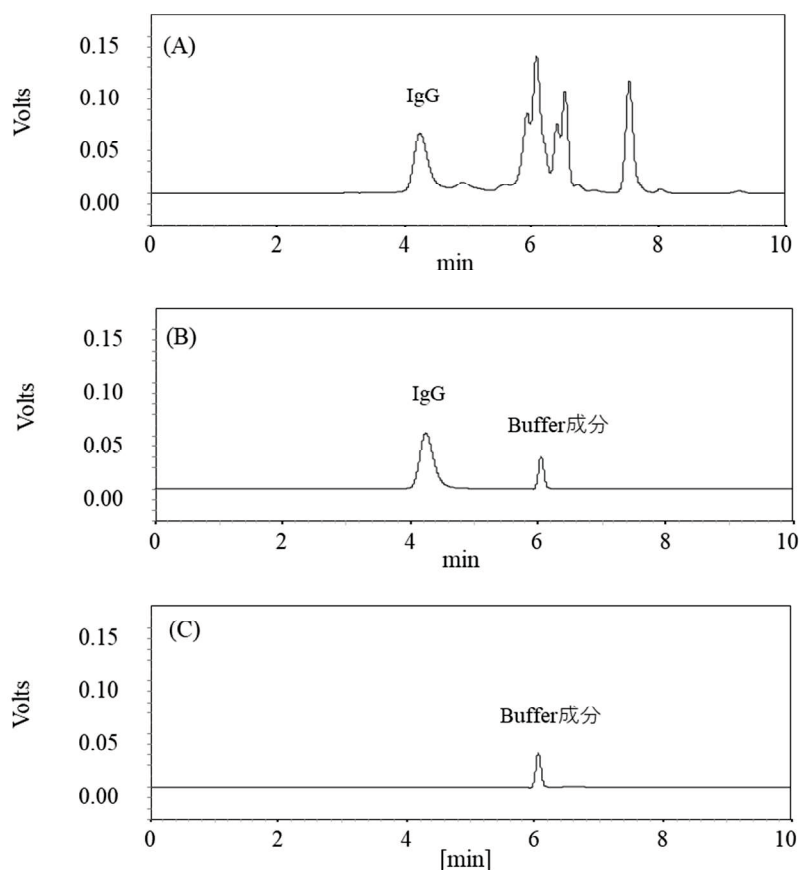


Figure 4-6. Chromatograms of immunoglobulin G extracted from the CHO cell culture medium using the spin column (AF30-HG10). (A) Culture medium without purification, (B) culture medium after purification with the spin column, (C) elution buffer



#### 4-2-4 結言

親水性ポリマーをコーティングしたシリカモノリスに対して抗体精製用リガンドとして **Protein A** を固定化した。**Protein A** の固定化量は、修飾したポリマーの組成、モノリスの表面積の大きさに依存した。作製したシリカモノリスを固定したスピнкаラムを抗体精製に用いたところ、ポア径の大きさの違いにより、抗体の回収率に大きな差が見られた。**CHO** 細胞培養液からの抗体の精製へ開発したスピнкаラムを使用したところ、高い精製度をもって抗体を精製することが可能であった。

### 4-3 親水性ポリマー修飾モノリスディスクへのトリプシンの固定化及びタンパク質の迅速消化

#### 4-3-1 緒言

検討 3-1 において、トリプシンを固定化したモノリスチップの検討を行った。アミノ基修飾モノリスチップに対してピペッティングにより、トリプシンを固定化が可能になったが、シリカモノリス表面へのアミノ基の固定化はアミノ基を有するシランカップリング剤により行った。トリプシンによるタンパク消化においては、母体に対してのタンパク質の非特異吸着の影響により、一部ペプチドの回収率の低下が見られた。

検討 4-1、4-2 において、親水性ポリマーをコーティングしたモノリスはタンパク質に対しての優れた非特異吸着能を示した。トリプシン固定においても同親水性コートモノリスゲルを用いることで、ペプチドの回収率の向上が期待される。

本章では、親水性ポリマーでシリカモノリス表面をコーティングした後、トリプシンの固定化を検討した。また、使用するモノリスのスルーポアの大きさを各種変更することでの消化効率の違いを確認することで、より迅速消化が可能になるスピンカラム型トリプシンカラムの開発を行った。

#### 4-3-2 実験

##### 4-3-2(1) 試薬

ヒドロキシエチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート、炭酸ジスクシミジル、エチレンジアミン、2,2-アゾビスイソブチルバレロニトリルは東京化成から購入した。HPLC グレードトリフルオロ酢酸は和光純薬株式会社より購入した。リン酸緩衝液を作製するのに使用したリン酸水素 2 ナトリウム、2 水和物、リン酸 2 水素ナトリウム、ジメチルホルムアミドはキシダ化学より購入した。TPCK 処理トリプシン(牛膵臓由来)は Worthington 社から購入した。トランスフェリン(ヒト)、牛血清アルブミン、N-a-benzoyl-dl-arginine ethyl ester、polyethylene oxide (PEO: Mw=100,000)、トリス緩衝液を作製するのに使用した TIMA base は、Sigma-Aldrich より購入した。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値 18.3MΩ/cm のものを使用した。

##### 4-3-2(2) HPLC 条件

HPLC システムはジーエルサイエンス社製 PU611 ポンプ、UV702 UV/VIS 検出計、DM-22AP 小容量用ミキサー、705 カラムオープンを用いて行った。サンプルインジェクターはモデル 8125(レオダイン社製)を用いた。分析用カラムとして、Inertsil WP300 C8 (4.6 mm I.D. x 150 mm, 5 μm、ジーエルサイエンス社製)を用いて実施した。装置の流速は 1 mL/min を用い、溶離液は 0.1% TFA を含むアセトニトリルと、0.1% TFA を含む水溶液を用いて、グラジエント分析により分析を行った。

キャピラリーHPLC システムは、ジーエルサイエンス社製 capillary HPLC system (MP711、

MP710 Micropump を使い、インジェクターはバルコ社製 Model C4、分析用カラムは MonoCap for FastFlow (0.2 mm I.D. 150 mm)を用いた。質量分析計は日本電子社製 AQua TOF JMS-T100LC を用いて実施した。スキャン分子量範囲としては、300-1500 m/z の範囲での測定を行った。

#### 4-3-2(3) シリカモノリスゲルの作製と, Trypsin の固定化

4-1-2(5)の手法を参考に、各種メソポアの大きさの異なるシリカモノリスへ親水性ポリマーとして HEMA-GMA をコーティングしたモノリスディスクを作製した。固定化の概念図を下記に示す (Figure 4-7, 4-8)。Protein A 固定時と同様のメソッドを用いるため、3-1 で 2 架橋性試薬として使用した DSS の代わりに、DSC を用いて固定化を行った。調製したモノリス 20 個に対して、エチレンジアミン-アセトニトリル溶液を 30 ml 添加し、超音波 (10 分)、脱気を繰り返した後、6時間 65°Cにおいて反応した。反応後、アセトニトリルにより洗浄を 4 回行い、70°Cにおいて 24 時間減圧乾燥を行った。得られた乾燥モノリスに対して、DSC アセトニトリル溶液を 30 ml 添加し、超音波 (10 分)脱気後、25°Cにて 24 時間振とう機により、50 ml バイアルごと振とうした。反応後、アセトニトリルにより洗浄を 4 回行い、25°Cにおいて 24 時間減圧乾燥を行った。

得られた乾燥モノリスに対して、10 mg/mL TPCK-treated Trypsin (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5))を添加後、脱気、超音波(10 min)処理後、24 時間 4°Cにて振とうした。反応後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄後、500 mM エタノールアミンを含む 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)により洗浄 3 回、ミリQにより洗浄 2 回後、4°Cにて保存した。作製したシリカモノリスをスピнкаラム及び、200 µL ピペットチップもしくはスピнкаラムへ固定化した。固定化された Trypsin の量は固定前、後の溶液中の Trypsin 量を測定することで算出された。

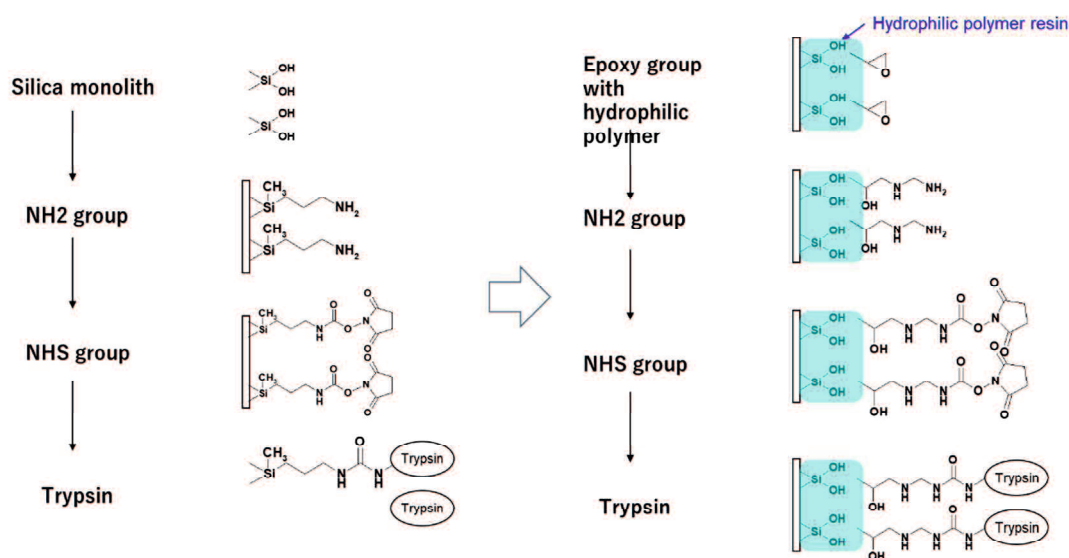


Figure 4-7 Chemical modification of the silica monolith

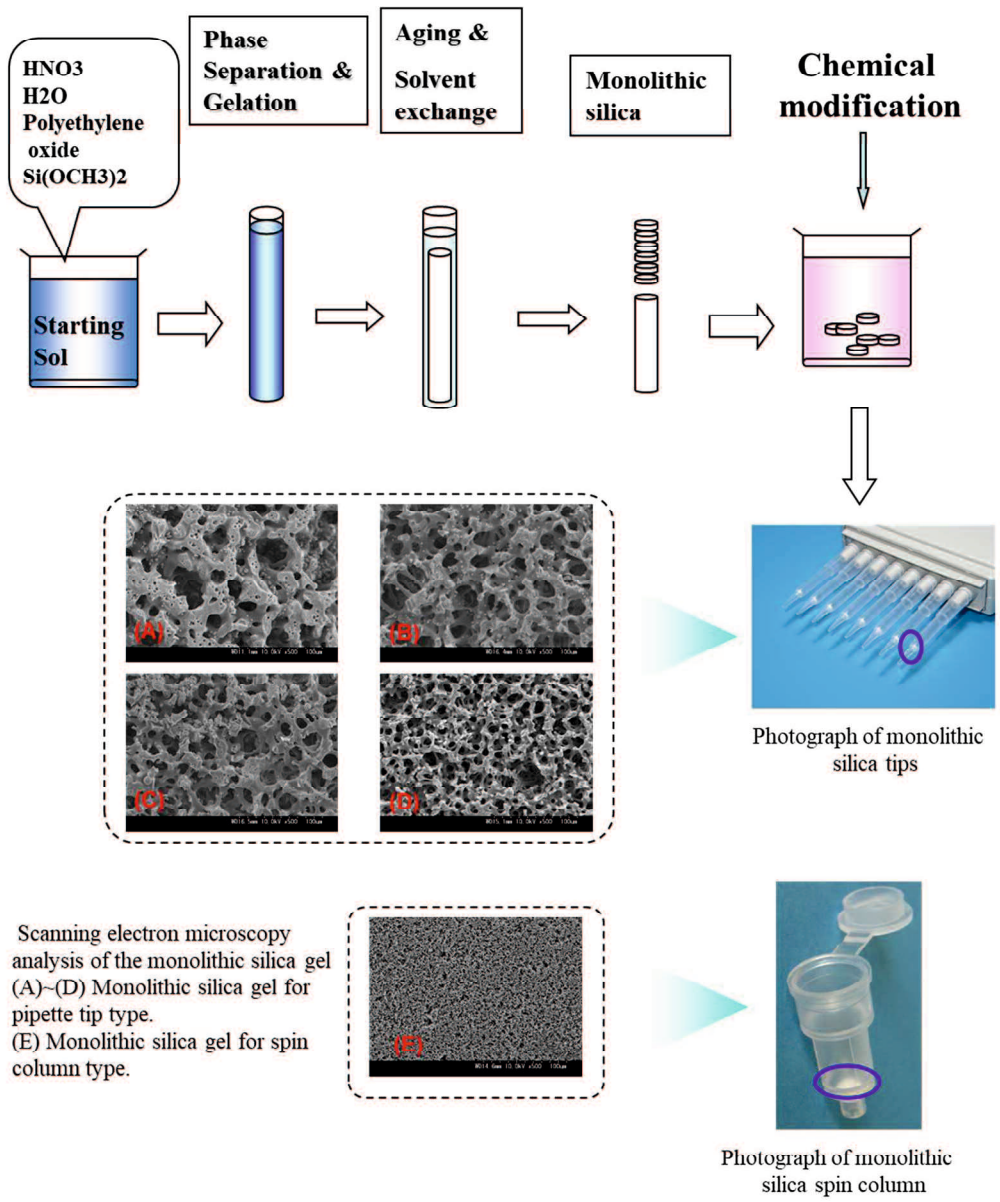


Figure 4-8. Synthesis of the trypsin-immobilized monolithic silica products

#### 4-3-2(4) トリプシン固定化シリカモノリスカラムによるタンパク質の迅速消化

ピペットチップに固定化したトリプシンによる消化は、3-1 を参考に実施した。トリプシンを固定化したスピんカラムによる迅速消化方法は、下記図に示す方法で行った(Figure 4-9、4-10、Table 4-10)。消化効率の確認には、BAEE (ベンゾイルアルギニンエチルエステル)の消化効率を確認することで行った。タンパク質は、還元アルキル化処理を行ったサンプルをカラムへ 2 回アプライすることによって実施した。その際の遠心処理の条件は 100xg で 5 分と設定した。消化後の溶液をHPLCで分析を行った。

Table 4-10 Digestion profile of arginine ethyl ester on MonoTip Trypsin

Pretreat sample :	Adjust sample to 50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> buffer(pH7.8)
Equilibrate :	Aspirate 100 ul 50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> buffer(pH7.8) and discard buffer
Apply sample :	Aspirate up to pretreated sample into tip. Dispense and aspirate sample 10 cycles at room temp.

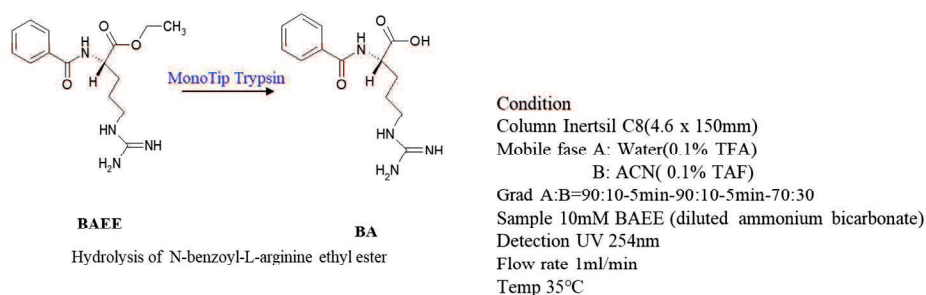


Figure 4-9 Digestion of arginine ethyl ester using MonoTip Trypsin

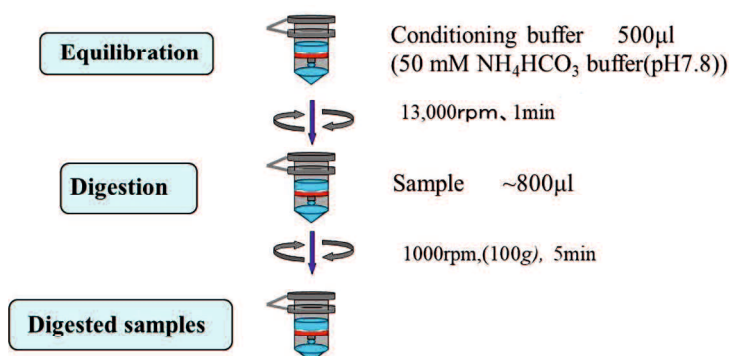


Figure 4-10 Digestion procedure using MonoSpin Trypsin

### 4-3-3 結果と考察

#### 4-3-3(1) 親水性ポリマー修飾シリカモノリスへのトリプシン固定と、メソポアの影響

3-1 において使用したシリカモノリスのスルーポアはピペッティングのしやすさを考慮して、約 10  $\mu\text{m}$  になるように設計した。より処理を早く行うには、スルーポアを大きくし、通液性を上げる必要がある。本検討では、スルーポアを大きくしたシリカモノリスに対して、親水性ポリマーをコーティング、トリプシンの修飾量の増加に伴い、スルーポアを大きくしても高い消化効率が得られるかを確認した(Figure 4-11)。

各種スルーポアの大きさの異なるシリカモノリスに対して、親水性ポリマーを修飾した後トリプシンを固定化し、BAEE の消化効率を確認した。Trypsin の固定化量はアミノ基を有するシラン剤に固定した場合と比較し、親水性ポリマーを修飾したモノリスへのトリプシンの固定量は増加しなかった(アミノ基修飾:  $\sim 500 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、親水性ポリマー修飾:  $\sim 300 \mu\text{g}/\text{disk}$ )。固定化したトリプシンの分子量は抗体などの巨大な分子量を有するタンパク質と比較して小さく、シラン剤により高密度に固定したアミノ基に対して、多量のトリプシンが固定化できたものと考えられる。得られたトリプシン固定化モノリスを用いて消化効率を比較した結果、モノリスのスルーポアを大きくすることで、BAEE の消化効率は低下し、産出される BA の量は減少した。スルーポアを大きくしたことで、基質である BAEE がトリプシンに接触するための効率が低下した結果、消化効率が低下したと考えられる。スルーポアを小さくするほど、消化効率は向上する為、スルーポアの大きさを小さくすることで、高い消化効率を有するデバイスの作製が可能になるが、一方で、スルーポアを小さくし過ぎると、通液抵抗が増し、スムーズなピペッティング操作を行うことができなくなった。

そこで、ピペッティングの代わりに、遠心力によりカラムに溶液を通過させるスピнкаラムに着目し、スルーポアの小さいモノリスカラム(スルーポアの大きさとしては 2  $\mu\text{m}$  を選択)を作製し、消化効率を評価した。溶液の通過には遠心力として 100xg を設定し処理を行った。BAEE の消化効率を確認した結果、ピペットチップタイプ(MonoTip)と比較してもスピнкаラムタイプは高い消化効率を示しかつ、通液回数も 2 回と煩雑さも軽減することが可能になった。

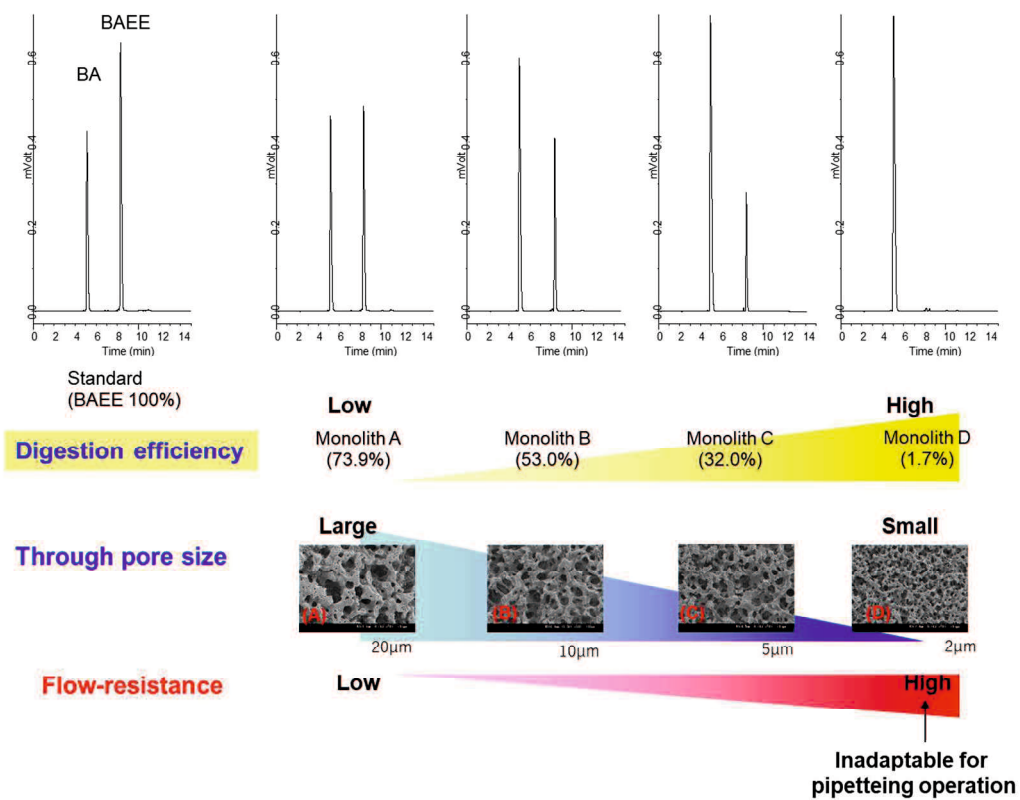


Figure 4-11 Chromatograms of a tryptic digest of BAEE with/without trypsin immobilized monolith tip with different macro pore((A),(B),(C), (D)).

#### 4-3-3(2) トリプシン固定化スピнкаラムを用いたタンパク質の迅速消化 固定法の違いの影響

作製したトリプシンスピнкаラムを用いてタンパク質の消化を検討した(Figure 4-12)。ピペットチップタイプ(MonoTip)同様に、還元アルキル化処理を行わずに、直接タンパク質をカラムへアプライしても、タンパク質はほとんど消化されなかった。迅速消化のメソッドにおいて、還元アルキル化処理は重要な工程であると考えられる。還元アルキル化を行わない場合には、タンパク質の立体構造は保たれたままであり、トリプシンの活性部位がタンパク質の消化される部位に対してスムーズにアクセスできないため消化ペプチドが得られなかったと考えられる。

下記図は還元アルキル化後の BSA の消化について示す。親水ポリマーと GMA(エポキシ基を有するモノマー)との共重合体に対してトリプシンを固定化したスピнкаラム(赤色)と、アミノシラン剤により修飾したトリプシンカラム(黒)において得られるペプチドのパターンを比較した。逆相クロマトグラムによって分離されたペプチドの量は、親水性ポリマーを修飾したトリプシンのほうが多かった。タンパク質、ペプチドの非特異吸着が軽減された結果、溶液に算出されるトリプシン量が増加したと考えられる。

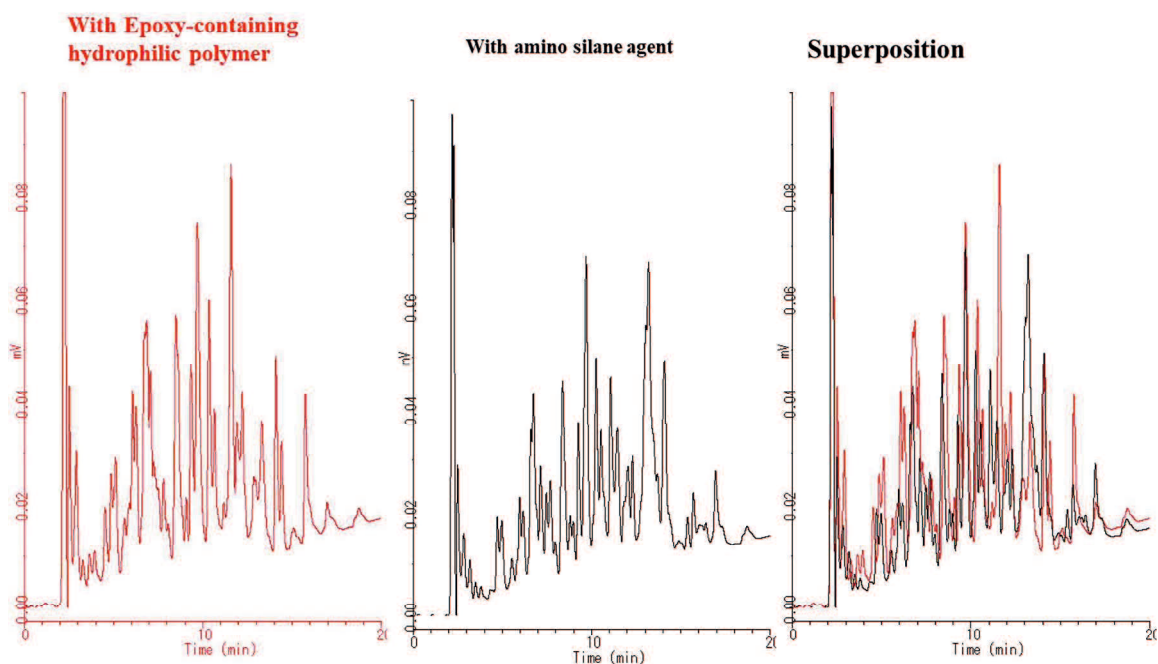


Figure 4-12 Chromatograms of BSA with digestion by MonoSpin Trypsin



#### 4-3-3(3) トリプシン固定化スピнкаラムを用いたタンパク質の迅速消化 バッチ消化との比較

親水性ポリマー修飾することで、シラン剤で修飾した場合と比較し、得られる消化ペプチドの量は増加した。プロテオミクス解析において、タンパク質の同定率を上げるためには、クロマトグラフィーによる分離、質量分析計による検出感度の向上の他に、消化酵素により効果的にタンパク質を消化する必要がある。消化時の温度、pH、時間、加える消化酵素の種類など多くの要素が消化効率に影響を与えるが、消化酵素の加える量も重要な影響を与える。通常は対象タンパク質に対して 1/50~1/100 量のトリプシンを添加し、10 時間以上の時間を掛けて消化を行う。消化効率の向上をする目的で、添加するトリプシンの量を増やす場合があるが、トリプシンを多量に加えると、質量分析における測定において、トリプシンの自己消化物及び、トリプシンそのものを検出してしまうため、高感度にペプチドを検出するためには、微量のトリプシンを用いて長時間かけて消化を行う必要がある。

固定化トリプシン担体を用いるメリットとしては、溶液が担体に接しているもしくはカラムを通過している際は、局所的に対象タンパク質に対する消化酵素の接触量を増やすことができる。トリプシンは担体へ固定化されている為、通過後、処理溶液にはトリプシンが混入しないため、質量分析計での測定においても影響を与えないメリットがある。以上の結果から、固定化トリプシンを用いることで、短時間での消化が可能になるが、使用している担体への吸着により、消化ペプチドの量が減る可能性がある。

作製したスピнкаラムを用いると、100xg で 5 分の遠心処理により、消化ペプチドを得ることが可能になる。18 時間かけ、溶液消化で調製したサンプルと比較した場合も、高い相関性が得られ、作製したスピнкаラムの有用性が示された(Figure 4-12)。使用したサンプル量は絶対量として 500  $\mu\text{g}$  であり非常に多くのサンプル量に適応できることが示された。

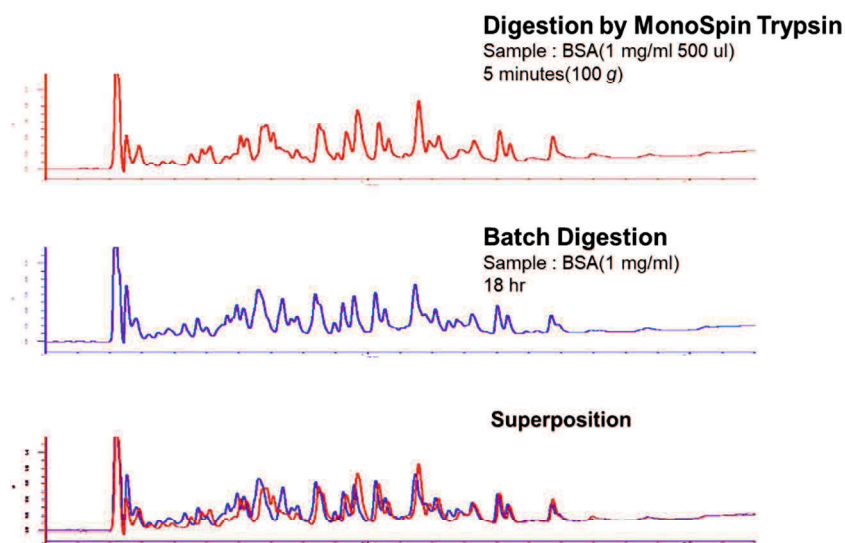


Figure 4-13 Comparison of digestive efficiency in batch digestion and trypsin-immobilized spin column digestion.

得られたペプチドを LC/MS を用いて分離及び、ペプチドの同定数を示した(Figure 4-14)。溶液消化の場合と比較して、同等のシーケンスカバレッジが得られ、またトリプシン由来のペプチドも検出されなかったことから、質量分析における解析にも使用可能なスピнкаラムであることが示された。

## LC/MS

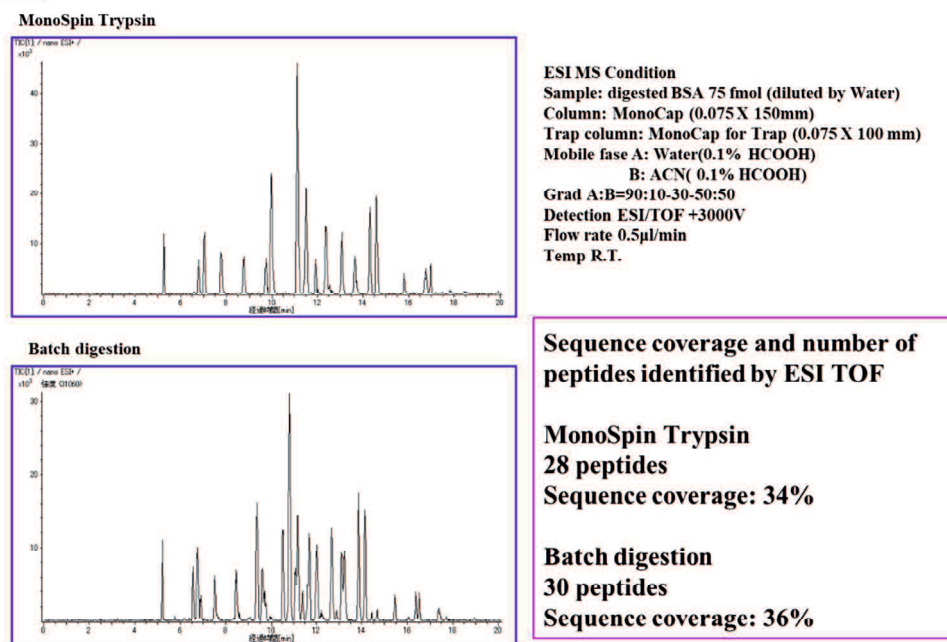


Figure 4-14. TIC of BSA with digestion by trypsin-immobilized spin column or batch digestion. BSA sample with desalted.

### 4-3-4 結言

親水性ポリマーをコーティングしたシリカモリスに対してトリプシンを固定化した。作製したモノリスをスピнкаラムへ固定化し、タンパク質の迅速消化を行った。アミノ基を有するシラン剤を用いて作製した場合と比較し、親水性ポリマーをコーティングすることで、得られるペプチドの量は増加した。溶液消化と比較しても、ペプチドの回収量において高い相関性を示し、10 時間以上要した消化時間を 10 分以内で消化を完了可能なスピнкаラムを作製した。

## 4-4 親水性ポリマー修飾モリスディスクへのボロン酸の固定化及びカテコールアミンの回収

### 4-4-1 緒言

生体試料中のカテコールアミンの濃度は非常に薄く(血中濃度としてアドレナリン 120 pg/mL、ノルアドレナリン 60~500 pg/mL、ドーパミン 30 pg/mL)、検出を行うためには、高感度検出器である電気化学検出器や質量分析計を用いて分析を行われる[33]。一方で、マウスやラットなど動物を用いた実験も行われ、試料としては血液、尿、脳の髄液等、サンプリングが可能な量が非常に微量である特徴がある。そのため、試料前処理には微量に適応可能であることが求められる。試料中には高濃度のタンパク質や塩、脂質などが夾雑成分として含まれるため、上記の検出器において分析を行う際には、固相抽出等の前処理が必要になる。しかしながら固相抽出での前処理の多くはカラムの大きさとしては 1 mL、溶液を回収するときに必要な液量としても 500  $\mu$ L~1 mL を必要とするため、実際に分析する際は濃縮後に行われるが、カテコールアミンなどの分解性が危惧される化合物においては、エバレーションなどの濃縮を行わずに分析を行う必要がある。本章においては、シリカモリスを親水性ポリマーによりコーティングを行う手法について検討している。本項目においては、親水性ポリマーを修飾後にフェニルボロン酸を導入することで、カテコールアミンの回収が可能なスピнкаラムの開発、検討を行った。

### 4-4-2 実験

#### 4-4-2(1) 試薬

ヒドロキシエチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート、3-アミノフェニルボロン酸、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミンは東京化成から購入した。HPLC グレードトリフルオロ酢酸は和光純薬株式会社より購入した。リン酸緩衝液を作製するのに使用したリン酸水素 2 ナトリウム、2 水和物、リン酸 2 水素ナトリウム、ジメチルホルムアミド、EDTA-2Na、オクタンスルホン酸ナトリウム(SOS)はキシダ化学より購入した。Polyethylene oxide (PEO: Mw=100,000)は、Sigma-Aldrich より購入した。スタンダード尿サンプルはバイオラッド社から購入した。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値 18.3 M $\Omega$ /cm のものを使用した。

#### 4-4-2(2) HPLC 条件

HPLC システムはジーエルサイエンス社製 PU611 ポンプ、ECD 検出計、705 カラムオーブンをを用いて行った。サンプルインジェクターはモデル 8125(レオダイン社製)を用いた。分析用カラムとして、Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. x 150 mm、5  $\mu$ m、ジーエルサイエンス社製)を用いて実施した。装置の流速は 1 mL/min を用い、溶離液は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.6)、50 mg/mL EDTA-

2Na、600 mg/mL SOS- 12% MeOH を用いて行った。分析時のカラム温度は 30°Cで行った。

#### 4-4-2(3) シリカモノリスゲルの作製と、フェニルボロン酸の固定化

4-1-2(5)の手法を参考に、シリカモノリスへ親水性ポリマーとして HEMA-GMA をコーティングしたモノリスディスクを作製した。固定化の概念図を Figure4-15 に示す。タンパク質の固定とは異なり、ジエチルアミンの修飾の時のように、有機溶媒に溶解したアミノフェニルボロン酸溶液をGMAのエポキシ基へ直接修飾した。具体的にはGNA修飾モノリス 20 個に対して、3-アミノフェニルボロン酸溶液を 30ml 添加し、超音波(10 分)、脱気を繰り返した後、6 時間 65°Cにおいて反応した。反応後、水、アセトニトリルにより洗浄を 4 回行い、70°Cにおいて 24 時間減圧乾燥を行った。

修飾したシリカモノリスをスピнкаラムへ固定化し、カテコールアミンの回収に使用した。フェニルボロン酸が修飾された担体は、下記図の通りアルカリ条件下において、シスジオールを有する化合物に対して共有結合を形成することが可能である[34-36]。その後、酸性溶液を流すことにより、結合した化合物を脱離することが可能である。シスジオール化合物としてはカテコールアミンの他、糖関連化合物も回収することが可能である。

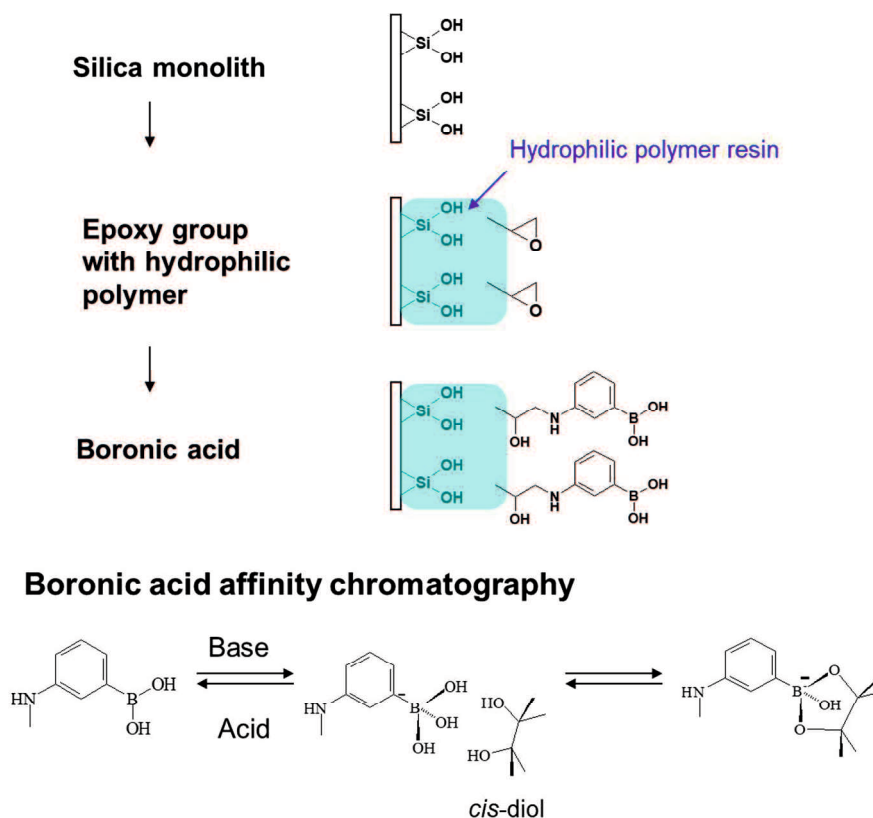


Figure 4-15 Chemical modification of monolith silica

#### 4-4-2(4) シリカモノリススピンカラムによるカテコールアミンの回収

フェニルホウ酸基を固定化したスピンカラムによる尿中カテコールアミンの回収方法は、すべて遠心処理により実施した。1%酢酸水溶液 500  $\mu$ L でカラムを洗浄し、100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH9)により平衡化を行った。尿サンプル 500  $\mu$ L に対して 1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH9) を 100  $\mu$ L 添加し、スピンカラムへ全量アプライした。カラムを 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH9) で洗浄後、1%酢酸により、吸着したカテコールアミンを回収した。遠心処理は 5,000xg で 1 分により実施した。

#### 4-4-3 結果

##### 4-4-3(1) シリカモノリススピンカラムによるカテコールアミンの回収

モノリススピンカラムによるカテコールアミンの回収結果について Figure4-16 に示す。5  $\mu$ g のカテコールアミンの回収を検討した結果、回収率は 98%を示した。処理時間は 5 分以内と短い時間で処理が可能であった。今回作製したフェニルホウ酸は化合物のシスジオール体に対して選択的なカラムである。そのため生体試料中のカテコールアミン類の中でも、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン 3 種類が吸着可能な化合物になる(Figure 4-17)。

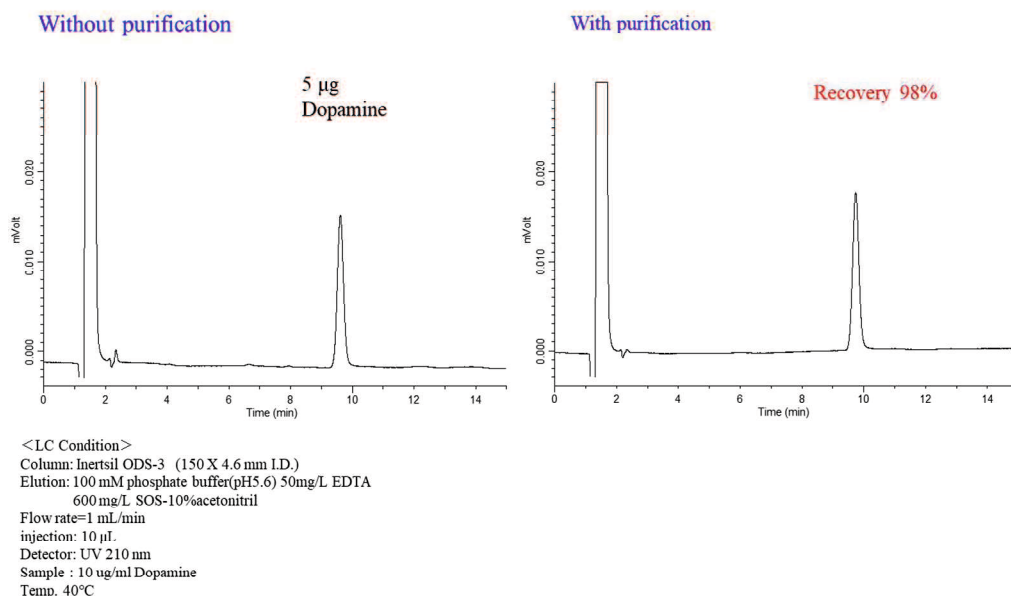


Figure 4-16 The comparison of dopamine with/without purification by MonoSpin PBA

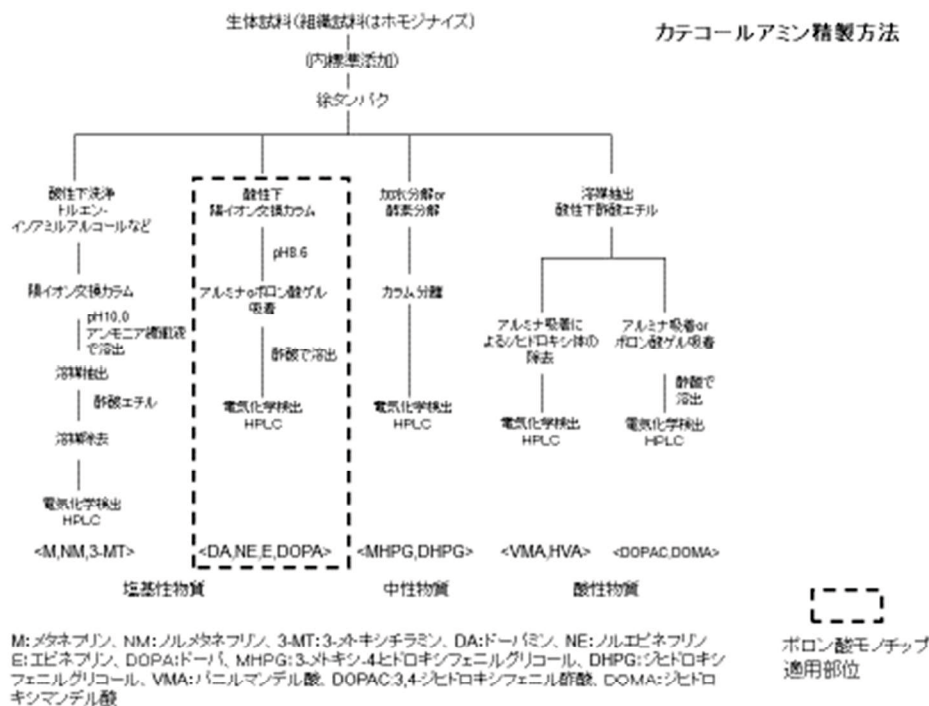


Figure 4-17 Catecholamine purification method

#### 4-4-3(2) 親水性コーティングによる血清中タンパク質の非特異吸着の軽減

4-2 および 4-3 の検証においては、親水性ポリマーをシリカモノリスへ修飾することで、タンパク質への非特異吸着を軽減させ、対象成分の回収率の向上を検討した。例えば IgG を対象成分とした場合には、担体に対しての IgG の非特異吸着を軽減させ、固定化した Protein A に対しての吸着、脱着に依存した抗体の回収が可能になった。トリプシン固定化においては、消化前のタンパク質及び、消化後のペプチドへの吸着を軽減させることで、回収されるペプチドの量を増加させた。本スピンカラムにおける検討では、親水性ポリマーを修飾することで、対象成分ではなく、夾雑成分の吸着を抑制し、溶出液への混入を抑えることを目的とした。

血清中には高濃度のアルブミンをはじめとするタンパク質が含まれる。カテコールアミンの精製において、これらタンパク質の成分が溶出画分に共溶出されると、HPLC における検出においてノイズの増加、カラム圧の上昇につながる可能性がある。

本検討で作製したスピンカラムからの溶出液に含まれるタンパク質量を確認した (Figure 4-18)。青のクロマトグラムは血清を 10 倍希釈、赤いクロマトグラムは 1000 倍希釈した試料を注入し、タンパク質の検出を行った結果である。アルブミンに由来したピークが確認されたが、フェニルホウ酸を修飾したカラムにおいては、精製後の溶液に含まれるタンパク質は 1% 以下であり、高効率でタンパク質が除去されていることが分かる。親水性ポリマーをコーティングすることで、夾雑タンパク質の吸着が抑制され、純度の高いカテコールアミンの回収が可能になったと考えられる。

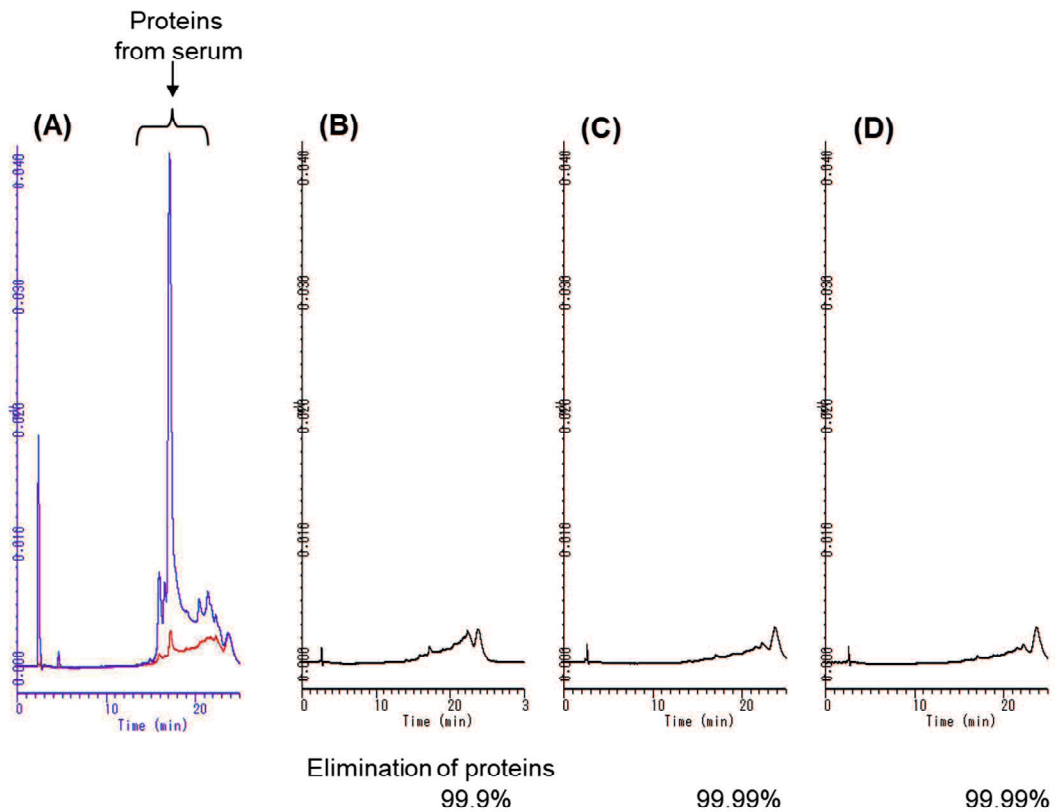


Figure 4-18 Chromatogram of the proteins form serum with/without purification by MonoSpin PBA.

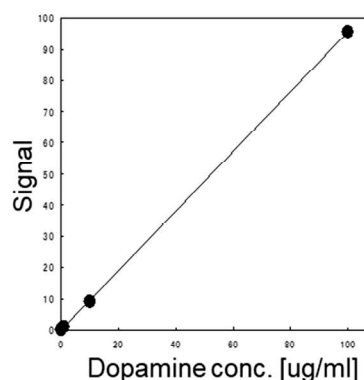
(A) Sample without purification. Blue : 10 times diluted solution, red : 1000 times diluted solution.  
 (B)~(D) Sample with purification by MonoSpin PBA,  
 wash operation (B)1 times,(C):2 times, (D): 3 times

<LC Condition>  
 Column: Inertsil WP300 C8(150 X 4.6 mm I.D.)  
 Flow rate : 1 ml/min  
 Mobile phase A: acetonitrile(0.1 % TFA),B: water(0.1 % TFA)  
 Gradient: A/B=20/80 – 20min – 60/40  
 injection: 10 µL  
 Detector: UV 280 nm  
 Temp. 40°C

#### 4-4-3(3) シリカモノリスピンカラムによる血清中からのカテコールアミンの回収

作製したモノリスカラムを用いて、血清中からのドーパミンの回収を検討した(Figure 4-19)。0.1~100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において、88~96%(CV1.6~5.4%)の回収率、直線性を示した。標準水中からの回収と比較しても同等の回収率を示し、マトリクスの影響を抑えながら対象成分が保持できていることが示された。サンプルの精製工程は 5 分で処理を完了することが可能であり、洗浄工程も 1 回の溶液添加によって血清中の 99%のタンパク質を除去することが可能なメソッドが構築された。

From serum				
Dopamine				
conc. [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0.1	1	10	100
Recovery[%]	88	87.5	90.3	95.6
CV. [%]	3.2	2.6	1.6	5.4
(n=4)				
Standard (diluted with water)				
Dopamine				
conc. [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0.1	1	10	100
Recovery[%]	87	88.9	90.7	94.5
CV. [%]	4.2	1.5	2.0	6.5
(n=4)				



The monolithic silica modified with hydrophilic resin reduced non-specific adsorption of proteins, leading to the elimination of proteins from serum sample. 99.9% of proteins from serum can be removed by washing procedure just 1 time.

The recovery ratio of dopamine from serum and standard indicated the almost same value. This result suggested that MonoSpin have no matrix effect in purification of catecholamine from serum.

MonoSpin PBA provide not only recovering catecholamines from biological samples, but also eliminate of proteins.

Figure 4-19 Recovery rate of dopamine using MonoSpin PBA from serum samples



#### 4-4-3(4) 血清中からのカテコールアミンの回収 溶出液量の確認

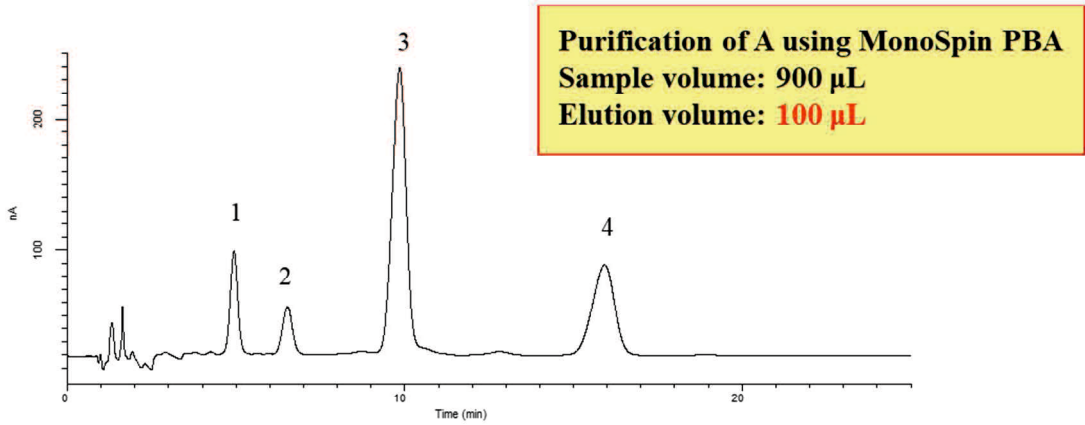
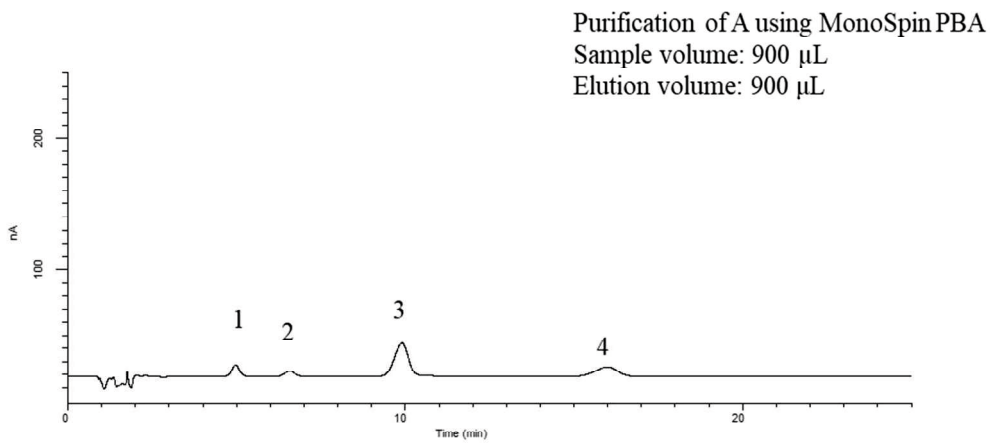
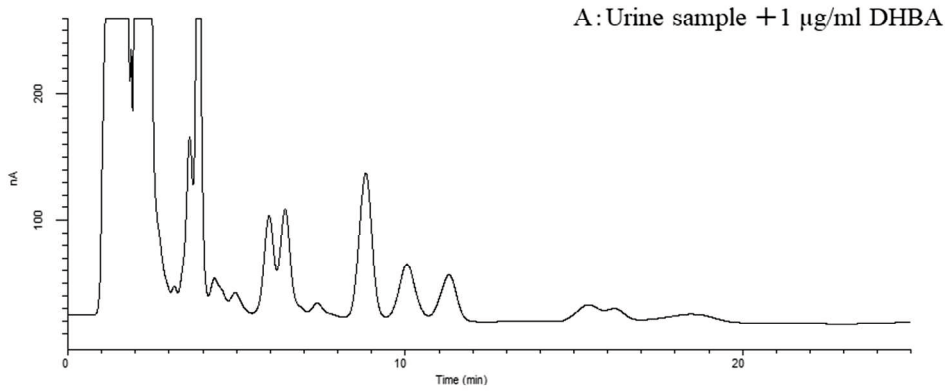
生体試料中のカテコールアミンの濃度は非常に薄く、検出を行うためにはECDや質量分析計を用いる必要がある[34]。電気化学検出器は化合物と電極表面との酸化還元反応により、化合物の濃度を電気化学的なシグナルとして検出する検出機器である。酸化還元反応を起こす化合物に対して選択的に検出可能である点、測定電位の調節により酸化還元反応を変更できることから、UV 検出器などと比較して、目的成分に対して高感度、高選択性を有する検出手法ではあるが、生体試料を分析する際は、サンプル中に含まれるイオン性化合物の影響を受けるため、下記クロマトグラムの通り目的成分以外にも電極表面で酸化還元を起こす結果、様々な化合物が検出されてしまう。

そのため、高選択性の検出器であっても、目的化合物に応じて精製が必要であり、カテコールアミン検出についても同様に前処理が求められる。フェニルホウ酸基を有するアフィニティ担体は化合物のシスジオール基に対して選択的であるため、生体試料中のカテコールアミンや糖を吸着することが可能である。フェニルホウ酸基に対しての吸着性は、pH に大きく依存する。pH をアルカリ性にすることで、より強い吸着性を示すが、カテコールアミンはpH8~9において吸着し、糖関連化合物はpH12以上が必要である。一方で、カテコールアミンはサンプル中のpHが9を超えると、分解性を有する。サンプルアプライ時のpHを9に設定することで、カテコールアミンに選択的な前処理が可能になる。

また、微量なカテコールアミンの検出において、サンプルのアプライ量と、溶出量を調製することで、より高感度に検出が可能になる。モリスの形状はスピнкаラム用に調製したゲルは、ピペットチップに固定したものと比較して大きく、体積としてはピペットチップ用が約2  $\mu\text{L}$  であるのに対して、スピнкаラム用は25  $\mu\text{L}$  弱と大きい。そのため必要溶出液量はピペットチップよりは増えてしまう。

今回作製したスピнкаラムによるカテコールアミンの回収において、溶出液量50  $\mu\text{L}$  では約70%の回収率を示し、100  $\mu\text{L}$  では85%以上の回収率を示した。Figure 4-20に精製前の尿サンプルのクロマトグラム、スピнкаラムにより精製を行ったクロマトグラム。溶出液量を減らし、濃縮を検討したクロマトグラムを記載する。

スピнкаラムを使用することで、尿中の夾雑成分を取り除くことが可能であった。更に溶出液を100  $\mu\text{L}$  を用いることにより、高感度が可能になった。



<LC Condition>

Column: Inertsil ODS-3 (150 x 2.1 mm I.D.)  
 Elution: 50 mM phosphate buffer(pH5.6) 50 mg/L EDTA  
 600 mg/L SOS-10% Methanol  
 Flow rate=300  $\mu\text{L}/\text{min}$   
 Injection: 5  $\mu\text{L}$   
 Detector: ECD703 plus Diamond +800 mV Ag/AgCl  
 Sample 1:Noradrenaline, 2:Adrenalin, 3:DHBA, 4:Dopamine  
 Temp. 35 $^{\circ}\text{C}$

Figure 4-20 Concentration of catecholamine from urine samples.

#### 4-4-4 結言

シリカモノリスに対して親水性ポリマーおよびフェニルホウ酸を修飾することで、生体試料中のカテコールアミン精製ツールの開発を行った。親水性ポリマーは血清中のタンパク質の吸着を抑制し、精製度の向上に寄与した。血清、尿からのカテコールアミンの回収においてサンプル溶出液量 100  $\mu\text{L}$  においても高い回収率が得られた。今後微量サンプルを用いた前処理用ツールとして機能することが期待される。

## 引用文献

- [1] E. L. Chaikof, E. W. Merrill, A. D. Callow, R. J. Connolly, S. L. Verdon, and K. Ramberg, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1992**, 26, 1163
- [2] 中林宣男,石原一彦, *化学と工業*, **1990**, 47, 1267
- [3] K. Ishihara, T. Ueda, and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **1990**, 22, 355
- [4] T. Ueda, H. Oshida, K. Kurita, K. Ishihara, N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **1992**, 22, 1259
- [5] 石原一彦: *高分子*, **2009**, 4, 199
- [6] M. Grom, M. Kozorog, S. Caserman, A. Pohar and B. Likozar, *J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **2018**, 1083, 44
- [7] L. M. Barnes, C. M. Bentley and A. J. Dickson, *Cytotechnology*, **2000**, 32, 109
- [8] Dorai H, Corisdeo S, Ellis D, Kinney C, Chomo M, Hawley-Nelson P, Moore G. Betenbaugh H. Dorai, S. Corisdeo, D. Ellis, C. Kinney, M. Chomo, P. Hawley-Nelson, G. Moore, M. J. Betenbaugh and S. Ganguly, *Biotechnol. Bioeng.*, **2012**, 109, 1016
- [9] S. Dharshanan, H. Chong, C. S. Hung, Z. Zamrod and N. Kamal, *Electron. J. Biotechnol.*, **2011** 14, 1
- [10] S. Dharshanan and C. S. Hung, *Methods Mol. Biol.*, **2014**, 1131,105
- [11] B. Zang, J. Ren, L. Xu and L. Jia, *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1008, 132
- [12] X. Zhang, Y. Duan and X. Zeng, *Process Biochemistry*, **2020**, 91, 90
- [13] X. Zhang, Y. Duan and X. Zeng, *ACS Omega* **2017**, 2, 1731
- [14] A. Denizli, A. Y. Rad, E. Pişkin, *J. Chromatogr. B*. **1995**, 668, 13
- [15] M. Lorenz, C. Paganini, G. Storti and M. Morbidelli, *Materials*, **2019**, 12, 1580
- [16] S. Ohlson and J. Wieslander, *J. Chromatogr. A*, **1987**, 397, 207
- [17] S. Huang, S. Y. Cheng, S. Y. Zhang, Y. L. Yan, S. L. Cai, X. L. Li, S. R. Zheng, J. Fan and W. G. Zhang, *New J. Chem.*, **2020**, 44, 7884
- [18] B. N. P. Sah, J. Lueangsakulthai, B. R. Hauser, V. D. Mathieu, B. Scottoline, M. K. Pастey, and D. C. Dallas, *Front Nutr.*, **2020**, 7, 136
- [19] Y. T. Chang, M. C. Chang, Y. J. Tsai, C. Ferng, H. C. Shih, Y. P. Kuo, C. H. Chen, I. L. Tsai, *J. Food and Drug Analysis*, **2019**, 27, 475
- [20] E. Lalli, J. S. Silva, C. Boi and G. C. Sarti, *Membranes*, **2020**, 10, 1
- [21] U. Černigoj, U. Vidic, B. Nemeč, J. Gašperšič, J. Vidič, N. L. Krajnc, A. Štrancar, A. Podgornik, *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1464, 72
- [22] M.V. Volokitina, V.A. Korzhikov-Vlakh, T.B. Tennikova and E.G. Korzhikova-Vlakh *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, 145, 169
- [23] M. W. H. Roberts, C. M. Ongkudon, G. M. Forde and M. K. Danquah, *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32, 2485

- [24] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 762, 135
- [25] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 797, 121
- [26] A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Yahata, M. Yashiki and M. Nagao, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 797, 121
- [27] T. Saito, R. Yamamoto, S. Inoue, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, S and Inokuchi, *J. Chromatog. B*, **2008**, 867, 99
- [28] P. Kovarik, R. J. Hodgson, T. Covey, M. A. Brook, J. D. Brenna, *Anal. Chem.*, **2005**, 773, 340.
- [29] R Mallik, H. Xuan and D. S. Hage, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1149, 294
- [30] X. Liu, J. Xing, Y. Guan, G. Shan and H. Liu, *Colloids and Surfaces A*, **2004**, 238, 127
- [31] S. C. Crowley, K. C. Chan, R. R. Walters, *J. Chromatogr. A*, **1986**, 359, 359
- [32] Z. Zhao, A. Malik and M. L. Lee, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2747
- [33] R. T. Peaston and C. Weinkove, *Ann. Clin. Biochem*, **2004**, 41, 17
- [34] R. P. Singhal and S. M. DeSilva, *Adv. Chromatog.*, **1992**, 31, 293
- [35] J. R. Mazzeo and I. S. Krull, *BioChromatog.*, **1989**, 4, 124
- [36] A. Bergold and W. H. Scouten, *Solid Phase Biochemistry (Scouten, W.H. 編)*, **1983**, pp. 149

## 第 5 章 Protein A 固定化シリカモノリスを利用した多検体前処理用システムの開発

### 5-1 96 ウェルプレートへのシリカモノリスの固定化及び特性解析

#### 5-1-1 緒言

抗体医薬の開発や製造においては、目的抗体を高発現する細胞の選択、発現抗体の品質の確認、培養条件の最適化等が必要で、そのために、数千を超えるサンプル(細胞培養液)中に含まれる発現抗体の定量、糖鎖構造の解析等を行う必要がある。現状の分析システムは精製、定量に1プレート(96 サンプル)あたり、60 分以上かかり、時間効率が悪い[1-3]。また、血清培地中の低濃度の抗体に関しては測定値がばらつき、定量が困難である。

このような諸問題を解決するためには、装置、システムの改良が不可欠である。具体的には、低濃度抗体の定量が困難な原因の一つとして、コンタミする不純物の存在があり、担体やプレートへの非特異的吸着を低減させて精製純度を向上させる必要がある。また処理時間を要するのは、高流速域での担体の保持能力の低下が影響し、処理速度を上げられないことが原因である。

高速処理時においても性能が低下しにくい担体として、シリカモノリス担体が挙げられるが、自動分注機は、既存の低流量に対応したシステムであるため、担体の持つ優れた高速分離特性を十分に生かしていないことも高速化が実現していない原因である。すなわち、シリカモノリス担体を利用した場合、吸着や脱離に必要な時間は数秒なのに、各種溶液を分注する作業に多くの時間が費やされている。

そこで本研究においては、クロマトアレイに最適な分注ロボットのシステム、ソフトウェアの開発を行うことで、ハイスループット抗体精製・定量システムの開発を目的とし、1 プレートあたり 10 分で処理可能なシステムに必要な要素検証を行うことを目的とした。

まず、高速処理が可能なクロマトアレイを作製することを目的に、作製したシリカモノリスを 96 ウェルプレートへ固定化する手法、およびウェルプレートを使用するにあたっての溶液組成、必要溶液量の確認を行った。

開発のポイント、目的、設定値を Figure5-1 に示す。分離媒体として使用するシリカモノリスには、目的物以外の化合物の非特異吸着を軽減する処理を施したゲルを採用し、96 個のサンプルを 15 分以内で精製可能なシステムの開発を行う。精製したサンプルは、0.005 ～1.5 mg/ml の範囲で抗体の定量が可能できるシステムとする。

## ハイスループット抗体精製・定量システムの開発

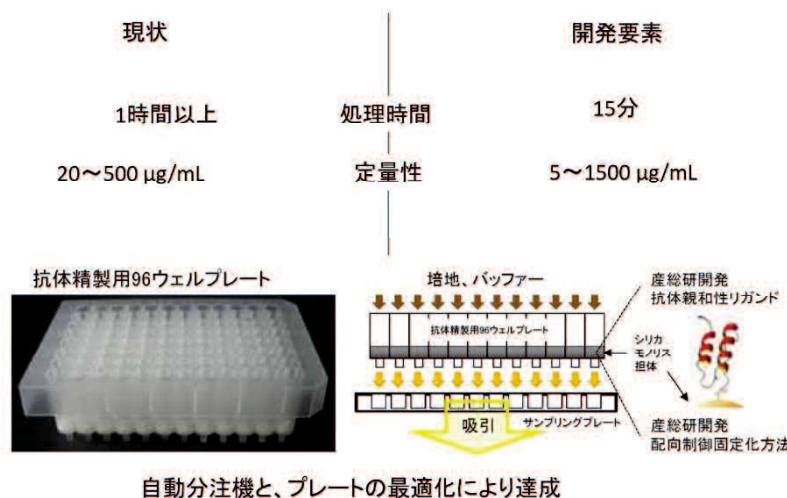


Figure 5-1 Development of the high-through put antibody purification system

### 5-1-2 実験

#### 5-1-2(1) 試薬

MonoSpin ProA に使用している Protein A 修飾シリカモノリスゲル、96 ウェルプレートはジーエルサイエンス社製を用いた。CHO 細胞培養液は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合において作製された培養液上清を用いた。超純水は、日本ミリポア製 Milli-Q Eluent システムにより製造した、抵抗値 18.3 MΩ/cm のものを使用した。

#### 5-1-2(2) 96 ウェルプレートへのモノリスの固定

シリカモノリスゲルをシリコンリングへはめ込み、アッセンブリしたパーツを 96 ウェルプレートへ装着した。アッセンブリを装着したウェルに対して、PP 製のリングを装着し、抗体精製用プレートとした。

#### 5-1-2(3) モノリス固定化 96 ウェルプレートを用いた抗体の精製

ウェルプレートにおいて使用した溶液は、MonoSpin ProA に付属の溶液をベースに実施した。吸着バッファーとして 100 mM リン酸緩衝液(pH7)、洗浄バッファーとして 100 mM リン酸緩衝液 (pH7)-1 M NaCl、溶出液としては、100 mM クエン酸緩衝液(pH3)の他、ギ酸、酢酸、リン酸、塩酸、各水溶液により抗体が回収可能であるか、またその際必要な溶液量について 50~300 µLの範囲で検証した。

### 5-1-3 結果と考察

#### 5-1-3(1) 96 ウェルプレートへのシリカモノリスの固定化

ジーエルサイエンス社製抗体精製カラム MonoSpin ProA は、シリカモノリス表面を親水性ポリマーにより覆うことで、タンパク質の非特異吸着を軽減させつつ、抗体精製用リガンドとして Protein A を固定化した前処理用カラムである。固定している Protein A は産業技術総合研究所によって開発された遺伝子組み換え Protein A であり、動的吸着量が高い。同社から販売されている MonoSpin シリーズはシリカモノリスの固定化を熱溶着によって実施しているため、同固定方法をタンパク質である Protein A に適応させるには、熱による変性のリスクが高い。そのため、シリカモノリスの固定化には、弾性を有するシリコンパッキンの台座へシリカモノリスを納めたのち、そのアセンブリをスピンカラムへ固定化している。

スピンカラムへの溶液の通液は遠心機により実施する為、圧力の解放によるシリコンパッキンからのシリカモノリスの脱離は起こりにくい。一方で、ウェルプレートの使用においては自動分抽装置では吸引もしくは、加圧によりシリカモノリスへ溶液を通過させる必要がある。操作を迅速に行うには、ウェルプレートへ溶液を添加後、吸引処理後に、急激に吸引状態から圧の開放が行われるため、下方に引っ張られたシリカモノリスは圧力の解放とともに、シリコンリングから外れるリスクがある。また、固定に使用しているシリコンパッキンの上面はモノリスに対して並行であるため、吸引処理時には、シリコンパッキンの周りに溶液が残存する可能性がある。

本検討では、そのリスクを軽減することを目的に、専用のプラスチックリングを作製し、シリコンリングで固定しているシリカモノリスを上から抑えることで、モノリスの脱離を抑えることを検討した (Figure 5-2)。

下記図に示される、中心部に向けて斜めにカットされた PP リングは、吸引、解放時のシリコンパッキンからのモノリスの脱離を抑制し、尚且つ、パッキン周辺への残存液の量を減らすことができた。



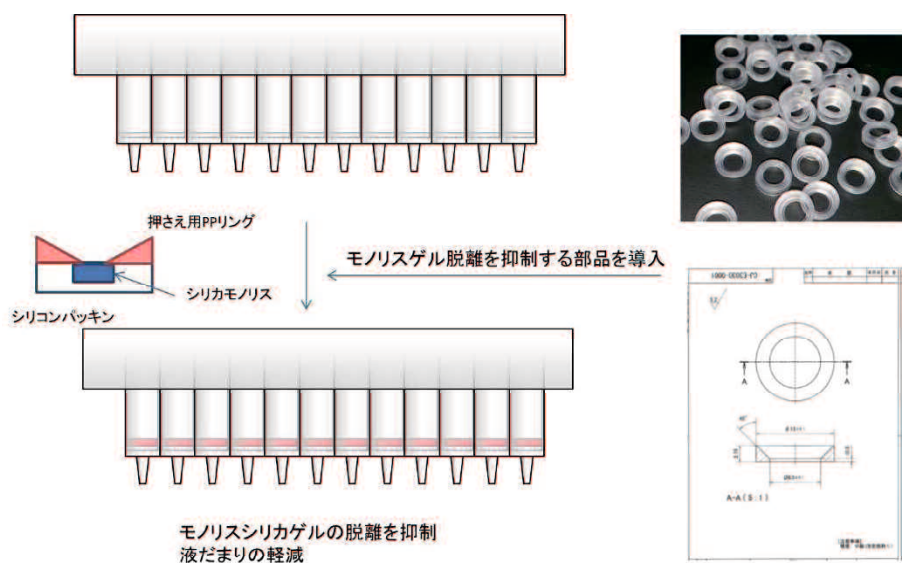


Figure 5-2 Development of the antibody purification 96 well plate

5-1-3(2) モノリス固定化 96 ウェルプレートを用いた抗体の精製

抗体を回収する酸緩衝液として製品に同梱されている 100 mM クエン酸緩衝液の他、酸の種類の違いによる抗体の回収率の違いを検証した (Figure 5-3)。Protein A に吸着した抗体は、酸緩衝液を通過させることで回収される。pH の値及び、酸の濃度、種類によって溶出効率は変わる。自動装置により回収する際、より効果的に抗体を回収する為、各種溶液による回収の基礎検討を行った。pH が低いほど、酸の濃度が高いほど高い回収率が得られた。培養細胞上清からの抗体の回収において、揮発性の緩衝液で回収できることは、精製後の溶液をそのまま LC/MS 分析に適応することができることを意味する。不揮発性の塩を含む溶液で回収したサンプルは、直接LC/MS に導入すると、感度低下や装置の故障の原因になるため、揮発性の酸で回収できることが確認できたことは、装置構築において重要な項目である。

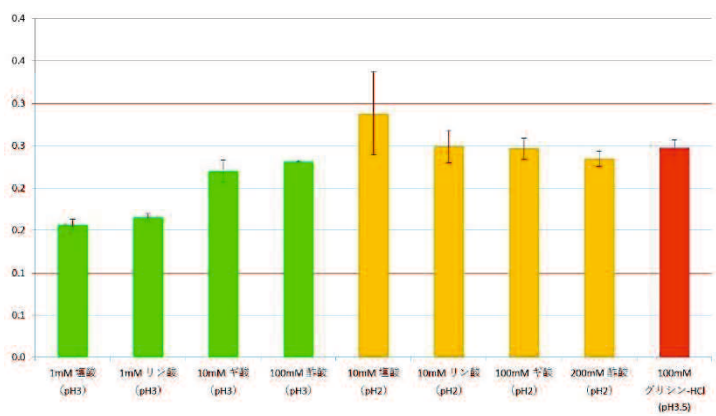


Figure 5-3 Effect of the acid buffer on the IgG recovery

次に作製したモノリスプレートを用いて抗体の精製を検討した。遠心処理に比べて吸引処理による通液ではカラムに残存する液量が多い。遠心処理では遠心力により溶液を通過させるため、モノリスのポアからも効果的に溶液を回収することが可能であるが、吸引ポンプによる通液では、表面張力の影響により、モノリスゲルから完全に溶液を回収することは困難である。スピнкаラムを用いた際の溶液量としては、50  $\mu\text{L}$ の溶出液で抗体を回収することができたが、吸引処理により安定に回収可能な溶液量としては150  $\mu\text{L}$ から安定に回収可能であった(Figure 5-4)。

図には溶出液量150  $\mu\text{L}$ を用いた際の抗体の回収結果を示す。96サンプルを吸引により通過させ、クエン酸緩衝液(pH3.5)により回収を行った。抗体の回収率としては90% CV値3.1%と良好な値を示した。

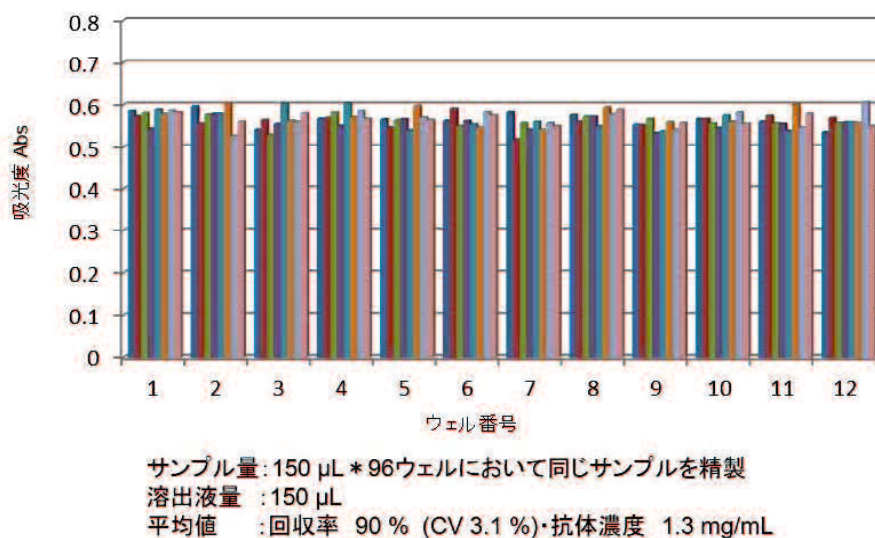


Figure 5-4 Recovery of IgG using Protein A-immobilized monolithic silica fixed 96 well plat

#### 5-1-4 結言

迅速抗体精製用の処理プレートとして、96ウェルプレートヘシリカモノリスディスクを固定化した。固定化には処理装置の機構を考慮し、再現性が高められるよう、PP製の押しえリングを装着し、使用する溶液量、使用する酸の種類を確認した。作製したプレートは150  $\mu\text{L}$ の溶出液を用いることで回収率90%、CV値は3.1%を示した。

## 5-2 迅速抗体精製システムの構築

### 5-2-1 緒言

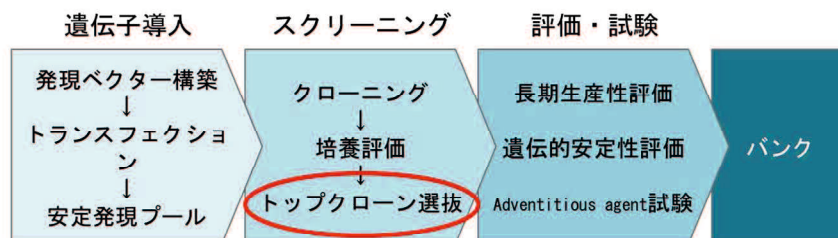
5-1 において検討を行ったシリカモノリス固定化 96 ウェルプレートを用いて、全自動溶液分抽装置による、抗体精製システムの構築を検討した。構築する自動精製システムの概略を下記図に示す。

マスターセルバンクの開発において、遺伝子導入した細胞から、優れたクローンをスクリーニングする方法としては、多検体培養を行った培養液の中から、高タイトーの培養液及び細胞をスクリーニングする必要がある。これまでに様々なクローンの選抜方法が提案、実施されており[4-8]、表面プラズモン共鳴を利用したオクテット等を用いた手法等[1]が挙げられる。

しかしながらこれら手法は、抗体を精製することなく濃度を測定する場合だったり、精製には非常に時間を要するシステムしか存在せず、タイトーだけではなく抗体糖鎖の均一性等、品質までを確認可能なスクリーニング法が望まれている。

そこで研究において開発するシステムは、迅速に精製、回収する手法を組み合わせ、迅速精製システムを構築することを目的とする(Figure5-5、5-6)。

#### マスターセルバンク作製までの流れ



より優れたクローンを選抜するためには？

- ✓ クローニングと培養のスループットを上げて多検体を評価する
- ✓ タイトーだけでなく品質分析を軸としたスクリーニングをおこなう

Figure 5-5 Construction for the CHO master cell bank

抗体を産生する CHO マスターセルを構築するにあたり、多検体細胞培養を実施した溶液から、細胞を除去し、得られた溶液を Protein A 固定化シリカモノリスプレートと全自動小型並列精製装置により、抗体の簡易精製を実施する。その際、プレートリーダーにより抗体濃度の測定を可能とする。簡易精製品は、LC/MS により、抗体の分子量、糖鎖のバリエーション、異性体解析に用いることを目的とする。

これまで報告されている高速精製システムに比べ処理時間を 1/4 に短縮することを目的にシステムの構築を行った。

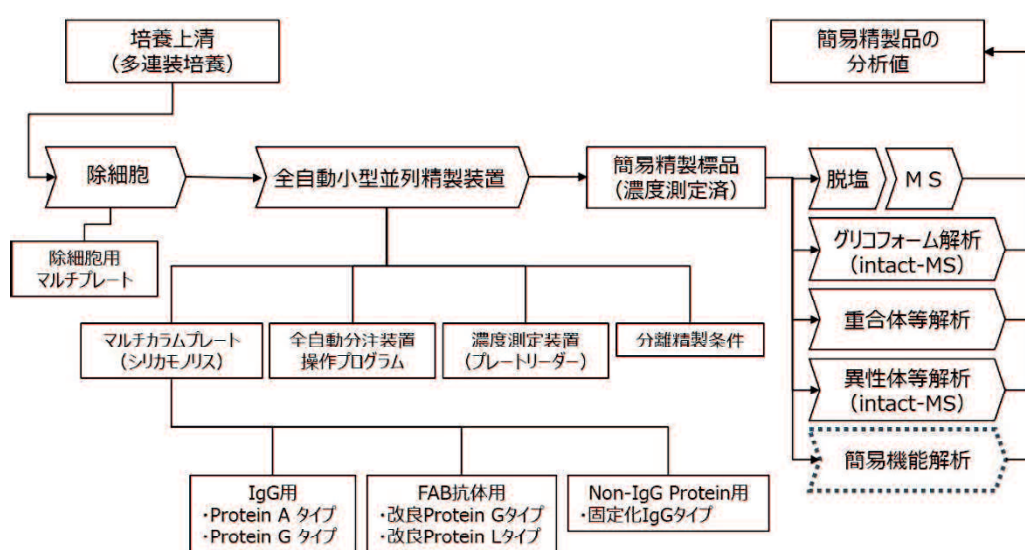
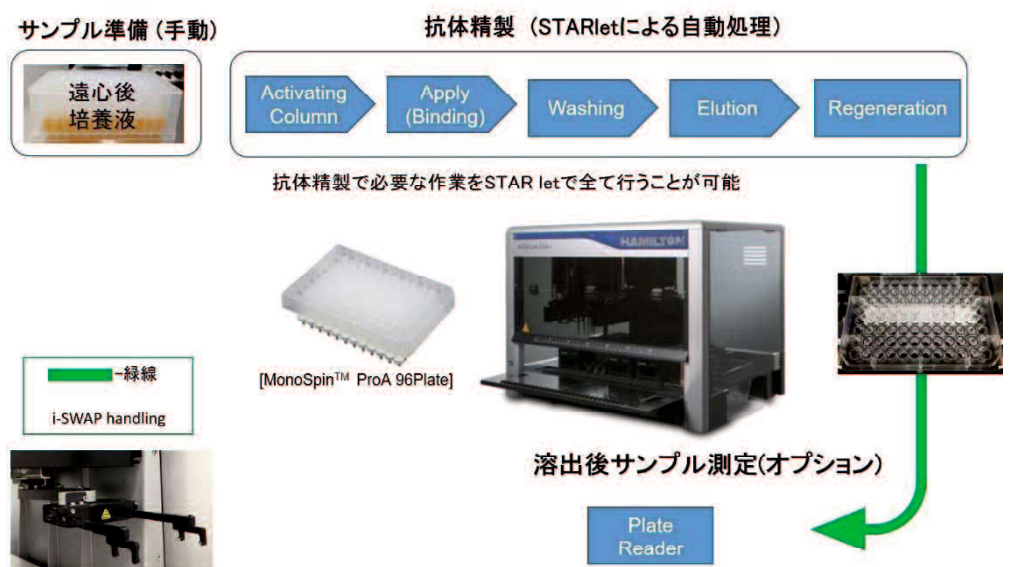


Figure 5-6 Concept of the high throughput antibody purification system

## 5-2-2(1) 使用装置

システム構築のために使用した機器を下記に記載する(Figure 5-7)。

ハミルトン社 Microlabo STARlet: 自動分抽装置、CVS バキュームユニット、CORE グリッパー、i-SWAP、Molecular Devices Spectra Max Plus384 を用いた。



### CVS (バキュームシステム)



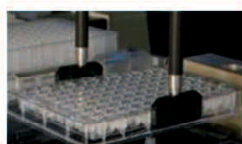
減圧吸引により  
抗体精製プレートの通液目的で使用  
※自動化対応の遠心機は価格と  
設置場所が膨らむのでCVSを採用

### Molecular Devices SpectraMax Plus384



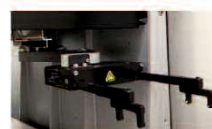
プレートリーダーにより、  
回収した溶液中の抗体の有無を判別

### CORE gripper



プレートの蓋の開閉や  
装置内のプレートの搬送が可能

### i-SWAP (外部デバイス用搬送アーム)



回収したプレートを外付けした  
プレートリーダーに搬送可能

Figure 5-7 Component of the antibody purification using Hamilton microlab STAR let.

## 5-2-2(2) 自動分抽装置による抗体サンプルの全自動精製

5-2-2(1)において記載した機器を Microlab STARlet(ハミルトン社)のデッキ上へ下記写真の通りに配置、シリカモノリス 96 ウェルプレートを設置し、全自動精製を検討した(Figure 5-7)。

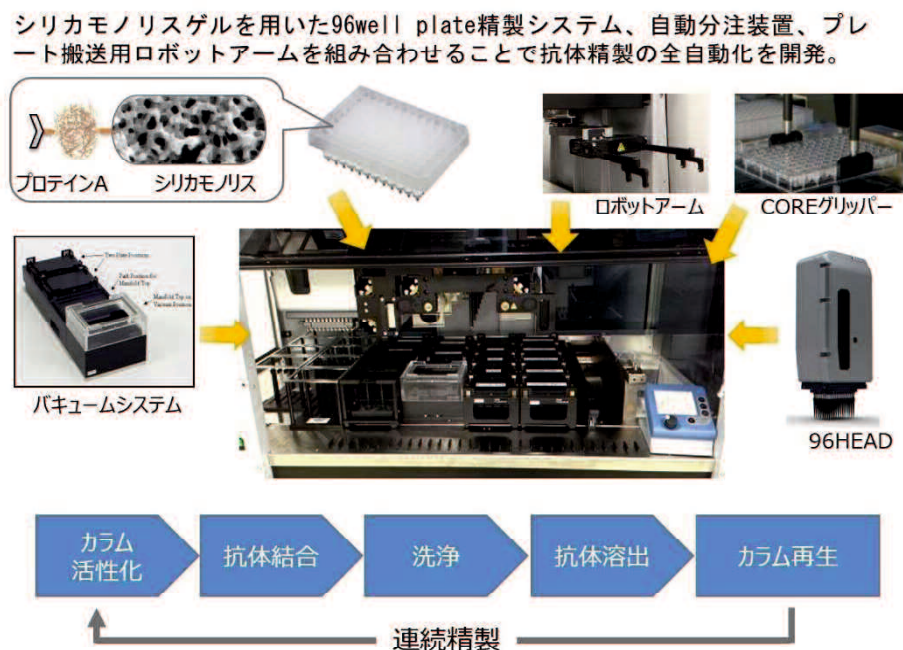


Figure 5-7 Deck layout of the antibody purification system

精製システムの処理フロー図 Figure5-8 を記載する。精製を行う培養液及び、精製を行うための吸着バッファー、洗浄バッファー、溶出バッファー、再生バッファーをデッキ上へセットする。容器及び、培養液のプレート上部にはコンタミを防ぐための蓋を設置する。蓋の開閉、溶液の吸引、吐出、プレートのバキューム処理及び、精製後の溶液の搬送、プレートリーダーでの読み取りから濃度算出の為にエクセル出力まですべてを全自動で実施する。

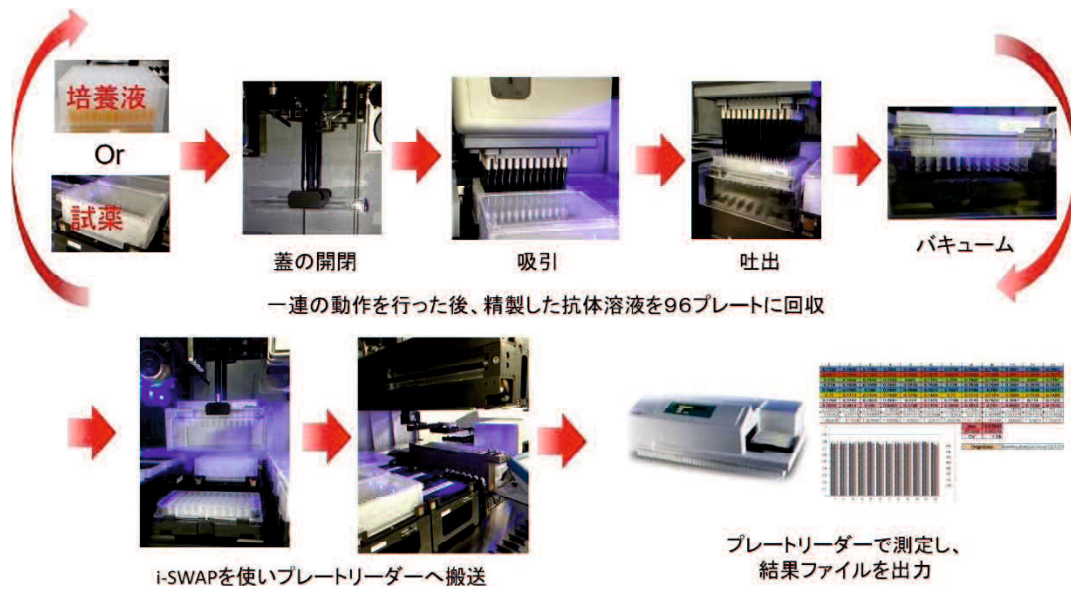


Figure 5-8 Workflow of IgG purification using Protein A immobilized monolithic plate.

PC でシステムを制御するためのインターフェース(Figure-5-9)については、下記のようなソフトウェアを作成して対応した。平衡化、吸着、洗浄、読出、プレートの再生までを各自実行、不実行が設定可能であり、各工程の回数、溶液量、吸引の強さ、時間までを設定することが可能になるように設計した。

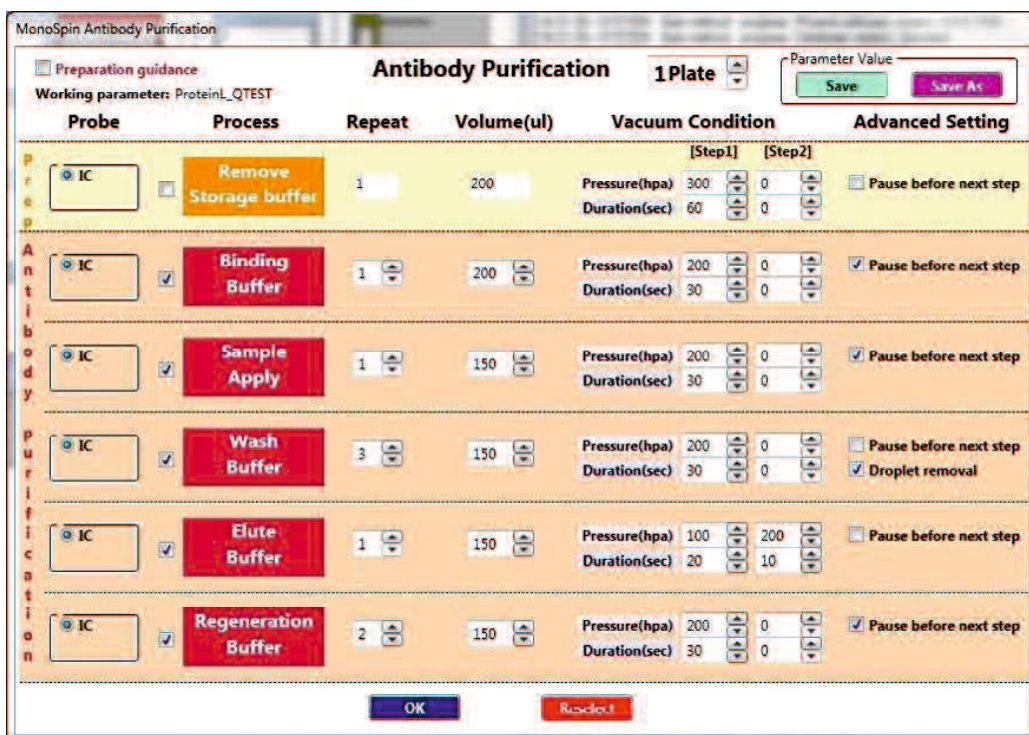


Figure 5-9 Graphical user interface to control the purification procedure.

### 5-2-3 結果

#### 5-2-3(1) 精製システムにおける洗浄の最適化の検証

全自動による抗体精製において、再現性は重要な項目である。今回作製のシステムにおける抗体の濃度測定は、溶液の吸光度を 280 nm の波長で検出することで対応する。そのため、溶液に抗体以外の不純物やタンパク質が含まれると、吸光度の値は高く出てしまう。結果として見かけの抗体濃度が高く算出されてしまう。96 コレクションプレートに同じ培養液のサンプルを入れ、ウェル間の再現性を確認した(Figure 5-10)。

再現性を高めるための最適化としては、プレートの洗浄回数を検討した。使用する溶液量は 5-1 において検討した 150  $\mu$ L を選択し、プレートの洗浄方法の回数、および洗浄溶液の通液速度、吸引力をそれぞれ変更することで、吸光度の安定化、再現性を検討した。

Wash method 1 においては洗浄 1 回での検討であったが、吸光度の平均値は 0.92 と想定値 0.58 よりも非常に高い値を示した。シリカモノリス担体中に培養液の成分が残存している結果であると考えられ、ばらつきも大きかった。洗浄回数を 2 回、吸引スピードを調節することで、吸光度の値を 0.57、CV 値を 3.1% が得られるシステムの構築ができた。

カラムの平衡化から、サンプルの溶出、中和の工程までに要する時間はトータル 9 分で完了することが可能であった。

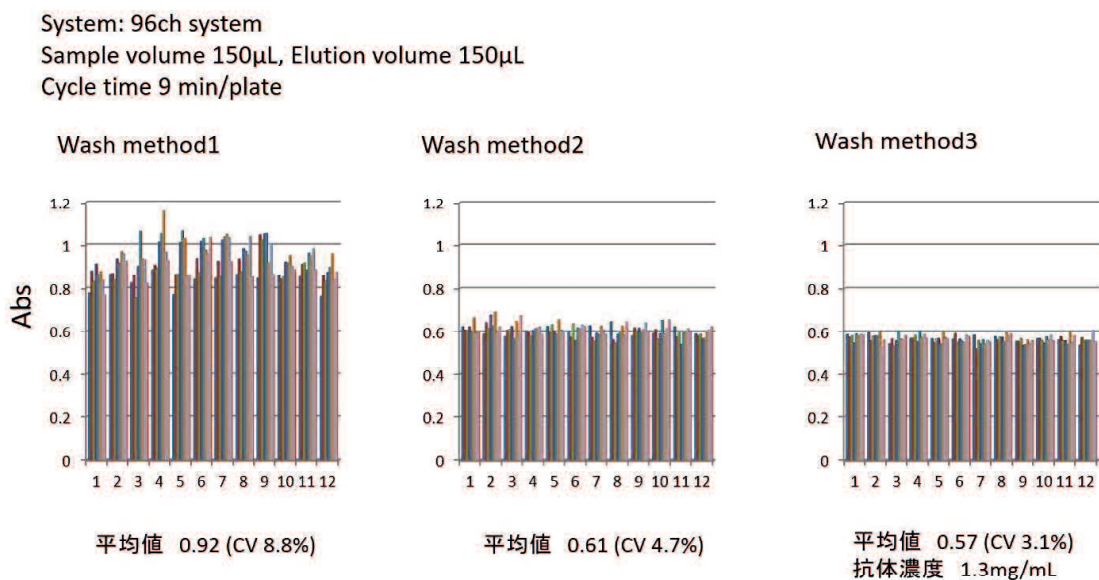


Figure 5-10 Optimization of the wash method on the IgG purification system.



## 5-2-3(2) 精製システムにおける再現性の確認

5-2-3(1)において洗浄方法を最適化後、システムの再現性を確認した。同一サンプルを 96 ウェルプレートへ移し替え、同一条件 3 回連続で精製処理を実施した結果(Figure 5-11)、3 回それぞれにおいて再現性、CV 値は2.1%以下であった。シリカモノリスディスクに対して抗体やマトリクス由来の成分が残存することなく、プレートが再生できていることが示された。

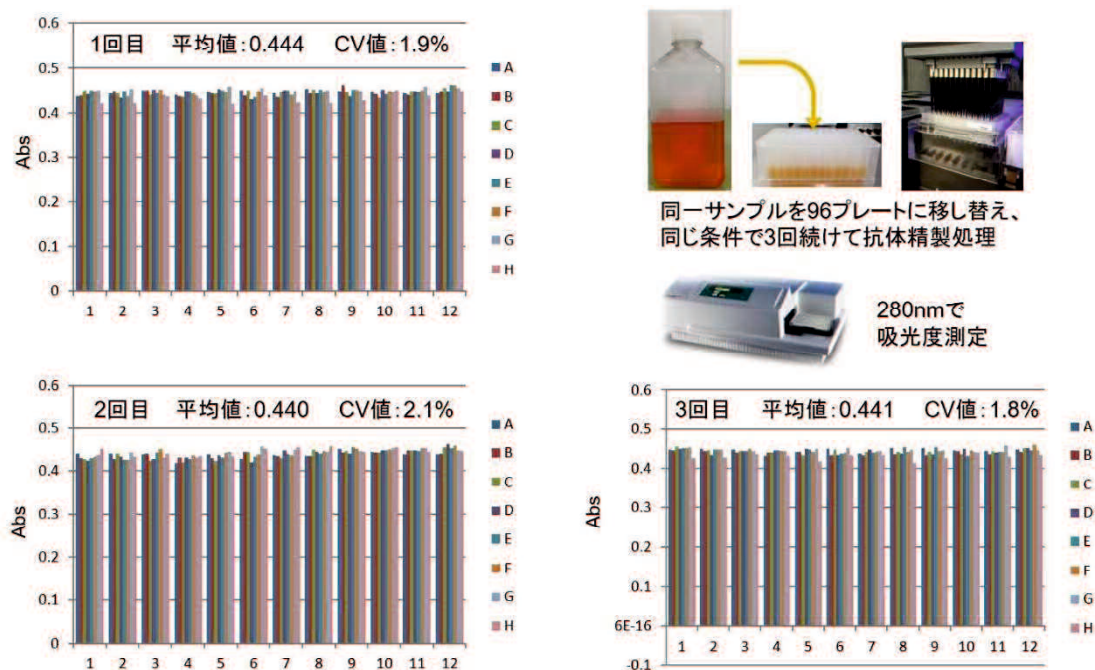


Figure 5-11 Reproducibility of the IgG purification using the developed system

CHO 細胞培養液の精製に一度使用した後のプレートを 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で洗浄し、平衡化、吸着、洗浄、溶出、水酸化ナトリウム溶液による再生を 10 回繰り返し行うことで、抗体の回収能を確認した (Figure 5-12)。その結果、抗体の回収量 (Abs 値) は、96WP 内においてバラツキもなく、良好な再現性を示した。水酸化ナトリウム洗浄を行った系においても、10 回の再生を行うことが可能な系が確立可能であった。

Figure 5-12 Alkali Durability

Against alkaline solutions

	Abs	CV[%]
2	0.369	1.8
3	0.37	1.9
4	0.372	2.1
5	0.371	2.5
6	0.369	2.6
7	0.373	2.3
8	0.373	2.3
9	0.375	2
10	0.376	2.4
Ave	0.372	
CV[%]	0.652	

### 5-2-3(3) ウェル間のコンタミネーションの確認

実際にシステムを運用する際は 96 ウェルそれぞれにおいて、異なる細胞、条件により産生された抗体を精製する必要がある。結果として抗体の濃度は各種バラバラであり、ウェル間のクロスコンタミネーションが起きることは避けなければならない。

本システムにおけるクロスコンタミネーションについて検証した結果を示す (Figure 5-13)。

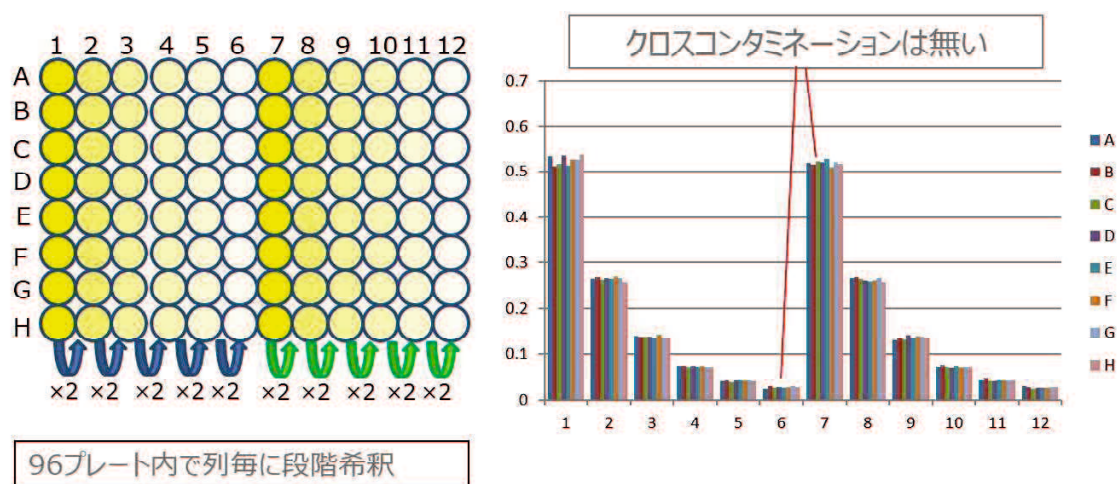


Figure 5-13 Cross contamination test on the antibody purification

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
濃度	原液	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	原液	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
吸光度	0.5249	0.2656	0.1382	0.0736	0.0415	0.0271	0.5192	0.2631	0.1357	0.0729	0.0427	0.0267
CV値	1.9%	1.6%	1.8%	1.2%	3.3%	6.5%	1.0%	1.5%	2.8%	1.8%	6.2%	5.3%

縦列1から抗体濃度を 1/2 になるように調製した培養液をアブライし、原液から 1/32 希釈を行ったサンプルの精製を行った結果、ウェル間のコンタミネーションは確認されず、各抗体濃度に依存した吸光度の値を確認することが可能であった。

#### 5-2-3(4) 抗体回収率に対する吸引力の影響

アフィニティクロマトグラフィーによる抗体精製において、担体と溶液の接触時間、接触方法は抗体の回収率に対して大きな影響を与える。アガロースゲルを担体として用いたプレートの場合には、抗体と担体の吸着時間が短いと、動的吸着量が低下する結果、回収率が低下する。そのため担体と抗体との吸着時間は 5~10 分必要とする。また、溶出時においても、酸性溶液に対して、担体を長時間曝す必要がある。結果としてシステムの処理時間を短縮することには限界がある。

一方シリカモノリス担体は溶液の通液速度を上げ、滞留時間を短く設定しても、抗体の吸着能が低下しにくい特徴がある (Figure 5-14)。

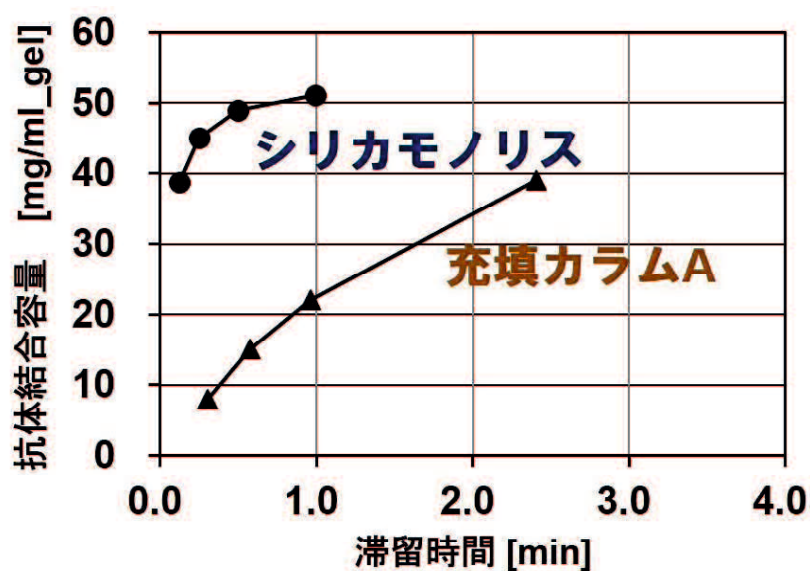


Figure 5-14 Dynamic binding capacity of monolithic silica column and particle packed column for antibody.

自動分抽装置における吸引力を 100 hPa、200 hPa、機器の最大吸引力である 300 hPa において吸引処理を行い、抗体の回収率を確認した (Figure 5-15)。吸引力が強くなることで、圧力開放時にシリコンパッキンからのモノリスの脱離のリスクは高まるが、5-1 において装着した押さえ用リングの影響で、モノリスの脱離は起きず、300 hPa の吸引力、通液速度においても安定した回収率が得られた。



サンプルプライと溶出作業に関してバキュームの強さを変更し得られた結果の違いを比較

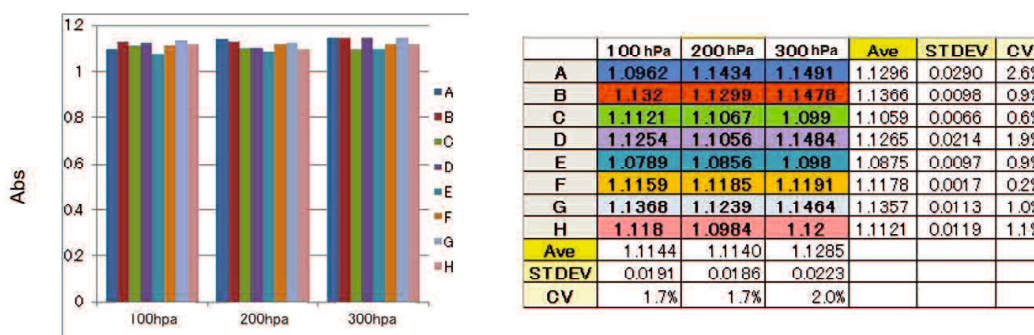


Figure 5-15 Vacuum condition development for a recovery of an antibody

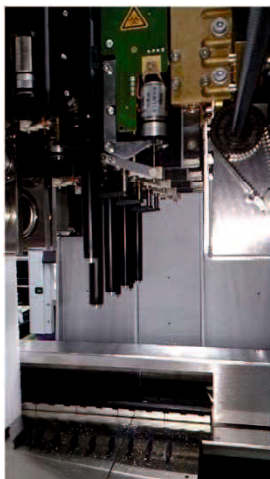
### 5-2-3(5) 構築装置のスループット

作製したシステムを最適化し、得られたメソッドのタイムテーブルを下記に示す (Figure 5-16)。システムとしては、分注チャンネルとして 8ch の独立チャンネルを用いた場合と、96ch を用いた場合とで比較している。システムコストとしては 8ch が安価に設定でき、場合に応じて使い分けが可能である。

目標としていた 96 サンプルの処理 15 分に対して、本システムは 96 ウェルサンプル処理においては 9 分、プレートの再生まで含めても 11 分で処理を完了することが可能であった。

工程	細目	8ch	8ch ver.2	96ch
プレート搬送	マニホールドの取り外し	7	7	7
	コレクションプレート搬送をマニホールドへ	7	7	7
	マニホールドの設置	7	7	7
	ProA 96WPをマニホールドへ	7	7	7
	サンプルプレートを吸引ポジションに搬送	7	7	7
保存液の除去	100barで吸引	70	35	35
	8chピペッターの装着	5	5	10
コンディショニング	A buffer 50 $\mu$ Lずつアプライ	180	180	60
	A buffer 吸引	70	35	35
サンプルアプライ	8chピペッター装着	5	5	5
	サンプル添加、吐出 8 x 12	420	420	60
	サンプル吸引	70	35	35
洗浄	8chピペッターの装着	5	5	10
	B bufferを100 $\mu$ Lずつアプライ	180	180	60
	B buffer吸引	70	60	60
溶出	マニホールドの取り外し	10	10	10
	回収用プレートの搬送	10	10	10
	マニホールドの設置	10	10	10
	8chピペッターの装着	10	10	10
	C bufferを50 $\mu$ Lずつアプライ	180	180	60
	C bufferを吸引	70	35	35
	Total Time(min) 固相前処理まで	23	21	9
再生	回収用プレートの搬送	20	20	20
	8chピペッターの装着	5	5	5
	D bufferを200 $\mu$ Lずつアプライ	240	240	60
	D bufferを吸引	70	20	20
Total Time(min) プレート再生まで	29	26	11	

8チャンネル



96チャンネル



Figure 5-16 Through-put of the developed system

#### 5-2-4 結言

マスターセル構築のための迅速抗体精製システムを作製した。作製したシステムは 96 サンプルからの抗体精製を 9 分、カラムの再生を含めると 11 分で完了することが可能であった。本システムを用いることで、マスターセルのスクリーニングにおける迅速化が期待される。

## 5-3 96 ウェルプレートへのシリカモノリスへの抗体の固定化及び免疫沈降への応用

### 5-3-1 緒言

5-2 において作製したシステムは、迅速に多検体からの抗体精製を可能とするシステムである。抗体精製用のリガンドとしては **Protien A** を固定している。**Protein A** に対して抗体を吸着させた状態で、化学処理により架橋を行うと、抗体を固定化した抗原に対して選択的なアフィニティ担体を作製することが可能である[9]。作製した抗体の品質評価や、抗体のスクリーニング用途として、微小空間に抗体を固定化が可能になると、システムの適応範囲を大きく広げることが可能になる。そこで、**Protein A** に対してモデルケースとして、抗 **BSA** 抗体を結合させ、テーラーメイドアフィニティプレートを作製することを目的とした。

### 5-3-2 実験方法

#### Anti-BSA 固定化カラムの作製及び **BSA** の回収

作製したシステムを用い、抗体をシリカモノリスへ固定化する工程を全自動化しアッセイを行った。固定化の手法は 3-1 において検討した手法をベースに、モデルケースとして抗アルブミン抗体を固定化したプレートを作製し評価を行った(Figure 5-17)。

#### Step1. カラムの準備

酸によりカラムを洗浄後、中性溶液により平衡化を行った。

#### Step2. カラムの活性化

固定している **Protein A** 中のカルボキシル基を **NHS**、**EDC** を用いて活性化を行う。

インキュベーション時間は、自動分抽装置のタイマー機能を用いて 60 分と設定して実施した。

#### Step3. 抗体の固定化

**Anti-BSA** 抗体サンプルを結合後、洗浄、結合の為のインキュベーション(60 分)、酸による吸着していない抗体の除去、平衡化を行った。

#### Step4. 抗体のブロッキング

**Protein A** の吸着残存部位をブロッキングする為、ブロッキングバッファーを通過させ、インキュベーション(30 分)、最後に平衡化溶液を用いて洗浄を行いカラムの作製を完了した。上記工程をすべて自動処理機によって実施した。**BSA** の回収は、通常の抗体精製と同じ溶液組成メソッドで実施した。

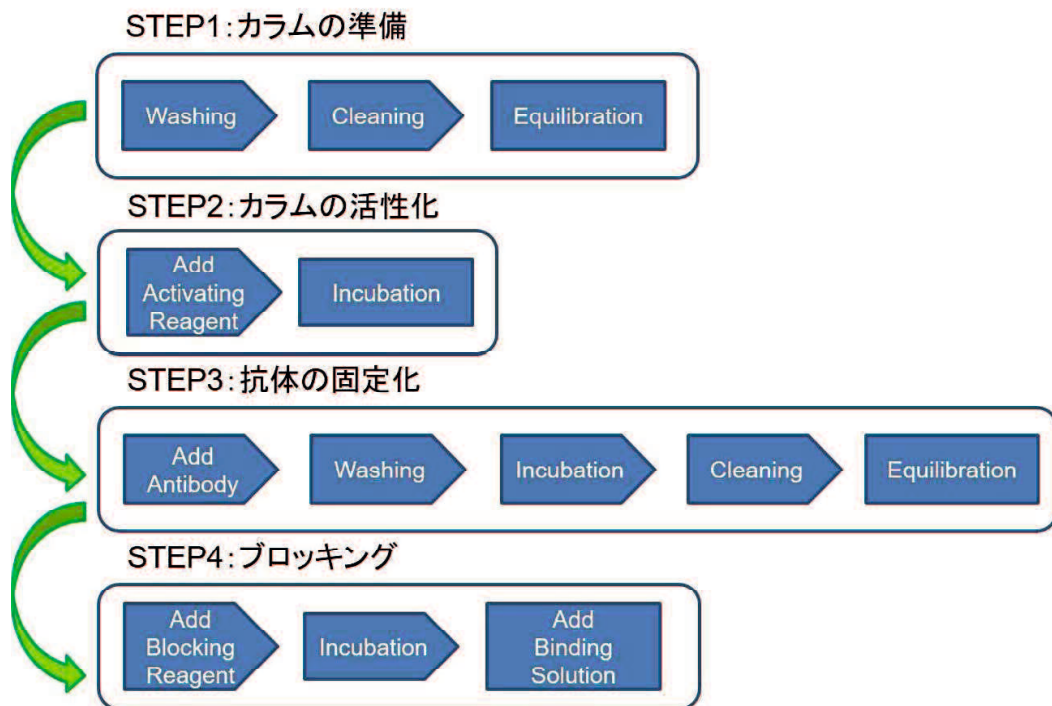


Figure 5-17 Immobilization of the anti-BSA to the Protein A immobilized monolithic silica plate.

### 5-3-3 自動分抽装置による anti-BSA 固定化プレートによる BSA の回収

結果を Figure 5-18 に示す。プレートの 1 列 8 サンプルに対して抗体を固定化していないウェル、隣の列 8 ウェルに対して Anti-BSA を 75 ug 固定化した。それぞれの列に BSA を 30 ug ずつアプライし、そのアプライ液と、溶出後の回収液を確認した。プレートリーダーに回収した抗体溶液の吸光度の値と、電気泳動の結果を示す。

左の図は、BSA 溶液アプライ後の結果を示す。抗体を固定化していないウェルにおいて、高い吸光度を示し、電気泳動の結果からも、BSA がシリカモリスに結合せずに素通りしていることが分かる。一方で、抗体を固定化しているウェルでは吸光度は確認されず、電気泳動の像にも BSA は確認されなかった。

溶出画分を確認したところ、抗体を固定化していないウェルにおいては、BSA が確認されず、固定化したウェルにおいて BSA が確認された。抗体を固定していないウェルにアプライしたスルーの BSA の量と、抗体を固定したウェルからの回収した BSA の量がほぼ同量の値を示していたことから、吸着した BSA はほぼ全量が回収されていることが示唆された。

抗体を固定したウェルにおける溶出液には、Protein A 及び固定した抗体に由来する電気泳動のバンドは確認されなかったことから、抗体、Protein A はシリカモリスに結合したまま、BSA のみが回収されていることが示された。

本固定法を用いることにより、テーラーメイドアフィニティカラムを自動で作製、免疫沈降試験も自動で行うことが可能であることが示された。

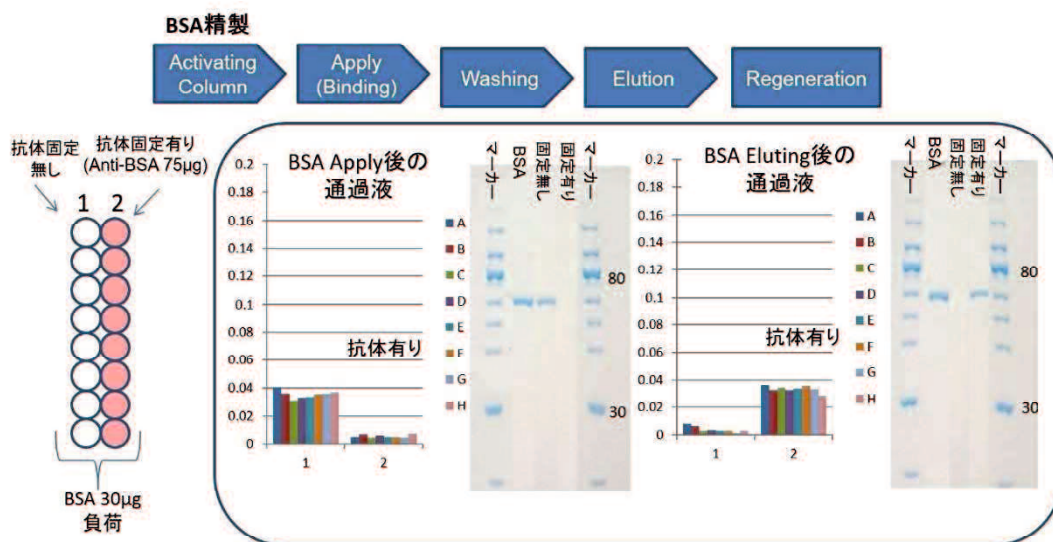


Figure 5-18 BSA recovery using the anti-BSA immobilized monolithic silica plate.



#### 5-3-4 結言

シリカモノリス固定化 96 ウェルプレート及び自動分抽装置を用いたシステムにより、抗体の固定化、固定化した抗体プレートによる抗原の回収を自動で行うことが可能になった。カラム容量が微量のアフィニティデバイスと再現良く回収することができ、多検体処理にも適していることから、今後の応用が期待される。

## 引用文献

- [1] B. Wang, T. Albanetti, G. M. Quesada, L. Flack, L. Li, J. Klover, K. Burson, K. Evans, W. Ivory, M. Bowen, R. Schoner, P. H. Nelson, *Biotechnol. Prog.* **2018**, 36, 1460
- [2] J. Dong, N. Migliore, S. J. Mehrman, J. Cunningham, M. J. Lewis, P. Hu, *Anal. Chem.* **2016**, 88, 8673
- [3] G. C. Barnard, M. D. Hougland, Y. Rajendra, *Biotechnol. Prog.*, 2015, 31, 239  
B. D. Kelley, M. Switzer, P. Bastek, J. F. Kramarczyk, K. Molnar, T. Yu, J. Coffman, *Biotech. Bioeng.* **2008**, 100, 950
- [4] S. A. Sundberg, *Current Opinion in Biotechnology*, **2000**, 11, 47
- [5] S. M. Browne, M. A. Rubeai, *Trends in Biotech.*, **2007**, 25, 425
- [6] V. B. Brochier, V. Ravault, *Engineering in Life Sci.*, **2016**, 16, 152
- [7] S. Shi, R. G.G. Condon, L. Deng, J. Saunders, F. Hung, Y. S. Tsao, Z. Liu, *J. Vis. Exp.* **2011**, 55, 3010
- [8] P. Leonard, P. Säfsten, S. Hearty, B. McDonnell, W. Finlay, R. O'Kennedy, *J. Immunolog. Methods*, **2007**, 323, 172
- [9] M. J. Yoo, D. S. Hage, *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32, 2776

## 総括

本研究は、クロマトグラフィーを用いた分析における試料前処理において、近年需要が高まっている微量、微小容量、多検体に対して適応可能なツール、デバイスの開発を目的としたものである。試料としては、上記において特に要望の多い生体試料を中心に、前処理に用いる担体としては、成形性のゲルである、シリカモノリスゲルを採用した。一般的に用いられる疎水性相互作用により対象成分を保持するオクタデシル基もしくはスチレン系のポリマー以外に、イオン交換や、アフィニティクロマトグラフィーといった様々な分離手法に適応可能な修飾法についても検討を行った。

第1章では、クロマトグラフィー前処理についての現状をまとめ、本論文の目的と、構成について示した。

第2章では、前処理用スピнкаラムを作製するため、イオン交換修飾モノリスゲルを調製し、通液時の遠心力、溶出量の最適化を行った。逆相クロマトグラフィーによる分析と組み合わせることにより、血清中の薬物において、高い選択性を有する分析系を確立することが可能であった。また、スルーポア、メソポアの大きさを変更したシリカモノリスを作製することで、全血サンプルの前処理においても、サンプル通過における目詰まりを生じさせることなく、安定した処理を行うことが可能であった。

第3章では、更に微量サンプルを処理するための前処理デバイスとして、ピペットチップへのシリカモノリスの固定化を行い、更にトリプシンの固定化や親水性修飾基の導入を試みた。作製したチップにより、タンパク質のトリプシン消化、糖鎖、ペプチドの回収手法を検討した。充填剤であるシリカモノリスの容積としては2  $\mu$ Lのゲルを調製し、フリット等を用いることなくピペットチップ先端にモノリスディスクを固定化した。サンプルの吸引吐出により、モノリスゲルの活性化、リガンドの固定化を行うことが可能であり、微量サンプルを処理するための前処理チップの作製が可能であった。今後本チップを用いたプロテオーム解析の前処理に広く適応可能であることが示唆された。

第4章では、シリカモノリスをアフィニティクロマトグラフィーへ適応させるため、担体への非特異吸着を軽減する目的で、親水性ポリマーをコーティングした。また、シリカモノリスのスルーポアやメソポアの大きさを変化させることにより、リガンドの固定化量を検証した。抗体を精製する目的でProtein Aを固定化した場合においては、母体への抗体の非特異吸着並びに、試料マトリクス中のタンパク質の非特異吸着が軽減された結果、高い純度の抗体を得ることが可能であった。トリプシンを固定化したリアクターカラムにおいては、消化対象タンパク質の吸着、消化後のペプチドの吸着が軽減された結果、回収されるペプチドの量を増加させることが可能であった。低分子であるカテコールアミンを回収する目的では、生体試料中のタンパク質に対しての吸着を軽減させた結果、

最終溶出液へのタンパク質の混入を防ぎ、分析カラムの保護、夾雑ピークを減少させることが可能であった。本修飾方法では、シリカモノリス表面を親水性ポリマーで覆うだけではなく、上記リガンドを導入するための活性基を導入することも可能である。そのため、様々なリガンドの固定化に適応することが可能であり、今後、微量サンプルに適したアフィニティクロマトグラフィー担体の開発に適応可能であると考えられる。

第5章では、開発したシリカモノリスゲルを96ウェルプレートへ導入する手法を検討し、自動分注装置による多検体迅速処理システムの構築、実証試験を行った。既存のシステムでは処理に60分要する作業を、15分以内に完了することが可能であった。

本研究で得た知見を活用することにより、クロマトグラフィーの前処理の応用の幅が広がり、微量、微小容量、迅速、多検体処理の前処理を行うための有用なツールの開発につながることを期待される。

## 略語表

AIBN: アゾビスイソブチロニトリル(azobisisobutyronitrile)

APTES: アミノプロピルトリエトキシシラン (aminopropyltriethoxysilane)

BA: N- $\alpha$ -ベンゾイルアルギニン (N $\alpha$ -benzoyl- L -arginine)

BAEE: N- $\alpha$ -ベンゾイルアルギニンエチルエステル (N $\alpha$ -benzoyl- L -arginine ethyl ester)

BSA: 牛血清アルブミン (bovine serum albumin)

CHO: チャイニーズハムスター卵巣 (chinese hamster ovary)

ConA: コンカナバリン A (concanavalin A)

CV: 変動係数 (coefficient of variation)

DMF: ジメチルホルムアミド (dimethyl formamide)

DNA: デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid)

DSC: 炭酸ジスクシミジル (disuccinimidyl carbonate)

DSS: ジスクシミジルスベレート (disuccinimidyl suberate)

DMSO: ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)

DHBA: 3,4-ジヒドロキシベンジルアミン (3,4-dihydroxybenzylamine)

ECD: 電気化学検出器 (electrochemical detection)

ESI: エレクトロスプレーイオン化 (electro-spray ionization)

FL: 蛍光検出器 (fluorescence detector)

GMA: グリシジルメタクリレート (glycidyl methacrylate)

HEMA: メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (2-hydroxyethyl methacrylate)

HEA: ヒドロキシエチルアクリレート (2-hydroxyethyl acrylate)

HILIC: 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (hydrophilic interaction liquid chromatography)

HPLC: 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)

IgG: イムノグロブリン G (immunoglobulin G)

I.D.: 内径 (inner diameter)

LOD: 検出限界 (limit of detection)

MPS: 3-メタクリロキシロピルトリメトキシシラン (3-methacryloylpropyltriethoxysilane)

MS: 質量分析計 (mass spectrometry)

NHS: N-ヒドロキシスクシンイミド (N-hydroxy succinimide)

ODS: オクタデシルシリル (octadecyl silyl)

PA: ピリジルアミノ (pyridyl amino)

PBA: フェニルホウ酸 (phenyl boronic acid)

PEO: ポリエチレンオキシド (polyethylene oxide)

PNGaseF: ペプチド N グリカナーゼ F (peptide-N-glycosidase F)

PP: ポリプロピレン (polypropylene)

RSD: 相対標準偏差 (relative standard deviation)

SAX: 強アニオン交換クロマトグラフィー (strong anion exchange chromatography)

SCX: 強カチオン交換クロマトグラフィー (strong cation exchange chromatography)

SDB: スチレンジビニルベンゼン (styrene divinyl benzene)

SDS: ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)

SEC: サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography)

SOS: オクタンスルホン酸ナトリウム (sodium octane sulfonate)

SPE: 固相抽出 (solid phase extraction)

SPR: 表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance)

S/N: シグナル-ノイズ比 (signal to noise ratio)

TEOS: テトラエトキシシラン (tetraethoxysilane)

TFA:トリフルオロ酢酸(trifluoro acetic acid)

TG:熱重量分析(thermogravimetric analysis)

THF:テトラヒドロフラン(tetrahydrofuran)

TPCK: N-トシル-L-フェニルアラニンクロメチルケトン(N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)

UV:紫外分光光度計(ultraviolet spectrophotometer)

2D-LC:二次元液体クロマトグラフィー(two-dimensional liquid chromatography)

96WP:96 ウェルプレート(96 well plate)

## 論文目録

- (1) 著者氏名: Shigenori Ota, Shota Miyazaki, Hideo Matsuoka Kei Morisato, Yukihiro Shintani, Kazuki Nakanishi  
論文題目: High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula  
学術雑誌名: Journal of Biochemical and Biophysical Methods  
巻、号、頁: Volume 70, Issue 1, Page 57-62  
発行年月: 2007 年  
(本文との関連: 主に本論文の第 3 章と関連)
- (2) 著者氏名: 宮崎 将太, 山田 智子, 太田 茂徳, 斉藤 剛, 奈女良 昭, 大平 真義  
論文題目: イオン交換型シリカモノリススピンカラムを用いる生体試料中イオン性化合物測定のための迅速前処理法  
学術雑誌名 BUNSEKI KAGAKU  
巻、号、頁: Volume 59, 3, Pages 213-218  
発行年月: 2010 年  
(本文との関連: 主に本論文の第 2 章と関連)
- (3) 著者氏名: Akira Namera, Takashi Saito, Shigenori Ota, Shota Miyazaki, Hiroshi Oikawa, Kazuhiro Murata, Masataka Nagao  
論文題目: Optimization and application of octadecyl-modified monolithic silica for solid-phase extraction of drugs in whole blood samples.  
学術雑誌 Journal of Chromatography A  
巻、号、頁: Volume 1517, 29, Pages 9-17  
発行年月: September 2017 年  
(本文との関連: 主に本論文の第 2 章と関連)
- (4) 著者氏名: Shigenori OTA, Yuko YUI, Tsutomu SATO, Noriko YOSHIMOTO, Shuichi YAMAMOTO  
論文題目: Rapid purification of immunoglobulin G using a Protein A immobilized monolithic spin column with hydrophilic polymers  
学術雑誌名: Analytical Sciences  
巻、号、頁: Accepted  
(本文との関連: 主に本論文の第 4 章と関連)



## 謝辞

本研究にあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました山口大学大学院創成科学研究科准教授、吉本則子先生に深く感謝申し上げます。また、本研究山口大学大学院創成科学研究科、山本修一先生に心より感謝申し上げます。次世代バイオ医薬品製造技術研究組合では第3分科会にも参加させていただいた中で、社会人としての人との接し方、関係構築など、実験以外についても様々な視点でのアドバイスをいただき、本当に感謝しております。

また、本研究において、生体試料の取り扱い、シリカモノリスの合成に関して、ご指導いただきました広島大学大学院医系科学研究科教授 奈女良昭先生、東海大学医学部付属病院救命救急センター教授 斎藤剛先生、名古屋大学大学院工学研究科 応用物質化学専攻教授 中西和樹先生に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与えていただいたジーエルサイエンス株式会社 長見善博社長、生産本部長 梁正一常務取締役、営業本部長 黒川利夫取締役、大阪支店支店長 牧重明様、営業企画部部長 大窪泰二様、営業企画部フィールドマーケティング課課長 古庄義明様、テクニカルマーケティング課課長 佐藤勉様、総合技術本部長 田村隆夫取締役、第一開発部部長 佐藤睦様、武蔵開発課課長 松岡秀雄様、福島開発課課長 宮崎将太様、カスタマーサポートセンター クロマト2課 由井夕湖様には、多大なるご支援を頂戴しました。大変感謝しております。

また、本研究を進めるにあたり、ご協力いただいたテカンジャパン株式会社 下谷真仁様、ハミルトンジャパン株式会社の皆様に感謝申し上げます。シリカモノリスの作製についてご協力いただきました京都モノテック株式会社に心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、協力、応援してくれた両親、家族に深く感謝します。

2021年3月

太田 茂徳