

【公開版】

平成 28 年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「メタボローム分析の高精度・ハイスループット化に資する
試料自動前処理・注入技術及び装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成 29 年 5 月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 公益財団法人わかやま産業振興財団

目 次

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景

(2) 研究目的及び目標と実施結果

1-2 研究体制

1-3 成果概要

(1) メタボローム分析のための自動前処理技術の開発

(2) 誘導体化溶出-全量注入一体化技術（自動誘導体化注入部）の開発

(3) ハンドリング技術の開発の開発

1-4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

(1) メタボローム分析のための自動前処理技術の開発

(2) 誘導体化溶出-全量注入一体化技術（自動誘導体化注入部）の開発

(3) ハンドリング技術の開発

第3章 全体総括

3-1 複数年の研究開発成果

3-2 研究開発後の課題

3-3 事業化展開

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景

超高齢化社会の到来を迎え、厚生労働省は高齢者の生活の質を維持する施策として「健康社会」の啓発活動を推進しており、そのための予防医学の確立や疾病の治療（創薬の進化）に力を入れ始めている。

これらの促進に欠かせない条件として、1. 病気のサインである特殊な代謝物の測定 2. 健康食品中の機能成分の作用機作を探るための代謝物の測定 3. 治療薬の効果を探るための代謝物の測定 等の代謝物を測定し分析する技術（メタボローム分析）が最近注目されており、がんや糖尿病、うつ病の発見の分野で大いなる進化を遂げている。

このメタボローム分析においては、分析手段も非常に煩雑で時間の要する「前処理」をこなす必要があり、すべて手作業でこれらの前処理を行うため再現性が低い、測定者の個人差が出やすいという欠点を有している。そこで、本研究では株式会社アイスティサイエンスの特許技術と国立大学法人大阪大学のメタボローム解析技術と和歌山県工業技術センターの検体物質の誘導体化技術を融合することにより、上記の欠点を克服する「メタボローム分析の高精度・ハイスループット化に資する試料自動前処理・注入技術および装置の開発」を行う。

(2) 研究目的及び目標と実施結果

【1】メタボローム分析のための自動前処理技術の開発

高度化目標 固相カートリッジの充填剤の効率的な吸着・保持・誘導体化を行い、高効率溶出技術、小型固相カートリッジの開発を行う。

目標値 前処理時間 10分以下 *達成

誘導体化(トリメチルシリル化)率が80%以上 *達成

対象化合物の添加回収試験での回収率が80%以上 *達成

再現性 RSD 5%以下 *達成

(1-1) 固相カートリッジへの充填剤の吸着・保持力の高効率化

高度化目標 モデル化合物を用いて2分以下で高効率に充填剤に吸着・保持する。

目標値 モデル化合物(アミノ酸/脂肪酸/糖類)での添加回収試験での回収率が90%以上 *達成

(1-2) 誘導体化溶出技術の開発

高度化目標 高効率で高再現性な誘導体化と溶出を図る。

目標値 誘導体化(トリメチルシリル化)率が80%以上 *達成
再現性(誘導体化率)RSD 5%以下 *達成

(1-3) 固相カートリッジ(形状)の開発

高度化目標 小型でデッドボリユームの少ない形状

目標値 カートリッジ容量 30 μ L 以下 *達成
デッドボリユーム 2 μ L 以下 *達成

(1-4) 固相カートリッジへの充填方法の開発

高度化目標 ϕ 2mm穴に高精度に充填する。

目標値 充填量 設定充填量 $\pm$ 10% *達成
生産性 200個/Hr 以上 *達成

【2】 誘導体化溶出-全量注入一体化技術(自動誘導体化注入部)の開発

高度化目標 少量の溶出量より濃縮量を一定化し、再現性に優れた高効率・高回収率システム

目標値 対象化合物の添加回収試験での回収率が80%以上 *達成
再現性 RSD 5%以下 *一部の成分を除き達成

(2-1) 自動全量注入時の誘導体化溶出最適条件の確立

高度化目標 誘導体化溶出を少量の溶出量(50 μ L)で高効率で高再現に行う。

目標値 対象化合物の添加回収試験での回収率が80%以上 *達成

(2-2) 自動誘導体化溶出注入対応のGC 注入ロシステムの開発

高度化目標 GC-MS への注入容器内の溶出液の濃縮量を一定化(2 μ L) *未達

目標値 2 μ L $\pm$ 10% *未達

【3】 ハンドリング技術の開発

(3-1) 固相カートリッジのハンドリング

高度化目標 固相カートリッジとクランプの高精度搬送と接続

目標値 流す液体の圧力(5MPa)下 液体が漏れないこと *達成
搬送時の位置精度 $\pm$ 0.25mm以下 *達成

(3-2) 洗浄技術

高度化目標 少ない溶媒量で残存試料が洗浄できる。

目標値 高濃度の対象化合物の添加回収試験後の溶媒試料の測定において検出されないこと *達成

(3-3) 自動前処理-誘導体化溶出注入装置による血清中のメタボローム分析精度の評価

高度化目標 高精度・高再現性・高スループット

目標値 既存メタボローム分析と添加回収率と再現性が同等以上 *達成

前処理時間が10分以内 *達成

1-2 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

事業管理機関

●公益財団法人わかやま産業振興財団

所在地：〒640-8033 和歌山県和歌山市本町二丁目1番地

代表者役職・氏名：理事長 島 正博

総括研究代表者（PL）

氏名：佐々野 僚一

所属組織名：株式会社アイスティサイエンス

所属役職：代表取締役

副総括研究代表者（SL）

氏名：福崎 英一郎

所属組織名：国立大学法人大阪大学

所属役職：工学研究科 教授

研究等実施機関

●株式会社アイスティサイエンス

所在地：〒640-8341 和歌山県和歌山市黒田 120-6

代表者役職・氏名：代表取締役 佐々野僚一

●国立大学法人大阪大学

所在地：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1

代表者役職・氏名：学長 平野 俊夫

●和歌山県工業技術センター

所在地：〒649-6261 和歌山県和歌山市小倉 60 番地

所長 和坂 貞雄

アドバイザー

●国立大学法人九州大学 生体防御医学研究所

所在地：〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

担当者役職・氏名：教授 馬場 健史

*メタボローム分析における開発助言、ニーズ提供等

●国立大学法人神戸大学大学院 医学研究科

所在地：〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1

担当者役職・氏名：准教授 吉田 優

*メタボローム分析における開発助言、ニーズ提供等

●一般社団法人食の安全分析センター

所在地：〒880-0212 宮崎県宮崎市佐土原町下那珂 5805

担当者役職・氏名：センター長 安藤 孝

*メタボローム分析における開発助言、新たな使用法（発酵・”食べごろ”分析）に対するニーズの提供等

1-3 成果概要

（1）メタボローム分析のための自動前処理技術の開発

[1-1] 固相カートリッジへの充填剤の吸着・保持力の高効率化においては、まずは既存の固相カートリッジ（充填量 30mg）を用いて、目標であるモデル化合物（アミノ酸、有機酸、糖質）での添加回収試験での回収率が 90%以上の数値目標を達成した。また、2 分以下でモデル化合物を吸着・保持することを確認した。次にオンラインを想定した極微量の固相カートリッジ（充填量 3mg：研究テーマ【1-3】）を用いて、その充填量におけるアミノ酸、有機酸、糖の吸着・保持力の効率化を固相に負荷する時の抽出液の組成を変動させて検討した。その結果、各々で良

【公開版】

好な結果が得られた。また、その結果を基にアミノ酸、有機酸、糖類の一斉分析かつ固相カートリッジの1ユニット化を目的とした、オンライン化の前処理法を開発した。

- [1-2] 誘導体化溶出技術の開発においては、固相上での誘導体化(TMS 化)反応を可能とする新しい反応システムを構築することができた。その結果、目標である誘導体化率が80%以上、再現性RSD5%以下に対し、ほとんどの物質に対し目標値を達成できた。

また、糖類(12種)におけるメトキシ化→TMS 化の2段階誘導体化反応に対する誘導体化率を評価した。その結果、目標である誘導体化率が80%以上、再現性RSD5%以下に対し目標値を達成できた。

実施したテーマ1(サブテーマ[1-1]、[1-2])の成果により、各種血清モデル化合物に対して「吸着・保持」、「誘導体化」を固相上で行うことが可能であることが実証された。これらの知見は、本事業の目的である「メタボローム分析のための自動前処理装置」において全行程をオンライン化することに必要不可欠な基盤技術を確立することができた。

- [1-3] 固相カートリッジ(形状)の開発においては、様々な条件のもとにシミュレーションや構造の改良点を吟味しながら、金型による固相カートリッジの製作を行った。その結果、カートリッジ容量20 μ L、デッドボリューム2 μ Lと事業目標値を達成するカートリッジを作成することができた。

- [1-4] 固相カートリッジへの充填方法の開発においては、常に一定量の充填剤しか充填できない工夫を施した治具を作成し、「誰が充填しても同じ工法かつ同時に複数個(48個)の充填」が可能となり、充填精度が飛躍的に向上した。また、フリットを球にしたことで装着が容易となり、フリットを押し込むための挿入棒を製作し、同じ位置で固定できるようにした。その結果、 $\pm 10\%$ 以内の精度で200個/時間を達成できた。

(2) 誘導体化溶出—全量注入—一体化技術(自動誘導体化注入部)の開発

- [2-1] 自動全量注入時の誘導体化溶出最適条件の確立においては、まず検証するための自動前処理装置の注入部(SPE—GC システム)を開発し、試作1号機を製作した。

【公開版】

その試作1号機を用いて、開発中の試作機を用いた血清モデル化合物に対する測定（オンラインでの誘導体化）の有効性を検証するために、テーマ1にて種々の検討を行った手作業での固相誘導体化法でのデータとの比較検討を行った。その結果、試作機による測定データは手作業での結果とほぼ同等のピーク面積を示した（手作業での固相誘導体化法に対して概ね80%以上）。

- [2-2] [2-1]での溶出条件における測定の再現性を向上させる目的で、新たに開発したプレフラッシュシステムを試作機に導入した。この改良を施した試作機を用い血清モデル化合物（アミノ酸混合溶液）に対する測定を繰り返し行ったところ、高い再現性（概ねRSD5%以下）が確認された。

（3）ハンドリング技術の開発

- [3-1] 固相カートリッジの挟み込み部・ニードル部の構造、形状・材質の検討および固相カートリッジのクランプ方法と移送技術の開発を実施するために、①移送精度の向上、②ノズルの着脱の安定性、③固相カートリッジの差し込み深さの安定性についての検討を行った。その結果、搬送時の位置精度±0.1mm以下を達成し、送液時の圧力5MPaにおいて液漏れは確認されなかった。

- [3-2] サンプル採取部に使い捨て型のチップ方式を採用することで、サンプルが触れる部分は全て使い捨てとなるため、測定成分が残存する可能性を排除することができた。

また、テーマ1（[1-3]、[1-4]）、テーマ2（[2-1]、[2-2]）、テーマ3（[3-1]、[3-2]）の成果により、実試料での検証に必要な動作や前処理機能を備えた試作2号機を完成することができた。

- [3-3] 試作2号機を用いて、その機械およびソフト面での機能を検証した。機械やソフトにおいて思わぬ不具合などがいくつも発生したが、その都度、改良を行い、対応した。この対応に長時間を要したが、その結果、安定した装置に仕上がった。そして、試作3号機を完成させた。この試作3号機を用いて、血清試料によるアミノ酸と有機酸の添加回収試験（一定量予め添加しておき、その収集率を確認する作業）、精度（再現性、感度）の評価、従来法との精度に対する比較評価を行った。その結果、アミノ酸および有機酸においては回収率、再現性とも既存メタボローム

【公開版】

分析と同等以上の結果を得ることができた。前処理時間も 10 分以内で、抽出したサンプルを本システムにセットするだけで高スループットで分析できた。

よって、今回実施したテーマ3(サブテーマ[3-3])の成果により、実試料（ヒト血清）中のアミノ酸・有機酸を固相上で「吸着・保持」、「誘導体化」する工程を自動前処理装置を用いてオンラインで行うことが可能であることが実証された。

これら事業成果により、GC-MS 測定によるメタボローム分析に必要な前処理工程を完全自動化/オンライン化が可能な自動前処理装置の開発に成功した。

尚、糖については、本オンラインシステムの条件の確立および血清による評価が期間中に間に合わなかった。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社アイスティサイエンス

①所在地：〒640-8341 和歌山県和歌山市黒田 120-6

②連絡先担当者氏名：代表取締役 佐々野 僚一

③電話番号：073-475-0033

④FAX番号：073-497-5011

⑤E-mail アドレス：sasano@aisti.co.jp

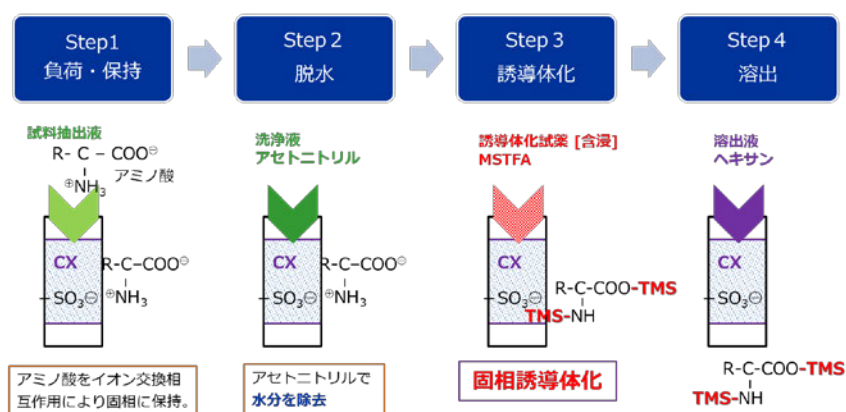
第2章 本論

(1) メタボローム分析のための自動前処理技術の開発

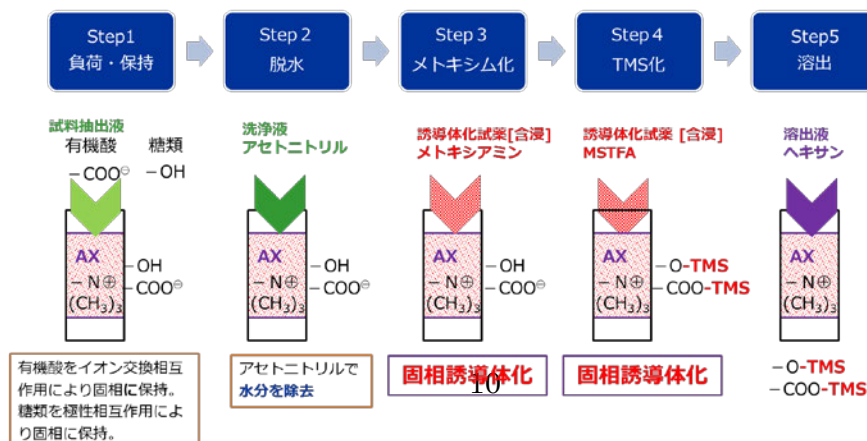
メタボローム分析の対象物質となる代謝物等は一般的に極性基（水酸基、アミノ基、カルボキシル基）を多く持ち揮発性が乏しいため、GC-MS により測定することが難しい。そのため、それら極性基をキャップし揮発性を高めるために、誘導体化と呼ばれる処理を行わなければならない。従来のメタボローム分析では、この誘導体化の脱水処理や誘導体化反応に長時間を要するとともに自動化が難しい手法が用いられてきた。そこで本事業では固相抽出技術を用いることで脱水処理を短時間でいき、固相上で効率的に誘導体化する方法を研究課題とした。

イオン交換樹脂の固相カートリッジに抽出した試料を負荷しアミノ酸および有機酸・糖類を固相に保持させ、アセトニトリルで洗浄することで固相に残存している水を除去した。その後、誘導体化試薬を固相カートリッジに直接添加し、固相に誘導体化試薬を浸漬させて、固相上で誘導体化反応させ、アミノ酸および有機酸・糖類を誘導体化した固相誘導体化法を開発した。

■ アミノ酸



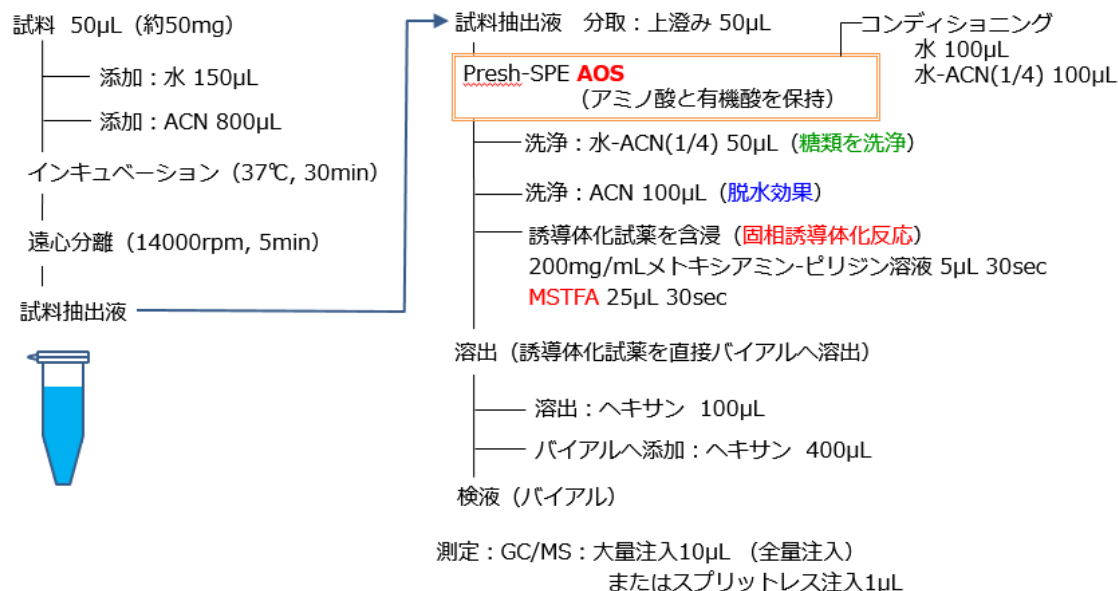
■ 有機酸・糖類



【公開版】

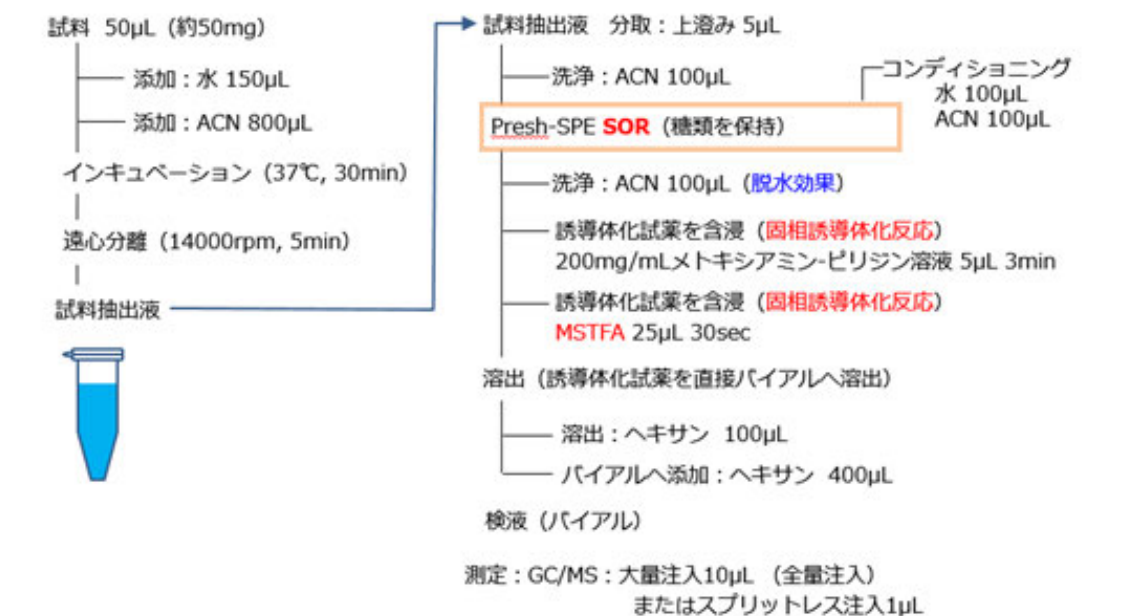
このように固相抽出技術を用いることで、脱水や誘導体化が効率よく迅速に行われ、オンライン化を含む自動化も期待できる。

■ アミノ酸・有機酸の手作業による固相誘導体化の前処理フロー



*AOSはCXとAXの混合

■ 糖類の手作業による固相誘導体化の前処理フロー



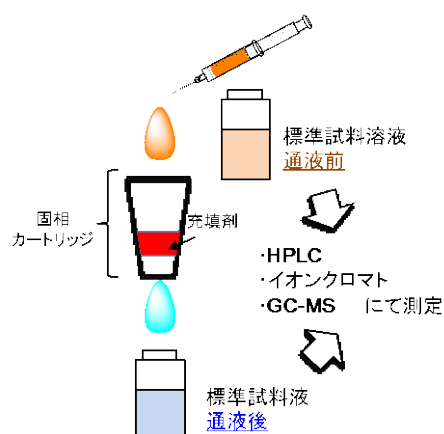
(1- 1) 固相カートリッジへの充填剤の吸着・

保持力の高効率化

i) 補助事業の具体的内容

メタボローム分析において対象となる物質（代謝物）は多岐にわたる。そのため、多種多様な物質を如何に効率的に再現性良く固相カートリッジに吸着保持させるかが技術的な課題となる。

サブテーマ（1-1）では、血清モデル化合物（アミノ酸、有機酸、糖類）の標準試料溶液を固相カートリッジに通液し、その溶出前後の各物質を HPLC、イオンクロマト、GC-MS 等の分析機器を用いて測定することで、吸着・保持力の評価を行った。

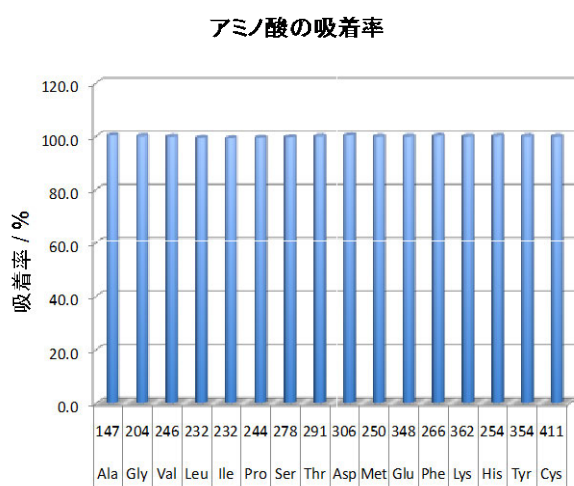


ii) 重点的に実施した事項

血清モデル化合物の固相カートリッジへの吸着・保持力を評価するために、各モデル化合物の固相カートリッジへの吸着率(%)を算出した。アミノ酸、有機酸、糖類の標準溶液を固相カートリッジへ通液し、通液前・後の溶液を各種分析装置にて測定することで、固相カートリッジを通過することで充填剤に吸着された物質の割合を算出した。

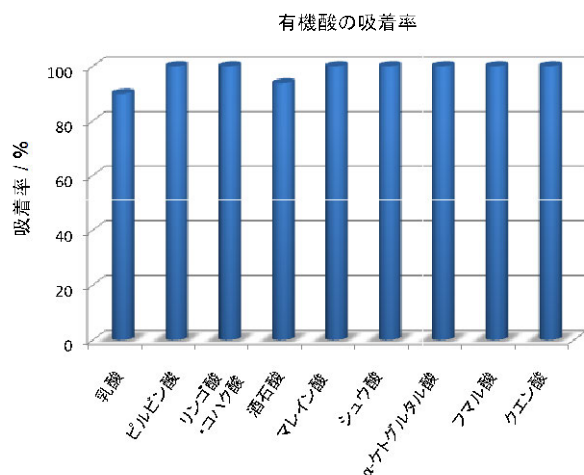
- ・アミノ酸：誘導体化GC-MS
- ・有機酸：イオンクロマト
- ・糖類：誘導体化HPLC

$$\text{吸着率(\%)} = \frac{\text{通液前のピーク面積} - \text{通液後のピーク面積}}{\text{通液前のピーク面積}} \times 100$$



A アミノ酸：固相カートリッジに通液を行う前・後のアミノ酸溶液の GC-MS 測定の結果、通液前の溶液に見られた各種アミノ酸のピークが、通液後の溶液ではほとんど認められなかった。固相カートリッジへの通液前・後の各アミノ酸に由来するピーク面積値の減少率から算出された吸着率もほぼ 100%となった。

【公開版】



B 有機酸：固相カートリッジに通液を行う前・後の有機酸溶液のイオンクロマト測定の結果、通液前の溶液では確認された各種有機酸のピークが、通液後の溶液ではほとんど認められなかった。固相カートリッジへの通液前・後の各有機酸に由来するピーク面積値の減少率から算出された吸着率もほぼ 100%となった。



C 糖類：固相カートリッジに通液を行う前・後の糖質溶液の HPLC-UV 測定の結果、2%含水アセトニトリルでの固相負荷の場合、ラムノース、アラビノース、フコースの糖質を除いて、通液前の溶液では確認された各種糖質のピークが、通液後の溶液ではほとんど認められなかった。ラム

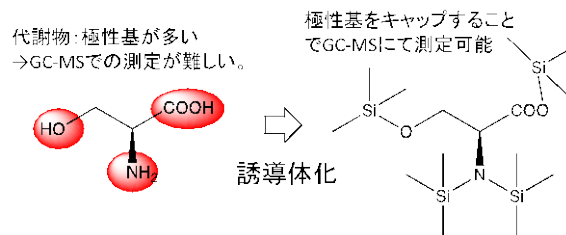
ノース、アラビノース、フコースについては、含水率を 1%まで下げた結果、吸着率の向上が認められ、良好な結果を得ることができた。得られた各種糖質に由来するピーク面積値から、糖質の固相への吸着率を算出した。その結果、ほとんどの糖質において 90%以上の吸着率が認められた。

以上の結果から、本研究にて最適化された処理方法は、固相カートリッジに高効率で吸着・保持させることが可能であることが確認された。事業目標に上げている 90%以上の数値目標を達成した。

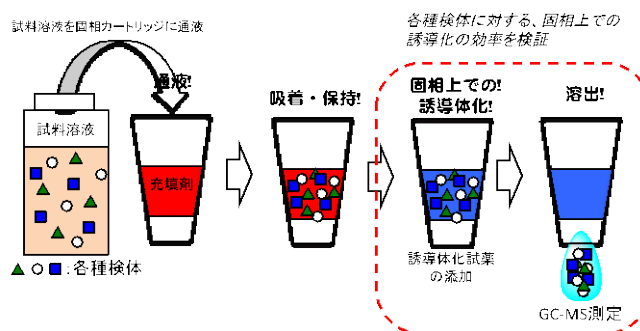
(1-2) 誘導体化溶出技術の開発

i) 補助事業の具体的内容

サブテーマ(1-2)では、自動処理を行うオンラインの系内で如何に効果的に誘導体化処理(反応)を行うかを検討した。その中で、血清モデル化合物(アミノ酸、有機酸、糖類)の標準試料溶液を固相カートリッジに通液・保持させた状態で誘導体化試薬を少量加える(充填剤を湿らせる程度)ことで、固相カートリッジ上にて誘導体化反応を行うことに成功した。そのため、従来法と固相抽出法における誘導体化のデータを比較するために、メタボローム分析の対象物質となる代謝物

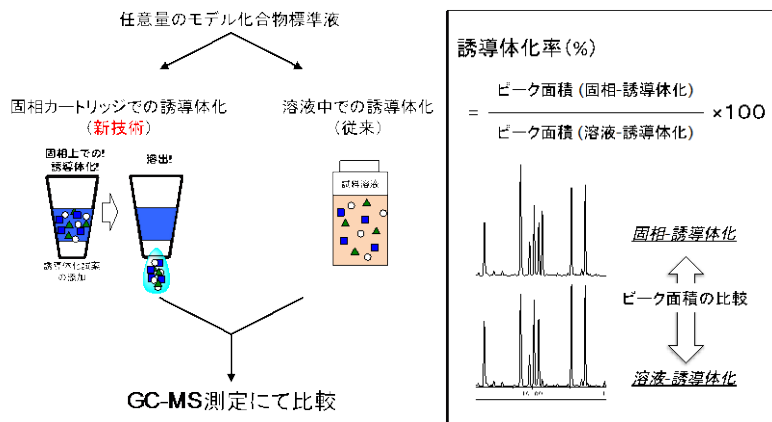


(アミノ酸、糖類)をヒト血清モデル化合物として選定し、これらを従来法および固相抽出法にて処理し誘導体化したものを GC-MS で測定し、従来法と固相抽出法の誘導体化効率の比較を行い、誘導体化率を算出した。

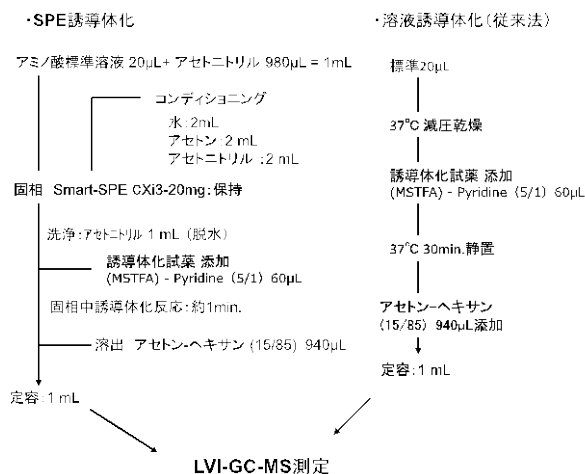


ii) 重点的に実施した事項

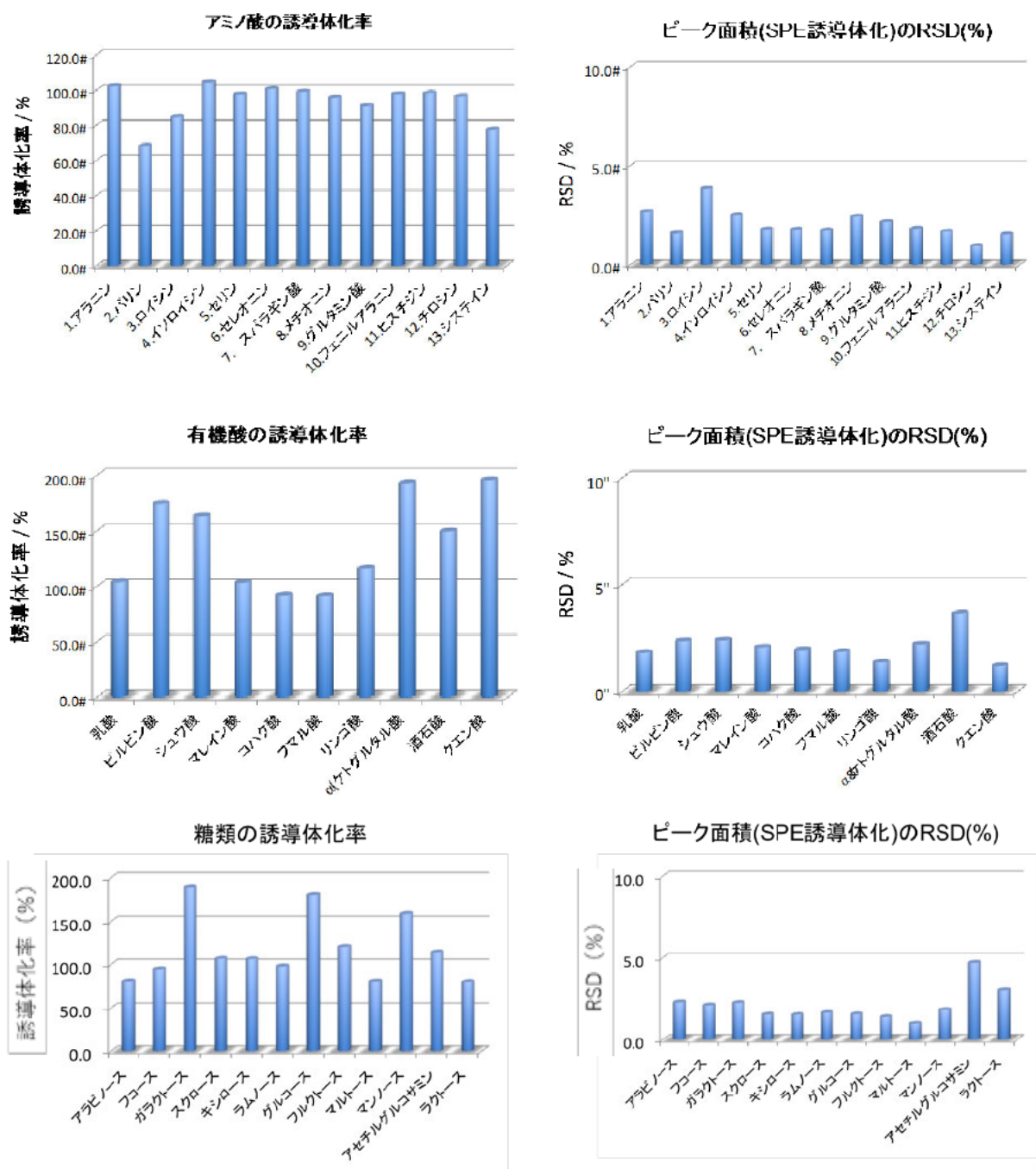
血清モデル化合物の固相カートリッジ上での誘導体化率を評価するために、各モデル化合物の誘導体化率を算出した。アミノ酸、有機酸、糖類の標準溶液を固相カートリッジへ通液・保持し、誘導体化反応を行い



リッジへ通液・保持し、誘導体化反応を行い溶出させ、GC-MS 測定を行った。また、同条件のサンプルを従来のメタボローム分析にて用いられていた誘導体化反応(溶液中でのバッチ反応)を行い、比較データとした。誘導体化率の算出については、従来の溶液反応での誘導体化後の測定データで得られた各化



化合物のピーク面積に対する、固相上での誘導体化後のピーク面積の割合として算出した。



これらの結果から、本研究にて開発された固相上にて誘導体化反応を行う固相誘導体化法は、各種アミノ酸、有機酸、糖類に対して高効率で誘導体化・溶出を行い、高い再現性にて測定可能であることが確認された。事業目標に上げている誘導体化率 80%以上、再現性 RSD(%)5%以下の数値目標を達成した。

（1- 3）固相カートリッジ（形状）の開発

i) 補助事業の具体的内容

小型でデッドボリュームの少ない形状を目的として、様々な条件のもとにシミュレーションし、3次元プリンターを用いて誘導体化して直接GCへ注入ができる固相カートリッジを製作した。固相カートリッジに配管やニードルを接続させやすくするために接続部分にペーパーを設け、直接プレスフィットできる形状にした。また、その配管やニードルが固相カートリッジのプレスフィット部分まで導入しやすくするために、固相カートリッジの上下に導入口を設けた。固相の充填剤をとどめ置くためのフリットは球状の焼結フィルターを用いた。

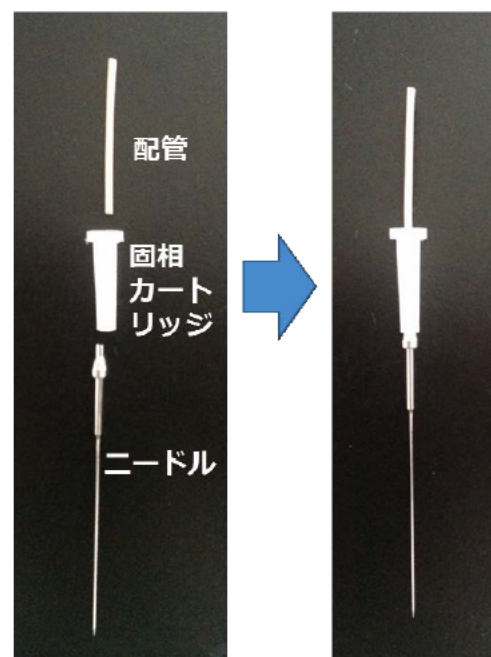
ii) 重点的に実施した事項

・カートリッジ形状の評価

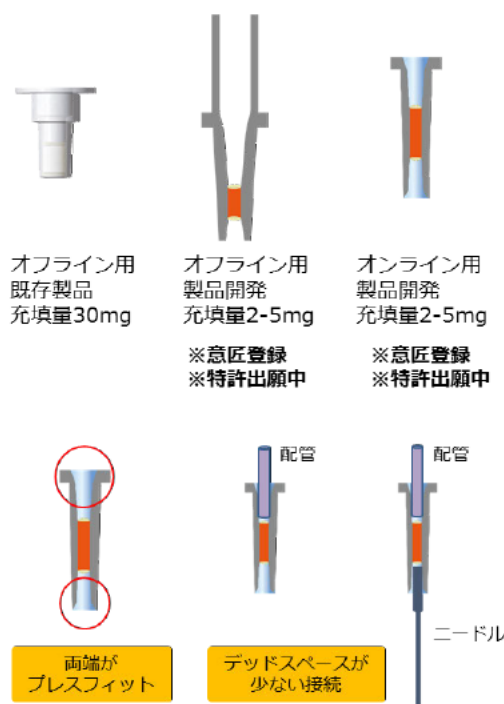
ピークチューブ（配管）やニードルを固相カートリッジに直接プレスフィット接続させることで試料や溶媒の流路に対してデッドボリュームを小さくすることができた。これにより、コンタミネーションの減少や洗浄工程の短縮が可能になり、また、簡単な機械的動作で接続できるため、接続の自動化が容易になると思われる。

フリットを球状にすることで、固相カートリッジおよびフリット製造において寸法の精度にわずかなバラつきが起こってもしっかりと対応できた。さらに、固相カートリッジにフリットを充填しやすく、製造コストを下げるができると思われる。

固相カートリッジとピークチューブ（配管）をプレスフィット接続して、水を3MPaで通液した時の漏れは確認できなかった。



【1-3】固相カートリッジ（形状）の開発

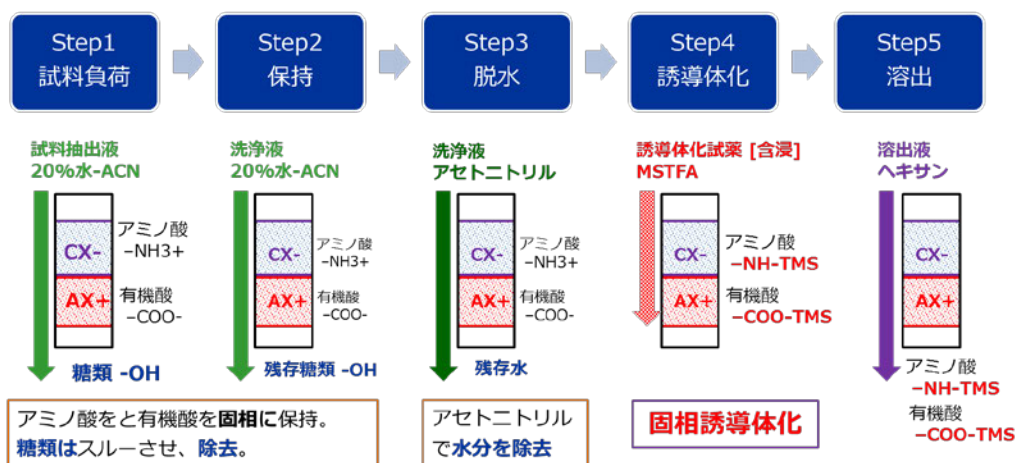


・カートリッジ容量の評価

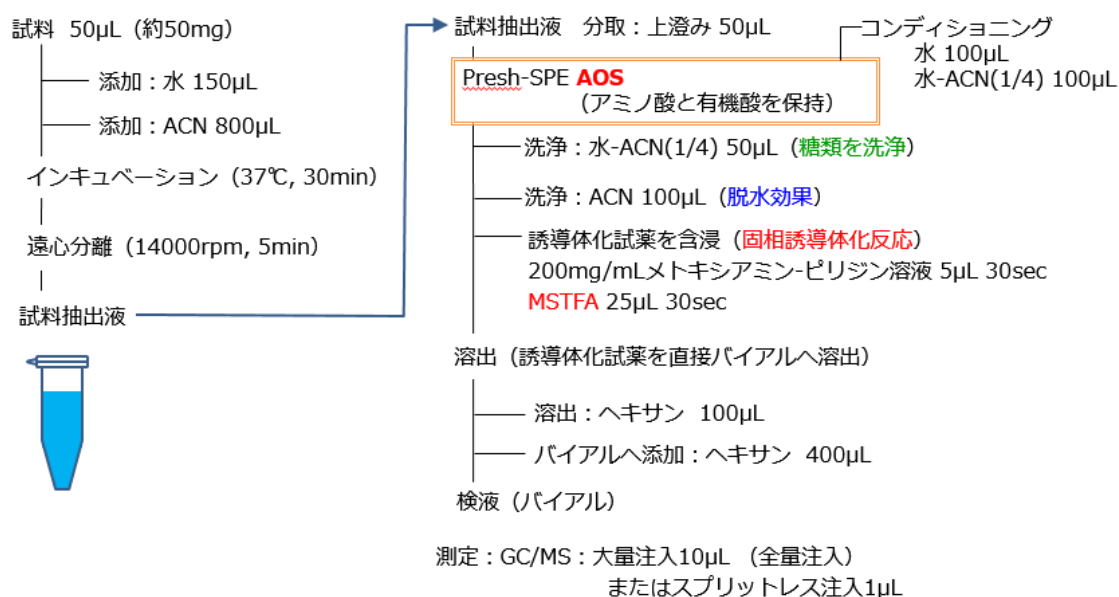
固相カートリッジに固相を充填できる部分の容量を 100 μL シリンジを用いて測定した。その結果、カートリッジ容量は 20 μL 以下であることが分かった。目標値である 30 μL 以下を達成した。固相カートリッジの下部フリットと接続したニードルとの間にできるデッドボリュームを 10 μL シリンジを用いて測定した。その結果、デッドボリュームは 2 μL であることが分かった。目標値である 2 μL 以下を達成した。

これまでの結果を基にアミノ酸、有機酸、糖類の一斉分析かつ固相カートリッジの1ユニット化を目的として、手作業による固相誘導体化の前処理法を考案した。

● アミノ酸と有機酸の一斉分析のための固相誘導体化法の考案

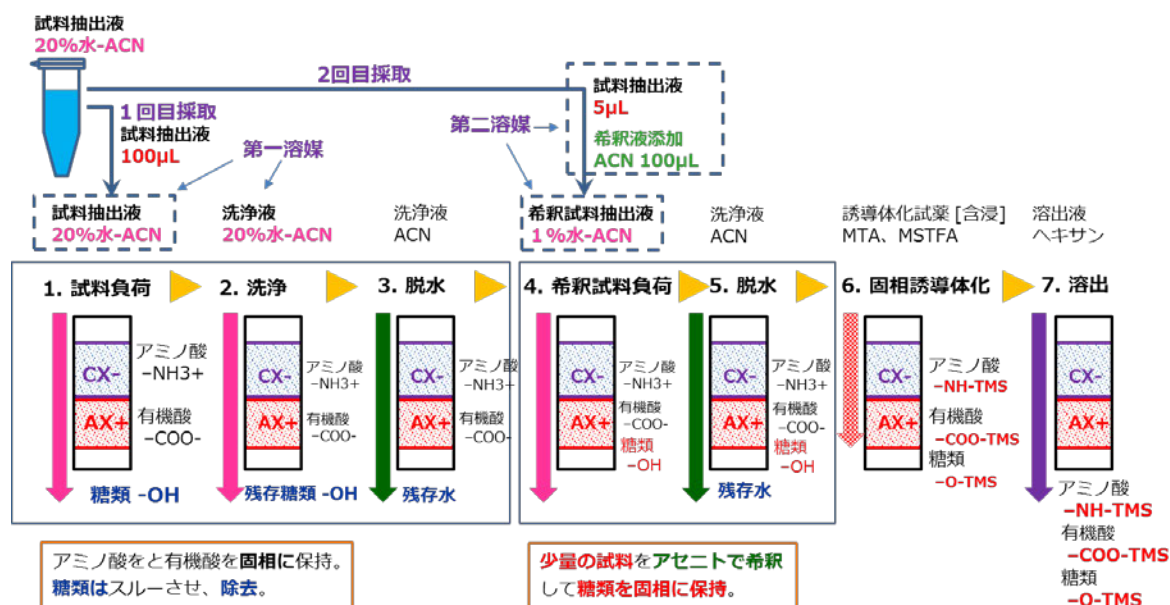


■ アミノ酸と有機酸の一斉分析のための固相誘導体化前処理フロー



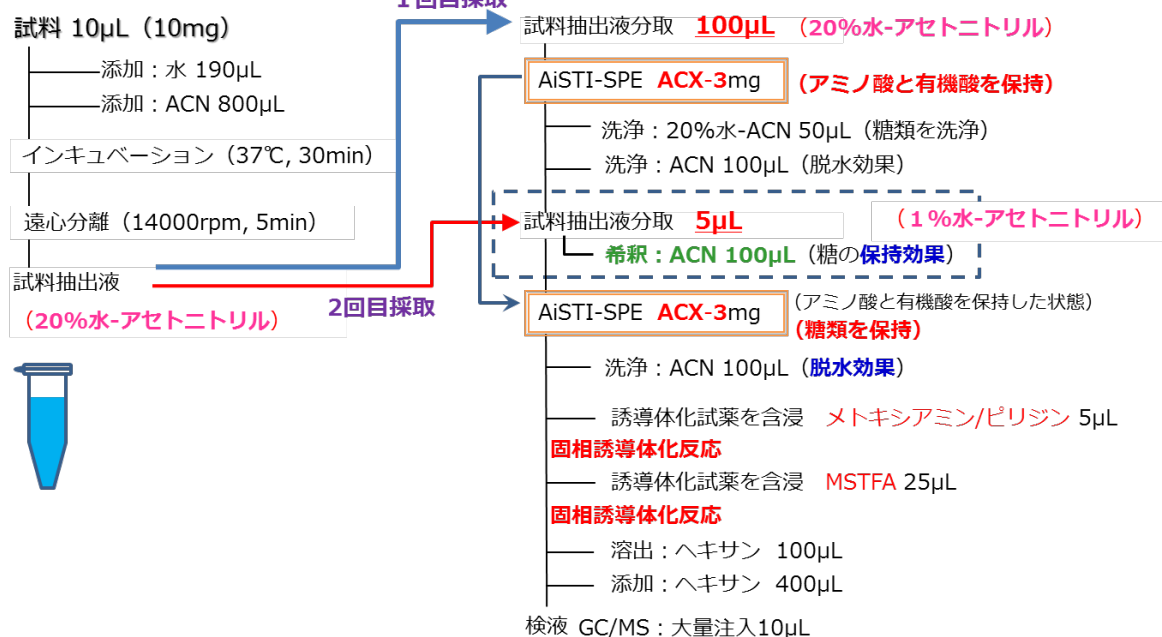
● 2段階試料採取法の考案

先の固相抽出の技術を応用し、第1回目の試料負荷では糖類は固相に保持させず、アミノ酸と有機酸を固相に保持させておき、第2回目の試料負荷では先の試料量の1/20以下にして先の固相に糖類を保持させ、アミノ酸と有機酸と糖質が固相に保持された状態で誘導体化して、その後、一斉に溶出するアミノ酸と有機酸と糖類の一斉分析法を考案した。



■ 2段階試料採取法の前処理フロー

野菜ジュース



（１－４）固相カートリッジへの充填方法の開発

i) 補助事業の具体的内容

静電対策を十分行った固相カートリッジに、フリット（液透過性膜）及び充填剤の高定量化な充填を検討する。あわせて製造用の治具（パレット・充填器具等）を開発し複数個同時に充填する技術を確立する。その後、精密電子天秤で固相カートリッジに充てんした固相の量を秤量する。

ii) 重点的に実施した事項

初めに静電気による充填剤の付着を防ぐために除電対策を行った作業環境を整備した。また、高定量化な充填を実現する為に、常に一定量のみ充填剤しか充填できない工夫を施した治具を製作し、「誰が充填しても同じ工法かつ同時に複数個（48 個）充填可能」を実現した。フリットを球にしたことで、フリットの装着が容易となり、フリットを押し込むための挿入棒を作成し、同じ位置で固定できるようにした。

充填方法は充填剤を所定容積量りとり、そのまま固相カートリッジに導入することで、精度高く充填することが可能となった。その結果、200個／時間を達成できた。

充填量の正確性を確認するため、充填後の固相カートリッジの重量を精密電子天秤及びレーザー測定機にて 1 個ずつ測定している。その結果、わずか数 mg の充填量にもかかわらず常に±10%以内の精度で一度に複数個の固相カートリッジに充填できる充填方法を確立できた。

製品としての出荷検査においては、充填量は光センサーを用いて充填容積の確認を全数検査行っており、また、重量は 100 個中 4 個の抜き取り検査を行うこととした。

（２）誘導体化溶出-全量注入一体化技術（自動誘導体化注入部）の開発

（２- １）自動全量注入時の誘導体化溶出最適条件の確立

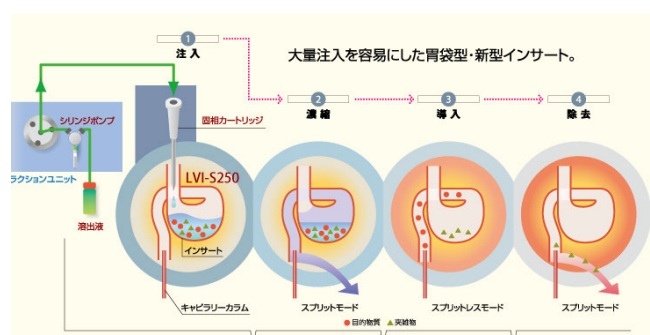
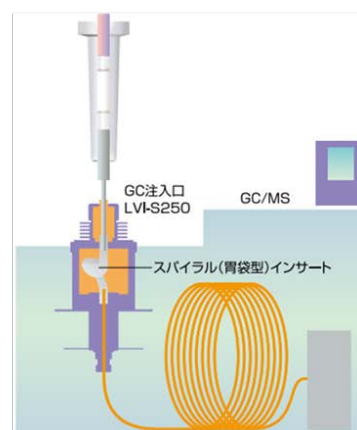
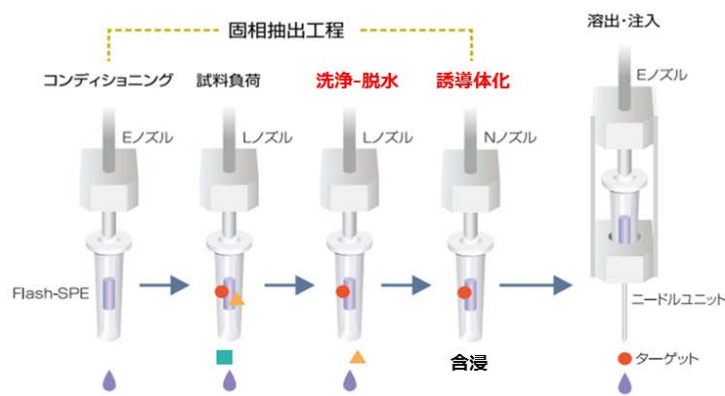
i) 補助事業の具体的内容

開発したオンラインSPE-GC/MSシステムにテーマ【１】で達成した固相誘導体化法のメソッドを組み込み、そのシステムにおけるそれぞれの最適条件を確立し、アミノ酸・有機酸の標準溶液を用いて評価した。

ii) 重点的に実施した事項

● オンラインSPE-GC/MSシステム

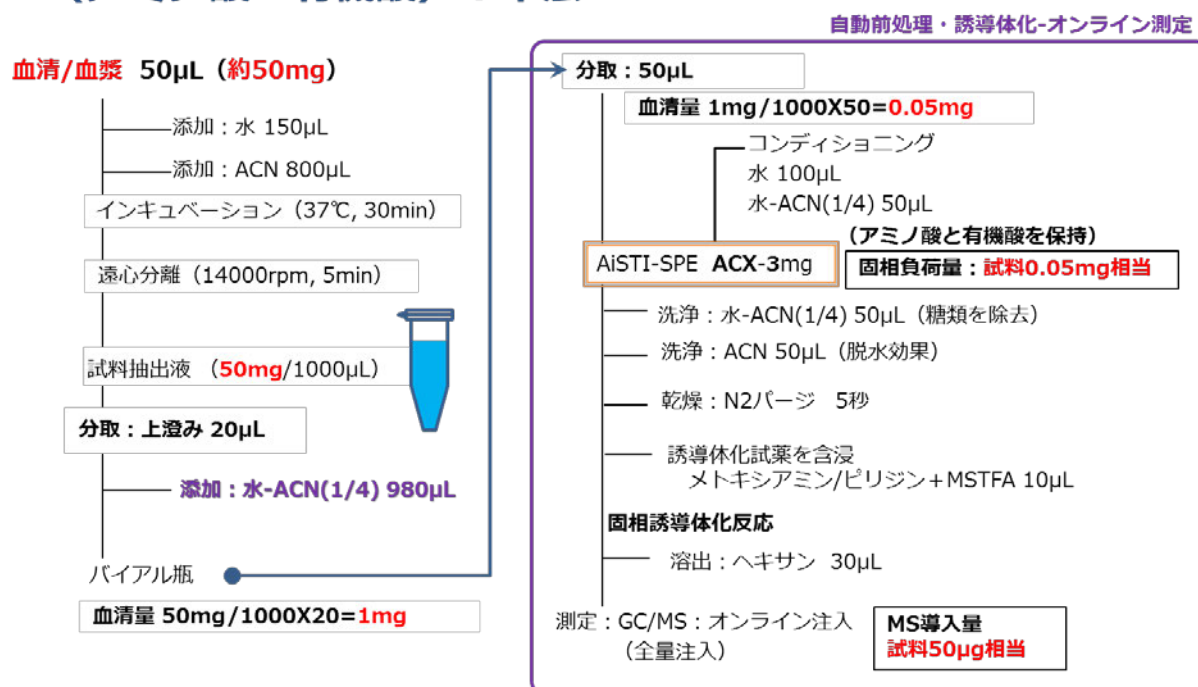
本研究開発では開発したオンラインSPE-GCの試作機を用いて、これまで開発してきたメソッドを基に自動化へ組み込んだ。EノズルとLノズルでコンディショニングを行い、Lノズルでバイアルから試料を採取し、固相に試料を負荷し、そのまま20%水-アセトニトリルで洗浄、アセトニトリルで脱水を行った。Nノズルで固相を乾燥後、Sノズルで誘導体化試薬（メトキシアミン/ピリジン/MSTFA）をその固相に含浸させて、固相上で誘導体化反応させた。その後、Eノズルを固相に連結し、続けてニードルと連結させて、ヘキサンで溶出させながら、胃袋型インサートを備えたGC注入口へ注入した。注入した溶出液は弊社で開発した大量注入法を用いてGC-MSで測定した。



● 固相誘導体化前処理法の自動化について

従来法と本事業のテーマ【1】で得られた研究成果の固相誘導体化法を基に試料量および測定装置GC-MSの感度（MS導入量）を検討して、試料自動前処理・溶出注入のオンラインSPE-GC/MSによる固相誘導体化法を考案した。

オンラインSPE-GC/MSシステムによる固相誘導体化法 （アミノ酸・有機酸）：本法



本法ではアミノ酸・有機酸の一斉分析を目的としているため、感度向上を目的として、MS導入量を従来法より多くした。オンライン化することで、固相に吸着・保持した目的成分を全量注入できるため、固相への試料負荷量を大きく少量化することができ、固相としての保持機能を高めることができた。

● 標準溶液（スタンダード）による評価

開発した試作機を用いて本法に従って得られたアミノ酸と有機酸の得られたピーク面積値の再現性（RSD）および手作業で得られたピーク面積値を基準とした回収率を示す。

化合物名	手作業			オンラインSPE-GC/MSシステム							RSD %	REC %
	Peak 面積値			Peak 面積値								
	1	2	Ave.	1	2	3	4	5	Ave.			
Alanine-2TMS	8,745,400	9,690,974	9,218,187	6,053,958	6,640,015	6,864,011	5,257,857	7,472,664	6,457,701	13.0	70	
Valine-2TMS	11,210,489	12,023,484	11,616,987	8,279,109	9,499,884	9,273,000	8,334,722	10,057,347	9,088,812	8.5	78	
Leucine-2TMS	13,894,142	14,838,178	14,366,160	10,704,441	12,750,216	11,512,388	9,611,237	12,263,475	11,368,351	11.0	79	
Isoleucine-2TMS	12,045,287	12,972,832	12,509,060	9,362,275	10,971,456	10,119,732	8,516,197	10,852,783	9,964,489	10.4	80	
Proline-2TMS	12,735,627	13,653,797	13,194,712	9,306,972	10,192,001	9,053,062	6,792,201	10,181,230	9,105,093	15.3	69	
Glycine-3TMS	942,903	1,018,028	980,466	877,197	1,146,029	1,001,461	973,245	1,021,275	1,003,841	9.6	102	
Serine-3TMS	6,231,497	6,835,245	6,533,371	7,857,913	8,310,548	8,074,065	6,417,177	8,695,734	7,871,087	11.1	120	
Threonine-3TMS	1,847,307	1,997,725	1,922,516	1,737,638	1,815,353	1,814,787	1,500,673	1,965,779	1,766,846	9.6	92	
Aspartic-3TMS	9,290,952	10,110,055	9,700,504	9,689,660	10,298,549	9,950,405	8,281,563	11,099,097	9,863,855	10.5	102	
Methionine-2TMS	8,569,979	9,352,252	8,961,116	7,249,148	7,209,966	7,226,102	6,198,402	7,952,974	7,167,318	8.7	80	
Glutamic acid-3TMS	7,256,426	8,222,053	7,739,240	6,984,397	6,890,304	7,004,854	6,205,581	7,967,267	7,010,481	9.0	91	
Phenylalanine-2TMS	7,128,687	7,850,210	7,489,449	6,710,397	6,783,792	6,915,964	6,297,378	7,435,932	6,828,693	6.0	91	
Lysine-4TMS	4,345,369	5,137,542	4,741,456	2,839,421	3,416,616	3,077,264	3,070,838	3,236,643	3,128,156	6.9	66	
Histidine-3TMS	1,770,575	2,721,495	2,246,035	777,653	534,491	741,025	652,108	1,109,962	763,048	28.2	34	
Tyrosine-3TMS	16,734,814	18,790,961	17,762,888	17,890,898	17,725,112	17,505,134	17,546,434	18,163,722	17,766,260	1.5	100	
Cystine-4TMS	9,041,938	11,390,197	10,216,068	11,486,990	11,041,516	10,961,315	11,219,096	11,557,095	11,253,202	2.3	110	

化合物名	手作業			オンラインSPE-GC/MSシステム							RSD	REC
	Peak 面積値			Peak 面積値								
	1	2	Ave.	1	2	3	4	5	Ave.	%		
Pyruvate acid-2TMS	919,069	913,021	916,045	828,338	782,867	949,339	677,105	933,201	834,170	13.5	91	
Oxalic acid-2TMS	6,664,293	6,705,879	6,685,086	5,896,227	5,061,331	5,686,508	5,382,197	5,101,599	5,425,572	6.7	81	
Maleic acid-2TMS	2,426,122	2,436,795	2,431,459	1,882,644	1,780,896	1,875,533	1,739,582	1,869,922	1,829,715	3.6	75	
Succinic acid-2TMS	555,039	558,462	556,751	1,569,984	1,520,633	1,596,840	1,469,098	1,562,816	1,543,874	3.2	277	
Fumaric acid-2TMS	10,032,043	10,127,230	10,079,637	7,330,374	7,057,780	7,459,490	6,896,377	7,512,753	7,251,355	3.7	72	
Malic acid-3TMS	2,996,433	2,976,290	2,986,362	2,894,787	2,822,271	2,897,108	2,783,578	2,927,078	2,864,964	2.1	96	
Ketoglutaric acid-3TMS	1,916,055	1,908,844	1,912,450	1,559,345	1,446,252	1,515,727	1,538,264	1,472,325	1,506,383	3.1	79	
Tartaric acid-4TMS	6,704,674	6,770,611	6,737,643	5,473,372	5,416,351	5,476,308	5,393,645	5,532,820	5,458,499	1.0	81	
Citric acid-4TMS	9,250,151	9,384,601	9,317,376	7,331,686	7,178,431	7,135,113	6,863,809	6,980,950	7,097,998	2.5	76	

これらの結果、試作機による測定データは手作業での結果とほぼ同等のピーク面積を示し、手作業での固相誘導体化法に対して概ね 80%以上の良好な結果を得ることができ、概ね目標値を達成できた。

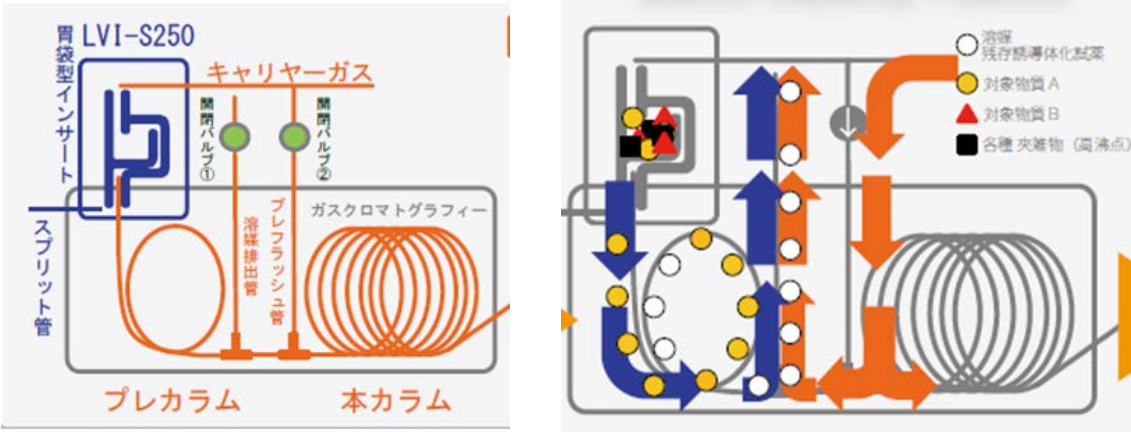
（2- 2）自動誘導体化溶出注入対応の GC 注入口システムの開発

i) 補助事業の具体的内容

開発した試作機を用いて、【2- 1】で確立した最適誘導体化溶出条件下での溶出量、溶媒排出時間、溶媒排出流量をそれぞれの最適条件を検討し、血清モデル化合物による回収率と再現性により評価した。

ii) 重点的に実施した事項

残存した誘導体化試薬を排出することを目的として、プレカラム溶媒（誘導体化試薬）排出機能のための電磁弁を備えた GC 注入口システムを開発し、試作機を製作した。



プレフラッシュ機能とオンラインSPE-GC/MSシステムの固相誘導体化法を用いた
アミノ酸分析の再現性と回収率

Compound	手作業	SPE-GC/MSシステム						RSD	REC
	Peak Area	Peak Area							
	1	1	2	3	4	Ave.	%		
Alanine-2TMS	5,180,763	3,900,411	3,705,027	4,375,084	4,729,104	4,177,407	11.1	81	
Valine-2TMS	6,175,204	6,080,824	6,391,486	6,636,035	6,439,899	6,387,061	3.6	103	
Leucine-2TMS	7,920,730	7,894,908	8,324,350	8,590,362	8,391,302	8,300,231	3.5	105	
Isoleucine-2TMS	7,902,141	7,875,516	8,292,466	8,567,950	8,370,412	8,276,586	3.5	105	
Proline-2TMS	7,368,209	5,717,486	6,750,937	6,812,973	6,657,882	6,484,820	7.9	88	
Glycine-3TMS	233,173	693,352	616,988	638,409	658,491	651,810	5.0	280	
Serine-3TMS	3,419,284	4,280,505	4,659,953	4,757,456	4,721,242	4,604,789	4.8	135	
Threonine-3TMS	822,035	933,243	993,653	1,023,749	1,000,213	987,715	3.9	120	
Aspartic-3TMS	4,532,608	5,026,453	5,425,468	5,102,683	5,309,995	5,216,150	3.5	115	
Methionine-2TMS	3,985,334	3,449,649	3,655,335	3,916,730	3,754,843	3,694,139	5.3	93	
Glutamic acid-3TMS	3,722,313	1,919,419	2,796,629	2,433,877	2,870,223	2,505,037	17.3	67	
Phenylalanine-2TMS	3,360,743	3,371,371	3,575,466	3,656,052	3,679,988	3,570,719	3.9	106	
Lysine-4TMS	801,533	1,241,211	1,100,506	1,123,106	1,218,531	1,170,839	5.9	146	
Tyrosine-3TMS	8,770,776	11,082,329	11,231,327	11,281,806	11,175,519	11,192,745	0.8	128	
Cystine-4TMS	5,883,610	4,862,710	5,014,095	5,027,696	5,123,099	5,006,900	2.2	85	

先の実験【2－1】のアミノ酸で得られた結果より、再現性および回収率とも向上したことが分かった。プレフラッシュ機能により、安定した注入技術を達成したと考えられる。

（３）ハンドリング技術の開発

（３- １）固相カートリッジのハンドリング

i) 補助事業の具体的内容

固相カートリッジの挟み込み部・ニードル部の構造、形状・材質の検討および固相カートリッジのクランプ方法と移送技術の開発を実施した。

評価は固相カートリッジを配管もしくはニードルでクランプし、流す液体の圧力を5MPa にして液体が漏れないことを確認した。

ii) 重点的に実施した事項

固相カートリッジの挟み込み部・ニードル部の構造、形状・材質の検討および固相カートリッジのクランプ方法と移送技術の開発を実施するために、以下の事項を具体的に検討した。

①移送精度の向上・・・小型カートリッジである Flash-SPE に、安定的に接続・移送するため、移送精度が 1/10 mm 以下で再現性良く制御できる方法を検討した。

②ノズルの着脱の安定性・・・1 回の分析で前処理に使用するノズルの着脱が多数あり、また、多検体を行うため、連続的に安定した形状を検討した。

③固相カートリッジの差し込み深さの安定性・・・固相カートリッジを装着し前処理場所に移動するが、移送精度は高くても、装着の位置がずれてしまうと問題になる。また、脱着する際も同様である。連続分析においても固相カートリッジの位置を常に一定にできる技術を検討した。

①移送精度の向上

・自社で独自開発、XYZ 型に駆動する産業ロボットについて検討した。

産業用ロボットでは、0.1mm 以下の精度が出る装置が市販されており、位置再現性・駆動安定性の面から産業ロボットを採用することとした。

XYZ 型駆動の産業ロボットには、直線的に移動する方式と中心点から円周上に駆動する方式があるが、精度の高さ・位置に到達するまでの速さから、円周方式の 4 軸ロボットを採用した。

②ノズル着脱の安定性

・1 年目では回転ロック方式を採用していたが、わずかな擦れが連続して多検体を実施して行くと問題になる可能性が考えられた。

【公開版】

そこで、着脱にマグネット式を採用し、回転ロックをしない方式を採用した。また、マグネットでは負荷がかかると外れてしまう可能性があるため、差し込み軸を採用し、動作による外れをなくした。これにより、連続動作での安定性が劇的に改善した。

③固相カートリッジ差し込み深さの安定性

・差し込み深さを一定にするために、ノズル側にバネを加え、固相カートリッジへの圧入する力が常に一定になるように改良した。これにより、バネが効いていることが一目で分かり、圧入がきちんとできているか不安になるので過剰な圧力をかけて差し込んでしまうことを防ぐことができた。

固相カートリッジの挟み込み技術が安定したことで、その状態での液漏れの発生有無について検証した。評価方法は固相カートリッジの上下をPEEK 配管でクランプし、送液時の圧力を 5MPa



にして液漏れを調査したが、液漏れは確認されなかった。HPLCの送液ポンプの制御画面「5MPa」に設定

これにより、固相カートリッジの挟み込み技術・クランプ方法・移送技術の開発が達成できた。またその方法を用いて液漏れ発生の有無を確認したが、液漏れは認められず、本テーマをすべて達成することができた。

(3- 2) 洗浄技術

i) 補助事業の具体的内容

順次、固相カートリッジを処理するが、前回の前処理の残留物が次の前処理に混入しないように、その都度、配管やノズルを洗浄することが必要である。その洗浄に必要な溶媒種類と溶媒量を検討した。

ii) 重点的に実施した事項

前回の前処理の残留物が次の前処理に混入しないように、その都度、配管やノズルを洗浄する際に必要な溶媒種類と溶媒量を検討した。

・洗浄評価

高濃度の標準溶液を本システムで測定後、続けて溶媒（ブランク）を測定し、配管やノズルの洗浄評価を行った。その結果、溶媒（ブランク）からは標準溶液の成分は検出されず、洗浄できていることが確認でき、事業目標を達成できた。

● 徐タンパクと抽出条件について

血清に含有されるタンパクは代謝物の固相抽出の抽出率あるいは測定機器システムへの汚染といった影響を与える可能性がある。そのため、本研究の測定対象の血清中代謝物ではないものの、血清中のタンパク量を知ることは本研究を進めていく上で重要である。また、血清中のタンパクを除去するために固相法、有機溶媒抽出法（従来法）、有機溶媒添加法を試み、これらのタンパク除去効果をヒト血清中の全タンパク量を BCA 法により測定した。これらのことから、ヒト血清に含まれるタンパクの除去手法の開発とその効率の評価を行なった。

固相カートリッジとして C18 および HLB を用い、酸性条件および塩基性条件において固相にタンパクが保持されるかどうかを調べた。その結果、すべての条件においてロード原液とロード画分にタンパクが多く含まれ、その他の画分（洗浄画分、溶出画分 1、溶出画分 2）のタンパク量は検出下限未満であった。したがって、血清中のタンパクは固相に保持されにくいことが明らかとなった。次いで、従来法である血清に水+メタノール+クロロホルム混合液を加える除タンパク法を行なった。その結果、血清に対する混合有機溶媒の比を増やすと除タンパクの効果が高くなった。血清と混合有機溶媒の比が 1：4 の場合において、上澄みに含まれるタンパクの除去率は 61 % であった。さらに、有機溶媒添加法として血清にアセトニトリルあるいはメタノールを加える除タンパク法を行なった。その結果、血清と有機溶媒の比が 1：1 の場合において、上澄みに含まれるタンパクの除去率はアセトニトリルで 80 %、メタノールで 23 % であり、従来法の同じ溶媒比における従来法の 3 % よりも除去効果があった。血清に対する有機溶媒の比を増やすと除タンパクの効果はさらに高くなり、1：2～1：4 の場合におけるタンパク量は検出下限未満であった。

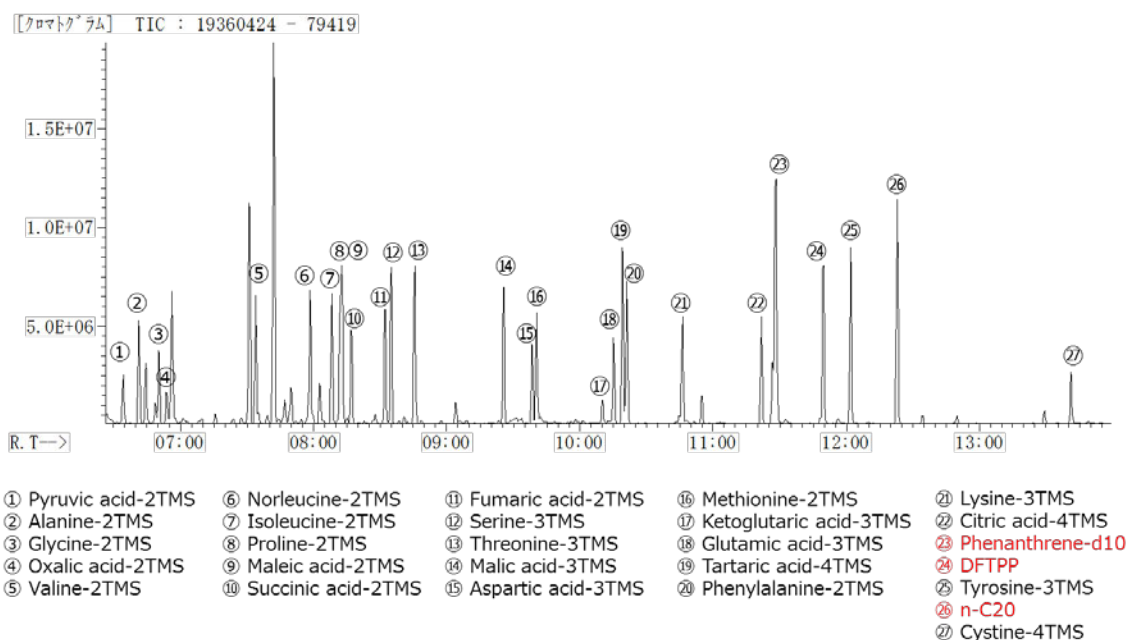
（3-3）自動前処理-誘導体化溶出注入装置による血清中のメタボローム分析精度の評価
試作 3 号機を用いて、アミノ酸と有機酸の標準溶液による性能評価および血漿・血清試料による従来法との精度に対する比較評価、添加回収試験（一定量予め添加しておき、その収集率を確認する作業）、精度（再現性、感度）の評価を行った。

A 標準溶液（スタンダード）による性能評価

標準溶液：10 pmol/μL アミノ酸および有機酸 in 水-アセトニトリル（1/1）

開発した試作機を用いて本法に従って得られたクロマトグラムとアミノ酸および有機酸のピーク面積値の再現性（ $n = 7$ ）、濃度と面積値の関係（直線性）を下記に示す。

アミノ酸と有機酸のオンラインSPE-GC/MS によるSCANトータルイオンクロマトグラム

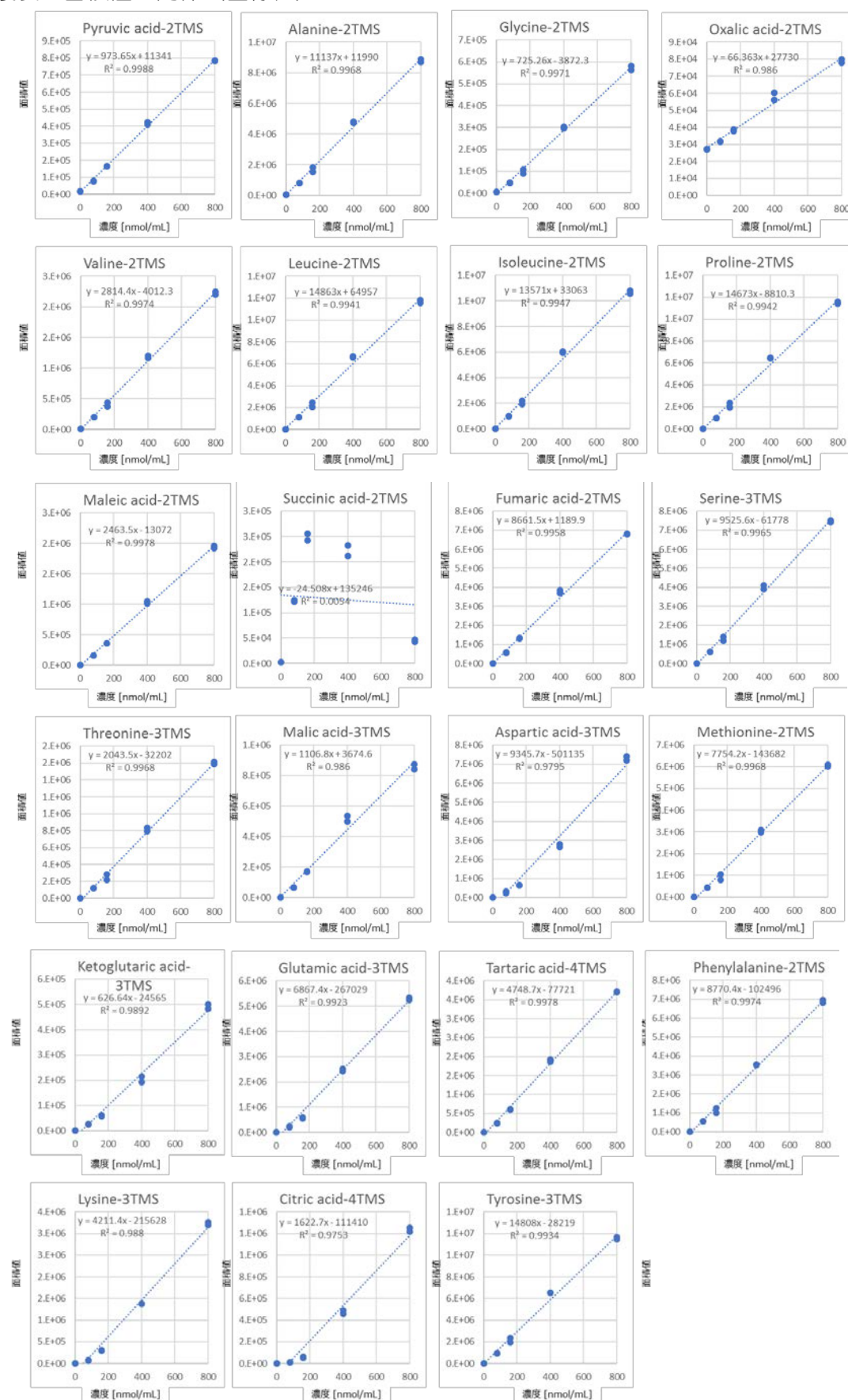


アミノ酸・有機酸標準溶液のオンラインSPE-GC/MSによる再現性 (面積値)

No.	成分名	ST アミノ酸・有機酸 0.02nmol/μL オンラインSPE-GC							Ave.	RSD,%
		1	2	3	4	5	6	7		
1	Pyruvic acid-2TMS	375,367	370,429	396,996	383,492	398,889	366,954	383,230	382,194	3.2
2	Alanine-2TMS	4,092,138	3,911,602	4,392,468	4,392,462	4,089,047	4,310,281	4,360,901	4,221,271	4.5
3	Glycine-2TMS	253,344	235,429	276,821	275,082	245,735	266,556	269,427	260,342	6.1
4	Oxalic acid-2TMS	51,871	54,230	62,833	63,320	56,066	58,495	58,987	57,972	7.3
5	Valine-2TMS	1,016,219	984,416	1,095,013	1,104,177	1,030,845	1,114,789	1,132,130	1,068,227	5.3
6	Leucine-2TMS	5,758,028	5,637,391	6,161,097	6,225,743	5,923,057	6,316,055	6,386,202	6,058,225	4.8
7	Isoleucine-2TMS	5,204,282	5,100,171	5,571,977	5,640,127	5,408,751	5,707,402	5,841,348	5,496,294	4.9
8	Proline-2TMS	5,704,860	5,480,532	6,067,538	6,074,341	5,675,549	5,999,217	6,189,740	5,884,540	4.5
9	Maleic acid-2TMS	926,739	955,415	965,895	972,527	989,351	1,010,143	1,025,309	977,911	3.4
10	Succinic acid-2TMS	550,107	579,053	543,938	523,539	553,914	466,285	468,362	526,457	8.3
11	Fumaric acid-2TMS	3,416,827	3,448,350	3,504,826	3,500,839	3,584,759	3,668,116	3,689,196	3,544,702	3.0
12	Serine-3TMS	3,571,321	3,525,394	3,889,782	3,802,575	3,676,477	3,859,749	3,876,260	3,743,080	4.0
13	Threonine-3TMS	734,143	730,085	791,351	782,691	752,836	795,771	800,013	769,556	3.9
14	Malic acid-3TMS	476,618	475,121	507,569	499,152	509,418	525,250	520,612	501,963	3.9
15	Aspartic acid-3TMS	2,003,602	1,837,708	2,383,854	2,267,233	2,052,635	2,495,425	2,466,616	2,215,296	11.5
16	Methionine-2TMS	2,870,406	2,703,593	3,051,908	3,079,414	2,908,365	3,099,303	3,152,639	2,980,804	5.4
17	Ketoglutaric acid-3TMS	184,337	193,839	157,349	168,174	193,011	203,251	189,362	184,189	8.7
18	Glutamic acid-3TMS	2,059,833	2,002,210	2,329,865	2,234,137	2,091,238	2,400,952	2,304,002	2,203,177	6.9
19	Tartaric acid-4TMS	1,760,564	1,766,113	1,832,190	1,834,772	1,854,375	1,862,933	1,889,904	1,828,693	2.7
20	Phenylalanine-2TMS	3,246,271	3,073,355	3,464,532	3,475,089	3,308,231	3,569,811	3,607,589	3,392,125	5.6
21	Lysine-3TMS	1,286,342	1,153,492	1,387,383	1,393,791	1,247,020	1,327,948	1,494,305	1,327,183	8.4
22	Citric acid-4TMS	379,377	356,475	405,536	412,186	357,985	429,796	393,474	390,690	7.1
23	Phenanthrene-D10	11,402,609	11,643,231	11,908,706	11,584,376	11,599,418	11,930,008	11,639,115	11,672,495	1.6
24	DFTPP	3,493,771	3,629,665	3,773,034	3,555,009	3,581,039	3,647,416	3,542,522	3,603,208	2.5
25	Tyrosine-3TMS	6,129,525	6,060,013	6,589,775	6,479,441	6,307,641	6,695,632	6,581,622	6,406,236	3.8
26	Eicosane	3,993,617	4,005,724	4,330,867	4,249,279	4,001,395	4,002,366	4,341,184	4,132,062	4.0
27	Cystine-4TMS	781,255	676,479	910,296	914,109	785,703	958,729	935,375	851,707	12.3

一部ブランクが見られるが、良好な SCAN トータルイオンクロマトグラムを得ることができた。また、再現性においても良好な結果を得ることができた。

■濃度と面積値の関係（直線性）



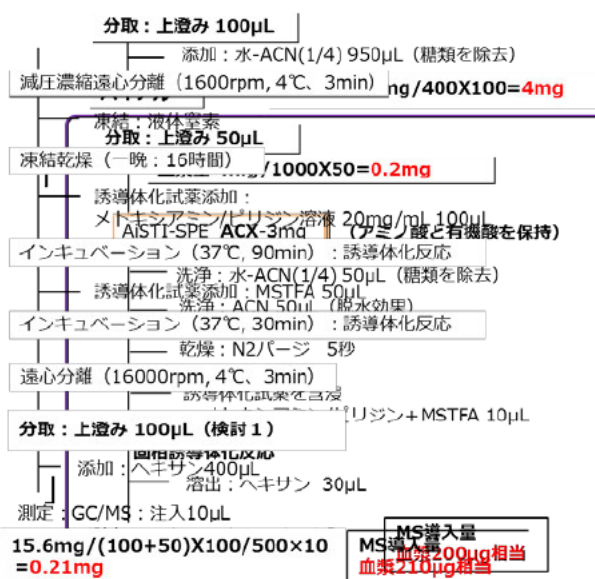
B ヒト血漿試料による従来法との精度に対する比較評価

血清/血漿 50μL (約50mg)



抽出条件を統一するために右記の従来法による抽出液を基にして、それぞれ従来法およびオンラインSPE-GC/MS法としてMSへの導入量が同じになるようにそれぞれの検液を調整して比較実験を行った。

■ 従来法



■ 本法: オンライン SPE-GC/MS 法

オンラインSPE-GC/MSシステムの固相誘導体化法を用いた ヒト血漿中アミノ酸・有機酸一斉分析の再現性と従来法との比較

No.	Compound	従来法	SPE-GC/MSシステム					RSD	本法／
		Peak Area	Peak Area						従来法
		1	1	2	3	4	Ave.		%
Amino group									
101	Valine-2TMS	1,087,620	1,251,955	1,230,977	1,243,134	1,289,565	1,253,908	2.0	1.15
102	Leucine-2TMS	447,077	1,042,668	1,009,945	1,012,102	1,054,715	1,029,858	2.2	2.30
103	Isoleucine-2TMS	365,323	483,975	471,299	471,788	492,978	480,010	2.2	1.31
104	Proline-2TMS	107,936	1,304,498	1,301,367	1,283,957	1,367,035	1,314,214	2.8	12.18
105	Glycine-3TMS	344,503	168,525	191,571	174,851	175,534	177,620	5.5	0.52
106	Serine-3TMS	152,486	701,713	680,547	681,253	715,110	694,656	2.4	4.56
107	Threonine-3TMS	105,355	139,602	135,804	135,539	145,175	139,030	3.2	1.32
108	Aspartic-3TMS	59,769	79,550	48,915	80,745	81,469	72,670	21.8	1.22
109	Methionine-2TMS	70,123	100,129	85,169	92,410	96,252	93,490	6.8	1.33
110	Glutamic acid-3TMS	233,048	372,469	232,122	342,740	399,825	336,789	21.8	1.45
111	Phenylalanine-2TMS	109,623	275,092	221,790	272,475	281,090	262,612	10.5	2.40
112	Lysine-4TMS	76,819	231,501	268,408	260,359	225,061	246,332	8.6	3.21
113	Tyrosine-3TMS	29,482	124,739	132,379	128,805	123,106	127,257	3.3	4.32
114	Cystine-4TMS	5,336	157,412	178,933	154,581	166,163	164,272	6.7	30.79
Organo acid group									
201	Maleic acid-2TMS	642	6,735	5,671	7,009	8,834	7,062	18.6	11.00
202	Succinic acid-2TMS	4,156	13,083	14,774	13,554	11,402	13,203	10.6	3.18
203	Fumaric acid-2TMS	7,499	18,729	17,731	19,835	19,675	18,993	5.1	2.53
204	Malic acid-3TMS	11,882	15,226	15,890	14,863	14,675	15,164	3.5	1.28
205	Ketoglutaric acid-3TMS	2,168	8,778	9,480	9,959	8,307	9,131	8.0	4.21
206	Tartaric acid-4TMS	7,264	2,775	2,561	2,821	2,793	2,738	4.4	0.38
207	Citric acid-4TMS	550,210	753,075	442,013	419,039	394,133	502,065	33.6	0.91

その結果、アミノ酸および有機酸を用いた本システムの感度（誘導体化率）は従来法と同等以上の結果を得ることができた。尚、実験で行った従来法の測定が本来のスプリット注入法を用いておらず、糖類が多く注入されたことによる影響を受けている可能性がある。

C ヒト血清によるアミノ酸と有機酸の添加回収試験（回収率）と再現性

試料：ヒト血清

添加試料中濃度：100nmol/mL

開発した試作機を用いて本法に従って得られたクロマトグラムとアミノ酸と有機酸の添加回収試験、およびピーク面積値の再現性（n = 10）、定量イオンクロマトグラムの重ね描きを下記に示す。

オンラインSPE-GC/MSシステムによる 固相誘導体化法（アミノ酸と有機酸）：本法

試料 50μL (約50mg)



抽出後の誘導体化前処理時間

10 分

オンラインSPE-GC/MSシステム (全自動)

分取：上澄み 40μL

コンディショニング
水 100μL
水-ACN(1/4) 100μL
Flash-SPE AOS-3mg (アミノ酸と有機酸を保持)

洗浄：水-ACN(1/4) 100μL (糖類を除去)
洗浄：ACN 100μL (脱水効果)
誘導体化試薬を含浸 MSTFA 8μL

固相誘導体化反応

溶出：ヘキサン 40μL

測定：GC/MS：オンライン注入

MS導入量
試料 40μg相当

ヒト血清のオンラインSPE-GCによる添加回収試験

No.	成分名	ST			ヒト血清 (A)				ヒト血清 + ST添加 (B)				回収率, % (B-A)/ST
		1	2	Ave.	1	2	3	Ave.	1	2	3	Ave.	
1	Pyruvic acid-2TMS	419,867	397,970	408,919	89,314	92,479	111,282	97,692	488,278	504,701	445,064	479,348	93
2	Alanine-2TMS	4,487,938	4,494,261	4,491,100	3,426,751	3,243,702	3,496,877	3,389,110	7,536,978	7,890,563	8,086,616	7,838,052	99
3	Glycine-2TMS	283,209	278,055	280,632	169,974	159,910	181,743	170,542	431,164	471,546	496,330	466,347	105
4	Oxalic acid-2TMS	56,083	58,355	57,219	27,649	27,516	24,357	26,507	102,648	104,878	105,382	104,303	136
5	Valine-2TMS	1,095,011	1,077,581	1,086,296	497,172	448,647	509,729	485,183	1,542,139	1,628,581	1,681,100	1,617,273	104
6	Norleucine-2TMS	6,110,062	6,028,958	6,069,510	1,666,863	1,507,120	1,691,869	1,621,951	7,431,279	7,712,759	7,989,215	7,711,084	100
7	Isoleucine-2TMS	5,511,937	5,430,785	5,471,361	814,472	736,585	827,123	792,727	6,138,085	6,367,562	6,560,174	6,355,274	102
8	Proline-2TMS	5,999,370	6,068,632	6,034,001	2,705,275	2,677,135	2,864,220	2,748,877	8,821,696	9,112,868	9,251,248	9,061,937	105
9	Maleic acid-2TMS	900,582	908,642	904,612	6,021	5,888	5,905	5,938	957,238	985,910	995,863	979,670	108
10	Succinic acid-2TMS	175,963	166,899	171,431	4,217	5,810	5,742	5,256	185,496	165,012	175,988	175,499	99
11	Fumaric acid-2TMS	3,453,383	3,445,113	3,449,248	13,133	10,118	8,920	10,724	3,526,216	3,463,954	3,341,228	3,443,799	100
12	Serine-3TMS	3,776,255	3,669,419	3,722,837	814,001	731,823	844,505	796,776	4,657,000	4,902,639	4,984,821	4,848,153	109
13	Threonine-3TMS	765,777	750,610	758,194	213,067	201,723	221,010	211,933	1,009,194	1,067,111	1,084,239	1,053,515	111
14	Malic acid-3TMS	528,130	501,215	514,673	3,108	3,267	3,499	3,291	480,100	472,677	437,311	463,363	89
15	Aspartic acid-3TMS	2,411,979	2,431,382	2,421,681	40,259	30,901	31,907	34,356	3,349,060	3,370,597	3,540,397	3,420,018	140
16	Methionine-2TMS	2,979,018	2,989,507	2,984,263	125,064	115,654	127,455	122,724	3,117,685	3,240,033	3,399,375	3,252,364	105
17	Ketoglutaric acid-3TMS	176,101	189,843	182,972	2,863	2,948	2,793	2,868	211,146	211,576	201,413	208,045	112
18	Glutamic acid-3TMS	2,417,753	2,370,480	2,394,117	324,156	269,290	279,678	291,041	2,889,830	3,066,877	3,149,820	3,035,509	115
19	Tartaric acid-4TMS	1,825,489	1,795,290	1,810,390	7,124	2,961	2,644	4,243	1,974,284	2,026,297	2,004,915	2,001,832	110
20	Phenylalanine-2TMS	3,367,816	3,350,897	3,359,357	401,284	366,549	400,348	389,394	3,577,907	3,756,276	3,967,753	3,767,312	101
21	Lysine-3TMS	1,266,785	1,439,047	1,352,916	277,449	233,655	269,016	260,040	1,908,116	1,960,613	2,043,240	1,970,656	126
22	Citric acid-4TMS	498,875	495,076	496,976	15,811	16,274	16,698	16,261	723,907	739,114	728,546	730,522	144
23	Phenanthrene-D10	12,074,373	12,021,374	12,047,874	11,989,097	13,067,513	12,620,512	12,559,041	11,999,367	12,917,647	12,893,369	12,603,461	105
24	DFTPP	2,940,149	2,845,097	2,892,623	2,815,323	3,010,497	2,989,559	2,938,460	2,898,702	3,362,634	3,194,944	3,152,093	109
25	Tyrosine-3TMS	6,698,153	6,405,584	6,551,869	763,618	699,891	762,379	741,963	7,043,418	7,490,430	7,844,485	7,459,444	103
26	n-C20	5,145,525	5,153,603	5,149,564	5,010,217	5,018,717	5,001,316	5,010,083	5,186,805	5,077,180	5,048,899	5,104,295	99
27	Cystine-4TMS	1,148,080	1,093,851	1,120,966	17,838	13,893	17,561	16,431	809,686	926,655	1,033,617	923,319	81

ヒト血清のオンラインSPE-GC/MSによる再現性（面積値）

これらの結果から、添加回収試験、再現性において良好な結果を得ることがわかった。以上から、実試料である血清および血漿サンプルを用いて、オンラインSPE-GC/MSシステムの固相誘導体化法はメタボローム分析における高精度・ハイスループット化に適応できることが分かった。

成果：アミノ酸および有機酸においては回収率、再現性とも従来の分析と同等以上の結果を得ることができた。さらに前処理時間は 10 分以内で、抽出したサンプルを本システムにセットするだけで高スループットで分析することができた。

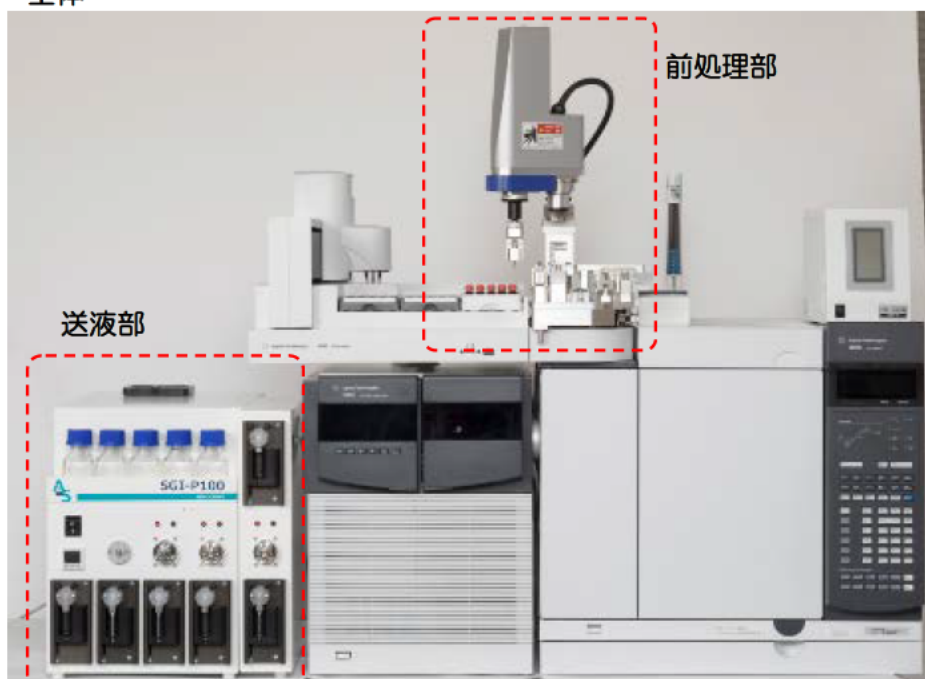
今回実施したテーマ3(サブテーマ(3-3))の成果により、実試料(ヒト血清)中のアミノ酸・有機酸を固相上で「吸着・保持」、「誘導体化」する工程を自動前処理装置を用いてオンラインで行うことが可能であることが実証された。

これら事業成果により、アミノ酸と有機酸においては GC-MS 測定に必要な前処理工程を自動化/オンライン化できる自動前処理装置の開発に成功した。

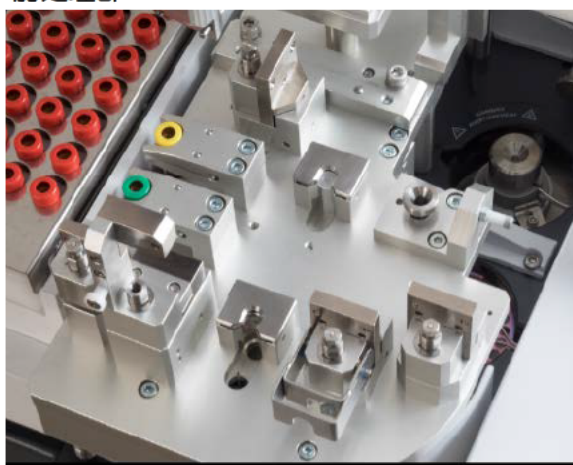
今後の課題として、糖類を含めたオンラインシステムの開発を目指す。

■ オンライン SPE-GC システム試作機

全体



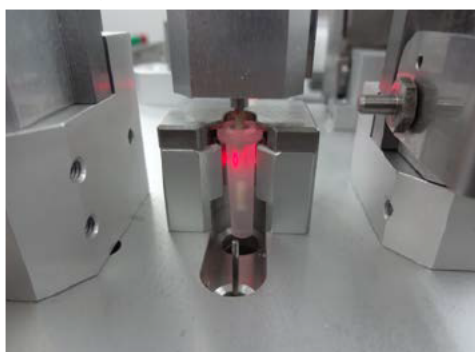
前処理部



溶出 & 注入

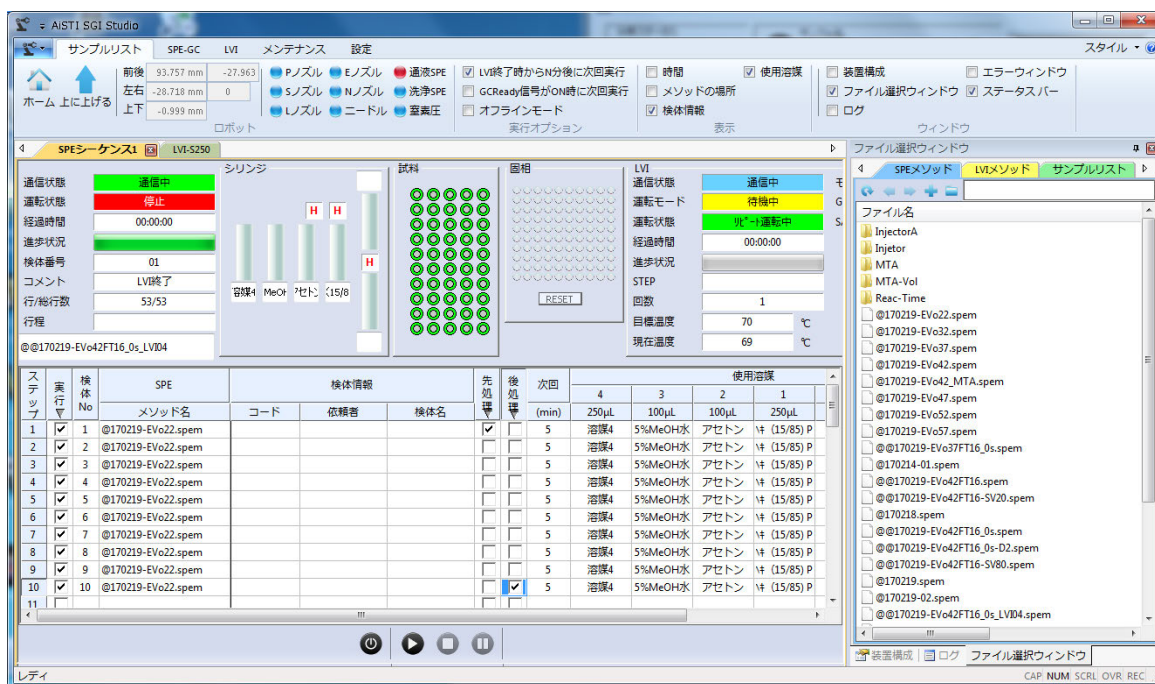


通液部

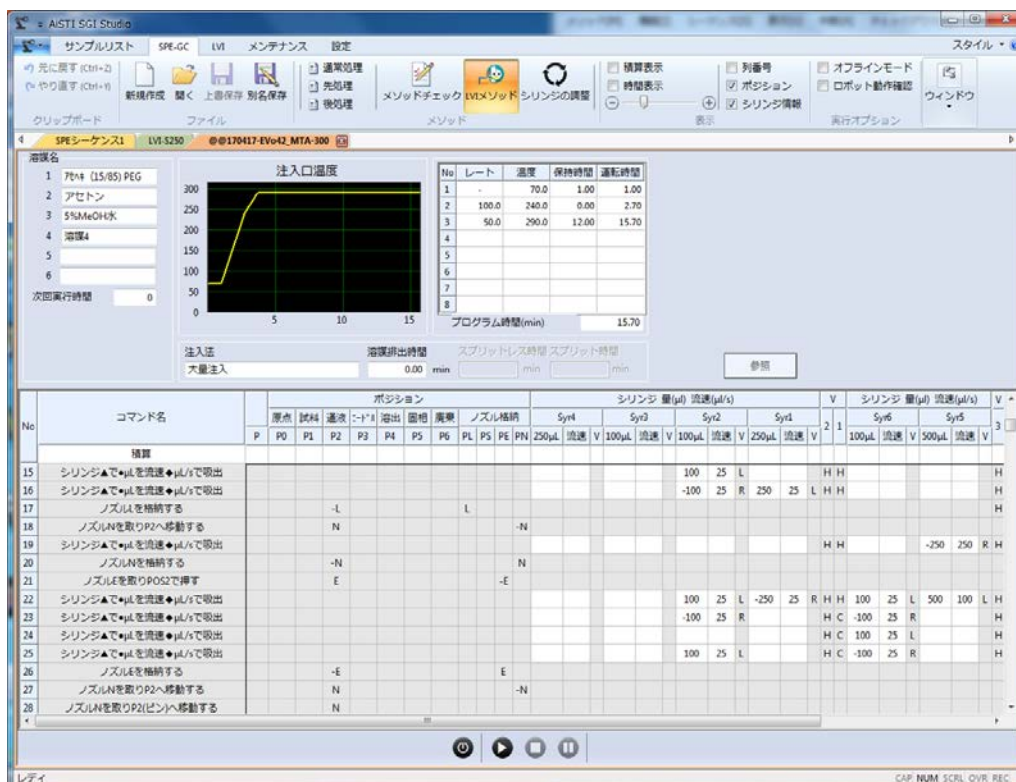


■ ソフトウェア

・ シーケンス画面



・ メソッド画面



第3章 全体総括

3-1 複数年の研究開発成果

【学会発表】

2015年6月 Metabolomics 2015 (国際学会)

「Development of in-SPE derivatization for GC-MS metabolome analysis」

O Ryoichi SASANO¹, Yoko KOJIMA¹, Shusuke OSAKI², Yoshie TANAKA²,
Akihiro MATSUMOTO², Toshiyuki YAMASHITA³, Takeshi BAMBA³, Eiichiro
FUKUSAKI³ 1: AiSTI, 2: Wakayama prefecture, 3: Osaka University

2015年9月 日本分析化学会年会

「固相誘導体化法を用いた GC/MS 測定における試料前処理の迅速化」

○大崎秀介 1* 松本明弘 1 佐々野僚一 2 馬場健史 3 山下俊幸 4 福崎英一郎 4

1. 和歌山県工技セ 2. アイスティ 3. 九大・生医研 4. 阪大・工

2015年10月 第9回メタボロームシンポジウム

「GC/MS 基盤メタボローム分析に資する固相誘導体化法の検討」

○大崎秀介 1* 松本明弘 1 佐々野僚一 2 馬場健史 3 山下俊幸 4 福崎英一郎 4

1. 和歌山県工技セ 2. アイスティ 3. 九大・生医研 4. 阪大・工

「GC/MS 基盤メタボローム分析に資する固相誘導体化法の応用」

○佐々野僚一 1* 大崎秀介 2 松本明弘 2 馬場健史 3 山下俊幸 4 福崎英一郎 4

1. アイスティ 2. 和歌山県工技セ 3. 九大・生医研 4. 阪大・工

2016年9月 第68回日本生物工学会

「Analysis of the components in Black pepper using in-SPE derivatization
method for GC-MS metabolome analysis」

○恩田浩幸 1, 杉立久仁代 2, 佐々野僚一 3, 松尾俊介 3, 佐川岳人 1, 福崎英一郎 4

1 エスビー食品, 2 アジレント, 3 アイスティ, 4 阪大院・工・生命先端

2016 年 12 月 GC 研究懇談会特別講演会（技術紹介）

「固相誘導体化法によるメタボローム分析」

○佐々野 僚一 アイスティサイエンス

2017 年 5 月：予定 第 65 回質量分析討論会

「固相誘導体化を用いた低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析法の開発」

○佐々野僚一 1・大崎秀介 2・古野正浩 3・福崎英一郎 3

1. アイスティ 2. 和歌山県工技セ 3. 阪大・工

2017 年 6 月：予定 Metabolomics 2017（国際学会）

「Development of Online SPE-GC/MS system with on-Solid phase derivatization method for automatic metabolome analysis」

ORyoichi SASANO¹, Koji MACHITANI², Shusuke OSAKI², Masahiro FURUNO³, Eiichiro FUKUSAKI³ 1: AiSTI, 2: Wakayama prefecture, 3: Osaka University

【展示・セミナー活動】

2015 年 10 月 久留米科学機器セミナー

メタボローム分析用固相誘導体化法の講演と展示

2015 年 10 月 第 110 回日本食品衛生学会

技術セミナー：メタボローム分析用固相誘導体化法を紹介

2015 年 10 月 第 67 回日本生物工学会

SPE-GC システム試作機を展示（アジレント・テクノロジーブース）

2015 年 11 月 アジレント主催メタボロミクスセミナー

メタボローム分析用固相誘導体化法の紹介と展示

2016 年 7 月 アジレント主催メタボロミクスセミナー

メタボローム分析用固相誘導体化法の紹介と展示

2016 年 11 月 久留米科学機器セミナー

メタボローム分析用固相誘導体化法の講演と展示

2017 年 3 月 アジレント GCMS ユーザーズセミナー（東京・大阪）

メタボローム分析用固相誘導体化法の技術講演

3-2 研究開発後の課題

- ・ 本事業の期間中に達成できなかった糖類を含めたオンラインシステムの開発を早期に達成する。
- ・ 血清や血漿以外のサンプル、例えば尿、唾液、呼気等または農作物や加工食品等にも挑戦していく。

3-3 事業化展開

（１）想定している具体的なユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果

血清中メタボローム分析用自動前処理誘導体化溶出注入装置においては、バイオ関連会社、大学医学部、大手病院を想定しており、市場が 400 機関と推定され、その 40%への導入を目指す。

また、自動前処理誘導体化溶出注入装置に使用する主たる消耗品である固相カートリッジ 1 台につき、50 検体/日 程度使用されるものと推定される。

（２）事業化見込み（目標となる時期・売上規模）

血清中メタボローム分析用自動前処理誘導体化溶出注入装置は、事業完了後より販売を開始し、販売開始 5 年後に 80 台・8 億円の売上を目指す。

また、固相カートリッジは販売開始 5 年後に 1.5 万箱（1 箱 100 個入り）・4 億円の売上を目指す。

【公開版】

製品等の名称		血清中メタボローム分析用自動前処理誘導体化溶出注入装置				
開発事業者		株式会社アイスティサイエンス				
想定するサンプル出荷先		バイオ関連会社、大学医学部、大手病院				
スケジュール	年 度	初年度	2年度	3年度	4年度	5年度
	サンプルの出荷					
	追加研究					
	設備投資					
	製品等の生産					
	製品等の販売					
売上見込	売上高（千円）	20,000	50,000	200,000	500,000	800,000
	販売数量（台）	2	5	20	50	80
	売上高の根拠	各都道府県の総合病院、大学の医学部の市場が 400 機関と推定され、その 40%への導入を目指す。定価 1,200 万円				

製品等の名称		固相カートリッジ				
開発事業者		株式会社アイスティサイエンス				
想定するサンプル出荷先		バイオ関連会社、大学医学部、大手病院				
スケジュール	年 度	初年度	2年度	3年度	4年度	5年度
	サンプルの出荷					
	追加研究					
	設備投資					
	製品等の生産					
	製品等の販売					
売上見込	売上高（千円）	2,419	13,305	49,593	158,457	376,185
	販売数量（千個）	10	54	206	660	1566
	売上高の根拠	固相カートリッジは血清中メタボローム分析用自動前処理誘導体化溶出注入装置 1 台につき、50 検体/日程使用されるものと推定される。定価 300 円/個				

（３）事業化に至るまでの遂行方法や今後のスケジュール

メタボローム解析研究のトップランナーである国立大学法人大阪大学、国立大学九州大学、国立大学法人神戸大学、宮崎県総合農業試験場と共に、「血清中メタボローム分析用自動前処理誘導体化溶出注入装置」を国内外の各種学会に発表していただくと共に各種展示会、セミナー（メタボロームシンポジウム、国際メタボローム学会、質量分析討論会、日本毒性学会、日本生物工学会など）へ積極的に参加し本システムを紹介していく。

また、各分析機器メーカーの分析機器（GC-MS）と組み合わせた、前処理から測定・解析までを一元的に管理するトータルソリューション戦略を試みる予定である。