

令和2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

「超高感度計測を可能にするキャピラリー電気泳動  
ー質量分析用インターフェイスの開発」

研究開発成果等報告書

令和3年5月

担当局 東北経済産業局  
補助事業者 公益財団法人庄内地域産業振興センター

## 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・・・P3
- 1-2 研究体制・・・P3
- 1-3 成果概要・・・P4-P6
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口・・・P6

### 第2章本論

- 【1. 現行ソースレスインターフェイスを用いた再現性確保と測定条件の最適化】  
・・・P7-P8
- 【2. 大気圧条件下において市販化を目標としたインターフェイスの開発】  
・・・P9-P13

### 最終章全体総括

- 3-1 研究開発成果まとめ・・・P14
- 3-2 研究開発後の課題・・・P14
- 3-3 事業化展開について・・・P15

## 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

#### 【研究開発背景】

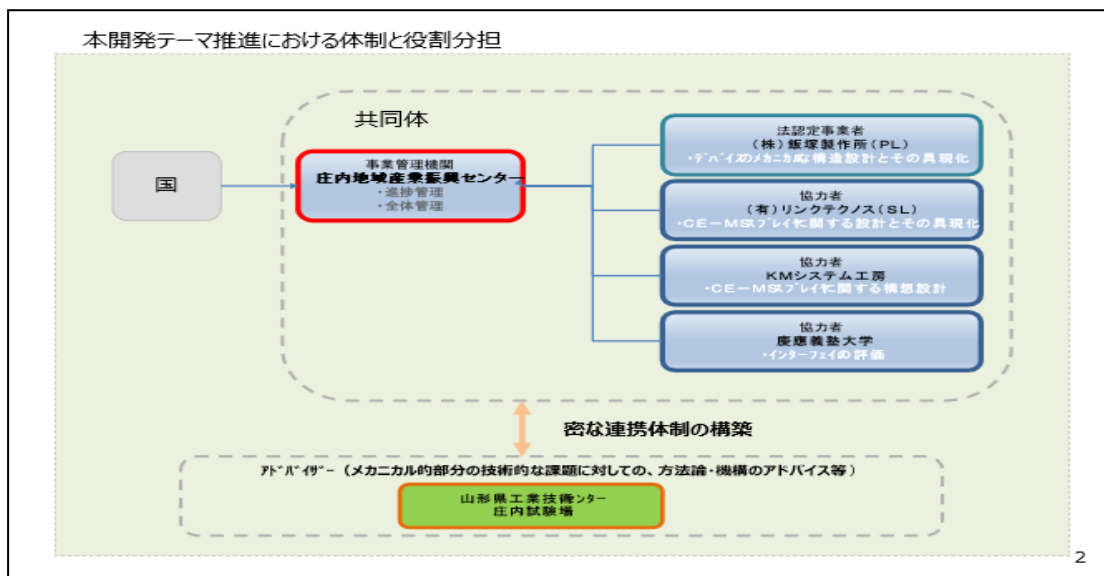
生体内代謝物を網羅的に計測するメタボローム解析では、これまでは測定をあきらめていた少量サンプルでも検出が可能となるような高感度計測技術への開発ニーズが高まっている。より少量のサンプル量で測定が可能になれば、サンプル採取時の患者負担などが低減され、より安全性の高いメタボローム解析が可能になると期待される。

#### 【研究目的及び目標】

本申請では、高感度計測を目的として、メタボローム解析技術の一つであるキャピラリー電気泳動-質量分析用の新規スプレーデバイスの開発を行う。慶應義塾大学で開発された新規測定法をベースに、スプレーの量産化およびデバイスの高機能化に対する技術開発を行い、最終的に従来法の100倍の高感度化を目指す。

### 1-2 研究体制

(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)



研究員 ①株式会社飯塚製作所

本間修 (PL)、佐藤正和、難波利成、川井航介、富樫寛、小泉香織

②有限会社リンクテクノス

庄司豊 (SL)、大滝均

③慶應義塾大学先端生命研

平山明由、高橋研一

④KMシステム工房

丸山光一

### 1-3 成果概要

#### 【1-1】 現行シーレススプレーヤーを搭載するためのデバイス設計

- スプレーヤーの位置調整に再現性を持たせた、手動 XYZ ステージ、及び微細な位置調整が可能な自動 XYZ ステージを組み込んだデバイスを開発した。

このデバイスを使用して、カチオン測定ではカバー無し構造が最適であるという結果を得ることができた。

アニオン測定はアシストガス方式を採用するための測定ユニットを開発し、安定した測定が可能になった。

#### 【1-2】 キャピラリー自動研磨機の製作

- ①キャピラリー自動研磨機を製作して、従来のハンドメイドによる製法よりも安定したキャピラリー研磨を実現した。

- ②この装置についての特許を出願した。(PCT 出願)

#### 【1-3-①】 スプレーヤー製作工程の標準化、治具開発

- ハンドワークで行っていた、スプレーヤー製作工程で使用する各種治具を製作した。

(A) キャピラリー接着、クラック処理治具

(B) 半透膜塗布装置

(C) キャピラリーカッター

これにより手作業で製作した時の不具合を解消し、作業の標準化が可能になった。

#### 【1-3-②】 測定方法の標準操作手順書 (SOP) の作成

スプレーヤーの量産を前提にキャピラリーへのクラック入れるプロセス、半透膜塗布プロセスを改良し、量産したスプレーヤーが安定して動作することをカチオン測定の 10 ロットの総イオン強度の相対標準偏差(RSD)が 3.9%で目標値の 15%以内に収まっていることを確認した。CE-MS 測定で高感度にピークを検出するために参照すべきパラメータとその調整方法の SOP を作成した。

#### 【2-1】 大気圧条件におけるシーレス CE-MS デバイスの高機能化

- 市販化に向けて、カメラによる撮像機能を搭載し、同一視野内にスプレー形状と MS 導入口を捉えることで、容易に微細な位置調整が可能になった。

- 画像処理による位置のオートフィードバック機能の構築が可能なることを確認したが、ズレ量を補正しても感度の飛躍的な上昇が無いことが分かったため、開発を中止した。

- アジレント社でスタートし、他社（サーモ社、サイエックス社）製の分析装置に対しても標準機と互換性のあるアタッチメントを開発した。
- アジレント社用とサーモ社用の評価機を各 1 台作製した。

#### 【2-2】 シースレス CE-MS スプレイヤーの製品化

- ①シースレス CE-MS スプレイヤーとして、低コストで組立が容易な、歩留まりの良いディスプレイザブルタイプのスプレイヤーを製品化した。
- ②くり返し使用可能な耐久性と安定性を確保した構造のスプレイヤーについては、組立分解を繰り返しても内部の電解液が漏れ出さない構造を実現した。

#### 【2-3】 シースレス CE-MS インターフェイスの性能評価

シースレス CE-MS 測定で安定に測定を行うために必要な条件を精査した。カチオン測定ではスプレー周辺が大気開放であることを実験的に明らかにし、従来のシースフロー(SF)CE-MS と比較して平均 13,100 倍の感度上昇を達成した。アニオン測定では従来放電を抑制するために利用していた微小流量のメタノールの添加手法を見直した。この手法を採用して従来の SFCE-MS と比較して 482 倍の感度向上を達成した。カチオン・アニオンとともに 50 回の連続測定を可能とした。一方、各標準試料の S/N の RSD はカチオンで 32%、アニオンで 35%であり、目標値の 20%を達成できていない。これはノイズの計算方法と洗浄に用いた溶媒が表面に残留している 2 つの問題が含まれていると考えられる。

#### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

所属：株式会社飯塚製作所

氏名：本間修

TEL：0234-33-5577 FAX：0235-64-4288

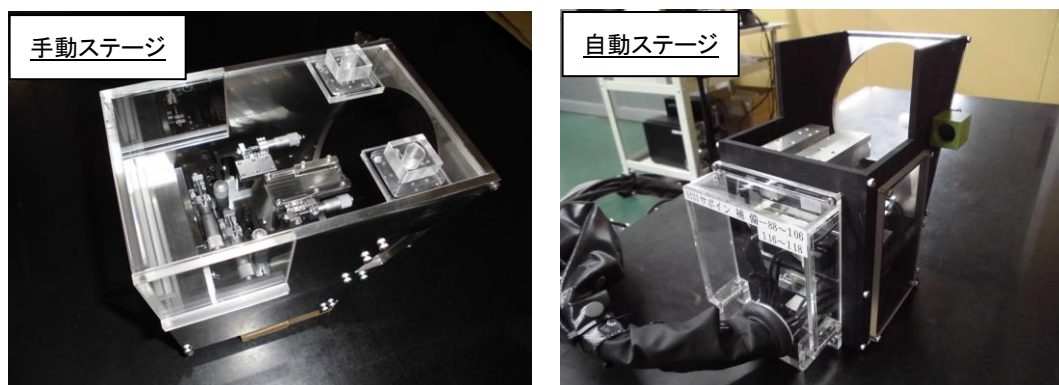
E-mail：osamu.h@izuka-i.co.jp

## 第2章 本論一（1）

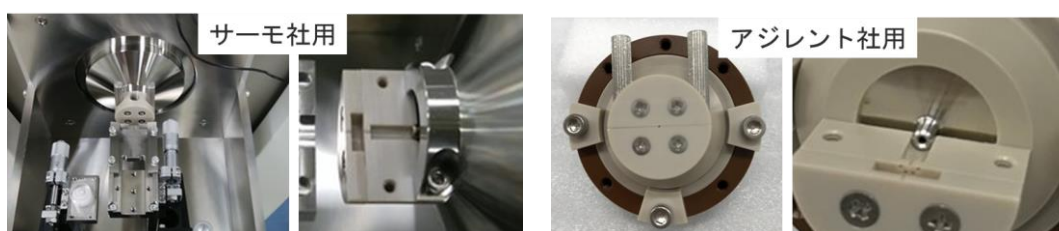
### 【1. 現行シーレスインターフェイスを用いた再現性確保と測定条件の最適化】

#### 【1-1】デバイス開発

- MS 導入口への X,Y,Z 方向の位置合せ精度向上の為、簡易的な手動ステージと微細な位置調整が可能な自動 XYZ ステージを組み込んだデバイスを開発した。



- その測定結果から Y,Z については、センター±0.5mmの範囲で安定領域があることが分かり、その条件で最適化した。
- X 軸については測定器の検出ピークを見ながら、印加電圧と合わせ調整することで、安定測定が可能となった。
- カチオン測定ではカバーが無い方が安定することが分かり、カバー無しの構造とした。
- アニオン測定はシー液（メタノールなど）をガス化して供給する必要があり、アシストガス方式を開発した。これにより安定した測定が可能になった。

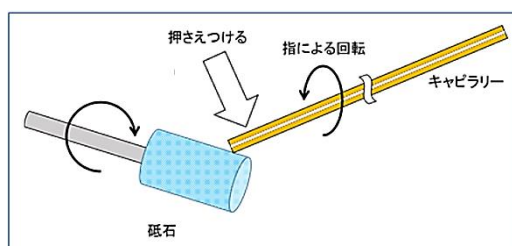


- Y,Z 軸の調整を無くすために MS 導入口に位置合せされたスプレーヤー先端搭載台を直付けする構造とした。（ステージ構成の簡易化が可能になる。）

#### 【1-2】キャピラリー自動研磨機の製作

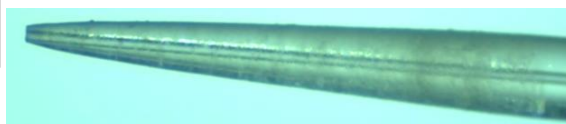
- ① 従来はハンドメイドによる製法であったが、キャピラリー自動研磨機を製作したことで、ハンドメイドと同等以上のキャピラリー自動研磨を安定して実施することができ、これにより

分析の安定性と高感度化が実現された。



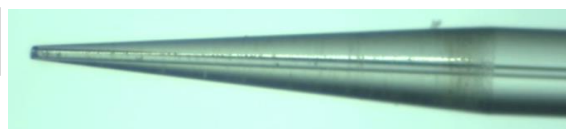
ハンドメイドによる研磨方法

先端径 70  $\mu\text{m}$



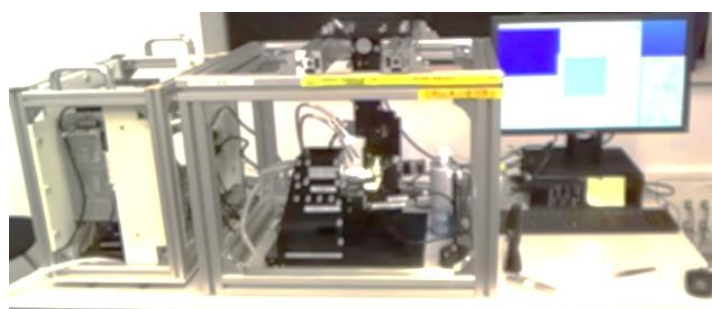
研磨見本：ハンドメイド品

先端径 55  $\mu\text{m}$



研磨見本：自動研磨機品

②キャピラリー自動研磨機は、マイクロメートルオーダーの精度で安定した研磨を可能とする機構や、非常に細いキャピラリーを容易に保持する構造などを持ち、短時間に効率の良い研磨が可能になった。



キャピラリー自動研磨機

③キャピラリー自動研磨機により研磨時間を安定的に短縮した。

○ハンドメイドによる研磨：10~60分/本（バラツキあり）

○キャピラリー自動研磨機：10分/本

④キャピラリー自動研磨機のユーザーインターフェイスは、プログラムにより研磨をほぼ自動化することで誰にでも使用できる装置とした。

#### 【1-3-①】ハンドワーク工程の治具化

・ハンドワークで行っていた、スプレイヤー製作工程で使用する各種治具を製作した。

##### (A) キャピラリー接着、クラック処理治具

固定板にキャピラリーを接着し、所定位置にクラックを入れる処理を 1 台の治具で容易に加工することが出来るようになった。

##### (B) 半透膜塗布装置

上記の方法でクラック処理をしたところに半透膜の溶液を塗布する際、位置、高さ、塗布範囲などが一定になるように治具化したことで、乾燥後の液漏れなどの発生を抑えることが出来た。

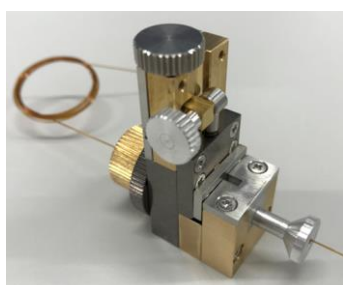
(A) キャピラリー接着、クラック処理治具      (B) 半透膜塗布装置



##### (C) キャピラリーカッター (C-1/C-2)

キャピラリー研磨工程の先端形状安定化のために、カット面にバリやカケが出ないカッターを作製した。

##### (C-1)



##### (C-2)





## 【1-3-②】測定方法の標準操作手順書（SOP）の作成

従来のスプレイヤー製造工程では半円状にカットした半透膜上にキャピラリーを瞬間接着剤で貼り付け、電位を確保するためのクラックを入れ、その上部から硬化時間が長く、柔軟性のある接着剤で封止する手法を採用していた。この手法では固体の半透膜と円筒型のキャピラリーに由来する隙間が生じ、封止時にデッドボリュームが生じることがスプレイヤーの機能を阻害して測定不安定性を招いていた。また、後者の接着剤は粘度が高く、塗布が難しい、硬化に半日の時間が必要であることが量産のボトルネックとなっていた。

これを踏まえ、クラックを入れる工程は新規に治具を作成することで再現性を担保、半透膜はキャスト製膜することでデッドボリュームを最小にする塗布手法を開発した。これにより硬化に長時間を有する接着材の使用が不要となり、接着剤の硬化に要する時間を大きく削減した。

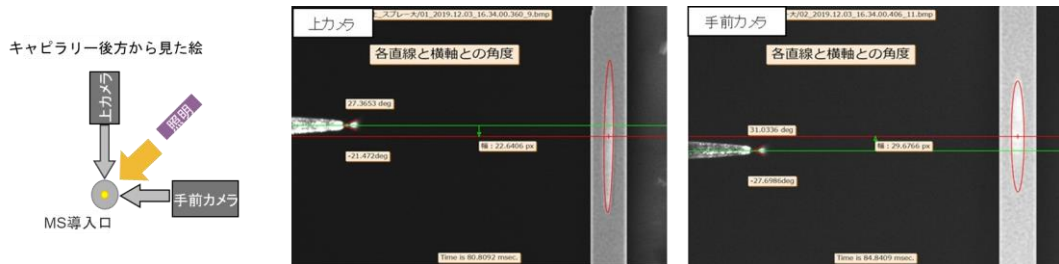
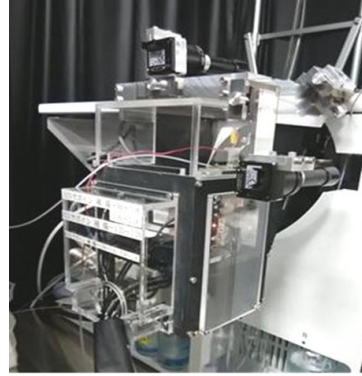
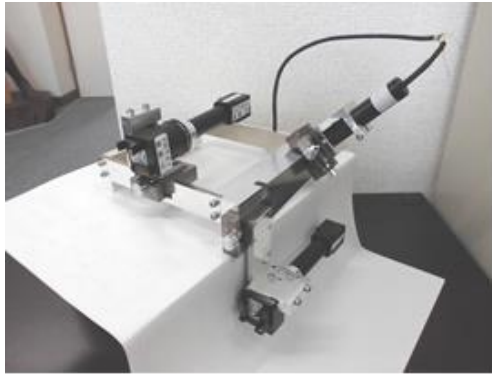
スプレイヤーの基材となるプラスチック部分はすべてインジェクション成型によるアクリルとし、溶剤系の接着剤による接着とすることで硬化に要する時間を大きく短縮できた。

製造したスプレイヤーが正常に稼働し、適切なスプレー噴霧能力を有するかを確認するため、CE-MS(アジレント社 CE, サーモ社 MS)で総イオン強度を測定しそのバラツキの評価を行った。各ロットの測定データから分析成分が含まれない2-4分の区間での総イオン強度の平均値を求め、10ロット分のデータ間の相対標準偏差(RSD)を求めた。目標値の15%に対して、3.9%のRSDを得ることができ、スプレーが安定して噴霧できるスプレイヤーの製作ができていることを確認した。

## 【2. 大気圧条件下において市販化を目標としたインターフェイスの開発】

### 【2-1-①】カメラ撮像機能開発

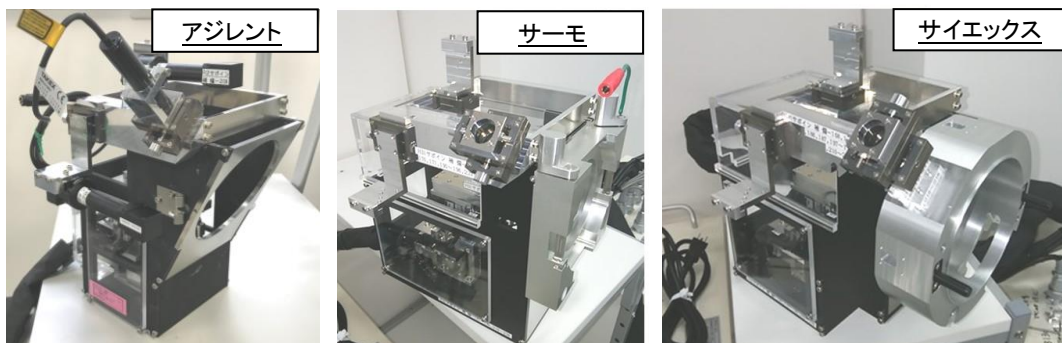
- ・超高画質 CMOS センサ搭載ビジョンカメラとグリーンレーザー照明の組合せで、イオン化する直前の噴霧状態を画像でとらえることが可能になった。
- ・ターゲットまでの距離をカメラの焦点深度に合わせて取付治具を設計することでピント調整が不要になった。
- ・レーザー照射位置を2台の直行したカメラに対して各々45°の角度で設置し、上面・前面の2画面を1台の照明で撮像することができた。
- ・レーザー照明の取付治具改善、及び位置を微調整できる小型ステージの開発により、スプレーの撮像が容易になった。



- 部分的な2値化処理により MS 導入口とスプレー形状 両方の画像を取り込むことで、画像処理による位置のオートフィードバック機能の構築が可能なることを確認したが、ズレ量を補正しても感度の飛躍的な上昇が無いことが分かったため、開発を中止した。

【2-1-2】 他社装置への展開、取付部アタッチメント製作

- デバイスの取付治具について、メーカー標準との互換性を高め容易に交換することが可能になった。
- 慶應所有装置（アジレント、サーモ、サイエックス）での評価用として、自動ステージ仕様のデバイスを各1台製作した。

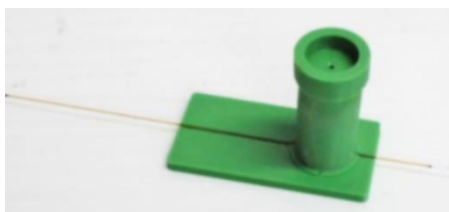


- アジレント社用とサーモ社用の評価機を各1台製作した。

【2-2-2】 シースレスCE-MS スプレヤーの製品化

- ① シースレスCE-MS スプレヤーの形状検討にあたり、3Dプリンターによるサンプル試作

を行うことで最適な形状を確立した。



試作サンプル

②製品化にあたっては射出成型により安価に安定した構成を確立した。

○製品化したスプレイヤーは、射出成型による部品と加工パイプ等による構成でこれまでより部品コストを約 1/4 に圧縮し、組立が容易であることから製造時間の短縮も可能で、歩留まりや安定性も改善した。



組立後の使用状態

③スプレイヤーの信頼性を評価

○接着部の剥離強度試験により必要な強度を確保していることを確認した。

○高温環境下(90℃・72時間)での寸法安定性と、液漏れが無いことを確認した。

④くり返し使用可能な構造のスプレイヤーについては、100回の組立と分解を繰り返しても内部の電解液が漏れ出さないことを確認した。

### 【2-3】シースレス CE-MS インターフェイスの性能評価

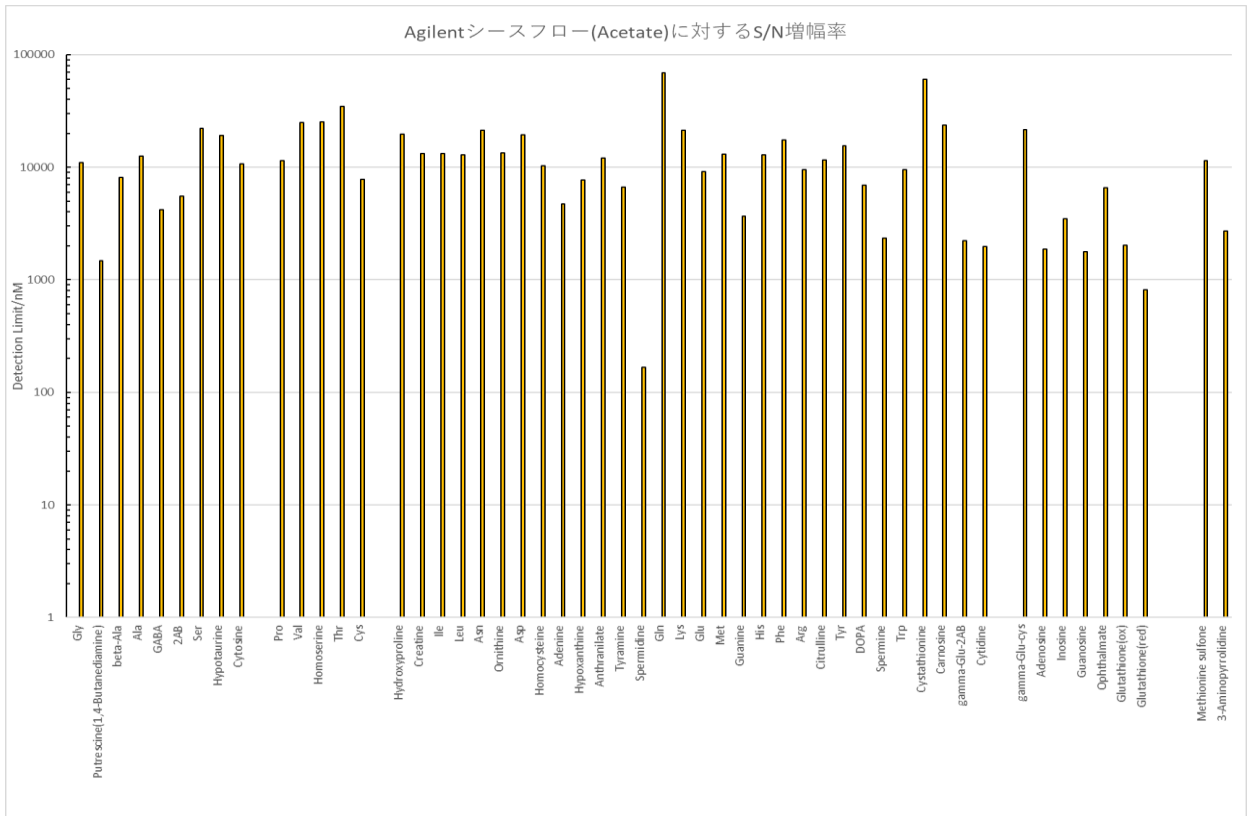
手動ステージ・電動ステージともにシースレス測定に必要な位置調整機構を有し、ピーク検出が可能であること、カメラによるスプレー撮像が可能なことを、MSに取り付けて確認した。

カチオン測定では外気由来のバックグラウンドノイズを低減すべく風防の取り付けを行い、内部に清浄な気体を導入することで感度の向上を試みた。キャピラリー先端とMSの入り口が大気開放状態で

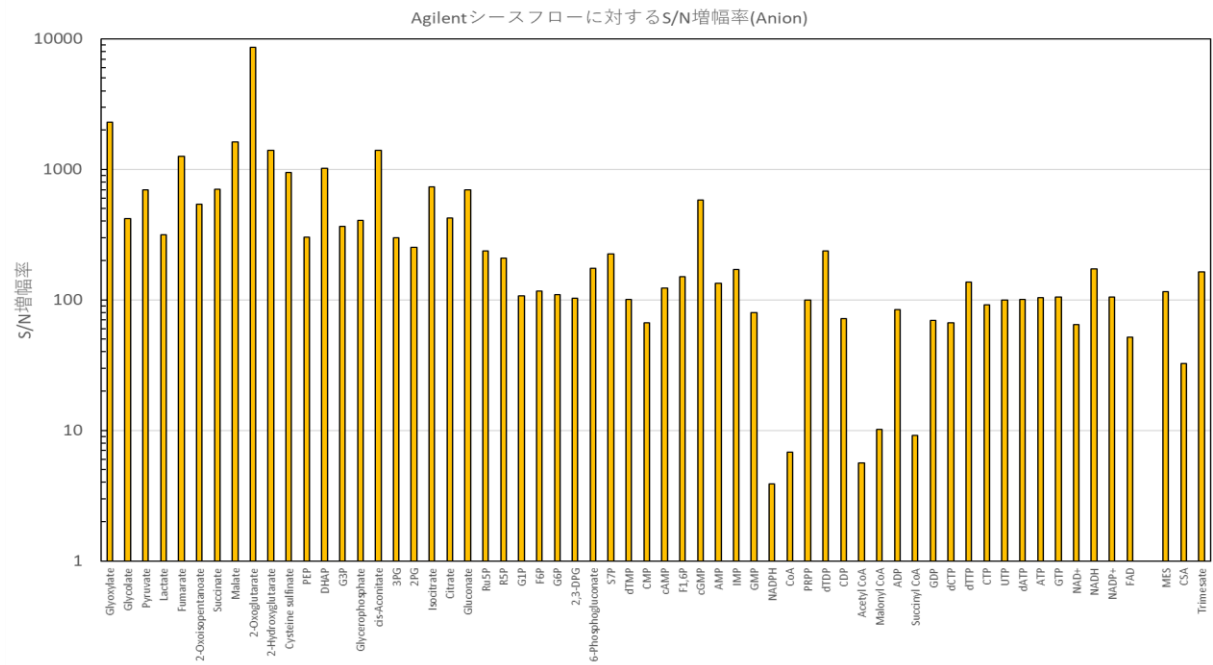
あることがスプレーの安定性を保つうえで重要であることを実験的に突き止めた。従来、アニオン測定では、スプレイヤーのキャピラリー先端にもう一本のシース供与用キャピラリーを接触させ、微量のシースを供与することでアニオン測定の問題である放電を抑えていた。これを踏襲して測定用治具を作成、スプレイヤーが安定して噴霧できる条件を探したが、1  $\mu$ m 単位での位置調整、2本のキャピラリー、MS 取り込み口の 3つの物体間での相対位置の調整を、カメラでの撮像によるスプレー噴霧状態の確認を行ってもなお測定が可能な状態に持ち込むことが難しく、ユーザーが実際に操作を行う上での課題となった。

そこで、新規にシースとなるメタノールを気体として送り込むことでアニオン測定を可能とするユニットの新規開発を行った。この手法では窒素ガスに所定のメタノール蒸気を混合し、キャピラリー先端と MS 導入部を覆うチャンバーに混合ガスを送り込む。測定前の機材の事前洗浄、ガス混合システムの改良、MS パラメータの最適化によってアニオン測定を可能とした。アジレント社 CE とサーモ社 MS を接続し、CE-MS としてカチオン、アニオンの S/N 増幅率を求めた。

カチオン測定では従来のシースフロー(SF)CE-MS と比較して平均 13,100 倍の感度上昇を達成した。アニオン測定では 482 倍の感度向上を達成した。また、カチオン・アニオンとともに単一のスプレーでの 50 回連続測定を可能とした。一方、各標準試料の S/N の RSD はカチオンで 32%、アニオンで 35%であり、目標値の 20%を達成できていない。カチオンでは解析時ノイズが低すぎて RMS の変動が大きいためと考えられる。一方、アニオンでは時間経過で減少するピークが見られ、これが部品洗浄の際に部品表面に吸着した残留溶媒に由来すると考えられ、事前にオープンで入念に乾燥させることで再現性の向上が見込まれる。



カチオン測定における標準サンプルごとの従来型シースフロー-CE-MS からの S/N 増幅率



アニオン測定における標準サンプルごとの従来型シースフロー-CE-MS からの S/N 増幅率

## 最終章 全体総括

### 3-1 研究開発成果まとめ

本研究開発では、生体内代謝物を網羅的に測定する技術の一つである、キャピラリー電気泳動-質量分析用のスプレーデバイスの開発を行い、従来法の100倍の高感度化を達成することを目標とした。3年間の研究開発により、以下の成果が得られた。

#### 【1. 現行シースレスインターフェイスを用いた再現性確保と測定条件の最適化】

- ✓ 手動、および自動XYZステージを搭載したデバイスを新規開発した。
- ✓ マイクロメートルオーダーの精度で安定した研磨を可能にするキャピラリー自動研磨機を開発した。
- ✓ スプレイヤー製作用の治具（キャピラリー接着・クラック処理治具、半透膜塗布装置、キャピラリーカッター）を開発した。

#### 【2. 大気圧条件下において市販化を目標としたインターフェイスの開発】

- ✓ スプレーの噴霧状態を確認し、最適な位置決めが可能なカメラ撮像機能を開発した。
- ✓ 各社の質量分析計に接続するためのアタッチメントを開発した。
- ✓ 射出成型によるスプレイヤーの新規製作方法を確立した。

最終的に、カチオン（陽イオン）測定においては従来法の約13,100倍の高感度化、アニオン（陰イオン）測定においては約482倍の高感度化を達成した。

### 3-2 研究開発後の課題

高感度化に関しては当初目標を大きくクリアしたが、再現性に関しては、50回の連続測定におけるRSD（相対標準偏差）がカチオンで約32%、アニオンで約35%であり目標値であった20%を達成することができなかった。今後の市販化を目指す上では到達必須項目であるため、継続して研究開発を行い再現性の向上を目指していく。

### 3-3 事業化展開について

本研究成果を受けて、装置の販売を行う新会社を令和3年中に設立する予定である。新会社では、本研究開発で未達であった再現性の向上に関する研究開発を継続するとともに、展示会等を利用して顧客の開拓を行っていく。最初はメタボローム（生体内代謝物）の測定をすでに実施している大学や企業を中心に活動を行うが、その他の分野についても順次拡大していく予定である。