

フィールド・フロー・フラクショネーション (FFF)

Eclipse™

タンパク質・高分子・ナノ粒子の分離システム

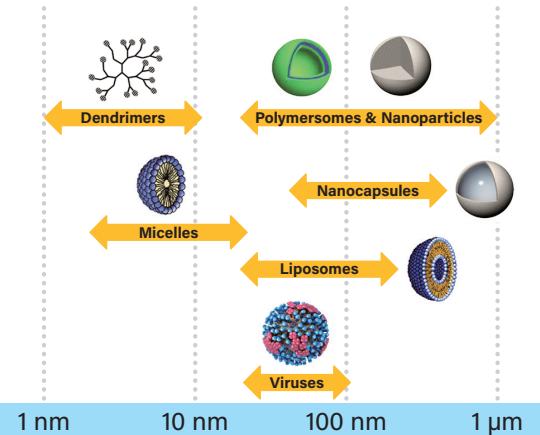


FFF-MALS 法による 絶対分子量・サイズ測定で特性解析

フィールド・フロー・フラクショネーション (FFF) は、高分子やナノ粒子をサイズ分離する手法です。単一の分離チャネル内の流量を変更するだけで 1 ~ 1,000 nm までの範囲全体にわたる高分子、微粒子、エマルジョンなどを優れた分解能で分離が可能です。

FFF システム Eclipse と多角度光散乱検出器 DAWN™、示差屈折率検出器 Optilab™、UV/Vis 検出器等を組み合わせることで、試料の分子量 *、濃度、形態、組成などを明らかにすることができます。

(* 溶解している高分子のみに適応します)



FFF-MALS の分離&分析対象物

- 遺伝子ベクター、ウィルス、DDS ナノ粒子
- ナノプラスチック、金属ナノ粒子、無機微粒子
- タンパク質とその会合・凝集体
- 高分子

オンライン分析に加えて、分画したサンプルを回収することで、他の分析機器を使った解析も可能です。



先進的な技術

Eclipse は、感度、再現性、機能性、操作性において、従来の装置よりも大幅に進歩し、4 つの新機能が追加された最先端の FFF システムです。

- 希釈コントロールモジュール (DCM) : 試料の濃度を最大で 10 倍まで濃縮することで、感度と分画量の両方を向上させます。
- Mobility : 電場式非対称フロー FFF (EAF4) 法を用いることで、それぞれのサイズ成分に対応するゼータ電位を測定することができます。
- 分離チャネルデザインの向上 : 温調機能が追加され、回収率、安定性、圧力安定性に優れます。
- システムヘルスインジケーター : タッチパネルスクリーン上でシステムの状態を確認できます。

Eclipse は、業界をリードする Waters Arc™ HPLC と連携することで、研究・開発・品質管理のあらゆる分野のニーズに応える、堅牢な FFF-MALS システムが実現します。

Eclipse の特長

優れた信頼性と操作性、高機能



業界をリードする
Waters Arc HPLC で
システム制御する
ことにより
安定した送液を実現

システムヘルス
インジケーターと
トラブルシューティング
ガイダンスにより
安定した運転を
サポート

水系緩衝液、
有機溶媒に対応

SEC スイッチング
(オプション) により、
同一システムで
FFF-MALS と
SEC-MALS の
双方の測定に対応

溶媒マネジメント
機能による
溶媒のリサイクル
により、
溶媒使用量を削減

全ての流路の
流量を
リアルタイム測定し、
優れた精度と
再現性を実現

見やすいインターフェース

システム状態を反映するフロントパネルは、Smart Services™ の入口です。

分離チャネルの状態

分離チャネルの状態はグラフィックで表記され、各流路の状態を視覚的に、直感的に確認することができます。また、ストリップチャートグラフは、システムパラメーターがどのように変化したかと設定値とのずれも表記します。

システム準備モニター

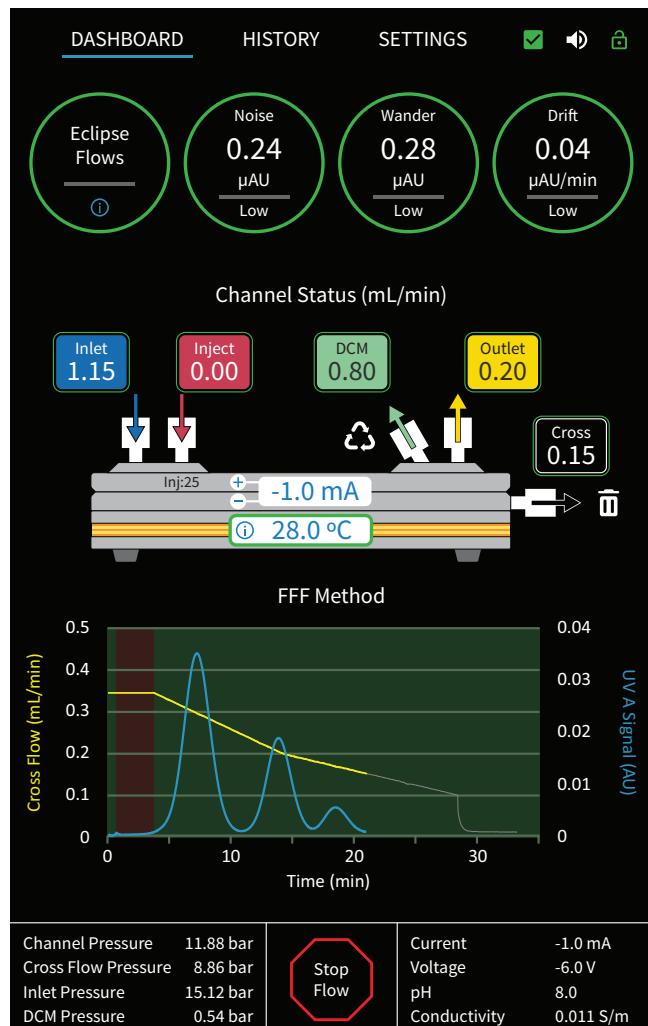
システムの平衡化が不十分であったり、異常が発生した場合でも、測定が無駄になることはありません。システム準備モニターがすべてのパラメーターを常に監視し、最適な状態かどうかをチェックしています。問題が発生した場合には警告を発し、システムを正常な状態に戻すために必要な対処方法をわかりやすく案内します。

リアルタイムヘルスインジケーター

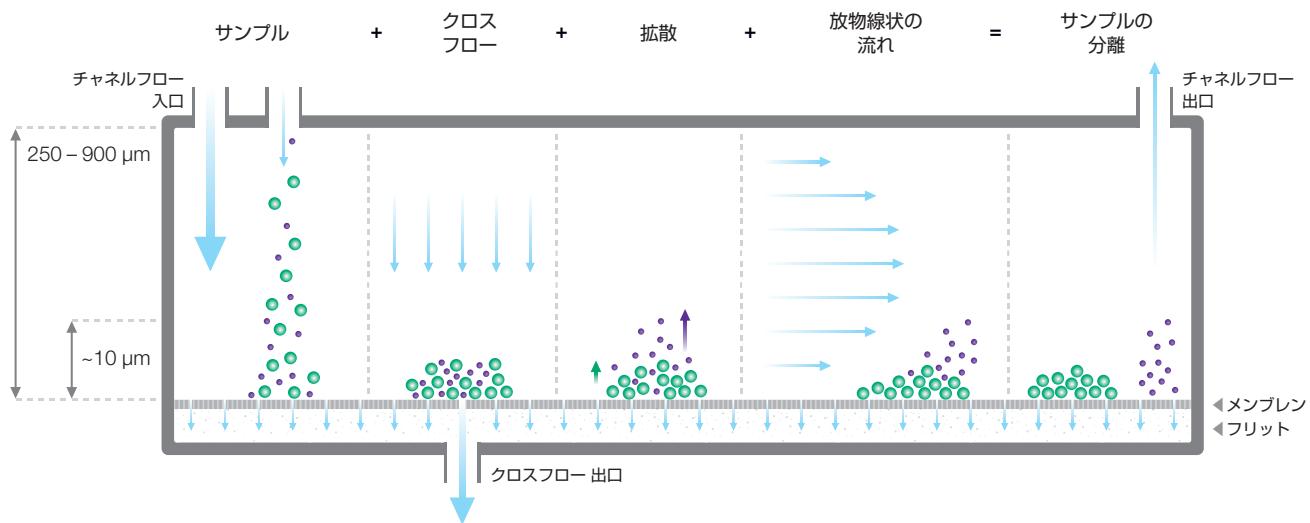
システム準備モニターでは、システム全体の状態を確認できますが、さらに詳しい情報はリアルタイムヘルスインジケーターで確認できます。問題が発生した場合には、何が起きているのかを表示するだけでなく、具体的な解決方法も案内されます。

コレクションモード

測定中は、進行状況バーや残り時間など、現在の測定の進み具合や実験全体の状況がディスプレイに表示され、必要な情報をひと目で確認できます。



FFF 法の分離機構



分離チャネルの状態はグラフィック表記され、各流路の現在の状態を直感的に確認することができます。また、ストリップチャートグラフは、システムパラメータがどのように変化したかと設定値とのずれも表記します。

- チャネルフロー：メンブレンに平行で長辺方向の流れ
- クロスフロー：ナノ孔メンブレンを透過する垂直方向の流れ

クロスフローは、試料を底壁に押し付ける力場として機能しますが、試料の拡散力は、それに対し反力を示し、試料をチャネルの中央に向かって分散させます。これらの力のバランスにより、メンブレン上に、粒子の拡散係数（つまり流体力学的な大きさ）のみに依存する指数関数的な濃度プロファイルが生み出されます。

チャネルフローは、層流であり、チャネルの中央部が早く、壁面が遅い、放物型微分速度プロファイルを発生させます。従ってメンブレンより、より上部にある小さな粒子が先に溶出し、追って低い位置にある大きな成分が溶出します。

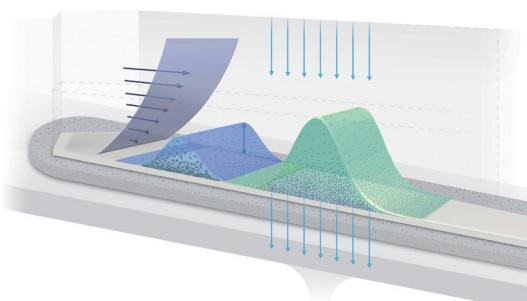
Eclipse は、フォーカスゾーンモードとチップインジェクションモードの 2 種の注入手法を実装しています。前者は、AF4 分離に最適なモードで、後者は、SEC モードで必要になります。

メソッドの最適化

FFF 法における試料の保持時間 t_R は、物理学上、以下の式の通り、試料の拡散係数 D_t 、チャネルの高さ w 、およびチャネルフローとクロスフローの比率 F_x/F_{ch} にのみ関連しています。

$$t_R = \frac{w^2}{6D_t} \ln \left(1 + \frac{F_x}{F_{ch}} \right)$$

その為、分離メソッドの検討において、クロスフローを調整するだけで、分離を最適化できます。クロスフロープログラムは、直線形および指数勾配に対応します。



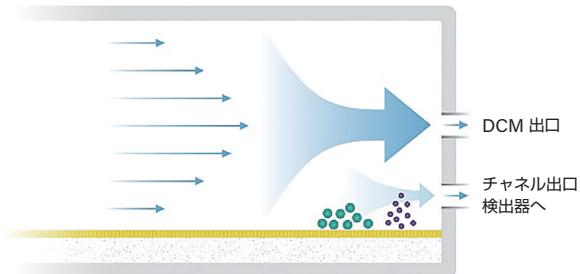
FFF による分離は、固定相が無く、表面積が非常に少ないため、試料をせん断することがなく、かつ SEC 分離に比べ、相互作用も少なくなります。

機能アップ可能なオプション

新しいレベルのパフォーマンスを追加します。

希釈制御モジュール (DCM)

希釈制御モジュール (DCM) は、試料を含まない上壁付近のチャネルフローの一部を厳密に調整された方法で分割することにより、分離チャネルから溶出する試料の濃度を標準 FFF の最大 10 倍まで上げることができます。最大 5 倍までは、分解能を保つことができます。

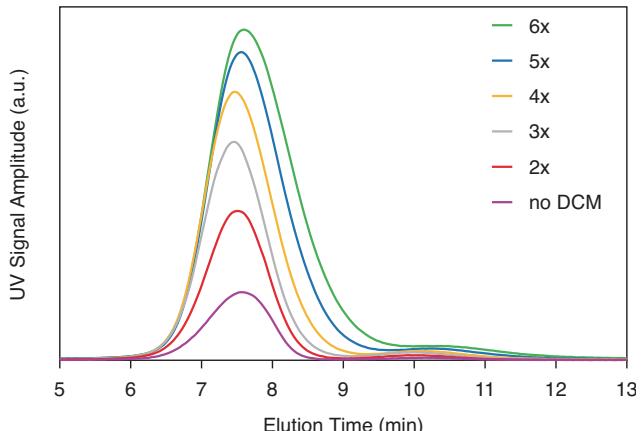


DCM の特長

- 低濃度試料の高感度検出が可能
- 分取試料の濃縮が可能
- 動的光散乱検出の測定精度が向上
- 検出器の流速を制御することにより、溶出時間の再現性が向上

DCM は、試料の損失や分解能を落とすことなく、試料が含まれない溶媒を除去することにより、検出器での試料濃度を高めます。

上のデータは、ウシ血清アルブミン (BSA) を DCM 機能を用いて分離し、UV 検出したものの重ね書きです。スプリット比の増加に比例して、ピークが大きくなっています。



同一のシステムで、配管等を交換する必要なく、FFF-MALS と SEC-MALS 測定の双方を実行できます。



FFF 分離チャネル

使いやすさと性能を向上させたデザイン

全てのアプリケーションに適した 分離チャネル

Eclipse は、様々な試料負荷量と分離要件に対応する数種の FFF 分離チャネルを用意しています。ショートチャネルは、殆どのアプリケーションに適しています。ロングチャネルは、大きな粒子または、高分子の分離を低クロスフローで行うことができ、メンブレンとの相互作用を最小限に抑えることができます。セミ分取チャネルは、mg 範囲までの試料負荷量を可能にします。

凝集しやすい試料の場合、フォーカス作業を伴う分離手法が適さないことがあります。そのような試料には、フォーカス作業の必要が無いディスパージョンインレットチャネルが最適です。

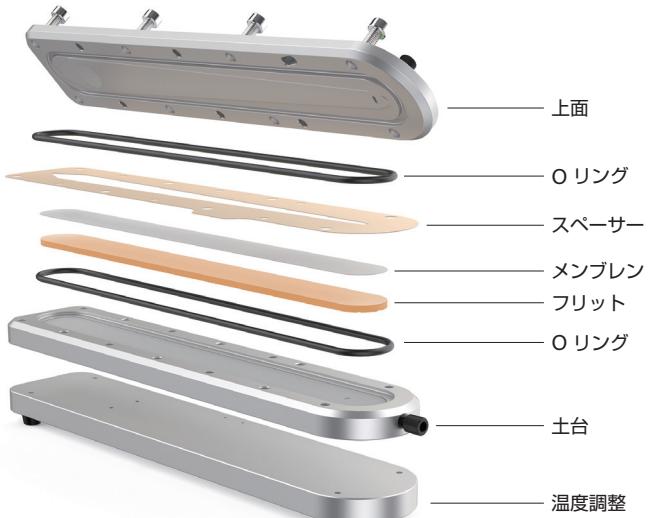
優れた性能を継続

分離チャネルは、材質に SUS316 を使用し、測定実行中または、その間に、湾曲やズレたりすることの無いよう剛性を実現するよう設計されています。このことが、全てのタイプの溶媒との互換性を維持しながら、前例のない信頼性と検出器の信号の品質の向上に繋がります。

更に、新しいチャネルスペーサーは、微視的な漏れの無い最適なシーリングを保証し、最大の試料回収率を提供します。

Mobility チャネルを含む、全てのチャネルは、DCM に対応します。

ロングチャネルの分解図



優れた再現性

再現性の高い保持時間を維持するには、分離チャネルの剛性に加えて、安定した温度制御も重要です。全ての Eclipse チャネルには、温調機能が付属しており、周囲温度から最大 50°C までチャネル内部の温調が可能です。この機能は、特に実験室内の温度が変動しやすい夜間にどのように実験を行う際に有用です。



左から、ショート、ロング、ディスパージョンインレット、セミ分取、電場式 FFF 用分離チャネル

Mobility

EAF4 法での粒子径と電荷による分離を実現します。



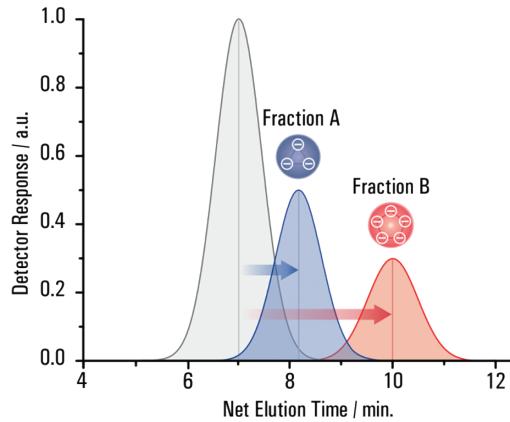
Mobility は、Eclipse システムと組み合わせ、内部に電極を追加した特殊な FFF 分離チャネルを使用することで、電場式非対称フロー FFF (EAF4) を実現させます。EAF4 は、ナノ粒子や高分子の大きさだけではなく、電気移動度も決定します。異種試料の場合、EAF4 は、各試料のゼータ電位も測定できます。

EAF4 の利点

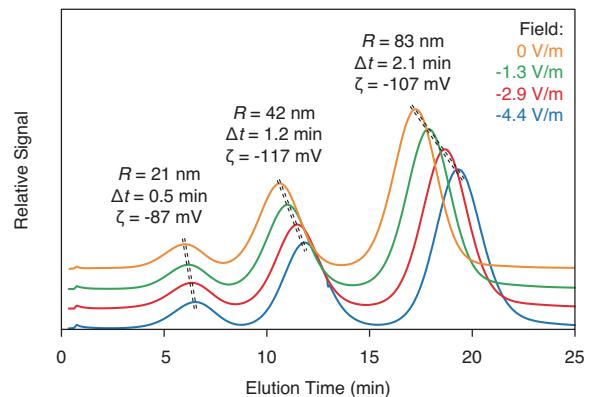
電荷は、タンパク質やオリゴヌクレオチドだけでなく、ナノ粒子においても重要な特性で、コロイドの安定性や相互作用に深く関係します。故にナノ医療の有効性や安全性の研究において、重要なパラメーターになります。EAF4 は、各成分の大きさ、電荷、もしくはその双方によって区別されるかは関係なく、複雑な試料内の各成分の大きさと電荷の両方を同時に決定できる手法です。

Mobility でできること

- 試料中の全ての成分が同じ化学表面であるか否かの確認
- 薬物と核酸デリバリー用ナノ粒子の N/P 比の評価
- バイオ医薬品の化学的もしくは物理的劣化の評価

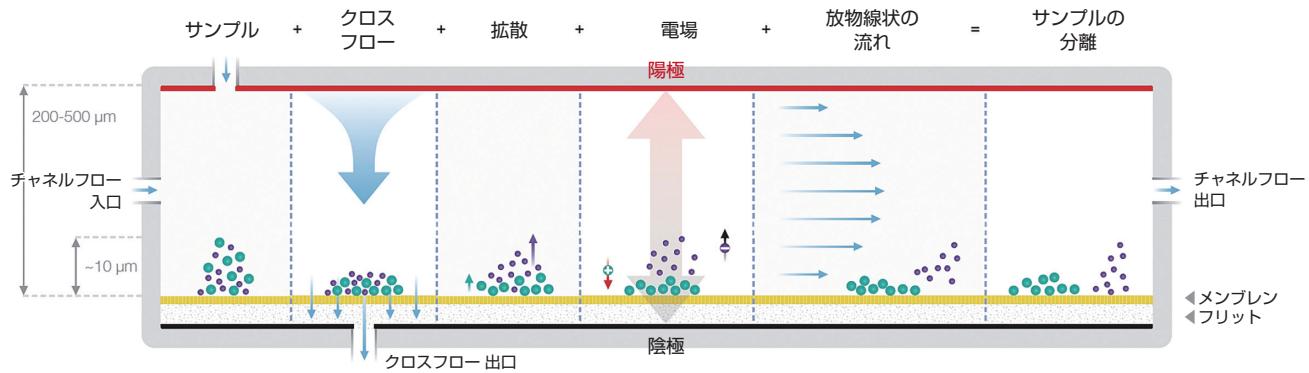


Mobility を用いることにより、同じ大きさの粒子でも、電荷の違いで分離することができます。



電場による溶出時間のズレから各ピークの電気移動度とゼータ電位を決定することができます。ここでは、3 種のポリスチレンラテックス粒子の混合試料を EAF4 で測定した結果を示しています。各粒子の粒子径とゼータ電位の双方を決定できます。

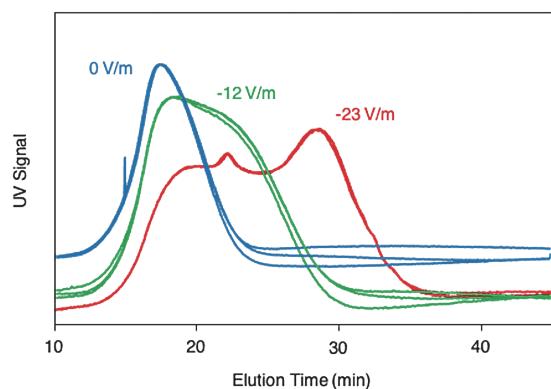
EAF4 の分離機構



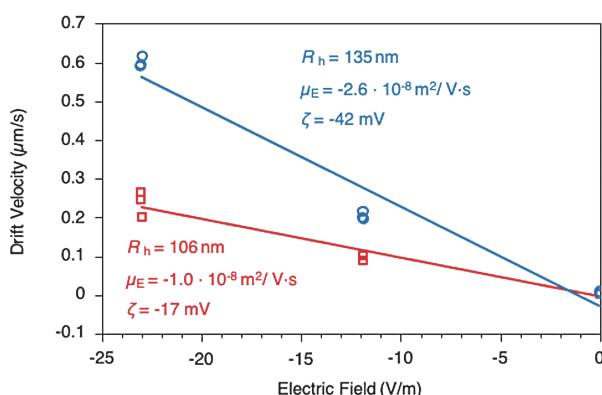
EAF4 では、クロスフローと平行の電場が印加され、試料は、その電荷に比例した力を受けます。試料の極性に応じて、その力は上方もしくは下方に向けられ、メンブレン上の平衡化の高さが変わります。これに対応し、その保持時間は、電場を掛けない AF4 からズレを生じます。

電場を掛けない場合の保持時間から流体力学径を計算できますが、印加した電場に対する保持時間のシフトの大きさから、電気泳動移動度とゼータ電位を導き出せます。この分析は、フラクトグラム内の各ピークに対して行えます。

リポソームの測定



リポソームを 0、-12、-23 V/m の電場を掛けて測定した際のフラクトグラムです。電場を掛けない AF4 のみの分離では、単一成分のように見えますが、負の電場を掛けることでショルダーピークとなり、更に負の電場を強めることで、ゼータ電位の異なる 2 成分が混在していることが明らかになりました。



VISION DESIGN™ は、左図のデータから、各成分の粒子径、電気移動度、正味電荷、ゼータ電位を計算することができます。この測定により、ゼータ電位で約 2.5 倍異なる成分があることが明らかになりました。

インターフェースソフトウェア VISION™ と 解析ソフトウェア ASTRA™

VISION

VISION は、Eclipse と多角度光散乱検出器 DAWN で構成された FFF-MALS システムのインターフェースソフトウェアで、システム制御から、分析メソッドの作成、最適化、実行、記録に至るまでを行います。

VISION DESIGN、VISION RUN™ の 2 つのモジュールで構成されます。

VISION DESIGN :



FFF 分離条件の最適化のために、物理的な FFF の分離理論とコンピュータの演算から、分離シミュレーションを実行します。また、AF4 と EAF4 の測定値から拡散係数とゼータ電位も計算できます。

VISION RUN :



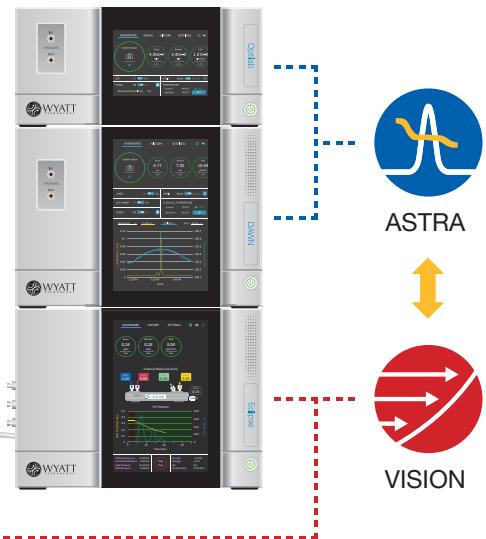
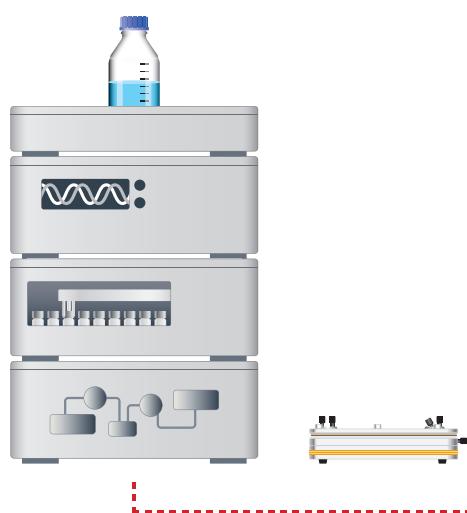
FFF メソッドを実行するための包括的なソフトウェアです。ポンプ、オートサンプラー、Eclipse、検出器、ASTRA をシームレスに動かします。また VISION DESIGN での診断と分析のために、FFF、電気、UV 信号を記録します。

ASTRA



ASTRA は、MALS、DLS、RI、UV 検出器の信号を収集し、解析を行えます。絶対分子量、粒子径の決定の他、以下の情報を提供します。

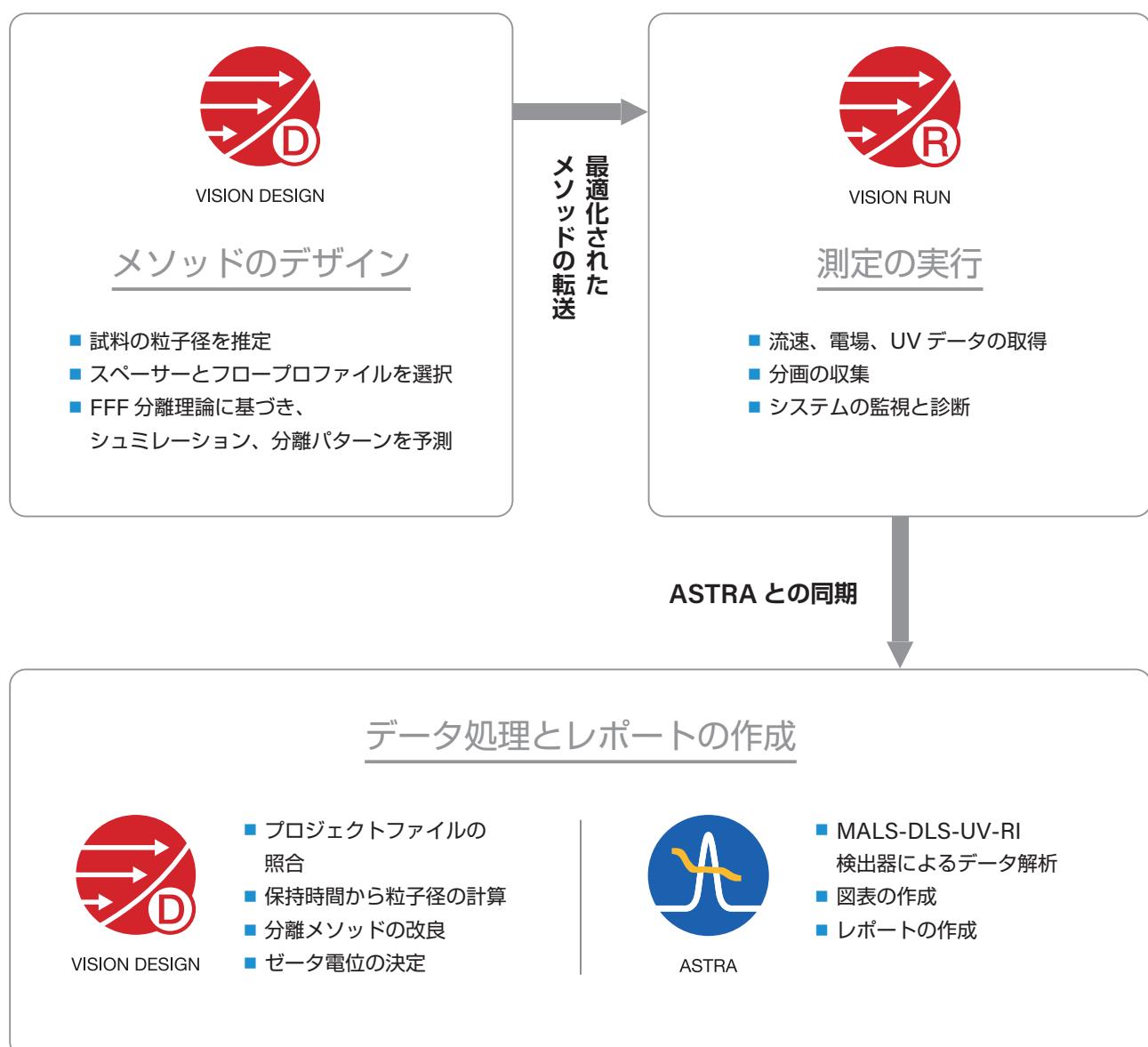
- 粒子濃度の計算と粒子形状もしくは構造の評価
- 高分子のコンフォメーション、分岐度の決定
- ウイルスベクターの核酸含有量もしくは PEG 化タンパク質の PEG 含有量の評価
- 複数試料の測定結果のグラフ化と平均値、標準偏差を計算し表形式の結果表示することが可能



統合ワークフロー

メソッド開発からデータの解析まで

VISION は、試料を測定する前に、FFF のフロープログラムをコンピュータで開発及び最適化することから始まり、試料のシーケンスを実行、データ処理、分離条件の改良、レポートの作成、データの統合に至るまで、幾つかの簡単なステップで、シームレスなワークフローを提供します。





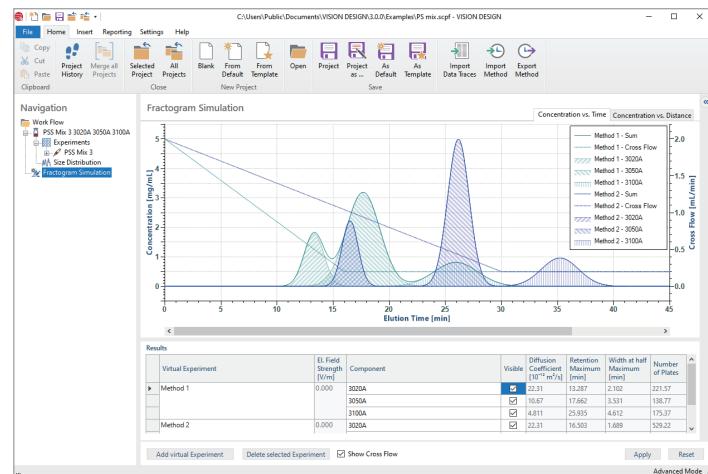
FFF 分離条件の作成

VISION DESIGN

PC 内でのシミュレーション機能

VISION DESIGN を使用することにより、FFF の分離条件検討に、膨大な時間を費やす必要はなくなります。試料の推定粒子径をリスト化し、FFF 分離チャネル、メンブレン、スペーサーの種類を選択し、クロスフローグラジエントを設定するだけです。VISION DESIGN は、FFF の基本理論に基づいて保持時間を計算し、予想されるフラクトグラムを表示します。

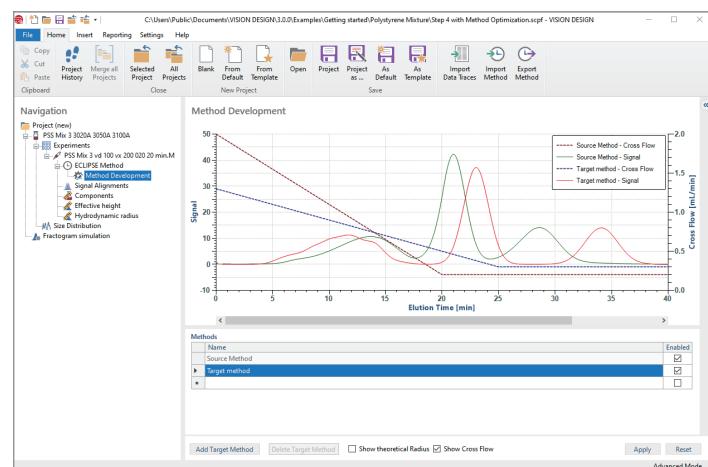
様々なクロスフローの流速と時間の影響を調べて分解能を向上させ、最適な分離条件を見つけるのに数分しか掛かりません。全て、デスクワークで実行できます。



分析条件の改良

最終的に決定した測定条件は、クリックするだけで、VISION RUN に転送され、実行できます。

最初に設定が実試料に適さなかった場合、測定結果を VISION DESIGN にフィードバックし、測定条件を改良することができます。通常、1回のテスト測定で最適化に十分な情報を得ることができます。





FFF データ解析

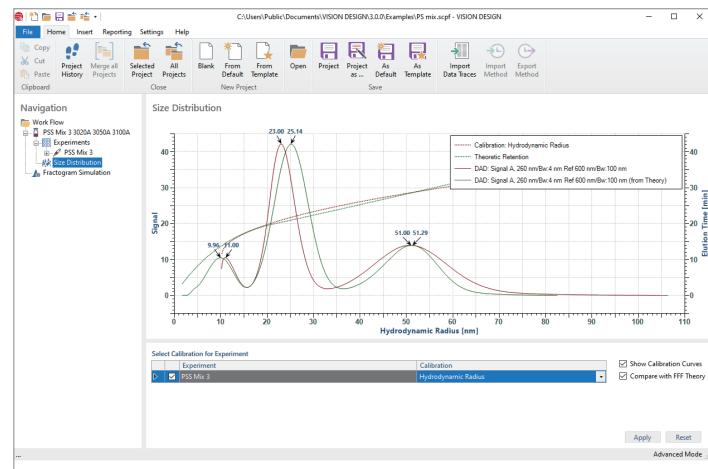
VISION RUN

粒子径分布

VISION DESIGN は、VISION RUN で取り込んだフラクトグラムを読み込み、試料の保持時間と、FFF の分離理論に基づいた計算もしくは、標準粒子を用いて作成した較正曲線から、試料の流体力学的半径を求ることができます。

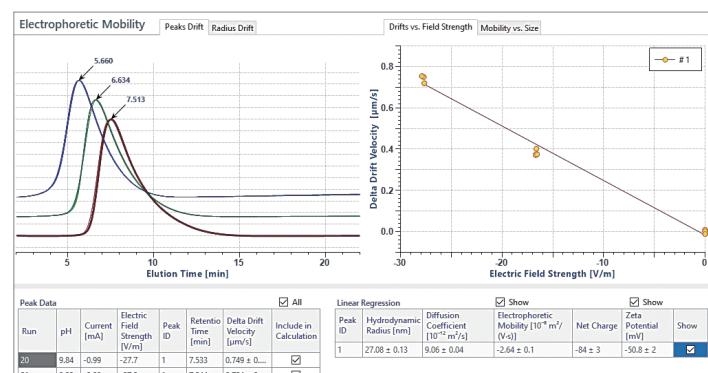
この機能から得られる詳細な高分解能粒子径分布は、FFF-MALS や動的光散乱法のデータを補完します。

ポリスチレン標準粒子の実測のフラクトグラムおよび較正曲線（赤）と理論値より計算したフラクトグラムと較正曲線（緑）の比較



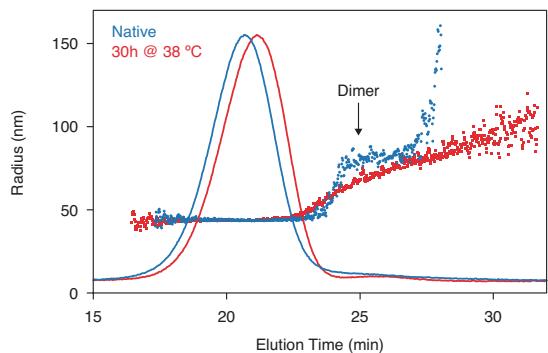
電気伝導移動度とゼータ電位

VISION は、様々な印加電場で行われた EAF4 測定から、電気泳動移動度とゼータ電位を計算できます。データ処理は、自動化され、ベースライン、ピークの選択に加え、ピーク保持時間と電場によるシフトまで含みます。



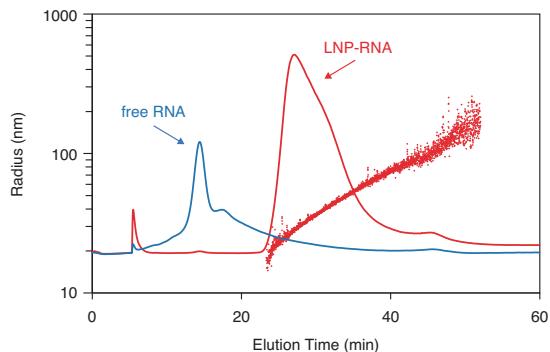
アプリケーション

ウイルスベクターと会合・凝集体



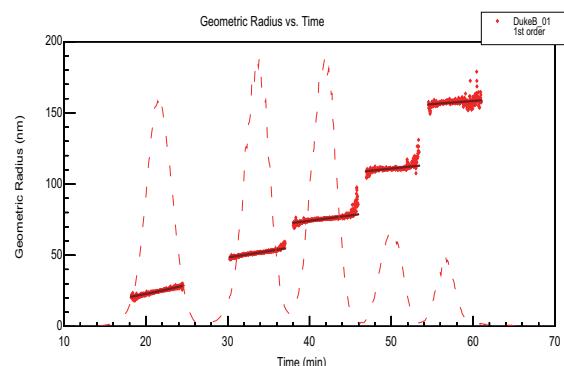
FFF-MALS は、AAV、アデノウイルス、レンチウイルスなどのウイルスやウイルスベクターの粒子径や濃度情報を提供します。上図は調整直後（青）のアデノウイルスと時間経過（赤）したアデノウイルスの測定結果です。核酸治療薬の安全性を評価するために必要な、凝集体の評価を行えます。

DNA/RNA と脂質ナノ粒子



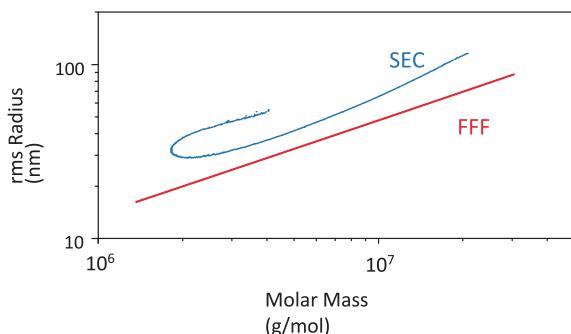
mRNA、siRNA、プラスミドDNAなどは、脂質ナノ粒子（LNP）などの非ウイルスベクターに取り込まれ、ドラッグデリバリーに用いられることがあります。ナノ粒子に内包されたDNA/RNAの量を知ることは非常に重要です。ここでは、FFFにより、フリーのRNAとmRNA-LNP複合体を分離し、フリーのRNAを定量できることを示しています。また、MALS-UV-RI検出を行うことにより、LNPの粒子径分布や核酸の内包率も評価することができます。

ラテックス粒子の分離測定



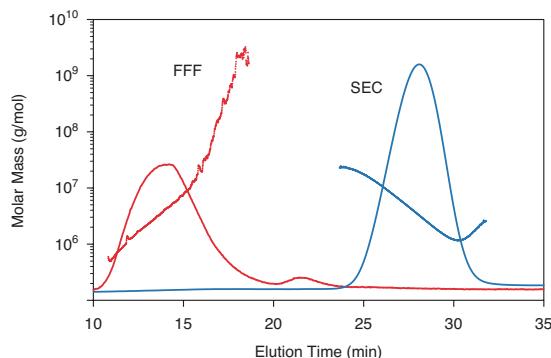
粒子半径 25 ~ 150 nm まで、5種のポリスチレンラテックス標準粒子を FFF で分離し、MALS 検出器で各々の粒子径を測定した例です。一般的に使用されるバッチ式の動的光散乱測定では、得られない高分解能粒度分布測定を実現させます。UV 検出器などの HPLC 検出器と接続することで、粒子の定量分析にも対応します。

分岐高分子の測定



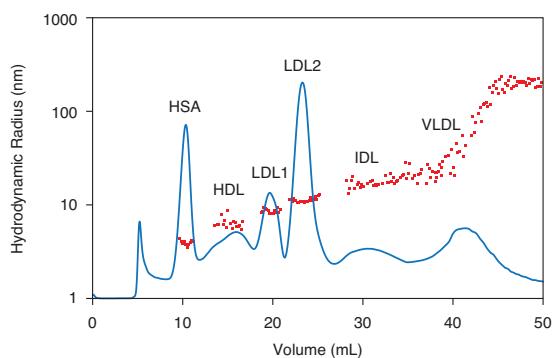
分岐高分子の分岐度や分子形態を適切に解析するためには、正しくサイズ分離を行うことが重要です。SEC カラムでは、時折、分岐高分子の溶出が遅れることがあります。FFF では、そのような試料でも正確にサイズ分離を行うことができます。ここでは、同一の分岐高分子を SEC-MALS 測定で行った場合と FFF-MALS で行った場合のコンフォメーションプロットを示しています。SEC では、高分子成分の溶出が遅れることにより直線性が得られていませんが、FFF では直線性が得られ、より正確な分岐高分子の解析が行えます。

HMW 複合体とコンジュゲート



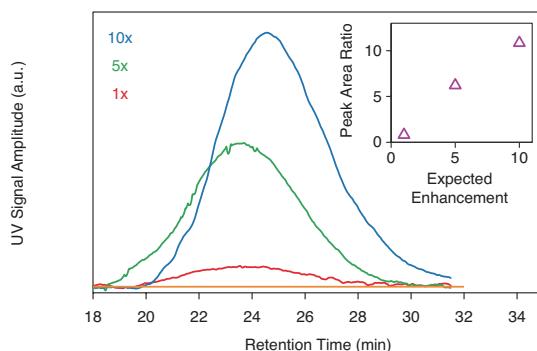
分子量の大きな生体高分子は SEC 分析にとって課題が多いです。分子量分布が 4 枠の広範囲にわたる高分子量のタンパク質 - 多糖コンジュゲート (PPC) を FFF-MALS (赤) と SEC-MALS (青) の両方で特性解析しました。約 10^7 g/mol 以上の高分子量成分が SEC カラムで除去されたことが明らかです。また、カラムとの非理想的な相互作用によって試料溶出が乱れました (青ピークのテールで分子量曲線が上昇)。しかし、FFF はこの大きなコンジュゲートをほぼ理想的に分離し、正確な MALS 分析に寄与しました。

複雑なサンプルの解析



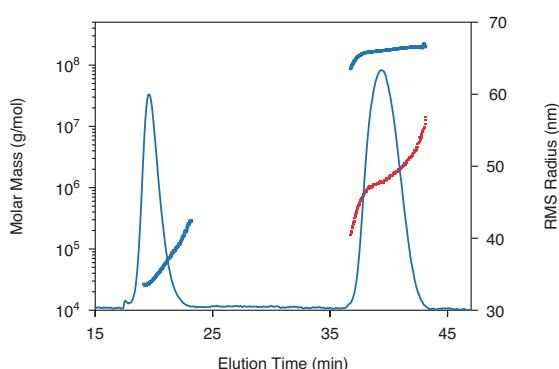
全血清の FFF-MALS-DLS 分離分析で、血清アルブミン、IgG、およびさまざまな種類のリポタンパク質の明確なピークが得られました。流体力学的半径 (R_h) は、DAWN MALS 検出器に組み込まれたオンライン DLS 装置によって測定されました。ここでは示されていませんが、MALS は各ピークの分子量を測定し、半径 10 nm 以上の成分については rms 半径 (R_g) も測定することができます。

DCM を用いた EV の濃縮



細胞外小胞 (EV) を扱う際、サンプル量の制限がしばしば課題となります。DCM 希釈制御モジュールは、FFF 分離されたサンプルの濃度と検出器信号を増加させることができます。ここでは、5 倍 (緑) および 10 倍 (青) の濃縮率が適用され、1 倍分離 (赤) に対して UV 信号の有効ピーク面積がそれに応じて増加しました。濃縮されたサンプルは、そのまま下流のフラクションコレクターで分画することができます。

ポリマー / ナノゲル溶液



THF 中で分離されたメタクリル酸メチル - アクリル酸ブチル - エチレングリコールジメタクリレートの RI フラクトグラムを示しました。溶液は、38 分で溶出する半径 40 ~ 55 nm のゲルナノ粒子による散乱のために濁っています。ナノゲルがカラムの細孔を塞ぐことでカラムが損傷する可能性がありますが、FFF はナノゲルと溶解した高分子を分離し、両方の成分の特性解析をすることができました。

仕様

Eclipse	
対応溶媒	水系 (pH = 2 ~ 12) および有機溶媒 (THF、トルエン、etc.)
接液部材質	316 ステンレス鋼、FFKM パーフルオロエラストマー、FR3 ステンレス鋼、ベスペル
クロスフロー制御	0.03 ~ 6.67 m L/min
チャネルフロー流速正確さ	0.1% (with DCM)
通信	Ethernet

分離チャネル	
種類	ショート、ロング、ディスパージョンインレット、セミ分取
最大圧力	30 bar (全チャネル)
温調	室温 ~ 50°C
接液部材質	316 ステンレス鋼、フューズドシリカ、FFKM パーフルオロエラストマー、アルミナセラミック、ポリカーボネート (水系)、Mylar (有機溶媒)
スペーサー	250 ~ 1,000 μm (チャネル種類に依存)、FFKM パーフルオロエラストマー (水系)、Mylar (有機溶媒系)
メンブレン	再生セルロース、ポリエーテルスルファン
出荷時オプション	DCM (希釀制御モジュール)、SEC スイッチング

電場式 FFF Mobility (追加オプション、pH センサー、電導度センサー内蔵)	
最大付加電力	± 30 V
最大付加電流	± 30 mA
接液部材質	プラチナ、チタン、ポリエーテルイミド、アルミナセラミック、PTFE、バイトン、PEEK、ポリカーボネート
寸法	58 cm (L) × 36 cm (W) × 26 cm (H)

※送液ポンプ、脱気装置、オートサンプラー or マニュアルインジェクターが別途必要です。

◆仕様およびデザインは、改良のため予告なく変更される場合があります。

Waters™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888

ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

取扱販売店

Waters、DAWN、miniDAWN、microDAWN、Eclipse、Calypso、COMET、Optilab、ViscoStar、WyattQELS、ASTRA および VISION RUN は Waters Corporation の商標です。
その他すべての商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2025 Waters Corporation. Printed in Japan. 2025年5月 720008790A 05A (PU)