

京都大学	博士 (工学)	氏名	川井 隆之
論文題目	Studies on High Performance Microscale Electrophoresis Using Online Sample Concentration Techniques (オンライン試料濃縮法を用いる高性能マイクロスケール電気泳動に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、オンライン試料濃縮法を用いた高性能マイクロスケール電気泳動手法、すなわちキャピラリー電気泳動 (CE) およびマイクロチップ電気泳動 (MCE) についての研究結果をまとめたものであり、序論を含む本編 6 章および総括からなっている。</p> <p>第 1 章は序論であり、マイクロスケール電気泳動におけるオンライン試料濃縮法である LVSEP (large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump) 法および関連手法の概略、並びに本論文で著されている研究の背景や目的、意義、位置づけなどを述べている。</p> <p>第 2 章では、糖鎖をモデル試料とし、LVSEP を適用した MCE 分析について検討を行っている。試料吸着を抑制するためポリビニルアルコール (PVA) で内面修飾したキャピラリーおよびマイクロチャンネルにおける電気浸透流 (EOF) 特性を評価し、低イオン強度の試料マトリクス中でのみ速い EOF が発生することを見出し、LVSEP 法に適した EOF 特性を有することを示した後、PVA 修飾マイクロチャンネルにおいて糖鎖の LVSEP-MCE 分析を行い、従来の pinched injection (PI)-MCE 分析と比較して、分離性能を維持しつつ最大で 2,900 倍の高感度化を達成している。あわせてチャンネル形状は従来の PI-MCE におけるクロス型チャンネルから単純なストレート型チャンネルへ、電圧操作は 4 チャンネル x 2 段階から 2 チャンネル x 1 段階へとそれぞれ大幅に簡略化されたことも示している。</p> <p>第 3 章では、CE への LVSEP 法の適用について検討し、高感度、高分離能が要求される糖鎖分析をモデルケースとして LVSEP-CE の技術的確立を試みている。試料溶液の電気伝導度が 100 μ S/cm 程度であっても LVSEP-CE 分析が可能であること、またキャピラリー全長の 96% が有効分離長として利用可能であることを明らかにしている。3 種類の糖タンパク質由来糖鎖の LVSEP-CE 分析を行ったところ、従来の CE と比較して分離性能をほとんど損なうことなく 400~770 倍の高感度化に成功し、従来検出できなかった 20 個の微量の糖鎖ピークの検出にも成功している。</p> <p>第 4 章では、キラル化合物をモデル試料とし、シクロデキストリン動電クロマトグラフィー (CDEKC)、シクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動 (CDCZE) およびシクロデキストリン修飾ミセル動電クロマトグラフィー (CDMEKC) によるキラル化合物分離への LVSEP の適用について検討を行い、それぞれの場合について従来法と比較して 500~1,300 倍の高感度化を達成している。理論的考察からはキラルセクターとの相互作用により実効電気</p>			

泳動移動度が大きくなった場合には分離性能の低下が懸念されたが、実際の分離性能の低下は限定的であることも示している。また、尿に添加した **ibuprofen** を固相抽出カラムで精製したものを生体由来モデル試料として **LVSEP-CDCZE** 分析を行い、従来の **CDCZE** では検出できなかった **250 ppb** の試料をベースライン分離することにも成功している。

第 5 章では、これまで陰極向きの **EOF** を利用するためアニオン性試料の分析にのみ適用可能であった **LVSEP** 法を、陽極向きの **EOF** を発生・制御することによるカチオン性試料への適用について検討している。弱く正に帯電した内表面を有する 3 種類の修飾キャピラリーを創製し、それぞれの **EOF** 特性を検討したところ、いずれのキャピラリーにおいても高イオン強度の泳動液では陽極向きの弱い **EOF** が発生し、低イオン強度の試料マトリクスでは陽極向きの速い **EOF** が発生することが明らかとなり、**LVSEP-CE** によるカチオン性試料の分析に適した **EOF** 特性を発現させるキャピラリー修飾法の開発に成功したことを示している。また、これらのキャピラリーを用いた 2 種類の芳香族アミンの **LVSEP-CE** 分析において、**290~750** 倍の高感度化が達成可能であることも示している。

第 6 章では、**LVSEP** 法と並ぶもうひとつのオンライン試料濃縮法であるトランジェントトラッピング (**tr-trapping**) 法について、従来疎水性試料に限定されていた同法の適用範囲を親水性試料へと拡大するため、疎水性の高い **BODIPY** を用いて試料を標識することによる親水性アミノ酸の **tr-trapping-CE** 分析について検討している。誘導体化によりアミノ酸の硫酸ドデシルナトリウムミセルへの保持係数が大幅に増加し、**tr-trapping** に適した保持特性を有することが確認され、従来の **CZE** や **MEKC** では分離できなかった 4 種類のアミノ酸の完全分離および最大 **125** 倍の高感度化を達成している。同様に **tr-trapping-MCE** 分析により 2 種類のアミノ酸を **25 s** 以内に完全分離し、最大 **150** 倍の高感度化が達成可能であることも示している。

最後は総括であり、本論文の内容についてまとめるとともに、電気泳動分析研究における本論文の位置づけと将来へ向けた課題についても言及している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、オンライン試料濃縮法を用いた高性能マイクロスケール電気泳動手法についての研究結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

- 1) マイクロチップ電気泳動において、マイクロチャネル全体に充填した試料を一定電圧の印加のみで濃縮・分離できる large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) 法の改良・適用を検討し、糖鎖試料の分離検出について、従来法と比較して同等の分離性能と、最大で 2,900 倍程度の高感度化を達成した。
- 2) LVSEP を適用したキャピラリー電気泳動分析においては、試料の電気伝導度の上限や有効分離長の減少度などの基礎的な知見は報告されていなかった。そこで糖鎖分析をモデルケースとして検討し、電気伝導度が 100 μ S/cm 程度の試料溶液であっても LVSEP の適用が可能であり、キャピラリー全体の 96% が有効分離長として利用可能であることを明らかにした。3 種類の糖タンパク質由来糖鎖の LVSEP 分析を行ったところ、従来法と比較して 400~770 倍の高感度化に成功した。
- 3) キラル化合物をモデル試料とし、LVSEP 法と種々のキャピラリー電気泳動手法との結合について検討した結果、LVSEP 法の適用により、光学異性体分析においても、500~1,300 倍の高感度化が達成可能であることを示した。
- 4) これまでアニオン性試料分析に限られていた LVSEP 法をカチオン性試料にも適用できるようにするため、弱く正に帯電した内表面を有する修飾キャピラリーの調製について検討を行い、2 種類の芳香族アミン分析で 290~750 倍の高感度化を達成した。
- 5) これまで疎水性試料に限定されていたトランジェントトラッピング法の適用範囲を親水性試料へと拡大するため、親水性アミノ酸を疎水誘導体化することにより、従来分離できなかった 4 種類のアミノ酸の完全分離および最大 125 倍の高感度化を達成した。

以上要するに本論文は、オンライン試料濃縮法を適用したマイクロスケール電気泳動分析の高性能化についての新たな知見をまとめたものであり、得られた成果は学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 24 年 2 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。