

氏 名	おかもと ゆきひろ 岡 本 行 広
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2759 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	工 学 研 究 科 材 料 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Fundamental Studies on Electrophoretic Analysis Using Functionalized Particles and Capillaries (機能性粒子およびキャピラリーを用いた電気泳動分析に関する基礎的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 塚 浩 二 教 授 岩 田 博 夫 教 授 松 原 誠 二 郎

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、機能性粒子および内表面を修飾したキャピラリーを用いるキャピラリー電気泳動(CE)分析についての基礎的検討結果をまとめたものであり、本編6章および緒論、結論からなっている。

緒論では、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。

第1章では、カチオン性粒子のCEによる分離について検討した結果について述べている。これまでCEにおけるコロイド粒子分離の研究は十分になされておらず、特にカチオン性粒子はサイズ分離が不可能であるとされてきた。本研究では、内表面をカチオン性高分子で修飾したキャピラリーを用いてCE分離を行い、試料のカチオン性粒子とキャピラリー内表面との静電反発を誘起させてサイズ分離を達成したことが述べられている。また、キャピラリー内面と粒子との静電相互作用に加え、緩衝液のpH、イオン強度、組成が分離におよぼす影響を明らかにしている。

第2章では、高密度リポタンパク(HDL)と低密度リポタンパク(LDL)のCEによる高性能分離について述べている。これまで、HDLとLDLのCE分離ではキャピラリー内面への試料の吸着抑制が十分でないため分離効率が低く、分離条件の最適化もなされていなかった。ここでは、吸着を抑制するために内表面をポリビニルアルコールで修飾したキャピラリーを使用したCEにより、HDLとLDLのベースライン分離を達成している。さらに、種々の分離パラメータが分離性能に与える影響について検討している。また、リポタンパクの組成および粒径の不均一性が分離効率におよぼす影響についても論じている。オンライン試料濃縮法を適用することにより、検出感度をおよそ10倍向上させることが可能であることも明らかにしている。

第3章では、第1章、第2章で得られた知見を基に、磁気微粒子(MP)を用いたアフィニティCEの高性能化について述べている。まず交互浸漬法をMPに適用して、磁場応答性に加え、蛍光性およびアフィニティリガンドを有する多機能性微粒子(MFMP)の作製について述べている。このMFMPを試料溶液と混合すると、ターゲット分子のみが特異的相互作用によりMFMPと複合体を形成し、同時に蛍光性を保持する。これにより、蛍光誘導体化に伴う特異的相互作用の消失という問題を解決したと結論づけている。さらに、この複合体を磁場が印加されたキャピラリー内に大量導入することで、高効率に濃縮・精製されることを示している。また濃縮された複合体が、レーザー励起蛍光検出の適用によってさらに高感度に検出できることを明らかにしている。

第4章では、MPをキャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)の固定相として用いる手法について検討している。まず、広範囲な化合物に対して光学認識能を有する塩基性タンパク質のアビジンをMP表面に固定化し、これを磁場印加によりキャピラリー内に固定することで、CECによるキラル分離用のキャピラリーが簡便に作製できることを示している。続いてこのキャピラリーを用いたキラル分離について検討し、ケトプロフェンのラセミ体分離が可能であることを明らかにしている。また、分離の再現性についても検討し、同一キャピラリーおよびキャピラリー間で得られる再現性共に良好であり、従来法に比べて本法が優位であることを実証している。

第5章では、交互浸漬法をキャピラリー内面修飾に適用し、CE用タンパク質吸着抑制表面およびキラル分離用固定相の作製を試みている。最外層をカチオン性高分子とする3層薄膜を作製し、塩基性タンパク質の良好な分離を可能にしている。また、エナンチオマーの光学分割が可能であることも示しており、簡便な操作で高い耐久性を有する試料吸着抑制表面あるいは固定相の作製が可能であることを明らかにしている。

第6章では、内面に共有結合を介してタンパク質を固定化したCECによるキラル分離用中空キャピラリーの作製について検討している。従来の物理吸着によるタンパク質の固定化では、脱離に伴う分離能の低下が頻繁に起こり、分離の再現性も良くなかった。これに対して、共有結合によりタンパク質をキャピラリー内表面に固定化することで、タンパク質の脱離が抑制され、高い耐久性を有する高性能キラル分離用キャピラリーが作製可能であることを示している。さらに、このキャピラリーを用いたCECと質量分析装置(MS)とを接続し、エナンチオマーのCE-MS分析が可能であることも実証している。

最後は結論であり、本論文で得られた成果について述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、機能性粒子および内表面を修飾したキャピラリーを用いるキャピラリー電気泳動(CE)分析についての基礎的検討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) カチオン性粒子のCEによる分離について検討し、内表面をカチオン性ポリマーで修飾したキャピラリーを用いることによってサイズ分離を達成した。また、キャピラリー内面と粒子との静電相互作用および緩衝液のpH、イオン強度、組成がこの分離に対しておよぼす影響を明らかにした。
- 2) 高密度リポタンパク(HDL)と低密度リポタンパク(LDL)のCEによる高性能分離を実現した。内表面をポリビニルアルコールで修飾したキャピラリーを用いてHDLとLDLのベースライン分離を達成し、種々の分離因子の影響を解明した。また、リポタンパクの組成および粒径の不均一性が分離効率におよぼす影響を明らかにした。さらに、オンライン試料濃縮法の適用により検出感度を約10倍向上させることに成功した。
- 3) 磁場応答性、蛍光性、およびアフィニティリガンドの3機能を有する多機能性磁気微粒子(MFMP)を作製し、アフィニティCEへの応用を検討した。MFMP-試料分子複合体をキャピラリー内に大量導入し磁場を印加することで、同複合体の高効率濃縮が可能であることを示した。また、同手法のキラル分離への適用が可能であることを示した。
- 4) 交互浸漬法をキャピラリー内表面の修飾に適用してタンパク質吸着抑制表面およびキラル分離用固定相の作製を行い、簡便で高い耐久性を有する機能化内表面の作製が可能であることを示した。

以上要するに、本論文は機能性粒子および内表面を修飾したキャピラリーを用いるCE分析についての新たな知見をまとめたものであり、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19年1月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。