

審査の結果の要旨

氏名 青山 千頭

生命現象の詳細な解析を行うためには、その構成成分の存在量を定量し、量的変動を追跡する必要がある。近年、様々な研究により、生命活動において重要な役割を担う構成成分の一部は、生体内において微量にのみ存在することが明らかにされてきた。そのため、より微量にしか存在しない成分を分離し定量するための方法が必要とされている。液体クロマトグラフィー (LC) は、多様な固定相が使用でき再現性が高いため、幅広い分野で用いられている分離分析法である。LC を用いて、生体内における微量物質の定量を行うためには、高感度な検出法及び高性能な分離カラムを用いる必要がある。学位申請者は、第一に、NBD-F (4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole) を蛍光誘導体化試薬として用い、HPLC-蛍光検出法によりセレノメチオニン (Se-Met) を定量するための方法を確立した。NBD-F と Se-Met の反応生成物は弱蛍光性であったが、酸化反応を施すことにより蛍光強度が増大することを見出し、この性質を利用して高感度な定量を実現した。学位申請者は、第二に、粒子充填型カラムよりも高性能な分離が期待されるピラー構造を用いた LC チップの開発を行った。ピラー構造を用いた LC では非常に規則性が高いピラー構造の表面において相互作用が行われるため、汎用されている粒子充填型カラムよりも高速で優れた分離性能を得ることに成功した。

まず、第1章では、本研究の背景、本研究の目的、および本研究の概要が述べられている。

第2章では、本研究で使用した試薬、装置および実験方法が述べられている。

第3章では、オンライン酸化を用いた HPLC-蛍光検出法によるセレノメチオニンの高感度定量法の開発が述べられている。セレン (Se) は人体に必須な元素であることが明らかにされて以来、様々な報告により生体内における重要性が示唆されている。多くのセレン含有化合物の中で Se-Met は、Se による抗がん作用において中心的な役割を担うと考えられている。そのため Se-Met の高感度な定量法は、生体内でのモニタリングを可能にするだけでなく、セレンによる抗がん効果の作用機序の解明にも貢献することが期待できる。Se-Met の定量法の多くは、HPLC と ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) を組み合わせた分析系によるものであるが、これらには定量精度に欠けるという短所があった。そこで、学位申請者は、Se-Met の高感度かつ高精度な定量を行うために、HPLC-蛍光検出系を用いた分析法を確立した。まず、Se-Met 溶液にホウ酸緩衝液 (pH 8.5) を加え、60°C において3分間 NBD-F と反応させることにより蛍光誘導体化した。次に、分離カラムからの溶出液をクーロメトリック型電気化学検出器のフローセルにより酸化し、その後、蛍光検出 (Ex.: 470 nm, Em.: 540 nm) することにより、ポストカラム酸化反応装置を組み込んだ分析系とした。作用電極にかける電位を最適化し、0.6 V (Pd reference) とした。これにより、酸化を行わない場

合と比較して、NBD-Se-Met のピーク高さとして約 10 倍の蛍光強度の増大が達成された。検出限界はインジェクト量あたり 50 fmol ($S/N=3$) であり、既存の ICP-MS を用いた報告とほぼ同等の感度を有していることが示された。本研究で確立した Se-Met 定量法は、簡便かつ高感度であるため、少量の生体試料中の Se-Met を定量するための有用な方法となることが期待できる。

第 4 章では、ピラー構造を利用した液体クロマトグラフィーチップの開発について述べられている。液体クロマトグラフィー (LC) は、多様な固定相が使用でき再現性が高いため、現在最も使われている分離分析法である。近年、分離性能の向上が期待できることから、マイクロ化学チップを用いた分離分析法の開発が多く行われている。しかし、その報告の多くは電気泳動によるものであり、マイクロ化学チップにおける LC の報告は非常に少ない。その原因として、チップの接続部における高い耐圧性や長い分離流路を確保することが困難な点が挙げられる。学位申請者は、これらの困難を克服することによりオンチップ LC を実現した。まず、一辺 20 mm の Si 基板を原料とし、フォトリソグラフィとドライエッチングにより流路パターンを形成した。ピラー構造を有する分離流路と共に試料注入用流路も作製し、この 2 つの流路が交差する部分を分離流路への試料注入部として用いた。流路パターンを形成した Si 基板は、その表面に酸化膜を形成させた後、ガラス基板と陽極接合により貼り合わせることで LC チップとした。ピラーは一辺が 3 μm の正方形、ピラー間の幅は 2 μm となるように設計した。分離部のピラー部分を含めた流路幅はそれぞれ 400 μm 、流路深さは 25 μm とした。この LC チップ表面に octadecylsilyl 基を化学的に結合させることで、ピラー構造の表面を逆相分離の相互作用の場とした。長さ 6.7 mm の直線の分離流路を有する LC チップを用いて 2 種類のクマリン色素 (C525, C545) を分離し、そのクロマトグラムから理論段数を算出した。この時の各ピークの理論段数は 800 程度であり、長さあたりの分離性能が市販の粒子充填型カラムよりも高いことが明らかになった。これにより、理論的に予想されていたピラー構造による LC の高い分離性能を、実験的に示すことができた。

第 5 章では、低拡散型曲線を有する液体クロマトグラフィーチップの開発が述べられている。チップ内において得られる直線流路の長さは限られる。そのため、より長い分離流路をチップ上に作製するには曲線流路を伴う必要がある。曲線部分に起因する拡散を最大限に抑制することを目的とした曲線構造を作製し、通常の間弧型曲線流路を有する LC チップよりも性能が優れていることを示した。また低拡散型曲線流路を有する LC チップにおいて、移動相の流速を変化させた時の理論段高さから van Deemter's plot を作成した。市販の粒子充填型カラムを用いた実験により得られたグラフと比較すると、それぞれの最適流速における理論段高さは、低拡散型曲線を有するピラー LC チップの方が小さな値を示していた。また、移動相の流速が最適条件よりも大きな場合、低拡散型曲線を有する LC チップは粒子充填型カラムと比べて高い分離性能を維持していた。さらに、この LC チップを用いて蛍光誘導体化した 7 種類のアミノ酸を 150 秒で分離することに成功した。

第6章では、本研究の総括が述べられている。

以上のように、学位申請者は NBD-F を蛍光誘導体化試薬として用いた HPLC-蛍光検出法によるセレノメチオニン (Se-Met) の定量法を確立した。また、ピラー構造を用いた LC を作製し、従来の粒子充填型カラムによる LC よりも優れた分離性能を有することを実験的に示した。さらに、低拡散型曲線構造を適用することにより、長さあたりの分離性能に優れているのみならず、十分な長さの分離流路が作製可能であることも明らかにした。この LC チップは、マイクロ化学チップの限定された領域において高い分離性能が得られるという点においてインパクトがある。今後、イオン交換クロマトグラフィーによる一次分離流路や誘導体化反応用流路なども LC チップ内に作製された形となり、生体成分の分離分析を行うために必要な操作の全てが行えるチップとして応用されることが期待される。学位申請者の開発した技術は生体微小成分の高感度定量を実現するものであり、分析化学、医学、薬学研究に大きく貢献すると期待される。よって、本研究を行った青山千頭は博士 (薬学) の学位をうけるにふさわしいと判断した。