

氏名 磯川 宗生

近年、微細加工技術によりマイクロメートルオーダーの流路を作製した基板を用いたマイクロ流体デバイスの研究が盛んに行われている。一枚の基板上に反応や分析のための要素技術を集積化することにより、通常行われている分析操作を行うことが出来ることから、Micro Total Analysis System (microTAS)というコンセプトが提唱され、化学分析やバイオ分析に利用されるようになってきた。マイクロ流体デバイスを分析に用いる利点として、システムの小型化による溶液や試薬の微量化、微少流路における微小効果による分析の高速化や高効率化、集積化することによる分析の自動化、システムの小型化、並列化などが挙げられる。

磯川は、生体低分子分析のためのマイクロ流体デバイスの開発を目指して、1) 分離部の高性能化と、2) 誘導体化反応部の開発を行った。

本論文は、6章より構成されている。第1章「序論」では、本研究の目的と背景、および概要が記載されている。

第2章では「低拡散かつ低流路抵抗なターン構造を有するピラーアレイカラムの開発」について述べられている。本研究では、分離部としてピラーアレイカラムを採用した。ピラーアレイカラムは「マイクロメートルサイズの柱（ピラー）が規則的に並んだ流路」を分離流路として用いる液体クロマトグラフィー(LC)の分離媒体であり、その内部構造の均一性から、汎用LCカラムを超える分離効率を有することが明らかになってきたためである。しかしながら、ピラーアレイカラムは、1) 分離流路長が短く相互作用面積が小さいこと、2) 表面を疎水性修飾して逆相LC (RPLC)が行われてきたことから極性の高い代謝物の保持や分離が難しいこと、という2つの問題を有していた。第2章においては、1)の問題について検討した。なお、2)の問題については、第4章で検討した。

限られた大きさのマイクロ流体デバイス上に長い流路を作製するためには、ターン構造が必要である。LCにおいては、分離の間に拡散を最小限に抑えることが必須であり、単純なターン構造は適さない。そのため、ターン内外の流路長を等しくした等流路長ターンが開発されたものの、ターンの流路幅が狭く、流路抵抗が大きいという問題があった。そこで、本研究において、ピラーアレイカラムを用いた生体分子の高速分離を目指して、低拡散かつ低流路抵抗なターン構造の開発を行った。この性質を有する新規ターン構造として、「ターンの流路幅を一定にしたまま、ピラーの密度を調節することで、ターン内外の移動相線速度分布を制御する」分布制御型ターンを開発した。ターンにおけるピラーの配置は、Hagen-Poiseuille式に従って算出した後、数値流体力学解析を用いて最適化を行った。分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを作製し、流路抵抗を測定したところ、等流路長ターンを有するピラーアレイカラムの1/6まで低減されることが示された。また、蛍光色素の分離によりターンにおける試料拡散について検討し、分布制御型ターンが等流路長ターンと同等に試料拡散を抑制することを示した。さらに、分布制御型ターンを有するピラーアレイカラムを5種蛍光誘導体化アミノ酸の分離に応用したところ、高流速の適用が可能となり、24秒以内の迅速分離を達成した。

第3章では「親水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)を用いた生体分子分析法に関する検討」が述べられている。第4章におけるピラーアレイカラムを用いた生体チオールのHILIC分離を行う前に、汎用LCを用いてHILICによる高極性生体分子の分離を検討した。具体的には、1) チオールのHILIC分離に適した蛍光誘導体化試薬の探索、2) 4-Fluoro-7-sulfobenzofurazan (SBD-F)で蛍光誘導体化したチオール(SBD-チオール)の保持や分離に適したHILIC官能基の探索、3) HILIC分離分析により生体試料中チオール濃度と病態との解析が可能であるかについての検討を行った。はじめに、HILICカラム(表面修飾官能基:スルホベタイン基、アミド基、ホスホリルコリン基)における4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (ABD-F)を蛍光誘導体化試薬として用いたとき、ABD-チオールの保持はSBD-チオールと比べると弱いものの、その保持や分離が十分可能であることを明らかにした。次に、アミドカラムとSBD-Fを用いた生体チオールのHILIC分析法を開発し、ピラーアレイカラムの表面修飾基としてアミド基を用いたとき、SBD-チオールの分離が可能であることを示した。さらに、HILIC-質量分析を行ない、マウス血清中に存在したSBD-不明チオールの精密質量を明らかにした。最後に、ホモシスチン尿症モデルマウスの血漿中チオールの分離分析を行なった。Cysteinylglycineや γ -Glutamylcysteineを含む一連の生体チオール化合物の一斉分析が可能であったことから、CBS欠損時においてGlutathione濃度を維持する機構について推察が可能となった。

第4章では「高極性官能基修飾ピラーアレイカラムの開発による親水性分子の親水性相互作用液体クロマトグラフィー分離」について述べられている。前述のように、ピラーアレイカラムの問題点の一つとして、高極性分子の保持が難しいことがあった。そこで、高極性化合物に対する保持が強いHILICモードにおけるピラーアレイカラムの開発を行った。第3章の結果に基づき、HILICの表面修飾官能基としてアミド基を採用した。3-(Methacryloyloxy)propyltri-methoxysilane処理とアクリルアミド重合反応によりアミド修飾を行った。アミド修飾したピラーアレイカラムでは、無修飾ピラーアレイカラムと比較して、アニオン性、カチオン性分子の保持が向上し、双性イオン性分子の保持は同等であるという結果を得た。さらに、アミド修飾ピラーアレイカラムを用いることにより、ヒト血液中に存在するCysteine、Homocysteine、Cysteinylglycine、Glutathioneを含む6種チオールのSBD-蛍光誘導体のHILIC分離に成功した。アミド修飾により、ピラーアレイカラムにおける高極性化合物の保持を向上させることが可能になった。

第5章では「誘導体化反応ユニットの開発による成分分離—誘導体化—検出の自動化」について述べられている。誘導体化は、生体分子の検出において、感度や選択性向上において重要である。分析の自動化を達成するには、成分分離後にオンチップで誘導体化反応を行う必要がある。このために、ポストカラムミキサーの開発を行った。ポストカラムミキサーが満たすべき要件は、分離成分と試薬が並行に合流したとき、1) 流れに対して垂直方向には混合を促進し、かつ2) 流れ方向の混合を抑制することである。これまでに、ピラーアレイ構造が上述の2つの要件を満たすことが明らかになっていた。本研究では、ピラーアレイミキサーの最適化を行い、その性能について定量的評価を行った。数値流体力学解析により、5、10、20 μm のピラーを有するミキサー構造が、ポストカラム誘導体化反応部が満たすべき2要件(溶液混合促進、試料拡散抑制)を満足しうることを示した。続いて、分離部としてピラーアレイカラムを、ポストカラム誘導体化反応部としてピラーアレイミキサーを搭載したマイクロ流体デバイスを作製した。このデバイスを用いた実験により、5、10 μm のピラーを有するミキサー構造が、ミキサーにおける溶液混合効率が高く、試料拡散性が小さいことに加えて、流路抵抗が小さいことが分かった。さらに、

ピラーアレイミキサー(ピラーサイズ5 μm)を搭載したデバイスを用いて、ethylamineと fluorescein の分離、naphthalene-2,3-dicarboxaldehydeによるethylamineの発蛍光誘導体化、蛍光顕微鏡によるオンチップ検出を、良好に達成した。

第6章「総括および今後の展望」では、本研究の意義と今後の課題がまとめられている。

以上のように、磯川は、本研究において、マイクロ流体デバイスの1) LC分離部について分布制御型ターンと流路表面のアミド修飾法を開発し、2) 誘導体化反応部としてピラーアレイミキサーを開発した。開発した機能部位を組み合わせることで生体分子分析の自動化、高速化が可能になると考えられ、生体低分子分析のためのマイクロ流体デバイスの基盤技術が開発された。よって、本論文は博士(薬学)の学位請求論文として合格と認められる。