

学位論文要旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	生体試料の微量分析前処理のためのシリカモノリス担体の開発
氏名 (Name)	太田 茂徳
<p>生体試料中の分析では、試料マトリクスに応じた適切な前処理が必要となる。近年は、質量分析計等分析機器の感度向上に伴い、試料の前処理において、より簡便な前処理を採用するケースが増えている。また、クロマトグラフィーにおける分析時間の短縮に伴い、前処理に対しても迅速性、微量、微小容量、多検体サンプルへの適応といった、新しいニーズが増えている。これらのニーズに対応した前処理担体を開発するためには材料の選択と形状の最適化が重要である。固相抽出をはじめとする前処理用カラムの担体を選択する際、スチレン系の合成ポリマー、シリカ等の無機担体、アガロースゲルなどの天然高分子が挙げられる。いずれの担体においても、使用時にはカラム等のハウジングへの充填作業が必要であるが、特に微小スケールのカラムを作製しようとした場合において、担体を均一にハウジングへ充填することは非常に困難な作業であり、再現性良くカラムを作製することは難しい。また微小容量カラムの場合において、使用するフリットの体積は、カラム内部体積に占める割合に対して大きくなる傾向にあり、デットボリュームが大きくなる為、高性能化を行うことは非常に困難な作業であった。本研究では、生体試料の前処理用担体としてシリカモノリスに着目し、微量生体試料の前処理に適切なデバイスの開発を目指し、ディスク型に成形したシリカモノリスを各種前処理に適応するための化学処理及び特性解析を行った。更に、開発したシリカモノリスデバイスの性能を引き出すことが可能な自動分抽システムを構築し、超高速試料前処理手法の提案を行った。</p> <p>最初に1章では、序論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。</p> <p>第2章では、生体試料中の医薬品の回収を迅速に行うためのシリカモノリスの構造体の最適化、各種官能基の導入の検討を行った。シリカモノリスの構造は、低分子医薬品向けに適したスルーポア、メソポアの設計を行った。スピンカラムへのディスクの設置、実際の使用時の遠心力の最適化を行った。試料による目詰まりが懸念される、血清、全血からの回収手法についてまとめ、迅速試料前処理法を考案した。</p> <p>第3章では、モノリスディスクをスピンカラム以外のデバイスに固定し、より微量なサンプルの前処理に適応することを検討した。ピペットチップの先端にシリカモノリスを固定化、各種化学修飾を行うことで、微量サンプルの前処理が可能になった。トリプシンを固定化することにより、ピペッティング作業によりタンパク質を消化するデバイスを開発した。その際スルーポアを最適化することで、スムーズな溶液の通過が可能になった。また NHS 活性基を導入することで、アミノ基を有するリガンドをピペッティングにより固定化が可能になるアフィニティデバイスの作製も行った。使用しているゲルの担体量としては 2 μL であり、微量、微小容量のアフィニティデバイスを作製することが可能になった。</p> <p>第4章では、3章で作製したアフィニティデバイスの作製において、使用したシリカモノリスの表面を親水性ポリマーで被覆することで、対象成分以外の非特異吸着の軽減を試みた。各種親水性ポリマーの配合を検討することで、非特異吸着の軽減を行うことができ、対象成分に対して選択的なアフィニティ</p>	

担体の作製を行うことができた。また、対象成分が抗体のようなタンパク質に適したゲルの設計を行い、回収量の増加も検討、実現した。

第5章では作製したシリカモノリスディスクを96ウェルプレートへ導入し、全自動分抽装置による抗体の迅速精製デバイスを開発した。サンプルの処理においては、既存の装置において60分以上要する工程に対して、開発したデバイスでは15分で作業を実施することができた。

最後に結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。

(様式 9号)

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	太田 茂徳
審 査 委 員	主 査：吉本 則子
	副 査：熊切 泉
	副 査：星田 尚可
	副 査：吉本 誠
	副 査：田中 一宏
	副 査：山本 修一
論 文 題 目	生体試料の微量分析前処理のためのシリカモノリス担体の開発 (Development of the monolithic silica carrier for microanalysis of biological samples)
<p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>生体試料の分析では、試料マトリクスに応じた適切な前処理が必要となる。近年は、質量分析計のような高度分析装置の分析感度の向上にとともに、必要となる試料前処理方法も変化している。また、クロマトグラフィー分析時間が短縮されることにより、前処理に対しても迅速性、微量、微小容量、多検体サンプルへの適応が要求されている。</p> <p>本研究では、上記さまざまな必要性に対応する新規高性能前処理方法として担体としてシリカモノリスに着目し、微量処理に適切なデバイス開発を目指し、ディスク型に成形したシリカモノリスを各種前処理に適応するための化学処理と特性解析を行っている。さら、超高速試料前処理手法の提案を行っている。</p> <p>第1章では、本研究の背景・目的を述べている。第2章で、生体試料中成分の迅速回収のためのシリカモノリスの構造体(スルーポア、メソポア)および操作方法の最適化を行い、迅速試料前処理法を考案している。第3章では、ピペットチップ先端にシリカモノリスを固定化、化学修飾を行うことで、微量サンプルの前処理を可能としたデバイスを開発している。第4章では、シリカモノリス表面を親水性ポリマーで被覆することで、非特異吸着の軽減を達成している。抗体のような蛋白質に適したゲルの設計を行い、回収量の増加を実現している。第5章ではシリカモノリスディスクを 96 ウェルプレートへ導入し、全自動分注装置による抗体の迅速精製デバイスを開発し、既存装置で 60 分以上要する工程を 15 分に短縮できたことを報告している。最後に得られた知見を整理し、今後の展望や課題をまとめている。</p>	

公聴会には、本学の教員・学生以外に製薬会社や化学会社から多数の研究者が参加し、多くの質問があった。

主な質問は、以下に示すシリカモノリスの耐久性とリガンド固定化法とポアサイズについてであった。

1. シリカモノリスは、アルカリ洗浄によりどの程度再利用できるのか。
また、アルカリ洗浄によりポアサイズが変化するのか。
2. 再利用のためには、膜や遠心による試料前処理が必要か。
3. スピнкаラムと HPLC カラムとしての利用で異なる点はあるのか。
4. プロテイン A リガンドを固定化するとき、スパーサーの役割は必要か。
5. プロテイン A リガンド固定化量とポアサイズの関係はどう考えるのか。

どの質問に対しても発表者からの確かつ明確に回答がなされた。

以上により、本研究は独創性、新規性に優れ、博士(生命科学)論文に十分値するものと判定した。

論文内容および審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

関連論文 計 4 編

- (1) 著者氏名: Shigenori Ota, Y. Yui, T. Sato, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto,
論文題目: Rapid purification and detection of immunoglobulin G using a Protein A-immobilized monolithic spin column with hydrophilic polymers
学術雑誌名: Analytical Sciences
巻、号、頁: DOI <https://doi.org/10.2116/analsci.20P378>
発行年月: 2020 年 12 月早期公開
- (2) 著者氏名: A. Namera, T. Saito, Shigenori Ota, S. Miyazaki, H. Oikawa, K. Murata, M. Nagao
論文題目: Optimization and application of octadecyl-modified monolithic silica for solid-phase extraction of drugs in whole blood samples
学術雑誌名: Journal of Chromatography A
巻、号、頁: Vol. 1517, 9-17
発行年月: 2017 年 5 月発行
- (3) 著者氏名: 宮崎 将太、山田 智子、太田 茂徳、斉藤 剛、奈女良 昭、大平 真義
論文題目: イオン交換型シリカモノリススピнкаラムを用いる生体試料中イオン性化合物測定のための迅速前処理法
学術雑誌名: BUNSEKI KAGAKU
巻、号、頁: Vol. 59, No.3, 213-218 (2010)
発行年月: 2010 年 3 月発行
- (4) 著者氏名: Shigenori Ota, S. Miyazaki, H. Matsuoka, K. Morisato, Y. Shintani, K. Nakanishi
論文題目: High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula
学術雑誌名: Journal of Biochemical and Biophysical Methods
巻、号、頁: Volume 70, Issue 1, Page 57-62
発行年月: 2007 年 2 月発行