



TITLE:

Development of analytical techniques for
biomedical applications toward point-of-
care testing devices(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Manmana, Yanawut

CITATION:

Manmana, Yanawut. Development of analytical techniques for biomedical applications
toward point-of-care testing devices. 京都大学, 2022, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2022-09-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24234>

RIGHT:

許諾条件により本文は2023-09-26に公開

京都大学	博士 (工学)	氏名	Manmana Yanawut
論文題目	Development of analytical techniques for biomedical applications toward point-of-care testing devices (ポイントオブケア検査装置に向けた生物医学的応用のための分析技術の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、ポイントオブケア (POC) 検査装置を指向する生物医学的応用のための分析技術の開発に関する基礎的研究成果をまとめたもので、本編 5 章及び総括からなっている。</p> <p>第 1 章は序論であり、本論文に収載されている各研究を始めるに至った経緯、各研究の目的と分離科学における位置付けについて述べている。</p> <p>第 2 章では、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) を適用したミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) によるステロイド分析について、UV 検出及びエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) 検出による高感度分析の可能性を探っている。硫酸ドデシルナトリウム (SDS) ミセルを用いる tr-trapping-MEKC により、アンドロステロン、コルチゾン、α-及びβ-立体異性体を含むエストラジオール、ヒドロコルチゾン、プロゲステロン、及びテストステロンが高感度に分析された。SDS ミセルの MS 検出器への流入を防ぐため、tr-trapping-MEKC-ESI-MS では酸性 (pH 3.5) 泳動液によって電気浸透流を抑制し、ミセルゾーンの移動速度が試料の移動速度より 2 倍程度遅くなることが示された。従来のキャピラリー電気泳動分析と比較して、tr-trapping-MEKC-ESI-MS では、アンドロステロンについてピーク強度 540 倍、検出限界 50 倍の性能向上を達成した。</p> <p>第 3 章では、分析物の濃度を検出パスに沿った色の変化として測定する距離ベース検出 (distance-based detection) 法のセンサーとして、ヒドロゲルの利用を検討している。従来の研究では、同手法の測定対象は小イオンのみであったが、本研究では、タンパク質などの大きな生体分子の距離ベース検出におけるヒドロゲル使用の可能性を探った。用いたヒドロゲルは、ジアクリル酸ポリエチレングリコール (PEG) 及び蛍光検出プローブとしてのフルオレセイン誘導体により調製された。標的タンパク質であるトリプシン存在下での蛍光変化は、強度ベース検出と距離ベース検出の両手法で測定可能であったが、蛍光試薬の濃度の影響は、距離ベース検出では微小であったのに対し、強度ベース検出では非常に大きいことが明らかとなった。トリプシンについて、濃度 (範囲 0.5~5 mM) と距離の変化との関係が観察され、生体分子の距離に基づく検出における本 PEG ヒドロゲルの使用が極めて有用であることが示された。</p> <p>第 4 章では、種々の流量の溶液を送出するマイクロ流体デバイスを作製し、分子インプリントポリマー (MIP) の重合条件の最適化への適用を試みている。MIP は幅広い応用が可能な分子認識機能を有する材料であり、標的分子の高い特異性を認識する</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	Manmana Yanawut
------	---------	----	-----------------

ためには重合条件の最適化が重要である。この最適化には多大な時間と労力が必要であるが、マイクロ流体デバイスを用いて溶液の流量制御や溶液の分割を行い、様々な条件で試料を調製することによって多変量データを取得し、その解析に基づいた最適化が可能である。ここでは、特定の流量の溶液を供給できる種々の流路幅のマイクロ流体デバイスを作製し、供給流量の精度をシミュレーション値と比較して、得られた流量値がシミュレーション値と同程度であり、分注量比も高い再現性を示すことを明らかにした。さらに、蛍光試薬溶液とタンパク質溶液の混合操作をこのデバイスとマイクロピペットそれぞれを用いて行い、調製された混合溶液から得られた多変量データの解析結果から、本デバイスと従来法（マイクロピペット）との間に有意差が無いことが確認され、本デバイスの有用性が示された。このデバイスによりテンプレート分子にリゾチームを用いた MIP ヒドロゲルを調製したところ、リゾチームに対する高いインプリント係数と吸着特異性を得ることに成功した。

第5章では、タンパク質検出のための蛍光センサーとして用いるための MIP ヒドロゲルの調製に関する基礎的検討が行われている。テンプレートとしてシトクロム c を、また蛍光プローブとしてフルオレセイン誘導体を使用した。シトクロム c が MIP ヒドロゲル内に吸着されることにより蛍光消光が観察されると考えられ、吸着性能と蛍光強度に影響を与える種々のパラメータについて検討し最適条件を求めた。同条件で調製した MIP ヒドロゲルは、シトクロム c に対する高い選択的吸着能と高感度蛍光応答を示した。この MIP ヒドロゲルは、シトクロム c に比べより大きなサイズのタンパク質（トリプシン及び BSA）に対するよりもシトクロム c に対する高い吸着選択性を示した。一方、シトクロム c と同程度の分子量及び pI 値を有するリゾチームに対しては、同様に高い吸着選択性を示した。しかしながら、この MIP ヒドロゲルによる蛍光消光は、シトクロム c のみに対して観察された。この結果は、本 MIP ヒドロゲルの蛍光センサーとしての応用の可能性を示唆している。

最後は総括であり、POC 検査装置を指向する生物医学的応用のための分析技術の開発の新規性・重要性について、本論文の内容と関連付けてまとめている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ポイントオブケア (POC) 検査装置を指向する生物医学的応用のための分析技術の開発に関する基礎的研究成果をまとめたもので、主な内容は以下のとおりである。

- 1) 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) を適用したミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) によるステロイド分析について、UV 及びエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) による検出を行った。従来のキャピラリー電気泳動分析と比較して、tr-trapping-MEKC-ESI-MS ではアンドロステロンについてピーク強度 540 倍、検出限界 50 倍の性能向上を達成した。
- 2) 分析物の濃度を検出パスに沿った色の変化として測定する距離ベース検出 (distance-based detection) 法を、ジアクリル酸ポリエチレングリコール (PEG) ヒドロゲルを検出場としたトリプシンの分析に適用し、生体分子の検出において PEG ヒドロゲルの利用が極めて有用であることを示した。
- 3) 種々の流量の溶液を送出するマイクロ流体デバイスを作製し、種々の混合比で調製した蛍光剤及びタンパク質の混合溶液について得られた多変量データは、従来法によるものと有意差の無いことが確認された。このデバイスにより分子インプリントポリマー (MIP) のテンプレート分子にリゾチームを用いた MIP ヒドロゲルを調製し、リゾチームに対する高いインプリント係数と吸着特異性が得られた。
- 4) タンパク質検出用の蛍光センサーとしての MIP ヒドロゲルの調製に関する基礎的検討を行った。テンプレートにシトクロム c を、蛍光プローブとしてフルオレセイン誘導体を使用した。作製した MIP ヒドロゲルは、シトクロム c に対して高い選択的吸着と高感度の蛍光応答を示した他、シトクロム c に対して特異的な蛍光消光を示した。

以上要するに、本論文は、POC 検査装置開発に資する分析技術の基礎的研究成果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、令和 4 年 8 月 10 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。