



キャピラリー電気泳動法またはマイクロチップ電気泳動法を用いた高塩濃度試料中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの同時迅速測定法の開発に関する研究

宮道, 隆

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2008-12-19

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3019

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003019>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 宮道 隆
博士の専攻分野の名称 博士（学術）
学 位 記 番 号 博ろ第 3019 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付 平成 20 年 12 月 19 日

【 学位論文題目 】

キャピラリー電気泳動法またはマイクロチップ電気泳動法を用いた高塩濃度試料中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの同時迅速測定法の開発に関する研究

審 査 委 員

主 査 教 授 齊藤 惠逸
教 授 上地 眞一
教 授 白杉 直子
教 授 田中 洋一
准教授 江原 靖人

論文内容の要旨

氏名 宮道 隆

推薦教授氏名 齊藤 恵逸

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

キャピラリー電気泳動法またはマイクロチップ電気泳動法を用いた高塩濃度試料中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの同時迅速測定法の開発に関する研究

論文要旨

この論文では高濃度の塩を含む試料中の硝酸、亜硝酸イオンを電気泳動分離と紫外領域吸光度検出で簡便、迅速に測定することを目的としており、試料の対象として海水と体液を検討した。その理由は、海水や体液中の硝酸、亜硝酸イオン濃度が地球環境や体内環境を知る上で今後ますます重要となると考えられること、そしてこのような高塩濃度試料中の硝酸、亜硝酸イオンの測定がこれまで困難であり、煩雑な操作や長い測定時間が必要であったために膨大な試料の測定に必要な知見の蓄積が困難であったことから、簡便、迅速な測定法の開発はこれら研究の発展のために重要であると考えたからである。

例えば、硝酸、亜硝酸イオンは赤潮の原因となる富栄養化を担う栄養塩類であるため、海水中の硝酸、亜硝酸イオンの測定は、地球規模での環境を考える上でも、ますます重

要性が増している。

また、体内では無機ラジカルのガス状分子である一酸化窒素 (NO) が多彩な生理的、病理的作用に関与していることが解明されつつあり、特に近年では酸化ストレスのメディエーターとしての役割や疾患との関連が注目されている。しかしながら、血液中の NO の半減期は短く、速やかに代謝されて硝酸、亜硝酸イオンとなるため、一般的に NO 産生量は硝酸、亜硝酸イオンの合計濃度から推定される。さらに、疾患との関連に関しては硝酸、亜硝酸イオンそれぞれの濃度に着目した報告例もある。

一般的に硝酸、亜硝酸イオンの測定にはグリース反応と酵素還元を組み合わせたキットが用いられるが、除タンパクが必須であること、硝酸、亜硝酸イオン両方の濃度を決定するには酵素還元操作と2回の吸光度測定が必要なことから、操作が煩雑で測定に長時間必要である。また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定法も開発されているがグリース法を用いるため、簡便、迅速な測定法とは言い難い。

これに対し、HPLCと比較して簡便、迅速、高分離能といった特長を有する測定手法としてキャピラリー電気泳動法 (CE) が注目されている。しかしながら、この方法でも通常の緩衝液を泳動液とした場合、高塩濃度試料の測定は困難である。そこで、福士らは高塩濃度の泳動液を用いることで試料中の塩の影響を抑制する手法を報告している。

さらに近年、半導体微細加工技術を応用して作製した微小流体デバイスを用いた新たな分析手法が注目されており、このデバイス (マイクロチップ) 上でキャピラリー電気泳動を行うマイクロチップ電気泳動 (MCE) の研究も盛んである。MCEの特長はCEと比較して測定時間が10分の1程度に迅速化可能なこと、試料量や廃液量が微少であること、そして装置の小型化が可能となるため可搬性を有するオンサイト分析装置の開発が期待できることなどである。

本研究では、CEまたはMCEに高塩濃度泳動液を適用して、高塩濃度試料中硝酸、亜硝

酸イオンの測定法の開発を目指した。はじめに、CEで新規泳動液の開発やオンライン濃縮法の検討といった基礎的研究を行った。次に、CEで開発した方法をMCEに適用して迅速化を図ると共に、生体試料への適用といった応用的研究を行った。

まず、海水中の硝酸、亜硝酸イオンの測定から着手した。ここでは主にオンライン濃縮法による測定の高感度化について検討した。その結果、高塩濃度試料におけるオンライン濃縮法としてスタッキングと過渡的等速電気泳動 (tITP) の有効性が確認された。スタッキングは試料と泳動液に10倍のイオン強度差を設けることで得られ、オンライン濃縮法として簡便かつ有効な方法であった。但し、泳動液のイオン強度がもともと高い場合、ジュール熱の発生の問題から試料を希釈する必要があるが、感度の観点から希釈にも限度がある。そこで、別の濃縮法としてtITPの検討を行った。tITPではターミナルイオンの種類と濃度によって濃縮効率の変化が見られ、さらに2種類用いることの実用性が見出された。以上の結果より、これら2つのオンライン濃縮法を併用する方法を確立し、深層海水試料 (MOOS-1) 中の硝酸、亜硝酸イオンの測定を達成した。

そこで、同じく塩濃度の高い試料である体液 (血液、唾液) への適用を試みることにした。スタッキングの効果や陰イオンの迅速分析のための電気浸透流 (EOF) 反転の効果を検討した結果、EOFを反転させるために陽イオン界面活性剤を添加した人工海水泳動液を用いたCEにおいて10倍希釈ヒト血清中硝酸、亜硝酸イオンの定量が可能であることが示された。しかしながら、特に亜硝酸イオンのピークが小さく、更なる感度の向上が必要であったが、そのためにはベースラインノイズの低減が必要と考えられた。

先の海水測定では人工海水を泳動液として用いたことが測定の安定性 (ベースラインノイズの低減) に寄与していたと考えられたことから、体液測定には体液組成類似の溶液を泳動液として用いることが有効と考え、ヒト血清成分に基づく新規泳動液の開発を行った。ベースラインノイズの低減を図るために214 nmのUV吸収を持つ成分の削除やス

タッキング効果を十分に得るためにイオン強度を高めるなどの組成の調整を行った結果、除タンパク処理を施し、10倍希釈したヒト血清中硝酸、亜硝酸イオンの定量を達成した。さらに、ヒト唾液にも適用したところ、同様に測定可能であることが示された。

しかしながら、CEでは装置の大きさなどからオンサイト迅速測定は困難である。そこで、CEで開発した方法を、小型・可搬化、迅速化、そして少試料・廃液化が期待されるMCEへ適用することを試みた。但し、MCEでは分離カラム長がCEと比較して顕著に短くなるため、硝酸、亜硝酸イオンのように電気泳動移動度が近いイオンの分離は困難である。そこで、分離能の向上を得るための流体制御を実現するために印加電圧条件を検討した結果、分離時間15秒で血清標準試料中硝酸、亜硝酸イオンピークの完全分離を達成した。また、ヒト唾液に適用した結果、ヒト唾液中硝酸、亜硝酸イオンの測定が可能であったので、運動負荷試験被験者唾液の測定に適用を試みた。NOは血管拡張因子であり、血管のシエアストレスの増大によって産生されることが知られており、運動負荷によって血液中の硝酸イオン濃度が上昇するとの報告がある。今回、運動負荷被験者の唾液中の硝酸イオン濃度の変化と生理信号の相関を検討したところ、運動負荷による心拍数や血圧の上昇に伴い唾液中硝酸イオン量が増加する傾向にあるとの興味深い予備的知見が得られた。

次に、開発した方法のヒト血清への適用を検討した。文献やCEでの検討から唾液中と比較して血清中の硝酸、亜硝酸イオン濃度が低いことが判明していることから高感度化が必要と考えられた。そこで試料大量導入による高感度化を目指して印加電圧条件の検討を行った結果、硝酸、亜硝酸イオンの検出限界 (S/N=3) はそれぞれ12 μ M、24 μ Mとなり、感度向上が得られた。しかしながら、スタッキングのために試料を10倍希釈しているため、感度は不十分であった。但し、標準添加を行った除タンパク処理済みヒト血清を測定したところ、6.5秒で硝酸、亜硝酸イオンピークの分離を達成したことから、

血清への適用が可能であることが示された。

さらに、測定全工程の迅速化には除タンパク処理の省略が不可欠と考え、除タンパク未処理のヒト血漿への適用を検討した。この時問題となるのは、流路へのタンパク質の吸着による測定再現性の低下である。そこでまず、CEで吸着抑制剤の検討を行った。吸着抑制剤の候補として両性イオン物質を検討した結果、グッド緩衝剤の1種である *N*-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acidを選定した。これを2%添加した泳動液をMCEに適用したところ、定量可能なことが示された。また、従来法であるグリースキットとの相関も良好であったことから、本法がキット法に替わるNO代謝産物の測定法となりうる技術的見通しが得られた。そして、本法の課題である高感度化についても、予備的検討から光路長の増大、試料の大量導入、そしてオンチップ濃縮という3つの要素技術に見通しを得たことから、将来的にオンサイト迅速測定法の確立は可能と考えられた。

[A4 (297mm×210mm)]

(注) 3,000~6,000字でまとめること。

論文審査の結果の要旨

氏名	宮道 隆		
論文題目	キャピラリー電気泳動法またはマイクロチップ電気泳動法を用いた高塩濃度試料中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの同時迅速測定法の開発に関する研究		
判定	合格・不合格		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	齊藤 惠逸
	副査	教授	上地 眞一
	副査	教授	白杉 直子
	副査	教授	田中 洋一
	副査	准教授	江原 靖人
要 旨			
<p>硝酸、亜硝酸イオンは赤潮の原因となる栄養塩類であり、また、酸化ストレスマーカーとして注目されているため、海水及び体液中の硝酸、亜硝酸イオンの測定は重要である。しかし、一般に用いられている硝酸、亜硝酸イオンの測定法は操作が煩雑で一検体当りの測定が長時間にわたるため、膨大な試料を分析し必要な知見を蓄積することが困難であることから、簡便で迅速な同時測定法の開発を試みたのが本研究である。</p> <p>本論文は、本文8章、謝辞、参考文献及び研究業績で構成されている。</p> <p>第1章「序論」では本研究の意義とキャピラリー電気泳動法及びマイクロチップ電気泳動法の概略、理論、先行研究などについて述べている。</p> <p>第2章から第4章まではキャピラリー電気泳動法を用いた基礎的研究である。第2章「オンライン濃縮法の検討」では高塩濃度試料に有効なオンライン濃縮法の開発と海水中の硝酸、亜硝酸イオンの同時分析、第3章「人工海水泳動液を用いたヒト血清試料の分析」では同法のヒト血清への適用について、さらに第4章「ヒト由来試料測定のための新規泳動液の開発」ではよりベースラインノイズの低い新規泳動液の開発による高感度化とヒト唾液への適用についてそれぞれ述べている。</p>			

第5章から第7章までは、第2章から第4章までの研究で得られた基礎的知見のマイクロチップ電気泳動法への適用とヒト由来試料への適用に関する応用的研究である。第5章「マイクロチップ電気泳動法の開発とヒト唾液試料への適用」ではキャピラリー電気泳動法のために開発した泳動液のマイクロチップ電気泳動法への適用と運動負荷試験被験者唾液の測定について、第6章「除タンパク処理済ヒト血清測定の検討」では高感度化のための試料大量導入の検討と除タンパクしたヒト血清への適用、さらに第7章「除タンパク未処理ヒト血漿測定の検討」ではタンパクの吸着抑制剤の選定と除タンパク未処理のヒト血漿への適用についてそれぞれ述べている。

第8章「結論」では研究成果のまとめと今後の課題及び展望を述べている。

ベースラインノイズの低い新規泳動液を開発し、分析時間の大幅な短縮とオンライン濃縮による高感度化を達成した点に本研究の独創性が認められる。本研究で開発された方法は簡便かつ迅速で、キャピラリー電気泳動法による海水の分析では11分、体液の分析では9分以内で硝酸、亜硝酸イオンの同時測定が可能である。さらに、マイクロチップ電気泳動法による体液の分析では15秒で硝酸、亜硝酸イオンの同時測定が可能であることを示している。

本研究で得られた成果の大部分は、以下の6編の査読付き論文として学術雑誌に報告されている。

- 1) Analysis of highly saline samples by capillary zone electrophoresis: enhanced direct UV detection of inorganic ions using on-capillary preconcentration and clean-up techniques, *Journal of Chromatography A*, 888 (2000) 309-319
- 2) Determination of nitrite and nitrate in a proposed certified reference material for nutrients in seawater by capillary zone electrophoresis with artificial seawater as the background electrolyte using transient isotachopheresis, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1928-1934
- 3) Development of a novel running buffer for the simultaneous determination of nitrate and nitrite in human serum by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1014 (2003) 197-202
- 4) Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological fluids by capillary electrophoresis and preliminary study on their determination by microchip capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1051 (2004) 185-191
- 5) High-throughput nitric oxide assay in biological fluids using microchip capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1109 (2006) 174-178
- 6) High-throughput assay of nitric oxide metabolites in human plasma without deproteinization by lab-on-a-chip electrophoresis using a zwitterionic additive, *Journal of Chromatography A*, 1206 (2008) 41-44

さらに、「臨床検査」及び「生物物理化学」にそれぞれ1編の論文を依頼執筆している。これは、本研究が高い評価を受けていることを示している。

以上の審査結果から、本論文の審査委員会は、学位申請者 宮道隆氏が博士（学術）の学位を授与される資格を有するものと判断する。