

SCE 2000

The Millennium Symposium

第20回

キャピラリー電気泳動
シンポジウム 2000
要旨集

Proceedings of

The 20th Symposium on Capillary Electrophoresis

会場 淡路夢舞台国際会議場・ウェスティンホテル淡路

会期 2000年11月29日(水)～12月1日(金)

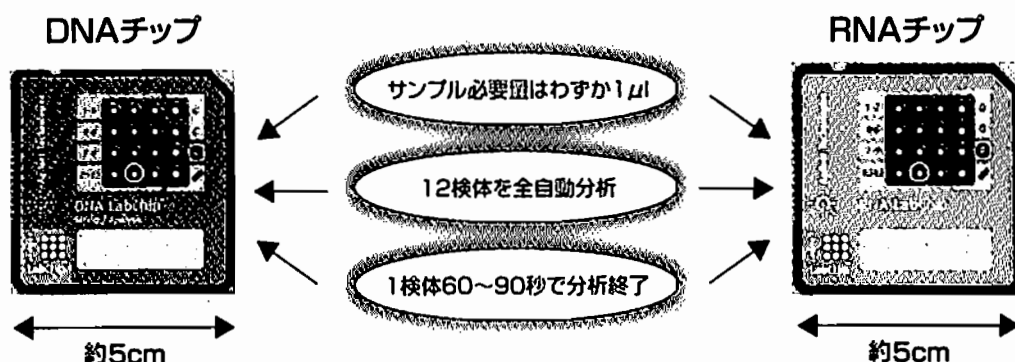
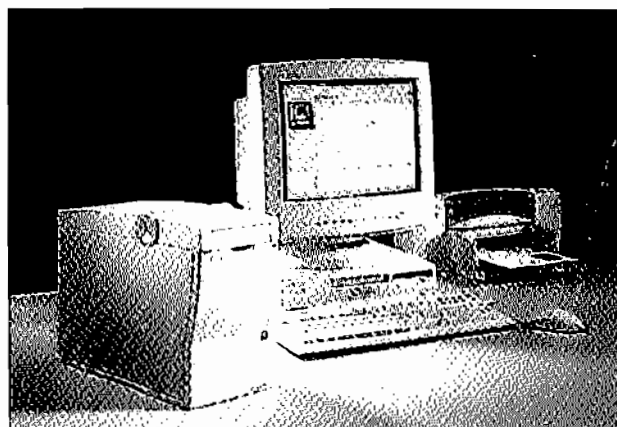
主催 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会

共催 日本分析化学会、日本分析化学会中国・四国支部、日本化学会、日本薬学会、
日本生化学会、クロマトグラフィー科学会、日本電気泳動学会

Agilent 2100 バイオアナライザ

手のひらにのった、サイエンスの未来。
ラボチップ™ テクノロジー

世界で初めて“Lab-on-a-Chip”の技術を利用した分析装置、それがアジレント2100バイオアナライザです。アジレント2100バイオアナライザは、DNA、RNA、SDS-Proteinの電気泳動を全自動で行う装置です。従来、別々の装置で行われていたゲルの作製、電気泳動から、バンドの検出、データ解析の全てを、非常にコンパクトな1台の装置とラボチップ™キットでまとめて行うことができます。ラボチップ™テクノロジーまたはアジレント2100バイオアナライザにご興味をお持ちの方は、横河アナリティカルシステムズ株式会社にご連絡ください。



もうトランスイルミネーターもスキャナーも
必要ありません!

Agilent 2100 バイオアナライザ DNAキットの特長

- ①PCR増幅産物を全自動でサイズ決定
各バンドの濃度を自動定量
- ②3種類のキットをご利用いただけます。
DNA500キット 測定範囲: 25-500bp
DNA7500キット 測定範囲: 100-7500bp
DNA12000キット 測定範囲: 100-12000bp
- ③感度は、エチジウムブロマイド染色に比べ、
約1けた向上。
- ④1枚のチップで12検体を全自動分析。
チップ1枚あたりの分析は約30分で完了。

もうゲルの調製も、器具の洗浄も
必要ありません!

Agilent 2100 バイオアナライザ RNA6000キットの特長

- ①totalRNA、mRNAを全自動で定量
- ②リアルタイムで表示されるエレクトロフェログラムにより、RNAの分解度をクリアにチェック可能
- ③totalRNAについては、rRNAのピークを自動認識。
さらにrRNAの比を全自動で計算
- ④mRNAについては、rRNAのコンタミネーション比率を全自動で計算
- ⑤感度は、エチジウムブロマイド染色に比べ、約50倍向上。
- ⑥1枚のチップで12検体を全自動分析。
チップ1枚あたりの分析は約25分で完了。

近日発売 SDS-Proteinキット

www.agilent.co.jp/chem/yan

横河アナリティカルシステムズ株式会社

営業本部/〒180-8543 東京都荒川区西日暮1-15-5 三鷹高木ビル TEL 0422-56-9393/4

アジレント・テクノロジーは、ヒューレット・パッカートの電子計測、化学分析、電子部品と医療電子の4つの事業が独立した新会社です。



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

SCE 2000

The Millennium Symposium

**Proceedings of
The 20th Symposium on Capillary Electrophoresis**

第20回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2000

要旨集

淡路夢舞台国際会議場・ウェスティンホテル淡路
2000年11月29日(水)～12月1日(金)

主催 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会

**共催 日本分析化学会、日本分析化学会中国・四国支部、日本化学会、日本薬学会、
日本生化学会、クロマトグラフィー科学会、日本電気泳動学会**

実行委員長 馬場嘉信

〒770-8505 徳島市庄町 1-78
徳島大学薬学部薬品物理化学教室
Tel: 088-633-7285, Fax: 088-633-9507
E-mail: ymttbaba@ph.tokushima-u.ac.jp

実行委員

育田夏樹(広島大・工)、江坂幸宏(岐阜薬大)、大塚浩二(姫工大・理)、
渋谷明正(京大院・薬)、鈴木茂生(近畿大・薬)、高柳俊夫(岡山大・理)、竹田さほり(大工研)

SCE2000 ホームページ

<http://www-pclab.ph.tokushima-u.ac.jp/SCE/SCE2000.html>



賛助御礼

本シンポジウム開催にあたり、下記の財団・企業・団体から多額の御助成・御寄付をいただきました。また、下記の企業・団体に展示・広告をお願いいたしました。シンポジウムを代表して、ここに厚く御礼申し上げます。

2000 年 11 月 29 日

第 20 回キャピラリー電気泳動シンポジウム

実行委員長 馬場嘉信

(財)兵庫県国際交流協会

(財)藤井・大塚国際教育研究交流資金

(株)島津製作所

横河アナリティカルシステムズ (株)

旭テクネイオン (株)

(社)日本分析化学会中国・四国支部

SCE2000 広告および展示企業・団体 (2000 年 11 月 15 日現在)

広告掲載企業 (申込み順)

(株)サンティー

日新器械 (株)

横河アナリティカルシステムズ (株)

(株)エイコーサイエンス

ロシュ・ダイアグノスティックス (株)

ライフテックオリエンタル (株)

アブライドバイオシステムズジャパン (株)

古野電気 (株)

四国八洲薬品 (株)

ベックマン・コールター (株)

大島器械 (株)

(株)大一器械

ナカライテスク (株)

(株)ケムコ

サーモクレスト (株)

三洋電機メディカルシステム (株)

片山化学工業 (株)

旭テクネイオン (株)

(株)島津製作所

四国理科 (株)

和光純薬工業 (株)

展示出展企業・団体 (申込み順)

メルク・ジャパン (株)

横河アナリティカルシステムズ (株)

大塚電子 (株)

(株)島津製作所

ヤマト科学 (株)

日製産業 (株)

Wiley-VCH

SCE '01

HPCE 2001

HPLC Kyoto

μTAS 2001, μTAS 2002

第20回キャピラリー電気泳動シンポジウム参加者の皆様へ

会場	受付	淡路夢舞台国際会議場 2F	Registration Desk
	講演会場	淡路夢舞台国際会議場 2F	メインホール
	ポスター会場	淡路夢舞台国際会議場 2F	ホテルへの連絡通路
	展示会場	淡路夢舞台国際会議場 2F	ホテルへの連絡通路
	レセプション	淡路夢舞台国際会議場 2F	レセプションホール B
	バンケット	ウェスティンホテル淡路 1F	宴会場

受付時間：11月29日 11 am - 6 pm; 11月30日 8 am - 6 pm; 12月1日 8 am - 4 pm

座長： 予定時間の30分前までに講演会場受付にお越し下さい。特別・招待講演では、時計係が計時はいたしますが、予鈴はありません。一般講演は、1鈴：10分、2鈴：12分、3鈴：15分といたします。時間厳守をお願いいたします。

口頭発表： 講演時間は1演題あたり15分（質問3分を含む）です。

時間を厳守して下さい。スライド・OHP・ビデオ・LCDプロジェクターが使用可能です。発表の30分前までに受付に使用する機種をお伝え下さい。スライド使用者は、その際にスライド受付にスライドを提出下さい。OHP・ビデオ・LCDプロジェクター（PC持参）は、発表者が操作して下さい。

ポスター発表： 掲示前にポスター受付で、ポスター掲示用のシールを受け取り下さい。

第1日(11月29日)の17:00までに所定の位置に掲示し、第3日(12月1日)の15:00までに撤去して下さい。ポスター賞授与式は、12月1日の13:00から行います。

ポスターセッション I (P101-P128)のコアタイム：11月30日 13:30-14:30

ポスターセッション II (P201-P227)のコアタイム：12月1日 11:00-12:00

ウェルカムレセプション：11月29日(水)の18時から19時までレセプションホールBで開催します。軽いスナックと飲み物を準備（無料）いたします。若手の企画もあります。是非、御参加下さい。

バンケット：11月30日(木)18:30からウェスティンホテル淡路 1F 宴会場で開催いたします。参加者は、チケットをバンケット受付でお示し下さい。

展示会：関連機器、カタログ等の展示会を併設しております。会場は、ポスター会場と同じです。

展示時間：11月29日 3 pm - 6 pm; 11月30日 9 am - 6 pm; 12月1日 9 am - 3 pm

座長一覧

第1日 11月29日(水)

13:00-13:50	20回記念特別講演 I	座長	津田孝雄
13:50-14:40	20回記念特別講演 II	座長	中川照眞
14:40-15:30	20回記念特別講演 III	座長	北森武彦
15:30-16:30	セッション I	座長	荒川秀俊
16:30-17:00	招待講演 I	座長	神野清勝

第2日 11月30日(木)

9:00-10:15	セッション II	座長	小林英三郎
10:25-11:40	セッション III	座長	萩中 淳
11:40-12:30	20回記念特別講演 IV	座長	本田 進
14:30-15:15	セッション IV	座長	釜堀政男
15:15-15:45	招待講演 II	座長	廣川 健
15:55-17:10	セッション V	座長	竹田さほり
17:10-18:00	20回記念特別講演 V	座長	寺部 茂

第3日 12月1日(金)

9:00-10:00	セッション VI	座長	福士恵一
10:00-11:00	セッション VII	座長	志村清仁
13:15-14:30	セッション VIII	座長	大塚浩二
14:30-15:45	セッション IX	座長	西 博行
15:45-17:00	セッション X	座長	波川明正

シンポジウム特別号の出版

Electrophoresis (Wiley-VCH, IF=3.445 in 99)より、本シンポジウムの特別号を出版いたします。投稿規則に従って、シンポジウム期間中は、原稿（オリジナル1部、コピー3部）を投稿デスクまでご投稿下さい。また、シンポジウム後は、12月28日（木）までに下記宛御投稿下さい。なお、ゲストエディターは、馬場嘉信（徳島大・薬）、大塚浩二（姫工大・理）、渋谷明正（京大院・薬）が務めます。

投稿先： 〒770-8505 徳島市庄町1-78 徳島大学薬学部薬品物理化学教室 馬場嘉信
Tel: 088-633-7285, Fax: 088-633-9507, E-mail: ymttbaba@ph.tokushima-u.ac.jp

ポスター賞

本シンポジウムでは、特に優秀なポスターにポスター賞を授与いたします。ポスター賞の選考は、若手ワーキンググループおよび実行委員会があたります。

ポスター賞授与式は、12月1日の13:00から行います。

ポスター賞の副賞は、横河アナリティカルシステムズ（株）、大塚電子（株）、ベックマン・コールター（株）より提供されます。

キャピラリー電気泳動シンポジウム（SCE）シリーズ

第1回 ^a 1981	東京	奥山典生	第12回 1992	姫路	寺部 茂
第2回 ^b 1982	東京	奥山典生	第13回 1993	東京	中村 洋
第3回 ^a 1983	大阪	木曾義之	第14回 1994	京都	中川照眞
第4回 ^a 1984	東京	奥山典生	第15回 1995	広島	廣川 健
第5回 ^a 1985	京都	木曾義之	第16回 1996	名古屋	津田孝雄
第6回 ^c 1986	名古屋	津田孝雄	第17回 1997	八王子	小林英三郎
第7回 ^c 1987	東京	小林英三郎	第18回 1998	福岡	今坂藤太郎
第8回 ^d 1988	京都	木曾義之	第19回 1999	八王子	志村清仁
第9回 ^d 1989	東京	吉田治弘	第20回 2000	淡路島	馬場嘉信
第10回 1990	大阪	本田 進	第21回 2001	神戸	福士恵一
第11回 1991	八王子	津田淑江			

^a細管式等速電気泳動分析シンポジウム
^c細管・等速電気泳動分析シンポジウム

^b等速電気泳動シンポジウム
^d電気泳動分析シンポジウム（細管・等速電気泳動）

第21回キャピラリー電気泳動シンポジウム（予告）

期日 2001年12月 会場 神戸商船大学

問い合わせ先

〒658-0022 神戸市東灘区深江南町 5-1-1

神戸商船大学船貨輸送研究施設

福士恵一

fukushi@cc.kshosen.ac.jp, Tel & Fax: 078-431-6343

第 20 回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2000
SCE 2000 The Millennium Symposium
プ ロ グ ラ ム

第 1 日 11 月 29 日 (水)

開会挨拶 委員長 津田孝雄、実行委員長 馬場嘉信

13:00-13:50 20 回記念特別講演 I 座長 津田孝雄

- S01 **The Role of Capillary Electrophoresis in the Revolution in Bioanalysis in the Beginning of the New Millennium**
○W.S. Hancock and C. Becker (Thermo Finnigan)

13:50-14:40 20 回記念特別講演 II 座長 中川照眞

- S02 **ミセル動電クロマトグラフィーの過去・現在・未来**
寺部 茂 (姫工大・理)

14:40-15:30 20 回記念特別講演 III 座長 北森武彦

- S03 **マイクロマシンの動向とマイクロ化学システムへの期待**
藤田博之 (東大・生産研)

15:30-16:30 セッション I 座長 荒川秀俊

- L01 **マイクロチップ電気泳動装置“MCE-2010”**
-- 石英製チップを用いた UV リニアイメージング --
○中西博昭¹、荒井昭博²、上田輝久² (島津製作所・¹基盤研、²分析機器事業部)
- L02 **マイクロチップ電気泳動解析システムとその応用例について「コスモアイ(日立 SV1100)、i-チップ」**
○井筒 浩¹、小原和彦¹、渡辺博夫¹、○町田浩昭²、萩原久²、宮崎祐輔² (¹日立化成工業・医薬品研、²日立電子エンジニアリング)
- L03 **アジレント 2100 バイオアナライザを用いた生体高分子 (DNA, RNA, 蛋白質) の分析**
○箕浦加穂¹、近藤直人¹、O. Mueller²、M. Kuschel² (¹横河アナリティカルシステムズ、²Agilent Technologies, Inc.)
- L04 **フリーフロー電気泳動モジュールによる試料の高速前処理**
○田島信芳、篠原悦夫 (オリンパス光学工業)

16:30-17:00 招待講演 I 座長 神野清勝

- I01 **Capillary Electrophoresis (CE) and Microfabricated CE Chip: A Powerful Tool of Tumor Markers Determination**
○B. Lin¹、F. Han¹、Q. Yu¹、X. Dong¹、H. Wang¹、Y. Ma²
(¹Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, ²Truman State University)

18:00-19:00 **Night Session by Young Scientists & Welcome Reception at the Reception Hall of Awaji Yumebutai International Conference Center**

第 2 日 11 月 30 日 (木)

9:00-10:15 セッション II 座長 小林英三郎

- L05 **Frit-FAB インターフェースを用いた MEKC-MS の検討**
○山田 郁¹、谷沢善明¹、氏家高志¹、保母敏行² (¹ライオン、²東京都立大院・工)

- L06 CE-MS/MS システムの製薬・蛋白質分析での応用
Albert Fu-Tai Chen, ○新井悦郎 (ベックマン・コールター)
- L07 キャピラリー電気泳動/質量分析用の大気圧化学イオン化インターフェースの開発
○田中喜秀¹, 大塚浩二², 竹田さほり³, 脇田慎一³, 寺部 茂² (¹日本ペーリンガーイ
ンゲルハイム, ²姫工大・理, ³大工研)
- L08 オンライン試料濃縮による MEKC-APCI-MS 分析の高感度化
○磯尾賢太郎, 山本和都, 大塚浩二, 寺部 茂 (姫工大・理)
- L09 オンライン前濃縮による CZE の高感度分析とフェログラムの解析
○廣川 健, 育田夏樹, 吉山竜也, 岡本 光 (広島大・工)

10:15-10:25 休憩

10:25-11:40 セッション III 座長 萩中 淳

- L10 マイクロチップを使った高効率化学合成
○久本秀明¹, 北森武彦^{1,2} (¹東大院・工, ²KAST)
- L11 高分子を用いたキャピラリーチップ電気クロマトグラフィーの開発
○内山一美, 徐 偉, 保母敏行 (東京都立大院・工)
- L12 PDMS-ガラスハイブリッドマイクロチップによる遺伝子解析
Hong Jong Wook^{1,3}, ○藤井輝夫², 関 実¹, 山本貴富喜², 遠藤 勲³ (¹東大院・工,
²東大・生産研, ³理研)
- L13 チャンネル中での DNA 1 分子の操作と加工
○平野 研, 松澤有希子, 安田八郎, 桂進司, 水野 彰 (豊橋技科大・エコロジー工学系)
- L14 微小空間での長鎖 DNA のダイナミクス
○上田正則, 加地範匡, 馬場嘉信 (徳島大・薬, 科技団 CREST)

11:40-12:30 20 回記念特別講演 IV 座長 本田 進

- S04 **High-Throughput Screening Based on Multiplexed CE and Absorption**
E.S. Yeung (Iowa State University)

12:30-13:30 休憩

13:30-14:30 ポスターセッション I (P101-P128)

14:30-15:15 セッション IV 座長 釜堀政男

- L15 キャピラリー電気泳動による大腸菌 Vero 毒素 O-157 遺伝子の検出
○荒川秀俊, 柏崎宏幸, 渡辺一之, 前田昌子 (昭和大・薬)
- L16 迅速グラフ法による ssDNA 分離時のレブテーション評価
○相澤克則^{1,2,3}, 柴田一浩^{1,2,3}, 村松正實^{1,2,3}, 林崎良英^{1,2,3,4} (¹CREST, JST, ²理研・ゲ
ノム科学総研セ, ³理研・筑波研, ⁴筑波大・医)
- L17 "ビーズアレイ" による DNA 解析
○小原賢信, 陳 鋼, 岡野和宣, 神原秀記 (日立製作所・中研)

15:15-15:45 招待講演 II 座長 廣川 健

- I02 **Effects of Polymer Chemistry on DNA Sequencing and SNP Detection Separations by Microchannel Electrophoresis**
M.N. Albarghouthi, I.V. Kourkine, B.A. Buchholz, E.A.S. Doherty, ○A.E. Barron (Northwestern University)

15:45-15:55 休憩

15:55-17:10 セッション V 座長 竹田 さほり

- L18 SELDI プロテインチップシステムによる培養上清中に含まれるペプチドの分析
○佐藤香枝、佐々木一樹、山口 建 (国立がん研)
- L19 プロテオーム解析に用いるフリーフローモジュールによるタンパク分離
○小林英三郎¹、太田和希¹、目黒一輝¹、長濱久花¹、田島信芳²、篠原悦夫² (¹城西大・理、²オリンパス光学工業)
- L20 マイクロチップ電気泳動による糖誘導体の高速分析
○鈴木茂生¹、斎藤由香¹、下津範久¹、本田 進¹、荒井昭博²、中西博昭² (¹近畿大・薬、²島津製作所・基盤研)
- L21 環境モニタリング用マイクロ電気泳動チップ (VIII) : 環境水中の溶存有機物質のキャラクタリゼーション
○脇田慎一¹、竹田さほり¹、千葉篤志²、福士恵一³、中西博昭⁴、松田十四夫² (¹大工研、²立命館大・理工、³神戸商船大、⁴島津製作所・基盤研)
- L22 キャピラリー内酵素反応を利用した生体成分分析チップ
○民谷栄一、森田智之、村上裕二 (北陸先端科学技術大学院大学)

17:10-18:00 20 回記念特別講演 V 座長 寺部 茂

S05 Lab-on-a-Chip Technology in the New Millennium
J.M. Ramsey (Oak Ridge National Laboratory)

18:30-20:30 Banquet at The Westin Awaji Island (バンケット ウェスティンホテル淡路)

第 3 日 12 月 1 日 (金)

9:00-10:00 セッション VI 座長 福士恵一

- L23 キャピラリー電気泳動による微生物の分離と定量的検出
○山田一隆^{1,2}、鳥村政基¹、蔵田信也^{1,2}、鎌形洋一¹、金川貴博¹、加納健司³、池田篤治³、横幕豊一²、倉根隆一郎¹
(¹通産省工技院・生命工学研、²環境エンジニアリング、³京大院・農)
- L24 高分子ミセルをコートしたマイクロキャピラリーを用いたリンパ球分離
○足立作一郎¹、桑原智枝²、沖明男¹、高村 禅¹、片岡一則¹、長崎幸夫²、堀池靖浩¹
(¹東大院・工、²東京理大・基礎工)
- L25 蛍光標識ペプチド等電点マーカーの安定性について
○紙谷圭一郎¹、志村清仁¹、笠井献一¹、松本浩幸² (¹帝京大・薬、²分子バイオホトニクス研)
- L26 電気浸透流抑制剤の存在下におけるタンパク質の電気泳動挙動：ポリアクリルアミドコートキャピラリーによる評価
○久保兼信、服部 愛 (近畿大・薬)

10:00-11:00 セッション VII 座長 志村清仁

- L27 ヒト T リンパ芽球性白血病細胞株 Jurkat 細胞中に熱ショックで増加する thymosin β -4 の電気泳動的解析と機能部位の検討
○中村和行¹、三谷紀之¹、藤本正憲¹、衣笠仁美²、寺部 茂² (¹山口大・医、²姫工大・理)
- L28 HPFA/CE を用いるヒト α 1-酸性糖タンパク質 variant の立体選択的薬物結合解析
○黒田幸弘、喜多陽子、澁川明正、中川照真 (京大院・薬)
- L29 サイズ分離キャピラリー電気泳動におけるタンパク質量法の検討
○向井 準、猶原暢洋、山口奈緒、真鍋 敬 (愛媛大・理)
- L30 キャピラリー電気泳動を利用するエンド型ヒアルロン酸分解酵素の酵素反応解析
木下充弘、小田泰雄、○掛樋一晃 (近畿大・薬)

11:00-12:00 ポスターセッション II (P201-P227)

12:00-13:00 休憩

13:00-13:15 ポスター賞授与式

13:15-14:30 セッション VIII 座長 大塚浩二

- L31 高感度アダマール変換キャピラリー電気泳動の開発
○小佐井一樹, 金田 隆, 今坂藤太郎 (九大院・工)
- L32 顕微鏡下におけるマイクロ電気クロマトグラフィーシステムの構築
○榊 隆弘¹, 北川慎也², 津田孝雄¹ (名古屋工大・¹工、²VBL)
- L33 繊維を固定相とするキャピラリー電気クロマトグラフィー
神野清勝, ○渡辺博史 (豊橋技科大・第5工学系)
- L34 多孔性シリカモノリス型カラムの CEC における特性解析
○小林宏資¹, 池上 亨¹, 細矢 憲¹, 田中信男¹, 石塚紀生², 水口博義², 中西和樹²
(¹京都工繊大・繊維, ²京大院・工)
- L35 交流電場を用いた電気クロマトグラフィー
○佐藤雅彦¹, 北川慎也², 津田孝雄¹ (名古屋工大・¹工、²VBL)

14:30-15:45 セッション IX 座長 西 博行

- L36 キャピラリー電気泳動法を用いた太陽光線被曝ラット組織中の新ヒスチジン代謝産物 S-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl]glutathione の測定
○絹田正裕, 益岡典芳, 太田 潤, 阿部匡史, 大塚 淳, 李 順愛 (岡山大・医)
- L37 キャピラリー電気泳動による薬物の高速 pKa スクリーニング法の開発
○石濱 泰, 浅川直樹 (エーザイ分析研)
- L38 統計学的手法によるオフロキサシン類縁物質一斉分離 CE 条件の迅速確立
○今野竹晃, 山崎憲一 (第一製薬・製薬研)
- L39 覚せい剤関連化合物の Highly Sulfated Gamma Cyclodextrin を用いた光学分割キャピラリー電気泳動
○岩田祐子¹, Agnes Garcia², 金森達之¹, 大前義仁¹, 小林寛也³, 井上博之¹, 岸徹¹, Ira Lurie⁴ (¹科警研, ²米国薬物取締局南東研, ³長野県警科捜研, ⁴米国薬物取締局特別試験研)
- L40 キラル充填剤を用いるキャピラリー電気クロマトグラフィーによる光学異性体の分離(4)
○川村浩司, 大塚浩二, 寺部 茂 (姫工大・理)

15:45-17:00 セッション X 座長 渋川明正

- L41 多糖類をキラルセクターとしたキャピラリー電気泳動による医薬品の光学異性体分離
○桑原由佳里, 西 博行 (田辺製薬・製品技術研)
- L42 非水系を用いたパラキノンアニオンラジカルの電気泳動
○江坂幸宏, 奥村典子, 宇野文二, 後藤正志 (岐阜薬大)
- L43 CZE における定量分析の再現性
○育田夏樹, 吉山竜也, 岡本 光, 廣川 健 (広島大・工)
- L44 キャピラリー電気泳動における S/N の向上 — スリット幅の最適化
○北岸恵子, 佐藤康博 (大塚電子)
- L45 一時的等速電気泳動を利用したキャピラリーゾーン電気泳動法による環境水中の亜硝酸及び硝酸イオンの定量: 複数のターミナルイオンの直接導入
○石尾暢宏¹, 宮道 隆², 西尾秀明¹, 道場加奈子¹, 福士恵一¹, 齊藤恵逸², 竹田さほり³, 脇田慎一³ (¹神戸商船大・船貨輸送研, ²神戸大・発達科学, ³大工研)

第 21 回キャピラリー電気泳動シンポジウム開催予告 次期実行委員長 福士恵一
閉会挨拶 実行委員長 馬場嘉信

ポスターセッション

(第1日(11月29日)の17:00までに所定の位置に掲示し、

第3日(12月1日)の15:00までに撤去して下さい)

ポスター賞授与式は、12月1日の13:00から行います。

ポスターセッション I (P101-P128) コアタイム: 11月30日 13:30-14:30

- P101 マイクロチップ電気泳動におけるオンライン試料濃縮
○世良洋一, 松原則男, 大塚浩二, 寺部 茂 (姫工大・理)
- P102 レーザー光熱変換効果によるマイクロチャンネル内の超高速化学反応制御
○Maxim Slyadnev¹, 田中有希², 渡慶次学¹, 北森武彦^{1,2} (¹KAST, ²東大院・工)
- P103 マイクロチップ型電気泳動による DNA 解析
○渥美 彩, 馬場嘉信 (徳島大・薬, 科技団 CREST)
- P104 キャピラリー PCR による高速遺伝子増幅
○畠岡由香利, 馬場嘉信 (徳島大・薬, 科技団 CREST)
- P105 マイクロチップ電気泳動とキャピラリー電気泳動によるゲノム多型解析
○遠藤由規, 馬場嘉信 (徳島大・薬, 科技団 CREST)
- P106 オンライン試料濃縮を用いるミセル動電クロマトグラフィーによるアミノ酸誘導体の高感度分析(2)
○佐伯知香, 大塚浩二, 寺部 茂 (姫工大・理)
- P107 陽イオン界面活性剤を用いる MEKC における EOF 抑制条件下でのオンライン試料濃縮
○金 宗福, 大塚浩二, 寺部 茂 (姫工大・理)
- P108 キャピラリー電気泳動によるカルボン酸のオンライン濃縮・分離
○井上直子, 大塚浩二, 寺部 茂 (姫工大・理)
- P109 キャピラリー電気泳動によるクロロフェノール類のオンライン濃縮法の検討 (II)
○竹田さほり¹, 茶山健二², 辻治雄², 福土恵一³, 山根昌隆¹, 城間純¹, 脇田慎一¹
(¹大工研, ²甲南大・理, ³神戸商船大)
- P110 等速電気泳動オンライン前濃縮-CZEによる希土類イオンの高感度分析
○岡本 光, 育田夏樹, 廣川 健 (広島大・工)
- P111 ポリオキシメタレート錯体生成に基づく CE 分析へのスタッキング効果
○中島陽一¹, 西川仁², 後藤拓哉², 北角巖², 姫野貞之² (¹大阪府産技総研, ²神戸大・理)
- P112 中空キャピラリーによる CEC
藤本忠蔵 (浜松医大)
- P113 キャピラリー電気泳動 -原子吸光分光分析装置(CE-AAS)の開発 (IV)
○山内利朗¹, 育田夏樹¹, 廣川 健¹, 中川利久², 酒井真澄² (¹広島大・工, ²島津製作所)
- P114 スパッタカーボンと微小薄層ラジアルフローセルを用いたアルキルフェノールの電気化学測定と電気泳動検出器への適用
○由 天艶¹, 丹羽 修¹, 栗田僚二², 林 勝義¹, 廣野 滋³ (¹NTT 生活環境研, ²NTT-AT, ³NTT アフテイ)
- P115 オンプレート CE-MALDI-TOF/MS 法の開発と生体成分分析への応用
尾島典行, 山本高大, ○升島 努 (広島大・医総薬)
- P116 パラボリックフィールド型 TOF/MS を検出器とする核酸塩基のキャピラリー電気泳動測定
○古本理郎, 福本敬夫, 渡會 仁 (大阪大院・理)
- P117 α1-酸性糖タンパク質のグライコフォーム分析 -キャピラリー電気泳動オフライン MALDI-TOFMS
○木下充弘, 川上大輔, 清一雄, 遠藤香織, 小田泰雄, 掛樋一晃 (近畿大・薬)
- P118 キャピラリー電気泳動による環境試料のイオン分析
○佐藤康博 (大塚電子)
- P119 キャピラリー電気泳動を用いた無機陰イオン、有機酸、アミノ酸、核酸および糖を含む陰イオン 200 化合物 の分析法
○曾我朋義¹, 野上知花¹, 今泉宗大² (¹横河アナリティカルシステムズ, ²豊橋技科大)

- P120 日本で飼育されているネコの血漿タンパク質と血球酵素型の遺伝的多型性について
○吉田治弘¹、廣田順子²、臼井玲子³ (¹専修大、²アリスどうぶつ病院、³臼井犬猫病院)
- P121 New method for DNA sequencing -Pyrosequencing- :Comparative study between pyrosequencing and gel-based sequencing
○Zhou Guohua, Masao Kamahori, Kunio Harada, Kazunori Okano and Hideki Kambara, (Hitachi Ltd.)
- P122 キャピラリーアレイゲル電気泳動を応用したDNA自動分取装置の分離性能
○入江隆史¹、福村龍太郎²、荒木良子²、嶋本桃子¹、安倍真澄²、神原秀記¹ (¹日立製作所・中研、²放射線医学総合研究所)
- P123 電気化学検出 - キャピラリー電気泳動によるDNA損傷分析法の開発
○稲垣真輔、江坂幸宏、後藤正志、酒向孫市、出屋敷喜宏 (岐阜薬大)
- P124 キャピラリーアレイ電気泳動によるSNPs解析
○吉田千穂、馬場嘉信 (徳島大・薬、科技団 CREST)
- P125 キャピラリー電気泳動におけるDNA分離のためのポリマーの検討
○田中靖子、馬場嘉信 (徳島大・薬、科技団 CREST)
- P126 1分子DNAの可視化とマニピュレーション
○加地範匡、上田正則、馬場嘉信 (徳島大・薬、科技団 CREST)
- P127 タンパク質およびインターカレート型蛍光試薬とDNAの相互作用解析
○Abd El-Maaboud Ismail Mohamed, 加地範匡、上田正則、馬場嘉信 (徳島大・薬、科技団 CREST)
- P128 トリプレットリピート DNA のキャピラリー電気泳動による分離と AFM によるコンフォメーション解析
○中川達夫、上田正則、馬場嘉信 (徳島大・薬、科技団 CREST)

ポスターセッションⅡ (P201-P227) コアタイム: 12月1日 11:00-12:00

- P201 硫酸ウンデシレニルナトリウムオリゴマーおよびウンデセン酸ナトリウムオリゴマーを擬似固定相として用いる MEKC における高濃度有機溶媒の添加
○和田光弘、大塚浩二、寺部 茂 (姫工大・理)
- P202 非水系 CE を用いた生薬成分アルカロイド類の分離
○内田大介、江坂幸宏、後藤正志、飯沼宗和 (岐阜薬大)
- P203 フリーフロー等速電気泳動における泳動界面の攪乱
○石川 誠、村上隆太郎、育田夏樹、廣川 健 (広島大・工)
- P204 キャピラリー電気泳動自動解析システムの開発 (IV)
○吉山竜也、育田夏樹、廣川 健 (広島大・工)
- P205 キャピラリー電気泳動の半導体分野への応用
○笹 一志、北岸恵子 (大塚電子)
- P206 新規キラル界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィーによる光学異性体の分離
○岩井義行¹、中村正樹²、大塚浩二¹、寺部 茂¹ (¹姫工大・理、²大阪市工研)
- P207 Enantiomer separations by open tubular capillary electrochromatography, open tubular liquid chromatography and affinity electrokinetic chromatography
○Zhen Liu, Koji Otsuka, Shigeru Terabe (Himeji Institute of Technology)
- P208 Glucuronyl glucosyl β -cyclodextrin をセクターとして用いたキャピラリー電気泳動による塩基性薬物の光学分割
○松永久美、萩中 淳 (武庫川女大・薬)
- P209 HPFA/CE を用いる酸化 LDL の薬物親和性増大機構の研究
○渡邊義敬、黒田幸弘、澁川明正、半田哲郎、中川照真 (京大院・薬)
- P210 キャピラリー電気泳動法によるフェノールフタレインの酸解離反応解析
○高柳俊夫、本水昌二 (岡山大・理)

The 20th Symposium on Capillary Electrophoresis

SCE 2000 The Millennium Symposium

November 29 - December 1, 2000, Awaji Yumebudai International Conference Center, Hyogo

PROGRAM

Wednesday, Nov. 29

Welcome and Opening of Symposium

Yoshinobu Baba, *Symposium Chairman*

Takao Tsuda, *Chairman, Division of Electrophoretic Research, Japan Society of Analytical Chemistry*

13:00 - 13:50

Plenary Lecture I

Chair: Takao Tsuda

S01. THE ROLE OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE REVOLUTION IN BIOANALYSIS IN THE BEGINNING OF THE NEW MILLENNIUM

*William S. Hancock and Chris Becker, *Thermo Finnigan*

13:50 - 14:40

Plenary Lecture II

Chair: Terumichi Nakagawa

S02. MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY: PAST, PRESENT AND FUTURE

Shigeru Terabe, *Himeji Institute of Technology*

14:40 - 15:30

Plenary Lecture III

Chair: Takehiko Kitamori

S03. RECENT DEVELOPMENT OF MICROMACHINES AND PROSPECTIVE APPLICATIONS IN MICRO CHEMICAL SYSTEMS

Hirofumi Fujita, *University of Tokyo*

15:30 - 16:30

Session I

Chair: Hidetoshi Arai

L01. Microchip Electrophoresis System "MCE-2010" -- Linear Imaging UV Detector Using Quartz Chips -- *Hiroaki Nakanishi (1), Akihiro Arai (2), Teruhisa Ueda (2), (1)Technology Research Laboratory, Shimadzu Corp., (2)Analytical Instruments Division, Shimadzu Corp.

L02. Micro-chip Electrophoretic Analytical System and Its Applications, *Hiroshi Izutsu (1), Kazuhiko Obara (1), Hiroo Watanabe (1), Hiroaki Machida (2), Hisashi Hagiwara (2), Yuusuke Miyazaki (2), (1)Pharmaceutical Research Lab., Hitachi Chemical Co., Ltd., (2)Electronic Equipments Div., Hitachi Electronics Engineering Co., Ltd.

L03. Analysis of Biomacromolecule (DNA, RNA and Protein) using Agilent 2100 BioAnalyzer, *Kaho Minoura (1), Naoto Kondo (1), Odilo Mueller (2), Meike Kuschel (2), (1)Yokogawa Analytical Systems Inc., (2)Agilent Technologies Inc.

L04. Free flow electrophoresis module for rapid sample preparation, *Nobuyoshi Tajima, Etsuo Shinohara, *Life-science Technology Research Center, Olympus Optical Co., Ltd.*

16:30 - 17:00

Invited Lecture I

Chair: Kiyokatsu Jinno

I01. CAPILLARY ELECTROPHORESIS (CE) AND MICROFABRICATED CE CHIP: A POWERFUL TOOL OF TUMOR MARKERS DETERMINATION

*Bingcheng Lin (1), Futan Han (1), Qingnan Yu (1), Xiuling Dong (1), Hui Wang (1), Yinfa Ma (2), (1)Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, (2)Truman State University

18:00 - 19:00 Night Session by Young Scientists & Welcome Reception at the Reception Hall of Awaji Yumebutai International Conference Center

Thursday, Nov. 30

9:00 - 10:15

Session II

Chair: Hidesaburo Kobayashi

L05. A Study of MEKC-MS with Frit-FAB Interface, *Kaoru Yamada (1), Yoshiaki Tanizawa (1), Takashi Ujiie (1), and Toshiyuki Hobo (2), (1)LION Corporation, (2)Faculty of Engineering, Tokyo Metropolitan University

L06. An Integrated CE-MS/MS System for Drug Discovery and Protein Characterization Application, Albert Fu-Tai Chen, *Etsuo Arai, *BECKMAN COULTER K.K.*

L07. Development of Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface for Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry, *Yoshihide Tanaka (1), Koji Otsuka (2), Sahori Takeda (3), Shin-ichi Wakida (3), and Shigeru Terabe (2), (1)Department of Analytical Chemistry, Nippon Boehringer Ingelheim, Co. Ltd, (2)Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, (3)Department of

- P211 キャピラリー電気泳動による錯体解離反応ダイナミックスの研究
○田中裕剛、河津博文（近畿大・九州工）
- P212 アミロイドベータ蛋白と金属錯体との相互作用
○西野 敏、西田雄三（山形大・理）
- P213 過酸化水素存在下での蛋白質と金属錯体との相互作用
西野 敏、○西田雄三（山形大・理）
- P214 ポリオキソメタレート錯体生成に基づく CE 分析に及ぼす有機溶媒の効果
○後藤拓哉¹、中島陽一²、姫野貞之¹（¹神戸大・理、²大阪府産技総研）
- P215 ヘテロポリオキソメタレート錯体生成反応の CE への応用 II. 遷移金属イオンの分析
○北角 巖¹、中島陽一²、姫野貞之¹（¹神戸大・理、²大阪府産技総研）
- P216 鉱物油重層による試料の水分蒸発抑制とキャピラリーアフィノフォレスス試料の微量化
○内山 昇、荒田洋一郎、平林 淳、志村清仁、笠井献一（帝京大・薬）
- P217 キャピラリー電気泳動によるタンパク質の解析
○田淵真理¹、馬場嘉信^{2,3}（¹岡本電機、²徳島大・薬、³科技団 CREST）
- P218 キャピラリー等電点電気泳動による神経疾患の患者脳脊髄液中βトレース蛋白（リボカリニン型プロスタグランディンD合成酵素）の Charge Microheterogeneity の検討
○平岡 厚¹、清水興介²、織田浩司²、江口直美³、裏出好博³、富永格⁴、馬場宏治⁴（¹杏林大・保健、²マルハ、³大阪バイオサイエンス研、⁴国立下総療養所）
- P219 レクチン修飾キャピラリーからの糖タンパク質の温度による溶出
○山中秀徳、曾田裕行、吉廻公博、長谷川幸雄（アマシャムファルマシアバイオテク）
- P220 キャピラリー電気泳動法による糖鎖—タンパク質結合解析法のレーザー励起蛍光検出による微量化
○多賀 淳、米屋智博、氏丸真理子、本田 進（近畿大・薬）
- P221 キャピラリー電気泳動による乳汁オリゴ糖の分析
○鈴木茂生、奥田佐枝子、黒岩美和、松浦直子、多賀 淳、本田 進（近畿大・薬）
- P222 キャピラリー電気泳動によるグリコーゲンの構造研究
○西川篤、多賀 淳、鈴木茂生、本田 進（近畿大・薬）
- P223 蛍光キャピラリー電気泳動による微生物の分離検出
○新谷智吉¹、山田一隆^{2,3}、鳥村政基²（¹愛媛県工技セ、²通産省工技院・生命工研、³環境エンジニアリング）
- P224 赤血球に適用可能な分離分析手法への磁性体の利用
○加藤勇治、北川慎也、奥田高士、津田孝雄（名古屋工大・工）
- P225 紫外吸光検出器と顕微鏡によるシングルセルレベルにおけるヒト赤血球の同時観測
○山内規寛¹、北川慎也²、津田孝雄¹（名古屋工大・¹工、²VBL）
- P226 チーズの加熱による遊離アミノ酸の変化
津田淑江、○竹内枝穂、山田正子、中澤勇二（共立女短大）
- P227 食品中糖類の分析
○川橋高子、笹 一志（大塚電子）
- P228 Separation, quantification and determination of pharmacokinetics of clenbuterol in the horse
○OCE Uboh^{1,2}、LR Soma²、F Guan²、EK Birks²、D Teleis²、JA Rudy¹、DS Tsang²、AO Watson¹、TD Teel²、
（¹West Chester University、²University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine、³New Bolton Center Campus）

Energy and the Environment, Osaka National Research Institute, AIST, MITI

- L08. **Improvement of Sensitivity in MEKC-APCI-MS Analysis Using On-line Sample Concentration**
*Kentaro Isoo, Wato Yamamoto, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, *Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*
- L09. **High Sensitive Analysis by CZE using On-line Preconcentration Techniques and Analysis of the Obtained Electropherograms,** *Takeshi Hirokawa, Natsuki Ikuta, Tatsuya Yoshiyama, and Hikaru Okamoto, *Faculty of Engineering, Hiroshima University*

10 : 15 - 10 : 25 **Break**

- 10:25 - 11:40 **Session III** **Chair: Jun Haginaka**
- L10. **Highly Efficient Chemical Synthesis by Using Microchip,** *Hidcaki Hisamoto (1), Takchiko Kitamori (1,2), (1)*Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo,* (2) *Integrated Chemistry Project, Kanagawa Academy of Science and Technology*
- L11. **Development of Capillary chip electrochromatography with polymeric material,** *Katsumi Uchiyama, Wei Xu, Toshiyuki Hobo, *Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo Metropolitan University*
- L12. **Monolithic PDMS-Glass Hybrid Microchip for Genetic Analysis,** Jong Wook Hong (1,3), *Teruo Fujii (2), Minoru Seki (1), Takatoki Yamamoto (2) and Isao Endo (3), (1)*Department of Chemistry and Biotechnology, The University of Tokyo,* (2)*Institute of Industrial Science, The University of Tokyo,* (3)*Biochemical Systems Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)*
- L13. **Manipulation and Processing of a Single DNA Molecule inside Channels for Genome Analysis,** *Ken Hirano, Yukiko Matsuzawa, Hachiro Yasuda, Shinji Katsura, and Akira Mizuno, *Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of Technology*
- L14. **Dynamics of a long DNA in small systems,** *Masanori Ueda (1,2), Noritada Kaji (1,2), and Yoshinobu Baba (1,2), (1)*CREST, JST,* (2)*Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima*

- 11:40 – 12:30 **Plenary Lecture IV** **Chair: Susumu Honda**
- S04. **HIGH-SPEED HIGH-THROUGHPUT SCREENING BASED ON MULTIPLEXED CE AND ABSORPTION DETECTION,** Edward S. Yeung, *Iowa State University*

12 :30 –13:30 **Lunch Break**

13 :30 – 14:30 **Poster Session I** (P101 - P128)

- 14:30-15:15 **Session IV** **Chair: Masao Kamahori**
- L15. **Detection of Two variant verotoxin genes in Escherichia coli by capillary electrophoresis,** *Hidetoshi Arakawa, Hiroyuki Kashiwazaki, Kazuyuki Watanabe, Masako Maeda, *School of Pharmaceutical Sciences, Showa University*
- L16. **Rapid Graphic Method to Evaluate the Reputation of Single-stranded DNA in Capillary Electrophoresis,** *Katsunori Aizawa (1), Kazuhiro Shibata (1), Masami Muramatsu (1), and Yoshihide Hayashizaki(1,2), (1)*Genome Exploration Research Group, RIKEN, Genomic Science Center (GSC) RIKEN Yokohama Institute, and Genome Science Laboratory, RIKEN Tsukuba Institute, CREST, Japan Science and Technology Corporation* (2)*Department of Medicine, Tsukuba University*
- L17. **DNA analysis by "beads-array",** *Yoshinobu Kohara, Gang Chen, Kazunori Okano and Hideki Kambara, *Hitachi Ltd., Central Research Laboratory*

- 15:15-15:45 **Invited Lecture II** **Chair: Takeshi Hirokawa**
102. **EFFECTS OF POLYMER CHEMISTRY ON DNA SEQUENCING SEPARATIONS BY MICROCHANNEL ELECTROPHORESIS,** Methal N. Albarghouthi, Brett A. Buchholz, Erin A. S. Doherty and *Annelise E. Barron, *Northwestern University*

15:45 –15:55 **Break**

- 15:55 –17:10 **Session V** **Chair: Sahori Takeda**
- L18. **Analysis of peptides in culture medium by SELDI ProteinChip system,** *Kae Sato, Kazuki Sasaki, Ken Yamaguchi, *Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute*
- L19. **Separation by Free Flow Electrophoresis Module for Proteome Analysis,** *Hidesaburo Kobayashi(1), Kazuki Ohta (1), Ikki Meguro (1), Hisaka Nagahama (1), Nobuyoshi Tajima (2), Etsuo Shinohara (2), (1)*Faculty of Science, Josai University,* (2) *Olympus Optical Co.,Ltd.*
- L20. **Fast Analysis of Carbohydrate Derivatives by Microchip Electrophoresis,** *Shigeco Suzuki (1), Yuka Saito (1), Norihisa Shimotsu (1) and Susumu Honda (1), Akihiro Arai (2), Hiroaki Nakanishi (2), (1)*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,* (2) *Shimadzu Corp*
- L21. **Microchip Based Capillary Electrophoresis for Environmental Monitoring (VIII) :**

Characterization of Dissolved Organic Substances in Environmental Waters, *Shin-ichi Wakida (1,2), Sahori Takeda (1), Atsushi Chiba (2), Keiichi Fukushi (3), Hiroaki Nakanishi (4), and Toshio Matsuda (2), (1)Osaka National Research Institute, AIST, (2)Faculty of Science and Technology, Ritsumeikan University, (3)Kobe University of Mercantile, (4) Shimadzu Corp.

- L22. On-capillary Enzymatic Reaction for On-chip Biomedical Analysis, *Eiichi Tamiya, Tomoyuki Morita, Yuji Murakami, Japan Advanced Institute of Science and Technology

17:10 -18:00 Plenary Lecture V Chair: Shigeru Terabe

- S05. LAB-ON-CHIP TECHNOLOGY IN THE NEW MILLENNIUM,
J. Michael Ramsey, Oak Ridge National Laboratory

18:30 -20:30 Banquet at The Westin Awaji Island

Friday, Dec. 1st

9:00 - 10:00 Session VI Chair: Keiichi Fukushi

- L23. Separation and Quantitative Detection of Microbial Cell by Capillary Electrophoresis, *Kazutaka Yamada (1,2), Masaki Torimura (1), Shinya Kurata (1,2), Yoichi Kamagata (1), Takahiro Kanagawa (1), Kenji Kano (3), Tokuji Ikeda (3), Toyokazu Yokomaku (2), and Ryuichiro Kurane (1), (1)Applied Microbiology Division, National Institute of Bioscience and Human-Technology, AIST, (2)Research and Development Laboratory, Kankyo Engineering Co., LTD. (3) Kyoto University
- L24. Study on Separation of Lymphocytes in Polymeric Micelles Coated Micro Chip, *Sakuitiro Adachi(1), Chic Kuwahara(1), Akio Oki(1), Yuzuru Takamura(1), Kazunori Kataoka(1), Yukio Nagasaki(2) and Yasuhiro Horike(1), (1)School of Materials Science, The University of Tokyo, (2) School of Materials Science, Science University of Tokyo
- L25. On the stability of fluorescent peptide isoelectric point markers, *Keiichi Kamiya (1), Kiyohito Shimura (1), Ken-ichi Kasai (1), Hiroyuki Matsumoto (2), (1)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University (2)Laboratory of Molecular Biophotonics
- L26. Assessment Study of the Electrophoretic Behavior of Proteins in the Presence of Electroosmotic Modifiers: Protein-Modifier Interaction Studied Using Polyacrylamide-Coated capillary, *Kancnobu Kubo, Ai Hattori, School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

10:00 - 11:00 Session VII Chair: Kiyohito Shimura

- L27. Separation and Functional Analysis of Heat Shock-Inducible Thymosin β -4 in A Human T Lymphoblastic Cell Line, Jurkat Cells by Two-Dimensional Electrophoresis and Capillary Electrophoresis, *Kazuyuki Nakamura (1), Noriyuki Mitani (1), Masanori Fujimoto (1), Hitomi Kinugasa (2) and Shigeru Terabe (2), (1)Department of Biochemistry and Biomolecular Sensing, Yamaguchi University School of Medicine, (2)Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- L28. Enantioselective Drug Binding Analysis of Genetic Variants of Human α_1 -Acid Glycoprotein using High Performance Frontal Analysis / Capillary Electrophoresis, *Yukihiro Kuroda, Yoko Kita, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
- L29. Studies on the Quantitative Analysis of Proteins by Sieving SDS Capillary Electrophoresis, *Jun Mukai, Nobuhiro Naohara, Nao Yamaguchi, Takashi Manabe, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ehime University
- L30. Evaluation of the Action Pattern of Endo-Type Hyaluronidase Using Capillary Electrophoresis, *Mitsuhiro Kinoshita, Yasuo Oda and Kazuaki Kakehi, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

11:00-12:00 Poster Session II (P 201 - P 227)

12:00 -13:00 Lunch Break

13:00 - 13:15 Poster Awards Presentation

13:15 - 14:30 Session VIII Chair: Koji Otsuka

- L31. Development of high sensitivity Hadamard capillary electrophoresis, *Kazuki Kosai, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka, Faculty of Engineering, Kyushu University
- L32. Miniature capillary electrochromatographic system with electrochemical detection for the set-up on a stage of microscope, *Takahiro Sakaki (1), Shinya Kitagawa (2), Takao Tsuda (1), (1)Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, (2)Venture Business Laboratory, Nagoya Institute of Technology
- L33. Capillary Electrochromatography Using Fibers as a Stationary Phase, Kiyokatsu Jinno and *Hiroshi Watanabe, School of Materials Science, Toyohashi University of Technology

- L34. Characterization of porous silica monolithic columns in capillary electrochromatography, *Hiroshi Kobayashi (1), Nobuo Tanaka (1), Norio Ishizuka (2), Hiroyoshi Minakuchi (2), Kazuki Nakanishi (2), (1)Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, (2)Division of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University
- L35. Electrochromatography using AC electric field, *Masahiko Sato (1), Shinya Kitagawa (2), Takao Tsuda (1), (1)Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, (2)Venture Business Laboratory, Nagoya Institute of Technology

14:30 - 15:45

Session IX

Chair: Hiroyuki Nishi

- L36. Determination of S-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl] glutathione, a new metabolite of L-histidine, in rat tissues after sunlight irradiation by capillary electrophoresis, *Masahiro Kinuta, Noriyoshi Masuoka, Jun Ohta, Tadashi Abe, Atsushi Otsuka and Shun-Ai Li, Department of Biochemistry, Okayama University Medical School
- L37. A High-Throughput pKa Screening Method in Drug Discovery using Capillary Electrophoresis, *Yasushi Ishihama, Naoki Asakawa, Analytical Research Laboratories, Eisai Co., Ltd
- L38. Rapid Development of Optimal Capillary Electrophoresis Conditions for Separation of Ofloxacin and its Analogs by Using an Experimental Design Approach, *Takeaki Konno, Ken-ichi Yamazaki, Analytical Research Center, Chemical Technology Research Laboratories, Daiichi Pharmaceutical Co., LTD
- L39. Chiral Capillary Electrophoresis of Amphetamine and Analogs using Highly Sulfated Gamma Cyclodextrin, *Yuko Iwata (1), Agnes Garcia (2), Tatsuyuki Kanamori (1), Yoshihito Ohmac (1), Kanya Kobayashi (3), Hiroyuki Inoue (1), Tohru Kishi (1) and Ira Luric (4), (1)National Research Institute of Police Science, (2)Southeast Laboratory, US Drug Enforcement Administration, (3)Research Institute of Scientific Criminal Investigation, Nagano Prefectural Police H.Q. (4)Special Testing and Research Laboratory, US Drug Enforcement Administration
- L40. Enantiomer Separation by Capillary Electrochromatography Using Chiral Stationary Phases (4), *Koji Kawamura, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

15:45 - 17:00

Session X

Chair: Akimasa Shibukawa

- L41. Enantiomer Separation of Drugs by Capillary Electrophoresis Using Polysaccharides as Chiral Selectors, *Yukari Kuwahara and Hiroyuki Nishi, Analytical Chemistry Department, Product Technology Development Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd
- L42. Non-aqueous Capillary Electrophoresis of para-Quinone Anion Radicals, *Yukihiro Esaka, Noriko Okumura, Bunji Uno, Masashi Goto, Gifu Pharmaceutical University
- L43. Reproducibility of quantitative analysis in CZE, *Natsuki Ikuta, Tatsuya Yoshiyama, Hikaru Okamoto, Takeshi Hirokawa, Faculty of Engineering, Hiroshima University
- L44. Improvement of S/N ratio in capillary electrophoresis - Optimization of aperture width, *Keiko Kitagishi, Yasuhiro Sato, Otsuka Electronics Co.
- L45. Capillary zone electrophoresis with on-line transient isotachopheresis for the determination of nitrite and nitrate in environmental waters: direct injection for a couple of terminating ions, *Nobuhiro Ishio (1), Takashi Miyado (2), Hideaki Nishio (1), Kanako Michiba (1), Keiichi Fukushi (1), Keiitsu Saito (2), Sahori Takeda (3), Shin-ichi Wakida (3), (1)Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine, (2)Faculty of Human Development, Kobe University, (3)Osaka National Research Institute, AIST

Invitation to SCE 2001
Close of Symposium

Keiichi Fukushi, Symposium Chairman of SCE 2001 at Kobe
Yoshinobu Baba, Symposium Chairman

Poster Session

Poster Session I (P101-P128)

Presentation time : Nov. 30

13 : 30 - 14 : 30

- P101. On-line Sample Concentration in Microchip Electrophoresis, *Yoichi Sera, Norio Matsubara, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- P102. Ultrafast Reaction Control in a Microchannel by Laser-Induced Photothermal Effect, *Maxim Slyadnev(1), Yuki Tanaka(2), Manabu Tokeshi(1), Takehiko Kitamori(1,2), (1)Integrated Chemistry Project, Kanagawa Academy of Science and Technology, (2)Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo
- P103. DNA Analysis by Microfabricated CE Chip, *Aya Atsumi(1,2), Yoshinobu Baba(1,2), (1)Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P104. High-Speed Gene Amplification by Capillary PCR, *Yukari Hataoka(1,2), Yoshinobu Baba(1,2), (1)Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P105. Genomic Polymorphism Analysis by Microchip and Capillary Electrophoresis, *Yuki Endo(1,2), Yoshinobu Baba(1,2), (1)Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P106. Highly Sensitive Micellar Electrokinetic Chromatographic Analysis of Amino Acid Derivatives Using On-line Sample Concentration (2), *Chika Saeiki, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

- P107. **On-line Sample Concentration in MEKC Using Cationic Surfactants Under Suppressed EOF**, *Jong-Bok Kim, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, *Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*
- P108. **On-line sample Concentration and Separation of Carboxylic Acids by Capillary Electrophoresis**, *Naoko Inoue, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, *Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*
- P109. **On-line concentration of chlorophenols in capillary electrophoresis (II)**, *Sahori Takeda(1), Kenji Chayama(2), Haruo Tsuji(2), Kei-ichi Fukushima(3), Masataka Yamane(1), Zyun Siroma(1), and Shin-ichi Wakida(1), (1)Osaka National Research Institute, AIST, (2)Faculty of Science, Konan University, (3)Kobe University of Mercantile Marine
- P110. **High Sensitive Analysis of Lanthanide Ions by Isotachophoretic On-line Preconcentration-CZE**, *Hikaru Okamoto, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa, *Faculty of Engineering, Hiroshima University*
- P111. **Stacking Effect on CE Analysis Based on the Formation of Heteropolyoxometalate Complexes**, *Yoichi NAKASHIMA(1), Hitoshi NISHIKAWA(2), Takuya GOTO(2), Iwao KITAZUMI(2) and Sadayuki HIMENO(2), (1)Technology Research Institute of Osaka Prefecture, (2)Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University
- P112. **Open Tubular Approaches to CEC**, Chuzo Fujimoto, *Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine*
- P113. **Development of Capillary Electrophoresis - Atomic Absorption Spectrometer(CE-AAS) (IV)**, *Toshiro Yamauchi(1), Natsuki Ikuta(1), Takeshi Hirokawa(1), Toshihisa Nakagawa(2), and Masumi Sakai(2), (1)Faculty of Engineering, Hiroshima University, (2)Shimadzu Co.
- P114. **Electrochemical Detection of Alkylphenols at Sputtered Carbon Microarray Electrode Coupled with a Miniaturized Thin-Layer Radial Flow Cell for CE Measurement**, *Tianyan You(1), Osamu Niwa(1), Ryoji Kurita(2), Katsuyoshi Hayashi(1), Shigeru Hirono(3), (1) NTT Lifestyle and Environmental Technology Laboratories, (2)NTT Advanced Technology (3)NTT Afty Corporation
- P115. **Development of On-plate CE MALDI-TOF/MS and Its Application to the Analysis of Biomolecules**, Noriyuki Ojima, Takahiro Yamamoto, and *Tsutomu Masujima, *Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University*
- P116. **Capillary Electrophoresis of Bases and Nucleosides Detected by Parabolic Field Accelerated Time of Flight Mass Spectrometer**, *Tadao Furumoto, Takao Fukumoto, and Hitoshi Watarai, *Graduate School of Science, Osaka University*
- P117. **Capillary Electrophoresis -Off Line MALDI-TOF MS of α 1-Acid Glycoprotein**, *Mitsuhiro Kinoshita, Daisuke Kawakami, Kazuo Sei, Kaori Endo, Yasuo Oda and Kazuaki Kakehi, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*
- P118. **Analysis of Inorganic Ions in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis**, *Yasuhiro Sato, *Otsuka Electronics Co.*
- P119. **Capillary Electrophoresis Method for the Analysis of 200 Anions Including Inorganic Anions, Organic Acids, Amino Acids, Nucleotides and Carbohydrates**, *Tomoyoshi Soga(1), Chika Nogami, (1) Motohiro Imaizumi(2), (1)Application Center, Yokogawa Analytical Systems Inc., (2)School of Materials Science, Toyohashi University of Technology
- P120. **Genetical Polymorphisms of Plasma Protein and Red Cell Enzymes of Domestic Cat in Japan**, *Haruhiro Yoshida(1), Junko Hirota(2), Reiko Usui(3), (1)Senshu University, (2)Alice Animal Hospital, (3)Usui Dog and Cat Animal Hospital
- P121. **New method for DNA sequencing -Pyrosequencing- :Comparative study between pyrosequencing and gel-based sequencing**, *Zhou Guohua, Masao Kamahori, Kunio Harada, Kazunori Okano and Hideki Kambara, *Central Research Laboratory, Hitachi Ltd.*
- P122. **Separation performance of automated DNA fragment sorter using capillary-array gel electrophoresis**, *Takashi Irie(1), Ryutaro Fukumura(2), Ryoko Araki(2), Momoko Shimamoto(1), Masumi Abe(2), and Hideki Kambara(1), (1)Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., (2)National Institute of Radiological Sciences
- P123. **Analysis of DNA adducts by capillary electrophoresis with end-column amperometric detection**, *Shinsuke Inagaki, Yukihiro Esaka, Masashi Goto, Magoichi Sako, Yoshihiro Deyashiki, *Gifu Pharmaceutical University*
- P124. **Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) using Capillary Array electrophoresis**, *Chiho Yoshida (1,2), Yoshinobu Baba (1,2) (1) The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P125. **Study of polymer solution for DNA Separation in Capillary Electrophoresis**, *Yasuko Tanaka(1,2), Yoshinobu Baba(1,2) (1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P126. **Visualization and manipulation of a single DNA molecule**, *Noritada Kaji(1,2), Masanori Ueda(1,2), Yoshinobu Baba(1,2) (1) The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P127. **Interaction of protein and intercalating fluorescence dye against DNA**, *Abd El-Maaboud Ismail Mohamed(1), Noritada Kaji(1,2), Masanori Ueda(1,2), Yoshinobu Baba(1,2), (1) The University of Tokushima, (2)CREST, JST
- P128. **Separation of Triplet Repeat DNA by Capillary Electrophoresis and the Conformational Analysis by Atomic Force Microscopy**, *Tatsuo Nakagawa(1,2), Masamori Ueda(1,2), and Yoshinobu Baba(1,2) (1), The University of Tokushima, (2)CREST, JST

Poster Session II (P201-P227) Presentation time : Dec. 1st 11 : 00 - 12 : 00

- P201. **Micellar Electrokinetic Chromatography with Sodium 10-Undecylenyl Sulfate Oligomer and Sodium 10-Undecenoic Acid Oligomer as Pseudo- Stationary Phases with High Concentrations of Organic Modifiers**, *Mitsuhiro Wada, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe, *Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*
- P202. **Non-aqueous CE Analysis of Alkaloids from Chinese Medicines**, *Daisuke Uchida, Yukihiro Esaka, Masashi Goto, Munekazu Inuma, *Gifu Pharmaceutical University*
- P203. **Disturbance at Moving Boundary in Free-flow Isotachophoresis**, *Makoto Ishikawa, Ryutaro Murakami,

- Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa, *Faculty of Engineering, Hiroshima University*
- P204. Development of Automatic Processing System for Capillary Electrophoresis (IV), *Tatsuya Yoshiyama, Natsuki Ikuta, Takeshi Hirokawa, *Faculty of Engineering, Hiroshima University*
- P205. Application of Capillary Electrophoresis for the Manufacturing of Semiconductors. *Katsushi Sasa, Keiko Kitagishi, *Otsuka Electronics Co*
- P206. Enantiomer Separation by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Novel Chiral Surfactants, *Yoshiyuki Iwai (1), Masaki Nakamura (2), Koji Otsuka (1), and Shigeru Terabe (1), (1)*Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*, (2)*Department of Industrial Chemistry, Osaka Municipal Technical Research Institute*
- P207. Enantiomer separations by open tubular capillary electrochromatography, open tubular liquid chromatography and affinity electrokinetic chromatography, *Zhen Liu, Koji Otsuka, Shigeru Terabe, *Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*
- P208. Separation of Basic Drug Enantiomers by Capillary Zone Electrophoresis Using Glucuronyl Glucosyl - Cyclodextrin as a Chiral Selector, *Hisami Matsunaga, Jun Haginaka, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University*
- P209. Study on the molecular mechanism of the binding between drug and oxidized LDL by using high performance frontal analysis / capillary electrophoresis, *Yoshinori Watanabe, Yukihiro Kuroda, Akimasa Shibukawa, Tetsuro Handa and Terumichi Nakagawa, *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University*
- P210. Equilibrium Analysis of Acid Dissociation Reactions of Phenolphthalein by Using Mobility Change in Capillary Zone Electrophoresis, *Toshio Takayanagi and Shoji Motomizu, *Faculty of Science, Okayama University*
- P211. Study of Complex Dissociation Dynamics by Capillary Electrophoresis, *Hirotaka Tanaka, Hirofumi Kawazumi, *Kyushu School of Engineering, Kinki University*
- P212. Interaction between amyloid- β -peptide and metal chelates, *Satoshi Nishino and Yuzo Nishida, *Department of Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University*
- P213. Interaction between protein and metal chelate in the presence of hydrogen peroxide ; origin of "gain-of-function" by mutant SOD in patients of Amyotrophic lateral sclerosis, Satoshi Nishino and *Yuzo Nishida, *Department of Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University*
- P214. Effect of Organic solvents on the CE Analysis Based on the Formation of Heteropolyoxometalate Complexes, *Takuya Goto (1), Yoichi Nakashima (2), Sadayuki Himeno (1), (1)*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University* (2)*Technology Research Institute of Osaka Prefecture*
- P215. Capillary Electrophoretic Analysis Based on the Formation of Heteropolyoxometalate Complexes II. Determination of Transition Metal Ions, *Iwao Kitazumi (1), Yoichi Nakashima (2), Sadayuki Himeno (1), (1)*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University*, (2)*Technology Research Institute of Osaka Prefecture*
- P216. Suppression of water evaporation from samples with a mineral oil-overlay and its use in the reduction of a sample volume for capillary affinophoresis, *Noboru Uchiyama, Yo-ichiro Arata, Jun Hirabayashi, Kiyohito Shimura, Ken-ichi Kasai, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko*
- P217. Protein Analysis by Capillary Electrophoresis, *Mari Tabuchi (1), Yoshinobu Baba (2,3), (1)*Okamoto Electric Co., Ltd.*, (2)*Department of Medical Chemistry, The University of Tokushima*, (3)*CREST, JST*
- P218. Analysis by Capillary Isoelectrofocusing of Charge Microheterogeneity of β -Trace Protein (Lipocalin - Type Prostaglandin D Synthase) in Cerebrospinal Fluid of Patients with Neurological Disorders, *Atsushi Hiraoka (1), Kohsuke Seiki (2), Hiroshi Oda (3), Naomi Eguchi (3), Yoshihiro Urade (3), Itaru Tominaga (4), and Kohji Baba (4), (1)*Kyorin University School of Health Sciences, Hachioji, Japan*, (2)*Maruha Corporations*, (3)*Osaka Bioscience Institute*, (4)*Shimohusa National Sanatorium*
- P219. Temperature regulated elution of the glycoproteins from the lectin, hapten sugar and temperature-responsive polymer immobilized capillary, *Hidenori Yamanaka, Hiroyuki Sota, Kimihiro Yoshizako, Yukio Hasegawa, *Amarsham Pharmacia Biotech K. K.*
- P220. Sample Reduction in Electrophoretic Carbohydrate-Protein Interaction Studies by Laser-Induced Fluorescence Detection, *Atsushi Taga, Tomohiro Komeya, Mariko Ujinaru and Susumu Honda, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*
- P221. Analysis of Milk Oligosaccharides by Capillary Electrophoresis, *Shigeo Suzuki, Saeko Okuda, Miwa Kurosaki, Naoko Matsuura, Atsushi Taga, Susumu Honda, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*
- P222. Study of Glycogen Structure by Capillary Electrophoresis, *Atsushi Nishikawa, Atsushi Taga, Shigeo Suzuki, and Susumu Honda, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*
- P223. Separation and Detection of microorganisms by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection, *Tomoyoshi Shintani (1), Kazutaka Yamada (2,3), and Masaki Torimura (2), (1)*Industrial Research Center of Ehime Prefecture*, (2)*Applied Microbiology Division, National Institute of Bioscience and Human-Technology, AIST*, (3)*Research and Development Laboratory, Kankyo Engineering Co.*
- P224. Use of a magnetic material for an aid of analysis and separation technique applicable to red blood cell, *Yuji Kato (1), Shinya Kitagawa (1), Takashi Okuda (2), Takao Tsuda (1), (1)*Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology*, (2)*Department of Materials Science and Engineering, Division of Inorganic Materials, Nagoya Institute of Technology*
- P225. Concurrent Observation of Red Blood Cells at Single Cell Level with UV Detection and Microscope, *Norihito Yamauchi (1), Shinya Kitagawa (2), Takao Tsuda (1), (1)*Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology*, (2)*Venture Business Laboratory, Nagoya Institute of Technology*
- P226. Changes of Free Amino Acid in Cheese during Heat Processing, Toshie Tsuda, *Shiho Takeuchi, Masako Yamada, Yuji Nakazawa, *Kyoritsu women's Junior College*
- P227. Analysis of saccharides in foods, *Takako Kawahashi, Katsushi Sasa, *Otsuka Electronics Co., Ltd.*
- P228. Separation, quantification and determination of pharmacokinetics of clenbuterol in the horse *CE Ubol (1,2), LR Soma (2), F Guan (2), EK Birks (2), D Teleis (2), JA Rudy (1), DS Tsang (2), AO Watson (2), TD Teel (2), (1)*West Chester University*, (2)*University of Pennsylvania*

S01

The Role of Capillary Electrophoresis in the Revolution in Bioanalysis in the Beginning of the New Millennium

William S. Hancock and Chris Becker

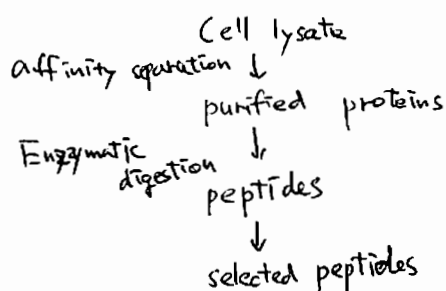
Proteomics Division, Thermo Finnigan, San Jose, CA

Capillary Electrophoresis will have a major contribution to the development of bioanalysis in the new millennium. Much of these advances will be based on the sequencing of the human genome and the subsequent analysis of the corresponding Proteome. Mass spectrometry will be the preferred detector because of the unparalleled information content provided by one or more dimensions of mass measurement. There is a key role, however, for both HPLC and HPCE as a separation process hyphenated to mass spectrometry. As has been discovered with the combination of MALDI-TOF and 2D gel proteomics studies, the measurement of low abundance proteins is compromised by the inability to achieve good ionization of complex peptide and protein mixtures. Therefore, highly efficient separation processes are an absolute requirement for advanced proteomic studies. While reverse phase HPLC is a popular approach, particularly in peptide mapping studies, HPCE has an important place as an orthogonal approach for separating polypeptide samples. In fact, a combination of the two approaches can be very powerful using both hydrophobicity and ionic charge to resolve very complex peptide mixtures. Another approach is to modulate the selectivity of a reversed phase separation with the use of electric fields at an appropriate point in the separation.

The term proteome has been introduced to define the full complement of proteins in a cell and also requires a description of the localization, concentration and multi-subunit

associations of each of these proteins. A key initial step in this daunting endeavor is the characterization of the constituents of an individual proteome in a high throughput manner. Peptide mapping with multidimensional HPLC- and HPCE-ion trap mass spectrometry (MS/MS) procedures can allow the characterization of at least 100 proteins per hour. Another advantage of such an approach is the ability to define post-translational modifications such as glycosylation, phosphorylation and sulfation as well as the incorporation of lipid components. The identification of these modifications is based on the measurement of specific changes in the chromatographic and mass spectral signatures of the peptide fragments. These modifications often play a key role in the activity, localization and turnover of an individual protein species.

Future developments in the field of proteomics will require the development of a new set of tools for the fractionation of biological samples that allow the preparation of protein fractions suitable for the MS/MS approach. This step will allow the characterization in a high throughput manner of the complex sets of protein mixtures present in different cellular regions. This presentation will describe the development of new instrumentation based on the combination of capillary-based separation systems, including reversed phase HPLC, capillary electrochromatography (CE) and electrochromatography (CEC) that can be used on-line with different mass spectrometers. Separation examples will include the characterization of novel glycoproteins and proteomic samples.



S02 ミセル動電クロマトグラフィーの過去・現在・未来

寺部 茂
姫路工大・理

Micellar Electrokinetic Chromatography: Past, Present and Future

Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was reported in 1984 as a capillary electrophoretic technique that can separate neutral analytes by using an ionic micelle as a pseudostationary phase. The separation principle of MEKC is based on the differential partitioning of the analytes between the micelle and the surrounding aqueous phase, which migrate at different velocities. Although most advantages of capillary electrophoresis can be held also in MEKC, some problems characteristic to MEKC must be solved to expand the applicability of MEKC: separation of highly hydrophobic analytes, use of a mass spectrometer as a detector, on-line sample concentration. In this paper, the summary of MEKC is going to be presented and future of MEKC will be discussed.

MEKC 発展初期

MEKC 発展初期の頃のいきさつについては以前に発表した[1]のどこでは簡単に述べる。参考までに 1982 年に初めて記録した MEKC による分離例を Fig. 1 に示す。クレゾール異性体 3 種を分離した例であるが、理論段数が高く簡単に分離できたのには感激した。長いキャピラリーを用いているので時間がかかっている。1985 年くらいまではキャピラリー電気泳動(CE)を研究しているグループは数えるほどしかなく、MEKC を発表しているのは演者のグループのみだったので、研究もゆっくりと進めておればよかった。しかし、1980 年代末には CE 装置も市販されるようになり、数グループが MEKC を始めたので、重要な研究だけは他のグループに先行しておく必要があると思い、学生を含めて 4,5 人の小さなグループ全員で MEKC を研究することにした。

MEKC 問題点とその解決

MEKC では移動時間の範囲が限られているので、保持比が大きい化合物の分離が悪くなる。電気浸透流を遅くして移動時間の範囲を広くするのも一方法であるが、疎水性の強い試料の保持比を小さくする

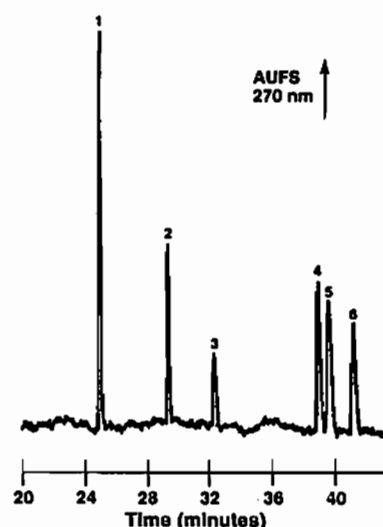


Fig. 1. First MEKC electropherogram recorded September 7, 1982 at Department of Industrial Chemistry, Kyoto University. Peak identification: 1, acetylacetone; 2, phenol; 3, mesityl oxide; 4, *o*-cresol; 5, *m*-cresol; 6, *p*-cresol. Conditions: capillary, 50 μ m x 134 cm (120 cm to the detector); running solution, 25 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0); applied voltage, 25 kV; current, 22 μ A; detection, 270 nm with a Jasco UVDEC-II.

ことも効果がある。前者は酸性条件にすることにより可能である[2]が、当時は自作の装置を用いていたのでキャピラリーの洗浄が容易ではなく、再現性のよい結果を得るのは難しかった。一方、後者としては、ミセル溶液への有機溶媒 [3]、シクロデキストリン(CD)[4]、高濃度尿素の添加[5]などが有用であった。CDの泳動液への添加は光学異性体の分離にも有効であった[6]。

質量分析計(MS)をCEの検出器として利用する研究は、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)をインターフェースとして用いて1986年に初めて報告された。ESIでは界面活性剤が入っている溶液を用いるとイオン化効率が低下してしまいMEKCには適用できないとされていた。この問題解決のために、擬似固定相として高分子界面活性剤の使用[7]、部分注入法の適用[8]、大気圧化学イオン化法の利用[9]を検討した。まだ問題点はあるが、MEKC-MSも可能となった。

MEKCに限らずCEでは濃度検出感度が低いことが問題であった。スタッキングと呼ばれるオンライン試料濃縮法が開発され、イオン性試料についてはかなりの感度増強が可能となった。しかし、スタッキング法は、試料ゾーンと泳動液ゾーンとの間での電場の強さの違いを利用した濃縮法なので、MEKCで主として分離対象としている中性試料にはそのままでは適用できない。中性試料もミセルに可溶化されると見かけの電気泳動移動度を持つので、スタッキングが可能であることを明らかにした[10]。スタッキングにおける濃縮機構を検討する過程で、ミセル可溶化反応を利用すれば、試料ゾーンと泳動液ゾーンが等しい電場の強さの条件で、より効率の高い濃縮が可能なることを見出し、この濃縮法をスウィーピング法と命名した[11]。この方法を用いると、疎水性の強い試料では5000倍までの濃縮が可能となった。

MEKCの将来展望

MEKCを始めて18年、基礎特性の解明、問題点の解決、応用範囲の拡大等を行ってきたが、まだ解決しなければならない問題も多々ある。MEKCは分離分析法としては優れた特性を持つが、広く利用されるには至っていない。この方法が実用的に広く受け入れられるためには、使いやすい装置、再現性のよい実験法、高い検出感度等が必要である。基礎研究分野では、動電クロマトグラフィーに種々の擬似固定相を用いて、分子認識に関する研究への応用が期待される。

文献

1. 寺部 茂、ぶんせき、(1996) 561.
2. K. Otsuka and S. Terabe, *J. Microcol. Sep.*, 1 (1989) 150.
3. 大塚浩二、寺部 茂、安藤貞一、日本化学会誌、(1986) 950.
4. S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E.R. Barnhart, L.R. Alexander, D.G. Patterson, Jr., B.L. Karger, K. Hosoya and N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, 516 (1990) 23.
5. S. Terabe, Y. Ishihama, H. Nishi, T. Fukuyama and K. Otsuka, *J. Chromatogr.*, 545 (1991) 359.
6. H. Nishi, T. Fukuyama and S. Terabe, *J. Chromatogr.*, 553 (1991) 503.
7. H. Ozaki, N. Itou, S. Terabe, Y. Takada, M. Sakairi and H. Koizumi, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995)
8. K. Koezuka, H. Ozaki, N. Matsubara and S. Terabe, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 3.
9. 尾崎祐人、寺部 茂、分析化学、46 (1997) 421.
10. J.P. Quirino and S. Terabe, *J. Cap. Elec.*, 4 (1997) 233.
11. J.P. Quirino and S. Terabe, *Science*, 282 (1998) 465

S03

マイクロマシンの動向とマイクロ化学システムへの期待

藤田博之

東京大学生産技術研究所

Recent Development of Micromachines and Prospective Applications in Micro Chemical Systems

Hiroyuki Fujita

CIRMM, Institute of Industrial Science, University of Tokyo, Tokyo, 106-8558

Research on micromachine technologies in recent ten years after the first micromotor was operated has made remarkable progress. The current status of the technology and micromachines is briefly reviewed. One of the most promising applications of micromachines is micro chemical systems. Features and possible use of micro chemical systems are discussed.

1. はじめに

目に見えないほどの小さな機械を作って、私達の体や手の入らないミクロの世界を自由に探検したり、微笑な物体を扱ったりすることは長い間の人類の夢であった。超小型の機械があれば、医療分野で治療や検査時の患者の負担を軽減したり、ホームオートメーションのための情報収集や空調などの各種制御をきめ細かく行うのに有用である。このような機械の小型化の要求に対応して、半導体製造技術を利用して μm オーダーの機械を作る、マイクロマシンの研究が最近盛んに行われている。

1987年に導入された表面マイクロマシーニング法と呼ばれる画期的な新プロセスにより、中心軸の回りを自由に回るギアや、ガイドのしたを左右に動くスライダ等を、多結晶シリコン薄膜でつくれるようになった[1]。これらの機械部品の大きさは、約 $10\sim 100\mu\text{m}$ と、髪の毛の太さと同じ程度である。更に、静電気や磁気で動かすアクチュエータもいろいろ作られ、安定した動作も確認されている。例えば、写真1は、筆者らの研究室で製作したローターの直径 $120\mu\text{m}$ 、厚さ $7\mu\text{m}$ の静電マイクロモーターである[2]。構造は電気メッキしたNiであり、ローターの下シリコン基板を SF_6 のドライエッチングで削り、回転できるようにした。毎分1万回転で回すことができた。

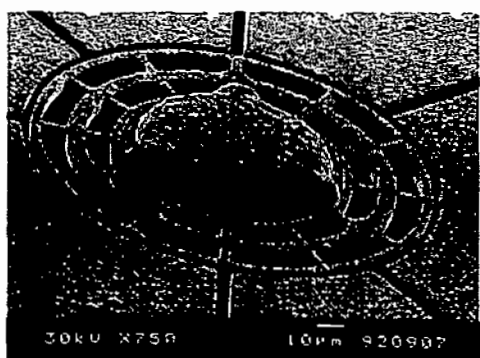


写真1 静電マイクロモータ。
ロータ直径 $120\mu\text{m}$ 、
厚さ $7\mu\text{m}$ のニッケル製[2]

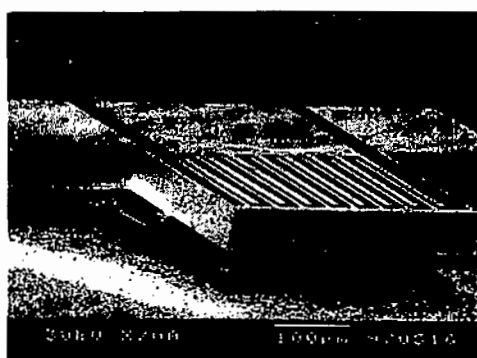


写真2 厚さ $50\mu\text{m}$ の静電アクチュエータ。
磁気ハードディスクのヘッド精密位置決め用[4]

2. マイクロマシンは役に立つのか

マイクロギアの発表から10年以上が経過し、複雑な立体形状を持つマイクロ構造(写真2)を作ったり、並進、振動、回転など高速で精密な運動をさせることが可能になった。しかし一般の方からは、こんな小さなものが本当に役に立つのかという質問を受けることがまだ多い。なぜならマイクロマシンは既に社会的インパクトのある製品として実用化されているけれども、その姿は我々の目に止まらぬ形になっているからである。

例えば、熱駆動式のインクジェットプリンタのヘッドは、微細加工したノズルとインク流路、薄膜技術で一体製作するマイクロヒータ(アクチュエータ)、アレイ構造による並列処理など、マイクロマシン技術の利点を極めてよく

生かしている。外界にも立派に作用を及ぼしているし、商業的にもすばらしい成功を取めている。今後、静電駆動式や薄膜ヒエソ素子駆動式のインクジェットプリンタも実用化される見通しで、一層の発展をするだろう。しかしマシン自体は大きなプリンタの一部になっており、マイクロマシンの姿は我々の目から隠されている。

ではこれが成功した理由は何だろう。第1に、マクロの世界では吹けば飛ぶような存在である、泡の力を利用したことだろう。ミクロの世界にマッチした機械は、正に「マクロの機械と様子の異なる機械」であったのだ。マイクロマシンの難題として指摘されている、モータや歯車などお互いに擦れ合って動く構造を使っていない点も、ミクロの機械の望ましい姿と考えられる。第2は、マクロの機構とミクロの機構の役割をうまく分担している点だ。マイクロマシン技術を利用したヘッドは、精密にそろったインク滴を同時に多数吐出するのを高速で繰り返し、マクロの機構はヘッド全体を大きく動かす役目をする。第3にマイクロマシン向きの応用分野が特定できたことである。マイクロマシンの流体への応用は有望と見られており、さらに情報機器は重さのない情報を取り扱う点でマイクロマシンに最適である。

インクジェットプリンタの他にも、マイクロマシンの実用化の事例として、圧力センサや加速度センサ、マイクロミラーのアレイを使ったディスプレイなどが商業的な成功を取めている。また数年のうちに、光通信ネットワーク用のマイクロデバイスや磁気ディスク装置などのデータ記憶装置、DNA分析センサなどにマイクロマシンを応用した製品が市場に登場するであろう。さらに地球環境へ配慮する必要が高まるため、マイクロマシンを環境の監視や汚染除去に用いることが期待される。1つのチップで環境からのサンプル収集、前処理、化学分析、データ処理まで行うマイクロ化学分析システムが活発に研究されている。

3. マイクロ化学システムへの期待

マイクロマシニング技術を化学システムへ応用する研究は、20年ほど前からマイクロポンプ、マイクロバルブ、マイクロ流路などについて多くの発表がある。これらの部品についての研究をふまえ、昨今は集積化したマイクロ化学システム（米国ではラボオンチップ、欧州でマイクロTASなどと呼ばれる）に関心が集まっている。マイクロTASのみを扱う国際会議も定期的開催され、200-500名の参加者を集めている。

マイクロ化学システムは、流路や反応器の小型化により次のような利点を持つと考えられる。

- ・比面積の増大 → 分離の高速化
- ・拡散長が短い → 短時間で反応が終了
- ・たくさんの反応系を並列化できる → 多種類の同時反応・分析可能
- ・短時間で並列に処理できる → 高スループット
- ・小容量、デッドスペース最小化 → 省薬品
- ・熱伝達の向上と熱容量の減少 → 温度制御の精密化と微細化可能
- ・熱伝達の向上と熱容量の減少 → 副生成物の抑制による反応効率向上

更に、センサや電子回路を集積化したシステムへ発展させることにより、従来一番小型の物でもテーブルトップサイズであった化学システムを、バーントップサイズへと小型化することが期待できる。ヒトの遺伝子配列を完全に同定できる時代を迎え、個人の遺伝子の微妙な差異に基づくカスタムメイド製薬や発見的創薬など、従来の化学システムでは対応できない要求が益々増えていくと考えられる。マイクロマシニングを応用した化学システムは、上述の利点を活かしてこれらの要求を満足する可能性を秘めており、今後一層の研究開発を推進する必要がある。

参考文献

- [1] L. S. Fan, Y. C. Tai, and R. S. Muller: "Integrated Movable Micromechanical Structures for Sensors and Actuators", IEEE Trans. Electron Devices, ED-35, 6, pp.724-730 (1988)
- [2] T. Hirano and T. Furuhashi: "Dry Released Nickel Micromotors and Their Friction Characteristics", Digest of Technical Papers International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Yokohama, Japan, pp.80-83(1993.6)
- [3] G.K.Fedder "Structured Design of Integrated MEMS", Tech. Digest IEEE MEMS'99, Jan.17-21, 1999, Orlando, FL, USA, pp.1-8.

L01

マイクロチップ電気泳動装置 “MCE-2010” —石英製チップを用いたUVリニアイメージング—

○中西 博昭¹、荒井 昭博²、上田 輝久²

(株) 島津製作所 基盤技術研究所¹、分析機器事業部²

Microchip Electrophoresis System "MCE-2010"

-- Linear Imaging UV Detector Using Quartz Chips --

Hiroaki Nakanishi¹, Akihiro Arai², Teruhisa Ueda²

¹Technology Research Laboratory, Shimadzu Corp.

²HPLC Business Department, Analytical Instruments Division, Shimadzu Corp.

We have developed a microchip electrophoresis system using specially designed quartz microchips and a linear imaging UV detector along with the chip. The microchips have an optical slit which cut off the stray light in order to improve the sensitivity of UV absorption detection on the chip. The signal level of UV absorption detection was effectively improved by applying the microchips having the "on chip" optical slit. It is possible also to improve the signal-to-noise ratio by repetitive scanning of linear photodiode array located along the separation channel, and signal averaging during eliminating the potential.

はじめに

マイクロチップ電気泳動は、電気浸透現象による送液が可能のためポンプやバルブといった機械的な能動部品が不要である、放熱特性に優れていることから分離流路に強い電界を印加することが出来るため高速分析が可能である、流路デザインの自由度が大きいため複数の流路を配設することによる高スループット化や前処理・後処理機能の集積化などの高機能化が可能である、などの特長を有する。このような特長から、最近、マイクロチップ電気泳動装置が国内外の数社から製品発表されつつある。

マイクロチップ電気泳動を装置化する場合、数 10pl という微量サンプルを扱う分析法であるため、分離した微量成分をチップ上で高感度に検出する技術がキーポイントとなる。我々は、石英ガラスを材料とする電気泳動チップを開発¹⁾し、汎用性の高い紫外吸光光度法を検出方法に適用した装置を開発した。今回は、石英製電気泳動チップのデザインを工夫して高感度化を図った試み、および UV リニアイメージングの検討について報告する。

装置

図 1 に、島津マイクロチップ電気泳動装置 "MCE-2010" を示す。1024 素子のフォトダイオードアレイを使用し、チップ分離流路全長に渡ってリアルタイム観察が可能なリニアイメージング機能を有している。図 2 に石英製電気泳動チップの写真を示す。取り扱い時の安全を考慮して、チップはプラスチックケースに収納されている。チップ上のリザーバ周辺にはワンタッチ装着

で泳動時の電圧印加が容易なように各々電極が形成されている。チップ表面には、電気泳動分離を行う流路に対応する位置に、光学検出時の迷光成分を減らしてS/N比を良くするための光学スリットが一体形成されている。

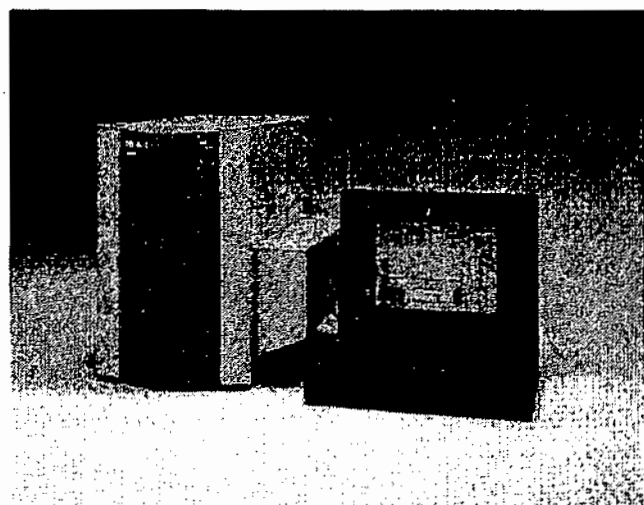


Fig.1 Microchip electrophoresis system "MCE-2010"

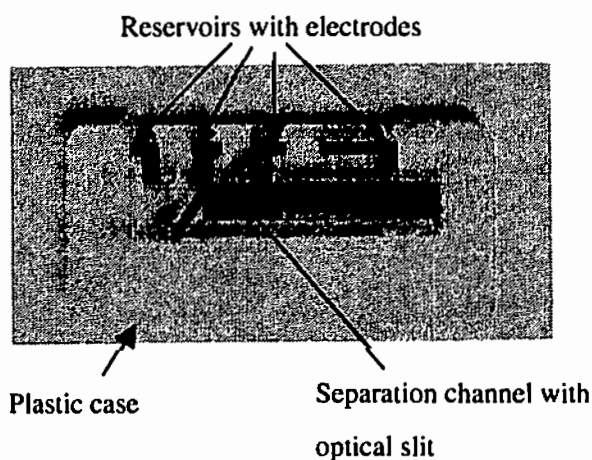


Fig.2 Quartz microchip

実験結果と考察

チップ上に光学スリットを形成することは、流路を通過しない迷光成分を効率良く遮断できることから S/N 比の改善に有効である。また、装置側に光学スリットを設けた場合に対して、光学系とチップの高精度な位置決めが必要なくなるというメリットもある。流路（幅 $50\mu\text{m}$ ）全長に渡り形成した光学スリットの効果を検証するため、光学スリットの開口幅を $66\mu\text{m}$ 、 $90\mu\text{m}$ と変えてその効果を実測した。加えて、チップの接合界面に光学スリット層を挟み込んだ構造の界面スリットチップも試作し、併せて評価した。界面スリットチップは流路幅と同じ開口幅を有する光学スリットを実現するため、理想的な光学スリットである。いずれの光学スリットもほぼ理論通りの、S/N 比の向上を示し計算値とほぼ一致する効果が確認できた。

さらに、流路全体をイメージとして捉えながら分離状態をリアルタイムでモニタし、分離後に電圧の印加を停止（泳動を停止）した状態で信号を積算平均化することで、ノイズレベルを低下させる、すなわち S/N 比を向上させる試みを行った。その結果、ノイズレベルは積算回数の平方根に逆比例して減少し、計算値と良く一致する結果が得られた。光学スリットと信号の積算平均化効果と併せて、従来の CE 装置と遜色の無いノイズレベルを実現している。

文献

1. H. Nakanishi, T. Nishimoto, M. Kanai, T. Saitoh, R. Nakamura, T. Yoshida, S. Shoji, *Sensors and Actuators*, 83 (2000) 136-141

L02

マイクロチップ電気泳動解析システムとその応用例について 「コスモアイ（日立 SV1100）、i-チップ」

○井筒浩¹、小原和彦¹、渡辺博夫¹、○町田浩昭²、萩原久²、宮崎祐輔²
日立化成・医薬品研究所²、日立電子エンジニアリング（株）・電子装置事業部¹、

Micro-chip Electrophoretic Analytical System and Its Applications

Hiroshi Izutsu¹, Kazuhiko Obara¹, Hiroo Watanabe¹

Hiroaki Machida², Hisashi Hagiwara², Yuusuke Miyazaki²

¹Pharmaceutical Research Lab., Hitachi Chemical Co., Ltd.

²Electronic Equipments Div., Hitachi Electronics Engineering Co., Ltd.

We have developed micro-chip electrophoresis system (Hitachi SV1100) for rapid DNA fragments analysis. We showed that electrophoresis of DNA fragments (50 - 800bp) was performed in 5 minutes with higher resolution in comparison with agarose electrophoresis by using the system.

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの進展等による DNA 配列情報の増加に伴い、PCR や RFLP 等の DNA 鎖長分析を、より簡便・迅速に行う手法の重要性が増大している。この目的のため、我々は、プラスチック板微細成形技術を応用して作製したキャピラリー(マイクロチップ:i-チップ)中で、迅速に DNA 鎖長分析を行うことのできる装置システム(日立 SV1100 形:コスモアイ)を開発した。

実験

幅 100 μ m、深さ 30 μ m の細溝を有するプラスチック板を精密射出成形で作成し、その上にプラスチックフィルムをラミネートしてマイクロチップを作製した。分析装置は、泳動用電源と、エチジウムブロマイドの蛍光を検出するための、半導体素子を用いた光源と蛍光検出器を内蔵している。サンプルとして、DNA ラダー、 ϕ X174DNA 分解物等を用いて泳動を行い、得られた泳動パターンは、パソコンに取り込み解析した。

結果と考察

25bpDNA ラダー(Fig.1)、 ϕ X174/HaeIII(Fig.2)の結果から、50~800bp 程度の PCR でよく用いられる鎖長の DNA を分析できることが示された。分析に要した時間は、ゲルの充填も含めて、約 5 分であった。また、アガロースゲル電気泳動ではほとんど分離しない、271bp と 281bp のピークも分離でき、解像度も優れていることが示された。PCR 産物の泳動・分析も、解像度よく迅速に行うことができた(Fig.3)。

謝辞

本研究で使用したマイクロチップ電気泳動装置の開発は、新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託を受け、一部実施したものです。

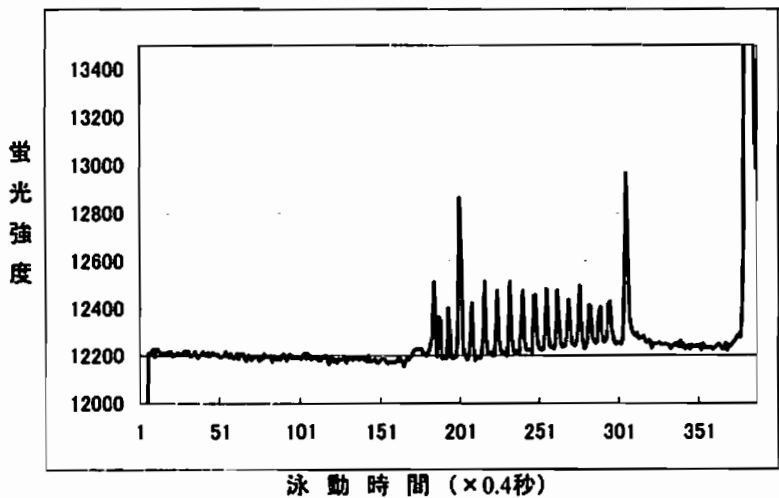


Fig.1 25bp DNAラダー分離結果

Sample: 25bp DNA Ladder (Gibco BRL) 0.1 μ g/ μ L in PCR Buffer

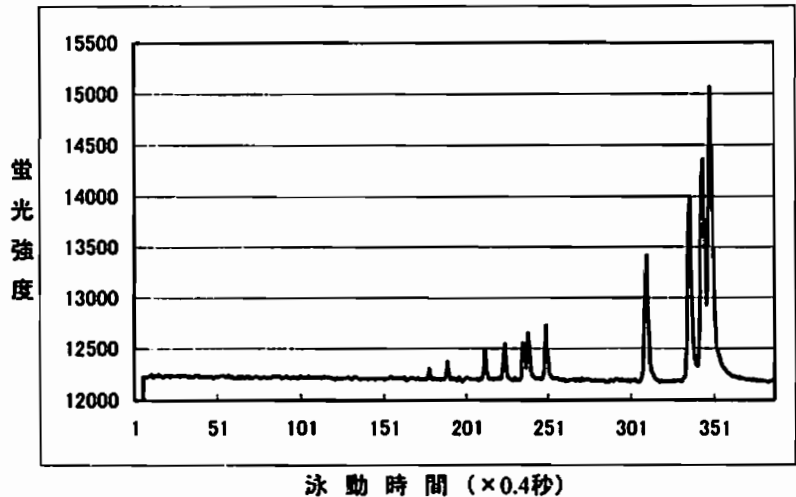
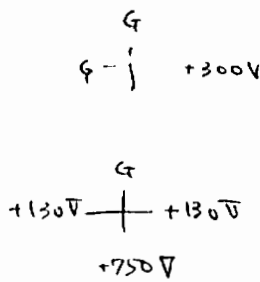


Fig.2 ϕ X174/HaeIII 分離結果

Sample: ϕ X174 DNA / HaeIII Fragments 0.1 μ g/ μ L in PCR Buffer

LED
472 nm

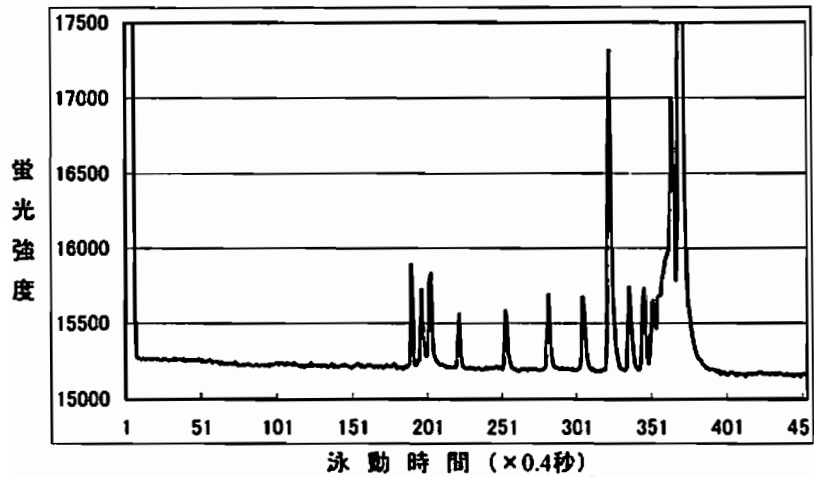


Fig.3 PCR産物(121、139bp)、100bpラダーDNA分離結果

Sample: *C. pneumoniae* ompB gene PCR products (121bp, 139bp)

100 bp DNA Ladder (Gibco BRL)

L03

アジレント 2100 バイオアナライザを用いた生体高分子 (DNA, RNA, 蛋白質) の分析

○箕浦 加穂¹、近藤直人¹、Odilo Mueller²、Meike Kuschel²

横河アナリティカルシステムズ株式会社¹

Agilent Technologies Inc.²

Analysis of Biomacromolecule(DNA, RNA and Protein) using Agilent 2100 BioAnalyzer

Kaho Minoura¹, Naoto Kondo¹, Odilo Mueller², Meike Kuschel²

*Yokogawa Analytical Systems Inc.*¹

*Agilent Technologies Inc.*²

The Agilent 2100 bioanalyzer is designed for the automated analysis of nucleic acids and SDS-Protein. The system integrates sample handling, separation, detection, and data analysis within a single, compact system architecture. The bioanalyzer performed fragment quantitation at 85% or better, with a percent standard deviation less than or equal to 10% using DNA kit. Over a size range of 100 to 12000 bps, the percent standard deviation of both the DNA7500 and DNA12000 assays was found to be 5% or lower, while accuracy was 90% or better. Using RNA kit, the Bioanalyzer provides a more precise quantitation of the total RNA and mRNA compared to the rough estimate obtained from gel electrophoresis.

はじめに

“Lab-on-a-chip”の技術を利用したマイクロチップ型の電気泳動装置は、分析の高速化、全自動化、多検体同時処理、試薬及びサンプル使用量の低減、簡便な操作性などの多くの特長をもち、次世代の分析装置として期待されている。ここでは米国 Caliper 社と Agilent Technologies 社 (旧 Hewlett-Packard 社) が共同開発した Agilent2100 バイオアナライザを用い、“Lab-on-a-chip”の技術を、DNA のサイズ決定と定量、RNA の品質分析、SDS-Protein のサイズ決定に応用した例を報告する。

実験

実験には上述した Agilent2100 バイオアナライザ (以下バイオアナライザと表記、図1) を用いた。DNA, RNA, SDS-Protein サンプルの分析には、同両社が開発したラボチップキット、DNA 500、DNA 7500、DNA 12000、RNA6000、及び Protein 200 LabChip Kit を使用した。各々の分析は、PCR 産物または大腸菌やマウスから抽出した RNA などの試料 1 μ l をラボチップ (図2) 上のウェルにアプライし、電気泳動法で分離させた後、装置に組み込んであるレーザー蛍光検出システムにて検出を行った。データはすべてコンピュータに自動的に取りこまれ、DNA に関しては内部標準による補正を自動で行った後、

各バンドのサイズ決定と定量を全自動で行った。RNA に関しては、定量および totalRNA 中の rRNA の比や mRNA に混入した rRNA の比率の計算を全自動で行った。

結果と考察

DNA7500 LabChip Kit を用いて、DNA マイクロアレイにスポットするための PCR 増幅産物を分析した。(図3) 300bp の鎖長の PCR 産物については、目的産物の純度が 98%以上であることがわかったが、3000bp の鎖長の PCR 産物については、非特異的増幅によるピークを複数確認した。各々のピークの濃度を自動定量した結果、目的産物の純度が 70%以下であることが判明した。感度について検討を行った結果、DNA の検出限界は約 0.02ng/ μ l であった。また、複数の PCR 増幅産物について、DNA500 LabChip Kit を用いて分析した結果、バイオアナライザは 1%アガロースゲル電気泳動より高い分解能を有していることがわかった。

マウス及び大腸菌より抽出した RNA サンプルを、1%アガロースゲル電気泳動と RNA6000 LabChip Kit を用いて分析した。その結果、totalRNA について、5ng/ μ l 程度の感度を有していることがわかった。さらに RNA の分解度の異なるサンプルを分析した結果、バイオアナライザで得られたエレクトロフェログラムから、RNase による分解の程度を推定することができた。Protein 200 LabChip Kit を用いた SDS 可溶化タンパク質の分析でも興味深い結果が得られた。

まとめ

Agilent2100 バイオアナライザを用いた分析結果により、1 μ l という微量の試料で分析が可能であること、複数の DNA バンドの検出と定量を短時間で行えること、RNA の分解の程度を半定量的に解析できることから、バイオアナライザは、各種 PCR の結果の確認や、DNA チップを用いた遺伝子発現解析用試料の品質分析などにきわめて有用であることがわかった。



図1. Agilent2100 バイオアナライザ

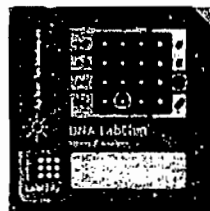


図2. DNA 分析
用チップ

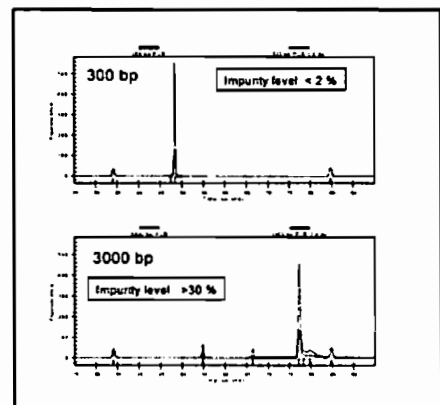


図3. PCR 増幅産物の分析結果

24. 635 nm

L04

フリーフロー電気泳動モジュールによる試料の高速前処理

○田島信芳、篠原悦夫

オリンパス光学工業（株）

ライフサイエンステクノロジーリサーチセンター

Free flow electrophoresis module for rapid sample preparation

Nobuyoshi Tajima, Etsuo Shinohara

Life-science Technology Research Center, Olympus Optical Co., Ltd.

Automatic rapid sample preparation system with free flow electrophoresis (FFE) module was constructed. This system could handle up to 100 samples as a batch. The FFE module was prepared with Pyrex glass substrates using microfabrication technologies. The size of the module was $\phi 100\text{mm} \times 2\text{mm}$, in which $40.5 \times 48\text{mm}$ electrophoresis bed with $30\text{ }\mu\text{m}$ deep flow gap was constructed. Seven inlets of buffer solution, one inlet of sample and six outlets were formed on the module. Two electrodes were fixed to the both edges parallel to its flow direction. To investigate its function a mixture of DNA and albumin was applied to the FFE with 4kV at a flow rate of $100\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$. The isolated DNA was recovered principally from outlet No. 4. The recovery ratio of DNA from outlet No. 4 was about 83% and the separation ratio was 96%.

はじめに

ゲノム研究、プロテオーム研究が急速に推進される中、微量サンプルからDNAやタンパクを高速分離する前処理技術が要求されている。我々はマイクロ加工技術を応用して、サンプルの高速分離抽出を行うフリーフロー電気泳動（FFE）モジュールを開発した。また、FFEモジュールを用いて全自動で分離抽出を行うシステムを開発し、複数サンプルからの連続的なDNA分離抽出検討を行った。

実験

開発した分離抽出システムは、サンプルの分注、分離・分取、モジュール洗浄までの全行程を全自動で行うものである（Fig.1）。検体処理速度 $100\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ での高速分離抽出が可能で、100検体を連続的に処理できる。FFEモジュールは外形 $\phi 100\text{mm} \times 2\text{mm}$ 、電気泳動相 $40.5 \times 48\text{mm}$ 、溝深さ $30\text{ }\mu\text{m}$ のパイレックスガラス構造体であり、バッファ入口7個、サンプル注入口1個、分取口6個を有し、注入口と分取口の間の両端にPt薄膜から成る電極を有する（Fig.2）。

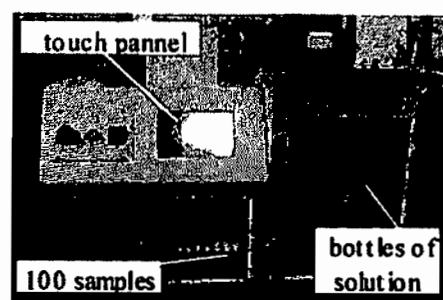


Fig.1 Automatic sample preparation system with a free flow electrophoresis module

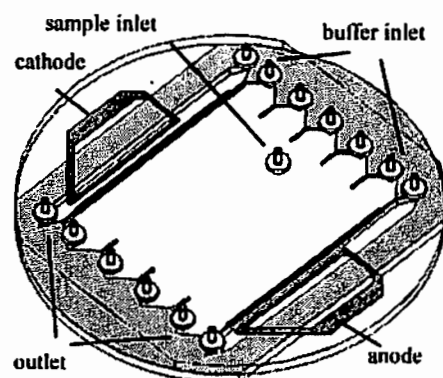


Fig.2 Schematic layout of the free flow electrophoresis module

DNAとBSAの混合サンプルを調製し、印加電圧 4kV、サンプル注入速度 100 μ l/min、バッファ送液速度 2.5ml/min の条件で分離抽出を行った。モジュール内部流速は約 40mm/sec であった。また、HBウイルスの全ゲノムを組み込んだプラスミドを血清に混合して分取検討を行った。疑似血清サンプル中の DNA 濃度は、0, 1 zepto, 1 atto, 1 femte, 10 femte mol/ μ l の 5 種類を調製し、連続的 DNA 抽出を検討した。

結果と考察

各分取口 No. を横軸とし、分取液中の濃度をプロットした (Fig.3)。DNA は陽極側の分取口 No.4 に、BSA は陰極側の分取口 No.3 に集中して流出した。分取口 No.4 における DNA の回収率は 83%、分離率は 96% と高い値を得た。希釈率は 1.5 倍であった。

疑似血清サンプルからの分取液を用いて PCR を行い、ゲル電気泳動して DNA の有無を評価した (Fig.4)。分取口 No.4~6 にてターゲット DNA のバンドがみられ、陽極側に DNA が泳動していることがわかる。ほぼすべての分取口で見られる分子量の短いバンドは、PCR 試薬中のプライマーダイマーであると考えられる。分取口 No.4 では 1 zepto mol/ μ l の DNA 濃度から増幅が確認できおり、DNA は特に分取口 No.4 に集中していることわかる。一方、可溶化された血清タンパクは No.2~3 に泳動していることが確認された。

本検討から、FFE 分離抽出システムは DNA 検査のための前処理技術として高速に DNA を抽出できる有効な手段であることが明らかとなった。

謝辞

本研究開発は、オリンパス光学工業 (株) が NEDO から委託を受けた「高感度 DNA 光検査装置の開発」として、実施したものである。

文献

1. E.Shinohara, N.Tajima, H.Suzuki and K.Kano, *Proceedings of μ TAS'98*, (1998)319-323
2. N.Tajima, H.Suzuki, K.Kano and E.Shinohara, *Proceedings of the 22nd International Symposium on Capillary Chromatography*, (1999)PI414

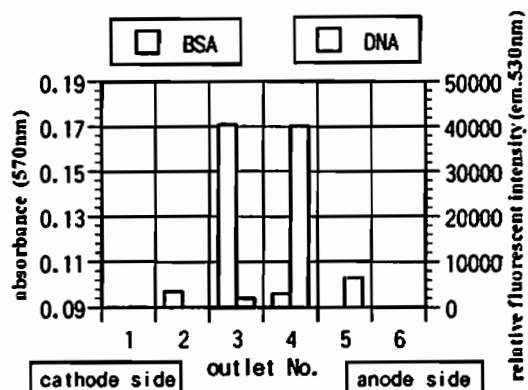


Fig.3 Fractions recovered from outlets

- mixture; DNA: 50mg/ml, BSA: 250mg/ml
- buffer: Gly-Tris (20mM) pH8+ 10% EtOH
- applied voltage: 4kV

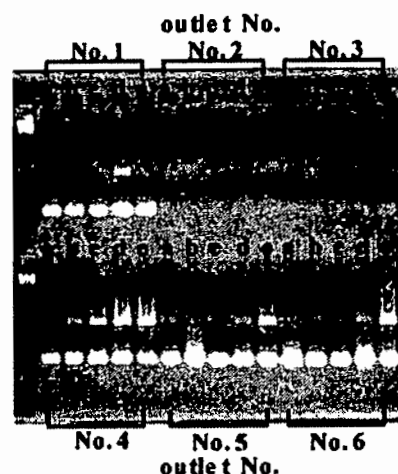


Fig.4 Gel electrophoresis of collected solutions from outlets

DNA concentration;
a: 0 mol/ μ l,
b: 1 zepto mol/ μ l,
c: 1 atto mol/ μ l,
d: 1 femte mol/ μ l,
e: 10 femte mol/ μ l

Capillary Electrophoresis (CE) and Microfabricated CE Chip:

101 A Powerful Tool of Tumor Markers Determination

Bingcheng Lin¹, Futan Han¹, Qingnan Yu¹, Xiuling Dong¹, Hui Wang¹, Yinfu Ma²

¹Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences

116023 Dalian, China (<http://www.biochem.dicp.ac.cn>)

²Truman State University, Kirksville, Missouri 63501, USA

Pteridines, polyamines and sialic acids are different classes of compounds excreted in human body fluids (serum and urine), the levels of which are found to elevate significantly in tumor-related diseases. The determination methods for the above compounds in body fluids were developed based on capillary electrophoresis with high sensitivity and high speed. A number of cancer patient's samples were measured, the data were compared with those of the normal persons used as the references (1-3).

Eight different pteridine derivatives were well separated, six of which were detected and characterized in urine samples from normal persons and different cancer patients with a home-built CE-LIF system. The detection limits of these pteridines are under 1×10^{-10} M. The levels of neopterin, pterine, xanthopterin and pterin-6-carboxylic acid were found to be significantly elevated in urine excreted by cancer patients, while the level of isoxanthopterin dropped in these patients. No significant change of biopterin level was found between healthy individuals and cancer patients.

CZE with indirect UV detection was employed for detecting three polyamines (putrescine (PU), spermine (SPM) and spermidine (SPD)) in serum. The concentrations of SPD and SPM in the serum of a group of healthy adults and hundred patients of different cancers were determined and compared.

The determination of NANA (N-acetylneuraminic acid, one kind of sialic acids) in 30 normal persons and 72 cancer patients was carried out with CE. The results demonstrated that NANA in the serum of cancer patients significantly increased as compared with the normal human ($P < 0.001$). The results of determination of SA (NANA) are summarized in Table 1. The data show that there's significant difference of SA for all the cancer patients investigated compared with those of healthy individuals ($p < 0.001$), but no significant difference among various cancer patients.

It can be found that the percentages of SA over the positive value were significantly higher than that of the other tumor markers as shows in Table 2. Specificity values were also evaluated for all markers. The highest value of 85.7% was found for SA, whereas for TSGT, CA153 and TPA the values of 54.2%, 41.7% and 62.5% respectively were found in the patients with breast cancer.

The detection of the mutation associated with cancer on microchip CE is in progress, electropherogram of the DNA fragment shown in Figure 1 indicates the possibility of the analysis of single-stranded conformational polymorphism (SSCP), which can be used to distinguish the normal and mutant strands of cancer patient.

General features for such determination of tumor markers with CE were discussed. These methods can be used in clinical laboratories either for cancer monitoring or for pre-cancer screening in principle.

Acknowledgement:

The Authors thanks National Nature Science Foundation of China for financial support.

References:

1. Futian Han, Bryan H. Huynh, Honlan Shi, Bingcheng Lin, Yinfu Ma, *Analytical Chemistry*, 71(1999) 1265-1269.
2. Yinfu Ma, Qingnan Yu, Bingcheng Lin, "Determination of Polyamines by Capillary Electrophoresis" in "Clinical Application of Capillary Electrophoresis", Edited by S. M. Palfrey, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1999
3. Xiuling Dong, Yi Xu, Bingcheng Lin, *Chromatographia*, 52 (1/2) (2000)14-16.

Table 1 Serum levels of SA in normal adult- and various cancer patients (mean±S.D.)

Groups	n	SA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	P
Normal controls	30	621±146	
Breast cancer	24	1198±379	<0.001
Lung cancer	11	1248±302	<0.001
Gynecological cancer	21	1161±287	<0.001
Endometrial cancer	9	1038±211	<0.001
Ovarian cancer	7	1145±324	<0.001
Cervical cancer	5	1138±269	<0.001
Leucocythaemia	16	1188±380	<0.001

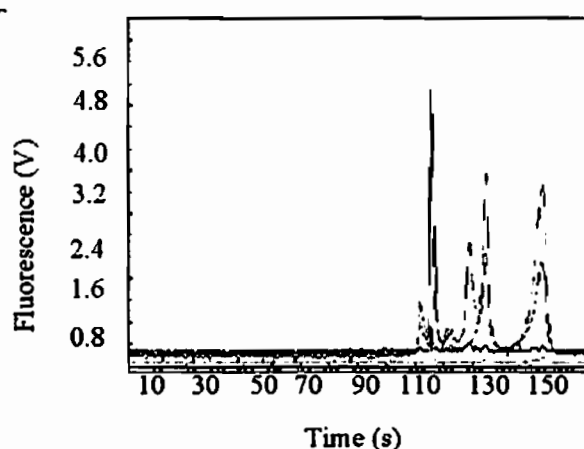


Fig. 1. Microchip Electropherogram for DNA Fragments Labeled by Fluorescence Dyes.

Table 2 Sensitivity for SA and five other tumor markers in various cancer patients

Groups	n	SA ^a No./total (%)	TSGF No./total (%)	CA153 No./total (%)	TPA No./total (%)	CA125 No./total (%)	CA199 No./total (%)
Breast cancer	24	21/24 (87.5)	13/24 (54.2)	10/24 (41.7)	15/24 (62.5)		
Lung cancer	11	11/11 (100.0)	6/11 (54.5)				4/11 (36.4)
Gynecological cancer	21	19/21 (90.5)				9/21 (42.9)	
Endometrial cancer	9	8/9 (88.9)				3/9 (33.3)	
Ovarian cancer	7	6/7 (85.7)				5/7 (71.4)	
Cervical cancer	5	5/5 (100.0)				1/5 (20.0)	
Leucocythaemia	16	15/16 (93.8)					

^a SA $\geq 767 \mu\text{g ml}^{-1}$

L05

Frit-FABインターフェースを用いたMEKC-MSの検討

○山田郁¹、谷沢善明¹、氏家高志¹、保母敏行²

ライオン（株）¹、東京都立大・工学部²

A Study of MEKC-MS with Frit-FAB Interface

Kaoru Yamada¹, Yoshiaki Tanizawa¹, Takashi Ujiie¹, and Toshiyuki Hobo²

¹LION Corporation, 7-chome 13-12, Hirai, Edogawa-ku, Tokyo 132-0035

²Faculty of Engineering, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Minami-Ohsawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0379

On-line coupling of micellar electrokinetic chromatography with frit-fast atom bombardment mass spectrometry (MEKC-Frit/FAB-MS) using liquid junction interface was developed. This method was able to obtain a stable base line using 25mM-SDS/20mM-phosphate buffer. When n-dodecylammonium bromide was analyzed, however sensitivity was insufficient. The main cause was found to be diffusion in a capillary which connected a liquid junction to MS. The loss of the FAB ionization efficiency of the sample resulting from coexistence of a surfactant was not large.

はじめに

分離分析法であるキャピラリー電気泳動（CE）の検出器として質量分析計（MS）を用いる方法、すなわち CE-MS は、極微量混合試料の分離分析と構造解析に威力を発揮するものと期待され研究が進められている。現状で最も検討されているインターフェースはエレクトロスプレーイオン化（ESI）法であるが、CE-MS で適用可能な試料範囲を広げるためには ESI 以外のイオン化法も必要となる。また、ESI をミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）へ適用するには、共存する界面活性剤が試料のイオン化を妨害するため、高分子量界面活性剤の利用、部分注入法などの工夫を必要とする。

我々は、液体クロマトグラフ／質量分析のインターフェースとして実用化されている Frit-FAB 法を CE-MS に応用して新規なインターフェースを開発した¹⁾。今回は、本インターフェースの MEKC への適用性を検討した。

実験

試作したシステムの概要を Fig.1 に示す。キャピラリー電気泳動装置は、Waters Quanta4000CE システムを改造し、UV 検出器後部のキャピラリーを装置外部まで引き延ばしインターフェース部と接続した。質量分析計は、日本電子（株）SX-102A 磁場型質量分析計を用いた。Frit-FAB 部は、日本電子（株）の Frit-FAB LC/MS インターフェースを流用し、空圧スプリッターの代わりに自作のリキッドジャンクション（液絡）を用いた。この部分はアクリル樹脂を加工して作成し、FAB イオン化に必要なマトリックス溶

液で満たした。また、テフロンチューブによるスリーブを設けキャピラリーの容易な取り外しとジャンクションの間隔調整を可能とした。

結果と考察

本インターフェースを用いることにより、MS の真空による分離キャピラリー内泳動液の吸引抑制と FAB イオン化に必要なマトリックスのポストカラム添加が実現でき、エレクトロフェログラムと FAB-MS スペクトルを得ることが出来た。

泳動液に 25mM-SDS/20mM リン酸緩衝液を用いた場合でも、流路が閉塞することなく安定したベースラインを得ることができた。

Fig.2 に n-ドデシルトリメチルアンモニウムブロミドの分析例を示す。泳動液には 25mM-SDS/20mM リン酸緩衝液を用い、FAB マトリックス溶液には 1%グリセリンを含む 90%メタノール水溶液を用いた。落差法 (10cm, 30 秒) にて 100ppm の水溶液を注入した結果、ピークを検出することはできたが感度は不十分であった。

そこで、検出感度におよぼす界面活性剤濃度および種類の関係、インターフェース部での拡散度合いを検討した。その結果、4 級アンモニウム塩の分析においては、界面活性剤の共存による FAB イオン化効率の低下は大きくなく、ジャンクションと MS 間のキャピラリー内での拡散が大きいことが分かった。

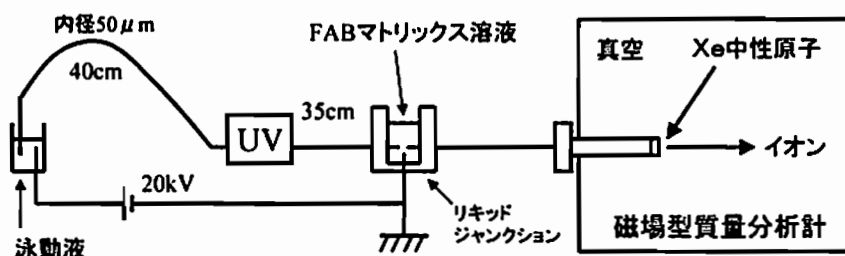


Fig.1 Schematic representation of the MEKC-FAB/MS setup.

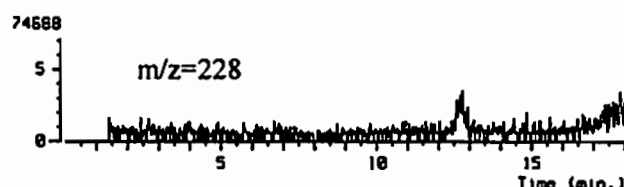


Fig.2 MEKC-FAB/MS electropherogram of
n-dodecyltrimethylammonium bromide.

文献

1. 山田, 谷沢, 氏家, 保母, 日本分析化学会第 48 年会講演要旨集, p.103(1999).

L06

CE-MS/MS システムの製薬・蛋白質分析での応用

Albert Fu-tai Chen、○新井悦郎

ベックマン・コールター株式会社

An Integrated CE-MS/MS System for Drug Discovery and Protein Characterization Application

Albert Fu-Tai Chen, Etsuo Arai

BECKMAN COULTER K.K.

An integrated CE-MS/MS system with single point software control is described.

Traditional ESI-based MS system uses volatile buffer like ammonium acetate and formate to carry out electrospray gas-phase ionization. However, using sodium or ammonium phosphate buffer for CE-based separation of basic drugs, a substantial improvement in resolution of mixture of 20 drugs was observed. Ammonium phosphate appeared to be buffer of choice for the analysis of basic drugs.

Using NH_4OAc buffer at pH of 3.1 and a PEO-treated fused silica capillary, the present integrated CE-MS/MS system provided user-friendly analytical tool for peptides and proteins samples.

Combining the high resolution of capillary electrophoresis with the power of ion trap MS/MS under single point software control creates a powerful, user-friendly analytical tool for drug discovery and development that require rapid, high-resolution separation and confirmatory characterization of analyte mixtures.

はじめに

LC-MS は広く普及し、試料の構造解析において多くの情報を提供している。一方でキャピラリー電気泳動法 (CE) も MS との接続が可能であることは以前から知られているが、いわゆる User Friendly な方法とは言い難い面があった。一方で、塩基性化合物や蛋白質・ペプチドについては CE の分離を有効に活用することで LC-MS 技術を補完することが可能であり、医薬品開発やプロテオームにおける構造解析では特に注目されつつある。

今回、CE 及び MS の接続においてより簡便に使用できるシステムを組み、これによる分析結果を紹介したい。

実験

CE としては Beckman Coulter 製 P/ACE™ システム MDQ を、MS/MS システムとしては Thermoquest Inc. 製 Finnigan LCQ™ Duo を使い、ESI を介して両者を接続した。キャピラリーは内径 $75\mu\text{m}$ (外径 $375\mu\text{m}$)、全長 80cm のヒューズドシリカキャピラリーを用いた。ESI の Sheath Liquid としては、0.5% ギ酸または酢酸のメタノール/水 (80/20) 溶液を流量 3 または $5\mu\text{l/min}$ で使用した。

結果・考察

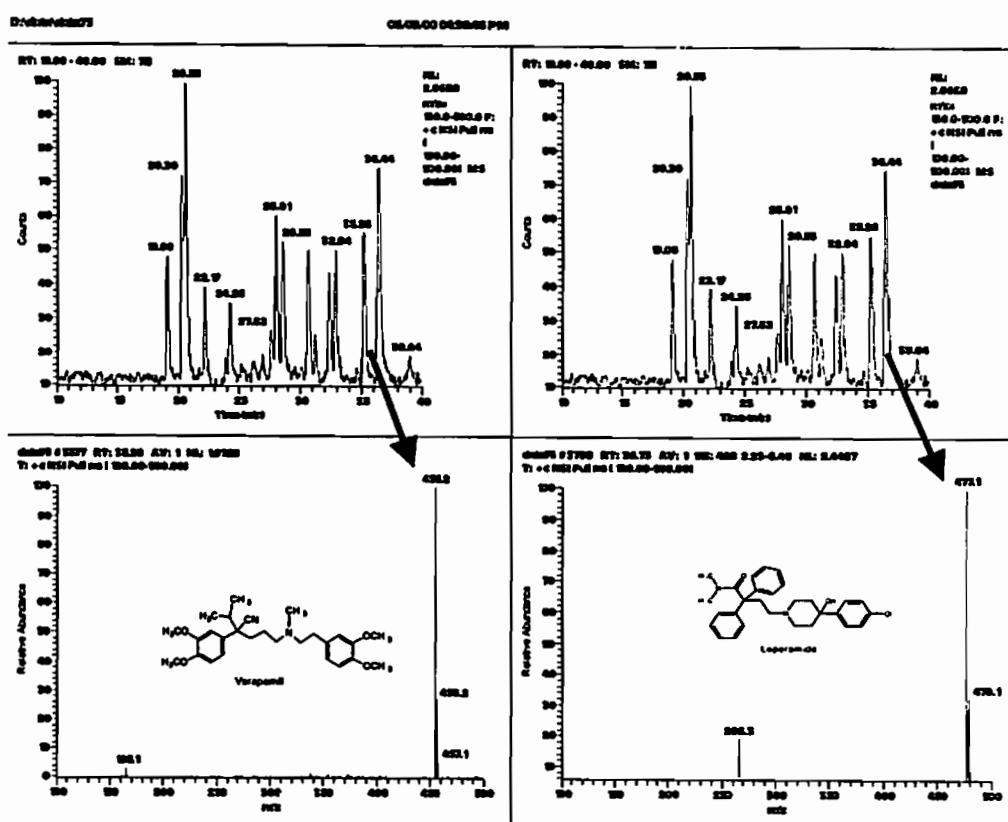
CEにおいてリン酸ナトリウム緩衝液で分離可能な20種類の塩基性有機化合物を、CE-MSシステムで分析した。MSにおいて有利と考えられる揮発性の酢酸アンモニウム緩衝液より、リン酸アンモニウムまたはリン酸ナトリウム緩衝液を用いるほうが良好な分離が得られ (Fig. 1)、ノイズの増大も認められなかった。これらの条件において、single ion monitorにより各成分が確認できた。

またリン酸アンモニウム緩衝液により、血液に50 ng/ml添加した trazodone を CE-MS/MS による分析も含め、確認した。同様の方法で、製剤中に含まれる塩基性の有効成分の確認も可能だった。

蛋白質/ペプチドの分析では酢酸アンモニウム緩衝液 pH3.1 と PEO 処理したキャピラリーを組み合わせることにより、試料成分に合致する質量スペクトルが得られた。

今回組み合わせた CE-MS/MS システムは、より幅広いユーザが使用可能な塩基性化合物及び蛋白質/ペプチドの構造解析ツールとなると考える。

Fig. 1 20種の塩基性有機化合物混合液中の Verapamil と Loperamide の
質量スペクトル 0.1 M Ammonium phosphate, pH 2.38



L07

キャピラリー電気泳動／質量分析用の大気圧化学イオン化 インターフェースの開発

○田中喜秀¹, 大塚浩二², 竹田さほり³, 脇田慎一³, 寺部茂²
日本ベーリンガーインゲルハイム¹, 姫工大・理², 阪工研³

Development of Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface for Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry

Yoshihide Tanaka¹, Koji Otsuka², Sahori Takeda³, Shin-ichi Wakida³ and Shigeru Terabe²

1 Department of Analytical Chemistry, Nippon Boehringer Ingelheim, Co. Ltd., Kawanishi,
Hyogo 666-0193

2 Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

3 Department of Energy and the Environment, Osaka National Research Institute, AIST, MITI,
Ikeda, Osaka 563-8577

For capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS), an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface was developed. A conventional interface for liquid chromatography/MS was modified to permit coaxial flows of assisted gas and a sheath liquid. To evaluate the performance of the interface, a reserpine solution was directly infused into it at the flow rate of 1~20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Since mass spectra of reserpine were obtained with high sensitivity, several parameters on the APCI interface, such as flow rate of sheath gas, temperature of vaporizer, and corona discharge current were optimized. The modified interface was applied successfully to CE/MS. An electropherogram of nicardipine obtained by CE/MS is described.

はじめに

現在、液体クロマトグラフィー／質量分析装置 (LC/MS) では、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) と大気圧化学イオン化法 (APCI) の2種類のインターフェースが汎用されている。しかし、キャピラリー電気泳動 (CE)／MSでは、ほとんどの分析がESIで行われている。LC用のAPCIインターフェースは、試料導入の最適流量が0.2~2.0 mL/minと言われており、CE/MSにおけるシース溶液の流量 (1~10 $\mu\text{L}/\text{min}$) とは一致しない。そこで、CE/MSで利用できるAPCIインターフェースの開発を試みることにした。CE/MS用のAPCI インターフェースとしては、キャピラリーの先端でESIにより溶液を噴霧後、APCIインターフェースへ導入する方法^{1), 2)} が既に報告されている。今回我々は、ESI噴霧を行わずに直接APCIインターフェースへ試料を導入する方法でインターフェースを構築した。

実験

MS 装置は、サーモクエスト社製 LCQ 又は日立製作所製 M-8000 を用いた。インターフェー

スは、LCQ 用の APCI インターフェース又は M-8000 用のセミマイクロ APCI インターフェースを用い、Fig. 1 のようにステンレス管の中にキャピラリーを通し、その間をシース溶液が流れる構造にした。キャピラリーは、Polymicro Technologies 社製の内径 50 μm 、外径 150 μm のものを用いた。APCI インターフェースの評価試料としては 50 mM ギ酸アンモニウム溶液-メタノール混液 (1:1) を用いて 1 ppm のレセルピン溶液を調製し、シリンジポンプで直接導入した。CE/MS は MS 装置として LCQ を用いて行い、シース溶液として電解質溶液・メタノール混液 (1:1) をシリンジポンプで送液 (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) し、松定プレジジョンデバイス社製高圧電源 HCZE-30PN0.25-LDSW により 15KV の電圧を印加した。

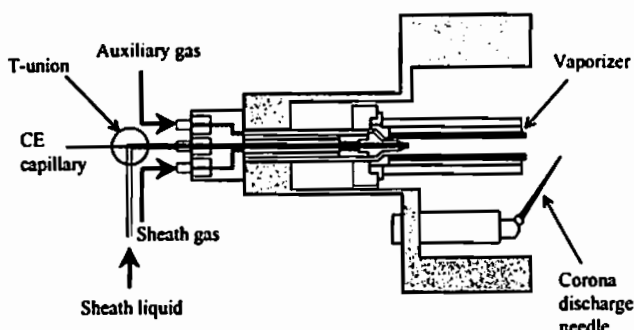


Fig.1 Diagram of APCI interface for CE/MS

結果と考察

はじめに、M-8000 のセミマイクロ APCI インターフェースを改造せずに用い、レセルピン溶液の直接導入により、試料溶液の流量に対する MS の検出感度を調べた。その結果、40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 以下の流量では著しく検出感度が損なわれ、レセルピンの MS スペクトルはほとんど得られなかった。そこで、インターフェースを改造してシースガスを併用する方法を試みたところ、数 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量でもレセルピンの MS スペクトルを感度よく検出できた³⁾。この条件でシースガス流量、脱溶媒温度、ニードル電流等の条件を検討し、APCI インターフェースの評価を行った。CE/MS の実験は、試料として塩酸ニカルジピンの溶液 (500 ppm) を用い、落差法 (10 cm $\times$ 10s) により注入した。その結果を Fig. 2 に示す。

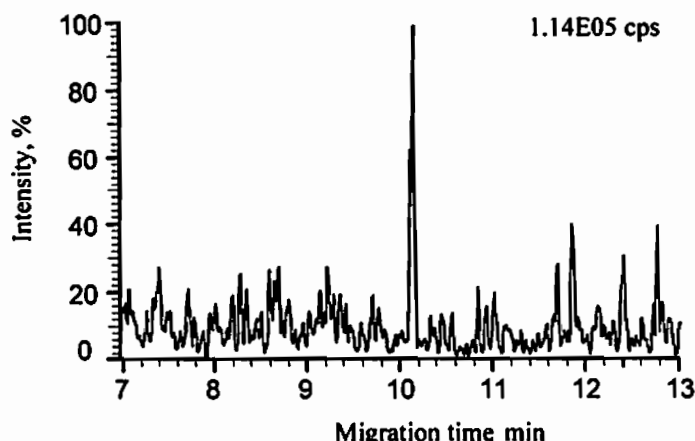


Fig.2 Reconstructed electropherogram of nicardipine (500 ppm, 10 cm $\times$ 10s) by CE/MS. Electrolyte, 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.0), 15 kV, capillary 70 cm., $m/z=479.9-480.9$.

文献

1. Y. Takada, M. Sakairi, and H. Koizumi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 9 (1995) 488.
2. 尾崎祐人, 寺部茂, 分析化学, 46 (1997) 421.
3. 田中喜秀, 大塚浩二, 寺部 茂, *Chromatography*, 21 (2000) 264.

L08 オンライン試料濃縮による MEKC-APCI-MS 分析の高感度化 ○磯尾賢太郎、山本和都、大塚浩二、寺部 茂 姫路工大・理

Improvement of Sensitivity in MEKC-APCI-MS Analysis Using On-line Sample Concentration

Kentaro Isoo*, Wato Yamamoto, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

On-line coupling of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using on-line sample concentration techniques with mass spectrometry (MS) using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface was investigated. By using UV detection, more than 1000-fold increase in detection sensitivity was gained for test solutes by sweeping-MEKC (under acidic condition) compared to conventional MEKC. Similarly, in sweeping-MEKC-APCI-MS a significantly improved detectability was attained compared to conventional MEKC-APCI-MS. For diisopropyl phthalate, a 600-fold improvement in MS detection was observed by sweeping-MEKC-APCI-MS under an acidic condition.

【はじめに】ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) と質量分析法 (MS) とのオンライン結合 (MEKC-MS)では、インターフェースとして大気圧化学イオン化法 (APCI) を用いることにより、分離溶液に含まれる塩や界面活性剤の影響を軽減して MS 検出できることが明らかになっている [1]。しかし、これまで MEKC-APCI-MS では MS 検出において十分な感度が得られておらず、感度向上が課題であった。我々は MEKC における種々のオンライン試料濃縮法を開発し、10~5000 倍程度の濃度感度向上が可能であることを明らかにしてきた [2, 3]。これまでに、中性条件下でスウィーピング (sweeping) 法をオンライン試料濃縮法として用いることで、MEKC-APCI-MS において 100 倍程度の MS 感度向上を達成することができた [4]。本研究では、酸性条件下で sweeping 法を用いることによりさらなる MS 感度向上の可能性について検討した。

【実験】キャピラリー電気泳動装置には HP¹⁰CE (Hewlett-Packard)、質量分析計には APCI インターフェースを装備した日立 M-1000、キャピラリーには内径 50 μ m、外径 150 μ m、全長 60 cm のフューズドシリカキャピラリーを用いた。MEKC 分離溶液は硫酸ドデシルナトリウム (SDS)を 40 mM リン酸-5 mM リン酸塩緩衝液に 50 mM の割合で溶解し、体積比で 10%メタノールを添加し調製した。MEKC 電圧は-11 kV、ESI 電圧は 4.0 kV、APCI 放電用針電極電圧は 2.8 kV とし、シース溶液には、緩衝液とメタノールの混合液 (1:1) を用い 1 μ L/min の流量で送液した。分析時にはキャピラリー入口側のバイアルに 25 mbar の圧力を印加した。試料にはフタル酸エステルを用いた。

【結果】これまで酸性条件下における sweeping-MEKC では、数千倍程度の濃縮効率が得られている。本研究では酸性条件下での sweeping を用いることによる MEKC-APCI-MS における MS 感度向上の検

討を行った。まず、フタル酸ジイソプロピル(DIPP)及びジイソブチル(DIBP)を用いて MEKC-APCI-MS における MS 感度の比較を行った。結果を Fig. 1 に示す。(A)は通常の MEKC-APCI-MS 測定を行ったときのもので、試料濃度が約 300 ppm となるように緩衝液と同組成の溶液に溶かしたものを、50 mbar の圧力で 2 s 注入し測定を行った。(B)は濃度が約 1 ppm (A の 1/300 倍) となるように希釈した試料を 50 mbar の圧力で 800 s 注入し、sweeping-MEKC-APCI-MS 測定を行ったときのものである。このとき、試料溶液は SDS を含まず、電気伝導率が分離溶液とほぼ等しくなるように sweeping 用に調製された溶液で希釈した。その結果、MS 検出においても 300 倍以上の濃度感度向上を達成することができた。次に、DIPP をさらに約 0.5 ppm (1/600 倍) にまで希釈し、同様に sweeping-MEKC-APCI-MS 測定を行った結果を Fig. 2 に示す。この場合、600 倍程度の MS 濃度感度向上が達成された。

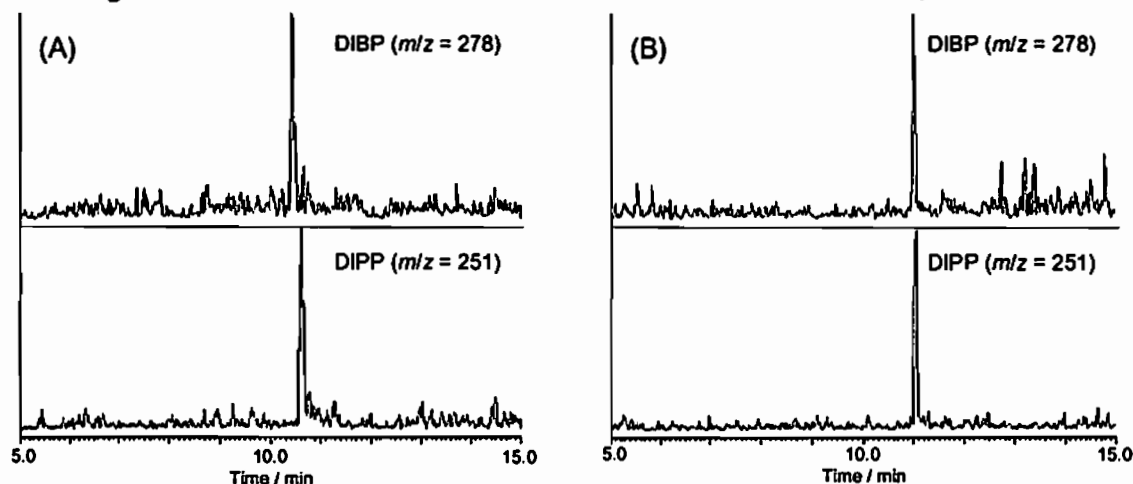


Fig. 1. Sweeping-MEKC-APCI-MS analysis of phthalates: (A) Conventional MEKC-APCI-MS, (B) sweeping-MEKC-APCI-MS. Samples, diisobutyl phthalate (DIBP), diisopropyl phthalate (DIPP); micellar BGS, 50 mM SDS / 40 mM phosphoric acid-5 mM phosphate buffer (pH 2.1) / 10% methanol; capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 60 cm; MEKC voltage, -11 kV; ESI voltage, 4.0 kV; pressure, 25 mbar; sheath liquid, 50% methanol / 50% buffer (1 μ L/min); concentration of samples, (A) 300 ppm, (B) 1 ppm; injection, (A) 50 mbar for 2 s, (B) 800 s.

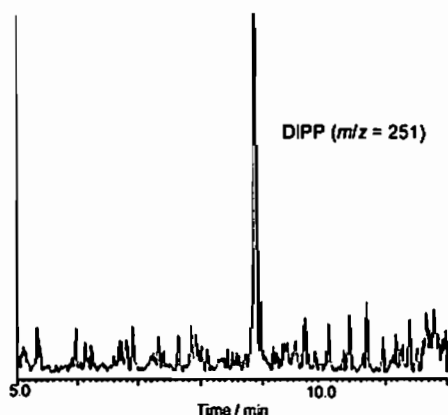


Fig. 2. Sweeping-MEKC-APCI-MS analysis of DIPP. Sample concentration, 0.5 ppm; injection, 50 mbar for 1200 s. Other conditions as in Fig. 1.

- 【文 献】 [1] 尾崎祐人, 寺部 茂, 分析化学, 46 (1997) 421-427.
[2] J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Cap. Elec.*, 4 (1997) 233-245.
[3] J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1638-1644.
[4] 磯尾賢太郎, 大塚浩二, 寺部 茂, 日本分析化学会第 48 年会, 岡山, 2000; 2112.

L09 オンライン前濃縮によるCZEの高感度分析とフェログラムの解析

○廣川 健、育田 夏樹、吉山 竜也、岡本 光

広島大学工学部

High Sensitive Analysis by CZE using On-line Preconcentration Techniques and Analysis of the Obtained Electropherograms

Takeshi Hirokawa, Natsuki Ikuta, Tatsuya Yoshiyama, and Hikaru Okamoto

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

On-line preconcentration technique is essential to improve concentration sensitivity of CE. When CZE mode is used, field-enhanced sample stacking and pseudo-isotachophoretic preconcentration is useful. However, analytical accuracy decreases when these techniques are used, since migration velocity (consequently migration time) depends on the sample concentration, its constitution (counter ion), and the injected volume. For this reason, not only qualitative analysis on the basis of migration time but also quantitative analysis based on the peak area was deteriorated in accuracy. In this paper, this effect was theoretically analyzed and utility of converted electropherograms with effective mobility axis was demonstrated with some model mixtures.

はじめに

キャピラリー電気泳動（CE）法は次世代の分析法として重要な種々の特徴を備えているが、相対感度（濃度感度）の向上と分析再現性の向上が大きな課題である。CZEモードではMEKCにおけるスイーピングにはおよばないが、スタッキングおよび擬似的等速電気泳動による前濃縮によりある程度濃度感度の向上が期待できる。このようなオンライン前濃縮法を使用した際、従来どおりの解析法では分析精度に問題が生じることがある。その理由であるが、スタッキングおよび擬似的等速電気泳動においては試料濃度や組成・注入体積に泳動速度が依存するため泳動時間が大きく変化し、その結果、泳動時間をベースとする定性分析だけでなく、面積を利用する定量分析にも大きく悪影響を与えるためである。

本講演ではスタッキングおよび擬似的等速電気泳動が泳動時間および試料面積に与える影響について、シミュレーションと実験を併用して理論的な検討を加え、演者らの考案した移動度軸を横軸とするフェログラムがこの問題の解決に有効であることを示す。

実験

シミュレーションには当研究室で作製したソフトウェアおよびGasらのSIMULを使用した。試料としては4種のカチオン(K, Li, Tris, ϵ -アミノカプロン酸(AMC))を用いた。支持電解液としては30mMクレアチニンと30mM酢酸の混合溶液を使用した。実験にはCAPI-3100（大塚電子）を使用した。キャピラリーは内径75 μ m、全長40cm(有効長27.7cm)のfused silica製で、印加電圧は10kV、キャピラリーチャンバーの温度は25℃に設定した。試料の濃度範囲は0.06-3mMで、導入には落差法（25mm）を用いて10秒から260秒注入した。注入量はHagen-Poiseuille式によりそれぞれ11, 53.5, 96.2 and 139nl, 試料プラグ長は0.24, 1.21, 2.18 and 3.15cm, 試料中の各成分量は0.06mMの場合、0.64, 3.21, 5.77 and 8.34 pmolと推定された。エレクトロフェログラムを得るには $\lambda=220$ nmにおける間接UV吸収を使用した。なお一部の実験には希土類混合物を使用した。

結果と考察

一般に、電導度が低い希薄な試料を注入し泳動させると、支持電解液部分の電位勾配に較べ

試料プラグ部分の電位勾配が高く泳動速度が速いため、試料プラグ-支持電解液界面で試料が濃縮される。これが通常のスタッキング効果であるが、このほかにも試料のカウンターイオンの実効移動度が支持電解液のそれより大きい場合、ある程度電導度が高くても通電後プラグ部分の電位勾配が上昇し、同様な効果が期待できる。しかし濃縮と同時に分析上、好ましくない現象も発生する。

図1 aに0.06mMの等モル混合試料について実測フェログラムの試料注入時間依存性を示した。図より明らかに試料注入体積の増加と共に、泳動時間が短縮している。この現象は次のように説明できる。試料の移動速度(v_{mig})は次式のように電気泳動速度(v_{ep})と浸透流速度(v_{eof})の和で表される。

$$v_{mig} = v_{ep} + v_{eof}$$

電導度が低く、従ってイオン強度が低い試料プラグ部のキャピラリー壁面では電位が上昇し、電気浸透流移動度は他の部分に比べ格段に大きくなる。また電位勾配も試料プラグ部に集中するため、キャピラリー全体の v_{eof} は試料が希薄なほど、試料プラグが長いほど増加し、その結果 v_{mig} が大きくなり、試料は早く検出器に到達する。しかし、分離を支配する v_{ep} は逆に小さくなるので、希薄試料を多量に注入すると分離が不十分なまま検出器に到達してしまう。このような場合、泳動時間に基づく定性分析が出来ないほか、ピーク面積に元づく定量分析にも支障を来す。

このようなフェログラムでも最近我々が提唱している実効移動度を横軸とするフェログラムを使用すると、図1 bのように変換が可能であり、定性分析に於いては全く問題が無くなり、定量分析については泳動速度を面積に乘じることにより良好な直線性が得られることが明らかになった[1]。なおこの変換法は特許申請中である。より厳密な定量分析の取り扱い[2]については講演I43で報告する。

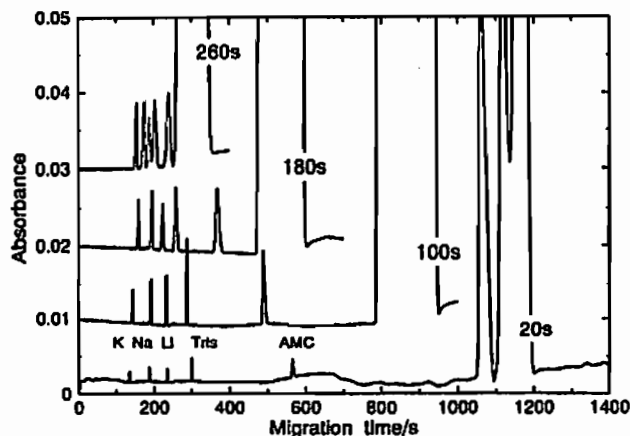


Fig.1. Electropherograms of five kinds of cations(0.06mM) obtained by varying sample injection time (hydrostatic injection, 25mm, 20s-260s)

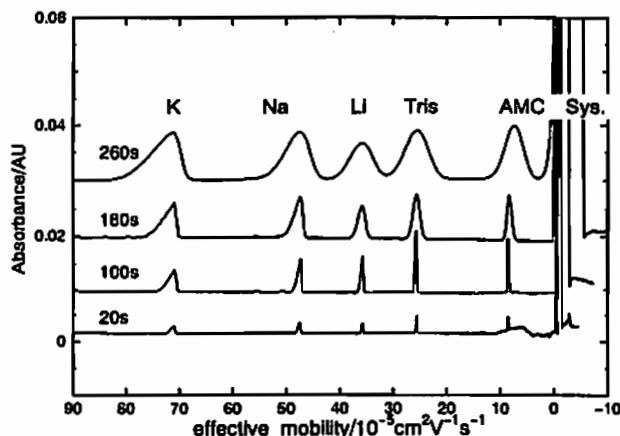


Fig.2. Electropherograms with effective mobility axis converted by temperature-coefficient method [1,2].

文献

1. T. Hirokawa, N. Ikuta, T. Yoshiyama, "Standardization of capillary zone electropherograms obtained by using field enhanced sample stacking", J. Chromatogr. A, Vol. 894, No. 1-2, pp. 3-9, 2000.
2. N. Ikuta, Y. Yamada, T. Yoshiyama, T. Hirokawa, "New method for standardization of electropherograms obtained in capillary zone electrophoresis", J. Chromatogr. A, Vol. 894, No. 1-2, pp. 11-17, 2000.

L10

マイクロチップを使った高効率化学合成

○久本 秀明¹・北森 武彦^{1,2}

東大院工¹・KAST²

Highly Efficient Chemical Synthesis by Using Microchip

Hideaki Hisamoto (1), Takehiko Kitamori (1,2),

(1) Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo

(2) Integrated Chemistry Project, Kanagawa Academy of Science and Technology

A microchannel fabricated on microchip provides novel chemical reaction field, such as short diffusion distance, large specific liquid-liquid interfacial area, and small heat capacity. These characteristics are expected to play important roles for demonstrating highly efficient chemical reaction in microchip.

Here we firstly investigated the synthetic chemical reaction in microchip for demonstrating high yield synthetic reaction by exploiting large specific interfacial area of the liquid-liquid interface statically formed in microchannel. In order to investigate the liquid-liquid interface diazocoupling reaction, organic phase containing resorcinol derivative and water phase containing diazonium salt were introduced into the microchannel possessing 250 μm width under continuous flow condition.

In contrast to the macro scale reaction involving undesirable side reaction, highly efficient synthesis of ca. 100% yield was performed in microscale reaction. Calculated productivity of single microchip suggested that a pile-up-chip system using plural microchips enables high throughput synthesis of the compound without any chemical engineering consideration.

【はじめに】 近年、ガラス基板上に幅数 10～数 100 μm の溝(マイクロチャネル)を作製し、化学システムを集積化する研究が注目を集めている。しかしながら世界の研究の流れは DNA の電気泳動分析が主流である。一方、我々は一般の化学反応も集積可能であり、特にマイクロチャネルのような液相微小空間を化学反応の場として見たときに、分子拡散距離が短い、比界面積が大きい、熱容量が小さいなど、高効率な化学反応に有利な数々のメリットを有することに着目し、これまでに錯形成、抗原-抗体反応等の研究を推進してきた。このような反応場では、物質移動時間の短縮、固液あるいは液液界面反応の顕在化及び反応系に対して熱エネルギー授受が速やかに行われることなどから、化学反応の高効率化が期待される。しかしながら、液相微小空間中での基本的な化学反応の研究例はほとんどない。

そこで本研究では、より一般的な有機合成反応をマイクロチップ中で行い、微小空間の特徴を活かした化学反応を実現することを目的とし、今回は液液界面を利用した高収率合成反応を試みた。また、マイクロチップで生産可能な生成物量を計算し、マイクロチップ合成シ

システムの生産性についても検討した。

2.35

【実験】ここでは油水界面色素合成反応を行った。これは油相に存在するレゾルシノール誘導体が水相に分配され、水相中のジアゾニウム塩とジアゾカップリング反応を起こした後に、生成した主生成物が再び油相に抽出される相間移動反応系である。実験は Y 字型マイクロチップ(幅 250 μ m、深さ 100 μ m)を用いた。有機相・水相をチャンネルに導入し、反応後の留出有機相を分析することで反応効率を評価した。また、比較のために同様の実験をマクロスケールでも行った。

【結果と検討】図1に比界面積と反応収率の関係を示す。マクロスケール反応においては攪拌操作を行っても収率が 80%程度であるのに対し、比界面積の大きなマイクロチップ内反応においては原料溶液の送液のみで 100%近い収率が得られている。これはマイクロチップ内反応においては、生成する主生成物が効率良く有機相に抽出されるために水相中での滞留時間が相対的に短く、副反応が進行しにくくなり、相対的に反応収率が向上したものと考えられる。

マイクロチップを用いた合成システムでは化学工学的検討が一切必要無く、平板状のチップの単純な積み上げ(パイルアップ)で、大量生産への適用が可能である(図2)。今回検討した高収率合成システムの結果を用いてチップ1枚あたりの生産量を計算し、年間生産量 1 トンの実現に必要な積み上げスペースを計算した。その結果、必要スペースは 0.4m³ 程度となり、少ないスペースでの大量生産が十分に可能であることがわかった。

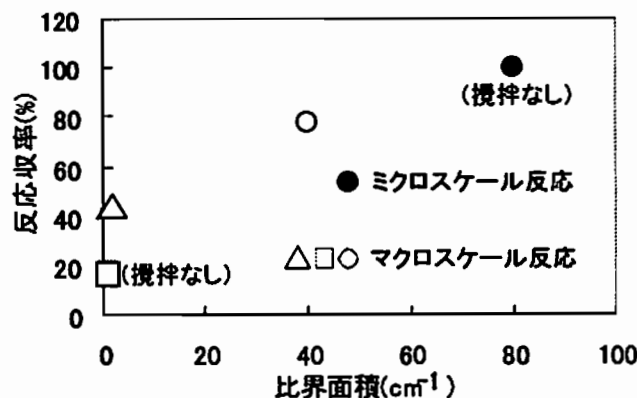


図1 反応収率と比界面積の関係

図2では、これまでの化学工学では実現困難であった原料の連続送液に基づく高収率合成や、積み上げ枚数調整によって、必要な物質を必要な量だけ合成する需要追従型合成システムの構築も容易である。

LIGA によって作製されるマイクロリアクターの研究においては、二液の混合効率(分子拡散)や反応熱の迅速な除去などに着目した研究が主流であった。しかし、今回の我々の検討から、ガラスマイクロチップを利用することで、副生成物の少ない高速高収率な合成反応が初めて実現され、少量多品種生産や大量生産にも適合する可能性が示唆された。

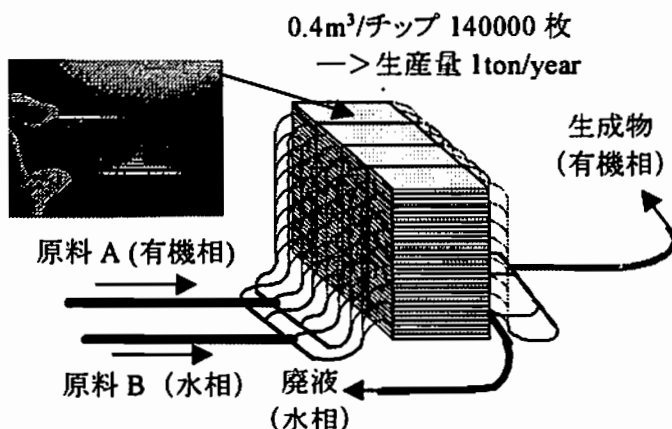


図2 パイルアップ型生産システム

L11

高分子を用いたキャピラリーチップ電気クロマトグラフィーの開発

○内山一美、徐 偉、保母敏行
東京都立大学・院・工

Development of Capillary chip electrochromatography with polymeric material

Katsumi Uchiyama, Wei Xu, Toshiyuki Hobo

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo

Metropolitan University, Tokyo 192-0397

We have developed a novel preparation method for polyester microchip by *in situ* polymerization. The method enables quantitative expression of selector moiety on the wall of microchannel by the addition of appropriate cross linker to the monomer solution. We found that 1) reproducible microchannel could be easily obtained by simple procedure, 2) the microchip showed superior separation efficiency to conventional fused silica capillary tube with MEKC mode, 3) the microchannel expressed 10-undecene-1-ol on the wall showed electro-chromatographic behavior, 4) SDS was strongly adsorbed at the wall of native polyester microchannel showing constant EOF regardless to the buffer pH, 5) the addition of non ionic surfactant to buffer solution decrease EOF almost zero, 6) accommodation of glass window into the chip could be easily accomplished. We will present recent progress of our new capillary chip electrochromatography with polymeric material.

1 はじめに

著者らはガラス製マイクロチャンネルレプリカの作成方法及びこれをテンプレートとして用い、*in situ* で機能性高分子を重合・合成する方法を開発^{1)~3)}した。これにより 1) 再現性の良い高分子マイクロチャンネルチップの作成が可能であること、2) 光ファイバーや光学窓などの組み込みが容易であること、3) カバーチップとマイクロチャンネルの接合は重ねあわせるだけで良いこと、4) マイクロチャンネル内壁に機能性分子を発現することが可能であることなどを示した。そこで MEKC 及び上記 4) のマイクロチャンネル内壁を固定相とした CEC について、内壁に分子機能の発現について H-u プロット、EOF 測定等によって解析した。

2 実験

高分子として不飽和ポリエステル (PE) オリゴマーを用い、種々のクロスリンカーを添加し重合・固化・接合した。マイクロチャンネルのテンプレートは LSI フォトマスク

用マスクブランケット(Alback, Cr: 50 nm on 50×50×3 mm glass)を用い既報¹⁾に従って作成した。マイクロチャンネルのパターンは折り返しを持つパターンとし、分離部の長さは約 35 cm とした。マイクロチャンネルは幅約 70~100 μm 、深さ約 15 μm である。試料導入は十字型の流路交差部に電氣的に試料を導入し行った。検出部は緩衝液溜めから約 1.5 cm のところに設置したガラス窓を通しレーザー光(He-Ne, 543 nm, 1 mW)を導入し LIF により行った。モデル試料として Sulforhodamine B 及び Sulforhodamine 101 を用いた。

3 結果及び考察

クロスリンカーを添加しない(スチレンモノマーのみ)PE マイクロチャンネルを MEKC モードで用い、色素の分離性能を石英性キャピラリーと比較した。どちらのキャピラリーとも 2 つの色素は完全に分離したが、理論段数は PE マイクロチャンネルが 1.4×10^5 であったのに対し溶融石英キャピラリーチューブでは 3.3×10^4 とマイクロチャンネルチップが約 5 倍の性能を示した。検出窓、キャピラリー内壁の違いも考えられるが、本マイクロチャンネルがなぜそのように高性能であるかは不明である。クロスリンカーを添加しないマイクロチャンネルではマイクロチャンネル内壁が疎水性であるため界面活性剤や有機溶媒を含まない泳動緩衝溶液の導入が難しい。種々のクロスリンカーを添加したときの内壁の状態を間接的に調べるため電流法による電気浸透流 EOF の測定を行った。即ち塩濃度だけ異なる二つの緩衝液を用い、電気泳動電流の変化から EOF の大きさを見積もった。MEKC モードにおける EOF の大きさの pH 依存性を、①溶融石英キャピラリーチューブ、②クロスリンカーを含まない PE、③クロスリンカーとして 10-undecen-1-ol を 6% 添加した PE チップについて比較した。①では pH の低下とともに EOF は著しく減少した。これはガラス表面のシラノール基の解離が pH 低下とともに減少したためと思われる。しかし②及び③では pH が低下してもほぼ一定の EOF 流速を示した。PE 表面には PE 鎖末端のカルボキシル基、③では undecanol が存在すると考えられるが、これらの解離ではこの現象は説明不能である。一方界面活性剤として非イオン性界面活性剤を添加すると EOF がまったく観測されないこと等を考慮すると SDS が内壁に強く吸着し、これがあたかも固定相として振舞うことにより一定の EOF となったと考察される。又、非イオン性界面活性剤で EOF が 0 になるという重要な事実も発見できた。これにより IEF が極めて容易に行え、現在検討している。内壁での機能性分子の発現を H-u プロットにより検討したところ、10-undecene-1-ol では理論段高さが最小となる緩衝液の線速度が存在し、内壁をつかった電気クロマトグラフィーとなっていることを確認した。今後内壁に分子鑄型を構築したチップも作成する予定である。

1) Development of Imprinted Polymer Microchannel Capillary Chip for Capillary electrochromatography K. Uchiyama, et al, *Anal. Sci.*, **15**, 825-826 (1999). 2) The Application of Polyester Microchip to Capillary Electrophoresis Wei XU et al, *Chem. Lett.*, 762-763 (2000). 3) Fabrication of Polyester Microchannels and Their Applications to Capillary Electrophoresis, Wei XU et al, *J. Chromatogr. A* (accepted for publication).

L12

PDMS-ガラスハイブリッドマイクロチップによる遺伝子解析

Hong Jong Wook^{1,3}、○藤井輝夫²、関実¹、山本貴富喜²、遠藤勲³

東京大学工学系研究科¹、東京大学生産技術研究所²、理化学研究所生化学システム研究室³

Monolithic PDMS-Glass Hybrid Microchip for Genetic Analysis

Jong Wook Hong^{1,3}、○Teruo Fujii², Minoru Seki¹, Takatoki Yamamoto² and Isao Endo³

¹Department of Chemistry and Biotechnology, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656

²Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Tokyo 106-8558

³Biochemical Systems Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),
Saitama 351-0198

The development of the polydimethylsiloxane (PDMS)-glass hybrid microchip for genetic analysis by functional integration of PCR and capillary gel electrophoresis (CGE) are reported. The microchip was produced by molding PDMS against a microfabricated master with comparatively simple and inexpensive methods. Adsorption of biomolecules to the surface of PDMS and glass was prevented by pretreatment of the chip. PCR was successfully carried out on the PDMS-glass hybrid microchip with the target of λ DNA and consecutive electrophoretic sizing was carried out on the same microchip. The chip could be considered as an inexpensive single use apparatus unlike the glass or silicon-made microchips for the same purpose.

はじめに

マイクロチップを用いて、一つのチップ上で、遺伝子の増幅と増幅産物の分離・同定を行うことは、ポストゲノムシーケンシング時代に向けて、技術的にも産業的にも、高い関心を集めている。これまでのマイクロチップの材料は、主にガラスやシリコンであり、ポリマー材料に比べて、加工の自由度などに制限がある。これに対して、著者らのグループでは、安価でかつ加工が容易な材料である PDMS(polydimethylsiloxane)を主材料として、PCR 反応とキャピラリーゲル電気泳動を一つのチップで行うことが可能な遺伝子解析用マイクロチップを開発したので以下に報告する[1-3]。

実験

シリコンポリマーである PDMS (polydimethylsiloxane)を主材料としたマイクロチップの構造を Fig. 1 に示す。PDMS を利用したマイクロ構造の形成はシリコンやガラスなどの材料にくらべ、単一のマスターから繰り返し作成が可能なため、安価に製造できるため、シングルユースとすることにより、クロスコンタミネーションを避けることができる。

マイクロチップの作成法としては、まず、シリコンウェハの上に、ネガティブフォトリソの SU-8 をスピンコートし、紫外線による露光と現像によって微細構造をもつマスターを製作する。これを用いて、replica molding を行うことにより、PDMS を成形する。この PDMS チップをガラス板に貼り付けることによって、PCR 反応と電気泳動による遺伝子解析を一つのチップ上で行うことが可能な PDMS-glass hybrid マイクロチップを作成した。チップ上での PCR 反応を行うにあたり、ベルチェ素子と温度センサ及びパソコンから構成される温度コントロールシステムも合わせて構築した。マイクロチップ上の電気泳動の観察は SYBR-Green I を用い、蛍光顕微鏡で行った。

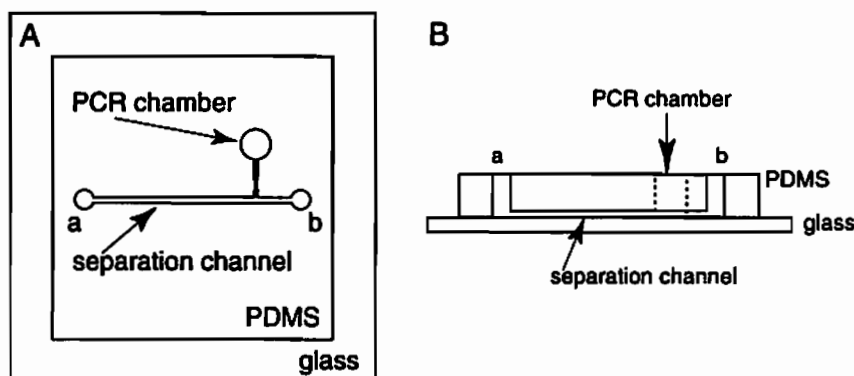


Fig. 1. Layout of PDMS-glass hybrid microchip for genetic analysis on by PCR and capillary gel electrophoresis (CGE) (not to scale). (A) Top view of the chip: The PCR chamber is $\phi = 3$ to 5 mm, which is drilled on the PDMS microchip. Separation channel is 14 mm long. (a) and (b) mean the access ports for gel introducing, sample loading and electrode introducing for CGE. $\phi = 1.5$ mm. (B) Cross-sectional view of the chip.

結果と考察

λ DNAの遺伝子をターゲットとして、マイクロチップ上で遺伝子の増幅反応を行った結果、500 bpの目的遺伝子配列の増幅に成功した。その後、反応溶液の蒸発を防ぐために、ミネラルオイルを乗せ、蛋白や酵素などの吸着を防ぐために、BSAを利用し、前処理を行った。30 μ lの反応溶液の場合、3段階PCRで、反応時間は約3000秒であった。次に、同一チップ上で、キャピラリーゲル電気泳動によって、ターゲットDNA解析を行った。その結果、幅400 μ m、深さ100 μ mのマイクロチャンネルの場合、わずか3 mm程度の長さがあれば、特定の500 bpのDNAの解析が可能であることを見いだした。さらに、その際の解析時間は、十数秒程度で極めて短い時間で分析が可能であることを確認した(Fig.2)。

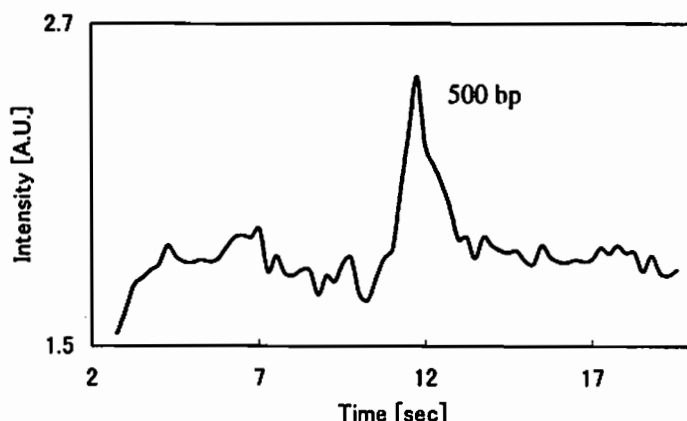


Fig. 2. Electropherogram of 500 bp DNA amplified and analyzed on a PDMA-based microchip.

文献

1. J. W. Hong, K. Hosokawa, T. Fujii, M. Seki, I. Endo, *Proc. IEEE Transducers*, 2(1999) 760.
2. J. W. Hong, K. Hosokawa, T. Fujii, M. Seki, I. Endo, *Bioseparation Engineering*, I. Endo et al. (Editors), Elsevier, Amsterdam, 16(2000) 69.
3. J. W. Hong, T. Fujii, M. Seki, T. Yamamoto, I. Endo, *Electrophoresis*, 2001, accepted.

L13

チャンネル中でのDNA 1分子の操作と加工

○平野 研、松澤有希子、安田八郎、桂 進司、水野 彰

豊橋技科大・エコロジー工学系

Manipulation and Processing of a Single DNA Molecule inside Channels for Genome Analysis

Ken Hirano, Yukiko Matsuzawa, Hachiro Yasuda, Shinji Katsura,
and Akira Mizuno

Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of Technology 441-8580

A micromanipulation technique for single DNA molecules using electrostatic force and laser beam, has been under development. In this paper, a single DNA molecule was cut from its terminus sequentially by pulsed N₂ laser and each fragment was continuously recovered using the separation channel fabricated on a glass substrate. This results suggest that total manipulation of single DNA molecule on a chip contribute to acceleration of genome analysis speed.

はじめに

DNA 1分子を操作することで、DNAとタンパク質との相互作用など生命現象を1分子レベルで直接観察する受動的な解析から[1]、分子の紐に結び目を作るなど人工的な操作[2]や分子加工[3]を行う能動的な解析をするものまで広い範囲の応用が可能になってきている。現在演者らは、レーザーマニピュレーションや静電気力を用いて、DNA 1分子の操作技術をゲノム解析へ応用することを試みている。このためには、DNA 1分子を位置制御、伸張固定、順次切断、回収、増幅を行う操作・加工の要素技術が必要となり、これまでに位置制御、伸張固定、回収の技術をほぼ確立してきた[3]。これら要素技術は、1分子を操作する故、独立には確立できるものの統合的に操作することは容易ではなかった。今回、ガラス基板上にチャンネルを形成し、その中でマニピュレーションすることにより、DNA 1分子の末端から順に切断し、個別のチャンネルへ回収するといったDNA分子の操作・加工を一連の操作として行った。

実験方法

DNA分子の操作・加工は、スライドガラス上でFig. 1のように形成したチャンネル中で行った。DNAには、片端をビオチン化したλ DNAを用い、アビジンコートされた基板へ末端固定した。DNAを直線状に伸張させ、かつその方向を制御するためにチャンネルの端子間（Fig. 1のGとA, B, Cとの間）に直流電界を印加した。観察には、正立型蛍光顕微鏡（Carl Zeiss, Axioplan）を用い、蛍光色素 YOYO-1 で染色されたDNA分子を超高感度カメラ SIT カメラにより蛍光像として捕らえている。また、DNA分子の切断は、波長 337nm のパルス窒素レーザー（Laser Science, VSL-337ND）をミラーを介

して顕微鏡に導入することで可能とした。

結果と考察

チャンネル中でDNA 1分子の伸張、方向制御、標的位置での切断、切断片の個別回収の様子を Fig. 2 に示す。はじめに基板に固定されていない不要なDNAを一掃する目的でポートC (Fig. 1) に電圧を印加し、電気泳動により回収した。その後、選択したチャンネル(ポートB)に+1kV/mの電界を加え、チャンネルの分岐点に片端固定されているDNA分子をチャンネル方向へ配向・伸張させた (Fig. 2a)。その状態で対物レンズにより絞った窒素レーザーを照射することで、分子上の目的位置を切断し、かつ切断片1分子を電気泳動によりチャンネルへ回収することが可能であった (Fig. 2b-c)。また、同様にして他のチャンネルへ末端から順に切断した切断片を回収することも可能であった (Fig. 2d-f)。これにより、DNA分子上の目的部分のみを回収可能であることを示すことができた。また、順に断片を調整することでDNA上の位置関係を把握した状態でライブラリーを作製する技術などへの応用が期待できる。それには、回収したチャンネルでPCRを行うことが必要となるが、1分子からのPCRは可能であり[4]、またチャンネルの特性を利用して連続的にPCRすることも可能である[5]ことが報告されており、チップを用いることで、統合的に技術を集約し、1分子操作を一連の操作として行うことが可能であると思われる。

謝辞

本研究を行うにあたり、アトムテクノロジー研究体、文部省科学研究費補助金 (A) [No. 09750875] の助成を受けて行われました。また、K.H. は日本学術振興会特別研究員制度による助成を受けて行いました。あわせて謝意を表します。

文献

1. A. D. Mehta, *et al.*, *Science*, 283 (1999) 1689.
2. Y. Arai, *et al.*, *Nature*, 399 (1999) 446.
3. A. Mizuno, *et al.*, *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 31 (1995) 1452.
4. S. Ouchi, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 26 (1998) 4339.
5. M. U. Kopp, *et al.*, *Science*, 280 (1998) 1146.

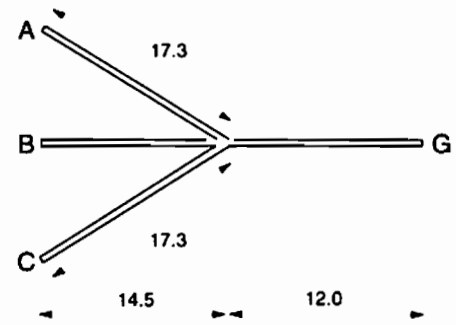


Fig. 1 チャンネル形状 (単位: mm)

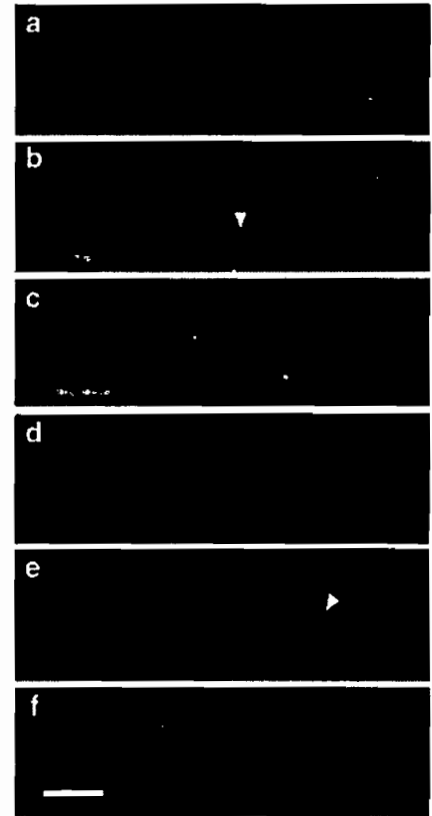


Fig. 2 DNA の操作・加工
(Scale bar: 15μm)

L14

微小空間での長鎖 DNA のダイナミクス

○ 上田正則^{1,2}, 加地範匡^{1,2}, 馬場嘉信^{1,2}

徳島大・薬¹、科技団 CREST²

Dynamics of a long DNA in small systems

Masanori Ueda^{1,2}, Noritada Kaji^{1,2}, and Yoshinobu Baba^{1,2}

¹CREST, Japan Science and Technology Corporation(JST), Chiba 292-0812

²Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima
770-8505

Microfabricated capillary electrophoresis (Micro CE) devices are new technology for next generation of gene analysis. In order to develop the new application technique on the micro CE, we investigated DNA dynamics in micro CE channels at the level of single DNA molecules. We will discuss about the difference of the dynamics between in gel or polymer solutions and in micro CE.

はじめに

ヒト・ゲノム解析計画の終了を迎え、個々人の遺伝子の変異を高速に診断する技術の開発に大きな関心が寄せられている。このような中で、DNA 解析方法の微細加工技術によるマイクロチップへの集積化は、将来的に遺伝子解析コストの低下をもたらし、個人の遺伝情報に基づいた医療を実現するための基盤技術として活発に研究が進められている。

これまで我々は、DNA に蓄積された変異によって引き起こされる遺伝病の診断方法や個人識別を正確・高速に行うための DNA 鑑定法などをキャピラリー電気泳動法を中心に開発し、それらの方法をマイクロチップ化キャピラリー電気泳動(μ -CE)へと移植してきた。更に、通常のキャピラリー電気泳動には無い、 μ -CE 固有のアプリケーションを開発するには、チップ内での DNA の泳動挙動を 1 分子レベルから理解することが重要である。本研究においては、マイクロチップ内での DNA を 1 分子レベルから可視化して、ゲル中やポリマー溶液中の運動形態と比較した。

実験

単一 DNA 分子のダイナミクスを解析するために、 λ DNA(48.5kbp)や T4DNA(166kbp)の長鎖 DNA を蛍光色素 YOYO1 または YOPRO1 で染色し、倒立型蛍光顕微鏡上にマイクロチップをセットして、SIT カメラで観察した。

マイクロチップは石英基板に、リソグラフィーとエッチングによって微細流路を作成し、流路幅と深さを変えたものを用いた。

2134b1

56 μm $\rightarrow$ 3-4 μm

結果と考察

Fig.1 には、流路幅約 50 μm 、深さ約 20 μm の流路の中を運動する T4DNA の蛍光イメージを示す。¹ T4DNA の慣性半径は外場の無いときで、約 3 μm である。このように、流路幅・深さともに、対象 DNA の慣性半径に比べて 10 倍程度のサイズでは、DNA の運動に微小空間のサイズ効果は観測されない。



20 μm

Figure 1. Fluorescence image of T4 DNA in microfabricated channels.

しかしながら、ゲル中やポリマー溶液中のように、DNA の運動を制限するサイズが、その慣性半径に比べて小さくなってくると、DNA は絡み合い効果等の影響を受けて自由溶液中とは全く違う形態変化を伴って運動するようになる。Volkmuth らは、人工的に作成した障害物をゲルの架橋点のように並べた基板上を DNA が運動する際、ゲル中と同じような伸び縮み運動をすることを報告している。²

本研究では、チップの流路幅や流路内障害物の濃度によって DNA の運動がどのように変化し、それがゲル中やポリマー溶液中とどのように違うかを、動画像解析から定量的に明らかにすることを目指している。

謝辞

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 (CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省長寿科学総合研究推進事業、の援助を得て行った。

文献

1. 上田 正則, 馬場嘉信, "電気泳動中の DNA のイメージング", 『バイオイメージング』7 巻(1998)31.
2. W. D. Volkmuth and R. H. Austin, "DNA electrophoresis in microlithographic arrays", Nature Vol. 358(1992)600.



S04

HIGH-THROUGHPUT SCREENING BASED ON MULTIPLEXED CE AND ABSORPTION DETECTION

Edward S. Yeung

*Ames Laboratory-USDOE and Department of Chemistry,
Iowa State University, Ames, IA 50011, U.S.A.*

Summary

Capillary electrophoresis (CE) is now a mature technique for analytical separations. In its various modes, impressive performance has been demonstrated for ionic as well as for neutral compounds. The Human Genome Project provided the impetus for developing multiple capillary systems. However, capillary arrays are not just for DNA analysis. Every CE protocol can be similarly multiplexed to achieve higher throughput and reduced reagent consumption without sacrificing its good resolving power and full automation. To extend the applicability to non-fluorescing compounds, we constructed a simultaneous multiplexed absorption detector for 96 capillaries. Entire sample trays in the 96-well microtiter plate format can be analyzed in one operation. This high-throughput capability gives CE a unique advantage over column liquid chromatography in most applications. Examples from DNA analysis, enzyme assay, peptide mapping and combinatorial synthesis will be presented.

1. Genetic Typing and HIV-1 Diagnosis

Current high-throughput approaches to the analysis of PCR products are based primarily on electrophoretic separation and laser-excited fluorescence detection. We show that capillary array electrophoresis can be applied to HIV-1 diagnosis and D1S80 VNTR genetic typing based simply on UV absorption detection. The additive contribution of each base pair to the total absorption signal provides adequate detection sensitivity for analyzing most PCR products [1]. Not only is the use of specialized and potentially toxic fluorescent labels eliminated, but also the complexity and cost of the instrumentation are greatly reduced.

2. Combinatorial Screening of Enzyme Activity

Efficient and comprehensive screening of enzyme activity was accomplished in a combinatorial array of 96 reaction microvials [2]. Quantitation of the extent of the reaction at well-defined time intervals was achieved by using 96-capillary array electrophoresis coupled with a multiplexed absorption detector. Capillary electrophoresis provides high separation resolution to isolate the product from the reactants. Absorption detection provides universal

applicability to combinatorial screening. For the conversion of NADH to NAD⁺, the catalytic activity of LDH was confirmed to be the highest at pH 7.

3. Comprehensive Peptide Mapping

A novel multi-modal method for peptide mapping of proteins by multiplexed CE is presented [3]. By combining charge to size separations in four different channels and micellar electrokinetic chromatography for hydrophobicity-based separations in two different channels in a 96-capillary array, peptide fragments of digested proteins were readily resolved and showed unique fingerprints. Each capillary spanned several diodes in a photodiode array for absorption measurement. This demonstrates that it is possible to rapidly screen biotechnological products as well as to efficiently optimize separation conditions in CE by a combinatorial approach.

4. Combinatorial Screening of Catalysis

Combinatorial chemistry is revolutionizing the discovery of new drugs, novel materials and efficient catalysts by scanning and testing vast numbers of possibilities. In order to fully realize the potential of combinatorial chemistry, general and powerful schemes for high-throughput screening are essential. We report here the use of capillary array electrophoresis for the rapid screening of a homogeneous catalytic reaction in a combinatorial manner [4]. This approach has allowed the effective optimization of a homogeneously catalyzed synthetic organic reaction and the discovery of conditions that produce yields superior to those obtained previously by a less systematic approach.

Acknowledgments

The Ames Laboratory is operated for the U.S. Department of Energy by Iowa State University under Contract No. W-7405-Eng-82. The instrumentation was developed with support from the Director of Science, Office of Basic Energy Sciences, Division of Chemical Sciences. This work was supported by the Director of Science, Office of Biological and Environmental Research and by the National Institutes of Health.

References

1. X. Gong, E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **741** (2000) 15-21.
2. L. Ma, X. Gong, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 3383-3387.
3. S. H. Kang, X. Gong, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 3014-3021.
4. Y. Zhang, X. Gong, H. Zhang, R. C. Larock, E. S. Yeung, *J. Comb. Chem.*, **2** (2000) 450-452.

Single Point Mutation
(Single Nucleotide Polymorphism) (SNP)

heteroduplexes

L15

キャピラリー電気泳動による大腸菌 Vero 毒素 O-157 遺伝子の検出

○荒川 秀俊、柏崎 宏幸、渡辺 一之、前田 昌子
昭和大・薬

Detection of Two variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by capillary electrophoresis

Hidetoshi Arakawa, Hiroyuki Kashiwazaki, Kazuyuki Watanabe, Masako Maeda
School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

Escherichia coli O157:H7 (O157) cause hemorrhagic colitis and have been associated with hemolytic-uremic syndrome in human. O157 produce verotoxins(VT). VT is classified into two types. One is VT1 which is identical with Shiga toxin, while the other type, VT2, which is different from VT1. These verotoxins are encoded from verotoxin 1 and verotoxin 2 gene, respectively. In this study, analysis of allele specific PCR, SSCP and CFLP by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection have been developed to identify VT1 and VT2 gene in O157. This method can be applied to the identification of O157 type including VT1/VT2, VT1 and VT2, and is shown to be specific, sensitive and speedy for clinical use.

はじめに

腸管出血性大腸菌 O157 は下痢を症状とする感染型の食中毒菌で、その強い感染力と発症後死に至る合併症を誘発するため、現在大きな社会問題となっている。O157 の産生する Vero 毒素 (VT) には、志賀赤痢菌の志賀毒素とアミノ酸配列が同じ VT1 と、アミノ酸配列は 45% 異なるものの毒性が類似した VT2 の 2 種類がある。これら毒素は VT1 と VT2 遺伝子によりそれぞれ発現されており、通常、O157 菌はこれら遺伝子を、それぞれ単独にまたは両方有するものが存在する。したがってこの菌を DNA で判定する場合、これら 2 種の遺伝子を正確に検出する必要がある。本研究では、感染源をより迅速に、しかも正確に判定するため、レーザー励起蛍光検出キャピラリー電気泳動 (CE) によるベロ毒素遺伝子の鎖長解析 (Allele specific PCR)、一本鎖高次構造多型解析 (SSCP) ならびに Cleavase fragment length polymorphism (CFLP) 解析法の確立について検討した。

実験

試薬と装置：キャピラリーはジーエルサイエンス社製、ポリアクリルアミド (MW : 700000 1000000) はポリサイエンス社製、CE は Beckman 社製 P/ACE5010 を用いた。

Allele specific PCR による O 157 の検出：VT1 と VT2 にそれぞれ特異的なプライマーを設定し duplexPCR により増幅後、以下の条件で鎖長解析を行った。キャピラリーは内径 100 μ m、長さ 37cm (検出器までの長さ 7cm) を用い、又泳動液は 3% アクリルアミドを含む Tris-Borate 緩衝液 (pH7.8) に 0.1 μ g/mL の発蛍光性試薬であるチアゾールオレンジを加えたものを用いた。電気泳動は、試料を電氣的に注入した後、電圧 6.4kV、温度 25℃、検

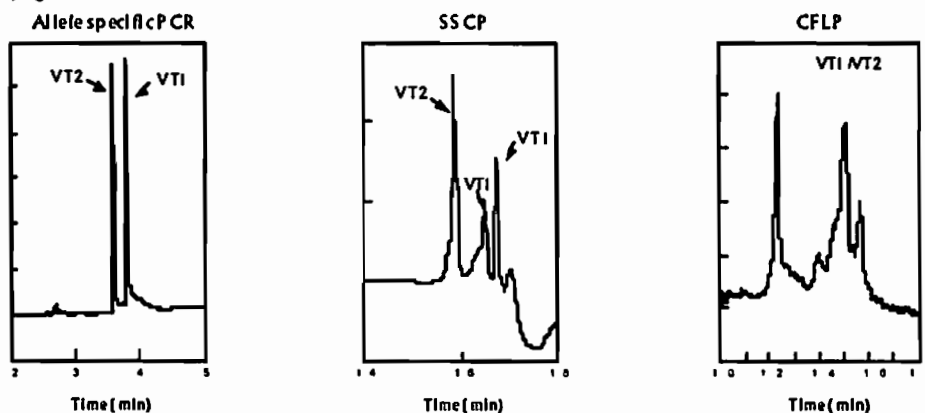
出をアルゴンレーザーを用いた蛍光検出（励起波長 488nm、検出波長 520nm）で行った。

SSCP による O157 の検出：VT1 と VT2 の遺伝子を同時に増幅できる PCR 部位を設定し、PCR 生成物 169bp を調製した。生成物は EtOH 沈殿後、水に溶解させ 99℃ で一本鎖にした後、以下の条件で分離した。内径 100 μ m、長さ 37cm（検出器までの長さ 30cm）キャピラリーを用い、又泳動液は一本鎖 DNA 発蛍光性試薬のアクリジンオレンジを加えたものを使用した。試料の注入は 40 秒間加圧的に行い、泳動を 7.4kv、20℃で行った。検出は上記と同様の方法で行った。

O157 の Cleavase fragment length polymorphism 法：上記 SSCP と同様、生成物を一本鎖に開裂後、Cleavase I と共に 50℃ で 5 分反応後、電気泳動による鎖長解析を行った。

結果と考察

本研究では、Allele specific PCR、SSCP、CFLP における VT 遺伝子の PCR 条件の設定並びに CE による鎖長解析と高次構造多型解析の分離条件について検討した。Allele specific PCR では VT1 と VT2 をそれぞれ特異的に増幅するプライマーの設定と同時に 2 種の遺伝子を増幅する Duplex PCR について検討した。その結果、VT1 と VT2 それぞれ 174 bp と 128 bp を特異的に増幅する方法を確立した。これら DNA 断片は有効長 7 cm のキャピラリーにより CE 解析を行ったところ、約 4 分で解析が可能であった。この方法は感度、精度共に良好であった。次に VT1 と VT2 遺伝子に共通のプライマーを設定し、PCR 後 DNA を一本鎖に解裂し、その高次構造により解析する SSCP と CFLP について検討した。SSCP は単に高次構造を CE により分離検出する方法であるため、高次構造形成に影響する分離温度、泳動距離について検討した。その結果、泳動距離 30 cm、分離温度 20℃ で VT1 と VT2 を約 17 分で解析可能であった。一方 CFLP は一本鎖高次構造のループの 5' 側を特異的に酵素で切断し、得られる DNA 断片数から高次構造の違いを検出する方法で、分離における厳密さを必要としない簡便な方法である。本研究では CFLP の条件、すなわち酵素濃度、反応温度、反応時間を検討し至適条件を設定したところ、Vero 毒素遺伝子を約 16 分で判定可能であった。CFLP は SSCP に比べ操作が簡便であるため、多サンプルの測定にはより適した方法と思われる。下図にそれぞれの方法によるエレクトロフェログラムを示す。



L16

迅速グラフ法による ssDNA分離時のレプテーション評価

○相澤克則^{1,2,3}、柴田一浩^{1,2,3}、村松正實^{1,2,3}、林崎良英^{1,2,3,4}
CREST, JST¹、理研・ゲノム科学総研セ²、同・筑波研³・
生体分子、筑波大・医⁴

Rapid Graphic Method to Evaluate the Reptation of Single-stranded DNA in Capillary Electrophoresis

Katsunori Aizawa¹, Kazuhiro Shibata¹, Masami Muramatsu¹, and Yoshihide Hayashizaki^{1,2}

¹Genome Exploration Research Group, RIKEN, Genomic Science Center (GSC) RIKEN Yokohama Institute, and Genome Science Laboratory, RIKEN Tsukuba Institute, Core Research of Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST), Tsukuba, Ibaraki, 305-0074

²Department of Medicine, Tsukuba University, Tsukuba, Ibaraki 305-8575

We developed previously RISA sequencer for acceleration of the sequencing procedure in Genome project. The sequencer can separate and analyze 384 DNA samples simultaneously. For the improvement of the DNA sequencing, we need the new sieving matrices with high resolution. The severe reptation of the longer ssDNA fragments during electrophoresis causes the reduction of the separation selectivity, resulting in low resolution. Therefore, suppression of the reptation would allow much better separation performance for DNA sequencing. We propose a rapid graphic method to evaluate the reptation.

はじめに

電気泳動によるDNAシーケンシングの分離性能は分離度 R_s の値による。 R_s は注目するピーク二個の理論段数の平均値 N と分離選択性 S から： $R_s = (S\sqrt{N})/4$ と表現できるので分離媒体の開発や泳動条件の最適化には段数と選択性の両者が用いられる。さて、一本鎖 DNA (ssDNA) を高電圧にて分子ふるい媒体中で泳動させた場合、その移動度は DNA 鎖が長くなるにつれ a) Ogston mode 領域から、より選択性が低くなる b) Reptation-without-stretching mode になり、さらに分離が困難な c) Reptation-with-stretching mode (Biased reptation mode) の領域に移行する。この Reptation の程度を評価する従来法 (例：文献1) は多数のデータと計算とを要し、多くの媒体/分離条件を評価する作業には適さなかった。今回、小数のデータと簡易な計算のみで Reptation を相対評価できるグラフ法を誘導しマルチキャピラリーシーケンサ (当研究室の RISA) 用の分離媒体開発に利用したので報告する。

迅速グラフ法

キャピラリー電気泳動において約 200b から 1500b 位の ssDNA の泳動は上記 b), c) の Reptation modes となり (文献2)、その移動度は： $\mu = \alpha \{(1/N) + \beta\}$ (1) となる。ここで μ は移動度、 N は DNA の塩基数で、 α 、 β 値 ($\alpha > 0$, $\beta \geq 0$) は N に依存しない。また、Reptation-without-stretching mode では $\beta = 0$ である。(1) の場合、ssDNA

の一塩基差あたりの分離選択性 S は: $S = 2 / \{1 + 2N + 2\beta N(N + 1)\}$ (2)

となり(文献3)、 β が小さい媒体や泳動条件ほど S が大きくなる。つまり分離度は理論段数が同一なら β が小さいほど高く、また β が同一ならば高段数ほど高くなる。このように β が評価できれば分離度(直接的には選択性)の最適化作業を加速できる。

ここで、 β を相対評価するグラフ法を誘導する。二種類の分離媒体ないしは泳動条件、A、Bにおける同一配列、塩基数の ssDNA の移動度を、それぞれ μ_A 、 μ_B とすると、それらの比は次になる:

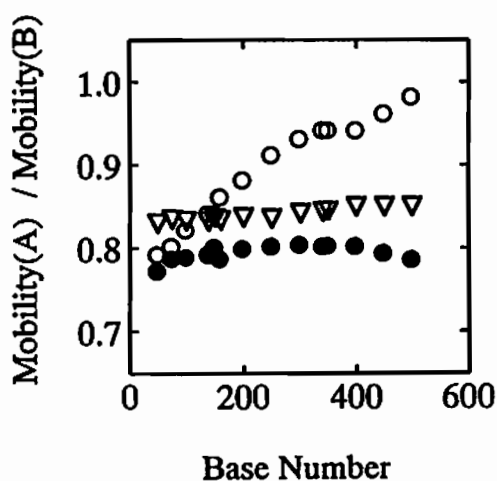
$$\mu_A / \mu_B = (\alpha_A / \alpha_B) [(\beta_A / \beta_B) + \{1 - (\beta_A / \beta_B)\} / (\beta_B N + 1)] \quad (3)$$

この「 μ_A / μ_B を Y 軸に、 N を X 軸にしてプロットする」と、数学的に β_B が β_A より小さい(大きい)ならば得られる曲線は右上がり(右下がり)になる事がわかる。

$$\text{また、}\beta_A = \beta_B \text{ なら Y 値は一定になる: } \mu_A / \mu_B = \alpha_A / \alpha_B \quad (4)$$

解析結果

GENESCAN-500 TAMRA (PE Biosystems) を標準の ssDNA とし、印加電圧 6kV、温度 50°C で SGE 社製 (I.D. = 0.1 mm、実効長 39.5 cm) のキャピラリーカラムを用いて電気泳動を行った。有機溶媒を重合前から含ませた Long Ranger ゲルでの移動度を A-gel の結果とし、有機溶媒を含まない対照を B-Gel としてグラフにした。その結果、Formamide をゲル重合前に加えても β は変わらない(●, A-gel は 10% formamide 含有)が、Methanol を加えるとグラフは右上がりになり β が大きくなった(○, A-gel は 10% methanol 含有)。ところが、この効果は重合時に Formamide が共存すると打ち消された(▽, A-gel は 10% formamide と 10% methanol を含有)。対照のゲルと Formamide / Methanol 共存のゲルの β は同一だが(▽)、段数が一番高い後者が最高の分離度を示した。この解析例より、当グラフ法は複雑な組成のゲル開発にも適用可能な事が示唆される。既に我々は、Kenndler らの式による理論段数の限界値と実際の媒体/泳動条件が示す段数とを比較する手続きを示した(文献4)。これら二種類の評価法により、分離度の高い媒体の開発が加速されるであろう。



謝辞

以上の研究は、科学技術振興実業団の戦略的基礎研究推進事業「生命活動のプログラム研究」、科学技術庁の理化学研究所ゲノム科学研究費により進められました。当研究へのRISAチームの方々の御助力に感謝致します。

文献

1. D. Figeys and N.J. Dovichi, J Chromatogr., 645 (1993) 311.
2. J. Rousseau, G. Drouin and G.W. Slater, Electrophoresis, 21 (2000) 1464.
3. V. Dolnik and W.A. Gurske, Electrophoresis, 20 (1999) 3373.
4. 相澤克則、林崎良英, Jpn J Electrophoresis, 44 (2000) 163.

L17

”ビーズアレイ”によるDNA解析

○小原賢信、陳鋼、岡野和宣、神原秀記

(株)日立製作所中央研究所

DNA analysis by "beads-array"

Yoshinobu Kohara, Gang Chen, Kazunori Okano and Hideki Kambara

Hitachi Ltd., Central Research Laboratory, Kokubunji, Tokyo 185-8601, JAPAN

A platform for DNA analysis, "beads-array", is presented. It is an array of DNA-probe-attached beads in a capillary. Its construction is as follows. 100s of synthesized DNA probes are fixed to beads (100 μ m) respectively. Beads with different DNA probe are arrayed in order in a capillary. One bead represents for one kind of DNA probe and their order is the index. Sample including fluorescence-labeled target are flown and hybridization occurs. After washing, fluorescence intensity of each bead, which corresponds to each target concentration, is measured. This platform is suited to pursue many simultaneous hybridization assays (100-1000) with small volume (< 1 μ l) for many samples (high reproducibility) in a short time (in 10s minutes).

For demonstrating this idea, a model system is constructed and tested. Several kind of DNA probe with -SH at 5'- are fixed to the maleimide group induced glass beads. These beads are arrayed alternatively in a capillary. 10 μ l solution of complementary DNA with Texas Red at 5'- is flown inside the capillary and the hybridization is observed by fluorescence microscope.

This work was performed as a part of the research and development project of Industrial Science and Technology Program supported by NEDO.

緒言 —”ビーズアレイ”の提案

現在、ヒトを含むさまざまな生物のゲノム配列解析を行うゲノムプロジェクトが世界的規模で進展する中、この配列情報を利用するポストゲノムと呼ばれる研究分野が開けつつある。この分野では、DNA 配列情報と臨床データの統計的な相関を知る必要があり、その為にはゲノム解析をしのぐ量の DNA 解析をこなす信頼性の高い高スループットな手法が必要である。このような状況下で、DNAチップの技術の弱点を補う技術として”ビーズアレイ”を考案した。ビーズアレイはキャピラリー内部に100 μ m スケールのビーズを一列に並べた構造をとる (Fig.1)。

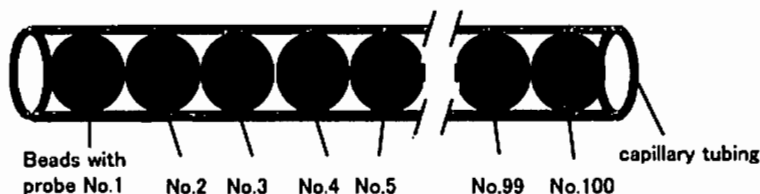


Fig.1 Schematic view of DNA probe attached beads array

それぞれのビーズはキャピラリーの内径に近い直径を持っているのでその順序が入れ替わることがなく、その並び順によって番号（インデックス）がつけられている（この例では No.100 まで）。各ビーズ表面には違う配列をもつプローブ DNA 末端を共有結合で固定する。このビーズアレイに対して試料溶液及び洗浄溶液を微小な溶液を扱えるポンプで往復運動させる（Fig.2）。

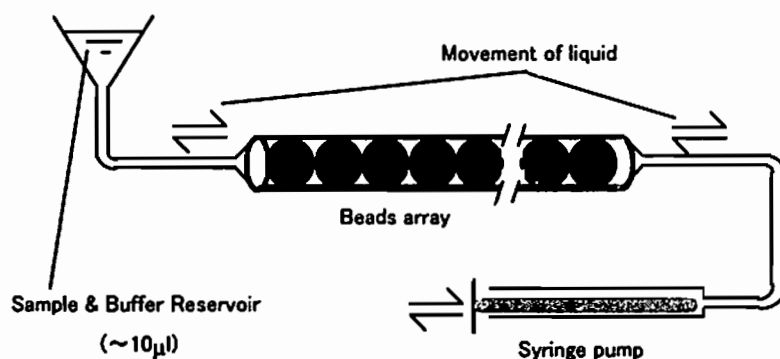


Fig.2 Schematic view of the flow system of beads array

試料溶液中のあらかじめ蛍光標識されたターゲット DNA は、ビーズ上に固定され相補的な配列を持つプローブ DNA にハイブリダイゼーションによって捕捉される。この蛍光強度を計測することで試料溶液中のターゲット DNA 量を知ることができる。

モデル実験の結果と考察

ビーズには 106-125 μm のガラスビーズを使用した。表面を γ -Aminopropyltrimethoxysilane で処理した後 NHS-ester のクロスリンカー試薬を使用してマレイミド基を導入し、5' チオール修飾した一本鎖合成 DNA プローブを固定した。このビーズを内径 150 μm のキャピラリーの内部に並べ、“ビーズアレイ”を作製した。サンプルにはプローブに相補的で TexasRed 標識をした一本鎖合成 DNA を使用し、マイクロシリンジを用いて“ビーズアレイ”の中を往復させた。ハイブリダイゼーション後に洗浄溶液を往復させることにより洗浄し、その後蛍光顕微鏡で観測した。キャピラリー内部においても従来通りハイブリダイゼーションが問題なく行われることが分かった。

謝辞

本研究の一部は、新エネルギー産業技術総合開発機構（NEDO）より委託を受けて実施した。

102

EFFECTS OF POLYMER CHEMISTRY ON DNA SEQUENCING SEPARATIONS BY MICROCHANNEL ELECTROPHORESIS

Methal N. Albarghouthi, Brett A. Buchholz, Erin A. S. Doherty and Annelise E. Barron

Department of Chemical Engineering, Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA.

Summary

The chemical and physical properties of entangled polymer solutions are critical for their performance as sequencing matrices for microchannel electrophoresis, affecting both DNA resolving capability and matrix viscosity for pressurized capillary loading. We have systematically compared matrices based on polymers and copolymers of acrylamide, dimethylacrylamide (DMA) and diethylacrylamide (DEA). Viscosities of 7% polymer solutions decrease by orders of magnitude with increasing polymer hydrophobicity, while hydrophilic polymers exhibit more pronounced reductions in viscosity with increased shear. As sequencing matrices under identical CE conditions, the longest read length was produced with linear polyacrylamide (LPA) while linear polyDMA (PDMA) gave ~ 100 fewer readable bases. Read lengths with DMA/DEA copolymers were lower, and decreased with increasing DEA content. This study highlights the importance of polymer hydrophilicity for DNA sequencing matrices, through formation of robust, entangled polymer networks.

1. Introduction

In CE, DNA sequencing is accomplished through separation of DNA fragments in an entangled, uncrosslinked polymer solution. The performance of a polymer matrix in DNA sequencing is governed primarily by the ability of polymer chains to form a robust, entangled polymer network. Here, we compare the rheological properties and sequencing performance of polymer matrices of different chemical structures, yet similar molar mass, including LPA, PDMA and different copolymer formulations of DMA and DEA.

2. Experimental

Homopolymers of acrylamide and DMA and copolymers of DEA and DMA were synthesized by free radical polymerization in aqueous solution and purified by dialysis and recovered by lyophilization. PDEA30, PDEA50 and PDEA70 code for copolymers prepared with 30, 50 and 70 % DEA, respectively. Molar mass of the polymers was determined by gel permeation chromatography followed by multi-angle laser light scattering detection.

Polymer solutions were prepared in denaturing Tris/TAPS/EDTA buffer. Polymer solution viscosity was determined by rheometry at room temperature. DNA sequencing was performed on a MegaBACE 1000™ equipped with 96 LPA-coated fused silica capillaries. M13 DNA sequencing fragments were injected electrokinetically at 94 V/cm for 30s and electrophoresed at 140 V/cm and 44°C.

3. Results and discussion

We find that for polymers of similar molar mass, more hydrophobic polymer chains adopt a more compact coil conformation in water. This increase in coil density results from a decrease in the radius of gyration of the polymer chain, R_g , at a given polymer molar mass, and leads to an increase in overlap threshold concentration, c^* as seen in Table 1.

Table 1. Physical characteristics of LPA, PDMA and copolymers of DMA and DEA

Polymer	Weight-average Molar mass (MDa)	Polydispersity Index	Measured R_g (nm)	Calculated c^* (% w/v)	Calculated R_g for 4.0 MDa polymer (nm)
LPA	3.5	1.21	129	0.06	140
PDMA	3.9	1.31	122	0.09	124
PDEA30	4.7	1.42	125	0.10	114
PDEA50	4.1	1.47	109	0.13	107
PDEA70	4.2	2.42	84	0.28	82

Polymer solutions studied behave as Newtonian fluids at low shear rates, but at higher shear rates exhibit non-Newtonian, shear-thinning behavior. At a given shear rate, the LPA solution has the highest viscosity in comparison to the solutions of other, less hydrophilic polymers. On the other hand, the low-shear viscosity of DEA-containing copolymer matrices decreases markedly with increasing DEA content in the copolymers, as shown in Figure 1.

Table 2 summarizes the read length produced in the various DNA sequencing matrices. Not surprisingly, LPA produced the longest read length, followed by PDMA, although the PDMA sample had a higher average molar mass than the LPA. For DMA/DEA copolymers, the read length decreased monotonically with increasing DEA content in the copolymer.

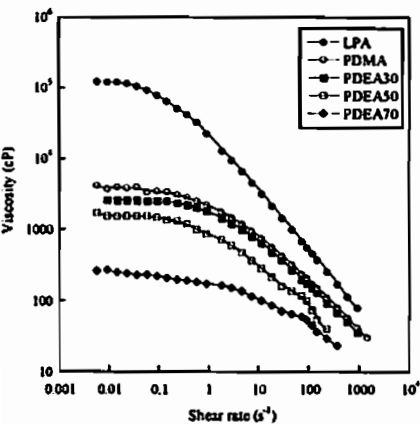


Figure 1. Effect of shear rate on the viscosity of polymer solution in sequencing buffer

Table 2. Effect of polymer chemistry on DNA sequencing read length

Polymer	Read length at 98.5% accuracy	Base number at resolution = 0.59
LPA	620	750
PDMA	512	600
PDEA30	460	530
PDEA50	378	480
PDEA70	122	140

L18

SELDI プロテインチップシステムによる培養上清中に含まれるペプチドの分析

○佐藤香枝、佐々木一樹、山口 建

(国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部)

Analysis of peptides in culture medium by SELDI ProteinChip system

Kae Sato, Kazuki Sasaki, Ken Yamaguchi

Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute

For the screening and identification of clinically informative markers, polypeptides present in culture medium were profiled on surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS). In proteomics, MS has been used exclusively for the identification or biochemical study of a given protein. However, the SELDI technique involves a set of chemically modified chips, termed ProteinChip, with different selectivity for different polypeptides, and serves to provide differential display of polypeptides present in mixtures. Also, the system allows the on-chip washing and removal of impurities that interfere with matrix-assisted mass spectrometry. We optimized analysis conditions of polypeptides found in as little as 1 μ l of crude, serum free culture medium conditioned by cultured cells (protein concentration 0.05-0.5 mg/ml), without "pre-chip" sample preparation.

はじめに

疾患に伴い量的または構造的に変化する物質を探索することは、基礎的生化学研究において、さらには、疾患の鑑別診断、病期の評価、治療効果判定が要求される臨床の分野においても重要なことである。現在までに様々なマーカーが同定されてきたが、それらを探索する手法としては抗体を使ったイムノアッセイ系や、分子生物学的手法の進歩に伴って実現した DNA 塩基配列を解析する方法が中心であった。特に後者の分野はヒトゲノム解析の進行と、DNA チップ技術が相まって近年格段に発展を遂げた。一方、ゲノム解析が終わりを迎えつつある現在、病態プロテオミクスというアプローチ、すなわち実際に発現しているタンパク質を網羅的に分析し、疾患のマーカータンパク質を探索する研究に注目が集まりつつある。

それらのプロテオーム解析において強力なツールとして使われはじめているのが質量分析法(MS)である。MSの中でも Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) は測定質量範囲が広く不揮発性高分子のイオン化が可能なため、タンパク質やペプチドの分析に用いられている方法である。近年開発された surface-enhanced laser desorption ionization (SELDI) mass spectrometry ProteinChip システムは MALDI-TOF-MS の一種であるが、MALDI プローブのかわりにプロテインチップと呼ばれる表面に化学処理が施されたチップを用いるシステムであり[1]、大きな特徴として、そのチップの性質を利用して分析対象に選択性を持たせたり、またチップ上で脱塩などの操作を行うことができる点が上げられる。

私たちは、培養細胞から放出されるペプチドの分析にこの SELDI ProteinChip システムを応用し、がん細胞培養株の培養上清中に存在するペプチドの網羅的な分析の中から候補マーカーを探索することを試みている。培養上清から見いだされた候補マーカーが実際の担がん患者血清中でも存在し腫瘍マーカーとして役立つ可能性は高い。たとえば、私たちが開発した肺小細胞がんの腫瘍マーカー ProGRP(31-98)は、多くの肺小細胞がん培養細胞株で同様に産生されていた[2-3]。培養上清を従来の MALDI-TOF-MS で分析する場合、培地成分などが分析の妨害になることが予想される。本研究では、SELDI ProteinChip システムを用いていることによって、培養上清中の微量ペプチドの効率的な脱塩および化学的性質による選択をチップ上で行うことのできる、簡便で迅速なペプチド分析法の開発を目的とし検討を行った。

結果および考察

1. 逆相系チップ H4 を用いた測定

1-1 チップ上での脱塩について

培養上清は塩濃度が高いので、MALDI-TOF-MS では前処理として固相抽出カートリッジなどによる脱塩の操作が不可欠であるが、SELDI ProteinChip ではアルキル鎖で表面修飾された逆相系チップ H4 を用いることによってチップ上で脱塩することが可能である。試料をチップに捕捉させたのち純水で洗浄することにより、非常に簡単に良好なマススペクトルを得ることができた。従来法よりも ProteinChip を用いたほうがはるかに試料の損失なく簡便に分析することが可能であった。

1-2 試料量について

培養上清中のタンパク質を検出するためには、ゲル電気泳動-銀染色法では 100 μ l 以上必要であった。それに対し SELDI ProteinChip システムを用いた場合には、培養上清 1 μ l (Protein 0.05-0.5 mg/ml) で分析できた。固相抽出後 MS で分析する場合も、1 μ l の試料では前処理時の希釈および損失のため分析することはできず、試料が少量しか得られない場合に極めて有効な分析法であることが示された。

2. イオン交換性チップ SAX2 および WCX2 を用いた測定

陰イオン交換系チップ SAX2、および陽イオン交換系チップ WCX2 を用いて分析を行った。同じ培養上清を用いても、チップの種類を変えると、捕捉されるタンパク質の種類が変わり異なったマススペクトルが得られた。またイオン交換性チップを用いることにより、試料中の含有量が比較的少ないタンパク質であっても濃縮して検出することが可能であることが示された。

まとめ

SELDI ProteinChip システムを用いて培養上清中に含まれるペプチドの分析を行った。通常プロテオーム解析において質量分析計は同定のみに用いており、その前段階に二次元電気泳動法やクロマトグラフィーでタンパク量の違いを比較している。そのような方法よりも、本法は操作性および再現性の点で優れていると思われる。また、本法では異なった化学的性質のチップを用いることで、含有量の少ないタンパク質を検出することが可能であることが示されたので、二次元電気泳動法では小さいスポットであっても本法では見落とさずに解析できるとと思われる。さらにクロマトグラフィーによる前処理に比較しても、本法は試料要求量が少なく済み、操作が簡単であり、多検体の比較解析などに有効な方法であると思われる。今後、多種類の細胞の培養上清の分析を行い、がん種特異的なペプチドの探索を行う予定である。

[1] M. Merchant and S. R. Weinberger, *Electrophoresis* 21, (2000) 1164.

[2] K.Aoyagi, Y.Miyake, K.Urakami, T.Kashiwakuma, A.Hasegawa, T.Kodama, K.Yamaguchi, *Clin. Chem.* 41 (1995) 537.

[3] T.Matsumoto, T.Terasaki, K.Mukai, M.Wada, A.Okamoto, J.Yokota, K.Yamaguchi, K.Kato, T.Nagatsu, Y.Shimosato, *Jpn. J. Cancer. Res.* 82 (1991) 820.

L19

プロテオーム解析に用いる

フリーフローモジュールによるタンパク分離

○小林英三郎¹、太田和希¹、目黒一輝¹、長濱久花¹、

田島信芳²、篠原悦夫²

城西大学理学部¹、オリンパス光学工業(株)²

Separation by Free Flow Electrophoresis Module for Proteome Analysis

Hidesaburo Kobayashi¹, Kazuki Ohta¹, Ikki Meguro¹, Hisaka Nagahama¹,
Nobuyoshi Tajima², Etsuo Shinohara²

¹Faculty of Science, Josai University, ²Life-science Technology Research Center,
Olympus Optical Co., Ltd.

One of key technologies in proteome analysis is to make a system that can carry out in rapid separation and high sensitive detection for small amount of protein. In two dimensional gel electrophoresis, although this method is most popular electrophoresis technique for proteome analysis, we have two questions on recovery and denaturation of protein, as follows. The first, recovery of protein from gel is not so high since gel structure may tightly hold protein molecules within that matrix and, the second, proteins in the second electrophoresis are usually denatured because electrophoresis is carried out with strong surfactant SDS. For answering these problems, we attempt to make a system for separating protein by using a free flow electrophoresis module with Pylex glass substrate using microfabrication technologies. We will report on feasibility of this system without any gel matrix for separating protein in proteome analysis.

はじめに

プロテオーム解析におけるタンパク分析の鍵は、タンパクの迅速分離と微量検出である。解析対象になるタンパクの種類は、ゲノム解析が完了した線虫では約19,000種類であることが既に報告されている。これに加えて、生体機能の発現に直接関わるタンパクは翻訳後修飾を受けているので、さらにこの数倍のタンパク種があると見積られる。従って、分析対象になるタンパクの分離は、分離原理が異なる方法を組合せる多次元分離が必要となる。

プロテオーム解析のために、現在最も多用されているタンパク分離システムは2次元電気泳動であるが、次の2つの点で改善の必要がある。1. アクリルアミドなどのゲルマトリックスを使用しているのでタンパクの分離能力は十分あるが、電気泳動後にゲルからタンパクを回収する技術は確立されていない。2. 2次元目の泳動は通常SDSを使用するので、ほとんどのタンパクは変性しており生理活性を維持したままのタンパクを分離することは出来ない。以上の2点を考慮すると、「1. ゲルマトリックスを使用

しない電気泳動原理を選択する。2. 界面活性剤などの変性剤を用いる系を出来るだけ避ける。」ことになる。これに加え、微量なサンプルをハイスループットで分離することを考慮した場合、電気泳動の分離槽にマトリックスを用いないフリーフロー電気泳動(FFE)を使用したタンパク分離が有力となる。

フリーフロー電気泳動による分離は電気泳動時に発生するジュール熱は定常流を乱すことになるので、高電圧下での電気泳動を行う目的で熱対流を無視できる微小重力条件下で行うなどの試みがなされてきた。[1,2] しかしながら、近年研究が活発になったマイクロ加工技術を用いて、マイクロ・フルーディクスと呼ばれる空間を形成する電気泳動槽をもつフリーフロー電気泳動モジュールが作製されてきた。この空間では強い層流形成が起こり安定な分離が期待できる。既に、全パイレックスガラスからなるFFEモジュールを用いたDNAの共雑タンパクからの分離については検討がなされ、本装置の実用性が示されている。[3,4]

ここでは生理活性を維持したままのタンパクを分離する事を目的とし、全パイレックスガラスからなるフリーフロー電気泳動モジュールで分離したタンパクの生理活性測定、および本装置の分離能の評価を行うためこれらタンパクをHPLC/C8で再分離し、TOF MSでの検出の検討を試みた。

実験装置

パイレックスガラスFFEモジュール (泳動分離槽: 40.5 X 48mm, d 30 μ m)

HPLC/POROS R2/M (C8:I.D.46mm, L 100mm P.S. 20 μ m)

Finniganmat VISION 2000 (reflection type)

結果と考察

予備実験により、HPLC/C8での分離および分取したタンパクサンプルはTOF MSでの検出に十分であったが、フリーフロー電気泳動モジュールで分離したトータルシステムでのタンパク分離に付いての検討は現在進行中である。

文献

1. H. Kobayashi, N. Ishii and S. Nagaoka, Journal of Biotechnology, 47(1996) 367
2. J. Bauer, W. C. Hymer, D. R. Morrison, H. Kobayashi, G.V.F.Seaman and G. Weber in Advances in Space Biology and Medicine, S. L. Bonting (Editor), Vol 7, JAI PRESS INC., Atamford, 1999, pp163-212
3. 田島信芳、鈴木浩文、篠原悦夫、狩野恭一、第19回キャピラリー電気泳動シンポジウム1999(東京)予稿集、1999、43-44
4. N. Tajima, H. Suzuki, K. Kano and E. Shinohara, The 22nd International Symposium on Capillary Chromatography, Gifu (Japan), Nov. 8-1, 2, 1999

L20 マイクロチップ電気泳動による糖誘導体の高速分析

- 鈴木茂生、斎藤由香、下津範久、本田進 (近畿大学薬学部)
荒井昭博、中西博昭 (島津製作所基盤技術研究所)

Fast Analysis of Carbohydrate Derivatives by Microchip Electrophoresis
Shigeo Suzuki, Yuka Saito, Norihisa Shimotsu and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Akihiro Arai and Hiroaki Nakanishi
Technology Research Laboratory, Shimadzu Corp.

As the first application of microchip electrophoresis (ME) to carbohydrate analysis, examples of the analysis of hexosamines and hexosaminitols are presented. Under the optimized conditions of 100 mM phenylborate buffer, pH 7.5, the 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives of these aminated monosaccharides could be well separated within 1 min by ME with detection limit of 12.5 μ M using argon laser-induced fluorescence.

はじめに

マイクロチップ電気泳動(ME)の最大の特長は分析の高速性にあり、この技術は生体試料、臨床試料、環境物質等の分析には好適であると考えられるため、応用研究の発展が望まれる。すでに ME は多くの生体成分に対して応用されつつあるが、糖質分析については報告例がない。そこで、ME による糖分析を目指して先ず、ヘキソサミンおよびヘキソサミニトールへの適用を試み、その結果をキャピラリー電気泳動(CE)による結果と比較考察した。

実験

7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-fluoride(NBD-F¹)による標識：ヘキソサミンの標品としては市販の特級 D-グルコサミン(GlcN)と D-ガラクトサミン(GalN)を用いた。また、ヘキソサミニトール類(GlcNol, GalNol)はこれらのヘキソサミンを水素化ホウ素ナトリウムで還元することにより調製した。これらの試料の溶液(～5 nmol, 5 μ L)に 100 mM HEPES 緩衝液、pH 6.0(15 μ L)、および 50 mM NBD-F アセトニトリル溶液(20 μ L)を加え、40℃で 20 min 加温した。反応液を Merck Si60 シリカゲルプレートにスポットし、*n*-ブタノール-酢酸-水(5:4:1, v/v)で展開後、R_f 0.5 付近に現れる蛍光バンドを掻き取り、Millipore ウルトラフリーMC(PTFE 膜)を使い、メタノール-水(2:1, v/v, 100 μ L)で抽出し、回収した。
LIF-ME：ME には島津製マイクロ石英チップ²⁾(十字架状レーンで交差部分から泳動液入口、試料入口および試料液溜までの距離がいずれも 7 mm、泳動液液溜までの距離が 33 mm)に、松定 HVR-2P 電源 4 基とリレースイッチを接続し、MSWindows 上 LabView で作成したプログラムを用いて電圧を制御した。検出用光源には Beckman P/ACE2000 型 CE 装置付属の Ar イオンレーザー(488 nm, 3 mW)を使用し、光ファイバーの先端を BX50WI 型オリンパス光学製顕微鏡の落射蛍光投光管へと導いた。検出部からの蛍光は干渉フィルターを介して浜松ホトニクス(HS784MOD)で検出し、807IT 型日本分光製データ処理装置で記録した。試料導入は入口に 0.54 kV、緩衝液入口に 0.43 kV、緩衝液液溜に 1.00 kV の電圧を 30 sec 印加することにより行い、分析は試料入口に 0.45 kV、緩衝液入口に 0.5 kV、

試料液溜に 0.45 kV を 120 sec 印加して行った。試料導入時は試料液溜を、また分析時には泳動液液溜を接地した。LIF-CE: CE には内径 50 μm 、有効長 15 cm、全長 30 cm のフェーズドシリカ管を用い、電源には松定 HEL3-30 を使用した。

結果と考察

アミノ糖、とくに GlcN と GalN は糖タンパク質やグリコサミノグリカンなどの複合糖質の重要な構成成分であり、それらの分析は重要である。また、 α -グリコシド結合糖タンパク質糖鎖の分析においては糖鎖切り離しにアルカリボロハイドライド法が常用されるが、この際、還元末端の GalN が還元され GalNol になるため GalNol の分析も重要である。これらのアミノ化単糖には発色団や発蛍光団がないので直接高感度検出することはできないため誘導体化が不可欠であるが、GalNol には還元性を利用した標識法が適用できない。そこでヘキシサミンおよびヘキシサミニトールに共通して適用できるアミノ基修飾を考え、アルゴンレーザー励起蛍光検出が可能な NBD-F による誘導体化について、誘導体化条件を調べ、分析条件の最適化を行った。

NBD-F による標識: NBD 化の標準的な条件ではアルカリ性のホウ酸緩衝液が用いられる。しかしヘキシサミンをこの条件で誘導体化すると複数の生成物が得られた。種々検討した結果、pH 6.0 の 0.1 M HEPES 緩衝液を使用し、40 $^{\circ}\text{C}$ という比較的低い温度で誘導体化を行うことにしたが TLC による簡易精製が必要であった。誘導体化反応は 20 分で完結した。 **誘導体の発蛍光性:** ホウ酸緩衝液中で NBD 標識アミノ糖の蛍光強度と pH との関係調べたところ、酸性側から中性にかけてはほぼ一定の蛍光強度を示したが、pH 8 より次第にヘキシサミン蛍光強度は弱くなり pH 11 においては完全に消失した。これに反してヘキシサミニトールの pH 依存性はあまり大きくなく、高 pH でも強い蛍光強度を示した。

分離条件: ホウ酸緩衝液中での分離を検討したところ、pH 9 以下でヘキシサミンおよびヘキシサミニトールの NBD 誘導体は全く分離されなかった。pH 9 以上では分離は見られたものの、上述の理由からヘキシサミン誘導体のピークの強度は極端に低かった。一方、フェニルホウ酸緩衝液においては中性付近で比較的良好な分離が得られた。検討の結果、100 mM, pH 7.5 が最適条件であることがわかった。また、アセトニトリルを加えたところわずかながら分離が向上した。 **分析例:** この条件で ME を行うと 0.9 min で GlcN, GalN, GlcNol, および GalNol を分離することができた。結果を Fig.1 に示す。検出下限はいずれの成分についても試料濃度として 12.5 μM 、導入試料量としてはおよそ 0.5 fmol, S/N=3) であった。なお同様の条件で CE 分析を行うと分析時間は約 1.4 min であった。ピーク面積の再現性は RSD にして 4% 程度であった。この結果に基づき若干の生体試料についても適用を試みた。

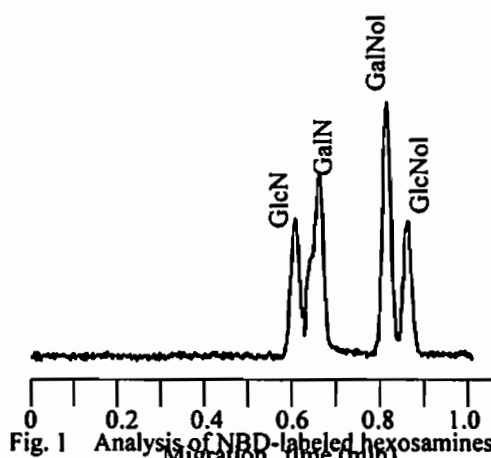


Fig. 1 Analysis of NBD-labeled hexosamines and hexosaminotols by ME with LIF detection. Buffer: 0.1 M phenylborate, pH 7.5 contg. 2% CH_3CN , appl. volt.: 0.5 kV, effective length: 25 mm.

文献

1. K. Imai, Y. Watanabe, *Anal. Chim. Acta.* **130** (1981) 377.
2. M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, R. Nakajima, K. Kondo, A. Arai, *J. Chromatogr. A* **867** (2000) 271.

L21 環境モニタリング用マイクロ電気泳動チップ (VIII) : 環境水中の溶存有機物質のキャラクタリゼーション

○脇田慎一^{1,2}、竹田さほり¹、千葉篤志²、福士恵一³、中西博昭⁴、松田十四夫²
大阪工業技術研究所¹、立命館大・理工²、神戸商船大³、島津・基盤研⁴

Microchip Based Capillary Electrophoresis for Environmental Monitoring (VIII): Characterization of Dissolved Organic Substances in Environmental Waters

Shin-ichi Wakida^{1,2}, Sahori Takeda¹, Atsushi Chiba², Keiichi Fukushi³, Hiroaki Nakanishi⁴, and Toshio Matsuda²

¹Osaka National Research Institute, AIST, Ikeda, Osaka 563-8577

²Faculty of Science and Technology, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga 525-8577

³Kobe University of Mercantile Marine, Higashinada, Kobe 658-0022

⁴Technology Research Laboratory, Shimadzu Corp., Soraku, Kyoto 619-0237

We preliminarily studied high throughput screening (HTS) for organic pollution in waters using microchip based capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (LIF) detection. The applied voltage was investigated to control the gated-valve injection and separation using self-made PC based controller for voltage supply. We obtained much improved HTS data for the reproducible separation of fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled river-water samples using zwitter-ion based buffer solution (Tris-CHES) to avoid the adsorption of the labeled sample to the channel of microchip.

We applied the HTS for the real samples of Hino River, which flows in Lake Biwa, at the ten sampling points and obtained the reproducible several peaks for each sample within 2 min.

はじめに

マイクロマシニング技術を用いて、マイクロチャネルなどを微細加工したガラス基板により、キャピラリー電気泳動法 (Capillary Electrophoresis; CE) を実現させたマイクロチップ CE の研究開発が進められている。マイクロチップ CE では、装置サイズのダウンサイジング化のみならず、試薬の低減や分離時間の大幅な短縮が可能である。米国 NIH の戦略的メガプロジェクトを反映して、DNA 分離チップの研究開発が活発に展開され、実用化段階に至っている。しかしながら、生活環境情報のオンサイト計測^{1,2}などへの応用を意図した研究報告はほとんどない³。

我々は、以前にキャピラリーゲル電気泳動法を用いて環境水中の有機汚濁物質の迅速キャラクタリゼーション法を報告したが、濃度感度が不十分であった⁴。本研究では、高感度検出システムであるレーザ励起蛍光 (LIF) 法を用いたマイクロチップ CE 法により、実環境水中の有機汚染のハイスループットスクリーニングの検討を試みたところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験

(1) マイクロチップ及び自作電気泳動・検出システム

本研究に使用したマイクロチップ (12 mm×35 mm×1.5 mm) には、幅 50 μ m (太い部分は 500 μ m)、深さ 20 μ m のチャンネルが形成されており⁵、この全チャンネルに泳動溶液を充填した後、泳動溶液、廃液および試料廃液の各リザーバーに約 10 μ l の泳動溶液を、試料溶液リザーバーに約 10 μ l の測定試料を満たした。

各リザーバーに白金電極を挿入し、直流高圧電源（グラスマン社製；MJ15P1000）を複数使用し、印加電圧は GP-IB プログラム（高砂製作所製；AP-1228T）を介し PC 制御により試料を泳動させ、アルゴンイオンレーザー（488 nm、5 mW）を励起光に用いたレーザー励起蛍光検出システムにより、ピーク検出を行った。

(2) 試料及び泳動溶液の調製

溶液制御に用いたモデル試料には、蛍光物質であるフルオレセインとカルセインを用いた。実環境水には採水地点の異なる日野川水（滋賀県：10 サンプル）及び標準フミン質を蛍光ラベル化剤であるフルオレセインイソチオシアネート（FITC）で誘導体化したものを使用した。泳動溶液には試料のチャンネルへの吸着を抑制するために、両性イオン電解質を含む 0.1 M Tris-CHES を用いた。

結果と考察

(1) モデル試料の溶液制御法の検討

マイクロチップ CE では、通常の CE とは異なる試料導入法を用いる必要がある。マイクロチップ CE で、一般的に用いられている Pinched Type Injection 法ではなく、試料の大量導入が可能で高感度検出が期待される Gated Valve Injection 法⁶を用いて、試料導入電圧の最適化を行った。時間に依存した試料導入が可能であり、カルセイン及びフルオレセインの混合試料を 1.5 分以内で完全分離することができた。

(2) 実河川水への予備的検討

最適化した印加電圧を用いて、FITC で蛍光誘導体化した日野川（琵琶湖流入河川）水の分離分析を行った。琵琶湖流入口付近の日野川水では 3 つの分離ピークが検出された。ピークの同定を検討した結果、1 本目のピークは未反応の FITC、3 本目のピークは環境水中に多く含まれるフミン質由来であると推定された。

さらに、採水地点の異なる同一河川水を分離分析したところ、分離ピークのパターンが大きく異なり、2 本目のピークは琵琶湖から 20 km 以上の上流では検出されないが、下流になるにつれてピーク高が増大する結果が得られ、本法が有機汚染の HTS となり得ることを実証することができた。

文献

1. 脇田慎一, 環境技術, **25** (1996) 693.
2. 脇田慎一, 水, **42**(6) (2000) 16.
3. T. Korenaga, T. Odake, R. Long, M. Tabuchi, Y. Ono, N. Sonoda, K. Yamamoto, T. Sato, H. Susaki, Y. Fujiyama and H. Nakanishi, *Chromatography*, **21** (2000) 99.
4. 脇田, 竹田, 宮崎, 薬師寺, 福士, 山根, 東, 分析化学, **46** (1997) 483.
5. 中西, 阿部, 西本, 荒井, 分析化学, **47** (1998) 361.
6. S. C. Jacobson, S. V. Ermakov and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **71** (1999) 3273.

L22

キャピラリー内酵素反応を利用した生体成分分析チップ

○民谷栄一、森田智之、村上裕二

北陸先端大・材料

On-capillary Enzymatic Reaction for On-chip Biomedical Analysis

Eiichi Tamiya, Tomoyuki Morita, Yuji Murakami

The School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Ishikawa 923-1292

We fabricated an on-chip capillary electrophoresis device for blood analysis. An on-chip capillary electrophoresis device was photolithographically fabricated on a glass chip. Alkaline phosphatase (ALP) was employed as a sample enzyme. Small amount of enzyme in the mixture of other proteins was detected with the electrophoretically mediated microanalysis (EMMA) method. Fluorescein diphosphate was used as fluorogenic substrate. The detection of ALP activity was achieved with laser-induced fluorescence monitoring fluorescein that was produced in enzyme reaction in capillary. Several methods to reduce the adhesion of protein are also discussed.

はじめに

最近、在宅介護の普及とともに、ポイント・オブ・ケア検査 (POCT) の重要性が高まっている。POCT 装置には小型化、迅速化、簡略化が不可欠であるが、定量検査が可能な小型、迅速かつ簡便な装置はほとんど実用化されていない。さて、微細加工技術を利用して作製するオンチップキャピラリー電気泳動 (CE) はポンプを必要としない微量送液機構をもつことから、微小化学分析システム (μ TAS) の中心技術として注目されている。そこで、本研究ではオンチップCEにより臨床検査において重要である特定酵素の活性検出を目的とし、アルカリフォスファターゼ (ALP) の分析に応用した^{1,2)}。

実験

フォトリソグラフィーとHFエッチングにより、ガラス基板にFig.1に示すチャンネルパターン (幅 90 μ m, 深さ 20 μ m) を形成した。これと超音波加工によりチャンネルの端点に合わせて穴を開けたガラス板と溶融接合した。その後、穴に合わせてリザーバーを設けてチップを完成した。

ALP はホウ酸バッファー (pH 10.0) とエチレングリコールで希釈して試料とした。ALP の基質は加水分解されると蛍光性を有するフルオレセイン二リン酸 (FDP) を使用した。実験手順はリザーバーにALP溶液、FDP溶液、バッファー満たし、まず、チャンネル内に基質を導入した。続いて、試料となるALPを導入した後、CEを開始した。その

後、いったん泳動を停止して、チャンネル内酵素反応(ALPによるFDP→フルオレセインの反応)を行った。再び泳動を再開し、生成物のフルオレセインをレーザー励起蛍光検出した。送液は適切に各リザーバーに電圧を印加してコントロールした。

結果と考察

チップ上の実験に先駆けて通常のCEでEMMAを行うための実験条件を検討したところ、試料にエチレングリコールを添加したのち導入すれば活性を維持したままキャピラリー内壁へのタンパク吸着量を抑制による再現性が向上が見られることがわかった。さらに市販のキャピラリー電気泳動装置でp-nitroフェニルリン酸を基質として血清ALPの検出を試みたところ生成物は見られるもののビリルビンの吸収ピークに隠れることがわかった(Fig.2)。

そこでFDPを基質として共存物の影響を抑えたところ滞留時間や酵素量に依存するピークを得ることができた(Fig.3)。ピークが2つ見られたのはFDPが蛍光性の中間反応物を生成することに起因する。(a)がエチレングリコール、(b)がフルオレセイン、(c)が中間生成物のフルオレセイン1リン酸とわかった。今回の結果より、オンチップCEによりALPの酵素活性を指標とした検出が可能であり、アイソザイム分析やエンザイムイムノアッセイへの応用が可能であることが示された。

文献

1. A. Koizumi, T. Morita, Y. Murakami, Y. Morita, T. Sakaguchi, K. Yokoyama, E. Tamiya, *Anal. Chim. Acta*, 399 (1999) 63.
2. Y. Murakami, T. Morita, T. Kanekiyo, E. Tamiya, *submitted*.

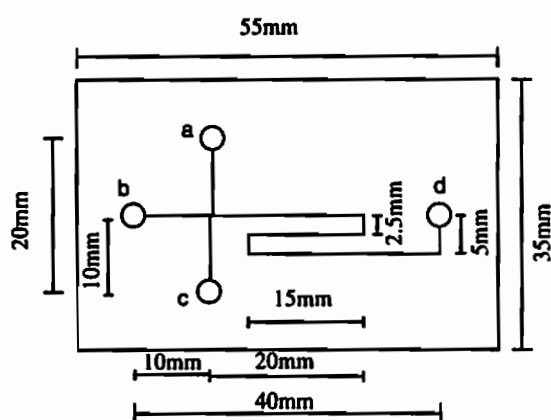


Fig.1 Channel pattern of the chip.

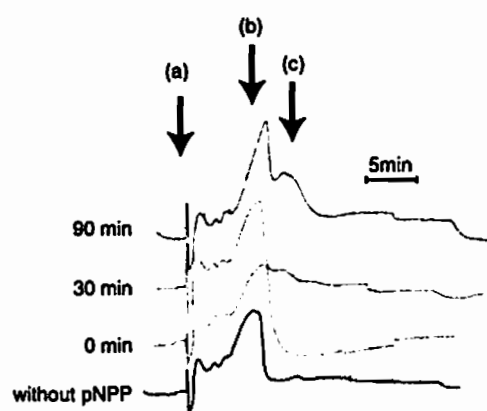


Fig.2 ALP activity in human serum at various reaction time.

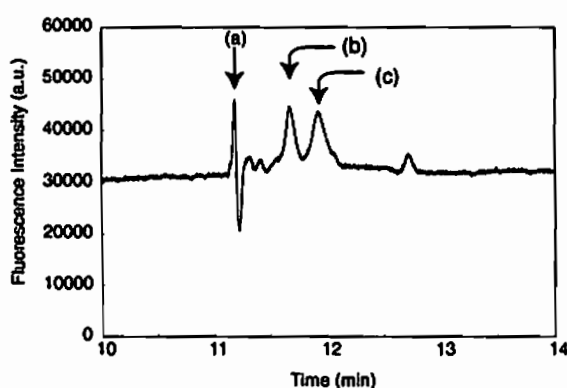


Fig 3 Typical electropherogram of alkaline phosphatase with ethylene glycol. PLAP of 200 μ g/mL with 28.6 μ M of FDP. After the separation for 30s, sample was allowed to react for 10min.

S05

LAB-ON-A-CHIP TECHNOLOGY IN THE NEW MILLENNIUM

J. Michael Ramsey

*Chemical and Analytical Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN,
37831-6142, USA*

The interest in microfabricated fluidic (lab-on-a-chip) devices for performing chemical and biochemical assays appears to be in an exponential phase of growth. A handful of researchers began investigating the possibilities of using microfabrication tools to build miniature devices that perform conventional "benchtop" chemical and biochemical experiments in the late 1980s. Now there are several dozen laboratories across the world involved in such investigations. Fortunately, there is a well-established developmental model in place for researchers to follow, i.e., the microelectronics/information technology sector.

The microelectronics industry has had an immense impact on global economics, not the least of which is the development of the information technology sector. It is also clear that technology which can greatly reduce the time and cost of acquiring chemical and biochemical information could also have significant economic implications, i.e., virtually any industry's products rely upon chemical information to some extent. The pharmaceutical industry is an example of an enterprise that depends quite heavily upon the acquisition of chemical information. Considering the number of human gene products (100,000) and the literally millions of compounds, such as oligopeptide sequences, which can be tested for gene specific activity, the total number of assays for potentially useful drugs is enormous. Of course, there is a massive amount of experimental effort remaining just to discover these gene products! We believe it is quite evident that a technological shift away from the present day laboratory to miniaturized versions will be necessary to make such experimental endeavors tractable. Many now believe that microfabricated fluidics devices may represent an enabling technology that provides the necessary quantum leap in experimental processing power. These microfluidic devices are fabricated using photolithographic patterning tools that find their origins in the microelectronics industry. While microfluidics devices utilize "carriers" consisting of liquid reagents that are transported through fluidic circuits rather than the electron "carriers" that are conducted through a semiconductor circuit, there are many analogous advantages to miniaturization. Reduction of dimensions provides speed of processing. Just as electrons have reduced distances to travel in microcircuits, molecules have reduced distances to travel in microfluidic circuits. This is of particular advantage in chemical separation devices [1] and microreactors where reagents are

mixed [2, 3]. The small dimensions of microfluidic circuits also reduce the amount of carriers (reagents) necessary to conduct a chemical process. Volumes of reagents for a single experiment are often in the nanoliter to picoliter range rather than the microliter range or larger in conventional experiments. Photolithographic based fabrication can also potentially provide a number of economic advantages to lab-on-a-chip devices as well. Devices containing highly replicated channel structures can be fabricated with small incremental cost per channel, allowing for massively parallel chemical analysis to address high throughput experimentation. Economy of scale in manufacturing will allow inexpensive disposable devices for many applications such as research and clinical diagnostics. Photolithographic patterning also allows fluidic connections to be easily made within the device's substrate allowing for integration of serial chemical processes or essentially automation of sample processing at the nanoliter volume scale. Lab-on-a-chip devices that integrate all the necessary chemical processing steps to generate chemical information from a "raw" sample will be quite powerful. Sophisticated chemistry and biochemistry procedures can be incorporated into the device at the point of manufacture, allowing novices to perform complex assay procedures similar to the way advanced design and analysis tools can be used on computers without intricate understanding of underlying theory.

Lab-on-a-chip devices have progressed rapidly but there are remaining issues to address. High throughput processing and analysis also implies that samples must be brought to devices in rapid succession to overcome what we have termed the "world-to-chip" interface. Approaches to this problem have been demonstrated but improvements are needed. Fabrication capabilities that allow viable manufacturing of three-dimensional fluidics devices and spatially heterogeneous patterning of surface chemistries will be quite valuable. Sensitive detection modalities besides optical fluorescence and mass spectrometry will also be highly desirable. Finally, computer aided design tools that include fluidics, chemistry, and biochemistry will be necessary to rapidly design the future generations of fluidics microchips, similar to the way microelectronics chips are designed today. An update on where we are today and where we will likely head in the future will be provided.

References

1. S. C. Jacobson, C. T. Culbertson, J. E. Daler, and J. M. Ramsey *Anal. Chem.* **70** (1998) 3476-3480.
2. S. V. Ermakov, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey *Anal. Chem.* **70** (1998) 4494-4504.
3. B. He and F. Regnier *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17** (1998) 925-932.

L23

キャピラリー電気泳動による微生物の分離と定量的検出

○山田一隆^{1), 2)}、鳥村政基¹⁾、蔵田信也^{1), 2)}、鎌形洋一¹⁾、
金川貴博¹⁾、加納健司³⁾、池田篤治³⁾、横幕豊一²⁾、倉根隆一郎¹⁾

¹⁾ 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所微生物機能部

²⁾ 環境エンジニアリング(株)技術研究室

³⁾ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学

Separation and Quantitative Detection of Microbial Cell by Capillary Electrophoresis.

Kazutaka Yamada^{1), 2)}, Masaki Torimura¹⁾, Shinya Kurata^{1), 2)}, Yoichi Kamagata¹⁾,
Takahiro Kanagawa¹⁾, Kenji Kano³⁾, Tokuji Ikeda³⁾, Toyokazu Yokomaku²⁾, and
Ryuichiro Kurane¹⁾

¹⁾ Applied Microbiology Division, National Institute of Bioscience and Human-Technology, AIST,
Ibaraki 305-8566.

²⁾ Research and Development Laboratory, Kankyo Engineering Co., LTD., Chiba 299-1141

³⁾ Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

Separation and quantitative detection of microbial cells from complex communities are required both for population dynamics analysis and for preparative purposes in environmental studies, medicine, microbiology, biotechnology, and industry.

Bacterial cell separation associated with the use of capillary electrophoresis including electrokinetic approaches were demonstrated in connection with the detection of each bacterial cell based on difference in charge density on surface between microbial cells. Each strain was separated at a purity greater than 90 % and the each peak area was proportional to the amount of each cell, and the quantitative results were in agreement with those of direct counting method such as fluorescent in situ hybridization (FISH) with fluorescence-labeled oligonucleotide DNA probes.

High resolution and feasibility of capillary electrophoresis to separate bacteria suggested that this technique possess a considerable potential as a powerful tool for analysis of population dynamics on autochthonous community or certain mixed culture.

【目的】

混合微生物系から細胞を分離し且つそれらを定量的に検出する技術は、複合生物系の群衆構造を解析したり、あるいは特定の細胞のキャラクタリゼーションを行う上で必要不可欠である。我々は細胞表面の荷電状態、あるいは細胞の高分子多糖や界面活性剤との親和性の違いを利用し、キャピラリー電気泳動法によって混合微生物試料から微生物細胞を簡便に分離し且つ定量的に検出する方法の開発を目的とした。

【実験】

複合生物系のモデルとして環境調和型油水分離ポリマーを生産する微生物コンソーシア（8種類の微生物: KYM1 KYM8 株から構成）を試料とし、Agilent 社製の UV 検出器付キャピラリー電気泳動装置を用いて電気泳動を行った。分離モードは capillary zone electrophoresis (CZE), capillary gel electrophoresis (CGE), micelle electrokinetic electrophoresis (MEKC) を利用した。

【結果と考察】

環境調和型油水分離ポリマーの生産に関与する2つの微生物: KYM7 と KYM8 の混合試料をサンプルとして CZE モードにより分析を行った結果、両菌株は2つの独立したピークとして検出された。CGE モードを利用すると両菌株の分離能は向上し、99%以上の純度を得た。そこで CGE モードを用いて KYM7・KYM8 両菌株について検量線を作成し、環境調和型油水分離ポリマー生産プロセスにおける KYM7・KYM8 両菌株の動態解析を行った。得られた結果は、オリゴヌクレオチド DNA プローブを用いたそれぞれの微生物の直接計数の結果とほぼ一致するものであった。また MEKC モードやを利用することでグラム陽性細菌の選択的な検出にも成功した。以上の結果はキャピラリー電気泳動が微生物の分離と検出を行う上で有効なツールとなり得ることを示唆するものである。

【謝辞】

本研究開発は、通産省工業技術院の産業科学技術プロジェクト「複合生物系等生物資源利用技術開発」の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）から委託を受けた JBA・生命研共同研究体において実施したものである。

L24

高分子ミセルをコートしたマイクロチップの リンパ球分離への検討

○足立 作一郎、桑原 智枝、沖 明男、高村 禪、片岡 一則、
長崎 幸夫*、堀池 靖浩
東大院・工 東京理科大・基礎工*

Study on Separation of Lymphocytes in Polymeric Micelles Coated Micro Chip

○S.Adachi,C.Kuwahara*,A.Oki,Y.Takamura,K.Kataoka,Y.Nagasaki*and Y.Horiike
School of Materials Science, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo113-8656,
Japan

* School of Materials Science, Science University of Tokyo, 2641, Noda, Chiba278-8501, Japan
e-mail:adachi@micro.mm.t.u-tokyo.ac.jp.ac.jp

As a part of studies on the "healthcare device" which enables to check our daily health from trace amounts of blood, an electrophoresis separation of B and T cells from lymphocytes has been tried in a quartz made microcapillary. The polymeric micelle coating on the inner wall of the capillary allowed us not only to suppress lymphocyte adsorption on the wall, but also to reduce the ζ -potential. Indeed, it was observed that lymphocytes were flown smoothly in the capillary. Distribution of lymphocyte electrophoresis velocity was measured by detecting the variation of absorbed intensity of a laser light which was irradiated to a slit set on the capillary. Our obtained results agreed with the data of references which reported the separation of B and T cells employing conventional methods.

1.はじめに

微量血液から日々の健康状態を診断する「ヘルスケアデバイス」創製の一貫として、マイクロキャピラリー内でのリンパ球分離研究を行っている。免疫機能の中心であるリンパ球を医療に役立てるため、B細胞、T細胞といった亜集団に分離する試みは、電気泳動での表面電荷の違いを利用した方法や、カラムなど高分子フィルターへの吸着の差を利用した方法などすでに多くの研究が行われているが[1,2]、チップ上でリンパ球のような付着しやすい細胞の電気泳動が可能になれば、簡便、迅速などの特徴を活かした多くの応用が期待できる。マイクロキャピラリーチップを用いてリンパ球分離を行うためには、電気浸透流の抑制と、細胞の吸着を防ぐための生体適合性が必要となる。今回、高分子ミセルを内壁にコーティング[3]することにより、生体適合化をはかると共にゼータ電位を制御し、電気浸透流の抑制を研究した。

2.実験

20mm角で厚さ0.5mmの石英板に、電子ビーム描画製作レチクルを用いた光露光によりパターンを転写し、CrをマスクとしたNLD(中性磁気ループ放電)によるドライエッチングにより、幅50 μ m、深さ20 μ m、長さ1.5mmのマイクロキャピラリーを作製した。そして1%HF中、24時間、1.3MPaで石英板を張り合わせ圧着し[4]、マイクロチップを得た。さらにシランカップリング処理により、アミノ基を導入後、ブロックコポリマー(Acetal-PEG-PLA-methacryloyl)で調製した架橋高分子ミセルを還元アミノ化反応により石英表面に導入した。まず、生体適合性を評価するため、基板上に高分子ミセルをコートし、FTIR-ATR(フーリエ変換赤外減衰全反射)により、血

清を基板上に静置した状態での時間変化を測定した。そして表面の電荷状態の変化を確認するために、ヒドロキシプロピルセルロースコートラテックスビーズ(大塚電子社製)を中性ビーズとして電気泳動させ、キャピラリー内部ゼータ電位の測定を行った。さらに5週令のウィスター系ラットオスの腸間膜よりリンパ球を抽出し、キャピラリー内で電気泳動させ、その速度分布を光学的に、スリットを通過する透過光の変化を利用し、計測した。緩衝液は pH7.4 の HBSS(HEPES buffered Hank's balanced salt solution)を用いた。

3.結果と考察

生体適合性評価として、石英と高分子ミセルコート
の FTIR-ATR 測定結果を図 1 に示す。石英表面より
血清蛋白の吸着の抑制が確認できた。またビーズの
電気泳動測定結果を図 2 に示す。これよりゼータ電位
を見積もると石英が -38.8mV、アミノ基導入後は
-23.9mV、高分子ミセルコート後は -5.5mV となり、石
英表面に比べ、高分子ミセルコート後は、ゼータ電位
が極めて低く抑えられた。また高分子ミセルをコートし
たキャピラリーは内壁に付着すること無く細胞が電気泳
動されることを確認した。さらにリンパ球の電気泳動
速度の測定結果を図 3 に示す。泳動時間 2 分内で速
度分布を計測すると、二つのピークが確認できた。こ
れまでの研究[5]より泳動速度の大きい方が T 細胞の
ピークと考えられる。泳動時間が 2 分を越えると速度
のばらつきが大きくなるが、この原因としてはチップ上
のリザーバ容積が小さいため、pH 変化が著しく、細胞
の表面状態に影響を与えたためと考えられる。正常
な動作時間が短いことは問題であるが、今回、細胞
の吸着を抑え、スムーズな導入と電気泳動を成功させ
たことより、今後、流路の設計など改善を加えるこ
とにより、T 細胞 B 細胞の分離が可能であると考えら
れる。

4.謝辞

本研究は、科研費、未来開拓推進事業研究費により
行われ、チップの製作には東京大学大規模システム
集積設計教育研究センターの設備を利用した。

5.文献

- 1.M.Shimizu T.Iwaguchi:Electrophoresis 8,556 (1987)
- 2.T.Turuta K Kataoka.et al.: J.Immunol.Methods 117, 289(1989)
- 3.K.Emoto Y.Nagasaki K.Kataoka :Langmuir Vol.15,No.16,5212(1999)
- 4.H.Nakanishi S.Shoji et al.:Sensors and Actuators 79,237-244(2000)
- 5.K.Morita T.Kondo:J.Colloid Interface Sci. Vol.147,No.2,457(1991)

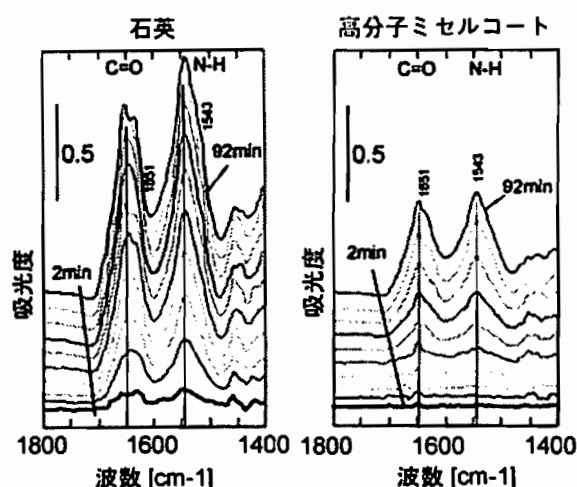


図 1:高分子ミセルコートの血清に対
する FTIR-ATR 測定結果

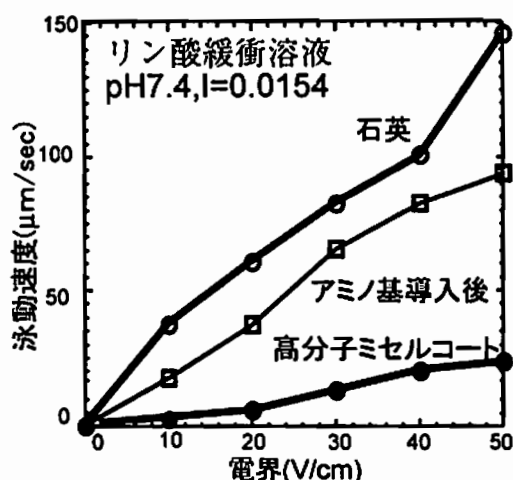


図 2:ゼータ電位測定結果

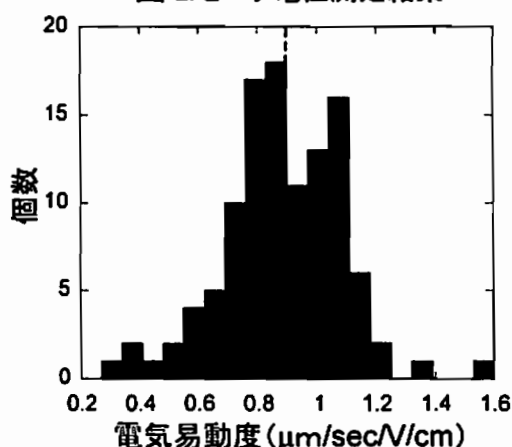


図 3:リンパ球の速度分布測定結果

L25

蛍光標識ペプチド等電点マーカの安定性について

○紙谷圭一郎¹、志村清仁¹、笠井献一¹、松本浩幸²
帝京大・薬¹、分子バイオホトニクス研究所²

On the stability of fluorescent peptide isoelectric point markers

Kamiya Keiichiro¹, Kiyohito Shimura¹, Ken-ichi Kasai¹, Hiroyuki Matsumoto²

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Kanagawa 199-0195

²Laboratory of Molecular Biophotonics, Hamakita, Shizuoka 434-8555

The detection sensitivity of capillary isoelectric focusing (CIEF) with laser-induced fluorescence (LIF) detection reaches down to the level of 10^{-13} M due to the focusing effect of isoelectric focusing. Fluorescence-labeled peptide pI markers ranging pI 3.64–10.12 were developed and were shown to form sharp peaks in CIEF. A formation of a new peak with slightly different pI was observed during storage of the markers under a certain conditions with concomitant decrease of each original peak. Reproduction of the formation of an additional peak by peracetic acid treatment suggests the oxidation of the sulfide bond between the labeling dye and a cysteinyl residue of the peptides to sulfoxide. Aqueous 50% n-propanol was found to be a suitable solvent for storage of the pI markers. Little change was observed after the storage in the dark for a week even at 37°C in this solvent.

はじめに

レーザー励起蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動 (LIF-CIEF) は焦点化の際の濃縮効果により、 10^{-13} M レベルの検出感度をもつ。本法を利用するには、キャピラリー内に形成された pH 勾配をモニターするための等電点マーカが必要になる。この目的に、我々は合成ペプチドのシステイン残基に tetramethylrhodamine-5-iodoacetamide を反応させ、pI 3.64–10.12 の範囲の蛍光性の等電点マーカを開発した。しかし、この蛍光等電点マーカの保存中に、もとは単一だったピークが等電点の少し異なる別のピークに徐々に変化していくことが観察された。このような変化は、酸性側の蛍光ペプチドマーカで特に目立って観察された。このような等電点変化が起こると、マーカの同定が曖昧になり、これらのマーカを用いた等電点決定の精度を減じることになる。そこで本研究では、この等電点の変化の原因を探るとともに安定に保存できる条件の確立をめざした。

実験

マーカの保存溶液の調製 ペプチドマーカの混合物を各溶媒で希釈し 5×10^{-9} M の溶液を作り、各条件下に保存した。溶媒としては、1 mM 塩酸、10 mM メチオニン、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM ヒドロキノン、10 mM 2-(メチルチオ)エタノール、(いずれも 0.1% Tween を含み塩酸で pH 3 に調製)、50% n-プロパノールを用いた。保存条件は -20°C (光なし)、4°C (光なし)、37°C (光なし)、室温 (光なし、又は光あり) である。また、スルフィドの酸化を見るために、5 mM 過酢酸を添加した。

等電点電気泳動 内壁をポリアクリルアミド又は、フルオロカーボンでコーティングした $\phi 50 \mu\text{m}$ 、長さ 180 mm の溶融シリカキャピラリーに両性担体を含む pI マーカの試料を注入し 0.5 kV/cm の電圧で 10–15 min 焦点化した。キャピラリーの中央部 136 mm を He-Ne レーザー (543.5 nm) で照射し、590 nm の蛍光について陰極側から 45 sec かけてスキャンした。

結果と考察

蛍光標識ペプチド等電点マーカーを 0.1% Tween 20 を含む 1 mM HCl 中で保存すると、pI の微妙に異なるピークが出現した (Fig. 1b)。同様な変化が、過酢酸処理により観察されたことから、スルフィド結合のスルホキシドへの酸化によることが示唆された (Fig. 1c)。

このような変化はアスコルビン酸やヒドロキノンといった一般的な抗酸化剤では防ぐことができなかった。メチオニンや 2-(メチルチオ)エタノールのようなスルフィド化合物の添加はこれらのピークの発生を防ぐことができたが、また別のピークを発生させることが明らかになった。

50% n-プロパノール中暗所では、37℃でも十分に安定に保存することができた (Fig. 2)。

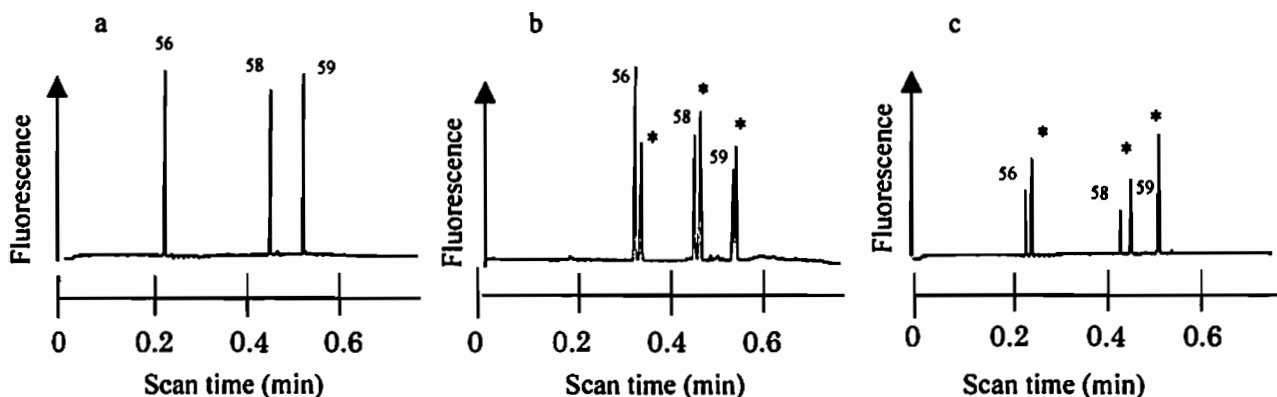


Fig. 1 Changes of fluorescence-labeled peptide pI markers observed under some conditions. The original mixture of three acidic pI makers (#56, pI=4.50; #58, pI=3.99; #59, pI=3.64) (a) was stored in 1 mM HCl, 0.1% Tween 20 at room temperature for 3 days under fluorescent light (b), or treated with 5 mM peracetic acid at 37°C for 30 min (c). Newly formed peaks are marked with asterisks. 1% (w/v) Pharmalyte pH 2.5-5, 0.1% (w/v) acetic acid and 0.3% (w/v) TEMED.

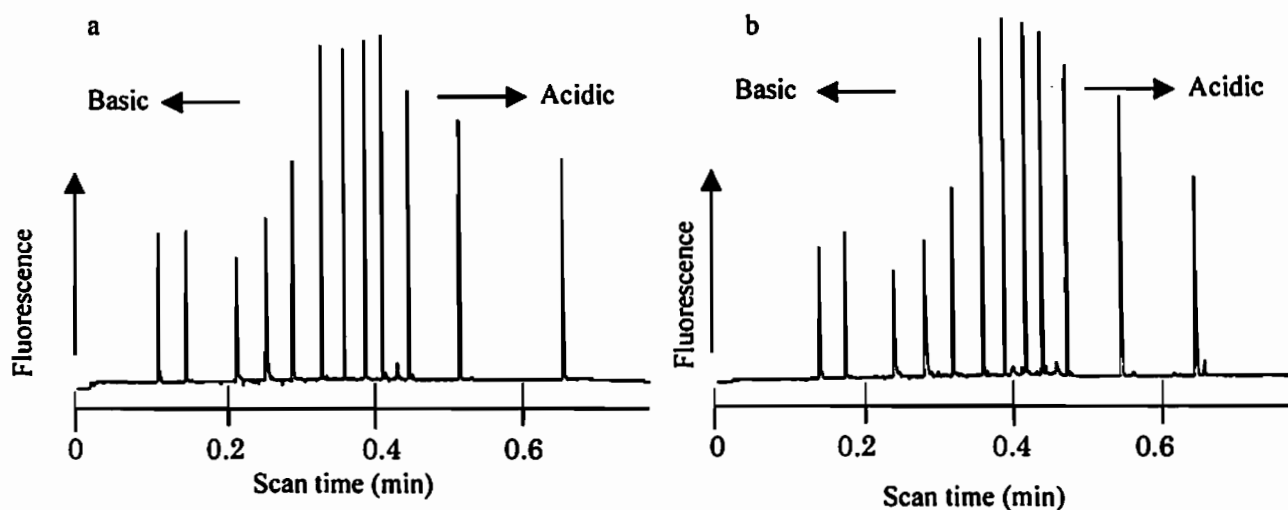


Fig. 2 Stability of fluorescence-labeled peptide pI markers ranging pI 3.64-10.12 in 50% n-propanol solution. The original mixture of twelve pI markers (a) was stored at 37°C for 1 week in the dark (b). 1% (w/v) Pharmalyte pH 3-10, 0.1% (w/v) acetic acid and 0.3% (w/v) TEMED.

L26 電気浸透流抑制剤の存在下におけるタンパク質の電気泳動挙動： ポリアクリルアミドコートキャピラリーによる評価

○久保兼信、服部 愛

近畿大学 薬学部

Assessment Study of the Electrophoretic Behavior of Proteins in the Presence of Electroosmotic Modifiers: Protein-Modifier Interaction Studied Using Polyacrylamide-Coated capillary

○ Kanenobu Kubo, Ai Hattori

School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Higashiosaka, Osaka 577-8502

The effect of electroosmotic modifiers as an enhancer on the electrophoretic separation of proteins with microheterogeneity was evaluated by using a polyacrylamide-coated capillary instead of an uncoated capillary. Electropherograms obtained in the presence of modifiers were inferior to those obtained in their absence with respect to resolution. Mobilities of the proteins decreased, and their peaks were broadened. The unfavorable effect was dependent on both of species of the modifiers and pH values of the electrolyte buffer. The reduction of resolution caused by modifiers was in the following order: SPD~SPD·HCl > BDA > HMC. The observed effect can be ascribed to the formation of complexes between the proteins and the modifiers. In addition, it was observed for the bare capillary that the complexes show interaction with the inner-surface, result in local suppression of electroosmosis, and lead to poor resolution. The high-resolution obtainable in the coated capillary was reduced in the presence of the modifiers. Thus, it should be reminded that use of the modifiers has negative effect on the analysis of protein microheterogeneity.

1. はじめに

素管キャピラリー中でタンパク質を電気泳動する場合、電気浸透流抑制剤をあらかじめ泳動緩衝液に加えておくと、いくつかのタンパク質について、それらの分離が高度に改善されることが報告されている (1-2)。その要因として浸透流抑制剤の素管キャピラリー内壁への結合に起因する①浸透流速の抑制に基づくタンパク質の実効泳動時間の増加、②タンパク質の吸着の抑制、そして③浸透流抑制剤とタンパク質の相互作用が考えられる。実際の電気泳動では、これらの効果の複合によって高分離が達成されると推察されている。上記の①と②は素管キャピラリー中での必然の帰結であり、これらと切り離して、③浸透流抑制剤とタンパク質の相互作用のみを独立的に考察することはできない。素管キャピラリーの代わりにポリアクリルアミド被覆キャピラリーを用いれば、①と②の寄与は無視でき、高分離に及ぼす③浸透流抑制剤とタンパク質の相互作用の寄与

について考察することが可能である。

2. 実験

CZE キャピラリー (内径、75 μ m) は 大塚電子(株)より購入した。内表面は、7 % アクリルアミドの重合によって被覆した (全長-有効長、33-25, 58-50, 83-75 cm) (3)。電気泳動緩衝液 (pH 7.4, 7.7, 8.5) には、0.1M ホウ酸-25mM 四ホウ酸ナトリウム、50mM HEPES-Tris を用いた。電気泳動は Quanta-4000 キャピラリー電気泳動装置 (ウオターズ社) を用いて、240 V/cm あるいは 600 V/cm、検出波長 214 nm、室温 (26℃) で行った。

試料 タンパク質として ovalbumin (OVA), bovine serum albumin (BSA), metallothionein (MT) を用いた。浸透流抑制剤 (1 mM) には hexamethonium chloride (HMC), 1,4-butanediamine (BDA), spermidine (SPD), spermidine trihydrochloride (SPD-HCl) を使用した。浸透流マーカーにはベンジルアルコールを使用した。

3. 結果と考察

浸透流の抑制(素管) 0.1M ホウ酸-25mM 四ホウ酸ナトリウム中での浸透流速は、抑制剤の種類、pH 値、電解質濃度に依存して様々に変化した。抑制力はそれぞれの pH 値で SPD~SPD-HCl > BDA > HMC の順であった。また pH 7.4 においては SPD-HCl と SPD、pH 7.7 では SPD について浸透流の逆転現象が認められた。この逆転は塩の添加によって解消された。また pH 7.7 での SPD-HCl については浸透流~ゼロが観察された。

タンパク質の電気泳動 ①ポリアクリルアミドコートキャピラリー 抑制剤不在下では OVA, BSA, MT は、それぞれ複数のシャープなピーク群を示した。また有効長(すなわち実効泳動時間)の延長は分離度を高めた。抑制剤存在下では、OVA, BSA は抑制剤不在下に比べ、分離ピーク数の減少と移動時間(陰極→陽極)の増加を示した。これらの結果から抑制剤-タンパク質複合体が形成されること、そしてその相互作用はタンパク質の分離に対して負の効果をもたらすことがわかった。分離度の低下は、pH 値と抑制剤に関してそれぞれ 7.4 > 7.7 > 8.5 そして SPD~SPD-HCl > BDA > HMC の順序であった。

②素管 浸透流~ゼロの条件下、OVA はテーリングした広いピークを示した。またその泳動図は同条件下でのコートキャピラリーで得られた泳動図に比べ顕著に広がっていた。この結果は、浸透流~ゼロ、すなわち素管内壁が多量の抑制剤で覆われても、その内壁(シラノール基あるいはアンモニウム基)は複合体との間で静電的相互作用を持つことを示唆している。コートキャピラリーの使用の場合との比較によって得られた以上の結果より、一般的には、浸透流抑制剤はタンパク質に結合することにより、タンパク質の固有の電荷に関してその個性を消失させ、個々の電気泳動分離を低下させていることがわかった。ある特別な状況においてのみ、浸透流抑制剤はタンパク質の分離に対して有効性を発揮するものと推察される。

4. 文献 1). R.P. Oda, et al., J. Chromatog. A, 680 (1994) 85. 2). M.E. Legaz and M.M. Pedrosa, J. Chromatog. A, 719 (1996) 159. 3). K. Kubo, Anal. Biochem., 241 (1996) 42.

L27

ヒト T リンパ芽球性白血病細胞株 Jurkat 細胞中に熱ショック
で増加する thymosin β -4 の電気泳動的解析と機能部位の検討
○中村和行¹、三谷紀之¹、藤本正憲¹、衣笠仁美²、寺部茂²
山口大・医¹、姫工大・理²

Separation and Functional Analysis of Heat Shock-Inducible Thymosin β -4 in A Human T Lymphoblastic Cell Line, Jurkat Cells by Two-Dimensional Electrophoresis and Capillary Electrophoresis

Kazuyuki Nakamura¹, Noriyuki Mitani¹, Masanori Fujimoto¹, Hitomi
Kinugasa², and Sigeru Terabe²

¹*Department of Biochemistry and Biomolecular Sensing, Yamaguchi
University School of Medicine, Yamaguchi 755-8505*

²*Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Hyogo 678-1297*

Heat shock-inducible thymosin β -4 in a human T lymphoblastic leukemia cell line, Jurkat cells was separated by two-dimensional gel electrophoresis. Thymosin β -4 has an N-terminal tetrapeptide, Ac-SDKP for showing its biological function of arresting cell growth of progenitor cells of T lymphocytes. The structural basis of the tetrapeptide for showing the function was studied by using cell growth assay of Jurkat cells with synthetic peptides including d-isomers, Ac-SDKP, Ac-sdkp, SDKP, PKDS which were separated by capillary zone electrophoresis.

はじめに

熱ショックを与えたヒト T リンパ芽球性白血病細胞株 Jurkat 細胞は、増殖速度が低下して一部の細胞はアポトーシスに陥る。その細胞内可溶性蛋白質を 2 次元ゲル電気泳動法で分離すると、pI 5.6, Mr 18,500 および pI 5.1, Mr < 8,000 の蛋白スポットが増加する¹⁾。これらの蛋白質の部分アミノ酸配列を決定したところ、前者は細胞外刺激を伝達する細胞内リン酸化蛋白 stathmin のモノリン酸化型で、後者は胸腺ホルモンの thymosin β -4 (Tb4) であった²⁾。Tb4 は、造血幹細胞の細胞周期を G1 期で停止させて細胞増殖を抑制する作用を有し、その機能部位は N-末端部の 4 つのアミノ酸配列 Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP) であると報告されている。

今回、熱ショックによる Jurkat 細胞の増殖抑制機構を明らかにする目的で、Jurkat 細胞内蛋白質を 2 次元ゲル電気泳動法で分離して Tb4 の増加の温度依存性を調べた。また、Tb4 の機能部位の構造特異性を明らかにするために、d-アミノ酸を含む Ac-SDKP 類似合成ペプチドを用いて Jurkat 細胞の増殖抑制作用を調べるとともに、キャピラリー電気泳動法による Ac-SDKP 類似合成ペプチドの分離特性を調べた³⁾ので報告する。

IEF - SDS-PAGE

実験

Jurkat 細胞は RPMI-1640 培地 (10%FCS, L-glutamine, Gentamicin sulfate 含有) で培養した。Subconfluent の状態で FCS (-) RPMI-1640 培地に細胞を移し、温浴中で 37°C を対照に 41°C から 2°C 刻みで 51°C まで温度を上げて 30 分間熱ショックを細胞に与えたのち、一部を trypan blue 染色して生細胞数を測定し、残りを 1mM EDTA で処理して細胞内可溶性蛋白質を抽出した。2 次元電気泳動は、pH 範囲 3.5~10 の 2% Ampholine^R を加えた毛細管型のアクリルアミドゲル (PAG) を用いて等電点電気泳動を行った後に SDS-PAGE (15%T, 2.67%C) 電気泳動を行った。Jurkat 細胞の増殖抑制実験は、細胞を 5×10^5 個/mL の濃度に調整して 37°C で 48 時間培養した後に増殖を確認して、その培養液中に合成ペプチドを $10^{-13} \sim 10^{-6}$ M の濃度に添加して 24 時間培養した後の細胞数を計測した。合成ペプチドの分離は、BioFocus3000 Capillary Electrophoresis (CE) System (Bio-Rad) で 50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.60 と 6.00) を泳動液に用い、印加電圧 16kV で行った。

結果と考察

熱ショックを与えた Jurkat 細胞は、43°C から次第に増殖抑制が起こり、生細胞数が減少して 51°C ではほとんど生細胞は認められなかった。Jurkat 細胞内の Tb4 は、43°C から stathmin のリン酸化が進むのに遅れて、45°C から次第に増加し始めて 51°C まで温度依存的に増加した。一方、Ac-SDKP の添加により Jurkat 細胞は濃度依存的に増殖速度を減じ、その現象は Ac-sdkp, SDKP, PKDS の添加では認められなかった。また、Ac-SDKP 添加により Jurkat 細胞内の stathmin はリン酸化されるとともに Tb4 も増加した (Fig.1)。Ac-SDKP 類似合成ペプチドは CZE によって SDKP, PKDS, Ac-SDKP の順に分離されたが (Fig.2)、Ac-sdkp と Ac-SDKP との分離には成功していない。

Tb4 は、F-actin の形成阻害や DNase I 活性抑制作用とともに細胞外に分泌されることも報告されている。今回の結果から、熱ストレスを受けた細胞の中で増加した Tb4 がその細胞の増殖を抑制するだけでなく、細胞外に分泌された Tb4 が近隣細胞の増殖も抑制する可能性が示唆される。さらに、Tb4 の作用が Ac-SDKP に構造特異的であることから、Ac-SDKP をヒト T リンパ芽球性白血病の増殖抑制剤として開発できる可能性が示唆された。

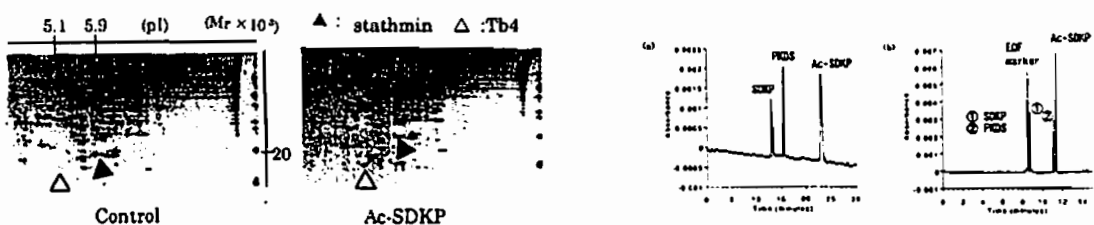


Fig.1. Increase of Tb4 in Ac-SDKP treated cells. Fig.2. CZE patterns of synthetic peptides.

文献

- 1.M.Fujimoto, Y.Nagasaka, T.Tanaka and K.Nakamura, *Electrophoresis*, 16(1998)2515.
- 2.中村和行、三谷紀之、藤本正憲、第 41 回日本生化学会中国・四国支部会抄録 (2000) 23.
- 3.衣笠仁美、寺部茂、坂本俊治、中村和行、第 19 回 SCE 要旨集 (1999) 72.

L28

HPFA/CE を用いるヒト α_1 -酸性糖タンパク質 variant の 立体選択的薬物結合解析

京都大学大学院薬学研究科

○黒田幸弘、喜多陽子、澁川明正、中川照眞

Enantioselective Drug Binding Analysis of Genetic Variants of Human α_1 -Acid Glycoprotein using High Performance Frontal Analysis / Capillary Electrophoresis

Yukihiro Kuroda*, Yoko Kita, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,

e-mail to kurodada@pharm.kyoto-u.ac.jp

Abstract

The microanalysis of drug - human α_1 -acid glycoprotein (AGP) binding was performed using high performance frontal analysis / capillary electrophoresis (HPFA/CE). AGP was separated into F1*S or A variants, and was also separated into concanavalin A (conA) retained or unretained form. (R)- or (S)-enantiomer of disopyramide (DP), verapamil (VER) was dissolved in the solutions of those fractionated AGPs, and the unbound drug concentrations of the solutions were determined by the HPFA/CE. Both conA retained and unretained AGPs did not show significant difference in the binding affinity and enantioselectivity to VER. However, conA unretained AGP did show larger affinity to DP than the other, while the enantioselectivity of both AGPs was almost preserved. On the other hand, genetic variants of AGP gave significant effect on the binding affinity and enantioselectivity to the model drugs.

【緒言】

α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) は多くの薬物に対する立体認識能を持ち、HPLC における光学分離用カラムの固定相として用いられている。しかしながらその分離メカニズムは未だ明らかではない。AGP の糖鎖およびペプチド鎖は共に光学活性なので薬物の立体認識に関与すると考えられる。ところが AGP は二本鎖、三本鎖、四本鎖糖鎖が混在する microheterogeneity を示し、さらにアミノ酸配列の異なるいくつかの遺伝的 variant が存在する。したがって立体認識メカニズムを調査するためには、これら AGP サブタイプごとに薬物結合解析等の実験を行う必要がある。AGP ペプチド鎖上の薬物結合部位は N 末端から数えて 1 番目と 2 番目の糖鎖結合部位の間にあると考えられているが、二本鎖糖鎖はこの二箇所の糖鎖結合部位にしか存在しない。そこで本研究では AGP を二本鎖糖鎖の有無に基づき分取し、それらの薬物結合親和性ならびに立体選択性を調べた。さらに AGP の遺伝的 variant を分取し、同様に薬物結合親和性ならびに立体選択性を調べた。結合実験法としては微量試料により結合解析が可能な高性能先端分析/キャピラリー電気泳動法 (HPFA/CE) を用いた。

【実験】

AGP subtype の分取： native AGP を concanavalin A カラムに保持されず、二本鎖糖鎖を持たない画分（UR-AGP、約 45%）と保持され、二本鎖糖鎖を持つ画分（R-AGP、約 55%）に分離精製した。また別途に native AGP を Iminodiacetate-Cu⁺⁺ カラムに保持されない画分（F1 及び S variant の混合物、約 70%）と保持される画分（A variant、約 30%）に分離精製した。分取精製過程前後で各 AGP サブタイプの CD 及び蛍光スペクトルに変化は見られなかった。 **HPFA/CE 法による非結合型薬物濃度の測定：**電気浸透流を抑えるためリニアポリアクリルアミドで内表面をコーティングした熔融シリカキャピラリーを用いた。キャピラリー内への泳動緩衝液(pH4.5)の注入に続き生理的 pH のリン酸緩衝液（pH7.4）を少量注入した後、試料側が正になるように高電圧（+7 kV、120 秒）を印加して試料を導入した。このとき結合平衡状態を維持しつつ、正に帯電した非結合型薬物のみがキャピラリー内に導入され、負に帯電したタンパク質や結合型薬物はキャピラリー内に導入されない。続いて電気泳動を開始する（+7kV）と台形状の非結合型薬物ピークが検出された。このプラトー高さから非結合型薬物濃度を求めた。

【結果・考察】

下表に得られた実験結果を示す。二本鎖糖鎖の有無に関わらず VER 異性体の非結合型薬物濃度、および立体選択性に大きな違いは見られなかった。しかしながら、DP の場合では UR-AGP 溶液における非結合型濃度が R-AGP 溶液中のそれより小さくなり、二本鎖糖鎖を持たない AGP の方が結合親和性が強いことが分かった。これは、糖鎖末端のシアル酸残基数が二本鎖糖鎖より三本鎖あるいは四本鎖糖鎖の方が多く、UR-AGP の方が R-AGP よりも DP と強く静電相互作用するためではないかと考えられる。それに対し立体選択性については UR-、R-AGP 間で大きな差異は認められなかった。一方、AGP の遺伝的 variant の薬物結合性を比較すると、両薬物ともに A variant により強い親和性を示すことが判明した。さらに DP では A variant が大きな立体選択性を示したが F1*S variants ではほとんど立体選択性を示さず、AGP の DP に対する立体認識能は主に A variant によることが分かった。また VER では A variant がわずかに大きな立体選択性を示し、F1*S variants も立体選択性を維持していた。このことから AGP のペプチド配列の違いが薬物親和性及びに立体選択性に大きく関与していること、ならびにその効果は薬物によって異なることが示唆された。

Unbound Drug Concentrations in the Solutions of UR- and R-AGP.

	Cu(R) (μM)	Cu(S) (μM)	Cu(R)/Cu(S)
<i>dlsopyramide</i>			
UR-AGP	6.56±0.16	5.61±0.059	1.17
R-AGP	7.84±0.099	6.89±0.039	1.14
<i>verapamil</i>			
UR-AGP	14.0±0.41	18.1±0.32	0.773
R-AGP	14.0±0.45	17.8±0.28	0.787

n=3. Cu(R) and Cu(S): unbound concentrations of (R)- and (S)-isomer.
Total concentration of AGP was 40μM. Total concentrations of DP, VER enantiomer were 15, 30μM, respectively.

Unbound Drug Concentrations in the Solutions of AGP Variants.

	Cu(R) (μM)	Cu(S) (μM)	Cu(R)/Cu(S)
<i>dlsopyramide</i>			
F1*S variants	10.8±0.031	10.1±0.16	1.07
A variant	4.16±0.107	1.76±0.032	2.37
<i>verapamil</i>			
F1*S variants	20.1±0.21	22.4±0.92	0.895
A variant	14.9±0.70	17.9±0.76	0.835

n=3. Cu(R) and Cu(S): unbound concentrations of (R)- and (S)-isomer.
Total concentration of AGP was 40μM. Total concentrations of DP, VER enantiomer were 15, 30μM, respectively.

L29

サイズ分離キャピラリー電気泳動におけるタンパク質定量法の検討
○ 向井 準、猶原暢洋、山口奈緒、真鍋 敬
愛媛大・理

Studies on the Quantitative Analysis of Proteins by Sieving SDS Capillary Electrophoresis

Jun Mukai, Nobuhiro Naohara, Nao Yamaguchi, Takashi Manabe

Department of Chemistry, Faculty of Science Ehime University, Ehime 790-0826

ABSTRACT

Quantitative sample injection in sieving SDS capillary electrophoresis by electrokinetic injection was examined. Using the results, we reconstructed a two-dimensional separation pattern of human plasma proteins by agarose gel isoelectric focusing followed by sieving SDS capillary electrophoresis.

1.はじめに

当研究室ではこれまでに、線状ポリアクリルアミド(LPA)を支持体とするキャピラリー電気泳動で、SDS 処理したタンパク質 (タンパク質-SDS 複合体) を分子サイズの違いにより分離する方法の条件を検討し、ヒト血漿タンパク質の分析に応用してきた。また、サイズ分離キャピラリー電気泳動をアガロースゲル等電点電気泳動と組み合わせ、ゲルを切片にし各等電点ゲル切片から抽出したタンパク質をサイズ分離キャピラリー電気泳動によって分離する一種の2次元分離を試みた。(Fig.1)

サイズ分離キャピラリー電気泳動は、紫外吸収でタンパク質を検出しているため高い定量性が期待できる。しかし、電圧印加による試料注入法を用いているため、キャピラリーへの試料導入量は試料中のイオン組成に強く影響されると予想される。そこで、サイズ分離キャピラリー電気泳動における定量的な試料注入条件の検討を行った。

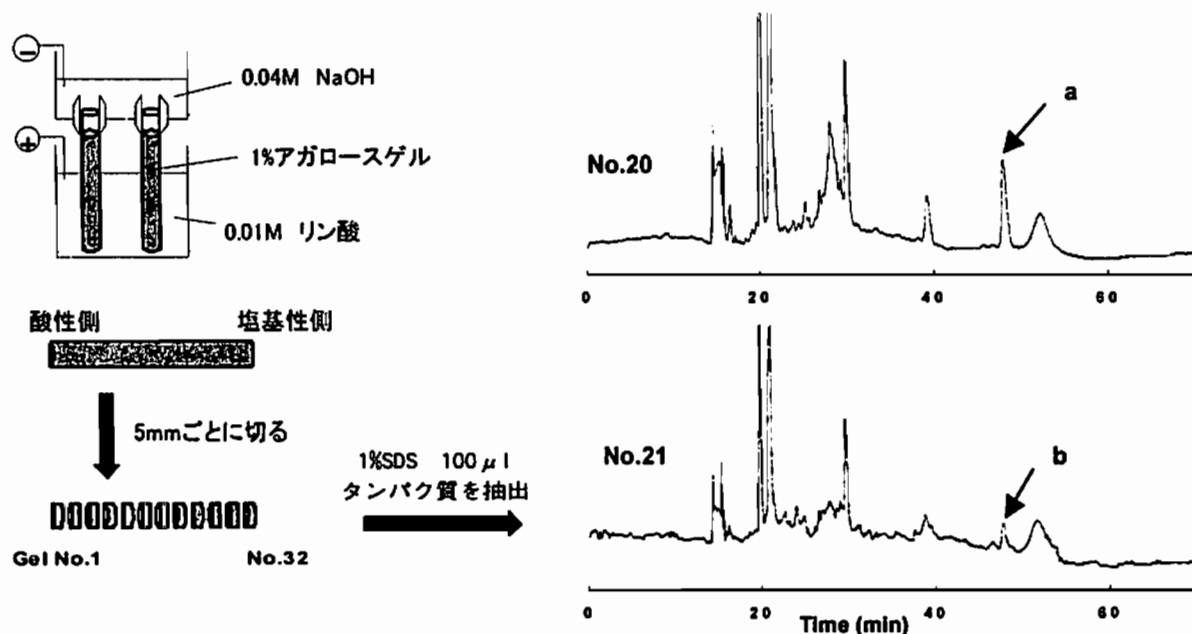


Fig.1 アガロースゲル等電点電気泳動とサイズ分離キャピラリー電気泳動の組み合わせによる
ヒト血漿タンパク質の2次元分離

未変成 - 未変成
未変成 - SDS
未変成 - 還元 + SDS
変成 - 変成

2.実験

サイズ分離キャピラリー電気泳動は、Beckman 社の P/ACE system 2100 を用い、キャピラリーは内径 75 μ m、実効長 30cm とし、内壁処理をして使用した。泳動液は 0.05M Tris-0.05M Tricine, 0.1%SDS を用い、キャピラリーに 4%LPA を含む泳動液を充填し、150V/cm の定電圧で泳動した。試料注入は 150V/cm での電圧印加による方法（電気泳動注入）を用い、検出は 230nm の紫外吸収を用いた。2 次元分離における等電点ゲルには内径 5mm、長さ 16cm の 1%アガロースゲルを用いた。試料として 40%ショ糖を含むヒト血漿 50 μ l を用い、500V の定電流でタンパク質を等電点に収束させた。泳動後ゲルを 5mm の切片にし 1%SDS 水溶液を加えゲルを細片化し、1 時間放置してタンパク質を抽出した。

3.結果

電気泳動注入を用いてキャピラリー中に試料を導入する場合、導入されるタンパク質・SDS 複合体の量は試料溶液中のイオン組成に強く影響されると予想される。そこで試料溶液中の SDS 濃度及びタンパク質濃度を様々に変え、それらの濃度とタンパク質紫外吸収ピーク面積の関係を調べた結果、試料溶液中の SDS 濃度が一定ならば、タンパク質の濃度とキャピラリーに導入されるタンパク質に比例関係があることがわかった。Fig.1 で示したアガロース等電点電気泳動とサイズ分離キャピラリー電気泳動の組み合わせによるヒト血漿タンパク質の 2 次元分離において、等電点ゲル切片からのタンパク質の抽出は 100 μ l の 1%SDS で行っている。すなわち、全ての抽出されたタンパク質溶液中の SDS 濃度は等しいと考えられる。従って、得られたサイズ分離キャピラリー電気泳動の泳動結果から、Fig.1 右グラフのピーク a 及び b のように対応するピークの面積を、タンパク質の量として比較することが可能である。そこで、等電点ゲル切片抽出タンパク質のサイズ分離パターンをコンピュータープログラムによる濃度プロファイルへの変換を行い、濃度データを含む 2 次元分離画像に再構成を行った。

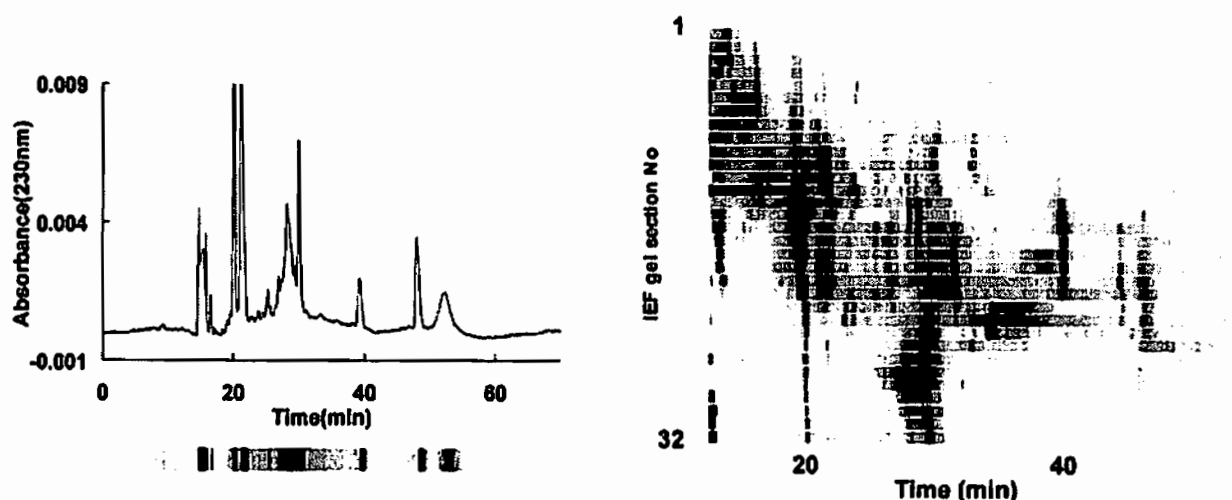


Fig.2 コンピュータープログラムによるサイズ分離キャピラリー電気泳動パターンの
2 次元濃度プロファイルへの変換

L30

キャピラリー電気泳動を利用するエンド型ヒアルロン酸分解酵素の 酵素反応解析

近畿大学 薬学部 木下充弘、小田泰生、掛樋一晃*

Evaluation of the Action Pattern of *Endo*-Type Hyaluronidase Using Capillary Electrophoresis

Mitsuhiro Kinoshita, Yasuo Oda and Kazuaki Kakehi

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

We found that oligomers derived from hyaluronic acid (HA) showed an anomalous migration, and their migration profiles showed a close relation to their biological functions. In the present study, we examined hyaluronidase action on pure HA oligomers to determine the relationship between their molecular size and their biological activities. From these studies, we found that the biological functions of the enzyme may be dependent on the size and conformation of the oligomers and capillary electrophoresis was a useful tool for the determination of the size of the substrate.

ヒアルロン酸(HA)やN-アセチルノイラミン酸が α -2,8結合により重合したコロミン酸は極めて規則正しい構造を有する酸性多糖であり、あるサイズ以上で生理作用を示すことが古くから知られている。我々はこれらの酸性多糖のオリゴマーおよびポリマーを表面修飾キャピラリー中、中性ポリマーを含む緩衝液中で電気泳動を行うことによりあるサイズで泳動順序の逆転現象が起こることを見出した。また、この泳動順序の逆転現象が生理作用の発現と密接な関係があることを明らかにした[Kakehi et al., Anal. Chem. 1999]。本研究ではこの泳動順序の逆転現象をさらに詳細に検討するために精製されたHAオリゴマーを材料として、ヒアルロン酸のエンド型加水分解酵素であるヒアルロニダーゼのHAオリゴマーに対する作用をキャピラリー電気泳動を用いて詳細に検討し、HAオリゴマーがヒアルロニダーゼにより作用を受けるための必要な条件を明らかにしたので報告する。

〔方法〕 キャピラリー電気泳動(CE) Beckman P/ACE 5010；キャピラリー、内壁を dimethylpolysiloxane 処理した DB-1 キャピラリー（内径 75 μ m, 有効長 50 または 20 cm）、またはフューズドシリカ素管（内径 50 μ m, 有効長 40 cm）。泳動用緩衝液 50 mM トリス-ホウ酸緩衝液 (pH 8.3)–10% PEG70000 または 50 mM ホウ酸緩衝液(pH 9.3)–100 mM SDS。印加電圧 –6 kV (DB-1 capillary); 20 kV (シリカ素管)。分析温度 30°C、検出 紫外吸収検出 (200 nm)、試料注入 加圧法 (10 秒)。HAオリゴマーの調製 ヒツジ鞆丸由来ヒアルロニダーゼにより部分消化されたブタ皮膚由来 HA を Sephadex G-25 カラムを用いるゲルろ過により HA 4 糖、6 糖、8 糖および 10 糖を精製し、ヒアルロニダーゼ用基質として使用した。

【結果・考察】精製された HA オリゴマーを使用して、温度を変えながら酵素反応を行いその様子をキャピラリー電気泳動により観察した結果を図に示す。

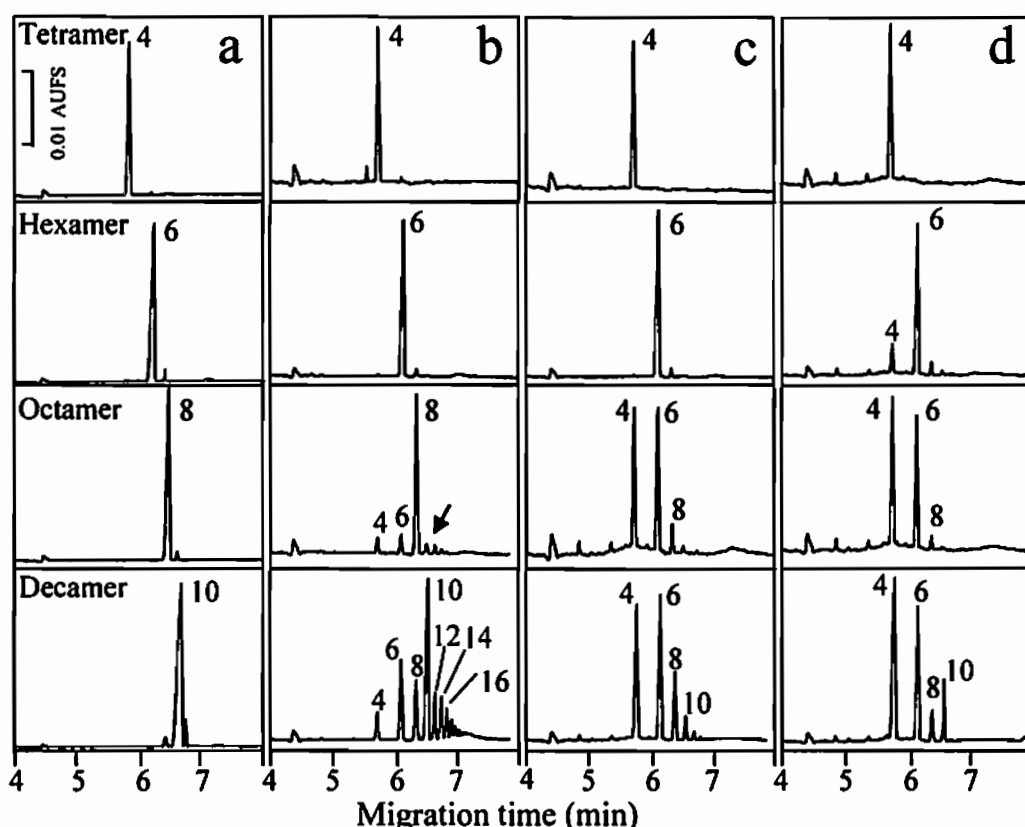


Fig. Enzyme reaction of HA oligomers with hyaluronidase. a: Each oligomer was examined before the enzyme reaction. b: The enzyme reaction was performed at 4°C for 1 h. c: The reaction at 4°C for 12 h. d: The reaction at 37°C for 1 h. The numbers with the peaks indicate the size of the HA oligomers (i.e. degree of polymerizations). 図から明らかなように、HA オリゴマーは 4 糖では酵素反応が全く進行しなかった。また、温度によって加水分解反応と糖転位反応に基づく重合度の増加が顕著に観察され、ヒアルロニダーゼによるヒアルロオリゴ糖の酵素反応は糖加水分解反応と糖転位反応の両面から解析する必要があることがわかった。我々はこれらの反応をモデル化できる酵素の受容体のモデルとして、HA オリゴ糖鎖を認識する隣り合った 2 種類の認識部位と糖転位反応及び糖加水分解反応を別々のポイントで行う酵素のモデルを推定した。

CE は条件を選ぶことにより数分間で反応経過の追跡が可能であるため、厳密な生成物の分析が必要な本研究のような酵素反応系において、CE が極めて有力な手段であることがわかった。

L31 高感度アダマール変換キャピラリー電気泳動法の開発

(九大院工) ○小佐井一樹, 金田隆, 今坂藤太郎

Development of high sensitivity Hadamard capillary electrophoresis

Kazuki Kosai, Takashi Kaneta, Totaro Imasaka

Faculty of Engineering, Kyushu University

ABSTRACT

Previously, we developed Hadamard transform capillary electrophoresis (HTCE), which is combined laser induced fluorometry/capillary electrophoresis with Hadamard transform. In HTCE, a sample was injected into a capillary by a photodegradation technique according to a pseudorandom Hadamard sequence. The electropherogram obtained by the multiplex sample injection method was transformed using an inverse Hadamard matrix. As a result, the signal-to-noise ratio is improved compared to that obtained by a conventional single injection method.

In this work, quantitative performance and detection limit of HTCE were evaluated. Ar ion laser emitting at 488 nm was used as an excitation light source for sodium fluorescein (absorption maximum : 493 nm). The calibration curve was linear over 5 orders (2.0×10^{-12} M $\sim$ 1.5×10^{-7} M). The detection limit depends on the laser power, and was 5×10^{-13} M using 250 mW of the laser power.

1.はじめに

レーザー励起蛍光検出/キャピラリー電気泳動法はアミノ酸やタンパク質などの高感度な分離分析法である。この手法と擬似乱数に基づく多重注入法を組み合わせたアダマール変換キャピラリー電気泳動法は、濃度感度を飛躍的に向上できる優れた特徴を持っている。¹⁾ 本研究では、蛍光色素であるフルオレセインナトリウムを試料として用い、本法の定量性や検出限界などの性能について検討を行なった。

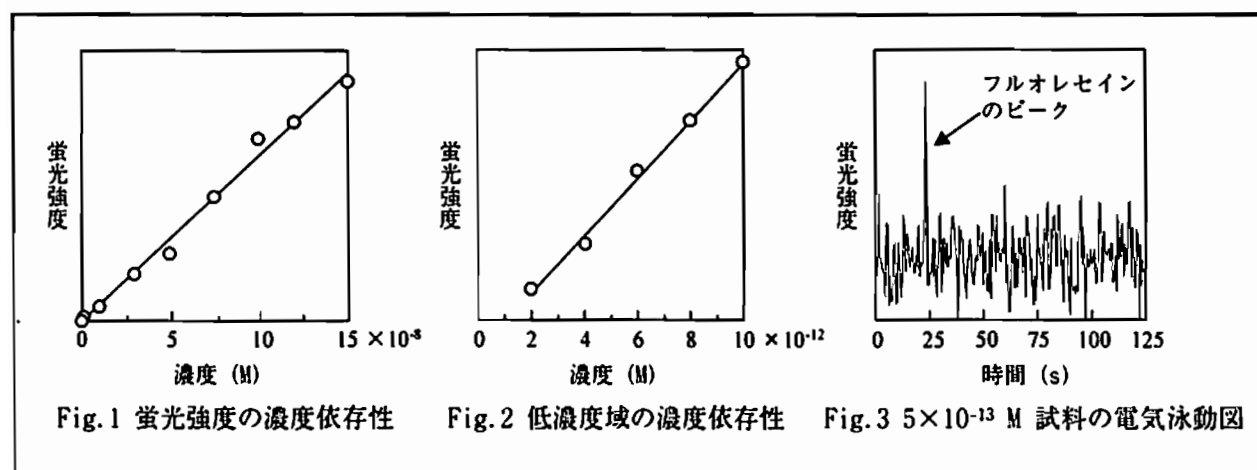
2.実験

定量分析における操作を簡単化するため、従来の装置を改良し、より短い全長 14 cm (有効長 4.5 cm) のキャピラリー (内径 25 μ m, 外径 375 μ m) を用いて印加電圧 10 kV で測定を行なった。泳動溶液には、30 mM 炭酸緩衝溶液 (pH 9.3) を用いた。本手法では、試料注入をアダマール変換コードに従って正確に行なう必要がある。しかし、従来の試料導入法 (重力注入法、電氣的移動法) では泳動用の電圧を印加しながら試料を導入することは困難である。したがって、試料であるフルオレセインナトリウムは、蛍光物質の光分解を利用する光ゲート法により導入した。²⁾ 光ゲート法は短時間で連続的な試料導入が可能であり、コード

に従った正確な試料注入を達成できる。本研究ではゲート光遮断用のシャッター開閉をアダマール変換コードに従ったプログラムを用いて制御することで、多重注入を行なった。試料導入用ゲート光及び励起光には、波長 488 nm のアルゴンイオンレーザーを用いた。

3. 結果と考察

キャピラリーを短くすることにより、分析時間は以前の実験装置を用いたときの約半分に短縮された。この装置を用いて、アダマール変換キャピラリー電気泳動法におけるの定量性を調べるために検量線を作成した。Fig. 1 は試料濃度 $2.0 \times 10^{-12} \sim 1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の領域における蛍光強度の濃度依存性、Fig. 2 は検出限界付近での濃度依存性を示している。この結果、低濃度領域も含め、広範囲に渡って良好な直線性 ($R=0.997$) が得られ、アダマール変換法においても優れた定量性が得られることが確認できた。さらに高感度化を目指してレーザー出力を 250 mW に上げて測定を行なったところ、Fig. 3 に示すように $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ の濃度においても明瞭に試料ピークが認められた。同測定条件下での単一注入の検出限界は $3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$ であった。したがって、アダマール変換を利用することにより 60 倍の感度向上が達成できたことになる。1 セグメント当たりの注入時間 (0.5 s) で、キャピラリー内に導入される試料体積は 0.55 nl である。この中には 166 個の試料分子が存在する。これは従来の単一注入方式のレーザー励起蛍光検出法を用いたキャピラリー電気泳動法と比較して、極めて良好な値である。今後、より微弱な信号を検出する為に高感度な蛍光検出素子、試料の光分解と励起を高効率化する為に高出力レーザーを使用することにより、更なる高感度化が期待でき、従来の方法では非常に困難である超低濃度での分析が可能になると予想される。



4. 文献

- 1) T. Kaneta, Y. Yamaguchi, T. Imasaka, *Anal. Chem.*, 71, 5444 (1999).
- 2) C. A. Monnig and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 63, 802 (1991).

PCR

L32 顕微鏡下におけるマイクロ電気クロマトグラフィーシステムの構築

○¹榊 隆弘、²北川慎也、¹津田孝雄

¹名古屋工業大学応用化学科

²名古屋工業大学ベンチャービジネスラボラトリー

Miniature capillary electrochromatographic system with electrochemical detection for the set-up on a stage of microscope

○ Takahiro Sakaki¹, Shinya Kitagawa², Takao Tsuda¹

¹ Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

² Venture Business Laboratory, Nagoya Institute of Technology

A very short column-separation system for electrochromatography was proposed. The system was composed of a micro-packed column, electrochemical detection system which consisted of the digital electrometer and homemade micro-carbon working electrode, miniaturized-reservoirs, high-voltage power supply and a novel injection device. Packed length of the homemade very short column was just 10 mm long. Sample was introduced electronically by using a sample holder of home-made syringe type. Moreover, it set these miniaturized capillary electrochromatographic system in the microscope stage. By using very miniaturized chromatographic apparatus we separated 5 model solutes with high efficiency under an applied voltage of 300. We would like to apply this separation system for very limited sample, such as an inner fluid of a single cell.

【はじめに】

分析システムの小型化は、マイクロ分析システム、もしくはマイクロチップ化などで現在発展の段階にある。微小化された分析システムは、ゲノム、ドラッグスクリーニング、臨床研究などの分野で大きな可能性がある。マイクロチップテクノロジーを利用して小型化された分析システムにおいて、化学物質の分離分析は、カラム長が極く短く、さらに分離能があることが望ましい。

電気泳動による分離は有力な手法である。しかし、すべての化学物質が電気泳動での

移動度の違いにより分離できるわけではない。そのため、マイクロ分析システムに別の分離モードとして、キャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）を導入した。化学物質は、キャピラリーの狭いチャンネル場で電気泳動、かつ分離モードにより分離することができる。CECは化学物質の分離に高い可能性を持っている。

本研究は、電気クロマトグラフィーの高分離能を利用し、微小体積物の分離分析を顕微鏡ステージ上で行える装置の構築を目標としている。

今回は、微量成分の試料を短時間に分離分析するために充填長 10mm の極く短いカラムを使用し、電気化学検出を用いた電気クロマトグラフィーシステムを構築して、試料の分離を試み、作製したカラム、システムの評価を行った。

【実験】

実験に用いた装置は、高電圧装置（MODEL 1041 DC HIGH VOLTAGE STANDARD、KIKUSUI ELECTRONICS CORP.）、電気化学検出器（デジタル・エレクトロメータ R8240、アドバンテスト（株））、顕微鏡（86940、ニコン（株））、CCDカメラ（CCD-S1、SHIMADZU RIKI INSTRUMENTS CO.,LTD.）、当研究室で作成した微小カーボン作用電極、カラム、カラム出入口に配置したリザーバー、試料導入リザーバーで構成されている。電圧は、接地したカラムの出口側に設けたリザーバーと入口側に設けたリザーバーとの間に印加した。実験では圧力差流は用いず、電気浸透流のみにより試料の展開を行った。キャピラリーカラムは内径 75 μ m のヒューズドシリカキャピラリー（GL Science）に陽イオン交換充填剤（IC-Cation-SW、東ソー（株））を充填し、充填部の両端にフリットを設けて作成した。

【結果】

顕微鏡ステージ上に設置することで、分離部をリアルタイムに顕微鏡視認しながら、試料導入、検出ができるシステムを構築することに成功した。また、試料にヌクレオチド類を用い高い分離能を得た。

【文献】

1. T. Sakaki, S. Kitagawa, T. Tsuda,
Electrophoresis 2000, 21, 3088-3092
2. Tsuda, T., Anal. Chem. 1988, 60,
1677-1679
3. Kitagawa, S., Tsuji, A., Watanabe, H.,
Nakashima, M., Tsuda, T., J. Microcol.
Sep. 1997, 9, 347-356

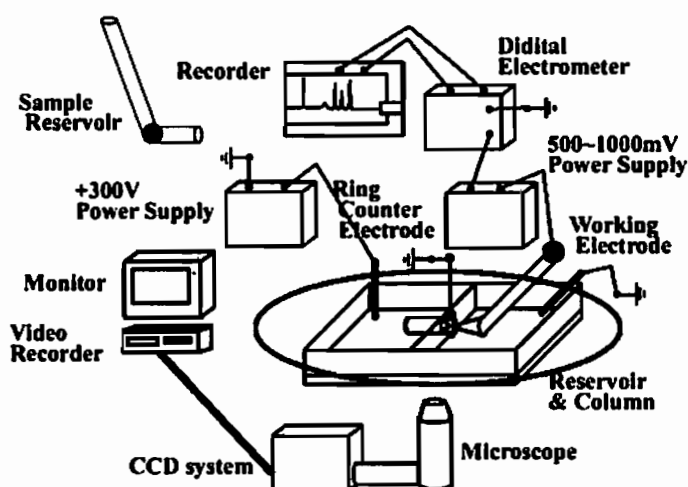


Fig.1. Schematic diagram for Miniature capillary electrochromatographic system

L33

繊維を固定相とするキャピラリー電気クロマトグラフィ

神野清勝、○渡辺博史

豊橋技術科学大学 第5工学系

Capillary Electrochromatography Using Fibers as a Stationary Phase Kiyokatsu Jinno and Hiroshi Watanabe

School of Materials Science, Toyohashi University of Technology, Toyohashi 441-8580, Japan.

Fiber-packed capillary columns have been evaluated in chromatographic performance in capillary electrochromatography (CEC). Change of electroosmotic flow (EOF) velocity and selectivity using different kinds of fiber materials were examined. As the results it has been found that different properties of the fibers produced different EOF velocity and retention behavior for some neutral solutes such as parabens. Using 200 μm i.d. $\times$ 5 cm Kevlar[®] fiber-packed column to shorten the total analysis time and a widebore postcolumn capillary (530 μm i.d. $\times$ 45 cm) to enhance EOF velocity, the separation of three parabens within 1 minute was achieved.

【緒言】

当研究室ではこれまで、セルロースアセテート繊維を固定相として利用する液体クロマトグラフィやキャピラリー電気クロマトグラフィ(CEC)について検討を行ってきた[1,2]。本研究では、簡便・迅速な分析法に CEC を適用することを目指し、充填の容易な種々の繊維を固定相として用い、繊維の種類が電気浸透流(EOF)の速度に与える影響や、分離選択性の違いについて検討を行った。また分析時間短縮につながる、CEC 分離場における EOF 速度を向上させる工夫についても併せて報告する。

【実験】

移動相: 2.5 mM リン酸ナトリウム緩衝液または Tris-塩酸緩衝液(pH は適宜調製)

固定相: ケブラー[®](HM(紡糸後熱処理したもの)/AS(紡糸後未処理のもの)、東レ・デュポン)
ザイロン[®](HM/AS、東洋紡)

いずれもほぼ同じ充填密度になるようにキャピラリー内に充填した。固定相の性質は、中性試料として主にパラベン類を用いて評価した。

装置は以下を組み合わせた CEC 装置を使用した。装置の概略を Figure 1 に示す。

キャピラリー: 内径 30/100/200/530 μm (GL サイエンス)

紫外検出器: 870-CE (日本分光)

高圧電源: 890-CE (日本分光)

データ取り込み: Borwin (日本分光)

【結果と考察】

本システムにおいて試料の分離は、導入部から検出部までの繊維が充填された数 cm の部分で行われ、他の部分は通常、分離に直接影響を与えない。ここでは、ポストカラムキャピラリーの内径を大きくすることにより、同じ印加電圧で、分離場における電気浸透流(EOF)速度を大幅に速めることができた (Figure 2)。これは、EOF の線速度はキャピラリーの直径に依存しないが、体積流量はキャピラリー内径が大きくなるほど増加し、その結果、システム全体で 50% 以上の長さを占める内径の太いキャピラリー部分で発生する EOF が、内径の細い部分の移動相を吸引するためであると考えられる。さらに、プレカラムキャピラリーを 75 μm から 100 μm にすると、より EOF の速度が向上することが観察された。この条件で、電圧 30 kV (400 V/cm)、ケブラー® 繊維を固定相とした 200 μm i.d. $\times$ 5 cm のカラムを用いて、3 種類のパラベン類を 1 分以内に分離した例を Figure 3 に示した。他の各種中性試料も、同様に数分以内での分離が達成された。他種類の繊維についての検討結果も併せて報告する予定である。

【文献】

1. Y.Kiso, K.Takayama and K.Jinno, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 12 (1989) 169.
2. K.Jinno, J.Wu, H.Sawada and Y.Kiso, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 21 (1998) 617.

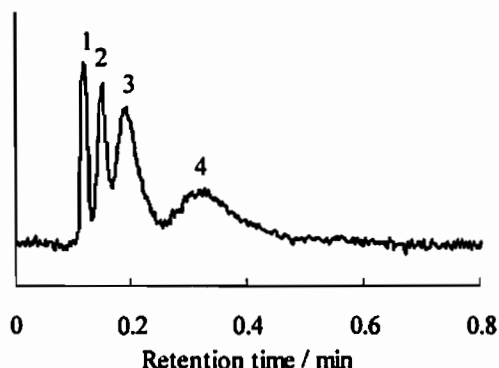


Figure 3 CEC separation of parabens within 1 minute. Internal diameter of the precolumn capillary; 100 μm . Other experimental conditions were the same as in Figure 2.

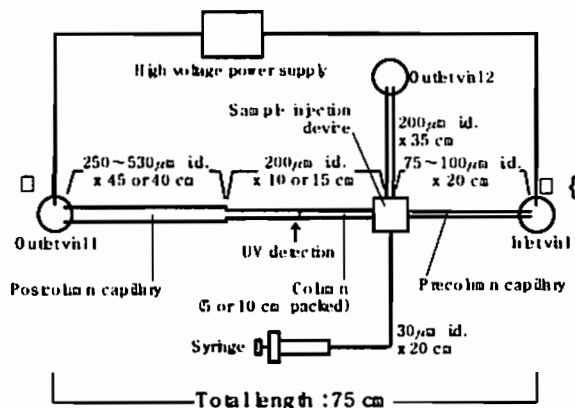


Figure 1 Schematic representation of CEC apparatus used in this study.

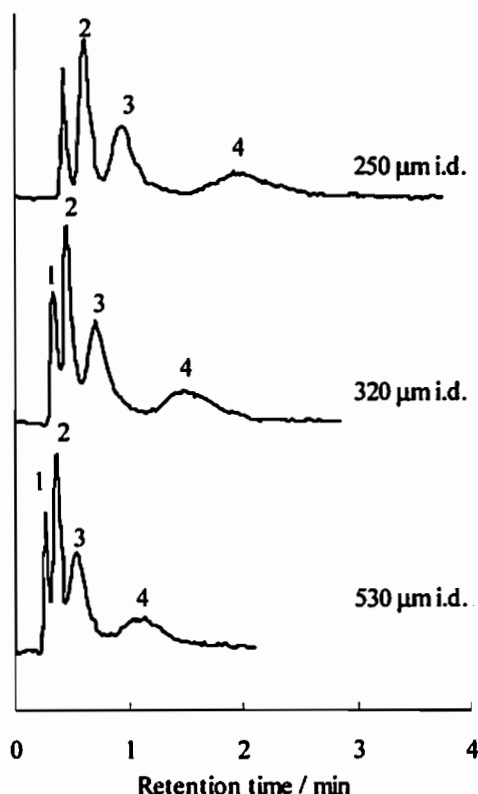


Figure 2 CEC separations of three parabens on the Kevlar® (AS) packed column with different postcolumn capillary internal diameters. Conditions: mobile phase; 2.5 mM phosphate buffer (pH 7.0), applied voltage; 30 kV (400 V/cm), packed length; 5 cm, internal diameter of the precolumn capillary; 75 μm . Peaks: 1; thiourea, 2; ethyl paraben, 3; *n*-propyl paraben, 4; *n*-butyl paraben.

L34

多孔性シリカモノリス型カラムの CEC における特性解析

○小林宏資¹、池上亨¹、細矢憲¹、田中信男¹、石塚紀生²、
水口博義²、中西和樹²

京都工芸繊維大学繊維学部¹、京都大学大学院工学研究科²

Characterization of porous silica monolithic columns in capillary electrochromatography

Hiroshi Kobayashi¹, Nobuo Tanaka¹, Norio Ishizuka², Hiroyoshi Minakuchi², Kazuki Nakanishi²

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

²Division of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Porous silica monolithic columns were prepared by acid-catalyzed hydrolytic polymerization of tetramethoxysilane in the presence of a water-soluble organic polymer in a fused-silica capillary. They were able to show high performance at low back pressure in HPLC on the basis of the small-sized skeletons and relatively high (skeleton size) / (through-pore size) ratios. A silica monolithic column in capillary prepared previously showed a large difference of column performance between HPLC and capillary electrochromatography (CEC). The relatively poor column efficiency at high linear velocity was caused by the presence of the large-sized through-pores (about 8 μm). The reduction of through-pore size of silica monolith has lead to the improvement in column efficiency at the expense of the increase in pressure drop. The results show the possibility of generating equally large plate numbers in similar separation time in HPLC and in CEC by employing silica monolith of the smaller domain size.

1. はじめに

多孔性シリカ連続体はアルコキシシランを高分子共存下で加水分解—重縮合させることにより調製される。調製されたシリカゲルは nm サイズの細孔（メソポア）を持つシリカ骨格と μm サイズの貫通型巨大細孔（スルーポア）より構成され、これらは立体的に連続的かつ周期的な秩序構造を示す。多孔性シリカ連続体の棒状カラム（シリカロッドカラム）に同時に存在するスルーポアによる大きな空隙と小さなシリカ骨格は独立して制御できるので、従来の粒子充填型カラムよりはるかに低いカラム圧力で高い性能を示すことが報告されている⁽¹⁾。また、シリカロッドカラムの安定な一体構造は、高圧電場の下で分離を行うキャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）において利点となる。以前報告した様に⁽²⁾、キャピラリー型シリカモノリスカラムの有する約 8 μm のスルーポアは移動相中の物質移動の遅さによりバンド広がりの原因となる。本研究ではより小さなスルーポアを有するモノリスの調製条件を検討し、HPLC および CEC におけるカラム性能の比較検討を行う。

2. 実験

内径 50 μm のフューズドシリカキャピラリーを 1 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液で満たし、40℃で 3 時間処理した後、1 mol/l HCl、超純水の順で洗浄した。内壁が活性化されたキャピラリー内で多孔性シリカ連続体を調製したオンカラム反応により ODS 化後、検出窓を作成した。このキャピラ

リーカラム(50-A、有効長 25 cm、全長 33.5 cm)を CEC モードで、80%CH₃CN - Tris-HCl 緩衝溶液 (50 mM, pH 8.0) 中、アルキルベンゼンをサンプルとして 150-900 V/cm の印可電圧で評価を行った。また、異なる条件で調製したキャピラリーカラム (50-B、有効長 45 cm、全長 53.5 cm) をオクタデシルシリル化した後、CH₃OH/H₂O = 80/20 および CH₃CN/H₂O = 80/20 を移動相として用い、HPLC におけるカラム性能の評価を行った。

3. 結果と考察

Fig. 1 に従来の調製法により得られたキャピラリー型シリカモノリスカラム(50-A)の HPLC と CEC による評価、及びより小さなスルーポアサイズを持つキャピラリーカラム(50-B)の HPLC による評価で得られた理論段高と線速度のプロットを示す。50-A カラムは HPLC と CEC においてカラム性能に大きな差を示した。この差は、50-A カラムがもつ約 8 μm の大きなスルーポアサイズに基づくものと考えられる。より小さなスルーポアサイズをもつ 50-B カラムは理論段数 (理論段高) については 50-A カラムより高い性能を示した。これは、シリカモノリスの示すドメインサイズ (スルーポアサイズとシリカ骨格サイズの和) が減少し、移動相中の物質移動の遅れによるバンド広がりへの寄与が抑えられたためであると考えられる。50-B カラムにおいてはカラム圧力が粒子充填型カラムより低く、しかも CEC と HPLC におけるカラム性能の差が小さいので、CEC において得られる最大限の理論段数をより短時間で HPLC において達成する事が可能となるものと期待される。

Fig. 2 に 50-A カラムの CEC による評価、および 50-B カラムの HPLC による評価で得られたアルキルベンゼンの分離クロマトグラムを示す。50-B カラムは Fig. 2 に示されるように、50-A カラムが CEC において示すより低い理論段数を与えているが、Fig. 1 の結果は 50-B カラムが HPLC と CEC において同等の分離時間で同等の高い分離性能を与える可能性を示している。これは、低い圧力での送液が可能であるシリカモノリスの特徴に基づくものである。しかし、ドメインサイズの小さなモノリス型カラムは従来のモノリス型カラムより高い送液圧力を必要とすること、および CEC における高性能分離の達成には高い線速度の発生が必要なことなどについてさらに検討が必要である。また、実際の測定条件下での HPLC と CEC における分離性能の比較に関心がもたれる。

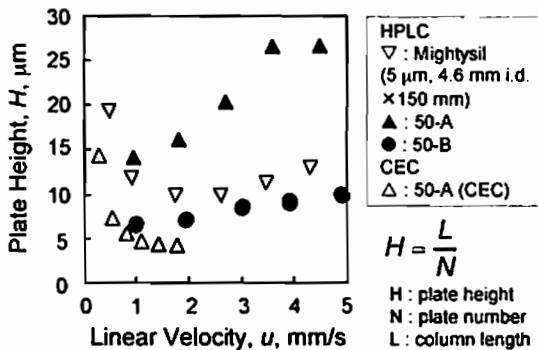


Fig. 1 理論段高と線速度のプロット

Conditions
HPLC
Mobile phase: CH₃CN / H₂O = 80 / 20
Solute: Hexylbenzene
Temperature: 25 °C (▲, ●), 30 °C (▽)
Detection: 200 nm (▲, ●), 254 nm (▽)
CEC
Mobile phase: CH₃CN / Tris-HCl buffer
(50 mM, pH 8.0) = 80 / 20
Solute: Hexylbenzene
Temperature: 20 °C
Detection: 200 nm

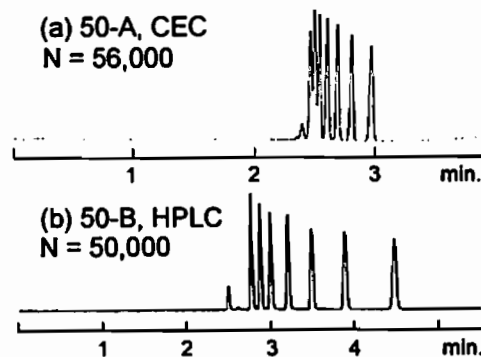


Fig. 2 アルキルベンゼンの分離クロマトグラム

(a) 50-A, CEC
Mobile phase: CH₃CN / Tris-HCl buffer
(50 mM, pH 8.0) = 80 / 20
Voltage: 900 V/cm
Temperature: 20 °C
Solute: C_nH_{2n-1} (n = 0-6)
Detection: 200 nm
Column length: 25 cm
(b) 50-B, HPLC
Mobile phase: CH₃CN / H₂O = 80 / 20
Temperature: 25 °C
Solute: C_nH_{2n-1} (n = 0-6)
Detection: 200 nm
Column length: 45 cm

(1) *J. Chromatogr. A.*, 762 (1997) 135-146., 797 (1998) 121-131.

(2) *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1275-1280.

L35

交流電場を用いた電気クロマトグラフィー

○佐藤雅彦¹、北川慎也²、津田孝雄¹
名工大院・工¹、名工大・VBL²

Electrochromatography using AC electric field

○Masahiko Sato¹、Shinya Kitagawa²、Takao Tsuda¹

¹Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

²Venture Business Laboratory, Nagoya Institute of Technology

Abstract

The application of an electric field along a column may induce the variation of the condition around the stationary phase. The distribution coefficient of a solute between stationary and mobile phase depends on the frequency of pulse electric field. The solute in the effluent was found to be released from the stationary phase at beginning of an application of pulse electric field. When the applied voltage was off, the solute was again retained with stationary phase. The variation of effluent composition with and without the application of pulse electric field were studied.

電気クロマトグラフィーは近年急速に注目を浴びている分離分析手法である。電気クロマトグラフィーでは、キャピラリー液体クロマトグラフィー用カラムのカラム軸方向に電圧を印加する。それゆえ、試料は固定相との相互作用と移動相中における電気泳動、すなわちクロマトグラフィーの分離機構とキャピラリー電気泳動の分離機構との両者の作用により分離される。電気クロマトグラフィーにおいて印加する電場は主として、電気浸透流、電気泳動などの移動相中における流れを発生させるために用いられる。

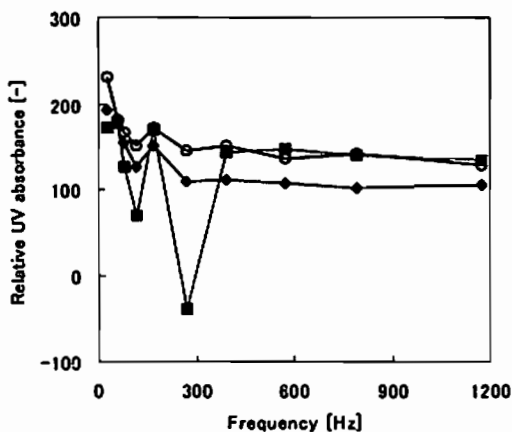
当研究室では、電場が流れを発生させる以外に、固定層と移動層の分配[1,2]、中性化合物の保持比[3]、カラムの電気抵抗[4,5]を変化させることを既に報告し、直流電場下におかれた固定相が電場の影響により通常の液体クロマトグラフィーには見られない新たなクロマトグラフィックな挙動を示すことを見い出している。

今回は、さらに、直流電場のみならず、実質的な電気浸透流や電気泳動が発生しない交流電場下においても固定層と移動相の分配が変化したこと、さらにその変化が印加電圧の周波数によって特異的に変化するを見い出した。

【実験】実験に用いた装置は、送液ポンプ (LC-6A, SHIMADZU, 京都)、高電圧装置 (HOPP-1B3, Matsusada Precision)、紫外線検出器 (UV-970, JASCO)、インジェクター (7410, RHEODYNE)、

当研究室で作成したカラムで構成されている。電圧は、カラム入口部分とカラムの出口側に接続した白金チューブとの間に交流電圧 1kV 印加した。全ての実験で圧力差流を使用している。カラムは内径 150~320 μm フューズドシリカキャピラリー (GL Science) およびガラス管に種々の充填剤などを充填して作成した。

【結果】ガラス管に IC-Anion SW、MCI GEL SCA04 を充填し、その両端をテフロンフィルターそして白金チューブを取り付けて、溶離液を送液した。この時、溶離液には上記の充填剤に対して保持があり、UV 吸収を持つ溶質を含んでいる。一定圧力(50kgf/cm²)で送液している間、クロマトグラムのベースラインは一定となっているが、充填剤両端に交流電場を印加すると充填剤に保持されていた溶質が放出され、その結果ベースラインが大きく上昇した。その後、そのまま印加し続けると、元のベースラインへと戻り、電圧を切ると溶質が固定層に保持されるためにベースラインが電圧印加前よりも下降した。そして、再びもとのベースラインへと戻った。この時のクロマトグラムから得られる吸光度の変化量(上ピークと下ピークの合計)と印加電圧の周波数の関係を Figure 1 に示した。交流電圧を印加すると常に固定層と移動相の分配が変化し、その変化量は印加電圧の周波数によって変化した。また、ある条件下では溶質の放出と保持の関係が逆転することが見られた。このことから交流電場によって固定層が変化していると考えられる。この現象の利用により、電場をグラジエントとするキャピラリー電気クロマトグラフィーへの応用が可能であろう。



Condition

- : Packing material:IC Anion SW
Effluent:3mM Phthalic acid + 3mM Hexa-methylenediamine+0.15mM HEPES / methanol (90/10)
- : Packing material:IC Anion SW
Effluent:3mM Benzenesulfonic acid / methanol (90/10)
- ◆ : Packing material:MCI GEL SCA04
Effluent:3mM Phthalic acid + 3mM Hexa-methylenediamine+0.15mM HEPES / methanol (90/10)

Figure 1. Relationship between frequency of applied voltage and relative UV absorbance

文献

1. S.Kitagawa, H.Watanebe, T.Tsuda, *Electrophoresis*, **20**, 9-17, 1999.
2. S.Kitagawa, T.Tsuda, *Analytical Sciences*, **14**, 571-575, 1998.
3. C.Chaiyasut, S.Kitagawa, H.Wada, Y.Nakabeya, T.Tsuda, *J.Microcol. Sep.*, **11**,590-595, 1999
4. S.Kitagawa, A.Tsuji, H.Watanabe, M.Nakashima, T.Tsuda, *J.Microcol.Sep.*, **9**(5),347-356, 1997.
5. C.Chaiyasut, S.Kitagawa, H.Wada, T.Tsuda, *Analytical Sciences*, **16**, 413-416, 2000.

L36

キャピラリー電気泳動法を用いた太陽光線被曝ラット組織中の新ヒスチジン代謝産物 *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]glutathione の測定

○絹田正裕、益岡典芳、太田 潤、阿部匡史、大塚 淳、李 順愛
岡山大学医学部生化学講座

Determination of *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]glutathione, a new metabolite of L-histidine, in rat tissues after sunlight irradiation by capillary electrophoresis

Masahiro Kinuta, Noriyoshi Masuoka, Jun Ohta, Tadashi Abe, Atsushi Otsuka and Shun-Ai Li
Department of Biochemistry, Okayama University Medical School, Okayama 700-8558, Japan

Urocanic acid is a key metabolite of L-histidine and its increase in quantity in the skin is given by sunlight irradiation. *S*-[2-Carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]glutathione [GS(CIE)], an adduct of glutathione and urocanic acid, was proposed to be an origin of a urinary compound, *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine [Cys(CIE)]. Various catabolites of Cys(CIE) were also isolated from human urine previously. However, no direct evidence showing an existence of GS(CIE) as a biological material had been given. By using capillary electrophoresis, GS(CIE) has now been found in the extracts from rat tissues involving kidney, liver, skin and blood when the rat was maintained under conditions of sunlight irradiation after the fur on its dorsal skin had been clipped. On the other hand, no or a trace of GS(CIE) was detected in rat tissue extracts when the animal was maintained under usual conditions in the room. These results indicate that GS(CIE) formation actually occurs in the body and that the formation is accelerated by the irradiation. Glutathione is a well-known scavenger of active oxygen and is catabolized by gamma-glutamyltransferase. As the inhibitory effect of GS(CIE) *in vitro* on enzymatic functions of the transferase was elucidated previously, it is possible that GS(CIE) formation is of sufficient physiological importance to maintain the glutathione levels in tissues consequently to prevent the tissues from various kinds of damage by active oxygen generated under conditions of sunlight irradiation.

はじめに

ヒスチジンは肝臓及び皮膚に強い活性が認められるヒスチダーゼ (EC 4.3.1.3) によって *trans*-ウロカニン酸に代謝される。肝臓では、さらにウロカナナーゼ (EC 4.2.1.49) によってイミダゾロンプロピオン酸に代謝されるが、皮膚ではウロカナナーゼの活性が認められず、ウロカニン酸が蓄積する。また、太陽紫外線の被曝によって皮膚ウロカニン酸は *trans* 型から *cis* 型への立体異性化を起こすことが知られている。紫外線被曝ラットを用いた実験で、皮膚の *cis*-ウロカニン酸は、その後 *trans* 型とは異なる動態を示すことを既に明らかにした [1]。

さらに、我々はウロカニン酸の二重結合にグルタチオン (GSH) の-SH 基が付加した化合物、即ち *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]glutathione [GS(CIE)] の代謝産物と考えられる 4 つの新規化合物を正常ヒト尿から単離・結晶化し、構造決定を行ってきた。また、化学合成した GS(CIE) を酵素反応基質として用い、その代謝経路を報告してきた [1-7]。しかし、生体物質として GS(CIE) 自体が存在するかどうかは明確でなかった。今回、キャピラリー電気泳動法を用いて、ラット組織中に GS(CIE) が存在することを明らかにした。また、その生成が太陽紫外線被曝によって著しく増加することを明らかにしたので報告する。

方法

背部剃毛ラットを太陽光線被曝下で2日間飼育した後に、エーテル麻酔下断頭瀉血し、血液、皮膚、腎臓、肝臓を摘出し、粗抽出液を作製後、イオン交換カラムで部分精製した。室内通常飼育ラットをコントロールにした。

キャピラリー電気泳動装置はP/ACE Diode array detector 装着 Beckman P/ACE system 5510 を用い、データ処理は Beckman System Gold で行った。キャピラリーは Beckman eCAP neutral coated capillary (有効長 30 cm、内径 50 μ m) を使用した。分析条件は、Beckman eCAP chiral kit adjustable pH buffer で調製した running buffer (pH 6.0) containing 80 mM hydroxypropyl- β -cyclodextrin を用い、field strength は 500 V/cm、温度 20℃で測定した。内部標準物質にフタル酸を用い、定量はピーク面積比較で行った。

FAB-MS は Shimadzu SCAP 1123 data system 及び Hewlett-Packard 7240A plotter printer を装着した Shimadzu 9020-DF gas chromatography-mass spectrometer で、グリセリンをマトリックスに用い、直接導入で測定した。

結果と考察

太陽光線被曝ラット組織抽出液中に、キャピラリー電気泳動で GS(CIE) の保持時間 9.14 分 [7] と同一の保持時間を示す物質を認めた。この物質は質量分析結果 [m/z 446 (MH⁺), 140, 95]、及び高圧ろ紙電気泳動でも GS(CIE) と確認された。

通常飼育ラットの各臓器では GS(CIE) が検出されないか、または測定限界以下 (トレース) であったが、太陽光線被曝ラットの組織では、腎臓 25.3 $\pm$ 6.8、肝臓 7.6 $\pm$ 3.4、背部皮膚 <3 nmol/g 組織湿重量、血液 <2 nmol/ml であった。

これらの結果は、GS(CIE) 生成が生体内で実際に起こっていること、また、その生成が太陽光線被曝によって著しく促進されることを示している。紫外線被曝は生体にとって酸化ストレスや活性酸素による様々なダメージの誘因となる。GSH は活性酸素のスカベンジャーとして作用する物質であり、 γ -glutamyltransferase によって分解されるが、この酵素に対する GS(CIE) の *in vitro* での阻害作用を、我々は既に報告している [8]。GS(CIE) 生成の生理学的意義は不詳であるが、紫外線被曝下で GS(CIE) が生成することによって、組織中 GSH 量が維持され、被曝で惹起する活性酸素によるダメージから生体を防御している可能性が示唆された。

謝辞：本研究は、文部省科学研究費補助金(基盤研究 C)により行われた。

文献

1. M. Kinuta, N. Masuoka, K. Yao, J. Ohta, S. Yoshida, S. Futani and T. Ubuka, *Biochem. J.*, 275 (1991) 617.
2. M. Kinuta, T. Ubuka, K. Yao, S. Futani, M. Fujiwara and Y. Kurozumi, *Biochem. J.*, 283 (1992) 39.
3. M. Kinuta, T. Ubuka, K. Yao, S. Yamada, K. Yukihiro and M. Tomozawa, *Biochim. Biophys. Acta* 1157 (1993) 192.
4. M. Kinuta, T. Ubuka, W.B. Yao, Y.Q. Zhao and H. Shimizu, *Biochem. J.*, 297 (1994) 475.
5. M. Kinuta, K. Sasaki, H. Shimizu and T. Ubuka, *Biochim. Biophys. Acta* 1291 (1996) 131.
6. M. Kinuta, H. Shimizu, N. Masuoka, J. Ohta, W.B. Yao and T. Ubuka, *Amino Acids* 13 (1997) 163.
7. M. Kinuta, H. Shimizu and T. Ubuka, *J. Chromatogr. A*, 802 (1998) 73.
8. H. Shimizu and M. Kinuta, *Biochim. Biophys. Acta*, 1425 (1998) 112.

L37

キャピラリー電気泳動による薬物の高速pKaスクリーニング法の開発

○石濱 泰、浅川直樹
エーザイ(株) 分析研究所

A High-Throughput pKa Screening Method in Drug Discovery using Capillary Electrophoresis

Yasushi Ishihama, Naoki Asakawa

Analytical Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Tsukuba, Ibaraki 300-2635

In drug discovery process, physico-chemical properties such as pKa, lipophilicity and solubility are important because these properties affect the bioactivity of the drug candidate. A high-throughput pKa screening method was developed using capillary electrophoresis. To shorten the analysis time, pressure was applied with voltage simultaneously. As a result, pKa values of more than 100 compounds could be measured in one day.

はじめに

近年、新薬開発ではコンビナトリアルケミストリーや巨大化合物ライブラリーの充実に伴い、候補化合物評価（薬効や体内動態）の High-Throughput Screening (HTS)化が進んでいる。脂溶性・溶解性などの物理化学的性質の評価においても種々の高速スクリーニング系が開発されつつあり、一日当たり 100 化合物程度の分析が可能となっている[1]。しかし、酸解離定数(pKa)については、微量試料量で高速な測定を行える適当な方法がなく、物性スクリーニング系の律速となっていた。

CE を用いた pKa 測定法は、滴定法などの従来法に比べ、高い濃度感度を有し、純度の影響も受けにくく、微量の試料で測定を行うことができる[2]。しかし内壁無処理のフューズドシリカキャピラリーを用いた場合、酸性域で電気浸透流がほとんど発生しなくなるため、測定時間が長くなり、分析時間の再現性を得ることが困難であった。内壁をイオン性高分子で被覆したキャピラリーを用いることでこうした問題は解決できるが[3]、それでも物性スクリーニング法の検体処理能力としては不十分であった。そこで我々は、空気圧を電圧と同時に印加することにより分析時間の短縮化を図り、高速 pKa スクリーニング法として CE 法を検討することとした。

実験

キャピラリー電気泳動装置は電圧と空気圧を同時に印加できる Beckman 社製 P/ACE MDQ System を用いた。キャピラリーは、内径 50 μm 、長さ 31 cm のフューズドシリカ管（内面無処理のもの、および SMIL コーティング[4]を施したもの）を用いた。検出には多波長検出器を用い、210・400 nm の吸収を測定した。試料溶液は 10 mM の薬物候補化合物を含むジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を水もしくは水・アセトニトリ

ル混液で 20 倍に希釈したもの（全量 100 μ L）を 96 well プレート上で調製し、そのまま CE 用試料プレートとして用いた。空気圧を除いた泳動条件および pKa 算出方法については文献[2]に従った。

結果と考察

一日処理能力 100 化合物で測定を行うには、空気圧の印加に伴う分離効率の低下の影響と装置の待機時間を最小限にする必要があった。空気圧と理論段数の関係を調べたところ、空気圧の上昇に伴って理論段数は低下した。分析時間とのバランスを考慮し、印加空気圧は 1~1.5 psi に設定した。また、多波長検出器を用いることにより、電気浸透流マーカーである DMSO と試料ピークを、UV 吸収波長の違いを利用して分離することも可能であった。

装置の待機時間を最小限にするため、ひとつの分析メソッドの中に 6 回分の分析ステップを組み入れることとした。得られたエレクトロフェログラムを Fig. 1 に示す。

ひとつの泳動溶液に対する分析時間は約 1.5 分で、その後、次の泳動溶液に詰め替え、試料を注入するというステップを繰り返した。一化合物当たりの全測定時間は約 15

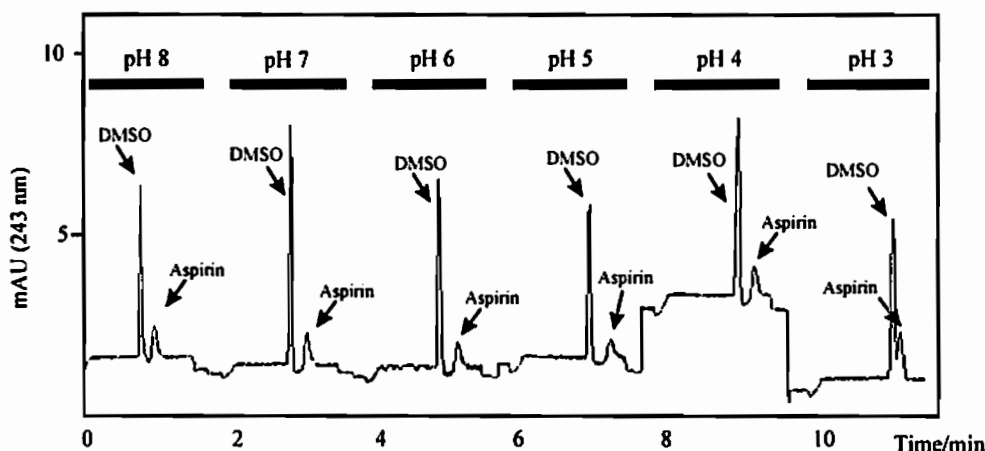


Fig. 1 pKa Determination of Aspirin using Pressurized CE.

分であり、目的処理能力を達成することができた。酸性薬物であるアスピリンについて、電気泳動移動度の pH 依存性から非線形最小二乗法を用いて得られた pKa 値は 3.43 であり、文献値(3.49)とほぼ一致した。本法の必要試料量は 50 nmol(10 mM DMSO 溶液で 5 μ L 相当)であり、薬物候補化合物の物性スクリーニング法として十分な性能を有していることがわかった。

本発表では、実際の薬物候補化合物群への適用例についても紹介する。

文献

1. Y. Fujita, *Gekkan Yakujii*, 42(2000)1917.
2. Y. Ishihama, Y. Oda, and N. Asakawa, *J. Pharm. Sci.*, 83(1994)1500.
3. H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *Anal. Sci.*, 14(1998)407.
4. H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *Anal. Chem.*, 70(1998)5272.

L38

統計学的手法によるオフロキサシン類縁物質一斉分離 CE 条件の迅速確立

○今野竹晃、山崎憲一

第一製薬株式会社 製薬技術研究所 分析技術センター

Rapid Development of Optimal Capillary Electrophoresis Conditions for Separation of Ofloxacin and its Analogs by Using an Experimental Design Approach

Takeaki Konno, Ken-ichi Yamazaki

Analytical Research Center, Chemical Technology Research Laboratories, Daiichi Pharmaceutical Co., LTD, 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan

A rapid method to determine optimal capillary electrophoresis (CE) condition for drug substances using an experimental design approach was developed. Ofloxacin drug substance and its analogs (OFLXs) were used as model drug substances. The procedure was as follows: (1) the pKa values of OFLXs were determined by the effective mobilities at various pHs. (2) Resolutions between peaks of OFLXs next to each other on the various CE conditions around the pKa values were estimated using the fractional factorial experiment (L_9 orthogonal array experiment). (3) The CE condition estimated in (2) was optimized using the full factorial experiment. Consequently the optimal CE condition for OFLXs was established. The advantage of this procedure leads us to the optimal CE condition by calculating statistically full data. This procedure will be applicable for other drug substance and its analogs.

はじめに

現在、主薬や不純物を分離する含量測定法は主に HPLC 法が用いられている。その一方、ICH では CE による試験法の公定書記載が検討されている。

今回、モデル化合物としてオフロキサシン及びその類縁物質 (OFLXs) を用い、CE による統計解析を利用した OFLXs の一斉分離条件の最適化条件の確立を目的とした。

実験

試料として、第一製薬 (株) 製 OFLXs 7 種 (OFLX、Des-Cl、Des-Me、9-Pz、N-Ox、Des-CO₂、FPA) を用いた。試料溶液はアセトン 3% を含む 0.01mol/L 水酸化ナトリウム試液に溶解し、各々約 0.5mg/mL とした。OFLXs 混合溶液は、0.05~0.2mg/mL を用いた。

分析装置として、フォトダイオードアレイ検出器付キャピラリー電気泳動装置は HP3D キャピラリー電気泳動システムを、キャピラリーは内面未処理溶融シリカキャピラリー 50 μ m $\times$ 41.5~48.5cm (有効長 33~40cm) を、解析装置は HEWLETT PACKARD Win NT 4.0 を用いた (何れも HEWLETT PACKARD 社製)。キャピラリーは約 25℃ で空冷し、システムへの試料導入は加圧法 (50mbar、2s)、印加電圧は 10~15kV で行った。

結果

Step 1: CE 法による pKa 測定^{1,2} (分離条件の予測)

CE 分離溶液は pH3~11 の緩衝液 (イオン強度 0.05) を用い、各 pH における実効移動度の関係から OFLXs の pKa を算出した。本結果から、pH 8 付近で OFLXs 一斉分離の可能性を見出した。ただし、ピーク形状及び分離の改善が必要と判断し、条件の最適化検討を実施することとした。

Step 2: 3水準系直交配列表実験 (変動要因の大きさの把握)

CE分離溶液はTable 1のリン酸塩緩衝液を用い、3水準系の L_9 直交配列表実験を実施し、統計解析で要因毎のOFLXs間の分離度を算出した。その結果、分離度はpHの影響を受けやすいと予想され、また、緩衝液濃度は高濃度側、カチオンはKイオン、印加電圧は10~12.5kVのとき、分離度の向上が予想された(Fig 1)。本検討から良好と推定された条件を精査した結果、CE分離溶液は30mMリン酸K緩衝液(pH8.0)、印加電圧は12.5kVが適当であると予想された($\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$)。

Table 1 Factors and Levels (1)

factors	level 1	level 2	level 3
α : pH	7.5	8.0	8.5
β : Buffer conc. (mM)	20	30	40
γ : Cation	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺
δ : Voltage (kV)	10	12.5	15

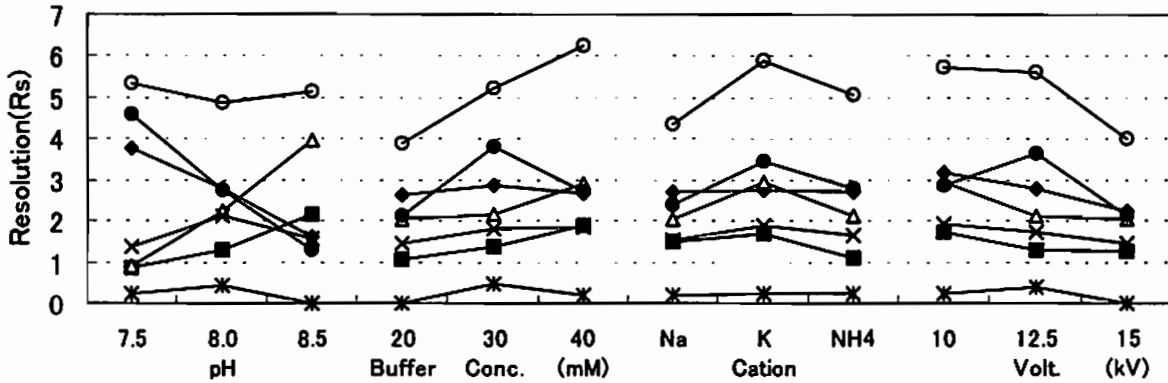


Fig.1 Estimated Resolution between OFLX

Alphabet: OFLX(A), Des-Cl(B), Des-Me(C), 9-Pz(D), N-Ox(E), F(FPA), Des-CO₂(G) and eof (acetone)
Symbols: E-F(○), D-E(●), G-eof(◆), C-A(△), A-B(×), eof-C(■) and B-D(*).

Step 3: 3水準二元配置実験 (分析条件の最適化)

分離良好と予想された条件 $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$ に従い、更に $\alpha_2\beta_2$ を最適化するため、3水準系の二元配置実験(Table 2)を実施した。各OFLXs間の分離度を算出後、pH-緩衝液濃度-分離度の三次元グラフを作成した。その結果、CE分離溶液が30mMリン酸K緩衝液(pH 8.1) ($\alpha_2\beta_2$)のとき、B-Dを除く全ての化合物のベースライン分離(分離度2.0以上)を達成した(Fig. 2)。なお、他条件もほぼ同等の分離を達成した。

Table 2 Factors and Levels (2)

factors	level 1	level 2	level 3
α_2 : pH	8.0	8.1	8.2
β_2 : Buffer conc. (mM)	27	30	33

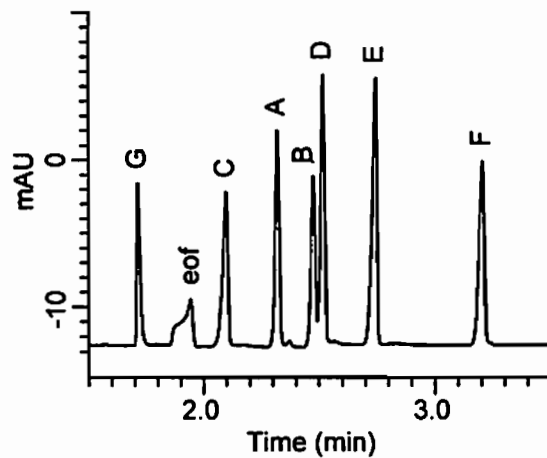


Fig.2 Electropherogram of OFLXs
(CE condition: $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$)

結語

モデル化合物としてOFLXsを用い、CEによる統計解析を利用したOFLXsの一斉分離条件の最適化条件を確立した。本手順の特長は、全ての取得データを用いた統計解析によって条件の最適化が可能な点である。今後、他の薬物へ応用展開していく予定である。

文献

1. Y. Ishihama et al., *J. Pharmaceu. Sci.*, 83 (1994) 1500-1507.
2. J. Barbosa et al., *J. Chromatogr. A*, 839 (1999) 183-192.

L39

覚せい剤関連化合物のHighly Sulfated Gamma Cyclodextrin を用いた光学分割キャピラリー電気泳動

○ 岩田祐子¹、Agnes Garcia²、金森達之¹、大前義仁¹、小林寛也³、
井上博之¹、岸 徹¹、Ira Lurie⁴

科警研¹、米国 DEA Southeast Lab.²、長野県警科捜研³、米国 DEA STRL⁴

Chiral Capillary Electrophoresis of Amphetamine and Analogs using Highly Sulfated Gamma Cyclodextrin

Yuko Iwata¹, Agnes Garcia², Tatsuyuki Kanamori¹, Yoshihito Ohmae¹, Kanya Kobayashi³, Hiroyuki Inoue¹, Tohru Kishi¹ and Ira Lurie⁴

¹National Research Institute of Police Science, Chiba 277-0882

²Southeast Laboratory, US Drug Enforcement Administration, Miami FL 33166, USA

³Research Institute of Scientific Criminal Investigation, Nagano Prefectural Police H.Q., Nagano 381-1232

⁴Special Testing and Research Laboratory, US Drug Enforcement Administration, McLean, VA 22102, USA

The simultaneous chiral separation of 11 amphetamine-like compounds by capillary electrophoresis was investigated. As a chiral selector, SU(XIII)- γ -CD (Highly Sulfated γ -Cyclodextrin, Beckman Coulter) was used.

d,l-Amphetamine, *d,l*-methamphetamine, *d,l*-dimethylamphetamine, *d,l*-norephedrine, *d,l*-ephedrine, *d,l*-norpseudoephedrine, *d,l*-pseudoephedrine, *d,l*-methylephedrine, *d,l*-methylenedioxyamphetamine, *d,l*-methylenedioxymethamphetamine and *d,l*-methylenedioxyethylamphetamine were separated under the conditions as follows: run buffer of 10 mM SU(XIII)- γ -CD with 50 mM phosphate background electrolyte at pH 2.6, applied voltage of -10.5 kV, capillary temperature of 15°C and detection wave length of 195 nm.

Seized *d*-methamphetamine hydrochloride samples dissolved in solvent at high concentration (20 mg/mL) were analyzed using this method. Trace precursor impurities such as *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine were determined. The results suggested that this method would be applicable to the impurity profiling analysis for characterization and classification of illicit methamphetamine samples.

はじめに

現在、覚せい剤関連化合物は、医薬品として用いられるもの、不正に使用されるものを含め多種類存在するが、それらの化合物は、光学活性の違いにより、薬理作用や規制

する法律が異なるものがある。また、光学活性は密造薬物の由来に関する重要な情報となる。

本研究では、Chiral selector として負電荷を多く有する Sulfated γ -CD (SU(XIII)- γ -CD)を用い、キャピラリー電気泳動により、覚せい剤関連化合物の光学異性体を同時に分離分析することを目的とした。さらに、本分析の法科学分野への応用について検討を行った。

実験

試料としては、11 種の覚せい剤関連化合物 (*dl*-amphetamine (AM)、*dl*-methamphetamine (MA)、*dl*-dimethylamphetamine (DMA)、*dl*-norephedrine (NE)、*dl*-ephedrine (E)、*dl*-norpseudoephedrine (NpE)、*dl*-pseudoephedrine (pE)、*dl*-methylephedrine (ME)、*dl*-methylenedioxyamphetamine (MDA)、*dl*-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)、*dl*-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)) の混合溶液を用いた。光学分割試薬としては、Highly Sulfated γ -Cyclodextrin (Beckman Coulter 社; (SU(XIII)- γ -CD))、 β -CD, Heptakis (2,6-di-*O*-methyl)- β -CD, 2-Hydroxypropyl- β -CD (Sigma-Aldrich 社) を、内部標準物質(IS)としては、(+)-Isoproterenol (+)-Bitartrate Salt (Sigma-Aldrich 社) を用いた。装置は Agilent Technologies 社製キャピラリー電気泳動装置を、キャピラリーは Polymicro Technologies 社製 Fused Silica Capillary Tubing (32 cm $\times$ 50 μ m i.d.) を用いた。検出波長は 195 nm である。

結果と考察

泳動液の組成、泳動方向などの条件を変え、分離の検討を行ったところ、10 mM SU(XIII)- γ -CD /50 mM リン酸緩衝液 (pH2.6) を泳動液とし、印加電圧-10.5 kV、キャピラリー温度 15 $^{\circ}$ C の条件で、22 ピーク全てが分離可能であった。

この条件を用い、押収覚せい剤 (*d*-MA) 資料中の不純物について分析を行ったところ、微量に含有されている *l*-E 及び *d*-pE の分析が可能であり、不純物プロファイリング分析に応用可能なことが示唆された。

L40

キラル充填剤を用いるキャピラリー電気クロマトグラフィーによる光学異性体の分離 (4)

○川村浩司、大塚浩二、寺部 茂
姫路工大・理

Enantiomer Separation by Capillary Electrochromatography Using Chiral Stationary Phases (4)

Koji Kawamura*, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

Enantiomer separation by capillary electrochromatography (CEC) using a packed capillary was investigated. Packing materials used were Daicel OD-type chiral packings (3 μm , 5 μm). By using acidic and basic aqueous acetonitrile solutions as mobile phases, several neutral and basic racemic compounds were optically resolved. The separation efficiency in the chiral CEC system was superior to that obtained in HPLC using chiral stationary phases. The plate heights obtained for several enantiomers were 5–7 μm and the reduced plate height of 1.5–2.2 with a 3 μm diameter particle.

【はじめに】近年、キャピラリー電気泳動 (CE) とマイクロ高速液体クロマトグラフィー (マイクロ HPLC) とを組み合わせた新しい分離手法であるキャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) が各方面から注目されている。CEC では従来の HPLC と比較して格段に高い理論段数が得られる可能性があり、高性能分離の実現が期待されている。

光学異性体の分析は薬学、生化学をはじめ各分野で重要な課題となっており、CE と同様 CEC でもその高性能微量分析という特徴を生かした応用として検討が行われており、我々はこれまでに粒径 5 μm のキラル充填剤を用いた CEC による光学異性体分離について報告してきた。[1, 2]。本研究では粒径 3 μm のキラル充填剤を用いて光学異性体分離を行い、その分離特性について検討した結果を報告する。

【実験】CEC 装置には HP^{3D}CE (Hewlett-Packard) を使用した。分離カラムには、OD タイプ充填剤 (粒径 3 μm , 5 μm ; ダイセル社製; Fig. 1) をフューズドシリカキャピラリー (全長 33 cm, 内径 100 μm , 有効長 24 cm) に充填したものをを用いた。充填には 2-プロパノールを分散溶媒に、アセトニトリルを加圧溶媒に用い、HPLC ポンプによって 480 bar に加圧して行った。充填剤を固定するためのフリットは、加圧溶媒を 1% NaCl 水溶液に置換した後、加圧下でキャピラリー外側を加熱し、充填剤自身を焼結させることにより作製した。試料注入は電氣的注入法で行い、キャピラリー両端のバイアルにそれぞれ圧力 (10 bar) をかけて測定を行った。

【結果および考察】試料として、ピンドロール、4-フェニル-2-ブタノール、ベンゾイン、PTH-DL-Met、ベンゾイン、インダパミドなど主として薬物成分のラセミ体を用い、光学分割を試みた。これまでの研究で、粒径 5 μm の充填剤を用いた場合、塩基性及び中性物質を中心に、エナンチオマー分離について HPLC よりも優れた性能が得られることが明らかとなっており、分離性能として換算段高さで 1.6~2.6 程度が得られている [1, 2]。そこで今回は粒径 3 μm の充填剤について同様の実験を行い、5 μm 充填剤との分離性能の比較、分離効率に対するカラム温度及び電気浸透流の影響、移動時間及び理論段数の再現性の検討を行った。その結果、3 μm 充填剤では 5 μm 充填剤以上の分離性能を得ることが可能となり、また良好な再現性が得られた。Fig. 2 にキラル分離の一例を示す。

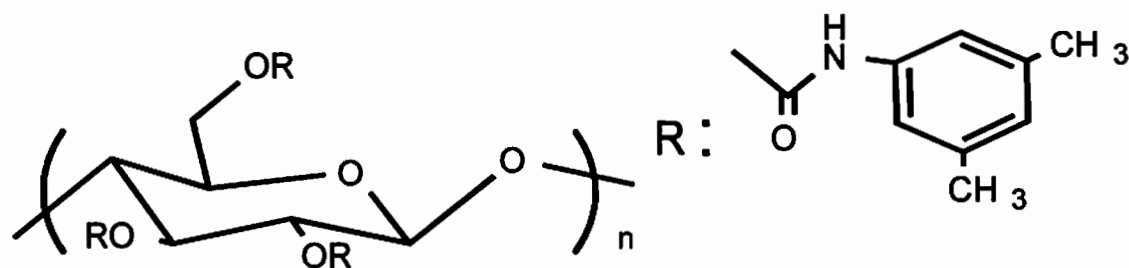


Fig. 1. Chemical structure of OD type chiral stationary phase.

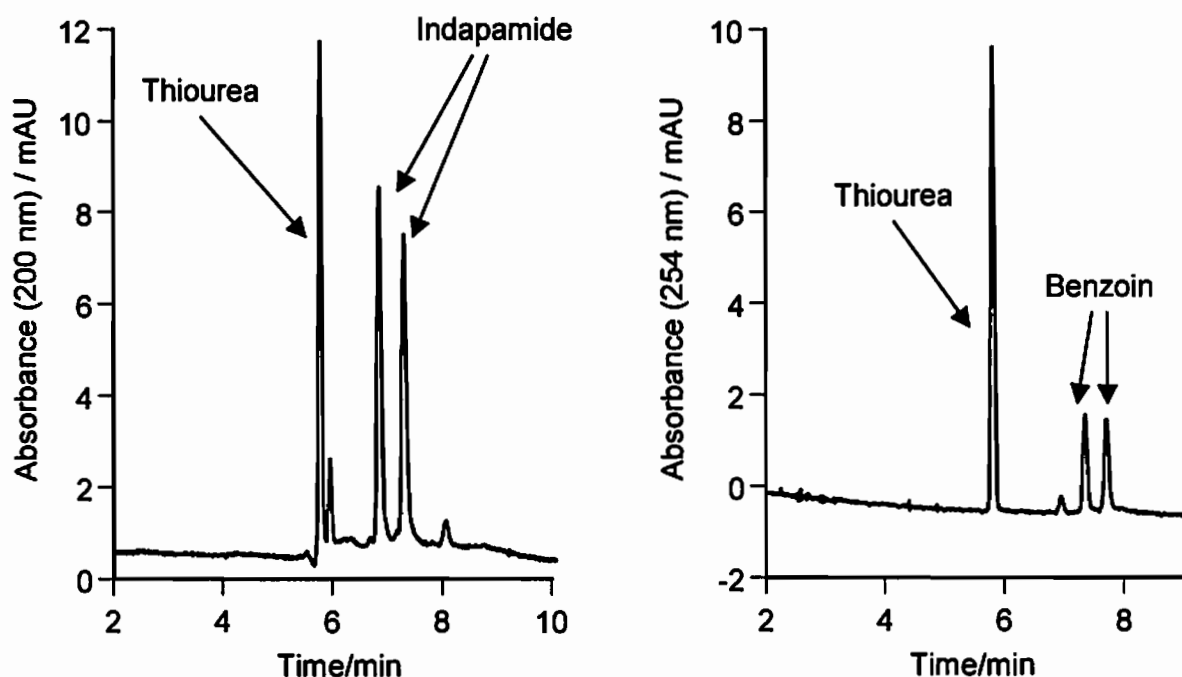


Fig. 2. Enantiomer separations of indapamide and benzoin by CEC with an OD type packing.

【文献】

1. K. Otsuka, C. Mikami, S. Terabe, Presented at the 2nd International Symposium on Capillary Electrochromatography, San Francisco, CA, USA, August 1998.
2. K. Otsuka, C. Mikami, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000) 457-463.

L41

多糖類をキラルセクターとしたキャピラリー電気泳動による 医薬品の光学異性体分離

○榎原由佳里, 西 博行

田辺製薬株式会社 製品技術研究所 分析化学研究部

Enantiomer Separation of Drugs by Capillary Electrophoresis Using Polysaccharides as Chiral Selectors

○Yukari Kuwahara and Hiroyuki Nishi

*Analytical Chemistry Department, Product Technology Development Laboratory,
Tanabe Seiyaku Co., Ltd., 16-89, Kashima 3-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8505 Japan*

Enantiomer separation by capillary electrophoresis (CE) has attracted considerable attention among analytical chemists as a promising new technique, especially in the fields of pharmaceutical, clinical, and agrochemical sciences. Capillary zone electrophoresis (CZE) is the most widely used for the enantiomer separation among several separation modes of CE, in which a chiral selector is added to the running buffer. Among various chiral selectors, polysaccharides are one of the most successfully employed chiral selectors in CZE. In this study, we investigated the capability of carboxymethyl (CM-) derivatives of polysaccharides such as CM-dextran, CM-amylose etc, as a CE chiral selector. As a result, CM-polysaccharides were found to be useful chiral selectors for the enantiomer separation of drugs.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は、高い分離性能を持ち、その特長を活かした応用として、光学異性体の分離分析に広く適用されている。これまで CE による光学異性体の分離分析では様々なキラルセクターが検討されてきたが、その中でもデキストリン、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ヘパリンなどの多糖類は優れた光学認識能を示すキラルセクターとして、その有用性が数多く報告されている [1-5]。今回は、新たな多糖類として、デキストラン及びデキストリンなどの中性多糖類にカルボキシメチル (CM) 基が導入されたものに着目し、医薬品を中心とした化合物の光学異性体分離における CE 用キラルセクターとしての有用性を検討した。その結果、CM 化多糖類はもとの中性多糖類と比較して、光学認識能が向上することが分かったので報告する。

実験

CE 装置は BECKMAN 社製、P/ACE 5510 system、キャピラリーはスベルコ社製のフューズドシリカ管 (内径 75 μ m, 有効長 40cm) を用いた。印加電圧は 15kV~25kV 一定とし、キャピラリーは冷却液を用いて 20℃ の一定温度に保った。検出波長は 220nm とした。また、

泳動液は 20mM リン酸塩緩衝液 (pH2.5) に 1 ~ 5 % 程度の CM 化多糖類 (CM・デキストラン, CM・アミロース, CM・セルロース) をキラルセクターとして添加し, 使用前に孔径 0.45 μm あるいは 5 μm のメンブランフィルターでろ過後, 超音波洗浄機 (Branson 3200) を用いて脱気し, 使用した. 光学異性体としては, 前報 [3] でのデキストリン及びデキストランを用いた検討で, どちらかの多糖類で光学認識された化合物, 塩酸ジルチアゼム, 塩酸トリメトキノール, 硝酸スルコナゾール, プリマキン, 臭化チメピジン, ベラパミルなどを中心とした塩基性薬物 12 種類を対象とした.

結果と考察

多糖類としてデキストランやデキストリンが有用であることは既に報告した [3]. その検討結果では, デキストリンのほうがデキストランよりも光学認識能に優れ, 3 ~ 6 % のデキストリンの添加により数多くの光学異性体の分離が達成された. その理由としては, α -1,4 結合で連なっているデキストリンがフレキシブルなコイル状構造をとり, その高次構造が光学異性体の識別に有効な場を提供したものと考えられた. 一方, α -1,6 結合であるデキストランでは, そのような高次構造をとれないため, その光学認識能が狭いものと判断された. 近年, 多数の多糖類誘導体が開発され, 手軽に利用できるようになったが, 今回はそれらの中で CM 化多糖類 (CM・デキストラン, CM・アミロース, CM・セルロース) について, そのもとの中性多糖類との光学認識能の比較検討を行った. 本検討では多糖類の平均分子量, また, その分子量分布, あるいは CM 基の導入率などが一定ではないので, 単純比較による考察は正確さを欠くが, 概略は以下の通りになった. CM・デキストリンでは粘度の関係で高濃度での実験は困難で, 1 % 濃度での検討を行った. その結果, 光学認識された化合物数はデキストリンより減少した. 一方, CM・デキストランでは 5 % 濃度までの泳動液の使用が可能であり, 分離された光学異性体数はデキストランより多くなった. とくにデキストリンでは良好に光学異性体分離され, デキストランでは困難であった, ジルチアゼム, プリマキンなどが分離されるなど, 上記 5 種類の多糖類, すなわち, デキストラン, デキストリン, CM・デキストラン, CM・アミロース (CM・デキストリン), CM・セルロースの中, また, 今回の実験条件下では, CM・デキストランが最も有用で, CM・セルロースも光学認識能が広いキラルセクターであることが分かった. そこで, CM・デキストランについて, 添加濃度 (1 ~ 5 %) 及び CM 化度 (0.5 と 0.9) の影響について検討を行った. 濃度ではその依存性が確認され, 高濃度ほど良好に分離された. CM 化度については 0.5 のものが 0.9 のものより多くの光学異性体を分離し, 微細な構造が光学認識に大きく影響していることが分かった.

文献

- [1] A. D'Hulst, N. Verbeke, *J.Chromatogr.A.*, **735**(1996)283-293.
- [2] A. M. Stalcup, N. M. Agyei, *Anal.Chem.*, **66**(1994)3054-3059.
- [3] H.Nishi, S.Izumoto, K.Nakamura, H.Nakai, T.Sato, *Chromatographia.*, **42**(1996)617-630.
- [4] H.Nishi, *J.Chromatogr.A.*, **792**(1997)327-347.(review)
- [5] R.M.C.Sutton, K.L.Sutton, A.M.Stalcup, *Electrophoresis*, **18**(1997)2297-2304.

L42

非水系を用いたパラキノンアニオンラジカルの電気泳動

○江坂幸宏、奥村典子、宇野文二、後藤正志
岐阜薬科大学

Non-aqueous Capillary Electrophoresis of para-Quinone Anion Radicals

Yukihiro Esaka*, Noriko Okumura, Bunji Uno, Masashi Goto

Gifu Pharmaceutical University

Electrophoretic detection of two kinds of *para*-quinone anion radicals arising from electrolysis of benzoquinone and chloranil was achieved by employment of an acetonitrile medium. Sufficient dehydration of a running solution was necessary for the detection of the benzoquinone anion radical. Oxygen in the running solution also caused serious decrease in the amount of the benzoquinone anion radical during electrophoresis. Addition of methanol as a hydrogen-donor decreased electrophoretic mobility of the benzoquinone anion radical significantly, while that of the chloranil anion radical was little changed. This result is interpreted in terms of hydrogen-bonding interaction between the *para*-quinone anion radicals and methanol reflecting the magnitude of their proton-accepting ability (benzoquinone anion radical > chloranil anion radical).

はじめに

近年、CE において非水系泳動液が利用できるようになってきた。非水系の泳動媒体を用いる利点の一つには、水溶液中では不安定な物質の分析が可能となることがある。この見地から我々は、ラジカルイオンをターゲットとした。反応中間体であるラジカルの多くは不安定である。ごく安定なスピニアダクト類を除いて、HPLC、CE 等の分離分析過程で生き残ることは容易でない。ただし、ラジカルの失活要因を分離媒体から除けば不可能ではない。ラジカルの分離検出、定量は、興味深い反応のメカニズム解明に有用な知見を与えるであろうし、その分離挙動が、ラジカルの物理的、化学的性質に関する重要な情報も与えることが期待できる。ここでは、ベンゾキノン (BQ) とクロラニル (CA) のパラキノンから電解生成した2種の有機アニオンラジカルを対象にアセトニトリル系CZEを用いた電気泳動検出を検討した。一般に水系環境下では、パラキノンアニオンラジカルは生成しない。また、分離媒体中の酸素は、アニオンラジカルを確実に失活させる。従って、嫌気性条件下、非水環境を用いた迅速分離が望まれる。

実験

試薬：BQ 及び CA はそれぞれ昇華、再結晶によって精製して用いた。アセトニトリル及びメタノール、テトラブチルアンモニウム過塩素酸塩(TBAP)は十分に脱水して用いた。電気泳動：キャピラリーは、DB-1 コーティングしたもの (J&W Science) を内径 0.05 mm、全長 (有効長) 50 cm (25 cm) で用いた。泳動液は窒素雰囲気下で調製し、通常、泳動前に 30 sec 窒素バブリー

ングを行った。浸透流がほとんど観察されないので、試料注入は陰極側から行った。泳動液には、25 mM TBAP アセトニトリル溶液を用い、電圧は-10 kVに設定し、電流は12 μ A程度であった。試料は注入直前に電解セルより採取した。電解：電解はバルク電解セル（容積100 mL）を用い、カーボン作用電極、銀塩化銀参照電極、白金対極の構成で行った。BQとCAの電解開始時の濃度は、それぞれ0.50 mMと0.48 mMに調製した。支持電解質としてのTBAPの濃度は10 mMとした。電解電位は前に測定したCVの半波電位より判断して、それぞれ-0.6 V及び0.0 Vに設定した。溶存酸素を除くために、窒素バブリングしながら電解を行った。

結果と考察

BQ、CA双方の電解溶液を試料に電気泳動を行ったところ、それぞれ320、420 nm及び320、450 nmにおける吸光検出で、陰イオン性成分の単一ピークが観測された。これらの検出波長は、それぞれのアニオンラジカルの特徴的極大吸収波長であり、検出成分がそのアニオンラジカルであることが強く示唆された。このベンゾキノンアニオンラジカル (BQ^-) とクロラニルアニオンラジカル (CA^-) の電気泳動移動度は、それぞれ0.046、0.040 $/\text{cm}^2\text{min}^{-1}\text{V}^{-1}$ と算出された。これはBQに比較して顕著なCAの嵩高さを考慮すると妥当な値である。

Fig.1に、A) 窒素雰囲気下 B) 酸素雰囲気下 C) 1%水共存下で行ったBQ $^-$ の泳動の様子を示した。泳動中におよそ80%のBQ $^-$ が酸素によって失活し、また1%の水が、BQ $^-$ のピークを完全に消失させた。この消失は、安定で電荷を持たないキンヒドロロン錯体の生成によるものと思われる。一方、CA $^-$ は、この条件下ではほとんど影響を受けなかった。CA $^-$ は、4つのクロル置換基が電子を引きつけるため、著しく安定化され、酸素による再酸化速度が遅くなる一方で、クロル基のかさ高さがキンヒドロロン錯体の形成を妨げるものと思われる。しかし一般に、アニオンラジカルのCE検出を行うためには、十分な脱酸素と脱水が必要と考えられる。

BQ $^-$ は、中性のBQに比較し、著しく水素アクセプター性が強いことが解っている。そこで、パラキノンアニオンラジカルの水素アクセプター性の差を泳動挙動のコントロールに利用することを検討した。方法は、水素ドナーとなるメタノールを添加し、各ラジカルの電位泳動移動度のメタノール濃度依存性を調べた。その結果、CA $^-$ に比較しBQ $^-$ の電気泳動移動度の著しい減少が見られた。これはメタノールとの水素結合錯体形成の強さに、各ラジカルの水素アクセプター性が明確に反映されたことを示している。

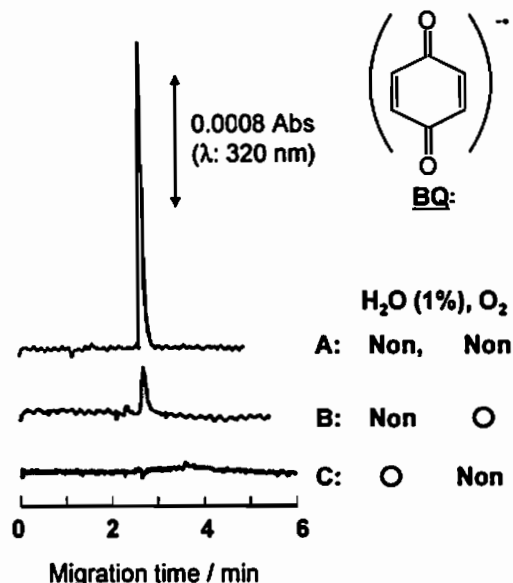


Fig. 1 CE Detection of BQ $^-$.

文献

1. Y. Esaka et al. *Anal. Sci.* (2001) in press.

L43

CZE における定量分析の再現性

○育田 夏樹、吉山 竜也、岡本 光、廣川 健
広島大学工学部

Reproducibility of quantitative analysis in CZE

Natsuki Ikuta, Tatsuya Yoshiyama, Hikaru Okamoto, Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University

We have developed some conversion methods from CZE electropherograms with migration time axis into that of effective mobility axis considering the temperature increase and relaxation of potential gradient (RPG) in the separation capillary. It has been demonstrated that the electropherograms with effective mobility axis was very useful for qualitative analysis. The peak position did not change in the converted electropherograms even if the hardware condition was changed. The reproducibility of peak position is important not only in the qualitative analysis but also in the quantitative analysis, since the change of migration time directly affects peak areas. Then we constructed a simple model describing the peak areas and developed the reproducible methods for the quantitative analysis.

はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)の最大の問題点は泳動時間の再現性がしばしば低下することである。その原因は主に浸透流 EOF の変化、ジュール熱によるキャピラリー内温度の上昇、電位勾配の緩和効果(RPG)である^{1,2)}。EOF や RPG の直接測定は可能であるが、キャピラリー内の温度上昇を直接測定することは困難である。そこで、我々はこれらの値を予測し、基準温度での実効移動度を求めることが可能な温度係数法(TC 法)および温度係数・遅延時間法(TCDT 法)を開発した^{2,3)}。さらに、泳動時間の再現性の低下は定性分析に影響を与えるだけでなく、ピーク面積にも影響するため定量分析の際にも問題となる。なぜなら、クロマトグラフィーや電気泳動など物質の流れを検出する分析法では、定量にはピーク面積を用いるため、検出器を横切るときの速度が定量に影響する。従って、前述のように泳動時間を変化させる原因、すなわち泳動速度を変化させるような原因が存在すると定量分析においても再現性が低下する。そこで、我々は泳動速度の変化がピーク面積に与える影響を定量化するための簡単なモデルを構築した。さらに、このモデルに基づき、再現性の高いピーク面積の算出法を開発した。本講演ではこの方法の詳しい説明と、実際の系に適用した例について詳しく議論する。

理論

検出器の直前まで目的の試料 i が泳動してきたと考える。このときのキャピラリー内における試料の濃度分布は(図 1 a に示すように)以下の式で与えられると仮定する。

$$f_i(x - v_i t) = \begin{cases} 0 & (x - v_i t > d/2, x - v_i t < -d/2) \\ C_i & (-d/2 \leq x - v_i t \leq d/2) \end{cases} \quad (6)$$

ここで、 x , v_i , t , d はそれぞれ、キャピラリー中の位置、試料 i の泳動速度、泳動時間、試料の幅である。このキャピラリー中の分布を測定したとき、絶対量 Q (単位は mol) は以下ようになる。

$$Q_i = C_i d S \quad (7)$$

ここで、 S はキャピラリーの断面積である。

速度補正法

試料が検出される間、キャピラリー内でのプロファイルが一定であると仮定する。有効長 l の位

置に検出器を固定したとき、ピーク先端と後端の検出時間 t_s, t_e は以下のように表される。

$$t_s = (l - 0.5d)/v_i \quad (8)$$

$$t_e = (l + 0.5d)/v_i \quad (9)$$

したがって、横軸を泳動時間としたときの面積 A_i (単位は $\text{mol} \cdot \text{s}$) は以下のように表される。

$$A_i = C_i d / v_i \quad (10)$$

得られた面積を使って絶対量 Q を表すと、

$$Q = A_i S v_i \quad (11)$$

となる。もし浸透流速度が測定ごとに違っていたと仮定すると、 A_i だけを使った定量分析では v_i の変化による誤差が生じる。従って、 A_i に速度を掛けた定量指標 I_i を用いると、便利である。

$$I_i = Q/S = A_i v_i = A_i l / t_i \quad (12)$$

また、この方法は電気泳動のみならず、クロマトグラフィーやフローインジェクションなど試料の流れを検出する分析法に応用することも可能である。また、正確な断面積が分かっているならば、式 11 を使って正確な絶対量を得ることができる。

移動度補正法(実効移動度計算法の定量分析への応用)

スタッキングを利用した分析の場合など電位勾配の緩和効果がある場合、検出器が一つしかない装置では v_i を正確に測定することが困難である。そこで、電位勾配の緩和効果や移動度の温度依存性を除去できる TCDT 法を用いることで、この問題が解決することを期待した。

ピーク先端が検出されたとき、ピークの中央は $l - 0.5d$ の位置にいる。従って、 t_s は以下のように表される。

$$t_s = \frac{l - 0.5d}{\{(1 + \alpha \Delta T) \overline{m}_{0,i} + m_{eof}\} E} = \frac{l}{\{(1 + \alpha \Delta T) m_s + m_{eof}\} E} \quad (12)$$

m_s について整理すると：

$$m_s = \frac{l}{1 + \alpha \Delta T} \cdot \left\{ \frac{(1 + \alpha \Delta T) \overline{m}_{0,i} + m_{eof}}{l - 0.5d} - m_{eof} \right\} \quad (13)$$

同様に、ピーク中央後端の泳動時間における移動度 m_e は以下のように表される。

$$m_e = \frac{l}{1 + \alpha \Delta T} \cdot \left\{ \frac{(1 + \alpha \Delta T) \overline{m}_{0,i} + m_{eof}}{l + 0.5d} - m_{eof} \right\} \quad (14)$$

従って、横軸を移動度にしたときに得られる面積 A_{mob} は

$$A_{mob} = \frac{(1 + \alpha \Delta T) \overline{m}_{0,i} + m_{eof}}{(1 + \alpha \Delta T)} \cdot \frac{ld}{l^2 - 0.25d^2} \cdot C_i \quad (15)$$

一般にゾーン電気泳動では $l \gg d$ であるので $0.25d^2$ を無視して

$$A_{mob} = \frac{(1 + \alpha \Delta T) \overline{m}_{0,i} + m_{eof}}{(1 + \alpha \Delta T)} \cdot \frac{d}{l} \cdot C_i \quad (16)$$

A_{mob} を用いて全量 Q を表すと

$$Q = \frac{(1 + \alpha \Delta T) IS}{(1 + \alpha \Delta T) \overline{m}_{0,i} + m_{eof}} \cdot A_{mob} \quad (17)$$

となる。

参考文献

- 1) N. Ikuta, H. Sakamoto, Y. Yamada, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A*, 838(1999) 19-29
- 2) N. Ikuta, Y. Yamada, T. Yoshiyama, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A* 894(2000), 11-17
- 3) 育田 夏樹、廣川 健、特願 2000-185276

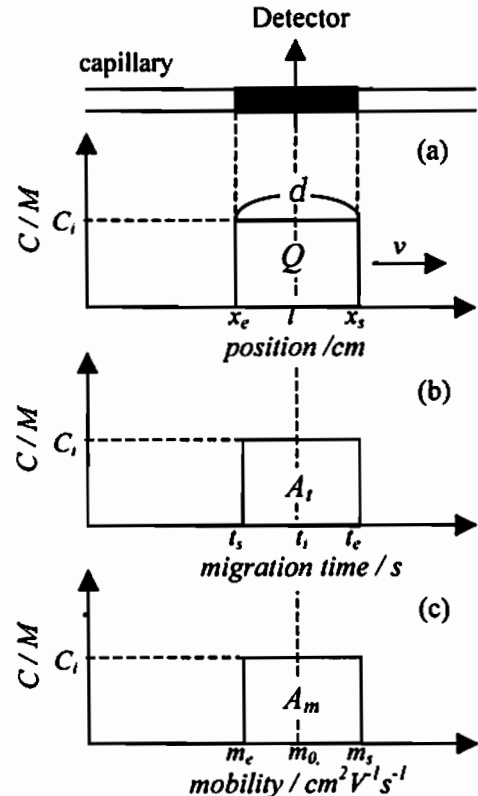


図 1、キャピラリー中の試料の分布モデル
(a)~(c)はそれぞれ横軸をキャピラリー中の位置、泳動時間、移動度としたときの濃度分布。試料が検出される間、拡散や濃縮が起こらないと仮定する。

L44

キャピラリー電気泳動における S/N の向上 —スリット幅の最適化

○ 北岸恵子、佐藤康博
大塚電子株式会社

Improvement of S/N ratio in capillary electrophoresis · Optimization of aperture width

Keiko Kitagishi, Yasuhiro Sato
Otsuka Electronics Co.

We attempted to elucidate both signal and noise of the capillary cell theoretically, and to optimize the signal-to-noise (S/N) ratio for the absorbance detection with a photodiode array, a photodiode, a photomultiplier, or a charge-coupled device. The relative S/N ratio could be estimated dependent upon the apparent beam width. This theory will be a tool to optimize the aperture width without the process of trial and error.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は、内径 $100\mu\text{m}$ 以下の中空キャピラリーを使用する。キャピラリーはセル断面が円形であるので、キャピラリー軸に垂直な断面を考えた場合、キャピラリー軸に垂直な光がキャピラリー中心を通る場合のみ、光路長が内径と等しくなる。ただし、そのような光は無限小の点で照射されることになり、光量がないので実際は検出できない。吸光度検出においては、検出に必要な光量をスリットなどのアパーチャーで制限して、回り込み光を含む、単純には光路長を定義できない光束を検出することになる。

エレクトロフェログラムの S/N の向上には、ノイズ (N) 低減、あるいはシグナル (S) 増大のいずれかが必要である。シグナル増大のためには、光路長が長い、つまりより細い光束でキャピラリー中心を通過するのが望ましい。ノイズ低減のためには、光量が多い、つまりより太い光束で測定するのがよい。光束の幅については、シグナル増大とノイズ低減で、相反する方向が望ましいということである。本研究では、光束がノイズとシグナルの両面に及ぼす影響を評価し、S/N をより高くするためのアパーチャーの最適化を理論的に行う方法を検討した。

2. 光束の制御による S/N 最適化

すべての光が図 1 のような均一な平行光路であると仮定し、平均観測幅 (光量に比例) が $2x$ の場合の平均光路長 L を求める。

$$x < r \text{ のとき、} L = r(\theta / \sin \theta + \cos \theta) \quad (\text{ただし、} x = r \sin \theta) \quad (1)$$

$$x \geq r \text{ のとき、} L = \pi r^2 / 2x \quad (2)$$

実際には、このような平行光路ではなく、キャピラリー内の液をまったく通らない回り

込みの光、キャピラリー軸に垂直でない光があり、光が強度分布を有する場合もある。それらの光を総合して、モル吸光係数 ϵ が既知の物質の濃度 c の水溶液をキャピラリー内に充填し、溶媒のときとの吸収差、 ΔA を求め、 $\Delta A = \epsilon cL$ から見かけの平均光路長 L を計算する。見かけの平均光路長 L はある光学系でのシグナル強度 S を決定する。平均観測幅 $2x$ が大きくなるにつれて L 、すなわち相対シグナル強度は小さくなる。

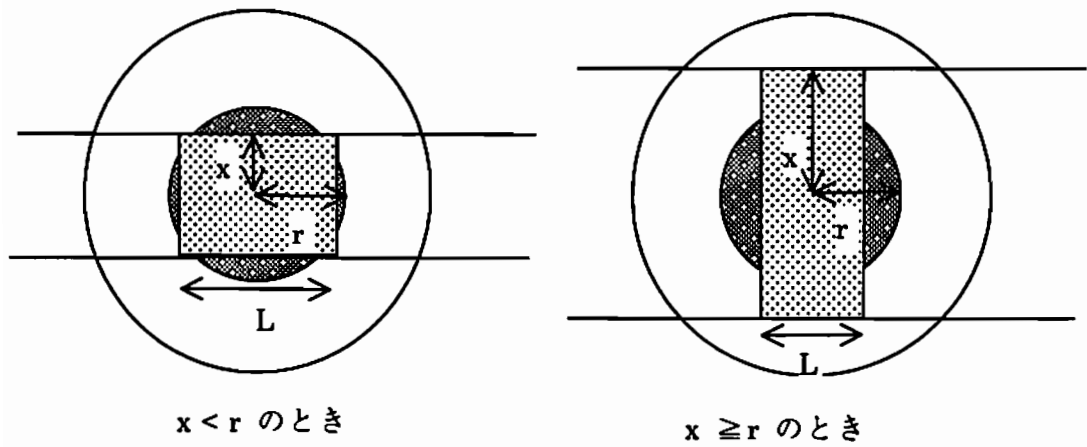


図 1. 平均観測幅 $2x$ 、平均光路長 L (キャピラリー内径: r)

光電子増倍管 (PMT)、フォトダイオードアレイ (PDA) のような積算型検出器では、ノイズ (N) は積算回数の平方根の逆数に比例する。

$$N \propto 1 / (n^{0.5}) \tag{3}$$

一定時間での積算回数は露光時間の逆数に比例する。露光時間は光量によって決まるため、一般的に積算回数は光量に比例する。キャピラリーでの光量は、吸光度が小さい場合には平均観測幅 $2x$ に比例して、

$$N \propto 1 / \{(2x)^{0.5}\} \tag{4}$$

(1) 式と (2) 式より平均観測幅 $2x$ に対する平均光路長 L (相対シグナル値に相当) を計算し、(4) 式から相対ノイズ値が求められるので、平均観測幅に対する相対 S/N 値が計算される。それを図 2 に示した。グラフから、 S/N 値について、最適な平均観測幅が存在することがわかる。

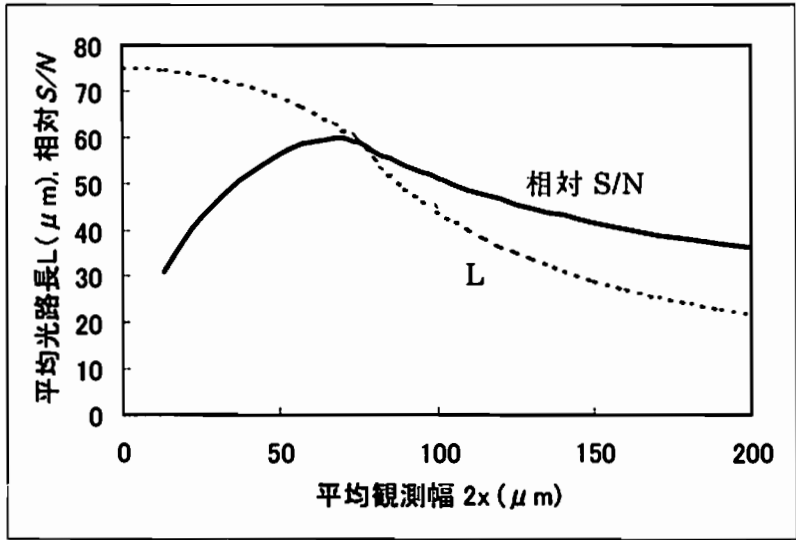


図 2. 内径 $75 \mu m$ のキャピラリーでの平均観測幅に対する平均光路長、および相対 S/N 値

L45

一時的等速電気泳動を利用したキャピラリーゾーン 電気泳動法による環境水中の亜硝酸及び硝酸イオン の定量：複数のターミナルイオンの直接導入

○石尾暢宏¹, 宮道 隆², 西尾秀明¹, 道場加奈子¹, 福土恵一¹,
齊藤恵逸², 竹田さほり³, 脇田慎一³

¹神戸商船大・船貨輸送研, ²神戸大・発達科学, ³大工研

Capillary zone electrophoresis with on-line transient isotachopheresis for the determination of nitrite and nitrate in environmental waters: direct injection for a couple of terminating ions

Nobuhiro Ishio¹, Takashi Miyado², Hideaki Nishio¹, Kanako Michiba¹, Keiichi Fukushi¹, Keiitsu Saito², Sahori Takeda³, Shin-ichi Wakida³

¹Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine,

²Faculty of Human Development, Kobe University,

³Osaka National Research Institute, AIST

We describe a novel transient isotachopheresis (TITP) in capillary zone electrophoresis (CZE) for the on-line concentration of nitrite and nitrate in environmental waters including seawater. The following conditions were examined using artificial seawater as the background electrolyte: the combination of selected ions as the terminating ion, the injection procedure of the terminating ions and the sample volume injected into the capillary. In order to obtain the maximum effect of the TITP, it was important to inject the maximum amount of terminating ion in which nitrate was completely separated from the terminating ion. We found that formate was effective as the terminating ion as well as sulfate. The mixture of 0.1 mg/l concentration of nitrite and nitrate could be injected into the capillary electrophoresis apparatus for 3 s. Further investigations are in progress to examine the optimum combination of selected terminating ions, as well as the injection procedure into the capillary.

はじめに

人為的に水圏に放出される栄養塩類が富栄養化の原因となり、赤潮などの問題を引き起こしていることはよく知られている。そこで、環境水中の栄養塩類を定量することが重要となってくるが、特に海水については既存の方法での定量は極めて困難である。我々は、人工海水を泳動バッファに用いることにより、環境水中の亜硝酸、硝酸イオンをキャピラリーゾーン電気泳動法によって簡便に定量することが可能であることを実証してきた¹。またこのとき、一時的等速電気泳動状態を利用すると高感度化に有効であること

を見出し、既に報告している²。さらに、希釈したサンプル溶液を大量に注入し、電場の差を利用したスタッキング効果を併用する方法では、2種類のターミナルイオンを同時に用いる方が1種類の時よりもより効果的であった³。しかし、亜硝酸イオンに関しては、更なる高感度化が望まれるため、今回は、これまでに高感度化に有効であることを確認してきた様々な手法について再検討し、これらを組み合わせることで最適方法を提唱することを目的として研究を行った。

実験

実験は、パーキンエルマー社製 Model 270A 及び Model 270A-HT を使用した。UV 検出器の波長は 210 nm とした。サンプル溶液を希釈しない場合は、内径 75 μm , 全長 72 cm, 有効長 50 cm の溶融シリカ管を用い、泳動電圧は -6 kV とした。希釈した場合は、内径 75 μm , 全長 97 cm, 有効長 75 cm の溶融シリカ管を用い泳動電圧は -11 kV とした。泳動液は、電気浸透流を反転させるため 3 mM のセチルトリメチルアンモニウムクロリドを含んだ人工海水を用いた。これまでは、濃度と注入量を一定にして高感度化に有効なターミナルイオンの種類を調べてきたが、今回は測定対象のイオンとターミナルイオンのピーク間距離がベースライン分離可能な限界まで注入量を増やして高感度化の再検討を行った。また、その結果を基に2種類のターミナルイオンの組み合わせについても再検討を行うことにした。前回までの実験で、一時的等速電気泳動状態を利用すると数倍の感度上昇が得られたことから、今回は標準サンプル溶液の亜硝酸、硝酸イオン濃度を 1/10 に下げ、各々 0.1 $\mu\text{g/l}$ として検討することが可能となったため、試料注入量についても再度検討を行った。

結果と考察

ターミナルイオンの注入量を変化させながら高感度化に有効なターミナルイオンの種類を検討したところ、測定対象イオンとターミナルイオンのピーク間距離がベースライン分離可能な限界まで接近していることが高感度化には重要であることが分かった。そこで、ターミナルイオンを限界まで注入して検討を行った。現在までの結果ではギ酸イオンや硫酸イオン等が非常に効果的であるが、2種類のターミナルイオンの組み合わせを含め、詳細を引き続き検討中である。試料溶液を希釈しない方法では、亜硝酸、硝酸イオン濃度がそれぞれ 1.0 mg/l の標準試料の場合には、試料注入量は 2 s が限界であったが、0.1 mg/l の標準試料では 3 s 注入することが可能であった。

1. K. Fukushi, N. Ishio, H. Urayama, S. Takeda, S. Wakida and K. Hiroy, *Electrophoresis*, **21** (2000) 388.
2. K. Fukushi, N. Ishio, T. Miyado, K. Saito, S. Takeda, S. Wakida and K. Hiroy, *Proceedings of the Third Biennial International Conference on Monitoring and Measurement of the Environment*, Ottawa, Canada, May 8 (2000) 125.
3. 宮道 隆, 西尾秀昭, 石尾暢宏, 福土恵一, 齊藤恵逸, 竹田さほり, 脇田慎一, 日色和夫, 日本分析化学会第 49 年会講演要旨集 (2000) 177.

P101

マイクロチップ電気泳動におけるオンライン試料濃縮

○世良洋一、松原則男、大塚浩二、寺部 茂

姫路工大・理

On-line Sample Concentration in Microchip Electrophoresis

Yoichi Sera*, Norio Matsubara, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

On-line sample concentration in microchip electrophoresis was investigated using sweeping as a concentration technique. Almost a 100-fold improvement in detection sensitivity was gained for He-Ne laser induced fluorescence detection. Optimization of the distance between the injection cross and the detection point is essential to achieve the maximum concentration efficiency.

1. はじめに

近年、分析に関する一連の作業をまとめ小型化された分析装置 μ -TAS (μ -total analytical system) が注目されている。マイクロチップ電気泳動ではキャピラリー電気泳動 (CE) では困難な回路の合流や分岐が容易に行えるので、プレカラム誘導体化等が可能となり、 μ -TAS への応用が期待されている。一方、通常の CE と同様にマイクロチップ電気泳動においても検出感度の向上は重要な課題である。本研究ではミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) におけるオンライン試料濃縮法であるスウィーピング (sweeping) をマイクロチップ電気泳動に適用し、検出感度向上の可能性について検討した結果を報告する。

2. 実験

マイクロチップには石英製のもの (島津製作所) を用い、蛍光顕微鏡のステージ上に設置した。MEKC 分離溶液は pH 8.7 の 50 mM ホウ酸塩緩衝液に硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を 20 mM の濃度に溶解し、メタノールを 10 % (v/v) 添加して調製した。試料には Rhodamine B, Sulforhodamine B, Cresyl fast violet を用い、これらを分離溶液または電気伝導度を分離溶液と等しくした SDS を含まない緩衝液に溶解した。検出は He-Ne レーザー (励起波長 543.5 nm, 検出波長 610 nm) で行った。

3. 結果と考察

Fig. 1 (A) には試料溶媒に分離溶液と同じものを用いた場合 (通常の MEKC) の分離を、(B) には試料溶液に SDS を含まないホウ酸塩緩衝液 (電気伝導度を分離溶液とほぼ等しくしたもの) を用いた場合の分離 (sweeping-MEKC) を示す。(A) に比べ (B) では、sweeping

によって 100 倍以上の検出感度の向上が確認された。濃縮と分離の様子を検出位置を段階的に変化させて観測した結果を Fig. 2 に示す。その結果、濃縮完了後にはピークの広がりや早くピーク高さが著しく減少していることが分かった。濃縮と分離とを同時に行うためには分離チャンネル長の最適化が重要な課題となる。

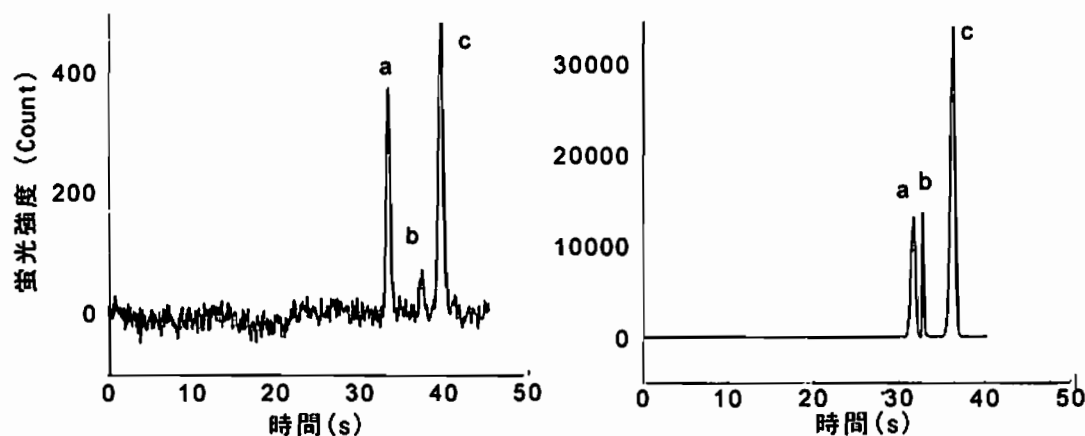


Fig. 1. 通常の MEKC 分離 (A) と sweeping-MEKC 分離 (B).
試料: (a) Sulforhodamine B (10 nM), (b) Cresyl fast violet (100 nM), (c) Rhodamine B (10 nM).

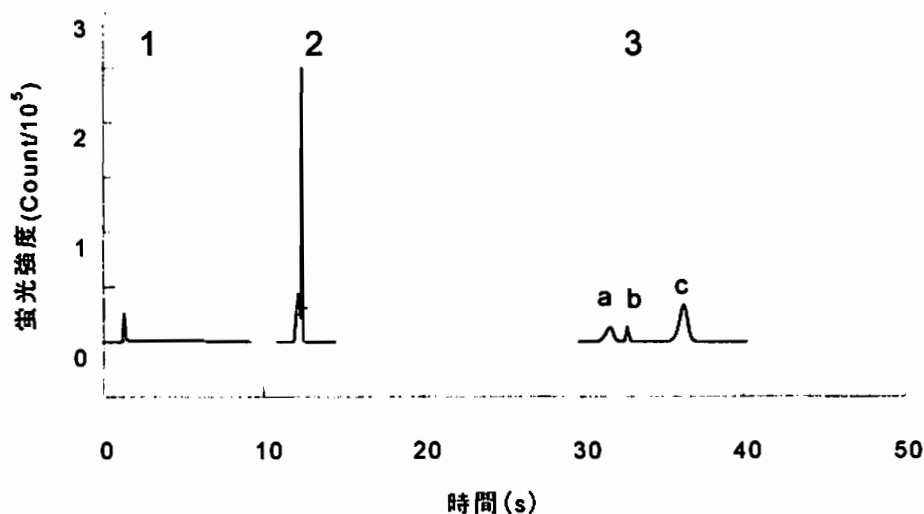


Fig. 2. Sweeping で濃縮したときの検出位置を段階的に変化させた結果。
条件は Fig. 1 と同じ。(1) 検出位置 1.4 mm, (2) 検出位置 11.4 mm, (3) 検出位置 29.4 mm.

4. 謝 辞

マイクロチップを提供していただいた島津製作所、及び助言をいただいた Joselito P. Quirino 博士 (Stanford Univ.) に感謝致します。

P102

レーザー光熱変換効果によるマイクロチャネル内の超高速化学反応制御

○Maxim Slyadnev¹、田中有希²、渡慶次学¹、北森武彦^{1,2}

KAST・インテグレートド・ケミストリープロジェクト¹、東大院・工²

Ultrafast Reaction Control in a Microchannel by Laser-Induced Photothermal Effect

¹Integrated Chemistry Project, Kanagawa Academy of Science and Technology, Kanagawa 213-0012

²Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656

Temperature control of an aqueous media inside a microchannel was performed using the infrared laser-induced photothermal effect. Using the fluorescence intensity quenching technique, ultrafast temperature pulses were observed in response on IR laser irradiation with duration of 8 ms. Spatial temperature distribution inside the microchannel was measured and fast heat removal was observed. Fast temperature rise and fall rates were attributed to the small heat capacity of the heated volume. Non-contact photothermal heating was applied to the control of enzyme-catalyzed reaction on a chip and 0.6 s reaction control was demonstrated.

Introduction: In order to integrate all variety of chemical systems including analytical and synthetic chemical reactions on a chip it is necessary to provide temperature control of reaction media. Temperature ramp rates is required to be fast for polymerase chain reaction (PCR) to reduce total analysis time and avoid false responses, as well as for organic synthetic reactions to decrease side-products yield. High heat capacity of electrothermal heaters based on Joule heating restricts these rates. To overcome this limitation we introduced non-contact heating by photothermal effect [1]. Small heat capacity of the heated volume inside microchannel and high heat conductivity of the glass chip is expected to provide large temperature rise and fall rates. The goal of present work is to rapidly control the temperature of the reaction media on microchip using infrared (IR) laser radiation.

Experiment: A glass microchip, with microchannels of 250 μm wide and 100 μm deep, was prepared by laser fabrication technique. The microchip was placed on the top of a Peltier stage, which maintained steady-state temperature of the chip. Equilibrated temperature of the bulk microchip was monitored by a thermocouple placed in contact with the top of the chip. Exact correlation between feedback controller of the Peltier stage (bottom of the chip) and the thermocouple (top of the chip) was maintained in the temperature range investigated (10–80 $^{\circ}\text{C}$).

An infrared diode laser ($\lambda=1470$ nm, 150 mW) was focused on the top of the channel for heating. A mechanical shutter was used for chopping of laser radiation. Temperature of the water inside microchannel was determined by quenching of the fluorescence intensity of Rhodamine-3B (Rh-3B) solution ($\lambda_{\text{ex}}=514$ nm, $\lambda_{\text{em}}=595$ nm). Fluorescence microscopy images of the microchannel were recorded by a CCD camera and were used in order to obtain spatially-resolved temperature profiles.

Fig. 1 shows a set-up for photothermal control of reaction. A product of the chromogenic horseradish peroxidase (HRP) catalyzed reaction between 4-aminoantipyrine (4-AAP) and aniline derivative (TOOS) with hydrogen peroxide was detected in the microchip downstream heating point using thermal lens microscopy (TLM).

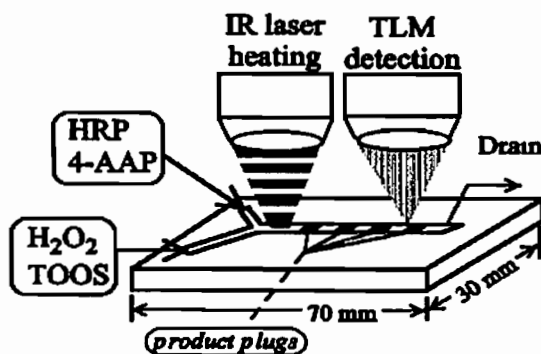
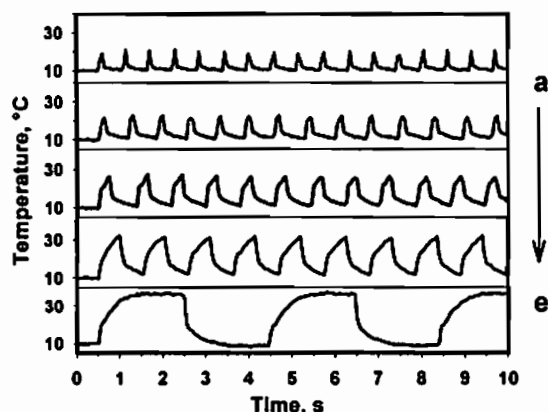


Fig.1 Schematic of the system setup.

Results and Discussion: Temperature dynamics and spatial distribution characteristics were obtained by monitoring fluorescence intensity of Rh-3B. Fluorescence intensity decreased with increase of the solution temperature (~5 fold for the interval 10 – 80 °C). Fig.2 shows dynamics of temperature change in the channel at the middle of IR laser spot for different irradiation times. Temperature ramp rates to the equilibrium state were determined as 36 °C/s for heating and 26 °C/s for cooling, with the time constant being 250 ms. Ultrafast temperature pulses were observed in response on the IR laser irradiation with duration of 8 ms. Cooling was achieved without any external means, only by heat dissipation to the bulk of the microchip. This is attributed to the large surface area of the channel walls and high heat conductivity of



the glass, which facilitates heat removal.

Fig.2 Temperature profiles for different irradiation periods: a – 67ms, b – 125 ms, c – 250 ms, d – 500 ms, e – 2 s.

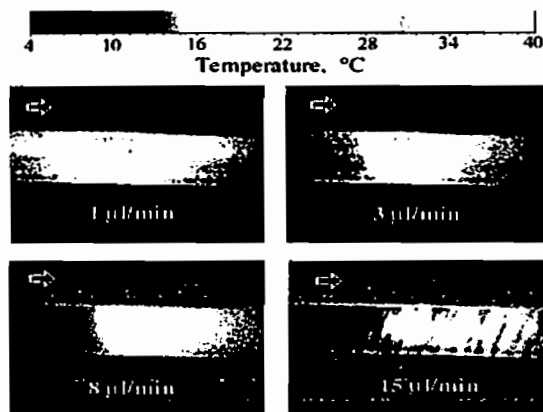


Fig.3 Temperature distribution inside micro-channel. Each image size is 1000x750 µm (WxH). Arrows indicate flow direction.

2-Dimensional distribution of the temperature in the microchannel upon IR irradiation, shown in Fig.3 for different flow rates of the solution, indicates heated volume size and how heat is dissipated to the channel walls. A top 50% increase in the temperature is occurred in the solution volume of 8 nl, as determined from the size of the heated zone on Fig.3. For the rate up to 3 µl/min heated volume remains almost unperturbed and its size is defined by thermal diffusion.

A laser-light effect on the reaction rate in the microchip was investigated. Fig.4 shows time-profiles of the product generated during periodic switching of the IR laser. The period of the detected signal correlated well with the cycle of the ON-OFF of the heating laser as was confirmed by Fourier transform of TLM signal and subsecond characteristic time was clearly demonstrated. These times are resulted from small heat capacity (~5 · 10⁻⁵ J/K) of heated volume. To our best knowledge, this is the fastest temperature reaction control, which is faster than could possibly be achieved by electrothermal contact heaters due to their much larger (~10⁴ times) heat capacity.

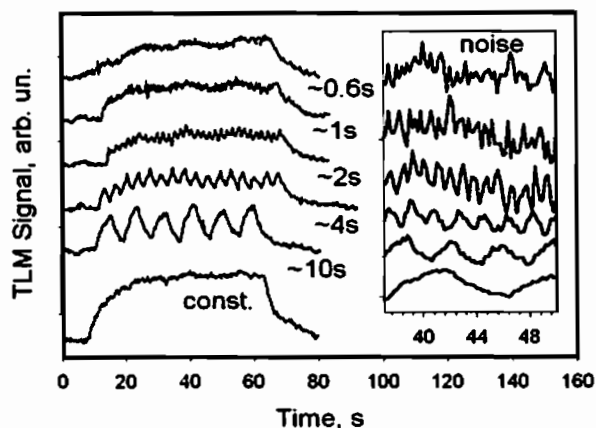


Fig.4 Temperature control of reaction on a microchip for different irradiation periods.

More powerful IR laser (~500 mW) is capable of higher temperature change that allows one to reach 95 °C, required for PCR reaction. Thus, time for total PCR reaction would be significantly shorter compared to electrothermal heating devices. Experiments to perform such a reaction is under investigation in our project.

Reference

- 1) Y.Tanaka, M.N.Slyadnev, A.Hibara, M.Tokeshi, T.Kitamori, *J.Chromatogr. A*, 894 (2000) 45.

P103

マイクロチップ型電気泳動によるDNA解析

○ 渥美 彩^{1,2}、馬場嘉信^{1,2}
徳島大・薬¹、科技団CREST²

DNA Analysis by Microfabricated CE Chip Aya Atsumi^{1,2}, Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

Microfabricated CE chip was realized by microfabrication technology and allowed high-speed DNA analysis, reproducible DNA sizing and quantitation. We succeeded to analyze DNA fragments from 100 to 1000 bases within 75 seconds. Besides, for ultra fast separation of DNA fragments and increasing accuracy of DNA sizing and quantitation, we tried to optimize the separation conditions, especially polymer matrix.

はじめに

ゲノムシーケンシング終了後の、ゲノム機能解析、ゲノム多型解析、プロテオーム解析などにおいて重要な役割を果たすものと期待される、マイクロチップ・ナノチップテクノロジーによるDNA解析技術の開発が進んでいる。その中で、高速化を目指した分離装置、マイクロCEチップが誕生した。これによる、DNAのサイズ決定とその定量の再現性について検証した。また、1000塩基までのDNAの分離についての高速・高精度化にも取り組んだ。

実験

実験には、マイクロチップ型電気泳動装置である Agilent 2100 Bioanalyzer (DNA 7500, DNA 12000 kit) および HITACHI コスモアイ (i-チップ) を使用した。試料をチップ上のウエルに加え、電気泳動法で分離後、レーザー蛍光にて検出を行った。データは全てコンピュータに取り込まれ、2種類のマーカーによってDNAのサイズ決定をし、面積値からDNAを定量する。サンプルとして、λファージDNAおよび各種DNA Ladderを用いた。

結果と考察

キャピラリー電気泳動によるDNAの解析時間をさらに短縮し、1000塩基までのDNAフラグメントを、わずか75秒以内に分離・検出するという高速解析に成功した。

Fig.1は、AgilentのDNA 7500 Kitを用い、12 well 全てにPCR productである500bp λ DNAフラグメントを泳動させた結果である。sizingに関しては、相対標準偏差 0.554 %、

濃度に関しては 5.26 %となり、どちらも再現性に優れていることがわかった。また、Sizing Error は、+1.05 %となり、精度に関してもかなりよい結果を得ることができた。

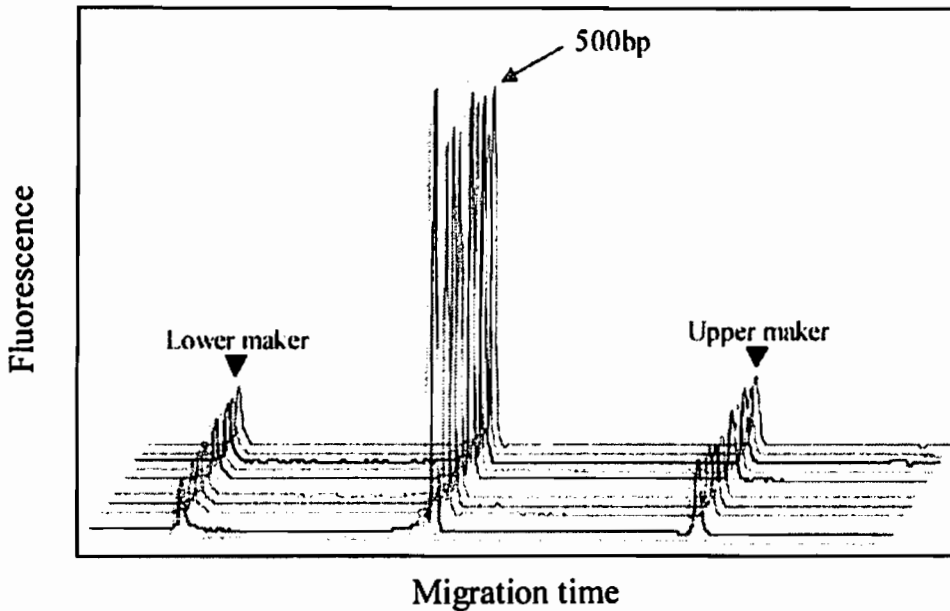


Fig.1 PCR amplified 500bp fragment (λ DNA)

また、希釈率の異なる同一試料を用いた場合、希釈率と DNA 量の間には比例関係が成立することが認められた。この定量機能によって、微量の試料からもとの試料に含まれる DNA 量を推定することが可能になる。

さらに、DNA フラグメントの分離の高速化、高精度化を図るために、泳動条件の中で、特にゲル中のポリマーを中心に比較検討し、泳動の最適化を行った。

謝辞

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の援助を得て行った。

参考文献

1. 馬場嘉信, 実験医学『ゲノム医科学とこれからのゲノム医療』, 2000, 18(12), 1595-1601.
2. Y. Baba, *Integrated Microfabricated Device Technologies: Advances in Genomic, Drug Discovery, and Clinical Diagnostic Applications*, M.H. Heller and A. Guttman (Editors), Marcel Dekker Publisher, 2001
3. Y. Baba, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, in press.
4. 馬場嘉信, *BioIndustry*, 2000, 17(8), 5-12.
5. 馬場嘉信, *Jpn. J. Electrophoresis*, 2000, 44, 85-89.
6. 馬場嘉信, *ぶんせき*, 2000(10)

P104

キャピラリーPCRによる高速遺伝子増幅

○島岡由香利^{1,2}、馬場嘉信^{1,2}

徳島大・薬¹、科技団 CREST²

High-Speed Gene Amplification by Capillary PCR

Yukari Hataoka^{1,2}, Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

Human genome project is quickly moving on to the post genome sequencing era, including genome polymorphism analysis. As a technology of a new era, genome analysis on a microchip is noticed now.

We examined gene amplification by capillary PCR device. In this study, we tried to optimize the reaction conditions for capillary PCR in order to apply this technique to PCR on a microchip. At the end of this experiment, we succeeded gene amplification by capillary PCR within 10 minutes.

【はじめに】

ゲノム DNA の解析は、現在急速に進んでおり、ポストゲノムシーケンシングの課題としてゲノム多型解析が注目を集めている。ゲノムシーケンシングは、現在キャピラリー電気泳動を用いて主に解析が行われているが、次世代ゲノム解析技術としてマイクロチップが着目されている。

本研究では、その臨床利用を視野に入れ、マイクロチップ上での PCR への応用を目的として、キャピラリーPCR の反応条件の最適化を図った。

【実験】

装置は、Roche 社の LightCycler を使用し、PCR 生成物のリアルタイムでの増幅を確認した。蛍光色素として、SYBR Green I を用いた。サンプルは、λ DNA を鋳型とし、500bp をキャピラリーPCR にて増幅した。Taq は、高速増幅が可能な Z-Taq (TaKaRa) を用いた。パラメータとして、①First denature の時間、②denature の時間、③annealing および extension の時間を変化させた。(①98℃ 0~45sec、②98℃ 0~10sec、③68℃ 10~20sec)。PCR はシャトル PCR で行った。

【結果と考察】

条件を変化させることにより、最適条件の下で 10 分以内での PCR に成功した。同時に融解曲線により T_m 値を算出したところ、下のグラフのようになった。(Fig. 1)

融解曲線分析は増幅サイクルの完了後、PCR 産物が生成されてから行い、サーマルチャンバー内の温度を 60℃ から 98℃ まで一秒間に 0.1℃ のペースで上げて行きその蛍光を連続測定することで融解曲線を得ることが出来る。融解曲線は、蛍光強度の温度に対する負の一次微分曲線である。

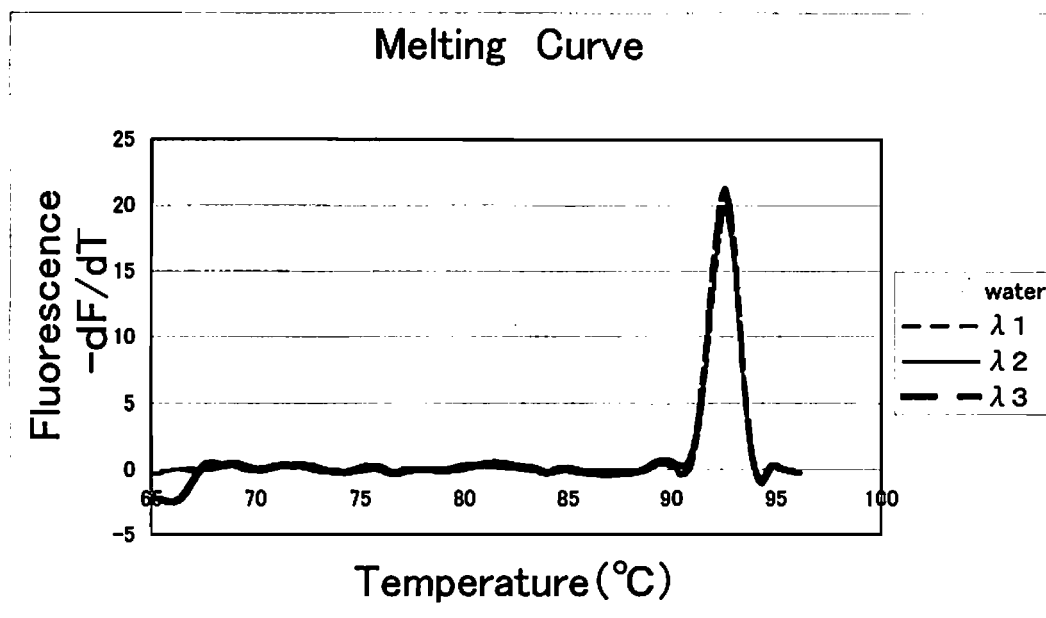


Fig. 1 PCR 生成物の融解曲線

融解曲線のピークは、84℃付近と 93℃付近の二つの位置に現れているが、negative control（細破線）のピークが 84℃付近にあることから、前者はプライマーダイマーであり、後者は PCR 生成物であると思われる。

PCR cycle の条件設定によって、PCR 生成物のピーク高さも変化している。ピーク面積を、同時に増幅した濃度既知のスタンダードのそれと比較する事により、濃度を概算することも可能である。

PCR 生成物をマイクロチップ電気泳動装置である Agilent 2100 bioanalyzer で測定し、定量および Sizing を行った結果、生成物がほぼ 500bp であることと、従来のヒートブロック式での PCR と遜色のない生成物濃度が確認された。なお、この電気泳動所要時間は、1 サンプルあたり約 90 秒であり、従来のキャピラリー電気泳動装置を用いた場合よりも劇的に短縮されている。また、SYBR Green I 以外の蛍光色素でも検討を行い、YO-PRO1 を代わりに用いて行ったが DNA の増幅自体が行われなかった。このことから YO-PRO1 は PCR を阻害することがわかった。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業（CREST）、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）の援助を得て行った。

【参考文献】

- ①Y. Baba and D. Figeys, Genomics and Proteomics for Analytical Scientists, John Wiley & Sons, 2001.
- ②馬場嘉信, 電気化学, 2000, 68(3), 197-201.
- ③馬場嘉信, Jpn. J. Electrophoresis, 2000, 44, 85-89.
- ④馬場嘉信, 化学, 2000, 55(4), 22-26.

P105

マイクロチップ電気泳動とキャピラリー電気泳動によるゲノム多型解析

○遠藤由規^{1,2}、馬場嘉信^{1,2}

徳島大・薬¹、科技団 CREST²

Genomic Polymorphism Analysis by Microchip and Capillary Electrophoresis

Yuki Endo^{1,2}, Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

In recent years, various methods for point mutation detection have been advanced and used [1,2]. Of them, it is accepted that the SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) technique is the most widely used mutation scanning method. SSCP is based on the difference of mobility between wild type and mutant under given electrophoresis conditions. It attributes to its own characteristic conformation that depends on an individual sequence of single strand DNA. We examined the PCR product of K-ras gene (oncogene) with/without SNP by SSCP analysis on both capillary electrophoresis and microchip device. The microchip technology is expected to play an important role in DNA analysis in that it may enable ultra-fast separation of DNA fragment. In conclusion we succeeded in detecting SNP by SSCP using microchip, and it led to saving time drastically.

はじめに

近年のゲノム DNA 解析技術のめざましい発展に伴い、ゲノム情報を基盤とした新しい医療が確立しようとしている。とくに個人個人に最適な医療を施すことを目指したオーダーメイド医療に大きな期待が寄せられている今、その個人情報基となるゲノム多型の解析方法として SNP（一塩基多型）解析が世界的な注目を集めている。SNPs の検出方法には、直接的な方法である DNA シークエンシング法、DNA チップ、SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法などが挙げられる。このうち SSCP 法は、最も簡便でかつ有用な SNP 解析方法として知られている。またそのような背景のもと、半導体集積化技術、半導体超微細加工技術の飛躍的な進歩により、それらに基づく新たなゲノム解析技術も開発されてきた。本研究で我々は、キャピラリー電気泳動による SSCP のデータをもとに、最先端技術であるマイクロチップ電気泳動による SSCP 法を用いた SNP 解析に取り組んだ。そしてその高速化を実現した。

【実験】

サンプルには、point mutation のあるがん細胞遺伝子、k-ras gene を GeneAmpPCR system 9700 (PERKIN ELMER) を用いて、PCR 増幅したものを用いた。PCR は、94℃で 5

分間、その後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、72℃で 60 秒間を 30 サイクル行ったのち、72℃で 10 分間、そして、10℃で保った。このとき、あらかじめ、プライマーの 5'末端を FAM または cy5 によってラベル化したものを用いることで各サンプルを蛍光標識した。

キャピラリー電気泳動装置には、レーザー誘起蛍光検出器付(励起波長:488 nm、filter: 520 nm)の Beckman P/ACE 5010 system (Beckman Instruments) を用いた。キャピラリーは、J&W 製 DB-17-coated capillary で、全長 27 cm、有効長 20.2 cm のものを使用した。メチルセルロースを TB に溶解したものにグリセロールを添加した系をポリマー溶液とし、キャピラリー中に満たした。PCR 増幅されたサンプルは、GeneAmpPCR system 9700 (PERKIN ELMER)で、90℃、5 分間の熱変性を行った後、氷上で 3 分間急冷し、一本鎖とした後、それらを電氣的に注入し測定した。またマイクロチップ電気泳動の装置には、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies)を用い、DNA 7500 LabChip kit また DNA 500 LabChip kit のプロトコールに従って行った。

【結果と考察】

まず、ガン細胞遺伝子である K-ras gene を PCR 増幅したサンプルを Agilent 2100 bioanalyzer によって測定し、その増幅の確認を行った。そのフラグメント長は、162 bp である。その後、この DNA フラグメントを用いて、まず、キャピラリー電気泳動装置による SSCP 解析を行った。メチルセルロースをポリマーとして TB に溶解し、それにグリセロールを添加したものを泳動 Buffer として解析を行った。本実験では、k-ras gene の Wild type と Mutant のサンプルを混合して測定することにより、その移動時間の差を確認することで、SNPs を検出することに重点をおいた。その結果、Wild type と Mutant のサンプル混合比率を徐々に変化させることで、それらの変異を検出することに成功した。この方法で行うことにより、間接的な方法ではあるが、同時にピークの同定も達成できた。

また、それらのサンプルを同様にマイクロチップ電気泳動装置である Agilent 2100 bioanalyzer でも測定した。それによりキャピラリー電気泳動では、10 分前後かかっていたものを 60 秒前後という短時間で、SNP を検出することに成功した。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の援助を得て行った。

【文献】

1. 馬場嘉信, ファルマシア, 2001, 37(1), in press.
2. Y. Endo, C. Yoshida, and Y. Baba, J. Biochem. Biophys. Methods, 1999, 41,133-141.

P106

オンライン試料濃縮を用いるミセル動電クロマトグラフィーによるアミノ酸誘導体の高感度分析 (2)

○佐伯知香、大塚浩二、寺部 茂
姫路工大・理

Highly Sensitive Micellar Electrokinetic Chromatographic Analysis of Amino Acid Derivatives Using On-line Sample Concentration (2)

Chika Saeki*, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

For on-line sample concentration of neutral analytes in micellar electrokinetic chromatography (MEKC), several techniques have been developed based on stacking and sweeping phenomena. In this study, stacking with reverse migrating micelles (SRMM) and sweeping methods were applied to the MEKC analysis of phenylthiohydantoin-amino acids (PTH-AAs) to enable a highly sensitive separation and detection. Under an acidic condition (pH 2.15), about 20 PTH-AAs were successfully separated and detected by SRMM-MEKC with 50 mM SDS. The detection sensitivity in SRMM-MEKC was improved up to 40-fold compared to conventional MEKC.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は高分離能微量分析法として幅広い分野において利用されている。通常 CE で用いられる紫外吸光検出では濃度検出感度の低さが指摘されており、感度向上のための種々の試みが報告されている。オンライン試料濃縮はその中でも有力な手法である[1]。本研究ではミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) によるアミノ酸誘導体の分離において、オンライン試料濃縮法としてスウィーピング (sweeping) 法[2]とスタッキング (stacking) 法[3]を適用し、高感度分析の可能性について検討した。

実 験

CE 装置には Beckman 社の P/ACE 2000 を、キャピラリーには内径 50 μm の内面無処理のフューズドシリカキャピラリーを用いた。分離溶液は、50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.15) に硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を 50 mM の濃度に添加して調製した。試料にはフェニルチオヒダントイン-アミノ酸 (PTH-AA) を 100%または 50%アセトニトリル水溶液に溶解したものを使用した。試料注入には圧力法 (0.5 psi) を使用した。MEKC分離において印加電圧は-20 kV、温度は 20 $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長は 214 nm とした。

結果と考察

これまでに、中性条件における通常の MEKC により 23 種の PTH-AA の分離が可能であることが報告されている[4]。本研究では、酸性条件において stacking を適用するため、まず酸性溶液を用いる通常の MEKC で分離を行った。続いて、同条件で行う stacking 法 (stacking with reverse migrating micelles, SRMM) について検討を行った。

Fig. 1 に、21 種の PTH-AA の分離例を示す。A は通常の MEKC 分離で、試料注入時間は 3 s である。B は SRMM-MEKC による分離で、この場合の濃縮・分離操作は以下の通りである: (1) A と同じ分離溶液 (50 mM SDS) でキャピラリーを満たす。(2) A の試料溶液を分離溶液よりも伝導率の低い溶液で 5 倍に希釈し 35 s 注入。(3) キャピラリーの両端を分離溶液に浸し、電気泳動を開始。ピーク高さに基づいて濃縮効率を求めたところ、5~9 倍であった。疎水性の高い試料 9 種類(ピーク番号 1-11)のみを濃縮させると、40 倍以上が得られた。sweeping については期待する濃縮効率を得るため現在検討中である。

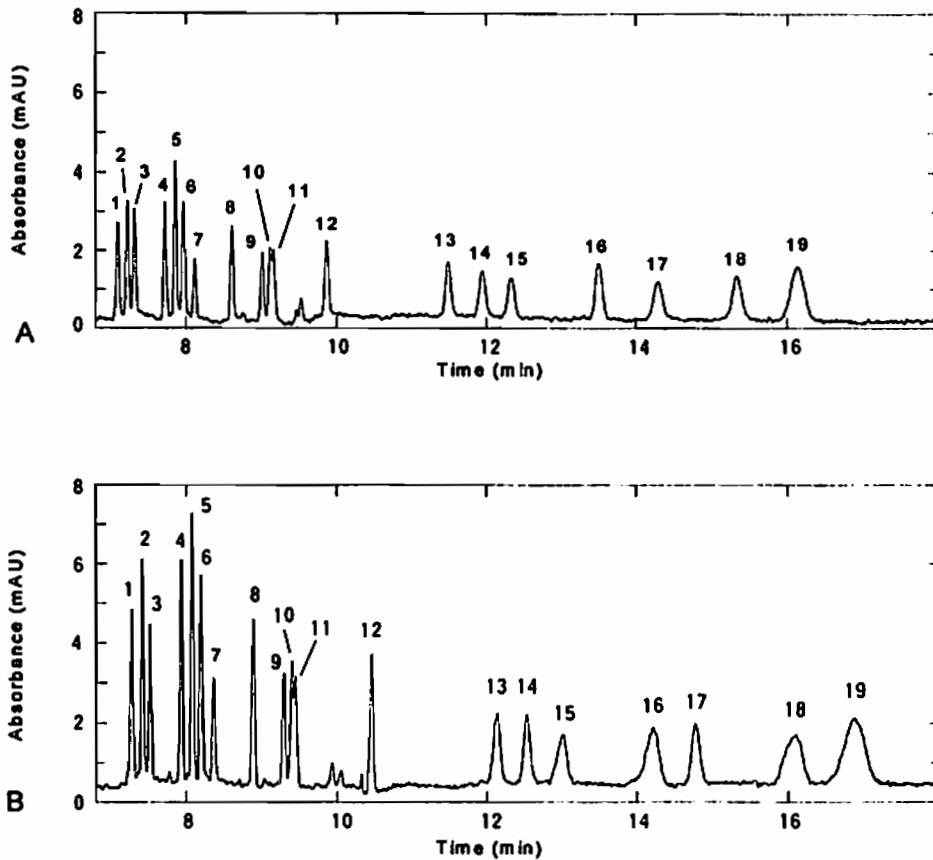


Fig. 1. Separation of 21 PTH-AAs by (A) conventional MEKC and (B) SRMM-MEKC: corresponding amino acids, (1) Arg, (2) His, (3) Lys, (4) Phe + Nle, (5) Trp, (6) Leu + Ile, (7) Ile, (8) Nva, (9) Met, (10) Val, (11) Pro, (12) Tyr, (13) Ala, (14) Glu, (15) Gln, (16) Gly, (17) Asp, (18) Ser, (19) Asn + Thr. concentration of analytes (A), Trp (5 ppm), others (11-24 ppm); Pressure (0.5 psi) was applied after (A) 9.0 min and (B) 10 min; separation capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 57 cm (50 cm effective).

- [1] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 465-482.
- [2] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1638-1644.
- [3] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Cap. Electrophoresis*, 4 (1997) 233-245.
- [4] S. Terabe, Y. Ishihama, H. Nishi, T. Fukuyama, K. Otsuka, *J. Chromatogr.*, 545 (1991) 359-368.

P107

陽イオン界面活性剤を用いる MEKC における EOF 抑制
条件下でのオンライン試料濃縮

○金 宗福, 大塚浩二, 寺部 茂
姫路工大・理

On-line Sample Concentration in MEKC Using Cationic Surfactants Under Suppressed EOF

Jong-Bok Kim*, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

The electroosmotic flow was successfully suppressed even in the presence of cationic surfactants, when a polyacrylamide-coated capillary was employed. Two on-line sample concentration techniques of sample stacking and sweeping were evaluated in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using the polyacrylamide-coated capillary. A cationic surfactant was used as a pseudostationary phase in MEKC. At least 60-fold and more than 400-fold increases in detection sensitivity were obtained in terms of peak heights by sample stacking and sweeping, respectively.

【はじめに】最近、キャピラリー電気泳動 (CE) における濃度検出感度を高めるための様々な試料濃縮法が報告されている。ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) におけるオンライン試料濃縮では、試料ゾーンと泳動液ゾーン間の電場強度の差に基づくスタッキング (stacking) [1] と界面活性剤を含む泳動液が界面活性剤を含まない試料ゾーンを通過する時に濃縮が起こるスイーピング (sweeping) [2] の2種の手法が利用可能である。本研究では陽イオン界面活性剤を使用する MEKC において電気浸透流 (EOF) を抑えるために内面をポリアクリルアミド (PAA) でコーティングしたキャピラリーを使用し、スタッキングおよびスイーピングによるオンライン試料濃縮について検討した。

【実験】CE 装置には HP^{3D} CE システム (Hewlett-Packard) を用いた。キャピラリーには内径 50 μm 、全長 59 cm、有効長 50.5 cm のフューズドシリカキャピラリーを用い内面を PAA でコーティング処理した [3]。キャピラリーコーティングは、(1) キャピラリーを水酸化ナトリウムで1時間、脱イオン水で1時間洗浄、(2) 窒素ガスを流しながら 110 $^{\circ}\text{C}$ で6時間乾燥、(3) 塩化チオニル充てん後キャピラリー両端を閉じて 70 $^{\circ}\text{C}$ で6時間加熱、(4) キャピラリー両端を開けて 1 M 臭化ビニルマグネシウム充てん後両端を閉じて 70 $^{\circ}\text{C}$ で6時間加熱、(5) キャピラリー両端を開けて PAA 充てんの順に行った。泳動液は、100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム (TTAB) を 50 mM の濃度で溶解し、10% (v/v) メタノールを添加して調製した。試料注入は加圧法 (50 mbar) で行い、印加電圧 +18 kV、設定温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長 247 nm で測定を行った。

【結果と考察】硫酸ドデシルナトリウム (SDS) のような陰イオン界面活性剤を添加して酸性条件下で MEKC を行うと EOF が抑えられ、EOF が強い条件下より高い濃縮効率が得られた [1, 2]。しかし、陽イオン界面活性剤を用いる MEKC では酸性条件下でも EOF が抑えられな

い。そこで、EOFを抑えるため内面をPAAでコーティングしたキャピラリーを用いた。PAAでコーティングしたキャピラリーではEOFが効果的に抑えられることが明らかとなった (Table 1)。中性でミセルが陽極から陰極に向かう条件でMEKC分離と濃縮を行った。Fig. 1Aに通常のMEKC分離、Bにスウィーピングで得られた電気泳動図を示す。TTABを使用するMEKCにおいてPAAでコーティングしたキャピラリーを使用したオンライン濃縮を行った結果、通常のMEKC分離より約300倍、またEOFがある条件下より3~4倍高い濃縮効率を得られた。

Table 1. Electroosmotic mobilities

Capillary	Surfactant ^{a)}	pH	Direction	mobility (10 ⁻⁴ cm ² ·V ⁻¹ s ⁻¹)	%RSD (n=6)
PAA-coated	TTAB	7.0 ^{b)}	+	0.12	0.72
untreated	TTAB	7.0 ^{b)}	-	3.2	1.5
untreated	SDS	7.0 ^{c)}	+	2.5	0.59
untreated	SDS	2.5 ^{c)}	+	0.21	0.87

^{a)} 50 mM surfactant.

^{b)} 100 mM Tris-HCl buffer containing 10% methanol.

^{c)} 50 mM phosphate buffer containing 10% methanol.

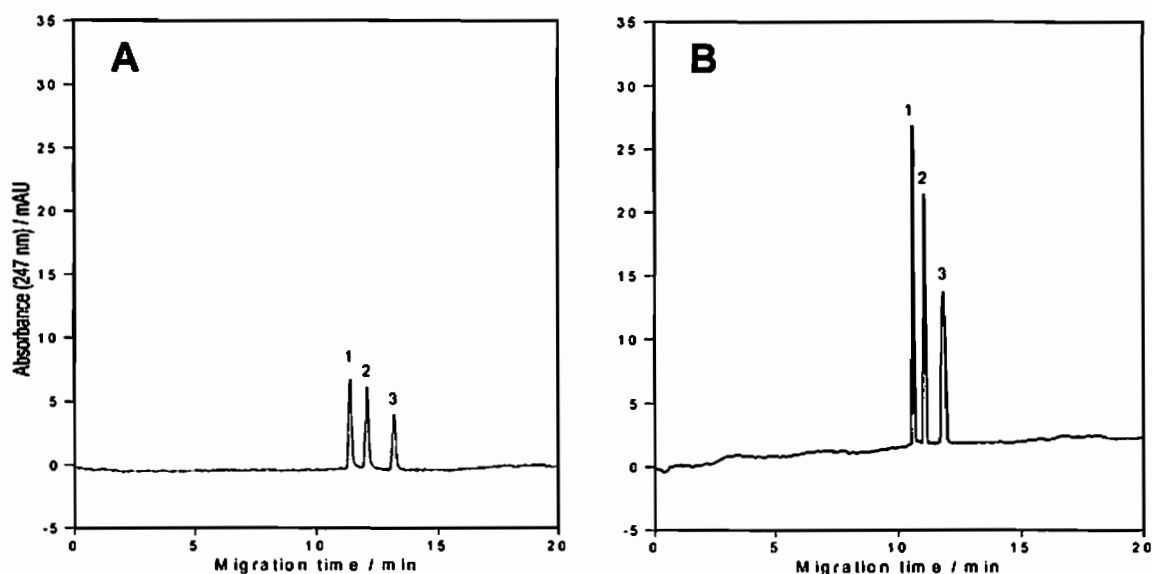


Fig. 1. Separations of the test steroids by (A) conventional MEKC and (B) sweeping MEKC. Background solution (BGS), 50 mM TTAB in 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) / 10% methanol; sample solution, samples in Tris-HCl buffer (pH 7.0) having conductivity similar to that of the BGS (6.9 mS/cm); injected length, (A) 0.57 mm, (B) 12.8 cm; concentration of samples, (A) testosterone (peak 1, 420 ppm), hydrocortisone (peak 2, 422 ppm), cortisone (peak 3, 430 ppm), (B) 100-fold dilution of the samples in A; PAA-coated capillary, 50 μ m I.D., 59 cm total (50.5 cm to detector); detection, 247 nm; applied voltage, +18 kV; temperature, 25°C.

[文 献]

1. J.P. Quirino and S. Terabe, *J. Cap. Elec.*, 4 (1997) 233.
2. J.P. Quirino and S. Terabe, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1638.
3. M. Nakatani, A. Shibukawa, and T. Nakagawa, *Biol. Pharm. Bull.*, 16 (1993) 1185.

P108

キャピラリー電気泳動によるカルボン酸のオンライン 濃縮・分離

○井上直子、大塚浩二、寺部 茂

姫路工大・理

On-line sample Concentration and Separation of Carboxylic Acids by Capillary Electrophoresis

Naoko Inoue*, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

Separation of six aromatic carboxylic acids were investigated using reversed migration micellar electrokinetic chromatography (RM-MEKC) with 50 mM sodium dodecyl sulfate (pH ca. 1.9) and capillary zone electrophoresis (CZE) with 50 mM borate buffer (pH 9.47). Several on-line sample concentration techniques were then evaluated to increase the detection sensitivity in the RM-MEKC and CZE systems. As on-line concentration techniques for MEKC, stacking with reverse migrating micelles (SRMM), sweeping, stacking using reverse migrating micelles and a water-plug (SRW), and field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles (FESI-RMM) were applied. SRMM and stacking-CZE provided the best results among the focusing techniques studied. Reproducibility in the migration time, peak height, corrected peak area obtained with SRMM were acceptable.

はじめに

生命の最小単位である細胞中には多種多様の化合物が微量に含まれており、植物や動物や私達の体内で代謝される。これらの分析を行うことは生命現象を解明する上で重要である。本研究では細胞中に微量に存在する芳香族カルボン酸の高感度分析法を開発するための予備検討として、オンライン試料濃縮法を用いるキャピラリー電気泳動(CE)による分離を行った。

実験

CE 装置には HP^{3D}CE (Hewlett-Packard)を、キャピラリーには内面未処理のフューズドシリカキャピラリー (全長 64.5 cm、有効長 56 cm、内径 50 μ m) を用い、波長 210 nm で検出を行った。印加電圧は、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) モードでは-20 kV、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) モードでは 20 kV とした。泳動液には、MEKC では 50 mM リン酸 (pH 約 1.9) に硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を 50 mM の濃度に溶解したものを、CZE では 50 mM ホウ酸溶液 (pH 9.47) を用いた。試料には trans-cinnamic acid,

3-(4-hydroxyphenyl)pyruvic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, proto-catechuic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid を用いた。試料注入は加圧法 (50 mbar) または電気的注入 (-20 kV) で行った。

結果・考察

MEKC 実験条件下では電気浸透流 (EOF) が抑制されているため SDS ミセルは陽極に向かって移動する。濃縮を行わない通常の MEKC で 6 種の試料は上記の順に移動し、良好に分離された。次に検出感度を向上させるためにオンライン試料濃縮法の適用を検討した。濃縮法にはスウィーピング(sweeping)、逆方向移動ミセル (RMM) を用いるスタッキング (SRMM)、RMM 及び水プラグを用いるスタッキング (SRW) の各手法を用いた。いずれの濃縮法を用いた場合でも通常の MEKC の場合とほぼ同等の分離が達成された。濃縮効率は sweeping で 5-6 倍程度、SRMM で 8-22 倍程度、SRW で 5-12 倍程度が得られた。どのカルボン酸も比較的親水性であるため保持比が小さく、高い濃縮倍率は得られなかった。また、CZE においてアルカリ性条件下で分離を行い MEKC で最も濃縮効率の良かったスタッキング法を適用して濃縮効率の改善を図ったが、SRMM と同程度の効率を得るにとどまった。さらに他の試料濃縮条件の適用を試み、濃縮効率の改善を検討している。

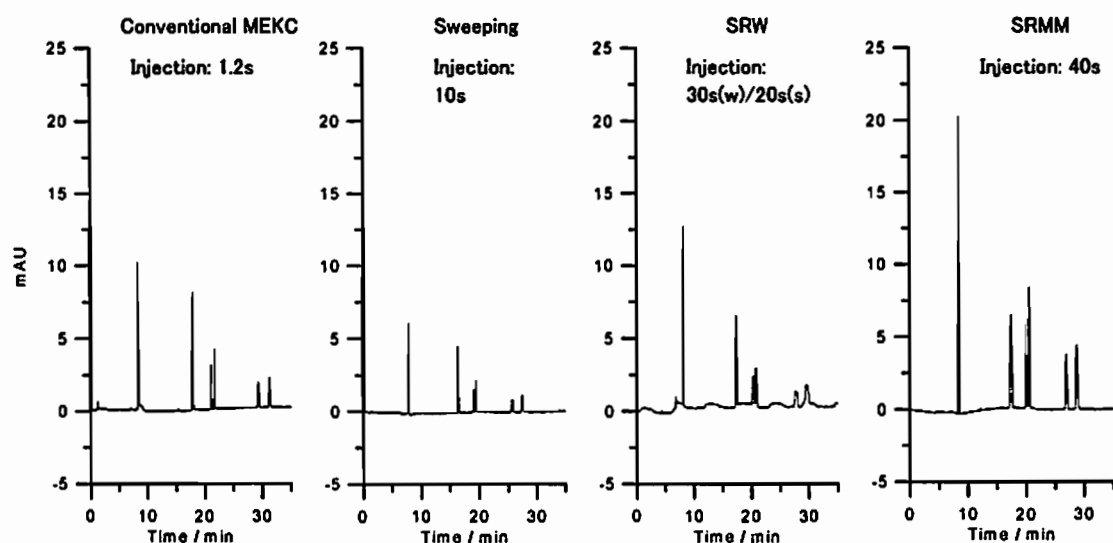


Fig. 1. 種々のオンライン試料濃縮法による分離。試料濃度: conventional MEKC: (1) 100 ppm, (2) 200 ppm, (3) 30 ppm, (4) 90 ppm, (5) 20 ppm, (6) 30 ppm; sweeping, SRW, SRMM: conventional MEKC に用いた試料溶液を 10 倍に希釈。

文献

1. J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 465.
2. J.P. Quirino, S. Terabe, *Science*, 282 (1998) 465.
3. J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1893.

P109 キャピラリー電気泳動におけるクロロフェノール類のオンライン濃縮法の検討(II)

○竹田さほり¹、茶山健二²、辻治雄²、福士恵一³、山根昌隆¹、城間 純¹、
脇田慎一¹

(大阪工業技術研究所¹、甲南大学理学部²、神戸商船大学³)

On-line concentration of chlorophenols in capillary electrophoresis (II)

○Sahori Takeda¹, Kenji Chayama², Haruo Tsuji², Kei-ichi Fukushi³, Masataka Yamane¹,
Zyun Siroma¹, and Shin-ichi Wakida¹

¹Osaka National Research Institute, AIST, Osaka 563-8577

²Faculty of Science, Konan University, Kobe 658-8501

³Kobe University of Mercantile Marine, Kobe 658-0022

Several chemicals are suspected that they have endocrine disrupting effects. We have been studied on the analysis of non-volatile or thermally degradable chemicals in water by capillary electrophoresis (CE) which can provide higher resolution than that of high-performance liquid chromatography. We have achieved the simultaneous separation of phenols, 1- and 2-substituted chlorophenols by CE. Their detection limits, however, were not sufficient for their determination in environmental waters. The combination of some concentration method is necessary. We studied the on-line concentration based on stacking. The effect of pH, injection volume and electrolyte concentration of the sample solution was investigated. The improvement of ten-times concentration sensitivity was achieved with the isomeric separation.

はじめに

近年、内分泌攪乱物質問題をはじめ、環境中に存在する化学物質の生態系への影響が懸念されており、これらの物質の存在量を簡便、迅速、高感度に計測できる技術の開発が急務である。GC-MSによる計測では、難揮発性・熱分解性の物質に対しては誘導体化が必要である。一方LCはGCに比べて分離能が低く、特に異性体分離は不十分なことが多い。化学物質においてはダイオキシン類のように異性体によって毒性が大きく異なるものもあり、その相互分離は重要であると考えられる。我々は、内分泌攪乱作用の疑いが持たれている2,4-ジクロロフェノールを含め、2置換までのクロロフェノール類を対象にキャピラリー電気泳動による分離の検討を行い、異性体を含む相互分離を達成した¹⁾。しかし、実試料への適用には濃度感度の向上が不可欠であることから、今回はオンライン濃縮のための試料組成について検討を行った。

実験

装置は大塚電子製CAPI-3000を、分離キャピラリーには内径75 μ m、全長62cm(有効長50cm)の内

面未処理のフューズドシリカ管を用いた。試料には市販のフェノールと、1置換および2置換のクロロフェノールの計10種類を用いた。泳動溶液には20mM炭酸水素アンモニウム水溶液(pH8.1)を用いた。印加電圧は20kVとし、検出波長210nmで測定を行った。

結果と考察

オンライン濃縮法として一般的に用いられているスタッキング法²⁾では試料マトリックスに純水を用いた場合に最も濃縮効果が高いとされているが、今回の実験に用いたフェノール類の pK_a は6.8~9.8であり、pHが高いほどその移動度が大きくなると考えられる。そこで、試料マトリックスのpHの影響について調べるため、1/10希釈泳動溶液、および1/10希釈アンモニア水添加泳動溶液(pHを9または10に調整)の計3種の溶液と、比較のため蒸留水を用いて分離挙動およびピーク高さを調べた。その結果、分離については試料マトリックスのpHが高いものほど、 pK_a が大きく早く泳動するフェノール類の分離が向上した。さらに試料導入量の影響について調べた結果、いずれも導入量が多くなるほどピークの分離は悪化したが、泳動溶液等を用いたものではその影響は蒸留水の場合より小さくなった。次いで、試料マトリックスへのアンモニア水の添加について検討した。試料マトリックス中のアンモニア水濃度を10mMとした場合、検出限界の比較では通常の試料導入量の場合に比べて最大で12倍程度感度が向上したが、その値は数十ppb程度であり、実環境水(サブppbレベル)への適用にはさらに検討が必要であると考えられる。

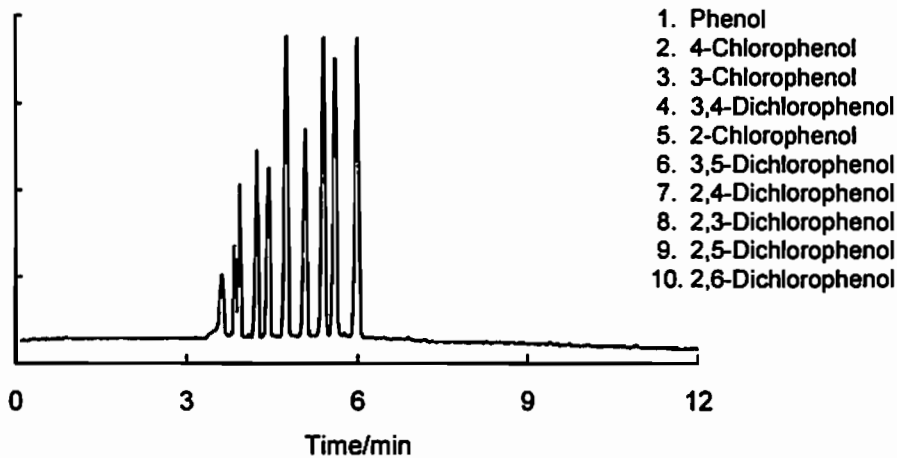


Fig.1 Pherogram of chlorophenols with ammonia solution added sample

文献

1. 竹田ほか, 分析化学, 49 (2000) 471.
2. D.S. Burgi and R.L. Chien, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2042.

P110

等速電気泳動オンライン前濃縮-CZE法による 希土類イオンの高感度分析

○岡本 光、育田夏樹、廣川 健

広島大学工学部

High Sensitive Analysis of Lanthanide Ions by Isotachophoretic On-line Preconcentration-CZE

Hikaru Okamoto, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Although absolute sensitivity of CE is very high, concentration sensitivity is relatively low because injection volume is geometrically limited. On-line preconcentration technique for a large volume of a sample solution is essential to improve concentration sensitivity. Although stacking technique is well known as a concentrating method, its ability is limited because the velocity of electroosmotic flow (EOF) increases with increase of the injected sample volume. Consequently, the separation window becomes narrower and then the separation efficiency becomes worse. In this report, preconcentration using stacking technique and transient isotachophoretic technique were applied for the analysis of a complex test mixture of lanthanide ions(2ppm-0.02ppm). When the transient isotachophoretic preconcentration technique was combined with stacking effect, better separation was obtained for Tb, Y, Dy, Ho, Er, Tm, Yb and Lu compared to the separation using only stacking effect.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) の課題の一つとして濃度感度の向上が上げられる。CEにおける低濃度試料の濃縮現象としては、試料溶液と支持電解液の電気伝導度の差を利用したスタッキングが良く知られている。しかしながら、高い濃縮効果を得ながら十分な分離を保つにはいくつか問題があり、余り複雑な試料系に応用された例はない。本研究では、移動度の差が小さい希土類イオン他18種の成分を含む複雑な試料を対象とし、スタッキング効果による検出濃度限界および過渡的等速電気泳動 [1] を併用した濃縮効果について検討した。

実験

18 種のカチオン(希土類イオン 15 種、K, Na, Li)は塩化物より調製した等濃度試料(2ppm-0.02ppm)を用いた。過渡的等速電気泳動のためのリーディング電解液としては、20mM アンモニア水に 7.5mM α -ヒドロキシイソ酪酸(α -HIBA)と 2.0mM マロン酸を錯形成剤として加え、2-エチル-n-酪酸で pH4.8 に調整した液、ターミナル電解液には 0.5M カルニチン塩酸塩を使用した。これらの電解液を試料の前後に落差法 (25mm, リーディング電解液: 800s, ターミナル電解液: 150s) で注入した。実験に使用した装置は CAPI-3100 (大塚電子)、内径 75 μ m、全長 100cm(有効長 87.3cm)の熔融シリカキャピラリー (大塚電子) を使用した。支持電解液は、30mM クレアチニンに 4mM α -

ヒドロキシイソ酪酸(α -HIBA)と 0.4mM マロン酸を錯形成剤として加え、2-エチル-n-酪酸で pH4.8 に調整した。サンプル注入法は落差法(25mm,100~1700s)を用いた。印加電圧 20kV、キャピラリー温度は 25℃とした。検出波長は 220nm であった。

結果と考察

低濃度試料の導入量を増加させるとスタッキング効果により濃度感度の向上が期待されるが、試料注入量を増加させると電気浸透流速速度が速くなり、結果として分離の場が狭くなり分離が達成されなくなる。本実験で用いた試料では 0.2ppm 試料については一斉分離が確認できるが、さらに 1/10 の濃度である 0.02ppm 試料ではピークを検出できなかった。Lu については $S/N=3$ とすると検出濃度下限は 0.1ppm であるとわかった。

以上のことから、スタッキング効果だけを利用したのでは、検出濃度に限界があることがわかったので、過渡的等速電気泳動を併用した。Fig.1 に過渡的等速電気泳動とスタッキングの併用 (a) および、スタッキングのみを利用した場合 (b) について得られたフェログラムを示す。スタッキングのみを利用した場合より、過渡的等速電気泳動を利用したほうが、移動度が大きなイオンおよび小さなイオンについて、ピークが鋭くなっていることがわかる。特に Lu については約 3 倍の高さとなっている。この濃縮法ではリーディング電解液およびターミナル電解液の濃度が高く注入量が多いと濃縮効果が高くなるが、ターミナル電解液について注入量を多くしすぎると、試料の中で移動度の最も小さい Lu から順にピークがターミナルゾーンから分離できなくなることを確認している。更に良好な分離条件を得るためのリーディングおよびターミナル電解液の濃度および注入量についての最適条件について、現在、理論・実験の両面から検討中である。

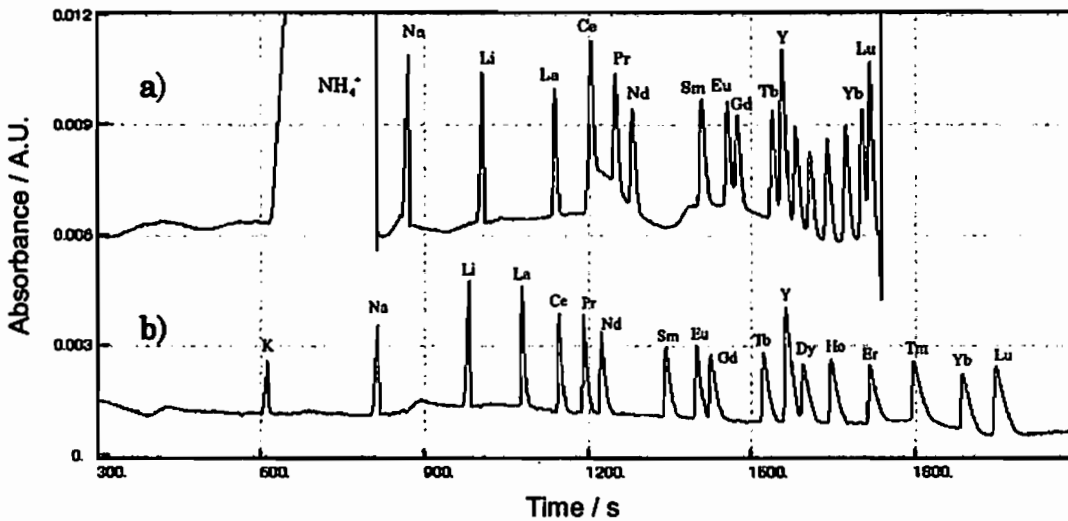


Fig.1 オンライン前濃縮の効果、a)過渡的等速電気泳動とスタッキングを併用、
b)スタッキング効果のみ、試料濃度 (2ppm)、落差法 (25mm, 800s)

1) L.Krivankova, P. Pantuckova, P. Bocek, J.Chromatogr.A, 838 (1999) 55-70.

P111

ポリオキソメタレート錯体生成に基づくCE分析へのスタッキング効果

○中島陽一¹、西川 仁²、後藤拓哉²、北角巖²、姫野貞之²
大阪府立産業技術総合研究所¹、神戸大学理学部化学科²

Stacking Effect on CE Analysis Based on the Formation of Heteropolyoxometalate Complexes

Yoichi NAKASHIMA¹, Hitoshi NISHIKAWA², Takuya GOTO², Iwao KITAZUMI²
and Sadayuki HIMENO²

¹Technology Research Institute of Osaka Prefecture, Osaka 594-1157

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University, Kobe 657-8501

We have investigated the sample stacking effect to improve separation efficiency and detection limit of CE analysis based on the formation of heteropolyoxometalates. The isomers of a Keggin-type dodecamolybdosilicate with approximately the same migration time could be separated satisfactorily by the sample stacking or the transitional isotachophoretic stacking. Similarly, the migration peaks due to the Anderson-type complexes became sensitive and well separated, so that the simultaneous determination of Ga(III) and Al(III) was also possible. Furthermore, the transitional isotachophoretic stacking was effective on the determination of phosphate based on the formation of a Keggin-type complex in aqueous-CH₃CN media.

はじめに

分離能の向上と測定の高感度化は、分離分析化学における大命題であり、CE においても数多くの研究がなされている。分離能の向上に関しては錯形成、イオン対形成、分配などの化学的・物理的相互作用の利用、質量分析、ICP 発光分析、原子吸光分析、蛍光 X 線分析など高選択性検出器の利用といった研究がある。また、測定の高感度化にも種々のオンラインスタッキング、固相抽出などの試料濃縮法、蛍光、MS などの高感度検出器の利用といったソフト、ハード両面からの研究が精力的になされている。

我々は、分析対象物をより大きなモル吸光係数を持つ物質へと変換、検出するという高感度化の手法に着目し、CE 分析への応用研究を続けている。リン酸やケイ酸などの簡便かつ高感度な吸光光度定量に用いられる Keggin 型錯体以外のポリオキソメタレート錯体の生成反応は、モリブデン酸イオンおよびヘテロイオンが高濃度でなければ進まないとされていた。我々は種々の錯形成反応が低濃度条件下で進み、かつ生成した錯イオンが安定であることを見出し、酸素酸イオンの高感度分析や酸化別状態分析に応用してきた。

今回、分離能の向上と高感度化を目指し、ポリオキソメタレート錯体生成に基づく CE 分析へのスタッキング効果について研究を行った。様々な試料溶液調製条件を検討した結果、Si(IV)の α -、 β -Keggin 型異性体の分離、Al(III)および Ga(III)の分離能の向上および高感度化、P(V)定量の高感度化などが可能であった。

実験

大塚電子製 CAPI-3200 型キャピラリー電気泳動装置を用いて測定を行った。キャピラリーは

内径 75 μm 、全長 62.2 cm の溶融シリカ管を用いた。泳動ピーク測定と同時にフォトダイオードアレイによるスペクトルの測定を行い、ポリオキソメタレート錯イオンの同定も合わせ行った。試料導入は陰極側から 30 もしくは 60 秒間、落差法(高低差 25 mm) によって行った。

結果と考察

0.1 mM Si(IV)-1.2 mM Mo(VI)-50 mM クロロ酢酸緩衝液(pH 2.5)を試料溶液とし、試料溶液と同濃度のクロロ酢酸緩衝液(pH 2.5)を泳動液に用いて CE 測定したところ、Si(IV)を中心原子とした Keggin 型錯体 $[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$ の α , β 両異性体を示すピークが観測されたがその分離は不十分であった。そこで、この試料溶液中のクロロ酢酸濃度を減少させピーク分離について検討したところ、10 mM に減少させた際に両異性体は完全分離し、各々の存在量を測定することが可能であった。しかし、クロロ酢酸濃度を増加させるとピークはブロードになった。これは試料ゾーンと泳動液との電気伝導度の差によるサンプルスタッキング現象として説明される。一方、同じ系の試料溶液中に塩化物イオンなどの電気泳動移動度の大きなイオンを添加すると、泳動中にいわゆる一時的等速電気泳動状態が起り、良好なピーク分離が得られた。しかし、添加する塩の濃度を増すと CZE の時間が短くなり、逆にピーク分離度が減少する結果になった。

Ga(III)及びその同族元素である Al(III)は酸性水溶液中で Mo(VI)と Anderson 型の錯体を生成し、これを用いた CE 分析が可能であることを見出した。この系においても試料溶液中の緩衝液の濃度を減少させるか、もしくは塩化物イオンを添加することにより、ピークの分離度が増加した。さらにこのスタッキング効果により検出感度も向上した。

試料溶液に補助溶媒としてアセトニトリルなどの有機溶媒を用いれば、P(V)は安定な Keggin 型錯体 $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ を生成する。この錯体生成に際し、添加する酸の種類を変化させ CE 分析を行った。酸として *p*-キシレン-2-スルホン酸を用いた場合、そのピークの高さは塩酸を用いた場合のおよそ 3 倍にもなった(Fig. 2)。ピーク高さと、加えた酸の水-アセトニトリル溶液の電気伝導度とには相関関係があった。このことから有機溶媒を添加した系においても、ヘテロポリオキソメタレート錯体の ITP スタッキングが起ることがわかった。

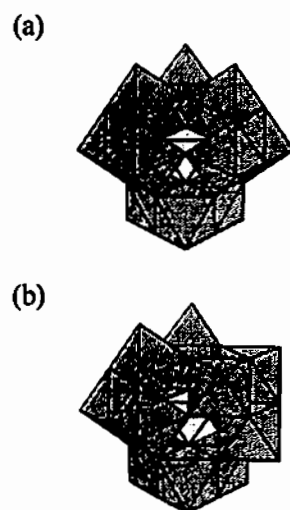


Fig. 1 The (a) α -Keggin and (b) β -Keggin Structure.

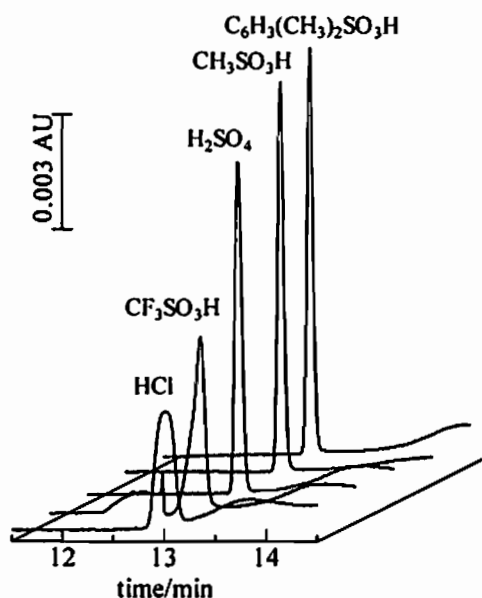


Fig. 2 Electropherograms for a 5×10^{-6} M P(V)-2.5 mM Mo(VI)-60%(v/v) CH_3CN system containing each strong acid (50 mM). Migration buffer, 50 mM HCl-60%(v/v) CH_3CN . Applied voltage; -8.5 kV.

P112 中空キャピラリーによる CEC

藤本忠蔵

浜松医科大学・化学教室

Open Tubular Approaches to CEC

Chuzo Fujimoto

Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine

Most capillary electrochromatographic (CEC) separations are currently being performed using 50-100 μm i.d. fused silica capillaries packed with octadecylated or mixed-mode silica with 1.5-3 μm particle diameter. However, some problems remain to be solved in order that CEC may be used for routine analyses. In CEC with packed capillaries, bubble formation is often a problem due to the presence of the frit holding the packing material in place. Efficient packing of small silica particles into a small i.d. capillary and fabrication of permeable frits in a reproducible manner also represent major challenges. Open tubular columns and fritless packed column technologies [1,2] are alternative approaches to packed columns that can avoid problems associated with frits and silica particles. A problem with open tubular columns is their low phase ratios, which lead to small retention factor and low sample capacity. In recent years several approaches have been developed in order to overcome this problem. These include technologies such as etching with ammonium hydrogenfluoride [3-5] and sol-gel processing with alkoxide precursors [6-10].

The aim of the present investigation is twofold. First, in order to increase the phase ratio of an open tubular column, we tried to pave submicron-sized silica particles on the capillary wall. After attaching functional groups onto the prepared layer through chemical bonding, the performance of the columns was examined under reversed-phase separation conditions. Second, in order to attain increased speed of separation and different selectivity for charged analytes, fused silica capillaries were coated with titania. The columns showed unique electroosmotic flow (EOF) properties: at acidic pH, the titania-coated columns have a large EOF that is toward either the anode or cathode, depending on the electrolytes used, while they have a cathodic EOF at neutral or alkaline pH. After modification with octadecyldimethyl-*N,N*-diethylaminosilane, the columns were used for the separation of neutral compounds.

現在、電気クロマトグラフィー（capillary electrochromatography, CEC）のほとんどは内径 50-100 μm のフューズドシリカキャピラリーに 1.5-3 μm のシリカ系充填剤を充填したカラムを使用して行われている。しかし、透過性のよいフリットを再現性よく

作製することが難しいこと、気泡が発生しやすいこと、カラムを充填するのに技術を要する[1,2]など、常用分析に供されるにはまだ解決されなければならない問題が多い。これらの問題は中空キャピラリーカラムやフリットレス充填カラムを CEC に使用することで解決することができる。しかし、中空キャピラリーカラムは相比が小さく、保持比、試料容量が小さいという欠点がある。中空キャピラリー液体クロマトグラフィーの開発当初よりこの問題を解決するため、種々の方法が試みられてきた。最近 CEC 分離のために開発された方法には、弗化水素アンモニウムによるキャピラリー壁のエッチング[3-5]やアルコキシドを用いるゾル-ゲル法[6-9]がある。

本研究では次の2つを目的に研究を行った。一つは、サブミクロンサイズのシリカ粒子をキャピラリー壁に付着させて表面積を増やす方法であり、アルキル基を結合することにより、逆相分離を行った。二つめは、フューズドシリカキャピラリー内壁を酸化チタンで被覆することである。幾つかの電解質溶液を用いて電気浸透流を測定したが、電解質によって酸性領域でもアノードへ向かう高い電気浸透流が観察できた。その条件下で陰イオンの分離を試みた。さらにチタニア表面をオクタデシル化することにより中性化合物の分離を行った。

文献

1. C. Fujimoto, *Trends Anal. Chem.*, 18(1999)291.
2. C. Fujimoto, *Chromatography*, 21(2000)195.
3. J.J. Pesek and M.T. Matyska, *J. Chromatogr. A.*, 736(1996)255.
4. J.J. Pesek, M.T. Matyska, and C. Sungjin, *J. Chromatogr. A.*, 845(1999)237.
5. M.T. Matyska, J.J. Pesek and A. Ktrekar, *Anal. Chem.*, 71(1999)5508.
6. Y. Guo and L.A. Colón, *Anal. Chem.*, 67(1995)2511.
7. Y. Guo and L.A. Colón, *Chromatographia*, 43(1996)477.
8. P. Narang and L.A. Colón, *J. Chromatogr. A.*, 773(1997)65.
9. S.A. Rodríguez and L.A. Colón, *Anal. Chim. Acta.*, 397(1999)207.

P113

キャピラリー電気泳動－原子吸光分光分析装置 (CE-AAS)の開発(IV)

○山内利朗¹、育田夏樹¹、廣川健¹、中川利久²、酒井真澄²
広島大・工¹、島津製作所²

Development of Capillary Electrophoresis - Atomic Absorption Spectrometer(CE-AAS) (IV)
Toshiro Yamauchi¹, Natsuki Ikuta¹, Takeshi Hirokawa¹, Toshihisa Nakagawa², and
Masumi Sakai²

¹Faculty of Engineering, Hiroshima University

²SHIMADZU CORPORATION

Abstract

The atomic absorption spectrometry (AAS) is a convenient elemental-analysis method with low detection limit and high qualitative potential. However, these may be deteriorated when a large amount of organic materials and/or other elements are included. In order to avoid such interference and speciation impossibility, elaborate chemical pretreatment has been used. To improve this situation, we started to develop capillary electrophoresis - atomic absorption spectrometry (CE-AAS) in which CE is used as the on-line pretreatment technique for AAS. Development and optimization of CE-AAS interface will be discussed in this report.

はじめに

原子吸光分光分析法（以下AAS）は、濃度感度が良好であり、定性能が高く、さらに操作が簡便であるなどの長所を有する優れた元素分析法である。しかし、有機物や測定元素以外の共存元素を多量に含む試料では分析感度が低下する場合があるほか、元素のスペシエーションができないなどの欠点がある。このような問題を避けるためには煩雑な前処理が必要であった。我々はAASのオンライン前処理法としてキャピラリー電気泳動法（以下CE）を用いるCE-AASの開発に着手した。本報告ではAASとCEのインターフェースの開発とその最適化について議論する。

装置

Fig.1にCE-AAS装置の概略を示す。CE-AASではAASの噴霧部における負圧により分離管内の溶媒が吸い出される。それを避けるために、ターミナル電極槽側は密閉されている。試料の導入部は気密を保つために、島津製作所社製IP-1Bのインジェクションバルブを用いた。

CE-AASインターフェースには3つの大きな役割がある。1, 電気泳動のために安定

した導通を保つ。2, 新鮮な電解液を系に供給する。3, 分離管の先端から噴霧部まで試料を輸送する。これらの条件を満たすために、AAS のネブライザー中の白金管 (内径 1mm) 内部に有効長 90mm のシリカキャピラリー (ジーエルサイエンス製 内径 0.530mm 外径 0.660mm) を挿入し、T 字管を使用して AAS 内の白金管と分離キャピラリーの間をリーディング電解液で満たした。

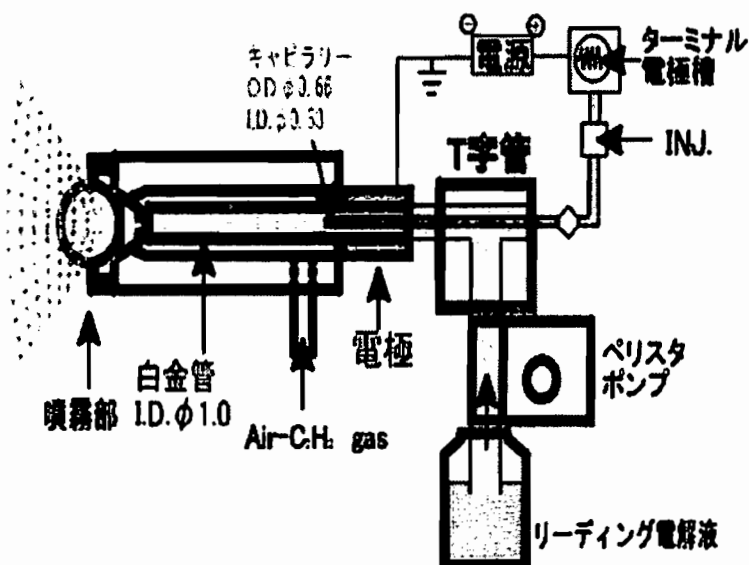


Fig.1 CE-AAS 概略図

実験

濃度調整効果のため試料ゾーン濃度が一定となる等速電気泳動を行い、噴霧部で発生する負圧が電気泳動にどの程度影響するか確認した。リーディング電解液には 20mM アンモニア pH4.8 (酢酸) を、ターミナル電解液には 10mM 塩酸を用いた。5mM ナトリウム水溶液 0.2-1.5 μ L をテスト試料として注入し、同時に電気泳動を目視で確認するため 0.5mM トリジンブルーを 1.0 μ L 注入した。

結果と考察

トリジンブルーの挙動を観察したところ、噴霧部の影響は確認されなかった。そのときに得られた CE-AAS フェログラムを Fig. 2 に示す。AAS で検出された Na ゾーンは等速電気泳動に特徴的な矩形のプロファイルが得られた。このことは噴霧部の影響がなかったことに加えて、分離管から噴霧部へ試料が拡散することなく輸送されていることを示す。このように、インターフェースに要求された役割を満たす装置は完成されたが、いくつか最適化すべきパラメーターや、改善点もある。講演では、これらについて詳細に議論する。

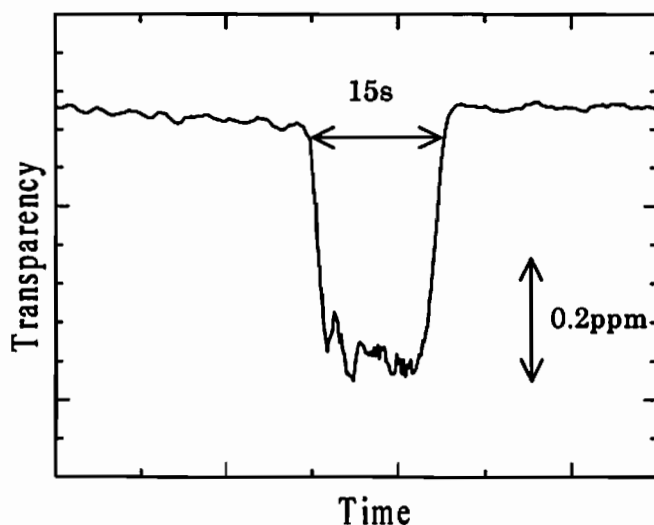


Fig.2 CE-AAS フェログラム

(注; Fig.2 の縦軸の矢印は Na 標準液 0.2ppm でキャリブレーションを行った透過率と等しい)

P114

スパッタカーボンと微小薄層ラジアルフローセルを用いたアルキルフェノールの電気化学測定と電気泳動検出器への適用

○ 由 天艶^a, 丹羽 修^{a,*}, 栗田 僚二^b, 林 勝義^a, 廣野 滋^c

^a NTT 生活環境研究所, ^b NTT-AT, ^c NTT アフティ

Electrochemical Detection of Alkylphenols at Sputtered Carbon Microarray Electrode Coupled with a Miniaturized Thin-Layer Radial Flow Cell for CE Measurement

○ Tianyan You^a, Osamu Niwa^{a,*}, Ryoji Kurita^b, Katsuyoshi Hayashi^a,
Shigeru Hirono^c

^a NTT Lifestyle and Environmental Technology Laboratories, 3-1 Morinosato,
Wakamiya, Atsugi, Kanagawa 243-0198, Japan

^b NTT Advanced Technology, 3-1 Morinosato, Wakamiya, Atsugi, Kanagawa
243-0198, Japan

^c NTT Afty Corporation, Midori-cho, Musashino, Tokyo, 181-8585, Japan

A new carbon film was prepared by electron-cyclotron-resonance plasma (ECR) sputtering method [1]. The parameters such as ion irradiation current density, acceleration voltage, substrate temperature and Ar gas pressure were controlled to deposit non-hydrogenerated amorphous carbon film onto the surface of silicon substrates. The typical thickness of the carbon film is 40 nm after 15 minutes deposition. The carbon film is different from that prepared by chemical vapor deposition (CVD) of aromatic compounds [2]. The ECR sputtered and CVD carbon films were fabricated into microarray electrodes by photolithography and dry-etching technique. Compared with CVD electrode, the ECR sputtered carbon film electrode exhibits good electrochemical properties such as low background current, wide potential window and good reproducibility.

In recent years, a lot of interest has been generated on the family of alkylphenols, especially on nonylphenol because they are considered as environmental pollutants as causing reproductive problems [3]. It is difficult to detect alkylphenols with electrochemical detection because electrode surface is easy to be fouled by oxidized products. We detect alkylphenols using miniaturized thin-layer radial flow cell with ECR sputtered and CVD carbon microarray electrodes following separation by capillary electrophoresis. ECR carbon film shows better sensitivity than CVD carbon film with better reproducibility.

Reference:

1. S. Hirono, S. Umemura, Y. Andoh, T. Hayashi and R. Kaneko, *IEEE Transactions on Magnetics*. 34 (1998) 1729.
2. O. Niwa and H. Tabei, *Anal.Chem.*, 66 (1994) 285.
3. S. Jobling and J. P. Sumpter, *Aquat. Toxicol.*, 27 (1993) 361.

P115

オンプレート CE-MALDI-TOF/MS 法の開発と
生体成分分析への応用
尾島典行、山本高大、○升島 努
広島大・医総薬

Development of On-plate CE MALDI-TOF/MS and Its Application to the Analysis of Biomolecules

Noriyuki Ojima, Takahiro Yamamoto, and Tsutomu Masujima

Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University

We have on lined the capillary electrophoresis (CE) and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). In this system, the eluted sample solution through the capillary tube is spotted onto the MALDI target plate by electronanospraying. The usefulness of on-plate CE-MALDI-TOF/MS (we call) was tested by using sample solution including two peptides bradykinin and hexapeptide (Orn-Pro-Pro-Phe-Ile-Val). The relative amount, calculated from a mass spectrum, of each peptide at a given migration time was consistent of that calculated CE chromatogram. The interface for more performance of this on-plate CE-MALDI-TOF/MS will be discussed.

【はじめに】マトリックス支援型レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) 法は低分子量から高分子量まで迅速に感度よく生体成分の検出を行うことができ、広く使用されている。しかしながら MALDI-TOF/MS 法は試料をマトリックスと混合してプレート上にロードするという前処理操作が必要なために、微量な試料を分離分析する優れた方法であるキャピラリー電気泳動 (CE) 法と組み合わせたオンライン測定を行うことは困難である。そこで我々はエレクトロナノスプレーの原理を用いてこの二つの方法を組み合わせることで多種類の試料を分離しながら分析が行える汎用性の高い質量分析ができると考え、オンプレート CE-MALDI-TOF/MS 法を開発している。

【実験】図1に装置の概念図を示す。キャピラリーの一端を試料溶液または泳動液中に浸し、他端にはステンレスのコネクターを取りつけ、このコネクターにさらにキャピラリーを取りつけその端を MALDI-TOF/MS 用プレート

の近傍に設置した。試料導入口、コネクターとプレートの間で段階的に電場を印加することで試料溶液-コネクター間のキャピラリーで CE を行い試料を分離し、溶出液をキャピラリーの試料出口端からプレート上に直接噴霧させた。実際にこの方法で CE

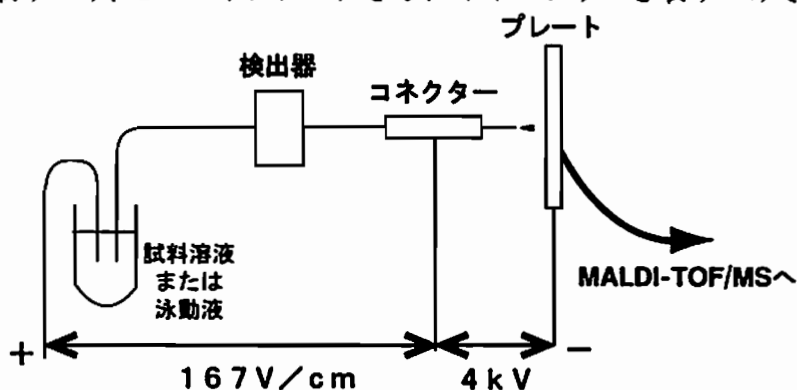


図1. on-plate CE-MALDI-TOF/MS 装置概念図

で分離し質量分析が行えるかを確認するために、ブラジキニン (Fw=1060.3) とヘキサペプチド (Om-Pro-Pro-Phe-Ile-Val, Fw=685.8) をそれぞれ 0.5nmol/ μ L 含む混合溶液について測定を行った。電気泳動中の試料は JASCO875—CE を用い紫外光吸収 (220nm) で検出した。試料導入端から検出器までのキャピラリーの長さを 40cm とし、泳動中キャピラリーには 167V/cm の電場を加えた。コネクタとプレート間には 20kV の電場を印加した。風乾後、試料噴霧部位にマトリックスとして α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (10mg/ml) 溶液を 1 μ L を滴下し、PE Biosystems 社製 Voyager RP MALDI-TOF/MS 装置を用いてマスペクトルを測定した。

【結果】図 2 にブラジキニンとヘキサペプチドを CE で分離したクロマトグラムを示す。泳動時間 10 分 30 秒と 15 分の位置にそれぞれの試料が溶出したことを示すピークが検出された。溶出液がプレート上にスポットされる位置を 30 秒ごとに換え、測定した各スポットのマスペクトルを図 3 に示す。泳動時間 10 分から 11 分の間でヘキサペプチドによる $m/z=685.86$ のピークのみが検出された。この 10 分、10 分 30 秒、11 分のマスペクトルのうち 10 分 30 秒のマ

マスペクトルのヘキサペプチドのピークのカウント数が最も大きく、CE クロマトグラムの結果と一致した。また泳動時間 14 分から 16 分の試料ではブラジキニンのみが検出された。14 分、15 分、15 分 30 秒、16 分の 4 つのマスペクトルのうち 15 分のブラジキニンのカウント数が最も大きくこれも CE クロマトグラムの結果と対応した。CE の結果とマスペクトルの結果を比較するため図 2 に泳動時間 9 分から 12

分 30 秒は $m/z=685.86$ (▲) の 13 分から 16 分は $m/z=1060.3$ (●) のカウント数をそれぞれ CE のクロマトグラムに合うように規格化し、泳動時間に対してプロットした。CE クロマトグラムとマスペクトルから得られた結果は良く一致しており、CE で成分分離しながら質量分析を行うことができた。発表ではさらにさまざまなモードの CE と組み合わせて行った結果や分離した成分を消化酵素処理しマスペクトルから蛋白質の配列決定を行った結果についても報告する。

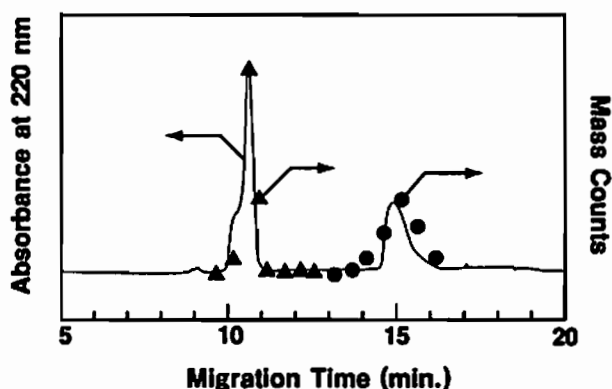


図 2. 混合溶液の CE クロマトグラム

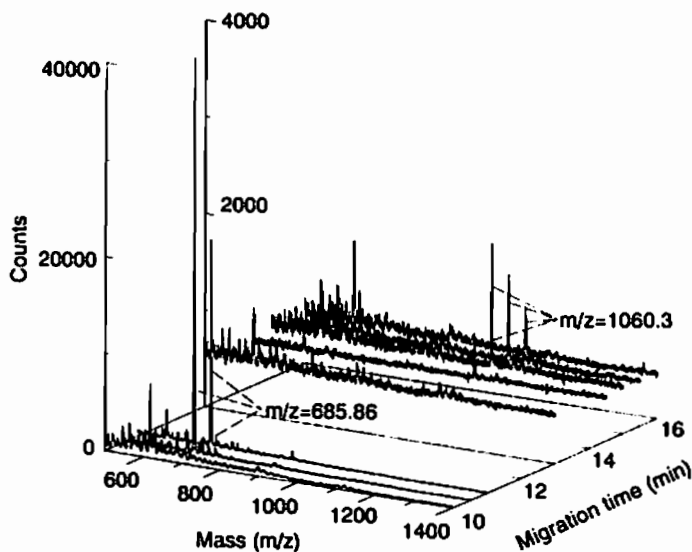


図 3. 溶出試料のマスペクトル

P116

パラボリックフィールド型TOF/MSを検出器とする 核酸塩基のキャピラリー電気泳動測定

○古本理郎、福本敬夫、渡會 仁

大阪大学大学院理学研究科

Capillary Electrophoresis of Bases and Nucleosides Detected by Parabolic Field Accelerated Time of Flight Mass Spectrometer

Tadao Furumoto, Takao Fukumoto, and Hitoshi Watarai

Graduate School of Science, Osaka University

Mass spectrometer has been widely studied as a sensitive and selective detector in capillary zone electrophoresis (CZE). However, the stability of the ionization interface and the speed of the acquisition rate of spectra still remain to be improved. In this study, electrospray ionization parabolic acceleration field time-of-flight mass spectrometer (ESI-TOF/MS, JAGUAR, LECO) was investigated as a detector in CZE of bases and nucleosides. A CE capillary with a small electrospray interface was designed to be able to add sheath solvent to the eluant of CZE at the end of the separation capillary and to introduce the solution into ESI-TOF/MS with appropriate flow rate. Advantages of the TOF/MS having parabolic acceleration field in its flight tube are wide m/z range (0 – 6500), high acquisition rate of spectra (5000 spectra/sec) and high sensitivity (over 1 count for 1 amol). Measurements were carried out using a buffer solution composed of water, acetonitrile and acetic acid (50:50:0.3 v/v, pH 3.5). In this acidic condition, adenine and adenosine migrated depending on the fraction of the protonated form by electrophoretic force. Introducing the eluant into ESI-TOF/MS, time-resolved mass spectra were obtained continuously and the electropherogram for each analyte was constructed.

はじめに

質量分析装置は高感度、高選択的な検出器としてキャピラリー電気泳動においても広く検討されているが、イオン化の安定性やスペクトルの取り込み速度に関しては依然改善の余地がある。本研究ではスペクトルの取り込み速度が 5000 スペクトル/秒と速く、フライトチューブ内にパラボラ型加速電場を有する TOF/MS 装置(JAGUAR, LECO)を検出器とし、自作のエレクトロスプレーインターフェース付き CE キャピラリーを用いて核酸塩基及びヌクレオシドがプロトン付加型を生じる酸性条件においてそれらの CZE 測定を行った。

実験

CZE には内径 50 μm 、外径 150 μm 、長さ 30 cm の熔融シリカキャピラリーを用いた。シリンジポンプから補助溶媒を送るためのキャピラリーと内径 190 μm 、外径 410 μm 、長さ 6 cm のステンレスチューブをテフロンチューブに挿入し、その外側を熱収縮性チューブで一つに固定して、エレクトロスプレーインターフェース付き CE キャピラリー(Fig.1)を製作した。

試料は水：アセトニトリル：酢酸混合溶液(50:50:0.3 v/v, pH 3.5)を溶媒として調製し、分離キャピラリーの両端に 1 kPa の圧力差をかけて導入した。CZE-TOF/MS 測定中は試料導入側にエレクトロスプレー部の電位 3.5 kV に対して 10 kV 高い 13.5 kV を白金電極を用いて印加した。補助溶媒には試料溶媒と同じ混合溶液を用い、CZE の開始と同時に流速 0.05 ml/h でシリンジポンプで送液した。また TOF/MS データの取り込みも同時に開始し、一定時間毎に積算したマススペクトルを表示させ、記録・解析を行った。

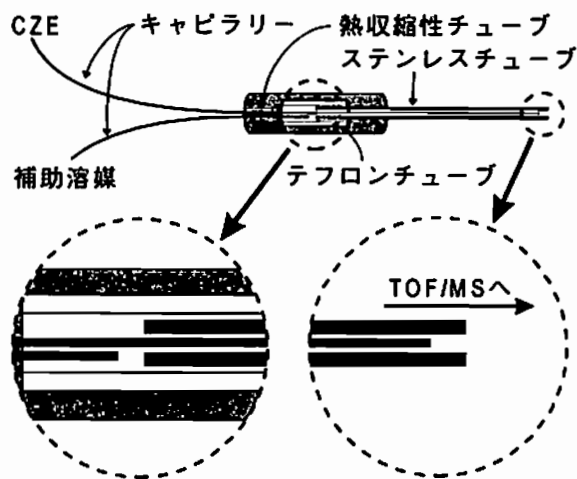


Fig.1 エレクトロスプレーインターフェース
付き CE キャピラリー

結果と考察

Fig.2 の電気泳動図はアデニン($pK_a = 3.6$)及びアデノシン($pK_a = 3.2$)をそれぞれ 45 fmol、55 fmol を含む混合試料を導入して測定した結果である。pH 3.5 ではアデニンの方がアデノシンよりもプロトン付加型が多く存在することが予想され、実際に保持時間はアデニンの方が短かった。しかしマススペクトルではアデノシンのプロトン付加型のシグナルがより強く現れた。またアデノシンから糖が解離して生じたアデニンのプロトン付加型も観測された。UV 検出器を用いた CZE では、このような解離が見られないことから、CID による解離と考えられる。

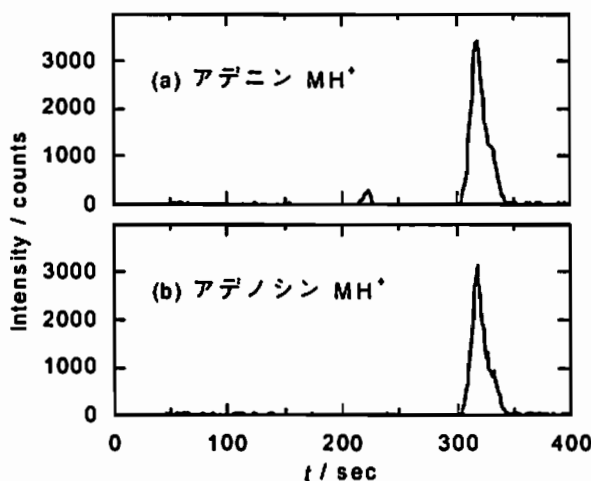


Fig.2 アデニン、アデノシン混合試料の
CZE-TOF/MS 検出電気泳動図

(a) m/z 135.7 – 136.7 (b) m/z 267.7 – 268.4
測定は 5000 スペクトル/秒で行い、6400 スペクトル(1.28 秒)を 1 点として表示した。

P117

α 1-酸性糖タンパク質のグライコフォーム分析 — キャピラリー電気泳動オフライン MALDI-TOFMS

近畿大学 薬学部 木下充弘*、川上大輔、清 一雄、遠藤香織、小田泰雄、掛樋一晃

Capillary Electrophoresis –Off Line MALDI-TOF MS of α 1-Acid Glycoprotein

Mitsuhiro Kinoshita, Daisuke Kawakami, Kazuo Sei, Kaori Endo, Yasuo Oda and
Kazuaki Kakehi

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

We have developed a CE method for the analysis of glycoforms of α 1-acid glycoprotein using a surface-modified capillary. In the present study, we collected each peak on the electropherogram and analyzed by MALDI-TOF MS. The earlier migrating fractions contained higher content of sialic acids. We further examined the relationship between glycoform separation on CE and the distribution of di-, tri- and tetra-antennary glycan chains attached to AGP molecules.

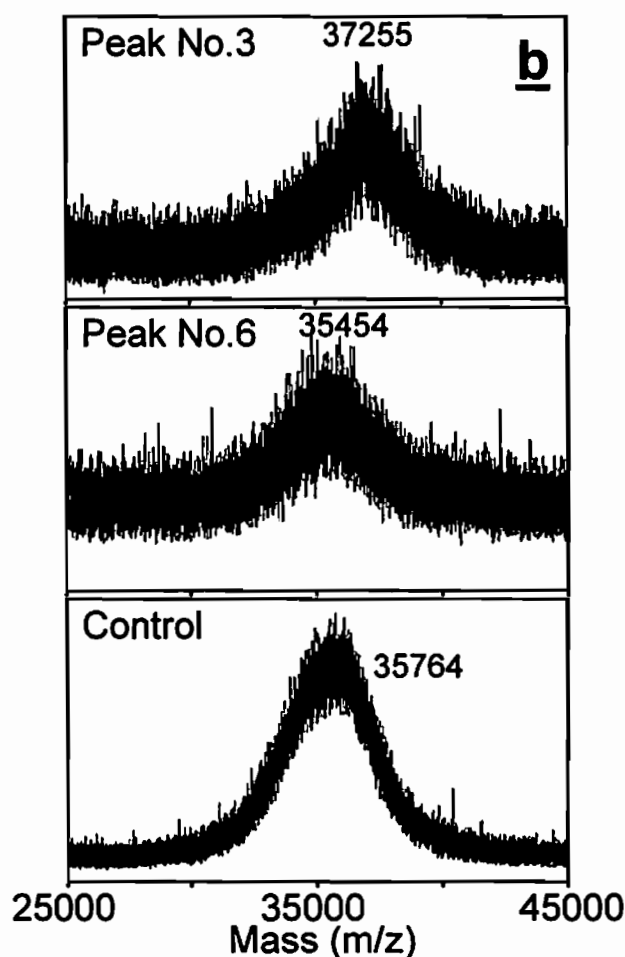
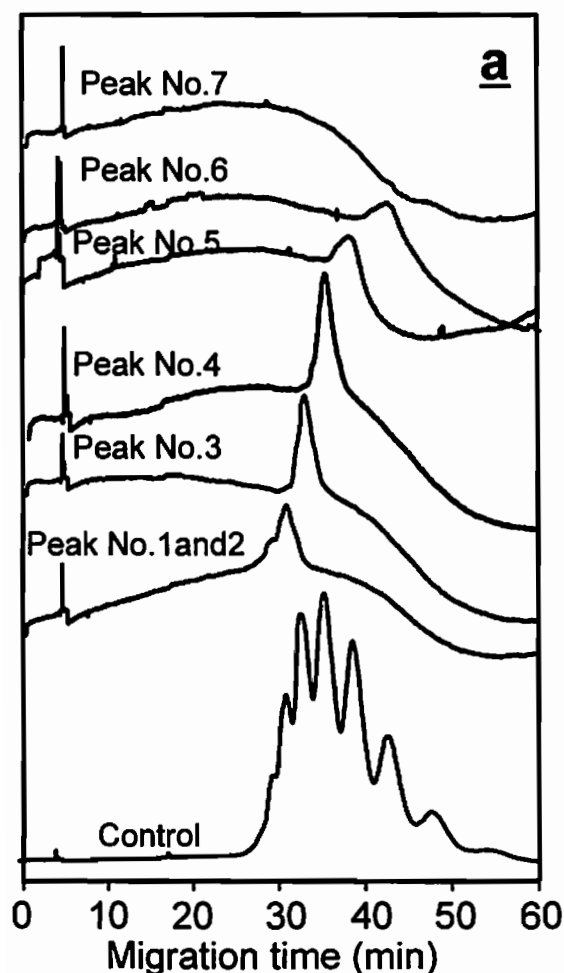
血清中に存在する α 1-酸性糖タンパク質(AGP)は加齢や炎症などの生理的な状態変化を反映してその量が変わることが知られている。また、AGP は塩基性薬物のキャリアータンパク質としての役割にも興味をもたれ多くの研究が行われている。我々は AGP をはじめとするシアル酸を含有する糖タンパク質のグライコフォーム分析について検討し、その等電点から少しずれた pH を有する緩衝液中で内面修飾キャピラリーを使用することにより高い分離能でグライコフォームが分離できることを示した[Kinoshita et al., J. Chromatogr. 2000]。今回、我々はイオン交換クロマトグラフィー、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーあるいは Con A アフィニティークロマトグラフィーにより分離された分画をキャピラリー電気泳動(CE)により分離し、各グライコフォームについて TOF-MS により検討したので報告する。

[方法] AGP グライコフォームの各種クロマトグラフィーによる分離 monoQ、イミダゾール、あるいは Con A を固定相とするクロマトグラフィーにより分離された AGP の不均一性と糖鎖の構造との関係について、糖鎖を N-グリコシダーゼ F により切断後蛍光標識し、HPLC により検討した。キャピラリー電気泳動(CE) Beckman P/ACE 5010；キャピラリー、内壁を dimethylpolysiloxane 処理した DB-1 キャピラリー（内径 100 μ m, 有効長 50 または 20 cm）をあらかじめ 0.5% ヒドロキシメチルセルロースを含む 20 mM 酢酸緩衝液（pH 4.2）で洗浄後使用した。泳動用緩衝液 20 mM 酢酸緩衝液（pH 4.2）、印加電圧 15kV、分析温度 30°C、検出 紫外外部吸収検出（214 nm）、試料注入 加圧法（10 秒）。MALDI-TOF MS 装置は PE Biosystems 社製 Voyager DE-PRO を使用した。Matrix には 2,5-dihydroxybenzoic acid を用い、試料

を 50% マトリックス溶液で溶解し、1 μ L 相当をネガティブイオンモードにより測定した。

キャピラリー電気泳動により分離された AGP グライコフォームと糖鎖不均一性との関係 AGP (10 mg/ml)水溶液を試料として上記条件で分析を行い、予備実験によりあらかじめ求めておいた泳動時間に緩衝液を充填した陽極側のバイアルを交換して各ピークを捕集した。この操作を 8 回くり返し、分取した各分画は、ミリポア製 Ultrafree MC (MW 10,000 cut off)により脱塩後、CE により確認した。さらに分離された各分画を TOF-MS により測定した。

〔結果・考察〕 Fig.1a に AGP を CE により分画した結果を示す。Fig.1b に分画された画分を MALDI-TOF MS によりそれぞれ測定した結果を示す。AGP は遺伝子多型及び糖鎖の不均一性により、 m/z 36,000~38,000 に幅広い分子イオンピークを与えたが、一般に速く泳動される成分は高分子量を示した。これは電気泳動上速く移動するグライコフォームほど、シアル酸量が高いことを考えると妥当な結果である。また、ピークの分離に及ぼす糖鎖の影響を検討するために、各種のクロマト手段により分離されたグライコフォーム中の糖鎖の分布と電気泳動挙動の関係を調べたところ、シアル酸含量ならびに 2 本鎖糖鎖の存在比がグライコフォームの分離に特に大きな影響を及ぼすことが示された。



P118 キャピラリー電気泳動による環境試料のイオン分析

○ 佐藤康博
大塚電子株式会社

Analysis of Inorganic Ions in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis

Yasuhiro Sato

Otsuka Electronics Co.

Inorganic anions and cations in environmental samples were measured by capillary electrophoresis. Anionic and cationic species in the samples were continuously measured only by setting two kinds of electrolytes for inorganic anions and cations with samples. The water samples we measured were collected from Kizu (Kyoto), Katsura (Kyoto), Uji (Kyoto), and Yodo (Osaka) Rivers. The limits of detection for anions (chloride, sulfate, nitrate, fluoride, phosphate) and cations (potassium, calcium, sodium, magnesium) were both 0.1ppm.

1. はじめに

環境試料は雨水、河川、湖沼、生活雑排水から工場排水に至るまで幅広く、地域の気象条件あるいは産業の活動状態などによって汚染状況が刻々と変化する。

年々深刻化する環境汚染に対し、最近では、様々な環境規制や下水処理施設の充実化といった努力により環境改善がおこなわれているが、それらの試料を迅速に分析し把握する事は水質管理や汚染源の解明において非常に重要である。

環境試料における従来のイオン分析方法では、分析対象となる成分に応じた分析方法や試料の前処理法の選択が必要であった。

キャピラリー電気泳動(CE)では、手間のかかる試料の前処理が無く、多くの成分について短時間、高分離の測定が可能であるので、環境試料のイオン分析には有効であると考えられる。

今回、実際の環境試料として、近畿地域の主要な河川である木津川、宇治川、桂川淀川の各河川中に含まれる陰イオンと陽イオンについて測定をおこない比較検討した。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は大塚電子 CAPI-3200Q を用いた。キャピラリーは全長 80cm、内径 75 μ m、有効長 67.5cm の合成シリカ製を使用した。

陰イオンの分析は無機アニオン分析用泳動液(大塚電子製)を使用し、印加電圧は-20kV でインダイレクト UV 法を用いて測定をおこなった。陽イオンの分析は陽イオン分析用泳動液(大塚電子製)を使用し、印加電圧は 20kV でインダイレクト UV 検出法を用いて測定をおこなった。

3. 結果と考察

木津川、宇治川、桂川、淀川の各河川の特徴として、木津川は奈良県、三重県を通る河川、

宇治川は琵琶湖より流れ出る瀬田川が京都を通過して名称が変わる河川であり、桂川については京都の市街地を流れる河川である。また、淀川はそれらの3つが合流して形成される河川である。

今回、それぞれの河川において測定の対象としたイオン種は、陰イオンについては Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 F^- 、 PO_4^{3-} 、陽イオンについては K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} であり、それぞれの検出感度は 0.1ppm であった。

4 種類の河川水に含まれるイオン種について CE により測定をおこない比較した結果、最もイオン濃度の高い河川は京都の市街地を流れる桂川であった(図 1、図 2)。

また、宇治川のイオン濃度は桂川よりもやや下回る程度であり、最もイオン濃度の低い河川は奈良県、三重県を通る木津川であった。

淀川のイオン濃度は、桂川や宇治川の場合と比較すると、淀川の全水量の約 2 割に相当する木津川の流入により、低い結果となっている。

以上の結果から、環境試料中のイオン分析において CE は有効である事がわかった。

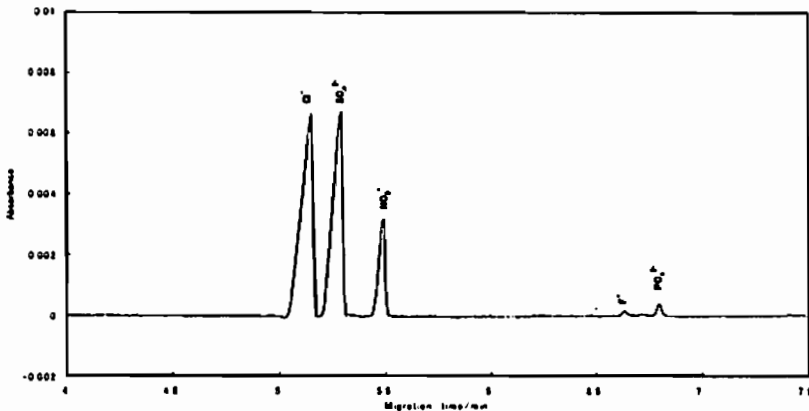


図 1 桂川(原液)の陰イオン分析

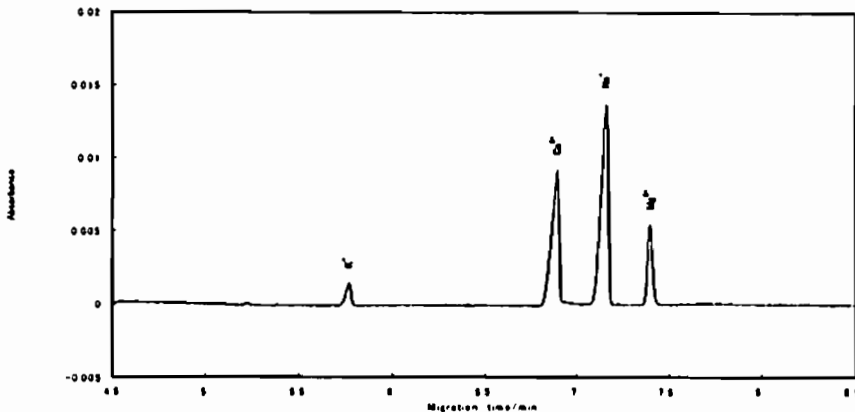


図 2 桂川(原液)の陽イオン分析

文献

1. 社団法人 日本水環境学会、日本の水環境 近畿編、5(2000)、14

P119

キャピラリー電気泳動を用いた無機陰イオン、有機酸、アミノ酸、核酸および糖を含む陰イオン 200 化合物の分析法

○曾我朋義¹、野上知花¹、今泉宗太²

横河アナリティカルシステムズ株式会社¹

豊橋科学技術大学²

Capillary Electrophoresis Method for the Analysis of 200 Anions Including Inorganic Anions, Organic Acids, Amino Acids, Nucleotides and Carbohydrates.

Tomoyoshi Soga¹, Chika Nogami¹, Motohiro Imaizumi²

¹Application Center, Yokogawa Analytical Systems Inc., Tokyo 180-0006

²School of Materials Science, Toyohashi University of Technology, Toyohashi 441-8580

A simultaneous determination method for underivatized inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides and carbohydrates was developed. Highly alkaline conditions were used to confer a negative charge not only on inorganic and organic anions but also on amino acids, nucleotides and carbohydrates, and to promote their migration towards the anode. Electroosmotic flow was reversed in the direction of the anode by adding cetyltrimethylammonium hydroxide to the electrolyte. Outstanding separations were obtained and electrophoretic mobilities of 200 anions including alcohols, pesticides, metal complexes, chelating reagents and forensic anions were determined by the method. The method provides excellent reproducibility, good linearity and appropriate sensitivity. Its utility was demonstrated by the analysis of a many kind of samples.

1. はじめに

無機陰イオン、有機酸、アミノ酸、核酸、糖などの陰イオン性化合物は、化学、生化学、薬学、農学、食品学等の分野で最も頻繁に分析されている化合物の一つである。これらの陰イオン性化合物の分析には、主にイオンクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーが用いられているが、分析対象物によって、分離カラム、移動相、検出器が異なるため、幾つもの分析装置や分析条件が必要であった。本研究では、キャピラリー電気泳動によるこれらの一斉分析法を開発し、この方法を用いて 200 の陰イオン性化合物を測定したので報告する。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は、ダイオードアレイ検出器を内蔵した Agilent Technology 製の Agilent CE (旧 HP3DCE) を使用した。キャピラリーには、フューズドシリカ (内径 50 μ m、全長 112.5 cm、有効長 104 cm) を使用した。泳動緩衝液には Agilent Basic Anion Buffer を用い、印加電圧 -30 kV、温度 15 $^{\circ}$ C で測定した。試料の注入は、加圧法 50 mbar, 6 sec で行った。検出は、UV ダイオードアレイ検出器を使用し、間接吸光度法で行った。

3. 結果および考察

アミノ酸の等電点は、2.77 から 10.76 であり、主な糖の pKa は 12 から 13 である。したがって pH12 以上の高アルカリ性条件下では、無機陰イオン、有機酸のみならずアミノ酸、糖もすべて陰イオン性を示し陽極に泳動した。またセチルトリメチルアンモニウム塩を泳動緩衝液に添加し、電気浸透流を陽極方向に反転することで分析時間を短縮した。Fig. 1 に本法を用いて測定した 43 成分の無機陰イオン、有機酸、アミノ酸、糖標準液の一斉分析例を示した。この標準液の繰り返し再現性(n=5)は、移動時間が相対標準偏差 0.5 %以内、面積が 0.8~4.9 %であった。この方法を用いて、上記陰イオンに加え、核酸、アルコール、農薬、キレート剤、有害陰イオン等を含んだ 200 の陰イオン性化合物の電気泳動移動度を測定した。また、醤油、日本酒、果物、海産物中の陰イオン類の一斉分析に応用した。本法は陰イオン類の一斉分析を可能にし、簡便さ、分析時間等、従来法に比べ優れており、様々な試料中の陰イオン分析に有用であると思われる。

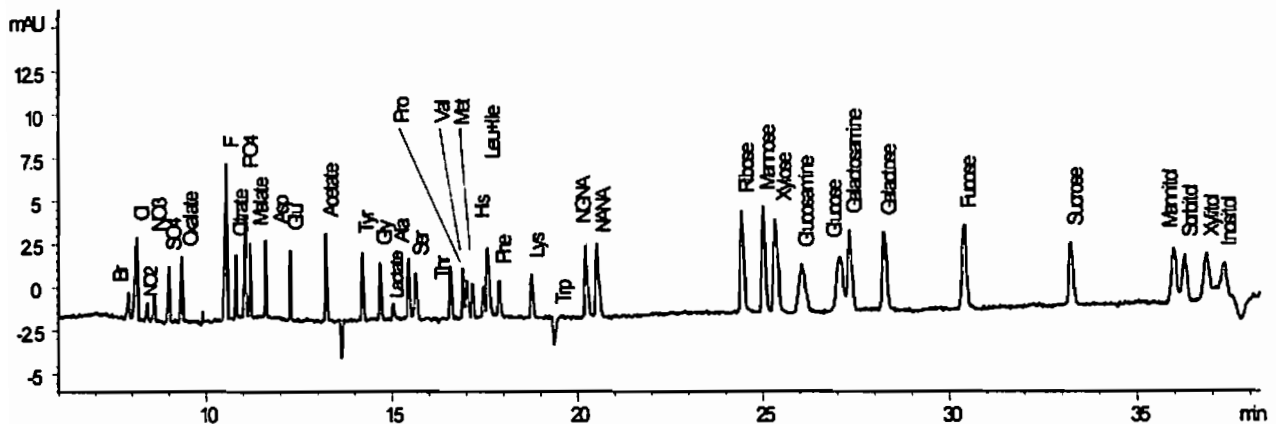


Fig. 1 Separation of inorganic and organic anion, amino acid and carbohydrate standard mixture (Concentrations: Cl⁻, 110 mg/l; carbohydrates, 200 mg/l each; others, 50 mg/l each).

参考文献

1. T. Soga and G.A. Ross, J. Chromatogr. A, 837 (1999) 231.
2. T. Soga, I. Tajima and D.N. Heiger, Am. Lab., 32 (2000) 124.

P120

日本で飼育されているネコの血漿タンパク質と血球酵素型の遺伝的多型性について

吉田治弘¹、廣田順子²、臼井玲子³

専修大学法学部¹、アリスどうぶつ病院²、臼井犬猫病院³

Genetical Polymorphisms of Plasma Protein and Red Cell Enzymes of Domestic Cat in Japan

Haruhiro Yoshida¹, Junko Hirota², Reiko Usui³

1) Senshu University, Kawasaki, 214-8580

2) Alice Animal Hospital, Iruma, 358-0011

3) Usui Dog and Cat Animal Hospital, Utsunomiya, 321-0136

In about 450 plasma samples of domestic cat in Japan including mongrel and 13 breeds, genetic polymorphism of orosomucoid(ORM), transferrin(TF), group specific component(GC) and antithrombin three (ATIII) types were examined through isoelectric focusing at the isoelectric point of pH 4.0-6.0. ORM showed 15 phenotypes by 5 bands of A,B,C,D,and E. TF showed 11 phenotypes by 5 bands of C,E,F,H and J. GC and ATIII showed 3 phenotypes. In about 330 samples including 14 breeds domestic cat red cell, genetical polymorphism of 6-PGD, ESD and PHI were examined used starch gel electrophoresis. 6-PGD and ESD showed 3 phenotypes and PHI showed 2 phenotypes. The ORM, TF, GC, ATIII, 6-PGD, ESD and PHI polymorphism show the gene frequencies each varied with breeds, and therefore suitable for cat identification, parentage testing and population studies.

はじめに

ネコの血液系遺伝標識については、赤血球抗原型、血漿タンパク多型、赤血球酵素型の多型性が明らかにされているものの、品種毎の検討については僅少である。今回、日本国内で飼育されている家ネコについて、急性相反応物質で炎症や悪性腫瘍などによる血漿中に増加するオロソムコイド (ORM)、多型性に富むトランスフェリン (TF)、グループスペシフィックコンポーネント (GC) およびプロテアーゼ阻害因子でトロンビンをはじめとする多くのセリンプロテアーゼと複合体を形成し、その活性を阻害することで知られているアンチトロンビンⅢ (ATⅢ) ならびに赤血球酵素の 6-PGD、ESD および PHI などの遺伝的多型性について、品種毎の表原型の出現頻度ならびに遺伝子頻度を検討した。

材料および方法

ネコ血漿は、疾病の治療および去勢などで動物病院に来院した個体の血液検査の残りを血漿分離し、血球はそのまま凍結保存した。血漿は約 450 例で、雑種、Chinchilla, Siamese, American short hair, 日本ネコ (JPN)、Persian, Himalayan などの 13 品種である。血球については、これらのうちの 330 例について検討を実施した。ネコ血漿の ORM, TF, GC の判定は Neuraminidase 処理した血漿を用い、ATⅢについては未処理血漿を用い、等電点電気泳動は pH4~6 で実施した。これらの血漿の各型判定は、泳動終了後のゲルに、ニトロセルロース膜を載せ、タンパク質を転写し、対応する抗血清に一晩浸漬した後、抗ウサギ IgG 血清を 2 次抗体として反応させたのち、染色し型判定を実施した。血球酵素型については、溶血液を加水澱粉ゲルで泳動し、酵素染色し、型判定を実施した。

実験結果

約 450 例の血漿は、ORM は図 1 に示す通り 15 表現型に分類できた。TF は、図 2 に示すように 11 表現型として分類できた。GC、ATⅢについては、それぞれ 3 表現型に分類できた。ORM, TF, GC および ATⅢの品種毎の例数と遺伝子頻度を表 1 にまとめた。血球酵素型 6-PGD、ESD は、図 3、4 に示すように 3 表現型として観察できた。表 2 に、品種毎の血球酵素型の遺伝子頻度をまとめた。これらの遺伝的多型性の品種による遺伝子頻度の差異は、品種の成立などに関連が考えられる。

図 1. 血漿 ORM の表現型

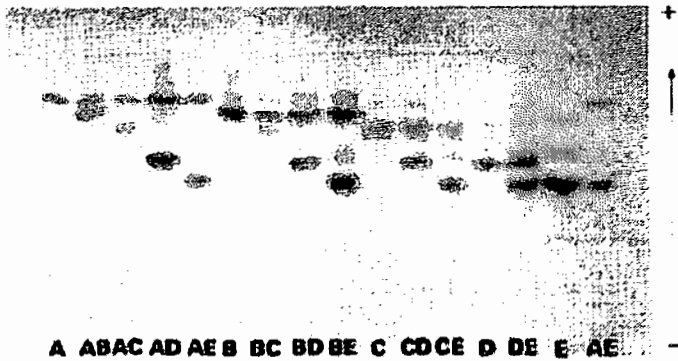


図 2. 血漿 TF の表現型

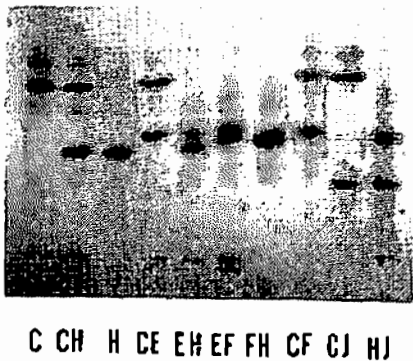


表 1. ネコ血漿 ORM、TF、GC および ATⅢの品種による遺伝子頻度の比較

品種	例数	ORM					TF					GC		ATⅢ	
		A	B	C	D	E	C	E	F	H	J	F	S	F	S
MIX	337	.024	.251	.030	.131	.570	.533	.006	.015	.437	.009	.271	.729	.926	.074
CHI	190	.053	.053	.105	.790	.700	0	0	.250	.050	.650	.350	.763	.237	
SIA	160	.563	.0	.218	.219	.531	0	.031	.438	0	.469	.531	.929	.071	
JPN	120	.042	0	.333	.625	.385	0	0	.615	0	.192	.808	1	0	
AMS	12	.083	.042	.083	0	.792	.542	0	0	.458	0	.042	.958	.773	.227
PER	100	.250	.250	.200	.300	.500	0	0	.500	0	.450	.550	.750	.250	
HIM	6	.083	.333	0	.167	.417	.667	0	0	.250	.083	.583	.417	.833	.167
SCF	50	0	0	.200	.800	.250	0	0	.750	0	.100	.900	.500	.500	
MAI	40	.125	0	.125	.750	.500	0	0	.500	0	.250	.750	1	0	
BUR	4	.125	.250	0	0	.625	0	0	.125	.875	0	.375	.625	1	0
ABY	30	0	.333	0	.667	.333	0	0	.667	0	.167	.833	.750	.250	
NFC	20	0	0	.250	.750	.250	.250	0	.500	0	.250	.750	.750	.250	
RUS	20	1	0	0	0	0	1	0	0	0	.750	.250	1	0	
Total	432														

図 3. 6-PGD の表現型

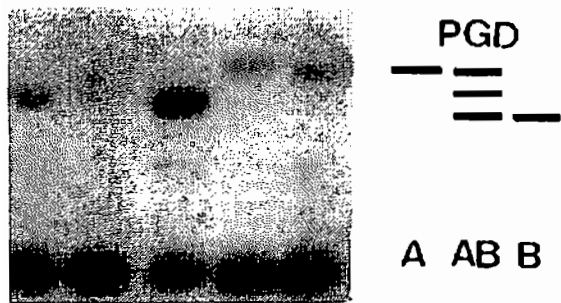


図 4. ESD の表現型

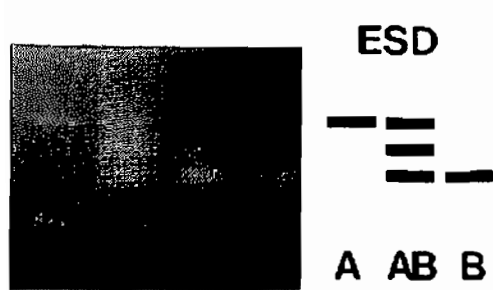


表 2. 血球酵素型の遺伝頻度

品種	例数	6-PGD		ESD		PHI	
		A	B	A	B	F	S
MIX	236	.250	.750	.519	.481	.014	.986
AMS	16	.750	.250	.219	.781	0	1
SIA	15	.367	.633	.800	.200	0	1
JPN	15	.300	.700	.467	.533	0	1
CHI	13	.462	.538	.429	.571	0	1
BUR	7	.214	.786	.938	.062	0	1
HIM	7	.786	.214	.857	.143	.071	.929
SCF	5	.600	.400	.400	.600	0	1
MAI	4	.250	.750	0	1	0	1
RSH	3	.167	.833	.750	.250	0	1
NFC	2	0	1	.500	.500	0	1
PER	2	1	0	.250	.750	.500	.500
ABY	1	0	1	0	1	0	1
Total	326						

P121

New method for DNA sequencing -Pyrosequencing- : Comparative study between pyrosequencing and gel-based sequencing

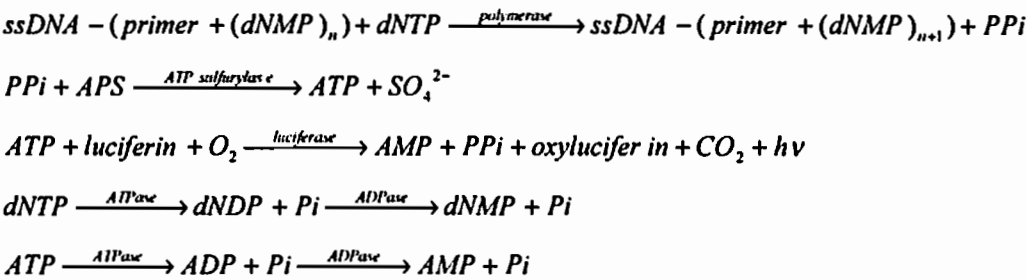
Zhou Guohua, Masao Kamahori, Kunio Harada, Kazunori Okano and Hideki Kambara
Central Research Laboratory, Hitachi Ltd.

Introduction

The human genome project has been accelerated by the high-throughput sequencing instrument such as gel-based capillary-array sequencers. We will get the database of whole human genome sequence soon. The further development of DNA field is owed to clarifying the functions of genes and their application to various fields. In the post genome era, new analytical tools are required to investigate gene expression profile, DNA diagnostics and genome comparative analysis including single nucleotide polymorphisms (SNPs), where it is not necessary to sequence long DNAs. Although various new technologies for this purpose have been reported, any good method to sequence several tens of bases to identify the DNA fragments has not yet been developed. One method called pyrosequencing¹ seems promising as a massive parallel method to sequence short DNA fragments. The introduction and the comparison with gel-based sequencing method were carried out in this paper.

Principle of pyrosequencing

In this technique, four enzymes are employed, DNA polymerase for incorporating nucleotides, ATP sulfurylase for catalyzing PPi to energy source ATP, luciferase for generating light (signals) from ATP, and apyrase for degrading ATP and extra nucleotides. All of the reactions are performed only in a single reaction step and a single chamber. All the reagents are put in the chamber except for dNTPs. The whole process can be expressed as the following cascade reactions.



Apparatus

The used pyrosequencing apparatus is very simple as shown in figure 1, which consists of a reaction module having a reaction chamber, four dNTP reservoirs, a side-on photomultiplier tube (PMT), an amplifier (AMP), a power supply and a computer. Pressure to inject dNTP into the reaction chamber is supplied by an air-pump which is attached to the respective dNTP reservoir. The diameters of the four dNTP reservoirs and the reaction chamber are 10mm and 6mm, respectively.

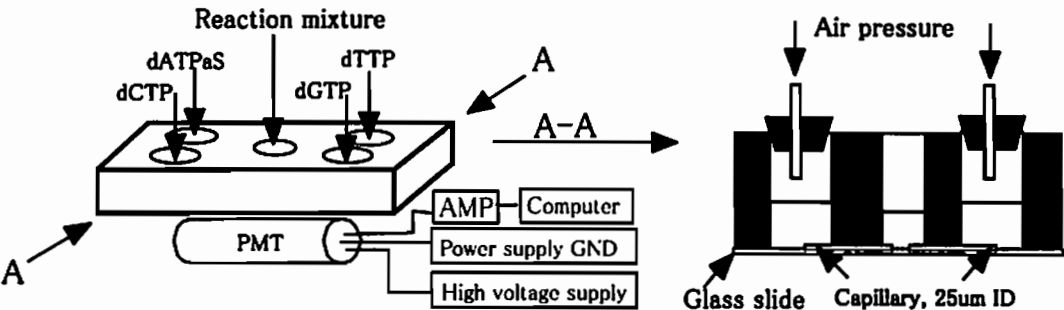


Figure 1. Schematic illustration of pyrosequencing apparatus

Results and discussion

Optimized condition. The reaction conditions including the amount of dNTP for each injection, the speed of dNTP injection, the amount of polymerase and apyrase, and linearity of pyrosequencing for the detection of homopolymeric regions were studied. The required pressure to inject 0.2 μ l of dNTP in 3s through the capillary of 2 cm long and 25 μ m i.d. is 1.24×10^5 Pa, which is easily realized by using an air pump. The leakage of undesired dNTP species into the reaction chamber by the capillaries is so small that polymerase reaction can not be occurred, and its accumulation is degraded by existed apyrase. 150 fmol of DNA template in 100 μ l is sensitive enough to give a linear result.

DNA sequencing for the region near to primer. It is well-known that gel-based electrophoresis can not give the right sequence near the primer, and the length is about 30-50 bases. The mistake occurs as the result of mobility change by using different labeled fluorescence to detect four kinds of bases in the same lane and overlap on the DNA peak of non-labeled fluorescence. In addition, several missing bases "N" in the electrophoresis sequencing profile may be observed. Because gel electrophoresis of DNA fragments is greatly affected by both electrophoretic condition (temperature, buffer solution, etc.) and sequence of DNA fragments. However this region can be accurately sequenced by pyrosequencing as shown in Figure 2.

DNA sequencing for GC-rich DNAs; Pyrosequencing can sequence GC-rich DNAs that can not readily sequenced by gel-based electrophoresis. A genome DNA containing 13 identical G in homopolymeric region was successfully detected as shown in Figure 3. While by gel electrophoresis, the sequence determination was stopped in this region. The linearity of pyrosequencing is very good for more than 10 identical bases in the homopolymeric region.

Conclusion

Pyrosequencing is a complementary method to gel-based electrophoresis, which can accurately sequence short DNAs. And it also has the advantage of real-time processing, simple instrumentation and avoiding the use of labeled primers or labeled nucleotides.

References

- I. M. Ronaghi, M. Uhlen, P. A. Nyren, *Science* **281**(1998)363, 365.

Acknowledgements

This study was performed as a part of the research and development project of Industrial Science and Technology Program supported by NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization).



Fig. 2. Pyrosequencing on a genome DNA(the region near to primer).

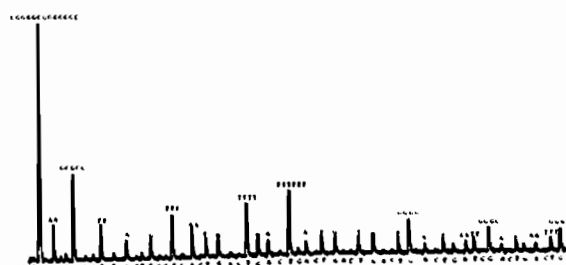


Fig. 3. Pyrosequencing on a genome DNA(GC rich).

P122

キャピラリーアレイゲル電気泳動を応用したDNA自動分取装置の
分離性能

○入江隆史¹、福村龍太郎²、荒木良子²、嶋本桃子¹、安倍真澄²、
神原秀記¹

日立中央研究所¹、放射線医学総合研究所²

Separation performance of automated DNA fragment sorter using capillary-array gel electrophoresis

Takashi Irie¹, Ryutaro Fukumura², Ryoko Araki², Momoko Shimamoto¹, Masumi
Abe², and Hideki Kambara¹

¹Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., Kokubunji Tokyo 185-8601

²National Institute of Radiological Sciences, Inage Chiba 263-8555

One of the major research topics in the post genome-sequencing era is to analyze gene functions through gene expression profiles. Although the cDNA micro-array is efficient for gene expression analysis, DNA fragment-analysis methods based on gel-electrophoresis, differential display for example, are still important and convenient to explore novel genes because they do not require complete sequence data and cDNA clones. In the fragment analysis, differentially expressed DNA fragments must be extracted from a gel for further analysis such as cloning and sequencing. Commercially available capillary-array DNA sequencers realize high-throughput DNA fragment analysis. However, extraction of DNA fragments is still problematic and labor-intensive process. A design of automated DNA fragment sorter based on capillary gel-electrophoresis was reported previously to solve this problem. It comprises 16 gel-filled capillaries and can sort up to 8 fractions in each of 80 samples per day. The resolution of about 2-5 bases was suggested by electropherograms of sorted DNA fragments after re-amplification by PCR. This resolution was examined more practically by fragment size distributions after cloning. The samples are prepared by an improved protocol based on the AFLP method. 48 reactions of colony-PCR per fractionation were sufficient to obtain the clones with desired fragment length.

はじめに

ポストゲノムシーケンシング時代の重要課題の1つは、遺伝子の発現プロフィールを基にした遺伝子機能の解明である。発現プロフィール解析法としてcDNAマイクロアレイ等が利用されているが、一方で遺伝子のライブラリーや詳細なゲノム配列情報を必要としないディファレンシャル・ディスプレイ(DD)法^{1) 2)}やAFLP法³⁾等も、新規な遺伝子を比較的簡便な操作で探索できる点で価値がある。DD法等において有意と思われる遺伝子の単離は、平板ゲル電気泳動によって分離したDNAバンドの内、複数検体間で強度差のあるものを切り取ることで行われており、この分取操作の効率化・精度向上が課題であった。既に報告したキャピラリーアレイ型DNA分取装置⁴⁾は、一日当たり80試料について各最大8フラクションを自動的に分取可能である。今回その分離性能を実際の遺伝子探索のプロトコルに即して評価することを目的として、分取フラクションを

クローニング後に colony-PCR で増幅し、各クローンの断片長を元の試料での断片長と比較検討した。

実験

- (1)試料調製；AFLP 法に改良を加えたプロトコルで調製した。2 種類の制限酵素を用いて cDNA を断片化し、両端の制限酵素サイトの内側 2 塩基ずつの選択 PCR によって 256 のグループに分けて増幅している。
- (2)電気泳動；(a)フラグメント解析：ABI-310(Applied Biosystems), 分離媒体 POP4, 泳動長 36cm(全長 47cm), キャピラリー温度 60℃, 泳動電圧 319V/cm。 (b)DNA 分取：分離媒体 3.5% LongRanger(Takara), 泳動長 20cm, 泳動バッファ 1xTBE, キャピラリー温度 25℃, 泳動電圧 75 V/cm。 (c)フラクションの取得条件：時間 20 秒(液量 0.2 μ L)。

結果と考察

- (1)分取したフラクションを PCR で再増幅しフラグメント解析を行った結果では、元の試料において分取を指定した断片長に対応するピークが検出された。
- (2)現在までに 7 フラクションをクローニングし、それぞれ 48 コロニーについて長さ解析を行ったところ、分取した長さに対応するフラグメントは 3-13 個検出された。
- (3)所望の長さの DNA がクローンとして取得できることから、本分取装置は特異的発現遺伝子のスクリーニングに適用可能であると考えられる。さらに純度の高いフラクションを得るために、試料調製プロトコルの最適化も含めて検討を行う。

謝辞

(株) Genox 創薬研究所殿には本分取装置の利用に便宜を図って頂きました。ここにお礼申し上げます。

文献

1. Liang, P., and Pardee, A. B., *Science* **257** (1992), 967-971
2. Ito, T., Kito, K., Adachi, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H., and Sakaki, Y., *FEBS Letter* **351**(2) (1994) 231-236
3. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijter, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M., *Nucleic Acids Res.* **23** (1995), 4407-4415
4. Irie, T., Oshida, T., Hasegawa, H., Matsuoka, Y., Li, T., Oya, Y., Tanaka, T., Tsujimoto, G., and Kambara, H., *Electrophoresis* **21** (2000), 367-374

P123 電気化学検出 - キャピラリー電気泳動による DNA 損傷分析法の開発

○稲垣真輔, 江坂幸宏, 後藤正志, 酒向孫市, 出屋敷喜宏
岐阜薬大

Analysis of DNA adducts by capillary electrophoresis with end-column amperometric detection

Shinsuke Inagaki, Yukihiro Esaka, Masashi Goto, Magoichi Sako, Yoshihiro Deyashiki

Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu, 502-8585

We investigated CE-EC analysis of DNA adducts using a laboratory-made simple amperometric detection cell for end-column detection. Guanine is the most damageable base among the four normal bases and many adducts seen in DNA are those from it. Most of them are electrochemically active, while normal bases except for guanine, are not. Thus EC detection will be a promised method to analyze damage of DNA. The four normal deoxynucleosides and two damaged deoxynucleosides: N²-ethyldeoxyguanosine (N²-Et-dG) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) were separated completely with MEKC and normal dG and the two damaged ones were detected selectively with our system. Sensitivity was parallel to that with UV detection. Improvement of the system in sensitivity and the study of preconcentration for practical DNA analysis are in progress.

はじめに

DNA の損傷はがんや様々な疾患の原因の 1 つと考えられている。新たな損傷塩基の発見は疾患発現のメカニズム解明につながり、また DNA における損傷塩基の存在量はこれらの疾患の診断や評価に際しての指標となりうるものである。そのため、高感度かつ選択的な DNA 損傷の分析法の開発は重要な課題である。現在、このような損傷塩基の検出および定量をする際によく用いられているのは ³²P-ポストラベル法である。この方法は DNA を数段階の酵素反応により加水分解を行い、続いて ³²P により放射標識したものを TLC などにより分離・検出するという手法である。しかし、放射標識および複雑な酵素反応を必要とすることを考慮すると、放射標識における安全面の問題や設備の問題からも誰もが行える手法とはいえず、より安全かつ簡便な分析法の開発が求められている。

当研究室では現在、アルコール依存症患者の DNA において特異的に多くみられる N²-エチルグアニンを対象に、キャピラリー電気泳動(CE)を用いた分析法の開発を検討している^{1), 2)}。ところで、核酸塩基の中で最も損傷を受けやすい塩基はグアニンであり、この N²-エチルグアニンも 1 例であるが、DNA が酸化障害を受けた際の代表的な生成物である 8-ヒドロキシグアニンなど、DNA 上に多種の損傷グアニンが存在することが知られている。これらは電気化学的に活性な物質であるため、電気化学検出(EC)により検出することが可能である。電気化学検出では CE における微小光路長やセル体積による濃度感度の低下がその検出原理上生じないため、高感度検出を可能にする手法である。加えて、核酸塩基の中で電気化学的に活性な物質はグアニンのみであるため、正常なグアニンおよび損傷を受けたグアニンを選択的に検出することも可能となる。このような観点から、ここでは本研究室で開発を行った CE 用の電気化学検出セルを用い、前述の損傷グアニンの高感度かつ選択的な分析法の開発を目的に検討を行った。

実験

電気化学検出器には BAS 製の LC-4C を用い、作用電極には独自に作成したカーボンファイバーのマイクロ電極を、対極には白金電極、参照電極には銀/塩化銀電極を用い、エンドキャピラリーで検出を行った。紫外吸収検出器には日本分光製の CE-970 を、キャピラリーにはジーエルサイエンス製の内径 50 μm 、全長 50 cm のフューズドシリカキャピラリーを使用した。

結果と考察

DNA 上の損傷塩基をデオキシヌクレオシドの形で検出することを想定して実験を行った。 N^2 -エチルデオキシグアノシン($\text{N}^2\text{-Et-dG}$)、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)および 4 種類の正常のデオキシヌクレオシドは SDS を用いた MEKC により完全に分離された。

続いて、電気化学検出を行うためサイクリックボルタンメトリーおよびヒドロダイナミックボルタンメトリーの測定を行い、最適な設定電位を求めることとした。その結果、最適な設定電位は +1.0 V と判断されたため、その条件下で CE-EC による分析を行った。Fig. 1 に示すように、電気化学的に不活性なデオキシヌクレオシドのピークは観測されない一方で、電気化学的に活性なデオキシグアノシンおよび損傷を受けたデオキシグアノシンが選択的に検出されていることがわかる。現時点における dG, 8-OH-dG, $\text{N}^2\text{-Et-dG}$ の検出限界はそれぞれ、 1.0×10^{-6} M, 5.9×10^{-7} M, 7.9×10^{-6} M ($\text{S/N}=3$)とこれは紫外吸収検出を用いた際と比較してやや良いかほぼ同程度の値であった。

しかし、アルコール依存症患者の DNA における N^2 -エチルグアニンは 10^7 個の正常な塩基に対して数個と極めて低い割合でしか存在しないといわれているため³⁾、固相抽出を含めた試料の前濃縮が必要となる。また、sweeping や stacking などによるオンライン試料濃縮法の適用も課題といえる。これらの手法について現在検討中であり、詳細を報告する予定である。

文献

- 1) Y. Esaka, S. Inagaki, M. Goto, M. Sako, *Electrophoresis*, in press.
- 2) 稲垣真輔, 江坂幸宏, 後藤正志ら, 日本分析化学会第 49 年会講演要旨集, 2000, pp.180.
- 3) J.-L. Fang, C. E. Vaca, *Carcinogenesis*, 18 (1997) 627.

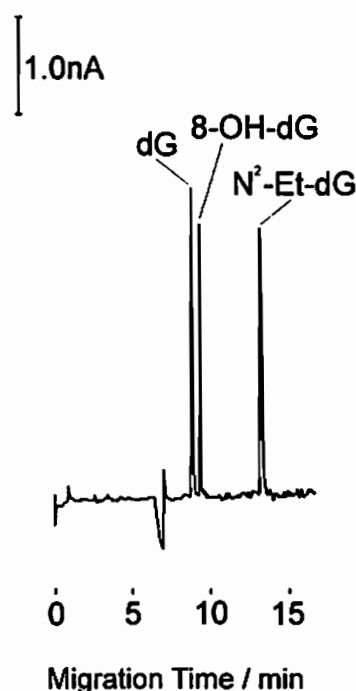


Fig. 1 CE-EC detection of deoxynucleosides.

Conditions: Running buffer solutions: 20 mM borate buffer (pH 9.5) containing 80 mM SDS; Capillary tube: 500 mm $\times$ 0.05 mm, i.d.; Applied voltage: 10 kV (Current 15 μA); Detection potential: +1.0 V.

P124

キャピラリーアレイ電気泳動によるSNPs解析

○吉田千穂、馬場嘉信
徳島大・薬、科技団 CREST

Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) using Capillary Array electrophoresis

Chiho Yoshida, Yoshinobu Baba

Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

Human genome project will quickly move on to the post genome sequencing era, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) analysis, functional genomics, mutation analysis, and proteome analysis.

In this study, SNPs analysis was carried out with 8-capillary array sequencer. Microchip instrument (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer) was utilized to optimize the step of cycle sequencing reaction. We analyzed sequences with modifications of sequencing errors by the electropherogram, by the plural sequencing, and by sequencing with reverse primer to keep accuracy of these results. We present an attempt to discern true allelic variations from sequencing errors.

1. はじめに

ゲノムシーケンシング時代の終了には高速シーケンシング技術の目覚ましい進展が貢献したが、現在ポストゲノムシーケンシング時代を迎え、21世紀のゲノム創薬・オーダーメイド医療の実現に向けゲノム解析技術のさらなる高速化が求められている[1-3]。ゲノム解析において、現在注目されているのはSNPs（一塩基多型）解析である。SNPsとは、集団内で1%以上の頻度で存在する、塩基配列上の単一塩基の置換、挿入、欠失による多型である。ゲノム上に広く高密度に分布するSNPsは、疾患の有無、人種、個人により異なるため、有益なゲノムマーカーであるとともに、SNPs自身が遺伝子発現に変化をもたらすと考えられる[4,5]。SNPコンソーシアムなどによって、ヒトの全ゲノムを対象としたSNPsの解析とそのデータベース化が行われているが、SNPsマッピングにおいて主に使用されているのがショットガンシーケンスなどの直接塩基配列決定法である。

我々は自動シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法によりSNPs解析を行った。

2. 実験

インフォームドコンセントが為された38検体のゲノムSNPs候補部位約500baseをベクターpUC118にインサートしたものをテンプレートとして以下の実験を行った。

Agilent Technologies 2100 Bioanalyzerを使用し、テンプレート濃度を測定した。

キャピラリーアレイ DNA シークエンサー電気泳動装置として BECKMAN CEQ 2000 を使い、ダイターミネーター法によりそれぞれ SNPs 候補部位の塩基配列を決定した。シーケンシングにおける実験はすべて BECKMAN 社によるプロトコールに従った。

3. 結果と考察

自動シーケンサーの一般化によって DNA 配列の読みとりも自動化され、直接塩基配列決定の変異検出手段としての利用はかなり実用的とされている[6]。しかし、SNPs 検出において最も問題となるのは、その正確性である。シーケンサーによる DNA 配列誤読は本来のテンプレート配列に対して挿入・欠損・置換といったかたちで見られる。様々な要因で起こるが、フラグメントの分離、特にピーク高やピーク幅が関係している。

現状としてはどのオートシーケンサーでもある程度誤った配列誤読をするのは避けられず、一つの領域を重複してシーケンシングすることが一般的となっている。

今回各フラグメントにおいて 16~18 サンプルのシーケンスデータを処理しエレクトロフェログラム、複数データ解析、逆方向からの配列解読という 3 ステップにおいてベスコーリングエラーを削除し、多型候補部位を絞った。このようなデータ処理によって重複データの必要なサンプル数が大幅に減少すると考える。

また、テンプレート濃度はサイクルシーケンス反応によって生成するフラグメント濃度を決定する要因の一つである。テンプレート濃度が適正濃度に満たない条件での SNPs 解析において、それぞれベスコーリングエラーによる SNPs 候補部位がどのように発現するかを検討した。

4. 謝辞

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の援助を得て行った。

5. 文献

- 1) Y. Baba, Encyclopedia of Chromatography, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker Publisher, 2001.
- 2) 馬場嘉信, 実験医学『ゲノム医科学とゲノム医療』, 2000, 63.
- 3) 馬場嘉信, 蛋白質・核酸・酵素, 2000, 45(1), 76-85.
- 4) 馬場嘉信, BioIndustry, 2000, 17(8), 5-12.
- 5) Y. Baba, *Integrated Microfabricated Device Technologies: Advances in Genomic, Drug Discovery, and Clinical Diagnostic Applications*, M.H. Heller and A. Guttman (Editors), Marcel Dekker, 2000.
- 6) C. Yoshida, Y. Endo, and Y. Baba, Eur. J. Pharm. Sci., 2000, in press.

P125 キャピラリー電気泳動における DNA 分離のための ポリマーの検討

○田中靖子^{1,2}、馬場嘉信^{1,2}
徳島大・薬¹、科学技術振興事業団 CREST²

Study of polymer solution for DNA Separation in Capillary Electrophoresis

Yasuko Tanaka^{1,2}, Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

Recently, the sequencing of human genome have almost completed, but further development of higher throughput analytical technologies for DNA, RNA, protein, and other bio-molecules is highly required towards post-genome sequencing era. Then much attention has been still focused on development of new technologies for DNA analysis. In this study, we investigated a capillary electrophoretic behavior of DNA fragments using different polymer solutions. Effects of polymer type, molecular weight of polymer, and concentration were examined and separation conditions were optimized for DNA analysis on a microchip.

はじめに

10 年前に開始されたヒト・ゲノム解析計画も今春完了し、次のポスト・ゲノムシーケンシング時代にはゲノム多型解析、ゲノム機能解析、プロテオーム解析のためのさらなる新規ゲノム解析技術の開発が必要とされている。このような背景のもと、コンピューターで培われた半導体チップ技術を応用した手のひらサイズのマイクロチップが注目を集めている。半導体チップ技術の急速な進歩に伴い、単一チップ上にマイクロアレイ、PCR、電気泳動などをすべて集積化できる方法も開発されつつある。本研究においては、DNA 解析のための新たな分離担体をマイクロチップへ適用することを目的としており、その基礎としてマイクロチップを用いた DNA の電気泳動による分離条件の最適化のための情報を得るため、ポリマー溶液中での DNA 分離のメカニズムについて検討した。

実験

DNA の電気泳動による分離にはレーザー誘起蛍光検出器付キャピラリー電気泳動装置である Beckman P/ACE 5010 とマイクロチップ型電気泳動装置である Agilent Technologies 製 2100 Bioanalyzer 及び日立製コスモアイを使用した。キャピラリーは、内壁をコーティングした J&W Scientific 製 DB-17 を使用し、セルロース誘導体溶液を満たして用いた。サンプルは 100 bp 二本鎖 DNA ladder (100 µg/mL)、1 kbp 二本鎖 DNA ladder (200 µg/mL)

および PCR 装置 GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER) を用いて増幅した DNA (500 bp) とし、キャピラリー中には、電気的に注入した。また、トリス・ホウ酸にポリマーとしてセルロース誘導体を加えたものを泳動溶媒とした。

結果と考察

電気泳動における DNA の分離は分子ふるい効果により達成され、そのメカニズムは DNA のサイズとマトリックスのポアサイズの関係により、Ogston 領域と reptation 領域に分類される。種々条件下で得られた泳動挙動をこれら Ogston model と reptation 理論に基づいて解析し、分離可能な DNA サイズと最適ポリマーの平均メッシュサイズの関係を明らかにした。また、Ogston model よりも reptation 理論に基づいた方が広範な DNA サイズについて解析できた。これらの結果をふまえ、キャピラリー電気泳動からマイクロチップへの移行に最適な分離媒体を検討中である。

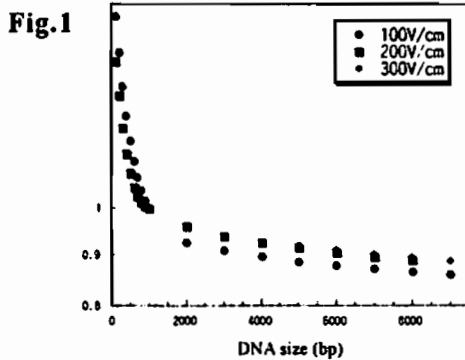


Fig.1 Ogston plots of double stranded DNA markers at various electric fields

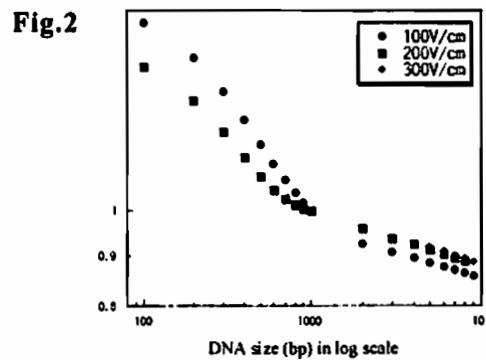


Fig.2 Plots of log (relative mobility) vs. log DNA size for double stranded DNA markers at various electric fields

謝辞

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 (CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業) の援助を得て行った。

文献

1. Y. Kiba and Y. Baba, *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker Publisher, 2001.
2. Y. Baba, *Gel Handbook*, Y. Nagata, K. Kajiwara (Editors), Academic Press, New York, 2001.
3. Y. Kiba and Y. Baba, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **41** (1999) 143-151.
4. 喜羽百合子、馬場嘉信, 分析化学, **48** (1999) 193-203.
5. 馬場嘉信, ファルマシア, **36** (2000) 24-28.

P126

1 分子 DNA の可視化とマニピュレーション

○加地範匡^{1,2}、上田正則^{1,2}、馬場嘉信^{1,2}
徳島大・薬¹、科技団 CREST²

Visualization and manipulation of a single DNA molecule

○Noritada Kaji^{1,2}, Masanori Ueda^{1,2}, Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

【ABSTRACT】

In this study, we propose novel method for stretching a DNA molecule in gel with alternating current (AC) electric fields. The molecular motion of a long DNA (T4 DNA; 165.6kbp in 1 % agarose gel) was investigated using fluorescence microscopy. Almost fully stretched DNA molecules were observed AC field only with the frequency of around 10 Hz. The maximum length of a stretched DNA was nearly proportional to the strength of external electric field. The stretching was not sensitive to the concentration of agarose gel. We can use the method in the wide range of agarose gel concentration from 0.5% to 1.5%.

The method reported here is promising to develop novel method of stretching much longer DNA, such as even the human chromosomal DNA, and contribute to analysis of a single DNA from a proper well.

【はじめに】

ヒト・ゲノムのシーケンシングが当初の予定を大幅に上回るスピードで終了した。このような DNA 解析技術の進歩に伴って、今後はたった 1 つの DNA 分子からその情報を読み取る究極の 1 分子ゲノム解析技術が重要になる^{1),2)}。1 分子ゲノム解析を実現するための DNA を 1 分子で自由にマニピュレートする技術が要求される。従来の単一 DNA 分子マニピュレーション・解析法には、光ピンセットや AFM が用いられてきたが、これらの方法では、DNA の前処理が必要であったり、マニピュレートした DNA を回収して新たなサンプルとして利用したりすることは不可能であった。今回われわれは、DNA をマニピュレートする方法、特に長鎖 DNA を伸張させる方法について検討し、より簡便で、伸張させた DNA を回収して再利用することが可能な方法として、ゲルと低周波交流電場を用いた DNA 伸張法³⁾について報告する。

【実験】

サンプルとしては、T4 DNA (165.6kbp, Nippon Gene) と *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA (225 – 2,200kbp, Bio-Rad Laboratories) を用いた。スライドガラス上に作製した小型の電気泳動装置にアガロースゲルをセットし、倒立型蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Axiovert 135TV) により、100 倍の対物レンズを通してサンプル DNA の直接観察・可視化を行った。

【結果と考察】

アガロースゲル中での T4 DNA に、9Hz の sin 型交流電場を 200V/cm で水平方向へ印加した際の伸張を、Fig.1 に示す。このように、アガロースゲル中における長鎖 DNA に低周波交流電場を印加することにより、DNA が伸張する現象を確認した。

次に、このような伸張現象がどのような要因により支配されるかについて考察した。伸張現象を支配する要因としては、アガロースゲルの濃度・交流電場の強度とその周波数が主に考えられる。アガロースゲルの濃度に関しては、0.5%から 1.5%までの各濃度にて同様の実験を行った結果、伸張を確認したが、ゲルの非存在下では伸張しなかった。ゆえに、ゲル繊維と DNA 分子との絡み合いが、この伸張現象に必須であると考えられる。また、DNA の伸張時の最大径は、交流電場の強度にほぼ比例して増加した。この伸張現象に最も影響を与えたのが、交流電場の周波数であり、10Hz 前後の特定の周波数でしか DNA は伸張しないことが明らかとなった。

現在、染色体レベルの長さをもつ DNA についてもこの伸張方法が有効であるかを検討中である。

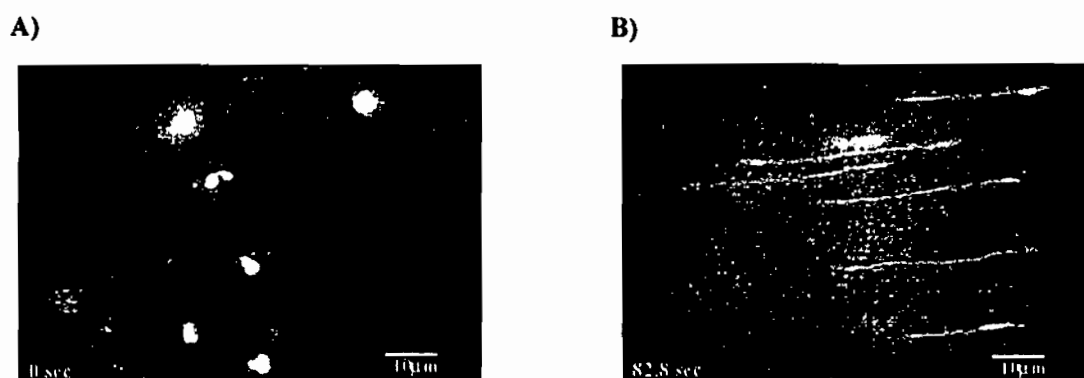


Figure 1. Fluorescence image of T4 DNA in 1% agarose gel. A) in the absent of external electric field. B) under sinusoidal AC field (200V_{pp}/cm, 9Hz).

【謝辞】

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の援助を得て行った。

【文献】

1. 上田正則、馬場嘉信、生物物理, 2000, 40(1), 48-51.
2. 馬場嘉信、ぶんせき, 2000(10), 602-606.
3. N. Kaji, M. Ueda, and Y. Baba, Nucleic Acids Symp. Ser., 44,247-248.

P127 タンパク質およびインターカレート型蛍光試薬と DNA の相互作用解析

○Abd El-Maaboud Ismail Mohamed¹、加地範匡^{1,2}、上田正則^{1,2}、馬場嘉信^{1,2}
徳島大・薬¹、科技団 CREST²

Interaction of protein and intercalating fluorescence dye against DNA

○Abd El-Maaboud Ismail Mohamed¹Noritada Kaji^{1,2}, Masanori Ueda^{1,2}, Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

【ABSTRACT】

Atomic force microscopy (AFM) was used to elucidate the location of the restriction enzyme sites of plasmid DNA and structural change of ds (double-strand) DNA owing to intercalation. The former was accomplished using two restriction enzymes, namely EcoRI and NaeI. The *p*-bluescript II SK (+) phagemid vector was linearized with NaeI, then EcoRI recognition site was imaged, and EcoRI binding site was calculated from AFM images. The latter was accomplished using intercalated fluorescence dye, YOPRO1 and YOYO1. The structural change accompanied by intercalation was confirmed by direct observation using AFM.

【はじめに】

近年、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたバイオイメーjing が盛んに行われている。従来、DNA やタンパクなどの微細構造を観察するときには電子顕微鏡が主に用いられてきたが、その前処理の煩雑さや観察に技術を要するという点から、決して気軽に観察できるというものではなかった。そこで、サンプル作製が容易で観察に比較的習熟を要さない AFM による観察が、あらたな観察方法として開発されてきた。AFM による観察は、先程あげた以外にも、溶液中のサンプルを観察することが可能であるという大きな利点を有する。これは、現在の観察方法の中では、最も立体構造を保持した、すなわち、生体内に存在するときの状態により近い姿を観察できるということである。

このような AFM の利点をいかし、緩衝液中におけるタンパク質および CE における DNA の蛍光検出に用いられるインターカレート型蛍光試薬と DNA とのコンプレックスを観察し、その相互作用について直接観察という観点から検討した。

【実験】

原子間力顕微鏡は、Nanoscope IIIa (Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA) に E-scanner を装着して用い、tapping mode にて観察を行った。カンチレバーは、窒化シリコン製のもの (NP-S) を使用した。

p-bluescript II SK (+) phagemid vector (Stratagene, USA) に NaeI (Takara Biochemicals, Japan) を作用させて直鎖状の dsDNA にした後、EcoRI (Takara Biochemicals, Japan) を作用させて生成した、切断された DNA をサンプルとした。これを、あらかじめ 2-Aminopropyltriethoxysilane で処理したマイカ上に滴下し、観察を行った。得られた画像より、DNA の全長を測定し、制限酵素の作用部位について検討した。

また、500bp, 1000bp のそれぞれの dsDNA のみを含むサンプル (DNA Quantitation Standards Kit, Gene

Sura)と、YOPRO1, YOYO1(Molecular Probes, Inc.)を各濃度にて混合し、先程と同様の手順で観察を行い、得られた画像より、DNA の全長を測定し、インターカラーターの DNA への影響について検討した。

【結果と考察】

制限酵素 NaeI と EcoRI を *p*-bluescript II SK (+)に作用させたときの AFM 像と、観察された DNA の全長を測定した結果を Fig.1 に示す。これらの結果より、AFM による観察から求めた DNA の全長は、理論値の 3% 以内に収まっていることがわかった。このように、制限酵素の作用部位を、AFM による直接観察から求めるというアプローチも可能であることが明らかとなった。さらに長いコスミドについても、このような方法により制限酵素地図の作製が可能であると考えている。

次に、インターカラーターを作用させたときの DNA の全長を測定したところ、作用させないときと比較すると長くなっていることが判明した。また、この長さが、インターカラーターの濃度に対してどのように変化しているかを調べると、YOPRO1 の場合は D/b (Dye / base) = 1 / 1 のときに、YOYO1 の場合は $D/b = 1 / 2$ のときに最大の長さとなり、それ以上インターカラーターを加えても長くならないことが明らかとなった。これは、YOYO1 が YOPRO1 とは異なり、ビスインターカラーターであることを示唆する結果である。

今回は、このような AFM による直接観察から DNA とタンパク、インターカラーターの相互作用について解析した結果を報告する。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)地域コンソーシアム研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)の援助を得て行った。

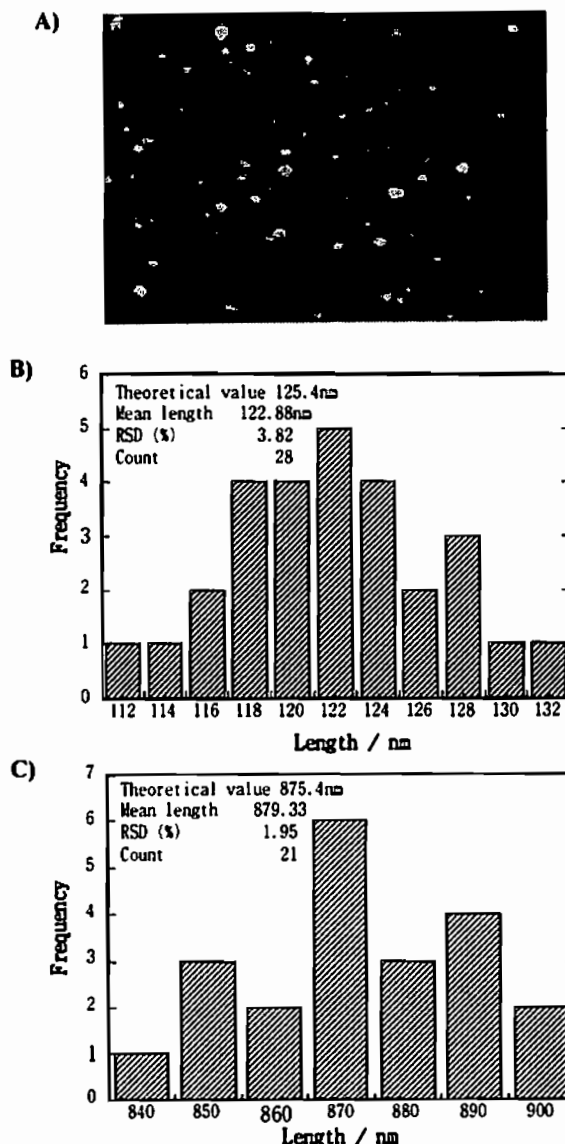


Figure 1. A) AFM image of linearized DNA molecules cleaved by EcoRI. Image scale is 800 nm. B) Distribution of lengths of 28 individuals, short DNA fragments. C) Distribution of lengths of 21 individuals, long DNA fragments.

P128

トリプレットリピートDNAのキャピラリー電気泳動による分離と原子間力顕微鏡による高次構造解析

○中川達夫¹、上田正則²、馬場嘉信^{1,2}

徳島大・薬 1、科技団 CREST²

Separation of Triplet Repeat DNA by Capillary Electrophoresis and the Conformational Analysis by Atomic Force Microscopy

Tatsuo Nakagawa¹, Masamori Ueda², and Yoshinobu Baba^{1,2}

¹Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

An extension for repeats of trinucleotide, like CTG, is known to cause some inherited neuromuscular diseases¹, called triplet repeat diseases. DNA fragments containing CTG repeats migrate faster than expected in non-denaturing polyacrylamide gels² and polymer solution³⁻⁵. This unusual electric behavior of triplet repeat DNA is expected to be used for the detection of an extension of the triplet repeat. However, the separation mechanism has been remained to be unclear. In this work, we have investigated the higher order structure of triplet repeat DNA fragment in a buffer solution by means of AFM.

はじめに

近年、トリプレット（三塩基対）リピートの異常増幅が関与した、脆弱X症候群、筋緊張性ジストロフィーなどの遺伝性筋疾患が報告され、新しいタイプの遺伝子変異に由来する遺伝病であるということから注目されている。このような配列を有するDNAは、ランダム配列のDNAと比較して異常に速い電気泳動速度を持つことが明らかとなっており、これはトリプレットリピートDNAのコンパクトな高次構造によるものであると推測されている。本研究では、AFMを用いて溶液中におけるトリプレットリピートDNAの高次構造解析を行い、電気泳動の結果とDNAの高次構造を直接的に対応させることを目指した。

実験・方法

キャピラリー電気泳動は、Beckman P/ACE 2100 capillary electrophoresis systemを用いて行った。キャピラリーは、内壁をコーティングしたJ&W製DB-17を使用し、キャピラリーを満たす緩衝溶液には、50mM Tris-boric acidを含むセルロース誘導体溶液を用いた。サンプルは、FITCでラベル化した90mer single-strand DNA、(CTG)₃₀、およびランダム配列の80mer single-strand DNAを用いた。AFM測定には、Nanoscope IIIa Multi Mode system (Digital Instruments)を使用し、溶液中においてタッピングモードにより観察した。J scanner および Si₃N₄ tipを使用し、drive frequency 9-10kHz、scanning rate 1Hzの条件下で測定した。マイカ基板は、アミノプロピルトリエトキシシランを雰囲気中に1-2時間さらすことにより作製した。上記のサンプルを50mM Tris-boric acidに溶解し、マイカ表面に吸着させることにより観察した。

結果

上記サンプルの混合溶液をキャピラリー電気泳動により分離したところ、トリプレットリピートDNAの

方が鎖長の短いランダム配列 DNA よりも速く検出された (Fig.1.)。トリプレットリピート DNA とランダム配列 DNA の AFM 像を比較したところ、それらの構造に違いは見られなかった。DNA の高さをそれぞれ測定した結果、 $1.3\text{nm} \pm 0.3\text{nm}$ (90mer)、 $1.1\text{nm} \pm 0.2\text{nm}$ (80mer)、 $1.5\text{nm} \pm 0.4\text{nm}$ (200bp ds DNA)となった。また、トリプレットリピート DNA とランダム配列 DNA の広がりを測定した結果、 $24.7\text{nm} \pm 3.3\text{nm}$ (90mer)、 $22.8\text{nm} \pm 4.9\text{nm}$ (80mer)となった。

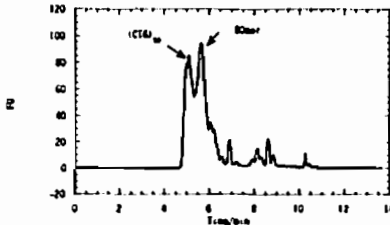


Fig.1. Electropherograms for 80 bases random-sequence and (CTG)₃₀.

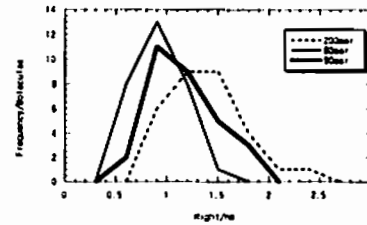


Fig.2. Histogram of the heights of DNA measured by AFM.

考察

以上の結果から、トリプレットリピート DNA の高次構造を明確に定義することはできなかった。トリプレットリピート DNA とランダム配列 DNA 間の電気泳動速度の違いは、スタティックな構造ではなくダイナミックな構造に関係していると推測される。この場合、ダイナミックな構造が DNA をマイカ上に吸着させる過程で変化すると考えられるため、AFM による解析は困難である。今後は、ダイナミックな構造においてさらなる研究が望まれる。

謝辞

本研究は、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 (CREST)、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 地域コンソーシアム (中核的産業創造型) 研究開発事業、厚生省厚生科学研究費補助金、文部省科学研究費補助金の援助を得て行った。

文献

1. Paulson, H.L. and Fischbeck, K.H. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 79-107.
2. Chastain II, P.D., Eichler, E.E., Kang, S., Nelson, D.L., Leventine, S.D. and Sinden, R.R. (1995) *Biochemistry*, **34**, 16125-16131.
3. Kiba, Y. and Baba, Y. (1999) *Bunseki Kagaku*, **48**, 193-203.
4. Kiba, Y. and Baba, Y. (1999) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **41**, 143-151.
5. Ueda, M., Kiba, Y., Abe, H., Arai, A., Nakanishi, H. and Baba, Y. (2000) *Electrophoresis*, **21**, 176-180.
6. Michell, J.E., Newbury, S.F. and McClellan, J.A. (1995) *Nucleic Acid Res.*, **23**, 1876-1881.
7. Y. Kiba and Y. Baba, *Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids*. K. Mitchelson and J. Cheng (Editors), Humana Press, Totawa, 2000.
8. T. Nakagawa, M. Ueda, and Y. Baba, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 2000.

P201

硫酸ウンデシレニルナトリウムオリゴマーおよびウンデ
セン酸ナトリウムオリゴマーを擬似固定相として用いる
MEKCにおける高濃度有機溶媒の添加

○和田光弘、大塚浩二、寺部 茂
姫路工大・理

Micellar Electrokinetic Chromatography with Sodium 10-Undecylenyl Sulfate Oligomer and Sodium 10-Undecenoic Acid Oligomer as Pseudo- Stationary Phases with High Concentrations of Organic Modifiers.

Mitsuhiro Wada*, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

The use of high-molecular-mass surfactants (HMMS) which have a polymerized hydrophobic interior and a charged hydrophilic exterior, as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been studied in recent years because of the advantages afforded by their stable structure. In this work, SUS (sodium 10-undecylenyl sulfate) oligomer was synthesized by polymerizing SUS monomer with ammonium persulfate. SUA oligomer (sodium 10-undecenoic acid) was also synthesized by the same method. SUS oligomer or SUA oligomer was more stable against the high concentrations of organic modifiers than sodium dodecyl sulfate (SDS). The performance of HMMS-MEKC will be discussed from viewpoints of signal to noise ratio and reproducibility in comparison with in SDS-MEKC.

【はじめに】

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) で極めて疎水性が高い化合物の分離を行うために有機溶媒添加は有効であるが、擬似固定相として硫酸ドデシルナトリウム (SDS) などの低分子量界面活性剤 (LMMS) を用いると有機溶媒の添加量に制限が出てくる。疎水部を共有結合により連結した高分子量界面活性剤 (HMMS) は溶液中でミセルと同様な構造をしており、有機溶媒の高濃度添加でも安定した分離が行える。そこで今回、硫酸ウンデシレニルナトリウム (SUS)、及びウンデセン酸ナトリウム (SUA) をラジカル重合を行うことにより合成できる陰イオンHMMSを擬似固定相として用い、有機溶媒を高濃度に添加した系における疎水性の高い試料の分離を試みた。

【実験】

イソプロピルアルコール溶媒で4,5回再結晶を行い精製したSUSを50 mMリン酸塩緩衝液 (pH 6.6) に臨界ミセル濃度 (CMC) を越える濃度で溶解させ、ペルオキシ二硫酸アンモニウム存在下で70 °C、26時間重合を行った[1]。重合後、SPECTRUM社の透析膜 (分子量1,000 カット) を用い透析したところ、収率30.6%でSUSオリゴマーを得ることができた。目的化合物は¹H-NMR、MSスペクトルにより確認を行った。CE装置にはBeckman P/ACE MDQを用い、キャピラリーには内径50 µm、有効長40.0 cmのフューズドシリカキャピラリーを用いた。泳動液として、0.6% (w/v) SUSオリゴマー (23 mMモノマー相当) (10 mM リン酸塩-ホウ酸塩緩衝液、pH 8.5、50% (v/v) アセトニトリルに溶解)、0.6% (w/v) SUAオリゴマー (27

mMモノマー相当)(20 mM リン酸塩-ホウ酸塩緩衝液、pH 8.5、50% (v/v) アセトニトリルに溶解) と、25 mM SDS (20 mM リン酸塩-ホウ酸塩緩衝液、pH 8.5、50% (v/v) アセトニトリルに溶解) を用いた。電圧は15.0 kVとし、試料には多環式芳香族炭化水素 (PAH)、フタル酸アルキルエステル類を50% (v/v) アセトニトリルで溶解したものを用いた。

【結果と考察】

合成したSUSオリゴマー、SUAオリゴマーはMSスペクトルから重合度にはばらつきがある混合物であることがわかった。Fig. 1aにSDS、Fig. 1bにSUSオリゴマーを用いたMEKCの分離例を示す。PAH8種の分離はSUSオリゴマー-MEKC系の方が良好であった。SUSオリゴマー-MEKC系は安定して分離を行うことができたのに対して、SDS-MEKC系における分離の再現性は低かった。SDSミセルは有機溶媒の高濃度添加で温度、塩濃度などの影響をより強く受け、ミセル形成の再現性が低くなったと考えられる。有機溶媒を高濃度に添加したSDS-MEKC、SUSオリゴマー-MEKC、SUAオリゴマー-MEKCについて定量性の基礎となる、試料の移動時間及びピーク面積・高さの再現性の相違について検討した結果についても報告する。

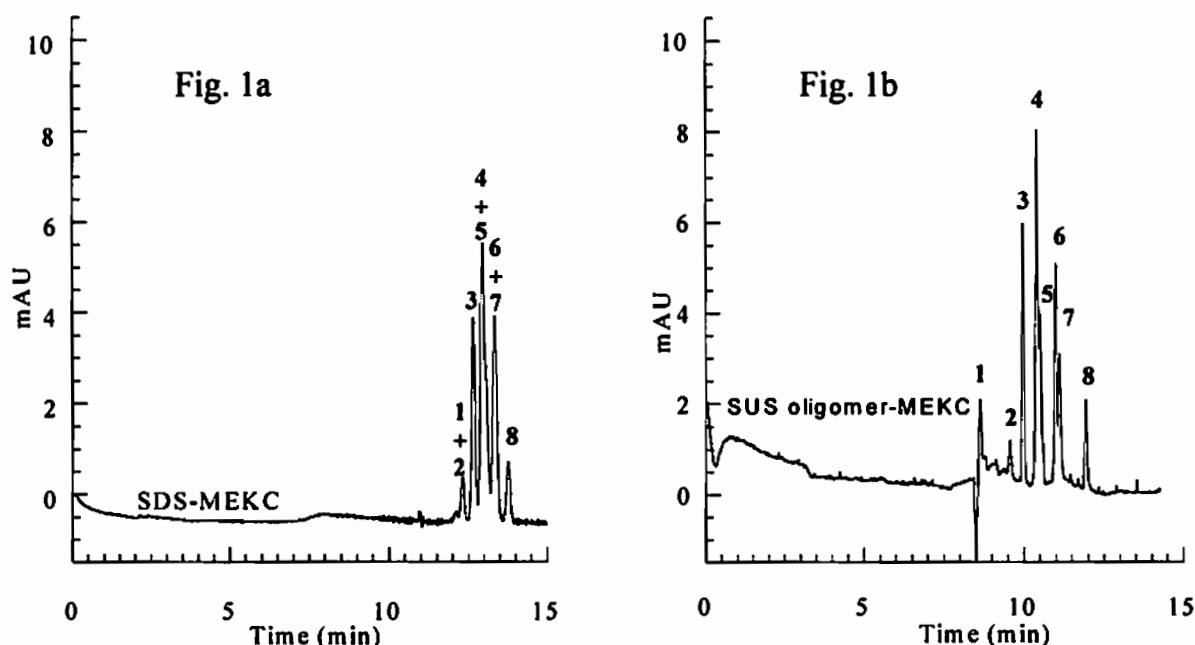


Fig. 1. MEKC analysis of 8 PAHs by (a) SDS-MEKC, (b) SUS oligomer-MEKC. Samples, (1) benzene, (2) toluene, (3) naphthalene, (4) acenaphthene, (5) ethylnaphthalene, (6) phenanthrene, (7) anthracene, (8) pyrene; capillary electrophoresis instrument, P/ACE MDQ; capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 50.2 cm; effective length, 40.0 cm; applied voltage, 15 kV; detection wavelength, 214 nm; temperature, 25 $^{\circ}$ C; additive, 50% (v/v) acetonitrile.

【参考文献】

- [1] C. P. Palmer, S. Terabe, *J. Microcol. Sep.*, 1997, 8, 115-121.

P202 非水系CEを用いた生薬成分アルカロイド類の分離

○内田大介、江坂幸宏、後藤正志、飯沼宗和
岐阜薬科大学

Non-aqueous CE Analysis of Alkaloids from Chinese Medicines

Daisuke Uchida*, Yukihiro Esaka, Masashi Goto, Munekazu Iinuma
Gifu Pharmaceutical University,

Non-aqueous CE separation of alkaloids in some crude drugs and aromatic compounds in natural products was studied using acetonitrile and methanol as running solutions, comparing with phosphate buffer. Non-aqueous media seemed to have some advantages in resolution and selectivity for analyses of the Chinese medicines.

はじめに

現在、医療の場において生薬が治療に用いられる機会が増えてきている。医薬としての生薬の特性は、単一の化合物とは異なった特性を持つが、これは結局、生薬の中に多種類の成分が共存混在している事に帰せられる。従って、その組成には大変興味をもたれるところである。また、生薬に限らず天然物中には、多くの薬理活性を有する化合物が含有され、その類縁の構造を持ちながら機能が不明な多くの化合物も存在（共存）していることがわかっている。これら天然物中有用成分の優れた分析手段の開発には大きな意味がある。

本研究では、その分析手段として非水系 CE の有用性の検討を目的としている。非水系 CE の期待される長所の一つに、水系では困難な、脂溶性の高い成分の泳動を可能にすることがある。天然物由来の興味の対象となる化合物には、アルカロイド類をはじめとする比較的脂溶性の高い物質が多い。実際、多くの成分は有機溶媒によって抽出され研究に供されている。また同時に、生理活性成分の多くは、その活性発現のために水酸基、アミノ基、カルボキシル基などの官能基を有しており、分離系修飾剤との水素結合等の非水系で有利な相互作用の分離モードとしての活用も期待できる。従って、複雑なマトリックス成分を持つ天然物試料の分析上、水系と相補的な役割も期待できる。

今回、試料としては、有効成分としてアルカロイド類を含む4種の生薬と、天然物由来の7種のフラボノイド類縁体、2種のポリフェノールを用いた。泳動液としてはアセトニトリル(ACN)、メタノール(MeOH)系を用いて検討した。また、水系のリン酸緩衝液を対照とした。

実験

装置：CE装置は、松定プレジジョン株式会社製高圧電源(HCZE-30PN0.25)、日本分光製紫外吸収検出器(UV-970)、島津製作所製クロマトパック(C-R6A)より構成される。キャピラリーは、非水溶媒使用時にはJ&W Scientific社製 μ sil DB-1(0.05mm i.d. $\times$ 500mm, 有効長 300mm)を、リン酸緩衝液使用時にはGL Sciences社製 silica capillary tube (0.05mm i.d.-0.375 mm o.d. $\times$ 500mm, 有効長 300mm)を用いた。

測定条件：電解液は、電解質として tert-(n-butyl)ammonium perchlorate(5mM)を含み、これに酸性泳動液の場合は Perchloric acid(1mM)、塩基性泳動液の場合には tert-(n-butyl)ammonium hydroxide(1mM)を含有

した ACN 溶液、MeOH 溶液を用いた。また、リン酸緩衝液は 10mM の濃度で、pH がそれぞれ 2.14, 7.22, 11.29 のものを用いた。印加電圧は、15kV(15~17 μ A)または 20kV(4~10 μ A)とした。

試料：4 種の生薬（オウレン、マオウ、カンゾウ、ロートコン）をそれぞれ 0.1%(w/v)の濃度で、泳動液に合わせて ACN、MeOH、蒸留水に溶解させたものを用いた。7 種のフラボノール類縁体 (5,7,2',3'-tetrahydroxyflavone, Skullcapflavone II, 5,7-dihydroxyflavanone, 5,7-dihydroxyflavone, sophoraflavanone G, rubraxanthone, genistein), 2 種のポリフェノール(vaticanol B,C)は、どの泳動液に関しても ACN に溶解させたものを用いた。

結果・考察

今回用いた生薬を ACN 系、MeOH 系、水系の条件で泳動させた結果、一般に、ACN、MeOH ではシャープなピークが観察され、サブ成分も明確に検出できた。これに対し、水系では、カンゾウを除いて、ピークが若干ブロードになる傾向が見られ、サブ成分は確認できない場合が多かった。非水系泳動液と疎水コーティングキャピラリーの使用は、生薬成分の分析に適しているように思われる。一方、フラボノール類縁体、ポリフェノール類の場合には、一般に ACN 系、水系でシャープなピークが観察されたが、MeOH 系でブロードなピークが出現する場合があった。ピーク形状以外にも、各泳動液で分離選択性が異なり、溶媒和の状態の違いが示唆されるとともに、水系で分離できない成分が、非水系で明確に分離されるケース（マオウ中の主成分 ephedrine とその異性体など）もあり、様々な溶媒系を用いることのできる有用性が示された。

次に、生薬試料中のアルカロイド、天然物中の芳香族化合物（フラボノール類縁体、ポリフェノール類）について電気泳動移動度(m_{ep})を算出した(Table 1, Table 2)。粘性の大きさは、蒸留水(0.8904)>MeOH(0.547)>ACN(0.345)であり、例えば ACN 溶液ではリン酸緩衝液の 2 倍以上の m_{ep} が観測されても良いはずである。しかし、両液においてそれほど大きな差が見られないケースも多い。また、MeOH 溶液を用いた際、skullcapflavone II, vaticanol B, C の m_{ep} が極端に低い。これらのことは、異なる溶媒を用いた泳動液中で試料の荷電状態に大きな差があることを示唆している。特に、MeOH 系と ACN 系では、酸塩基の種類、濃度が等しいことから、溶媒の酸塩基性を反映している結果といえる。さらに詳細な検討を行う予定である。

Table 1 The m_{ep} value of 4 alkaloids in crude drugs.

	ACN	Methanol	Phosphate buffer ¹⁾
berberine	20.31	15.64	24.89
ephedrine	24.79	16.67	24.78
glycyrrhizin	31.25	16.64	19.64
atropine	27.14	16.22	22.59

1)The pH are 2.14 except for the case of glycyrrhizin (pH 7.22).

Table 2 Electrophoretic mobility of 9 aromatic compounds.

	ACN	Methanol	Phosphate buffer (pH 11.29)
5,7,2',3'-(OH) ₄ flavone	43.14	18.38	24.30
Skullcapflavone II	25.07	2.38	14.60
Chrysin	32.64	14.70	20.33
5,7-(OH) ₂ flavanone	30.95	14.13	18.96
Sophoraflavanone G	26.71	11.93	26.46
Rubraxanthone	33.67	14.50	25.30
Genistein	27.79	12.67	29.83
Vaticanol B	18.28	5.71	25.03
Vaticanol C	20.81	6.77	24.36

P203

フリーフロー等速電気泳動における泳動界面の攪乱

○石川 誠、村上 隆太郎、育田 夏樹、廣川 健
広島大・工

Disturbance at Moving Boundary in Free-flow Isotachopheresis

Makoto Ishikawa, Ryutaro Murakami, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa

Faculty of Engineering, Hiroshima University

Free-flow electrophoresis is the method for continuous separation and fractionation of a sample. Isotachopheresis has preparative advantage that concentrated sample zones can be fractionated. However, when a large driving current is applied to obtain high throughput, sharpness of the moving boundary is deteriorated and the separation becomes worse. Although it seemed that the disturbance was caused by thermal convection due to joule's heat, we found that this disturbance still existed under microgravity environment. There were several possible causes such as sedimentation, vortex street, Marangoni convection and distortion of zone due to difference of permittivity. We tried to clarify which phenomenon was the most affective to the disturbance.

はじめに

フリーフロー電気泳動装置（以下 FFEU）は電気泳動分離のために印加した電場方向に垂直に試料と電解液を流すことにより、試料の連続分離・分取を目的とする装置である。比較的大量の分取フラクションが得られるので、タンパク質や細胞や血球などの生体成分への応用が期待されている。また、等速電気泳動は濃度調整効果により分離した試料ゾーンの成分濃度が高く一定に保たれるため、分取に有効である。しかし単位時間に分離可能な量を増加させようとして分離槽に大電流を供給すると、等速電気泳動特有の鋭い試料界面に攪乱が生じ、分離に悪影響を及ぼす。当初、この界面攪乱の原因は駆動電流によって発生したジュール熱に伴う熱対流であると考えていたが、微小重力下でも存在したことから熱対流ではないことが明らかになった。界面攪乱の原因として他に沈降、カルマン渦、マランゴニ対流、誘電率の差に起因するゾーンの歪み等が考えられる。本研究では界面攪乱に影響する主な原因を実験的に明らかにすることを試みた。

実験

FFEU としては Dr. Weber 製 Octopus を用いた。この装置では泳動槽の下から電解液と試料を流し、泳動槽左右の電極に電圧を印加して電気泳動を行い、泳動槽の上端で分取を行う。試料にはアストラゾンピンク、SPADNS の二種類の色素を用いた。電解液は 40mM アンモニア水を 2-エチル-n-酪酸で pH4.7 に調整したものを陰極電解液に、10mM 塩酸カルニチンを陽極電解液に用いた。泳動条件は泳動槽厚さが 0.4mm、泳動槽の電解液の流速は 2.2ml/min.、駆動電流を 40mA とした。泳動挙動はビデオカメラで記録し、後で解析した。微小重力状態での実験のため航空機実験も行った。

結果と考察

Fig. 1 に 1G (A) および μG (B) での実験結果を示した。A、B 共に左側のゾーン (SPADNS)

にスパイク状の界面攪乱が観測される。この結果から界面攪乱へのGの影響はほとんどないので、熱対流に起因するものではないことが明らかになった。

そこで界面攪乱を泳動槽内の電解液の流れと泳動槽表面の干渉、または各ゾーンの電解液流速の違いによるカルマン渦ではないかと考え、泳動槽内の電解液の流れを止めて泳動実験を行った。流れを止めればカルマン渦の影響は無視できるので界面攪乱が収まるはずである。この実験での泳動電流は50mAであった。Fig. 2に電圧印加前(A)および電圧印加後4min.(B)の実験結果を示した。Aでは観測されていない界面攪乱がBで観察される。この結果から界面攪乱はカルマン渦に起因するものではないことが明らかになった。

つぎに、この界面攪乱をリーディングとターミナルゾーンの温度差に起因するマランゴニ対流ではないかと考え、物理的移動速度を小さくするために電解液の粘度を増加させて泳動実験を行った。マランゴニ対流が原因であれば界面攪乱が収まるはずである。この実験での試料はアストラゾンピンクとピクリン酸とSPADNSである。また、電解液の粘度増加にはHPC(ヒドロキシプロピルセルロース)を使用し、HPC濃度0%、0.1%、0.5%で実験を行った。Fig. 3にHPC 0%(A)、HPC 0.1%(B)、HPC 0.5%(C)の電解液を用いた実験結果を示す。A、B、Cと電解液の粘度を増加させると界面攪乱が収まっていることがわかる。A、Bでは隣り合うアストラゾンピンクとピクリン酸のゾーンの分離が乱れているがC



Fig. 1 A:1GとB:微小重力での界面攪乱の様子



Fig. 2 A:電圧印加の状態とB:電圧印加後4min.の泳動状態

ではほとんど攪乱が収まっており、良好な分離が得られた。



Fig. 3 A:HPC 0% B:HPC 0.1% C:HPC 0.5%の電解液での泳動状態

以上の結果をまとめると、等速電気泳動特有の鋭い試料界面に生じる攪乱は熱対流などに起因するものではなく、マランゴニ対流に起因するものであると推定される。しかし、このような系における発生メカニズムについてはまだ十分検討されておらず、今後流体力学的な見地から更に詳しい解析が必要である。

謝辞

本研究はJ S F (NASDA) の補助により、公募地上研究(「微小重力下における高性能フリーフロー電気泳動装置に関する基礎的研究」、1997-1999)の一環として行われたものである。記して感謝申し上げる。

P204

キャピラリー電気泳動自動解析システムの開発 (IV)

○吉山 竜也、育田 夏樹、廣川 健
広島大・工

Development of Automatic Processing System for Capillary Electrophoresis (IV)

○Tatsuya Yoshiyama, Natsuki Ikuta, Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University

Electropherograms with migration time axis would not always be useful for qualitative and quantitative analysis if capillary zone electrophoresis was performed using various apparatuses with different migration voltages and capillaries. We developed the "temperature coefficient method", which converts the x-axis from the migration time into the effective mobility at the reference temperature by correcting such factors influencing migration time as electroosmotic flow, temperature rise in the capillary due to Joule's heat, relaxation effect of potential gradient, applied voltage, and capillary length. Since the conversion procedure is time-consuming, we developed a computer program. Furthermore, we constructed a system to determine physico-chemical constants such as absolute mobility and pKa and retrieve candidates from our database.

はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動法 (以下CZE) では通常サンプルイオンの泳動時間が定性指標として用いられている。しかし、この泳動時間は印加電圧やキャピラリー長等の実験条件に加えて、制御が困難な電気浸透流(EOF)、ジュール熱によるキャピラリー内温度の上昇、電位勾配の緩和効果(RPG)などの影響を受ける。このように泳動時間はハードウェアに依存するため、泳動時間を用いた定性分析はしばしば困難となる。したがって、エレクトロフェログラムの横軸に物質と電解液条件のみに依存する実効移動度を用いることが有用である。しかしながら前述の理由からEOFのみを補正する変換法では十分な再現性が得られない。そこで我々は、EOFに加えてキャピラリー内の温度上昇およびRPGを考慮した変換法である温度係数法¹⁾を開発した。これまでの研究の結果、指標である実効移動度の再現性が温度係数法により向上することが確認された。しかし、移動度への変換を伴う解析を手動で行うと計算操作が煩雑なため、専用の解析プログラムが必要となる。そこで、本研究ではこの変換法を用いる解析プログラムを開発した。さらに、このプログラムを発展させて絶対移動度、pKa等の物理化学定数の決定、およびデータベース検索システムの構築を行ったので報告する。

システム

本システムは実効移動度変換プログラムと物理化学定数決定プログラムから構成される。温度係数法による実効移動度への変換には次のパラメーターが必要である。印可電圧、キャピラリー長、移動度既知の標準試料3種の移動度と泳動時間。これらのパラメーターをデータ毎に指定し、1式により実効移動度に変換する。本システムを使用することで、温度係数法による実効移動度への変換、および実効移動度を用いた解析を迅速、かつ明確に行うことが可能である。

$$m = \frac{l}{(t - \tau)E} - m_{eof} \quad (1) \quad \begin{array}{ll} m: \text{実効移動度} & E: \text{印加電圧} \\ l: \text{キャピラリー有効長} & m_{eof}: \text{浸透流移動度} \\ t: \text{泳動時間} & \alpha: \text{温度係数} \end{array} \quad \Delta T: \text{温度差 (25}^\circ\text{C)}$$

以下に、物理化学定数の決定、この定数を用いた物質の検索について説明する。

電気泳動において実効移動度は、存在するイオン種の解離度とこの移動度の積の和で表される(2式)。一価の酸を例にとると、3式のように解離定数、絶対移動度と水素イオン濃度で表される。

$$\bar{m} = \frac{1}{c_i} \sum_{i=0}^k c_i m_i \quad (2)$$

$$\bar{m} = \frac{c_1}{c_i} \times m_1 = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \times m_1 \quad (3)$$

実効移動度とpHの関係を測定し非線形最小二乗法により理論値とベストフィットすることで絶対移動度、pKaを決定できる。

そこで、本システムでは実効移動度変換プログラムにより得られた実効移動度と、電解液のpH等を物理化学定数決定プログラムに渡し、絶対移動度・pKaを算出する。そして、ここで得られた定数を絶対移動度・pKaのデータベースと照らし合わせ物質の検索を行う。検索は得られた絶対移動度・pKaの値を基に任意の範囲で行う。検索結果は各定数との差が小さいものから順に任意の数だけ表示する。

実験

本システムを評価するために、CZEにより絶対移動度とpKaの知られた有機酸の移動度のpH依存性(pH=2.9~7.2)を測定した。CE装置には大塚電子社製のCAPI-3100を、分離には内径75 μ m、全長50cm(有効長37.7cm)の石英キャピラリーを使用した。印加電圧は20kV、測定温度は25 $^{\circ}$ Cで行った。試料はギ酸、酢酸、酪酸、カプロン酸の0.5mM等モル混合溶液を使用し、標準試料に塩化物イオン、臭素酸イオンを使用した。

結果と考察

Fig. 1に横軸を実効移動度で表したフェログラムを示す。ここでは、標準試料以外の試料をA、B、C、Dで表す。これらの試料の絶対移動度とpKaを求め、この値を用いデータベースから物質を検索した。この結果をTable 1に示す。ギ酸(A)、酢酸(B)に関しては該当物質が1種類であったが、酪酸(C)、カプロン酸(D)に関しては数種類の物質が該当した。これらの結果から、絶対移動度・pKaを用いた物質の検索は、同定に有効であることがわかる。また、本システムを使用することで、これらの操作を迅速に行うことが可能となった。

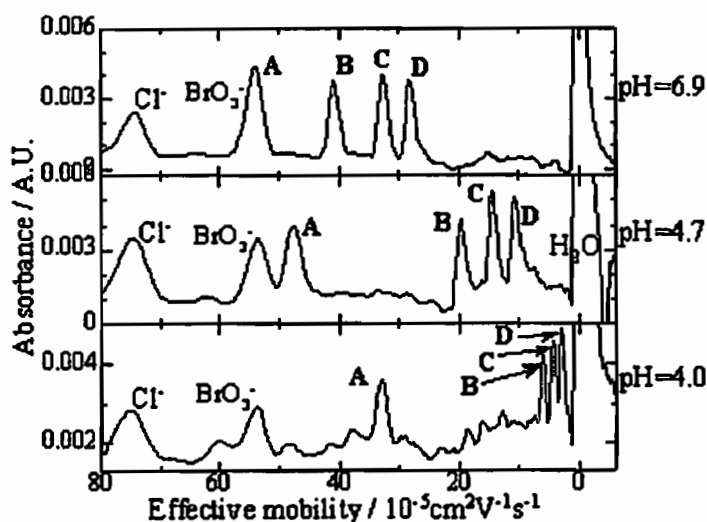


Fig1. pH=6.9, 4.7, 4.0 のフェログラム

塩化物イオン、臭素酸イオン、システムピークを標準試料とし温度係数法により25 $^{\circ}$ Cにおける実効移動度に変換した。

Table 1. 算出された絶対移動度・pKaを用いて物質を検索した結果

([物質X] m=(算出された絶対移動度):pKa=(算出されたpKa)) 検索範囲(m $\pm$ 2, pKa $\pm$ 0.2)

[A] m=54.7 : pKa=3.79	m	pKa	[B] m=43.1 : pKa=4.73	m	pKa
1) formic acid	56.6	3.75	1) acetic acid	42.4	4.76
2)			2)		
[C] m=34.7 : pKa=4.85	m	pKa	[D] m=30.1 : pKa=4.94	m	pKa
1) 4-hydroxybutyric acid	34.3	4.72	1) 3-methoxypyridine	30.0	4.91
2) butyric acid	33.8	4.82	2) oaproic acid	30.2	4.86
3) allylacetic acid	33.9	4.67	3) p-toluidine	30.0	5.09

参考文献 1) N. Ikuta, Y. Yamada, T. Yoshiyama, T. Hirokawa, "New method for standardization of electropherograms obtained in capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, Vol. 894, No. 1-2, pp. 11-17, 2000.

P205

キャピラリー電気泳動法の半導体分野への応用

○笹 一志、北岸恵子

大塚電子株式会社

Application of Capillary Electrophoresis for the Manufacturing of Semiconductors.

Katsushi Sasa, Keiko Kitagishi

Otsuka Electronics Co, Tokyo 192-0082

For the quality control of large-scale integrated circuits of semiconductor, ionic contaminants both in the materials and the solutions should be determined in every processes of the manufacturing. Capillary electrophoresis is suitable for the purpose because of short analysis time and simplicity in the sample handling.

はじめに

LSI (Large Scale Integrated circuit) の製造過程は、ウェハーにトランジスタや配線を形成するウェハー・プロセス (前工程) とウェハーを切断しチップをパッケージするパッケージ・プロセス (後工程) の2工程に通常分けられる。半導体製造プロセスの大半はドライ洗浄であるが、洗浄プロセスではウェット処理が主流となっている。ドライ洗浄には、パーティクルの除去ができないという、洗浄技術として大きな弱点がある。

それに対し、ウェット洗浄は、パーティクル、金属不純物、有機酸などの汚染物質を除去することができる優れた洗浄技術である。CVD (Chemical Vapor Deposition) などの表面状態に敏感なプロセスではそれらの汚染物質の存在は許されない。

今回、キャピラリー電気泳動 (CE) により洗浄工程で用いられる高濃度薬液中の微量のイオン分析をおこなった。また、その他の製造工程においても検討をおこなった。

実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子製 CAPI - 3200Q を用いた。また、陽イオン、無機陰イオンおよび有機酸分析は、大塚電子 CAPI 消耗品 α -ISOA、 α -ISOB、 α -ISOC シリーズの泳動液を用いておこなった。また、キャピラリー管は内径 $75\ \mu\text{m}$ で、各分析に応じて全長 805 mm (有効長 680 mm) と 1350 mm (有効長 1225 mm) のものを用いた。

試料注入においては、イオン濃度が 100 ppb 以下の試料の場合に電氣的導入方法を用いた¹⁾。その濃度以上の試料には、落差法で注入をおこなった。

結果および考察

Fig 1 に前工程のウェット洗浄に用いられるフッ化水素酸系薬液の無機陰イオン分析のフェログラムを示す。その結果、高濃度のフッ化水素酸（約 15%）が夾雑ピークにならず Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} などのイオンを分離することができた。また、フッ化水素酸はガラスの腐食や金属などを侵す。そのため、イオンクロマトグラフィー（IC）ではカラムの充填剤を侵すため不向きな試料である。キャピラリーもシリカできておりフッ化水素酸に侵される可能性がある。しかし、絶対注入量が少ないことや中空のためその影響がほとんどなく分析することができた。

Fig 2 にエッチング工程に用いられる薬液中の陰イオン分析のフェログラムを示す。エッチング液には一般に高濃度の水酸化ナトリウム溶液が用いられている。この薬液もフッ化水素酸と同様に IC には不向きな試料であるが、CE では分析が可能であった。

今回の分析により、半導体分野で用いられる薬液中のイオン分析に対し CE は有効であることがわかった。

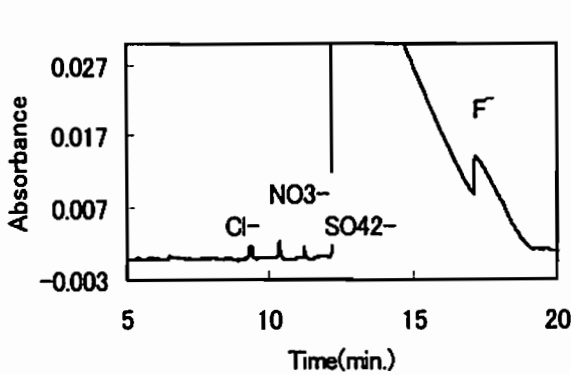


Fig.1 Analysis of washing solution

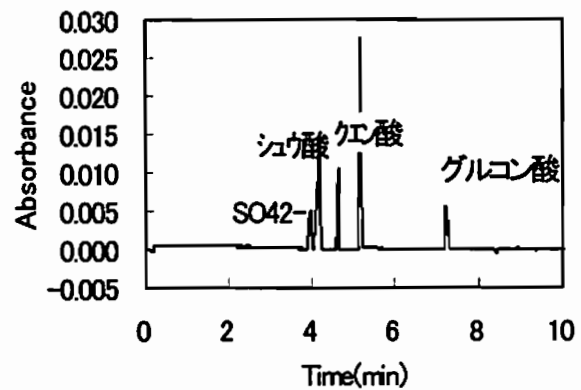


Fig.2 Analysis of etching solution

参考文献

- 1) P.landik, W.R.Jones, J.Chromatogr., 546, 431 (1991)

P206 新規キラル界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィーによる光学異性体の分離

○岩井義行¹、中村正樹²、大塚浩二¹、寺部 茂¹
姫路工大・理¹、大阪市工研²

Enantiomer Separation by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Novel Chiral Surfactants

Yoshiyuki Iwai¹, Masaki Nakamura², Koji Otsuka¹, and Shigeru Terabe¹

¹Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297

²Department of Industrial Chemistry, Osaka Municipal Technical Research Institute, Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536-8553

A novel synthesized chiral surfactant, sodium *N*-decanoyl-*N*-methylglucamide sulfate, was employed in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) as a chiral pseudostationary phase for enantiomeric separation. Chiral separation of several racemic dansyl amino acids, PTH-amino acids, and chiral drug components were achieved.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) による光学異性体の分離法には、主としてシクロデキストリン (CD) を用いる CD-CE と、キラルな界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) とがある。後者では、界面活性剤がイオン性であればそのみで中性試料の分離が可能であり、通常の MEKC と同様データ解析が容易である。しかし市販されているキラルな界面活性剤は限定されており、新たな界面活性剤の開発に対する要求も強い。我々はこれまでに、酒石酸誘導体やグルコース誘導体である合成光学活性界面活性剤を用いる MEKC によるキラル分離について検討を行ってきた [1, 2]。本研究では今回新たに合成されたグルカミン誘導体光学活性界面活性剤を用い、種々の光学異性体の分離を行った結果について報告する。

実験

CE 装置には Beckman 社の P/ACE 2200 を用い、キャピラリーには内径 50 μm 、外径 375 μm 、全長 57 cm、有効長 50 cm のフューズドシリカキャピラリーを用いた。光学活性界面活性剤として sodium *N*-decanoyl-*N*-methylglucamide sulfate (Fig. 1) を用い、20 mM ホウ酸塩-リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に 50 mM の濃度に溶解して分離溶液とした。試料には種々のダンシルアミノ酸 (Dns-AA)、PTH-アミノ酸 (PTH-AA)、及び薬物成分などのラセミ体を、それぞれ 0.1 mg/ml の濃度になるように 50 % メタノールに溶かして用いた。試料注入は圧力法 (0.5 psi, 3 s) で行った。MEKC 分離の印加電圧は 15 kV、温度は 20 $^{\circ}\text{C}$ 、UV 検出波長は 214 nm とした。

結果と考察

本 MEKC 系により、Dns-AA をはじめ、種々の化合物の光学分割が達成された。Fig. 2 に 4 種類の Dns-AA の相互分離とエナンチオマー分離を示す。これ以外のいくつかの Dns-AA や数種の PTH-AA、テルブタリン、クロルプレナリン、トルペリゾン、ピンドロールなどについて、不完全ではあるがキラル分離が達成された。それらの結果から、親水性の化合物ではミセルとの相互作用が小さく、良い分離を得ることが難しいと言える。現在、界面活性剤濃度をはじめいくつかの分離パラメータについて検討を行い、分離の改善を試みている。

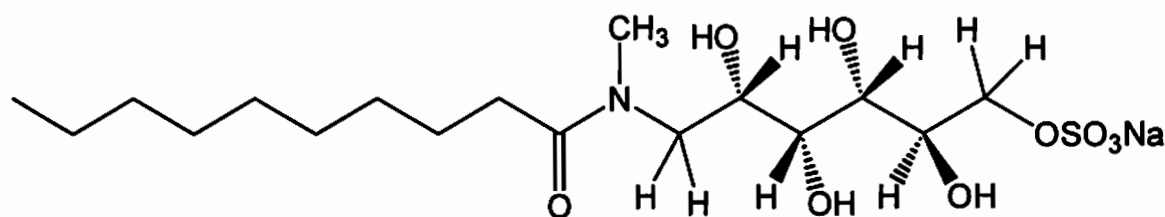


Fig. 1. Structure of sodium *N*-decanoyl-*N*-methylglucamide sulfate.

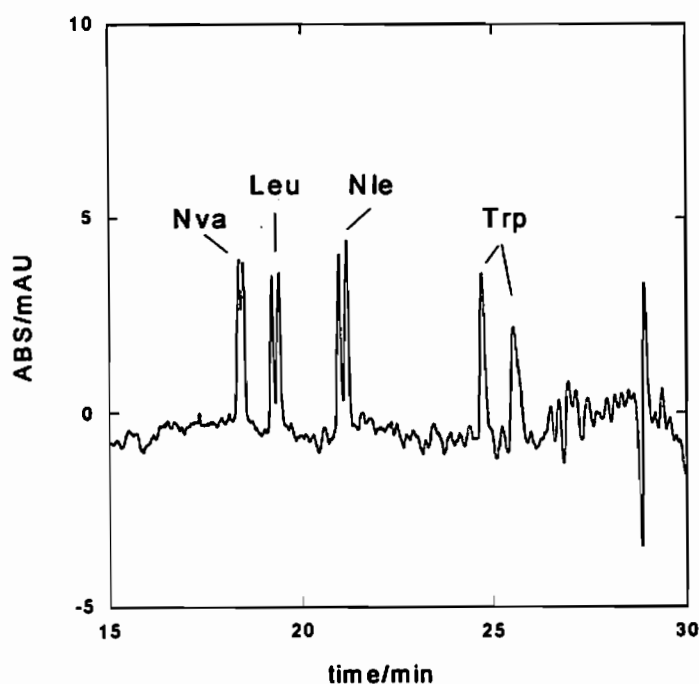


Fig. 2. Chiral separation of Dns-AA by MEKC using sodium *N*-decanoyl-*N*-methylglucamide sulfate.

文献

1. 杉本, 大塚, 寺部, 老田, 中村: 日本化学会第 72 春季年会, 東京, 1997; 1B733.
2. 大塚, 杉本, 寺部, 老田, 中村: 第 48 回日本電気泳動学会春季大会, 東京, 1998.

P207

Enantiomer separations by open tubular capillary electrochromatography, open tubular liquid chromatography and affinity electrokinetic chromatography

Zhen Liu*, Koji Otsuka, Shigeru Terabe

*Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori,
Hyogo 678-1297*

Enantioseparations by open tubular capillary electrochromatography (OTCEC), open tubular liquid chromatography (OTLC) and affinity electrokinetic chromatography (AEKC) were achieved with avidin and vancomycin as stationary and pseudostationary phases. The OTCEC and OTLC separations were based on a chiral stationary phase of avidin prepared by the physical adsorption method proposed previously. While in AEKC, continuous separation zone built fully in a capillary (common mode) and discontinuous separation zone built partly in a polyacrylamide-coated capillary (partial filling mode, PF) were employed with avidin and vancomycin as pseudostationary phases. A drug with two chiral centers, chrysanthemic acid, was baseline separated by both OTCEC and PF-AEKC with avidin as chiral selector (see Fig. 1). Due to its large changeable range of phase ratio, AEKC offers a possibility to separate enantiomers having weak interactions with the chiral selector. Two tetrapeptide enantiomers with four chiral centers, acetyl-L-ser-L-aspartyl-L-lys-L-pro (Ac-SDKP) and acetyl-D-ser-D-aspartyl-D-lys-D-pro (Ac-sdkp), were baseline resolved by PF-AEKC with avidin as chiral selector (see Fig. 2). Two pentapeptide enantiomers with three chiral centers, gly-L-arg-gly-L-aspartyl-L-ser (GRGDS) and gly-D-arg-gly-D-aspartyl-D-ser (grgds), were baseline separated by common AEKC with vancomycin as chiral selector (see Fig. 3). Due to the requirement on the charge status of the analyte, it is very difficult for both OTCEC and AEKC to separate basic chiral compounds. However, three racemic basic drugs, E2020, sulconazole nitrate and nicardipin hydrochloride, were separated well with fast speed by OTLC with adsorbed avidin as stationary phase (see Fig. 4).

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the post-doc fellowship and the Grant-in-Aid for scientific research (No. 99290) for Dr. Zhen Liu supported from Japan Society for the Promotion of Science. Besides, ZL gratefully appreciates kind offering of the polyacrylamide-coated capillaries by Mr. Jong-Bok Kim.

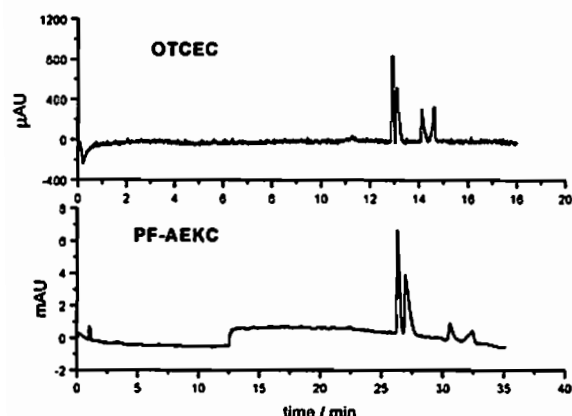


Fig. 1. Separations of chrysanthemic acid by OTCEC and PF-AEKC. Capillary, (OTCEC) 57 cm (50 cm to detector) $\times$ 20 μ m i.d.; (PF-AEKC) 57 cm (50 cm to detector) $\times$ 50 μ m i.d., polyacrylamide coated; stationary phase for OTCEC, adsorbed avidin; separation solution for PF-AEKC, 10 μ M avidin in 10 mM phosphate buffer (pH 5.95), filled length, about 40 cm; mobile phase, 10 mM phosphate buffer (pH 5.95); temperature, 20°C; applied voltage, -10kV.

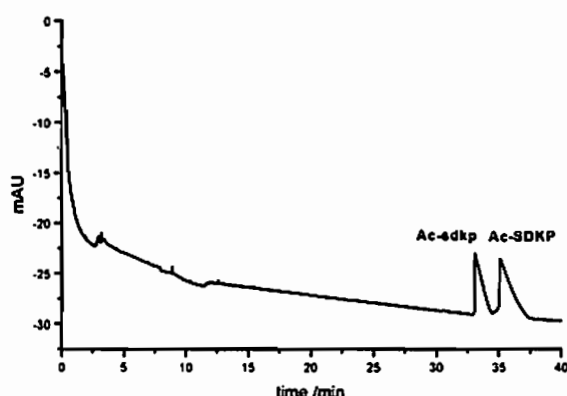


Fig. 2. Separations of Ac-SDKP and Ac-sdgp by PF-AEKC with avidin as pseudo-stationary phase. Capillary, 57 cm (50 cm to detector) $\times$ 50 μ m i.d., polyacrylamide coated; separation solutions, 250 μ M avidin in 10 mM phosphate buffer (pH 5.95), filled length, about 40cm; mobile phase, 10 mM phosphate buffer (pH 5.95); temperature, 20°C; applied voltage, -15kV.

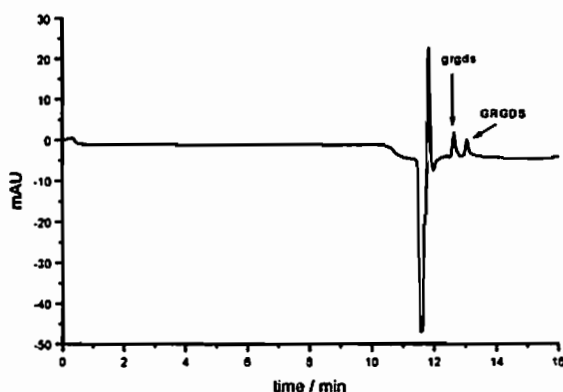


Fig. 3. Separation of GRGDS and grgds by common AEKC with vancomycin as pseudostationary phase. Capillary, 57 cm (50 cm to detector) $\times$ 50 μ m i.d.; separation solution, 500 μ M vancomycin in 10 mM phosphate buffer (pH 8.00); mobile phase, 10 mM phosphate buffer, (pH 8.00); temperature, 20°C; applied voltage, 10kV.

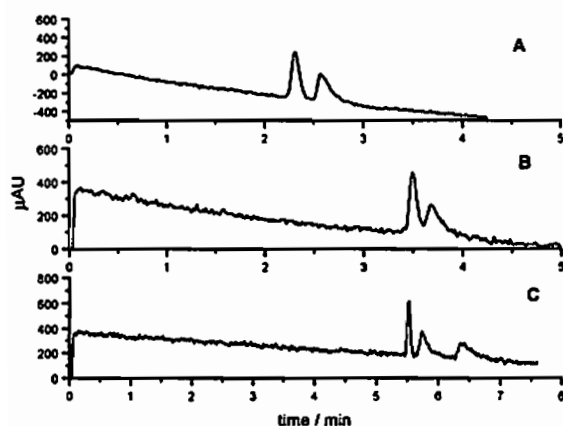


Fig. 4. Separations of basic chiral compounds by OTLC with adsorbed avidin stationary phase. Solute, (A) E2020, (B) nicardipin, (C) sulconazole. Capillary, (A) 57 cm (50 cm to detector) $\times$ 27 μ m i.d., (B) and (C), 57 cm (50 cm to detector) $\times$ 20 μ m i.d.; mobile phase, 10 mM phosphate buffer (pH 5.95) containing different percentages (v/v) of methanol: (A) 15% (B) none, (C) 25%; pressure, 138 kPa; temperature, 20°C.

P208

Glucronyl glucosyl β -cyclodextrin をセクターとして用いたキャピラリー電気泳動による塩基性薬物の光学分割
○松永久美、萩中 淳
武庫川女子大・薬

Separation of Basic Drug Enantiomers by Capillary Zone Electrophoresis Using Glucuronyl Glucosyl β -Cyclodextrin as a Chiral Selector

Hisami Matsunaga, Jun Haginaka

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8179

Enantiomer separations of basic drugs have been investigated using glucuronyl glucosyl β -cyclodextrin (GUG β -CD) as a chiral selector in the background electrolyte by capillary zone electrophoresis. Chiral resolution of 16 basic drugs was attained using 10 mM GUG β -CD in 40 mM phosphate buffer solution at pH 2.5 or 5.8 as the running buffer solution. The chiral recognition abilities of GUG β -CD were compared with those of β -CD and maltosyl β -CD. GUG β -CD showed the highest chiral recognition abilities for basic drugs tested among the CDs.

はじめに

β -Cyclodextrin (β -CD) およびその誘導体はキャピラリー電気泳動法による薬物の光学分割のためのセクターとして広く用いられている。今回、セクターとして maltosyl β -CD (Ma β -CD) の分岐部分の末端グルコース残基のヒドロキシメチル基だけが位置特異的に酸化され、ウロン酸型に変換された glucuronyl glucosyl β -CD (GUG β -CD) を用い、塩基性薬物の最適な光学分割条件を検討するとともに、GUG β -CD の光学認識能を β -CD および Ma β -CD のそれと比較・検討した。

実験

キャピラリー電気泳動装置は Beckman 製 P/ACE 5500 に linear polyacrylamide をコーティングしたフューズドシリカ管（内径 50 μ m、有効長 50 cm）を装着して使用した。印加電圧は 25.0 kv、キャピラリー温度は 20℃で、検出は 214 あるいは 254 nm で行った。泳動液は、各セクターを含むリン酸緩衝液を用い、セクターおよびリン酸緩衝液のモル濃度と pH を変化させた。試料は、16 種の塩基性薬物を用い、その濃度は homochlorcyclizine と trimetoquinol は 0.1 mg/ml、promethazine と chlorpheniramine は 0.5 mg/ml でその他の薬物は 0.2 mg/ml とし、加圧法（0.5 psi、1s）で注入した。

結果と考察

泳動液は、GUG β -CD の濃度 5、10 および 20 mM、リン酸緩衝液のモル濃度 20 および 40 mM、リン酸緩衝液の pH 2.5 および pH 5.8 とし、塩基性薬物の光学分割を検討した。セクターの濃度を 5、10、20 mM と変化させた時、検討した薬物のうち clorprenaline、dimethindene、isoprenaline、pindolol、propranolol、terbutaline および trimetoquinol は、高いセクター濃度において良好な分離を示した。しかし、homochlorcyclizine はセクター濃

度 5 mM で最も良好な分離が得られた。いずれの薬物も少なくともセクター濃度 10 mM において十分な分離が得られたので、以下の検討では、セクター濃度を 10 mM とした。泳動液の pH を 5.8 から 2.5 に変化させた時、検討したすべての塩基性薬物の泳動時間は短くなったが、pH 2.5 では ketamine、promethazine、homochlorcyclizine および verapamil の光学分割が可能になった。

Table. Influence of cyclodextrin type on the migration times and resolution of basic drugs

Analyte	GUG β -CD		Ma β -CD		β -CD	
	t_i	R_s	t_i	R_s	t_i	R_s
Atenolol	17.60	0.51	16.14	0.34	16.27	< 0.2
Chlorpheniramine	10.42	1.61	11.21	1.36	10.55	1.35
Clorprenaline	14.93	4.83	13.98	3.81	13.99	3.72
Dimethindene	9.62	3.70	9.05	3.02	8.81	2.36
Homochlorcyclizine	21.16	0.51	19.80	-	18.02	-
Isoprenaline	13.70	1.55	13.50	1.39	13.03	1.27
Ketamine	16.69	1.57	15.80	1.50	15.02	1.43
Pindolol	15.03	0.98	14.46	0.69	14.36	0.64
Piperoxan	17.15	3.93	16.07	2.89	15.64	2.76
Promethazine	34.40	0.96	26.90	<0.2	24.10	0.21
Propranolol	20.50	0.61	18.64	0.56	17.65	0.46
Terbutaline	17.61	5.88	16.80	4.00	15.98	3.44
Trimetoquinol	15.47	2.97	15.32	2.79	15.01	2.87
Verapamil	34.16	1.26	27.21	0.47	25.31	0.48

HPCE conditions: linear polyacrylamide coated capillary, 50 μ m i.d., L=50/57 cm; E, 500 V cm⁻¹; T, 20 °C; buffer, 40 mM phosphate buffer containing 10 mM each CD (pH 2.5); detection, 214 nm.

次に、これらの塩基性薬物の光学分割を 10 mM の GUG β -CD、Ma β -CD および β -CD をセクターとして用いて比較・検討した。表に示したように、分離度はいずれの薬物においても GUG β -CD > Ma β -CD $\geq$ β -CD の順に良好な結果を与えた。Homochlorcyclizine は GUG β -CD を用いた時だけ、光学分割が可能であった。塩基性薬物の光学分割において、GUG β -CD は、Ma β -CD および β -CD より優れたキラルセクターであることが明らかとなった。

P209 HPFA/CE を用いる酸化 LDL の薬物親和性増大機構の研究

(京大院・薬) ○渡邊義敬、黒田幸弘、澁川明正、半田哲郎、中川照眞

Study on the molecular mechanism of the binding between drug and oxidized LDL by using high performance frontal analysis / capillary electrophoresis

Yoshinori Watanabe*, Yukihiro Kuroda, Akimasa Shibukawa, Tetsurou Handa and Terumichi Nakagawa
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501 Japan.

High performance frontal analysis / capillary electrophoresis (HPFA/CE) was applied to the binding study between basic drugs (verapamil and propranolol) and several liposomes to investigate the effect of LDL (low density lipoprotein) oxidation upon drug binding affinity from molecular-based viewpoint.

The model liposomes consisted of 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC, C16:0, C18:1), 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylcholine (PLPC, C16:0, C18:2), dilauryl-phosphatidylcholine (DLPC, C12:0, C12:0) or 1-palmitoyl-3-phosphocholine (monoPPC, C16:0) did not show significant difference in the drug binding affinities. However, the liposome consisted of 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG, C16:0, C18:1) showed much stronger binding affinity to the model drugs than the other liposomes. This result suggests that the decrease in the positive charges of LDL phospholipids gives more significant effect upon the drug binding affinity than the changes in acyl-chain length or the number of unsaturated bonds.

Keywords: LDL, liposome, verapamil, capillary electrophoresis, high performance frontal analysis.

【緒言】

疎水性ならびに塩基性薬物との血漿タンパク結合に関与する低密度リポタンパク質 (LDL) は、種々のリポタンパク質の中で最も血中濃度が高く、病態や個人差によって血漿中濃度が大きく変動し、高脂血症や動脈硬化症時には酸化修飾を受けることが知られている。当研究室ではこれまでに、高性能先端分析/キャピラリー電気泳動法 (HPFA/CE) を薬物と LDL の血漿タンパク結合研究に適用し、LDL の酸化に伴い薬物の結合親和性が増大することを報告してきた[1,2]。しかし、そのメカニズムの詳細については不明である。LDL が酸化されると、脂質中の共役ジエン構造の増加やアシル鎖切断、リゾリン脂質の生成、脂質過酸化物やシッフ塩基形成などによる正電荷の減少などの現象が起こる。本研究では HPFA/CE 法を用いて、アシル鎖の不飽和度や鎖長、極性基の荷電数が異なるリン脂質から成る 4 種のモデルリポソームおよび脂質酸化生成物であるリゾリン脂質を混合したモデルリポソームとの薬物親和性を測定し、LDL 酸化に伴うリン脂質成分の構造変化が薬物結合性に与える影響を検討した。モデル薬物として共に塩基性薬物である verapamil (VER、カルシウム拮抗薬) および propranolol (PRO、β遮断薬) を使用した。なお、LDL と薬物との結合には立体選択性が見られなかったため、本研究では、両薬物とも活性体である(S)体を使用した。

【実験】

リポソームの調整、粒径、濃度の評価: モデル脂質として、1-palmitoyl-2-linoleoylphosphatidylcholine (PLPC、C16:0, C18:2)、1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC、C16:0, C18:1)、dilauryl-phosphatidylcholine (DLPC、C12:0)、1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG、C16:0, C18:1)、1-palmitoyl-3-phosphocholine (monoPPC、C16:0) を使用し、POPC、PLPC、DLPC については単独

で、POPG と monoPPC は POPC と混合して超音波法によりリポソームを調整した。粒径は動的光散乱法により測定し、リン脂質モノマー濃度はコリンオキシダーゼ法により定量した。

HPFA/CE法による非結合型 VER 濃度の測定: 内面未処理の溶融シリカキャピラリー (内径 75 μ m、全長 42cm、有効長 30cm) に泳動緩衝液 (pH7.4、I=0.17 のリン酸緩衝液) を満たし、試料溶液 (20-80 μ M の (S)-VER あるいは (S)-PRO を含むリポソーム溶液、モノマー濃度 455 μ M) にキャピラリーの一端を入れ、差圧法により約 100-300nL の試料溶液をキャピラリー内に導入した。続いて電気泳動を開始する (+7kV) と結合平衡状態を保ちつつ結合型薬物がリポソームから解離し、台形状の非結合型薬物ピークが検出された。このプラトー高さから非結合型薬物濃度を求めた。

【結果・考察】

リポソーム中リン脂質成分の差異に基づく薬物結合性の変化: (S)-VER、(S)-PRO の両塩基性薬物は、ある濃度範囲ですべてのリポソームにおいて非結合分率が変化せず LDL と同様に結合飽和の見られない非特異的な結合が起こっていることが示された。両薬物の非結合分率は PLPC、POPC、DLaPC の各リポソーム間において顕著な相違が見られず、また脂質過酸化生成物であるリゾリン脂質 monoPPC を混合することによっても大きな変動は見られなかった。一方、POPG (電荷 -1) と POPC (電荷 ± 0) とを混合したリン脂質リポソームは、他の 4 種のリポソームに比べ非結合分率が大きく低下し、リポソームの極性頭部の持つ電荷が塩基性薬物の結合親和性に多大な影響を及ぼすことが示された。極性頭部の電荷が負である POPG の結合親和性増大が他のリン脂質リポソームに比べ大きいことから、LDL 表面における正電荷数の減少が主要な因子となって LDL の酸化に伴う塩基性薬物の結合親和性増大が起こり、脂質アシル鎖の鎖長や不飽和度の変化による影響はそれに比べ小さいものと考えられる。

Table. Unbound fraction (%) of (S)-VER and (S)-PRO in liposome solutions

component	unbound fraction (%)	
	(S)-VER	(S)-PRO
PLPC	73.5 $\pm$ 1.0	59.4 $\pm$ 0.9
POPC	57.8 $\pm$ 1.0	65.0 $\pm$ 1.7
DLaPC	72.3 $\pm$ 1.7	66.2 $\pm$ 1.2
POPC + POPG	29.9 $\pm$ 0.9	19.8 $\pm$ 0.8
POPC + monoPPC	68.4 $\pm$ 1.1	59.5 $\pm$ 0.5

Mean $\pm$ SD., n=3. Sample: 30 μ M (S)-VER and (S)-PRO with POPC, PLPC or monoPPC liposome (monomer concentration 455 μ M). 50 μ M (S)-VER and (S)-PRO with DLaPC liposome or POPG liposome.

【参考文献】

- [1] N.A.L.Mohamed, Y.Kuroda, A.Shibukawa, T.Nakagawa, S.E.Gizawy, H.F.Askal, M.E.E.Kommos, J. Chromatogr. A. **875**, (2000) 447.
- [2] N.A.L.Mohamed, Y.Kuroda, A.Shibukawa, T.Nakagawa, S.E.Gizawy, H.F.Askal, M.E.E.Kommos, J. Pharm. Biomed. Anal. **21** (1999) 1037

P210

キャピラリー電気泳動法によるフェノールフタレインの酸解離反応解析

○高柳俊夫、本水昌二

岡山大・理

Equilibrium Analysis of Acid Dissociation Reactions of Phenolphthalein by Using Mobility Change in Capillary Zone Electrophoresis

Toshio TAKAYANAGI and Shoji MOTOMIZU

Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka Okayama 700-8530

An equilibrium analysis method by capillary zone electrophoresis was applied to the determination of acid dissociation constants of Phenolphthalein, which is unstable in an alkaline aqueous solution. Acid dissociation constants of Phenolphthalein were determined by using the mobility change of Phenolphthalein in capillary zone electrophoresis. Apparent electrophoretic mobility of Phenolphthalein increased with increasing pH of a migrating solution, and a non-linear least-squares analysis provided the acid dissociation constants (pK_a) of 8.84 and 9.40.

はじめに

フェノールフタレイン (PP) はよく用いられる酸塩基指示薬の一つであるが、アルカリ性水溶液中で不安定なために、ごく最近まで基本的な物性である酸解離定数は求められていなかった。また、吸光光度法により求められている報告値^{1,2}には大きな違いがあり、未だ明確なものはない。これまでにキャピラリー電気泳動法 (CZE 法) による平衡反応解析は酸解離反応にも適用され、アナライトを極低濃度で測定できる点が注目されていた³。しかしながら、CZE 法のもう一つの重要な特徴である分離特性の活用は注目されていなかった。CZE 法では、不安定化学種など平衡反応に関与しない化学種は目的とする化学種から分離されるので、これら不安定化学種の影響を受けずに解析することが可能である。本研究では、溶液内での不安定化合物の例としてフェノールフタレインを取りあげ、CZE 法の移動度測定からその酸解離定数を決定した。

実験

キャピラリー電気泳動装置として Hewlett Packard 3DCE を用い、56+6.5cm (内径 50 μ m) の熔融シリカキャピラリーを装着した。pH 測定には Corning Ion Analyzer 250 に複合電極を装着して用いた。

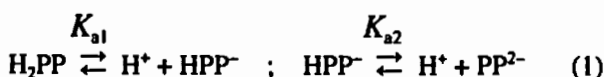
四ホウ酸ナトリウム溶液に HCl あるいは NaOH を添加して pH を調整し、イオン強度が 0.05 になるように NaCl を添加したものを泳動液として用いた。試料液には泳動液成分と 1×10^{-5} M PP, 2×10^{-5} M メチルオレンジ (MO) を含むものを用いた。キャピラリーの陰極側から試料液を 150 mbar $\cdot$ s 注入し、15 kV の電圧を印加して電気泳動を行い、230 nm で吸光検出した。バイアル温度、キャピラリー温度はともに $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ とした。

結果と考察

フェノールフタレインのэлектроフェログラムを Fig. 1 に示す。pH の上昇とともに PP の泳動時間はおそくなっている。これは、解離型 PP (HPP⁻, PP²⁻) の割合が増加したためである。pH 11.5 以上では PP のシグナルはブロードなものとなった (Fig. 1 d)。PP(OH)³ が生成したためと考えられる。

pH 変化に伴う電気泳動移動度の変化を Fig. 2 に示す。PP の移動度は pH の上昇に伴って S 字型に上昇し、無電荷化学種から陰イオン化学種への変化が示された。一方、MO の移動度は測定した pH 範囲内ではほぼ一定の移動度となり、PP の移動度変化には泳動液の粘度変化などの外的要因がはたらかないことが示された。

フェノールフタレインの酸解離反応及びその平衡は次式 (1), (2) で示される。



$$K_{a1} = \frac{a_{\text{H}^+} [\text{HPP}^-]}{[\text{H}_2\text{PP}]} ; \quad K_{a2} = \frac{a_{\text{H}^+} [\text{PP}^{2-}]}{[\text{HPP}^-]} \quad (2)$$

PP に関する物質収支式、平衡式 (2), 及び移動度の式から、PP の見かけの電気泳動移動度 ($-\mu_{\text{ep}}'$) は (3) 式で与えられる。

$$-\mu_{\text{ep}}' = \frac{(a_{\text{H}^+}^2/K_{a1}K_{a2})(-\mu_{\text{ep,H}_2\text{PP}}) + (a_{\text{H}^+}/K_{a2})(-\mu_{\text{ep,HPP}}) + (-\mu_{\text{ep,PP}})}{(a_{\text{H}^+}^2/K_{a1}K_{a2}) + (a_{\text{H}^+}/K_{a2}) + 1} \quad (3)$$

ここで、 $-\mu_{\text{ep,H}_2\text{PP}}$, $-\mu_{\text{ep,HPP}}$, および $-\mu_{\text{ep,PP}}$ はそれぞれ H_2PP , HPP^- , PP^{2-} の移動度である。 a_{H^+} と $-\mu_{\text{ep}}'$ を入力変数とする非線形最小自乗法により K_{a1} , K_{a2} を決定した。なお、解析にあたっては電荷量・分子量から、 $-\mu_{\text{ep,HPP}}$ 値を $-\mu_{\text{ep,PP}}$ 値の 1/2 とした。得られた $-\mu_{\text{ep,PP}}$ 値は塩基型フェノールレッドに近く、無電荷から二価陰イオンへの反応であることが示された。また、得られた酸解離定数 ($\text{p}K_a$) は 8.84 ± 0.09 , 9.40 ± 0.09 であり、Tamura らの報告値²に近い値が得られた。 $-\mu_{\text{ep,HPP}}$ 値を変化させた解析においても、 $\text{p}K_a$ 値に大きな違いは認められなかった。

謝辞

本研究は、日本学術振興会研究費補助金(奨励研究 A 12740409)の助成を受け行われた。

文献

- 1) T. Ozeki, H. Morikawa and H. Kihara, *Bunseki Kagaku*, 42 (1993) 887. 2) Z. Tamura, S. Abe, K. Ito and M. Maeda, *Anal. Sci.*, 12 (1996) 927. 3) S. J. Gluck and J. A. Cleveland, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 49.

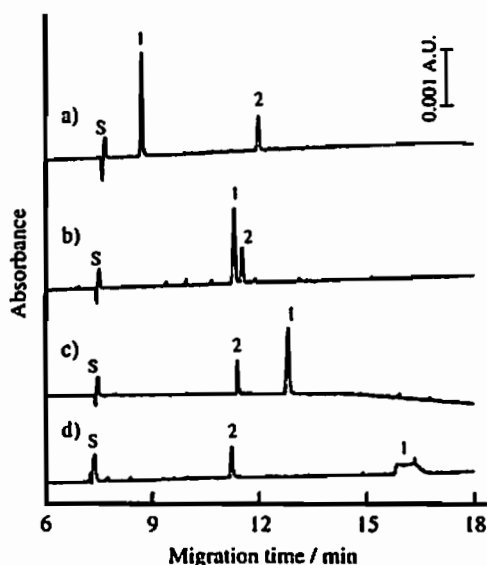


Fig.1 Electropherograms for PP and MO. pH conditions: a), 8.64; b) 9.42; c) 9.81; d) 11.6. Signals: 1, PP; 2, MO.

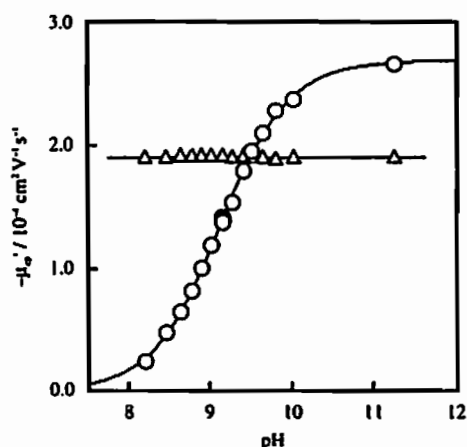


Fig.2 Change in $-\mu_{\text{ep}}'$ of PP and MO. ○: PP; △: MO.

P211

キャピラリー電気泳動による錯体解離反応ダイナミクスの研究

○田中裕剛, 河津博文

近畿大・九州工

Study of Complex Dissociation Dynamics by Capillary Electrophoresis

Hiroataka TANAKA, Hirofumi KAWAZUMI

Department of Environmental and Biological Chemistry, Kyushu School of Engineering, Kinki University

A new approach for the kinetic study of complex formations is proposed by using the capillary electrophoresis. Chelate complexes (Fe(II), Cu(II) and 1,10-phenanthrolines) formed in advance are injected into the capillary in which a buffer solution does not contain the ligand. During the electrophoresis, the complex decomposes because the equilibrium is one-sided to the complex products. An amount of the survived complex is analyzed by changing the electrophoresis time. The dissociation rates and the dependence of metal ions on the kinetic stability could be obtained.

キャピラリー電気泳動 (CE) は、高分離能・微量分析・完全自動化などといった優れた特徴を持つ方法で幅広い分析分野で使われはじめている。CEでは、試料を泳動液で満たしたキャピラリーに導入して電圧を印可し、イオンを電気的に移動させる。さらに電気浸透流 (EOF) で中性物質の移動もコントロールできる。この特徴を利用し、CEを分析装置としてではなく、分析化学において重要な平衡反応の速度論的な研究へと応用することにつき検討した。本研究では、典型的な溶媒抽出反応である錯体形成反応を取り上げた。効率の良い抽出操作のためには、錯平衡反応定数の詳細を知る必要がある。通常、平衡定数は熱力学的平衡状態での化学種の濃度比で表され、良く研究されている。一方、速度論的には正反応速度と逆反応速度の比で表させるが、その適当な研究方法は少ない。例えば、平衡定数の知られている錯形成反応において錯体分解速度が測定できれば、高速な錯体生成速度がわかることになる。キャピラリー電気泳動において、錯体平衡反応に関係する化学種は、それぞれの電気移動度により泳動され、反応の平衡状態は電気泳動

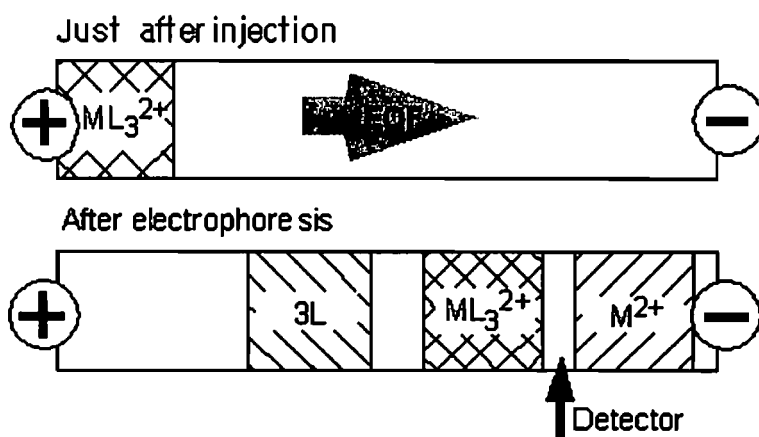


Fig.1 錯体分解速度測定原理の概念

の間に刻々と変化する。Fig. 1で表されるように注入時に平衡状態にあった反応は、泳動がはじまると大きく平衡状態からずれ、泳動中は解離反応のみが常に起こることになる。CEでは反応時間の変化は印可電圧やキャピラリーの長さを変えることで達成でき、分解速度定数を決定できることになる。

【実験】 試料として25 μ M Fe(II)もしくはその他の金属イオン, 200 μ M 1, 10 - phenanthroline (PTH), 0.5%ヒドロキシルアミン, 2.5mM 酢酸アンモニウム緩衝液から成る溶液 (pH 5) を作成した。これの試料をキャピラリーに圧力で注入し、HP - 3DC E装置により測定を行った。

【結果と考察】 配位子の吸収波長で測定したエレクトロフェログラムは、最初に錯体からの鋭いピーク、次に解離反応によりフリーになった配位子からの幅広い歪んだピーク、最後に注入した試料プラグに余剰に存在した配位子からの鋭いピークとそれぞれが分離して観測された。そこで印加電圧やキャピラリー長を変えて、検出時間の変化を創りだし、錯体の分解を測定した。Fig. 2は錯体からのピークの高さの対数を検出時間に対してプロットしたものである。良い直線関係を示し、キャピラリー中の錯体の解離が一次反応速度に従っていることが示された。この直線の傾きから、Fe(II)とPTHの錯体の分解速度定数を $3.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (at pH 8) と求めた。金属イオンは多段階の錯体形成反応をへて、PTHと最大1:3の錯体を生成する。平衡定数は、速度論的には正反応速度と逆反応速度の比で表されるので、平衡定数から各段の速度を求めることができる。一般的に多段階の錯体形成反応は1個目の配位子結合反応が遅く、その反応が律速反応であると言われている。しかしそのことを直接示した例は少ない。今回のFe(II)とPTHの生成反応では一段目に比べ三段目が約10倍も速いということがわかった。また、逆反応を見てみると一段目の反応が三段目の反応に比べ約100倍速い事がわかった。2つの異なる印可電圧(8及び18 kV)の実験のピーク強度の比率から錯体の安定性のpH依存性を調べた。比はpH 8で最低となり、そこで安定性が低く錯体の分解も進みやすいということがわかった。pH 8の時は分解したPTHの代わりに水が配位し、ポテンシャルエネルギーが低いいため分解しやすいと考えられる。また酸性状態

の時は分解したPTHに水素イオンが反応し、塩基性状態の時は分解したFe(II)に水酸化物イオンが反応するため自由エネルギー変化を多く必要とし、分解しにくくなると考えられる。

キャピラリー泳動装置の工夫により短い時間での分解測定にこの方法を応用できるようになれば、錯体形成反応あるいは分子会合体の研究にとって有用な方法になると期待される。

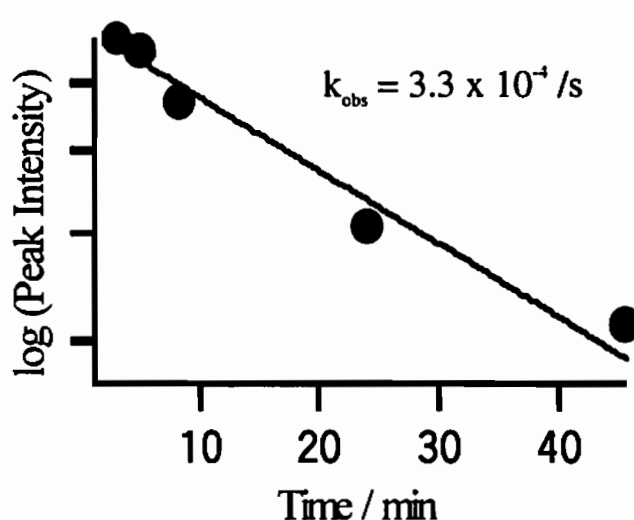


Fig. 2 単分子解離反応での解析

P212

アミロイドベータ蛋白と金属錯体との相互作用

○西野敏、西田雄三

山形大学理学部

Interaction between amyloid- β -peptide and metal chelates

Satoshi Nishino and yuzo Nishida

Department of Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University Yamagata 990-8560

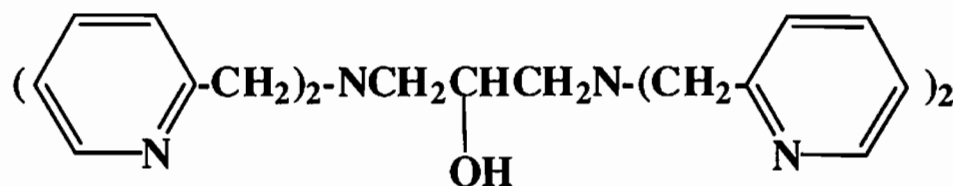
Interaction between amyloid β -peptide(1-40) and metal chelates in the presence of hydrogen peroxide was investigated in terms of capillary electrophoresis method

はじめに

アルツハイマー病、筋萎縮性即索硬化症 (ALS)、プリオン病（狂牛病等）は現代を代表する神経性疾患である。アルツハイマーとプリオン病では似た症状が見られると指摘されている。アルツハイマー病の特徴は、アミロイドベータ蛋白が異常に生成され、それが神経細胞に沈着し、細胞に強い毒性を示すことが病気の原因とされている。このアミロイドベータ蛋白には、鉄、銅、亜鉛イオンが多量に含まれているが、それらの金属イオンの由来や細胞毒性の原因については解明されていない。プリオン蛋白は、脳において銅イオンと結合するタンパクであると推定されている一方で、病気を引き起こす変型プリオン蛋白の生成にも銅イオンの関与が指摘されているが、後者の反応に関与すると指摘されている銅イオンがどのような形態で細胞内に存在しているのかさえ、解っていない。このような観点から、脳における銅イオンの挙動と神経性疾患との関連性が非常に注目されている。今回、アミロイドベータ蛋白（以下、A β P(1-40)と略する）と各種金属錯体との相互作用を過酸化水素の存在下、またはそれが無い時と比較しながら、A β P(1-40)の化学的な性質を明らかにし、病気の治療、予防策について考察した。

実験

用いた錯体は銅 (II) 錯体（これについては、別で発表（西野、西田）の要旨参照のこと）と、H(HPTP)を配位子とする Zn(II)、Co(II)、Fe(III) 錯体である。



H(HPTP)

これらの錯体と AβP(1-40)、過酸化水素を混合し、その時間的变化を、キャピラリー電気泳動、ESI-質量スペクトルで追跡した。

結果

代表的な例として、AβP(1-40) と Cu(tpa) 錯体を混合した系について下図に示した。一定時間後 (—— A) に、特異的なシグナル (図での * 印で示したピーク) が現れ、それは時間とともに消失する (··· B) が、この過程で AβP(1-40) の分解はほとんど生じていないことが ESI-質量スペクトルから分かる。

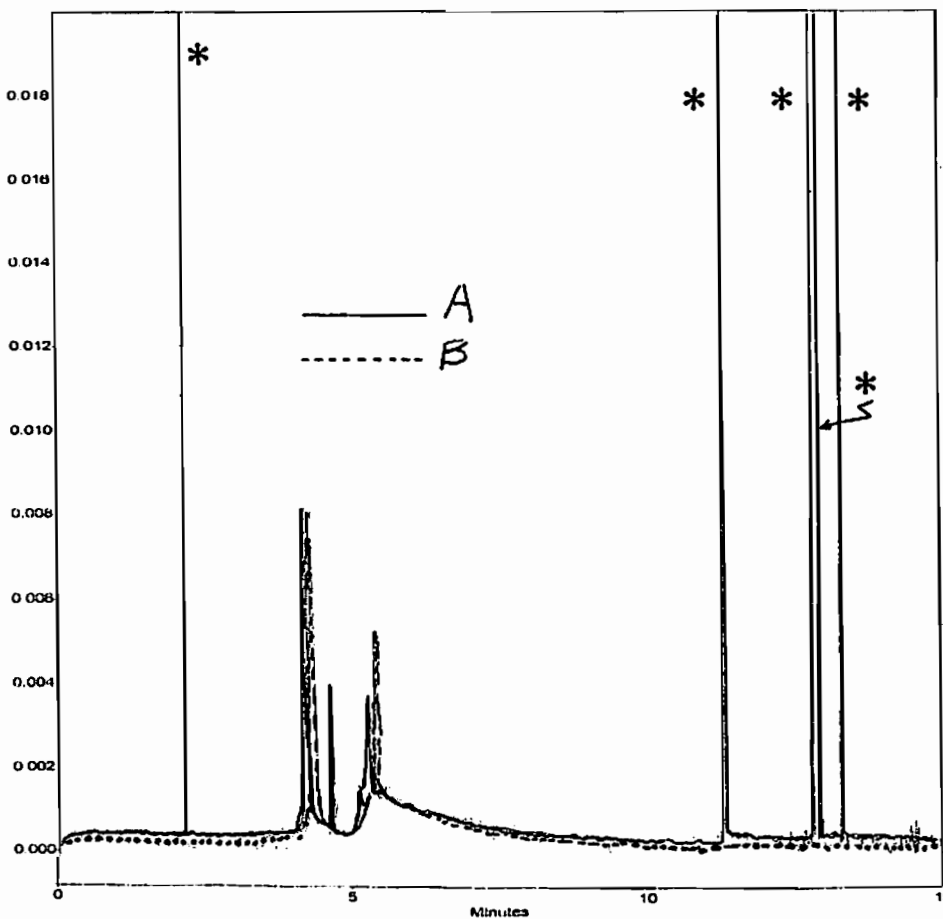


図. AβP(1-40)、Cu(tpa)、過酸化水素混合系の CE.

似たような変化は、Zn₂(HPTP) 錯体でも見られた。一方、Cu(bdpg)、Co₂(HPTP)、Fe₂(HPTP) 錯体では、AβP(1-40) の消失が観測された。このような結果は、AβP(1-40) は、いろいろな金属錯体と多様な相互作用をすることを示しており、今後、AβP(1-40) の形成、分解をコントロールする金属錯体の合成が可能であることを示唆している。

P213

過酸化水素存在下での蛋白質と金属錯体との相互作用

西野敏、○西田雄三

山形大学理学部

Interaction between protein and metal chelate in the presence of hydrogen peroxide; origin of "gain-of-function" by mutant SOD in patients of Amyotrophic lateral sclerosis

Satoshi Nishino and yuzo Nishida

Department of Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University Yamagata 990-8560

Capillary electrophoresis method has revealed that a (hydroperoxo)copper(II) species can interact with the proteins as a nucleophile; this may be very important to understand the origin of "gain-of-function" observed in mutant SOD.

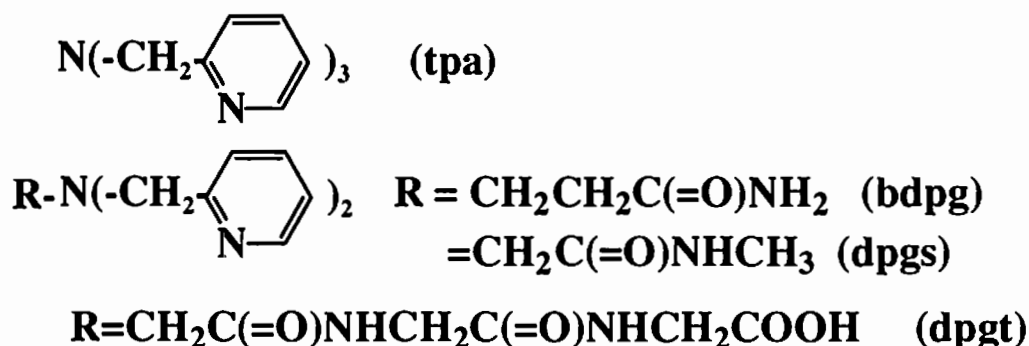
はじめに

アルツハイマー病、筋萎縮性即索硬化症 (ALS)、プリオン病（狂牛病等）は現代を代表する神経性疾患である。アルツハイマーとプリオン病では似た症状が見られると指摘されている。アルツハイマー病の特徴は、アミロイドベータ蛋白が異常に生成され、それが神経細胞に沈着し、細胞に強い毒性を示すことが病気の原因とされている。このアミロイドベータ蛋白には、鉄、銅、亜鉛イオンが多量に含まれているが、それらの金属イオンの由来や細胞毒性の原因については解明されていない。プリオン蛋白は、脳において銅イオンと結合するタンパクであると推定されている一方で、病気を引き起こす変型プリオン蛋白の生成にも銅イオンの関与が指摘されているが、後者の反応に関与すると指摘されている銅イオンがどのような形態で細胞内に存在しているのかさえ、解っていない。このような観点から、脳における銅イオンの挙動と神経性疾患との関連性が非常に注目されている。ALS は、スーパーオキシドジスムターゼ (Cu/Zn-SOD) の変異に見られる遺伝子病であるが、この変異の原因を調べることは、上で述べた2つの病気の原因を調べる上でも重要である。

変異 SOD では、もともとの酵素には見られなかったいくつかの作用が現れる。そのなかでも、特異的な酸化力は注目すべきであろう。この酸化力については我々はモデル錯体から明らかにしてきた。最近、我々は（ヒドロペルオキシ）銅 (II) 錯体について DFT (density-functional theory) に基づいた計算を行った。それによれば、変異 SOD に可能な（ヒドロペルオキシ）銅 (II) にこれまでにない新しい作用が出ることが期待されている。今回、この作用をキャピラリー電気泳動法で見い出すことができた。

実験

われわれはすでに、細胞内における自由銅モデルとして、ペプチド結合を含む銅(II)錯体の挙動に注目し研究を続けてきている(配位子の代表例として下図、参照のこと)。



この種の錯体に過酸化水素を加えると、その反応性が周辺基（上の図での R のこと）の違いによって大きく左右されることを報告してきた。とくに Cu(tpa) と Cu(bdpg) 錯体での違いは顕著である。これらの事実は、mutatet SOD における銅イオン周辺での配位環境の変化が、反応の途中で形成されるパーオキサイド付加体の反応性を大きく変えており、それがこの酵素による "gain-of-function" の原因であり、mutant SOD による ALS 誘導の原因であることを示唆している。そして、プリオン蛋白での異常な挙動も、銅(II) 錯体／過酸化水素系の効果として説明ができることも明らかになった。¹⁾

結果

今回、SOD モデルとして可能な、Cu(tpa) 錯体と過酸化水素を carbonic anhydrase に加えると、異常なシグナルが検出され、時間の経過とともにそれが消えていくことを見い出した。(tpa) 錯体以外でも、同様な現象が観測された。この新しいシグナルの由来については現在でも確実ではないが、一つの可能性として、Cu(tpa) 錯体が、(ヒドロペルオキシ) 錯体形成と共に、carbonic anhydrase と結合したとみなすことができる。よってこの作用は酸化的なものとは違っており、それは DFT 計算結果から得られた結論、すなわち (ヒドロペルオキシ) 銅 (II) 錯体は、そのプロトンの位置によって、反応性がおおきくコントロールされており、ある場合には、nucleophile として作用する、²⁾ と対応している。

この種の（ヒドロペルオキシ）銅(II)錯体による nucleophilic な作用は、蛋白質の conformational change を引き起こす原因とも考えられ、これらの病気の原因としての蛋白質の misfolding の由来を考える上で重要な事実となろう。

- 1) Nishida, Trends Inorg. Chem., 5 (1998) 89. Nishida and Nishino, J. Bioscience, 54c (1999) 1107. 2) Nishida and Nishino, in press.

P214

ポリオキシメタレート錯体生成に基づくCE分析に及ぼす有機溶媒の効果

○後藤拓哉¹、中島陽一²、姫野貞之¹

神戸大学理学部化学科¹、大阪府立産業技術総合研究所²

Effect of Organic solvents on the CE Analysis Based on the Formation of Heteropolyoxometalate Complexes

Takuya Goto¹, Yoichi Nakashima², Sadayuki Himeno¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University 657-8501

²Technology Research Institute of Osaka Prefecture 594-1157

The formation of heteropolyoxometalates has been applied to the spectrophotometric and voltammetric determination of various hetero-ions such as P(V) and Si(IV). In recent studies, we have found that some molybdophosphates being unstable in aqueous solution can be stabilized by the presence of water-miscible organic solvents like CH₃CN as auxiliary solvents. On the basis of these findings, the complex-formation reaction of polyoxometalates was applied to the capillary electrophoretic determination of phosphate, phosphonate and diphosphate in aqueous-CH₃CN media, because well defined peaks due to the respective heteropolyoxomolybdate complexes were obtained.

On the other hand, we have also found that Mo(VI) reacts rapidly with low concentrations of Ni(II) even at room temperature, to form a stable Anderson-type heteropolyanion in acidic aqueous-CH₃CN media, and Ni(II) can be determined with high sensitivity by the acetonitrile-stacking. Similarly, the acetonitrile-stacking is observed for the determination of Al(III), Ga(III), Cr(III) and Si(IV).

はじめに

ポリオキシメタレート錯体は、モリブデン酸イオンやタングステン酸イオンと種々の酸素酸との縮合反応により生成する錯体である。近年これらの錯体は、触媒化学、無機医薬などの広い分野において大いに注目されている。また、分析化学分野においては、ポリオキシモリブデート錯体の生成反応を用いた吸光光度測定法、いわゆるヘテロポリブルー法が、リン酸やケイ酸の簡便かつ高感度な定量法として広く知られている。

一部のケギン型錯体を除いて、ポリオキシメタレート錯体は低濃度領域で錯形成しないとされていた。我々は錯形成条件の詳細な検討の結果、アンダーソン型錯体をはじめとする多くの錯体種が低濃度領域においても室温下で瞬時に錯形成することを見だし、この錯形成反応を CE 分析に応用してきた[1]。これらの錯体は大きなモル吸光係数を持つことから、Cr(III), Al(III), Ga(III), I(VII)などの高感度な直接 UV 検出が可能であった。これまでのポリオキシメタレート錯体の CE への応用研究は主に水溶液系で行われてきたが、我々は水-有機混合溶媒中でさらに多くの錯体種が生成することを明らかにしている。今回、ポリオキシメタレート錯体の CE 分析に及ぼす錯体の安定性、スタッキングおよび有機溶媒の効果について検討した。

実験

Beckman coulter 社製 P/ACE MDQ を用い実験をおこなった。キャピラリーは内径 75 μm 、全長 70 cm、有効長 50 cm の熔融シリカ管を用いた。ピーク検出と同時にスペクトル測定を行い、ポリオキシメタレート錯体を同定した。試料導入は陰極側から 5 秒間、加圧方式 (0.5 psi.) によって行った。

結果と考察

まず、 PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 PHO_3^{2-} と Mo(VI) との錯形成反応について検討した結果、いずれも水溶液系で錯体を生成しなかったが、系にアセトニトリルなどの補助溶媒を添加すると、低濃度条件下でかつ瞬時に錯形成することがわかった。この時生成した錯体は各々 $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ 、 $[(\text{P}_2\text{O}_7)\text{Mo}_{18}\text{O}_{54}]^{4-}$ 、 $[(\text{PHO}_3)_2\text{Mo}_{15}\text{O}_{45}]^{4-}$ であった。この錯形成反応の CE 分析への応用を検討したところ、泳動液に水溶液を使用した場合は電気泳動中に錯体が分解し、分析が不可能であったが、サンプル溶液と同濃度のアセトニトリルを添加した場合には良好なフェログラムを得ることができた。今回得られた定量範囲は PO_4^{3-} 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 PHO_3^{2-} について各々 $1 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。

一方、これまで低濃度領域では錯形成しないとされていた Ni(II) が反応場を水-有機混合溶媒系に変えると極低濃度で Mo(VI) と錯形成することを見いだした。種々の検討の結果、アンダーソン型 $[\text{NiMo}_6\text{O}_{24}\text{H}_6]^{4-}$ の生成を確認することができた。この $[\text{NiMo}_6\text{O}_{24}\text{H}_6]^{4-}$ は安定であり、 Ni(II) の CE 分析への応用を試みたところ、泳動液を水溶液とする方が感度よく分析でき、先のリン系の分析とは異なる結果が得られた。本法は、泳動液にもアセトニトリルを添加する手法と比べ泳動時間の短縮化を実現できるほか、スタッキングの効果により定量限界 $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ という高感度分析が可能であった。

また同様に、水溶液系の CE 高感度分離分析に応用してきたアンダーソン型 $[\text{M}^{\text{III}}\text{Mo}_6\text{O}_{24}\text{H}_6]^{3-}$ ($\text{M} = \text{Al}, \text{Cr}$) や、ケギン型 $[\text{Si}^{\text{IV}}\text{Mo}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$ の反応場を水-有機混合溶媒系へ変えたところ、各々の錯形成を阻害することなく、スタッキング効果による感度の向上が見られた。

文献

1. Y. Nakashima, K. Kusuyama, H. Shen, I. Kitazumi, S. Himeno, Proceedings of the 19th Symposium on Capillary Electrophoresis 40 (1999).

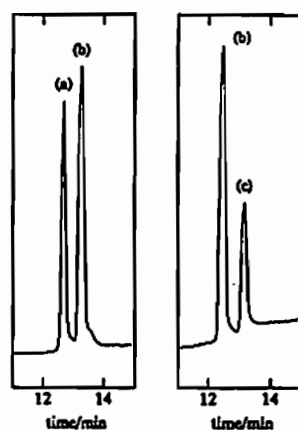


Fig.1 Electropherograms for test solutions containing (a) $1 \times 10^{-5} \text{ M P}_2\text{O}_7^{4-}$, (b) $1 \times 10^{-5} \text{ M PO}_4^{3-}$, (c) $2 \times 10^{-4} \text{ M PHO}_3^{2-}$.

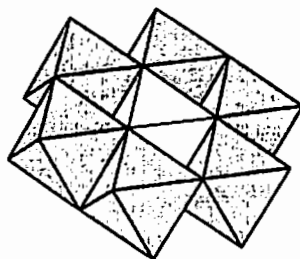


Fig.2 The Anderson structure.

P215

ヘテロポリオキソメタレート錯体生成反応の CE への応用 II—遷移金属イオンの分析—

○北角巖¹、中島陽一²、姫野貞之¹

神戸大学理学部化学科¹、大阪府立産業技術総合研究所²

Capillary Electrophoretic Analysis Based on the Formation of Heteropolyoxometalate Complexes II. Determination of Transition Metal Ions.

Iwao Kitazumi¹, Yoichi Nakashima², Sadayuki Himeno¹

¹*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe 657-8501*

²*Technology Research Institute of Osaka Prefecture, Izumi, Osaka 594-1157*

Recently, we have found that the complex-formation reaction of polyoxometalates proceeds rapidly even at very low concentrations of Mo(VI) or W(VI) and various oxoanions, and the polyoxometalates are stable in aqueous and aqueous-organic media. Since the polyoxometalates possess high molecular absorptivity, we have applied such complex-formation reactions to the capillary electrophoretic determination of oxoanions being capable of acting as central heteroions.

In the present study, we develop a new method based on the formation of ternary mixed polyoxometalates in aqueous media. The present method made it possible to determine various oxoanions being incorporated in the peripheral structure.

はじめに

それ自身 UV 吸収を持たない金属イオンやアニオンを CE 分析する場合、泳動液に UV 吸収を持つ電解質を添加し、目的イオンが検出部を通過する際の負の吸収を測定する indirect UV 法がよく用いられる。indirect UV 法は簡便ではあるが、その検出限界は必ずしも高くない。そのため、金属イオンに関しては、適当な有機配位子と高いモル吸光係数を持つ錯体を生成させ、感度の向上を図っている。

モリブデン酸イオンやタングステン酸イオンはリン酸イオンやケイ酸イオンなどの酸素酸イオンと反応して非常に大きなモル吸光係数を持つポリオキソメタレート錯体を生成する。我々はこれらポリオキソメタレート錯体生成反応が低濃度条件下で速やかに起こることを見だし、CE 分析への応用を続けている。前回、モリブデン酸イオンやタングステン酸イオンを反応試薬とする種々の酸素酸イオンの分離分析への応用について報告した¹。

モリブデン酸イオンやタングステン酸イオンがリン酸イオンをヘテロイオンとして中心に取り込んだ欠損型錯体の欠損部位に各種酸素酸イオンが結合した錯体種を三元ポリオキソメタレート錯体といい、これまで数多くの三元ポリオキソメタレート錯体が合成・単離されている。既報が中心の酸素酸イオンを分析対象物としていたのに対し、今回、この三元錯体の外側に配位する酸素酸イオンを分析対象物として注目し、分析対象物の拡大を目的とした新しい分析法の開発を試みた。その結果、種々の酸素酸イオンの分析について良好

な結果が得られたので以下に報告する。

実験

キャピラリー電気泳動装置は Beckman 社製の P/ACE MDQ を使用し、キャピラリーは内径 75 μm 、全長 60 cm、有効長 50 cm の熔融シリカ管を用いた。泳動ピーク測定と同時に PDA によるスペクトルの測定を行い、ポリオキソメタレート錯体の同定も行った。試料は陰極側から 10 秒間加圧法により導入した。

結果と考察

モリブデン酸イオンとリン酸イオンを反応試薬とした時に生成する欠損型錯体をホストとし、金属イオンをゲストとする錯体生成反応について検討した。酒石酸、クエン酸、クロロ酢酸、及びマロン酸緩衝溶液について泳動液の検討を行ったところ、クロロ酢酸もしくはマロン酸緩衝溶液を使用したときにのみ三元ポリオキソメタレート錯体生成反応によるピークが検出された。しかし、マロン酸緩衝溶液を使用すると、クロロ酢酸緩衝溶液を使用したときに比べ錯体生成に時間を要したため、今回、泳動液はクロロ酢酸緩衝溶液を用いることにした。その結果、外側に Fe(III)、V(IV)、V(V) が配位した三元錯体の生成を CE 分析に応用することができた。V(IV)、V(V) に関しては同時定量も可能であった (Fig. 1)。

次に分析対象物の拡大を図る目的で、タングステン酸イオンとリン酸イオンを反応試薬とした分析法の開発を試みた。しかし、この反応試薬の場合、モリブデン酸イオンとリン酸イオンを反応試薬とした分析法に比べかなりの反応時間を要するという欠点があった。そこで、今回、タングステン酸イオンとリン酸イオンがつくる $[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}]^{7-}$ 欠損型錯体をあらかじめ合成し、これをホストとした種々の酸素酸イオンとの三元ポリオキソメタレート錯体生成反応について検討した。その結果、 $[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}]^{7-}$ 欠損型錯体を反応試薬とした場合、錯体生成反応が速やかに進み、反応時間に関する問題点を克服することができたため Al(III)、Ga(III)、In(III)、Fe(III)、Cr(III)、Zr(IV)、V(V) の迅速かつ簡便な CE 分析への応用が可能となった。

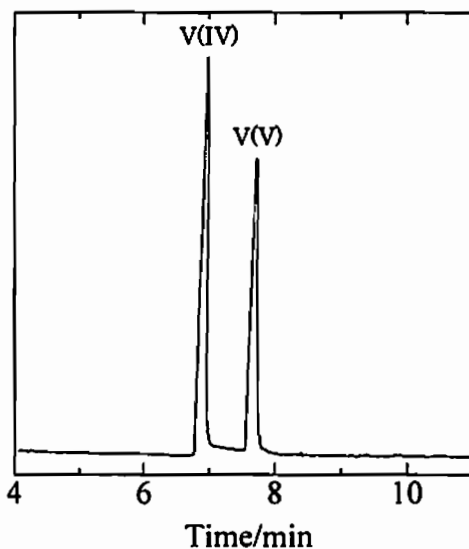


Fig.1 An electropherogram for 5.0 mM Mo(VI) + 0.5 mM P(V) containing 0.1 mM V(IV) + 0.1 mM V(V) (0.1 M $\text{CClH}_2\text{COOH}-\text{CClH}_2\text{COONa}$ buffer (pH 2.0)).

文献

1. Y. Nakashima, K. Kusuyama, H. Shen, I. Kitazumi, S. Himeno, Proceedings of the 19th Symposium on Capillary Electrophoresis (1999) 40.

P216

鉱物油重層による試料の水分蒸発抑制とキャピラリー アフィノフォレシス試料の微量化

○内山 昇、荒田洋一郎、平林 淳、志村清仁、笠井献一
帝京大学薬学部

Suppression of water evaporation from samples with a mineral oil-overlay and its use in the reduction of a sample volume for capillary affinophoresis

Noboru Uchiyama, Yo-ichiro Arata, Jun Hirabayashi, Kiyohito Shimura, Ken-ichi Kasai
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Kanagawa 199-0195

In affinophoresis, the mobility of a protein depends on the concentration of an affinophore filled in a capillary. Analysis of the mobility changes caused by the affinophore leads to the determination of an affinity constant. With decreasing the volume of the affinophore solutions in a sample tray, the problems brought about by evaporation of water become increasingly serious. The condensation of affinophore solutions results in abnormal baseline, excessive current and aberrant separations. We found a mineral oil-overlay can effectively suppress the evaporation of water from samples without affecting the performance of electrophoresis with an automatic CE instrument. A sample less than 20 μL can be used without any cooling devices for more than several hours.

はじめに

キャピラリー中に注入する試料が非常に微量で済むことが、キャピラリー電気泳動における大きな利点のひとつである。しかし試料バイアル中の試料が微量になると、蒸発の影響が大きくなり、試料の濃縮が起こる。アフィノフォレシスで親和定数を決定する際には、アフィノフォアの濃度を変えた液でキャピラリーを満たしてタンパク質を泳動するが、蒸発でアフィノフォア液の濃度が高まると、ベースラインの異常、過大な電流、異常な分離などの問題が生じる。本研究では水の蒸発によるアフィノフォア液の濃縮を防ぐ方法として、試料にミネラルオイルを重層する方法の有効性を検討した。

実験操作

○試料の蒸発量の算出

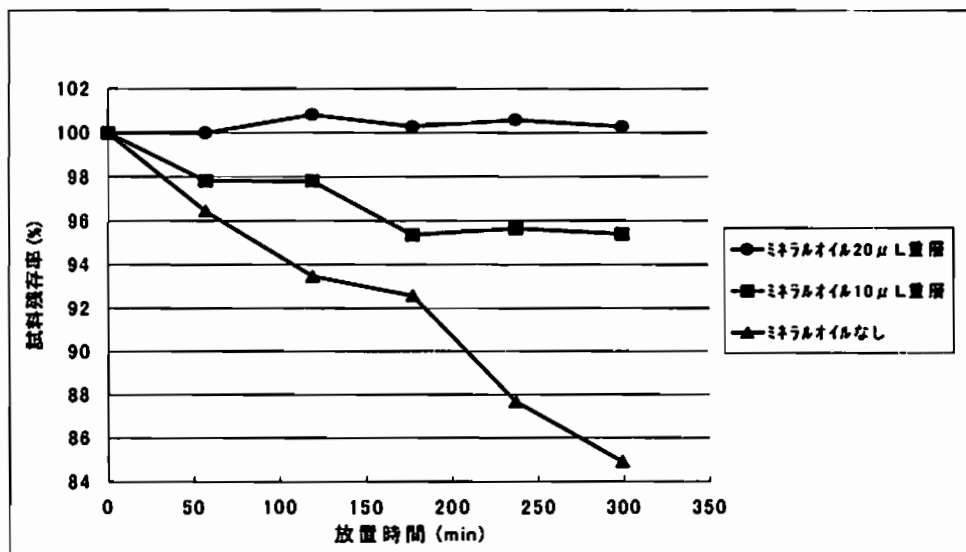
電気泳動用緩衝液 (0.02% NaN_3 を含む 0.1M Tris-AcOH (pH 7.9)) 20 μL を試料カップ (容量 200 μL) に入れ、試料上にミネラルオイル (white light oil, Sigma) を重層した。これを試料ホルダーに入れ、スリットの入ったゴムキャップをして、Beckman P/ACE 5010 の試料トレイにセットした。各時間ごとに重量を測定して試料の蒸発量を算出した。コントロールとしてミネラルオイルを重層しないものを作り、同一条件下で蒸発量を測定した。

○ミネラルオイルのキャピラリーアフィノフォレシスに対する影響の観察

電気泳動には Beckman P/ACE 5010 を用いた。キャピラリー (内径 0.05 mm、長さ 270 cm、スクシニルポリリジンコート) にアフィノフォア液を満たした後、マーカー (7

クリアミト[®]およびアセチルトリプトファン) とラクトース特異的レクチンであるヒトガレクチン 1 をキャピラリーの陽極端に注入し、300V/cm, 20°C で電気泳動を行った。各アフィノフォア液 20 μ L に、蒸発防止のためのミネラルオイル 20 μ L を重層した。泳動図と電流値の時間経過による変化を、同一条件下でミネラルオイルを重層しないコントロール実験と比較した。

Fig.1 試料放置時間と試料残存率の関係



結果と考察

今回の実験に用いた試料カップにおいては 20 μ L の試料の蒸発を完全に抑制できるミネラルオイルの量は 20 μ L であった (Fig. 1)。実際にキャピラリーアフィノフォレシスを行った結果、ミネラルオイルの重層は、試料の蒸発を原因とする泳動図と電流値グラフの異常を顕著に抑制した。またミネラルオイル 20 μ L を重層しても、キャピラリーのサンプリングに影響は見られなかった。

現時点ではカップの形状と機器の構造の都合上、試料量 10 μ L 以下ではサンプリングが不確実になる恐れがあるが、今後カップの形状を改善することで、より少量の試料でもミネラルオイルを重層することによって、蒸発の影響を受けずに長時間扱えるようになると思われる。

文献

Simura, K., and Kasai, K. (1996) *J. Biochem.* **120**, 1146-1152.

P217

キャピラリー電気泳動によるタンパク質の解析

○田淵眞理¹、馬場嘉信^{2, 3}

岡本電機（有）¹、徳島大・薬²、科技団 CREST³

Protein Analysis by Capillary Electrophoresis

Mari Tabuchi¹, Baba Yoshinobu^{2,3}

¹Okamoto Electric Co., Ltd.

²Department of Medical Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

³CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

High Throughput Screening System is necessary for the proteome analysis towards post genomic sequencing era. So in this study, we investigated the development of the separation carrier, which can separate proteins and peptides at high speed and high resolution by capillary electrophoresis. The migration time and the resolution of peptides depended on the concentration of phosphate buffer. The addition of the polymer such as methylcellulose hastened the migration time without decreasing of the resolution, though the dextran gave the tailing of the peak. The addition of the polysaccharide, which shows the physiological activator, also hastened the migration time. These polymer and polysaccharides will be proposed as the separation carrier. Moreover, this saccharide could be analyzed within 10 minutes without preconditioning such as derivatization, though the saccharide analyses always need the preconditioning.

はじめに

ヒト・ゲノム解析の終了とともに、今後、ポストゲノムシーケンシング時代には、遺伝子産物であるタンパク質や生体内の代謝生成物、糖鎖等を調べる、プロテオーム解析、メタボローム解析、グライコーム解析等が重要な課題となる。近年、タンパク質分析の高速化の研究が行われており、SDS- ポリアクリルアミドゲル- マイクロチップ電気泳動によって、タンパク質の高速分離が達成されている¹⁾。しかしながら、実際のプロテオーム解析では、2次元ゲル電気泳動が使われているのが現状である。1つの細胞で、最低1万種類発現していると言われるタンパク質をすべて解析するためには、HTS (High Throughput Screening) システムの開発は急務である。そこで、本研究では迅速かつ高分離なプロテオーム解析技術の開発を目的とし、タンパク質の高速、高分離能をもつ分離用担体の検討をキャピラリー電気泳動により行った。

実験

キャピラリー電気泳動装置として Hewlett Packard 製 HP^{3D}CE を用いた。検出はフォトダイオードアレイにより、200nmで行った。キャピラリーは内壁がコーティングされている J&W Scientific 製の DB-17 キャピラリー (内径 0.1mm、外径 0.36mm、全長 32.5cm、有効長 24cm) を用いた。サンプルとして BIORAD のペプチドスタンダードを用いた。緩衝液として 0.5-0.1M

リン酸バッファー(pH2.5)、ホウ酸バッファー(pH5.5)、トリス-ホウ酸バッファー(pH8.5)、を用いた。分離用担体として、メチルセルロース(分子量40万)、デキストラン(分子量10万~20万)、カードラン、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、アルギン酸ナトリウム、生体試料抽出物を用いた。測定条件は、電場300V/cm、サンプルインジェクションは8 kV/8 secで行った。測定温度は25℃とした。

結果と考察

ペプチド標準品を用いて、キャピラリー電気泳動により、泳動液の検討及び各種ポリマー、添加剤の分離用担体としての評価を行った。移動度および分離能はリン酸バッファー濃度に依存し、0.1M以下で移動度の向上が見られたが、分離能は低下した。メチルセルロースの添加により、0.1%濃度で移動度を保持したまま、分離能の回復が見られたが、0.5%濃度ではベースラインの乱れが生じた。デキストランの添加ではテーリングが見られた。粒子状ポリマーを分離用担体として用いた場合には、ピークがブロードとなった。その他 SDS やアルギン酸ナトリウムは逆に分離能を低下させた。生理活性物質の糖鎖の添加は、移動度の向上を示し分析時間が短縮された。一般に DNA 分析においては、セルロース誘導体などのポリマー溶液が形成するメッシュを利用した分離が行われており、DNA サイズとポリマー濃度の関係が示されている²⁾。しかし、本実験で有効性が認められたポリマー濃度は低濃度であるため、メッシュの形成は行われておらず、ポリマーは分子ふるいの効果ではなく、分離担体としての作用を呈しているものと考えられる。また、ポリマーや生理活性物質の添加により移動時間が加速されたことは、測定試料とのなんらかの相互作用が考えられる。

さらに今回我々は、上記糖鎖を、キャピラリー電気泳動を用いて、泳動液条件及び測定条件を最適化することにより、直接法で測定を可能とした。一般にタンパク質、糖鎖のキャピラリー電気泳動による分析は困難な点が多く、糖鎖の場合には2-アミノピリジン等による誘導体化反応を要する。今回の糖鎖の直接検出は、複雑な前処理操作が簡略化されることで、迅速な分析が可能となる。またタンパク質は糖鎖構造の異なる成分を含み、これによりタンパク質固有の機能をもつものが多い。従ってこれら生理活性物質は、今後のプロテオーム解析の研究過程で極めて重要であると考えられる。

謝辞

本研究は、通商産業省新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)地域コンソーシアム研究開発事業の助成を得て行われた。記して、謝意を表す。

参考文献

- 1) S.Yao, D.S.Anex, W.B.Caldwell, D.W.Arnold, K.B.,Smith, P.G.Schltz, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96 (1999) 5372.
- 2) 喜羽百合子・二宮美千代・馬場嘉信: Chromatography, 20(1999) 27.

P218

キャピラリー等電点電気泳動による神経疾患の患者脳脊髄液中 β トレース蛋白（リポカリン型プロスタグランディンD合成酵素）の Charge Microheterogeneity の検討

○平岡厚¹, 清水興介², 織田浩司², 江口直美³, 裏出良博³, 富永格⁴, 馬場宏治⁴
¹杏林大・保, ²マルハ（株）, ³大阪バイオサイエンス研究所, ⁴国立下総療養所

Analysis by Capillary Isoelectrofocusing of Charge Microheterogeneity of β -Trace Protein (Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase) in Cerebrospinal Fluid of Patients with Neurological Disorders

Atsushi Hiraoka¹, Kohsuke Seiki², Hiroshi Oda³, Naomi Eguchi³, Yoshihiro Urade³, Itaru Tominaga⁴, and Kohji Baba⁴

¹Kyorin University School of Health Sciences, Hachioji, Tokyo 192-8508, Japan, ²Maruha Corporations, ³Osaka Bioscience Institute, and ⁴Shimohusa National Sanatorium

Charge microheterogeneity of β -trace protein (β TP) (lipocalin-type prostaglandin D synthase) in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with various neurological disorders was analyzed by capillary isoelectrofocusing. Under the conditions employed, β TP in CSF was split into several isoforms with different isoelectric points and their patterns varied in association with some diseases, suggesting that pathophysiological roles of this protein change depending on pathological conditions in the central nervous system.

1. はじめに

β トレース蛋白（ β TP）（リポカリン型プロスタグランディンD合成酵素）は、ヒト脳脊髄液（CSF）蛋白質中で血しょうではなく中枢神経系（CNS）に由来する部分では平常最も濃度の高い成分であり、CNSにおける脂溶性低分子の移送担体及び酵素の両方の機能を持つ平均分子量27,000のシアル酸含有糖蛋白である。我々は、神経疾患の患者CSF中の β TPの量的質的変動について臨床生化学的研究を進めてきており、現在までに、CSF中の β TP濃度が、CNSの器質性疾患の回復過程及び病的脳萎縮と結びついて上昇すること及び β TPのそのような量的変化が、その molecular mass microheterogeneity を伴う場合があることを既に報告した。今回は、キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）を用いて、種々の神経疾患の患者より得られたCSF中の β TPの charge microheterogeneity を分析し、臨床生化学的検討を行った。

2. 材料及び方法

(1) 試料: 種々の神経疾患の患者70人余の腰椎より得られたCSF検体より, 遠心限外ろ過を用いて, 分子量1-5万の低分子蛋白の濃縮・脱塩済み画分を定量的に調整した。

(2) CIEF: eCAPTM Neutral Capillary を reversed polarity mode で装着したBeckman PACE/2000型を使用し, ベックマン(現ベックマン・コールター)社のプロトコールにしたがって行った。この方法は, focusing の終了後, 分離された各蛋白質が微弱な電気浸透流に押されて検出器(280 nm)を通過するようにさせる one step 方式のCIEFである。

(3) その他: electropherogram上における β TPのピークの同定を, 原検体をモノクロナル抗体カラムを通した場合における当該ピークの選択的消失により確定した。又, CSF中 β TP総濃度を酵素免疫測定法(ELISA)で定量し, その測定値とピーク面積比の変化より, β TPの各 isoform の消長を検討した。

3. 結果及び考察

CSF中の β TPは, electropherogram上に少なくとも4つの isoform のピークに分離し, それらは, 等電点(pI)が各々 4.6-4.8, 4.9-5.2, 5.3-5.6 及び 5.8-6.0 の範囲に少なくとも1本ずつ検出された。各ピーク頂点の等電点は検体ごとに微妙に異なり, 又, 同じ領域の中で複数のピークに分かれることもあったが, 面積比ではどの検体でも pI 4.6-4.8 のピークが最大であった。又, 一部の検体では, pI値が4.6以下(4.1-)及び6.0以上(-7.8)にも, 原検体の β TPのモノクロナル抗体のカラム通過後に消失するピークが出現したが, それがカラムへの吸着によるのか単に分析される蛋白質量の減少によるのかの判定が困難なため, β TPの同定を確定できなかった。ELISAによる測定で得られたCSF中 β TPの総濃度と上記各領域の β TP isoform(s)の量的変動を調べたところ, 脳血管障害及び脳・髄膜の炎症性疾患の回復期の患者では, 主として pI 4.6-4.8のmajorなisoformの増加にもとづいてCSF中の β TPレベルが上がっていたが, 病的脳萎縮のある神経変性疾患及び寛解期に向かいつつある多発性硬化症では, pI 5.3-5.6の領域等のアルカリ側の minor な isoform を中心にCSF中の β TPが増加していた。又, β TPの minor な isoform である可能性のあるその他の小ピークのうち, pI値が 4.2 ± 0.1 のものは, 脳萎縮性病変のある患者CSFのelectropherogram上にのみ検出された。

CNS器質疾患回復期や病的脳萎縮の存在等の病態において, CSF中の β TPは, 脂溶性低分子の老廃物や有毒物質と結合してCNSから末梢血へ運び出す機能を持っていると推察され, 一方, β TPの分子量及び電荷における microheterogeneity の変動は, そのような機能の変化と結びついていると考えられる。CIEFのelectropherogram上に検出された各 isoformのpI値(検体ごとに微妙に異なっている)の変動は, β TP分子中の2本のオリゴ糖側鎖中のシアル酸残基の数の差異によってのみならず, β TPに結合している脂溶性低分子の性質によっても影響を受けている可能性がある。

又, electropherogram上では, α_1 -acid glycoprotein, β_2 -microglobulin 及び γ -trace protein のピークが検出・同定され, 各々 β TPとは独立的に疾患と結びついた量的変動を示していることが示唆された。

P219

レクチン修飾キャピラリーからの糖タンパク質の温度溶出

○山中秀徳、曾田裕行、吉廻公博、長谷川幸雄

アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社

Temperature regulated elution of the glycoproteins from the lectin, hapten sugar and temperature-responsive polymer immobilized capillary

Hidenori Yamanaka, Hiroyuki Sota, Kimihiro Yoshizako, Yukio Hasegawa

Amarsham Pharmacia Biotech K.K., Tokyo 169-0073

Fused silica capillary inner wall modification with the lectin and hapten sugar introduced temperature-responsive polymer was successfully achieved. In this study we examined the feasibility of the temperature elution of the glycoprotein or sugar derivatives as lectin affinity capillary chromatography. The model system was constructed with lactose, RCA120 and poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) as hapten sugar, lectin and temperature-responsive polymer each. The lactose derivatives was bound to the RCA120 at 15°C. And the bound lactose derivatives was confirmed to be eluted from capillary at 35°C.

Keywords: lectin affinity capillary chromatography, glycoprotein, temperature-responsive polymer, LCST

はじめに

複合糖質の糖鎖は生体の高次情報機構を担う極めて重要な生体分子であるが、その構造は非常に多種多様かつ複雑であり優れた分離解析装置の開発が待望されている。

我々は、既にポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm)¹⁾ の下限臨界共溶温度 (LCST) 前後の分子鎖の広がりの違いによりポリマー主鎖に固定化されたレクチンとハプテン糖の相互作用が温度によって制御できるような系をセファロース担体上に作成し、レクチンアフィニティークロマトグラフィーからの糖タンパク質の温度溶出に成功している。今回、さらに微量の糖鎖を分析する事を目指して CE にこのシステムを適用し実際にキャピラリー内壁上のレクチンへのラクトース誘導体の脱着が溶離液組成の変化やハプテン糖を使用せずに温度のみによってコントロール可能である事を確認した。

実験

キャピラリー内壁への温度応答システムの構築および検証実験は以下に示した手法により行った。

1. 温度応答性システムの合成

DMF 中で、イソプロピルアミンでポリ (N-アクリロイロキシスクシイミド) (pNAS) のスクシイミド基を部分的に(90%程度)置換する事により水溶性にした。この水溶性ポリマーを PBS バッファーに溶解した後に β -ラクトシルアミンと反応させラクトース置換 PNIPAAm(PNIPAAm-lac)を作成した。この PNIPAAm-lac の PBS バッファー溶液をアミノプロピルシリカで処理してアミノ基を導入したキャピラリーに圧入して PNIPAAm-lac の残存しているスクシイミド基を利用して固定化を行った。最後に RCA120 の PBS バッファー溶液を圧入して、この固定化された PNIPAAm-lac に RCA120 を導入した。

2. システムの検証

上記のように作成した表面修飾キャピラリーにモデル化合物としてラクトース誘導体を任意の温度に設定安定化した後に圧入、洗浄した。さらにキャピラリー部の温度を変化させてから再びバッファーをキャピラリー内に圧入してキャピラリー内に脱離してきた物質を UV(214nm)にて検出した。

結果と考察

検証実験で 15℃でラクトース誘導体を導入した後にキャピラリー部の温度を 35℃まで上昇させた場合には、RCA120 に保持されたラクトース誘導体の 90%程度が溶出される事が確認された。これは、PNIPAAm の LCST 前後の分子鎖の広がりの違いによりポリマー主鎖に固定化されたレクチンとハプテン糖の相互作用が温度によって制御できる事を示唆する。LCST はラクトース及び RCA120 の導入量により操作可能であり、今回の実験では 35℃で溶出を行ったが、生体試料に対しては溶出温度が高すぎるので今後より低い温度で溶出可能なシステムに改良する予定である。このシステムを使用すれば、リガンドを固定化したキャピラリークロマト及び電気泳動においてハプテン糖を使用せずに目的物質を溶出するので検出装置として MS が使用でき、超微量糖鎖の分析等に应用可能と考えられる。

謝辞

本研究は、通産省の産業科学技術研究開発制度の一貫として、新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて実施したものである。

文献

1. Hideko Kanazawa, Yoshikazu Matsushima, and Teruo Okano, *Trends in Anal. Chem.*, 17 (1998) 435. (PNIPAAm による温度クロマトグラフィー)

P220

キャピラリー電気泳動法による糖鎖-タンパク質結合解析法の レーザー励起蛍光検出による微量化

(近畿大・薬) ○多賀 淳、米屋智博、氏丸真理子、本田 進

Sample Reduction in Electrophoretic Carbohydrate-Protein Interaction Studies by Laser-Induced Fluorescence Detection

Atsushi Taga, Tomohiro Komeya, Mariko Ujimaru and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Abstract We have shown that capillary electrophoresis is a powerful tool for studying carbohydrate-protein interaction and have developed two systems for this methodology, i. e., the normal and reverse systems. In the present paper we describe further extension of this methodology to allow for ultramicro analysis using fluorescence tags. Association constants could be determined by using a 2.5 nM NBD-labeled protein sample in the normal system, and a 25 nM 6AF-labeled carbohydrate samples in the reverse system.

1. はじめに

演者らのグループではキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE) による糖鎖-タンパク質間相互作用の解析法について一連の研究を行い、その方法としてリガンド含有泳動液中でタンパク質を分析する系 (normal system)¹⁾ およびタンパク質含有泳動液中でイオン性リガンドを分析する系 (reverse system)²⁾ の 2 つの系を確立することができた。これらの方法においては紫外部検出を行う場合、normal system では 100 µg/ml~1 mg/ml (数 µM~数十 µM)、reverse system では 100 µM 程度の試料濃度が適切であり、1 回の分析に必要な試料量としては、それぞれ数十 fmol および数 pmol レベルと極微量である。今回はレーザー励起蛍光 (laser induced fluorescence, LIF) 検出を用いることによりさらに微量化する方法について検討を行った。

2. 実験

CE 装置 : BIO-RAD BioFocus CE system を用いた。レーザー光源にはアルゴンレーザーを用いた (*Ex* 488 nm, *Em* 520 nm)。

2. 1. **Normal system** : キャピラリーには Polybrene-polyacrylic acid 2 層コーティングしたフューズドシリカ管 (50 µm i. d., 45 cm) を使用した。泳動液にはラクトースの 2-mercaptoethanesulfonate (MerES)¹⁾ 誘導体を添加した 25 mM リン酸緩衝液 (pH

7.5) を用い、印加電圧 20 kV、キャピラリー温度 25°Cで電気泳動を行った。試料にはガラクトース認識レクチンであるピーナッツレクチン (peanut agglutinin, PNA) を用い、7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-fluoride (NBD-F)³⁾ により蛍光標識した。

2. 2. Reverse system : キャピラリーには polyacrylamide コーティングしたフューズドシリカ管 (50 μm i. d., 39.5 cm) を使用した。ガラクトース認識レクチンである大豆レクチン (soybean agglutinin, SBA) を添加した 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を泳動液をして用い、印加電圧 15 kV、キャピラリー温度 25°Cで電気泳動を行った。試料にはメリビオース (melibiose, Mel) およびラクトース (lactose, Lac) の 6-aminofluorescein (6AF)^{4,5)} 誘導体を用いた。

3. 結果と考察

3. 1. Normal system : タンパク質を誘導体化するこの系においては置換基の導入により結合能が変化することが懸念されたため、ガラクトースを添加することにより結合サイトを保護した場合とサイト保護を行わずに誘導体化を行った場合の NBD-PNA の MerES-Lac に対する結合能を比較したところ、ほぼ同等の結果が得られた。NBD-アルギニンを移動度のマーカーとして使用し、250 nM、25 nM および 2.5 nM の NBD-PNA を試料として対 MerES-Lac 結合定数を測定したところ、いずれもほぼ同等の値が得られた。

3. 2. Reverse system : 演者らのグループにおいてメチルアミノ化を介して NBD-F 化を行うことにより超高感度で LIF 検出できる誘導体化法を既に開発したが⁶⁾、糖-NBD 誘導体の電荷が弱くタンパク質との電気泳動速度の差が小さいため、本研究においては還元アミノ化により 6AF 化した Mel および Lac を試料として用いた。その結果、25 nM 濃度の 6AF-Mel および 6AF-Lac を試料として SBA 含有泳動液中で電気泳動を行うことにより、それぞれの対 SBA 結合定数を一斉測定することができた。

4. 結論

LIF-CE を用いることにより UV 検出を用いる従来法に比べて normal system および reverse system の両系において約 4 桁の微量化が可能であった。

- 1) A. Taga *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **839**, 157-166 (1999).
- 2) A. Taga *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **837**, 221-229 (1999).
- 3) H. Kanazawa *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **763**, 23-29 (1997).
- 4) C. G. Glabe *et al.*, *Anal. Biochem.*, **130**, 287-294 (1983).
- 5) G. Okafo *et al.*, *Anal. Chem.*, **69**, 4985-4993 (1997).
- 6) S. Honda *et al.*, *Anal. Biochem.*, in press.

P221

キャピラリー電気泳動による乳汁オリゴ糖の分析
○鈴木茂生、奥田佐枝子、黒寄美和、松浦直子、多賀淳、本田進
近畿大・薬

Analysis of Milk Oligosaccharides by Capillary Electrophoresis

Shigeo Suzuki, Saeko Okuda, Miwa Kurosaki, Naoko Matsuura, Atsushi Taga, Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae, Higash-iosaka 577-8502

A convenient method was developed for the analysis of free oligosaccharides in bovine milk. The oligosaccharides were freed from proteins and greater part of lactose was removed by treating 500 μ L of milk with ethanol, followed by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 column. The oligosaccharides thus obtained were labeled with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone and the derivatives analyzed by capillary electrophoresis. Excellent separation was obtained by using 150 mM borate, pH 9.7.

はじめに

哺乳動物の乳汁中には様々なオリゴ糖が存在し、それらは *Bifidus* factor として腸内フローラの改善に寄与していることが知られている。既にヒトの乳汁については数十種類に及ぶオリゴ糖の構造が決定されており、免疫賦活効果などとの関係が調査されている。しかし、ヒトの食生活に関係の深いウシの乳汁についてはあまり研究が進んでおらず、オリゴ糖を一斉分離した報告も見あたらない。そこで我々は、今回市販の牛乳ならびにウシ初乳中に存在するオリゴ糖を分析するための簡便な方法を検討した。

実験

試料：牛乳は市販品をそのまま用い、ウシ初乳は日本 NZMP 社（東京都港区愛宕）から供与されたものを用いた。乳汁からのオリゴ糖の調製：木幡らの方法¹⁾準じ、牛乳 500 μ L を 70°C で 30 分間加熱し、冷後、5000 rpm で 10 分間、遠心分離を行って得られた上清液 250 μ L にエタノール 500 μ L を加え、4°C で一夜放置した。次いで 5000 rpm で 20 min 遠心分離を行い、上清を濃縮乾固し、再度水 500 μ L に溶解したのち、Millipore Ultrafree (cut-off: 5 000)でろ過し、SephadexG25 カラムクロマトグラフィーによって無機塩とラクトースを除去した。1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP)によるオリゴ糖の標識²⁾：試料に 0.3 M 水酸化ナトリウムおよび 0.5 M PMP メタノール溶液を各 5 μ L 加え、70°C で 30 分間加熱し、反応後 0.3 M 塩酸 5 μ L を加えて中和し、乾固した。次いで、水 20 μ L に溶解し、過剰の試薬を 20 μ L のクロロホルムで 3 回抽出した。水層を乾固し、水 100 μ L に溶解したものを分析用試料とした。キャピラリー電気泳動：装置には Hewlett-Packard^{3D}CE 装置を使用した。キャピラリーには内径 50 μ m、有効長 60 cm のフューズドシリカ管を用い、泳動液には 150 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.7) を使用し、20 kV を印加して分析した。検出は 245 nm における吸収を測定することにより行った。

結果と考察

オリゴ糖の分画：牛乳には無機塩や脂質が含まれる上、遊離オリゴ糖の90%以上をラクトースが占めることが知られている。そこで、様々な前処理法を比較検討した結果、脂質を遠心分離で除去し、アルコールでタンパク質を変性沈殿させ、過剰のラクトースはSephadex G-25カラムを用いて除去する方法が最適であった。内部標準にイソマルトペンタオースやタンニン酸を用いて再現性を検討したところ、RSDはおよそ5%であった。供与された初乳粉末も水に5%濃度になるように溶解し、同様の操作により脂質、タンパク質およびラクトースを除去した。

分離条件の検討：オリゴ糖を分析する条件としてミセル動電クロマトグラフィーモードやホウ酸錯体モードなどを検討したところ、pH 9.7の150 mM ホウ酸緩衝液を用いた際に最も良好な分離が得られた。市販牛乳について得られた結果をFig. 1に示す。標準品との比較、ならびにエキソグリコシダーゼ消化の結果より、ピークのほとんどがオリゴ糖由来であり、牛乳中にもヒトと同様に数多くの遊離オリゴ糖が存在することが示された。初乳についても同様に分析を行ったところ、Fig. 1にほぼ類似した泳動パターンが得られた。牛乳および初乳についての個々のピークの比較等については調査を続行中である。

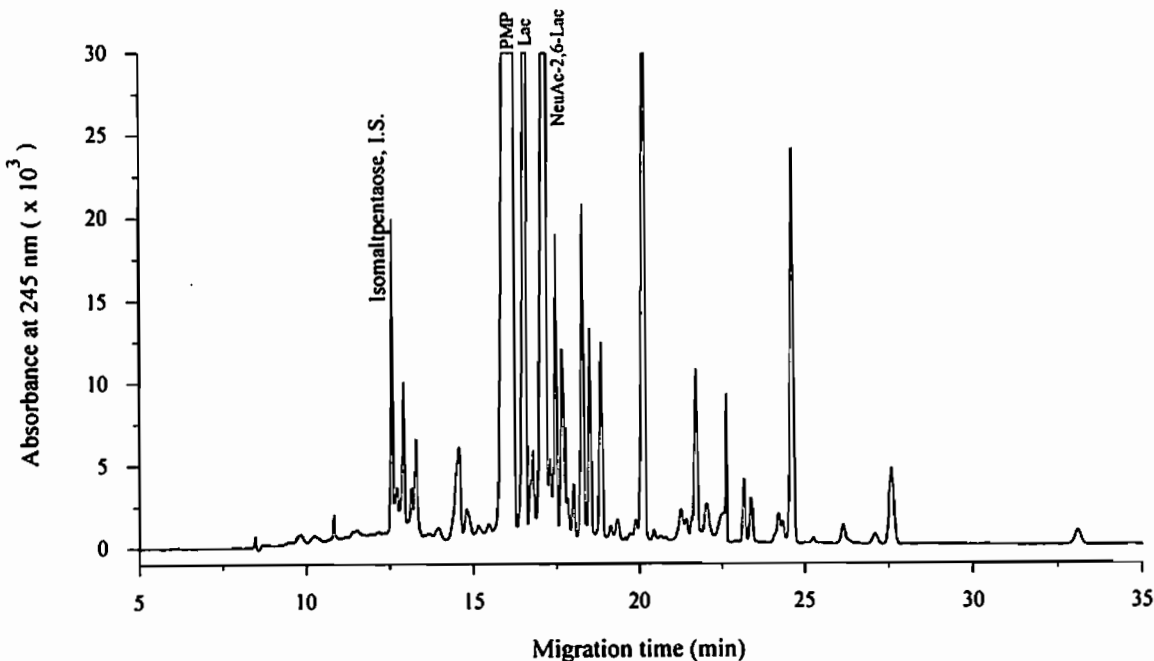


Fig. 1. Separation of oligosaccharides in bovine milk as their PMP derivatives. Capillary, fused silica (50 μ m i.d., 60 cm); running buffer, 150 mM borate, pH 9.7; applied voltage, 20 kV; detection, UV absorbance at 245 nm.

文献

1. A. Kobata, K. Yamashita and Y. Tachibana, *Methods Enzymol.* **50** (1978) 216.
2. S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, **180** (1989) 351.

P222

キャピラリー電気泳動によるグリコーゲンの 構造研究

(近畿大薬) ○西川篤、多賀淳、鈴木茂生、本田進

Study of Glycogen Structure by Capillary Electrophoresis

○Atsushi Nishikawa, Atsushi Taga, Shigeo Suzuki,
and Susumu Honda

Faculty of Pharmaceutical Sciences., Kinki University

3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka

[はじめに] キャピラリー電気泳動 (CE) は分離能がよいため糖質のように構造類似体の多い物質群の分析には最も適していると考えられる。しかし、一般に糖質にはイオン性がなく、また発色団や発蛍光団がないため直接分析は困難であり、誘導体化が必要となる。種々の誘導体化法が報告されてきたが、これらには定量性、シアル酸基の部分脱離、検出法の汎用性等の問題があるため、当グループでは別途 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone を用いる方法 (PMP 法)を開発し、これをルーティン分析法として糖質分析に広く応用するための研究を続けている。

多糖の構造研究もその一環であり、本演題においては、種々の酵素で水解脱離される単糖、オリゴ糖を PMP 誘導体として CE 分析することにより有力な構造情報を得、これを基にしてグリコーゲンの構造に関する考察を行った。

[実験方法] CE: Waters Quanta 2,000 型装置を用いて行った。キャピラリーには Polymicro Technologies 社製のフューズドシリカ管 (内径 50 μ m, 長さ 58 cm) を用いた。検出は 254 nm における紫外吸収により行った。酵素: α -amylase (*Bacillus subtilis*), isoamylase (*Klesbiella pneumoniae*), および pullulanase (*Pseudomonas amyloclavata*) はそれぞれ和光純薬、Sigma および ICN より入手した。グリコーゲンは rabbit liver (RL), oyster (OY) および mussel (MU) から分離したものをいずれも Sigma 社より入手してそのまま使用した。誘導体化: 既報(Honda, et al., *Anal. Biochem.*, **180**, 351, 1989.)に従い、PMP により誘導体化した。

[結果・考察] グリコーゲンが α 1-6 分岐をもつ α 1-4 ポリグルカンであることは古くから知られているが、類似のポリグルカンであるでんぷんの微細構造が起源や生合成・代謝酵素系の分布状態等により多様であるように、グリコーゲンにおいても分岐の様子や立体構造が起源や関連酵素によって互いに異なることも予想される。そこでこのような微細構造の違いを調べるために、基質特異性の異なる種々の水解酵素を用いてグリコーゲンを消化し、生成した単糖やオリゴ糖を PMP 誘導体として CE 分析する方法を考え、分析条件の最適化を行った。

分析条件の設定 これらの酵素により生成する単糖はいずれもグルコースであるが、オリゴ糖は重合度、結合位置、結合様式等により多岐にわたる。検討の結果これらのオリゴ糖の相互分離にはホウ酸錯体としてのゾーン電気泳動が最も有力なモードであることが示され、一般にアルカリ性のホウ酸緩衝液にドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加したものを泳動液にすると、よい分離が得られた。このような条件では電気浸透流は陽極から陰極へ速い速度で流れ、重合度の高いオリゴ糖ほど電荷/サイズ比が小さいためより陰極へ引き戻される度合いが小さくそれらの結果早く現れた。

種々の酵素による水解物の分析 糖鎖の切断には種々の水解酵素が知られており、それらは独自の基質特異性をもっている。例えば α -amylase (EC 3.2.1.1)は α 1-4 結合を選

択的に切断して種々の重合度をもつオリゴ糖混合物を生成し、isoamylase (EC 3.2.1.9)は α 1-6結合を切断してアミロース様オリゴ糖/多糖混合物を生成すると言われている。また、pullulanase (EC 3.2.1.42)はisoamylaseと同様 α 1-6結合を水解するが、文献上ではグリコーゲンには不活性であるとされている。

それぞれの最適条件を探索し、得られた条件でグリコーゲン標品 (MU) を α -amylase, isoamylase, および pullulanase で消化し、生成した単糖およびオリゴ糖を PMP 誘導体として分析したところ (Fig. 1)、それぞれの酵素が互いに異なる結果を与えた。

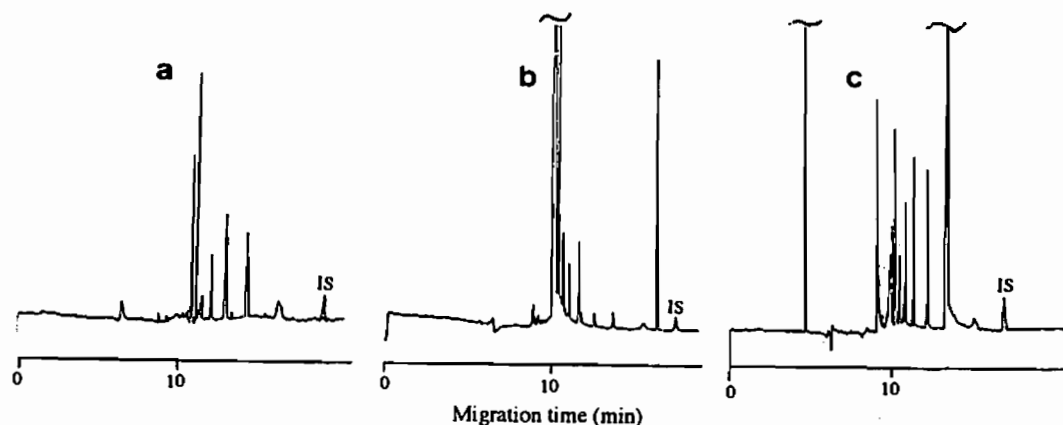


Fig.1. Comparison of the oligosaccharide patterns among hydrolases. Capillary, fused silica (50 μ m i.d., 58 cm); running buffer, 200 mM borate buffer (pH 8.2) contg. SDS (200 mM); applied voltage, 15 kV; detection, UV absorption at 245 nm; sample, glycogen (MU). a: α -amylase, b: isoamylase, c: pullulanase.

すなわちこのグリコーゲン標品に対して α -amylase 消化物は比較的単純なパターンを示し、高重合度オリゴ糖は種類も量も少なかった (a) が、isoamylase による生成物是对照的に高重合度オリゴ糖を多量に生成した (b)。また、pullulanase による生成物には低重合度のオリゴ糖が多量に含まれ、逆に高重合度のオリゴ糖は種類も量も少なかった (c)。

種々のグリコーゲンからの生成物の比較 Fig.2 は種々の起源から得られたグリコーゲン標品を同一条件で isoamylase で消化し生成物を分析した結果を示している。各標品は異なったパターンを示し、一次構造の違いを示唆している。

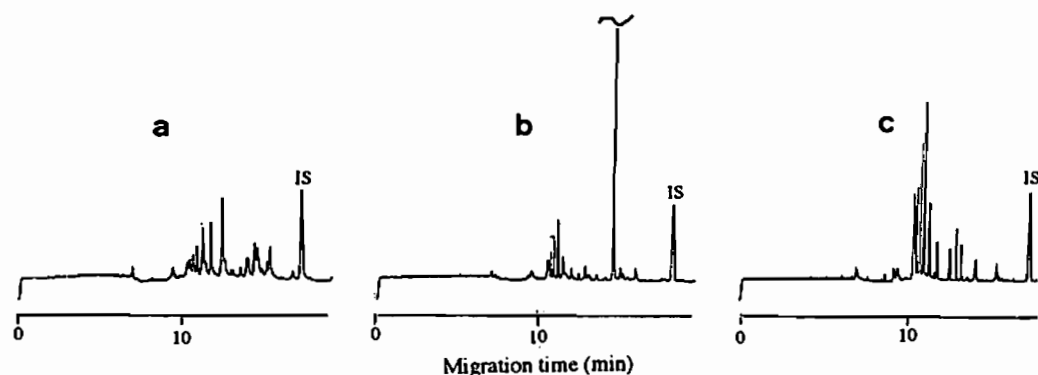


Fig. 2. Comparison of the oligosaccharide patterns among glycogen samples. Running buffer, 200 mM borate buffer (pH. 9.6) containing SDS (50 mM). The other conditions as in Fig. 1. a: RL, b: OY, c: MU, IS: internal standard (cinnamic acid)

このようにグリコーゲンの構造は従来の知見のように画一的なものではなく、起源により微細構造の違いがあることが示された。そしてそれらの構造解析には上述の水解酵素等により生成する糖類の分析が有力であり、PMP 誘導体としての CE 分析が有効であることが明らかになった。結合位置を含めたさらに詳細な解析が進行中である。

P223

蛍光キャピラリー電気泳動による微生物の分離検出

新谷智吉¹, 山田一隆^{2,3}, 鳥村政基²

愛媛県工業技術センター¹、生命工学工業技術研究所²、環境エンジニアリング³

Separation and Detection of microorganisms by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection

Tomoyoshi Shintani¹, Kazutaka Yamada^{2,3}, and Masaki Torimura²

¹Industrial Research Center of Ehime Prefecture

²Applied Microbiology Division, National Institute of Bioscience and Human-Technology, AIST.

³Research and Development Laboratory, Kankyo Engineering Co., LTD.

A rapid, specific, and inexpensive method of detecting *Salmonellae* infection in poultry is necessary to reduce human outbreaks. In recent years some more rapid methods of detecting *Salmonellae* have been developed. However, these methods are not directly detectable in low quantities *Salmonellae*. On the other hand, capillary zone electrophoresis (CE) has gained increasing potential not only in the separation of charged molecules but also in the separation of particles and biological cells. We have developed a CE with laser-induced fluorescence immuno-detection (CE-LIF-ID) system using a polyclonal antibody for the detection of *Salmonellae*. 10 cell level per injection (10^6 cells/mL) of *Salmonella* Enteritidis for pure cultures was successfully detected with the CE-LIF-ID. The CE-LIF-ID is conveniently used as a highly sensitive bacterial counter in clinical, environmental, and industrial microbiology.

はじめに

1999年度は食中毒患者総数の3分の1(11,000人)がサルモネラ食中毒によるものでその件数は年々増加傾向にあり、サルモネラ食中毒の迅速かつ特異的処置および感染源の阻止にはサルモネラ存在を判断できる簡便な手法の開発が望まれる。従来の培養法に基づくサルモネラ検出法は熟練された技術と4~6日間の期間を必要とされる。一方で微生物の迅速検出を目的とし、マイクロプレートを用いたELISA法やDNAプローブ法、フローサイトメトリーなど方法が開発されているが、検出時間・感度・コスト面で十分に対応できているとは言い難い。最近キャピラリー電気泳動による微生物の分離が行われるようになったが、紫外光散乱に基づく検出では十分感度が得られず微量の微生物検出が難しい¹⁻³。本研究では、食品・医療分野等種々の検体中の微量サルモネラ属菌を迅速かつ特異的に検出する手法の開発を目的とし、微生物を標識する蛍光抗体法を導入したキャピラリー電気泳動蛍光検出法について検討したので報告する。

実験

蛍光キャピラリー電気泳動はP/ACE system MDQ (Beckman Coulter)を用いて行った。キャピラリーはBeckman社製フーズドシリカ管；内径75 μ m、総長：31.2 cm、有効長：21 cmを使い、微生物の検出は488 nmアルゴンイオンレーザー光により励起させ、検出器：MDQレーザー誘導蛍光ディテクタ(530 nm)により蛍光測定した。蛍光試薬はLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability KitsのSYTO9溶液(Molecular Probes)及びFITC標識Anti-Salmonella抗体(Kirkegaard & Perry Lab. Inc.)を用いた。

菌株は *Brucella* sp. strain KYM-1, *Stenotrophomonas* sp. strain KYM2, *Acinetobacter* sp. strain

KYM3, *Comamonas* sp. strain KYM4, *Aureobacterium* sp. strain KYM6, *Cellulomonas* sp. strain KYM7, *Agrobacterium* sp. strain KYM8, *Escherichia coli* 3 種, *Salmonella* Enteritidis と *S. Typhimurium* の細菌 12 株を用いた。

結果と考察

蛍光キャピラリー電気泳動を用いて *Salmonella* 属である *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* の 2 株について分離検出を試みた結果、BacLight SYTO9 で生細胞を選択的に蛍光標識した場合 2 株はそれぞれシャープなピークとして分離検出できることが確認できた (図1)。一方、FITC 標識 Anti-*Salmonella* 抗体により *Salmonella* 属の細胞表層を特異的に蛍光標識した場合、*S. Enteritidis* は図1と同じ泳動移動度をもつピークとして観察された (図2)。このピークを分画し蛍光顕微鏡により観察したところ蛍光を発する菌体の存在が確認された。この場合、フリーの FITC 抗体は *S. Enteritidis* と泳動過程で BF 分離され、さらに本抗体の *Salmonella* 属特異性により 10 種の非 *Salmonella* 属細菌共存下でもその検出になんら妨害は見られなかった (図2)。FITC 標識 Anti-*Salmonella* 抗体を特異的に *S. Enteritidis* と結合させることにより、蛍光キャピラリー電気泳動による *S. Enteritidis* の微量検出 (10 細胞レベル、濃度で 10^6 cells/mL) が可能となった。

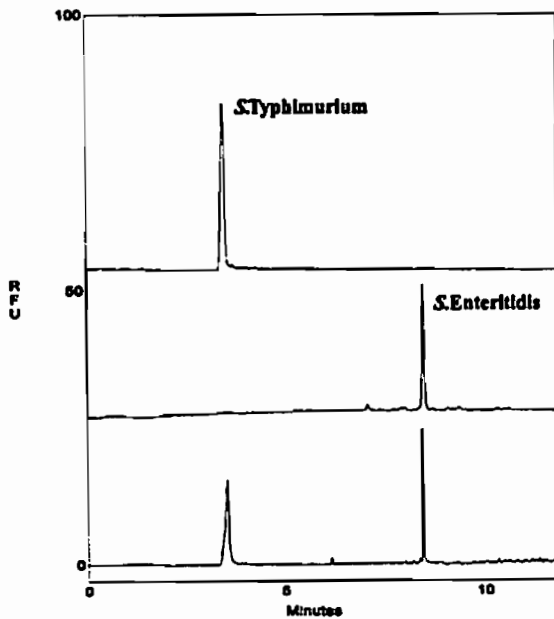


図1 BacLight(SYTO9)を用いた *S. Enteritidis* 及び *S. Typhimurium* のキャピラリー電気泳動による検出

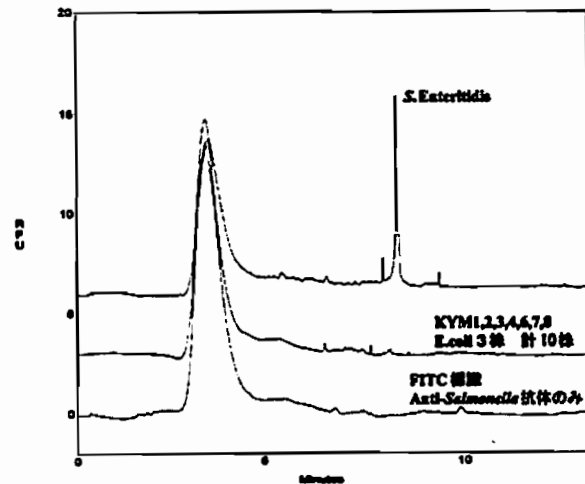


図2 FITC 標識 Anti-*Salmonella* 抗体を用いた *S. Enteritidis* の蛍光キャピラリー電気泳動による検出

本研究で検討した蛍光抗体を利用したキャピラリー電気泳動法は、種々の検体中のサルモネラ菌を特殊な技術を必要とせず培養操作なしに短時間に検出できるため、サルモネラ食中毒の防止及び対策において有用な情報を提供できると考えられる。

文献

1. J.M. Schneiderheinze, D.W. Armstrong, G. Schulte and D.J. Westenberg, FEMS. Microbio. Lett., 189(2000)39.
2. D.W. Armstrong, G. Schulte, J.M. Schneiderheinze and D.J. Westenberg, Anal. Chem., 71(1999)5465.
3. R.C. Ebersole and R.M. McCormick, Biotech., 11(1993)1278.

P224

赤血球に適用可能な分離分析手法への磁性体の利用

○加藤勇治、北川慎也、奥田高士、津田孝雄

名古屋工業大・工

Use of a magnetic material for an aid of analysis and separation technique applicable to red blood cell

Yuji KATO¹, Shinya KITAGAWA¹, Takashi OKUDA², Takao TSUDA¹

¹*Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa, Nagoya 466-8555*

²*Department of Materials Science and Engineering, Division of Inorganic Materials, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa, Nagoya 466-8555*

Magnetic field is not common in separation process in general. However, it is relative easy to handle, and has a unique character to be able to pass through glass wall. We tried to use magnetic field as an additional tool in separation and/or for manipulation of red blood cells.

A very small magnetic particles, of which size were several tens square micrometers, were set in capillary tube and manipulated from outside by magnetic field generated by an electromagnet. When red blood cells was set inside the capillary, it came to possible to push or expel a red blood cell by operating the small magnetic particles.

As red blood cell contains a lot of hemoglobin in its inside, they are sensitive to magnetic field in some extent. Therefore it is possible to force to move them by magnetic field which was applied from outside of capillary column.

This presentation is rather initial stage of experiment, it is certain that magnetic field would be valuable and possible to use as additional tool for separation.

はじめに

磁場と電場は互いに異なる空間を作るが、これらはまた密接な関係を持っていることはよく知られている。

しかし、電場は現在ではより多くの場所で用いられているが、その対象物質への電場の直接的な作用は多くの場合、その組成に大きく影響を与えてしまう。

通常日常で使用される程度の磁場は、電場に比べてその直接的なあるいは化学的な物質への変化をもたらすような作用はあまり見られず、非接触でその対象物質に力を及ぼすことができる。

磁性体は、磁場によって力を受け、非接触で空間的な移動ができる物質である。今

回はヒト赤血球に適用できるサイズの微小な磁性粒子に磁場を照射して動かし、赤血球に対して物理的な力を加えることによる分離分析への適用を試みた。

また、シングルセルレベルでの赤血球への磁場の影響を観察し、その挙動についての研究を行った。

実験

磁性体 $\text{PbFe}_{12}\text{O}_{19}$ を細かく砕いて、数十 μm^2 程度のものを肉眼でよりわけ、これを 1000 倍の顕微鏡で観察するため、プレパラート上に設置した。また、対象となる赤血球は研究者個人の血を用いて、生理食塩水にて薄め、冷蔵保存したものを使用した。

先に用意したプレパラートに赤血球を乗せ、顕微鏡の下にて観察を行うと同時に、電磁石を用いて、微小磁性粒子の移動を行い、赤血球への接触を観察した。

また、今回用いた赤血球に様々な強さの磁場を直接照射して、赤血球の動向を観察した。

結果

赤血球密度や電磁力の強さによって、磁性粒子が赤血球へ向かって移動するときの移動速度が変化することが認められた。磁性粒子の局所空間におけるマニピュレーションは、赤血球を破壊せずに溶液ごと赤血球を押し出すことが可能となり、また磁性粒子に赤血球を絡めて、瞬間的に移動させることなどが可能となった。

赤血球へ 60.0mT 程度の直流磁場を照射したところ、生理食塩水中で赤血球が N 極方向へ移動するのが観察された。

考察

本研究を発展させれば、赤血球密度や電磁力の調節によって、赤血球を瞬間的に破壊したり、特定の赤血球のみに磁性体を接触させ、取り出したりするなどの応用が今後可能になるであろうと思われる。

また、赤血球への磁場の物理的な影響を明らかにすることによって、磁場下におけるヒトの血管、血流への作用などが明らかにできるであろう。

文献

1. Harry E.Burke 著, 河本 修監訳, “磁気現象ハンドブック”, 共立出版株式会社 (1995).

P225

紫外吸光検出器と顕微鏡によるシングルセルレベルにおける
ヒト赤血球の同時観測

○山内規寛¹、北川慎也¹、津田孝雄¹

¹名古屋工業大学大学院工学研究科

²名古屋工業大学ベンチャービジネスラボラトリー

Concurrent Observation of Red Blood Cells at Single Cell Level with UV Detection and Microscope

Norihiro Yamauchi ¹, Shinya Kitagawa ¹, Takao Tsuda ¹,

¹*Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology*

²*Venture Business Laboratory, Nagoya Institute of Technology*

By using capillary electrophoresis, human red blood cells were separated at the single cell level. In the study of cell biology, it is important to make sure the cell properties in each level. To achieve this, we tried to use concurrently two methods of detection: direct microscopic observation and UV detection. Red blood cells migrated toward the positive electrode under an electric field because of negative surface charges. The injection of diluted blood sample gave an electropherogram in which all of peaks were almost equal height. The peak position in the electropherogram from UV detection corresponds to the one from direct microscopic observation. Our finding is the first report to present the fine separation of red blood cells at the single cell level.

はじめに

これまでの細胞の分析の際には、数千から数十万個の細胞が取り扱われてきた。これらより得られた値は平均値であり、これをもって個々の細胞の性格を示すものではない。細胞にはそれぞれ1個1個生命体として個性があるだろう。ヒト赤血球についていえば赤血球は2～15週間の寿命を持つので、ヒト赤血球群はこれらの集合体といえる。本研究は個々の細胞から情報を得ることを目的としている。これを目標に、赤血球をシングルセルレベルで分離することを試みた。

赤血球の表面には糖鎖が存在し、その糖鎖の非還元末端にはシアル酸が存在する¹。今回の実験ではシアル酸のマイナス電荷による赤血球の電気泳動を利用し、シングルセルレベルでヒト赤血球を分離するためのシステムを考案した。実験装置には顕微鏡とUV検出器を改良して用い、キャピラリー中での赤血球の分離状態を目視と紫外検出器により同時観測した。

実験

検出は高速液体クロマトグラフ用紫外吸光光度計検出器UVD-2(島津製作所)を自作の部品と組み合わせて改良したものを用いる。泳動管にはアルブミンコーティングを施した内径50 μ mのキャピラリーを用い、生理食塩水で50倍に希釈した赤血球をインジェクトする。赤血球が検出部に入る直前の様子を顕微鏡で確認、録画し、UV検出の結果と比較する。

Condition

fused-silica capillary modified with
bovine serum albumin
length: 9cm
effective length: 2.5cm
I.D.: 50 μ m
O.D.: 375 μ m
sample: whole blood diluted to 20
times by saline
medium: saline containing 10%
glucose
siphoning injection: 5mm*10s
applied voltage: 1kV
current: 20 μ A

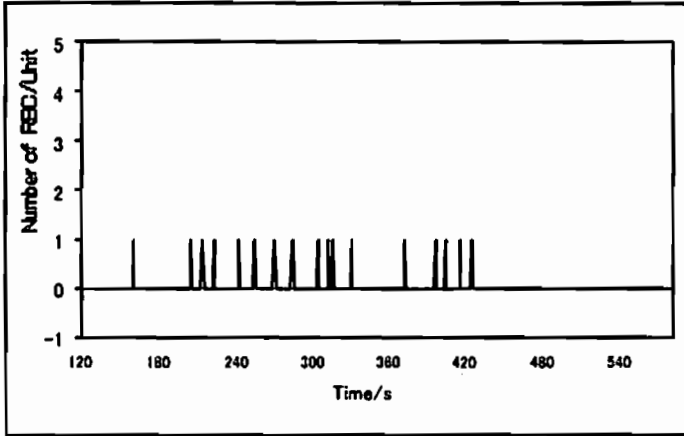


Figure 1 Electropherogram of RBC by monitor

Condition(Same as Figure1 except for Effective length)

fused-silica capillary modified with
bovine serum albumin
length: 9cm
effective length: 5cm
I.D.: 50 μ m
O.D.: 375 μ m
sample: whole blood diluted to 20
times by saline
medium: saline containing 10%
glucose
siphoning injection: 5mm*10s
applied voltage: 1kV
current: 20 μ A

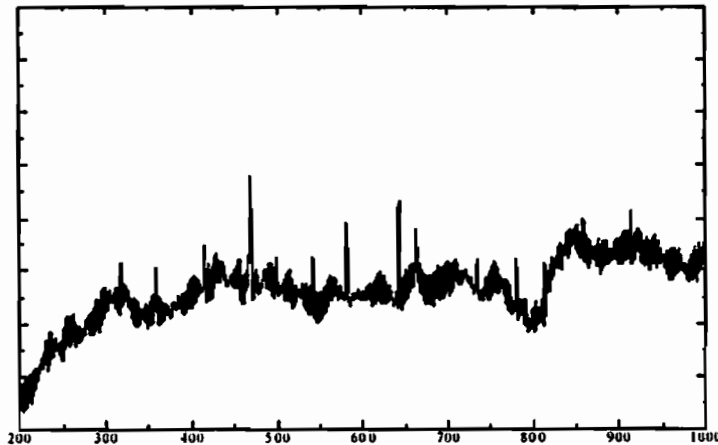


Figure 2 Electropherogram of RBC by UV detector

結果

顕微鏡とCCDカメラにより、記録した映像から、画像上に設定したラインを通過した赤血球の個数を1秒ごとに測定し、プロットした(Figure1)。また、UV検出による結果をFigure 2に示す。これらのグラフは同じサンプルによるものであるが、Figure2のカラムの有効長はFigure1における条件の2倍にあたるため、Figure2ではFigure1のデータの約2倍付近の時間にピークが認められる。このように、目視とUV検出という複数の方法を同時に用いることにより、より確実な方法で、赤血球をシングルセルレベルでキャピラリー電気泳動により個々の速さに基づいて分離できることが確認できた。

文献

1. T.Tsuda, N.Yamauchi, and S.Kitagawa, *Analytical Sciences*, 2000, 16, 847.

P226

チーズの加熱による遊離アミノ酸の変化

津田淑江、○竹内枝穂、山田正子、中澤勇二
共立女子短期大学

Changes of Free Amino Acid in Cheese during Heat Processing

Toshie Tsuda, Shiho Takeuchi, Masako Yamada, Yuji Nakazawa

Kyoritsu women's Junior College

We eat not only Natural cheese but also heat processed cheese. The flavor is created unique from natural cheese during heat processing. This study compared the quantitative determination of amino acids in natural and heat processed cheese. The CZE and HPLC were applied for this determination. The cheese examined was Mozzarella cheese.

CZE analysis of amino acids was performed with CZE Quanta 4000 (Waters) with the following conditions : run buffer; 50mM borate(pH 5.0) plus 75M SDS plus 1M Urea, 37.5 cm × 75 μm I.D. fused-silica capillary, detection; UV absorbance detector at 254 nm, applied voltage; 6.5 kv.

These results indicated that heat processing at 150~200°C was related to the improvement of the cheese flavor.

1.目的

近年日本においても、チーズは料理の材料として幅広く用いられるようになってきた。生食だけでなく、加熱調理食品にも多く用いられている。特にナチュラルチーズは、加熱により口触りや風味が変わり、この特性を利用した食品も多くある。食品の旨味および風味は遊離アミノ酸、低ペプチドが多様に関与しているという報告もある。加熱により生じるこれらの変化もアミノ酸由来によるものと考えられる。チーズの熟成過程中的の変化について多くの報告がなされているが、加熱による口触りや遊離アミノ酸の変化についての報告はない。本研究では、チーズを加熱しアミノ酸量とテクスチャーの変化について検討を行った。

2.実験

試料はモッツァレラチーズを用いた。試料の加熱温度は 150°C~250°Cとし、テクスチャーの測定には不動工業のレオメーターNRM-2010J-CWを用いて破断試験を行った。また、アミノ酸の分析は、キャピラリーゾーン電気泳動 (Capillary zone electrophoresis; CZE) 及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。CZE は、クウォンタ 4000 (ウォータース社製) を用い、キャピラリーチューブは、内径 75 μm、長さ 37.5 cm のフューズドシリカチューブを用いた。試料注入方は、落差法で行い、検出には 254nm を用いた。内部標準物質としてカフェインを用いた。HPLC は、Gulliver インテリジェントシス

テム (ジャスコ社製) を用い、検出器の波長は Ex340nm、Em450nm とし、カラムは AA pak Li⁺ (6.0mm×100mm、日本分光製) を用い、カラム温度は 40℃ とした。

3. 結果及び考察

(1) 遊離アミノ酸の変化

試料の調製方法は以下の通りに行った。食品を試料とする場合、食品中にはビタミン、ミネラルなどが多量に存在しており、試料の前処理が必要となってくる。そのためまず、未加熱及び 150℃～200℃ で加熱したチーズをトリクロール酢酸 (TCA) で除タンパクを行い、得られた TCA 可溶性画分から遊離アミノ酸を得るためにイオン交換樹脂 Dowex-50 を用いて分子篩を行って低分子ペプチド画分 (アミノ酸重合度 1.0～2.7) に分画した。CZE 分析ではアミノ酸を特定化するため、分析に先立ってこの分画液をフェニルチオカルバミル (PTC) 誘導体化した。泳動溶液は、四ホウ酸 Buffer (50mM 四ホウ酸ナトリウム (pH5.0)、75mM 陰イオン性硫酸ドデシルナトリウム+1M 尿素) を用い、試料注入時間 30 秒、6.5kV の泳動条件で行った。その結果、Fig 1 に示すようにいくつかの物質が泳動され、旨味成分のグルタミン酸は 150℃ で最も高い値を示し、香気成分であるロイシンも認められた。HPLC の分析には、分画液を乾固後、pH2.2 に調製したクエン酸リチウム溶液で混合した試料を用いた。移動相は、クエン酸リチウム塩緩衝液 (pH2.97, 3.28, 4.25, 3.75, 4.55 の 5 種類) 及び水酸化リチウムを用い、分析時間は 260 分とした。その結果、HPLC も CZE と同様の結果を得た。

(2) チーズのテクスチャーの変化

チーズを直径 3 cm、高さ 4 cm の鉄製の円柱型でくり抜き、型から外さない状態で 150℃、180℃、200℃、220℃、250℃ の温度条件において 5～20 分間加熱し、25℃、30 分放置した後、破断試験を行った。その結果、加熱温度が高くなるに従って柔らかさが減少し、硬度が上昇した。また、加熱時間による破断強度変化は 150℃～200℃ ではあまりみられなかったが、220℃ 以上では加熱時間が長くなるにしたがい強度が増した。

以上の結果より、チーズは加熱温度が高くまた加熱時間が長い程、調理後生よりも柔らかさが増し硬度が上昇するが、加熱温度を 150℃～200℃ で行う事で調理後のチーズの柔らかさ、硬さに変化が少なく、さらにグルタミン酸、ロイシンの含有量も多くなり、その風味向上につながる事が明らかとなった。

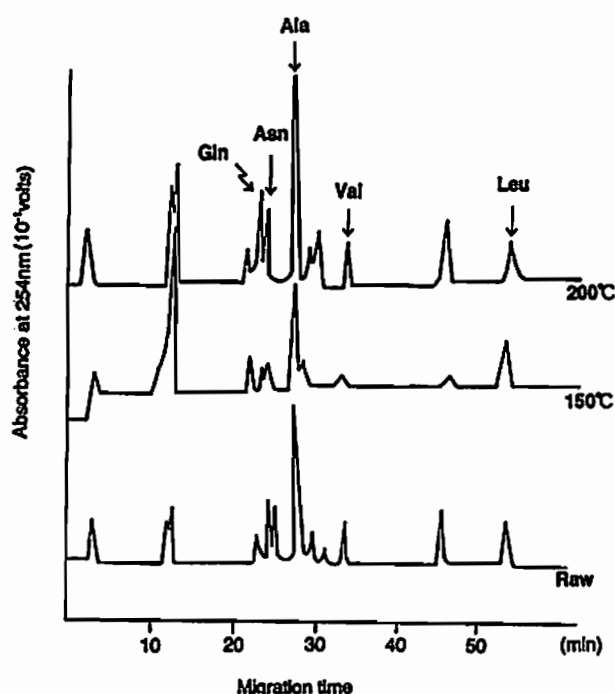


Fig.1 CZE Chromatograms of the Free Amino Acids
extracted from Mozzarella Cheese

P227

食品中の糖類分析

○川橋高子、笹一志

大塚電子株式会社

Analysis of saccharides in foods

Takako Kawahashi, Katsushi Sasa

Otsuka Electronics Co., Ltd.

Capillary electrophoresis was applied to determination of saccharides in foods. Derivatization procedures were used since saccharides do not absorb in UV. These requires many preteatments. Three saccharides were separated and detected with indirect UV detection under strongly basic condition. This method provided good reproducibility.

はじめに

糖類は発色団を持たないため、従来 PMP(1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン)や AP(2-アミノピリジン) などによる誘導体化を用いた分析が多く行われてきた。しかしこれらの誘導体化は何段階もの前処理を必要とする。ホウ酸イオンとの反応による陰イオン性錯体形成を利用した直接検出法も以前に報告されているが、温度を 60℃に上げなければ十分な分離が得られないことと、短波長紫外部(195nm)で検出しているために実際の試料では夾雑物の妨害を受ける可能性が高いという問題点がある。

多くの糖類は電荷を持たないが、強アルカリ性では水酸基が解離するので陰イオンとしての挙動を示す。そのためイオン性官能基を導入することなくフリーゾーン電気泳動法で分析することが可能になる。今回、強アルカリ性条件下でインダイレクト UV 法を使用することにより、煩雑な前処理を行うことなく食品中の糖類を分析することができたので報告する。

実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製 CAPI-3200Q を用いた。キャピラリーは内径 75μm、全長 80cm、有効長 68.5cm の合成シリカ製のものを使用した。試料注入は落差法(25mm、60sec)で行った。泳動液には糖類分析用泳動液を用い、印加電圧は 10kV、温度は 20℃で測定した。検出波長は 240nm でインダイレクト検出を行った。

結果と考察

3種類の糖を分析した結果を Fig.1 に示す。標準試料を水に溶解しただけで測定しているが、各成分は 10 分以内に検出されており、良好な分離が得られた。Fig.2 には清涼飲料水の分析結果を示した。前処理は蒸留水による希釈のみである。また、連続測定の再現性(n=10)は移動時間で 0.08~0.14%、ピーク面積で 0.32~1.37%であった。固形物が含まれる試料であっても、フィルターでろ過するだけで測定可能である。

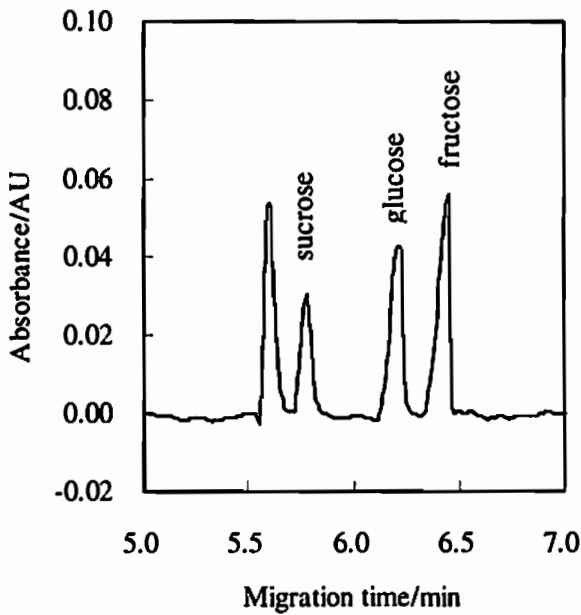


Fig.1 Electropherogram of three sacchrides

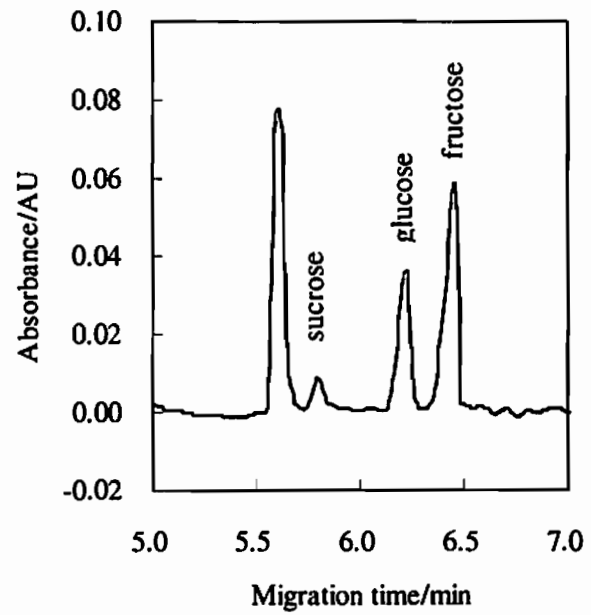


Fig.2 Electropherogram of saccharides in drink

文献

1. S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, 180(1989)351.
2. S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H. M. Widmer, *Anal. Chem.*, 63(1991)1541.
3. P. Cancalon, *LC-GC*, 11(1993)748.

P228

SEPARATION, QUANTIFICATION AND DETERMINATION OF PHARMACOKINETICS OF CLENBUTEROL IN THE HORSE

CE Uboh^{1,2}; LR Soma², F Guan²; EK Birks², D Teleis², JA Rudy¹, DS Tsang², AO Watson¹ and
TD Teel²

¹PA Equine Toxicology and Research Center, Department of Chemistry, West Chester
University, West Chester, PA 19382

and

²University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine, Department of Clinical Studies,
New Bolton Center Campus, Kennett Square, PA 19483

Summary

Following intravenous administration of clenbuterol (1.6 µg/kg) to horses, the concentration of clenbuterol in urine was about 100 x greater than that in plasma. The median elimination half-life ($t_{1/2D}$) was 8.3 h (7.9-9.4), area under the time concentration curve (AUC) was 15.0 h*ng/mL (6.9-16.3), and a zero time concentration (C_1) of 1.31 ng/mL (0.54-1.38). The result shows that clenbuterol is slowly cleared from the horse.

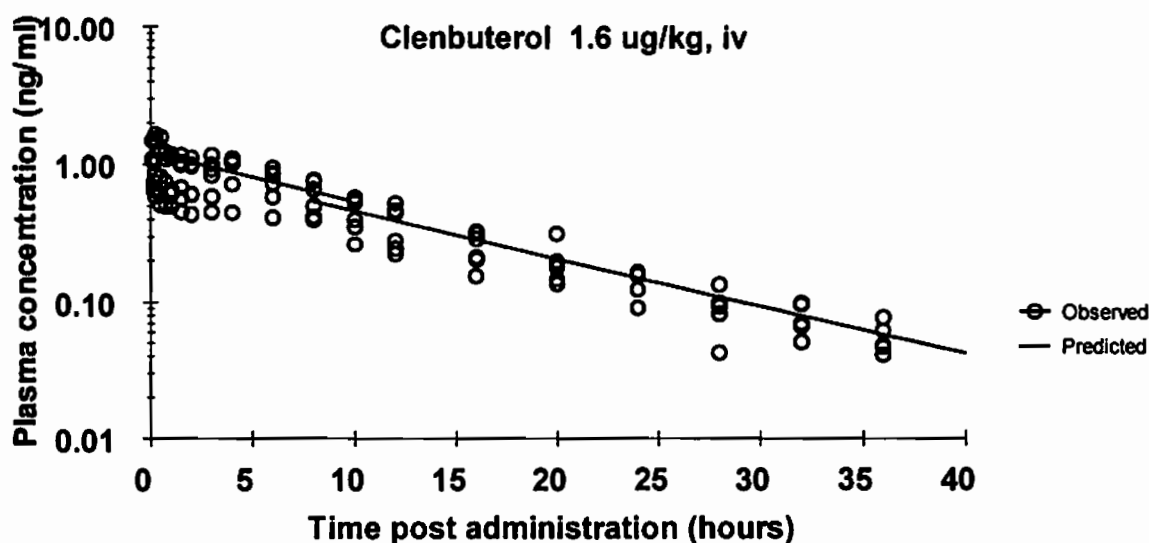
1. Introduction

Clenbuterol is a bronchodilator. It is widely used in horses for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [1]. Intra-tracheal (IT) administration of clenbuterol to COPD horses is as effective as saline. Clenbuterol does not help non-COPD horses during strenuous exercise because their lungs are maximally dilated by circulating catecholamines. The problem encountered with this medication in racehorses is that post-race urine and plasma samples from these horses test positive for clenbuterol long after the drug had been withdrawn from the horse. Such positive test results may lead to loss of purse or suspension of the trainer regardless of the concentration of clenbuterol confirmed. Information on the withdrawal time for clenbuterol prior to race time is lacking. For this reason, this study was undertaken to determine the pharmacokinetics and disposition of clenbuterol following iv and oral administrations, and to determine the relationship between plasma and urinary concentrations of clenbuterol in horses.

2. Experimental

Horses were iv treated with 1.6 µg/kg twice/day. Plasma & urine were collected for up to 96 h. Orally, 3.2 µg/kg, BID, was administered for 5 days and samples collected for 7 days post last dose. All chemicals and reagents used were of HPLC-grade. Clenbuterol was detected by ELISA (Neogen) and extracted by liquid-liquid extraction using petroleum ether. Analysis was accomplished by LC/MS/MS. HPLC separation was on a CN column. Transition of clenbuterol (m/z 277-203 and mabuterol (IS, m/z 311-237) was monitored in positive ion mode.

3. Results and discussion



About 65 % of clenbuterol administered by iv was accounted for in urine during the 36 h of sample collection post administration. The estimated concentration of clenbuterol in urine was $\sim 100 \times$ in plasma. The slow clearance of clenbuterol from the horse suggests that clenbuterol is sequestered into, an as yet unidentified, area from where it is slowly released into the circulation and eliminated in urine for a prolonged period of time.

Acknowledgments

The study was supported by the PA Department of Agriculture, the PA Horse Racing Commission and the PA Harness Racing Commission.

References

H.L. Sasse and R. Hajer, J. Vet. Pharm & Ther, 1 (1978) 43-50

平成 12-13 年度(社)日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会役員

顧問 奥山 典生(都立大名誉教授) 木曾 義之(広大名誉教授)

委員長 津田 孝雄(名工大)

常任委員 (50 音順)

今坂 藤太郎(九大院工)	中村 洋(東理大薬)
小林 英三郎(城西大理)	馬場 嘉信(徳島大薬) **
志村 清仁(帝京大薬)	廣川 健(広大工)
津田 淑江(共立女短大)	本田 進(近畿大薬)
寺部 茂(姫路工大理)	真鍋 敬(愛媛大理)
中川 照眞(京大院薬)	吉田 治弘(専修大法)

委員 (50 音順)

新井 悦郎(ベックマンコールター)	高橋 孝行(日本ウォーターズ)
石濱 泰(エーザイ)	高柳 俊夫(岡山大理)
今坂 藤太郎(九大院工)	竹田 さほり(阪工研)
今澤 正興(国立精神神経センター)	田中 信男(京都工繊大繊維)
江坂 幸宏(岐阜大薬)	津田 孝雄(名工大)
大塚 浩二(姫路工大理)	津田 淑江(共立女子短大)
奥津 徹(日本バイオラッド)	寺部 茂(姫路工大理)
恩田 宣彦(パーキンエルマー)	中川 照眞(京大院薬)
金田 隆(九大院工)	中村 洋(東理大薬)
釜堀 政男(日立中研)	永柳 衍(島津製作所)
北川 慎也(名工大) *	西 博行(田辺製薬)
北森 武彦(東大院工)	萩中 淳(武庫川女大薬)
児玉 裕敬(高知医大)	馬場 嘉信(徳島大薬) **
小林 英三郎(城西大理)	平岡 厚(杏林大保健)
笹 一志(大塚電子)	廣川 健(広大工)
篠原 悦夫(オリンパス)	福士 恵一(神戸商船大)
澁川 明正(京大院薬)	藤本 忠蔵(浜松医大)
志村 清仁(帝京大薬)	本田 進(近畿大薬)
鈴木 茂生(近畿大薬) *	真鍋 敬(愛媛大理)
千田 正昭(日本分光)	吉田 治弘(専修大法)
曾我 朋義(横河アナリティカルシステムズ)	

**第 20 回キャピラリー電気泳動シンポジウム実行委員長
(*は事務局担当)

第 20 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集

平成 12 年 11 月 29 日発行

編集責任者 馬場嘉信

発行 (社)日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

印刷 総合印刷(有) 徳島市南昭和町 6-17 (088)622-6281

HPLC Kyoto

International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Kyoto

September 11-14, 2001

Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan

Organized by the Society for Chromatographic Sciences

Symposium Chairman: Nobuo Tanaka

Co-Chairman: Shigeru Terabe

Secretariat: Ken Hosoya (E-mail: hplckit@ipc.kit.ac.jp)

<http://www.poly.kit.ac.jp/bunshi/hplckyoto.html>



旭テクネイオン株式会社

SECトリプル検出器は高分子医薬品分析において多彩な情報を提供します！！

【プロテイン専用 トリプル検出器E-Z PRO TDA】

- ・トリプル検出器は、3つの検出器（光散乱、差圧粘度、レーザ屈折）及びカラムオープンが内蔵されており、全て同じ温度でコントロールされているメタルフリーシステムです。
 - ・高分子医薬品であるタンパク性医薬品をはじめ、多糖類などトリプル検出器採用により、より多くの情報を提供します。
- （絶対分子量、分子量分布、固有粘度、分子サイズ、分岐構造等）

【主要取り扱い製品】

- ・高速液体クロマトグラフィー関連商品
- ・SECトリプルディテクターシステム
- ・赤外分光光度計システム（FT-IR）
- ・各種質量分析計（LC/MS, TOF/MS）
- ・その他各種分析計

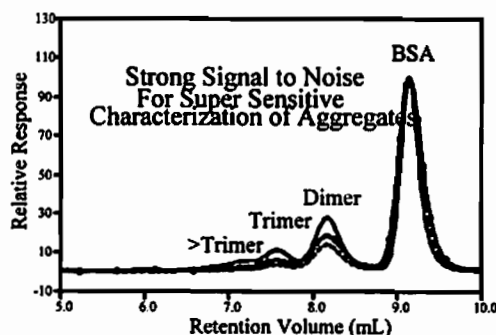
旭テクネイオン株式会社 科学機器販売部

本社：東京都新宿区新宿1-1-14 (03)3225-6228

大阪営業所：大阪市淀川区西中島5-11-9 (06)6307-7773

ホームページ <http://www.asahi-technoion.co.jp>

プロテイン専用
トリプル検出器E-Z PRO TDA





マルチファンクショナル マイクロプレートリーダー

蛍光・時間分解蛍光・蛍光偏光・発光・吸光！ 複数の測定機能を一つの装置に集積！

アプリケーション・分析手法に対応した装置を豊富にラインアップ！

High Speed! & High Performance!



ウルトラ



ポラリオン



スペクトラ
フルオプラス



スペクトラ
フルオ



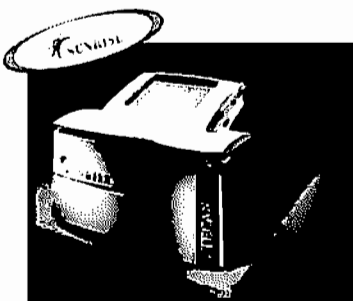
高感度で多彩な測定機能を
集積したTECAN社マルチ
ファンクショナルマイクロ
プレートリーダーは、生物
化学分野での各種アッセイ
に最適な測定装置です。
“より早く！より高感度に！”
というご要望に対する答え
がここにあります。

創業・UltraHITS！ ルーチン測定！ 基礎研究！

様々なシチュエーションに最適な装置をお選び下さい。

吸光マイクロプレートリーダー

“スペクトラリーダーの進化型
サンライズリーダーの登場です”



TECAN社が新規開発した吸光マイクロプレートリーダー
サンライズにはタッチパネルを導入し、従来機種のスペク
トラで培われた高い測定性能に加え、優れた操作性を実現
しています。

Windows-CE™を搭載したタッチパネル式ディスプレイ搭載
高機能演算ソフト内蔵
スタンドアロン制御、演算処理可能
メモリーカードスロット装備（メモリーカード1枚標準付属）
高速測定 1波長6秒、2波長8秒
波長範囲 340～750nm
エンドポイント/カインेटリック測定

※仕様を予告なく変更する場合があります。



スペクトル測定



温度制御

Basic

サンライズ
クラシック

Thermo

サンライズ
サーモ

SPECTRUM

サンライズ
レインボー

SPECTRUM & Thermo

サンライズ
レインボーサーモ

Image

スペクトラ
イメージ

★パンフレットをご希望の方は、弊社、または弊社代理店にご請求下さい。
弊社ホームページでもご覧いただけます。

輸入元 テカンジャパン株式会社

発売元 和光純薬工業株式会社

和光純薬工業株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
東京支社 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号
URL: <http://www.wako-chem.co.jp>

問い合わせ先

フリーダイヤル: 0120-052-099 フリーファックス: 0120-052-806

西日本: 本社 学術部 Tel.06(6203)1788 Fax.06(6201)5965

E-mail: labchem-tec@wako-chem.co.jp

東日本: 東京支店 学術部 Tel.03(3270)8123 Fax.03(3242)6501

E-mail: labchem-tec@wako-chem.co.jp

Nisshin Medical Instrument



「いつも時代に前向き」

わたしたちは、柔軟思考の医療環境ソリューション集団です。

よりよい地域医療のために

医科器械・病院設備・理化学器械・実験動物



日新器械株式会社

NISSHIN MEDICAL INSTRUMENT CO.,LTD.

本社 〒770-0044 徳島市庄町1丁目22番地12
TEL (088) 632-4131代/FAX 632-4195

埼玉営業所 〒357-0042 埼玉県飯能市矢廻125-1
TEL (0429) 72-1323代/FAX 72-1910

生命を支え、豊かな社会に貢献



人の生命は

さまざまな力によって

支えられています。

医療、薬品、

専門分野の研究・・・

私たちはそれらの発展を

かげでバックアップし、

かけがえのない

“生命”を支えています。

営業品目

■医科器械

病院設備、臨床検査装置、手術器械、人工臓器、放射線機器、MRI、リハビリテーション用器械、超音波診断装置、医療情報処理用器械、各種診断及び治療装置

■科学器械

環境試験機器、分析計測機器、光学器械、測定機器、汎用器械、教育用器械、バイオ関連機器、遺伝子 (DNA) 合成装置

■獣医、畜産、酪農器械

■実験用ガラス器具

■コンピュータ関連機器

ミニコンピュータ、パーソナルコンピュータ、自動計測、画像処理、CAI、CAD、ネットワーク

業務内容

■医療部門

医療現場で日々使用される器械類の販売だけでなく、各メーカーからの様々な情報、業界の動向なども積極的に提示。医療機器におけるトータルアドバイザーとして努力を続けています。

■科学部門

官公庁の研究機関や大学、農業各種試験場、メーカーなどにおいて、研究者の有能なブレーンとして様々な研究活動を支援しています。

■システム販売部門

ソフト・システムを含めたコンピュータ機器の、専門知識を生かした独自の提案が強味です。

■製造・技術部門

どんなに豊富な商品群を誇っていたとしても、すべてのニーズに既製品で対応することはできません。研究者方から好評のガラス加工製造部門では、特別なガラス器具、実験器具をオーダーメイドで作成。複雑な形状のものにも熟練した技術者が迅速に対応します。また独自のシステムを構築し、経験豊かなスタッフ陣を揃え、自社でアフターサービスを展開しています。

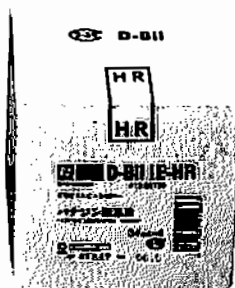


医療・科学・畜産・コンピュータ
株式会社 大一器械

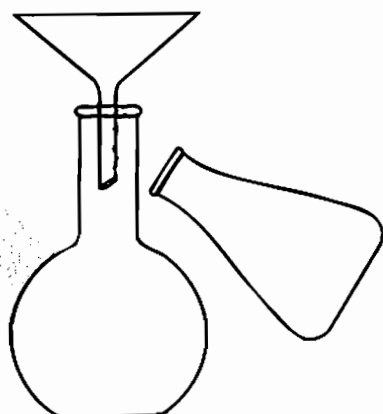
☐ 本社 〒771-0185 徳島市川内町平石若宮340番地
 医療機器営業部 Tel.088-656-8101 Fax.088-656-8109
 科学機器営業部 Tel.088-656-8122 Fax.088-656-8108
 ストーマ・福祉用具 Tel.088-656-8103 Fax.088-656-8151
☐ 香川営業所 〒761-8072 高松市三桑町39-7
 Tel.087-865-7233 Fax.087-865-3289
 ホームページアドレス <http://www.daiichi-kikai.co.jp/>



分析機器



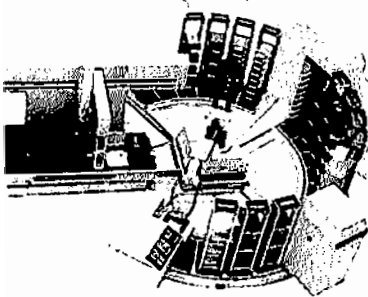
臨床試薬



実験器具

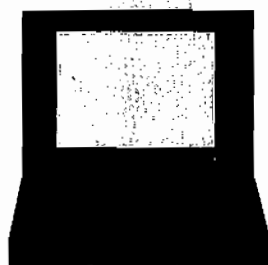


一般試薬

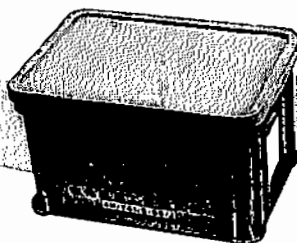


検査機器

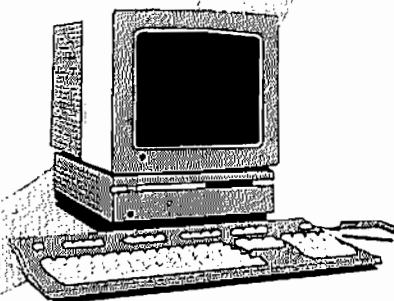
試薬だけでは ありません



各種パソコン



化成品(原料)



アップルコンピューター



四国八洲薬品株式会社

各種研究用試薬
臨床検査用試薬
臨床検査用機器
各種研究用機器
各種輸入試薬

本社	〒770-0873	徳島県徳島市東沖洲2丁目17 電話(0886)64-6321(代表)
高松営業所	〒761-1701	香川県香川郡香川町大字大野649番1 電話(087)888-6111(代表)
愛媛営業所	〒791-1102	愛媛県松山市来住町1445番1 電話(089)960-0260(代表)
新居浜出張所	〒792-0801	愛媛県新居浜市菊本町2丁目13番8号 電話(0897)32-8171(代表)

☆営業品目☆

理化学機器・工業計測機器・医科機器
生化学機器・組織培養機器・試薬他

四 国 理 科 株 式 有 限 公 司

本 社 〒781-5103 高知市大津乙 1067-6
TEL 088-866-5000 FAX 088-866-5015
徳 島 支 店 〒770-0872 徳島市北沖洲 2 丁目 9-31
営 業 所 TEL 088-636-0678 FAX 088-664-6564

*The group of
Think tank, Technology, Touch mind.*



私たちは3つのスローガンでIT環境づくりを提案します。



株式 会社 **サンディー**
TTT CO., LTD.

□本 社／徳島市南二軒屋町2丁目1-10 〒770-8063 TEL(088) 623-5511 FAX(088) 623-6968
□大阪営業所／大阪市中央区南船場1丁目10-2SANWAトレーディングビル2F201号 〒542-0081 TEL(06) 6271-7551 FAX(06) 6271-7552
□新浜営業所／徳島市新浜町1丁目1-18 〒770-8006 TEL(088) 663-5511 FAX(088) 662-1100
□高松営業所／高松市松島町2丁目7-9 〒760-0068 TEL(087) 833-8616
□国分寺営業所／香川県綾歌郡国分寺町字国分565-2 〒769-0102 TEL(087) 874-1900 FAX(087) 874-5900
□事務所／東京 □出張所／志度、丸亀

株式会社 エイコーサイエンス

- ☐ 遺伝子関連機器
- ☐ 薬理・生理関連機器
- ☐ 試薬

徳島

TEL 08853-3-1705

FAX 08853-3-0627

福岡

TEL 092-691-9139

FAX 092-691-9169

大阪

TEL 06-6706-6029

FAX 06-6706-6490

輝く命を守りたい。

健やかな命を育みたい。

いつまでも健康でいたい、健やかな人生を過ごしたい…

それは、世界共通の願いです。

私たち片山化学は創業以来 80 有余年、一貫して試薬で多分野に参画。

いま最も重要視される予防医学、環境分析、バイオテクノロジーに必要な試薬及び機器等の提供を通じて生活環境に貢献し、健康という人類共通の願いにお役に立ちたいと、信頼性の高い製品の研究・開発に全力を傾けています。



片山化学工業株式会社

本社 / 〒541-0045 大阪市中央区道修町 2 丁目 5 番 10 号

TEL(06)6203-3441 FAX(06)6222-3804

池田営業所 / 〒563-0024 大阪府池田市鉢塚 1 丁目 9 番 14 号

TEL(0727)63-1920 FAX(0727)63-1926

東京営業所 / 〒111-0041 東京都台東区元浅草 1 丁目 6 番 29 号

TEL(03)3845-9801 FAX(03)3845-7106

岡山営業所 / 〒703-8236 岡山市園富 1 丁目 11 番 3 号

TEL(086)271-6511 FAX(086)271-9175

徳島営業所 / 〒770-0006 徳島市応神町古川戎子野 136 番 2

TEL(088)666-3711 FAX(088)666-3722

山口営業所 / 〒755-0028 山口県宇治市東本町 1 丁目 2 番 30 号

TEL(0836)21-9196 FAX(0836)21-9197

三田工場 / 〒699-1339 兵庫県三田市テクノパーク 16 番 4 号

TEL(0795)68-2659 FAX(0795)68-2462

尼崎工場 / 〒660-0892 尼崎市東灘波町 3 丁目 20 番 22 号

TEL(06)6481-6769 FAX(06)6482-1505

SANYO

人と地球が大好きです

10円硬貨の表面はなぜ“無菌”なのか

人の手から人の手へと渡る10円硬貨。

しかし、その表面は銅のもつ抗菌作用のため無菌です。

それは、ごく微量の銅イオンがたんぱく質と結合し、
活性を低下させて代謝機能を阻害、細菌を死滅させるからです。

サンヨーは、銅のもつこの驚くべき抗菌効果に注目し、

新型CO₂インキュベータの内箱や棚などに銅合金ステンレスを採用。

銅がもつ「抗菌性の高さ」とステンレスがもつ「耐腐食性の高さ」を融合させました。

銅合金ステンレスは、銅と同じ抗菌性をもちながら腐食しにくいステンレスの特性を兼ね備えています。もちろん、抗菌作用の性質は表面効果によるものであり、シャーレ内の培養物への悪影響はまったくありません。コンタミネーションの防止と高い培養精度をお届けするサンヨーのCO₂インキュベータの導入をぜひご検討ください。

- 抗菌効果の高い素材でコンタミネーションを防止
- 銅合金ステンレス製内装
- 精度の高い温度環境と迅速な温度復帰が可能
- エアージャケット (DHAジャケット構造) 方式
- 温度の影響を受けないCO₂制御が可能
- 赤外線式CO₂センサ



■ CO₂インキュベータ
MCO-17AIC

標準価格950,000円(税別・据付納入費別)

有効内容積	164L
CO ₂ 濃度	0~20.0%
温度	室温+5℃~50℃

お問い合わせは

〈ホームページ <http://www.sanyo.co.jp/medica>〉

三洋電機株式会社

三洋電機メディカシステム株式会社

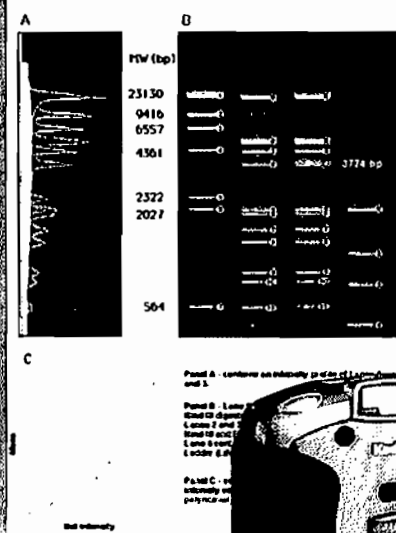
本社 〒570-8677 大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号
販売促進部 TEL 06(6994)3408(代)

北海道営業所 / TEL 011(231)7113(代) 近畿営業所 / TEL 06(6994)4742(代)
東北営業所 / TEL 022(266)2131(代) 中国営業所 / TEL 082(247)7532(代)
関東営業所 / TEL 048(666)1361(代) 四国営業所 / TEL 087(843)3334(代)
東京営業所 / TEL 03(5803)4040(代) 九州営業所 / TEL 092(291)2601(代)
中部営業所 / TEL 052(551)0822(代)

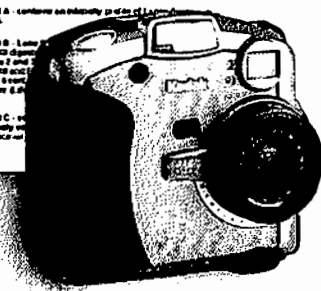
clearly superior.

The New KODAK EDAS 290 Gel Imaging System
makes instant film a thing of the past!

Molecular Weight and Mass Analysis of DNA Fragments



- Eliminate film cost and waste.
- Faster, more accurate analysis.
- Easier publication and printing.



clearly
Kodak

7月発売予定

Kodak® Digital Science™ はEastman Kodak Co.の登録商標です。

製造元

Kodak *ds*
digital science™

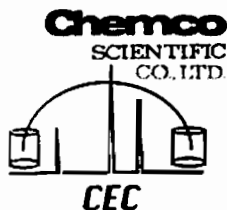
発売元

ライフテック オリエンタル株式会社

営業企画部 TEL(03)3663-8143 FAX(03)3663-8242

大阪営業所 TEL(06)6339-8165 FAX(06)6339-8138

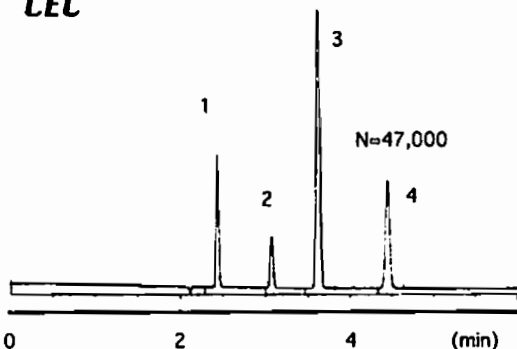
つくば駐在事務所 TEL(0298)55-8800 FAX(0298)55-8905



ケムコ キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)・マイクロLC用カラム

電場充填ミクロ HPLC・CEC カラム

株式会社ケムコは名古屋工業大学津田孝雄先生との共同研究により、カラムへの充填方法として高電圧による電場を採用した電場充填キャピラリーカラム(特許申請中)を開発いたしました。



<特長>

- ・電場充填による優れた分離効率
- ・均一な充填構造
- ・高耐圧性 → 加圧送液CEC、マイクロHPLCカラムとしても使用可能
- ・優れたカラム間再現性

<カラムサイズ>

CEC用 ; 内径0.1 mm x 充填長50~500mm.
マイクロHPLC用 ; 内径0.1, 0.32 mm x 150, 250 mm.

<充填剤>

Chemcosorb, Chemcobond, Quicksorb, Nucleosil, Hypersil
ODS, C8, TMS, Ph, CN, NH₂, Si, OH, イオン交換, ポリマー充填剤等

装置: Beckman P/ACE system 5510

カラム: 内径100μm (外径375μm) カラム全長27cm, 充填長20cm

充填剤: Chemcosorb 3-ODS-H, 移動相: 5mM Tris-HCl (pH=8.0)/アセトニトリル=1/9

電圧: 700V/cm, カラム温度: 20℃, 試料注入法: 電圧10kV/3s, 検出: UV254nm

試料: 1. アセトン 2. 安息香酸エチル 3. ビフェニル 4. アントラセン

*CECカラムご注文時にはご使用の装置名、カラムサイズ(内径、充填長、全長)をご明記下さい。
本製品は受注生産のためご注文より約2週間でお届けいたします。



株式会社

ケムコ

□大阪本社 〒530-0016 大阪市北区中崎2-8-14 (堀川ビル)

TEL 06 (6375) 0395 (代表) FAX 06 (6372) 0533 E-mail: chemco@anet.ne.jp

□東京営業所 〒108-0074 東京都港区高輪2-19-17 (高輪交角ハイツ)

TEL 03 (3444) 4201 (代表) FAX 03 (3444) 4238

フルノ新時代に向けて

世界で初めて魚群探知機の実用化に成功して半世紀。
漁業の町、長崎の海からはじまり、陸へ、空へ、宇宙へ——。
フルノは未来へ向かって、限りなく挑戦しつづけます。

Marine Electronics
FURUNO



古野電気株式会社

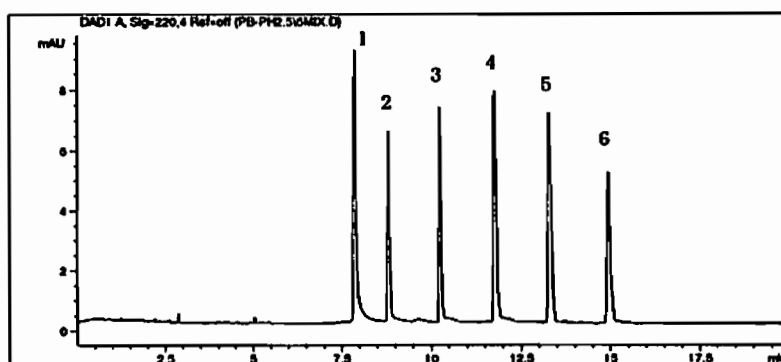
本社 / 〒662-8580 西宮市戸塚町9番52号 ☎(0798)65-2111(大代表)
東京支社 / 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町2番6号(皇延ビル) ☎(03)5687-0411(代表)
<http://www.furuno.co.jp/>



キャピラリー電気泳動用緩衝液

キャピラリー電気泳動(CE)は、高い分離性能が得られることやランニングコストが安いことなど、優れた分析法の1つであり、その利用者も増加傾向にあります。当社では、再現性のよい分析を行うために厳しい品質基準に合格した緩衝液を発売致しております。

ペプチドの分離

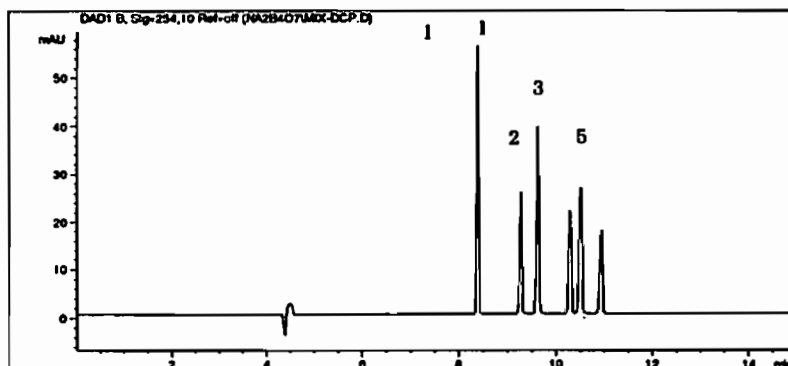


50mM リン酸緩衝液(pH2.5)

キャピラリー 内径 50 μ m・長さ 64.5cm(有効長 56cm), 30KV, UV220nm

試料 1.アンジオテンシン I, 2.アンジオテンシン II, 3. LH-RH(Human), 4.ボンベシン, 5.ロイシン-エンケファリン, 6.オキシトシン

ジクロロフェノールの分離



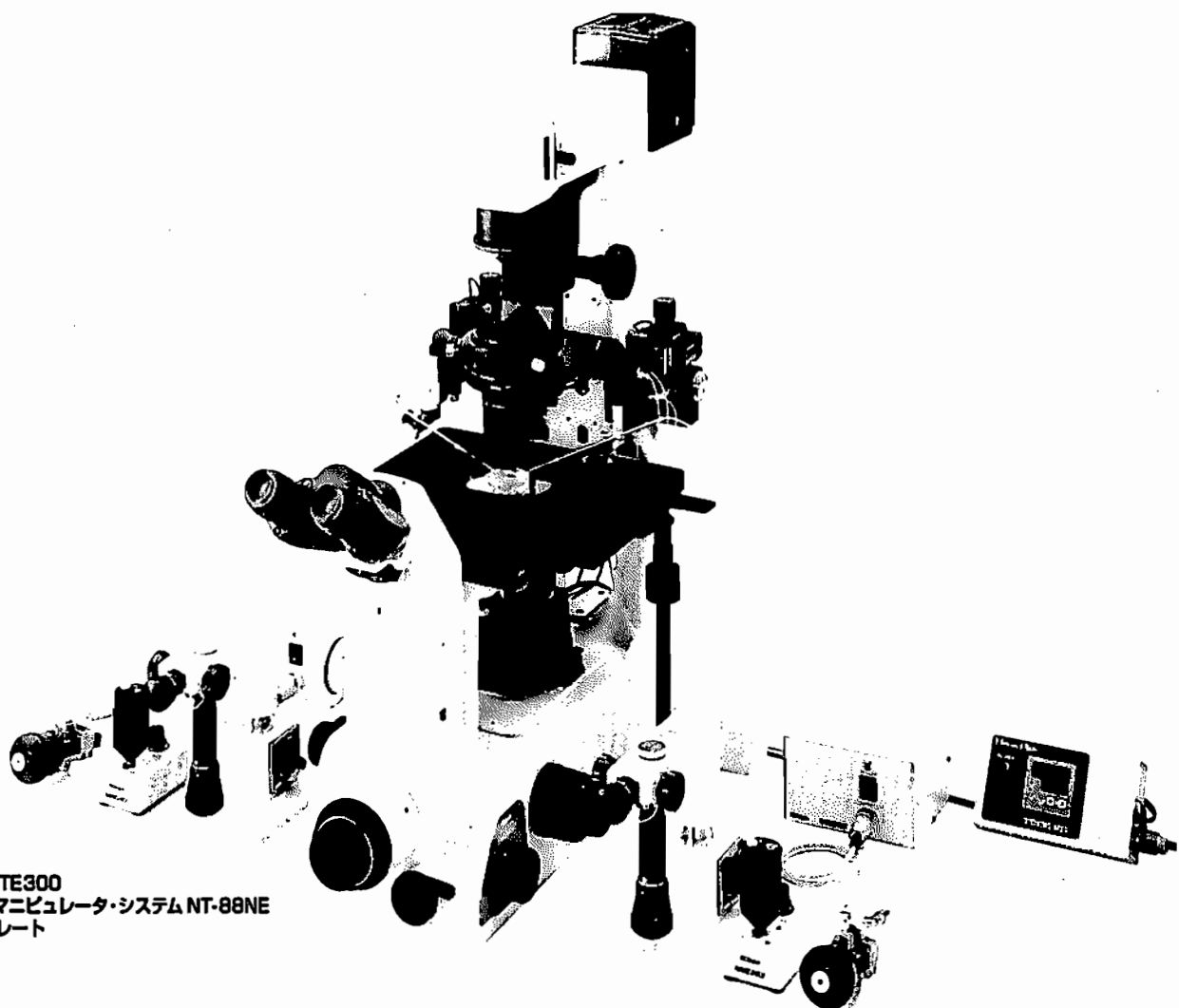
50mM ホウ酸緩衝液(pH9.3)

キャピラリー 内径 50 μ m・長さ 64.5cm(有効長 56cm), 30KV, UV254nm

試料 1,3,4-ジクロロフェノール(DCP), 2,3,5-DCP, 3, 2,4-DCP, 4, 2,3-DCP, 5, 2,5-DCP, 6, 2,6-DCP

Nikon

CFI60



エクリプス TE300
+ マイクロマンピュレータ・システム NT-88NE
+ サーマプレート

理想的な性能のために、CFI60システムを搭載。
最先端の研究を支える、先進の倒立顕微鏡です。

ECLIPSE TE300

さまざまな研究用途に応える、
マルチポートタイプの最高級機。

ECLIPSE TE200

優れた基本性能はそのままに、
経済性を高めたスタンダードタイプ。

■新光学系、CFI60システムを搭載

定評あるCF光学系の性能に無限遠補正光学系の特性を取り入れた、CFI60システムを搭載。対物レンズには、同焦点距離60mm、ネジ径25mmの新規格を採用しました。

■高N.A.と長作動距離を両立

N.A.を大きく、しかも作動距離(ワーキングディスタンス)を大きくという両立が困難な特性を実現。優れた解像度と操作性を提供します。

■ユニバーサル対物レンズを新開発

明視野・暗視野・位相差・微分干渉・蛍光・偏光観察を対物レンズの交換なしにカバー。複数の観察法の併用などに威力を発揮します。

■IVF用途に最適なHMCコンデンサを新開発

IVF用途に最適な、作動距離44mmのホフマンモジュレーション用コンデンサを独自に開発しました。

■ひときわ鮮明な蛍光像を実現

より明るくなった照明装置や、紫外線透過率の高い対物レンズなどにより、従来比約2倍の明るさを実現しました。

販売元
株式会社 ニコン / 株式会社 ニコン インステック バイオメディカル部

カタログ・パンフレット等のご請求は、株式会社ニコン インステックバイオメディカル部へ 112-0004東京都文京区後楽1-4-25(日教販ビル) 電話(03)5802-0218(ダイレクト)



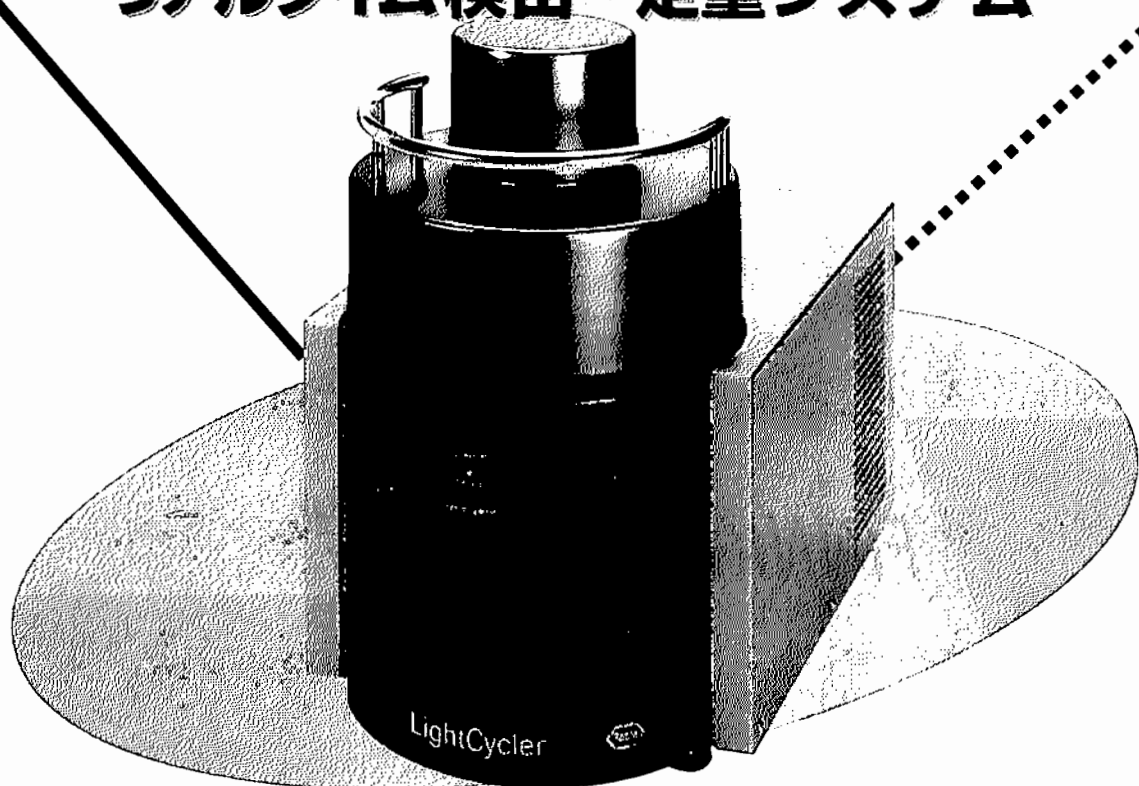
世界最速約 30 分で定量解析

Roche Molecular Biochemicals

Roche

LightCycler™ System

キャピラリーPCR 法による リアルタイム検出・定量システム



《特 長》

- ・超高速 PCR の実現
- ・オンライン検出の実現
- ・ゲル解析不要な融解特性分析
- ・突然変異検出への応用
- ・多様な蛍光フォーマット利用
- ・高い再現性(CV = 2.7%)
- ・幅広いダイナミックレンジ
- ・システムを保証する最適な試薬の提供

☆ 詳しい資料をご希望の方は、本社バイオケミカルビジネス部もしくは弊社代理店にご請求下さい。

Roche

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
(旧 ベーリンガー・マンハイム株式会社)
TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098

新 設 LightCycler™ System

◆ 詳しい情報は、下記ホームページをご利用ください。
<http://biochem.roche.com/lightcycler>

LCQ...さらなる進化

FINNIGAN LCQ^{DECA}

イオントラップ型LC/MSⁿシステム

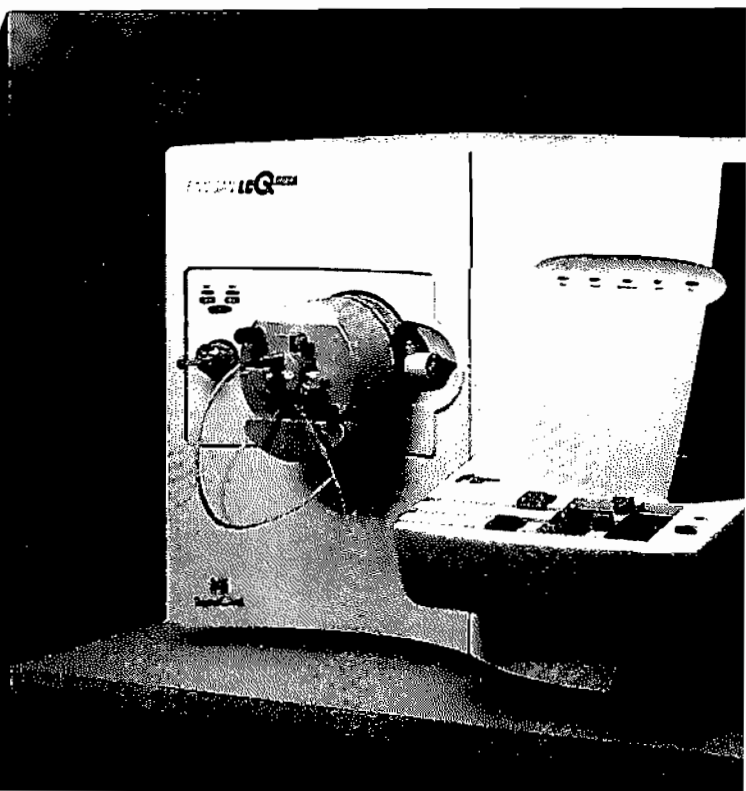
MS/MS/MS.../MS(n=10)

コンパクトかつ高機能・高性能

最新技術のAPI2搭載

広いマスレンジ~4000m/z

XcaliburTMデータ処理システム



FINNIGAN LCQ^{DUO}

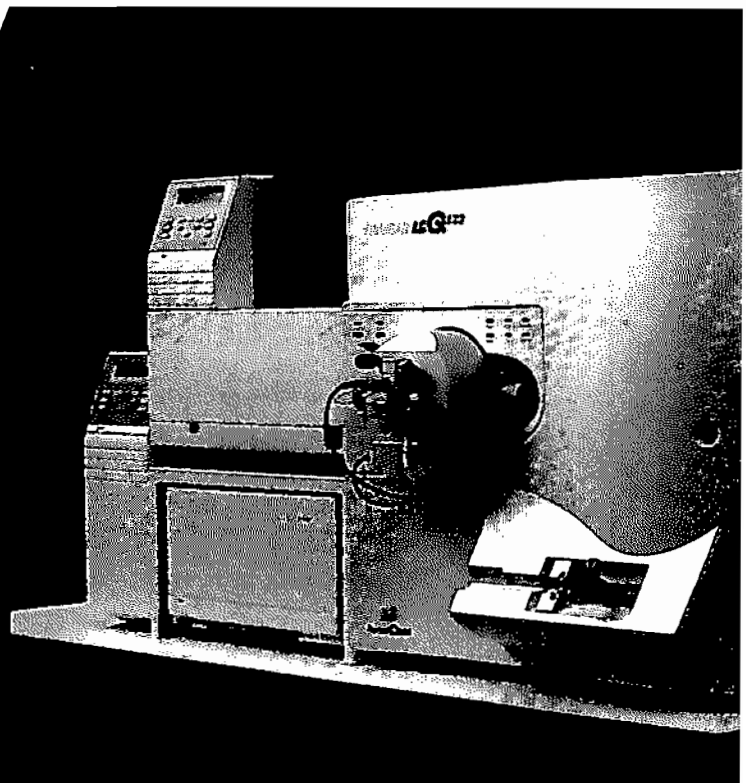
イオントラップ型LC/MS/MSシステム

コンパクトかつ高機能・高性能

最新技術のAPI搭載

優れたコストパフォーマンス

XcaliburTMデータ処理システム



ThermoQuest
サーモクエスト株式会社

<http://www.kagaku.com/tqkk/>

■ 東京都渋谷区初台2-5-8 西新宿豊国ビル3F
〒151-0061 TEL.03(3372)3001 FAX.03(3372)7051

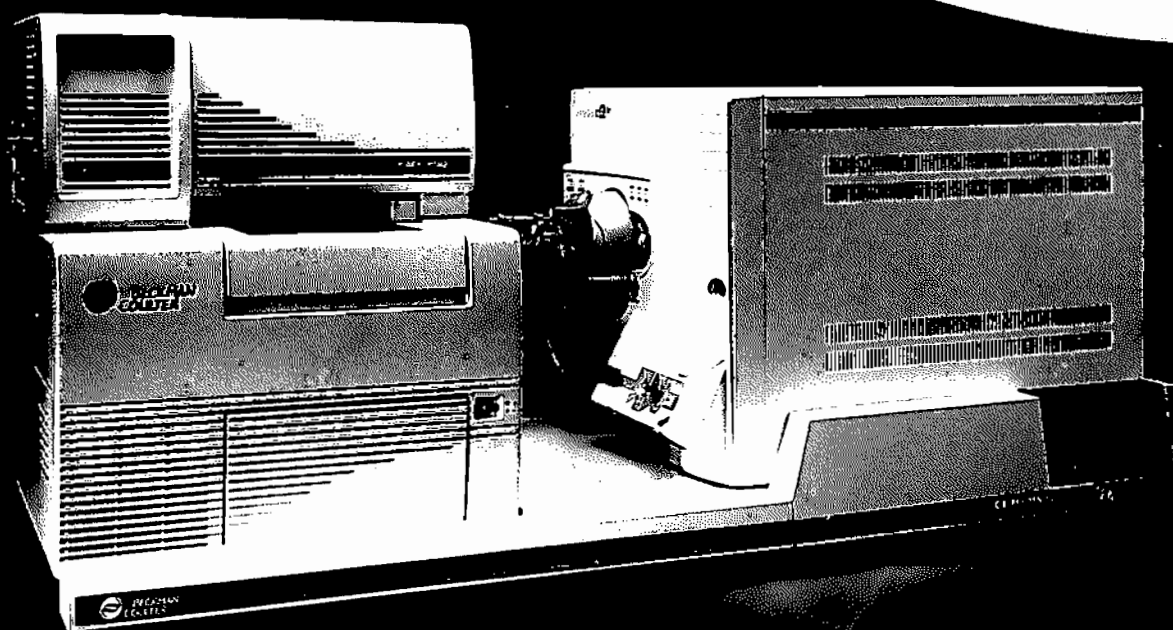
■ 大阪府吹田市江坂町2-3-1 江坂グランドビル4F
〒564-0063 TEL.06(6387)6681 FAX.06(6387)6641



キャピラリー電気泳動と質量分析計がドッキング!!

P/ACE MDQ-Finnigan LCQ Duo

CE-MS/MS システム



キャピラリー電気泳動と質量分析計を合体させて、
2001年(予定)に発売します。
2つのシステムを予定しています。

Protein Characterization

蛋白質解析においてキャピラリー電気泳動は重要な分析ツールです。LCQ DuoのMS/MSと組み合わせることにより、圧倒的な情報量が同定や構造解析の効率を飛躍的に高めます。

遺伝子機能への影響や疾患との関連を探索するこれらの蛋白質研究、Proteomicsに欠かせない技術です。

Pharmaceutical Analysis

多くの塩基性医薬品はその正電荷によりクロマトグラフィ技術での分析が困難です。キャピラリー電気泳動はこの分野でも重要なツールです。MS/MSと組み合わせると、これらの混合物の分離と、各成分の同定や構造解析を同時に迅速に行うことができます。

ベックマン・コールター株式会社

本社 〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-5-1 虎ノ門37森ビル お客様専用 ☎0120-70-5201 ☎03-5404-8359 FAX03-5404-8436

札幌 ☎011-825-9243 ・ 仙台 ☎022-225-8057 ・ つくば ☎0298-52-6640 ・ 名古屋 ☎052-934-3081 ・ 大阪 ☎06-4863-1671 ・ 福岡 ☎092-622-7391
E-mail bckkcas@beckmancoulter.com URL <http://www.beckmancoulter.com>



AB Applied Biosystems

平成12年8月1日をもって、PEバイオシステムズジャパン株式会社は、アプライドバイオシステムズ ジャパン株式会社に変更いたしました。

アプライド バイオシステムズ ジャパン 株式会社

〒104-0032 東京都中央区八丁堀 4-5-4 秀和桜橋ビル

TEL. 03-5566-6100 FAX. 03-5566-6501

この製品は研究目的でのみ使用できます。

Copyright (C) 2000. Applied Biosystems Japan Ltd. All rights reserved 記載の社名および製品名は、弊社もしくは各社の商標または登録商標です。

Mariner API-TOFワークステーションは多様な場面で使用していただける質量分析計です。プロテイン、ペプチド、オリゴヌクレオチドなどのキャラクタリゼーションにも対応しています。 Marinerワークステーションの使いやすさや高い質量精度によりスタンドアローン使用はもちろんのこと、HPLCシステム等との接続にも理想的です。よりパワフルになったソフトウェアとの組み合わせでMariner API-TOF ワークステーションはライフサイエンスの研究リサーチに新しい可能性を切り開きます。詳細はアプライドバイオシステムズの Web サイト www.appliedbiosystems.com/jp をご覧ください。
これからのスタンダード。あなたならどう使いますか？



Biosystems Membership 入会受付中!

アプライドバイオシステムズの情報サービスです。ニュースレターの送付等、ライフサイエンス研究者のための新鮮な情報を無料でお届けします。登録は弊社Webサイトで。

www.appliedbiosystems.com/jp

MS01ADB0009AC

ABI
PRISM 3100
Genetic Analyzer

16 Capillaries

AB Applied Biosystems

平成12年8月1日をもって、PEバイオシステムズジャパン株式会社は、アプライドバイオシステムズジャパン株式会社に社名を変更いたしました。

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer はApplied Biosystems の確立されたDNA解析技術によって誕生した最新のDNA解析システムです。ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer と3700 DNA Analyzer の流れを継承し、高い信頼性と確立されたテクノロジーで、ライフサイエンスの研究を促進します。マルチキャピラリーDNA解析システム、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer の詳細は www.appliedbiosystems.com/jp をご覧下さい。

アプライド バイオシステムズ ジャパン 株式会社

〒104-0032 東京都中央区八丁堀 4-5-4 秀和桜橋ビル TEL. 03-5566-6100 FAX. 03-5566-6501

この製品は研究目的でのみ使用できます

Copyright (C) 2000 Applied Biosystems Japan Ltd. All rights reserved. 記載の社名および製品名は、弊社もしくは各社の登録商標または登録商標です。



Biosystems Membership 入会受付中!

アプライドバイオシステムズの情報サービスです。ニュースレターの送付等、ライフサイエンス研究者の為の新鮮な情報を無料でお届けします。登録は弊社Webサイトで www.appliedbiosystems.com/jp

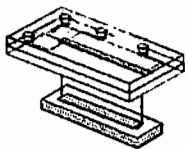
SHIMADZUSolutions for Science
since 1875**ミクロの技術で、高感度、高速分析****島津マイクロチップ電気泳動装置****MCE-2010****ハイスループット**

流路幅: 数十 μm 、泳動距離
25mmの分離流路上で、10秒/
分離の超高速分析が可能です。

UVリニアイメージ検出
(特許出願中)

1024素子ダイ
オードアレイ
で、リアルタイムでの分離の
進行状況を完全
に記録でき
ます。

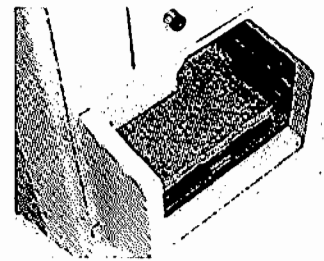
単色光



フォトダイオードアレイ

自動化

試料ラックにマイクロプレート
を採用し、すべての分析工程の自
動化を実現しました。

**簡単操作**

グラフィカル画面による、簡易な
操作体系により、多彩な制御処
理環境を実現しました。

⊕ 島津製作所

本社 京都市中京区西ノ京桑原町1

島津ホームページアドレス <http://www.an.shimadzu.co.jp>

分析機器事業部 (075) 823-1195

お問合せはもよりの営業所へ

●東京 (03) 3219-5685	●大阪 (06) 6373-6551	●札幌 (011) 205-5500
●仙台 (022) 221-6231	●郡山 (0249) 39-3790	●つくば (0298) 51-8511
●大宮 (048) 646-0081	●横浜 (045) 311-4615	●静岡 (054) 272-5600
●名古屋 (052) 565-7531	●京都 (075) 811-8151	●神戸 (078) 331-9666
●岡山 (086) 221-2511	●高松 (087) 834-3031	●広島 (082) 248-4311
●福岡 (092) 283-3334		

島津分析コールセンター (お客様に対する電話相談窓口)
東京 (03) 3219-1691 (東日本地区) 京都 (075) 813-1691 (西日本地区)