

第29回 キャピラリー電気泳動シンポジウム  
(SCE2009)

プ ロ グ ラ ム

と き 2009年11月17日～19日

と ころ 近畿大学・本館大ホール他

## 第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (29th Symposium on Capillary Electrophoresis)

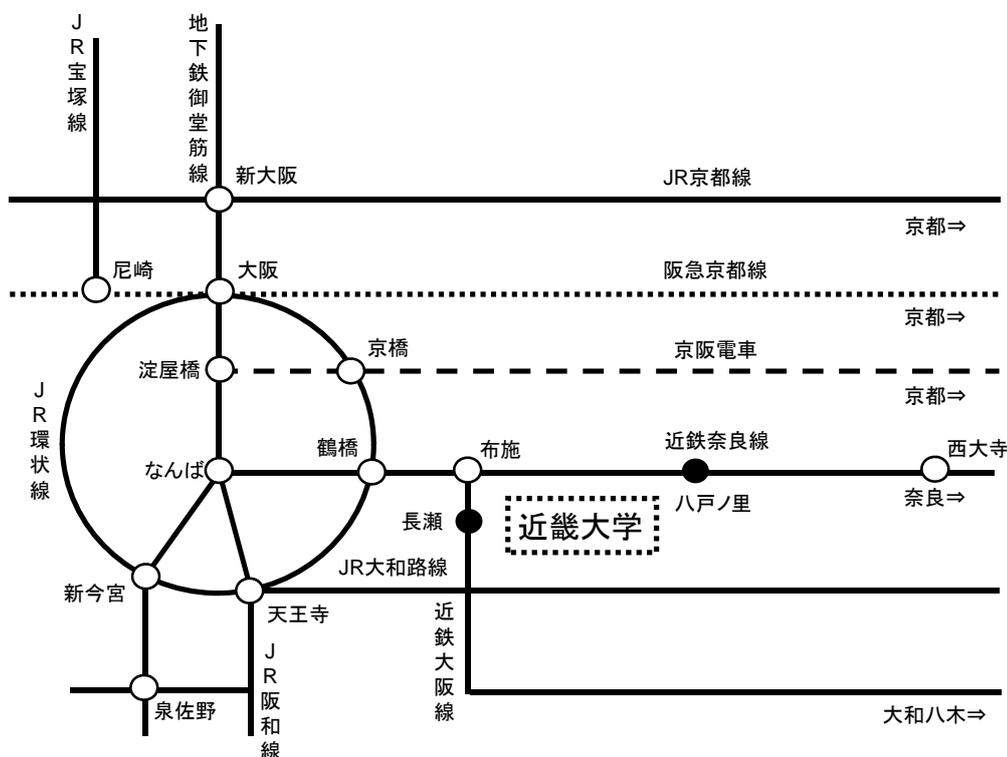
【会 場】 近畿大学  
〒577-8502 東大阪市小若江3-4-1  
TEL : 06-6721-2332(代表) FAX : 06-6721-2505

(大会に関する問合せ先) 近畿大学薬学部内  
SCE2009 事務局

鈴木茂生

TEL : 06-6721-2332 E-mail : [suzuki@phar.kindai.ac.jp](mailto:suzuki@phar.kindai.ac.jp)  
FAX : 06-6730-1394 URL :  
<http://www.phar.kindai.ac.jp/analche2/sce09.htm>

### 【案内図】

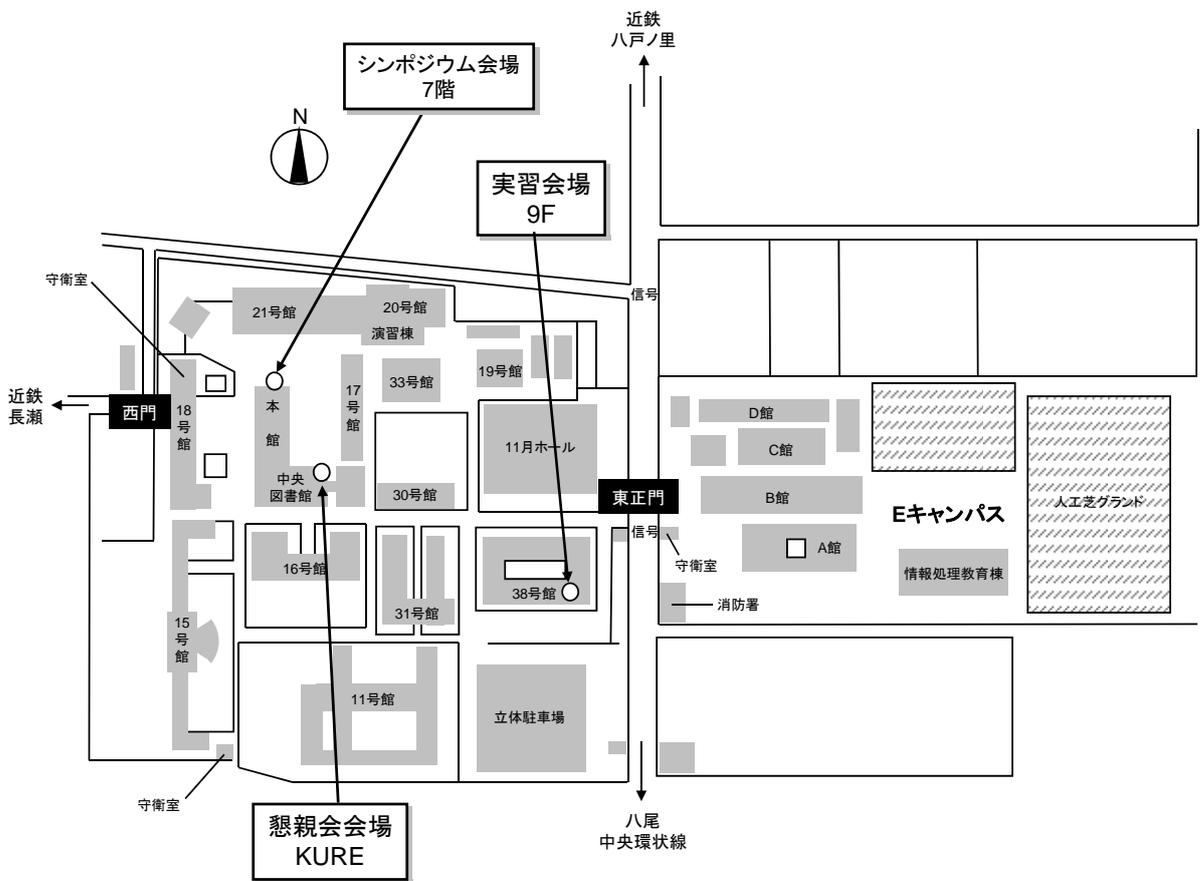
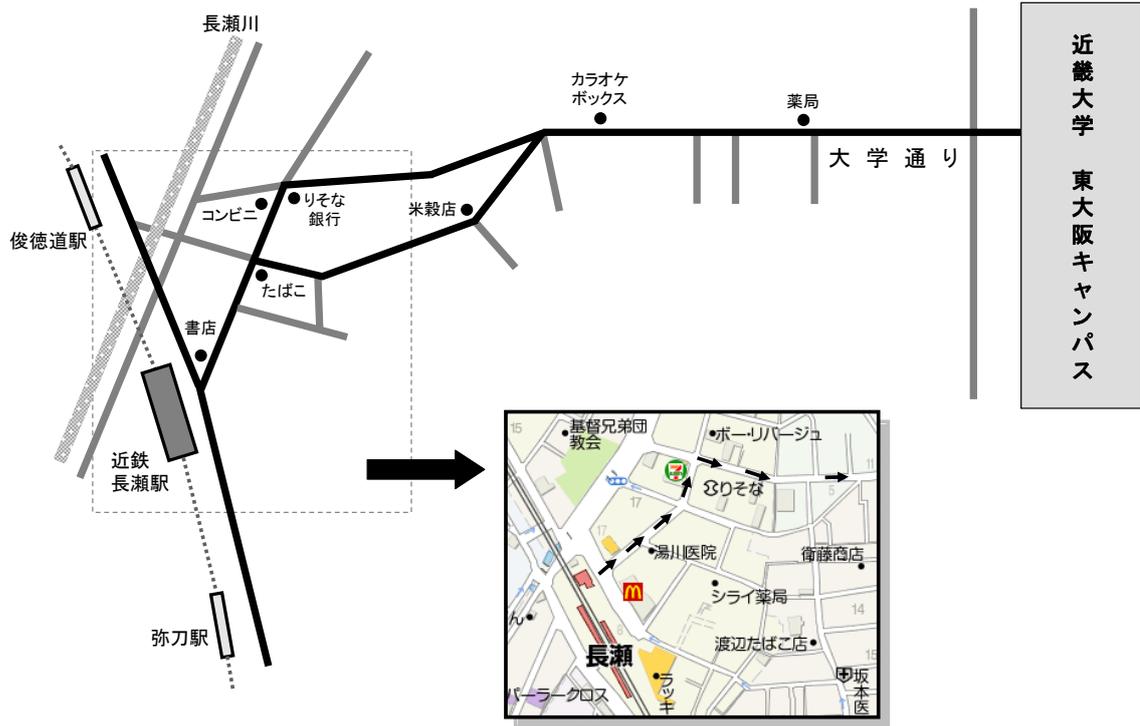


### 【交通】

最寄駅は、近畿日本鉄道 大阪線「長瀬駅」で、普通電車のみの停車となっています。  
大阪まで JR、阪急、阪神電車ご利用の場合、「大阪駅」にて JR 環状線（外回り）に乗り換えていただき、「鶴橋」にて近鉄にお乗り換えください。  
京阪電車をご利用の場合、「京橋駅」にて JR 環状線（外回り）に乗り換えていただき、「鶴橋」にて近鉄にお乗り換えください。  
近鉄奈良線をご利用の場合、「布施」駅にて、大阪線にお乗り換えください。

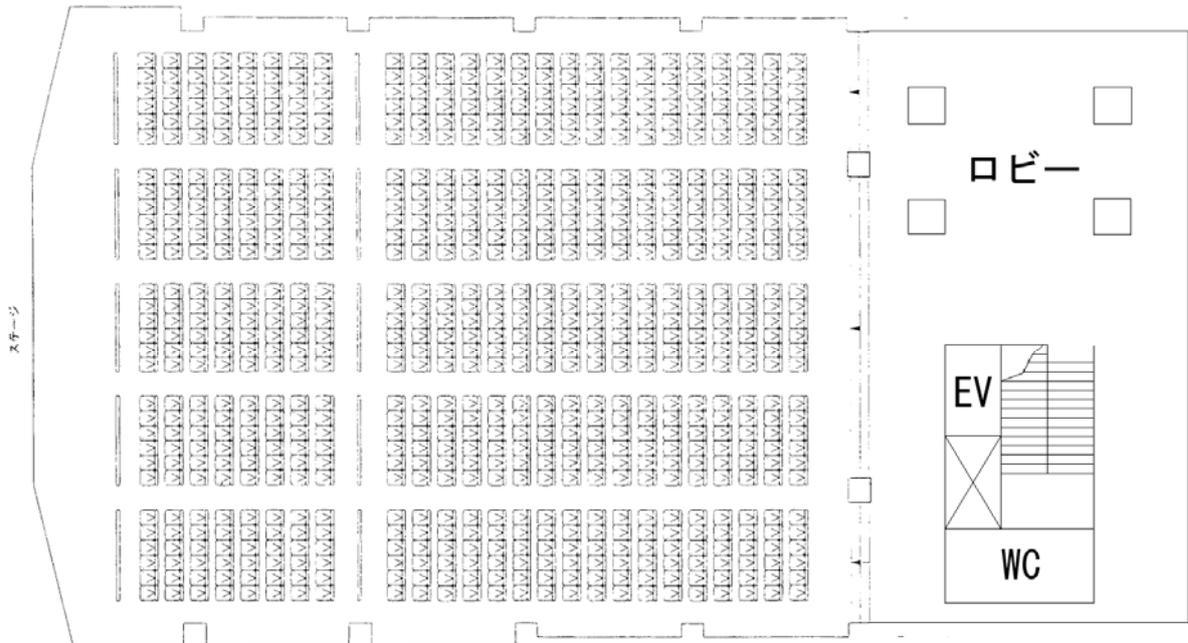
### 【長瀬駅から大学まで】

「長瀬駅」より、徒歩約 10 分です。  
長瀬駅の案内をご参考に商店街を進んでいただき、りそな銀行を目印にお曲がりください。まっすぐ進んでいただければレンガ造りの西門がお迎えいたします。





## 会場図(本館7階大ホール)



- 当日参加の方は、総合受付へお越しください。
- 座長、演者の方は、座長・演者受付へお越しください。

# 第29回キャピラリー電気泳動シンポジウム プログラム

期 間:2009年11月17日(火)–19日(木)

会 場:近畿大学東大阪キャンパス 本館7階ホール

講演時間:特別講演・依頼講演 60分(討論10分を含む)

一般講演 20分(討論2分を含む) ポスター口演 2分

11月17日(火)

休憩(10分)

13:00–16:00

特別講演 (近畿大学薬学部ハイテクリサーチセンター主催講演)

座長 木下 充弘

S-1 医薬品分析におけるキャピラリー電気泳動の現状と展望

西 博行 (安田女子大学 薬学部)

座長 脇田 慎一

S-2 キャピラリーチップ電気泳動を用いた全自動免疫測定システムの開発

川端 智久 (和光純薬・臨床検査薬研究所)

座長 笹 一志

S-3 オンライン前濃縮によるキャピラリー電気泳動法の高感度化と検出限界

廣川 健 (広島大学大学院 工学研究科)

16:00–16:10

開会式・会長挨拶

開会挨拶 実行委員長 鈴木 茂生

会長挨拶 電気泳動分析研究懇談会委員長 大塚 浩二

16:10–17:10

一般講演1

座長 大塚 浩二

L-1 ナノピラーチップを用いたDNAの高速分離分析

○安井 隆雄<sup>1</sup>, 加地 範匡<sup>1,2</sup>, 岡本 行広<sup>1,2</sup>, 渡慶次 学<sup>1,2</sup>, 堀池 靖浩<sup>3</sup>, 馬場 嘉信<sup>1,2,4,5</sup> (名大院工<sup>1</sup>, 名大予防早期医療創成センター<sup>2</sup>, 物質・材料研究機構<sup>3</sup>, 名大プラズマナノ工学研究センター<sup>4</sup>, 産総研 健康工学研究センター<sup>5</sup>)

L-2 パルスフィールドキャピラリー電気泳動を利用したRNA分離

○山口 佳則<sup>1,2</sup>, 住友 慶子<sup>1</sup>, 李 振慶<sup>1,3</sup>, 寶 曉鳴<sup>3</sup>, (早大・科健機構<sup>1</sup>, 阪大・フォトニクス融合研究セ<sup>2</sup>, 上海交通大学<sup>3</sup>)

L-3 プロテオーム一斉解析のためのショットガンプロテオミクス測定システムの構築

岩崎 未央<sup>1</sup>, 三輪 昌平<sup>2</sup>, 富田 勝<sup>1</sup>, 田中 信男<sup>2</sup>, 石濱 泰<sup>1,3</sup> (慶大・先端生命研<sup>1</sup>, 京工織大院<sup>2</sup>, JST, さきがけ<sup>3</sup>)

11月18日(水)

9:30–10:00

ポスター掲示 <<本館7階ロビー>>

10:00–12:00 13:00–15:00

キャピラリー電気泳動とマイクロチップ電気泳動の実習 <<38号館9階>>

9:50–10:50

一般講演2

座長 北川 文彦

L-4 Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis

○Oliver Woodhouse (eDAQ Southeast Asia, Bangkok, Thailand)

L-5 ハイブイド試料導入法によるキャピラリーゾーン電気泳動法の高感度化:電圧及び導入時間の影響

○栗師寺 雄樹<sup>1</sup>, 福土 恵一<sup>1</sup>, 岡村 秀雄<sup>1</sup>, 橋本 陽一<sup>2</sup>, 齋藤 恵逸<sup>3</sup> (神戸大院・海事<sup>1</sup>, 北興化学<sup>2</sup>, 神戸大院・人間発達環境学<sup>3</sup>)

L-6 生体試料中のNO代謝物のオンチップ電気泳動アッセイとストレス負荷被験者実験への予備的な検討

○脇田 慎一, 宮道 隆, 田中 喜秀, 永井 秀典, 鳴石 奈穂子 (産総研・健康工学研究セ)

11:00–12:00

ポスター口演

座長 鈴木 茂生

P-1S 新しいマルチターゲット SNP 検出システムの構築とその基盤技術としての一塩基置換一本鎖DNAのキャピラリー電気泳動分離法の開発

○櫻井 隆郎, 高橋 透, 星野 仁 (東北大院・環境)

P-2S キャピラリー電気泳動法による食品添加物合成着色料の同時分析

○伊藤 あすか<sup>1</sup>, 岩月 聡史<sup>1</sup>, 脇田 慎一<sup>2</sup>, 茶山 健二<sup>1</sup> (甲南大院・自然<sup>1</sup>, 産総研関西セ<sup>2</sup>)

P-3S 試薬放出キャピラリーを用いたキャピラリー等電点電気泳動用条件探索デバイスの開発

○片岡 正輝, 横山 大輝, 八尾 俊男, 久本 秀明 (阪府大院・工)

P-4 非水系キャピラリー電気泳動によるアンジオテンシンの分離

野路 晃嗣, ○北川 慎也, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-5 廃グリセロール利活用によるバイオプラスチック生産ハロモナス菌培養液のキャピラリー電気泳動による分析

○竹田 さほり, 黒岩 愛, 河田 悦和 (産総研)

P-6 CEを用いたナノファイバー類の分離

○加藤 大 (東大院・工)

P-7 キャピラリー電気泳動/質量分析法の法科学分析への有効利用—化学修飾キャピラリーによる迅速性と再現性の向上—

○岩室 嘉晃<sup>1,2</sup>, 石丸(飯尾) 麗子<sup>1</sup>, 地中 啓<sup>1</sup>, 高山 成明<sup>1</sup>, 小玉 修嗣<sup>2</sup>, 早川 和一<sup>3</sup> (石川県警・科捜研<sup>1</sup>, 富山健研<sup>2</sup>, 金沢大・医薬保健研究域<sup>3</sup>)

P-8S シクロデキストリン動電クロマトグラフィーにおける生体試料のスウィーピング(4)

○斎藤 拓也, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-9S トランジェントトラッピング法によるMEKCの高感度化(13)

○橋場 皇太, 田中 隆大, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-10S キャピラリー電気泳動へのインクジェットマイクロチップの導入法 の開発

○池田 紗織, 齋藤 望, 中嶋 秀, 内山 一美 (首都大・環境科学)

P-11S イオン種の結合反応媒体としての非イオン界面活性剤ミセルのキャラクタリゼーション

○生田 愛有美, 高柳 俊夫 (岡山大院・自然)

P-12 キャピラリー電気泳動法によるシトシンのメチル化比率計測の基礎検討

○宮道 隆<sup>1</sup>, 脇田 慎一<sup>1</sup>, 藤井 紳一郎<sup>2</sup>, 高津 章子<sup>2</sup>, 加藤 大<sup>3</sup>, 丹羽 修<sup>3</sup> (産総研・健康工学研究セ<sup>1</sup>, 産総研・計測標準研究部門<sup>2</sup>, 産総研・生物機能工学研究部門<sup>3</sup>)

P-13 マイクロチップ電気泳動法によるDNA酸化損傷マーカーの迅速分離

宮道 隆, ○永井 秀典, 脇田 慎一 (産総研・健康工学研究セ)

P-14 血漿中NO代謝物測定の高感度化:過渡的等速電気泳動法の適用

宮道 隆<sup>1</sup>, ○脇田 慎一<sup>1</sup>, 島津 希世子<sup>2</sup>, 澁谷 康彦<sup>2</sup>, 野瀬 和利<sup>3</sup>, 下内 章人<sup>3</sup> (産総研・健康工学研究セ<sup>1</sup>, 大阪工業大学・工学部<sup>2</sup>, 国立循環器病センター研究所・病因部<sup>3</sup>)

P-15 簡便なマイクロチップゲル・等速電気泳動による生体試料の高感度検出法の開発

Wang Jung<sup>1</sup>, ○岡本 行広<sup>1,2</sup>, 加地 範匡<sup>1,2</sup>, 渡慶次 学<sup>1,2</sup>, 馬場嘉信<sup>1,2,3,4</sup> (名大院・工<sup>1</sup>, 名大予防早期医療創成センター<sup>2</sup>, 名大プラズマナノ工学研究センター<sup>3</sup>, 産総研・健康工学研究セ<sup>4</sup>)

P-16S カルボキシル基を利用した光硬化性アクリルアミドゲルを用いる選択的オンライン濃縮法の開発

○山本 佐知雄, 渡邊 裕樹, 鈴木 茂生 (近畿大・薬)

P-17S 電気泳動分析用ナフィオン修飾 PDMS チップの開発(4)

○瀬野 万里子, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-18S マイクロヒーター集積化 PDMS チップを用いる電気泳動分析(4)

○谷川 佳奈, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-19S 1,10-フェナントロリン CL 系を用いたマイクロチップ CE; 界面活性剤の効果

○野上 貴裕・橋本 雅彦・塚越 一彦 (同志社大・理工)

P-20 ESI/MS による DNA 塩基損傷分析のための全量注入型オンライン濃縮チップの製作

○村上 博哉<sup>1</sup>, 古口 未央<sup>1</sup>, 炭谷 徳人<sup>1</sup>, 江坂 幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野 文二<sup>1,2</sup>, 石濱 泰<sup>3</sup> (岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐大院連合創薬<sup>2</sup>, 慶大・先端生命<sup>3</sup>)

P-21S 有機ナノ結晶を用いる電気泳動分析(4)

○須田木 裕, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-22S 不均一電場下での電気泳動速度差を利用した電気クロマトグラフィー分離の高性能化に関する基礎検討

○武野 裕紀, 北川 慎也, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-23S 異種キャリアー置換電気クロマトグラフィーの研究

○小林 美紀<sup>1</sup>, 江坂 幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野 文二<sup>1,2</sup> (岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐大院連合創薬<sup>2</sup>)

12:00-13:00 昼休み (60分)

13:00-14:00 依頼講演 座長 志村 清仁

I-1 複合糖質由来生物医薬品の開発からレギュレーションまで - キャピラリー電気泳動が果たせる役割 -

掛樋 一晃 (近畿大・薬)

休憩 (10分)

14:10-16:10 一般講演3 座長 江坂 幸宏, 鳥村 政基

L-7 キャピラリー/マイクロチップ電気泳動における糖鎖分析の高感度化(2)

○川井 隆之, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

L-8 APTS 標糖たん白質糖鎖のキャピラリーアフィニティー電気泳動

○八木 有紀<sup>1</sup>, 篠原 千圭代<sup>2</sup>, 山本 佐知雄<sup>2</sup>, 鈴木 茂生<sup>2</sup> (協和発酵キリン<sup>1</sup>, 近畿大・薬<sup>2</sup>)

L-9 キャピラリー電気泳動法を用いる 2-アミノ安息香酸標糖単糖の高感度光学異性体分離

○北 莊一郎<sup>1</sup>, 中世古 みなみ<sup>1</sup>, 木下 充弘<sup>1</sup>, 掛樋 一晃<sup>1</sup>, Lee Yuan Chuan<sup>2</sup> (近畿大・薬<sup>1</sup>, ジョンスホプキンス大<sup>2</sup>)

L-10 キャピラリー電気泳動による抗体医薬品不均一性分析

○前田 瑛起<sup>1</sup>, 北 莊一郎<sup>2</sup>, 木下 充弘<sup>2</sup>, 掛樋 一晃<sup>2</sup> (武田薬<sup>1</sup>, 近畿大・薬<sup>2</sup>)

L-11 組換えアフィニティープローブによるヒトインスリンのアフィニティープローブキャピラリー電気泳動

○志村 清仁<sup>1</sup>, 梶 昇太郎<sup>2</sup>, 金子 真之<sup>2</sup>, 笠井 献一<sup>2</sup> (東大院・工 ナノバイオ研究拠点<sup>1</sup>, 帝京大・薬<sup>2</sup>)

L-12 微生物細胞のキャピラリー電気泳動におけるポリマー添加効果

○鳥村 政基, 孫 麗偉, 稲垣 真輔, 田尾 博明 (産総研・環境管理)

16:10-17:40 ポスターセッション(討論)

18:00-20:00

懇親会 <大学食堂>

11月19日(木)

10:00-12:00 キャピラリー電気泳動とマイクロチップ電気泳動の実習 <38号館9階>

9:30-10:50 一般講演4 座長 北川 慎也

L-13 部分的に短鎖グラフト鎖を導入した金蒸着 LDPE 表面へのリン脂質自己組織化膜の構築

○宮本 洋行, 笹井 泰志, 近藤 伸一 (岐阜薬大)

L-14 イオン会合キャピラリー電気泳動分離系における疎水性相互作用の制御因子および新しい汎用泳動緩衝液モディファイアーとしての尿素の利用

○高橋 透, 櫻井 隆郎, 星野 仁 (東北大院・環境)

L-15 キャピラリー電気泳動におけるタンパク質の分離メカニズム-分子ふるいの細孔サイズとタンパク質サイズ-

○眞弓 皓一<sup>1,2</sup>, 住友 慶子<sup>1</sup>, 増田 光俊<sup>1,3</sup>, 南川 博之<sup>1,3</sup>, 酒井 康博<sup>1,2</sup>, 横山 英明<sup>2</sup>, 清水 敏美<sup>1,3</sup>, 山口 佳則<sup>1,4</sup>, 伊藤 耕三<sup>1,2</sup> (科学技術振興機構 SORST<sup>1</sup>, 東大院・新領域<sup>2</sup>, 産総研・ナノチューブ応用研セ<sup>3</sup>, 阪大フotonics融合研究セ<sup>4</sup>)

L-16 共重合比を異にする高分子電解質のキャピラリー電気泳動

○佐藤 康博, 中村 彰一, 高木 俊夫 (大塚電子 医用・分析機器事業部)

休憩 (10分)

11:00-12:00 一般講演5 座長 田中 喜秀

L-17 トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化(11)

○末吉 健志, 橋場 皇太, 田中 隆太, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

L-18 トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化(12)

○田中 隆太, 橋場 皇太, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

L-19 磁性流体の利用によるマイクロチップ電気泳動の高機能化(4)

○寒川 陵史, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

12:00-13:00 昼休み (60分)

13:00-14:00 依頼講演 座長 久本 秀明

I-2 キャピラリー電気泳動-化学発光検出装置の開発; マイクロチップ上への展開

塚越 一彦 (同志社大・理工)

休憩 (10分)

14:10-14:50 一般講演6 座長 高柳 俊夫

L-20 非水系 CE-希土類錯体時間分解蛍光検出による高感度実用分析システムの開発

○江坂 幸宏<sup>1,2</sup>, 水谷 真理<sup>1</sup>, 石田 由美<sup>1</sup>, 宇野 文二<sup>1,2</sup>, 住友 慶子<sup>3</sup>, 山口 佳則<sup>3,4</sup> (岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐大院連合創薬<sup>2</sup>, SORST(JST)<sup>3</sup>, 阪大院フotonics<sup>4</sup>)

L-21 試薬放出キャピラリーを用いたキャピラリー等電点電気泳動濃縮型高感度イムノアッセイ

○横山 大輝, 片岡 正輝, 八尾 俊 男, 久本 秀明 (阪大院・工)

休憩 (10分)

15:00-15:20 ポスター賞発表・授与式, 閉会挨拶

電気泳動分析研究懇談会委員長 大塚 浩二

15:20-15:30 第30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 江坂 幸宏 (岐阜薬大)

## 特別プログラム

### 1. 特別講演 本館7階 大ホール 11月17日(火) 13:00~16:00

1. 「医薬品分析におけるキャピラリー電気泳動の現状と展望」  
西 博行 (安田女子大学 薬学部)
2. 「キャピラリーチップ電気泳動を用いた全自動免疫測定システムの開発」  
川端 智久(和光純薬・臨床検査薬研究所)
3. 「オンライン前濃縮によるキャピラリー電気泳動法の高感度化と検出限界」  
廣川 健 (広島大学大学院工学研究科)

### 2. 一般学術講演 本館7階 大ホール 11月17日16:10~, 11月18日9:50~, 19日9:30~

### 3. 主題講演 本館7階 大ホール 11月18日(水), 19日(木) 13:00~14:00

1. 塚越一彦(同志社大・理工)...キャピラリー電気泳動-化学発光検出装置の開発;マイクロチップ上への展開(先生は長年にわたり, 化学発光と分離分析を組み合わせた広範な研究をされています。)
2. 掛樋一晃(近畿大・薬)...複合糖質由来生物医薬品の開発からレギュレーションまで -キャピラリー電気泳動が果たせる役割-(糖タンパク質性医薬品のキャピラリー電気泳動や糖鎖解析等に関する様々な研究の成果をご発表いただく予定です)

### 4. 実習 薬学部38号館9階 11月18日(火) 10:00~12:00, 13:00~15:00

今のところ, 一日の実習を予定しておりますが, 参加者数によっては11/19の午前も実施します。

1. 体験! マイクロチップ型電気泳動で簡単バイオ分析 (アジレント・テクノロジーズ)
2. 過渡的等速電気泳動前濃縮を用いた陽イオンの高感度分析 (大塚電子株式会社)
3. キャピラリー電気泳動による医薬品の光学分割 (バックマンコールター)

### 5. 懇親会

場所 : 本館地下食堂

時間 : 11月18日(水) 18:00~20:00

会費 : 5,000円。参加申込の受付は, 当日, 大会総合受付で行います。

## お知らせとお願い

【受付】 11月17日の午前11時30分から本館7階ホール受付で行います。

【参加費】 一般会員 5,000 円, 学生会員 3,000 円。(当日は一般 6,000 円, 学生 4,000 円)  
事前登録された方は, 参加登録証と要旨集引換券をご持参ください。未登録の方は大会受付でお支払いいただき, 参加証, 領収書, ネームカードケース, 講演要旨集をお受け取り下さい。会場では参加証をネームカードケースに入れてご呈示ください。

【懇親会】 会費 5,000 円です。できるだけ参加申込時にご登録下さい。なお, 会場は本館地下食堂です。

### 【演者の方へ】

発表は液晶プロジェクターとノートパソコン(PC)を用いる口頭形式になります。  
PCは各演者をご持参下さい。  
以下の注意事項に従い学会の円滑な進行にご協力頂きますようお願いいたします。

#### 『発表時間』

一般学術講演 : 20 分(発表 15 分, 質疑応答 5 分)  
特別講演・依頼講演 : 60 分(発表 50 分, 質疑応答 10 分)  
・質疑応答時間は特に設けていません。

#### 『ご用意いただくもの』

ノートパソコン 1 台 (併写はできません)  
AC アダプター  
バックアップデータ(USB メモリまたは CD-R に保存されたもの。DVD, MO は不可)

OS はウィンドウズまたはマッキントッシュのいずれかとします。PC の機種や OS のバージョン(XP や Vista 等)は特に指定しませんが, あらかじめ次の環境に合ったもの, 調整したものに限りします。

- ミニ D-Sub15 ピンコネクタによる映像出力が可能なこと。  
会場のプロジェクターの接続用コネクタの形状はミニ D-Sub15 ピンです。外部出力端子が外付となっている場合, 外付装置もご持参下さい。



← ミニ D-Sub15 ピンコネクタ

- MS-PowerPoint 等のプレゼンテーションソフトがインストールされていること。
- **スクリーンセーバーおよび省電力設定が解除**されていること。
- 画面の解像度が **1024 × 768 ピクセルに設定**されていること。  
他の解像度では, プロジェクターで表示されない等不具合の原因になります。
- 十分なメモリが実装されていること。  
多量のカラー映像や動画等をお使いになる場合, 十分なメモリの実装と割り当てを行って下さい。  
PC がフリーズすることがあります。

### 【ポスター発表の方へ】

ポスターボードには縦 210 cm, 幅 90 cm のものを用意しております。最適なポスターサイズは 80 cm × 150 cm 程度です。ポスターは 2 m 以上離れても見えるような大きな活字を用いてください。

### 『当日の発表までの流れ』

#### 発表 1 時間前(早朝は 30 分前)まで

各自、**必ず PC をお持ち下さい**。ご希望の方は受付で、映像を確認できます。

#### 発表 30 分前まで

**各会場の受付**で登録して下さい。

#### 発表前

次演者席にお着き下さい。

また、液晶プロジェクターとの接続コード(未使用のもの)を PC に接続させた後、PC を起動させ、いつでも発表ができるようにスライドショーの状態にしてお待ち下さい。

※ **プロジェクターと接続した後は、PC の電源 OFF やスタンバイモード、休止状態にしないで下さい。また、スピーカーも消音(ミュート)にしてください。**

#### 演者交代～発表

演者交代の間に係員がプロジェクターの表示を演者の PC へ切り替えます。

発表時間終了 **1 分前**および**質疑応答終了時**に、それぞれ予鈴を鳴らします。

発表では**時間厳守**にご協力下さい。

### 【座長の先生方へ】

- ・座長の先生は、ご担当時間の 30 分(早朝は 15 分)前までに、各会場の受付にお越し下さい。
- ・次座長の先生は、ご担当時間の 20 分前までに次座長席にご着席ください。

### 【昼 食】

本館地下食堂および 11 月ホール地下食堂ならびに周辺の飲食店をご利用下さい。

### 【喫 煙】

校舎内は全面禁煙となっております。喫煙はご遠慮ください。

## Current status and perspectives of capillary electrophoresis in the drug analysis

Hiroyuki NISHI

Department of Pharmacy, Yasuda Women's University

### 1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) 装置が国内で市販されるようになってから 20 年が過ぎた。ゲノム解析での「DNA シーケンサー」は、CE と認識されていない点が残念であるが、必要不可欠の装置であり、メタボロミクス研究や覚せい剤・違法ドラッグ分析での CE-MS 法は、有利ということで採用されている。その他は如何であったろうか。医薬品分析では、HPLC が比較的不得意とする高分子化合物、すなわち、タンパク質や核酸塩基 (DNA) の分離分析には有効であることが分り、低分子合成医薬品においても高分離が達成され、有望と考えられた。しかし、日本で CE が品質評価法として HPLC にとって代わったと言う話は聞かない。HPLC における優れた再現性の壁、また、検出感度 (検出限界) の問題も残る。

筆者らは、バラツキにあまりこだわらない試験ということで、純度試験、とりわけ、光学異性体の分離分析について研究を行い、いくつか成果を報告した。その後、一層のマイクロ化を志向したチップ電気泳動、あるいは HPLC とのコラボ的な CEC などで研究が推し進められたが、医薬品評価における CE 法の、国内での実用手法としての利用度は低い。しかし、近年のバイオ医薬品の開発の進展に伴い、CE 法の有用性が明らかとなり、抗体医薬品の品質評価では汎用されていると聞く。また、エナンチオマー分離では HPLC 法より有利である。機器メーカーは、この辺には敏感で、新装置も投入された。本講演では医薬品開発、特に CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) 研究における CE の現状と展望についてまとめて見たい。

### 2. 医薬品の開発とその品質評価

#### 2.1 医薬品分析におけるガイドライン

医薬品の開発における分析を分類すると大きく括って 2 つに分けることができる。一つは、動物を対象とした各種安全性・毒性、また、ヒトにおける薬物の吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) 試験における薬物濃度分析、もう一つは、医薬品の品質を保証するための分析である。今回は、後者品質管理における CE について述べるが、医薬品の品質は、製造 (Good Manufacturing Practice ; GMP と呼ばれる基準) と評価法である「規格及び試験方法」により担保される。「規格および試験方法」は、「医薬品製造指針 2008」に詳しく、具体例としては「日本薬局方 (Japanese pharmacopoeia ; JP)」が参考になる。また、新医薬品であれば、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization ; ICH) で合意されている、品質に関する Q (Quality) パートに様々なガイドライン (特に Q6A と Q6B) がある。

医薬品の品質の担保のための評価方法は、このように厳格に様々な基準に従って設定されるが、個別の試験法として採用されている手法の中心は、クロマトグラフィーである。このクロマトグラフィーは、JP では「一般試験法」というところに詳細に記述されており、いわゆる「公定法」と呼ばれる試験法になる。CE は如何かということ 2005 年、第 14 改正 JP 第 2 追補参考情報で「等電点電気泳動法」、「ペプチドマップ法」などとともに記載された。同第 1 追補参考情報に既記載の「SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法」(SDS-PAGE) とあわせ、参考情報であるが JP に記載され、生物製剤評価やエナンチオマー分離を含む低

分子医薬品の CE 分析 (ミセル動電クロマトグラフィー、MEKC も含む) に対応できるようになっている。なお、試験法は分析法バリデーション (ICH ガイドライン Q2) により、バリデートされればよいわけだが、FDA 公開の分析法バリデーションガイドライン (ドラフト) の中には、CE についての記述もある。

## 2.2 CMC における医薬品分析

医薬品メーカーの CMC 研究部門では、医薬品開発の各ステージ (安全性確認のフェーズ 1 試験、有効性確認の POC (Proof of Concept) 試験 (フェーズ 2a)、用量設定のフェーズ 2b 試験、また、大規模臨床試験であるフェーズ 3 試験等) にあわせて治験薬を製造し、オンタイムに臨床試験に供給することがミッションの一つとなる。これらの品質評価を CMC 分析部門が担当するが、分析部門ではこれらの品質評価のため、試験項目として様々な項目を合理的に設定する。原薬では、定量法と純度試験、とりわけ、分解物や不純物を評価する純度試験 (類縁物質) が重要で、これらの試験には公定法である HPLC を中心としたクロマトグラフィーによる評価法が汎用される。この類縁物質 (あるいは不純物) の中に光学異性体が含まれる。

また、原薬製造法や製剤処方、医薬品開発過程では確立されていないことが多く、CMC では、頻繁な製法改良や他社の製法特許回避法の開発が行われる。それに関連して、測定対象物質の素性 (不純物プロフィール) も変わるので、評価法にはグラジエント溶出法による HPLC 分析が採用されている。対象医薬品の製法が固まり、製法由来の不純物や分解物が決まれば、測定条件の最適化を行い、通常は、この段階で今後の品質管理法を睨んで、イソクラティック溶出の HPLC 分析に試験法が変更される。残留溶媒の評価はもっぱら GC 分析である。

## 3. CE による医薬品分析

### 3.1 エナンチオマー分離

CE の有利性を示せる分野に光学純度測定がある。キラルカラムの開発の進展により、多くの低分子化合物は HPLC で光学異性体分離されるようになったが、どのキラルカラムを使えば分離できるのかは相変わらず難しい問題であり、試行錯誤的に検討をする。高価なキラルカラムを多種類そろえておく必要もある。一方、CE によるエナンチオマー分離では、一般にキラル識別剤 (selector、SO) を泳動液に添加して行う。SO としては、検出 (UV 透過性)、溶解性、種類の多さからシクロデキストリン (CD) 誘導体が使いやすく、また、キラル識別能も優れているため汎用されている。CE エナンチオマー分離では、HPLC のカラム効率 (例えば、理論段数 5000 段) に比べて一般的に分離性能 (100000 段は容易に得られる) が高いので、エナンチオマー間の分離係数  $\alpha$  がわずかであっても (1.02 程度でも) 十分分離が達成されることになる。HPLC では困難で CE のみでエナンチオマー分離された医薬品候補化合物を著者は経験した。更に、開発段階では、エナンチオマー分離の方法論の開発の容易さ (例えば、SO の種類と添加濃度などの最適化) は、絶大な CE の優位性と考える。識別能の優れた硫酸化 CD のキットも市販されている。

CE エナンチオマー分離は、ジャーナルで特集号<sup>1-3)</sup>が定期的に出版されていることから分るように CE の能力が発揮される分野であるが、方法論は、2000 年ごろの総説でまとめてあるものに網羅されており、新規なものは特にない。CEC (キャピラリー電気クロマトグラフィー)、また、マイクロチップ CE 分野が進展しているが、W. Lindner らも 2009 年の総説<sup>3)</sup>で述べているが、CE エナンチオマー分離の中心は、CE (いわゆる CZE) と MEKC であろう。CZE では、新規な添加剤として、相変わらず CD の誘導体の合成と適用が多数報告されている。一方の MEKC でも方法論は同じで、キラルな界面活性剤を用いるか、通常のアキラルなミセル、例えば SDS ミセルにキラルな添加剤を加えることでエナンチオマー分離が達成される。毎年、いくつかの新しいキラルな界面活性剤の合成と CE 適用が報告されている。また、別に、エナンチオ

マー分離における高感度化にフォーカスした総説もあるので参考にされたい<sup>4)</sup>。

### 3.2 バイオ医薬品の糖鎖解析

この10年の動きとしてインターフェロンやエリスロポエチンといったバイオ医薬品、特に、抗体医薬品の開発・実用化が進んだことがあげられる。これら糖タンパク質性医薬品中の糖鎖は、多彩な役割を担っており、その製造・品質管理は極めて重要であるが、付加糖鎖の多様性と糖鎖組成の不均一性は避けられない。この糖鎖解析には、高分離性能を持つCEが有効である。エリスロポエチンでは、CZEによるグライコフォーム（糖鎖多様性）分析の検討が、早くも1999年に全世界13箇所のラボで行われている。この共同作業を受ける形でEPの従来法であるスラブゲル等電点電気泳動(IEF)に変わる確認試験法としてCZEの試験法が提案されている。従来法と比較して、多くのグライコフォーム（8種類）が分離されていることや、感度、精度もよく、また、自動化が可能であることから、2002年にはEPに収載された<sup>5)</sup>。2008年には、キャピラリーIEF(cIEF)で、検出にCCDカメラを用いる手法により、迅速な（12分以内）エリスロポエチンのグライコフォーム分析が報告されている<sup>6)</sup>。

抗体医薬品の基本構造は、免疫グロブリン(IgG)と相同性を有する糖タンパク質であり、糖鎖を有する2分子の重(H)鎖と糖鎖を持たない2分子の軽(L)鎖からなる。これらを従来法であるSDS-PAGEで分析すると、H鎖とL鎖は明瞭に分離評価されるが、その他の糖鎖の有無や不均一性は評価できない。これをキャピラリーSDSゲル電気泳動(CE-SDS)で行うと、CEの持つ、簡便性、再現性、自動化、数値化等のメリットが得られる。特に、還元・非還元状態での分析を行うことで、糖鎖の有無やL鎖の脱落などが評価でき、数値化もできることから、これら抗体医薬品の品質管理で極めて有力な評価法となっている<sup>7)</sup>。

一方、糖鎖の含量が低い場合は、糖鎖をPNGase F等の酵素を用いて切り出して、分離分析を行う。切り出した糖鎖は、蛍光試薬等でラベル化した後、HPLCあるいはCEで分離を行う。蛍光誘導体化試薬としては、2-アミノピリジン(2-PA)、2-アミノ安息香酸(2-AA)、3-アミノ安息香酸(3-AA)、8-アミノピレン-1,3,6-トリスルフォネート(APTS)等が用いられている。CE(レーザー蛍光検出)の方が感度や迅速性の面で勝っているように思われ、この分野での評価法として普及するものと考えられる。なお、抗体医薬品などの糖タンパク質性医薬品のCEによる品質評価や糖鎖分析(糖鎖構造解析)の現状については、Kamodaらの総説に詳しいので参照されたい<sup>8,9)</sup>。抗体医薬ではないが、多糖類であるヘパリンナトリウムに関して、安全性の問題が昨年起こり、原料に含まれていた過硫酸化コンドロイチン(over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS)が原因物質であることが分った。このOSCSの評価にCE法は有効である<sup>10,11)</sup>。

### 3.3 代替法

医薬品の品質評価法には、上述のようにほとんどHPLCが採用されており、CEがHPLCに変わって採用される可能性は低い。しかし、その中で有望と考えられるものとして、代替法としての位置づけのCEがある。これはICHガイドラインQ6Aの「2.7代替法(Alternative procedures)」に規定されているが、以下のような例が示されている。「製造工程で原薬が分解しないことが確認されている錠剤の出荷試験には、承認申請書記載の方法がクロマトグラフ法であっても、吸光度法を用いてもよい」。現在の欧米での医薬品のCE

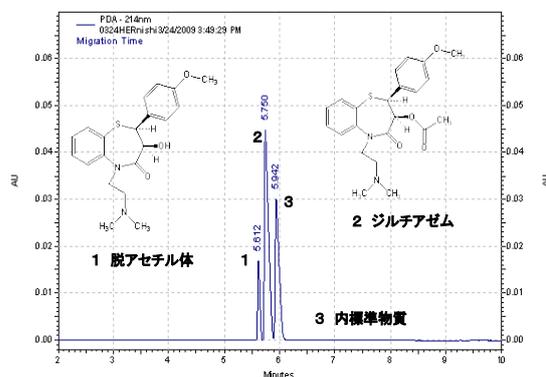


Fig.1 Separation of diltiazem and its desacetyl form by CZE. Capillary, 75 $\mu$ m x 60cm (effective,50cm), 25 $^{\circ}$ C, +30kV, 214 nm, 20 mM phosphate buffer (pH 2.5), 1mg/mL, 0.5psi, 5s.

分析法の普及には、この代替法としての利用がある。CE では溶媒は原則、用いない。また、消費量も極めて少量である。グリーンアナリシスの観点から、HPLC で設定した評価法を CE で置き換えることは、医薬品メーカーの品質評価部門として取り組むべきと考える。最適化はしていないが、図1に pH2.5 のリン酸塩緩衝液のみによるジルチアゼムとその主分解物（かつ不純物、代謝物）の分離を示す。

### 3.4 低分子医薬品の定量法、確認試験および純度試験

医薬品分析では、その有効成分の含有量を測定する定量法と不純物量を評価する類縁物質試験が重要であるが、いずれも CE で可能である。定量法では適切な内標準物資を用いることで精度よく、定量することができる。溶媒フリーの定量法を設定できることが多く、メリットがある。上述したが代替法としての採用が期待される。また、医薬品では「確認試験」という試験項目を試験規格に盛り込む。原薬であれば IR スペクトルを、製剤では UV スペクトル法を用いることが多い。一方、複合製剤の場合は、配合成分個別に特異的な確認試験法を設定するか、また、分離分析法での一斉確認法を採用する。この場合は、原則、定量法として採用した HPLC とは異なる方法で設定することになるので、やはり、溶媒フリーである CE による一斉多成分の確認試験法は適している。純度試験については、エナンチマー分離のところ述べたが、検出感度の問題がクリアできていれば、CE に適した試験項目である。CE では通常用いられている UV 検出で低波長の 200 nm を採用できるので、多くの有機化合物をある程度の感度で測定できる。CE による医薬品の純度試験に関する報告も多く、Kenndler らの総説に詳しい<sup>12)</sup>。

## 4. おわりに

CE でなければできない分析法といったところに CE の活路があるのは間違いない。DNA シーケンサーや CE-SDS による抗体医薬分析では、従来法がゲル電気泳動法であったことからすんなり CE に移行し、CE はなくてはならない手法となった。CE エナンチオマー分離は日本でもっと利用されてよい。また、環境問題の重要度はますます大きくなっている。代替法という考え方をもっと浸透させ、溶媒フリーである CE 法による定量法や確認試験を、日常分析として用いる努力を一層すべきと考える。

## 文献

- 1) Chankvetadze, B., Fanali, S., Eds., *Electrophoresis*, 24(15) (2003).
- 2) Gubitz, G., Schmid, M.G., *Electrophoresis*, 28, 114-126 (2007).
- 3) Preinerstorfer, B., Lammerhofer M., Lindner, W., *Electrophoresis*, 30, 100-132 (2009).
- 4) S-Hernandez, L., Crego, A.L., G-Ruiz, C., *Electrophoresis*, 29, 237-251 (2008).
- 5) *European Pharmacopoeia* 4, 1316, 1123-1128 (2002).
- 6) Dou, P., Liu, Z., He, J., Xu, J.-J., Chen, H.-Y., *J.Chromatogr.A.*, 1190, 372-376 (2008).
- 7) 新井悦郎、*生物物理化学*、52、139-144、(2008).
- 8) Kamoda, S., Kakehi, K., *Electrophoresis*, 27, 2495-2504 (2006).
- 9) Kamoda, S., Kakehi, K., *Electrophoresis*, 29, 3595-3604 (2008).
- 10) [http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin\\_a\\_new\\_capillary\\_electrophoresis\\_method.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_a_new_capillary_electrophoresis_method.pdf)  
欧州医薬品品質管理理事会 (EDQM) HP。
- 11) 掛樋一晃ほか、*日本薬学会第 129 年会発表データ* 26Q-pm008 (2009).
- 12) Jouyban, A., Kenndler, E., *Electrophoresis*, 29, 3531-3551 (2008).

# S-2 キャピラリチップ電気泳動を用いた全自動免疫測定システム の開発

【和光純薬工業株式会社】 ○川端 智久

## **Fully-automated immunoassay system using on-chip capillary electrophoresis.**

Tomohisa KAWABATA

*Wako Pure Chemical Industries Ltd.*

### **Abstract**

A quantitative, rapid, microfluidic immunoassay was recently developed. The highly charged DNA attached on antibody contributed to sharpening the immunocomplex peak during CGE, resulting in higher S/N. An electrokinetic analyte transport assay method (EATA) with using DNA coupled antibody enabled on-chip reaction and concentration of reaction products by Isotachophoresis prior to separation by Capillary Gel electrophoresis. The reagents and sample were precisely aliquot by loading into capillary zones by pressure. Using this EATA format, we demonstrated an AFP-L3 assay on polymeric, disposable chips with good performance. AFP-L3 and DCP (called PIVKA II in Japan) are known serum biomarker for HCC (hepatocellular carcinoma). In order to implement this assay in the clinical setting, we developed a fully-automated system and characterized its performance.

### **【緒言】**

1990年、試薬混合、反応、分離及び、検出行程を一片数センチ角のチップ上に集積化して分析を行う Micro Total Analysis System ( $\mu$ TAS) の概念が提唱された。この概念の実用化は分析試薬量の低減、分析時間の短縮化、分析省スペース化というニーズに大きく貢献できると考えられている。そこで我々は、オンチップキャピラリ電気泳動技術を分離原理として  $\mu$ TAS 概念に基づく免疫反応測定システムの実用化を行った。

キャピラリチップ電気泳動による生体成分の分析において、その電気泳動的均一性と取り扱いやすさから核酸分析システムの実用化が先行した。一方、免疫反応を用いたタンパク質分析においては、測定感度及び、再現性の面から実用化レベルに達していなかった。これは、糖鎖修飾等の違いにより同一タンパク質であっても電気泳動的にヘテロな挙動を示し、電気泳動時のピーク形状がブロードになるためであった。この問題を解決するために、我々は検出目的タンパク質に特異的に結合する抗体分子に DNA 分子が結合した DNA-抗体ハイブリッド分子を利用することによってタンパク質の電気泳動挙動を改善し、タンパク質定量検出感度の向上を実現した。

次に、キャピラリ中でのサンプルと試薬の混合及び免疫反応の迅速化と再現性の向上が実用化に向けて課題となった。我々はキャピラリチャンネル構造の工夫により分析に使用するサンプル・試薬量をキャピラリ容量で規定し且つ、等速電気泳動で DNA-抗体ハイブリッド分子を濃縮させながら検出目的タンパク質と反応させる Electrokinetic Analyte Transport Assay 法 (EATA 法) を開発してさらなる高感度化と再現性の向上を実現した。

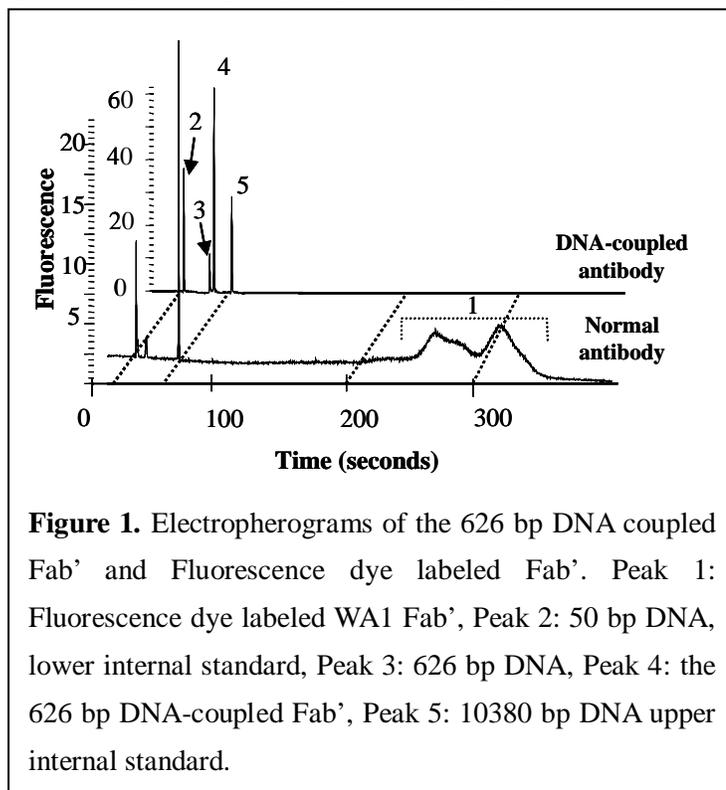
これら、新たに開発した技術をベースに全自動免疫測定システムの開発を行い、肝癌マーカーである  $\alpha$ -フェトプロテイン L1/L3 (AFP-L1/L3) 及び、PIVKA II 定量検出の実用化を行った。

### 【キャピラリ電気泳動における DNA-抗体ハイブリッド分子の効果】<sup>[1]</sup>

DNA は 1 塩基毎にマイナスチャージを持つ分子で且つ、鎖長のコントロールが容易であり電気泳動的に均一な分子である。そこで多価チャージを持つ DNA 分子を抗体に結合させて分子全体としての電氣的バリエーションを少なくすることにより、電気泳動挙動の改善を試みた。

DNA 分子を結合させた抗体及び、DNA を結合させていない抗体を同一のキャピラリチップ電気泳動条件で分析した結果、抗体のピークは非常にブロードで大きく 2 つに分かれていた (Figure1 Peak1)。しかしながら、626bpDNA を同一の抗体に結合させた DNA-抗体ハイブリッド分子のピークは非常にシャープでそのピーク形状は DNA 分子のそれと同等であった (Figure1 Peak4)。また、この DNA-抗体ハイブリッドを用いた免疫複合体も同様に良好なピーク形状となった。さらに、免疫複合体は検出目的タンパク質の結合によりピーク移動度がシフトするため未反応 DNA-抗体ハイブリッド分子ピークとの分離が可能であった。

以上のことから、DNA - 抗体ハイブリッド分子がキャピラリ電気泳動における免疫反応分析に有効であることが分かった。



**Figure 1.** Electropherograms of the 626 bp DNA coupled Fab' and Fluorescence dye labeled Fab'. Peak 1: Fluorescence dye labeled WA1 Fab', Peak 2: 50 bp DNA, lower internal standard, Peak 3: 626 bp DNA, Peak 4: the 626 bp DNA-coupled Fab', Peak 5: 10380 bp DNA upper internal standard.

## 【Electrokinetic Analyte Transport Assay 法 (EATA 法)】<sup>[2]</sup>

EATA 法はキャピラリチャンネル構造の工夫によりサンプル、試薬、電気泳動ゾーン形成を行い、等速電気泳動により DNA-抗体ハイブリッド分子を濃縮させながらキャピラリチャンネル中でサンプルとの混合反応を行う方法である。形成される免疫反応複合体も結合している DNA 分子の効果及ぶことにより等速電気泳動濃縮されることから、検出の高感度化が可能となる。

Figure2 は EATA 法で使用されるキャピラリチャンネル概略図を示している。

等速電気泳動を行うための Trailing Buffer (TB ウェル)、Leading buffer (LB/ST ウェル)、免疫反应用 DNA-抗体ハイブリッド分子 (DW ウェル) 及び、サンプル (SW ウェル) を所定のウェルに添加後、全 Waste ウェル (WW ウェル) に陰圧を印加すると電気泳動方向上流から Trailing buffer、DNA-抗体ハイブリッド、サンプル、Leading buffer の順でゾーンが形成される。

TB ウェルと LB ウェルに電界を印加すると DNA-抗体ハイブリッドが等速電気泳動の原理により濃縮されながら、下流のサンプルゾーン中を移動する。この時、DNA-抗体ハイブリッド分子とサンプル中の検出目的タンパク質との間で免疫複合体が形成される。免疫複合体が Handoff junction に泳動された時点で陰極を TB ウェルから HO ウェルに切替えることにより等速電気泳動モードからゲル電気泳動モードに切替え、免疫複合体の分離検出を行う。最終的に電気泳動分離された免疫複合体分子は下流の蛍光検出器で検出される。

EATA 法による再現性は CV=2-3% (N=15) と非常に優れた再現性を示した。キャピラリチャンネル内で形成させたゾーン容量で使用するサンプル・試薬量を規定できること及び、DNA-抗体ハイブリッド分子を高濃度に濃縮させることによる反応効率の向上が大きな要因であると考えられる。また、印加する電界を調節することによって反応効率を調整できることも特徴の一つである。

以上のように、EATA 法は試薬とサンプルを微細流路中で混合反応させることができるとともに、Trailing イオンと Leading イオンの選択によっては、続くゲル電気泳動分離チャンネルに導入する必要のない分子をある程度排除できるというメリットを持ち合わせる有効な方法である。

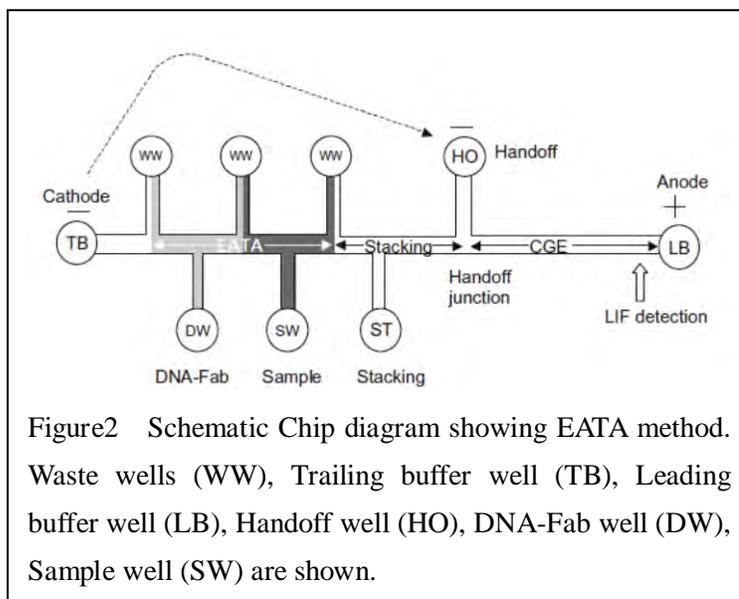
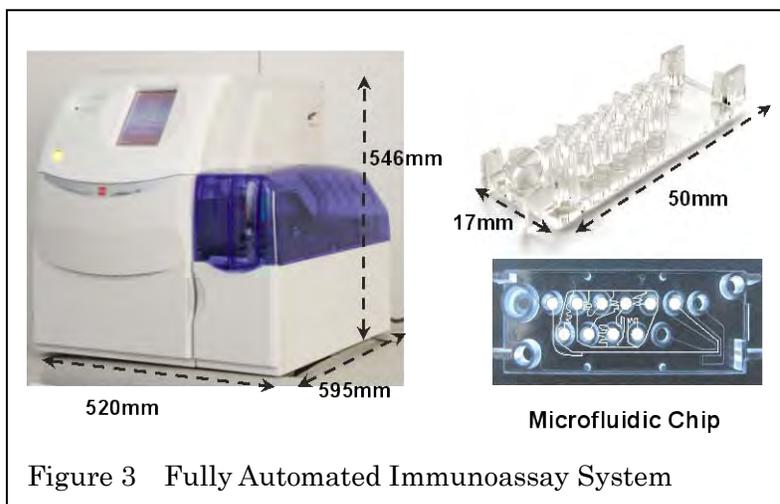


Figure2 Schematic Chip diagram showing EATA method. Waste wells (WW), Trailing buffer well (TB), Leading buffer well (LB), Handoff well (HO), DNA-Fab well (DW), Sample well (SW) are shown.

### 【全自動免疫測定システムの開発】<sup>[3]</sup>

前述の新規に開発した DNA-抗体ハイブリッド分子及び、EATA法をベースに全自動免疫測定システムの開発を行った(Figure 3)。装置は高さ 546mm、横幅 520mm、奥行き 595mm ベンチトップ型コンパクトサイズとなっている。搭載可能試薬数は 6 試薬でランダムアクセス可能である。測定開始から結果打ち出しまでは約 9 分と従来の免疫測定装置に比べて速く、スループットは約 25 アッセイ/時間となっている。



検出感度は 0.1pM レベルと高感度で、定量直線性は  $10^4$  程度と広い。また、測定再現性は CV%=0.3-1.5% となり免疫測定システムとしては既存のシステムより高い測定再現性を示す。

現在、臨床検査薬として AFP、AFP-L3%、PIVKA II について実用化されているが、今後さらに測定項目を拡大する予定である。

### 【文献】

- [1] Kawabata, T., Watanabe, M., Nakamura, K., Satomura, S., *Anal. Chem.*, 2005, 77, 5579-5582.
- [2] Kawabata, T., Wada, H., Watanabe, M., Satomura, S., *Electrophoresis* 2008, 29, 1399-1406.
- [3] Kagebayashi, C., Yamaguchi I., Akinaga A., Kitano H., Yokoyama K., Satomura M., Kurosawa T., Watanabe M., Kawabata T., Chang W., Li C., Bousse L., Wada H., Satomura S., *Anal. Biochem.*, 2009, 388, 306-311

# S-3

## オンライン前濃縮によるキャピラリーゾーン電気泳動法の高感度化と検出限界

【広島大学大学院工学研究科 物質化学システム専攻 応用化学】

○廣川 健

### High-sensitive analysis by CZE using on-line preconcentration and the limit of detection

Takeshi HIROKAWA

*Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

#### Abstract

Electrokinetic supercharging preconcentration (electrokinetic injection [EKI] with transient isotachopheresis [tITP]) is effective for high-sensitive analysis of ions by CZE. Strategy of optimizing EKS preconcentration method to obtain high sensitivity was discussed from a theoretical view point, together with those of the other preconcentration method like tITP. We have found that the distance between the electrode in sample reservoir and the capillary-end was very crucial in EKI process to obtain high sensitivity. The LOD of lanthanide ions could be improved to a ppt level by adopting appropriate configuration.

#### 【はじめに】

キャピラリーゾーン電気泳動法（CZE）の濃度感度向上にオンライン前濃縮が有効であることは良く知られており、各種の方法が紹介されている[1]。我々は過渡的等速電気泳動と電気的注入を組み合わせ、動電加給前濃縮法（Electrokinetic supercharging preconcentration, EKS）と呼ぶ方法を報告した[2]。最近では EKS 過程のコンピューターシミュレーションによる結果を考慮し、電極とキャピラリー末端の距離を遠ざけ、かつ比較的大量の試料を使用することにより、UV 間接吸収法でサブ ppb レベルの希土類イオンの検出に成功し、検出下限濃度としては Er で 20ppt (120 pM) を得ている[3]。この結果より EKS-CZE により、希薄水溶液中金属陽イオンについては ICP-AES はもとより、ICP-MS に迫る検出限界を得られる可能性が示唆された。

本講演では、EKS-CZE に関する最近の進歩を中心に、CZE の検出限界、過渡的等速電気泳動前濃縮(tITP)や EKS の濃縮原理等について、シミュレーションの結果を含め報告する。

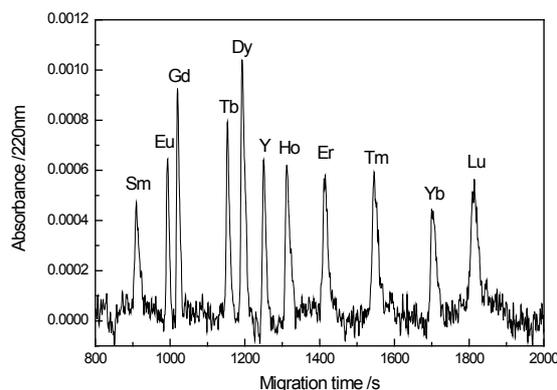


図1.EKSによる希土類標準試料(0.1ppb, 500 uL)のフェログラム：電極-キャピラリー末端間19.5mm、injection, 10 KV, 250 s

### 【実験】

使用した電気泳動装置は CAPI-3200 (大塚電子) である。シリカキャピラリーは全長 50cm、有効長 37.7cm、内径 75  $\mu$ m である。キャピラリーチャンバー内の温度は 25°C に設定した。試料は希土類標準試料 (K, Na, Li, La, Nd, Sm, Gd, Y, Er, Yb 等の塩化物) で、濃度範囲は 0.25nM から 25nM である。検出には間接 UV 法を用いた。支持電解液としては 10mM 4-メチルベンジルアミン (UV 可視化剤), 4mM HIBA, 0.4mM マロン酸, 0.1% HPC を含む水溶液を、2-エチル n 酪酸で pH4.8 に調整して使用した (超純水は、Milli-Q water)。コンピューターシミュレーションには CFD-ACE+ (ver. 2006, CFDRC, AL, USA) を用いた。

### 【結果と考察】

シミュレーションによると、EKS 過程で導入されるのは電極とキャピラリー末端間の試料イオンのみであり、通常の配置 (電極とキャピラリー末端間距離、約 1mm) では試料リザーバー中にながりの試料イオンが残る。これは、EKS 過程における試料イオンの電気泳動速度に比べて、試料イオンの拡散速度がかなり遅いためと考えられる。実際、試料体積を 500  $\mu$ l から 17ml に増加させても、ピーク面積は約 3 倍になるのみであった (EKS 250 s)。そこで、サンプルリザーバー上部にリング状の白金電極を、下部にキャピラリー末端を配置し測定したところ、EKS 60 s でもピーク面積は約 5 倍となった。また、従来の配置で長時間試料導入すると、巨大なシステムピークが現れ試料ピークを妨害したが、新しい配置ではシステムピークが遅れ、長時間の導入が可能になった (EKS 300 s)。このシステムピークは、EOF によってのみ移動し、希薄な試料を使用する EKS 系に特有な、自動的に発生するターミナルゾーンで、高い濃縮度を得る上で非常に重要な役割を果たしている。

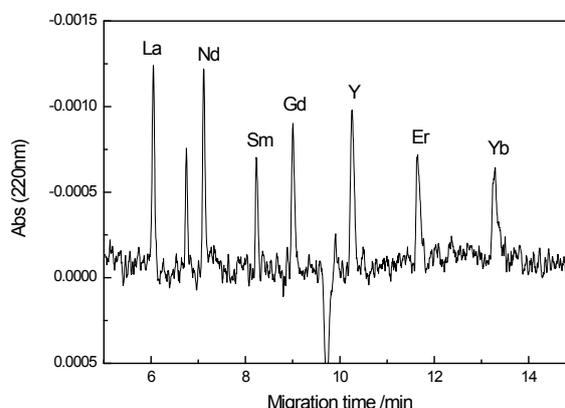


図 2. 各 0.25nM (約 40ppt) の希土類標準試料の EKS-CZE による分離 (EKS 20kV 300 s) リング電極、試料体積 17 mL、試料導入中攪拌。

リング電極を使用し、EKS 中に試料を攪拌したところ、より有効に試料イオンが導入でき、希土類試料で検出濃度下限が Er で ppt レベルとなる高感度分析が可能になった (図 2)。この感度は ICP-MS に比肩できる。EKS-CZE は中性近傍の希薄試料には非常に有効な方法であり、純水の純度評価や飲料水の分析などに適している。ただし、試料中にマトリックス成分が大量に存在する試料では、対象となる試料イオンの輸率が低下するため、感度は劣化する。特に H<sup>+</sup> は移動度が大きいので、溶液の pH が 4~5 程度でも試料濃度によっては導入効率にかなり影響があることに注意する必要がある。このような試料には EKS が本質的に適さず、tITP を適用する必要がある。講演では試料の性質に応じた濃縮法の使い分けについても報告する。

### 【参考文献】

- 1) Breadmore, M.C., *Electrophoresis*, 28, 254-281 (2007)
- 2) T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš : *Electrophoresis*, 24, 498 (2003)
- 3) T. Hirokawa, E. Koshimidzu, Zhongqi Xu, *Electrophoresis*, 29, 3786-3793 (2008)

# I-1

## 複合糖質由来生物医薬品の開発からレギュレーションまで

### —キャピラリー電気泳動が果たせる役割—

【近畿大・薬】 掛樋 一晃

## Capillary electrophoresis for the analysis of biopharmaceuticals from development stage to regulation

Kazuaki KAKEHI

*School of Pharmacy, Kinki University*

Based on advances in biotechnology over recent decades, the development of biopharmaceuticals such as monoclonal antibody pharmaceuticals has rapidly generated a source of particularly promising molecular targeting drug groups as tailor-made medicines. This presentation focuses mainly on the application of capillary electrophoresis of carbohydrates in glycoprotein pharmaceuticals, especially antibody pharmaceuticals. In addition, recent topics on heparin affairs are also shown. Glycosaminoglycans having highly negative charges were successfully evaluated by CE. And we proposed a CE method for the analysis of the contaminated oversulfated chondroitin sulfate in heparin preparations, which causes anaphylactic shock in USA and Europe.

エリスロポエチンや抗体医薬品をはじめとする糖鎖を含むタンパク質性バイオ医薬品は、本質的に分子多様性を持つことから、開発・品質管理・安定性評価そして市販におけるレギュレーションなどの各段階で高度な分離分析技術が必要とする。また、最近ヘパリン製剤中に混入された過硫酸化コンドロイチン硫酸により多数の死者が報告されたヘパリン事件は、生物由来の医薬品に故意に化学合成物を添加した疑いが持たれ、局方などの公定書に記載された試験法では対応できないケースとして、各国に衝撃が広がった。

上記のような流れを受けて、日米欧三極の医薬品規制当局はバイオ医薬品の評価に対応できる試験法の調和を目指し、アミノ酸分析法、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法そしてキャピラリー電気泳動法などが第 15 改正日本薬局方参考情報として収載された。

我々は、これまで複合糖質中の糖鎖の分離分析に従事し、キャピラリー電気泳動を利用して癌細胞中に存在する糖タンパク質中の糖鎖の網羅解析に従事してきた。また、これらの成果により生まれた技術を糖タンパク質性医薬品類の品質評価に適用するための実用化研究を実施してきた。本発表では、最近我々が報告した抗体医薬品の糖鎖解析およびヘパリン製剤の品質評価に関する結果を中心に、キャピラリー電気泳動法がバイオ医薬品の開発から上市後のレギュレーションに至るさまざまな局面において果たせる役割を紹介する。

### 抗体医薬品

昨今のバイオテクノロジーの技術進展により、モノクローナル抗体(mAb)は癌やリウマチに対する適応などが期待され、世界各国で激しい開発競争が進められている。Wang らの報告 (J. Pharm. Sci.(2007)) によれば、米国で承認済みの mAb 医薬品は 23 品目を数え、更に 200 以上の品目が現在開発中である。

mAb 医薬品は通常 CHO(Chinese hamster ovary)細胞などの哺乳類の細胞株を用いて生産され

るため、しばしば生産に使用する細胞株やその培養条件により独特な糖鎖修飾を受ける。このような糖鎖修飾は、タンパク質の安定性やリガンドの結合性、抗原性あるいは血中半減期などに影響を及ぼす可能性があり、mAb 医薬品中の糖鎖の恒常性を担保するために規制当局からその詳細な解析が求められている。

典型的な IgG 分子は 2 本の重鎖 (HC) と 2 本の軽鎖 (LC) がジスルフィド結合によって結合し、HC 中のそれぞれの Fc 領域に 1 本の N-型糖鎖が結合している。これらの糖鎖は一般に 2 本鎖の複合型糖鎖であるが、抗体分子 (分子量約 150000) のうちの約 3% を占めるにすぎない。しかし、抗体中の糖鎖の存在は抗体の活性発現に極めて重要であることが明らかにされつつある(1,2)。

糖タンパク質などの複合糖質中の糖鎖の解析については、1990 年代は誘導体化を必要としない高性能陰イオン交換クロマトグラフィーとパルスアンペロメトリック検出器を組み合わせる糖鎖解析法がしばしば利用されてきた。しかしながら、糖鎖に対する検出器のレスポンスが異なることや保守管理の煩雑さなどから、蛍光標識を利用する HPLC が汎用されるようになった。

レーザー励起蛍光検出装置を装備したキャピラリー電気泳動法 (CE-LIF) は極めて高い分離能と高感度分析を可能にする技術であり、我々は 8-aminopyren-1,3,6-trifulfonate (APTS)、3-aminobenzoic acid(3-AA)、2-aminobenzoic acid(2-AA) 等の蛍光標識試薬を用いる糖タンパク質糖鎖解析法を開発・検討し、CE による糖鎖解析に基づく抗体医薬品の評価について検討した。

すなわち、糖鎖が付加した HC と糖鎖が付加していない HC の比率をあらかじめ CE-SDS により求め、その後 IgG に含まれる主要な糖鎖ならびに細胞株や培養条件の変化などが顕著に反映されると考えられるマイナー成分である高マンノース型ならびに混成型糖鎖などの精密解析を CE、HPLC および MS を駆使して実施した。

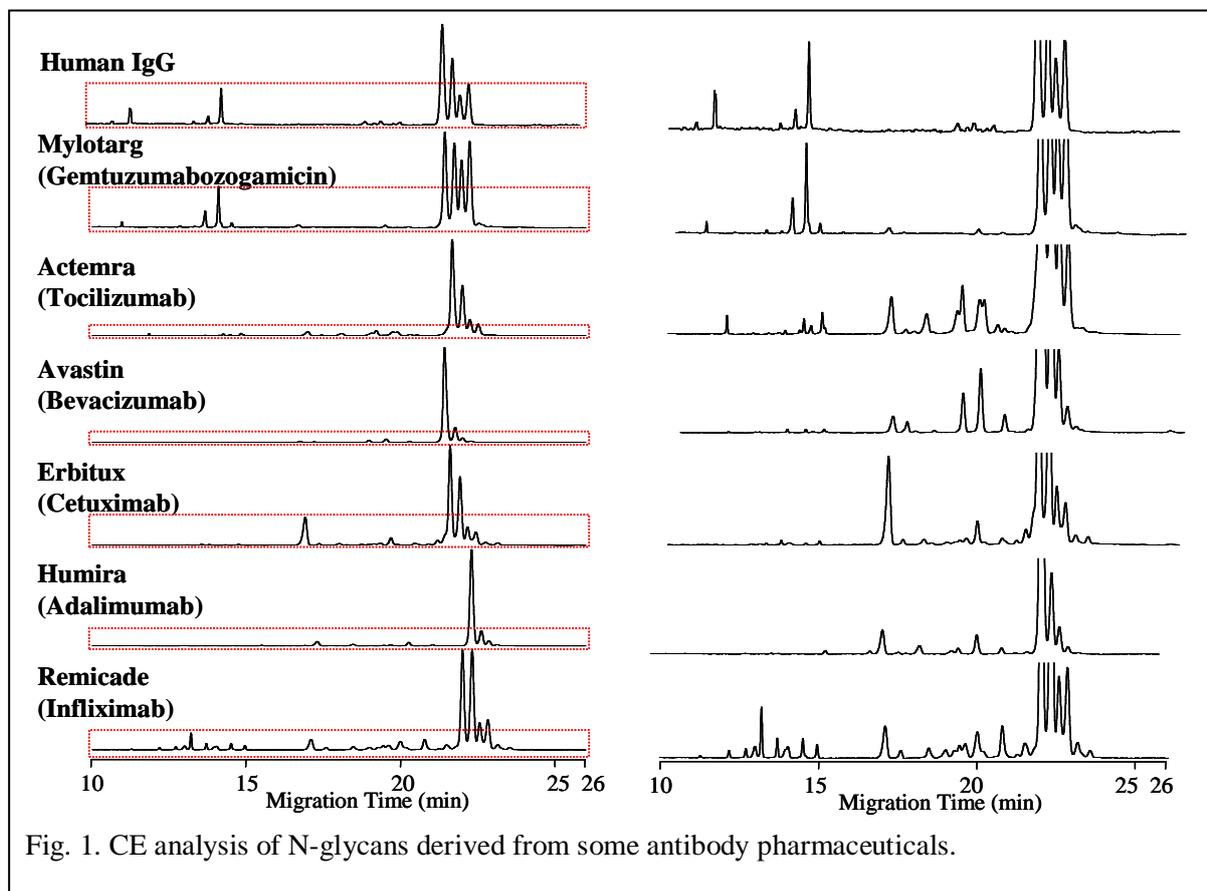


Fig. 1. CE analysis of N-glycans derived from some antibody pharmaceuticals.

Fig. 1は、市販されているいくつかの mAB 医薬品中の糖鎖を解析した結果である。参考のために、試薬として市販されているヒト IgG の糖鎖の分析結果も示した。図に示すように、6種類の抗体医薬品の糖鎖を調べたが、製品ごとに糖鎖は顕著なバリエーションを示した。CE を利用するこれらの糖鎖の分析のバリデーションを行った結果、実用上全く問題がないことがわかった。

## ヘパリン製剤

ヘパリンナトリウムは、ウロン酸 (L-イズロン酸または D-グルクロン酸) と D-グルコサミンの 2 糖単位の繰り返し構造に、2 糖あたり平均 2~3 個の硫酸基を持つ構造からなる硫酸化グリコサミノグリカンのナトリウム塩である。ヘパリンナトリウムは血液透析などの体外循環装置使用時の血液凝固防止剤として世界中で汎用されるなど、臨床上極めて重要な医薬品であり、第 15 改正日本薬局方に記載されている。

2007 年 12 月米国において、Baxter 社製ヘパリンナトリウム製剤の静脈内急速大量投与を受けた患者に、血圧低下や頻脈等を伴うアレルギー反応が頻発し、80 名以上の死亡例が報告された。これまでヘパリン関連製剤に関して、血小板減少症などの副作用が知られていたが、今回発生した副作用はこれまでの報告例とは明らかに異なるものであった。さらに、ドイツでも別メーカーが製造したヘパリンナトリウム製剤の投与を受けた患者に同様のアレルギー反応が見られたことから国際的な問題へと発展した。2008 年 3 月、米国食品医薬品局 (FDA) は有害事象が多発したロットにヘパリン様物質が混入していることを発表し、後に Guerrini らによる 2 次元 NMR などを用いる構造解析によって、このヘパリン様物質は化学的に合成された過硫酸化コンドロイチン硫酸 (oversulfated chondroitin sulfate; OSCS) であることが明らかにされた。通常、天然に存在するコンドロイチン硫酸は、D-グルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンの 2 糖単位の、硫酸基が 1~3 個結合している。しかし、問題のヘパリンナトリウム製剤に混入していた OSCS は、コンドロイチン硫酸中のすべての水酸基が硫酸化され 2 糖単位中に硫酸基が 4 個結合した構造であった。また、有害事象を引き起こしたヘパリン

ナトリウム中には、OSCS に加えて、同じ硫酸化グリコサミノグリカン類の一種であるデルマタン硫酸 (dermatan sulfate; DS、別名; コンドロイチン硫酸 B) も、従来の製品よりも多量に含まれていることが明らかにされた。

我が国でも、問題のヘパリンナトリウム製剤と同じ原薬を使用した国内 3 社が予防的措置として自主回収をおこなった。そのため、世界的にヘパリン関連医薬品の供給不足への懸念が広がり、ヘパリンナトリウム製剤の安定供給のために、ヘパリンナトリウム原料中の OSCS 及び DS の試験法の整備が緊急課題となった。我々はヘパリンナトリウム製剤の品質・安全性確保を目的として、キャピラリー電気泳動法による試験法を確立すると共に、分析法のバリデーションを実施し、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験としての適用可

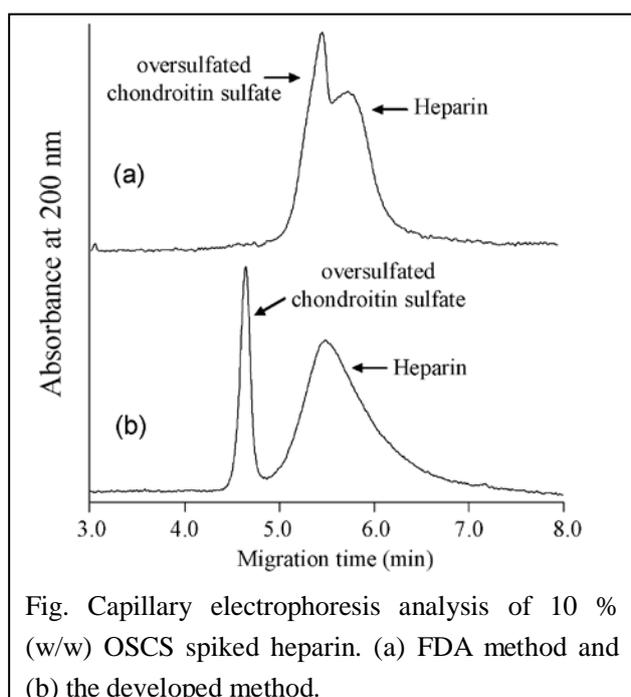


Fig. Capillary electrophoresis analysis of 10 % (w/w) OSCS spiked heparin. (a) FDA method and (b) the developed method.

能性を検証した(3)。Fig. 2に我々が設定した条件で実施したCE分析の結果を示す。a)はFDAがWebで公開した初期の条件であり、b)は我々が設定した分析条件である。OSCSおよびヘパリンは不均一性が高く、かつ極めて負電荷の高い多糖であるため、高濃度の酸性緩衝液を使用するとともにキャピラリーの内径を50  $\mu\text{m}$  から25  $\mu\text{m}$  に変更して分析中に流れる電流量を抑制して分析を実施した。さらに、用いる塩を比較的電気伝導度が低いトリスに変更することで電流値を抑制した。高濃度で低pHの緩衝液を使用するため、緩衝能の低下の恐れがあるが、繰り返し分析でも高い再現性を与え分析上問題はなかった。加えて、安定に分析を実施するために定電流モード(50  $\mu\text{A}$ )で泳動することとした。

ヘパリンナトリウムは従来生物活性を指標としていたために、精製が十分でないために原料に由来するDSがしばしば含まれる場合がある。DSが混入したヘパリン製剤を投与することによりもたらされる効果については現在議論されているところであるが、我々はヘパリンナトリウム中に存在するDSにも対応できるCEの分析条件について検討し、OSCS用に設定したヘパリンナトリウムの分析条件を若干変更することにより、高い精度でDSを分析することに成功した。

本発表では、昨今の生物医薬品、特に糖タンパク質やプロテオグリカンなどの複合糖質医薬品について、従来薬局方などの公定書に記載されている試験法では対応できない成分を、CEにより解析できることの意義を紹介した。アメリカやヨーロッパでは、産官学が合同で研究会を開催し、CEによる生物医薬品の試験法を医薬品開発に積極的に取り込んでいくための活動が行われている。最近のトピックとしてはゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲット)に代表される抗体に抗癌剤を結合させたバイオ医薬品の品質評価法として、マイクロチップフォーマットの等電点電気泳動装置を適用する研究成果が目立つ。

CEとしばしば対比される高速液体クロマトグラフィーは、なお医薬品の分離分析において主要な役割を果たしているが、CEが生物医薬品の分野で果たせる役割は重要であり、その簡便性や感度の面から国内でも産官学の連携による試験法の研究などが期待される。

## 引用文献

- (1) Kamoda, S., and Kakehi, K. Electrophoresis, 2008, 29, 3595 – 3604.
- (2) Kamoda, S., Ishikawa, R. and Kakehi, K. J. Chromatogr. A. 2006, 1133, 332 – 339.
- (3) 梶 直孝、木下 充弘、川崎 ナナ、山口 照英、早川 堯夫、掛樋 一晃、薬学雑誌、2009、印刷中。

# I-2

## キャピラリー電気泳動-化学発光検出装置の開発；

### マイクロチップ上への展開

【同志社大・理工】○塚越一彦

## Development of Capillary Electrophoresis—Chemiluminescence

### Detection System; Application to Micro-chip

Kazuhiko TSUKAGOSHI

*Faculty of Science and Engineering, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan*

#### Abstract

The author has studied capillary electrophoresis (CE)-chemiluminescence (CL) detection system. Various types of the CL detection cells for CE were developed, including flow- and batch-type cells. The author took advantage of several CL reagents such as luminol, peroxyoxalate, ruthenium(II) complex, and 1,10-phenanthroline in the system, and also introduced several separation modes such as micellar electrokinetic chromatography, capillary isoelectric focusing, and capillary gel electrophoresis to the system. Consequently, a variety of analytes including amino acids, peptides, proteins, saccharides, nucleic acids, nucleosides, metal ions, metal complexes, alkaloids, fluorescence compounds, fluorescence compound-including liposomes, and phenolic compounds were analyzed by means of CE-CL detection system. The system provided excellent selectivity and sensitivity. The sensitivity of the system was better than those of absorption and fluorescence detection systems; for example, the detection limit for luminol was  $1.5 \times 10^{-11} \text{ M}$  (S/N=3), representing the highest sensitivity of luminol yet reported. The author describes mainly an application to micro-chip CE-CL detection system.

化学発光 (CL) は、化学反応によって励起された分子が基底状態にもどる際、そのエネルギーを光として放出する現象である。CLを利用した分析法はCL分析法として知られ、吸光分析法、蛍光分析法などとともに、光分析法のひとつとして位置づけられている。その研究・開発は、基礎から応用分野にわたる様々な領域で活発に進められている。

CL分析には、分析化学的視点から、1) 高感度、2) 定量の濃度範囲が広い、3) 操作が簡単、4) 試薬・装置が安価かつ環境にやさしい、5) 光源、分光器を必要とせず小型化が可能、6) 連続分析系に組み込みやすいなどの特徴が挙げられる。これまでにCL分析は、フローインジェクション分析法、高速液体クロマトグラフィーなどの流れ分析系の検出手段として広く利用され、また種々の微量検出センサーとしても適用されてきた。

一方、CLには、上述の分析化学的な立場からみた特長以外にも自然科学的な一般論として以下のような魅力が内在している。1) CLはあらゆる領域に存在する；酸化還元反応が関与するような、または何らかのエネルギー移動が起こっているところには、微弱ではあってもCL反応が生じている可能性がある。2) CLは生命活動に広く関与している；バイオフィトン、生物発光はもちろんながら、生体の酵素反応、食殺菌作用など生体内の広い領域で微小CLが

観測されている。さらに、3) CLは、当然ながら化学反応に基づくものであり、それ自身が Chemistryの研究分野として魅力的である。いずれにせよ、CLの現象に基づくCL分析法の特長、魅力が、将来どのようなかたちで具体化されていくのか、いまだ未知の領域とされる部分は多く、今後の研究に負うところが大きい。

キャピラリー電気泳動(CE)は溶液試料の分析に極めて高い分離性能を示す測定法である。CEに使われているはん用的な検出手段として、吸光検出およびレーザー励起蛍光検出が挙げられる。これらはCEの特性を生かした有用な検出手段であることに間違いはないが、前者は濃度感度が低い、また後者は装置が高価かつ複雑になるという問題点が指摘される場合もある。そこで、1990年代の初め、CEとCLのそれぞれの特長を併せ持つような新しい分離・検出の方法とし“CE-CL 検出”の概念が提案され、Haraら<sup>1)</sup>、Rubertoら<sup>2)</sup>、Dadooら<sup>3)</sup>によって、CE-CL検出装置における先駆的な論文が発表された。その後も“CE-CL検出”が注目される分析手法として紹介されている。

著者はCE-CL検出装置を開発するにあたり、重要と思われる幾つかのポイントを意識しながら研究を展開してきた。それらは以下の八つの項目に整理することができる。CE-CL検出装置の研究で基本となる点は、いかにしてCEとCL系とを検出セルを使って接続するかというところにある。したがって、まずは(1)“CL検出セルの開発”と(2)“各種CL系の利用”という二つの研究項目が挙げられる。続いてCEとCLのそれぞれの特長を生かすことを考え、(3)“各種CE分離モードへの応用”と(4)“高感度化”を研究項目として取り上げ検討した。上述の“CL検出セルの開発”、“各種CL系の利用”および“各種CE分離モードへの応用”という研究課題を遂行しながら、CE-CL検出装置で分析できる試料範囲を拡大すること、すなわち(5)“各種分析対象物への応用”を試みてきた。また、他分野との技術融合を常に意識してきた。その例として(6)“マイクロチップへの展開”と(7)“免疫分析との組み合わせ”がある。更に新しい分離・検出法としてのCE-CL検出装置に関する(8)“CLピーク形状の考察”も重要な研究項目である。

今回は、主にCE-CL検出装置の“マイクロチップへの展開”について紹介する<sup>4,11)</sup>。CL検出は光源や複雑な分光装置を一切必要としないので、CL検出を用いたマイクロチップ装置の開発は、真の $\mu$ -TASの実現に向けて大きな可能性を有する。すなわち、マイクロチップ“CE-CL検出”は、分離能、検出感度、分析時間、小型・軽量化、経済性の観点から優れた方法論として期待できる。

- 1) T. Hara, S. Okamura, S. Kato, J. Yokogi, R. Nakajima, *Anal. Sci.*, 7, 261 (1991).
- 2) M. A. Ruberto, M. L. Grayeski, *Anal. Chem.*, 64, 2758 (1992).
- 3) R. Dadoo, L. A. Colón, R. N. Zare, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15, 133 (1992).
- 4) M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, R. Nakajima, K. Kondo, A. Arai, *Chem. Lett.*, 1999, 781.
- 5) M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, R. Nakajima, K. Kondo, A. Arai, *J. Chromatogr. A*, 867, 271(2000).
- 6) K. Tsukagoshi, M. Hashimoto, R. Nakajima, A. Arai, *Anal. Sci.*, 16, 1111 (2000).
- 7) K. Tsukagoshi, M. Hashimoto, T. Suzuki, R. Nakajima, A. Arai, *Anal. Sci.*, 17, 1129 (2001).
- 8) K. Tsukagoshi, T. Suzuki, R. Nakajima, *Anal. Sci.*, 18, 1279 (2002).
- 8) K. Tsukagoshi, N. Jinno, R. Nakajima, *Anal. Chem.*, 77, 1684 (2005).
- 9) K. Tsukagoshi, K. Tsuge, R. Nakajima, *Anal. Sci.*, 23, 739 (2007).
- 10) K. Tsukagoshi, T. Saito, R. Nakajima, *Talanta*, 77, 514 (2008).
- 11) T. Nogami, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *J. Sep. Sci.*, 32, 408 (2009).

# L-1

## ナノピラーチップを用いた DNA の高速分離分析

【名大院工<sup>1</sup>, 名大予防早期医療創成センター<sup>2</sup>, 物質・材料研究機構<sup>3</sup>,  
名大プラズマナノ工学研究センター<sup>4</sup>, 産総研 健康工学研究センター<sup>5</sup>】

○安井隆雄<sup>1</sup>, 加地範匡<sup>1,2</sup>, 岡本行広<sup>1,2</sup>, 渡慶次学<sup>1,2</sup>, 堀池靖浩<sup>3</sup>, 馬場嘉信<sup>1,2,4,5</sup>

### Nanopillar chips for high-speed DNA separation analysis

Takao YASUI<sup>1</sup>, Noritada KAJI<sup>1,2</sup>, Yukihiro OKAMOTO<sup>1,2</sup>, Manabu TOKESHI<sup>1,2</sup>, Yasuhiro HORIIKE<sup>3</sup>, Yoshinobu BABA<sup>1,2,4,5</sup>

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering, Nagoya University<sup>2</sup>, National Institute for Materials Science<sup>3</sup>, Plasma Nanotechnology Research Center, Nagoya University<sup>4</sup>, Health Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<sup>5</sup>*

#### Abstract

Recently, the separation method to separate and detect particular molecules out of complex samples with undesired substance widely utilized from clinical diagnosis to chemical industry. There are many techniques to separate molecules, for example, gas/liquid chromatography, electrophoresis, centrifugation, and liquid-liquid / solid extraction. Because these separation techniques have an intrinsic trade-off between resolution and separation time, it is known that high-resolution and high-speed separation is theoretically beyond possibility. But, at the latest research, non-equilibrium transport that does not suffer from an intrinsic trade-off between resolution and separation time proposed by Laachi et al. This anomalous transport was derived from theoretical calculation and computer simulation, then there were no experimental results so far. In the case of this transport, high-resolution and high-speed separation would be realized under high electric field. In this report, we demonstrate that non-equilibrium DNA transport with both resolution and high-speed is achieved by using nanopillar chips we developed.

#### 【緒言】

多くの共雑物を含む試料の中から目的物質を分離・検出する分離分析法は、臨床診断や化学産業などの分野で広く利用されている。現在、その分離分析法として、ガス/液体クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、溶媒・固相抽出など、原理の異なる多数の分離技術が利用されている。これら分離技術において、分離能と分離時間は trade-off の関係にあり、高分離能かつ迅速な分離は困難である<sup>1)</sup>。しかし、最近、ナノメートルサイズの微細流路を用いた電気泳動分離において、分離能と分離時間との間の trade-off の影響を受けない非平衡輸送原理が、理論計算とコンピュータシミュレーションの結果より予測された<sup>2)</sup>。この原理を応用すれば、高電場を印加することによって高分離能と高速分離を両立した DNA 分離を達成でき、将来的には分離能を損なわない高速な分離分析が実現可能になると考えられる。しかし、その実験的な難しさのために実験結果による立証は未だ報告されていない。今回の発表では、我々が開発したナノピラーチップを用いることによって、世界

で初めて非平衡輸送原理に基づく高分離能と高速分離を両立した DNA 分離の結果について報告する。

### 【実験】

石英基板上に幅  $25\ \mu\text{m}$ 、高さ  $4\ \mu\text{m}$  のマイクロチャンネルを Fig. 1(a) のようにデザインした。ナノ微細加工技術を用いて、中心間距離  $800\ \text{nm}$ 、直径  $500\ \text{nm}$ 、高さ  $4,000\ \text{nm}$  のナノピラー(Fig. 1(b))をマイクロチャンネル内部に配列した(Fig. 1(c))。その SEM 写真を Fig. 1(d) に示す。今回実験に用いた DNA サンプルは basepairs/dye = 15 の割合で、蛍光試薬 YOYO-1 (491/509) によって染色したものを使用した。DNA 分離実験の蛍光観察には蛍光顕微鏡 (対物レンズ:  $10\times/0.45\ \text{NA}$ ) を使用し、検出はクロス部より  $4.3\ \text{mm}$  の部分で行った。

### 【実験結果および考察】

Fig.2 にそれぞれの電場における  $600\ \text{bp}$  と  $100\ \text{bp}$  DNA のエレクトロフェログラムを示す。 $20\ \text{V/cm}$  の印加電場では、 $600\ \text{bp}$  と  $100\ \text{bp}$  DNA を分離できなかったが、印加電場を徐々に高くしていくと、 $70\ \text{V/cm}$  で  $600\ \text{bp}$  と  $100\ \text{bp}$  DNA が分離した。さらに、この条件下では  $600\ \text{bp}$  DNA の方が  $100\ \text{bp}$  DNA よりも早く泳動するということがわかった。サイズ大きな DNA が小さな DNA よりも早く泳動するというのは、エントロピックトラッピングによる分離においても報告されているが<sup>3)</sup>、今回の結果では DNA の慣性半径がナノ空間よりも小さいために、エントロピックトラッピングでは説明することができない。Fig. 3 に印加電場が  $2450\ \text{V/cm}$  のときのエレクトロフェログラムを示す。この時の分離能は印加電場が  $70\ \text{V/cm}$  と同じであり ( $R_s = 1.09$ )、印加電場を高くして、分離時間の短縮を行っても分離能は低下しないことがわかった。上記の結果より、ナノピラーチップを用いた分離では、非平衡輸送原理に基づき、分離能と高速分離を両立した分離を行うことが可能であると考えられる。

### 【文献】

- 1) J. C. Gidding, E. Kucera, C. P. Russell, and M. N. Myers, *J. Phys. Chem.*, **72**, 4397 (1968).
- 2) N. Laachi, C. Declet, C. Matson, and K.D. Dorfman, *Phys. Rev. Lett.*, **98**(9), 098106 (2007).
- 3) J. Han and H. G. Craighead, *Science*, **288**, 1026 (2000).

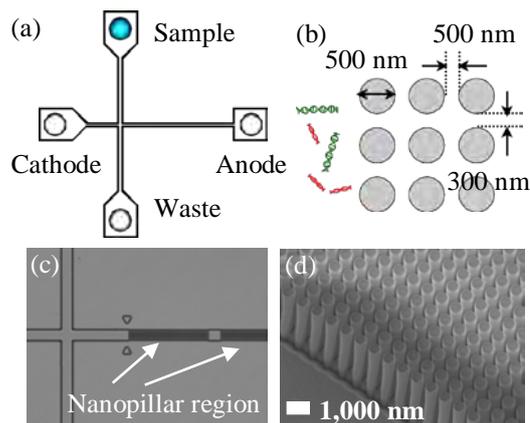


Figure 1. (a),(b) Schematic diagrams of nanopillar chips. (c) Optical image of nanopillar chips. The dark region revealed nanopillar region and the clear nanopillar-free region. (d) Scanning electron microscopy image of nanopillar region.

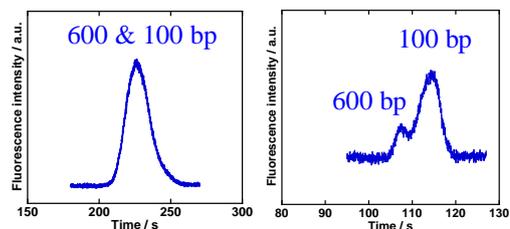


Figure 2. Electropherograms of  $600\ \text{bp}$  and  $100\ \text{bp}$  DNA. Applied electric fields were (Left)  $20\ \text{V/cm}$  and (Right)  $70\ \text{V/cm}$ . The separation buffer includes  $445\ \text{mM}$  Tris-borate and  $10\ \text{mM}$  EDTA.

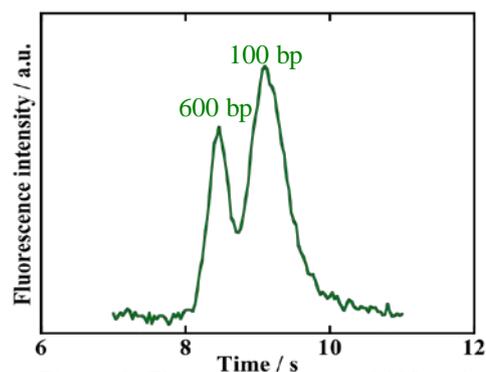


Figure 3. Electropherogram of  $600\ \text{bp}$  and  $100\ \text{bp}$  DNA. Applied electric field was  $2,450\ \text{V/cm}$ .

# L-2

## パルスフィールドキャピラリー電気泳動を利用した RNA 分離

【早大・科健機構<sup>1</sup>, 阪大・フォトンクス融合研究セ<sup>2</sup>, 上海交通大学<sup>3</sup>】

○山口佳則<sup>1,2</sup>, 住友慶子<sup>1</sup>, 李振慶<sup>1,3</sup>, 竇曉鳴<sup>3</sup>

### Separation of RNA Fragments by Pulsed-Field Capillary Electrophoresis

Yoshinori YAMAGUCHI<sup>1,2</sup>, Keiko SUMITOMO<sup>1</sup>, Zhenqing LI<sup>1,3</sup>, Xiaoming DOU<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ASMeW, Waseda University, <sup>2</sup>Photonics Advanced Research Center, Osaka University,

<sup>3</sup>Shanghai Jiaotong University

#### Abstract

RNA separation by pulsed-field capillary electrophoresis was performed in this work. While pulsed-field capillary electrophoresis was applied for the separation of large dsDNAs, especially over 2,000 bp, RNA separation by pulsed-field capillary electrophoresis was merely reported in spite of the importance of the detail analysis of RNA. Thus, we demonstrated pulsed-field capillary electrophoresis for RNA sequential separation, and evaluated its performance based on the frequency and modulation in pulsed-field capillary electrophoresis. As a result, the separation performance with the pulsed-field condition improved by comparison with the conventional RNA capillary electrophoresis, whereas, the frequency for pulsed-field capillary separation improved little for the RNA separation. In contrast, the modulation of the pulsed-field capillary electrophoresis contributed the separation performance. In this paper, we discuss the RNA separation performance based on the fundamental modulated electrophoretic factors, such as electrical frequency and modulations.

#### 【緒言】

キャピラリー電気泳動によるRNAの網羅的分析は、DNAに匹敵するほどの高分離は達成されていないのが現状である。我々は、これまで、RNAの分離能向上のため、酢酸を変性剤としたインキャピラリーディネイチャリングポリマー電気泳動法や新規溶媒チアジアゾールを添加剤としたキャピラリー電気泳動を研究開発し、変性剤の開発を中心にRNAの分離能向上、分析時間の短縮、分析精度の向上を達成してきた<sup>1,2</sup>。

パルスフィールドキャピラリー電気泳動は (PFCE) は、直流波を印加する通常のキャピラリー電気泳動では分離が難しい2,000塩基以上のDNAの分離に優れた分離能を示すことが報告されている。PFCEはRNA分離においても、有効な手段と考えられ、さらに、これまで開発してきた変性剤と組み合わせることで、より分離の向上が期待できる。しかし、これまでPFCEによりRNAの分離を実施した報告はほとんどなく、一方では、RNAは分子内水素結合がDNA以上に強く、dsDNAやssDNAと比較して分子の屈曲性が高いといったDNAとは異なる物性を有することから、DNAとは異なる分離挙動を示すと考えられる。そこで、今回は、RNAをPFCEにより分離を行い、平均電圧、周波数、モデュレーションが分離に与える影響など基礎的な分離評価を行った。

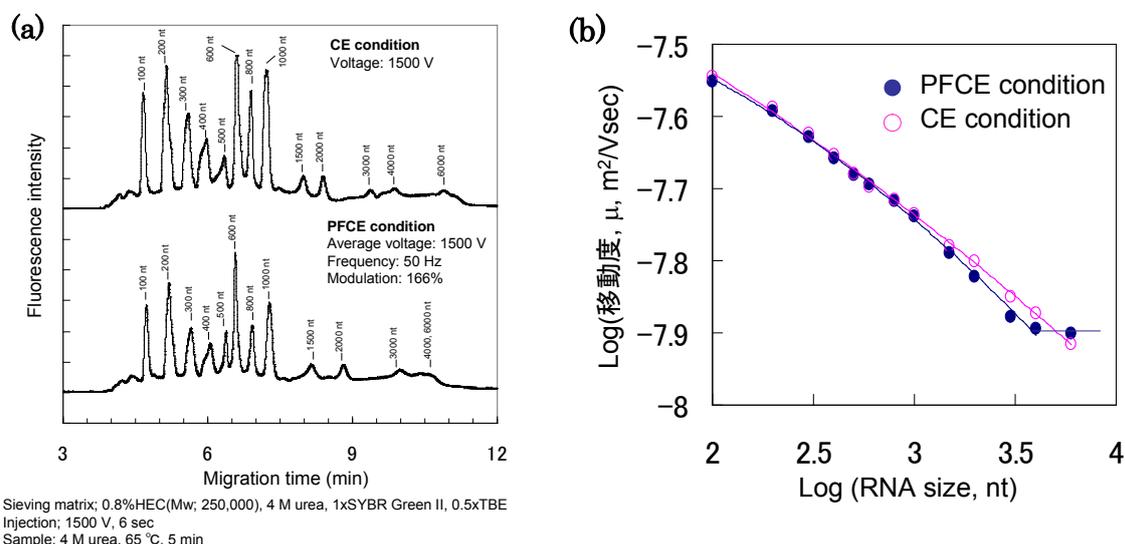
#### 【実験】

キャピラリー電気泳動分析には、倒立型顕微鏡(IX71, OLYMPUS)をベースに開発したキ

キャピラリー電気泳動顕微鏡装置を利用し、励起には水銀ランプ、検出には光電子増倍管(R928、浜松ホトニクス)とした。高電圧部は交直両用アンプリファイア(トレックジャパン, Model610E)を用いることによって、±10 kVの高圧交流出力を可能とし、LabViewにより電源制御を行った。4 M尿素とSYBR Green IIを含む0.5xTBE緩衝液に溶解した0.8%(w/v)ヒドロキシエチルセルロース(Mw 250,000)を分離媒体とし、平均電圧1500 V、波形を矩形波に固定し、周波数を10-50 Hz、モジュレーション80-200%に変化させて分離分析を行った。試料は、Perfect RNA Markers™ 0.1-1kbおよび0.2-10kb (Novagen) を最終濃度100 µg/mLとなるように1:1で混合し、4 M尿素を変性剤とし90°Cで5分加熱後、2分氷冷することで調製した。

### 【結果と考察】

平均電場 100V/cm、周波数50 Hz、モジュレーション166%の矩形波を印加して100-10,000塩基のRNAを分離し、各RNAの移動度を算出した(Fig.1a,1b)。100 V/cmの直流電場における分離と比較すると、600塩基以下のRNAでは矩形波と直流波で移動度の違いは見られなかった。一方、600-4,000塩基のRNAでは、矩形波の方が各ピーク間の移動度の差が大きくなった(Fig.1b)。理論段数については、矩形波と直流波で全てのピークにおいてほぼ同じ値を与え、500-2,000塩基の範囲において矩形波を印加することによって分離度の向上が確認された。さらに、モジュレーションが大きくなることで分離がより向上することが明らかになった。一方で、周波数は分離に影響を与えなかった。以上の結果は、PFCE分離においてDNAとRNAの分離挙動が全く異なっていることを示しており、これは、RNAは屈曲性に富んだ高分子であるために、電場方向への配向および電場反転による再配向が起こりにくいためだと考えられる。



**Fig.1 The RNA Separation by Pulsed-Field Capillary Electrophoresis (a)Electropherogram, (b)mobility**

### 【文献】

1. Keiko Sumitomo, Motoyasu Sasaki, Yoshinori Yamaguchi, Electrophoresis 2009, 30, 1538-1543.
2. 山口佳則, 竜田邦明 「チアジアゾールを用いる生体分子の分離分析方法」 特願2007-226301

# L-3

## プロテオーム一斉解析のためのショットガンプロテオミクス測定システムの構築

【慶大・先端生命研<sup>1</sup>, 京工繊大院<sup>2</sup>, JST, さきがけ<sup>3</sup>】岩崎未央<sup>1</sup>, 三輪昌平<sup>2</sup>, 富田勝<sup>1</sup>, 田中信男<sup>2</sup>, 石濱泰<sup>1,3</sup>

### Development of shotgun proteomics-based analytical platforms for completing proteome analysis

Mio IWASAKI<sup>1</sup>, Shohei MIWA<sup>2</sup>, Masaru TOMITA<sup>1</sup>, Nobuo TANAKA<sup>2</sup>, Yasushi ISHIHAMA<sup>1,3</sup>  
*Institute for Advanced Biosciences, Keio University<sup>1</sup>, Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology<sup>2</sup>, PRESTO, JST<sup>3</sup>*

#### Abstract

Shotgun proteomics approaches based on nano-scale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) for protease-digested cell lysates have been widely used to analyze proteomes of a wide variety of organisms. Because of the high complexity and the wide dynamic range of the samples, it is hardly possible to identify the entire proteome by the limited number of nanoLC-MS/MS measurement even when multidimensional separation was employed prior to nanoLC-MS/MS. Previously, we developed sample preparation protocols for shotgun proteomics approaches to analyze focused proteomes such as membrane proteome and phosphoproteome. In this study, we investigated nanoLC separation to maximize the proteome coverage. Several parameters such as the column temperature, the column length and the gradient conditions have been evaluated. As a result, using 4  $\mu\text{g}$  of *E. coli* lysates, 1,881 proteins were identified by a single 2,365-min LC-MS/MS run with a monolithic C18 silica column (0.1 mm ID, 3.5 m length), achieving 74 % coverage of the expressed proteome.

【緒言】 LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオーム解析では、試料前処理としてトリプシンなどの消化酵素を用いてタンパク質を特異的に切断し、断片化する必要がある。例えば大腸菌トリプシン消化試料には  $10^5 \sim 10^6$  の濃度差を含む約 130,000 種のペプチドが含まれていると予測されるが、このように複雑性および濃度差の高い試料を 1 分析で網羅的に同定することは難しい。そのため、プロテオーム解析の網羅性を高めるために、nanoLC-MS で用いる逆相クロマトグラフィーと、陽イオン交換クロマトグラフィー(SCX)や等電点電気泳動(IEF)を組み合わせた多次元分離を行う方法が主に用いられている。しかし、必要試料量および合計分析時間が増大するといった問題がある。また、このような現状のシステムでは全プロテオームを一斉に解析には、酵母のような比較的遺伝子数の少ない生物でも 1 試料あたり 1 ヶ月以上の測定を要する。我々の研究グループではショットガンプロテオーム解析法において、試料の前処理法や nanoLC-MSMS の高性能化を図ることで、特定の翻訳後修飾をうけたプロテオームの選択的な解析システムや、数回の分析で全プロテオームを同定可能なシステムの開発を目指している。この研究では、nanoLC の高性能化を図ることで試料中の複雑性

および濃度差の問題点を解決し、測定可能なプロテオームの範囲を最大化することを目的としている。今回、大腸菌トリプシン消化試料を用いて、カラム温度、長さ、グラジエント条件を、充填剤型シリカカラムおよびモノリス型シリカカラムを用いて評価した。さらに、最適条件でのモノリス型シリカカラムによる1分析と、充填剤型シリカカラムでの1分析、また SCX や IEF と組み合わせた多次元分離分析との比較を行った。

【実験】大腸菌 BW25113 株をルリア-ベルターニ(LB)培地(37 °C)で培養し、大腸菌タンパク質を抽出した後、含可溶化剤溶媒(50 mM 炭酸水素ナトリウム, 12 mM デオキシコール酸ナトリウム、12 mM N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)で溶解させ、LysC およびトリプシンで消化を行った。消化後試料は脱塩・濃縮を行い、SCX および IEF による分画処理を5分画ずつ行った。カラムは、3 μm 径のシリカ粒子充填剤型カラム (Reprosil C18-AQ, 0.1 mm 径, 15 cm 長) およびモノリス型シリカカラム (0.1 mm 径, 3.5 m 長)を用い、移動相 A 液に 0.5 % 酢酸水溶液、B 液に 80 % アセトニトリルを含む 0.5 % 酢酸溶液を用いて B 濃度 5% から 40% までのリニアグラジエント溶出を行った。MS には LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific 社)を用い、MS スキャンは後段のオービトラップで、MSMS スキャンは前段のイオントラップで同時測定を行った。得られた分析データから Mass Navigator (三井情報)を用いてピークリストを作成し、Mascot v 2.2 ソフトウェア (マトリクスサイエンス社)によるタンパク質の同定を行った。

【結果と考察】従来の充填剤型カラム (15 cm 長)を用いた1時間前後のグラジエント溶出での結果と比較して、1メートル以上の長いモノリスカラムを用いた緩やかなグラジエント溶出システムでは、ピークキャパシティーが著しく改善し、高分離能が得られた。350 cm 長のモノリスカラムを用いて 37 時間のグラジエント溶出を行った結果を図 1 に示す。本システムは SCX および IEF による多次元分離システムよりも短い分析時間で、より多くのタンパク質を同定することが可能であった (15,418 ペプチド, 1,881 タンパク質)。これは大腸菌発現プロテオームの 74% に相当する。1 回の LC-MS 分析で生物の全プロテオームの 50% 以上を同定した例は今までになく、本システムがショットガンプロテオーム解析に有効であることがわかった。

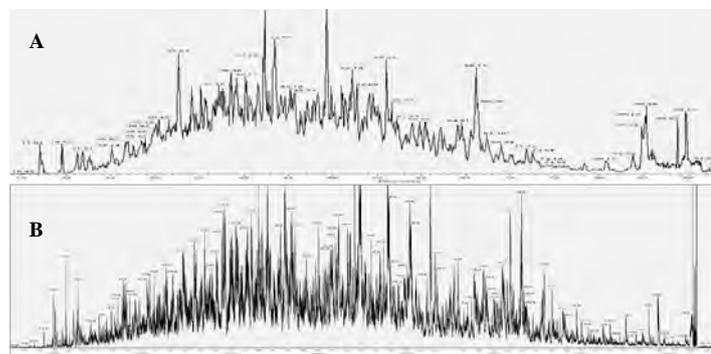


Fig. 1 Total ion current chromatograms of *E. coli* tryptic digested samples using particle-packed column 15 cm (A) and monolith silica column 350 cm (B).

A: sample amount: 2 μg, analysis time: 110 min

B: sample amount: 4 μg, analysis time: 2,365 min

#### 【文献】

1. Masuda, T. *et al.*, *J. Proteome Res.* **2008**, 7 (2), 731-40.
2. Miyamoto, K. *et al.*, *Anal Chem* **2008**, 80 (22), 8741-50.
3. Masuda, T. *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, **2009**, Sep 18. [Epub ahead of print].

# L-6

## Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis

Oliver Woodhouse

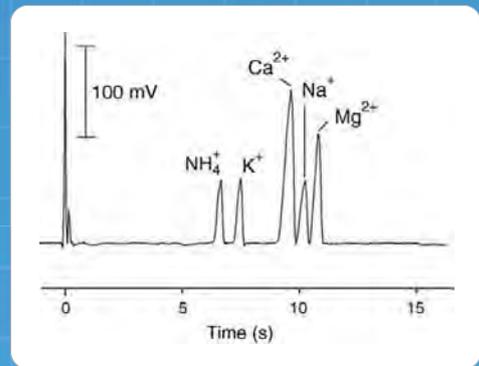
*eDAQ Southeast Asia, Bangkok, Thailand*

Capacitively-coupled contactless conductivity detection (C4D) is a universal method that has been used to detect inorganic ions, as well as organic and biochemical species. C4D has several advantages over UV and fluorescence detection. It has been reported to give better sensitivity than indirect-UV (when the species doesn't have a chromophore).

C4D can also be used for microchip electrophoresis, ion chromatography/HPLC and flow injection analysis.

The principles of C4D, and some of its applications, will be presented.

# C<sup>4</sup>D 非接触型電気伝導度検出器

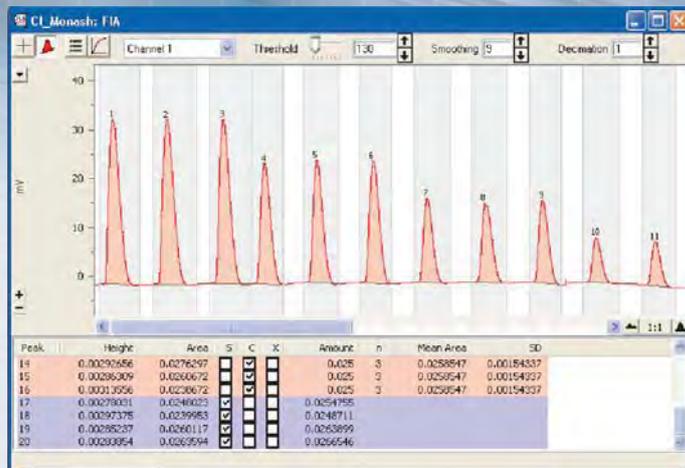


- キャピラリー電気泳動
- マイクロ流体チャンネル
- イオンクロマトグラフィー
- カラムテストング

C<sup>4</sup>Dの電極はサンプルには直接接触していません。従って電極はサンプルから電氣的に絶縁(電気泳動の検出には理想的)されており、電極がコンタミする心配もありません。キャピラリー電気泳動の大部分の検体はイオン基を有し、最小限のサンプル調整で機能するC<sup>4</sup>Dシステムは“普遍的”な検出器として優れた威力を発揮します。この検出器を可視UV吸光度計や蛍光検出器と並列して使用することも可能です。

## フローインジェクション解析システム

- ピークアナリシスソフトウェア
- データ取得
- アンペロメトリー
- フローセル
- ポンプコントロール



輸入元：バイオリサーチセンター株式会社 eDAQ事業部



〒461-0001 名古屋市東区泉2丁目28-24(ヨコタビル4F)  
TEL(052)932-6421 FAX(052)932-6755  
<http://www.edaq.jp>

eDAQ 販売代理店：アクト・サイエンス株式会社



〒105-0014 東京都港区芝3丁目2-14  
TEL(03)5484-6417 FAX(03)5443-1262  
<http://www.act-science.jp>

## L-5

### ハイブリッド試料導入法によるキャピラリーゾーン電気泳動法の高感度化：試料導入時間及び電圧の影響

【神戸大院海事<sup>1</sup>，北興化学<sup>2</sup>，神戸大院人間発達環境学<sup>3</sup>】

○薬師寺雄樹<sup>1</sup>，福士恵一<sup>1</sup>，岡村秀雄<sup>1</sup>，橋本陽一<sup>2</sup>，齋藤恵逸<sup>3</sup>

#### Sensitivity Enhancement for Capillary Zone Electrophoresis Using a Hybrid Sample Injection Mode: Effects of Time and Voltage for Sample Introduction

Yuki YAKUSHIJI<sup>1</sup>, Keiichi FUKUSHI<sup>1</sup>, Hideo OKAMURA<sup>1</sup>, Youichi HASHIMOTO<sup>2</sup>, Keiitsu SAITO<sup>3</sup>

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences<sup>1</sup>, Hokko Chemical Industry Co., Ltd<sup>2</sup>, Graduate School of Human Development and Environment Kobe University<sup>3</sup>

#### Abstract

A novel sample injection, hybrid sample injection mode (hSIM) is proposed to enhance the sensitivity for capillary zone electrophoresis (CZE). Samples are introduced into the capillary using both vacuum and electrokinetic injections simultaneously. Using a sample mixture of an anti-fouling agent, pyridine-triphenylborane (PTPB) and its estimated degradation products such as diphenylborinic acid (DPB), phenylboronic acid (MPB), and phenol in acetonitrile, optimum voltage and time for the sample introduction was examined. Peak height results for phenol, PTPB, DPB, and MPB using hSIM were 1.0, 32, 24, and 2.2 times higher, respectively, than results found using only vacuum injection for a sample introduced for 4 s at -4 kV. The hSIM procedure is simple and possesses sufficient concentration power to be useful for improving the sensitivity for CZE. Investigations are in progress to prepare calibration graphs for these components.

#### はじめに

船体への生物付着を防止するために船舶用塗料に使用される有機ホウ素系船底防汚剤として、ピリジントリフェニルボラン (PTPB) があるが、環境中における分解性、生物毒性等に関しては不明な点が多い。その理由として、PTPB 及び予想される分解生成物であるジフェニルボリン酸 (DPB)、フェニルボロン酸 (MPB) 等の定量法が確立されていないことが挙げられる。以前我々は、キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) による PTPB, DPB, MPB, フェノールの分離定量法を確立し<sup>1)</sup>、PTPB の分解挙動について基礎的な検討を行った<sup>2)</sup>。また、これまでは試料導入法として真空吸引法を用いてきたが、真空吸引法と電氣的導入法を同時に用いる導入法 (ハイブリッド試料導入法, hSIM) を提案した<sup>3)</sup>。そこで本研究では、さらなる高感度化を目指し、hSIM 法について、試料導入時の導入時間と電圧について検討した。

## 実験

試料として、ピリジントリフェニルボラン (PTPB) 及びその分解生成物であるフェノール、ジフェニルボリン酸 (DPB)、フェニルボロン酸 (MPB) のアセトニトリル混合溶液を用いた。泳動条件は以下の通りである。キャピラリー：内径 75  $\mu\text{m}$ ，全長 72 cm，有効長 50 cm；泳動液 (BGE)：20 mM 四ホウ酸ナトリウム溶液 (1 M NaOH で pH 9.8 に調整)，BGE 充填前に 0.01% ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) 溶液でキャピラリーを修飾；印加電圧：15 kV；検出波長：200 nm。初めに，各成分を 0.4 mg/L ずつ含む試料を用い，hSIM 法 (-1 kV) における各成分のピーク高さに対する試料導入時間 (1~5 s) の影響及びピーク高さの再現性について調べた。次いで，試料導入時の電圧 (-1~-5 kV) の影響について同様に検討し，最適条件を確立した。さらに，確立した hSIM 法と真空吸引法 (4 s) について，各成分のピーク高さを比較した。

## 結果及び考察

試料導入時間 4 s における各成分のピーク高さは，1 s の場合の 1.4~2.7 倍であり，ピーク高さの相対標準偏差 (RSD) は，3.6~7.6% であった。5 s では，ピークのベースライン分離が出来なかった。試料導入時の電圧 -4 kV における各成分のピーク高さは，-1 kV の場合の 1.3~8.4 倍であり，ピーク高さの RSD は，2.5~12% であった。-5 kV では，ピークのベースライン分離が出来なかった。また，hSIM 法 (最適条件 4 s，-4 kV) によるピーク高さは，真空吸引法 (4 s) と比較すると，フェノール 1.0 倍，PTPB 32 倍，DPB 24 倍，MPB 2.2 倍であり，PTPB，DPB，MPB について高感度化が達成された。hSIM 法 (4 s，-4 kV) と，真空吸引 (4 s) の場合のエレクトロフェログラムを Fig. 1 に示す。

## 文献

- 1) 薬師寺 雄樹，福士 恵一，岡村 秀雄，橋本 陽一，齋藤 恵逸：日本分析化学会第 57 年会講演要旨集，p. 159 (2008)。
- 2) 薬師寺 雄樹，福士 恵一，岡村 秀雄，橋本 陽一，齋藤 恵逸：第 28 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集，p. 31 (2008)。
- 3) 薬師寺 雄樹，福士 恵一，岡村 秀雄，橋本 陽一，齋藤 恵逸：日本分析化学会第 58 年会講演要旨集，p. 97 (2009)。

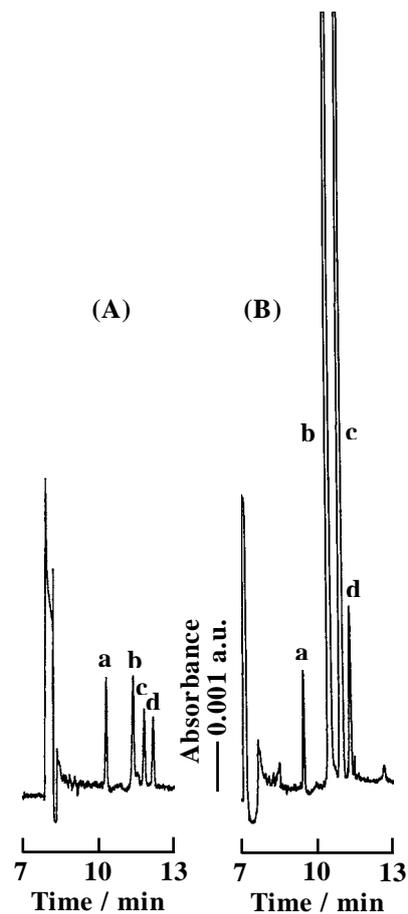


Fig. 1 Electropherograms of a mixture of 0.4 mg/L phenol, PTPB, DPB, and MPB. (A) vacuum injection for 4 s. (B) hSIM for 4 s at -4 kV. Identification of peaks: a, phenol; b, PTPB; c, DPB; d, MPB.

# L-6

## 生体試料中の NO 代謝物のオンチップ電気泳動アッセイと ストレス負荷被験者実験への予備的な検討

【産総研】 ○脇田慎一, 宮道隆, 田中喜秀, 永井秀典, 鳴石奈穂子

### Development of On-Chip Electrophoretic NO Assay in Biological Samples and Preliminary Application of Human Stress Task

Shin-ichi WAKIDA, Takashi MIYADO, Yoshihide TANAKA, Hidenori NAGAI, Nahoko NARUIISHI

*Health Technology Research Center,*

*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*

#### Abstract

Nitric Oxide (NO) has been identified as an intrinsic mediator to play key roles in physiological and pathological conditions in the human body. Recently, the relationship between NO and diseases is attracted much attention. Due to its short half-life, the amount of NO is generally deduced from the concentrations of NO metabolites, *i.e.*, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). The Griess method is widely used for determination of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ ; however, this method is relatively complicated and time-consuming because of the complicated chemical reactions.

We have investigated for novel running buffer, microfluidic control and reduction of protein adsorption to develop high-throughput simultaneous assay of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  using based on an electrophoretic Lab-on-a-Chip (microchip capillary electrophoresis, MCE) with UV detection. We established the salivary NO assay in 10% diluted human saliva. We also have investigated the blood NO assay in human plasma as well as whole blood using on-chip removal technology of hemocyte to determine clinical NO assay within 1 minute in bedside monitor.

In this paper, we described that the present status and issues of the NO assay using the MCE technology including a preliminary application of human stress task.

#### 【緒言】

一酸化窒素 (NO) は血管弛緩因子であり、循環器系疾患の治療として、硝酸剤や NO 吸入療法が広く用いられている。NO は血管拡張作用のみならず、活性酸化窒素種であり抗炎症作用など多彩な生理機能を有することが見いだされ、生活習慣病や加齢などに伴う疾患にも関わるということが認められてきた。また、唾液 NO 代謝産物の計測は口腔疾患や循環器病疾患の臨床研究ニーズがある。NO の半減期は極めて短いため、臨床化学的な NO 産生量の推定には、その代謝産物である亜硝酸イオンと硝酸イオンの含量によって算出される。

現在、一般的に使用されている NO 代謝産物測定キットは酵素還元と比色法に基づくため、測定に 3 時間以上要し、簡便迅速に測ることが困難である。そこで、我々は、ベッドサイドで一滴の全血で簡便迅速に測れるマイクロチップ電気泳動 (MCE) 法の開発を行ってきた<sup>1,2)</sup>。ここでは、これまでの研究成果と課題を報告し、今後の展開を展望したい。

## 【実験】

本研究では、石英ガラス製チップには島津製作所製 Type U (または Ui) を、オンチップ計測評価には同社製マイクロチップ電気泳動装置 (MCE-2010) を用い、分離チャンネルのリニアイメージング UV 検出 (214 nm) により行った。

## 【結果と考察】

まず、キャピラリー電気泳動法 (CE) を用い、低ベースラインノイズでシステムピークのない安定した分離分析を実現するために、ヒト血清成分に基づく新規泳動液を開発し<sup>3)</sup>、この泳動液を MCE に適用した。MCE では極端に分離カラム長が短くなるが、Fig. 1 に示すように電圧制御による流体制御により亜硝酸と硝酸イオン標準溶液の分離を達成した<sup>4,5)</sup>。さらに、高度な流体制御法を検討し、除タンパクした標準添加ヒト血清試料の分離アッセイを 6.5 秒で達成し<sup>6)</sup>、さらに、開発したタンパク吸着抑制剤により標準添加ヒト血清試料での迅速分離を実現した<sup>7)</sup>。

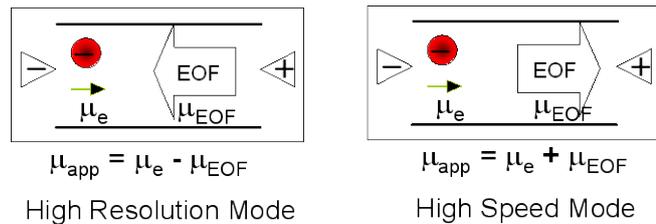


Fig. 1 Microfluidic control on electroosmotic flow for high resolution and high speed modes

そこで、全血 1 滴その場 NO アッセイを目指して、まず鍵となる、除血球処理のオンチップ化技術を確立し、全血 NO アッセイの実用化の技術的な見通しを得た。今後は、使い捨てが可能な新規ラボチップ設計研究、オンチップ濃縮法の適用さらに検出器の高感度化を目指した実用化研究を進めたいと考えている。

また、人間工学倫理委員会で承認されたストレス負荷実験の被験者試料の予備検討を行った結果についても報告する予定である。

## 【文献】

- 1) 宮道隆, 脇田慎一, マイクロチップ電気泳動による酸化ストレスマーカー迅速アッセイ, 臨床検査, **49**, 1011-1014 (2005).
- 2) 宮道隆, 脇田慎一, キャピラリー電気泳動法及びマイクロチップ電気泳動法を用いた体液中一酸化窒素代謝産物の迅速測定法の開発, 生物物理化学, **52**, 145-149 (2008).
- 3) Miyado T, Nagai H, Takeda S, Wakida S, *et al.*, Development of a novel running buffer for the simultaneous determination of nitrate and nitrite in human serum by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1014**, 197-202 (2003).
- 4) Miyado T, Tanaka Y, Nagai H, Wakida S, *et al.*, Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological fluids by capillary electrophoresis and preliminary study on their determination by microchip capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1051**, 185-191 (2004).
- 5) Miyado T, Tanaka Y, Nagai H, Wakida S, *et al.*, High-throughput microfluidic devices for NO assay based on electrophoretic separation, *3rd IEEE/EMBS Special Topic Conf. on Microtechnology in Medicine and Biology, Book Series: IEEE EMBS*, pp.66-68 (2005)
- 6) Miyado T, Tanaka Y, Nagai H, Wakida S, *et al.*, High-throughput nitric oxide assay in biological fluids using microchip capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1109**, 174-178 (2006).
- 7) Miyado T, Wakida S, *et al.*, High-throughput assay of nitric oxide metabolites in human plasma without deproteinization by lab-on-a-chip electrophoresis using a zwitterionic additive, *J. Chromatogr. A*, **1206**, 41-44 (2008).

# L-7

## キャピラリー/マイクロチップ電気泳動における 糖鎖分析の高感度化 (2)

【京大院・工】 ○川井 隆之, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二

### Highly Sensitive Analysis of Sugar Chains in Capillary / Microchip Electrophoresis. 2

Takayuki KAWAI, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, and Koji OTSUKA  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

#### Abstract

Recently, rapid and highly sensitive methods for the analysis of sugar chains are required as researches in glycomics have been intensively in progress. In this study, capillary electrophoresis (CE) and microchip electrophoresis (MCE), which are rapid analytical methods with high separation performance, were combined with an on-line preconcentration method, large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP). The LVSEP-CE analysis of real sugar chains was performed in a PVA-coated capillary. As a result, the analytes were well preconcentrated and separated with up to a 2,500-fold sensitivity enhancement compared with the conventional capillary zone electrophoresis analysis. The LVSEP-MCE analysis was also performed on a PDMS microchip with a straight microchannel. In consequence, the sample injection procedure was simplified and the analytes were well enriched and separated with a 2,200-fold sensitivity increase compared to the conventional MCE analysis with the pinched injection method.

#### 【緒言】

近年のグライコミクスの進展にともない、糖鎖を迅速に分析できるキャピラリー電気泳動 (CE) やマイクロチップ電気泳動 (MCE) が注目されているが、濃度感度が低いという欠点が挙げられる。本研究では分離場全体に充填した試料を濃縮、分離できる large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP) 法<sup>1</sup>を適用し、糖鎖 CE 分析の高感度化を検討した。また、LVSEP-MCE 分析をストレートチャンネル上で行い、糖鎖分析の簡略化、高速化、高感度化を図った。

#### 【実験】

CE 分析では内径 50  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーを、MCE 分析では分離チャンネルの深さおよび幅がいずれも 50  $\mu\text{m}$  の poly(dimethyl siloxane) (PDMS) 製のストレートチャンネル型マイクロチップを用い、電気浸透流 (EOF) および試料の吸着を抑制するためにそれぞれ poly(vinylalcohol) (PVA) による内面修飾を行った。泳動液には 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.0) を用い、脱イオン水で希釈した試料溶液をキャピラリーもしくはチャンネル全体に注入して電圧を印加することで分析を行った。CE 分析では P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を、MCE 分析では高圧電源と蛍光顕微鏡を組み合わせた手製装置をそれぞれ用い、レーザー励起蛍光法 (励起波長 488 nm, 検出波長 520 nm) で検出を行った。試料には、bovine ribonuclease B から酵

素によって遊離させた糖鎖および maltohepaose (G7) を 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonic acid に よって誘導体化したものをを用いた。

### 【結果と考察】

LVSEP では、EOF を抑制したキャピラリー全体に、低イオン強度のアニオン性試料溶液を 注入して電圧印加を行う (Fig. 1a)。この際、試料は電場増強効果により陽極側の界面において 濃縮されるが、低イオン強度の試料溶液の存在により一時的に速い EOF が発生するため、濃 縮された試料は陰極側へと押し戻される (Fig. 1b, 1c)。その後、濃縮された試料が陰極付近ま で移動し、試料プラグが高電解質濃度の泳動液によってキャピラリーから押し出されると、 再び EOF は抑制される (Fig. 1d)。その後、試料は陽極へ向かって電気泳動を開始し、キャピ ラリーゾーン電気泳動 (CZE) による分離が行われる (Fig. 1e)。PDMS マイクロチップを用いた MCE 分析の蛍光画像からも、実際に試料がこのような泳動挙動をとることが確認された。

そこで糖鎖実試料の LVSEP-CE 分析を行ったところ、 CZE と同様に M5 ~ M9 の 5 種類の糖鎖が分離され、 CZE と比較して 780 倍の高感度化 (M5) が達成された。 このとき、内標準を用いて補正した検出時間および ピーク高さの RSD ( $n = 3$ ) はそれぞれ 0.1% 以下、1.3% となり、高い再現性を持つことが示された。また、検 出限界 ( $S/N = 3$ ) を評価するために G7 の分析を行っ たところ、CZE では 5 nM であったのに対し、LVSEP- CZE では 2 pM となり、約 2500 倍の高感度化が確認さ れた。

LVSEP 法の MCE への適用についても検討を行った。 クロスチャネル型マイクロチップ上で pinched injection (PI) 法を用いる一般的な MCE 分析では、試料注入お よび分離のために複雑な電圧制御が必要となるが、 LVSEP 法ではストレートチャンネルに試料を満たした 後、一定の電圧印加で電気泳動を行うので、高感度化 と同時に分析手順の大幅な簡略化が期待される。そこ で PDMS 製ストレートチャンネルチップを用いて LVSEP 法を適用した MCE 分析を行ったところ、M5 ~ M9 の 5 種類の糖鎖の分離が達成され、さらに一般的な MCE 分 析と比較して 2200 倍の高感度化 (M5) に成功した。また、 内標準を用いて補正した検出時間およびピーク高さ の RSD ( $n = 3$ ) はそれぞれ 0.6%、7.2% となり、MCE に 適用した際にも良好な再現性が確認された。

### 【文献】

(1) He, Y.; Lee, H. K. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 995-1001.

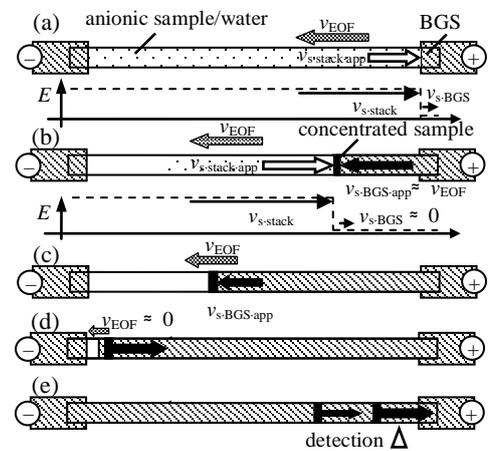


Fig. 1. Schematic diagram of LVSEP. (a) sample injection and voltage application, (b) sample enrichment, (c) analytes moving toward cathode, (d) EOF suppression and beginning of MCZE, (e) separation and detection.

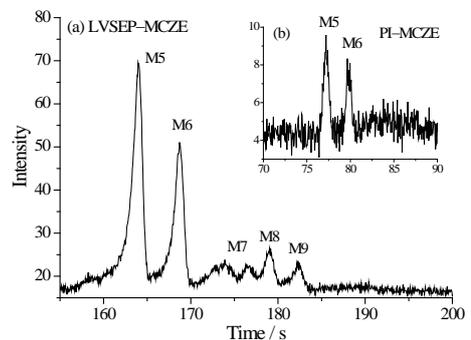


Fig. 2. Analyses of sugar chains obtained from bovine ribonuclease B in (a) LVSEP-MCZE and (b) PI-MCZE. The ratio of sample dilution, (a) 2000-fold with water; (b) 10-fold with the BGS.

# L-8

## APTS 標識糖たん白質糖鎖のキャピラリーアフィニティー電気泳動

【協和発酵キリン<sup>1</sup>, 近畿大・薬<sup>2</sup>】○八木有紀<sup>1</sup>, 篠原千圭代<sup>2</sup>, 山本佐千雄<sup>2</sup>, 島田佳宏<sup>1</sup>, 鈴木茂生<sup>2</sup>

### Capillary Affinity Electrophoresis of Glycans labeled with 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid.

Yuki YAGI<sup>1</sup>, Chikayo SHINOHARA<sup>2</sup>, Sachio YAMAMOTO<sup>2</sup>,

Yoshihiro SHIMADA<sup>1</sup>, Shigeo SUZUKI<sup>2</sup>

*Bio Process Research and Developmental Laboratories, Kyowa Hakko kirin<sup>1</sup>*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University<sup>2</sup>*

#### Abstract

Glycosylation is one of the most complicated post-translational modification of proteins and has important roles in many biological functions. High sensitivity and specificity method is important to obtain structural information of glycans.

In this study, glycans released from various glycoproteins were derivatized with APTS (8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid) and these derivatized glycans were separated in partial filling affinity capillary electrophoresis (PFACE). PFACE is the technique which separates glycans in the presence of semi-immobilized lectin phase. Each glycans showed different migration time according to the difference of the affinity strength between each glycans and lectins. This technique showed the possibility of high-sensitivity and simultaneous determination of glycan structure in mixture sample.

#### 【緒言】

タンパク質の翻訳後修飾のなかでも糖鎖の付与はもっともバリエーションが多く、糖鎖が様々な生命現象に深く関わっていることが明らかとなっている。微量でしか得られないこれらの糖鎖の多様性を解析するには、高感度かつ特異性の高い分析方法が有効である。

APTS はピレン骨格に 3 個のスルホン酸基を有する標識試薬であり、誘導体の強い酸性はキャピラリー電気泳動において優れた分離能をもたらす。また APTS は糖鎖と結合すると励起波長が大幅に長波長シフトするので、Ar レーザー(488 nm) を光源に用いる CE において高感度検出が可能となる。レクチンは特異的な糖鎖構造を認識して結合するタンパク質であり、その性質をクロマトグラフィーに応用したレクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖鎖構造解析法が知られている。

本研究では APTS を使った糖鎖標識とレクチンをキャピラリー管中に層状に半固定した partial filling affinity CE (Fig. 1) を組み合わせた検討を行った。この方法を使うと、泳動液中のレクチン含量に応じてピークの泳動時間が変化することから特定の糖鎖の部分構造の有無及び含量が判定でき、また、複数のレクチンとの相互作用により、high-throughput に糖鎖構

造の同定が可能であると考えられる。

### 【実験】

糖タンパク質糖鎖の APTS 誘導体の調製：糖タンパク質は DTT, ヨードアセトアミドで処理した後, トリプシン消化を行い, さらに peptide N-glycanase F を作用させて糖鎖を遊離させた。HLB カートリッジを使ってペプチドを除去した後, 糖鎖を APTS で標識化し, Sephadex G-25 カラムを使って精製した。

キャピラリー電気泳動：アルゴンレーザー光源を装着した Beckman 社製 P/ACE MDQ を用いた。キャピラリーには GL サイエンス社製 Inert Cap 1 (50  $\mu\text{m}$  i.d., 40 cm, 有効長 30 cm) を用いた。また, 光学系はフルオロセイン用(488 nm /522 nm)のものを使用した。泳動液には 0.05% ヒドロキシプロピルセルロースを含む 100 mM Tris/酢酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。キャピラリー内を水および泳動液で置換した後, 各種レクチン溶液(ConA, WGA, AAL 等)を加え, 続いて APTS 標識化糖鎖を導入し, -15 kV を印加して分析した。

### 【結果と考察】

各種レクチンをキャピラリーに導入した後, APTS 標識した糖タンパク質糖鎖の混合物を流したところ, レクチン無しの場合と比較して, 泳動時間が遅延するピークと変化しないピークが検出された (Fig. 2)。泳動時間が遅延するピークは, 半固定化したレクチンと相互作用した糖鎖であり, 試料中に含まれる糖鎖の特異的な構造及びピーク面積よりその含量も推定可能であった。

従来の Affinity CE 法では泳動液にレクチンを導入していたが, この方法を用いることにより, 複数のレクチンを層状に半固定することができ, 複雑な生体試料や糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造を同時に短時間で同定できる可能性が示された。

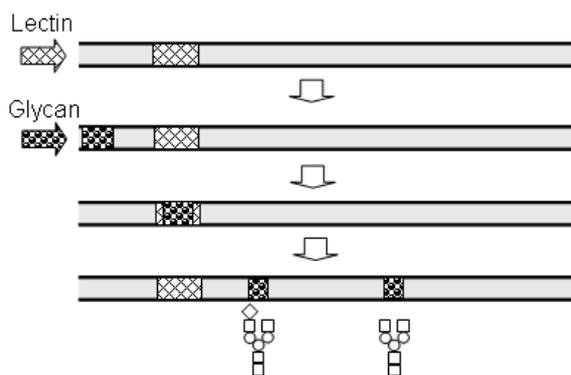


Fig. 1 Mechanism of partial filling affinity capillary electrophoresis

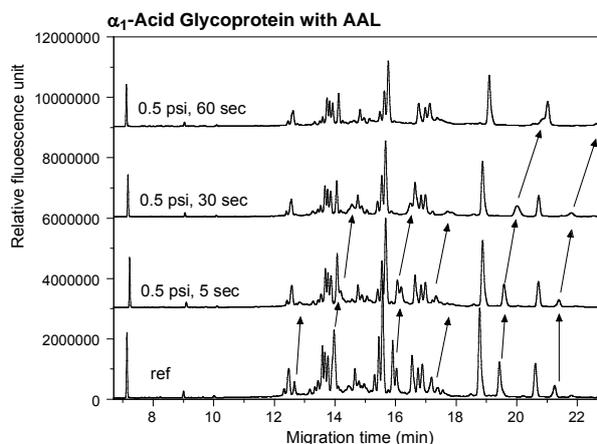


Fig. 2 Partial filling affinity CE analysis of the APTS labeled glycan from  $\alpha_1$ -acid glycoprotein

# L-9

## キャピラリー電気泳動法を用いる2-アミノ安息香酸標識単糖の高感度光学異性体分離

【近畿大・薬<sup>1</sup>, ジョンスホプキンス大<sup>2</sup>】○北莊一郎<sup>1</sup>, 中世古みなみ<sup>1</sup>, 木下充弘<sup>1</sup>, 掛樋一晃<sup>1</sup>, Lee Yuan Chuan.<sup>2</sup>

### Chiral resolution of fluorescence labeled monosaccharides with 2-aminobenzoic acid by capillary electrophoresis

Soichiro KITA<sup>1</sup>, Minami NAKASEKO<sup>1</sup>, Mitsuhiro KINOSHITA<sup>1</sup>, Kazuaki KAKEHI<sup>1</sup>, Yuan Chuan LEE.<sup>2</sup>

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University<sup>1</sup>, Johns Hopkins University<sup>2</sup>*

#### Abstract

All the biological systems on the earth can use D- or L-isomers of amino acids or monosaccharides. This is very interesting considering the evolution and development of life on the earth. In order to obtain insight on the origin of life, we aim at analyzing organic compounds in meteorite and rocks in moon. In the present report, we are focusing on the analysis of trace amount of monosaccharides in meteorite, and have developed a method for the enantiomeric analysis of monosaccharides with ultra high sensitivity as the preliminary studies. We show chiral separation and quantitative analysis for 12 aldoses which were labeled with fluorescent 2-aminobenzoic acid. The labeled monosaccharide derivatives were analyzed by laser-induced fluorescence detection-capillary electrophoresis (LIF-CE). D/L-isomers of aldoses were successfully analyzed using electrolyte containing (glucosyl-CD etc.) in the presence/absence of phenylboronic acid as a chiral selector.

#### 【緒言】

単糖類にはアミノ酸と同様に互いに光学異性体となるD体とL体が存在する。個々の生物はそのどちらかの異性体のみを生命の営みに利用するが、その選択的な存在と生命誕生の起源と進化との関わりは興味深く、隕石や月の岩石などに含まれる有機物の分析を通じて生命の起源に迫る課題に古くから興味が寄せられている。本研究では隕石などに含まれる超微量の単糖類の分析を目指して、単糖DL体を分離し、定量的な評価を目標として、レーザー励起蛍光検出-キャピラリー電気泳動 (LIF-CE)を利用し、12種の単糖分離及びそれぞれの単糖のDL体分離について検討した結果を報告する。

#### 【実験方法】

単糖類：アルドースのD体及びL体12種類を用いた。蛍光標識：アルドースを2-アミノ安息香酸(2AA)を用いる還元アミノ化反応により蛍光標識した。キャピラリー電気泳動：装置: Beckman

Coulter P/ACE MDQ, キャピラリー: シリカキャピラリー, He-Cdレーザー励起蛍光検出器。単糖のDL体分離にはリン酸緩衝液 (pH6.8)中にシクロデキストリン(CD) 誘導体やフェニルホウ酸を加えたものを用いて条件検討を行った。また, 12種類の単糖分離にはホウ酸緩衝液を用いて条件を検討した。

【結果・考察】

12種類のアルドースについて f mol オーダーの検出限界 (試料濃度 100 nmol/L, S/N 比 > 3) で分離することに成功した。光学異性体分離に関しては 6-O- $\alpha$ -D-Glucosyl- $\beta$ -CD 等の修飾 CD をもちいることにより 12種のうち 8種で 1.1以上、2種で 0.5以上の分離度で異性体分離に成功した。さらに、修飾 CD とフェニルホウ酸を併せて用いる泳動用緩衝液を組み合わせることにより、12種すべてのアルドースの DL 体を 0.7~2.2の分離度で DL 体の分離に成功した。使用した 12種類の単糖は 0.625~20.0 mmol / L にわたって、相関係数 0.999 と高い直線性を示す分析に成功した。

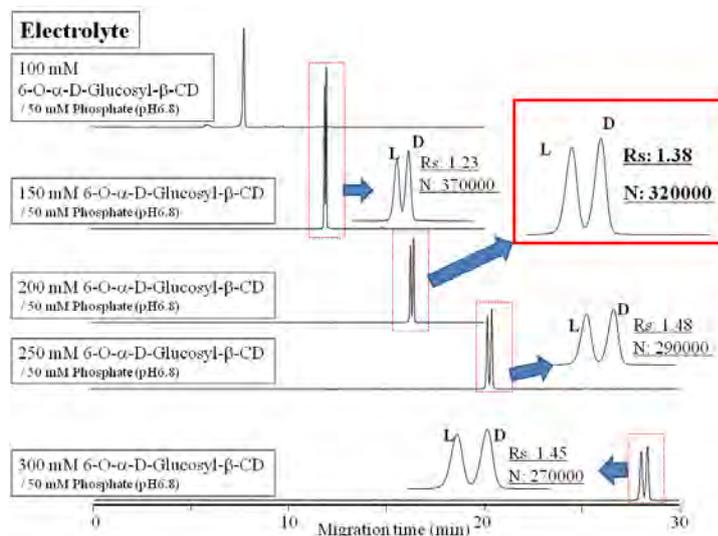


Fig. 1, Chiral resolution of fluorescence labeled DL-glucose using 6-O- $\alpha$ -D-glucosyl- $\beta$ -CD as a chiral selector by capillary electrophoresis

Rs, resolution of DL-glucose isomers; N, theoretical plate numbers.

本研究により、糖の光学活性体を高い分解能で高感度分析することに成功したが、隕石などの地球外の試料中の含量を知るためには、更なる高感度化が必要であり今後、試料濃縮法の検討などを含めた検討を続けていきたい。

# L-10 キャピラリー電気泳動による抗体医薬品の不均一性分析

【武田薬品<sup>1</sup>, 近畿大・薬<sup>2</sup>】 ○前田瑛起<sup>1</sup>, 北総一郎<sup>2</sup>, 木下充弘<sup>2</sup>, 掛樋一晃<sup>2</sup>

## Analysis of Heterogeneities in Monoclonal Antibody Pharmaceuticals Using Capillary Electrophoresis

Eiki MAEDA<sup>1</sup>, Soichiro KITA<sup>2</sup>, Mitsuhiro KINOSHITA<sup>2</sup>, Kazuaki KAKEHI<sup>2</sup>

*Analytical Development Laboratories, Takeda Pharmaceutical Company Ltd.<sup>1</sup>,*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University<sup>2</sup>,*

### Abstract

In this study, the feasibility of capillary electrophoresis (CE) for the analysis of heterogeneity of antibody pharmaceuticals in terms of charge and glycan structure was investigated using commercially available mAb pharmaceuticals, Mylotarg. For charge heterogeneity analysis, cIEF platform was developed and optimized by using design of experiment software, JMP, and then Mylotarg was separated into 22 peaks which showed more than 13 peaks in gel IEF. In optimized conditions, relative standard deviations of migration times of pI markers were less than 0.22%; thus cIEF was demonstrated as a powerful tool to evaluate charge variants in mAb pharmaceuticals. On the other hand, for glycan analysis, *N*-glycans derived from Mylotarg were separated into 18 peaks. In addition, it should be noted that *N*-glycolylneuraminic acid occupied over 90% of whole sialic acids in Mylotarg. These results indicated that it is possible to apply CE to the analysis of heterogeneities of mAb pharmaceuticals, and the further development of applications is anticipated.

### 【緒言】

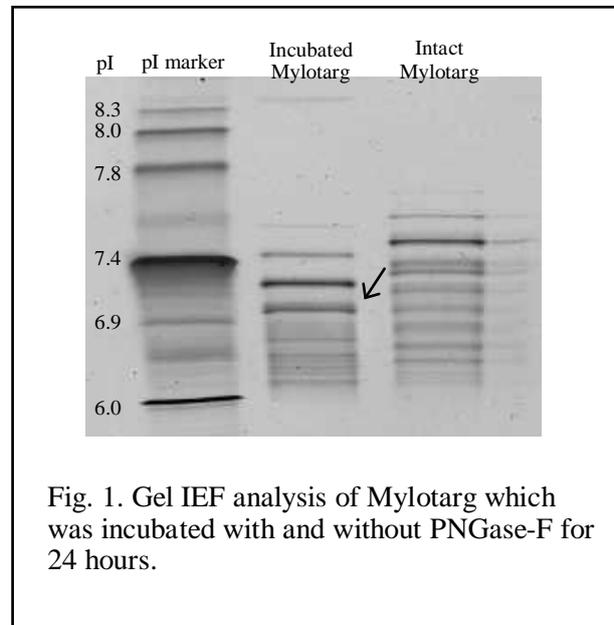
近年のバイオテクノロジーの技術進展に伴い、タンパク質製剤をはじめとするバイオ医薬品の研究開発が世界各地で進められている。特にモノクローナル抗体 (mAb) を用いる医薬品開発は、ヒト抗体及びヒト化抗体作製技術の進展と共に急速に加速し大きな注目を集めている。しかしながら、mAb 医薬品は通常 CHO 細胞などを用いて生産され、その細胞培養精製工程などの影響により生産ロットごとの品質が変化する可能性が無視できないため、mAb 医薬品中の品質同等性を保証するための試験が規制当局からも求められている。

mAb 医薬品が示す分子量、電荷、糖鎖構造不均一性は翻訳後修飾 [1] により引き起こされる。糖鎖修飾は mAb 医薬品の活性に影響を与え得る翻訳後修飾として知られ[2]、糖鎖構造の詳細な検討は医薬品開発において極めて重要な事項である。また、シアル酸のような負電荷を持った糖鎖による修飾は mAb 医薬品の本来の電荷にも影響を与え、電荷の不均一性の一因となる。このように、mAb 医薬品の示す不均一性は互いに影響し合い、それぞれの不均一性を詳細に分析することが他の不均一性を解明するための足がかりとなる可能性を有している。

本研究では、市販の mAb 医薬品である Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin) を試料として、その電荷不均一性及び糖鎖不均一性をキャピラリー電気泳動 (CE) を中心に検討し、mAb 医薬品の構造不均一性分析における CE の利用可能性について検討した。

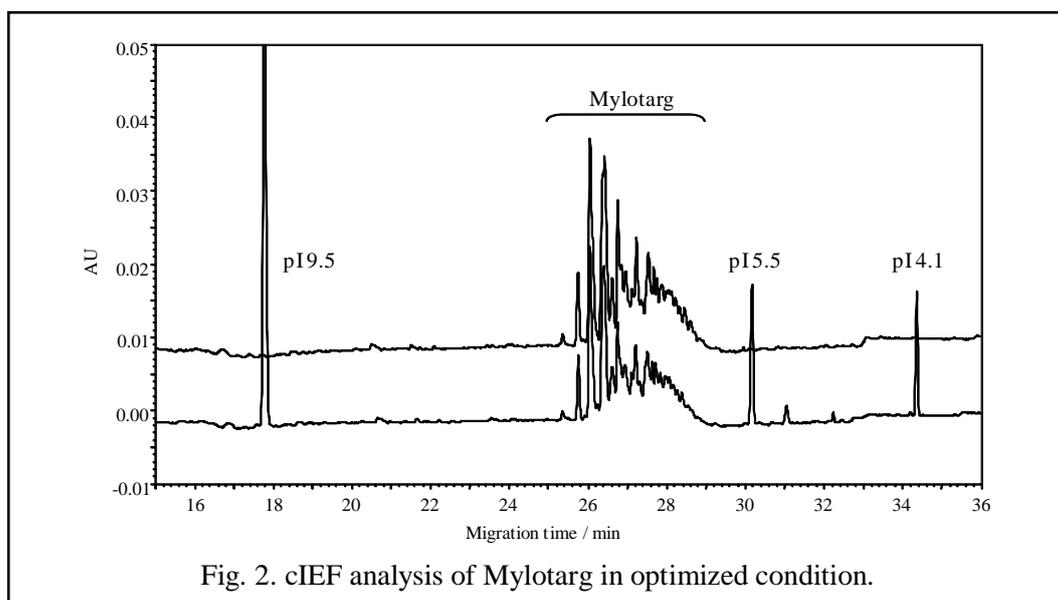
### 【実験】

試料は市販製剤である Mylotarg を用い、調製時にバイアル中で適切に溶解して使用後、残存溶液を近畿大学附属奈良病院薬剤部から供与された。試料は使用まで冷蔵保存した。その他の試薬および試液は特級あるいは HPLC グレードを使用した。Mylotarg からの糖鎖遊離には *N*-グリコナーゼ (PNGase-F) を用い、糖鎖の完全脱離を CE で確認した後、mAb 及び糖鎖をそれぞれ回収した。回収した mAb は脱塩後、ゲル等電点電気泳動 (IEF) 及びキャピラリー等電点電気泳動 (cIEF) により電荷不均一性の検討に使用した。また、回収した糖鎖は 2-アミノ安息香酸で標識後、CE を用いて分析した。



### 【結果及び考察】

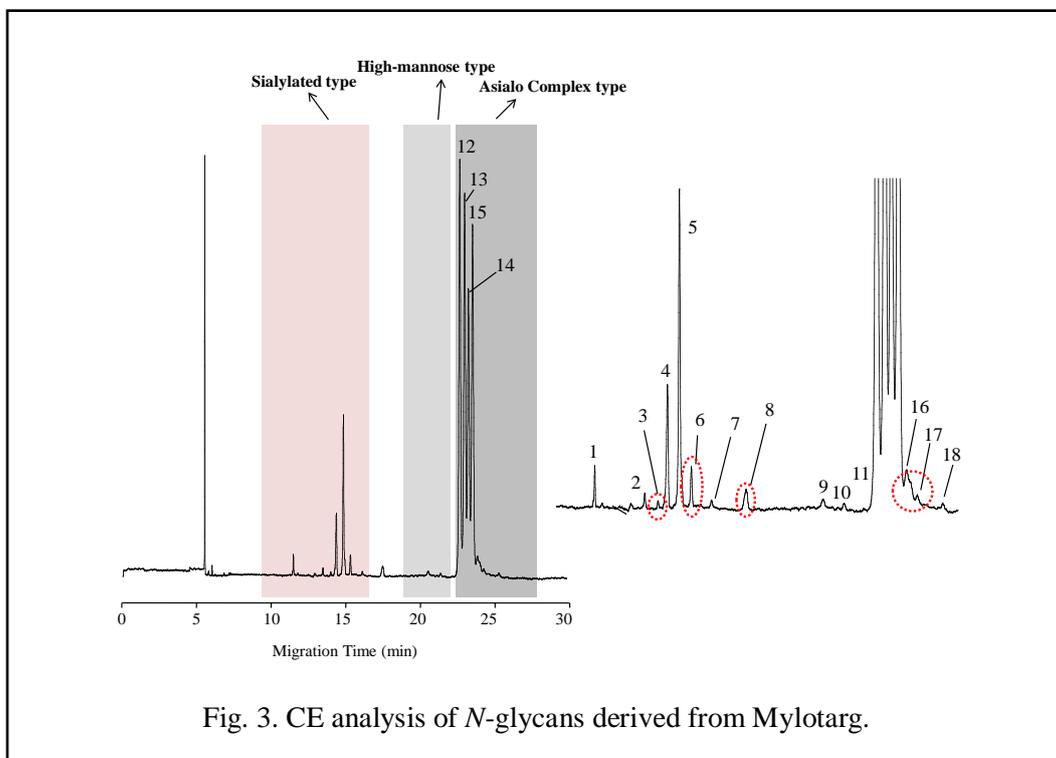
Mylotarg 及び Mylotarg の脱糖鎖体をアガロース IEF ゲル上で分離した結果、Fig. 1 に示す結果が得られた。酵素消化の前後で得られる pI 値が酸性側へシフトしていることから、Mylotarg 内に負電荷を与えるシアロ糖鎖が存在することが示された。また、どちらの試料で



も pI 6.0 付近にバンドが観察されていることから、これらがアシアロ糖鎖あるいは糖修飾を受けていない mAb 由来であることが示された。

次に、cIEFによる電荷不均一性分析のために、ヒトIgG<sub>4</sub>抗体を試料としてDB-1 キャピラリー (内径: 0.05 mm) を用いて分析条件の最適化を行った。キャピラリーに充填するポリマー溶液、キャピラリー内壁へのmAbの非特異的吸着を抑制する尿素、また、試料溶液中のアルギニン、イミノ二酢酸及び両性担体濃度について実験計画法を用いて最適化した。最適条件下でIgG<sub>4</sub> は再現性良く分離され、試料溶液中のpIマーカーの電気泳動時間の相対標準偏差は0.22%以下 (n=11) であった。この最適条件下でMylotargを分析したところ計22本のピークに分離された (Fig. 2)。ゲルIEFで13本のバンドしか観察できなかったことを考えると、cIEFの使用がより詳細なmAb医薬品電荷不均一性情報をもたらすことが示唆された。

一方、回収した糖鎖を内径 0.10 mmのDB-1 キャピラリーで分析し、Fig. 3の結果を得た。



また、回収糖鎖をシアリターゼ処理することによりシアル酸含有糖鎖が全体の約9.3%存在していることが明らかとなった。この結果はPNGase-F処理によりMylotargのpI値が酸性側にシフトしたことと一致している。続いてシアル酸分析を実施し、全シアル酸の約94%をN-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) が占め、N-アセチルノイラミン酸は全体のわずか6%程度しか存在しないことを明らかにした。これまでにNeuGcはヒトの正常組織の糖脂質や糖タンパク質には含まれないと報告されているが [3]、Mylotargは抗マウスCD33 mAbをヒト化した遺伝子組み換えIgG<sub>4</sub>抗体であるため、その分子内にヒトでは見られないNeuGc含有糖鎖が観察されたと考えられる。NeuGcは本来ヒト体内に存在していない分子であるため、mAb医薬品中に

極微量に存在するNeuGcがヒトの健康に与える影響について十分に考慮する必要があることが強く示唆された。

#### 【結論】

本研究では市販mAb医薬品であるMylotargを試料として電荷不均一性及び糖鎖不均一性分析を実施した。本研究で最適化したcIEF条件下では、Mylotargの22本のピークを分離可能であり、電荷不均一性の検討に有用な分析法であることを明らかにした。CEによる糖鎖不均一性分析においては、mAb医薬品中に含まれる糖鎖構造推定が可能であり、それぞれの存在比率を容易に算出可能であることを実証した。さらに、シアル酸分析によりMylotarg中のシアル酸のうちの90%以上がNeuGcであることを明らかにした。本研究により、CEのmAb医薬品構造不均一性分析への適応の可能性を示すことができた。

#### 【参考文献】

1. Mann M. and Jensen ON., *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(3), 255-261.
2. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N. and Shitara K., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(5), 3466-3473.
3. Irie A., Koyama S., Kozutsumi Y., Kawasaki T. and Suzuki A., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(25), 15866-15871.

# L-11

## 組換えアフィニティープローブによるインスリンのアフィニティープローブキャピラリー電気泳動

【東大院・エ・ナノバイオ<sup>1</sup>, 帝京大・薬<sup>2</sup>】

○志村清仁<sup>1</sup>, 梶 昇太郎<sup>2</sup>, 金子真之<sup>2</sup>, 笠井献一<sup>2</sup>

### Affinity Probe Capillary Electrophoresis of Insulin with a Recombinant Affinity Probe

Kiyohito SHIMURA<sup>1</sup>, Shohtarou KAJI<sup>2</sup>, Masayuki KANEKO<sup>2</sup>, Ken-ichi KASAI<sup>2</sup>

*Center for NanoBio Integration, School of Engineering, The University of Tokyo<sup>1</sup>,*

*School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University<sup>2</sup>*

#### Abstract

A recombinant Fab' for human insulin was prepared from a mouse hybridoma producing anti-human insulin monoclonal antibody. The Fab' was labeled with a fluorescent dye at a single cysteine residue and a main component was purified by isoelectric focusing in agarose gel. The purified component was used for affinity probe capillary electrophoresis of insulin using a separation mode of isoelectric focusing. The complex of insulin and the affinity probe was measured using a scanning laser-induced fluorescence detector. The affinity probe appeared as a peak of pI 7.6 with 98% purity, whereas the major peak of the complex with insulin appeared at pI 6.7. The detection limit for standard insulin sample was about 5 pM. A linear relation between the peak area of the complex and the concentration of insulin from 5 pM to 5 nM was obtained.

【緒言】 アフィニティープローブキャピラリー電気泳動は蛍光標識分子であるアフィニティープローブを試料に添加し、アフィニティープローブと複合体を形成した標的分子を蛍光性の複合体としてキャピラリー電気泳動によって分離定量する方法である。1994年の開発以来、キャピラリー等電点電気泳動との組合せによる本法の高感度な特性に着目し、翻訳後修飾解析法としての実用化に向けて様々な開発を行ってきた<sup>1</sup>。その一つとして、高純度のアフィニティープローブを容易に調製するために、組換え抗体の利用を検討してきた。以前、抗 $\alpha_1$ -アンチトリプシン組換え Fab' のアフィニティープローブとしての利用を検討したが、キャピラリー等電点電気泳動で、はっきりとした複合体ピークをとらえることができなかった<sup>2</sup>。今回、より単純なタンパク質抗原であるインスリンに対し、組換えアフィニティープローブを調製し、その有用性を検討した。

【実験】 抗ヒトインスリン抗体産生マウスハイブリドーマ cDNA より PCR によって IgG<sub>1</sub>

の  $V_H$ - $C_{H1}$  領域と  $V_L$ - $C_L$  領域を増幅し、直列に連結して pAK400E プラスミドに挿入した。このプラスミドで大腸菌をトランスフォームし、抗インスリン Fab' 産生株をコロニーリフトアッセイ法によって選択した。産生クローンの Fab' を菌のペリプラズム画分より回収し、抗 E tag カラムで精製した。ヒンジ部のシステインの SH 基をテトラメチルローダミンで蛍光標識した後、アガロースゲル等電点電気泳動によって精製し、アフィニティープローブとして用いた。

キャピラリー等電点電気泳動はフューズドシリカキャピラリー（内径 50  $\mu$ m、長さ 120 mm）の内壁をポリジメチルアクリルアミドで被覆して行った。試料は 2.5% Pharmalyte 3-10、0.1% 酢酸、0.3% テトラメチルエチレンジアミン、0.1% Tween 20 に溶解してキャピラリー全体を満たし、陽極液として 0.1 M リン酸、陰極液として 0.1 M NaOH を用いた。500 V/cm で 5 分間焦点化した後、532 nm のレーザーを励起光源として、蛍光を走査検出した。

【結果と考察】 蛍光標識組換え Fab' の主ピークは pI 7.6、副ピークは pI 7.2 だった。ゲル等電点電気泳動によって精製したところ、主ピークの純度は 64% から 98% に上昇し、これをアフィニティープローブとして用いた。

蛍光標識 Fab' をインスリンと混合し、キャピラリー等電点電気泳動をおこなったところ pI 6.7 に複合体の主ピークが検出された (Fig. 1)。複合体ピークは焦点化時間の経過とともに、しだいに減少した。ピーク面積の対数を焦点化時間に対してプロットすると直線的な関係が得られ、傾きから解離反応の速度定数は  $1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、半減期は約 10 min と計算された。インスリン標準試料について、5 pM から 5 nM の範囲でほぼ直線的な関係が得られた。

遊離アフィニティープローブの pI は 7.6 であるのに対し、複合体の pI は 6.7 と、酸性側にずれていた。これは、pI 5.4 のインスリンとの複合体形成の結果と考えられる。インスリンとの複合体が鋭いピークとして検出できたことから、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンについて、予期したような複合体検出が行えなかった原因は抗原の特性によるものと考えられた。

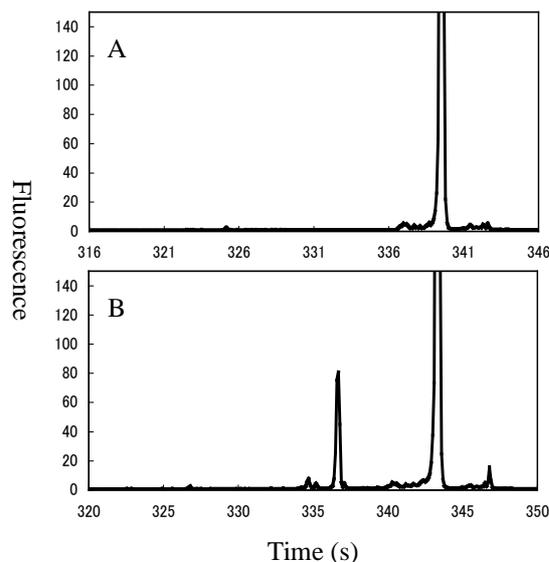


Fig. 1 Affinity probe capillary electrophoresis using 50 nM anti-insulin recombinant affinity probe: A, without insulin; B, with 5 nM insulin. Scan rate, 1 mm/s.

にずれていた。これは、pI 5.4 のインスリンとの複合体形成の結果と考えられる。インスリンとの複合体が鋭いピークとして検出できたことから、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンについて、予期したような複合体検出が行えなかった原因は抗原の特性によるものと考えられた。

#### 【謝辞】

抗インスリン抗体産生ハイブリドーマをご恵与下さった協和発酵株式会社ならびに、pAK400 プラスミドをご恵与くださった A. Plückthun 博士 (Universität Zürich) に深謝いたします。

#### 【文献】

1. Shimura, K., Karger, B. L., *Anal. Chem.* 1994, 66, 9-15.
2. Shimura, K., Hoshino, M., Kamiya, K., Katoh, K., Hisada, S., Matsumoto, H., Kasai, K., *Electrophoresis* 2002, 23, 909-917.

# L-12 微生物細胞のキャピラリー電気泳動におけるポリマー添加効果

【産総研・環境管理】○鳥村政基, 孫 麗偉, 稲垣真輔\*, 田尾博明

## Improvement of Peak Shapes of Microorganisms Migration on CE Using Polymers

Masaki TORIMURA, Liwei SUN, Shinsuke INAGAKI\*, Hiroaki TAO

Measurement Technology Research Group, Research Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

### Abstract

Capillary electrophoresis (CE) was applied to the rapid discrimination and quantification of microorganism. In general, it is difficult to separate and detect microorganisms since the peak shape apt to be broad. However, addition of an appropriate amount of anionic carbohydrate polymer such as sodium alginate or sodium dextran sulfate to the running buffer solution made it possible to obtain a reproducible sharp peak. In this study, we examined the effect of anionic carbohydrate polymers as buffer additives, using lactic bacteria for specimen as a representative example of microorganism.

### 【緒言】

医療・食品・環境など様々な分野において微生物の種類や量を迅速に把握する必要性が益々高まっており、これまでの微生物検査法とは原理的に大きく異なるキャピラリー電気泳動(CE)を利用する技術開発が進められてきた。一般に、CEによる微生物細胞分離で得られるピーク形状は非常にブロードになる傾向があり、実際に複数微生物を分離・検出することは困難と考えられていた。しかし、泳動液に特定の添加剤を添加することにより、開発当初では考えられなかった高分離能で微生物細胞を分離することが可能になってきた。添加剤としてポリエチレンオキサイド(PEO)が着目され、微量のPEO添加によりキャピラリー内の細胞凝集が促進された結果、細胞ピークの理論段数が飛躍的に改善されることが報告された[1]。しかしながら、PEOを添加剤として用いた場合、試料注入した細菌の濃度により泳動時間が変化し、その濃度が高いほど電気泳動移動度が減少するという特異的な現象が観測されている。一方、我々はこれに対し、いくつかの陰イオン性の糖ポリマーを添加剤として用いることにより、乳酸菌細胞の泳動ピーク形状が改善されることを明らかにしてきた[2]。本研究ではCEによる微生物の迅速な分析法の確立を目的に、泳動液に対する陰イオン性の糖ポリマーを中心とする各種添加剤の効果について、その機構解明を試みた。

### 【実験】

キャピラリー電気泳動装置としてBio-Focus CE 3000 (Bio-Rad)あるいはP/ACEシステムMDQ (Beckman)を用いた。キャピラリーは内壁が未修飾で内径50 μm、全長24 cm(有効長20 cm)のものを泳動前毎に1.0 M NaOH、超純水および泳動液で十分に洗浄して使用した。

各種微生物細胞は培養後、それぞれの培養液から 1.0 mL 採取し、1,000×g で 2 分間遠心し、泳動液に懸濁させたものをキャピラリー電気泳動測定に供した。乳酸菌試料は日本乳業技術協会等から購入し、MRS 培地を用いて 37 °C で 24 時間培養を行った。また、顕微鏡下で観察される細胞の泳動挙動を動画解析するために、ライブラリー社の 2 次元動画計測ソフト「Move-tr/2D」を用いた。

### 【結果と考察】

Fig. 1 に *Lactobacillus delburueckii sub. bulgaricus* B-5b について、泳動液にアルギン酸ナトリウムを添加した場合のエレクトロフェログラムの変化を示す。このような効果を示すポリマーとして、デキストラン硫酸ナトリウムやヘパリンナトリウム、コンドロイチン硫酸 C ナトリウムについても確認できた。

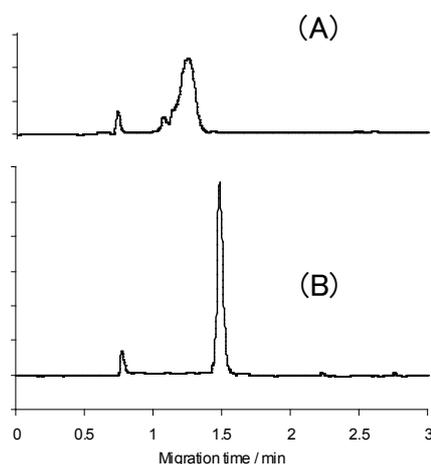
一方、このような効果は、当該ポリマーを泳動液に添加した際には観察されるが、注入サンプル溶液中にだけ細胞と共に共存させてもその効果は観察されないだけでなく、細胞とポリマーとの間に相互作用のようなものは発生していないように見受けられた (Fig. 2)。このことは、泳動する細胞が細胞間の反発などにより分散する過程でポリマーが特別な機能を果たしていると考えられる。

現在、どのような時間スケールでポリマーが機能を発揮するのか、また電場の印可とどのように関係しているかについて、細胞の泳動画像解析を含めた調査を行っている。本シンポジウムでは、その詳細について報告する。

### 【文献】

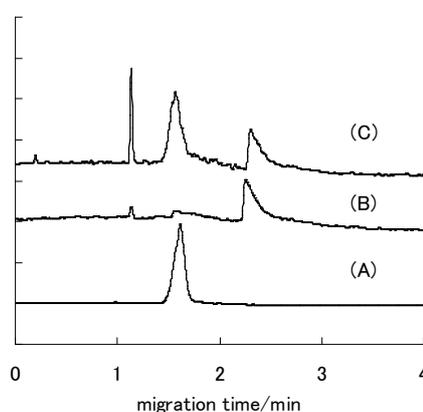
1. D. W. Armstrong, M. Girod, L. He, M. A. Rodriguez, W. Wei, J. Zheng and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5523.
2. 稲垣真輔, 鳥村政基, 孫 麗偉, 佐藤浩昭, 田尾博明, 新谷智吉, 第 24 回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE'04).

\* : 現在の所属は静岡県立大学薬学部



**Fig. 1 Electropherograms of cultured cells of *L. bulgaricus* B-5b.**

Conditions: running buffer: (A) 10 mM borate buffer, (B) 10 mM borate buffer containing 0.075 % (w/v)



**Fig. 2 Electropherograms of cultured cells of *L. bulgaricus* B-5b.** Samples (A)B-5b, (B) sodium alginate, (C)B-5b+sodium alginate.

# L-13

## 部分的に短鎖グラフト鎖を導入した金蒸着 LDPE 表面へのリン脂質自己組織化膜の構築

【岐阜薬大】○宮本洋行, 笹井泰志, 近藤伸一

### **Fabrication of Self-Assembled Phospholipid Layer onto the Low Density Polyethylene (LDPE) Coated with Gold Partially Grafting Short Alkyl Chains**

Hiroyuki MIYAMOTO, Yasushi SASAI and Shin-ichi KONDO

*Gifu Pharmaceutical University*

#### **Abstract**

We have reported a novel fabrication of self-assembled phospholipids layer on a hydrophobic polymer by the plasma-assisted method. The key technology of this method would be the stable and robust introduction of short alkyl-grafted chains onto the polymer surface. In this study, we examined the fabrication of self-assembled phospholipid layer onto the low-density polyethylene (LDPE) coated with gold (LDPE-Au). 1-Hexanethiol was introduced onto the LDPE-Au to obtain the alkyl-grafted LDPE (LDPE-Au-SH). Then, LDPE-Au-SH was immersed into the suspension of phosphatidyl choline (PC) to prepare the self-assembled phospholipids layer (LDPE-Au-SH-PC). The density of PC on LDPE-Au-SH-PC was ca 38  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . It was also confirmed that the self-assembled phospholipids layer obtained was thermally stable.

#### **緒言**

我々はこれまでにプラズマ表面処理を利用した高分子基材表面への生体分子固定化に関する一連の研究を展開している。その研究過程において、プラズマを利用した疎水性高分子基材表面への親水性高分子の固定化に成功するとともに、その表面に短鎖アルキル基を導入した基材をリン脂質懸濁液に浸漬することにより、高分子基材表面に容易にリン脂質自己組織化膜を構築することが可能であることを見出した(図1)1)。また、本方法により得られたリン脂質自己組織化膜は80°Cに加熱しても基材表面からの脱離も無いことから高い熱安定性を持ち、かつ流動性を有していることを明らかにした。本手法のキーポイントは、高分子基材表面に短鎖アルキル基を強固に固定化する点であると考えられる。したがって、プラズマ表面処理に限らず他の手法においても同様な高分子表面へのアルキル基の導入が可能であるならば、高分子表面にリン脂質膜を構築することが可能であると考えられる。

チオールやジスルフィドなどの化合物は、金表面に結合し、自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayers: SAMs)を形成することがよく知られている。また、アルカンチオール類を用いて形成したSAMs表面にリン脂質膜を構築する研究はあるものの、部

分的にアルカンチオールを導入した表面へのリン脂質膜形成に関しては我々の知る限り報告されていない。

かかる背景より、本報告では、低密度ポリエチレン(LDPE)表面に金蒸着を行い、金コーティング LDPE(LDPE-Au)を調製した後、その表面に低密度にアルカンチオールを導入し、短鎖アルキル基を持つ基材(LDPE-Au-SH)を構築した。引き続き、LDPE-Au-SH をホスファチジルコリン(PC)懸濁溶液に浸漬することにより、リン脂質自己組織化膜を有する高分子基材(LDPE-Au-SH-PC)の構築について検討した。また、得られたリン脂質自己組織化膜の熱安定性についても検討を行った。

## 実験

LDPE (1cm X 3cm) 表面に真空蒸着により金コーティングを行い、LDPE-Au を作成した。アルカンチオールとして 1-hexanethiol を用いた。0.4 $\mu$ M 1-hexanethiol-ethanol 溶液 (5 ml) に LDPE-Au を 5 時間浸漬させ LDPE-Au-SH を構築した。LDPE-Au-SH を種々の濃度の PC 懸濁液に浸漬することにより、リン脂質自己組織化膜(LDPE-Au-SH-PC)を構築した。得られたリン脂質自己組織化膜について PC 固定化密度の定量及び熱安定性の評価を行った。LDPE-Au を PC 懸濁液に浸漬したもの(LDPE-Au-PC)についても同様の評価を行った。

## 結果及び考察

0.8 mg/ml の PC 懸濁液を用いて調製した LDPE-Au-SH-PC の固定化密度は 7.2  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> であり、既報のプラズマを利用した構築法 (LDPE-HE-PC) と同程度の PC 密度を有しており、簡便にリン脂質自己組織化膜の構築が可能であった。

熱安定性試験は、LDPE-Au-SH-PC を蒸留水に浸漬し経時的に加熱を行い、遊離した PC 量を定量することにより行った。その結果、LDPE-Au-SH-PC では 50 $^{\circ}$ C 付近までは検出範囲内で PC の脱離は認められなかった。現在、熱安定性に関してより詳細に検討を行っている。

## 文献

1. S. Kondo, Y. Sasai, Y. Yamauchi, M. Kuzuya, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **22** 477 - 480 (2009).

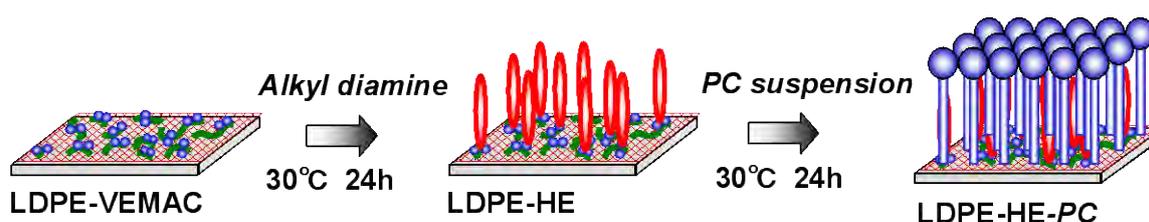


図 1 高分子基板上へのリン脂質自己組織化膜の構築法

# L-14 イオン会合キャピラリー電気泳動分離系における疎水性相相互作用の制御因子および新しい汎用泳動緩衝溶液モディファイアーとしての尿素の利用

【東北大院環境】 ○高橋 透, 櫻井 隆郎, 星野 仁

## The Use of Urea As A Control Factor of the Hydrophobic Interaction in Ion-association Capillary Electrophoresis And A New Versatile Electrophoretic Buffer Solution Modifier

Toru TAKAHASHI, Takao SAKURAI, Hitoshi HOSHINO

*Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University*

### Abstract

Urea was shown to be effective in improving the separation of Ion-association (IA) capillary electrophoresis (CE). The fine-tuning of the resolution of IA-CE separation of four anionic metal complexes of Al(III), Co(III), Cr(III), and Fe(III) with 2,2'-dihydroxyazobenzene-5,5'-disulfonate (DHABS) was accomplished using urea as an electrophoretic buffer modifier. The reduction of the ion-association constants between complexes and tetrapentylammonium in aqueous urea solution indicates the hydrophobic interaction contributing to the ion-association during IA-CE separation processes can be controlled by urea. The additional advantages of using urea as an electrophoretic buffer modifier are that it does not significantly suppress the EOF but it sharpens the peak. Urea, therefore, would be a new concept electrophoretic buffer modifier differs from the organic solvents used in conventional buffer modifiers, and allows for a resolution enhancement without any expansion in the separation period. These characteristics of urea are also expected to be beneficial for the resolution enhancement of other CE separation systems.

【緒言】 2,2'-dihydroxyazobenzene-5,5'-disulfonate (DHABS) 金属錯体のイオン会合 (IA) キャピラリー電気泳動 (CE) 分離では, アニオン性金属錯体とその反対符号の電荷を有し, かつ疎水的なイオン会合試薬 (テトラアルキルアンモニウム) との間の静電相互作用, および疎水性相互作用を駆動力とするイオン会合平衡に基づいて分離が達成される. IA-CE おける分離能は, イオン会合試薬の種類とその濃度によって決定されるが, イオン会合試薬が適切でない場合, その濃度を変化させても良好な分離を得ることができない. 例えば, DHABS 錯体の分離ではイオン会合試薬として tetrabutylammonium (TBA<sup>+</sup>) が有効であったが, TBA<sup>+</sup> よりも大きく疎水的なイオン会合試薬を用いると良好な分離は得られない. 基本的に, IA-CE は適度な疎水性を持つほとんどのイオン性溶質の CE 分離に適用可能な分離テクニックがあるが, 必ずしもすべての分離系において適切なイオン会合試薬が見つかるとは限らない. 従って, IA-CE の適用範囲の拡大を図る上で, その分離能を向上するための新たな分離パラメーターの導入が必要になる. これに対し, 我々は濃厚尿素水溶液を移動相として用いる逆相分配 (RP-) HPLC を実現し, 尿素によって RP-HPLC 分離プロセスにおける疎水性相互作用, すなわち, 溶質の分配, 固定相アルキル鎖の溶媒和状態の制御が可能であることを見出した<sup>2</sup>. そこで, 演者らは IA-CE の泳動緩衝溶液モディファイアーとして尿素を導入し, 尿素による溶質とイオン会合試薬とのイオン会合過程における疎水性相互作用の制御によってその分離能を向上することを着想した. 本講演では尿素の添加による DHABS 錯体の IA-CE 分離における分離能の向上に加え, 疎水性相互作用の制御因子としての尿素の働きについて溶液化学的な側面から考察した. また, IA-CE 分離系において尿素を使用した場合の分離特性について検討し, 従来用いられてきた有

機溶媒とは異なる特性を持った新しいタイプの汎用的な泳動緩衝溶液モディファイアーとしての尿素の可能性について調べた。さらに、IA-CE 以外のいくつかの CE 分離系に泳動緩衝溶液モディファイアーとして尿素を導入したところ顕著な分離能の向上が認められたのでこれについても併せて報告する。

【結果と考察】 Al(III), Co(III), Cr(III)および Fe(III)の4種類の DHABS 錯体は、電荷が等しく、分子サイズにもほとんど差異がないため、通常の CE 分離系では全く分離することができないが、TBA<sup>+</sup>をイオン会合試薬として用いた IA-CE 分離では4種類の DHABS 錯体の分離が達成された。これに対し、TBA<sup>+</sup>よりも分子サイズが大きく疎水的な tetrapentylammonium (TPA<sup>+</sup>)をイオン会合試薬として用いた場合、4つの錯体のうち Co(III)錯体と Cr(III)錯体との分離を達成することができなかった。そこで、泳動緩衝溶液に 1-5M の尿素を添加したところ分離挙動に変化が見られた。さらに、尿素濃度について詳細に検討したところ、1.5 M の尿素を添加したとき、ほぼ完全に4種類の錯体を分離することができた。従って、IA-CE 分離系の分離能を向上するための泳動緩衝溶液モディファイアーとして尿素が有用であることが分かった。一方、IA-CE を利用して DHABS 錯体と TPA<sup>+</sup>とのイオン会合定数 ( $K_{ip}$ ) を算出したところ、3M 尿素水溶液中の  $K_{ip}$  は水溶液中のそれに比べて小さい値が得られた。水中の疎水性分子の周囲にはバルクの水分子に比べ構造性の高い水の層（疎水性水和殻）が形成され、疎水性水和殻中の水分子は負の  $\Delta S$  を持っている。疎水性相互作用とは、疎水的な分子同士の会合による疎水性水和殻を形成する水分子の減少に伴う負の  $\Delta S$  の解放によるエントロピー駆動系である。尿素水溶液中では疎水性水和殻中の水分子の一部が尿素分子で置換されており、尿素分子は水分子よりもかさ高いため疎水性水和殻中の分子数は水液中のそれに比べて減少し、その結果、疎水性水和殻の有する負の  $\Delta S$  も減少する。以上のようなエントロピー効果の減少の結果として尿素による疎水性相互作用の減少効果が説明されており<sup>3</sup>、本系でも尿素の添加による同様の効果によって DHABS 錯体と TPA<sup>+</sup>とのイオン会合が抑制されたものと考えられる。従って、IA-CE 系における泳動緩衝溶液モディファイアーとしての尿素の働きは、CE 分離プロセスにおける疎水性相互作用の制御と、それに伴う分離選択性の変化にあると考える。

尿素およびいくつかの有機溶媒を泳動緩衝溶液モディファイアーとして用いたときの各々の CE 分離特性について検討した。有機溶媒系では泳動緩衝溶液への添加濃度の増加に伴って電気浸透流速度が大幅に減少したが、尿素を加えた場合、同様に濃度の増加と共に電気浸透流速度は減少したものの、その度合いは有機溶媒系に比べて小さかった。一方、尿素の添加により顕著なピークの尖鋭化が見られた。ピークの尖鋭化は実質的な分離効率の向上を示している。従来、泳動緩衝溶液モディファイアーとして有機溶媒が多用されてきたが、そのコンセプトは電気浸透流を抑制しセパレーションウィンドウを拡大することにある。従って、上述の尿素系の分離特性は、尿素を使用することによってセパレーションウィンドウを拡大することなく分離能の向上を達成することが可能であり、尿素は有機溶媒とは全く異なった新しいタイプの泳動緩衝溶液モディファイアーとして有用であることを示唆している。さらに、金属イオン-DNA 間相互作用を利用する一塩基変位一本鎖 DNA の CE 分離系<sup>4</sup>、および DNA 塩基の酸解離特性を利用する一塩基変位一本鎖 DNA の CE 分離系<sup>5</sup>のいずれにおいても尿素の添加による顕著な分離の向上が認められたことから、尿素は種々の CE 系への適用が可能な汎用泳動緩衝溶液モディファイアーとして有用であることが示唆される。

【文献】 1) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *J. Chromatogr. A*, **1993**, 652, 539-546. 2) T. Takahashi, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Anal. Sci.*, **2001**, 17, 910-915. 3) J. Tsai, M. Gerstein, M. Levitt, *J. Chem. Phys.*, **1996**, 104, 9417- 9430. 4) T. Takahashi, T. Sakurai, K. Hirata, H. Hoshino, *Analyst*, **2009**, 134, 1299-1301. 5) 櫻井隆郎, 高橋透, 星野仁, 日本分析化学会第 58 年会講演要旨集, B1004, pp. 29 (2009).

# L-15

## キャピラリー電気泳動におけるタンパク質の分離メカニズム —分子ふるいの細孔サイズとタンパク質サイズ—

【科学技術振興機構 SORST<sup>1</sup>, 東大院新領域<sup>2</sup>, 産総研ナノチューブ応用研セ<sup>3</sup>, 阪大フォトンクス融合研究セ<sup>4</sup>】 ○眞弓皓一<sup>1,2</sup>, 住友慶子<sup>1</sup>, 増田光俊<sup>1,3</sup>, 南川博之<sup>1,3</sup>, 酒井康博<sup>1,2</sup>, 横山英明<sup>2</sup>, 清水敏美<sup>1,3</sup>, 山口佳則<sup>1,4</sup>, 伊藤耕三<sup>1,2</sup>

### Protein Separation Mechanism in Capillary Electrophoresis

Koichi MAYUMI<sup>1,2</sup>, Keiko SUMITOMO<sup>1</sup>, Mitsutoshi MASUDA<sup>1,3</sup>, Hiroyuki MINAMIKAWA<sup>1,3</sup>, Yasuhiro SAKAI<sup>1,2</sup>, Hideaki YOKOYAMA<sup>2</sup>, Toshimi SHIMIZU<sup>1,3</sup>, Yoshinori YAMAGUCHI<sup>1,4</sup>, Kohzo ITO<sup>1,2</sup>

*SORST, Japan Science and Technology Agency<sup>1</sup>, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo<sup>2</sup>, Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<sup>3</sup>, Photonics Advanced Research Center, Osaka University<sup>4</sup>*

#### Abstract

We studied the relationship between the physical properties including the structure, pore size and homogeneity of sieving polymer, and separation mechanism of protein in SDS capillary electrophoresis (SDS-CE). We employed dynamic light scattering (DLS) in order to reveal the molecular sieving mechanism in SDS-CE. DLS measured the mesh size  $\xi$  and homogeneity of polymer solutions directly. With decreasing the mesh size  $\xi$ , the peak spacing increased in the range of the mesh size  $\xi < 10$  nm, where the mobility  $\mu$  of proteins changed with the mesh size and the molecular sieving effect acted on the migration of proteins. Furthermore, peak width was dependent of sieving molecular species: PAA < PEO < HEC. This polymer dependence was related to the fact from the DLS result that PAA solution formed the most homogeneous polymer network in those three sieving polymers. In this study, we expected that the optimized sieving medium for the efficient capillary polymer separation for proteins was a homogeneous polymer network medium and whose pore size is less than 10 nm.

#### 【緒言】

高分子の分子篩い効果を利用したキャピラリー電気泳動における分離原理は、理論・実験の両面で様々な研究がなされてきたが、それらは主にDNAを観察対象とし、高分子分離媒体の内部でのDNAの泳動挙動を解析した研究である。分離媒体である高分子ゲルや溶液の内部構造が分離に与える影響については、高分子の網目サイズを理論的なアプローチにより見積もり、キャピラリー電気泳動の結果と併せて研究がされているが、実験的な検証は行われていなかった。我々は分離媒体である高分子化合物の網目構造を動的光散乱法（DLS）によって実験的に検証し、キャピラリーゲル電気泳動における分析対象物の分離挙動との比較を行った。動的光散乱法は高分子溶液や高分子ゲルのナノ構造を短時間でかつ簡易に分析できる計測手法で、高分子網目のサイズや不均一性を評価することができる<sup>1</sup>。本研究では、電気泳動の分析対象としてタンパク質に着目し、タンパク質の分離原理の解明を試みた。ここで得られる知見は、タンパク質分離に対して理想的な分離媒体を設計する指針を与え、さらには分子篩い効果を原理とする高分子化合物の分離において分離対象の分子種によらない普遍的な分離原理の解明につながると考えられる。本研究が、今後様々な分離媒体の構造解析に動的光散乱法が用いられる契機となることを期待したい。

### 【実験】

分離媒体として、分子量の異なるヒドロキシエチルセルロース (HEC) 3 種類、ポリアクリルアミド (LPA) 2 種類、ポリエチレンオキサイド (PEO) 7 種類を準備し、それぞれ様々な濃度の水溶液に調整した。これらを用いて FITC で蛍光標識し、SDS によって変性させた分子量 14,300–97,200 の 6 種類のタンパク質をキャピラリーゲル電気泳動によって分離した。また、比較のために、HEC 水溶液を用いて二重鎖 DNA (20–15,000 bp) の分離分析も行った。一方、キャピラリー電気泳動で用いた高分子溶液に対して動的散乱測定を行い、高分子網目の平均網目サイズと不均一性を評価した。

### 【結果と考察】

まず、高分子網目の網目サイズがタンパク質の移動度に与える影響を調べた。Fig. 1 に動的散乱法によって実測した網目サイズ  $\xi$  とタンパク質の移動度  $\mu$  の関係を示す。分離媒体である高分子の化学種、分子量による移動度の差異は小さく、タンパク質の移動度は主に網目サイズによって支配されている。また、網目サイズが 10 nm 以下になると急激に移動度の網目サイズ依存性が強くなり、高分子網目による分子篩効果が有効に働いていることが分かる。実際、細孔サイズが 10 nm 以下の領域では、タンパク質間の移動度差が大きく、分離に有利であった。この移動度差は網目サイズが小さいほど大きくなった。

一方、タンパク質分離における理論段数は、高分子網目の化学種によって異なり、LPA を用いた場合が最もシャープなピークを与えた。動的散乱の測定によって、LPA は他の高分子に比べて均一な網目を形成することが分かっており、網目の均一性が理論段数に大きな影響を与えると考えられる。以上の結果を総合すると、分子量 14,300–97,200 のタンパク質を分離するには、細孔サイズが 10 nm 以下の均一な網目構造を有する分離媒体が適していることが分かった。

最後に、分離原理の解明において最も重要な、タンパク質の移動度と分子量の関係を調べた。絡み合った高分子のダイナミクスを理論的に記述したレプテーション理論に従えば、移動度はタンパク質の全長  $L$  と網目サイズ  $\xi$  の比  $L/\xi$  に支配されるはずである。Fig. 2 に移動度  $\mu$  と  $L/\xi$  の関係を示す。広い分子量範囲の二重鎖 DNA についても同様の解析を行い、タンパク質の結果と比較した結果、DNA とタンパク質とは化学構造や剛直性が異なるにも関わらず、キャピラリー内部における分子ダイナミクスは同じ理論モデルに従うことが分かった。解析の詳細については発表当日に報告する。

### 【文献】

1. 高分子学会編、高分子の構造 (2) 散乱実験と形態観察、共立出版 1997.
2. Sumitomo, K.; Mayumi, K.; Yokoyama, H.; Sakai, Y.; Minamikawa, H.; Masuda, M.; Shimizu, T.; Ito, K.; Yamaguchi, Y. *Electrophoresis* 2009, DOI: 10.1002/elps.200900255.

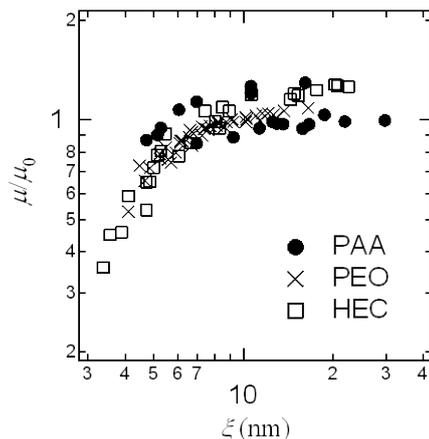


Fig.1 Plot of normalized mobility  $\mu/\mu_0$  as a function of mesh size  $\xi$  for lysozyme.  $\mu_0$  is the free mobility of lysozyme in the buffer solutions.

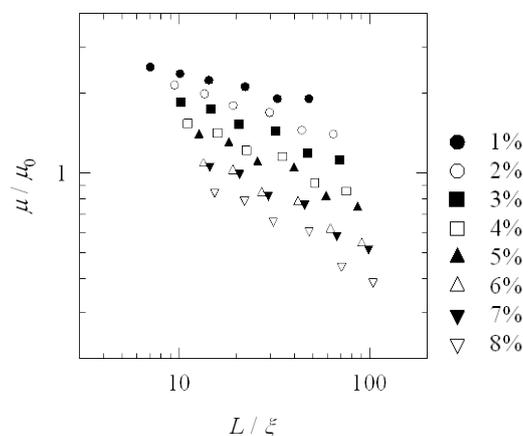


Fig.2 Plot of normalized mobility  $\mu/\mu_0$  as a function of the ratio of  $L/\xi$ .  $L$  is the contour length of the proteins

**Capillary electrophoresis of polyelectrolytes with different copolymerization ratios**

Yasuhiro SATO, Shoichi NAKAMURA, Toshio TAKAGI

*Otsuka Electronics Co.***Abstract**

Polyelectrolytes are used in the chemical industry and food industry etc. as a thickener, swelling agent, dispersant and flocculant. The property of polyelectrolyte differs with molecular weight and degree of dissociation. The molecular weight has been evaluated in measurement by liquid chromatography(HPLC), static light scattering (SLS) and nuclear magnetic resonance (NMR). However the charge state of the polyelectrolyte has not been detail. Therefore we tried the measurement of charged polyelectrolyte with different copolymerization ratios by capillary electrophoresis(CE).The value of R.S.D.%(N=5) is between 0.47 and 1.25 for migration time. The value R.S.D. %(N=5) is between 1.33 and 3.72 for peak area. As a result, the difference in mobility of the copolymers with different copolymerization ratios was detected as peaks by CE.

**【はじめに】**

高分子電解質を共重合体化した水溶性ポリマーは、分散、凝集、増粘、膨潤などの機能を持っており、化学工業、環境、食品など幅広い分野で添加剤として用いられてきている。共重合体の機能は、その分子量や重合度、あるいは解離基の違いによって大きく異なる。このような共重合体の分子量や重合度については高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、静的光散乱 (SLS)、核磁気共鳴 (NMR) などによる分析がおこなわれている。しかし、どれも共重合比の異なる共重合体の荷電状態について詳細に評価をおこなうことは困難である。そこで我々は、最初に高分子電解質の電気泳動挙動を観測するために、分子量の異なるポリスチレンスルホン酸のキャピラリー電気泳動 (CE) による分析をおこない、次に共重合比の異なる共重合体についての測定を試みたので報告する。

**【実験】**

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子 (株) 製 CAPI-3300 を用いた。ポリスチレンスルホン酸の測定に使用した泳動液はリン酸緩衝液 (pH 9.0)、キャピラリーは内径 75  $\mu$ m、全長 50.0cm、有効長 37.8cm を使用した。試料注入方法は落差法 25mm、30 秒であった。検出はダイレクト UV 法 (200nm) でおこなった。印加電圧は 20 kV であった。また、測定に使用したポリスチレンスルホン酸は Americanpolymer Standards 社製のものを使用した。

ポリアクリル酸とポリアクリルアミド共重合体 (copolymerA、B、C、D) の測定は、泳動液にバックグラウンド吸収剤を含むトリス緩衝液 (pH 9.0) を使用した。試料注入方法は加圧法 5kPa、4 秒であった。検出はインダイレクト UV 法 (230nm) でおこなった。印加電圧は 15 kV であった。

測定に使用した共重合体は MT アクアポリマー株式会社より提供されたものを使用した。

#### 【結果と考察】

高分子電解質の電気泳動挙動を観測するため、分子量の異なるポリスチレンスルホン酸について測定をおこない移動度を求めた。ポリスチレンスルホン酸の移動度は分子量 ( $M_w$ ; 14,500~900,000) にかかわらず  $-6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  程度と一定になり、分子量に鈍感であることがわかった。この事は、Hermans と Fujita ら<sup>1)</sup> により理論的に予測され、Noda ら<sup>2)</sup> により実証された理論 (高分子電解質の電気泳動挙動は、全体の荷電ではなく単位当たりの荷電に敏感である) とよく一致する結果が得られた。

次に、排水処理施設などで、よく凝集剤として使用されるポリアクリル酸とポリアクリルアミドの共重合体 (分子全体に占めるアクリル酸の比率が A、B、C そして D の順序で低くなる) について測定をおこなった結果を Fig 1 に示す。Fig 1 の 3 分付近にみられる大きなピークは電気浸透流に相当し、そのピークよりも速いものほど正荷電量が大きく、遅いものほど負荷電量が大きくなる。従って、サンプルピーク (Fig 1 中の矢印部分) の migration time は分子全体のアクリル酸の比率を、ピーク形状は共重合度分布をよく反映している事がわかる。また、それぞれのサンプルについての再現性 ( $N=5$ ) は、migration time について R. S. D. (%) = 0.47~1.25、Peak Area について R. S. D. (%) = 1.33~3.72 と良好であった。以上の結果から、キャピラリー電気泳動による共重合体の測定において、ピーク形状および検出時間は分子量とはほとんど無関係であるが、重合比の違いについては密接に関係している事がわかった。そのため、共重合体の評価をおこなう手段として、キャピラリー電気泳動の利用は非常に有効であると考えられる。

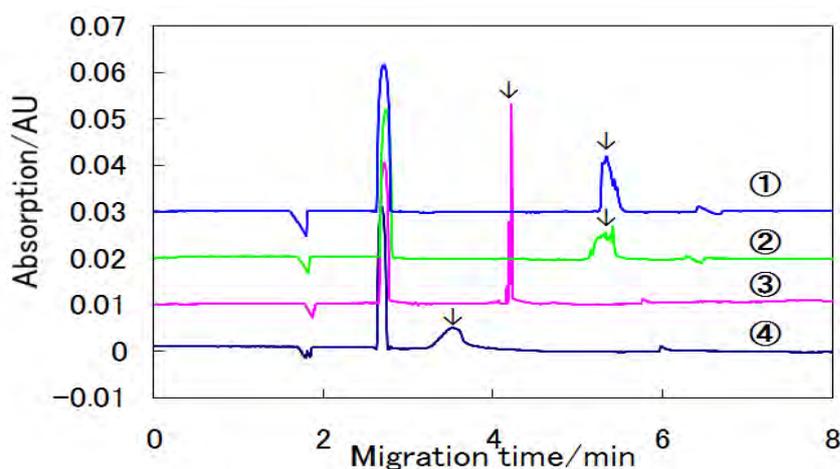


Fig1 Electropherogram of ①copolymerA(0.5g/L), ②copolymerB(0.5g/L),  
③copolymerC(0.5g/L), ④copolymerC(2.5g/L)

#### 【参考文献】

1. Hermans, J. J., Fujita, H., Proc. Akad. Amsterdam., B58, 182-187 (1955)
2. Noda, I., Nagasawa, M., Ota, M., J. Am. Chem. Soc., 86, 5075-5079 (1964)

# L-17 トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化 (11)

【京大院工】○末吉 健志, 橋場 皇太, 田中 隆太, 北川 文彦, 大塚 浩二

## Transient-Trapping in MEKC for High-Sensitive Detection. 11

Kenji, SUEYOSHI\*, Kota HASHIBA, Ryuta TANAKA, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA

*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

### Abstract

This paper reports a novel on-line sample preconcentration based on transient-trapping (tr-trapping) to improve the detectability and separation efficiency in micellar electrokinetic chromatography (MEKC). Applying the tr-trapping to microchip MEKC (tr-trapping-MCMEKC), the evaluation of the effective diffusion constants by a fluorescence imaging technique clarified the tr-trapping process including the sample preconcentration due to trapping, separation due to releasing and MEKC, band broadening due to desweeping, and migration based on zone electrophoresis. In tr-trapping-MCMEKC, furthermore, the hydrophobic rhodamine dyes could be 580-fold concentrated and separated within 5.0 s at the effective separation length of 5.0 mm, whereas they could not be resolved in conventional pinched injection-MCMEKC.

### 【緒言】

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) は, 広範な化合物に対して高い分離能を有する優れた分離分析法として知られている一方で, 光学検出における低い濃度感度が問題視されることが多い。その改善のために, これまでも電場増強スタッキング法やスウィーピング法などの様々なオンライン試料濃縮法の適用が試みられてきたが, これらの手法では試料の大量導入により有効分離長が減少し分離能が低下するという欠点が指摘されている。そこで, 当研究室では MEKC 分析における濃度感度と分離能を同時に向上可能な新規オンライン試料濃縮法としてトランジェントトラッピング (tr-trapping) 法を開発し, その原理の解明や高性能化, 実試料分析への適用などについて検討を行ってきた<sup>1</sup>。本研究では, 分析過程の画像解析が可能なマイクロチップ電気泳動 (MCE) 分析によりその基本的な原理を検証し, マイクロチップ MEKC (MCMEKC) の分離能および濃度感度の向上について検討を行った。

### 【実験】

泳動液 (BGS) にはリン酸塩緩衝液 (pH 7.2) を, 試料溶液 (S) にはローダミン類の泳動液溶液をそれぞれ用いた。濃縮・分離用のミセル溶液 (M) には, 電気伝導度を BGS と同じになるよう調整した硫酸ドデシルナトリウム (SDS) のリン酸塩緩衝液溶液を用いた。MCE 分析においては, tr-trapping 法を MCMEKC 分析へ適用するために, M および S プラグを連続して分離チャンネルに導入可能な 5 叉路型の試料導入チャンネルを有する石英製マイクロチップを製作して使用した。電圧は PC 制御の 5ch 型高圧電源によって印加し, 蛍光顕微鏡を利用したレーザー励起蛍光装置 (励起/検出波長, 532/600 nm) により検出を行った。

## 【結果と考察】

部分的に注入した M プラグを利用して試料を濃縮・分離する tr-trapping 法では、ミセルによる保持の影響を強く受ける試料は M プラグとの界面近傍においてミセルの S プラグ方向への拡散の影響を受けてトラップされる (Fig. 1b)。その後、M プラグの拡散等によるミセル濃度の減少にともなって保持が減少し、トラップされていた試料は保持の弱い順番に M プラグ中へリリースされる。このとき、リリースされる時間の差により試料は分離される (Fig. 1c)。その後、M プラグ中では MEKC の、BGS ゾーン中ではマイクロチップゾーン電気泳動 (MCZE) の原理にそれぞれ基づいて試料は泳動する (Fig. 1d, 1e)。

以上の分析過程について、濃縮された試料のバンド幅の経時変化に着目し、蛍光画像解析による検証を行った。観察された試料バンドの濃度分布をガウス分布近似し、分散  $\sigma^2$  を求めた結果、Fig. 2 が得られた。この図から、実効拡散係数  $D_{\text{eff}}$  を  $\sigma^2 = 2D_{\text{eff}} \cdot t$  の式に基づいて算出したところ、tr-trapping 分析時には  $D_{\text{eff}}$  が異なる 4 つの過程 (i)–(iv) の存在が確認された。また、それぞれの過程は (i) 界面近傍におけるトラップ、(ii) M プラグ中での MEKC、(iii) M プラグから抜出す際の試料バンド拡散および (iv) BGS 中での MCZE と関連していることが明らかとなった。

続いて、保持係数の異なるローダミン類を用いた画像解析により、トラップ・リリース機構の詳細な検討を行った。試料導入時間を 1–8 s まで増加した際には濃縮完了直後の試料バンド幅は 25–32  $\mu\text{m}$  とほぼ一定であった。また、ミセル溶液導入時間を 1–5 s まで増加した際にはリリース時間の差が 3.5–16.1 s まで増加した。さらにはこれらの試料濃縮および分離が 10 mm 以内で完了することが確認された。そこで、より高速かつ高感度な分離分析の実現を目指し、有効分離長 5.0 mm における MCE 分析について検討を行った。その結果、pinched injection 法を用いた一般的な MCMEKC 分析では、有効分離長の減少によりローダミン類の分離は困難であったのに対して、tr-trapping–MCMEKC 分析では一般法と比較して 580 倍の高感度化と良好な分離が 5.0 s 以内に達成された。以上の結果から、短い有効分離長でも tr-trapping 法の適用による MEKC 分析の高感度化と分離能の向上が可能であることが明らかとなった。

## 【文献】

(1) Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1255–1262.

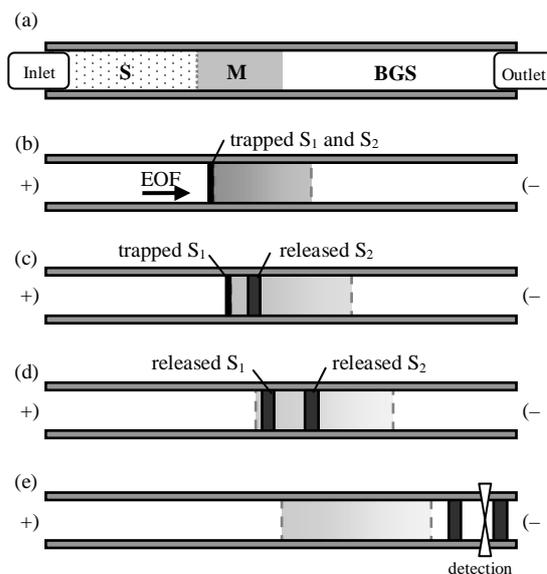


Figure 1. Schematics of tr-trapping–MCMEKC. (a) Initial condition, (b) preconcentration by the trap mechanism, (c), (d) separation by the difference in the release timing, (e) detection of the released analytes.

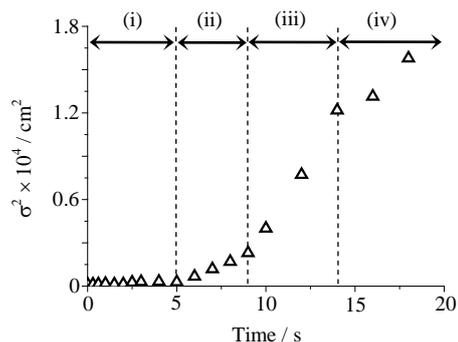


Figure 2. Dependence of  $\sigma^2$  on  $t_{\text{sep}}$  in tr-trapping–MCMEKC at  $t_{\text{inj,M}}$  and  $t_{\text{inj,S}}$  of 1.0 and 2.0 s, respectively. Effective diffusion constant, (i) 0–0.2; (ii) 2.5; (iii) 8.5; (iv)  $4.5 \times 10^{-6}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , respectively.

# L-18

## トランジェントトラッピング法による MEKC の高感度化 (12)

【京大院工】○田中 隆太, 橋場 皇太, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二

### Transient-Trapping in MEKC for High-Sensitive Detection. 12

Ryuta TANAKA, Kota HASHIBA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

#### Abstract

This paper reports an improvement of the preconcentration and separation efficiencies of steroids and peptides in transient-trapping–micellar electrokinetic chromatography (tr-trapping–MEKC) by using a poly(vinylpyrrolidone) (PVP)-modified capillary to suppress the electroosmotic flow (EOF) and a nonspecific adsorption. When steroids and sodium dodecyl sulfate (SDS) solutions, which were selected as sample and micellar solutions, were injected for 600 and 300 s, respectively, both the effective preconcentration and separation were achieved with the PVP-coated capillary, while the steroids could not be resolved completely with the uncoated one. The estimated values of the sensitivity enhancement factor in tr-trapping–MEKC under the suppressed EOF were 2.5–3.6-fold improved relative to those under the fast EOF. In the tr-trapping–MEKC analysis of peptides using the PVP-coated capillary, furthermore, bradykinin was 130-fold preconcentrated without the nonspecific adsorption.

#### 【緒言】

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) における低い濃度感度を改善するため, これまでスウィーピング法など様々なオンライン試料濃縮法の適用による MEKC の高感度化が検討されてきた。しかし, 多くの場合試料の大量導入にともなう有効分離長の減少による分離度の低下が懸念される。そのような欠点を克服するべく, われわれは, 分離キャピラリー内に部分的に注入した界面活性剤ミセル溶液を利用することで高い濃縮効率と高分離能を同時に達成可能な新規オンライン試料濃縮法であるトランジェントトラッピング (tr-trapping) 法を開発し基礎検討を行ってきた。これまで, 未修飾キャピラリーやマイクロチップを用いて電気浸透流 (EOF) が存在する条件下で tr-trapping 法についての検討が進められてきた。しかし, ペプチドやタンパク質などキャピラリー内壁に吸着する試料を分析するためにはポリマーなどで内壁を修飾する必要がある, その際に EOF が抑制されることが多い。そこで本研究では, polyvinylpyrrolidone (PVP) 修飾キャピラリーを用いて, EOF を抑制した条件における tr-trapping–MEKC に関する検討を行い, 生体試料の MEKC 分析の高感度化を目指した。

#### 【実験】

装置には Agilent CE (検出波長 220 nm) を, 分離キャピラリーには未修飾および PVP 修飾を施したフューズドシリカキャピラリー (全長 60 cm, 有効長 51.5 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$ ) を用

いた。ミセル溶液には 25 mM リン酸塩緩衝液で調製した 15 mM 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 溶液を用いた。泳動液には電気伝導度をミセル溶液と同じに調整したリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いた。試料には アンドロステロン (And), エストロン (Est), テスロステロン (Tes), プロゲステロン (Pro) の 4 種類のステロイド類とペプチド (ブラジキニン) を用いた。溶液は圧力 (30 mbar) で注入し, 印加電圧は PVP 修飾キャピラリーでは -15 kV, 未修飾キャピラリーでは 15 kV とした。

### 【結果と考察】

まず, ミセル溶液の注入量が分離に与える影響について検討した。ミセル溶液注入時間を 300 ~ 800 s まで変化させたところ, 注入時間の増加にともない試料の分離が向上し, 600 s 注入した際にすべての試料が分離された。And と Pro については, ミセル溶液の注入量の増加により分離度が向上した。これは保持係数の大きい試料ではリリース機構に基づく分離の影響が大きく, ミセル溶液の注入量の増加にともないミセル濃度の減少速度が遅くなったことで, リリース時間の差が増加したためであると考えられる。しかし, Tes と Est については, ミセル溶液の注入量の増加により分離度が低下した。これは保持係数の小さい試料ではリリース後の MEKC の影響が大きく, ミセル溶液の注入量の増加にともなってリリース時間が遅れたためであると考えられる。

次に, 未修飾および PVP 修飾キャピラリーを用いて, EOF が tr-trapping 法に与える影響について検討した。その結果, 未修飾キャピラリーでは 200 倍, 100 倍であった And と Pro の濃縮効率が, PVP 修飾キャピラリーでは 490 倍, 370 倍となり, EOF の抑制により濃縮効率が向上することが確認された。

続いて, ブラジキニンを試料としてペプチド分析の高感度化を試みた。未修飾キャピラリーを用いて CZE 分析を行ったところ, 大きくテーリングしたピークが検出され, 試料の壁面への吸着が示唆された。そこで, PVP 修飾キャピラリーを用いて MEKC を行ったところ, シャープなピークが得られ, 吸着抑制効果が確認された (Fig. 1a)。さらに, 同じキャピラリーにミセル溶液および試料溶液をそれぞれ 300 s 注入し, tr-trapping-MEKC 分析を行ったところ, 通常の MEKC 分析と比較して 130 倍の高感度化が達成された (Fig. 1b)。

以上の結果から, PVP 修飾キャピラリーを用いた tr-trapping-MEKC 分析により, EOF 抑制下においても生体試料の高感度分析が可能であることが明らかになった。

### 【文献】

[1] Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1255–1262.

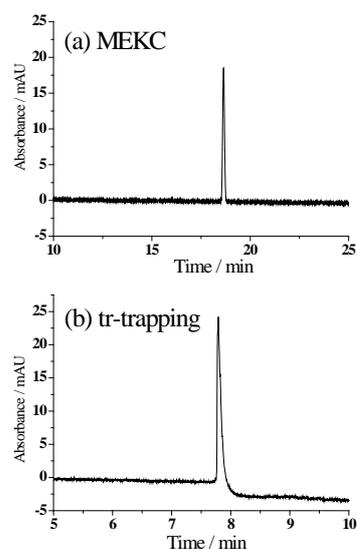


Figure 1. Electropherograms obtained with (a) conventional MEKC and (b) tr-trapping in PVP-coated capillary. Sample concentration; (a) 100 ppm, (b) 1 ppm.

# L-19

## 磁性流体の利用によるマイクロチップ電気泳動の 高機能化 (4)

【京大院工】○寒川 陵史, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二

### Microchip Electrophoretic Analysis Using Magnetic Fluid. 4

Takafumi SAMUKAWA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA

Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

#### Abstract

This paper reports an application of magnetic fluid (MF), which is a dispersion of nanometer-sized magnetic particles, to microchip electrophoresis (MCE). It was reported that MF can form the nanopillar-array structure under a magnetic field<sup>1</sup>, so that it was expected that the MF nanopillar formed in a microchannel should work as a separation medium with a molecular sieving effect, a packed column for chromatographic separation, physical and/or electrokinetic filter, and so on. Actually, the size separation of the small DNA (2.7 and 7.2 kbp) and the complete filtration of the extremely large DNA ( $\lambda$ -DNA, 48.5 kbp) were attained on the MF-packed microchips. Using the diluted buffer, furthermore, uranine could be filtrated in front of the packed MF on the basis of electrokinetic filtering, providing the 600-fold increase in the sensitivity compared to that of the conventional MCE analysis.

#### 【緒言】

磁性流体 (MF) はナノメートルサイズの磁気微粒子分散液であり、磁場を印加すると磁場方向に粒子が配列するというユニークな特徴を有する。このように磁場によって配列したナノ微粒子の構造体はナノサイズの直径および間隙を有するピラーとしてふるまうため、ピラーの間隙サイズによる分子ふるい効果を利用した生体高分子の分離媒体としての応用が期待される。また、MF は磁場によってマイクロチャンネル内に固定化することができるため、プリントを作製することなく、充填カラムを構築することが可能である。さらには、形成したナノピラー構造における間隙サイズを利用したフィルタリングもオンラインで簡便に実行できると考えられる。本研究では、上記のような特徴を有する MF を poly(methyl methacrylate) (PMMA) チップのチャンネル内に磁場により固定化することで、マイクロチップ電気泳動 (MCE) における DNA 分析の高性能化について検討を行った。また、イオン強度の低い緩衝液を用いた際にナノピラー表面におけるデバイ長が増加し、表面と同じ電荷の試料がナノ空間から排斥される動電フィルタリング (EKF) 効果を利用した試料濃縮についても検討を行った。

#### 【実験】

PMMA チップのクロス型チャンネル (幅 100  $\mu\text{m}$ , 深さ 30  $\mu\text{m}$ ) 内に 5% (v/v) MF / 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を満たし、ネオジウム磁石 (1 × 1 × 1 mm, 表面磁束密度 201 mT; 2 ×

3 × 3 mm, 表面磁束密度 403 mT) を分離チャンネルの上下から挟み込んで磁場を印加した。その後電気泳動により磁場印加部以外の MF を除去し, MF 充填チップを作製した。DNA 分析においては, 試料として大腸菌由来 DNA (2.7 kbp), フェージ由来 DNA (7.2 kbp), λ-DNA (48.5 kbp) を POPO-3 で染色したものを, 泳動液には 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用い, 検出は励起/検出波長が 532/590 nm のレーザー励起蛍光 (LIF) 法により MF 充填部から 2 mm の位置で行った。EKF 実験においては, 試料にアニオン性低分子であるウラニンを, 泳動液には 100 μM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用い, 検出は励起/検出波長が 488/519 nm の LIF 法により充填部手前にて行った。

### 【結果と考察】

作製した MF 充填チップにおいては, 分離電圧を印加した際にも MF の流出は認められなかった。2.7 kbp と 7.2 kbp DNA を混合した試料を分析したところ, MF を充填していないチップでは単一の鋭いピークが観測されたのに対して, MF を充填したチップでは 2 本のピークに分離された。このことから, MF 充填カラムは分子ふるい効果をもつことが確認された。また, λ-DNA (48.5 kbp) を分析した際には, ピークが検出されなかった。そこで, 蛍光画像により充填部の確認を行ったところ, MF 充填部に試料由来の蛍光が確認された。したがって, 充填した MF はフィルターとしても機能することがわかった。以上の結果より, 磁場により固定化された MF は DNA に対して有効な分離媒体であることが示された。

また, 試料としてアニオン性低分子であるウラニンを用いて, 希薄泳動液 (100 μM リン酸塩緩衝液) 中で EKF を利用したオンライン試料濃縮に関する検討を行ったところ, 一般的な pinched injection 法を用いたマイクロチップゾーン電気泳動 (MCZE) 分析での結果と比較して約 600 倍の濃縮が達成された (Fig. 1)。一方, 泳動液に 10 mM リン酸塩緩衝液を用いて EKF 分析を行った場合, ピークは観測されなかった。このことから, EKF の原理に基づいたアニオン性低分子のオンライン試料濃縮が, MF によって形成されたナノピラー構造を用いても可能であることが示された。

### 【文献】

(1) Hong, C.-Y. et al. *J. Appl. Phys.* **1997**, *81*, 4275-4277.

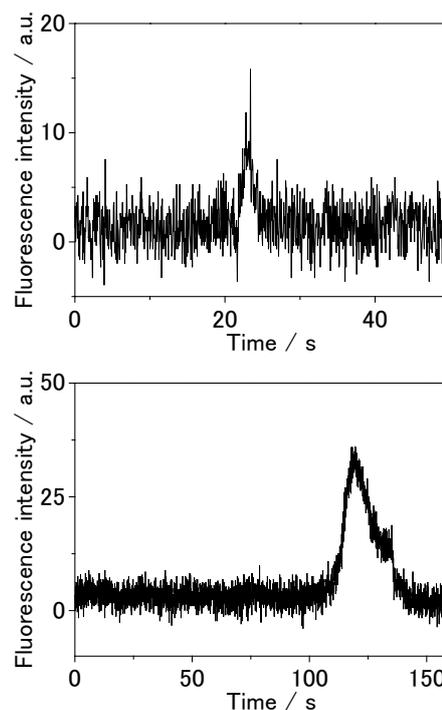


Figure 1. MCE analyses of uranine on (a) open channel and (b) MF packed microchips. Concentration of samples: (a) 20 nM, (b) 100 pM. Concentraion of background solutions: (a) 10 mM, (b) 100 μM.

# L-20

## 非水系 CE—希土類錯体時間分解蛍光検出による高感度実用分析システムの開発

【岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐大院連合創薬<sup>2</sup>, SORST(JST)<sup>3</sup>, 阪大院エフオトニクス<sup>4</sup>】  
○江坂幸宏<sup>1,2</sup>, 水谷真理<sup>1</sup>, 石田由美<sup>1</sup>, 宇野文二<sup>1,2</sup>, 住友慶子<sup>3</sup>, 山口佳則<sup>3,4</sup>

### Non-aqueous CE of rare metal complexes with time resolution fluorescence detection as a highly sensitive analysis method for rare bioactive molecules

Yukihiro ESAKA<sup>1,2</sup>, Mari MIZUTANI<sup>1</sup>, Yumi ISHIDA<sup>1</sup>, Bunji UNO<sup>1,2</sup>,  
Keiko SUMITOMO<sup>3</sup>, Yoshinori YAMAUCHI<sup>3,4</sup>

*Gifu Pharm. Univ.*<sup>1</sup>; *United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Science, Gifu Univ.*<sup>2</sup>; *SORST(JST)*<sup>3</sup>; *Graduate School of Industry, Osaka Univ.*<sup>4</sup>

#### Abstract

We have investigated non-aqueous (using acetonitrile and/or DMSO as solvents of running solutions) CE system equipped with a time-resolved fluorescence detector for highly sensitive detection of biological interests including biomarkers. We employed the europium ( $\text{Eu}^{3+}$ ) complex with the  $\beta$ -diketone derivatives of alkylphenols with CDPP (DPP-derivatives) as the detection form. The complex formation between  $\text{Eu}^{3+}$  and the DPP-derivatives was necessary for both their electrophoretic migration and emission of fluorescence. The concentrations of  $\text{Eu}^{3+}$  and TPPO, and solvent composition in running solutions were optimized and the detection limit was ca.  $10^{-9}$  M. It would be a very good one without laser lights. The remarkable effect of DMSO on migration of DPP-derivatives and then, on improvement of the separation will be discussed in detail. Some flavonoid compounds were also analyzed by the present method.

【緒言】希土類錯体には、有機配位子の吸収した光のエネルギーを錯体内で希土類イオンへ移動して希土類特有の波長で長寿命発光するものがある。この発光の時間分解選択的検出による、高感度検出のための誘導体化試薬と方法が考案されてきた。一方、多種成分の分析には分離過程が必要であり松本らはEu錯体誘導体化試薬の一種としてHPLC用のCDPPを合成検討している。<sup>1</sup> 検出系は、ほとんどの場合、水系で疎水場としてミセルを含有し、その中に分配させて発光させる方法をとる。共存させる TOPO やトリフェニルホスフィンオキシド (TPPO) 等の金属錯体抽出促進剤は、金属イオン、配位子と三元錯体を形成して発光増強する。これまでに発表者らは、CDPPによる誘導体を (DPP誘導体) をHPLC分離し、ポストカラム法でミセル、 $\text{Eu}^{3+}$ 、TOPO溶液を混合する方法を検討してきたが、流路内での $\text{Eu}^{3+}$ の深刻な吸着・蓄積現象によるバックグラウンド蛍光の経時的上昇と、合成CDPP試薬の不純物による検出干渉のという実用上深刻な問題が残った。そこで、発表者らは、完全非水 (アセトニトリル、AN) 系で $\text{Eu}^{3+}$ とTPPO共存下でDPP誘導体をEu錯体として電気泳動する方法を考案し、吸着問題を解決し、また、レーザーを用いないCEとしては非常に高感度に検出できることを既に報告した。今回この非水CE法を、実用を念頭において検討し、特に分離面で良好な結果

を得た。試料にはアルキルフェノール類、あるいはフラボノイド類を用いた。

【実験】試料には、アルキルフェノールとして、4-t-butylphenol (T, Figure 1 中のピークの記号を表す。DPP 誘導体を指す)、4-octylphenol (O, 同), 4-n-nonylphenol (N, 同), bisphenol (B1,B2, 同。それぞれ1付加2付加 DPP 誘導体) の4種を用いた。CE 泳動液は、AN、ジメチルスルホキシド (DMSO) もしくはその混液を溶媒とし、TPPO、Eu 塩を含み、活性化したモレキュラーシーブで十分に脱水して用いた。CDPP は誘導体化に先立ち、HPLC (C18 カラム: Superiorex 資生堂) で大部分の不純物を除いた。誘導体化の方法は文献1に拠った。キャピラリーは、DB-1 内壁コートした、内径 50  $\mu\text{m}$ 、全長 700mm もしくは 1200mm(有効長はそれぞれ 500mm と 1000mm)のものを用いた。検出器には、浜松フオトニクス社製 時間分解りん光検出器を用いた。

【結果】本法で、アルキルフェノール (AP) を CDPP で誘導体化し、DPP 誘導体 (DPP-AP) として検出する場合に問題になる主なことは、①DPP 部位の構造が大きいために、もとの試料分子の大きさの差を CE 分離に反映させにくく、4種の DPP-AP の分離が不十分であること、②CDPP に検出時間が DPP-AP に重なる不純物が存在することであった。[幸い、誘導体化の際に生成し、高感度検出の際には問題となりがちな膨大な CDPP の加水分解物(陰イオン)の大部分は負電荷を有するため、この CE のシステムでは電場印加後、すぐに排出され、検出されず問題にならない。] ②については、誘導体化直前の CDPP の HPLC 分離精製により大きな改善が見られるが、試料 (AP) 濃度  $10^{-6}$  M 以下では、除去しきれない僅かな不純物が深刻な干渉成分となった。分離能力の向上が①と②両面において有効であり、重要と捉え、添加物を検討することにした。

ここでは DMSO の添加が著しい効果をもたらした。図に示したように、まずピークの先鋭化が起り、DMSO 濃度の増加に従い、30%程度までは全体に検出時間が顕著に早くなる。この現象及びビスフェノールの2付加体 (B2) の動きは Eu 錯体の化学量論が変化していると現在解釈している。50%以降の検出時間の遅れは泳動液の粘度上昇が原因と思われる。また、この変化に平衡して、図には小さくて見えていないが、不純物ピークが AP-DPP の前方へ移動し、これらと分離し、干渉の

著しい低減が達成されている。分離最適化した CE システムでの検出限界は、DPP 誘導体標品で  $3 \times 10^{-9}$  M 程度であった。現在、不純物の干渉を出来るだけ抑え、標品の場合程度の実質的感度を上げている。

ポリフェノール類も誘導体化、CE 検出が出来ており、実試料の分析へ展開する予定である。

【文献】 1. K. Matsumoto, J.Chromatogr.B, 773(2002)135-142

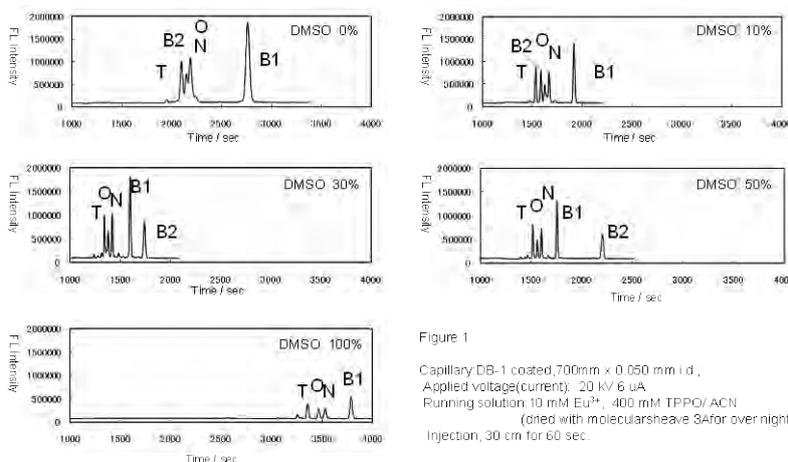


Figure 1  
Capillary DB-1 coated, 700mm x 0.050 mm i.d.,  
Applied voltage (current): 20 kV / 6  $\mu\text{A}$   
Running solution: 10 mM  $\text{Eu}^{3+}$ , 400 mM TPPO/ACN  
(dried with molecularsieve 3A for overnight)  
Injection, 30 cm for 60 sec.

# L-21 試薬放出キャピラリーを用いたキャピラリー等電点電気泳動濃縮型高感度免疫アッセイ

【阪府大・院工】○横山大輝, 片岡正輝, 八尾俊男, 久本秀明

## Highly Sensitive Immunoassay Based on Preconcentration by Capillary Isoelectric Focusing (cIEF) by Using Reagent-Release Capillary (RRC)

Hiroki YOKOYAMA, Masaki KATAOKA, Toshio YAO, and Hideaki HISAMOTO

*Osaka Prefecture University, JAPAN*

### Abstract

Reagent-release capillary physically coated with fluorescently labeled antigen and carrier ampholyte was prepared. By using this capillary, antibody sample introduction by capillary force allowed to release both antigen and carrier ampholyte, and subsequent immuno-reaction. Then, application of electric field allowed us simple, and rapid preconcentration of immuno complex. Total analysis time was within 10 minutes, and the detectable concentration range was from 11 to 1100 ng/mL. Increasing the accumulation time of CCD camera from 2s to 20s, improved the detectable concentration range (10~1000 pg/mL). In addition, limit of detection (LOD) was calculated to be 5.3pg/mL (S/N:3).

### 【緒言】

近年、医療診断等で用いられている免疫アッセイは試薬が高価、反応時間が長い、反応操作が煩雑という問題がある。一方、私たちは最近試薬放出キャピラリーを用いた等電点電気泳動 (Reagent Release Capillary- Isoelectric Focusing: RRC-IEF) の研究を行っている。これは等電点電気泳動に必要な両性電解質ポリマー及びラベル化剤など、試料分子と反応する試薬を物理吸着させたキャピラリーを用いる方法であり、毛細管力で試料溶液を導入するのみで自発的に反応が進行するために、その後、電圧を印加するのみで分離・濃縮が可能となる手法である。この方法は、キャピラリーという微小空間を用いるため、試薬の拡散時間短縮による、反応時間短縮、試薬・試料量の減少、cIEFによる迅速な濃縮・分離が可能、という特徴を持つ。本研究ではこれを免疫アッセイに適用する事で、抗原抗体反応の迅速化、抗原抗体複合体と未反応抗原の迅速分離・濃縮による高感度化が同時かつ簡便に達成できると考え、免疫アッセイが現在抱える問題の解決を試みた。

## 【実験】

**RRC の作製：** 内径 50 $\mu$ m 角の角型キャピラリー内に電気浸透流 (Electric osmotic flow:EOF) を抑制するために、ポリジメチルアクリルアミド (PDMA) を共有結合修飾した。このキャピラリーを 4cm にカットし、キャピラリー内に市販の両性電解質 (BioLyte)、添加剤 (tween20、glycerol)、抗原 (Rabbit IgG-FITC) を含む溶液を毛細管力で導入し、2h 減圧乾燥させ、内壁に物理吸着させた。

**グリセロール添加効果の検討：** 作製したコーティングキャピラリーにグリセロール、両性電解質ポリマー、FITC-デキストランを固定化し、実体顕微鏡観察、蛍光顕微鏡観察により試薬固定時の均一性に及ぼすグリセロール添加の効果を評価した。

**RRC による IEF と通常の cIEF の比較：** 作製したキャピラリー内に抗体 (Anti rabbit IgG-TRITC) 水溶液を毛細管力で導入して両端をリザーバー溶液 (リン酸水溶液 20mM、水酸化ナトリウム水溶液 20mM) に接触させ 2kV の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。また、すべての試薬を混合して直接キャピラリーに注入し、通常の cIEF を行った場合と比較した。

**CCD カメラ検出における露光時間の検討：** 検出器である CCD カメラの露光時間を検討し、本システムの検出下限を算出した。

## 【結果・考察】

グリセロール添加をした試薬を物理吸着させたコーティングキャピラリーを未添加の場合と比較したところ、未添加の場合では試薬が塊状に偏在しているのに対し、添加した方では、均一なライン状に試薬が固定化されていることが顕微鏡観察により確認された。これはグリセロール添加によって粘度および PDMA 表面への濡れ性が向上したことによると考えている。以上より、キャピラリー作製時のグリセロール添加は試薬の均一固定に対し有効であることがわかった。

RRC-IEF のイムノアッセイにおいて、蛍光画像観察を行ったところ、RRC による cIEF、通常の cIEF は双方ともほぼ同じ位置に抗原抗体複合体が濃縮する様子が観察された。試薬放出キャピラリーを用いたイムノアッセイ実験では毛細管力による簡便な試料導入から約 15 分で抗原・抗体複合体ピークが得られ、迅速な抗原抗体複合体と未反応抗原の分離・濃縮が完了した。抗体の濃度 11ng/mL~1100ng/mL の範囲でピークエリアと抗体濃度の関係をプロットしたところ、良好な直線関係が得られた。(S/N : 3 以上) また、ピークの半幅から濃縮倍率は約 2000 倍であると計算された。CCD カメラの露光時間を検討し、同様の実験を行った結果、抗体濃度が 10pg/mL~1000pg/mL の濃度範囲でピークエリアと抗体濃度に相関性がみられた。また、S/N : 3 を最低下限とすると 5.3pg/mL であると計算された。

## 新しいマルチターゲット SNP 検出システムの構築と その基盤技術としての一塩基置換一本鎖 DNA の キャピラリー電気泳動分離法の開発

【東北大院環境】櫻井 隆郎, 高橋 透, 星野 仁

### Construction of a novel multi-target SNP detection system and development of a capillary electrophoretic separation method of single-base substituted single stranded DNA as its fundamental technology

Takao SAKURAI\*, Toru TAKAHASHI, Hitoshi HOSHINO  
*Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University*

A new capillary electrophoretic technique for the separation of one-base substituted ssDNA using the acid dissociation equilibrium of nucleobases and urea as electrophoretic buffer modifier was developed. The mixture of 12 mer ssDNA consists of a ssDNA with normal sequence and its 12 kinds of sequential isomers of all one-base substitution patterns could be completely separated by the method. The successful applications of the proposed method to the separation of a 68 mer ssDNA and its single base mutant, and the detection of one base mutation in PCR products (68 mer) were also demonstrated. The proposed method is, therefore, promising as the fundamental technology of a novel multi-target SNP detection system with good operability and high reliability.

【緒言】一塩基多型(SNP)はゲノム上のある部分において高頻度にみられる一塩基が変異した多型であり、個々の体質の差異や遺伝病の原因、薬剤応答性を左右するものなどが数多く知られている。このような SNP をゲノム上のマーカーとして利用することで個人に合った医療、即ちテーラーメイド医療の実現が期待されており、SNP 検査法はテーラーメイド医療における基盤技術である。現在報告されている SNP 検出法はその殆どがターゲット DNA に対して相補的配列を持つ DNA(プローブ DNA)を用い、そのハイブリダイズの有無により検出することを基本原理とする。したがって、ターゲット毎に個別のプローブ DNA の調製と検出条件設定とを必要とするため、臨床検査現場での労働負担が大きい。また変異の有無の判定において、原理的にミスハイブリダイズによる誤判定のリスクもある。それに対し我々は、キャピラリー電気泳動法(CE)を用いる、信頼性・操作性に優れた新しい SNP 検出システムの構築を着想し、さらにこれを実現するための基盤技術としてシンプルながら極めて高い分離能をもつ一塩基変異一本鎖 DNA(ssDNA)の新奇 CE 分離法を考案した。本講演では、これを用いて同一条件における一塩基変異 ssDNA の全変異パターンの一斉相互分離に加え、これを基盤技術とする新しいマルチターゲット SNP 検出システムの構築へ向けた種々の検討結果について報告する。

【実験】ssDNA : 4 塩基 ssDNA(5'-tttt : poly t, 5'-gggt : GT, 5'-aatt : AT, 5'-cctt : CT), 12 塩基 ssDNA(K-ras 遺伝子断片(5'-gcaggtcaagag)と、その一塩基を変異させた 12 種の ssDNA), 68 塩基 ssDNA(N-ras 遺伝子断片(5'-gactgagtacaaactgggtggtggtggagcaggtggtggtgggaaagcgcactgacaatccagctaa)と、その g→t 変異体(Cys)及び g→c 変異体(Arg), (いずれも太字部分)). ssDNA 濃度 : 1.6 μM. CE 条件 : 溶融シリカキャピラリー ; L=31 cm, l =22.5 cm, i.d.=50 及び 15μm, 印加電圧 ; -10/-15 kV, 試料注入 ; 加圧法, 検出波長 ; 260 nm. 泳動緩衝溶液 : リン酸塩緩衝溶

液(0.02~1 M, pH 2~6).

【結果・考察】一般的に、等鎖長 ssDNA 配列異性体の CE 分離は、その配列が異なっても電気泳動移動度が等しいため、極めて難しい。これに対し、我々は核酸塩基の酸解離平衡特性が各々異なることに着目した。酸性条件でもプロトン化しない t のみで構成された poly t に対する GT, AT, CT の相対電気泳動移動度を、泳動緩衝溶液の pH を変化させて測定した。GT, AT, CT の相対電気泳動移動度は pH の減少とともに増加したが、酸性条件下での各 DNA を構成する核酸塩基間の酸解離特性の差異を反映し、各々の電気泳動移動度の増加の度合が異なることが分かった。演者らはこれに基づいて塩基の酸解離特性の差異を利用する ssDNA の CE 分離システムを考案し、さらに、尿素を泳動緩衝溶液モディファイアとして導入することでその分離能を飛躍的に向上することに成功した。また、これを用いて、pH 3, 尿素 8 M の泳動条件で、K-ras 遺伝子断片(5'-gcaggtcaagag)とその塩基配列中の各々特定の 1 つの a, c, g, t について可能な全ての変異パターンで置換した 12(4×3)種の ssDNA の混合試料を、各々独立した 13 のピークとして一斉相互分離することに成功した(Fig.1)。従って本法は同一条件で全ての変異パターンに対応できることが分かった。ところで、実際の SNP 検査においては、検体をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)処理したものが試料となるため、本法を実試料に適用するには少なくとも 60 塩基程度の DNA の分離を達成する必要がある。そこで、より長鎖長の ssDNA(68mer)について、CE 分離条件の最適化を行った。その結果、pH2, 尿素 8 M の条件で N-ras 遺伝子断片(Wild)と、その一塩基変異体(Cys 及び Arg)を完全に相互分離することに成功した。さらに、実際に PCR 産物として得た Wild と Cys をカラム精製した試料を調製し、その分離を検討したところ、Wild-Cys 間の分離が達成され、SNP の検出が可能であった(Fig.2)。一方、Wild と Cys 相補鎖同士は分離されなかったが、これは相補鎖間は a→c 変異であり変異前後の pKa の差が小さいために長鎖長ではこの違いが分離に反映されなかったためと考える。

このように本法により分離が難しい変異パターンは存在するが、そのパターンの相補鎖は必ず分離可能な組み合わせとなる。さらに、PCR 処理により必ず相補鎖が生成するため、PCR 処理を行った実試料では、ターゲット鎖同士あるいは相補鎖同士のいずれかが必ず分離可能な変異パターンとなる。従って、本法により実質的に全ての変異パターンの SNP 検出が可能である。CE 分離によって得られた電気泳動図において、ピークがターゲット、相補鎖とも 1 本ずつ(計 2 本)であれば変異はなく、また、それより多く(3 または 4 本)のピークが観察されれば(Fig.2)変異があるというように、本法を用いる変異の判定はピークの本数という明確な情報で行われるため、原理的に誤判定の可能性が極めて低い。さらに、あらゆるターゲットに同一条件で適用出来るため、検出に係る労働負担も少ない。以上から、本システムは信頼性・操作性に優れた実用的な SNP 検出システムといえる。

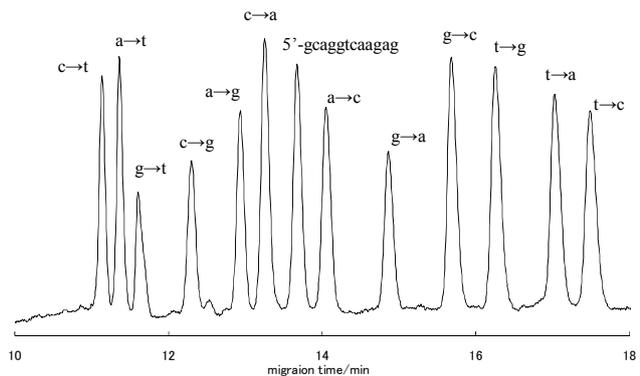


Fig.1 Electropherogram for the mixture of K-ras gene fragment and its 12 kinds of single base mutants including all patterns of substitution. Electrophoretic buffer :20 mM phosphate containing urea 8M (pH 3).

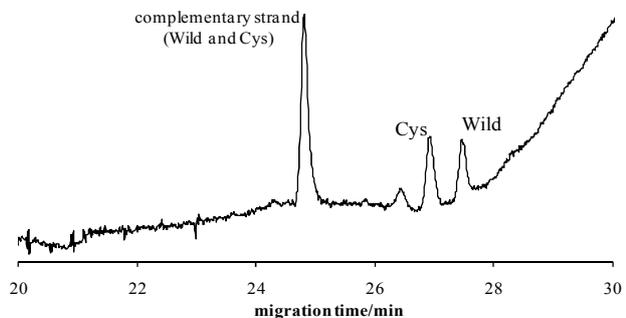


Fig. 2 Electropherogram of the mixture of PCR products of 68 mer DNA (Wild and Cys). Electrophoretic buffer : 1 M phosphate containing urea 8 M.

# P-2S

## キャピラリー電気泳動法による食品添加物合成着色料の 同時分析

【甲南大院・自然<sup>1</sup>，産総研・関西セ<sup>2</sup>】

○伊藤あすか<sup>1</sup>，岩月聡史<sup>1</sup>，脇田慎一<sup>2</sup>，茶山健二<sup>1</sup>

### Simultaneous analysis of synthetic food dyes by Capillary Electrophoresis

Asuka ITO<sup>1</sup>, Satoshi IWATSUKI<sup>1</sup>, Shin-ichi WAKIDA<sup>2</sup>, Kenji CHAYAMA<sup>1</sup>

Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Konan University<sup>1</sup>, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)<sup>2</sup>

#### Abstract

Twelve synthetic food dyes that are permitted to use in Japan, may have a bad influence on human health. Capillary electrophoresis is a rapid method with high resolution. In this study, we have developed the method for the determination of the synthetic food dyes. The mixture of 11.7 mM borate, 20 mM sodium hydroxide (pH 9.75) and 60 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) were used for the buffer solution. This method was effective for improving the separation and shorten the migration time. With the addition of  $\gamma$ -cyclodextrin, the migration times of New Coccine and Indigo Carmine became to be long, caused the efficient separation. Further, we selected of four surfactants instead of SDS. The highest resolution was obtained with the use of lithium dodecyl sulfate.

#### 【緒言】

近年、食の安全性が社会的な問題となり、人々の関心が高まってきている。食品に含まれる着色料には天然着色料と合成着色料があり、天然着色料は天然の成分を抽出した色素である。一方で、合成着色料はタール色素とも言われ、鮮明な色を出し退色しにくいといった優れた特徴を持つ反面、石油製品を原料とした化学合成によって製造されているため、過剰摂取により発ガン性やアレルギー性など人体に悪影響を及ぼすことが知られている。

色素は一般的に、クロマトグラフ法によって分析されるが、この方法では同時分析時の分離能が悪く、廃液として多量の有機溶媒が出るなどの問題点がある。そこで本研究では省時間、省試料、低コストで高分離能であり、フォトダイオードアレイによる吸光検出が可能なキャピラリー電気泳動法 (CE) を用いて、食品中に含まれる合成着色料の迅速な分離分析を行った。

#### 【実験】

CE 装置には大塚電子社製 CAPI-3200Q を使用した。キャピラリーには内径 50  $\mu\text{m}$ ，全長 62 cm (有効長 50cm) 内径未処理のフューズドシリカキャピラリーを用いた。分離モードの検討の際には、15 mM 四ホウ酸ナトリウムと 20 mM 水酸化ナトリウムを用いて pH 11 に調整し泳動溶液として使用した。また、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を分離モードとしたときには調整した泳動溶液に 40 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加したのものを用いて測定を行った。標準試料としては、日本で使用が許可されている 12 種の色素を用い泳動溶

液で希釈し測定した。分析条件は落差法 25 mm, 300 秒でサンプル注入を行い、泳動時間を 30 分、恒温槽温度 25°C, 印加電圧 20 kV, 検出波長 220 nm として測定を行なった。

初期条件の検討の際には、11.7 mM 四ホウ酸ナトリウム, 8.3 mM リン酸二水素ナトリウム, 20 mM 水酸化ナトリウムを用いて pH を調整し泳動溶液とした。恒温槽温度 37°C, 印加電圧 25 kV として測定を行なった。また、包接試薬の検討には、空孔径の違う  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリン (CD) をそれぞれ用いて測定を行い、界面活性剤の検討の際にはデオキシコール酸ナトリウム、N-ドデカノイルサルコシン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、SDS をそれぞれ pH 調整後の泳動溶液を用いて 50 mM に希釈し測定を行なった。

### 【結果・考察】

まず、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) モードで標準試料の測定を行なった結果、移動時間の重複したピークが検出され、New Coccine の移動時間が 25 分以上かかり検出時間が長いことから分離モードを MEKC に変えて測定を行なった。その結果、すべての試料の移動時間が 20 分以内となり移動時間の短縮やシャープなピークが得られ分離性の向上にもつながった。

各標準試料の吸光を測定した結果、赤色 7 種においては 500 nm, 520 nm 付近、黄色 2 種では 450 nm, 緑色 1 種と青色 2 種においては 600 nm 付近に極大吸収波長が得られた。この結果をそれぞれの検出波長とし今後の測定に用いた。

泳動溶液 pH の検討では、pH 7.5 ~ pH 10 まで変化させて測定を行なった結果 pH 9.75 のときに比較的検出時間も短く、最も分離性が高いピークが得られたため泳動溶液 pH 9.75 を最適 pH とした。pH 9.75 の泳動溶液を用いて SDS 濃度を 10 mM ~ 100 mM まで変化させて検討した結果、60 mM と 100 mM のときに分離性が高い結果が得られた。SDS には測定時にキャピラリー管内を洗浄する効果があることから 100 mM を最適濃度とした。SDS 濃度の検討でも検出波長 500 nm, 520 nm において Amaranth, New Coccine, Acid Red の 3 種と、検出波長 600 nm において Fast Green FCF と Indigo Carmine の 2 種の移動時間の重複があったためさらに包接試薬添加の検討を行なった。100 mM SDS を添加した泳動溶液に 20 mM  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD をそれぞれ添加し測定を行なった結果、どの空孔径の CD でもキャピラリー管がつまり測定が出来なかった。これは泳動溶液の濃度が高くなりキャピラリー管のつまりの原因になったものと考えられる。そこで、比較的分離性の高い 60 mM に SDS 濃度を下げ、そこへ CD を添加し測定を行なった。その結果、 $\beta$ -,  $\gamma$ -CD 添加後は検出波長 450 nm において Sunset Yellow FCF のピークがシャープになり、 $\alpha$ -,  $\gamma$ -CD では検出波長 500 nm, 520 nm においても New Coccine の移動時間が遅くなり分離が可能であった。 $\beta$ -CD では Amaranth, New Coccine の移動時間が遅くなり Acid Red の分離が可能であった。600 nm では  $\gamma$ -CD が最も分離性が高い結果が得られた。

界面活性剤の検討において、コール酸ナトリウムのみブロードなピークが検出された。他の界面活性剤ではシャープなピークが得られドデシル硫酸リチウムが最も分離性が高い結果が得られた。

### 【参考文献】

1. Sumiko Suzuki et al., J.Chromatogr. A, 680 (1994), 541-547
2. Saeid Razee et al., J.Chromatogr. A, (1995) 179-188

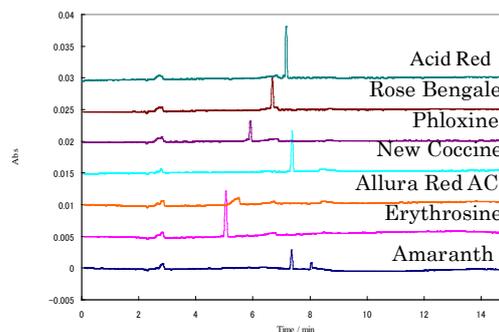


Fig.1. Electropherogram of seven red dyes.

Experimental condition : buffer; mixture of 11.7 mM borate, 20 mM sodium hydroxide (pH 11) and 20 mM lithium dodecyl sulfate, voltage=25 kV, capillary temperature=25°C, detection wavelength=520 nm

# P-35

## 試薬放出キャピラリーを用いたキャピラリー等電点 電気泳動用条件探索デバイスの開発

【阪府大・院工】○片岡正輝, 横山大輝, 八尾俊男, 久本秀明

### Development of screening device for capillary isoelectric focusing using reagent release capillary(RRC)

Masaki KATAOKA, Hiroki YOKOYAMA, Toshio YAO, Hideaki HISAMOTO

*Osaka Prefecture University Graduate School of Engineering*

*Material Science and Engineering*

#### Abstract

We report new procedure of CIEF based on the capillary modified with commercial protein labeling reagent and carrier ampholyte(CA). Introducing sample solution into this capillary by capillary force allowed spontaneous mixing with carrier ampholyte, sample proteins and labeling reagent to form fluorescently labeled protein in the sample solution containing CA. Therefore, simple addition of acidic and basic media at both sides of capillary and voltage application allows us convenient CIEF. Here, two RRCs immobilizing different CAs were prepared. Protein sample solution was introduced into these RRCs and parallel CIEF was performed to evaluate the possibility of applying RRC array for CIEF condition screening.

#### 【緒言】

キャピラリー等電点電気泳動(CIEF)において、キャリアアンフォライト(CA)・添加剤の種類・濃度の最適化は必要不可欠である。しかしこれを行うためには、それらの組み合わせと混合した試料を多種類用意する必要と長時間を費やすという問題点がある。また蛍光検出を行う場合は試料の蛍光ラベル化も必要である。一方当研究室では、格子状流路を有するポリジメチルシロキサン(PDMS)基板と、その流路幅にあった外径をもった角型キャピラリーを組み合わせた分析デバイス、キャピラリー-アセンブルド・マイクロチップ(CAs-CHIP)<sup>1)</sup>の研究を行っている。このチップでは、キャピラリーにあらかじめ様々な化学修飾を施し、並列化することで様々な条件での同時分析ができる。前回、キャピラリー内に CA・添加剤等を物理吸着させ、試料溶液を導入・電圧印加のみで簡便に CIEF を行うことの出来るキャピラリー(試薬放出キャピラリー、RRC)を報告した<sup>2)</sup>。今回は RRC を用いた CIEF の条件探索を行うため、異なる pI 範囲の CIEF 挙動を同時に検討できるデバイスを作製し、ヒトヘモグロビン AFSC を試料としてアプリケーションを行った結果を報告する。

#### 【実験】

試料放出キャピラリーの作製: 内径 50 $\mu$ m 角の角型キャピラリー内にポリジメチルアクリルアミド(PDMA)を共有結合修飾した。このキャピラリー内に測定可能 pI 範囲の異なる

CA(BioLyte3/10、7/9)、添加剤(Tween20、Glycerol)、市販のたんぱく質蛍光ラベル化試薬(Quant-iT)の混合溶液を導入して、3h 減圧乾燥させ、内壁に物理吸着させた。

RRC を用いた CIEF と通常の CIEF の比較: BioLyte3/10、BioLyte7/9 をそれぞれ固定した 4cm 長の RRC を用いヒトヘモグロビン AFSC 水溶液を毛細管力でキャピラリー内に導入した。キャピラリー両端に酸性電極液(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)、塩基性電極液(NaOH)を接触させた後、2kV の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。また、全ての試薬を直接 PDMA 修飾キャピラリーに注入し、通常の CIEF を行った場合と比較した。

RRC を用いた CIEF 条件探索: BioLyte3/10、BioLyte7/9 を固定した 4cm 長の試薬放出キャピラリーを 2 本並列に配置し、ヒトヘモグロビン AFSC 水溶液を毛細管力でキャピラリー内に同時に導入した。その後、並列したキャピラリー両端に電極液を接触させ、同様に 2kV の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。

### 【結果と考察】

RRC による CIEF と通常の CIEF の比較: BioLyte3/10 を固定した RRC では陽極側からの距離 19mm に 1 点の濃縮ピークが確認され、BioLyte7/9 を固定した RRC では陽極からの距離 8mm 付近に 5 点の濃縮ピークが確認された。また通常の CIEF でもほぼ同じ挙動が確認された。ヒトヘモグロビン AFSC は pI=7 付近に 4 つの異性体が存在していることが知られており、また 5 つの異性体が存在するという報告もある<sup>3)</sup>。BioLyte3/10 では pH3-10、BioLyte7/9 では pH7-9 の pH 勾配がキャピラリー長さ方向に形成されるため、BioLyte3/10 では陽極側からの距離 22mm 付近に、BioLyte7/9 では陽極からの距離 0mm 付近に 4 ないし 5 つのピークが現れることが期待される。結果の濃縮位置のずれは pH 勾配の圧縮<sup>4)</sup>や電気浸透流の影響が考えられる。BioLyte3/10 ではピークが 1 点しか確認できなかったが、これは単位キャピラリー長あたりの pH 勾配の傾斜が相対的に大きいため、pI の差が 0.1 程度の異性体は分離できなかったためと考えられる。

RRCを用いたCIEF条件探索: BioLyte3/10を固定したRRCでは陽極側からの距離15mmに1点の濃縮ピークが確認され、BioLyte7/9を固定したRRCでは陽極からの距離8mm付近に5点の濃縮ピークが確認された。これはそれぞれ1本のキャピラリーでCIEFを行った結果とほぼ同じ値であり、1回のCIEF実験で異なるpI範囲における分離条件スクリーニングができることがわかった。

### 【参考文献】

1. H. Hisamoto, et al *Anal. Chem.* 2004, 76, 3222-3228
2. 片岡ら, 第28回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, p39(2008)
3. J. Qu, et al *Anal. Chem.* 2008, 80, 7401-7407
4. K. Shimura, et al *Anal. Chem.* 2008, 80, 3818-3843

## P-4 非水系キャピラリー電気泳動によるアンジオテンシンの分離

【名工大院・工】野路晃嗣, ○北川慎也, 大谷 肇

### Separation of angiotensins in non-aqueous capillary electrophoresis

Akitsugu NOJI, Shinya KITAGAWA\*, Hajime OHTANI

*Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering,  
Nagoya Institute of Technology*

#### Abstract

Separation of angiotensins (I to IV) in nonaqueous acetonitrile (ACN) capillary electrophoresis was investigated. Four angiotensins were not separated at all, i.e., a single peak was detected, when ACN containing 0.5% TFA alone was used as the medium. On the other hand, the addition of perchloric acid and perchlorate to the ACN was effective to improve the separation, which would be produced by the difference in the magnitude of some interaction between perchloric anion and analytes. The on-capillary concentration method for angiotensins was also successfully performed utilizing the significant difference in conductivity between sample solvent (0.5% TFA in ACN) and migration medium (50 mM tetraethylammonium perchlorate).

#### 【緒言】

非水系溶液を泳動媒体とするキャピラリー電気泳動(CE)では、水素結合やイオンペア形成などの、通常の水系での電気泳動法では利用しにくい相互作用を特異的に利用することが可能である。我々はこれまでに、アセトニトリルを泳動媒体とする非水系 CE において、泳動媒体への過塩素酸および過塩素酸塩の添加により、アミノ酸やペプチドの分離が達成されることを報告している[1,2]。本研究では、アセトニトリルを泳動媒体として用いる非水系電気泳動でのアンジオテンシンの分離において、添加する過塩素酸塩の種類による分離挙動の違いについて検討を行った。また、過塩素酸塩添加によりアセトニトリル溶液の電気伝導度が大きく上昇することを利用して、非水系におけるオンキャピラリー濃縮法についても検討を行った。

#### 【実験】

CE 装置は CAPI-3100 (大塚電子) を用いた。分離用キャピラリーには未処理のフューズドシリカキャピラリー (内径 50  $\mu\text{m}$ , 有効長 36 cm, 全長 48 cm, GL サイエンス) を用いた。泳動媒体 (アセトニトリル) に添加する酸としては、トリフルオロ酢酸(TFA)、過塩素酸(PA)、塩としては過塩素酸テトラエチルアンモニウム(TEAP)、過塩素酸ナトリウム(NaP)を用いた。実験条件としては、印加電圧 10 kV、検出波長 210 nm、温度 25°C、落差注入法 (25 mm) を用いた。試料溶液は、アンジオテンシン I~IV を 0.5% TFA アセトニトリル溶液に溶解し調製した。

## 【結果】

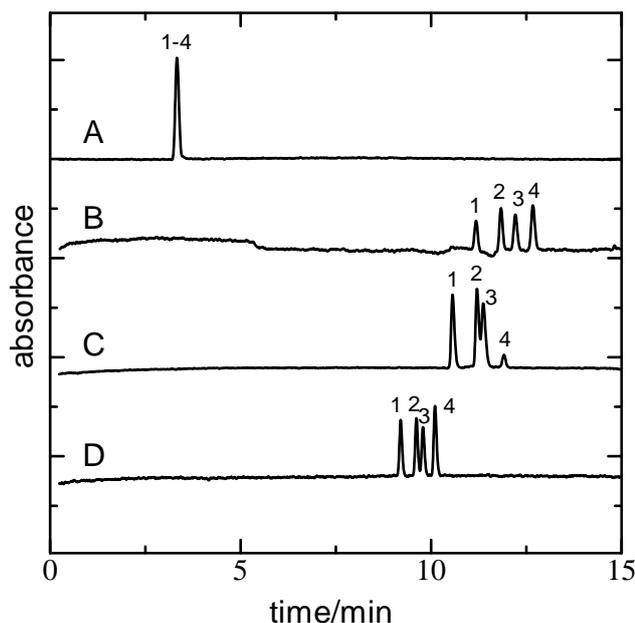
非水系キャピラリー電気泳動によるアンジオテンシン類の分離を Fig. 1 に示した。既報の通り、0.5% TFA を添加しただけのアセトニトリル泳動溶液 (Fig.1-A) では、アンジオテンシン I~IV は全く分離されず、さらに 50 mM の TEAP を添加することでアンジオテンシン類のベースライン分離が得られた (Fig.1-B)。TEAP の代わりに、0.5% PA、50 mM NaP を加えた泳動溶液を用いた場合にも、Fig.1-C, D に示すように、アンジオテンシン類の分離が得られた。すなわち、過塩素酸イオンとアンジオテンシン類との相互作用により分離が進行していると考えられる。アンジオテンシン II と III (ピーク 2, 3) の分離について Fig. 1 をさらに検討すると、TEAP を加えた際には、ベースライン分離が得られているが、PA、NaP の場合はピークの重なりが観測された。また、全体的にピーク群が観測される泳動時間も異なっている。これらのことから、泳動媒体中に存在する陽イオン種もアンジオテンシン類の分離に影響を与えていることがわかる。しかしながら、その詳細については更なる検討が必要である。

Fig. 1 に示した分離では 10 kV の電圧印加を行っている。このとき流れる電流値は、過塩素酸類を添加した B, C, D は 23~25  $\mu\text{A}$  であったが、TFA のみを添加した A では電流値の測定が不可能であった (0  $\mu\text{A}$  を表示)。すなわち、過塩素酸類の添加により、泳動媒体の電気伝導度が大きく上昇していることが明らかである。このことから、試料溶液の溶媒には、0.5% TFA アセトニトリル溶液を用い、泳動媒体には、50 mM TEAP アセトニトリル溶液を用いて、アンジオテンシン類のスタッキング濃縮を試みた。

0.5  $\mu\text{M}$  アンジオテンシン I~IV を落差法にて 30 秒間注入したところ、明確なピークを観測することができなかった。一方、500 秒間の試料注入(17 倍濃縮)を行ったところ、4 本の鋭いピークを得ることができた。5  $\mu\text{M}$  アンジオテンシン I~IV を 30 秒間注入して得られたピークと比較したところ、そのピーク高さはすべて約 1.4 倍(14 倍濃縮)であり、ほぼ理論どおりの濃縮効率が得られた。すなわち、非水系キャピラリー電気泳動によるペプチド分離においても、スタッキング法を適用することが可能であることが明らかになった。

## 【参考文献】

1. 中川浩行, 浅井孝弘, 北川慎也, 大谷 肇, 日本分析化学会第 55 年会講演要旨集, p. 149.
2. 松下尚文, 北川慎也, 大谷 肇, 第 28 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, pp.35-36.



**Fig. 1** Separations of angiotensins in 0.5% TFA acetonitrile solution without additive (A), with 50 mM TEAP (B), with 0.5% PA (C), and 50 mM NaP (D). Peaks 1 to 4 are angiotensin IV to I, respectively.

# 廃グリセロール利活用によるバイオプラスチック生産 ハロモナス菌培養液のキャピラリー電気泳動による分析

【産業技術総合研究所】○竹田 さほり, 黒岩 愛, 河田 悦和

## Analysis of the cultivation media of *Halomonas* sp. KM-1 producing bioplastic utilizing waste glycerol by capillary electrophoresis

Sahori TAKEDA, Ai KUROIWA and Yoshikazu KAWATA

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Bio-based Polymers Collaborative Research Team, AIST Kansai Collaboration Center

### Abstract

Bio-diesel is favored as carbon neutral fuel, but its by-product waste glycerol utilization is becoming a critical problem. We obtained a bacterium; *Halomonas* sp. KM-1, that can use waste glycerol as a single carbon source and convert it to bioplastic; polyhydroxyalcanoate (PHA). The pH of cultivation media decreased with the elapse of time. This result suggests that some organic acids were produced in the cultivation media. For a simple analysis of the ionic components in cultivation media, analytical conditions of capillary electrophoresis were examined. We investigated three types of migration buffers to analyze presumable organic acids. The migration buffer with higher pH gave the better shaped and more quantitative peaks of the organic acids. The simultaneous analysis of the organic acids and glycerol was possible within 30 min. Complicated pre-treatment of cultivation media samples including waste glycerol was not necessary.

Keywords: Bio-diesel fuel; Bioplastic; Cultivation media; Glycerin; Organic acid

### 1. 緒言

持続可能型社会の化石資源に代わる再生可能燃料として、植物油脂などを原料とするバイオディーゼル燃料 (BDF) の生産と普及が進められつつある。しかし、BDF の生産工程では副成物として高塩濃度・高 pH の廃グリセロールが 1 割程度生じ、その有効利用が課題となっている。一方、プラスチック生産においても再生可能原料が求められ、微生物などにより生産されるポリヒドロキシアルカノエート (PHA) が注目されている。

そこで廃グリセロールの利活用を目指し、一般の微生物の生育が難しい高塩濃度 (約 0.2 M)、高 pH (9~10) の環境で生育する菌体をスクリーニングした結果、乾燥菌体あたり 80 % 以上の PHA を蓄積する菌体 *Halomonas* sp. KM-1 株を見い出した<sup>1)</sup>。この菌体の培養条件検討のため、培養液中成分の経時変化についてキャピラリー電気泳動 (CE) により分析を行った。

### 2. 実験

CE 装置には大塚電子製 CAPI-3300 を用いた。キャピラリーは内径 50  $\mu\text{m}$ 、全長 62 cm、有効長

50 cm の内面未処理フューズドシリカ管を用いた。泳動溶液は有機酸分析の報告例 2 種類と陰イオン一斉分析報告例 1 種類の計 3 種類を検討した<sup>2-4)</sup>。試料は落差法で行い（導入量約 1.7 nl）、印加電圧は -20 kV（試料導入端が陰極）、測定波長 230 nm で間接吸光検出を行った。

*Halomonas* sp. KM-1 株の培養は、プレ培養した培養液 0.2 ml と培地 20 ml を 100 ml 容の三角フラスコに入れ、シリコ栓をして 35 °C で振盪させながら行った。12 時間後より経時的に培養液を回収して試料とした。培地組成は、NaHCO<sub>3</sub> 1.68 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mg、NaNO<sub>3</sub> 250 mg、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mg、NaCl 100 mg、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 mg、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4 mg、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg、Na<sub>2</sub> EDTA 8 mg、A5+ Co 溶液（H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 286 mg、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 250 mg、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22.2 mg、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 7.9 mg、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.1 mg、Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 4.398 mg を蒸留水 100 ml に溶解したもの）0.1 ml、これに廃グリセロール等の炭素源を数 % 加え、蒸留水に溶解し全量を 100 ml とした。

### 3. 結果と考察

培養液の pH は炭素源によっては時間の経過と共に低下する傾向がみられたため、有機酸生成の可能性が推察され、また、簡易キットで乳酸が検出される場合があった。そこで、まず有機酸を測定対象とする泳動溶液 2 種類（20 mM ピリジンジカルボン酸（PDC）+0.5 mM 水酸化セチルトリメチルアンモニウム（CTAH）pH 5.70<sup>2)</sup>、及び 5 mM PDC+0.5 mM 臭化セチルトリメチルアンモニウム pH 5.60<sup>3)</sup>）を用い、5 % グリセロール溶液に乳酸を 1 g/l 添加した模擬試料の分析を行った。その結果、乳酸のピークは検出されたが、他のピークと重なったり、かなりブロードになった。この現象の一因として試料の pH が泳動溶液よりも高いことが推測されたので、アミノ酸や糖も含めた陰イオン一斉分析における泳動溶液（20 mM PDC+0.5 mM CTAH、pH 12.1<sup>4)</sup>）を用いたところ、シャープなピークが得られ定量性も改善された。この条件で廃グリセロール培養液の分析を行った場合、乳酸及び酢酸が検出され、それらは 5 分程度で測定可能であった。さらに泳動時間を長くしたところ、糖が検出されるよりも少し遅い時間（約 15 分頃）にもピークが検出された。このピークは時間経過と共に小さくなること、また、その量的変化が GC-FID での測定結果とほぼ一致したことからグリセロールと考えられた。従って、CE においては後者の条件下で、複雑な前処理を行うことなくグリセロールと有機酸の一斉分析が可能であった。

### 謝辞

本研究は、環境省平成 21 年度循環型社会形成推進科学研究費補助金 K2161 により実施し、廃グリセロールは京都市廃食油燃料化施設より供与いただきました。関係者各位に感謝いたします。

### 参考文献

- 1) Y. Kawata and S. Aiba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- 2) T. Soga and G. A. Ross, *J. Chromatogr. A*, **767**, 223-230 (1997).
- 3) 石黒ほか、*食衛誌*、**41**, 261-268 (2000).
- 4) T. Soga and G. A. Ross, *J. Chromatogr. A*, **837**, 231-239 (1999).

Separation of nanofibers using CE

Masaru KATO

Center for NanoBio Integration,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Abstract

The field of nanotechnology currently is expanding dramatically in many research fields, and many different types of nanoscale compounds have been developed recently. These nanomaterials receive much attention, because of their excellent functions, as well as their risk to the environment and health, because it is believed that even a single nanostructure can cause the strong effects. For example, single quantum dots are now used as probes for single biomolecules, and single nanowires are used for integrated electrically driven photonic devices. Therefore, the demand for an efficient and accurate method for singlecompound analysis of these nanomaterials is increasing..

【緒言】

科学の進展により、炭素より構成されるナノファイバーであるカーボンナノチューブ (CNT)、アルツハイマー病患者の脳内に高濃度で存在するアミロイド線維 (Aβ) (Fig. 1)など、ナノメートルサイズの断面とナノ～マイクロメートルサイズの長さを有する物質 (以下、ナノファイバーと記す) の物性や機能が明らかになってきている。これらの研究成果を製品として社会で実用化するためには、これらの物質を分析し、品質を保証する必要がある。しかし既存の方法では、これらナノファイバーを効率的に分離精製することはできない。そこで本研究では、ナノファイバー類の高効率な分離精製法の開発を目指し以下の検討を行った。

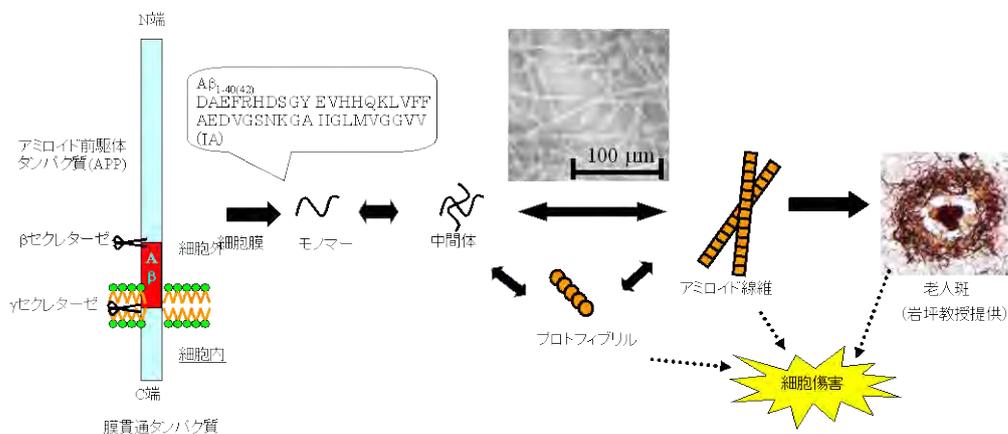


Fig. 1 Aβの重合の模式図

### 【実験】

キャピラリー電気泳動は、P/ACE System MDQ (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)を、SPMにはNanoWizard (JPK Instrument, Berlin, Germany)を用いた。CEで分離した分画を正確に分取するために、DiNa MaP (KYA-Technologies Corporation, 東京)及び、高撥水性印刷スライドガラス (Fig. 2、松浪硝子工業、大阪)を用いた。

A $\beta$ 重合体の分析には、レーザ励起蛍光検出器を有するキャピラリー電気泳動装置を用い、泳動液には10 $\mu$ M チオフラビン T(ThT)を溶解した200mM グリシン緩衝液(pH 9.5)を用いた。ThTは、 $\beta$ シート構造を有する重合体に結合するとスペクトルが変化するため、重合体の選択的な検出に有効であった<sup>1</sup>。

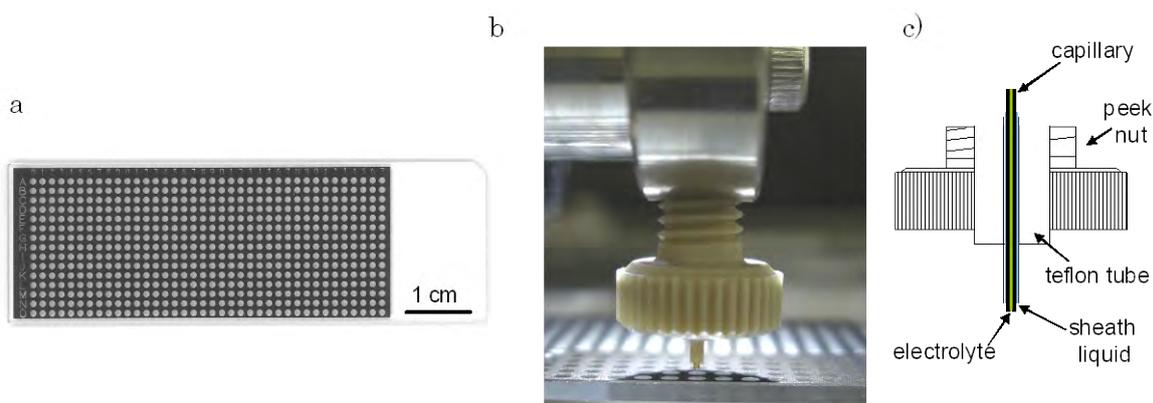


Fig. 2 a) 分取プレートの写真, (b) キャピラリーのアウトレットと分取プレートの図 (c)キャピラリーアウトレットの概念図

### 【結果及び考察】

図2に示すスライドガラスと分取システムを利用することで、CEで分離した数100nLの画分を連続的に正確に分取することが可能になった<sup>2</sup>。分取した各分画をSPMで観察した結果、アミロイド重合体と考えられる太さが約6nmの線維状物質が観察された。また線維状物質の前駆体であるプロトフィブリルと考えられる球状の物質が異なった分画で観察された。以上の結果より、CE-LIFもしくはCS-SPMを用いることで、A $\beta$ 重合体を迅速に分析できることが分かった。

### 【謝辞】

本研究は、東京大学大学院医学系・薬学系研究科 岩坪 威教授、工学系研究科 丸山茂夫教授、理化学研究所 福島孝典チームリーダーとの共同研究である。また新エネルギー・産業技術総合開発機構の産業技術研究助成事業(若手研究 Grant)及び、科学研究費補助金の若手研究(B)の助成により行った。

### 【文献】

1. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4887-4891. 2. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7336-7341.

# P-7

## キャピラリー電気泳動/質量分析法の法科学分析への有効利用 —化学修飾キャピラリーによる迅速性と再現性の向上—

【石川県警・科捜研<sup>1</sup>, 富山衛研<sup>2</sup>, 金沢大・医薬保健研究域<sup>3</sup>】○岩室嘉晃<sup>1,3</sup>, 石丸(飯尾)麗子<sup>1</sup>, 地中 啓<sup>1</sup>, 高山成明<sup>1</sup>, 小玉修嗣<sup>2</sup>, 早川和一<sup>3</sup>

### Utilization of capillary electrophoresis/mass spectrometry for forensic analysis – Improvement of rapidity and reproducibility using chemically modified capillaries –

Yoshiaki IWAMURO<sup>1,3</sup>, Reiko IIO-ISHIMARU<sup>1</sup>, Satoshi CHINAKA<sup>1</sup>, Nariaki TAKAYAMA<sup>1</sup>, Shuji KODAMA<sup>2</sup>, Kazuichi HAYAKAWA<sup>3</sup>

Forensic Science Laboratory, Ishikawa Prefectural Police Headquarters<sup>1</sup>, Toyama Institute of Health<sup>2</sup>, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Science, Kanazawa University<sup>3</sup>

#### Abstract

Capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS) using chemically modified capillary has been developed as an effective analytical method for abused drugs and herbicides. Control of electroosmotic flow (EOF) is essential to determine total analysis times, resolutions and reproducibilities of migration times. Four types of chemically modified capillaries, which have sulfonate, carboxyl, diol or amino groups, were studied for control of EOF.

【緒言】 キャピラリー電気泳動法(CE)は、試料量の少なさや迅速性などの点から有望な方法と考えられているが、再現性に難点があると指摘される場合もある。薬毒物の法科学分析に用いられる分析法は、信頼性と迅速性が大切である。CEにおいて電気浸透流(EOF)は、泳動時間の再現性、分離度、分析に要する時間に関係する重要な要素である。EOFは、泳動液に種々の添加剤を加えることでコントロールすることが可能であるが、キャピラリー電気泳動/質量分析(CE/MS)では、泳動液が揮発性のものに限定される。著者らは、内壁に種々の官能基を導入することでEOFをコントロールすることが可能な化学修飾キャピラリーに注目し、様々な化合物に対する化学修飾キャピラリーの実用性について検討を進めてきた<sup>1-3</sup>。今回、各化学修飾キャピラリーにおける泳動液pHとEOF速度の関係を求めた。そして、分析対象化合物の性質に合わせて、EOF特性が異なる化学修飾キャピラリーを選択し最適化を行った。

【実験1, 泳動液pHとEOFの関係】 CE装置 Agilent CE system G1600, CE条件 キャピラリー: GL Sciences 化学修飾キャピラリー-FunCap-CE Type S [スルホン基], Type C [カルボキシル基], Type A [4級アミノ基], Type D [ジオール基], フェーズドシリカキャピラリー素管(untreated) いずれも50 μm i.d. × 64.5 cm 泳動液: 200 mM ギ酸及びアンモニア 印加電圧: +30 kV 温度: 25°C

【結果1】 ギ酸とアンモニアを混合し、泳動液のpHを変化させたときのEOF及び電流値を、dimethylsulfoxideをマーカーとして測定した(Fig. 1)。Type Sでは低pH域から高速のEOFが得られ、pH 4以上でほぼ一定となった。Type C, Type Dではそれぞれ、untreatedよりも高速及び低速なEOFが得られた。また、Type AはpH 4以下でEOFが反転し、高速のEOFが得られた。本泳動液組成では、中性付近で電流値が増加した。Type Sでは、マトリックスリッチな分析対象に合わせて泳動液の

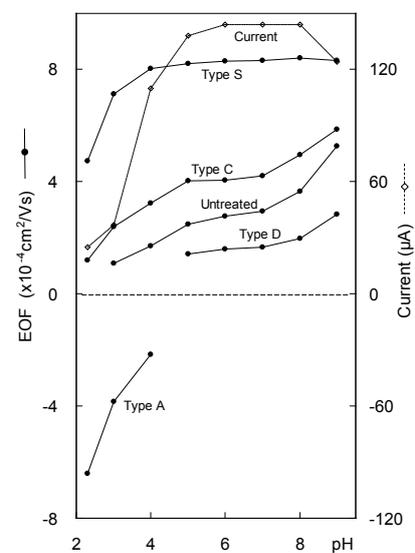


Fig. 1 Effect of pH on the EOF and

イオン強度を上げた場合に、電流が抑えられる低pHにせざるを得ない場合でも、高速のEOFが得られるという利点がある。

【実験2, Type Sを用いた覚せい剤及び代謝物のアキラル及びキラル分析】

**CE/MS装置** Beckman Coulter P/ACE MDQ CE system – Bruker Daltonics micrOTOF II, Agilent Technologies CE/MS/MS system 6410, **CE条件** 泳動液(アキラル): 500 mM ギ酸 – 10 mM トリエチルアミン (pH 2.1) 泳動液(キラル): 1M ギ酸 – 20 mM エチレンジアミン (pH 2.2) – 6 mM heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin 印加電圧: +30 kV 温度: 30°C, **MS条件** イオン化法:ESI+ シース液: 10 mM 酢酸アンモニウム – メタノール (1:1, 4  $\mu$ L/min) ネブライザー: 0.4 bar (泳動中以外は0 bar) **標準資料** methamphetamine (MA), amphetamine (AP), *p*-hydroxyMA (*p*OHMA), *p*OHMA sulfate, *p*OHMA glucuronide

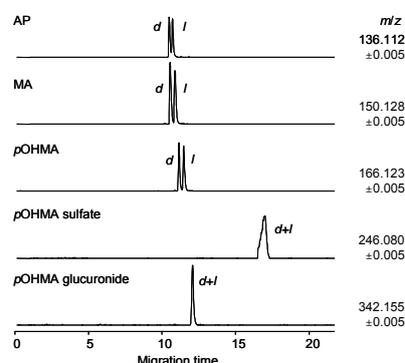


Fig. 2 Chiral analysis data of a spiked urine (each 10  $\mu$ g/mL)

【結果2】 Type Sでは高速のEOFが得られることから、分析時間は、アキラルで約6分、キラルで約17分(Fig. 2)となり、従来法(untreated)の約半分短縮できた。標準水溶液分析時の泳動時間の再現性(RSD%,  $n=5$ )は、キラルで0.1% (MA)であり、untreated (0.5% (MA))より良かった。当初、ピークがテーリングし、MA類のアミノ基と内壁のスルホン基とが静電的に相互作用する影響と推定されたため、泳動液にアミン系化合物を添加することで改善できた。特に、エチレンジアミンを加えることで、Type SのEOFを弱めることが可能であり、その濃度を調整することで、適切なキラル分離度を得ることが可能であった。

【実験3, Type Aを用いた含リンアミノ酸系農薬の分析】

**CE条件** 泳動液: 100 mM ギ酸に100 mM アンモニアを加え、pH 3.4に調整 印加電圧: -30 kV 温度: 30°C, **標準資料** glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), bialaphos (BIAL), aminomethylphosphonic acid (AMPA), 3-methylphosphinopropionic acid (MPPA) 他の条件は実験2と同様

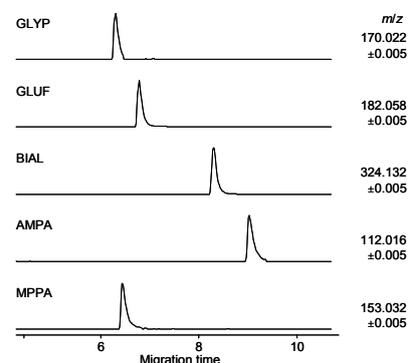


Fig. 3 Mass pherograms of a solution containing all five analytes (each 50  $\mu$ g/mL).

【結果3】 Type AではEOFが反転するため、CEをネガティブモードにした場合でも電流が維持され、泳動を行うことが可能であった。Type Aを用いることで、本泳動液条件でアニオンとしての挙動 (AMPAを除く) を示す含リンアミノ酸系農薬を、中性化合物やカチオン性化合物に先行させ、泳動を行うことが可能であった(Fig. 3)。

【まとめ】 化学修飾キャピラリーを用いることで、EOFをコントロールし、分析対象化合物の化学的性質に合わせて条件の最適化を行った。Type Sでは安定した高速のEOFが得られ、覚せい剤及び代謝物の分析において、再現性の向上と、分析時間の短縮化を達成した。Type AではEOFを反転させ、含リンアミノ酸系農薬の分析条件の最適化を行った。

【文献】 1) 地中ら, 法科学技術学会第13回学術集会講演要旨集, P.37 (2007). 2) 岩室ら, 日本法中毒学会第27年会講演要旨集, p.62 (2008). 3) 岩室ら, 日本法中毒学会第28年会講演要旨集, p.144 (2009).

# P-8S

## シクロデキストリン動電クロマトグラフィーにおける 生体試料のスウィーピング (4)

【京大院工】○齋藤 拓也, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二

### Sweeping of Biogenic Compounds in Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography. 4

Takuya SAITO, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA

Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

#### Abstract

The application of the sweeping technique to cyclodextrin electrokinetic chromatography (CDEKC) was investigated to achieve a faster separation and sensitive detection of  $\alpha$ -amylase ( $\alpha$ -AMY) and basic proteins. In the CDEKC analysis of  $\alpha$ -AMY from *bacillus subtilis*, sulfated  $\beta$ -cyclodextrin (S- $\beta$ -CD) was employed as a pseudostationary phase. As a result,  $\alpha$ -AMY was swept to give a 280-fold improvement of the detection sensitivity compared to conventional CDEKC. The developed method was applied to the real sample analysis of  $\alpha$ -AMY in human saliva, resulting in a 170-fold improvement of the sensitivity. In the sweeping analysis of the mixture of other proteins, including cytochrome *c*, ribonuclease A,  $\alpha$ -chymotrypsinogen A, and lysozyme, 6–8-fold improvements of the sensitivity were attained with good resolution .

#### 【緒言】

タンパク質は生物の生命活動において中心的な役割を果たしており、その発現や機能、構造などを解析するプロテオミクスの重要性が高まっている。生体内に存在する数十万種のタンパク質の多くはごく微量であるため、プロテオミクスの進展のために省試料でより高感度かつ迅速な分析手法の開発が求められている。そこで本研究では高速分析が可能なキャピラリー電気泳動 (CE) において、硫酸化  $\beta$ -シクロデキストリン (S- $\beta$ -CD) との相互作用を利用したシクロデキストリン動電クロマトグラフィー (CDEKC) に基づく生体試料の高性能分離について検討を行った。さらにレーザー励起蛍光 (LIF) 検出法やオンライン試料濃縮法の一つであるスウィーピング法の適用により、タンパク質分析の高速化、高感度化を目指した。

#### 【実験】

キャピラリー電気泳動装置 P/ACE MDQ (Beckman Coulter) により CDEKC 分析を行った。タンパク質の非特異的吸着を抑制するために、フューズドシリカキャピラリーの内表面を poly(vinylpyrrolidone) (PVP) や poly(vinylalcohol) (PVA) を用いて修飾した。試料には fluorescein isothiocyanate (FITC) でラベル化した枯草菌由来、ヒト唾液由来の  $\alpha$ -amylase (FITC-AMY) および 4 種の塩基性タンパク質 Lysozyme (Lys), Cytochrome *c* (Cyt *c*),

Ribonuclease A (RNase A),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A ( $\alpha$ -Chy A) を、擬似固定相には 7~11 の硫酸基を有する S- $\beta$ -CD を用いた。泳動液には 10 mM S- $\beta$ -CD を含む、10 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) または 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) を用いた。試料注入は圧力注入 (0.5 psi) で行い、分離においては -20 kV の電圧を印加した。検出は励起波長 488 nm, 検出波長 520 nm の LIF 測定もしくは 214 nm の UV 吸収測定で行った。

### 【結果と考察】

スウィーピング法では、S- $\beta$ -CD を含まない緩衝液に溶解した試料と S- $\beta$ -CD を含む泳動液を用いた電気泳動を行い、試料と S- $\beta$ -CD との相互作用に基づく泳動速度変化を利用して濃縮する。枯草菌由来の FITC-AMY の試料溶液を 100 秒間注入した際には、スウィーピング条件下では鋭いピークが検出され、通常の CDEKC 分析に比して、約 280 倍の高感度化が達成された (Fig. 1a)。得られたピークが FITC-AMY 由来のものであることを確認するために FITC でラベル化した bovine serum albumin (FITC-BSA) をスウィーピング条件で測定したところ、FITC-BSA はブロードなピークとして検出された。これは S- $\beta$ -CD との相互作用が小さい FITC-BSA がスウィーピング効果をほとんど受けなかったためであると考えられる。このことから FITC-AMY が S- $\beta$ -CD との特異的な相互作用により濃縮されたことが示唆された。

以上の知見を基に FITC-AMY 実試料分析の高感度化について検討を行った。ヒト唾液由来 AMY 標品の分析を行ったところ、スウィーピング条件で鋭いピークが得られ、通常の CDEKC と比べ、約 120 倍の高感度化が達成された。そこで、実試料として採取したヒト唾液をスウィーピング条件下で測定したところ、標品と同様のピーク分離と約 170 倍の高感度化が達成された。

また、AMY の場合と同様に  $\beta$ -CD との相互作用が報告されている 4 種の塩基性タンパク質についても検討を行った。これらの混合試料に対して、S- $\beta$ -CD との相互作用を利用したスウィーピングによる高感度化と分離を試みたところ Lys, Cyt c, RNase A ではスウィーピングによる濃縮が観察され、それぞれ通常の CDEKC と比して 6~8 倍の高感度化と良好な分離が達成された (Fig. 1b)。

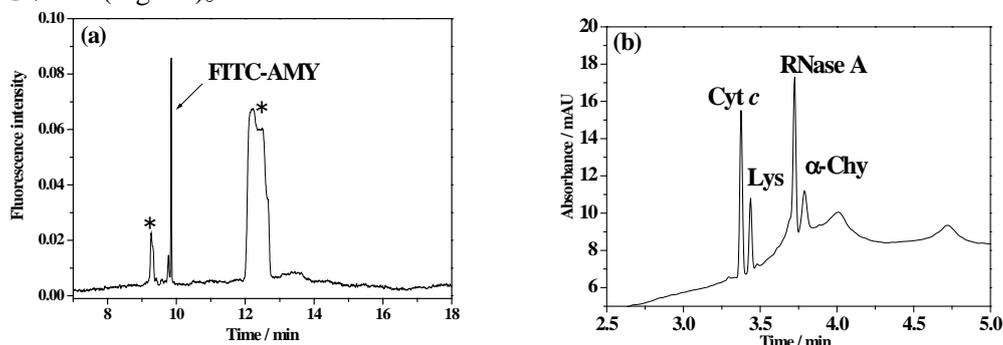


Fig. 1. Sweeping-CDEKC analyses of (a) FITC-AMY (0.1 ppm) and (b) a mixture of four proteins (50 ppm): Background solution, (a) 10 mM S- $\beta$ -CD in 10 mM borate buffer (pH 8.0) and (b) 10 mM S- $\beta$ -CD in 10 mM phosphate buffer (pH 3.0); sample matrix, (a) 40 mM borate buffer (pH 8.0) and (b) 70 mM phosphate buffer (pH 3.0). Asterisk indicates the peak of free and decomposed FITC.

**Transient-Trapping in MEKC for High-Sensitive Detection. 13**

Kota HASHIBA, Ryuta TANAKA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

**Abstract**

Among several on-line sample preconcentration techniques for micellar electrokinetic chromatography (MEKC), transient-trapping (tr-trapping) is suitable for the high throughput analysis since it provides a rapid and sensitive analysis with high resolution. However, the applicability of tr-trapping was limited to hydrophobic compounds. To overcome this drawback, “hydrophobic labeling” using a BODIPY dye was investigated for the sensitive analysis of hydrophilic amino acids. As a result, the BODIPY-labeled phenylalanine was successfully concentrated in tr-trapping-MEKC, whereas the native one was not. In tr-trapping-MEKC, furthermore, several BODIPY-derivatized amino acids could be separated from each other on the baseline with the 106–125-fold improvements of the sensitivity. In sweeping-MEKC, on the other hand, these analytes could not be resolved well. These results demonstrated that the hydrophobic labeling improved the applicability of tr-trapping ranging from the hydrophobic to hydrophilic analytes.

**【緒言】**

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) は高い分離性能の反面, 低い濃度感度が問題となることも多く, その改善のために様々なオンライン試料濃縮法が開発され適用が試みられてきた。しかしながら, 試料をキャピラリーに大量注入して濃縮を行うため有効分離長が減少し, 分離が不十分になる場合がある。そこで, 本研究ではこの問題点を解決するために, マイクロチップ電気泳動において新規に開発されたトランジェントトラッピング (tr-trapping) 法<sup>1</sup>をキャピラリー電気泳動 (CE) 装置を用いた MEKC へ適用し, 高感度かつ高分離能な分析の実現を目指した。また, tr-trapping 法における試料の適用範囲を拡大するため, 親水性試料の疎水性誘導体化についても検討した。

**【実験】**

CE 装置には P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を, 分離には内径 50  $\mu\text{m}$ , 全長 40.2–69.5 cm (有効長 30.0–59.3 cm) のフューズドシリカキャピラリーを使用し, tr-trapping 法の実験では, 泳動液 (BGS) にはリン酸塩緩衝液を, ミセル溶液 (M) には硫酸ドデシルナトリウム (SDS) のリン酸塩緩衝溶液を用いた。試料 (S) には 1-ナフチルメチルアミン (NMA), 1-(1-ナフチル)-エチルアミン (NEA), 2-(1-ナフチルアミノ)-エチルアミン (NAEA) およびアミノ酸 (Arg, His, Lys, Phe, Ile, Leu, Val) の BODIPY 誘導体を用いた。溶液注入は圧力注入 (0.5 psi) で行い, 印加電圧は 20 kV とした。検出は UV 吸収 (220 nm) 検出およびレーザー励起蛍光 (励起/検出波長, 488/520 nm) 検出にて行った。

## 【結果と考察】

Tr-trapping 法ではミセルを含まない泳動液を充填したキャピラリーにミセル溶液を部分的に注入した後、泳動液を用いて調製した試料溶液を大量に注入して分析を行う。試料の大量導入により有効分離長が短くなるが、試料/ミセル溶液の境界面近傍におけるトラップ・リリース機構により高効率な試料濃縮と高い分離度を同時に得られるのが本法の大きな特徴である。

CE においても tr-trapping 法が適用できることを確認するために、疎水性の高い芳香族アミン類をモデル試料とした tr-trapping-MEKC 分析について検討を行った。その結果、一般的な MEKC 分析では分離が困難であったのに対して、tr-trapping 法の適用により全ての試料が完全に分離され、それぞれ 40–60 倍の高感度化が達成された。

しかしながら、tr-trapping 法はミセルと試料との強い疎水性相互作用を必要とするため、アミノ酸のような疎水性の低い試料に対してはその適用が困難であった。そこで、ミセルとの相互作用を強くするため疎水性の高い BODIPY を用いた蛍光誘導体化を行った。その結果、tr-trapping 法によるアミノ酸の濃縮・分離が可能になった。特に、中性アミノ酸の分析においては目的成分の完全分離および 106–125 倍の濃縮効率が同時に達成された (Fig. 1a)。一方、ミセルとの相互作用を同様に利用したオンライン試料濃縮法であるスウィーピング法について、同じミセル溶液を泳動液として用いてその濃縮・分離性能を検討したところ、tr-trapping 法と同程度の濃縮効率は確認されたが、ベースライン分離は困難であった (Fig. 1b)。どちらの手法も分離機構はミセルとの相互作用の差に基づいているが、tr-trapping 法では MEKC の原理に基づく分離に加えてリリース機構が効果的に作用したために高い分離度が得られたと考えられる。また、塩基性アミノ酸の分析に関しても、スウィーピング法では分離されなかった試料が、tr-trapping 法では完全に分離された。

以上の結果から、tr-trapping 法は CE へも適用可能であり、疎水性誘導体化によって広範な化合物に対して高感度かつ高分離能な MEKC 分析を実現できることが示された。

## 【文献】

(1) Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1255-1262.

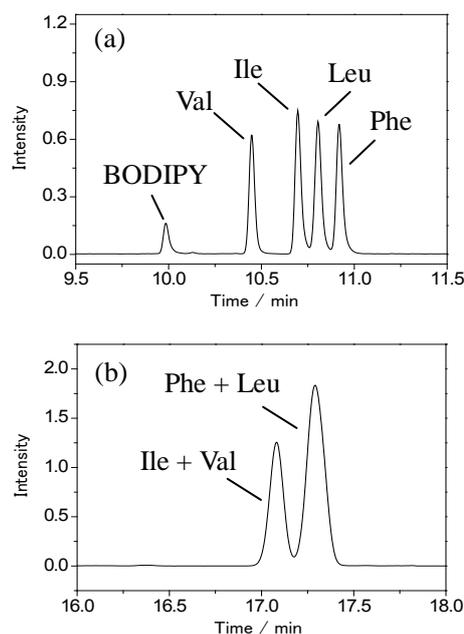


Figure 1. Electropherograms of BODIPY-labeled amino acids obtained with (a) tr-trapping and (b) sweeping. BGS, (a) 34 mM phosphate buffer (pH 5.2), (b) 25 mM SDS in 22 mM phosphate buffer (pH 5.2); S, (a) and (b) 1 nM BODIPY-Phe, Leu, Ile, Val in 34 mM phosphate buffer (pH 5.2) injected for 450 s; M, (a) 25 mM SDS in 22 mM phosphate buffer (pH 5.2) injected for 60 s.

# P-10S キャピラリー電気泳動へのインクジェットマイクロチップの導入法の開発

【首都大・環境科学】○池田 紗織, 斉藤 望, 中嶋 秀, 内山 一美

## A Sample Introduction Method for Capillary Electrophoresis Using an Inkjet Microchip

Saori IKEDA, Nozomi SAITO, Takako NAKAHARA, Hizuru NAKAJIMA, Katsumi UCHIYAMA

*Faculty of Environmental Science, Tokyo Metropolitan University*

**An inkjet microchip exactly controls the volume of a droplet in the range of pL to nL. Sample introduction method for capillary electrophoresis was developed with the inkjet microchip. Highly reproducible sample introduction was possible using an inkjet. Linear relationship between the concentrations of Rhodamine-B and peak areas was obtained. Some applications for the system would be presented in detail.**

【緒言】 CE では一般に内径 25~100  $\mu\text{m}$  のキャピラリーを用いるため、その必要試料量は極めて少なく(数 nL 程度)、極微量を再現性良く試料導入する必要がある。

本研究では、試料導入にインクジェットマイクロチップを用いた CE の試料導入法を開発した。インクジェットマイクロチップは pL~nL の液滴量を精度よく正確な位置に吐出することができる。極微量の試料導入により、試料バンドを極めて小さくすることが可能であることから、高分離能を得やすく、再現性良い導入は再現性の高い検出につながると考えられる。

【実験】 1. 試薬 キャピラリーは UV 透過被膜コーティングキャピラリーチューブ (o.d.0.375 mm, i.d.0.100mm, GL Sciences 社製), モデル試料には東京化成社製の Rhodamine-B (R-B)を用いた。試料には対象成分の蒸発防止及び粘度・比重の増加を目的としグリセリン(Wako 製)を添加した。泳動液には Tris-HCl バッファー(50mM, pH=9 に調整, Wako 製)を用いた。

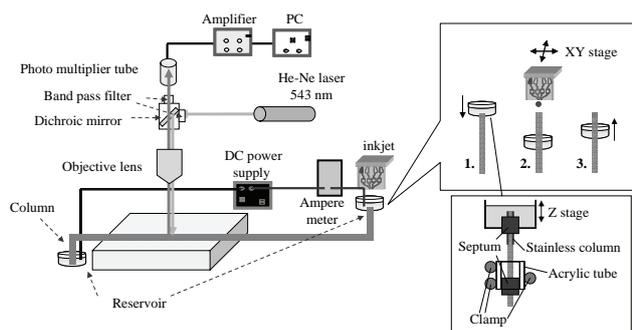


Fig. 1 Measurement device used inkjet microchip

2. 装置 キャピラリーにインクジェットマイクロチップで試料を直接導入し、落射蛍光顕微鏡を用いたレーザー誘起蛍光法により検出を行った。その装置全体図を Fig. 1 に示す。セプタムとアクリル管を用いてキャピラリーの位置をクランプにより固定した。上下リザーバーに電極を挿入し電気泳動用電源へと導いた。インクジェットマイクロチップはキャピラリーに直接導入できる位置へ XY ステージにて

位置合わせを行った。上部リザーバーを、Z ステージを用いて下に移動させることによりキャピラリーの上端を空气中に露出させ、試料をキャピラリー断面上に吐出した後上に移動させることにより先端を再びバッファー内へと沈めた。検出はグリーン He-Ne レーザー (543nm, 1mW) を励起光源として使用し、落射蛍光顕微鏡を用いてカラムに垂直に入射するようにした。蛍光は光電子増倍管からの信号を CDS (LAsoft 製) を用いて記録した。

【結果と考察】 1. インクジェットによる吐出 インクジェットで吐出した試料は、液滴数が 10 滴ほどであれば、キャピラリー先端の高低差によりキャピラリー断面からキャピラリー内部へと入っていくのが肉眼で確認できた。液滴数が大きい場合(100 滴~), 液滴内に気泡が生じた。これはキャピラリー内のバッファーやキャピラリー断面に液滴が何度も勢よく衝突することが原因と考えられる。今回の実験では測定に支障をきたすことはなかったが、試料の種類によってはインクジェット駆動電圧を調整し、液滴の速度を落とすことにより気泡を生じないようにさせる必要がある。

2. 再現性 キャピラリー先端の位置は、セプタムにステンレス管(内径 0.500mm)を差し込んだ中にキャピラリーを通すことによって、上下には動くが左右には動かないように固定した。このことにより、吐出した液滴がキャピラリー中心に確実に到達するようになり、再現性が向上した。泳動時間の RSD は 1.07~2.07%、ピーク面積の RSD は 4.16~9.66% であった。試料がキャピラリーの断面に付着するなど、キャピラリー内にうまく入らない場合、試料バンドが広がり、ピーク幅・ピーク高さにばらつきが見られた。これはステンレス管の内径とキャピラリーの外径を合わせキャピラリー先端の位置の再現性をより高めることによって改善できると考えられる。

3. 定量性 R-B の検量線を作成した。インクジェットチップで 10 滴吐出し(70 V, 1 kHz), 5~125  $\mu\text{M}$  (絶対量で約 1.5fmol~37.5fmol) の濃度範囲で測定を行った。Fig. 2 に示すように直線状の検量線が得られた。

【結論】 本研究では、キャピラリー電気クロマトグラフィーの更なる高性能化を目指して、インクジェットマイクロチップを用いた試料導入法を開発した。インクジェットマイクロチップを用いて極微量での試料導入が行なえ、Rhodamine-B の定量性が確認された。インクジェットによる

試料導入システムにより、容易に微量試料を再現性良く導入できた。今後、インクジェットの吐出特性を詳細に検討し、より微量の導入と再現性の向上について検討する予定である。

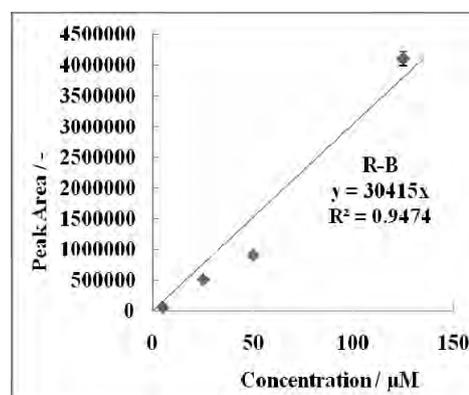


Fig. 2 Calibration curve of R-B

**Characterization of non-ionic surfactant micelles  
as binding media for ionic species**

Ayumi IKUTA, Toshio TAKAYANAGI

*Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University***Abstract**

Binding equilibrium of ionic species to non-ionic surfactant micelles has been analyzed through the changes in the electrophoretic mobility ( $\mu_{ep}$ ). Non-ionic surfactant of Brij 58 was used as a model micelle-forming surfactant. The electrophoretic mobility of ionic species was measured by capillary zone electrophoresis in the presence of Brij 58 in the migrating buffer to determine the binding constants of the ionic species to the non-ionic surfactant micelle ( $K_B$ ). While the  $K_B$  determined increased along with the molecular volume of the analytes, the  $K_B$  values of cationic analytes were relatively small compared to the anionic ions. The phenomena were attributed to the polyether moiety of Brij 58, which would incorporate the buffer cation and the counter anion would accompany the cation.

**【緒言】**

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) は試料イオンの電気泳動移動度の差異に基づいて分離する方法である。CZE では類似化合物等の分離改善のためにモディファイヤーがしばしば用いられる。非イオン界面活性剤ミセルはミセル自体に電荷がなく、水と混じり合わない有機溶媒と等価な疎水性媒体としてとらえることができる。また、ポリエーテル系の非イオン界面活性剤ミセルは、マイクロ構造、大きな比表面積、ポリオキシエチレン部位の特性から、無電荷の物質に加えてイオン性物質を結合する。これらの結合平衡は、電気泳動移動度に反映される (Fig. 1)。

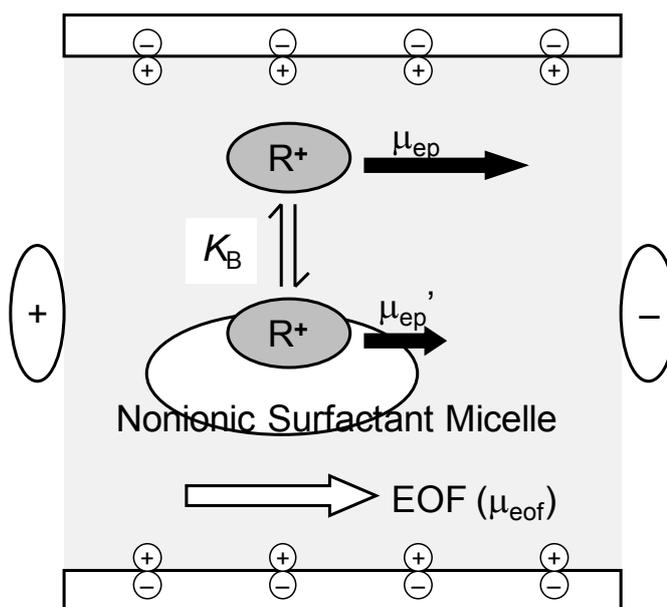


Fig. 1 Electrophoretic migration in micelle-binding.

本研究では、この電気泳動移動度の変化を利用し、キャピラリーゾーン電気泳動法により、フェニルアルキルアンモニウム等のイオン種の結合反応媒体としての非イオン界面活性剤ミセルの特性を評価した。

### 【実験】

キャピラリー電気泳動装置として、Agilent Technologies 社製の<sup>3D</sup>CE装置を用いた。キャピラリーには、全長 64.5 cm、検出器までの有効長 56 cm、内径 50 μm のものを用いた。泳動液に非イオン界面活性剤である Brij 58 を所定量添加した。結合特性を調べるプローブイオンには、陰イオンであるポリニトロフェノレート、アルキルベンゼンスルホン酸、ダンシルアミノ酸、陽イオンであるフェニルアルキルアンモニウム、アルキルイミダゾリウム、アルキルピリジニウムを用いた。常法により試料イオンのみかけの電気泳動移動度( $\mu_{ep}$ )を求め、非線形最小自乗解析して結合定数 ( $K_B$ ) を決定した。

また、分子体積の計算では、MOPAC7.0 上で AM1 関数により構造最適化を行い、ファンデルワールス体積を見積もった。

### 【結果と考察】

試料イオンはアルキル鎖長の違いに基づいて分離検出された。解析により得られた結合定数はアルキル鎖が長くなるにつれ増大した。分子体積と  $\log K_B$  との相関をとったところ正の相関関係が見られ、疎水性分配に基づく現象であることがわかった (Fig. 2)。

陰イオンと比較すると、陽イオンは  $K_B$  が小さくなる傾向がある。これは、Brij 58 のエーテル酸素と泳動液中の  $\text{Na}^+$  等が結合し、陽イオン種は交換によるミセル結合が阻害されているためであると考えられる。泳動液中の陰イオンはカウンターイオンとして陽イオンよりも弱く結合しているため、交換されやすいものと考えられる。

また、同じ一価の陽イオン間では、アンモニウム基を有するもので  $K_B$  は大きかった。これは、Brij 58 のポリエーテル部分の効果と考えられる。

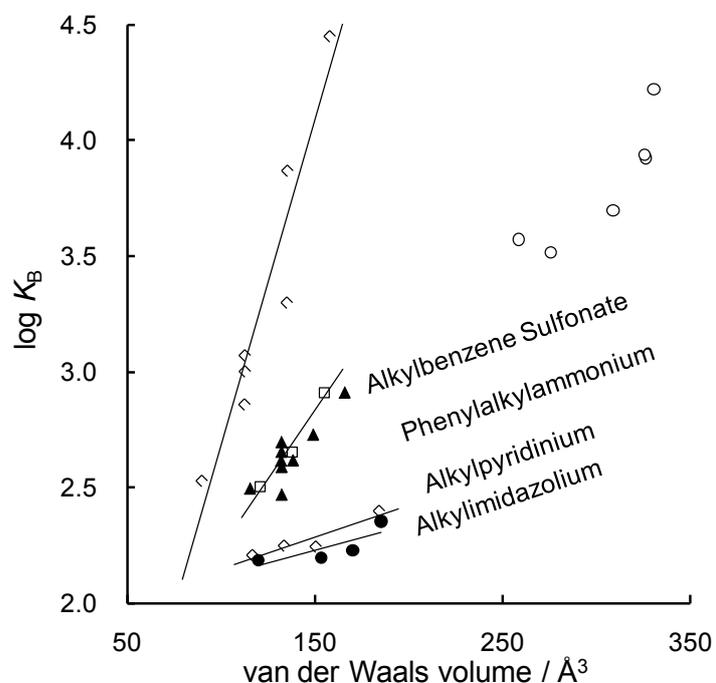


Fig. 2 Relationship between binding constant ( $K_B$ ) and van der Waals volume of analytes. Surfactant : Brij 58.

## キャピラリー電気泳動法によるシトシンのメチル化比率計測の基礎検討

【産総研・健康工学研究センター<sup>1</sup>, 産総研・計測標準研究部門<sup>2</sup>, 産総研・生物機能工学研究部門<sup>3</sup>】○宮道隆<sup>1</sup>, 脇田慎一<sup>1</sup>, 藤井紳一郎<sup>2</sup>, 高津章子<sup>2</sup>, 加藤大<sup>3</sup>, 丹羽修<sup>3</sup>

**Preliminary study for Measurement of Degree of Cytosine Methylation using Capillary Electrophoresis**

Takashi MIYADO<sup>1</sup>, Shin-ichi WAKIDA<sup>1</sup>, Shin-ichiro FUJII<sup>2</sup>, Akiko TAKATSU<sup>2</sup>,  
Dai KATO<sup>3</sup>, Osamu NIWA<sup>3</sup>

*Health Technology Research Center,*

*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)<sup>1</sup>,*

*Metrology Institute of Japan, AIST<sup>2</sup>, Institute for Biological Resources and Functions, AIST<sup>3</sup>*

**Abstract**

Recently, epigenetic gene regulation has attracted much attention. Cytosine methylation is one of the well-known epigenetic mechanisms. It has been reported that several cancers may be closely associated with changes in cytosine methylation status of tumor suppressor genes. In particular, the degree of cytosine methylation can be important in the development of cancer.

The aim of this study is the development of a high-throughput measurement for the degree of cytosine methylation using a microchip capillary electrophoresis (MCE). In this paper, to develop the assay, the preliminary investigation on running buffers using capillary electrophoresis was described. Using the 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) buffer reported, the complete separation of dCMP, mdCMP and dTMP was achieved, however, the separation windows was insufficient for the separation using the MCE. Therefore, the other running buffers were investigated. Among the several running buffer, the relatively good separation windows of dCMP and dTMP was obtained by Tris-HCl buffer.

**【緒言】**

近年、遺伝子発現を制御する機構としてエピジェネティクスが注目されており、例えば細胞種を定義するエピジェネティックな修飾の解明の重要性が報告されている<sup>1)</sup>。また、エピジェネティクス機構の1つであるシトシンのメチル化は腫瘍抑制遺伝子の機能を阻害することで発がんを誘引することが多種の癌で知られている。今まで報告されてきた主なメチル化シトシン解析法は Bisulfite 法や制限酵素法であるが、反応時間が長い、解析領域に制限がある、定量性に乏しいなどの問題点がある<sup>2)</sup>。近年、簡便、迅速な定量法の確立を目指してキャピラリー電気泳動法を用いたメチル化シトシ

ンの分離研究が報告されている<sup>3,4)</sup>。

本研究では、特定の配列中の全シトシンとメチル化シトシンの比率から解析を行う手法<sup>4)</sup>に着目し、より迅速かつ少試料量が可能なマイクロチップ電気泳動法での計測を目標として、キャピラリー電気泳動法を用いた泳動液の検討を、33 mer の 1 本鎖 (ssDNA) のモデル試料測定の結果とともに報告する。

#### 【実験】

キャピラリー電気泳動装置に Beckman Coulter 製 P/ACE MDQ、キャピラリーに内径 75  $\mu\text{m}$ 、全長 60.2 cm、有効長 50 cm のフューズドシリカ管を用い、検出波長 254 nm、印加電圧 -15 kV で実験を行った。標準試料はヌクレオチドの標品と PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; pH 8.8) から調製した。DNA モデル試料は 9 箇所のシトシンのうち 5 箇所がメチル化している ssDNA を酵素で加水分解処理して調製した。ミセル動電クロマトグラフィーを行うため、泳動液には塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC) を添加した。

#### 【結果と考察】

藤井らの報告<sup>4)</sup>した AMP を用いる泳動液 (pH 9.95) で DNA モデル試料を測定したところ (Fig. 1)、完全分離を達成したが、シトシン (dCMP)、メチル化シトシン (mdCMP)、チミジン (dTMP) のピークが近接していた。pH や CTAC 濃度によって分離が幾分改善されることを確認したが、マイクロチップ電気泳動法でのピーク分離は困難が予想された。

そこで、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) とリン酸緩衝液 (pH 7.4) について標準試料を用いて検討したところ、Tris-HCl 緩衝液の場合、dCMP と dTMP の分離窓が広がった (Fig. 2)。現在、Tris-HCl 緩衝液などを用いて、モデル DNA 試料の分離度向上を検討している。

#### 【文献】

- 1) American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force; European Union, Network of Excellence, Scientific Advisory Board., *Nature*, 454 (2008) 711-715.
- 2) 牛島俊和, 眞貝洋一編, 実験医学別冊エピジェネティクス実験プロトコール, 羊土社 (2008) 18-29.
- 3) I. Yang, I.Y. Park, S-M. Jang, L.H. Shi, H-K. Ku, S-R. Park, *Nucleic Acids Res.*, 34 (2006) e61.
- 4) 藤井紳一郎, 絹見朋也, 高津章子, 日本分析化学会第56年会要旨集, (2007) 125.

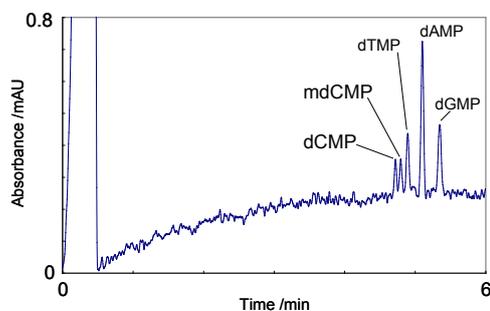


Fig.1 Electropherogram of nucleotids using AMP buffer

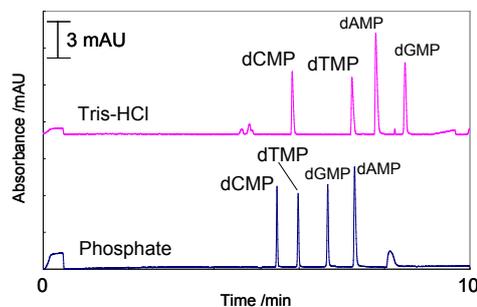


Fig.2 Electropherogram of standard sample using Tris-HCl or Phosphate buffer

# P-13

## マイクロチップ電気泳動法による DNA 酸化損傷マーカーの迅速分離

【産総研・健康工学研究センター】宮道隆, ○永井秀典, 脇田慎一

### Development of High-throughput Separation Method for Markers of Oxidative DNA Damage using Microchip Capillary Electrophoresis

Takashi MIYADO, Hidenori NAGAI, Shin-ichi WAKIDA

*Health Technology Research Center,*

*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*

#### Abstract

It is well-known that DNA and proteins were injured by oxidative stresses. It has attracted much attention that several diseases were caused by oxidative stresses. We have investigated a high-throughput assay for oxidative stress markers, *e.g.* NO metabolites. 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) is one of the well-known markers of oxidative DNA damage. Similarly, 8-nitro deoxyguanosine (8-NO<sub>2</sub>dG) and 8-chloro deoxyguanosine (8-ClIdG) are also the markers. In this paper, we described the high-throughput separation for the markers of oxidative DNA damage using microchip capillary electrophoresis.

At first, a kind of buffer and a kind of surfactant were investigated as a running buffer using nucleoside standard solution. Because of the good separations, a borate buffer (pH 9.18) added with 30 mM cetyltrimethylammonium chloride was selected. As a result, the complete separations of 8-OHdG and nucleoside were achieved within 15 seconds. Using same buffer, the separations of 8-OHdG, 8-NO<sub>2</sub>dG and 8-ClIdG were also achieved.

#### 【緒言】

高額の国民医療費の抑制が急務となる中で、治療から予防への医療の転換が進められている<sup>1)</sup>。また、体内の酸化力が抗酸化力を上回った状態（酸化ストレス）では DNA やタンパク質が損傷を受け、生活習慣病、ガン、加齢などが誘引されることが知られている<sup>2)</sup>。予防医療の実現には健康のリスクを定量的に知る必要があるため、酸化ストレスに関連する物質がリスクの指標として注目されている。

グアノシン残基への選択的酸化などで生成する 8-OHdG はそのまま尿中に排泄されるため、DNA の酸化損傷マーカーとして注目されている。しかしながら、一般的な測定法は ELISA 法や HPLC-電気化学検出(ECD)法であり、長い測定時間、煩雑な操作などの問題点がある。

そこで、簡便、迅速、少試料量での測定が可能なマイクロチップ電気泳動 (MCE) -UV 検出法を用いた DNA 酸化損傷マーカーの測定法の確立を目指し、今回は標準試料を用いて予備的な分離の検討を行った。さらに、8-OHdG に加えて、活性酸化窒素種である一酸化窒素の代謝産物によるニトロ化で生成する 8-NO<sub>2</sub>dG<sup>3)</sup>、感染などによる慢

性炎症で活性化された酵素<sup>4)</sup>によって誘引される 8-ClIdG<sup>2)</sup>についても分離を検討したので併せて報告する。

### 【実験】

MCE 装置には島津製作所製 MCE-2010 を、石英ガラス製マイクロチップには同社製 Type U(流路幅：50  $\mu\text{m}$ 、深さ：20  $\mu\text{m}$ 、分離路長：25 mm)を用いた。検出はリニアイメージング法により検出波長 260 nm で行った。泳動液にはホウ酸塩緩衝液 (pH 9.18) またはリン酸塩緩衝液 (pH 7.14) を、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を行うための界面活性剤にはドデシル硫酸ナトリウム (SDS) または塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC) を用いた。試料にはヌクレオシド、ヌクレオチド、8-OHdG、8-NO<sub>2</sub>dG、8-ClIdG の標準溶液を用いた。

### 【結果と考察】

まず、ヌクレオシドの標準試料を用いて泳動液の検討を行った。ホウ酸塩緩衝液に 80 mM SDS または 30 mM CTAC を添加した場合に分離が得られたが、CTAC を用いた方がより良好な分離が得られた。また、本泳動液でヌクレオシドとヌクレオチドも分離することが確認された。以上の結果から、30 mM CTAC 添加ホウ酸塩緩衝液を泳動液に選択した。

そこで、ヌクレオシドに 8-OHdG を加えた試料を用いて分離を検討した結果、良好な分離が得られた (Fig.1)。分離時間も 15 秒以内であったため、DNA 酸化損傷マーカーの迅速分離を達成した。

さらに、8-OHdG、8-NO<sub>2</sub>dG、8-ClIdG の分離を検討したところ、8-NO<sub>2</sub>dG のニトロ基の酸化/還元体を含む 4 本のピークが得られ (Fig. 2)、健康リスクマーカーとなりうるグアノシンの修飾物質の一斉分離に見通しが得られた。

今後は分離の改善と高感度化が課題である。

### 【文献】

- 1) 新エネルギー・産業技術総合開発機構, 個別化健康管理に向けた技術・ツール (治療中心から予防中心へ) の開発と産業化に関する調査, (2007).
- 2) 二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二, 酸化ストレスマーカー, 学会出版センター (2005).
- 3) T. Akaike, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 2448.
- 4) H. Ohshima, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 417 (2003) 3.

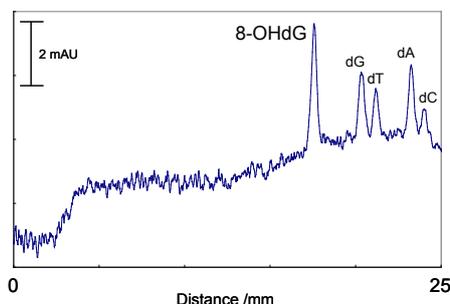


Fig.1 Separation profile of 8-OHdG and nucleoside

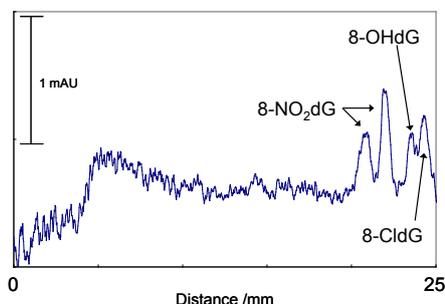


Fig.2 Separation profile of 8-OHdG, 8-NO<sub>2</sub>dG and 8-ClIdG

# P-14

## 血漿中 NO 代謝産物測定の高感度化：過渡的等速電気泳動法の適用

【産総研・健康工学研究センター<sup>1</sup>，阪工大・工<sup>2</sup>，国立循環器病センター研・病因<sup>3</sup>】宮道隆<sup>1</sup>，○脇田慎一<sup>1</sup>，島津希世子<sup>2</sup>，澁谷康彦<sup>2</sup>，野瀬和利<sup>3</sup>，下内章人<sup>3</sup>

### Development of High sensitive Assay Method for NO Methabolites in human plasma using Microchip Capillary Electrophoresis: Application of transient isotachopheresis as an on-line preconcentration method

Takashi MIYADO<sup>1</sup>, Shin-ichi WAKIDA<sup>1</sup>, Kiyoko SHIMADU<sup>2</sup>, Yasuhiko SHIBUTANI<sup>2</sup>, Kazutoshi NOSE<sup>3</sup>, Akito SHIMOUCI<sup>3</sup>

*Health Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)<sup>1</sup>, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology<sup>2</sup>, Department of Etiology and Pathogenesis, National Cardiovascular Center Research Institute<sup>3</sup>*

#### Abstract

Recently, the relationship between nitric oxide (NO) and disease has attracted much attention. We have investigated a high-throughput assay method for NO metabolites, *i.e.* nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), in biological fluids by microchip capillary electrophoresis (MCE) with UV detection using the novel running buffer. However, in order to determine NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in serum or plasma samples, it was necessary that the improvement of sensitivity was investigated.

For the increase of optical path length, a dry etching chip was used. For the increase of sample injection volume, the applied voltage conditions were changed. Moreover, as an on-line preconcentration technique, transient isotachopheresis was investigated. As the results, using 800 μM molybdate as a terminal ion, the limits of detection (S/N=3) for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in human serum were 9.1 μM and 2.3 μM, respectively.

#### 【緒言】

近年、一酸化窒素(NO)の生体内での多彩な生理・病理的作用への関与、特に疾病との関係が注目されている。NOの半減期が生体内で極めて短いため、その産生量は、一般に代謝産物である亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)と硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の含量によって推定される。しかしながら、現在実用化されているNO代謝産物測定キットは酵素還元と Griess法を用いるため、測定に3時間以上要し、迅速測定には程遠い。そこで我々は、キャピラリー電気泳動法において新規泳動液を開発し<sup>1)</sup>、さらにそれを用いたマイクロチップ電気泳動法(MCE)による迅速測定法の開発を行ってきた<sup>2)</sup>。

これまでに本法をヒト唾液に適用し、運動負荷試験被験者唾液測定の予備的検討の結果を報告した<sup>3)</sup>。しかしながら、ヒト唾液と比較して極めて濃度が低い血液試料で

は測定感度の不足という課題があった。そこで、今回は高感度化の達成を目指し、オンチップ濃縮法の1つである過渡的等速電気泳動 (tITP) の適用を検討した。

### 【実験】

実験には島津製作所製 MCE 装置 MCE-2010 と石英ガラス製マイクロチップ Type Ui (流路幅: 30  $\mu\text{m}$ 、深さ: 30  $\mu\text{m}$ ) を用いた。泳動液にはヒト血清成分に基づく溶液<sup>1)</sup>を用い、ピーク検出は UV (214 nm) 吸収で行った。試料は、除タンパク処理を施したヒトプール血清またはヘパリン添加血液から除血球・除タンパク処理で得たヒト血漿に、ターミナルイオンとしてモリブデン酸 ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) を添加して調製した。

### 【結果と考察】

感度向上のために①光路長の増大、②試料大量導入、③オンライン濃縮の3点を検討した。①ではウエットエッチングチップ (Type U; 流路幅: 50  $\mu\text{m}$ 、深さ: 20  $\mu\text{m}$ ) からドライエッチングチップ (Type Ui) に変更した。②では試料導入時の印加電圧条件を検討した。③では tITP を実現するため、ターミナルイオンの検討を行った。まず、tITP 状態を長く維持するために電気泳動移動度が  $\text{NO}_3^-$  と近いこと、容易に添加濃度の検討が行えるように 214 nm に吸収を持つことを条件にターミナルイオンの種類を検討し、モリブデン酸を選択した。次に、 $\text{MoO}_4^{2-}$  と  $\text{NO}_3^-$  の分離と濃縮効果を考慮して試料への添加濃度及び試料導入時間を検討し、それぞれ 800  $\mu\text{M}$  と 30 秒とした。

確立した条件をヒトプール血清に適用したところ、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の検出限界 (S/N=3) はそれぞれ 9.1  $\mu\text{M}$  と 2.3  $\mu\text{M}$  となり、実試料の検出が可能であることが確認された。

そこで、臨床現場のニーズに合わせ、ヒト血漿での測定を試みたところ、濃縮効率が低下し、 $\text{NO}_3^-$  では実試料の検出が可能であったが、 $\text{NO}_2^-$  は未検出であった (Fig.2)。

今後、血漿での濃縮効率改善を目指し、ターミナルイオンの種類を検討する予定である。

### 【文献】

- 1) T. Miyado, S. Wakida, *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1051 (2004) 185.
- 2) T. Miyado, S. Wakida, *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1109 (2006) 174.
- 3) 宮道隆, 脇田慎一 他, 日本分析化学会第 55 年会要旨集 (2006) 117.

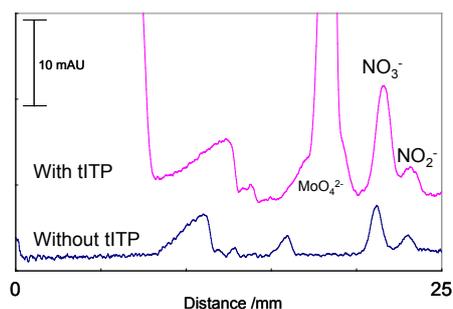


Fig.1 Separation profile of human pooled serum added 50  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  standard solutions with/without tITP as preconcentration technique

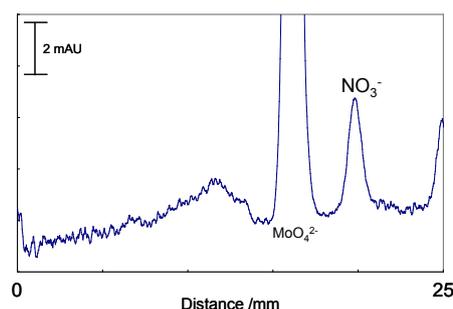


Fig.2 Separation profile of human plasma using tITP

# P-15

## 簡便なマイクロチップゲル・等速電気泳動による生体試料の高感度検出法の開発

【名大院工<sup>1</sup>, 名大予防早期医療創成センター<sup>2</sup>, 名大プラズマナノ工学研究センター<sup>3</sup>, 産総研 健康工学研究センター<sup>4</sup>】

Wang Jung<sup>1</sup>, ○岡本行広<sup>1,2</sup>, 加地範匡<sup>1,2</sup>, 渡慶次学<sup>1,2</sup>, 馬場嘉信<sup>1,2,3,4</sup>

### Development of high sensitive detection method for biomolecules by simple microchip gel and isotachopheresis

Wang JUNG<sup>1</sup>, Yukihiro OKAMOTO<sup>1,2</sup>, Noritada KAJI<sup>1,2</sup>, Manabu TOKESHI<sup>1,2</sup>, Yoshinobu BABA<sup>1,2,3,4</sup>

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering, Nagoya University<sup>2</sup>, Plasma Nanotechnology Research Center, Nagoya University<sup>3</sup>, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<sup>4</sup>*

#### Abstract

A simple isotachopheresis (ITP)-based microchip gel electrophoresis was developed for the concentration and separation of aptamer and its thrombin complex in a simple cross-channel made from poly (methyl methacrylate). The aptamer and its thrombin complex can be simultaneously concentrated and separated by our developed method which does not require time-consuming steps and complicated chip design. We found that terminating electrolyte (TE) ions significantly affect the degree of concentration and that lower mobility of TE ions can afford higher concentration results. After optimization of various factors, we successfully achieved the separation of aptamer and aptamer-thrombin complex, and attained about 2000-fold concentration of aptamer-thrombin complex.

#### 【緒言】

マイクロチップ電気泳動(MCE)は省試料・高速分離分析という特徴を有するために生体試料の分離・分析に最適な手法のひとつであると考えられる。しかし、対象とする生体試料は低濃度で存在するために現状のMCEの検出感度では生体試料への適用は困難であり、さらなる高感度化が望まれている。

等速電気泳動(ITP)は簡便な濃縮方法のひとつであり、ITPの利用によるMCEの高感度化が報告されている。しかしこれらの報告では複雑なマイクロチャネル構造および煩雑な実験操作が必要とされ、簡便な高感度化は達成不可能であった。

そこで、本研究では市販のクロスチャネルを利用した簡便なITP法を開発し、これにより生体試料の高感度検出を目指した。

#### 【原理】

実験操作を図1に示す。リーディングイオン(LE)、ターミナルイオン(TE)、試料を図1aのように設定後、電圧を印加し試料導入を行なう。そして分離チャネルへの試料導入、試料分離のための電圧を設定し(図1(b)(c))、分離・濃縮された試料を検出する(図1(d))。

**【実験】**

MCE 装置として SV1210 (日立)、マイクロチップに i-chip 3 DNA(日立化成)を使用した。泳動液として 1%メチルセルロース (400 cP) 0.01% Tween 20 を含む トリス塩酸塩緩衝液(pH8.3)を、LE として 20 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 8.3)を使用した。

**【実験結果および考察】**

図 2 に aptamer と aptamer/thrombin 複合体の電気泳動結果を示す。aptamer、aptamer/thrombin 複合体の ITP 利用による濃縮率はピーク高さ基準でそれぞれ 100 倍、1300 倍となった。この aptamer、aptamer/thrombin 複合体の濃縮率の差は電気泳動移動度の差によるものと推測される。すなわち高塩濃度の glycine を含む TE 近傍に存在する Aptamer/thrombin 複合体は LE 近傍に存在する aptamer と比較し、濃縮される度合いが大きくなったと考えられる。続いて TE が分離・濃縮に及ぼす影響を検討した。その結果、図 3 に示すように  $\gamma$ -amino butyric acid(GABA)が最も高い濃縮率を達成可能であった。これは最も電気泳動移動度の低い GABA を用いることで試料ローディングから試料導入の時間 (図 1b から図 1c まで) が長くなり、より多くの試料が導入され濃縮されたからと考えられる。

**【結論】**

簡便な ITP 操作の開発に成功するとともに生体試料の高感度化を達成した。また詳細な検討の結果、TE の電気泳動移動度が試料濃縮に影響を及ぼすことを明らかとし、約 2000 倍の濃縮率を達成した。

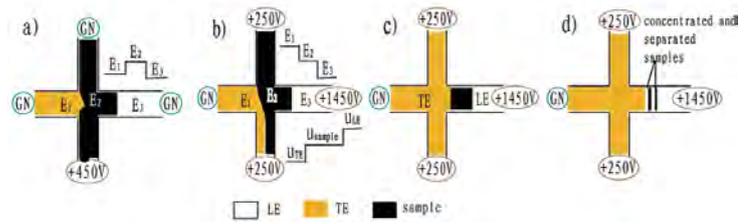


Figure 1. Schematic diagrams of the ITP concentration principle in MCE.

E1, E2, E3 are the electric field strength in TE, sample, and LE zone, respectively.

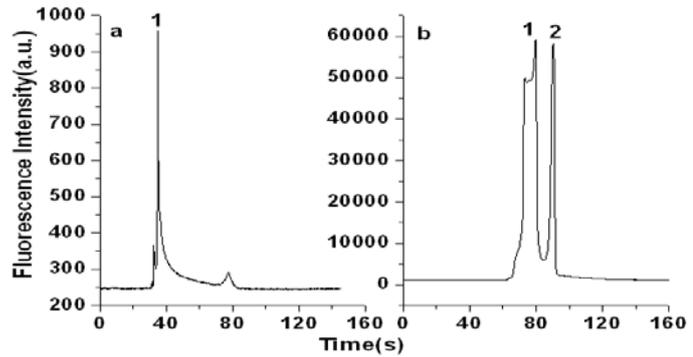


Figure 2. Electropherograms of the aptamer(peak 1) and its thrombin complex(peak 2) obtained (a)without ITP and (b) with ITP

Experimental conditions:Background solution, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) including 0.01% Tween-20 and 1% methylcellulose; LE, 20 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(pH 8.3); TE, 25mM Tris-HCl and 192 mM glycine (pH 8.3).

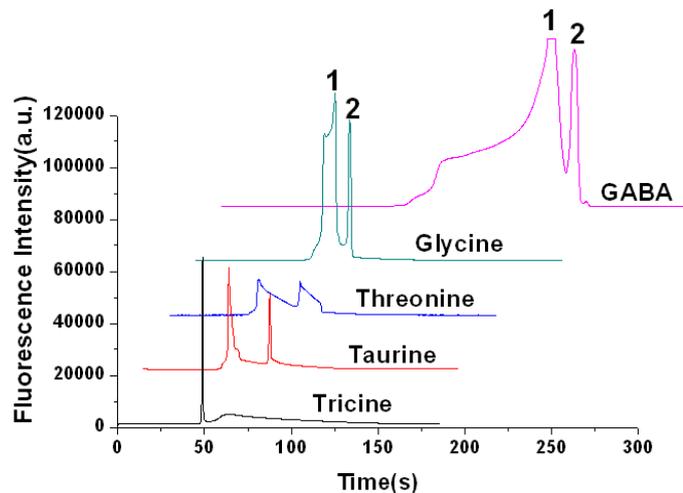


Figure 3. Electropherograms of the aptamer and its thrombin complex obtained using different TE buffers  
Experimental conditions: same as figure2

# P-16S カルボキシル基を利用した光硬化性アクリルアミドゲルを

## 用いる選択的オンライン濃縮法の開発

【近畿大・薬】○山本佐知雄，渡邊裕樹，鈴木茂生

### Development of Online Selective Concentration Using Photopolymerized Acrylamide Gel Containing Carboxy Groups

Sachio YAMAMOTO, Yuki WATANABE, Shigeo SUZUKI

*School of Pharmacy, Kinki University*

#### Abstract

A simple and efficient method has been developed to fabricate sample selective preconcentrator on a channel of a commercial polymethylmethacrylate-made microchip, without using any photolithography and etching techniques. Selective preconcentration device was fabricated by simple photochemical copolymerization monomers of acrylamide, bis-acrylamide and acrylamideglycolic acid by irradiating an argon ion laser beam, which also used as the light source for fluorimetric detection of sample components. The carboxylate groups on the polyacrylamide gel layer cause selective repulsion with anions, and enable to trap carboxylates such as fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled peptides besides pass through strong anions such as sulfonic acids. The availability of weak anionic preconcentrator was applied to the sensitive analysis of some FITC-glycopeptides.

#### 【緒言】

近年、オンサイトでの利用を目指した分析法としてマイクロチップ電気泳動が注目され、今後は家庭での臨床診断などへ応用されようとしている。これを実現するには、生体成分のような複雑な試料から特定の成分を効率よく抽出しなければならない。すなわちマイクロチップの流路を高機能化し、分析を行う前に、オンラインで試料溶液の精製や濃縮を行うことが必要となる。この目的のためにナノスケールでの微細加工技術を応用した極めて効率の良い濃縮技術が開発されている。しかし、これらの微細加工はコストがかかり、一般的に普及させることは難しい。ところで我々は、アクリルアミド系ポリマーの光重合反応を使った簡便かつ極めて効率の高い permselective 濃縮法の開発に既に成功し<sup>[1]</sup>、一昨年の本年会において発表した。今回はさらにこの方法を発展させることを目的として弱酸性のイオン交換ゲル層を交差部近傍に設け、イオン性試料成分の特異的濃縮について検討した。

#### 【実験】

試料：糖タンパク質としては、ニワトリ卵白オバルブミン，ウシ胎児血清フェツイン，およびヒト血清  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質を用いた。まずトリプシンで消化し，セルロースカラムを

使って糖ペプチドを分離・回収した<sup>[2]</sup>。さらに蛍光標識にはアミノ基標識試薬として知られる fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いた<sup>[3]</sup>。また、強酸性蛍光試薬には 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) を使用した。

**マイクロチップ電気泳動:** マイクロチップは日立製の SV1100 用十字型 PMMA チップを用い、オリンパス製 BX50WI 正立型蛍光顕微鏡のステージ上に固定した。蛍光検出の光源にはアルゴンレーザーを用い、蛍光シグナルを浜松フォトニクス製 H578MOD で検出した。また光重合型弱酸性イオン交換アクリルアミドゲルはアクリルアミド(AA), メチレンビスアクリルアミド(bis), 2-アクリルアミドグリコール酸(AGA)を用いて合成した。

### 【結果・考察】

ゲルの組成比を検討した結果, AA-bis-AGA(12%, 4%, 3%, w/v)が最適であった。まず, アクリルアミド酸混合液を buffer inlet 側で硬化させ, マイクロチップ流路交差部付近に設けたゲルと陰イオン性蛍光剤の泳動挙動を観察した。Fig. 1 のように電圧を印加して, カルボン酸型のゲルと FITC の濃縮を行ったところ FITC は効率よく濃縮された。一方, 同様の条件で強酸性試料である APTS の濃縮を試みたところ APTS はゲル層を通過した。この現象は, APTS がカルボキシル基に比べて酸性が強いことによると考えられる。すなわち, APTS が濃縮されると試料近傍の pH が減少し, カルボキシル基の電離が抑制されたためと思われる。次に試料に FITC 標識化ウシ胎児血清フェツインを, 緩衝液に 0.05% ヒドロキシプロピルセルロースを含む 150 mM Tris/ホウ酸緩衝液 (pH 7.5) を用いて濃縮・分離を試みた結果を Fig. 2 に示す。濃縮効率は 220 倍であった。本方法は, イオン性試料の特異的な捕捉や濃縮法として利用できると思われる。

### 【参考文献】

- [1] Yamamoto, S., Hirakawa, S., Suzuki, S. *Anal. Chem.* 2008, 80, 8224-8230.
- [2] Shimizu, Y., Nakata, M., Kuroda, Y., Tsutsumi, F., Kojima, N., Mizuochi, T. *Carbohydr. Res.* 2001, 332, 381-388.
- [3] Gani, M. M., Hunt, T., Summerell, J. M. *J Immunol Methods* 1980, 34, 133-139.

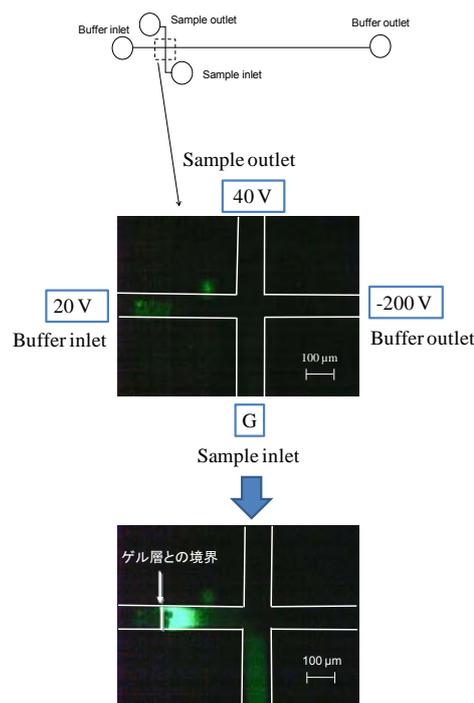


Fig. 1 試料に FITC を用いた時のマイクロチップ流路交差部の様子。上は電圧印加直後, 下は 60 秒後の様子。

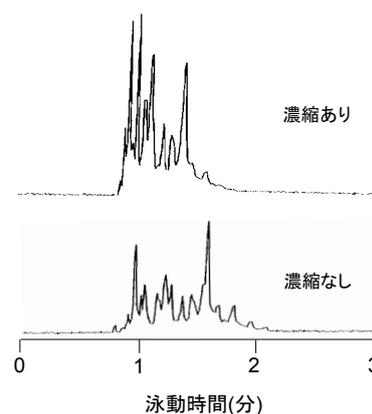


Fig. 2 光硬化性アクリルアミドによる選択的濃縮法を使って FITC 標識化フェツイン由来糖ペプチドの CE 分離に適用した。下が対照として通常のマイクロチップ電気泳動を行った場合のエレクトロフェログラム, 上が 100 倍希釈した同試料を濃縮・分離した。

# P-17S

## 電気泳動分析用ナフィオン修飾 PDMS チップの開発(4)

【京大院工】○瀬野 万里子, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二

### Development of Nafion-coated Poly(dimethylsiloxane) Microchip for Electrophoretic Analysis. 4

Mariko SENO, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA

*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

#### Abstract

This paper reports a stable coating of a Nafion thin membrane onto the inner surface of a poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannel to generate a fast and stable electroosmotic flow (EOF) in microchip electrophoresis. The Nafion membrane could be easily formed by the multi-layer coating with solutions of a cationic polymer and an anionic Nafion, and 30-min baking at 110 °C. In the Nafion-coated PDMS microchip, a higher electroosmotic mobility ( $3.0\text{--}7.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ ) was observed relative to that in an untreated PDMS chip ( $2.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ ). After the 30-times repetition, furthermore, the fast EOF was still observed on the Nafion-coated PDMS chip. In addition, the hydrophilic and anionic surface of the Nafion thin membrane could suppress the adsorption of carbohydrates.

#### 【緒言】

電気泳動分析用 poly(dimethylsiloxane) (PDMS) マイクロチップでは、チャンネル内表面に残存するシラノール基によって得られる電気浸透流 (EOF) が遅く不安定なことや、生体試料が非特異的にチャンネル内壁に吸着することが問題とされている。その改善のため、これまでに種々の内面修飾法が報告されているが、速く安定した EOF が発生し耐久性の高いコーティングが得られる簡便な修飾手法の報告例は多くない。そこで我々は、新規内面修飾剤としてアニオン性高分子のナフィオンに着目した。高分子電解質膜に用いられるナフィオンは、側鎖に存在するスルホ基によって広範な pH 領域において強く負に帯電しており、加熱乾燥させることで耐久性の高い薄膜が容易に形成されるという特徴を有する。本研究では、ナフィオンとカチオン性高分子との静電相互作用を利用して PDMS マイクロチップのチャンネル内壁を修飾し、その電気浸透移動度 ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) と糖類に対する吸着抑制効果について検討を行った。

## 【実験】

ソフトリソグラフィーの手法によって、幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 100  $\mu\text{m}$  のストレート型チャンネルを有する PDMS 製マイクロチップを作製した。泳動液には 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を、試料にはアニオン性の蛍光色素であるウラニンおよび 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) で誘導体化したグルコースラダーを用いた。ナフィオンをチャンネル内壁に強く固定化するために、カチオン性高分子である polybrene (PB) とナフィオンそれぞれの水溶液をチャンネルに交互に導入することで、静電相互作用によってチャンネル内表面を修飾し、これを加熱硬化した (Fig. 1)。このチップを用いて電気泳動を行い、 $\mu_{\text{EOF}}$  を算出した。また、グルコースラダーを用いてチャンネル内表面への親水性生体試料の吸着テストを行った。

## 【結果と考察】

APTS 誘導体化グルコースおよびウラニンを試料とした際、ナフィオン修飾チップでは試料のチャンネル内壁への吸着は確認されなかった。そこで、ウラニンの実効電気泳動速度からそれぞれのチップの  $\mu_{\text{EOF}}$  を算出した。ナフィオン修飾 PDMS チップでは、測定回数を重ねるにつれて  $\mu_{\text{EOF}}$  が徐々に増加する傾向が観察され、 $7.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  を超える値も確認された。また、30 回測定の後にも速い EOF が観察されたことから、薄膜として固定化されたナフィオンに対して PB 層が剥離したため、チャンネル内壁の負電荷密度が相対的に増加したことが示唆された。一方、未修飾のチップを用いて電気泳動を行った際の  $\mu_{\text{EOF}}$  は  $1.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  と小さく、同程度の負の電気泳動移動度を有するアニオン性試料の分析が困難であった。また、Table 1 に示すように過去に報告されているその他のチップや修飾法と比較しても、ナフィオン修飾チップにおける  $\mu_{\text{EOF}}$  は大きいことが確認された。以上の結果から、ナフィオン修飾により高い耐久性と速い EOF を兼ね備え、糖試料の吸着を抑制できる電気泳動分析用 PDMS チップを作製できることが明らかとなった。

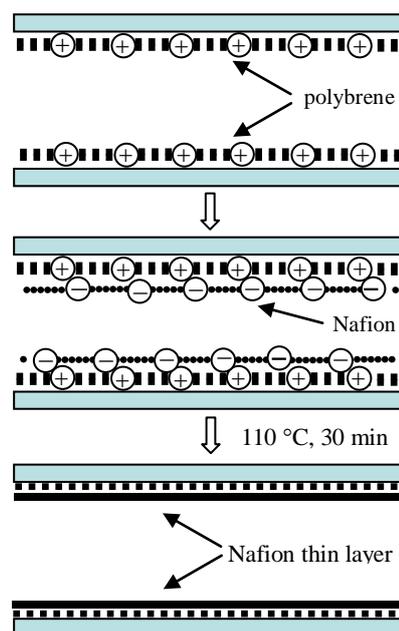


Fig. 1. Schematics of the coating of the PDMS channel with cationic polymer and Nafion thin membrane.

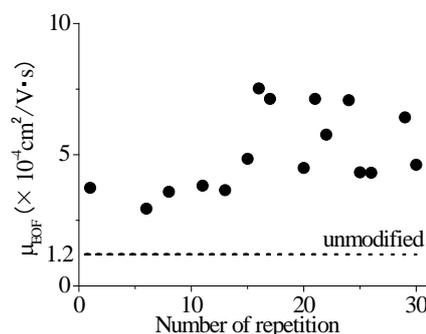


Fig. 2. Variation of  $\mu_{\text{EOF}}$  in the Nafion-coated PDMS chip.

Table 1. Estimated and reported values of  $\mu_{\text{EOF}}$  obtained by the various coating methods and materials.

	$\mu_{\text{EOF}}$ ( $\times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ )
bare PDMS	1.2
PB-coated <sup>1)</sup>	2.2
PB/DS-coated <sup>1)</sup>	-3.6
PMMA <sup>2)</sup>	2.3
fused silica capillary	4.6

1) Liu, Y. et al. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5939-5944.

2) Soper, S. A. et al. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *470*, 87-99.

# P-18S

## マイクロヒーター集積化 PDMS チップを用いる 電気泳動分析 (4)

【京大院工】 ○谷川 佳奈, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二

### Microchip Electrophoresis Using Microheater Integrated PDMS Chip. 4

Kana TANIGAWA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA  
Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

#### Abstract

This paper reports a novel on-line sample preconcentration technique for microchip electrophoresis (MCE) based on the sodium dodecyl sulfate (SDS) and thermal denaturation of proteins on a heater integrated microchip. In our proposed method, a solution of native proteins without SDS is injected as a long plug into the separation channel filled with a back ground solution containing SDS. When the analytes reach the microheater, the SDS denaturation of proteins is strongly promoted by heating. The effective velocity of the proteins was decreased by the denaturation, so that the long sample zone is swept around the heater. Actually by increasing the temperature to 90 °C around the heater, fluorescently labeled proteins were detected as sharp peaks with heating, whereas broad peaks were observed without heating.

#### 【緒言】

マイクロチップ電気泳動 (MCE) は、高分離能、高速分析、省試料等の利点を有しているため、タンパク質等の生体試料分析への適用が期待されている。しかし、低い濃度感度が問題視され、より高感度な分析法の開発が求められている。本研究では、タンパク質が硫酸ドデシルナトリウム (SDS) により変性する際に大きな電気泳動移動度の変化をともなうことを利用した新規スイーピング法による高感度化について検討した。さらに、分離チャンネル内の局所的な加熱が可能なマイクロヒーターを設置したマイクロチップを作製し、加熱によるタンパク質の SDS 変性の促進を利用した濃縮効率の向上と、ゲル電気泳動による試料の分離についても検討を行った。

#### 【実験】

ソフトリソグラフィーにより、幅 60  $\mu\text{m}$ 、深さ 50  $\mu\text{m}$  のクロス型チャンネルを有する PDMS 製マイクロチップを作製し、厚さ 50  $\mu\text{m}$ 、幅 4.0 mm の銅薄膜を分離チャンネル直下に設置することで、マイクロヒーター集積化電気泳動チップとした (Figure 1)。

試料には、fluorescein isothiocyanate (FITC) でラベル化した bovine serum albumin (BSA) と trypsin inhibitor (TI) を 25 mM phosphate buffer (pH 7.0) に溶解して用いた。泳動液には、50 mM SDS, 5% 2-mercaptoethanol と 8% dextran を含む 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) を用いた。

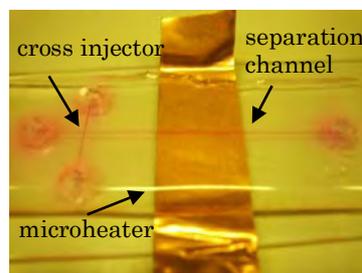


Figure 1. Microheater integrated PDMS chip.

### 【原理】

加熱による SDS 変性を利用したオンライン試料濃縮法では、まず SDS を含まないアニオン性タンパク質試料溶液を SDS を含む泳動液で満たされた分離チャンネルに長いプラグとして注入する。チャンネル内壁への SDS の吸着により速い電気浸透流 (EOF) が発生するため、試料溶液中のタンパク質は速く泳動する。SDS を含む泳動液に到達したタンパク質は SDS により変性し大きな負電荷密度を有するようになるため、EOF とは逆方向きの電気泳動速度が増加する。そのため実効泳動速度は減少し、スウィーピングの原理に基づく試料濃縮が起こる。さらに分離チャンネルに設置したヒーターで変性を促進することにより、高効率な濃縮が期待される。

### 【結果及び考察】

ローダミンBの蛍光量子収率が温度に依存することを利用して、銅薄膜に電流を流した際のローダミンBの蛍光強度変化を測定した。その結果、電流の増加により蛍光強度の減少が観測され、約3.5 Aでおよそ80 °Cまでの昇温が可能であることが確認された (Figure 2)。そこで、熱変性を利用したオンライン試料濃縮について検討を行ったところ、非加熱時にはブロードなピークが観察されたのに対し (Figure 3a), 加熱時には鋭く高いピークが観察された (Figure 3b)。これは、非加熱時にはタンパク質はSDS溶液との境界面で十分に変性されておらず、加熱することでSDS変性が促進された結果、スウィーピングの原理に基づく試料濃縮の効率が向上したことを示している。

ヒーター幅拡張による加熱時間の増加により濃縮効率がさらに向上したことから、今後、ヒーター幅や印加温度等の最適化によるタンパク質の高感度分析法の実現が期待される。

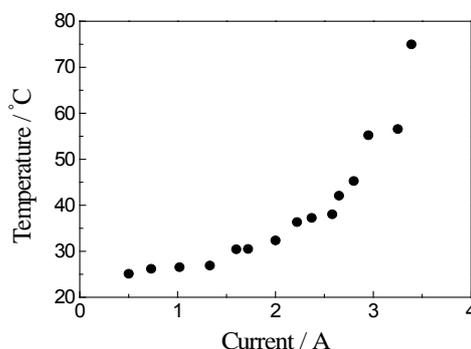


Figure 2. Dependence of the estimated temperature at the distance of 5.0 mm from the heater on the current.

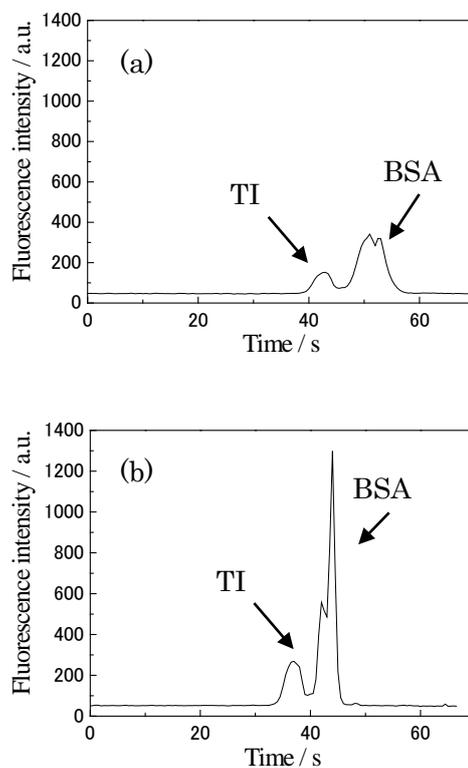


Figure 3. Electropherograms of fluorescently labeled BSA and TI obtained with (a) no heating and (b) thermal denaturation. Injection time, 5 s. Current, (a) 0 A; (b) 5.0 A.

# P-19S

## 1, 10-フェナントロリン CL 系を用いたマイクロチップ CE ; 界面活性剤の効果

【同志社大・理工】○野上貴裕, 橋本雅彦, 塚越一彦

### Microchip CE Using 1,10-Phenanthroline CL System; Effects of Surfactants

Takahiro NOGAMI, Masahiko HASHIMOTO, and Kazuhiko TSUKAGOSHI

Faculty of Science and Engineering, Doshisha University

#### Abstract

The fourth periodic transition metal ions, such as Cu(II), Fe(II), Co(II), Zn(II) and Ni(II) were analyzed by a microchip capillary electrophoresis (CE) method with chemiluminescence (CL) detection using the reaction of 1,10-phenanthroline and hydrogen peroxide, where the metal ions acted as catalysts for the CL reaction and the CL was enhanced in the presence of cationic surfactants. The effects of six cationic surfactants on the CL intensities and migration velocities were examined in detail for the Cu(II) analyte. The CL of Cu(II) analyte extremely increased at the concentrations of the cationic surfactants higher than their critical micellar concentrations. Using of 8 mM CEAB, the sensitivities of metal ion analytes for the reaction were Cu(II), Fe(II), Co(II), Zn(II) and Ni(II) in this order. The Cu(II) was determined over the range of  $7.5 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  with the detection limit of  $7.5 \times 10^{-9} \text{ M}$  (S/N=3).

#### 【緒言】

近年、数センチ角の微小基板（マイクロチップ）上で様々な分析を行う研究が注目を集めている。このようなマイクロチップを用いた分析は分析時間の短縮、必要試料量の軽減、小型化や自動化といった利点がある<sup>1)</sup>。我々は、マイクロチップキャピラリー電気泳動（MCE）における検出法として、化学発光（CL）検出を適用した MCE-CL システムを開発し、高速かつ高感度な分析に取り組んできた<sup>2)</sup>。今日、界面活性剤分子集合体を CL の反応場とし、検出感度の向上を目的とした研究が盛んに行われている。しかし、そのメカニズムを詳細に検討した報告は少なく、明確な結論は得られていない。本研究では、金属イオンが触媒として作用する 1,10-phenanthroline (phen) CL 系において、界面活性剤ミセルを本 CL 反応の反応場としたときの CL の増感効果の本システムにより検討した。さらに、分離度の向上を目的とし、界面活性剤の添加が金属イオンの電気泳動挙動に与える影響についても検討した。

#### 【実験】

マイクロチップの概略図を Fig. 1 に示した。本マイクロチップは、十字に交差する 2 本のマイクロチャンネル(幅  $50 \mu\text{m}$  x 高さ  $20 \mu\text{m}$ ; 分離チャンネル長  $31 \text{ mm}$ )を有し、基板の上面に、直径  $2 \text{ mm}$ 、深さ  $1 \text{ mm}$  の円柱形リザーバー(R1-R4)が設けられた。チャンネルにアルカリ性溶液 ( $130 \text{ mM NaOH} - 50 \text{ mM NaCl}$  (pH13))で調製した  $25 \mu\text{M} - 10 \text{ mM}$  陽イオン界面活性剤を満たし、同アルカリ性溶液で調製したサンプル溶液を R1 に、 $20 \mu\text{M phen}$  を R2 および R3 に、 $1.1 \text{ M H}_2\text{O}_2$  溶液を R4 に、それぞれ  $2 \mu\text{l}$  ずつ注入した。R1-R4 に印加する電圧をコントロールする

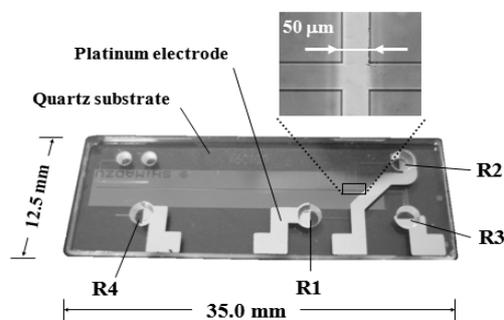


Fig. 1. The microchip for the MCE - CL.

ことにより、サンプル溶液を R1 からチャンネル交差部を経て分離チャンネルへと泳動させた。R4 において生じた CL を光電子増倍管 (PMT) で直接検出し、得られた信号を記録し積算した。

### 【結果と考察】

R1 に 1.0  $\mu\text{M}$  Cu (II) のサンプルを注入し、チャンネル中の陽イオン界面活性剤濃度を変化させていったときの CL 強度の応答および電気泳動挙動を調べた結果を Fig. 2 に示した。界面活性剤濃度を上昇させていき、特定の濃度に達すると CL 強度が著しく増加した。それらの濃度は、本実験条件下における臨界ミセル濃度 (CMC) であると考えられる。ミセル形成によって CL 強度が増加する要因として、本 CL 系において phen に対する酸化種であるスーパーオキシドラジカルアニオン ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) が正電荷を有するミセル表面に静電的相互作用によって濃縮されること、濃縮場が疎水場であることから  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の存在寿命が長くなる為だと考えられる。このことは、陰イオン界面活性剤である sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いた同様の実験において CL 増感が見られなかった事からも推測できる。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の分解で生成するヒドロキシルラジカル ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  と反応し CL 反応を阻害するが、ここでは生成した  $\text{OH}^{\cdot}$  がミセルによって消去されるためであると考えられる<sup>3)</sup>。Cu (II) 以外の遷移金属イオン (Zn (II), Co (II), Fe (II), Ni (II)) の CL 応答についても同様に調べた結果、遷移金属イオンの種類によって CL の増感度が異なることが分かった。その結果を Table 1 に示した。また、界面活性剤濃度を上昇させていくにつれ電気泳動速度が低下し、CMC 付近の濃度で電気泳動方向が反転した。結果を Fig.

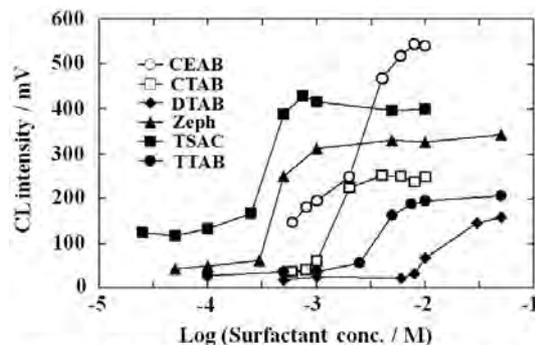


Fig. 2. The relationships between surfactant concentrations and CL intensities by the present system.

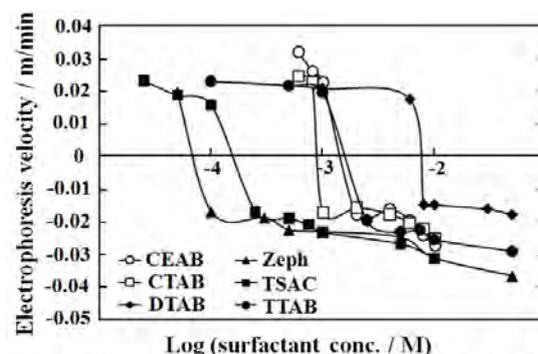


Fig. 3. The relationships between surfactant concentrations and electrophoresis velocities by the present system.

Table 1. The relationships between six different cationic surfactants and CL intensities by the present system.

Sample	Concentration / $\mu\text{M}$	CL intensity / mV						
		None	CEAB	CTAB	DTAB	Zeph	TSAC	TTAB
Cu (II)	1	6	543	251	158	342	428	206
Co (II)	500	0	32	52	25	29	11	39
Zn (II)	500	0	47	32	18	58	93	10
Fe (II)	500	0	41	25	22	106	39	27
Ni (II)	500	0	37	32	0	82	32	51

3 に示した。原因として、陽イオン界面活性剤がマイクロ流路壁面に付着することで生じる電気浸透流の反転によるものだと考えられる。この条件下において、Cu(II) と Fe(II) の分離検出を達成した。

### 【文献】

- 1) K. Tsukagoshi, S. Ishida, and R. Nakajima, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **2008**, *14*, 130-137.
- 2) M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, R. Nakajima, and K. Kondo, *J. Chromatogr. A*, **2000**, *867*, 271-279.
- 3) K. Ishii, M. Yamada, and S. Suzuki, *Bunseki Kagaku*, **1986**, *35*, 373-385.

# P-20

## ESI/MS による DNA 塩基損傷分析のための全量注入型オンライン濃縮チップの製作

【岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐阜大院連合創薬情報<sup>2</sup>, 慶大先端生命<sup>3</sup>】○村上 博哉<sup>1</sup>, 古口 未央<sup>1</sup>, 炭谷 徳人<sup>1</sup>, 江坂 幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野 文二<sup>1,2</sup>, 石濱 泰<sup>3</sup>

### Development of On-line Preconcentration Tips for the Analysis of DNA Adducts in ESI/MS

Hiroya MURAKAMI<sup>1</sup>, Mio KOGUCHI<sup>1</sup>, Tokuhito SUMITANI<sup>1</sup>, Yukihiro ESAKA<sup>1,2</sup>, Bunji UNO<sup>1,2</sup>, Yasushi ISHIHAMA<sup>3</sup>

*Gifu Pharmaceutical Univ.<sup>1</sup>, United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Science, Gifu Univ.<sup>2</sup>, Institute for Advanced Biosciences, Keio University<sup>3</sup>*

#### Abstract

We have developed a sensitive and quantitative method of DNA adducts by using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI/MS) for replacing the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. Although <sup>32</sup>P-postlabeling assay is the major method because of the most sensitive one at this moment, this involves the postlabeling process and the use of troublesome radioactive materials. In this study, we prepared the preconcentration tips for LC-ESI/MS analysis which can remove normal nucleosides or bases and selectively enrich DNA adducts. We have removed almost normal nucleosides or bases successfully and have performed selective enrichment of CPrdG or CPr-Gua as a model DNA adduct treated by preconcentration tips. Furthermore, using this tip, the amount of CPrdG in the sample solution of relatively large volume was injected with one-shot manner to LC/MS system and we have accomplished 21-times higher sensitive detection of CPrdG. This method would be a useful tool for the quantitative determination of trace DNA adducts.

#### 【緒言】

DNA 損傷体は、日本人の死因のトップである「癌」発症のリスクマーカーとして注目されている。しかし、ガン化への第一段階と考えられている DNA 損傷は、 $10^8 \sim 10^9$  個に数個という極めて低い割合でしか存在しないため、分析法には高い感度が求められる。そのため高い感度を有する <sup>32</sup>P ポストラベル法が主な分析法として用いられている。しかし本手法は放射性物質の利用などを理由に、より安全性が高く、高い性能と感度を有する分析法の開発が望まれている。現在までに我々は、LC-ESI/MS(LC/MS)に注目して DNA 損傷体の分析法の開発を行ってきた<sup>1</sup>。LC/MS は感度面では放射標識法には劣るものの高感度な分析手法であり、また LC 分離と分子量に基づく検出の組み合わせにより高い同定性能を持っている。さらの誘導體化などの前処理の必要がないという利点も有している。そこで本研究では、濃縮を含む選択的な前処理が可能であり、かつ処理全量を分析系に導入可能なシステムの開発を目的とし、石濱らにより開発された stop-and-go-extraction tips (Stage Tips)<sup>2</sup> 技術を用いて DNA 損傷体を選択的に捕捉・濃縮が可能なチップを試作し、これを用い

た高感度 DNA 損傷体の分析法の開発を行った。

#### 【実験】

DNA 損傷体モデルとして、アセトアルデヒド由来の DNA 損傷体を考え、そのマーカーとなりうるヌクレオシドとして 1,*N*<sup>2</sup>-cyclicpropano-2'-deoxyguanosine(CPrdG)を、塩基として 1,*N*<sup>2</sup>-cyclicpropano-guanine(CPr-Gua)及び *N*<sup>2</sup>-ethylguanine (Et-Gua)の標品をそれぞれ合成し、Stage Tips の処理能力の評価を行った。Stage Tips には、3M 社製のエムポアディスク(充填剤:C18)と Waters 社製の Sep-Pak カートリッジ用の ODS をそれぞれ用いた。LC/MS 装置は HP-1100 series LC/MSD システムを、分離カラムには TOSOH 100V をそれぞれ用いた。溶離液には水-メタノール系を用いた。

#### 【結果・考察】

Stage Tips に充填する ODS 量を調整することにより、正常ヌクレオシドのみを除去しほぼ 100%の回収率にて CPrdG を選択的に捕捉可能なチップの開発に成功した。また 1mL の試料全量をチップにて処理し、その処理試料全量を分析系へと注入した結果、処理前と比較して約 21 倍濃縮の濃度感度上昇に成功した(Fig. 1)。次にヌクレオシドと比較して良好なイオン化効率を有し、二本鎖 DNA から酸処理のみの簡便な前処理により単離が可能であるプリン塩基での分析を想定し、その選択的濃縮チップの作製を検討した。その結果、CPr-Gua と Et-Gua ヌクレオシドの場合と同様に正常塩基を除去し、損傷塩基のみを選択的に濃縮可能であることが明らかとなった(Fig. 2)。さらに実試料成分分析を想定し、AA と二本鎖 DNA を反応させた CPrdG 含有二本鎖 DNA に対して、酸処理を施し、その酸処理を施した試料をチップにて処理した結果、CPr-Gua のみを濃縮が可能であることが明らかとなった。発表では現在検討を行っているチップと MS とをオンライン化した分析系を用いた結果と合わせて報告する。

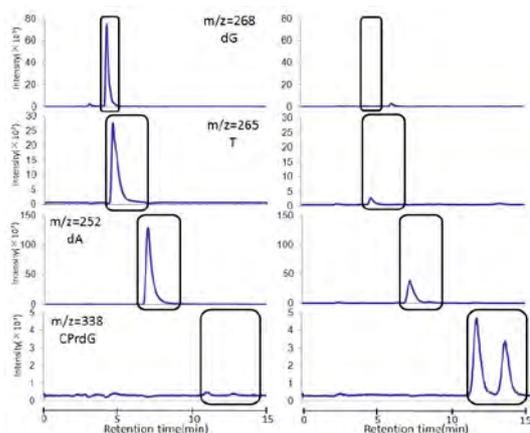


Fig. 1 LC/MS profiles of before(Left) and after (right) Stage Tips treatment (CPrdG)

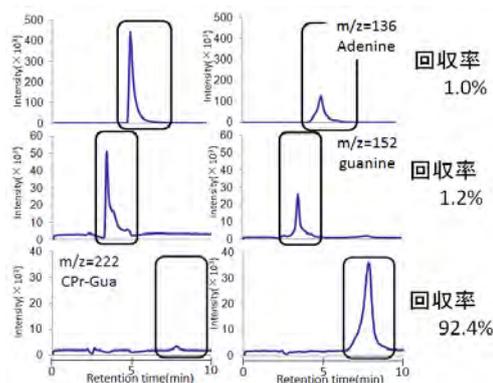


Fig. 2 LC/MS profiles of before(Left) and after (right) Stage Tips treatment (CPr-Gua)

#### 【文献】

- (1)Inagaki, S.; Esaka, Y.; Deyashiki, Y.; Sako, M.; Goto, M. *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 341-347.
- (2)Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1896-1906.

**Electrophoretic Analysis Using Organic Nanoparticles. 4**

Hiroshi SUDAKI, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA

*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University***Abstract**

This paper reports a preparation of cinchonidine (CCND) and cinchonine (CCNN) nanocrystals and their applications to an enantioseparation by capillary electrochromatography (CEC). The CCND and CCNN nanocrystals were prepared by the emulsion method which utilized a crystal growth in an oil-in-water emulsion without stabilizer. As a result, white-colored aqueous dispersions of the organic nanoparticles were obtained. The SEM images showed that the prepared CCND nanocrystals were spherical-shaped with the diameter ranging from 400 to 600 nm. When the obtained dispersion was introduced into a poly(diallyl-dimethylammonium chloride) (PDDAC) coated capillary, the nanocrystals were strongly absorbed onto the inner surface due to the electrostatic interaction between cationic PDDAC and the negatively-charged organic nanocrystals. By using the CCND or CCNN-coated capillary, the CEC enantioseparations of racemic amino acids were successfully attained.

**【緒言】**

近年、キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) においてナノ微粒子を固定相に用いた高性能化が注目されている。ナノ微粒子を固定化した場合、固定相の表面積の増加による分離能の向上や、ナノ微粒子の表面修飾による分離選択性の制御などが期待される。しかしながら、高いアフィニティを有する分子 (リガンド) を固定相に適用する際には、リガンドに対して表面固定化を可能にする官能基の導入が不可欠であり、煩雑な合成操作が必要となる。また、静電相互作用を利用してリガンドをキャピラリー内表面に固定化する方法も報告されているが、電荷を持たない疎水的なリガンドには適用できない。そこで、本研究では、疎水性の高い化合物を水中に安定に分散可能であり調製が容易な有機ナノ結晶に着目し、アミノ酸類に対する光学認識能を示すものの、疎水性が高く CEC 固定相への適用が困難であったシンコナルカロイド類のナノ結晶化を試みた。また、作製したナノ結晶をキャピラリー内に静電相互作用によって固定化し、それを用いた CEC によるアミノ酸の光学異性体分析について検討を行った。

**【実験】**

本研究では、アミノ酸への高い光学認識能が報告されているシンコニジン (CCND) およびシンコニン (CCNN) を Nakanishi らの研究グループにより開発された再沈法<sup>1)</sup>とエマルション法<sup>2)</sup>を用いてナノ結晶化した。再沈法では水 10 mL に対し、攪拌下で 5 mM CCND メタノール溶液 400  $\mu$ L をゆっくりと滴下することで結晶を調製した。エマルション法では 200 mM CCND / トルエン溶液 6 mL を水 100 mL に分散し、60  $^{\circ}$ C で 10 分間超音波処理を行った後、2 時間かけて室温まで冷却することでナノ結晶分散液を得た。ナノ結晶固定化キャピラリーは、フューズドシリカキャピラリー内面をカチオン性ポリマーであるポリジアリルジメチル

アンモニウムクロリド (PDDAC) で修飾した後、表面のゼータ電位が負の CCND または CCNN ナノ結晶の分散媒を通液し、静電相互作用による吸着を利用して作製した。CEC 分析には P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を用い、泳動液には pH 5.0 のリン酸塩緩衝液を、試料には DNB-ロイシンおよびフェニルアラニンのラセミ体、電気浸透流 (EOF) マーカーにはチオ尿素をそれぞれ用いた。

### 【結果と考察】

再沈法により CCND をナノ結晶化したところ、溶液滴下終了直後にはほぼ均一な分散液が得られたが、すぐに凝集し、キャピラリーへの通液は困難であった。一方、エマルション法により作製した CCND および CCNN ナノ結晶は、作製 5 日後も安定な分散状態を維持していた。このエマルション法により作製したナノ結晶の SEM 像を測定したところ、直径 400~600 nm の球状のナノ結晶が観測された (Fig. 1)。

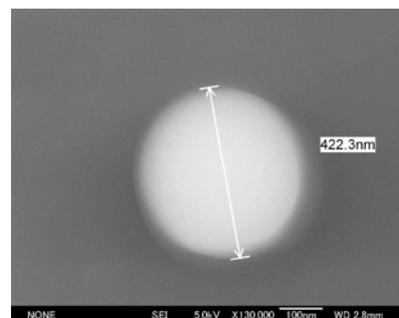


Fig. 1. SEM image of the organic CCND nanocrystal prepared by the emulsion method.

PDDAC 修飾により内壁が正に帯電したキャピラリーに対して負に帯電した有機ナノ結晶の分散液を通液し、静電相互作用を利用した修飾を試みた。このキャピラリーにおける表面修飾状態を EOF 測定によって評価した。その結果、PDDAC を修飾したキャピラリーで観測された陽極側への EOF が、CCND および CCNN ナノ結晶の修飾により反転することが確認された。なお、EOF マーカーの検出時間の再現性は RSD ( $n = 5$ ) で 5% 以下と良好であった。以上の結果から、負のゼータ電位を有する CCND および CCNN ナノ結晶が表面に安定に固定化されたことが示唆された。そこで、作製した CCND ナノ結晶修飾キャピラリーを用い、DNB-ロイシンとフェニルアラニンの CEC 分析を行ったところ、どちらも pH 5.0 の泳動液を用いた際にキラル分離が達成された (Fig. 2)。また、CCNN を用いた場合も同様にロイシンのキラル分離が達成された。以上の結果から、ナノ結晶化により、疎水性の高いシンコナルカロイド類のキャピラリー内壁への安定な修飾と、これを固定相に用いた光学異性体分離が可能であることが明らかとなった。

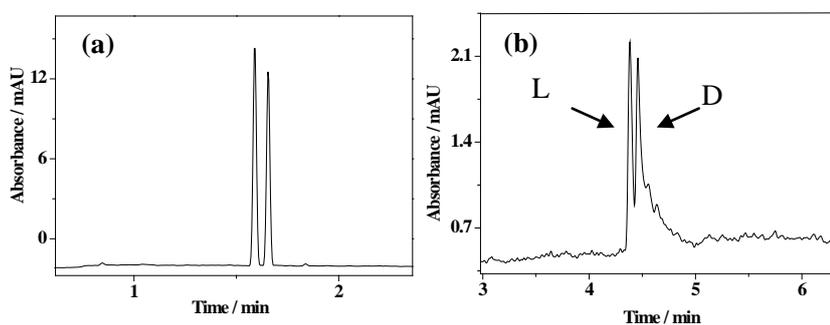


Fig. 2. Enantioseparations of (a) DNB-leucine and (b) phenylalanine in CEC with the CCND coated capillary.

### 【参考文献】

- 1) Kasai, H. et al. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1992**, *31*, L1132–L1134.
- 2) Kwon, E. et al. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 600–602.

Enhancement of separation in capillary electrochromatography utilizing  
difference in electrophoretic velocity under heterogeneous electrical field

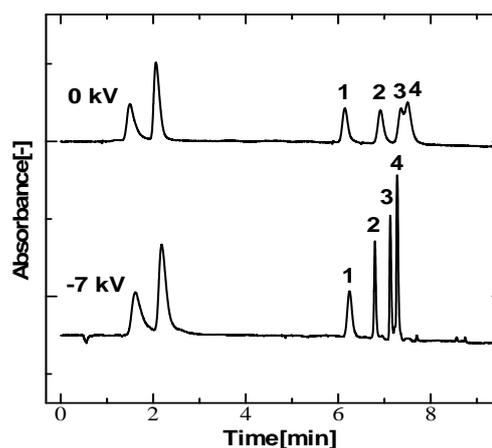
Hiroki BUNO\*, Shinya KITAGAWA, Hajime OHTANI

*Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering,  
Nagoya Institute of Technology***Abstract**

The mechanism of the voltage-induced peak zone sharpening, which was found previously in the separation of peptides in pressurized flow driven hydrophilic interaction capillary electrochromatography using mobile phase containing perchloric acid (PA), was investigated by using a contactless conductivity detector. When the gradient elution was performed with the mobile phase containing PA, the formation of a high conductive zone, which might be generated as a result of desorption of PA from the surface of the stationary phase, was observed in the column. The high conductive zone was transferred to the column outlet end by the pressurized flow and outstripped the sample zone. At the interface between high-conductive and low-conductive zones, the peptides would be stacked by the difference in electrophoretic migration velocity.

**【緒言】**

キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) は液体クロマトグラフィーとキャピラリー電気泳動の分離機構を併せた手法である。当研究室では、以前よりグラジエント溶離を適用した親水性相互作用電気クロマトグラフィーにおけるペプチド分離について研究を行っている。その結果、Fig. 1 に示すように、移動相に過塩素酸を添加し-7 kV の電圧を印加した場合にペプチド試料のピークが先鋭化し、分離が大幅に改善するという現象を見出している。この現象は、印加電圧が-3 kV および-5 kV である場合には得られず、また-7 kV を印加しても添加した酸がトリフルオロ酢酸 (TFA) およびペンタフルオロプロピオン酸 (PFPA) である場合にも



**Fig. 1** Separations of angiotensins with and without application of voltage. Mobile phase : (A) 0.02% PA in acetonitrile-water (15/5, v/v), (B) 0.02% PA in water, Gradient elution : (B) from 0% to 60% in 15 min. Peaks 1 to 4 are angiotensin IV to I, respectively

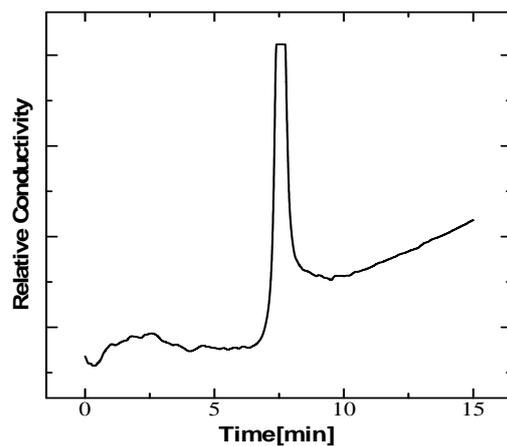
得られていない。この現象を様々な試料の分析に応用することで CEC 分離の高性能化が可能であると考えられるが、この現象が発現するメカニズムについてはまだ解明されていない。そこで本研究では、カラム内の電気伝導度測定により過塩素酸イオン挙動を解析することで、ピーク先鋭化のメカニズムの解明を試みた。

### 【実験】

装置には、グラジエント送液のための 2 台のポンプ(LC-20AD, Shimadzu)、インジェクター(7520, Rheodyne)、非接触型電気伝導度検出器 TraceDec(三和通商)、高電圧電源(HCZE-30PN0.25, Matsusada) を用いた。分離カラムには溶融シリカキャピラリー (i.d. 0.15 mm) に Amide-80 充填剤(TSKgel, Tosoh)をスラリー充填し作成した。移動相には過塩素酸を添加したアセトニトリル/水混合系を用いた。

### 【結果と考察】

非接触型電気伝導度検出器を用いて、過塩素酸添加移動相を用いた場合のグラジエント溶離適用時におけるカラム内の電気伝導度変化を Fig. 1 に示した。過塩素酸添加移動相を用いた場合では 7.5 分付近に局所的な高電気伝導度領域が見られ、TFA および PFPA 添加移動相を用いた場合ではそれは見られなかった。これは固定相に吸着した過塩素酸イオンがグラジエント溶離により脱着したことで過塩素酸イオン高濃度領域が生じ、カラム内に不均一な電場が形成されたためであると考えられる。低伝導度(高電場)領域中のペプチド試料が高伝導度



**Fig. 2** Variation in conductivity during gradient elution using mobile phase containing perchloric acid.

(低電場) 領域に泳動すると電気泳動速度が低下するため、これらの領域の界面で試料が濃縮し、ピークが先鋭化したと考えられる。-3 kV および -5 kV でピークが先鋭化しないのは、低伝導度領域での試料の泳動速度より界面の速度の方が大きいためであると考えられる。また、TFA および PFPA 添加移動相を用いた場合にピークが先鋭化しないのは、これらの酸は固定相に吸着せず不均一電場が形成されないためと考えられる。このようにカラム内での電場の不均一性を利用することで、CEC 分離の高性能化が期待される。

P-23S

## 異種キャリアー置換動電クロマトグラフィーの研究

【岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐大院連合創薬<sup>2</sup>】 ○小林美紀<sup>1</sup>, 江坂幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野文二<sup>1,2</sup>

### Study of EKC Separations with Stepwise Carrier Changing Systems

Miki Kobayashi<sup>1</sup>, Yukihiro Esaka<sup>1,2</sup> Bunji Uno<sup>1,2</sup>,  
*Gifu Pharm. Univ.<sup>1</sup>; United Graduate School of Drug Discovery  
and Medical Information Science, Gifu Univ.<sup>2</sup>;*

#### Abstract

We have been studied EKC separations changing carrier systems overtime in each single run by replacing inlet running solutions in the absent of electroosmotic flow. Previously, we employed a mixed micellar system consisting of CTAC and Tween 20 to separate organic anions such as substituted benzoic acids. With gradual change in the composition of CTAC and Tween 20 in the running solution of the inlet reservoir, both much better separation and acceptable analysis time was achieved simultaneously. Next, we increased concentration of cationic CTAC micelles using a pure CTAC system during a single run to achieve micellar concentration gradient elutions for better and fast separations of neutral analytes. In the present work, we will mention about use of different kinds of carriers possessing remarkably different characteristics in interaction with analytes. Namely we have employed both SDS and ionic CD derivatives as carriers in single runs and have achieved remarkable change in selectivity in separation of substituted benzenes. Some theoretical discussions for employment carriers of more than one with different electrophoretic mobility and simulation of separation will be given also.

#### 【はじめに】

我々の研究室では、これまでに、MEKC キャリアーとしての、ミセルの濃度、組成を一分離過程に変化（実際にはミセルを置換）する方法を検討してきた。光学分割などの高度の分離選択性では、高次構造を有するキャリアーと試料間の配向性の高い相互作用によって達成されることが知られている。これより類推して、高次構造を有するキャリアーの置換・変化を一分離過程で行うことができれば、より高い分離選択性獲得につながると考えるからである。これまでに、ミセル濃度グラジエント法、組成グラジエント法について報告してきた。今回は、同種、同系での切り替えでなく、界面活性剤と包接化合物という試料への選択性が大きく異なるキャリアー間での切り替えを検討した。選択性の大きな違いを持つキャリアーを組み合わせることで、幅広い選択性を構築できるシステムの獲得を期待した。

## 【実験】

試料には、Fig.2 の説明に示した、中性試料を主とした 9 種の置換ベンゼン類を用いた。キャリアーには陰イオン性界面活性剤である sodium dodecyl sulfate (SDS) と陰イオン性 CD 誘導体である  $\beta$ -Cyclodextrin Sulfobutyl Ethers, Sodium Salts ( $\beta$ -CD-SBE) を用いた。 $\beta$ -CD-SBE とは  $\beta$ -CD を構成している D-glucose の 2,3,6 位の hydroxyl 基(Fig.1)、計 21 個の側鎖に対し 6 ~7 個 sulfobutyl 基が ether 結合した構造をもつ化合物である。キャピラリーには、電気浸透流を抑制する目的で poly-N,N-dimethylacrylamide 内壁コーティングをしたものを使用した。測定中のキャリアー逐次導入は、GND に落とした inlet 側リザーバーの交換をして行った。

**【結果および考察】** Fig.2 に、1.2w/v%  $\beta$ -CD-SBE のキャリアー単独で泳動した結果、1.2w/v%  $\beta$ -CD-SBE から 30mM SDS に 3min で切り替え泳動した結果、30mM SDS のキャリアー単独で泳動した結果を示す。一分離過程に異種キャリアーを導入する方法であり、それぞれの定常的なキャリアーゾーンの形成が望まれる。この定常的キャリアーゾーン形成には全てのキャリアーが同じ速度で移動する必要がある。同じ速度で泳動させるために、等速電気泳動の条件が成り立つ濃度に各キャリアーを調製したうえ、定電流モードで泳動を行った。1.2w/v%  $\beta$ -CD-SBE では一般に分離能が低く分離が全く不十分である。一方で、30mM SDS では 9 の試料が 60 分経過しても検出できなかった。そして、双方の溶出順は大きく異なる。切り替えにより、双方のキャリアーの影響を切り替え時間に応じた形で分離挙動に反映し、選択性を大きく変化させ、結果的に分離を向上させることが出来た。

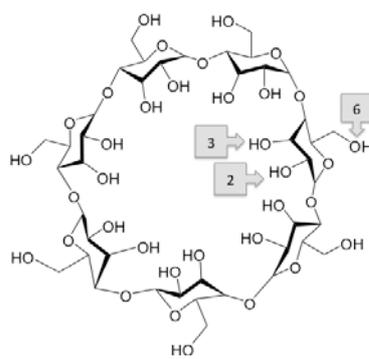


Fig.1 Chemical structure of  $\beta$ -CD

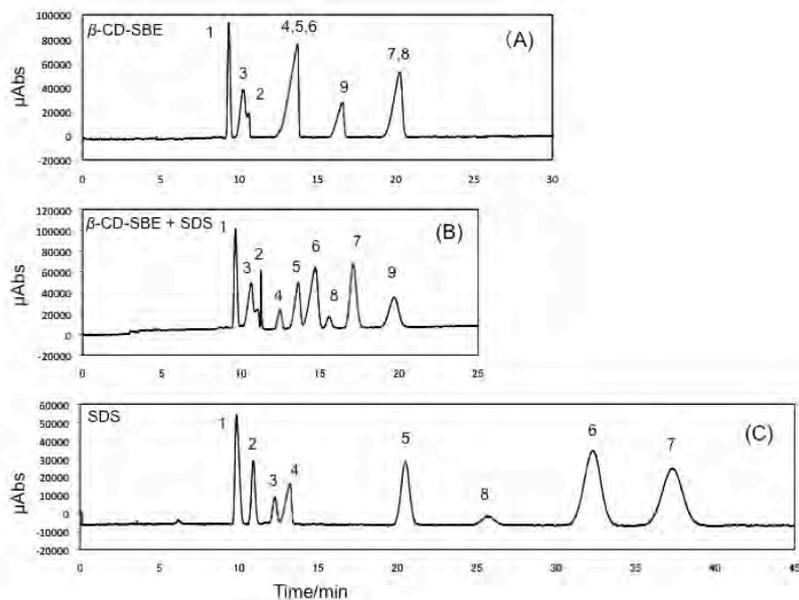


Fig.2 Electrokinetic separation of Substituted Benzenes.

Capillary, poly N,N dimethylacrylamide-coated, 60 cm (30 cm of effective length), applied voltage (operate current), 8  $\mu$  A (A;10.0kv, B;11.2-11.6kv, C;15.7-15.8kv); running buffer solutions, 5 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing (A)1.2w/v%  $\beta$ -CD-SBE (B) 1.2w/v%  $\beta$ -CD-SBE (0-3min) 30mM SDS(3min-) (C)30mM SDS.

Peak assignment:

- (1) benzoic acid; (2) 4-nitrophenol; (3) 4Et-phenol; (4) 1,4dimetoxybenzen; (5) cresol;
- (6) 3-methoxyphenol; (7) acetanilide;
- (8) benzaldehyde; (9) phenol;