

# SCE2010

The 30<sup>th</sup> Symposium on Capillary Electrophoresis

Nov. 15-17, 2010

*The 30<sup>th</sup> Anniversary Conference at Nagarakawa Convention Center (Gifu)*

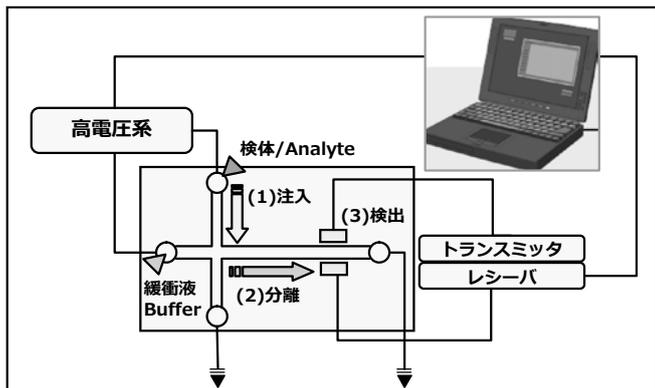
## 第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム 30周年記念大会 要旨集

2010年11月15日-17日

長良川国際会議場・大会議室(岐阜)

主催

日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会



チップに統合した検出システム

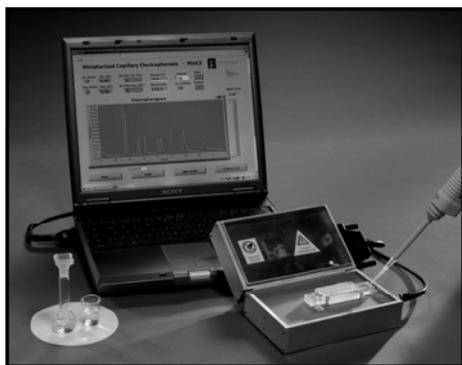
高速, 小型のマイクロキャピラリ電気泳動システムを, 提案いたします。

### Lab-on-a-chipシステム"MinCE"(ミンツエ)

- ・高速検出(数十秒~), 安価, 多用途, 小型
- ・非接触電気伝導度検出(C4D)採用
- ・ドイツの微細加工研究所による開発

- (1)研究室での利用
- (2)自社製品への, 本製品技術の取り込み  
...どちらも, 承っています。

### 仕様(2010年1月現在)



#### USB接続独立・小型

LabViewベースのソフトウェアにより, データはASCIIとして加工可能。

小型で, 持ち運びや実験開始が容易。

#### 非接触電気伝導度検出(C4D)

マーカ不要。液体と非接触なので浸食がない。

C4Dは光学的手法ではないため, 不透明, 難加工性で扱いにくい耐薬品性の高いPEEKが, 将来チップに採用され得る。

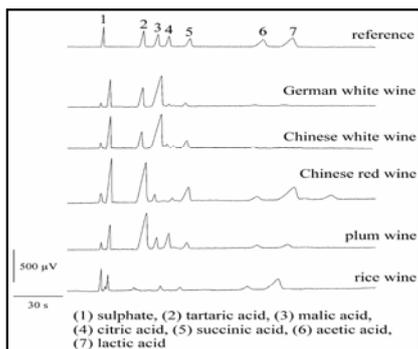
- ・電圧: -4.0 kV ~ 4.0 kV
- ・電流: 最大0.25 mA
- ・溶液濃度: 10 μM ~ 10 mM
- ・分析時間: 30 s ~ 3 min (typ.)
- ・外形: 225 mm x 160 mm x 85 mm
- ・USBインタフェース駆動
- ・PMMA製チップ



#### チップ

チップは, PMMAにて製品化されている。また, 薬品耐性が強く, 難加工性であるPEEKの実用化を, 視野にいれている。

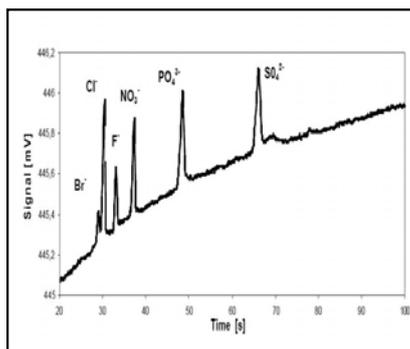
### アプリケーション例



#### 食品分析

ワインとジュースの有機酸イオン標準溶液との比較

濃度:(1)~(5)0.5 mM, (6)2 mM, (7)3 mM  
BGE: MES30 mM, His 10 mM, pH 5.6

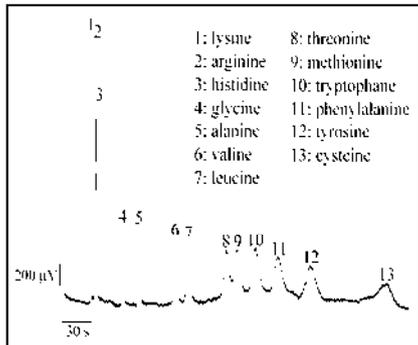


#### 工業現場

##### 陰イオンの分離

6種類の陰イオンの分離

電圧4.0 kV  
BGE: MES 50 mM/  
His 25 mM, pH 6.5

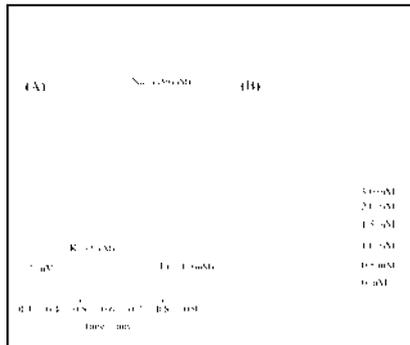


#### バイオ分析

##### 蛋白質構成アミノ酸

13の蛋白質構成アミノ酸のエレクトロフェログラム  
濃度:(1)~(11)0.4 mM, (12)と(13)0.8 mM  
BGE: 酢酸 2 M, pH 2.25

PMMAチップの代わりに, 強酸に耐え得るPEEKチップが用いられた



#### 医療現場

##### 血中イオン(リチウム)

(左)K - Na - Li混合液のエレクトロフェログラム  
(右)Li較正のエレクトロフェログラム

BGE: MES 100mM,  
His 100 mM, pH 6.0

## 第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集

### 目次

○タイムスケジュール	i
○プログラム（日本語）	ii ~ iv
○プログラム（英語）	v ~ viii
○要旨	
一般講演 1 (口頭発表) (L-1~L-6)	1
依頼講演 (IL-1)	13
記念講演 (ML-1, ML-2)	15
特別セッション 1 (SS1-1~SS1-5)	23
特別セッション 2 (SS2-1~SS2-2)	33
特別セッション 3 (SS3-1~SS3-6)	37
特別講演 (SP-1, SP-2)	49
特別セッション 4 (SS4-1~SS4-4)	53
特別セッション 5 (SS5-1~SS5-4)	61
一般講演 2 (口頭発表) (L-7~L-9)	69
特別セッション 6 (SS6-1~SS6-5)	75
一般講演 (ポスター発表)	85
○キャピラリー電気泳動シンポジウムの歩み	147
○広告	
協賛企業一覧	149
アジレント・テクノロジー株式会社	150
大塚電子株式会社	151
オザワ科学株式会社	152
株式会社カーク	152
株式会社 ASICON	表紙裏
株式会社島津製作所	153
ジーエルサイエンス株式会社	154
浜松ホトニクス株式会社	154
島津サイエンス西日本株式会社	155
バイオリサーチセンター株式会社	156
理科研株式会社	157
○第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム実行委員会	裏表紙裏

# 第30回 キャピラリー電気泳動シンポジウム プログラム

期間: 2010年11月15日(月) - 17日(水) 会場: 長良川国際会議場 大会議室(4F)

	第一日目 11/15(月)	第二日目 11/16(火)	第三日目 11/17(水)
9:00	9:15-9:20 開会式		9:00-10:00 一般講演 2 (口頭) (L-7~L-9)
10:00	9:20-11:20 一般講演 1 (口頭) (L-1~L-6)	9:00-11:10 特別セッション 3 「マイクロフルイディクス」 (SS3-1~SS3-6)	10:00-10:10 休憩
11:00	11:20-11:30 休憩	11:10-11:20 休憩	10:10-12:10 特別セッション 6 「最先端バイオ分析」 (SS6-1~SS6-5)
12:00	11:30-12:00 依頼講演	11:20-12:10 特別講演 1	
13:00	12:00-13:00 昼休み・委員会	12:10-13:10 昼休み	12:10-13:10 昼休み
14:00	13:00-13:35 記念講演1	13:10-14:00 特別講演 2	13:10-15:10 基礎講習会 デモンストレーション
	13:35-14:10 記念講演2	14:00-14:10 休憩	大塚電子 アジレントテクノロジー
15:00	14:10-14:20 休憩	14:10-16:10 特別セッション 4 「CE装置・CE/MS」 (SS4-1~SS4-4)	15:10- 閉会式
16:00	14:20-16:15 特別セッション 1 「オンライン濃縮」 (SS1-1~SS1-5)	16:10-16:20 休憩	22 <sup>nd</sup> Cheminasのお知らせ SCE2011のお知らせ SCE2012のお知らせ 閉会挨拶
17:00	16:15-16:25 休憩	16:20-18:20 特別セッション 5 「メタボロミクス」 (SS5-1~SS5-4)	
	16:25-17:35 特別セッション 2 「CEによる速度論・平衡論研究」 (SS2-1~SS2-2)		
18:00	17:35-17:50 休憩		
19:00	17:50-19:10 一般講演(ポスター発表) 17:50-18:30 奇数番号 18:30-19:10 偶数番号	18:30-20:30 懇親会 ポスター賞授与式 22 <sup>nd</sup> Cheminas のお知らせ	
20:00	19:10-20:30 フリーディスカッション ポスター賞選考		
21:00			

# 第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム プログラム

期間：2010年11月15日（月）—17日（水）会場：長良川国際会議場 大会議室（4F）

11月15日（月）

9:15 - 9:20

開会式

9:20 - 11:20

一般講演 1（口頭発表）

座長：藤本 忠蔵

山口 佳則

L-1 不均一電場下での電気泳動を利用した圧力差流送液型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)

L-2 電場増幅試料導入法及び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

○ネトナビット ケオチューイ<sup>1</sup>, 福士 恵一<sup>1</sup>, 齋藤 恵逸<sup>2</sup>, 廣川 健<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・海事, <sup>2</sup>神戸大院・人間発達環境学, <sup>3</sup>広島大院・工)

L-3 LVSEP 法によるミクロスケール電気泳動の高感度化(2)

○川井 隆之, 木南 芽子, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

L-4 陰イオン交換モノリスカラムによる二重鎖 DNA の高性能分離

○アハマド サバルディン, 遠藤 朗, 高崎 裕加, 朱 沁, 梅村 知也 (名大・エコトピア科学研究所)

L-5 動的光散乱法による分離媒体の構造解析に基づいた絡み合い効果の考察：キャピラリー電気泳動における高分子溶液の網目サイズの効果

○眞弓 皓一<sup>1</sup>, 住友 慶子<sup>2</sup>, 横山 英明<sup>1</sup>, 増田 光俊<sup>3</sup>, 南川 博之<sup>3</sup>, 清水 敏美<sup>3</sup>, 山口 佳則<sup>4</sup>, 伊藤 耕三<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・新領域, <sup>2</sup>早大・ナノ理工, <sup>3</sup>産総研・ナノチューブ応用研セ, <sup>4</sup>阪大・フォトリクス融合研セ)

L-6 PEO を分離媒体とした SDS-キャピラリー電気泳動によるタンパク質分離における緩衝液の選択とその効果

○住友 慶子<sup>1,2</sup>, 眞弓 皓一<sup>3</sup>, 南川 博之<sup>4</sup>, 増田 光俊<sup>4</sup>, 清水 敏美<sup>4</sup>, 朝日 透<sup>2,5</sup>, 伊藤 耕三<sup>3</sup>, 山口 佳則<sup>2,6</sup> (<sup>1</sup>早大・ナノ理工, <sup>2</sup>早大・科健機構, <sup>3</sup>東大・新領域, <sup>4</sup>産総研・ナノチューブ応用研セ, <sup>5</sup>早大・理工, <sup>6</sup>阪大・フォトリクス融合研セ)

休憩(10分)

11:30 - 12:00

依頼講演

座長：江坂 幸宏

IL-1 基材表面へのアルキル鎖の導入を利用したリン脂質自己組織化膜の構築とその応用

○近藤 伸一, 笹井 泰志 (岐阜薬大)

12:00 - 13:00

昼休み (60分・ポスター掲示・電気泳動懇談会委員会)

13:00 - 13:35

記念講演 1

座長：鈴木 茂生

ML-1 キャピラリー電気泳動へのあゆみ

高木 俊夫 (阪大名誉教授)

13:35 - 14:10

記念講演 2

座長：大塚 浩二

ML-2 キャピラリー電気泳動研究を顧みて

寺部 茂 (兵庫県立大名誉教授)

休憩(10分)

14:20 - 16:15 特別セッション 1 「オンライン濃縮」

オーガナイザー：廣川 健 (広島大院・工), 末吉 健志 (京大院・工)

SS1-1 トランジェントトラッピング法によるミクロスケール電気泳動分析の高感度化 (2)

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

SS1-2 非水系キャピラリー電気泳動におけるペプチドのオンライン濃縮法の開発

○北川 慎也, 野路 晃嗣, 大谷 肇 (名工大院・工)

SS1-3 簡便な高感度バイオ分析に向けた試薬放出キャピラリーIEF

○久本 秀明 (阪府大院・工)

SS1-4 *In situ* 光硬化型機能性アクリルアミドゲルマイクロチップ電気泳動分析法

○鈴木 茂生 (近畿大・薬)

SS1-5 動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法(EKS-CZE)による高感度分析 - 濃縮メカニズム

○廣川 健, 徐 中其, 川人 浩二, 森 聡美, 藤岡 直人 (広島大院・工)

休憩(10分)

16:25 - 17:35 特別セッション 2 「CE による速度論・平衡論研究」

オーガナイザー：壺岐 伸彦 (東北大院・工), 高柳 俊夫 (岡山大院・自然)

SS2-1 キャピラリー電気泳動反応器:キャピラリー電気泳動分離プロセスを利用する「錯体」の解離反応速度解析手法

○高橋 透 (福井大院・工)

SS2-2 溶液内反応の平衡論研究におけるキャピラリーゾーン電気泳動法の活用

○高柳 俊夫 (岡山大院・自然)

休憩(15分)

17:50 - 19:10

一般講演 (ポスター発表)

17:50-18:30 奇数番号

18:30-19:10 偶数番号

P-1S 電気泳動分析用ナフィオン修飾ポリマー製チップの作製

○瀬野 万里子, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-2S トランジェントトラッピング法による生体試料の高感度分析 (2)

○田中 隆太, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-3S マイクロヒーター集積化 PDMS チップによるタンパク質の電気泳動分析 (2)

○谷川 佳奈, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二 (京大院・工)

P-4S アリールボロン酸との錯形成を利用した糖のラベルフリー電気泳動分析

○楠本 梨沙<sup>1</sup>, Philip Britz-McKibbin<sup>2</sup>, 末吉 健志<sup>1</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>, 大塚 浩二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京大院・工, <sup>2</sup>McMaster University)

P-5S イオンクロマトグラフィーによる乾燥ワカメ中の陰イオンの定量

○飯山 貴史, 福士 恵一 (神戸大院・海事)

P-6S キャピラリーゾーン電気泳動法によるヒト血清中主要陰イオンの定量

○喜多 謙治<sup>1</sup>, 福士 恵一<sup>1</sup>, 平岡 厚<sup>2</sup>, 鈴木 祥史<sup>2</sup>, 副島 昭典<sup>2</sup>, 宮道 隆<sup>3</sup> (<sup>1</sup>神戸大院・海事, <sup>2</sup>杏林大保健, <sup>3</sup>近畿職業能力開発大学校)

P-7S キャピラリーゾーン電気泳動法による海水中亜硝酸及び硝酸イオンの定量：高精度化及び高感度化

○林 隆宏, 福士 恵一 (神戸大院・海事)

P-8 キャピラリーゾーン電気泳動法を用いたバイオ医薬品の品質評価試験

○前田 由貴子, 岩田 美紀, 表 由佳子, 春野 玲弥, 佐藤 了平, 中谷 圭吾, 疋田 昌義, 岡嶋 孝太郎, 酒井 治美, 清水 将年, 中山 智加男 (株式会社社住化分析センター)

P-9S 平板型カラムを用いた新規二次元分離手法の開発(V)

○伊東 寛明, 北川 慎也, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-10S 有機モノリスカラムを用いたキャピラリー電気泳動分析でのビタミン類の分離に関する基礎検討

○山田 紘揮, 北川 慎也, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-11S 不均一巨大貫通孔をもつ超低流路抵抗ポリマーモノリスカラムを用いた低圧高速液体クロマトグラフィーの開発

○平野 友彦, 北川 慎也, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-12 マイクロ液滴磁泳動速度測定によるイオン液体のキャラクタリゼーション

○飯國 良規, 時田 雄太, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-13S 磁泳動のためのフォトソグラフィによる有機ポリマーモノリス成形マイクロ流路の作製

○岡田 孝征, 飯國 良規, 大谷 肇 (名工大院・工)

P-14S マイクロチップウエスタンブロットングシステムの開発

○峰岸 真紀, 佐藤 記一, 吉村 悦郎 (東大院・農学生命)

P-15S 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析デバイスの開発～簡便・迅速・高感度イムノアッセイの開発～

○横山 大輝, 片岡 正輝, 八尾 俊男, 川村 邦男, 久本 秀明 (阪府大院・工)

- P-16S 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析デバイスの開発～超高感度酵素活性検出法の開発～  
○野川 悠人, 横山 大輝, 川村 邦男, 久本 秀明 (阪府大院・工)
- P-17S 管状白金電極を用いるフローインジェクション-キャピラリー電気泳動インターフェースの試作  
○中井 洋和, 手嶋 紀雄, 酒井 忠雄 (愛工大・応用化学科)
- P-18S インクジェット試料導入法を用いた定量的濃縮電気泳動法  
○中川 ゆり, 池田 紗織, 齋藤 望, 中嶋 秀, 内山 一美 (首都大・都市環境学部)
- P-19S 一本鎖 DNA 結合タンパク質-一本鎖 DNA 複合体の速度論的特性評価におけるキャピラリー電気泳動反応器の利用  
○富谷 頼行<sup>1</sup>, 高橋 透<sup>2</sup>, 壹岐 伸彦<sup>1</sup>, 星野 仁<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院・環境, <sup>2</sup>福井大院・工)
- P-20S フミン酸のダイナミックコーティング-非ゲルキャピラリー電気泳動分離における分離メカニズムの検討とそのフミン酸の分子量分布の推定への応用  
○田村 優樹<sup>1</sup>, 高橋 透<sup>2</sup>, 星野 仁<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院・環境, <sup>2</sup>福井大院・工)
- P-21S 動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による痕跡濃度アニオンの分析  
○藤岡 直人, 廣川 健, 徐 中其 (広島大院・工)
- P-22S キャピラリー電気泳動法による生体関連試料の精密分取・分析  
○福永 義樹, 徐 中其, 廣川 健 (広島大院・工)
- P-23S 動電過給前濃縮-キャピラリーゲル電気泳動法によるDNA断片の高感度・高精度・高分離能分析  
○森 聡美, 山田 美穂路, 徐 中其, 廣川 健 (広島大院・工)
- P-24 エレクトロスプレー質量分析法及びキャピラリー電気泳動-エレクトロスプレー質量分析法によるロジウムポルフィリン系 CO 酸化電極触媒の分析  
○竹田 さほり, 山崎 眞一 (産総研・ユビキタスエネルギー研究部門)
- P-25S ヘキサゴナル構造のゲルを用いた生体物質の分離  
○諏訪内 悠介, 三田 智文, 加藤 大 (東大院・薬)
- P-26 キャピラリー電気泳動法による緑茶中の成分分析  
○佐藤 康博, 中村 彰一, 黒田 秀樹 (大塚電子株式会社)
- P-27 蛍光イメージング検出法を用いたキャピラリー等電点電気泳動システム: 等電点電気泳動における焦点化過程の実時間観察  
○松本 浩幸<sup>1</sup>, 志村 清仁<sup>2</sup> (<sup>1</sup>浜松ホトニクス(株)中央研究所, <sup>2</sup>福島県立医科大学)
- P-28S プラズマを利用して高分子基材表面に構築したリン脂質自己組織化膜上への酵素の固定化  
○天野 佑, 笹井 泰志, 近藤 伸一 (岐阜薬大)
- P-29S 非水系 CE-Eu 錯体時間分解蛍光検出による高感度分析システムの開発  
○水谷 真理<sup>1</sup>, 石田 由美<sup>1</sup>, 江坂 幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野 文二<sup>1,2</sup>, 住友 慶子<sup>3,4</sup>, 山口 佳則<sup>5</sup> (<sup>1</sup>岐阜薬大, <sup>2</sup>岐大院連合創薬, <sup>3</sup>早大・ナノ理工, <sup>4</sup>早大・科健機構, <sup>5</sup>阪大・フォトニクス融合研究セ)
- P-30S ESI/MSによる高感度DNA損傷体分析のためのオンライン濃縮チップ開発に関する研究  
○古口 未央<sup>1</sup>, 村上 博哉<sup>1</sup>, 河村 理恵子<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> (<sup>1</sup>岐阜薬大, <sup>2</sup>岐阜大院連合創薬, <sup>3</sup>京大院・薬)
- P-31S 非水系逆相 HPLC-Eu 錯体蛍光時間分解検出による高感度分離分析法の開発  
○石田 由美<sup>1</sup>, 水谷 真理<sup>1</sup>, 江坂 幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野 文二<sup>1,2</sup>, 住友 慶子<sup>3,4</sup>, 山口 佳則<sup>5</sup> (<sup>1</sup>岐阜薬大, <sup>2</sup>岐大院連合創薬, <sup>3</sup>早大・ナノ理工, <sup>4</sup>早大・科健機構, <sup>5</sup>阪大・フォトニクス融合研究セ)

19:10 - 20:30 フリーディスカッション  
ポスター賞選考

11月16日(火)

- 9:00 - 11:10 特別セッション3 「マイクロフルイディクス」  
オーガナイザー: 久本 秀明 (阪府大院・工), 渡慶次 学 (名大院・工)
- SS3-1 タンパク質を内包した光開裂性ナノ粒子の調製  
村山 周平, Su Baowei, ○加藤 大 (東大院・薬)
- SS3-2 マイクロサザンハイブリダイゼーションシステムの開発  
○佐藤 記一 (東大院・農学生命)
- SS3-3 水力的手法を利用したマイクロ細胞操作システムの開発

- 山田 真澄 (千葉大院・工)
- SS3-4 誘電泳動による微粒子集積と電気化学変換濃縮を組み合わせた迅速で高感度な免疫センシング  
○安川 智之, 水谷 文雄 (兵庫県立大院・物質理学研究科)
- SS3-5 自律駆動マイクロチップによる簡便・高感度なイムノアッセイ  
○細川 和生 (理研・基幹研)
- SS3-6 ナノ構造体を利用した新規無標識検出法の開発  
安井 隆雄<sup>1</sup>, ○加地 範匡<sup>1</sup>, 岡本 行広<sup>1</sup>, 渡慶次 学<sup>1</sup>, 堀池 靖浩<sup>2</sup>, 馬場 嘉信<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>名大院・工・名大革新ナノバイオ研セ, <sup>2</sup>物材機構, <sup>3</sup>産総研・健康工学研)

休憩(10分)

- 11:20 - 12:10 特別講演 1 座長: 馬場 嘉信  
SP-1 Crossing the Boarde – Infection Biology as Inspiration for Organic Bio-Electronics  
Agneta Richter-Dahlfors (Swedish Medical Nanoscience Center, Dept of Neuroscience Karolinska Institutet)

12:10-13:10 昼休み (60分)

- 13:10 - 14:00 特別講演 2 座長: 久本 秀明  
SP-2 Micro / Nanofilters for Molecular and Cellular Separation and Diagnostics  
Jongyoon Han (Department of Electrical Engineering and Computer Science / Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology)

休憩 (10分)

- 14:10 - 16:10 特別セッション 4 「CE 装置・CE/MS」  
オーガナイザー: 田中 喜秀 (産総研・健康工学), 北川 文彦 (京大院・工)

- SS4-1 高感度・小型・微小領域蛍光検出器の開発  
○福澤 隆, 田中 裕之, 東 秀樹 (日本板硝子株式会社)
- SS4-2 高感度 CE-ESI-MS のためのシーレスインタフェース  
○新井 悦郎<sup>1</sup>, Jerry Feitelson<sup>2</sup> (<sup>1</sup>ベックマン・コールター株式会社, <sup>2</sup> Beckman Coulter, Inc.)
- SS4-3 CE-TOFMS による陰イオン性化合物の最新測定法  
○曾我 朋義 (慶大・先端生命研)
- SS4-4 質量分析を用いた生体超分子の構造機能研究-構造生物学から見た CE への期待-  
○明石 知子 (横浜市大院・生命ナノシステム科学)

休憩(10分)

- 16:20 - 18:20 特別セッション 5 「メタボロミクス」  
オーガナイザー: 曾我 朋義 (慶大・先端生命研), 福崎 英一郎 (阪大院・工)
- SS5-1 CE-MS によるメタボローム測定法とがんの代謝解析  
○平山 明由 (慶大・先端生命研)
- SS5-2 ポジティブモード CE-MS によるアニオン性代謝物網羅的測定法とその応用  
○原田 和生<sup>1</sup>, 福崎 英一郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>阪大院・薬, <sup>2</sup>阪大院・工)
- SS5-3 酸性泳動液を用いた CE-MS による陰イオン性代謝物測定法と植物試料でのメタボローム解析  
○若山 正隆, 安彦 友美, 青木 直大, 佐々木 治人, 大杉 立 (東大院・農)
- SS5-4 CE-MS を用いた医療・食品メタボロミクスの応用研究  
○杉本 昌弘, 曾我 朋義, 富田 勝 (慶大・先端生命研)

18:30 - 20:30 懇親会  
ポスター賞授与式  
22<sup>nd</sup> Cheminas のお知らせ

11月17日(水)

9:00 - 10:00 一般講演2(口頭発表) 座長:北川 慎也

L-7 レクチン固定化アフィニティーマイクロチップ電気泳動法の開発

○山本 佐知雄, 鈴木 翔, 鈴木 茂生(近畿大・薬)

L-8 キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 -

○仲西 暁良<sup>1</sup>, 佐藤 葵<sup>1</sup>, 木下 充弘<sup>1</sup>, 森山 博由<sup>2</sup>, 早川 堯夫<sup>2</sup>, 掛樋 一晃<sup>1</sup>(<sup>1</sup>近畿大・薬, <sup>2</sup>近畿大・薬総研)

L-9 加齢マーカーとしての糖鎖の可能性~CEによる血清糖鎖プロファイルの加齢ならびに生活習慣に伴う変動追跡~

○能登 啓介<sup>1</sup>, 奥田 茜<sup>1</sup>, 木下 充弘<sup>1</sup>, 早川 堯夫<sup>2</sup>, 掛樋 一晃<sup>1</sup>(<sup>1</sup>近畿大・薬, <sup>2</sup>近畿大・薬総研)

休憩(10分)

10:10 - 12:10 特別セッション6「最先端バイオ分析」

オーガナイザー:鈴木 茂生(近畿大・薬), 加藤 大(東大院・薬), 鳥村 政基(産総研・環境管理)

SS6-1 SDS-キャピラリー電気泳動法による抗体医薬品の品質評価

○川上 信彦, 中村 裕子, 寺島 勇, 鎌田 国博, 岡本 寿美子, 古賀 明子(中外製薬株式会社 CMC 開発部(分析技術))

SS6-2 半固定したレクチン及び糖加水分解酵素を用いたキャピラリー電気泳動による抗体医薬品の糖鎖構造解析

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

SS6-3 キャピラリー電気泳動のバイオ医薬品品質試験への適用可能性

○前田 瑛起<sup>1</sup>, 岸本 昌太<sup>2</sup>, 浦上 康司<sup>1</sup>, 木下 充弘<sup>2</sup>, 掛樋 一晃<sup>2</sup>(<sup>1</sup>武田薬, <sup>2</sup>近畿大・薬)

SS6-4 微量試料導入系を用いた CE-誘導結合プラズマ質量分析装置による核酸の分析

○藤井 紳一郎, 稲垣 和三, 千葉 光一, 高津 章子(産総研・計測標準)

SS6-5 キャピラリー電気泳動による微生物生細胞の泳動挙動観察

○鳥村 政基<sup>1</sup>, 新谷 智吉<sup>2</sup>, 田尾 博明<sup>1</sup>(<sup>1</sup>産総研・環境管理, <sup>2</sup>愛媛産技研)

12:10-13:10 昼休み(60分)

13:10 - 15:10 基礎講習会・デモンストレーション

13:10 - 14:10 大塚電子:「イオン分析における検出感度の向上 ~過渡的等速電気泳動などの濃縮法の応用について~」

14:10 - 15:10 アジレントテクノロジー:「キャピラリー電気泳動による有機酸、糖類の一斉分析法の食品分析への適用」

15:10 - 閉会式

22<sup>nd</sup> Cheminasのお知らせ

SCE2011のお知らせ

実行委員長 曾我 朋義(慶大・先端生命研)

SCE2012のお知らせ

実行委員長 田中 喜秀(産総研・健康工学)

閉会挨拶

電気泳動分析研究懇談会委員長 鈴木 茂生(近畿大・薬)

The 30<sup>th</sup> Symposium on Capillary Electrophoresis  
November 15 – 17, 2010, Gifu

Monday, Nov. 15

9:15 - 9:20

**Opening Remarks**

9:20 - 11:20

**Session 1**

Chair: Cyuzo Fujimoto  
Yoshinori Yamaguchi

**L-1 Basic study for high performance separation in pressurized flow driven electrochromatography based on the electrophoresis under the heterogeneous electric field**

Hiroki Buno\*, Shinya Kitagawa, Hajime Ohtani  
*Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

**L-2 Sensitivity Enhancement for Capillary Zone Electrophoresis Using Field Amplified Sample Injection and Hybrid Sample Injection**  
**Kaewchuay Netnapi<sup>1</sup>, Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Keitsuo Saito<sup>2</sup>, Takeshi Hirokawa<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Kobe University Graduate School of Maritime Sciences, <sup>2</sup>Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University, <sup>3</sup>Graduate School of Engineering, Hiroshima University

**L-3 Highly Sensitive Microscale Electrophoresis Using Large-volume Sample Stacking with Electroosmotic Flow Pump. 2**

Takayuki Kawai\*, Saeko Kinami, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, and Koji Otsuka  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

**L-4 Monolithic Anion Exchange Column for Chromatographic Separation of Double Strand DNA Fragments**

A. Sabarudin\*, R. Endo, Y. Takasaki, S. Shu, T. Umemura  
*Division of Nano-materials Science, EcoTopia Science Institute, Nagoya University*

**L-5 Dynamic Light Scattering to Evaluate Mesh Size of Sieving Polymer Solutions: Effect of Mesh Size on DNA Migration in Capillary Electrophoresis**

Koichi Mayumi<sup>1</sup>, Keiko Sumitomo<sup>2</sup>, Hideaki Yokoyama<sup>1</sup>, Mitsutoshi Masuda<sup>3</sup>, Hiroyuki Minamikawa<sup>3</sup>, Toshimi Shimizu<sup>3</sup>, Yoshinori Yamaguchi<sup>4</sup>, Kohzo Ito<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, <sup>2</sup>Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University, <sup>3</sup>Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <sup>4</sup>Photonics Advanced Research Center, Osaka University

**L-6 Buffers for Protein Separation on SDS-Capillary Polymer Electrophoresis with PEO**

Keiko Sumitomo<sup>1,2</sup>, Koichi Mayumi<sup>3</sup>, Hiroyuki Minamikawa<sup>4</sup>, Mitsutoshi Masuda<sup>4</sup>, Toshimi Shimizu<sup>4</sup>, Toru Asahi<sup>2,5</sup>, Kohzo Ito<sup>3</sup>, Yoshinori Yamaguchi<sup>2,6</sup>  
<sup>1</sup>Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University, <sup>2</sup>ASMeW, Waseda University, <sup>3</sup>Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, <sup>4</sup>Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <sup>5</sup>School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, <sup>6</sup>Photonics Advanced Research Center, Osaka University

Break (10min)

11:30-12:00

**Invited Lecture**

Chair: Yukihiko Esaka

**IL-1 Fabrication of self-assembled phospholipid layer on the material surface introducing grafted alkyl-chain and its application**

Shin-ichi Kondo\*, Yasushi Sasai  
*Gifu Pharmaceutical University*

12:00-13:00

Lunch Break (60min)

13:00-13:35

**Memorial Lecture 1**

Chair: Shigeo Suzuki

**ML-1 Short History of Electrophoresis leading Up To the Use of Capillary**  
Toshio Takagi\*, *Osaka University, Emeritus Professor*

13:35-14:10

**Memorial Lecture 2**

Chair: Koji Otsuka

**ML-2 My Research on Capillary Electrophoresis in Retrospect**  
Shigeru Terabe\*, *University of Hyogo, Emeritus Professor*

Coffee Break (10min)

14:20-16:15

**Special Session 1 [On-line Concentration]**

Organizer: Takeshi Hirokawa, Kenji Sueyoshi

**SS1-1 Transient Trapping in Microscale Electrophoresis for High Sensitive Detection. 2**

Kenji Sueyoshi\*, Hiroshi Koino, Ryuta Tanaka, Kota Hashiba, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

**SS1-2 On-line concentration of peptides in non-aqueous capillary electrophoresis**

Shinya Kitagawa\*, Akitsugu Noji, Hajime Ohtani  
*Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

**SS1-3 Reagent-release capillary-Based Isoelectric Focusing (RRC-IEF) Towards Simple and Highly-Sensitive Bioanalysis**

Hideaki Hisamoto\*  
*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University*

**SS1-4 Microchip Electrophoresis Using Functionalized Polyacrylamide Gels by *in situ* Photopolymerization**

Shigeo Suzuki\*  
*Faculty of Pharmacy, Kinki University*

**SS1-5 High-sensitive Analysis by Electrokinetic Supercharging-Capillary Zone Electrophoresis (EKS-CZE) - Concentration Mechanism of EKS**

Takeshi Hirokawa\*, Zhongqi Xu, Kouji Kawahito, Satomi Mori, Naoto Fujioka  
*Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

Coffee Break (10min)

**16:25-17:35 Special Session 2 [Equilibrium and Kinetic Studies Using CE]**

Organizer: Nobuhiko Iki, Toshio Takayanagi

**SS2-1 Capillary Electrophoretic Reactor: Dissociation Kinetic Analysis Method for "Complexes" Utilizing Capillary Electrophoretic Separation Process**

Toru Takahashi\*  
*Graduate School of Engineering, University of Fukui*

**SS2-2 Utilization of Capillary Zone Electrophoresis on Equilibrium Analysis in Homogeneous Solution**

Toshio Takayanagi\*  
*Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University*

Coffee Break (15min)

17:50-19:10

**Poster Presentation and Discussion**

17:50-18:30 odd number

18:30-19:10 even number

**P-1S Fabrication of Nafion Modified Polymer Microchips for Electrophoretic Analysis**

Mariko Seno\*, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka

- Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Kyoto University*
- P-2S Transient Trapping in Bioanalysis for High-Sensitive Detection. 2**  
Ryuta Tanaka\*, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Kyoto University*
- P-3S Microchip Electrophoresis with Microheater Integrated PDMS Chip. 2**  
Kana Tanigawa\*, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka  
*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Kyoto University*
- P-4S Label-Free Electrophoretic Analysis of Sugars Using Complexation with Aryl Boronic Acids.**  
Risa Kusumoto\*, Philip Britz-McKibbin<sup>2</sup>, Kenji Sueyoshi<sup>1</sup>, Fumihiko Kitagawa<sup>1</sup>, Koji Otsuka<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Kyoto University,* <sup>2</sup>*Department of Chemistry, McMaster University*
- P-5S Determination of Anions in Dried Seaweed (Wakame) Using Ion Chromatography**  
Takashi IYAMA\*<sup>1</sup> and Keiichi FUKUSHI<sup>1</sup>  
*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*
- P-6S Determination of Major Anions in Human Serum Using Capillary Zone Electrophoresis**  
Kenji Kita\*<sup>1</sup>, Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Atsushi Hiraoka<sup>2</sup>, Yoshifumi Suzuki<sup>2</sup>, Akinori Soejima<sup>2</sup>, and Takashi Miyado<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences,* <sup>2</sup>*Faculty of Health Sciences, Kyorin University,* <sup>3</sup>*Kinki Polytechnic College*
- P-7S CZE Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater: Reproducibility Improvement and Sensitivity Enhancement**  
Takahiro Hayashi\*<sup>1</sup>, Keiichi Fukushi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*
- P-8 Specification test for biologics by capillary zone electrophoresis**  
Yukiko Maeda\*, Miki Iwata, Yukako Omote, Remi Haruno, Ryohei Satou, Keigo Nakatani, Masayoshi Hikita, Kotaro Okajima, Harumi Sakai, Masatoshi Shimizu, Chikao Nakayama  
*Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.*
- P-9S Development of new two-dimensional separation method using planer column (V)**  
Hiroaki Ito\*, Shinya Kitagawa, Hajime Ohtani  
*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*
- P-10S Separation of Vitamins in Capillary Electrochromatography using Polymer Monolithic Columns**  
Hiroki Yamada\*, Shinya Kitagawa, Hajime Ohtani  
*Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*
- P-11S Development of low pressure high performance liquid chromatography using ultra low flow resistance polymer monolithic column with winding huge through**  
Tomohiko Hirano\*, Shinya Kitagawa, and Hajime Ohtani  
*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*
- P-12 Measurement of electromagnetophoretic velocity of micro-droplets to characterize ionic liquids**  
Yoshinori Iiguni\*, Yuta Tokida, and Hajime Ohtani  
*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*
- P-13S Micro channel fabrication by polymer monolithic membrane for electromagnetophoresis using photolithography**  
Takamasa Okada\*, Yoshinori Iiguni, and Hajime Ohtani  
*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*
- P-14S Development of Micro Western Blotting System**  
Maki Minegishi\*, Kiichi Sato, Etsuro Yoshimura  
*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*
- P-15S Reagent-release Capillary-Based Isoelectric Focusing for Highly-Sensitive Bioanalysis ~ Simple Rapid, and Sensitive Immunoassay ~**  
Hiroki Yokoyama\*, Masaki Kataoka, Toshio Yao, Kunio Kawamura and Hideaki Hisamoto  
*Osaka Prefecture University*
- P-16S Reagent-release capillary-based isoelectric focusing for highly-sensitive bioanalysis ~Simple, rapid, and sensitive enzyme activity assay~**  
Yuto Nogawa\*, Hiroki Yokoyama, Kunio Kawamura and Hideaki Hisamoto  
*Osaka Prefecture University*
- P-17S Flow Injection-Capillary Electrophoresis Interface Using a Tubular Platinum Electrode**  
Hirokazu Nakai\*, Norio Teshima, and Tadao Sakai  
*Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology*
- P-18S Quantitative preconcentration technique for capillary electrophoresis with inkjet sample injection**  
Yuri Nakagawa\*, Saori Ikeda, Nozomi Saito, Hizuru Nakajima and Katsumi Uchiyama  
*Graduate school of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan university*
- P-19S The use of capillary electrophoresis reactor in the kinetic characterization of single-stranded DNA binding protein-single-stranded DNA complexes**  
Yoriyuki Tomiya\*<sup>1</sup>, Toru Takahashi<sup>2</sup>, Nobuhiko Iki<sup>1</sup>, Hitoshi Hoshino<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University,* <sup>2</sup>*Graduate School of Engineering, University of Fukui*
- P-20S Investigation of the separation of humic substances and its application to the estimation of the molecular weight distribution of humic substances with dynamic coating – non-gel capillary electrophoresis**  
Yuuki Tamura\*<sup>1</sup>, Toru Takahashi<sup>2</sup>, and Hitoshi Hoshino<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University,* <sup>2</sup>*Graduate School of Engineering, University of Fukui*
- P-21S Analysis of Trace Anions by Electrokinetic Supercharging – Capillary Zone Electrophoresis**  
Naoto Fujioka\*, Takeshi Hirokawa, Zhongqi Xu  
*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University*
- P-22S Precise fractionation and analysis of minor components in biological fluids by capillary electrophoresis**  
Yoshiki Fukunaga\*, Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa  
*Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University*
- P-23S Development of a high-sensitivity, high-accuracy and high-resolution method for DNA fragments analysis by electrokinetic supercharging preconcentration –capillary gel electrophoresis.**  
Satomi Mori\*, Mihoro Yamada, Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa  
*Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University*
- P-24 Analysis of Rh porphyrin complexes as electrocatalysts for CO oxidation by electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry**  
Sahori Takeda\*, and Shin-ichi Yamazaki  
*Research Institute for Ubiquitous Energy Devices, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*
- P-25S Separation of biological nanocompounds by hexagonal structure gel**  
Yuusuke Suwanai\*, Tomofumi Santa and Masaru Kato  
*Graduate school of Pharmaceutical sciences, The University of Tokyo*
- P-26 Analysis of components in green tea by Capillary Electrophoresis**  
Yasuhiro Sato\*, Shoichi Nakamura, Hideaki Kuroda  
*Otsuka Electronics Co.*
- P-27 Capillary isoelectric focusing system with fluorescence-imaging detection : Real-time observation of the dynamic focusing processes in isoelectric focusing**  
Hiroyuki Matsumoto\*<sup>1</sup>, Kiyohito Shimura<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.,* <sup>2</sup>*Chemistry Division, Department of Natural Science, Fukushima Medical University*
- P-28S Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto the self-assembled phospholipid layer fabricated on the low-density polyethylene film by plasma-assisted method**  
Yuu Amano\*, Yasushi Sasai, Shin-ichi Kondo  
*Gifu Pharmaceutical University*

**P-29S Non-aqueous CE of Europium complexes with time resolved fluorescence detection for highly sensitive analysis of rare bioactive molecules**

Mari Mizutani<sup>\*1</sup>, Yumi Ishida<sup>1</sup>, Yukihiro Esaka<sup>1,2</sup>, Bunji Uno<sup>1,2</sup>, Keiko Sumitomo<sup>3,4</sup>, Yoshinori Yamaguchi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Gifu Pharm. University, <sup>2</sup>United Grad. School of Drug Discovery and Med. Inform. Sci., Gifu University, <sup>3</sup>Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University, <sup>4</sup>ASMeW, Waseda University, <sup>5</sup>Photonics Advanced Research Center, Osaka University

**P-30S Development of On-line Preconcentration Tips for the Analysis of DNA Adducts in ESI/MS**

Mio Koguchi<sup>\*1</sup>, Hiroya Murakami<sup>1</sup>, Rieko Kawamura<sup>1</sup>, Yukihiro Esaka<sup>1,2</sup>, Bunji Uno<sup>1,2</sup>, Yasushi Ishihama<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Gifu Pharmaceutical University, <sup>2</sup>United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Science, Gifu University, <sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

**P-31S Non-aqueous RP-HPLC of Europium Complexes with Time Resolved Fluorescence Detection for Highly Sensitive Analysis of Rare Bioactive Molecules**

Yumi Ishida<sup>\*1</sup>, Mari Mizutani<sup>1</sup>, Yukihiro Esaka<sup>1,2</sup>, Bunji Uno<sup>1,2</sup>, Keiko Sumitomo<sup>3,4</sup>, Yoshinori Yamaguchi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Gifu Pharm. University, <sup>2</sup>United Grad. School of Drug Discovery and Med. Inform. Sci., Gifu University, <sup>3</sup>Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University, <sup>4</sup>ASMeW, Waseda University, <sup>5</sup>Photonics Advanced Research Center, Osaka University

19:10-20:30 Free discussion

**Tuesday, Nov. 16**

9:00-11:10 **Special Session 3 [Microfluidics]**

Organizer: Hideaki Hisamoto, Manabu Tokeshi

**SS3-1 Development of photocleavable nanoparticle containing protein**

Shuhei Murayama, Baowei Su, and Masaru Kato<sup>\*</sup>  
*Graduate school of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*

**SS3-2 Development of Micro Southern Hybridization System**

Kiichi Sato<sup>\*</sup>  
*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

**SS3-3 Development of Micro Cell Manipulation Systems Utilizing**

**Hydrodynamics**  
Masumi Yamada<sup>\*</sup>  
*Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Chiba University*

**SS3-4 Rapid and sensitive immunosensing system based on the combination of dielectrophoretic particle manipulation and electrochemical signal amplification**

Tomoyuki Yasukawa<sup>\*</sup>, Fumio Mizutani  
*Graduate School of Material Science, University of Hyogo*

**SS3-5 Power-free microchip for easy and sensitive immunoassay**

Kazuo Hosokawa<sup>\*</sup>  
*Advanced Science Institute, RIKEN*

**SS3-6 Development of a Novel Label-Free Detection Method Using Nanostructures**

Takao Yasui<sup>1</sup>, Noritada Kaji<sup>\*1</sup>, Yukihiro Okamoto<sup>1</sup>, Manabu Tokeshi<sup>1</sup>, Yasuhiro Horiike<sup>2</sup>, Yoshinobu Baba<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice, Nagoya University, <sup>2</sup>National Institute for Materials Science, <sup>3</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Coffee Break (10min)

11:20-12:10 **Special Presentation 1** Chair: Yoshinobu Baba

**SP-1 Crossing the Boarde – Infection Biology as Inspiration for Organic Bio-Electronics**

Agneta Richter-Dahlfors<sup>\*</sup>  
*Swedish Medical Nanoscience Center, Dept of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

12:10-13:10 Lunch Break (60min)

13:10-14:00 **Special Presentation 2** Chair : Hideaki Hisamoto

**SP-2 Micro / Nanofilters for Molecular and Cellular Separation and Diagnostics**

Jongyoon Han<sup>\*</sup>  
*Department of Electrical Engineering and Computer Science / Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology*

Coffee Break (10min)

14:10-16:10 **Special Session 4 [Instrumental developments, CE/MS]**

Organizer: Yoshihide Tanaka, Fumihiko Kitagawa

**SS4-1 Development of Compact High Sensitivity Fluorescence Detector**

**For Micro Region**  
Takashi Fukuzawa<sup>\*</sup>, Hiroyuki Tanaka, Hideki Azuma  
*Nippon Sheet Grass Co., Ltd.*

**SS4-2 A Sheathless Interface for High Sensitivity CE-ESI-MS**

Etsuo Arai<sup>\*1</sup>, Jerry Feitelson<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Beckman Coulter K.K., <sup>2</sup>Beckman Coulter, Inc

**SS4-3 A Novel CE-TOFMS Method for Analysis of Anions**

Tomoyoshi Soga<sup>\*</sup>  
*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

**SS4-4 Mass spectrometry of protein complexes - Prospects for applications of CE to structural biology -**

Satoko Akashi<sup>\*</sup>  
*Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University*

Coffee Break (10min)

16:20-18:20 **Special Session 5 [Metabolomics]**

Organizer: Tomoyoshi Soga, Eiichiro Fukusaki

**SS5-1 Investigating cancer metabolism by CE-MS metabolome analysis of tumor tissues**

Akiyoshi Hirayama<sup>\*</sup>  
*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

**SS5-2 Comprehensive analytical method for anionic metabolites by means of positive mode CE-MS and its application**

Kazuo Harada<sup>\*1</sup>, and Eiichiro Fukusaki<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>2</sup>Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, Osaka University

**SS5-3 Plant metabolome analysis by CE-MS using acidic electrolytes for anionic metabolites**

Masataka Wakayama<sup>\*</sup>, Tomomi Abiko, Naohiro Aoki, Haruto Sasaki and Ryu Ohsugi  
*Crop Science Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

**SS5-4 Medical and Food Metabolomics using CE-MS**

Masahiro Sugimoto<sup>\*</sup>, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita  
*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

18:30-20:30 Banquet  
Poster Awards  
Invitation to 22<sup>nd</sup> Cheminas

**Wednesday, Nov. 17**

9:00-10:00 **Session 2** Chair: Shinya Kitagawa

**L-7 Development of Affinity Microchip Electrophoresis Method by *In situ* Photopolymerization of Lectin-impregnated Acrylamide**

Sachio Yamamoto<sup>\*</sup>, Sho Suzuki, Shigeo Suzuki  
*School of Pharmacy, Kinki University*

**L-8 Evaluation of Cell Characteristics using Glycans as Marker Molecules**

A. Nakanishi<sup>\*1</sup>, M. Sato<sup>1</sup>, M. Kinoshita<sup>1</sup>, H. Moriyama<sup>2</sup>, T. Hayakawa<sup>2</sup>  
and K. Kakehi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, <sup>2</sup>Pharmaceutical  
Research and Technology Institute, Kinki University

**L-9 Profiling of oligosaccharides as candidate for aging marker: Serum  
glycan profiles with aging and diet as examined by CE**

Keisuke Noto<sup>\*1</sup>, Akane Okuda<sup>1</sup>, Mitsuhiro Kinoshita<sup>1</sup>, Takao Hayakawa<sup>2</sup>  
and Kazuaki Kakehi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, <sup>2</sup>Pharmaceutical  
Research and Technology Institution, Kinki University

Coffee Break (10min)

**10:10-12:10 Special Session 6 [Current Trends in Bioanalysis]**

Organizer: Shigeo Suzuki, Masaru Kato, Masaki Torimura

**SS6-1 Quality Evaluation of Antibody Drug by SDS - Capillary**

**Electrophoresis**

Nobuhiko Kawakami<sup>\*</sup>, Yuko Nakamura, Isamu Terashima, Kunihiro

Kamata, Sumiko Okamoto, Akiko Koga

CMC Development Dept. (Analytical Technology), Chugai

Pharmaceutical Co., Ltd.

**SS6-2 Characterization of Glycans on Therapeutic Antibody with Partial**

**Filling Lectins and Glycosidases in Capillary Electrophoresis**

Yuki Yagi<sup>\*1</sup>, Chikayo Shinohara<sup>2</sup>, Sachio Yamamoto<sup>2</sup>, Yukihito

Ohyama<sup>1</sup>, Shigeo Suzuki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bio Process Research and Development Laboratories, Kyowa Hakko

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

**SS6-3 Capillary Electrophoresis for Quality Testing of Biopharmaceuticals**

Eiki Maeda<sup>\*1</sup>, Shota Kishimoto<sup>2</sup>, Koji Urakami<sup>1</sup>, Mitsuhiro Kinoshita<sup>2</sup>,

Kazuaki Kakehi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Takeda Pharmaceutical Company Ltd., <sup>2</sup>School of Pharmacy, Kinki

University

**SS6-4 Nucleic Acid Analysis by Using Capillary Electrophoresis**

**Hyphenated with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry**

**Equipped with High Performance Concentric Nebulizer**

Shin-ichiro Fujii<sup>\*1</sup>, Kazumi Inagaki<sup>1</sup>, Koichi Chiba<sup>1</sup> and Akiko Takatsu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of

Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

**SS6-5 Monitoring the Migration Behavior of Living Microorganisms in**

**Capillary Electrophoresis**

Masaki Torimura<sup>\*1</sup>, Tomoyoshi Shintani<sup>2</sup>, and Hiroaki Tao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Measurement Technology Research Group, Research Institute for

Environmental Management Technology, National Institute of

Advanced Industrial Science and Technology, <sup>2</sup>Ehime Institute of

Industrial Technology

12:10-13:10 Lunch Break (60min)

**13:10-15:10 Basic training session and Demonstration**

OTSUKA ELECTRONICS / Agilent Technologies

15:10 -

**Closing Session**

**Invitation to 22<sup>nd</sup> Cheminas**

**Invitation to SCE2011**

Tomoyoshi SOGA, *Keio University*

**Invitation to SCE2012**

Yoshihide Tanaka, *AIST*

**Closing Remarks**

Shigeo Suzuki, *Kinki University*

# 不均一電場下での電気泳動を利用した 圧力差流送液型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

## Basic study for high performance separation in pressurized flow driven electrochromatography based on the electrophoresis under the heterogeneous electric field

Hiroki BUNO\*, Shinya KITAGAWA, Hajime OHTANI

*Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering,*

*Nagoya Institute of Technology*

### Abstract

The method of the voltage-induced peak zone sharpening in pressurized flow driven electrochromatography utilizing a heterogeneous electric field was investigated. In the proposed method, the mobile phase was altered from high-conductive (HC) solution to low-conductive (LC) one to produce the drastic variation in the potential gradient during the separation procedure. When the analyte migrates toward the column outlet end electrophoretically and the electrophoretic velocity was faster than the moving velocity of the HC-LC interface, the analyte was stacked at the interface due to the extreme decrease in the electrophoretic migration velocity. As the instance, the peak zone sharpening of 1-naphthalenesulfonic acid sodium salt was successfully achieved with the combination of the application of 4 kV and step-gradient using the mobile phase with and without 20 mM NaNO<sub>3</sub>.

### 【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を併せた分離手法である。当研究室で、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たところ、移動相に過塩素酸を添加し比較的高い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、分離が大幅に改善されるという現象を見出した。この現象が発現するメカニズムについて検討を行ったところ、固定相に吸着した過塩素酸イオンがグラジエント溶離適用時に脱着し、カラム内に局所的な高伝導度領域が形成されていることが判った。高伝導度領域ではペプチド試料の電気泳動速度は低下するため、この局所的な高伝導度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。本研究では、このメカニズムを応用したピーク先鋭化モデルを考案し、CEC 分離の高性能化について検討した。

## 【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)、紫外吸収検出器 (CE-2075, Jasco)、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。分離カラムはUV透過皮膜コーティングキャピラリー (i.d. 0.10 mm) に、逆相系充填剤 (CHEMCOSORB, Chemco) をスラリー充填し調製した。移動相には、アセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.1) 混合溶液に、硝酸ナトリウムを添加した高伝導度移動相 (HC 移動相) と未添加の低伝導度移動相 (LC 移動相) を用いた。

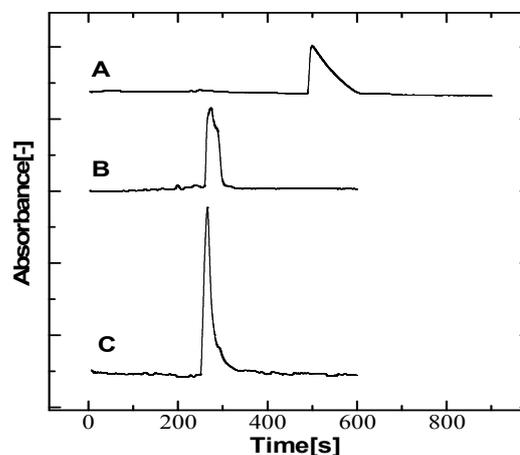
## 【結果と考察】

圧力差流送液型の CEC において、不均一な電場はステップグラジエントにより容易に形成することが可能である。まず HC 移動相を満たしたカラム内に試料を注入する。次に、ステップグラジエントにより LC 移動相を送液すると、LC 移動相中では HC 移動相中より試料の電気泳動速度が大きくなるため、これらの領域の界面で試料濃縮が起こる。その後、ステップグラジエントにより LC 移動相がカラム内に満たされるにつれ、両領域の電位勾配差が小さくなるため、試料は界面に追いつけなくなり、濃縮が終了する。

陰イオン性試料である 1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムを用い、HC 移動相のみを用いたアイソクラティック溶離における測定結果を Fig. 1A に、4 kV の電圧を印加した測定結果を Fig. 1B に示した。Fig. 1A と B より、電圧を印加することで試料はカラム出口側方向へ電気泳動し、溶出時間が早くなることが判る。また、このときの試料の電気泳動移動度は  $1.5 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{Vs}$  であった。

ここで、HC 移動相から LC 移動相へと切り替えるステップグラジエントを適用した。HC 移動相と LC 移動相の界面速度は 0.51 mm/s であり、試料が注入され溶出するまでの間に、LC 移動相中の試料が界面に追いつくためには 4 kV 以上の電圧印加が必要であることが計算された。これをもとに、4 kV の電圧印加と HC 移動相から LC 移動相へと切り替えるステップグラジエントを適用したところ、Fig. 1C に示すように、Fig. 1B と比較してピークが先鋭化することを確認した。

以上の結果から、不均一電場を利用することでピークを先鋭化し、CEC 分離の高性能化が可能であることが示された。



**Fig. 1** Electrochromatograms obtained without both application of voltage and step gradient (A), with application of voltage alone (B), with both application of voltage and step gradient (C). Sample : 1-naphthalenesulfonic acid sodium salt, Mobile phase : ( I ) acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 4.1) (20/80, v/v), ( II ) 20 mM sodium nitrate in ( I ), Gradient elution : ( I ) from 0% to 100% in 0.01 min, Applied voltage : 4 kV

# 電場増幅試料導入法及び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

○ネトナピット ケオチューイ<sup>1</sup>, 福士恵一<sup>1</sup>, 齋藤恵逸<sup>2</sup>,  
廣川 健<sup>3</sup>

<sup>1</sup>神戸大院・海事, <sup>2</sup>神戸大院・人間発達環境学,

<sup>3</sup>広島大・院工

## Sensitivity Enhancement for Capillary Zone Electrophoresis Using Field Amplified Sample Injection and Hybrid Sample Injection

Kaewchuay Netnapit<sup>\*1</sup>, Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Keiitsu Saito<sup>2</sup>, Takeshi Hirokawa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

<sup>2</sup>*Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University*

<sup>3</sup>*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

We describe a novel hybrid sample injection mode (hSIM) to enhance the sensitivity of capillary zone electrophoresis (CZE). Samples are introduced into the capillary using both vacuum and electrokinetic injections simultaneously. Using a sample mixture containing an anti-fouling agent, pyridine-triphenylborane (PTPB) and three of its estimated degradation products, diphenylborinic acid (DPB), phenylboronic acid (MPB), and phenol in acetonitrile, voltage and period for sample introduction were examined. The results were compared to those obtained using field amplified sample injection (FASI) and electrokinetic injection (EKI). Peak height results for PTPB, DPB, MPB, and phenol using hSIM were 1.6, 1.6, 4.4, and 4.2 times higher than those using FASI, respectively. Peak heights for PTPB and DPB using FASI were 34 and 41 times higher than those using EKI, respectively.

### Introduction

We have developed capillary zone electrophoresis (CZE) for the simultaneous determination of a pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and its degradation products<sup>1</sup>. In order to enhance the sensitivity, we have proposed a hybrid sample injection mode (hSIM)<sup>2</sup>, using both vacuum and electrokinetic injections simultaneously for the introduction of samples into the capillary. For further improvement of hSIM, it is required to understand field amplified sample injection (FASI)<sup>3</sup> in which a water plug is injected into the capillary prior to sample introduction followed by electrokinetic injection (EKI). In the present study, optimum injection period for water, voltage and period for sample introduction were examined using FASI. In addition, compositions of sample solvent were investigated.

### Experimental

The detection wavelength was set at 200 nm. The background electrolyte was 20 mM sodium tetraborate adjusted to pH 9.8 with 1 M sodium hydroxide. A standard solution

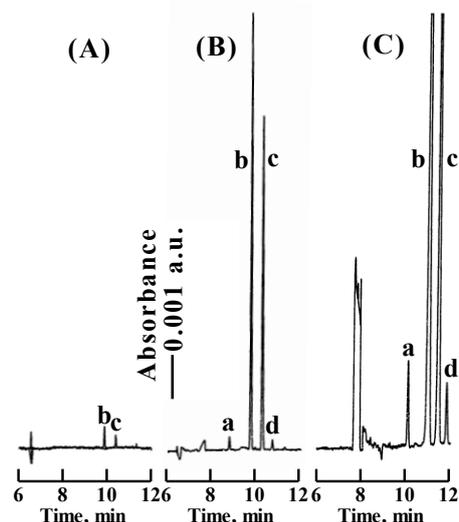
containing 0.5 mg/L PTPB, DPB, MPB, and phenol in acetonitrile was analyzed using hSIM, FASI, and EKI applying 15 kV with the sample inlet side as the anode. The voltage (1-5 kV with the sample inlet side as the cathode) and period (1-5 s) for sample introduction were investigated using hSIM. Effects of injection period (1-3 s) of water plug, voltage (3-6 kV) and period (3-7 s) for sample introduction on sensitivity and reproducibility were examined using FASI. In addition, the sample solutions prepared with mixtures of acetonitrile (1-100%) and water were analyzed using FASI.

### Results and discussion

The highest peaks for the analytes were obtained using hSIM (4 kV for 4 s). When the injection period of water plug was 2 s for FASI, the reproducibility was better than that for 1 and 3 s: the relative standard deviations (RSDs) of peak height were obtained, respectively, for PTPB, DPB, MPB, and phenol, as 3.4-11%, and for migration time 0.64-1.1%. The peak height for PTPB, DPB, MPB, and phenol were 0.76, 0.48, 2.8, and 3.2 times compared with that for 1 s. When the sample was injected with -4 kV for 6 s, the sensitivity and reproducibility were better than those for other conditions: the RSDs of peak height were obtained, respectively, for PTPB, DPB, MPB, and phenol, as 4.4-15%, and for migration time 0.13-0.14%. When the sample solutions were prepared using 100% acetonitrile, the highest peak heights were obtained. The RSDs of peak height were obtained, respectively, for PTPB, DPB, MPB, and phenol, as 5.7-15%, and for migration time 0.19-0.40%. Peak height results for PTPB, DPB, MPB, and phenol using hSIM (-4 kV, 4 s) were 1.6, 1.6, 4.4, and 4.2 times higher than those using FASI (1 s injection of water plug, -4 kV, 4 s), respectively. Peak heights for PTPB and DPB using FASI were 34 and 41 times higher than those using EKI, respectively (MPB and phenol were not detected with EKI). The results are illustrated in Fig. 1. The novel hSIM is simple and useful for improving the CZE sensitivity for PTPB, DPB, MPB, and phenol.

### References

1. K. Fukushi, Y. Yakushiji, H. Okamura, Y. Hashimoto, K. Saito. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 2187 (2010).
2. Y. Yakushiji, K. Fukushi, H. Okamura, Y. Hashimoto, K. Saito. in *the Abstracts of the 58th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 97 (2009).
3. K. Netnapit, K. Fukushi, K. Saito, T. Hirokawa, in *the Abstracts of the 59th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 333 (2010).



**Fig. 1** Electropherograms of a mixture of 0.5 mg/L PTPB, DPB, MPB, and phenol. (A)EKI (4 kV, 4 s). (B)FASI (1 s injection of water plug, 4 kV, 4 s). (C)hSIM (4 kV, 4 s). Identification of peaks: a, phenol; b, PTPB; c, DPB; d, MPB. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{tot}=72$  cm,  $L_{det}=50$  cm, 75  $\mu$ m I.D.  $\times$  375  $\mu$ m O.D.; BGE, 20mM sodium tetraborate adjusted to pH 9.8 with 1M NaOH; voltage, 15 kV with the sample inlet side as the anode; wavelength for detection, 200 nm.

# LVSEP 法によるマイクロスケール電気泳動の高感度化 (2)

川井 隆之, 木南 冴子, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二  
京大院工

## Highly Sensitive Microscale Electrophoresis Using Large-volume Sample Stacking with Electroosmotic Flow Pump. 2

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

### Abstract

Online preconcentration techniques, which have improved the low sensitivity of microscale electrophoresis, often reduce the effective separation length so that the high separation performance is sacrificed. On the other hand, large-volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP) provides both the high sensitivity and high resolution with a simple experimental procedure. However, the applicability has been limited to the analysis of anionic compounds in zone electrophoresis. In this study, we combined cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis with LVSEP to realize chiral separation. As a result, the enantioseparation of anionic warfarin was achieved with a 1000-fold sensitivity increase and with no loss of resolution. We also modified the capillary coating procedure by using the mixture of poly(vinyl alcohol) and poly(allylamine) for the analysis of cationic compounds by LVSEP. As a result, the cationic promethazine and chlorpheniramine were well separated with up to 110-fold sensitivity enhancement under the LVSEP condition.

### 【緒言】

マイクロスケール電気泳動の低い濃度感度を改善するために様々なオンライン試料濃縮法が開発されてきたが、一般的に試料の大量導入にともなって有効分離長が減少するため、高感度化のために分離能が犠牲になるという問題点があった。一方、オンライン試料濃縮法の一つである large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP) 法 [1,2] は、操作が簡便である、有効分離長がほとんど減少しないなどの優れた特徴を有する。本研究ではアニオン性試料のゾーン電気泳動分析に限定されていた LVSEP 法の適用範囲を拡張することを目標とし、シクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動 (CDCZE) との結合による光学異性体分析およびキャピラリー修飾法の改良による LVSEP カチオン分析を試みた。

### 【実験】

キャピラリーには全長 40 cm, 有効長 30 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーを用い、電気浸透流 (EOF) を抑制するために、LVSEP-CDCZE 分析では poly(vinyl alcohol) (PVA) を、LVSEP カチオン分析では PVA と poly(allylamine) (PAA) の混合ポリマーをそれぞれ用いて内面修飾を行った。泳動液 (BGS) および試料として、LVSEP-CDCZE 分析では 10 mM 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) / 50 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) および warfarin を、

LVSEP カチオン分析では 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) および chlorpheniramine, promethazine をそれぞれ用いた。分析装置には P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を用い、脱イオン水で希釈した試料溶液をキャピラリー全体に注入して -20 kV の電圧を印加し、UV 吸収 (検出波長 200 nm) によって検出を行った。

### 【結果と考察】

LVSEP 法では、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 (Figs. 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、BGS に応じてキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE), CDCZE などによる分離が行われる (Fig. 1e)。

LVSEP の分離モードを拡張するため、BGS にキラルセクターとして DM- $\beta$ -CD を添加した LVSEP-CDCZE により warfarin の分析を行ったところ、従来の CDCZE と比較して 1000 倍の高感度化が達成された (Fig. 2)。検出時間の RSD および分離度は、従来法では 1.6%, 2.5 であったのに対し、LVSEP-CDCZE では 2.0%, 2.6 となり、CZE 以外の分離モードでも再現性および分離性能を維持しつつ効率的な高感度化が可能であることが示された。

また、LVSEP カチオン分析を行うため、キャピラリー内面修飾法の検討を行った。LVSEP カチオン分析を実現するためには弱く正に帯電した内面修飾が必要であり、本研究では中性の PVA およびカチオン性の PAA の混合ポリマーを用い、その混合比を変えることで表面状態の最適化を図った。4.75% PVA と 0.25% PAA の混合ポリマーを用いて従来の PVA 修飾法と同様の手順でキャピラリーの修飾を行ったところ、BGS を脱イオン水とすると  $\mu_{\text{EOF}} = -4.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  と速い陽極向きの EOF が発生し、pH 3.0~7.0 のリン酸塩緩衝液を用いると  $\mu_{\text{EOF}} > -0.17 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  となり EOF は抑制された。このキャピラリーを用いてカチオン性の promethazine および chlorpheniramine の LVSEP 分析を行ったところ、良好な分離および 110 倍の高感度化が達成された。

### 【参考文献】

- [1] He et al. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 995-1001.
- [2] Kawai et al. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 6504-6511.

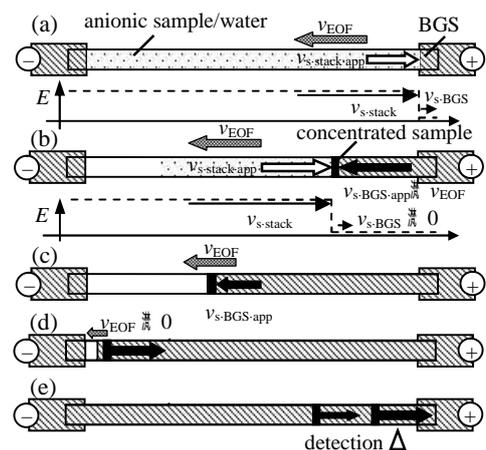


Fig. 1. Schematic diagram of LVSEP. (a) sample injection and voltage application, (b) sample enrichment, (c) analytes moving toward the cathode, (d) EOF suppression and beginning of separation, (e) separation and detection.

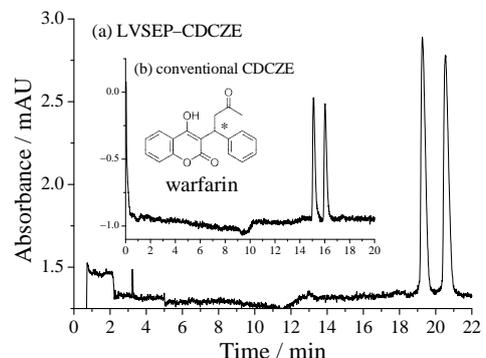


Fig. 2. Enantioseparation of warfarin by (a) conventional CDCZE and (b) LVSEP-CDCZE. Sample concentration, (a) 50 ppm, (b) 100 ppb.

# **Monolithic Anion Exchange Column for Chromatographic Separation of Double Strand DNA Fragments**

A. Sabarudin, R. Endo, Y. Takasaki, S. Shu, T. Umemura  
Division of Nano-materials Science, EcoTopia Science Institute,  
Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603

Monolithic materials have rapidly developed during the last decade and nowadays hold an impressively strong position in separation science as well as in other areas of chemistry. Monolithic columns possess a bimodal pore structure consisting of macropores and mesopores. Macropores form a dense network of pores while the mesopores form the fine porous structure of the column. Briefly, major features of monolithic columns arise from this mesopore/macropore structure. Fast separations are possible due to the low-pressure drop across the column, allowing higher flow rates and thereby reducing the separation time, while high-efficiency can be achieved due to the small-sized skeletons, providing sufficient surface area for the separation, and to the large-sized through-pores, providing fast mass transfer kinetics and high binding capacity. The organic polymer monoliths provide the advantage of facile synthesis and modification, which facilitate great potential in chromatographic separations with several mechanisms i.e ion-exchange, affinity, hydrophilic interaction, hydrophobic interaction, etc.

In this presentation, an anion exchange monolithic column was prepared. The polymer-based monolithic support was synthesized by in situ copolymerization using glycidyl methacrylate (GMA) as monomer, ethylene dimethacrylate (EDMA) as crosslinking reagent, and a mixture of 1-propanol, 1,4-butanediol, and water as porogen solvents. The monolith was subsequently converted into weak anion-exchanger via reaction with diethyl amine through the ring-opening of epoxide. The dynamic binding capacity for BSA was 10.72 mg/mL at 10% breakthrough (column: 1 mm i.d x 100 mm length). The pore-size distribution of this monolithic column was determined by inverse-size exclusion chromatography (ISEC). To optimize the separation efficiency, the effects of various chromatographic parameters upon the resolution of the DNA samples were investigated.

The resulting monolithic anion exchanger demonstrated a very good potential for the separation of double strand DNA fragments using HPLC by applying a Tris-HCl buffer (20 mM, pH 9) and NaCl (1 M) as a gradient former. The fragments of 20 bp DNA ladder (13 fragments), and 100 bp DNA ladder (11 fragments) were successfully resolved. Further application showed that 19 fragments of of pBR322-HaeIII digest could be separated.

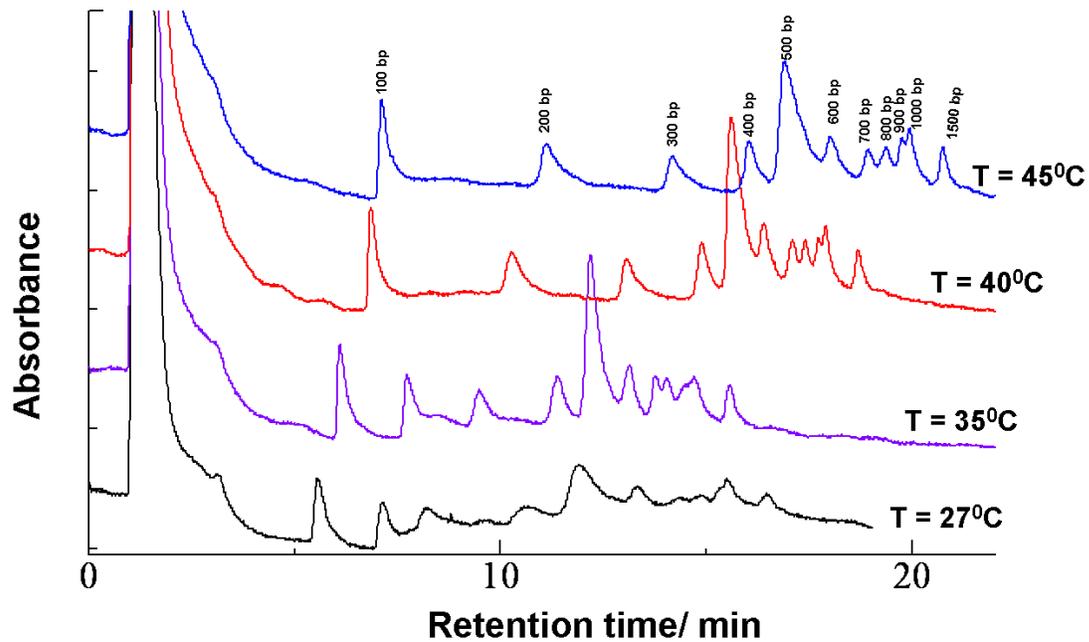


Fig 1. Separation of 100 bp DNA ladder fragments  
Mobile phase A: 20 mM Tris-HCl pH 9, mobile phase B: A+1M NaCl, flow rate: 0.05 mL/min, wavelength: 260 nm, injected sample: 1  $\mu$ L

# 動的光散乱法による分離媒体の構造解析に基づいた絡み合い効果の考察：キャピラリー電気泳動における高分子溶液の網目サイズの効果

○眞弓皓一<sup>1</sup>，住友慶子<sup>2</sup>，横山英明<sup>1</sup>，増田光俊<sup>3</sup>，南川博之<sup>3</sup>，清水敏美<sup>3</sup>，山口佳則<sup>4</sup>，伊藤耕三<sup>1</sup>

【東大院新領域<sup>1</sup>，早大 ナノ理工<sup>2</sup>，産総研ナノチューブ応用研セ<sup>3</sup>，阪大フォトニクス融合研究セ<sup>4</sup>】

## Dynamic Light Scattering to Evaluate Mesh Size of Sieving Polymer Solutions: Effect of Mesh Size on DNA Migration in Capillary Electrophoresis

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

<sup>1</sup>Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo,

<sup>2</sup>Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University

<sup>3</sup>Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,

<sup>4</sup>Photonics Advanced Research Center, Osaka University

### Abstract

The physical interpretation of the migration mechanism of DNA in capillary electrophoresis is a still controversial issue because it requires detailed discussion from the viewpoint of polymer physics. We experimentally evaluated the mesh size  $\xi$  of sieving polymer solutions by means of dynamics light scattering (DLS) technique, and studied the relationship between the mesh size  $\xi$  and electrophoretic mobility  $\mu$  of DNA. When the molecular weight of sieving polymer is large, the electrophoretic mobility of DNA is dependent on the mesh size of sieving polymer solution, but independent of the molecular weight of the polymer. The migration of DNA, whose contour length  $L$  is smaller than  $5\xi$ , follows the Ogston model. On the other hand, when  $L$  is larger than  $5\xi$ , the mobility of DNA rapidly decreases with the size of DNA due to the entanglement effect.

### 【はじめに】

高分子溶液を分離媒体に用いたキャピラリー電気泳動は、DNAシーケンサーをはじめとして生体分子の分離分析に広く用いられているが、その泳動原理を物理的に完全に記述することは容易ではない。電気泳動の理論としてよく知られているOgstonモデル[1]とReptationモデル[2]は、あくまで限定された泳動条件のもとで有効なモデルである。Ogstonモデルは分離媒体である高分子溶液の濃度が十分希薄な条件でしか成立しない。また、Reptationモデルは高分子濃度が十分濃厚な領域で、かつ電場強度が弱く自由拡散に近似できる条件でしか成り立たない。

キャピラリー電気泳動における泳動原理の理解を深めるために、我々は分離媒体である高分子溶液の構造解析を動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) によって行い、高分子網目のナノ構造とDNA・タンパク質の泳動挙動の比較を行ってきた[3]。DLSを用いることで高分子溶液の平均網目サイズを実験的に決定することができ、網目サイズが電気泳動移動度に与える影響について定量的な議論が可能になる。本研究では、分離媒体である高分子溶液の網目サイズと分子量がDNAの電気泳動移動度に与える影響について系統的な実験を行い、物理的な考察を行った。

### 【実験】

分離媒体として、分子量 24,000、90,000、250,000、720,000 のヒドロキシエチルセルロース (HEC) 4 種類を準備し、それぞれを 1×SYBR Green I を含む 0.5×TBE 緩衝液に溶解させ、様々な濃度に調整した。本研究で使用した高分子濃度は全て絡み合い濃度以上であり、キャピラリー内部で網目構造を形成している。この HEC 溶液を用いて 20~15,000 bp の二本鎖 DNA (dsDNA) をキャピラリー電気泳動によって分離した。一方、キャピラリー電気泳動で用いた HEC 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を見積もった。

### 【結果及び考察】

DNAの電気泳動移動度 $\mu$ は、DNAの全長 $L$ と網目サイズ $\xi$ の比 $L/\xi$ に大きな影響を受ける。網目サイズ $\xi$ が9 nmの場合におけるDNAの電気泳動移動度を $L/\xi$ に対してプロットした結果をFig. 1に示す。HEC 250kと720kでは電気泳動移動度にほとんど差は見られないが、分子量の低いHEC 90kの場合は両者に比べて移動度が大きくなっている。これは、HECの分子量が低い場合は、DNAが網目を通り抜ける前に、HECの絡み合いがほどけ、網目による拘束が緩まるためと考えられる。一方、HECの分子量が十分高いと、静的な網目が形成されていると見なすことができ、DNAのダイナミクスはHECの分子量にはよらず、網目のサイズのみ支配される。この場合、 $L/\xi$ の値によって、DNA分子量に対して移動度 $\mu$ が緩やかに減衰する領域 ( $1 < L/\xi < 5$ )、移動度 $\mu$ が急激に減衰する領域 ( $5 < L/\xi < 30$ )、移動度 $\mu$ がDNA分子量にほとんどよらない領域 ( $30 < L/\xi$ ) に分類される。上記のような領域が存在することは先行研究からすでに知られていたが、領域間の境界を定める $L/\xi$ の値を実験的に見積もったのは本研究が初めてである。

第一の領域と第二の領域の境界である $L/\xi=5$ の時、DNAの慣性半径 $R_g$ と網目サイズ $\xi$ はほぼ等しくなる。従って、第一の領域におけるDNAの移動度はOgstonモデルによって記述され、第二の領域ではDNAとHECの絡み合い効果が泳動挙動を支配していると考えられる。絡み合った高分子のダイナミクスを記述するReptationモデルでは、電気泳動移動度はDNAの分子量 $M$ に対して $\mu \propto M^1$ となるが、Fig.1に示したように、第二の領域における移動度のDNA分子量依存性はReptationモデルの予測よりも弱く $\mu \propto M^{0.4}$ であった。Reptation理論から逸脱する理由としては、DNAを拘束している網目がゆらいでいることによる影響や、強い電場 (100 V/cm) によって泳動されるためにDNAが泳動方向に歪んだ形態をとっていることなどが考えられる。当日は、他の網目サイズでの解析結果を合わせて議論し、3つの領域のダイナミクスに対する網目サイズの効果についても報告する予定である。

【謝辞】 本研究は、(独)科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 発展研究(SORST)により実施いたしました。関係者各位に感謝いたします。

### 【文献】

1. Slater, G. W.; Kenward, M.; McCormick, L. C.; Gauthier, M. G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 58–64.
2. Sartori, A.; Barbier V.; Viovy J. L. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 421–440.
3. Sumitomo, K.; Mayumi, K.; Yokoyama, H.; Sakai, Y.; Minamikawa, H.; Masuda, M.; Shimizu, T.; Ito, K.; Yamaguchi, Y. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 3607–3612.

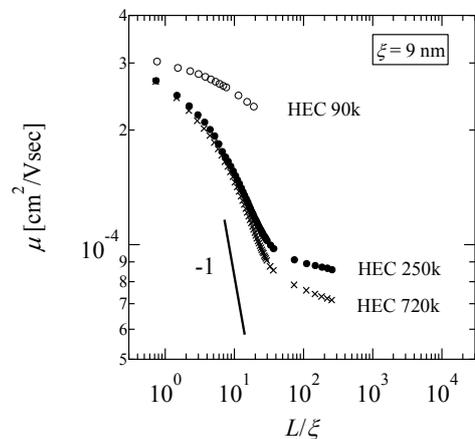


Fig.1 Plot of electrophoretic mobility  $\mu$  of dsDNA as a function of the ratio  $L/\xi$ . Here  $L$  is the contour length of dsDNA and  $\xi$  is the mesh size of the sieving polymer solution.

# PEOを分離媒体としたSDS-キャピラリー電気泳動によるタンパク質分離における緩衝液の選択とその効果

○住友慶子<sup>1,2</sup>, 眞弓皓一<sup>3</sup>, 南川博之<sup>4</sup>, 増田光俊<sup>4</sup>, 清水敏美<sup>4</sup>,  
朝日透<sup>2,5</sup>, 伊藤耕三<sup>3</sup>, 山口佳則<sup>2,6</sup>

【早大・ナノ理工<sup>1</sup>, 早大・科健機構<sup>2</sup>, 東大・新領域<sup>3</sup>, 産総研・ナノチューブ応用研セ<sup>4</sup>,  
早大・理工<sup>5</sup>, 阪大・フォトンクス融合研究セ<sup>6</sup>】

## Buffers for Protein Separation on SDS-Capillary Polymer Electrophoresis with PEO

Keiko SUMITOMO<sup>\*,1,2</sup>, Koichi MAYUMI<sup>3</sup>, Hiroyuki MINAMIKAWA<sup>4</sup>, Mitsutoshi MASUDA<sup>4</sup>,  
Toshimi SHIMIZU<sup>4</sup>, Toru ASAHI<sup>2,5</sup>, Kohzo ITO<sup>3</sup>, Yoshinori YAMAGUCHI<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup> Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University, <sup>2</sup> ASMeW, Waseda University

<sup>3</sup> Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, <sup>4</sup> Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <sup>5</sup> School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, <sup>6</sup> Photonics Advanced Research Center, Osaka University

**Abstract** Although polyethylene oxide (PEO) offers several advantages as a sieving polymer in SDS capillary polymer electrophoresis (SDS-CPE), solution properties of PEO cause deterioration in the electrophoresis because PEO in solution aggregates itself, degrades into smaller pieces, and forms polymer-micelle complexes with SDS. We examined protein separation on SDS-CPE with PEO as a sieving matrix in four buffer solutions: Tris-CHES, Tris-Gly, Tris-Tricine, and Tris-HCl buffers. And the solution properties of PEO as a sieving matrix in those buffers were examined by dynamic light scattering (DLS) and by surface tension. In Tris-CHES buffer, substantial adsorption of SDS to PEO competed with protein-SDS complexation and impairs the protein separation efficiency on the electrophoresis. On the other hand, the Tris-CHES buffer prevented SDS from adsorbing onto the PEO. Tris-CHES buffer only achieved baseline separation.

【緒言】 ポリエチレンオキサイド(PEO)は、キャピラリー内壁のシラノール基と相互作用し、物理的に吸着することで電気浸透流の発生を抑制し、さらに、キャピラリー内壁へのタンパク質吸着を防ぐことから、SDS-キャピラリー電気泳動によるタンパク質分離における分離媒体として広く利用されている。一方、PEOは、水分子を介した水素結合により凝集体を形成すること、光や酸素により容易に低分子化すること、多量のSDSが吸着することが報告されており、これらは分離性能低下の一因となる。分離性能を低下させるPEOの性質は、溶液の組成、イオン強度、pHに依存しており、PEOを分離媒体とした場合、緩衝液の選択が重要となる。しかしこれまで、緩衝液の最適化、緩衝液中でのPEOの構造に着目した議論はされてこなかった。

我々は、PEOを分離媒体とした電気泳動で広く利用されているTris-CHESを含む、4種類のトリス緩衝液を利用しタンパク質の分離を行った。さらに、動的散乱により、各緩衝液中でのPEOが形成する網目サイズ、凝集体の形成を評価し、表面張力により、SDSのPEOへの吸着挙動を測定した。これより、各緩衝液中でのPEOの網目サイズは同じであるにも

かかわらずタンパク質分離性能は大きく変化し、高分離が達成される緩衝液中では、SDS吸着が抑制されていることを明らかにした。

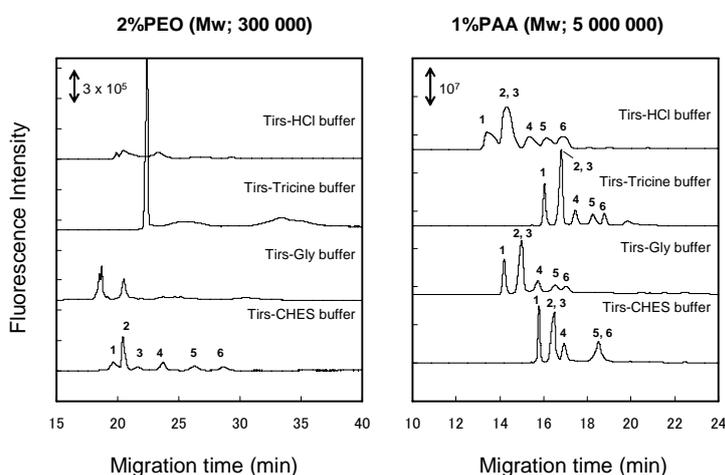
**【実験】** 泳動液として、0.1% SDSを含む100 mM Tris-CHES pH 8.6 (Tris-CHES buffer)、75 mM Tris-Gly pH 8.3 (Tris-Gly buffer)、100 mM Tris-Tricine pH 8.3 (Tris-Tricine buffer)、100 mM Tris-HCl pH 8.6 (Tris-HCl buffer)を調整した。各緩衝液に溶解した2% PEO(分子量300,000)を分離媒体とし、FICTで蛍光標識された6種類のタンパク質を分離した。各PEO溶液は、動的光散乱により、網目サイズを測定し、凝集体形成、分子鎖の切断の有無を評価した。PEOへのSDS吸着挙動は、Tris-CHES bufferとTris-Gly bufferにおいて、SDS濃度を0 mMから100 mM(2.9%)まで変化させたときの表面張力の変化から評価した。凝集体の形成や分子鎖の切断が起こりにくく、SDSが吸着しないポリアクリルアミド(PAA: 濃度1%、分子量5,000,000)についても同様に実験を行い、PEOの結果と比較した。

**【結果と考察】** PEOを分離媒体としたタンパク質分離では、4種類のトリス緩衝液の内、Tris-CHES bufferの場合のみ、6種類のタンパク質全てのベースライン分離が達成され、他の緩衝液ではタンパク質は分離されなかった (Fig. 1)。一方、PAAでは、緩衝液の違いによる分離性能の差は小さい。

分離性能を大きく左右する因子として、PEOの網目サイズの変化が考えられるが、各緩衝液での網目サイズは5

nmまたは7 nmであり、その差は僅かであった。またPEOの切断は観測されず、理論段数を低下させる凝集体の形成は、Tris-CHES buffer中でのみ観察されたが、この緩衝液ではベースライン分離が達成されていた。次に、SDSの吸着挙動を調べたところ、Tris-Gly bufferでは、PEOへのSDS吸着が観察され、ベースライン分離が達成されたPAAやTris-CHES buffer中のPEOでは、SDSの吸着は観察されなかった。以上より、PEOを分離媒体とした場合、SDSの吸着が分離低下の主な要因であり、PEOを分離媒体としたタンパク質の高分離では、SDS吸着を抑制する必要があることが明らかとなった。

**【謝辞】** 本研究は、(独)科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業(SORST)により実施いたしました。関係者各位に感謝いたします。



**Fig. 1.** Separation of proteins with 2% PEO and 1% PAA in four buffer solutions. The peaks were characterized as follows: 1. lysozyme (14 200 Da), 2. trypsin inhibitor (20 100 Da), 3. carbonic anhydrase II (29 000 Da), 4. ovalbumin (45 000 Da), 5. bovin serum albumin (66 000 Da), 6. phospholipase b (97 200 Da).

# 基材表面へのアルキル鎖の導入を利用したリン脂質自己組織化膜の構築とその応用

○近藤伸一<sup>1</sup>、笹井泰志<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬大

## Fabrication of self-assembled phospholipid layer on the material surface introducing grafted alkyl-chain and its application

Shin-ichi Kondo\*<sup>1</sup>, Yasushi Sasai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Gifu Pharmaceutical University*

### Abstract

We have developed a novel fabrication of self-assembled phospholipids layer on a hydrophobic polymer by the plasma-assisted method. The stability of self-assembled phospholipids layer depended on the density and the length of grafted alkyl groups. To immobilize proteins onto the surface of self-assembled phospholipids layer, stearic acid (SA) was introduced into the self-assembled phospholipids layer as a scaffold to immobilize proteins. The model protein, albumin, was conjugated with the introduced SA by condensation reaction. It was clarified that the self-assembled phospholipids layer possessed fluidity. Cytochrome C antibody was also immobilized on self-assembled phospholipids layer. The activity of immobilized antibody on self-assembled phospholipids layer was higher than that of antibody directly immobilized on LDPE-VEMAC.

高分子は、成型加工性に優れ、安価であり、また焼却処分可能であることなどから、医療用材料をはじめとして、様々な分野において利用されている。一方、高分子は優れた力学的あるいは光学的特性を持つものの、生体分子などの固定化の観点からは、多くの場合固定化に有用な官能基が無い場合、表面処理などによる官能基導入が不可欠である。しかしながら、プラズマ表面処理をはじめとする表面改質法において導入した表面官能基は経時的に脱離するなどの表面劣化の問題があり、長期にわたり安定な表面官能基導入法の開発が望まれている。

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行ってきており、その研究過程においてプラズマ架橋性である疎水性高分子基盤表面（低密度ポリエチレン（LDPE）など）に親水性高分子前駆体であるビニルメチルエーテル-無水マレイン酸共重合体（VEMA）を収着させた後、高分子基材のプラズマ表面架橋反応により VEMA を固定化し、引き続き酸無水物部位を加水分解しカルボキシル基にすることにより、持続性ある高耐久性親水性表面の構築（LDPE-VEMAC）に成功している。<sup>1,2)</sup>さらに、上述の方法により構築した高耐久性親水性表面に短鎖のアルキル鎖を導入（LDPE-HE）した後、リン脂質の懸濁液に浸

漬することによる高分子基材表面へのリン脂質自己組織化膜の構築が可能であることを見出した (図 1)。<sup>3,4)</sup>ここでは、本方法により構築したリン脂質自己組織化膜の特性およびその表面への生体分子固定化について紹介する。

本研究では、フォスファチジルコリン (PC) をリン脂質として用い自己組織化膜の調製を行った。本方法により得られるリン脂質自己組織化膜の安定性には、高分子基材上に導入したアルキル鎖が重要な役割を果たすと考えられる。そこで、アルキル鎖の導入率及びアルキル鎖長について種々検討を行った。その結果、本実験範囲内においては、アルキル鎖の導入率の増加に伴いリン脂質自己組織化膜の熱安定性は増大し、また、アルキル鎖長に関しては炭素数が 6 以上のアルキル鎖を導入すれば 80°C までは検出範囲内においてリン脂質の脱離の無い安定な膜が得られることが明らかとなった。

PC は生体分子固定化が可能な官能基を持たないため、本リン脂質自己組織化膜に直接生体分子を固定化するのは困難である。そこで、脂肪酸をリン脂質自己組織化膜内に導入し、生体分子を固定化する足場とした。脂肪酸としては、生体膜の構成成分でもあるステアリン酸 (StA) を用いた。モデルタンパク質としてアルブミンを用い、StA を導入したリン脂質自己組織化膜上への固定化を行い、Bradford 法によりアルブミン固定化量を評価した。アルブミン固定化量は、自己組織化膜中の StA 量に依存して増加するものの、定常化する傾向が示された。固定化したアルブミンの一部について蛍光標識を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、明確な蛍光を観測すると共に、本研究において構築した自己組織化膜は流動性を有することを明らかにした。

かかる知見を基に、モデル抗体として cytochrome C 抗体をリン脂質膜上に固定化し、ELISA 法によりその抗体活性を評価した。比較として、LDPE-VEMAC に直接固定化したものについても検討を行った。その結果、同程度の固定化量ではあるものの、明らかにリン脂質自己組織化膜上に固定した方が活性が高く、生体分子固定化基材として有用であることが示唆された。

## 文献

1. S. Kondo, T. Sawa, M. Kuzuya, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **16**, 71 (2003); S. Kondo, Y. Sasai, M. Kuzuya, *Thin Solid Films*, **515**, 4136 (2007).
2. S. Kondo, Y. Sasai, Y. Yamauchi, M. Kuzuya, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **22**, 477 (2009); S. Kondo, Y. Sasai, Y. Yamauchi, M. Kuzuya, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **23**, 567 (2010).

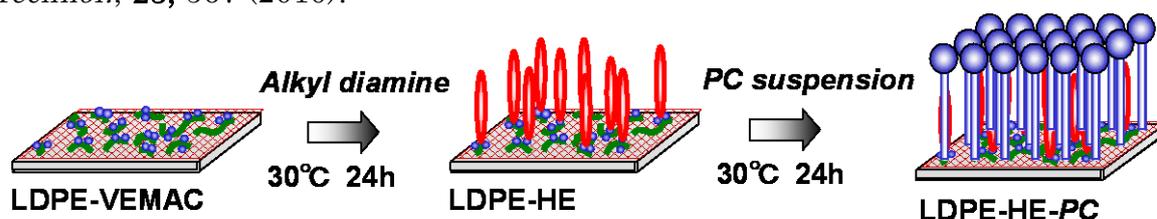


図 1 高分子基板上へのリン脂質自己組織化膜の構築法

# キャピラリー電気泳動へのあゆみ

高木俊夫  
(大阪大学名誉教授)

## Short History of Electrophoresis leading Up To the Use of Capillary

Toshio TAKAGI

*Osaka University, Emeritus Professor*

### Abstract

One of the most important motivations of the development of electrophoresis techniques was the struggle against GRAVITY that might be said in other word CONVECTION. Convection was first suppressed by the use of U-tubes that enabled the allocation of the solvent upon a solution. TISELIUS APPARATUS with a square cell section operated at 4 °C was the terminal of such an approach. Inability of real separation by BOUNDARY SEPARATION led to the various approaches using glass or silica tubes. Prominent success was attained by Hjertén using a rotating tube eliminating the effect of GRAVITY. This was a milestone demonstrating the ability of electrophoresis in separation of various materials independent of their molecular weights. Efforts were continued towards the use of straight tubes with narrower diameters, and were finally paid off by the use of flexible coated capillary tube developed in the field of information technology.

### 1 はじめに

限られた時間で電気泳動の歴史を語るのために、その一つの切り口に着目することにした。それは重力であり、もう少し身近な用語を用いるなら、対流で置き換えることもできよう。

### 2 U字管電気泳動

電気泳動では、基本的には、溶液を溶媒で挟む必要がある。試料溶液に、電極を突っ込むことは、そこで起こる電気化学反応を考えたら、避けたいのが自然である。従って、真っ直ぐな管で電気泳動を行うことは、普通には考えられない。結局、使えるのは U 字管ということになった。試料溶液は、先記の条件を守るためには、下部の屈曲部を抜け出せない。結局、可能なのは、U 字管の下半分ほどに溶液を満たし、上部双方に溶媒を置き、適当に隔離された電極に接続し、境界分離を観察する方式を取らざるを得なかった。

したがって、最初の時期、電気泳動はもっぱら、U 字管を用いて行われた。この形式への依存と固執は顕著であった。他に選択肢があることは判っていたが、当時、それらの道は、一段と険しかった。

また、電気泳動に関心を持ったのが、超遠心分析の創始者、Svedberg に源流を持つ、物理化学の研究者達であったことも、無視できない。正体の分からぬゲルなどより、整ったがっしりした電気泳動機器を完成したいという思いが強かったのであろう。U字管電気泳動は Tiselius のグループによって完成の域に達し、普及もした。セルの形状は角ばったものとなり、断面は長方形になり、対流が起こりにくい 4 °C が選ばれた。血液製剤企業は長らく、製品の検定に、Tiselius の装置を使用することが、義務づけられた。

濃度勾配の距離微分に比例する変位を与えるシュリーレン光学系が採用された。その結果、血清について良好な分析が行えるようになり、そこには、複数のタンパク質が存在することが判り、以後の各種の方法によるタンパク質分析の先駆けとなった。

この装置によって得られた最大の成果の一つは、Pauling らにより、鎌状赤血球症の原因が、電気泳動のパターンのレベルで解明され、それが E → V の一アミノ酸置換にもとづく、分子病であることが、明らかにされたことであろう。

### 3 U字管から直管へ

U字管電気泳動の根本的な欠陥、それは境界分離に止まり、層状分離ができないことであった。現在までに考えられ、模索された方式は以下であった：1) 回転による重力の影響の回避；2) 狭い空間の利用；3) 無重力環境の利用。

画期的な進歩は、Tiselius の弟子の Hjertén によってなされた。内径 3mm のシリカ製円筒管を回転させ、その中で電気泳動による分離が行われた。管の全域を走査することにより、分離の状況が観察された。この方法で、試料のサイズに関わりなく、電気泳動分析が可能になった。これは、円筒管を用い、対流の発生を避けて、高分解能を達成したという意味で、キャピラリー電気泳動の先駆けとなったと云えよう。残念ながら、精緻を極めた同装置は、全く普及しなかった。

Hjertén は、回転方式に見切りをつけ、より狭い直管を用い、恒温下で電気泳動を行う努力を続けた。しかし、彼は、情報工学分野で、光学的担送体として、“屈曲性に富んだ中空シリカキャピラリー”が開発されている事に、気付かなかった。今日の方式のキャピラリー電気泳動の扉の直前まで、彼は到達していたのであった。

上記の三つの方式の中で、もっとも騒ぎ立てられたのは、宇宙空間での電気泳動ではなかったろうか。巨額の研究費を投じながら、これほど成果の乏しかった研究も珍しかった。電極に発生した泡が浮かび上がらなかったから、電気泳動が上手く実施できなかったなど、実験するまでもなく想像できたことではなかろうか。

### 4 おわりに

どのように電気泳動が展開してきたかを、“対流の抑制”という切り口でもって、振り返ってみた。キャピラリー電気泳動は、幾つかの分流の中での素晴らしい“結実”であろう。その支流の一つ、“チップ電気泳動”、の進展も著しい。しかし、一つの分析技術が成熟期に到達した段階で、それに向き合うことになった若い人達は、なかなか大変であると思われる。一つの選択肢、それは、分析技術としてのキャピラリー電気泳動を、一見するだけでは無関

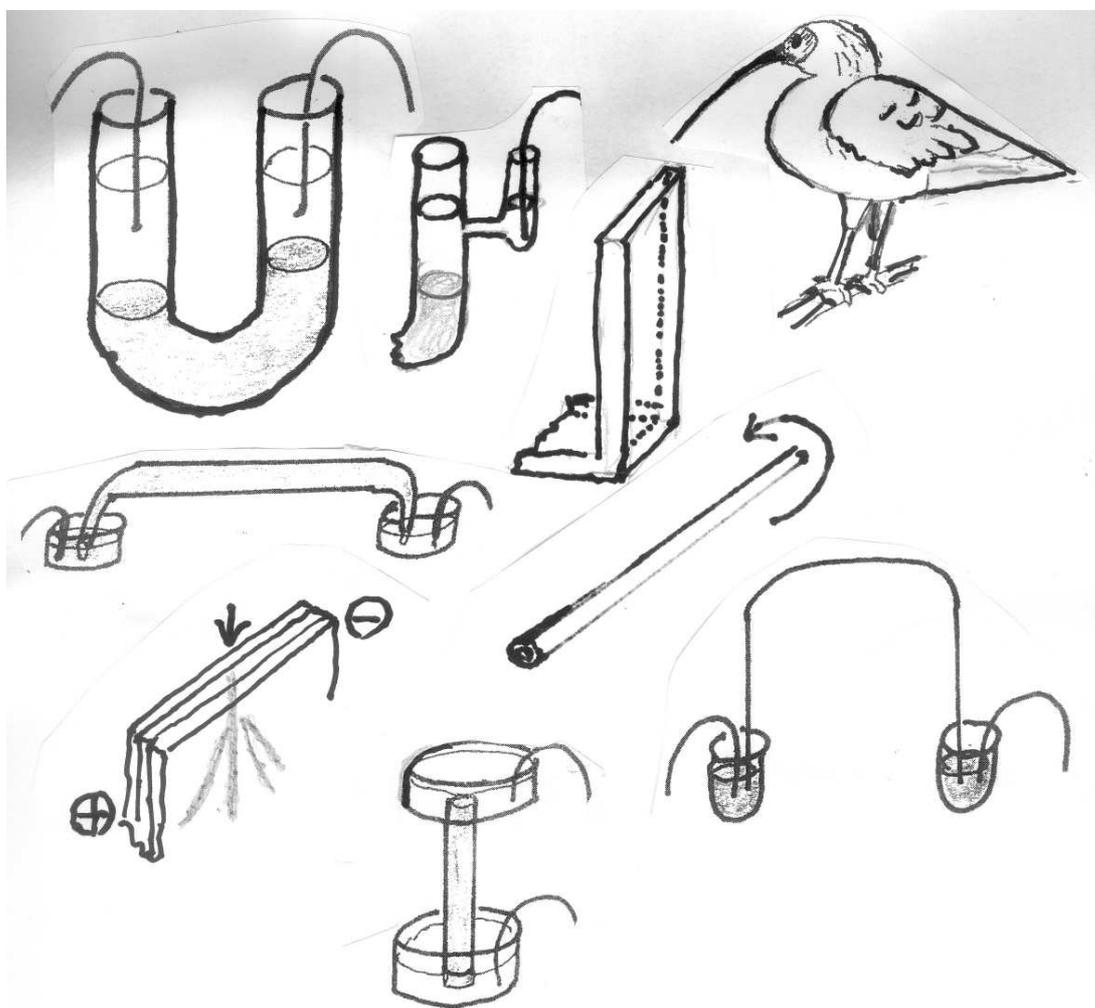
係な分野と結びつけることができる能力を持つことであろう。

私は、界面活性剤を扱っていたことがありますから、それらのミセルの可溶化力が、対象物質の親水性・疎水性の比率、HLB (Hydrophilic-Lipophylic Balance) に依存することは、熟知していました。しかし、当時、新興のキャピラリー電気泳動と HLB を、結びつけて考えることは、出来ませんでした。その意味で、次ぎに話される寺部先生の話の内容が、若い研究者の皆さんを、勇気づけるものであると信じています。

以上の内容は、下記の文献から、拾い出した。

## 文献

高木俊夫、「電気泳動の歴史」(バイオサイエンス最前線'97 増刊号)、アトー(株)、1997



## 電気泳動

色々、ありました (ほんの一部だけ)」

# キャピラリー電気泳動研究を顧みて

寺部 茂

兵庫県立大名誉

## My Research on Capillary Electrophoresis in Retrospect

Shigeru TERABE

*University of Hyogo, Emeritus Professor*

A history of capillary electrophoresis (CE) is briefly reviewed from the viewpoint of the author's research history on CE. The author's study on CE started in 1982 at Kyoto University and ended in 2006 at University of Hyogo. Their researches were mainly concerned about micellar electrokinetic chromatography (MEKC). MEKC is the most successful in separating small molecules and several techniques have been developed to strengthen the method. Major targets of the present CE studies are biopolymers, such as DNA, proteins and oligosaccharides. The future prospects of CE researches are going to be discussed based on the author's personal viewpoints.

### 1. はじめに

内径が 50 $\mu\text{m}$  程度のキャピラリー内で行うキャピラリー電気泳動(CE)が始まる前に、CEにつながる研究がいくつか発表されていた<sup>1-3)</sup>。CE研究に大きな影響を与えたのは Jorgenson らの 1981 年の報告<sup>4)</sup>であった。日本ではその頃細管式等速電気泳動(イソタコ)が使われるようになり本会の前身である細管式等速電気泳動シンポジウムが 1981 年から始まっている<sup>5)</sup>。一方、クロマトグラフィー分野では当時名大工学部の石井大道教授のグループが開発したマイクロ LC が注目を集めていた。このように当時の日本では CE 研究を始めるのに好都合な条件がそろっていた。事実、津田らは 1982 年に CE に関する研究を発表している<sup>6)</sup>。市販の CE 装置が発表されたのは 1988 年になってからである。

### 2. CE 研究初期

CE は当初従来のゲル電気泳動に替わるタンパク質等の生体高分子の分離に使えると期待された。直ちに問題となったのは、タンパク質のガラスへの非特異吸着であった。CE の低い濃度感度および再現性の悪さも指摘されたが、将来の発展の可能性に期待して多くの研究者が CE 研究に参加し始めた。CE に関する国際会議も、以前から存在したクロマトグラフィー関係の会議の他に、日本では上述の細管式等速電気泳動シンポジウムが 1990 年からキャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE) に発展した。ヨーロッパではオランダや東欧の研究者が中心になった等速電気泳動国際シンポジウム(ITP シリーズ)が 1988 年から CE を加えたシンポジウム名に変更し今日まで続いている。1989 年には高性能キャピラリー電気泳動国際シンポジウム (HPCE シリーズ) も始まった。HPCE は 2005 年から MSB シリーズに変わった。アジアでは APCE シリ

ーズが 1996 年から始まった。

演者は当時京大工学部工業化学科で分離分析の研究を行っていた。1981 年の Jorgenson らの最初の報告を見て直ちに CE 研究に取りかかりたかったが、研究資金難で初めての結果が得られたのは 1982 年 8 月になってからであった。Jorgenson の初めての報告を見たときに中川俊夫先生の提言<sup>7)</sup>が頭にあり CE で最初に取りかかる課題はミセルを使った分離と決めていたので、後にミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) と名づけた方法を試し期待以上の結果が得られた。MEKC の基礎特性についての論文<sup>8,9)</sup>が発表できたのは 1984 年になったからであった。MEKC は中性分子の分離が可能であり、クロマトグラフィーの原理に基づいているので多くの分離化学者には馴染みやすい方法であった。

### 3. CE 研究の展開期

CE によるタンパク質の分離では非特異吸着を防ぐ種々の方法が開発されたが、特筆すべき成果はあがっていない。一方、ヒトゲノム解析計画に関連し DNA 塩基配列決定法にキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) が有望となり、短期間にマルチキャピラリーを用いる DNA シークエンサーが開発され、ヒトゲノム解析計画の期間短縮に大きく貢献した。CE を医薬品、とくに生体マトリックス中の薬品分析に利用する研究も大きく発展した。キラル化合物の分離では容易に分離条件が探索できる利点があり多くの研究が行われた。キラル分離のために多数のシクロデキストリン (CD) 誘導体が開発された。検出では UV 吸光検出とレーザー励起蛍光 (LIF) とが主な方法で、質量分析計 (MS) がエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法をインタフェースとして利用可能となった。LIF を除いては濃度感度が低く、改善策として各種オンライン試料濃縮法が開発された。過渡的等速電気泳動 (tITP) と電場増強スタッキング法が主な方法であった。これにより 3 桁以上の感動向上が可能な場合も多く報告されるようになった。

MEKC 研究では MEKC 特有の課題として、疎水性の高い化合物の分離、移動時間範囲の拡大、MS 検出、オンライン試料濃縮があった。前 2 者は比較的容易に解決できたが、後の二つは難題であった。オンライン試料濃縮に関しては当時大学院生の Quirino が頑張って各種方法を開発してくれた。中でもスウィーピング<sup>10)</sup>と命名した方法は中性化合物の濃縮可能な優れた方法であり広く利用されるようになった。MS 検出は可能とはなったが、容易に使える方法までには至っていない。

### 4. CE 研究の成熟期

2000 年代後半になると CE 研究は成熟期に達し、応用研究センターとなった。タンパク質やオリゴ糖等の生体高分子分離に関する CE 研究は活発であり、確実に進歩している。マイクロチップ電気泳動 (MCE) は 2000 年代になって盛んになり、マイクロチップを用いる分離技術の主要な要素となっている。CE を超微量分析法としてシングルセル分析に利用する研究は活発であり、今後ますます発展すると期待される。市販 CE 装置の開発は低調となった。HPLC が装置、カラムとも優れた製品が多数市販され、分離性能、検出感度、再現性などが向上し CE の利点が相対的に低下したのが大きな理由と考えられる。産業界に於いて CE があまり広く利用されるようにならなかった

ので、機器メーカーも CE 装置の改良に熱が入らないと言う悪循環に陥った。

MEKC 研究に於いても主要な課題はほぼ解決され、応用研究中心となった。MEKC ではトランジェント-トラッピング<sup>11)</sup>とミセル崩壊による試料濃縮(Analyte Focusing by Micelle Collapse, AFMC)<sup>12)</sup>の 2 種の新規オンライン試料濃縮法が開発されたことは特筆に値する。

## 5. CE 研究の将来展開

演者は既に現役を引退して 5 年になろうとしているので、印象だけで言えば CE 研究は 1990 年代初期の頃と比べると活気がなくなっている。研究分野を牽引していける魅力的な研究課題が少なくなっているのが原因と思われる。液相における分離分析では HPLC 全盛となっているが、HPLC と CE と比べてみると CE の方が優れている点が多い。HPLC もマイクロ化に向いているが、エコの要求されるこの時代では CE の方が遙かにエコに相応しい方法である。生体試料分析のように微量試料での分析が必要な場合には CE の方が有利である。問題は濃度感度が低いとか再現性が劣るとかの議論ではなく、優れた装置の開発と研究者の層の厚さであると思われる。すなわち、研究者を強く引きつけることのできる研究課題を提示できれば問題は解決するであろう。そのためには本シンポジウム参加の皆様の奮起を期待します。

## 文献

1. S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.*, **9** 122 (1967).
2. R. Virtanen, P. Kivalo, *Suomen Kemistilehti*, **B42** 182 (1969).
3. F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th.P.E. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **169** 11 (1979).
4. J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53** 1298 (1981).
5. 本多 進, 第 25 回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集, 兵庫県立先端科学支援センター, S-1 (2005.11.15-17).
6. T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, **248** 241 (1982).
7. 中川俊夫, 日本化学会コロイドおよび界面化学部会 *NEWSLETTER*, **6** (No.3) 1 (May 1981).
8. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **56** 111 (1984).
9. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, **57** 834 (1985).
10. J.P. Quirino, S. Terabe, *Science*, **282** 465 (1998).
11. K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, *Anal. Chem.*, **80** 1255 (2008).
12. J. P. Quirino, R. Haddad, *Anal. Chem.*, **80** 6824 (2008).

# トランジェント - トラッピング法による マイクロスケール電気泳動分析の高感度化 (2)

末吉健志, 恋野寛嗣, 田中隆太, 橋場皇太, 北川文彦, 大塚浩二  
京大院工

## Transient Trapping in Microscale Electrophoresis for High Sensitive Detection. 2

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

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

### Abstract

This paper reports an improvement of a concentration sensitivity and resolution in microscale electrophoresis (capillary electrophoresis, CE; microchip electrophoresis, MCE) by transient trapping (tr-trapping). In tr-trapping, both a highly effective preconcentration and separation based on a trap and release mechanisms were demonstrated by a partial injection of a micellar solution plug and a large volume injection of a sample solution. As a result, the sensitive detection of various analytes such as hydrophobic dyes, steroids, amino acids and peptides could be achieved by the application of tr-trapping to CE and MCE. In addition, a highly sensitive enantioseparation could be demonstrated by a combination of tr-trapping with cyclodextrin electrokinetic chromatography.

### 【緒言】

マイクロスケール電気泳動 (キャピラリー電気泳動, CE; マイクロチップ電気泳動, MCE) の低い濃度感度を改善するため, これまでに様々なオンライン試料濃縮法が CE および MCE に適用されてきた。しかしながら, 容易に高感度化を実現可能である反面, 試料の大量導入による有効分離長の減少にともなう分離能の低下が懸念されている。一方, 部分的に注入されたミセル溶液プラグを利用した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) 法は, トラップ機構に基づく高効率な試料濃縮とリリース機構に基づく高い分離能を兼ね備えた手法として注目されている [1]。本研究では, tr-trapping 法によるマイクロスケール電気泳動分析の高感度化に取り組んできた成果について, 光学異性体分析の高感度化を中心として報告する。

### 【実験】

装置として, 全長 40 cm, 有効分離長 30 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーを装填した P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を用いた。ミセル溶液 (M) としては, 25 mM 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) / 20 mM リン酸塩緩衝液を, 泳動液 (BGS) としては硫酸化  $\beta$  シクロデキストリン (S- $\beta$ -CD) / 15 mM リン酸塩緩衝液をそれぞれ用いた。また, 試料溶液 (S) には, 1-アミノインダン (AI) またはクロルフェニラミン (CPA) を BGS に溶解したも

のを用いた。泳動液で満たされたキャピラリーに M プラグを 0.5 psi の圧力で部分的に注入後、試料溶液を 5 kV の電圧印加により注入し、20 kV の分離電圧を印加して tr-trapping 分析を行った。検出は UV 吸収 (検出波長 200 nm) により行った。

### 【結果と考察】

CD を含む BGS で満たされたキャピラリーに M プラグを部分的に注入後 (Figure 1a), 試料を電気的に注入することで、疎水性の高い試料は S/M 界面にトラップされ、濃縮される。このとき、負電荷を有する SDS ミセルの実効泳動移動度が小さいことから、試料の大量導入にともなう有効分離長の減少が圧力注入時と比較して抑制される (Figures 1b and 1c)。一方、部分的に注入された M ゾーンでは、拡散等の影響によるミセル濃度の減少にともない試料の保持が徐々に減少することから、試料が界面から過渡的にリリースされる (Figure 1d)。リリース後、M ゾーンを通過した試料に対して、BGS 中で CDEKC の原理に基づくキラル分離が行われる (Figure 1e)。

以上の原理を検証するために、M プラグを 10 s、試料を 180 s それぞれ注入後、分離電圧を印加して AI と CPA の混合試料の tr-trapping-CDEKC 分析を行った結果 (Figure 2b)、従来の CDEKC 分析 (Figure 2a) と比較して、ともに 50 倍程度の高感度化が良好なキラル分離と同時に達成された。一方、BGS に含まれる S-β-CD と試料との相互作用を利用したスウィーピングによるオンライン試料濃縮を試みた際には、試料溶液を 60 s 注入した際にピークがブロードニングし、濃縮効果はほとんど観察されなかった。また、SDS ミセルと S-β-CD を様々な比で混合した溶液を BGS として用いた CD 修飾ミセル動電クロマトグラフィーの系においてスウィーピングを試みた際にも、高ミセル濃度では試料がミセルに強く保持されるためキラル分離が、高 CD 濃度ではミセルによる保持の減少により試料濃縮が、それぞれ達成されなかった。以上の結果から、光学異性体の電気泳動分析の高感度化法として、tr-trapping-CDEKC が有効であることが示された。

### 【参考文献】

[1] Sueyoshi, K.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1455–1462.

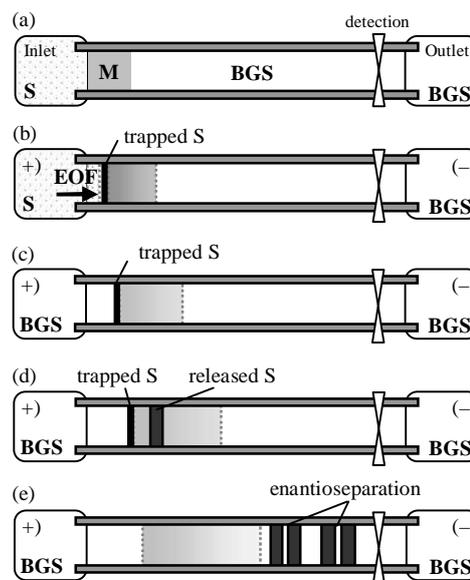


Figure 1. Schematics of tr-trapping with electrokinetic injection of sample. (a) Initial condition, (b) preconcentration by the trap mechanism, (c) application of the separation voltage, (d) separation by the difference in the release timing, and (e) enantioseparation on the basis of CDEKC.

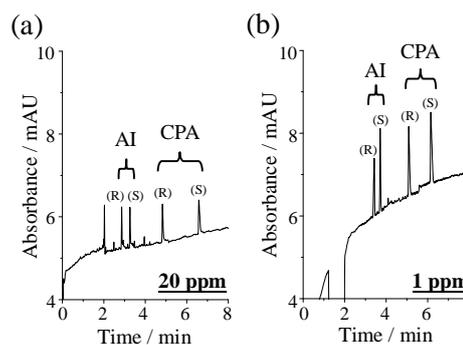


Figure 2. Enantioseparations of 1-aminoindan and chlorpheniramine obtained with (a) CDEKC and (b) tr-trapping-CDEKC. Background solution, 5 mM S-β-CD / 10 mM phosphate buffer (pH 7.0); micelle injection, (a) none, (b) 0.5 psi, 10 s; sample injection, (a) 0.5 psi, 3 s, (b) 5.0 kV, 180 s; separation voltage, 20 kV; UV detection, 200 nm.

# 非水系キャピラリー電気泳動におけるペプチドのオンライン濃縮法の開発

○北川慎也, 野路晃嗣, 大谷 肇  
名工大院工

## On-line concentration of peptides in non-aqueous capillary electrophoresis

Shinya KITAGAWA\*, Akitsugu NOJI, Hajime OHTANI

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

### Abstract

Single step on-line concentration and separation method for peptides in non-aqueous capillary electrophoresis was developed. As the electrophoretic medium, acetonitrile (ACN) containing 50 mM tetraethyl ammonium perchlorate was employed, in which the angiotensins I to IV were separated due to the difference in the magnitude of the interaction with perchloric anion. When the sample solution (ACN containing 0.5% trifluoroacetic acid and angiotensins) were injected as a large volume plug, the analytes were concentrated around the inlet end of the capillary; then the separation procedure was started automatically. The angiotensins were successfully concentrated and separated with the large volume injection until 80% of effective length of the capillary, and the peak heights were proportional to the injection period.

### 【緒言】

吸光検出法を用いるキャピラリー電気泳動 (CE) は、一般的に濃度感度が低いという問題を有している。この問題を解決するため、これまでに電場増幅試料スタッキングやスウィーピング、過渡的等速電気泳動法など様々なオンライン濃縮法が開発されている[1]。非水系溶液を泳動媒体とする非水系キャピラリー電気泳動 (NACE) においても、オンライン濃縮法が報告されているが、その数はあまり多くない。本研究では、アセトニトリルを泳動媒体として用いる NACE でのペプチド分離において、オンキャピラリー濃縮と分離が一工程 (シングルステップ) で行われる分析法の開発を行った。

### 【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。泳動媒体には、50 mM 過塩素酸テトラエチルアンモニウム (TEAP) アセトニトリル溶液を用いた。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。ペプチド試料溶液は、アンジオテンシン I~IV を 0.5% トリフルオロ酢酸 (TFA) アセトニトリル溶液に溶解し調製した。

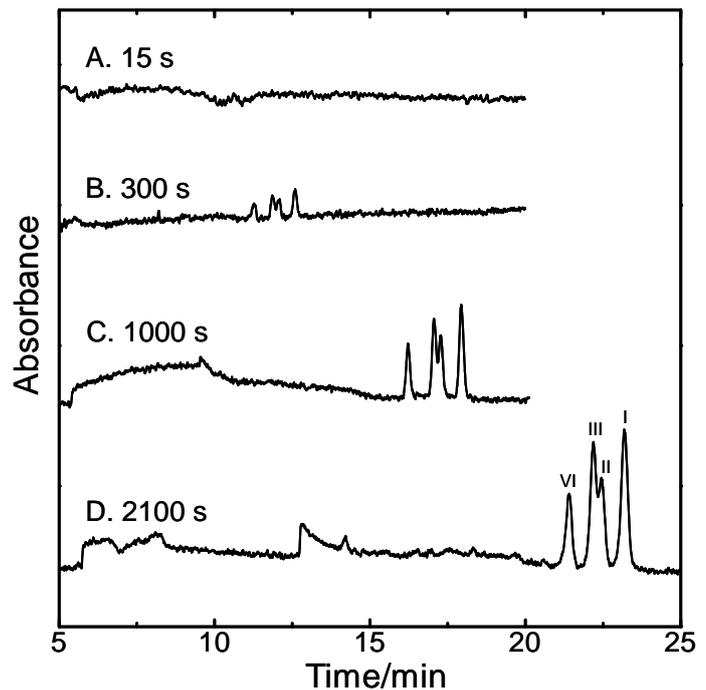
## 【結果】

今回適用するオンライン濃縮法では、試料溶液と泳動媒体の電気伝導度の差異が重要な因子の一つである。試料溶媒である 0.5% TFA アセトニトリル溶液、及び、泳動媒体 (50 mM TEAP アセトニトリル溶液) をそれぞれキャピラリーに満たし、10 kV の電圧印加を行った。TEAP 添加泳動媒体では、約 24  $\mu$ A の電流が流れたが、TFA 添加溶液では電流値の測定が不可能であった (0  $\mu$ A を表示)。すなわち、試料溶液部と泳動媒体部の電位勾配の差異が極めて大きいことがわかった。なお、アンジオテンシン類の分離には、既報と同様に、アセトニトリル中での過塩素酸イオンとペプチド類の相互作用を利用した[2]。

0.1  $\mu$ M アンジオテンシン I~IV を落差法にて 15 秒間注入したところ、Fig. 1 A に示すように、明確なピークを観測することができなかった。一方、300 秒間の試料注入を行ったところ、

Fig. 1B に示すように、4本の鋭いピークを得ることができた。さらに注入時間を大きくするにつれて、アンジオテンシン類のピーク高さが増加した。すなわち、NACE においてアンジオテンシン類のオンライン濃縮・分離に成功した。なお、Fig. 1D の 2100 秒注入では、分離有効長の約 80% が試料溶液で満たされた状態からの、オンライン濃縮・分離に成功している。

Fig. 1D について、10  $\mu$ M アンジオテンシン I~IV を 15 秒間注入して得られた分離結果と比較したところ、試料注入時間 (注入体積) の比と試料濃度とピーク高さから計算される濃縮比を計算したところ、それぞれ 140 倍および 143 倍であった。すなわち、開発した手法では、ほぼ理想的に試料のオンライン濃縮が行われていることが確認できた。



**Fig. 1** On-line concentration and separation of angiotensins with large volume injections of diluted sample solution. Sample solution: 0.5% TFA acetonitrile solution containing angiotensins I to IV (0.5  $\mu$ M each). Capillary: i.d. 50  $\mu$ m, o.d. 375  $\mu$ m, effective length 38 cm, whole length 48 cm. Injection: hydrodynamic injection ( $\Delta H = 25$  mm), injection periods were described in each electropherogram. Detection: UV 210 nm. Applied voltage: 10 kV.

## 【参考文献】

1. 福士恵一; 竹田さほり, ぶんせき, 2006, 2, 52-58.
2. 野路晃嗣; 北川慎也; 大谷 肇, 第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, pp. 67-68.

# 簡便な高感度バイオ分析に向けた

## 試薬放出キャピラリーIEF

【阪府大・院工】○久本秀明

### Reagent-release capillary-Based Isoelectric Focusing (RRC-IEF) Towards Simple and Highly-Sensitive Bioanalysis

Hideaki Hisamoto

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Osaka Prefecture University*

#### Abstract

The fabrication and characterization of a simple and disposable capillary isoelectric focusing (cIEF) device containing a reagent-release capillary (RRC) and poly (dimethylsiloxane) (PDMS) platform are presented. RRC-IEF allows simple, rapid and highly-sensitive bioanalysis since RRCs contain all the reagents needed for analysis, such as carrier ampholyte (CA), labeling reagents, or other molecular recognition reagents. Here, rapid screening of cIEF conditions using plural RRCs containing different carrier ampholytes (CAs), and rapid immunoassay using an RRC immobilizing fluorescently-labeled antigen are presented.

#### 【緒言】

キャピラリー等電点電気泳動(Capillary Isoelectric Focusing: CIEF)は、タンパク質の分離・濃縮法として極めて有用な方法であるにも関わらず、2次元ゲル電気泳動での IEF ほど普及していない。この原因は、実験の条件出しに手間がかかることや、1次元分離だけでは分析手法としては使いにくいことなどが一因として考えられる。

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、その流路幅と同サイズの外径を持つ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)の研究を行っている。<sup>1</sup> 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を同時に分析することができる。したがって、様々な種類・濃度の両性電解質、添加剤、さらにはラベル化や分子認識に使える試薬をあらかじめ物理吸着させた「試薬放出キャピラリー」を作製して CAs-CHIP 上に並列化すれば、試料導入・電圧印加のみで多条件同時に IEF の条件出しを行ったり、たとえ1次元だけでも迅速に濃縮・分離できることに大きな意味があるイムノアッセイ等、上記の問題解決に寄与できる種々の高感度マルチバイオアッセイを提案できる。今回は、下記2種のキャピラリー開発・性能評価・デバイス化の取り組みについて、我々の成果を紹介する。

1) オンラインラベル化 CIEF 用キャピラリーおよびアレイ化デバイスに基づく CIEF 条件スクリーニング

2) オンライン免疫反応キャピラリーに基づく CIEF 濃縮型簡便・高感度イムノアッセイ

## 【オンラインラベル化 CIEF 用キャピラリーおよびアレイ化デバイスに基づく CIEF 条件スクリーニング】<sup>2</sup>

簡便な CIEF 条件スクリーニングの1例として、異なる CA を固定化した RRC を作製・アレイ化し、CA 種選択を迅速に行えるデバイス開発を行った。まず電気浸透流抑制のため、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を共有結合修飾した。このコーティングキャピラリーを 4cm 長にカットし、キャピラリー内に市販の両性電解質 (BioLyte 3/10, 7/9, 5/8: Bio Rad) と添加剤 (Tween20・グリセリン) 溶液、市販のタンパク質ラベル化剤溶液 (Quant IT: Invitrogen) 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。ここでは異なる BioLyte を固定した 3 種の RRC を作製し、この 3 本にテスト試料であるヘモグロビン AFSC 水溶液を毛細管現象でキャピラリー内に導入して 2kV の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。また、3 本同時に電圧印加した場合も比較した。その結果、それぞれの RRC について、毛細管現象による試料注入・電圧印加のみでエレクトロフェログラムが得られ、乾燥固定した CA・ラベル化試薬が試料溶液に溶解し、試料タンパクへの自発的なオンラインラベル化反応が進行したことを示している。次に 3 本の RRC の両端を同じアノード・カソードに接触させ、RRC-array IEF を試みたところ、それぞれ単独のとほぼ同じエレクトロフェログラムを得ることができた。ここで必要な分析時間は約 10 分以内であり、この RRC-array を用いることで迅速な CA 条件の探索ができることがわかった。

## 【オンライン免疫反応キャピラリーに基づく CIEF 濃縮型簡便・高感度イムノアッセイ】<sup>3</sup>

イムノアッセイの迅速化・高感度化は診断・創薬分野の大きな課題である。ここでは上記のラベル化反応試薬の代わりに蛍光標識抗原 (Human IgG-FITC) を物理吸着固定した RRC を試作し、迅速・高感度なイムノアッセイへの適用を検討した。試料抗体としては、原理検証のために異なる蛍光試薬でラベル化された蛍光標識抗体 (Anti-human IgG-TRITC) を用いた。その結果、試料抗体を含まない溶液導入では電圧印加後に蛍光標識抗原に帰属される緑色 (FITC) の蛍光スポットのみが現れたが、蛍光標識抗体溶液を導入すると、約 15 分程度の電圧印加で異なる位置に緑色 (FITC) ・赤色 (RBITC) の両方のフィルターで観察できる蛍光スポットが現れた。このことは抗原抗体複合体形成および、その濃縮信号が得られたことを示している。ピークの半値幅とキャピラリー長からおおよそ見積もられる濃縮倍率は約 2000 倍程度であった。このスポットのピーク面積を抗体濃度に対してプロットしたところ、約 11-1100 ng/ml の範囲で直線的な検量線を得ることができた。また、CCD カメラの感度調整により、約 5pg / ml の検出下限を得ることができるともわかった。

## 【参考文献】

1. H. Hisamoto, Y. Nakashima, C. Kitamura, S.-i. Funano, M. Yasuoka, K. Morishima, Y. Kikutani, T. Kitamori and S. Terabe, *Anal. Chem.* 2004, 76, 3222-3228.
2. M. Kataoka, H. Yokoyama, T.G. Henares, K. Kawamura, T. Yao, and H. Hisamoto *Lab Chip*. 2010 in press.
3. H. Yokoyama, M. Kataoka, T. G. Henares, T. Yao, and H. Hisamoto *Proc. Micro-TAS* 2009, 2, 1204-1206.

# *In situ* 光硬化型機能性アクリルアミドゲルマイクロチップ 電気泳動分析法

○鈴木茂生

近畿大・薬

## **Microchip Electrophoresis Using Functionalized Polyacrylamide Gels by *in situ* Photopolymerization**

○Shigeo Suzuki

*Faculty of Pharmacy, Kinki University*

### Abstract

Most of the recent equipments for microchip electrophoresis (ME) possess laser-induced fluorescence detector (LIF). The LIF system was used as a light source for *in situ* photopolymerization of acrylamide with various functions near the cross section of a microchip channel. Strong anion phase prepared by co-polymerization of acrylamide with acrylamidesulfonic acid enables perm-selective concentration of anions at the channel cross. This method was applied to the preconcentration of oligosaccharides labeled with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate by a factor of  $10^6$ – $10^8$ . This strategy was also applied to the specific entrapment of saccharides by photopolymerized lectin-impregnated polyacrylamide gel.

### はじめに

マイクロチップ電気泳動(ME)はハイスループットな分析法として注目されているが、様々な問題点も指摘されている。例えば一般的な交差型流路を用いる試料導入法ではリザーバーに加えた数  $\mu\text{L}$  の試料の内、分析に供されるのは nL にも満たない。また、ME は短時間での分離が可能であるが、分離成分の回収が難しく、質量分析による解析も難しい。ところで、ME では分離系に見合う高感度な検出手法が必要なことから、レーザーを光源に用いる検出法(LIF)がよく利用される。このレーザー光源は光学系を調整することで、任意のビーム幅が得られるので、流路内で部分的に光重合することが可能となる。われわれはこの光重合反応を用いて、試料の濃縮や試料成分の特異的抽出への応用について検討してきた。ここでは、将来性も含めて、本法の有用性についても述べたい。

### 実験

日立製の SV1100 用十字型 PMMA 製マイクロチップを用い、正立型蛍光顕微鏡 (オリンパス BX50WI) のステージ上で操作した。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。機能性光重合ゲルの調製方法の概要を Fig. 1 に示す。アクリルアミド・メチレンビスアクリルアミドに、陽イオン交換機能を持つ 2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸やレクチンを加えたゲル溶液を作成する。このゲ

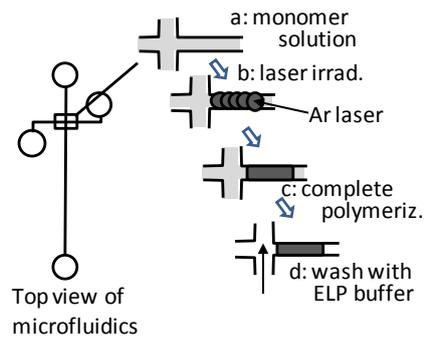
ル溶液をマイクロチップに満たし、交差部近傍でアルゴンレーザーを照射して、機能性ポリアクリルアミドゲル層を作成した。次いでゲルを通過するように電位を印加し、特異的に試料を捕捉させた。試料には 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) で標識化した糖類などを用いた。

### 結果及び考察

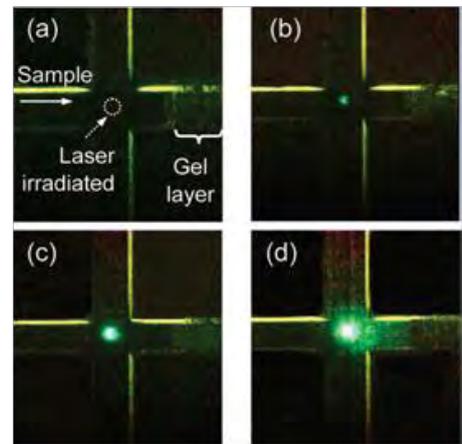
**Perm-selective 法による酸性試料の特異的濃縮**：スルホン酸型ゲルを用い、試料槽に 200V の電圧を印加して APTS を交差部に送ると、Fig. 2 に示すように、試料はゲルを通過することなく、ゲルの直近に濃縮され、およそ 2 分で極大に達した。この際、ゲル直近における濃縮効率はおよそ 100 万倍に達し、試料槽に満たした試料成分がほぼ濃縮されたと考えられた。しかし、本法は大幅に検出感度が向上するものの、単純に電位を切り替えて分離を行うと、分離能が低いことがわかった。そこで、泳動液の組成、試料の導入方向や、電位設定切り替えのタイミングなどを種々検討した。その結果、最終的に Fig. 3 に示すような条件を設定することで、十分な濃縮効率と感度向上が観察された。同様にカルボン酸型のゲルを調製し、強酸を含む試料から弱酸性化合物を特異的に回収する方法についても検討した。

### レクチン含有ゲルを用いる糖鎖のアフィニティー抽出

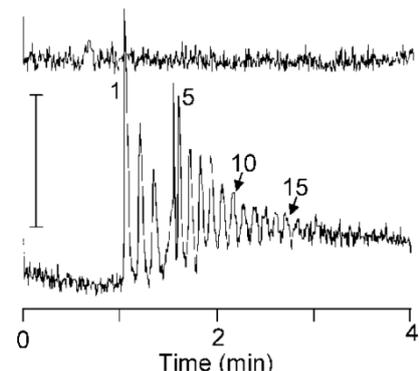
**出**：上述のスルホン酸型ゲルを用いる代わりに、糖を認識するタンパク質分子をゲル溶液に混合し、光重合を行うことで、糖鎖を構造特異的に捕捉できるアフィニティー抽出が可能になる。Con A を固定化したゲルを使い、一連の高マンノース型糖鎖をもつ RNase B 由来 APTS 標識化糖鎖の濃縮を試みるとともに脱着条件についても検討した。



**Fig. 1.** Schematic illustration of fabrication, by photopolymerization, of polyacrylamide preconcentration gel with various functions.



**Fig. 2.** Time-sequence images of concentration of fluorescent sample at the channel cross with *in situ* fabricated anionic poly(methyl methacrylate) gel layer. Images a-d were taken respectively after 85, 90, 110, and 125 s of injection of sample.



**Fig. 3.** Preconcentration and electrophoretic separation of APTS labeled isomaltooligosaccharide mixture under the optimized conditions (lower traces) and their references (upper traces). Top reservoir was filled with sample solution (~10<sup>-8</sup> M as total) and the other three reservoirs were filled with the running buffer. Preconcentration was accelerated rapidly toward the right reservoir and stacked at the cross channel by applying voltage sets, 0, 250, 0, and 50 V for ~5 min, respectively, on top, right, bottom, and left. Subsequently, all potentials were stopped for 1 s to inject concentrated sample components to the analysis channel. Then, the voltage sets 0, 250, 0, and 0 V were applied for 10 s on top, right, bottom, and left, respectively, to remove concentrated sample components from the cross-channel to the sample inlet. Thereafter, potentials of 0 V and 1 kV were applied for 2 min on right and bottom, respectively, for separation of sample components.

# 動電過給前濃縮－キャピラリーゾーン電気泳動法 (EKS－CZE)による高感度分析－濃縮メカニズム

○廣川 健、徐 中其、川人 浩二、森 聡美、藤岡 直人  
広島大学大学院工学研究科 応用化学専攻

## High-sensitive Analysis by Electrokinetic Supercharging-Capillary Zone Electrophoresis (EKS-CZE) - Concentration Mechanism of EKS

Takeshi Hirokawa\*, Zhongqi Xu, Kouji Kawahito, Satomi Mori, Naoto Fujioka  
Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

### Abstract

Electrokinetic supercharging (EKS) is a powerful and practical method for on-line preconcentration of trace ionic analytes prior to capillary zone electrophoresis (CZE), especially when the sample solution has very low conductivity. When rare earth ions were analyzed by EKS-CZE, very low LOD could be obtained by using a sampling compartment where the distance between the electrode and the capillary end was kept as long as possible depending on the sample volume. For example, when 0.9 mL sample was used in a long vial where the available distance was 40 mm, the LOD achieved was 5.6ppt (34pM), which was better than ICP-AES and comparable with ICP-MS. The concentration mechanism of EKS was detailed with some applications.

### はじめに

動電過給前濃縮 (Electrokinetic supercharging, EKS) は、キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) の高感度化を目的として行うオンライン前濃縮法である。電気的注入を行う際、等速電気泳動前濃縮が起こるような電解液条件を設定することにより、mL 程度の試料中微量成分を、濃縮しながらキャピラリーに導入出来るため、痕跡量の成分の分析を行うことが出来る。ただし、電気的導入の特性として、試料のイオン強度が低いこと (純水に近いこと) が必要である。目的成分の輸率が低いと (共存イオンが多量に存在すると)、高感度化は期待できない。また、試料中のイオンを有効に導入するには、試料溶液全体にわたって電場を印加する必要がある、そのためには電極配置を工夫する (電極とキャピラリー末端間の距離を長くする) 必要がある。これらの点に注意すれば、EKS-CZE は操作性・実用性・コストパフォーマンスのいずれにも優れた高感度分析法である。

### 実験

使用した電気泳動装置は、CAPI-3300 (大塚電子) である。全長 50cm、有効長 37.7cm、内径 75  $\mu$ m のシリカキャピラリーを用いて測定を行った。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、濃度範囲は各成分について 0.25nM から 25nM である。検出には間接 UV 法を用いた (220 nm)。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  $\alpha$ -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。

## 結果および考察

従来、我々の研究室で得られている EKS-CZE による感度 (LOD、S/N=3) を、中希土類の Er (原子量 167.3) について、表 1 にまとめた。例えば、試料体積が 0.9mL で長細いバイアル (体積 1 mL、大塚電子) を電極-キャピラリー末端間距離 40mm で使用すると、Er の LOD として 5.6ppt (34pM) がえられ、濃縮率は 60,000 倍と計算された。これは ICP-AES の感度を上回り、ICP-MS の感度に比肩できる数値である。

Table 1. LOD of Er achieved by EKS-CZE

Sample volume/ $\mu$ L	Vial volume/mL	Distance/mm (electrode-cap)	Electrode structure	LOD of Er/ppt	Concentration factor
500	1.8	1.1	Wire	270	-
500	1.8	20	Wire	20	-
900	1.0	40	Wire	5.6	60,000
17,000	20	24	Ring (with stir)	1	500,000

## 濃縮メカニズムについて

EKS においては、BGE の co-ion が等速電気泳動のリーディングイオンの役割を果たす。従って、分析対象とするイオンの移動度が co-ion (本実験系では UV 可視化剤である 4-methylbenzylamine) のそれより小さいイオンが濃縮される。逆に、分析対象とするイオンの移動度が co-ion のそれより大きいと、濃縮出来ないことが多いが、EKS には FASI の要素があるため、試料濃度や導入時間次第で、濃縮されることがある。ただし、このような場合、長時間導入すると、濃縮・検出できなくなるのが普通である。移動度の大きいイオンに EKS を確実に適用するには、従って、K<sup>+</sup>など移動度の大きいイオンを含むリーディング電解液を試料の前に導入する必要がある。

EKS により高い濃縮が得られる事を説明する重要なポイントは、ターミナルゾーン (試料ゾーンよりも移動度が小さく、電位勾配が大きいゾーン、Tゾーン) が自動的に生成する点である。すなわち、試料導入側キャピラリー末端において、co-ion が電気泳動した後に残るカウンターイオン (本実験系では 2-エチル n 酪酸など) が、電気的中性則から、導入される試料カチオンとだけでは従来の pH を保てず、プロトンを生成する方向に平衡移動する (ゾーンの pH が下がる)。この結果、そのゾーンの電気伝導度が下がり (電位勾配が上昇し)、あたかもターミナル液として酸を導入したような状況が起こるためである。試料イオンはこの Tゾーンを高速度で抜けて co-ion の後にスタックする。この Tゾーンは EOF によって移動するので、UV 可視化剤を用いるカチオン分析ではしばしば強いシステムピークとして観察される。試料溶液の濃度が高いと、自動発生した Tゾーンの電位勾配は低くなり (あまり pH が下がらないため)、濃縮を完了するには別にターミナル液を導入し、濃縮を完了させる必要がある。アニオン分析では、通常、電気泳動方向と EOF の方向が逆で、上記ターミナルゾーンの生成がカチオン分析ほど容易ではなく、LOD にも影響すると考えている。講演では濃縮メカニズムのシミュレーションのほか、EKS-CZE の幾つかの応用例について報告する。

- 1) T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš : *Electrophoresis*, 24, 498 ( 2003 )
- 2) T. Hirokawa, E. Koshimidzu, Zhongqi Xu, *Electrophoresis*, 29, 3786-3793 ( 2008)
- 3) Z.Q. Xu, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A*, 1216, 660-670 (2009).
- 4) Z.Q. Xu, E. Koshimidzu, T. Hirokawa, *Electrophoresis*, 30, 3534-3539 (2009).

# キャピラリー電気泳動反応器:キャピラリー電気泳動分離プロセスを利用する“錯体”の解離反応速度解析手法

福井大院工 高橋 透

## Capillary Electrophoretic Reactor: Dissociation Kinetic Analysis Method for “Complexes” Utilizing Capillary Electrophoretic Separation Process

Toru Takahashi\*

*Graduate School of Engineering, University of Fukui*

A new convenient tool for the dissociation kinetic analysis of “complexes” is proposed. The dissociation kinetics of “complexes”, such as metal complexes and biomolecular complexes, were successfully determined with the capillary electrophoretic reactor (CER). The basic idea of the kinetic analysis by CER is to measure the degree of the depletion of the complex by the decrease of the peak height signal as a function of migration time. The dissociation degree-time profiles for the complexes are quantitatively described by analyzing a set of electropherograms of “complexes” with different migration times using some appropriate standards. The details about the basic concepts of CER and its application to the dissociation kinetic analysis of broad-sense “complexes” will be mentioned. CER can monitor relatively slow reactions with a half-life of minutes to some tens of minutes. Some related methodologies enabling the monitoring of the fast reactions with a half-life of seconds and the very slow reactions with a half-life of hours would be also introduced.

安定な共有結合からなる有機化合物とは異なり、金属イオン(M)とその配位子(L)との配位結合からなる金属錯体(ML)は、それ単独で存在する場合、つまりその周囲から遊離の金属イオンおよび配位子が取り除かれると、解離反応方向( $ML \rightarrow M + L$ )への推進力を受ける。MRI コントラスト造影剤として使われている Gd(III) 錯体をはじめ、各種プローブや薬剤として種々の金属錯体が利用されているが、これらが生体内に投与された場合、上に述べたような状況に置かれることとなる。従って、これらの金属錯体はその機能を発現するには、解離しないこと、つまり、速度論的に安定であることが必須の要件となり、その設計にあたっては速度論的安定性を加味する必要があるが、それを評価するには解離反応速度定数を測定する以外にない。一方、タンパク質や核酸といった生体分子で構成される生体分子複合体における分子間相互作用解析の重要性については論を俟たない。生体物質間相互作用は、*in vitro* における結果としての結合の平衡状態で議論されることが多いが、実際の細胞内における生命活動はそれとは異なり時間的にも空間的にも一時的な非平衡の物質間相互作用である場合がほとんどである。このような背景から、近年、生体分子間

相互作用の生物学的な意味を理解する上で速度論的な考察の重要性が広く認識されるようになった。

金属錯体に加え、生体分子複合体、分子錯体など、配位結合や水素結合、イオン間相互作用、疎水性相互作用といった比較的弱い結合や相互作用によって結びつけられた広い意味での分子会合体をここでは“錯体”と呼ぶ。一般に、“錯体”の反応速度定数を測定することは、従来の速度解析法のすべてが平衡状態での測定であることから、そもそも技術的に困難であり、煩雑な操作を繰り返す必要があることに加え、その測定精度も決して高いものではなかった。これに対し、近年報告されている生体分子複合体の速度解析法は、複合体の構成分子の一方をセンサー表面に固定化し、今一方の構成分子を含む溶液と、それを含まない溶液とを交互にセンサー表面に接触させることによって、非平衡状態、つまり、複合体の生成または解離反応方向への一方的な推進力を創り出すものであり、従来法に比べて、簡便かつ高精度な反応速度解析を実現している。しかしながら、これらの手法にも、固定化の影響、固-液二相間における物質移動による制限、必要試料量が少なくないといった原理上の問題がある。

一方、我々の研究グループでは、既存のどの手法とも異なる“錯体”の解離反応速度解析法を開発し、キャピラリー電気泳動 (CE) 分離プロセスを“錯体”の解離反応容器として用いるというコンセプトに基づいていることからこの手法を「キャピラリー電気泳動電気泳動反応器 (CER)」<sup>1)</sup>と命名した。一般に、CE 分離プロセスの有する速度論的な特性についてほとんど考慮されることはないし、またこれを考慮する必要はないが、ある条件下で行う“錯体”の CE 分離においては、これが“錯体”に対して解離反応方向への一方的な推進力を与える特殊な反応場となる。“錯体”の構成成分を一切含まない泳動緩衝溶液を用いて過剰量の一方の構成成分を含む“錯体”溶液試料の CE 分離を行った時、“錯体”とその構成分子とは電気泳動移動度の差異によって分離され、ある程度分離が進行すると、各々孤立したバンドを形成する。このとき、“錯体”のバンド内は“錯体”の周囲から過剰の構成分子が取り去られた一種の濃度ジャンプ反応系となり、“錯体”は解離反応方向への推進力を受けることになる。また、この解離反応によって生じる生成物（構成成分）は生成後直ちに分離されるため、逆反応（生成反応）は起こらない。すなわち、“錯体”は定常的に解離反応方向への一方的な推進力に晒されながらキャピラリー内を泳動していく。このような、“錯体”のキャピラリー内解離反応挙動を観察するという極めて明快な原理に基づく本法は、均一溶液中における“錯体”の解離反応速度定数の直接測定を可能とする唯一の手法である。現在、金属錯体系では CER およびその派生技術<sup>2,3)</sup>により、数秒から数時間程度の半減期の反応系の解離反応速度解析を達成している。講演では、これらの基本原理を概説するとともに、生体分子系への応用例<sup>4)</sup>についても述べる予定である。

【文献】 1) *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4812. 2) *Analyst*, **2005**, *130*, 1337. 3) *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 7849. 4) *Electrophoresis*, **2009**, *30*, 3079.

# 溶液内反応の平衡論研究におけるキャピラリーゾーン電気泳動法の活用

高柳俊夫

岡山大・院自然

## Utilization of Capillary Zone Electrophoresis on Equilibrium Analysis in Homogeneous Solution

Toshio TAKAYANAGI

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

### Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) is a prominent separation system for charged species. Separation modifiers have sometimes been used to develop the resolution and to control the electrophoretic mobility through the intermolecular interactions between the analytes and the modifier. Therefore, analyzing the electrophoretic mobility change with varied concentrations of the modifier enables the equilibrium analyses in homogeneous solution. Advantages on using CZE for the equilibrium analysis were demonstrated on the analysis of acid dissociation of phenolphthalein, ion association in an aqueous solution, as well as binding to nonionic surfactant micelles.

### はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) は、電荷 / 質量比に基づく均一溶液中での電気泳動現象を活用する分離分析法であり、イオン性物質の分析に広く用いられている。単純な泳動液による CZE では分離できない類似物質でも、泳動液に添加するモディファイヤーとの分子間相互作用の差を利用して、相互分離が達成される場合が多い。モディファイヤーとの速い平衡が成立する系においては、ある物質から生成する複合体に電荷 / 質量比の変化が生じるため、生成物の電気泳動移動度はその物質本来の値から変化する。従って、観測される電気泳動移動度は溶液中に平衡状態で存在するそれら化学種の平均的な電気泳動移動度として反映される。モディファイヤーによる平衡系での分離改善は、この現象を活用している。

キャピラリーゾーン電気泳動法では、効率的な熱放散により温調が容易であり、溶融シリカ管を用いた場合に再現性の高い電気浸透流が得られることから、電気泳動移動度を正確に測定することが可能である。均一溶液系での分離分析により高い理論段数を示すことも正確な移動度測定には利点となる。以上のことから、泳動液へ添加するモディファイヤー濃度に伴う電気泳動移動度の変化を解析することにより、キャピラリー電気泳動装置を均一溶液中での速い平衡反応の解析装置として有効に活用することができる。本発表では、CZE の長所を活用したいいくつかの平衡反応の解析例[1]を紹介する。

### CZE を平衡反応解析に用いる利点

キャピラリーゾーン電気泳動法では、上記の電気泳動移動度の測定に関する特長に加えて、分離分析法としての利点も平衡解析に活用することができる。CZE が分離分析であることから、試料中の目的物質を精製する必要はなく不純物を含んでいても良い。分離分析の利点は、複数の平衡反応を同時に解析することも可能とする。CZE が高感度検出法である点を活用し、低い溶質濃度で扱える点も長所であり、沈殿の生成や福次反応を抑制することが可能である。

### 酸解離平衡の解析

酸解離平衡は最も一般的な解析対象であり、溶液内での  $H^+$  の授受による電気泳動移動度の変化を解析に用いる。演者らは、分離分析法の利点を活用して遅い平衡反応あるいは不可逆反応が伴う速い平衡反応を解析の対象とした。分光学的手法では、副反応により対象物質の物質量が変化するので一般的には解析が不可能である。CZE では、定量的指標である物質量ではなく、定性的指標である泳動時間を用いるので、物質量が変化しても解析に影響を受けない特長を有する。また、遅い平衡や不可逆反応に伴い生成する物質は電気泳動分離され、主平衡反応に影響しない。これら利点を活用し、アルカリ性で分解するフェノールフタレインの酸解離定数を決定した[2]。

### 水溶液内イオン会合平衡の解析

イオン会合反応は、静電的イオン会合反応、疎水的イオン会合反応とも、分析化学の領域で重要な平衡反応の一つである。有機イオンの分離分析に際しては疎水的イオン会合反応が利用され、溶媒抽出、固相抽出、イオン対 RP-HPLC 等に利用されている。演者らは均一溶液、特に水溶液での疎水的イオン会合反応の挙動を対象とする研究を進めた。バッチ式反応容器を用いる解析法ではイオン会合体が凝集して沈殿してしまうが、CZE では低濃度で扱える利点、管軸方向での会合/解離のダイナミクスに基づいて凝集を抑制できる利点を有する。水溶液内での疎水性イオン会合平衡におけるアルキル基の鎖長効果、多点相互作用、芳香環相互作用、親水性/疎水性バランス等の寄与を克明に解析した。

### 非イオン界面活性剤ミセルへの結合平衡の解析

界面活性剤ミセルを擬均一系における疎水性媒体として捉えた場合、物質が分配する固定相になるが、分子集合体としての物質として捉えると、その平衡は結合反応となる。電荷を有さない擬似有機相に対応する非イオン界面活性剤ミセルへの結合特性を、溶質試料の電気泳動移動度の変化から解析した。また、副反応係数を用いることにより無荷電物質の結合平衡を解析した。陽イオンと陰イオンの比較では、陰イオンで大きな結合定数が得られ、荷電物質と無荷電物質の比較では、無荷電物質で大きな結合定数が得られた。

### 文献

1. T. Takayanagi, *Anal. Sci.*, **20**, 255 (2004).
2. T. Takayanagi, S. Motomizu, *Chem. Lett.*, **2001**, 14.

# タンパク質を内包した光開裂性ナノ粒子の調製

村山周平, Su Baowei, ○加藤 大  
東大院・薬

## Development of photocleavable nanoparticle containing protein

Shuhei Murayama, Baowei Su, and Masaru Kato\*

Graduate school of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

**Abstract** Because proteins show high activity and are essential for biological function, proteins are important and useful biomolecules; however, it is hard to control activities whenever and wherever required. We have recently developed a method to encapsulate proteins within hydrogels that can be photocleaved with ultraviolet (UV) light, thus releasing the proteins; we refer to this method as “Protein Activation and Release from Cage by External Light (PARCEL).” Biological activities of protein restricted by hydrogel encapsulation were recovered by applying external light to the protein-hydrogel. In this talk, we introduce a photocleavable nanoparticle containing protein and used the particle as an effective carrier of protein to cell.

はじめに ゼル反応によって調製される高含水ゲルは、緩和な条件で網目構造を形成することから生体物質の固定化に適した材料である。ゲルの含水量が生体内と類似した量であることから、固定化された生体物質は長期間その機能を維持し、さらに繰り返し利用できることから理想的な支持体であった。しかし高含水ゲルの調製過程でアルコールが発生するため、アルコールによって変性や失活し易い生体物質の固定化には適していなかった。そこで調製時にアルコールが発生しない新しい高含水ゲルの調製法を開発した。この方法では、珪酸ナトリウムとコロイダルシリカを原料に用い、高含水ゲルを調製した。しかし、この方法で調製したゲルは脆く、繰り返し利用していく過程で固定化された生体物質の機能が大幅に低下した。そこで調製時にアルコールが発生せず、さらに、高強度な高含水ゲルとして、シリカゲルとアクリルアミドゲルよりなるダブルネットワークゲルを利用した新しい生体物質の固定化法を開発した。2種類のゲルを組み合わせることで、強度の増加と共に、固定化された酵素の活性が増加した。

シリカゲルに有機ゲルを混合しても、内包された生体物質の機能が維持されたことから、次に有機ゲルに外部刺激に応じて崩壊し、内包した生体物質を放出する機能を組み込んだ(図1)。光開裂基として2-ニトロベンジル誘導体を導入したゲルを調製し、光(UV = 365nm)の照射前後で放出される生体物質(酵素)の量を比較した。また対照実験として、2-ニトロベンジル誘導体を導入していないゲルについても同様な検討を行った。光照射前は、酵素はゲルに内包されているため活性はほとんど見られなかったが、光照射によって光開裂基を導入したゲルのみで内包されてい

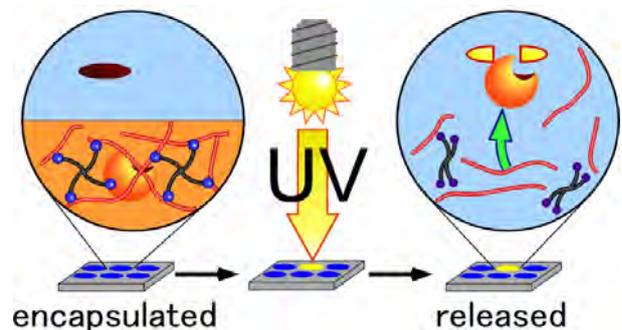


Fig. 1 Representation of photocontrolled enzymatic reaction.

た酵素が放出され、強い酵素活性が確認された。以上のことから、光開裂性ゲルに酵素を内包することで、光によって酵素活性を制御することに成功した。

そこで本研究では、本光開裂性ゲルを細胞等に投与するために、ナノ粒子に成形した。

## 結果及び考察

光開裂性のモノマー分子を重合することでナノ粒子を調製した。調製したナノ粒子を電子顕微鏡で観察した結果を図2に示した。粒子径が150nm程度であり、狭い粒子径分布であった。

次に、本ナノ粒子に光を照射したところ、粒子は細かい断片に分解することが分かった。したがって本ナノ

粒子を細胞に導入し、光を照射することで、ナノ粒子に内包されていたタンパク質が放出されると期待された。そこで蛍光物質であるBODIPYで標識したcaseinをナノ粒子に内包させ細胞に投与した。BODIPY-caseinは、BODIPY同士のクエンチングにより蛍光を発しないが、ペプチド断片に消化されると蛍光を発する。ナノ粒子を投与した細胞に光を照射しないで培養すると変化が見られなかったのに対し、光を照射した細胞では緑色の蛍光が検出された(図3)。これは光照射によってナノ粒子が崩壊し、内包されていたBODIPY-caseinが放出され、消化され、蛍光が検出されたと考えられる。

以上より本ナノ粒子は、細胞内へのタンパク質の導入に有効であり、光を照射することで内包していたタンパク質の放出が可能であることが分かった。光は、照射するタイミングや場所、強さを調節することが可能なことから、本ナノ粒子を用いることで、細胞内でタンパク質が機能する時間、場所、量を制御できると期待できる。

## 謝辞

本研究は、NEDO 産業技術研究助成事業と東京大学グローバルCOEプログラム「学融合に基づく医療システムイノベーション」の支援で行いました。この場を借りて、感謝します。

## 文献

S. Murayama, M. Kato: Photocontrol of Biological Activities of Protein by Means of a Hydrogel *Anal. Chem.* **82**, 2186-2191 (2010).

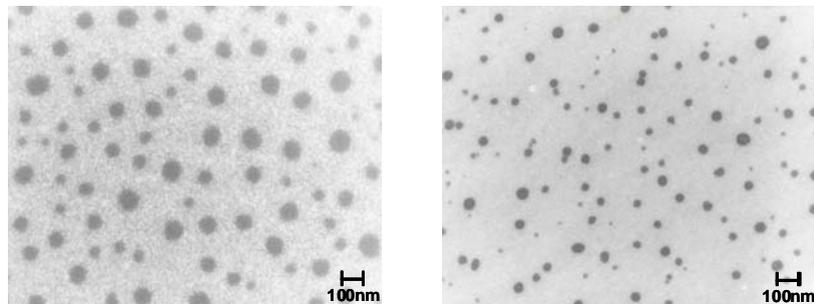


Fig. 2 TEM images of the nanoparticles before and after the irradiation.

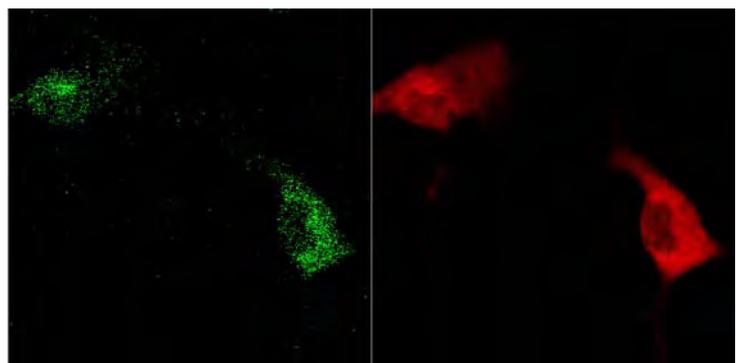


Fig. 3 Confocal laser scanning microscopy images of the nanoparticle injected cell.

# マイクロサザンハイブリダイゼーションシステムの開発

○佐藤 記一

東京大学 大学院農学生命科学研究科

## Development of Micro Southern Hybridization System

Kiichi Sato

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

Microchip-based Southern hybridization analysis system was developed, which consists of DNA separation by microchip electrophoresis and successive hybridization in a micro square space. Parallel electric field in the square space was realized by branching control channel. Size separation and hybridization of ssDNA in the square region were realized. Analysis time of the microchip-based Southern hybridization was greatly reduced from 1 day to 5 min.

### はじめに

サザンハイブリダイゼーション法は DNA を電気泳動によりサイズ分離した後に、特定の配列を持つ DNA 断片のみを検出する分析法である。この手法は特定の配列を有する DNA だけを選択的に検出する分析法であり、目的とする遺伝子の有無を確認するなど、分子生物学の世界で広く利用されている。しかし従来法では、分析に 12~16 時間という長い時間が必要であり、また手作業による操作が煩雑であるといった欠点があった。そこで本研究では、電気泳動分離とハイブリダイゼーションの 2 つのプロセスを集積化したマイクロチップを開発し、サザンハイブリダイゼーション法の分析時間の大幅な短縮と操作の簡便化を目指した。

### 分析の原理

前述の二つのプロセスの集積化を実現するために、一枚のチップ上に電気泳動分離流路とハイブリダイゼーション領域を構築し、分離流路で分離された DNA のバンドパターンを維持した形で、そのままハイブリダイゼーション領域に移動させてハイブリダイゼーションを行わせる 2 段階の分析方法を着想した。これを実現するために、一枚のチップに電気泳動分離流路とハイブリダイゼーション領域を作製し、かつその両者が平行に隣接するように、幅の広い流路に並べて設置した。この方法では、まず、DNA 試料は細い分離流路内で大きさによって電気泳動分離される。次に、この分離されてきた DNA 断片を幅の広い流路の中をまっすぐに、引き続き電気泳動分離させる。幅広流路内で十分に分離した試料に対して、電場の方向を 90 度変えて印加することによって、バンドパターンを維持したままの状態をハイブリダイゼーション領域に搬送する。このまま泳動を続けると目的の DNA 断片のみがハイブリダイゼーションによって領域内にとどまり、残りの DNA はそのまま領域外へと排出される。これによって目的 DNA の特異的検出を行うことができる。

## 実験方法

チップは厚膜型フォトレジスト SU-8 を鋳型にし、シリコーンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン(PDMS)に転写して作製した。分離流路内に充填する分離剤としてはヒドロキシエチルセルロース溶液を用いた。ハイブリダイゼーション領域には標的 DNA の配列をモデルに設計した 20mer のプローブ DNA とポリジメチルアクリルアミドの共重合体ポリマー溶液を充填した。チップの設計および電気泳動条件の検討については CoventorWare を用いたシミュレーションと実際の泳動実験を繰り返すことにより最適化を行った。

## 結果と考察

電気泳動において、細い流路から幅広流路に到達すると試料は出口において同心円状に広がってしまう。そのため、幅広流路内の電場を制御する必要があった。そこで、幅広流路に電場制御用の多分岐流路を組み合わせることで流路内に平行電場を発生させ、試料を制御することを考案した。種々の条件検討により幅広流路に平行に並んだ電位勾配に従って、幅広流路内での広がりを最小限に抑えながら試料を電気泳動することが可能になった。

開発したチップでの DNA の電気泳動分離能を評価するためにファージ DNA を制限酵素処理した dsDNA 断片をモデル試料として用いた。また ssDNA の電気泳動を評価するために、dsDNA 断片を熱処理によって一本鎖化したものも同様に分析した。試料はそれぞれ SYBR Green によって染色し、蛍光顕微鏡でその蛍光強度を測定、解析した。その結果、dsDNA 断片は 120 秒、ssDNA 断片は 70 秒程度で従来のゲル電気泳動法と同等の分離を実現した。

次に、ハイブリダイゼーションのための結合領域について検討した。ハイブリダイゼーション用ポリマー溶液を幅広流路の下部に導入し、ここを結合領域とした。また分離領域には 7 M 尿素を含む 2.2% ヒドロキシエチルセルロースを導入した。試料には FITC 標識したファージ dsDNA 断片をアルカリ変性の後に熱変性させることにより一本鎖化したものを用いた。

その結果、DNA 断片は分離領域でその長さに応じて分離され、2 段階目の操作によって標的の DNA 断片のみがハイブリダイゼーション領域上で相補的結合反応により固定され、他の断片は廃液リザーバーまで泳動される様子が観察された。これにより DNA の大きさによる分離と標的配列を有した DNA 断片の特異的検出をチップ内で実現した。

以上、マイクロチップを利用したハイブリダイゼーションを約 60 秒で完了することに成功し、先の電気泳動や導入のプロセスを合わせてもわずか 5 分以内で分析を完了することを実現した。従来法で必要だった長い分析時間を大幅に短縮した上、手作業による煩雑な操作を廃し、電位操作のみで分析することが可能となった。本システムは試料を RNA に代えることでそのままノーザンハイブリダイゼーション分析にも応用可能であると期待され、幅広い応用可能性を有していると考えられる。

## 謝辞

本研究は科学技術振興機構(JST)さきがけ研究助成を得て行われました。また、電場シミュレーションにおいてご指導いただいた馬場嘉信教授、加地範匡博士（名古屋大学）に深く感謝いたします。

# 水力学的手法を利用したマイクロ細胞操作システムの開発

○山田 真澄

千葉大院・工

Development of Micro Cell Manipulation Systems Utilizing Hydrodynamics

Masumi YAMADA\*

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Chiba University*

## Abstract

Microfluidic devices are useful for precisely manipulating small substances including cells, particles, and biomacromolecules, with sizes similar to the microchannel dimensions. Here we introduce our achievements on the hydrodynamic filtration scheme and its applications to cell manipulation, separation, and treatment systems. The microscale hydrodynamics was utilized for developing the continuous size-dependent cell sorter and the cell nucleus isolator by short-time chemical treatment. These applications clearly demonstrated the wide applicability of the simple microfluidic systems as essential components for MicroTAS or integrated biomedical microdevices.

## はじめに

1990年代にマイクロチップ電気泳動システムが開発されて以来、微小な流路構造を利用した革新的な分離・分析システムが多数開発されてきた。マイクロ・ナノメートルの流路構造は、同程度の大きさの微小な対象物を正確に操作する上で非常に有利であるため、分子や生体高分子を分離するためのナノ流体デバイスや、細胞・微粒子・液滴などの対象を選抜・処理・作製・培養するためのマイクロシステムなど、非常に幅広い応用が行われている。本発表では主に、これまでに我々の研究グループで開発を行ってきた、粒子や細胞を簡便かつ連続的に分離・分析・処理するための、水力学的フィルトレーション (HDF) 手法<sup>1-4</sup>について紹介する。この手法では、複数の分岐構造を有する流路ネットワークに細胞や粒子の懸濁液を導入すると、ある大きさを有する粒子は、水力学的な流れのプロファイルに従って特定の分岐流路を通過する、という原理を利用する。そして流路構造全体を抵抗回路とみなして設計することによって、受動的かつ連続的な、大きさによる粒子の分離・選抜が可能となる。これまでに、大きさがサブミクロンである粒子や大きさの差がサブミクロンである粒子群であっても正確かつ簡便に分離できること、液滴のようなソフトマテリアルにも適用可能であること、さらに血球・肝細胞・上皮細胞などの実際に医療の現場において有用な細胞選抜系への適用が可能であることなどを実証してきた。さらに、大きさによる粒子・細胞の分離のみならず、キャリア溶液の迅速な交換による細胞の瞬間的化学的処理・細胞核の単離デバイス、フローサイトメトリーのための細胞フォーカシング手法、形状に依存した細胞選抜などの開発を行ったため、それらについて簡単に紹介する。

## 原理・実験

水力学的フィルトレーション (HDF) の基本原理を Fig. 1 に示す。分岐を有する流路構造

において、流路幅と分配される流量比の関係から、ある一定のサイズより大きな粒子が分岐流路に導入されないように、流路を設計・作製することが可能である。つまり、分岐流路に導入されない最小の粒子径は Fig. 1 における仮想的な流れの幅  $w$  によって決定され、その値は流路全体を抵抗回路とみなして設計することで任意に調節することができる。この原理を応用することで、細胞を大きさによって 4 段階に分離するための流路ネットワーク (Fig. 2) や、2 段階の溶液交換による細胞核の単離・精製システム (Fig. 3) などの開発を行ってきた。なお実験では、主にソフトリソグラフィーによって作製した PDMS 製マイクロ流体デバイスを用いた。また流路の幅・深さは、対象とする最大粒子径の 2~4 倍程度のものを主に利用した。

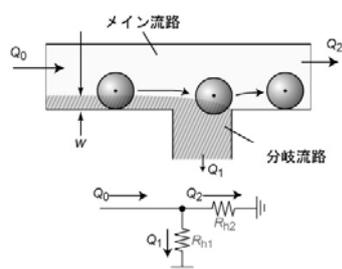


Fig. 1 水力学的フィルトレーションの基本原理図。

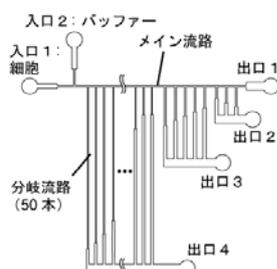


Fig. 2 大きさによる肝細胞分離のための流路デザイン。

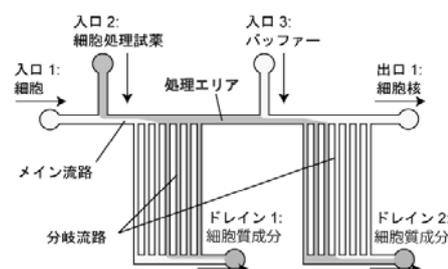


Fig. 3 処理時間制御による細胞核単離のための流路ネットワーク図。

## 結果及び考察

例えば、Fig. 2 に示す流路を用いたラットプライマリ肝細胞の分離においては、直径が 8~30  $\mu\text{m}$  程度の範囲である細胞を、連続的かつ簡便に大きさによって分離することが可能であり、さらに実質・非実質細胞の分離、多核・単核細胞の濃縮なども可能であった。また同様の流路構造を用いることで、直径数ミクロンの微粒子の分離や赤血球・白血球の選別が可能であること、形状に依存した粒子・細胞の分離が可能であること等を実証することができた。また Fig. 3 に示す流路構造を用い、Triton X-100 水溶液を用いて細胞を処理すると、処理時間が約 40 msec 以上の場合に細胞の生存率が劇的に低下すること、処理時間が 3~4 sec 程度の場合には細胞核の形状を保ったまま細胞膜・細胞質成分を除去でき、細胞核の単離が可能であることなどが確認できた。これらの水力学的手法を利用した細胞操作システムは、その簡便性および汎用性ゆえに幅広い応用が可能である他、微小生化学分析・分離・反応システムのための要素技術としても有用であると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたりサポート頂きました、科学技術振興機構および日本学術振興会に感謝いたします。

## 文献

1. M. Yamada and M. Seki, *Lab Chip*, 5, 1233 (2005).
2. M. Yamada and M. Seki, *Anal. Chem.*, 78, 1357 (2006).
3. M. Yamada, et al., *Biomed. Microdev.*, 9, 637 (2007).
4. M. Yamada, et al., *Lab Chip*, 2008, 8, 772 (2008).

# 誘電泳動による微粒子集積と電気化学変換濃縮を組み合わせた迅速で高感度な免疫センシング

○安川智之, 水谷文雄

兵庫県立大学大学院物質理学研究科

## Rapid and sensitive immunosensing system based on the combination of dielectrophoretic particle manipulation and electrochemical signal amplification

Tomoyuki Yasukawa\*, Fumio Mizutani

Graduate School of Material Science, University of Hyogo

We report herein a rapid and sensitive immunoassay using a microfluidic device consisting of an interdigitated microarray (IDA) electrode for a particle manipulation with dielectrophoresis (DEP), and an Indium-tin-oxide (ITO) electrode modified with a poly(vinylpyridine) containing [Os(bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> and horseradish peroxidase (Os<sup>II</sup>/HRP-polymer). On applying an AC voltage to the IDA in a negative DEP (n-DEP) frequency region, glucose oxidase (GOx) labeled goat anti-mouse immunoglobulin G (anti-mouse IgG)-immobilized microparticles moved to the polymer surface coated with anti-mouse IgG and were captured on the polymer to form the immuno-complexes in the presence of an analyte (mouse IgG). The captured microparticles were determined by the electrochemical measurement by using the catalytic reactions of the couple of enzymes in the presence of glucose. Since the formation of the sandwich structures was accelerated significantly by n-DEP, a period as short as 30 s was sufficient to detect the immunoreaction at the surface. The present procedure therefore yields a rapid, sensitive, and separation-free immunoassay in a simple device.

これまで、誘電泳動を利用した微粒子のマニピュレーション技術を微粒子や細胞の分離<sup>1-3)</sup>、ナノ微粒子アレイの構築<sup>4,5)</sup>、微粒子や細胞の迅速な配列<sup>6-8)</sup>に関して研究を行ってきた。さらに、マイクロ流路内において誘電泳動により抗体固定化微粒子を捕捉し、抗原および抗体溶液を順に導入して免疫複合体を形成させている<sup>9,10)</sup>。しかし、この手法では安定した送液が必要であるため簡便性に問題がある。そこで、近年、迅速で簡便な微粒子の配列化技術を免疫測定法へと応用展開している<sup>11-13)</sup>。マイクロ空間に負の誘電泳動力の作用する周波数領域の不均一交流電場を形成させると微粒子を基板上に配列させることが可能である。しかし、この微粒子配列体は交流電圧の印加を停止すると誘電泳動による規制力を失い再分散状態に戻る。この分散現象に着目し微粒子と基板間に免疫反応を組み込むことにより迅速で簡便な免疫測定法の開発を行った (Fig. 1)。抗体固定化微粒子を抗体固定化基板間に集積化させる。

溶液中にターゲットである抗原分子が含まれていると、免疫反応により微粒子-基板間において免疫複合体を形成するため、微粒子を基板に捕捉することができる。固定化された「微粒子の数」が分析対象物質濃度を反映するため免疫測定が可能になる。さらに、この微粒子集積化に要する時間はわずか 10 秒程度であるため、極めて迅速な測定

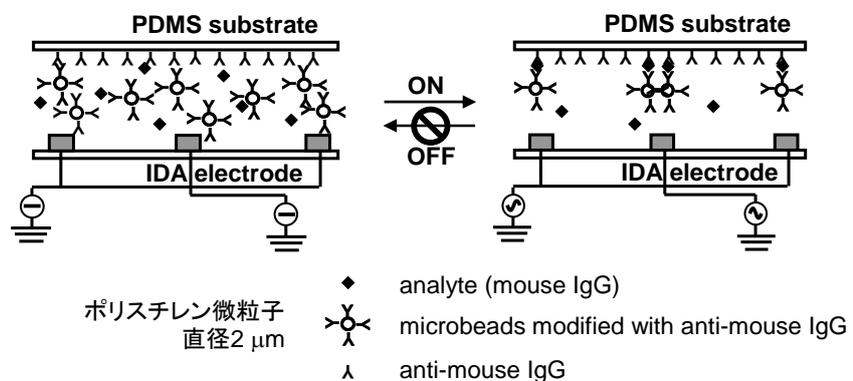


Fig. 1 Immunosensing using the particle patterning based on the negative dielectrophoresis.

ができる。

対向する基板として $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ 、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) および抗体 (または抗原) を含むポリマー被覆電極を用いると、微粒子に固定化された酵素反応生成物を極めて高感度に検出することが可能であり、迅速性および簡便性を兼ね備えた高感度免疫測定システムを構築できる。 $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$  および HRP を含むポリマーを被覆した ITO 電極を対向基板として用い、誘電泳動による微粒子配列を行った。交流電圧を印加すると微粒子は瞬時にポリマー表面へと移動しライン配列体を形成した。この際、ラインの形成位置は電極バンド間の真上であった。これは、導電性の ITO 電極を対向基板として利用することにより、

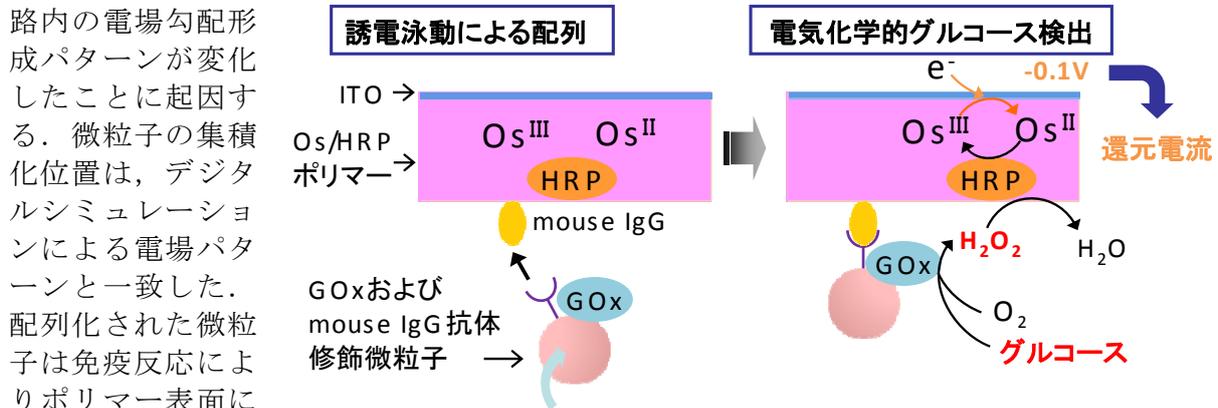


Fig. 2 Combination with the particle manipulation using dielectrophoresis and the charge accumulation system.

に固定化されている GOx を電気化学的に計測した (Fig. 2)。流路内にグルコースを導入すると還元電流の増加が観測された。これは、ポリマー内の $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{2+}$ の電気化学還元反応に起因する。グルコースの存在下、微粒子表面上の GOx によるグルコース酸化の際に過酸化水素が生成され、この過酸化水素がポリマー内の HRP によって還元される際にポリマー内の $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ が酸化されるためである。ポリマー内で酸化された錯体は、ポリマー外に拡散できず蓄積濃縮が可能であるため、一括で還元することにより高感度化が可能となる。現在、酵素反応生成物を他の化学種に変換して電極表面に蓄積し、ストリッピングによる高感度化も行っている。これについても、紹介したいと考えている。

## 文献

- 1) S. Ogata, T. Yasukawa, T. Matsue, *Bioelectrochemistry*, **54**, 33 (2001).
- 2) 鈴木雅登, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一, *分析化学*, **54**, 1189 (2005).
- 3) T. Yasukawa, M. Suzuki, H. Shiku, T. Matsue, *Sens. Actuators B*, **142**, 400 (2009).
- 4) H. J. Lee, T. Yasukawa, M. Suzuki, Y. Taki, A. Tanaka, M. Kameyama, H. Shiku T. Matsue, *Sens. Actuators B*, **131**, 424 (2008).
- 5) H. J. Lee, T. Yasukawa, M. Suzuki, Sang Hyun Lee, Takafumi Yao, Y. Taki, A. Tanaka, M. Kameyama, H. Shiku T. Matsue, *Sens. Actuators B*, **136**, 320 (2009).
- 6) M. Suzuki, T. Yasukawa, Y. Mase, D. Oyamatsu, H. Shiku, T. Matsue, *Langmuir*, **20**, 11005 (2004).
- 7) M. Suzuki, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Langmuir*, **23**, 4088 (2007).
- 8) M. Suzuki, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1049 (2008).
- 9) T. Yasukawa, M. Suzuki, T. Sekiya, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 2730 (2007).
- 10) J. Ramón-Azcón, R. Kunikata, F. -J. Sanchez, M. -P. Marco, H. Shiku, T. Yasukawa, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1592 (2009).
- 11) H. J. Lee, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1000 (2008).
- 12) H. J. Lee, S. H. Lee, T. Yasukawa, J. Ramón-Azcón, F. Mizutani, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, *Talanta*, **81**, 657 (2010).
- 13) J. Ramón-Azcón, T. Yasukawa, H. J. Lee, T. Matsue, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, F. Mizutani, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 1928 (2010).

# 自律駆動マイクロチップによる簡便・高感度な免疫アッセイ

○細川 和生  
理研・基幹研

## Power-free microchip for easy and sensitive immunoassay

Kazuo HOSOKAWA\*

*Advanced Science Institute, RIKEN*

### Abstract

Immunoassay is a chemical analysis method utilizing antigen-antibody binding, and is widely used for clinical diagnosis. Toward point-of-care clinical diagnosis, we have been developing an easy and sensitive immunoassay method using our two original technologies: power-free microchip and laminar flow-assisted dendritic amplification (LFDA). The power-free microchip needs no external power sources for fluid pumping. Instead, the microchip is driven by the microchip material (PDMS), which is degassed in advance. The power-free microchip minimizes the system's complexity and the operator's labor. In the LFDA, two amplification reagents (FITC-labeled streptavidin and biotinylated antibody) are simultaneously but separately supplied to the captured analyte molecules using laminar flow to construct dendritic structures. As an example, we have achieved analysis of C-reactive protein with an analysis time of 23 min, a sample volume of 0.5  $\mu\text{L}$ , and a limit of detection of 0.15 pM.

### はじめに

免疫アッセイ（免疫学的測定法）は抗原と抗体の特異的な結合を利用した化学分析法であり、医療診断に広く用いられている。たとえば体内のどこかで急性の炎症あるいは組織崩壊性の病変が起きると、血中のC反応性タンパク質（CRP）濃度が上昇するので、血中CRPを免疫アッセイにより定量すれば、そうした急性の病変を検知することができる。免疫アッセイはこれまでに様々な形態のものが実用化されてきた。しかし高感度なもの（ELISA法など）は複雑な設備と長い測定時間を必要とし、反対に簡便・迅速なもの（ストリップテストなど）は感度が低い。そのため、簡便・迅速・高感度という特長を併せ持った免疫アッセイ手法が求められている。

簡便・迅速・高感度な免疫アッセイを実現する手段として、マイクロ流体チップ（マイクロチップ）の活用が期待されている。マイクロチップを用いたダウンサイジングには二つの大きな効果がある。一つは検体量・試薬量の低減であり、これは診断の低侵襲化・低コスト化につながる。もう一つは測定時間の短縮で、これは拡散のスケール則に基づく効果である。少し説明を加えると、ELISA法など高感度タイプの免疫アッセイでは、固相表面上で抗原・抗体反応をさせるのが普通である。この場合、液相中を抗原（または抗体）が拡散する過程が律速段階となるため、測定に長い時間がかかる。拡散に要する時間はおおむね距離

の2乗に比例するので、容器の寸法を100分の1にすれば拡散時間は1万分の1となり、ほとんど無視できるようになる。しかしながら、今度はその小さな空間にどうやって液体を送り込むか、という問題が生じてくる。これまで報告されてきたほとんどのマイクロチップは、液体を送り込むためにポンプなどの周辺装置を必要としていた。そのため、システム全体としては必ずしも小型・簡便とは言えなかった。

本講演では、筆者らの二つの独自技術「自律駆動マイクロチップ」と「層流樹状増幅法」に基づく、簡便・迅速・高感度なマイクロチップイムノアッセイの開発について述べる。

### 自律駆動マイクロチップ

筆者らは数年前に、ポンプなどの外部動力源を用いることなくマイクロ流路に液体を注入できる「自律駆動マイクロチップ」を発明した<sup>1</sup>。その原理は、マイクロチップの母材PDMS（ポリジメチルシロキサン）に多量の空気が溶け込むという性質を利用した、ユニークなものである。まずPDMSマイクロチップを真空中に置くと、PDMSに溶けていた空気が取り除かれる。このマイクロチップを大気中に取り出すと、PDMSに空気が再び溶解しはじめる。この空気再溶解、特にマイクロ流路内の空気がPDMS壁面に溶け込む過程が、液体の注入に利用できるのである。イムノアッセイに必要な検体・試薬を同じ流路に順次注入することも可能であり、この方法でCRPの固相イムノアッセイ試みたところ、測定時間22分、検体量1.0 µLで検出限界48 ng/mL (0.42 nM)という結果が得られた<sup>2</sup>。

### 層流樹状増幅法 (LFDA: laminar flow-assisted dendritic amplification)

上記の結果は最初のトライとして悪くはなかったものの、検出限界はストリップテストと比較して格段に良いとは言えなかったので、次のステップではその改善に取り組んだ。従来のELISA法では高い感度を得るために、酵素反応を使って化学的な信号増幅を行う。しかし、これをそのままマイクロチップに移植することは、筆者らが試みた限り、簡単ではなかった。そこでマイクロチップに特化した増幅法：「層流樹状増幅法 (LFDA)」を開発した。層流とは全く乱れない流れのことで、マイクロ流路では普通に見られる現象である。樹状増幅はあまり一般的ではないが、いくつか先行研究があり、その本質は、固相表面に捕捉したターゲット分子上に、2種類の試薬（これらは互いに多点で結合する）を「交互に」反応させて巨大な樹状構造を形成させ、検出を容易にすることである。LFDAでは層流によって2種類の試薬を「同時に」供給できるため、従来の樹状増幅法よりもはるかに速く、簡便に行うことができる。結果として、上記CRPの検出限界を3ケタ改善することができた。具体的には測定時間23分、検体量0.5 µLで検出限界は17 pg/mL (0.15 pM)であった<sup>3</sup>。

### 文献

1. K. Hosokawa, K. Sato, N. Ichikawa, M. Maeda, *Lab Chip*, **4**, 181 (2004).
2. K. Hosokawa, M. Omata, K. Sato, M. Maeda, *Lab Chip*, **6**, 236 (2006).
3. K. Hosokawa, M. Omata, M. Maeda, *Anal. Chem.*, **79**, 6000 (2007).

# ナノ構造体を利用した新規無標識検出法の開発

安井 隆雄<sup>1</sup>、加地 範匡<sup>1</sup>、岡本 行広<sup>1</sup>、渡慶次 学<sup>1</sup>、  
堀池 靖浩<sup>2</sup>、馬場 嘉信<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>名大院工・名大革新ナノバイオ研セ、<sup>2</sup>物材機構、

<sup>3</sup>産総研健康工学研

## Development of a Novel Label-Free Detection Method Using Nanostructures

Takao Yasui<sup>1</sup>, Noritada Kaji\*<sup>1</sup>, Yukihiro Okamoto<sup>1</sup>, Manabu Tokeshi<sup>1</sup>, Yasuhiro Horiike<sup>2</sup>,  
Yoshinobu Baba<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice, Nagoya University

<sup>2</sup>National Institute for Materials Science

<sup>3</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

### Abstract

In this paper, we developed a new method for label-free detection of biomolecules by using the nanowall array chips. Our method is based on the detection of diffracted light by nanostructures inside a microchannel, and also has a great potential not only to detect biomolecules but define the difference between water and buffer solution without any fluorescent molecules. Moreover, as for the detection limit, our label-free method could detect DNA molecules to the extent of zepto-mole level.

### 【はじめに】

近年、ナノ微細加工技術の発展により様々なナノ構造体が作製され、生体分子解析に応用された例が数多く報告されている。特に、生体試料分離の分野では、これらのナノ構造体は分離場として用いられることが多く、ゲルやポリマーの代替物として開発され、分離能の向上や大幅な時間短縮、試料量の低減等が実現されている<sup>1,2</sup>。しかし、これらナノ構造体を使用した生体試料の分離分析においても、生体試料の検出は従来法と変わらず、バルク中でサンプルを蛍光ラベル化する必要があった。今回の発表では、これまでに我々のグループが開発してきた石英製ナノ構造体の優れた光透過性に注目し、ナノ構造体特有の回折光を利用することで、ナノ構造体をサンプルの分離場としてだけでなく検出場としても使い、生体分子の無標識検出に成功した結果を報告する。

### 【実験】

Fig. 1 に無標識検出を行うための実験系の概略図を示す。今回、無標識検出を行うための光源として、532 nm のレーザーを用いた。532 nm のレーザーを対物レンズを通して、ナノウォール(幅 600 nm、高さ 2.7 μm、間隔 200 nm)チップ(Fig. 2)に垂直に入射すると、レーザーがナノウォール構造によって回折現象をおこす。この時生じる回折光をフォトダイオードにより検出することで、無標識検出を行った。レーザーをチョッパーによって周期的に変調し、回折光の信号をロックインアンプに取り込

み周波数分離・増幅した。

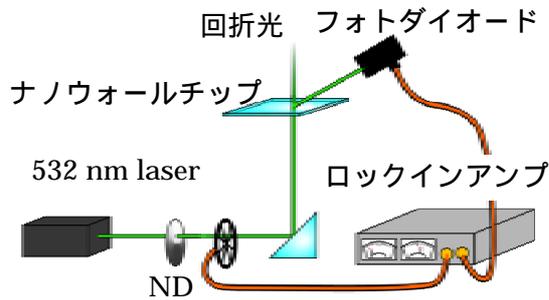


Fig. 1 Schematic apparatus of the instruments for a novel label-free detection method.

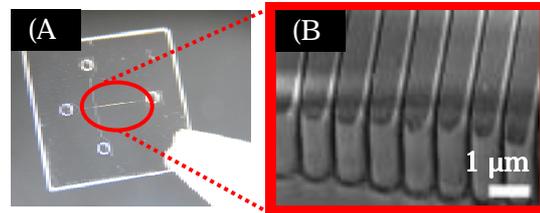


Fig. 2 (A) Photo of a nanowall array chip. (B) SEM image of a nanowall-array chip.

### 【結果及び考察】

ナノウォールチップを用いて、ナノウォール領域に純水がある場合と無い場合（空気）の信号強度の違いを測定することで実験系の基本検出性能の評価を行った。流路に純水が無い状態で回折光をモニターしながら、純水を導入した時の信号変化を検出した。結果を Fig. 3 に示す。この結果より、ナノウォール領域の僅かな純水の有無によっても、今回構築した実験系で大きな信号変化として計測できることを確認できた。次に、DNA 分子を電気泳動によってナノウォール領域に泳動したところ信号強度が変化することを確認した。検出した DNA 分子は λDNA と 1000 塩基対 DNA であり、今回構築した実験系で高感度な無標識検出が可能であることが分かった。光学系の最適化を行うことで、さらなる高感度化も可能であると考えられる。

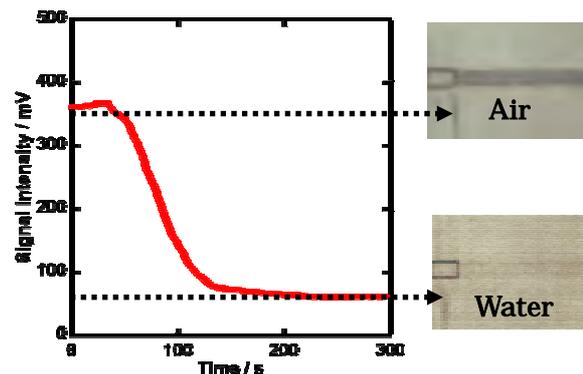


Fig. 3 Signal intensity changes during the water immersion process in the nanowall array region.

### 【参考文献】

1. G. B. Salieb-Beugelaar, K. D. Dorfman, A. van den Berg, and J. C. T. Eijkel, "Electrophoretic separation of DNA in gels and nanostructures", *Lab chip*, **9**, 2508 (2009).
2. N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Baba, "Nanopillar, nanoball, and nanofibers for highly efficient analysis of biomolecules", *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 948-956 (2010).

# CROSSING THE BOARDES – INFECTION BIOLOGY AS INSPIRATION FOR ORGANIC BIO-ELECTRONICS

Agneta Richter-Dahlfors

*Swedish Medical Nanoscience Center, Dept of Neuroscience  
Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

## Summary

*Organic bioelectronics* is a novel area pioneered within the Strategic Research Centre in Organic Bioelectronics (*OBOE*). In the *OBOE* knowledge hub, new interfaces between electronics and medicine are created, and possibilities for manmade electronics to communicate and regulate bioprocesses *in vitro* and *in vivo* are explored. By integrating elements of physics, electronics, material science, biology, and medicine, we create communication interfaces between electronic components and tissues. The need of such novel tools to solve medical problems stem from our other line of research, focusing on infection biology. This interdisciplinary research results from the collaboration between our group located within the Swedish Medical Nanoscience Center at Karolinska Institutet, and the Organic Electronics group at Linköping University.

## 1. Real-time analysis of bacterial infections in the live animal

A cornerstone of infection biology is the study of the complex interplay occurring between the infecting organism and its host. Combining the power of multiphoton-based live animal imaging with innovative surgery, we have developed a system that allows us to visually track a live infection from the first interactions between the bacterium and the host tissue within a living animal. Our studies reveal some of the molecular components, i.e. ion fluxes such as  $\text{Ca}^{2+}$ , engaged in orchestrating the multi-cellular tissue responses and show that prompt inter-organ communication is required for the host to manage its early local tissue response to infection. There is, however, a shortage of available *in vitro* techniques to study these dynamic processes at a molecular detail outside the living animal.

## 2. Organic Bioelectronics for Cell Communication

Fluxes of small cations, such as  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , within and between cells are important means for cell communication *in vitro* and *in vivo*. A bacterial toxin has been shown to induce slow  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in renal cells, thereby modulating the host's immune response. To expand on the possibilities to modulate  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in cells, we developed an organic electronic ion pump, i.e. a programmable electrophoretic delivery electrode based on organic conducting polymers. In this device,

an applied electronic in-put signal is translated to the release of bio-substances. This includes cations, e.g.  $H^+$ ,  $K^+$ , and  $Ca^{2+}$ , as well as positively charged neurotransmitters, e.g. aspartate, glutamate, acetyl choline. This latter finding inspired us to expand on the utility of the electronic delivery device from infection biology to neurobiology. The planar device was accordingly re-designed to enable glutamate-specific neurostimulation, thus establishing a tool for regulation of nerve cell signalling *in vivo* in order to affect mammalian sensory organs. Currently, we are adding a biosensor function in order to develop an artificial nerve cell.

### 3. Surface Switches for Defined Cell Cultivation

An important feature of conducting polymers is that the electrochemical state can be precisely controlled. We have taken advantage of this when constructing a functionalized cell culture dish. This allows us to direct cells to specific areas of the dish. Using an electrochemical transistor channel based on conducting polymers, a gradient of cells can be formed along the channel. We are currently exploring these devices as tools for improved analysis of cell signalling.

### Acknowledgment

Our research is supported by grants from the Swedish Research Council, the Swedish Royal Academy of Sciences, and the Swedish Foundation for Strategic Research (SSF). The Swedish Medical Nanoscience Center is funded by Karolinska Institutet, the Swedish Governmental Agency for Innovation Systems and Carl Bennet AB. *OBOE* research is funded by SSF.

### References

1. Månsson LE et al, "Real-time studies of the progression of bacterial infections and immediate tissue responses in live animals" *Cell Microbiol* (2007) 9:413-24 (Epub 2006 Aug 1)
2. Berggren M and Richter-Dahlfors A (2007) "Organic Bioelectronics" *Advanced Materials* 19 (20):3201-13
3. Isaksson J et al, (2007) Electronic control of  $Ca^{2+}$  signalling in neuronal cells using an organic electronic ion pump. *Nature Materials* 6(9):673-9
4. Tybrandt K et al, (2009) Translating electronic currents to precise acetylcholine-induced neuronal signaling using an organic electrophoretic delivery device. *Advanced Materials* 21:4442-6
5. Simon DT et al, (2009) Organic electronics for precise delivery of neurotransmitters to modulate mammalian sensory function. *Nature Materials* 8:742-6
6. Svennersten K, M Bolin, E Jager, M Berggren, A Richter-Dahlfors (2009) "Electrochemical modulation of epithelia formation using conducting polymers" *Biomaterials* 31:6257-6264
7. Bolin MH, Svennersten K, Nilsson D, Sawatdee A, Jager EWH, Richter- Dahlfors A, Berggren M (2009) "Active control of epithelial cell density gradients grown along the channel of an organic electrochemical transistor" *Adv Mater*, 21:4379-4382

# Micro / Nanofilters for Molecular and Cellular Separation and Diagnostics

**Jongyoon Han**

*Department of Electrical Engineering and Computer Science / Department of Biological Engineering,  
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA*

## **Summary**

As alternative molecular sieving material, artificial micro/nanofilter systems provide unique functions that are not easily obtainable in conventional molecular sieving systems. In this talk, I will present several recent examples of exploiting the benefits of microfabricated filters - precise control of objects to be analyzed - for advanced separation and analysis. Biomolecular filtration and sieving processes in nanoporous materials and gels are critically important in biomedical research, but the scientific understanding of molecular sieving has been less than desired. Recent development in nanofabrication allows one to construct various nanofilter systems, with a good control of pore size and shape. This provides ideal experimental model systems for studying the mechanical interaction between biomolecules / cells and micro/nanofilters.

## **1. Immuno-Separation and Detection using Anisotropic Nanofilter Array**

Artificial nanofilters and nanomembranes with 20-100nm pore sizes can be designed and fabricated to provide a unique separation modality. One distinctive example is the construction of Anisotropic Nanofilter Array (ANA) (1), which allows unique, continuous flow size fractionation of biomolecules (proteins and DNA) based on the size. This technology can be applied to an immune-separation of antibody-target complex (2), enabling homogeneous immune-separation assay as well as a mean to directly measure the binding kinetics.

## **2. Theoretical Modeling of Ogston Sieving in Nanofilters**

I will present both analytical and numerical models (3-5) to explain the sieving behavior observed in the molecular separation experiments done using the microfabricated nanofilter systems and nanopores. Structural parameters of nanopores and nanofilters can be correlated to the selectivity and dispersion of

nanopore sieving / separation systems, which could lead to model-based engineering of molecular sieving systems.

### **3. Microfilters for analyzing and separating malaria-infected red blood cells based on deformability**

We have designed and fabricated an optimized array of micron-size filter array systems, in order to analyze and separate malaria-infected red blood cells based on the cell deformability. Ring-stage malaria-infected red blood cells are slightly less deformable than uninfected red blood cells, providing a non-chemical marker for infected cells. We built a continuous-flow deformability cell sorter, allowing continuous separation of infected red blood cells from uninfected cells using a 2.2 $\mu$ m filters.(6) In addition, we have made a high-throughput cell deformability cytometer(7), which can measure the dynamic deformability of 1000~10,000 individual red blood cells.

### **Acknowledgement**

This work was supported by NIH (EB005743), Singapore MIT Alliance-II, and Singapore MIT Alliance for Research and Technology (SMART) center.

### **References**

1. Fu J, Schoch RR, Stevens AL, Tannenbaum SR, & Han J (2006) *Nat. Nanotech.* **2** 121 - 128.
2. Yamada M, Mao P, Fu J, & Han J (2009) *Anal. Chem.* **81**, 7067–7074.
3. Li ZR, Liu GR, Chen YZ, Wang J-S, Bow H, Cheng Y, & Han J (2008) *Electrophoresis* **29**, 329–339.
4. Li ZR, Liu GR, Hadjiconstantinou NG, Han J, Wang JS, & Chen YZ (2010) *Electrophoresis* **accepted for publication.**
5. Li ZR, Liu GR, Han J, Cheng Y, Chen YZ, Wang J-S, & Hadjiconstantinou NG (2009) *Phys. Rev. E* **80**, 041911.
6. Bow H, Hou HW, Goldfless S, Abgrall P, Tan K, Niles J, Lim CT, & Han J (2009) in *MicroTAS 2009* (Jeju, Korea), pp. 1219-1221.
7. Huang S, Bow H, Diez-Silva M, Suresh S, & Han J (2010) in *MicroTAS 2010* (Groningen, the Netherlands).

# 高感度・小型・微小領域蛍光検出器の開発

○福澤隆、田中裕之、東秀樹  
日本板硝子株式会社

## Development of Compact High Sensitivity Fluorescence Detector For Micro Region

Takashi Fukuzawa\*, Hiroyuki Tanaka, Hideki Azuma  
*Nippon Sheet Glass Co., Ltd.*

### Abstract

Detection for capillary electrophoresis needs high sensitivity with small amount of sample, so fluorescence detector is considered to be most suitable. But at present it is not easy to get such detector for experiment or detection module of analyzer. As the fluorescence detector available is limited only for standard sample case such as micro titer plate.

By using SELFOC<sup>®</sup> micro lens as key parts for an optical unit of fluorescence detector, practically compact fluorescence detection module has been achieved with low cost. This module allows high-sensitivity measurements of small amount of sample even in the blight place just by bringing the lens at the tip of the optical fiber close to the sample.

### 1. はじめに

キャピラリー電気泳動など微量サンプルでの分析には微小領域での高感度な測定が必要であり、この分野では蛍光検出法がよく使われている。特にクリニックやフィールド等で使用可能な POCT 用装置をターゲットとする場合は、高感度を維持しながらの小型化・低コスト化の要求が強く、蛍光検出器がより好適な検出器となる。

しかしながら簡単に入手可能なものはマイクロタイプレート用などサンプル容器が限定され、実験や装置組み込みに即した容器での測定には独自の設計を行う必要があり、低コストで入手できるものはなかった。

そこで我々は Fig.1 に示す SELFOC<sup>®</sup> Micro Lens(以下 SML と略記)を初めとするマイクロオプティクス技術を用い、微小領域の測定が簡単にでき、小型低コストで高感度な蛍光検出モジュールを開発したので報告する。

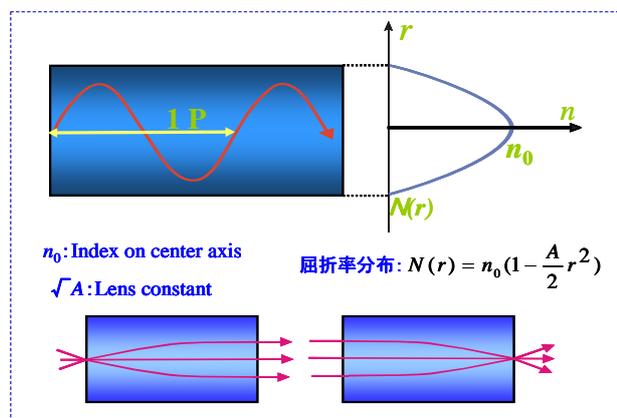


Fig. 1 SML とその特性

## 2. 実験

マイクロオプティクスノウハウを用い、微小領域を高感度で測定できる小型蛍光検出モジュールを種々概念設計した。これらの中から使いやすさと低コスト化を加味し、光源をLED、全光路を光ファイバとし、分波器とプローブにSMLを使用した蛍光検出用光学ユニット (Fig. 2) を開発し、小型蛍光検出モジュールに組み上げた。この検出モジュールを使用し、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) をもちいて、感度評価、使いやすさの確認等を行った。

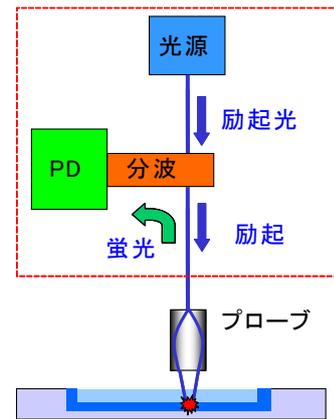


Fig.2 光学ユニット

## 3. 結果及び考察

試作した蛍光検出モジュールの写真を Fig. 3 に示す。モジュールのサイズは 100\*75\*30mm である。またこのモジュールをもちいた微小領域 ( $\phi 0.3 \times 0.5 \text{mm} = 40 \text{nL}$ ) での FITC 溶液の感度評価の結果を Fig. 4 に示す。この結果からの 40nL 試料でも 5nM 以下の検出が可能であることが分かった。言い換えると 200a (アト) mol の蛍光物質まで測定可能である。

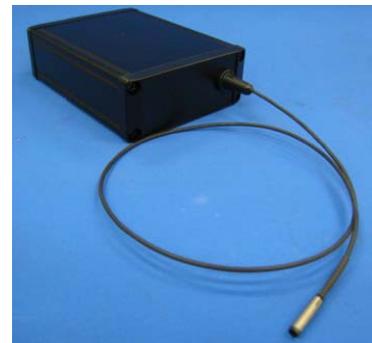


Fig.3 検出モジュール

また Fig. 5 に示すように SML のついた先端  $\phi 4 \text{mm}$  のプローブをサンプルに近づけるだけで測定が可能であり、明るい場所でもほとんど感度低下なく測定できる事を確認した。さらに微小流路での測定もできる事から、キャピラリー電気泳動の検出器としても十分に使用できることが確認できた。

## 4. 謝辞

評価にあたり産業技術総合研究所健康工学研究部門の田中善秀様のご協力を頂き深く感謝申し上げます。

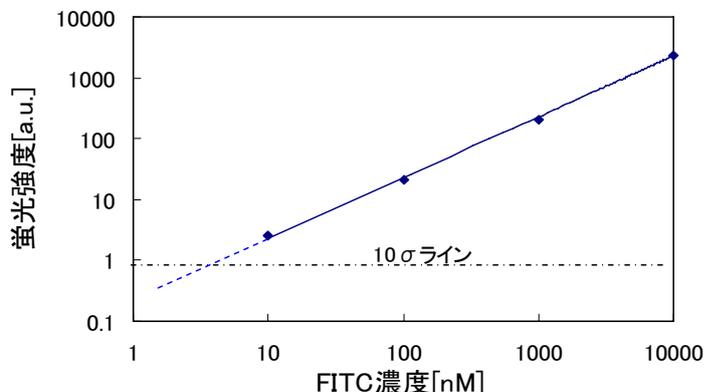


Fig.4 感度評価結果

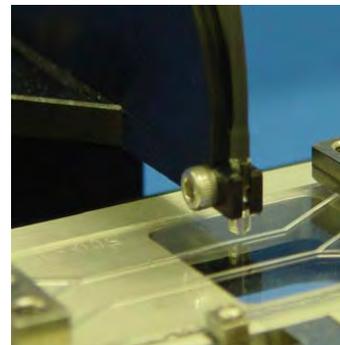


Fig.5 測定状況

# 高感度 CE-ESI-MS のためのシースレスインタフェース

○新井悦郎<sup>1</sup>, Jerry Feitelson<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>ベックマン・コールター株式会社, <sup>2</sup>Beckman Coulter, Inc.)

## A Sheathless Interface for High Sensitivity CE-ESI-MS

Etsuo Arai <sup>1\*</sup>, Jerry Feitelson <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Beckman Coulter K.K. <sup>2</sup> Beckman Coulter, Inc.

### Abstract

Capillary Electrophoresis should have a perfect marriage with Mass Spectrometry if its inherent advantages are maintained, such as low flow rates and high resolution. For this reason, CE-MS is a very valuable and useful new analytical strategy to complement the widely used LC-MS technology, particularly for charged and polar analytes. Nevertheless, many challenges remain before CE-MS becomes universal. A significant improvement in sensitivity due to ultra-low flow rates is one of its key attributes.

The novel sheathless design with a porous tip at the electrospray site provides a practical solution to this challenge. This design also retains the intrinsic high resolution of CE, along with robustness and reduction of electrochemical artifacts. Details of the current prototype design and application results will be discussed.

### 【はじめに】

今日、多くの実用的なアプリケーションの開発に伴い、キャピラリー電気泳動（CE）法の必要性が拡大している。製薬分析においては生物製剤の開発・品質管理には不可欠な地位を確立し、合成医薬品分析・エナンチオマ分析においても必要度が高まっている。また製薬分野以外でも食品・化学工業の分野で応用が増加している。

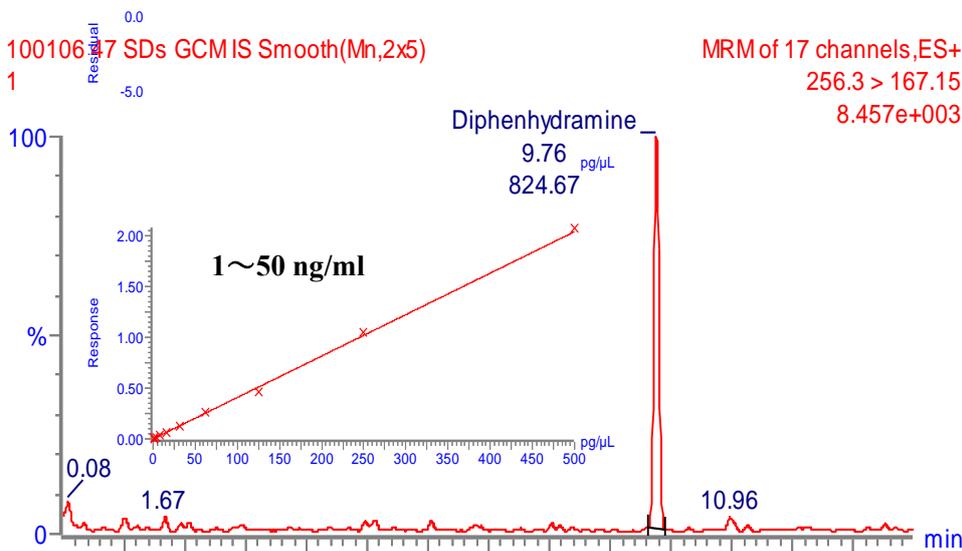
並行してメタボローム研究や、生物製剤含めての製薬開発研究分野で、キャピラリー電気泳動－質量分析（CE-MS）法の有用性も評価され、応用例が増加している。液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）法においてカラム保持が困難なイオン性物質の一斉分析に効果的に応用され、特にメタボローム研究分野では第一選択の地位を確立しつつある。

CE-MS 法は、双方がイオン化された試料において分析効率が向上する利点とともに、CE 法における高分解能・低流量が MS にとって有効であることから、理想的な組合せ分析法と考えられる。汎用されている LC-MS 法に対しても相補的な分析手法としての価値を持つ。一方でこの手法の標準化においては、多くの改善すべき点が残されている。現在通常用いられているシース液を使用するスプレー法は、測定対象成分の希釈から感度面での不利益が推測される。ここでは、シースレスでの接続を可能とするキャピラリー先端部分のデザイン開発と、応用における感度・その他の効果について、考察する。

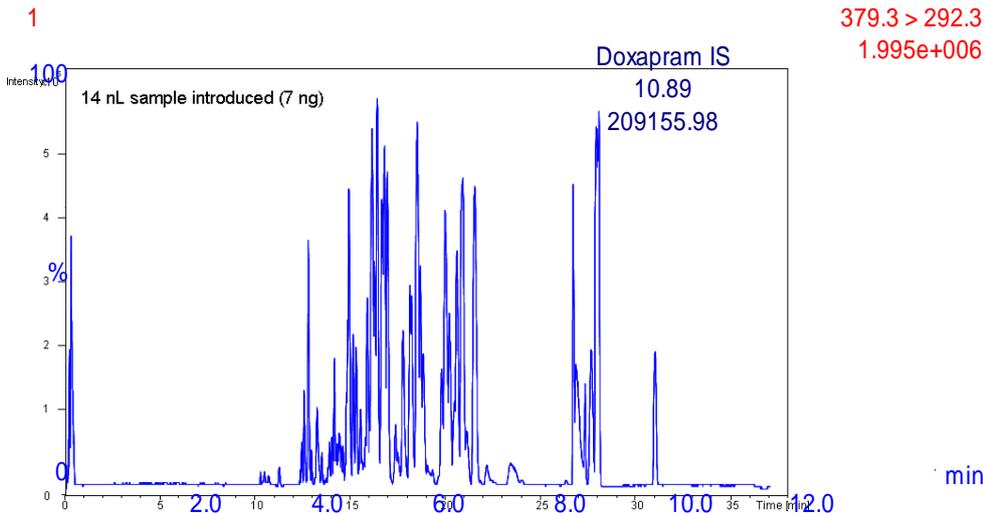
**【実験、及び結果】**

CEはPA 800 plus、及びPA 800 Enhanced（バックマン・コールター社）を使用した。キャピラリーは外径 150 μm、内径 30 μm のものについて、スプレー側末端部分のみを外径約 40 μm とし、多孔質の極薄シリカ部分を通して通電可能な構造としたものを用いた。この構造を安全に保護しつつ容易にセッティング可能なデザインを開発した。

アンジオテンシンの検出においてはシース液使用 CE-MS 法に対して 20 倍の感度が得られた。尿中薬物分析のための 1 ng/ml の含量を定量的に測定した。ミルクタンパク質のトリプシン消化物において、多くの高効率でイオン化されるペプチドとともに、共存するリン酸化ペプチドの検出に応用できた。



**Fig.1 MRM of parent ion (256.3 m/z) and daughter ion (167.15 d) of diphenhydramine Standard (1 ng/ml)**



**Fig.2 TIC of milk powder tryptic digest at 0.5 mg/ml**

# CE-TOFMS による陰イオン性化合物の最新測定法

○曾我朋義

慶應義塾大学先端生命科学研究所

## A Novel CE-TOFMS Method for Analysis of Anions

Tomoyoshi SOGA\*

*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

### Abstract

We describe a sheath flow CE-TOFMS method in negative mode using a platinum ESI spray needle, which allows the comprehensive analysis of anions. The material of the spray needle had significant effect on the measurement of anions. A stainless steel spray needle oxidized and corroded at the anodic electrode due to electrolysis. The precipitation of iron oxides plugged the capillary outlet, resulting in shortened capillary lifetime. Many anions also formed complexes with the iron oxides or migrating nickel ion, which was also generated by electrolysis and moved toward the cathode (the capillary inlet). The metal-anion complex formation significantly reduced detection sensitivity of the anionic compounds. The use of a platinum ESI needle prevented both oxidation of the metals and needle corrosion. Overall this method is quantitative, sensitive and robust, and its utility was demonstrated by the analysis of the metabolites in the central metabolic pathways extracted from mouse liver.

### はじめに

演者らが開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) 法による陰イオン測定法<sup>1</sup>は、千種類以上のイオン性代謝物質の同時定量分析を可能にした。これまでに様々な生物種のメタボローム測定にも応用され、幾つかの新規知見を得た<sup>2-4</sup>。しかしこの測定法は、使用するキャピラリーの寿命が短いなどの問題点があった。今回演者らは、キャピラリーの寿命が短くなる原因は、MS用のエレクトロスプレーニードルの電気分解であることを突き止め、白金製のニードルを用いることによってこの問題を解決した<sup>5</sup>。

### 実験

CE-TOFMSは、Agilent CE、Agilent LC/MSD TOF 飛行時間型質量分析計およびシース液送液用の Agilent 1100HPLC ポンプで構成した。陽イオンポリマーコーティングキャピラリーとして内径 50  $\mu\text{m}$ 、長さ 110 cm の COSMO キャピラリー (ナカライテスク社製) を使用した。泳動バッファには、50 mM 酢酸アンモニウム (pH 8.5) を使用し、印加電圧は -30 kV であった。エレクトロスプレーニードルには、ステンレス製と白金製 (Agilent G1700-60041) を使用した。その他の測定条件の詳細は論文を参照されたい<sup>5</sup>。

## 結果と考察

ステンレス製スプレィーニードルを用いて陰イオン標準液を繰り返し測定したところ、わずか5回の測定でキャピラリー出口にさびのような詰まりとニードルの腐食が観察された。このさびのような物質を各種の有機溶媒および塩酸、硝酸、硫酸で溶解したところ、塩酸にのみ溶解したことから、この物質は鉄やニッケルなどのイオン化傾向の大きい遷移金属であることが判明した。キャピラリーを先端から20cm毎に切断しフッ酸に溶解後、ICP-MSによって金属を測定したところ、ステンレス製ニードルでは電気分解によって、鉄やニッケルイオンが生成し、これらの金属イオンがキャピラリー出口に詰まること、またニッケルイオンは、キャピラリー内をキャピラリーの入口に向かって逆流し、クエン酸やヌクレオチドなどの陰イオンと錯体を形成することが判明した<sup>5</sup> (Fig. 1A)。この問題を解決するため、白金製のスプレィーニードルを試作した。白金は水素よりイオン化傾向が小さいため、白金ニードルを用いると水の電気分解が起き、水素イオンが生じた (Fig. 1B)。したがって、前述の各種の問題は完全に解決され、一本のキャピラリーで500回以上の分析が可能になった。またクエン酸やヌクレオチドなどほとんどの陰イオンで数倍から数十倍の高感度分析が可能になった<sup>5</sup>。

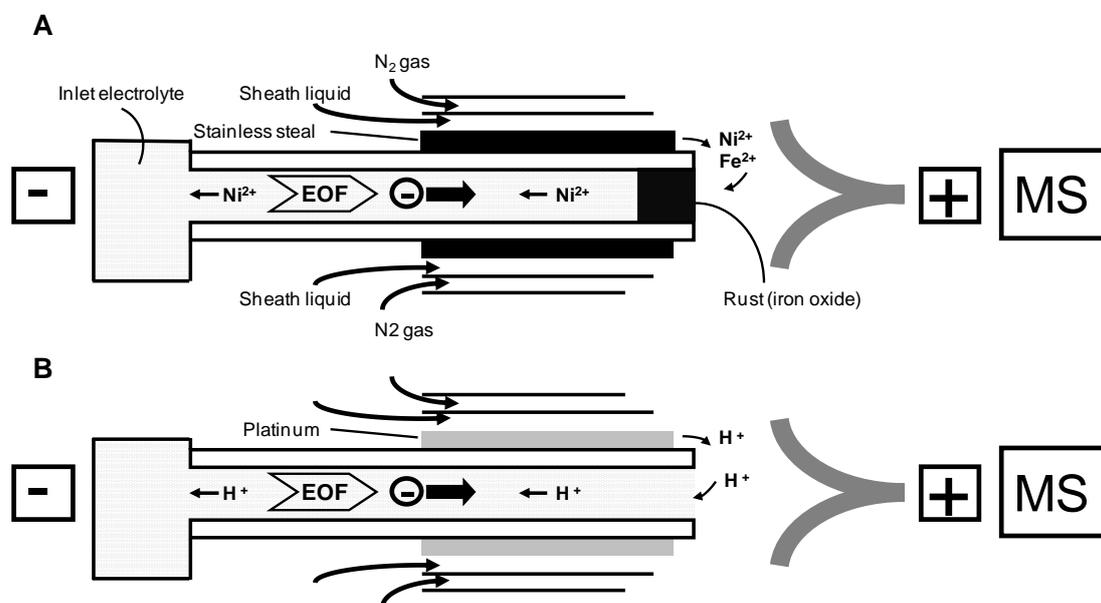


Fig. 1 CE-MSによる陰イオン測定時のスプレィーニードルの影響。(A) ステンレス製、(B) 白金製

## References

- [1] Soga, T. *et al. Anal. Chem.* 74: 2233-2239, 2002.
- [2] Ishii, N., *et al. Science* 316: 593-597, 2007
- [3] Minami, Y., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 9890-9895, 2009
- [4] Hirayama, A., *et al. Cancer Res.* 69: 4918-4925, 2009.
- [5] Soga, T. *et al. Anal. Chem.* 81: 6165-6174, 2009.

# 質量分析を用いた生体超分子の構造機能研究 —構造生物学から見た CE への期待—

明石知子

横浜市大院・生命ナノシステム科学

## Mass spectrometry of protein complexes

### - Prospects for applications of CE to structural biology -

Satoko Akashi

*Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University*

#### Abstract

Due to the significant progress of mass spectrometry, it has now been widely used in proteomics research. Moreover, it is now an essential tool also in structural biology. Mass spectrometry (MS) can give accurate molecular masses not only of single polypeptides but also of non-covalently bound complexes. In the present paper, our recent MS studies of non-covalently bound protein complexes will be demonstrated. Based on our previous study of top-down analysis of a telomere protein, TRF2, by using a microchip CE-MS system, discussion on the future prospects for applications of CE to the research of structural biology will be presented.

#### はじめに

転写の開始やその制御には、様々なタンパク質が関与し、多くの場合タンパク質複合体（生体超分子）として機能している。しかしながら、これら生体超分子は結晶化が難しく巨大であるため、構造生物学の一般的な実験手法である X 線結晶構造解析や NMR での解析が困難である。そこで我々は、構造生物学において、溶液中に存在するタンパク質複合体の質量を決定できる質量分析法を用いて生体超分子の構造解析を行っている。

タンパク質の同定を行う場合には、変性状態のタンパク質から得られるペプチドの質量や部分アミノ酸配列を質量分析法で決定し、DNA のデータベースと照合する方法が一般に用いられている。この目的のために、我々はマイクロチップ CE-MS のシステムを開発した。<sup>1</sup> このシステムは、アフィニティによる選別機能を付加することで、例えば DNA 結合能を有するタンパク質を検出・同定することができる。本発表では、生体超分子の質量分析による構造研究で得られた最近の成果について紹介し、CE との接続の可能性を議論したい。

#### 実験

試料とするタンパク質は大腸菌大量発現系で調製し、カラムクロマトグラフィーで精製した。生体超分子の測定には、質量分析装置は Q-tof2 (Waters) および SYNAPT G2 (Waters) を用い、試料は酢酸アンモニウム水溶液として質量分析装置に導入した。

#### 結果と考察

(1) *Bacillus* 属細菌の転写翻訳制御因子 TRAP-anti-TRAP 複合体の構造解析<sup>2</sup>

TRAP は、*Bacillus* 属バクテリアの *trp* オペロンの転写翻訳制御に関わるタンパク質で、anti-TRAP はその制御タンパク質である。TRAP および anti-TRAP は X 線結晶構造解析で構造が決定されており、TRAP は 8.4 kDa のサブユニット 11 個からなる 11 量体、anti-TRAP は 5.7 kDa のサブユニット 3 個からなる 3 量体×4 の 12 量体を形成することが明らかになっている。

TRAP-anti-TRAP 複合体の X 線結晶構造解析で得られた構造は、TRAP 12 量体+anti-TRAP 3 量体×6 (204 kDa) であった。一方、TRAP-anti-TRAP 複合体の ESI マススペクトルでは、A : TRAP 12 量体+anti-TRAP 3 量体×6 (204 kDa)、B : TRAP 11 量体+anti-TRAP 3 量体×5 (179 kDa)、C : TRAP 11 量体+anti-TRAP 3 量体×4 (162 kDa)、D : TRAP 11 量体+anti-TRAP 3 量体×3 (144 kDa) の 4 種類の複合体が検出された。anti-TRAP と結合していないフリーの TRAP の場合は、11 量体の結晶構造が報告されていることから、X 線結晶構造解析の結果だけで解釈すると、TRAP は anti-TRAP で認識される際に、11 量体から 12 量体へ構造変換していることになる。また、フリーの TRAP の ESI マススペクトルでは、11 量体のシグナルに加えずに 12 量体のシグナルも観測されていることから、総合的に判断すると、複雑な結合比を持つ複合体から対称性の良い TRAP 12 量体+anti-TRAP 3 量体×6 が結晶化されたのに対し、溶液中では TRAP-anti-TRAP 複合体は多種多様な結合比で存在し機能しているものと考えられる。本研究は、結合比が複雑な巨大な生体超分子でも、試料溶液に存在する様子を示す“スナップショットが撮れる”という質量分析法の利点を示すものである。

## (2) リコンビナント ヒトヒストン多量体の構造解析<sup>3</sup>

真核生物の DNA は 4 種類のヒストンタンパク質 (H2A、H2B、H3、H4) 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に巻きつき、折りたたまれて核内にコンパクトに収納されている。必要に応じて遺伝子の転写が行われタンパク質がつくられるが、この転写の制御はヒストンの N 末端部分のアセチル化やメチル化などの修飾が関係していることが知られている。また、ヒストン 8 量体 (112 kDa) およびヒストン 8 量体に 146 もしくは 147 塩基対の二重鎖 DNA が巻き付いたヌクレオソームコア粒子 (NCP) (200 kDa) の結晶構造は解かれているのに対し、4 種のヒストン単量体 (11~15 kDa)、H2A/H2B 2 量体 (28 kDa)、H3/H4 4 量体 (55 kDa) の構造は X 線結晶構造解析でも NMR でも解かれていない。我々は、ヒストン多量体の構造解析と修飾による構造変化の解析を目的として、ESI-MS を用いてヒストン多量体丸ごとの質量分析を検討した。

その結果、(1) ヒストン多量体の ESI-MS の測定では、2 M 以上の高い濃度の酢酸アンモニウム水溶液で試料を調製することで、多量体を解離させずに観測することができた。(2) ヒストン H2A/H2B 2 量体について、アルギニン残基の脱イミノ化を行うと、2 量体の安定性が高くなることがわかった。現在、さらなる解析を行っている。

## 文献

1. S. Akashi et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 1932-1938 (2006).
2. (a) M. Watanabe et al. *PNAS*, **106**, 2176-2181 (2009). (b) S. Akashi et al. *Anal. Chem.* **81**, 2218-2226 (2009).
3. S. Shimoyama et al. *J. Mass Spectrom.* **45**, 900-908 (2010).

# CE-MSによるメタボローム測定法とがんの代謝解析

○平山明由

慶大・先端生命

## Investigating cancer metabolism by CE-MS metabolome analysis of tumor tissues

Akiyoshi HIRAYAMA\*

*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

### Abstract

Most cancer cells are known to obtain their energy primarily by glycolysis rather than oxidative phosphorylation even in the presence of adequate oxygen supply (Warburg effect). Moreover, inadequate blood supply resulting from defective angiogenesis is often observed in colon and pancreatic cancer tissues. In these cancer tissues, nutritional conditions are therefore unfavorable. From this perspective, the tumor microenvironment *in vivo* might be considerably different from typical *in vitro* culture conditions. In this presentation, I introduce our strategies for CE-MS-based metabolome analysis and its application for studying cancer-specific metabolism by analyzing surgically excised tumor tissues.

### はじめに

がん細胞が、好氣的条件下でも酸素を必要としない解糖系にエネルギー産生の多くを依存するという現象は、ワーバーグ効果として古くから知られている。通常、がん細胞の増殖には ATP が不可欠であるが、膵臓がんや大腸がんなど一部のがん種においては、血流が乏しいために、解糖系に必要なグルコースも酸化的リン酸化に必要な酸素も不足していることがわかっている。よってこれらのがんにおいては、十分な ATP 産生は一見不可能なように思われる。しかしながら、このような栄養的に非常に劣悪な環境下においても、実際に生存・増殖しているがんには、別の何か特殊なエネルギー産生のメカニズムが存在しているのではないだろうかという仮説を立て、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用いたメタボローム測定により、がん組織のエネルギー産生のメカニズムの解明を試みた。

### 実験

キャピラリー電気泳動装置、飛行時間型質量分析計は共に Agilent 社製のものを用いて行った。手術で採取された臨床検体は、病理医によって同一検体から腫瘍部と非腫瘍部の2つに分けた後、それぞれを前処理してメタボローム測定に供した。

## 結果及び考察

CE-TOFMS を用いたメタボローム測定によって、16 名の大腸がん患者、および 12 名の胃がん患者の腫瘍組織中から約 800~1,100 種類の代謝物質由来と思われるピークを得た。その内、エネルギー代謝に特に重要である解糖系、ペントースリン酸回路、TCA 回路の代謝中間体を代謝経路上にマッピングした結果を図 1 に示す。

特に大腸組織で顕著であるが、クエン酸回路の後半部分の代謝物（コハク酸、フマル酸、リンゴ酸）が腫瘍部において有意に増加していた。古くから嫌気性微生物や回虫などの寄生虫の一部において、嫌気的条件下でフマル酸呼吸と呼ばれる代謝によって ATP 産生が行われることが知られており、がん細胞もフマル酸呼吸かそれに類似した代謝によって ATP を産生しているのではないかと考えられる。

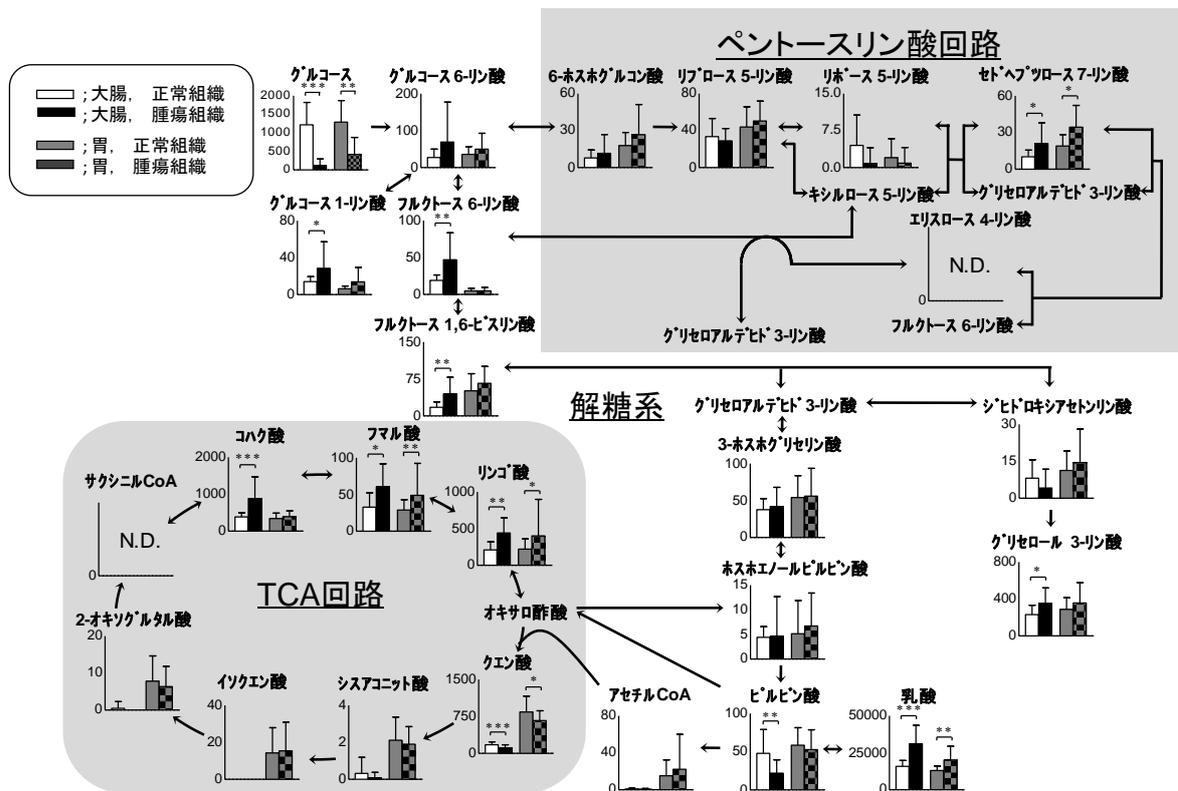


図 1 解糖系、ペントースリン酸回路、TCA 酸回路に関与する代謝物の変動

## 謝辞

本研究は厚生労働省がん研究助成金、文部科学省グローバル COE プログラム「In Vivo ヒト代謝システム生物学」、山形県、および鶴岡市の支援によるものである。

## 文献

1. A. Hirayama, T. Soga et al., *Cancer Res*, **69** 4918 (2009).

# ポジティブモード CE-MS によるアニオン性代謝産物 網羅的測定法とその応用

○原田和生<sup>1</sup>, 福崎英一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科, <sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科

## Comprehensive analytical method for anionic metabolites by means of positive mode CE-MS and its application

Kazuo HARADA<sup>\*1</sup>, and Eiichiro FUKUSAKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

<sup>2</sup> Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, Osaka University

### Abstract

A simple method for the simultaneous analysis of anionic metabolites such as sugar phosphates, organic acids, nucleotides and CoA compounds based on positive mode capillary electrophoresis - mass spectrometry is described. An ordinary fused silica or sulfonated capillary would be promising due to providing a stable EOF and avoiding a current drop. The non-treated fused silica capillary also attracts analysts due to its low cost. We showed that our analytical method provided enough resolution to separate anionic metabolite isomers. We also applied the method to some biological researches.

### はじめに

メタボロミクスは生体内に含まれる代謝産物の総体(メタボローム)を解析することにより,細胞内代謝ネットワークの理解を目指すポストゲノムサイエンスであり,網羅的に代謝産物を同定,定量する測定技術は最も重要な基幹技術である. 解糖系, ペントースリン酸経路, TCA 回路などといった生命活動維持に関わる非常に重要な代謝経路の中間体である糖リン酸, 有機酸, ヌクレオチド, CoA 類の一斉測定は, メタボロミクスで汎用される GC-MS, FT-NMR では困難であり, また, LC-MS ではイオンペア試薬, あるいはイオンサプレッサーを使用しなければならない等の制約がある. 慶応大学曾我教授らが提示したカチオン性ポリマー(SMILE(+), COSMO)および中性ポリマー(DB-1)をコーティングしたキャピラリーを利用した CE-MS 法は高理論段を達成でき, 極めて優れた手法であるが, 高価なキャピラリーを用いなければならない点, アニオン性代謝産物を網羅するためには 2 種類の手法を併用しなければならない点が課題として挙げられる. そこで演者らは汎用のフューズドシリカキャピラリーを用い, ポジティブモードによる CE-MS によりアニオン性代謝産物の網羅的解析を行う手法を提案した.

### 実験

キャピラリー電気泳動装置として Beckman Coulter 社 P/ACE MDQ, 質量分析計は Bruker Daltonics 社 Esquire 3000 plus および Applied Biosystems 社 4000QTRAP を使用した. 電解質は酢酸アンモニウムやトリメチルアミン, トリエチルアミン溶液を用い, pH は 8 以上に設定し

た. キャピラリーサイズは内径 50  $\mu\text{m}$ , 長さ 80 ~100 cm 程度に揃えた.

## 結果及び考察

糖リン酸, 有機酸, ヌクレオチド, CoA 類を含む 54 種類のアニオン性化合物を測定した結果を Fig. 1 に示す. 電解質の pH を高くすることにより, 電気浸透流の流速が全ての分析対象化合物の電気泳動移動度 (静電引力によって移動する速度) よりも上回るようにし, アニオン性化合物を陰極である MS 側に移動させることに成功した. また, グルコース 6-リン酸, フルクトース 6-リン酸などの異性体も十分に分離することができることが示された. 我々は更にスルホン化キャピラリーを用いることによって, 同様の測定が安定に行えること, 特に, 移動時間再現性が向上することを示している. また, これらの手法を用いて微生物, 植物, 動物などあらゆる生物のメタボローム解析に応用している.

## 文献

1. K. Harada, E. Fukusaki, A. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 403 (2006).
2. K. Harada, Y. Ohyama, T. Tabushi, A. Kobayashi, E. Fukusaki, *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 249 (2008)

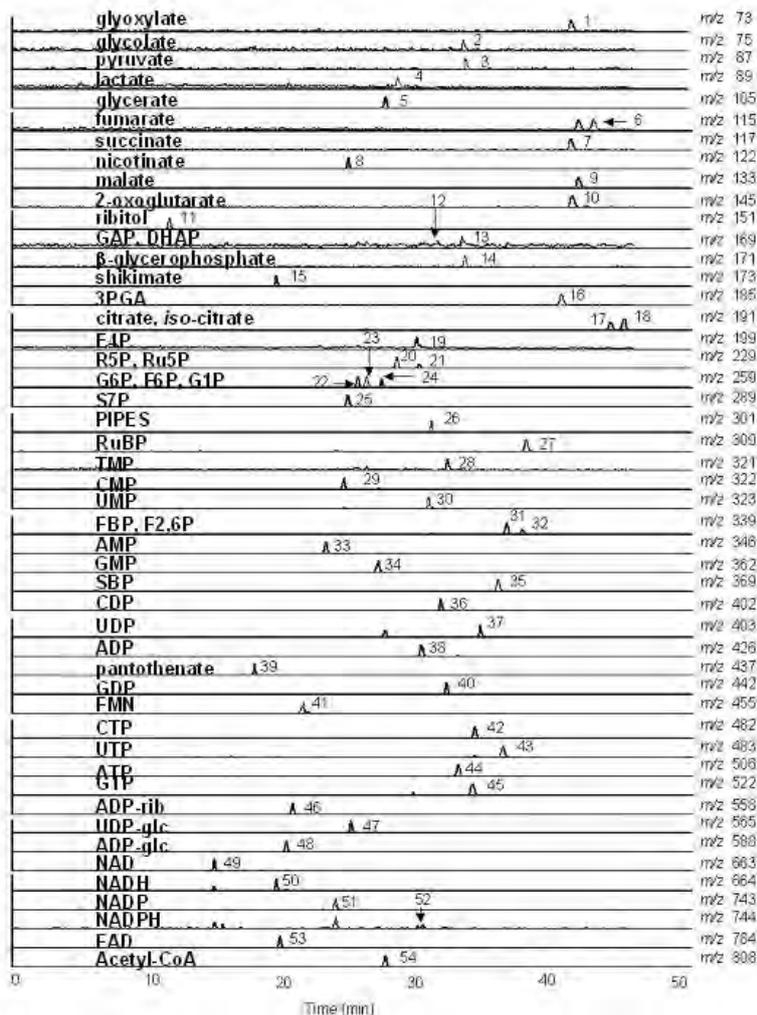


Fig. 1. Mass electropherograms of anionic standards. Experimental conditions : Sample concentration, 100  $\mu\text{mol/l}$  each; Injection, 5.0 sec at 0.14 bar; Capillary, fused silica capillary 50 mm i.d.  $\times$  100 cm; Temperature, 20°C; Sheath liquid, 5  $\mu\text{l/min}$  5 mM ammonium acetate in 50% (v/v) methanol/water; Electrolyte, 50 mM Trimethylamine, pH 10.0; Applied voltage, 30 kV (0-30 min), 0 kV (30-50 min); Pressure to inlet vial by air pump, 0 bar (0-30 min), 0.10 bar (30-50 min). (文献 1 より改変して引用)

# 酸性泳動液を用いた CE-MS による陰イオン性代謝物測定法と植物試料でのメタボローム解析

○若山正隆, 安彦友美, 青木直大, 佐々木治人, 大杉立

東大院・農

## Plant metabolome analysis by CE-MS using acidic electrolytes for anionic metabolites

Masataka Wakayama\*, Tomomi Abiko, Naohiro Aoki, Haruto Sasaki and Ryu Ohsugi

*Crop Science Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

### Abstract

For metabolome analysis, the comprehensive analysis of both amino acids and anionic carboxylic acids were valuable. When the single set of CE-MS equipment was used, the changes of electrolyte types and/or capillary types were required to analyze these metabolites. Acidic electrolytes restrict the electroosmotic flow and often used for amino acids analysis of CE-MS. Based on this property of acidic electrolytes, we established two CE-MS methods for anionic carboxylic acids by using uncoated fused-silica capillary. 1) In normal directional electrophoresis (CE inlet sets to the anode) with assistance of sheath gas flow, the anionic carboxylic acids above  $pK_a = 3$  were detected after the detection of amino acids. 2) In reverse directional electrophoresis (CE inlet sets to the cathode) with excluding alkali, the anionic carboxylic acids including below  $pK_a = 3$  were also detected. By using this method, the metabolite changes after the nitrogen absorption in rice were elucidated.

### はじめに

キャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)は近年、極性低分子のメタボローム解析に利用される機会が増加している。当研究室では、イネを中心とした植物試料の CE-MS での解析に取り組んでいるが、従来からあるアミノ酸類の測定方法に加えて、陰イオン性カルボン酸の簡便な新たな方法を開発した。本発表では、この陰イオン性カルボン酸の解析方法と植物試料での解析事例を報告する。

### 酸性泳動液を用いた陰イオン性代謝物の測定法の確立

メタボローム解析においては、アミノ酸類と陰イオン性カルボン酸類の両者の解析が望まれるが、通常 CE-MS では両者の解析には異なった種類の泳動液、または異なる種類のキャピラリーが必要となる。CE-MS 装置 1 台の場合、これらの交換と保管および交換に伴う安定化の作業が必要となる。CE-MS でのアミノ酸類の測定に広く使用されているギ酸等の酸性泳動液は電気浸透流を強く抑制する性質を持つ。この性質を利用して、未修飾の溶融シリカキャピラリーを用いて陰イオン性カルボン酸類が測定できるシステムを確立した。具体的には以下の二つの方法である。1)従来からの CE-MS でのアミノ酸分析系である酸性泳動液の順方向電気泳動(試料導入側を+極、MS 側を-極)にシースガスによる高い吸引力を併用し、アミ

ノ酸類の検出後、中性物質が検出されるまでのピークがほとんど検出されない測定時間に、MS の検出モードを正イオンモードから負イオンモードに変えることで 1 回の試料導入でアミノ酸のみならず  $pK_a=3$  以上の陰イオン性物質の測定を可能とした。この方法に加えて 2) シーン液の塩基成分を取り除き、CE における電流安定性を確保した上で、アミノ酸の分析と同一の酸性泳動液を用いて、逆方向の電気泳動（試料導入側を一極、MS 側を+極）を行うことで  $pK_a=3$  以下の物質を含む陰イオン性カルボン酸、糖リン酸の解析を可能とした。

### **$^{15}N$ を用いたイネの窒素吸収に伴うメタボローム解析**

植物が根から吸収した窒素を初期同化する仕組みを理解するために、植物体にアンモニウムを与え、その後の代謝産物の変動を解析することは重要である。さらに、 $^{15}N$  を窒素処理に用いることで、新規に同化された窒素代謝産物と窒素処理以前に内在する窒素代謝産物を区別することが可能である。播種後種子栄養のみで 2 週間水耕栽培したイネを、 $^{15}N$  アンモニウムを含む水耕液に移すことで窒素吸収処理を行い、器官別、経時的に採取して代謝産物を CE-MS で分析した。ギ酸を泳動液として、アミノ酸類は従来からあるアミノ酸分析の方法で、陰イオン性カルボン酸類、糖リン酸類は 2) の方法で測定した。

新たにつくられた  $^{15}N$  アミノ酸類は、窒素処理後 24 時間以内にピークに達し、以後減少した。処理後 48 時間経過するまでに  $^{15}N$  アミノ酸は、 $^{15}N$  を含まない内在性の窒素からなるアミノ酸と同程度から 1.5 倍以内の濃度に減少した。窒素処理に伴い、根ではリンゴ酸を含む多くの陰イオン性カルボン酸、糖リン酸類が処理直後から減少する一方、地上部ではカルボン酸類が窒素処理直後に増加した。窒素処理後 24 時間経過すると根ではカルボン酸類が増加する一方、地上部のカルボン酸類がピークに達しその後減少していく傾向を示した。以上から、吸収窒素がアミノ酸類に同化されるのに伴い、有機酸類の地下部、地上部での各濃度が大きく影響されることが明らかになり、アミノ酸を中心とした窒素代謝産物とアミノ酸を生成するために必須な炭素代謝産物との関わりについて新たな知見が得られた。

### **グルタミン酸脱水素酵素遺伝子を高発現させたイネの代謝応答**

イネは根から吸収したアンモニウムをグルタミン合成酵素(GS)によってグルタミンに同化している。一方微生物ではアンモニウムと 2-オキソグルタル酸をグルタミン酸脱水素酵素(GDH)によってグルタミン酸に同化する経路も有する。植物における窒素同化系の向上を目指して、微生物がもつ GDH を高発現させたイネを用いて窒素吸収後の代謝物の経時的な変化を CE-MS で解析した。その結果、根では GDH の基質となる 2-オキソグルタル酸は GDH 高発現イネでは常に不足していることが分かった。GS の阻害剤を加えて通常窒素同化を抑制させると、野生型のイネの根では新たな窒素同化が行われず、2-オキソグルタル酸が蓄積するのみであった。一方、GDH 高発現イネでは、グルタミン酸が新たに作られ 2-オキソグルタル酸が低濃度になっていた。これらのことから、新たに導入された GDH 遺伝子は従来の窒素吸収・同化に付加的に貢献していることが明らかとなった。以上のように CE-MS を用いて経時的な代謝変化を解析することは GDH の役割を包括的に捉えるために有効である (Planta: 232 (2): 299-311(2010))。

# CE-MS を用いた医療・食品メタボロミクスの 応用研究

○杉本昌弘<sup>1</sup> 曾我朋義<sup>1</sup> 富田勝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>慶應大・生命

## Medical and Food Metabolomics using CE-MS

Masahiro SUGIMOTO<sup>\*1</sup>, Tomoyoshi SOGA<sup>1</sup>, Masaru TOMITA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

### Abstract

Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS), which can simultaneously quantify hundreds of metabolites, is a powerful tool for metabolomics research fields. To utilize the profiling ability of CE-MS for metabolomics, the development of data processing software for CE-MS data and the establishment of bioinformatics technologies for metabolome analyses are important. Here, we describe the development of non-targeted analytical algorithm, which automatically interpret all detected CE-MS peaks. As a medical application, a study for cancer detection using salivary metabolomics profiles is introduced. As food applications, correlation analyses between metabolomic profiles and taste of Japanese sake (*Nihonsyu*) and immature soybean (*Edamame*) are also introduced.

### はじめに

CE-MS は数百のイオン性代謝物質を一度に測定することができる強力なツールであり、様々なメタボロミクスの応用研究がおこなわれている。しかし、CE-MS の測定能力を最大限活かすためには、データ処理などの基盤技術の開発と、応用研究に活用できるインフォマティクス技術の確立が欠かせない。

### 結果及び考察

医療応用として、UCLA 大学との共同研究にて唾液を用いた癌検出の可能性を探索した [1]。また、食品応用として、日本酒に含まれる代謝物と味の相関解析 [2] やただちゃ豆（山形県庄内地方の枝豆）の保存時の味と代謝物の変動を解析した [3]。また、このような応用研究のために CE-MS のデータ処理を効率的に行い、データ間の差を検出するソフトウェアの開発 [4] と、データ中に含まれる全てのピークの解釈を行い、未知ピークの物質予測も行うノンターゲット解析のアルゴリズムの開発 [5] も行った。

### 謝辞

本研究は、山形県および鶴岡市の支援のもとに行われている。

### 文献

1. M. Sugimoto, D. T. Wong, A. Hirayama, T. Soga, M. Tomita *Metabolomics* **6** 78 (2010).
2. M. Sugimoto, T. Koseki, A. Hirayama, S. Abe, T. Sano, M. Tomita, T. Soga *J. Agric Food Chem* **58** 374 (2010).
3. M. Sugimoto, H. Goto, K. Otomo, M. Ito, H. Onuma, A. Suzuki, M. Sugawara, S. Abe, M. Tomita, T. Soga *J Agric Food Chem* **58** 8418 (2010).

4. M. Sugimoto, A. Hirayama, T. Ishikawa, M. Robert, R. Baran, K. Uehara, K. Kawai, T. Soga, M. Tomita *Metabolomics* **6** 27 (2010).

5. M. Sugimoto, A. Hirayama, M. Robert, S. Abe, T. Soga, M. Tomita *Electrophoresis* **31** 2311 (2010).

# レクチン固定化アフィニティーマイクロチップ

## 電気泳動法の開発

山本佐知雄，鈴木翔，鈴木茂生

近畿大・薬

### Development of Affinity Microchip Electrophoresis Method by *In situ* Photopolymerization of Lectin-impregnated Acrylamide.

Sachio Yamamoto\*, Sho Suzuki, Shigeo Suzuki

School of Pharmacy, Kinki University

**Abstract:** For the specific entrapment of saccharides derivatives, a simple and efficient method has been developed to fabricate a lectin-immobilized preconcentrator in a channel of a commercial polymethylmethacrylate-made microchip without using any photolithography and etching techniques. The preconcentration device was made by simple photochemical copolymerization monomers of acrylamide/*bis*-acrylamide containing various lectins by irradiating an argon ion laser beam, which also used as a light source for fluorimetric detection of sample components. The lectins were maintained their activities in the polyacrylamide gel layer caught saccharides as their 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) derivatives based on their specificities. The availability of glycan preconcentrator was demonstrated by the application to the sensitive analysis of some APTS-glycans derived from some glycoproteins.

#### 【緒言】

タンパク質の翻訳後修飾の中でも糖鎖の付与はもっともバリエーションに富み、様々な生命現象に深く関わっている。糖鎖の機能や病態、疾病との関連を調べるには、先ず糖鎖を高速・高感度で分離する必要がある。これを実現可能な分析法として、ハイスループット分析が可能なマイクロチップ電気泳動が注目を集めている。しかし、糖鎖は微量でしか得られない上、構造の多様で含量比も幅が広いことから、糖鎖をマイクロチップ電気泳動だけで解析することは困難である。ところでレクチンは糖鎖を認識するタンパク質の総称であり、糖鎖の部分構造を区別して認識することが知られる。しかも既に多くの特異性の異なるレクチンが単離されており、レクチンを組み合わせれば糖鎖構造の解析が可能となる。そこで、このレクチンをマイクロチップ流路内に光硬化性のアクリルアミドゲルを使って固定化し、オンラインで糖鎖を特異的に捕捉するアフィニティーマイクロチップ電気泳動(AMCE)法の開発を試みた。

#### 【実験】

**試料:** 糖標品としてマンノピオースを、糖タンパク質にはウシ臍臓リボヌクレアーゼ B (RNase B) やヒト血清由来トランスフェリン(TRF)などを用いた。糖タンパク質

をトリプシンで消化し、peptide- $N^4$ -(acetyl- $\beta$ -glucosaminyl)-asparagine amidase を加えて糖鎖を遊離させ、8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS)で誘導体化した。レクチンはタチナタマメ由来 Concanavalin A (ConA), 日本ニワトコレクチン (SSA)を用いた。

**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。

### 【結果・考察】

まず、Con A を 5 mg/mL になるようにアクリルアミドゲル溶液で調製し、流路交差部にアルゴンレーザーを5分間照射することでレクチン固定化アクリルアミドゲル層を作製した。試料に一連の高マンノース型糖鎖をもつRNase B由来 APTS 標識化糖鎖を用い、図1の電位設定でゲル層での試料捕捉に伴う蛍光強度の増減を観察した。その結果、時間の経過とともに顕著に蛍光が増大し、糖鎖が特異的に捕捉されていることが判明した。対照としてシアル酸認識レクチンである SSA を固定化したゲル層を作製して同様の実験を行ったが、ゲル層の蛍光強度の増大は観察されなかった。このことからレクチンはアクリルアミドゲル層でも活性を保持し、非特異的な吸着が起こっていないことが示唆された。次に脱着条件の検討を行った。種々の条件で検討を行った結果、BIに25 mMリン酸緩衝液(pH 2.0)を、BOを200 mMホウ酸緩衝液(pH 11.0)で満たし、1000 Vを印加したところ迅速な脱着が達成された。この条件で APTS 標識化マンノピオースを用いて濃縮効率の算出を試みたところ、およそ3分の濃縮で460倍の濃縮効果が得られた。次にRNase Bへの応用を試みた。濃縮の結果を図2(b)に示す。なお、図2(a)は対照として50倍濃度の濃いものを通常のgated導入して分析したものである。2つのエレクトロフェログラムを比較すると泳動時間にほとんど差がなく、対照と比較するとシャープなピークが得られた。現在、レクチンの種類を増やすとともに他の糖タンパク質糖鎖と同様に糖ペプチドの解析にも応用している。

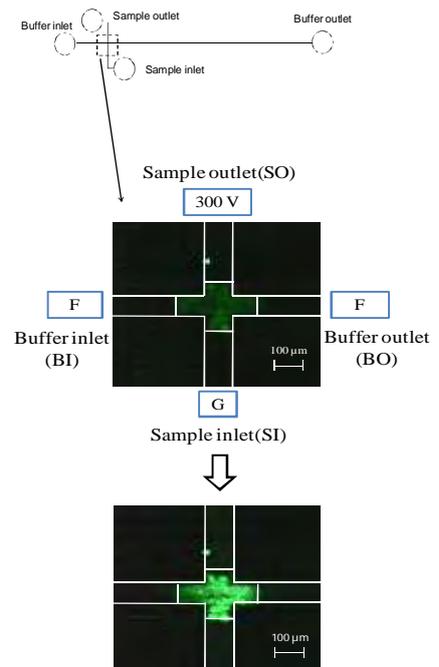


図1 試料にRNase Bを用いた時のマイクロチップ流路交差部の様子。上は電圧印加直後、下は180秒後の様子。

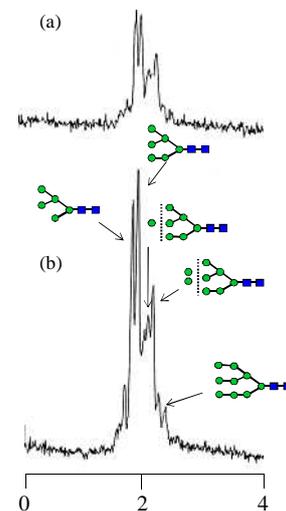


図2 Con A 固定化アクリルアミド層を用い APTS 標識化 RNase B 由来糖鎖の AMCE 分離に適用した。(a)が対照として通常のマイクロチップ電気泳動を行った場合、(b)が50倍希釈した同試料をAMCEにより濃縮・分離した場合のエレクトロフェログラム。

## キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 -

○仲西暁良<sup>1</sup>、佐藤葵<sup>1</sup>、木下充弘<sup>1</sup>、森山博由<sup>2</sup>、早川堯夫<sup>2</sup>、掛樋一晃<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬、<sup>2</sup>近畿大・薬総研

### Evaluation of Cell Characteristics using Glycans as Marker Molecules

\*A. Nakanishi<sup>1</sup>, M. Sato<sup>1</sup>, M. Kinoshita<sup>1</sup>, H. Moriyama<sup>2</sup>, T. Hayakawa<sup>2</sup> and, K. Kakehi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

<sup>2</sup>Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

On the clinical use of human somatic stem cells, it is important to characterize cells for confirmation of the purity of cells that are ensured by removing nontargeting cells. Although there have been many reports concerning the characterization of cell nature, profiling of glycans will be one of the candidate methods for evaluation of cell characteristics. In the present study, we examined glycans derived from more than 10 cancer cell lines, and attempted to characterize them. We showed that N-Glycans obtained from different batches of the cultured cells gave similar glycan profiles with high reproducibility as examined by CE and MALDI-MS methods. In the presentation, we would like to propose the possibility of total glycan analysis for evaluation of stem cells for regenerative medicine.

1. はじめに 再生医療の実用化を目指して、動物を用いる組織再生に向けた研究が精力的に行われている。一方で、ヒト幹細胞の臨床応用における最大の問題点として、細胞製品中への目的外細胞の混入、分化誘導時における細胞の特性変化などに留意しなければならない。そのため、原材料・中間製品・最終製品としての細胞の特性と品質を評価できる技術と評価基準の策定が急務となっている。我々は、これまでに細胞の糖鎖を指標として細胞個性の解析に取り組み、糖鎖がタンパク質性マーカーだけでは識別できない細胞の識別に有効であることを示してきた<sup>1)</sup>。本研究では、細胞の糖鎖解析を再生医療実用化のための技術として活用するために、キャピラリー電気泳動法を用いる細胞評価法について検討した。また、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術としての適用可能性の検証と細胞表面糖鎖マーカーの有用性と限界等について検討した。

2. 実験 試料調製：ヒト培養癌細胞( $5 \times 10^5$  cell)を 10 cm ディッシュに撒き 48 時間培

養後、総タンパク質分画を回収し、得られた分画から N-結合型糖鎖を調製後、2-アミノ安息香酸で蛍光標識したものを試料とした。キャピラリー電気泳動(CE)： He/Cd レーザー励起蛍光検出器(Em 325 nm, Ex 405 nm)を備えた Beckman MDQ Glycoprotein System を使用した。分析用キャピラリーは J&W Scientific 製 DB-1(40 cm, 100  $\mu$ m i.d.)を使用した。泳動用緩衝液には 5 % PEG を含む 100 mM Tris-borate(pH 8.3)を使用した。印加電圧は-25 kV、分析温度 25  $^{\circ}$ C、試料溶液は加圧法(1.0 psi, 10 sec)により導入した。質量分析(MS)：島津製作所 AXIMA Resonance を用い、測定モードは Negative ion mode で、マトリックスとして 2,5-Dihydroxybenzoic acid を用いた。

**3. 結果・考察** 上皮系癌細胞およびリンパ腫を含む 10 種類の癌細胞の N-結合型糖鎖を CE により解析した結果、細胞ごとに特徴的な糖鎖プロファイルを示した。また、若年および老齢線維芽細胞の糖鎖解析結果から、老化による糖鎖末端シアル酸残基の  $\alpha$ 2-3 結合から  $\alpha$ 2-6 結合への変化についても観察でき、CE を用いる糖鎖解析は糖鎖の結合様式の違いについても識別することができる高い分解能を有することがわかった。一方、細胞の糖鎖は培養バッチ毎で再現性が高く、主要糖鎖ピークにおいて CE で相対標準偏差(RSD%)0.5~12.1 %、MALDI-MS で 2.1~35.3 %であった(Fig. 1)。また、その検出限界は CE で  $10 \times 10^5$  cell、MALDI-MS で  $1 \times 10^5$  cell であり細胞・組織加工医薬品の製造工程全体において細胞の管理・評価を行うことのできる実用可能な細胞数であると考えられる。

マウス由来胚性腫瘍細胞 P19 をレチノイン酸により神経細胞へと分化させ、糖鎖解析を行った結果、分化に伴う糖鎖の変化を捉えることができ、細胞の比較解析により分化状態に応じた糖鎖プロファイルを取得することができた。このように細胞に発現する N-結合型糖鎖の全体像を捉え解析することで細胞の特製

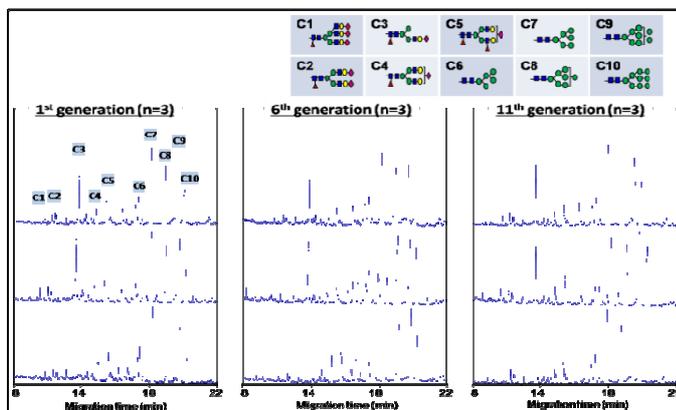


Fig. 1 Capillary electrophoresis of N-glycans in MKN45 at the different generations

を把握することが可能であり、糖鎖を指標として評価を行うことで細胞自身の品質を管理できることを確認した。また、CE はその高分解能、ハイスループット性から不均一な細胞の糖鎖を評価するうえで有力な手段であり、細胞の分化状態を評価・判別することが可能であると言える。細胞の糖鎖情報は、現在実施されている細胞形態観察や遺伝子、タンパク質解析で得られた情報を補完し、今後より厳密な細胞評価が求められる再生医療分野において、糖鎖解析技術が有力な手段となることが期待できる。

#### 文献

- (1) Naka, R.; Kamoda, S.; Ishizuka, A.; Kinoshita, M.; Kakehi, K. *J Proteome Res* **2006**, *5*, 88-97.

# 加齢マーカーとしての糖鎖の可能性～CEによる血清糖鎖プロファイルの加齢ならびに生活習慣に伴う変動追跡～

○能登啓介<sup>1</sup>, 奥田 茜<sup>1</sup>, 木下充弘<sup>1</sup>, 早川堯夫<sup>2</sup>, 掛樋一晃<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大・薬, <sup>2</sup>近畿大・薬総研

## Profiling of oligosaccharides as candidate for aging marker: Serum glycan profiles with aging and diet as examined by CE

Keisuke Noto\*<sup>1</sup>, Akane Okuda<sup>1</sup>, Mitsuhiro Kinoshita<sup>1</sup>, Takao Hayakawa<sup>2</sup> and Kazuaki Kakehi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University;

<sup>2</sup>Pharmaceutical Research and Technology Institution, Kinki University

### Abstract

Since structural alterations of glycans are known to be associated with changes of physiological environments, glycans have been received attention as target molecules for clinical biomarkers. In this study, we analyzed N- and O-glycans of glycoproteins from rat serum samples using capillary electrophoresis, and found that N-glycans showed distinctive changes with age or high-fat diet. The present results indicate that glycans will be one of the useful biomarkers for aging.

【緒言】生体内の糖鎖は複数の遺伝子産物の協調作業により生合成されるため、細胞の生理的環境の変化を受け容易に変化する。細胞レベルにおけるこれらの微細な変化の蓄積は、老化の過程においても重要な一面を担うと考えられ、種々のバイオマーカー開発の標的としても興味深い。本研究では、抗加齢医学の実践に欠くことのできない加齢マーカーとしての糖鎖の可能性を検証するため、キャピラリー電気泳動（CE）を用いてラット血清糖タンパク質糖鎖の加齢に伴う変化を追跡した。また、メタボリックシンドロームモデル作製用高脂肪食で飼育したラットの加齢及び食環境の違いが血清糖鎖プロファイルに及ぼす変化を解析した。

【方法】血清試料：通常食及びメタボリックシンドロームモデル作製用高脂肪食により飼育した3週齢以降のWistar系ラット血清（50 μL）を分子量カット3,000のフィルターにより限外ろ過し総タンパク質を調製した。糖鎖分析：N-グリコナーゼF消化により切り離されたN-結合型糖鎖ならびに当研究室で開発した糖鎖自動切断装置（AGC）により調製したO-結合型糖鎖を、それぞれ2-アミノ安息香酸（2-AA）により蛍光標識後、キャピラリー電気泳動、質量分析ならびに高速液体クロマトグラフィーを組み合わせ解析した。

【結果・考察】ラット血清中の糖タンパク質糖鎖の加齢に伴う変化を定量的に解析した結果、N-結合型糖鎖では15週齢までに全糖鎖量が約2倍に増加した(Fig.1)。一方、O-結合型糖鎖では15週齢までに全糖鎖量の著しい増減は観察されなかった。N-結合型糖鎖を詳細に解析した結果、全38種類の糖鎖が観察され、最も含量の高い糖鎖非還元末端にN-アセチルノイラミン酸（NeuAc）を2残基持つジシアロ2本鎖糖鎖のうち、NeuAcのO-アセチル体を持つジシアロ2本鎖糖鎖が3週齢～15週齢までに3.5倍以上に増加することがわかった。一方、高脂肪食で飼育したラットではNeuAcのO-アセチル体は減少傾向であり、通常食で飼育したラッ

トと逆の特徴的な変動パターンを示した(Fig.2)。

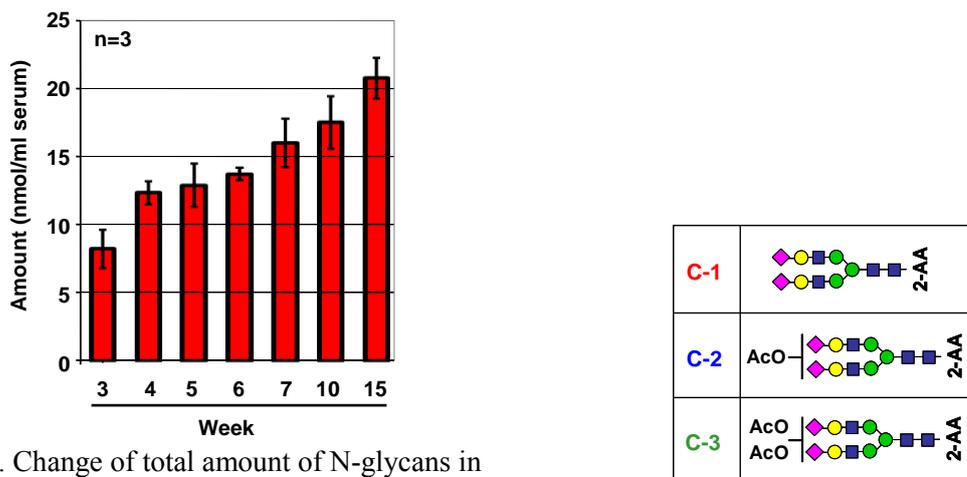


Fig. 1. Change of total amount of N-glycans in rat serum glycoproteins with ages.

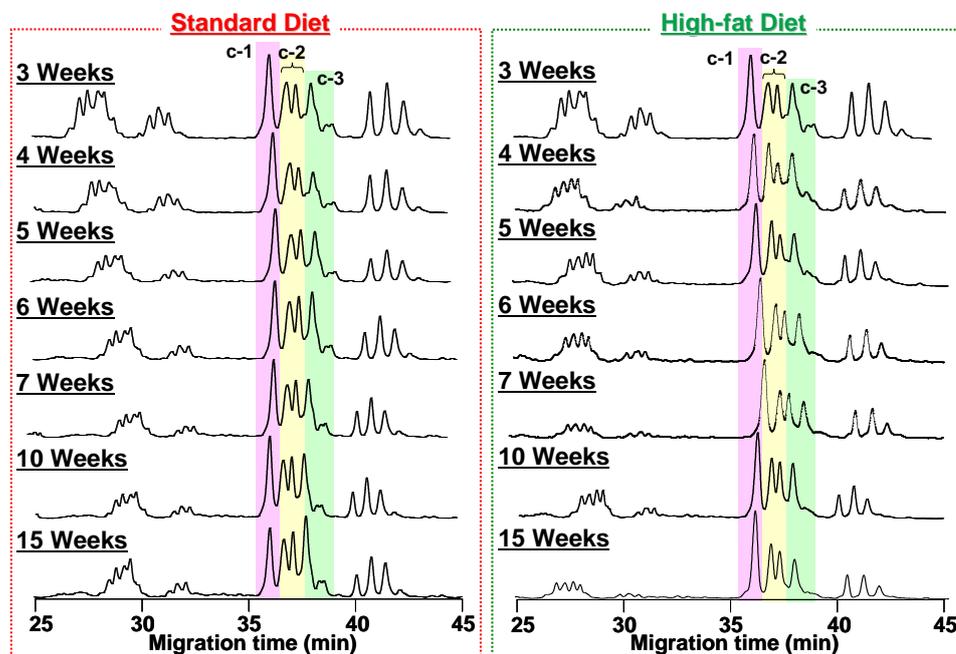


Fig. 2. CE analysis of N-glycans in serum samples of rats raised with standard diet and high-fat diet. Analytical conditions: Capillary, DB-1 (100  $\mu$ m i.d., 50 cm); Buffer, 0.1 M Tris-borate (pH 8.3) containing 5 % PEG70,000; Applied voltage, 25 kV; Detection, He-Cd induced fluorescent detection (Ex 325 nm, Em 405 nm); Injection: hydrodynamic injection (1 psi, 10 sec)

N-結合型糖鎖のうち複合型2本鎖糖鎖の非還元末端に位置するラクトサミン (Gal-GlcNAc) の結合様式について詳細に解析した結果、通常食で飼育したラットでは、Gal $\beta$ 1-4GlcNAc を持つ糖鎖が多く、高脂肪食で飼育した場合では特に6週齢以下でGal $\beta$ 1-3GlcNAc を持つ糖鎖が顕著に増加することがわかった。以上のように、血清糖タンパク質糖鎖の変化は、加齢や食環境による個々の血清糖タンパク質群の量的変化を反映した結果であると考えられた。今後、血清プロテオーム解析により、加齢と食環境により変動するタンパク質の解析にも着手していく予定である。

## SDS-キャピラリー電気泳動法による抗体医薬品の品質評価

○川上信彦, 中村裕子, 寺島勇, 鎌田国博, 岡本寿美子, 古賀明子  
中外製薬株式会社 CMC 開発部 (分析技術)

### Quality Evaluation of Antibody Drug by SDS - Capillary Electrophoresis

Nobuhiko KAWAKAMI, Yuko NAKAMURA, Isamu TERASHIMA, Kunihiro KAMATA,  
Sumiko OKAMOTO, Akiko KOGA

*CMC Development Dept. (Analytical Technology), Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.*

SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE) has been used for many years as a purity test for antibody drugs. However, SDS-PAGE is labor-intensive and it is difficult to pursue both high detection and quantitative capabilities. This led us to develop an SDS-capillary electrophoresis (CE-SDS) method as an alternative to SDS-PAGE.

After the method development, we conducted the validation of the analytical procedure, including evaluation of robustness, stability indicating capability and peak characterization. As a result, it was shown that the developed CE-SDS method is suitable for quality control tests and stability studies.

In addition, comparison of CE-SDS to other electrophoresis methods was made.

**【はじめに】** SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法) は抗体医薬品の品質評価に一般的に利用される電気泳動法である。しかしながら, SDS-PAGE 法は良好な検出感度と定量性を兼ね備えることが困難な試験法であることに加え, 操作が煩雑な試験法である。そのため我々は, SDS-PAGE 法に替わるゲル電気泳動法の開発を行う目的で, SDS-キャピラリー電気泳動法 (CE-SDS 法) を立ち上げ, 分析法バリデーションを行った。

**【実験】** 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester を用いて各種抗体医薬品試料を蛍光標識化した後, ゲルろ過カラムにてクエン酸-リン酸緩衝液への交換を行った。得られた試料にヨードアセトアミド含有 SDS 若しくは DTT 含有 SDS を加え, 70°C で変性反応を行い測定用試料とした。ベックマンコールター製キャピラリー電気泳動装置を用いて測定し, 蛍光検出により得られたエレクトロフェログラム上のピーク面積を用いて, 抗体医薬品に含まれる目的物質関連物質の含量比を算出した。

**【結果及び考察】** ICH ガイドラインに従った分析法バリデーションを実施した結果, 各分析能パラメータ (特異性, 真度, 直線性, 精度, 検出限界, 定量限界) において良好な結果が得られ, 本試験法が抗体医薬品の品質を高感度且つ定量的に評価できることが確認された。さらに, SDS-PAGE 法で検出されるバンドとの相関関係を調べることで, CE-SDS 法で検出されるピークの構造同定を試みた。

本研究結果から, 蛍光標識を利用した CE-SDS 法が抗体医薬品の品質評価に適した試験法であることが確認された。

さらに, 他の電気泳動法との比較についても考察を加えた。

# 半固定したレクチン及び糖加水分解酵素を用いたキャピラリー電気泳動による抗体医薬品の糖鎖構造解析

【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>,  
山本佐知雄<sup>2</sup>, 大山幸仁<sup>1</sup>, 鈴木茂生<sup>2</sup>

## Characterization of Glycans on Therapeutic Antibody with Partial Filling Lectins and Glycosidases in Capillary Electrophoresis.

Yuki YAGI<sup>\*1</sup>, Chikayo SHINOHARA<sup>2</sup>, Sachio YAMAMOTO<sup>2</sup>, Yukihiro OHYAMA<sup>1</sup>,  
Shigeo SUZUKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Bio Process Research and Development Laboratories, Kyowa Hakko Kirin*

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

### Abstract

Glycans in recombinant therapeutic antibodies have important roles for its various biological functions. A highly sensitive and specific method is required to obtain structural information of glycans. There are several analytical techniques are currently applied to characterizing glycans of antibody, such as HPLC, mass spectrometry and capillary electrophoresis (CE).

In this study, we experienced partial filling lectins and glycosidases in CE for characterization of glycans on a therapeutic antibody. *N*-linked glycans released from therapeutic antibody were derivatized with APTS (8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid) and were separated in CE with partial filling lectins or glycosidases. In the lectin filling method, glycans showing affinity to the lectin were swept out. While, in the glycosidase filling method, glycans digested specifically by the glycosidase disappeared. Partial filling CE methods don't need overnight incubation and optimization of reaction buffers for each lectins and glycosidases. The combination of these partial filling CE methods will enable us to characterize glycan profiles of therapeutic antibodies easily and rapidly.

### 【緒言】

抗体に結合している糖鎖は、その生物学的活性に様々な影響を及ぼすことが知られている。また、CHO 細胞などによる組み換え抗体は、ヒトに対して抗原性を持つ糖鎖が付加する可能性もある。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。

本検討では、まず抗体から *N*-グリコシダーゼにより切り出した糖鎖を APTS 標識し、あらかじめレクチンまたは糖加水分解酵素を導入したキャピラリー中に注入して、電気泳動を行う。泳動液 (pH7.0) 中では、ほぼ中性の pI を持つレクチンや酵素は移動せずに半固定状態となるが、酸性の強い APTS で標識された糖鎖はキャピラリー中を陽極側 (検出器) に向かって移動する。レクチンを導入したキャピラリーでは、試料中の特定の糖鎖とレクチンとが相互作用し、キャピラリー管内にトラップされるため、検出器にはレクチンと相互作用しな

い糖鎖のみが届く。また、糖加水分解酵素を導入したキャピラリーでは、酵素に特異的な糖鎖構造の切断が起こり、消化物が分離される。レクチンや酵素の導入無しのエレクトロフェログラムと比較することにより、各ピークの糖鎖構造が同定可能である。概要を Fig.1 に示す。

### 【実験】

糖タンパク質糖鎖の APTS 誘導体の調製：抗体医薬品に *N*-グリコシダーゼを作用させて糖鎖を遊離させ、エタノール沈殿処理により蛋白質を除去した後、糖鎖を APTS で標識した。

CE：装置はアルゴンレーザー光源を装着した Beckman 社製 PA-800 を用いた（励起波長：488 nm，検出波長：520 nm）。キャピラリーは J&W scientific 社製 DB-1（50 μm i.d., 40 cm，有効長 30 cm）を用いた。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、各種レクチン溶液または糖加水分解酵素溶液を導入し、続いて APTS 標識化糖鎖を注入し、-15 kV を印加して分析した。

### 【結果と考察】

各種レクチンまたは糖加水分解酵素をキャピラリーに導入した後、APTS 標識した抗体由来糖鎖の混合物を流した。得られた結果を Fig.2 に示す。抗体からは Fig.2 最下段に示すように、末端のガラクトース付加数の異なる 4 本の主要なピークと、それ以外の構造を有する数本の微少なピークが観察される。糖鎖試料注入前にレクチンを導入した場合は、レクチンと相互作用する糖鎖ピークは泳動時間が遅延し、レクチン濃度を上げると全く検出されなくなった。また、糖加水分解酵素を導入した場合は、酵素に特異的な構造を有する糖鎖ピークの消失が起こり、酵素濃度を上げると完全に消失した。

使用するレクチンと酵素の特異性の選択により、各ピークの詳細な糖鎖構造が同定可能である。また、従来の糖鎖構造解析手法である各ピークの分取、精製、酵素消化、リクロマト等の操作が不要であり、簡便かつ短時間で糖鎖構造の解析が可能であることが示された。

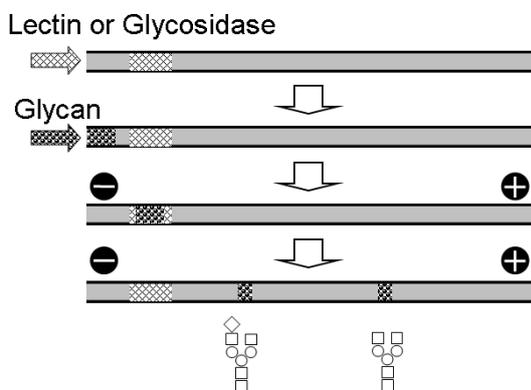


Fig. 1 Mechanism of partial filling CE method.

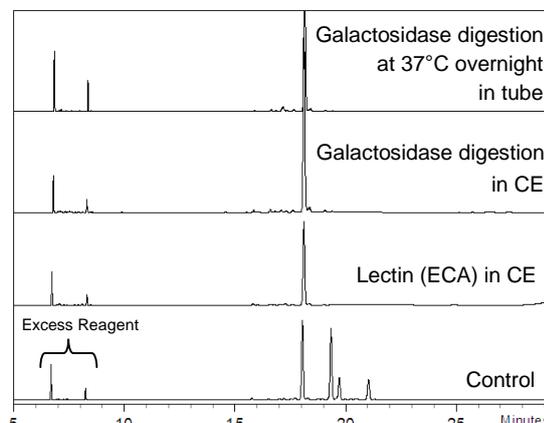


Fig. 2 Partial filling CE analysis of the APTS labeled glycan from therapeutic antibody.

# キャピラリー電気泳動のバイオ医薬品品質試験への適用可能性

○前田瑛起<sup>1</sup>、岸本昌太<sup>2</sup>、浦上康司<sup>1</sup>、木下充弘<sup>2</sup>、掛樋一晃<sup>2</sup>

<sup>1</sup>武田薬、<sup>2</sup>近大・薬

## Capillary Electrophoresis for Quality Testing of Biopharmaceuticals

Eiki Maeda<sup>\*</sup>, Shota Kishimoto<sup>†</sup>, Koji Urakami<sup>\*</sup>, Mitsuhiro Kinoshita<sup>†</sup>, Kazuaki Kakehi<sup>†</sup>

<sup>\*</sup>*Takeda Pharmaceutical Company Ltd.*

<sup>†</sup>*School of Pharmacy, Kinki University*

### Abstract

Biological therapeutics, such as hormone, enzyme, cytokines, antibodies, blood coagulation factors and vaccines, have been attracting much attention from the pharmaceutical industries, and the development of such products has been accelerating. In addition, several modified biopharmaceuticals have been developed in order to achieve excellent efficacy and stability, like conjugates between proteins and chemical compounds and proteins modified with polyethylene glycol. These conjugated biopharmaceuticals have highly complex structures due to the chemical modifications as well as intrinsic post-translational modifications. Therefore, sophisticated methodology for the separation has been needed to evaluate these products accurately. In this study, performance of capillary electrophoresis was investigated using commercially available biopharmaceuticals (Mylotarg<sup>®</sup>, Pegasys<sup>®</sup> and PegIntron<sup>®</sup>) in CE-SDS and capillary isoelectric focusing as purity and identification tests, respectively. The results obtained in this study indicated that CE will be a powerful tool in quality testing of biopharmaceuticals, especially for modified protein products having highly complex structure.

### はじめに

近年のバイオテクノロジー技術の進展に伴い、ホルモン、酵素、サイトカイン、抗体、血液凝固因子、ワクチンなどのタンパク質製剤の開発はますます活発になりつつあり、上市されるバイオ医薬品数は増加を続けている。これらのタンパク質製剤の多くは翻訳後修飾を受けるために、分子内に高い多様性を有する[1,2]。また、これらのタンパク質製剤にさらに修飾を加えた製剤の開発も盛んに行われており、新たな製剤ターゲットとして注目を集めている。化合物の複雑さが増す一方で、これらの医薬品を分析する手法として、従来ゲルベースの電気泳動法が用いられてきたが、より高分離能を有するキャピラリーベースの電気泳動法(CE)への変換が迫られ、CEの導入及び試験への適用が試みられている。本研究では、市販の修飾医薬品である3種類のバイオ医薬品を試料とし、CEの品質試験への適用可能性を明らかにすることを目的に検討を実施した。

### 実験

試料には、抗体-抗生物質の複合体であるMylotarg<sup>®</sup>、ポリエチレングリコール(PEG)修飾イ

ンターフェロンであるPegasys<sup>®</sup>及びPegIntron<sup>®</sup>を用いた。またそれぞれのモデルタンパク質として、ヒトIgG<sub>4</sub>及びPEG化リゾチームを用いた。装置はベックマン製キャピラリー電気泳動装置(PA800)を使用した。Mylotarg<sup>®</sup>についてはキャピラリー等電点電気泳動(cIEF)を、Pegasys<sup>®</sup>及びPegIntron<sup>®</sup>についてはCE-SDS, cIEFをそれぞれ検討した。

## 結果及び考察

抗体-抗生物質の複合体であるMylotarg<sup>®</sup>をcIEFで分析した結果をFig.1に示す。Mylotarg<sup>®</sup>は翻訳後修飾として糖修飾を受けた糖タンパク質であるため、酵素処理により脱糖鎖させることで電気泳動図のパターンが明確に変化し、品質の劣化等のトレースが容易に可能であることを明らかとした。また、Mylotarg<sup>®</sup>の抗体部分を構成するIgG<sub>4</sub>をモデルタンパク質として本分析系の再現性を検討した結果、各ピークの等電点の繰り返し精度0.06%以下、室内再現性1.0%以下と良好な値が得られた。また、観察される各ピークの相対存在比の室内再現性は5.0%以下と良好であった[3]。

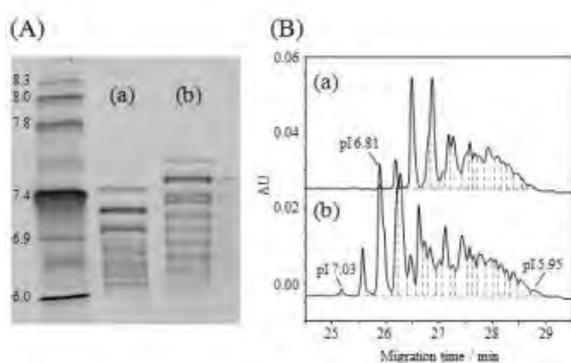


Fig. 1 ゲル(A)及びキャピラリー(B)によるMylotarg<sup>®</sup>の等電点電気泳動分析。  
(a) Deglycosylated and (b) intact samples.

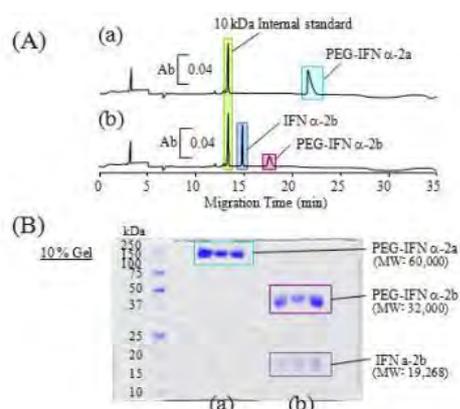


Fig. 2 キャピラリー(A)及びゲル(B)によるPEG化医薬品の不純物分析。(a) Pegasys<sup>®</sup> and (b) PegIntron<sup>®</sup>.

一方、PEG修飾タンパク質の検討では、リゾチームを試料としてモデルPEG化タンパク質の合成を行い、CE-SDS、MSを用いて合成したPEG化リゾチームの分子量を確認した。合成したPEG化リゾチームはCE-SDS、cIEF両分析系において未修飾リゾチームと良好に分離された。CE-SDSではPEG化による分子量の増加が、cIEFではPEG化による電荷変化によりピークのシフトが観察された。また、それぞれの分析条件を用いて、Pegasys<sup>®</sup>及びPegIntron<sup>®</sup>について分析を実施した。CE-SDSの結果をFig. 2に示す。Pegasys<sup>®</sup>ではすべてのタンパク質がPEG修飾されていること、PegIntron<sup>®</sup>では未修飾の分子がいくらか含まれていることが明らかとなった。

これらの結果により、CEの化学修飾タンパク質製剤への適用可能性が示された。CEの有する分解能の高さを最大限に発揮できるよう、更なる検討及び化合物ごとにおける分析条件の最適化が必要である。

## 文献

1. M. Mann, O.N. Jensen, *Nat. Biotechnol.*, 21 (2003) 255-261.
2. J. Seo, K.J. Lee, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 37 (2004) 35-44.
3. E. Maeda, K. Urakami, M. Kinoshita, K. Kakehi, *J. Chromatogr A*, in press.

# 微量試料導入系を用いた CE-誘導結合プラズマ質量分析装置による核酸の分析

○藤井 紳一郎<sup>1</sup>、稲垣 和三<sup>1</sup>、千葉 光一<sup>1</sup>、高津 章子<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>産総研・計測標準

## Nucleic Acid Analysis by Using Capillary Electrophoresis Hyphenated with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Equipped with High Performance Concentric Nebulizer

Shin-ichiro Fujii<sup>\*1</sup>, Kazumi Inagaki<sup>1</sup>, Koichi Chiba<sup>1</sup> and Akiko Takatsu<sup>1</sup>

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

### Abstract

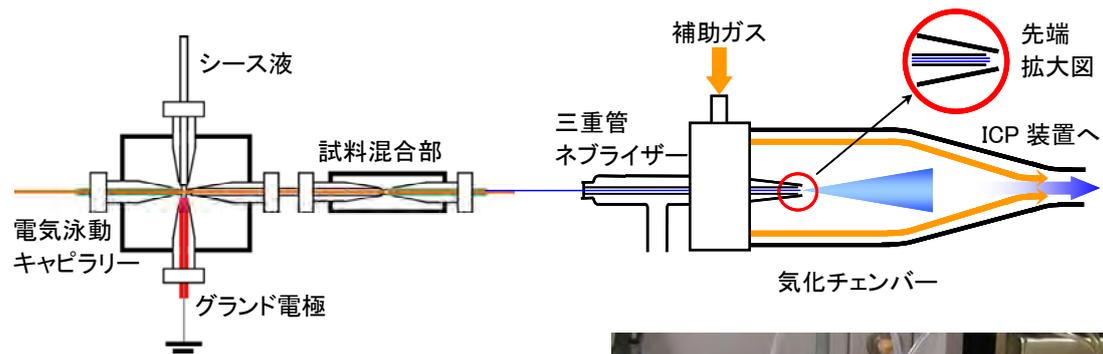
An accurate quantification of nucleic acids such as DNA and RNA is of critical importance in many forensic analysis, clinical diagnoses and biological studies. The phosphorus determination in DNA molecule by using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and ICP-optical emission spectroscopy (OES) has developed in the demand of these analytical fields. On the other hand, a capillary electrophoresis (CE) is widely used for the analysis of the DNA sequencing fragment generally. We have reported the interface device for CE hyphenated with ICP-MS.<sup>1)</sup> In this study, we have applied the CE-ICPMS with the interface device to the quantification of phosphorus in the DNA content molecules separated by using capillary electrophoresis. Then the concentration of DNA was obtained from the measured value of phosphorus.

### はじめに

DNAやRNAなどの核酸を精確に定量することは、法医学、臨床検査、生化学研究などの分野において重要視されている。また、核酸分子内のリン元素を測定対象として、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) や発光分光分析装置 (-OES) を用いて高精度に定量する研究も進められている。一方、核酸分析には電気泳動法が広く用いられ、キャピラリー電気泳動装置 (CE) は微量の核酸分子をモノマーからポリマーまで幅広く分離する応用例が数多く報告されている。これらの装置を組み合わせると核酸分子を測定すれば、高精度な定量値を得ることが期待できる。我々はエス・ティ・ジャパン社と共同でCE-ICPMS用微量試料導入系を開発し<sup>1)</sup>、両分析装置の接続と分析評価を行った。また、当該システムを利用して核酸分子内リン元素を指標とした核酸の定量分析を行ったので報告する。

### 実験

本研究では、(株)エス・ティ・ジャパンと産総研で共同開発した微量試料導入系であるAIF-01を用いてCE-ICPMSの接続を行った。CE-ICPMSの接続概念図と接続例を図1に示す。図内に示すCE-ICPMSを用いて、リン酸標準溶液を用いたリンの検量線を作成した。



装置構成

CE: P/ACE MDQ (Beckman Coulter)

ICPMS: Agilent 7500a (Agilent technologies)

Interface: AIF-01 (S.T. Japan, AIST)



図 1. CE-ICPMS の接続概念図と接続例

また、DNA の定量実験として、任意の塩基配列を有する 100 bp の二本鎖 DNA を PCR で増幅し、カラム精製したものを分析試料とした。試料 DNA を Phosphodiesterase I (Sigma) 及び DNase I (Sigma) を用いて 37 °C で酵素消化した後に酵素を熱失活させ、生成したヌクレオチドのリンを測定した。内径 50  $\mu\text{m}$ 、有効長 100 cm のフューズドシリカキャピラリーを装着した CE 装置を用い、Cetyl trimethyl ammonium bromide によるミセル導電クロマトグラフィ (MEKC) 法で分離した。シース液として 0.1 % 硝酸溶液を用い、ヌクレオチド分子内リンと共に内標としてセレンを選択して ICP-MS で測定した。

#### 結果及び考察

本研究で用いた微量試料導入系は数  $\mu\text{L}/\text{min}$  程度という微量流量域において、粒子径 3  $\mu\text{m}$  弱の細かい液滴を効率的に発生することが可能であった。微量試料導入系を用いた CE-ICPMS でのリン酸標準溶液による検量線は ppb レベルで良好な直線性を示した。リンの検出限界は既報値と比較して 1 桁から 2 桁の改善が見られ、開発した微量試料導入系による高効率な噴霧が示された。酵素分解した DNA 試料を CE-ICPMS に導入した結果、DNA を構成する 4 種のヌクレオチドと遊離のリン酸を CE で分離し、ICP-MS でリンを検出することができた。CE-ICPMS で得られたリン測定結果から算出したヌクレオチド濃度を基にして、試料 DNA 濃度を算出した。

#### 謝辞

本研究の一部は科研費 (21550094) の助成を受けたものである。また、(株)エス・ティ・ジャパンの阿部正昭氏には多大なるご支援をいただいた。ここに記して謝意を表す。

#### 文献

- 1) S. Fujii, K. Inagaki, A. Takatsu, T. Yarita and K. Chiba, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7488–7492 (2009).

# キャピラリー電気泳動による微生物生細胞の泳動

## 挙動観察

○鳥村 政基<sup>1</sup>, 新谷 智吉<sup>2</sup>, 田尾 博明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>産総研・環境管理, <sup>2</sup>愛媛産技研

## Monitoring the Migration Behavior of Living Microorganisms in Capillary Electrophoresis

Masaki TORIMURA<sup>\*1</sup>, Tomoyoshi SHINTANI<sup>2</sup>, and Hiroaki TAO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Measurement Technology Research Group, Research Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<sup>2</sup>Ehime Institute of Industrial Technology

### Abstract

Capillary electrophoresis (CE) was applied to the rapid discrimination and quantification of living microorganism. In general, it is difficult to monitor the migration behaviors of living microorganisms since the depth of field apt to be too narrow to see an entire field of capillary. However, by using microchip capillary, which channel is enough thin, made it possible to monitor a whole microorganisms in the channel. In this study, we examined the effect of initial time profile in applied voltages for separation by the migration monitoring using video microscopy.

### はじめに

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異なるキャピラリー電気泳動 (CE) を利用する技術に迅速性や簡便性が期待されている。一般に、CE による微生物細胞分離で得られるピーク形状や泳動の再現性にはいくつか問題点が残されており、それらが本技術の実用化を阻む原因にもなっていた。

それらを明確にするためには、微生物細胞の粒子各々の泳動挙動を直接観察することが必要と考えられるが、微生物細胞はその粒子形状を光学顕微鏡で観察できる限界のサイズ (数  $\mu\text{m}$ ) である。しかし、形状を確認できるレベルまで顕微鏡の倍率を拡大すると、レンズの被写界深度の問題でキャピラリー内の深さ方向のごく一部しか観察できず、汎用されるキャピラリーサイズの 50  $\mu\text{m}$  内径では泳動している細胞全体のせいぜい 1/10 以下程度の細胞しか観察できない。一方で、ガラス基板上に流路を形成して作るマイクロチップは、チャンネルの深さ方向を任意に制御して製作できるので、上記被写界深度の問題を克服できるサイズで、チャンネル全体の細胞粒子の泳動挙動観察が可能になる。

本研究ではこうしたビデオ顕微鏡法を泳動観察に適用することで、今まで分光検出器で取得していたフェログラムからだけでは知り得なかった微生物泳動挙動の特殊性を確認し、更にこれらの観察から微生物の泳動分離に電圧印可の時間プロファイルの重要性を見出したので、その詳細について報告したい。

## 実験

電気泳動装置として P/ACE システム MDQ (Beckman) あるいは高圧電源 (松定プレジジョン) を用いた。キャピラリーは内壁が未修飾で内径 50  $\mu\text{m}$ 、全長 24 cm (有効長 20 cm) のものを、またガラスマイクロチップは流路幅 110  $\mu\text{m}$ 、流路深さ 20  $\mu\text{m}$  のものを用い、それぞれ泳動前毎に 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 $\times$ 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。また、顕微鏡下で観察は、高速ビジュアルロガー PLEXLOGGER (シナノケンシ) を用いて観察し、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。

## 結果及び考察

Fig. 1 に、酵母 *S. cerevisiae* K-9 と乳酸菌 *S. thermophilus* 510 について、マイクロチップのチャンネル内で電場印可 1 秒以内に酵母と乳酸菌が完全分離される様子を示す [1]。このように、条件が整うと非常に迅速な細胞の分離が可能であるが、一方でこれらの映像から細胞粒子の動きを観察するとフェログラムからは読み取れなかった分離の様子が確認できた。

まず、電場を印可した直後の細胞粒子の泳動挙動であるが、これは静止していた細胞が定常的な泳動速度に移行するまでの泳動速度が加速度的に増加する重要な過程であり、実際にここでの電場印可の時間プロファイルが泳動の再現性や各細胞粒子の泳動のバラツキに大きく影響するケースが観察された。このことは、その結果得られるフェログラムからもピークのシャープさ (理論段数) としても確認できた。

これまで我々は微生物電気泳動のピーク形状の改善に泳動液に添加する陰イオンポリマーが重要であることを報告してきた [2] が、現在、どのような時間スケールでこれら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研究を行っている。本シンポジウムでは、その詳細について報告する。

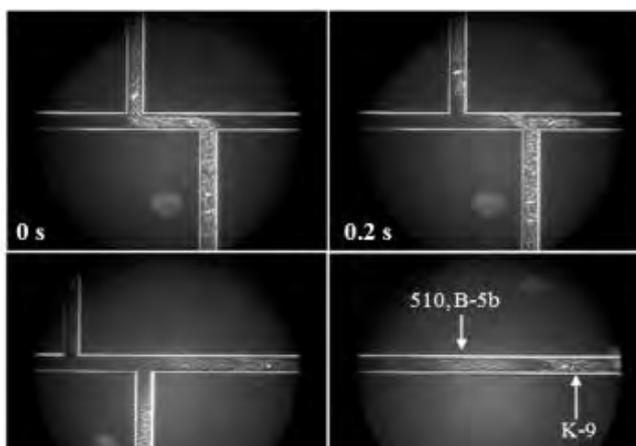


Fig. 1 Video monitoring of microorganisms migration

## 文献

1. Shintani T, Torimura M, Sato H, Tao H, Manabe T, *Anal.Sci.*, 21 (2005)57-60.
2. 鳥村政基, 孫麗偉, 稲垣真輔, 田尾博明, 第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE'09).

# 電気泳動分析用ナフィオン修飾ポリマー製チップの 作製

瀬野 万里子, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二  
京大院工

## Fabrication of Nafion Modified Polymer Microchips for Electrophoretic Analysis

Mariko SENO\*, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA, Koji OTSUKA

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

### Abstract

In electrophoretic analysis on a polymer microchip, a modification of the inner surface of the channels is one of the important issues since an untreated polymer microchip often provides an unstable and slow electroosmotic flow (EOF). To overcome these drawbacks, we studied on the coating method using Nafion which has negatively charged side chains and easily forms a durable thin membrane by drying.

In poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and poly(methyl methacrylate) (PMMA) microchips, the inner surfaces of the channels were modified with cationic polybrene and hexamethylene diamine, respectively, for the strong retention of anionic Nafion by the electrostatic interaction. In the Nafion-coated PDMS and PMMA microchips, higher electroosmotic mobilities ( $3.0\text{--}7.5$  and  $3.4\text{--}5.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively) were observed relative to those on untreated PDMS and PMMA chips ( $2.2$  and  $2.3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively). After the 30-times repetitive measurements the fast EOF were still observed on the Nafion-coated PDMS and PMMA chips.

### 【緒言】

ポリマー製マイクロチップでは、ポリマーの合成条件やチップ接合条件などによって、チャンネル内表面に存在する官能基が変化するため、電気泳動分析の際に安定した速い電気浸透流(EOF)を得ることが困難である。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 と高い耐久性、そして簡便な修飾手順を全て兼ね備えた修飾法の報告例は少ない。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する、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などの特徴を有する。本研究では、静電相互作用を利用したマイクロチップ内表面へのナフィオンの修飾方法として、カチオン性高分子であるポリブレン (PB) を用いたポリジメチルシロキサン (PDMS) の修飾法およびヘキサメチレンジアミン (HMDA) を用いたポリメチルメタクリレート (PMMA) の修飾法についてそれぞれ検討を行った。

## 【実験】

ポリマー製マイクロチップとして、ソフトリソグラフィーの手法によって作製した幅 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 製チップおよび幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 30  $\mu\text{m}$  のクロス型チャンネルを有する市販の PMMA 製チップを用いた。PDMS 製チップに対しては、PB およびナフィオン溶液を交互に注入した後、加熱乾燥した。PMMA 製チップでは、HMDA を導入後、室温で一晩乾燥することによって内表面に固定化してから、ナフィオン溶液を注入し、加熱乾燥した (Fig. 1)。泳動液に 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)、試料にアニオン性の蛍光色素であるウラニンを用いて、これらのチップにおける電気浸透移動度 ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) を算出し、ナフィオン修飾の耐久性について評価した。

## 【結果と考察】

ウラニンの実効電気泳動移動度から未修飾およびナフィオン修飾 PDMS チップの  $\mu_{\text{EOF}}$  を算出した。作製した未修飾の PDMS チップでは、 $\mu_{\text{EOF}}$  の値が  $1.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と小さかったが、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、測定途中において  $7.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  を超える値も確認された (Fig. 2)。さらに、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水溶性の高い PB 層が剥離したため、チャンネル内表面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、PMMA チップにおいては、測定を重ねると徐々に  $\mu_{\text{EOF}}$  の値が減少したものの、未修飾の PMMA チップ ( $\mu_{\text{EOF}} = 1.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) を大きく上回る速さの EOF がナフィオン修飾によって発生した ( $\mu_{\text{EOF}} = 3.0 \sim 5.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )。このことから、共有結合によって HMDA をチャンネル内表面に結合したことで、比較的安定した EOF を得ることができたものと考えられる。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、静電相互作用を利用したナフィオン修飾により高い耐久性と速い EOF を兼ね備えた電気泳動分析用ポリマー製チップを作製できることが明らかとなった。

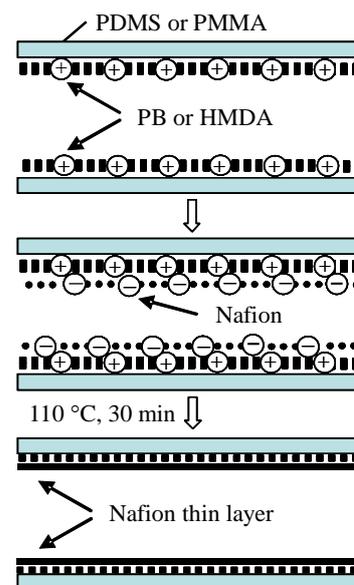


Figure 1. Schematics of the coating of the channel with cationic polymers and Nafion thin membrane.

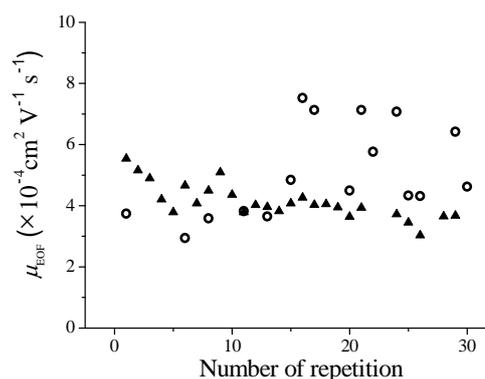


Figure 2. Variations of  $\mu_{\text{EOF}}$  in the Nafion-coated PDMS (○) and PMMA (△) chips.

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

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

\*dextran sulfate

1) *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5939-5944.

2) *Anal. Chim. Acta* **2002**, 470, 87-99.

# トランジェント - トラッピング法による 生体試料の高感度分析 (2)

田中 隆太, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二  
京大院工

## Transient Trapping in Bioanalysis for High-Sensitive Detection. 2

Ryuta TANAKA\*, 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 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. To confirm the applicability of tr-trapping–MEKC under the suppressed EOF, bradykinin was analyzed in the PVP-coated capillary. Comparing to the conventional MEKC analysis, a 230-fold enrichment of bradykinin was achieved in tr-trapping–MEKC without the nonspecific adsorption. The limit of detection of bradykinin was improved from 2.0 ppm to 6.2 ppb by the application of tr-trapping. When the sample solution containing angiotensin I, II and III was injected for 600 s, these peptides were enriched with 380–700-fold sensitivity increases compared to the conventional MEKC analysis. These results indicated that the sensitivity improvement of the biological sample was achieved by the application of tr-trapping, which should contribute to the progress of bioanalysis.

### 【緒言】

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) における低濃度感度を改善するため、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により、高い濃縮効率と高分離能を同時に達成可能な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、その基礎的性質の解明と応用について検討を進めてきた [1]。これまでに、ペプチドやタンパク質などのキャピラリー内壁への吸着を抑制するための poly(vinylpyrrolidone) (PVP) 修飾キャピラリーによって電気浸透流 (EOF) が抑制された場合でも、tr-trapping 法の MEKC への適用が可能であることを明らかにしてきた。本研究では、PVP 修飾キャピラリーを用いた tr-trapping–MEKC によるペプチド分析の高感度化および分離能の向上を目指した。

### 【実験】

キャピラリー電気泳動装置には Agilent CE 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 45 cm、有効長 36.5 cm、内径 50  $\mu$ m) を用いた。ミセル溶液にはリン酸塩緩衝液で調製した硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 溶液を用いた。泳動液にはミセル溶液と電気伝導度を等しくしたリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いた。

試料にはブラジキニン、アンジオテンシン I、II、III (AI, AII, AIII) の 4 種類のペプチドを用いた。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、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キャピラリーゾーン電気泳動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、試料のキャピラリー内表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、鋭いピークが検出され、吸着抑制効果が確認された。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  $230$  倍の高感度化が達成された。また、このときの試料の検出下限は  $6.2$  ppb ( $n = 3$ ) であった。

続いて、アンジオテンシン類の tr-trapping-MEKC 分析を行った。その結果、試料溶液注入量の増加とともにピーク強度が増加する様子が観察され、試料溶液を  $600$  s、ミセル溶液を  $150$  s 注入した際に、AI において通常の MEKC 分析と比較して  $700$  倍程度の高感度化が達成された (Fig.1a)。一方、同様にミセルとの相互作用を利用したオンライン試料濃縮法である sweeping 法を適用した際には、試料溶液を  $150$  s 以上注入すると有効分離長の減少により試料の分離が困難となった。そのため、sweeping 法の適用時には  $40$  倍以上の高感度化は困難であった (Fig.1b)。しかしながら、tr-trapping-MEKC 分析において試料溶液を  $600$  s 注入した際には、リリース機構に基づく分離とリリース後の電気泳動による分離の複合的な影響により、AI-AIII の分離度は低下したが、AIII-AII の分離度は向上した。このことから、tr-trapping-MEKC 分析では短い有効分離長でも効果的な分離が可能となることが示唆された。また、MEKC および sweeping-MEKC 分析におけるピークの検出時間が  $50 \sim 60$  min であったのに対し、tr-trapping 法の適用により検出時間が  $11$  min に短縮された。これは負電荷を有する界面活性剤の内面吸着により検出部側から試料導入部側に向かう EOF が発生するため、MEKC 分析においては試料の実効泳動速度が減少したのに対し、tr-trapping-MEKC では、その減少がミセル溶液の部分的注入により抑制されたためであると推測される。

以上の結果から、PVP 修飾キャピラリーを用いた tr-trapping-MEKC 分析による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。

### 【参考文献】

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

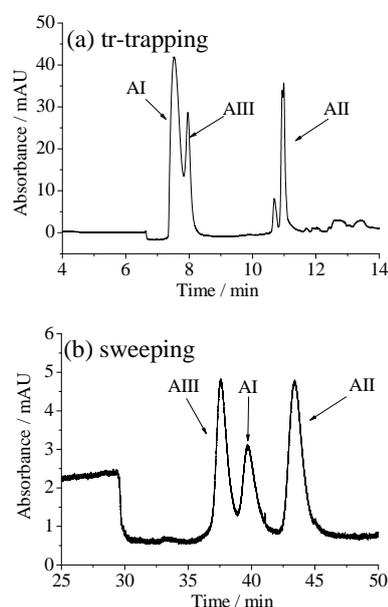


Fig. 1. Electropherograms obtained with (a) tr-trapping-MEKC and (b) sweeping-MEKC in PVP-coated capillary.

# マイクロヒーター集積化 PDMS チップによる タンパク質の電気泳動分析 (2)

○谷川 佳奈, 末吉 健志, 北川 文彦, 大塚 浩二  
京大院工

## Microchip Electrophoresis with Microheater Integrated PDMS Chip. 2

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 apparent velocities of the proteins were decreased by the denaturation, so that the long sample zone is swept around the heater. Actually, by increasing the temperature over 80 °C around the heater, fluorescently labeled proteins were detected as sharp peaks with heating, whereas broader 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、省試料という利点を有しており、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が、低い濃度感度が問題視されている。そこで本研究では、分離チャンネルの局所的な加熱が可能なマイクロヒーターとして銅薄膜を設置したマイクロチップを作製し、タンパク質が硫酸ドデシルナトリウム (SDS) により変性される際に大きな電気泳動移動度の変化をとまなうことと、加熱により SDS 変性が促進されることを利用した新規オンライン試料濃縮法の開発について検討を行った。また、白金薄膜を分離チャンネル内に直接設置したチップを作製し、濃縮効率の向上を目指した。

### 【実験】

ソフトリソグラフィーにより作製した幅 60  $\mu\text{m}$ , 深さ 50  $\mu\text{m}$  のチャンネルを有するポリジメチルシロキサン (PDMS) チップに、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) で蛍光標識した 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。また、白金薄膜をチャンネル内に設置したチップを用いた実験では、Alexa で蛍光標識した BSA を 0.25% dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, 0.03% methyl cellulose, 20 mM NaCl (pH 6.8) 溶液に溶解したものを試料溶液とした。

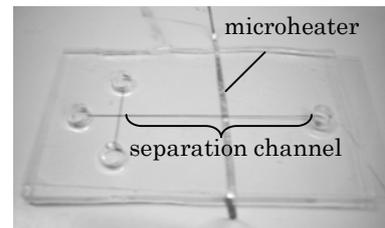


Figure 1. Microheater integrated PDMS chip.

## 【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 により変性され負電荷密度が増大するため、EOF とは逆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】

SDS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 2a), チャンネル内を 80 °C以上に加熱した場合には鋭く高いピークが観察された (Figure 2b)。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变性されておらず、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。さらに、銅薄膜の幅を 4.0 mm とした場合では、幅 0.7 mm の銅薄膜を用いた際と比較して濃縮効率が約 2 倍向上した。

また、白金薄膜をチャンネル内に設置したチップでは白金に電圧を印加しない場合においても試料濃縮効果が確認された (Figure 3)。そこで、より詳細に検討するため、チャンネル内に試料溶液を満たし、蛍光画像解析を行った。その結果、チャンネル両端に電圧を一定時間印加した後に印加極性を逆転させると、白金薄膜近傍から陽極に向かって濃縮された試料バンドが泳動する様子が観察された。本実験条件下では、チャンネルに電圧を印加すると白金薄膜近傍で水の電気分解が起こり、チャンネルの陽極側では pH が上昇し、陰極側では低下する。このことから、観察された試料濃縮効果は、負に帯電した Alexa-BSA が初期の電圧印加時に陽極へ向かって泳動する際、白金薄膜近傍の pH の低下にともない電気泳動移動度が減少して濃縮された後、極性が逆転したことで再び pH が上昇して電気泳動移動度が増加し、陽極側へ泳動したことによるものと考えられる。

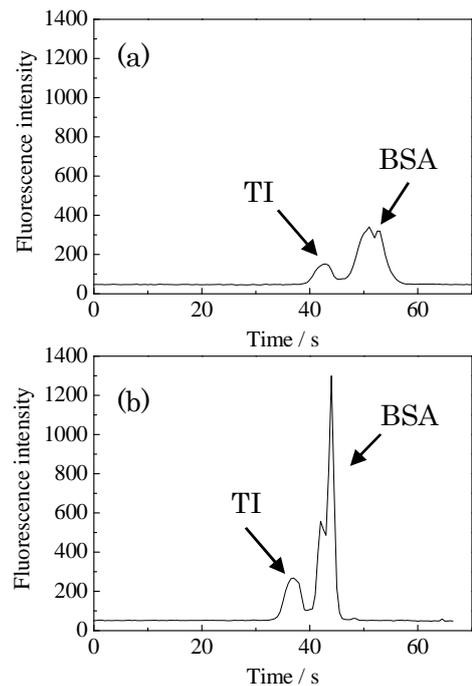


Figure 2. Electropherograms of fluorescently labeled BSA and TI obtained with (a) no heating and (b) thermal denaturation. Injection time, 5 s. Current, (a) 0 A; (b) 5.0 A.

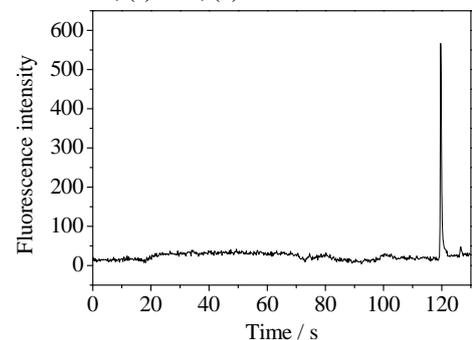


Figure 3. Electropherogram of fluorescently labeled BSA by using the PDMS microchip integrated with a platinum film. Detection point, 20 mm from a platinum film.

# アリールボロン酸との錯形成を利用した糖のラベルフリー電気泳動分析

楠本 梨沙<sup>1</sup>, Philip Britz-McKibbin<sup>2</sup>, 末吉 健志<sup>1</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>,  
大塚 浩二<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 京大院工, <sup>2</sup> McMaster University

## Label-Free Electrophoretic Analysis of Sugars Using Complexation with Aryl Boronic Acids.

Risa Kusumoto<sup>\*1</sup>, Philip Britz-McKibbin<sup>2</sup>, Kenji Sueyoshi<sup>1</sup>, Fumihiko Kitagawa<sup>1</sup>, Koji Otsuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University,

<sup>2</sup> Department of Chemistry, McMaster University

### Abstract

This paper reports a label-free analysis of sugars in affinity capillary electrophoresis (ACE) using a complexation with aryl boronic acids. In conventional capillary electrophoresis of sugars, a troublesome derivatization is often required for the detection and/or separation since many sugars have no charge and no UV absorbance. To overcome this drawback, we focused on the ACE analysis using aryl boronic acids which form complexes with sugars. In a background solution (BGS) containing aryl boronic acids, the complexation provides the variations of both the wavelength of absorption maximum and apparent electrophoretic mobility of the complex from those of native one, resulting in both the label-free detection and selective separation of sugars. When a phosphate buffer (pH 7.0) containing 3 mM 3-nitrophenylboronic acid was used as the BGS in ACE, sorbitol and its stereoisomer (mannitol) could be detected and separated without any derivatization.

### 【緒言】

生体を構成する物質の一つである糖は代謝や細胞認識に関与していることが知られており、様々な疾患の診断指標としても用いられている。近年、糖の分析法として、省試料、短分析時間、高分離能などの利点からキャピラリー電気泳動が注目されている。しかし、糖にはUV吸収を示さないものや電氣的に中性なものも多く、従来法では還元末端に対するプレカラム誘導体化を要するため、非還元糖への適用は困難であった。そこで我々は、アリールボロン酸を用いたアフィニティキャピラリー電気泳動 (ACE) 分析 [1] に注目した。アリールボロン酸は糖などのジオールを特異的に認識して錯形成を行い、モル吸光係数や極大吸収波長を変化させる特徴を有する。このことから、泳動液にアリールボロン酸を添加し、錯形成時の吸光度と実効泳動移動度の変化を利用することで、糖のラベルフリー検出が可能となる。本研究では、アリールボロン酸を用いたより高感度かつ高選択的な糖分析手法の開発を目指し、その基礎検討として数種類のアリールボロン酸について UV 吸収スペクトルの変化を測定し、糖との錯形成定数を算出、比較した。また、この結果に基づいて立体異性体であるソルビトールおよびマンニトールのラベルフリーでの ACE 分離・検出を目指した。

## 【実験】

アリールボロン酸をリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解し, 0~80 mM のソルビトールを添加した際の UV 吸収スペクトルおよびモル吸光係数の変化を測定した。アリールボロン酸にはキノリン-3-ボロン酸 (QBA), 3-ニトロフェニルボロン酸 (NPBA), 1-ナフタレンボロン酸 (NPA), 3-ピリジンボロン酸 (PyBA) および *N*-メチル 4-ピリジンボロン酸 (MePyBA) を用いた。各アリールボロン酸について, ソルビトール濃度に対するモル吸光係数変化を測定した結果から Benesi-Hildebrand プロットを行い, その傾きから錯形成定数を算出した。また, NPBA を泳動液に添加した ACE 分析を行った。CE 装置には P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を, 分離には全長 40 cm, 有効長 30 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーを用いた。泳動液には 3 mM NPBA をリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを, 試料にはソルビトールおよびマンニトールを用いた。検出は UV 吸収で行った。

## 【結果と考察】

アリールボロン酸のリン酸塩緩衝液をそれぞれ調製し, 0~80 mM のソルビトールを添加したところ, 糖濃度の上昇にともない 270~320 nm 付近のモル吸光係数が増大し, それぞれ一定値に収束した。この結果を基に 5 種類のアリールボロン酸について Benesi-Hildebrand プロットを行い, 算出された錯形成定数や極大吸収波長の変化を比較した (Table 1)。NPBA では 20 mM のソルビトールを添加すると極大吸収波長が 7 nm 長波長側へシフトしたが, 他のボロン酸ではソルビトールを添加しても変化がなかった。また, NPBA の 278 nm におけるモル吸光係数の変化は  $900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  に達した。以上の結果から, pH 7.0 において NPBA を泳動液に添加して ACE 分析を行い, 278 nm 付近の UV 吸収を測定することで, 糖のラベルフリー分析が可能となることが示唆された。そこで, ソルビトールおよびその立体異性体であるマンニトール (Fig. 1a) について, NPBA を添加した泳動液を用いて ACE 分析を行った。その結果, 電荷と UV 吸収を持たない二つの非還元糖の ACE 分離とラベルフリー検出が同時に達成された (Fig. 1b)。以上の結果から, 種々のアリールボロン酸を泳動液に添加することで, 様々な糖のラベルフリー ACE 分析が可能となることが期待される。

Table 1. Complexation of five aryl boronic acids with sorbitol.

	$K / \text{M}^{-1}$	$\Delta\lambda_{\text{m}} / \text{nm}$	$\Delta\varepsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\mu / \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
NPBA	870	7	900 (278 nm)	$4.1 \times 10^{-5}$
QBA	410	0	100 (310 nm)	$3.0 \times 10^{-5}$
NPA	40	0	500 (280 nm)	0
PyBA	940	0	250 (260 nm)	0
MePyBA	530	0	-1350 (220 nm)	0

$K$ ,  $\lambda_{\text{m}}$ ,  $\varepsilon$ , and  $\mu$  represent formation constant of complex, wavelength of maximum absorption, extinction coefficient, and electrophoretic mobility, respectively.

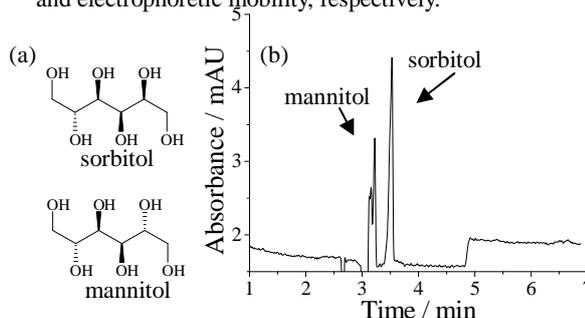


Figure 1. (a) Structures of sugars. (b) ACE analysis of sorbitol and mannitol. BGS, 3 mM NPBA in phosphate buffer (pH 7.0).

## 【参考文献】

[1] Kaiser, C. *et al. Chem. Comm.* **2008**, 3, 338–340.

# イオンクロマトグラフィーによる乾燥ワカメ中の陰イオンの定量

○飯山 貴史, 福士 恵一

<sup>1</sup>神戸大院海事

## Determination of Anions in Dried Seaweed (Wakame) Using Ion Chromatography

Takashi IIYAMA<sup>\*1</sup> and Keiichi FUKUSHI<sup>1</sup>

*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

We describe a method to identify the origin of dried seaweed (Wakame) through the determination of inorganic anions such as bromide, nitrate, phosphate and sulfate using ion chromatography (IC). Seven samples of seaweed were purchased from three different districts, Sanriku area, Naruto area in Japan, and China. The above components were extracted from powdered seaweed into water using ultrasonic extraction prior to analysis by IC. Discriminant functions were calculated using the analytical results. Four combinations were considered by selecting one component from the major components ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) and another one from the minor components ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). For example, a linear discriminant function was obtained using the  $\text{SO}_4^{2-}$  results for seaweed from the Sanriku area and China:  $Z=3.45x-13.8$  ( $Z$ : discriminant function;  $x$ : concentration of  $\text{SO}_4^{2-}$ ). When  $Z < 0$ , it was shown that the seaweed was produced in Sanriku; when  $Z \geq 0$ , the seaweed was produced in China. The accuracy of identification was 100% for the seaweed produced in the Sanriku area and that for China was 85.7%. Experiments using more samples are ongoing to improve the accuracy of identification.

### はじめに

近年、様々な種類の食品について産地偽装問題が多発し、問題となっている。原料原産地表示の真正性を検証するためには、科学的な判別方法の確立が必要である。現在、ワカメの場合、試料を酸分解した後、誘導結合プラズマ発光分析法で金属成分を定量し、統計処理により産地判別が可能であることが示されている。しかし、この方法は酸分解が煩雑であると同時に長時間を要する。ワカメは根を用いて自分の体を岩などに固定し、葉をとおして海水中より栄養分を吸収して生長することが知られている。そこで本研究では、ワカメ中に含まれる陰イオンに着目し、主要陰イオンとして  $\text{Br}^-$  及び  $\text{SO}_4^{2-}$ 、微量イオンとして  $\text{NO}_3^-$  及び  $\text{PO}_4^{3-}$  を定量することにより、簡易的なワカメ産地判別の可能性について検討することを目的とした<sup>1,2</sup>。

### 実験

試料として、市販の三陸産、鳴門産、中国産乾燥ワカメ各 7 検体を使用した。

イオンクロマトグラフィー (IC) における分析条件は以下の通りである。溶離液：1.8 mmol/l 炭酸ナトリウム及び 1.7 mmol/l 炭酸水素ナトリウムの混合溶液，流量：1.5 ml/min，試料導入量：25  $\mu$ l，検出器：電気伝導度検出器。検出器の出力範囲が 10  $\mu$ S では  $\text{Br}^-$ ， $\text{NO}_3^-$  のピークが小さく，一方 3  $\mu$ S では  $\text{PO}_4^{3-}$  及び  $\text{SO}_4^{2-}$  の検量線が直線にならないため，測定開始 5.5 min 後に IC の output range を 3  $\mu$ S から 10  $\mu$ S に切り替えた。試料は以下のように調製した。ミルを用いてワカメ 5 g を 1 min 粉碎して得られた粉末 0.1 g に純水 20 ml を加え，15 min 超音波抽出した。抽出後，純水 5 ml で 2 回洗浄しながら，遠心沈殿管に移した。これを 3000 rpm で 5 min 遠心分離し，上澄み液を採取した。残った沈殿物に純水 10 ml を加えて攪拌し，更に遠心分離後，上澄み液をとり，前記上澄み液と合わせ，0.45  $\mu$ m メンブランフィルターでろ過した。ろ液を 50 ml に定容し，IC 分析用試料とした。一検体につき 3 回ずつ抽出実験を行い，ピーク面積及び高さより各陰イオン濃度を求めた。主要陰イオンから一成分，微量成分から一成分を選び，四種類の組み合わせについて散布図を作成すると同時に判別関数を求めた。

### 結果及び考察

標準溶液を分析したところ，ピーク面積及びピーク高さの場合とも直線性の良い検量線が得られた： $\text{Br}^-$ ， $\text{NO}_3^-$  の場合， $r=0.9916-0.9999$  (output range 3  $\mu$ S)， $\text{PO}_4^{3-}$ ， $\text{SO}_4^{2-}$  では  $r=0.9990-0.9992$  (10  $\mu$ S)。 $\text{Br}^-$ ， $\text{NO}_3^-$ ， $\text{PO}_4^{3-}$ ， $\text{SO}_4^{2-}$  の溶離時間，ピーク面積の相対標準偏差 (RSD) はそれぞれ 0.30-0.40, 1.1-5.5% であった。検出限界 (LOD,  $S/N=3$ ) はそれぞれ 0.011, 0.0057, 0.10 及び 0.017 mg/l であった。また，本法によりワカメ試料を分析した際，ピーク面積の RSD は各陰イオンについて，それぞれ 1.1-10, 7.0-30, 2.8-20, 1.0-6.9% であった。中国産と三陸産ワカメについて， $\text{SO}_4^{2-}$  濃度のみから求めた判別関数は  $Z=3.45x-13.8$  ( $x$  は  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度) であり， $Z < 0$  ならば三陸産， $Z \geq 0$  ならば中国産と判別できることがわかった。この際，判別の中率は三陸産 100%，中国産 85.7% であった。判別の精度を高めるために，現在さらにワカメを購入し，分析中である。

### 文献

1. T. Iiyama, M. Inagaki, and K. Fukushi, in *the Abstracts of the 71st Annual Symposium of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 183 (2010).
2. T. Iiyama and K. Fukushi, in *the Abstracts of the 59th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 390 (2010).

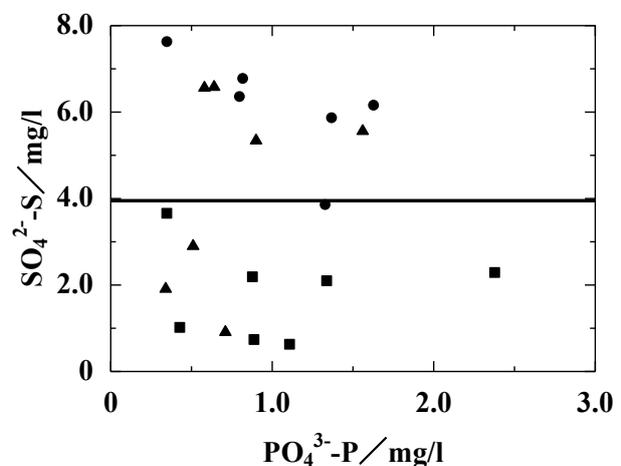


Fig. 1. Distribution of phosphate and sulfate concentration. Symbols: ■, Sanriku; ▲, Naruto; ●, China.

Fig. 1 linear discriminant function

# キャピラリーゾーン電気泳動法によるヒト血清中主要陰イオンの定量

○喜多謙治<sup>1</sup>, 福士 恵一<sup>1</sup>, 平岡 厚<sup>2</sup>, 鈴木祥史<sup>2</sup>, 副島昭典<sup>2</sup>, 宮道 隆<sup>3</sup>

<sup>1</sup>神戸大院・海事, <sup>2</sup>杏林大・保健, <sup>3</sup>近畿職業能力開発大学校

## Determination of Major Anions in Human Serum Using Capillary Zone Electrophoresis

Kenji Kita<sup>\*1</sup>, Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Atsushi Hiraoka<sup>2</sup>, Yoshifumi Suzuki<sup>2</sup>, Akinori Soejima<sup>2</sup>, and Takashi Miyado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

<sup>2</sup>*Faculty of Health Sciences, Kyorin University*

<sup>3</sup>*Kinki Polytechnic College*

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with indirect UV detection for the simultaneous determination of major anions such as  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and citric acid in human serum. The limits of detection (LODs) for  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and citric acid were, respectively, 0.062, 0.17, 0.25 mg/l at a signal-to-noise ratio of three. The relative standard deviation (RSD,  $n=8$ , intra-day) of peak area obtained for  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and citric acid in a serum sample without deproteinization were 1.0, 1.6, and 4.0%, respectively. The analytes were detected within 18 min. Dproteinization was not required using the background electrolyte (BGE) containing 0.01% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). The analytical results for  $\text{Cl}^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  obtained by the proposed method agreed with those obtained by conventional methods. Investigations are in progress to determine other anions such as lactic acid, L-ascorbic acid (AsA), and uric acid (UA) in human serum using CZE.

### はじめに

人体に疾患がある場合、ヒト血清中陰イオン濃度は異常値を示すことが知られている。たとえば、 $\text{Cl}^-$ 濃度は、慢性肺疾患や髄膜炎では低下し、 $\text{PO}_4^{3-}$ 濃度は、副甲状腺機能亢進や副腎皮質不全では低下し、腎疾患等では上昇する。また、低酸素状態やCa代謝異常などにおけるクエン酸の異常高値、ショック状態や心疾患などにおける乳酸の異常高値が報告されている。さらに、AsAやUAの減少は酸化ストレスの発生を示し、UAの増加は痛風の原因となる。従って、これら成分を定量することは疾患の発見に役立つと考えられる。従来、これら成分はイオン電極法( $\text{Cl}^-$ )や酵素法( $\text{PO}_4^{3-}$ , クエン酸)等により個別に定量されている。我々は、現在までに、CZEによる海水中 $\text{PO}_4^{3-}$ 定量法を確立した。海水と血清の主要成分組成は類似している。そこで本研究では、本法をもとに、CZEによる血清中の主要陰イオンの同時定量法を確立することを目的とした<sup>1,2</sup>。

## 実験

泳動液：pH 3.5 に調整した 5 mM 2,6-ピリジンジカルボン酸に 0.01% ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を添加した溶液；印加電圧：15 kV (試料注入側を陰極)；検出波長：273 nm；試料注入時間 (真空吸引法)：3 s. 血清試料として、精度管理用血清 (オリエンタル酵母工業製液状ネスコール-N (正常域, 除タンパク済み及び未処理) 及び-A (異常域, 未処理)) と健康な成人血清 (除タンパク済み) を用いた. まず、精度管理用血清を 10 倍に希釈し、本法により  $\text{Cl}^-$  及び  $\text{PO}_4^{3-}$  を定量し、メーカーによる表示値と比較した. 次に、除タンパクの有無による定量結果への影響について検討した. さらに、ヒト血清を分析し、従来法による定量結果と比較した. 最後に、ヒト血清試料検体についてクエン酸を定量した.

## 結果及び考察

$\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , クエン酸について、ピーク面積を用いた場合、直線性の良い検量線が得られ、ピーク面積及び泳動時間の RSD ( $n=8$ ) は、それぞれ、1.3, 0.62, 3.2% 及び 0.45, 0.37, 1.1% であった. 未処理精度管理用血清 (正常域及び異常域) 中  $\text{Cl}^-$  及び  $\text{PO}_4^{3-}$  定量結果は、メーカーによる表示値とほぼ同様であった. また、除タンパク済み精度管理用血清の定量結果は、未処理血清定量結果とほぼ同様であった. 従って、本法では血清の除タンパク操作を要しないことがわかった. 本法によるヒト血清の定量結果と従来法による定量結果について  $t$  検定を行ったところ、差があるとは言えないことがわかった. さらに、クエン酸定量結果 (1.5-3.7 mg/dl) は、ほぼ正常値の範囲内 (1.95-12.9 mg/dl) であり、本法により、 $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , クエン酸を同時定量できることが示された. 今後、泳動条件を詳細に検討し、血清中の乳酸, AsA, UA 等について同時定量できるようにしたい.

## 文献

1. K. Kita, A. Naridomi, K. Fukushi, A. Hiraoka, Y. Suzuki, A. Soejima, and T. Miyado, in *the Abstracts of the 71st Annual Symposium of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 191 (2010).
2. K. Kita, A. K. Fukushi, A. Hiraoka, Y. Suzuki, A. Soejima, and T. Miyado, in *the Abstracts of the 59th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 334 (2010).

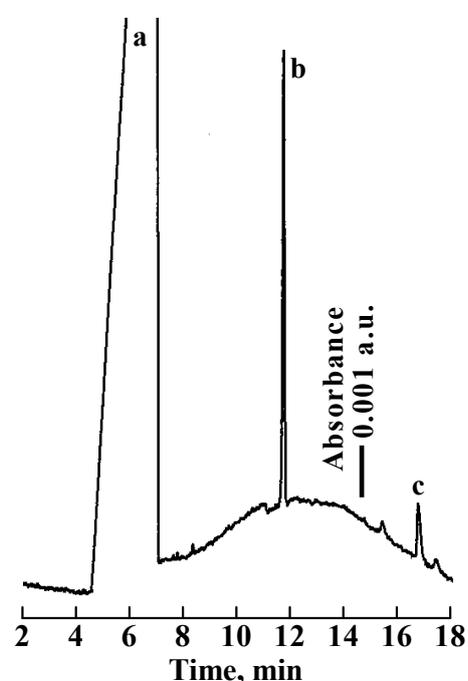


Fig. 1. Electropherogram of human serum. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{\text{tot}}=72$  cm,  $L_{\text{det}}=50$  cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D.  $\times 375 \mu\text{m}$  O.D.; BGE, 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid containing 0.01% hydroxypropylmethylcellulose adjusted to pH 3.5 with 1 M NaOH; voltage, 15 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 273 nm; vacuum injection period of a sample, 3 s (63 nl). Peaks: a,  $\text{Cl}^-$ ; b,  $\text{PO}_4^{3-}$ ; c, citric acid.

# キャピラリーゾーン電気泳動法による海水中亜硝酸及び硝酸イオンの定量：高精度化及び高感度化

○林 隆宏<sup>1</sup>, 福士恵一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神大院・海事

## CZE Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater: Reproducibility Improvement and Sensitivity Enhancement

Takahiro Hayashi<sup>\*,1</sup>, Keiichi Fukushi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

We have reported a method using transient isotachopheresis (tITP)-capillary zone electrophoresis (CZE) for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in seawater using artificial seawater at low pH as the background electrolyte (BGE)<sup>1</sup>. In order to improve the reproducibility and enhance the sensitivity several conditions were examined: the effect of rinsing the capillary with 1 mol/l NaOH before analysis, the addition of bromide to the BGE, and variation of the injection mode for the terminating ion. It was found the reproducibility was improved by rinsing the capillary and using a BGE containing bromide: the relative standard deviation (RSD, n=4) of peak area obtained for nitrite and nitrate were 1.0 and 0.80%, and for peak height 1.1 and 1.0%, and for migration time 0.30 and 0.50%, respectively. The sensitivity was slightly enhanced using an electrokinetic injection mode for the terminating ion.

### はじめに

富栄養化の原因物質である海水中の窒素，リンなどの栄養塩類濃度をモニタリングすることは，海洋環境保全及び海洋化学的観点から重要である．我々は，海水中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及び NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を高感度に同時定量するために，一時的等速電気泳動 (tITP) によるオンライン濃縮を利用したキャピラリーゾーン電気泳動法を開発してきた．第 27 回本シンポジウムでは，低 pH の人工海水泳動液 (BGE) を用い，電気浸透流 (EOF) を抑えることにより，高感度化可能であることを示した<sup>1</sup>．しかし再現性に問題があった．そこで本研究では，再現性を改善するために，まずオンライン濃縮をせずに，分析開始時の 1 mol/l NaOH によるキャピラリー洗浄効果及び人工海水泳動液中の Br<sup>-</sup>の影響について調べた．一方，tITP におけるターミナルイオン導入法として，真空吸引法と電氣的注入法が考えられる．そこで，両者を比較することにより，感度及び精度の点でどちらが最適導入法であるか検討した．

### 実験

キャピラリーは，内径 75 μm，全長 72 cm，有効長 50 cm である．泳動液として pH 3.4 に調整した人工海水を用い，印加電圧は 6 kV (試料導入側を陰極)，紫外可視吸光検出器の波長は 210 nm とした．再現性に関する実験では，試料は 0.1 mmol/l NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及び NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を添加した人工海水とし，以下の条件について検討した：一日の分析開始時の 1 mol/l NaOH 溶液によるキャピラリー洗浄効果，泳動液中の Br<sup>-</sup>の有無．次に，同様の試料及びターミナルイオン溶液として 600 mmol/l 酢酸ナトリウム溶液を用い，tITP におけるターミナルイオン溶液導入法として，真空吸引法 (時間：8-12 s) 及び電氣的導入法 (電圧：2-20 kV (試料導入側を陰極)，時間：8-48 s) について比較した．

## 結果と考察

泳動液として  $\text{Br}^-$  を含まない人工海水を使用し、 $\text{NaOH}$  溶液によりキャピラリー洗浄しない場合、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の相対標準偏差 (RSD) は、ピーク面積 25%、22%、ピーク高さ 22%、19%、泳動時間 3.6、0.73% であった。洗浄した場合は、ピーク面積 7.6%、5.1%、ピーク高さ 5.2%、6.6%、泳動時間 3.6、0.50% であり、泳動時間以外は改善された。 $\text{Br}^-$  を含む人工海水を使用し、1 mol/l  $\text{NaOH}$  でキャピラリーを洗浄後に分析したところ、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の RSD は、ピーク面積 1.0%、0.80%、ピーク高さ 1.1%、1.0%、泳動時間 0.30、0.50% であり、大幅に改善された。この場合、1 mol/l  $\text{NaOH}$  でキャピラリーを洗浄した影響も考えられた。そこで、1 mol/l  $\text{NaOH}$  の代わりに純水で 10 min 洗浄したところ、RSD はピーク面積 3.7%、2.9%、ピーク高さ 2.2%、1.5%、泳動時間 1.5、1.5% であった。以上より、泳動液として  $\text{Br}^-$  を含む人工海水を使用し、1 mol/l  $\text{NaOH}$  でキャピラリーを洗浄することで再現性が改善されることがわかった。ピーク面積及びピーク高さを用いた場合とも、直線性の良い検量線が得られた ( $r=0.9995-0.9998$ )。次にターミナルイオン導入法として真空吸引法を用いた場合、試料導入時間 3 s では、ターミナルイオンの最適導入時間は 8 s であった。このとき RSD は、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  それぞれピーク面積については 5.8、2.2%、ピーク高さ 2.0、2.2%、泳動時間 0.42、0.25% であり、非常に良い再現性が得られた。また、電気的導入法を用いた場合、試料導入時間 3 s では、ターミナルイオンの最適導入時間は 48 s、印加電圧は 10 kV であった。このとき RSD は、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  それぞれピーク面積については 2.5、1.6%、ピーク高さ 2.3、1.3%、泳動時間 0.76、0.44% であり、再現性の良い結果が得られた。また、ターミナルイオン導入法として電気的導入法を用いた場合、 $\text{NO}_2^-$  及び  $\text{NO}_3^-$  のピーク高さは、真空吸引法の場合と比較し、それぞれ約 1.1 及び 1.2 倍であった。従って、ターミナルイオン導入法としては電気的導入法のほうが高感度化に有用であることがわかった。現在、より低濃度試料を用い、再現性の向上及び高感度化について検討中である。また今後、BGE の pH 等についても詳細に検討する必要がある。

## 参考文献

1. K. Fukushi, S. Matsui, S. Takeda, and S. Wakida, in *the Abstracts of the 27th Capillary Electrophoresis Symposium*, p. 67 (2007).
2. T. Hayashi, K. Fukushi, in *the Abstracts of the 59th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 334 (2010).

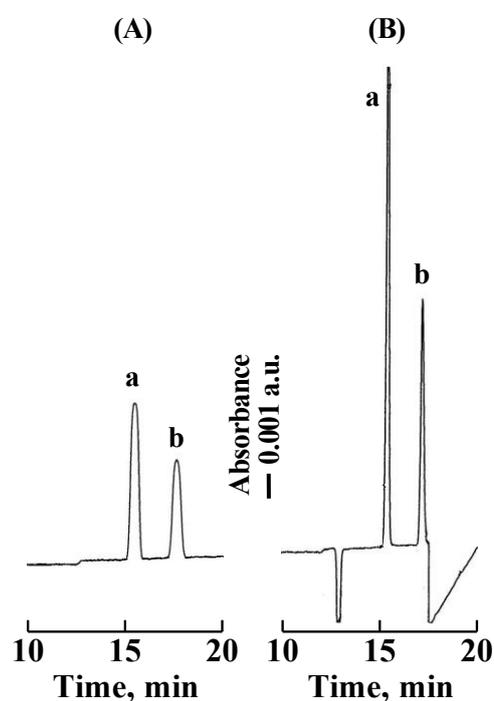


Fig. 1. Electropherograms of a mixture of 0.1 mmol/l nitrite and nitrate in artificial seawater. (A) Without tITP. (B) With tITP. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{\text{tot}}=72$  cm,  $L_{\text{det}}=50$  cm, 75  $\mu\text{m}$  I.D. $\times$ 375  $\mu\text{m}$  O.D.; BGE, artificial seawater containing  $\text{Br}^-$ , voltage, 6 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 210 nm; Sample: artificial seawater containing 0.1 mmol/l  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ ; vacuum injection period, 3 s (63 nl). Termination ion, 600 mmol/l acetate; voltage for electrokinetic injection, 10 kV; period, 48 s. Peaks: a,  $\text{NO}_3^-$ ; b,  $\text{NO}_2^-$ .

# キャピラリーゾーン電気泳動法を用いたバイオ医薬品の品質評価試験

前田 由貴子, 岩田 美紀, 表 由佳子, 春野 玲弥, 佐藤 了平,  
中谷 圭吾, 疋田 昌義, 岡嶋 孝太郎, 酒井 治美, 清水 将年,  
中山 智加男  
株式会社住化分析センター

## Specification test for biologics by capillary zone electrophoresis

Yukiko MAEDA\*, Miki IWATA, Yukako OMOTE, Remi HARUNO, Ryohei SATOU, Keigo NAKATANI, Masayoshi HIKITA, Kotaro OKAJIMA, Harumi SAKAI, Masatoshi SHIMIZU, Chikao NAKAYAMA

Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.

### Abstract

Many biologics are glycoproteins and it is known that the carbohydrate chains may have effects on the physicochemical characters, bioactivities, dispositions and so on. Therefore, it is important to evaluate the carbohydrate chains of biologics as a parameter of quality control. In this study, we examined the utility of capillary zone electrophoresis as specification test for biologics by characterizing glycoforms of three biologics (two types of recombinant human erythropoietins and one antibody pharmaceutical). We were able to detect specific electropherograms in each erythropoietin. These results reflected differences in oligosaccharide structure between EPO- $\alpha$  and EPO- $\beta$ . As to the antibody pharmaceutical, we were able to detect the content of non-glycosylated peptides. Consequently, we indicated the efficiency of capillary zone electrophoresis for specification test for biologics.

### はじめに

バイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）の多くは糖タンパク質である。その糖鎖は翻訳後修飾により付加されるため、糖鎖構造に不均一性が生じる。糖鎖はバイオ医薬品の物理化学的性質、生物活性、体内動態などに影響を及ぼす場合があることが知られている<sup>\*1</sup>。そのため、糖タンパク質性医薬品の研究開発段階では糖鎖の構造解析が実施され、品質評価のパラメーターとして糖鎖不均一性の確認が求められるなど、糖鎖の評価が重要視されつつある。糖鎖解析にはキャピラリー電気泳動法や質量分析などの分析技術が利用されている<sup>\*1</sup>。今回我々は、糖鎖解析技術の一つであるキャピラリーゾーン電気泳動法を用いて、バイオ医薬品のグライコフォーム分布を評価し、品質評価試験法としての有用性を検討した。

### 実験

由来の異なる組換えヒトエリスロポエチン(EPO- $\alpha$ 、EPO- $\beta$ )製剤および抗体製剤を用いて、キャピラリーゾーン電気泳動法によりグライコフォーム分析を実施した。エリスロポエチン製剤は、試料を脱塩後、欧州薬局方(EP)<sup>\*2</sup>に準拠した方法により分析した。抗体製剤は、

試料を還元後、前田らの方法<sup>\*3</sup>に準拠して分析した。また、抗体製剤の試験法について妥当性の検証（分析法バリデーション）を行った。

### 結果および考察

由来の異なるエリスロポエチン製剤について、各々に特異的なエレクトロフェログラムが得られ（Fig. 1）文献情報<sup>\*4</sup>から予想されるシアル酸結合数・糖鎖分枝数など糖鎖構造の差異を反映した結果が得られた。抗体製剤についても、文献情報<sup>\*3</sup>と同様に、糖鎖付加の不均一性を検出することができた（Fig. 2）。また、分析法バリデーションでは、特異性及び試験の再現性を検討し、設定した判定基準を満たした。本結果より、キャピラリーゾーン電気泳動法はバイオ医薬品の品質評価試験法として有用な技術であることが示された。

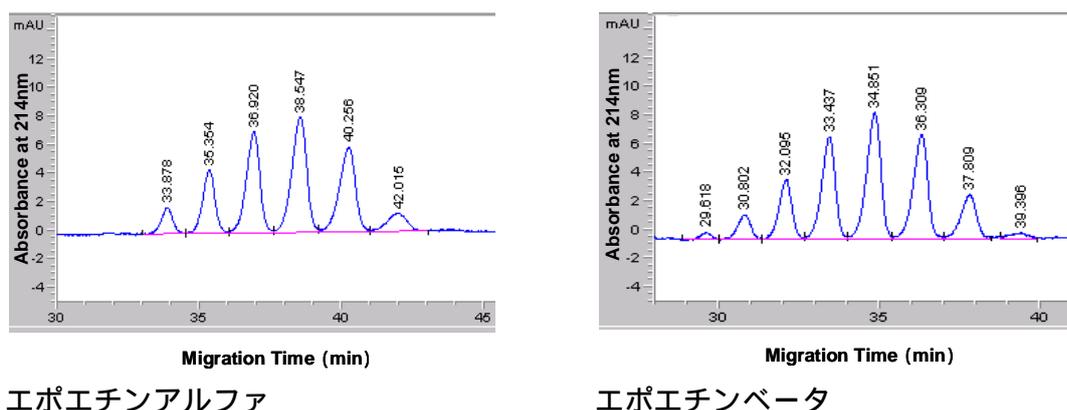


Fig. 1 エリスロポエチン製剤のエレクトロフェログラム

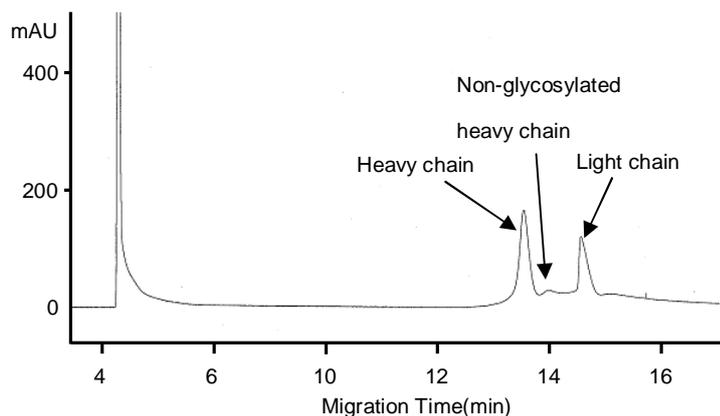


Fig. 2 抗体製剤のエレクトロフェログラム

### 文献

\*1 早川堯夫, バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保, エル・アイ・シー (2007).

\*2 Erythropoietin concentrated solution, *European Pharmacopoeia*, Volume 2, Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, Strasbourg, sixth ed., 1813-1814(2008).

\*3 前田ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **41**, No.6, 477-489 (2010).

\*4 F.Benavente *et al.*, *Electrophoresis*, **27**, 4008-4015 (2006).

# 平板型カラムを用いた新規二次元分離手法の開発(V)

○伊東寛明, 北川慎也, 大谷 肇  
名工大院工

## Development of new two-dimensional separation method using planer column (V)

Hiroaki ITO\*, Shinya KITAGAWA, Hajime OHTANI

*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

### Abstract

A new two-dimensional separation method using a planer column equipped with two electrodes at the both sides was developed. In this method, a mobile phase was supplied to the planer column and a voltage was applied in cross-directional to the mobile phase stream. Therefore, two-dimensional separation, based on chromatographic and electrophoretic mechanisms, was progressed simultaneously on the planer column. The methacrylate-ester-based reversed phase monolithic planer columns with two gold-coated electrodes were prepared and used in both one (chromatographic) and two-dimensional separations of fluorescent analytes in both isocratic and gradient elution modes. The CCD observation confirmed that the analytes were separated in two-dimensional with the application of the cross directional electric field.

### 1, 緒言

現在、細胞の活動によって生じる代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスや、タンパク質を系統的・包括的に解析するプロテオミクスなどのオミクス研究がさかんに行われている。オミクス研究では多数の代謝物やタンパク質の測定が行われるが、一つの分離モードだけでは十分な分離を得ることが困難であり、二つ以上の分離モードを組み合わせる手法がしばしば用いられる。しかし、二次元ゲル電気泳動や二次元液体クロマトグラフィーのような従来の方法では分離過程に時間がかかりすぎてしまうため、その迅速化が望まれている。

そこで我々は、平板型カラムを用いることで HPLC 分離と CE 分離が直交し、且つ、両者が同時に行われる新規二次元分離手法の開発を行った。すなわち、両端に電極を有する平板型カラム上において、移動相の流れ方向における HPLC 分離と、移動相の流れを横断する方向に印加された電場によって電気泳動分離が同時に行われる、新規な分離手法の開発を行った。

本発表では、二次元分離場となる平板型カラム及び二次元分離システムの開発、蛍光モデル試料のアイソクラティック条件、および、グラジエント条件での分離について報告する。

## 2,実験

Figure 1 に示すような平板型カラムを用いた二次元分離システムを、既報の通り、送液ポンプ(LC-10AD、島津)、試料注入用マイクロシリンジ、電気泳動用電源 (Power Phorester Model-3810、Anatech)、UV-vis 光源、CCD カメラ(WAT-902H ULTIMATE、Watec)を用いて構築した<sup>1)</sup>。平板型カラムは、メタクリル酸ブチル(BMA)-co-

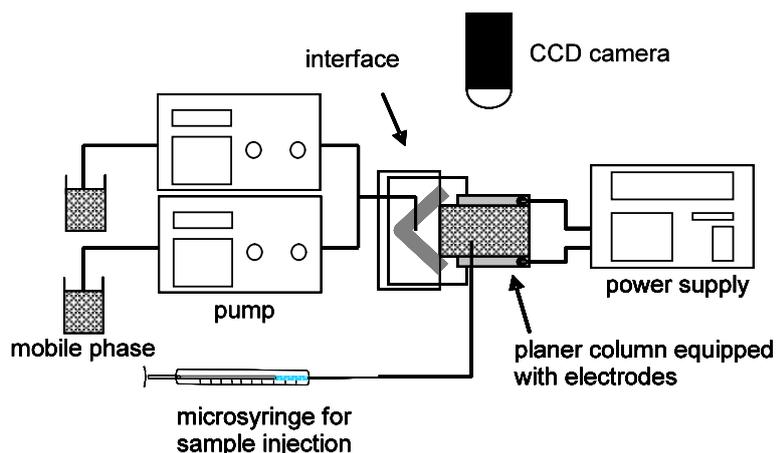


Figure 1 Apparatus for simultaneous two-dimensional separation using planer column.

二メタクリル酸エチレン(EDMA)とメタクリル酸ドデシル(DMA)-co-EDMA 系の二種類を低温下光重合により調製し、それぞれアイソクラティックとグラジエント溶離に適用した。

蛍光物質(硫酸キニーネ、ローダミン6G、アシッドレッド52、コロネン)を試料として用い、CCD カメラによる直接観察を行うことで、構築した二次元分離システムのアイソクラティック、グラジエント条件における評価を行った。

## 3,結果と考察

これまで報告している BMA-co-EDMA 平板型カラムに加え、より疎水性の強い DMA-co-EDMA 平板型カラムについて、細孔形成剤、光量、反応時間について最適化を行い、平板型カラム内に均一性の高いモノリスを調製することに成功した。

電圧を印加を行わず、アイソクラティック条件下で BMA-co-EDMA 平板型カラムに3種類の蛍光試料成分(硫酸キニーネ、ローダミン6G、アシッドレッド52)を注入したところ、これらの試料成分のクロマトグラフィー分離が確認できた。また、電圧を印加し、二次元同時分離を試みたところ、試料成分が二次元で同時に分離されていることが確認できた。

続いて、DMA-co-EDMA 平板型カラムを用いて、グラジエント溶離時における移動相の流れについて基礎検討を行った。ブロモフェノールブルー水溶液を移動相として使用し、平板型カラムにグラジエント溶離を適用した際の流れを CCD カメラで観察したところ、中央が速く、両端部が遅い放物線状のプロファイルで移動相の交換が行われていることがわかった。その後、グラジエント条件下で4種類の蛍光試料(上記3種類にコロネンを追加)のクロマトグラフィー分離を行ったところ、疎水性が高く、アイソクラティック条件下では溶出しなかったコロネンが溶出し、4種類の蛍光試料の分離が確認できた。さらに、電圧印加を行った二次元分離条件下での分離についても検討した。

1) 伊東寛明, 北川慎也, 大谷 肇, 第 17 回クロマトグラフィーシンポジウム要旨集(2010) pp.101-102

# 有機モノリスカラムを用いたキャピラリー電気クロマトグラフィーでのビタミン類の分離に関する基礎検討

○山田紘揮, 北川慎也, 大谷 肇  
名工大院工

## Separation of Vitamins in Capillary Electrochromatography using Polymer Monolithic Columns

Hiroki YAMADA\*, Shinya KITAGAWA, Hajime OHTANI

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

### Abstract

Capillary electrochromatography has the potential to separate the hydrophilic and hydrophobic vitamins simultaneously utilizing electrophoretic and chromatographic mechanisms. The dodecyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate (DMA-*co*-EDMA) monolithic columns containing 2-acrylamido-2-methyl-1-propansulfonic acid (AMPS), as a EOF generator, were prepared by low temperature UV photo-polymerization. In the case of separation of four water-soluble vitamins (vitamin B<sub>1</sub>, vitamin C, nicotinic acid, nicotinamide) with 5mM phosphate buffer solution (pH 8.8)/acetonitrile (70/30, v/v), the monolithic columns containing 0.1wt% AMPS failed to generate fast EOF to elute the anionic analytes. When the monolithic columns with 1.0wt% AMPS was used, all vitamins were successfully detected and separated in baseline level whereas the peaks of anionic analytes were broadened.

### 【緒言】

ビタミンは微量で生理機能を発揮する一方で、不足した際には欠乏症を引き起こす生命の維持に欠かすことのできない物質である。そのため生化学や医療の分野では、生体内における存在量を分析する必要がある。ビタミンはその構造と性質から、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンに大別され、通常、別々に取り扱われ分析されている。

キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) は電気泳動移動度の違いと、固定相への保持の差によって分離を行う手法である。したがって、逆相系のカラムを用いた CEC を行うことで、水溶性ビタミンには、主として電気泳動移動度の違いを、脂溶性ビタミンには固定相への保持の差を利用し、同時分離が可能であると考えられる。本研究では、高い分離性能と通液操作の容易さを有する有機モノリスを CEC の固定相として用いて、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンの一斉分離に関する基礎検討を行った。

## 【実験】

装置には UV 可視検出器 (CE-970UV, Jasco), 高電圧電源 (HCZE-30PN0.25, Matsusada) 気泡発生を抑制するための自作の加圧装置を用いた. カラムは UV 透過被膜コーティングキャピラリー (i.d.100  $\mu\text{m}$ , o.d.375  $\mu\text{m}$ , GL Sciences) に, モノマーとしてメタクリル酸ドデシル (DMA), 架橋剤に二メタクリル酸エチレン (EDMA) を用いた有機モノリスを低温下光重合することで調製した. また, 電気浸透流 (EOF) を生じさせるため, 2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸 (AMPS) を共重合した. 移動相にはリン酸緩衝液 (pH 8.8) /アセトニトリルを用いて測定を行った<sup>1)</sup>.

## 【結果と考察】

まず, AMPS を DMA に対し 0.1 wt% 添加して有機モノリスカラムを調製した. このカラムはアルキルベンゼン類の CEC 分離において, 理論段数 90,000~120,000 段/m という良い分離性能を示した. これは同カラムを HPLC で用いた際の 1.6~2.1 倍であり, EOF の栓流性による効果が得られた. このカラムで水溶性ビタミンの分離を試みたところ, pH 8.8 の緩衝液条件では, 負電荷を有する成分がカラム入口方向へ逆流してしまうことが分かった. そこでより大きな EOF を発生させるために, AMPS を 1.0wt% 添加したカラム調製し, 水溶性ビタミンの分離を行った.

リン酸緩衝液 (pH 8.8) /アセトニトリル (70/30, v/v) を移動相として用いた際の水溶性ビタミン4種の分離を Fig. 1 に示した. 負電荷を有する成分も溶出し, 各成分のベースライン分離が達成された. しかし, ビタミン C とニコチン酸に関しては, ピーク形状が悪化してしまっている. これは, EOF を発生させるためのスルホン酸基に由来する, 不均一な電場による影響である考えられる. このピーク形状の改善や脂溶性ビタミンとの同時分離についても検討を行った.

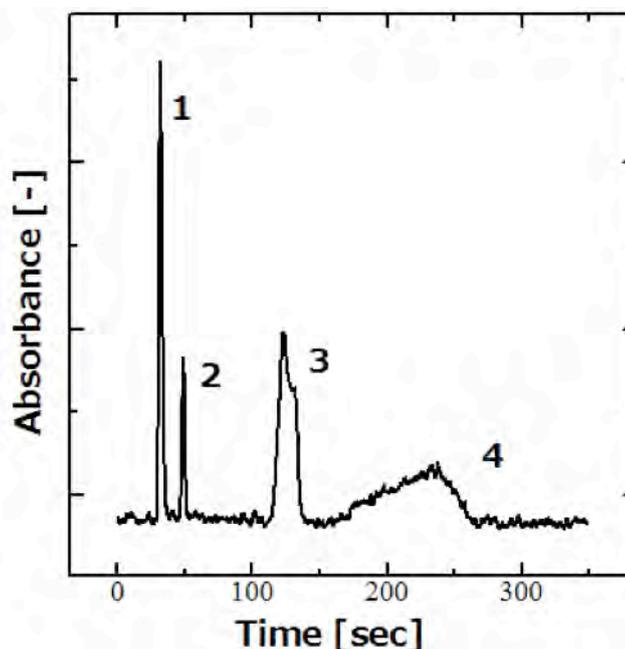


Fig. 1 Separation of four water-soluble vitamins in CEC.

Mobile phase : 5 mM phosphate buffer (pH 8.8)/acetonitrile (70/30, v/v), apply voltage : 15.0 kV, effective column length : 11.0 cm, injection : 0.3 MPa - 20 s, detection : 260 nm, Samples : (1) vitamin B<sub>1</sub>, (2) nicotinamide, (3) vitamin C, (4) nicotinic acid.

## 【参考文献】

1. D. B Gomis, L. L. González, D. G. Álvarez, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 55–60

# 不均一巨大貫通孔をもつ超低流路抵抗ポリマーモノリスカラムを用いた低圧高速液体クロマトグラフィーの開発

○平野 友彦, 北川 慎也, 大谷 肇  
名工大院工

## Development of low pressure high performance liquid chromatography using ultra low flow resistance polymer monolithic column with winding huge through

Tomohiko HIRANO\*, Shinya KITAGAWA, and Hajime OHTANI  
*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

### Abstract

An ultra low flow resistance poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) based monolithic column was prepared with the low temperature ultraviolet photo-polymerization. A polymer monolith structure with winding huge through pore of 10-30  $\mu\text{m}$  in diameter was constructed in i.d. 100  $\mu\text{m}$  fused silica capillary by the photo-polymerization for relatively short period followed by removal of the fragile parts in the monolith. A column with ultra low flow resistance was prepared in polymerization period of 2 min under a low temperature of  $-15^{\circ}\text{C}$ . The column efficiency was evaluated under an isocratic condition and high column efficiency up to around 148 000 plates/m for uracil at the flow rate of 0.5 mm/s was obtained. Using this column, gas pressure-driven low pressure HPLC (gas pressure of 0.15 MPa) without conventional HPLC pump was constructed, and the separation of alkylbenzenes was demonstrated.

### 1. 緒言

モノリスカラムは無機あるいは有機高分子の連続多孔体を固定相とするカラムであり、充填カラムと比較して流路抵抗が低い。そのため、高速送液を用いた高速分離や、1 m を超す長いカラムなどへの応用が期待されている。さらに、流路抵抗の極めて低いモノリスカラムを低流速で用いる場合、送液に高圧を必要としないため、従来の送液ポンプなどの高圧送液系が不要な低圧高速液体クロマトグラフィー (low pressure high performance liquid chromatography, LPHPLC) を構築できる可能性もある。

発表者らはこれまでに、 $-15^{\circ}\text{C}$ 程度の低重合温度における紫外線光重合を用い、有機高分子の一種であるポリメタクリル酸エステルをベースとする、ポリマーモノリスカラムの調製法の検討を行ってきた。本研究では、ポリマーモノリスの重合時間を短縮、すなわち重合反応を早い段階で停止し、続いてカラムを溶媒で洗浄し未成長なポリマーモノリスを流出させることでカラム内に巨大貫通孔を導入した。これにより、従来のモノリスカラムよりも流路抵抗を大幅に低下させた。このカラムを用い、高圧送液系を使用せず、僅かなガス加圧により送液を行なうLPHPLCを開発した。

## 2. 実験

メタクリル酸ブチル(モノマー, 24%), ニメタクリル酸エチレン (架橋剤, 16%), 1-デカノール (細孔形成剤, 34%), シクロヘキサノール (細孔形成剤, 26%), 2,2-ジメトキシフェニル-2-アセトフェノン (光開始剤, モノマーと架橋剤の合計に対して 1%) からなる重合反応溶液を紫外線透過フューズドシリカキャピラリー (内径 100  $\mu\text{m}$ , 外径 375  $\mu\text{m}$ ) に注入した。-15°C に保った恒温装置内でこれに紫外線 (強度 170  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 波長 365 nm) を照射し, 光重合によりポリマーモノリスカラムを調製した。重合反応後カラムにメタノールを送液し, 未反応物を除去した。調製したカラムは逆相モードでアルキルベンゼン類の分離を行い, 流路抵抗と分離効率を評価した。

## 3. 結果と考察

はじめに, ポリマーモノリスの重合時間を 1.5, 2, 4, 8, 16 分で変化させたところ, 重合時間が短いほど流路抵抗は減少した。しかし, 最も短い 1.5 分では, 洗浄時にモノリスが完全に壁面から崩れて流出してしまっただけのため, 次に短い 2 分を最適条件とした。重合時間 2 分で調製したカラムでは, 線流速 1  $\text{mm}/\text{s}$ , カラム長 10  $\text{cm}$  当たりの背圧が 0.14  $\text{MPa}$  と, 極めて低い流路抵抗が得られた。この値は既報ポリマーモノリスカラムの 2 分の<sup>1)</sup>, 粒子径 3  $\mu\text{m}$  充填カラムの 40 分の 1 程度である。このカラムの断面の共焦点レーザー顕微鏡による観察結果を Fig. 1 に示す。ここから, 曲がりくねった直径 10~30  $\mu\text{m}$  程度の不均一巨大貫通孔がカラム内に生成していることが明らかになった。この巨大貫通孔のため, 極めて低い流路抵抗が得られたものと考えられる。このカラムでアルキルベンゼン試料の分離を行ったところ, 理論段数は線流速 0.5  $\text{mm}/\text{s}$  程度で最大となり, ウラシル ( $t_0$  マーカー) で約 148 000 段/ $\text{m}$ , トルエンで 95 000 段/ $\text{m}$  という高い値が得られた。

このカラムを用い, 高圧送液ポンプなどの高圧送液系を使用せずに, 0.15  $\text{MPa}$  という僅かなガス加圧を利用し移動相をカラムに送液したところ, Fig. 2 に示すようにアイソクラティック, グラジエントどちらの場合でも試料分離を行うことができた。このように, 流路抵抗が極めて低いカラムを用いることで高圧送液系を省略可能であることを示すことができた。

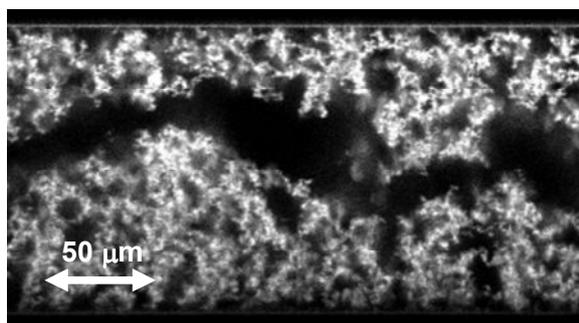


Fig. 1. Longitudinal cross-section of the ultra low flow resistance column prepared with 2 min of polymerization period observed with confocal laser scanning microscope.

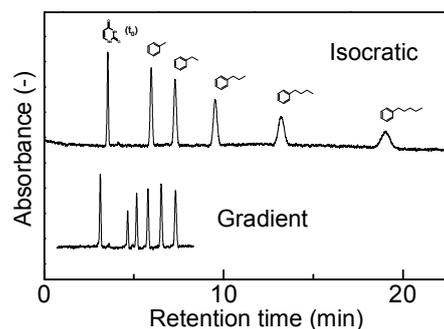


Fig. 2. Separation of alkylbenzenes using a gas pressurization system supplying eluent to the ultra low flow resistance column. Column length: 90  $\text{mm}$ , Mobile phase: Isocratic ACN/water = 40/60, Gradient ACN/water = 40/60 to 60/40 in 10 min, Detection: UV 190  $\text{nm}$ , Pressure: 0.15  $\text{MPa}$ .

1) T. Hirano, S. Kitagawa, and H. Ohtani, *Anal. Sci.*, **2009**, *25*, 1107-1113.

# マイクロ液滴電磁泳動速度測定によるイオン液体の キャラクタリゼーション

○飯國良規, 時田雄太, 大谷 肇

名工大院・工

## Measurement of electromagnetophoretic velocity of micro-droplets to characterize ionic liquids

Yoshinori IIGUNI\*, Yuta TOKIDA, and Hajime OHTANI

*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

### Abstract

Electromagnetophoretic migration velocimetry of organic micro-droplets in liquids allows us to characterize their surface conductivities caused by an electric double layer of them. In this study, we applied this technique to characterize ionic liquids which were electrical conductive fluid.

Under the magnetic field of 1 T generated by the Nd-Fe-B magnets, we could observe the migration of N-methyl-N-butylpyrrolidinium bis (trifluoromethanesulfonyl) imide (mbpTFSI) micro-droplets. In 0.5 M KCl solution, the migration velocity of mbpTFSI droplets was similar to that of 2-fluorotoluene droplets. On the other hand, in 0.25 M KCl solution added by 0.25 M KTFSI, the migration velocity of mbpTFSI droplets decreased. It was indicated that the migration velocity of mbpTFSI reflected the inner conductivity under the condition that TFSI ions could be exchanged between KCl buffer solution and mbpTFSI droplets. This result suggests that electromagnetophoretic velocimetry is promising for effective characterization of ionic liquids.

### はじめに

近年、研究が盛んに行われているマイクロリアクタは試料量の低減や高感度化および高速度化が可能である。液滴を反応場とする系は、その大きな比界面積から注目されており、このような系では、液滴のキャラクタリゼーションやマニピュレーション手法が有効な技術である。そこで我々は、電磁泳動による水中液滴のキャラクタリゼーション法の開発を行っている。電磁泳動は均一電場とそれに直交する均一磁場を用いる液相中の微粒子の泳動現象であり、対象に非接触、非浸襲に作用することから、固体粒子に限らず液滴など様々な物質への適用が可能である。これまでの研究において、有機液滴の電磁泳動速度から液滴表面へ吸着した界面活性剤のキャラクタリゼーションが可能であることを示した。本研究では、特異的な物性から新しい反応場として注目されているイオン液体をマイクロ液滴として電磁泳動を観測することにより、泳動速度へのイオン液体の電気伝導度の影響について検討を行い、本法によるイオン液体のキャラクタリゼーションを試みた。

### 実験

試料として、N-メチル-N-ブチルピロリジニウム ビス(トリフルオロメタンサルホニル)イ

ミド(mbpTFSI)( $0.0026 \text{ S cm}^{-1}$ )および2-フルオロトルエン(2-ft)を、それぞれ  $1.0 \text{ mol dm}^{-3}$  又は  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  の KCl 水溶液中に超音波により液滴として分散させたものを用いた。1 対の Nd-Fe-B 磁石を間隔 1 mm で固定し作成した磁場中に、 $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  の正方形キャピラリーセルを磁場方向に対して垂直方向に設置した。セル中の試料溶液に電流を印加し、液滴の泳動挙動を CCD カメラ付光学顕微鏡により観測し、画像をパソコンに取り込み泳動速度解析を行った。また、カリウム ビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミド(KTFSI)を塩化カリウム水溶液に少量添加したときのイオン液体液滴の泳動挙動の観測を行った。さらに、mbpTFSI とはアニオンが同じで電気伝導度の異なるイオン液体である N-メチル-N-プロピルピロリジニウム ビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミド(mppTFSI) ( $0.0039 \text{ S cm}^{-1}$ )および 1-アリル-3-ブチルイミダゾリウムビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミド(ABImTFSI)( $0.0015 \text{ S cm}^{-1}$ )についても電磁泳動速度測定を行った。また、電磁泳動速度から式(1)を用いて電気伝導度を求めた。

$$v_{\text{EMP}} = \frac{4}{9} \left( \frac{\sigma_p - \sigma_f}{2\sigma_f + \sigma_p} \right) \frac{i Br^2}{S \eta} \quad (1)$$

ここで  $i$  は電流、 $B$  は磁束密度、 $r$  は微粒子、 $S$  はセルの断面積、 $\eta$  は媒体の粘度である。[1]  $\sigma_f$  は媒体の電気伝導度であり、 $\sigma_p$  は、固体粒子および有機液滴において、それ自体の電気伝導度ではなくこれらの微粒子表面に形成する電気二重層に起因する表面電気伝導度である。[2]

## 結果及び考察

1 T の磁場中において直径約  $7 \mu\text{m}$  の mbpTFSI 液滴の電磁泳動速度を測定した。その結果、 $1.0 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl 水溶液中で測定した mbpTFSI 液滴の電磁泳動速度は、2-ft 液滴のそれと同程度であった。これは電気二重層に起因する電気伝導度が高いため、mbpTFSI 液滴内部の電気伝導度の影響が小さいためと考えた。そこで、表面電気伝導度を下げるため、 $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl 水溶液とし液滴の電磁泳動を観測したところ、実測した泳動速度から求めた電気伝導度は mbpTFSI 液滴および 2-ft 液滴でそれぞれ  $0.015 \text{ S cm}^{-1}$  および  $0.012 \text{ S cm}^{-1}$  となりこの場合も大きな差は見られなかった。このことより、液滴に電流が流れるために必要である、媒体と液滴の間でのイオンの交換がないためと考えた。そこでさらに、媒体に mbpTFSI と同じアニオンを有する塩である KTFSI を添加し、 $0.25 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl +  $0.25 \text{ mol dm}^{-3}$  KTFSI 水溶液中における液滴の電磁泳動速度を測定すると、mbpTFSI 液滴のみ電磁泳動速度が低下した。これはイオンの交換により液滴中に電流が流れたためであると考えられ、イオン液体の泳動速度では内部の電気伝導度の影響が示唆された。さらに、mppTFSI および ABImTFSI 液滴の電磁泳動速度の比較からイオン液体のキャラクタリゼーションを試みた。

## 文献

1. A. Kolin, *Science*, **117**, 134 (1953).
2. Y. Iiguni, M. Suwa, H. Watarai, *J. Chromatogr. A*, **1032**, 165 (2004)

# 電磁泳動のためのフォトリソグラフィーによる 有機ポリマーモノリス成形マイクロ流路の作製

○岡田 孝征, 飯國 良規, 大谷 肇  
名工大院工

## Micro channel fabrication by polymer monolithic membrane for electromagnetophoresis using photolithography

Takamasa OKADA\*, Yoshinori IIGUNI, and Hajime OHTANI

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

### Abstract

We introduced a new micro-channel cell fabricated with a photopatterned polymer monolith membrane to remove influence of bubbles generated from electrodes and to apply the controlled current for electromagnetophoresis, which is the migration phenomenon of micro-particles dispersed in conductive fluids when the electric current and the magnetic field are applied perpendicular to each other. The polymerization solution of methacrylate-based monomers with a photopolymerization initiator was inserted to a gap of 300  $\mu\text{m}$  between two slide glasses and then exposed UV light through the photomask to form the monolith. By photolithography, the channel, whose size was 3 mm  $\times$  300  $\mu\text{m}$   $\times$  15 mm, and two reservoirs for electrodes separated from the channel by polymer monoliths were molded. Moreover, polymerization temperature and irradiation conditions were optimized in terms of strength of monolith membrane and homogeneity of applied current in the channel.

### はじめに

自然界には、細胞や小器官、大気中浮遊粒子などの環境微粒子、粘土粒子や微結晶など多種多様な微粒子が存在し、元素循環や分子リサイクルに重要な役割を果たしていることから、これらを微粒子として分離・分析することが必要である。低分子に対する技術はクロマトグラフィーをはじめ、質量分析やキャピラリー電気泳動など多くの手法があるが、サブマイクロからマイクロメートルオーダーの微粒子を分離・分析し、評価する方法は少ない。そこで、我々は、均一電場とそれに直交する均一磁場を外場とする電磁泳動を利用する、サブマイクロからマイクロメートルオーダーの液中微粒子を分離・分析するための新しい手法の開発を行ってきた。[1] 本研究では、永久磁石でも可能な簡易な分離法のための新規な電磁泳動セルとして、電極から発生する気泡の影響を除去し、制御した電流印加が可能な Fig. 1 に示すセルをデザインした。

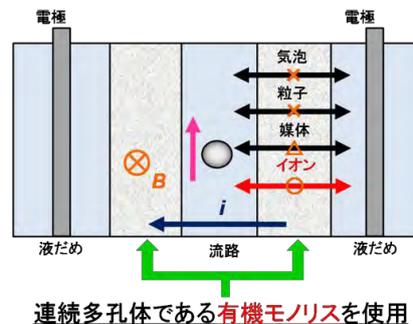


Fig. 1 セルのデザイン

ここでは、流路をデザインするための素材として、光重合性有機ポリマーモノリスに注目し、マイクロ流路をフォトリソグラフィにより成形した、新規な電磁泳動セルを作製した。

## 実験

モノマーとしてメタクリル酸メチル、架橋剤として二メタクリル酸エチレン、細孔形成剤として1-デカノールとシクロヘキサノールを20:30:28:22 wt%の比率で混合し、さらに重合開始剤として、1 wt%相当の2,2'-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン(全て、和光純薬工業株式会社)を加え、メタクリル酸エステル系有機ポリマーモノリスの重合溶液を調製した。[2] 26 mm×38 mmにカットしたスライドガラス(MATSUNAMI GLASS)の表面に3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン処理によりビニル基を修飾した。2枚のスライドガラスを、スペーサーを用いて間隔300 μmとなるように貼り合わせ、そこに重合溶液を導入した。黒色のアクリル板及びスライドガラスで作製した流路部と電極用液だめを遮光するフォトマスクをかぶせ、恒温槽内で高圧水銀ランプ(MODEL HLR100T-2, SENLIGHTS CORP)により、紫外線(365 nm、170 mW/cm<sup>2</sup>)を照射してモノリスを光重合し、流路成形を行った。

## 結果及び考察

フォトリソグラフィによるモノリスの成形における、重合時間、重合温度およびマスク遮光部の厚さについて、最適な条件を検討した。作製したフォトマスクを用いて室温において重合を行ったところ、遮光部ではモノリスの生成が抑えられたが解像度は低かった。これはモノリスの強度を上げるため、重合時間を長くした結果、光開始剤ラジカルが遮光部へ拡散したことが原因であると考えた。そこで拡散を抑えるため重合温度を0°Cとしたところ、解像度は向上したが、一方でモノリスの強度は低下する結果となった。また、強度をあげるため重合時間を長くすると重合温度0°Cにおいても解像度が低下し、流路成形には適さなかった。

以上の結果から、常温において短時間でのモノリス重合が流路成形には適していると考え、照射する紫外線の強度をあげ、モノリスの重合を行った。照射強度を上げたとき、迷光も増大することが予想されたことから、遮光部の厚みを増すために約10 mmのフォトマスクを使用したところ、解像度が向上し、3 mm×300 μm×15 mmの流路および電極用液だめを成形することができた。本法により作製したセルにおける流路中への印加電流の均一性について検討を行った。

## 文献

1. Y. Iiguni, M. Suwa, and H. Watarai, *J. Chromatogr. A*, **165** 1032 (2004)
2. T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani, *ANALYTICAL SCIENCES* SEPTEMBER, **25** 1107 (2009)

# マイクロチップウエスタンブロットティングシステム

## の開発

○峰岸真紀、佐藤記一、吉村悦郎  
東京大学 大学院農学生命科学研究科

## Development of Micro Western Blotting System

Maki Minegishi\*, Kiichi Sato, Etsuro Yoshimura

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

Microchip-based Western blotting analysis system was developed, which consists of separation by microchip electrophoresis and successive antigen-antibody reaction of denatured protein in a microchannel. Separation of denatured protein in the microchannel was realized. In addition, consecutive separation and antigen-antibody reaction of native protein in that place were realized.

### はじめに

ウエスタンブロットティング法はタンパク質を電気泳動分離した後、抗体を用いて特定のタンパク質のみを検出する特異性の高い分析法で、生化学研究において広く利用されている。しかし従来法では作業が煩雑であり、また電気泳動からブロットティング、抗原抗体反応、検出まで1日程度要するのが一般的であり、分析時間が長いという問題が存在する。そこで我々は電気泳動分離と抗原抗体反応を一枚のチップ上で連続的に行うマイクロチップシステムを開発することによりこれらの問題点を解決することを目指した。本研究ではタンパク質をSDS電気泳動する方法や抗体を流路内に固定するためのポリマーの作製法、マイクロチップ内で抗原抗体反応を行うための条件等について検討した。

### 分析の原理

前述の二つのプロセスの集積化を実現するために、Fig.1のような流路を考案し、設計・試作した。一枚のチップ上に分離領域と結合領域を構築し、分離領域で分離されたタンパク質のバンドパターンを維持した形で、そのまま結合領域に移動させて抗原抗体反応を行わせる2段階の分析方法を着想した。これを実現するために、一枚のチップに分離領域と結合領域を作製し、かつその両者を直列に並べて設置した。分離領域のポリマーにはポリエチレンオキシドを用い、結合領域では抗体をN-アクリロキシスクシンイミドを介してポリジメチルアクリルアミドに結合させた。この方法では、まず、SDSで変性させたタンパク質は細い分離流路内で分子量に応じて電気泳動分離される。次に、この分離されてきたタンパク質をそのまま結合領域へ泳動させ、抗体と結合するタンパク質のみが抗原抗体反応をして泳動を止め、それ以外のタンパク質は泳動を続ける。分離領域と結合領域のエレクトロフェログラム

を比較することで特異的検出を行うことができる。

## 実験方法

マイクロチップはフォトレジスト SU-8 を鋳型にして、加工が容易なシリコン樹脂 PDMS に転写して作製した。また、PDMS に MPC コーティングを施すことで流路表面を親水性にし、タンパク質の吸着を防いだ。タンパク質はあらかじめ蛍光標識し、SDS で変性させたものを用いた。泳動には多チャンネル電源 (LabSmith HVS448) を、検出には倒立型蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) と CCD カメラ (Rolera-XR) を用いた。

## 結果

まず流路全体にポリエチレンオキシドを用いた分離剤を充填し、SDS で変性させたタンパク質を電気泳動させた。流路の幅や高さ等を最適化することにより、分子量に応じて分離させることに成功した。そこで得られたエレクトロフェログラムを元に、それぞれのタンパク質の分子量の対数と泳動速度の関係性を調べたところ、相関があることを確認した。これにより、分子量未知のタンパク質についても分子量マーカーと共に泳動させることにより分子量を特定できると考えられる。

次に、マイクロチップ内での抗原抗体反応条件を検討するため、タンパク質を変性しない状態で分離領域で電気泳動分離を行い、結合領域で抗原抗体反応を行った。この時、抗体と反応したタンパク質のみが泳動を止め、それ以外のタンパク質は泳動を続けた。これより、分離領域と結合領域のエレクトロフェログラムを比較することで抗体と反応したタンパク質を特定できることを確認した。

今後、タンパク質を変性させた条件での検討を行い、マイクロチップ内でのウエスタンブロットティングの実現を目指す。

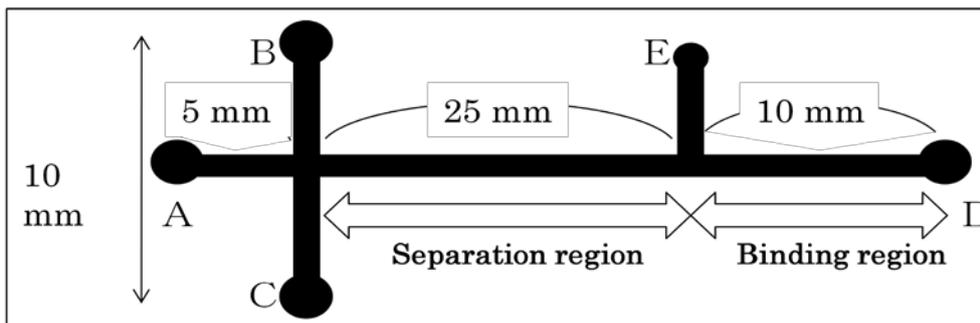


Fig.1 Illustration of microchip for Western blotting

- |                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| A Buffer reservoir | D Buffer waste           |
| B Sample reservoir | E Buffer injection waste |
| C Sample waste     |                          |

## 謝辞

MPC コーティングに関しまして、東京大学 大学院工学系研究科 石原一彦教授、高井まどか准教授にお世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

# 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく

## 高感度バイオ分析デバイスの開発

### ～簡便・迅速・高感度免疫アッセイの開発～

【阪府大・院工】○横山大輝 片岡正輝 八尾俊男 川村邦男 久本秀明

## Reagent-release Capillary-Based Isoelectric Focusing for Highly-Sensitive Bioanalysis

### ～ Simple Rapid, and Sensitive Immunoassay ~

Hiroki YOKOYAMA\*, Masaki KATAOKA, Toshio YAO, Kunio KAWAMURA and Hideaki HISAMOTO

Osaka Prefecture University, JAPAN

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 took place. 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 10 to 1000 pg/mL. In addition, limit of detection (LOD) was calculated to be 5.3pg/mL (S/N:3).

Recently, we found that the sample solution introduction into RRC by capillary force resulted in reagents immobilized at capillary wall to be flowed downstream of capillary. This phenomenon might affect to the formation of pH gradient, which directly correlated with analytical performance. Here, fundamental characterization on the pH gradient formation was investigated by using pI markers, and found that the pH gradient formation was highly dependent on the direction of the sample solution introduction.

【緒言】最近我々はタンパクを分離、濃縮できるキャピラリー等電点電気泳動（CIEF）に注目し、Carrier ampholyte（CA）及び蛍光標識抗体を、キャピラリー内壁に物理吸着固定した試薬放出キャピラリー（RRC）を開発した。これはタンパク試料溶液を毛細管現象で吸い上げるのみで CA および固定化試薬が自発的に混合・反応するため、その後電圧印加のみで簡便・迅速・高感度にタンパク検出可能なデバイスである。このデバイスを免疫アッセイに応用し、検出時間約 10 分で 10~1000pg/mL の範囲の抗体検出に成功した<sup>1)</sup>。しかしながら、この方法では試料導入時に固定化した試薬が流れによってキャピラリーの下流の端に偏ってしまう現象が見られた。この現象は最終的に形成される pH 勾配に影響を与えると考えられ、このことはタンパク分析時の分離能や検出限界とも関わるため、重要な検討課題である。そこで今回は、pI マーカーを用いて従来の CIEF と RRC を用いた

CIEF を比較し、pH 勾配の形成に関する基礎検討を行った結果と、簡便・迅速・高感度化されたイムノアッセイの結果を発表する。

**【実験】RRC の作製：** 内径 100 $\mu$ m (又は 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) を含む溶液を導入し、2h 減圧乾燥させ、内壁に物理吸着させた。

**RRC-IEF イムノアッセイ：** 作製した RRC に試料抗体 (Anti rabbit IgG-TRITC) 水溶液を毛細管現象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 1.6kV (又は 2kV) の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。

**通常の CIEF による pH 勾配形成の確認：** pI マーカー (5.1、6.6、7.6、8.1、9.0)、IEF 用試薬 (glycerol 0.7%, Tween20 0.1%, Biolyte3/10 1%) を混合し、毛細管現象によりキャピラリー (4cm) に導入後、酸性・塩基性電解質を両端のリザーバーに満たして電圧印加 (2kV) し CIEF を行った。

**RRC との比較：** IEF 用試薬を固定化した RRC を作製し、試料として pI マーカー (5.1、6.6、7.6、8.1、9.0) 水溶液を毛細管現象によりキャピラリーに導入後、同様に電圧印加 (2kV) し CIEF を行った。検出はいずれも、蛍光顕微鏡を用いて行い、各 pI マーカーの濃縮位置を比較した。ここでは試料溶液導入時、酸性あるいは塩基性電解質と接触する端面の両方からそれぞれ試料溶液の導入を試み、結果の比較を行った。

**【結果・考察】RRC-IEF のシステムを用いてイムノアッセイを行った結果、10~1000 pg/mL の濃度範囲で抗原抗体複合体の検出が可能ということがわかり、検出時間は電圧印加から約 10 分であった。また、検出下限は 5.3pg/mL であると計算され、簡便・迅速・高感度なイムノアッセイが達成された。**

通常の CIEF において、5.1~9.0 の pI マーカーは酸側から 1.5~3.9cm の範囲で濃縮され、キャピラリー長さ方向の pH 勾配は約 5 分程度で形成できることがわかった。

次に、RRC を用いて CIEF を行った。試料溶液を酸性電解質と接触する端面から導入し、試薬の偏りが塩基側によっている場合、通常の CIEF とほぼ同じ濃縮位置となった。それに対し、塩基側から試料溶液を導入して、試薬が酸側によっている場合、pH 勾配の傾きはほぼ通常の CIEF と同じであったが、全体的に酸側にシフトした結果となった。これは、今回用いた CA を構成している分子群には pI が低い化学種が多く、試料導入時に用いた中性溶液中では負電荷を帯びているものが多いために、酸側に寄っている場合には電圧印加に伴って進入する H<sup>+</sup> との酸塩基反応が起こっている間に、OH<sup>-</sup> がキャピラリー内に進入してしまい、pH 勾配が酸側にシフトしたものと考えている。現在、これを明らかにする実験を進めている。

#### **【参考文献】**

- 1) H. Yokoyama et al., Proc. Micro-TAS, 2009, 2, 1204-1206.

# 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく

## 高感度バイオ分析デバイスの開発

### ～超高感度酵素活性検出法の開発～

【阪府大・院工】○野川悠人 横山大輝 川村邦男 久本秀明

## Reagent-release capillary-based isoelectric focusing for highly-sensitive bioanalysis

### ~Simple, rapid, and sensitive enzyme activity assay~

Yuto NOGAWA\*, Hiroki YOKOYAMA, Kunio KAWAMURA and Hideaki HISAMOTO

Osaka Prefecture University, JAPAN

Enzyme activity assay in cell lysate solution is an important analytical method in the field of drug screening. However, existing methods need much time to culture a large number of cells. Therefore highly-sensitive assay that uses a small amount of sample and short analysis time is required. On the other hand, we have been prepared a reagent-release capillary (RRC) physically coated with fluorescently labeled antigen and carrier ampholyte (CA). This capillary allowed simple, rapid, and highly-sensitive protein analysis by simply introducing a sample, followed by rapid preconcentration of immuno complex by IEF.<sup>1)</sup> Here we focused on the use of fluorescent substrate based on Rhodamine 110 for physical coating. This molecule reacts with protease to form fluorescent Rhodamine 110. Since Rhodamine 110 possess amino and carboxyl groups, this molecule is expected to be concentrated by the principle of IEF. Therefore, if we prepare an RRC that immobilizes CA and fluorescent substrate based on Rhodamine 110, development of simple, rapid and sensitive enzyme activity assay device is expected. Here we carried out some preliminary experiments involving IEF behavior of Rhodamine 110, preparation of RRC, and enzyme activity assay by using RRC with and without IEF.

#### 【緒言】

細胞破碎液中の酵素活性計測は、薬剤のスクリーニングなどに不可欠な分析手法である。しかし、既存の方法では多量の細胞が必要であり培養に長期間を要するため、特に培養が難しい細胞の分析や、細胞自体が少なく貴重である場合には、少量かつ高感度、短時間での計測の実現が望まれている。

一方、我々はキャピラリー等電点電気泳動（CIEF）の簡便化に注目し、Carrier ampholyte (CA) 及びラベル化剤などの試薬をキャピラリー内壁に物理吸着固定した試薬放出キャピラリー（RRC）を開発している。これは試料溶液を毛細管現象で吸い上げるのみで CA および固定化試薬が自発的に混合・反応するため、溶液導入後に電圧

を印加すると IEF の原理で目的タンパクをキャピラリー内の一点に濃縮することができる。<sup>1)2)</sup> 本研究では、ローダミン 110 をベースとした蛍光基質分子に注目した。この分子はプロテアーゼとの反応によって、ローダミン 110 を生成する。ローダミン 110 は、分子内にアミノ基とカルボキシル基を有するため、IEF の原理で濃縮できる可能性がある。したがって、CA とこの蛍光基質を固定化した RRC を作製すれば、キャピラリー内で試料酵素の活性を簡便・迅速・高感度に測定でき、試料の少量化のみならず、希少な細胞を用いた分析への応用も期待できると考えた。

今回はこのコンセプト実現のための基礎検討として、酵素反応生成物となるローダミン 110 が濃縮可能かを調べた。さらに、実際に RRC を作製し、試料酵素(trypsin)導入による酵素活性検出の予備実験を行った。

#### 【実験】

**ローダミン 110 濃縮の基礎検討：** 内径 100 $\mu$ 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。このキャピラリーに両性電解質 (Biolyte 3/10 : 2%)、添加剤(Tween 20 : 0.1%、Glycerol : 0.7%)、酵素反応生成物(Rhodamine 110 :  $1 \times 10^{-9}$  ~  $5 \times 10^{-7}$  M)混合溶液を導入し、通常の IEF を行った。

**RRC の作製：** PDMA コーティングキャピラリー内に CA (同上)、添加剤(同上)、酵素基質(Rhodamine 110, bis-(CBZ-L-alanyl-L-arginine amide), dihydrochloride) :  $1 \times 10^{-5}$  M) を含む溶液を導入し、2h 減圧乾燥させ、内壁に物理吸着させた。

**キャピラリー内酵素反応時間の検討：** RRC に酵素 (trypsin) を 0.2、0.5、1.0、10、100  $\mu$ g/ml で導入し、時間経過とともに蛍光強度がどのように変化するかを調べた。

**RRC-IEF：** 作製したキャピラリー内に 1  $\mu$ g/ml 酵素水溶液を毛細管力で導入した。20 分後、キャピラリーの両端をリザーバー溶液 ( $H_3PO_4$  20 mM、NaOH 20 mM) に接触させ、1.6 kV の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。

#### 【結果・考察】

蛍光性酵素反応生成物であるローダミン 110 はキャピラリー内において、等電点電気泳動の原理で濃縮され、汎用の CCD カメラ付き蛍光顕微鏡を用いてもローダミン 110 の濃度として  $10^{-9}$  Mオーダーまで測定可能であることがわかった。

次に RRC を作製して、酵素溶液をそれに導入すると、キャピラリー内で発蛍光が観察された。これは、酵素反応が進行して蛍光性酵素反応生成物が生成したものと考えられる。また、酵素濃度を変化させ、時間変化とともに蛍光強度を測定すると酵素濃度によって傾き・蛍光強度に差がみられ、濃縮しない状態では、今回試した最低酵素濃度 0.2  $\mu$ g/ml まで測定可能であった。

最後に、RRC に酵素溶液を導入し、キャピラリーに電圧を印加すると蛍光性酵素反応生成物が一点に濃縮される様子が観察された。このことから、RRC-IEF によって酵素反応生成物の濃縮による高感度酵素活性測定が可能であることを明らかにした。今後さらに詳細な検討を進める予定である。

#### 【参考文献】

- 1) Yokoyama et al . , *Proc. Micro TAS* 2009, 2, 1204-1206
- 2) Kataoka et al . , *Lab Chip* 2010 in press

# 管状白金電極を用いるフローインジェクション- キャピラリー電気泳動インターフェースの試作

○中井洋和, 手嶋紀雄, 酒井忠雄

愛知工業大学応用化学科

## Flow Injection-Capillary Electrophoresis Interface Using a Tubular Platinum Electrode

Hirokazu NAKAI, Norio TESHIMA, and Tadao SAKAI

Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology

### Abstract

An alternative interface for flow injection-capillary electrophoresis (FI-CE) based on electrokinetic injection is described. The interface basically consists of tubular platinum and a commercially available standard tee connector. The tubular platinum works as not only an electrode, but also a waste outlet of a split sample solution. The availability of the proposed interface was evaluated by the separation of several transition metals, such as vanadium, iron, and cobalt with 1,10-phenanthroline (phen) where on-line complexation reactions with phen were performed in the FI part. We also propose here another improved FI-CE interface.

### はじめに

フローインジェクション (FI) 法は、分析試料の誘導体化、濃縮などの前処理の自動化を得意とし、主として単一成分の高感度・迅速定量に威力を発揮している<sup>1)</sup>。しかし、基本的に分離能が無いため多成分分析に弱点がある。一方、キャピラリー電気泳動法 (CE) は、内径 50  $\mu\text{m}$  程度の熔融シリカキャピラリー細管内で分離分析が行われ、高い分解能を有する。しかし、一般的には感度が悪く、低濃度分離分析を行うためには、オフラインでの前処理が必要となる。そこで、FI 法と CE 法を特殊なインターフェースで結合すれば、両法の特長を保ちながら弱点を補完し合う有用な分析技術を創出することができる。本研究では、市販の 3 方コネクターと管状白金を用いるシンプルな FI-CE インターフェースを試作し、金属錯体の分離によりその性能を評価した<sup>1)</sup>。更に FI 部からの試料溶液を滴下し、CE 部に導入する改良型のインターフェースの試作についても報告する。

### 実験

分析対象物として V(V), Fe(III), Co(II), 配位子として 1,10-フェナントロリン (phen) を用いた。FI 部は、標準/サンプル溶液, phen と酢酸塩緩衝液 (pH 4.0) の混合液, 泳動液としての酢酸塩緩衝液 (pH 4.0) の 3 流路で構成される。標準/サンプル溶液と phen 溶液を合流させ、オンライン誘導体化された錯体が、サンプルループに充填される。バルブを切り替えると、錯体を含む試料溶液が泳動液に注入され、自作のインターフェースに導かれる。この際、試料溶液の一部がキャピラリー管に導入され、過剰な試料溶液は管状白金電極を通し

廃棄される。導入された試料溶液を CE にて分離し、測定波長 220 nm で測定を行った。

## 結果及び考察

### 直接結合型インターフェース

FI-CE インターフェースの構造を、Fig. 1 に示す。FI と CE はインターフェースにより直接結合されている。FI 側から誘導体化（錯形成）後の試料溶液が送液され、電気浸透流により CE へと一部の試料が導入される。Fig. 2 に 3 元素混合の標準溶液のエレクトロフェログラムを示す。Fig. 2 の a, b, c および d はそれぞれ、Co(III)-, Fe(II)-, V(V)-phen 錯体、および未反応の phen である。phen 共存下で Fe(III) による Co(II) の定量的な酸化反応が起こるので、Fe は 2 価、Co は 3 価として検出された。標準鉄鋼中の鉄の定量値は保証値と一致し、本法の有効性が確かめられた。

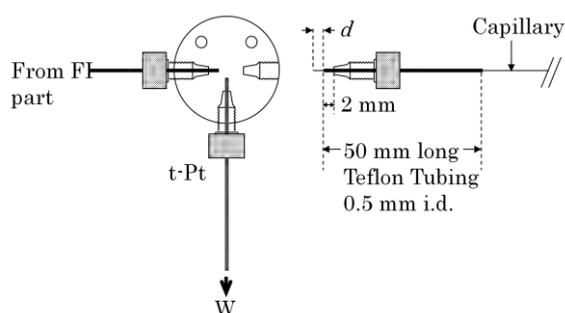


Fig. 1 Schematic of the FI-CE interface. t-Pt, tubular Pt electrode;  $d$ , distance from the end of the Teflon tubing to the end of capillary; W, waste.

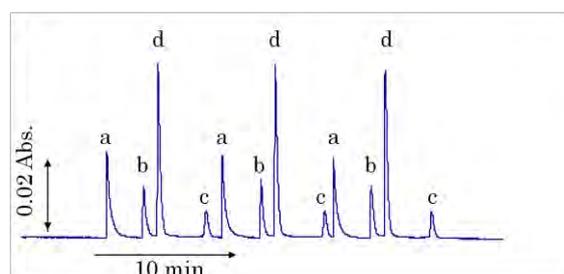


Fig. 2 Electropherogram of vanadium, iron, and cobalt ( $16 \text{ mg L}^{-1}$  each) with the FI-CE system in triplicate at pH 4. (a), cobalt(III); (b), iron(II); (c), vanadium(V); (d), phen.

### 試料滴下による間接結合型インターフェース

上記のインターフェースは、FI と CE が直接結合しているため、CE からの高電圧により FI 装置が故障することがあった。そこで、Fig. 3 に示すように、FI 部からの溶液をインターフェースに滴下するよう改良し、FI と CE を間接的に結合させた。FI 側からの試料溶液がシリンジ上部から滴下され、内部に設置されたチップを通し 3 方コネクターへ導入される。廃液側にも同様にシリンジを設置し、廃液側からポンプを利用して試料溶液の滞留を防止した。現在、この改良型インターフェースの機能を評価している。

## 謝辞

本研究は、JST 平成 22 年度研究成果最適展開支援事業 (A-STEP) フィージビリティスタディステージ (FS) 探索タイプの支援を受け実施されている。

## 文献

- 1) 手嶋紀雄, 酒井忠雄, *ぶんせき*, **2010**, 281.
- 2) N. Teshima, T. Hino, T. Sakai, *Anal. Sci.*, **23**, 751 (2007).

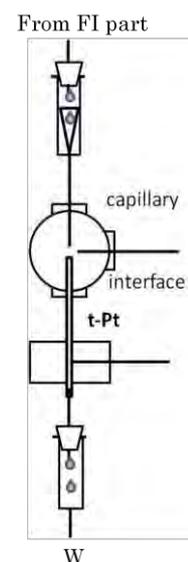


Fig. 3 Falling-drop FI-CE interface.

# インクジェット試料導入法を用いた 定量的濃縮電気泳動法

○中川ゆり,池田紗織,斎藤望,中嶋秀,内山一美  
首都大学東京・都市環境学部

## Quantitative preconcentration technique for capillary electrophoresis with inkjet sample injection

Yuri NAKAGAWA\*, Saori IKEDA, Nozomi SAITO, Hizuru NAKAJIMA  
and Katsumi UCHIYAMA

*Graduate school of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan university*

### Abstract

The purpose of this study is preconcentrate sample introduced by inkjet followed by the quantitative analysis for micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). The droplets are ejected onto the tip of capillary in the range of 0.5~300nL. When droplets are placed at an inlet of a capillary, they were gathered to form a large droplet, then was introduced into the capillary by capillary force. RhodamineB was used as a model sample. To improve reproducibility, glycerin was added to the sample solution. RhodamineB dissolved in the electrolyte without SDS emerge sharp peak showing sweeping effect. Linear relationships were obtained between the concentration and peak area and also between the droplet number and peak area.

### はじめに

キャピラリー電気泳動(CE)での微小試料の導入やスタッキング、スウィーピングといったオンライン濃縮での大容量の試料導入において任意の試料量を操作することは困難であった。我々は CE の試料導入方法としてインクジェットチップを用いる方法について研究している。インクジェットチップは数ピコリットルの液体を再現性よく吐出することができ、吐出位置の再現性も良好であることを利用しキャピラリー端に液滴を滴下しサブナノリットルの極微小試料を再現性よく導入することに成功した。本研究ではインクジェットを用いて高い精度で大容量の試料の導入し、オンライン濃縮後の定量的な検出を目的とした。

### 実験

インクジェットチップは富士電機製のものを用い試料をキャピラリー(外径 0.375mm 内径 0.050mm 全長 45cm GLサイエンス社)の先端に吐出した。液滴は一度に導入されず Fig.1 のように毛管現象によって少しずつ導入される。試料導入が完了したのちキャピラリーを泳動緩衝液内に戻した。

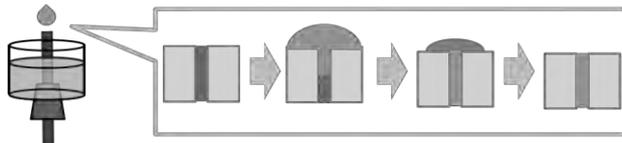


Fig.1 sample injection with inkjet chip

泳動緩衝液は SDS(50mM 和光純薬)を含むクエン酸ーリン酸緩衝液(pH=2.5,50mM 関東化学)とし、モデルサンプルとしてローダミン B(東京化成)を用いた。電気泳動は印加電圧 15kV、検出に

は紫外可視吸光度計(543nm 日本分光 CE-971UV)を用いた。吐出位置や量の再現性の問題で吐出できない場合があったが、試料にグリセリン(和光純薬)を添加することで吐出の再現性が向上し RSD は 1~5% となった。様々な溶液の吐出特性について検討したところ SDS を含む緩衝液では 5wt% が、SDS を含む緩衝液では 20wt% のグリセリン添加が最適であった。

### 結果及び考察

一回に導入する液滴数について検討した。液滴数が大きいほどキャピラリー内に導入される時間が長く溶液の気化、濃縮が懸念される。逆に液滴数が小さいと液滴導入の確認が難しい。そこで確実に導入できていると確認できる 10 滴を複数回吐出し導入することとした。

泳動緩衝液(50mM SDS, pH=2.5)に 20wt% グリセリンとローダミン B を溶かし試料とした。試料溶液 1 滴の重量は測定の結果  $7.9 \times 10^{-7} \text{g}$ 、再現性は RSD1%(n=5)であった。キャピラリーに導入する液滴数を変化させたときのエレクトロフェログラムを Fig.2 に、濃度と面積の関係を Fig.3 に示した。

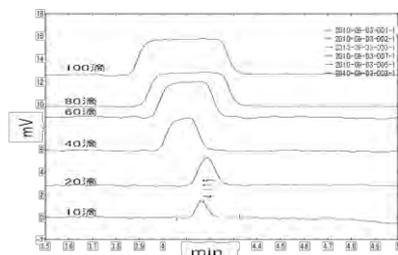


Fig.2 Electropherogram

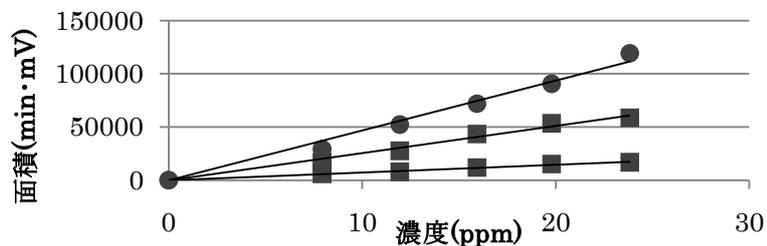


Fig.3 Calibration curve of R-B

液滴数が 40~60 滴ではサンプルプラグに応じたピークの形状をとった。それ以上の液滴数では高さが一定になった(Fig.2)。各液滴数での濃度と面積の間で直線関係がえられた(Fig.3)。しかし液滴数の増加とともに切片を 0 にした時の直線性が悪くなった。これは連続して滴下するとキャピラリーから外れる液滴が出てくるためと考えられる。

次に SDS を含まない緩衝液(pH=2.5)に 5wt% グリセリンとローダミン B を溶かし試料としたものについて検討した。試料溶液 1 滴の重量は測定の結果  $5.7 \times 10^{-7} \text{g}$ 、RSD は 1%(n=5)であった。

滴下した液滴数と面積の関係を Fig.4 に示した。ピーク面積の再現性は 3.4~11%(n=4)であった。

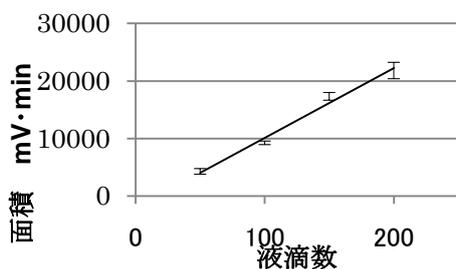


Fig.4 Calibration curve

50 滴(RSD:11%)、200 滴(RSD:6.5%)導入では再現性が低下した。50~250 滴では標準偏差をほぼ等しいことから拡散の影響によりピークの両端がなだらかであったため面積が 300~500 程度の誤差を持つと考える。50 滴のピークは RSD が大きくなり導入量が 10 滴の時にはピークが検出されなくなった。

キャピラリーの内径が 0.100mm で行った通常の CE ではピーク面積の再現性は 2%(RSD)程度と小さかったが今回の大量の試料の導入では再現性は 3.4% 以上であった。今後キャピラリー内径、印加電圧や吐出方法についての検討を行い再現性、定量性を向上させる。

### 参考文献

1 Joselito P. Quirino , Shigeru Terabe , Anal. Chem., 70 , 149-157 (1998)

# 一本鎖 DNA 結合タンパク質-一本鎖 DNA 複合体 の速度論的特性評価における キャピラリー電気泳動反応器の利用

○富谷 頼行<sup>1</sup>, 高橋 透<sup>2</sup>, 壹岐 伸彦<sup>1</sup>, 星野 仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東北大院環境, <sup>2</sup> 福井大院工

## The use of capillary electrophoresis reactor in the kinetic characterization of single-stranded DNA binding protein-single-stranded DNA complexes

Yoriyuki Tomiya<sup>1\*</sup>, Toru Takahashi<sup>2</sup>, Nobuhiko Iki<sup>1</sup>, Hitoshi Hoshino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

<sup>2</sup> Graduate School of Engineering, University of Fukui

### Abstract

A capillary electrophoretic reactor (CER) and a microchip capillary electrophoretic reactor ( $\mu$ CER), which was developed as a tool for direct measurement of the dissociation kinetics of biomolecular complexes, was applied to the evaluation of the kinetic properties of the complexes of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (SSB) with single-stranded DNA (ssDNA). Dissociation rate constant ( $k_d$ ) of SSB-ssDNA complexes consisting of 15-mer, 20-mer, 25-mer and 31-mer ssDNA were directly determined to be  $2.07 \times 10^{-2}$ ,  $1.50 \times 10^{-3}$ ,  $4.82 \times 10^{-4}$  and  $3.99 \times 10^{-4}$ /s, respectively. The  $k_d$  values found decrease with increase of chain length of ssDNA. Furthermore, SSB-ssDNA complexes consisting of 31-mer-a, 31-mer-g, 31-mer-c and 31-mer-t ssDNA were determined to be  $(3.78 \pm 1.84) \times 10^{-4}$ ,  $(3.13 \pm 2.28) \times 10^{-4}$ ,  $3.89 \times 10^{-4}$ , and  $(2.91 \pm 0.78) \times 10^{-4}$ /s, respectively. Difference of the base of ssDNA had no significant influence on the  $k_d$  values. The kinetic characterization of SSB-ssDNA complexes was achieved by CER and  $\mu$ CER.

【緒言】生体分子複合体の解離反応速度論解析を行うことは生命現象の理解において重要な意味を持つが、それを行うための有用な方法は欠落している。これに対し、我々は、均一溶液系における生体分子複合体の解離反応速度定数( $k_d$ )の直接測定が可能な唯一の手法としてキャピラリー電気泳動反応器(CER)およびマイクロチップキャピラリー電気泳動反応器( $\mu$ CER)を用いる解離反応速度解析法を確立した<sup>1),2)</sup>。本研究では、これらの手法を用いて、一本鎖 DNA 結合タンパク質(SSB)と一本鎖 DNA(ssDNA)からなる複合体の速度論的特性の評価を行った。ssDNA の塩基長や塩基の種類の違いが複合体の  $k_d$  に与える影響について調査した。

【実験】キャピラリー電気泳動装置は、CE-2070 型吸光検出器(JASCO), HCZE-30PNO.25 型高圧電源装置(松定プレジジョン製)に内径 50  $\mu$ m, 有効長 42 cm の熔融シリカキャピラリーを装着して用いた。マイクロチップキャピラリー電気泳動装置は、MCE-2010 型(島津製作所)にクロス型マイクロチャンネルを配した石英ガラス製マイクロチップ Type Ui[30 $\times$ 30](流路幅 30  $\mu$ m, 深さ 30  $\mu$ m, 分離長 25 mm)を装着して用いた。泳動緩衝液は 15 mM リン酸(pH 7.2)を使用した。試料は *E.Coli* 由来の SSB および ssDNA(31 塩



# フミン酸のダイナミックコーティングー非ゲルキャピラリー電気泳動分離における分離メカニズムの検討とそのフミン酸の分子量分布の推定への応用

○田村 優樹<sup>1</sup>, 高橋 透<sup>2</sup>, 星野 仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大院環境, <sup>2</sup>福井大院工

## Investigation of the separation of humic substances and its application to the estimation of the molecular weight distribution of humic substances with dynamic coating – non-gel capillary electrophoresis

Yuuki TAMURA\*<sup>1</sup>, Toru TAKAHASHI<sup>2</sup>, and Hitoshi HOSHINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

<sup>2</sup>Graduate School of Engineering, University of Fukui

### Abstract

Rapid and effective separation of humic substances had been achieved with the dynamic coating – non-gel capillary electrophoresis(CE) employing the electrophoretic buffer solution containing hydroxyethyl cellulose and polyethylene glycol. The results of the investigation with ultrafiltration technique and the separation of DNA ladder strongly suggested that the separation of humic substances with the proposed method was based on the molecular sieve effect of the polymer solution. It also found that the information about the molecular weight distribution of humic acids could be estimated with the proposed method. The details about the molecular weight distribution of humic acids were also studied through the investigation with size exclusion chromatography.

**【緒言】**地球表面のあらゆる環境水中には、植物の生分解に由来する非常に複雑な構造を有する不定形有機高分子の混合物が溶解している。フミン(腐植)物質と呼ばれるこれらの有機物は、水環境と深い関わりを持っていることが知られているが、NMR等の分光学的手法では官能基に関する情報しか得られないため、これらを用いる従来のアプローチはフミン物質のキャラクタリゼーション法として決して十分とはいえない。それに対し、我々は混合物の分析に有用な分離手法の中で高性能分離デバイスであるキャピラリー電気泳動(CE)に注目し、これを用いてフミン物質の精密分離を行い、その電気泳動パターンの変化からフミン物質の化学的・動態変化を読み取る新規キャラクタリゼーション法を着想した。その基礎検討として、ヒドロキシエチルセルロース(HEC)、ポリエチレングリコール(PEG)混合ポリマー溶液を泳動緩衝溶液として用いるダイナミックコーティングー非ゲルCE分離法を開発し、フミン物質のキャラクタリゼーションを読み取る有用な方法であることを見出した<sup>1)</sup>。ここでのフミン物質の分離メカニズムは、ポリマー鎖の分子ふるい効果によるものであると推定したが、その詳細は明らかではない。本研究では、限外ろ過、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)等の分離手法を使用し、この分離メカニズムを明らかにするとともに、フミン物質の分子量分布に関する新たな知見を獲得することを目指した。

**【実験】**フミン酸試料;市販のフミン酸に Tris-HCl 緩衝溶液(pH=8.0)を加えて 0.5mg/ml に調製し、0.45 μm のディスミックフィルターでろ過した。CE 緩衝溶液;リン酸緩衝溶液(pH=7.0)

に HEC0.5(w/v)%, PEG(Mw.10,000)1.0(w/v)%を添加した. CE 条件; 全長 37.5 cm, 有効長 25 cm, 内径 50  $\mu$ m の熔融シリカキャピラリーを用いた. 試料は陰極側から電氣的注入法(-10 kV, 10 s)により注入し, 分離時の印加電圧は-15 kV とした. 陽極側で検出波長 254 nm で吸光検出を行った. ダイナミックコーティングは以下の手順に従って行った. キャピラリーに 1 M HCl 水溶液を通液(10 min), した後, HEC および PEG を含む CE 緩衝溶液を充填した(3 min).

【結果と考察】分画分子量がそれぞれ 50,000 および 10,000 の限外ろ過フィルターに通したフミン酸試料の CE 分離を行ったところ, 限外ろ過を行った試料では, しないものと比べて, その分画分子量が小さくなるにつれて泳動時間の長い成分のピークが順次消失した(Fig.1a-c). これは, 本法によるフミン酸の分離において泳動時間が長い成分ほどその分子量が大きいことを意味している. さらに, このことから本法の分離は混合ポリマー溶液の分子ふるい効果によるものであることが示唆された. 一方, 本法を用いて DNA ラダー(0.1-20 kbp)をほぼ分離することができたが, このとき DNA の塩基長(分子量)の増加に伴い泳動時間は増加した(Fig.2). これは, 前述のポリマーの分子ふるい効果に基づく分離メカニズムを強く支持するものである. また, これはさらに, 本法で得たフミン酸の電気泳動図からその分子量分布に関する情報を読み取ることが可能であることを示している.

次に, CE 用泳動緩衝溶液と同じリン酸緩衝溶液(2 mM, pH=7.0)を分離液として使用しフミン酸を SEC 分離したところ, ブロードなピークを検出した(Fig.3). ピークが出始めた溶出時間 7-13 分の成分について, 特定の時間間隔でフラクションの分取を行った. 現在, 本法を用いて分取した各フラクションの分離を行い, フミン酸の分子量分布について詳細に検討している.

【文献】1) T. Takahashi, J. Kawana, and H. Hoshino, *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 761-766 (2009).

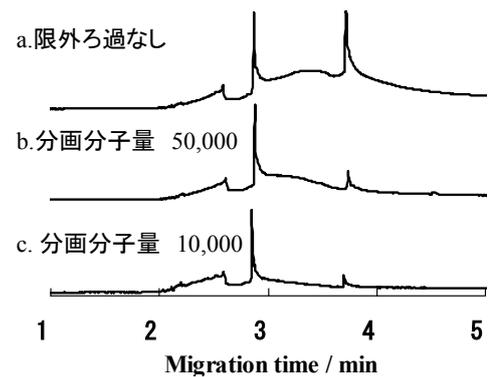


Fig.1 限外ろ過によるフミン酸の電気泳動図変化

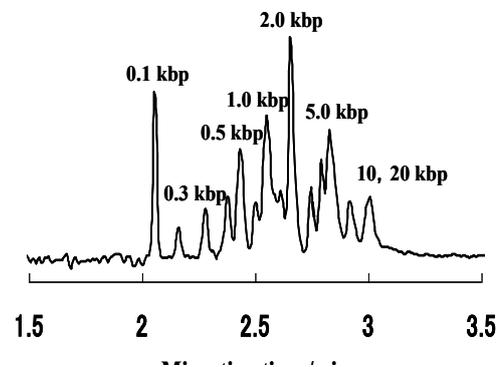


Fig.2 本法による DNA ラダーの分離

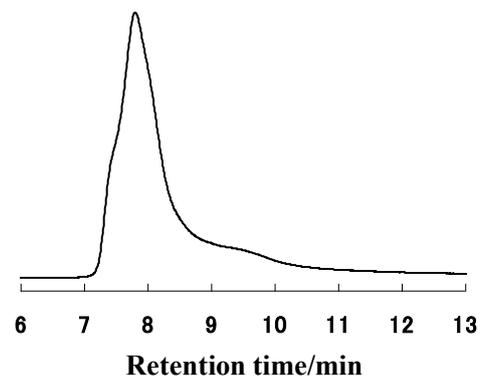


Fig.3 SEC 分離したフミン酸のクロマトグラム

# 動電過給前濃縮-キャピラリーゾーン電気泳動法による 痕跡濃度アニオンの分析

○藤岡 直人、徐 中其、廣川 健

広島大学工学部応用化学、広島大学大学院工学研究科応用化学専攻

## Analysis of Trace Anions by Electrokinetic Supercharging - Capillary Zone Electrophoresis

Naoto Fujioka\* , Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa

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

The sensitivity of cation analysis by CZE has been improved to ppt level by using EKS-CZE, but we still face difficulties for anions to reach high sensitivity. One of the essential reasons may be the electroosmotic flow (EOF) might hinder the electrokinetic injection of anions due to the counter direction at the normal conditions. The proposal of suppressing even reversing EOF during EKS of anions is a way to achieve large sample introduction. Addressing this challenge of analysis of trace anions, we added CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide) in BGE to reverse the migration of EOF due to the inner surface changes of fused capillary. The expected effects of anions were investigated and reported in this study.

### 【はじめに】

動電過給前濃縮—キャピラリーゾーン電気泳動法(EKS-CZE) [1]によるカチオン分析においては、細長いバイアルを用いて、試料に電場を広く印加できるように電極間距離を離すことによって、ppt レベル(原子量 167 の Er で 5.6ppt, 34pM)の LOD を達成している。しかし、アニオン分析においては、同程度のモル吸光係数を持つ UV 吸収可視化剤を用い、同じ電極構造をとっていても、未だにカチオン分析並の高感度化は実現できていない。現在この理由を明らかにする研究を行っている。

考えられる理由の一つとして、電気浸透流 (EOF) が挙げられる。カチオン分析において、EOF はカチオンと同方向であるが、アニオン分析においては、進行方向と逆向きである。このため、アニオン試料では EKS-時に試料が導入されにくくなっているのではないかと考えている。そこで我々は EOF の影響を抑え、または反転させることにより、アニオン試料もカチオンと同程度の LOD で分析が出来るのではないかと考えた。本研究では EOF を抑制・反転できると期待される HPC や CTAB を電解液に加え [2]、それらの有無とピーク面積の関係を比較し、試料導入効果への影響について検討した。

### 【実験】

使用した電気泳動装置は CAPI-3300 (大塚電子) である。シリカキャピラリーは全長 50 cm、有効長 37.7 cm、内径 75  $\mu$ m である。測定中はキャピラリーチャンバー内の温度を 25  $^{\circ}$ C に保った。試料はアニオン 5 種 ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) を含み、濃度範囲は 500 nM $\sim$ 2  $\mu$ M である。電極間距離は 40 mm で、試料体積は 1 mL である。電解液としては 10 mM トリメリット酸 (UV 可視化剤) を使用し、ヒドキシプロピルセルロース (0.1%,

0%) および CTAB (3 mM, 0 mM) を加え、測定直前に Bis-Tris で pH 6.0 に調製した。使用した水はすべて超純水 (Milli-Q water) である。測定の流れは以下の通りである。①コンディショニング、超純水で 3 分間、②電解液注入、吸引法で 3 分間、③試料導入、電気的注入 (-15 kV, 20 s)、④電気泳動、印加電圧-10 kV、12 分間。

### 【結果と考察】

測定結果の一例を Fig. 1 に示し、HPC・CTAB の有無によるピーク面積の変化を Table 1 にまとめた。CTAB を含んでいる電解液は Br<sup>-</sup> の吸収が大きく Cl<sup>-</sup> の吸収と重なっているため、その他の 3 種アニオンの補正後ピーク面積 (ピーク面積を移動時間で割った値) を比較した。Table 1 中の比は HPC・CTAB を共に含まない電解液を 1 として、どの程度面積が大きいかを示している。Table 1 から、アニオン 3 種について、HPC 0.1%、CTAB 3 mM の電解液で測定した場合は、それらを含まない電解液で測定した場合よりも、ピーク面積が増加している事がわかる。EOF が緩和または反転した場合、泳動時間は少し短くなっているだけであるが、試料導入量は約 2 倍程度増加していた。現在達成している LOD は、例えば C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (分子量 118) について 8.5 nM、1 ppb 程度である。

この電解液系の co-ion はトリメリット酸で、通常はこれがリーディングイオンの役割を果たしているが、CTAB 添加により移動度の大きい Br が何かの影響を及ぼした可能性もある。今後、この原因を明らかにするため、電気的注入の時間をさらに増やした上で、CTAB の濃度依存性を調査・最適化を図ると共に、更に EKS による高感度化を目指して検討を重ねる予定である。

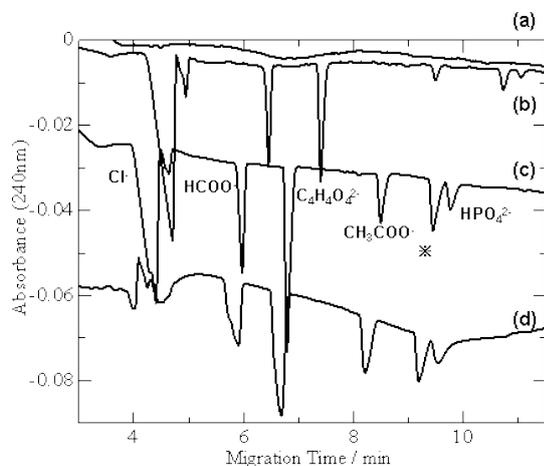


Table 1 HPC・CTAB の有無とピーク面積 (比)

	HPC無 CTAB無	HPC有 CTAB無	HPC有 CTAB有
HCOO <sup>-</sup>	2.82E-04 (1)	4.18E-04 (1.5)	5.28E-04 (1.9)
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3.43E-04 (1)	6.60E-04 (1.9)	7.96E-04 (2.3)
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	3.61E-05 (1)	1.50E-04 (4.2)	2.52E-04 (7.0)

Fig. 1 500 nM 試料の電解液中の CTAB 濃度比較

試料導入法: EKI (-15 kV, 20 s)、電極間距離: 40 mm

キャピラリー内径: 75 μm I.D.、キャピラリー長: 50 cm、有効長: 37.7 cm

印加電圧: -10 kV、検出波長: 240 nm (間接 UV 吸収)、※不純物

(a) blank (b) HPC 無し・CTAB 無し (c) HPC 有り・CTAB 無し (d) HPC 有り・CTAB 有り

### 【参考文献】

- [1] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš, *Electrophoresis*, 24, 498-504 (2003)
- [2] G. M. Janini, K. C. Chan, J. A. Barnes, G. M. Muschik, H. J. Issaq, *Journal of Chromatography A*, 653, 321-327 (1993)

# キャピラリー電気泳動法による生体関連試料の精密分取・分析

○福永 義樹、徐 中其、廣川 健

広島大学大学院工学研究科応用化学専攻

## Precise fractionation and analysis of minor components in biological fluids by capillary electrophoresis

Yoshiki Fukunaga\*, Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa

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

### Abstract

A 100-nL level fractionation was reported after CE separation. The fraction collection was achieved by pressurized flow (50 mbar at 80 s) to push the target into a vial containing 15  $\mu$ L pure water. Then the collected fraction was quantified by CE to calculate the recovery. We focused on the parameters that significantly affected recovery. A model biogenetic amine of serotonin was examined. It was found that the recovery could be stabilized and improved from 80% to 120% by sufficient agitation of the collected fraction. The recovery was not much difference between the pure sample and mixture based on our results. The fraction is currently reanalyzed by CE, furthermore, the proposed method is promising to obtain the fraction existing in complex biological matrices, firstly separated by CE and secondly preconcentrated or identified by the other methods like as MS etc.

### 【はじめに】

キャピラリー電気泳動法 (CE) において、加圧法等を使って導入される試料体積は、100 nL レベルと極めて少量である。この程度の体積に含まれる成分を分離・分取し、次の分析に妨害となる不純物を除去したり、必要な成分のみを分取する試みは、従来、数多く報告されている。分取で得られた試料の再分析のため、質量分析など CE 以外の他の高感度分析法で分析するためには、可能な限り純水（または純有機溶媒）に補集したい。しかしながら、そのような報告はあまりない。本研究では、対象試料として生体液中微量成分（生理活性アミン等を想定し、目的成分を高精度かつ高回収率で分取する手法の確立を目的としている。

従来報告されている分取方法は、大別して2種類ある。第一は電気泳動で目的成分をキャピラリー外まで泳動させ分取する方法で、層流や試料の吸着などの影響を考慮することなく分取が行えるため、精度は高いとされている。しかし、分取時、試料を捕集する液に電解液を使用する必要がある。この結果、CE 分析以外の方法（例えばMS）で再分析を行う際、溶媒・電解質成分が妨害となる場合がある。第二の方法は、加圧により成分ゾーンを押し出す方法である。この場合、圧力差流による層流形成や吸着は避けられないが、試料を超純水中に受けることができるため、再分析時に不要な成分を少量に抑えることができる。我々は後者の加圧法を採用しているが、回収率が低くかつ不安定であるという問題があった。本研究では、どうすれば回収率の高い分取が可能になるか、回収率に影響を与える要素について基礎的な検討を重ねた結果について報告する。

### 【実験】

キャピラリー電気泳動装置としてはAgilent製のHP-3Dを使用した。キャピラリーは全長50

cm、有効長 41.5 cm、内径 75  $\mu$ m のものを使用した。試料は Serotonin 単品（濃度 1 mM）、および Serotonin を含む 4 種の成分の混合試料（濃度各 1 mM $\sim$ 100  $\mu$ M）を用いた。また、低濃度からの分取を検討する際には混合試料をさらに希釈したものを使用した。印加電圧は +10 kV、検出波長は 210 nm とした。試料導入時の圧力は 50 mbar、分取時に試料を押し出す圧力も 50 mbar であった。試料捕集用超純水は Agilent 製バイアルを用いた場合に電極が液面に届く最小試料体積（15  $\mu$ L）とした。

### 【結果と考察】

まず簡単な組成を持つモデル試料からの分取を行い、CE 分析により回収率の評価を行った。Serotonin 単品試料（1 mM）を 25 秒間導入し（体積約 100 nL、物質質量 200 pmol）用いて泳動後に分取用バイアル（水 15  $\mu$ L）に 50 mbar で 78.4 s（8.5 cm 相当、約 400 nL）だけ押し出した。当初、振動攪拌装置を使用すれば、分取成分を捕集用の水に拡散させる事が出来ると考えていたが、予想とは異なり、この方法では攪拌が不十分で、回収率は 30 $\sim$ 180% と大きく変動する事（RSD=66%, n=3）がわかった。

この原因として、少量の分取試料（体積 15.4  $\mu$ L）の挙動は、いわゆる低レイノルズ数領域の挙動として考える必要があり、振動攪拌装置を用いた程度では、乱流の形成による攪拌の至らなかったためと考えた。そこで、試料の攪拌方法として、振動攪拌に加えて、得られた試料を「ピペットで吸いあげ押し出す」操作を繰り返してしたところ、回収率が 100% 付近で安定するようになった（RSD=14%）。またその際の試料濃度は検量線法により約 9.0  $\mu$ M であった。

試料原濃度 1 mM の場合、分取を定量的に行うことができたため、現在、実試料への応用を目指して低濃度での分取を試みている。分取時、成分が希釈されるため、分取元の試料の濃度が低い場合、圧力導入では再分析時に検出下限濃度を下回りピークを検出できない可能性がある。Fig. 1 に 100  $\mu$ M モデル混合試料から分取を行った結果を示す。図 1 左は分取前のフェログラムで、Serotonin と Tyramine のピークが重なり 1 本のピークとして検出されている。このピークに分取を目的として、Imidazole がキャピラリー外に出てから電気泳動を停止させ（4.8 min）、その後 50 mbar で 78.4 秒押し出し、分取を行った。得られた試料を再分析した結果を Fig. 1 右に示す。目的とした Tyramine と Serotonin のピークを取り出すことができ、再分析時の電解液条件を変えることで 2 本のピークに分離し検出することができた。なお、低濃度試料からの分取や再分析では、加圧法による試料導入法では導入量が少なすぎる。そのため、試料導入法に EKS 等を使用することにより導入量を増加させることは、低濃度試料での分取では非常に有効な手段となると思われる。講演ではこれらの点についても報告する予定である。

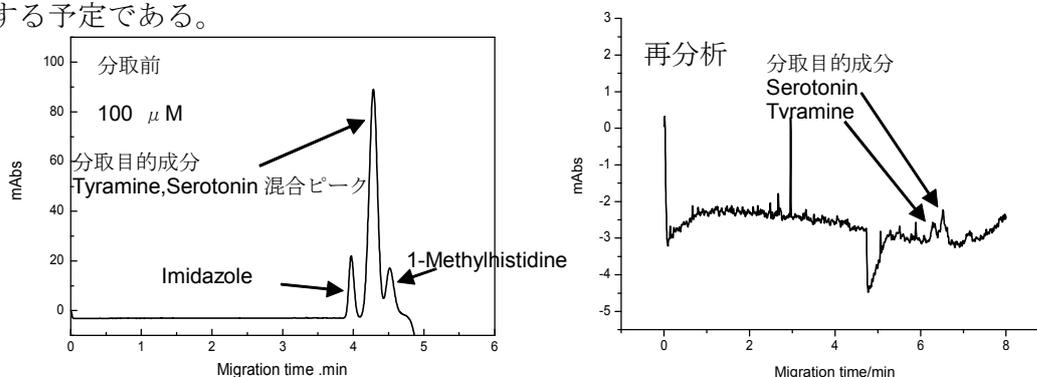


Fig.1 100  $\mu$ M 混合試料からの分取実験

キャピラリー：全長 50 cm、内径 75  $\mu$ m、有効長 41.5 cm、印加電圧：+10 kV、検出波長：210 nm

分取前試料導入条件：加圧法 50 mbar, 25 s、分取前電解液：30 mM NaOH, pH 6.2(MES)

再分析時試料導入条件：加圧法 50 mbar, 50 s、再分析時電解液：30 mM KOH, 0.1% HPC, pH 6.2(MES)

# 動電過給前濃縮 - キャピラリーゲル電気泳動法による DNA 断片の高感度・高精度・高分離能分析

○森 聡美、山田 美穂路、徐 中其、廣川 健

広島大学大学院工学研究科 応用化学専攻

## Development of a high-sensitivity, high-accuracy and high-resolution method for DNA fragments analysis by electrokinetic supercharging preconcentration - capillary gel electrophoresis.

Satomi Mori\*, Mihoro Yamada, Zhongqi Xu, Takeshi Hirokawa

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

### Abstract

The separation of DNA fragments plays a significant role in medical and biological area, e.g. applied for forensic, diagnostic and genetic research. Due to minor sample that obtained in these areas, a high-sensitivity method for DNA quantitative analysis is always required. Furthermore, the repeatability of peak positions for DNA qualitative analysis is critical to avoid wrong identification in forensic and genetic science, where a high-accuracy technique is strongly expected. In this study, a method of transverse axis that converted from migration time to effective mobility was adopted for improving the repeatability of peak position. After such conversion, the error of 500 bp fragment identification was within  $\pm 0.1$  bp ( $n=10$ , ca. RSD=0.02~0.04 %). Besides, we herein also reported the analysis of highly diluted sample by using EKS-CGE with UV detection, which gave 50 ppt LOD for 310 bp components in  $\phi$  X174/HaeIII digest.

### 【はじめに】

DNA断片の分析は遺伝子鑑定など諸分野において重要な基盤技術である。生体試料ではしばしば得られる試料量の制約が大きく、定性・定量には少量で高感度・高精度な分析法が必要である。本研究では、高感度化には動電加給前濃縮法[1]を、高精度化には電気泳動時間軸を移動度軸に変換する方法[2]を適用することで、高性能で実用性の高いDNA分析法の確立を目指している。感度については断片濃度が明らかな $\phi$  X174/HaeIII digestを用いて検討し、現在の所、310bpで50pptというLODを得ている。これは従来当研究室でおこなった過渡的等速電気泳動前濃縮-CGE-蛍光検出(tITP-CGE-FD)の結果にくらべ[3]同程度である。一方、ピークポジションの再現性については50bp step laddersを用いた実験で、500bp $\pm$ 0.1bp程度まで向上させる事が出来た。

### 【実験】

使用した電気泳動装置はCAPI-3300（大塚電子製、UV検出、電極間距離40mm、試料体積1000 $\mu$ l）およびHP-3D(Agilent、UV検出)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。試料は50bp DNA Step Ladder 340 $\mu$ g/ml（Promega）を超純水で希釈したもの、電解液は2% HPMC、6% Mannitol、0.1M Tris、0.1M Boric Acid、2mM EDTAを使用した。フラグメントサイズは50~800bp、1800bpである。手順としてはコンディショニングを行った後、-9kV、30secで試料導入を行い、-10kVで電気泳動を行った。またDNA分

析においてごく一般的に用いられている DNA マーカーである  $\phi$  X174/HaeIII digest (72、118、194、234、271、281、310、603、872、1078、1353bp) の原液 (0.5  $\mu$  g/mL) を 10,000 倍以上希釈し、検出限界を求めた。

### 【結果及び考察】

動電加給前濃縮では、co-ion がリーディングイオンの役割を果たすが、DNA 分離のようにシービング剤が必要な系では、溶液の粘度が高くなり、予想以上にリーディングイオンの移動度が低下し、濃縮効果が得にくいことがある。用いた電解液系 (4.9 c P) は Lin らによる低粘度のシービング電解液系で[4]、我々はこの系で極めて容易に EKS が成立する事を見いだした。今までの実験結果によると、この電解液系では Borate イオンが DNA 断片に対してリーディングイオンの役割を果たしていると考えている。試料を希釈すると不純物の影響が顕著になるため、現在まで正確な LOD は算出できていないが、10 万倍希釈の 310bp 成分 (S/N=16.9) から求めたところ、tITP-CGE-FD と同程度 (50ppt) であった。

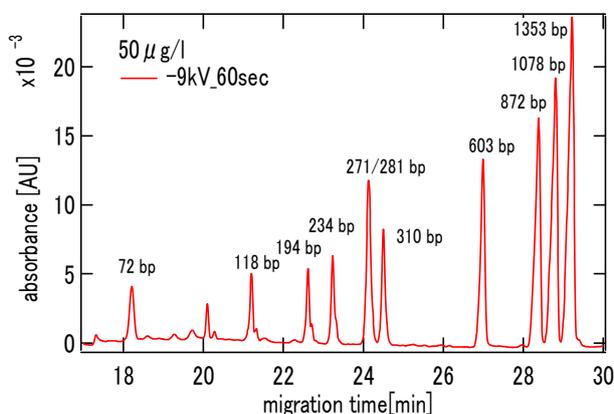


Fig 1. 50  $\mu$  g/l の  $\phi$  X174/HaeIII 試料の分離  
(原液の 1/10000)

Table 1. 軸変換前後の平均値と RSD(n=10)

bp	泳動時間 /min	RSD 移動時間/%	移動度 $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	RSD 移動度/%
50	18.4	0.99	17.29	0(標準)
100	19.59	1.01	16.31	0.023
200	21.44	1.04	14.95	0.042
300	22.84	1.07	14.04	0.042
400	23.91	1.09	13.39	0.041
500	21.74	1.11	12.93	0.041
600	25.38	1.13	12.58	0.029
700	25.88	1.14	12.33	0.22
800	26.27	1.16	12.13	0(標準)
1800	24.8	1.18	11.38	0(標準)

### 【文献】

- [1] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš : *Electrophoresis*, 24, 498 ( 2003 ).
- [2] N.Ikuta, Y. Yamada, T. Yoshiyama, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A*, 894, 11-17 (2000).
- [3] Z. Xu, T. Esumi, N. Ikuta, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A* 1216, 3602-3605 (2009).
- [4] F. Han, J. Xue, B. Lin, *Talanta* 46, 735-742 (1998).

# エレクトロスプレー質量分析法及びキャピラリー電気泳動 ーエレクトロスプレー質量分析法によるロジウムポルフィ リン系CO酸化電極触媒の分析

○竹田 さほり, 山崎 真一

(産業技術総合研究所・ユビキタスエネルギー研究部門)

## Analysis of Rh porphyrin complexes as electrocatalysts for CO oxidation by electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry

Sahori TAKEDA\*, and Shin-ichi YAMAZAKI

Research Institute for Ubiquitous Energy Devices, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

### Abstract

CO poisoning of Pt-based electrocatalysts is a problem in the development of the proton-exchange membrane fuel cells. Their performance can be improved by removing CO through electrolytic oxidation. Several rhodium tetraphenylporphyrin complexes synthesized by Yamazaki *et al.* as electrocatalysts reduce CO poisoning. The difference in the structures influences their activity. To confirm the formation of the complexes, analyses were performed using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry (CE–ESI-MS). In ESI-MS, other peaks aside from that of the complex were detected at different values of  $m/z$ . The ESI-MS/MS and CE–ESI-MS analysis results suggest that these peaks correspond to the complexes coordinating CO or other ions, or to remaining uncoordinated porphyrin. CO coordination is supported by the ESI-MS results for the Rh octaethylporphyrin. Separation of the uncoordinated porphyrin from the complex was achieved by CE–ESI-MS.

### はじめに

次世代のエネルギー供給システムである固体高分子形燃料電池の開発において、アノード側に用いられている白金系電極触媒の一酸化炭素 (CO) 被毒による性能低下が問題となっている。そこで、高濃度 CO に耐性を有するアノード用電極触媒の開発が進められており、山崎らは CO を電気化学的に酸化除去できる触媒として種々のロジウムポルフィリン系錯体を合成し、側鎖の構造によって性能が異なることを見い出している<sup>1</sup>。今回は、それらの錯体をエレクトロスプレー質量分析法 (ESI-MS) 及びキャピラリー電気泳動ーエレクトロスプレー質量分析法 (CE–ESI-MS) により分析し、生成確認や分子・イオンの付加状況等について検討した結果を報告する。

### 実験

MS 装置には Bruker-Daltonics 社製 Esquire 3000 plus (イオントラップ型) を用いた。ESI インターフェースは Agilent Technology 社製の 2 種類のうち、直接導入 ESI-MS の場合には二重

管構造、CE-ESI-MSにはシース液を流せる三重管構造のものを用いた。試料溶液（直接導入ESI-MS）及びシース溶液（CE-ESI-MS）の送液には、Cole-Parmer社製 model 74900-05 シリンジポンプを用い、それぞれ流速を4  $\mu\text{L}/\text{min}$  及び10  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。ESI電圧は正イオン検出時 -3 kV、負イオン検出時 3 kV に設定した。ネブライザガス及びドライガスには窒素を用い、前者の圧力は10.0 psi、後者の流速及び温度は5 L/min 及び320°Cにそれぞれ設定した。MS/MSは装置の auto モードで行った。CE装置はBeckman-Coulter社製P/ACE MDQを用い、Polymicro Technologies社製内径50  $\mu\text{m}$ 、外径375  $\mu\text{m}$ 、全長80 cmの内面未処理のフューズドシリカキャピラリーを用いた。泳動溶液には100 mM 炭酸水素アンモニウム-炭酸アンモニウム混合溶液（pH 9、アルカリ性）または50 mM ギ酸（酸性）を用い、印加電圧は30 kVとした。試料として、テトラフェニルポルフィリンのフェニル基のパラ位に4つのカルボキシル基、アセチル基及びメチル基の付いた3種類の錯体（Rh(TCPP)、Rh(T(-OCH<sub>3</sub>)PP) 及びRh(T(-CH<sub>3</sub>)PP)）のエタノール溶液と、フェニル基が無く8つのエチル基が付いた錯体（Rh(OEP)）のエタノール及びクロロホルム溶液を用いた。

## 結果及び考察

まずRh(TCPP)、Rh(T(-OCH<sub>3</sub>)PP) 及びRh(T(-CH<sub>3</sub>)PP)の3種のテトラフェニルポルフィリン錯体をESI-MSで分析したところ、正イオン検出ではいずれの錯体においても自身のピークの外、それよりも $m/z$ が28だけ大きい小ピークも検出された。そのピークを対象にMS/MSを行った結果、いずれも錯体イオンと同じ $m/z$ のピークが検出され、 $\Delta m/z$  28に相当するのはCOではないかと推測された。そこで、上記の3種よりもCOとの相互作用が弱いRh(OEP)を用い、エタノール溶液とクロロホルム溶液中でCOを吹き込み、それらのMSスペクトルを比較した。その結果、COが外れやすいエタノール溶液では $\Delta m/z$  28のイオンはわずかに検出されたのみであったが、クロロホルム溶液では3種の錯体とほぼ同様の割合で検出され、 $\Delta m/z$  28は錯体にCOが1分子付加したイオンであると考えられた。また、Rh(TCPP)についてはロットの異なる2種類の試料を測定したところ、一方では $m/z$  791にもピークが検出され、未反応のポルフィリンの可能性が示唆された。一方、負イオン検出では $\Delta m/z$  70のピークが検出され、その値と同位体分布から塩化物イオンが2つ付加した1価陰イオンと考えられた。また、Rh(TCPP)においては $m/z$  925 ( $\Delta m/z$  34)のピークも検出された。

次いでCE-ESI-MSを行った結果、Rh(TCPP)についてはアルカリ性条件下で正イオンの $m/z$  891と919 ( $\Delta m/z$  28)、負イオンの $m/z$  925のピークは同じ時間に検出された。しかし、片方のロットで検出された $m/z$  791のピークはそれらより遅れて検出され、分離可能であった。

## 謝辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託を受けて実施しました。関係各位に感謝いたします。

## 文献

1. S. Yamazaki, *et al. Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 8968 (2010).

# ヘキサゴナル構造のゲルを用いた生体物質の分離

○諏訪内悠介, 三田智文, 加藤大  
東大院・薬

## Separation of biological nanocompounds by hexagonal structure gel

Yuusuke Suwanai\*, Tomofumi Santa and Masaru Kato.

Graduate school of Pharmaceutical sciences, The University of Tokyo

**Abstract** Arrayed nano structure is expected as a promising material that recognizes the size and the shape of nanometer scale compound. In this study, we paid attention to hexagonal structure gel which has nano size cylinder gap and examined the separation property of the structure by gel electrophoresis. Amino acid, peptide, and protein were used as analytes. Although compound with molecular weight of less than 6 kDa migrated a hexagonal structure gel which was made from ADEKA TOL, on the other hands, compound with molecular weight of more than 12 kDa did not migrate the gel. It was expected that the separation based on the molecular weight became possible by the hexagonal structure gel.

はじめに 規則的なナノ構造は、その規則構造を利用することで物質の大きさや形を認識する新しい材料として利用できると予想される。その調製法として、現在、トップダウン法とボトムアップ法の2種類がある。トップダウン法による調製は、時間や費用等の面から、現時点では利用範囲は限定されている。一方、自己組織化反応によるボトムアップ法による調製は、簡便に大量調製できるため、有望な手法として考えられている。その中でも、界面活性剤が形成するヘキサゴナル構造は、円筒状構造が六方晶系に配列し、形状の整った筒状のナノサイズの空隙を形成するという特徴を有している。

アデカトールは、ポリオキシエチレンラウリルエーテルの一種で、天然アルコールより合成される両親媒性分子であり、分散剤や乳化剤として利用されている。アデカトールは、溶液との混合比率や温度によって異なる構造(ミセル、ヘキサゴナル、ラメラ構造)を形成し、特に室温付近でヘキサゴナル構造を形成することから、優れた分離基材として利用できると期待された。そこで本実験では、アデカトールによって調製されるヘキサゴナル構造を利用して生体物質の分離を試みた。

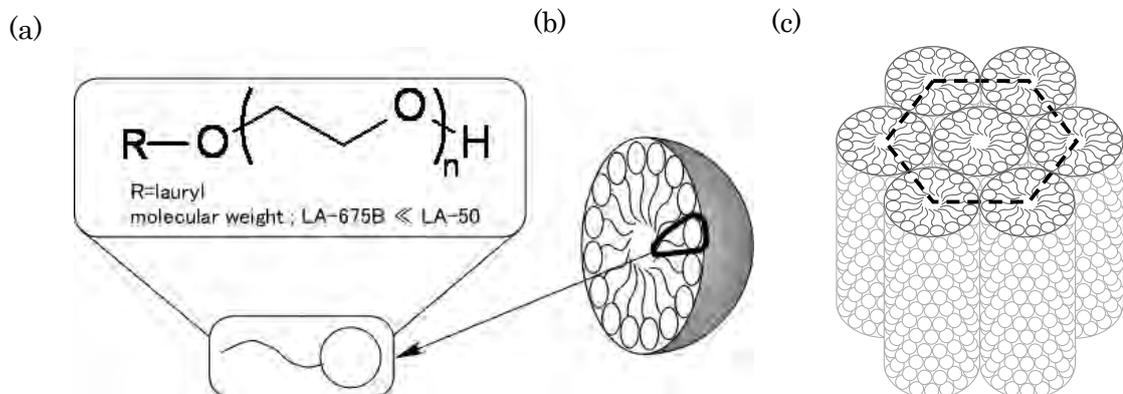


Fig. 1. Chemical structure of ADEKA TOL (a) and structure images of micelle (b) and hexagonal (c).

**実験** キャピラリー電気泳動の実験は、装置には Agilent<sup>3D</sup>CE System、印加電圧として 30 kV、試料にはアミノ酸と BSA を用いた。LA-675B の濃度が 0%、25%、50%となるように調製した 50mM の酢酸溶液を内径 100  $\mu\text{m}$  のキャピラリーに充填し、その分離能を評価した。カラムの有効長は、約 20 cm とした。

スラブゲル電気泳動の実験は、装置には Mupid<sup>®</sup>-exu、泳動溶液にはグリシン緩衝液 (pH8.3) を用い、試料には 10 種類の分子量マーカー (分子量 225-12 kDa) や下記の手法で標識化したペプチドを用いた。スラブゲルは、50% LA-50 水溶液を 70°C に加温し、室温に戻すことで調製した。

試料の FITC I による蛍光標識化は、0.1 M 炭酸バッファー (pH9) に溶解させた試料と FITC I の等量混合液を、室温で 5 時間程度反応させた。

**結果及び考察** 本実験では、泳動液に、1) アデカトールがミセル構造を形成する 25% 溶液、2) ヘキサゴナル構造を形成する 50% 溶液と 3) 比較のためにアデカトールを添加していない溶液を用いた。試料として 4 種のアミノ酸と 1 種のタンパク質 (BSA、分子量 66 kDa) を用いた (図 2)。アデカトールを添加していない条件では、ゾーン泳動として 5 種類の試料が 5 分以内に泳動された。アデカトールを 25% 添加しミセルが形成される条件では、ミセル動電クロマトグラフィーとして泳動され、全ての試料で泳動時間が長くなった。Trp、Phe、Met 及び BSA のピークは、20-30 分付近に検出され、泳動時間が大幅に延長した。アデカトールを 50% 添加し、ヘキサゴナル構造が形成される条件では、アミノ酸の泳動時間はさらに延長し、35-50 分付近に泳動されたのに対し、BSA のピークは 1 時間以内には検出されなかった。これは、ヘキサゴナル構造が形成する空隙を低分子化合物であるアミノ酸は通過できるのに対し、高分子化合物である BSA は通過できないため、泳動に時間がかかっていると予想した。

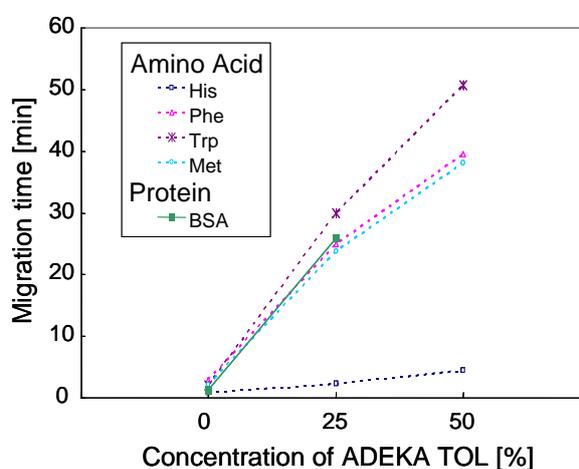


Fig. 2 Relationship between ADEKA TOL concentration and migration time of analytes.

そこで、50% アデカトール溶液が形成するヘキサゴナル構造を通過できる物質の大きさを探るために、分子量の異なった 11 種類の化合物 (225-6 kDa) をスラブゲル電気泳動で泳動した。2.5 時間泳動を行った結果、12 kDa より大きい物質は原点に留まっていたが、FITC で標識したインスリン (約 6 kDa) は泳動された。キャピラリー電気泳動においても、アミノ酸は泳動されたが、タンパク質 (BSA) は泳動されなかったことから、アデカトールによって形成されたヘキサゴナル構造は、小さな分子は通過するが、大きな分子は通過できないため、ナノサイズのフィルター等への利用が期待され、その境界は分子量が 6-12 kDa の間にあると考えられる。現在、分子量が 6-12 kDa の間の物質の泳動を試みており、その結果も合わせて発表する予定である。

**謝辞** 本研究で使用した ADEKA TOL を御提供して下さった (株)ADEKA に、この場を借りてお礼を申し上げます。

# キャピラリー電気泳動法による緑茶中の成分分析

○佐藤康博、中村彰一、黒田秀樹  
大塚電子株式会社

## Analysis of components in green tea by Capillary Electrophoresis

*Yasuhiro Sato\*, Shoichi Nakamura, Hideki Kuroda*  
Otsuka Electronics Co.

### Abstract

Green tea contains catechin, theanine, caffeine and metal ions in major components. Analysis of these components is therefore important for research and quality control. In the present study, capillary electrophoresis(CE) was applied to analyze details of these components. By the use of chelating reagent, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and sodium dodecyl sulfate in buffer solution, components of metal ions and catechin, theanine, caffeine were successfully separated and simultaneously detected. As a result, epigallocatechin(EGC), epicatechin(EC), catechin gallate(CG), epicatechin gallate(ECG), epigallocatechin gallate(EGCG), theanine, caffeine, ascorbic acid and magnesium in green tea were determined by using CE method.

### はじめに

緑茶にはポリフェノール類の一種で、渋みがあり、抗酸化、抗菌、消臭などの生理活性作用をもつカテキン類や、旨味成分のテアニン、苦み成分のカフェイン、ビタミン類や金属イオンなど多くの成分が含まれている可能性がある。これらの成分を簡単に精度高く測定することは、製品の品質管理や研究開発において非常に重要であり、従来、イオンクロマトグラフィー(IC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)や原子吸光(AA)などにより分析されている。しかし、飲料および分析成分の種類によって複数台の分析装置が必要になることや、試料の前処理が煩雑になりやすく、測定時間が長いといった問題点がある。キャピラリー電気泳動(CE)を用いると、緑茶等の飲料中のカテキン類、テアニン、カフェイン、ビタミン類をCE 1台で測定でき、今まで多くの測定条件の検討がおこなわれていた<sup>1,2)</sup>。今回はそれらの成分と金属イオンについても同時に分析可能な測定条件を検討したので報告する。

### 実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製CAPI-3300を用いた。キャピラリーは内径50 $\mu$ m、全長100.0cm、有効長87.5cmの合成シリカ製のものを使用した。条件検討の際には、ドデシル硫酸ナトリウム、2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、キレート剤などを含んだカテキン分析用泳動液(pH 8.7)(大塚電子)を用い、検出はダイレクトUV法により、200nmあるいは265nmで行った。印加電圧は20kVであった。測定に使用した茶飲料は市販品を使用した。

## 結果と考察

測定の対象とした成分はepigallocatechin(EGC)、epicatechin(EC)、catechin gallate(CG)、epicatechin gallate (ECG)、epigallocatechin gallate(EGCG)、テアニン、カフェイン、アスコルビン酸であった。内部標準としてp-toluic acidを試料に添加して測定した。アスコルビン酸については、265nmについても解析をおこなった。これらの成分は、泳動液中の2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリンの添加量が高くなるにつれ分離は向上する傾向が見られ、27mM 2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリンの添加が分析に最適であった。また、今回の分析に使用した泳動液にはキレート剤を含むため、Migration time 30分以降にはCa、Mg、Mn、Zn、Cuといった金属イオンについても分析可能であると考えられる。

Fig1に緑茶飲料(2倍希釈)について測定したエレクトロフェログラムを示す。測定の結果、カフェイン、テアニン、EGC、EC、CG、ECG、EGCG、アスコルビン酸の各成分についてピークがみられた。また、30分以降にMgのピークがみられた。

以上に述べた分析条件を使用すると、1台のキャピラリー電気泳動装置で緑茶中の多くの成分についての分析が可能であることがわかった。

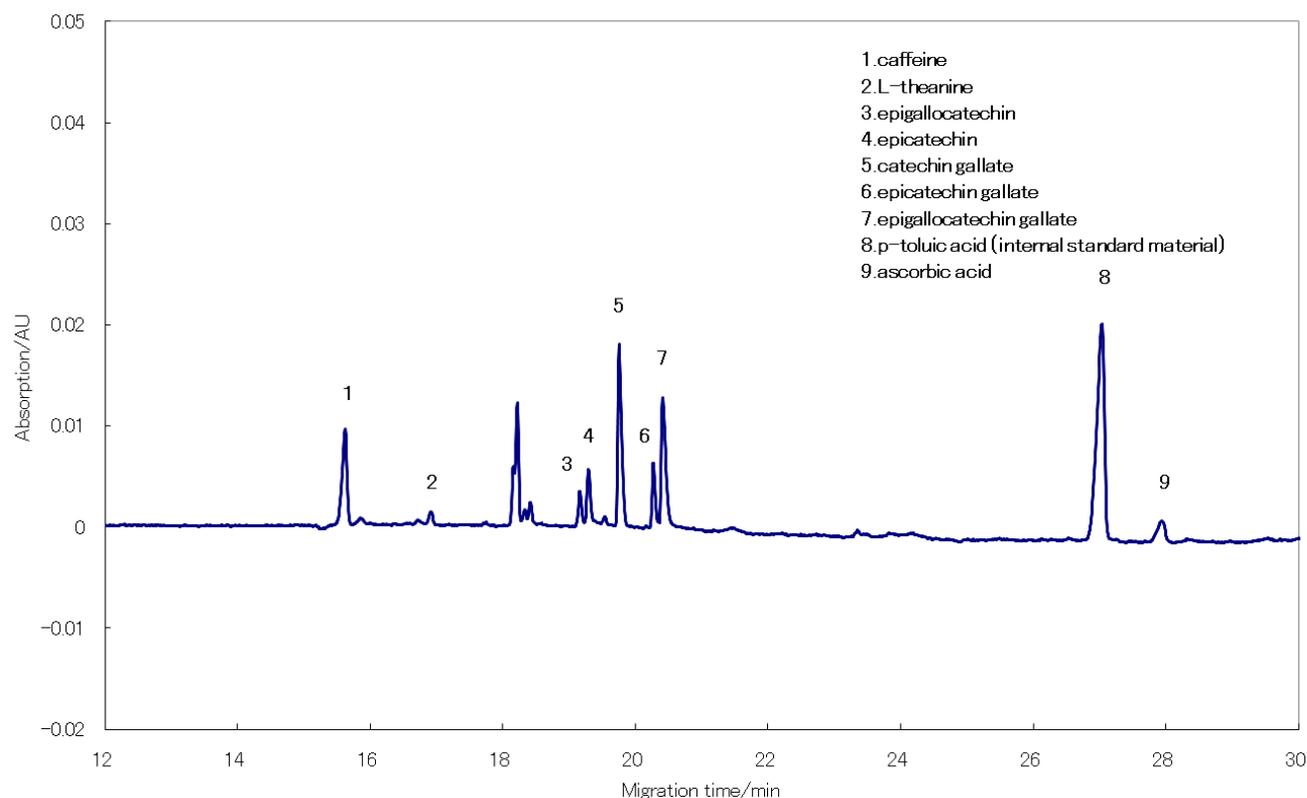


Fig.1 Electropherogram of green tea drink 1:1 diluted by water

## 文献

- 1.Horie, H., Mukai, T., Kohata, K. J. Chromatogr. A, **758**, 332, (1997).
- 2.Gotti, R., Furlanetto, S., Pinzauti, S., Cavrini, V., J. Chromatogr. A, **1112**, 345, (2006).

# 蛍光イメージング検出法を用いたキャピラリー等電点電気泳動システム: 等電点電気泳動における焦点化過程の実時間観察

○松本浩幸<sup>1</sup>、志村清仁<sup>2</sup>

<sup>1</sup>浜松ホトニクス(株)中央研究所、<sup>2</sup>福島県立医科大学

## Capillary isoelectric focusing system with fluorescence-imaging detection : Real-time observation of the dynamic focusing processes in isoelectric focusing

Hiroyuki Matsumoto\*<sup>1</sup>, Kiyohito Shimura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.

<sup>2</sup>Chemistry Division, Department of Natural Science, Fukushima Medical University

A capillary isoelectric focusing system with fluorescence-imaging detection using channels formed in fused silica plate has been developed. The fused silica plate was mounted to the holder which assembled electrodes and valves for introducing sample solution into the channels or electrolytes into electrode ports. A diode-pumped YAG laser (532 nm) was used as an excitation source, the laser beam was expanded using cylindrical lens, and entire the channel was illuminated. The fluorescence emitted from the channels was imaged onto an image-intensified CCD camera. Three kinds of fluorescence-labeled peptides were used as samples, focusing processes of originally loaded throughout the channels into bright spots was observed continuously. This system is expected as useful tool which analyzes various phenomena in isoelectric focusing.

### 【はじめに】

キャピラリー等電点電気泳動法 (c IEF) とレーザー励起蛍光検出法の組合せは、等電点への焦点化の際の濃縮効果と高感度検出により、希薄な試料においても数 pM 以下の標識タンパク質やペプチドの分離検出が可能となる。c IEF ではキャピラリー内で焦点化した試料を固定した一点で検出するには、試料を検出部位まで移動させる必要がある。この工程には pH 勾配の歪みや分離能の低下、再現性等、多くの問題が残されている。キャピラリー全体を検出すればこのような問題は解決される上、連続的な蛍光検出が可能となれば、試料の等電点への焦点化の過程も観察できると期待される。そこで我々は、熔融石英の基板中に微小流路を設け、流路全体をレーザー光で照射して蛍光イメージング検出を行うキャピラリー等電点電気泳動システムを構築した。本発表では構築したシステムの概要と、蛍光標識ペプチドの等電点電気泳動における焦点化の過程を実時間で観察して得られた結果について報告する。

### 【実験】

長さ 60mm、一辺が 100  $\mu$ m の角柱状の微小流路を有する熔融石英基板 (縦 25mm、横 60mm、厚さ 6mm) と、基板を装着して微小流路の洗浄・試料溶液の導入、流路両端の電極槽への電極液の導入がバルブの切り替えで行える機能を有するホルダーユニットを作成した (Fig. 1)。流路内壁は直鎖状ポリアクリルアミドで被覆した<sup>1)</sup>。

N 末端の  $\alpha$ -アミノ基、あるいはシステインを有する場合はそのチオール基にテトラメチルローダミンを標識した合成ペプチド<sup>2)</sup>を試料とした。40 倍希釈 Pharmalyte 3-10、0.1% Tween 20、5mM アルギニン、0.5% メチルセルロースを含む試料溶液を調製して流路全体に充填後、電極液として 0.4% メチルセルロースを含む 20mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (陽極液)、20mM NaOH (陰極液) を

用い、200V/cmの電圧を印加して焦点化を行った。

半導体励起 YAG レーザー (532nm) を光源として、そのレーザー光をシート状に広げ、焦点化を行っている微小流路全体を照射し、高感度 CCD カメラ (image-intensified CCD camera) を用い、得られる蛍光像を連続的に撮像するシステム (Fig. 2) にて焦点化の過程を観察した。

### 【結果と考察】

微小流路を有する熔融石英基板を装着したホルダーユニットは、試料溶液や電極液の導入の精度や再現性に優れており、等電点電気泳動を行う上で有効であることが確認された。3種類の蛍光標識ペプチドの焦点化の過程を観察した結果、いずれの場合にも電圧を印加して直ぐに微小流路の両側で蛍光のスポット像が出現し、それらが時間と共に一点に焦点化することがわかった (Fig. 3(A), (B))。この結果は、微小流路内での両性担体による pH 勾配形成の状態を反映していると考えられた。等電点 ( $pI$ ) や  $-dz/dpH$  の値が異なる2種類の蛍光標識ペプチドを同時に焦点化した場合、焦点化する位置と時間が異なり、それぞれの値 ( $pI$  値、 $-dz/dpH$  値) を良く反映していると考えられた (Fig. 3(B))。

構築した“蛍光イメージング検出法を用いたキャピラリー等電点電気泳動システム”は、等電点電気泳動法における様々な現象を解析する有効なツールとして期待される。

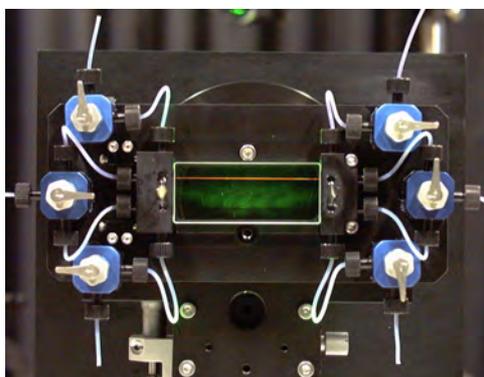


Fig.1 Photograph of the fused silica plate and holder for capillary isoelectric focusing.



Fig.2 Photograph of the capillary isoelectric focusing system with fluorescence-imaging detection.

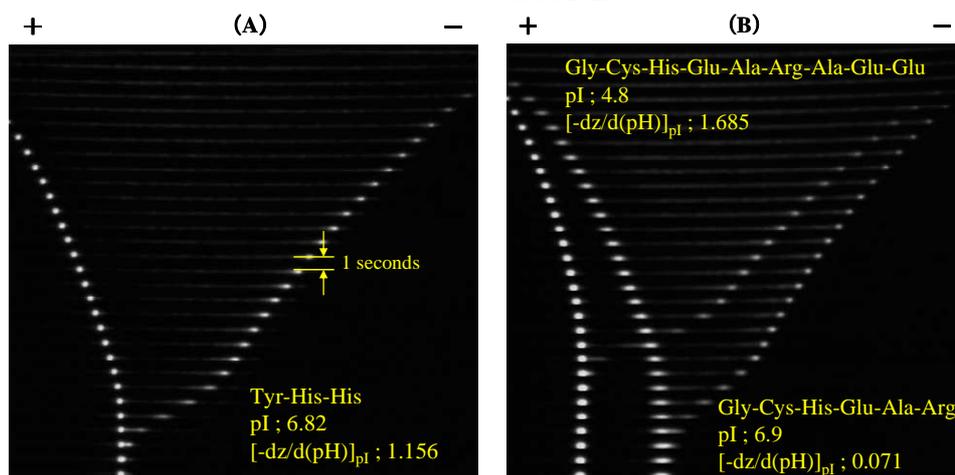


Fig.3 Images of focusing processes of fluorescence-labeled peptides.

- (A) One kind of peptide was labeled at its N-terminal amino group  
 (B) Two kinds of peptides were labeled at their thiol group of cystein

### 【文献】

- 1) Hjerten, S., *J. Chromatogr.*, **347** (1985) 191-198
- 2) Shimura, K., Matsumoto, H., and Kasai, K., *Electrophoresis*, **19** (1998) 2296-2300

# プラズマを利用して高分子基材表面に構築したリン脂質自己組織化膜上への酵素の固定化

○天野佑<sup>1</sup>、笹井泰志<sup>1</sup>、近藤伸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬大

## Immobilization of $\beta$ -galactosidase onto the self-assembled phospholipid layer fabricated on the low-density polyethylene film by plasma-assisted method

Yuu Amano\*<sup>1</sup>, Yasushi Sasai<sup>1</sup>, Shin-ichi Kondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Gifu Pharmaceutical University*

### Abstract

We have fabricated the self-assembled phospholipids layer containing stearic acid on the low-density polyethylene film by plasma-assisted method. Stearic acid was introduced into the self-assembled phospholipids layer as a scaffold to immobilize  $\beta$ -galactosidase. The self-assembled phospholipids layer with stearic acid was thermally stable as well as without it up to 80°C. The activity of immobilized  $\beta$ -galactosidase was evaluated with *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside. The activity of  $\beta$ -galactosidase immobilized onto the self-assembled phospholipids layer was higher than that onto the hydrophilic surface that hydrophilic polymer was immobilized by plasma-crosslinking reaction. It was suggested that the self-assembled phospholipid layer fabricated in this experiment was suitable for the interface to conjugate the bio-molecules.

### はじめに

我々はこれまでにプラズマ表面処理を用い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。その過程において、プラズマ表面処理を用いて、疎水性高分子基材表面への親水性高分子の固定化によるカルボキシル基の安定な導入法を確立している。さらに、本方法により構築した親水性表面への生体分子の固定化についても検討を行っている。しかしながら、本基材表面への酵素の固定化においては高活性を保持した固定化には至っておらず、その理由として酵素と基材表面との相互作用あるいは立体障害による活性低下が考えられた。近年、我々はプラズマを利用して構築した親水性表面に短鎖アルキル基を導入し、その後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<sup>1)</sup>。リン脂質は生体膜の成分であることから酵素などの生体分子の変性を引き起こさず、有効なインターフェイスとなることが期待される。

本研究では、高分子基材と生体分子との直接的な相互作用を回避することを目的とし、上述のリン脂質自己組織化膜構築法を利用して、酵素を固定化する足場としてステアリン酸を導入したリン脂質自己組織化膜 (PC-SA) の構築とその熱安定性評価を行った。また、モデル酵素として  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (EC3.2.1.23) を用い、PC-SA 上

への $\beta$ -ガラクトシダーゼの固定化を行い、その固定化量および酵素活性についても検討を行った。

## 実験

高分子基材として低密度ポリエチレン (LDPE) フィルムを用いた。既報に従いプラズマ表面処理を利用して LDPE 表面に親水性高分子を固定化した後、縮合試薬を用いてヘキサメチレンジアミンを導入した。引き続き、ステアリン酸とリン脂質との懸濁液に本基材を浸漬することにより PC-SA を構築した (LDPE-PC-SA)。PC-SA の熱安定性は、所定の温度の milliQ に LDPE-PC-SA を浸漬し、脱離したリン脂質量を定量することにより評価した。PC-SA 上への $\beta$ -ガラクトシダーゼ固定化は、縮合試薬を用いた $\beta$ -ガラクトシダーゼと LDPE-PC-SA との反応により行った (LDPE-PC-BG)。比較として、親水性高分子を固定化した LDPE について同様の操作を行い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを固定化したフィルムを調製した (LDPE-BG)。基材表面に固定化した $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を評価するため、*o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを基質として用い、酵素反応生成物である *o*-ニトロフェノールを 405nm における吸光度測定により定量した。基材表面のタンパク固定化量についてはクマシーブリリアントブルー-G250 を用いて評価した。

## 結果及び考察

LDPE-PC-SA の熱安定性について検討したところ、本実験条件下において得られた自己組織化膜は、ステアリン酸の有無に関わらず 80°C までは検出範囲内においてリン脂質の脱離は認められず、熱的に安定な膜であることが明らかとなった。また、自己組織化膜中のステアリン酸量と酵素固定化量に関する基礎的知見を得るため、モデルタンパクとしてアルブミンを用いて固定化量を検討したところ、ステアリン酸量の増加に伴いアルブミン固定化量も増加するものの、定常化する傾向が示された。

$\beta$ -ガラクトシダーゼを固定化したフィルムについて *o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを基質として酵素活性を検討した。その結果、基材表面の親水性基に直接 $\beta$ -ガラクトシダーゼを固定化した LDPE-BG よりも、リン脂質自己組織化膜上に $\beta$ -ガラクトシダーゼを固定化した LDPE-PC-BG の方がより高い酵素活性を保持していることが示唆された。

以上の知見より、プラズマを利用して構築したリン脂質自己組織化膜は、生体分子固定化のためのインターフェイスとして有効であることが示唆され、今後、より高活性を保持した固定化法の確立を目指す。

## 文献

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

# 非水系 CE—Eu 錯体時間分解蛍光検出による高感度分析システムの開発

○水谷真理<sup>1</sup>, 石田由美<sup>1</sup>, 江坂幸宏<sup>1,2</sup>, 宇野文二<sup>1,2</sup>, 住友慶子<sup>3,4</sup>, 山口佳則<sup>5</sup>

岐薬大<sup>1</sup>、岐大院連合創薬<sup>2</sup>、早大・ナノ理工<sup>3</sup>、早大・科健機構<sup>4</sup>、阪大・フォトニクス融合研究セ<sup>5</sup>

## Non-aqueous CE of Europium complexes with time resolved fluorescence detection for highly sensitive analysis of rare bioactive molecules

Mari Mizutani<sup>1\*</sup>, Yumi Ishida<sup>1</sup>, Yukihiro Esaka<sup>1,2</sup>, Bunji Uno<sup>1,2</sup>, Keiko Sumitomo<sup>3,4</sup>,

Yoshinori Yamaguchi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Gifu Pharm. Univ.; <sup>2</sup>United Grad. School of Drug Discovery and Med. Inform. Sci., Gifu Univ.;

<sup>3</sup> Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University,

<sup>4</sup>ASMeW, Waseda University; <sup>5</sup>Grad. School of Industry, Osaka Univ.

### Abstract

We have investigated non-aqueous (acetonitrile and/or DMSO) 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.

はじめに 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、高感度分析のための誘導体化試薬と分析システムが主としてバッチ法で考案されてきた。一方、多種成分の分析には分離過程の導入が事実上必須であり、松本らは Eu 錯体誘導体化試薬の一種として HPLC 分析用の CDPP を合成・検討した。<sup>1</sup> これら従来法の検出系は、バッチ法及び HPLC システムともに、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。増強剤として用いる TOPO や triphenylphosphine oxide (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、空の配位座を占めることで発光増強すると考えられている。当初、発表者らは、CDPP によるターゲット誘導体 (DPP 誘導体) を水系の溶離液を用いた RP-HPLC 分離し、ポストカラム法でミセル、 $\text{Eu}^{3+}$ 、TOPO 溶液を混合して検出する従来の方法の最適化を行ってきたが、流路内での  $\text{Eu}^{3+}$ の深刻な吸着・蓄積によるバックグラウンド上昇、膨大な CDPP 加水分解物による分離干渉という実用上深刻な問題が残った。実用性

の獲得には、分離系の抜本的な転換、単純な増強系の導入が必要と思われた。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し、その錯体のまま検出する方法を考案し、高輝度のレーザー光を用いない CE としては非常に高感度での検出を達成した。今回、この非水 CE 法を、実用性を念頭に検討し、特に DMSO の添加により、検出、分離の両面で、著しい改善を得た。分析対象には内分泌攪乱物質であるアルキルフェノール類（AP）を選択した。

**実験** 試料には、AP として、4-t-butylphenol、4-octylphenol、4-n-nonylphenol、bisphenol の 4 種を用いた。CE 泳動液には 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、Eu 塩を含んだものを用いた。増強剤としては TPPO 及び DMSO を用いた。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  $700\text{mm}$ （有効長  $500\text{mm}$ ）のもの、検出器には、浜松フォトニクス社製時間分解りん光検出器を用いた。

**結果** 本法では、AP を CDPP により誘導体化し、DPP 誘導体（DPP-AP）として検出する。泳動液溶媒に TPPO 共存下で十分に脱水した AN100%を用いたところ、DPP-AP 類の分離が不十分であった。これは、DPP-AP の DPP 部分が大きいため、試料である AP の大きさの差を CE 分離に反映させにくいこと、そしてピーク幅が大きいことが原因であると考えられる。ここで泳動液に DMSO を加えると、分離能を著しく改善することができた。まず、DMSO 濃度 30%程度までは全体的にピーク検出時間が早くなる。これは大きな TPPO から増強剤でもある DMSO へ配位子の置換が徐々に起こり、錯体がコンパクトになるためと考えられる。同時に起こる分離の向上は、試料である AP の大きさが CE 分離に反映されやすくなるとともに、TPPO より DMSO が錯体形成平衡の速度が速いためピーク幅が小さくなったためと解釈している。さらには、Eu 錯体形成の化学量論変化が原因と思われる、Bis の DPP 2 付加体の顕著な泳動順変化が、5 種の DPP 付加体の完全分離をもたらしている。また、DMSO を加えることにより、Fig. 1 に示すように不純物ピークが相対的に DPP-AP の前方に移動し、DPP-AP のピークと分離し、不純物による干渉を低減させることができた。検出に関しても、DMSO の添加により、含水による消光を避けることができ、実用性が向上できた。現在、HPLC などを用いて、DPP 誘導体の標品の分離・精製を行っている。この標品を用いて、検出限界の測定や最適反応条件（温度・時間・CDPP 濃度）を決定するとともに、S/N 比を向上させる観点から、バッチ法を用いた検出条件の最適化を再度行う予定である。

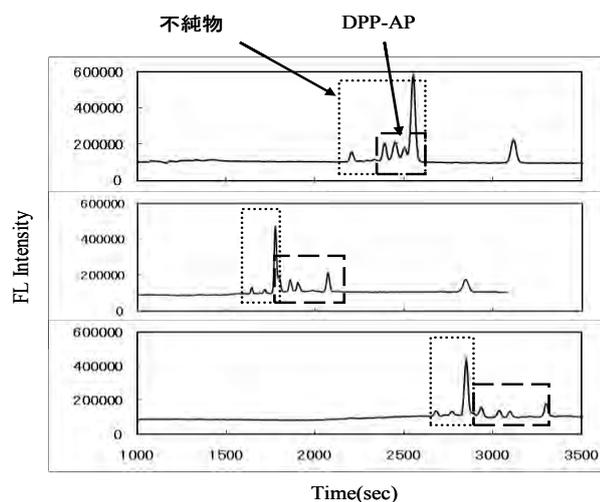


Fig1. Capillary:DB-1 coated,700mm x 0.050 mm i.d.  
Applied voltage(current): 20 kV 6 uA  
Running solution:10 mM  $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$ , 400 mM TPPO  
/ ACN (dried with molecularsieve 3A for over night)  
Injection, 30 cm for 60 sec.

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

# ESI/MS による高感度 DNA 損傷体分析のためのオンライン濃縮チップ開発に関する研究

【岐阜薬大<sup>1</sup>, 岐阜大院連合創薬情報<sup>2</sup>, 京大院薬<sup>3</sup>】○古口 未央<sup>1</sup>,  
村上 博哉<sup>1</sup>, 河村 理恵子<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

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

<sup>1</sup>Gifu Pharmaceutical University, <sup>2</sup>United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Science, Gifu University, <sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

### 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 a one order of magnitude higher detection sensitivity 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 損傷体は、 $10^8 \sim 10^9$  個に数個という極めて低い割合でしか存在しないため、分析法には非常に高い感度が要求される。そのため現在、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。しかしその一方で本手法は、放射性物質の利用などを理由に、より安全性が高く、より汎用性の高い分析法の開発が望まれている。現在までに本研究室では、その代替法として 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非常に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。さらに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、DNA 損傷体分析において必要な改善点と考えられる①大過剰に共存する未損傷体の除去と②極微量にしか存在しない DNA 損傷体の濃縮の二点を同時に達成するために、濃縮を含む選択的な前処理が可能であり、か

つその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】

チップの処理能を評価する DNA 損傷体モデルとしては、アセトアルデヒド由来の DNA 損傷体への適用を考慮し、そのマーカーとなりうる損傷体として 1,N<sup>2</sup>-cyclicpropano-2'-deoxyguanosine(CPrdG)とその塩基体である 1,N<sup>2</sup>-cyclicpropano-guanine(CPr-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:C<sub>18</sub>及び SDB-XD)と Waters 社製の Sep-Pak カートリッジ用の ODS 及びジーエルサイエンス社製の IntertSep PLS-2 のスチレンジビニルベンゼン(SDB)ポリマーをそれぞれ用いた。LC/MS 装置は HP-1100 series LC/MSD システム及び 3200 Q TRAP LC/MS/MS System を、分離カラムにはナカライテスク社製の COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II をそれぞれ用いた。

#### 【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、100%の回収率にて CPrdG を選択的に濃縮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するシステムを自作することによって、処理前と比較して一桁の濃度感度上昇に成功した(Figure)。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 から酸処理のみという簡便な前処理によって単離することが可能な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行った。現在までの検討の結果、ODS を充填剤として用いた場合には、損傷塩基の極性の高さのため、保持をすることが困難であったが、担体を SDB に変更することにより、ヌクレオシドの場合と同様に正常塩基を除去し、損傷塩基である CPr-Gua のみを選択的に濃縮可能であることを示唆する知見を得ている。発表では、損傷塩基への適用に関する検討に加え、実試料成分分析を想定した DNA 鎖試料を用いた検討結果に関しても合わせて報告する。

#### 【謝辞】

本研究は、JST 平成 22 年度研究成果最適展開支援事業(A-STEP)フィジービリティスタディステージ(FS)探索タイプの支援を受け実施されている。

#### 【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.

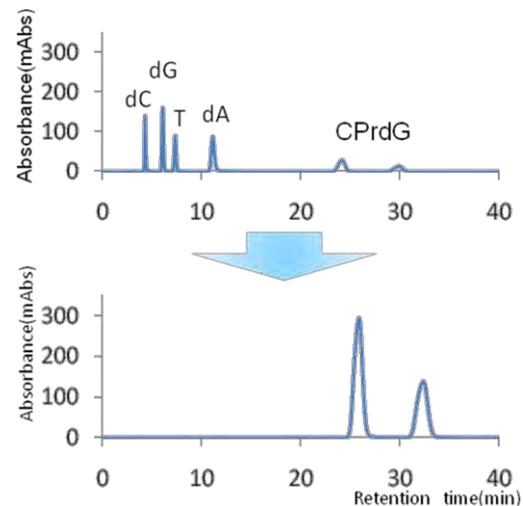


Figure LC/MS profiles of before (upper) and after (lower) Stage Tips treatment (CPrdG)

# 非水系逆相 HPLC—Eu 錯体蛍光時間分解検出 による高感度分離分析法の開発

○石田由美<sup>1</sup>、水谷真理<sup>1</sup>、江坂幸宏<sup>1, 2</sup>、宇野文二<sup>1, 2</sup>、  
住友慶子<sup>3, 4</sup>、山口佳則<sup>5</sup>

岐阜大<sup>1</sup>、岐大院連合創薬<sup>2</sup>、早大・ナノ理工<sup>3</sup>、早大・科健機構<sup>4</sup>、  
阪大・フォトニクス融合研究セ<sup>5</sup>

## Non-aqueous RP-HPLC of Europium Complexes with Time Resolved Fluorescence Detection for Highly Sensitive Analysis of Rare Bioactive Molecules

Yumi Ishida<sup>1\*</sup>, Mari Mizutani<sup>1</sup>, Yukihiko Esaka<sup>1, 2</sup>, Bunji Uno<sup>1, 2</sup>, Keiko Sumitomo<sup>3</sup>,  
Yoshinori Yamaguchi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Gifu Pharm. Univ.; <sup>2</sup> United Grad. School of Drug Discovery and Med. Inform. Sci., Gifu Univ.;

<sup>3</sup> Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University,

<sup>4</sup> ASMeW, Waseda University; <sup>5</sup> Grad. School of Industry, Osaka Univ.

### Abstract

We have investigated a flow analysis system including non-aqueous (acetonitrile and DMSO) RP-HPLC separation and formation of the europium ( $\text{Eu}^{3+}$ ) complexes with a post-column method for a following time-resolved fluorescence detection for highly sensitive detection of biological interests. We prepared  $\beta$ -diketone derivatives of alkylphenols with CDPP as the ligands of the complex in pre-column manner. The concentrations of  $\text{Eu}^{3+}$  and solvent composition in postcolumn-reagent solutions were optimized and the detection limit was ca.  $10^{-10}$  M. The remarkable effect of DMSO on emission of the Eu-complex and improvement of the separation will be discussed in detail.

**はじめに** ユーロピウム (Eu) は、ある種の有機化合物と錯体を形成することで長寿命の蛍光を発する性質を持つ。適切な疎水マトリックス中で、蛍光増強剤共存下に、有機配位子の吸収波長である励起光が  $\text{Eu}^{3+}$  錯体に入射すると Eu 特有の波長 (615nm 他) で発光する。この発光現象では、発光に至る過程に配位子内軌道での系間交差を内包するため、発光が比較的長寿命であり、散乱光や干渉蛍光と区別して、目的錯体の発光を選択的に時間分解して検出できる。干渉発光の抑制で S/N 比が顕著に向上し、通常の蛍光検出よりも有意に高感度での検出が可能となる。

演者らは、HPLC 分析用の、目的物質を  $\text{Eu}^{3+}$  錯体の配位子に誘導体化する CDPP<sup>1</sup> を用い、内分泌攪乱物質とされる 4 種のアシルフェノール類 (APs) の高感度 HPLC 分析法を検討してきた。当初、この誘導体 (DPP-APs) を水系溶離液を用いる逆相 HPLC で分離し、ポストカラム法で発光環境としてのミセル、 $\text{Eu}^{3+}$ 、増強剤 TOPO を含む試薬溶液を混合して検出する方法の最適化を行ってきたが、成分の流路吸着や膨大な CDPP 加水分解物による分離干渉という深刻な課題が残った。そこで、完全非水系で  $\text{Eu}^{3+}$  と triphenylphosphine oxide (TPPO、増強剤) 共存下で、DPP-APs を Eu 錯体として電気泳動し、検出する方法を考案した。

ここでは、CE で用いた完全非水系を HPLC 法に還元して利用することを目的とした。HPLC 法は CE 法と比較して許容試料注入量が大きいいため、有意な濃度感度の向上を期待した。

**実験・方法** 溶離液[主溶媒アセトニトリル(AN), 0-5 % DMSO, 0.05%TFA]を流速 0.1 mL/min で流し、DPP-APs 5種 (APs: 4-nonylphenol, 4-t-butylphenol, 4-octylphenol, Bisphenol A) を、ODS カラム(Superiorex, 資生堂, 2.0×250mm)で分離し、ポストカラム法で試薬非水溶液 (Eu(CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, TPPO /AN, DMSO) を 0.1mL/min で合流させ、形成した錯体の発光を時間分解検出してクロマトグラフィーを記録した。検出は、励起光 350nm、検出波長 615nm で行った。

**結果・考察** 非水系 CE では、疎水コーティング管を用いることで、当初の HPLC 法で採用した水系溶離液とミセル含有水系検出系の組み合わせで観察される吸着現象を解消できた。この知見に基づき、HPLC 法においても溶離液、検出系すべてを非水系にして、検討を行った。まず、AN を溶離液に用い、吸光検出法での、DPP-APs 相互、誘導体化溶液の分離を検討した。DPP-APs は、十分な脂溶性を持つため、非水 (AN) 溶離液を用いても ODS カラムで分離に必要な保持が得られた。また、誘導体化反応で多量に生成する CDPP の加水分解物は、水系ではテーリングして深刻な干渉を示したが、この AN 系では溶出されず、分解物の分離干渉を防げる (水系洗浄液でカラムも容易に再生可)。一方で、対象ピークはテーリングを示し、連続注入に従い、ピーク高が小さくなり、流路での吸着・蓄積が示唆された。さらに、CE での知見では、市販の AN 中の含水が Eu の発光を完全に消光することから、脱水を行ったところ、すべての物質がカラムにほぼ完全に保持されなくなった。分離には、AN への含水 (推定 0.1%前後) が必要であった。

検出には含水分子による消光を避ける必要がある。TOPO や TPPO は、DPP が配位している以外の配位座に結合することで、その蛍光増強作用を示すと考えられている。水が配位すれば消光するので、水を配位座から排除する強い配位能をもち、消光作用のない増強剤の添加で、この問題は解決できる。結果的には DMSO がその能力を持つことがわかった。溶離液への 5%程度の DMSO 添加でも、含水の消光作用を排除でき、かつ、分離には含水の効果が表れ、必要な保持が得られるようになった。さらに、DMSO は試料の流路吸着を抑え、ピーク形状を著しく改善 (先鋭化) し、分離と感度を向上し、同時に良好な再現性のもととなった (Figure 1)。

また、カラム温度によりピークの形状が変化し、20°Cで最も鋭いピークを与えた。さらに Eu<sup>3+</sup>濃度と DMSO 濃度の最適条件を検討し、Eu<sup>3+</sup>濃度を 0.25mM、DMSO 濃度を 100%としたとき最大の S/N 比を得た。その条件で誘導体化試料を検出した結果、現段階での検出感度は、DPP-APs

標品を用いたもので 10<sup>-10</sup> M であった。これは CE での検出限界と同等であり、更なる溶離液、Eu 液組成の最適化を図る予定である。また、バックグラウンドが、水系に比較して顕著に高く、時間分解検出の S/N 比での有利さを十分に活用できていないと考えられる。

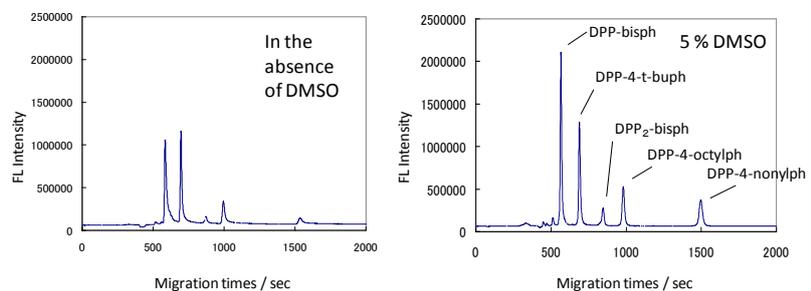


Figure 1 Effect of DMSO as an additive in RP-HPLC Separation of DPP derivatives of Alkylphenols with Time-resolved Fluorescence Detection of Eu-complexes of the DPP-derivatives. Conditions: HPLC: Column, Superiorex (2.0 x 250 mm); Eluent, AN(0.05%TFA ,0or5%DMSO); Flow rate, 0.1 ml/min. Postcolumn reagents solution: AN and DMSO(70% and 30 %) including 2mM Eu(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>; flow rate, 0.1 ml/min; Temp.: 20°C; sample: DPP-APs 10<sup>-5</sup> M each

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

キャピラリー電気泳動シンポジウム（前身も含めて）の歩み

回	開催年	開催地	名称	委員長
1	1981	東京	細管式等速電気泳動シンポジウム	奥山典生
2	1982	東京	等速電気泳動シンポジウム	奥山典生
3	1983	大阪	細管式等速電気泳動シンポジウム	木曾義之
4	1984	東京	細管式等速電気泳動シンポジウム	奥山典生
5	1985	京都	細管式等速電気泳動シンポジウム	木曾義之
6	1986	名古屋	細管・等速電気泳動シンポジウム	津田孝雄
7	1987	東京	細管・等速電気泳動シンポジウム	小林英三郎
8	1988	京都	電気泳動シンポジウム（細管・等速電気泳動）	木曾義之
9	1989	東京	電気泳動シンポジウム（細管・等速電気泳動）	吉田治弘
10	1990	東大阪	キャピラリー電気泳動シンポジウム	本田 進
11	1991	八王子	キャピラリー電気泳動シンポジウム	津田淑江
12	1992	姫路	キャピラリー電気泳動シンポジウム	寺部 茂
13	1993	東京	キャピラリー電気泳動シンポジウム	中村 洋
14	1994	京都	キャピラリー電気泳動シンポジウム	中川照眞
15	1995	広島	キャピラリー電気泳動シンポジウム	廣川 健
16	1996	名古屋	キャピラリー電気泳動シンポジウム	津田孝雄
17	1997	八王子	キャピラリー電気泳動シンポジウム	小林英三郎
18	1998	福岡	キャピラリー電気泳動シンポジウム	今坂藤太郎
19	1999	八王子	キャピラリー電気泳動シンポジウム	志村清仁
20	2000	淡路島	キャピラリー電気泳動シンポジウム	馬場嘉信
21	2001	神戸	キャピラリー電気泳動シンポジウム	福士恵一
22	2002	東京	キャピラリー電気泳動シンポジウム	北森武彦
23	2003	岡山	キャピラリー電気泳動シンポジウム	本水昌二
24	2004	仙台	キャピラリー電気泳動シンポジウム	星野 仁
25	2005	上郡	キャピラリー電気泳動シンポジウム	寺部 茂
26	2006	京都	キャピラリー電気泳動シンポジウム	大塚浩二
27	2007	浜松	キャピラリー電気泳動シンポジウム	藤本忠蔵
28	2008	八王子	キャピラリー電気泳動シンポジウム	内山一美
29	2009	東大阪	キャピラリー電気泳動シンポジウム	鈴木茂生
30	2010	岐阜	キャピラリー電気泳動シンポジウム	江坂幸宏
31	2011	鶴岡 (予定)		曾我朋義
32	2012	大阪 (予定)		田中喜秀

2010年度 (社)日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会 役員

顧問：

奥山典生	(都立大名誉)	木曾義之	(広大名誉)
津田孝雄	(ピコデバイス)	寺部 茂	(兵庫県大名誉)
中川照眞	(京大名誉)	本田 進	(近畿大名誉)
真鍋 敬	(愛媛大院理工)		

委員長：

鈴木茂生 (近畿大薬)

常任委員：

今坂藤太郎	(九大院工)	大塚浩二	(京大院工)
小林英三郎	(城西大理)	志村清仁	(福島県医大)
曾我朋義	(慶応大先端生命)	津田敏江	(共立女短大)
中村 洋	(東理大薬)	馬場嘉信	(名大院工)
廣川 健	(広島大院工)	福土恵一	(神戸大海事)
藤本忠蔵	(浜松医大)		

委員：

新井悦郎	(ベックマンコールター)	壹岐伸彦	(東北大院環境科学)
石濱 泰	(京大院薬)	内山一美	(首都大都市環境)
江坂幸宏	(岐阜薬大)	加地範匡	(名大院工)
加藤 大	(東大院薬)	金田 隆	(九大院工)
釜堀政男	(日立中研)	北川慎也	(名工大院工)
北森武彦	(東大院工)	小林章一	(島津製作所)
笹 一志	(大塚電子)	佐藤記一	(東大院農)
澁川明正	(千葉科学大薬)	鈴木茂生	(近畿大薬)
千田正昭	(千田分析技研)	高柳俊夫	(岡山大理)
竹田さほり	(産総研)	田中喜秀	(産総研)
渡慶次学	(名大院工)	鳥村政基	(産総研)
西 博行	(安田女大薬)	萩中 淳	(武庫川女大薬)
野上知花	(アジレントテクノロジー)	久本秀明	(阪府大院工)
平岡 厚	(杏林大保健)	星野 仁	(東北大院環境科学)
松本浩幸	(浜松ホトニクス)	吉田治弘	(専修大法)

連絡先：

〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1  
近畿大学薬学部内  
電気泳動分析研究懇談会  
委員長 鈴木茂生  
Tel: 06-6721-2332(ex.5550)  
E-mail: suzuki@phar.kindai.ac.jp

## 賛助御礼

本シンポジウムの開催にあたり、下記の企業より、本要旨集への御広告の掲載や御展示による御支援を賜りました。心より御礼申し上げます。

アジレント・テクノロジー株式会社

大塚電子株式会社

オザワ科学株式会社

株式会社 ASICON

株式会社カーク

株式会社島津製作所

ジーエルサイエンス株式会社

島津サイエンス西日本株式会社

ナカライテスク株式会社

バイオリサーチセンター株式会社

浜松ホトニクス株式会社

理科研株式会社

(五十音順)



**New!**  
**Agilent 7100**  
キャピラリー電気泳動システム

## 最高の感度 最高の生産性 最小のスペース

キャピラリー電気泳動(CE)は、HPLCでの分離が困難な生体分子、低分子の塩基性および酸性薬剤、イオンといった帯電物質の分析において、優れた効率と分離能を備え、高速分離を可能にするテクニックです。CE/MS、ダイオードアレイなど、充実した検出器ラインナップを揃えています。単一ベンダーソリューションならではの信頼性、堅牢性を併せ持つ Agilent 7100 はCEおよびCE/MSシステムの最高の選択肢です。

生産性向上を実感できるアジレントのソリューション。



# CAPI-3300

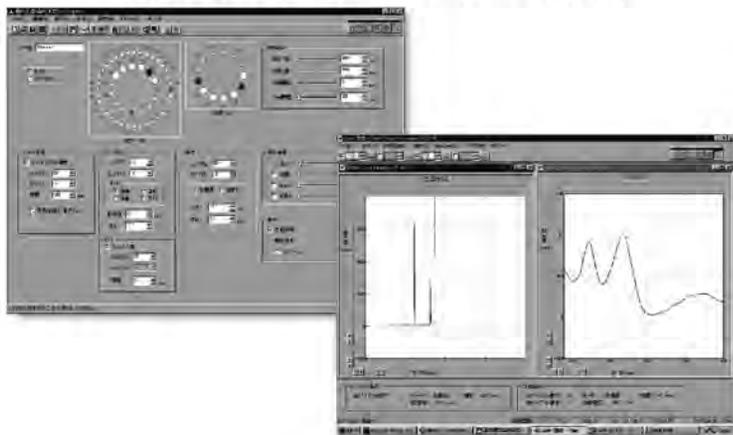
Capillary Electrophoresis Measuring System



## キャピラリー電気泳動装置



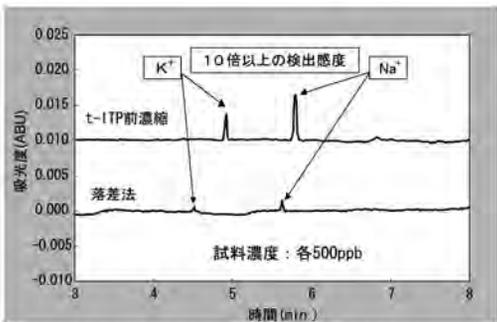
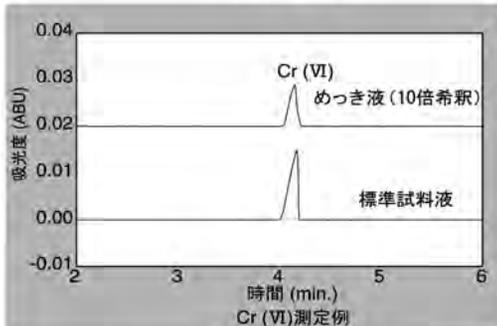
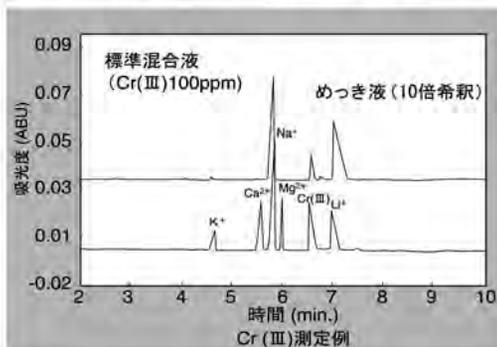
### 前処理不要でイオン分析



微量サンプル・低濃度・短時間・高分離能  
各種イオン、有機酸、アミンの分析を1台で

- 日本語表示、機能的重視でシンプルな画面構成、幅広いユーザーに対応したユーザーインターフェースなど、使いやすさを追求したソフトウェア。
- 陽イオン・陰イオンの連続測定が可能。泳動液条件や印加電圧などの複数の分析条件を自動で切り替え、連続して測定することができます。
- 豊富な機能(オートサンプラー、キャピラリー温調機能、サンプル温調機能(オプション)など)で安定した測定結果が得られます。
- 定性能力をアップするフォトダイオードアレイ検出器を採用。
- 各種サンプル注入法に対応。落差法、電気的導入法、吸引法、加圧法(オプション)から、サンプルに応じた注入方を選択できます。
- AIA形式をサポート。AIA形式対応の市販のインテグレーションソフトウェアでの解析が可能です。
- アプリケーションキットやアフタートレーニングスクールなど、充実したサポート体制でトータルの分析をバックアップします。
- 新技術のt-ITPにより従来の10倍以上の感度で測定することが可能になりました。

Cr<sup>3+</sup>とCr<sup>6+</sup>を一台で分析できます。



t-ITP前濃縮と落差法による陽イオンの感度の比較

option

サンプル温調  
ユニット

ガスドライブ  
ユニット

微量バッファ  
バイアル

アプリケーション  
キット(各種)

## 大塚電子株式会社

<http://www.photal.co.jp>

●本社      〒573-1132 大阪府枚方市招提田近3丁目26-3      TEL.(072)855-8564      FAX.(072)850-9159

●東京支店      〒192-0082 東京都八王子市東町1-6 橋完LKビル4F      TEL.(042)644-4951      FAX.(042)644-4961

未来の科学に  
奉仕する



科学機器・計測システムの技術・情報商社

 **オザワ科学株式会社**  
OZAWA

本社 / 〒460-0003 名古屋市中区錦三丁目9番22号  
TEL (052) 951-5331 (代) FAX (052) 962-7358

本社分室・春日井・刈谷・豊川・豊田・四日市・亀山・岐阜・浜松・静岡・沼津・商品センター

URL <http://www.ozawasc.co.jp>

E-mail [welcome@ozawasc.co.jp](mailto:welcome@ozawasc.co.jp)

ライフサイエンス  
サポート企業へ。

For Customer

CaHC

株式会社 **カーク**

〒460-0002  
名古屋市中区丸の内 3-8-5  
Tel 052-971-6533(代)

愛知東営業所 0564-66-1580  
岐阜営業所 058-268-8151  
浜松営業所 053-431-6801  
三重営業所 059-236-2531

バイオサイエンス・ライフサイエンスにおいて、  
オンリーワン、ナンバーワンを目指します。

ライフサイエンス  
サポート企業へ。

For Customer

CaHC

株式会社 **カーク**

〒460-0002  
名古屋市中区丸の内 3-8-5  
Tel 052-971-6533(代)

愛知東営業所 0564-66-1580  
岐阜営業所 058-268-8151  
浜松営業所 053-431-6801  
三重営業所 059-236-2531

バイオサイエンス・ライフサイエンスにおいて、  
オンリーワン、ナンバーワンを目指します。

CaHC

For Customer

ライフサイエンス  
サポート企業へ。

バイオサイエンス・ライフ  
サイエンスにおいて、  
オンリーワン、ナンバーワンを  
目指します。

株式会社 **カーク**

愛知東営業所 0564-66-1580  
岐阜営業所 058-268-8151  
浜松営業所 053-431-6801  
三重営業所 059-236-2531

〒460-0002 名古屋市中区丸の内 3-8-5  
Tel 052-971-6533(代)



Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis



# MultiNA

DNA/RNA分析用  
マイクロチップ電気泳動装置

繰り返し使用できるマイクロチップが  
分析コストの低減を実現

自動分析技術が最大108サンプルまでの  
全自動分析を実現

蛍光検出技術が、エチジウムブロマイド不使用の  
高感度検出を実現

Power of small.

小さくても、パワフル。  
小さいからこそ、扱いやすい。

私たちは、そんなラボツールを  
ラインアップしていきます。

高い分離能と再現性

データ整理も簡単

株式会社 **島津製作所** 京都市中京区西ノ京桑原町1  
分析計測事業部

■ 東 京 (03) 3219-5685	■ 北 関 東 (048) 646-0081	■ 神 戸 (078) 331-9665
■ 関 西 (06) 6373-6556	■ 横 浜 (045) 311-4615	■ 岡 山 (086) 221-2511
■ 札 幌 (011) 205-5500	■ 静 岡 (054) 285-0124	■ 四 国 (087) 823-6623
■ 東 北 (022) 221-6231	■ 名 古 屋 (052) 565-7531	■ 広 島 (082) 248-4312
■ 郡 山 (024) 939-3790	■ 京 都 (075) 823-1603	■ 九 州 (092) 283-3334
■ つくば (029) 851-8515		

<http://www.an.shimadzu.co.jp>

**HAMAMATSU**



# Photon is Our Business

光で何ができるか...

人類がこれまで目にしたことのない世界。そこに分け入るツールとして「光」への期待は高まるばかりです。浜松ホトニクスは光の本質に迫る研究とその産業応用に様々な視点から取り組み、分野を問わず幅広い貢献をしています。

**浜松ホトニクス株式会社**

〒434-8601 浜松市浜北区平口5000 TEL (053)586-7111 TEL (053)586-6180 <http://jp.hamamatsu.com>

社会の発展のために優れた科学技術・製品をお届けする  
総合理化学商社 島津サイエンス西日本株式会社

*With You*

皆様と共に

迅速 *Quick*

正確 *Professionally*

誠意 *Wholeheartedly*



島津超高速液体クロマトグラフ  
Nexera



レーザー脱離イオン化  
飛行時間型質量分析計  
AXIMA Performance



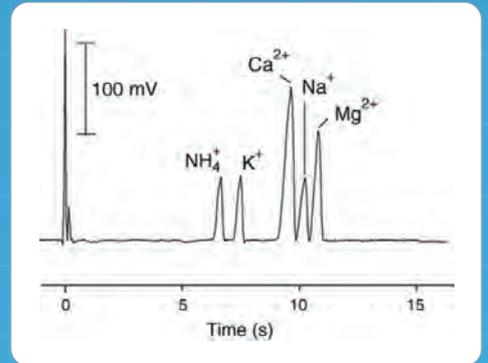
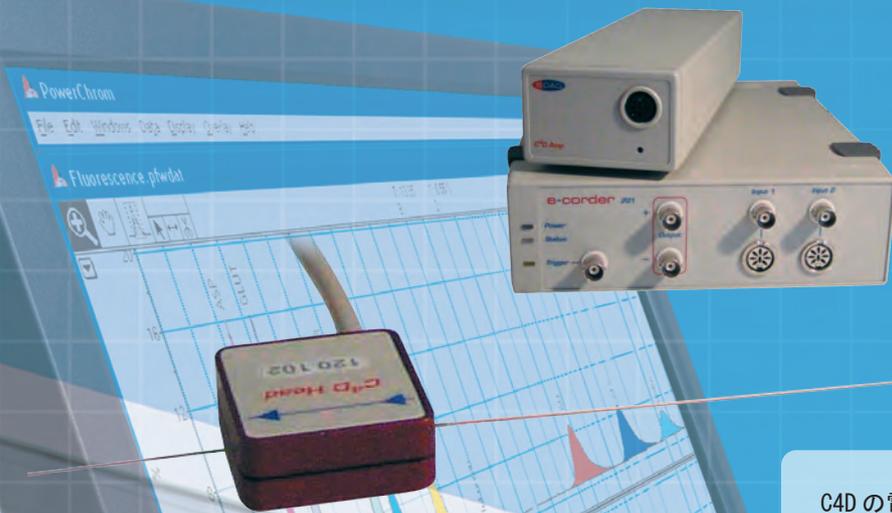
トリプル四重極型LC/MS/MSシステム  
LCMS-8030

⊕ 島津サイエンス西日本株式会社

本社	〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎5-4-9 (商業第二ビル3F)	TEL 06(6372)0370	FAX 06(6372)2600
大阪支店	〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎5-4-9 (商業第二ビル3F)	TEL 06(6372)2001	FAX 06(6372)2600
和歌山支店	〒640-8150 和歌山県和歌山市13-36	TEL 073(422)8133	FAX 073(431)5516
名古屋支店	〒450-0001 愛知県名古屋市中村区那古野1-47-1 (名古屋国際センタービル19階)	TEL 052(571)5950	FAX 052(571)5920
神戸支店	〒650-0032 兵庫県神戸市中央区伊藤町119 (三井生命神戸三宮ビル5階)	TEL 078(325)2011	FAX 078(325)2171
奈良営業所	〒630-8113 奈良県奈良市法蓮町973-9	TEL 0742(23)8810	FAX 0742(23)8819
岐阜営業所	〒500-8167 岐阜県岐阜市東金宝町1-18 (AVENUE 2階)	TEL 058(265)9261	FAX 058(265)0929
新居浜営業所	〒792-0812 愛媛県新居浜市坂井町2-1-32 (モンシェモアⅡ1階)	TEL 0897(32)2460	FAX 0897(37)1892
京都事務所	〒604-8445 京都府京都市中京区西ノ京徳大寺町1	TEL 075(823)2930	FAX 075(823)2932

島津サイエンス西日本ホームページ <http://www.ssw-shimadzu.co.jp>

# C4D 非接触型電気伝導度検出器

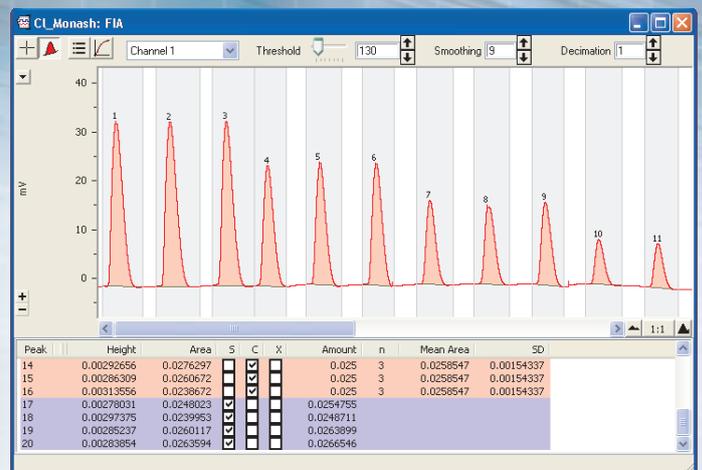


- キャピラリー電気泳動
- マイクロ流体チャンネル
- イオンクロマトグラフィー
- カラムテストング

C4D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C4D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>

# 私たちの使命は 最新の 情報と技術を 研究者のもとへ

「生命科学」の世界は、驚くべき早さで発展しています。その欠かせない要素こそが

私たちの提案する「モノ」なのです。

世界の優れた商品や技術を研究者に提供し、研究そのものをサポートします。

また、各種機器やシステムの提案だけでなく、研究者とメーカーをつなぐ架け橋として

研究者の声をメーカーにフィードバックすることも RIKAKEN の役割と考えます。

RIKAKEN CO., LTD.

 **理科研株式会社**

- 本社 / 〒463-8528 名古屋市守山区元郷2-107  
TEL 052-798-6151(代) FAX 052-798-6157
- 岡崎営業所 / 〒444-0864 愛知県岡崎市明大寺町字西長峰50番  
TEL 0564-57-1751(代) FAX 0564-57-1757
- 福井営業所 / 〒910-0842 福井県福井市開発3丁目3010  
TEL 0776-52-1651(代) FAX 0776-52-1653
- 岐阜営業所 / 〒500-8225 岐阜県岐阜市岩地2-25-2  
TEL 058-240-0721(代) FAX 058-240-1082
- 津営業所 / 〒514-0036 三重県津市丸之内養正町20-14  
TEL 059-224-6661(代) FAX 059-224-6671
- 四日市営業所 / 〒512-1211 三重県四日市市桜町2129-1  
TEL 059-326-0231(代) FAX 059-326-3577
- 静岡営業所 / 〒421-0121 静岡市駿河区広野3-29-8  
TEL 054-256-3751(代) FAX 054-256-3755

<http://www.rikaken.co.jp>

- 東京支店 / 〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-1  
TEL 03-3815-8951(代) FAX 03-3818-0889
- つくば営業所 / 〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-16-2  
TEL 029-839-1251(代) FAX 029-839-1255
- 柏営業所 / 〒277-0871 千葉県柏市若柴197-17  
TEL 04-7135-6651(代) FAX 04-7135-6751
- 神奈川営業所 / 〒226-0025 横浜市緑区十日市場町901-31  
TEL 045-989-6551(代) FAX 045-989-6701
- 鶴見営業所 / 〒230-0033 横浜市鶴見区朝日町1-49  
TEL 045-500-4551(代) FAX 045-500-4571
- 三島営業所 / 〒411-0943 静岡県駿東郡長泉町下土狩217-1  
TEL 055-980-1101(代) FAX 055-980-1105
- RIKAKEN USA / 4800 Hampden Lane, Suite #255 Bethesda, MD 20814  
アメリカ合衆国 メリーランド州  
TEL 240-482-3735 FAX 240-482-3759

関連会社 / 並木薬品株式会社 〒930-0834 富山県富山市問屋町3-1-33 TEL 076-451-4545(代) FAX 076-451-0085

[取扱品目] 遺伝子研究関連機器 / 免疫学研究関連機器 / 組織培養関連機器 / 生化学関連機器 / Bio関連機器 / RI関連機器 / 動物飼育関連機器  
汎用試薬・特殊試薬 / 輸入試薬・特注試薬 / 遺伝子関連試薬 / 免疫学関連試薬 / 組織培養関連試薬 / 生化学関連試薬  
各種研究用設備 / 動物飼育用飼料 / DNA依頼合成

第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2010) 実行委員会

実行委員長	江坂 幸宏	(岐阜薬大)	
実行委員	鈴木 茂生	(近畿大薬)	電気泳動研究懇談会委員長
	壹岐 伸彦	(東北大院工)	
	石濱 泰	(京大院薬)	
	加地 範匡	(名大院工)	
	加藤 大	(東大院薬)	
	金田 隆	(九大院工)	
	北川 慎也	(名工大院工)	
	北川 文彦	(京大院工)	
	笹 一志	(大塚電子)	
	佐藤 記一	(東大院農)	
	末吉 健志	(京大院工)	
	住友 慶子	(早大ナノ理工)	
	曾我 朋義	(慶応大生命)	
	高橋 透	(福井大院工)	
	高柳 俊夫	(岡山大院理)	
	竹田 さほり	(産総研)	
	田中 喜秀	(産総研)	
	渡慶次 学	(名大院工)	
	鳥村 政基	(産総研)	
	久本 秀明	(阪府大院工)	
	藤本 忠蔵	(浜松医大)	
	松本 浩幸	(浜松ホトニクス)	
	山口 佳則	(阪大院工)	
	宇野 文二	(岐阜薬大)	SCE2010 顧問
	村上 博哉	(岐阜薬大)	庶務

[五十音順 (一部除く)]

*Special thanks to Mitsuko Hayashi, who helped us complete this project, especially in making and maintenance of the Home Page (<http://www.gifu-pu.ac.jp/sce2010>).*

第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集  
2010 年 11 月 15 日発行

編集責任者 岐阜薬科大学 江坂 幸宏  
〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4  
TEL : 058-230-8100 (ex. 3640)  
E-mail: esaka@gifu-pu.ac.jp

発行 (社) 日本分析化学会 電気泳動研究懇談会

印刷所 (株) 愛和印刷  
〒501-0111 岐阜県岐阜市鏡島 2004-6