

SCE 2011

The 31st Symposium on Capillary Electrophoresis

November 9 – 11, 2011

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

(Tsuruoka)

第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム 要旨集

2011 年 11 月 9 日 - 11 日

鶴岡メタボロームキャンパス

慶應義塾大学先端生命科学研究所

主催

日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

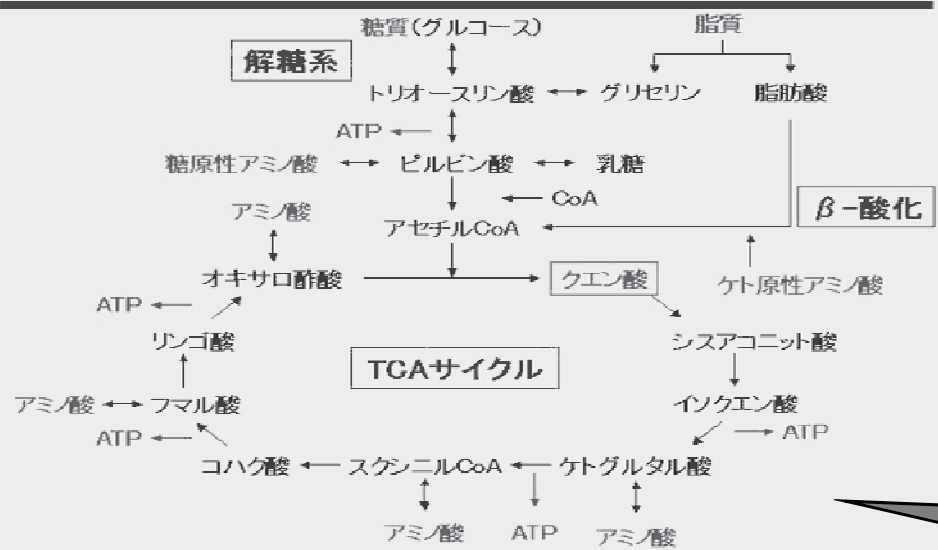


アジレント メタボローム解析用 CE-TOF MS システム



CE-TOF MS システム

生体内エネルギー生産系とクエン酸



これらの分析には
CE-MSが最適

< お問い合わせ先 >

アジレント・テクノロジー株式会社

カスタムコンタクトセンター

TEL : 0120-477-111



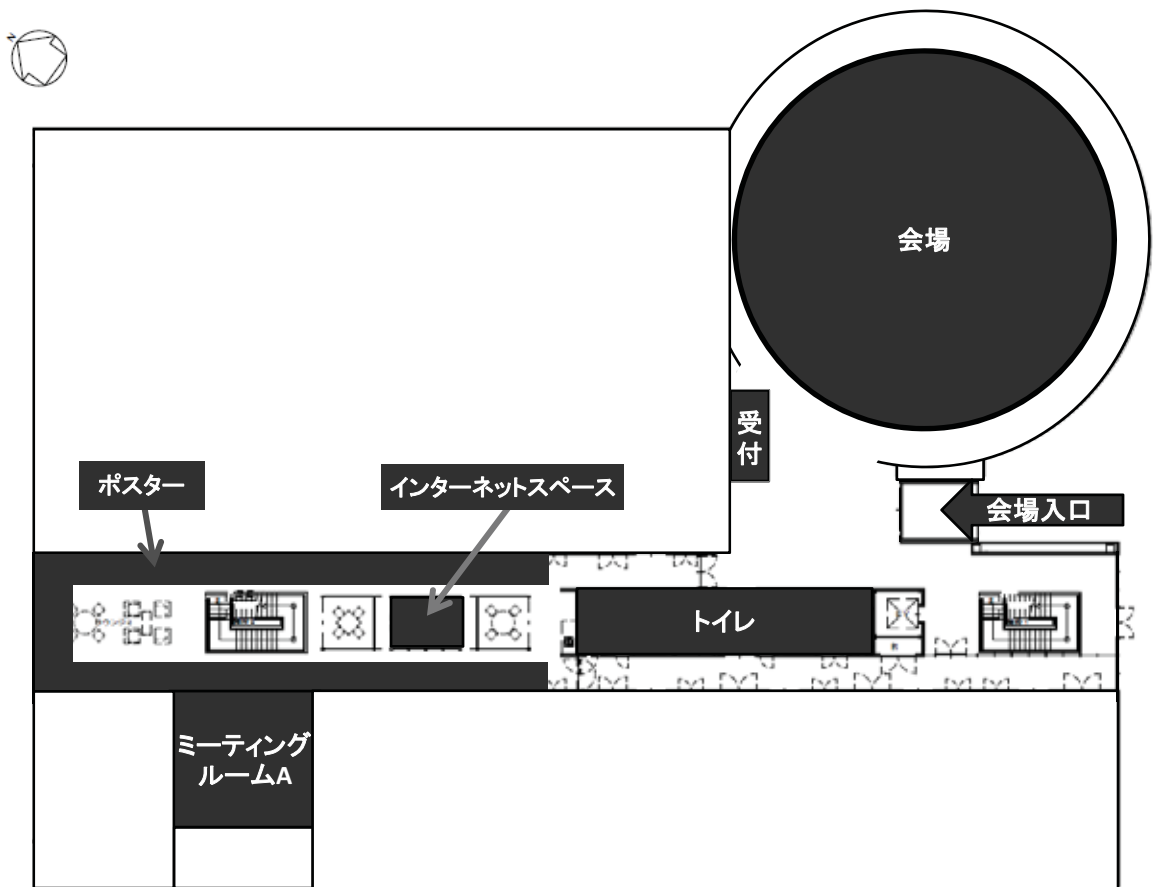
Agilent Technologies

<http://www.chem-agilent.com/>

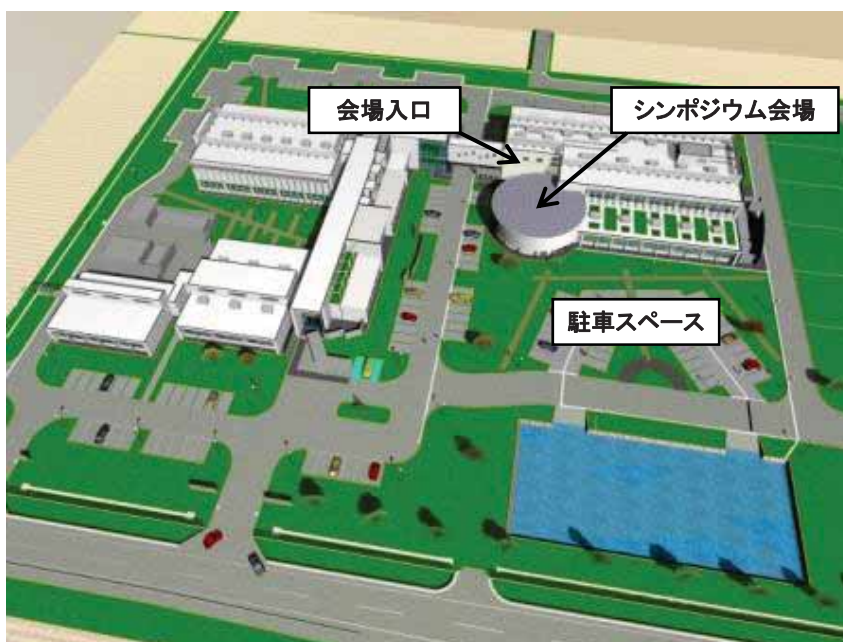
第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集 目次

タイムテーブル	1
プログラム（日本語）	1
プログラム（英語）	1
要旨	1
特別講演 S1～S2	2
記念講演 M1～M4	2
一般講演 O1～O37	2
ポスター P1～P34	2
キャピラリー電気泳動シンポジウムの歩み	1
2011 年度(社)日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会役員	1
広告	1
第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム実行委員会	1

会場見取り図



全体図



第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム プログラム
期間：2011年11月9日(水)－11日(金)

	第一日目 11/9 (水)	第二日目 11/10 (木)	第三日目 11/11 (金)
9:00	8:45-9:30 開場・受付	9:00-9:30 記念講演2	9:00-9:30 記念講演4
	9:30-9:40 開会式		
10:00	9:40-10:10 記念講演1	9:30-10:50 一般講演(O-13～O-16)	9:30-10:30 一般講演 (O-31～O33)
	10:10-11:10 一般講演 (O-1～O-3)		
11:00		10:50-11:00 休憩	10:30-11:50 一般講演 (O-34～O-37)
	11:10-12:10 一般講演 (O-4～O-6)	11:00-12:20 一般講演 (O-17～O-21)	
12:00			11:50- 閉会式
	12:10-13:00 ランチ	12:20-13:10 ランチ	
13:00	13:00-14:00 一般講演 (O-7～O-9)	13:10-13:40 記念講演3	
	14:00-15:00 一般講演 (O-10～O-12)	13:40-14:40 特別セッション1 (O-22～O-24)	
14:00			
	15:00-15:15 コーヒーブレイク	14:40-16:00 ポスターセッション 14:40-15:20 奇数番号 15:20-16:00 偶数番号	
15:00	15:15-16:00 特別講演1		
16:00	16:00-16:45 特別講演2	16:00-18:00 特別セッション2 (O-25～O-30)	
	16:45-17:45 ラボツアー		
17:00			
	17:45-18:00 懇親会会場へ移動		
18:00			
19:00	18:00-20:30 懇親会	18:00- オプションツアー	
20:00			
21:00			

第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム プログラム
期間：2011 年 11 月 9 日（水）～11 日（金）

第一日目 11 月 9 日（水）

9:30 – 9:40 開会式

9:40 – 10:10 記念講演 1 座長：石濱 泰

M-1 慶應鶴岡キャンパスの挑戦 ～メタボローム解析技術の医療・環境・食品分野への応用

○富田 勝（慶應義塾大学先端生命科学研究所）

10:10 – 11:10 装置開発

オーガナイザー：金田 隆、北川慎也

O-1 LC-Q-TOFMS 及び CE による唾液中の類似麻薬の分離分析

○林 震煌（台湾師範大学化学研究科）

O-2 蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動システムの開発

○松本浩幸（浜松ホトニクス株式会社 中央研究所）

O-3 マイクロチップを用いたキャピラリー電気泳動の臨床応用

○黒澤竜雄（和光純薬工業株式会社 臨床検査薬研究所）

11:10 – 12:10 新分析法

オーガナイザー：高柳俊夫、壹岐伸彦

O-4 キャピラリーゾーン電気泳動法による速度論反応共存下での迅速な平衡反応の解析

○高柳俊夫（岡山大学大学院自然科学研究科）

O-5 キャピラリー電気泳動分離に基づく天然高分子のキャラクタリゼーション法の開発

○高橋 透（福井大学大学院工学研究科）

O-6 シースレス CE-MS 法による高感度測定法の開発

○平山明由，曾我朋義（慶應義塾大学先端生命科学研究所）

12:10 – 13:00 ランチ（電気泳動分析研究懇談会若手 WG，ミーティングルーム A）

13:00 – 14:00 医薬分野への応用

オーガナイザー：松本浩幸、鳥村政基

O-7 キャピラリー電気泳動法による製薬支援、生物製剤・カウンターイオン・光学異性体への応用

○新井悦郎（ベックマン・コールター株式会社）

O-8 キャピラリー電気泳動法のバイオ/抗体医薬品分析への応用 –特性解析から品質試験まで–

○前田由貴子，岩田美紀，表由佳子，疋田昌義，岡嶋孝太郎，日根智恵美，清水将年，中山智加男（株式会社住化分析センター）

O-9 CE-TOFMS によるうつ病血液マーカー開発

○大橋由明¹, 篠田幸作¹, 川村則行² (¹ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社,² 外苑メンタルクリニック)

14:00 – 15:00 食品、環境分野への応用

オーガナイザー：田中喜秀、澤田浩和

O-10 キャピラリー電気泳動／質量分析法の法科学分析への有効利用 –尿中大麻代謝物の分析–

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

O-11 野菜と茶の品質成分分析

○堀江秀樹 (農業食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所)

O-12 キャピラリー電気泳動-質量分析計による空気中の塩基性ガスの分析

○飯川玲子 (株式会社住化分析センター)

15:00 – 15:15 コーヒーブレイク

15:15 – 16:00 特別講演 1 座長 曾我朋義

S-1 iPS 細胞を用いた神経再生・疾患・創薬研究

○岡野栄之 (慶應義塾大学医学部)

16:00 - 16:45 特別講演 2 座長 曾我朋義

S-2 オリジナル蛍光プローブの精密設計による新たな生体イメージングの実現

○浦野泰照 (東京大学大学院医学系研究科)

16:45 ラボツアー

18:00 懇親会

第二日目 11月10日(木)

9:00 – 9:30 記念講演 2 座長 江坂幸宏

M-2 ナノバイオデバイスの開発と医療応用

○馬場嘉信 (名古屋大学大学院工学研究科)

9:30 – 10:50 マイクロフルイディクス

オーガナイザー：久本秀明、加地範匡

O-13 液体電極プラズマ発光分光分析法による微量金属イオン定量

○高村 禪 (北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科)

O-14 マイクロ生化学分析のためのリン脂質ポリマーバイオインターフェース

○高井まどか（東京大学大学院工学系研究科）

O-15 マイクロ流体デバイスを応用した細胞培養環境操作

○木村啓志，藤井輝夫（東京大学生産技術研究所）

O-16 核酸塩基分子の単分子識別 – 3世代 DNA シーケンサーに向けて–

○谷口正輝（大阪大学産業科学研究所）

10:50 – 11:00 休憩

11:00 – 12:20 分離技術

オーガナイザー：志村清仁、加藤 大

O-17 ナノ空間を利用した生体物質の分析

○加藤 大（東京大学大学院薬学系研究科）

O-18 糖タンパク質糖鎖の高感度検出分離分析

○鈴木茂生（近畿大学薬学部）

O-19 微生物の CE 分離における初期過程の泳動挙動観察

○鳥村政基，田尾博明（産業技術総合研究所環境管理技術研究部門）

O-20 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・高精度分析と低濃度試料における妨害ピークについて

○森 聡美，井上淳司，廣川 健（広島大学大学院工学研究科 応用化学専攻）

O-21 平板型カラムを用いた新規二次元分離手法の開発(VII)

伊東寛明，○北川慎也，大谷 肇（名古屋工業大学大学院工学研究科）

12:20 – 13:10 ランチ（電気泳動分析研究懇談会委員会，ミーティングルーム A）

13:10 – 13:40 記念講演 3 座長 大塚浩二

M-3 ミセル動電クロマトグラフィーの開発

○寺部 茂（兵庫県立大学 名誉教授）

13:40 – 14:40 特別セッション 1 最先端バイオ分析

オーガナイザー：石濱 泰、竹内昌治

O-22 マイクロ流体デバイスを用いた細胞組み立て

○竹内昌治（東京大学生産技術研究所、JST-ERATO）

O-23 複合的マイクロバイオアッセイシステムの開発

○佐藤記一（群馬大学大学院工学研究科 応用化学・生物化学専攻）

O-24 プロテオーム一斉解析に向けたナノ LC-MS システムの開発

○石濱 泰（京都大学大学院薬学研究科・慶應義塾大学先端生命科学研究所）

14:40 – 16:00 **ポスター発表**

14:40 – 15:20 **奇数番号**

15:20 – 16:00 **偶数番号**

P1 網羅的 DNA 付加体分析を目指した迅速前処理法の開発

○河村理恵子¹, 川島静香¹, 古口未央¹, 江坂幸宏^{1,2}, 宇野文二^{1,2}, 村上博哉¹, 石濱 泰³ (岐阜薬大¹, 岐阜大院連合創薬情報², 京大院薬³)

P2 ホウ酸塩存在下のエチレングリコールとグロセロールのキャピラリー電気泳動; インダイレクト UV 法による検討

○佐藤康博, 中村彰一, 黒田秀樹 (大塚電子株式会社)

P3 LVSEP 法を用いた二次元マイクロチップ電気泳動分析の高感度化 (3)

○木南冴子, 川井隆之, 末吉健志, 北川文彦[‡], 大塚浩二 (京大院工, [‡]弘前大院理工)

P4 酸・塩基含有水ゲルの開発と簡便なキャピラリー等電点電気泳動への応用

○藤井裕二, 野川悠人, 横山大輝, 遠藤達郎, 久本秀明 (大阪府立大学大学院 工学研究科)

P5 アリールホウ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 (4)

○楠本梨沙¹, Philip BRITZ-MCKIBBIN², 川井隆之¹, 末吉健志¹, 北川文彦^{1‡}, 大塚浩二¹ (京大院工¹, McMaster University², 弘前大院理工[‡])

P6 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 (4)

○恋野寛嗣, 橋場皇太, 末吉健志, 北川文彦[‡], 大塚浩二 (京大院工, 弘前大院理工[‡])

P7 CE による一斉分析法の応用: グリコサミノグリカンの硫黄含量測定

○大塚祐也 (生化学工業株式会社中央研究所)

P8 CE-TOFMS を用いた口腔プラークバイオフィルムの糖代謝メタボローム解析 ~フッ化物やキシリトールによる影響を *in vivo* で探る~

○鷲尾純平, 小川珠生, 真柳 弦, 高橋信博 (東北大学大学院歯学研究科口腔生化学分野)

P9 ポリアミド4 関連低分子化合物の CE-MS 分析

○竹田さほり, 山野尚子, 川崎典起, 安藤尚功, 中山敦好 (産業技術総合研究所 ユビキタスエネルギー研究部門 バイオベースポリマー研究グループ)

P10 等電点電気泳動濃縮可能な蛍光性酵素基質分子の設計・合成と高感度 ELISA に向けた基礎検討

○上野山雄大¹, 池上 謙², 梅沢啓太郎², 横山大輝¹, Daniel CITTERIO², 鈴木孝治², 久本秀明¹ (阪府大院工¹, 慶大院理工²)

P11 酸性泳動液を用いた CE-MS 分析の改良への試み

○若山正隆, 青木直大, 佐々木治人, 大杉 立 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)

P12 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法-キャピラリー電気泳動反応器による鉄(III)-フルボ酸錯体の解離速度論解析

○田村優樹¹, 高橋 透², 壹岐伸彦¹, 星野 仁¹ (¹東北大院環境, ²福井大院工)

P13 難溶性タンパク質に由来する可溶性ペプチドの APCE

○志村清仁¹, 高橋克佳², 鶴沼 豊², 青笹正義³, 松田治男³, 榎本 学⁴, 秋葉 望⁴, 笠井献一⁴ (¹福島県立医科大学医学部, ²シャープ株式会社研究開発本部, ³広島大学大学院生物圏科学研究科, ⁴帝京大学薬学部)

P14 キャピラリー電気泳動のためのインクジェット試料導入とその応用

○池田紗織, 中川ゆり, Zeng HULIE, 中嶋 秀, 内山一美 (首都大学東京大学院都市環境科学研究科)

P15 アミノ酸分析の電気化学検出マイクロチップシステムのためのプレカラム誘導体化リアクター

○佐々木俊輔¹, 谷 博文², 石田晃彦² (¹北海道大学大学院総合化学院, ²北海道大学大学院工学研究院)

P16 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識糖タンパク質糖鎖のオンライン試料濃縮部分導入アフィニティー電気泳動

○山本佐知雄, 福島依里子, 中谷夢美, 鈴木茂生 (近畿大学薬学部)

P17 ジクロロ酢酸またはピルビン酸を投与した MELAS ミトコンドリア病細胞の比較メタボローム解析

○紙健次郎¹, 藤田泰典^{2,3}, 曾我朋義¹, 富田 勝¹, 伊藤雅史^{2,3}, 田中雅嗣³ (¹慶應義塾大学先端生命科学研究所, ²岐阜国際バイオ研究所, ³東京都健康長寿医療センター研究所)

P18 イオンクロマトグラフ/キャピラリーゾーン電気泳動による二次元分離法の開発

○田辺健二¹, 中島沙知¹, 富永達哉¹, 飯田 豊¹, 廣川 健² (¹株式会社東レリサーチセンター, ²広島大学大学院工学研究院)

P19 キャピラリーゾーン電気泳動法による飲料水中のケイ酸・ホウ酸の分析

○中島沙知¹, 田辺健二¹, 富永達哉¹, 飯田 豊¹, 廣川 健² (¹株式会社東レリサーチセンター, ²広島大学大学院工学研究院)

P20 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¹, 福士恵一¹, 平岡 厚², 宮道 隆³ (¹神戸大院海事科学, ²杏林大保健, ³近畿職業能力開発大学校)

P21 イオンクロマトグラフィーによる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)

P22 キャピラリーゾーン電気泳動法による野菜中の金属イオンの定量

○日高祐一郎¹, 福士恵一¹, 早川 真², 湊 太郎³ (¹神戸大院海事科学, ²日本アドバンスストアグリ, ³青木マリーン)

P23 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: 泳動液組成の検討

○林 隆宏¹, 福士恵一¹, 廣川 健² (¹神戸大院海事科学, ²広島大院工)

P24 キャピラリーゾーン電気泳動法による野菜中の有機酸及びアミノ酸の定量

○服部考成¹, 福士恵一¹, 早川 真², 湊 太郎³ (¹神戸大院海事科学, ²日本アドバンスストアグリ, ³青木マリーン)

P25 キャピラリーゾーン電気泳動法によるクラゲ中のアンモニウムイオン及びアルカリ・アルカリ土類金属イオンの定量

○楊 康, 福士恵一 (神戸大院海事科学)

P26 ビタミン C 感受性および非感受性がん細胞株における比較メタボローム解析

○上瀧 萌 (慶應義塾大学環境情報学部)

P27 タンパク質-チアカリックスアレーン金属錯体のコンジュゲーションと CE を用いる相互作用解析

○馬場 諒¹, 田中铁兵¹, 壹岐伸彦¹, 高橋 透², 星野 仁¹ (¹東北大院環境, ²福井大院工)

P28 High-Sensitive Analysis of DNA fragments by CGE using a Low Viscosity BGE based on Electrokinetic Supercharging and Optimized Sample Injection

○Xiaoxue YE, Junji INOUE, Zhongqi XU, Takeshi HIROKAWA (*Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University*)

P29 GSH 合成阻害によるがんの代謝変動の解析

○北川光洋, 曾我朋義 (慶應義塾大学先端生命科学研究所)

P30 食餌性 Val による食肉呈味成分量の制御及びその機構の解明

○山田菜由子¹, 渡辺 徹¹, 石川 玄², 久保田真敏³, 門脇基二^{1,3}, 藤村 忍^{1,3} (¹新潟大院自然研, ²ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ, ³新潟大超域)

P31 がん細胞と正常細胞の酸化ストレスに対する代謝応答

○飯野慧子^{1,2}, 紙健次郎^{1,2}, 五十嵐沙織¹, 菅原尚子^{1,2}, 曾我朋義^{1,2,3}, 富田 勝^{1,2,3} (¹慶大・先端生命研, ²同・政策メディア・先端生命科学プログラム, ³同・環境情報)

P32 メタボローム解析を用いたリジン代謝の組織特異性の研究：食肉の高品質化に向けた研究

○渡邊源哉¹, 塩野智洋¹, 伊藤友紀¹, 柴田昌宏², 久保田真敏³, 門脇基二^{1,3}, 藤村 忍^{1,3} (¹新潟大院自然研・²近中四農研・³新潟大超域)

P33 蛍光相関分光法検出型マイクロチップ等電点電気泳動システムの開発

○長谷川寛^{1,2}, 松本浩幸³, 石井勝弘¹ (¹光産業創成大学院大学 光情報・システム分野, ²浜松ホトニクス (株) 電子管事業部, ³浜松ホトニクス (株) 中央研究所)

P34 CE-TOFMS を用いたマウス腸管内容物のメタボローム解析

○山本優理^{1,2}, 中西裕美子^{1,3}, 村上慎之介^{1,3}, 野津量子⁴, 植野昌未⁴, 日置恭司⁴, 高倉 彰⁴, 平山明由¹, 杉本昌弘^{1,3,5}, 曾我朋義^{1,2,3}, 伊藤 守⁴, 野村達次⁴, 富田 勝^{1,2,3} (¹慶大・先端生命研, ²慶大・環境情報, ³慶大・政策メディア, ⁴実中研, ⁵京大・医学研)

16:00 – 18:00 特別セッション2 CE-MS メタボロミクス

オーガナイザー：福崎英一郎、曾我朋義

O-25 CE-MS メタボロミクスによる肝臓疾患マーカー探索

○曾我朋義 (慶應義塾大学先端生命科学研究所)

O-26 メタボロミクスとケミカルバイオロジー

○井本正哉 (慶應義塾大学理工学部生命情報学科)

O-27 安定同位体標識を用いた酵母のターンオーバー解析

○福崎英一郎 (大阪大学工学研究科生命先端工学専攻)

O-28 CE-TOFMS を用いたバイオエタノール生産酵母の代謝プロファイリング

○蓮沼誠久 (神戸大学自然科学系先端融合研究環)

O-29 匂いに対する恐怖反応のメタボロミクス解析

○小早川高 (大阪バイオサイエンス研究所 神経機能学部門)

O-30 腸内常在菌の代謝産物のメタボロミクス解析

○松本光晴 (協同乳業株式会社研究所技術開発室)

18:00 終了、オプションツアー

第三日目 11月11日(金)

9:00 – 9:30 記念講演 4 座長 鈴木茂生

M-4 キャピラリーゾーン電気泳動法 -高感度化のストラテジーと応用例

○廣川 健 (広島大院工)

9:30 – 10:30 高感度測定法

オーガナイザー：北川文彦、竹田さほり

O-31 非水系 CE-希土類錯体時間分解蛍光検出による生理活性物質の微量分析

○江坂幸宏^{1,2}、石田由美¹、梁川綾住¹、村上博哉¹、宇野文二^{1,2}、住友慶子³、山口佳則⁴ (岐葉大¹、岐大院連合創薬²、早大ナノ³、阪大院工⁴)

O-32 簡易操作型電気泳動チップによる生体試料の高感度分析

○北川文彦¹、川井隆之²、木南冴子²、伊藤 潤²、末吉健志²、大塚浩二² (¹弘前大学理工学研究科、²京都大学工学研究科)

O-33 電場増幅試料導入法を用いたキャピラリーゾーン電気泳動法による環境試料中の有機ホウ素系防汚剤の定量

○ケオチューイ ネットナピット¹、福士恵一¹、齋藤恵逸²、廣川健³、壺井 愛¹、岡村秀雄¹ (¹神戸大院海事科学、²神戸大院人間発達環境学、³広島大院工)

10:30 – 11:50 理論と応用

オーガナイザー：江坂幸宏、福士恵一

O-34 LVSEP-FASI 法を用いた糖鎖電気泳動分析の1万倍の高感度化 (3)

○川井隆之、上田真澄、末吉健志、北川文彦³、大塚浩二 (京大院工、弘前大院理工³)

O-35 マイクロチップキャピラリー電気泳動におけるオンチップ検出法の開発

○田中喜秀 (産業技術総合研究所 健康工学研究部門)

O-36 CESI-MS によるペプチド・タンパク質分析

○神末和哉¹、木下充弘¹、掛樋一晃¹ (¹近畿大・薬)

O-37 熔融シリカキャピラリーを用いる分光法：高温高压液相反応のその場観測

○川村邦男 (広島修道大学 人間環境学部)

11:50 閉会式

ポスター賞授与式

SCE 2012 のお知らせ

実行委員長 田中喜秀 産業技術総合研究所

閉会挨拶

電気泳動分析研究懇談会委員長 鈴木茂生 近畿大学 薬学部

The 31st Symposium on Capillary Electrophoresis
November 9 – 11, 2011, Tsuruoka

Wednesday, Nov. 9

9:30 – 9:40 Opening Remarks

9:40 – 10:10 Memorial Lecture 1 Chair: Yasushi ISHIHAMA

M-1 Metabolome Analysis and its application to medical, environmental and food sciences

Masaru TOMITA*

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

10:10 – 11:10

Organizer: Takashi KANETA, Shinya KITAGAWA

O-1 Determination of designer drugs in saliva by liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOFMS) and capillary electrophoresis (CE)

Cheng-Huang LIN*

Department of Chemistry, National Taiwan Normal University

O-2 Development of Capillary Isoelectric Focusing System with Fluorescence Detection

Hiroyuki MATSUMOTO*

Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.

O-3 Clinical Testing Application of Microfluidic Chips Electrophoresis

Tatsuo KUROSAWA*

Diagnostics Research Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

11:10 – 12:10

Organizer: Toshio TAKAYANAGI, Nobuhiko IKI

O-4 Analysis of Fast Equilibria by Capillary Zone Electrophoresis in Concurrence of Slow Kinetic Reaction

Toshio TAKAYANAGI*

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

O-5 Development of the Characterization Methods for Natural Polymers Based on Capillary Electrophoretic Separation Techniques

Toru TAKAHASHI*

Graduate School of Engineering, University of Fukui

O-6 Development of a highly sensitive sheathless CE-MS method

Akiyoshi HIRAYAMA*, Tomoyoshi SOGA

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

12:10 – 13:00 Lunch Break

13:00 – 14:00

Organizer: Hiroyuki MATSUMOTO, Masaki TORIMURA

O-7 Capillary Electrophoresis Applications of mAbs for Clinical Use, Counter Ions and Enantiomers to Support Pharmaceutical Development and Quality Control

Etsuo ARAI*

Beckman Coulter K.K.

O-8 Application of Capillary Electrophoresis for Biologics Analysis - from Characterization to Specification Test -

Yukiko MAEDA*, Miki IWATA, Yukako OMOTE, Masayoshi HIKITA, Kotaro OKAJIMA, Chiemi HINE, Masatoshi SHIMIZU, Chikao NAKAYAMA

Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.

O-9 Development of a Novel Biomarker for Depression by CE-TOFMS

Yoshiaki OHASHI*¹, Kosaku SHINODA¹, Noriyuki KAWAMURA²

¹*Human Metabolome Technologies, Inc.*

²*Gaien Mental Clinic*

14:00 – 15:00

Organizer: Yoshihide TANAKA, Hirokazu SAWADA

O-10 Forensic use of capillary electrophoresis/mass spectrometry

– **Analysis of metabolites of tetrahydrocannabinol in urine** –

Yoshiaki IWAMURO*¹, Reiko Iio-ISHIMARU¹, Satoshi CHINAKA¹, Nariaki TAKAYAMA¹, Shuji KODAMA², Kazuichi HAYAKAWA³

¹*Forensic Science Laboratory, Ishikawa Prefectural Police Headquarters*

²*Toyama Institute of Health*

³*Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University*

O-11 Analysis of qualitatively important components in vegetables and tea

Hideki HORIE*

National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO

O-12 Quantification Method of Basic Compounds in Atmosphere by CE-MS

Reiko IIKAWA*

Sumika Chemical Analysis Service, LTD.

15:00 – 15:15 Coffee Break

15:15 – 16:00 Special Lecture 1 Chair: Tomoyoshi SOGA

S-1 Regeneration of the damaged CNS using human iPSCs-based technologies

Hideyuki OKANO*

School of Medicine, Keio University

16:00 - 16:45 Special Lecture 2 Chair: Tomoyoshi SOGA

S-2 Novel Imaging Techniques with Precisely Designed Original Fluorescence Probes

Yasuteru URANO*

Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

16:45 Lab Tour

18:00 Banquet

Thursday, Nov. 10

9:00 – 9:30 Memorial Lecture 2 Chair: Yukihiro ESAKA

M-2 Development of Nanobiodevices and Biomedical Applications

Yoshinobu BABA*

Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Nagoya University

9:30 – 10:50

Organizer: Hideaki HISAMOTO, Noritada KAJI

O-13 Trace Metallic Ion Measurement by Liquid Electrode Plasma Atomic Emission Spectrometry

Yuzuru TAKAMURA*

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

O-14 Phospholipid Polymer Biointerface for Micro-bioanalysis

Madoka TAKAI*

Department of Bioengineering, The University of Tokyo

O-15 Control of Cell Culture Environment by Microfluidic Technology

Hiroshi KIMURA*, Teruo FUJII

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

O-16 Identification of Single Base Molecules-Towards 3rd Generation DNA Sequencer-

Masateru TANIGUCHI*

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

10:50 – 11:00 Break

11:00 – 12:20

Organizer: Kiyohito SHIMURA, Masaru KATO

O-17 Separation of biomolecules using a nano space

Masaru KATO*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

O-18 Novel Methods for Sensitive Analysis of Glycoprotein-derived Oligosaccharides

Shigeo SUZUKI*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

O-19 Monitoring the Initial Migration Behavior of Living Microorganisms in CE

Masaki TORIMURA*, Hiroaki TAO

Measurement Technology Research Group, Research Institute for Environmental Management

Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

O-20 Development of a Highly Sensitive and Accurate Method for the Analysis of DNA Fragments by Electrokinetic Supercharging Preconcentration - Capillary Gel Electrophoresis and the Interference Peaks in a Low Concentration Sample

Satomi MORI*, Junji INOUE, Takeshi HIROKAWA

Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

O-21 Development of new two-dimensional separation method using planer column (VII)

Hiroaki ITO, Shinya KITAGAWA*, Hajime OHTANI

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

12:20 – 13:10 Lunch Break

13:10 – 13:40 Memorial Lecture 3 Chair: Koji OTSUKA

M-3 Development of Micellar Electrokinetic Chromatography

Shigeru TERABE*

Professor Emeritus, University of Hyogo

13:40 – 14:40 Special Session 1

Organizer: Yasushi ISHIHAMA, Shoji TAKEUCHI

O-22 3D tissue construction using microfluidic devices

Shoji TAKEUCHI*

Institute of Industrial Science, Univ. of TOKYO

JST-ERATO

O-23 Development of A Total Micro-bioassay systems

Kiichi SATO*

School of Engineering, Gunma University

O-24 NanoLC-MS System towards Complete Proteome Analysis

Yasushi ISHIHAMA*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

14:40 – 16:00 Poster Presentation and Discussion

14:40 – 15:20 Odd number

15:20 – 16:00 Even number

P1 Development of a simple and quick pretreatment method for comprehensive DNA adduct study

Rieko KAWAMURA*¹, Shizuka KAWASHIMA¹, Mio KOGUCHI¹, Yukihiro ESAKA^{1,2}, Bunji UNO^{1,2}, Hiroya MURAKAMI¹, Yasushi ISHIHAMA³

¹*Gifu Pharmaceutical Univ.*

²*United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Science, Gifu Univ.*

³*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.*

P2 Capillary Electrophoresis of Ethylene glycol and glycerol in the Presence of Borate: Analysis by Indirect Detection

Yasuhiro SATO*, Shoichi NAKAMURA, Hideki KURODA

Otsuka Electronics Co.

P3 Highly Sensitive Two-Dimensional Microchip Electrophoresis by LVSEP. 3

Saeko KINAMI*, Takayuki KAWAI, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA[‡], Koji OTSUKA

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

[‡]*Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*

P4 Development of Hydrogel containing Acid or Base and its Application for Simple and Easy-to-use Capillary Isoelectric Focusing

Yuji FUJII*, Yuto NOGAWA, Hiroki YOKOYAMA, Tatsuro ENDO, Hideaki HISAMOTO

Graduate school of Engineering, Osaka Prefecture University

P5 Label-Free Electrophoretic Analysis of Sugars Using Complexation with Aryl Boronic Acids. 4

Risa KUSUMOTO*¹, Philip BRITZ-MCKIBBIN², Takayuki KAWAI¹, Kenji SUEYOSHI¹, Fumihiko KITAGAWA^{1‡}, Koji OTSUKA¹

¹*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University,*

²*Department of Chemistry, McMaster University,*

[‡]*Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki*

University

P6 Highly Sensitive Electrophoretic Analysis Based on Transient Trapping. 4

Hiroshi KOINO*, Kota HASHIBA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA[‡], Koji OTSUKA
Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University,

[‡]*Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*

P7 Application of simultaneous analysis using CE: Determination of sulfur content of glycosaminoglycan

Yuya OTSUKA*

Central Research Laboratories, Seikagaku Corporation

P8 Metabolome analysis of glucose fermentation by oral plaque biofilm using CE-TOFMS - Effects of fluoride and xylitol *in vivo*–

Jumpei WASHIO*, Tamaki OGAWA, Gen MAYANAGI, Nobuhiro TAKAHASHI

Division of Oral Ecology and Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

P9 CE–MS Analysis of low-molecular compounds related to polyamide 4

Sahori TAKEDA*, Naoko YAMANO, Norioki KAWASAKI, Hisanori ANDO, Atsuyoshi NAKAYAMA
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),

Bio-based Polymers Research Group, Research Institute for Ubiquitous Energy Devices

P10 Design and synthesis of novel fluorescent enzyme substrate for capillary isoelectric focusing (CIEF) towards application to highly-sensitive ELISA

Yuta UENOYAMA*¹, Ken IKEGAMI², Keitaro UMEZAWA², Hiroki YOKOYAMA¹, Daniel CITTERIO², Koji SUZUKI², Hideaki HISAMOTO¹

¹*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University*

²*Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University*

P11 Improvement of CE-MS analysis using acidic electrolytes

Masataka WAKAYAMA*, Naohiro AOKI, Haruto SASAKI, Ryu OHSUGI

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

P12 Dissociation kinetic analysis of Fe(III)-fulvic acid complex with dynamic coating-non-gel capillary electrophoresis-capillary electrophoretic reactor

Yuuki TAMURA*¹, Toru TAKAHASHI², Nobuhiko IKI¹, and Hitoshi HOSHINO¹

¹*Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University*

²*Graduate School of Engineering, University of Fukui*

P13 APCE of Soluble Peptides Derived from a Protein of Low Solubility

Kiyohito SHIMURA*¹, Katsuyoshi TAKAHASHI², Yutaka UNUMA², Masayoshi AOSASA³, Haruo MATSUDA³, Manabu ENOMOTO⁴, Nozomi AKIBA⁴, Ken-ichi KASAI⁴

¹*School of Medicine, Fukushima Medical University*

²*Healthcare Systems Laboratories, Sharp Corporation*

³*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University*

⁴*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University*

P14 Injection method using inkjet microchip for capillary electrophoresis

Saori IKEDA*, Yuri NAKAGAWA, Zeng HULIE, Hizuru NAKAJIMA, Katsumi UCHIYAMA

Institute for Urban Environmental Science, Tokyo Metropolitan University

P15 Pre-column derivatization reactor for microchip-based amino acid analysis system with electrochemical detection

Shunsuke SASAKI¹, Hirofumi TANI², Akihiko ISHIDA²

¹*Division of Chemical Sciences and Engineering, Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University*

²*Division of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University*

P16 On-line Preconcentration with Partial Filling Affinity Capillary Electrophoresis of Glycans Labeled with 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic Acid

Sachio YAMAMOTO*, Eriko FUKUSHIMA, Yumi NAKATANI, Shigeo SUZUKI

School of Pharmacy, Kinki University

P17 Metabolomic Profiling of Dichloroacetate and Pyruvate Efficacy in Cybrid Cells Harboring MELAS Mitochondrial DNA Mutations

Kenjiro KAMI*¹, Yasunori FUJITA^{2,3}, Tomoyoshi SOGA¹, Masaru TOMITA¹, Masafumi ITO^{2,3}, Masashi TANAKA³

¹*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

²*Department of Longevity & Senescence Study, Gifu International Institute of Biotechnology*

³*Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

P18 Development of two-dimensional separation method using combination of ion chromatography and capillary zone electrophoresis

Kenji TANABE*¹, Sachi NAKASHIMA¹, Tatsuya TOMINAGA¹, Yutaka IIDA¹, Takeshi HIROKAWA²

¹*Toray Research Center, Inc.*

²*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

P19 Determination of silicate (SiO₃²⁻) and borate (BO₃³⁻) in drinking water using capillary zone electrophoresis

Sachi NAKASHIMA*¹, Kenji TANABE¹, Tatsuya TOMINAGA¹, Yutaka IIDA¹, Takeshi HIROKAWA²

¹*Toray Research Center, Inc.*

²*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

P20 Determination of Major Anions in Human Serum Samples Using Capillary Zone Electrophoresis

Kenji KITA*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Atsushi HIRAOKA², Takashi MIYADO³

¹*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

²*Faculty of Health Sciences, Kyorin University*

³*Kinki Polytechnic College*

P21 Determination of Inorganic Anions in Seaweed (Wakame) Using Ion Chromatography

Takashi IYAMA*, Keiichi FUKUSHI

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

P22 Determination of Metal Ions in Vegetables Using Capillary Zone Electrophoresis

Yuichiro HIDAKA*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Makoto HAYAKAWA², Taro MINATO³

¹*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

²*Nihon Advanced Agri Co., Ltd*

³*Aoki Marine Co., Ltd*

P23 CZE Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater: Composition of background electrolyte

Takahiro HAYASHI*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Takashi HIROKAWA²

¹*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

²*Graduate School of Engineering Hiroshima University*

P24 Determination of Organic and Amino Acids in Vegetables Using Capillary Zone Electrophoresis

Takanari HATTORI*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Makoto HAYAKAWA², Taro MINATO³

¹*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

²*Nihon Advanced Agri Co., Ltd*

³*Aoki Marine Co., Ltd*

P25 Determination of Ammonium Cations and Alkali and Alkaline Earth Metal Cations in Jellyfish by Capillary Zone Electrophoresis

Yang KANG*, Keiichi FUKUSHI

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

P26 Comparative Metabolome Analysis of Vitamin C-sensitive and -insensitive Cancer Cells

Megumi UETAKI*

Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

P27 Bioconjugation of thiacalixarene-metal complex with proteins and the interaction analyzed with CE

Ryo BABA*¹, Teppei TANAKA¹, Nobuhiko IKI¹, Toru TAKAHASHI², Hitoshi HOSHINO¹

¹*Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University*

²*Graduate School of Engineering, University of Fukui*

P28 High-Sensitive Analysis of DNA fragments by CGE using a Low Viscosity BGE based on Electrokinetic Supercharging and Optimized Sample Injection

Xiaoxue YE*, Junji INOUE, Zhongqi XU, Takeshi HIROKAWA

Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

P29 Metabolomic effect of GSH depletion in cancer cells

Mitsuhiro KITAGAWA*, Tomoyoshi SOGA

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

P30 Regulation of taste active components in meat by dietary Val and clarification of its mechanism

Mayuko YAMADA*¹, Toru WATANABE¹, Gen ISHIKAWA², Masatoshi KUBOTA³, Motoni KADOWAKI^{1,3}, Shinobu FUJIMURA^{1,3}

¹*Graduate school of Sci. and Tech. Niigata Univ.*

²*Human Metabolome Technologies*

³*Center for Transdisciplinary Research Niigata Univ.*

P31 Metabolomic responses of cancer and normal cells under H₂O₂-induced oxidative stress

Keiko IINO*^{1,2}, Kenjiro KAMI^{1,2}, Mitsuhiro KITAGAWA¹, Saori IGARASHI¹, Shoko SUGAWARA¹, Tomoyoshi SOGA^{1,2,3}, Masaru TOMITA^{1,2,3}

¹*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

²*Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University*

³*Department of Environment and Information Studies, Keio University*

P32 Study of tissue specific lysine metabolism by metabolome analysis

G. WATANABE*¹, T. SHIONO¹, Y. ITO¹, M. SHIBATA², M. KUBOTA³, M. KADOWAKI^{1,3}, S. FUJIMURA^{1,3}

¹*Graduate School of Science and Technology, Niigata Univ.*

²*Ohda branch, WeNARC*

³*Center for Transdisciplinary Research, Niigata Univ.*

P33 Development of the microchip isoelectric focusing system with fluorescence correlation spectroscopy

Yutaka HASEGAWA*^{1,2}, Hiroyuki MATSUMOTO³, Katsuhiro ISHII¹

¹*The Graduate School for Creation of New Photonics Industries,*

²*Electron Tube Division, Hamamatsu Photonics K.K.*

³*Central Research laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.*

P34 Metabolomic analysis for murine intestinal contents using CE-TOFMS

Yuri YAMAMOTO^{1,2}*, Yumiko NAKANISHI^{1,3}, Shinnosuke MURAKAMI^{1,3}, Ryoko NOZU⁴,

Masami UENO⁴, Kyouji HIOKI⁴, Akira TAKAKURA⁴, Akiyoshi HIRAYAMA¹, Masahiro

SUGIMOTO^{1,3,5}, Tomoyoshi SOGA^{1,2,3}, Mamoru ITO⁴, Tatsuji NOMURA⁴, Masaru TOMITA^{1,2,3}

¹*Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.*

²*Dept. Env. & Info. Studies., Keio Univ.*

³*Grad. Sch. Media & Governance., Keio Univ.*

⁴*Cent. Inst. Exp. Animal.*

⁵*Grad. Sch. Med. and Fac. of Med., Kyoto Univ.*

16:00 – 18:00 Special Session 2

Organizer: Eiichiro FUKUSAKI , Tomoyoshi SOGA

O-25 CE-MS metabolomics Reveals γ -glutamyl dipeptides as Biomarkers for Discrimination among Different Forms of Liver Disease

Tomoyoshi SOGA*

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

O-26 Chemical Biology Using Metabolome Analysis

Masaya IMOTO*

Faculty of Science and Technology, Keio University

O-27 Stable isotope labeling based metabolic turnover analysis of yeast.

Eiichiro FUKUSAKI*

Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

O-28 Metabolic Profiling of Bioethanol-producing Yeast with CE-TOFMS

Tomohisa HASUNUMA*

Organization of Advances Science and Technology, Kobe University

O-29 Metabolomics Analysis of Fear Response Evoked by Odors

Ko KOBAYAKAWA*

Osaka Bioscience Institute

O-30 Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome

Mitsuharu MATSUMOTO*

Dairy Science and Technology Institute, Kyodo Milk Industry Co. Ltd.

18:00 Optional Tour

Friday, Nov. 11

9:00 – 9:30 Memorial Lecture 4 Chair: Shigeo SUZUKI

M-4 Capillary Zone Electrophoresis – Strategy for High-sensitive Analysis and Applications

Takeshi HIROKAWA*

Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

9:30 – 10:30

Organizer: Fumihiko KITAGAWA, Sahori TAKEDA

O-31 Non-Aqueous Capillary Electrophoresis of Eu Complexes with Time- Resolved Fluorescence Detection for Sensitive Analysis of Alkylphenols

Yukihiro ESAKA*^{1,2}, Yumi ISHIDA¹, Ayaka YANAGAWA¹, Hiroya MURAKAMI¹, Bunji UNO^{1,2}, Keiko SUMITOMO³, Yoshinori YAMAGUCHI⁴

¹*Gifu Pharm. Univ.*

²*United Grad. School of Drug Discovery and Med. Inform. Sci., Gifu Univ.*

³*Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University*

⁴*Grad. School of Industry, Osaka Univ.*

O-32 Highly-sensitive Analysis of Biomolecules Using Simplified-operation Electrophoresis Chips

Fumihiko KITAGAWA*¹, Takayuki KAWAI², Saeko KINAMI², Jun ITO², Kenji SUEYOSHI², Koji OTSUKA²

¹*Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*

²*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

O-33 Determination of pyridine-triphenylborane and its degradation products in environmental samples using capillary zone electrophoresis with field amplified sample injection

Netnapit KAEWCHUAY*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Keiitsu SAITO², Takeshi HIROKAWA³, Ai TSUBOI¹, Hideo OKAMURA¹

¹*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

²*Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University*

³*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

10:30 – 11:50

Organizer: Yukihiro ESAKA, Keiichi FUKUSHI

O-34 Toward 10,000-fold Sample Preconcentration Efficiency for Oligosaccharide Analysis in Capillary Electrophoresis. 3

Takayuki KAWAI*, Masumi UEDA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA[‡], Koji OTSUKA
Graduate School of Engineering, Kyoto University

[‡]*Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*

O-35 Development of On-Chip Detection for Microchip Capillary Electrophoresis

Yoshihide TANAKA*

Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

O-36 Analysis of protein biopharmaceuticals using CESI-MS coupled with sheathless interface

K. KAMISUE*, M. KINOSHITA, K. KAKEHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

O-37 A Spectrophotometric Technique Using Fused-Silica Capillary: *in situ* Measurement of Liquid Phase Reactions at High Temperature and Pressure

Kunio KAWAMURA*

Department of Human Environmental Studies, Hiroshima Shudo University

11:50 Closing Session

Poster Awards

Invitation to SCE 2012

Yoshihide TANAKA

Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Closing Remarks

Shigeo SUZUKI

Kinki University

S-1

iPS 細胞を用いた神経再生・疾患・創薬研究

○岡野栄之

慶應義塾大学医学部

Regeneration of the damaged CNS using human iPSCs-based technologies

Hideyuki OKANO*

School of Medicine, Keio University

Abstract

Although the enthusiasms for patients-specific human embryonic stem cells (ESCs) using somatic nuclear transfer has been toned down, the technology for induced pluripotent stem cells (iPS cells) has been attracting attentions. In fact, there is an increasing interest of iPS cells as a source of neural stem/progenitor cells (NS/PCs), which can be obtained from adult somatic tissues. We found that mouse and human iPS cells can be induced for NS/PCs by the same method for neural differentiation of mouse [1, 2] and human ES cells, respectively. We examined the therapeutic potential of mouse and human iPSCs-derived neural progenitor cells in a mouse spinal cord injury (SCI) model. Although mouse [3] and human iPSCs-derived neural progenitor cells showed varied tumor forming propensities depending their parental iPSC lines. When the “safe” mouse [4] and human [5] iPS-derived neural progenitor cells were transplanted into the spinal cord 9 days after contusive injury, they differentiated into all three neural lineages without forming teratomas or other tumors. They also induced the remyelination, axonal regrowth of host 5HT(+) serotonergic fibers and participated in synaptogenesis with host neurons, promoting locomotor function recovery. I will also mention the results of transplantation of human iPS-derived neural progenitor cells into NOD/SCID mice and non-human primate SCI models. Furthermore, the perspectives of the strategy for clinical applications as well as potential drawbacks (e.g. tumorigenicity and immune rejection) of iPS cells-based cell therapy, application of iPS technologies [6] and transgenic non-human primates [7] for modeling diseases will be discussed in detail.

要旨

iPS 細胞 (induced Pluripotent Stem Cell, iPS 細胞は、皮膚の繊維芽細胞などの体細胞に Sox2, Oct3/4, Klf4, (c-Myc)などの少数の転写因子の遺伝子を導入するだけで、試験管内で誘導される多能性の幹細胞であり、細胞移植治療や疾患研究において大きな期待を集めている。一方、実際に iPS 細胞技術を細胞移植に用いるためには、腫瘍形成の問題等の安全性の問題をクリアする必要がある。我々は、京大の山中伸弥教授との共同研究により、体細胞の由来や c-Myc

transgene の有無や遺伝学的な選択の有無などの観点から樹立法が異なる様々なマウス iPS 細胞を出発材料にして、ES 細胞と同様のプロトコール[1, 2]にて神経系前駆細胞を分化誘導し、マウス脳へ移植する試験を行った。その結果、神経幹・前駆細胞細胞集団中に未分化な細胞が残存している場合は移植によりテラトーマが発生し、iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞(ニューロスフェア)の腫瘍源性(テラトーマ形成の危険性)は、iPS 細胞樹立時の起源細胞に依存していることが明らかとなった [3]。このようにして安全性についての厳格な評価により、すなわち iPS 細胞由来の神経幹・前駆細胞集団中に分化抵抗性の未分化細胞の含量が検出されず、iPS 細胞由来の神経幹・前駆細胞移植によりテラトーマ形成の危険性が低いことが示された事により、安全性の担保された iPS 細胞株(マウス 38C2 株, ヒト 201B7 株)を同定した。同 iPS 細胞株から誘導された神経幹・前駆細胞移植の脊髄損傷への治療効果が証明された[4, 5]。また、iPS 細胞技術は、ヒト疾患モデル細胞の提供により、疾患の原因の解明や創薬研究(開発研究、毒性の検討)に大きく貢献し、医学研究の大きなパラダイムシフトを産む出すものと期待される。本講演では、アルツハイマー病 [6]、パーキンソン病、ALS、統合失調症疾患などの精神・神経疾患を対象とした疾患モデル細胞作出という観点からの iPS 細胞研究の最近の我々の研究成果や世界的動向について紹介する。さらには、iPS 細胞研究と並行して我々が開発を進める遺伝子改変霊長類モデル[7]とその活用について紹介したい。我々は、昨年遺伝子改変霊長類(コモンマーモセット)の作出に成功した。現在、この遺伝子改変技術を用いてヒトのパーキンソン病、などの神経難病のモデルマーモセットの作出を進めており、これら神経難病の治療法開発研究などへの貢献が期待される。さらに遺伝子改変マーモセット作成の技術開発を進めるとともに、ヒトあるいは霊長類に固有な脳の構造と機能の解析、さらにはこれらが障害されたヒト精神・神経疾患モデルの開発を行い、iPS 細胞技術と相補的な技術として発展させたいと考える。

References

- [1] Naka, H. et al. *Nat. Neurosci.* 11: 1014-1023, 2008
- [2] Okada, Y., et al. *Stem Cells.* 26: 3086-3098, 2008.
- [3] Miura, K., et al. *Nat. Biotech.* 27:743-745, 2009.
- [4] Tsuji, O., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:12704-12709, 2010.
- [5] Nori, S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:16825-16830, 2011.
- [6] Yagi, T., et al. *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 13. [Epub ahead of print]
- [7] Sasaki, E., et al. *Nature*, 459:523-527, 2009.

S-2

オリジナル蛍光プローブの精密設計による新たな生体イメージングの実現

○浦野泰照

東京大学大学院医学系研究科

Novel Imaging Techniques with Precisely Designed Original Fluorescence Probes

Yasuteru URANO*

Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Abstract

We succeeded to construct several versatile rational design strategies for novel fluorescence probes. Indeed, based on these design strategies, various novel fluorescence probes were successfully developed including those for reactive oxygen species, pH, and various reporter enzymes. Here, I will describe the details of probe design as well as some imaging results with our novel smart probes. Also I will introduce our recently achieved in vivo cancer imaging techniques with newly developed fluorescence probes.

蛍光イメージング技法は、生きている細胞や動物体内における各種生体応答を、リアルタイムかつ高感度に捉えることが可能であるため、現代の医学・生物学領域研究に無くてはならない手法となっている。その実現には、観測対象分子に対して選択的に結合・反応することで、その蛍光特性が大きく変化する分子、いわゆる蛍光プローブが必要不可欠であり、それらは GFP などの蛍光タンパク質をベースとするものと有機合成小分子をベースとするものに大別される。

前者のプローブは、遺伝子導入によって細胞に発現させるだけで簡便にイメージングが可能であるという特長を持ち、主に2つの蛍光タンパク質間のエネルギー移動 (FRET: Forster Resonance Energy Transfer) 効率の変化を動作原理としている。一方、後者の有機小分子をベースとするプローブは、細胞外液に添加するだけですべての細胞に、速やかにかつ濃度を制御して導入可能であるなどの特長を有するため、多種多様なプローブの開発が強く望まれている。本プローブ群の検出原理としては、FRET よりもむしろ蛍光消光 (quenching) がよく用いられているが、一般に有機小分子の蛍光・消光過程を論理的に制御することは極めて困難であり、よって限られた蛍光団に基づく、限られたターゲットに対する蛍光プローブしかこれまでは存在しなかった。

このような中、筆者らは独自のアプローチにより、従来は困難であった蛍光プローブの論理的な設計を可能とする、新規プローブデザイン法を世界に先駆けて複数確立することに成功してきた。具体的には、分子内光誘起電子移動¹と分子内スピロ環化制御²に基づく設計法

を確立し、これに基づき活性酸素種^{2,4}、pH⁵、レポーター酵素類^{6,7}、ペプチダーゼ類など様々なターゲットの可視化を実現する蛍光プローブの開発に成功した。実際開発したプローブのうちいくつかは既に市販され、培養細胞系での強力な研究ツールとして基礎生物学領域研究において汎用されている。

しかしながらこれまで、蛍光イメージング法の適用対象は培養細胞系や組織スライス切片などに限定されていた。これは光の組織透過性が良くないためであり、確かに動物体内深部で起こる変化を蛍光イメージングすることは原理的に難しい。しかしながら、ある特定の特徴を持つ細胞のみを検出する蛍光プローブの開発は十分に可能であり、例えば疾患細胞を正常細胞と区別する機能性プローブを開発すれば、外科手術時や内視鏡検査時における全く新たな概念に基づく Evidence Based Medicine が可能となるはずである。そこで筆者らは、ヒト患者体内の微小がん部位を高選択的に蛍光可視化する新規蛍光プローブの開発に着手した。

その結果、まずがん抗体やある種の糖タンパク質が、がん細胞選択的にエンドサイトーシスにより取り込まれる現象を可視化するプローブの開発に成功した。具体的には、血中や細胞外などの中性 pH 環境下ではほぼ無蛍光であるが、リソソームなどの弱酸性環境下に置かれると強い蛍光を発するようになる蛍光プローブを設計・開発し、これをがん抗体などにタグしたプローブ複合体を作成した。本プローブはそれ自身はほぼ無蛍光であるが、がん細胞選択的に取り込まれ、リソソームへと運搬されて蛍光を発することが期待され、実際 iv、ip 投与により、生きている状態のがんモデル動物体内に出来たがん部位を、それが 1 mm 以下の大きさであっても明確に検出することに成功した⁵。また本プローブの特長を生かすことで、エタノール注入による癌治療効果をリアルタイムに可視化することにも成功した。

さらにごく最近、ある種のがん細胞が持つ特徴的なペプチダーゼ酵素活性を可視化する有機小分子蛍光プローブの開発にも成功し、本プローブを蛍光内視鏡下でがんモデルマウス体内に噴霧することで、肉眼で識別困難な微小がん部位を、数十秒程度で明確に可視化することにも成功した。

研究会当日は、確立したプローブの設計法の概略から、開発に成功したプローブによるイメージング例まで、幅広く紹介する予定である。

References

- [1] Miura T, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 8666-8671, 2003.
- [2] Kenmoku S, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**: 7313-7318, 2007.
- [3] Tanaka K, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**: 2530-2536, 2001.
- [4] Setsukinai K, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**: 3170-3175, 2003.
- [5] Urano Y, et al., *Nat. Med.*, **15**: 104-109, 2009.
- [6] Urano Y, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**: 4888-4894, 2005.
- [7] Kamiya M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**: 3918-3929, 2007.

M-1

慶應鶴岡キャンパスの挑戦

～メタボローム解析技術の医療・環境・食品分野への応用

○富田勝

慶大先端生命科学研究所

Metabolome Analysis and its application to medical, environmental and food sciences

Masaru TOMITA

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Institute for Advanced Biosciences of Keio University and its spin-out company, Human Metabolome Technologies Inc., form Japan's largest metabolomics research center in Tsuruoka city. The center's main force is capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) developed by Keio [1]. The technology can simultaneously quantify a large number of cellular metabolites ranged from 70 to 1,000 molecular weights, and is being applied to various fields of biotechnology in the post-genomic era, such as medical diagnosis (blood, urine, saliva, tissue), food science, and systems biology of model organisms [2].

We have recently discovered serum biomarkers of hepatotoxicity [3,4] and saliva biomarkers of oral, breast and pancreatic cancer [5]. Furthermore, metabolome data have been used to successfully confirm simulation results of red blood cell metabolism [6,7] and to discover cancer-specific energy metabolism [8].

In the area of food science, we conducted metabolome analysis of soybeans [9] and sake (rice wine) and its correlation with taste [10].

生物を包括的に理解しようとするとき、DNA塩基配列の網羅的解析（ゲノム解析）や、たんぱく質の網羅的解析（プロテオーム解析）に加えて、代謝物質の網羅的解析（メタボローム解析）はきわめて重要である[2]。どういう条件の時にどんな物質がどのくらい生体内（あるいは細胞内）に存在するのか。ポストゲノム時代において、メタボローム解析はさまざまなバイオ分野に応用できると考えられる。現在私たちは医療分野（血液、唾液などによるバイオマーカー）、食糧分野（農作物の食味と健康機能性）、環境分野（オイル産生藻）にメタボローム解析を応用しているので報告する。

慶應義塾大学先端生命科学研究所のメタボロームグループは、キャピラリ電気泳動（CE）と質量分析計（TOFMS）を組み合わせたメタボローム解析装置を開発した[1]。このCE-TOFMSは血清や細胞抽出液などの生体サンプル内のイオン性代謝物質を一斉に定量することを可能とする。この技術を用いると、ふたつのサンプルのメタボロームプロファイリングを比較し、大きく差があった物質を同定することによって、それらサンプルの代謝物質の違いを明確にすることができる。

医療分野では、特定の疾病患者の血液と正常者の血液をメタボローム比較することによって、その疾病特有に増減する代謝物質を特定することが可能となる。現在までに各種がんや

アルツハイマー、うつ病などの精神疾患、肝炎[3,4]、腎炎などを血液分析で診断する方法を開発している。唾液で、口腔がん、乳がん、膵臓がんを発見する手法も開発した[5]。

また、がん細胞と正常細胞をメタボローム解析して比較したところ、がん細胞は酸欠・栄養枯渇状態でもしぶとく生きるための特殊な呼吸法を持っていることを発見。それが回虫（寄生虫）の呼吸法と酷似していることから、「虫下し薬」を使った新たながん治療の可能性も示唆した[8]

環境分野では「オイル産生藻」の研究をしている。この藻は単細胞生物で、水と光があれば光合成により二酸化炭素を軽油に変換してくれる、いわば究極のエコ微生物である。より効率よくオイルを合成してもらうために、この藻の細胞内代謝をさまざまな条件で徹底的に分析し、改良を目指している。

食品分野では、メタボローム解析を駆使して、食品が含有する代謝物質と味との関係を化学的に解明することが名農になる。50種類の日本酒(山形県産地酒)をプロの利き酒師に点数をつけてもらい(甘味、雑味、苦味、酸味)、それをメタボローム解析結果と相関をとることによって、日本酒の味を決定している代謝物を同定した[10]。

また、鶴岡市名産の「ダダチャ豆」が通常の枝豆とどこが違うのか、成分を比較するとともに、保存温度と保存期間によって成分がどのように変化するかを調べたので報告する[9]。

References

- [1] Soga *et al.* “Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry” *Anal. Chem.* 81:6165-6174 (2009)
- [2] Ishii *et al.* “Multiple high throughput analyses monitor the response of E. coli to perturbations” *Science* 316 : 593-597 (2007)
- [3] Soga *et al.* “Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption” *J. Biol. Chem.* 281:16768-16776 (2006)
- [4] Soga *et al.* “Serum Metabolomics Reveals g-Gutamyl dipeptides as Biomarkers for Discrimination among Different Forms of Liver Disease.” *J. Hepatol.* 55:896-905 (2011)
- [5] Sugimoto *et al.* “Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles” *Metabolomics* 6:78-95 (2009)
- [6] Kinoshita *et al.* “Roles of Hemoglobin Allosterism in Hypoxia-induced Metabolic Alterations in Erythrocytes: SIMULATION AND ITS VERIFICATION BY METABOLOME ANALYSIS” *J. Biol. Chem.* 282: 10731-10734(2007)
- [7] Nishino *et al.* “In silico modeling and metabolome analysis of long-stored erythrocytes to improve blood storage methods” *J. Biotech* 144:212-223 (2009)
- [8] Hirayama *et al.* “Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry” *Cancer Res* 69:4918-25 (2009)
- [9] Sugimoto *et al.* “Metabolomic Profiles and Sensory Attributes of Edamame under Various Storage Duration and Temperature Conditions.” *J. Agric Food Chem.* 58:8418–8425(2010)
- [10] Sugimoto *et al.* “Correlation between Sensory Evaluation Scores of Japanese Sake and Metabolome Profiles” *J. Agric. FoodChem* 58:374-383 (2009)

M-2

ナノバイオデバイスの開発と医療応用

○馬場嘉信

名古屋大学大学院工学研究科

名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター

名古屋大学シンクロトロン光研究センター

産業技術総合研究所・健康工学研究部門

Development of Nanobiodevices and Biomedical Applications

Yoshinobu BABA*

Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Nagoya University

FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice, Nagoya University

Synchrotron Radiation Research Center, Nagoya University

Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Abstract

Nanobiodevice is a piece of contrivance, equipment, machine, or component, which is created by the overlapping multidisciplinary activities associated with nanotechnology and biotechnology, intended for biological, medical, and clinical purposes. During the past decade, nanobiodevice has progressively begun to focus on the establishment of main four fields of biomedical applications of nanotechnology, including 1) diagnostic devices, 2) molecular imaging, 3) regenerative medicine, and 4) drug delivery systems. In this lecture, I will describe the development of nanobiodevices to analyze biomolecules and cells towards biomedical applications. I developed numerous diagnostic nanodevices based on the single biomolecular separation and detection. These devices are also applicable to fast and low invasive blood marker detection of cancer with pM-fM detection sensitivity. Additionally, I developed new synthetic method of quantum dots (QDs) based on the appropriate cluster confirmation by the ab initio molecular orbital calculation. QDs are applied to the development of nanobiodevice for single cancer cell diagnosis, single molecular epigenetic analysis, *in vivo* imaging for stem cell therapy and theranostic device for cancer diagnosis and therapy.

ナノバイオデバイスによる単一分子や単一細胞計測技術の開発が、バイオ・医療の世界に大きな変革をもたらそうとしている。半導体微細加工技術に基づいたナノバイオデバイスやナノバイオセンサーの出現により、これまでの治療に基づく医療から予防医療への転換や、がんの超早期診断、再生医療、DDS、分子イメージングなどに大きな変革をもたらしてきた。

本講演では、内閣府最先端研究開発プログラムおよび愛知県知の拠点重点研究プロジェクトで進めているナノバイオデバイス開発を目指した、医工連携・産学連携の研究成果として、我々のグループが最近進めてきたナノピラー・ナノウォールを用いたナノデバイス上の電気泳動による



DNA 解析、単一分子計測・

図1 ナノバイオデバイスの研究成果

単一細胞計測に基づくがん転移診断、イムノピラーデバイスによる疾患診断、幹細胞治療の *in vivo* イメージングなどの成果(図1)[1-20]を中心として、ナノバイオデバイスの基礎研究から実用化に向けた研究動向について解説する。

References

- [1] N. Kaji, et al., *Chem. Soc. Rev.*, 39, 948 (2010).
- [2] M. Tabuchi, et al.: *Nature Biotech.*, 22, 337 (2004).
- [3] R. Bakalova, et al.: *Nature Biotech.*, 22, 1360 (2004).
- [4] R. Bakalova, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 9328 (2005).
- [5] R. Jose, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 629 (2006).
- [6] M.R. Mohamadi, et al., *Anal. Chem.*, 79, 3667 (2007).
- [7] L. Mohmoudian et al.: *Anal. Chem.*, 80, 2483(2008).
- [8] T. Tachi, et al., *Lab on a Chip*, 9, 966 (2009).
- [9] Y.S. Park, et al., *ACS Nano.*, 4, 121 (2010).
- [10] H. Yukawa, et al., *Biomaterials*, 31, 4094 (2010).
- [11] M. Ikami, et al., *Lab on a Chip*, 10, 3335 (2010).
- [12] M. F. Serag, et al., *ACS Nano.*, 5, 493, (2011).
- [13] H. Hatakeyama, et al., *Biomaterials*, 32, 4306, (2011).
- [14] J. Wang, et al., *Anal. Chem.*, 83, 3528 (2011).
- [15] K. Kitazoe, et al., *Lab on a Chip*, 11, 3256 (2011).
- [16] H. Hatakeyama, et al., *Mol. Therapy*, 19, 1487 (2011).
- [17] T. Yasui, et al., *Lab on a Chip*, 11, 3356 (2011).
- [18] T. Yasui, et al., *Anal. Chem.*, 83, 6635 (2011).
- [19] T. Yasui, et al., *ACS Nano*, in press (2011).
- [20] K. Hirano, et al., *Nucleic Acids Res.*, in press (2011).

M-3 ミセル動電クロマトグラフィーの開発

○寺部 茂

兵庫県立大学 名誉教授

Development of Micellar Electrokinetic Chromatography

Shigeru TERABE*

Professor Emeritus, University of Hyogo

Abstract

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was shown to be able to separate neutral compounds by capillary electrophoresis (CE) in 1982 by the authors' group. MEKC is a new type of analytical separation method, which utilizes micelles as pseudostationary phases in chromatography. MEKC has several advantages as well as other separation modes of CE but several issues had to be solved for MEKC to be established as a practical analytical separation method. The authors' group was successful in solving most of the issues and MEKC has been widely accepted as one of the separation modes of CE. The outline of the development of MEKC by authors' group is going to be presented.

はじめに

演者らは 1982 年にミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)と名づけた方法を開発した。MEKC はキャピラリー電気泳動(CE)の分離モードの 1 種であるが、中性分子を電気泳動で分離できる方法として広く受け入れられた。分離原理はイオン性ミセルを擬似固定相として用いるクロマトグラフィーの 1 種とも解釈できる。MEKC を高性能分離分析法として確立するために、各種の技法を開発した。本講演では、MEKC 開発の概略を述べる。

MEKC 開発初期

1981 年に Jorgenson らによる CE の論文¹が発表されたと同じ頃中川俊夫博士によりミセルを分離媒体として利用する電気泳動の提言²が発表された。このアイデアは CE によって実現出来ると信じて CE 装置の製作に取りかかり、1982 年 9 月に、後にミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)を名づけた方法³に初めて成功した。MEKC の分離原理を Fig. 1 に模式的に示す。MEKC はそれまでにない新規な分離分析法であったので、その基礎特性の解明と分離分析法としての可能性を詳細に検討した。その結果、MEKC は(1)ミセルと水相との間の分配係数に基づく分離、(2)小分子の分離に優れている、(3)中性分子のみならずイオンの分離にも優れている、(4)広い範囲で分離選択性を変えることが可能、(5)市販の CE 装置に何ら修正を加えることなく実行可能、などの特性を持つことを明らかにできた。

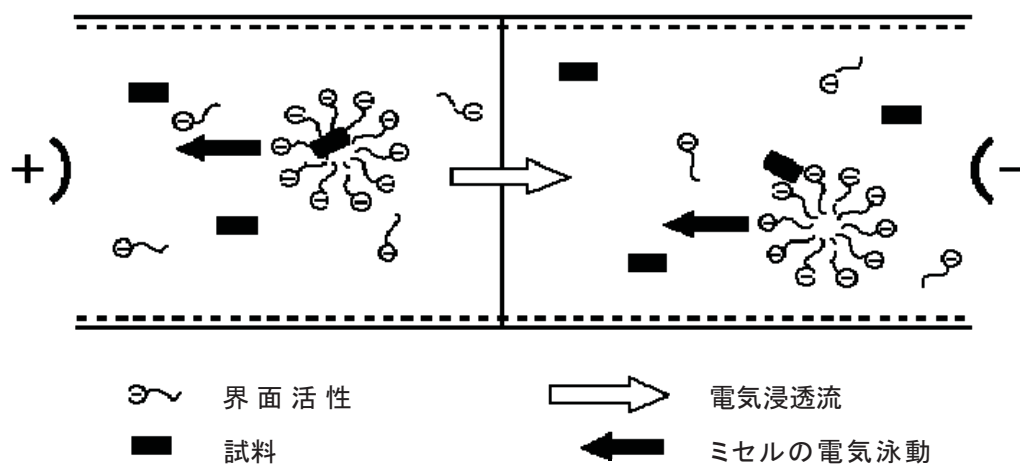


Fig. 1 ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)の分離原理を示す模式図

MEKC の分離分析法としての確立

MEKC を分離分析法としてより使いやすい方法にするための課題として、(1)移動時間の範囲が狭く分離が不十分な場合がある、(2)疎水性の高い化合物はミセルに取り込まれやすく、分離が困難である、(3)界面活性剤の構造と分離選択性の関係が明らかでない、(4)濃度感度が低い、とくに中性化合物の優れたオンライン濃縮法がない、(5)質量分析法計をオンライン検出に利用するのが難しい、などの解決が要求された。(1)と(2)は比較的容易に解決できた。(4)は中性化合物も濃縮可能な方法としてスウィーピング法を開発でき、イオンの濃縮にも有効である。(3)と(5)は演者らのみでは解決できなかったが、(3)についてはかなり解明された。(5)は依然として容易ではないが実行可能な方法が開発された。従って、MEKC は普通のキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)と比べて何ら遜色のない分離分析法として確立されたといえる。

その後

演者は 2006 年に兵庫県立大学を退職して MEKC に関する研究も終了したが、その後他の研究者らにより MEKC に改良が加えられている。しかし、残念なことに CE が普及していない現状では、MEKC の利用も限られている。分離分析法としては、HPLC に比べて利点こそ多いが、劣る点は少ない。CE が普及しない問題点は、CE に詳しい技術者が企業等で少ないことと、市販装置の機種が限定されていることにある。CE を普及させるためには、他の分離分析法よりも優れていることを多数の例で示すことが必要であると思われる。

References

- [1] Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D. *Anal. Chem.* 53 : 298-302, 1981
- [2] 中川俊夫, 日本化学会コロイドおよび界面化学部会ニューズレター, Vol. 6 (No. 3, May 1981), 1.
- [3] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. *Anal. Chem.* 56: 111-113, 1984.

M-4

キャピラリーゾーン電気泳動法 - 高感度化のストラテジーと応用例

○廣川 健
広島大院工

Capillary Zone Electrophoresis – Strategy for High-sensitive Analysis and Applications

Takeshi HIROKAWA

Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

Abstract

With the aim of achieving high-sensitive CZE analysis, several on-line preconcentration methods were discussed in relation to the conductivity of the analyzed samples. The strategy and theoretical backgrounds of the preconcentration methods were brought into focus and their analytical capabilities were demonstrated using some applications.

はじめに

キャピラリー電気泳動法 (CE) は、ゲノム・プロテオーム・メタボローム解析分野で欠くことのない分離分析法であり、これらオミクスを支える基盤技術の一つである。同時にメッキ液に代表される工業関連試料の分析、あるいは環境水等に含まれる微量イオンの分析などにも広く使用されている。CEは絶対感度・分析の迅速性・メンテナンス・ランニングコスト・ローエミッションである事などの点で優れた分析法である一方、幾何学的制約により試料負荷が小さいため、濃度感度の改善が課題であった。Haddadは1999年の論文¹⁾で、CEとイオンクロマトグラフィーのLODを比較し、CEは200ppb、ICは10ppbと20倍の差をつけている。その後、CEの感度向上のため、ハードウェアの改良およびオンライン前濃縮法の適用など多くの研究がなされ、現在では「CEは低濃度感度とは言えない」時代になっている。ここでは、イオン性試料を対象とするキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) にCEを限定し、UV検出器がデフォルトである通常のCE装置を対象に、特にオンライン前濃縮による高感度化、なかでも試料の伝導度と前濃縮法選択の関連に重点を置き、応用例を示して解説する。

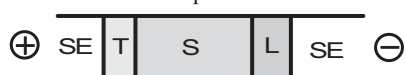
試料溶液の伝導度とオンライン前濃縮法の選択

ハードウェアに依存しない高感度化の基本的ストラテジーは「分離能を損なわずに、可能な限り大量

1. Stacking



2. Transient Isotachopheresis



3. Electrokinetic injection



4. Electrokinetic supercharging



図1 CZE用オンライン前濃縮法: SE, 支持電解液, S, sample cations; L, リーディング電解液; T, ターミナル電解液. SEがLの役割を持つ場合、Lは省略できる。

の試料を分離キャピラリーに導入・前濃縮する」ことである。が、ある試料中の微量イオン成分の高感度分析を行おうとする場合、試料の伝導度 (イオン濃度とイオン移動度(m)に比例) および対象イオンの輸率によって、分析に使用できる前濃縮法は異なる。そのため、伝導度に応じて場合分けが必要となる。従来報告されている代表的なオンライン前濃縮法としては、図1に示したように、①電場増強スタッキング(FASS)、②過渡的等速電気泳動 (tTTP)、③電氣的試料導入 (EKI)、④動電加給前濃縮(EKS)がある (各前濃縮法についてはレビュー参照²⁾)。④は過渡的等速電気泳動法と電氣的試料導入法を組み合わせた試料導入法である³⁾。

これらのうち、①④は伝導度が支持電解液 (SE) のそれより十分低い試料に適用した際、効果的な前濃縮法である。①の FASS の操作は、希薄試料 (S) を落差法や減圧/加圧法でキャピラリー内に導入後、電圧を印加するのみである。試料部分の電位勾配(E)が、SEのそれより高い

ため、試料成分イオンは試料プラグ部の先端まで迅速に泳動し(泳動速度 $v=mE$)、その結果界面で濃縮が起こる。そのため、SEとSの伝導度比が高いほど、効率的なスタッキング濃縮が起こる。しかし、試料プラグが長すぎると、そこで発生した高い電位勾配のため、系全体の電気浸透流が増加し、その結果、カチオン分析では分離ウインドウが狭くなり分離不十分となるほか、試料プラグ部と泳動バッファ一部での電気浸透流のミスマッチが深刻な分離パターンの劣化を引き起こす事がある。このような分離劣化の例を、希土類イオンについて図2aに示した。 μM 程度の希薄な試料の場合、スタッキングのみでは、導入可能な体積はキャピラリー長の数%程度に限られる。200 ppbの試料 (Erについて $1.2 \mu M$)を用いて検出濃度下限を推定したところ、120ppb (Er について720 nM)であった。

④のEKSが低伝導度試料に適している理由は、高い伝導度の原因となる成分(たとえば血清中のNaCl)が存在すると、目的微量成分の輸率を小さくし、導入効率が低くなるためである。一方、低イオン強度の試料では輸率に比例して導入効率が上昇するため、純水中痕跡濃度イオンの分析も可能となる。この際、自動的にターミナルゾーンに相当する部分が形成されるという大きな利点もある

(System-induced terminator)。EKSでは、比較的大量 ($500 \mu L \sim 1 mL$) の試料から長時間の試料導入ができるため、濃度感度は高い。Er についてLOD 0.3ppb \sim 10pptを実現している。ただし、対象イオンについてMobility biasは避けられないため、共存イオンの移動度に注意を要する。

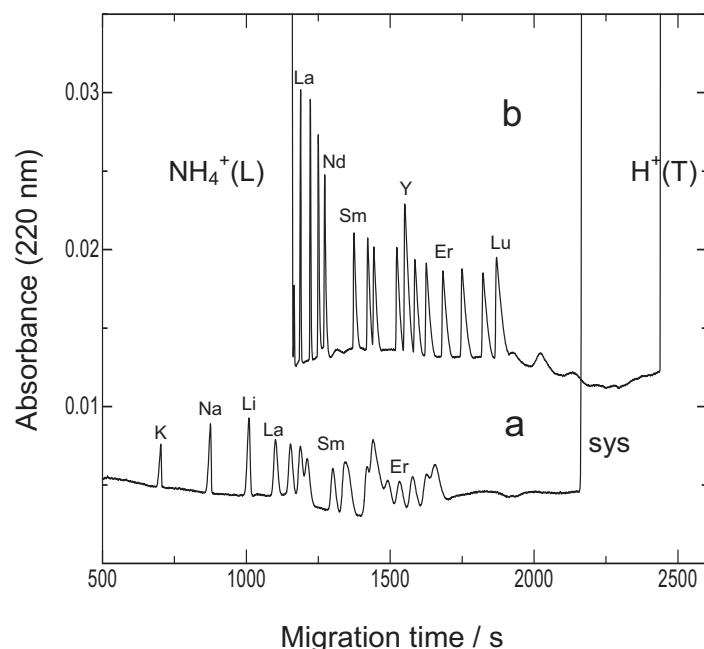


図2 スタッキングおよびtITP-CZEによる18種カチオンの分析: (a) スタッキング, (b) tITP-CZE (Mode I); L, 100 mM NH_4aq , 7.5 mM HIBA, 2.0 mM マロン酸 (pH 4.8, 2-エチル-n-酪酸); T, 1 M HCl; 注入法, 落差法 (25 mm), 試料の推定注入体積 193 nL, 5%; tITP (Mode I) の操作 (i) Lを注入 (800 s), (ii) Sを注入 (900 s), (iii) Tを注入 (80 s) .

③のEKIは伝導度の大小に関わらず試料導入ができ、簡便であるが、上述のようにMobility biasがあること、試料の伝導度がSEより大きい場合、②や④のようなターミナルゾーンがないため、濃縮効果は期待できない。しかし試料の伝導度が低下すると、リーディングがない場合のEKSと等価になり、高い濃縮効果が得られる。

最後に、②のtITPの一例を図2 bに示した。希薄な試料においても、ITPの濃縮効果およびゾーン自己保持効果を利用して単純なスタッキングの欠点を抑制することができる。さらに、tITPはマトリックスにより伝導度が高い場合にも、比較的濃縮効果が得やすい方法である。特に体液試料のように高濃度のNaClを含む場合、試料自体にリーディングイオンが含まれていることになり(組成に基づく過渡的等速電気泳動)、適切なターミナル電解液(T)を設定する事により、高感度分析が可能である。

講演では、以上の濃縮法について、各種応用例を示して報告する。

References

- [1] P. R. Haddad, P. Doble, M. Macka, *J. Chromatogr. A* 856, 145 (1999).
- [2] M.C. Breadmore, J.E. Thabano, M.D.Z. Dawod, A.A Kazarian, J.P. Quirino, R.M. Guijt, *Electrophoresis* 30, 230 (2009).
- [3] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš, *Electrophoresis* 24, 498 (2003).

O-1 LC-Q-TOFMS 及び CE による唾液中の類似麻薬の分離分析

○林 震煌

台湾師範大学化学研究科

Determination of designer drugs in saliva by liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOFMS) and capillary electrophoresis (CE)

Cheng-Huang LIN*

Department of Chemistry, National Taiwan Normal University

Abstract

Optimal conditions for the separation and detection of a mixture of 6 designer drugs (*o*-, *m*-, *p*-chloro- and *o*-, *m*-, *p*-fluoro-amphetamines) in saliva are described. The methodology involves the use of liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOFMS) and capillary electrophoresis (CE). In the former case, the separation for the 6 amphetamines was performed using a gradient elution (A, 0.1% formic acid aqueous solution/pH, 2.5; B, methanol). However, the completed separation of *m*-, and *p*-chloroamphetamines was difficult when a 5C18-MS column was used. In contrast to this, when the CZE/UV method was used, the separation can be completed within 15 min. Meanwhile, the limit of detection can be improved to ~15 ng/mL when CE/LIF method was applied. Saliva samples were obtained by spiking saliva received from volunteers with the 6 designer drugs. After liquid-liquid extraction, the samples were quantitatively analyzed using CE/UV, CE/LIF and LC-Q-TOFMS methods, respectively. Details of the extraction procedures used for the saliva samples and the experimental conditions are described.

はじめに

類似麻薬とは、現存する麻薬(例えばアンフェタミン)の分子構造を組変えることにより、現行法では対処できなくなっている薬物である。不正市場に出回っている多くの類似麻薬に関する標準法は、まだ確立されていないのが現状である。台湾国内でも *m*-クロロアンフェタミンの規制は最近になって始まったばかりである。しかしながら、検体に異性体である *o*-, *m*-, *p*-フッ化アンフェタミン(Mw, 153.10)と *o*-, *p*-クロロアンフェタミン(Mw, 169.07)が混入している場合、それらの分離分析は容易ではない。通常、麻薬の分析では、測定原理の異なるふたつの手法を用いることが求められているため、本研究では、6種のアンフェタミン類似麻薬を添加した唾液をサンプルとして、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法及びキャピラリー電気泳動/吸光-蛍光法による分析について検討した。

実験

LC-Q-TOFMS は、HPLC ポンプ(Waters 1525)及び四重極-飛行時間型質量分析計(Q-TOF; Micromass)で構成した。ナカライテスク社製の逆相液体クロマトグラフィーカラム(Cosmosil 5C18-MS, 5 μm ; 25 cm \times 4.6 mm I.D)を使用した。キャピラリー電気泳動法では、自作のCE/UV、CE/LIF (励起光源：473 nm 半導体レーザー)装置を使用した。

結果と考察

質量分析法を用いた場合、異性体の識別は困難であるが、ベンゼン環上の置換基の種類(フッ素,塩素)と位置(*o*-, *m*-, *p*-)によって、親分子 $[\text{M-H}]^+$ とフラグメントイオンとのイオン強度比が変化するため、識別が可能であった。そのため、Electrospray-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (ELDI-MS)などの方法でも、分離せずに錠剤中の類似麻薬をスクリーニングすることは容易であった。また、誤った判断を避けるために、市販のLabVIEWプログラムを用いたマススペクトルの認識ソフトウェアを試作した。これにより、分子の同定結果を数値化することができた。しかしながら、唾液のような検体に含まれる類似麻薬の分析では分離が不可欠である。そこで、LC-Q-TOFMS法を用いて分離分析の最適化を行ったが、5C18-MSカラムを用いた場合では、*m*-と*p*-クロロアンフェタミンの完全な分離は困難であることがわかった(Fig. 1)。これに対して、CZE/UV法では、内径 50 μm のキャピラリー(全長 50 cm, 有効距離 41 cm)を用い、印加電圧を 15 kVとし、酸性のバーファー(pH, 3.1; acetonitrile/methanol/water = 12.5/17.5/30; NaH_2PO_4 , 50 mM/ β -CD, 7.5 mM/ Na_2HPO_4 , 100 mM)を用いることで、15分程度で6種のアンフェタミン類似麻薬を完全に分離することができた(Fig. 2)。法的にアンフェタミンの規制値は 0.5 ppmであるため、CE/LIF法を使った方が有利である。本研究ではFITC (fluorescein isothiocyanate)を用いて蛍光ラベル化を行った。これにより、検出限界は~15 ppbまで向上した。また、分析時間を短縮するために、マイクロ波オーブンでラベル化を加速させた結果、十数時間(通常の一晩放置)の反応時間を 5分までに短縮することができた。

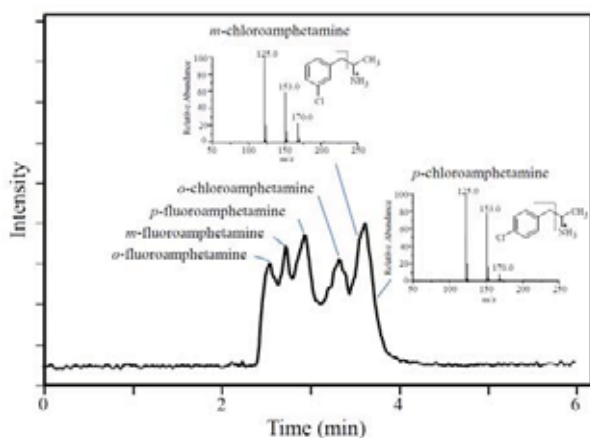


Fig.1 LC-Q-TOFMS による類似麻薬の分離

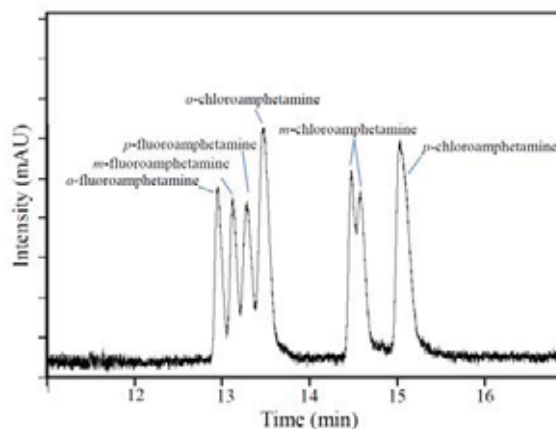


Fig.2 CZE/UV による類似麻薬の分離

O-2

蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動システムの開発

○松本浩幸

浜松ホトニクス株式会社 中央研究所

Development of Capillary Isoelectric Focusing System with Fluorescence Detection

Hiroyuki MATSUMOTO

Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.

The detection sensitivity of capillary isoelectric focusing (cIEF) with laser-induced fluorescence (LIF) detection reaches to a level of several pM range with a relatively simple on-column detector. The on-column single point detector requires a mobilization process which lengthens the analysis time and sometimes compromises reproducibility. To solve these problems, two kinds of LIF detection systems for microchip-based IEF instead of capillary format were developed: fluorescence-imaging detection and scanning fluorescence detection. Focusing process and dynamics of fluorescence-labeled peptides were observed continuously by using fluorescence-imaging detection system. On the other hand, high speed of focusing and high detection sensitivity were achieved by using scanning fluorescence detection system. These systems should expand the utility of analysis by cIEF-LIF detection.

はじめに

レーザー励起蛍光検出法とキャピラリー等電点電気泳動の組合せ (LIF-cIEF) は等電点への焦点化による濃縮効果により、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。一方、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り、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。キャピラリーに代わり、基板中に微小流路を設けたマイクロチップを分離と検出の場を利用することで pH 勾配全体を検出することが可能となり、これらの問題が解決できると期待される。そこで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システム (Imaging LIF-cIEF システム) と、流路をレーザー光で走査しながら蛍光検出を行うシステム (Scanning LIF-cIEF システム) を構築した。本発表ではこれらのシステムの概要と評価結果について報告する。

実験

テトラメチルローダミンを標識した合成ペプチド (N 末端の α -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標識^{1,2)}) およびタンパク質 (大腸菌で発現した抗ヒト α 1-アンチトリプシン (α 1-AT) 組換え Fab' の Fd 鎖 C 末端付近の Cys のチオール基に標識³⁾) を評価用試料として、またシステムの光源として半導体励起 YAG レーザー (532nm) を用いた。

(Imaging LIF-cIEF システム)

長さ 60mm、一辺が 100 μ 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。流路内壁は直鎖状ポリアクリルアミドで被覆した⁴⁾。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 H₃PO₄（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。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.1(A)）にて焦点化の過程を観察した。

（Scanning LIF-cIEF システム）

縦54mm、横90mm、厚さ1mmの合成石英基板中に長さ30mm、幅100 μ m、深さ25 μ mの微小流路をフォトリソグラフィとエッチング技術を用いて5mm間隔で3本作製した。流路の両端に直径2mm、深さ1mmの円柱状の貫通孔を形成後、厚さ180 μ mの熔融石英製カバープレートを熱融着した。作製した微小流路内壁はポリジメチルアクリルアミド（終濃度4%）でコートした⁵⁾。0.1%Tween 20、0.3% TEMED、0.1% AcOH、1mM NaH₂PO₄、0.1%メチルセルロース、および40倍希釈 Pharmalyte 3-10を含む試料溶液を微小流路に充填後、微小流路の両端の貫通孔を20mM H₃PO₄（陽極液）および20mM NaOH（陰極液）でそれぞれ満たし、貫通孔に電極を挿入して600V/cmの電圧で焦点化を行うという一連の操作を、溶液分注ロボットを用いて完全に自動化した（Fig.1(B)）。測定は微小流路に沿って検出ユニットを走査（2秒/流路）して収束した試料からの蛍光を検出した。

結果と考察

Imaging LIF-cIEF システムにおいて蛍光標識ペプチドの焦点化の過程を観察した結果、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。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。Scanning LIF-cIEF システムではマイクロチップへの試料溶液や電極液の分注等の手作業による操作を完全に自動化した。蛍光標識ペプチドを用いた評価実験およびイムノプローブ等電点電気泳動法による測定結果から、試料は電圧印荷後90秒以内に収束しており、pM以下の分離検出が可能であった。また、複合体は抗原である α 1-ATの電荷的不均一性を反映していた。構築したシステムは等電点電気泳動法を用いた分析の分野における有効なツールとして期待される。

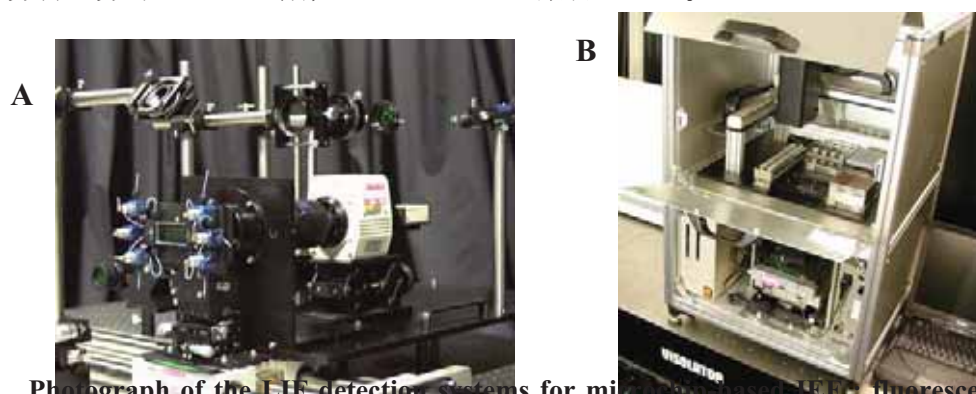


Fig.1 Photograph of the LIF detection systems for microchip LIF detection (A) and scanning fluorescence detection (B).

References

- [1] Shimura, K., Matsumoto, H., and Kasai, K., *Electrophoresis*, 19 (1998) 2296-2300
- [2] Shimura, K., Kamiya, K., Matsumoto, H., Kasai, K., *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1046-1053
- [3] Shimura, K., et. al., *Electrophoresis*, 23 (2002) 909-917
- [4] Hjerten, S., *J. Chromatogr.* 347 (1985) 191-198
- [5] Wan, H., Ohoman, M., Blomberg, L., *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 59-70

O-3

マイクロチップを用いたキャピラリー電気泳動の臨床応用

○黒澤竜雄

和光純薬工業株式会社 臨床検査薬研究所

Clinical Testing Application of Microfluidic Chips Electrophoresis

Tatsuo KUROSAWA

Diagnostics research Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Abstract

We have developed a fully automated microfluidic immunoassay system, μ TASWako i30, by employing disposable plastic microfluidic chips. Implementation of the on-chip immunoassay was achieved using μ TASWako i30 that will prepare the chip and run the assay with a total assay time of <9 minutes. Reagent/sample mixing, concentration, and reaction in microfluidic channels occurs by the Electrokinetic Analyte Transport Assay (EATA) technique¹⁻⁴, enabling the integration of all assay steps on-chip.

Procalcitonin (PCT) concentration in serum or plasma has been used as a marker for the diagnosis and therapeutic monitoring of sepsis, severe sepsis, and septic shock of bacterial origin. Rapid determination of PCT concentration is beneficial for early diagnosis of sepsis, resulting in better patient outcome.

By using μ TASWako i30, PCT determination became available within 9 min. The method showed good performance in terms of sensitivity (LoD= 0.02 ng/mL), and reproducibility (CV: within 4.0%). We believe this new PCT assay contributes to the better outcome of septic patients.

はじめに

マイクロチップ電気泳動は、迅速、高分離能を備えた測定方法として研究されている。特に、たんぱく質、DNA の分析に期待がもたれている。我々は、2009年に数センチ角のプラスチックチップの中で免疫反応とキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) を行う新規のマイクロチップ電気泳動蛍光免疫測定システム ミュータスワコー i30 を構築した。本システムは、等速電気泳動 (ITP) を用いた electrokinetic analyte transport assay (EATA) technique を使用してサンプルの濃縮、免疫反応を行うシステムである。本システムは、マイクロチップへの試薬とサンプルの分注、EATA 法による免疫反応と検体濃縮、ゾーン電気泳動による分離分析及び結果報告までを9分で行う高感度迅速システムである¹⁻⁴。

我々は本法の迅速性を活かすために、細菌感染症の診断に着目した。細菌感染症の診断では、タンパク質マーカー測定や、感染細菌の同定のために体液を検体として DNA 分析を行う場合がある。まず、我々は細菌等の感染により起こる敗血症のマーカーであるプロカルシトニン (PCT) 測定試薬の開発を行った。PCT は、細菌性敗血症の診断とともに、治療の状態を示すマーカーと言われている。我々は、ミュータスワコーi30 で PCT を測定するために試薬組成の検証を行った。結果、9分という迅速での PCT 測定を可能とした。

実験

PCT 測定試薬の開発には、ミュータスワコーi30 を用いて、処方検討を行い、以下の試薬組成で PCT 測定を実施した。leading buffer (LB) : 0.4% (w/w) poly-2-dimethylaminoethyl methacrylate (pDMA), 3% (w/w) glycerol, 42 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM NaCl, 0.01% bovine serum albumin (BSA). trailing buffer (TB) : 0.8% (w/w) pDMA, 3% glycerol (w/w), 77mM Tris, 128mM HEPES, 0.01% BSA. sample buffer (SB) : 1.0% (w/w) pDMA, 3% glycerol (w/w), 77 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM NaCl, 0.1% BSA and 9 mM MES. stacking buffer (ST) : 0.8% (w/w) pDMA, 3% (w/w) glycerol, 77 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 0.01% BSA。測定に使用する抗体には、Hilyte Fluor 647 dye (AnaSpec) を標識した抗カタカルシンモノクローナル抗体 (BRAHMS GmbH)、245bp DNA を標識した抗カルシトニンモノクローナル抗体 (BRAHMS GmbH) を用いた。測定方法の詳細については、論文で述べている¹⁻⁴。

結果と考察

ミュータスワコーi30 を用い、PCT (分子量 13,000) 0, 2, 20ng/ml を測定したところ、Fig.1 の様な免疫複合体のピークが得られ、本法で測定可能なことが確認できた。最低検出感度は、0.02ng/mL と高感度であった。また、0.15ng/mL の再現性は、CV4%と良好であった。我々は、敗血症診断のために迅速性が要求される PCT をわずか9分で迅速高感度に測定することを可能とした。本試薬の開発は、臨床検査において非常に重要と考えられる。

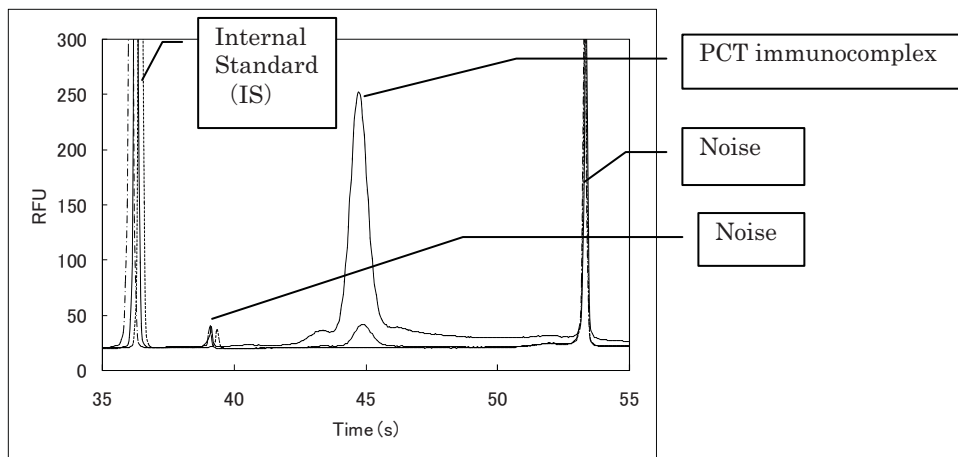


Fig.1 Electropherogram of PCT immunocomplex.

References

- [1] Kagebayashi, C., *et al Anal. Biochem.*388:306-311, 2009
- [2] Kawabata, T., *et al Electrophoresis* 29:1399-1406, 2008
- [3] Park, C., *et al. Anal. Chem.*80:808-814, 2008
- [4] 黒澤竜雄 *細胞* 43(2):26(72)-29(75), 2011

O-4

キャピラリーゾーン電気泳動法による速度論反応共存下での迅速な平衡反応の解析

○高柳俊夫

岡山大学大学院自然科学研究科

Analysis of Fast Equilibria by Capillary Zone Electrophoresis in Concurrence of Slow Kinetic Reaction

Toshio TAKAYANAGI*

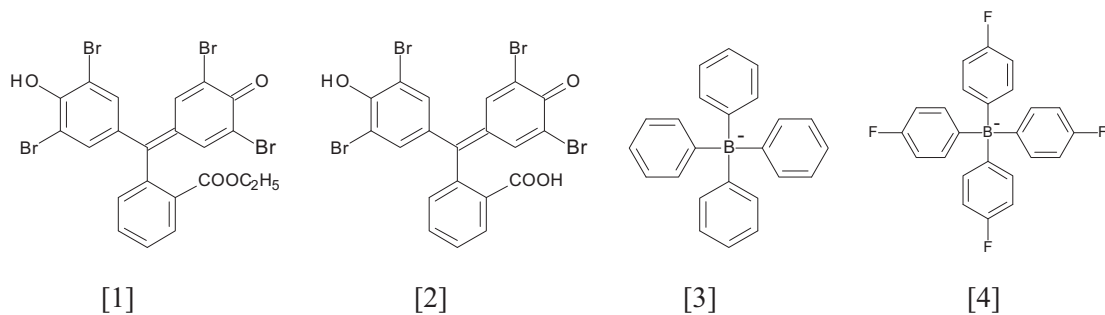
Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

Abstract

Capillary zone electrophoresis is a useful tool to analyze physicochemical equilibria by using electrophoretic mobility. Observed electrophoretic mobility reflects the weighted average of equilibrium species of interest. Compared with spectrophotometric techniques, advantage on using electrophoretic mobility is that coexisting substances is allowed to exist on the basis of the separation analysis, even when the target compound gradually changes and the amount of the compound decreases, because the equilibrium of interest is not affected with such substances. In this study, acid dissociation equilibria of phenolphthalein derivatives and ion association equilibrium of tetraphenylborate ions are demonstrated.

はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) により観測される電気泳動移動度は、溶液内に存在する物質の物理化学的性質を反映しており、その物質がある種の迅速な平衡反応にある場合には、平衡反応に関与する化学種の加重平均の移動度として観測される。CZE が分離分析であることから、共存物質は分離されるので対象とする平衡解析に影響を受けないことは勿論のこと、非常に遅い反応速度を有する場合には、エレクトロフェログラム上に異なる泳動時間を示す別の物質として観測される。また、測定時間と同程度の反応速度を有する場合には、平衡反応に関与する主ピークのシグナル強度は減少しても観測される電気泳動移動度は影響を受けない。演者らは、この CZE による平衡反応解析の特徴を活用して、アルカリ溶液中で徐々に分解するフェノールフタレインの迅速な酸解離平衡を、分解生成物の影響を受けずに解析できることを報告した¹。本発表では、この手法を用いてフェノールフタレインの類縁体 [1, 2] の酸解離平衡の解析、テトラフェニルホウ酸イオン [3, 4] のイオン会合反応解析に適用した事例について報告する。



実験

キャピラリー電気泳動装置として Agilent ^{3D}CE を使用し、適度な検出時間内で検出できるようにキャピラリー長、印加電圧等を調整した。なお、測定条件が測定対象物質の電気泳動移動度に影響しないことを、泳動液の電気抵抗、基準物質の電気泳動移動度から確認した。酸解離平衡の解析では、各種 pH 緩衝液により pH を調整した泳動液を用い、フェノールフタレイン誘導体を試料液に用いて電気泳動移動度を測定した。イオン会合平衡の解析では、pH を調整した泳動液にアルカリ金属塩、第四級アンモニウム塩を添加して電気泳動移動度を測定した。電気泳動移動度の変化を解析し、酸解離定数、イオン会合定数を決定した。

結果と考察

フェノールフタレイン誘導体の酸解離平衡の解析

テトラブロモフェノールフタレインエチルエステル [1, TBPE] は、可視部に光吸収を示す一価の陰イオン性イオン会合試薬として開発された試薬である。TBPE は酸性でエチルエステルの加水分解が生じるため、従来、酸解離定数の決定は困難であった。本研究では、泳動液の pH 低下に伴い、TBPE は分解してシグナルがテーリングしたが、主ピークの泳動時間/電気泳動移動度から酸解離定数を決定することができた。また、テトラブロモフェノールフタレイン [4, TBPP] では、酸性側での分解が顕著だが 2 段階の酸解離定数を決定することができた。

テトラフェニルホウ酸イオンの酸解離平衡の解析

テトラフェニルホウ酸イオン [3, TPB⁻] は、K⁺をはじめとする陽イオンのイオン対沈殿試薬、イオン対抽出試薬として開発された一連の物質である。陰イオンの TPB⁻、F₄TPB⁻ [4] に対して、対イオンとして Li⁺、Na⁺を用いた場合には電気泳動移動度にほとんど変化が見られず、水溶液中ではイオン会合性が弱いことが示された。K⁺、Rb⁺、Cs⁺とサイズの大きなアルカリ金属イオンで電気泳動移動度が低下したが、イオン会合に伴って TPB⁻、F₄TPB⁻のシグナルは減少した。分解を伴うがイオン会合定数を決定することができた。第四級アンモニウムイオンを用いた場合に、シグナルの減少は顕著であった。

References

[1] T. Takayanagi and S. Motomizu, *Chem. Lett.*, **2001**, 14.

O-5

キャピラリー電気泳動分離に基づく 天然高分子のキャラクタリゼーション法の開発

○高橋 透

福井大学大学院工学研究科

Development of the Characterization Methods for Natural Polymers Based on Capillary Electrophoretic Separation Techniques

Toru TAKAHASHI*

Graduate School of Engineering, University of Fukui

Abstract

Two characterization methods taking advantage of the separation efficiency of CE for natural polymers, DNA, and humic substances, were proposed. Initially a novel multi-target SNP detection method based on the CE separation technique for one-base substituted ssDNA utilizing the difference of the basicity of individual base was developed. The proposed method was successfully applied for the detection of some known SNPs. Secondly a powerful separation technique for humic substances dynamic coating-non-gel CE was proposed. The rapid and effective separation of water-soluble humic substances was achieved employing a phosphate electrophoretic buffer solution containing polyethylene glycol, and hydroxyethyl cellulose. The method was also successfully applied to the studies of the interaction of humic substances with other chemicals, such as the complexation with metal ions.

はじめに

従来、キャピラリー電気泳動 (CE) の分離手段としての側面だけが注目されてきたが、CE の極めて高い分離能を一つの“機能”と捉えれば、これを活かしたこれまでにない新たな“計測”システムの構築が可能である。例えば、溶質間の相互分離の達成は、CE によって溶質間の性質の差異を“識別”でき、これを泳動時間の差として検出できることを意味している。本講演では、上述のようなアイデアに基づいて演者らが開発した“計測”システムの例として、CE の分離機能を活用した天然高分子のキャラクタリゼーション法について述べる。

一塩基変異一本鎖 DNA の CE 分離法に基づくマルチターゲット SNP 検出法¹

既存の一塩基多型 (SNP) 検出法のほとんどは、ターゲットに対して相補的な配列を持つ専用のプローブ DNA を準備し、これとのハイブリダイズの有無によって SNP を検出する。それに対し、我々は、キャピラリー電気泳動 (CE) による一塩基変異一本鎖 DNA の精密分離法を基盤技術とする新規なマルチターゲット SNP 検出システムを着想した。

核酸塩基のプロトン解離特性の差異を利用する一塩基変異一本鎖 DNA の CE 分離法を独自に考案した。12 塩基長的一本鎖 DNA については、その 12 (4 X 3) 種類の可能なすべての変異パターンで置換した一本鎖 DNA との混合試料の一斉分離が可能であったが、60 塩基長程度の一本鎖 DNA については相互分離が達成できない変異パターンが存在することが判った。

しかし、ターゲット鎖の変異パターンが CE 分離の難しいものであった場合、それらの相補鎖における変異パターンは必ず CE 分離可能な変異パターンとなることを見出した。そこで、ターゲット鎖だけでなくそれらの相補鎖を同時に CE 分離し、得られた CE 電気泳動図パターン（ピークの数）によって SNP の有無の判定を行うという SNP 判定法を新たに考案した。すなわち、SNP の疑われる DNA 断片（二本鎖）試料に正常な配列を持つ DNA 断片（二本鎖）を参照として添加して CE 分離を行うと、変異の存在しない場合は試料中には計 2 種類の一本鎖 DNA しか存在しないので電気泳動図には 2 本のピークだけが現れる。一方、変異が存在する場合、試料中には計 4 種類の一本鎖 DNA が存在することになり、これを上記の CE 系で分離すると電気泳動図上には 3 ないしは 4 本のピークが現れる。このように、CE の電気泳動図パターン（ピークの本数）という明確な情報に基づいて SNP の有無の判定を行うため、本法では原理的に誤判定のリスクがない。

ダイナミックコーティング-非ゲル CE 分離法によるフミン物質のキャラクタリゼーション

フミン物質とは、動植物の遺骸が脱水や分解等の物理的・化学的变化を受け、残った比較的安定な有機物のうち、明確な化合物として識別されない物質の総称であり、地球上のすべての表層環境水中に存在する。我々を取りまく水循環系におけるフミン物質の動態変化を明らかにすることは、あらゆる意味において我々人間の生活環境の質的向上を図る上で極めて重要であるが、その詳細は未だに明らかにされていない。フミン物質のキャラクタリゼーションを困難にしている要因は、それが数百～数十万という広範な分子量分布と極めて複雑な構造を有する不定形高分子であるところにある。そこで我々は、CE によってフミン物質の精密分離を行い、そのフェログラムパターンの変化から環境水中におけるフミン物質の動態変化を読み取ることを着想した²。

フミン物質の精密分離のための分離条件の検討を行い、ヒドロキシエチルセルロースおよびポリエチレングリコールを含む泳動緩衝溶液を、キャピラリー内壁のダイナミックコーティングとフミン物質の分離メディアの双方に用いる非ゲル CE 法を確立した。このとき、ポリアクリルアミドにより内壁を化学修飾したキャピラリーを用いた場合と全く同じフェログラムが得られ、フミン物質の高分子量成分であるフミン酸を 5 分以内に少なくとも 4 つのフラクションに分離することに成功した。この手法を用いて由来の異なるフミン物質の分離を行ったところ、それぞれ異なったフェログラムパターンが得られた。さらに、この手法を用いてフミン物質と金属イオンや難溶性有機化合物との相互作用を検討したところ、これらの共存物質の存在によりフェログラムパターンが明瞭に変化することを明らかにした。また、最近、金属錯体の解離反応速度解析の手法であるキャピラリー電気泳動反応器³に本法を適用し、Fe(III)-フルボ酸錯体の解離反応速度定数を得ることに成功した。

References

- [1] 櫻井, 他, 第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集 P-1S (2009).
- [2] Takahashi, T., *et al. Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 761-766(2009).
- [3] Iki, N., *et al. Anal. Chem.*, 72, 4812-4820(2000).

O-6 シースレス CE-MS 法による高感度測定法の開発

○平山明由, 曾我朋義
慶應義塾大学先端生命科学研究所

Development of a highly sensitive sheathless CE-MS method

Akiyoshi HIRAYAMA*, Tomoyoshi SOGA

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Abstract

Since capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) is a powerful tool for the comprehensive analysis of charged compounds, it is widely used in metabolomics profiling. In CE-MS, although sheath flow interface is commonly used, it loses much sensitivity due to dilution of analytes with the sheath liquid.

In this presentation, we evaluate the performance of the High Sensitivity Porous Sprayer (HSPS), a novel sheathless CE-MS interface developed by Beckman Coulter, Inc., and also explore the possibility of applying it for metabolome analysis.

はじめに

キャピラリー電気泳動-質量分析法(CE-MS)はイオン性物質の一斉分離に適しているため、近年メタボロミクスの分野で広く利用されている。通常、CE-MSにおけるイオン源としてはシース液を用いるエレクトロスプレー(ESI)法が一般的であるが、この方法ではシース液によりサンプルが希釈され、結果として検出感度が低下する問題があった。

この問題の解決策として、シース液を使用しない、いわゆるシースレス ESI 法が開発されてきたが、インターフェイスの作成過程が複雑な場合や、堅牢性、汎用性の面で実用的ではないものも多かった^{1,2)}。

今回演者らは、ベックマン・コールター(株)が開発した High Sensitivity Porous Sprayer (HSPS)を用いて、シースレス CE-MS 法のメタボローム測定への適用可能性について検討したので報告する。

実験

キャピラリー電気泳動装置(CE)はベックマン・コールター社の PA 800 plus、飛行時間型質量分析計(TOFMS)はアジレントテクノロジー社の 6220 TOF LC/MS を用いて行った。キャピラリーはベックマン・コールター社の HSPS を使い、泳動バッファには、10%(v/v)酢酸溶液(pH 2.2)を用いた。

結果及び考察

シーレス CE-MS 法を、演者らが通常メタボローム測定に用いている標準溶液に適用した結果を図 1 に示す。連続 10 回測定における面積値の相対標準偏差(RSD)はほぼ全ての物質において 10%以下であり、連続測定においても安定して使用できることが確認された。検出限界については、平均すると約 4.5 倍の高感度化が達成されたが、アミノ酸に関してはシーフロー方式と比べてほぼ同等という結果になった。この原因は大部分のアミノ酸が検出される $m/z < 200$ のレンジに泳動バッファ由来の多数のバックグラウンドピークが観測され、いくつかのアミノ酸に関してはこのバックグラウンド上に検出されるため、結果として感度の低下を招いたものと考えられる。最後に、本法を尿サンプルに適用したところ、従来法に比べて約 9 倍のピークを検出することができた。このことから、シーレス CE-MS 法はターゲットを絞らないメタボローム測定に特に有効である可能性が示唆された。

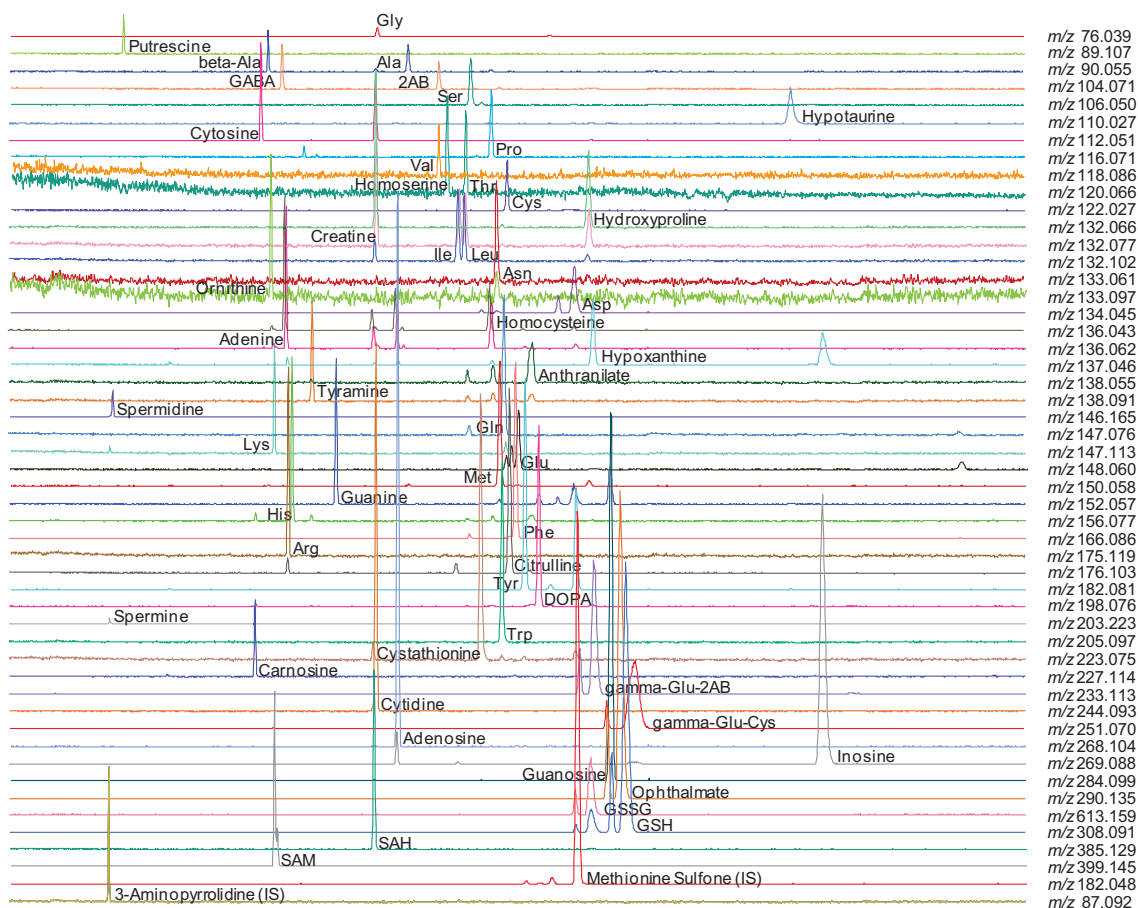


図 1 シーレス CE-MS 法による陽イオン性代謝物標準溶液の測定結果 (各 10 μ M)

References

- [1] A.D. Zamfir et al., *J. Sep. Sci.* **29** 414 (2006).
- [2] P. Cao, M. Moini, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8** 561 (1997).

O-7

キャピラリー電気泳動法による製薬支援、生物製剤・カウンターイオン・光学異性体への応用

○新井悦郎

ベックマン・コールター株式会社

ライフサイエンスアプリケーション&マーケティング統括部門

Capillary Electrophoresis Applications of mAbs for Clinical Use, Counter Ions and Enantiomers to Support Pharmaceutical Development and Quality Control

Etsuo ARAI*

Beckman Coulter K.K.

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is one of the best solutions to analyze and test ionic and/or highly polar molecules, and widely used in pharmaceutical research, development and quality control of the products.

The best example is the analyses and tests of antibodies (mAbs) for clinical use. Various CE separation modes involving capillary zone electrophoresis (CZE), capillary gel electrophoresis (CGE) and capillary isoelectric focusing (cIEF) are used to check the heterogeneities of the mAbs as glycoprotein. Recently, because of that revolutionary advance, CE-MS is expected as the powerful and helpful candidate to analyze conformation details of mAbs on the research and development stage.

Seeing CE applications for small molecules, the counter ions of the synthesized drugs are better matching target of CE technology. The analysis of enantiomers, even the targets are not ionic, is also covered by CE with charged chiral selectors solved in electrophoresis buffers.

These pharmaceutical applications will be discussed with the examples.

概略

キャピラリー電気泳動 (CE) 法は高分子から低分子までのイオン性・極性物質の分離分析法として適しており、医薬品の探索・開発や品質管理においてもこれら物質の分析・試験法として応用され、その領域は拡大しつつある。

現在最も確立されているのは、抗体医薬品の多様性試験としての応用であり、その薬効に密接に関連する糖鎖の有無を含めての評価試験 (Fig. 1) が CGE 法により行われている。CGE 法はまた、付随する糖鎖の詳細なプロファイリングにも有効である。さらに cIEF 法や CZE 法は糖鎖・その他の翻訳後修飾に基づく等電点における多様性評価に活用されている。CE 法の質量分析装置への接続も近年目覚しく発展しており、シーズ液無しでの CESI-MS は生物製剤開発研究への応用が期待されている。

一方で低分子イオン・化合物への応用も充実しつつある。合成医薬品製剤のカウンターイオン分析 (Fig. 2) や、イオン性キラルセレクトアを用いてのエナンチオマ解析が好例である。前者は、試料調整時に必要に応じて加えられる有機溶媒の影響を受けにくく、実用的である。これらの応用例について、背景と事例を提示する。

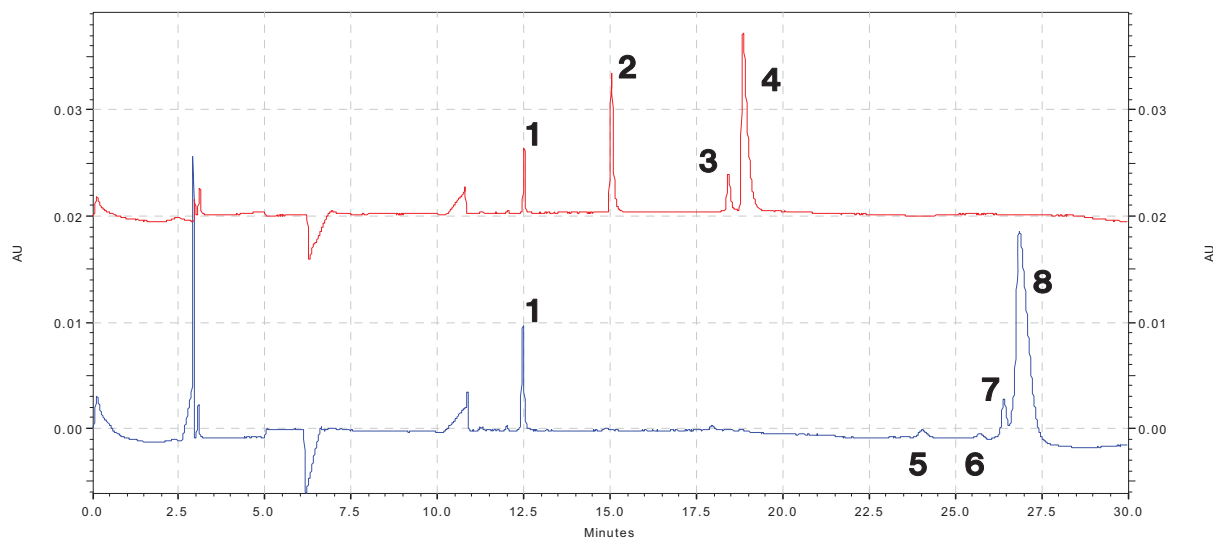


Fig.1
Electropherograms of both reduced (upper) and non-reduced (lower) recombinant monoclonal antibody IgG by capillary SDS gel electrophoresis. Peak 1: internal standard (10 kd); 2: light chain (L); 3: non-glycosylated heavy chain; 4: heavy chain (H); 5: 2 heavy chains (2H); 6: 2 heavy chains and 1 light chain (2H1L); 7: non-glycosylated IgG; 8: IgG.

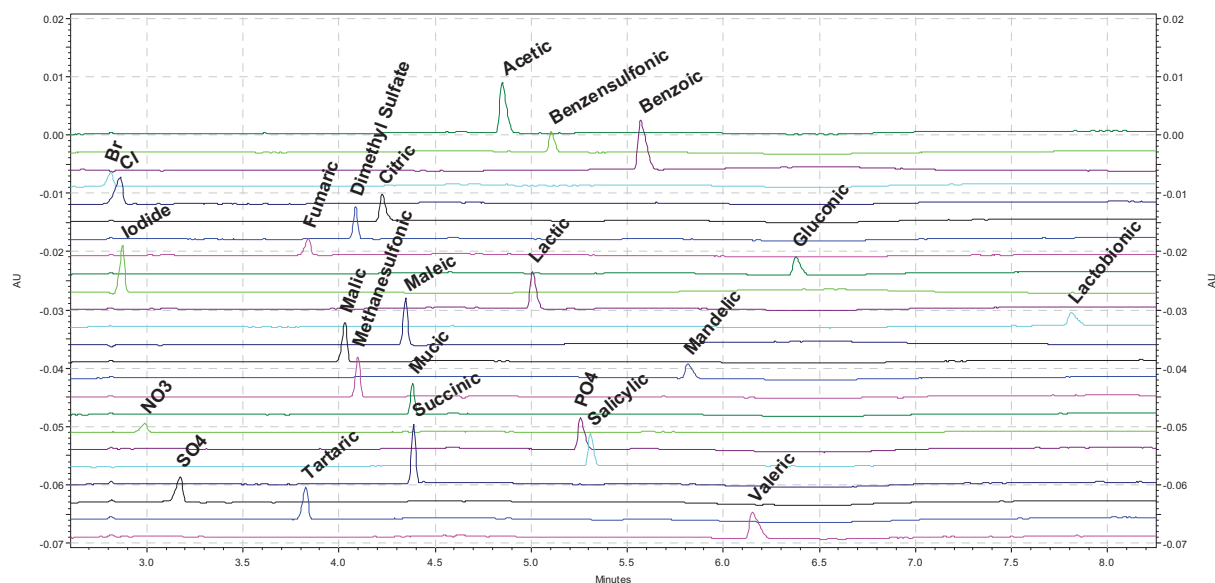


Fig.2
Electropherograms of small anions which are used as counter ions of synthesized medical drugs. Various inorganic and organic anions were analyzed by same condition with indirect detection.

O-8

キャピラリー電気泳動法のバイオ/抗体医薬品分析への応用 - 特性解析から品質試験まで -

○前田由貴子, 岩田美紀, 表由佳子, 疋田昌義, 岡嶋孝太郎, 日根智恵美,
清水将年, 中山智加男
株式会社住化分析センター

Application of Capillary Electrophoresis for Biologics Analysis - from Characterization to Specification Test -

Yukiko MAEDA*, Miki IWATA, Yukako OMOTE, Masayoshi HIKITA, Kotaro OKAJIMA,
Chiemi HINE, Masatoshi SHIMIZU, Chikao NAKAYAMA
Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.

Abstract

An inherent degree of structural heterogeneity occurs in biologics due to the biosynthetic processes to produce them and the molecular characteristics. Because the safety and efficacy of the product are guaranteed by ensuring the consistency of the quality, test procedures to demonstrate the degree and the profile of the heterogeneity of biologics are need to be selected. Capillary electrophoresis that is harmonized with Japanese Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia and the U.S. Pharmacopoeia is expected as one of the useful test procedures to demonstrate them. In this study, we examined the utility of capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis for characterizing glycoforms as specification tests for biologics (two types of recombinant human erythropoietins and one antibody pharmaceutical (Adalimumab)). Consequently, we indicated the usefulness of these analytical techniques as specification tests 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）は、製造に組換え技術や細胞培養技術を応用した生合成過程が利用されること、また、分子量の大きさや翻訳後修飾に由来する構造上の複雑さのため、本質的に分子構造不均一なものが産生する可能性がある。加えて、従来の低分子医薬品に比べて環境の変化に対して不安定なため分解物や凝集体が生成したり、製造や精製工程で使用する材料由来の不純物が混入する可能性もある（Fig.1）。

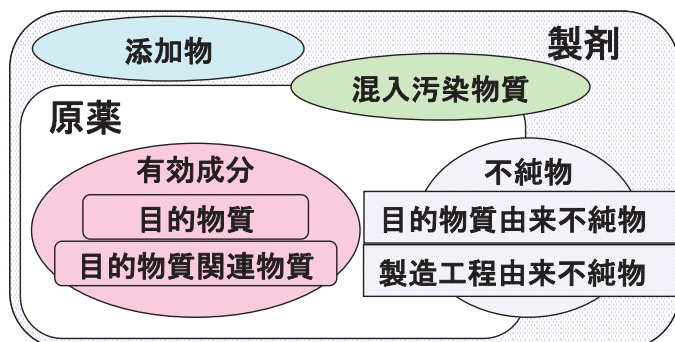


Fig.1 バイオ医薬品の構成成分

医薬品の安全性および有効性は、品質の恒常性を確保することで担保されるため、このようなバイオ医薬品の不均一性の程度やプロファイルが確認できる試験方法を、製品の種類や特性と分析系の特徴を最大限に考慮して選択しなければならない^[1]。

キャピラリー電気泳動法は日本薬局方・米国薬局方・欧州薬局方の3極で調和された試験法であり、主にバイオ医薬品の物理化学的性質を明らかにするために用いられている。我々は、バイオ医薬品の品質評価試験としてのキャピラリー電気泳動法のデモンストレーション試験を実施し、その有用性について検討した。

実験

抗体製剤（Adalimumab）のキャピラリー等電点電気泳動およびエリスロポエチン製剤、抗体製剤（Adalimumab）のキャピラリーゾーン電気泳動によるグライコフォーム分析のデモンストレーション試験を実施した。抗体製剤のキャピラリー等電点電気泳動は、Agilent Technical Note^[2]を参考にして実施した。エリスロポエチン製剤のグライコフォーム分析は、試料を脱塩後、欧州薬局方^[3]に準拠した方法により分析した。抗体製剤のグライコフォーム分析は、試料を還元後、前田らの方法^[4]に準拠して分析し、本法については妥当性の検証（分析法バリデーション）も行った。

結果と考察

等電点電気泳動では、pI 7.2～9.6 の間に抗体製剤のピークを再現よく確認でき、等電点を推定することができた。グライコフォーム分析では、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、文献情報^[5]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^[4]と同様に、糖鎖付加の不均一性を検出することができた。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。今回我々が検討した試験項目でも、バイオ医薬品の品質評価試験法への適用可能性が確認できた。今後、更なるノウハウの蓄積、技術の普及により、キャピラリー電気泳動法がバイオ医薬品の品質評価試験法として広く活用されることが期待される。

References

- [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] Agilent Technologies, Technical Note, 5988-0974EN
- [3] 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).
- [4] 前田瑛起ら, 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).
- [5] F.Benavente *et al.*, *Electrophoresis*, **27**, 4008-4015 (2006).

O-9

CE-TOFMS によるうつ病血液マーカー開発

○大橋由明¹、篠田幸作¹、川村則行²

¹ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

²外苑メンタルクリニック

Development of a Novel Biomarker for Depression by CE-TOFMS

Yoshiaki OHASHI*¹, Kosaku SHINODA¹, and Noriyuki KAWAMURA²

¹*Human Metabolome Technologies, Inc.*

²*Gaien Mental Clinic*

Abstract

Diagnosis of psychiatric disorders is still based solely on oral interview. Molecular markers which could improve the current classification of psychiatry disorders and stratify patients on a molecular biological basis into more homogeneous subgroups, are needed. In order to identify novel markers for major depression, we have applied a comprehensive profiling of metabolites using plasma samples. **Methods:** Plasma levels of 538 metabolites were assayed by high-throughput CE-TOFMS and statistically compared between 34 subjects with major depression and 38 matched controls. All diagnoses were done based on Structured Clinical Interview for DSM-IV. Independent validation subjects including those from periphery disease groups were recruited in the same way. **Results:** Thirteen metabolites were identified as differentially expressed in major depression. The differential metabolites included neurotransmitter and monoamine metabolites which association with depression has previously been reported. Newly discovered biomarker was ethanolamine phosphate (EAP) which was significantly ($P < 10^{-9}$) lower for MDD subjects ($1.83 \pm 0.80 \mu\text{M}$) than for controls ($3.96 \pm 2.95 \mu\text{M}$). Of note, the plasma levels of EAP alone were sufficient to distinguish MDD subjects from non-MDD subjects (true positive rate=82%, true negative rate=95%). The plasma EAP level was negatively correlated with CES-D depression score ($r = -0.433$). The EAP alteration was validated in 11 independent validation subjects. The decrease in plasma EAP level disappeared after successful antidepressant treatments. Among 538 metabolites, taurine showed very strong positive correlation with EAP. Both EAP and taurine are hydrolysate of endocannabinoid and target of fatty acid amide hydrolase (FAAH) that terminates endocannabinoid signaling. **Conclusions:** A plausible hypothesis is that depletion of inactive form of fatty acid amides in the brain cause depressive mood, which results in peripheral reduction of its hydrolysate compounds, i.e. EAP, ethanolamine and taurine. Although preliminary, our study supports the hypothesis. Further larger studies on this association are needed in order to establish link between the biomarker and endocannabinoids.

はじめに

精神疾患の生物学的マーカーが見いだされれば、精神疾患の治療を均一化でき、病因、病態解明につながる可能性もある。近年、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析の手法を用いてうつ病の生物学的マーカーを同定しようとする研究が精力的に行われているが、未だ決定的な分子は発見されていない。うつ病は、元来、セロトニン、ノルアドレナリンなど、モノアミン代謝物質の異常が背景にあることが知られており、代謝物の包括的解析法（メタボローム解析）を用いれば、良いマーカーが発見できるように思われた。そこで我々は、DSM-IV で大うつ病性障害に該当する 34 例と該当しない 38 例を対象に、CE-TOFMS を用いて血漿の代謝物計 538 物質の定量的な比較を行った。結果、エタノールアミンリン酸(EAP)が、単独で両群を高い精度(感度 82%, 特異度 95%, ROC 下面積 0.87, $P < 0.0001$)で判別できることが分かった。うつ病群中、投薬の有無と EAP の濃度に統計上有意($P < 0.05$)な相関は認められなかったことから、投薬による変化ではなく、抑うつ症状を反映した指標である蓋然性が高い。他施設で採取したうつ病患者と非うつ病患者の間でも、この差は再現された。さらに、同一被験者の、治療前と寛解期のサンプルを比較したところ、寛解期では、血漿中の EAP の濃度が健常者の範囲に戻っていた。以上より、血漿中の代謝物質のグローバルな解析（メタボロミクス）で発見した EAP がうつ病の生物学的診断指標、回復の指標として有用であることが強く示唆された。なお、この試験は、国立精神・神経センター（現：独立行政法人国立精神・神経医療研究センター）の倫理委員会の承認を受け、全ての被験者から書面によるインフォームド・コンセントを得て行われた。

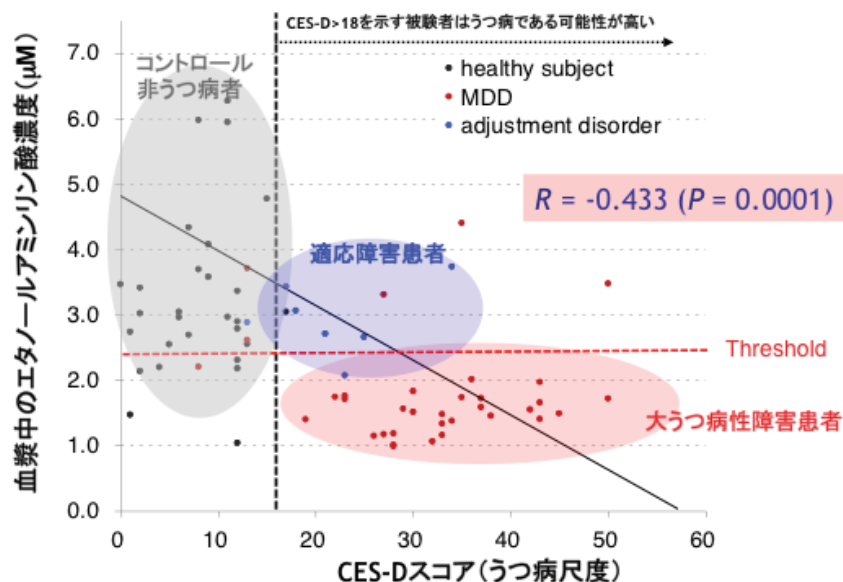


Fig.1 CE-TOFMS によるメタボローム解析で得られたうつ病マーカー（エタノールアミンリン酸）の血中レベル。

O-10 キャピラリー電気泳動／質量分析法の法科学分析への有効利用 — 尿中大麻代謝物の分析 —

○岩室嘉晃¹, 石丸(飯尾)麗子¹, 地中 啓¹, 高山成明¹, 小玉修嗣², 早川和一³

¹石川県警・科捜研, ²富山衛研, ³金沢大・医薬保健研究域

Forensic use of capillary electrophoresis/mass spectrometry – Analysis of metabolites of tetrahydrocannabinol in urine –

Yoshiaki IWAMURO*¹, Reiko Iio-ISHIMARU¹, Satoshi CHINAKA¹, Nariaki TAKAYAMA¹, Shuji KODAMA², and Kazuichi HAYAKAWA³

¹*Forensic Science Laboratory, Ishikawa Prefectural Police Headquarters*

²*Toyama Institute of Health*

³*Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University*

Abstract

We developed several analytical methods for forensic samples using capillary electrophoresis / mass spectrometry (CE/MS). Chemically modified capillaries were used to control electroosmotic flow for optimizing analysis time and separations of methamphetamines or phosphorous-containing amino acid-type herbicides. In recent years, with the increase in the abuse of marijuana, a simple and robust analytical method has been desired for identifying the use of marijuana. In this report, we have developed a CE/MS method for determining metabolites of tetrahydrocannabinol, which is a primary psychoactive component in marijuana.

はじめに

キャピラリー電気泳動法(CE)は、試料前処理が簡便、キャリーオーバーがほとんど無いなどの特徴から、迅速性、信頼性が要求される法科学分野において有望な分析法の一つと言える。しかし、再現性を確保するには内部標準物質による補正が必要、質量分析計(MS)と接続した場合には電気浸透流 EOF のコントロールに用いる添加剤が揮発性のものに限定される、分析対象によっては長い泳動時間を要するといった課題がある。そこで我々は、CE(MS)が法科学分析に有効に利用されるべく、これらの弱点を克服するための研究を進めてきた。現在までに、内壁に種々の官能基を導入した化学修飾キャピラリーを用いて EOF のコントロールを行うことで、尿直接導入法による覚せい剤類分析の再現性向上¹、アニオン性化合物である含リンアミノ酸系農薬分析の迅速化²を達成した。今回、近年乱用が増加している大麻について、その代謝物を尿直接導入法により検出できる方法を開発した。

実験

CE/MS 装置	Agilent Technologies G1600 CE – 6410 triple quad MS
CE 条件	キャピラリー; untreated fused-silica (50 μm i.d. \times 85 cm), 25°C 泳動液; 40 mM ギ酸アンモニウム(pH 6.4) 印可電圧; +30 kV
MS 条件	イオン化法; ESI+ 測定モード; multiple reaction monitoring シース液; 5 mM ギ酸アンモニウム-メタノール (50/50, v/v), 5 $\mu\text{L}/\text{min}$
標準試料	11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH), THC-COOH glucuronide (THC-glu)

結果と考察

THC-COOH 及び THC-glu (Fig. 1)はアニオン性化合物であるため、まず内壁にアミノ基を導入した化学修飾キャピラリーを用い、MS 側を正極として電氣的泳動方向を EOF の方向と一致させたところ、十分な分離が達成される前に泳動が完了してしまっただ。そこで、untreated fused-silica キャピラリーを用い、MS 側を負極として電氣的泳動方向を EOF と逆向きにしたところ、満足する分離が得られた。泳動液は、pH が 9 以上では EOF が速すぎて十分な分離が得られず、5 以下では THC-COOH の解離が不十分であったため、ギ酸アンモニウム溶液 (pH6.4)とした。尿試料の前処理方法として、水で希釈後に遠心し、上澄みを CE/MS に注入する方法を試みたところ、ブロードなピークしか得られなかった。これは、サンプルゾーンの電気伝導率が高いことによるDESTACKINGが生じたためと推定された。そこで、メタノールを用いて同様に前処理を行ったところ、水で希釈した場合よりも電気伝導率が下がり、ピーク形状が改善した。以上の条件で、標準化合物を添加した健常人尿を分析したところ、10分以内に THC-COOH 及び THC-glu の定量を妨害するピークは認められなかった(Fig. 2)。また、大麻乱用者の尿から THC-COOH 及び THC-glu を検出できた。本法により、迅速で簡便なヒト尿中大麻代謝物分析が可能となった。

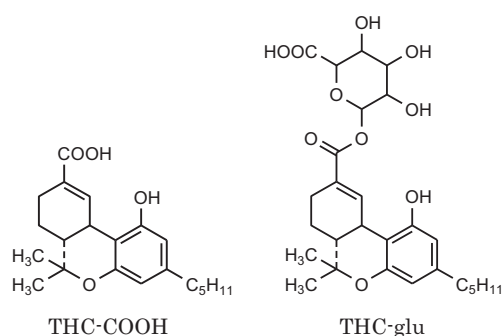


Fig.1 THC-COOH and THC-glu

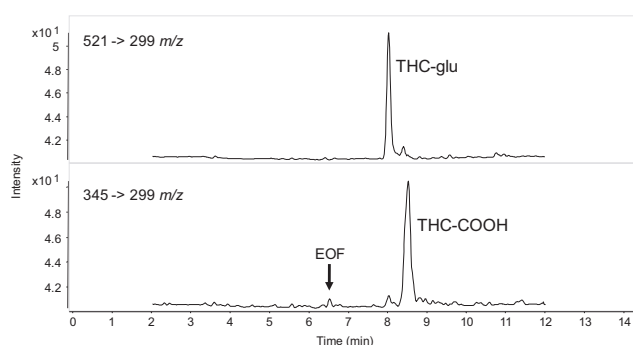


Fig.2 Analytical results of a urine spiked with THC-COOH and THC-glu (each 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in urine)

References

- [1] Y. Iwamuro *et al.*, *Forensic Toxicol.*, **2010**, 28, 19.
- [2] Y. Iwamuro *et al.*, *J Health Sci.*, **2010**, 56, 606.

O-11 野菜と茶の品質成分分析

○堀江秀樹

農業食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所

Analysis of qualitatively important components in vegetables and tea

Hideki HORIE*

National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO

Abstract

Capillary electrophoresis is an effective tool to evaluate and investigate the quality of tea and vegetables. This lecture reviews the development of the methods to analyze the compounds of these agricultural products. Applications of these methods are also introduced.

はじめに

飽食といわれる時代にあつて、より安心・安全でおいしい農産物が求められている。演者は野菜と茶の品質評価に関わる研究にたずさわる中で、キャピラリー電気泳動法を利用し、おいしさに関わる成分の解析をすすめてきた。本講演においては、農産物の品質評価の上でのキャピラリー電気泳動法の特徴を従来法と比較し、さらにこれを活用することによって演者らの得た知見を紹介する。

茶成分分析への応用

日本の緑茶においては、うま味成分としての遊離アミノ酸、機能性成分としてのカフェイン、苦渋味成分としてのカテキン類、鮮度に関係するアスコルビン酸が品質指標として分析されてきた。しかしながら、これらの成分を高速液体クロマトグラフィーで分析する場合、複数の測定法を併用せねばならなかった。キャピラリー電気泳動法を導入することにより、これらを同時に分析することを可能にした（ただし、遊離アミノ酸については、最大の含量を占めるテアニンのみ分離）¹。本法は、簡易で微量試料にも対応できることから、茶葉から湯への成分の溶出の解析²や、1本の茎につく葉の新芽中成分分析などに利用された。

茶の有機酸とアスパラギン酸、グルタミン酸を同時に分析する方法を開発した³。茶を硬水でいれると白濁することは知られていたが、この白濁がシュウ酸カルシウムによるものであることを示すことができた⁴。さらに、うま味調味料で味付けした茶がよく問題になるが、本法でグルタミン酸／アスパラギン酸の比をとれば、添加の判定が可能である。また、キャピラリー電気泳動法では、茶抽出物中のナトリウムイオン、アンモニウムイオンの同時分析も可能⁵であり、偽装（グルタミン酸ナトリウム添加や茶葉の着色（アンモニウム塩を使用する））判定に利用できる。

野菜成分分析への応用

トマトにおいては、甘味と酸味のバランス、さらにグルタミン酸のうま味が重要とされる。Soga らの方法を基に、野菜の有機酸、アミノ酸、糖を同時分析する方法を開発した⁶。本法は、成分に特徴のあるトマト突然変異系統の選抜に用いられている。また、本法により、多種類の野菜について成分比較したところ、ハウレンソウやシュンギクのようなえぐみのある野菜にグルタミン酸は多く含まれており、人類がこれらの植物を野菜として取り入れた要因のひとつはグルタミン酸に由来するうま味によるものかもしれないと考察された⁶。

ハウレンソウについては、硝酸イオンやシュウ酸が品質を低下させる要因とされる。硝酸イオンと有機酸を同時に分析する方法を開発し⁷、本法を利用して、ハウレンソウのシュウ酸に由来するとされるえぐみに関して解析を進め、ハウレンソウ中に含まれていたシュウ酸イオンが唾液中のカルシウムイオンと結合し、舌の上に沈殿する刺激がえぐみであるとの仮説を提案した⁸。

野菜においては、特有の成分が香味に大きな影響を与える場合がある。ユリ科野菜の含硫成分は特徴的な辛味や香りに関係する。ニラやニンニクに含まれる特徴的な含硫成分 methiin と alliin について誘導体化せずに分析する方法を開発した⁹。

農産物分析上の問題点

キャピラリー電気泳動法を用いることによって安価に多成分の分析が可能で、廃液量も少ない点は魅力である。しかしながら、試料によっては適切な前処理かキャピラリー管のコンディショニングを行わないと、泳動時間の再現性が得られないばかりか、ピークの分離も悪くなる場合がある。利活用の機会を広げるには再現性を向上させるためのノウハウの蓄積が必要と考えている。

References

- [1] 堀江秀樹ら 茶研報 87: 59-65, 1999.
- [2] 堀江秀樹ら 茶研報 91: 29-33, 2001.
- [3] Horie, H., et al. J. Chromatogr. A 817: 139-144, 1998.
- [4] 堀江秀樹ら 食科工 45: 364-367, 1998.
- [5] 堀江秀樹ら 茶研報 87: 81-84, 1999.
- [6] 堀江秀樹ら 分析化学 58: 1063-1066, 2009.
- [7] 堀江秀樹ら 園学研 4: 95-98, 2005.
- [8] 堀江秀樹ら 日調理誌 39: 357-361, 2006.
- [9] Horie, H., et al. J. Chromatogr. A 1132: 337-339, 2006.

O-12 キャピラリー電気泳動-質量分析計による空气中的塩基性ガスの分析

○飯川玲子

株式会社住化分析センター

Quantification Method of Basic Compounds in Atmosphere by CE-MS

Reiko IIKAWA

Sumika Chemical Analysis Service, LTD.

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is an effective tool for evaluating basic compounds in atmospheres such as cleanroom environment for semiconductor manufacturing. An even more sensitive analysis can be conducted with an addition of a mass spectrometric detector (MS). Here described is a quantitative analysis method for basic compounds in air. Small amount of sample is sufficient for CE/MS, therefore filter sampling is used to collect the basic compounds in the air. Basic compounds collected on the filter is extracted and concentrated into a small amount of solution for measurement. By the use of CE/MS, it is possible to assign the unknown compounds by the obtained composition formula. These compounds were defined as total-amines.

1. はじめに

半導体集積回路(IC : Integrated Circuit)を製造するクリーンルームではプロセスに有害な作用を及ぼす可能性のあるガス状の物質を分子状汚染物質(AMC : Airborne Molecular Contaminants)と定義し、製造プロセスに応じて、その種類と濃度を監視・制御している。AMCはその化学的性質ごとに、酸(Acids)、塩基(Bases)、凝縮性有機物(Condensables)、ドーパント(Dopants)に分類される。ICの小型化と高機能化に伴い、制御すべきAMCは痕跡量となり、その量は半導体の専門家集団から成るITRS(International Technology Roadmap for Semiconductors)委員会によるロードマップで示されている。

CEやCE-MSの分離と検出の原理は、酸性成分や塩基性成分を網羅的に高感度に定量することに適しており、特に塩基性成分については、他の定量装置に比較して優位な点が多い。我々はフィルタサンプリング法により気中の塩基性成分を捕集しCE-MSで測定することで、今まで検出できなかった成分を定量可能とした。ここではその手法と得られるデータについて紹介する。

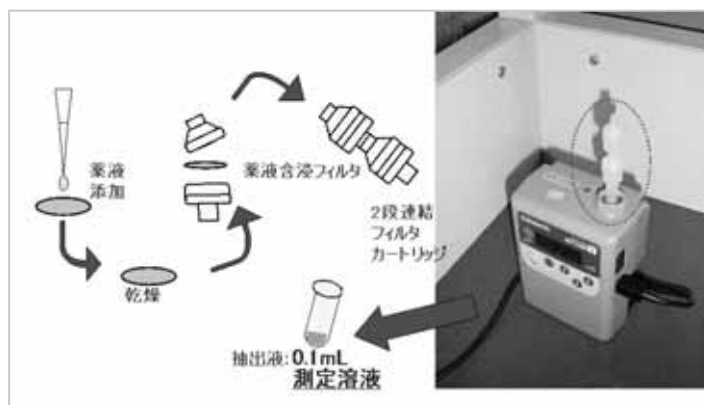


Fig.1 Filter sampling method

2. 実験条件

(1) 空気中成分の捕集方法

13mmφ 石英不織布フィルタに希硫酸とグリセリンの混合水溶液を滴下して乾燥した。これをフィルターホルダーにセットして、ダイヤフラムポンプに接続し 1 L/min で任意の時間、空気を捕集した。捕集後、フィルタをマイクロチューブに入れメタノールで抽出後フィルタを取り出し、抽出液を窒素ガス吹き付け濃縮法により除去し残渣を水で再溶解し、CE-MS 測定用の試料溶液とした。

(2) 測定

キャピラリー電気泳動-質量分析計は Agilent Technologies 社の装置を用いた。キャピラリーは GL サイエンス製キャピラリー電気泳動用チューブ Funcap -CE/Type-S を用い、泳動液は 50mM ギ酸アンモニウム(pH3.5)を使用し、印加電圧は Positive で泳動した。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (Positive) で、この際シース液には 5mM ギ酸アンモニウム / 50% メタノール水溶液とした。

3. 得られる結果および分析例

本法により空気中の塩基性成分を網羅的に測定することが可能となり、我々はこれをトータルアミンと定義し、空気中の濃度や発生源を特定する手法として広く活用している。ここで定義したトータルアミンとは、泳動液 pH3.5 において陽イオンとして解離する成分であり、エレクトロフェログラム上、中性成分の移動位置よりも早い成分である。この手法により、24 時間の空気捕集でのトータルアミン濃度を下限 $10\text{ng}/\text{m}^3$ で定量することが可能となった。これは ITRS で要求する Total-Bases を評価するに十分な感度である。

気中塩基性成分の分析例として、クリーンルーム構成材料である床材から発生したガスを測定した結果を Fig.2 に示す。部材に含まれる物質が塩基として気中に放出されることが確認された。この手法は材料を判定する用途としても有用である。

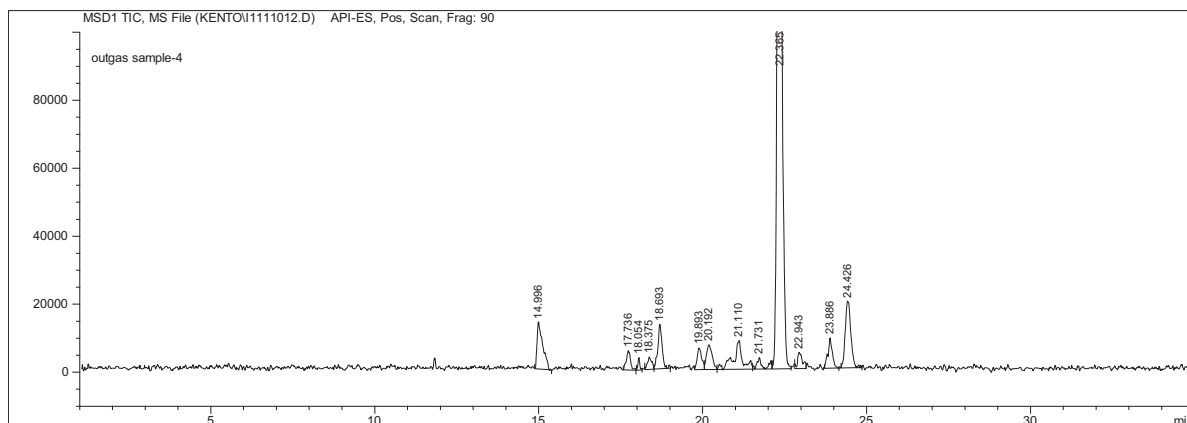


Fig.2 Total ion current electropherogram of Total-Amines included in cleanroom material

References

- [1] ISO14644-6 Cleanrooms and associated controlled environments-Part6:Vocabulary (2007)
- [2] R.Iikawa, et.al, Proceedings of the 21st Annual Semiconductor Pure Water and Chemicals Conference, (2002)

以上

O-13 液体電極プラズマ発光分光分析法による微量金属イオン定量

○高村 禅

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科

Trace Metallic Ion Measurement by Liquid Electrode Plasma Atomic Emission Spectrometry

Yuzuru TAKAMURA*

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

Abstract

An elemental analysis method for liquid sample in micro chip has been developed, namely liquid electrode atomic emission spectrometry (LEP-AES). A micro channel whose center was made narrower was fabricated on a quartz glass chip. Solution samples were introduced into the channel. A high voltage (800 - 1500 V) was applied to the solution from the both ends of the channel. The sample solution was locally heated by confined electric current at the narrower part, to evaporate and to make discharge with element specific spectra. From the spectra, we can measure the elemental concentration in the liquid sample. It was found that the long accumulation using quartz chip with sample flow was effective to improve limit of detection. The current limit of detection of this method for Cd and Pb were derived as 0.5 ppb and 5 ppb, respectively, in 0.1 M HNO₃. These values were low enough for the environmental analysis applications. The method can monitor concentrations continuously, so it is also expected to be used for element sensitive detector in liquid chromatography.

はじめに

工業廃水などによる水質汚濁、工業跡地周辺の重金属による土壌汚染、さらにはそれらによる食物汚染が深刻化してきており、より頻繁な水質・土壌モニタの必要性が高まっている。しかし現在使用されている ICP 発光分析装置等は高価であり、また操作に熟練を要するため、利用できる機会が限られる。我々はマイクロ流路中の試料に高電界を印加したときに発生するプラズマの発光分析により、簡易に元素分析が出来ることを見出した。これを用いたオンラインで測定できる簡易超小型元素分析器の開発を行っている¹⁻³。本法は、連続計測が可能のため、工場での溶液の監視や、液体クロマトグラフィの検出器としての用途も考えられる。

実験

Fig. 1 の様に中央を絞った流路中に水溶液試料を導入し、両端に 2ms 程度のパルス電圧を印加する。断面積が最も小さい中央部に電流が集中し、ジュール熱により水蒸気の泡が発生

する。この泡には溶液を通して電圧が印加されているので、放電条件を満たす大きさに気泡が成長した時、泡の中にプラズマが発生する。この時、両端の溶液は電極の役割をしており、液体が電極のため、液体電極プラズマと呼んでいる。液体電極中の原子がプラズマ中で発光するので、これを分光分析することにより、溶液の元素分析が可能である。パルスとパルス間に溶液を移動させることで、発光により生成した細かい泡等を除くことができ、また電極である液体はリフレッシュされるので、高い繰り返し再現性が得られる。これを積算することで、検出限界の向上が期待できる。

結果と考察

Fig. 2 は、0.1 M HNO₂ 水溶液中の Pb を測定した例である。石英製の流路チップを用い、サンプルを流しながらパルス発光させ、Pb 405.8nm 輝線の発光量を積算した。これにより、精度と検出限界が大幅に改善され、3σ の検出限界は 5ppb と求められた。同様の実験により Cd の検出限界 0.5 ppb が得られた。河川の水質基準 0.01ppm なので、環境計測に十分用いることができる。また、20nm 程度の大きさのナノ粒子であれば、感度は落ちるがイオンと同様にある程度測定可能であることも分ってきた。本法を用いると、様々な試料の高感度元素分析を、小型の装置で簡単に実現できる。従って、単なる元素分析器だけでなく、汎用性の高い検出器として、様々な装置に組み込んで使う用途も考えられ興味深い。

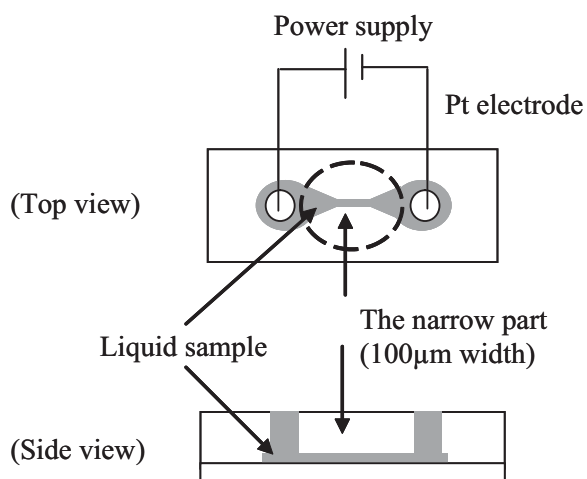


Fig. 1 Chip design for liquid electrode plasma.

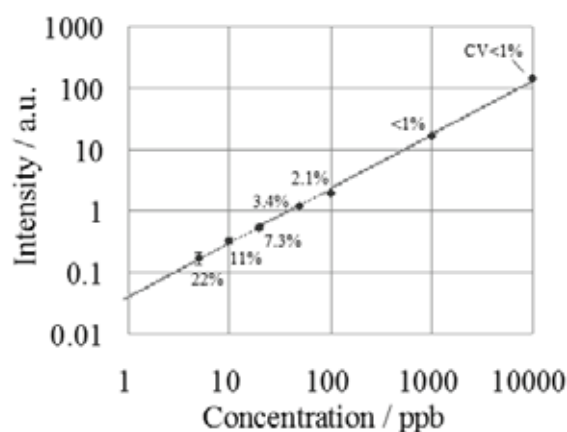


Fig. 2 Calibration curve for Pb measurement.

References

- [1] M. Banno, et al., Anal. Chim. Acta, 634,153, 2009.
- [2] 熊井みゆき他, 分析化学, 58(6),561, 2009.
- [3] 中山慶子他, 分析化学, 60(6), 515, 2011.

O-14 マイクロ生化学分析のためのリン脂質ポリマー バイオインターフェース

○高井まどか

東京大学大学院工学系研究科

Phospholipid Polymer Bionterface for Micro-bioanalysis

Madoka TAKAI*

Department of Bioengineering, The University of Tokyo

Abstract

We prepared the biocompatible phospholipid polymer, poly [2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-3-(methacryloyloxy)propyltris (trimethylsilyloxy) silane (MPTSSi)]: PMMSi for the surface modification in microchannel of PDMS bioanalysis devices. The protein adsorption was resisted and electro-osmotic flow (EOF) was reduced on the PMMSi coated PDMS surface. The repeatable precision on electrophoresis was obtained, so it is expected the PMMSi coated interface is suitable for micro-bioanalysis.

はじめに

近年、マイクロ流路デバイスによる化学/生物学的分析は、分析時間の高速化、多項目の同時分析、高効率化という様々な利点があり、在宅検査や、緊急医療時の簡易検査などへの応用が期待されている。マイクロ流路内を反応場として用いるこれらの分析チップでは、流路内壁の物性により精度や感度が支配される。特に生体試料の流路内壁への付着は分析感度の低下を引き起こす。そこで、我々はタンパク質や細胞といった生体試料の付着を抑制する生体親和性ポリマーによりマイクロ流路内を修飾する界面創製技術の研究を行っている。

今までに、Lab on a Chip, micro-TAS に使うことを目的として様々な生体親和性ポリマーを用途別に開発している[1-4]。本講演では、マイクロ分析チップ基材として広く利用されている polydimethylsiloxane(PDMS) への修飾を目的として開発した生体親和性ポリマーの紹介し、タンパク質のマイクロチップ電気泳動の最近の結果について報告する。

生体親和性リン脂質ポリマーの創製

PDMS は疎水性を示しさらに水中では負電荷を帯びることから、タンパク質や細胞が非特異的に吸着する。タンパク質の非特異的吸着や細胞の付着を抑制するには、PDMS の表面を親水性かつ中性の荷電状態に変える処理を施す必要がある。タンパク質の吸着を抑制する生体親和性ポリマー材料として、我々の研究室では、生体膜類似構造をもつリン脂質ポリマー

を使っている。リン脂質ポリマーは、ホスホリルコリン基をポリマー側鎖に有し、優れた抗血栓性が得られることが報告されている。そこで、PDMS の表面処理剤として、Figure 1 に示す構造式のリン脂質ポリマー

(PMMSi) を開発した[5]。この PMMSi は、エタノール溶媒を用いた溶液コーティング法という極めて簡単な処理でマイクロ流路内壁に薄膜を形成させ、流路内壁のタンパク質吸着を抑える機能を有する。

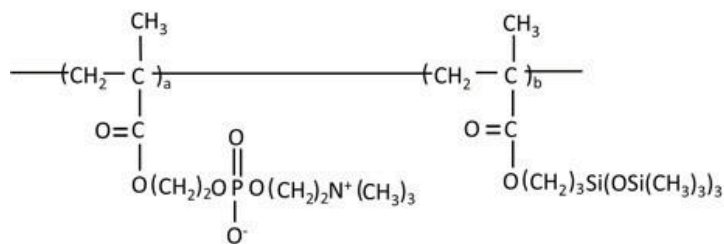


Fig.1 Poly(MPC-co-MPTSSi) (PMMSi) の構造式

リン脂質ポリマーインターフェースの物性

合成したポリマーを PDMS 基材へコーティングし、その物性を評価した。ここでは、タンパク質のマイクロチップ電気泳動への応用を念頭に、ゼータ電位の測定およびタンパク質の吸着実験を行った。さらにマイクロ流路を作製し、電気浸透流移動度(EOF)の評価も行った。MPC : MPTSSiの組成比が20:80, 30:70のPMMSi20, PMMSi30においてPDMS基材へ安定にコーティングが可能ながことが確かめられた。酸素プラズマ処理を施したPDMS基材のゼータ電位が-30mVであったのに対し、PMMSi20, PMMSi30をコーティングしたPDMSのゼータ電位は、それぞれ-16 mV、-15 mV であった。EOF測定ではコーティングを施していないPDMSマイクロチップ流路の電気浸透流移動度はFigure 2 に示すように減少した。また、タンパク質の吸着も効果的に抑制されていること蛍光標識タンパク質の吸着実験から確認した。現在タンパク質のマイクロチップ電気泳動分離の研究をすすめている。

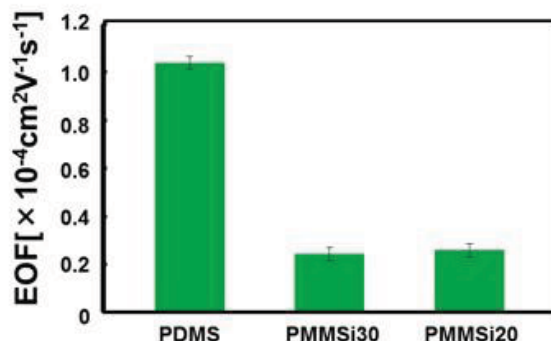


Fig. 2 酸素プラズマ処理 PDMS, PMMSi30, および PMMSi20 を修飾した PDMS の EOF.

References

- [1] T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro, K. Ishihara, *Biomaterials*, **27**, 5151-5160, 2006.
- [2] Y. Xu, M. Takai, T. Konno and K. Ishihara, *Lab Chip*, **7**, 199-206, 2007.
- [3] J. Sibarani, M. Takai, K. Ishihara, *Coll. Surfaces B-Biointerfaces*, **54**, 88-93, 2007.
- [4] J-H. Seo, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, *Biomaterials*, **29**, 1367-1376, 2008.
- [5] J-H. Seo, T. Shibayama, M. Takai and K. Ishihara, *Soft Matter*, **7**, 2968-2976, 2011.

O-15 マイクロ流体デバイスを用いた細胞培養環境操作

○木村啓志, 藤井輝夫
東京大学生産技術研究所

Control of Cell Culture Environment by Microfluidic Technology

Hiroshi KIMURA*, Teruo FUJII

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

Abstract

Conventional cell-based assays in life science and medical application can be difficult to maintain functionally. Microfluidics is an emerging technology with potential to provide integrated environments for maintenance, control, and monitoring of surround of cells. In this presentation, we introduce integrated microfluidic platforms, which allow precisely control of the cell culture environment. The microfluidic structure in the devices can mimic a physiological environment in vitro. Moreover, functional components, such as sensors, valves and pump, can be integrated into the devices by microfabrication. Because dynamic cell activity could be maintained and measured, these devices may have applications in drug screening and toxicity testing.

はじめに

細胞や組織の挙動を総合的に理解する上で、それらを取り巻く微小環境が大きな役割を果たすことが指摘されて久しいが、従来の実験系では、微小空間を精密に制御することが困難である。演者らは、マイクロ流体デバイス技術を応用することで、細胞外微小環境の設計・制御・計測といった操作を実現する新規の細胞アッセイプラットフォームを構築する試みを進めている。微細加工技術によって生体内環境を模擬した微小空間に様々な機能を集積化することによって、細胞の機能維持、挙動制御、動態計測などを実現してきた。本講演では、マイクロ流体デバイスを用いて、いかにして、細胞外微小環境を整え、制御し、計るかといったテーマに絞って研究内容を紹介する。

細胞外微小環境を整える

生体内には、大小様々な管が存在するが、血管などは数ミクロンからミリオーダーの大きさである。微細加工技術によって、上記のオーダーの流路は比較的容易に製作することができる。演者らは、この利点を活かして、二つの目的に向けて細胞外微小環境を整えることのできるデバイスを開発した。一つ

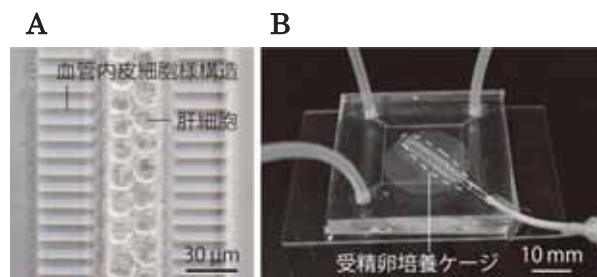


Fig. 1 細胞外微小環境を整えるデバイス
(A)肝細胞培養デバイス (B)受精卵培養デバイス

は肝臓の最小単位である肝細胞索の構造を模擬することによって, *in vitro* 培養における細胞の機能維持を目指すデバイスである¹。このデバイスは, 微小構造によって生体内同様に肝細胞を配列制御することで, 毛細胆管や細胞極性の再構築を実現した(Fig. 1A)。もう一つは, 生殖補助医療への展開を見据えた受精卵培養デバイスであり, 受精卵を生体外で培養することを目的として, 卵管や子宮の環境を微小空間に再現するものである(Fig. 1B)²。このデバイスを用いて受精卵を培養することによって, 従来の培養法に比べ, 発生率の向上が望める。

細胞外微小環境を制御する

微小流路内の流れは, 層流と呼ばれる特殊な流れであり, この流体现象を操作することは容易である。演者らは, 層流操作によって細胞外の微小空間を制御することが可能なデバイスを開発し, 多能性幹(ES,iPS)細胞の分化誘導制御に応用したところ, 単一微小空間内の多能性幹細胞組織の部位特異的な分化誘導が実現可能であることを示した(Fig. 2)³。このような知見は, 幹細胞を使った再生医療や病理モデル構築への応用が期待されている。

細胞外微小環境を計る

さらに演者らは, 細胞培養チップにマイクロセンサを組み込むことで, 従来の培養系では困難な細胞動態の *in situ* 計測を実現するデバイスも開発した(Fig. 3)⁴。このデバイスを毒性物質暴露試験に適応したところ, 搭載したグ

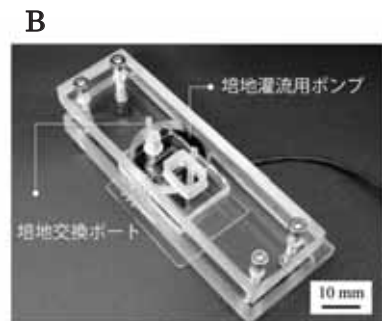
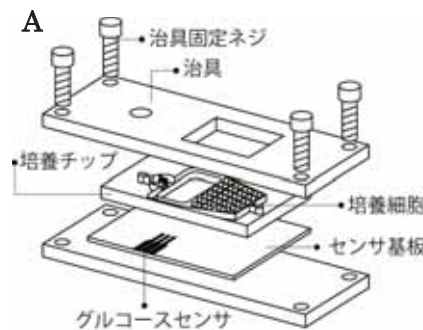


Fig. 3 グルコースセンサ集積型デバイス (A)概観図 (B)写真

ルコースセンサによって, 細胞動態のオンラインモニタリングが可能であることを確認した。生命科学の興味は遺伝子情報や分子構造といった静的な情報から, 構成要素の動的な情報へと移行しつつあり, 微小空間を厳密に制御することが可能なマイクロ流体デバイスは新たな細胞アッセイツールとなり得る。

References

- [1] Nakao, Y. et al. *Biomicrofluidics*. 5: 022212, 2011.
- [2] Ostrovidov, S. et al. *Proc. μTAS 2005*. 1: 361-363, 2005.
- [3] Kawada, J. et al. *Proc. μTAS 2010*. 1: 7-9, 2010.
- [4] Kimura, H. et al. *JRM*. 22: 594-600, 2010.

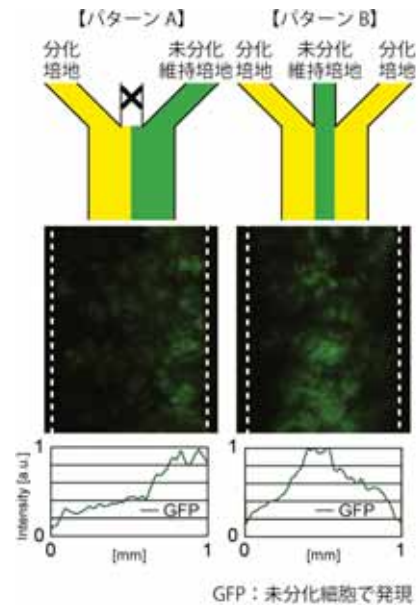


Fig. 2 微小空間内での iPS 細胞分化制御

O-16 核酸塩基分子の単分子識別—3世代 DNA シーケンサーに向けて—

○谷口正輝

大阪大学産業科学研究所

Identification of Single Base Molecules-Towards 3rd Generation DNA Sequencer-

Masateru TANIGUCHI*

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

Abstract

First- and second-generation DNA sequencing technologies identify nucleotides by light emission, while third-generation technologies identify a single nucleotide by measuring electric current. The latter takes advantage of recent advances in nanotechnology, which have enabled us to fabricate gating nanopores. The devices are expected to make it possible to quickly sequence a single human genome for a price of \$1000 in order to make personalized genomic medicine available to the general population. Here we report on single-molecule electrical sequencing of DNA and RNA by a hybrid method of identifying single base molecules via a tunnelling current and random sequencing. Our method reads sequences of 6 types of DNA oligomers composed of 3 base molecules. The complete sequence of a microRNA composed of 7 base molecules was also identified by creating a composite of overlapping fragment sequences randomly determined using a tunnelling current conducted by single base molecules as they passed between a pair of nanoelectrodes.

はじめに

演者らが、ナノ電極間を流れる電流により、ナノ電極間を通過する1塩基分子の種類を識別する1分子解析技術を開発した¹。この手法は、1世代・2世代DNAシーケンサーが検出できないメチル化シトシンや酸化グアニンの1分子識別を可能にした²。このように、塩基分子や変異塩基分子の1分子識別は実証されたが、DNAやRNA上の1塩基識別と塩基配列決定は実現されていなかった。今回、演者らは、電流による1分子識別法とランダム塩基配列決定法を組み合わせ、6種類のDNAオリゴマーとマイクロRNAの塩基配列決定を行った³。

実験

1塩基分子の電流を計測するゲーティングナノポア(図1A,1B)は、微細加工技術を用いて作製され、ナノ電極間は0.8 nm~1nmに固定された。測定対象として、DNAとRNAを構成する全ての塩基分子、3塩基分子から構成される6種類のDNA、および7塩基から構成されるマイクロRNAが用いられた。

結果と考察

DNA を構成する塩基分子(dA、dC、dG、dT)と RNA を構成する塩基分子(rA、rC、rG、rU)の電流の時間変化を計測したところ、スパイク状の電気シグナルが観察された。スパイクシグナルの最大電流値を積算して作成したヒストグラムには、それぞれ1つのピーク電流値が得られ、1分子電気伝導度の大きさが、 $dT < dC < dA < dG$ と $rU < rC < rA < rG$ であることが分かった。次に、GGG、TGT、GTG、ATA、CAC、GAG の塩基配列を持つ DNA の電流—時間プロファイルを計測し、ピーク電流値のヒストグラムを作成した。GGG のヒストグラムでは1つのピーク電流値が得られ、他の DNA のヒストグラムでは2つのピーク電流値が得られた。1 塩基分子の計測で得られた電気伝導度を基準値として、得られたピーク電流値の帰属を行ったところ、ピーク電流値が各 DNA を構成する塩基分子に帰属された。さらに、各 DNA で得られた電流—時間プロファイルを解析することで、DNA の塩基配列が決定された(図 1C)。同様に、UGAGGUA の塩基配列を持つマイクロ RNA の塩基配列決定を行った。マイクロ RNA の電流ヒストグラムには、A、G、U に帰属されるピーク電流値が得られ、電流—時間プロファイルの解析から、UGA や GUA などの断片配列が多く得られた。そこで、得られた断片配列を組み合わせると全塩基配列を決定するランダム塩基配列決定法を応用したところ、マイクロ RNA の全塩基配列が得られた。

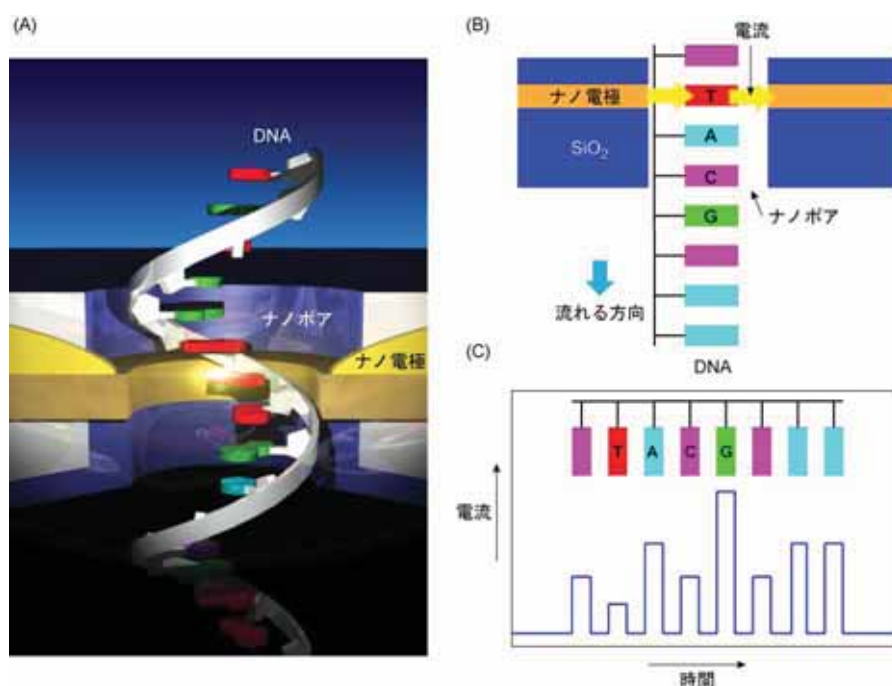


Fig.1 ナノ電極間の電流による1塩基分子識別。(A)、(B)ゲーティングナノポアの構造と (C) ナノ電極間の電流の時間プロファイル。4つの塩基分子で、異なる電流が得られる。

References

- [1] Tsutsui, M., Taniguchi, M., Yokota, K., Kawai, T. *Nat. Nanotech.* 5: 286-290 (2010).
- [2] Tsutsui, M., et al. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 9124-9128 (2011).
- [3] Tsutsui, M., et al. *Sci. Rep.* 1: 48 (2011).

O-17 ナノ空間を利用した生体物質の分析

○加藤 大

東京大学大学院薬学系研究科

Separation of biomolecules using a nano space

Masaru KATO*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

Abstract

Linear polymer molecules, such as polyacrylamide and agarose, have been used for the preparation of separation gel matrix for electrophoresis. Mesh structure of the gel worked as a sieving matrix for molecular separation.

Recently, bottom up technique has paid attention to the preparation procedure of nanostructures. The nanostructures made from surfactant are changed by the preparation conditions. We prepared a gel matrix from a surfactant, polyoxyethylene lauryl ether, and used for gel electrophoresis. Although large molecule did not migrate using the gel, small molecule, amino acid and peptide, migrated. The gel prepared from the surfactant did not have enough space for penetration of large molecule. We supposed that this gel matrix can be used for condensation of large molecules and separation of small molecules.

はじめに

これまでポリアクリルアミドやアガロースなどの鎖状高分子化合物によって調製されるゲルが、電気泳動用の分離媒体として利用されてきた。近年、規則的なナノ構造を作製する手法としてボトムアップ的な手法が注目を浴びており、界面活性剤を利用してミセル、ヘキサゴナル、キュービックなどの様々なナノ構造体を形成する手法が報告されている。

ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Fig. 1) は、天然アルコールより合成される界面活性剤であり、水との混合比率や温度によって様々なナノ構造体 (ミセル、ヘキサゴナル、ラメラ構造) を形成することが知られている。ボトムアップ法によって形成される構造は、鎖状高分子が形成する構造よりも、ナノメートルオーダーでより規則的な繰り返し構造になると考えられた。そこで本研究では、ポリオキシエチレンラウリルエーテルが形成するナノ構造を有するゲルを調製し、生体物質の分離に利用した。

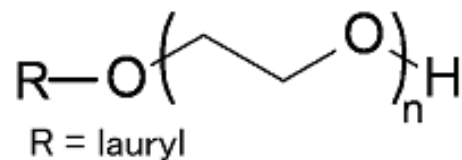


Fig.1 ポリオキシエチレンラウリルエーテルの化学構造

実験

ポリオキシエチレンラウリルエーテルとして LA-50 (ADEKA) を用い、Tris-Gly 緩衝液 (pH 8.2) と等量混合し、70°C に加温した後、室温に戻すことでゲルを作製した。スラブゲルは、の大きさは高さ 6cm、幅 5.9cm とした。泳動液には Tris-Gly 緩衝液を、ゲルの両端に 500V の電圧を印加し、1 時間泳動を行った。試料には、分子量マーカー、Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Health Care, 12-225 kDa)、Dual Xtra Standards (Bio-Rad, 2-250 kDa) 及び、DNS-Cl、NBD-F、FITC I で標識したアミノ酸とペプチドを用いた。

結果と考察

LA-50 と水との等量混合液を 70°C に加温し、混合した後、室温に戻すことで電気泳動用のゲルが調製された。分子量マーカーを泳動した所、2 kDa のマーカーは泳動されたが、5 kDa のマーカーは泳動されなかった。したがって本ゲルで試料が通過できる空隙は、非常に狭く分子量が数千以下の分子しか通過できないと考えた。次に、アミノ酸、ペプチドの蛍光標識体を泳動し、その結果を Fig. 2 にまとめた。相対泳動距離の基準には、蛍光試薬である FITC I 由来のピークを用いた。m/z の値が小さい、分子量が小さく、負電荷の多い物質は

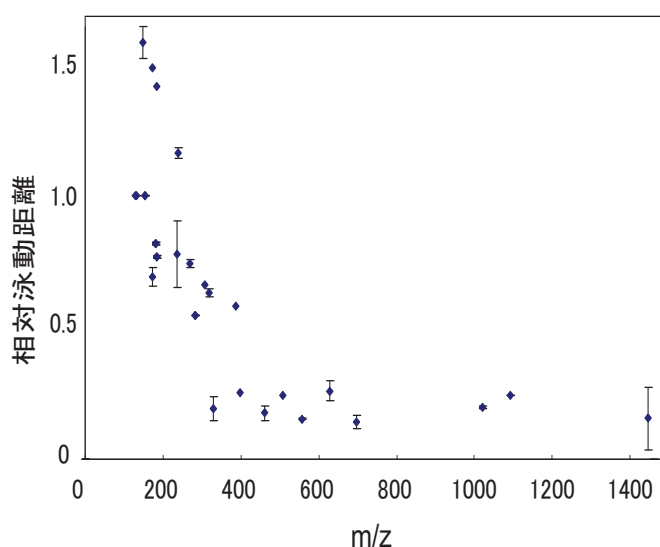


Fig. 2 生体物質の m/z と相対泳動距離の関係

ど速く泳動され、m/z の値が大きい、分子量が大きく、負電荷の少ない物質ほど遅く泳動されたことから、LA-50 によって調製されたゲルも電気泳動用の分離媒体として利用できることが分かった。

LA-50 の形成するゲルは、水の添加や加熱によって溶液に戻るため、電気泳動後の試料の回収が容易であると期待している。今後は、本ゲルを用いて DNA の分離を試み、その結果もあわせて報告する。

謝辞

本研究で使用した LA-50 をご提供してくださった(株)ADEKA に、この場を借りて御礼申し上げます。

O-18 糖タンパク質糖鎖の高感度検出分離分析

○鈴木茂生

近畿大学薬学部

Novel Methods for Sensitive Analysis of Glycoprotein-derived Oligosaccharides

Shigeo SUZUKI*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Abstract

Two CE methods, AMC method and PNGase-NBD method were developed for sensitive analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides. In AMC method, we chose LED-based fluorimetric detection CE system with neutrally coated capillary and alkaline borate buffer as background electrolytes. AMC-labeled saccharides have no charge, but form stable acidic complex in basic borate buffer, which enables specific separation and detection of derivatives without removal of excess reagent remained in sample mixture. The limit of detection was 10^{-9} M concentration or a few ten amol level. In PNGase-NBD method, oligosaccharides released from core proteins as *N*-glycosylamines (which are exclusively present at least during the course of the enzyme reaction) in the initial step of the action of the *N*-glycanase F were directly derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F). Derivatization was completed within 3 hr. This method was applied for the sensitive analysis of glycoprotein derived oligosaccharides by CE with argon laser-induced fluorimetric detection without the loss of chemically unstable monosaccharide residues.

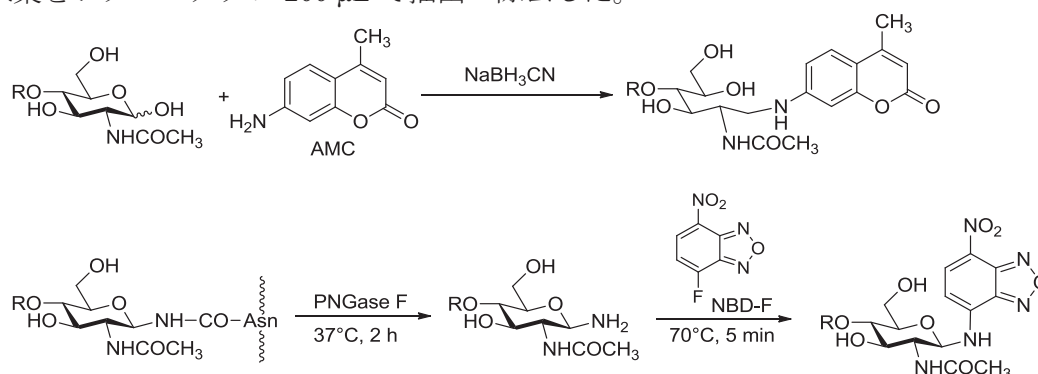
はじめに

糖タンパク質糖鎖の機能解析が盛んに進められているが、糖鎖は構造が多様で含量にも幅がり、構造と量的な分布を同時に調べる必要がある。糖鎖には必ず一残基の還元末端を有するので、これを蛍光標識すると、ピーク強度から糖鎖の量をほぼ正確に知ることができる。しかし、糖鎖の標識試薬はそれ自体が蛍光を持つものが多く、しかも還元的アミノ化のように酸性での加熱処理は、酸に不安定な糖残基の解離を招く。この問題を改善するための新たな CE 分析法の開発を検討した結果について報告する。

実験

CE : 装置には Beckman PACE MDQ を使用し、キャピラリーには内径 50 μm , 有効長 40 cm, 全長 50 cm の InertCap® 1 (GL サイエンス社製) を使用した。AMC 誘導体は泳動液に 200 mM ホウ酸緩衝液(pH 9.5)-アセトニトリル-ヒドロキシプロピルセルロース(89.95:10:0.05)使用し、印加電圧-15 kV、350 nm LED 光源を用いた。一方、NBD 誘導体はアルゴンレーザーを用い、

泳動液には 100 mM ホウ酸緩衝液(pH 8.3)を用いた。**AMC 法**：糖試料に 60 mM AMC/DMF 溶液、0.2 M ピリジン-ボラン溶液をそれぞれ 20 μ L 加え、70°C で 1 時間処理した。**PNGase-NBD 法**：糖タンパク質(100 μ g)を 10 μ L の 20 mM リン酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、N-glycanase F (0.2 U)を加え、37°C、2 時間加温し、その後、沸騰水浴上で加熱変性した。さらに 0.3 M NBD-F アセトニトリル溶液を加えて 70°C で 5 分加熱し、水 100 μ L を加えた後、過剰試薬をジクロロメタン 200 μ L で抽出・除去した。



Scheme 1. AMC derivatization method (upper) and PNGase-NBD method (bottom) used for labeling glycoprotein-derived oligosaccharides.

結果と考察

AMC 法：糖の AMC 誘導体は高感度検出が可能である。しかし、CE や HPLC で分析するには、その後、さらに二段階の精製が必要であった¹。PDMS 被覆キャピラリーを用いて糖をホウ酸錯体として分離したところ、精製操作を必要とせず、しかも LED 光源を使って蛍光検出することで、10 amol レベルでの分析が可能であった。

PNGase-NBD 法：酵素反応と誘導体化条件を最適化することで、糖試料を one pot 反応でしかも 3 時間以内に誘導体化することが可能であった。しかも反応条件が緩和なために、シアル酸のような化学的に不安定な糖残基の脱離を伴うことなく誘導体化できることが判明した。分析例を Fig. 1 に示す²。

References

- [1] Yodoshi M. *et al.* *J. Chromatogr. A* 1203: 137-45, 2008.
- [2] Oyama T. *et al.* *J. Chromatogr. B* 879: 2928-34, 2011.

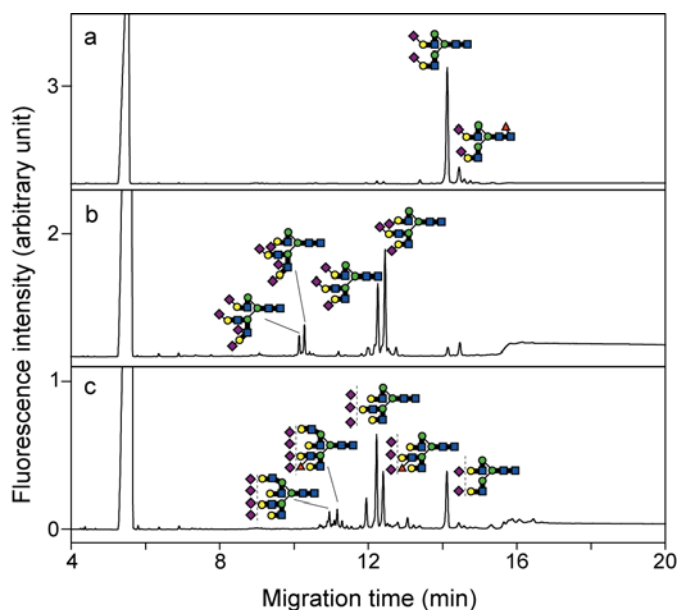


Fig. 6. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorometric detection of oligosaccharides derived from human serum transferrin (a), fetal calf serum fetuin (b), and human α_1 -acid glycoprotein (c). Analytical condition: capillary, InertCap®1 (50 cm, 100 μ m i.d.; effective length 40 cm); buffer, 100 mM borate (pH 8.3); applied voltage, -15 kV.

O-19 微生物の CE 分離における初期過程の泳動挙動観察

○鳥村政基、田尾博明

産業技術総合研究所環境管理技術研究部門

Monitoring the Initial Migration Behavior of Living Microorganisms in CE

Masaki TORIMURA*, Hiroaki TAO

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

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) was applied to the rapid discrimination and quantification of living microorganism. In general, aggregation and/or adhesion of the microorganism cells occurs in the process of migration. Thus the microscope was connected the CE system which allows observing the moving microorganisms was constructed in it is difficult to monitor the migration behaviors of living microorganisms inside the capillary. In this study, we examined the effect of initial time profile in applied voltages for separation by the migration monitoring using high-speed 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ハイスピードで高感度な手法の開発が期待されている。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の観点から期待されているが、一般に CE による微生物細胞分離では、キャピラリー内で起きる細胞の凝集や吸着などの現象と向き合うことになる。それ故に得られるピーク形状や泳動の再現性には未だ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。

キャピラリー内で生細胞が引き起こす現象を理解することが何よりも重要であり、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。本研究では、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 (特に電圧印可初期過程) の特殊性を確認するために、ビデオ顕微鏡法をキャピラリー内の泳動観察に適用した。

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 (松定プレシジョン) を用いた。キャピラリーは内壁が未修飾で内径 50 μm 、全長 24 cm (有効長 20 cm) のものを、またガラスマイクロチップは流路幅 110 μm 、流路深さ 20 μm 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×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。微生物細胞の対象として 2~5 μm のポリスチレンビーズを用いた。また、顕微鏡下での観察は、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。

結果と考察

これまで我々は、微生物電気泳動のピーク形状の改善において、泳動液に添加する陰イオンポリマーが特別な機能を果たしていることを報告してきた^{1,2}。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、また電場の印可とそれがどのように関係しているかについて、電場印可の時間プロファイルを変えた実験から得られるフェログラムの理論段数の考察も行った³。電場を印可した直後の細胞粒子の泳動挙動について、特に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過程について、ビデオ顕微鏡観察により評価した。

本シンポジウムでは、その詳細について報告したい。

References

- [1] Shintani T, Torimura M, Sato H, Tao H, Manabe T, *Anal.Sci.*, 21: 57-60, 2005.
- [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).
- [3] 鳥村政基, 新谷智吉, 田尾博明, 第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE'10).

O-20 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・高精度分析と低濃度試料における妨害ピークについて

○森 聡美、井上淳司、廣川健

広島大学大学院工学研究科 応用化学専攻

Development of a Highly Sensitive and Accurate Method for the Analysis of DNA Fragments by Electrokinetic Supercharging Preconcentration - Capillary Gel Electrophoresis and the Interference Peaks in a Low Concentration Sample

Satomi MORI*, Junji INOUE, Takeshi HIROKAWA

Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

Abstract

We have developed a high-sensitive analytical method for DNA fragments with high-qualitative ability by using electrokinetic supercharging preconcentration and capillary gel electrophoresis (EKS-CGE). We achieved e.g. 10 ppt LOD for a 72 bp component in ϕ X174/HaeIII digest, however, some interference peaks appeared to disturb the analysis of a low concentration sample. The origin of the peaks were explored and it was found that they could be suppressed by decreasing injection voltage (from -10 kV to e.g. -2 kV) and time, although the cause of formation was still unknown. By using a function between mobility and bp number obtained under the condition, we could accurately estimate the bp number (e.g. ± 0.1 bp for a 300 bp fragment).

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、PCR技術が利用できるものの、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 ϕ X174/HaeIII digestを用いて検討し、現在の所、72bpで90pptというLODを得ている。また塩基数を精度よく決定するため、塩基数と移動度の関係式を求めたところ、特に低濃度試料について123bp相当の妨害ピークが検出された。この妨害ピークは、同じ試料バイアルから繰り返し試料導入した際、本来の成分ピークが減少する中、増大した。本研究ではこの現象について考察した結果について報告する。

実験

電気泳動装置としてはCAPI-3300（大塚電子製、UV検出、電極—キャピラリー末端間距離40mm、試料体積900 μ l）を使用した。シリカキャピラリーは全長50cm、有効長37.7cm、内径75 μ mであった。試料は50bp DNA Step Ladder（50、100、…800、1800bp）の原液0.34 μ g/ μ l（Promega）と ϕ X174/HaeIII digest（72、118、194、234、271、281、310、603、872、

1078、1353bp) の原液 (0.5 μ g/mL) をそれぞれ超純水で 2000 倍-4000 倍に希釈したものを使用した。電解液は 2% HPMC、6% Mannitol、0.1M Tris、0.1M Boric Acid、2mM EDTA[3]で、粘度が低い(4.9cps)点の特徴である。手順としてはキャピラリーのコンディショニングを行った後、電氣的に試料導入を行い、-10kV で電気泳動を行った。

結果と考察

従来、-10 kV、100 s で試料導入を行ってきた。この場合、Fig.1 に示したピーク (123bp 相当) が出現し、次第に増大した。妨害ピークの原因は、電解液あるいは大気由来の contamination ではないかと考え検討したが、該当する物質は現在まで検索できていない。一方、この妨害ピークが DNA とほぼ同じ極大吸収波長を持つことから、別の可能性として、測定の過程で何らかの原因により DNA が変性しているのではないかと考え、試料の導入条件を検討した。

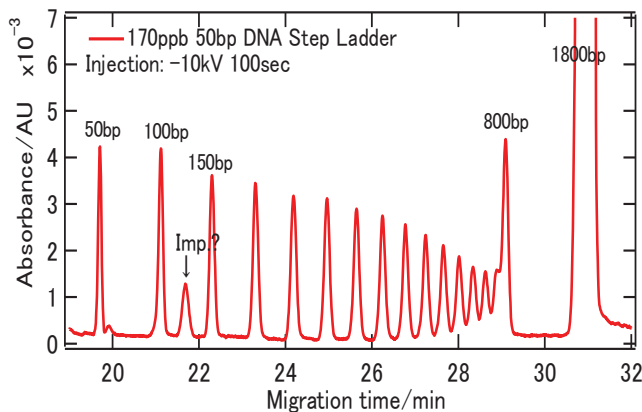


Fig.1 混合試料中における妨害ピーク (Imp.?)

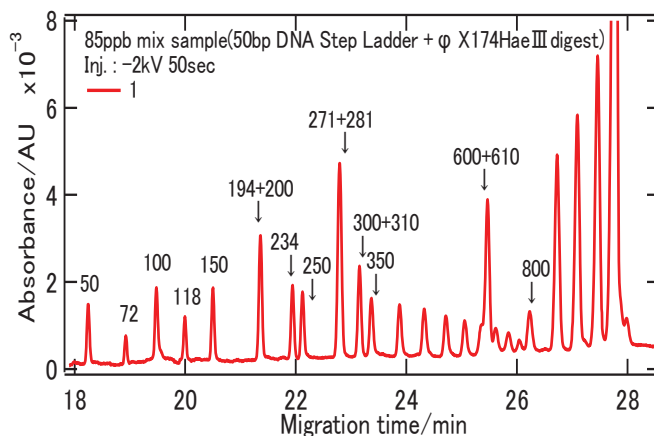


Fig.2 低電圧・短時間導入での混合試料測定(85ppb 50bp DNA Step Ladder+ ϕ X174HaeIII digest)

試料導入電圧を下げると(たとえば-2kV)、妨害ピークの強度は非常に弱く、DNA ピークも十分な強度で観察された。そこで、低電圧で試料導入時間を変化させて測定を試みた結果、短時間での試料導入では妨害ピークが観察されなかった(Fig.2)。そこで低電圧での導入の優位性を確認するために、-2kV、20sec の条件で同一バイアルから試料を採取する十数回の連続測定を試みたところ、やはり妨害ピークの影響は少なく、十分な強度の DNA ピークが観察された。この条件が他の試料にも応用できるかを調べるため、50bp step ladder と ϕ X174 digest を混合してエレクトロフェログラムを観察した (Fig.2)。

一方、この条件で測定したエレクトロフェログラム(n=5)より各塩基の移動度と塩基数の関係式を求め、このような混合試料の各ピークの移動度から精度良く断片数を求めることができた(300 bp 断片について ± 0.1 bp)。発表ではこれらの結果について報告する。

References

- [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] F. Han, J. Xue, B. Lin, Talanta 46, 735-742 (1998).

O-21 平板型カラムを用いた新規二次元分離手法の開発(VII)

伊東寛明, ○北川慎也, 大谷 肇

名古屋工業大学大学院工学研究科

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

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. A DMA-co-EDMA monolith for the separation was wholly prepared in the planer column after the local photopolymerization of high flow-resistance BMA-co-EDMA monoliths along the electrodes using a photomask to suppress the influence of a bubble formation on the separation. The CCD observation confirmed that the analytes were separated in two-dimensional without the influence of a bubble formation.

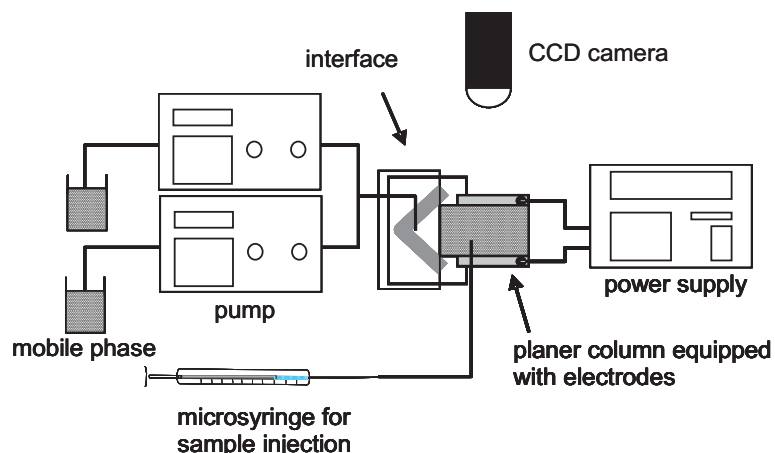
はじめに

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。これまで開発した平板型カラムでは、電圧印可に伴う気泡の発生、電極反応による移動相組成の変化が分離に対して悪影響を与えていた。本発表では、これらの問題点を解決する新規平板型カラムの開発とその性能について報告する。

実験

これまで、均一な低温光重合によりメタクリル酸ドデシル(DMA)-*co*-二メタクリル酸エチレン(EDMA)モノリスを電極間に調製し固定相として用いていた。新規平板型カラムでは、フォトマスクを用いてメタクリル酸ブチル(BMA)-*co*-EDMA に光重合し、局所的に高度モノリスを調製したのち、DMA-*co*-EMDA モノリスを全



体的に調製した。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、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。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、ピレン、ペリレン)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。

結果と考察

従来型平板カラムでは、電圧印可を長時間行うと分離場内に気泡が進入したが、新規カラムでは電極反応により発生した気泡が高密度モノリスを超えて分離場に進入することはなく、速やかにカラム外に排出されることが確認された。また、従来の平板型カラムでは、移動相として 0.01% TFA 水/アセトニトリル(85/15)混合溶液 (pH 2.8) を用いた際、電極近傍の移動相の pH が 3.7 および 7.5 へ変化していたが、新規カラムでは 2.8 および 3.9 と変化を小さくすることができた。また、緩衝溶液を用いた場合は pH 変動を完全に抑制することができた。

続いて、新規平板型カラムの移動相流れについて検討を行ったところ、従来型と同様に乱れがなかったことから、局所的に調整された高密度モノリスが分離場の流れに対して悪影響を与えていないことが確認できた。グラジエント条件下で 6 種類の蛍光試料を、グラジエント溶離を伴う二次元同時分離を行ったところ、新規平板型カラムでもイオン性の試料成分の二次元分離、および非イオン性試料成分の一次元分離が行われることが確認された。

References

- [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.

O-22 マイクロ流体デバイスを用いた細胞組み立て

○竹内昌治

東京大学生産技術研究所、JST-ERATO

3D tissue construction using microfluidic devices

Shoji TAKEUCHI*

Institute of Industrial Science, Univ. of TOKYO

JST-ERATO

Abstract

We demonstrated a 3D tissue structure by stacking the "cellular" beads in a 3D mold. Since this method allows us to fabricate 3D in vivo like tissue structures, it can be applicable in the fields of regenerative medicine and drug development. To prepare the cellular beads, we used an axisymmetric flow focusing device (AFFD) that allows us to encapsulate HepG2 cells within monodisperse collagen beads. We then seeded 3T3 cells on the surface of the collagen beads. Finally HepG2 and 3T3 cells were successfully made contact with each other. Moreover, by putting these capsules in a 3D chamber and incubating them, we successfully established complicated and milli sized 3D structures. We believe that altering the shape can be possible as simple as changing the mold, and will try to combine multiple types of cells to create more complex system that functions as a living organism.

概要：

マイクロ流体デバイスは、微小空間で流体を扱うプロセスに適している。粘性力が慣性力よりも支配的なる微小流路中では、液体の流れは層流となり、操作が容易になる。また、体積に比べ表面積の割合が大きくなるため、化学反応が効率的に起きる。さらに、微小な流路内を満たすだけの溶液があれば、反応を推進することができるため、経済的であり、繰り返し実験を高速に行なえる。ここでは、このようなマイクロ流体デバイス技術によって、微小構造や液滴を制御・加工したり、細胞3次元組織構造を作製する研究について紹介する。

最近、我々は、マイクロ流路を利用して、接着細胞をハイドロゲルビーズで包含し、細胞をビーズのように規格化された材料として扱う方法を確立した。これにより、これまで扱いにくかった細胞がデバイス中で容易に扱えるようになってきた。また、これらのビーズ内に異種細胞（肝細胞や線維芽細胞など）を階層的に構造化したヘテロ組織構造を作成することにも成功した。生体内では異種細胞が階層的に配置され機能を発現していることから、ここで創られたビーズがより生体に近い物質産生や薬物応答を示すことがわかってきた。さらに、均一直径化された細胞ビーズを、3次元の鋳型に詰めて培養することによってビーズ同士を接着・一体化させることに成

功した。これまで消化器官系の細胞では難しかった高密度でミリメートルサイズの細胞の 3 次元組織構造を内部まで生かした状態で形成することで、将来、万能細胞を利用した 3 次元臓器形成などに応用展開が期待できる。講演では、ビーズに加えて、ファイバー型やプレート型に規格化された細胞構造も提案する予定であり、細胞をブロックとして積み上げる Bottom-up Tissue engineering に関して議論する。

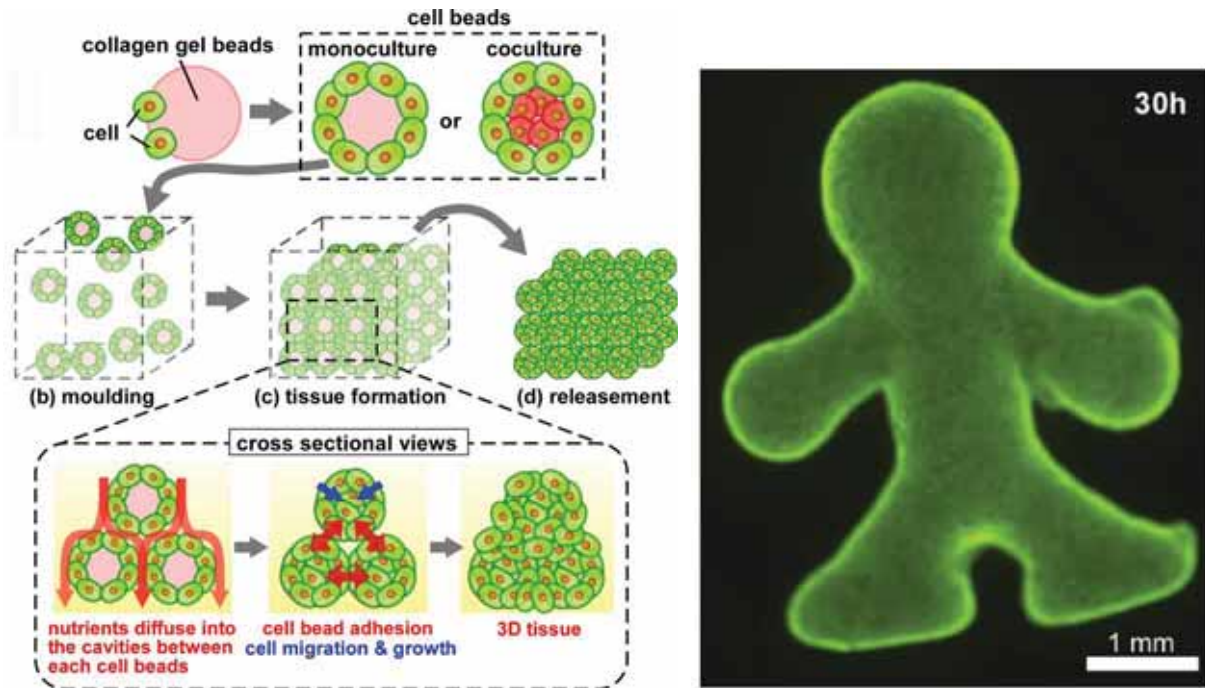


Figure: Microbeads based 3D tissue construction

References

- [1] Y. Matsunaga, Y. Morimoto and S. Takeuchi, Bead-based tissue engineering: moulding cell beads into a 3D tissue architecture, **Advanced Materials**, vol. 23, no.12, pp. H90-H94, 2011.
- [2] Midori Neigishi-Kato, Yukiko Tsuda, Hiroaki Onoe, and Shoji Takeuchi: A neurospheroid network-stamping method for neural transplantation to the brain, **Biomaterials**, vol. 31, pp. 8939-8945, 2010.
- [3] N. Misawa, H. Mitsuno, R. Kanzaki, S. Takeuchi: A Highly Sensitive and Selective Odorant Sensor using Living Cells Expressing Insect Olfactory Receptors, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 107(35), pp. 15340-15344, 2010
- [4] W-H. Tan and Shoji Takeuchi: Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation, **Advanced Materials**, vol. 19, pp. 2696-2701, 2007
- [5] W-H. Tan and Shoji Takeuchi: A Trap-and-Release Integrated Microfluidic System for Dynamic Microarray Applications, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 104, no. 4, pp. 1146-1151, 2007

O-23 複合的マイクロバイオアッセイシステムの開発

○佐藤記一

群馬大学 大学院工学研究科 応用化学・生物化学専攻

Development of A Total Micro-bioassay systems

Kiichi SATO*

School of Engineering, Gunma University

Abstract

A bioassay using cultured cells is one of the most important analytical methods in a search for new drugs, a safety evaluation of foods and chemical compounds, and basic biochemical studies. In this study, a microchip-based total bioassay system for oral anticancer agents and estrogens was developed, and overall activity of the agents, i.e. digestion, intestinal absorption, hepatic metabolism, and bioactivity to target cells, could be assayed with simple operations. The microchip was composed of a slide glass, a membrane filter and two PDMS sheets which had microchannels. Human intestinal model cells were cultured on the membrane in the microchip. Human hepatocellular carcinoma cells were cultured on the microcarrier beads, and then packed in the microchannel. Human breast carcinoma cells were cultured on the fibronectin-coated glass surface of the microchannel as target cells. All processes of the microchip-based total bioassay system were done by introduction of an assay drug. Overall activity of the agent could be assayed successfully. The system realized reduction of assay time and cell consumption. We concluded that the developed system had an ability to evaluate the overall characters of the agents, i.e. both bioavailability and bioactivity to the target cells.

はじめに

従来、培養細胞を用いたバイオアッセイ系は単一の活性を検定するものが中心であったが、実際の生体ではより多くの過程を経て、生理活性を示す。例えば、経口摂取された薬剤や食品中の成分は、腸から体内に取り込まれ、代謝を受けながら各組織で生理活性を示す。そこで、本研究では生物学的利用能（バイオアベイラビリティ）、すなわち消化や腸管での吸収と肝臓での代謝（初回通過効果）を評価するシステムや、バイオアベイラビリティまたは腎排泄を考慮に入れながら標的組織での生理活性を評価できるバイオアッセイ系を一枚のマイクロチップ上に構築することにより、経口摂取された物質の生理活性を複合的に評価するシステムの開発を試みた。

実験

シリコンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) とスライドガラスを用いてマイクロチップを設計、作製した。チップ内に設置したメンブレンフィルター上に腸上皮のモデルとして Caco-2 細胞を腸上皮様に培養し、細胞を介した物質透過をみることで吸収を評価した[1]。マイクロ腸管の血管側下流に肝臓モデルとして HepG2 細胞を培養したビーズを充填し、物質の代謝を行わせた。マイクロ肝臓の下流に標的細胞としてヒト乳がん由来の MCF-7 細胞を培養し、その細胞活性を計測することで吸収、代謝された物質の生理活性を評価した[2]。

結果と考察

1枚のチップ上の所定の位置に3種類の細胞を培養した複合的マイクロバイオアッセイチップを構築した。ここに、モデル物質として経口投与可能なプロドラッグ型抗がん剤、通常経口投与されない抗がん剤、エストロゲン活性を持つ物質、エストロゲンアンタゴニストなどを2日間連続的に投与することにより実際にアッセイを試みた。その結果、抗がん剤については、腸管の透過性や肝臓での代謝による活性化などの差異に応じた抗がん活性を検出することに成功した。また、エストロゲン類に関しては腸管の透過性と肝臓で代謝されて失活しやすいことが確認でき、また乳がん由来細胞株への増殖活性を検出することに成功した。

このように、腸吸収や肝代謝の影響を考慮に入れたバイオアッセイ系を構築することに成功した。本システムは、将来的にドラッグスクリーニングなどにおける初期のバイオアッセイや、患者由来の細胞を用いた薬剤感受性などに関する個別診断、一般化学物質の安全性試験など様々な分野への応用の可能性が期待できる。

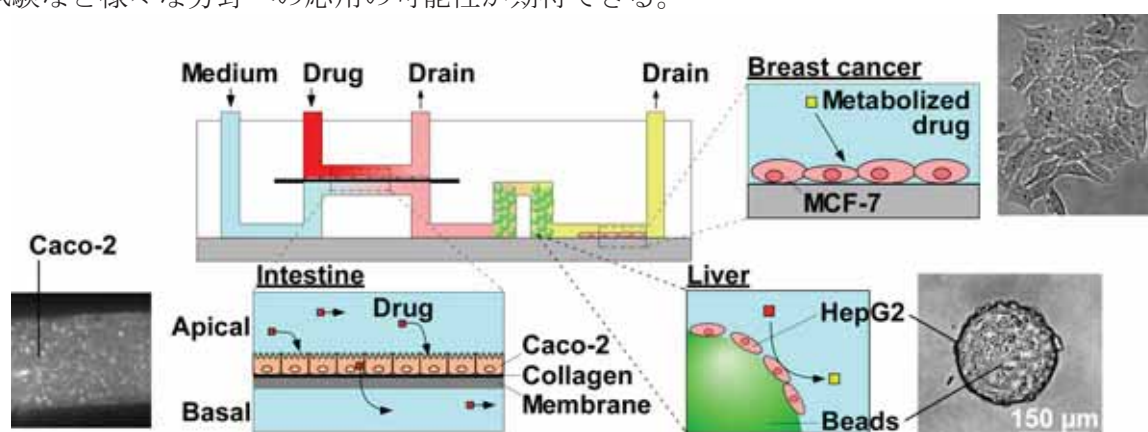


Fig.1 複合的マイクロバイオアッセイチップの断面模式図

References

- [1] Imura, Y. *et al. Anal. Sci.* **2009**, *25*, 1403–1407.
- [2] Imura, Y. *et al. Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9983–9988.

O-24 プロテオーム一斉解析に向けたナノ LC-MS システムの開発

○石濱 泰

京都大学大学院薬学研究科・慶應義塾大学先端生命科学研究所

NanoLC-MS System towards Complete Proteome Analysis

Yasushi ISHIHAMA*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Abstract

We have developed one-dimensional nanoLC-MS/MS systems with meter-scale monolithic silica-C18 capillary columns for human proteome analysis. When tryptic peptides from 4 microgram HeLa cell lysate proteins were directly injected onto a 4-meter, 100 micron i. d. monolithic silica C18 column and an 8-hour gradient was applied at 500 nL/min, 41,319 non-redundant tryptic peptides from 5,970 proteins were successfully identified from quadruplicate measurements; this is the best result yet reported without the use of exhaustive pre-fractionation. Because separation efficiency in the long monolithic column system was much higher than that in a conventional particle-packed column system, ion suppression caused by co-elution of peptides was drastically reduced, resulting in a 5-fold improvement in MS responses on average.

はじめに

演者近年の MS の進化は著しく、ハイエンド MS の高性能化は目覚ましいスピードで進行している。それにも関わらず、ヒトなどの高等生物のプロテオーム一斉解析はいまだに実現していない。これは、複雑さと広いダイナミックレンジを有するプロテオーム試料に応えられるだけの性能をまだ測定システムが備えていないからである。ショットガンプロテオミクスで現在最も一般的に用いられている方法は、オンラインで接続した逆相クロマトグラフィーでの分離に加え、さらにその前段階で様々な分離モードを組み合わせた二次元分離を行うものである。しかし、このようなアプローチは分析時間が非常に長くなることに加え、それぞれの成分が複数の画分にスプリットしたり、分離ステップを重ねることによって回収率が低下したりするため、実用性には大きな問題がある。そこで我々は、逆相 LC の性能を極限まで高めた単次元 LC とハイエンド MS を直結した最もシンプルな LC-MS システムを開発することにより、上記の問題点を克服した高性能プロテオーム解析システムが実現できるのではないかと考え、メートル長シリカモノリスカラムを用いた系の検討を行った。

実験

NanoLC-MS システムは、LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific 社)もしくは TripleTOF

5600(AB Sciex 社)質量分析計、Ultimate3000RSLCnano ポンプ(Dionex 社)、HTC-PAL オートサンプラ(CTC Analytics 社)で構成した。シリカモノリスカラムは論文に従い調製した¹。他の条件は論文を参照されたい²。

結果と考察

単次元 LC 用の逆相カラムとして理論段数 100 万段が達成可能なメートル長シリカモノリスカラム¹について検討した。その結果、数十時間の緩勾配溶出を組み合わせると、一次元分離だけで大腸菌程度の遺伝子数の生物であれば十分にマイクロアレイスケールでのプロテオーム一斉測定が可能であることがわかった²。本条件と従来の充填剤型カラムを用いる系と比較したところ、同じ注入量にも関わらずペプチドのピーク面積値は平均 5 倍増加した。これは分離効率が向上したことにより、MS 導入時のエレクトロスプレーイオン化におけるイオン化抑制効果が弱まったことによると考えられる。さらに、多次元分離を排したことで必要試料量が 10 分の 1 以下となり、全分析時間も減らすことができた。次に、本システムをより複雑なヒト培養細胞に適用した。HeLa 細胞抽出タンパク質消化物 4 μg を試料として、100 μm 径 4 メートル長のモノリスシリカキャピラリーカラムに流速 500 nL/min で 8 時間のグラジエント溶出で測定を行ったところ、1 回の測定で平均 26,210 ペプチド、4 回の繰り返し測定で 41,319 ペプチド、5,970 タンパク質を同定することができた。従来の粒子充填剤カラムを用いた測定の平均同定数は約 10,000 ペプチド程度であり、大幅に測定効率を高めることに成功した。また、大腸菌プロテオーム測定の場合と同様に、充填剤型カラムとの比較で約 5 倍のピーク面積の増加が認め

られた。しかしその一方で、大腸菌プロテオーム測定時では得られた約 80 倍のダイナミックレンジの拡大が今回の測定では認められなかったことから、ヒトプロテオーム一斉解析の達成には、LC、MS の両方に更なる技術開発(更なる高分離能 LC および高速高感度スキャン MS)が必要であることが分かった。

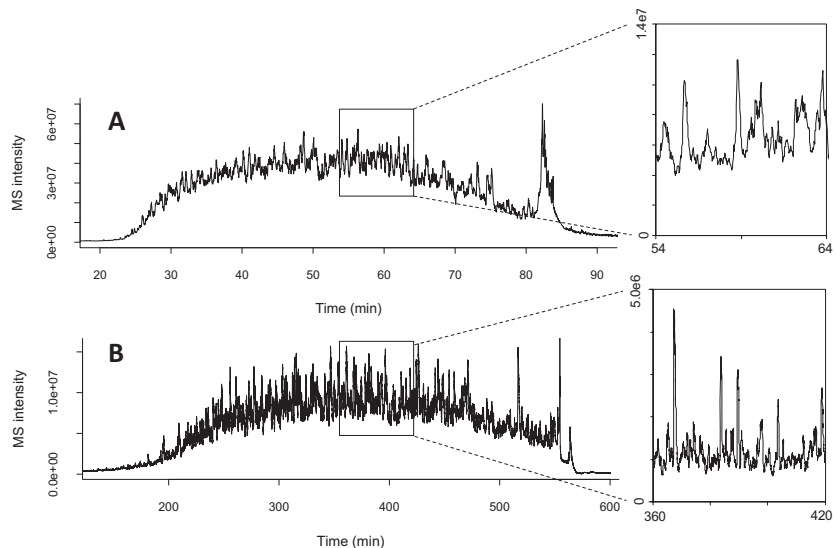


Fig. 1 HeLa細胞のTICクロマトグラム (A)15 cm長粒子充填剤カラム、(B)4 m長シリカモノリスカラム (右ボックスは m/z 700-800の抽出クロマトグラム)

References

- [1] Miyamoto *et al. Anal. Chem.* 80: 8741-8750, 2008.
- [2] Iwasaki *et al. Anal. Chem.* 82: 2616-2620, 2010.

O-25 CE-MS メタボロミクスによる肝臓疾患マーカー探索

○曾我朋義

慶應義塾大学先端生命科学研究所

CE-MS metabolomics Reveals γ -glutamyl dipeptides as Biomarkers for Discrimination among Different Forms of Liver Disease

Tomoyoshi SOGA*

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Abstract

CE-MS metabolomics has become a powerful new tool for gaining insights into cellular and physiological responses. Using this approach, we profiled mouse liver and serum metabolites following acetaminophen-induced hepatotoxicity and found the elevation of the level of ophthalmate in both liver and serum. We revealed ophthalmate as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. Subsequently, to evaluate this biomarker response, we analyzed a total of 248 serum samples obtained from nine types of liver disease including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. We found that in liver diseases in humans, many γ -glutamyl dipeptides (γ -GDPs), which were synthesized from many amino acids with γ -glutamyl cysteine synthetase (GCS), were increased and that measurement of their levels could distinguish among different liver diseases.

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) 法によるメタボローム測定法¹は、細胞内に存在するメタボローム (千種類以上の代謝物質) の同時定量分析を可能にした^{2,4}。本法はバイオマーカー探索にも威力を発揮し、これまでにマウスのモデルで薬剤性肝炎のバイオマーカーオファタルミン酸を発見した⁴。さらに今回ヒトの各種の肝疾患マーカー γ -グルタミルジペプチド (γ -GDP) を見出した⁵。詳細を報告する。

実験

山形大病院および東大病院で入手した9種類の肝疾患患者 (薬剤性肝炎 (DI)、B型持続性肝炎 (AHB) および慢性肝炎 (CHB)、C型の持続性肝炎 (CNALT)、慢性肝炎 (CHC)、肝硬変 (CIR)、肝細胞がん (HCC)、単純性脂肪肝 (SS)、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)) および健常者 237 例の血清をメタボローム解析した。肝疾患マーカーの探索には CE-TOFMS、血清中の γ -GDP 類の高感度分析には、LC-MS/MS 法を用いた。CE-TOFMS、LC-MS/MS のその他の測定条件の詳細は論文を参照されたい⁵。

結果と考察

図1に示したように、すべての肝疾患で十数個の γ -GDP類が増加することを見出した。図2に各肝疾患のAST、ALT値と γ -GDP類の濃度の箱髭図を示した。AST、ALTはB型およびC型持続性肝炎では、健常者との差はなかったが、 γ -GDP類は有意に増加した。また各種の肝疾患に対する γ -GDP類の血中濃度は異なっており、幾つかの γ -GDP類を組み合わせることで9種類の肝疾患患者を高精度に診断することが可能であった⁵。このマーカーは肝疾患の診断のみならず疾患の進行の機序の解明にも有用であると考えられる。

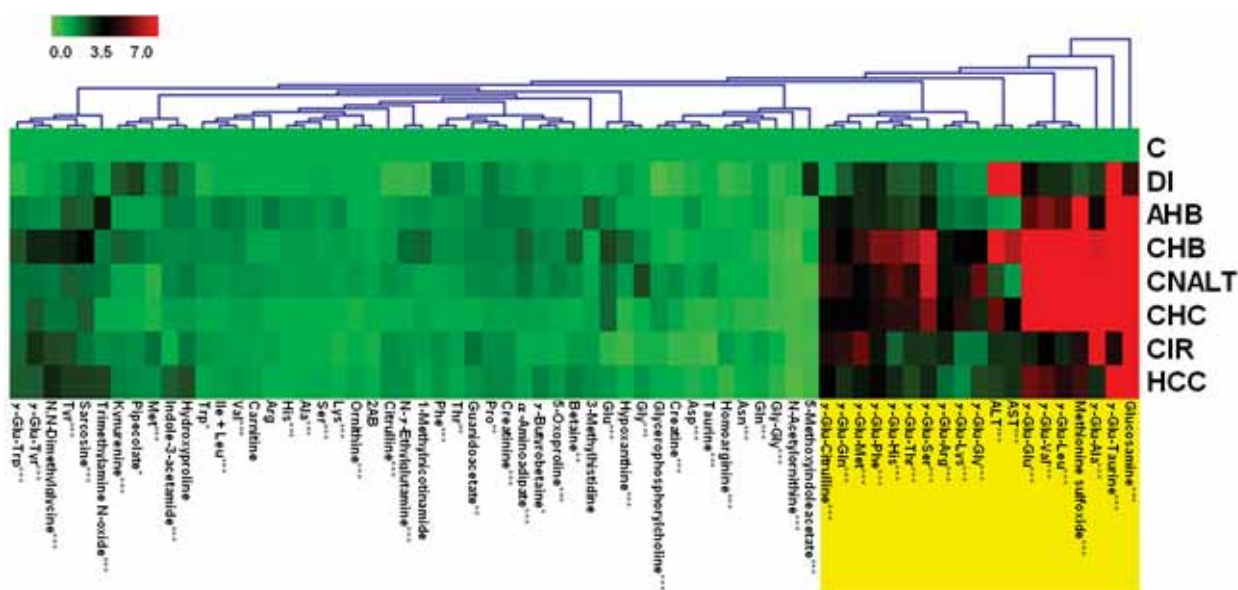


図1 各肝疾患患者の血清中の代謝物の濃度

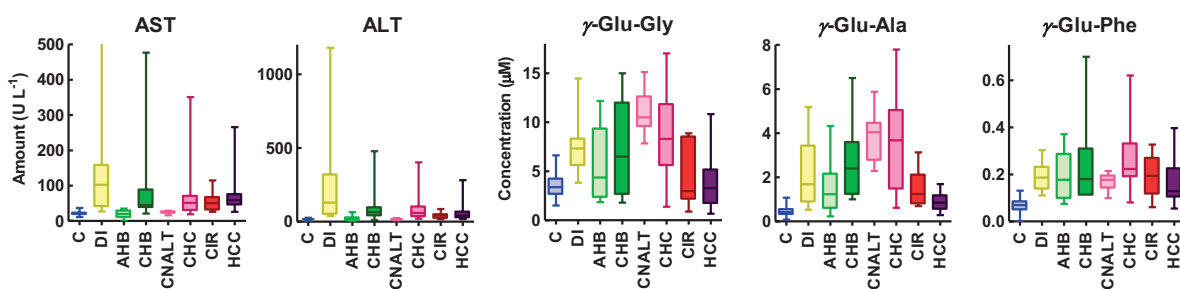


図2 各肝疾患患者の血清中の肝機能マーカーと γ -GDP類の濃度

References

- [1] Soga, T. *et al. J. Proteome Res.* 2: 488-494, 2003.
- [2] Ishii, N., *et al. Science* 316: 593-597, 2007
- [3] Hirayama, A., *et al. Cancer Res.* 69: 4918-4925, 2009.
- [4] Soga, T. *et al. J. Biol. Chem.* 281: 16768-16776, 2006.
- [5] Soga, T. *et al. J. Hepatol.* online doi:10.1016/j.jhep.2011.01.031.

O-26 メタボロミクスとケミカルバイオロジー

○井本正哉

慶應義塾大学理工学部生命情報学科

Chemical Biology Using Metabolome Analysis

Masaya IMOTO*

Faculty of Science and Technology, Keio University

Abstract

To fully understand the regulation of cellular events, functional analysis of each protein involved in the regulatory systems is required. Among a variety of methods to uncover protein function, chemical biology is a remarkable approach in which small molecular compounds are used as probes to elucidate protein functions within signaling pathways. However, identifying the target of small molecular bioactive compounds isolated by cell-based assays represents a crucial hurdle that must be overcome before chemical biology studies can commence. Metabolomic technologies have advanced tremendously in recent years, and CE-TOFMS has emerged as a powerful new tool for the comprehensive analysis of cellular metabolites. Analysis of the metabolome with CE-TOFMS also reveals metabolic changes induced by small molecules. Thus, despite a lack of reports describing the identification of chemical inhibitor targets using metabolomic analysis, such efforts would be worthwhile. In this symposium, we will present our recent study toward the target identification of bioactive compound using CE-TOFMS.

はじめに

小分子化合物を用いて生体内分子の機能や反応を明らかにするケミカルバイオロジーが近年注目されている。この研究には小分子化合物の標的分子同定が必須だが、確実な手法は未だに確立されていない。一方、メタボローム解析の手法が近年確立され、代謝産物の一斉測定が可能となった。当研究室ではこれまでに、メタボローム解析を用いて細胞内 ATP 量を減少させるグルコピエリシジン A の標的分子同定に成功した。このことから、代謝変動を誘導する化合物ならばメタボローム解析を用いて標的分子を同定できると考えた。

そこで、当研究室が保持している標的未知化合物の中から ATP 量の変化を指標に代謝変動を誘導する化合物を探索した。その結果、標的未知化合物インセドニンが V-ATPase 阻害剤バフィロマイシン A1 と 4 時間併用処理することでヒト扁平上皮がん由来 A431 細胞の細胞内 ATP 量を減少させることを見出した。インセドニンはアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-xL の機能阻害化合物として当研究室で単離された新規物質だが、ビオチン体を用いた結合実験でも標的分子は同定されていない。そこで本研究では、メタボローム解析を用いてインセドニ

ンの標的分子同定を目指した。

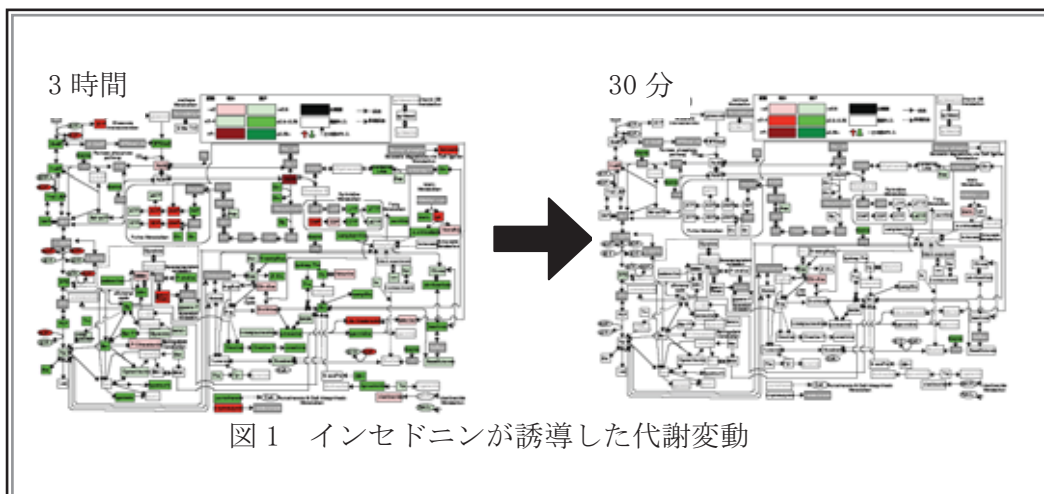
方法

インセドニンとバフィロマイシン A1 が代謝に与える影響を調べるために、両薬剤を併用または単独で 4 時間処理した A431 細胞から MeOH で代謝産物を抽出し、約 500 種類の細胞内代謝産物量を慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我教授に CE-TOFMS で定量していただき、この定量データを用いて無処理時と化合物処理時の代謝産物量を比較差異解析した。

結果と考察

インセドニンは解糖系、TCA 回路、各種アミノ酸等様々な代謝産物を減少させたが、多くの代謝変動が一様に減少したため解析が困難であった。これは、インセドニンが最初に誘導した代謝変動が波及した結果であると考えられる。そこで、インセドニンの一次作用点を明らかにすべく、処理時間を短縮して再度メタボローム解析を行った。その結果、インセドニンの処理時間を短くするほど変動する代謝産物の種類が減少した(図 1)。特に、インセドニン処理後 30 分では 7 種類の代謝産物にのみ変化が見られ、中でもチアミン量を著しく減少させた。チアミンは細胞

外から取り込まれた後にチアミンニリン酸へと変換され、ATP 合成に重要な酵素を制御して



いることが知られている。このことから、インセドニンはチアミンの取りこみを阻害している可能性が考えられ、チアミン放射標識体を用いてインセドニンがチアミンの取りこみ量に与える影響を調べた。しかし、インセドニンはチアミンの取りこみを全く阻害しなかった。このことから取りこみ阻害以外にチアミンが減少する原因としてチアミンの消費が考えられ、現在この点を解析している。

O-27 安定同位体標識を用いた酵母のターンオーバー解析

○福崎英一郎

大阪大学工学研究科生命先端工学専攻

Stable isotope labeling based metabolic turnover analysis of yeast.

Eiichiro FUKUSAKI*

Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University.

Abstract

Metabolic profiling usually imply a static analysis based on multiple snapshot of metabolome. In some case, dynamic information would be necessary. Metabolic flux analysis is one of the most important tactics for dynamic metabolic analysis. But the method is rather difficult for person who is not familiar with metabolic engineering. Time course sampling after labeling with stable isotopomer metabolites would be useful for apparent metabolic turn over analysis. Some preliminary experimental data are discussed.

はじめに

メタボロミクスでは静的なスナップショット代謝解析を用いる場合が多い。しかしながら、代謝分岐経路の分配率や、還流回路の回転方向、代謝律速経路の発見等を高解像度で知りたい場合、スナップショット解析では不十分な場合がある。代謝フラックス解析は、上記問題を解決する良い方法論であるが、代謝工学に不慣れな研究者には敷居の高い技術でもある。安定同位体標識基質の取り込み後、経時サンプリングを行い、質量分析によって代謝経路中の代謝物の標識率比の経時推移を観測することにより、半定量的ではあるが、上記問題に対する解決に資する情報を得ることができる。植物および酵母を材料として上記概念を証明する実験結果をいくつか示したい。

実験

CE-TOFMS は、Beckman Coulter 社製キャピラリー電気泳動装置 (P/ACE MDQ) に AB Siex 社製タンデム四重極リニアイオントラップ質量分析計 (4000QTRAP) を連結して構成した。泳動は、極性反転させ電気浸透流を利用して行った。標識実験は、実験材料に応じて、タバコは ^{13}C -二酸化炭素、植物培養細胞は、 ^{15}N -硝酸カリウム、酵母は、 ^{13}C 標識グルコースを用いた。標識後、経時サンプリングし、標識率の時間推移を計測し、種々の議論を行った。

結果と考察

タバコ葉に光照射下、¹²C-二酸化炭素を供給し、光合成が安定した時点で¹³C-二酸化炭素に切り替え、経時的にサンプリングし、CE-MS 分析に供した。標識率の時間推移を解析したところ、細胞質性フォスホグルコムターゼ反応が律速段階であることが示唆された。また、葉緑体におけるカロテノイド生産において、*beta-caroten hydroxylase* 反応が律速であることが示唆された。

増殖が極端に遅いが、生理活性アルカロイドであるベルベリンを大量生産するセリバオウレン培養細胞の窒素代謝に関わる情報を得るために、¹⁵N 標識した無機塩を用いて同様の実験を行ったところ、セリバオウレン培養細胞では、窒素取り込みに関与するグルタミン酸ならびに、フェニルアラニンはターンオーバーが早いことがわかった。また、アルギニン、リシン等の塩基性アミノ酸のターンオーバーが極端に遅いことが判明した。これら塩基性アミノ酸の下流にはカダベリン、プトレシン等の植物細胞分裂に関わる生理活性アミンがあり、それらの供給不足が増殖が遅い原因であることが示唆された。

¹³C-グルコースを標識源として通常の振盪培養下の出芽酵母に標識、経時サンプリング、質量分析を行い、各代謝物を標識率時間推移を標識炭素数毎に別ベクトルとしてデータマトリクスを作成し、主成分分析に供した。フマル酸とリンゴ酸の非標識体がクエン酸よりも解糖系の糖リン酸群に近い位置にプロットされた。また、¹³C を 3 個含むリンゴ酸やフマル酸のアイソトポマーがクエン酸よりも解糖系のフルラベルアイソトポマーの近くにプロットされていた。これらのことから、通常好気の条件では出芽酵母の TCA 回路は順方向には回転していないことが示唆された。

O-28 CE-TOFMS を用いたバイオエタノール生産酵母の代謝プロファイリング

○蓮沼誠久

神戸大学自然科学系先端融合研究環

Metabolic Profiling of Bioethanol-producing Yeast with CE-TOFMS

Tomohisa HASUNUMA*

Organization of Advances Science and Technology, Kobe University

Abstract

The development of novel yeast strains with increased tolerance toward inhibitors in lignocellulosic hydrolysates is highly desirable for the production of bio-ethanol. Weak organic acids such as acetic and formic acids released during the hydrolysis and solubilization of lignocelluloses negatively affect microbial growth and ethanol production. However, since the mode of toxicity is complicated, genetic engineering strategies addressing yeast tolerance to weak organic acids have been rare. In this study, the effect of acetic acid on xylose fermentation was analyzed by examining metabolite profiles in a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae* with CE-TOFMS. Our metabolomic approach revealed one of the molecular events underlying the response to acetic acid and focuses attention on the non-oxidative pentose phosphate pathway as a target for metabolic engineering. An important challenge for metabolic engineering is identification of gene targets that have material importance. This study has demonstrated that metabolomics is a powerful tool to develop rational strategies to confer tolerance to stress through genetic engineering.

はじめに

エネルギーセキュリティの確保、低炭素社会の構築に向け、再生可能で食糧と競合しないセルロース系バイオマスを経済調和型のバイオプロセスにて変換し、バイオ液体燃料を効率良く生産する技術の開発が求められている。バイオエタノール生産の場合、バイオプロセスの要となる発酵工程は酵母を用いることが一般的であるが、その際の課題の一つは、バイオマスの前処理工程で生成する過分解物質（酢酸、ギ酸、フラン等）が引き起こす発酵阻害を緩和することである。本研究では、CE-TOFMS を用いて、主要な発酵阻害物質である酢酸が酵母の代謝に与える影響を調べることにした。

実験

キシロース資化性を付与するためにキシロースレダクターゼ遺伝子、キシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え酵母を用いて、40 g/l

のキシロースを単一炭素源とする YP 培地 (10 g/l yeast extract, 20 g/l polypeptone) に 30~60 mM の酢酸を添加し 30°C 微好気条件下で発酵を行った。発酵中の菌体を経時的にサンプリングし、コールドメタノール法¹およびボイリングエタノール法¹を用いて細胞内代謝物質を抽出した。抽出物は CE-TOFMS に供して代謝物質の蓄積量を調べた²。

結果と考察

微好気条件下のキシロース発酵では酢酸濃度依存的にキシロース消費速度およびエタノール生産速度が低下することが確認された。発酵開始から 4、6、24 時間後の菌体を回収し、細胞内代謝物質の CE-TOFMS 分析を行ったところ、酢酸非存在下では経時的に減少する非酸化的ペントースリン酸回路の代謝中間体が、酢酸存在下では逆に蓄積することが明らかとなった (Fig. 1)。中でも糖リン酸化合物の中では細胞内賦存量の多いセドヘプツロース 7 リン酸については、60 mM の酢酸を添加することにより発酵開始 24 時間後の細胞内蓄積量が、10 倍以上増加していた。この結果を基に、セドヘプツロース 7 リン酸 (S7P) を基質として変換するトランスアルドラーゼ (TAL) を過剰発現させたところ、TAL 過剰発現株は酢酸存在下における糖リン酸の蓄積を解消するとともに、キシロースからのエタノール生産量を増大させた。このことから、TAL の過剰発現は、酢酸添加により減速されたペントースリン酸代謝フラックスが増加させ、酢酸存在下のエタノール生産速度が向上させると考えられる。本研究は、CE-TOF を用いた代謝プロファイリングを行うことにより、発酵阻害存在下におけるエタノール生産の鍵反応を特定することに成功するとともに、メタボローム解析がバイオ燃料生産酵母育種のための有用なツールとなり得ることを示すことができた。

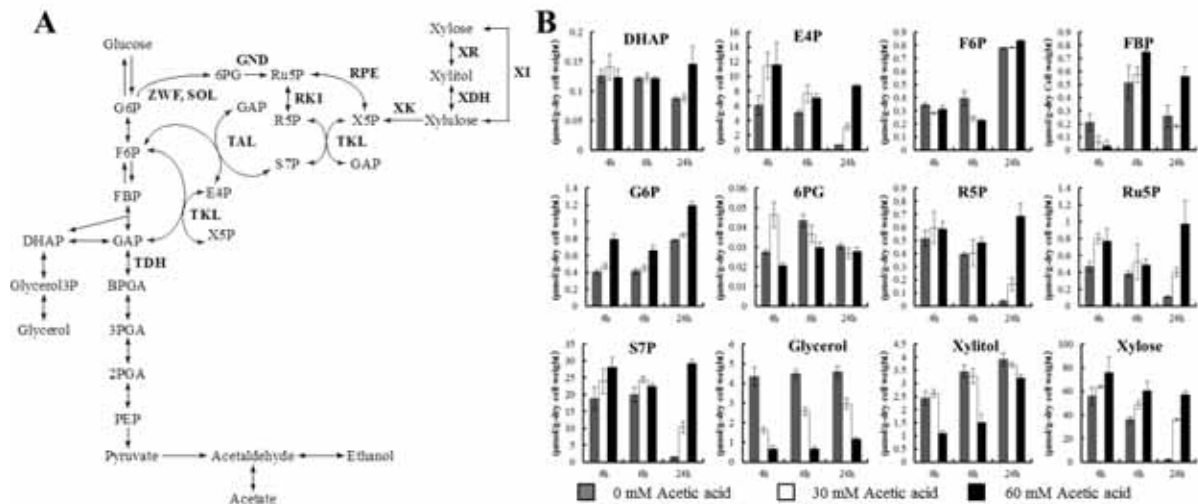


Fig.1 キシロースからのエタノール生産経路 (A) と酢酸存在下の代謝物蓄積量の経時変化 (B)

References

- [1] Canelas, A.B. *et al. Anal Chem.* 81: 7379-7389, 2009.
- [2] Hasunuma, T. *et al. Microb. Cell Fact.* 10: 2, 2011.

O-29 匂いに対する恐怖反応のメタボロミクス解析

○小早川 高

大阪バイオサイエンス研究所 神経機能学部門

Metabolomics Analysis of Fear Response Evoked by Odors

Ko KOBAYAKAWA*

Osaka Bioscience Institute

情動とは私たちが生きていく上で欠かせない本能を呼び起こす心の働きである。空腹時においしい食べ物の匂いがして食欲を刺激されることや、腐敗物の強烈な悪臭に思わず顔を背けることは誰にでも経験できる。情動は外界の状況や、脳や体の内面の状況に応じて適切なものが選択される必要があるのだが、この適切なものを選択するというメカニズムは良く分かっていない。また、情動をどのように客観的に定義すべきなのか、情動をどのように計測するのかという定量的な研究を開始する上での前提条件もはっきりしているとは言えない状況にある。このような状況で、私たちは、匂い情報を伝達する嗅覚神経回路の機能に着目することで、特異的な情動を制御する未知の神経メカニズムを解明したり、特異的な情動を定量計測する心のものである「情動マーカー」を開発したりすることを目指した研究を進めている。

匂い分子が鼻腔の深部の嗅上皮と呼ばれる領域へ到達すると、そこに存在する嗅細胞によって感知される。嗅細胞が匂い分子を感知したという情報は脳の嗅球を経由して嗅覚中枢へ伝達される。嗅球の表面には糸球と呼ばれる球状の構造体があり、この糸球で嗅細胞は嗅球の神経細胞と接続している。1つの匂い分子は複数の嗅覚受容体と結合して、その結果、複数の糸球を活性化させる性質がある。糸球の活性化パターンを脳が読み解いて特異的な情動を引き起こすメカニズムを解く手がかりが私たちの研究から明らかになってきた。

脳には複数の領域があり、運動野や視覚野のように、それぞれの領域の機能は異なっていることが知られている。嗅球は匂い情報を伝達する役割を持っているが、さらに細かく分類すると嗅球の中でも位置によって機能が異なっているのだろうか？私たちは嗅上皮の背側ゾーンに存在する嗅細胞のみに発現する遺伝子を同定し、この遺伝子のプロモーターを用いて、背側ゾーンの嗅細胞のみを選択的に除去した「背側除去マウス」を作製した。背側除去マウスでは嗅球の背側領域は嗅細胞と接続せず糸球が形成されなかった。背側除去マウスは腹側の糸球を用いて腐敗物や天敵の匂いを正常に感知することができた。ところが、背側除去マウスではこれらの忌避性の匂い分子を嗅がせた際に、野生型マウスで見られる忌避行動、脳内のストレス経路の活性化、血液中のストレスホルモンの分泌などの反応が全く起こらなかった。但し、後天的に学習すれば背側除去マウスでも匂いに対する忌避行動を示した。逆に、腹側の糸球を除去したミュータントマウスは匂いに対する先天的な忌避行動を示した。これらの実験結果から、匂いに対する忌避行動は背側の嗅覚神経回路によって先天的に制御

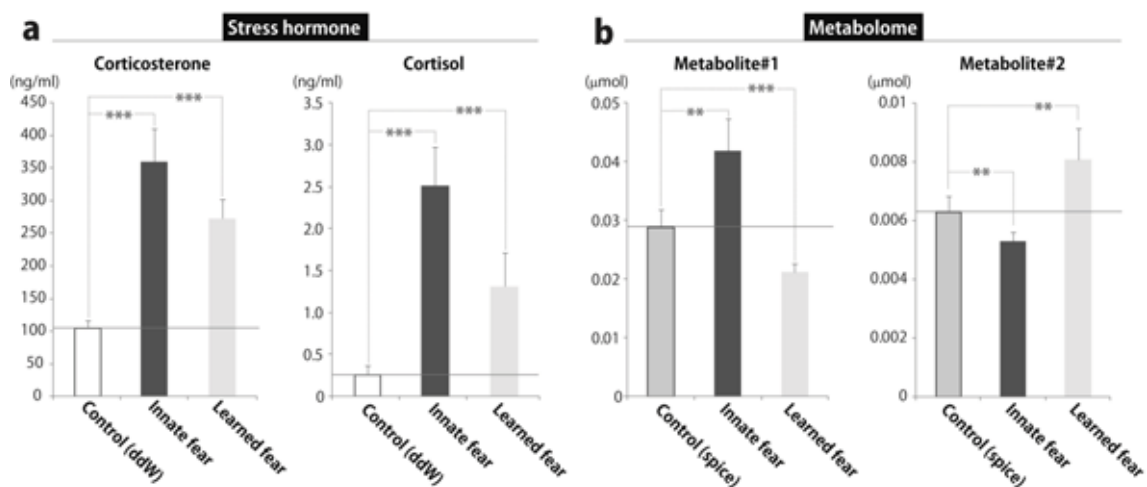
されていることが明らかになった。野生型のマウスであれば猫の付けていた首輪ですらその匂いを恐れて近づかないが、背側除去マウスは恐れるそぶりも見せずに猫に近づいてしまうという驚くべき行動を示した。

私たちの研究以前にはキツネの分泌物由来の匂い分子の成分であるトリメチルチアゾリン (TMT)が先天的な恐怖情動を誘発する最も活性の高い匂い分子であると考えられていた。これに対して、私たちは、先天的な恐怖情動を誘発する嗅覚神経回路の活性に着目することで TMT に比較して最大で10倍以上の強い恐怖情動の誘発活性を持つ人工物由来の一連の匂い分子群である「恐怖臭セット」を発見することに成功した。「恐怖臭セット」を用いることで様々な強度での先天的な恐怖情動を定量的に誘発することが可能になった。元々は恐怖には感じない感覚刺激と電気



ショックなどを関連学習することで後天的な恐怖情動を誘発することができる。私たちは「恐怖臭」を用いて誘発した先天的な恐怖情動と、後天的な恐怖情動の比較解析を行った。その結果、両者の恐怖反応は脳内の異なる神経回路によって処理され、異なる種類の生理応答を伴うことが明らかになった。この発見によって、哺乳類の恐怖には異なる種類の神経回路の活性化や生理応答の組み合わせによって定義できる複数の異なる種類が存在することが明らかになった。

恐怖情動のマーカーとしてストレスホルモン(corticosteron や cortisol)が用いられてきた。下図に示すように、ストレスホルモンの解析では先天的(innate)と後天的(learned)の恐怖情動を区別できないが、メタボローム解析では両者の情動を区別できた。メタボローム解析によって恐怖情動をこれまでになく精度で定量評価する「情動マーカー」が開発できる可能性がある。



(本研究の一部はイノベーション創出事業などによって実施)

O-30 腸内常在菌の代謝産物のメタボロミクス解析

○松本光晴

協同乳業(株)研究所技術開発室

Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome

Mitsuharu MATSUMOTO*

Dairy Science and Technology Institute, Kyodo Milk Industry Co. Ltd.

Abstract

Low-molecular-weight metabolites produced by intestinal microbiota play a direct role in health and disease. In this study, we analyzed the colonic luminal metabolome using CE-TOFMS in order to clarify the metabolite profiles in the intestinal lumen. CE-TOFMS identified 179 metabolites from the colonic luminal metabolome and 48 metabolites were present in significantly higher concentrations and/or incidence in the germ-free (GF) mice than in the Ex-GF mice ($p < 0.05$), 77 metabolites were present in significantly lower concentrations and/or incidence in the GF mice than in the Ex-GF mice ($p < 0.05$), and 56 metabolites showed no differences in the concentration or incidence between GF and Ex-GF mice. These indicate that intestinal microbiota highly influenced the colonic luminal metabolome and a comprehensive understanding of intestinal luminal metabolome is critical for clarifying host-intestinal bacterial interactions.

はじめに

腸内菌叢が宿主の健康に多大な影響を与えているのは周知の事実であるが、その代謝産物の研究は殆ど進んでいない。しかしながら、低分子で腸上皮細胞や血中にも移行する多くの代謝産物は、腸内細菌自体あるいは菌体成分よりも直接的に健康に関与している可能性が高い。本研究では、腸内菌叢の代謝産物を把握する目的でマウス大腸内容物のメタボローム解析を実施した。

実験

BALB/c マウスを兄妹交配させ、同腹の雄性マウスを無菌 (GF) マウスと通常菌叢 (Ex-GF) マウスの 2 群に分けて飼育し、7 週齢で屠殺し大腸内容物を得た。Ex-GF マウスは、4 週齢に日本クレア製マウスの糞便カクテルを経口投与した。大腸内容物は 4 倍量の PBS で抽出し、分子量 1,000 以下をターゲットとした CE-TOFMS にてメタボローム解析 (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(株)の受託解析) した。同様の方法で飼料も解析した。

結果と考察

大腸内容物より 179 成分が検出され、その内 46 成分は GF が Ex-GF より有意に高濃度、77 成分は GF が Ex-GF より有意に低濃度であり、腸内菌叢が産生する物質、吸収する物質、影響を与えない物質の存在および分類が確認できた。例えば、生理機能を有する一級アミン（GABA、ポリアミン等）は腸内菌叢の脱炭酸作用で生じること、また、大腸内でのアミノ酸産生（ペプチド消化）に対する腸内菌叢の影響が少ないことが認められた。既存の知見、例えば、腸内菌叢が短鎖脂肪酸を産生することや、抱合型胆汁酸の脱抱合に強く関与していること等も確認された。一方で、GF マウスから酸化ストレスマーカー *Ophthalmic acid* が検出されるなど新規知見の発見もあった。本研究成果は腸内菌叢と宿主のクロストークを考える上での基礎的なデータになると考えられる。

なお、本研究は生研センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業の研究支援を受けて実施したものである。

O-31 非水系 CE—希土類錯体時間分解蛍光検出による生理活性物質の微量分析

○江坂幸宏^{1, 2}、石田由美¹、梁川綾住¹、村上博哉¹、宇野文二^{1, 2}、住友慶子³、山口佳則⁴
岐薬大¹、岐大院連合創薬²、早大ナノ³、阪大院工⁴

Non-Aqueous Capillary Electrophoresis of Eu Complexes with Time-Resolved Fluorescence Detection for Sensitive Analysis of Alkylphenols

Yukihiro ESAKA^{1,2*}, Yumi ISHIDA¹, Ayaka YANAGAWA¹, Hiroya MURAKAMI¹ Bunji UNO^{1,2}, Keiko SUMITOMO³, Yoshinori YAMAGUCHI⁴

¹ Gifu Pharm. Univ.; ² United Grad. School of Drug Discovery and Med. Inform. Sci., Gifu Univ.; ³ Institute for Nanoscience & Nanotechnology, Waseda University, ⁴ Grad. School of Industry, Osaka Univ.

Abstract

We have investigated non-aqueous (acetonitrile and/or DMSO) capillary electrophoresis system equipped with a time-resolved fluorescence detector for highly sensitive detection of biological interests including biomarkers. We employed the europium (Eu^{3+}) complex with the β -diketone derivatives of alkylphenols (APs) by CDPP [1], DPP-APs, as the detection form. The complex formation between Eu^{3+} and the DPP-APs was necessary for both their electrophoretic migration and the emission of fluorescence. The concentrations of Eu^{3+} and triphenylphosphine oxide, and solvent composition in running solutions were optimized and the detection limit was ca. 5×10^{-10} M. It would be a good sensitivity for CE methods without laser lights. The remarkable effects of DMSO on both migration behaviors of DPP-APs and their detection will be discussed in detail.

はじめに

人間社会から排出された生理活性物質が環境に深刻な悪影響を及ぼす可能性は、環境化学において常に議論されるテーマである。それらの分析においては非常に低濃度での検出が要求される場合が多い。質量分析法の性能向上が著しいが、汎用の観点を含め、依然として他の分析法の発展も重要である。高性能分離分析法と蛍光検出法の組み合わせは、高感度で、実用性も高く、有用である。

演者らは、高性能分離法と希土類錯体時間分解遅延蛍光検出法を結合した高感度分離分析システムの開発を行っている。本検出法において、分析対象は、 Eu^{3+} と錯体形成し、吸収した光エネルギーを Eu^{3+} に移動させ、長寿命で蛍光発光させる配位子構造へ誘導体化変換し、これを分離の後に錯体として検出する。従来、誘導体を逆相 HPLC 分離した後、錯体形成場と蛍光発光場としてのミセル、 Eu^{3+} 、蛍光増強する Trioctylphosphineoxide などの補助配位子を合流し、錯体形成させて、その発光を検出する方法が取られてきた。演者らは、最近、非水系 CE を基盤手法とした、同原理の検出を可能にする有望なシステムを開発した。ここで

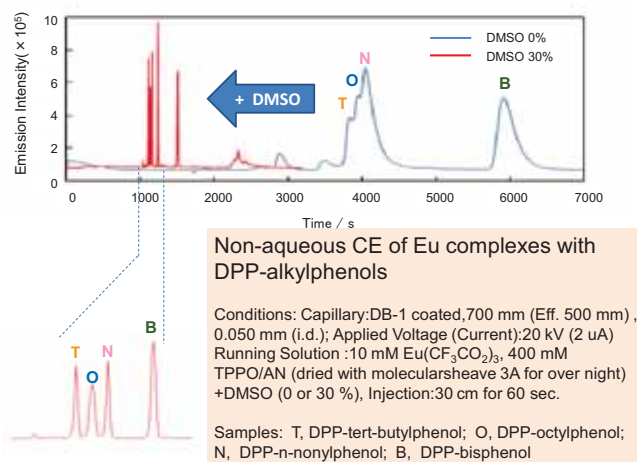
は、単に有機溶媒に適切な Eu 塩を溶解した溶液で錯体形成させて、その荷電で泳動分離し、錯体の蛍光を遅延検出するのみである。溶媒は Acetonitrile (AN) と DMSO の混液であり、DMSO が泳動と発光の両面で重要な役割をする。DMSO が引き起こす錯体の配位子再構成や構造の変化の観点から、その分離と検出への効果を考察する。

実験

分析対象には 4-t-butylphenol、4-octylphenol、4-n-nonylphenol、bisphenol の 4 種を用い、CDPP を用いて誘導体化した。¹ CE 泳動液には AN、DMSO、その混液を溶媒とし、Eu(CF₃COO)₃ を 10 mM で溶解させて用いた。比較の蛍光増強剤として triphenyl phosphineoxide (TPPO) を用いた。キャピラリーは、DB-1 内壁コートした、内径 50 μm、全長 700mm (有効長は 500mm)、浜松フォトニクス社製 時間分解りん光検出器を用いた。

結果と考察

当初の分析系は、十分に脱水された AN に Eu(CF₃COO)₃ と TPPO を添加したものをを用いた。CDPP による 4 種のアルキルフェノール誘導体 (DPP 誘導体) は、AN の脱水によって、蛍光発光は十分に観測されたが、それらのピーク形状は非常にブロードであり、検出時間は 100 分程度であった (下図参照)。DMSO の添加で、1) 劇的な検出時間の短縮 (20 分程度) 2) 劇的なピーク形状の向上 (分離達成、以上、下図参照) 3) 電流の増加、が生じ 4) TPPO が不要 (発光に関して) 5) 脱水が不要 (発光に関して) となった。これは、「当初は、Eu³⁺ が TPPO、蛍光消去能のある水分子と多元錯体を作り、CF₃COO⁻ と大部分でイオンペアを形成していた。そこに添加された DMSO 分子が、水、TPPO を錯体環境から排除・置換し、イオンペア解離を促進し、また、結果的に蛍光増強剤として機能した。」と説明される。DPP 誘導体は、Eu³⁺ と DMSO の三元錯体の形で検出されていると考えられる。さらに、DMSO 濃度の上昇に従い、bisphenol の誘導体 (2 付加体) の Eu³⁺ との錯体形成の化学量論が徐々に 1:2 から 1:1 に変化したことが泳動挙動の変化から示された。検出限界は、DPP 誘導体の標品として、5 × 10⁻¹⁰ M (S/N = 3) 程度であり、高輝度光源を持たない蛍光法による CE 手法としては非常に良好な感度を有している。実際の分析では、誘導体化反応液を分析するため、その不純物による干渉や誘導体化の効率など考慮すべき問題が生じる。これらへの対処としての前処理についても検討した。



References

[1] K. Matsumoto *et al.*, *J.Chromatogr.B*, 773(2002)135

O-32 簡易操作型電気泳動チップによる生体試料の高感度分析

○北川文彦¹, 川井隆之², 木南冴子², 伊藤 潤², 末吉健志², 大塚 浩二²
¹弘前大学理工学研究科, ²京都大学工学研究科

Highly-sensitive Analysis of Biomolecules Using Simplified-operation Electrophoresis Chips

Fumihiko KITAGAWA^{1*}, Takayuki KAWAI², Saeko KINAMI², Jun ITO², Kenji SUEYOSHI², and Koji OTSUKA²

¹Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University, ²Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Abstract

We studied an application of on-line sample preconcentration technique, large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP), to microchip electrophoresis (MCE). In the MCE analysis of biomolecules, sample adsorption onto the channel surfaces should be suppressed, so that the surface was modified with poly(vinyl alcohol) (PVA). Although it is well-known that the PVA coatings can suppress the electroosmotic flow (EOF), an enhanced EOF with the mobility of $4.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ was observed in a low ionic strength sample solution. It was revealed that such temporarily enhanced EOF in the sample zone worked as the driving force to remove the sample matrix in LVSEP. To evaluate the analytical performance of LVSEP, oligosaccharides were analyzed in the PVA-coated microchannel. As a typical result, *N*-glycans released from bovine ribonuclease B were well enriched and separated with the preconcentration efficiency of 4700. Furthermore, peptides, proteins, DNA and amines were successfully concentrated and resolved by applying the LVSEP technique.

はじめに

生体試料のマイクロチップ電気泳動 (MCE) 分析においては、チャンネル表面への試料吸着、複雑な電圧操作、低濃度感度などが問題となる。我々は、生体試料の吸着を抑制する poly(vinyl alcohol) (PVA) 修飾を施したチャンネル全体に、試料成分を脱イオン水に溶解した溶液を注入すると、電気浸透流 (EOF) 速度が大きく増加することを発見し、この現象を利用して分離チャンネル全体に充填した試料を濃縮・分離できる large volume sample stacking with electroosmotic flow pump (LVSEP) を MCE 分析に適用してきた。LVSEP-MCE 分析では、直線状チャンネル全体に試料を注入した後、一定電圧を印加するだけで試料は狭いゾーンに濃縮されるため、分離チャンネルへの電氣的注入操作が不要となり、簡易操作型 MCE を実現できる。しかも、LVSEP では陰極端で試料の濃縮が完了した後に、移動の向きが反転して分離が開始するため、分離長のロスがなく、高性能な分離が期待される。今回は、LVSEP-MCE をオリゴ糖、ペプチド、タンパク質、DNA 等の分析に応用した例について紹介する。

実験

MCE 分析ではチャンネルの深さ・幅 $50\ \mu\text{m}$ 、全長 $8\ \text{cm}$ の poly(dimethylsiloxane) 製ストレートチャンネルチップを用い、試料の吸着を抑制するために PVA 修飾を施した。脱イオン水で希釈した試料溶液をチャンネル全体に注入し、一定電圧を印加することで分析を行った。

結果と考察

LVSEPにおいては、PVAコーティングにより EOF を抑制したチャンネル全体に、低イオン強度のアニオン性試料溶液を注入して電圧を印加すると、試料溶液と BGS ゾーンの間には大きな電場強度差が生じ、試料成分の泳動速度が大きく減少するため、BGS との境界面に濃縮される。このとき、試料ゾーンでは速い EOF が発生するため、試料は濃縮されながら陰極側へと押し戻される。試料マトリクスがチャンネルから完全に押し出されて BGS により置換されると EOF は抑制され、試料の泳動速度がそれを上回るために、試料成分は陽極へ向かって電気泳動を開始し、ゾーン電気泳動により分離される (Fig. 1)。マイクロチップのチャンネル全体に脱イオン水で 4000 倍に希釈した N-結合型オリゴ糖試料を満たして LVSEP-MCE 分析を行ったところ、枝分かれ構造を

有するオリゴ糖が 190 秒以内に濃縮・分離され、一般的な MCE 分析と比較して 4700 倍の高感度化に成功した (Fig. 2)。分離度もほぼ同等であり、チャンネル全体に注入した試料が狭いゾーンに濃縮された後、分離が行われたことを反映している。

今回開発した LVSEP 法は応用性が高く、蛍光ラベルしたアンジオテンシン類や α_1 -酸性糖タンパク質の濃縮およびゾーン電気泳動分離に適用できることが確認された。また、T 字型チャンネルを用いることで、LVSEP と二次元分離を容易に結合できることが確認され、LVSEP により濃縮した DNA 断片をゲル電気泳動分離できることがわかった。一方、キャピラリー電気泳動による実験において、BGS にシクロデキストリン類を添加することで、ワーファリンなどの光学異性体を濃縮・キラル分離できることや、PVA を修飾する際にアミノ基を有する修飾剤を添加することで、アミン類の分析にも適用できることも明らかとなった。以上の結果より、PVA 修飾した直線状チャンネルにおいて LVSEP を行う簡易操作型 MCE が、生体試料全般の高感度分析に有効であることが示された。

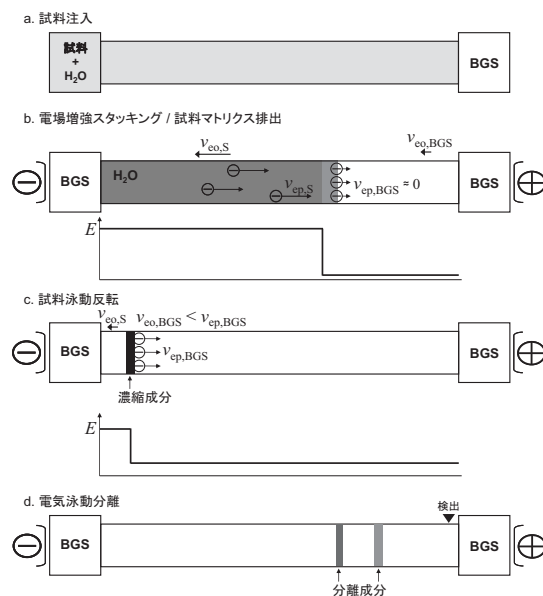


Figure 1. LVSEP of anionic analytes. E , $v_{eo,S}$, $v_{eo,BGS}$ and v_{ep} represent the electric field strength, EOF velocity in sample zone and BGS zones, and electrophoretic velocity of the analytes.

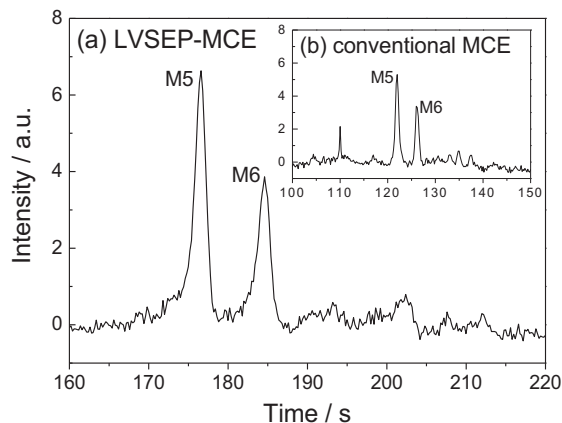


Figure 2. (a) LVSEP- and (b) conventional MCE analyses of oligosaccharides released from bovine ribonuclease B. Sample dilution, (a) 4000-fold with water and (b) 1.14-fold with the BGS.

O-33

電場増幅試料導入法を用いたキャピラリーゾーン電気泳動法による環境試料中の有機ホウ素系防汚剤の定量

○ケオチューイ ネットナピット¹, 福士恵一¹, 齋藤恵逸², 廣川健³, 壺井愛¹, 岡村秀雄¹

¹神戸大院海事科学, ²神戸大院人間発達環境学, ³広島大院工

Determination of pyridine-triphenylborane and its degradation products in environmental samples using capillary zone electrophoresis with field amplified sample injection

Netnapit KAEWCHUAY^{*1}, Keiichi FUKUSHI¹, Keiitsu SAITO², Takeshi HIROKAWA³, Ai TSUBOI¹, Hideo OKAMURA¹

¹*Kobe University Graduate School of Maritime Sciences*

²*Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University*

³*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

Abstract

Field-amplified sample injection (FASI)-capillary zone electrophoresis (CZE) was used to determine a pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and three of its degradation products, diphenylborinic acid (DPB), phenylboronic acid (MPB), and phenol in paint wastes collected in shipyards. The LODs for PTPB, DPB, MPB, and phenol were 0.85, 0.88, 44, and 28 µg/l, respectively. The RSDs of peak area were obtained, respectively, for PTPB, DPB, MPB, and phenol as 3.4-18%, and for peak heights 2.6-16%, and for migration times 0.22-0.43%. The concentrations of PTPB, DPB, MPB, and phenol in the paint wastes were 0.044-1.8, 0.26, 9.6, and 2.9-17 µg/g, respectively. The FASI-CZE method is simple and useful for the determination of PTPB and its degradation products in paint wastes.

Introduction

We have been developing a sensitive method for the simultaneous determination of a pyridine-triphenylborane (PTPB) anti-fouling agent and its degradation products such as diphenylborinic acid (DPB), phenylboronic acid (MPB), and phenol using CZE¹⁾. In the present study, field amplified sample injection (FASI) in which a water plug was injected into the capillary prior to sample introduction by electrokinetic injection (EKI) was applied for the determination of pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and its degradation products in paint wastes obtained from shipyards.

Experimental

As the background electrolyte (BGE) 20 mM sodium tetraborate (pH 9.8) was used. The wavelength was set at 200 nm. The water injection time was 2 s, the sample injection

voltage and time were -5 kV and 6 s, respectively. Three paint-waste samples (waste I, waste II, and waste III) were analyzed. Each sample (2.5 g) in 25 ml of ethyl acetate was shaken at 200 r.p.m. for 6 h to extract PTPB and its degradation products. The solution was centrifuged at $4530\times g$ for 10 min. The supernatant solution was evaporated using a rotary evaporator. The residue was dissolved with 5 ml of hexane and the solution was passed through a coulm (Bond Elut SI, 1g, Agilent Technologies). Then 5 ml of dichloromethane, ethyl acetate, and methanol were passed successively. Each eluate was dried up by blowing nitrogen stream. The residue was dissolved with 2 ml of acetonitrile (ACN)/pyridine (1%v/v). The ACN solution was analyzed using FASI-CZE with standard addition method.

Results and Discussion

Peak heights for PTPB and DPB using FASI were 16 and 58 times higher, respectively, than those using electrokinetic injection (EKI). Peak heights for MPB and phenol could not be detected using EKI. The limit of detections (LODs) for PTPB, DPB, MPB, and phenol were 0.85, 0.88, 44, and 28 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectively (improved 29, 34, 1.1, and 1.0 times compared to the LODs obtained using vacuum injection). The RSDs of peak area were obtained, respectively, for PTPB, DPB, MPB, and phenol as 3.4-18%, and for peak heights 2.6-16%, and for migration times 0.22-0.43%. The calibration graphs obtained with a standard addition procedure for PTPB, DPB, MPB, and phenol in paint waste samples were linear: correlation coefficients were in the range 0.9667-0.9999. The concentrations of PTPB, DPB, MPB, and phenol in waste I were 1.8, 0.26, 9.6, and 17 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectively; the concentration of PTPB and phenol in waste II was 0.044 and 2.9 $\mu\text{g}/\text{g}$; in waste III were 0.096 and 6.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ (DPB and MPB could not be detected in wastes II and III). The electropherograms of the waste I are shown in Fig. 1. The FASI-CZE method is simple and useful for the determination of PTPB and its degradation products in paint wastes.

References

- [1] K. Fukushi, Y. Yakushiji, H. Okamura, Y. Hashimoto, K. Saito, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2187.

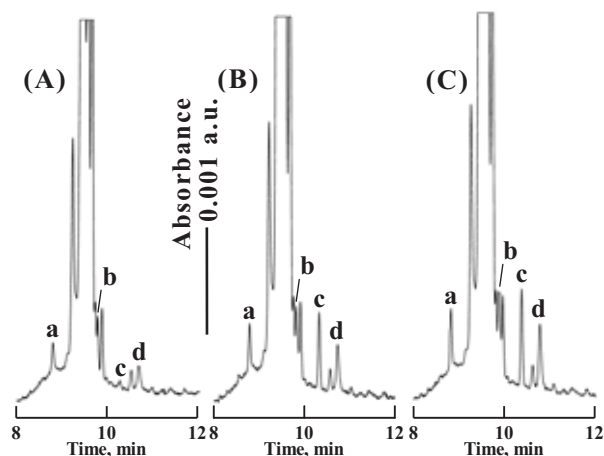


Fig. 1 Electropherograms of the paint waste I. (A) Waste I diluted 50 times. (B) The diluted waste I spiked with a mixture of 0.2 mg/L of phenol, MPB, 0.02 mg/L of PTPB and DPB. (C) The diluted waste I spiked with a mixture of 0.4 mg/L of phenol, MPB, 0.04 mg/L of PTPB and DPB. Identification of peaks: a, phenol; b, PTPB; c, DPB; d, MPB. Electrophoretic conditions: FASI (injection of water plug for 2 s, sample injection with 5 kV for 6 s); 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, 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.

O-34 LVSEP-FASI 法を用いた糖鎖電気泳動分析の 1 万倍の高感度化 (3)

○川井隆之, 上田真澄, 末吉健志, 北川文彦[‡], 大塚浩二
京大院工, 弘前大院理工[‡]

Toward 10,000-fold Sample Preconcentration Efficiency for Oligosaccharide Analysis in Capillary Electrophoresis. 3

Takayuki KAWAI^{*}, Masumi UEDA, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA[‡], Koji OTSUKA
Graduate School of Engineering, Kyoto University

[‡]*Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*

Abstract

In capillary electrophoresis of oligosaccharides, one of the serious disadvantages is the poor concentration sensitivity due to the short optical path length and/or the small injection volume of samples. To overcome the drawback, we employed an online sample preconcentration technique, large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP), resulting in up to a 780-fold sensitivity increase in the oligosaccharide analysis. For the further sensitive analysis, in this study, we combined LVSEP with field-amplified sample injection (FASI), where larger amount of the sample than that in the conventional LVSEP can be supplied by the electrokinetic sample injection scheme. As a typical result, maltoheptaose was well concentrated and separated from the free dye with a 10,000-fold sensitivity improvement. The relative standard deviations of the detection time and the peak height were 2.4% and 11%, respectively.

1. 緒言

キャピラリー/マイクロチップ電気泳動 (CE/MCE) は高分離能および高速分析を実現する優れた分離分析法であるが, 光学検出における光路長が極めて短く, また試料導入量が数 nL 程度に限定されるために濃度感度が低いという問題点を有する。我々はこれまでにキャピラリーやマイクロチャンネル全体に充填した試料を濃縮, 分離できる large volume sample stacking with an electroosmotic flow (EOF) pump (LVSEP) 法を CE/MCE へ適用することにより, 糖鎖分析における操作の簡略化や高感度化を実現してきた [1,2]。しかし, LVSEP 法では試料導入量がキャピラリー全容量に限定されており, 原理上さらなる濃縮効率の向上は困難であった。そこで, 我々はバイアル内の試料を濃縮しながらキャピラリーに注入する電場増強試料注入 (FASI) 法と LVSEP 法を組み合わせることで, CE のさらなる高感度化を検討した。本研究では, モデル試料として fluorescein を用い, LVSEP-FASI 法についての基礎的検討を行った後, 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) で誘導体化した maltoheptaose (G7) を糖鎖試料として用い, 糖鎖電気泳動分析のさらなる高感度化について検討を行った。

2. 実験

CE 分析では分析装置に P/ACE MDQ を用い, キャピラリーとして内径 50 μm , 全長 40 cm, 有効長 30 cm のフューズドシリカキャピラリーを用いた。EOF および試料の吸着を抑制する

ために、キャピラリー内表面を poly(vinyl alcohol) (PVA) により修飾した。泳動液には 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.0) を用い、脱イオン水で希釈した fluorescein 溶液を陰極側バイアルおよびキャピラリー全体に注入した後、 -20 kV の電圧および $0 \sim 1.0$ psi の圧力を印加して試料濃縮を行った。一定時間経過後、電圧および圧力を停止し、陰極バイアル内の試料溶液を泳動液へと交換した後、電圧印加のみを再開して分離を行い、レーザー励起蛍光法 (励起: 488 nm, 検出: 520 nm) により検出を行った。G7 の分析においても、 -15 kV の電圧を印加して同様の手順で分析を行った。

3. 結果, 考察

LVSEP-FASI 法では、陰極側バイアルおよびキャピラリー内部に低イオン強度のアニオン性試料溶液を、陽極側バイアルに高イオン強度の泳動液をそれぞれ導入し、電圧および圧力を印加する (Fig. 1a)。試料は電場増強スタッキングの原理により濃縮された後、陰極側バイアル末端近くまで EOF によって押し戻される (Fig. 1b)。また EOF により低イオン強度の試料マトリクスがキャピラリーから排出されるため、EOF 速度は徐々に減少する。印加圧力と EOF が釣り合うと濃縮界面の移動が停止し、試料はさらに FASI の原理に基づき濃縮される (Fig. 1c)。この際、印加圧力の調整により、停止する界面の位置および停止までの LVSEP に基づく濃縮効果を制御できると考えられる。陰極側バイアル内の溶液を試料溶液から泳動液に入れ替えると濃縮が終了し、その後、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) の原理に基づき試料は分離される (Fig. 1d)。

LVSEP-FASI 法の濃縮性能を検討するため、モデル試料として fluorescein を用いて LVSEP-FASI-CZE 分析を行った。バイアルの交換時間および印加圧力の検討を行ったところ、バイアル交換が早い場合は圧力を印加しない方が、遅い場合は圧力を印加した方が、それぞれより高い濃縮効率が得られた。最適化の結果、バイアルの交換時間および印加圧力をそれぞれ 10 min, 1.0 psi とした際、従来の CZE 分析と比較して 70,000 倍の高感度化が達成された。

APTS 誘導体化 G7 の LVSEP-FASI-CZE 分析を行った。fluorescein 分析と同様に濃縮条件の最適化を行った結果、0.5 psi の圧力印加および 15 min におけるバイアルの交換により、CZE と比較して 10,000 倍の高感度化および未反応の APTS と G7 のベースライン分離が達成された。検出時間、ピーク高さの RSD はそれぞれ 2.4%, 11% であり、オンライン試料濃縮を長時間行う分析法としては良好な再現性が得られた。

References

- [1] Kawai, T. et al. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 6504–6511.
 [2] Kawai, T. et al. *J. Chromatogr. A*, in press.

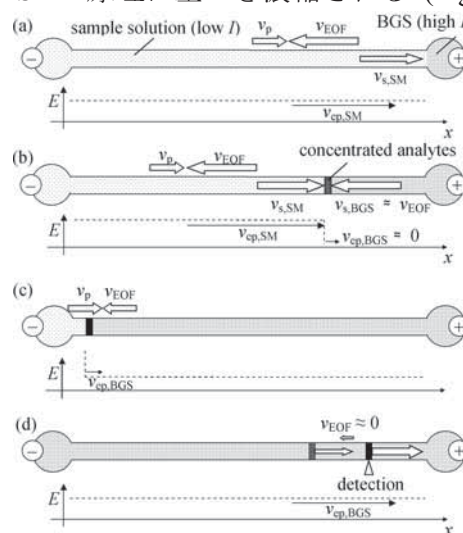


Figure 1. Concept of LVSEP-FASI in the PVA-coated capillary. I , E , v_{ep} , v_p , v_{EOF} and v_s are the ionic strength, electric field strength, electrophoretic velocity of the analyte, hydrodynamic velocity generated by the pressure, EOF velocity, and apparent velocity of the analyte, respectively.

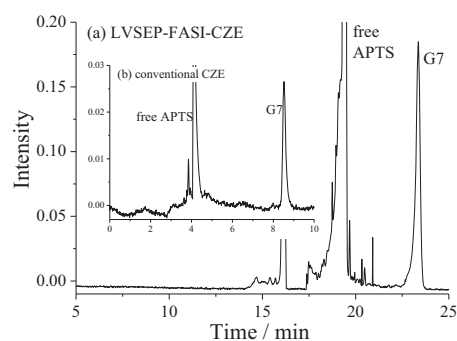


Figure 2. (a) LVSEP-FASI-CZE and (b) conventional CZE analyses of maltoheptaose. Sample concentration: (a) 1 nM, (b) 1 μ M.

O-35 マイクロチップキャピラリー電気泳動におけるオンチップ検出法の開発

○田中喜秀

産業技術総合研究所 健康工学研究部門

Development of On-Chip Detection for Microchip Capillary Electrophoresis

Yoshihide TANAKA*

Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Abstract

Microchip capillary electrophoresis is an attractive separation technique for high-throughput analysis of biofluids and environmental samples. However, a highly sensitive on-chip detection method is required for the detection of analytes inside the channel because the detection volume in a microchannel is extremely small. In this presentation, an on-chip fluorescent detection based on the integration of tunable film dye laser is introduced. As an alternative approach for inorganic analysis, a potential of capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) is demonstrated.

はじめに

マイクロチップキャピラリー電気泳動（マイクロチップ CE）は、装置の小型化・軽量化、試料の少量化、分析時間の短縮などが可能となり、特にオンサイト分析（現場分析）へのアプリケーション展開が期待されている。一方、微小流路内の分析対象物に対してオンチップ高感度検出が要求され、現在のところ、半導体レーザーなどを用いる蛍光検出、熱レンズ顕微鏡検出、電気伝導度検出などに限られる。蛍光検出は、我々も光ファイバー型蛍光検出器を用いて取り組んできたが、励起光源により波長の制限を受けるため、測定対象物は特定の励起波長帯を持つ蛍光物質または蛍光ラベル化物質に限定される。そこで、九州大学と共同で、フィルム型の有機固体色素レーザーを用いて、マイクロチップ CE-マルチ蛍光検出を目指している。今回は、電気泳動型チップへのフィルムレーザー実装技術などを紹介する。

食品、環境などの分野では、無機イオンや有機酸の分離・定量分析が求められている。これらの分析対象物は、蛍光性を持たず紫外吸収も弱いため、間接検出法がよく用いられる。しかしながら、泳動液に蛍光もしくは紫外吸収を持つ成分を添加する必要があるため、分析中のベースライン変動が高感度検出の際に影響する。一方、イオンクロマトグラフィーでは電気伝導度検出器が一般的であり、近年、マイクロチップ CE 用の非接触型電気伝導度検出器 (C⁴D) も市販されるようになった。我々も環境水分析などをターゲットとし、C⁴D による無機陰イオン分析を試みているので、研究の一部を紹介する。

実験

(1) 有機固体色素レーザーを用いたオンチップ蛍光検出

シリコン基板と光硬化性樹脂 (SU-8, 日本化薬社製) で流路パターンを持つ鋳型を作製した。これに有機固体色素レーザーを描写したビームエキスパンダーを載せて、ポリジメチルシロキサン (PDMS) プレポリマーを流して硬化し, PDMS チップにレーザー光源を実装した。

(2) マイクロチップ CE-C⁴D 検出

C⁴D 検出は, eDAQ 社製のマイクロチップ用 C⁴D センサープラットフォーム (ET121), C⁴D アンプ (EA120), およびデータ収録システム (PowerChrom 280) のシステム構成で実施した。市販の電気泳動型チップ (i-chip, 日立化成工業社製) を用い, 陰イオン標準溶液を分析した。Fig. 1 に実験の様子を示す。

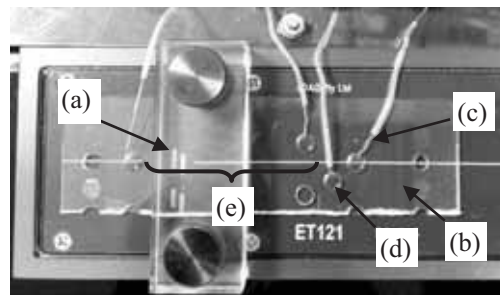


Fig.1 マイクロチップ CE-C⁴D 実験
(a) C⁴D センサー, (b) i-chip, (c)白金線,
(d) リザーバー, (e) 分離流路

結果と考察

(1) 有機固体色素レーザーを用いたオンチップ蛍光検出

電気泳動型チップの概略図を Fig. 2 に示す。参照用流路に蛍光色素溶液を充填し, 流路面に照射されるレーザー光の位置を確認して調節できる設計にした。ビームエキスパンダーに 570 nm, 600 nm などを出力する有機固体色素レーザーを描写し, PDMS チップ上に実装した。現在, マイクロチップ CE 分析の実現に向けて, 励起光源としての性能評価などに取り組んでいる。

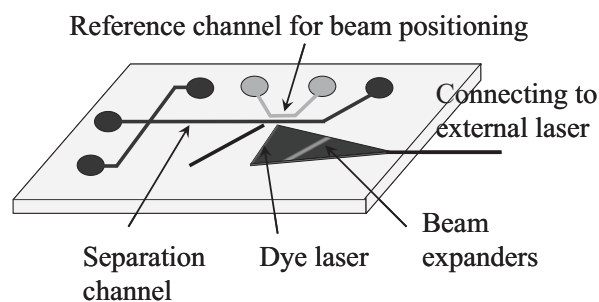


Fig. 2 有機固体色素レーザーを実装した
電気泳動用 PDMS チップの概略図

(2) マイクロチップ CE-C⁴D 検出

陰イオンの迅速分析を実現するために, i-chip の流路はポリ塩化ジアリルジメチルアンモニウムでコーティングし, 電気浸透流を反転させた。種々の泳動液を検討したところ, pH 8.7 の 50 mM Tris-CHES 溶液で, 良好なピーク分離やベースライン安定性などを獲得した。

謝辞

本発表は, 大学との共同研究ならびに産総研の技術研修制度を利用して獲得した研究成果の一部である。九州大学システム情報科学研究院 興雄司准教授, 近畿大学薬学部 鈴木茂生教授, 神戸大学大学院人間発達環境学研究科 齊藤研究室 山本冴音氏, 大阪工業大学応用科学科 澁谷研究室 日浦直人氏, ならびに研究にご協力いただいた関係諸氏に深謝いたします。

O-36 CESI-MS によるペプチド・タンパク質分析

○神末和哉¹ 木下充弘¹ 掛樋一晃¹

¹近畿大・薬

Analysis of protein biopharmaceuticals using CESI-MS coupled with sheathless interface

K. KAMISUE^{1*}, M. KINOSHITA¹, K. KAKEHI¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Abstract

CE-ESI-MS is a very valuable and useful analytical strategy to complement the widely used LC-ESI-MS technique, particularly for charged and polar molecules (e.g. peptides and proteins). In CE-ESI-MS technique, the liquid sheath flow for interfacing CE and ESI-MS is widely used, but incorporating the sheath liquid to the CE eluent often reduces the sensitivity of the ESI mass spectrometer. The sheathless interface method provides a practical solution for this problem to keep the high resolving power of CE. In this study, we used the sheathless interface with a porous tip as the spray emitter for analyzing charged and polar molecules, and show the result on the analyses of protein-related biopharmaceutical and antibody pharmaceuticals.

はじめに

キャピラリー電気泳動法(CE)は、製薬開発においてその有用性が評価されつつあり、特に糖タンパク質性バイオ医薬品中のオリゴ糖分析やペプチドマッピング、分子量や等電点の測定に効果的に応用されるなど、タンパク質性バイオ医薬品分析の強力なツールとして期待される。キャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)法は、LCを凌ぐ高分解能と低流量がMSにおいても有効であり、理想的な組み合わせと考えられるが、一般的に使用されるシース液を使用するスプレー法では、測定成分の拡散による感度の低下は避けられない。

本研究ではシースレスでの接続が可能なインターフェースを備えたCESI-MSシステムを用いたペプチドならびにタンパク質分析への適用について検討するとともに、抗体をはじめとする糖タンパク質性バイオ医薬品の分析へと応用した結果についても報告する。

実験

ペプチドならびに糖ペプチド試料：分析条件検討用としてアンジオテンシン I と II の混合物を使用した。市販のタンパク質それぞれトリプシンで消化し、ペプチドの混合物を得た。

CESI-MS：Beckman Coulter 社製キャピラリー電気泳動装置(PA800)及び島津製作所製 LCMS-IT-TOF を用いた。キャピラリーは外径 150 μ m、内径 30 μ m のフューズドシリカを使用

し、スプレー側末端部分のみを外径 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。泳動緩衝液には 10%酢酸を使用し、印加電圧は-30 kV であった。

結果と考察

アンジオテンシン I(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH)およびアンジオテンシン II(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH)をそれぞれ等濃度で含む水溶液を用い、基礎検討を行ったところ(Fig. 1)、13 分付近、13.5 分付近にそれぞれピークが観察され、アミノ酸 2 残基の差で良好に分離できた。ウシ血清アルブミン(BSA)のトリプシン消化物を分析した結果(Fig. 2)、10 分から 18 分までに、分離は十分でないものの、ペプチド由来のピークが観察された。また、観察されたペプチドの質量情報をタンパク質データベースと照合したところ、全アミノ酸のうち 48%のカバー率でペプチド部分を同定できた。今後、さらに分離条件について検討するとともに、分離能、検出限界など分析能パラメータの評価も行い、タンパク質性バイオ医薬品分析への適用について明らかにしていきたい。

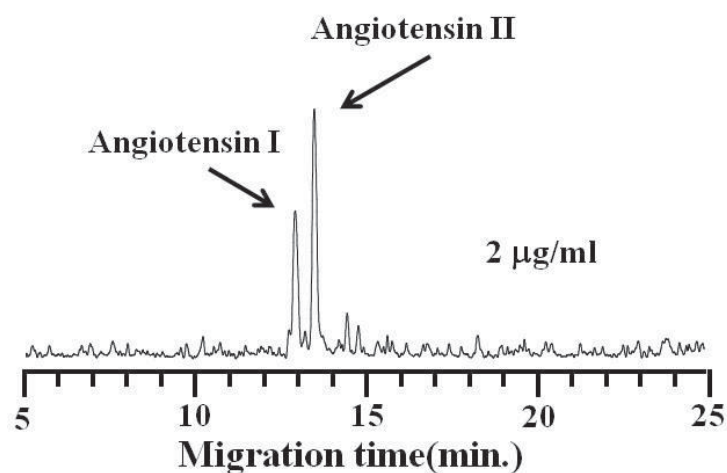


Fig. 1. CESI-MS analysis of Angiotensin I and II(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Electrolyte, 10 % acetic acid; injection, hydrodynamic injection(10 psi, 0.5 min.)

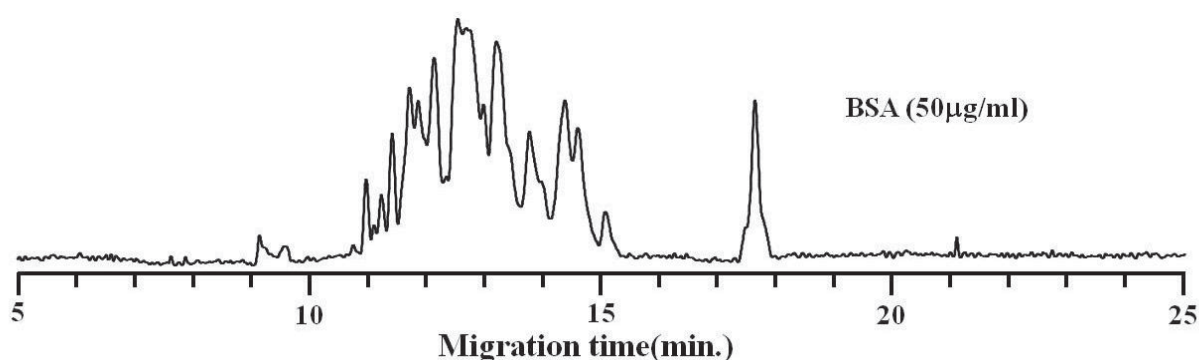


Fig. 2. CESI-MS analysis of BSA peptides (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Electrolyte, 10 % acetic acid; injection, hydrodynamic injection(10 psi, 0.5 min.)

O-37 熔融シリカキャピラリーを用いる分光法:高温高压液相反応のその場観測

○川村邦男

広島修道大学・人間環境学部

A Spectrophotometric Technique Using Fused-Silica Capillary: *in situ* Measurement of Liquid Phase Reactions at High Temperature and Pressure

Kunio KAWAMURA*

Department of Human Environmental Studies, Hiroshima Shudo University

Abstract

Liquid phase reactions at high temperature and pressure over 100 °C are important in both fundamental and practical areas. However, the conventional techniques using high temperature and pressure resistant vessel does not allow direct monitoring, and requires a large sample volume, which results in relatively dangerous and time-consuming procedures. Here, I show a spectrophotometric method using fused-silica capillary tubing with a UV-visible detector, which enables monitoring reactions at 388 °C at 30 MPa within the heating time range at 0.08 – 3.2 s.

はじめに

生物系統樹の解析や化学進化実験により、生命は超高温高压の海水中で誕生したと考えられている。我々は、熱水中での化学反応を観測する研究ツールを開発しつつ生命の起源を検証してきた¹⁻³。この過程で、熔融シリカキャピラリーをフローリアクターの反応炉として用い、高温高压液相反応をミリ秒～秒レベルの時間範囲でその場追跡する方法論を確立した⁴⁻⁶。これは、地球化学・鉱物学・溶液化学などの基礎分野や、有機合成反応・無機材料の水熱合成・環境技術などの応用分野の研究を格段に促進する新しい研究開発ツールとして期待されている。今回は、紫外可視吸収スペクトルのその場観測法について最新の成果を報告する。

原理および装置

装置は、溶媒容器、高性能ポンプ（日本分光 PU-2085）、内径 0.1 mm のキャピラリーを設置した加熱反応器、冷却部、圧力調節器（アップチャーチ P-880）、試料採取部、温度調節器、光ファイバー、紫外可視検出器（日

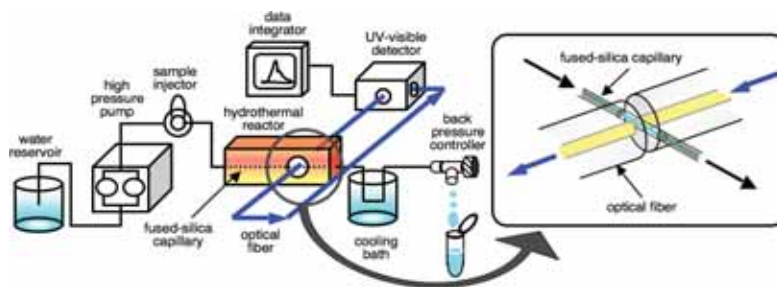


Fig. 1 高温高压液相反応のその場紫外可視分光装置。

本分光 UV1575) などからなる (Fig. 1) ^{4,6}. ここで, あらかじめ加熱した熔融シリカキャピラリーの中に試料を通過させることによりごく短時間だけ試料溶液を加熱する. 一方で熔融シリカキャピラリーに光ファイバーで光束を導出し検出器と結合することで, 高温高圧下での試料の紫外可視吸収スペクトルをその場観測する. この結果, 温度 380°C以上で 0.08~3.2 秒間の加熱時間で観測できた.

結果と考察

熔融シリカキャピラリーの耐熱性は約 360°Cであるが 400°C程度まで使用できた. また, 紫外可視領域で透明なコーティングをしたものは 200°C以上で被覆がはがれた. Ocean Optics 製の検出器では紫外・可視・近赤外吸収スペクトルのミリ秒レベルでの観測が可能であった⁷.

本装置を用いて, 生体高分子の高温下での挙動を観察することを試みた⁵. 第1に, インターカレーターを用い DNA の高温下での挙動を調べることに成功した. 100°C以下では 2 重らせん DNA が T_m 以上の温度で 2 本鎖から 1 本鎖になることを確認できた. 100°C以上では 1 本鎖 DNA の溶解度が低下するため DNA 溶液は白濁することを見いだした. 特に Mg^{2+} の存在下で顕著であった. 200°C以上では白濁は消えたが, これはリン酸ジエステル結合が解裂し DNA の鎖長は短くなり再び溶解するためであると推定した.

第2に, 色素プローブとタンパク質との会合を利用しタンパク質の挙動を観測した. 高温下でタンパク質と色素との会合を観測できる系を見いだすために, 数種類のタンパク質と色素プローブの組み合わせを検討した. 他の系ではタンパク質が高温下で不溶になった, あるいは吸収スペクトル変化は観察されなかったが⁶, 牛血清アルブミン (BSA) に対して陰イオン性ポリフィリン (TPPS) をプローブとして用いると, その吸収スペクトル変化から会合挙動を 100°C以上でも観測できた. 意外なことに, TPPS をはじめとする多くの有機色素は高温下でもかなり安定であった. 本装置による解析の結果, BSA と TPPS との会合は温度上昇に伴って弱くなるがこれは主に BSA の変性に基づくことが明らかになった.

References

- [1] Kawamura, K. *Int. J. Astrobiology* 3:301-309, 2004.
- [2] Kawamura, K. *J. Am. Chem. Soc.* 127:522-523, 2005.
- [3] Kawamura, K. et al. *Astrobiology* 11:461-469, 2011.
- [4] Kawamura, K. *Anal. Sci.* 18:715-716, 2002.
- [5] Kawamura, K. & Nagayoshi, H. *Thermochim Acta* 466:63-68, 2007.
- [6] Kawamura, K. et al., *Anal. Chim Acta* 667:88-95, 2010.
- [7] 平成 21 年度戦略的基盤技術高度化支援事業, 研究開発成果等報告書「高性能化学合成プロセス効率化ツール: 高温高圧近赤外スペクトロメータの実用化」, 日本ベル(株)・大阪府立大学, 仲井和之・川村邦男

P-1

網羅的 DNA 付加体分析を目指した迅速前処理法の開発

○河村理恵子¹, 川島静香¹, 古口未央¹, 江坂幸宏^{1,2}, 宇野文二^{1,2},
村上博哉¹, 石濱 泰³
岐阜薬大¹, 岐阜大院連合創薬情報², 京大院薬³

Development of a simple and quick pretreatment method for comprehensive DNA adduct study

Rieko KAWAMURA*¹, Shizuka KAWASHIMA¹, Mio KOGUCHI¹, Yukihiro ESAKA^{1,2}, Bunji UNO^{1,2}, Hiroya MURAKAMI¹, Yasushi ISHIHAMA³

¹Gifu Pharmaceutical Univ., ²United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Science, Gifu Univ., ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.

Abstract

We have developed a sensitive and quantitative method of DNA adducts by using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for replacing the ³²P-postlabeling assay. Although ³²P-postlabeling assay is the major method because of the most sensitive one at this moment, this assay involves the post-labeling process and the use of troublesome radioactive materials. We previously prepared the pre-concentration tips for LC-/MS/MS analysis, which can remove normal nucleosides and selectively enrich DNA adducts. In this study, we improved the pre-concentration tips for more easily preparing the tips and pretreating the sample. In addition to improvement of the tips, the pretreatment sample was measured by neutral loss scan (NLS) set at the loss of 2'-deoxyribose moiety. By coupling the preconcentration tips with NLS, an easily comprehensive DNA adducts analysis method would be established. This method would be a useful tool for revealing the relationship between DNA adducts and cancer.

はじめに

DNA 付加体は、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の産物と考えられる DNA 付加体は、極めて低い割合でしか存在しないことから、非常に高感度である放射性物質を用いた ³²P ポストラベル法が主な分析法として用いられてきた。しかし、その一方で、放射性物質の利用などを理由に、より安全性と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/MS(LC/MS/MS)に注目し、簡便な DNA 損傷体の分析法の開発を行ってきた。LC/MS/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。DNA 付加体

の LC/MS/MS を用いた分析においては、①大過剰に共存する未損傷体の除去と②極微量にし
か共存しない DNA 付加体の濃縮、の二点が求められる。これらの課題を同時に達成可能な前
処理の手法開発を目的とし、石濱らによりペプチド解析のために開発された
stop-and-go-extraction tips (StageTips)¹ 技術を用いて、これまでに DNA 付加体用の StageTips の
開発に成功している(Figure)²。今回、StageTips を、より簡便に作製及び処理が可能な形へと
最適化することにより、DNA 付加体分析のための多検体同時前処理系の確立を行った。そし
て、これを用いて、癌と DNA 付加体との間の関係性を明らかにすることを想定した、ニュー
トラルロスキャン(NLS)を用いた DNA 付加体の網羅的分析（アダクトミクス）法の基礎検
討を行った。

実験

チップの処理能を評価する DNA 損傷体モデルとして、アセトアルデヒド由来の DNA 損傷
体の Cyclic 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine (CPdG) の標品を合成し、StageTips の処理能力の
評価を行った。StageTips には、3M 社製のエムポアディスク（以下エムポア、充填剤:C₁₈及び
SDB-XD）をそれぞれ用いた。LC-ESI-MS/MS 装置は、3200 Q TRAP を用いて検討を行った。

結果と考察

以前の検討では、保持容量を増加させるためにエム
ポアをフリットとして用い、ODS単体をさらに充填
する形にて作製していたが、本検討ではStageTipsに充
填するエムポアのサイズを大幅に増大し、エムポアの
みの構成へ変更し、操作の簡便化を図った。その結果、
充填材を充填した旧タイプとほぼ同等の性能を有す
るStageTipsの調製が可能となった。またStageTipsへ未

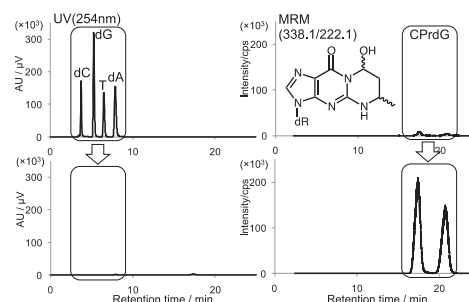


Fig. HPLC profiles of before (upper) and
after (lower) StageTips treatment

損傷体を除去するために通液するH₂Oの流速を変化
させることにより、未損傷体の除去能を向上する可能性を示唆する結果を得た。現在これら
の前処理法により処理を行った標準試料を用い、NLSによるDNA付加体の網羅的分析の基礎
検討を行っている。本手法が汎用的分析法として利用可能な分析手法となれば、今後のDNA
付加体と癌との関係を明らかにする上で非常に重要な手法になるものと考える。

謝辞

本研究は、平成23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)探索タイプおよび平成23年度財団法人越山科学技術振興財団の研究助成のもと遂行さ
れたものである。

References

[1] Rappsilber, J. Mann, M. Ishihama, Y. *Nat. Protocols* **2007**, 2, 1896.

[2] Murakami, H. Koguchi, M. Esaka, Y. Uno, B and Ishihama, Y. *Anal. Sci.* **2011**, 27, 217.

P-2

ホウ酸塩存在下のエチレングリコールとグリセロールの キャピラリー電気泳動;インダイレクト UV 法による検討

○佐藤康博、中村彰一、黒田秀樹
大塚電子株式会社

Capillary Electrophoresis of Ethylene glycol and glycerol in the Presence of Borate: Analysis by Indirect Detection

Yasuhiro SATO*, Shoichi NAKAMURA, Hideki KURODA

Otsuka Electronics Co.

Abstract

Ethylene glycol and glycerol is widely used as industrial commodities, medical supplies and so on. Since Ethylene glycol and glycerol is neutral and low molecular weight, chemical modifications are required in application of capillary electrophoresis to its analysis. In the present study, the capillary electrophoretic behavior of Ethylene glycol and glycerol in the presence of borate in different pH of buffer solution was studied for Ethylene glycol and glycerol. Ethylene glycol and glycerol without UV absorption have measured by an indirect detection method. As the result, Ethylene glycol and glycerol was detected in high sensitivity and high separation in the presence of borate buffer solution in pH 10. The detected limits of Ethylene glycol and glycerol are 0.01% each.

はじめに

エチレングリコールやグリセロールは、工業製品、医薬などの素材として広く利用されている。従って、その分析は研究や品質管理の観点から重要である。しかし、UV 吸収がなく無荷電であるため、キャピラリー電気泳動 (CE) を行うためには、化学修飾が必要とされている[1]。前回、我々は、ポリエチレングリコール (PEG) に、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) のようなイオン性界面活性剤を添加し複合体を形成させることにより CE での分析を試みた。しかし、この方法では、Mw 300 以上の PEG については分析可能であったが、エチレングリコールについては分析が困難であった[2]。そこで、今回、我々は、泳動液にホウ酸塩を荷電導入剤として用いることで、エチレングリコールやグリセロールが分析できることがわかったので報告する。

実験

キャピラリー電気泳動装置は、アジレント・テクノロジー(株)製 Agilent 7100 を用いた。キャピラリーは内径 75 μ m、全長 80.5cm、有効長 70cm を使用した。泳動液はホウ酸塩を含

む大塚電子(株)製 α -AFP206 を使用した。検出はインダイレクト UV 法(270nm)でおこなった。印加電圧は-15 kV である。測定に使用したエチレングリコール(Mw 62.07)とグリセロール(Mw 92.09)の試料は和光純薬(株)製である。

結果と考察

エチレングリコールとグリセロールの分析は、ホウ酸塩を含む α -AFP206 泳動液の pH 依存性 (pH6~12) について検討をおこなった。その結果、pH6~8 ではグリセロールのみピークとしてみられた。pH9 以上でグリセリンとエチレングリコールの両ピークがみられはじめ、pH10 以上でエチレングリコールとグリセロールの両方についてピークの検出と分離が良好になることがわかった(Fig.1)。また、エチレングリコールとグリセロールの検出感度については pH10 が最も良好であり、それぞれ 0.01%以上であることがわかった。

以上の結果から、本分析条件を用いると、キャピラリー電気泳動によりエチレングリコールとグリセロールの一斉分析が可能であることがわかった。また、今回の分析条件を用いてクーラント液に含まれるエチレングリコールの分析についても検討をおこなったので報告する。

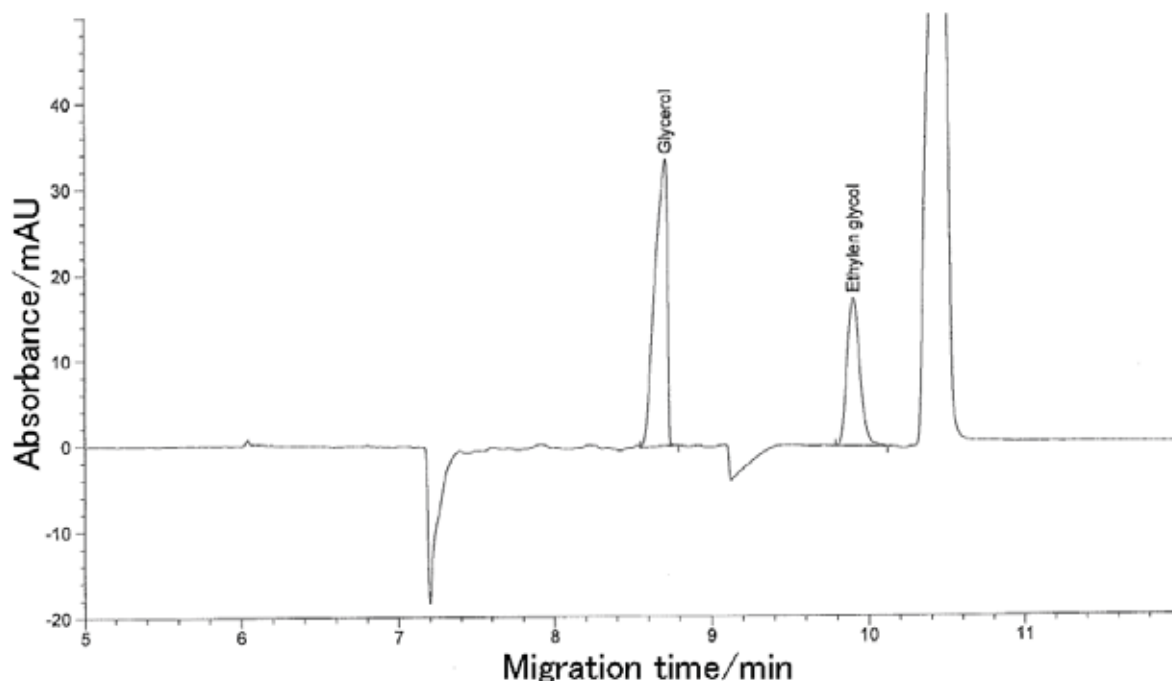


Fig.1 Electropherogram of Ethylene glycol and Glycerol 0.5% each

References

- [1] Kathalijine A.Oudhoff, Peter J.Schoenmakers, Wim Th.Kok, J.Chromatogr.A, 2003, 985, 479-491
- [2] Yasuhiro Sato, Shoichi Nakamura, Toshio Takagi, 第26回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集, 2006, 44-45

P-3

LVSEP 法を用いた二次元マイクロチップ電気泳動分析の高感度化 (3)

○木南冴子, 川井隆之, 末吉健志, 北川文彦[‡], 大塚浩二
京大院工, [‡]弘前大院理工

Highly Sensitive Two-Dimensional Microchip Electrophoresis by LVSEP. 3

Saeko KINAMI*, Takayuki KAWAI, Kenji SUEYOSHI, Fumihiko KITAGAWA[‡], Koji OTSUKA

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

[‡]Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University

Abstract

In two-dimensional microchip electrophoresis (2D-MCE) which is performed by the on-line connection of different separation modes on a single microchip, there are great advantages such as high resolution and low consumption of samples. However, there are some drawbacks, including the low concentration sensitivity and requirement of troublesome procedure to fill a second matrix only in a specific region of channels. To overcome these drawbacks, a novel technique for on-line coupling of sample preconcentration by large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) with 2D-MCE was developed for a highly sensitive and high peak-capacity analysis of biomolecules.

はじめに

近年、微量の生体試料の迅速な分析法としてマイクロチップ電気泳動 (MCE) が注目されている。なかでも二次元 MCE (2D-MCE) は、原理の異なる複数の分離モードを組み合わせて、連続的に分析を行うことから、特に高い分離能を有している。一方で、数種類の溶液導入や多段階の電圧印加などの煩雑な実験操作と、低い濃度感度がその欠点として挙げられる。当研究室では、キャピラリー電気泳動におけるオンライン試料濃縮法の一つである large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) 法 [1] の改良により、ストレート型チャンネルを用いた簡便かつ高感度な MCE 分析法を開発し [2], 糖鎖やタンパク質の分析に適用してきた。本研究では、2D-MCE 分析の高感度化・簡略化を目指し、チャンネルの一次元目で LVSEP 法による試料の濃縮とマイクロチップゾーン電気泳動 (MCZE) 分析を、二次元目でマイクロチップゲル電気泳動 (MCGE) に基づくサイズ分離をそれぞれ行う、LVSEP-2D-MCE 分析法の開発を行った。

実験

本実験では、生体試料の非特異的吸着と電気浸透流を抑制するために poly(vinyl alcohol) で内表面を修飾した poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 製 T 字型マイクロチップ (チャンネル幅 110 μm , 深さ 50 μm) (Figure 1) を用いた。YOYO-1 で蛍光標識した $\phi\text{X174 RF DNA Hae III digest}$

を脱イオン水に溶解して試料とした。一次元目の LVSEP-MCZE の泳動液には 1×tris-acetate-EDTA (TAE) 緩衝液 (pH 8.3) に 0.2 μM YOYO-1 を添加したものを、二次元目の MCGE の分離媒体には 2% (w/v) hydroxypropyl methyl cellulose を 1×TAE 緩衝液に溶解したポリマー溶液をそれぞれ用いた。ポリマー溶液を二次元目チャンネル内にもみ充填するため、試料溶液をチャンネル全体に注入後、ポリマー溶液を V₃ ポートから T 字分岐点まで注入した。その後 V₂ ポートの吸引により一次元目チャンネルに流入したポリマー溶液を除去すると同時に試料溶液で満たした。V₁, V₂ ポートに泳動液を満たした後 (Figure 2a), Figures 2b, c に示す電圧を印加して分析を行った。検出は V₃ ポートから 5 mm の地点でレーザー励起蛍光 (励起/発光波長, 488/520 nm) によって行った。

結果と考察

Figures 2b, c に示す電圧を印加して蛍光画像観察を行ったところ、一次元目では LVSEP の原理に基づいて一時的に発生した電気浸透流 (EOF) によって V₂ ポートから TAE 緩衝液がチャンネル内に流入し、チャンネル全体に充填した試料成分が濃縮されながら V₁ ポートに向かって泳動する様子が確認された。TAE 緩衝液が一次元目チャンネル全体に満たされると、EOF は再び抑制され、アニオン性試料の泳動の向きは反転し、V₂ ポートに向かって泳動を開始した。その後、電圧を切り替えることで試料が T 字分岐点から V₃ ポートに向かって泳動し、二次元目チャンネルに充填したポリマー溶液中を泳動する様子が観察された。そこで、塩基対数の異なる 11 のフラグメントが含まれた DNA 試料の LVSEP-2D-MCE 分析を試みた。その結果、一次元目では DNA 試料が濃縮された 1 つのピークとして検出されたのに対して、二次元目チャンネル末端部で検出した際にはフラグメントに分離されて検出された (Figure 3)。以上の結果から、作製した T 字型マイクロチップを用いることで一次元目に LVSEP-MCZE による試料濃縮、二次元目に MCGE によるサイズ分離をそれぞれ行う 2D-MCE 分析が可能となることが示された。

References

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

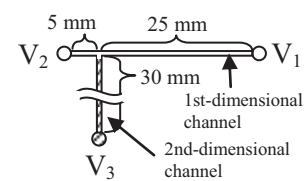


Figure 1. Configuration of T-channel for 2D-MCE.

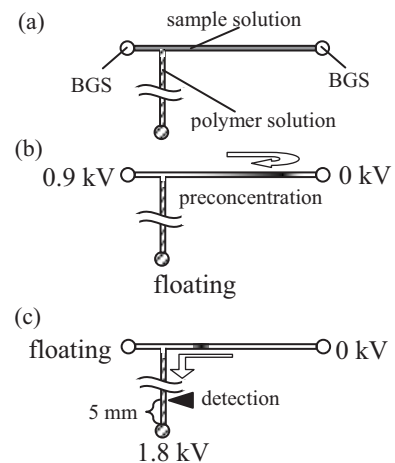


Figure 2. Schematics of the LVSEP-2D-MCE analysis. (a) Initial condition, (b) sample pre-concentration by LVSEP and 1st-MCZE separation, and (c) 2nd-MCZE separation.

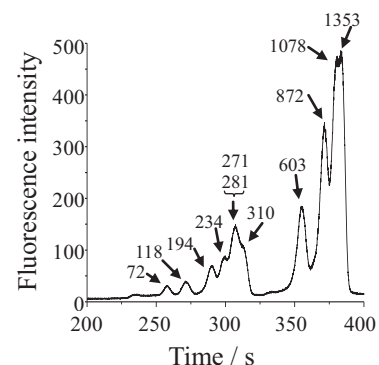


Figure 3. LVSEP-2D-MCE analysis of 110 pg/μL YOYO-1 labeled ΦX 174 RF DNA-*Hae III* digest. Numbers in the electropherogram correspond to the size of fragments in bp.

P-4

酸・塩基含有ハイドロゲルの開発と簡便なキャピラリー等電点電気泳動への応用

○藤井裕二、野川悠人、横山大輝、遠藤達郎、久本秀明

大阪府立大学大学院 工学研究科

Development of Hydrogel containing Acid or Base and its Application for Simple and Easy-to-use Capillary Isoelectric Focusing

Yuji FUJII*, Yuto NOGAWA, Hiroki YOKOYAMA, Tatsuro ENDO, Hideaki HISAMOTO

Graduate school of Engineering, Osaka Prefecture University

Abstract

We have been working on the development of easy, speedy, and highly sensitive bioassay device, "reagent release capillary isoelectric focusing" (RRC-IEF), for immuno assay, enzyme activity assay, and protein assay. However, unstable focusing behavior occurred by height difference between acid and base solution reservoirs was often observed. In this work, hydrogels containing acid or base were newly developed and used as ion suppliers of CIEF. Since hydrogel is solid rather than conventional solution, instability of focusing caused by solution flow is expected to be improved. Tilting experiments of CIEF setup clarified that hydro gel ion supplier was effective for stopping solution flow occurred by solution height difference. Furthermore, CIEF of pI markers using glass capillary and hydrogel ion supplier was carried out. Focusing of pI markers was successfully observed, and it was evident that the possibility of focusing many other sample molecules possessing pI, and the formation of pH gradient using hydrogel ion supplier.

はじめに

当研究室では、タンパクを等電点(pI)に応じて分離・濃縮することができるキャピラリー等電点電気泳動(CIEF)に注目し、Carrier ampholyte(CA)及び種々のセンシング試薬をキャピラリー内壁に固定化した試薬放出キャピラリー(RRC)を用いた CIEF(RRC-IEF)の研究を進めている。このデバイスでは、試料溶液を毛細管現象で RRC に導入することで試料・CA・固定化試薬の混合・反応が自発的に起こるため、その後キャピラリー両端に酸・塩基水溶液を接触させ、電圧を印加するのみで簡便・迅速・高感度に目的タンパクが検出可能である。我々はこれまでに、蛍光標識抗体、蛍光性両性イオン型酵素基質、ラベル化剤を固定化した RRC を用いることで、免疫アッセイ¹、酵素活性アッセイ²、プロテインアッセイ³を RRC-IEF で達成してきた。しかしながら、試料導入後にキャピラリー両端に酸・塩基水溶液を接触させることで H⁺、OH⁻の供給を行うため、両端の微妙な液落差により濃縮挙動の再現性が安定しないという問題があった。そこで、酸・塩基を含有したハイドロゲルを H⁺、OH⁻供給体として用いることを着想した。酸・塩基供給体としてハイドロゲルを用い、試料溶液の入ったキャピラリーの両端をふさぐことで、酸・塩基溶液との接触を維持したまま液体流れを止め、液落差の影響を抑制できると考えた。本研究では、酸・塩基含有ハイドロゲルの試作およびハイドロゲルを H⁺、OH⁻供給体として用いた CIEF を試みた。

実験

酸・塩基含有ハイドロゲルの作製：アクリルアミドと N,N-メチレンビスアクリルアミドを重量比 36:1 で混合し、10mM リン酸または水酸化ナトリウム水溶液で溶解して 10 wt% の水溶液を調製した。光重合開始剤(1 wt% 2-Hydroxy-2-methylpropiophenone)を添加して PDMS 製モールドを満たし、紫外光を照射してハイドロゲル(15 mm×15 mm×6 mm)を作製した。

液落差の抑制効果の確認：蛍光色素水溶液を満たした長さ 5 cm、内径 100 μm 角型溶融シリカキャピラリーの両端に①10mM 塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を接触させた場合および②酸と塩基含有ハイドロゲルを接触させた場合のそれぞれについて、全体を傾けることで液落差による試料溶液の流出の有無を確認した。

CIEF への応用：長さ 5 cm、内径 100 μm 角型キャピラリーに pI マーカー(5.1、5.5、7.6、9.0)および両性電解質ポリマー Biolyte3-10 を含む水溶液を導入して、両端を酸・塩基含有ハイドロゲルに接触させた。その後、ハイドロゲルに白金電極を接触させて両端に電圧(2.2 kV)を印加して蛍光画像を取得した。

結果と考察

酸・塩基を含有させたハイドロゲルを Figure 1 に示す。いずれの場合も十分な機械的強度を持つハイドロゲル作製に成功した。キャピラリーおよび酸・塩基供給体を 2.7° に傾けたところ、水溶液を供給体とした場合は傾斜の発生とほぼ同時に蛍光色素水溶液の流出が起り、約 3 分間でキャピラリー内水溶液のほぼ全てが流出した。一方、ハイドロゲルを供給体とした場合には、傾斜させても流出は起こらず、キャピラリーおよびハイドロゲルを垂直に傾けても流出は見られなかった。このことから、ハイドロゲルを酸・塩基供給体として用いることで、液落差の影響を抑制できることが分かった。

酸・塩基含有ハイドロゲルを用いて pI マーカーの CIEF を行ったところ、pI マーカーの分離・濃縮が観察された。濃縮位置とキャピラリーの水平位置との関係をプロットしたところ直線性が得られ(Figure 2)、電圧印加によるハイドロゲルからの酸・塩基の供給および pH 勾配の形成が行われていることが確認できた。このことから、酸・塩基含有ハイドロゲルは、酸・塩基水溶液同様、CIEF の酸・塩基供給体として機能することが明らかとなった。

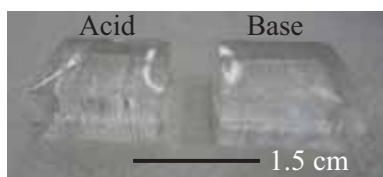


Fig.1 Photograph of hydrogel

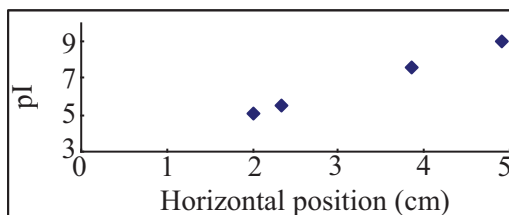


Fig.2 Focusing position of each pI marker

References

- [1] Yokoyama, H., *et al. Proc. Micro-TAS*, 2009, 2, 1204-1206.
- [2] Nogawa, Y., *et al. Proc. Micro-TAS*, 2011, in press.
- [3] Kataoka, M., *et al. Proc, Lab Chip*, 2010, 10, 3341-3347

P-5

アリールホウ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 (4)

○楠本梨沙¹, Philip BRITZ-MCKIBBIN², 川井隆之¹, 末吉健志¹,
北川文彦^{1‡}, 大塚浩二¹
京大院工¹, McMaster University², 弘前大院理工[‡]

Label-Free Electrophoretic Analysis of Sugars Using Complexation with Aryl Boronic Acids. 4

Risa KUSUMOTO^{*1}, Philip BRITZ-MCKIBBIN², Takayuki KAWAI¹, Kenji SUEYOSHI¹,
Fumihiko KITAGAWA^{1‡}, Koji OTSUKA¹

¹*Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University,*

²*Department of Chemistry, McMaster University,*

[‡]*Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology,
Hirosaki 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, both reducing and nonreducing sugars could be detected and separated without any derivatization.

はじめに

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 (CE) 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、アリールホウ酸を用いたアフィニティキャピラリー電気泳動 (ACE) 分析に注目した [1]。アリールホウ酸は糖などのジオールを特異的に認識して錯体を形成し、モル吸光係数や極大吸収波長が変化する特徴を有する。そのため、泳動液にアリールホウ酸を添加し、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実現可能である。本研究では、アリールホウ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ラベルフリーでの還元糖および非還元糖の一斉分析を目指した。

実験

3-ニトロフェニルホウ酸 (NPBA) およびフェニルホウ酸 (PBA) 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モル吸光係数の変化を測定した。NPBA を泳動液に添加した ACE 分析の際には、CE 装置として P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を、分離キャピラリーとして全長 40 cm、有効長 30 cm、内径 50 μm のフューズドシリカキャピラリーをそれぞれ用いた。泳動液にはリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に NPBA を 3 mM 添加したものを、試料にはグルコース、フルクトース、ソルビトールおよびマンニトールをそれぞれ用いた。検出は UV 吸収 (280 nm) で行った。

結果と考察

NPBA 溶液にソルビトールを添加したところ、分子内電荷移動 (ICT) に由来する吸光度が増大したのに対し、PBA ではそれが減少する様子が観察された。このことは、NPBA においてホウ素原子の空軌道に由来する求電子性により阻害されていたベンゼン環からニトロ基への ICT が、糖との錯形成によりホウ素原子のルイス酸性が向上し 4 配位型となることで求電子性が低下したことで、ニトロ基との ICT が起こる確率が増加したためと考えられる。一方、ホウ素原子以外に電子吸引基を有しない PBA においては、錯形成時のベンゼン環からホウ素原子への ICT の低下によりその吸光度が減少したものと考えられる。以上の結果から、泳動液に NPBA を添加することで、錯形成時のバックグラウンド吸収の変化により糖のピークを検出可能であることが示された。そこで電荷と UV 吸収を持たない非還元糖のソルビトール、マンニトールおよび還元糖のフルクトース、グルコースの混合溶液について、NPBA を添加した泳動液を用いた ACE 分析を行った。その結果、フルクトース、ソルビトール、マンニトールの ACE 分離とラベルフリー検出が同時に達成された (Fig. 1)。このことから、水溶液中での平衡状態において、アリールホウ酸との錯形成が可能な *cis*-ジオール構造を取り得る糖は還元糖、非還元糖にかかわらず NPBA との複合体をピークとして検出可能であることが示された。一方、グルコースのみが検出されなかったのは、水溶液中ではそのほとんどが六員環として存在しており NPBA との錯体がほとんど形成されなかったためと考えられる。以上の結果から、アリールホウ酸を泳動液に添加した ACE 分析により、種々の糖の構造選択的なラベルフリー検出および分離が可能となることが明らかとなった。

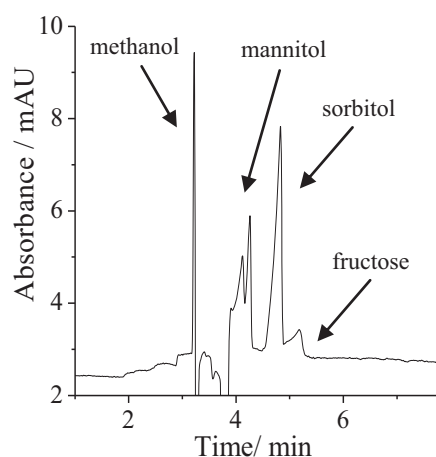


Fig. 1. ACE analysis of sugars. BGS, 3 mM NPBA in phosphate buffer (pH 7.0).

Reference

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

P-6

トランジェント-トラッピング法によるミクروسケール電気泳動分析の高感度化 (4)

○恋野寛嗣, 橋場皇太, 末吉健志, 北川文彦[‡], 大塚浩二
京大院工, 弘前大院理工[‡]

Highly Sensitive Electrophoretic Analysis Based on Transient Trapping. 4

Hiroshi Koino*, Kota Hashiba, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa[‡], Koji Otsuka

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

[‡]Department of Frontier Materials Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University

Abstract

This paper reports an improvement of the detectability of enantioseparations in cyclodextrin electrokinetic chromatography (CDEKC) by the application of transient trapping (tr-trapping). In tr-trapping-CDEKC, a sample solution is electrokinetically introduced into the capillary filled with a background solution containing CDs after a partial injection of a micellar solution plug. Hydrophobic analytes are concentrated by the trap mechanism, and then released by the decrease in the micellar concentration due to the diffusion. After passing through the micellar zone, an enantioseparation of the concentrated analytes proceeds in the BGS zone. When the injection times of the micellar and sample solutions were 10 and 420 s, respectively, a 230-fold enhancement of the sensitivity as well as enantioseparation was achieved in tr-trapping-CDEKC. Additionally, the BGS components were optimized for the application of tr-trapping to a mass spectrometric detection scheme.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は, 高速分析, 省試料, 高分離能等の利点を有する一方, 濃度感度が低いという欠点も有するため, 様々なオンライン試料濃縮法の開発による高感度化が試みられてきた。当研究室で開発された新規オンライン試料濃縮法であるトランジェント-トラッピング (tr-trapping) 法は, キャピラリー内に部分的に注入したミセル溶液を用いることで, 短い有効分離長で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良好な分離を同時に達成可能な手法である [1, 2]。しかし, 本手法は試料とミセルとの疎水性相互作用の差に基づいて分離を行うため, 光学異性体分離への適用は困難であった。そこで本研究では, tr-trapping による試料濃縮とリリース後のシクロデキストリン動電クロマトグラフィー (CDEKC) に基づくキラル分離との組み合わせにより, 光学異性体分析の高感度化を目指した。また, ミセル溶液ゾーンを通過後に試料が検出される tr-trapping 法の利点を生かし, tr-trapping-ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) とエレクトロスプレーイオン化-質量分析 (ESI-MS) との結合についても検討した。

実験

CE 装置には P/ACE MDQ (Beckman Coulter) を、分離には全長 40 cm, 有効長 30 cm, 内径 50 μm のフューズドシリカキャピラリーを使用した。泳動液 (BGS) には硫酸化 β -シクロデキストリン (S- β -CD) を、ミセル溶液には硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を、電気伝導度が等しくなるようにそれぞれリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものをを用いた。試料には 1-アミノインダンの BGS 溶液を用い、UV 吸収 (200 nm) で検出した。また、CE-MS 検出への適用を目指した検討では、BGS に揮発性緩衝液であるギ酸アンモニウム緩衝液を用いた。

結果と考察

BGS を満たしたキャピラリーに、ミセル溶液を 0.5 psi の圧力で 10 秒注入した後、1-アミノインダンを 5 kV の電圧印加により 420 秒間注入し、tr-trapping-CDEKC 分析を行った。その結果、試料がミセルとの界面で疎水性相互作用によりトラップされた後、ミセルゾーンの拡散により、リリースされた試料が S- β -CD を含む BGS ゾーンを泳動することで、従来法 (Figure 2a) と比較して約 230 倍の高感度化および CDEKC による光学異性体分離が同時に達成された (Figure 2b)。

MS 検出に tr-trapping 法を適用するためには、揮発性緩衝液を用いる必要がある。そこで、ギ酸アンモニウム緩衝液を用いて tr-trapping-MEKC 分析を試みたところ、リン酸塩緩衝液を用いた際とほぼ同等のэлектроフェログラムが得られた。また、ESI-MS 検出の際には、不揮発性かつ電荷を有する界面活性剤による試料のイオン化効率の低下と検出装置の汚染を抑制する必要があるため、部分的に注入されたミセル溶液が検出部側に泳動しないことが望ましい。その一方で、安定なエレクトロスプレーを維持するためには、ある程度の速さの EOF が必要である。そこで、これらの条件を満たす最適な EOF が得られる BGS の組成について検討したところ、pH 3.5 のギ酸アンモニウム緩衝液において界面活性剤分子の電気泳動移動度 ($-2.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) を下回る電気浸透移動度 ($1.97 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) が得られることが確認された。以上の結果をもとに、tr-trapping-MEKC 分析の MS 検出への適用について検討を行っている。

Reference

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

[2] Sueyoshi, K.; Hashiba, K.; Kawai, T.; Kitagawa, F.; Otsuka, K. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 1233–1240.

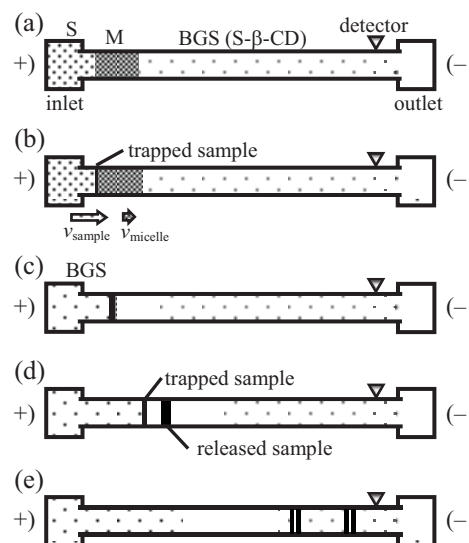


Figure 1. Schematics of tr-trapping-CDEKC. (a) Initial condition, (b) sample injection and preconcentration based on trap mechanism, (c) replacing the inlet vial with BGS vial, (d) separation based on release mechanism and (e) enantioseparation by CDEKC.

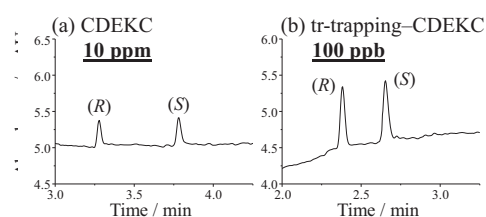


Figure 2. Enantioseparations of 1-aminoindan racemate obtained by (a) CDEKC and (b) tr-trapping-CDEKC. Micelle injection, (a) none, (b) 0.5 psi, 10 s; sample injection, (a) 0.5 psi, 3 s, (b) 5.0 kV, 420 s. Separation voltage, 20 kV; UV detection, 200 nm.

P-7

CE による一斉分析法の応用：グリコサミノグリカンの硫黄含量測定

○大塚祐也

生化学工業株式会社中央研究所

Application of simultaneous analysis using CE: Determination of sulfur content of glycosaminoglycan

Yuya OTSUKA*

Central Research Laboratories, Seikagaku Corporation

Abstract

A capillary electrophoresis method has been developed by Soga *et al* for simultaneous analysis of both inorganic and organic cations, and carbohydrates. We applied this method for quantification of sulfur contents of glycosaminoglycans (GAGs). As the standards, sulfate ion, *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) after acid treatment showed good linearity in the method. Then several types of chondroitin sulfates were subjected for the analysis to determine their sulfur contents. The results were in good agreement with those quantified by enzymatic digestion followed by HPLC analysis. This method will be promising for specification of both natural and chemically modified GAGs.

はじめに

グリコサミノグリカン(GAG)は生体内に広く分布し、多様な生理的機能を司る分子群である。一部の例外を除き、*N*-アセチルヘキソサミンとウロン酸の二糖繰り返し構造を基本骨格とした直鎖状多糖であり、その多くが硫酸化修飾を受ける。硫酸化度は GAG 類の物性及び生理機能を規定する要因の一つとして重要であり、従来からイオンクロマトグラフィ法や GAG 分解酵素による消化と HPLC 分析を組み合わせた二糖分析法¹によって解析されてきた。しかし、前者は乾燥減量およびナトリウム含量による補正が不可欠であり、後者は酵素消化抵抗性の構造を有する場合の解析が原理上困難であるという欠点があった。

今回我々は、曾我らによって開発されたキャピラリー電気泳動法による陰イオン、有機酸、アミノ酸、糖類の一斉分析法²を、GAG の硫黄含量測定法に適用することを試みた。GAG を塩酸にて完全加水分解したのち、遊離した硫酸イオン及びヘキソサミンを同時定量することにより、それらの濃度比から直接 GAG の硫黄含量を算出することが可能であったので報告する。

実験

キャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動装置はAgilent 7100 CE (Agilent製)を用い、キャピラリーは内径 75 μm 、長さ 110 cm のフューズドシリカキャピラリーを使用した。泳動バッファには、Basic anion buffer (Agilent製)を使用し、キャピラリー温度は 25°C、印加電圧は-30 kV とした。

測定試料の調製

約 0.1% (w/v)に調製した GAG の水溶液 50 μL と 6N HCl 150 μL を 1.5 mL の PP チューブ中に混和し、密封後 110°Cにて加熱した。反応終了後、溶液を蒸発乾固させて塩酸を除去し、超純水に溶解して測定に用いた。また、既知量の硫酸イオン及び GalNAc, GlcNAc を含む水溶液を標準溶液とし、GAG の水溶液と同様に処理して測定に用いた。

結果と考察

標準溶液を用いて硫酸イオン、GalNAc、GlcNAc の濃度と時間補正面積の相関を確認したところ、いずれも良好な直線性を示した(GalNAc, GlcNAc はそれぞれ脱アセチル化された GalN, GlcN として検出)。

次にコンドロイチン硫酸 A(CSA)、コンドロイチン硫酸 C(CSC)に関して分析し、算出された硫黄含量を二糖分析法による測定結果と比較したところ、ほぼ同等の値となった。日間における測定値の CV は 2.5%であった(n = 3)。

CS の不飽和二糖標準物質を分析した結果、それぞれ理論値よりも若干高値を示したが、各硫黄含量と相関する結果が得られた。

本結果により、キャピラリー電気泳動による一斉分析法は、GAG の硫黄含量測定に有用であることが示された。当方法は、乾燥減量や金属含量の測定を必要としない簡便な硫黄含量測定法として、GAG の化学的硫酸化反応のモニタリングや規格化に有効な手段となりうる。

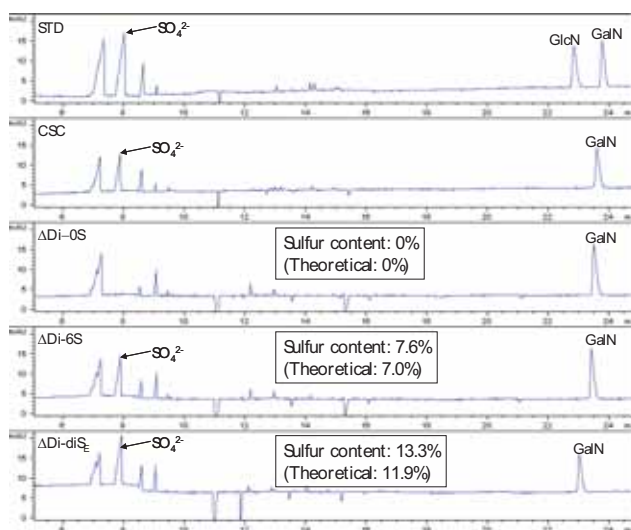


Fig.1 Electropherograms of hydrolyzed standard solution, CSC, and unsaturated chondro- disaccharides.

References

- [1] Yoshida, K. *et al. Anal. Biochem.* 177: 327-332, 1989.
- [2] Soga, T. *et al. J. Chromatogr. A* 837: 231-239, 1999.

P-8

CE-TOFMS を用いた口腔プラークバイオフィルムの糖代謝メタボローム解析 ～フッ化物やキシリトールによる影響を *in vivo* で探る～

○鷲尾純平、小川珠生、真柳弦、高橋信博
東北大学大学院歯学研究科口腔生化学分野

Metabolome analysis of glucose fermentation by oral plaque biofilm using CE-TOFMS - Effects of fluoride and xylitol *in vivo*-

Jumpei WASHIO*, Tamaki OGAWA, Gen MAYANAGI, Nobuhiro TAKAHASHI

Division of Oral Ecology and Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

Abstract

Oral plaque biofilm consist of various bacteria. In bacterial cells, there are several thousands of metabolic products and intermediates produced through their metabolic activities, and the products and intermediates sometimes cause various oral diseases. For example, dental caries is initiated by demineralization of the tooth surface through acid production from sugar by oral plaque biofilm. However, the metabolic mechanism in oral plaque biofilm is unknown, because it is technically difficult to analyze metabolites comprehensively and simultaneously in a small amount of sample. We applied CE-TOFMS to metabolome analysis of oral plaque biofilm. Furthermore, we attempted to confirm the inhibitory mechanisms of fluoride and xylitol, used worldwide as caries preventive reagents, in oral plaque biofilm *in vivo*.

Almost all the targeted metabolites in the central carbon metabolism were detected, and effects of fluoride and xylitol were evaluated from changes in the metabolome profile. Fluoride appeared to inhibit bacterial enolase activity as well as lactate production *in vivo*. While, xylitol had no effect on acid production and the metabolome profile, although xylitol 5-phosphate, derived from xylitol phosphorylation, was detected.

Metabolome analysis of oral plaque biofilm using CE-TOFMS may provide a new knowledge about the pathogenic mechanism of oral diseases and the preventive methods.

はじめに

口腔プラークバイオフィルムすなわち歯垢は、そのおよそ 8 割以上が細菌によって構成されている。これらの細菌は、多様な代謝産物（代謝中間体及び最終代謝産物）を産生しており、これら代謝産物が、様々な口腔疾患の発生や増悪に関与していると考えられている。たとえばう蝕は、口腔内細菌が糖代謝により産生した乳酸などの有機酸により、pH が低下し、歯表面が脱灰されることで始まることが示されている。

しかし、実際の口腔プラークバイオフィルム内で、どのような代謝産物が、どのように産生され、どのようにその産生がコントロールされているのか？については、これまでほとんど明らかになっていない。

その大きな要因としては、口腔プラークバイオフィルムは採取できる試料の量が極めて少量であるため、既存の方法では代謝産物を網羅的に検出・定量することが難しかったことがあげられる。例えばう蝕に関する基礎的な研究は、代表的なう蝕関連細菌である *Streptococcus mutans* (Sm) などの培養細菌を用いた *in vitro* で行われ、その研究結果から、代謝機構などが推測されてきた。

しかし、実際のヒトの口腔内プラーク細菌叢に占める *Sm* の比率は数%以下と低く、これまで *Sm* で得てきた知見が、そのまま実際の口腔プラークバイオフィームにも適用できるかどうかについて不明であった。

CE-TOFMS は、微量の試料からの代謝産物および代謝中間体の網羅的な解析が可能である。そこで我々は、*in vivo* での口腔プラークバイオフィーム代謝研究への本装置の応用を試み、実際の微量の口腔プラークバイオフィームから糖代謝系関連代謝産物および代謝中間体が検出できるかを検討した。また、歯科医学分野においては、甘味料の一つであるキシリトール (*Xyl*) や、う蝕抑制成分として歯磨き剤や洗口剤などに配合されているフッ化ナトリウム (*NaF*) などが、広くう蝕予防に利用されている。これまでの研究で、*Sm* は *Xyl* から酸を産生しない上、*Xyl* のリン酸化によって生じたキシリトール 5 リン酸 (*Xylitol 5P*) が、*Sm* のグルコース (*Glu*) 代謝や増殖を阻害することが報告されている^[1,2]。一方、*Sm* は、*NaF* によって解糖系酵素エノラーゼが阻害され、その結果、酸産生が抑制されることが報告されている^[3]。そこで、口腔プラークバイオフィーム糖代謝に対する *in vivo* での *Xyl* および *NaF* の効果についても合わせて検討した。

実験

被験者 7 名より、*Glu* 溶液、*Xyl* 溶液及び *Glu*+*Xyl* 溶液の洗口前後、また *NaF* 洗口 10 分後に行った *Glu* 溶液洗口の前後に口腔プラークバイオフィームを採取し、糖代謝経路 (解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路) の代謝中間体・代謝産物、及び *Xylitol 5P* を対象として、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。

結果と考察

微量の口腔プラークバイオフィームから、対象とした糖代謝系関連代謝産物及び代謝中間体のほとんど全てが検出され、また *Glu* 洗口前後で、その検出量の変動を確認できたことから、本装置が口腔プラークバイオフィームの糖代謝研究に、有用であることが示唆された^[4,5]。

また、*Xyl* 洗口では、*Xylitol 5P* が見られたものの乳酸は産生されず、*Glu*+*Xyl* 洗口では *Xylitol 5P* は蓄積したが、*Glu* 洗口と比べ他の代謝中間体、乳酸量に有意な差はなかったことから、*Xyl* は口腔プラークバイオフィームの酸産生基質にならないが、*Glu* 代謝をほとんど抑制しないことが示され、これまでの *in vitro* 研究で得た知見と、少し異なることが示唆された。

一方、*NaF* 洗口により各種代謝中間体の増減及び乳酸の減少が観察されたことから、*NaF* は口腔プラークバイオフィームの糖代謝にも影響し酸産生を抑制することが示された。代謝中間体の変動解析から、*in vitro* で観察されてきたエノラーゼ阻害を含め、*NaF* は種々の代謝反応に影響することが示唆された。

今後、う蝕予防など細菌叢の代謝に関する研究は、代表的口腔細菌をもちいた *in vitro* の検討だけでなく、実際の口腔プラークバイオフィームを用いた *in vivo* の検討が極めて重要になると考えられた。CE-TOFMS を用いた口腔プラークバイオフィームのメタボローム解析は、今後口腔疾患の成因やその予防法に関し、新しい知見を提供してくれるものと思われる。

References

- [1] Trahan L. Int Dent J 45(Suppl 1): 77-92, 1995
- [2] Miyasawa H et al. Oral Microbiol Immunol 18(4):215-219, 2003.
- [3] Kaufmann M et al. Caries Research 26:110-116, 1992
- [4] Takahashi N, et al. J Dent Res 89:1383-1388, 2010
- [5] Washio J. et al. J Oral Biosci 52(3): 225-232, 2010

P-9

ポリアミド4関連低分子化合物のCE-MS分析

○竹田さほり、山野尚子、川崎典起、安藤尚功、中山敦好

産業技術総合研究所 ユビキタスエネルギー研究部門

バイオベースポリマー研究グループ

CE-MS Analysis of low-molecular compounds related to polyamide 4

Sahori TAKEDA*, Naoko YAMANO, Norioki KAWASAKI, Hisanori ANDO, Atsuyoshi

NAKAYAMA

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

Bio-based Polymers Research Group, Research Institute for Ubiquitous Energy Devices

Abstract

Polyamide 4 (PA4) is a plastic which has good thermal and mechanical properties, and biodegradability. The low-molecular compounds related to the production of PA4 from biomass are 4-aminobutylic acid (GABA), glutamic acid (Glu, raw material of GABA), 2-pyrrolidone (PRN, thermal cyclodehydration product of GABA and synthetic intermediate of PA4), and pyroglutamic acid (PGlu, thermal cyclodehydration product of Glu). We have developed the efficient conversion process of Glu to GABA by biological decarboxylation. The four compounds in biological treated samples were analyzed by CE-MS. The determination values of GABA and Glu were close to those analyzed by pre-column derivatization HPLC.

はじめに

我々はこれまで、優れた熱的および機械的特性を有し、かつ生分解性を有するプラスチックであるポリアミド4（ナイロン4）について、実用化に向けた特性改善を行うための新規合成法¹や、化石燃料の代替としてバイオマスを原料とするモノマー生産の検討を行ってきた。ポリアミド4のモノマーはγ-アミノ酪酸（GABA）であり、GABAはグルタミン酸（Glu）の脱炭酸によって得ることができる。バイオマスからのGluの製造については発酵法が既に確立され広く用いられているため、Gluを効率的に脱炭酸してGABAを得る手法を検討した結果、大腸菌を用いたバイオプロセスによる大量合成法を開発することができた²。この過程におけるGABAおよびGluの測定はイソチオシアン酸フェニルを用いたプレカラム誘導体化HPLCで行われているが、煩雑な前処理が必要である。なお、ポリアミド4は今のところGABAからの直接重合によっては合成できず、高温下（> 200 °C）での脱水環化により2-ピロリドン（PRN）を生成させ、これを強アルカリ条件下で開環重合するという2段階の化学プロセスを経ることによって得られる。また、GluがGABAと同様に脱水環化した場合（> 175 °C）にはピログルタミン酸（PGlu）が生成する。

以上の関連化合物のうち、アミノ酸については CE-MS による一斉分析法が開発されておりメタボローム解析における強力なツールとなっているが³、CE-MS の適用範囲をその他の分野に広げていくことも重要であると考えられる。そこで我々はポリアミド4 関連低分子化合物として、アミノ酸である GABA、Glu、PGlu のほか PRN も対象とし、これらの一斉分析法としての CE-MS について検討を行った。

実験

CE 装置には Beckman-Coulter 社製 P/ACE MDQ を使い、Polymicro Technologies 社製内径 50 μm 、外径 375 μm 、全長 80 cm の内面未処理フューズドシリカキャピラリーを用いた。MS 装置には Bruker-Daltonics 社製 Esquire 3000 plus を使い、それらを Agilent Technology 社製 CE-MS 用 ESI インターフェースにより接続した。シース液の送液には Cole-Parmer 社製 model 74900-05 シリンジポンプを用い、流速を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。CE の試料導入量は約 7 nL、泳動溶液には 1 M ギ酸を用い、印加電圧は 30 kV とした。ESI 電圧は -3 kV (陽イオン検出) に設定し、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、後者の流速と温度は 5 L/min 及び 320 $^{\circ}\text{C}$ にそれぞれ設定した。

結果と考察

通常、CE-MS におけるキャピラリー長は 100 cm 程度であるが、我々のシステムにおいては 80 cm まで短縮することが可能であり、GABA、Glu、PRN、PGlu の混合標準溶液を用いた場合、この順序で検出され 20 分程度で一斉分析を行うことができた。また、GABA については新しい内標物質探索の結果、ジプロピルアンモニウム酢酸塩を用いることにより分析時間をさらに短縮し、5~7 分程度で定量することが可能であった。

シース溶液については、電解質溶液と有機溶媒種類をそれぞれ変えて比較検討した結果、10 mM ギ酸とメタノールの 1:1 (v/v) 混合溶液を用いた場合にピーク面積値の最も良い再現性が得られた。このうち GABA と Glu については、実際に得られた GABA の大量合成試料を用いてプレカラム誘導体化 HPLC と比較したところ、ほぼ同様の定量結果が得られた。一方、PRN や PGlu については他の定量法との比較はできなかったが、実試料からは両者とも検出されず、大量合成時にはこれらの副生はほとんど起こっていないものと考えられた。

References

- [1] Kawasaki, N. *et al. Polymer* 46: 9987–9993, 2005.
- [2] Yamano, N. *et al. Japan Patent Kokai* 2009-159840, 2009.
- [3] Soga, T. *et al. Anal. Chem.* 72: 1236–1241, 2000.

P-10

等電点電気泳動濃縮可能な蛍光性酵素基質分子の設計・合成と高感度 ELISA に向けた基礎検討

○上野山雄大¹, 池上謙², 梅沢啓太郎²,
横山大輝¹, Daniel CITTERIO², 鈴木孝治², 久本秀明¹
阪府大院工¹, 慶大院理工²

Design and synthesis of novel fluorescent enzyme substrate for capillary isoelectric focusing (CIEF) towards application to highly-sensitive ELISA

Yuta UENOYAMA,¹ Ken Ikegami,² Keitaro Umezawa,² Hiroki Yokoyama,¹ Daniel CITTERIO,² Koji Suzuki,² Hideaki Hisamoto¹

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University¹,
Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University²*

Abstract

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is an established method using enzyme labeled antibody. It is widely used for clinical diagnostic tool because highly sensitive and selective protein analysis is possible. However, ELISA has a disadvantage that it is difficult to detect marker proteins with very low concentrations. In this study, We designed and synthesized the novel fluorescent enzyme substrate Rhodamine-DP (RD-DP) which is able to be concentrated by capillary isoelectric focusing. This molecule reacts with alkaline phosphatase(ALP) 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. Thus, with this molecule, development of highly-sensitive ELISA exceeding the present detection limit is expected, because the final fluorescent product of an enzyme reaction in ELISA can be concentrated at a certain point of capillary without any loss of it. Here, we carried out some preliminary experiments involving capillary-ELISA using RD-DP, evaluation of concentration behavior of rhodamine110 which is enzyme reaction products using the capillary immobilizing antibody.

緒言

酵素免疫測定法(ELISA 法)は抗原-抗体反応を酵素活性で検出する手法であり、各種タンパク質の分析に広く用いられている。しかし、極低濃度での検出が困難であるという問題があり、より高感度な分析法の実現が望まれている。

本研究では、キャピラリー等電点電気泳動法(CIEF 法)によって濃縮可能なアルカリフォスファターゼ(ALP)基質分子 Rhodamine-DP (RD-DP) を新規に設計・合成した。この分子は、ALP 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 の原理で濃縮可能であることがわかっている^[1]。したがって、この分子を用いれば、酵素反応生成物を CIEF によって全てキャピラリー内の一点に濃縮させ

ることが可能であり、高感度な分析が期待されると考えた。

今回はこのコンセプト実現のための基礎検討として、RD-DP を用いた ELISA で試料中の抗原の定量が可能であるかを確認した。さらに、抗体を内部表面に固定化したキャピラリーを用い、酵素反応生成物であるローダミン 110 の CIEF 濃縮挙動の検討を行った。

実験

抗体固定化キャピラリー-の作製：内径 100 μ m 角の角型キャピラリー内にプロテイン A を化学結合によって修飾し、ここに Anti-human IgG を結合させた。

RD-DP を用いた ELISA の基礎検討：抗体固定化キャピラリーを 4cm にカットし各濃度 (0,1,10,100,1000,5000ng/mL) の IgG を含む Human refernce serum をそれぞれ導入し、20 分間インキュベートした。これを Washing solution (0.14M HCl, 0.05% Tween 20 を含む pH=7.4 50 mM Tris-HCl buffer) で洗浄した。ここに 10 ng/mL Anti-human IgG-ALP を導入し、20 分間インキュベートした。再びこれを Washing solution で洗浄した。最後に 12.4 μ M RD-DP を導入し、60 分間インキュベートした後、蛍光顕微鏡画像を取得した。

抗体固定化キャピラリーを用いた CIEF 濃縮検討：12.4 μ M RD-DP, キャリアーアンフォライト (Biolyte 3/10: 3%), 添加剤 (Tween 20: 0.1%) を溶解した 1 mM Tris(hydroxymethyl)aminoethane 溶液に 0.1 U/mL ALP を加え、2 時間インキュベートした。これを 4 cm にカットした抗体固定化キャピラリーに導入した。キャピラリーの両端をリザーバー溶液 (H_3PO_4 20 mM \cdot 200 mM \cdot 2 M, NaOH 20 mM \cdot 200 mM \cdot 2 mM) に接触させ、1.2 kV の電圧を印加し、蛍光顕微鏡画像を取得した。また、同様の操作を電気浸透流 (Electric osmotic flow :EOF) を抑制するために、ポリアクリルアミド (PDMA) を共有結合修飾したキャピラリーで行い、比較検討した。

結果・考察

RD-DP を用いて ELISA を行い、蛍光画像観察を行ったところ 100 ng/mL 以上の human IgG の定量が可能であることがわかった。コンセプト通り RD-DP が ALP 標識抗体によってローダミン 110 を生成していることを確認した。

次に、酵素反応生成物を含む溶液を PDMA キャピラリーに導入して CIEF を行くと、どのリザーバー濃度の場合でも + 極から 15 mm 付近に蛍光分子の濃縮が観察された。一方で、抗体固定化キャピラリーの場合は、リザーバー濃度が 20 mM, 200 mM ではキャピラリー全体で蛍光強度の緩やかな勾配は見られるものの、濃縮は観察されなかった。リザーバー濃度を 2M としたとき、+ 極から 15 mm 付近に蛍光分子の濃縮が観察された。これは、表面がタンパクで覆われているキャピラリーの場合、各リザーバーから供給される H^+ , OH^- がアミノ基、カルボキシル基を多数有するタンパクによって消費されてしまうため pH 勾配形成に必要な H^+ , OH^- が PDMA キャピラリーよりも多く必要であったためと考えた。

今回の結果から、ELISA 後に酵素反応生成物を濃縮・高感度検出するための条件を見出すことができたため、現在、IEF 濃縮を用いた高感度 ELISA の検討を進めている。

References

[1] Nogawa, *et al.*, Proc. μ TAS 2011, in press.

P-11

酸性泳動液を用いた CE-MS 分析の改良への試み

○若山正隆, 青木直大, 佐々木治人, 大杉 立

東京大学大学院 農学生命科学研究科

Improvement of CE-MS analysis using acidic electrolytes

Masataka WAKAYAMA*, Naohiro AOKI, Haruto SASAKI and Ryu OHSUGI

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

Abstract

For CE-MS analysis targeted to small polar metabolites, the acidic electrolytes such as formate or acetate were often used. In the reverse directional electrophoresis (CE inlet sets to the cathode) with excluding alkali, the anionic carboxylic acids including below $pK_a = 3$ were detected by using non-coated fused silica capillary. For metabolomics, rapid, high resolution, and high sensitivity analysis were desirable. Here, we try to improve the reverse directional CE-MS analysis using acidic electrolyte and non-coated fused silica capillary. For reducing of detection time, reducing capillary length is good because the resolution and sensitivity were not getting worse. However, the capillary at the cathode side were often broken by the large current for electrophoresis. Although reducing the capillary inner diameter was one of the solutions to reduce the current, the sensitivity of detection was reduced because injected sample volume was also decreased. As adding to less than 25 % of methanol or 2-propanol without changing the acidic electrolyte concentrations, the current was reduced without changing the sensitivity and resolutions. Thus, adding the small amount of alcohols to acidic electrolyte is one of the solutions for improving the reverse directional CE-MS analysis.

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。ギ酸、酢酸といった酸性水溶液を CE-MS の泳動液に利用することにより順方向の電気泳動(試料導入側を+極、MS側を-極)でアミノ酸類の分析ができる。更にシースガスによる高い吸引力を併用することでアミノ酸類の検出後、 $pK_a = 3$ 以上の陰イオン性物質の分析が可能である¹。またアンモニウムなどの塩基性成分を取り除いたシース液と酸性泳動液を利用することにより、表面処理をしていない熔融シリカキャピラリーでも逆方向の電気泳動(試料導入側を-極、MS側を+極)が可能であり $pK_a = 3$ よりも低いピルビン酸などの陰イオン性物質、ヘキサース-6-リン酸などの糖リン酸類の分離が可能となる²。この酸性泳動液での逆方向電気泳動はメタボローム解析などで非常に有用ではあるが、メタボローム解析では迅速かつ、分離が良く高感度であることが望まれる。本発表ではギ酸を泳動液としたときの CE-MS 分析のうち特に逆方向の電気泳動における更なる最適化を試みた。

実験

キャピラリー電気泳動装置は Beckman Coulter 社製 P/ACE MDQ を、四重極型質量分析計は Thermo Fisher Scientific 社製 Discovery Max を使用した。シースガスは窒素発生装置により発生させ、シース液は資生堂製送液ポンプ Nanospace SI-2 により供給し、安定な送液になるように調整した。キャピラリーは未修飾の熔融シリカキャピラリーを使用した。キャピラリーは長さ 1 m、内径 50 μm のものを基準として長さとお内径を調整し、分析結果への影響を確認した。泳動液は 1 M ギ酸を中心として使用し、メタノールや 2-プロパノールといった溶液を混合させることによって泳動結果への影響を確認した。

結果と考察

50% 2-Propanol をシース液とした 1M ギ酸での逆方向電気泳動によりヘキソース燐酸類 (Glucose-1-phosphate, Glucose-6-phosphate, Fructose-6-phosphate) の良好な分離が可能となった。これよりも低い濃度のギ酸ではこれら糖リン酸類の分離が難しかった。1M ギ酸泳動液では pKa が高いコハク酸、キナ酸等は分析が長くかかり、中性物質に近い分析時間で検出された。シースガスの吸引作用により分析時間そのものは短縮できるが上記の糖リン酸類の分離が難しくなった。このためキャピラリーを 90cm 以下に短くすることにより分析時間の短縮を試みたところ、短時間で感度を落とさず高分解能の分離が確認された。しかし CE 側末端付近で電圧印加 (30 kVm^{-1}) に伴うキャピラリーの破損がしばしば確認された。キャピラリー長を短くすると電流が流れやすくなりキャピラリー破損が起りやすくなる。このため 1) 50 μm より小さい内径のキャピラリーを用いる、2) 1M ギ酸泳動液にメタノール、2-プロパノール等を混合させて影響を確認した。1)の方法では、小内径のキャピラリーを使用することで電流が低くなりキャピラリー破損が防止され、各ピークの分解能が向上した。しかし小内径になったため導入できる物質質量が減少し検出感度は改善できなかった。2)の方法であるギ酸泳動液にメタノール、2-プロパノールを混合させたときの電気泳動では、泳動時の電流を抑制することができた。分離パターンは同一ギ酸濃度の泳動であればアルコールが入らない水溶液での泳動液と大きくは変わらなかった。50%以上のメタノール、2-プロパノールを利用すると分解能が減少し、電気泳動も電流が流れないことも多かった。以上よりギ酸における逆方向電気泳動の分離、感度を維持して分析時間の短縮をはかるには、キャピラリーを短くし電気泳動にかかわる力を大きくし、分離に影響が無いようにギ酸の濃度を 1 M に維持し、これに 25%以下のメタノール等の溶媒を混合させることによりキャピラリーに流れる電流を抑えることで、キャピラリー破損が起りにくく、かつ分離、感度を維持した比較的短時間の電気泳動が可能であることが明らかになった。

References

- [1] Wakayama, M., Aoki, N., Sasaki, H., Ohsugi, R. *Anal. Chem.* 82: 9967–9976, 2010.
- [2] 若山正隆, 安彦友美, 青木直大, 佐々木治人, 大杉立, 第30回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, pp.65-66.

P-12

ダイナミックコーティング-非ゲルキャピラリー 電気泳動分離法-キャピラリー電気泳動反応器 による鉄(III)-フルボ酸錯体の解離速度論解析

○田村優樹¹, 高橋 透², 壹岐伸彦¹, 星野 仁¹

¹東北大院環境, ²福井大院工

Dissociation kinetic analysis of Fe(III)-fulvic acid complex with dynamic coating-non-gel capillary electrophoresis-capillary electrophoretic reactor

Yuuki TAMURA*¹, Toru TAKAHASHI², Nobuhiko IKI¹, and Hitoshi HOSHINO¹

¹Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

²Graduate School of Engineering, University of Fukui

Abstract

A rapid and effective separation technique for fuming substances, dynamic coating-non-gel capillary electrophoresis(CE), was successfully applied to the evaluation of the kinetic properties of the complex of Fe(III) with fulvic acid (FA) by capillary electrophoretic reactor (CER), which was developed as a tool for direct measurement of the dissociation kinetics of metal complexes. The peak height of Fe(III)-FA complex gradually decreased with the increase of the migration time. For the evaluation of the residual ratio of Fe(III)-FA complex with the peak height of the complex, nitrate ion, and adenosine 5'-triphosphate were used as the internal standard, and the external standard, respectively. The dissociation rate constant (k_d) of Fe(III)-FA complex was determined to be $(1.37 \pm 0.61) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, corresponding to a half-life of 1.41 h, by the first-order dissociation kinetic analysis for the kinetic dissociation reaction profile of the complex.

緒言

海水中に極めて微量に存在する鉄イオン(Fe(III))が海洋における植物プランクトンの発生に必須であり, その供給源は陸水に由来するフルボ酸(FA)との錯体として存在するものであることが最近の研究により明らかにされた. 上記のような河川から海に至る Fe(III)の運搬過程及び植物プランクトンの Fe(III)の取り込みメカニズムを理解する上で, Fe(III)-FA 錯体の解離反応特性の把握が重要な鍵を握っている. これまで, 置換配位子との配位子交換反応を利用してそのオーバーオール速度定数または配位子置換速度定数を算出した報告はあるものの, これまで Fe(III)-FA 錯体の解離反応速度定数(k_d)の算出に成功した研究例はない. 一方, 我々はフミン物質の迅速かつ精密な分離を達成する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法(CE)を開発し, これを用いて金属イオンとの相互作用をはじめとするフミン物質のキャラクタリゼーションを行ってきた^{1,2)}. 本研究では, 本法を金属錯体の k_d の直接測定が可能なキャピラリー電気泳動反応器(CER)³⁾に適用し, Fe(III)-FA 錯体の k_d の算出及びその速度論的評価を行った.

実験

FA 試料は、国際腐植物質学会から購入した FA(Suwannee river)を 0.5 mg/ml に調製し、0.45 μm のディスクフィルターでろ過したものを使用した。CE 分離には全長 33.5 cm, 有効長 25 cm, 内径 50 μm の熔融シリカキャピラリーを使用した。泳動緩衝溶液は、リン酸緩衝溶液(pH=7.0)に HEC(0.5(w/v)%), PEG(Mw.10,000 1.0(w/v)% , Mw.8,000,000 0.1(w/v)%)を添加したものをを使用した。キャピラリーに 1 M HCl 水溶液を通液(10 min)後、泳動緩衝溶液を通液した(3 min)。試料は電気的注入法(-10 kV, 10 s)で注入し、陽極側で吸光検出(234 nm)した。

結果と考察

Fe(III)-FA 錯体のダイナミックコーティング-非ゲル CE 分離において、印加電圧を変化させて泳動時間の異なる複数の電気泳動図を取得した(Fig.1)。泳動時間の増加に伴って Fe(III)-FA 錯体のピーク高さの減少が見られた。これは、CE 分離の進行に伴ってキャピラリー内で Fe(III)-FA 錯体の解離反応が進行しているためである。Fe(III)-FA のキャピラリー内解離反応((1)式)は一次反応である。



したがって、Fe(III)-FA の k_d を算出するには、反応時間(泳動時間)の増加に対する Fe(III)-FA の残存率変化を一次の減衰曲線として解析すればよい。ここでは、硝酸イオンを内標準物質及びアデノシン 5'-リン酸(ATP)を外標準物質として用いる二重規格化法により Fe(III)-FA 錯体の残存率を見積もった。すなわち、同条件における ATP の電気泳動図を別途取得し、硝酸イオンのピーク高さで規格化した Fe(III)-FA 錯体のピーク高さ($R(\text{Fe(III)-FA})$)を更に ATP のピーク高さ($R(\text{ATP})$)で規格化($R(\text{Fe(III)-FA})/R(\text{ATP})$)し、これを Fe(III)-FA 錯体の残存率とした。泳動時間(t_m)に対して $R(\text{Fe(III)-FA})/R(\text{ATP})$ をプロットし、キャピラリー内解離反応における Fe(III)-FA 錯体の残存率の時間プロファイルを得た(Fig.2)。また、これを(2)式でフィッティングして、Fe(III)-FA 錯体の k_d として $(1.37 \pm 0.61) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を得た。

$$R(\text{Fe(III)-FA})/R(\text{ATP}) = \alpha \exp(-k_d t_m) \quad (2)$$

以上、CER による Fe(III)-FA 錯体の k_d の直接測定を達成した。また、 k_d の値から求めた半減期は 1.41 h であり、河川から海洋へ至る Fe(III)-FA 錯体の運搬のタイムスケールに対して、解離反応が極めて速く進行することを意味している。したがって、この運搬過程において Fe(III)-FA 錯体はそれ単体で移動するのではなく、遊離の FA との平衡系を保ちながら移動していることが示唆された。

References

- [1] T.Takahashi et al., *Anal.Bioanal.Chem*, **393**, 761-766(2009).
- [2] 日本分析化学会第 59 年会講演要旨集 G1023(2010).
- [3] N.Iki et al., *Anal.Chem*, **72**, 4812-4820 (2000).

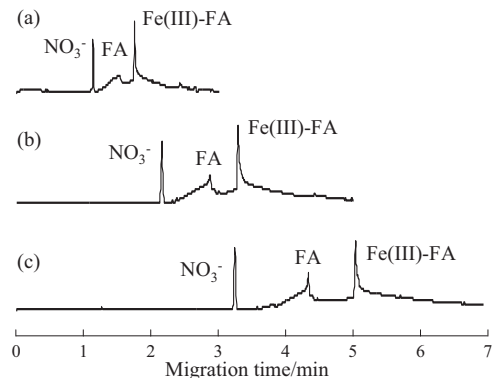


Fig.1 印加電圧変化におけるFe(III)-FA錯体の電気泳動図
サンプル: Fe(III)-FA錯体+ NO₃⁻
印加電圧: (a)-20 kV (b)-12 kV (c)-8 kV

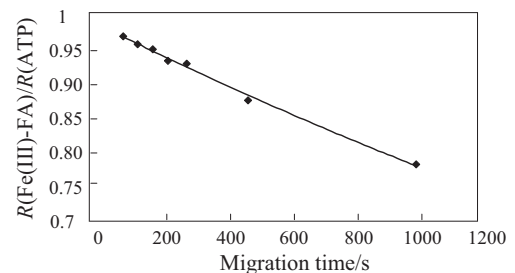


Fig.2 Fe(III)-FA錯体の解離反応プロファイル

P-13

難溶性タンパク質に由来する可溶性ペプチドの APCE

○志村清仁¹, 高橋克佳², 鵜沼 豊², 青笹正義³, 松田治男³, 榎本 学⁴,
秋葉 望⁴, 笠井献一⁴

¹ 福島県立医科大学医学部, ² シャープ株式会社研究開発本部,

³ 広島大学大学院生物圏科学研究科, ⁴ 帝京大学薬学部

APCE of Soluble Peptides Derived from a Protein of Low Solubility

Kiyohito SHIMURA*¹, Katsuyoshi TAKAHASHI², Yutaka UNUMA², Masayoshi AOSASA³, Haruo MATSUDA³, Manabu ENOMOTO⁴, Nozomi AKIBA⁴, Ken-ichi KASAI⁴

¹ School of Medicine, Fukushima Medical University; ² Healthcare Systems Laboratories, Sharp Corporation; ³ Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University; ⁴ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

Abstract

Immunological detection of proteins of low solubility is carried out with western blotting. Its immunochemical signals can be properly identified in terms of molecular weight. Although it is widely accepted in the area of biochemical analysis, the whole procedure takes one day and precise quantification is difficult. The epitope on a protein can sometimes be liberated as a soluble peptide by limited degradation of a parent protein. The solubilized epitopic peptide can be a preferable target for the detection with affinity probe capillary electrophoresis (APCE). In the course of development of an APCE system for mouse prion protein (MoPrP), we found that a form of recombinant MoPrP (rMoPrP) presents limited solubility under the conditions of APCE. We tested degradation of rMoPrP and subsequent detection with APCE using an affinity probe (AP) derived from an anti-MoPrP chicken scFv and capillary isoelectric focusing (CIEF). For this APCE system for rMoPrP, CNBr degradation yielded several distinct peaks as complexes with the AP. The result suggests that the combination of limited degradation and APCE could be a fast and precise alternative to western blotting of proteins of low solubility or those forming a part of insoluble entities such as cells or extracellular matrices.

はじめに

膜タンパク質などの難溶性タンパク質の免疫化学的検出にはウェスタンブロッティングが一般に用いられている。ウェスタンブロッティングは分子量によってシグナルを同定できる点でも有用性が高く、生化学領域で広く使われている。しかし、操作全体に1日を要し、定量性が十分ではない。難溶性のタンパク質であっても、エピトープを担う部分を可溶性ペプチドとして切り出すことができればアフィニティープローブキャピラリー電気泳動¹(APCE)によって短時間に定量的検出が可能になると考えられる。われわれはマウスプリオンタンパ

ク質 (MoPrP) の組換え体の検出に APCE を試みたところ、APCE 条件下では溶解性が低いために検出が困難であるという問題に遭遇した。そこで、組換え MoPrP (rMoPrP) を適当に分解することによって、APCE による検出が可能になるか否かを検討した。

実験

rMoPrP は大腸菌で発現させ、精製後 0.1 M ギ酸溶液として回収した。プロモシアン (CNBr) 分解は常法によって行い、減圧乾燥によってギ酸ならびに CNBr を除去した。アフィニティプローブ (AP) は抗 MoPrP ニワトリ抗体から調製した 1 本鎖 scFv 抗体の C 末端領域に導入したシステインに tetramethylrhodamine iodoacetamide を反応させて調製した。キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF) は既報にあるように行った²。

結果と考察

AP を cIEF で分離すると pI 4.4 に 1 本のピークを示した。rMoPrP に対して APCE を行うと、AP の減少は認められるものの、はっきりとした複合体ピークの生成は認められなかった。rMoPrP は 244 残基からなるポリペプチドで分子量は 27000、等電点の計算値は 9.3 という塩基性タンパク質である。フォールディングしづらいために APCE の条件下で不溶化したものと考えられた。

比較的大きな断片が期待できる CNBr 分解を行った後 APCE を試みたところ、pI 7.6 と 8.3 に 2 つのはっきりした複合体ピークを観察された (Fig. 1)。AP のエピトープは予想される CNBr 分解物中で最も長い 116 残基のペプチド上にある。このペプチドの pI の予測値は 10.4 と高く、複合体が AP よりかなり高い pI を示したことで矛盾しない。ペプチド中には -Gly-Asn-Arg- という脱アミドを起こしやすい配列が存在するので、等電点の異なる 2 種の複合体は脱アミドによるものかもしれない。

タンパク質試料を断片化して APCE で検出する方法は、難溶性あるいは不溶性タンパク質を短時間に、かつ定量的に検出する方法としてさまざまな場面で有効であると考えられる。

References

[1] Shimura, K., Karger, B.L. Anal. Chem. 66: 9-15, 1994.

[2] Takahashi, K., et al. J. Sep. Sci. 32: 394-398, 2009

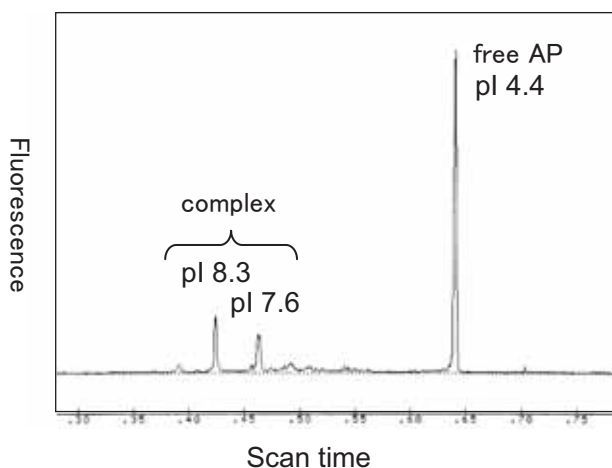


Fig. 1 APCE of CNBr fragments of rMoPrP

P-14 キャピラリー電気泳動のためのインクジェット試料導入とその応用

○池田紗織, 中川ゆり, Zeng HULIE, 中嶋 秀, 内山一美
首都大学東京大学院都市環境科学研究科

Injection method using inkjet microchip for capillary electrophoresis

Saori IKEDA*, Yuri NAKAGAWA, Zeng HULIE, Hizuru NAKAJIMA, Katsumi UCHIYAMA
Institute for Urban Environmental Science, Tokyo Metropolitan University

Abstract

We have developed a precise and reproducible sample injection method using an inkjet microchip for capillary electrophoresis. The method is based on microdrops and hydrodynamics. The volume of a single drop was approximately 273 pL (1.01 RSD%). We could inject given volume of sample into the capillary, separate 4 kinds of amino acids labelled by NBD-F, and detect them by laser-induced fluorescence detection. Even or better reproductivity was obtained compared with hydrodynamic injection that is an ordinary injection method. This method is useful to inject a small amount of the sample precisely and reproducibly. And we can calculate the absolute amount of the injected sample and molecules precisely.

はじめに

キャピラリー電気泳動では一般に内径 100 μ m 以下のキャピラリーを用いることから、再現性の高い分析には通例数 nL 以下の試料量とする必要がある。著者らは、インクジェットマイクロチップを用いた試料導入法を開発し、従来の導入法との比較を行った。インクジェットマイクロチップは、pL~nL の液滴を正確な位置に精度よく吐出することができる。精確な極微量試料の導入により、試料バンドを極めて小さくすることが可能で、高分離能を得やすく、再現性の高い検出が期待される。

実験

インクジェットマイクロチップは富士電機製のものを用い、駆動電圧 35 V、繰り返し周波数 1 kHz とした。インクジェットからキャピラリー (外径 0.375 mm, 内径 0.050 mm) へ直接試料を導入できるようインクジェットとキャピラリーを配置した。キャピラリー先端を泳動液から露出させ、インクジェットから吐出した液滴をキャピラリー先端に吐出し、表面圧により試料を導入した。導入後キャピラリー先端を泳動液中に沈め、測定を開始した。検出はレーザー誘起蛍光法 (473nm) により行った。

結果と考察

分離試料として、NBD-Fによりラベル化した4種類のアミノ酸 (L-Phe, L-Ser, L-Asp, Gly) を用い、泳動液は50 mM ホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を用いた。試料をインクジェットより50滴吐出し、キャピラリーへ導入した。泳動結果を Fig. 1 に示す。1滴の体積は約273 pL (1.01 RSD%) であった。

また、従来法である落差法との比較を行った。結果を Table. 1 に示す。インクジェット導入法では、落差法と同等もしくはそれ以上の再現性が得られた。インクジェット導入法では、極微量の試料を簡便に再現性良く導入することができており、微量なサンプルの精確な測定に有用である。また、導入された試料量と試料分子の絶対量を簡単かつ精確に求めることができる。

種々の導入量、導入方法についてもあわせて検討し報告する予定である。

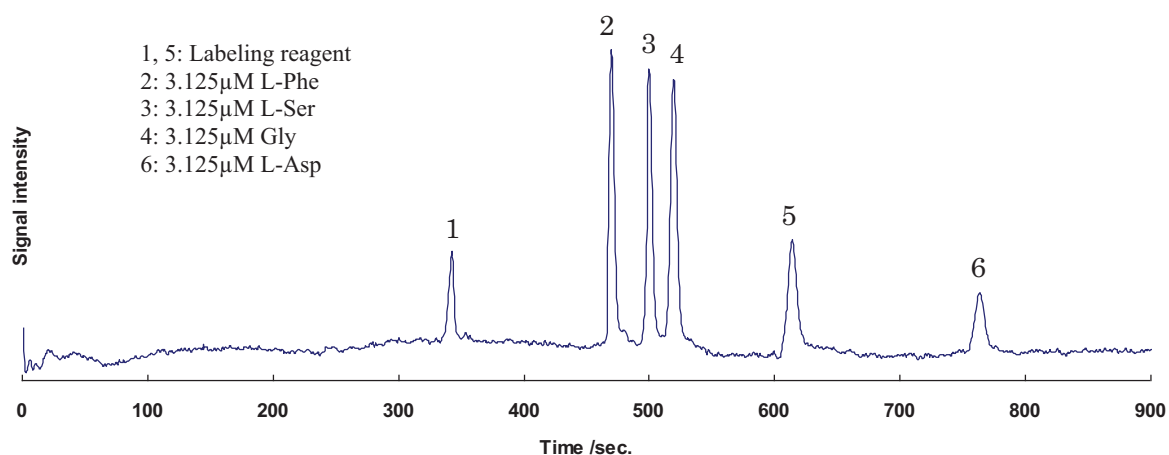


Fig. 1 Electropherogram of amino acids injected by inkjet injection

Table. 1 Comparison of hydrodynamic method with inkjet injection

導入方法		落差法	インクジェット導入法
導入条件		5.5 cm, 10 秒	50 滴, 35 V
ピーク面積の RSD%	L-Phe	0.75 ~ 7.30	0.77 ~ 3.21
	L-Asp	0.31 ~ 9.47	1.66 ~ 9.42
	L-Ser	1.75 ~ 5.98	0.43 ~ 3.09
	Gly	0.70 ~ 5.33	3.13 ~ 4.50

○佐々木俊輔¹, 谷 博文², 石田晃彦²¹北海道大学大学院総合化学院, ²北海道大学大学院工学研究院**Pre-column derivatization reactor for microchip-based amino acid analysis system with electrochemical detection**Shunsuke SASAKI¹, Hirofumi TANI², Akihiko ISHIDA²¹*Division of Chemical Sciences and Engineering, Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University.*²*Division of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University.***Abstract**

A pre-column derivatization reactor has been developed on a PDMS-SU-8-glass hybrid microchip platform for amino acid analysis with electrochemical detection. The micro reactor consisted of two chaotic mixers with microfabricated cyclic pattern of herringbone grooves, and a reaction channel for derivatization of amino acids with a labeling reagent, NPCA. The chaotic mixer demonstrated a complete mixing within a shorter distance, compared with a typical Y-type mixer. The performance of the reactor was tested by assessing the products with a lab-made microchip reversed-phase liquid chromatograph. The chromatographic peak obtained with the reactor was seven times higher than that in batch reaction, indicating its high reaction efficiency.

はじめに

電気化学検出法 (ECD 法) は検出部と装置が小型で、感度が高いため、我々はこれまでに ECD 法に基づくマイクロ分析システムを構築してきた。しかし、臨床医学、生化学、食品分野で分析ニーズが高いアミノ酸は検出できなかった。そこで、本研究では、アミノ酸を電気活性物質へ誘導体化するためのマイクロフローリアクターを開発した。その際、誘導体化試薬 NPCA¹⁾ (Fig. 1) と流路底面の微細な溝により誘起されるカオス混合を利用したミキサー²⁾ (Fig. 2) を用いた。さらに、サンプルおよび試薬の少量化、分析時間の短縮、操作の自動化を目指した。本研究では、ミキサーの混合能力を明らかにしたのち、本ミキサーを利用したマイクロリアクターの性能を評価した。

実験

1) ミキサーの作製：フォトリソグラフィーにより、ガラス基板に塗布したレジスト (SU-8) 層に規則的に配列した矢はず型の溝を作製し、これとソフトリソグラフィーにより作製した Y 型流路付きポリジメチルシロキサン (PDMS) 製チップを張り合わせた。ミキサー長さは 30 mm とした。2) ミキサーの混合能力

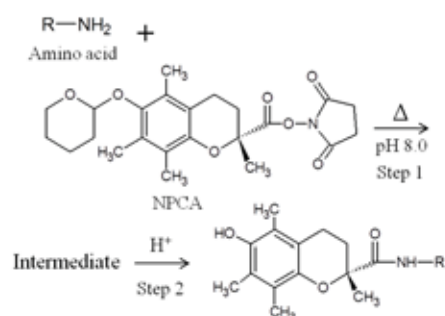


Fig. 1 Scheme of derivatization of amino acid with NPCA.

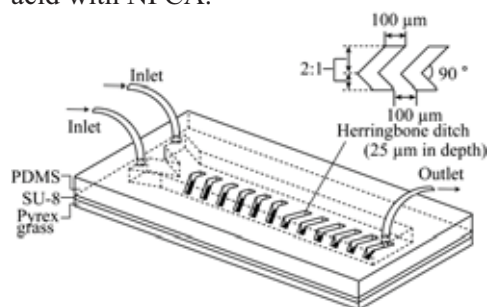


Fig. 2 Schematic of a chaotic mixer.

の評価：フェノールフタレイン溶液（pH 5.0, 無色）および 0.1 M NaOH 水溶液をミキサーに送液し、混合に伴う赤紫の呈色を CCD カメラで撮影し、画像解析した。3) リアクターの作製と反応効率の評価：ミキサーと同様の操作により、Fig. 3 のようなリアクターを作製し、底面にアルミ板を介してシリコンラバーヒーターを設置した。性能評価のためにインレット A から 0.5 mM グリシン（0.1 M リン酸, pH 8.0）、インレット B から 2 mM NPCA（東京化成工業製；アセトニトリル溶液）をそれぞれ 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、インレット C からリン酸（水：アセトニトリル = 1 : 1）を 1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ でシリンジポンプにより送液した。マイクロリアクターの出口に当研究室で開発したマイクロチップ ECD - 逆相 LC を直結し、クロマトグラムを測定することにより誘導体の電流値を得た。比較のためバッチ式で反応を行う場合は、グリシンおよび NPCA の各溶液 1 mL をマイクロチューブ内で混合後、恒温槽内で放置し、所定時間後リン酸溶液 2 mL を加えて室温で 4.6 分間かくはんした。

結果と考察

ミキサーは既報²⁾をもとに設計した。作製したミキサーの混合能力を評価するため、底面に溝がある場合とない場合のミキサー内の混合状態を観察した。混合が観察された領域は、溝がない場合、2 液の合流から 30 mm の間で 2 液界面近傍のみだったが、溝がある場合、合流から 13 mm 以降で流路全体であった。以上から、本ミキサーは短時間で有効に混合することを確認した。

バッチ式による誘導体化反応の検討によれば、反応の 1 段目が遅く、2 段目は速いため、2 つのミキサーと 1 段目の反应用流路を持つリアクター（Fig. 3）を設計した。圧力損失の増大による溶液の流路からの漏れを防ぐため、出口流量をその限界以下の 2.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。リアクター出口の LC に接続するシリコンチューブの長さは、装置構成上最小の 3.0 cm とした。

グリシンを用いて、1 段目の反応時間の電流値への影響をバッチ式および本リアクターで検討した（Fig. 4）。この検討のため、反应用流路の長さが異なる 3 種類のリアクターを作製した。Fig. 4 が示すように、バッチ式において、温度 60°C、反応時間 4.6 分で得られる電流値は、本リアクターでは約半分の時間で得られている。また、本リアクターで、反応時間 7 分、加熱温度 60°C での電流値は、それと同条件のバッチ式で得られた電流値の約 7 倍であった。本リアクターにおいて 1 段目の反応時間を 3.8 分とした場合、LC までに到達する時間は 8.4 分で、必要な試料体積は 5 μL であった。以上、誘導体化反応をマイクロ流体システムとして行うことにより、操作が自動化されバッチ式よりも短時間で高い電流値を得ることができた。このことから、他のアミノ酸での検討が必要であるが、アミノ酸のマイクロ分析システムの構築に必要な誘導体化リアクターの開発に成功した。

References

- [1] T. Sasaki, T. Fukushima, M. Ohishi and T. Toyo'oka, *BioMed. Chromatogr.*, 22, 888 (2008).
- [2] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone and G. M. Whitesides, *Science*, 259, 647 (2002).

謝辞

本研究の一部は平成 23 年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金（基盤研究 C, 23550087））の助成を受けたものである。

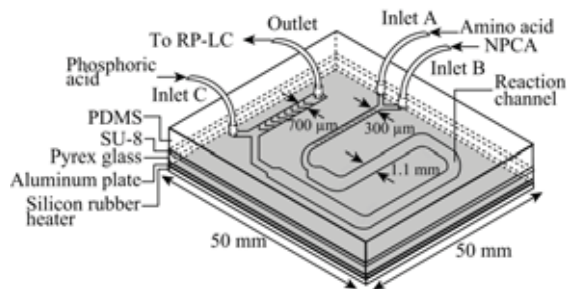


Fig. 3 Schematic of the micro reactor. Channel height, 70 μm .

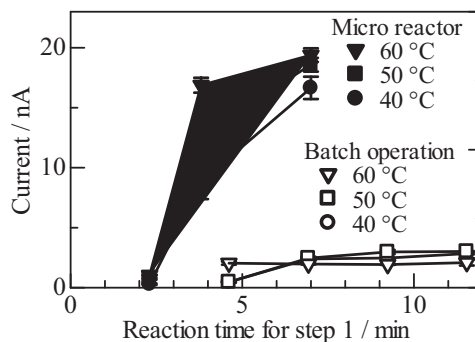


Fig. 4 Current obtained from the chromatographic peak of derivative by varying reaction time of the first step of the derivatization. ECD, + 0.3 V vs. Au.

P-16 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識糖タンパク質糖鎖のオンライン試料濃縮部分導入アフィニティー電気泳動

○山本佐知雄, 福島依里子, 中谷夢美, 鈴木茂生
近畿大学薬学部

On-line Preconcentration with Partial Filling Affinity Capillary Electrophoresis of Glycans Labeled with 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic Acid

Sachio YAMAMOTO*, Eriko FUKUSHIMA, Yumi NAKATANI, Shigeo SUZUKI
School of pharmacy, Kinki University

Abstract

Glycosylation is one of the most complicated post-translational modifications of proteins and plays important roles in the expression of many biological functions of proteins. To interpret the diversity of structure of glycans, a highly sensitive and reliable method should be developed for profiling of glycans. Here we report a novel and sensitive affinity capillary electrophoretic method based on the combination of affinity to lectins using partial filling affinity capillary electrophoresis (PFACE) with large volume sample stacking using electroosmotic flow (LVSEP). Glycans from glycoproteins were derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS). Whole of the capillary was filled with an aqueous diluted solution of APTS-glycans, and then the anodic end was filled with a short plug of lectin. By immersing bot end of the capillary was immersed in Tris/acetate buffer and applying separation voltage, sample phase was removed from cathodic end by electroosmotic flow besides APTS saccharides are stacked at the boundary of lectin phase. After the depletion of aqueous phase the APTS saccharides are separated based on the affinity to the lectin and separated based on their size and charge ratio. Careful choice of lectin indicates structure information of glycans.

はじめに

タンパク質の翻訳後修飾の中でも糖鎖修飾はもっともバリエーションが多く、様々な生命現象と深く関わっていることが明らかとなっている。しかし、糖鎖には多様性があり、しかも含量に幅があるために、糖鎖解析には高感度かつ高い分離能を有する分析方法が求められている。キャピラリー電気泳動法(CE)は高分離能が期待できるが、構造が類似した糖鎖を十分に分離することは難しい。そこで、演者らは既に糖鎖を特異的に認識するレクチンを用いた部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動(Partial filling affinity capillary electrophoresis; PFACE)を開発し¹、本シンポジウムでも発表した。今回は、さらに糖鎖の高感度検出を達成するために Large volume sample stacking using electroosmotic flow (LVSEP)と PFACE を組み合わせた高感度糖鎖解析法についての検討を行った(Fig. 1)。

実験

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

キャピラリー電気泳動：キャピラリー電気泳動装置は Beckman Coulter 社製 P/ACE™ Capillary Electrophoresis System 32 Karat™8.0 を用いた。キャピラリーには GL science 社製の InertCap (内径 50 μm, 全長 50 cm, 有効長 40 cm) を使用した。泳動液には 0.05% ヒドロキシプロピルセルロースを含む 100 mM Tris/酢酸緩衝液(pH 7.0) を用いた。キャピラリー内を水および泳動液で置換した後，APTS 標識化糖鎖を圧力で導入し，試料溶液でキャピラリーを満たした。その後，各種レクチン溶液(タチナタマメ由来 Concanavalin A, ヒロチャワンタケレクチン(AAL), インゲンマメレクチン, 日本ニワトコレクチン(SSA)) をキャピラリー出口から圧力で導入し，負電圧を印加して分析を行った。

結果と考察

試料にヒト血清由来トランスフェリン(TRF)を用い LVSEP によって濃縮された試料でも PFACE が有効であるかを調査した。TRF は主に α 2,6 結合した *N*アセチルノイラミン酸を末端にもつ二本鎖の糖鎖からなり，コアおよび側鎖の *N*アセチルグルコサミンにフコース残基を有する糖鎖の存在も知られる。APTS 標識化 TRF でキャピラリー内を満たした後，フコース残基を認識する AAL (1 mg/mL) を 0.5 psi, 30 秒でキャピラリー出口から注入した後，負電圧を印加して電気泳動を行った。その結果を Fig. 2 に示す。得られたエレクトロフェログラムを見ると 18 分付近の 2 本の高いピークではほとんど変化がないのにも関わらず，丸で囲んだフコース残基を有するピークが消失していることがわかる。この

ことから部分導入したレクチンは LVSEP 濃縮時も活性を保持していることが判明した。本発表では他の試料およびレクチンを用いた高感度糖鎖特異性解析結果についても報告する。

References

[1] Yamamoto, S. *et al. J. Chromatogr. A* 1218: 4772–4778, 2011.

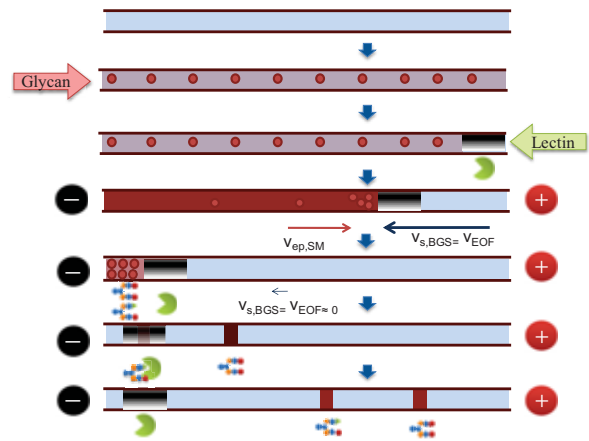


Fig.1. Principle of lectin PFACE with LVSEP. Large volumes of APTS-labeled glycans mixture and lectin solution were introduced by pressure. By applying voltage, sample and lectin bands were concentrated at anodic end and finally APTS glycans was passed through lectin band and separated background electrolytes.

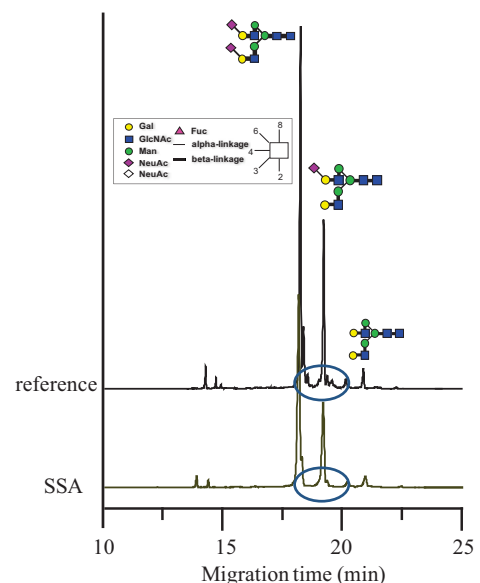


Fig.2. LVSEP concentration and separation of APTS labeled glycans from human serum transferrin with (a) AAL injected at 0.5 psi, 30 sec (lower trace) and (b) without AAL (upper trace).

P-17 ジクロロ酢酸またはピルビン酸を投与した MELAS ミトコンドリア病 細胞の比較メタボローム解析

○紙健次郎¹, 藤田泰典^{2,3}, 曾我朋義¹, 富田 勝¹, 伊藤雅史^{2,3}, 田中雅嗣³

¹慶應義塾大学先端生命科学研究所, ²岐阜国際バイオ研究所,

³東京都健康長寿医療センター研究所

Metabolomic Profiling of Dichloroacetate and Pyruvate Efficacy in Cybrid Cells Harboring MELAS Mitochondrial DNA Mutations

Kenjiro KAMI *¹, Yasunori FUJITA^{2,3}, Tomoyoshi SOGA¹, Masaru TOMITA¹, Masafumi ITO^{2,3}, Masashi TANAKA³

¹*Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

²*Department of Longevity & Senescence Study, Gifu International Institute of Biotechnology*

³*Research Team for Functional Biogerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

Abstract

Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) syndrome is one of the mitochondrial cytopathies caused by a nucleotide A-to-G mutation in mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene. Dichloroacetate (DCA), a lactate-lowering agent, has been used as a typical treatment agent for MELAS, but its clinical efficacy is considered doubtful. In contrast, pyruvate treatment was recently found to alleviate clinical symptoms of MELAS and thus is promising as a highly effective and side-effect-free therapeutic. Here, we conducted comparative metabolome analysis on cybrid human 143B osteosarcoma cells harboring normal (2SA) or MELAS-mutant mitochondria (2SD) by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry to elucidate metabolomic effects of DCA or ¹³C-labeled pyruvate treatment on the cybrids. Quantifications of the time-change in 161 intracellular and 85 medium metabolites and flux interpretations in the cells clarified consistently low ATP levels and poor energy status in 2SD cells. The treatment of pyruvate, but not DCA, improved [NADH]/[NAD] of 2SD cells, thereby enhancing their anaerobic glycolysis and partial TCA cycle for maintaining the energy status as high as that in 2SA cells. The results demonstrated a dramatic and sustainable effect of pyruvate administration on the energy metabolism of 2SD cells, supporting an idea that balancing the [NADH]/[NAD] is crucial for facilitating ATP production and improving energy status of MELAS mutant cells. Pyruvate was thus identified as a more effective and metabolically rational treatment regimen than DCA for improving symptoms associated with MELAS and even other mitochondrial diseases.

はじめに

代表的なミトコンドリア病の一つである MELAS (ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群) は, mtDNA の点突然変異 (主に 3243A→G 変異) により引き起こされ, 酸化リン酸化によるエネルギー生成に異常をきたし, 全身性強直, 癲癇, 脳卒中様発作に加え運動能力, 視力, 精神機能の低下などの症状を伴う根治法の無い難病である. 典型的に血清・髄液中の乳酸値が高いことから, 乳酸アシドーシスを緩和するジクロロ酢酸の投与がこれまで臨床的に行われてきたが, その薬効は疑わしく重篤な神経障害の副作用も報告されている. 一方, 近年, 高濃度のピルビン酸投与が様々なミトコンドリア病患者の症状を劇的に改善することが確認された. そこで, ジクロロ酢酸およびピルビン酸の薬効をエネルギー代謝の観点から明らかにする目的で, MELAS 変異を伴うミトコンドリアを含む Cybrid 細胞のメタボローム解析を行った.

実験

ヒト 143B 骨肉腫 ρ^0 細胞に MELAS ミトコンドリア病患者由来の野生型ミトコンドリア (2SA 細胞) または MELAS 変異ミトコンドリア (2SD 細胞) を加えて Cybrid を形成し, それぞれの細胞に対し 0.1 mM ジクロロ酢酸または 10 mM ピルビン酸を加え, 0, 1, 2, 4 時間後に細胞および培養液を採取し, CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った.

結果と考察

メタボローム解析により, エネルギー代謝に関連する細胞中の 161 成分および培養液中の 85 成分の同定・定量を行った. 2SA 細胞に比べ 2SD 細胞では ATP およびエネルギーチャージの低下が観察され, NADH および乳酸過多の状態であり, エネルギー生成の停滞が示唆された. しかしながら, ジクロロ酢酸の投与では 2 種の細胞に見られるこれらの特徴に変化が見られず, 期待された TCA 回路中間物質の変化も僅かであった. 一方, ピルビン酸投与条件では, 2SD 細胞におけるエネルギー状態が劇的に改善し, さらに [NADH]/[NAD] や多くの解糖系物質が 2SA 細胞のレベルにまで回復した. 従って, ピルビン酸の投与により, ピルビン酸→乳酸の反応が亢進することで NAD が増加し, 解糖が正常化されたために, 主に嫌氣的解糖による ATP 生成の亢進が促され, 2SD 細胞のエネルギー代謝が改善したと考えられた. 結果として, CE-TOFMS を用いた MELAS 変異細胞のメタボローム解析から, ジクロロ酢酸に比してピルビン酸が, エネルギー代謝の観点からより効果的であることが示された.

P-18 イオンクロマトグラフ/キャピラリーゾーン電気泳動による二次元分離法の開発

○田辺健二¹, 中島沙知¹, 富永達哉¹, 飯田 豊¹, 廣川 健²

¹株式会社 東レリサーチセンター, ²広島大学大学院工学研究院

Development of two-dimensional separation method using combination of ion chromatography and capillary zone electrophoresis

Kenji TANABE*¹, Sachi NAKASHIMA¹, Tatsuya TOMINAGA¹, Yutaka IIDA¹ and Takeshi HIROKAWA²

¹Toray Research Center, Inc.

²Graduate School of Engineering, Hiroshima University

Abstract

A new two-dimensional separation method using combination of ion chromatography and capillary zone electrophoresis (IC/CZE) was developed for various ionic species. In order to improve the selectivity and enhance the sensitivity, electrokinetic injection CZE (EKI-CZE) was performed for the fractions obtained by IC equipped with a suppressor. Determination of inorganic cations, amines in the standard solution and separation of inorganic anions, organic acids in the standard solution were reported in this study. The results indicate that IC/CZE has unique separation capability. The detection limits reached ppb level comparable with those of IC.

はじめに

イオンクロマトグラフィー (IC) は、イオン成分を高感度且つ一斉分析できる手法として広く使われている。しかしながら、アミン類や有機酸類など保持時間が近いものは、分離カラムや溶離液組成を最適化しても分離が難しい場合も少なくない。キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) 法は、より優れた分離能を有するものの IC 同様、泳動時間が近い成分の分離には工夫が必要である。

CZE のオンライン濃縮法の一つである電氣的注入法 (EKI-CZE) は、通常の試料注入法 (落差法や加圧法) と比較して飛躍的に測定感度を上げることができ、IC と同等の感度 ($\mu\text{g/L}$ レベルの検出下限値) を達成している^{1,2)}。しかしながら EKI-CZE は、夾雑物質を含まない試料にのみ適用可能な技術であるなど、実試料への適用には課題がある。

そこで我々は、サプレッサー式 IC の検出器を通過した後の溶液には夾雑物質が含まれないことに着目し、両手法を組み合わせた IC/CZE 二次元分離法を開発した。本発表ではカチオン標準液 (14 成分) あるいはアニオン標準液 (17 成分) を IC で測定し、得られた分取液をさらに EKI-CZE で分離した例を報告する。

実験

[カチオンの測定] 無機カチオン・低級アミン類 14 成分、各 $100\mu\text{g/L}$ の混合標準液を IC にて測定した。IC は DX-500 (Dionex) を使い、試料注入量 $500\mu\text{L}$ 、流速 0.25mL/min 、分離カラム Ion Pac CS14 ($2\text{mm}\phi\times 250\text{mm}$)、溶離液 10mM メタンスルホン酸の条件で分離を行い、サプレッサー (CSRS-300)、電気伝導度検出器通過後の溶液(フラクション)を 2 分ごとに採取した。これらを EKI-CZE の測定に供した。CE は CAPI-3300(大塚電子)、キャピラリーは内径 $75\mu\text{m}$ 、全長 800mm 、泳動液は $\alpha\text{-CFI101}$ ($\text{pH } 4.0$ 大塚電子)を用いた。試料注入法は EKI (10kV 、 10 秒)、検出はインダ

イレクト UV(210nm)で行った。

[アニオンの測定] 無機アニオン・低級カルボン酸類 17 成分、各 100 μ g/L の混合標準液をカチオンと同様に IC/CZE にて測定した。IC は ICS-3000 (Dionex)、試料注入量 500 μ L、流速 0.25mL/min、分離カラム Ion Pac AS23 (2mm ϕ ×250mm)、溶離液は水酸化カリウム/グラジエントの条件で分離を行い、サプレッサー (ASRS-300)、電気伝導度検出器通過後の溶液を EKI-CZE の測定に供した。CE は CAPI-3300(大塚電子)、キャピラリーは内径 75 μ m、全長 800mm、泳動液は α -AFQ108 (pH6.0 大塚電子)を用いた。試料注入法は EKI (-5kV、10 秒)、検出はインダイレクト UV(265nm)で行った。

結果と考察

1) カチオンの測定結果

IC/CZE 二次元分離を行った例を Fig.1 に示す。IC では分離困難な成分 (例えばピーク 3,4) が分取して EKI-CZE で測定されることにより、分離されている (Fraction-2)。IC での保持時間、および CZE での泳動時間の二次元で成分を分離することから、飛躍的に選択性が向上したといえる。加えて IC のサプレッサー通過後の溶液は試料マトリクスがほぼ純水になることから EKI-CZE で高感度且つ再現性のよい分析が可能となる。なお、本法の検出下限は 1~10 μ g/L であった。

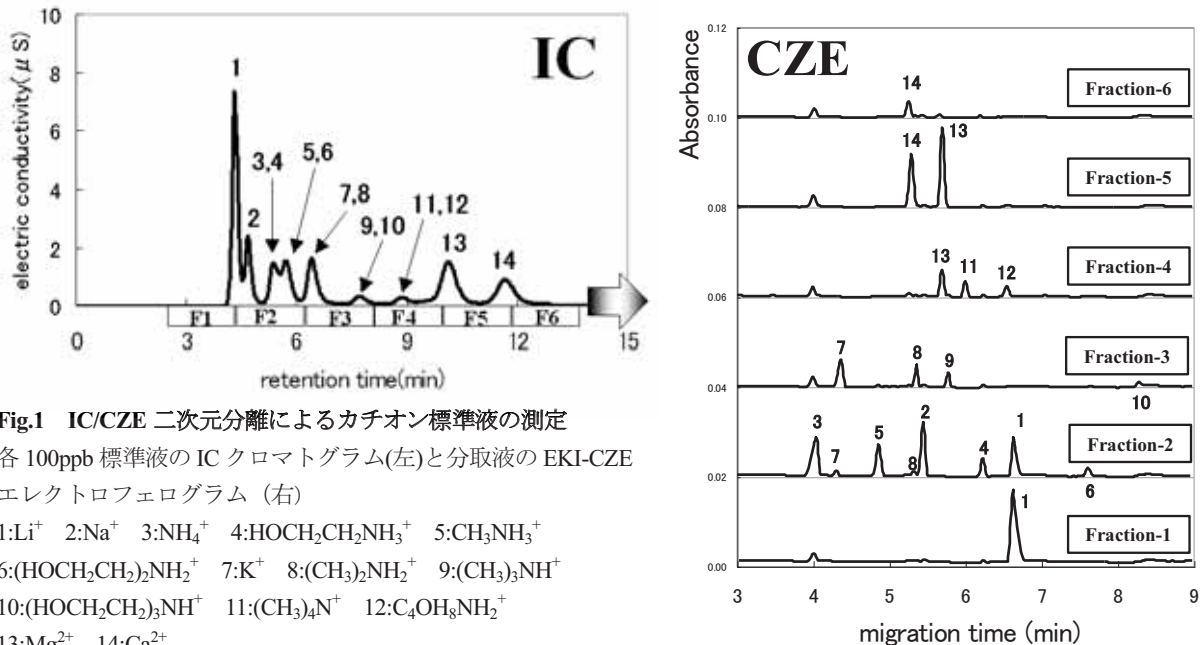


Fig.1 IC/CZE 二次元分離によるカチオン標準液の測定
 各 100ppb 標準液の IC クロマトグラム(左)と分取液の EKI-CZE エレクトロフェログラム (右)
 1:Li⁺ 2:Na⁺ 3:NH₄⁺ 4:HOCH₂CH₂NH₃⁺ 5:CH₃NH₃⁺
 6:(HOCH₂CH₂)₂NH₂⁺ 7:K⁺ 8:(CH₃)₂NH₂⁺ 9:(CH₃)₃NH⁺
 10:(HOCH₂CH₂)₃NH⁺ 11:(CH₃)₄N⁺ 12:C₄OH₈NH₂⁺
 13:Mg²⁺ 14:Ca²⁺

2) アニオンの測定結果

IC/CZE の二次元分離を行い、標準液の 17 成分を分離することができた。CZE 測定の一例を Fig.2 に示す。IC では分離が難しい酢酸、乳酸、グリコール酸を分離できている。なお、IC 分取液の pH は 5.5 であった。EKI-CZE に供する前に、pH を 6.8 程度にすることで感度が向上、pH が 8 以上では感度が低下した。

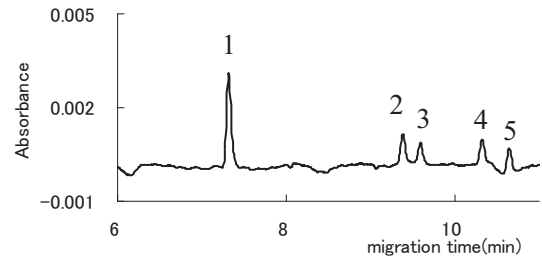


Fig.2 IC 分取液のエレクトロフェログラム
 1:F 2:グリコール酸 3:酢酸 4:乳酸
 5:プロピオン酸

References

- [1] T.Hirokawa, H.Okamoto, B.Gaš., Electrophoresis, 24,498-504 (2003)
- [2] Sarazin et al., J.Chromatography A, 1217, 6971-6978 (2010)

P-19

キャピラリーゾーン電気泳動法による飲料水中のケイ酸・ホウ酸の分析

○中島 沙知¹, 田辺 健二¹, 富永 達哉¹, 飯田 豊¹, 廣川 健²

¹株式会社 東レリサーチセンター, ²広島大学大学院工学研究院

Determination of silicate (SiO_3^{2-}) and borate (BO_3^{3-}) in drinking water using capillary zone electrophoresis

Sachi NAKASHIMA^{*}1, Kenji TANABE¹, Tatsuya TOMINAGA¹, Yutaka IIDA¹ and Takeshi HIROKAWA²

¹Toray Research Center, Inc.

²Graduate School of Engineering, Hiroshima University

Abstract

The performance of capillary zone electrophoresis (CZE) for the determination of silicate (SiO_3^{2-}) and borate (BO_3^{3-}) in drinking water was examined. The quantitative limit for both SiO_3^{2-} and BO_3^{3-} derived from standard solutions was found to be 1mg/L. Linear relationships between the concentration and peak area were found to be 1-140mg/L for SiO_3^{2-} and 1-30mg/L for BO_3^{3-} . Because BO_3^{3-} was not found in seven drinking water samples, examination for sensitivity improvement using electrokinetic injection CZE (EKI-CZE) was carried out. Although 100 time sensitivity enhancement was achieved for standard solution, serious suppression of sensitivity was observed for drinking water samples. As this was considered to be caused by carbonate.

はじめに

天然水中に含まれるケイ酸は生物地球化学的な物質循環に重要な成分の一つである。またホウ酸は2004年に水道水質の管理項目として新たに加えられ、2010年にはREACHのSVHCリストに挙げられるなど、これらの成分の分析需要が高まっている。これまでのケイ酸やホウ酸を定量する手法としては吸光光度法やイオンクロマトグラフィーが挙げられるが、前者は前処理操作が煩雑で熟練を要し、後者は特殊なカラムや検出器が必要であるため、簡便で高感度な分析手法の開発が望まれている。

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) 法は優れた分離能を有し、様々な成分を簡便に同時分析できる手法として期待されている。そこでCZE法を用いてケイ酸・ホウ酸を測定する方法を検討し、飲料水の分析へ応用した。さらに、感度を向上させるため電氣的注入法 (EKI) によるオンライン濃縮法を検討した。

実験

CEはCAPI-3300(大塚電子)、キャピラリーは内径75 μm 、全長800mm、泳動液は α -AFP205 (pH9.5 大塚電子)を用いた。試料注入法は落差法 ($\Delta H=25\text{mm}$, 30sec) またはEKI (-15kV, 10秒)、検出はインダイレクトUV(230nm)で行った。標準液にはケイ素標準液 (1000mg/L 関東化学)、ホウ素標準液 (1000mg/L 関東化学) をそれぞれケイ酸イオン (SiO_3^{2-})、ホウ酸イオン (BO_3^{3-}) に換算したのを用い、超純水で適宜希釈した。試料には市販のミネラルウオ

一ター、水道水、琵琶湖水を用いた。

結果と考察

1) ケイ酸の測定

ケイ酸の標準液を測定した結果、相関係数 $r=0.999$ で直線性の良い検量線が得られ (Fig.1)、定量下限は 1mg/L と見積もられた。この検量線を用い、各試料水中のケイ酸を定量した結果を Table 1 に示す。この結果は、ICP 発光分光分析法で定量した Si を SiO_3^{2-} に換算した値と良く一致し、本方法でケイ酸が測定できることがわかった。

2) ホウ酸の測定

ホウ酸もケイ酸と同様、相関係数 $r=0.999$ で直線性の良い検量線が得られ(濃度範囲 $1\text{-}30\text{mg/L}$)、定量下限は 1mg/L と見積もられた。この検量線を用い、飲料水中のホウ酸を測定した結果、いずれの試料も定量下限未満であった。そこで測定感度向上を目的として EKI-CZE を用いたホウ酸の測定を試みた。この結果、ホウ酸の標準液の測定では、落差法と比較して感度が 100 倍程度向上し、 0.1mg/L の定量下限値を得ることができた。しかしながら飲料水の測定に適用すると、ベースラインが大きく乱れるとともに、測定感度の低下が認められた (Fig.2)。

ホウ酸の pKa が 9.3 であるため試料中のホウ酸が十分に解離せず、EKI で注入されにくいことが原因と考え、ホウ酸の標準液をトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンで $\text{pH}9.3$ 、 9.9 に調整した溶液について EKI-CZE で測定を行った。その結果、上述の予想に反して $\text{pH}9.3$ 、 9.9 の溶液では、 $\text{pH}6$ の標準液と比較して感度が低下した。

飲料水中のホウ酸測定における感度低下の主な要因として、共存する炭酸の影響が考えられる。EKI では電氣的に移動度が大きい成分や試料中の濃度が高い成分が優先的に注入されやすい^{1,2)}。そのため、EKI での試料注入時に炭酸が優先的に注入され、ホウ酸が注入されにくくなったと考えられる。現在、試料中の炭酸を除去して EKI-CZE 測定を行う方法を検討中である。

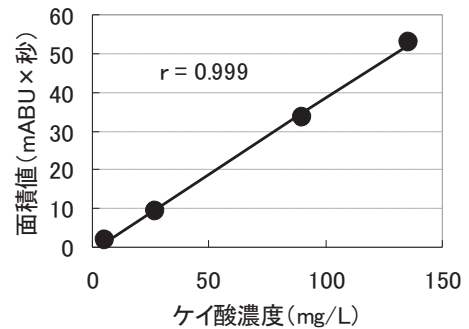


Fig.1 ケイ酸の検量線

Table 1 ケイ酸の分析結果

試料名	産地	SiO_3^{2-} (mg/L)
ミネラルウォーターA	日本	97
ミネラルウォーターB	日本	47
ミネラルウォーターC	フランス	38
ミネラルウォーターD	日本	79
ミネラルウォーターE	日本	43
ミネラルウォーターF	フランス	20
ミネラルウォーターG	フランス	14
水道水	滋賀県	5
琵琶湖水	滋賀県	7

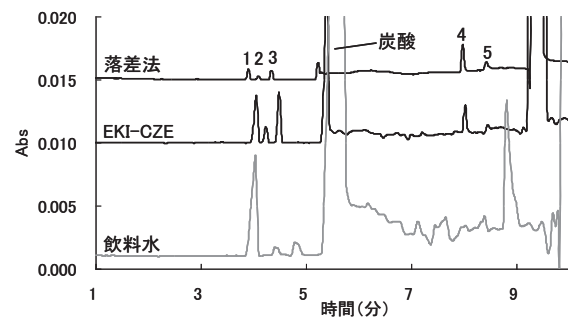


Fig.2 落差法による各 10ppm 標準液、EKI による各 0.1ppm 標準液、EKI による飲料水のエレクトロフェログラム

(1: Cl^- 2: NO_3^- 3: SO_4^{2-} 4: ホウ酸 5: ケイ酸)

References

- [1] R.L. Chien and D.S. Burgi., Anal. Chem., 64, 489(1992)
- [2] T.Hirokawa et al., Analytica Chimica Acta, 581, 83-88 (2007)

P-20

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¹, 福士恵一¹, 平岡 厚², 宮道 隆³

¹神戸大院海事科学, ²杏林大保健, ³近畿職業能力開発大学校

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

Kenji KITA^{*1}, Keiichi FUKUSHI¹, Atsushi HIRAOKA², and Takashi MIYADO³

¹Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

²Faculty of Health Sciences, Kyorin University

³Kinki Polytechnic College

Abstract

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with indirect UV detection for the simultaneous determination of major anions, such as Cl^- , PO_4^{3-} , citric acid, and lactic acid in a human serum. As the background electrolyte (BGE), 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) containing 0.001% hexadimethrine bromide (HDB) adjusted to pH 3.5 was used. The limits of detection (LODs) for Cl^- , PO_4^{3-} , citric acid, and lactic acid were, respectively, 0.061, 0.020, 0.11, 0.15 mg/l at a signal-to-noise ratio of three. The relative standard deviation (RSD, n=6, intra-day) of peak area obtained for Cl^- , PO_4^{3-} , citric acid, and lactic acid in a human serum sample for quality control without deproteinization, were 3.2, 5.2, 2.0, and 2.9%, respectively. The analytes were detected within 7 min. Deproteinization was not required washing the capillary with 0.1 M NaOH between runs. The analytical results for Cl^- and PO_4^{3-} in the samples obtained by the proposed method agreed with those obtained by conventional methods. Investigations are in progress to determine other anions such as L-ascorbic acid (AsA), uric acid (UA), and acetic acid in human serum samples 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。例えば、 Cl^- 濃度は、慢性肺疾患や髄膜炎では低下する。また、無機リン酸 (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。さらに、低酸素状態やカルシウム代謝異常などにおけるクエン酸の異常高値、糖尿病や肝臓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、ヒト血清中のこれら成分を定量することは関連する疾患を発見し、適切な治療を行う上で有意義であると考えられる。従来、これら成分はイオン電極法 (Cl^-) や酵素法 (PO_4^{3-} , クエン酸, 乳酸) 等により個別に定量されている。また、AsA や UA の定量に高速液体クロマトグラフィーが用いられている。我々は、現在までに、CZE

による海水中 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おり、本研究では、この方法をもとに、CZEによる血清中の Cl^- 、 PO_4^{3-} 、クエン酸及び乳酸の同時定量法を確立することを目的とした¹⁾。

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 (PDC) に 0.001% 臭化ヘキサジメトリン (HDB) 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)) を用いた。まず、10 及び 20 倍に希釈した精度管理用血清 (正常域, 未処理) を本法により分析し、各成分の泳動時間及びピーク面積の再現性に対する希釈率の影響について検討した。次いで、20 倍に希釈した精度管理用血清 (正常域, 除タンパク済み及び未処理) を用い、毎分析時の 0.1 M NaOH によるキャピラリー洗浄効果について検討した。

結果及び考察

精度管理用血清 (正常域, 未処理) を 10 倍に希釈した場合、各成分の泳動時間の RSD は 3.7-6.5%、ピーク面積の RSD は 2.9-6.6% であり、20 倍に希釈した場合はそれぞれ、2.4-4.6% 及び 2.0-6.5% であった。また、20 倍希釈試料分析時、0.1 M NaOH によりキャピラリー洗浄を行った場合、各成分の泳動時間の RSD は 0.70-0.79%、ピーク面積の RSD は 2.0-5.2% であった。さらに、本法による未処理精度管理用血清 (正常域及び異常域) 中 Cl^- 及び PO_4^{3-} 定量結果は、精度管理用血清付属の分析値とほぼ同様であった。従って、本法では血清中 Cl^- 及び PO_4^{3-} を定量する場合、除タンパク操作を要しないことがわかった。現在、標準添加実験を行い、回収率を求めているところである。今後、泳動条件を詳細に検討し、血清中の AsA, UA, 酢酸等について同時定量できるようにしたい。

References

- [1] K. Kita, K. Fukushi, A. Hiraoka, Y. Suzuki, A. Soejima, and T. Miyado, *Abstracts of the 59th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 334 (2010).

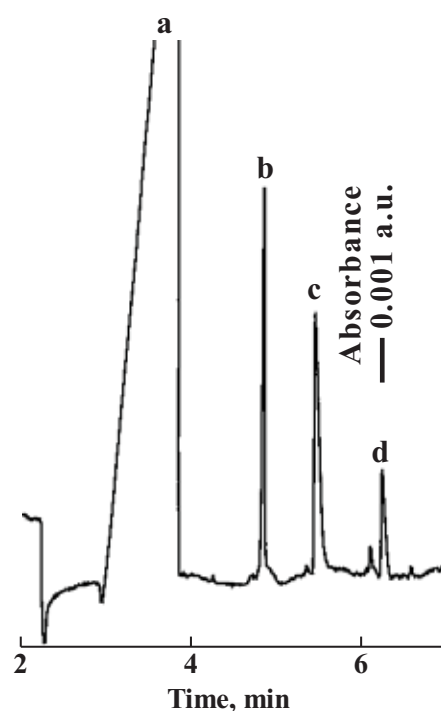


Fig. 1. Electropherogram of a serum sample for quality control. Electrophoretic conditions: capillary, $L_{\text{tot.}}=72$ cm, $L_{\text{det.}}=50$ cm, $75 \mu\text{m}$ I.D. $\times 375 \mu\text{m}$ O.D.; BGE, 5 mM PDC containing 0.001% HDB adjusted to pH 3.5 with 1 M NaOH; voltage, 15 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 273 nm; sample, a human serum sample for quality control without deproteinization (normal range, 20 times diluted); vacuum injection period of a sample, 3 s (63 nl). Peaks: a, Cl^- ; b, PO_4^{3-} ; c, citric acid; d, lactic acid. The capillary was washed with 0.1 M NaOH between runs.

P-21

イオンクロマトグラフィーによるワカメ中の陰イオンの定量

○飯山貴史, 福土恵一

¹神戸大院海事

Determination of Inorganic Anions in Seaweed (Wakame) Using Ion Chromatography

Takashi Iiyama^{*1} and Keiichi Fukushi¹

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

Abstract

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 in seaweed using ion chromatography (IC). It is difficult to obtain dried seaweed samples whose home of material is known. Therefore, salted seaweed whose place of origin is known was obtained from three different districts, Sanriku area, Naruto area in Japan, and China. The salted seaweed was dried and powdered to prepare dried seaweed. The above components were extracted from the powdered seaweed into water using ultrasonic extraction prior to IC analysis. Linear discriminant functions were obtained using the PO_4^{3-} and SO_4^{2-} results. For seaweed in Sanriku area and China: $Z = -7.04 + 6.03x_1 + 3.56x_2$ (Z : discriminant function; x_1 : concentration of PO_4^{3-} ; x_2 : concentration of SO_4^{2-}), in Naruto area and China: $Z = -11.0 + 5.42x_1 + 8.83x_2$. When $Z < 0$, it was identified that the seaweed was produced in Sanriku (Naruto) area; when $Z \geq 0$, the seaweed was produced in China. Investigations are in progress using additional samples to improve the accuracy of the discriminant functions. The discriminant functions finally obtained will be applied to the analytical results of dried seaweed previously obtained.

はじめに

近年、様々な食品の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。ワカメの場合、試料を酸分解後、誘導結合プラズマ発光分光分析法で無機元素を定量すること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、この方法は前処理操作が煩雑であり、長時間を要する。我々はワカメ中の陰イオンに着目し、イオンクロマトグラフィー (IC) を用い、簡易的なワカメ産地判別の可能性について検討してきた¹⁾。加工品である乾ワカメについては、産地判別に不可欠な原産地の明確な試料の入手が難しい。そこで、原料である原産地が明確な湯通し塩蔵ワカメを入手し、乾燥試料を調製した。試料中の Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} を IC により定量し、判別関数を構築した²⁾。本研究では、さらに湯通し塩蔵ワカメの試料数を増やすとともに構築した判別関数を市販の乾ワカメの定量結果に適用した。

実験

試料として、産地の明確な三陸産、鳴門産、中国産湯通し塩蔵ワカメを使用した。まず、ワカメの葉体半分を横方向に8等分し、偶数部4個をビーカーにとり、重量比で10倍量の純水を加えて5分間静置した。プラスチック策に移して脱水後、定温乾燥機（ヤマト科学製 DX601）に移し、60°Cで約48時間乾燥した。乾燥試料約6gをミルで1分粉碎して得られた粉末0.10gをビーカー（20ml）に移し、純水20mlを加え、15分超音波抽出した。内容物を純水5mlで2回洗浄しながら、遠心沈殿管に移した。これを1630×gで5分遠心分離し、上澄み液を採取した。残った沈殿物に純水10mlを加えて攪拌し、更に遠心分離後、上澄み液を前記上澄み液と合わせ、0.45 μmメンブランフィルターでろ過した。ろ液を50ml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った。IC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混合溶液、流量：1.5 ml/min、試料導入量：25 μl、検出器：電気伝導度検出器。測定開始9.5 min後にICのoutput rangeを3 μSから10 μSに切り替えた。

結果及び考察

ワカメ試料30検体を分析した際、ピーク面積の相対標準偏差は、Br⁻、NO₃⁻、PO₄³⁻、SO₄²⁻について、0.8-35、2.5-24、0.59-13、0.41-21%であった。三陸産と中国産ワカメについて、PO₄³⁻、SO₄²⁻濃度から求めた線形判別関数は $Z = -7.04 + 6.03x_1 + 3.56x_2$ (x_1 : PO₄³⁻-P, x_2 : SO₄²⁻-S) であり、鳴門産と中国産ワカメでは $Z = -11.0 + 5.42x_1 + 8.83x_2$ であった。この場合、 $Z < 0$ ならば三陸産あるいは鳴門産、 $Z \geq 0$ ならば中国産であると判別する。SO₄²⁻濃度が判別に大きく寄与しており、この傾向は以前行った市販乾ワカメの場合と同様であった。現在、より正確な判別関数を求めるために、湯通し塩蔵ワカメの試料数を増やして分析中である。さらに、構築した判別関数を市販の乾ワカメの定量結果に適用する予定である。

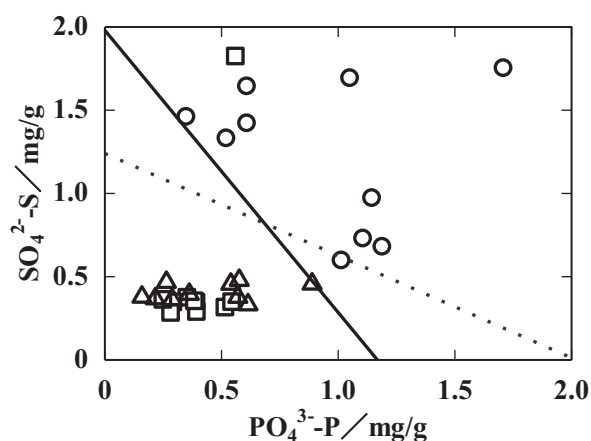


Fig. 1 Distribution of phosphate and sulfate concentrations in seaweed samples. Symbols: □, Sanriku; △, Naruto; ○, China. Ion-chromatographic conditions: pre column, Dionex AG4A-SC, separator column, AS4A-SC; suppressor, ASRS300; mobile phase, 1.7 mmol/l NaHCO₃ + 1.8 mmol/l Na₂CO₃; flow-rate, 1.5 ml/min; detection, conductivity.

References

- [1] T. Iiyama and K. Fukushi, *Abstracts of the 30th Symposium on Capillary Electrophoresis*, pp. 93-94 (2010).
- [2] T. Iiyama and K. Fukushi, *Abstracts of the 60th Annual Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry*, p. 404 (2011).

P-22 キャピラリーゾーン電気泳動法による野菜中の金属イオンの定量

○日高祐一郎¹, 福土恵一¹, 早川 真², 湊 太郎³

¹神戸大院海事科学, ²日本アドバンストアグリ, ³青木マリーナ

Determination of Metal Ions in Vegetables Using Capillary Zone Electrophoresis

Yuichiro HIDAKA*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Makoto HAYAKAWA², Taro MINATO³

¹Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

²Nihon Advanced Agri Co.,Ltd

³Aoki Marine Co.,Ltd

Abstract

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with direct UV detection for the determination of metal ions such as Ca^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} in vegetables. The following optimum conditions were established: capillary, $L_{\text{tot.}}=59.6$ cm, $L_{\text{det.}}=49.3$ cm, 75 μm I.D. \times 375 μm O.D.; BGE, 0.02 M borax containing 2 mM *trans*-cyclohexane-1,2-diaminetetraacetic acid (CyDTA); applied voltage, 20 kV with the sample inlet side as the anode; detection wavelength, 200 nm; pressure injection period of a sample, 10 s (50 nl). The limits of detection (LODs) for Ca^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} were, respectively, 0.41, 0.16, 0.48 mg/l at a signal-to-noise ratio of three. When extracts from ice plant were analyzed, the relative standard deviation (RSD, n=4, intra-day) for Ca^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} , respectively, for migration time were 0.36, 0.21, and 1.1%; the RSDs of peak area were 3.8, 11, and 14%; the RSDs of peak height were 2.3, 8.0, and 5.8%. The proposed method determined the above analytes in ice plants (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) for 15 min. Investigations are in progress to separate Mg^{2+} from Mn^{2+} in the sample solutions.

はじめに

近年、漁業や発電所におけるクラゲによる被害が報告されている。回収されたクラゲは一般廃棄物として処理されているが、循環型社会形成の観点から有効利用が望まれる。クラゲは肥料として有用な成分を含むが、野菜の生長を阻害する高濃度ナトリウムも含む。最近注目されているアイスプラントという野菜を栽培する際、塩化ナトリウム溶液を与える必要がある。そこで我々は、塩化ナトリウム溶液の代わりにクラゲ上澄み液を用いてアイスプラントを栽培した。本研究では、栽培したアイスプラント中の金属イオンをキャピラリーゾーン電気泳動法により定量し、クラゲ上澄み液の有用性について検討することを目的とした。

実験

泳動条件は以下の通りである。キャピラリー：内径 75 μm ，全長 59.6 cm，有効長 49.3 cm；泳動液：2 mM *trans*-シクロヘキサン-1,2-ジアミン四酢酸 (CyDTA) を添加した 20 mM 四ホウ酸ナトリウム水溶液¹⁾；印加電圧：20 kV (試料注入側を陽極)；検出波長：200 nm；試料注入法：加圧法 (50 nl)；標準溶液：10 mg/l カルシウム，鉄，亜鉛，2 mM CyDTA 混合溶液。確立した泳動条件により検量線を作成した。ついで，アイスプラント可食部生重量 (約 10 g) を乾燥 (約 60°C) し，乳鉢ですり潰した。粉末 0.20 g に 0.13 M 硝酸 10 ml を添加し，超音波抽出を行った²⁾。ろ過後，ろ液に 2 mM CyDTA を加え，本法により分析した。ピーク面積より各成分濃度を求め，生重量 100 g 中の各金属イオン含有量を求めた。

結果と考察

カルシウム，鉄，亜鉛の検量線を作成したところ，ピーク面積を用いた場合，直線性の良いものが得られ ($r=0.9949-0.9995$)，標準溶液を分析した場合，ピーク面積及び泳動時間の相対標準偏差 (RSD, $n=4$) は，それぞれ，2.1, 0.88, 2.7%及び 0.42, 0.28, 0.48%であり，検出限界は 0.41, 0.16, 0.48 mg/l であった。アイスプラント抽出液を分析した結果，泳動時間，ピーク面積，ピーク高さの RSD ($n=4$) は，カルシウムについては 0.35, 3.8, 2.3%，鉄は 0.21, 11, 8.0%，亜鉛は 1.1, 14, 5.8%であった。今回の実験では，クラゲ上澄み液を用いて栽培したアイスプラントと NaCl 溶液を用いて栽培したアイスプラントではカルシウム，鉄，亜鉛の含有量に差はみられなかった。また，アイスプラント中の鉄，亜鉛濃度は低いため，高感度化が必要であった。現在，マグネシウムとマンガンとの分離及び分析目的成分の高感度化について検討中である。

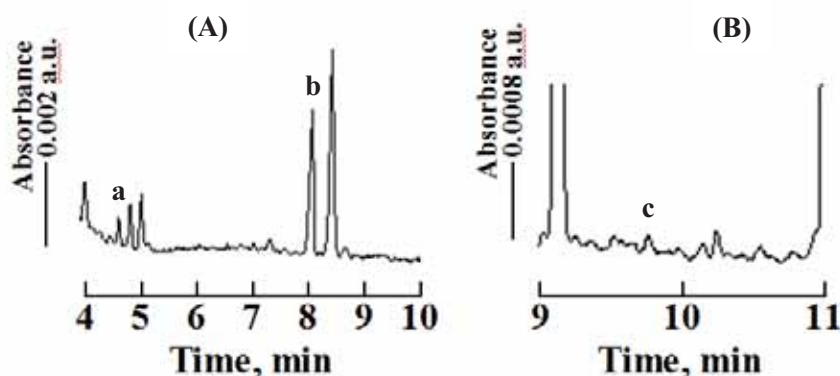


Fig. 1 Electropherograms of extracts from ice plant. (A) Determination of Ca²⁺ and Fe³⁺. (B) Determination of Zn²⁺. Electrophoretic conditions: capillary, $L_{\text{tot.}}=59.6$ cm, $L_{\text{det.}}=49.3$ cm, 75 μm I.D. \times 375 μm O.D.; BGE, 0.02 M borax containing 2 mM CyDTA; voltage, 20 kV with the sample inlet side as the anode; wavelength for detection, 200 nm; pressure injection period of a sample, 10 s (50 nl). Peaks: a, Fe³⁺; b, Ca²⁺; c, Zn²⁺.

References

- [1] 本水昌二，松田伸也：第 11 回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集，p. 57 (1991).
- [2] C. C. Nascentes, M. Korn, M. A. Z. Arruda: *Microchemical Journal*, 69, 37 (2001).

P-23

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：泳動液組成の検討

○林 隆宏¹, 福士恵一¹, 廣川 健²

¹神戸大院海事科学, ²広島大院工

CZE Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater: Composition of background electrolyte

Takahiro HAYASHI^{*1}, Keiichi FUKUSHI¹, Takashi HIROKAWA²

¹Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

²Graduate School of Engineering Hiroshima University

Abstract

We have been studying a method using transient isotachopheresis (tITP)-capillary zone electrophoresis (CZE) for the simultaneous determination of NO_2^- and NO_3^- in seawater using artificial seawater at low pH as the background electrolyte (BGE). We have found the reproducibility was improved by rinsing the capillary with 1 mol/l NaOH before the first analysis in each day and using a BGE containing Br^- . In order to improve the reproducibility and enhance the sensitivity analytical conditions were examined: pH of the BGE, the addition of SO_4^{2-} to the BGE, and variation of the injection mode for the sample and terminating ions. It was found the reproducibility was improved using a BGE without SO_4^{2-} : when the artificial seawater sample containing 3 $\mu\text{mol/l}$ NO_2^- and 20 $\mu\text{mol/l}$ NO_3^- was analyzed, the relative standard deviation (RSD, $n=4$) of peak area obtained for NO_2^- and NO_3^- were 5.4 and 2.0%, and for peak height 4.5 and 3.1%, and for migration time 0.34 and 0.37%, respectively. The sensitivity was slightly enhanced using vacuum injection mode for the sample and 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を定量することは、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_2^- 及び NO_3^- 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。昨年年第30回本シンポジウムでは、泳動液 (BGE) として Br^- を含む人工海水 (pH 3.4) を使用し、一日の分析開始前に 1 mol/l NaOH でキャピラリーを洗浄することにより、 NO_2^- 及び NO_3^- のピーク面積、高さ、泳動時間の再現性が改善されることを示した。本研究では、さらに再現性及び感度を改善するために、BGE の pH, BGE 中の SO_4^{2-} , 試料及びターミナルイオン溶液導入法の影響について検討した。

実験

キャピラリーは内径 75 μm , 全長 72 cm, 有効長 50 cm であり、検出波長は 210 nm とした。BGE として pH 4.7 に調整した人工海水を用い、試料は 3 $\mu\text{mol/l}$ NO_2^- 及び 20 $\mu\text{mol/l}$ NO_3^- を添加した人工海水とした。印加電圧は 6 kV (試料導入側を陰極), 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た。試料及びターミナルイオン溶液導入法として、真空吸引法あるいは電気的

注入法を用いた。

結果と考察

まず、試料導入法として真空吸引法、ターミナルイオン溶液導入法として電気的注入法 (10 kV) を用いた。pH 4.7 の BGE では試料注入時間は 5 秒、ターミナルイオン溶液注入時間は 99 秒が最適であった。この場合、 NO_2^- 、 NO_3^- の RSD は、それぞれピーク面積 18, 2.0%, ピーク高さ 17, 1.4%, 泳動時間 0.23, 0.24% であった。高感度化するためには、試料及びターミナルイオン導入量を増加する必要があるが、BGE 中の SO_4^{2-} に由来するシステムピークが分析目的成分とターミナルイオンとの間に存在するため、ターミナルイオン溶液導入量を増加できない。そこで、 SO_4^{2-} を含まない人工海水を BGE として用いたところ、システムピークが小さくなりターミナルイオン溶液注入時間を 155 秒まで増加できた (Fig. 1)。この場合、 NO_2^- 、 NO_3^- の RSD は、それぞれピーク面積 5.4, 2.0%, ピーク高さ 4.5, 3.1%, 泳動時間 0.34, 0.37% であり、 NO_2^- のピーク面積及びピーク高さの RSD が改善された。LOD は $0.16 \mu\text{mol/l}$ 、 $0.10 \mu\text{mol/l}$ であり、以前に確立した方法²⁾と比較し、 NO_3^- の LOD を 1/2 に低下できた。次に SO_4^{2-} を含まない人工海水 (pH 4.7) を BGE とし、試料及びターミナルイオン溶液導入法として真空吸引法を用いた。この場合、試料注入時間は 5 秒、ターミナルイオン溶液注入時間は 23 秒が最適であり、 NO_2^- 、 NO_3^- の RSD は、それぞれピーク面積 11, 5.4%, ピーク高さ 10, 7.6%, 泳動時間 0.83, 0.96% であり、LOD は $0.11 \mu\text{mol/l}$ 、 $0.14 \mu\text{mol/l}$ であった。次に、試料導入法として電気的注入法 (6 kV)、ターミナルイオン溶液導入法として真空吸引法を用いた。この場合、試料注入時間は 10 秒、ターミナルイオン溶液注入時間は 23 秒が最適であり、 NO_2^- 、 NO_3^- の RSD は、それぞれピーク面積 15, 9.3%, ピーク高さ 14, 9.6%, 泳動時間 0.26, 0.28% であり、LOD は $0.22 \mu\text{mol/l}$ 、 $0.32 \mu\text{mol/l}$ であった。これらの結果よりターミナルイオン導入法として電気的注入法、試料導入法として真空吸引法が感度及び精度の点で有利であることがわかった。現在、泳動液組成及び pH についてさらに検討中である。

References

- [1] T. Hayashi, K. Fukushi, *Abstracts of the 30th Capillary Electrophoresis Symposium*, p. 97 (2010).
- [2] K. Fukushi, Y. Nakayama, J. Tsujimoto: *J. Chromatogr. A*: **1005**, 197 (2003).

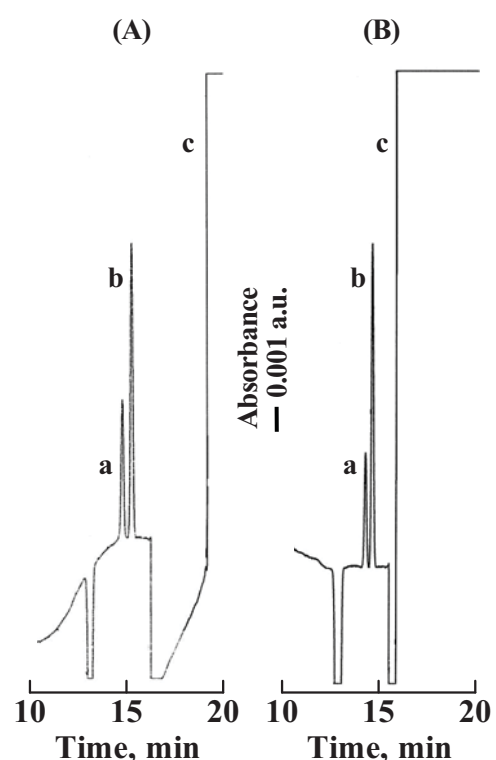


Fig. 1 Electropherograms of a mixture of 3 $\mu\text{mol/l}$ nitrite and 20 $\mu\text{mol/l}$ nitrate in artificial seawater. (A) With SO_4^{2-} . (B) Without SO_4^{2-} . Electrophoretic conditions: capillary, $L_{\text{tot.}}=72$ cm, $L_{\text{det.}}=50$ cm, 75 μm I.D. \times 375 μm O.D.; BGE, artificial seawater without SO_4^{2-} , voltage, 6 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 210 nm; Sample: artificial seawater containing 3 $\mu\text{mol/l}$ NO_2^- and 20 $\mu\text{mol/l}$ NO_3^- ; vacuum injection period, 5 s (105 nl). Terminating ion, 600 mmol/l acetate; voltage for electrokinetic injection, 10 kV; period, 155 s. Peaks: a, NO_2^- ; b, NO_3^- ; c, CH_3COO^- .

P-24 キャピラリーゾーン電気泳動法による野菜中の有機酸 及びアミノ酸の定量

○服部考成¹, 福土恵一¹, 早川 真², 湊 太郎³

¹神戸大院海事科学, ²日本アドバンストアグリ, ³青木マリーン

Determination of Organic and Amino Acids in Vegetables Using Capillary Zone Electrophoresis

Takanari HATTORI*¹, Keiichi FUKUSHI¹, Makoto HAYAKAWA², Taro MINATO³

¹Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

²Nihon Advanced Agri Co., Ltd

³Aoki Marine Co., Ltd

Abstract

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with direct UV detection for the determination of Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , organic and amino acids in vegetables. As the background electrolyte, a mixture of disodium hydrogenphosphate and hexadimethrine bromide (HDB) was used for the direct detection of the analytes. The limits of detection (LODs) were 0.066-4.2 mg/l at a signal-to-noise ratio of three. The values of the relative standard deviation (RSD, n=4, intra-day) of migration time and peak area were, respectively, 0.28-0.47% and 4.0-9.3%. The proposed method determined the above analytes in common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) for 12 min.

はじめに

近年、クラゲによる被害が漁業や発電所で発生している。クラゲは肥料として有用な成分を含むが、植物の生長を阻害するナトリウムも多く含む。最近、栽培時に塩化ナトリウム溶液を必要とするアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) という野菜が注目されている。そこで我々は、塩化ナトリウム溶液の代わりにクラゲ上澄み液を利用してアイスプラントを栽培した。本研究では、まず、CZEによる有機酸及びアミノ酸の定量条件について検討した。次いで、確立した方法によりアイスプラント中の有機酸及びアミノ酸を定量し、クラゲ上澄み液の有用性について検討した。

実験

泳動条件は以下の通りである。キャピラリー：内径 75 μm , 全長 112.35 cm, 有効長 100 cm ; 印加電圧 : 25 kV (試料注入側を陰極) ; 検出波長 : 190, 210, 270 nm (直接吸光法では 190, 210 nm (NO_2^- , NO_3^- 定量時のみ 210 nm), 間接吸光法では 270 nm) ; 試料注入 : 真空吸引法 (50 kPa, 1 s (70 nl に相当)) ; 標準溶液 : 50 mg/l Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , シュウ酸, クエン酸, リンゴ

酸, アスパラギン酸, グルタミン酸, 酢酸の混合溶液. 泳動液について感度, 緩衝能, 再現性の観点から以下の条件を検討した: 検出法 (リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) を用いた直接紫外吸光法, 2,6-ピリジンジカルボン酸 (PDC) を用いた間接紫外吸光法), 泳動液の pH, 電気浸透流を反転するための陽イオン界面活性剤 (0.6 mM 塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム (TTAC), 0.001% 臭化ヘキサジメトリン (HDB)). 次いで, 上記成分の検量線を作成し, アイスプラント抽出液を分析した. ピーク面積より各成分濃度を求め, 生重量 100 g 中の各成分含有量を求めた. アイスプラント中の各成分は, 生重量に対して 2 倍量の純水で抽出した. なお, Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , シュウ酸定量時は抽出液を 100 倍に希釈した.

結果と考察

検出法を検討したところ, 間接紫外吸光法¹よりも, 直接紫外吸光法の方が感度, 再現性ともに良かった. 泳動液の pH は, 分析対象成分が陰イオン化し, 緩衝能があり, ノイズが小さい 10.6 とした. 界面活性剤として, TTAC を用いた場合, 実サンプル分析時にグルタミン酸ピークの再現性が悪かったため, HDB を用いることとした. ピーク面積を用い, 分析対象成分の検量線を作成したところ, 直線性の良いものが得られた ($r=0.9978-0.9996$). また, 検出限界は 0.066-4.2 mg/l であった. 本法によりアイスプラント抽出液を分析したところ, 泳動時間及びピーク面積の相対標準偏差は 0.28-0.47%, 4.0-9.3% であった. なお, 酢酸は検出限界以下であった. Fig. 1 にアイスプラント抽出液のエレクトロフェログラムを示す. また, クラゲ上澄み液及び NaCl 溶液で栽培したアイスプラントを比較したところ, クラゲ上澄み液で栽培した方がクエン酸, リンゴ酸が少なく, アスパラギン酸, グルタミン酸が多い傾向が見られた. 今後, 本法により他の野菜についても分析する予定である.

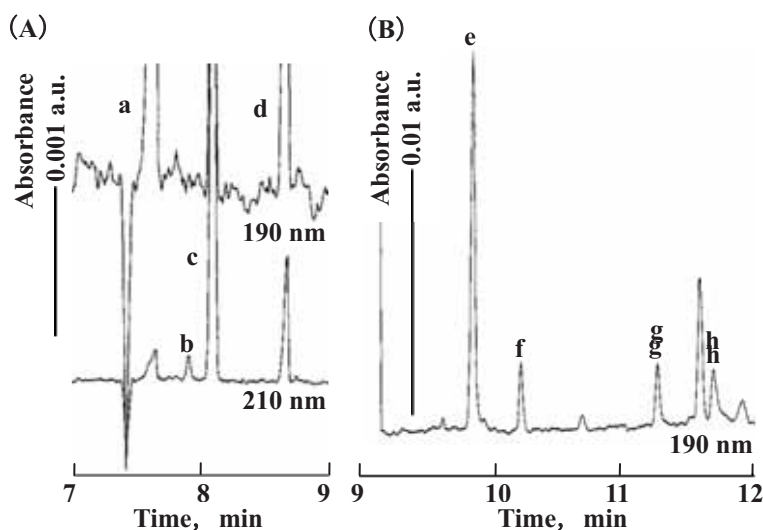


Fig. 1 Electropherograms of an extract from *Mesembryanthemum crystallinum* L. (A) 200 times diluted. (B) 2 times diluted. Electrophoretic conditions: capillary, $L_{\text{tot.}}=112.35$ cm, $L_{\text{det.}}=100$ cm, $75 \mu\text{m}$ I.D. $\times 375 \mu\text{m}$ O.D.; BGE, 20 mM Na_2HPO_4 containing 0.001% HDB adjusted to pH 10.6 with 1 M NaOH; voltage, 25 kV with the sample inlet side as the cathode; detection, 190 nm (a, d, e, f, g, h) and 210 nm (b, c); vacuum injection period of a sample, 1 s (70 nl). Peaks: a, Cl^- ; b, NO_2^- ; c, NO_3^- ; d, oxalic acid; e, citric acid; f, malic acid; g, aspartic acid; h, glutamic acid.

References

- [1] 堀江秀樹: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **58**, 1063 (2009).

P-25

キャピラリーゾーン電気泳動法によるクラゲ中のアンモニウムイオン及びアルカリ・アルカリ土類金属イオンの定量

○楊 康¹, 福士恵一¹

¹神戸大院海事科学

Determination of Ammonium Cations and Alkali and Alkaline Earth Metal Cations in Jellyfish by Capillary Zone Electrophoresis

Yang KANG¹ and Keiichi FUKUSHI¹

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

Abstract

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with contactless conductivity detection for determination of ammonium cations and alkali and alkaline earth metal cations in jellyfish. As the background electrolyte, a mixture of 25 mmol/l 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 25 mmol/l histidine (HIS), and 2 mmol/l 18-crown-6 was used for the complete separation of all analyte cations. Jellyfish (*A. aurita* and *N. nomurai*) were stored, respectively, in containers at room temperature after they were collected. The supernatant solutions (5 l) were concentrated *ca.* 5.8 times using a homemade concentrator. The proposed method successfully determined the above analyte cations in the supernatant solutions before and after concentration.

はじめに

我々はこれまで、クラゲを野菜の肥料として有効利用できないか検討してきた。一般に、クラゲ中の高濃度ナトリウムは植物の生長を抑制するが、最近注目されているアイスプラントはその生長過程で塩化ナトリウムを必要とする。これまでの研究で、クラゲは静置するだけで比較的短時間に液状化し、クラゲ中大部分の栄養塩類は、数十日で上澄み液中に移行することがわかっている。また、クラゲの約 96-97%は水分であり、主要成分濃度は海水とほぼ同様である。そこで、アイスプラント栽培にクラゲ上澄み液を利用できないかと考えた。一方、我々は、クラゲ上澄み液を利用する際、輸送コストを軽減するために、上澄み液の真空加熱濃縮処理を提案している。この際、濃縮操作により、有用成分の減少をできるだけ抑えたい。そこで、本研究では、まず、電気伝導度検出器を備えた CZE によるクラゲ中の NH_4^+ 及びアルカリ・アルカリ土類金属イオン定量法を確立することを目的とした。ついで、本法により、濃縮前後の上澄み液中のこれら成分を定量し、成分減少率を求めた。

実験

泳動条件は以下の通りである。キャピラリー：内径 50 μm ，全長 80 cm，有効長 59.75 cm；印加電圧：20 kV；検出器：非接触型電気伝導度検出器；試料注入時間（真空吸引法）：1 s；泳動液：2 mmol/l 18-クラウン-6 を添加した L-ヒスチジン(HIS)と 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES) 混合溶液。標準試料として、0.4 mg/l $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，0.8 mg/l K^+ ，0.2 mg/l Ca^{2+} ，20 mg/l Na^+ ，2 mg/l Mg^{2+} 混合溶液を調製し、HIS 及び MES 濃度を 10-50 mmol/l と変化させた。確立した方法によりまず、検量線を作成した。ついで、室温で保存したミズクラゲ及びエチ

ゼンクラゲの上澄み液を用い、真空加熱濃縮前後の溶液を適宜希釈し、本法によりこれら成分を定量した。なお、ミズクラゲは、2007年8月に関西電力大阪南港発電所のクラゲ採取装置より採取し、一方、エチゼンクラゲは2005年12月に鳥取県農林局より送ってもらい、室温で保存したものである。

結果及び考察

HIS及びMES濃度が10及び50 mmol/lの場合、 Ca^{2+} 、 Na^{2+} 、 Mg^{2+} の分離が不十分であった。25 mmol/lでは、すべての成分が分離でき、ノイズも小さかった。したがって、泳動液として、2 mmol/l 18-クラウン-6を添加した25 mmol/l HISと25 mmol/l MESの混合溶液を用いることとした。ピーク面積を用いた場合の検量線は、 NH_4^+ では $y=1.86 \times 10^3 x + 1.82 \times 10^2$ (y =ピーク面積, $x=0.20$ - 1.0 mg/l, $r=0.9889$), K^+ では $y=5.65 \times 10^2 x + 1.39 \times 10^2$ ($x=0.40$ - 2.0 mg/l, $r=0.9948$), Ca^{2+} では $y=9.30 \times 10^2 x + 13.1$ ($x=0.050$ - 0.25 mg/l, $r=0.9984$), Na^+ では $y=8.27 \times 10^2 x + 1.04 \times 10^3$ ($x=5.0$ - 25 mg/l, $r=0.9984$), Mg^{2+} では $y=1.52 \times 10^3 x + 1.88 \times 10^2$ ($x=1.0$ - 5.0 mg/l, $r=0.9987$)であり、直線性の良いものが得られた。ピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の相対標準偏差($n=8$)はそれぞれ、2.3-4.8%, 1.1-4.2%, 0.25-0.32%であった。検出限界($S/N=3$)は、0.028 mg/l (NH_4^+ -N), 0.22 mg/l (Na^+), 0.12 mg/l (K^+), 0.072 mg/l (Mg^{2+}), 0.040 mg/l (Ca^{2+})であった。本法により、濃縮前のミズクラゲ上澄み液を分析したところ、 NH_4^+ -N, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 濃度はそれぞれ、314, 10750, 323, 1390, 78 mg/lであった。また、濃縮後(濃縮率5.8倍)のミズクラゲ上澄み液を分析したところ、 NH_4^+ -N, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 濃度はそれぞれ、195, 52900, 1580, 5830, 0 mg/lであった。 NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} の減少率はそれぞれ、89, 16, 16, 28, 100%であった。一方、濃縮前のエチゼンクラゲ上澄み液濃度はそれぞれ、320, 9950, 369, 1160, 0 mg/lであり、濃縮後のエチゼンクラゲ上澄み液濃度はそれぞれ、352, 49300, 1340, 5640, 0 mg/lであった。 NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} の減少率はそれぞれ、81, 15, 36, 17, 100%であった。現在、 NH_4^+ 及び Ca^{2+} の減少率を抑える濃縮法について検討中である。今後、海水や食塩中のアルカリ・アルカリ土類金属イオンや主要陰イオンの定量を行い、CZEの検出器としての電気伝導度検出器の応用可能性について検討していきたい。

References

- [1] 楊 康, 福士恵一: 日本分析化学会第60年会講演要旨集, p. 410 (2011).

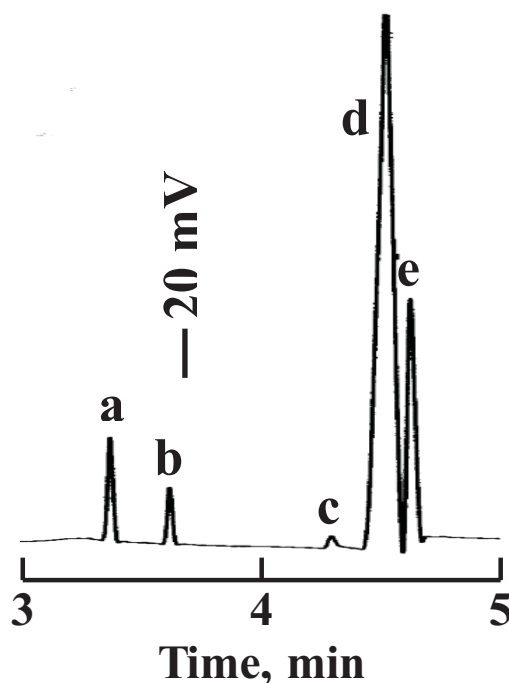


Fig. 1 Electrophoretic conditions: capillary, $L_{\text{tot.}}=80$ cm, $L_{\text{det.}}=59.75$ cm, $50 \mu\text{m}$ I.D. \times $375 \mu\text{m}$ O.D.; BGE, 25 mmol/l 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 25 mmol/l L-histidine (HIS) and 2 mmol/l 18-crown-6; voltage, 20 kV with the sample inlet side as the cathode. Sample, the supernatant solution of *A. aurita* before concentration (500 times diluted); vacuum injection period, 1 s (ca.11 nl). Identification of peaks: a, NH_4^+ ; b, K^+ ; c, Ca^{2+} ; d, Na^+ ; e, Mg^{2+} .

P-26 ビタミン C 感受性および非感受性がん細胞株における比較メタボローム解析

○上瀧 萌

慶應義塾大学環境情報学部

Comparative Metabolome Analysis of Vitamin C-sensitive and -insensitive Cancer Cells

Megumi UETAKI*

Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Abstract

The intravenous administration of high-dose vitamin C (ascorbic acid) is getting attention in cancer therapy. Recent studies suggested that high-dose vitamin C exerts the pro-oxidant effect, rather than the anti-oxidant, and selectively kills the cancer cells. However, the mechanism of the cytotoxic effect in cancer cells has not been clarified yet. To increase the information on this matter, we here analyzed the metabolomic changes after vitamin C treatment in vitamin C-sensitive cells (MCF7) and -insensitive cells (HT29) by CE-TOFMS. As a result, the metabolomic changes were similarly observed in both cell lines by vitamin C treatment at the toxic doses, while the toxic doses for the cell lines were different, suggesting that vitamin C toxicity links to the metabolomic changes. In detail, both the decrease in nucleotide triphosphates and the increase in nucleotide mono-phosphates levels were seen by the treatment of vitamin C at toxic doses, indicating that vitamin C reduced the energy production. It was also observed that the increase in several metabolites in glycolysis and TCA cycle seemed to accompany with the decrease in NAD(H). These data suggests that high-dose vitamin C causes the deficiency in energy metabolism in cancer cells.

背景

高濃度ビタミン C 点滴療法は副作用の少ないがんの代替療法として近年注目されている。一般にビタミン C は抗酸化物質としてよく知られるが、近年の研究結果では高濃度ビタミン C はむしろ酸化促進的に働くことにより、がん細胞に選択的に作用することが示唆されている¹。しかし、その作用機序の詳細は不明である。今回我々は、がん細胞における高濃度ビタミン C の作用機序についてメタボロミクスの観点から解明することを目的とし、ビタミン C に対し高感受性を示した MCF7 (ヒト乳がん細胞株) および低感受性を示した HT29 (ヒト結腸がん細胞株) を用い、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置 (CE-TOFMS) によるメタボローム解析を行った。

実験

細胞を播種し、24 時間後に濃度を振ってビタミン C(0-10mM)を添加した。添加後 1 時間で培地交換を行い、ビタミン C を除去した。その後 48 時間まで経時的に細胞数を調べることにより、MCF7 及び HT29 細胞におけるビタミン C の毒性濃度、および毒性を発揮する時間帯を決定した。またメタボローム測定は、ビタミン C の毒性濃度、及び非毒性濃度について、毒性を発揮し始める 12 時間までのタイムポイントにてサンプルを採取した。前処理を施し、CE-TOFMS によりメタボローム解析を行った。

結果と考察

生存細胞数を調べた結果、MCF7 細胞ではビタミン C 1 mM より、HT29 細胞では 10 mM より細胞毒性が生じ、MCF7 細胞がビタミン C 高感受性、HT29 細胞が低感受性であることがわかった。メタボローム測定をしたところ、いずれの細胞も非毒性濃度のビタミン C では大きな代謝変化は見られず、一方で毒性濃度域では両細胞で類似の代謝変化が見られた。このことから、ビタミン C は両細胞について毒性を発揮する濃度域で代謝変化を誘導することが示唆された。また、代謝変化の内容を見ると、ATP などのヌクレオチド 3 リン酸が顕著に低下すると共に AMP などのヌクレオチド 1 リン酸が増加し、ビタミン C によりエネルギー生成が低下していることが示唆された。また、NAD、NADH 濃度の減少に伴い、解糖系上流および TCA 回路上流の代謝物質の増加が見られたことから、NAD(H)の分解によってエネルギー代謝全体が停滞していることが推測された。さらに、高濃度ビタミン C は酸化作用を示すことが知られるが、抗酸化作用を有する NADPH の細胞内濃度が、ビタミン C 高感受性の MCF7 細胞に比して低感受性の HT29 細胞において高濃度であり、酸化ストレス耐性とビタミン C 耐性との関連性も示唆された。以上の結果より、ビタミン C による細胞毒性がエネルギー代謝に顕著な影響を与えることで引き起こされることが推測された。

References

[1] Chen, Q., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102, 13604-13609, 2005.

P-27 タンパク質-チアカリックスアレーン金属錯体のコンジュゲーションと CE を用いる相互作用解析

○馬場 諒¹, 田中鉄兵¹, 壹岐伸彦¹, 高橋 透², 星野 仁¹

¹東北大院環境, ²福井大院工

Bioconjugation of thiacalixarene-metal complex with proteins and the interaction analyzed with CE

Ryo BABA*¹, Teppei TANAKA¹, Nobuhiko IKI¹, Toru TAKAHASHI², and Hitoshi HOSHINO¹

¹Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

²Graduate School of Engineering, University of Fukui

Abstract

The noncovalent bioconjugation of thiacalix[4]arene-*p*-tetrasulfonate (TCAS) and TCAS-Tb^{III} complex with bovine serum albumin (BSA) has been investigated by capillary electrophoresis. The results suggested that BSA and TCAS formed kinetically and thermodynamically stable complex with a 1:1 stoichiometry. In the case of TCAS-Tb^{III} complex, it gave two peaks in the electropherogram assignable to TCAS₁Tb₁ and TCAS₂Tb₃. Upon mixing the Tb^{III} complexes and BSA, the TCAS₁Tb₁ peak disappeared and TCAS₂Tb₃ decreased. At the same time, a new peak assignable to BSA-TCAS-Tb^{III} conjugate appeared, which showed only slight decrease upon extending the electromigration time from 5 to 50 min. This also suggested the conjugate was kinetically stable. To determine stoichiometry and evaluate kinetic and thermodynamic stability of the conjugate, the optimal condition to obtain only TCAS₂Tb₃ is now being investigated.

緒言

モル吸光係数の高い光アンテナ配位子とランタニドイオン(Ln^{III})を錯形成させると、配位子から Ln^{III}へのエネルギー移動によって錯体は f-f 遷移に基づく強い発光を示す。このエネルギー移動発光を示す錯体は、 μs ~ ms の発光長寿命性、大きなストークスシフトおよびシャープな発光ピークという特長から高感度な発光プローブとして注目されている。最近、我々はチアカリックスアレーン-*p*-テトラスルホン酸-テルビウム(III)錯体(TCAS-Tb^{III})がエネルギー移動発光に基づく 0.73 ms の長寿命発光を示すことを明らかにし、発光プローブとしての有用性を見出した¹⁾。それゆえ、TCAS-Tb^{III}は高 S/N 比の検出が可能な時間分解測光イムノアッセイへの応用価値が高い。イムノアッセイは、抗体の特異的認識能を利用し、抗体や架橋剤のアビジンに標識したプローブにより測定する方法である。しかし一般的に、その標識化はもっぱら有機合成反応による共有結合形式であるため、煩雑な操作と時間を要する。それに対し、我々は TCAS のスルホ基と抗体やアビジンの正に帯電したアミノ酸残基の静電相互作用による非共有結合的な標識を着想した。本研究では、その基礎検討として塩基性タンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA)と TCAS、次いで BSA と TCAS-Tb^{III}のコンジュゲーションを試み、コンジュゲートの速度論的安定性と熱力学的安定性を評価するため、CE による相互作用解析を検討した。

実験

BSA-TCAS 試料の CE: 文献記載の方法²⁾に従って合成した TCAS の水溶液を BSA と混合して BSA-TCAS 試料を調製した. 全長 37.5 cm, 有効長 25 cm, 内径 50 μm の熔融シリカキャピラリーを用い, 泳動緩衝液は, 20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を使用した. 落差法(25 mm, 60 s)により注入し, 印加電圧 5~20 kV として陰極側で検出波長 300 nm で吸光検出した. **BSA-TCAS-Tb^{III} 試料の CE**: TCAS 水溶液, Tb^{III} 水溶液および CHES 緩衝液(pH 9.5)を混合して 45°C で 1 日静置後, BSA と混合して BSA-TCAS-Tb^{III} 試料を調製した. 全長 90 cm, 有効長 45 cm, 内径 50 μm の熔融シリカキャピラリーを用い, 泳動緩衝液は 20 mM HEPES(pH 7.4)を使用した. 印加電圧 5~20 kV として陰極側で励起波長 318 nm, 検出波長 544 nm で蛍光検出した.

【結果と考察】 BSA-TCAS 試料の CE 分離により, BSA-TCAS 複合体の形成が確認された. BSA 濃度に対して TCAS 濃度 1 倍以下では遊離の TCAS ピークが見られなかったことから, 熱力学的に安定な BSA₁TCAS₁ が形成されたと考える(Fig. 1a). また, TCAS 濃度を 1 倍以上にしても BSA-TCAS 複合体のピーク強度の増大は見られず, 遊離 TCAS ピークが増大しただけであった(Fig.1b). したがって, 複合体のピークは BSA₁TCAS₁ に由来し, BSA₁TCAS₂ が形成されたとしても解離活性であるため検出されなかったと推察する. 印加電圧を減じて BSA₁TCAS₁ を 20 min 泳動させてもその解離を確認することができなかつたため, これは速度論的に安定であることが示唆された. 次に, TCAS-Tb^{III} 試料と BSA-TCAS-Tb^{III} 試料の CE 分離を行った. ピーク 1 と 2 は, それぞれ組成の異なる錯体 TCAS₂Tb₃, TCAS₁Tb₁ である(Fig. 2a). BSA-TCAS-Tb^{III} 試料では, 1, 2 がそれぞれ減少, 消滅し, 5 min に新たなピーク 3 が現れたことから, 3 を BSA-TCAS-Tb^{III} 複合体と帰属した(Fig. 2b). TCAS₁Tb₁ は全て BSA に結合したので Tb₃TCAS₂ に比べ熱力学的に安定な BSA-TCAS-Tb^{III} 複合体を形成したと言える. BSA-TCAS-Tb^{III} 複合体は, 50 min 泳動後もほぼ解離することなく検出され, 速度論的安定性が示唆された. 今後, 解離反応速度定数を算出する手法である電気泳動反応器を用いて詳しく速度論的安定性を調査する. 以上より, BSA と TCAS-Tb^{III} の非共有結合的なコンジュゲーションに成功した. しかし, TCAS-Tb^{III} 試料には TCAS₂Tb₃, TCAS₁Tb₁ および TCAS が含まれており, 3 種とも BSA と結合するため, コンジュゲートの量論比の決定は困難である. 現在, TCAS₂Tb₃ のみを形成させる条件を調査しており, 試料を最適化した後, 量論比の決定と熱力学的および速度論的解析を行う予定である.

References

- [1] N. Iki, M. Ohta, T. Horiuchi, H. Hoshino, *Chem. Asian J.*, **3**, 849(2008).
- [2] N. Iki, T. Fujimoto, S. Miyano, *Chem. Lett.*, **27**, 625(1998).

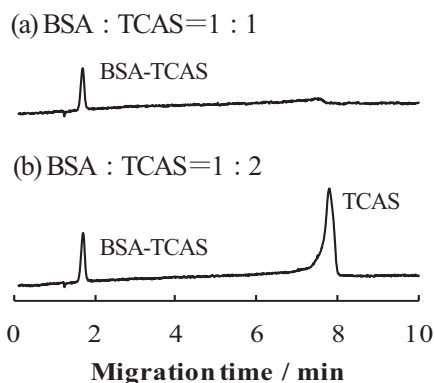


Fig. 1 BSA-TCAS 試料の電気泳動図. [BSA] = 2.0×10^{-4} M, [TCAS] = (a) 2.0×10^{-4} M, (b) 4.0×10^{-4} M.

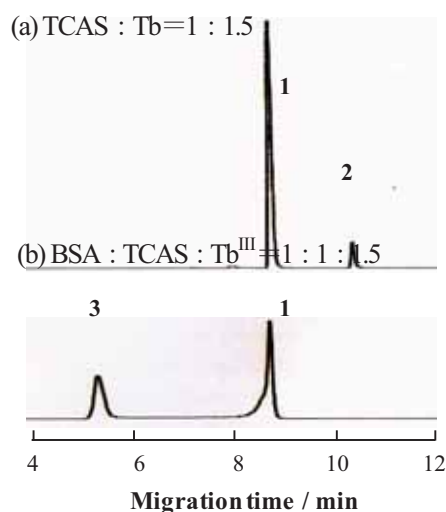


Fig. 2 TCAS-Tb^{III} 試料および BSA-TCAS-Tb^{III} 試料の電気泳動図. [BSA] = [TCAS] = 2.0×10^{-5} M, [Tb^{III}] = 3.0×10^{-5} M.

High-Sensitive Analysis of DNA fragments by CGE using a Low Viscosity BGE based on Electrokinetic Supercharging and Optimized Sample Injection

Xiaoxue YE, Junji INOUE, Zhongqi XU, Takeshi HIROKAWA

Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

Abstract

We developed a novel, simple and highly sensitive method for DNA analysis by capillary gel electrophoresis (CGE) using a low viscosity BGE based on electrokinetic supercharging (EKS [1]) and optimized sample injection of Agilent HP-3D CE workstation equipped with a modified sampling compartment. The standard DNA sample of ϕ X174/HaeIII digest was used to evaluate the qualitative and quantitative abilities of the proposed strategy. A highly diluted DNA sample was detected; the LOD was down to 0.04 ng/ml for the 72 bp fragment, apparently improved more than 1000-fold in comparison with a conventional UV detection method.

Introduction

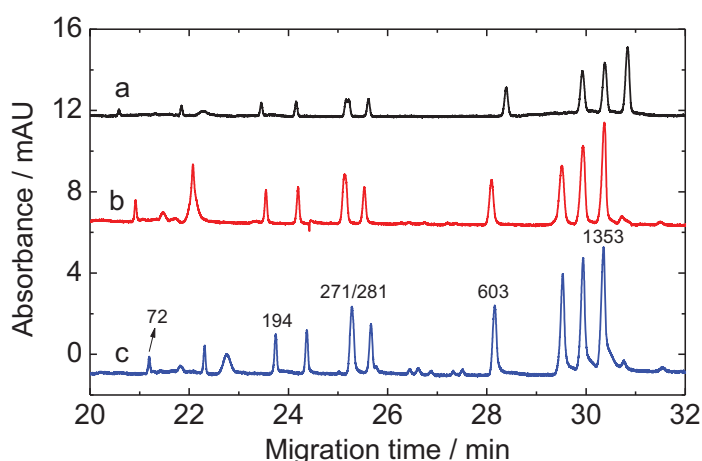
The rapid development of DNA by CGE has increased the demand of high concentration sensitivity. To address this issue, on-line preconcentration strategies such as EKS has been proposed in DNA analysis using conventional UV detectors. High detection sensitivity was achieved by EKS based on the concept that a long electrokinetic injection to introduce the great amount of analyte followed by a transient ITP (tITP) stacking step to refocus the injected analytes into a narrow zone. Additionally, the use of a low-viscosity sieving buffer is essential to ensure ITP preconcentration process where the mobility of the leading co-ion (borate polyanion) should be higher than those of sample ions. In our previous work, it was shown that analytes occurring in an effective field can only be introduced into the capillary, so more analytes are accumulated during electrokinetic injection stage by optimizing sample introduction configuration as demonstrated for CAPI-3300 CE system (Otsuka)[2]. We present here a simple modification to sample injection setting of Agilent HP-3D CE system, which is different from that of CAPI-3300 to offer a lower LOD in DNA analysis.

Experimental

All experiments were carried out on the Agilent HP-3D CE system, which was equipped with a photodiode array detector and fused-silica capillary of 50 cm (41.5 cm effective length) \times 75 μ m ID. The BGE contained 2% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, the average molecular weight is \sim 10,000 and the viscosity of 2% aqueous solution is 5 cP), 6% mannitol, 0.1M Tris-0.1M boric acid and 2mM EDTA. The applied voltage was -10kV for the EKS of sample and CGE separation. The DNA sample was ϕ X174/HaeIII digest purchased from Takara BIO Inc. (Shiga, Japan).

Results and Discussion

In EKS, the mobility of co-ion in the separation buffer should be larger than those of the DNA fragments to give ITP preconcentration. The sieving buffer reported [3] is suitable for this study. The sensitivity was strongly improved by this on-line preconcentration strategy. However, in order to achieve a further improvement in sensitivity, a modification on sample introduction configuration has been done. The distance between the electrode tip and capillary-end could be extended from 4.0 mm to 15.0 mm. And a ring platinum electrode was positioned around the capillary, which replaced the original sheath electrode covering the separation capillary. This modification was effective to maintain the effective electric field strength over a larger space [4]. Meanwhile, the volume of the sample was increased from 100 μ L to 250 μ L to ensure the shorter electrode dip in the sample. With this alteration, more DNA fragments were accumulated within the effective electric field and then maintained as focused zones due to transient isotachopheresis. Electrophoregrams in Fig.1 demonstrated a larger



effective electric field caused by the short electrode and Pt-ring electrode result in the improvement in the peak areas and heights of DNA fragments. 3-fold reduction in LOD was obtained by using Pt-ring electrode and LOD was 6-fold reduced as 0.04 ng/ml for the 72 bp fragment. However, the LOD obtained was not very

satisfactory compared with our previous results obtained by using CAPI-3300. Now we are exploring the cause on the assumption that the sample might be contaminated by the BGE and consequently the transport number of the DNA fragment decreased.

References

- [1] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gas, *Electrophoresis* 24: 498-504, 2003.
- [2] Z. Xu, K. Nakamura, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Anal. Chem.* 83: 398-401, 2011.
- [3] F. Han, B. H. Huynh, Y. Ma, B. Lin, *Anal. Chem.* 71: 2385-2389, 1999.
- [4] Z. Xu, K. Kawahito, X. Ye, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Electrophoresis* 32: 1195-1200, 2011.

P-29 GSH 合成阻害によるがんの代謝変動の解析

○北川光洋、曾我朋義

慶應義塾大学先端生命科学研究所

Metabolomic effect of GSH depletion in cancer cells

Mitsuhiro KITAGAWA*, Tomoyoshi SOGA

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Abstract

The reduced glutathione (GSH) is highly contained in cancer cells, playing important role to scavenge reactive oxygen species (ROS) and also to control the redox balance. Though, the importance of GSH role to the large metabolisms in cancer cells was not realized very well. To investigate on this issue, here we analyzed the cancer metabolomic changes after GSH depletion caused by the inhibitor against GSH synthesis. All 5 cancer cell lines used in this study showed a marked decrease in cellular GSH levels by the inhibitor, while its toxicity varies among the cell lines. The most severe depletion was seen in human squamous epithelium carcinoma A431 cell line, in which GSH levels became almost 0 % 24h after the inhibitor treatment. In this condition, both the increase in NADP and the decrease in NAD(P)H levels were observed, indicating that the redox balance was collapsing. Accompanying with this, the levels of some metabolites in glycolysis, TCA cycle, pentose phosphate pathway and nucleotide synthesis were changed, suggesting that the whole metabolism was affected by GSH depletion. The elevation in Acetyl CoA amount was commonly observed in all 5 cell lines, in several of which no remarkable changes in other metabolites amount except Acetyl CoA and GSH were observed. Since Acetyl CoA links not only to the pyruvate entry into TCA cycle but also to the fatty acid synthesis and the beta oxidation, it was suggested that fatty acid metabolisms were remarkably affected. Taken together, it was suggested that GSH depletion causes the whole metabolomic changes in cancer cells.

はじめに

近年メタボローム測定技術の進歩から、がん代謝の詳細な分析が可能となり、がんは顕著に異なる代謝を有することがわかってきた。しかし、がんが代謝を維持する仕組みの詳細は不明である。抗酸化作用を有する還元型グルタチオン (GSH) はがんに多く含まれており、活性酸素種 ROS による傷害から防御する分子としてよく知られる。しかし、GSH が代謝全体に与える影響はよくわかっていない。今回演者らは GSH 合成の阻害剤を用い、細胞内 GSH 量の減少が代謝全体にどのような影響が及ぶのかメタボローム解析を行った。

実験

ヒト扁平上皮癌 A431、非小細胞肺癌 A549、腎癌 ACHN、腎淡明癌 KMRC-1 及び胃癌 MKN7 の5つのがん細胞株を用いた。GSH 合成阻害剤として Buthionine-sulfoximine (BSO) を用い、添加後 48 時間後の生存細胞数を MTT 法にて評価することにより、5つの細胞株の BSO 感受性を調べた。次に BSO 添加後 12、24 時間後にサンプリングし、がん細胞のメタボローム解析を行った。サンプルは前処理を施し、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) にてカチオン種、アニオン種の代謝物 113 成分について測定・定量分析した。

結果と考察

BSO 添加後 48 時間後の生存細胞数を評価したところ、5細胞のうち A431、KMRC-1、MKN7 細胞が BSO に感受性を示したのに対し、A549、ACHN 細胞は BSO 1mM の濃度域まで不感であった。メタボローム測定をしたところ、BSO 感受性のがん細胞では GSH/total glutathione 比が顕著に減少していたが、細胞内 GSH 量そのものはいずれのがん細胞でも顕著に減少していた。このことから、GSH/total glutathione 比は細胞死と関連があるものの、GSH 量の減少はただちに細胞死に直結しないことが示唆された。GSH は細胞内にて発生する ROS を除去することにより細胞生存に寄与するため、ROS 産生能の高い細胞が BSO により細胞死を招くことが推測された。一方で、他の代謝物量の変動傾向を見てみると、BSO により NAD(P)H の減少及び NAD(P)の増加傾向が見られ、細胞内の酸化還元状態が崩れつつある事が推測された。またわずかながら解糖代謝、TCA サイクル及びヌクレオチド合成の代謝物質に変化が見られ、細胞内 GSH 量の減少が代謝全体に影響しうると示唆された。最も顕著な変化は Acetyl-CoA 量の増加であった。Acetyl-CoA はピルビン酸の TCA サイクルへの流入を媒介するだけでなく、脂肪酸合成及びβ酸化にも関わる。これより、GSH 量の減少は脂肪酸代謝にも影響することが推測され、現在脂質分析のための基礎検討を行っている。以上より、がんにおいて細胞内 GSH 量の減少は細胞内の酸化還元状態を変化させ、また代謝全体に影響することが示唆された。

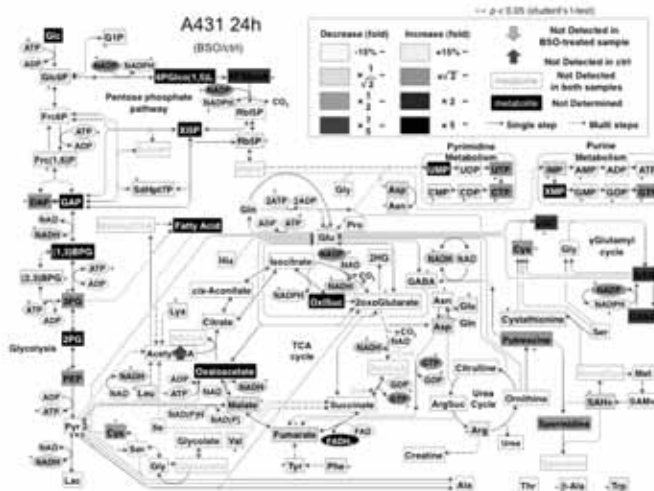


Fig ヒト扁平上皮癌 A431 細胞にて BSO 1mM 添加して 24 時間後の代謝物の変化

P-30 食餌性 Val による食肉呈味分量の制御及びその機構の 解明

○山田茉由子¹, 渡辺徹¹, 石川玄², 久保田真敏³, 門脇基二^{1,3}, 藤村忍^{1,3}
¹新潟大院自然研, ²ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ,
³新潟大超域

Regulation of taste active components in meat by dietary Val and clarification of its mechanism

Mayuko YAMADA*¹, Toru WATANABE¹, Gen ISHIKAWA², Masatoshi KUBOTA³, Motoni
KADOWAKI^{1,3}, Shinobu FUJIMURA^{1,3}

¹Graduate school of Sci. and Tech. Niigata Univ.

²Human Metabolome Technologies

³Center for Transdisciplinary Research Niigata Univ.

Abstract

Regulation of taste is one of the effective methods to improve meat quality. The main taste active component in meat is glutamate (Glu). Our studies have been demonstrated that free Glu could be increased by short term feeding of high protein diet and some dietary amino acids on broiler chickens (Imanari *et al.*, 2007 and 2008, Kobayashi *et al.*, 2011). And also, it has been shown that dietary valine (Val) in the either feed or drinking water has the ability to regulate free Glu in meat. However, mechanism of increased free Glu in meat was not cleared. If the mechanism was clarified, it is possible to regulate free Glu more effectively than before. This study was aimed to clarify the regulation mechanism of free Glu by dietary Val using metabolome analysis. From this study, it was shown that regulation mechanism of Glu could be related with BCAA catabolism pathway and other regulation factors, but not TCA cycle.

はじめに

食肉の高品質化の手法の一つとして、呈味の調節は有効である。また、食肉中の主要な呈味成分はグルタミン酸(Glu)である¹。当研究室のこれまでの検討から、ブロイラーを用いた高タンパク質飼料および食餌性アミノ酸の短期給与により筋肉遊離 Glu 量調節の可能性を得た^{2,4}。また、食餌性バリン(Val)は、飼料あるいは飲水への添加によって筋肉遊離 Glu 量調節効果を持つことが示された^{5,6}。しかし、その増加メカニズムについては未解明な点が多く、代謝機構を解明することができれば、より効率的な制御が可能であると考えられる。そこで本研究では、食餌性 Val による筋肉遊離 Glu 増加機構を解明することを目的とし、メタボローム解析を用いた代謝変動の網羅的解析を行った。

実験

14日齢 Chunky 系雌ブロイラーを供試動物とした。試験区は、Val 無添加の水を摂取させる

コントロール区 (Control) と、0.6%Val 溶液を摂取させる Val 水区 (Val sol) の 2 試験区を設定した。なお、各区には NRC 要求量に準じた共通の試験飼料を給餌した。供試動物は平均体重が等しくなるよう、各区に 6 羽を割り当て、試験飼料を、水および Val 添加水とともに自由摂取させた。試験期間は 3 日間とし、そこから採取した浅胸筋サンプルを用いた。試料は採取後、速やかに液体窒素で凍結し、解析まで -80°C で保管した。

分析項目は飼育成績、筋肉遊離アミノ酸測定(JLC500V, 日本電子)、およびメタボローム解析(CE-TOFMS system, Agilent)である。また、メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー社 (鶴岡) にて行った。

結果および考察

筋肉遊離 Val 量について Control と Val sol を比較した結果、メタボローム解析と全自動アミノ酸分析機ではほぼ同じ増加率で増加した($P < 0.01$)。Glu についても有意な増加が見られ、これについても 2 種の解析方法で同様の増加効果を捉えることができた。また Leu、Ile については、試験区間で変化は見られなかった。

この代謝に関して、これまで TCA 回路に関与する α -KG が GDH 活性を介して Glu 量を調節する可能性が考えられてきた。しかし、メタボローム解析により Val 水給与による TCA 回路への影響が見られなかったため、Glu 増加における α -KG の関与は少ないことが推察された。一方、新たに分枝アミノ酸(BCAA)異化経路で生成する中間代謝産物(KIV)の増加が観察されたことから、BCAA 異化経路が、筋肉遊離 Glu 量増加の主な要因の 1 つであることが推察された(Fig.1)。また、Val 異化の下流に位置する 3-Aminoisobutylic acid を生成する反応も Glu 量調節に関与している可能性が示された。さらに、Val 給与による代謝への影響として、Glutathione 代謝の亢進、糖代謝関連物質減少作用が示唆された。これらのことから、食餌性 Val による Glu 量の調節は、Val 異化周辺だけが関与するのではなく、他の物質代謝の変化も伴って生じるものであることが推察された。

本検討においてメタボローム解析の有効性と重要性が示された。ただし、従来のアミノ酸代謝研究の主体であった評価法と今回の解析において、一部で定量値の相違がみられたことから、より詳細な代謝機構の解明には検討も必要かもしれない。

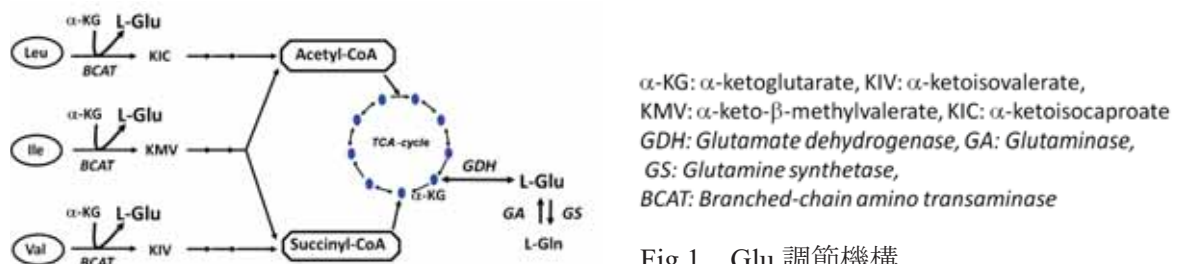


Fig.1 Glu 調節機構

References

- [1]Fujimura, S. *et al.*, *Anim. Sci. Tech.* 66: 43-51, 1995.
- [2] Imanari, M. *et al.*, *British Poult. Sci.* 48 (2): 167-176, 2007.
- [3] Imanari, M.*et al.*, *British Poult. Sci.* 49 (3): 299-307, 2008.
- [4] Kobayashi, H.*et al.*, *Anim. Sci. J.* 82 (1): 86-92, 2011.
- [5] 藤村ら、特許出願 2008-77737 号、2008.
- [6] 渡辺、山田ら、日本畜産学会第 114 回大会要旨、2011.

P-31

がん細胞と正常細胞の酸化ストレスに対する代謝応答

○飯野慧子^{1,2}, 紙健次郎^{1,2}, 五十嵐沙織¹, 菅原尚子^{1,2}, 曾我朋義^{1,2,3},
富田 勝^{1,2,3}

¹慶大・先端生命研, ²同・政策メディア・先端生命科学プログラム, ³同・環境情報

Metabolomic responses of cancer and normal cells under H₂O₂-induced oxidative stress

Keiko IINO^{1,2,*}, Kenjiro KAMI^{1,2}, Mitsuhiro KITAGAWA¹, Saori IGARASHI¹, Shoko SUGAWARA¹,
Tomoyoshi SOGA^{1,2,3}, and Masaru TOMITA^{1,2,3}

¹ *Institute for Advanced Biosciences, Keio University*

² *Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University*

³ *Department of Environment and Information Studies, Keio University*

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) avidly react with biomolecules and perturb various cellular systems. Chronically exposed to high levels of ROS, cancer cells often adapt to the stress environment by effectively eliminating ROS. However, the adaptive mechanisms of cancer cells to oxidative stress are incompletely understood despite intensive investigations on their ROS-responsive genes and antioxidant enzymes. In contrast, few studies approached from a viewpoint of metabolomics with a notion that cancer-specific metabolism may have crucial roles in their defense mechanisms against ROS. Here, we conducted metabolome analyses of hydrogen peroxide (H₂O₂)-stimulated pancreatic normal (PE) cells and cancer (Panc-1) cells using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS). As a result, basal levels of redox potentials ([GSH]/[GSSG] and [NADPH]/[NADP]) were found to be significantly higher in Panc-1 cells than in PE cells and the trend was retained under H₂O₂ stress. By quantifying ¹³C-labeled isotopomers, we also identified that Panc-1 cells activated the pentose phosphate pathway (PPP) presumably for replenishing NADPH in response to H₂O₂-induced oxidative stress. These results imply that cancer cells alter their metabolomic compositions more smoothly and effectively than normal cells in order to alleviate oxidative stress and provide a guideline for the development of cancer therapeutics with improved selectivity and efficacy.

はじめに

がん細胞は好気条件下でも嫌気呼吸をしていることが知られている。近年、がん細胞の嫌気呼吸は、酸化ストレスによる細胞傷害を防ぐ働きがあることが示唆された¹。がん細胞特有の代謝機構の制御と酸化ストレスの発生を組み合わせれば、選択的にがん細胞を除去できる可能性がある。一方で、酸化ストレスの発生に対してがん細胞内の代謝物がどのように変化するか詳細は分かっていない。本研究では、酸化ストレスを負荷したがん細胞と正常細胞の

細胞内代謝物を、キャピラリー電気泳動飛行型質量分析装置（CE-TOFMS）を用いて網羅的に測定し、高酸化ストレス条件下における細胞の代謝変動を調べた。

実験

膵臓がん細胞（Panc-1）と膵臓正常細胞（PE）に対し、過酸化水素（ H_2O_2 ）を負荷し、12時間まで継時的にメタボロームデータを取得した。また、培地中のグルコースを $1-^{13}C$ グルコースにすることで細胞外から取込んだ糖の代謝の流れを調べた。

結果と考察

メタボローム解析の結果、 H_2O_2 負荷後には、中心糖代謝に関わる代謝物質がいち早く変動していることが分かった（Fig. 1）。これらの変動はPEとPanc-1両細胞において観察された。一方で、Panc-1はPEに対し H_2O_2 への高い抵抗性を示した。PEとPanc-1の代謝の違いを探索するため、数十分の短時間内で代謝変化を比較したところ、Panc-1ではペントースリン酸経路（PPP）への糖の流入がPEに比べ早いことが観察された。また、 ^{13}C でラベルされた代謝物の解析の結果、PPPの入り口にあたる6-PhosphogluconateがPanc-1で顕著に上昇していた。これらの結果より、Panc-1では H_2O_2 負荷に対しPPPへの糖源の供給がPEに比べ速やかに行われているのではないかと考えられる。PPPは、酸化型グルタチオン（GSSG）を酸化ストレス除去作用のある酸化型グルタチオン（GSH）に戻す働きを担っている。細胞内GSH/GSSGはPanc-1で高く、酸化ストレス負荷後も比較的安定していた。PPPの促進による速やかなRedox調節がPanc-1の酸化ストレス抵抗性を支えている可能性が考えられる。

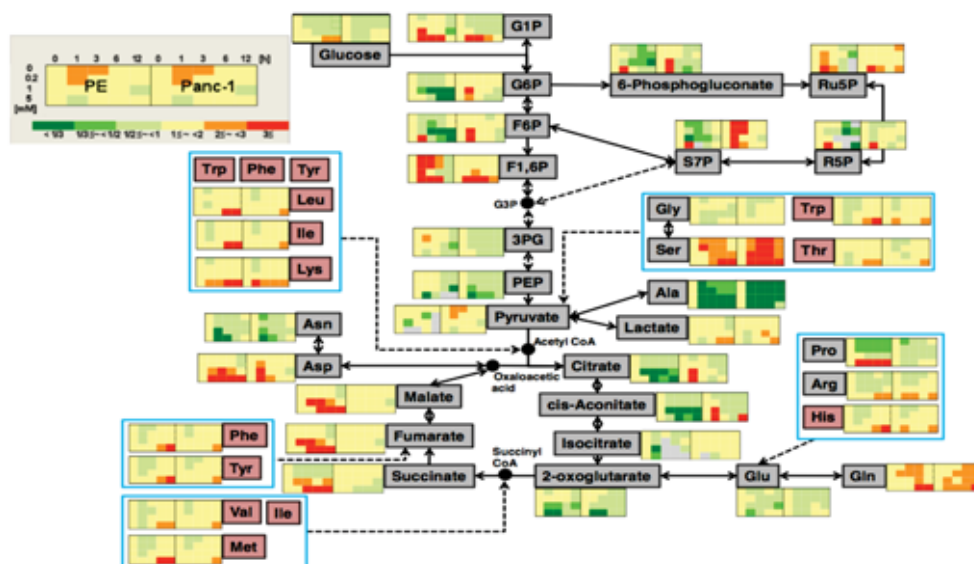


Fig. 1 Panc-1 における中心代謝経路上の物質とアミノ酸の物質質量変化。各条件下の代謝物量を、添加直前（ $T=0$ ）を1とした場合の割合比で塗り分けた。

References

[1] Kondo, H. *et al.*, *Histol Histopathol.*, 22: 85-90, 2007.

P-32

メタボローム解析を用いたリジン代謝の組織特異性の研究：食肉の高品質化に向けた研究

○渡邊源哉¹、塩野智洋¹、伊藤友紀¹、柴田昌宏²、久保田真敏³、
門脇基二^{1,3}、藤村 忍^{1,3}

¹新潟大院自然研、²近中四農研、³新潟大超域

Study of tissue specific lysine metabolism by metabolome analysis

G. WATANABE¹, T. SHIONO¹, Y. ITO¹, M. SHIBATA², M. KUBOTA³, M. KADOWAKI^{1,3}, S. FUJIMURA^{1,3}

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata Univ.

²Ohda branch, WeNARC

³Center for Transdisciplinary Research, Niigata Univ.

Abstract

Regulation of meat taste is one effective method for improvement of meat quality. Free glutamate (Glu) content, the main taste-active component of meat, was significantly increased by dietary lysine (Lys). In this study, we researched effects of dietary Lys on free Lys and Glu content of breast muscle, liver, kidney, and small intestine. Compared with the control group, free Lys was increased all tissues. In contrast, increased Glu content was found only in breast muscle. Then we measured LKR and GA mRNA expression. As a result, LKR and GA mRNA expression were both increased by dietary Lys. In metabolome analysis, saccharopine and pipercolic acid were increased in muscle. Our results suggested that muscle has specific Lys metabolism.

はじめに

従来、食肉の高品質化は、主に育種（遺伝子）及び食肉加工技術によりおこなわれてきた。その一方で、飼料栄養を用いた食肉の高品質化において、色、香り、酸化抑制といった研究に関しては報告がなされてきたが、呈味に関する報告は少ない。呈味に関しては、飼料栄養によりミオシン、アクチンなどのタンパク質が影響を受けないため、栄養の影響はないものとされてきた。これに対し、我々の飼料アミノ酸を用いた一連の研究から^{1,2}、飼料中に Lys を添加することにより、食肉中の主要な呈味成分である筋肉遊離 Glu 量が、鶏の浅胸筋で増加することを明らかにした³。この結果はこれまでの報告にはない新たな品質制御の手法であり、食肉の生産段階において、高品質化を図る場合に非常に有効な技術であると考えられる。しかし他方で、添加した Lys がどのようなメカニズムによって筋肉中の遊離 Glu 量を増加させるのかは不明な点が多い。

本研究は組織間比較により、食餌性 Lys による筋肉特異的な Glu 増加のメカニズムを解明することを目的とする。Lys の飼料給与による食肉の高品質化メカニズムが明確なものとなれば、より効率的な筋肉遊離 Glu 量増加技術への展開が期待できると考えられる。

実験方法

・試験 I

28 日齢 Chunky 系雌ブロイラーを供試し、試験飼料の Lys 量は NRC(1994) に対し 100%(Control) 及び 150% (高 Lys) とした。これらを 10 日間給餌し、筋肉、肝臓、腎臓及び小腸を採取し、遊離アミノ酸濃度をアミノ酸分析機 (日本電子, JLC-500/V) で測定した。また、各組織の Lys α -ketoglutarate reductase (LKR)、及び glutaminase (GA) の遺伝子発現量を Real-timePCR (Roche, LightCycler) で測定した。

・試験 II

14 日齢 Chunky 系雌ブロイラーを供試し、試験飼料の Lys 量は NRC(1994) に対し 100%(Control) 及び 150% (高 Lys) とした。これらを 10 日間給餌し、筋肉のメタボローム解析を行った (Agilent, CE-TOF MS)。メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (株) が行った。

結果および考察

・試験 I

高 Lys 飼料給与により各組織の遊離 Lys 濃度は有意に増加し、遊離 Glu 濃度は筋肉でのみ 35% 有意に増加した。LKR の mRNA 発現量は測定した 4 組織いずれも Lys 給与により有意に増加し、GA は小腸以外の組織で有意に増加した。しかし、食餌性 Lys による LKR, GA の遺伝子発現上昇は筋肉以外の組織でも確認できたため、遊離 Glu 量増加と異なり、非特異的なものであることが示された。このことから、筋肉での遊離 Glu 量増加には、他の Glu 合成機構や、Glu の分解機構などが寄与する可能性が示された。

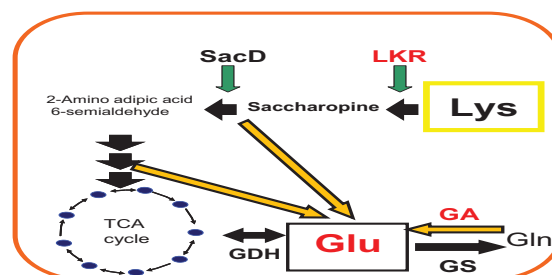


Fig.1 生体における Lys 及び Glu の主要代謝経路

・試験 II

試験 I の結果を受け、食餌性 Lys により、筋肉の網羅的な代謝産物の変動を確認するため、メタボローム解析を行った。この結果、同定された 127 物質のうち、68 物質でコントロールに対して 1.2 倍以上の増加が見られ、22 物質でコントロールに対して 0.8 倍以下となった。このうち、Lys の分解産物であるサッカロピン、ピペコリン酸などの物質で著しい増加がみられた。

今後は筋肉で増加、減少の見られた物質から着目すべき代謝系を取り上げる一方、筋肉の代謝産物と肝臓などの Glu 増加が見られない臓器の代謝産物とを比較し、筋肉の代謝特異点をみることで、Glu 増加メカニズムのさらなる解明を検討している。

References

- [1] Imanari, M. et al., *British Poult. Sci.* 49 (3): 299-307, 2008.
- [2] Kobayashi, H. et al., *Anim. Sci. J.* 82 (1): 86-92, 2011.
- [3] 藤村忍ら、特許出願 2005-079375 号、2005.

P-33

蛍光相関分光法検出型マイクロチップ等電点電気泳動システムの開発

○長谷川寛^{1,2}, 松本浩幸³, 石井勝弘¹

¹ 光産業創成大学院大学 光情報・システム分野, ² 浜松ホトニクス株式会社電子管事業部, ³ 浜松ホトニクス株式会社中央研究所

Development of the microchip isoelectric focusing system with fluorescence correlation spectroscopy

Yutaka HASEGAWA*^{1,2}, Hiroyuki MATSUMOTO³, Katsuhiko ISHII¹

¹ *The Graduate School for Creation of New Photonics Industries,*

² *Electron Tube Division, Hamamatsu Photonics K.K.*

³ *Central Research laboratory, Hamamatsu Photonics K.K*

Abstract

Since separation and concentration of the fluorescent sample molecules occur simultaneously in capillary isoelectric focusing (cIEF) with laser induced fluorescence (LIF) detection (cIEF-LIF), this is effective technique for a high sensitive analysis method. However, with conventional cIEF-LIF in which the fluorescent sample molecules are separated on the basis of differences in their isoelectric points (*pI*s), the application of this technique was limited in the case of poor differences of their *pI*s. Combining the molecular mass measurement of separated fluorescent sample molecules with cIEF-LIF expected to overcome this problem.

To confirm this possibility, we have developed the new system which combined microchip isoelectric focusing with laser induced fluorescence detection (mIEF-LIF) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS). FCS provides the average number of fluorescent molecules and the diffusion constant which reflects their molecular mass in the detection field. The developed system consisted of three kinds of technical elements, microchip-based mIEF, scanning LIF detection and FCS measurement.

Two kinds of fluorescent sample molecules (tetramethylrhodamine labeled peptide and protein) were focused in the channel by isoelectric focusing, the channel was scanned by using the principle of Laser Scanning Microscopes, and FCS measurement was performed at focused zone of fluorescent sample molecules in the channel.

Consequently, we found that the developed system was 20 times more sensitive than before focusing and molecular weight was estimated by the measured diffusion time in the microchip with a pH gradient. The mIEF-FCS which combined separation analysis by mIEF-LIF and FCS is expected as a new analysis system.

はじめに

試料の分離と収束が同時に行われる蛍光検出マイクロチップ等電点電気泳動法は高感度分

析法として有効であるが、それぞれの試料の等電点が近いか同じ場合には分離して定量することが困難である。この問題を解決するため、樹脂基板中にチャンネルを形成したマイクロチップを用い、蛍光相関分光法とマイクロチップ等電点電気泳動法を組み合わせたシステムを開発した。本システムは、チャンネル内に収束した試料画分を蛍光走査法によって検出すると同時に、蛍光相関分光法によって分子の数と大きさを測定することを特徴としている。蛍光標識ペプチドあるいはタンパク質を試料として分析を行ったところ、等電点の値に応じて収束した画分の検出分子数は、収束前と比較して約20倍以上増加していた。一方、計測された並進拡散時間より分子量を推察することができた。本システムは、等電点の差だけでは分離定量することが困難な試料に対して、分子量による分離を組み合わせた新しい分析法として期待される。

実験

蛍光相関分光法とマイクロチップ等電点電気泳動法を組み合わせたシステムを開発した。システム実証の為に、蛍光標識ペプチド (Probe A) および蛍光標識タンパク質 (Probe B) を測定用試料として用意した。Probe A は、N 末端 α -アミノ基に 5-TAMRA, SE を結合させた合成ペプチド (ペプチド研究所社製、配列: DDEHHHKR) であり、報告¹⁾ に準拠して調製した。蛍光標識後のペプチドの分子量は約 1,500、等電点(pI)は 6.23 であり、pI 値については、既報²⁾ に記載されている方法に従って測定した。Probe B は、ヒト α 1-アンチトリプシンに対する抗体遺伝子をクローニング後に大腸菌で Fab' 体として発現した組換えタンパク質であり、Fd 鎖 C 末端付近の Cys を 5-TMRIA で標識し、標識体の分子量は約 50,000、pI 値は 5.59 である。

結果と考察

Probe A 及び Probe B とも等電点電気泳動前の 20 倍以上の分子数の増加を確認した。また、実測した Probe A, Probe B の並進拡散時間は、それぞれ 0.114 ms, 0.377 ms であった。Probe A の分子量は約 1,500 Da であった為 既報³⁾ より Probe B の分子量を計算すると 54,250 Da となり Probe B の理論分子量 50,000 Da と類似した結果となった

構築したシステムは、等電点の差だけでは分離定量することが困難な試料に対して、分子量による分離を組み合わせたまったく新しい分析システムといえる。今後は免疫アッセイの分野での本システムの適用が期待される。

References

- [1] K. Shimura, K. Kasai: *Electrophoresis*. **16**, 1479 (1995)
- [2] K. Shimura, K. Kamiya, H. Matsumoto, K. Kasai: *Anal. Chem.*, **74**, 1046 (2002)
- [3] 原口徳子・木村宏・平岡泰: “生細胞蛍光イメージング”, 初版, p.101(2007), (共立出版)
- [4] 長谷川寛・松本浩幸・石井勝弘 “蛍光相関分光法を用いたマイクロチップ等電点電気泳動システムの開発”, 分析化学, in press

P-34

CE-TOFMS を用いたマウス腸管内容物のメタボローム解析

○山本優理^{1,2}、中西裕美子^{1,3}、村上慎之介^{1,3}、野津量子⁴、植野昌未⁴、日置恭司⁴、高倉 彰⁴、平山明由¹、杉本昌弘^{1,3,5}、曾我朋義^{1,2,3}、伊藤 守⁴、野村達次⁴、富田 勝^{1,2,3}

¹慶大・先端生命研、²慶大・環境情報、³慶大・政策メディア⁴実中研、⁵京大・医学研

Metabolomic analysis for murine intestinal contents using CE-TOFMS

Yuri YAMAMOTO^{1,2*}, Yumiko NAKANISHI^{1,3}, Shinnosuke MURAKAMI^{1,3},
Ryoko NOZU⁴, Masami UENO⁴, Kyouji HIOKI⁴, Akira TAKAKURA⁴,
Akiyoshi HIRAYAMA¹, Masahiro SUGIMOTO^{1,3,5}, Tomoyoshi SOGA^{1,2,3},
Mamoru ITO⁴, Tatsuji NOMURA⁴, Masaru TOMITA^{1,2,3}

¹ *Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.*

² *Dept. Env. & Info. Studies., Keio Univ.,*

³ *Grad. Sch. Media & Governance., Keio Univ.*

⁴ *Cent. Inst. Exp. Animal.,*

⁵ *Grad. Sch. Med. and Fac. of Med., Kyoto Univ.*

Abstract

Intestinal microflora plays a key role in nutrition, metabolism, and immune responses of the host. Especially, microbial composition among different intestinal contents influences on host's intestinal biochemistry. Unraveling the relationship between host and microorganisms, we utilized capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) for metabolomics profiling of murine intestinal contents (stomach, upper small intestine, lower small intestine, cecum, proximal colon and distal colon) in two specific pathogen-free (SPF) mice and CIEA flora mice, a germ free (GF) mouse with a few gut microorganisms and GF mice. We identified site-specific metabolites variance of each intestinal content.

はじめに

腸内細菌とは腸壁や腸管内食うに存在する常在菌であり、宿主の栄養面、代謝、免疫応答において重要な役割を担っている。さらに、腸管の部位による腸内細菌叢の違いが宿主の腸内環境に影響を及ぼしている。そこで、我々はまず腸管の部位ごとにメタボローム解析を行い、各腸管部位に特徴的な代謝物を推定することを目的とし実験を行った。本研究では、腸内細菌の違いがビタミンや有機酸など腸内細菌が産生する代謝物に大きく影響を与えることがわかった。

実験

本研究では 79 種の腸内細菌（CIEA フローラ）を定着させた CIEA マウス、SPF マウス、GF マウスについてそれぞれ各 3 個体ずつの腸管部位(胃、小腸上部、小腸下部、盲腸、結腸上部、結腸下部)の内容物と糞便を採取し、キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置（CE-TOFMS）を用いてメタボローム解析を行った。

結果と考察

メタボローム解析の結果、腸管内容物の代謝プロファイルは個体差よりも腸管の部位ごとに大きく特徴があることがわかった。また、CIEA マウスと SPF マウスを比較した場合、腸管内容物から同定された代謝物のうちの約半数が腸内フローラの違いにより有意に差があり、特に、ビタミンや有機酸など腸内細菌が産生する代謝物において有意差が見られた。さらに、腸内細菌由来の代謝物を特定するため、無菌マウスの腸管各部位における代謝プロファイルと比較した結果、CIEA マウスで同定された物質の数が GF マウスの約 2 倍になり、CIEA マウス、GF マウスのどちらでもみられた物質の中ではビタミンやアミノ酸の濃度に大きく違いが見られた。変化が見られた物質の多くはアミノ酸代謝や尿素回路に集中していた。さらに、ビタミン B6 とされている pyridoxamine は有菌のみ、pyridoxine は SPF マウスでのみみられた。このことにより、腸内細菌叢の違いにより pyridoxine の産生が異なることが示唆される。

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	福土恵一
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	キャピラリー電気泳動シンポジウム	曾我朋義
32	2012	大阪 (予定)		田中喜秀

2011 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)
田中信男* (ジューエルサイエンス)	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)	福士 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)
北川 文彦* (弘前大院・理)	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)
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)
塚越 一彦* (同志社大・理工)	渡慶次 学 (名大院工)
鳥村 政基 (産総研)	西 博行 (安田女大薬)
野上 知花 (アジレントテクノロジー)	萩中 淳 (武庫川女大薬)
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)

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ご支援を賜りました。心よりお礼申し上げます。

株式会社 ASICON

アジレント・テクノロジー株式会社

大塚電子株式会社

極東貿易株式会社

サカタ理化学株式会社

株式会社シバタインテック 荘内営業所

株式会社セイミ

ナカライテスク株式会社

西川計測株式会社

株式会社バイオメディカルサイエンス

バイオリサーチセンター株式会社

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

ベックマン・コールター株式会社

(五十音順)

Agilent 7100

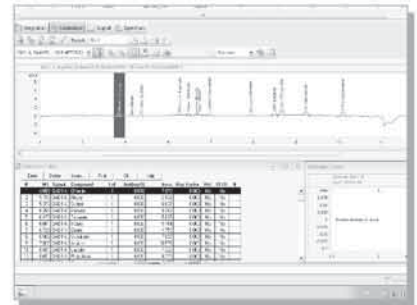
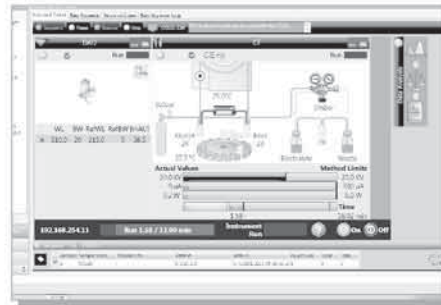
Capillary Electrophoresis Measuring System



キャピラリー電気泳動システム



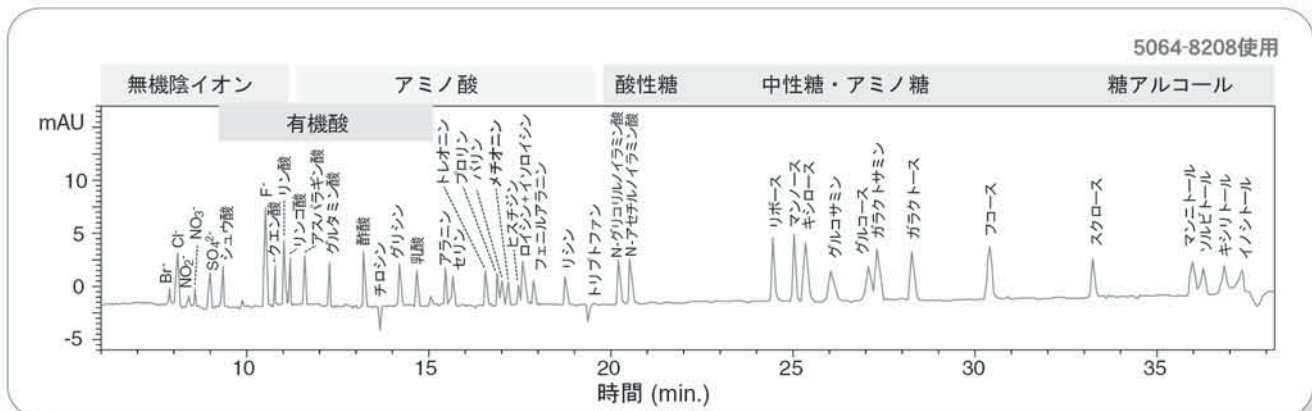
最高の分離能、最高の感度、
最高のアプリケーション



キャピラリー電気泳動のメリットを高い信頼性で実現

- バッファマニュアルなど豊富なアプリケーションによる優れた技術サポート
- 陽イオンや陰イオンなど異なる成分を一台の装置で分析可能
- 微量サンプルで短時間・高分解能な分析が可能
- バブルセルキャピラリーにより分離能を損なわず3～5倍の高感度化を実現
- 対イオンや夾雑物の影響を受けにくく前処理がほとんど不要
- 高価なカラムや溶剤を使用しないため経済的で環境にも優しい

無機陰イオン・有機酸・アミノ酸・糖類43成分を38分で一斉分析！



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
●東京支店 〒192-0082 東京都八王子市東町1-6 橋完LKビル4F

TEL.(072)855-8564 FAX.(072)850-9159
TEL.(042)644-4951 FAX.(042)644-4961

明日を見つめて、
時代のニーズに応えます。

バイオ関連機器・分析機器・理化学機器・研究用試薬



本社・鶴岡営業所 〒997-0010 山形県鶴岡市余慶町6番38号
TEL 0235(24)6938・FAX 0235(23)6577
山形営業所 〒990-0074 山形県山形市芳野3番1号
TEL 023(615)2977・FAX 023(634)2966
秋田営業所 〒010-1638 秋田県秋田市新屋表町6番17号
TEL 018(888)8581・FAX 018(888)8582
仙台営業所 〒984-0058 宮城県仙台市若林区元茶畑44コーポ高橋106
TEL 022(217)1928・FAX 022(217)1938
酒田営業所 〒998-0005 山形県酒田市宮海字中砂畑27番地の21
TEL 0234(33)5585・FAX 0234(24)5399

URL <http://www.sakatarikagaku.co.jp>

明日への先端科学技術分野に貢献する



—信頼される技術とサービスを人へ社会へ地域へ—

ライフテクノロジーを追求する

 **株式会社 シバタインテック**

本 社 〒984-0015 仙台市若林区卸町二丁目11番地3
TEL 022(236)1911 (直通) FAX 022(232)6835

山形支店 〒990-2323 山形市桜田東二丁目1番21号 TEL 023(642)8153(代表)
庄内営業所 〒998-0828 酒田市あきほ町659番地の8 TEL 0234(26)2272(代表)
鶴岡営業所 〒997-0021 鶴岡市宝町9番21号 TEL 0235(29)1366(代表)
郡山営業所 〒963-0206 郡山市中野一丁目55番地 TEL 024(951)2977(代表)
メンテナンスセンター 〒984-0015 仙台市若林区卸町三丁目2番7号 TEL 022(782)7422(代表)
物流センター 〒984-0015 仙台市若林区卸町三丁目2番7号 TEL 022(235)0978(代表)



登録番号：Q391

ホームページ：www.shibataintech.co.jp

E-mail：info@shibataintech.co.jp

Technology continues progressing
so long as we continue
having a dream.

Machine&Instrument/Reagent

私たちは研究者と、

国内外の最新の情報とテクノロジーをつなぐ

生命科学のサポーターです。



生命科学のサポーター

SEIMI 株式会社 **セイミ**

■本社/〒981-0933 仙台市青葉区柏木二丁目3番28号 TEL 022-233-1717 FAX 022-233-1725
■仙台営業所/〒997-0042 鶴岡市新形町5番22号 TEL 0235-29-0461 FAX 0235-29-0460

ホームページ <http://www.chemle.co.jp>



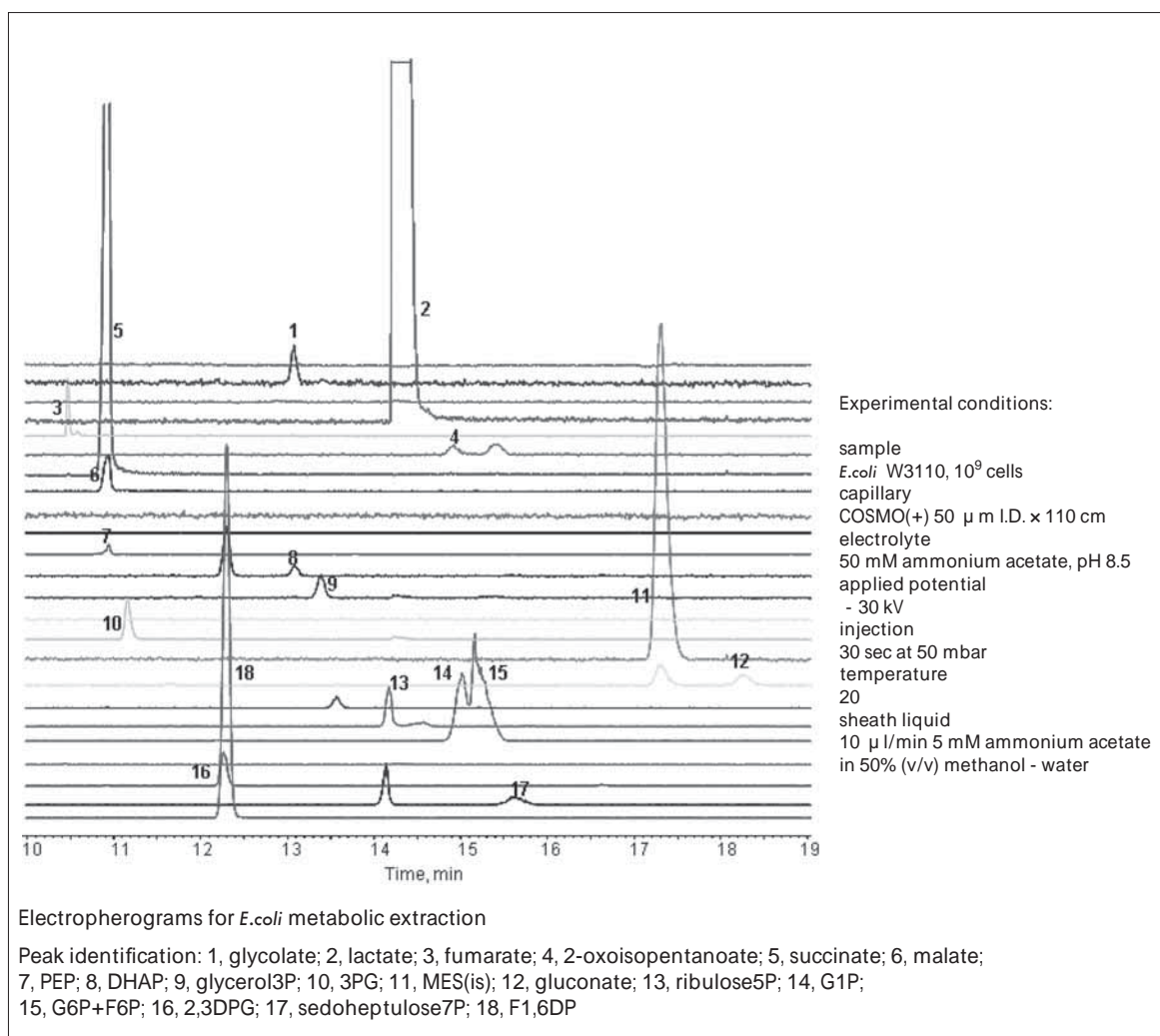
COSMO(+)キャピラリー

特長

EOFは、未修飾のキャピラリーとは反対方向にpHに非依存的に発生
良好な再現性
幅広いpH領域(pH2 ~ 10)で使用可能
吸着なし

使用例

E. coli の代謝産物の同時検出



COSMO(+)キャピラリーの逆方向へのEOFと電解質として用いた50mMの酢酸アンモニウム、pH8.5により様々なタイプの代謝物が20分で分析できました。

【データご提供】 慶応義塾大学先端生命科学研究所 曾我朋義 先生

ラボにおける“シンプル”かつ“安価”な データバックアップをご提案いたします!

ラボのデータとレポートの管理、こんなこと感じたことはありませんか?

データやメソッドの
バックアップを個別に
行っているのが大変。

分析機器が故障して
データやメソッドが
消失してしまっているのが
困る。

レポートや報告書(紙)の
保管が大変。
後々探すのも大変。

AFASは、分析機器のメーカーや種類に依存しない、ラボ専用のデータ管理システムです。

ラボのデータおよびレポートの一元管理を、シンプルかつ安価に実現します。

(本製品は、GxP等のコンピューターバリデーションに対応しておりません。)

各種メーカー・機器に対応

PC (Windows) が接続されている分析機器であれば、ほとんどのメーカーおよび機種に対応します。

データの自動バックアップ

データを常時自動でバックアップすることが可能。PCトラブルなどによるデータの消失を最小限に抑えます。

レポートの電子管理

メーカー毎に異なるレポートも全てpdf形式に変換して一元管理します。また、遠隔のPCからブラウザ (IE) を使用してレポートを検索・閲覧ができ、その情報を二次活用することが可能です。

ラボの効率化

バックアップの自動化、遠隔 (居室等) からのデータ閲覧や解析・分析の終了確認、プリンターの削減など様々な効率化が実現できます。

専用のサポート体制

AFAS専用のコールセンターを常設。オンサイトサポートも全国のサービススポットから迅速に対応します。

■価格構成例 180万円*1 (税込み)

〈内訳〉 サーバー (HDD容量 1.0TB)

自動バックアップソフトウェア (PC5台分ライセンス)

3年間 ハードウェア保守

現地据付調整費

*1: 価格は予告無く変更する場合があります。本構成例では、レポートの管理・検索機能は含みません。

ラボのマネージャー
および
情報システム部の方
必見!

今なら、
お客様にて作成していただきました
導入事例資料をお配りしています!

申し込みは、chemplus1@nsw.co.jp

測定データを一元管理する
分析データ管理システム

AFAS

〈エイファス〉

■問い合わせ先

西川計測株式会社 分析営業本部

Tel: 03-3453-1337 E-mail: chemplus1@nsw.co.jp

製品の詳しい情報は・・・<http://www.nsw.co.jp/cp>

卓越した機能搭載 卓上式破砕機

待望!の卓上型

DNA/RNA/たんぱく質の抽出に最適!

機能が大幅アップして新登場!

「破砕作業」を 一挙に解決!

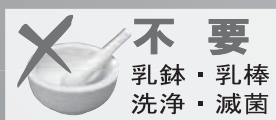
Shake Master
NEO

ビーズ式細胞破砕装置 **NEO**
Shake Master
シェイクマスターネオ ver1.0 BMS-M10N21

三次元ビーズ衝撃式
多検体細胞破砕装置
【細胞破砕装置シリーズ】



NEW



- 1.三次元ビーズ衝撃式のため破砕ムラ0ゼロ!
- 2.完全密閉式のためサンプルロス・コンタミ0ゼロ!
- 3.液体窒素(-196℃)を用いて完全凍結破砕OK!
- 4.アルミブロックを冷却して4℃破砕OK!
- 5.最適な微調整破砕を可能にする三次元衝撃度(rpm)可変調節機構
- 6.マイルドな破砕を可能にする間欠タイマー機構

少量～大量サンプルの一括処理可能

容器の種類	1.5ml 2.0ml	13ml 15ml	50ml	96 Deep Well Plate	特殊ステンレス容器 (冷凍破砕用)
最大処理本数	常温	60本	9本	4本	2個
	冷蔵 4℃	60本	9本	4本	2個
	冷凍 -196℃				
					4ml×2個 250ml×1個

消音設計

・卓上式破砕機(非常にコンパクトな設計で音も静か)

処理本数

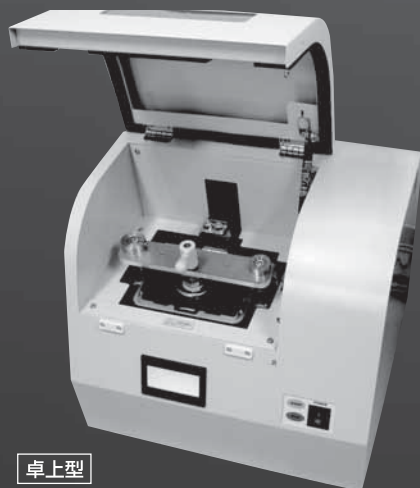
・卓上式破砕機の中で一番処理本数が多い!

多彩な容器対応

・1.5mlチューブ(少量)から250ml(大容量)容器まで対応

冷蔵/冷凍破砕OK

・液体窒素を利用した凍結破砕も、もちろん可能!



卓上型

破 砕 方 式: 三次元ビーズ式破砕(サイクリング方式)

振 動 方 式: クランクによる上下振動

振 動 回 転 数: 450~1500rpm

振 動 時 間 設 定: 1秒~59分59秒

動 作 設 定: タッチパネル入力によるプログラム設定

サ イ ズ: 520(W) x 450(D) x 484(H) mm

重 量: 50 kg

周 波 数: 100V 10A 50/60Hz

対 応チューブ: ①2mlチューブ×60本 ②15ml×9本 ③50mlチューブ×4本
④96DeepWellPlate×2コ ⑤ステンレス容器:45ml×2コ
⑥ステンレス容器:250ml×1コ

NEO
Shake Master
シェイクマスターネオ ver1.0 BMS-M10N

デモ
承ります

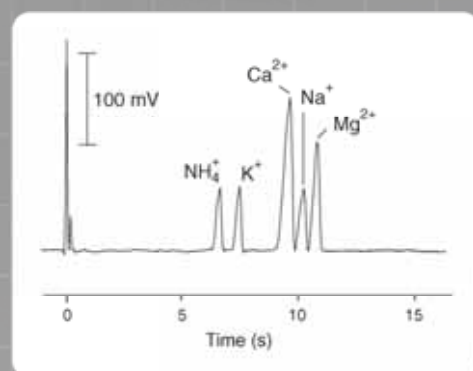
シェイクマスターネオ ver1.0 BMS-M10N21 ￥2,100,000
(本体にはネオ用ブロック収納ケースが付きませ)

<http://www.bmsci.com>

bms
bio medical science



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。

C⁴D マイクロチップ[®]電気泳動システム

C⁴DをLab-On-Chipに応用したマイクロチップ電気泳動システムです。電極を組み込んだマイクロ流路チップ、C⁴Dヘッドステージ付きマイクロチップアダプター、高電圧シーケンサー、C⁴Dデータシステムから構成されています。



micronit
MICROFLUIDICS
X35100C4D



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>



測定から解析まで HMTが皆様の研究をお手伝いいたします メタボローム受託解析サービス

お客様のご要望に応じて選択していただける多彩な解析プランをご用意しています。
ご希望の実験デザインに応じて最適なプランをご提案いたしますので、お気軽にお問い合わせください。

Basic Plan

20万円 / 検体

主要代謝経路

半定量

Premium Plan

40万円 / 検体

すべての検出ピーク

半定量

Energy Scope

14万円 / 検体

エネルギー代謝

定量

パスウェイマッピング

Core Scope

20万円 / 検体

中心代謝

定量

パスウェイマッピング

DIFFERENTIAL PACK

95万円 / 6 検体
150万円 / 10 検体

主要代謝経路

定量 / 半定量

パスウェイマッピング

PCA/HeatMap

※ただし2群、N=3/5に限ります

一番人気!

得られたデータの理解に役立つ各種統計解析 (ANOVA、階層的クラスタリング)、未知ピークの同定解析なども行っております (オプション)。

お得な
パッケージ
プラン

第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE 2011) 実行委員会

実行委員長	曾我 朋義	(慶大・先端生命研)	
実行委員	鈴木 茂生	(近畿大・薬)	電気泳動分析研究懇談会委員長
	壹岐 伸彦	(東北大院・工)	
	石濱 泰	(京大院・薬)	
	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	(岡山大院・自然科学)	
	北川 慎也	(名工大院)	
	北川 文彦	(弘前大院・理)	
	澤田 浩和	(アジレント・テクノロジー)	
	志村 清仁	(福島医大・医)	
	高柳 俊夫	(岡山大院・理)	
	竹内 昌治	(東大・生産技術研)	
	竹田 さほり	(産総研)	
	田中 喜秀	(産総研)	
	鳥村 政基	(産総研)	
	久本 秀明	(大阪府大院・工)	
	福崎 英一郎	(阪大院・工)	
	福士 恵一	(神戸大院・海事科学)	
	松本 浩幸	(浜松ホトニクス)	
		[五十音順 (一部除く)]	

第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集
2011年11月9日発行

編集責任者 慶應義塾大学先端生命科学研究所 曾我 朋義
〒997-0035 山形県鶴岡市馬場町 14-1
TEL: 0235-29-0800
Email: office@ttck.keio.ac.jp

発行 (社) 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会

印刷所 有限会社アート写真印刷
〒997-0857 山形県鶴岡市美咲町 17-13

