

キャピラリー電気泳動法

齋藤 伸吾

1 電気泳動

1.1 電気泳動とは

物質を空間的に分離する手法には様々なものがある。中でも非常によく使われる手法は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と電気泳動 (electrophoresis) であろう。後者の電気泳動法はその装置構成でも分類され、キャピラリー電気泳動法 (capillary electrophoresis, CE), スラブゲル電気泳動, マイクロチップ電気泳動などがあるが、本稿では CE についてのみ解説する。この入門講座における主眼は、初心者あるいはこれから CE を使った分析や研究を進めたい人に対し、「簡単な原理」と「実際法として何ができるのか」あるいは「研究レベルでの使われ方」を紹介するものとする。最初に CE の特長を述べておく。1) 少試料量, 2) 短時間で高分離が得られる分析手法であり, 3) 特にイオン性物質に対して高度な分離が可能である。これら特長および特徴を応用した分析法に興味があれば、さらに読み進めると良い。

はじめに電気泳動について説明する。電気泳動とは「空間的に均一な電場中における流体に対する分散粒子の動き」のことであり、簡単に言えば、均一な電場勾配中で荷電粒子 (イオン等) が移動する現象のことである。分離科学としての電気泳動の歴史は 1931 年の Tiselius の研究から始まった。それ以前から導電現象は知られていたが、1937 年の Tiselius の装置の発明によって血清タンパク質が分離されることが見いだされた。Tiselius は 1948 年に電気泳動と吸着による分析法の業績によってノーベル賞を受賞している。その後、化学物質を個別のバンド (ゾーン) に分離する電気泳動手法はゾーン電気泳動法と名付けられた。ゾーン電気泳動は大きく二つに分けると、自由溶液中 (ゲルなどの分離媒体のない一般的な溶液) あるいは支持体 (主にゲル) 中での電気泳動するものに分類できる。

1.2 電気泳動移動度 (electrophoretic mobility)

1.2.1 自由溶液中における移動度

簡単に自由溶液中での電気泳動について考えてみる。CE で何ができるかが知りたい場合には、1.2 節は読み飛ばしても良い。自由溶液中のイオンは電場勾配中 (電極を置いて電圧を印加する) に置かれると、その正負の電荷によってそれぞれカソードあるいはアノード方向へと移動 (電気泳動) する。この時の粒子 A^z にかかる力 F_{ep} を考える (図 1 上)。 F_{ep} は電気泳動現象の駆動力であり、

$$F_{ep} = zeE \dots\dots\dots (1)$$

と表せる。ここで ze は電荷 q であり、 e および E はそれぞれ電気素量と電場である。電気泳動が始まるとほぼ同時にイオンは溶媒からの摩擦力 F_f を受ける。その結果、この二つの力はつり合い、イオンは等速運動をする。ここで、 F_f はある条件において、

$$F_f = 6\pi\eta av_{ep} \dots\dots\dots (2)$$

と表せる。 η , a および v_{ep} はそれぞれ溶液の粘度、イオンの半径、泳動速度である。式 (1), (2) から

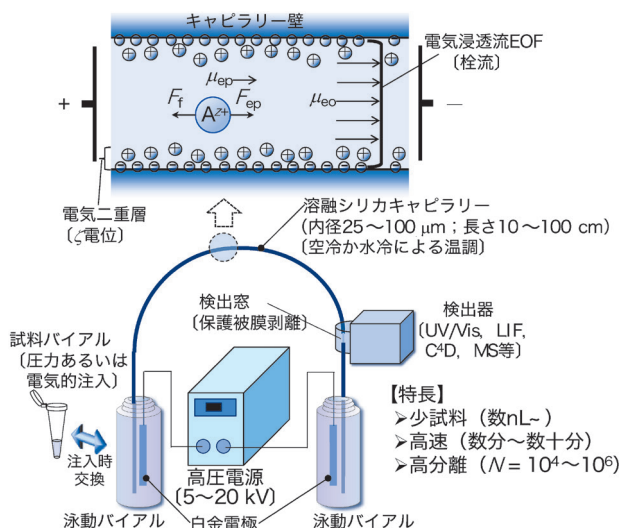


図 1 電気泳動の原理 (上) と CE の装置構成 (下)

$$\mu_{cp} = \frac{v_{cp}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta a} \dots\dots\dots (3)$$

が導ける（ただし、イオンを球体とみなし、イオン周りの電気二重層は非常に薄い等の仮定を置いていることに注意。aは溶媒和効果も考慮に入れた、いわゆるストークス半径）。 μ_{cp} は電気泳動移動度でありイオンに固有の値である。つまり、泳動速度 v_{cp} は $\mu_{cp}E$ で与えられる。式(3)は、単純なイオンに関してはある程度成立することが知られ、 μ_{cp} 同士の比較が可能である。つまり、自由溶液におけるイオンの電気泳動を支配する因子として q/a (電荷/サイズ比) の寄与が大きいことが分かる。

1・2・2 ゲルにおける移動度

次にゲル媒体中での μ を考えてみる。3次元ファイバーで構成されるとみなしたゲル中での泳動では分子ふり効果が働く。これをモデル化したものとして Ogston モデル¹⁾²⁾がよく例示される。剛体球(溶質)の流体力学的半径 R が平均細孔径と同程度か小さい時、かつファイバーの長さが十分に長い場合に、剛体球が移動するのに十分な溶媒空間に存在する確率 P は

$$P = \exp(-2k\pi R^2 C_{gel}) \dots\dots\dots (4)$$

となる³⁾。ここで C_{gel} はゲル濃度、 k は定数である(実際の Ogston モデルでは C_{gel} の関数ではなく、ファイバー中心の濃度とファイバーの長さの関数であり、ファイバーの半径も考慮している)。よって、ゲル中の電気泳動移動度 μ_{gel} は

$$\mu_{gel} = \mu_{cp} \exp(-K_R C_{gel}) \dots\dots\dots (5)$$

となる。ここで K_R は R に依存する定数である。式(5)の両辺の対数を取り、 μ_{gel} の C_{gel} 依存性を計測すれば、その傾きから K_R を実験的に求められる。Ogston モデルでは一般に μ_{gel} と $\log M$ (M は分子量) に線形の相関があることが知られている。Ogston モデルはかなり簡易化したモデルであるが、タンパク質のゲル電気泳動に対してある程度合致する。

分子長の長い DNA などは Ogston モデルには従わず、レプテーションモデル⁴⁾(あるいは拡張レプテーションモデル)に従うとされる。レプテーションとは蛇のような動きを意味しており、長鎖分子が折れ曲がりながら長軸に沿って運動するというものである。このモデルでは

$$\mu_{gel} \propto \frac{1}{M} \dots\dots\dots (6)$$

が成立し、拡張モデルでは

$$\mu_{gel} \propto \frac{1}{M} + bE^2 \dots\dots\dots (7)$$

となる。ここで E は電場、 b は細孔径に関する定数である。以上のように、細孔径に対して同等かそれ以下の分子(主にタンパク質)は Ogston モデルに、細孔径に対してより長い鎖鎖高分子(主に核酸)はレプテーションモデルに従うと初学者は考えると良い。

2 CE の装置構成と動作方法

2・1 CE の装置構成

CE とは、細管(キャピラリー)中で上記の電気泳動を行う手法である。CE は 1) キャピラリー、2) 電極、3) 電源、4) 検出器および 5) 泳動バイアルからなる比較的単純な装置構成である(図1下)。さらにオートサンプラー、自動温調装置(空冷あるいは水冷式)がセットになった全自動 CE 装置が各社から販売されている。

一般にキャピラリーとして用いられるのは溶融シリカキャピラリーである。内径 25~100 μm 、長さ 10~100 cm のものが、特に分析用では内径 50 あるいは 75 μm 、長さ 30~60 cm のものがよく用いられる。また、溶融シリカキャピラリーの内表面を化学的にコーティングしたのも各種市販されている。これらは試料のキャピラリー壁への吸着を抑え、同時に電気浸透流(後述)を抑制するもの(主にポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールおよびポリアクリルアミド修飾など)と、キャピラリー内表面を正電荷あるいは負電荷に修飾し、同電荷イオンの吸着抑制と同時に安定な電気浸透流を得られるものである。

CE では、キャピラリー中に泳動液を充填して高電圧を印加して泳動する。泳動時にはキャピラリー両端は泳動液および電極の入った泳動バイアルに浸けられる。電極としては白金ワイヤーがほとんどの場合使われる。CE の特長の一つとして高電圧(5~30 kV、特に 15~20 kV がよく使われる)を印加可能なことが挙げられる。高電圧下では電気浸透流および各ゾーンの移動速度が大きくなり(後述、式(11)参照)、理論段数も向上することで(式(13)参照)短時間での分離が可能となる。

2・2 試料注入法

CE における試料の注入体積は 3~100 nL 程度と非常に少なくて済む(バンド幅~数 mm)。よって、CE は生体試料などの希少試料の分離分析に有効である。試料の注入法は主に 1) 加圧、2) 落差、および 3) 電氣的導入法がある。1) 加圧法ではキャピラリーの導入側から加圧する(ポンプや窒素ガスなどによる)方法が一般的である。全自動の CE 装置では圧力 p と時間 t_{inj} を設定して注入量を制御する。注入体積 v は Hagen-Poiseuille の式から見積られる。

$$v = \frac{\Delta p d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L} \dots\dots\dots (8)$$

ここで、 d は内径、 η は粘度、 L はキャピラリー全長である。2) 落差法は導入側と検出側のキャピラリー端の高さに高低差をつけ(5~20 cm程度)、サイフォンの原理で試料を導入する方法である。この方法は多少時間がかかるものの再現性も良い。一方で、大容量注入(4・1節のCE濃縮法を参照)するには時間がかかりすぎることで、全自動CE装置ではこの導入法が適用できない機種もあること等の欠点がある。3) 電気的導入法は電圧を印加することで試料を導入する方法である。この際、試料中のイオンは電気泳動的にキャピラリー内へ導入される。また、電気浸透流(後述)が抑制されなければ、この効果も含めて注入される。イオンの注入量 Q (注入体積ではないことに注意)は以下の式で見積もれる。

$$Q = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) E \pi d^2 C t_{inj} / 4 \dots\dots\dots (9)$$

ここで μ_{eo} は電気浸透流移動度(後述)、 C は導入するイオンの濃度である。電気的導入法はイオンの電荷に対してある程度の選択性のある導入方法であるが、試料のイオン強度や μ_{ep} によって注入量が変わり、また、注入体積も明確にわからないことが多い。さらに、注入後にバイアル中の試料組成が変化するため、試料の都度調製が必要である。一方で、CEの分離様式の一つであるキャピラリーゲル電気泳動(CGE, 3・4節参照)では流動性のないゲルが充填されているため圧力注入ができないため、電気的注入法が専ら使用される(この場合、電気浸透流は発生しない)。

2・3 検出法

HPLCほど多様ではないものの、CEでも種々の検出法が開発されている。ここでは代表的な1) UV/Vis吸光光度検出、2) レーザー励起蛍光検出(LIF)、3) 電気伝導度検出および4) 質量分析計(MS)について簡単に説明する。

UV/Vis吸光検出やLIF検出では、光を入射するための検出窓をキャピラリーに作製する。一般にキャピラリー外側がポリイミドコーティングされた熔融シリカキャピラリーが販売されており、このコーティングを剥離することで検出窓を作る。

1) UV/Vis吸光検出は、最も一般的な手法であり、光吸収を持つ分子であれば検出可能である。一方で、Lambert-Beerの法則(吸光度は光路長に比例)に従うため、その検出感度はHPLCなどと比べてかなり低い。1 cmセルと比べてもキャピラリー内径は1%以下であることからこの低濃度感度は当然である。CE-UV/Vis検出の一般的な検出限界は μM レンジである。ただし、

CEは導入量が少ないことが特徴であり、物質質量としての検出限界は数十fmolとなり、その点では感度は悪くはない。フォトダイオードアレイ(PDA)を内蔵する機種ではピークのスペクトル情報も同時に獲得できる。

2) 一般に蛍光分析は吸光分析よりも10~100倍程度感度が高いが、レーザー光を使えばより感度は高くなる。CE-LIF検出では蛍光色素を使用すれば数百~サブpMの検出限界が得られる。ただし、レーザーの励起光波長に合った蛍光物質にしか適用できない、すなわち非蛍光物質の場合には蛍光ラベル化が必要である。また、使用できるレーザー波長にも制限がある。これは反対に、蛍光検出ならではの選択性があると言える。

3) 非接触型電気伝導度検出器(capacitively coupled contactless conductivity detector, C⁴D)も市販されている。この検出器は検出窓を作製する必要はなく、数cmの検出部(ヘッドステージ)にキャピラリーを通し、計測したいキャピラリー位置に設置するだけで良い。C⁴Dは市販CE装置には搭載されていないが、自分で取り付けることが可能である。原理的にはすべての電荷をもった化学種の検出が可能であるが、泳動液の電気伝導度が高いとバックグラウンドノイズが大きくなること、検出選択性が低いこと等が短所となる。検出限界は一般にUV/Vis検出の数倍良いとされる。

4) 質量分析計(MS)をCEに接続したCE-MSも現在は比較的良好に使われている。MS検出は比較的高価な装置オプションではあるものの、代謝物の一斉解析への応用等においては、分子量情報(m/z)によって物質を同定できるという点で他にない強力な検出法である。イオン化はエレクトロスプレー(ESI)法が使用されることが多い。一般にはキャピラリーをESIインターフェースに接続し、シース溶液を流して高電圧をかけて噴霧・イオン化する。最近ではシースレスのものも開発されている。他のESI-MS同様、カチオン性化合物により感度が高いことが多い。感度はnM以下の化合物も検出可能である。一方で、イオン化させるために揮発性溶媒の泳動液を使うことが多く、泳動液の選択に制限があるため(一般には酢酸やギ酸、アンモニア/水混合溶媒など)、分離モードに特殊なものを用いることができない(カスタマイズの幅が狭い)ことが欠点である。

3 CEの分離様式

3・1 電気浸透流(EOF)

ここからは、CEで良く用いられる分離様式について述べていくが、その前にCEにおいて特徴的な電気浸透流(electroosmotic flow, EOF)を説明する必要がある。EOFとはキャピラリーチューブ等に高電圧を印加した際に発生する流れのことである。CEでは、試料はこのEOFによって流されながら電気泳動分離されることが多い。EOFが発生する原理を説明する(図1上)。熔融

シリカキャピラリー内壁の表面にはシラノール基 (-SiOH) が存在するが、pH 3 以上では一部酸解離している (-SiO⁻)。泳動液中の電解質 (カチオン) が静電相互作用によって解離シラノール基表面近くに位置することで、電気二重層を形成する。ここに電圧を印加するとクーロン力によって電気二重層のすべり面のカチオンがカソード方向へと移動する。これらカチオンは溶媒和しており、バルクの溶媒と一緒に移動するため、キャピラリー内の溶媒全体がカソード方向へと移動する流れ、すなわち EOF が発生する。EOF の移動度 μ_{eo} は次式で与えられる。

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \dots\dots\dots (10)$$

ここで ε および ζ はそれぞれ比誘電率とゼータ電位である。ゼータ電位は電気二重層のすべり面の電位である。中性 pH 以上では多くのイオンの $|\mu_{cp}|$ よりも $|\mu_{eo}|$ は大きくなることが多い。つまり、ほとんどのイオンはカチオン、アニオンにかかわらず EOF に運ばれて流れていくことになる。EOF の流れの速度プロファイルは栓流 (plug flow, 図 1 上) である。HPLC など圧力駆動の流れ分離分析系のほとんどが層流 (放物線流) を示すのと大きく異なり、管軸方向への速度が管径方向に依存せず一定である。これによりゾーンの拡散を最小限にとどめられる。これが、CE が非常に高分離な手法である一因である。

EOF の存在は、高速分離を可能にするため益するところが大きい、EOF を抑制したいというケースも存在する。そのような場合には、装置の項で説明したようにコーティングキャピラリーを使用する。また、カチオン性ポリマーでコーティングしたものでは EOF の向きが溶融シリカキャピラリーの場合と反転するため、電圧の極性を反転させて用いる。

3.2 キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)

3.2.1 CZE の原理

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) とは最も単純で基本的な分離様式である。CE と呼称を区別しない場合もある。溶融シリカキャピラリーを用いる CZE では、EOF の存在下でイオン性化合物を電気泳動分離することになる。よって、あるイオンの見かけの泳動速度 v_{obs} は、

$$v_{obs} = v_{cp} + v_{eo} = (\mu_{cp} + \mu_{eo})E = \mu_{obs}E \dots\dots\dots (11)$$

となる。上述したように一般に $|\mu_{cp}| < |\mu_{eo}|$ が成立するため、すべてのイオン性化合物は EOF に流れに乗り、カソード側に設置した検出器まで運ばれる。その間にイオン性化合物は電気泳動的に (μ_{cp} の違いに基づき) 分離する。つまり、EOF が HPLC などにおけるポンプの

役割を果たしている。よって CZE ではカチオンとアニオンの両方を一斉検出可能である (図 2 も参照)。式 (11) より、 v_{obs} はカチオン > EOF (電気的中性分子) > アニオンとなる。また、式 (3) より、カチオン (アニオン) では電荷 $|q|$ が大きいほど早く (遅く)、同じ q であれば分子サイズの小さいものほど早く (遅く) 検出される。実際に見かけの電気泳動移動度 μ_{obs} を計測する際は以下の式を用いる。

$$\mu_{obs} = \frac{Ll}{tV} \dots\dots\dots (12)$$

t はピークの検出時間、 V は印加電圧、 L と l はそれぞれキャピラリー全長および有効長 (検出器までの距離) である。

次に分離効率に関して考えてみる。CZE での理論段数 N は次式で与えられる。

$$N = \frac{\mu_{obs}V}{2D_m} \dots\dots\dots (13)$$

ここで D_m は拡散係数である。HPLC の段理論で出てくる van Deemter 式と比べ、多流路拡散や物質移動の項が存在せず、かつ CZE では栓流であるため、より狭いバンドでの分離が可能なが分かる。CZE では高電圧の印加が可能であり、大きな μ_{obs} を得られるため、数万から十万程度の N が容易に得られる。また、分離度 R_s は

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{cp}\sqrt{N}}{\mu_{cp} + \mu_{eo}} \dots\dots\dots (14)$$

となる。ここで $\Delta\mu_{cp}$ および $\overline{\mu_{cp}}$ は分離する二つの物質の移動度の差とその移動度の平均である。

3.3 ミセル導電クロマトグラフィー (MEKC)

CZE はイオン性化合物の分離分析が可能であるが、電気的中性の化合物はすべて EOF と同じ速度で移動し、EOF の検出時間と同じ時間で検出されるため、分離できない。電気的中性化合物に対して CE の高分離能を適用するために開発されたのが MEKC (micellar electrokinetic chromatography) である。この手法は 1984 年に Terabe らが初めて開発した日本で産まれた技術である⁵⁾。MEKC では、泳動液に臨界ミセル濃度 (CMC) 以上の濃度でイオン性界面活性剤を添加する。界面活性剤は親水性ヘッドグループが溶媒に接し、疎水性テールグループが非極性のコアとなったほぼ球形の分子集合体 (ミセル) を形成する。このミセルが擬似固定相として機能し、ミセル内部と泳動液間で電気的中性化合物の分配平衡が起こる。かつイオン性ミセル自体は電気泳動するため、電気的中性化合物でも逆相-HPLC のように分離できる。MEKC に適した界面活性剤としてドデシル硫酸

ナトリウム（陰イオン性）が最も一般的であるが、臭化セチルトリメチルアンモニウム（陽イオン性）なども用いられる。

MEKCにおいてミセルに分配される電気的中性化合物の泳動時間 t_R は次のように表される。

$$t_R = \frac{(1+k')t_{co}}{1+(t_{co}/t_{mc})k'} \dots\dots\dots (15)$$

ここで k' は保持係数、 t_{mc} はミセルを試料とした時の検出時間であり、 t_R は常に t_{co} と t_{mc} の間にある。MEKCではCZEと異なり、 k' が分離を制御する主なパラメーターとなる。分離度は式(16)で与えられる

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha-1}{\alpha} \frac{k_2'}{1+k_2'} \frac{1-t_{co}/t_{mc}}{1+(t_{co}/t_{mc})k_1'} \dots\dots\dots (16)$$

ここで分離係数 α は k_2'/k_1' である。式(16)の第一項は分離効率、第二項は分離選択性、第三と第四項で保持性能を表している。

3.4 キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)

CGEはキャピラリーにゲルを充填して行う電気泳動で、分離原理は1・2・2項で説明した。平板ゲルのスラブゲル電気泳動では、電圧を印加した際のジュール熱の発生により、高電圧の付加が不可能であったり（一般には200V程度まで）、バンドの拡散などが生じて分離効率が大きく低下したりする。一方、CGEだけに限らずCE全般においては、効率的に熱を放散させられるため、高電圧（最大30kV）を印加できる。この高電圧印加により高効率かつ高速な分離が可能であることがCGEの大きな利点である。

ゲルマトリクスとしては、架橋ポリマーとしてポリアクリルアミドゲルが良く使用される。これはスラブゲル電気泳動と同様であるが、固定化ゲルの場合、EOFは完全に抑制される。あるいは非架橋ポリマー溶液を圧力充填する手法もよく用いられている。ポリマーとしてはポリアクリルアミド、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、デキストラン、アガロースなどが用いられる。ゲル細孔径は実験条件によって1nm程度まで制御可能である。検出は用途により、UV/Vis, LIF, MSなどが用いられる。

CGEは、 μ_{ep} が同程度であり、分子量あるいは分子の相対的な大きさの違いで分離をしたい場合に有力な分離様式である。分析対象となる物質はタンパク質、ペプチド、DNA、RNAおよびオリゴヌクレオチドなどの生体高分子が主である。分離原理から q/a が同じであれば、小さい分子が最も速く移動し、大きい高分子は最も遅く移動する。CGEは、スラブゲルのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動と比べて試料導用量が少なく済み、より短時間で同等以上の分離を示すため、分析法として有

用である。一方で、CGEの欠点としては、その試料導用量の少なさから回収・精製には不向きである点が挙げられる。

3.5 キャピラリー等電点電気泳動 (cIEF)

cIEFはチューブゲル電気泳動で用いられる等電点電気泳動(IEF)をキャピラリーで行うものであり、原理自体はIEFと変わらないため、ここではごく簡単に述べるに留める。IEFはタンパク質やペプチドの等電点 pI の差異に基づいて物質の濃縮と分離を同時に達成する手法である。試料と pI 値の異なる両性電解質の混合物（ポリマーを含む）を充填することで pH 勾配を分離場に形成する。その結果、試料はそれぞれ pI 位置まで泳動し濃縮（フォーカシング）される。これを、EOFを抑制したキャピラリー中で行うのがcIEFである。cIEFはチューブゲル電気泳動と異なり、フォーカシング後に検出器までタンパク質ゾーンを移動させることが必要である。そこで、フォーカシング後に泳動液を塩溶液（あるいは酸、塩基溶液）に置換して電圧を印加する手法がある。これにより、 pH 勾配をなくしてタンパク質に実効電荷を与えることで検出器までフォーカスされたゾーンを移動させることができる。他にも圧力やEOFで送液する方法もある。また、キャピラリー全体をイメージングする方法なども開発されている。cIEFは0.005 pI 単位の差異でも分離できるとされ、様々なタンパク質の分析、アイソフォームの分析、 pI の測定に用いられる。

3.6 CEを用いる実際法

CZEは基本的にすべてのイオン性化合物に適用可能である。金属イオン、有機イオン、無機イオン、タンパク質等への応用が多い。実際法としては、めっき液の分析（金属イオン、無機陽イオン、有機酸、無機陰イオン）にはCEが欠かせないものとなっている（図2）。

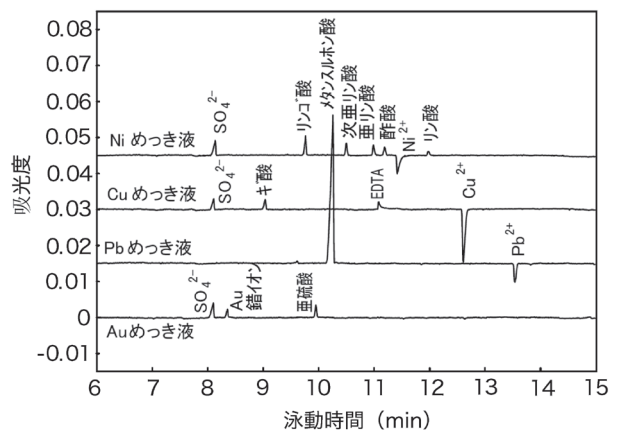


図2 無電解めっきのCZEの例
大塚電子株式会社から提供。

汎用的な直接および間接吸光検出が用いることができ、めっき液試料は希釈してCEに直接導入可能である。前処理が要らず、短時間でめっき液分析が可能な手法は、現在のところCEのみである。また、環境試料や工業排水試料などの金属イオン、陰イオン分析としてもCZEは有用である。米国環境保護庁（EPA）（SW-846 Test Method 6500）⁶⁾やASTM規格（ASTM-6508）の水試料中の陰イオン分析法にも採用されている。この方法は、クロム酸塩を泳動液に添加した間接吸光検出であり、飲料水、排水、地下水に対し、0.1~50 ppmの無機陰イオンを5分以内で分析可能である。他にも酒類などの食品中の有機酸や薬剤および麻薬成分のCE-MS分析など非常に多くの実際的な例がある。また、生体物質に対して公定法として定められたCZEの例としては、米国薬局方（USP）のヘパリンの分析がある。この方法ではブタ由来のヘパリンナトリウムを酸性条件下のリン酸緩衝溶液を泳動液として紫外吸光検出している。

実用レベルでの生体物質分離という点では、メタボロミクス（代謝物質の網羅的分析）においてCE-MSが欠かせない手法である。代謝物としては、アミノ酸、アミン、核酸塩基、ヌクレオシド、有機酸（リン酸化物を含む）、ヌクレオチド、ニコチンアミド、ケトン体等と非常に多くのもに対して適用可能である。これはCEのイオン性化合物に対する高い空間分離能とMSの物質同定能が組み合わさったことで網羅的分析が可能となった代表例である。

薬剤のCE分析例としては、ゾルミトリプタンやロピバカイン塩酸塩（*S*-エナンチオマー）の純度測定がUSPに掲載されている。これらの方法では共に β -シクロデキストリン（CD）類縁体を泳動液に添加し、*R*体との分離を達成している。ここでは包接化合物であるCD類縁体がキラル認識試薬（キラルセレクター）として用いられている。このような分離様式はCDCEとも呼称される。

CGEの実際的な利用法としては、DNA配列の決定法（シーケンシング）が欠かせない。これによりサンガーシーケンスの自動化が可能となり、ヒトゲノム計画や2001年アメリカ同時多発テロ事件におけるワールドトレードセンター倒壊後の遺留物の特定などに寄与することとなった（本稿ではサンガー法については触れない）。次世代シーケンス（NGS）が主流となった現在でも幾つかの会社でシーケンス用の機器として販売、あるいはシーケンス委託業務に使用されている。また、近年ではCGEは抗体薬（図3）やmRNAワクチンの品質管理法としても利用されている。mRNA分析についてはUSPにも記載されている。この方法では1.3 MDaの1%ポリビニルピロリドンポリマーマトリクスとして用い、RNAをUV検出あるいは蛍光染色試薬存在下でLIF検出する。2020年に始まったコロナウィルスの

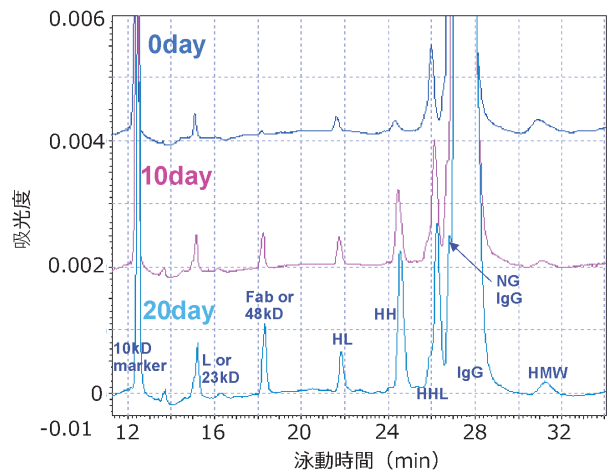


図3 IgG抗体TrastuzumabのCGEによる加速試験の例
株式会社イービー・サイエックスから提供。

パンデミック以降のmRNAワクチンの需要を考えると重要な手法の一つとなるであろう。

4 その他のCE技術

4.1 オンキャピラリー濃縮法

CEの低感度を解決するために多くのオンキャピラリー濃縮法が開発されている。オンキャピラリー濃縮法は公定法等に記載されている例は少ないものの、実試料を計測可能な手法が幾つも開発されている⁷⁾。ここでは代表的な濃縮法を簡単に紹介する。

電場増幅試料注入法（FASI）⁸⁾と電場増幅試料スタッキング（FASS）法⁹⁾は類似の原理の濃縮法である¹⁰⁾。試料の電気伝導率（抵抗）が泳動液の伝導率よりも著しく低い場合には、電圧を印加した際にそのゾーンに対して大きな電場勾配が生じる。よって試料中のイオンは加速して泳動するが、高伝導率な泳動液ゾーンとの境界で電場勾配が小さくなり失速する。つまり、試料と泳動液の境界線にイオンが積み重なっていく。これをスタッキングと呼ぶ。このスタッキングを試料注入の際に行うのがFASIである。一方、低電気伝導率な試料を圧力注入し、泳動中にスタッキングするのがFASSである。FASSでは泳動時に試料と泳動液の緩衝溶液が混合され、自動的にCZE分離モードに移行する。これらの手法では千倍近くの濃縮効果が得られるときがあるが、試料の電気伝導率に濃縮倍率が左右される。また、各ゾーンでのEOFが異なりピークが歪むため、分離の再現性にも問題が生じることがある。

電気伝導度の違いによる濃縮を原理としながらもCEとしては大容量の試料体積を正確に導入できる方法に大量試料注入スタッキング（LVSS）がある¹¹⁾。試料をキャピラリーチューブ全体に導入し、EOF反転剤の存在下でキャピラリー入口方向へとスタッキングする。試料のほとんどが濃縮され、キャピラリー内が泳動液で満

たされると同時に自動的に EOF が反転し、通常の CZE モードへと移行するという手法である。他にも pH ジャンプによる移動度の変化で境界にスタッキングする動的 pH ジャンクション法もある¹²⁾。この方法では、試料と泳動液とで異なる pH を設定することで、(酸解離反応などに基づき) 試料ゾーンでの移動度が、泳動液での移動度よりも非常に大きい分析対象物質に対して、試料ゾーンと泳動液との境界面での濃縮が可能である。

また、過渡的等速電気泳動 (tITP) 法という方法もある¹³⁾。ITP は、濃縮したい標的イオン (S) を含むゾーンを、標的よりも $|\mu|$ の大きいリーディングイオン (LI) と $|\mu|$ の小さいターミナルイオン (TI) を含むゾーンで挟み込んで電気泳動する方法である。この時、 $TI > S > LI$ の順序で泳動し、各イオンは混ざり合わずに移動し、試料ゾーンの S が濃縮されて最終的には等速で移動する定常状態となる。LI, S, TI を順次圧力注入して、泳動初期に ITP 濃縮を起こし、泳動が進むにつれ泳動液が混合し CZE 分離に過渡的に移行させるオンキャピラリー濃縮-分離法が tITP である。tITP は様々なイオン性化合物に適用可能であり、数桁の濃縮が可能である。日本においても、FASI と tITP を結合し、金属イオンに対し約 3000 倍の濃縮を達成した electrokinetic supercharging 法¹⁴⁾ や tITP と LVSS 法を組み合わせ、糖鎖分子を約 2000 倍濃縮し、超高感度 CE-LIF, CE-MS 検出を達成した LDIS 法¹⁵⁾ など、多くの実際的な手法が開発されている。

MEKC のように擬固定相との分配を利用したオンキャピラリー濃縮法にスウィーピング法がある¹⁶⁾。スウィーピングでは、通常 EOF は抑制しておき、大容量の試料を注入した後、キャピラリー入口から荷電ミセルを泳動させる。試料分子はミセルに強く分配し試料ゾーンとミセルゾーンの境界に濃縮される。濃縮後は通常の MEKC モードで分離がなされる。スウィーピングが用いられる系では数千倍に及ぶ濃縮も可能である。

4・2 CE による化学平衡・速度計測法

CE は分離定量法としてだけでなく、反応解析法としても応用できる。オンキャピラリーでの早い動的平衡にある反応 (酸解離平衡や錯形成平衡) であれば、対象物質の μ_{cp} の pH あるいは錯形成試薬濃度の依存性を CZE 測定することで、平衡定数を得ることができる。CE 分離のタイムスケールに対して反応速度が遅い場合には、CZE で生成物と反応物に分離してそれらの濃度を定量して平衡定数を求められる。平衡解析における CE の利点は、不純物や分解物が系に存在する場合や、分光学的にシグナルを分離できない反応系でも、正確な物理化学定数を決定可能な点である¹⁷⁾。

反応速度の CE 解析も行われている。金属錯体の解離反応速度に対して、キャピラリー電気泳動反応器 (CER)

が報告されている。CER ではキャピラリー壁の ξ 電位¹⁸⁾ あるいは電圧¹⁹⁾ を制御し、泳動時間 (= 反応時間) を制御し、標的分子のピーク強度の変化を観測する。また、DNA とタンパク質の相互作用解析に用いられる平衡混合物の非平衡 CE 法 (NECEEM 法) では、生成物と反応物のピーク、およびピーク間に生じるブリッジ部分を解析することにより、平衡定数と速度定数を一度の計測で決定できる²⁰⁾。また、モーメント理論に基づくピーク解析により、比較的高速な反応 (秒オーダー) に対する分子間相互作用の速度定数の決定法も報告されている²¹⁾。類似の平衡および速度解析手法は HPLC でも開発されているが²²⁾、CE を用いる利点は、固定相を必要としないため、1) 単純な系での正確な測定が可能であること、2) 固定相と相互作用する生体物質の変性を起こさずに正確に計測できること、3) 反応前後で電荷に少しでも違いが生じれば測定可能であることである。

5 最後 に

最初の項で CE の特長を述べたように、最後に CE 法の短所を述べておく。現在でも CE は HPLC と比べると再現性が低いことは否めない。HPLC ではピーク面積の精度は 1 % 以内のこともしばしばあるが、CE では 5 % 以内を確保できるというところであろう。

一方、近年の CE 研究に目を移すと、分離においては分子だけでなくより大きな粒子 (細菌細胞²³⁾²⁴⁾、動物細胞²⁵⁾、細胞内小器官²⁶⁾²⁷⁾ やナノ粒子²⁸⁾²⁹⁾ の分離にも有効であることが示されている。また、反応解析法の発展形としては分子認識能を有する核酸 (アプタマー) の *in vitro* 選抜にも応用されており^{30~32)}、分子発見器としての役割も果たしている。この様に CE 研究は多様な方向へのさらなる展開を見せている。

CE 研究に取り掛かりたい場合には、日本には多くの CE 研究者がいるので、コンタクトすることも一つの方法である (本稿では日本人研究者の論文も多く引用した)。本稿を読んで CE についてより詳細な知識を得たければ比較的平易な日本語の参考書も出版されている³³⁾³⁴⁾。また、最新の研究動向を知りたい場合には、日本分析化学会の電気泳動セッション (年会と討論会の年二回) や電気泳動懇談会主催のキャピラリー電気泳動シンポジウム (年一回) で様々な新規手法の取り組みが毎年報告・討論されている。また、電気泳動研究懇談会の HP も参照されたい³⁵⁾。

文 献

- 1) A. G. Ogston : *Methods Protein Separation*, 2, 145 (1958).
- 2) A. G. Ogston, B. N. Preston, J. D. Wells : *Proc. R. Soc. Lond. A*, 333, 297 (1973).
- 3) G. Cobbs : *Biophys. J.*, 35, 535 (1981).
- 4) P. J. Gennes : *J. Chem. Phys.*, 55, 572 (1971).
- 5) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando :

- Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- 6) SW-846 Test Method 6500: Dissolved Inorganic Anions in Aqueous Matrices by Capillary Ion Electrophoresis.
 - 7) M. C. Breadmore, M. Dawod, J. P. Quirino : *Electrophoresis*, **32**, 127 (2011).
 - 8) X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare : *Anal. Chem.*, **60**, 375 (1988).
 - 9) R. L. Chien, D. S. Burgi : *J. Chromatogr.*, **559**, 141 (1991).
 - 10) 富士恵一, 竹田さほり : *ぶんせき (Bunseki)*, **2006**, 52.
 - 11) M. C. Breadmore, P. R. Haddad : *Electrophoresis*, **22**, 2464 (2001).
 - 12) P. Britz-McKibbin, D. D. Y. Chen : *Anal. Chem.*, **72**, 1242 (2000).
 - 13) M. Urbánek, L. Krivánková, P. Boček : *Electrophoresis*, **24**, 466 (2003).
 - 14) 廣川 健, 岡本 光, 徐中其, 育田夏樹 : *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **52**, 1069 (2003).
 - 15) T. Kawai, N. Ota, A. Imasato, Y. Shirasaki, K. Otsuka, Y. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **1565**, 138 (2018).
 - 16) J. P. Quirino, S. Terabe : *Anal. Chem.*, **71**, 1638 (1999).
 - 17) T. Takayanagi, M. Amiya, N. Shimakami, T. Yabutani : *Anal. Sci.*, **31**, 1193 (2015).
 - 18) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi : *Anal. Chem.*, **72**, 4812 (2000).
 - 19) S. Saito, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi : *Anal. Sci.*, **16**, 1095 (2000).
 - 20) M. Berezovski, S. Krylov : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13674 (2002).
 - 21) K. Miyabe, R. Takahashi, Y. Shimazaki : *Anal. Sci.*, **31**, 1019 (2015).
 - 22) 渋川雅美 : *ぶんせき (Bunseki)*, **2017**, 140.
 - 23) D. W. Armstrong, G. Schulte, J. M. Schneiderheinze, D. J. Westenberg : *Anal. Chem.*, **71**, 5465 (1999).
 - 24) S. Saito, T. Massie, T. Maeda, H. Nakazumi, C. L. Colyer : *Anal. Chem.*, **84**, 2454 (2012).
 - 25) K. Hirose, M. Tsuchida, H. Asakura, K. Wakui, K. Yoshimoto, K. Iida, M. Sato, M. Shibukawa, M. Suganuma, S. Saito : *Analyst*, **142**, 4030 (2017).
 - 26) G. Wolken, E. A. Arriaga : *Anal. Chem.*, **86**, 4217 (2014).
 - 27) C. F. Duffy, S. Gafoor, D. P. Richards, H. Admadzadeh, R. O' Kennedy, E. A. Arriaga : *Anal. Chem.*, **73**, 1855 (2001).
 - 28) F.-K. Liu : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 9034 (2009).
 - 29) T. Takayanagi, K. Miyake, S. Iwasaki, D. Uehara, H. Mizuguchi, H. Okabe, N. Matsuda : *Anal. Sci.*, **38**, 1199 (2022).
 - 30) S. D. Mendonsa, M. T. Bowser : *Anal. Chem.*, **76**, 5387 (2004).
 - 31) S. Saito, T. Sakamoto, N. Tanaka, R. Watanabe, T. Kamimura, K. Ota, K. R. Riley, K. Yoshimoto, Y. Tasaki-Handa, M. Shibukawa : *Chem. Eur. J.*, **27**, 10058 (2021).
 - 32) K. Wakui, T. Yoshitomi, A. Yamaguchi, M. Tsuchida, S. Saito, M. Shibukawa, H. Furusho, K. Yoshimoto : *Mol. Ther. Nucl. Acids*, **16**, 348 (2019).
 - 33) 日本分析化学会編 : “電気泳動分析”, 初版, (2010), (共立出版).
 - 34) 前田耕治, 安川智之, 床波志保 : “機器分析ハンドブック 2 高分子・分離分析編”, 初版, (2020), (化学同人).
 - 35) 電気泳動研究懇談会 : (<https://www.jsac.or.jp/~den-ei/SCE-homepage/>), (accessed 2023. 6. 26).



齋藤 伸吾 (Shingo SAITO)

埼玉大学大学院理工学研究科 (〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255). 東北大学大学院工学研究科博士後期課程応用化学専攻. 博士 (工学). 《現在の研究テーマ》電気泳動を含む分離分析法による新規機能性分子の創出. 《主な著書》“ベーシックマスター 分析化学”, (オーム社). 《趣味》ラーメン食べ歩き, ギター.

『ぶんせき』再録集 vol. 1 出版のお知らせ

ぶんせき誌の過去記事の有効利用の一環として、『ぶんせき』再録集 vol. 1 が出版されました。2011年から2020年まで、10年間分の〈ミニファイル〉の記事が詰まっています。

下記10章からなり、それぞれ12から14の話題が集められています。

1. 実験器具に用いられる素材の特徴, 2. 分析がかかわる資格, 3. 顕微鏡と画像データ処理, 4. 最新のweb文献検索データベース, 5. ポータブル型分析装置, 6. 分析化学と材料物性, 7. 分析化学者のための多変量解析入門, 8. 土壌分析, 9. サンプルング, 10. 前処理に必要な器具や装置の正しい使用方法。

本書はアマゾンオンデマンド出版サービスを利用して出版した書籍ですので、書店には並びません。アマゾンサイトからのネット注文のみとなりますので、ご注意ください。詳しくは「ぶんせき」誌ホームページをご確認ください。