

21. 遺伝子解析による微生物の迅速同定法

本法は、医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において検出される微生物（細菌及び真菌）を遺伝子解析法によって種又は属レベルで同定又は推定する手法を示す。無菌試験や無菌製造工程で検出された汚染微生物の同定は、汚染原因の究明に役立つ。また、医薬品製造区域や医薬品原料等から検出される微生物の種類についての知見は、微生物学的に安全な医薬品を製造する上で重要である。微生物の同定法は、微生物固有の形態や生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせて、分類階級の上位から下位に進めていく表現形質解析法が広く用いられてきた。表現形質による微生物同定用キットも数多く市販されているが、医薬品製造原料や環境から検出される微生物の中には、同定できないものも多い。また、表現形質による同定法は、一般に専門知識が必要な上、結果の判定が客観性に欠ける恐れがある。微生物の進化の歴史はリボソーム RNA (rRNA) に記録されているとされており、近年の微生物分類学ではこの記録をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されている。本法は、細菌については、16S rRNA の高度可変領域の一部、真菌については 18S rRNA と 5.8S rRNA 間のスペーサー領域 (ITS1) の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合することによって微生物を迅速に同定又は推定する手法を示す。なお、本法は他の同定法にとって替わるものではない。また、本法に示した方法は、用いる装置や材料、実施者の経験などによって変更可能である。

また、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能である。

装置

(1) DNA 自動解析装置

DNA の塩基配列を読み取る（シーケンスする）装置で、ゲル板法やキャピラリー法など、種々の機種がある。

(2) DNA 増幅装置

被検菌の標的 DNA の増幅 (PCR) に用いる。また、PCR 産物をシーケンシング試薬で標識するためにも用いる。

操作法

以下、操作法の一例を示す。

1. 鋳型 DNA の調製

同定対象とする細菌又は真菌は純培養されていることが重要である。被検菌が集落の場合は、1.5 mL 遠心チューブに被検菌処理液を 0.3 mL 入れ、これに滅菌竹串などで集落の一部（カビの場合は、ごく少量）をとり懸濁させる。被検菌が液体培養物の場合は、1.5 mL 遠心チューブに培養物を 0.5 mL とり、10000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去し、残留物に被検菌処理液を 0.3 mL 入れて懸濁させる。ヒーターを用いて懸濁液を 100℃ で 10 分間加熱する。細菌、酵母類は一般に、加熱処理物でも PCR はかかるが、カビは加熱処理後、攪拌機や超音波処理で菌体を破壊した上で DNA 抽出を行った方がよい。

2. PCR

PCR 反応液に加熱処理した菌液の上清又は DNA 抽出物を 2 μ L 加え、細菌の場合は 10F/800R プライマーセット、真菌の場合は ITS1F/ITS1R プライマーセットを添加して以下の条件で PCR を行う。94℃, 30 秒 → 55℃, 60 秒 → 72℃, 60 秒の反応を 30 サイクル。細菌の場合は約 800 bp, 真菌の場合は菌種により約 150 ~ 470 bp の DNA 断片が増幅生成する。PCR を行う際には、陰性対照（菌液の代わりに水）を置くこと。

3. PCR 産物の検出

反応終了後の PCR 液 5 μ L を 1 μ L のローディング緩衝液と混合し、1.5 w/v% アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液を用いて電気泳動する。この際、適当な DNA サイズマーカーも並行して泳動する。泳動後、トランスイルミネーター（主波長：312 nm）で観察し、鮮明な 1 本の標的サイズバンドが得られていることを確認する。複数のバンドが確認された場合には、標的バンドを切り出し、適当な市販 DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出を行う。

4. PCR 産物の精製

未反応物（dNTP やプライマーなど）を除去するための方法としてはいろいろある。採用する方法のプロトコルに従って精製する。

5. 精製 DNA の定量

精製 DNA 量を分光光度計で測定する場合には、

1 OD_{260 nm} = 50 μ g/mL で換算する。

6. 精製 PCR 産物の標識

DNA 解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シーケンシング試薬を用い、PCR 産物を標識する。

7. シーケンシング反応物の精製

1.5 mL 遠心チューブに薄めたエタノール（7 → 10）を 75 μ L 入れ、反応終了物を移す。氷中に 20 分間

放置後、15000 rpm で20分間遠心する。遠心終了後、上清を除去し、薄めたエタノール（7 → 10）250 μ L を加え、15000 rpm で5分間遠心する。上清を除去し、乾燥させる。

8. 塩基配列の解析

DNA 解析装置やシーケンス試薬に合った方法で処理した試料を DNA 解析装置にセットし、塩基配列を読み取る。得られた塩基配列を BLAST 検索によりデータベースと照合する。

判定

一般に、得られた塩基配列とデータベースとが90%以上合致した場合、以下のように判定できる。

1. 細菌の場合は、10F プライマーで読み取った最初から50 ~ 350 領域の約300塩基を BLAST を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。
2. 真菌の場合は、ITS1F プライマーで読み取った領域を BLAST を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

試薬・試液

(1) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液, 0.5 mol/L

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g を水に溶かし、100 mL とする。

(2) トリス緩衝液, 1 mol/L, pH 8.0

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 24.2 g を水に溶かし、0.2 mol/L 塩酸試液を加え、pH を8.0に調整した後、水を加えて200 mL とする。

(3) TE 緩衝液

pH 8.0 の1 mol/L トリス緩衝液 1.0 mL に0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 0.2 mL を加えた後、水を加えて100 mL とする。

(4) 被検菌処理液

Triton X-100 を1 vol%含む TE 緩衝液を小分けし、使用時まで凍結保存する。

(5) PCR 反応液

10 倍緩衝液*	5 μ L
dNTP 溶液** (各 2.5 mmol/L)	4 μ L
10 μ mol/L センスプライマー	1 μ L
10 μ mol/L アンチセンスプライマー	1 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1 U/ μ L)	1 μ L
水	36 μ L

* 10 倍緩衝液

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3- プロパンジオール・塩酸 (pH 8.4)	100 mmol/L
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

** dNTP 溶液 (dGTP, dATP, dCTP, dTTP の等モル混合液)

dGTP (2'-デオキシグアノシン 5'-トリフォス フェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L
dATP (2'-デオキシアデノシン 5'-トリフォス フェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L
dCTP (2'-デオキシシチジン 5'-トリフォス フェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L
dTTP (2'-デオキシチミジン 5'-トリフォス フェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L

なお、これらの成分を有する適当な製品を記載に従って用いてもよい。

(6) シークエンシング試薬

シークエンシング方式には、プライマーを標識するダイプライマー (dye-primer) 法、dNTP ターミネーターを標識するダイターミネーター (dye-terminator) 法など、種々の方法がある。DNA 自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを使用する。

(7) TAE 緩衝液, 50 倍濃縮

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 242 g に酢酸 (100) 57.1 mL, 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 100 mL 及び水を加えて溶かし、1000 mL とする。

(8) 1 倍 TAE 緩衝液

使用時、50 倍濃縮 TAE 緩衝液を水で50倍に希釈したものを1倍 TAE 緩衝液という。

(9) アガロースゲル

アガロース 1.5 g に50倍濃縮 TAE 緩衝液 2.0 mL, 臭化エチジウム (3,8-diamino-5-ethyl-6-

phenylphenanthridinium bromide) 溶液 (1 → 100) 10 μ L, 及び水 100 mL を加えて加熱して溶かした後, 60°C に冷却し, アガロースゲルを調製する.

(10) ローディング緩衝液, 6 倍濃縮

プロモフェノールブルー 0.25 g, キシレンシアノール FF 0.25 g 及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 1.63 g を水 50 mL に溶かし, グリセリン 30 mL を加え, 水を加えて 100 mL とする.

(11) PCR 用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
真菌	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCTTCATCGATG-3'

22. キャピラリー電気泳動法

キャピラリー電気泳動法は、毛細管内の電解質液中に存在する荷電試料が直流電場の影響下で移動することに基いた物理的な分析法である。

電場 E における移動速度は、試料の電気泳動移動度と毛細管内の緩衝液の電気浸透移動度により決まる。電気泳動移動度 μ_{ep} は試料の特性（電荷、分子の大きさや形）と緩衝液の特性（電解液の種類とイオン強度、pH、粘性及び添加剤）に依存する。球形を想定した物質の電気泳動速度 v_{ep} は、次式により与えられる：

$$v_{ep} = \mu_{ep}E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r}\right)\left(\frac{V}{L}\right)$$

q ：粒子の有効電荷

η ：緩衝液の粘度

r ：溶質イオンの Stokes 半径

V ：電圧

L ：毛細管の全長

緩衝液で満たされた毛細管に電圧を印加すると、電気浸透流と呼ばれる溶媒の流れが毛細管内に発生する。電気浸透流の速度は毛細管内壁の電荷密度及び緩衝液の特性に依存する電気浸透移動度 μ_{eo} により決まる。電気浸透速度は次式により与えられる：

$$v_{eo} = \mu_{eo}E = \left(\frac{\varepsilon\xi}{\eta}\right)\left(\frac{V}{L}\right)$$

ε ：緩衝液の誘電率

ξ ：毛細管内壁のゼータ電位

試料の移動速度 (v) は次式により与えられる：

$$V = v_{ep} + v_{eo}$$

試料の電気泳動移動度と電気浸透移動度は試料の電荷により、同方向あるいは反対方向に働く。通常のキャピラリー電気泳動法では陰イオンは電気浸透流と逆方向に泳動され、移動速度は電気浸透流より遅い。陽イオンは電気浸透流と同方向に泳動され、移動速度は電気浸透流より速い。試料イオンの電気泳動速度と比べて速い電気浸透流が存在する条件下では、陽イオン、陰イオンの両者を一斉分析することが可能である。

毛細管の試料導入末端から検出部までの距離（有効長、 l ）を試料が移動するのに要する時間 (t) は、次式により与えられる：

$$t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \times L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}$$

通常、内面未処理の溶融シリカ毛細管は、pH 3 以上で内壁に存在するシラノール基が解離することにより負電荷を帯びる。したがって、陽極側から陰極側へと向かう電気浸透流が発生する。試料の移動速度において高い再現性を得るために電気浸透流を一定に保つ必要がある。分析の目的によっては、毛細管の内壁を修飾したり、緩衝液の濃度、組成及び pH を変えることにより電気浸透流を抑制することが必要な場合がある。

試料導入後、各試料成分イオンは、それぞれのゾーンとして電気泳動移動度に応じて電解質内を移動する。ゾーンの分散、すなわちそれぞれの試料バンドの広がりはいろいろな現象によって起こる。理想的な条件では試料ゾーンの広がりに対する唯一の原因は毛細管に沿った方向への試料成分の分子拡散（軸方向拡散）である。理想的な場合のゾーンの分離効率、理論段数 (N) として次式により表される：

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times l}{2 \times D \times L}$$

D ：緩衝液中での試料の分子拡散

実際には、熱放散、毛細管壁への試料吸着、試料と緩衝液間の伝導率の不均一性、試料プラグ（層）の長さ、検出セルのサイズ、泳動液槽の水位差等も、ゾーンの広がりの原因となりうる。

二つのバンド間の分離（分離度 R_S として表される）は、試料の電気泳動移動度、キャピラリー内に発生する電気浸透移動度を変更して各試料イオンのゾーンの分離効率を向上することにより達成される。

$$R_S = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}$$

μ_{epa} 及び μ_{epb} : 分離した2種類の試料イオンの電気泳動移動度

$\bar{\mu}_{ep}$: 2種類の試料イオンの電気泳動移動度の平均 ($\bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2}(\mu_{epb} + \mu_{epa})$)

装置

キャピラリー電気泳動装置は下記のものから構成される。

- (1) 電圧可変高電圧電源
- (2) 規定の陽極液及び陰極液を入れ、同じ水位に保持された二つの泳動液槽
- (3) 泳動液槽に浸され、電源に接続した一対の電極（陰極と陽極）
- (4) 光学検出用ウインドウを設けた分離用毛細管（通常熔融石英製）。毛細管の両端は泳動液槽中に置かれる。この毛細管は各条で規定する溶液で満たされる。
- (5) 適切な試料導入システム
- (6) 所定の時間に毛細管の検出部を通過する目的物質の量をモニターできる検出器。通常、紫外可視吸光度測定法あるいは蛍光光度法によるが、分離目的によっては電導度測定、電流測定あるいは質量分析による検出も有用である。紫外吸収あるいは蛍光性を持たない化合物には間接的な検出法が用いられる。
- (7) 再現性のよい分離が得られるように毛細管内の温度を一定に保つことのできる温度調節システムが勧められる。
- (8) レコーダー及び適切なインテグレーターあるいはコンピューター

注入操作とその自動化は正確な定量分析のために重要である。注入方法として、落差法、加圧法あるいは吸引法及び電気的な導入法がある。電気的に導入される各試料成分の量は、各々の電気泳動移動度に依存し、この試料導入法の採否を決定する要素となる。

各条に規定された毛細管、泳動液、毛細管の分析前処理法、試料溶液及び分析条件を用いる。分析中に検出を妨害したり、気泡が発生して通電が遮断されることを防ぐため、泳動液はろ過及び脱気を行う。泳動時間について、高い再現性を得るためには、各分析法において厳密な毛細管の洗浄手順を設定しておくべきである。

1. キャピラリーゾーン電気泳動法

キャピラリーゾーン電気泳動法では、対流を防ぐ支持体を含まない緩衝液のみを満たした毛細管内で試料を分離する。この方法では、試料中のそれぞれの成分が、異なる速度で不連続のバンドとして移動することにより分離が起こる。各バンドの移動速度は毛細管内での溶質の電気泳動移動度と電気浸透流に依存する（概論参照）。シリカ表面に吸着しやすい物質の分離能を高めるために内面修飾された毛細管も使用できる。

本分離モードを用いて、低分子試料 ($M_r < 2000$) ならびに高分子試料 ($2000 < M_r < 100000$) を分析できる。キャピラリーゾーン電気泳動法の高い分離効率により、質量電荷比がわずかしか異ならない分子間の分離も可能となる。この分離法ではキラルセクター (chiral selectors) を分離用緩衝液に加えることによってキラル化合物の分離も可能となる。

分離の最適化

複数のパラメーターが分離に関与する場合には、分離条件の最適化が複雑になる。この分離法の条件設定では、機器及び電解質溶液が主要なパラメーターである。

機器に関するパラメーター

(1) 電圧 印加電圧及びカラム温度の決定には、ジュール熱プロットが有用である。分離時間は印加電圧に反比例する。しかし、電圧を上げると過剰な熱が発生し、毛細管内部の緩衝液の温度が上昇し泳動液の粘度にむらが生じる。結果としてバンドが広がり、分離度を低下させる。

(2) 極性 電極の極性については通常の電圧印加（試料導入側が陽極、廃液側が陰極）で、電気浸透流は陰極側へ流れる。極性を逆にした場合には電気浸透流は廃液側から導入側へ向かって発生し、電気浸透流よりも速い電気泳動移動度をもつ試料のみが検出部を通過する。

(3) 温度 温度の影響は主に、泳動液の粘度と導電率に対してみられ、移動速度に影響を与える。場合によっては毛細管温度の上昇がたん白質の立体構造を変化させ、それらの移動時間や分離効率が変化することもある。

(4) 毛細管 毛細管の寸法（長さ及び内径）は分析時間、分離効率及び試料容量に影響を与える。全長の増加は電場を減少（定電圧時）させ、有効長さ及び全長の増加により泳動時間が長くなる。緩衝液と電場が一定ならば、熱放散効率は毛細管内径により異なる。したがって、それによって起こされる試料バンドの拡散は毛細管の内径によっても変化する。また、使用する検出法にもよるが、内径が変わると試料導入量が増えるため、検出限界にも影響を及ぼす。

毛細管内壁への試料成分の吸着が分離効率を低下させるため、分離法の設定で吸着を防ぐ方法を考慮する必要がある。特にたん白質を試料とする場合、吸着を防ぐいくつかの方法が工夫されている。その方法として緩衝液組成の工夫（高あるいは低 pH や陽イオン性添加剤の内壁への吸着）をするだけでたん白質の吸着を防ぐ方法もある。その他、たん白質と負電荷を帯びたシリカ表面との相互作用を防ぐために、毛細管内壁を共有結合によりポリマーで被覆する手法がある。この目的のために、親水性の中性ポリマーや陽イオン性あるいは陰イオン性ポリマーで修飾された毛細管を入手することができる。

電解質溶液に関するパラメーター

(1) 緩衝液の種類と濃度 キャピラリー電気泳動法に適した緩衝液は、使用する pH 範囲内で適当な緩衝能を持ち、また、電流発生を最少に抑えることができる低移動性のものである。

可能ならば緩衝液イオンの移動度を溶質の移動度に合わせることで、ピーク形状のゆがみを最少にすることができる。分離効率を高め検出感度を向上するために、キャピラリー内において試料ゾーンの収束を図る上で、試料溶媒の種類も重要である。

一定の pH において緩衝液濃度を高くすると電気浸透流及び試料の移動速度は減少する。

(2) 緩衝液の pH 緩衝液の pH は、試料や添加剤の電荷及び電気浸透流に影響するので、試料の分離に影響を及ぼす。たん白質及びペプチドの分離において、緩衝液の pH を試料の等電点より高い pH から等電点より低い pH に変えることにより、試料の正味の電荷が負から正に変化することになる。一般に、緩衝液の pH を高めると電気浸透流は速くなる。

(3) 有機溶媒 試料あるいは泳動液添加剤の溶解度を高めたり、あるいは試料成分のイオン化度を変えるために水性緩衝液に有機溶媒（メタノール、アセトニトリルなど）を添加する場合がある。一般にこれらの有機溶媒の緩衝液への添加は電気浸透流を低下させる。

(4) キラル分離のための添加物質 光学異性体を分離するためには、泳動液にキラルセクターを添加する。最も一般的に用いられるキラルセクターはシクロデキストリン類であるが、クラウンエーテル類、多糖類あるいはたん白質が使用される場合もある。光学異性体の認識はキラルセクターとそれぞれの鏡像異性体との相互作用が異なることによるため、その分離度は用いるキラルセクターの種類により著しく異なる。内腔の大きさの異なるシクロデキストリン類（ α 、 β 、 γ シクロデキストリン）、あるいは中性基（メチル、エチル、ヒドロキシアルキルなど）又は極性基（アミノメチル、カルボキシメチル、スルホブチルエーテルなど）を持つシクロデキストリン類を用いることができる。修飾シクロデキストリンを使用するとき、製品間で修飾率にバラツキがあるため、キラル分離に影響を及ぼすことがあるので、注意する必要がある。キラル分離で分離度に影響を与えるその他の因子として、キラルセクターの濃度、緩衝液の組成と pH、及び分析温度がある。メタノールあるいは尿素のような有機系添加剤の使用も分離度に影響を与える。

2. キャピラリーゲル電気泳動法

キャピラリーゲル電気泳動法では、分子ふるい効果を持つゲルを充てんした毛細管内で分離が行われる。類似した質量電荷比を持つ分子において、分子サイズの小さい成分が大きい成分よりもゲルのネットワーク内を自由に移動できることから、小分子が大分子よりも速い速度で泳動されることで分離が達成される。キャピラリーゲル電気泳動法は類似した質量電荷比を持つ生体高分子（例えばたん白質及び DNA 断片）をそれらの分子量に従って分離できる。

ゲルの特徴

二種類のゲルが用いられる。架橋型ゲルと非架橋型ゲルである。架橋されたポリアクリルアミドゲルのような化学ゲルは、毛細管内でモノマーを重合させて調製する。通常ゲルは溶融シリカ内壁と結合しているため、毛細管を破壊しないかぎり取り去ることはできない。ゲルを還元条件下でたん白質の分析に使用するとき、泳動液は通常ドデシル硫酸ナトリウムを含み、試料を導入する前にドデシル硫酸ナトリウムと 2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトールの混液と加熱して変性させる。非還元的条件の分析（例えば不変性の抗体）では、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトールを使用しない。架橋ゲル中での分離において（キャピラリーゾーン電気泳動法の項で述べたように）、泳動液の調節やゲル調製時のアクリルアミドの濃度や架橋剤の比率を変更してゲルのポアサイズを調節することによって最適化できる。一般に、ポアサイズが小さい場合は試料の移動度も小さくなる。ゲルは強固なため試料導入は電気的方法を利用する必要がある。

流動性（非架橋型）ゲルとして、直鎖ポリアクリルアミド、セルロース誘導体、デキストランなどの水溶性ポリマーも分子ふるい効果をもつ。これらの分離媒体は、架橋型ポリマーと比べて調製が容易である。バイアル中で調製し、電気浸透流が発生しないように内壁が修飾された毛細管に圧力によって充て

んすることができる。一般に試料を導入する前にゲルを交換することにより分離の再現性は高くなる。高分子量のポリマー（一定の濃度で）を使うか、ポリマー濃度（一定の分子量で）を低くすることで、ゲルのポアサイズを大きくすることができる。ゲルのポアサイズを小さくすると同一緩衝液では試料の移動度は小さくなる。これらのポリマーは緩衝液に溶解しても粘性は低いので、試料の導入は落差法及び電氣的導入法のいずれでも行える。

3. キャピラリー等電点電気泳動法

等電点電気泳動法では、分離緩衝液に溶解した広範囲の等電点 (pI) を持つ両性電解質 (ポリアミノカルボン酸) により形成された pH 勾配中で、試料分子はその pI 以外のところでは電荷を持つため電場の影響下で移動する。

等電点電気泳動法の三つの基本的なステップは、試料添加 (loading)、集束 (focusing) 及び移動 (mobilization) である。

(1) 試料添加 二つの方法を利用できる。

(i) ワンステップ添加：試料を両性電解質と混和し、加圧又は吸引により毛細管に導入する。

(ii) 連続的な添加：リーディング緩衝液 (leading buffer)、両性電解質、両性電解質と混和した試料、両性電解質、最後にターミナル緩衝液 (terminating buffer) の順に毛細管に導入する。試料の容量は pH 勾配を乱さないように少量でなければならない。

(2) 集束 電圧を印加すると、両性電解質はそれぞれの電荷により陰極あるいは陽極へと移動し、陽極 (低い pH) から陰極 (高い pH) へ pH 勾配が形成される。同時に分離する成分は、それらの等電点 (pI) に対応する pH のところに移動し、集束すると電流が著しく低下する。

(3) 移動 分離した成分のバンドを検出部まで移動させる。三種の方法を利用できる：

(i) 第 1 の方法では、電気浸透流により集束中に成分移動が達成される。ただし、成分を集束させるために電気浸透流を小さくする必要がある。

(ii) 第 2 の方法では、集束終了後に圧力を用いて移動させる。

(iii) 第 3 の方法では、集束終了後に陰極又は陽極側の泳動液 (移動させたい方向により選択) に塩類を加えて電圧を印加すると毛細管中の pH が変化し、成分が移動する。pH が変化するにつれてたん白質と両性電解質は塩類を加えた液槽の方向へ移動し、検出器を通過する。

得られる分離は pH 勾配 (dpH/dx)、異なる等電点を持つ両性電解質の数、分子拡散係数 D 、電場の強さ E 及びその pH における試料の電気泳動移動度の変化 ($-d\mu/dpH$) から ΔpI により表すことができる。

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D \left(\frac{dpH}{dx} \right)}{E \left(-\frac{d\mu}{dpH} \right)}}$$

最適化

分離条件を決定する主要なパラメーターを以下に示す。

(1) 電圧 キャピラリー等電点電気泳動法では集束時に 300~1000 V/cm の高電場を利用する。

(2) 毛細管 試料を検出部まで移動させる方法 (上記参照) によっては電気浸透流を消失もしくは最小限に抑えなければならない。内面修飾された毛細管は電気浸透流を抑えるものが多い。

(3) 溶液類 陽極槽には等電点が最も酸性の両性電解質の等電点より低い pH の液を満たし、陰極槽には最も塩基性の両性電解質の等電点より高い pH の液を満たす。陽極側にはリン酸が、陰極側には水酸化ナトリウムがしばしば使用される。

両性電解質液にメチルセルロースのようなポリマーを添加すると、粘性が増すことによって対流や電気浸透流が抑制される。市販の両性電解質にはいろいろな pH 範囲のものがあり、広い pH 範囲が必要な時には、混和して使用する。広い pH 範囲は試料の等電点を推定するために用い、狭い範囲のものは測定精度を上げるために用いられる。標準たん白質マーカーの等電点と移動時間の関係から pH を校正することができる。

必要ならば、グリセリン、界面活性剤、尿素、両性イオン緩衝剤等を緩衝液に添加することにより等電点でたん白質が沈殿することを防ぐことができる。しかし、尿素は濃度によってはたん白質を変性させてしまう。

4. ミセル動電クロマトグラフ法 (MEKC)

ミセル動電クロマトグラフ法 (MEKC) では、臨界ミセル濃度 (cmc) 以上の濃度で界面活性剤を含む電解質溶液中で分離が行われる。試料分子は水性緩衝液とミセルからなる疑似固定相へ、試料の分配係数に基づいて分配される。したがって、この方法は電気泳動とクロマトグラフィーの両者の特徴を有する。MEKC は、キャピラリー電気泳動の効率、スピード及び装置への適応性を兼ね備え、かつ中性及び荷電した試料の両者の分離に利用できる電気泳動法である。MEKC で最も広く用いられる界面活性剤は陰イオン性のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) であるが、セチルトリメチルアンモニウム塩のような陽イオン性界面活性剤も

用いられる。

MEKC における分離のメカニズムは以下の通りである。中性及びアルカリ性 pH においては、強い電気浸透流が発生し、泳動液は陰極方向に移動する。SDS を用いると負電荷を持つミセルは電氣的に逆の陽極方向へ移動する。その結果、泳動液に比べてミセルの移動速度は遅くなる。中性物質の場合には、ミセルと水性緩衝液の間で分配が起こり、電気泳動されないため、その移動速度はミセルと水性緩衝液間の分配係数のみに依存する。電気泳動図において、中性物質由来のピークは常に電気浸透流マーカーのピークとミセルのピークの間が存在する（これらの二つのピーク間は separation window と呼ばれる）。電荷を持つ試料の場合、その移動速度はミセルと水性緩衝液間の分配係数とミセルが存在しない場合の電気泳動移動度との両者に依存する。

中性又は弱くイオン化した試料の MEKC における分離原理は本質的にはクロマトグラフィーであるので、試料の移動度と分離は試料の (k')、すなわちミセル中の溶質のモル数と移動相中のモル数の比である質量分布比 (D_m) で一般化することができる。

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K \frac{V_S}{V_M}$$

t_R : 試料の移動時間

t_0 : 保持されない物質の移動時間 (ミセルに取り込まれない電気浸透流マーカー、例えばメタノールの移動時間)

t_{mc} : ミセルの移動時間 (ミセルに常時取り込まれて、ミセルと共に移動するズダン III (Sudan III) のようなミセルマーカーの移動時間)

K : 試料の分配係数

V_S : ミセル相の容積

V_M : 移動相の容積

同様に、2 種類の隣接して移動する試料間の分離度 (R_s) は次式で得られる:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_b}{k'_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right) k'_a}$$

N : 一方の成分の理論段数

α : 選択性

k'_a, k'_b : 両成分の質量分布比 ($k'_b > k'_a$)

同様の関係から、電氣的に荷電した試料に対する k' 値及び R_s 値が得られる。

最適化

MEKC における分析条件を決定する際に考えられる主なパラメーターとして以下に示すものがある。

機器に関するパラメーター

(1) 電圧 分析時間は電圧に反比例する。しかし電圧を上げると熱を発生し、毛細管の断面で熱及び粘度の勾配が生じる。この効果はミセルを含むような高導電性の泳動液で著しく起こりやすい。熱放散が不十分な場合にはゾーンの拡散を引き起こし、分離度が低下する。

(2) 温度 毛細管の温度の変動は試料の緩衝液とミセルへの分配係数、臨界ミセル濃度及び泳動液の粘度に影響を及ぼす。これらのパラメーターは試料の移動時間に影響する。適切な冷却システムを用いることで試料の移動時間の再現性が改善される。

(3) 毛細管 キャピラリーゾーン電気泳動法におけるように、毛細管の寸法 (長さ及び内径) が分離時間及び分離効率に影響を与える。有効長さ及び全長を長くすると (定電圧下では) 電場が低くなり、移動時間が長くなるため分離効率が向上する。内径は (同一泳動液及び同一電場下で) 熱放散に関与し、結果として試料ゾーンの拡散に関わる。

電解質溶液に関するパラメーター

(1) 界面活性剤の種類と濃度 界面活性剤の種類はクロマトグラフィーの固定相と同様に分離の選択性を変えるので分離度に影響を与える。界面活性剤の濃度の増加に伴い、中性化合物の $\log k'$ 値は直線的に増加する。 k' が $\sqrt{t_m/t_0}$ 値に近づくと MEKC における分離度は最大に達するので、移動相中の界面活性剤の濃度が変わると分離度は変化する。

(2) 緩衝液の pH pH はイオン化していない試料の分配係数を変えないが、コーティングしていない毛細管中の電気浸透流を変化させる。MEKC において、pH が下がると電気浸透流が減少し、そのため分析時間

が長くなり、中性試料の分離度が向上する。

(3) 有機溶媒類 疎水性化合物の MEKC における分離を改善するため、電解質溶液にメタノール、プロパノール、アセトニトリルなどを添加することができる。これらの溶媒の添加により一般に移動時間及び分離の選択性が減少する。有機溶媒の添加は臨界ミセル濃度に影響を与える。有機溶媒濃度を高くするとミセル形成が阻害されるので、MEKC の分配メカニズムが失われるような高濃度では使用できない。高濃度の有機溶媒の存在によるミセルの消失が必ずしも分離を不可能にするということではなく、イオン性の界面活性剤モノマーと中性の試料との疎水性相互作用により電気泳動的に分離可能な親溶媒性の複合体が形成される場合もある。

(4) 光学分離用添加物質 MEKC で光学異性体を分離するためにはキラルセクターを界面活性剤と共有結合させたり、泳動液に添加するなどしてミセル分離系に加える。光学識別できる部位を持つミセルには *N*-ドデカノイル-L-アミノ酸塩、胆汁酸塩などがある。光学活性体の分離は、光学認識能のない界面活性剤を含む電解質溶液にシクロデキストリン類のようなキラルセクターを添加することによっても達成される。

(5) その他の添加剤 泳動液に化学物質を添加して、選択性を変更させる方法がいくつかある。数種のシクロデキストリン類を添加してミセルと疎水性試料間の相互作用を競合させ、選択性を高めることもできる。

ミセルに吸着する化合物を加えて試料とミセル間の相互作用を調節し、MEKC における分離を改善できる。これらの添加剤にイオン性あるいは非イオン性の他種の界面活性剤を添加して混合ミセルを形成したり、ミセルに溶けて試料と錯体形成が可能な金属陽イオンを加えることもできる。

定量分析

ピーク面積は、以下の理由から対応するピークの泳動時間で除することにより正しい面積を求める。

- (1) 分析ごとの移動時間の変動によるピークレスポンスの補正
- (2) 異なる泳動時間で観察される試料成分間のレスポンスの補正

内標準物質を使用する場合は、定量しようとする物質のピークが内標準物質のピークと重ならないことを確認する。

計算

得られた値から目的成分の含量を算出する。処方されている試料の場合は、測定しようとする一成分あるいは複数成分の含量%を、溶媒や添加剤以外の全ピークの補正した総面積に対する目的ピーク的面積%として求める。自動積分システム（インテグレーター又はデータ読み込み処理装置）の使用が推奨される。

適合性パラメーター

キャピラリー電気泳動システムのチェックには適合性パラメーターを使用する。これらのパラメーターは用いるキャピラリー電気泳動法の分離モードにより選択する。質量分布比 (k' 、ミセル動電クロマトグラフ法の場合のみ)、理論段数 (N)、シンメトリー係数 (A_s) 及び分離度 (R_s) がある。 N 及び R_s に関する理論的説明は上述の通りであるが、電気泳動図から次式によってこれらのパラメーターを算出することができる。

理論段数

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R : 目的成分のピークの移動時間又は試料導入点から目的成分のピークの頂点から垂直に下した点までのベースラインに沿った距離

w_h : ピークの半値幅

分離度

殆ど同じピーク高さを持つ 2 種類の成分間の分離度 (R_s) は次の式で表される。

$$R_s = \left(\frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \right)$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} , t_{R2} : 泳動時間又は試料注入点から隣り合う二つのピークのそれぞれの頂点から垂直に下した各線のベースラインに沿った各点までの距離

w_{h1} , w_{h2} : 各ピークの半値幅

一部分離しているピークの場合は二つのピーク間の谷の高さ (H_v) と小さい方のピークの高さ (H_p) を測定し、その比を計算して分離度を算出してもよい。

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

ピークの対称性

ピークの対称性を示すシンメトリー係数は次式により計算することができる：

$$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$ ：ピーク高さの 20 分の 1 におけるピーク幅

d ：ピーク頂点から垂直に下した点とピーク高さの 20 分の 1 におけるピークの立ち上がり部分との距離

面積の再現性（面積あるいは面積と移動時間の比の標準偏差）及び移動時間の再現性（移動時間の標準偏差）の試験を適合性パラメーターに加えるべきである。移動時間の再現性は、毛細管の洗浄操作の適合性の試験になる。移動時間の再現性が低い場合には、内標準物質との相対移動時間を用いて再現性を補うことができる。

標準試料に対する S/N 比を調べる（あるいは定量限界の測定）試験も有用である。

シグナルーノイズ比

検出限界値及び定量限界値はそれぞれ S/N 比 3 以上及び 10 以上に相当する。S/N 比は次式を用いて計算する。

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H ：規定の標準試料溶液で得られた電気泳動図中の目的成分に相当するピークの高さ、ピークトップから半値幅の 20 倍に相当する範囲から推定できるベースラインまでの距離を測定する。

h ：ブランクの注入後に得られた電気泳動図で、規定の標準試料溶液から得られた泳動図中のピークの半値幅の 20 倍に相当する時間範囲で、かつこのピークが現れる位置の前後の範囲を観察したときの、バックグラウンドの幅。