

Webで学ぶ

【雑話】 キャピラリー電気泳動序論

本資料の掲載情報は、著作権により保護されています。本情報を商業利用を目的として、販売、複製または改ざんして利用することはできません。

大塚電子株式会社

- | | | |
|--------|---|-------------------|
| ●大阪本部 | 〒540-0021 大阪市中央区大手通三丁目1番2号 エスリードビル大手通6F | TEL.(06)6910-6522 |
| ●東京支店 | 〒192-0082 八王子市東町1-6 橋完LKビル4F | TEL.(042)644-4951 |
| ●東北営業所 | 〒980-0021 仙台市青葉区中央2-2-10 仙都会館5F | TEL.(022)208-9645 |
| ●東海営業所 | 〒460-0008 名古屋市中区栄3-2-3 名古屋日興証券ビル4F | TEL.(052)269-8477 |
| ●九州営業所 | 〒810-0001 福岡市中央区天神1-9-17 福岡天神フコク生命ビル15F | TEL.(092)717-3338 |

ホームページ <http://www.otsukael.jp>

1.はじめに

“電気泳動”は伝導性の液体、したがって普通は水溶液、の中に存在するイオンが、電場を掛けられた場合に移動する現象です。それは、水溶液中の“電気伝導”と同じではないかと云われそうです。たしかに、電気泳動は電気伝導の一種であると云えるかも知れません。今日、電気泳動という概念を特徴づけているのは、そこで何かを行いたいという意志が働いていることではないでしょうか。つまり、イオンの移動を定量的に測定しよう、あるいは移動速度の違いによって、それらを分離・分析しようとしているのです。

ところで、私たちは“対流圏”に住んでいて、常に対流という現象から極めて大きな恩恵を受けています。しかし、“電気伝導”ではなく“電気泳動”を実現しようとする、対流ほど面倒なものはありません。

昔から、気体にせよ液体にせよ、厳密に対流なしの条件下で物性の測定を行うことは、非常に困難なことでした。その典型例の一つが“拡散定数”の決定でありました。厳密な恒温に保ったうえで、内部の状況を精密に測定する必要があったのです。この際に、二つのアプローチが行われております。一つは、溶液の方が密度が高いから下におき、密度が低い溶媒の方を上におき、両者の間に形成させた鋭い境界が、時間の経過とともに“ぼやけてゆく”のを観察する方式(I)でありました。もう一つは、キャピラリーを用いるものでした。“キャピラリー”という用語をつかいましたが、以前は“毛细管”あるいは“毛管”と呼ぶことが多かったようです。ここでは“キャピラリー”を用います。ここでは、二つの方式が試みられました。一つは多孔性の隔壁を用いる方式(IIa)であり、他は円筒状のキャピラリーを使用する方式(IIb)でありました。

方式Iでは対流の発生を、正直に真正面から防止しようとしたのに対して、方式IIではキャピラリーを用いることにより、簡便な対応で対流の発生を回避あるいは抑制したと云えるでしょう。方式IIaでは複雑に入り組んだキャピラリーが、方式IIbでは単純に真っ直ぐなキャピラリーが用いられました。

電気泳動の世界でも、19世紀初頭に始まって、20世紀の半ば過ぎ頃までは、方式Iに近いものが、幅をきかせていました。これを“自由境界電気泳動”と呼んでいましたが、今では博物館に行かないと装置を見ることはできません。その後、IIaの全盛時代を迎えて、今日にいたっています。これには、色々の方式が考えられましたが、今日でも元気なのは、“ゲル電気泳動”がそれです。IIbは、ようやく20年ほど前から実用性が評価されるようになり、また周辺環境もようやく整って、発展し始めました。それが、“キャピラリー電気泳動”です。ゲル電気泳動も、一種のキャピラリー電気泳動ではあるのですが、この名称は円筒型キャピラリーと、その系統を引く真っ直ぐな単純明解なキャピラリーを用いる方式の電気泳動に限って使われています。

2.ゲル電気泳動

狭い隙間では対流が起きにくいことは、随分と昔から知られていたことでしょう。表面、とくに親水性のもの、の近傍の水は非共有結合によって動きが拘束されています。液体には粘性というものがあり、これは<ずらす>作業に力を必要とすることを意味しています。パイプのような管の水なら、大部分は壁近傍の水とは無関係に流れます。しかし、キャピラリーのように狭い空間の中に満たされた水は、前述の壁近傍の水が錨の役割をするので、流動が大幅に拘束されます。シリカ、ゼラチン、あるいは寒天などのゲル、高分子を粉碎して作った微粒子を充填したカラム、濾（ろ）紙、これらの中の水が、そのような性質を示します。

それらの“隙間”を電気泳動の媒体にすることは、20世紀初頭から色々と試みられてきました。濾紙を用いる方式は一定の成果を示し、濾紙電気泳動が、一時期には広く用いられました。微粒子充填カラムは、隙間の比率が低いためでしょう、分解能が上がらず、速やかに見捨てられました。ゲルは網目構成物質の体積比率が低い点では、格段に優れていました。しかし、初期に使用されたゲルは吸着性が高いのが最大の欠点でありました。特に、シリカゲルは、シリカ微粒子が薄層クロマトグラフィーの担体として用いられていることから判るように、吸着性が強く、電気泳動の媒体としては使用に耐えるものではありませんでした。また、これらの狭い隙間においては、電気浸透流の発生が著しく、そのために実用できなかったものも多かったようです。

ゲル電気泳動を実用化に導いたのは、優れた素材、特にポリアクリルアミドゲルそしてアガロースゲルの開発でありました。そこでは、吸着と電気浸透の両難題が完全に近い形でクリアされていました。キャピラリー電気泳動の世界では、両者と常に向かい合うことが求められています。それらを押さえ込んだ、あるいは上手く利用したと思っても、いつ何時に悪戯（わるさ）を仕掛けてくるか判りません。用心深い心構えが求められます。ゲル電気泳動に慣れ親しんだ人が、キャピラリー電気泳動の世界に踏み込んだとき、最も戸惑うのは、吸着と電気浸透を忘れ去ることができないということでしょう。

ともかく、今はゲル電気泳動が全盛の時代を迎えています。特に、生化学や分子生物学の分野においては、ゲル電気泳動無しでは、研究が進められないと云うのが実状です。

3.キャピラリー電気泳動

毛細管の利用によって、対流の発生を抑止することは、上述のように随分と昔から行われていました。しかし、それは濾紙あるいはゲルのように複雑に入り組んだ毛細管群の集合体の利用でした。真っ直ぐな円筒状の毛細管が、試料の容量が限定されるという点を除けば、優れていることは判っていたでしょ

う。この中空円筒を用いることには、物理学者が早くから注目していたようで、内径がミリメートルのオーダーの場合には、円筒を軸の廻りに回転させて、対流の発生を防ぐという、涙ぐましい努力が一部で行われていました。内径を狭くすれば、より好ましいことは判っていましたが、そのようなものを作ることは、少なくともある時点までは、望めないことでありました。この難題は光ファイバー製造技術の進展によって解決されました。IC用のシリカ基盤の需要は、シリカの質の向上をもたらしました。また、クロマトグラフィーの進歩は内径10 μm の円筒内の吸光度測定を可能にしていました。高分子合成化学は、何かと問題を引き起こしがちなシリカ表面を、必要とあれば被覆することを可能にしました。このように、キャピラリー電気泳動の進展には、他分野での進歩が非常に大きく貢献してきました。今後も、この状況は強化されてゆくでしょう。

キャピラリー電気泳動の最大の利点は、何といたっても<自由溶液>（ゲルなどの夾雑物のない、普通の溶液のこと）の中での電気泳動測定を可能にしたことです。従来、ゲル濃度ゼロへの外挿によって自由溶液中の電気泳動移動度が求められていましたが、隔靴搔痒（かっかそうよう）の感があったことは否定できません。ともかく、<自由溶液中の挙動>を知った上で、他の物質の添加など、その他の条件下の検討・活用に進むことができるということは、極めて重要なことです。キャピラリー電気泳動には、多くの選択肢が用意されています。さらに重要なことは、オンライン検出が容易であるので、小は低分子量のイオンから、大は細胞やラテックスまで、幅広い対象に電気泳動の門戸が開かれたことでしょう。ゲル電気泳動は、生体高分子に的をしぼって、発展してきた電気泳動法でありました。その他の対象を顧みることは少なく、またそれらへの対処能力が不十分でした。

内径が狭くなると比表面積の増大のために、吸着それから電気浸透流の問題が浮上してきますが、これらの解消あるいは後者の積極的活用の道が考えられています。現在のキャピラリー電気泳動は、このような幾つかの技術上のブレークスルーによって支えられて、展開が可能となった実験技術です。

さらに付け加えるべきは、内径数10 μm 以下のキャピラリーからは、最初に述べたように、水溶液が抜け落ち難いことです。キャピラリー電気泳動は、この単純な事実が大きく依存しています。つまり、このことの故に、キャピラリーの先端を、ある液から他の液に、キャピラリー内部の液体の状態を攪乱することなく移動させることができるのです。これは、電気泳動の在り方に革命的な変化をもたらしました。つまり、コンピュータ制御による高度の自動化の達成でした。キャピラリー内部は詰め替えが可能な空間です。単一の管を何度も用いて電気泳動を行うことが可能です。しかし、測定の再現性は、開始時における管の内壁・内容の状況が常に更新されることによって保証されます。つまり、再現性は出発時の状況を同一にし、同一状況下で電気泳動を行う条件を設定できなければなりません。このことが、キャピラリー電気泳動の自動化を強力に求める動機となりました。そして、そこでの要請の多くが実現されてきております。

4.ブラックボックス化

ゲル電気泳動は、生物化学と分子生物学の分野で実に様々な思いつき・工夫を産み出して、多彩な発展を遂げてきました。そこでは、いわゆる分析化学者の寄与は少なかったようです。それは、ゲル電気泳動が、実験をする人の身近なものとして存在したことに負うところが大きでありました。キャピラリー電気泳動も、最初のうちは手作りの実に単純な装置から始まったのですが、自動化への適合性と必要性から、極めて急速に自動化、そして高級化が進行しました。そこでは、多くの分析化学者からの新規な方法の提案がありました。

しかし、ゲル電気泳動の場合のような、草の根からの提案といった方法論の展開は、ゲル電気泳動の場合と比較しますと、遙かに少ないままに推移してきたように感じられます。これは、キャピラリー電気泳動にとって不幸なことであると思います。生化学・分子生物学へのキャピラリー電気泳動の展開は決して順調とは云えません。ゲル電気泳動においては存在し、キャピラリー電気泳動に欠けているのは何でしょうか。それは、“身近さ”であると思います。

キャピラリー中の液体の挙動への関心は、次の記述から明らかなように、近代科学の端緒の一つであったようです：「17世紀になると分子間力の最初の科学的吟味が始まる。Newton は分子間力が物体の物理的性質とどのように関係づけられるかを考察し、後年18世紀の多数の研究者はガラス管中の液体の毛管現象の研究を始めた。1808年に Clairaut は液体とガラス分子間の引力がもし液体分子間の引力と異なっていれば毛管現象が説明できることを示唆した。また、液柱が上昇する高さは毛管の壁の厚さには無関係であることに気づき、これらの力のおよぶ範囲は非常に小さいという結論に達した。」(J. N. イスラエルアチヴィリ (Israelachvili) 著・近藤保／大島広行訳、「分子間力と表面力 (原著名: Intermolecular and Surface Forces: With applications to Colloidal and Biological Systems)」、マクローヒル、1991)。私たちがキャピラリー電気泳動に接する際に、それを完成された分析手段としてしか、受け取っていないのではないのでしょうか。キャピラリー電気泳動を、もっと身近なものとして、そこに出没する現象を、もっと好奇の目で眺めて、自らサイエンスするという姿勢が必要と考えられます。

最近、次の章で述べますように、キャピラリー電気泳動を、シリコンあるいはプラスチックの小さな基盤に形成した毛細管中に行おうとする試みが盛んです。それらは、チップ電気泳動と呼ばれています。そこでは、使用者側から見るならば、ますますブラックボックス化が進行するでしょう。“身近さ”の取り戻し、あるいは維持は、容易なことではありません。

5.チップ電気泳動

キャピラリー電気泳動の市販装置は、長さ数十センチメートル、内径数十マイクロメートル前後の円筒型キャピラリーを用いることを念頭において設計されています。一方、最近になって、エレクトロニクスの分野で進歩した加工技術を用いて、基盤の上にキャピラリー電気泳動のシステムを作成する試みが、あちこちで行われています。広く見るならば、これは μ TAS (micro-total analysis system) への流れの一環でしょう。現在のところ、これによって微量化・迅速化が達成されてはいますが、これではなければならないブレークスルーは達成されていないのではないのでしょうか。検出手段が、キャピラリー部分の微小化に追従できないようで、蛍光検出だけが幅を利かせていることが気掛かりであります。しかし、対象とする試料が限定されていて、しかも使用頻度が高い分野では、この種の特殊なキャピラリー電気泳動の利用が、定着して行くと予想されます。この分野の研究が進めば、微細流路における液体の挙動が詳細に把握され、シミュレーション解析も可能になってくるでしょう。その過程で集積される知識からのアウトプットには、大いに期待すべきものがあります。

6.チップ電気泳動

ハイフネーテッドと申しますのは、二つの測定装置をつなぐという意味です。ところで、我々ハイフンという日本語化表記・発音に引きずられています、英語ではハイファネイテッドと云った方が正しいようですね。キャピラリー電気泳動において、オンラインで検出するには、普通には可視・紫外分光光度法を用います。このほかに、蛍光、示差屈折率、熱光学、CD、電気化学、電気伝導度などの物性に着目した検出が行われています。これらも、電気泳動装置と他の装置をつないでいるのですが、ハイフネイテッド・テクニックとは、一般には呼ばないようです。それは、電気泳動のキャピラリーの端から一旦出て、別の装置で改めて検出するという場合に使われる用語のようです。したがって、この範疇に入るもので、現に活用され始めているのは、キャピラリー電気泳動に質量分析装置を連結するもので、CE-MSと略称されています。

以前からLC-MSの名で呼ばれていた、HPLC装置に質量分析装置を連結する方式が存在します。キャピラリー電気泳動をMSに連結する方式は、この延長線上に考えられたものです。HPLCと比較した場合に面倒であるのは、電気泳動が文字通りに電氣を用いていることです。電気泳動を一旦完結して、出てきた試料を質量分析装置の試料ガス化・イオン化のシステムにつなぐ必要があります。この問題がうまく処理されたなら、質量分析法で試料を分析することによって、同定を行うことができます。可視・紫外のスペクトルがとれはしますが、キャピラリー電気泳動においては、同定を標準物質のクロマトグラムとの比較に依存している場合が、多いようです。したがって、質量分析装置との連結は、分析装置としてのキャピラリー電気泳動の価値の向上に大きく寄与すると期待されます。

【雑話】キャピラリー電気泳動序論

もっとも、連結というよりも、質量分析装置の試料供給装置として、キャピラリー電気泳動が付属するといった感じがします。

7.おわりに

ここ暫く、電気泳動の世界を担って行く立て役者は、ゲル電気泳動とキャピラリー電気泳動でありましょう。キャピラリー電気泳動を取り上げる際に、とかく私たちはキャピラリー電気泳動の広がりゆく先端諸領域に目を注ぎがちです。しかし、広範な範囲の試料を対象とすることができ、しかも“自由溶液”に始まって、様々の媒体中での定量的な分離・分析が行える電気泳動法は、キャピラリー電気泳動を除いて存在しません。このことが、キャピラリー電気泳動の原点です。原点に立ち帰って、原点に立って、原点的な普通の装置を用いて、物事を考えることも大切ではないでしょうか。

(大阪大学名誉教授 高木 俊夫 2000/4)

<関連製品>



キャピラリー電気泳動システム Agilent7100

高分離能・短時間・微量分析を実現するキャピラリー電気泳動システムです。