

新たな技術開発の経験

神原 秀記

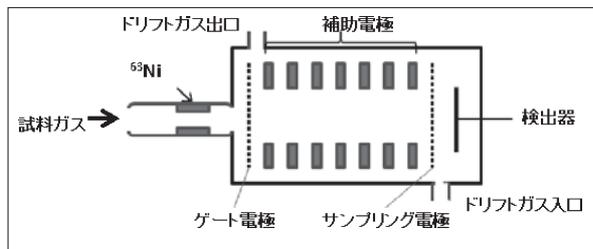
生命科学・バイオテクノロジー分野の発展は目をみはるばかりであるが、この発展の原動力の一つが分析技術の発展である。新たな分析技術が生まれたとき、どうしてこんな素晴らしいものが開発されたのか不思議に感じることがある。しかし、多くの場合、新たな素晴らしい技術は突然出てきたわけではない。その下地となる技術があり、その発展形として出るべくして新たな技術が出た場合が多いのである。ある時期には使えないと思われていたものが時代の変遷とともにキー技術に進化・変貌していく場合もあり、環境に応じて進化していく生命に似たものを感じる。世の中の発展する方向や将来を見据えて新たな技術開発を目指していくと思わぬ発展に遭遇することがある。新たな技術は最初から魅力的な場合は少ないが、視点を変えたり、将来を見据えたりすることによりそれが非常に価値の高い技術に変貌するのである。そのような視点を持つことで誰にでも魅力的な新たな技術開発のチャンスが生まれてくるように思う。ここではこれまでに体験した技術開発を振り返り、なるべくそのような視点で紹介したい。

イオンの移動度測定から大気圧イオン化質量分析計へ

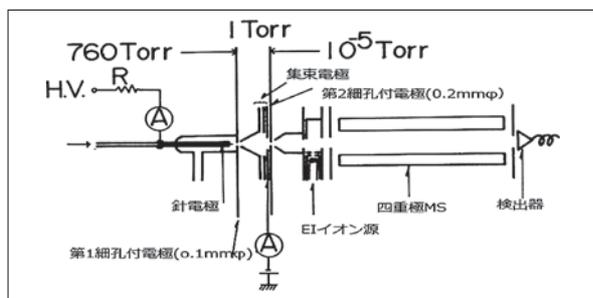
1972年に日立中央研究所に入社したが最初に与えられたテーマは大気圧化でイオンを生成し、その移動度からイオン種を同定し、ガス中に含まれる微量成分の分析を行うプラズマクロマトグラフィ(PC, plasma chromatography)の追試と評価であった。それまでイオンの移動度の実験は主として物理分野でイオンの特性を調べるために減圧下で行われていた。この技術を分析に都合のよい1気圧下で行うことで高感度のガス成分分析が行えることをKarasekが1971年に示した¹⁾。PCでは⁶³Niから出るβ線を用いてガスをイオン化して、ドリフト管に導入する。イオンはドリフト管の入口近傍に設けられたゲート電極によりパルスイオンとしてドリフト管に入る。その後ドリフトガスとの衝突による相互作用に由来する移動度の違いにより分離され第2ゲートに到達するが、第2ゲートを時間的にスキャンしてイオン種を選別して検出する。1次イオンの生成から分析部のドリフト管に入るまでにイオンは周りのガスと10⁶回以上衝突し

てイオン分子反応を繰り返して平衡状態になる。ガス中にイオン化されやすいのがあると、そちらに電荷やH⁺を移すイオン分子反応が進行(質量分析分野でいう化学イオン化)するのでイオン化されやすい特定の成分を高感度で検出できる。この技術をそのまま行うには放射性物質取扱許可が必要であり、不便であった。そこでニードル電極を用いたコロナ放電を1次イオン生成に用いる方法を開発した。また、第2ゲートも取り除き、リアルタイムでスペクトルが得られるようにした(図1(a))。そのために、パルス回路を作ったり、応答の速い高感度の検出器を手作りしたりしたが、この経験はあとで大いに役に立った。スペクトルは得られるようになったが、一つの試料でも濃度によって複雑にスペクトル形状が変化する。イオン種の同定のため、検出器に相当する部分に小さなサンプリング細孔を設け、ここを通してイオンを真空中に引き込み質量分析したが感度が不十分であった。そこでコロナ放電電極のごく近傍にサンプリング用の細孔(0.1 mmφ)を設けた。これにより十分なイオン量が確保され、種々イオンが高感度で質量分析できることが確認された。これではドリフト管がない方がイオンの同定もできるしよいのではないかと考えてデーターをとっていたところ、Horningにより大気圧イオン化質量分析計(APIMS, atmospheric pressure ionization mass spectrometry)の報告がなされた²⁾。かろうじてコロナ放電を用いる特許は取ったものの大気圧質量分析計に関しては先を越されてしまった。当時は石油ショックの後で研究費にも実験装置にも事欠く状況で、使用していた質量分析計は手作りの質量分析範囲がわずか100 amuと狭いものであった。このため、質量の大きな有機物の測定は難しく、純ガス中の不純物分析に活路を見いだした³⁾。大気圧で生成したイオンを真空中の質量分析部に取り込むには大容量の真空ポンプが必要であったが、そのようなポンプを持ち合わせてなかった。そこで排気を2段階にして大気圧と真空の間に中間圧力部(1 Torr)を設けて2段階排気とした。中間部にはイオンを集束する電極を設けた(図1(b))。大気圧下のイオン化ではガス中にppmオーダーの水が存在すると水のクラスターイオンが生成し、そこからのH⁺移動反応が主なイオン

(a) プラズマクロマトグラフィ(PC)



(b) 大気圧イオン化質量分析計(APIMS)



(c) 大気圧下での反応

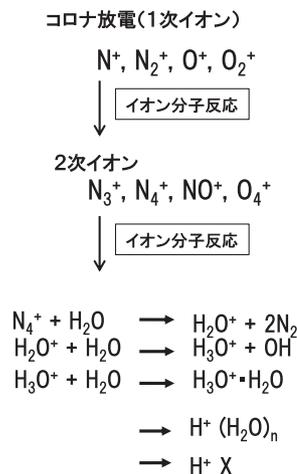


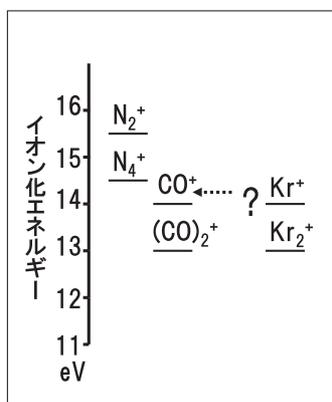
図1. プラズマクロマトグラフィ (PC) (a), 大気圧イオン化質量分析計 (APIMS) (b), 大気圧下でのイオン分子反応 (c). PCでは大気圧下で一連のイオン分子反応で生成したクラスターイオンをイオンの移動度で識別するが, APIMSでは質量計測する.

生成過程となる。H⁺アフィニティの強い物質はH⁺付加イオンあるいはさらに水がついたクラスターイオンとなる(図1(c))。クラスターイオンの組成が中間部の電界強度により大きく変化することを見いだした。これは中間部の電界でイオンが加速され、周りのガスと衝突を繰り返し、少しずつ励起されるためであり、通常みられる衝突によるエネルギー緩和と逆の現象が起きていることに気がついた。調べてみるとクラスターイオンの解離エネルギーと電界強度には相関があった⁴⁾。電界を調節することで厄介なクラスターイオンを消滅させ、単純なスペクトルを得ることができた。純チッソガスは公害分析の基準ガスとして広く用いられているが、その中に含まれるNO_xの分析が問題となっていた。それらをAPIで分析できることを示し、標準ガス検定装置として化技研に納入した。また窒素中にppm-ppbオーダー含まれるCOを分析できないかガス会社から問い合わせがあった。COの質量は27.99492で大多数の成分である窒素分子の質量は28.00614と非常に近く、従来の質量分析でも分光学的な方法でもチッソガス中の微量のCO測定は困難であった。そこでN₂とCOのイオン化ポテンシャルがそれぞれ15.6eVおよび14eVと大きく異なることを利用してこれらを識別して検出することを試みた。試料中に水分があるとH₃O⁺が主成分となり測定できないのでモレキュラーシーブに水分を吸着させて除いた。

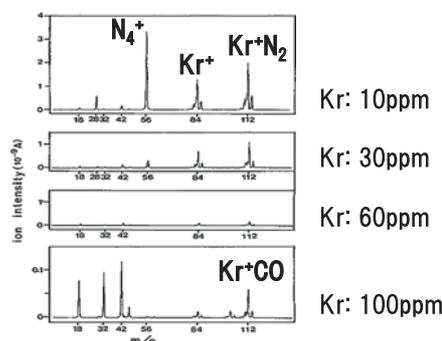
N₂とCOの間のイオン化ポテンシャルを持った物質を探してKrが有望と考えた。窒素ガス中にKrを入れて測定すれば窒素由来のイオンはKrに移動してしまうがCO由来のイオンはそのまま残るに違いないと推定して実験をしたが結果はその通りとなった⁵⁾(図2)。さらに、APIを用いたLC/MS技術の開発などに取り組んだが、液体中に含まれる試料を空中に浮遊させれば測定できると考え、霧化API⁶⁾さらに加熱スプレー⁷⁾を用いたイオン化方法を開発し、LC/APIMS実用化につなげた。その後、APIMSは半導体ガス中の不純物分析など環境分析にも用いられ、半導体分野の発展にもAPIMSは大きく寄与した。

質量分析用脱離イオン化技術

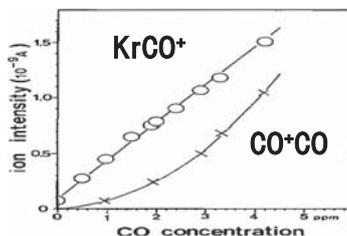
質量分析法はガス試料の分析技術として発展してきたが、1970年代初頭から不揮発性の生体関連物質の分析にも用いられ始めた。その先駆けとなったのは電界イオン化から発展した電界イオン脱離(FD, field desorption ionization)である⁸⁾。10ミクロンのタングステン線状にカーボンのマイクロニードルを気相成長させ、溶媒にとかした不揮発性の生体関連物質を塗布して乾燥させる。これを真空中にセットして高電圧を対向電極との間に印加すると針の先端部分に非常に強い電界が生じる。それにより生体関連物質はイオン化され電界にひかれて



(a) イオン化エネルギー



(b) APIスペクトル



(c) KrCO⁺の検量線

図2. CO, N₂およびKrのイオン化エネルギー (a) と Krを含んだ純チッソガスのAPIスペクトル (b) およびKrCO⁺とCO濃度の関係 (c). 加えたCOが零の時のKrCO⁺イオン強度からCO濃度を推定できる.

真空中にイオンとして取り出される。多くの場合、分子イオンあるいはH⁺付加分子イオンが観測され、分子量を特定することができる。FDに続いてレーザーデソープション (LD)⁹⁾、プラズマデソープション (PD)¹⁰⁾、secondary ion mass spectrometry (SIMS)^{11,12)}、fast atom bombardment (FAB)¹³⁾などのソフトイオン化技術が登場した。SIMSは個体の元素分析方法として発展してきた方法であるが、測定には高真空が必要で、真空度が悪いと固体表面に吸着されたガス成分に由来するイオンが観測され元素分析の妨害となっていた。1976年Benninghovenは固体表面にアミノ酸を塗布し、イオン衝撃で固体表面をスパッタすることによりアミノ酸の分子イオンが観測できることを報告した。アミノ酸自体はあまり魅力的な試料とはいえなかったが、方法を改良することでこれまで測定できなかった物質の分子イオンを観測できるかもしれないと考え、技術開発をスタートした。Ar⁺などの高速イオンが個体に照射されるとイオンは固体表面を通過して固体原子と衝突を繰り返しながらエネルギーを失いやがて停止する。個体を与えられたエネルギーにより、表面近傍では中性原子・クラスターや正負イオン、電子などが生じ、固体表面から脱離する。それらを観測するのがSIMSである。表面に塗布した分解しやすい分子をどうしたら効率よく表面から脱離して観測できるか。一

次イオンの重量が小さく高速のイオンは個体内部に深く潜り込むが大きいと表面近傍にとどまりエネルギーを表面近傍に与える。そこで、Ar⁺に変わりXe⁺を一次イオンに用いたりした¹⁴⁾。さらに、「表面との結合力を切ったり、過剰なエネルギーを他の分子に与えて自身は冷却されることが必要だろう」などいろいろ考え、金属のサポーター表面を酸化して荒らしたり、水を含めて低温プローブで使用したり、有機物マトリックスを用いてみたり工夫した。これらの中でよい結果を与えたのがグリセロールマトリックスであった。グリセロールの分解と反応による雑多なイオンが低質量領域に観測されるが、大きな質量領域にはH⁺付加したターゲット分子に起因したイオンだけが観測できた¹⁵⁾ (図3)。これまで観測できなかった種々物質の分子イオンが観測できると喜んでいましたが、同じころイギリスのBarberらにより中性粒子衝撃 (FAB) でマトリックスに閉じ込めた種々生体関連物質のイオン化ができることが示され、マトリックスを用いたイオンあるいは粒子線照射による脱離イオン化が生体関連物質の有力手法として認知されていった。その後、マトリックスを用いる方法はLDと組み合わせられ、さらに採用している飛行時間差質量分析計 (TOFMS, time of flight mass spectrometer) の分解能の画期的な向上もあり大いに発展した¹⁶⁾。

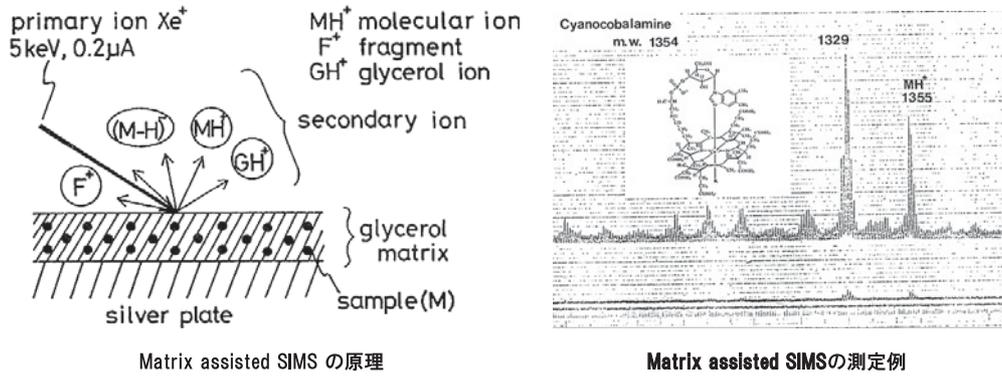
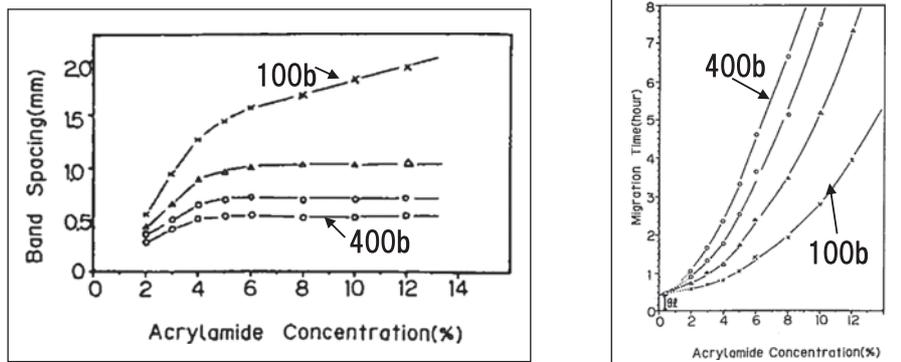


図3. Matrix assisted SIMSの原理と測定例



(a) ゲル濃度とバンド幅の関係 (b) ゲル濃度と泳動時間の関係

図4. DNAのゲル電気泳動特性：アクリルアミドゲル濃度とDNAバンド間隔 (a) から約5%以上のゲル濃度では分離は向上しないこと、また、泳動時間との関係 (b) からゲル濃度が高くなるとほぼゲル濃度の2乗に比例して泳動時間が増加することが分かり、これまで使われていたより低い濃度が優れていることが分かる。

DNA分析技術

DNA塩基配列決定技術は1975-1977年 Sangerおよび Maxam & Gilbertにより開発された。これらはオートラジオグラフィーを用いた手作業によるもので、その自動化の試みが和田プロジェクト (1981-1986) によりなされた。筆者らは和田プロジェクトに参加し、蛍光式DNAシーケンサ (平板ゲルに蛍光標識したDNA断片を載せ、電気泳動してくるDNA断片を実時間検出する装置) の開発を行った。多くの泳動路をいかにレーザー照射して高感度蛍光検出をするかが課題であった。いろいろ試行錯誤しているとき、たまたま使用済みのゲル断片の端にレーザーを入射させたところ、ゲル平面に沿ってレーザーが入ることを観察した。これにヒントを得てレーザー側面照射技術を開発した。最初はオートラジオグラフィーに準じたゲル濃度 (10%前後) を用いて測定が行われたが、一回の測定に何と1昼夜かかった。質

量分析などの計測装置に馴染んだ者としては非常に違和感があった。何とか1-2時間で測定できないかゲル濃度と分離時間および分解能の関連を丹念に調べ (図4)、高速で解析することに成功した¹⁷⁾。開発装置はDNAシーケンスに十分な感度を持っていたが、当時はまだPCR技術が発達しておらず、さらに高感度化して少ないDNA量で測定できれば利点となった。感度を決めているのはゲルから出る背景蛍光であった。この原因を追究したが、ゲル素材中に不純物があるわけではなく、重合してゲル化すると出てくるのがわかった。そこで、ゲルからDNAバンドを抜き出してゲルのない状態で計測するなどしたがゲル中の背景蛍光因子も溶出するらしくうまくいかなかった。この試みは失敗したが、後に役に立つことになる。和田プロジェクトが終わるころ、世界数か所、ほぼ同時期に蛍光式DNAシーケンサの報告があり、それぞれ製品化された¹⁸⁻²⁰⁾。

DNAシーケンサが自動化され、競争によりさらに性

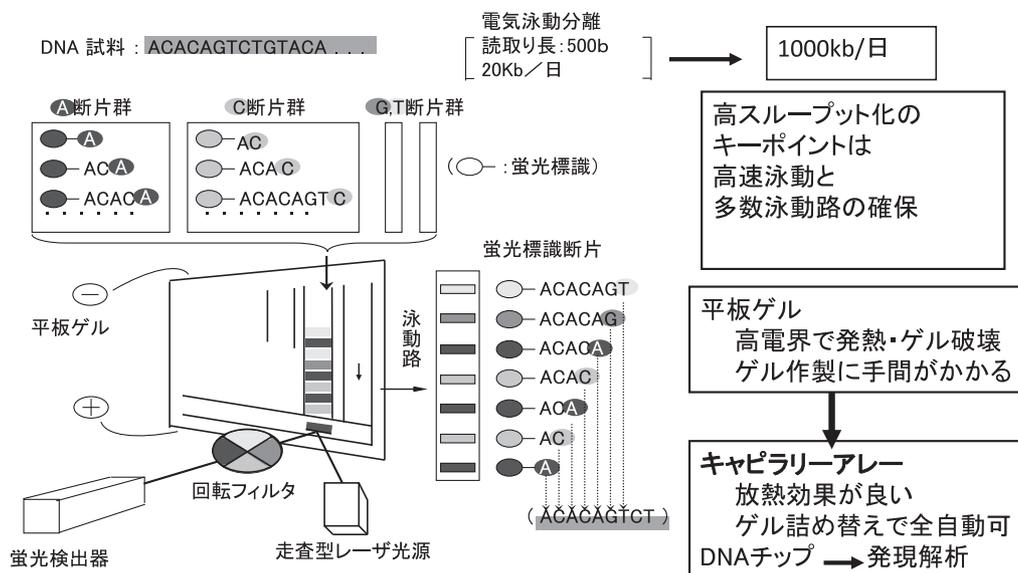


図5. ゲル電気泳動を用いたDNAシーケンサの概念図と原理

能が向上すると「ヒトゲノム解析も夢ではない」との期待が高まり、ヒトゲノム解析計画が1990年スタートする。ヒトゲノム計画を完成させるには現状の能力より100倍近い能力のDNAシーケンサが必要となる。DNAチップを用いた新たなDNAシーケンサの提案などもなされたが²¹⁾、一番早く実用的な装置を作りえるのは実績のある電気泳動を用いる方法と考えた。図5はゲル電気泳動および側面レーザー照射技術を用いたDNAシーケンサの原理図である。鋳型となるDNAコピーを沢山用意してプライマーをハイブリダイズさせる。4種の核酸基質 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) を加えて相補鎖合成をおこなうが、種類ごとに異なる蛍光で標識された疑似塩基 (ターミネータ, ddNTP) を加えておく。これらは核酸基質に代わって相補鎖に一定の割合で取り込まれるが、取り込まれるとそれ以上相補鎖合成は進行しない。このために1塩基ごとに長さが異なり末端の塩基種に応じて異なる蛍光で標識されたDNA断片が生じる。これらをゲル電気泳動で分離するが、DNAは短いものほど早く泳動するので、一定時間たつと短いものから順にバンド状に並んでレーザー照射部を通過する。その時に観測される蛍光を用いて末端塩基種を知ることができるが、順番に末端塩基種を決定することでDNA塩基配列が分かる。解析能力、スループットを上げるには沢山の泳動路を確保し、高速電気泳動を実現する必要がある。平板ゲルでは高速泳動しようとする、電流が流れすぎて発熱が大きくなり、使い物にならない。そこで、寺部氏が開発し、当時数社から実用装置が市販され始めていた

キャピラリー電気泳動に注目した。キャピラリーにゲルを詰めて分離媒体とすれば放熱がよく、問題が解決すると思われた。技術開発が世界数か所で行われ、1本のキャピラリーを用いた報告が早々となされた^{22,23)}。しかし、ターゲットは100本近いキャピラリーをどのように光照射して高感度DNA検出をするかである^{24,25)}。キャピラリーを並べてレーザー照射したがレーザーが屈折したりしてすべてを照射できなかった。そんなときに思いついたのが平板ゲルで失敗したDNAバンドを溶液中に抜き出す方法である。平板ゲルではゲルの端面が大きくうまくいかなかったが、キャピラリーでは端面の面積が小さいのでうまくいくかもしれないと思い試してみた。しかし、キャピラリーから抜き出たところで電界強度が非常に弱くなるのでDNAバンドが動かない。そこで、溶媒の流れを作り、レーザー照射部までDNAバンドを運ぶことにした(図6(a))。結果は良好であった²⁵⁾。「この技術が製品に搭載されればヒトゲノム解読は終了するだろう。次は医療をはじめいろいろな分野の人々がDNAシーケンサを使うようになるだろう。誰でも使える装置が必要である。このような視点に立つとシースフローを用いた装置は保守に手間がかかり不向きである。誰かがキャピラリーアレーをレーザーで直接照射する方法を開発するとすぐにすたれるだろう」などと思った。そこで、キャピラリーアレーを直接レーザー照射する技術開発を再スタートした。キャピラリーアレーをレーザーで串刺し照射できないのはなぜかいろいろと検討した。いくつかの原因が判明したが、一番大きな要因はレーザー照射窓作

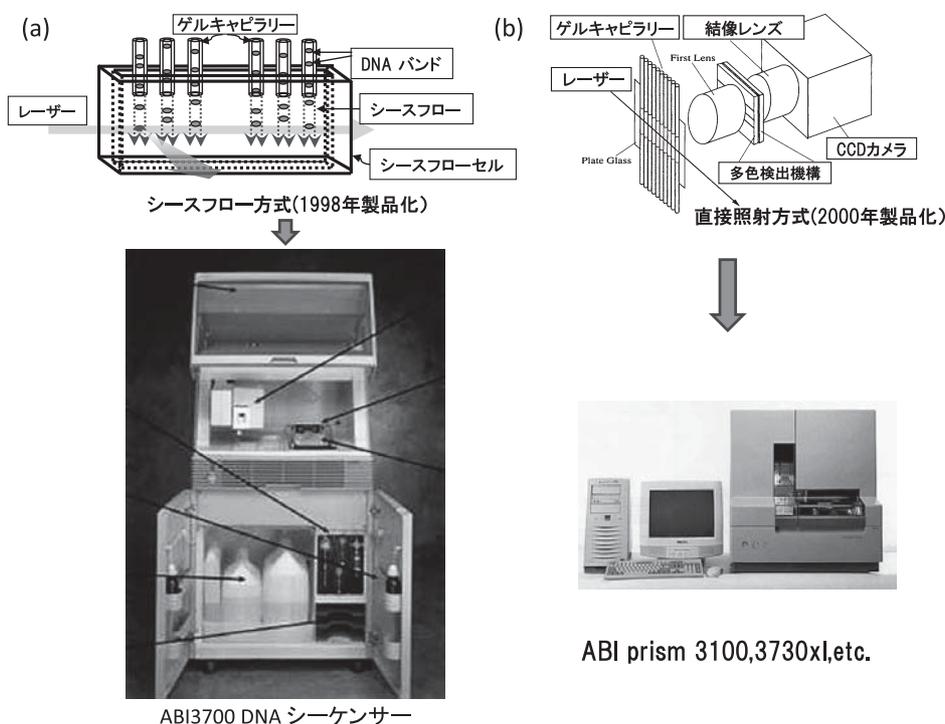


図6. キャピラリー電気泳動を用いたDNAシーケンサ。(a) シースフロー方式のDNAシーケンサのレーザー照射部の構成とこれを活用した製品、(b) キャピラリーアレーをレーザーで直接串刺し照射する方式のDNAシーケンサ模式図とこれを採用した製品。

りにあった。キャピラリーは折れやすく、強度を補強するためポリイミド樹脂でコーティングされており、これをはがしてレーザー照射窓を作る。弱いバーナーでポリイミドを焼却して作っていたが、その時いくつかのキャピラリーが歪み、並べたときに軸が平面からずれるのが原因であった。酸素プラズマを用いて低温で窓を作成する技術を開発してこの課題を克服した²⁶⁾。串刺し照射方式(図6(b))はシースフロー方式の製品化(1998年)に続いて2000年にABIとの共同事業として製品化されたが、これらはヒトゲノム解読に大きく寄与するとともにバイオ分野の基本装置として広く使用されている。

これら装置はゲノムセンターや研究室で共同利用する類の装置である。しかし、教育や診断目的に手のひらに載るような小型のDNAシーケンサも必要と考えていた。そんな折に、1998年マイアミのゲノム会議でパイロシーケンシング技術の報告を聞いた。図7に示したように反応セルに4種のdNTPを順番に繰り返し注入してDNA相補鎖合成を1段階ずつ行う。相補鎖合成に伴って生成するピロリン酸(Pyrophosphate)をATPに変換してルシフェラーゼの存在下でルシフェリンと反応させて得られる化学発光を検出する。発光が検出できれば、注入したdNTPを取り込む相補鎖合成が行われたことになるので順番に配列を決定できる。配列決定の能力は20塩基余

りであったが、性能向上は可能と思われた。そこで小型DNAシーケンサの開発をスタートし、数年後に実用的な小型装置を実現した(図7)²⁷⁾。反応セルを小さくして多くの反応セルを並べるとかなり性能の高い装置が実現するようになってきたが、反応セルを小さくするとなぜか信号が測定できなくなった。担当者が退職したのでその試みはそのままになってしまったが、後日454life-scienceによる大容量パイロシーケンサ開発²⁸⁾の事実を知り、大変残念なことをしたと感じた。ちょうどパイロシーケンサ開発を始めたころ、旧知のBrenner(2002年ノーベル生理学・医学賞を受賞)はビーズにmRNAを一個ずつ捉えて蛍光標識されたDNAオリゴマーを用いて配列決定し、一個一個のmRNAをデジタルカウンティングする技術開発を進めていた²⁹⁾。Massive parallel DNAシーケンシングの走りである。最初に話を聞いた時には突拍子もない考えに聞こえたが、不可能ではないと思えた。技術開発を担当しているLynxのEltreにパイロシーケンシングを使ってはどうかなどと議論した思い出があるが、今日、少し違う形ではあるがこれらは次世代DNAシーケンサとして実現し、話題を集めている。

大きな解析能力を持つ次世代DNAシーケンサ技術の開発をサポートしたのはNIHの\$1000ゲノムプロジェクトであった。ヒトゲノム解読終了時点では、ヒトゲノ

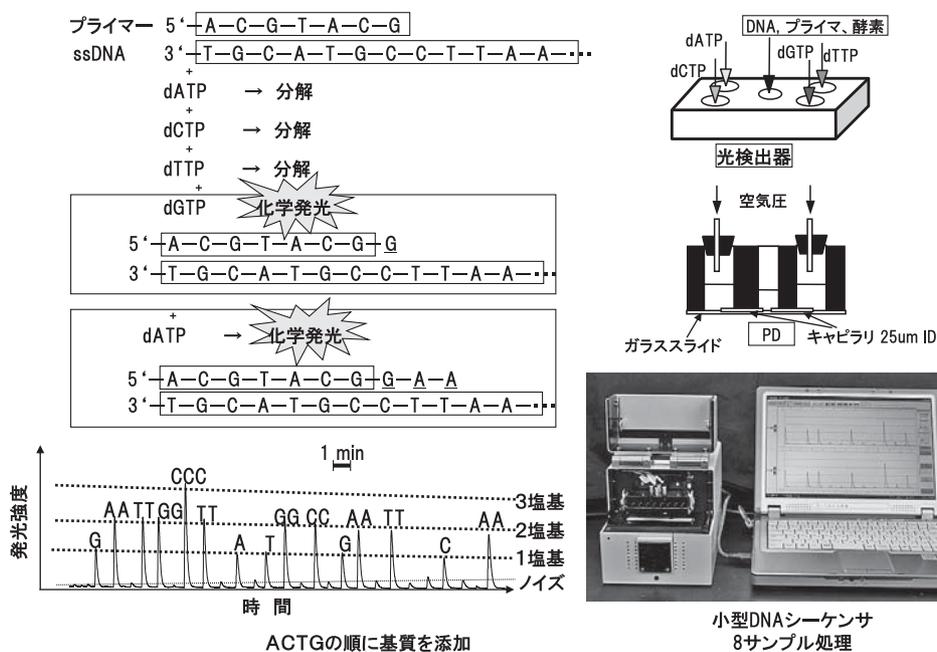


図7. パイロシーケンシングの原理と小型DNAシーケンサ

ムの解読には数億円のお金がかかっていた。それを\$1000で行える技術開発を目指したのであるが、当時はまったく不可能に思えた。しかし、現在目標は達成されつつある。目標は大きく、その世の中に与えるインパクトの大きさを共有して技術開発することの重要性を示した例である。

1 細胞計測へ

次世代DNAシーケンサが開発されるとさらにスループットの高い装置開発に多くの人々が参入し始めた。このような状況になると開発人員と開発費を多く持つところに開発競争ではかなわない。生命科学分野で高速DNAシーケンサ以外になにもいらないわけではない。なぜみんなは同じ方向に向かってばかり走りたがるのだろう。DNAシーケンサの次に重要となるものを考えた方が成功する確率が高い。DNA配列を沢山読み取れば生命現象はすべてわかるのか？いくら生命を構成する部品を分析しても本当に重要なことは見逃されているかもしれない。しかも現在得ている情報は多くの細胞を試料として用いた平均的なものである。生命はシステムだからその最小単位である1細胞の挙動と中の分子成分をもっと定量的に知らないといけなくなるだろう。などと仲間と議論して文部科学省特定領域研究「ライフサイバヤを目指して」をスタート(2006年)した³⁰⁾。これに合わせて正確に定量的に1細胞中のmRNAの種類と

量を測る技術の開発をスタートした。究極的にはBrennerが思い描いたようにmRNAの配列を一個一個決めてmRNAをデジタルカウントするのが目標である。それに先立ち、いち早く1細胞中のmRNA検出ができるように当時もっとも定量精度がよいといわれていた定量PCRを用いる方法の開発も並行して行った。通常、定量PCRでは1回の測定で1種類のDNAしか分析できない。cDNAライブラリに含まれる多種類のcDNAの定量分析を行おうとすると、まずcDNAを含む溶液を分割して計測する必要がある。コピー数が少ないときには精度が低下する。これを避けるにはcDNAライブラリを増幅してから分割すればよいが、増幅により遺伝子発現量にバイアスがかかる恐れがある。そこで、cDNAライブラリを磁気ビーズ上に構築し、これを繰り返し定量PCRに使用する技術を開発した。磁気ビーズ上のcDNAライブラリは定量PCRの熱サイクルを経る毎にビーズ上から約7.6%が脱落し、都合が悪い。そこで、ホルムアミド(5%)を加えて、DNAの T_m を下げ、低温で動作するPCR法を開発した。cDNAライブラリのビーズからの脱離は2.3%以下となり、実用的な繰り返し定量PCRが実現した³¹⁾。測定例の1部を図8に示したが、同じようにコントロールした細胞であるが遺伝子発現はかなりばらついていることがわかる。さらに多くの遺伝子について定量分析するには大規模DNAシーケンサを活用してcDNAを1個ずつ配列解析するディジタ

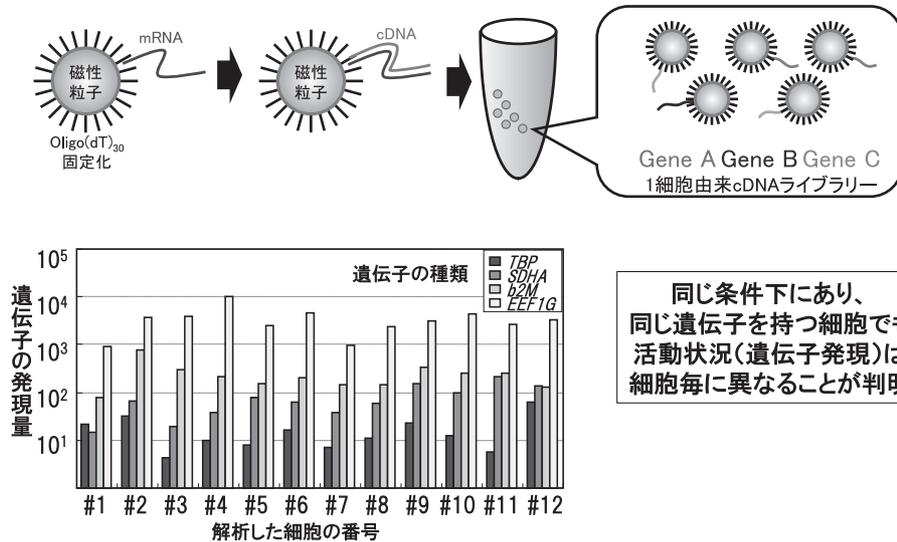


図8. 定量PCRを用いた1細胞中のmRNA分析方法の原理と1細胞遺伝子発現解析例：1細胞意中のmRNAを磁気ビーズに固定したポリTプローブで捕獲してcDNAライブラリを作成する。1細胞cDNAライブラリを繰り返し使用して種々遺伝子の発現量を求める。同じように調整して細胞周期を合わせた細胞でも遺伝子の発現にばらつきがある。

ルカウンティングが有望である。そのためにはcDNAライブラリを一括増幅することが必要であるが、増幅時のバイアスを除くために各プロセスを詳細に検討して、ほぼ均一なcDNAライブラリ増幅を実現した。細胞ごとの遺伝子発現をいろいろな細胞について測定するとどのような世界が見えてくるか今後が楽しみである。

生命科学分野は医療とも関連し、人類にとって非常に重要な分野で急速に発展しつつある。この発展には新たな種々分析技術および装置が必要である。これらの開発には将来を見据えた大きな発想と夢を持つことが重要であり、意欲的な若い方々に適した分野である。多くの方々の参入を期待したい。

文 献

- 1) Karasek, F. W.: *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 330 (1970).
- 2) Carroll, D. I. *et al.*: *Anal. Chem.*, **46**, 706 (1974).
- 3) Kambara, H. and Kanomata, I.: *Anal. Chem.*, **49**, 279 (1977).
- 4) Kambara, H. and Kanomata, I.: *Anal. Chem.*, **51**, 1447 (1979).
- 5) Kambara, H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **52**, 1500 (1980).
- 6) Kambara, H.: *Anal. Chem.*, **54**, 143 (1982).
- 7) Sakairi, M. and Kambara, H.: *Anal. Chem.*, 1159 (1989).
- 8) Beckey, H. D.: *Principle of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry*, Pergamon Press, Oxford (1977).
- 9) Hercules, D. H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **54**, 280A (1982).
- 10) Macfarlane, R. D.: *Anal. Chem.*, **55**, 1247A (1983).
- 11) Benninghoven, A. *et al.*: *Appl. Phys.*, **11**, 35 (1976).
- 12) Barber, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **54**, 645A (1982).
- 13) 神原秀記：有機合成化学, **43**, 1108 (1985).
- 14) Kambara, H. and Hishida, S.: *Org. Mass Spectrom.*, **16**, 167 (1981).
- 15) Kambara, H. *et al.*: *Shituryoubunseki*, **30**, 169 (1982).
- 16) Jurinke, C. *et al.*: *Molecular Biotechnology*, **26**, 147 (2004).
- 17) Kambara, H. *et al.*: *Biotechnology*, **6**, 816 (1988).
- 18) Smith, L. M. *et al.*: *Nature*, **321**, 674 (1986).
- 19) Ansorge, W. *et al.*: *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **13**, 315 (1986).
- 20) Trainor, G. L.: *Anal. Chem.*, **62**, 418 (1990).
- 21) Schena, M. *et al.*: *Science*, **270**, 467 (1995).
- 22) Drossman, H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **62**, 900 (1990).
- 23) Kambara H.: *Curr. Top. Anal. Chem.*, **1**, 21 (1998).
- 24) Huang, X. C. *et al.*: *Anal. Chem.*, **64**, 967 (1992).
- 25) Kambara, H. and Takahashi, S.: *Nature*, **361**, 565 (1993).
- 26) Anazawa, T. *et al.*: *Anal. Chem.*, **68**, 2699 (1996).
- 27) Zhou, G. *et al.*: *Electrophoresis*, **22**, 3497 (2001).
- 28) Margulies, M. *et al.*: *Nature*, **437**, 376 (2005).
- 29) Brenner, S. *et al.*: *Nature Biotechnology*, **18**, 630 (2000).
- 30) 神原秀記ら監修：シングルセル解析の最前線，シーエムシー出版 (2010).
- 31) Taniguchi, K. *et al.*: *Nature Methods*, **6**, 503 (2009).