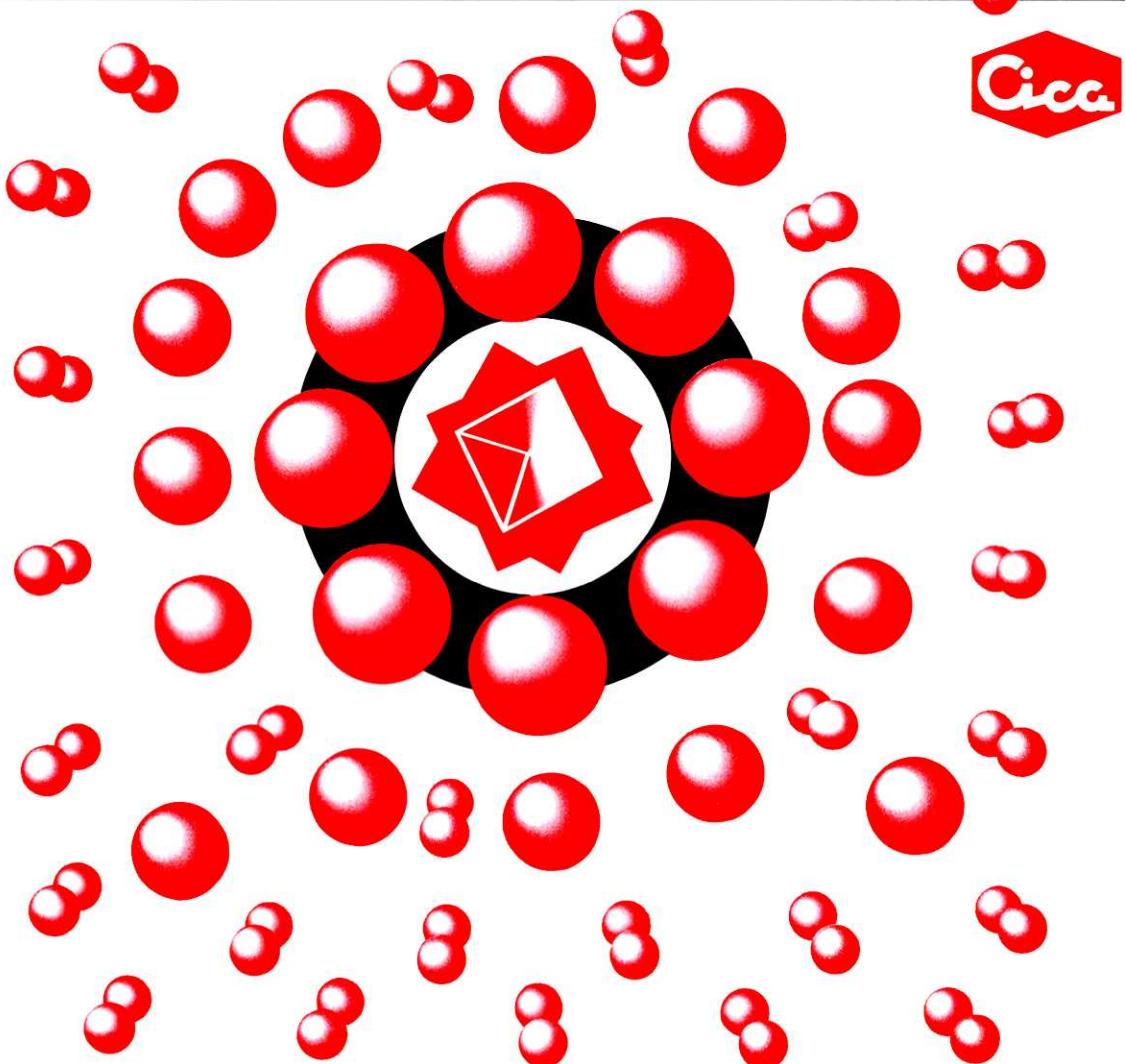


THE

ISSN 0285-2446
KANTO CHEMICAL CO., INC.
1997 No.3 (通巻165号)

CHEMICAL TIMES



Cica

目 次

臨床化学並びに臨床化検査への接近	佐々木 植一	2
18. 生体試料中の無機質および電解質の臨床検査— Ca^{2+} , Mg^{2+} , および $\text{CO}_2(\text{HCO}_3^-)$ —		
生体中の微量元素(Ⅱ)	今井 弘	8
—Mn, As, Se, Mo, Cd—		
ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(Ⅱ)	齋藤 忠夫	15
—化学構造的特徴とその利用性(その2)—	浦島 国	
新しい免疫グロブリン分離精製剤	大瀧 伸之	21
“ImmunoAssist MG-PP” の開発	井上 千也	
編集後記		24

臨床化学並びに臨床化学検査への接近

18. 生体試料中の無機質および電解質の臨床検査 —Ca²⁺, Mg²⁺, および CO₂(HCO₃⁻)—

札幌医科大学附属病院 検査部 非常勤講師 佐々木 権一

I. はじめに

前回では臨床化学および臨床化学検査の面から、生体試料中の最も重要な電解質である Na⁺, K⁺, ならびに Cl⁻について解説した。

これに続いて今回は Ca²⁺, Mg²⁺, および CO₂ (あるいは HCO₃⁻) について、それ等の生理的並びに診断的意義、および代表的測定法を紹介しようと思う。前述の Na⁺や Cl⁻に比べて各存在量は少ないが、それぞれが重要な生理的並びに診断的意義を有している。測定法に関しては、各項目とも最近は酵素的測定法が普及し、また注目されていることが特徴である。

II. カルシウム Ca²⁺

1. Ca²⁺の生理的並びに診断的意義：

(1) Ca の生理的意義 —

人体中の Ca 量の 99% は骨や歯等の硬組織で、リン酸塩の一種である hydroxyapatite 3Ca₃(PO₄)₂·Ca(OH)₂として、固体の形で存在している。しかしこれ等の Ca は絶えず血漿 Ca²⁺との間で交換が行われており、いわゆる動的平衡を保っている。この点から骨は人体内の Ca の貯蔵庫とみることができよう。

体液中には Ca²⁺ は 2 個の陽イオンとして広く存在し、細胞内における各種の酵素の活性化や、神経や筋細胞の興奮性に強く関与している。血漿中の Ca の濃度は 8.5~10mg/dl であるが、表 1 のようにこの中の①約 33% は蛋白と結合し (非透析性 Ca), ②13% が Ca²⁺ の形で、③残りの 54% がリン酸、重炭酸、有機酸等と非イオン化 Ca と

表 1. 血漿中 Ca の分布

血漿中 Ca 濃度 : 8.5~10.6 mg/dl (4.3~5.3 mEq/l)	
非透析性 Ca	蛋白と結合した Ca 33%
	Ca ²⁺ 13%
透析性 Ca	非イオン化 Ca 54% (リン酸塩、重炭酸、有機酸と結合した Ca)

して存在している (②, ③は透析性 Ca)。

血中の Ca のイオン化は血液 pH に依存しており、pH がアルカリ性に傾くとイオン化率は減少する。血漿中 Ca 濃度は性差、年齢差ではなく、日内変動としては、食後に僅かに上昇することが指摘されている。

(2) Ca の診断的意義 —

Ca は生体内では骨という大きなプールを持っているので、血漿 Ca 値は容易に変化するものではない。血漿 Ca 濃度は副甲状腺ホルモン (parathormone) により保持されており、腸管からの Ca の吸収促進、尿への排泄抑制、すなわち尿細管からの再吸収促進、骨からの溶出により調節している。従って副甲状腺機能亢進症では高 Ca 血症を、低下症では低 Ca 血症を招来する。また vitamin D は腸管からの Ca の吸収を促進し、過剰投与例では高 Ca 血症を来たすことがある。強度の低 Ca 血症では全身けいれんを来たすテタニー症状を呈することがある。

血漿蛋白としては globulin より albumin の方が Ca と結合しやすい。従って血清蛋白の低下、albumin の低下では、血中 Ca が低下する傾向がある。Ca は生体にとって重要な無機質であるが、体内ではリン酸、シュウ酸、尿酸等と不溶性の結晶を作り、胆石、腎結石、膀胱結石等

表 2. 血漿 Ca 値の病的変動

上昇する疾患	減少する疾患
原発性副甲状腺機能亢進症	特発性副甲状腺機能低下症
異所性副甲状腺ホルモン産生腫瘍	偽性副甲状腺機能低下症
家族性低 Ca 血症	術後副甲状腺機能低下症
悪性腫瘍骨転移	吸収不全症候群
多発性骨髓腫	急性、慢性腎炎
プロスタグランдин産生腫瘍	クエン酸中毒
ビタミン D 中毒症	悪性腫瘍の骨芽球性骨転移
サルコイドーシス	慢性腎不全
Addison 病	骨硬化症
甲状腺機能亢進症	ビタミン D 欠乏症
ミルクアルカリ症候群	ビタミン D 依存症
急性不溶性骨萎縮	偽性ビタミン D 依存症

の原因となる。血清中 Ca^{2+} と無機リンの濃度の間には $[\text{PO}_4] \times [\text{Ca}^{2+}] = \text{一定}$ の関係が成立している。臨床材料中の Ca 正常値を表3. にまとめて紹介した。

表3. 臨床材料中の Ca 正常値

臨床材料	正 常 値 (範囲)
血漿(清)	9.0~11.0 mg/dl
尿	7.5 (1.4~3.0) mEq/l
リ ン パ	4.2 (3.4~5.6) "
脳脊髄液	2.4 (1.9~3.4) "
胃 液	3.6 (2.0~4.8) "
胆 汗	5.0~7.0 "
脾 液	10.1 (5.2~11.6) mg/dl
唾 液	5.8 (5.2~9.7) "
汗	1~8 "
関 节 液	9.7 (8.3~10.7) "

2. Ca の測定法

従来用いられた Ca の測定法を図1. にまとめた。 Ca^{2+} が各種の多価有機酸と不溶性の塩、または非解離性のキレートを作るので、これを利用して重量法、容積法(滴定法)、および比色法が数多く考案されてきた。血清中 Ca の一部は蛋白と結合しているので、測定に際して pH を酸性にしたり、より結合の強いキレート剤を用いることが必要である。これ等の中 ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 滴定法と、o-cresolphthalein complexone (OCPC) 比色法が最もよく利用してきた。現在も Ca の自動化測定系では OCPC 比色法が、かなり用いられている。

Ca^{2+} はまた炎光分析法、原子吸光法で、高い精度で測

図2. 酵素を用いる Ca 測定原理

- 1. α -AMY を用いる方法 :
 - (1) 2-chloro-4-nitrophenyl- α -maltotriose (G3-CNP)/ α -AMY/2-chloro-4-nitrophenol (CNP) 比色法
 - (2) p-nitrophenyl- α -D-maltotriose (G3-pNP)/ α -AMY/p-nitrophenol (pNP) 比色法
 - (3) 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltopentaoside (G5-CNP)/ α -AMY/CNP 比色法
- 2. PL-D を用いる方法 :
 - (1) phosphatidylcholine (PC)/PL-D/choline oxidase (COD, EC 1.1.3.17)/peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)/phenol/4-aminoantipyrine (4-AAP) 比色法
- 3. PK を用いる方法 :
 - (1) phosphoenolpyruvate (PEP)/PK/hexokinase (HK, EC 2.7.1.1)/glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) UV 法

[註] 略号は本文などを参照

定可能であるが、臨床検査の分野では現在特殊な場合以外、ほとんど使用されていない。

一方最近 Ca^{2+} の酵素的測定法が、次々開発されているが、これ等は Ca^{2+} 依存性の活性を示す酵素を利用する方法である。すなわち図2. に示した様に、 Ca^{2+} 依存性の α -amylase (α -AMY, EC 3.2.1.1) や、phospholipase D (PL-D, EC 3.1.4.4.) および pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40) を用いる方法がある。これ等の中 α -AMY を用

図1. Ca の測定法 — 酵素的測定法は除く —

I. 重量法

- 1. シュウ酸カルシウム沈殿法
- 2. ピクロロン酸カルシウム結晶重量法

II. 容積法

- 1. シュウ酸カルシウム沈殿加熱($\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO}$)/0.01 NHCl 滴定法
- 2. シュウ酸カルシウム沈殿/希硫酸/遊離シュウ酸/KMnO₄滴定法
- 3. シュウ酸カルシウム沈殿/希硫酸/遊離シュウ酸/硫酸セリウム滴定法
- 4. シュウ酸カルシウム沈殿/希硫酸/遊離シュウ酸/硫酸セリウム過剰添加/硫酸第一鉄アソニウム滴定法

III. EDTA 滴定法

- 1. EDTA-Ca 錫塩形成/Ca 指示薬* 添加/EDTA 滴定
 - * murexide, calcon, calcein, cal-red, eriochrom black T, eriochrome blue S. E., ミツイクロール緑, acid alizarin, methylthymol blue, nuclear fast red (NFR, 紫青色), hydroxynaphthol blue, 等

IV. 直接比色法

- 1. Ca との錯塩形成/Ca 指示薬* 添加/比色測定
 - * alizalin, plasma corinth B (赤色), nuclear fast red (NFR, 紫青色), o-cresolphthalein complexone (OCPC, 深紅色), murexine, glyoxal bis (2-hydroxyanil), hydroxynaphthol, 等

V. 間接比色法

- 1. シュウ酸カルシウム沈殿形成/過剰の KMnO₄ 添加/KMnO₄ の吸光度の減少を測定
- 2. シュウ酸カルシウム沈殿形成/ CaCO_3 に変換/OCPC 添加/比色測定
- 3. クロラニル酸カルシウム沈殿形成/EDTA 添加/遊離クロラニル酸比色
- 4. クロラニル酸カルシウム沈殿形成/ FeCl_3 比色測定
- 5. naphthalhydroxyzam 酸比色法

VI. 蛍光測定法

- 1. calcein-Ca の黄緑色蛍光を測定

VII. 機器分析法

- 1. 炎光分析法
- 2. 原子吸光法
- 3. X線分光分析法
- 4. X線蛍光分析法
- 5. 電気滴定法、ポーラログラフィ
- 6. Ca イオン電極法
- 7. その他

いる方法〔図2中1(1)の方法〕と、PKを用いる方法〔図2中3(1)の方法〕との、反応原理をそれぞれを図3および

図4に示した。これ等の酵素的測定法の本格的評価と今後の普及に、大きな期待が寄せられている。

図3. G3-CNP/α-AMY/CNP 比色法による Ca^{2+} の酵素的測定法

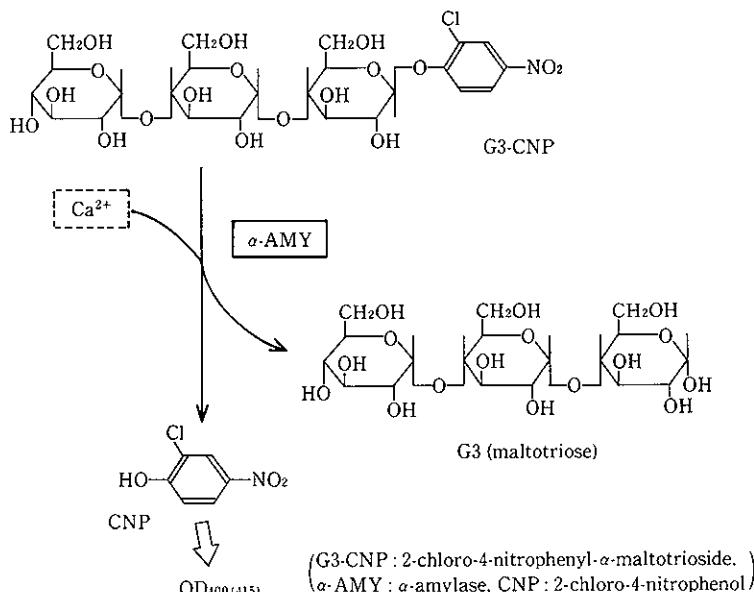
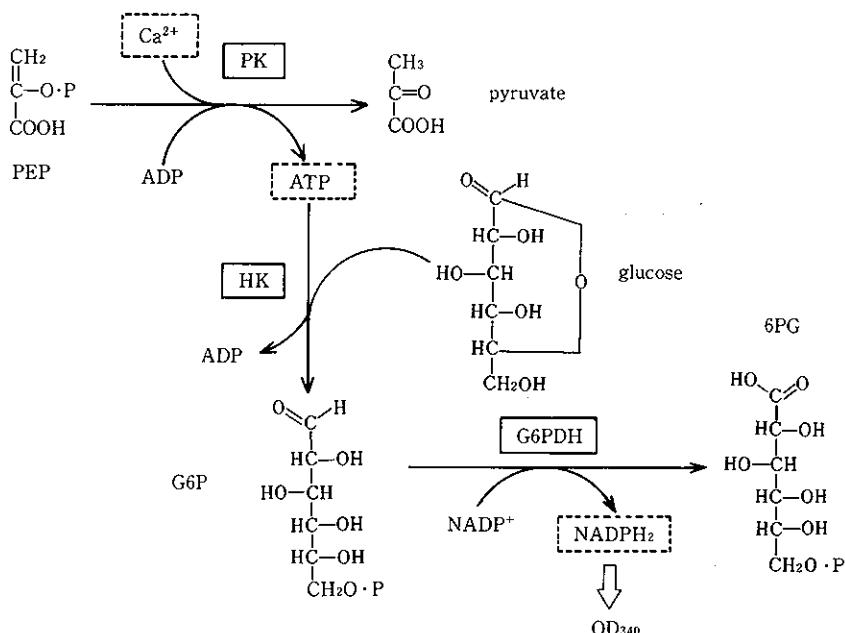


図4. PEP/PK/HK/G6PDH/NADPH₂ UV 法による Ca^{2+} の酵素的測定法



(PEP : phosphoenol pyruvate, PK : pyruvate Kinase, HK : hexokinase, G6P : glucose-6-phosphate, G6PDH : glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6PG : 6-phosphogluconate)

III. マグネシウム Mg^{2+}

1. Mg^{2+} の生理的並びに診断的意義 :

生体内での Mg は Ca と同じく、約 70% が骨にリン酸塩として存在する。体液内分布としては、細胞内液に多い。 Mg^{2+} は解糖系酵素、尿素サイクル酵素、phosphatase、多くの酵素の賦活剤として重要である。血漿中では Mg の約 20% は蛋白と結合した、いわゆる非透析性 Mg として存在している。

血清 Mg の正常値は 1.7~2.3 mg/dl (原子吸光分析法) とされているが、40 歳以上で、また女性でやや低値を示す傾向がある。また赤血球中の Mg は 4.5~6.5 mEq/l である。

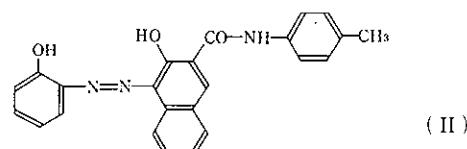
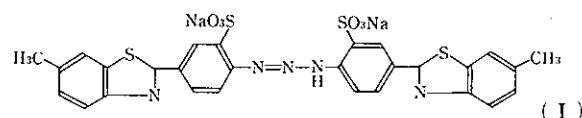
日常血清 Mg 値を測定することはあまり多くないが、高 Mg 血症では心臓の刺激伝達系に阻害が起こり、最終的には呼吸まひを招来し、心筋の拡張期での心停止につながる。血清中 Mg 値が上昇する疾患としては、急性並びに慢性腎不全乏尿期、不適切な透析液による人工透析後、Addison 病、甲状腺機能低下症、急性肝炎、含 Mg 剤や vitamin D 投与時、ミルクアルカリ症候群があげられる。一方減少する疾患としては急性並びに慢性腎炎多尿期、尿細管性 acidosis、aldosterone 症、甲状腺機能亢進症、吸収不全症候群、ループ利尿剤、および低 Mg 輸液の大量投与があげられている。

2. Mg^{2+} の測定法 :

(1) キレート剤を用いる比色定量法 —

Ca と同様各種のキレート剤比色定量法が開発されてい

るが、その中で titan yellow (I) と xylylidyl blue (II) が実用されており、特に後者の方が感度、再現性で優れている。



(2) 原子吸光法 —

他イオンの干渉がない利点がある。

(3) 酵素的測定法 —

Ca の場合と同じく Mg^{2+} を必要とする酵素を用いる測定法が開発されている。図 5 には現在報告されている Mg^{2+} の酵素的測定法を列記したが、hexokinase (HK, EC 2.7.1.1), 或いは glucokinase (Glc. K, EC 2.7.1.1-1) を用いる方法、glycerokinase (GK, EC 2.7.1.30), phosphoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1), 或いは iso-citrate dehydrogenase (ICDH, EC 1.1.1.42) を用いた UV 法や比色法がある。この中比較的最近報告された 2 (2) の方法と、4 (1) の方法について、その反応原理をそれぞれ図 6 と図 7 に紹介した。

図 6 . glycerol/GK/G3POD/POD/4-AAP/N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidine 法による Mg^{2+} の定量

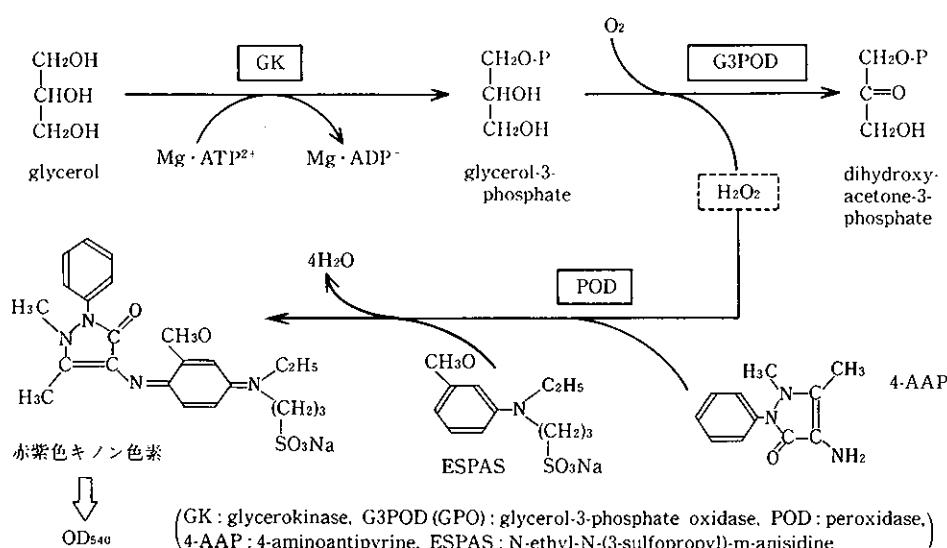


図5. 酵素を用いる Mg^{2+} の測定原理

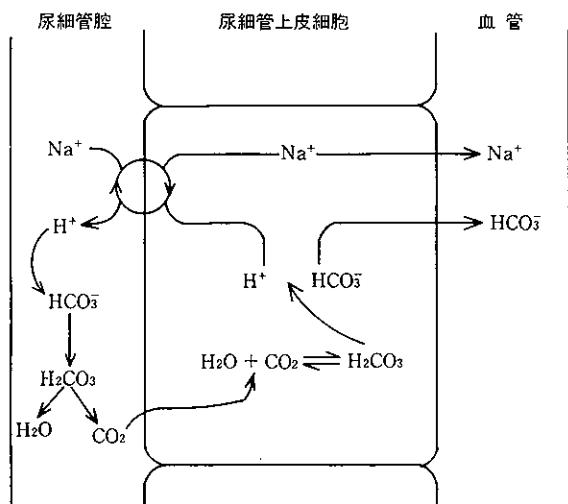
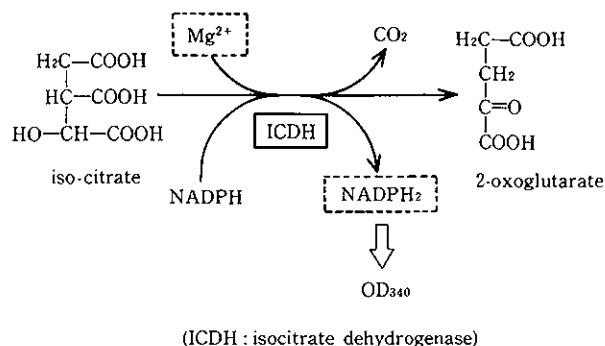
1. HK 或いは Glc・K を用いる方法 :
 - (1) glucose/HK/G6PDH/NADPH₂ UV 法
 - (2) glucose/Glc・K/G6PDH/NADPH₂ UV 法
 - (3) glucose/Glc・K/G6PDH/glutamate oxidase (GLOD, EC 1.4.3.7)/K₃Fe(CN)₆/luminol 化学発光法
2. GK を用いる方法 :
 - (1) glycerol/GK/glycerol-3-phosphate oxidase (G3POD; GPO, EC 1.1.3.21)/POD/4-AAP/2-hydroxy-3, 5-dichlorobenzene sulfonate (HDCBS) 比色法
 - (2) glycerol/GK/GPO/POD/4-AAP/ESPA 比色法
3. PGM を用いる方法 :
 - (1) glucose-1-phosphate (GIP)/PGM/G6PDH/NADPH₂ UV 法
4. ICDH を用いる方法 :
 - (1) iso-citrate/ICDH/NADPH₂ UV 法

IV. 重炭酸イオン HCO_3^- (或いは 二酸化炭素 CO_2)

1. HCO_3^- の生理的並びに診断的意義 :

生体内では、呼吸の結果各種栄養物から CO_2 が生成される。生成した CO_2 は体液中に溶存し、また H_2O と化合して H_2CO_3 となり、さらに解離して HCO_3^- となり、その有する緩衝作用が体液の酸・塩基平衡の重要な役割を果している。

血漿中の HCO_3^- は Cl^- と共に陰イオンの主役となっている。最近電極法により他イオン同様測定が容易となり、臨床検査、特に緊急検査の目的でよく利用されている。いわゆる血漿の HCO_3^- の正常値(基準値)は、21~27 mmol/l(ガラス電極法)とされている。総 CO_2 は24~30 mEq/lである。

図8. 尿細管における HCO_3^- 再吸収の機序図7. iso-citrate/ICDH/NADPH₂ UV 法による Mg^{2+} の酵素的測定法

呼吸性 acidosis では血中の CO_2 が上昇し、代謝性 acidosis では著しく低下する。溶存 CO_2 , H_2CO_3 , および HCO_3^- の合計値を総 CO_2 といい、陽イオンの和 ($Na^+ + K^+$) と陰イオンの合計 ($Cl^- + HCO_3^-$) の差は anion gap と称して、一定値(約 10 mEq/l) となっている。尿細管における HCO_3^- 再吸収の機序を図8に示したが、 HCO_3^- は糸球体を自由に通過するが、尿細管上皮は HCO_3^- を透過せず、 $Na \leftrightarrow H$ 交換に関係する間接的機序により HCO_3^- が再吸収される。

2. HCO_3^- の測定法

総 CO_2 の測定法としては次のものがある。

(1) CO_2 電極法 —

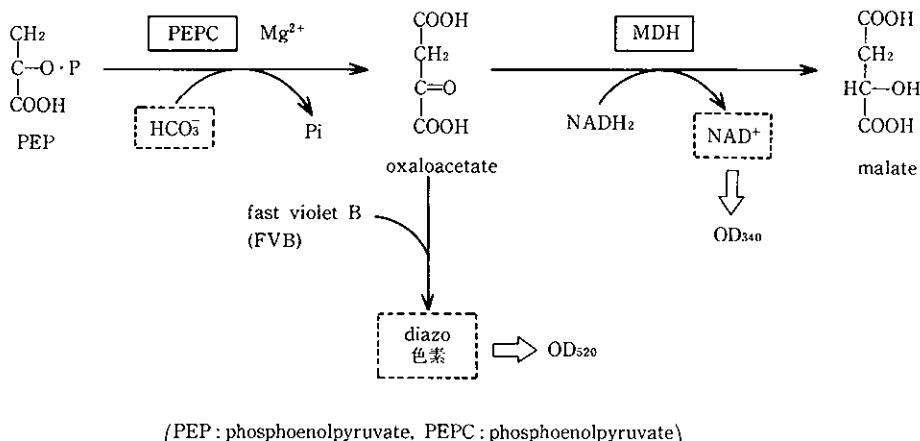
血清試料を希釈して CO_2 電極で測定する。正確な酸・塩基平衡の状態を知る目的では、動脈血を用い血液ガス分析計で直ちに測定する。

(2) 比色測定法 —

血液に乳酸を添加し、発生するガスを弱アルカリ性溶液に吸収させ、中和によって変化する pH を phenolphthalein 指示薬を用いて比色測定する。

(3) 酵素を用いる HCO_3^- の測定法 —

従来電極法が軌道に乗るまでは、 HCO_3^- の測定は容易ではなかった。一方最近開発された酵素的測定法は、操作の面で便利な方法である。図9に示した様に、 HCO_3^- と Mg^{2+} 依存性の phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) を用いる HCO_3^- の酵素的測定法が2種知られている。すなわち共役酵素として malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) を利用する UV rate 測定法と、生成した oxaloacetate を fast violet B (FVB) を用いる diazo coupling 比色法 (OD_{520}) がある。

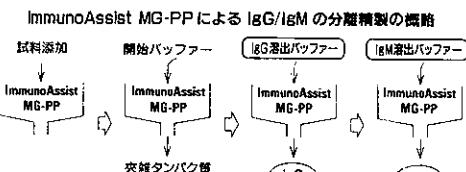
図9. PEPCを用いる HCO_3^- の酵素的測定法

(PEP: phosphoenolpyruvate, PEPC: phosphoenolpyruvate)
(carboxylase, MDH: malate dehydrogenase)

IgM/IgG 分離精製用 ImmunoAssist MG-PP 免疫グロブリンの精製に!!

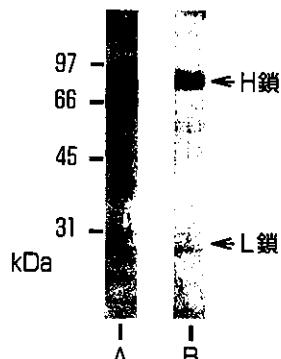
ImmunoAssist MG-PP は、プロテインAなど従来の分離剤に替わるコストパフォーマンスに優れた新しい分離精製剤です。

1. マイルドな分離条件
分離にはすべて中性の緩衝液を使用します。
pHによるダメージを与えません。
2. 優れた耐久性
血清等クレードな物の精製を10回繰り返しても、
精製能は低下しません。
3. 精製可能な動物種が豊富
ヒト、マウス等の哺乳類の他、魚類の IgM
分離精製に成功した例もあります。



開始バッファー : 0.01M リン酸バッファー (pH6.8) など
IgG溶出バッファー : 0.3M 塩化ナトリウム水溶液 (pH6.8) など
IgM溶出バッファー : 0.3M リン酸バッファー (pH6.8) など

モノクロナル IgM (マウス腹水)の精製例



SDS-PAGE A:マウス腹水
B:精製後

生体中の微量必須金属元素(II)

—Mn, As, Se, Mo, Cd—

関西大学工学部 教養化学 教授 工学博士 今 井 弘

1. はじめに

2. マンガン

3. ヒ素

以上前号(通巻162号)掲載

4. セレン

4.1 歴史

セレンは1817年 Berzelius によって、硫酸製造時に出る鉛室泥の中から発見された。この元素は、すでに発見されていたテルル(地球を意味する)と性質が似ているので、これと対応させるために、「月」を意味するギリシャ語の Selene に因んで命名された。

セレンの毒性は昔から知られていて、『東方見聞録』には中国の西北部(現在の甘粛省)に猛烈な毒草が生えているという記録がある。その後の調査によって、この毒草は高濃度のセレンを含んだ土壌で生育した草であることが判明した¹⁵⁾。のことから、セレンは長い間、毒物として取り扱われてきた。しかし、1950年後半から1970年にかけて、生体におよぼすセレンの毒性を調べているうちに、動物はセレンの欠乏によって、種々な障害があらわれることがわかってきた。また、ヒトに対しても重要な元素の一つであることが認められてきた。

4.2 存在

地球上でセレンは硫化物として広く分布しているが、高濃度で集中的に存在している場所は少ない。とくに、日本は低セレン地域になっている。この元素は非金属性と金属性をもっているので、生体内で遊離の状態では、 Se^{2-} , Se^{4+} , Se^{6+} として存在する。

高濃度のセレンを比較的多く含む土壌で生育した草には、乾燥物として数 g/kg のセレンを含んでいる草があるといわれている。

セレンを比較的多く含む食品は魚介類、肉類、卵類、穀物であって、約 0.1 μg/g 程度含まれている。

日本人の血清中のセレンは 0.10~0.15 μg/ml であり、赤血球中には 0.20~0.35 μg/ml 含まれている。しかし、

セレン欠乏症といわれている克山病患者の全血液中のセレン濃度は 0.02 μg/ml 以下であると報告されている¹⁶⁾。

4.3 吸収と排泄

日本人のセレン摂取量は 1 日あたり 100~130 μg であって¹²⁾、その 1/3 は魚介類から摂取している。この摂取量は世界的にやや高い値であるが、適正値の範囲内にある。

セレンは経口吸収されても、必要量だけが生体内に残り、過剰分は Se^{2-} を経て $(\text{CH}_3)_2\text{Se}, (\text{CH}_3)_2\text{Se}^+$ の形でみやかに体外へ排泄される。とくに、高セレン含有食品を多く摂取したヒトほど、尿中のセレン濃度は高い¹⁷⁾。体内に取り込まれたセレンは腸の粘膜上皮細胞で吸収されて血液中に入り、続いて血液中の赤血球、アルブミン、 α -グロブリンによって肝臓、腎臓、心臓、肺臓などに送られる。

4.4 必須性

セレンが必須元素であることを実証したのは Schwarz と Foltz であって¹⁸⁾、彼等はセレン欠乏とラットの肝臓壞疽の因果関係を見出し、亜セレン酸塩の添加によって防止できることを報告した。また、Thompson と Scott はセレン化合物がヒツジ、ウマ、ウシの筋ジストロフィー(白筋症)の治療に有効であることから、哺乳動物に対して微量必須元素であることを確認した¹⁹⁾。

セレン欠乏症には、すでに述べたように中国の東北部から雲南省に至る地帯の風土病である克山病(心筋症を主体とする疾患)、さらにカシンベック病(変形性骨関節炎)などがある。また、多発性硬化病(脱髓性疾患の一種)、クワシオルコル(低タンパク栄養失調症)、不妊症なども知られている。

生体内で、セレンはセレノシステインの形態でグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)の活性中心を構成し²⁰⁾、生体内で発生した過酸化水素や種々の過酸化物を除去して、細胞を酸化的な障害から防御する役割を果たしている²¹⁾。

一方、セレンは生体内に取り込まれたヒ素、水銀、カ

HIROMU IMAI

Chemistry of General Education
Faculty of Engineering,
Kansai University

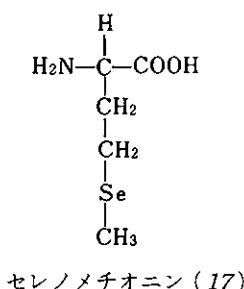
ドミウム、鉛などの重金属イオンと反応して、金属イオン相互間の毒性を軽減する拮抗作用をもっている。たとえば、ヒ素をセレンと同時に摂取すると、すみやかに排泄されるので、ヒ素の毒性が緩和される。また、水銀の蓄積量が多い生体ほど、共存するセレン濃度が高くなっている。それは、セレンが体内で水銀と反応して不溶性の安定なセレン-水銀複合体を形成し、両元素の毒性をたがいに軽減した形態で組織中に蓄積されているからである。

イカやアザラシの肝臓には、100 ppm 以上のセレンと 300 ppm 以上の水銀が蓄積されていて、両元素のモル比は約 1 であると報告されている²²⁾。また、水銀鉱山の従業員について、組織中のセレンと水銀の蓄積量が調べられている²³⁾。それによると、セレンは正常人の数倍から 10 倍も多く、水銀とセレンのモル比は約 1 である。このようなことから、水銀とセレンが 1:1 で結合して不溶性の化合物となって存在していることがほぼ確実になってきた。さらに、カドミウムの急性毒性の軽減にも有効であるといわれている。

以上のように、「毒をもって毒を制する」という諺のように、セレンは無機水銀、メチル水銀さらに他の重金属とも反応して毒性を軽減する。

4.5 酶 素

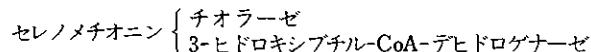
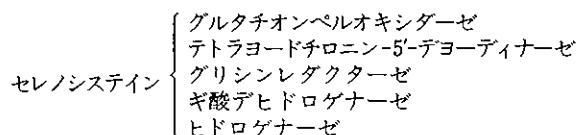
高濃度のセレンを含む土壤で生育した植物はこれを吸収して各種のセレン含有アミノ酸になっている。その化学形態はまだ十分に解明されていないが、小麦の酵素加水分解中にセレノメチオニン (17) が確認されており、また大豆タンパク中におけるセレンの大部分はセレノメチオニンであると報告されている²⁴⁾。このように、食品中のセレンは亜セレン酸やセレン酸の形態ではなく、アミノ酸と結合している。



魚肉中のセレンの化学形態もよくわかっていないが、魚の組織に GSHPx 活性が認められることから、セレノシステイン (Se-cys) の形態で存在しているものと考えられている。

哺乳動物の組織には、多種類のセレン含有酵素が存在する。その中で最も重要な生理機能をもっているのが GSHPx であって、ウシやヒツジの肝臓ならびに血液から分離された。この酵素中のセレンは Se-cys 残基として存在している²⁵⁾。

ここで、セレン含有酵素をあげると、つぎのようなものがある。



Se-cys というのは、図 4 に示したようにシステインの S 原子またはセリンの O 原子が Se 原子で置換したアミノ酸で、ペプチド結合の中にこのような活性中心をもつセレノアミノ酸からなるものがセレン含有酵素である。ここで、Se-cys 残基をもつ主な酵素の特性を表 2 にあげる。なお、酵素 1 分子中における含有セレンの数も併記した。

グルタチオンとは、図 5 に示したように、グルタミン酸、システイン、グリシンがペプチド結合したものであ

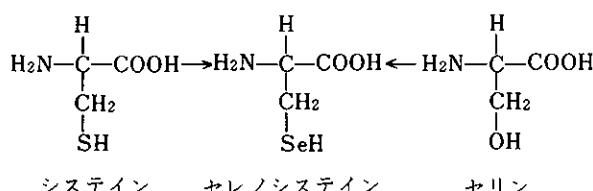


図 4. セレノシステイン (Se-cys)

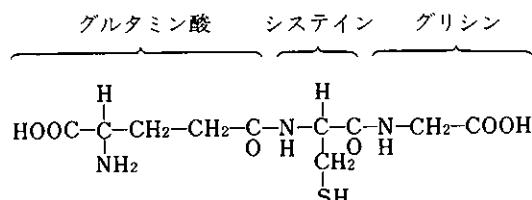


図 5. グルタチオン (GSH)

る。この中で重要な因子はシステインのSHであることから、グルタチオンをGSHと略記される。したがって、システインのS原子がSe原子に置換したものがGSH-Pxである。この酵素は1つのサブユニットに1個のセレンをもち、計4つのサブユニットからなっている。酵素活性はセレン欠乏で低下するが、供給すると回復する。

生体内でGSHPxは赤血球に多く存在し、発生した過酸化水素を水と酸素分子に分解させる触媒である。この酵素によって、細胞膜やヘモグロビンは過酸化水素による酸化から保護されている。一方、ビタミンEは抗酸化剤として過酸化物の生成を抑制する作用をもつことから、GSHPxとの相互関係が注目されている。

表2. セレンを含む酵素

酵素	分子量	金属イオン	作用
グルタチオンペルオキシダーゼ	84,000	4 Se	過酸化物の分解
ギ酸デヒドロゲナーゼ	600,000	1 Se	$\text{HCOOH} + \text{A} \rightarrow \text{AH}_2 + \text{CO}_2$
グリシンレダクターゼ	6,000	1 Se	Glyの脱アミノ化

4.6 毒作用と薬理作用

セレンは高等動物にとって必須元素であるが、毒性も強い元素である。その必須性と毒性の適用範囲は狭く、そのため、欠乏症や過剰症があらわれる²⁶⁾。

セレンは植物にとっても有害であるが、高濃度のセレンを含む土壌で生育した植物はセレンに対して耐性をもつようになる。

アメリカ中部の平原で、家畜がセレン含有量の高い植物を食べたために、アルカリ病や暈倒病が発生した。また、ヒトに対しても高濃度のセレンを摂取すると、種々な障害があらわれる。

ヒトに対するセレンの毒性については、種々な説明がなされている。高濃度の無機態セレンを摂取すると、タンパク質、核酸、複合糖質中のS原子がSe原子に置きかわり、正常な機能が発現できなくなる。これが毒性としてあらわれる。また、セレンを含む金属酵素であるGSHPxは過酸化水素を分解させる性質をもっている反面、この酵素中のセレンが生体内的酸素分子と反応して、図6のように有毒な活性酸素種(O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$)を発生させることもわかってきた²⁷⁾。このように、セレン化合物は生体内で二面性をもち、複雑な挙動を示す。

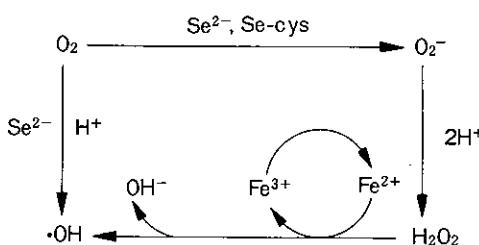
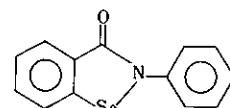


図6. 生体内におけるSeの挙動

一方、ある種の有機セレン化合物には、薬理作用がある、抗炎症剤、免疫促進効果剤、制ガン剤などの医薬品が開発されている。たとえば、低毒性の有機セレン化合物であるエブセレン(18)は炎症部位において、大量



エブセレン(18)

に発生した活性酸素種を分解除去する能力、すなわちスカベンジャーとしての抗炎症作用を示す。また、セレンの拮抗作用の応用として、強い制ガン活性をもつシスプラチン([PtCl₂(NH₃)₂])は副作用として強い腎毒性を示すが、亜セレン酸を併用すると、抗腫瘍性に影響をおよぼすことなく、腎毒性を軽減させることができるという報告がある²⁸⁾。

5. モリブデン

5.1 歴史

この元素は1778年に発見された。molybdosはギリシャ語で鉛を意味することから、古代では方鉛鉱をモリブデンと呼んでいた。その後、この名称は主成分としてMoS₂を含む輝水鉛鉱にも用いられるようになり、今日に至っている。

この元素は生命の誕生と深い関係があって、「生命はモリブデンの存在量が多い宇宙空間のどこかで発生した」と言われていた。しかし、現在では、太古の海は現在の海と異なり、多くの微量元素とともに鉄の濃度とほぼ同程度のモリブデンが多量に含まれていたことから、「生命は海から誕生した」といわれている。その科学的根拠として、ある種のモリブデン含有酵素の活性中心が、生物

誕生以前から存在していたと考えられているフェレドキシンの構造⁴⁾と似ているからである。

5.2 存 在

モリブデンは地球上に広く分布しているが、比較的少量で、平均 1.5 ppm である。また、海水中に約 0.01 ppm 含まれている。動植物中には、低濃度であるが、組織中に存在する。モリブデンの含有量が多い食品として、豆類に 0.2~5.0 ppm、穀類に 0.1~1.2 ppm 含まれている。これについて多いのが野菜類で、比較的乏しいのは果実類、食肉類、酪農食品である。

体重70kgの成人に対するモリブデン含有量は約10mgである。肝臓には約3.2 ppm、腎臓には約1.6 ppm含まれていて、他の臓器と比べて高濃度である。血液中には約6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 含まれている。

5.3 必須性

この元素は1930年、窒素固定菌の成長に必要であることがわかつて以来、すべての窒素固定生物や根粒バクテリアにとって欠かすことができない元素であることがわかつてきた。一方、モリブデンが欠乏した土壌で生育し

た柑橘類の葉は、黄斑病(Yellow spotting)になり、またブロッコリー やカリフラワーも鞭状葉症(Whiptail)にかかることがわかった。さらに、このような土壤では、野菜の収穫量が減少するが、モリブデン酸塩を与えると回復することも明らかになった。

動物に対しても、モリブデンの含有量が少ない牧草を摂取すると、組織に銅が蓄積されやすくなり、このために銅中毒を引き起こすことが指摘されている。

このようなことから、モリブデンは必須元素の1つに数えられるようになった。

5.4 醇类

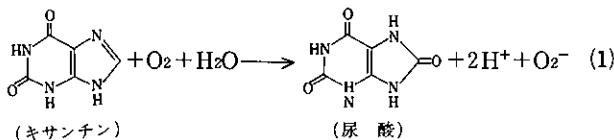
動植物体から単離された酵素であるフラビンタンパク酵素* やキサンチンオキシダーゼの活性中心にモリブデンが存在することが確認されて以来²⁹⁾、モリブデンを含む多くの酵素が見つかってきた。これらの酵素は生体内における酸化-還元反応、とくに窒素固定の触媒として極めて重要な働きをする。ここで、代表的な酵素を表3にあげる。なお、酸化数は普通、2, 4, 6をとるが、これらの酵素中ではよくわからないものがある。

表3. モリブデンを含む酵素

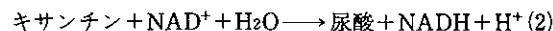
酵 素	分子量	金属イオン	存 在
キサンチンオキシダーゼ	275,000	2 Mo, 8 Fe	牛乳, 動物の肝臓
キサンチンデヒドロゲナーゼ	300,000	2 Mo, 8 Fe	細菌
アルデヒドオキシダーゼ	270,000	2 Mo, 8 Fe	兔肝臓
亜硫酸オキシダーゼ	114,000	1 Mo	動物の肝臓
ギ酸レダクターゼ	280,000	1~2 Mo	E. coli
ギ酸デヒドロゲナーゼ	340,000	1 Mo, 1 Se	植物の種子
ニトロゲナーゼ	226,000	2 Mo, 24 Fe	藍藻, 根粒菌

酸化作用がある酵素には、キサンチンオキシダーゼ、キサンチンデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、亜硫酸オキシダーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼなどがある。これらの酵素の活性中心は $Mg^{VI}O_2$ または $Mg^{VI}OS$ からなっている。

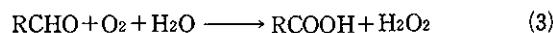
キサンチンオキシダーゼは動物体に広く分布していて、ウシの乳汁から単離したものは赤褐色である。この酵素はキサンチンを尿酸に酸化させるときの触媒である。(1)



コチニアミドアデニンジヌクレオチド) が関与する。



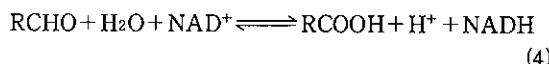
アルデヒドオキシダーゼは動植物や微生物中に広く分布している酵素で、アルデヒド類をカルボン酸に酸化させるときの触媒である。(3)式に示したように、この反応で過酸化水素が発生する。



アルデヒドデヒドロゲナーゼは動物の肝臓にあって、

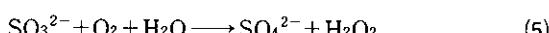
*これはリボフラビンを補欠分子族とする複合タンパク酵素である。

アルデヒド類をカルボン酸にするときの触媒で、(4)式のように、NAD⁺が関与する。



この酵素は逆反応においても触媒作用をする。

亜硫酸オキシダーゼは亜硫酸を硫酸に酸化するときの触媒である。(5)式に示したように、この反応で過酸化水素が発生する。



この酵素の活性中心は図7のように推定されている³⁰⁾。

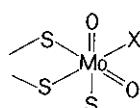
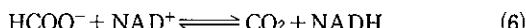


図7. 亜硫酸オキシダーゼの活性中心

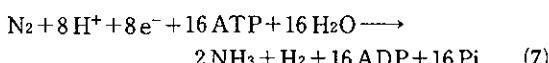
ギ酸デヒドロゲナーゼはギ酸イオンを二酸化炭素に酸化するときの触媒で、(6)式のように NAD⁺が関与する。



また、逆反応においても触媒作用を示す。この酵素には、セレンが含まれている。

還元作用がある酵素には、ニトロゲナーゼ、硝酸レダクターゼがある。このほかに、ギ酸レダクターゼ、亜硫酸レダクターゼなども知られている。

ニトロゲナーゼは、植物や微生物が窒素の代謝を行うために必要な酵素である。これは大気中に含まれている80%の窒素分子を固定する細菌中に含まれている。また、根粒バクテリア、シロアリ、フナムシの腸内細菌にも存在している。これらの細菌やバクテリアによる窒素固定量は1億5千万トン以上であるといわれていて、環境を破壊することなく、(7)式に示したように大気中の窒素をアンモニアに変換し、アミノ酸の生合成のための窒素源になっている。



ここで、ATPはアデノシン三リン酸、ADPはアデノシン二リン酸、Piはリン酸である。

この酵素の活性中心の構造が広域X線吸収微細構造解析(EXAFS)法によって調べられている³¹⁾。

図8に示したように、この構造はFe-Sタンパク質であるフェレドキシンの活性中心に類似し⁴⁾、モリブデンは無機態のS原子3個とシステイン中の有機態S原子2個と配位している。

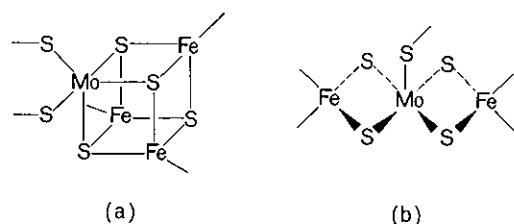
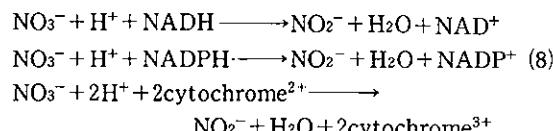


図8. ニトロゲナーゼの活性中心の予想構造

硝酸レダクターゼは硝酸態の窒素をアンモニア態窒素に変換する酵素である。この酵素は電子供与体によって数種類ある。その電子供与体には、NADH、NADPH(ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリボ核酸)、シトクロムなどがあって、たとえばNADHが電子供与体である酵素を硝酸レダクターゼ(NADH)という。硝酸イオンが亜硝酸イオンに還元される触媒反応を(8)式に示す。



5.5 毒作用

この元素の毒性は比較的弱い。一般に、動物が高濃度のモリブデンを摂取すると、成長が遅れ、体重は減少し、貧血や皮膚の脱色が生じる。動物に対する耐性は牛<羊<馬=豚の順である。

ウシの場合、モリブデンを多量に含む草を摂取すると、激しい下痢症状があらわれる。この症状は多量の銅を投与すると回復する。ヤギの場合、モリブデンの摂取量が少ないと、肝臓に毒性を示す程度の銅が蓄積する。それに対して、モリブデンを取り過ぎると、銅の欠乏があらわれる。ブタの場合、1000 ppmのモリブデンを含む飼料を連続3ヶ月間投与しても影響があらわれない。しかし、4000 ppmになると、貧血症状があらわれ、それ以上では、下痢を起こす。⁹⁹Moを用いた研究によれば、ブタの耐性は早い吸収と早い排泄によるものであると説明さ

れている。

ヒトに対しては、健康ならびに病気のいずれにもモリブデンの顕著な効果が認められていないので、十分に知られていない。

モリブデンと銅との間には複雑な関係があって、両者間に拮抗作用が認められる。したがって、動物に対するモリブデンの毒性は銅との比に支配される。たとえば、硫酸塩の還元によって生成した硫化物がモリブデンと反応してチオモリブデンイオンとなり、これが銅と反応して不活性で安定なCuMoS₄を形成し、モリブデンの毒性を軽減するものと考えられている。

6. カドミウム

6.1 歴史

この元素は1817年に、菱亜鉛鉱から発見された。鉱石中では、おもに硫化物として存在する。カドミウムという名称は、鉄が混ざった酸化亜鉛、またはそれを含む鉱石をカラミン(calamine)と呼んでいたので、そのラテン語である cadomia に因んで命名された。

6.2 存在

カドミウムは少量であるが、海水や土壤中に含まれている。ヒトはこのようなところで生育した動植物を摂取するので、体内にもカドミウムが存在している。

海藻や海産物中のカドミウムが初めて測定されたのが1941年であって、それらの乾燥物中に0.1~1 ppm含まれていることが報告されている。その後の測定によって、魚介類では肝臓に多く存在し、イカや二枚貝中には約100 ppm含まれていることがわかった。

野菜類には0.1 ppm以下、果実類には0.01 ppm以下、また米には0.04~0.08 ppm含まれている。

日本人の体内には30~45mg含まれていて、その1/3は腎臓に、1/6は肝臓にそれぞれ存在する。そのほかに、脾臓、甲状腺、胆嚢、睾丸にやや多く、骨、脳には少ない。正常人の血液中には約0.7 μg/100 ml、また尿中には約1.3 μg/100 mlで極めて低い。毛髪中には、男子で約3 μg/g、女子で約2 μg/g含まれている。

6.3 吸収と排泄

ヒトはカドミウムを経気道と経口から吸収する。日本人のカドミウム吸収量は1日あたり3~150 μgで、そのうちの18~27 μgは食物から摂取している¹²⁾。

経口吸収した場合、主として小腸から体内に吸収され、その大部分は体外に排泄されるが、一部は毛髪、汗、尿からも排泄される。血液中に移ったカドミウムはメタロチオネインの形態で腎臓や肝臓などに蓄積される。蓄積されたカドミウムの生物学的半減期は長く、10~30年で

あるといわれている。

6.4 必須性

この元素はイタイイタイ病(以下イ病)で有名になったことから、毒性に関する研究や記録が多く、必須性に関してはあまり見当たらない。しかし、同地域に住む同年代、同性のヒトについて、血管大動脈を比較した結果、イ病患者(70才以上)は健康人よりも動脈硬化が起きにくいことが明らかになり³²⁾、この元素の必須性について議論され始めてきた。

6.5 タンパク質

Kägiらはウマの腎臓に多量のカドミウムが含まれていることを見出したことから、これを単離する研究を行った。その結果、カドミウムを5.9%、亜鉛を2.2%含むタンパク質を得た。この物質の化学構造はアミノ酸残基61とSH基をもつシステイン残基20からなっていて、数種の2価の金属イオンを配位することができる活性部位が7ヶ所あることから、これをメタロチオネイン(metallothionein)と名づけた³³⁾。

メタロチオネインと金属イオンの結合力は $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$ の順に弱くなる。この順序は生体内に存在する金属イオン濃度に反比例し、毒性の強さに比例している。このことから、メタロチオネインは微量で強い毒性をあらわす金属イオンと強く結合し、毒性の発現を阻止する役割をもっている。さらに、貯留や輸送に関与することから、体外に排泄させる作用もある。

6.6 養作用

カドミウム中毒は第二次世界大戦のとき、アメリカで電気冷蔵庫の製氷皿、金属食器のメッキなどにカドミウムが用いられたことから発生した。また、1940年頃からカドミウムを取り扱うメッキ工場やアルカリ蓄電池工場における従業員の間でも、発生し始めた。その後、基準量以上のカドミウムを含む環境汚染地域で生育した米や野菜を摂取したために、腎臓障害があらわれ、イ病と呼ばれる骨軟化症が発生した³⁴⁾。このイ病の発生の前ぶれとして、近位尿細管機能障害が出現する。この障害にかかると、カルシウムやリンの代謝異常があらわれ、とくにイ病に関係があるカルシウムの尿への排泄量が注目されている³⁵⁾。このことから、カドミウムは害毒をあたえる元素として、また環境を汚染する元素として関心を呼ぶようになった。

この元素の経気道吸収による急性中毒として、胸痛、頭痛、めまい、咳、たん、鼻粘膜の異常、咽喉の刺激感、呼吸困難などの症状があらわれる。経口吸収による急性中毒として、食欲不振、嘔吐、下痢などの胃腸障害があらわれる。慢性中毒になると、腎臓疾患となり、尿細管

機能障害を起こすのが特徴である。末期になると、イ病といわれる骨軟化症になる。この病気の発生はカルシウムやリンの代謝異常によるものであると考えられている。この代謝異常はカドミウムによって腎臓のビタミンDの活性*が阻害され、その結果、7-ジヒドロコレステロールから生成するビタミンD₃が欠乏し、Ca²⁺が骨に沈着しなくなると説明されている。

生殖作用に対するカドミウムの毒性研究がある。雄のラットに塩化カドミウム0.02~0.04 mM/kg 体重を注射すると、睾丸の出血による壞死が認められた。この壞死はカドミウムが睾丸への血液供給を妨害するためであるといわれている。このような現象は雄のラットにもあらわれ、排卵のない卵巢に大量の出血による壞死がみられる。そのほか、カドミウム中毒になると、ラットや仔ウシの腎臓と肝臓はいちじるしく障害をうけ、また赤血球やヘモグロビン濃度の減少もみられる。

カドミウムの生物学的重要性は毒性のほかに、高血圧患者の尿を検査すると、正常人よりも高濃度のカドミウムが排泄されていること、また腎臓にも正常人よりも多量のカドミウムが存在することから、高血圧症と関係があるのでないかといわれている。

参考文献

- 15) H. A. Schroeder, D. V. Frost, J. J. Balassa, *J. Chronic. Dis.*, **23**, 227(1970).
- 16) J. H. Watkinson, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 936(1981).
- 17) 吉田宗弘, 栄食誌, **44**, 357(1991).
- 18) E. J. Schwarz, C. M. Foltz, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292(1957).
- 19) J. N. Thompson, M. L. Scott, *J. Nutr.*, **67**, 335(1969).
- 20) L. Flohe, W. A. Guenzler, H. H. Schock, *FEBS Lett.*, **32**, 132(1973).
- 21) C. Little, P. J. O'Brien, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145(1968); C. Kim, K. Yasumoto, T. Suzuki, M. Yoshida, *Nutr. Res.*, **8**, 767(1988).
- 22) J. H. Koeman, W. H. M. Peeters, C. H. M. Koudstaal-Hol, P. S. Tjioe J. J. M. DeGoeij, *Nature*, **245**, 385(1973).
- 23) 永沼 章, 井村伸正, 生化学, **59**, 1339(1987).
- 24) K. Yasumoto, T. Suzuki, M. Yoshida, *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 463(1988).
- 25) J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, W. G. Hoekstra, *Science*, **179**, 588(1973).
- 26) 桜井治彦, 土屋建三 訳, National Council 編, “環境汚染物質の生体への影響 4. セレン”, p. 129, (1978), 東京化学同人.
- 27) 濑子義幸, 化学, **49**, 483(1994), 化学同人.
- 28) A. Naganuma, M. Satoh, N. Imura, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 217(1984).
- 29) D. A. Richert, W. W. Westerfeld, *J. Biol. Chem.*, **203**, 915 (1953).
- 30) J. Brordas, R. C. Bray, C. D. Garner, S. Guttridge, S. S. Hasnatin, *Biochem. J.*, **191**, 499(1980); S. P. Cramer, R. Whal, V. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7721(1981).
- 31) S. P. Cramer, K. O. Hodgson, W. O. Gillum, L. E. Mortenson, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3398(1978).
- 32) S. Takebayashi, T. Harada, S. Yoshimura, *Environ. Health Rep.*, **54**, 207(1988).
- 33) J. H. R. Kägi, B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460(1960); **236**, 2435(1961).
- 34) 萩野 昇, 吉岡金市, 日整会誌, **35**, 812(1961).
- 35) 青島恵子, 加藤輝隆, 寺西秀豊, 堀口兵剛, 加須屋実, 日衛誌, **47**, 1009(1993).

*これはカルシフェロールともいわれ、カルシウムとリンの吸収を促進する。

ミルクオリゴ糖（乳中少糖）の比較生化学（II）

—— 化学構造的特徴とその利用性（その2）——

東北大学農学部 助教授 農学博士 斎藤忠夫
帯広畜産大学畜产学部 助教授 農学博士 浦島匡

1. はじめに

これまで、ヒトミルク (Human breast milk, 以下人乳) から単離され、化学構造の決定されている60種類以上の「ミルクオリゴ糖 (Milk oligosaccharide)」の構造上の特徴を中心に、最新の文献紹介も含めて考察してきた¹⁻³⁾。これらの研究の歴史的背景には、小児栄養学における小児科医の立場での興味関心が存在した。とくに、母乳栄養児の腸管に優勢で、感染防御に関係の深いビフィズス菌 (*Bifidobacterium*) を特異的に増殖させる因子 (ビフィズス因子) の検索を目的として初期の研究が開始された。また同時に、不整炭素化合物研究の有機化学者にとって、糖質は格好の生物素材と考えられ、ミルクオリゴ糖の研究が進展した。近年では、ガン研究などの医学・薬学的視点から、これらの研究がさらに重要度を増してきたこと等について述べてきた。

人乳は、ラクトース (Lactose, 乳糖) 以外のミルクオリゴ糖群が、全泌乳期を通して存在することが最大の特徴であり、特筆される点でもある。なぜなら、通常の哺乳動物種（特に我々にミルクを供給する関係の深い複胃動物などの反芻（すう）動物）では、ミルクオリゴ糖は、分娩後しばらくの間に分泌されるいわゆる「初乳」にのみ含まれている特殊なオリゴ糖であり、泌乳期が進むに連れてミルク中から忽然と姿を消すのが常だからである。著者らは、「ミルク中に合目的性の無い成分は存在しない。」という基本的な考え方とスタンスを取っており、この視点からこれらのミルクオリゴ糖には、従来言われているビフィズス因子=糖源という余りに単純な結論を遙かに超えた、重要な生理的役割（生物活性）を発現するために、乳腺細胞により合目的に生合成されてきたに違いないと考え始めている。近年、生体機能を調節する作用を摂取後に発現するために、予め設計された成分例としてミルクタンパク質が注目されて来ており、「食品の第三次機能」と呼ばれている。我々は、これらミルクオリゴ糖にこの生体機能を調節する第三次機能が有るのではないかと、今後の研究に期待を膨らませている。

地球上で我々人類が多量に利用している家畜乳の中ではウシ、ヒツジ、ウマおよびヤギなどの代表的な動物種が存在するが、それらのミルクオリゴ糖については十分に研究が進んでいるとは言いがたい。そこで、今回はウシの分泌するミルクについて考え、従来の研究成果と合わせて、筆者らの最新の研究成果を紹介し、再びミルクオリゴ糖の存在意義についてヒトの場合と対比させながら、考察を進めるこにする。

稀少動物を含めた多くの哺乳動物種におけるミルクオリゴ糖の研究は、これまで著者ら以外にはほとんど行われていなかったものである。特に、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル法による機器分析を中心とする筆者らの一連の研究成果は、この分野研究において従来に無かった新しい切り口の研究手法を提示していると考えている。

2. ウシミルクオリゴ糖の種類とその特徴

我々が日常的に食卓で飲んでいる牛乳は、ウシ常乳 (bovine normal milk) と言われ、泌乳期では分娩後一週間以降に分泌される普通のミルクである。以後、ウシ常乳を単に「牛乳」と呼ぶことにする。ウシの分娩後から泌乳が終了するまでの期間は約300日であるが、ミルクの組成はその泌乳期の進行とともに大きく変化する。牛乳に含まれている糖質は、その99.8%以上がラクトース (Gal β1-4 Glc) であり、これ以外のミルクオリゴ糖は存在しないと言われている。しかしながら、筆者らは大量の牛乳を処理すると、ラクトース以外にも種々のオリゴ糖が存在していることをペーパクロマトグラフィー (PC) 分析では確認しているが、量的には確かに極微量ではある。

一方、分娩後1週間程度に渡って分泌されるウシ初乳 (colostrum) には、ラクトース以外に数パーセントの含有量で、この哺乳動物種に特徴的なミルクオリゴ糖が含まれている。これから述べる、興味深い構造知見は、このオリゴ糖画分に含まれるものである。

A. 单糖類

牛乳（ウシ常乳）には、ごく少量であるが5種類の单

TADAO SAITO Dr. Agric.

Laboratory of Animal Products Chemistry,
College of Agriculture, TOHOKU University

TADASU URASHIMA Dr. Agric.

Faculty of Animal Science, OBIHIRO University
of Agriculture and Veterinary Medicine

糖がタンパク質等に結合しているのではなく、遊離の状態で存在することが1960年代後半には既に知られていた。これら5種の単糖の名称と含有量を、図1に示した。また、Peetersらの初期の研究(1954年)では、PC分析による呈色反応により、ウシ初乳および乳腺組織にはD-系列の2-ケトースの一種であるD-セドヘプツロース(sedoheptulose)の存在が報告されている(図2)。この糖質は、乳腺組織中での糖代謝における中間体とも考えられ注目されているが、最新の分析データによる確認は行われていない。また、常乳期の牛乳には存在しない。牛乳の糖タンパク質(κ -カゼイン、脂肪球皮膜糖タンパク質やラクトフェリンなど)や糖脂質における糖鎖の必須構成糖単位である、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、D-マンノース(D-Man)、L-フコース(L-Fuc)およびN-アセチルノイタミン酸(NANA)などの遊離状態での糖質は検出されず、この点も興味深い点である。

1. D-グルコース(Glc, 13.8 mg)
2. D-ガラクトース(Gal, 11.7 mg)
3. N-アセチルグルコサミン(GlcNAc, 11.2 mg)
4. β -2-デオキシ-D-リボース(2.6-4.5 mg)
5. ミオイソシトール(meso-イソシット, 4-5 mg)

図1. 牛乳中に遊離に存在する单糖の種類と含有量
(数値は、牛乳100ml中の含有量)

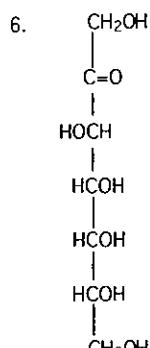


図2. D-セドヘプツロースの化学構造
本名称は慣用名であり、正確にはD-alto-ヘプツロース

B. オリゴ糖類

1. これまでの知見

Truccoらは、初めて牛乳中にラクトース以外の7種のオリゴ糖の存在を示した(1954年)。これらは、2種の酸性糖と5種の中性糖であり、中性糖の中には、D-Manを含むものもあり、当時大変に注目された。しかしながら、後年の研究によりD-Manを含むオリゴ糖は確認されず、かつ同定された中性オリゴ糖には、ラクトースを酵素的に分解除去する際に副生した「転移オリゴ糖」の含まれていることが他の研究者により指摘された。当時は、試料に含まれる多量のラクトースを除くために、バクテリアやカビ由来の β -ガラクトシダーゼによる酵素的加水分解がしばしば行われていた。現在では、この様な

β -ガラクトシダーゼによる酵素的加水分解時には、ラクトースの非還元末端残基のD-Gal分子が、もう1分子のラクトースの非還元末端Gal分子に導入されるという「糖転移反応」の起こる場合が良く知られている。当時はこの反応が知られておらず、実験系からのラクトースの除去にこの酵素を不用意に用いた様である。従って、彼らの報告はArtifactを検討していたとされ、現在では否定されている。

1960年代に入り、著名な有機化学者であり、あのヒトラー総督によりノーベル賞を辞退させられた悲劇のエピソードでも有名なR. Kuhnらの研究グループによる一連の優れた研究により、ウシ初乳中に8種の酸性オリゴ糖の存在が報告された。ミルクオリゴ糖における酸性残基には、他の複合糖質にも広範囲に存在するシアル酸(ノイタミン酸のアシル誘導体)として、NANAまたはN-グリコリルノイタミン酸(NGNA)およびこれらのN,O-ジアセチル誘導体が存在する。シアル酸は、通常の炭素骨格の6員環からなるアルドヘキソースに比較して、炭素骨格は9と分子量の大きな非還元糖であり、現在までに30種類以上の誘導体が知られている。自然界には遊離の状態で存在せず、一般に糖タンパク質やガングリオシド(シアル酸を結合する糖脂質)の糖鎖部分の非還元末端を占めており、酸に不安定な α -グリコシド結合で結合している。自然界には広く分布しているが、植物界には見出されていない特異な糖質であり、シアル酸の構造には種特異性が見られるが、その生物学的意義は完全には解明されていない。代表的なシアル酸2種(NANAおよびNGNA)の構造を図3に示した。

通常の生体pHでは、シアル酸分子中のカルボキシル基はマイナスに荷電しているので、この糖質を結合するミルクオリゴ糖は酸性オリゴ糖と呼ばれる。Kuhnらの報告した8種類のミルクオリゴ糖は、全てがシアル酸を結合しており、これら酸性ミルクオリゴ糖の化学構造を図4に示した。

ヒトミルクオリゴ糖では、1990年にKitagawaらにより発見された2種の酸性オリゴ糖(筆者らの前報³)の図4参照)以外は、全てのオリゴ糖の還元末端はラクトース単位である「Lactose系列」のオリゴ糖であった。しかしながら、ウシ初乳ではN-アセチルラクトサミン(Gal β 1-4 GlcNAc, LacNAcと略)を還元末端に持つ「LacNAc系列」のオリゴ糖(12および13)が存在し、動物種の違いを反映している。

ついで両種で決定的に異なる点は、ヒトミルクオリゴ糖やヒト由来のいかなる複合糖質にも、全く見出されていないNGNAを結合するミルクオリゴ糖(10, 11およ

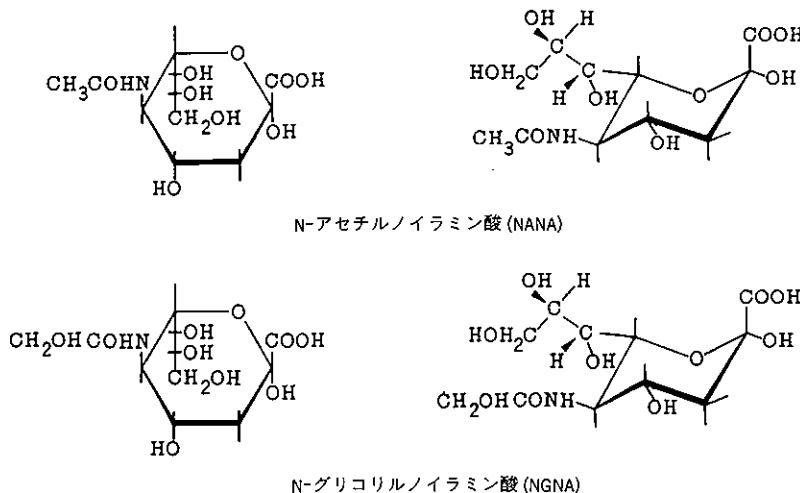


図3. 代表的なシアル酸2種の化学構造

び13) がウシでは存在する点である。このNGNAは、自然界では最も一般的なNANAに次いで存在比の高いシアル酸であるが、血清療法等でヒトの体内に入ると、抗体を生じて病気の原因となる場合がある。また、ヒトでは正常細胞が癌化するのに伴って、糖鎖合成系の狂いからNGNAが合成され、検出されることが知られているが、一般には見出されることが無い糖質である。NGNAは、NANAを前駆物質として酵素的に変換されて作られるが、この変換酵素はヒトの場合複製されず、サイレント遺伝子の形で存在する。ヒトの細胞が癌化すると、遺伝子の複製に狂いが生じ、NGNAが合成されると考えられている。この様に、非常に限られた範囲でのミルクオリゴ糖の相互比較においても、ヒトとウシにおいて動物種の大きな違いを読みとることが出来る。このことは、当然ミルクオリゴ糖を合成する糖質転移酵素系の違いをそのまま反映していると考えられ、糖鎖生物

7. NANA α 2-3Gal(3'-N-アセチルノイラミニルガラクトース)
8. (O-Acetyl)-NANA α 2-3Gal β 1-4Glc(O-アセチル-3'-N-アセチルノイラミニルラクトース)
9. NANA α 2-6Gal β 1-4Glc(6'-N-アセチルノイラミニルラクトース)
10. NGNA α 2-3Gal β 1-4Glc(3'-N-グルコリルノイラミニルラクトース)
11. NGNA α 2-6Gal β 1-4Glc(6'-N-グルコリルノイラミニルラクトース)
12. NANA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc(6'-N-アセチルノイラミニル-N-アセチルラクトサミン)
13. NGNA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc(6'-N-グリコリルノイラミニル-N-アセチルラクトサミン)

図4. ウシ初乳中に報告されているシアル酸を含む7種の酸性ミルクオリゴ糖

学的に大変興味が持たれる。

さらに、ウシではNANAの水酸基（特にC-7からC-9位）の一つが、さらにO-アセチル化されているN,O-ジアセチル（アセチル基を2残基結合している）体の存在する点も、ヒトと異なる点である。ただし、ウシ初乳ミルクオリゴ糖におけるNANA分子上のO-アセチル基の存在は、Kuhnらの報告以来、再確認されていないために、その存在については慎重になる必要があるだろう。

2. 最近の知見

最近、筆者らはウシ初乳中に存在するラクトース以外の遊離の中性ミルクオリゴ糖を再点検し、その種類と正確な構造を調べた。その結果、図5に示すような、8種の新規な中性オリゴ糖を見出した⁴⁻⁶⁾。

N-アセチルラクトサミン(14, Lac NAc)は、これまで複合糖質の糖タンパク質等におけるN-グリコシド型（血清型）糖鎖の構成2糖単位(unit)としてのみ存在しており、遊離状態での存在は確認されていなかった。ウシ初乳中にこの2糖の存在が確認され、天然界で初めて遊離で存在する例証のあることが判明した⁴⁾。この事実は、ウシ初乳 κ -カゼイン（カゼイン成分中の唯一の糖タンパク質成分）には、泌乳初期にのみ常乳 κ -カゼインには見られないLac NAc単位を結合した糖鎖群が存在するという、筆者らの研究過程で偶然見出されたものである。泌乳期が移行するに連れて、この2糖単位は κ -カゼイン糖鎖からもミルクオリゴ糖にも認められなくなることにより、初乳を分泌している乳腺細胞において同一の生合成系により限られた期間のみ作られていることが強く示唆された。

しかしながら、ミルクオリゴ糖の遊離 Lac NAc がゴルジ体の糖鎖合成系で作られているのか、あるいはサイトゾル中で可溶型の糖転移酵素系で作られているのかの証明は無い。また、その生理的存在意義も未解明である。

前述した「Lactose 系列」のオリゴ糖には 5 種 (16, 17, 18, 20, 21) が該当し、別のグループである「Lac NAc 系列」には 2 種 (14, 19) のオリゴ糖が該当した。しかしながら、この 2 系列に当てはまらない別の生合成系を経たと考えられる第 3 の系列に分類される 2 種のオリゴ糖 (7, 15) も存在した。

14. Gal β 1-4 Glc NAc (N-アセチルラクトサミン)
15. Gal NAc β 1-4 Glc
16. Gal β 1-3 Gal β 1-4 Glc (3'- β -ガラクトシルラクトース)
17. Gal α 1-3 Gal β 1-4 Glc (3'- α -ガラクトシルラクトース)
18. Gal β 1-6 Gal β 1-4 Glc (6'-ガラクトシルラクトース)
19. Gal β 1-4[Fuc α 1-3]-Glc NAc (フコシル-N-ラクトサミン)
20. Gal NAc α 1-3 Gal β 1-4 Glc
21. Gal β 1-3[Gal β 1-4 Glc NAc] β 1-6-Gal β 1-4 Glc (ラクト-N-ノボヘンタオース I)

図 5. 新たにウシ初乳中に見出された 8 種類の中性ミルクオリゴ糖の化学構造

さらに、ウシでは非還元末端に D-Gal 残基が α 結合で導入された 3 糖 (17) の存在が特徴的である。また、ヒトには存在しない D-Gal NAc 残基を含み、しかも α 結合で導入されている特徴的なオリゴ糖 (20) の存在は特徴的である⁶⁾。この糖質の NMR 構造解析の解釈は、特に後述することにする。

このように、ウシ初乳に含まれるミルクオリゴ糖群は、人乳に含まれている同群とは実に多くの相違点があることに気が付く。さらに、ヒトではこれらのミルクオリゴ糖が全泌乳期を通して（泌乳初期に限定されず、いつでも）含まれているが、ウシではその含有量は分娩直後から急速に時間単位で減少し、牛乳（常乳）ではほぼラクトースのみとなる。筆者らの検討では、ウシの場合では、分娩後 24 時間から 48 時間後には、これらのミルクオリゴ糖量は激減している。従って、泌乳初期の乳児にのみ生理的な必要性があり、この重要な時期を経過すると生合成系も休止するのではないかと推定している。この様に、ヒトとウシでのミルクオリゴ糖の存在形態は大きく異なり、乳児に対する生理的役割の大きな差異を反映していることが示唆される。

3. ^{13}C -NMR による構造解析例

筆者らの初期の研究では、ミルクオリゴ糖を活性炭ク

ロマトグラフィー、PC およびゲルろ過等により精製し、分析に供した。最近では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離が一般的である。精製したオリゴ糖は、構成糖をガスクロマトグラフィー (GLC) 分析により検討し、ついで、メチル化分析により構成糖間の結合位置を決定する。そして、最終的にアノマー分析と結合位置の確認を核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) スペクトル法により行い、総合的に構造上の矛盾が無かった場合に、初めてその化学構造が確定するわけである。

この NMR 分析には、 ^1H -NMR (PMR, プロトン NMR) と ^{13}C -NMR (CMR, カーボン NMR) の 2 つのモードが選択可能である。研究の初期には、現在の様な高分解能の NMR 装置は普及しておらず、分解能の低い装置を使用した場合には、シグナル同士の重なりの少ない CMR による分析の方が有利であった理由により、筆者らの研究もここからスタートした。1991 年に、筆者らによりウシ初乳中に見出されたユニークな Gal NAc を α 結合で非還元末端に結合する遊離 3 糖 (20) の CMR スペクトラムを図 6 に示した。

この手法の理解しやすい点は、各炭素原子からは 1 本のシグナルしか立ち上がらない点である。これは、測定を通して全ての ^1H を照射するプロトンデカップリング処理をしているために、 ^1H - ^{13}C 間のカップリングは打ち消されており、全ての ^{13}C シグナルはシングレット (單一線) として観察される手法である。この還元性の 3 糖は、既に別の分析により構成糖が Gal NAc, Gal および Glc の 3 種類であり、その結合順序は Gal NAc \rightarrow Gal \rightarrow Glc (H, OH) であり、メチル化分析により各構成糖間の結合位置も Gal NAc (1 \rightarrow 3) Gal (1 \rightarrow 4) Glc であることが確認されている。従って、この CMR 分析で主として確認したいのは、Gal NAc, Gal のアノマー配向性 (α か β か) および結合位置 (Gal の C-3 位および Glc の C-4 位) の確認である。

これまでの手法では、特にこの構成糖の結合配向性の決定 (アノマー分析) が困難であった。この 3 糖でも α -および β -N-アセチルヘキソサミニダーゼを作用させ、どちらの酵素で Gal NAc が遊離してくるかを検討し、アノマーをまず決定する。ついで、同様に α -および β -ガラクトシダーゼを作用させ、どちらの酵素で Gal が遊離するかを決めなくてはならない。目的酵素の精製品が市販されていない場合もあり、何よりも試料を大量に必要とする。クロム酸酸化法によるアノマー分析は、さらに多量の試料を消費する破壊分析法である。この意味では、NMR 分析は非破壊分析であり、試料を全く失うこ

と無くアノマー配向性だけでなく多くの構造情報が短時間で得られるこの手法は、画期的とも言える方法である。

図6のチャート上には、26本のカーボンシグナルが検出されている。この3糖における還元末端のGlc残基に由来するシグナルは、C-1に結合する水酸基の配向性の違いから α -体と β -体の2種が存在するために、6本の2倍の12本が検出される。インターナルユニットのGal

残基からは6本のシグナルが、また非還元末端のGal NAc残基からは、炭素骨格の6本に加えてN-アセチル基由来の特徴的な2本のシグナル（メチル基が25 ppm付近の高磁場、カルボニル基が180 ppm付近の低磁場）の8本が得られ、合計では26本の異なるシグナルが得られる訳である。

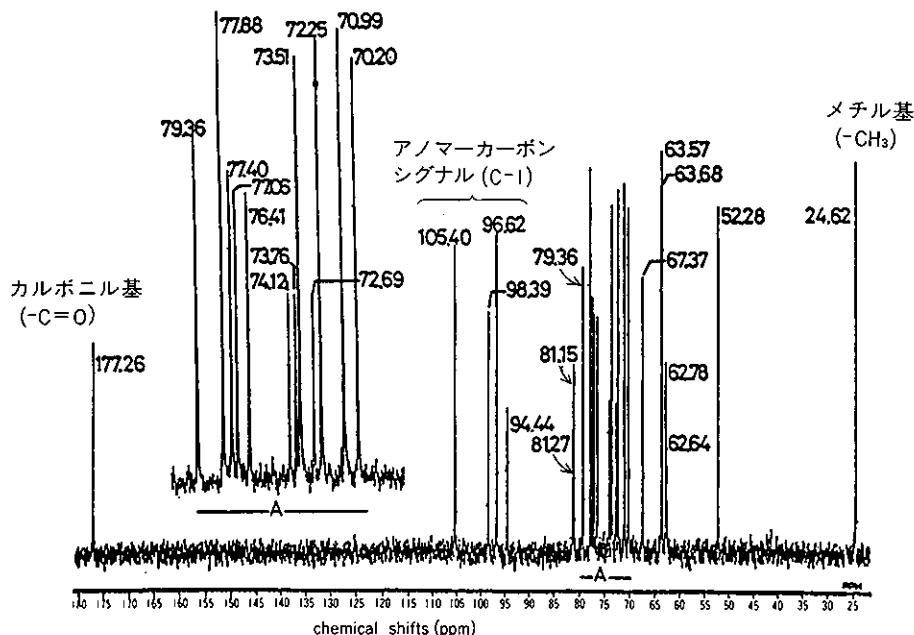


図6. ウシ初乳より単離した新規中性3糖(20)の
 ^{13}C -NMRスペクトラム

またアノマーカーボンシグナル(C-1)は、一般に100 ppm付近に得られ、この場合には4本が立ち上がっていいる。Gal NAcは96.62 ppmに、Galは105.40 ppmに帰属され、それぞれ α および β 型であることが判明した。還元末端Glcは2本のC-1が検出され、98.39 ppmおよび94.44 ppmはそれぞれ β および α 型に帰属された。 β -アノマーシグナルの方が α -アノマーシグナルよりも強度が大きいのは、この糖の水溶液中の α 型/ β 型の存在割合の違いを反映している。しかしながら、CMRの特徴は、各シグナルの高さが必ずしもその炭素原子の存在比を反映していない点にあり、注意が必要である。これで、この3糖は、Gal NAc α (1→X)Gal β (1→X')Glcであることが判明した訳である。

次には、結合位置の検討が残されている。单糖では置換されていないために、通常80 ppmより低磁場には基

本骨格由来のカーボンシグナルは存在しないはずである。しかしながら、この3糖では、81.27 ppm, 81.15 ppmおよび79.36 ppmの3本のシグナルがこの領域に見出された。これらは、糖残基が結合したことにより、本来のシグナル位置よりも低磁場(左側)にシフトして来たものと解釈され、それぞれGlcのC-4 β , GlcのC-4 α およびGalのC-3位のシグナルに帰属された。

糖鎖の置換位置の決定に際しては、置換位置のシグナルは未置換单糖の同位置のシグナル値よりも低磁場シフトする。また同時に、隣接炭素シグナルは、未置換单糖の同位置のシグナルよりも若干高磁場シフトするという経験則も解釈上、極めて重要である。

これら全シグナルの正確な帰属には、当然関連化合物のシグナル帰属データ情報が不可欠である。この3糖の解釈の背景には、ラクトース、3'- β -ガラクトシルラクトー

ス、3'- α -ガラクトシルラクトース等の正確な帰属データの蓄積があったことは言うまでもないがここでは省略する。これらの関連データとの比較により、残りの60-80 ppm付近にまとめて検出される各構成糖の基本骨格カーボンシグナルを全て帰属することが出来た。

試料が多量にある場合や、1次元よりも多くの情報が得られる2次元NMRによる解釈(C-H COSY等)の必要な場合などには、このCMRを取ると良い。また、高感度分析を目指す場合や、試料が極微量しか無い場合や、構成糖間の定量的な情報を知りたい等の場合には、短時間で測定が終了し、シグナル強度の積分値が存在比を直接反映するPMR分析も益々重要な分析方法として位置付けられる。

次回は、ヒト、ウシに統いて重要な家畜である、ヒツジ、ウマ、ヤギ等のミルクオリゴ糖について、考察を続けることにする。

参考文献

- 1) 浦島 匠、齋藤忠夫：化学と生物, 31, 80(1993).
- 2) 足立 達、齋藤忠夫：「動物成分利用集成」(奥山 隆監修、陸産動物編)“概説とラクトース、その他の糖含有成分”, R & D プランニング社(東京) p. 859-870(1987).
- 3) 齋藤忠夫、浦島 匠, *The Chemical Times*, No. 154, 13(1994).
- 4) Saito, T., T. Itoh and S. Adachi, *Biochim. Biophys. Acta*, 801, 147(1984).
- 5) Saito, T., T. Itoh and S. Adachi, *Carbohydr. Res.*, 165, 43(1987).
- 6) Urashima, T., T. Saito, K. Ohmisa and K. Shimazaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 1073, 225(1991).

大腸菌O157を培地上で判別

CHROMagar O157

クロモアガー O157

◆特 徴

- 分離段階でコロニーの着色により O157 を推定できます。
- 従来の紛らわしいソルビトール醸酵性による鑑別と異なり明瞭に区別できます。
- 免疫学的に血清反応で疑陽性を引きおこしやすい *E.hermanii* が分離段階で色により判別できます。



関東化学株式会社

〒103 東京都中央区日本橋本町3-2-8 TEL:03-3667-8061

新しい免疫グロブリン分離精製剤 "ImmunoAssist MG-PP*" の開発

関東化学株式会社 中央研究所 無機材料研究室 大瀧伸之
井上千也

1. はじめに

中央研究所無機材料研究室では、さまざまリソ酸塩を機能性材料として利用する研究をしており、その一環として生体関連物質の分離精製剤としての実用化研究に取り組んでいる。これまでに、優れた生体親和性をもつことで知られるカルシウムのリソ酸塩の一種ヒドロキシアバタイトを、独自の製法により、品質の安定した高分離能の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用充填剤として開発し^{1,2)}、製品化している。

また、さまざまリソ酸塩とタンパク質や核酸などとの親和性を研究するなかで、ある種の金属の縮合リソ酸塩が生体関連物質の分離精製剤として適切な性質を持つことを見出した^{3,4)}。特に、代謝やミネラルの恒常性維持など生体内にあって重要な働きをしているマグネシウムを金属成分とする縮合リソ酸塩が免疫グロブリンと高い親和性を示すことに着目して研究を進め、今回、ピロリソ酸マグネシウムを主成分とする新しい免疫グロブリン分離精製剤 "ImmunoAssist MG-PP" を開発し、上市するに至った。本稿では、ImmunoAssist MG-PP の特徴や免疫グロブリン精製の実際について述べる。

2. ImmunoAssist MG-PP

2.1 ImmunoAssist MG-PP の基本的な特性

2.1.1 ImmunoAssist MG-PP の性状

ImmunoAssist MG-PP は、物理化学的に安定なピロリソ酸マグネシウムを主成分とする無機物質からなる多孔質の球状粒子(平均粒径: 約100 μm)である。水中では速やかに沈降し、沈降容積は約1.8 ml/g である。膨潤収縮などによる体積変化は生じない。

2.1.2 ImmunoAssist MG-PP における免疫グロブリンの保持と溶離について

ImmunoAssist MG-PP について、免疫グロブリンをはじめとするさまざまなタンパク質の溶離挙動について調べたところ、pH 6.8 に調整したリソ酸ナトリウムバッファー

を溶離液とした場合、等電点6以下の酸性タンパク質のほとんどが保持されなかつたが、等電点6以上の中性及び塩基性タンパク質は保持され、バッファー濃度の増加に伴って溶出された³⁾。δ-電位を測定した結果、ピロリソ酸マグネシウム粒子表面は負の電位を有するので、同じく負の電荷をもつ酸性タンパク質に対しては静電的な斥力が働き、反対に正の電荷をもつ塩基性タンパク質に対しては静電的な引力が働くことによって、酸性タンパク質は保持されにくく、塩基性タンパク質は保持されやすいものと考えられる。保持されたタンパク質の溶離モル濃度はpHの増加に伴って低下するが、リソ酸バッファーのpHの増加に伴ってピロリソ酸マグネシウム粒子の負の電位が大きくなることと、pHによってタンパク質の荷電状態も変化することが、静電的な相互作用に影響し、保持の強さに変化が生じるものと思われる。これらの結果から、ImmunoAssist MG-PP における免疫グロブリンの分離は、主に静電的な相互作用によるものと考えられる。ただ、それだけでは説明できない結果もあり、例えば、IgM はリソ酸バッファーを溶離液とした場合には溶出されるが、塩化ナトリウム溶液を用いた場合には溶出されなかつた。したがって、免疫グロブリンの溶離は静電的な相互作用に加えて、ほかのさまざまな要因も影響しているものと考えられる。

2.1.3 γ-Globulin 吸着量と試料溶液の塩濃度/pH

濃度やpHの異なるリソ酸バッファーを溶媒として調製したウサギγ-グロブリン溶液を試料としてそれぞれの最大吸着量を調べた。表1に示した通り、塩濃度及びpHの減少に伴ってγ-Globulin 吸着量は増加した。

表1. γ-Globulin 溶液の性状と吸着量
(mg/g-MG-PP)

リソ酸バッファー濃度(mM)	6.2	6.5	6.8
10	22.0	19.4	14.8
20	17.2	14.6	10.5
100	1.1	0.7	0.1

* 商標登録出願中

NOBUYUKI OHTAKI

Central Research Laboratory, Kanto Chemical Co., Inc.

SENYA INOUE

Central Research Laboratory, Kanto Chemical Co., Inc.

2.1.4 種々の動物に由来する γ -Globulin の最大吸着量
いろいろな動物に由来する γ -Globulin の最大吸着量を調べた結果、動物種にかかわりなく、ほぼ約20 mg/g 程度の吸着量を示した(表2)。ヒト γ -Globulin の吸着に関しては、二次的な吸着が生じているために、ほかよりも大きな値となっているものと推測される。

表2. 種々の γ -Globulin 最大吸着量

動物種	最大吸着量 (mg/g-MG-PP)
マウス	18.7
ラット	17.1
ウサギ	16.6
ヒツジ	25.6
ウシ	25.5
ヒト	39.2

2.1.5 γ -Globulin 吸着量と吸着時間

ImmunoAssist MG-PP に対する γ -Globulin 吸着量に及ぼす吸着時間の影響をバッチ法によって調べた結果、 γ -Globulin は ImmunoAssist MG-PP に対して速やかに吸着されることが確認された(表3)。

表3. 吸着時間と吸着量

吸着時間	吸着量 (mg/g-MG-PP)
5分	17.2
10分	17.3
1日	17.3
1週間	17.2

試料： ヒト γ -Globulin 溶液(濃度 5mg/ml)

溶媒： 10mM リン酸バッファー, pH 7.0

温度： 室温

2.1.6 γ -Globulin 吸着量と線速度

ウサギ γ -Globulin を試料として、最大吸着量に及ぼす試料負荷時の線速度の影響について調べた結果、線速度約8 cm/min までは最大吸着量にほとんど変化は認められなかった(図1)。

2.2 ImmunoAssist MG-PP による免疫グロブリン精製のあらまし

等電点を中性から塩基性にもつ免疫グロブリンは、pHを中性付近に調整した10 mM リン酸バッファーを溶離液とした場合、ImmunoAssist MG-PP に保持されるが、血清中に夾雜する血清アルブミンやトランスフェリンなどの酸性タンパク質は保持されない。そのほか、培地に添加されているpH指示薬などの低分子量物質も保持されない。保持された免疫グロブリン(IgG 及び IgM)は、300から500 mM リン酸バッファーによって回収される。こ

こで500 mM 塩化ナトリウム溶液(10 mM リン酸バッファーでpH 6.8 に調整)を溶離液として用いれば IgG だけが溶出されるので、血清や腹水、培養上清などから IgG 及び IgM を容易に精製できる。

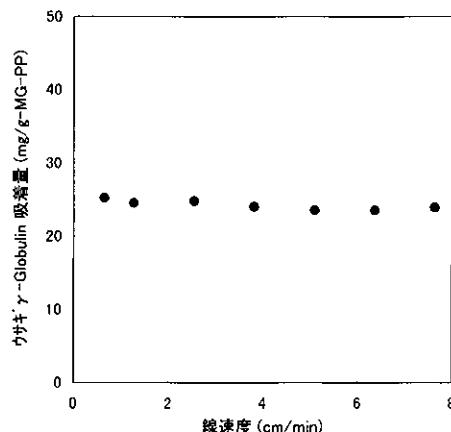


図1. 線速度と最大吸着量の関係

2.3 ImmunoAssist MG-PP による IgM の精製

ImmunoAssist MG-PP によって、従来精製が難しかった IgM を簡単に、短時間で、純度よく精製することができる。従来 IgM の精製にはゲルろ過クロマトが用いられることが多いが、分離能が低いことや長時間を要すること、1回の処理量が少ないとなどの問題があり、あまり実用的な方法ではない。これに対して ImmunoAssist MG-PP では、塩化ナトリウム溶液とリン酸バッファーの2種類の溶離液を用いるステップワイズ溶離法で、血清や腹水、培養上清などから IgM を簡単に純度よく精製でき、また一連の精製操作は、すべて中性付近に pH を調整したバッファーだけを使用するので、抗体活性を損ないにくい。また IgM は ImmunoAssist MG-PP に対して比較的強く保持されるので、透析(バッファー交換)や濃縮などの前処理は必要ない。

2.3.1 ラット血清からの IgM の精製例

ImmunoAssist MG-PP カラムを用いて、ラット血清から IgM を精製した例を図2 に示す。ラット血清はメンブランフィルター(孔径: 0.45 μm)により不溶分を除去したのち、塩化ナトリウムを加えイオン強度を約0.3に調整した。イオン強度の増加によって IgM 以外のタンパク質が保持されにくくなる効果が期待できる。実験では ImmunoAssist MG-PP 1g に対して、前述の処理を施したラット血清 5ml を負荷し、精製を試みた(図2-a)。高速ゲルろ過クロマトによる精製度評価の結果(図2-b), IgM

は IgM 溶出画分に純度90%以上に精製されていることが確認できた。

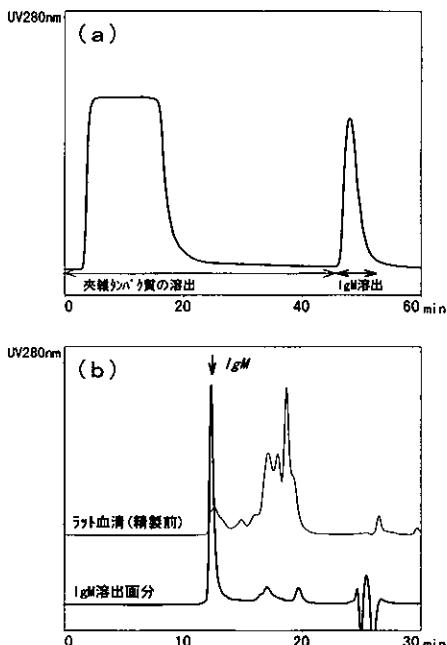


図2. ラット血清からの IgM の精製

- (a) ImmunoAssist MG-PP カラムによる精製
- (b) ゲルろ過クロマトによる IgM 溶出画分の精製度の評価

2.3.2 マウス腹水からのモノクローナル IgM の精製

ImmunoAssist MG-PP カラムを用いて、マウス腹水から IgM を精製した例を図3に示す。マウス腹水は前処理せずに、そのままカラムに負荷し、精製を試みた(図3-a)。IgM 溶出画分の SDS-PAGE 評価(図3-b)において、IgM に由来する H鎖及び L 鎖以外のバンドはほとんど認められなかった。

2.4 ImmunoAssist MG-PP による IgG の精製

従来、IgG の精製には Protein A ゲルや Protein G ゲルがよく用いられているが、これらの群特異的アフィニティークロマトでは、強く結合した IgG と Protein A(G) から IgG を回収するために、溶出力の強い酸性溶離液を用いるので、抗体活性を損なう恐れがある。また Protein A(G) と IgG との結合性の強さはサブクラスや動物種によって異なり、結合性を示さないものもあることから精製対象が限定されるのに対して、IgG は ImmunoAssist MG-PP に静電的な相互作用によって保持されるので、動物種にかかわらず精製できる。また非特異的な吸着がないので、保持された免疫グロブリンはほぼ定量的に回収する

ことができるのことや、中性付近に pH を調整したバッファーや塩化ナトリウム溶液だけを用いるので抗体活性を損ないにくいことなどの特長を持っている。

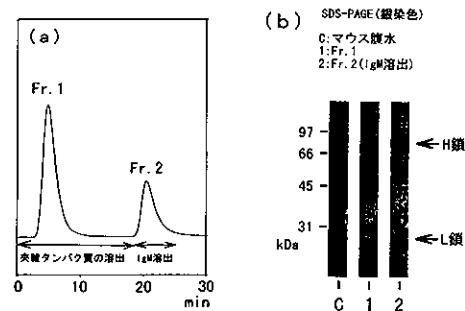


図3. マウス腹水からの IgM の精製

- (a) ImmunoAssist MG-PP カラムによる精製
- (b) SDS-PAGE による IgM 溶出画分の精製度の評価

2.4.1 ヤギ血清からの IgG の精製

ImmunoAssist MG-PP カラムを用いて、ヤギ血清から IgG を精製した例を図4に示す。ヤギ血清はメンブラン

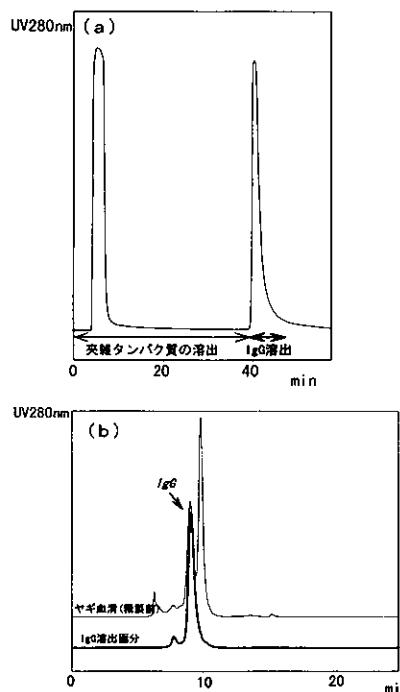


図4. ヤギ血清からの IgG の精製

- (a) ImmunoAssist MG-PP カラムによる精製
- (b) ゲルろ過クロマトによる IgG 溶出画分の精製度の評価

フィルター(孔径: 0.45 μm)により不溶分を除去したのち、カラムに負荷し、精製を試みた(図4-a)。高速ゲルろ過クロマトによる精製度評価の結果(図4-b), IgG は IgG 溶出画分に純度90%以上に精製されていることが確認できた。

2.4.2 ラット腹水からのモノクローナル IgG の精製

ImmunoAssist MG-PP カラムを用いて、ラット腹水から IgG を精製した例を図5に示す。ラット腹水は 10 mM リン酸バッファーで 5 倍に希釈してカラムに負荷し、精製を試みた(図5-a)。IgG 溶出画分の SDS-PAGE 評価(図5-b)において、IgG に由来する H鎖及び L鎖以外のバンドはほとんど認められなかった。

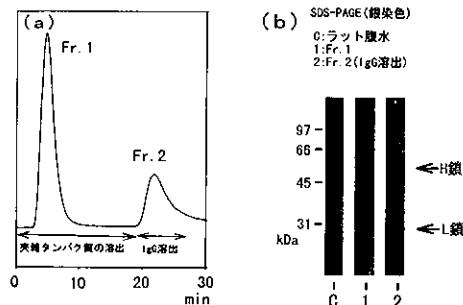


図5. ラット腹水からの IgG2a の精製

- (a) ImmunoAssist MG-PP カラムによる精製
- (b) SDS-PAGE による IgM 溶出画分の精製度の評価

3.まとめ

ImmunoAssist MG-PP は免疫グロブリンの新しい精製方法として有用である。特に、純度の高い IgM を簡単に短時間で得られることは大きな特長である。また IgG の精製においても、抗体活性を損なう恐れの少ない中性付近の溶離液だけで精製できること、動物種を問わず精製対象とすることはできることは、さまざまな抗体を取り扱う機会の多い研究者には、とりわけ有用ではないかと思う。また、従来のゲル状の精製剤とは異なり、取り扱いや保存性に優れたセラミックスタイプの精製剤であることも特長の一つである。

参考文献

- 1) S. Inoue and N. Ohtaki, *J. Chromatogr.*, 515, 193(1990).
- 2) S. Inoue and N. Ohtaki, *Analytical Sciences*, 8, 361(1992).
- 3) S. Inoue and N. Ohtaki, *J. Chromatogr.*, 645, 57(1993).
- 4) 大瀧伸之, 井上千也, 分析化学, 44(10), 875(1995).

〈編集後記〉

最近、コンピュータを利用した情報・通信の分野では、インターネット、イントラネット、cc:メール、E-メールなどその進展にはめざましいものがあります。弊社は、前号でお知らせしましたように、昨年12月からホームページ <http://www.kanto.co.jp> を開設し、内容の充実に努めています。それに伴い、今後は、本誌でも関東化学の最新情報の発信を心がけたいと思います。

本号では、佐々木先生、齋藤先生、今井先生から頂戴した玉稿の後に、弊社研究陣が開発した新しい免疫グロ

ブリン分離精製剤の紹介を掲載いたしました。

梅雨の最中にもかかわらず、6月の雅語が水無月とは現在ではしつくりきませんが、陰暦6月は、今の7~8月、梅雨明け後の天気が安定したころと考えればそのとおりかも知れません。それにしても、昔は、冷夏や集中豪雨など気象の異変が今ほどではなく、季節感がよりはっきりしていたのではないでしょうか。

梅雨明けまでには、まだ若干、間がありそうですが、今年も夏らしい夏を期待しております。 (青井)

 関東化学株式会社

〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号
電話 (03) 3279-1751 FAX (03) 3279-5560
編集責任者 青井 克夫 平成9年7月1日 発行