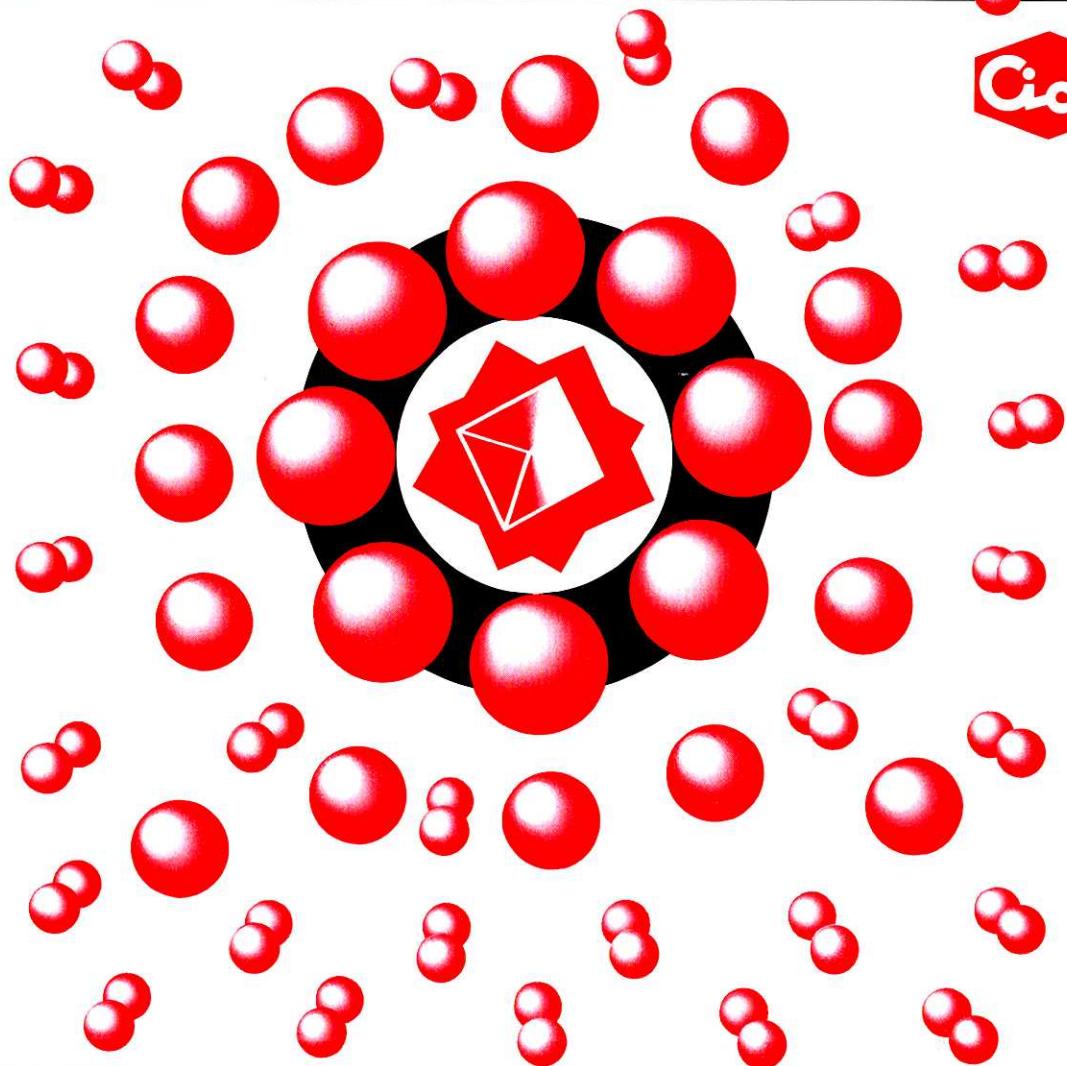


THE

ISSN 0285-2446
KANTO CHEMICAL CO., INC.

1997 No.4 (通巻166号)

CHEMICAL TIMES



目 次

宇宙の彼方に生命を求めて.....	小池 悅平.....	2
その 7. 火星から飛来した隕石とは		
生物活性化合物の構造修飾-2.....	渋谷 哲.....	7
ペプチドのバイオイソスター（その 2）		
飼料中の硝酸態窒素に対する簡易測定法の検討.....	一柳 かおり.....	16
	小林 好一	
リービッヒの生家の絵についての疑問.....	原田 銀.....	21
編集後記.....		24

宇宙の彼方に生命を求めて

その7. 火星から飛來した隕石とは

東京工業大学 生命理工学部 理学博士 小池 悅平

プロローグ

我々地球人類は宇宙で唯一の生命体であるらしい。“らしい”といったのはまだよくわからないからである。私たちが火星に興味を持つのは、太陽系天体の中で火星がもっとも生命体の可能性がある惑星だからである。もちろん、昔の人達が考えたようなタコに似た火星人はいないだろうが、もっとも下等な原始生物ならいても不思議ではないのである。

それでは、なぜ我々は火星の生命探査をするのか、その意義について筆者の考えを述べてみよう。それはなにも、火星でなくてももちろん良いのだが、現在の我々の知識では火星がもっとも適当なのである。火星生命探査のもっとも大きな目的の一つは、地球生命の起源と進化論の面で非常に興味がある。つまり、地球の生命はオバーリングがいったように地球で誕生し、ダーウィンの進化論に従ったことはまず間違いない。しかし、その生命誕生の過程で、大気成分から低分子の生体有機物ができるることは、すでにミラーの火花放電の実験(S・ミラーとH・ユーリーが1953年、原始地球大気であるメタン、アンモニア、水の混合気体に火花放電を行って数種類のアミノ酸が生成することを証明した。これは化学進化の実験として有名)で証明済みである。さらに、こうした有機物の重縮合によってタンパク質や核酸や細胞膜に似たものができることも実験的にわかっている。しかし、現在こうした生体分子から生命に至る過程の証明ができないのである。これを実証するもっとも良い方法は、原始生命体の微化石を見つけて進化の過程を理解することなのであるが、残念ながら、地球は岩盤運動が激しいため、36億年より古い地層はもはや地上に現存しない。つまり、実証しようにもそれは不可能なのである。しかし、火星は岩盤運動がないし、30数億年前から冷えている。もし、原始生命が誕生していれば、多分、微化石があるいは進化のとまった生物が見つかる可能性がある。

もう一つの目的は、故カール・セーガン博士(1934~

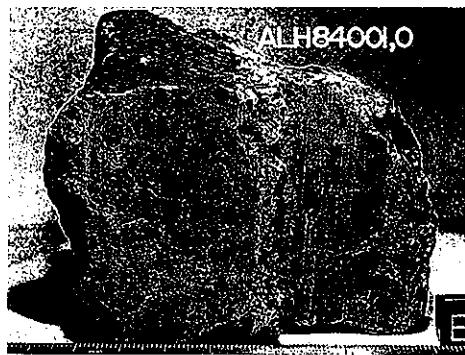
1996、コーネル大学教授。プラネタリーソサエティー会長として太陽系惑星の探査計画を積極的に推進した。著書「コスモス」や「核の冬」の提言者としても有名)がいっていたように“火星生命の証明は、我々地球人類の歴史においてターニング・ポイントになることだろう。なぜならば、生命は一つの太陽系の二つの惑星だけでなく、広大な宇宙のどこにでも誕生することになるのだから……”。まさに、火星で生命体が誕生したことが証明されれば、宇宙において生命の誕生はそんなに特別な現象ではなく、比較的普遍的におこっている現象であることを証明になる。つまり、我々地球人類は孤独な宇宙人ではないことの証明になるのである。これは地球の人類史始まって以来の最大の科学的出来事であることは、まず間違いない。

火星から飛來した隕石からわかったこと

1. 火星微化石を含んだ隕石とは?

1996年8月7日、NASA(アメリカ航空宇宙局)ジョンソン宇宙センターのデビッド・マッケイ博士とスタンフォード大学のリチャード・ゼア教授らのグループは「火星から飛來した隕石の中に36億年以上前に誕生した生命の痕跡らしきものを発見した」と発表した。この隕石はALH 84001(ALHは南極のアランヒルズという隕石が採取された場所の頭文字を示し、84001は1984年に見つかった1番最初の隕石であることを示している。普通隕石の名前は見つかった場所に近い郵便局の名前をつけることになっている)とよばれ、重さ約1.9キログラムでほぼジャガイモ位の大きさのものである。この隕石は放射性同位元素の分析から45億年前に形成されたことがわかった。したがって、火星が誕生して1億年位たったころからの貴重な記録をとどめていることになる。そして、この隕石は今から1500万年前に彗星か小惑星の衝突で火星の地表面からはじき飛ばされて、宇宙空間をただよい1万3000年前に地球の南極大陸に落下し、13年前に南極の氷の中から発見されたものである。

現在までに採取された隕石は2万個近くに達しているが、その内火星から飛来した隕石は12個知られている。この火星起源の隕石は、隕石グループの頭文字をとってSNC隕石(シャーゴッタイト; Shergottite, ナクライ特; Naklite, シャシナイト; Chassignite)と呼ばれている。そして、このALH 84001は12個のSNC隕石の中のひとつである。この12個の中には日本の南極昭和基地で採取されたY 793605も含まれている。



火星から飛来し、南極大陸で発見された隕石 ALH 84001。この中から火星の原始生命の痕跡らしいものが発見された。(NASA)

表1. 現在までに発見された火星隕石一覧表

隕石名	発見場所	回収年	重量	岩石タイプ*	結晶化年代**	宇宙線照射年**
Shergotty	インド	1865年(落下)	~5kg	S-玄武岩	163 Ma	2.5 Ma
Zagami	ナイジェリア	1962年(落下)	~18kg	S-玄武岩	178~186 Ma	2.6 Ma
EETA 79001	南極	1980年(発見)	7.9kg	S-玄武岩	172~177 Ma	0.6 Ma
QUE 94201	南極	1994年(発見)	12.0g	S-玄武岩	144±23 Ma	2.4 Ma
ALH 77005	南極	1977年(発見)	482g	S-レルゾライト	187 Ma	3.4 Ma
LEW 88516	南極	1988年(発見)	13.2g	S-レルゾライト	—	3.6 Ma
Y 793605	南極(昭和基地)	1979年(発見)	16g	S-レルゾライト	—	—
Nakhla	エジプト	1911年(落下)	~40kg	N-单斜輝石岩	1.3 Ga	10.3~10.7 Ma
Lafayette	アメリカ	1931年(発見)	~800g	N-单斜輝石岩	1.3 Ga	10.3~10.7 Ma
Governador Valadares	ブラジル	1958年(発見)	158g	N-单斜輝石岩	1.3 Ga	10.3~10.7 Ma
Ghassigny	フランス	1815年(落下)	~4kg	C-ダナイト	1.3 Ga	9.9 Ma
ALH 84001	南極	1984年(発見)	1939.9g	斜方輝石岩	4.56 Ga	15 Ma

* S: シャーゴッタイト, N: ナクライ特, C: シャシナイト / ** Ma: 100万年, Ga: 10億年 (日本宇宙生物科学会誌)

2. 火星隕石とした証拠

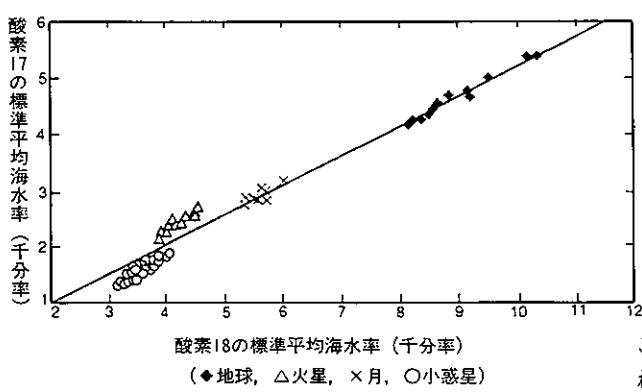
このALH 84001が火星から飛来したもので、それが45億年前に形成されたことが、なぜわかったのだろう。まず、火星隕石である証拠として、次のような根拠があげられる。

1) 火星特有の酸素同位体組成をもっていた。酸素には質量数16, 17, 18をもつ同位体が存在する。これら3つの同位体を用いて、隕石や惑星を区別することができる。SNC隕石はユニークな同位体比を示すグループで、小惑星や地球、月とは完全に区別できる(図1参照)。

2) 二酸化炭素や窒素、希ガス同位体組成が火星大気と一致した。バイキング探査で明らかにされた火星大気の同位体組成と今回の火星隕石のガラス成分中に封じ込められていたガスの同位体組成が全く一致したのである(図2参照)。

3) 含水鉱物が存在した。これも小惑星や月の隕石にはない特徴である。さらに、これは原始火星に水が存在したことを示唆している。

4) 強い衝撃の痕跡がみられた。これは、衝撃によって一部が融解された痕跡や、斜長石が衝撃によって非晶質化したマスケリナイトと呼ばれる鉱物の存在



$$\text{酸表17または18の} = \left[\left(\frac{\text{試料の酸素17または18の同位体値}}{\text{標準平均海水の酸素17または18の同位体値}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

図1. 領石の酸素同位対比 (R·N·クライトン, T·K·マエダによる)

地球と月隕石は直線上にのっているため、同一起源と考えられるが、火星隕石と小惑星のものは異なる起源であることがこれによって証明される。ALH 84001 は火星の隕石グループに含まれる。

などでわかる。これによって、地球型惑星の表面から飛散したことがわかった。

5) マグマから結晶作用によって形成された集積岩の組成をもっていた。集積岩とはマグマ中で結晶した鉱物が液体との密度差によって沈降、集積してできた岩石で、大きな重力場をもつ惑星で結晶が形成されたことを意味している。したがって、この隕石は小惑星のような小さな重力の場で形成されたものではなく、火星のようなある程度大きな重力場をもった惑星で形成されたことを示唆している。

このように、いくつかの証拠によって火星由来と考えられたが、特に1)と2)が今回の隕石を火星由来と考えた決定的な証拠となった。

つぎに、45億年前の隕石である根拠は、放射性物質の解析によって決定された。隕石は宇宙空間をただよっている間に、エネルギーの強い宇宙放射線にさらされて放射性物質ができる。この放射性物質をガンマ線カウンターで測定することによって、半減期の長い金属物質が検出される。たとえば、隕石であれば天然には存在しない半減期が10⁶年のアルミニウム26を検出することによってそれが容易に確認できる。このように、放射性物質を測定することによって、その隕石の履歴が明らかになるのである。

3. 火星生命の痕跡

ALH 84001 には、かすかに亀裂の入った割れやすい箇所がある。恐らくこれは、40億年前に岩石が何かが衝突して亀裂が入り、そこに水が流れ込み、生物が繁殖したと考えられる。この亀裂部分を調べたところ直径50マイクロメートルほどの小さな炭酸塩の粒子がたくさん分布している部分に生命の痕跡らしきものが発見されたのである。この痕跡を火星生命と考えた根拠を、マッケイ博士らは次の3つの証拠からそれを説明している。

第1の証拠: PAH (多環式芳香族炭化水素) とよばれる有機物がみつかっていることである。今回、この火星隕石からは主に6種類のPAHが検出された。通常、このPAHは微生物や海洋プランクトン、植物などが死滅した後に化学変化をおこしてできる物質である。石炭や石油の中には多量に含まれている。したがって、我々のまわりでも車の排気ガスや石油燃料を燃やせば、その中にこの物質がたくさん含まれているのである。また、PAHは生物の関与なしで、自然界の化学変化でも作られる。さらに、生命現象とは関係なくつくられたと考えられる炭素分に富んだ炭素質コンドライトとよばれる隕石中にも、すでにPAHはみつかっているのである。

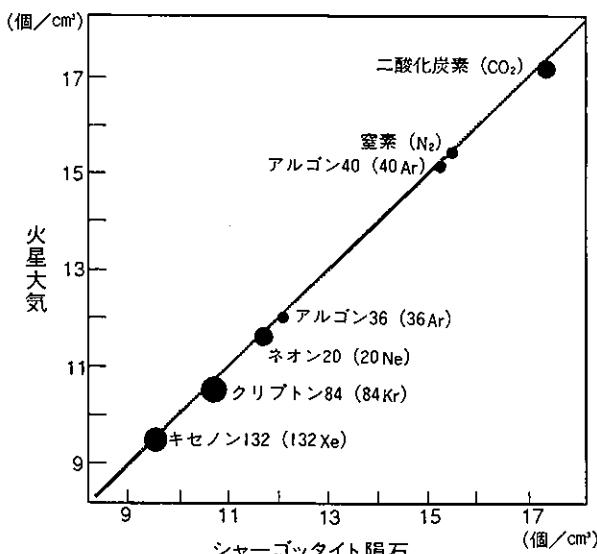


図2. 希ガス同位対比 (H·Y·マックスウェインによる)

SNC隕石のガラス成分中に封じ込められている二酸化炭素、窒素、希ガスに関して 1cm³中の同位体組成と含有量が測定された。その結果バイキングで調べた火星大気のものと全く一致した。

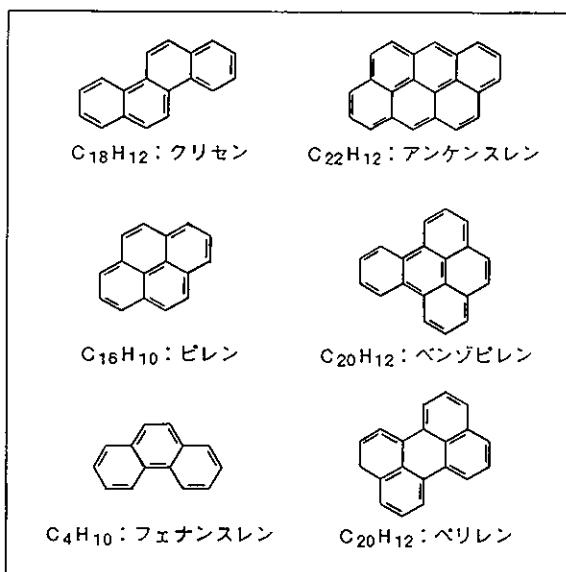
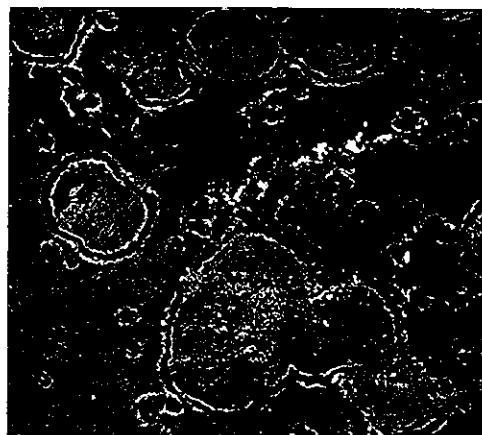


図3. 発見された主なPAH(多環芳香族炭化水素)の構造。(日本惑星科学会誌)

しかし、ゼア教授らはこれに関して次のような説明をおこなっている。「炭素質コンドライトでみつかったPAHは多種類にわたっているが、ALH 84001のものは主に数種類である。したがって、生物由来の有機物が分解してできたと解釈すれば、種類が少ないことは、むしろ理屈に会っている。」さらに、地球に落下した後に、大気中のPAHが汚染したのではないかという疑問に対しても、マッケイ博士は次のように説明している。「この隕石は南極に落下したために地球上の物質に汚染される機会はきわめて少なかった。また、南極で発見された他の隕石と比べても、地球大気で汚染されるPAHの量は無視できるほどに少ない。さらに、決定的なのは、もしも地球上での汚染によるものであれば、PAHは隕石の外側に多いはずであるが、ALH 84001の場合隕石の内部にいくにしたがって増加していた。したがって、この隕石でみつかったPAHは火星の地殻部分で作られたものであると判断される。」まさに完璧である！

第2の証拠：炭酸塩の粒子の縁の部分に磁鉄鉱と磁硫鉄鉱がたくさん存在していたことである(写真参照)。磁鉄鉱は鉄と酸素の化合物、磁硫鉄鉱は鉄と硫黄の化合物である。これらは0.1マイクロメートル以下の大きさの立方体や涙滴形の粒子で、地球上ではある種の嫌気性細菌がこうした化合物を作る。ただ、これら二つの化合物は、生物の関

与なしでも作ることができる。しかしながら、磁鉄鉱ができる過程は酸化反応であるのに対して、磁硫鉄鉱ができる過程は還元反応なのである。つまり、酸素原子が結合する反応とまったく逆の遊離する反応が、自然の状態で同じ場所で、しかも同じ時期におこることは考えにくいわけである。地球上では、このような相反する反応が同時に起こる現象は微生物が関与した環境でしかおこりえない。したがって、何らかの生物が関与したと考えたわけである。

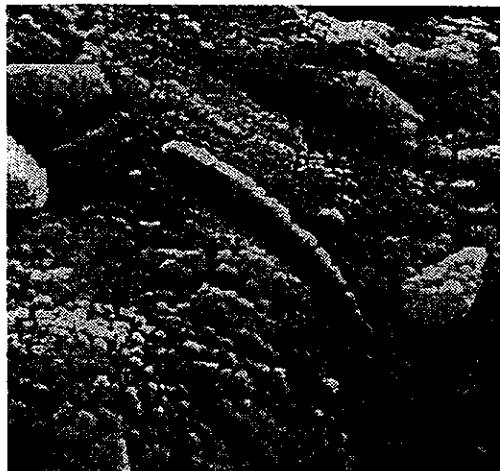


ALH 84001 の亀裂面の拡大面像。炭酸塩の大きな粒子が分布しているのがわかる。この部分から有機化合物が検出され、細菌の化石らしい構造も発見された。炭酸塩は黒い物質で縁取られている。この部分には微生物の活動と関連あるとみられる磁鉄鉱と磁硫鉄鉱が多く含まれていた。(NASA)

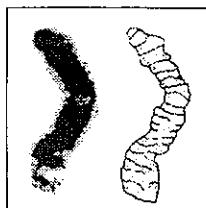
第3の証拠：超高倍率の電子顕微鏡で撮影した画像である。そこに微生物の化石らしいものが写っていたのである。つまり、卵形あるいはそれが連なったチューブ状の形をしたもののが発見されたのである。この微化石は地球上では西オーストラリアのノースポールで見つかった先カンブリア時代のラン藻の仲間でシアノバクテリアという微生物の微化石にとてもよく似ている(写真参照)。ただ、今回発見されたものは長さが20~100ナノメートルときわめて小さく、地球上で発見されている微生物化石の約100分の1程度の大きさしかなかった。地球上にはこうしたナノバクテリアと呼ばれる微小微生物の研究はあまり行われていない。ただ、ナノバクテリアは結構たくさん地球上に生存しているといっている生物学者もいる。

このように、彼等は3つの証拠を上げて火星生物の証明をおこなっている。しかし、残念ながら決定的な証拠はまだこれだけでは不十分である。結局、彼等もいって

いるように、個々の結果だけをみると、色々な解釈ができるが、すべての結果を総合的に解釈すれば、火星の生物と判断して間違いなかろうと考えた。



ALH 84001 隕石中に発見されたチューブ状の構造体。地球で発見された35億年前のシアノバクテリアの微化石によく似ている。
(NASA)



シアノバクテリアの微化石
オーストラリアの西部のノースポールにあるワラウーナ層と呼ばれる35億年前の堆積層中で見つかったシアノバクテリアの微化石(左)とそのスケッチ(右)。
(W. Schopfによる)

4. 今後の問題点

火星の微生物の化石を含んでいると考えられている隕石は、今後どのような研究をしてその微生物を証明したらよいか考えてみよう。

マッケイ博士らもすでに研究に入っているようであるが、決定的な証明は、その微生物の化石らしい部分を切って、電子顕微鏡で調べ、そして、もしそこに微生物の細胞質や膜の痕跡が発見されれば、火星生命の痕跡として、もはや誰も疑問をさしはさむ人はいないであろう。しかし、それは対象がきわめて微小であるために、枯れ草の山の中から一本の針を探すようなもので、もし見つかったとすればほとんど奇跡に近い作業になるであろう。

もっと現実的な研究方法としてはゼア教授らが提案している、その微生物らしいものが見つかった化石部分か

ら、アミノ酸があるいは核酸塩基といった生体有機物が検出されれば、これは原始生命の決定的な証拠になる。この研究を行うために、彼等は2段階レーザー質量分析計を開発した。これは一つ目のレーザーをあてて岩石を加熱し、蒸発した分子を二つ目のレーザーで分析するというものである。現在はまだPAHの確認程度のデータしか得られていないようであるが、おおいに期待はできる。

もしかりに、電子顕微鏡で微生物の細胞膜の痕跡がみつかなくとも、化石の一部から化学的な分析方法で生体有機物がみつかなくとも、火星生命の痕跡が隕石中に存在したという事実は否定出来ない。今回の火星の隕石の研究では、生命の痕跡以外でも多くの貴重な事実が明らかになった。例えば、炭酸塩の存在からは、かつて火星に水が存在した事実が推測された。また、磁鉄鉱や磁硫鉄鉱といった無機化合物の存在は、生物の生命活動を暗示させた。今後、まだまだ研究することはたくさんある。

記者会見の席上で、NASAのダニエル・ゴールディン長官は次のように言っている「我々は今日、ドアを少しだけ開けるためにここに集まつた。驚くべき科学的発見ときわめて興味深い探求物語を紹介し、かつて火星に生命が存在したという考えに至るための手がかりを明らかにするために、まさに今、ドアは開けられた。地球の隣の惑星に、少なくとも過去のある時代に生命が存在したという可能性を、科学的に語ることができるようになつたのである」

参考文献

- 1) ニュートン別冊「火星生命のなぞ」1997年3月10日、教育社。
- 2) 図解火星探査一火星人から生命探査まで 河島信樹・小池惇平著、PHP研究所出版1997年8月5日発行。
- 3) 特集：火星の生命 PART 1, 宇宙生物科学, 10(4), 1996.
- 4) 特集：火星の生命 PART 2, 宇宙生物科学, 11(1), 1997.

生物活性化合物の構造修飾－2

ペプチドのバイオイソスター(その2)

東京薬科大学 薬学部 教授 渋 谷 皓

1. はじめに

著者は生物活性化合物の構造修飾について広く述べていく予定であるが、本稿では前稿¹⁾につづき、ジペプチトイソスターの利用について述べる。ヒドロキシメチレンジペプチトイソスター、ヒドロキエチレンジペプチトイソスターなど種々のジペプチトイソスターを取り込んだ生物活性化合物が合成された¹⁾。一方で、 β -アミノ- α -ヒドロキシカルボン酸、 γ -アミノ- β -ヒドロキシカルボン酸の効率のよい不斉合成が検討された。また、 β -アミノ- α -ヒドロキシ酸のカルボキシル基をリン原子團に置き換えた β -アミノ- α -ヒドロキシホスフィン酸構造をもつホスホニルジペプチトイソスターもレニン阻害剤の合成に活用された^{2,3)}。プロテアーゼによって加水分解を受けるペプチドの部分をジペプチトイソスター構造に置き換えると、その化合物はプロテアーゼに対して強い親和性を有し、酸性プロテアーゼの基質となるが、プロテアーゼと結合する部位がアミド結合ではないので加水分解されることはない。そのような化合物はそのプロテアーゼに対する有効な阻害剤になる。ジペプチトイソスターがプロテアーゼの分子構築に最もよく導入されている例は、降圧剤の開発を目的とするレニン阻害剤とエイズ治療薬の開発を目的とするHIVプロテアーゼ阻害剤に見られる。本稿では

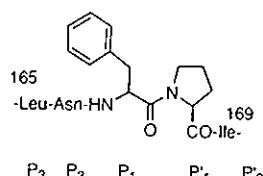


図1. Sequence of pol substrate

ジペプチトイソスターを利用するHIVプロテアーゼ阻害剤の合成を中心に述べる。HIVプロテアーゼ阻害剤の創製に関する報告はきわめて多いので代表的な報告例を引用するに止めた。

2. HIVプロテアーゼの機能と構造⁴⁾

HIVプロテアーゼは、HIVの増殖過程の後期段階において、Gag(構成蛋白)やGag-Pol(構成蛋白-逆転写酵素)複合体蛋白を感染性ウイルスの形成と成熟に必要な機能性蛋白に切断する酵素であり、ウイルスの感染性保持に重要な役割をもっていると考えられている⁴⁾。HIVプロテアーゼをもたない変異ウイルスには感染能力がないのでHIVプロテアーゼ阻害剤は有望なエイズ治療薬になるという期待感からHIVプロテアーゼ阻害剤の合成が活発に研究されている。

HIVプロテアーゼは、レニンと同様にアスパラギン酸プロテアーゼに属する酵素で、基質のTyr-Pro(チロシン-プロリン)及びPhe-Pro(フェニルアラニン-プロリン)を特異的に切断する極めてユニークなものである(図2)。哺乳動物のアスパラギン酸プロテアーゼには基質のTyr-Pro及びPhe-Proを開裂させる能力はない。HIVプロ

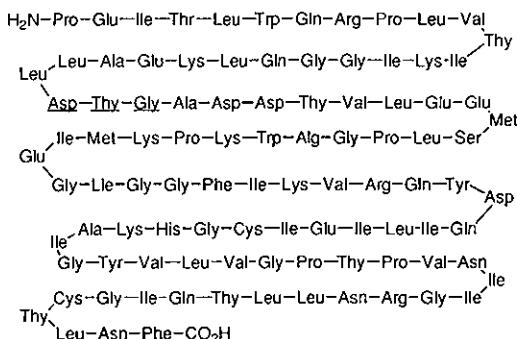
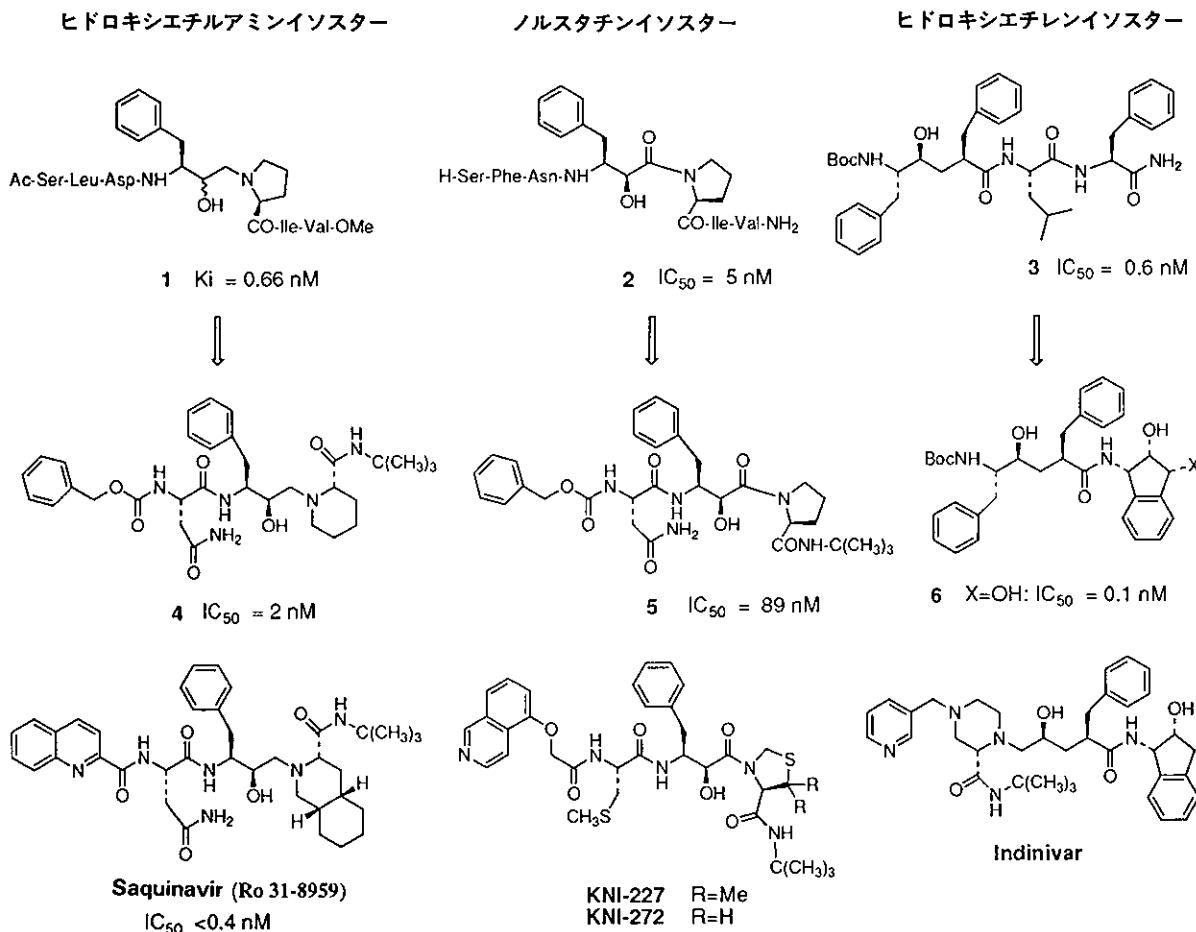


図2. HIVプロテアーゼの一次構造

テアーゼは99個のアミノ酸からなる比較的小さなポリペプチドで⁴⁾、300個以上のアミノ酸からなるレニンなどのアスパラギン酸プロテアーゼの約1/3の大きさである。レニンなどの他のアスパラギン酸プロテアーゼの構造と大きく異なり、この99個のポリペプチドが2回転軸対象性を有するホモダイマー構造をとり、活性を発現する⁴⁾。ホモダイマー構造の二つのサブユニット上のそれぞれのアスパラギン酸残基の触媒作用によって水分子がペプチド結合のカルボニルへ付加することを促進させる。この水和によってタンパク質が分解するのでHIVプロテアーゼの活性の発現にこのホモダイマー構造をとることは重要な意味をもつのである。図2にHIVプロテアーゼの一次構造を示した。

図3.



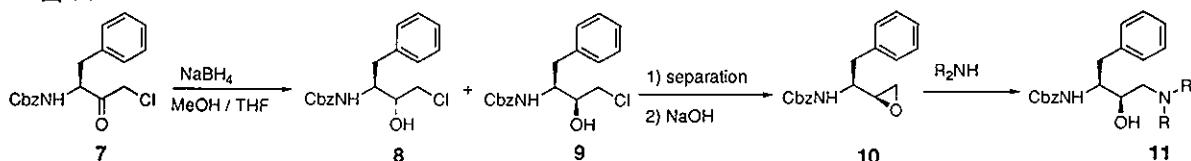
3. 非対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤

HIV プロテアーゼ阻害剤はレニン阻害剤の開発にみられるように、基質が切断されるペプチドの部位をジペプチドイソスターで置き換える手法でデザインされた。すなわち、そのデザインの基本は Tyr-Pro あるいは Phe-Pro をジペプチドイソスターで置き換え、さらに切断部位のペプチド結合の N-末端側の構成アミノ酸 (P1-P2-P3) と C-末端側の構成アミノ酸 (P'1-P'2-P'3) の構造を修飾することである⁴⁾。ヒドロキシエチルアミン型ジペプチドイソスターを組み込んだ¹⁾ およびノルスタチン型ジペプチドイソスターを組み込んだペタマ-(2)⁶⁾ は強いHIVプロテアーゼ阻害活性を示す。また、ヒドロキシエチレン型ジペプチドイソスターを組み込んだ³にもHIVプロ

ロテアーゼ阻害活性が見い出された⁷⁾。

これらを治療薬として使用するためには、生体内における安定性や細胞膜透過性が問題となる。これらの問題を解決するために、低分子量化や非ペプチド化が広範囲に検討された。**1**をリード化合物として**1**のAc-Ser-Lel-Asp-およびIle-Val-OMeのペプチド部分の構造修飾が活発に行われ、**4**が合成された⁸⁾。さらに、上記の問題点をクリアーするための検討の結果 **Saquinavir** が開発された⁸⁾。**2**は本會らによって合成された化合物で、**2**をリード化合物として構造修飾が検討され、**5**が合成された⁶⁾。さらに検討の結果、KNI-227 および KNI-272 が開発された⁹⁾。KNI-272 はバイオアベイラビリティー（生物学的有効率）も高く、第Ⅰ相臨床試験にあり、有望視されている¹⁰⁾。3のC-末端ジペプチドユニット(P'2-P'3)を、シスアミノインダノールに置き換えるように構造修飾した化合物(**6**)は、高いHIVプロテアーゼ阻害活性を示した¹¹⁾。**6**の最適化の過程でN-末端側を構造修飾して **Indinivar** が開発された¹²⁾。**Saquinavir** および **Indinivar** は米国FDA(Food & Drug Administration)から認可を受け、

図4.



アリールアルコールの不斉エポキシ化によって容易に得られるエポキシ体(**12**)を $Ti(O-iPr)_2(N_3)_2$ でアジド化するとアジド化は位置選択的に進行し **13** が生成する。**13** の一

AZTなどの逆転写酵素阻害型抗HIV剤と併用してAIDSの治療に使用されている^{13a)}。**Indinivar** は、我国でも1996年希少疾病用医薬品に指定され、1997年3月に厚生省の承認を受け、AIDSの治療薬として使用されるようになつた^{13b)}。

4. ジペプチドイソスター構造の合成

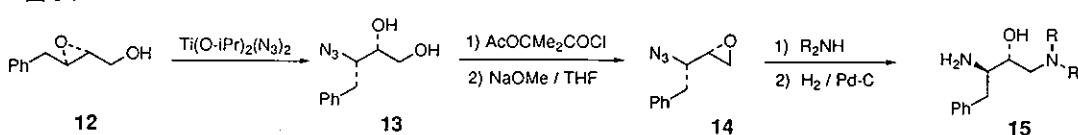
3の分子中に組み込まれたヒドロキエチレンジペプチドイソスターの代表的な合成法については既に前稿¹⁾に述べたのでここでは省略する。ノルスタチン型ジペプチドイソスターおよびアミノメチレンジペプチドイソスターの一般的な合成法の一例を示す。

4.1. アミノメチレンジペプチドイソスターの合成

α -アミノ酸から誘導されるアミノケトン(**7**)を $NaBH_4$ で還元するとアミノアルコール体(**8**)および(**9**)が得られる。**(9)**を分離し、アルカリで処理するとエポキシ体(**10**)が得られる。**10**をアミン類と反応させるとエポキシ環が開裂し、容易に相当する**11**に誘導することが出来る¹⁴⁾。

級水酸基を塩素で置換した後、アルカリで処理するとエポキシ体(**14**)が得られる。エポキシ環をアミンで開環した後、還元すると**15**が容易に生成する¹⁵⁾。

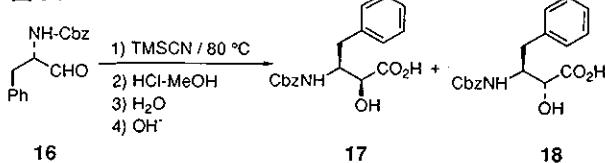
図5.



4.2. α -ヒドロキシ- β -アミノ酸の合成例

α -アミノ酸から誘導される α -アミノアルデヒド(**16**)を TMSCN と反応させるとシアヒドリン体がスレオ体と

図6.



エリスロ体の混合物として得られる。シアヒドリンの混合物を塩酸酸性条件下、メタノールで処理して相当するイミノエステルとし、次いで加水分解すると α -ヒドロキシ- β -アミノ酸(**17**)および(**18**)が得られる。温合物を分離して目的の**17**を得る¹⁶⁾。

5. 対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤

HIVプロテアーゼ阻害剤のデザインは、当初、HIVプロテアーゼの基質構造に着目し、その $P_3-P_2-P_1-P'_1-P'_2$ -

P'3部位を、これと等価な機能を持つ構造(ミミック構造)に置き換えるところから始まった。図7(1)に阻害剤(A)のHIVプロテアーゼに対する阻害様式を模式的に示した。ここで、HIVプロテアーゼの活性部位をS2-S1-S'1-S'2(基質の切断部位からN末端側に対応する酵素分子の活性中心のサイトをそれぞれS1, S2, C末端側をS'1, S'2と命名する)で表した。HIVプロテアーゼの活性中心が2回転対称性を有することから、それと相互作用する対称性をもつ阻害剤がデザインされた。すなわち、基

質(A)のP'1-P'2-P'3部分をP1-P2-P3に置き換え、P3-P2-P1部分をP1-P2-P3と結合させると、P3-P2-P1-P1-P2-P3で表される対称性分子(B)がデザインされる。一方、(A)のP1-P2-P3部分を除去して、代わりに対称性分子になるようにP'1-P'2-P'3を結合させるとP'3-P'2-P'1-P'1-P'2-P'3で表される対称性分子(C)がデザインされる。これらの分子は図7(2)及び(3)に示すような様式でHIVプロテアーゼと相互作用し、HIVプロテアーゼ阻害活性を示すことが予想された¹⁷⁾。

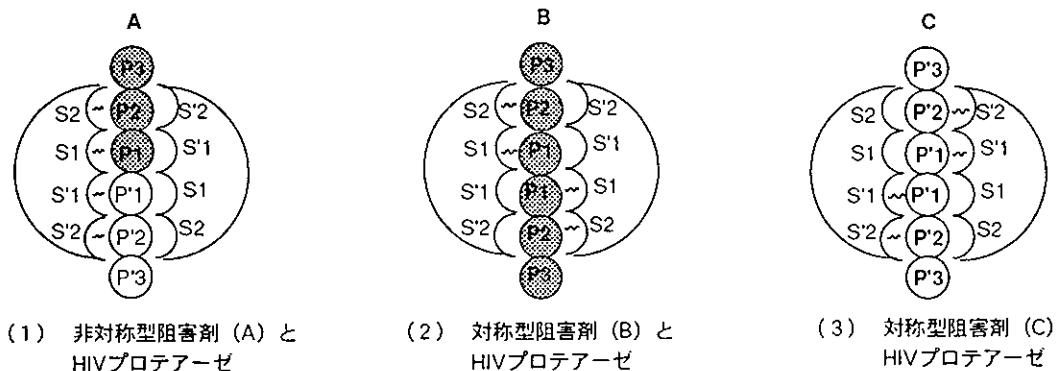


図7. HIVプロテアーゼ阻害剤の阻害様式の模式図

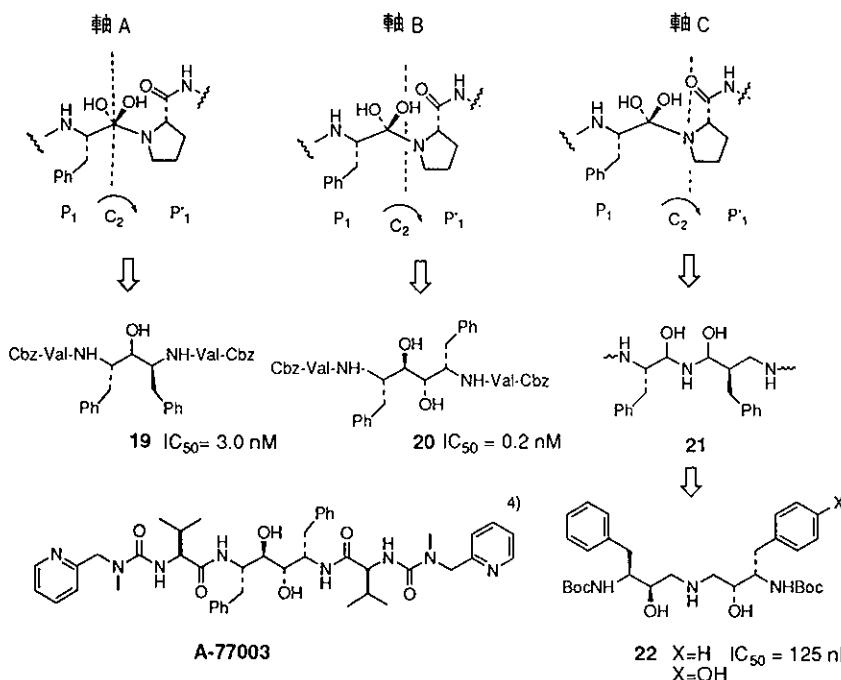
図8. 阻害様式(2)に基づくC₂対称性HIVプロテアーゼ阻害剤

図7(2)に示す阻害様式に基づく阻害剤は Frickson および Kempf 等によってデザインされた。すなわち、 Erickson および Kempf 等¹⁷⁾は基質の加水分解遷移状態の N-末端の構成アミノ酸ユニット(P1)を保持するようにして、軸 A で対称化した化合物(19)を合成した。彼ら¹⁸⁾はこれと同様に、P1を保持するようにして軸 B で対称化した化合物(20)を合成した。これらの分子は予想したように HIV プロテアーゼの活性中心と結合し、*in vitro*において抗 HIV 活性を示した。**20** ($IC_{50} = 0.2 \text{ nM}$) は **19** ($IC_{50} = 3.0 \text{ nM}$) よりも強い活性を示した。**20** の 2 個の水酸基の立体配置は、活性に殆ど影響しないが、R, R'-配置の化合物がリード化合物に選択された。**20** のバリンの窒素上の置換基 Cbz を水溶性を高める効果のある置換基に置き換えると、経口投与も可能になる。このようにして構造修飾の試行の結果 **A-77003** が合成された¹⁹⁾。

図7(2)で示した阻害様式を基本とする阻害剤のデザインには、この他にも基質の加水分解遷移状態を軸 C で

対称化するデザインの方法がある。このようにして **21** がデザインされた。しかし、**21** は化学的に不安定で医薬として使用することは困難であろう。そこで、炭素原子数を増炭して化学的に安定化した対称分子 **22** が合成された²⁰⁾。**22** の阻害活性はそれほど高い数値 ($IC_{50} = 125 \text{ nM}$) を示さないが、優れた細胞膜透過性を有するので、経口投与が可能な阻害剤となる。**22** にはかなりの細胞毒性が認められるが、P1側のフェニル基上に lipophilic な置換基を導入すると、その細胞毒性が低下することが明らかにされている²⁰⁾。

図7(3)で示される阻害様式を持つ阻害剤として、始めに述べた非対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤(**6**)の C-末端(図9、**6**の右半分)を 2 量化するように対称化した分子(**23**)も合成された。**23** は $IC_{50} = 0.67 \text{ nM}$ を示し、図7(1)の阻害様式をもつ阻害剤と同等の HIV プロテアーゼ阻害活性を示す²¹⁾。

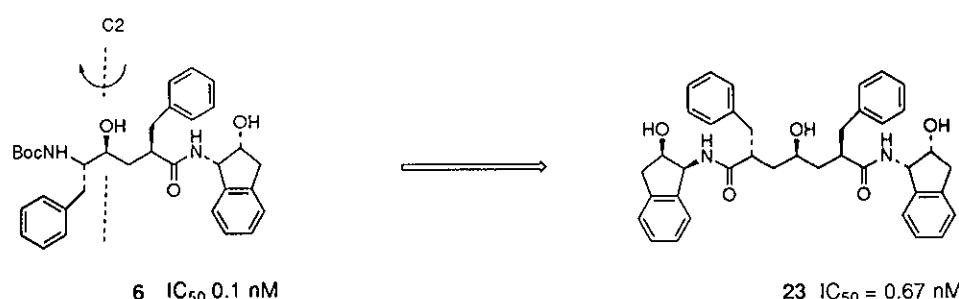


図9. 阻害様式(3)に基づくC2対称性HIVプロテアーゼ阻害剤

5. ジアミノジオール誘導体の合成

A-77003 のような図8の軸Bで対称化した分子において、

HIV プロテアーゼ阻害活性発現に主要な役割をもつ部分構造はジアミノジオールの部分である。**A-77003** の関連化合物

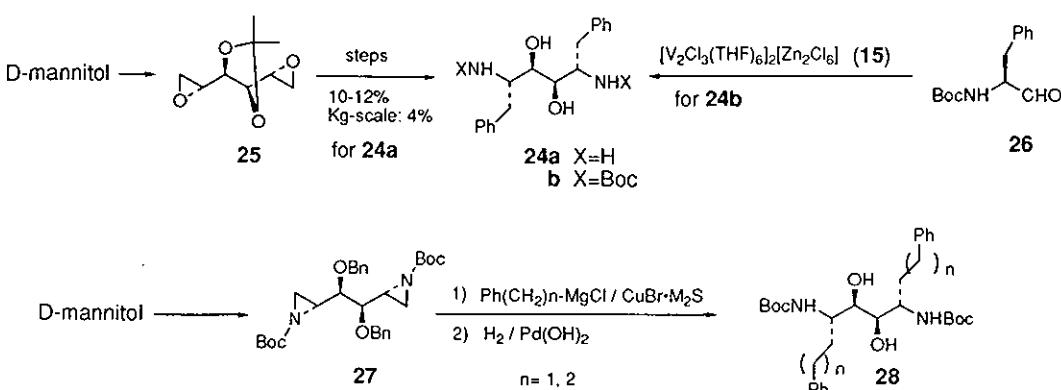


図10. ジアミノジオール **24a, b, 28** の合成

物の構造修飾において鍵となる段階はジアミノジオール誘導体(24)の不斉合成である。24の主要な合成法として、次の2法が知られている。1) D-マンニトールから容易に得られるビスエポキシ体(25)をフェニル化剤によってエポキシ環を開環して、さらに官能基変換反応する方法¹⁸⁾および2) α-アミノアルデヒド(26)のピナコール型縮合による方法²²⁾がある。1) の方法を用いると、D-マンニトールから9行程を要するがKgのスケールで24aを大量合成することができる。2) の方法において、カッピング試薬としてバナジウム錯体を用いることによって、望む立体配置のカッピング成績体(24b)を1行程で高選択的に合成することが出来る²²⁾。著者らはビスマシリジン(27)からアルキル剤によってアシリジンを開環して24bの類縁体である28を合成した²³⁾。27のフェニル化反応は低収率であり、ジアミノジオール(24b)の合成には適さないが、炭素原子数を増炭した28の合成に利用できることからこの種の化合物の一般的な合成法として有効な方法である。

6. 対称性 HIV プロテアーゼ阻害剤の構造修飾を基本とする非対称性 HIV プロテアーゼ阻害剤のデザイン

対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤(20)の2個の水酸基が、HIV プロテアーゼの活性中心の2個のアスパラギン酸

(Asp-25とAsp-25')と対称的に水素結合して、阻害活性を発現すると予想されていた²⁴⁾(図11参照)。しかし、20とHIV プロテアーゼの複合体のX線結晶解析の結果、実際は20の2個の水酸基の一つが図11に示すように HIV プロテアーゼの活性中心の2個のアスパラギン酸(Asp-25とAsp-25')と強く非対称的に水素結合していることが明らかとなった。また、2個の水酸基のうち、水素結合に関与していない方の水酸基は、むしろ結合に不利に働いていることが示唆された²⁴⁾。これらの結果を基にして、A-77003の水酸基の一つを除去し、さらに、N-末端の置換基の構造修飾についても種々検討され、Ritonavirが見い出された²⁵⁾。Ritonavirは、FDAの認可を受けたAIDS治療薬の一つである^{13a)}。このような対称型分子から新しい概念で非対称型分子に構造修飾された例として29がある。29は新しいタイプの非対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤で、20の水酸基の一つをホスフィン酸に替え、ホスフィネートジペチドイソスターを利用したユニークな分子である。29にも強い HIV プロテアーゼ阻害活性($IC_{50}=0.5\text{ nM}$)が見い出されている²⁶⁾。29の立体選択的合成は困難であり、シアステレオマーの混合物として得られるが、この IC_{50} の数値は混合物で得た数値である²⁶⁾。

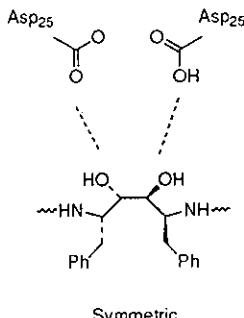
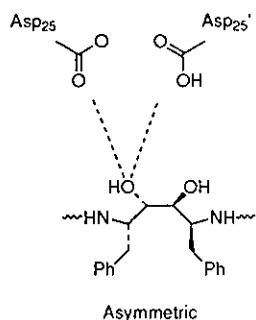
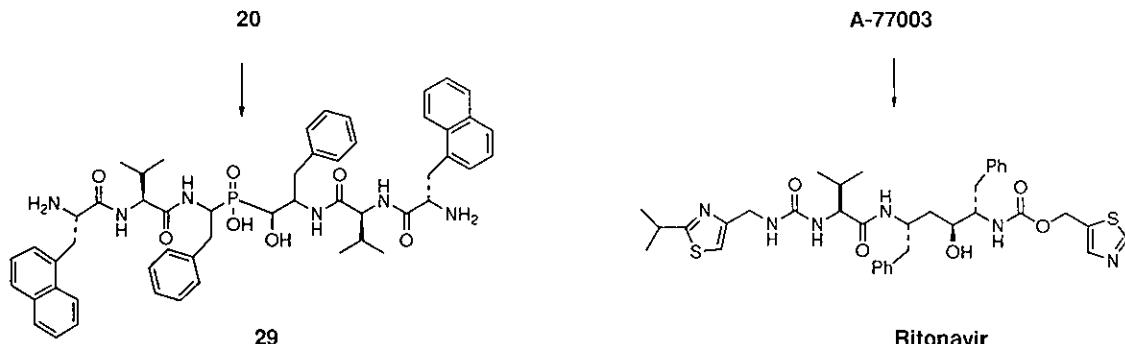


図11. A-77003 のジアミノジオール部分構造とアスパラギン酸(Asp 25 および Asp 25')の結合様式



著者等は、 α -アミノアルデヒド(30)のホスホニル化反応を検討し、29の部分構造となる β -アミノ- α -ヒドロキシホスホン酸(33a, b)を立体選択的に合成した²⁷⁾。すなわち、30をTiCl₄存在下のシリルホスファイト(31)でホスホニル化するとエリスロ体(33a)が選択的に得られた。また、ホスホニル化剤として亜リン酸ジエチル(32)を用い

るとスレオ体(33b)が立体選択的に生成した。**33a, b**をそれぞれ脱保護すると、ペプチド合成に利用可能な**34a, b**に変換することが出来る。**34a, b**は29に誘導可能な合成中間体と考えられるが、さらに、これらはレニン阻害剤の重要なジペプチドイソスターの一つでもある²⁸⁾。

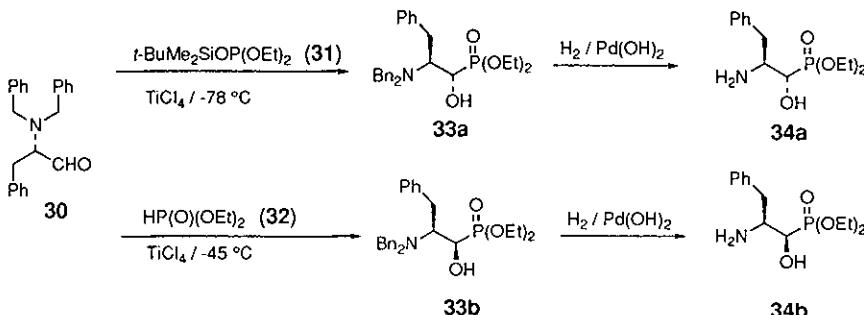


図12. β -アミノ- α -ヒドロキシホスホン酸誘導体の合成

7. 環状ウレア型 HIV プロテアーゼ阻害剤

ジペプチドイソスターの直接的な活用とは必ずしも云えないが、構造修飾の過程で新しい型の HIV プロテアーゼ阻害剤がデザインされた。HIV プロテアーゼと阻害剤によって生成する複合体の X 線結晶解析から、阻害剤と HIV プロテアーゼは、活性部位の二つのアスパラギン酸残基 (Asp-25 および Asp-25') と HIV プロテアーゼの "flap" と呼ばれる領域 (ダイマー構造の上方の可動性の高い部分) のアミノ酸残基 (Ile-50 および Ile-50') との間で "structural water" と呼ばれる水を介して図13に示すように水素結合していることが明らかにされた⁴⁾。分子中に "structural water" と同じ水素結合能を有する官能基 (structural water のミック) を組み込むと、その分子のプロテアーゼに対する親和性はエネルギー的に有利になることが予想された。また、この "structural water" は、レニンなどの哺乳動物のプロテアーゼには存在せず、HIV などのレトロウイルスのプロテアーゼに特異的に存在する。従って "structural water" のミック構造を分子内に組み込んだ分子は、レニンなどの他のプロテアーゼの機能を損なうことなく、HIV プロテアーゼを選択的に阻害することが期待された²⁸⁾。このような背景のもとに、DutPont 社の研究陣は、Erickson および Kempf 等によって合成されたジアミノジオール型 HIV プロテアーゼ阻害剤(20)をリード化合物として、新しい環状ウレア型 HIV プロテアーゼ阻害剤(35a-d)をデザインした²⁸⁾。35a-d は HIV プロテアーゼの活性部位のアスパラギン酸残基 (Asp-25 および Asp-25') と水素結合するジオ-

ル構造をそのまま残し、さらに、"structural water" のミックとしてカルボニル基を組み込んだ化合物である(図14)。35a (Ki=0.27 nM; IC₅₀=0.036 mM) について第Ⅰ相臨床試験が行われたが、バイオアベイラビリティーが悪く、さらに、生体内で代謝を受けやすいために、この段階で開発が中止された²⁹⁾。35 と同じように "structural water" のミック構造を組み込んだ HIV プロテアーゼ阻害剤として、環状スルホン誘導体(36)も合成されている²⁹⁾。36 は、経口投与可能な代謝拮抗型 HIV プロテアーゼ阻害剤のリード化合物として期待されている。

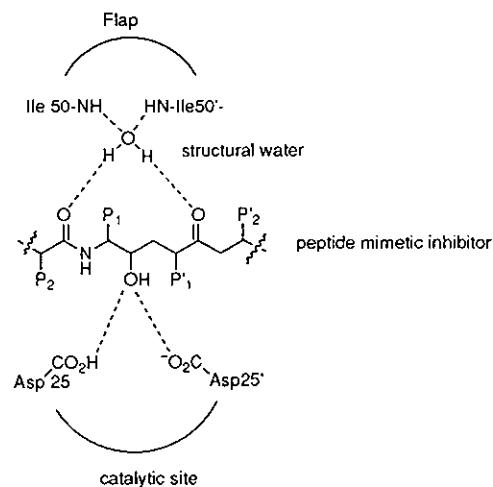


図13. HIV プロテアーゼ阻害剤と活性部位の結合における "structural water" の役割

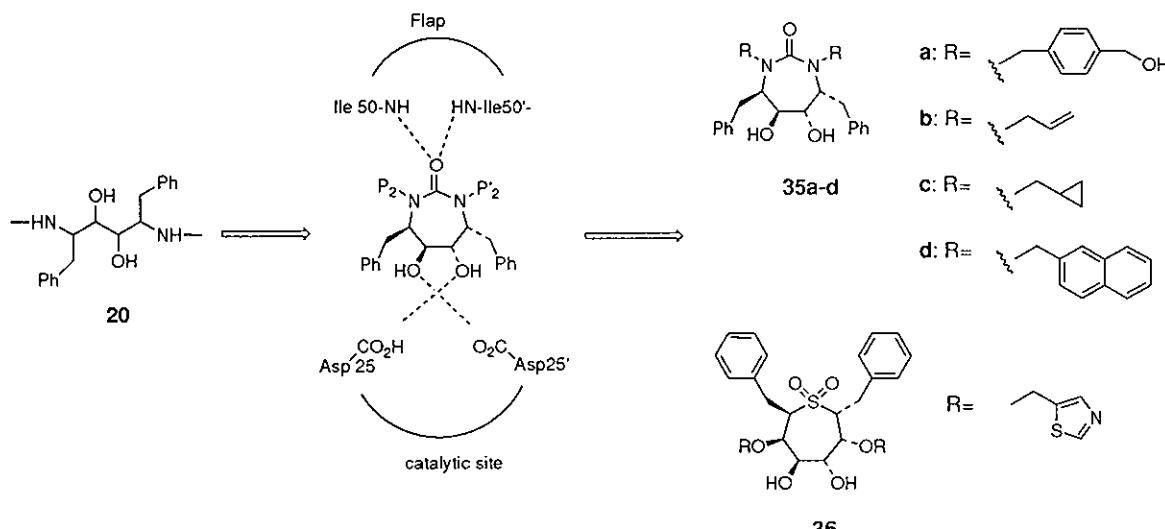


図14. "structural water" のミックを組み込んだ HIV プロテアーゼ阻害剤

8. おわりに

以上述べたように、紙面の都合上、構造活性相関にまで言及することは出来ないが、本稿では、エイズ治療薬の合成を目的にペプチドのバイオイソスターが活発に活用されている現状を簡単に述べた。医薬の創製において、活性発現の背景となる理論に基づくデザインが重要な鍵となることは当然ではあるが、一方でリード化合物の探索においては偶然の発見やランダムスクリーニング、突然の思いつきによるものも少なくない。しかし、リード化合物の選定や最適化の過程において、分子の安定化、分配係数の調整、物理化学的な性質の改善、バイオアベイラビリティーの改善等においてバイオイソスターの概念が巧みに活用されている。

参考文献

- 1) S. Shibuya, *The Chemical Times*, 163, 16 (1997).
- 2) a) D. V. Patel, K. Rielly-Gauvin, D. E. Ryono, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5587 (1990); b) D. V. Patel, K. Rielly-Gauvin, D. E. Ryono, C. A. Free, et al., *J. Med. Chem.*, **38**, 4557 (1995).
- 3) 横松, 山岸, 渋谷, 有機合成化学協会誌, **53**, 881 (1995).
- 4) a) J. R. Huff, *J. Med. Chem.*, **34**, 2305 (1991); b) E. D. Clercq, *J. Med. Chem.*, **38**, 2492 (1994).
- 5) D. H. Rich, J. Green, M. V. Toth, G. R. Marshall, S. B. H. Kent, *J. Med. Chem.*, **33**, 1285 (1990).
- 6) T. Mimoto, J. Imai, S. Tanaka, N. Hattori, O. Takahashi, S. Kisanuki, Y. Nagano, H. Shintani, H. Hayashi, H. Sakikawa, K. Akaji, Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2465 (1991); T. Mimoto, J. Imai, S. Tanaka, N. Hattori, S. Kisanuki, K. Akaji, Y. Kiso, *ibid*, **39**, 3088 (1991).
- 7) J. P. Vacca, J. P. Guare, S. deSolms, W. M. Sander, et al., *J. Med. Chem.*, **34**, 1225 (1991).
- 8) N. A. Robert, J. A. Martin, D. Kinchinton, A. V. Broadhurst, et al., *Science*, **248**, 358 (1990).
- 9) S. Kageyama, T. Mimoto, Y. Murakawa, M. Nomizu, H. Ford, Jr., T. Shirasaka, S. Gulnik, J. Erickson, K. Takaya, H. Hayashi, S. Broder, Y. Kiso, H. Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 810 (1993).
- 10) a) 馬場昌範, ファルマシア, **30**, 253 (1994); b) 木曾良明, ファルマシア, **30**, 246 (1994); c) 木曾良明, 化学, **47**, 726 (1992).
- 11) T. A. Lyle, C. M. Wiscount, J. P. Guare, W. J. Thompson, et al., *J. Med. Chem.*, **34**, 1228 (1991).
- 12) J. P. Vacca, B. Doriese, R. Levine, S. McDaniel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4069 (1994).
- 13) a) E. K. Wilson, *Chem. Eng. News*, issued on 1996, July 29, 43; b) 武之令, ファルマシア, **33**, 768 (1997).
- 14) A. K. Ghosh, W. J. Thomson, M. K. Holloway, S. P. McKee, et al., *J. Med. Chem.*, **36**, 2300 (1993).
- 15) D. P. Getmar, G. A. Decrescenzo, R. M. Heintz, K. L. Reed, et al., *J. Med. Chem.*, **36**, 288 (1993).
- 16) a) T. F. Tam, J. Carrile, I. D. Macdonald, A. L. Castelhano, *J. Med. Chem.*, **35**, 1318 (1992); b) J.-H. Gu, M. Okamoto, M. Terada, K. Mikami, T. Nakai, *Chem. Lett.*, **1992**, 1169; c) R. Herranz, J. Castro-Pichel, S. Vinesa, M. T. Garcia-Lopez, *J. Org. Chem.*, **55**, 2232 (1990).
- 17) J. W. Erickson, D. J. Neidhart, J. VanDrie, D. J. Kempf, et al., *Science*, **249**, 527 (1990).
- 18) D. J. Kempf, T. J. Sowin, E. M. Doherty, S. M. Hannick, et al.,

- J. Org. Chem.*, **57**, 5692 (1992).
- 19) D. J. Kempf, L. Codacovi, X. C. Wang, W. E. Kohlbrenner, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **36**, 320 (1993).
- 20) J. C. Barrish, E. Gordon, M. Alam, P.-F. Lin, G. S. Bisacchi, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **37**, 1758 (1994).
- 21) R. Bone, J. P. Vacca, P. S. Anderson, M. K. Holloway, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9382 (1991).
- 22) B. Kammermeier, G. Beck, D. Jakobi, H. Jendralla, *Angew. Chem.*, **106**, 719 (1994).
- 23) T. Yokomatsu, K. Suemune, S. Shibuya, *Heterocycles*, **35**, 577 (1993).
- 24) J. Greer, J. W. Erickson, J. J. Baldwin, M. D. Varney, *J. Med. Chem.*, **37**, 1035 (1994).
- 25) D. J. Kempf *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 2482 (1995).
- 26) B. Stowasser, K. -H. Budt, L. Jian-Qi, A. Peyman, D. Ruppert, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 6625 (1992).
- 27) T. Yokomatsu, T. Yamagishi, S. Shibuya, *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1401 (1993).
- 28) P. Y. S. Lam, P. K. Jadhav, C. J. Eyermann, C. N. Hodge, *et al.*, *Science*, **263**, 380 (1994).
- 29) C. U. Kim, L. R. McGee, S. H. Krawczyk, E. Harwood, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **39**, 2431 (1996).

新発売!! 「農薬混合標準液」

ゴルフ場で使用される農薬や食品衛生法で規定される残留基準など、近年農薬に関する規制が増加しつつあります。弊社ではこれらの規格基準等にあわせ、随時品目の追加に努めております。
今回新たに「水質試験」及び「ゴルフ場農薬の分析」で用いられる混合標準液を発売開始いたしました。
今後ともご愛用の程よろしくお願い申し上げます。

製品番号	製品名	濃度	溶液
34000-96	農薬混合標準液 I (水質分析GC対象13種)	各 10 μ g/ml	アセトン溶液
34001-96	農薬混合標準液 II (水質分析オキソ体4種)	各 100 μ g/ml	アセトン溶液
34002-96	農薬混合標準液 III (ゴルフ場農薬GC対象2種)	各 10 μ g/ml	アセトニトリル溶液
34003-96	農薬混合標準液 IV (ゴルフ場農薬GC対象25種)	各 10 μ g/ml	アセトン溶液
34004-96	農薬混合標準液 V (ゴルフ場農薬GC対象4種)	各 10 μ g/ml	アセトン溶液
34005-96	農薬混合標準液 VI (ゴルフ場農薬LC対象4種)	各 10 μ g/ml	アセトニトリル溶液

・2mlアンプル×5本包装

・冷凍保存



関東化学株式会社 試薬事業本部

<< 関東化学インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp> >>

〒103 東京都中央区日本橋本町3-11-5 03(3663)7631
 〒541 大阪市中央区瓦町2-5-1 06(222)2796
 〒812 福岡市博多区山王1-1-32 博多港ビル 092(414)9361

飼料中の硝酸態窒素に対する簡易測定法の検討

全国酪農業協同組合連合会 分析センター 一柳かおり 小林好一

はじめに

硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) は硝酸塩としてすべての植物体内に常時存在し、植物体内で光合成によるたんぱく質合成などに利用されているが、硝酸塩はその植物の生育条件等により植物体内に蓄積されやすく、これが牛などの家畜に硝酸塩中毒をもたらすことがある。

牛などの反芻動物は普通、体内に取り込んだ硝酸塩をルーメン内の微生物の作用によりアンモニアにまで還元し、糞便としている。しかし、短時間に過剰の硝酸塩を摂取してしまうとルーメン内での分解が間に合わなくななり、中毒を引き起こすこととなる。

硝酸塩による中毒は急性中毒が多く、場合によっては死に至ることもあるため、飼料中の硝酸塩含量はできるだけ早く知っておく必要がある。

硝酸態窒素の定量は現在、複雑な装置を用いずに簡易測定装置で行うことが可能である。MERCK 社製の RQflex は硝酸態窒素の簡易測定を行うことができる装置の一つであり、分析精度も優れていることがわかっている。

この簡易測定装置は小型で携帯に適しており、酪農の現場で使用することが可能である。しかし、従来の硝酸態窒素の抽出操作には、試料の粉碎、振とうといった過程を要するため機器が必要であり、現場で測定を行うことは難しいと考えられた。

そこで、特別な機器を用いなくても簡易測定装置を使って硝酸態窒素の定量が行えるよう、簡易測定法を検討した。

装置及び器具

- ・反射式光度計 RQflex (メルク社製)
- ・リフレクトクアント硝酸イオンテスト試験紙 測定レンジ 5-225 mg/l (メルク社製)
- ・ハサミ
- ・500 ml 容量瓶 (なるべく広口、密栓が可能なもの)
- ・500 ml メスシリンダー (プラスチック製)

KAORI HITOTSUYANAGI
KOICHI KOBAYASHI

Analysis Centre, The National Federation of Dairy Co-operative Association

・はかり (クッキングスケールなど、デジタル表示で 1 g 単位で秤れるものが良い)

RQflex, リフレクトクアント硝酸イオンテストの測定原理

試料中の硝酸イオンは、還元剤により亜硝酸イオンとなり芳香族アミンと反応し、ジアゾニウム塩を生成する。この紫色に呈した部分に光を当て、その反射光の強さから硝酸塩濃度を測定する。

方法及び結果

1. サンプリングによる測定値のバラツキの確認

植物体内の硝酸塩は、土壌中の窒素が硝酸化成菌の作用により硝酸塩となり、根より吸収されたものである。干ばつ後に降雨があり、硝酸化成菌の活性化と植物が急激に水分を吸収したときや、肥料中に多量の窒素が含まれていた場合、硝酸塩の吸収も多量に起こることとなる。植物が若く光合成能力が低い場合や、日照不足などにより光合成が阻害されるときもまた硝酸塩含量が高くなることとなる。従って、同じ草種の試料であっても個々の植物体により硝酸塩の含量は異なり、また植物体内の部位によても含量は異なっている。

このような試料を分析する場合、通常数カ所からサンプリングを行っているが、サンプリングの仕方によっては分析値にかなりのバラツキがあると考えられる。現場で即時に測定を行うことができたとしても、その値にどれほどの偏差があるかを理解していかなければならない。そこで、サンプリングによるバラツキについて確認した。

1-1 試料

本会では、輸入粗飼料を扱っており、比較的硝酸態窒素の含量が高いことからステンレス乾草を用いた。

1-2 方法

試料約 5 kg から 5 カ所任意にサンプリングして測定試料とし、これを 10 回繰り返し 10 個の測定試料を調製し

た。これらについてそれぞれ粉碎機で粉碎後 1 g 精秤し、蒸留水 50 mL を加えて振とう機で 20 分間振とうして抽出を行った。抽出液を No.5 A ろ紙でろ過し、MERCK 社製 RQflex にて硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) の測定を行った。

1-3 結果

測定結果を表 1 に示した。その結果、平均値 1676 ppm、標準偏差 262.615、変動係数 15.7% であった。しかし、この結果は約 500 ppm ほどのサンプリングによる誤差と考えられた。この誤差を少なくするためにもサンプリングは出来るだけ多くの箇所から行うことが必要であり、よく混合できるような試料の調製が必要であると思われた。

表 1 スーダングラス乾草中 $\text{NO}_3\text{-N}$ の測定結果 (ppm)

試 料	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
$\text{NO}_3\text{-N}$	1258	1654	1883	1564	1716	1530	1527	2058	2082	1491	1676

試料の調製方法を検討したところ、十分に混合するためには短く切るのがよいのではないかと考えられた。この後の実験に用いる試料はすべてハサミで 3 ~ 5 cm 程度に切ってから用いることとした。

2. 抽出方法の検討

ハサミで 3 ~ 5 cm 程度に切った試料をよく混合してから 500 mL 容蓋付ポリ容器に 10 g 秤り、蒸留水 490 mL を加えた。この測定試料について振とう、静置による抽出を検討した。

RQflex による測定は、本来、体積中の重量 (mg/ℓ) で求めることになっているが、簡易抽出を行おうすると体積で硝酸態窒素濃度を求めるのは難しいと考えられた。このため、重量中の重量 (mg/kg) により求めることは出来ないかと考えた。試料 10 g に水 490 mL を加えた試料溶液 500 g は、体積ではほぼ 500 mL であったため、重量により求めることに特に問題はないと考えられた。

2-1 振とう抽出の検討

2-1-1 試 料

スーダングラス乾草

2-1-2 方 法

サンプルを 1 分間、2 分間、…… 5 分間振とうし、RQflex で硝酸態窒素を測定した。

2-1-3 結 果

振とうによる検討結果を表 2 に示した。振とう時間が増加するにつれて抽出も十分に行えるという傾向がみられたが、人が連続で振とうを行うとするなら 1 分間が限度ではないかと思われた。

表 2 スーダングラス乾草の振とう時間の変化による $\text{NO}_3\text{-N}$ の抽出結果 (ppm)

	1分	2分	3分	4分	5分
1	633	1119	1469	1458	1559
2	848	1141	1367	1458	1503
平均	741	1130	1418	1458	1531

2-2 静置による抽出の検討

2-2-1 試 料

スーダングラス乾草

2-2-2 方 法

サンプルを内容物がよく混ざる程度混和後、静置し、10 分ごとに RQflex で硝酸態窒素を測定した。測定の前にはサンプルを 1 分程度振とうした。この操作を 4 回行った。

2-2-3 結 果

静置時間による検討結果を図 1 に示した。この結果、30 分間静置後は測定値に上昇が見られず、ほぼ一定した測定値であった。これにより、30 分静置することで硝酸態窒素の抽出が可能であることがわかった。

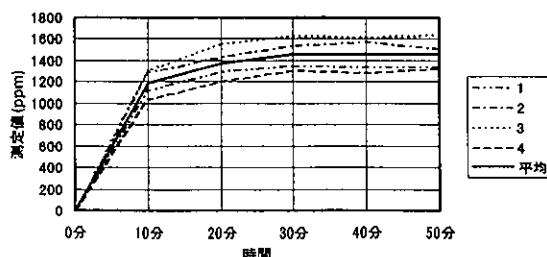


図 1 スーダングラス乾草の静置抽出時間の変化に伴う $\text{NO}_3\text{-N}$ 測定結果

30 分間静置することにより 5 分間振とうして行う抽出と同様の結果が得られたため、以後この方法により抽出を行うこととした。

3. 静置による抽出方法のバラツキの確認

3-1 試 料

スーダングラス乾草

3-2 方 法

試料 10 g を 500 mL 容蓋付ポリ容器に秤り、蒸留水 490 mL を加えて内容物がよく混ざる程度振とうし、30 分以上静置後、約 1 分間振とうし、RQflex で硝酸態窒素の測定を行った。これを 10 回繰り返し、この方法のばらつきの有無を確認した。

3-3 結 果

静置による抽出方法を 10 回繰り返した結果を表 3 に示

した。その結果平均は 1461 ppm であり、全体的に測定値は低いように思われたが、変動係数は 5.3% であり、この方法によるバラツキは少ないということが分かった。別に粉碎機で粉碎した同じ試料 1 g に蒸留水 50 mL を加え、振とう機で抽出を行った硝酸態窒素の測定値は 1689 ppm であった。この差は約 200 ppm であり、サンプリング時の誤差を考慮すれば、この方法で十分に抽出が行えると考えられた。

表 3 スーダングラス乾草の静置による NO₃-N の抽出結果 (ppm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
NO ₃ -N	1367	1458	1514	1413	1582	1469	1514	1322	1458	1514	1461

4. 他の乾草による検討

今までの抽出方法の検討を試料としてスーダングラス乾草で行ってきたが、この抽出方法が他の乾草に適用できるか検討した。

4-1 試 料

アルファアルファベール

4-2 方 法

ハサミで 3 ~ 5 cm に切った試料を 500 mL 容蓋付ポリ容器に 10 g 秤り、蒸留水 490 mL を加えて 3-2 の方法で抽出を行い、RQflex で測定を行った。これを 10 回繰り返した。

4-3 結 果

アルファアルファベールによる検討結果を表 4 に示した。この結果平均値は 1222 ppm であった。この試料も粉碎機で粉碎後、1 g 秤り、蒸留水 50 mL を加えて振とう機で抽出を行い測定を行ったところ、測定値は 1230 ppm であり、簡易抽出により測定した値とほぼ同じであった。10 回繰り返した測定値の変動係数も 8.6% であり、バラツキもそれほど大きくなかったことから、この抽出方法は他の乾草にも適用できることと考えられた。

表 4 アルファアルファベールの静置による NO₃-N の抽出結果 (ppm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
NO ₃ -N	1175	1300	1198	1311	1379	1311	1130	1153	1232	1028	1222

5. サイレージによる検討

サイレージはトウモロコシ、牧草などを発酵させた粗飼料である。乳牛では給与量が高く、施肥や刈取時期などにより、硝酸態窒素が多く含まれている可能性があるためサイレージについても、その抽出方法について検討した。

5-1 簡易抽出方法の検討

5-1-1 試 料

トウモロコシサイレージ

5-1-2 方 法

まず、通常法(試料 50 g を 200 mL 容メスシリダーに秤り、蒸留水を加えて全量を 200 mL とし、冷蔵庫内で一夜静置)で抽出を行い RQflex で測定を行った。次に 500 mL 容蓋付ポリ容器に試料を 100 g 秤り、蒸留水を 400 mL 加えた。この測定試料について振とう、静置により抽出方法の検討を行った。

サイレージもまた、体積で硝酸態窒素濃度を求めるのは難しいと考えられた。試料 100 g に水 400 mL を加えた試料溶液 500 g の体積を測定したところ、ほぼ 500 mL であったため、重量により求めるに特に問題はないと考えられた。

5-1-3 結 果

約 1 分間振とうした抽出溶液、及び 10 分間静置後約 1 分間振とうした抽出溶液について RQflex で測定を行ったところ、それぞれ現物で 34 ppm、35 ppm であった。また、通常の方法で抽出を行った結果は現物で 33 ppm であり、同様の値を示したことから、サイレージについては、振とうのみで抽出が行えると考えられた。

5-2 バラツキの確認

5-2-1 試 料

5-1 と同じトウモロコシサイレージを用いた。

5-2-2 方 法

試料 100 g を 500 mL 容ポリ容器に秤り、蒸留水を 400 mL 加えた。これを約 1 分間振とうし、RQflex で測定した。この操作を 5 回繰り返した。

5-2-3 結 果

サイレージの簡易抽出法による測定結果を表 5 に示した。この結果、平均値 34 ppm、変動係数 2.7% であり、この方法によるバラツキはほとんどみられなかったことから、この方法はサイレージの簡易抽出に適していると考えられた。

表 5 トウモロコシサイレージ中 NO₃-N の測定結果 (ppm)

	1	2	3	4	5	平均
NO ₃ -N	34	33	33	35	33	34

6. クッキングカッターを用いた抽出時間の短縮化の検討

硝酸態窒素の抽出は試料が細かく、攪拌がよく行える方が抽出は早く行えるようである。試料の細切と溶液の攪拌を同時に行うことが出来れば、抽出時間の短縮が図れるのではないかと考えられた。そこで、クッキングカ

ッターを用いて検討を行うこととした。

6-1 試 料

スーダングラス乾草

6-2 使用機器

クッキングカッター（FV-F1, 日立製）を使用した。

6-3 方 法

3～5cmにハサミで切った試料を10g秤り、蒸留水490mLを加えてクッキングカッターに供した。試料全体が細かくなつてから約30秒ほど攪拌後、RQflexで硝酸態窒素の測定を行つた。

6-4 結 果

RQflexで硝酸態窒素の測定を行う際、抽出液にそのまま試験紙を浸したところ、試験紙に多量の試料が付着したため、抽出液を一度ガーゼで漉してから測定を行つた。この結果、測定値の平均は1635ppmであった。

静置による抽出方法の結果とほとんど差もなく、抽出時間の短縮も行えるため、十分に利用可能であると考えられた。しかし、容器を洗い水分を拭き取らなければならぬなどの手間がかかるため、検体数が多いときは全般的な面からみればそれほど時間の短縮にはつながらないのではないかと考えられた。

注意事項

抽出液は、放置しておくと微生物などの影響により変質し、硝酸態窒素を正しく測定できないことがあるので抽出後は直ちに測定を行わなければならない。

計 算

RQflexが表示する値は溶液中の硝酸イオン濃度である。次式により硝酸態窒素濃度に換算する。

$$\text{NO}_3\text{-N (ppm)} = \frac{\text{A} \times 0.226 \times (\text{W} + \text{B})}{\text{W}}$$

A：測定値（RQflexが表示した値（硝酸塩濃度））

0.226：硝酸態窒素換算係数

(NO₃=62, N=14より N/NO₃=14/62=0.226)

B：加水量（g）

W：試料重量（g）

したがつて本法の試料重量、加水量で行った場合は次のように表される。

(1)乾草

$$\text{NO}_3\text{-N (ppm)} = \frac{\text{A} \times 0.226 \times (10 + 490)}{10}$$

(2)サイレージ

$$\text{NO}_3\text{-N (ppm)} = \frac{\text{A} \times 0.226 \times (100 + 400)}{100}$$

まとめ

飼料中の硝酸態窒素の簡易測定方法について検討を行つた。その結果、次の方法により測定が可能であると考えられた。

(1)乾草

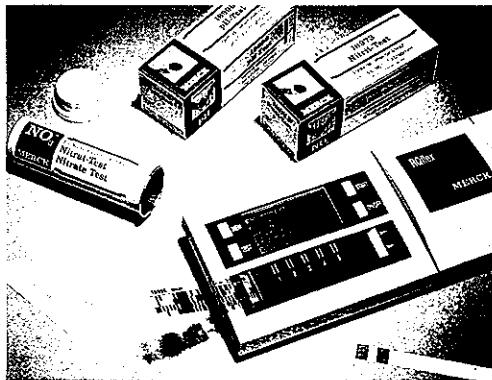
- ①分析を行おうとする試料から偏りがないように出来るだけ多くの箇所（5カ所以上）からサンプリングする
- ②サンプリングした試料をハサミで3～5cmに切り、よく混合する
- ③500mL容蓋付ポリ容器に10g秤り、水を490mL加えてよく混合する
- ④30分静置する
- ⑤約1分間激しく振とうし、RQflexで測定する

(2)サイレージ

- ①分析を行おうとする試料から偏りがないように出来るだけ多くの箇所（5カ所以上）からサンプリングする
- ②サンプリングした試料をよく混合する（大きめの袋に入れる）
- ③500mL（又は1000mL）容蓋付ポリ容器に100g秤り、水を400mL加える。
- ④約1分間激しく振とうし、RQflexで測定する

反射式光度計 RQフレックス

Reagents
MERCK



反射式光度計 RQフレックス

専用のリフレクトクアント試験紙を用いるポケットサイズの高精度な反射式光度計です。検量線をバーコードで入力し、検水に試験紙を浸し、RQフレックスに挿み込むスリーステップ操作で、どこでも迅速・正確な分析結果が得られます。

特長

- 1)呈色した試験紙の反射光の強さをもとに、試料中の目的物質の濃度を測定できます。
- 2)測定は常に2回行なわれ、平均値が高精度で表示されます。

応用例

- ☆農作物の栄養診断
- ☆水耕栽培の養水の診断
- ☆金属処理液の分析

- ☆土壤の分析
- ☆食品の成分分析
- ☆定着液の分析

測定項目

アンモニウム	(20-180 mg/l NH ₄ ⁺)	アンモニウム	(0.2-7.0 mg/l NH ₄ ⁺)
アルミニウム	(5.0-50.0 mg/l Al ³⁺)	アスコルビン酸	(25-450 mg/l)
カルシウム	(2.5-45 mg/l Ca ²⁺)	クロム酸	(1.0-45.0 mg/l CrO ₄ ²⁻)
銅	(5-200 mg/l Cu ²⁺)	定着液	(0.20-5.00 g/l Ag ⁺)
ホルムアルデヒド	(1.0-45.0 mg/l HCHO)	鉄	(0.5-20 mg/l Fe ²⁺)
鉄	(20-200 mg/l Fe ²⁺)	鉛	(20-200 mg/l Pb ²⁺)
マンガン	(0.5-45.0 mg/l Mn ²⁺)	モリブデン	(1.0-45.0 mg/l Mo ²⁺)
ニッケル	(10-200 mg/l Ni ²⁺)	硝酸	(3-90 mg/l NO ₃ ⁻)
硝酸	(5-225 mg/l NO ₃ ⁻)	亜硝酸	(0.5-25.0 mg/l NO ₂ ⁻)
過酢酸	(1.0-22.5 mg/l)	過酢酸	(75-400 mg/l)
過酸化物	(0.2-20.0 mg/l O ₂ ²⁻)	pH	(pH 4.0-9.0)
pH	(pH 9.0-13.0)	pH 潤滑油用	(pH 7.0-10.0)
りん酸	(5-120 mg/l PO ₄ ³⁻)	カリウム	(0.25-1.20 g/l K ⁺)
亜硫酸	(10-200 mg/l SO ₃ ²⁻)	コバルト	(25-450 mg/l Co ²⁺)

Caco 関東化学株式会社 試薬事業本部

〒103 東京都中央区日本橋本町3-11-5 03(3663)7631
〒541 大阪市中央区瓦町2-5-1 06(222)2796
〒812 福岡市博多区山王1-1-32 博多港池ビル 092(414)9361

<< 関東化学インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp> >>

リービッヒの生家の絵についての疑問

筑波大学名誉教授 神戸松蔭女子学院(短期)大学教授 原田 香

J.リービッヒ (J. Liebig, 1803-1873) は19世紀の前半から半ば過ぎまで化学理論、応用化学及び化学教育において多くの貢献をしたドイツの化学者である。彼が最も活躍したギーセン時代の足跡は、その地の「リービッヒ博物館」で見ることができる。この博物館（参考文献1）、リービッヒが生まれたダルムシュタット市(2, 3)、及びその生家(4)については以前に紹介した。

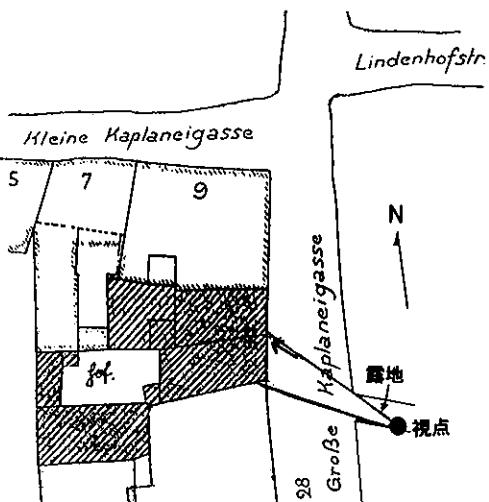


図1. 斜線の部分がリービッヒの生家、グロッセ・カブライ小通りに面して入口(矢印)がある。入口を背にして斜め右に露地がある、図2参照。図(4, 5)および写真(6)の視点は露地の●印近くにある。

ここで再びリービッヒの生家について言及するのは、ここに二つの公的に展示されている二枚の絵と一枚の写真があるからである。それらの絵とはギーセンのリービッヒ博物館に掲げられている雪景色の油絵(図4)であり、もう一つはダルムシュタット工科大学のケクレ記念室(Kekule Sammlung)に掲げられている同じく雪景色のリービッヒの生家の絵(図5)である。図6はリービ



図2. グロッセ・カブライ小通りの子供達が遊んでいる所に右側から光がさしている。ここに個人用の露地がある。この露地の奥から図4, 5が描かれ、図6の写真が撮られたことになる。通りの向う(北)に明るく見えるところはリンデンホフ通りである。

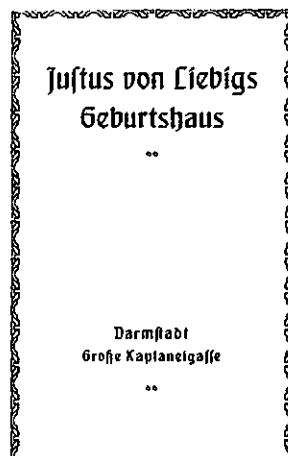


図3. ダルムシュタット市が1922年に作成した改修前のリービッヒの生家についての小冊子(20頁), 文献4参照。

ッヒ博物館に掲げられているリービッヒの生家の写真である。これら図4, 5, 6の画家、写真家の名前、及び制作年代についてギーセン大学に問い合わせたが不明であった。図5の雪景色の絵は「ケクレ記念室」を管理している女性によれば、ケクレ(A. Kekulé, 1829-1896)が描いたものであるという。本稿ではこれらの絵と写真的関係について考察したい。

これら図4, 5及び図6を比較すると奇妙な一致がある。
すなわち

- これらの二つの絵と写真是視点が前後、左右、上下の点で全く同じであり、極めて狭い範囲(約20~30cm)内でその視点が一致する。
- この視点は、リービッヒの生家の斜め前にある路地の奥の二階の一点である。
- 前の通り(グロッセ・カプラナイ・ガッセ)からではリービッヒの生家は近すぎて描くことが(または写真を撮ることが)できず、路地の奥まで引き下がって描写(又は写真撮影)したのである。
- そのため図4, 5, 6の絵の左、右は露地をつくっている建物の陰になり、目的とするリービッヒの生家は、入り口のある建物の一部が描写(撮影)されているのみである。

これらのことから次のようないかが生まれる。

- 図4, 5及び6の視点は全く同一であるが、これらの絵及び写真是互いにどのような関係にあるのかという疑問である。
- 図4, 5, 6がそれぞれ別人により、異なる時代に描かれ、また撮影されたのであれば、これらの視点があまりよく一致しているのでその可能性は低い。
- 若し、図4, 5, 6のうちのどれかが原画であり、これをコピーしたのであれば、視点の一致は説明できるが、もしそうだとすれば、果たしてどれが原画であろうか?

このように仮定して絵及び写真を比較すると図4と6はあらゆる点で極めてよく一致している。絵4は細部に到るまで、描写が明瞭であり、描かれたものの相対的位置、形、角度が写真6と同じである。一つ一つ指摘しないが、ほとんどの点で絵4では写真6に写っているものが正確に描かれている。このことは絵4が写真6を原画として描かれた可能性が大きいことを示している。但し絵4は雪景色である。しかし雪景色にすれば屋根や石畳の詳細を描かずにすむ。

同様に絵5もまた絵4と同様なプロポーションで描かれているが、5では細部が省略され、角度が少し異なり、相対的位置がわずかにずれている。このような点から絵



図4. リービッヒの生家の斜め向かいの露地の奥の2階からの風景、油絵、ギーセンの『リービッヒ博物館』。



図5. 前図と同じく露地の奥からのリービッヒの生家の風景、油絵、ダルムシュタットの『ケクレ記念室』。

5は絵4と比較して正確さに欠け、いわば雑な絵となっている。このように考えると絵5は写真6を原画としたというより、むしろ絵4を原画として描かれたものではないか。後者の考え方を支持するものが図4、5にある。それは生家にうつる建物の影が4と5では同じであり、写真6とは全く異なることである。このことは5の原画は4である可能性があることを示唆している。

それでは写真6はいつ頃写されたものであろうか？この間にに対する確実な答えはない。市の土木局が老朽化して危険になったリービッヒの生家を取り壊すことを中止し、これを市の小さな科学・技術博物館にすることに決定し、その家屋を買収したのは1920年のことであった。それ以後生家の玄関のドアの上には記念板と思われるものが掲げられている（図7）。しかし図4、5、6には何れもこの記念板がないので、これらはそれ以前の1920年代はじめのものであると思われる。リービッヒと共にヘッセンの他の科学、技術者の成果を展示する小博物館として完成したのは（正確な年代は不明であるが）おそらく1920年代の後半であろう。このような博物館創設の動きが生まれたのは、ミュンヘンにおける科学・技術に関する「ドイツ博物館」の建設が進行していた当時の時代の動きがあったからであろう。ダルムシュタット工科大学では長い間準備していたケクレ記念室が1920年に開館した。リービッヒの小博物館は当時未だ計画中であった。おそらくダルムシュタットの市当局は博物館をつくる案が出た1920年を少し過ぎた頃まで、リービッヒの生家には全く関心を払わず、建物は古くなるままに老朽化していただろう。もしこのような推測が当たっているならば、リービッヒの生家の写真（図6）は1920年頃、改築前に撮影され、絵はその後に描かれたのではないだろうか？私は図6が古い写真としては質のよいものであるので、1920年代初期の改築前の姿を留めるために市当局が公式な記録として撮影したものと想像する。

次で問題になるのは絵5である。絵5を描いたのはA.ケクレであると「ケクレ記念室」の管理者はいったが、それは真実ではないだろう。絵5は絵4、または写真6をもとにして描かれたものではないかと思う。なるほどケクレは少年時代に極めて巧みな絵を描いていた。ケクレは1896年に67才でボンで死亡したが、リービッヒが少年時代を過ごした生家を描くためにケクレが遠く離れたダルムシュタットまでやってきて、雪の日に写真6と全く同じ図柄の雑な絵を描いたとは思われない（しかしダルムシュタットはケクレの生まれた町であった）。以上のように考えると絵4、5は何れもケクレの時代より新らしい1920年過ぎにリービッヒの生家を小博物館に改築しよ



図6 同じく露地の奥から写された写真。この露地が個人用のものであることは引き入れられた荷車および入口に戸があることでわかる。ギーセンの『リービッヒ』博物館。

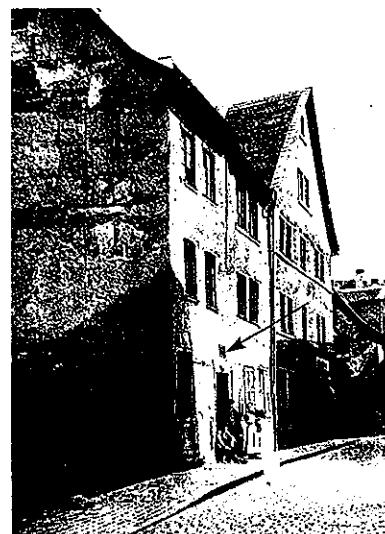


図7 グロッセ・カプラナイ小通りから見たリービッヒの生家。前出の図と同様改修前の建物であるが、入口の上に記念板が掲げられている。図6よりも相対的に新しい写真である。

うとした頃に写真6を原画として描かれたのであろう。ギーセンの博物館の設立は1920年であった。

ここで絵と写真の関係について結論を述べれば、絵4は写真6を原画として描かれ、絵5はおそらく絵4をもとにして描かれたと考えられる。相対的年代では6が最も古く、次で4→5の順序となると思われる。

付記

絵4を詳細に見ると右上の屋根の上に一匹の猫が描かれている。寒いドイツの冬の雪の日に、こたつで丸くなっている筈の猫が雪に覆われた屋根の上を散歩しているのを描くとは、この画家はサービス精神の旺盛な人である。絵の質からいえば絵4は5より高度であるが、おそらくこれらの絵は1920年代に博物館創設の必要から当時の無名の画家により描かれたものと考えられる。

参考文献

1. 原田 等、「科学巡礼・ギーセンにて」、1.近畿化学工業界、7月号、4~7(1988); 2.同誌、8月号、2~5(1988); 3.同誌9月号、6~9(1988); 4.同誌、10月号、7~9(1988); 5.同誌11月号、10~12(1988)。
2. 原田 等、「科学巡礼・ダルムシュタットにて」、1.近畿化学工業界、7月号、8~10(1989); 2.同誌8月号、8~9(1989); 3.同誌、9月号、14~16(1989); 4.同誌、5月号、17~19(1990); 5.同誌、6月号、12~14(1990)。
3. 原田 等、「ダルムシュタットのE.メルク社」、The Chemical Times, No. 4, 8~17(1995); 同誌, No. 1, 12~18(1996)。
4. 原田 等、「ダルムシュタットのリービッヒの生家」、The Chemical Times, No. 2, 9~16(1994); 同誌, No. 3, 9~12(1995)。

腸管出血性大腸菌 O 157 関連試薬

	製品コード	製品名	包装
選択増菌培地	717504-2 711129-5	mEC培地・一升パック トリプトンソーヤブイヨン(CM 129)	1.8L用×10 500g
分離培地	72005 711813-5 717506-1 717505-2 717508-1	クロモアガーO 157 ソルビトールマッコンキーカンテン培地(CM 813) SMC(ソルビトールマッコンキー)寒天生培地(OX) SMC(ソルビトールマッコンキー)寒天生培地(OX) CT-SMAC寒天生培地(OX)	5L用 500g 10枚×10 100枚×2 10枚×10
添加試薬	6255-1M 714071-1 713030-1 713172-1	ノボビオシンーナトリウム塩 MUGサプリメント(BR 71) 亜テルル酸カリウム溶液3.5%(SR 30) CTサプリメント(SR 172)	1g 10バイアル 2ml×10 500ml用×10
抗原検出試薬	71903-00	大腸菌O 157 検出キット「UNI」(DR 620)	100テスト

問合せ先：関東化学株式会社 試薬事業本部 臨床検査薬部 TEL 03-3667-8061

（編集後記）

今年の7月5日、米国の火星探査機「マーズ・パスファインダー」が火星に着陸し、画像のデータなどを地球に送り続けています。昨年、NASAが火星からのいん石に生命の痕跡らしいものを発見したとの発表もあり、想像を超える科学の進歩に驚ろかされながら、興味津津たるものがあります。

実は、探査機の火星着陸が報道されて間もなく、「ニュートン」にも執筆されている東京工業大学小池惇平先生から着陸を確認されたうえで時機をはずさないうちにと「宇宙の彼方に生命を求めて」その7をご寄稿いただき、本号に掲載することができました。

多忙な毎日ではありますが、紅葉に天下の秋を知り、月を愛でる感性は、持ち続けたいものです。（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10月1日 発行