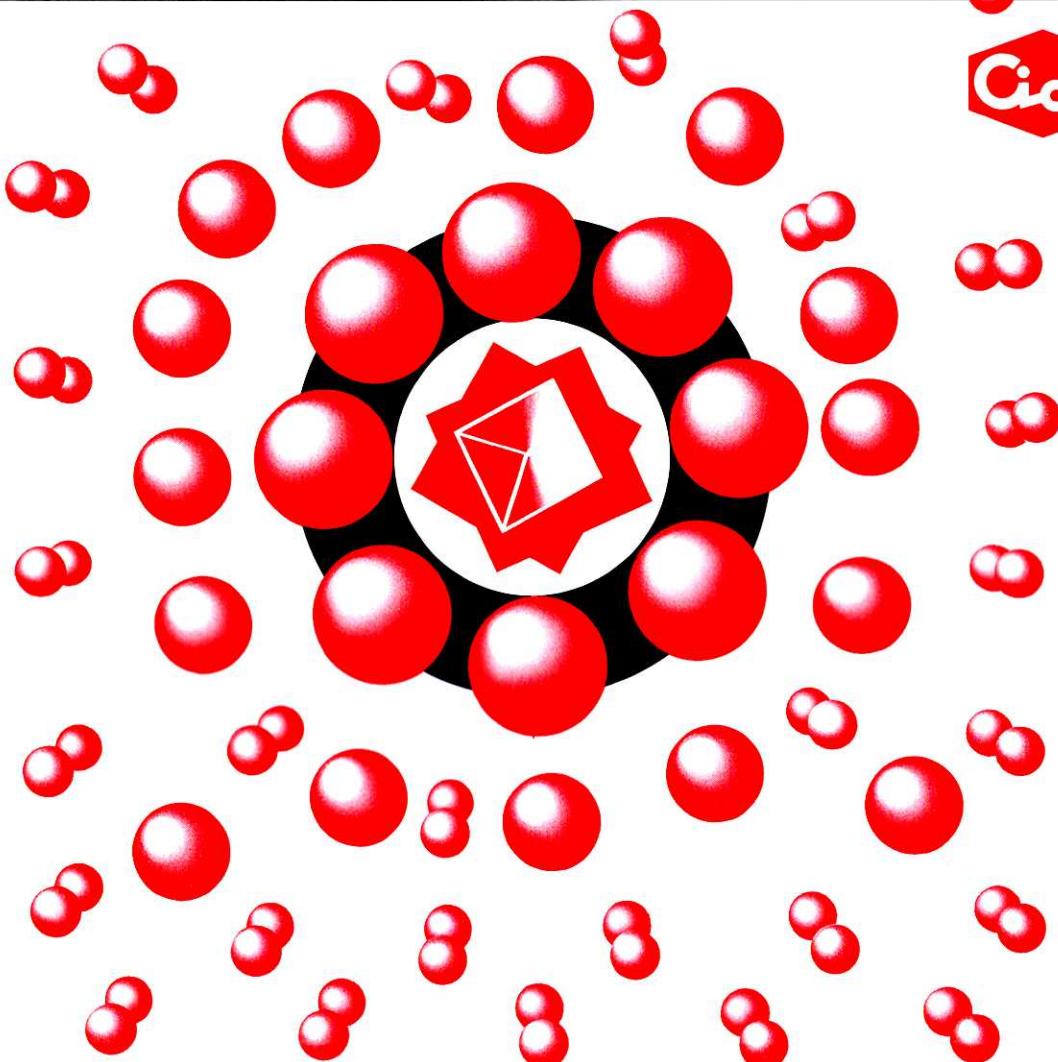


THE

ISSN 0285-2446
KANTO CHEMICAL CO., INC.
1999 No.1 (通巻171号)

CHEMICAL TIMES



目 次

| | | |
|---|-------------|----|
| 新年を迎えて..... | 野澤 俊太郎..... | 2 |
| 二点配位型ルイス酸のデザインと精密有機合成への応用..... | 丸岡 啓二..... | 3 |
| マイティシルカラムによるラットインスリンの高効率精製と 高感度酵素免疫測定法の開発..... | 本庄 勉..... | 8 |
| 高純度シリカゲル・フルエンドキャップ充填剤..... | 酒井 芳博..... | 17 |
| Mightysil RP-18 GP | | |
| 恐竜王国へようこそ(3)..... | 福田 芳生..... | 21 |
| —鳥類は恐竜の生き残り— | | |
| 編集後記..... | | 24 |



新年を迎えて

代表取締役社長 野澤俊太郎

新年明けましておめでとうございます。

ケミカルタイムズの読者の皆様並びにご執筆の諸先生方にはさぞよい新春を迎えたこととお慶び申し上げます。

不況が続く我が国の経済は、金融不安を背景に負の連鎖が断ち切れず、信用不安が需要の減少を加速して企業の生産・設備投資を萎縮させる悪循環に陥り、景気は一段と低迷の度合いを深めております。とりわけ銀行を中心とする金融界では不良債権の増大がまだ続いているとされ景気回復のポイントとなる金融不安解消の現実的な実施は国際的な日本の信用問題となっている現状であります。

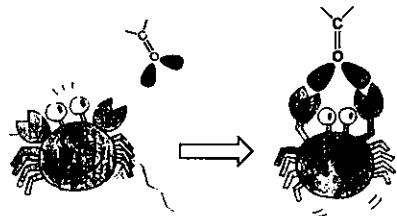
景気回復の兆しは当分期待できない厳しい経済情勢のなか、弊社では売上高500億円突破の継続と新たな収益分野を求めて全社一丸となって目標達成に努力いたしております。また、環境・安全への取組みが広く社会の関心を集めている状況下、昨年はISO 14001による環境マネジメントシステムの認証を全工場で取得し、ISO 9000とともに新たな経営資源として地球にやさしい企業経営を目指す基礎を確立することができました。今後は、これらのシステムの有効な運用により大きな成果が生まれるものと確信しております。

一層間近となった21世紀、これからは後世に地球を万全なものとして引継ぐ必要性から従来のような地球資源の消費は許容され難く、その結果、新しさより古いものの価値が見直されて開発より自然保護、廃棄・破壊より保存・再利用への指向が増大するとともに精神面での豊かさがより求められるようになるに違いありません。

年頭に際し、それらを踏まえゆとりと豊かさの実現に向けて明るい未来を切り拓くべく事業と業界の安定発展に邁進する決意を新たにしておりますので今後とも倍旧のご支援をお願い申し上げます。

皆様方におかれましてはこの1年が光輝に満ちた幸多い年でありますよう祈念いたします。

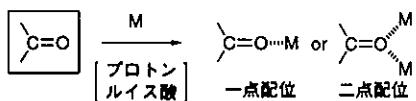
二点配位型ルイス酸のデザインと精密有機合成への応用



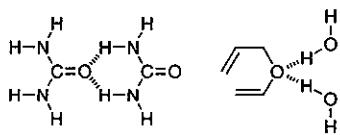
北海道大学大学院理学研究科 教授 丸岡 啓二

1. はじめに

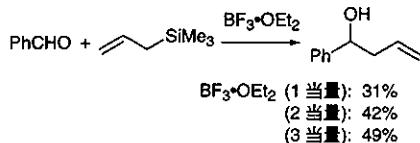
カルボニル基 ($C=O$) は有機化学において最もポピュラーな官能基のひとつである。蛋白質の構成要素であるアミノ酸あるいは脂肪酸など、生体に必須の官能基でもある。有機化学では、こういったカルボニル基の親電子的活性化にブレンステッド酸やルイス酸が使われる。その場合、カルボニル酸素にはふたつの孤立電子対があるが、ブレンステッド酸やルイス酸は、これらふたつの孤立電子対の一方あるいは両方に配位することによりカルボニル基を活性化しているのであろうか。



例えば、ブレンステッド酸の世界を眺めてみると、尿素の結晶中ではふたつのアミドプロトンが別の尿素カルボニル基へ二点配位していることが見い出されている。¹⁾また、アリルビニルエーテルのクライゼン転位を水中で行なうと、水2分子がアリルビニルエーテル基質のエーテル酸素を二点配位により活性化することが知られている。²⁾



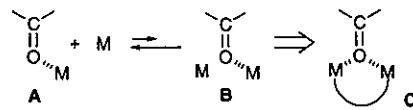
これに対してルイス酸がカルボニル基に二点配位するような例は、従来、ほとんど知られていない。こういった形は、実在しうるのであろうか。例えば、アリルシランを用いるベンズアルデヒドへのアリル化反応において、ルイス酸としての三フッ化ホウ素エーテル錯体を過剰に用いたからといって収率が大幅に向上するものではない。³⁾理論的にもルイス酸によるカルボニル基のふたつの孤立電子



対への配位において、ひとつ目のルイス酸は有効に配位するものの、これに更にふたつ目のルイス酸がもう一方の孤立電子対に配位して二点配位型を形成するにはエネルギー的にかなり不安定であるとされている。⁵⁾

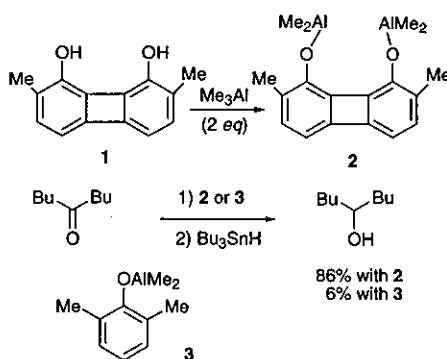
2. 二点配位型ルイス酸の創製

2.1 二点配位型アルミニウム系ルイス酸 通常見られる一点配位型 [A] に較べ、本来、あまり好ましくない二点配位型 [B] を可能にするには、配位様式 [C] に示したように、適当なテンプレートを使ってルイス酸中心となるふたつの金属間距離をうまく調節し、カルボニル基のふたつの孤立電子対に配位しやすいように設計する必要がある。そして酸素原子と高い親和性を有する金属としてのアルミニウムやチタン原子を選ぶことにより、カルボニル基への σ , σ -結合型を有する二点配位型ルイス酸の創製を目指した。⁶⁾

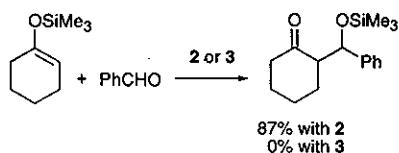


まず、適切な金属間距離を得るために必要なスペーサーとして、2,7-ジメチル-1,8-ビフェニレンジオール 1 を選んだ。⁷⁾ これにジクロロメタン中、2 当量のトリメチルアルミニウムを加え、(2,7-ジメチル-1,8-ビフェニレンジオキシ) ピス (ジメチルアルミニウム) 2 を合成した。これとカルボニル基質である 5-ノナノンとの複合体を形成後、還元剤としての水素化トリプチルスズを加えると還元体である 5-ノナノールが 86% の収率で得られた。一方、二

点配位型 **2** に相当する一点配位型ルイス酸として 2,6-キシレノールとトリメチルアルミニウムから調製したジメチルアルミニウム 2,6-キシレノキシド **3** を用いて同様の反応条件下で還元を行うと 5-ノナノールはわずか 6% 取れただにすぎなかった。一点配位型ルイス酸 **3** を 2 当量使っても 5-ノナノールの収率は 10% にしかならないため、この型のルイス酸は通常の条件下ではカルボニル基に二点配位しないことがわかる。

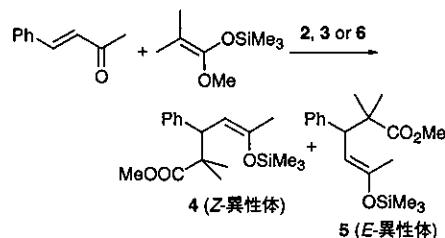


さらに、二点配位型ルイス酸 **2** を向山アルドール反応、すなわち、1-(トリメチルシリル)-1-シクロヘキセンとベンズアルデヒドとの反応に適用したところ、望ましいアルドール体が 87% の収率(エリトロ/トレオ比は 1:3)で得られたが、相当する一点配位型ルイス酸 **3** では全くアルドール体が生成しなかった。



続いて、二点配位型ルイス酸の選択性についても検討したところ、ルイス酸存在下におけるシリルケテニアセタールの α, β -不飽和ケトンへの位置および立体選択的マイケル付加反応において興味ある知見が得られた。⁵⁾ 例えば、シリルケテニアセタールとベンザルアセトンとの反応をジメチルアルミニウム 2,6-二置換型アリールオキシド **6** の存在下で行うと、マイケル付加体としての *Z*-体 **4** と *E*-体 **5** の混合物が得られるが、ここでアルミニウム反応剤 **6** の 2,6-位の置換基をかさ高くしていくと、マイケル付加生成物の *Z*-選択性は低下してゆく。実際、アルミニウム反応剤のフェノキシ置換基を 2,6-キシレノキシ基、2,6-ジイソプロピルフェノキシ基に変えてゆくと、*Z*-選択性は 80:20 から低下してゆき、2,6-ジ-*tert*-ブチ

ルフェノキシ基では、生成物の選択性は逆転してしまう。

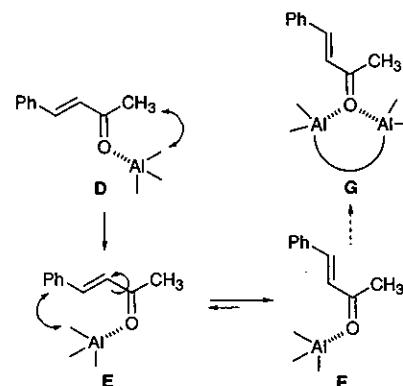


| ルイス酸 | 6a | 3 | 6b | 6c | 2 |
|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|
| <i>Z/E</i> 比 | 80:20 | 70:30 | 67:33 | 33:67 | 28:72 |

Z ← → *E*

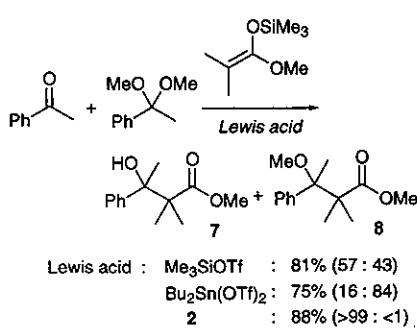
$\begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{Me}_2\text{Al}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3-\text{R} \\ | \\ \text{R} \end{array}$
6a (*R* = H)
6b (*R* = Pr)
6c (*R* = Bu)

ところが、二点配位型ルイス酸 **2** を用いてこの反応を行うと、最も高い *E*-選択性が得られた。立体的にそれほどかさ高くなない Me_2AlOPh **6a** では [D] のような配位形式を取りながら、**3**, **6b**, **6c** となるにつれて、かさ高くなったアルミニウムはカルボニル基のもう一方の孤立電子対に配位するようになり、[E] を経由して [F] の配位形式を取ると仮定すれば、*Z/E*-選択性の発現をうまく説明できる。二点配位型複合体 [G] は [F] の究極の形であり、最も高い *E*-選択性が得られる訳である。

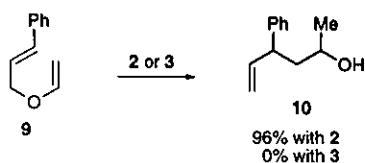


さらに、カルボニル化合物とそのアセタールが共存するような系に二点配位型ルイス酸 **2** を適用すると、カルボニル基を選択的に捕捉、高活性化するため高い官能基選択性が見られる。⁸⁾ 例えば、アセトフェノンとそのジメチルアセタールの等量混合物を **1** 当量の二点配位型ルイス酸 **2** と低温で処理し、ケテンシリルアセタールを加えると、アセトフェノンからのアルドール体である **7** のみ

が高収率で得られてくる。これに対して、従来、汎用されているトリメチルシリルトリフラーートでは選択性が著しく低下し、またアルデヒドの選択性の活性化に極めて有効なジブチルスズビストリフラーートを用いると逆にアセタールが優先的に反応してしまう。

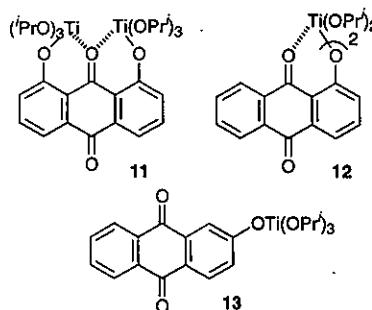


このような二点配位型ルイス酸によるカルボニル基の二重活性化の概念は、原則的にはエーテル系基質にも適用でき、そのひとつの応用例としてルイス酸触媒によるクライゼン転位反応が挙げられる。⁶⁾ 例えば、トランス-シンナミルビニルエーテル **9** を二点配位型ルイス酸 **2** と反応させると転位の後、メチル化した生成物 **10** が高収率で得られてくるが、相当する一点配位型ルイス酸 **3** ではなく転位が進行しないことが認められた。

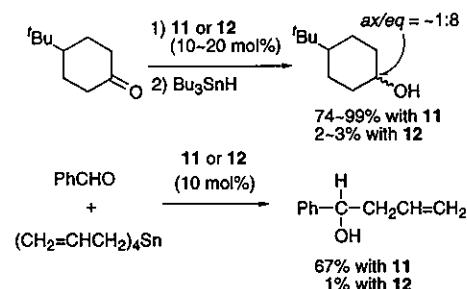


2.2 二点配位型チタン系ルイス酸 それでは、二点配位型ルイス酸は他の金属を用いても、同様に一点配位型ルイス酸に比べて反応性の向上が見られるだろうか。特に遷移金属の場合、典型金属であるアルミニウムでは難しい触媒サイクルが期待できる。そこで酸素原子と親和性の高い金属であり、かつ有機合成に汎用されているチタン金属を選び、二点配位型ルイス酸の調製に取りかかった。⁹⁾ 元来、チタンテトライソプロポキシド、 $\text{Ti}(\text{OPr})_4$ は非常に弱いルイス酸性しか示さないため、このルイス酸に二点配位型の概念を導入することにより、その反応性の向上を試みた。¹⁰⁾ 種々検討した結果、スペーサーとして 1,8-ジヒドロキシアントラキノンが適当であることがわかり、これに 2 当量のチタンテライソプロポキシドを加えることにより容易にビス(チタン)反応剤 **11** が調

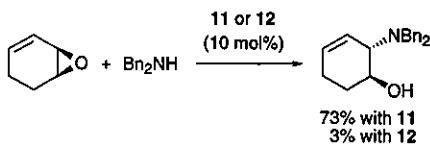
製できた。反応性の比較となる一点配位型ルイス酸 **12** は 1-ヒドロキシアントラキノンから調製したが、この場合、1-ヒドロキシアントラキノンをチタンに対し 1 当量加えても、2 当量配位した **12** のみが生成する。



まず二点配位型チタン反応剤 **11** を 10 モル % 用いて 4-*tert*-ブチルシクロヘキサンオノの水素化トリブチルスズによる還元を行ったところ、目的物であるアルコールが 74% の収率で得られた。このことからルイス酸 **11** は触媒能力を有することがわかった。触媒量を 20 モル % にすると還元はほぼ定量的に進行する。これに対し、一点配位型ルイス酸 **12** では、20 モル % 用いた場合でも生成物はわずか 3 % しか得られない。一点配位型 **12** ではチタンは 6 配位をとっており、そのルイス酸性が低下している恐れがある。そこで、**13** のようなチタン反応剤を調製してこの還元反応に適用したところ、やはり低収率 (4 ~ 6 %) しか得られなかった。他の例としてテトラアリルスズによるベンズアルデヒドのアリル化反応を行ったが、ここでも両者の間に顕著な反応性の差が現われた。

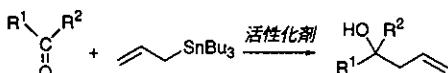


また興味深いことに、この二重活性化はカルボニル基に対してだけではなく基質としてエポキシドを用いた場合にも現われ、シクロヘキサジエンモノエポキシドのジベンジルアミンによる開環反応でも、二点配位型チタン触媒 **11** は **12** に比べ反応を強く促進することがわかった。



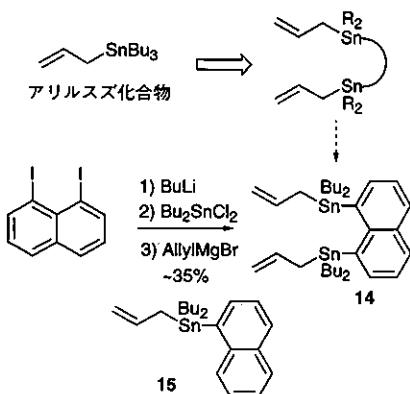
3. キレート型中性有機金属分子の活性化

上述のように、ふたつの金属間距離をうまく調節できれば二点配位によるカルボニル基の大幅な活性化が実現できる。この知見は、また逆の立場から見れば、本来、不活性なふたつの中性有機金属分子を望ましい金属間距離に設定することによって、カルボニル基とのキレート形成による中性有機金属分子の概念的に新しい活性化の可能性を示唆している。通常、親電子反応におけるカルボニル化合物の活性化剤として、ルイス酸がよく用いられる。例えば、アリルトリアルキルスズ等の有機金属化合物は、それ自体、アルデヒドやケトン等のカルボニル化合物と反応しないため中性有機金属化合物とみなせ、カルボニル化合物との反応にはルイス酸、ブレンステッド酸や高圧、光などの活性化剤を必要とする。¹¹⁾ このよう

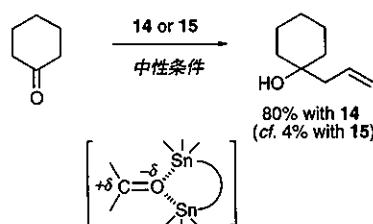


活性化剤：ルイス酸、ブレンステッド酸、高圧、光

な本来、不活性なアリルスズ化合物をふたつ、ナフタレン環で架橋することにより望ましい金属間距離を有するビス（アリル）スズ化合物¹⁴を調製すれば、カルボニル基の二点配位によって潜在的なルイス酸性を引き起こすことが期待できる。実際、このものは従来のアリルスズ化合物〔例えば、¹⁴に相当するモノ（アリル）スズ化合物¹⁵やアリルトリブチルスズ〕と異なり、各種のカルボニル化合物に対しカルボニル酸素の二つの孤立電子対への二

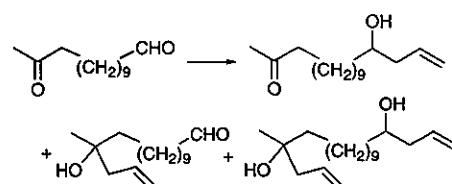


点配位が可能になるため、上述のようなルイス酸等の活性化剤を必要とせず、それ自体、高い反応性を示すことを見い出した。¹²⁾ 例えば、1,8-ジヨードナフタレンから調製したビス（アリル）スズ化合物¹⁴をトルエン中、シクロヘキサンと加熱すると1-アリルシクロヘキサノールが80%で得られるが、相当するモノ（アリル）スズ化合物¹⁵を同様の条件下で反応させたところ、アリル化体はわずか4%しか得られなかった。



このビス（アリル）スズ体¹⁴による加速効果は、その潜在的なルイス酸性がカルボニル基の配位によるキレート形成によって誘起させられたものと解釈できる。勿論、キレート形成によってアリルスズ基の求核性も同時に高められている点も見逃せないであろう。

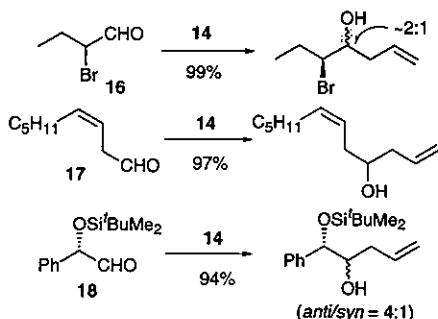
ビス（アリル）スズ化合物¹⁴は、また、際立って高い官能基選択性を持っている。例えば、ケトアルデヒドやステロイドのジケトンの官能基選択性的アリル化反応が容易に進行し、その選択性は立体選択性も含め従来のアリル化法に較べ、格段に優れていることが見い出された。



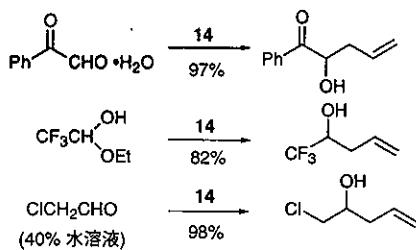
| | |
|---|-------------------------|
| $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{MgBr}$ | 7 : 40 : 53 (41%) |
| $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{SnBu}_3/\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ | 83 : 11 : 6 (47%) |
| $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Ti(OPr)}_4\text{MgBr}$ | 98 : 1 : 1 (65%) |
| $(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)_2\text{Sn/HCl}$ | 98.7 : 0.8 : 0.5 (87%) |
| 14, 中性条件下 | >99.9 : <0.1 <0.1 (99%) |

このように中性かつ穏和な条件下でビス（アリル）スズ体¹⁴が反応することは、有機合成的に極めて高い利用価値が生じる。¹²⁾ 例えば、 α -ブロモアルデヒド¹⁶や非共役な β, γ -不飽和アルデヒド¹⁷、キラルな α -シロキシアルデヒド¹⁸では、従来型のアリルトリアルキルスズを用いたルイス酸存在下での反応を行うと、それぞれエポキシドの形成、オレフィンの転位、ラセミ化といった副反応

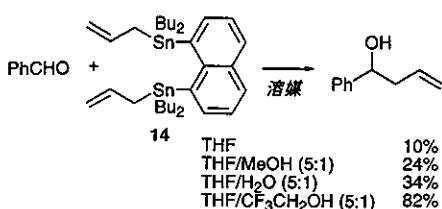
が進行してしまうのに対し、ビス体14ではアリル化体のみが高収率で得られる。



また、ビス体14は水存在下でも反応が円滑に進行するため、フェニルグリオキサールの水和物やトリフルオロアセトアルデヒドのヘミアセタール、クロロアセトアルデヒドの水溶液などはそのまま反応に用いることができ、いずれも高い収率で相当するアリル化生成物が得られた。



とくにプロトン性反応溶媒であるメタノールや水を添加すると中性条件下でのアリル化の反応性が上がり、なかでもトリフルオロエタノールが存在するとアリル化が格段に加速されることがわかった。



4. あとがき

生体内ではペプチド結合やエステル類の活性化には、ひとつのプロトンや金属によるカルボニル基の一重活性化がしばしば見られる。とすれば、従来稀だったカルボニル基やエーテル基等の二重活性化は、これまで我々が単に見逃していただけなのか、あるいは生体のより進化

した形なのであろうか。二点配位型ルイス酸のケミストリーを進めていくと生体分子や固体分子触媒を取り扱う際にも、今後、二重活性化の観点から改めて見直して見ることが必要な気がする。こういった分野も含めたこれから展開が楽しみである。

本稿では二点配位型ルイス酸のデザインとそれらの反応性、選択性に関する評価を幾つかの簡単な有機合成反応を使って例証したが、今後さらに不斉合成も視野に入れた精密有機合成への適用を計っていきたい。

参考文献

- 1) Swaminathan, S.; Craven, B. M.; McMullan, R. K. *Acta Cryst.*, **B40**, 300 (1984).
- 2) Severance, D. L.; Jorgensen, W. L. *Angew. J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10966.
- 3) (a) Harman, W. D.; Fairlie, D. P.; Taube, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 8223. (b) Huang, Y.-H.; Gladysz, J. *J. Chem. Educ.*, **1988**, *65*, 298. (c) Klein, D. P.; Dalton, D. M.; Mendez, N. Q.; Arif, A. M.; Gladysz, J. *J. Organomet. Chem.*, **1991**, *412*, C7.
- 4) 大井貴史、丸岡啓二、未発表。
- 5) Lepage, T. J.; Wiberg, K. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6642.
- 6) Ooi, T.; Takahashi, M.; Maruoka, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 11307.
- 7) (a) Hine, J.; Hahn, S.; Miles, D. E.; Ahn, K. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 5092. (b) Hine, J.; Ahn, K. *ibid.* **1987**, *52*, 2089.
- 8) T. Ooi, E. Tayama, M. Takahashi, and K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7403.
- 9) (a) Seebach, D.; Weidmann, B.; Widler, L. In "Modern Synthetic Methods", Scheffold, R. Ed.; Salle: Frankfurt, 1983; Vol. 3, 217; (b) Reetz, M. T. "Organotitanium Reagents in Organic Synthesis"; Springer Verlag: Berlin, 1986; (c) Narasaka, K. *Synthesis* **1991**, 1; (d) Mikami, K.; Shimizu, M. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1021. (e) Hoveyda, A. H.; Morken, J. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1263.
- 10) Asao, N.; Kii, S.; Hanawa, H.; Maruoka, K. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 3729.
- 11) (a) Yamamoto, Y. *Aldrichim. Acta* **1987**, *20*, 45. (b) Yamamoto, Y. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 243. (c) Hull, C.; Mortlocks, S. V.; Thomas, E. J. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1007. (d) Nishiguchi, Y.; Takuwa, A.; Naruta, Y.; Maruyama, K. *ibid.* **1993**, *49*, 7395.
- 12) Asao, N.; Liu, P.; Maruoka, K., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 2507.
- 13) Asao, N.; Abe, N.; Tan, Z.; Maruoka, K., *Synlett*, **1998**, 377.

マイティシルカラムによるラットインスリンの高効率精製と 高感度酵素免疫測定法の開発

株式会社 森永生科学研究所 本 庄 勉

1. 何故今さらインスリン測定なのか

近年、日本を含む先進国の中では糖尿病、高血圧、脳血管障害等の生活習慣病が著しく増えてきている。特に日本では糖尿病が国民病と言っても良いくらいに患者数が増え、その患者数が500万人とも600万人とも言われていて。

更に耐糖障害をもつ糖尿病予備群と呼ばれる人達を含めるとその数は1,000万人を越えるとも言われている。糖尿病はその初期には全く自覚症状が現れないため悪化しやすく、自覚症状が出始めたときには重篤な合併症（糖尿病性網膜症：失明の恐れ、糖尿病性腎炎：腎透析へ移行する恐れ、糖尿病性神経症：末梢組織切斷の恐れ）を併発することが多い。したがって、患者数が著しく多いことと合併症から来る重篤な障害のために医療費をはじめとする社会補償費の面から見ても現在から未来に向けて非常に大きな問題を抱えている、と言うことが出来る。

このため糖尿病の研究が最近になって盛んになってきており、発症のメカニズムを含めたかなりの研究成果が出つつある。更に研究成果の集大成としての糖尿病治療薬も次々と開発されつつある。

糖尿病は尿中にグルコースが排泄されることからその名がついているが、尿糖よりも血糖値が糖尿病を判断・治療する上で最も重要な因子である。血糖値さえしっかりとコントロールすることが出来れば大半の合併症を防ぐことが出来ると考えられているからである。血糖はインスリン、グルカゴン、エピネフリン等のホルモンによってコントロールされている。特に血中に吸収されたグルコースを速やかに細胞内に取り込ませる役割をするインスリンは最も重要な働きをしている。

糖尿病は臓器にあるインスリン分泌細胞である β 細胞が重大な損傷を受けてインスリン分泌が無くなってしまうことにより糖尿病となるインスリン依存型糖尿病と、インスリン分泌はあるてもそれに対する反応性が低下して糖尿病を発症してしまうインスリン非依存型糖尿病の二つに大別されている。最近の知見によってインスリン

非依存型糖尿病でもインスリン抵抗性と呼ばれるインスリン過剰分泌の時期（この時期はインスリンに対する反応性が低下している）を経てインスリン分泌が低下することが明かとなり、インスリン非依存型糖尿病でもインスリンの糖尿病発症に果たす役割が非常に大きいことが示されている。

従って、抗糖尿病薬の開発のみならず糖尿病の研究にはインスリン動態を把握することが必須となっている。

インスリンは臨床的にはラジオイムノアッセイ^{1,2)} (Radioimmunoassay=RIAと略される。Barson, Yallowによって世界で最初にインスリンを測定対象として系が確立された、放射性同位元素を用いた微量免疫測定法である)で測定されてきたが、最近は特別な使用施設（ラジオイムノアッセイは放射性同位元素使用施設で使用する必要がある）を必要としない酵素免疫測定法^{3,4)} (Enzyme Immunoassay=EIA又はEnzyme Linked Immunosorbent assay=ELISAと略される。Engvall, Perlmann及びvan Weenmen, B. K. and Schuurs, A. H. W. M.らによって開発された)で測定されることが増えている。

実験動物のインスリンに関しては殆どの場合ヒトインスリン測定系を流用して測定系が組まれていた。しかし、これまでの測定系では測定に供する試料（殆どの場合血清又は血漿）が最低でも50 μ lから100 μ l（二重測定ではこの倍の100 μ lから200 μ l）程度必要とされるため、用いられる実験系に制約があった。例えば、ラットを用いる実験で同一個体から経時的に採血して測定しようとしても動物に影響を与えない範囲で採血できる量には限界がある。ましてやラットの1/10以下の大きさのマウスを実験に用いる場合は更に大きい制約があることは明らかである。この制約を回避するため、結果的に一群のデータを取得するために数多くの実験動物を使用しなければならなかった。

このような実験系は人的にも金銭的にも負担が大きいだけではなく、動物愛護の立場からも大きな問題と考えられる。

測定に用いる試料が少なくて済むならば一匹の動物から経時的に試料を採取することが可能となり、用いる実験動物の数も必然的に少なくて済むことになる。

更に、一匹の個体から試料を採取することが出来れば同一個体を用いて得たデータについては個体差について考慮する必要が無くなり、この面からも使用する動物数を更に減らすことが出来るようになる。

筆者らは従来用いられてきた測定法の感度を維持したまま、測定に用いる試料の容量を極力少なくすることを目的に実験動物用高感度インスリン測定法の開発を進め、 $5\mu\text{l}$ の検体量で従来法と同程度の感度を有する測定法を完成させた。

今回はこのインスリン法の開発経緯を、特に苦労した実験用小動物由来インスリンの精製法と抗体の作製を中心として述べ、加えて筆者らの開発した実験動物用インスリン測定系について紹介したい。

本稿では最初に抗体を作製するための免疫原や標準物質として用いるための実験用小動物由来インスリンの精製と抗体の作製について、次にこれらを応用した測定法の説明とその応用について述べたい。

2. 実験用小動物由来インスリンの精製

動物実験を考える場合、先ず対象として考えるのはマウス、ラットであろう。

糖尿病を研究する場合でもその例に漏れず、殆どの動物実験がマウス、ラットを用いて行われている。

筆者らがインスリン測定法の開発に取り組み始めたときは世界中でただ一社だけであったが、まだ Novo がラットインスリンを供給していた。

しかし、医療用のインスリンが豚やウシの臍臓から抽出・精製したインスリンから遺伝子組み替えヒトインスリンに置き換わると共にラットインスリンも供給されなくなってしまった。世界の市場からラットインスリンが消えてしまったのである。仕方なく我々はその精製から始めなければならなくなってしまった。

実験用小動物から取り出した少量の臍臓を原料として従来からの精製法^{5~9)}にならって何度か精製を試みたが、収量、純度ともに満足な結果が得られず、結果的に全く新しい精製法を開発することとなった。

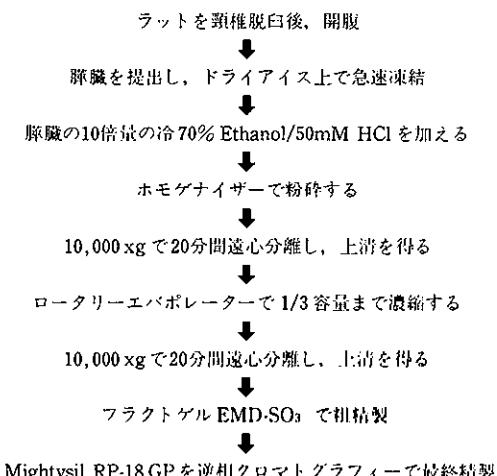
特にインスリンの分解を最小限に止め、収率を上げるために従来の方法に捕らわれず短時間で効率的な精製工程を組み上げることに開発の主眼をおき、これを完成させた。精製工程を組み立てる段階で Merck 社製フラクトゲル EMD-SO₃⁻と関東化学株式会社製 Mightysil RP-18 GP に巡り会ったことが成功の最大のポイントであつ

たと思う。

ラットインスリン精製工程の概略を図1.に示した。基本的には他の動物由来のインスリンも同様に精製することが可能である。

図1.に示した精製工程を下に詳述する。

図1. ラットインスリン精製工程概略



2-1. ラット臍臓の摘出

ラットを頸椎脱臼し、開腹して臍臓を摘出する。この時のラットは事前に絶食しておくことが好ましい。摘出した臍臓は直ちにドライアイスの上に乗せて急速凍結し、使用まで-40°C以下で凍結保存する。

ラット、マウスをはじめとする小動物の臍臓ははっきりとした形をもつものではなく、腸間膜に広がった臍器であるので、効率よく摘出するには経験と技術を要する。また、周りにある脂肪組織（臍臓よりも白っぽく、透明感がある）を間違って取らないようにしなければならない。これはインスリン分解酵素の混入を極力避けるためである。

2-2. 臍臓抽出液の調製

凍結保存した臍臓10 gに氷冷した50mM 塩酸を含む70%エタノール/水を100 ml 加え、ホモゲナイザーで破碎する。破碎した組織からタンパク分解酵素が同時に抽出され、インスリンを分解してしまうので、絶対に中性付近の緩衝液を用いてはならない。

ホモゲネートを4°Cで10,000×g、20分間遠心分離して上清を分離した後、ロータリーエバポレーターで約1/3容量になるまで濃縮し（濃縮しすぎると大量の沈殿が生成し、インスリンも一緒に沈殿して回収率が著しく悪くな

ることがあるので濃縮のしすぎに注意すること), 濃縮液を4°Cで10,000×g、20分間遠心分離して上清を得る。

2-3. フラクトゲル EMD-SO₃⁻によるクロマトグラフィー

この濃縮上清をMerck社製フラクトゲルEMD-SO₃⁻に通してインスリンを含む画分を吸着させる。カラムを水で洗浄して残存するエタノールを除いた後、50mMアンモニア水でインスリンを含む画分を溶出し、直ちにトリフルオロ酢酸でpHを1から2に調整する。

2-4. 逆相クロマトグラフィー

pHを1から2に調整した、インスリンを含むフラクトゲルEMD-SO₃⁻溶出液を0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したMightysil RP-18 GP(関東化学製、4.6×150mm、粒径5μm)に流速1ml/minで通し、インスリンを吸着させる。カラムを0.1%トリフルオロ酢酸で洗浄した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル/水を最終溶離液として濃度勾配溶出する。インスリンはアセトニトリル濃度約30%前後に溶出されてくるが、ラットのインスリンはインスリン1とインスリン2の二種類(マウスのインスリンもラットと同様2種類あり、一次構造はラットのものと一致する)があり(図2)、アセトニトリルの濃度勾配を1カラム容量あたり5%で溶出した場合にはこれらが分離はするが近接して溶出されてくる(図3)ため、この二種類のインスリンを別々のフラクションに分取するためにはこの辺りの濃度勾配をもっと緩やかにする必要がある。

図2.

ラットインスリン1 一次構造

| | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|----|---|---|----|----|----|----|----|
| A鎖 | G | I | V | D | Q | C | T |
| B鎖 | F | V | K | Q | H | L | C |

CGCTSI CSLYQLEN YCN
GPHLVE ALYLV CGER GFFYTPKS

ラットインスリン2 一次構造

| | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|----|---|---|----|----|----|----|----|
| A鎖 | G | I | V | D | Q | C | T |
| B鎖 | F | V | K | Q | H | L | C |

CGCTSI CSLYQLEN YCN
GSHLVE ALYLV CGER GFFYTPMS

筆者らの研究室では4.6mm×150mm(粒径5μm)のカラムを用い、1ml/minの流速クロマトグラフィーを行う場合、アセトニトリルの濃度勾配が10分間で1.5%程度となるようしている。これより急峻な濃度勾配だとインスリン1とインスリン2が近接して溶出され、インスリン1とインスリン2を別々のフラクションに分けて取ることが難しくなる。

これよりも緩やかな濃度勾配にしてもそれぞれのピークは離れるがピークの幅が広がってしまい、あまり意味

がないのでこのくらいの濃度勾配が適当のようである。

図3.

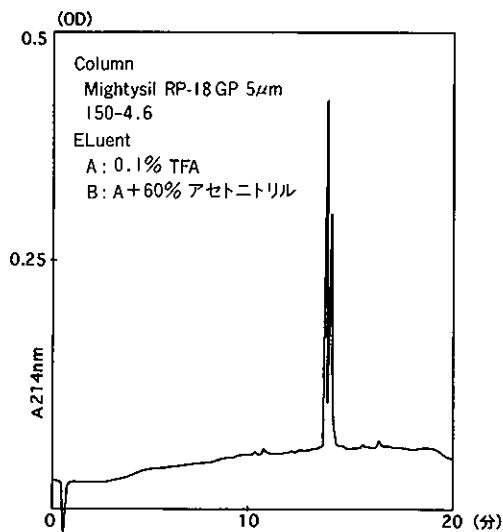


図4.

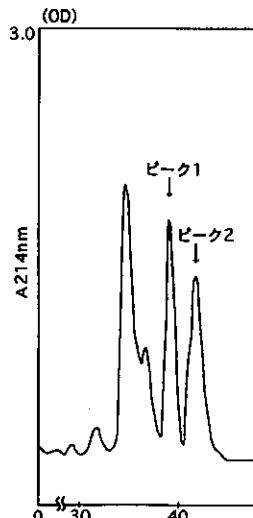


図4.に粗精製したラットインスリンをMightysilで分離したパターンを示したが、酵素免疫測定法で各フラクションに含まれるインスリンを定量すると図に示したようにインスリンはピーク1とピーク2の大きく二つに分かれて溶出されてくる(このほかにもプロインスリンや修飾されたインスリンの小さなピークが認められること

もあるが、量的には殆ど問題にならない位しか存在しない)。

得られた二つのピークをそれぞれ分取してプロテインシーケンスを行ったデータを図5に示す。

図5. Mightysil ピーク1とピーク2のアミノ酸配列分析結果

| | | | |
|------|---------------------|---|----|
| ピーク1 | 1 | 5 | 10 |
| | F V K Q H L C G P H | | |
| ピーク2 | 1 | 5 | 10 |
| | F V K Q H L C G S H | | |

| | |
|------|---------------------|
| ピーク1 | G I V D Q C C T S I |
| | |
| ピーク2 | G I V D Q C C T S I |
| | |

シーケンステータから最初に溶出されてくる方がインスリン1、後に溶出されてくる方がインスリン2であることが判る(図2の一次構造を参照のこと)。

ラット及びマウスのインスリン測定系を組み立てる際にインスリン1とインスリン2に対する反応性を常に一定に保つ必要がある。そのためには測定系に使用する標準インスリンはインスリン1と2の比率が常に一定でなければならない。

ラット臍臓中ではインスリン1と2が2:1の比で存在することが明かにされており、測定系に用いる標準インスリンも同じ比であることが好ましい。

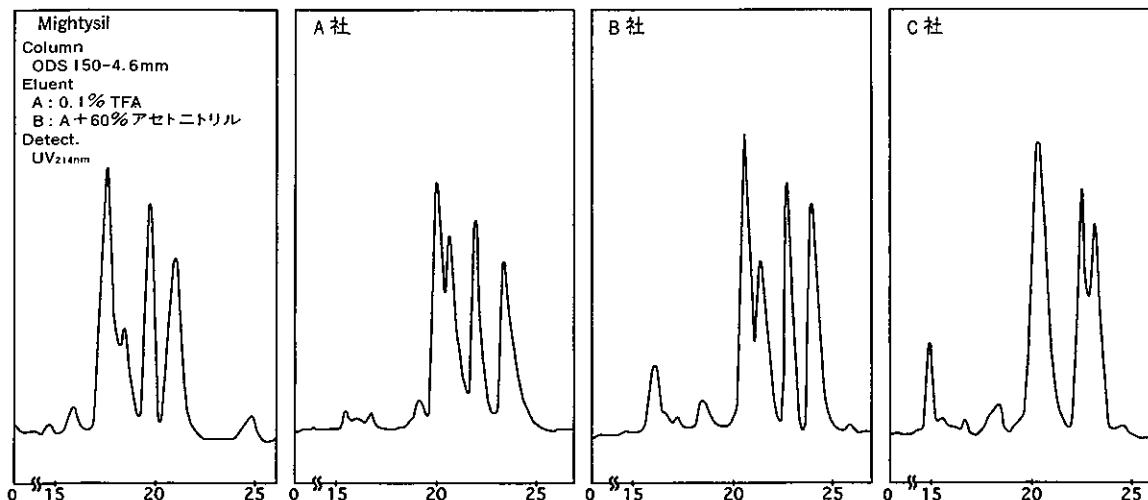
また、インスリン1と2は筆者らの経験では精製中の安定性が異なり、インスリン1の方がインスリン2よりも不安定である。言い換えると時間をかけて精製すると量の少ないインスリン2よりもインスリン1の方が先に減っていく現象が認められる。短時間に精製を終えるとインスリン1とインスリン2の比はほぼ2:1となるが、厳密には精製毎に比が異なる。従って、キットに用いる標準品に含まれるインスリン1とインスリン2が常に一定の比となるように作製するには両者をきっちりと分け取り、標準品作製時に両者の比を2:1として混合する必要がある。

従って、この逆相クロマトグラフィーは単にインスリンを高純度に精製する工程と言うだけでなく、インスリン1とインスリン2を分ける、非常に重要な工程となる。

最近のODSカラムはどのメーカーのものでも殆ど同じ分離を示すことが多いのだが、インスリン1とインスリン2はアミノ酸配列が2箇所しか違わず極めて類似した挙動を取ることが考えられ、カラムの分離能の些少の違いでも分離パターンに違いが生ずる可能性がある。そこでラット臍臓抽出液を出発原料としてフラクトゲルEMD-SO₃⁻を用いて粗精製したインスリンを試料とし、Mightysilを含む数種類のカラムを用いて、それぞれのカラムのクロマトグラムや酵素免疫測定法で測定したインスリンの溶出パターンなどを比較検討して最も良いカラムを総合的に判断し、使用することにした。

それぞれのカラムのクロマトグラムを図6に示す。

図6.



224 μg の粗精製インスリンをそれぞれ4.6mm×150mm(粒径5 μm)のODSカラムで精製したところ、クロマトグラムからも判るように、Mightysilだけが保持時間がわずかに短いだけで、他の3種類については殆ど同じ保持時間を示した。インスリン1とインスリン2の分離についてみると、C社製ODSを除き、殆ど同じような分離パターンを示した。この保持時間の違いは恐らくはカーボンコンテンツの違いによるものと思われる。

しかし、クロマトグラムを良く見てみると溶出画分中のインスリン1とインスリン2の比率に違いが認められた。

酵素免疫測定法で負荷試料中と溶出液中のインスリンを測定したところ、表1に示したように Mightysil が最も良い回収率を示し、カラムに負荷したインスリンの90%以上が回収された。他の3種類についてはいずれも回収率が90%未満であり、最も回収率の悪かったB社では80%を下回っていた。

表1：各種ODSカラムによるラットインスリンの精製

| ODSカラム | 原液中インスリン量(μg) | 回収されたインスリン1(μg) | 回収されたインスリン2(μg) | 総インスリン回収率(%) |
|-----------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
| Mightysil | 224 | 117 (52.2%) | 89.2 (39.8%) | 92.1 |
| A社 | 224 | 97.1 (43.3%) | 77.5 (34.6%) | 87.3 |
| B社 | 224 | 94.0 (42.0%) | 81.6 (36.4%) | 78.4 |
| C社 | 224 | 84.7 (37.8%) | 80.1 (35.8%) | 82.4 |

更に、インスリン1とインスリン2の回収率を別々に計算し、その比を比べてみると Mightysil では1.31であるのに対し、他の3種類のものに関してはそれぞれA社:1.25, B社:1.15, C社:1.06、であり、インスリン1の回収率がインスリン2に比べて悪いことが示され(この時に用いた粗精製ラットインスリンは精製後-110°Cで長期間保存しておいたものを用いたのでインスリン1とインスリン2の比が2ではなく、より小さくなっている)、特にインスリン1の回収率がそれぞれのカラムによって大きく異なることが示唆された。

インスリン1とインスリン2の回収率に差があると考えられたことから、これを確認するために、精製したラットインスリン1とインスリン2を2:1の比で混ぜたものの10 μg を分析試料として各社のODSカラムに負荷し、同じグレジエントプロファイルで展開して比較を試みた。各社のカラムによるクロマトグラムを図7に示す。

各フラクションに含まれるインスリン含量を酵素免疫測定法で定量し、インスリン1とインスリン2の比を算出した値を表2に示した。

図7.

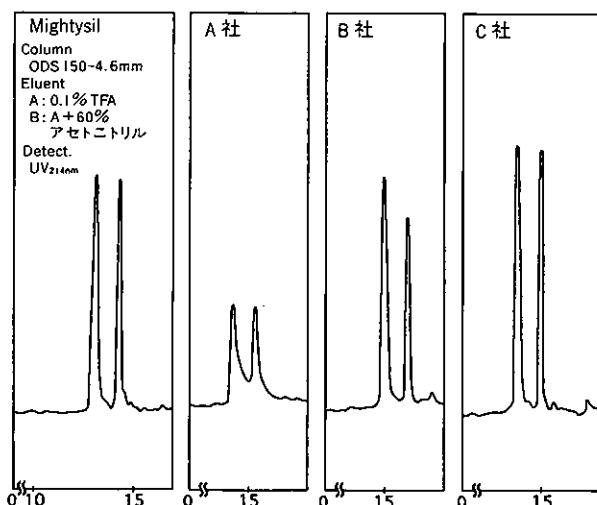


表2：各種ODSカラムによるラットインスリンの分離

| ODSカラム | 負荷試料中のインスリン1/インスリン2比 | 溶出画分中のインスリン1/インスリン2比 |
|-----------|----------------------|----------------------|
| Mightysil | 2.0 | 1.97 |
| A社 | 2.0 | 1.89 |
| B社 | 2.0 | 1.62 |
| C社 | 2.0 | 1.47 |

Mightysil は溶出画分に含まれるインスリン1とインスリン2の比率がカラムに負荷した試料と殆ど同じ値(2)を示したのに対し、他の3種類のカラムはこれよりも値が小さく、最も悪いものでは比率が1.47と極めて不満足な値を示した。

インスリン1の回収率が悪い順番は先に示した分取クロマトグラフィーを行った場合と同じであった。

カラムによる回収率の違いがどの様な理由によるのかは明かではないが、構造が殆ど同じであるインスリン1とインスリン2の回収率に差が認められることから、単に非特異的吸着以外に何らかの相互作用があるものと考えられる。このことから、ラットインスリンの精製には Mightysil が最も適していると思われた。

分取クロマトグラフィーを行う場合にはカラムの結合容量が非常に重要な因子となる。

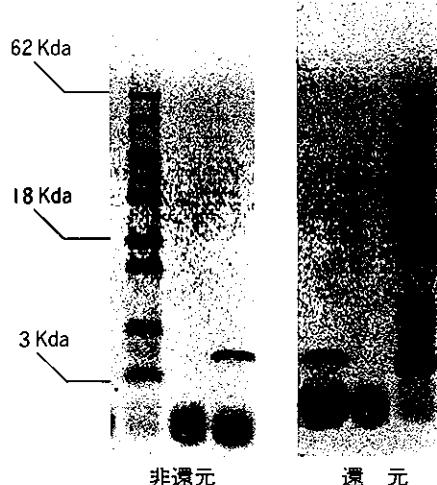
結合容量が少なければ負荷できる量が制限され、同じ量を処理するのにかかる手間がそれだけ増える(単純に言えばクロマトグラフィーの回数を増やさなければ処理

できない、ということであり、結果的に人件費増大、経費増大につながる)ことになる。そこで4種類のカラムの中で最も成績が良かった Mightysil を用いて一回のクロマトグラフィーでどれくらいのインスリンを精製できるかを検討した。

4.6×150mm(粒径5μm)のMightysilに2mgの粗精製ラットインスリン(280nmの吸収で130、核酸も含まれていると考えられるので樹脂に結合すると考えられるものが数十mg含まれていると思われる)を負荷してもインスリンはカラムに保持され、インスリン1とインスリン2の分離も、ピークの幅が少し広がっただけで良好な分離パターンが得られた。

インスリン1とインスリン2を含むフラクションを混合し、NuPAGE™ Bis-Tris ゲル電気泳動で分析したところ、単一バンドを示し(図8.)高純度のインスリンが得られていることが確認された。

図8. 精製ラットインスリン NuPAGE™ Bis-Tris ゲル電気泳動



一回のクロマトグラフィーで1mgを越えるインスリン1とインスリン2が良好に分離され、電気泳動で単一バンドを示す標品(図8.)が得られる、ということはセミ分取のために直径が10mm以上のカラムを調達する必要が無くなり、カラムの調達費用のみならず、昨今のように廃液の処理にかかる費用もかなりのものであることを考えあわせるとランニングコストの面でも大幅にコストダウン出来ることになる。この面からも Mightysil は筆者らにとって実験用小動物由来のインスリンの精製はもとより他のタンパク質やペプチドを精製する際に欠くことの

出来ない強力な道具となっている。

3. 抗インスリン抗体の作製と測定系の開発

精製したインスリンをキーホールリンベットのヘモシアニンに結合させ(重量比は1:1、結合にはdimethyl adipimidateやdimethyl suberimidateなどの二架橋性試薬を用いている)、フロイントの完全アジュバントでエマルジョンを作り、動物を免疫する¹⁰⁾。

インスリンそのものを免疫する方法もあるが、一過性に低血糖ショックを起こすことがある、そのための手当がわざわざしいことと動物の歩留まりをふせぐため、筆者らは行っていない。

一匹当たりの投与量はモルモットであれば一回当たりインスリンとして50から100μg、マウスであればこの1/2から1/5くらいを皮下に投与している。

投与箇所は出来るだけ多い方が良く、モルモットでは少なくとも10ヵ所、マウスでは4ヵ所以上に分けて投与した方が結果は期待できる。

二週間おきに3回から5回程度免疫すればインスリンに対する抗体の力値が上昇してくる。モノクローナル抗体は抗体の力値が上昇してくる適当な時期に常法¹¹⁾で融合細胞を作製し、スクリーニング及びクローニングを行う。

ポリクローナル抗体は認識するエピトープが動物の個体によってかなり異なるので、一匹づつ抗血清の検討を行う必要がある。

こうして得られたマウス抗ラットインスリンモノクローナル抗体を固相化抗体とし、モルモット抗ラットインスリン抗血清を検出用二次抗体として組み合わせ、更に增幅システムとしてペルオキシダーゼ標識抗モルモットIgG抗体を用いることで、血清や血漿を用いる場合には5μlの試料で1pg以下のインスリンを測定することが出来る測定系が出来上がった。

4. 実験用小動物インスリン測定法

筆者らが開発したインスリン測定法の構成内容は表3に示されている通りである。

本測定系は増幅系を含むサンドイッチ酵素免疫測定法であるが、その測定原理を図9.に示した。

次にこの測定法の手順を図10.に示す。

本測定法は実験用小動物、特にラットやマウスを主な測定対象として開発された測定系であり、その特徴は5μlの検体量での高感度測定が可能であることがある。

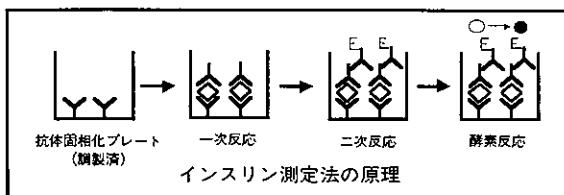
5μlの検体量を用いた場合の標準曲線の例を図11.に示すが、標準インスリンの濃度は156pg/ml(インスリンの絶対量として0.78pg)から10,000pg/ml(インスリン

の絶対量として50 pg)である。

表3. インスリン測定キット構成内容

| 品名 | |
|-------------------------|--------|
| A 抗体固相化凍結乾燥プレート | 48ウェル |
| B 凍結乾燥インスリン標準品(ラット) | 200 μl |
| C 検体希釈液1 | 50ml |
| D 検体希釈液2 | 30ml |
| E 凍結乾燥モルモット抗インスリン抗血清 | 3ml |
| F 凍結乾燥酵素標識抗モルモット IgG 抗体 | 6ml |
| G OPD(オルトフェニレンジアミン)錠 | 10ml |
| H 基質溶解液(リン酸・クエン酸緩衝液) | 30ml |
| I 反応停止液(1N 硫酸) | 6ml |
| J PBS粉末 | 500ml |
| K 20% Tween 20 | 500ml |

図9. インスリン測定法の原理



一次反応：検体中のインスリンがプレート上の固相化抗インスリンモノクローナル抗体とモルモット抗インスリン抗体に結合し、固相化抗インスリンモノクローナル抗体—インスリニーモルモット抗インスリン抗体の複合物を形成する。

二次反応：酵素標識抗モルモット IgG 抗体がモルモット抗インスリン抗体に結合する。

酵素反応：OPD(オルトフェニレンジアミン)基質を加えると、プレート上の複合物に結合した酵素により呈色する。

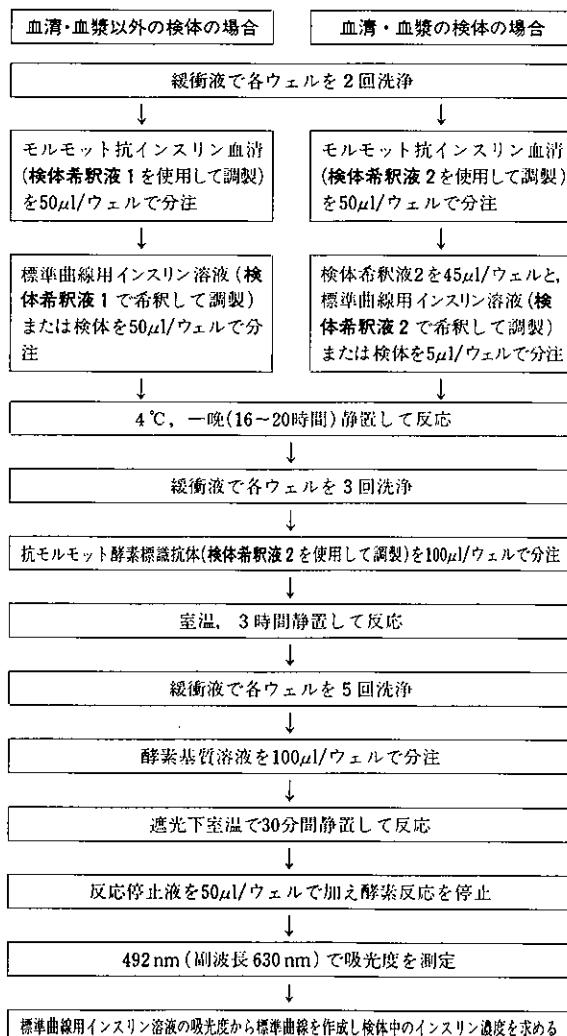
得られた吸光度に対応するインスリン濃度を標準曲線から算出する。

本測定法の基本性能は日内変動($CV=3.5\%$)、日差変動($CV=6.7\%$)と良好な値となっている。

近年は研究分野でも合理化が叫ばれ、インスリンのような測定もその日の内に結果を出したい、というユーザーからの声も多い。他の手法の中には反応を 4°C ではなく、室温あるいは 37°C で行うことにより測定時間を短くしているものもある。ここに紹介しているインスリン測定法も測定時間の短縮は可能であるが、低温で一次反応を行う系で得られるデータと全く同じデータが得られる保証は無い。これは以下に示す理由による。

インスリン測定を行う実験は次に述べる二通りに分けて考えることが出来る。

図10. 操作手順の概略



血清や血漿などの生体試料そのものを測定対象とする場合と、血清や血漿などの生体試料以外を測定対象とする場合(生体から取り出した β 細胞や臍島を血清を含まない単純な緩衝液系で処理してその上清を対象とする場合など)である。

血清を含まない単純な緩衝液系を測定対象とする場合には測定系に抗原抗体反応やインスリンの安定性に影響を与える物質が無いか、あっても無視できる量となる場合が殆どであるので問題は殆ど起こらない。

それに対して血清や血漿などの生体試料そのものを測定対象とする場合、試料中に含まれる抗原抗体反応やインスリンの安定性に影響を与える物質の測定系内への混

入が考えられることからこれに対する配慮が必要になる。

ヒトの場合、血清や血漿中のインスリンは安定であるとされているが、筆者らの経験によればラットやマウスの場合、血清・血漿中のインスリンは4°Cでは安定であるが常温以上では不安定であることが明かとなっている(表4.)。

データを細かく検討すると、25°Cで静置した場合にインスリンが不安定であることは実験に供した試料全てに共通しているが、全ての試料が同じ速度で抗原活性を失って行くわけではないことが判る。25°Cで反応を行って得た測定値と低温で反応を行って得た値を同じように比較することは危険を伴っているのである。

言い換えると反応温度を上げるなどの工夫をして、見かけ上反応時間が早くなっても血清や血漿などの生体試料中での測定対象物の安定性が確保されなければ得られた値が意味のないものになってしまう恐れがある、ということである。

表4. 血清中インスリンの安定性

| sample name | storage condition | | | | fresh |
|-------------|-------------------|------------|------------|----------|------------|
| | 25°C, 4 hr | 25°C, 2 hr | 25°C, 1 hr | 4°C, O/N | |
| 49 | 2.681 | 71% | 3.221 | 86% | 3.630 96% |
| 51 | 3.082 | 86% | 3.331 | 93% | 3.671 103% |
| 55 | 2.557 | 75% | 3.025 | 88% | 3.320 97% |
| 66 | 2.892 | 88% | 3.119 | 95% | 3.283 100% |
| Donryu | 1.274 | 85% | 1.348 | 90% | 1.436 96% |
| Wistar | 2.466 | 90% | 2.586 | 94% | 2.724 99% |
| Wistar/ST | 0.866 | 78% | 0.897 | 81% | 0.980 89% |
| SD | 1.816 | 87% | 1.866 | 90% | 1.984 96% |

(単位:ng/ml)

図12. 経口糖負荷(2 g/kg)マウスの血中グルコース、インスリン濃度の経時変化

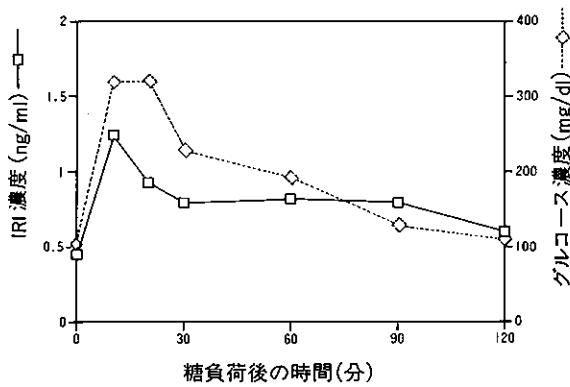
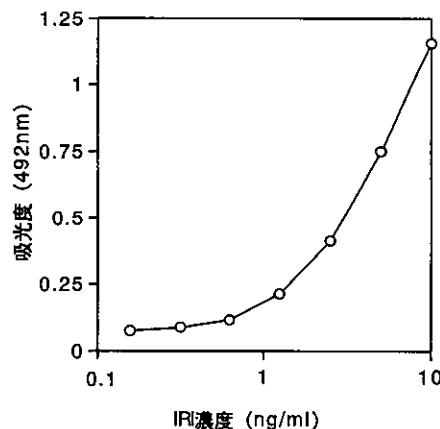


図11.

標準曲線の例



従って、実験動物由来の血清や血漿を想定対象としてインスリンを測定する場合にはより正しい値を得ようとするならば時間がかかるても低温でのインキュベーションを選択することが望ましいと考えられる。

最後にこの測定系を用いてマウスを用いた実験を紹介したい。

図12に示すのはマウスにグルコースを経口で負荷し、時間を追って眼窩静脈叢から採血したものを試料として血糖値と血中インスリン(Immuno-Reactive Insulin=IRI)を測定したものである。一匹のマウスから7回(一回当たり50-100 μl程度)採血して測定することが出来た。

5. あとがき

最近ヒトを対象にした臨床診断から動物実験にも普及してきた高感度酵素免疫測定系の開発と測定系の概略について述べた。

高感度酵素免疫測定系の開発という生化学、免疫化学の応用に取り組んだことにより、いかに基礎技術が大切かを思い知らされた気がする。これらの基礎技術に関して感じたこといくつかについて最後にまとめてみた。

5-1. 良い抗体の作製について

高感度の免疫測定系を組み立てるポイントはなんと言っても良い抗体を得ることに尽きるが、良い抗体を得るために最重要ポイントは純度の高い抗原を得るところにある、と言っても過言ではないだろう。

特にインスリンのように免疫原性の低いものを免疫する場合、わずかな夾雑物があってもそれに対する抗体が優先的に作られてしまう場合が多い。

現在は遺伝子全盛時代であり研究者も多い。しかし逆にタンパク質をとともに扱える研究者は減りつつあり、ましてや優れたタンパク質の精製技術をもつ研究者は殆どなくなってしまった感がある。

5-2. クロマトグラフィーについて

免疫原をはじめ、タンパク質やペプチドを精製するにはクロマトグラフィーが必須である。筆者が学生時代から社会人になった20年くらい前には高速液体クロマトグラフィーを応用してタンパク質を精製する、などということはごく一部の先端を走っている研究者を除いて夢のまた夢であった。現在は数万円で買えるカラムより分離能の悪いカラムが極めて高価であったので、学生には扱わせない研究室もあったそうである。

今回の開発には使用しなかったが、現在は超高速での分離が可能（イオン交換クロマトグラフィーを含む各種の濃度勾配溶出が数分～10分程度で終了する）な樹脂も含め多種多様な分離担体が手ごろな価格で入手可能な状態にあるが、扱ってみるとそれぞれの性質も多種多様であることが実感できる。

それ故、分析に用いる担体も実体を反映した結果が得られるものを選択しないと、一見したところまともな結果のように見えるものがartifactを取り込んだデータを見てしまった、という結果にもなりかねないことを肝に銘すべきであろう。本格的な実験にはいる前に数種類の分離担体を比べて使用目的にあったものを選ぶ必要がある。要はクロマトグラフィーの基本（本当はこれが一番難しいのだが）をしっかりと踏まえた上で実験をする必要がある、ということに尽きる。

5-3. タンパク質研究について

新しい遺伝子を単離し、その配列を明らかにすればそれだけでレポートは書けるが、それまでに精製できなかったタンパク質を精製し、たとえその配列を決めたとしてもそれだけではレポートにはならない現状が一番肝心

と思えるタンパク質の精製技術（ハードウェアだけではない）を維持・向上させなくなってしまったのではないかだろうか。勿論遺伝子研究の重要性については筆者も理解しているし、否定するつもりなど全く無い。現状では難しい仕事、時間のかかる仕事は後回し、と言うことなのである。

話はそれてしまうが、筆者らの開発したインスリン測定法はマウスを用いた経時採血の実験まで可能にした。

しかし、これでインスリンの挙動の全てが明らかとなる（あるいはなった）わけではない。血中に存在するインスリンがどの様な割合でどの様な存在形態をとっているのか、と言う極めて基本的なことすらも明らかにされていないのが現状である。

遺伝子研究が今日のように盛んになった背景には画期的なアイデアとそれを応用した技術の発展がある。タンパク質研究の発展にもハードウェアの発展だけではなく、それを使いこなすソフトウェアの発展が必須である。

勿論、それらを扱う研究者の質の向上を欠いてはタンパク質研究の発展は見込めない。

今後はタンパク質研究を支える基礎技術が発展し、研究の裾野が広がると共に、タンパク質を扱う研究者がもっともっと増えて研究が益々盛んになることを願って止まない。

引用文献

- 1) S. A. Berson and R. S. Yallow : *J. Clin. Invest.*, **38**, 1996(1959).
- 2) S. A. Berson and R. S. Yallow : *J. Clin. Invest.*, **38**, 2017(1959).
- 3) Engvall, E. and Perlmann, P. : *Immunochemistry*, **8**, 871(1971).
- 4) van Wegenen, B. K. and Schuurs, A. H. W. M. : *FEBS Lett.*, **15**, 232(1971).
- 5) M. Somogyi, E. A. Doisy, P. A. Schaeffer, *J. Biol. Chem.*, **60**, 31(1924).
- 6) J. J. Abel, Proc. Natl. Acad. Sci., **12**, 132(1926).
- 7) C. R. Harrington, D. A. Scott, *Biochem. J.*, **23**, 384(1929).
- 8) D. A. Scott, A. M. Fischer, *Biochem. J.*, **29**, 1048(1935).
- 9) M. Sahyum, *J. Biol. Chem.*, **138**, 487(1941).
- 10) 大海 忍等：細胞工学別冊 ペプチド抗体実験プロトコール, p 48(1994).
- 11) Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, **256**(1975).

高純度シリカゲル・フルエンドキャップ充填剤

Mightysil RP-18 GP

関東化学株式会社 草加工場 生産技術部 酒井芳博

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)においてシリカゲルを原料とした逆相クロマトグラフィー(RPLC)は、オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)充填剤が最も多く使用されているが、溶離における二次相互作用がその開発以来課題となっている。この二次相互作用は、シリカゲルやODS充填剤を合成する際に発生するシラノール(解離型シラノールによるイオン交換性相互作用及び、解離型シラノールによる水素結合性相互作用)、およびシリカゲルに含まれる金属不純物(負の電荷とのイオン交換性相互作用、配位性相互作用)が原因であるとされている(1)(2)(3)。金属不純物が原因となる二次相互作用については、高純度シリカゲル(純度:99.99%以上)を使用することにより解消することが可能であるが、シラノールに起因する二次相互作用は、エンドキャップを完全に施さない限り除くことはできない。

従来、エンドキャップ処理は、ODS充填剤とTrimethylchlorosilane(TMCS)または、Hexamethyldisilazane(HMDS)(4)(5)(6)をトルエン中で加熱還流させ反応する方法が一般的に使用されているが、反応に長時間を要するにもかかわらず完全なエンドキャップは大変困難である。

我々は、高純度シリカゲルを原料に使用し、ODS処理をした後、完全なエンドキャップを短時間に行う高温高圧法(7)を開発し、Mightysil RP-18を平成7年に発売しているが、さらにこれを改良した高温液相法(8)を開発することにより、Mightysil RP-18 GPシリーズを平成9年に上市するにいたっている。この高温液相法を応用した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用充填剤であるMightysil RP-18 GPシリーズは、金属不純物の少ない高純度シリカゲルを使用し、独自の合成反応を採用することにより極限まで不活性化した逆相充填剤となっている。

Mightysil RP-18 GPシリーズは、分析バリデーション対応、すなわちGLP・GMPにおける分析バリデーシ

ョンをサポートするための逆相系HPLC充填カラムとして、従来から実施されているカラムの性能評価をはじめとして、バッチ間の変動を6種類の溶離特性試験で管理する厳しい品質管理を導入することで、再現性の良い製品を提供することを可能としている。

2. Mightysil RP-18 GP 充填剤の物理特性

Mightysil RP-18 GP充填剤の基本物性をTable-1に示す。

Mightysil RP-18 GPは、平均細孔径120Åの真球状シリカゲルを使用し、カーボン量20%と比較的炭化水素含有量が高く選択性の良い充填剤となっている。また、粒子径は5μmと3μmの2種類を取り揃えているが、高精度に分級されており粒度分布の幅が極めて狭く、圧力損失が小さいことが特徴である。

Table-1に5μmの充填剤の物理特性を示す。

Table-1 Physical Property of Mightysil RP-18 GP

| Particle Size (μm) | Specific Surface Area (m ² /g) | Mean Pore Diameter (Å) | Pore Volume (ml/g) | Carbon Content (%) |
|-----------------------|--|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 5 | 340 | 120 | 1.1 | 20 |

3. エンドキャップ(TMS化)処理

ODS充填剤のエンドキャップ処理は、トルエン還流下でトリメチルシリル化(TMS化)を行う方法が一般的であるが、この他の方法として気相法(9)、高温高圧法(8)等の方法も報告されている。

弊社においては、従来法を高温(200°C~250°C)で反応するため反応溶媒を改良することにより短時間でより完璧な疎水化が可能となった。

残存シラノールは、水素結合型とイオン交換性シラノールに分類されているが、水素結合性シラノールは従来法によりほとんどエンドキャップ処理することが可能であるが、イオン交換性シラノールは依然残存している。この様子をFig.1に示す。これは従来法によるエンドキ

YOSHIHIRO SAKAI

Production Technique Dept., Soka Factory,
Kanto Chemical Co., Inc.

アップにより得られたODS充填剤の²⁹Si CP-MAS NMRのスペクトルを示しているが、水素結合型シラノールは消滅しているがイオン交換性シラノールは残存している様子が明らかである。Fig.2は、Fig.1の充填剤を高温液相処理して得られた結果であるが、Fig.1で残存していたイオン交換性シラノールが減少していることがわかる。

この様に、Mightysil RP-18 GPシリーズは、残存シラノールを極限までエンドキャップすることに成功したODS充填剤であることが明らかである。

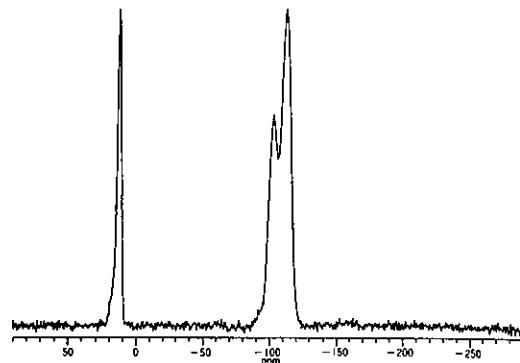


Fig.1 ²⁹Si CP-NMR Spectrum of ODS endcapped by conventional method

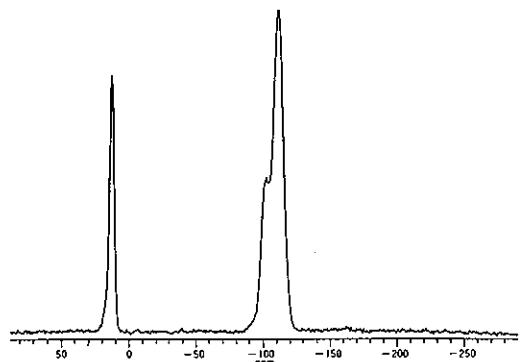


Fig.2 ²⁹Si CP-NMR Spectrum of ODS endcapped by High Temp. Liquid method.

4. Mightysil RP-18 GP の溶離特性について

Mightysil RP-18 GPシリーズは、分析バリデーションをサポートすることを目的に以下に示す6種類の溶離特性試験を行いバッチ間の再現性を確認し、優れた再現性を保証することを最大の特徴としている。

(1) ODS充填剤が持っている基本性能である疎水性と分離性能、および立体選択性の評価をテスト-Iで実施しているが、これら溶離特性は田中試験(10)で知られている評価方法を採用することにより、充填剤の疎水性と立体選択性を評価し、ODS固定相が均一であることを確認している。

(2) エンドキャッピングの評価をテスト-II、Vで実施しているが、テスト-IIでは中性溶離液におけるプロカインアミド、アセチルプロカインアミドの溶離挙動を、テスト-Vではピリジンおよびアニリン類の溶離挙動からエンドキャップの達成度を確認している。本試験方法で現在市販されている高純度シリカゲルODSを充填したカラムを評価すると、最も大きな差が見られる項目である。

(3) 金属配位化合物との相互作用の評価(金属不純物)をテスト-III、IV、VIで実施しているが、高純度シリカゲル(純度99.99%以上)を原料に使用しているため、金属配位化合物の溶出は良好である。

Chromatograms

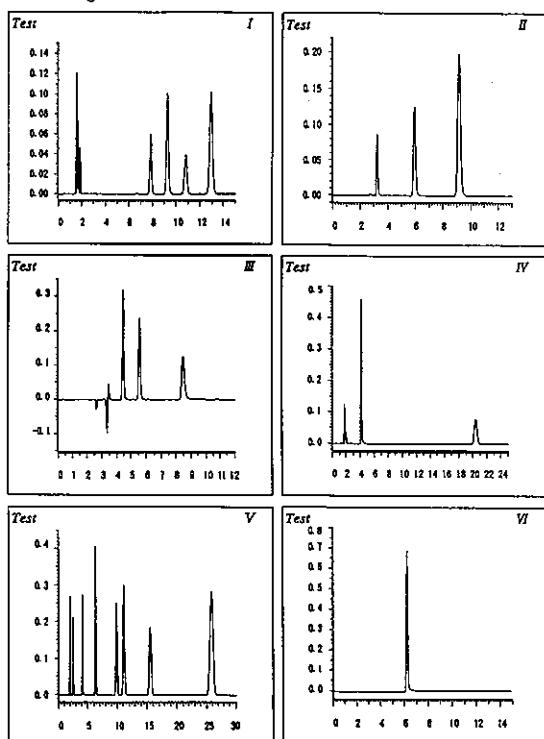


Fig.3 Batch Analysis Data of Mightysil RP-18 GP (5μm). Chromatographic Condition is shown in Table-2

Table-2 Certificate of Analysis Data of Mightysil RP-18 (5μm)

Mightysil RP-18 GP (5μm)
Certificate of Analysis
Batch No. 98M0223



Analytical Results for Bulk Material

| Physical Inspection | | Atomic Emission | |
|-------------------------|-----------|-----------------|---------|
| Mean Particle Size [μm] | 4.3~4.7 | Na [ppm] | ≤20 3.3 |
| Surface Area [m²/g] | 325~380 | Al [ppm] | ≤ 1 0.6 |
| Mean Pore Diameter [Å] | 110~140 | Fe [ppm] | ≤10 6.5 |
| Pore Volume [m³/g] | 1.0~1.2 | Ti [ppm] | ≤ 1 0.2 |
| Carbon Content [%] | 19.5~21.5 | | |
| 20.6 | | | |

Chromatographic Results and Conditions

- Column: Mightysil RP-18 GP 150~4.6 (5μm) -

Selectivity test

| Analytical Conditions | | | |
|---------------------------------------|-----------|------|---|
| Test I | | | |
| K' Anthracene | > 5.5 | 5.90 | Eluent : Methanol / Water = 80 / 20 |
| K' Anthracene / K' Biphenyl | 1.4~1.5 | 1.46 | Flow rate : 0.5 ml / min |
| K' Toluene / K' o-Toluene | 1.4~1.5 | 1.47 | Temp. : 40 °C |
| | | | Detection : UV 254 nm |
| | | | Inj. Vol. : 5 μl |
| Test II | | | |
| K' Anthracenone / K' Phenanthrene | 1.9~2.2 | 2.20 | Eluent : Methanol / 20mM buffer(pH7.6)* = 40 / 60 |
| | | | Flow rate : 0.5 ml / min |
| K' Semicarbazide / K' Benzene | 2.0~2.5 | 2.14 | Temp. : 40 °C |
| K' Dihydroanthrone / K' Benzoic acid | 5.0~6.0 | 5.00 | Detection : UV 254 nm |
| | | | Inj. Vol. : 5 μl |
| Test III | | | * pH adjust : add 20mM K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O to 20mM KH ₂ PO ₄ . |
| K' Semicarbazide / K' Benzoic acid | 2.0~2.5 | 2.14 | Eluent : Acetonitrile / 20mM buffer(pH4.4)* = 1 / 2 |
| K' Dihydroanthrone / K' Benzoic acid | 5.0~6.0 | 5.00 | Flow rate : 0.5 ml / min |
| | | | Temp. : 40 °C |
| | | | Detection : UV 225 nm |
| | | | Inj. Vol. : 5 μl |
| Test IV | | | * pH adjust : add conc. CH ₃ COOH to 20mM CH ₃ COONa. |
| K' Oxine-copper / K' Caffeine | 0.10~0.15 | 0.13 | Eluent : Acetonitrile / 20mM H ₃ PO ₄ = 5 / 95 |
| | | | Flow rate : 1.0 ml / min |
| | | | Temp. : 40 °C |
| | | | Detection : UV 250 nm |
| | | | Inj. Vol. : 5 μl |
| Test V | | | |
| K' Pyridine / K' Caffeine | 2.3~2.6 | 2.50 | Eluent : Acetonitrile / Water = 30 / 70 |
| K' Aniline / K' Pyridine | 2.6~2.9 | 2.75 | Flow rate : 1.0 ml / min |
| K' o-Toluolene / K' Aniline | 1.8~2.0 | 1.85 | Temp. : 40 °C |
| K' Methylbenzene / K' o-Toluolene | 1.6~1.8 | 1.74 | Detection : UV 254 nm |
| K' 2-Ethylbenzene / K' m-Nitrobenzene | 1.1~1.3 | 1.15 | Inj. Vol. : 10 μl |
| K' 3-Nitroanisole / K' p-Nitroanisole | 1.3~1.5 | 1.46 | |
| K' m-Nitroanisole / K' p-Nitroanisole | 1.7~1.9 | 1.71 | |
| Test VI | | | |
| K' Histidine | 3.0~3.5 | 3.34 | Eluent : Acetonitrile / 20mM KH ₂ PO ₄ = 40 / 60 |
| | | | Flow rate : 1.0 ml / min |
| | | | Temp. : 40 °C |
| | | | Detection : UV 320 nm |
| | | | Inj. Vol. : 5 μl |

Fig. 3 に製品に添付されているバッチ試験のデータを、Table-2 にその規格を示す。

5. Mightysil RP-18 GP の耐久性について

これまで、Mightysil RP-18 GP の溶離特性の安定性について述べてきたが、ここでは充填剤の化学的な安定性とカラムの耐久性について述べる。

5-1 耐薬品性

Table-3 に酸性 (pH 1.5) 溶離液に浸せきした場合のカラムの理論段数と保持時間の変化を示したが、1000時間以上酸性下においても理論段数および保持時間の変化は小さく耐酸性に優れていることが示されている。

Table-3 Chemical Stability of Mightysil RP-18 GP under Acidic Condition

| Time (h) | 0 | 100 | 200 | 300 | 500 | 700 | 1000 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| N/m (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 99 | 98 | 100 |
| RT (%) | 100 | 96 | 92 | 95 | 99 | 96 | 95 |

Table-4 は、アルカリ性 (pH 10.0) の溶離液に保存した場合のカラム性能の変化を示したが、理論段数、保持時間共に安定していることを示している。

この様に、Mightysil RP-18 GP は、酸性およびアルカリ性下において安定したカラム性能を発揮することができる事が明らかである。

Table-4 Chemical Stability of Mightysil RP-18 GP under Basic Condition

| Time (h) | 0 | 100 | 200 | 300 | 500 | 700 | 1000 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| N/m (%) | 100 | 98 | 100 | 99 | 97 | 94 | 98 |
| RT (%) | 100 | 100 | 100 | 99 | 99 | 99 | 98 |

N/m および Retention Time (RT) の測定条件

Mobile Phase : Acetonitrile/Water=75/25

Flow Rate : 1 ml/min. Temperature : 40°C

Detection : UV 254 nm Test Sample : Anthracene

5-2 耐圧性

Table-5 にグラジエント試験による耐圧試験の結果を示した。

この結果に示される様に、Mightysil RP-18 GP は、機械的な強度も充分保持していることが明確である。

Table-5 Mechanical Stability of Mightysil RP-18 GP

| Gradient Cycle | 0 | 20 | 50 | 80 | 100 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| N/m (%) | 100 | 97 | 98 | 98 | 99 |
| RT (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Eluent Condition

Column : Mightysil RP-18 GP (5μm)

(4.6mm φ × 150 mm)

Eluent A : 10mM Phosphate Buffer (pH 4.7)

B : 20% Methanol

C : 80% Methanol

Gradient : A → B → C Linear Gradient ;
each 30min.

Flow Rate : 1 ml/min Temperature : 40°C

Chromatographic Condition

Mobil Phase : 1 ml/min. Temperature : 40°C

Detection : UV 254 nm Test Sample :

Anthracene

以上示したように、Mightysil RP-18 GP は、耐薬品性、機械的耐久性共に優れており長時間、安定して使用できると考えている。

6. 終わりに

以上、**Mightysil RP-18 GP** の性質と特徴を述べてきた様に、従来課題となっていた充填剤のバッチの違いによる溶離特性の変動を最小限にとどめ、かつ化学的、物理的に安定性の高い製品の供給が可能となった。

これまで使用していただいている **Mightysil RP-18** と同様に環境・食品・医薬など多くの分野で幅広く安心して使用できるものと考えている。

参考文献

- 1) M. Verzele and C. Dewaele, Chromatographia, 18(1984) 314.
- 2) Y. Ohtsu, Y. Shiojima, Y. Okuyama, J. Koyama, K. Nakamura, K. Kimata and N. Tanaka, J. Chromatogr., 481(1989) 147.

- 3) K. Kimata, N. Tanaka and T. Araki J. Chromatogr., 594 (1982) 63.
- 4) C. H. Lochmuller and D. B. Marshall, Analitica Chimica Acta, 142(1982) 63.
- 5) K. Jinno, S. Shimura, N. Tanaka, K. Kimata, J. C. Fetzer, W. R. Biggs, Chromatographia, 27(1989) 285.
- 6) N. Nagae, Y. Hatano, D. Ishii, Chromatography, 14(1993) 45R.
- 7) Y. Sakai, M. Hosoda, Chromatography, 17(1996) 39.
- 8) 酒井芳博, 浜川大爾, 太田鈴枝, 第2回 LC テクノプラザ講演要旨集(1997) BP 2.
- 9) Y. Sudo, Chromatography, 12(1991) 38.
- 10) K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, J. of Chromatogr. Science, 27(1989) 721.

GLP / GMP Validation Support · Certified Quality



KANTO Reagents

Mightysil GP シリーズ

GLP / GMP における分析バリデーションをサポートします。



充填剤バッチ間・カラムロット間偏差を厳しい規格として設定し、高精度の充填を行っています。

▼
バリデーションが必要とされるあらゆる分析工程において、
安心してご利用いただけます。

充填剤の物性・溶離特性を証明する「Certificate of Analysis」を添付。

▼
酸性、塩基性、金属配位性化合物などの幅広い試料に対して、
抜群のピーク形状と高い再現性をお約束します。

▼
常時3バッチの充填剤をご用意しています。

▼
医薬品などの分析法検討の際、充填剤バッチの異なるカラム3本を
あらかじめ試験することができます。

▼
RP-18(ODS) · RP-8(C8) · RP-4(C4) 充填剤をご用意。

▼
幅広い化合物の分析ご利用頂けます。
カラムサイズも、各種ご用意しています。

製品に関する資料をご用意しております。下記までお問い合わせ下さい。



関東化学株式会社 試薬事業本部

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3-11-5 03(3663)7631

〒541-0048 大阪市中央区瓦町2-5-1 06(222)2796

〒812-0015 福岡市博多区山王1-1-32 博多堀池ビル 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> >>

恐竜王国へようこそ(3)

—鳥類は恐竜の生き残り—

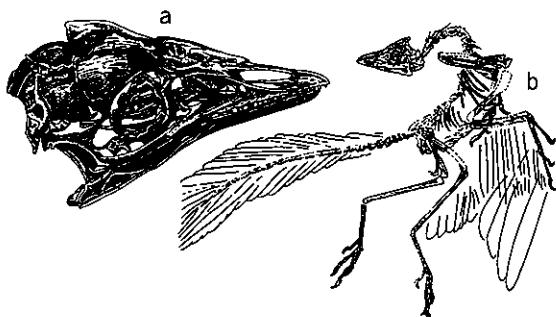
千葉県衛生研究所 医学博士 福田芳生

鳥類の誕生秘話

今回は、哺乳類と同じ温血動物の一員である鳥類の誕生について述べることにしましょう。1862年のことです。

ドイツ南部のバーバリア地方にあるアイヒstattの石切場から、現在のカラスほどの大きさの奇妙な動物の化石が見つかりました。

それは残念なことに、頭部が欠けていました。その15年後、頭部の揃った完全な遺骸が掘り出されました(第1図)。化石の埋まっていた地層は、今から約1億5000万年前の大気な渦の堆積物からなっています。時代はジュラ紀末に当たります。



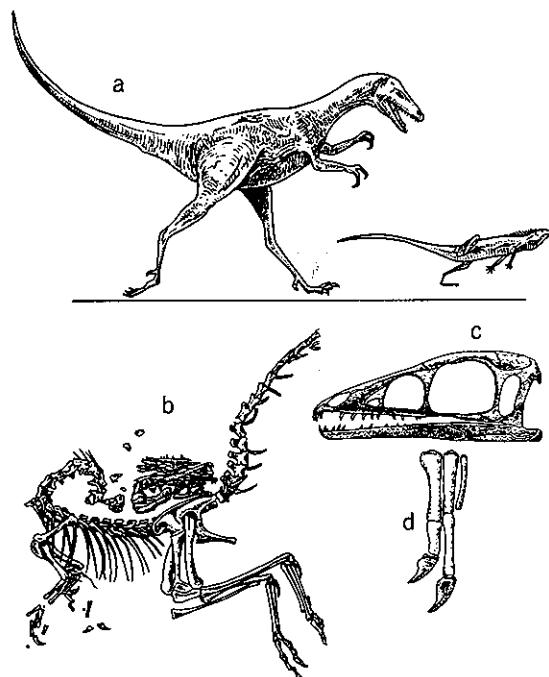
第1図：aは始祖鳥アルケオプテリックスの頭骨、
bは頭部の揃った全身骨格。

遺骸にはトカゲの尾のような長いしっぽがあり、その尾椎骨の左右に羽毛が生えています。言うまでもなく、現在の鳥の尾と異なり、全く開閉することができません。前肢は翼になっていますが、その末端に鋭い鉤爪を備えた3本の指があります。

胸骨が未発達なことから、そこに付着する飛翔筋がひどく貧弱で、飛ぶ力が弱かったことが分かります。頭骨はかなり現在の鳥に似ていますが、驚いたことに口ばしに鋭い円錐形の歯がずらりと並んでいます。今迄に、6点の標本が発見されているとのことです。

先述のアイヒstattの化石は、アルケオプテリックス(古代の翼という意味)と命名され、日本では始祖鳥として広く知られています。

この羽毛の生えた奇妙な動物は、その骨格を調べれば調べるほど、肉食恐竜の仲間のコンプソグナツス(かわいい顎の意)にそっくりです。なにしろ、以前コンプソグナツスとして登録されていた標本を再検討したところ、羽毛の痕跡が見つかったので、あわてて始祖鳥として再登録しなおしたほどですから。



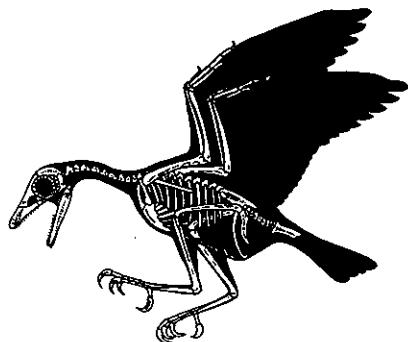
第2図：aはトカゲを追跡するコンプソグナツス。bは頭部を背側に折り曲げたコンプソグナツスの全身骨格。このような異状な姿勢は死後硬直による。cは頭骨、dは前肢の指骨。

このコンプソグナツスは現在のニワトリぐらいの大きさしかありません。地上を敏捷に走り回って、トカゲや昆虫を食べていたようです(第2図)。それは化石の腹部に残されていた未消化物を調べることによって、明らかになつたことなのです。始祖鳥の歯の摩り減り方からすると、食物はコンプソグナツスのものと、かなり近いことが挙げられています。

始祖鳥とコンプソグナツスの化石骨の取違い事件を耳にした多くの古生物学者は、始祖鳥アルケオプテリックスというのは単にコンプソグナツスに羽毛が生えたにすぎないのだから、鳥の先祖というのは考えものだと言いました。

始祖鳥の長いしっぽは、地上を走る際のバランサーに違ひあるまい。その飛翔力だってせいぜい木の枝から枝へ飛び移るぐらいのものだから、鳥に似た小型獸脚類という分類が適当じゃないかと、本気で話し合われたほどです。

ところが、1990年代に入って間もなく、中国大陸の奥地から始祖鳥にそっくりの鳥の化石が発見されたというニュースが突び込んで来ました。それは中国の鳥を意味する、シノルニスと命名されました(第3図)。



第3図：始祖鳥より一層進歩した鳥シノルニス。

大きさは現在のスズメ程ですが、始祖鳥の持つ長大なしっぽは、短かい尾骨に変わっています。この尾骨の先に扇形の尾羽（おばね）が付いています。尾羽は飛行を助け、着地の際にはブレーキの役目を果しました。

前肢は翼になっていますが、未だ3本の立派な指が残っています。一方、胸骨が発達していて、現代の鳥に大分近くなっています。従って、シノルニスは飛行可能な本格的な鳥と申せましょう。しかし、頭骨は始祖鳥にそっくりで、小さな鋭い歯が口ばしに生えています。想像するに、頭の方は飛行にあまり関係なかったので、その改造（改良）は後回しにされたのではないでしょうか。

シノルニスの発見された地層は白亜紀初期ですから、始祖鳥が出現してから、1000万年ほど経過していることになります。このシノルニスの発見によって、始祖鳥アルケオプテリックスは最古の鳥であり、小型肉食性恐竜コンプソグナツスの仲間から進化して来たことがはっきりしました。

このシノルニスの発見と相前後して、スペインのエスカニア・ホヤスにある白亜紀前期（約1億2000万年前）の地層から、現在のツグミ大の鳥の化石が見つかり、イベロメソルニス（イベリアの鳥）と命名されました(第4図)。

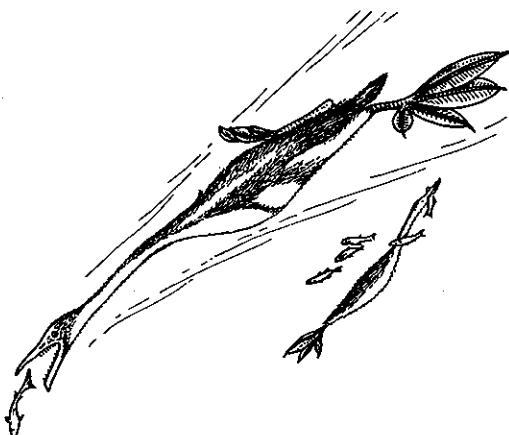


第4図：イベロメソルニスの復元模型。これはスペインの主都マドリッドの自然史博物館に展示されていたもの。

身体のつくりは、前記のシノルニスのものとほとんど変るところがありません。イベロメソルニスの発見が加わり、鳥類の進化史上における始祖鳥の地位は、今や不動のものとなった感があります。白亜紀後期（今から7000～8000万年前）になると、地上にはツグミやフクロウの仲間、モアのような巨大な走鳥まで出現し、一部に未だ歯を備えた原始的なグループもいましたが、その多くは現在の鳥類と極めて近い関係にありました。それらの鳥類は翼竜に対抗する勢力となり、恐竜大絶滅後もしづく生き続けます。

そして、海には現在のペンギンのように全く飛翔力を失ない、海中生活に適応した鳥類が登場します(第5図)。それはヘスペロルニスと呼ばれる鳥で、翼が退化消失し、専ら潜水して魚を捕えて食べてきました。そのためでしょうか、口ばしはピンセットのように細長くなっています。

歯は退化しつつあると見えて、下方の口ばしには歯がずらりと並んでいますが、上方の口ばしでは奥の方にわずかに存在するにすぎません。同時代の海鳥イクチオルニス（魚鳥）は、現在のグンカンドリのように海面近くを飛翔し、魚を見つけると急降下して捕え、食べていたと考えられています。

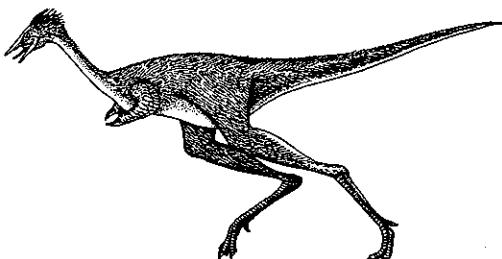


第5図：水中に潜って魚を追跡するヘスペロルニス。

不思議な鳥モノニクス

1993年になって、モンゴルのゴビ砂漠にある白亜紀後期の地層より、モノニクス（單一の爪という意味）という不思議な鳥の化石が発見されました（第6図）。全長60センチほどあり、体長の半分を占めるしっぽは始祖鳥のように細長く、前肢は退化的ですが、その先端に1本の太く頑丈な爪が生えています。言うまでもなく、翼は消失しています。モノニクスは前肢の太い爪を用いて土を掘り起こし、内部に潜む昆虫を食べていたと考えられています。

脚や胸骨は始祖鳥に比べて、ずっと現代の鳥に近くなっています。頭骨の方は始祖鳥型で、口ばしには立派な



第6図：白亜紀後期の奇妙な鳥類モノニクス。

歯が生えています。

この鳥類と肉食性恐竜とのミックスしたモノニクスを、どのように解釈すればよいのでしょうか。それをモンゴルの古生物学者アルタンゲル博士は、以下のように考えています。

モノニクスは翼を失なって地上生活を送るようになつたため、先祖の肉食性恐竜の姿に逆戻りしたのだというものです。このようにしてみると、今や鳥類と恐竜を分ける垣根は完全に消え去った感があります。鳥類は恐竜の一派なのだという意見が、今後学者の間でますます力を増すことが予想されます。実際、1997年になって南米パタゴニアから翼を持った恐竜ウネンラジア（半分の鳥の意）が発見され、上記の意見は補強され、鳥類イコール恐竜説の勢いは止まるところを知らない程です。

巨大走鳥ディアトリマ

今から約6500万年前の白亜紀の終りに恐竜が絶滅して、新生代第三紀に入って間もなくのことです。背の高さ2メートル以上にも達する巨大な走鳥が、我もの顔で地上をのし歩きます。



第7図：肉食性の巨大走鳥ディアトリマの全身骨格。

その代表ディアトリマ目の走鳥（第7図）がアメリカやヨーロッパの始新世（今から約5000万年前）の地層から発見されています。アジアでは中国の河南省から発掘されたチュウウゲンドリが有名です。

ディアトリマ目の強力な後脚にかかるては、当時の小

型のウマなど一蹴りで絶命したでしょう。そのようにして倒した獲物を足で地面に押えつけ、鋭く尖った巨大な口ばしで引き裂いて食べていたと考えられています。このディアトリマこそ恐竜そのものだとする意見が、アメリカの古生物学者の間から起こっています。

同時代のフォルラコスは、走鳥ではあっても、未だ小型の翼があったことが、化石骨の研究によって明らかになっています。それらの肉食の凶暴な走鳥は、今から約

2000万年前に姿を消しましてしまいました。

しかし、つい最近までモアやエピオルニスなどの巨大な走鳥（植物の葉や種子を食べていた）がニュージーランドやマダガスカル島に生息していたことを思うと、その絶滅が悔まれてなりません。それらの鳥類は、絶滅しまった恐竜の姿を髣髴させる存在であったに違いないからです。

微量タンパク質の検出には

ICN Pharmaceuticals, Inc. Chemiluminescent Detection System AURORA™ WESTERN BLOT KIT

AURORA™ Western Blot Kit は、アルカリフェオスマーカーを用いた化学発光検出キットです。
メンブレン上の微量な抗原を迅速かつ高感度に検出できます。



ULTRA SENSITIVE

pgを用いた分析法に匹敵する感度です。pgオーダーの微量な抗原を検出できます。発色法より高感度ですので、一次抗体を更に希釈してご使用頂けます。貴重な抗体を無駄にしません。

REPROBING

添付のプロトコールにより一次抗体を剥して、プロットの再検出が可能です。一枚のメンブレンで複数の一次抗体による検出が行えます。

LOW BACKGROUND

キットには、特異性の高いALP標識抗体と、高感度検出に適した専用のプロッキング剤が付属しております。これにより非特異的反応は極めて低くなっています。

StarLight™ Chemiluminescent Substrate
Secondary antibody conjugate (アルカリフェオスマーカー)
AURORA™ Blocking Reagent
Opti-Membrane™ Reagent
10X Assay Buffer
Development Folder

(化学発光基質)
(アルカリフェオスマーカー)
(プロッキング剤)
(エンハンサー)
(濃縮緩衝液)
(露光用メンブレンフォルダー)

AURORA
A社化学発光基質

キットにはAnti-Mouse, Anti-Rabbit, Anti-Rat, Anti-Humanの4種類がございます。お使いになる一次抗体に合わせてお選びください。
DNAの検出にはAURORA™ Southern Blot Kitをご利用下さい。



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> >>

〈編集後記〉

明けましておめでとうございます。

今年も弊誌をご愛読くださいますようよろしくお願い申し上げます。新年号に際し、初夢に因んで弊誌編集委員の本誌への夢と併せてメンバーをご紹介いたします。
①読み易く(読み易い誌面づくり), ②面白く(分析, 合成など化学関連の最新話題), ③幅広く(内容と執筆陣), ④易しく楽に(編集作業), ⑤効果観面(広報・宣伝)。い

ずれも実現が困難なところが夢たる由縁ですが一步でもその実現に向けて努力いたします。

ケミカルタイムズ編集委員会一同
斎藤次男(電子材料事業本部技術部長), 天野二郎(試薬事業本部技術部課長), 平井徳弘(同学術部課長), 伊藤弘美(臨床検査薬技術部課長), 佐藤勝彦(技術・開発本部課長), 原田悦子(同薬事業務課係長), 片岡博頭(総務部広報室), 青井克夫(品質保証部長)

関東化学株式会社

〒103-0023 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
インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>
編集責任者 青井 克夫 平成11年1月1日 発行