

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. Cica CHEMICAL TIMES

2005 No.3(通巻197号)

ISSN 0285-2446

“香り”の機能性 — 発ガン予防 —	宮澤 三雄 奥野 祥治	2
超臨界CO ₂ 中での酵素反応による有用物質の合成	松田 知子	8
高感度アンモニア測定試薬の開発	千室 智之 小口 雄二	14
化学分析における基礎技術の重要性(3) — 微量分析における汚染源の特定とその対策 —	井上 達也	17
ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(10) イマニュエル・カント	原田 馨	22
編集後記		24



“香り”の機能性 — 発ガン予防 —

Biological Function of Fragrance — Cancer Prevention at the Initiation Stage —

近畿大学 大学院総合理工学研究科 / 近畿大学 理工学部応用化学科 教授 宮澤 三雄

MITSUO MIYAZAWA

Kinki University, Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Professor

Kinki University, Department of Applied Chemistry, Professor

近畿大学 大学院総合理工学研究科 博士研究員 奥野 祥治

YOSHIHARU OKUNO

Kinki University, Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Postdoctoral

1. はじめに

ヒトは「香り」によって、気分がリラックスしたり食欲が増すなどの反応を無意識に起こす。このように我々が今まで自然に身につけてきた「香り」の効用が、近年、科学的に解明され、現在、食品、嗜好品、化粧品等の分野で実用化されている。我々は、この「香り」を一つの化学物質として捕らえ、その機能性と効用について先導的に研究を行い、「香り」を構成する化合物(香気成分と称する)から種々の生理活性成分を特定し、その本体を解明してきた。そして、この香気成分の中に、発ガン抑制等、非常に強い生理活性機能が発現していることを明らかにしてきた。これを有効的に利用するならば現在のようにヒトが、病気治療の為に薬を経口投与や静脈内投与等の攻撃的な方法で体内に取り込むのではなく、近い将来にはごく自然に「香りを嗅ぐ」という動作で、鼻や口から香気成分を体内に取り入れる等、体にとってより優しい方法で、病気の予防や治療が可能になるのではないかと我々は期待している。

本稿では、今まで我々が、科学的に明らかにしてきたこの香気成分の各種生理活性に関する研究を、数回に分けて紹介する。

2. 香気成分の発ガン予防に関する研究

2-1 香気成分による抗変異原性の研究

発ガンの要因は種々あるが、その大部分は外因性の環境因子によるものである。人間の正常細胞は、幾つもの段階を経てガン化するが、その第一段階では、まず正

常細胞が発ガン物質の影響を受け、DNA及び染色体に突然変異が起こる。我々は、このように突然変異を起こす物質(変異原物質)を失活させたり、この変異原物質によって生じた突然変異の修復を助ける物質(抗変異原物質)を見出すことが、ガン予防の観点からも大変重要なことと考えている。ここでは、香気成分テルペノイドなどの抗変異原性に関する我々の研究を概説する。

2-2 抗変異原性試験法

抗変異原性試験法には大きく分けて、微生物、培養動物細胞、昆虫類、および動物を用いる方法がある。微生物試験法では1975年に米国Ames博士らによって開発されたサルモネラ菌を試験菌株とする変異原性物質を検出する復帰突然変異試験法(Ames テスト)が、試験の簡便さから抗変異原性試験法として、現在世界中で広く用いられている。しかしながら、この方法でも2日間の日数を要する。これに比べて1985年に開発された *umu* テスト(図1)では数時間でDNA損傷の有無の検出を可能にした。*Umu* テストはDNA損傷によって誘導されるSOS反応(図2)を指標とする試験であり、我々はこの *umu* テストを応用し、変異原性物質の検出ではなく抗変異原性試験法としてシステムを構築し、抗変異原性物質を約5時間で検出することに成功した。それ以来、我々はこの方法で天然物の抗変異原性を多数明らかにしている。^{1)~23)}

2-3 モノテルペンの抗変異原性¹⁰⁾

モノテルペン炭化水素の抗変異原性については、表1に示した8種(1~8)の化合物について我々が行った変異原物質Furylfuramide(AF-2)に対する抑制効果の結果

Culture of bacteria (*Salmonella typhimurium* TA1535/ρSK1002)
 Overnight culture of bacteria strain was diluted 50-fold into TGA medium
 and incubated at 37°C until the bacteria density reached at 0.25-0.30 in A600.

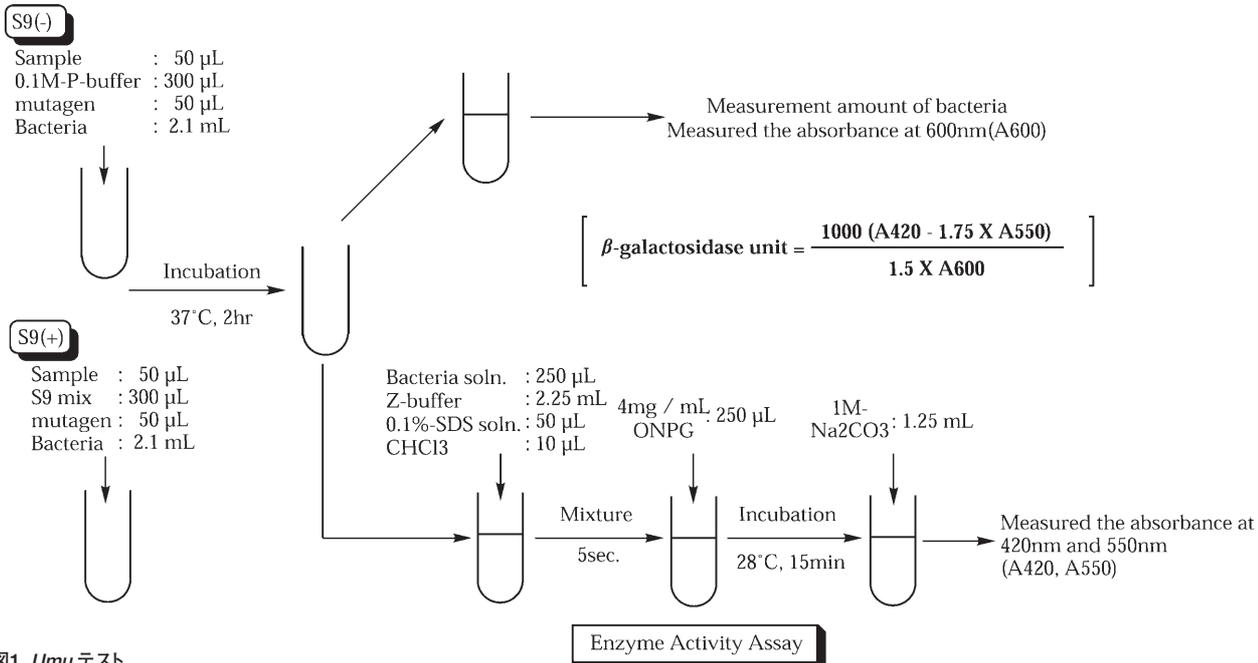


図1 Umuテスト

が知られているのみである。(+) -
 Limonene (1) は柑橘類の代表的な香気成分として知られ、ヒトは日常生活においてかなりの量を摂取している。抗変異原性に関しては *umu* テスト図1において 0.7μmol/mLの濃度で8.2%の抑制効果を示した。(-) -体(2) は天然物には少なく、ミント油、シトロネラ油に少量存在するのみで、抗変異原性は認められていない。Limoneneの異性体である(1*R*) - (+) -*trans*-Isolimonene (3) では4.1%の抑制効果を示した。γ-Terpinene (5) および (+) -*p*-Menth-1-ene (7) は、炭化水素類のなかでは比較的強い抑制効果を示し、それぞれ14.6%、20.2%であった。α-Terpinene (4), Terpinolene (6) および α-Phellandrene (8) においては若干の抑制効果を確認した。

モノテルペンアルコールでは1.0μmol/mLの濃度において、(+)-Menthol (9)、(-)-Menthol (10)、(+)-Isomenthol (11) および (-)-Dihydrocarveol (15) はモノテルペ

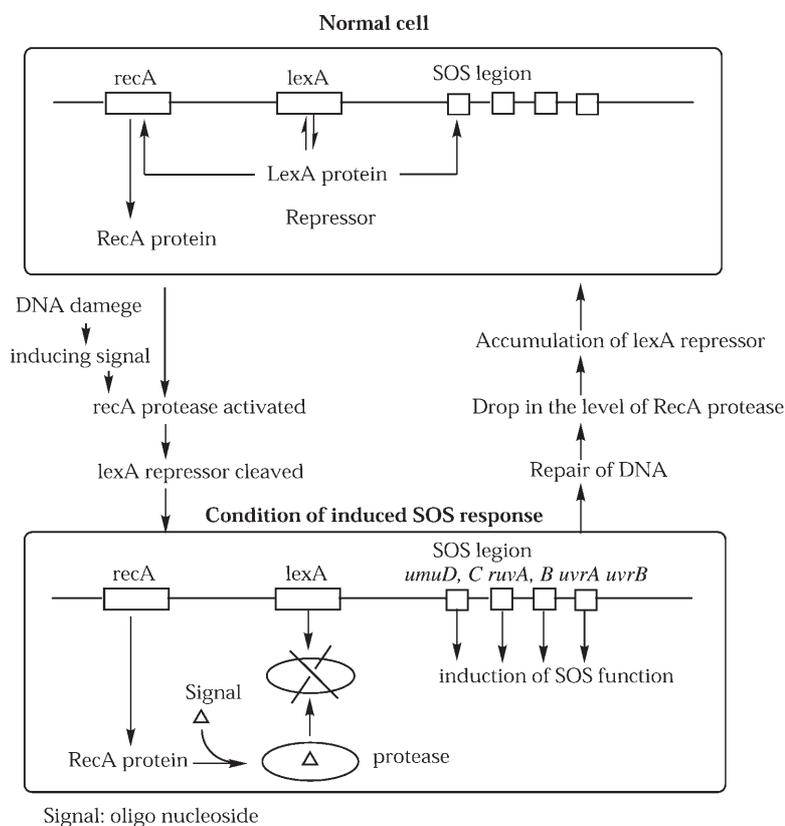


図2 SOS反応

ンケトン類とほぼ同様の強い抑制効果を示し、それぞれ77.2%, 79.5%, 70.0%および67.1%であった。また(+)-Terpinen-4-ol (13), (-)-Terpinen-4-ol (14), およびCuminy alcohol (16)においては化合物9, 10, 11, 15に比べ若干低い値を示している。

モノテルペンケトンでは1.0 μ mol/mLの濃度において、(+)-Pulegone (17), (-)-Menthone (20), (-)-Isomenthone (21) およびPiperitenone (23) はかなり強い抑制効果を示し、その値は67.4%, 61.1%, 61.3%および79.6%であった。また(+)-Carvone (18), (-)-Carvone (19), (+)-Piperitone (22) においても強い抑制効果が認められた。

モノテルペンアルデヒドである(-)-Perilla aldehyde (24) およびCuminaldehyde (25) においては、モノテルペンケトン、モノテルペンアルコールとほぼ同等の強い抑制効果を我々は見出し出している。これら*p*-menthan骨格を有する化合物(図3)の構造活性相関についての検討から、モノテルペンケトンおよびモノテルペンアルコールでは六員環内のオレフィンの有無が抑制効果の発現に影響を与えており、オレフィンを持たない方が強い抑制効果を発現することを示している。またアルデヒド類では環内にオレフィンを有するにも関わらず強い抑制効果を示していることから、アルデヒド基が抑制効果の発現因子であると考えられる。

表1. モノテルペノイドの抗変異原活性

compound	suppressive effect (0.1 μ mol/mL)	ID50 ^c (μ mol/mL)
1 (+)-Limonene	8.2	-
2 (-)-Limonene	0	-
3 1 <i>R</i> -(+)- <i>trans</i> -Isolimonene	4.1	-
4 α -Terpinene	2.8	-
5 γ -Terpinene	14.6	-
6 Terpinolene	2.5	-
7 (+)- <i>p</i> -Menth-1-ene	20.2	-
8 α -Phellandrene	6.3	-
9 (+)-Menthol	77.2	0.52
10 (-)-Menthol	79.5	0.65
11 (+)-Isomenthol	70.0	0.60
12 Isopulegol	55.9	0.80
13 (+)-Terpinen-4-ol	41.2	-
14 (-)-Terpinen-4-ol	57.3	0.92
15 (-)-Dihydrocarveol	61.5	0.85
16 Cuminy alcohol	29.3	-
17 (+)-Pulegone	67.4	0.52
18 (+)-Carvone	51.8	0.90
19 (-)-Carvone	44.6	-
20 (-)-Menthone	61.1	0.79
21 (-)-Isomenthone	61.3	0.80
22 (+)-Piperitone	21.7	-
23 Piperitenone	79.6	0.52
24 (-)-Perilla aldehyde	70.3	0.60
25 Cuminaldehyde	75.4	0.52

^aFurylfuramide was added at 0.05 mg. Positive control was added at furylfuramide without terpenoids. ^bHydrocarbons were added at a concentration of 0.07mmol/mL. ^cDose for 50% inhibition

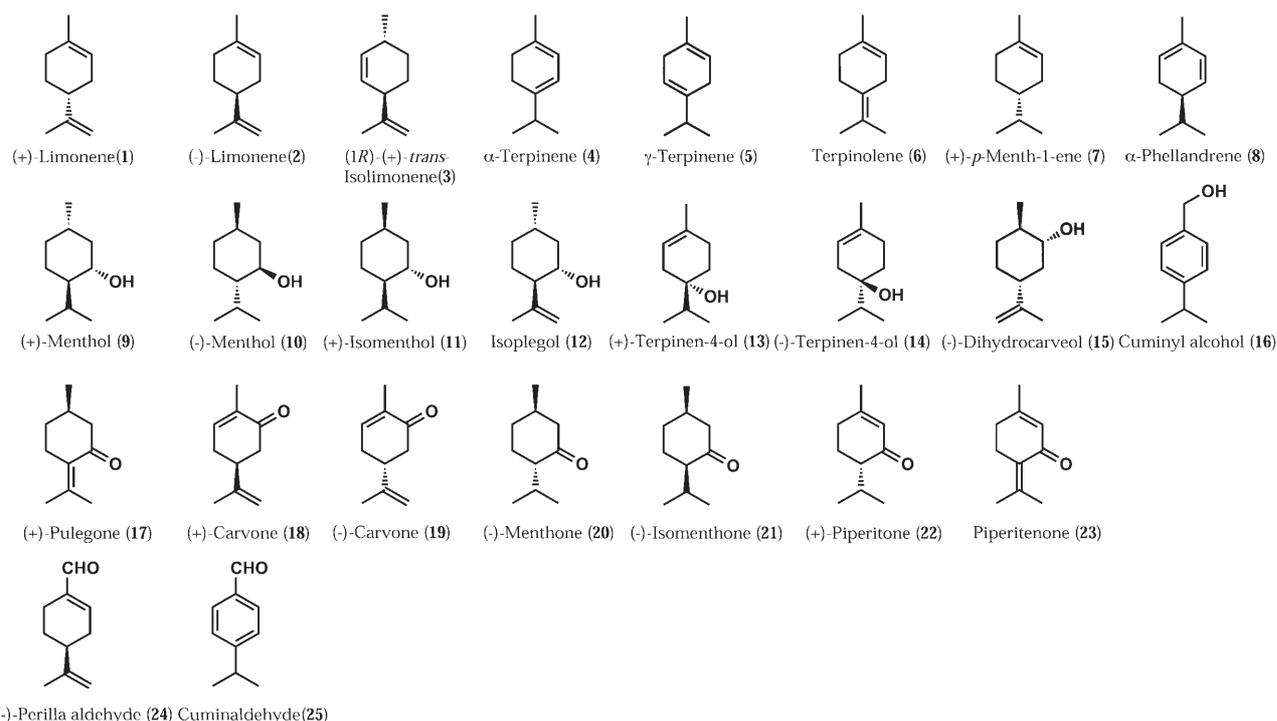


図3 *p*-Menthan骨格を有するモノテルペノイド

2-4 セスキテルペンの抗変異原性^{24, 25)}

モノテルペン類と同様に変異原物質であるFurylfuramideに対する抑制効果について、7種のセスキテルペン類を調べた。その結果を表2に示す。この結果から、比較的強い抑制効果を示した化合物は、(-)-Aristolene (30)、(-)- α -Copaene (32)であり、0.1 μ mol/mLの濃度で、50%以上の抑制効果を示した。

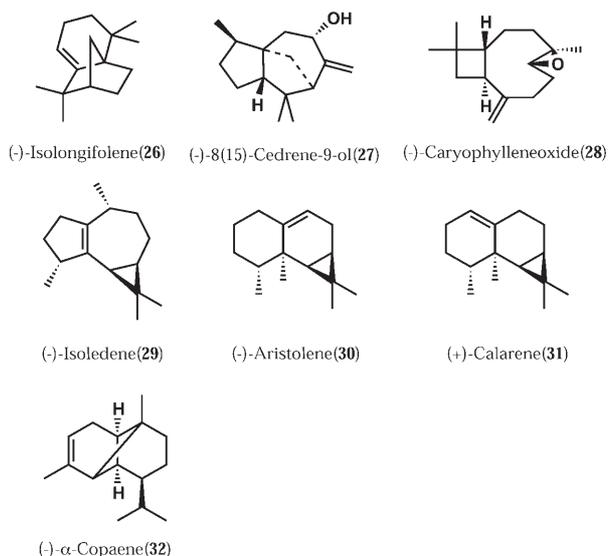


図4 抗変異原活性を示したセスキテルペノイド

表2. セスキテルペノイドの抗変異原活性

compound	suppressive effect (0.1 μ mol/mL)	ID50 ^b (μ mol/mL)
26 (-)-Isolongifolene	50.9	0.10
27 (-)-8(15)-Cedrene-9-ol	53.4	0.08
28 (-)-Caryophyllene oxide	58.1	0.08
29 (-)-Isolatedene	51.9	0.10
30 (-)-Aristolene	66.6	0.07
31 (+)-Calarene	57.5	0.08
32 (-)- α -Copaene	60.0	0.07

^aFurylfuramide was added at 0.05 mg. Positive control was added at furylfuramide without terpenoids. ^bDose for 50% inhibition.

以上、モノ、セスキテルペン類の研究から各種変異原物質に対する抗変異原性の物質を見出してきた。現在、植物中の抗変異原物質に関する報告は、フラボノイド、カテキン類などのポリフェノール系化合物において、抗変異原性の作用機序に関する研究が盛んに行われて来ているが、テルペン類についてはここで述べてきたように、最近になってようやく *in vitro* での抗変異原性が見出されたものが殆んどであり、作用機序について、あまり明らかになっていないのが現状である。

3. 植物成分の発ガン予防に関する研究

3-1 山薬の抗変異原性²⁶⁾

我々の抗変異原性に関する一連の研究において、和漢生薬「山薬」から活性成分としてセスキテルペノイドである β -Eudesmol (33) を単離した(図5)。試料として用いた山薬はヤマノイモ科ヤマイモ (*Dioscorea japonica*) の根茎の外皮を除去して乾燥させたものであり、滋養・強壯薬として用いられている。化合物33は *umu* テストにおいて、Furylfuramideおよび肉などの焼げ焦げから単離された変異原物質である Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol) に対して0.18 μ mol/mLで80%、48%の抑制効果を示した(図6)。また化合物33は *Salmonella typhimurium* TA100を用いた Ames テストにおいても両変異原物質に対して強い抗変異原活性を確認した。生薬の香気成分に含まれるこれらの抗変異原物質は、今後、漢方製剤の香りが発ガン予防をもたらす可能性を示唆しているものと考えられる。

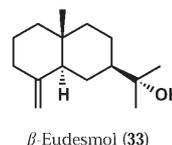


図5 山薬から単離された抗変異原性セスキテルペノイド

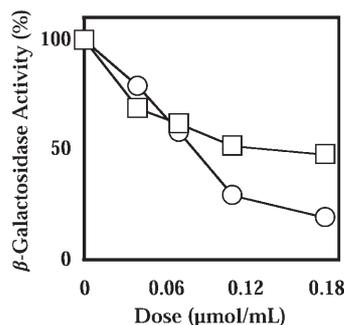


図6 β -Eudesmolの抗変異原活性 ○: Furylfuramide □: Trp-P-1

3-2 黒米の抗変異原性²⁷⁾

植物成分から抗変異原物質を探索することは、前述の生薬同様、新たな抗変異原物質の解明につながる。現在、我々が食している現代米のルーツを探ると「赤米」、「黒米」と呼ばれる古代米に辿り着く。このような野生種には現代米への新品種開発の過程で失った古代米特有の生理活性成分が存在するものと考えられている。

我々は古代米である「黒米」について抗変異原物質の探索を行った。

この研究では、黒米の糠のアルコール抽出物を、前述のテルペン類と同様に、抗変異原性試験法(2-2)を用いて、抗変異原活性成分を単離したところ、香り成分であるVanillic acid (34)とProtocatechuic acid (35) (図7)を得た。化合物34は薄いビターテイストの香りを有する。

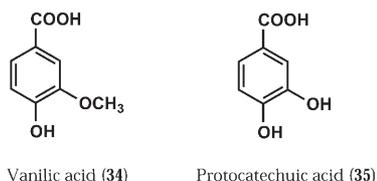


図7 黒米の糠から単離された抗変異原性物質

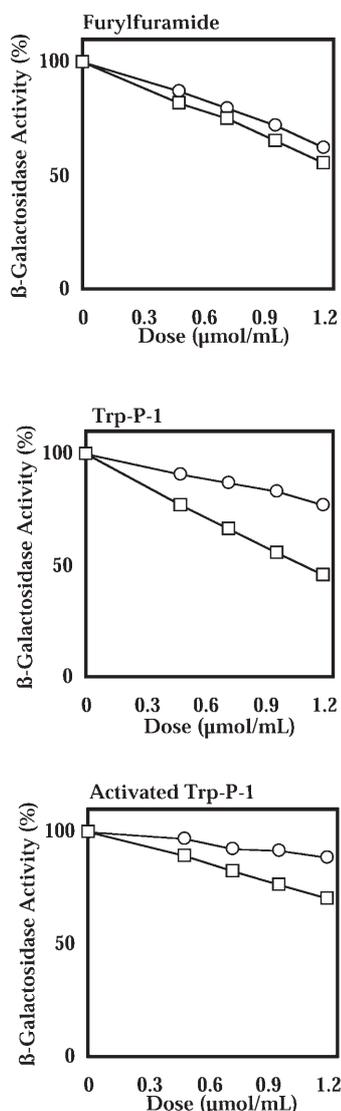


図8 Vanillic acidおよびProtocatechuic acidの抗変異原活性
○ : Vanillic acid □ : Protocatechuic acid

化合物34、35のFurylfuramideおよびTrp-P-1に対する抗変異原活性について検討した結果、両変異原物質に対し化合物35が化合物34よりも強い抑制効果を示した(図8)。このことより、3位の水酸基が活性の発現に重要な要因であると考えられた。またこれらの化合物のTrp-P-1に対する阻害機構を検討するために、Trp-P-1を事前にラット肝臓の酸化酵素群であるP450を含むS9mixにより代謝活性化させた活性化Trp-P-1を用いた *umu* テストを行った(図8)。その結果、化合物34、35の抑制効果は大きく減少した。このことから両化合物のTrp-P-1に対する抑制効果はS9 mixによる代謝活性化を阻害することに起因していることが明らかになった。

「米」は、日本の気候風土に適した素晴らしい作物である。我々日本人の食文化の根底となる伝統的な食品に存在する抗変異原物質・抗発ガン物質を解明することは、発ガン予防に向けた食品素材研究に於いても、大変重要な課題であると考えられる。

4. おわりに

テルペン類は多種多様の複雑な化学構造を有する化合物群である。また、ポリフェノール系化合物等の他の二次代謝産物群と比較して、動植物には微量ではあるが、多種多様存在しているところに特徴がある。これら一つ一つの化合物について、それぞれの機能性と効用を解明していくことは大変重要ではあるが、その為には膨大な時間が必要である。多数の揮発性テルペン類で構成される植物精油は、単品では表現することが出来ない独特の香りを醸し出し、この複合効果は現代科学でも解明しがたい部分である。最近の我々の研究において、精油の主要構成成分の単品から精油の構成組成に近づくにしたい生理機能が向上する植物精油の持つ不思議な相乗効果を見出しており、その神秘性も我々の研究によって徐々に解明されつつある。今後も我々は、ここに示した揮発性テルペン類の抗変異原性・抗発ガン性の他に、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性などの各種生理活性や生体内動態、代謝に関与するヒトP450分子種の決定などについて探究を続け、それらの作用機序を解明するとともに、香りの機能性の全貌を明らかにしたいと考えている。

文 献

- 1) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **43**, 284 (1995).
- 2) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **43**, 1428 (1995).
- 3) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **43**, 3012 (1995).
- 4) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **44**, 3444 (1996).
- 5) F. Uenobe, S. Nakamura, M. Miyazawa, *Mutat. Res.* **373**, 197 (1997).
- 6) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **45**, 2849 (1997).
- 7) H. Shimamura, M. Miyazawa, K. Emonoto, S. Nakamura, H. Kameoka, *Nat. Prod. Lett.* **10**, 261 (1997).
- 8) M. Miyazawa, Y. Okuno, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **46**, 904 (1998).
- 9) M. Miyazawa, Y. Okuno, K. Oshiro, H. Kasahara, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1425 (1998).
- 10) M. Miyazawa, Y. Okuno, S. Nakamura, H. Kosaka, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5440-5443 (2000).
- 11) M. Miyazawa, Y. Okuno, S. Nakamura, H. Kosaka, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 642-647 (2000).
- 12) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, W. Sugiura, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4377-4380 (2000).
- 13) M. Miyazawa, K. Sakano, S. Nakamura, H. Kosaka, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 336-341 (2001).
- 14) M. Miyazawa, Y. Nakamura, K. Sakano, S. Nakamura, H. Kosaka, *J. Oleo Sci.*, **50**, 485-489 (2001).
- 15) M. Miyazawa, K. Sakano, S. Nakamura, H. Shimamura, H. Kosaka, *J. Oleo Sci.*, **50**, 545-554 (2001).
- 16) M. Miyazawa, M. Hisama, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4019-4025 (2001).
- 17) M. Miyazawa, H. Kinoshita, Y. Okuno, *J. Food Sci.*, **68**, 52-56 (2003).
- 18) M. Miyazawa, T. Yamada, H. Utsunomiya, *Nat. Prod. Res.*, **17**, 319-323 (2003).
- 19) M. Miyazawa, M. Hisama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2091-2099 (2003).
- 20) M. Miyazawa, M. Hisama, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6413-6422 (2003).
- 21) Y. Okuno, M. Miyazawa, *Lett. Drug Design and Discovery*, **1**, 66-68 (2004).
- 22) M. Miyazawa, G. Kohno, *Nat. Prod. Res.*, **19**, 29-36 (2005).
- 23) M. Miyazawa, Y. Okuno, K. Imanishi, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2312-2315 (2005).
- 24) 嶽崎まゆ子、宮澤三雄、第44回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会・講演要旨集、p. 64-66 (2000).
- 25) 奥野祥治、嶽崎まゆ子、宮澤三雄、第46回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会・国際精油シンポジウム (ISEO) 合同大会要旨集、p. 95-97 (2002).
- 26) M. Miyazawa, H. Shimamura, S. Nakamura, H. Kameoka, *J. Agric Food Chem.*, **44**, 1647 (1996).
- 27) M. Miyazawa, T. Oshima, M. Tokura, M. Hisama, *J. Oleo Sci.*, **52**, 471-481 (2003).

超臨界CO₂中での酵素反応による有用物質の合成

Organic synthesis by enzymes in supercritical CO₂

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 講師 松田 知子
TOMOKO MATSUDA

Tokyo Institute of Technology, Department of Bioengineering, Associate Professor

1. はじめに

二酸化炭素は、常温常圧では気体であるが、温度を31度(臨界温度)以上とし、圧力を73気圧(臨界圧力)以上とすると、“超臨界流体”となる。超臨界CO₂は、図1に示すように、液体と気体の両方の性質を併せ持つ溶媒であり、高機能性溶媒として、様々な分野で利用されている。例えば、拡散性が高いことや物質を溶かすことができるため、コーヒー豆からのカフェインの抽出、ビール用のポップエキスの抽出、香料の抽出、クロマトグラフィー用の溶媒、染色、精密部品の洗浄等に用いられてきた。また、有機合成反応や高分子合成の溶媒や反応剤としても用いられている¹⁾。本研究では、超臨界CO₂中で酵素反応²⁾を行い、光学活性体等の有用物質を合成できたので、紹介したい。

2. 加水分解酵素を用いるラセミ体アルコールの速度論的分割反応—立体選択性の制御³⁾

加水分解酵素であるリパーゼは、図2(a)に示すように、自然界では脂肪酸エステルを加水分解する酵素である。ところが、水が少ない環境、つまり、有機溶媒中で用いると、その逆反応のエステル化反応を触媒する(図2(b))。アセチル化剤としては、vinyl acetateが頻繁に用いられている。基質のアセチル化と同時に生成するvinyl alcoholがacetaldehydeに変換されるため、生成したエステルの分解反応を防げるためである(図2(c))。本研究では、ラセミ体の二級アルコールを基質として用い、アセチル化反応を行った。R体とS体では反応速度が異なるため、どちらかをエステルに変換して逆側をアルコールのままで残す速度論的分割反応が可能である(図2(d))。

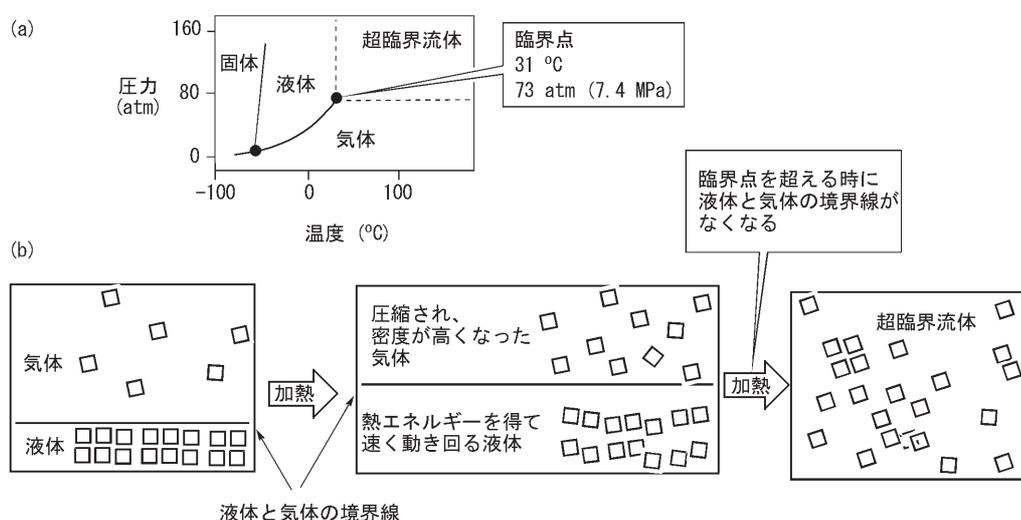


図1 (a) CO₂の相図 (b) 超臨界流体のイメージ(密閉された容器の中で液体を加熱すると、臨界温度で液相と気相の区別がなくなり、超臨界流体となる。)

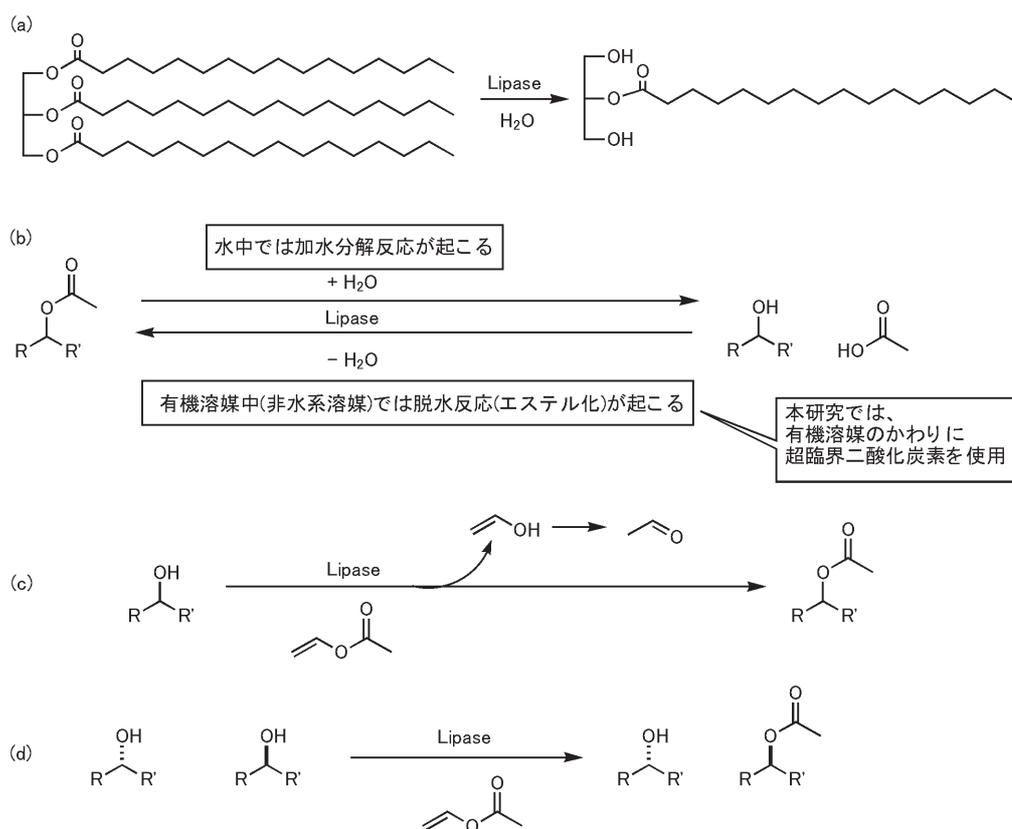


図2 (a) 自然界でのリパーゼの反応 (b) リパーゼの逆反応 (c) アセチル化剤として vinyl acetate を用いるアセチル化反応 (d) ラセミ体アルコールの速度論的分割反応

反応の立体選択性を示す尺度としては、反応が速い異性体と遅い異性体の反応速度の比である E 値を用いた。

リパーゼの反応を、有機溶媒中ではなく、超臨界CO₂中で行った理由は、CO₂は、1) 安価であり、2) 無害であり、3) 地球上に多量に存在し、4) 反応終了後は常圧に戻すだけで生成物と簡単に分離でき、5) 拡散性が高いので反応速度が加速できるためである。さらに、超臨界CO₂は、その溶媒の性質を圧力や温度によって制御できる。超臨界流体は、図1 (b) に示すように、気体のように密度が低い部分と液体のように密度が高い部分が混ざっている状態であるので、例えば、少し圧力を上げると、密度が高い部分が多くなり、その結果、溶解度や誘電率、拡散係数等の物理化学的な性質が大きく変化する。本研究では、反応溶媒として用いるCO₂の圧力や温度が、リパーゼの立体選択性におよぼす影響を調べた。有機溶媒の種類を変化させることにより、リパーゼの反応の溶媒効果を検討した例は多数ある。しかし、有機溶媒を用いる場合には、有機溶媒の種類を変化さ

せると、分子の形が変わるため、その影響までが出てしまう。一方、超臨界CO₂を用いると、分子の形は変わらない。さらに、有機溶媒の性質は連続的に変化させることは不可能である。例えば、ヘキサンをヘプタンにすると、炭素数は、6から7へと変化する。しかし、6.1や6.2の炭素数の化合物は存在しないため、その間がどのようになっているのかは、調べることができない。ところが、超臨界CO₂を用いる場合には、圧力や温度は連続的に次第に変化させることができるので、立体選択性も連続的に変化させることができる。

図3に結果を示す。図3 (a) に示すリパーゼの反応の立体選択性は、圧力や温度を変化させることにより連続的に変化した (図3 (b,c))。ここで、超臨界CO₂を利用すると、圧力や温度により立体選択性を制御できることがわかった。また、その変化は、密度の変化 (図3 (d)) とも関係深いことがわかった。ではなぜ、温度や圧力により超臨界CO₂の密度が変化すると、反応の立体選択性が変化するのか考察した。CO₂の酵素への吸着等による酵素の構造の微妙な変化が立体選択性に影響を与え

ているのではないかと考えているが、詳しくは現在検討中である。温度により立体選択性の制御に関しては、有機溶媒中のリパーゼの反応においても報告されており⁴⁾、

そこでの説明に用いられている絶対反応速度式を、超臨界CO₂中での反応を説明するためにも用いることができた(図3(e))。

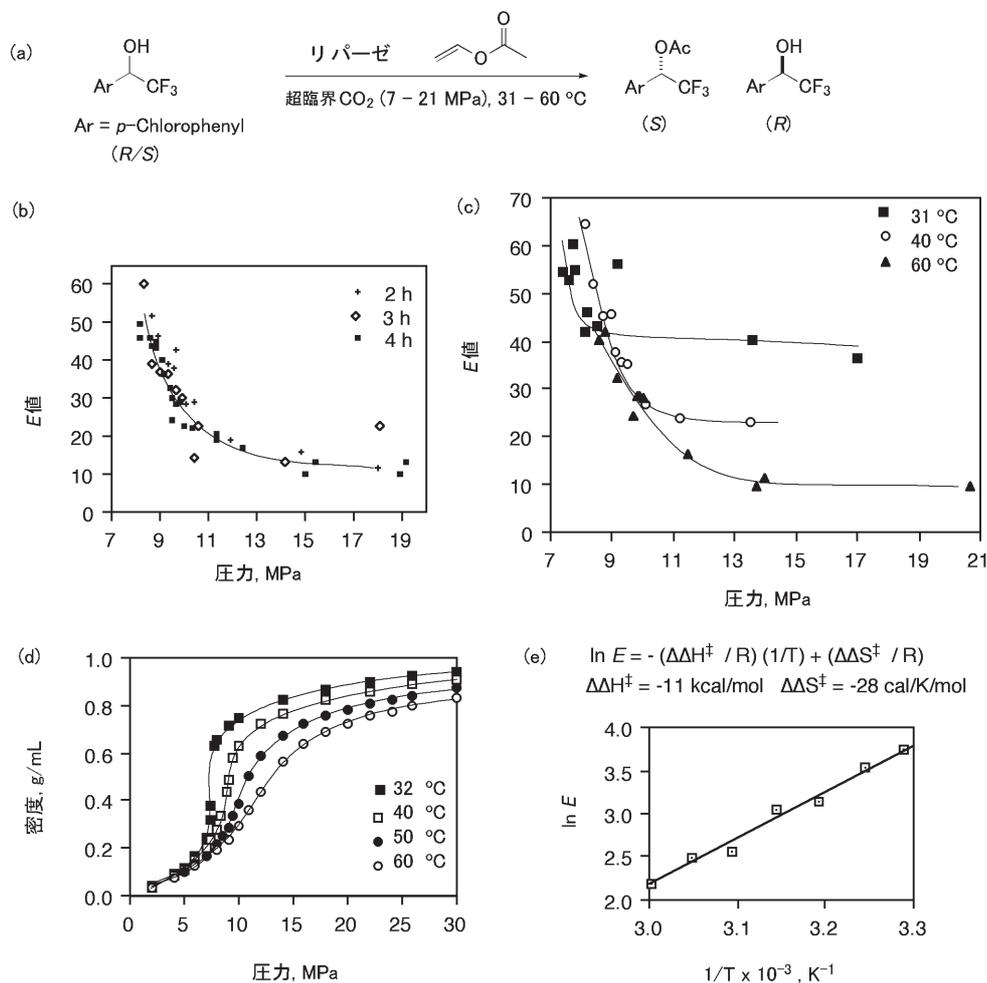


図3 超臨界CO₂中でのリパーゼによるフルオロアルコールの速度論的分割反応の立体選択性におよぼす圧力および温度の影響 (a) 反応スキーム (b) 55 °Cでの立体選択性におよぼす圧力の影響 (c) 様々な温度での立体選択性におよぼす圧力の影響 (d) CO₂の密度⁵⁾ (e) CO₂の密度一定条件下(0.75 g/mL)での立体選択性におよぼす温度の影響

3. 加水分解酵素を用いるラセミ体アルコールの速度論的分割反応—大量合成⁶⁾

超臨界CO₂を用いる反応では、高压容器を必要とするため、なるべく単位スペースあたりの収率が高い方が有利である。そのため、フロー系の反応を行った。反応には、*Candida antarctica*由来の固定化リパーゼであるNovozym435を用いた。この酵素は固定化されているので、反応管に簡単に充填できる。ラセミ体の基質をCO₂と酵素を充填した反応管へ送液することにより、生成物である光学活性化合物が連続的にしかもバッチ式に比べて高い効率(400倍)で得られることが

わかった(図4(a))。ラセミ体の1-phenylethanolとvinyl acetateを用いて反応を行ったところ、R体のアルコールが選択的にアセチル化され、S体は未反応であった(図4(b))。まずラセミ体のアルコールとvinyl acetateのモル比を1:0.5とし、反応を行った。結果を表1に示す。反応はスムーズに進行し、ほぼ定量的にR体のアセテートが高い光学純度で得られた。この時、立体選択性を示すE値は非常に高く、1800以上であった。反応条件を検討したところ、vinyl acetateを少過剰量用いることにより、収率を47%から50%へと向上させることが可能であり、R体のアセテートのみではなく、未反応のS体のアルコールも99%以上の不斉収率で得ることができ

た。vinyl acetateを大過剰に用いても、*S*体のアルコールの過剰反応は避けられた。また、圧力の検討により、9-20MPaの範囲で同様の結果が得られ、この反応は圧力に影響を受けないことがわかった。さらに、3日間の連続運転反応を行ったところ、図4(c)に示すように収率や立体選択性の低下は見られず、1.73gの固定化酵

素(Novozym435)を用いて、221gのラセミ体のアルコールを99%ee以上の*S*体のアルコールおよび*R*体のアセテートへと変換できた。本反応の、基質特異性の検討を行ったところ、図4(d,e)に示すように、2-undecanolのような脂肪族や1-tetralolのような環状アルコールの速度論的分割反応にも成功した。

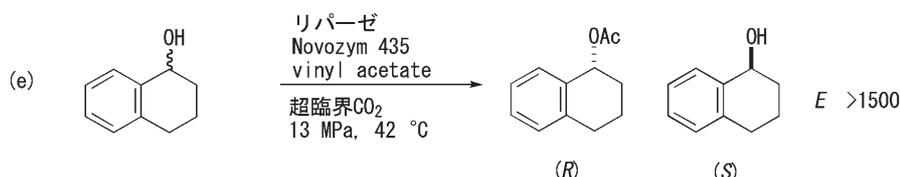
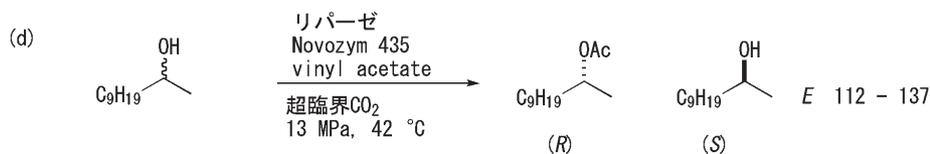
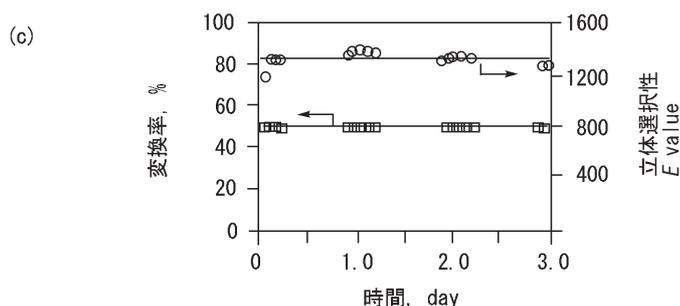
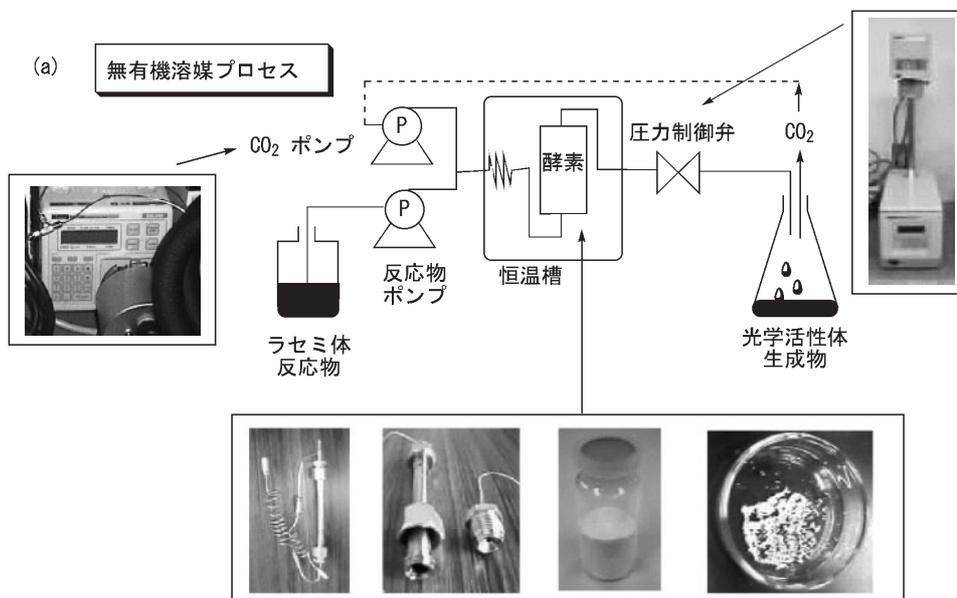


図4 (a) フロー系超臨界CO₂反応装置の概要 (b) 1-phenylethanolの速度論的分割反応 (c) 1-phenylethanolを基質とする3日間の連続運転反応 (d) 2-undecanolのフロー系速度論的分割反応 (e) 1-tetralolのフロー系速度論的分割反応

表1. 超臨界CO₂中でのリパーゼNovozymによるラセミ体1-phenylethanolのフロー系速度論的分割反応の条件検討

1-phenylethanol:vinyl acetate mol/mol	圧力 MPa	(S)-alcohol %ee	(R)-alcohol %ee	変換率 % ^d	E
1:0.50 ^a	13.0	89.6	99.7	47	1850
1:0.60 ^b	13.0	98.8	99.2	50	1240
1:1.30 ^c	12.9	>99.5	99.0	50	>1000
1:1.30 ^c	8.9	>99.5	99.0	50	>1000
1:1.30 ^c	20.0	>99.5	99.0	50	>1000

反応条件：42-43 °C, Novozym: 5.0 mL, 超臨界CO₂流速：1.5 mL/min, 1-phenylethanolの流速：0.050 mL/min (1-phenylethanolとvinyl acetateの混合物の流速：^a0.070 mL/min, ^b0.074 mL/min, ^c0.100 mL/min) ^d 1-phenylethanolを基準としたアセチル化体への変換率。

4. アルコール脱水素酵素によるケトンの不斉還元反応⁷⁾

チチカビ (*Geotrichum candidum* IFO5767) 由来のアルコール脱水素酵素はケトンの不斉還元反応を行うための触媒として有用であるが、超臨界CO₂が反応媒体として有望であることも分かった。一般に水中での反応では、水からの生成物の抽出が困難であるが超臨界CO₂中の反応では、分離の問題が解決できる。触媒としては、単離酵素ではなく、細胞を水と2-propanolの懸濁液とし、そこに吸水性ポリマーを加えることにより、ポリマー上に固定化、分散させたものを用いた。この反応により、初めてアルコール脱水素酵素が超臨界CO₂中で活性を示すことを見出した。また、様々な基質の還元反応は、非常に高い立体選択性で進行し、光学活性なアルコールが生成した。(表2)。

表2 チチカビによる超臨界CO₂中でのケトンの不斉還元

生成物	収率 (%)	ee (%)	絶対配置
	51	>99	S
	81	>99	S
	53	>99	S
	11	97	S
	96	96	R
	22	>99	S
	61	>98	S
	96	-	-

5. 脱炭酸酵素によるCO₂の固定化反応(カルボキシル化反応)⁸⁾

脱炭酸酵素を超臨界CO₂中で用いると、その逆反応により、CO₂の固定化反応が開発できる。ここでは、*Bacillus megaterium* PYR2910由来の脱炭酸酵素を、超臨界CO₂層と水層の二層系の反応系で用いた。この酵素は、長澤らにより通常の条件において効率的にピロールのカルボキシル化反応を触媒し、ピロール-2-カルボキシルートを36g/L蓄積できることを見出されている。単離された酵素よりは細胞中に存在する酵素の方が安定

であるため、超臨界CO₂中の反応においては細胞そのものを用いた。その結果、脱炭酸酵素によるピロールのカルボキシル化反応が、超臨界CO₂中においても進行することを見出した(図5(a))。系内を0.1 MPa(常圧)に保つと反応はほとんど進行せず、10 MPaの方がはるかに速く進行した(図5(b))。圧力は臨界点付近以下の圧力で収率は最高となり、臨界圧力以上で減少した(図5(c))。水層のpHの低下や、基質と生成物の水層と超臨界CO₂層への分配等が原因であると考えられる。このシステムは他の脱炭酸酵素を用いたCO₂の固定化反応にも応用可能であり、今後のさらなる発展が期待される。

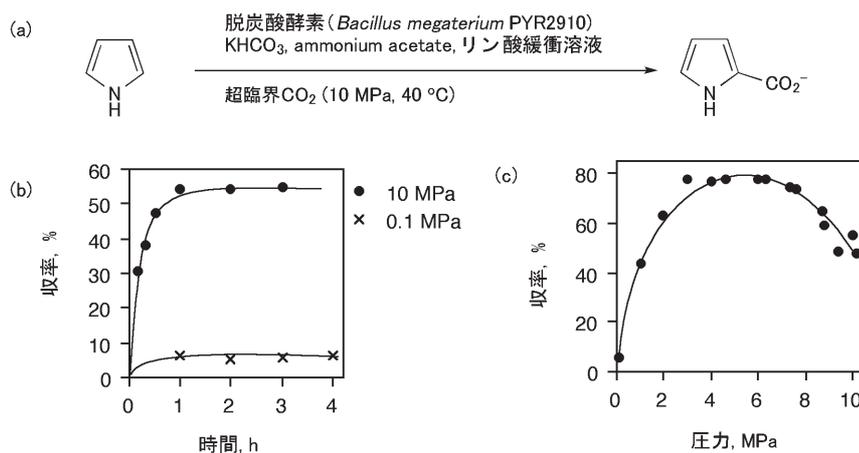


図5 (a) *Bacillus megaterium*による超臨界CO₂中でのピロールのカルボキシル化反応 (b) 経時変化 (c) 圧力の影響

6. まとめ

超臨界CO₂を利用したバイオプロセスの開発は、始まったばかりであり、超臨界流体の特徴を十二分に活かせる系を構築するには、多くの技術的改良および新しい反応の開発が必要である。今後、これらの研究開発が進めば、CO₂を用いた新規合成反応群が生み出されるだろう。最終的には、微生物や植物がCO₂をバランス良く循環させているように、人類も酵素を駆使することにより自然界に多量に存在するCO₂を用い、持続的社會を築けるようになることが期待される。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、龍谷大学理工学部の原田忠夫教授に御指導頂き、感謝致します。また、本研究は龍谷大学理工学部原田研究室の卒業生の皆様との共同研究の結果であり感謝致します。また、3章のリパーゼによる光学活性体の大量合成は、碓屋隆雄教授、有田佳生氏、美澄幸弘博士、市川真一郎氏（東京工業大学）との共同研究であり、4章のアルコール脱水素酵素の反応は、中村薫助教授（京都大学）との共同研究であり、5章の脱炭酸酵素の反応は、長澤透教授（岐阜大学）との共同研究であり、ここに感謝致します。

文献

1) For organic synthesis in scCO₂, see: P. G. Jessop, T. Ikariya, R. Noyori, *Nature*, 1994, **368**, 231; P. G. Jessop, T. Ikariya, R. Noyori, *Science*, 1995, **269**, 1065; P. G. Jessop, T. Ikariya, R.

Noyori, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 475; P. G. Jessop, W. Leitner, Eds. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*; Wiley-VCH: Weinheim, 1999; R. Noyori, T. Ikariya, In *Stimulating Concepts in Chemistry*; F. Vögtle, J. F. Stoddart, M. Shibasaki, Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2000; pp 13_24; M. F. Sellin, I. Bach, J. M. Webster, F. Montilla, V. Rosa, T. Aviles, M. Poliakoff, D. J. Cole-Hamilton, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, **24**, 4569; W. Leitner, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 746; J. M. DeSimone, *Science*, 2002, **297**, 799.

- For enzymatic reaction in scCO₂, see: T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, T. Ikariya, *Tetrahedron: Asymm.*, 2005, **16**, 909; T. Mori, Y. Okahata, *Chem. Commun.*, **1998**, 2215; T. Mori, A. Kobayashi, Y. Okahata, *Chem. Lett.*, **1998**, 921; A. J. Mesiano, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 623; Y. Ikushima, N. Saito, M. Arai, H. W. Blanch, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 8941.
- T. Matsuda, R. Kanamaru, K. Watanabe, T. Harada, K. Nakamura, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 8319; T. Matsuda, R. Kanamaru, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada, K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymm.*, 2003, **14**, 2087.
- T. Sakai, I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, M. Utaka, *J. Org. Chem.* 1997, **62**, 4906; T. Sakai, T. Kishimoto, Y. Tanaka, T. Ema, M. Utaka, *Tetrahedron Lett.* 1998, **39**, 7881.
- T. Moriyoshi, T. Kita, Y. Uosaki, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1993, **97**, 589.
- T. Matsuda, K. Watanabe, T. Harada, K. Nakamura, Y. Arita, Y. Misumi, S. Ichikawa, T. Ikariya, *Chem. Commun.*, **2004**, 2286.
- T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2000**, 1367; T. Matsuda, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2003**, 1198.
- For carboxylation under ambient conditions, see: M. Wieser, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 4309; M. Wieser, N. Fujii, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Eur. J. Biochem.*, 1998, **257**, 495; T. Yoshida, T. Nagasawa, *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, **89**, 111; M. Wieser, T. Yoshida, T. Nagasawa, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 179.
- T. Matsuda, Y. Ohashi, T. Harada, R. Yanagihara, T. Nagasawa, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2001**, 2194.

高感度アンモニア測定試薬の開発

Development of a highly sensitive reagent for the determination of ammonia

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 生化学研究室 千室 智之
TOMOYUKI CHIMURO

Biochemical Department of Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 臨床化学研究室 小口 雄二
YUJI OGUCHI

Clinical Department of Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

1. はじめに

栄養素として取り込まれたアミノ酸のうち、タンパク質や核酸の生合成に利用されなかった過剰なアミノ酸は、水、二酸化炭素、アンモニアに分解される。アンモニアは非常に毒性の強い物質であるにもかかわらず、生命を維持する過程で絶えず産生されている。また、腸内に大量に常在している細菌もアンモニアを産生しており、産生されたアンモニアの一部は腸管壁を経て体内に侵入してくる。このように、生体は常にアンモニアの脅威にさらされているといえる¹⁾。これに対して生体はアンモニアを無毒化するシステム(解毒システム)を体内に構築し、対応している。その中心となるのが肝臓の尿素サイクルである。血中のアンモニアはここで直ちに無毒な尿素に変換され、尿として体外に排泄される。さらに、体中の組織や腎臓にも複数のアンモニア消去機能があり、たとえシステムの一部に軽度な障害が生じたとしても、血中のアンモニアは常に低濃度(10~70 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ 程度)に保たれるようになってい¹⁾。一方、肝硬変、肝癌、劇症肝炎などの重篤な肝臓疾患や先天性の尿素サイクル欠損症といったこのシステムに重度な障害を生じた患者は、血中のアンモニアを消去しきれないため、アンモニア中毒におちいるリスクが高くなる。アンモニア中毒が進むと昏睡や死に至ることもあることから、特にこのような患者に対しては血中アンモニア濃度を把握することが極めて重要になる²⁾。

今般著者らは、旭化成株式会社(現旭化成ファーマ株式会社)と共同で、血中アンモニアを測定する新たな方法を開発した。本稿ではその測定方法を体外診断薬に応用した例を中心として紹介する。

2. 開発の背景

先に述べたように、健常人の血中アンモニアは低濃度に保たれている。従って、測定法には少なくとも数 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ レベルのアンモニアを測定できる性能が要求される。また、赤血球中にはAMPデアミナーゼのようなアンモニア産生に関与する一連の酵素(核酸代謝酵素)と基質であるプリンヌクレオチドが存在しているため、検体中のアンモニア濃度は非常に上昇し易³⁾、採血後直ちに測定する場合以外は何らかの前処理が必要になる。通常、この前処理は検体の希釈を伴うため、測定法にはさらに低濃度のアンモニアを測定できる性能が望まれる。

体外診断薬として重要な点は測定結果の信頼性を確保することであり、測定感度の向上はこれを達成するための必須要件であるが、その他に操作の簡便性、試薬の安定性、汎用型自動分析装置への適用性などが求められる。現在、臨床検査に用いられている主な血中アンモニア測定法を表1に示したが、いずれの方法も一長一短があり、求められている性能のすべてをもつような測定法は見出されていない。

表1 血中アンモニア測定法と性能の比較

方法	検体	測定	感度	特異性	再現性	多検体
直接比色法 ⁴⁾	血漿* 全血*	的手法	○	△	△	×
ドライケミストリー法 ⁵⁾	全血	専用機	△	△	△	△
酵素法 (GIDH-UV法 ⁶⁾)	血漿	汎用機**	△	○	△	○
酵素法 (NADS-UV法 ⁷⁾)	血漿	汎用機**	△	○	○	○

各項目の性能を3段階で評価した(○:良好(高い), △:不良(低い), ×:不可)

* 検体を除タンパク処理し、その上清を検体に用いる

** 汎用型自動分析装置

GIDH: glutamine dehydrogenase

NADS: nicotinamide adenine dinucleotide synthetase

3. 酵素サイクリング法によるアンモニアの高感度測定

今般著者らは、3種類の酵素反応を組み合わせたアンモニアの測定方法を考案した(図1)。

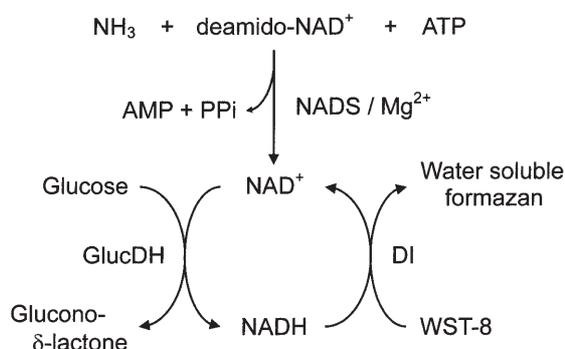


図1 高感度アンモニア測定試薬の測定原理
NADS: NAD synthetase; GlucDH: glucose dehydrogenase;
DI: diaphorase

本法は検体中のアンモニアを NAD^+ に変換する反応と、生成した NAD^+ をグルコースデヒドロゲナーゼ(以下GlucDHと略)とジアホラーゼ(以下DIと略)とで増幅する反応(酵素サイクリング反応)の2段階で構成されている。GlucDHとDIによって NAD^+ と NADH 間のサイクリング反応が n 回転すると、 NAD^+ (または NADH)の n 倍量の水溶性ホルマザン色素がWST-8から生成し蓄積されるために、単位時間あたりの回転数が多いほど感度が上昇することになる。さらに、水溶性ホルマザンの生成速度はアンモニアから変換された NAD^+ の濃度と比例関係にあるため、水溶性ホルマザンを分光学的に測定することで検体中のアンモニア濃度を求めることができる。

4. 測定感度の設定

測定感度はサイクリング定数 Kc と時間 t の積で決まり、 $Kc = (K_a \times K_b) / (K_a + K_b)$ であるため、 $K_a + K_b$ を一定としたとき、 $K_a = K_b$ で Kc が最大になる(K_a 、 K_b はGlucDHとDIの酵素反応定数)⁸⁾。実際には、必要な測定可能範囲や試薬の安定性を考慮して、酵素濃度を調整し、 Kc を決定する。本検討では血中のアンモニアを測定することを意図し、 $400 \mu\text{g}/100\text{mL}$ のアンモニアを検体としたとき測定終了時の吸光度が2.0以下で、かつ基準範囲($12 \sim 66 \mu\text{g}/100\text{mL}^2$)付近の測定再現性がCV 3%以下を満足するような試薬処方と分析条件(検体/試薬

比や反応時間など)を設定した。設定した条件でアンモニア標準液($200 \mu\text{g}/100\text{mL}$)を測定したときのタイムコースを図2に示す。

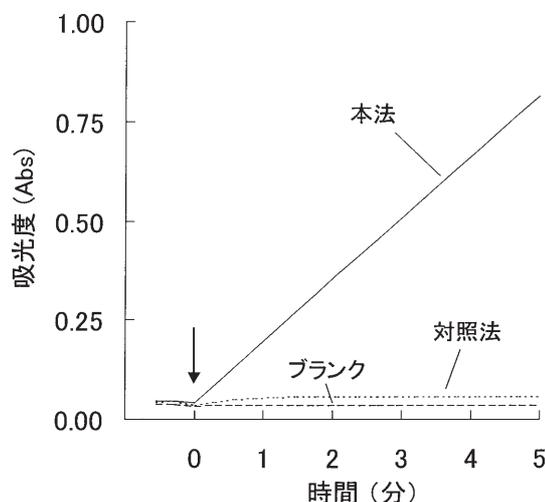


図2 アンモニア標準液($200 \mu\text{g}/100\text{mL}$)の測定(タイムコース)
本法:水溶性ホルマザンを検出(450nm における吸光度)
対照法: NADH を検出(増幅なし、 340nm における吸光度)

本法の場合、吸光度は時間軸に対して一次的に上昇し、5分間の吸光度変化量は0.75に達した。一方、酵素サイクリングをさせない対照法では、反応開始後ほぼ1分でプラトーに達し、5分経過した時の吸光度変化量は0.02でしかなかった。5分間の反応において、本法は対照法に対して37.5倍に増感された。なお、反応時間を延長することでさらに感度を上昇させることができるし、本法の場合にはGlucDH濃度を2倍、3倍と増やすだけでも感度を上昇させることが可能である(図3)。究極的には1000倍以上感度を高められる可能性がある。

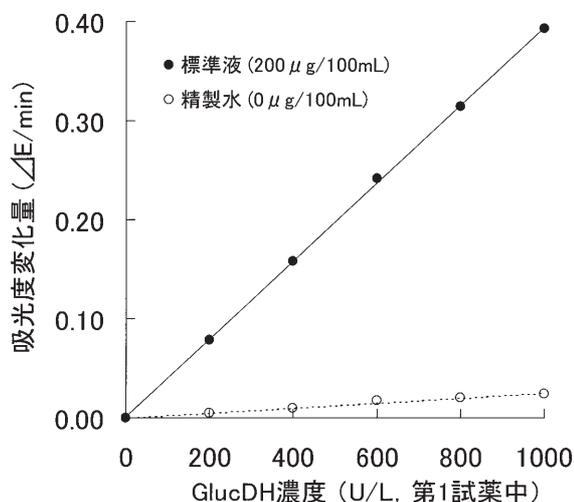


図3 グルコースデヒドロゲナーゼ濃度と測定感度の関係
GlucDH: glucose dehydrogenase

5. 使用方法

本測定原理に基づき、第1試薬と第2試薬の2つの試薬から成るキットを作製した。

標準的な測定手順は次のとおりである。まず検体と30倍量の第1試薬を混合し、37°Cで5分間インキュベートする。続けて10倍量の第2試薬を加えて反応を開始し、450 nmでの吸光度変化量 ($\Delta E/\text{min}$) を測定する。そして、専用の標準液を用いて予め作成した検量線から検体中のアンモニア濃度を算出する。

6. 基本性能

臨床検査で広く普及している汎用型の自動分析装置を用いて本試薬の基本性能を評価した。

(1) ヒト血漿を検体とした場合

再現性は日内および日間とも変動係数(CV)が1~3%、測定可能な濃度範囲は3~400 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ であった。測定を妨害する可能性がある還元性物質(アスコルビン酸、グルタチオン等)やビリルビン、さらには溶血、乳び等の影響はほとんど認められなかった。従来の酵素法試薬との相関性は本法をY軸にした場合、回帰式 $y=1.02x-6.76$ 、相関係数 $r=0.999$ と良好であった。

(2) 全血を前処理した検体の場合

採血後に生じる検体中のアンモニア濃度の上昇を防ぐには、タングステン酸ナトリウムを含んだ強酸性溶液で除タンパクする方法が有効である。この処理を行った検体は、長期間安定であるため信頼性を確保するのに有用であるが、これまでは検体の性質により直接比色法(用手法)にしか適用できなかった。本法はこの除タンパクを行った検体についても血漿を検体とした場合と同等の性能を示し、全血を検体として用いるドライケミストリー法との相関では、本法をY軸とした場合、回帰式 $y=0.969x+6.250$ 相関係数 $r=0.998$ と良好な結果が得られた。

本キットは製造後8ヶ月(冷蔵保存)以上安定であった。本キットは体外診断薬として十分な性能を有していると考えられた。

7. 他項目への応用展開

本稿で紹介した酵素サイクリング法は、ATPや K^+ 、 Mg^{2+} (金属濃度に応じてNADSが活性化する)の高感度測定試薬としてそのまま応用が可能である。さらに、図4に示したようにアンモニア、ATP、deamido- NAD^+ のいずれかを生成する酵素を組み合わせることで、様々な物質の定量や酵素活性のための高感度測定試薬への展開も可能である。

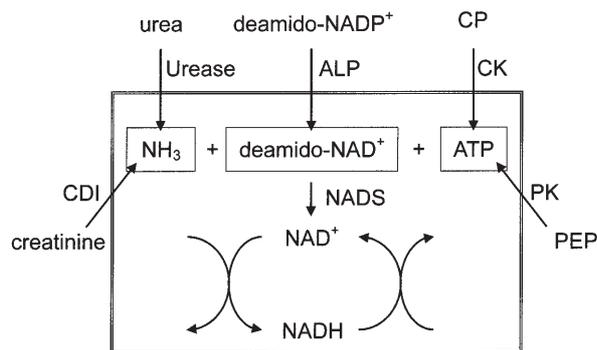


図4 酵素サイクリング反応を用いた高感度試薬
ALP: alkaline phosphatase; CK: creatine kinase; PK: pyruvate kinase;
CDI: creatinine deimidase; CP: creatine phosphate;
PEP: phosphoenol pyruvate

8. おわりに

酵素サイクリング法は、高感度測定法として以前から研究されているものである⁹⁾。酵素サイクリング法は生体試料のように多種多様な成分を含む場合でも目的物質のシグナルのみを増幅させることができるため、臨床検査のように迅速性が要求される場合には特に有効な方法と考えられる。しかし、一般的に分析操作が煩雑な場合が多く、胆汁酸、ケトン体、カルニチンなど一部の項目にしか利用されていない。本稿では酵素サイクリング法の実用化の一例として血中アンモニアの測定試薬の開発について紹介させて頂いた。この試薬はReady to Useな試薬であり、高感度で再現性、特異性に優れ、長期間安定であるという特徴を有している。さらに、従来法と比べて検体/試薬比を小さくすることができるため、夾雑成分や除タンパク試薬の影響を受けにくく、従来法では困難であった全血を除タンパク処理した上清も検体として用いることが可能である。このことから、本試薬は臨床検査の様々な状況に対応できると考えている。なお、本試薬は平成15年8月からシカリキッド NH_3 として、さら

※21ページに続く

化学分析における基礎技術の重要性 (3)

Importance of Basic Technique on Chemical Analysis (3)

— 微量分析における汚染源の特定とその対策 —

関東化学株式会社 草加工場 検査部 井上 達也
TATSUYA INOUE

Department of Inspection, Soka Factory, Kanto Chemical Co., Inc.

1. はじめに

ISO 17025や各種GLPなどの認定取得において、試験データの信頼性が問われることが最近一般的になりつつある。妥当性確認をされた公定試験法であっても、それを用いる試験所ごとにデータの信頼性が異なることが多い。一般的に、データの信頼性は使用する設備機器の性能とその保守管理、試験要員の熟練度、使用する試薬類の純度とその管理、それぞれの取扱いやサンプリング、器具洗浄などの作業標準類等いわゆる4Mのレベルに左右される。特に微量分析の場合、汚染源の特定とそれらへの対策がきわめて重要な課題となる。本稿では、我々が今までに経験した汚染源に関する情報を紹介し、微量分析の基礎技術習得の一助となることを期待する。

2. 試験室に運び込まれる汚染

試験室に運び込まれる汚染は、汗や唾液等の人体が発する物質、衣服に付着している物質、化粧品を介して持ち込まれる物質及び靴底に付着して持ち込まれる物質等が主流である。

2.1 人体が発する汚染物質

人体が発する汚染物質の代表は、汗と唾液であるが、ナトリウム等これらに多く含まれる元素はほぼ定常的に検出される。しかし、それ以外の元素は分析結果が毎回大きく異なり、摂取した食品の影響も強く受ける。

化粧品の類による汚染では、次のような経験がある。

ある試験要員の試験結果が、常にナトリウムと亜鉛の2項目で他者に比べ高い値を示したことがあった。その試験要員の動作を一部始終観察したが、当初は他者と異なる操作は認められなかった。しかし、何回か観察するうちに頭を指で搔く癖があることに気付き、その試験要員の髪を超純水で洗い、その洗浄液を筆者自身のそれと比較した結果、亜鉛が高いことが判明した。この試験要員の整髪料や洗髪料等を調査したところ、シャンプーに亜鉛が含まれていることが明らかとなった。この他にも制汗剤に含まれる銀をはじめとして様々な化粧品に含まれる金属化合物の汚染事例があるが、これらの汚染要因は服装や操作、こまめな手の洗浄等の規制によりある程度防止することができる。

表1. 吸着マットに吸着された金属元素

元素	ng/cm ²	元素	ng/cm ²
Fe	1800	Mn	28
Na	1500	Cr	27
Ca	930	Sr	22
Zn	870	B	15
Al	400	Cd	<10
Mg	260	Co	<10
Si	200	Li	<10
Cu	81	Bi	<10
Ni	73	Mo	<10
Ba	58	V	<10
Pb	49	Be	<10
K	33		

2.2 靴底に付着して持ち込まれる汚染物質

最近では、試験室の入り口に靴底の汚れを室内に持ち込ませないため吸着マットのが設置が普及している。試験室入り口に設置したゴム製吸着マットに吸着された元素の測定例を表1に示す。

サンプリングは、使用済みのマットの中央部分10cm四方を被検試料とし、事前に酸で洗浄し超純水を染込ませたる紙(5種C)で拭きとることにより行った。そのろ紙を酸で洗浄して金属を抽出し、ICP発光分析で定量した。こうしたデータを解析することで汚染源を特定することが可能となる。表1の場合、多く捕獲された元素はセメントの成分である SiO_2 、 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 CaO 、 MgO あるいは天井材として使用される石膏ボード成分、アルミサッシ成分等と一致する傾向にある。また、塗料の成分である亜鉛もしばしば検出される。鉄については意外な盲点があり、シューズボックスが汚染源である場合がある。試験室に入る際、通常室外履きと室内履きを履き替えるが、同じシューズボックスに両方を入れる場合、金属製のシューズボックスでは、雨に濡れた室外履きを入れておくとかなり早い時期から錆が発生し、室内履きに金属汚染が伝播してしまうので無視できない対策点といえよう。一方、陰イオンについて検証したところ、表2に示す陰イオンが検出された。

表2. 吸着マットに吸着されたイオン

イオン	ng/cm ²
Cl^-	7000
NO_3^-	3500
SO_4^{2-}	5700

サンプリングは、使用済みのマットの中央部分10cm四方を被検試料とし、事前に超純水で洗浄し超純水を染込ませたる紙(5種C)で拭きとることにより行った。そのろ紙を超純水で洗浄しイオンを抽出して、イオンクロマトグラフで定量した。

観測されたイオンは、 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} など最も一般的なイオンばかりであった。これらの実験は、いずれもマット洗浄後5日間放置後のデータである。

以上のように、試験室には常に外部からの汚染が侵入する危険性があるため、試験要員は可能な限り汚染物質を持ち込まないよう心掛けることが重要である。吸着

マット等の使用は大変効果的であるので、分析施設の各所入口に設置されるよう推奨したい。

2.3 新設のクリーンルームやクリーンベンチから発生する汚染物質

一般の試験室のみならずクリーンルームでも室内で表1の上位7元素が観測される。過去の経験では、新設したクリーンルームでは稼働当初にこれらの元素が顕著に観測されることが多い。例えば、エア・パーティクル・カウンタでは何らの異常も検出できないが、放置法で金属汚染を調査すると前記の元素が観測され、日を追うごとに減少するもののその速度が極めて遅いといった現象に遭遇することがある。即ち、エア・パーティクル・カウンタでは検出できない更に微細な塵埃が室内に残留しているため、このような状態がしばしば見られる。設置工事中に飛散したコンクリートや金属等の極微粉末が壁に付着し、これらが徐々に剥がれ落ちてくるものと考えられ、その対処として壁を洗浄したり拭き掃除すれば汚染レベルを劇的に下げることができる。

図1は、クリーンルーム設置後運転を開始し、室内のカルシウムが低下していく過程を測定したグラフである。初回の測定値を100として放置法により経時変化を追った。Caの低下が遅いため、15日目に壁の洗浄を実施したところ顕著な効果が認められ、Ca汚染が壁に付着した成分に起因していることが判明した。

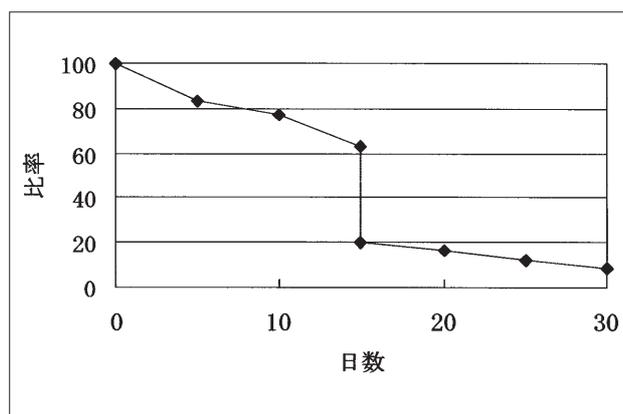


図1. 新設クリーンルーム内のCaの変化

同時に他の成分も似た挙動を示した。この結果は、ICP質量分析装置が、クリーンルームに1台設置されている状況下での観測例であり、室内に各種装置、機器が更に設置されている場合には、更に複雑な観測結果とな

ろう。クリーンルームだから安心して運用できるわけではないという事例であるが、施設の適合性評価がいかに重要であるかお分かりいただけよう。

3. 室内で発生する汚染

我々の試験室では、試薬の分析を中心とした試験を実施している。試薬の試験では塩酸、硝酸を用いた比色、比濁分析あるいは加熱分解、蒸発乾固等の操作が頻繁に行われている。当然のことながら、これらの酸による室内汚染が気になる点である。そこで300 mLのガラス製ビーカーに酸性ガスの吸収液として超純水300 mLを入れ、試験室に放置した後その吸収液をイオンクロマトグラフで分析し、その経時変化を追った。

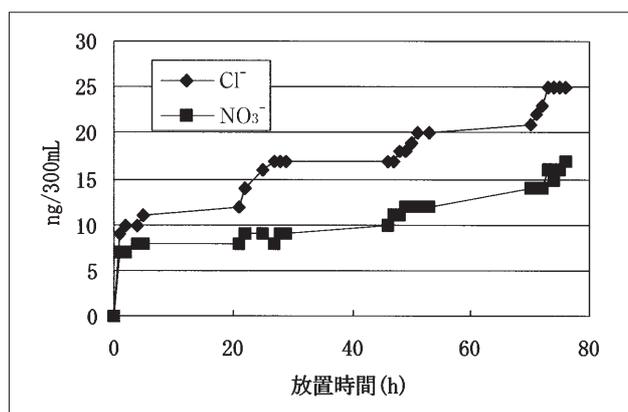


図2. 試験室内の陰イオンの変化

図2にその結果を示す。Cl⁻、NO₃⁻の吸収量、即ち室内の塩酸や硝酸ガスによる汚染は、時間の経過と共に進行していることが分かる。この汚染は作業時間帯(日中)に集中し、作業をしていない時間帯(夜間)では少ない様子が伺える。

図2中、初期の段階では、イオン吸収量が多く認められたが、これはハングリーウォーター(炭酸を含めイオンを含まない水)の効果によるものと思われる。

また、試験室のガラスは、長らく清掃を怠ると白くなることがある。溶剤を多く使用する試験室では別であるが、ほとんどの場合、試験室で使用した塩酸、硝酸、酢酸のアンモニウム塩が付着していることが多い。図3はガラスの付着物を超純水で洗い、その液をイオンクロマト

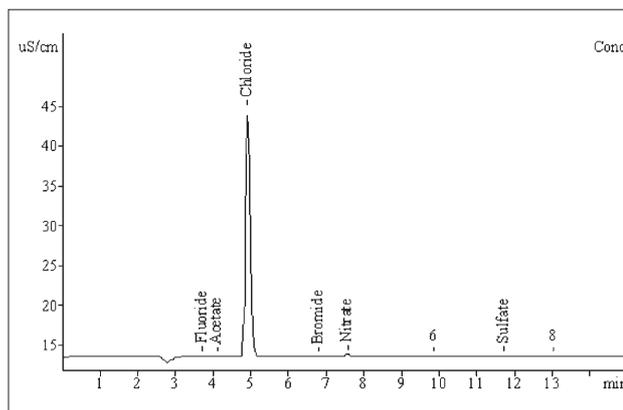


図3. ガラスに付着した成分のイオンクロマトグラム

グラフで分析した結果である。先にも述べたように試薬の試験では塩酸とアンモニア水の使用が多く、その状況によく一致した結果が得られた。

また、稀にはあるが、分析機器間での汚染も起きる。実際にイオンクロマトグラフのすぐ脇にpH計を設置した場合、塩化物イオンのブランクが上昇するケースがある。これは、pH電極の内部液及び保管液が塩化カリウム溶液であることに起因する。塩化カリウムは、乾燥再結晶化の際、温度条件及び空調(気流)によっては綿菓子のような軽い結晶となり飛散しやすくなる。試験室において分析装置間の交差汚染にも注意を払う必要があり、その際には空調(気流)と配置を関連付けて考慮しなければならない。

4. 各種材質からの汚染

上述の各項では、環境からの汚染について述べたが、容器や器具等試料及び試薬と接触する材質からの汚染は、それを上回るインパクトを与える。最近では頻繁に使

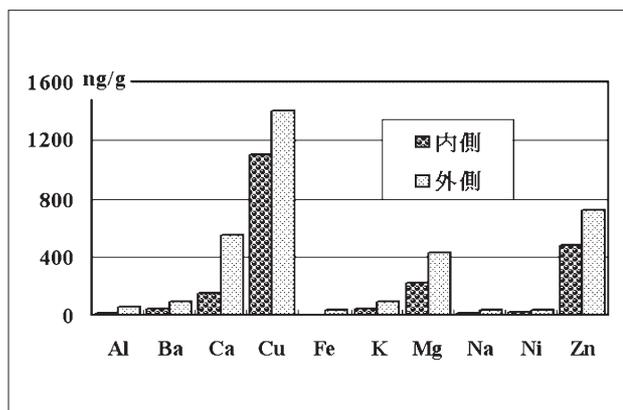


図4. 市販のPFAボトルの金属不純物測定例

用されるようになったPFAに代表されるふっ素樹脂製の容器は、清浄な材質と錯覚されやすいが、実際には多くの不純物を含んでいる。

図4は、市販のPFA製ボトルの側面を切り取り、切り取った試料を表面側と裏面側に二分して切り離し、それぞれを分解処理しICP質量分析で金属を測定した結果である。

一般的にふっ素樹脂製容器は真鍮製の金型で成型されるため、その成分である銅及び亜鉛を取り込んでしまう。特にボトルの外側に多く残存していることがわかる。さらにPFAは多孔質であるためガス透過性が強く、容器の内側だけを洗浄しても外側付近に残存する金属不純物であっても容器の内側に取り込まれる可能性が残り、信頼できる清浄度を維持しにくい傾向を有している。

表3. 容器成型前のPFA粉末に含まれる金属不純物測定例

元素	ng/g	元素	ng/g
Al	7	Li	<5
Ba	<5	Mg	28
Ca	110	Mn	<5
Cd	<5	Na	22
Co	<5	Ni	5
Cr	21	Pb	<5
Cu	6	Sr	<5
Fe	23	Tl	<5
Ga	<5	V	<5
K	<5	Zn	9

表3は、成型前のPFA粉末の測定例であるが、図4の成型された市販品の測定結果と比較すると、成型時の汚染の状況が良く理解できよう。

これらの汚染状況は、金型の管理や成型品のバリ取り

でどのような処理がなされているかなど、複数の要因に支配されている。したがって、ふっ素樹脂製容器は、購入後の洗浄が不可欠な要素である。例えば、マイクロウェーブ分解装置の分解容器はPFAが主流であり、 $\mu\text{g/g}$ レベルの分析には重宝であるが、 ng/g 付近からの高感度分析では、図4に示すようなブランクの高さを示すので、なかなか信頼性のあるデータが得られず苦労することが多い。その模範として、pptレベルで金属不純物を保証している市販の超高純度酸では、PFA容器に充填して供給されている事例が挙げられるが、このようなテフロン汚染データを踏まえ、大変高度な容器の洗浄技術が投入され、品質が維持されているということがよく理解できよう。一方、ポリエチレン製容器では各種の添加剤が使用され、それらが汚染の要因となることが知られている。

表4にポリエチレン容器に含まれる金属不純物の測定例を示す。カルシウム及びマグネシウムが最も多く含まれ、またアルミニウム及びけい素もしばしば検出される。即ちチグラナーナター系の重合触媒(けい素担体にアルミニウム及びチタン化合物を含む触媒)の残留やさらには着色剤として用いられる銅フタロシアニン(青)、チタン(白)、クロム(緑)等の影響によるものである。これら一連のデータは、各材質に含まれる不純物の例であるが、分析に各種材質の容器や器具を用いる場合、こうした背景を理解し、適切な処理や目的にあった使い方が肝要である。

また、分析の前処理に用いる白金製のろつぼ及び蒸発皿では、しばしば研磨剤による汚染が問題となりやすい。もともと白金器具は成型加工の直後では市販品ほどの輝きは無く、これを研磨して仕上げられるため、研磨剤の残留が分析結果に影響を及ぼす場合がある。アルミニウムのブランクがなかなか下がらないという状況に悩まされた方も多いかと推察しますが、白金器具でもこのような影響の除去を考慮しなければならない。

表4. 市販のポリエチレン容器に含まれる金属不純物測定例

ng/g	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Al	650	93	200	70	1700	40000	2200	29000	1100	12000
Ca	100	90	110	230	200	320	6700	540	310	16000
Fe	100	66	47	33	54	52	77	91	34	120
Mg	53	30	320	88	1500	44000	2400	41000	1400	5200
Na	10	10	200	200	500	450	900	580	430	3700
Si	150	120	190	730	920	930	390	1700	290	1200

さらには加熱器具からの汚染も無視できない事例がある。熱伝導型のホットプレート市販品の多くは本体がアルミニウムで作られており、非常に細かい錆が徐々に発生し、特に本体内部にファンを装備している場合では、微量の汚染を噴出するような状態で引き起こしやすい。こうした場合、金属部の表面を樹脂等でコーティングしたり、本体の材質を樹脂製のものに換えるなど、また表面がガラスセラミック製の赤外線ホットプレートやハロゲンランプホットプレートなどに換えることで、より汚染の少ない分析が可能となる。

5. 分析による汚染

水酸化ナトリウムなどのナトリウム塩中の金属不純物を測定する場合、主成分を除去せずに各種の試料をICP質量分析装置に導入することがあるが、そのような場合白金製のスキマーコーンを使用すると、熱伝導の関係で2時間ほどでスキマーコーンの穴がナトリウム塩で塞がれてしまう。その対策としてニッケル製のスキマーコーンを使用することとなるが、この場合、ニッケル製スキマーコーンをステンレス製スキマーベースと組み合わせると銅の汚染が発生し、時として銅の測定が困難となることがあり、このような場合にはスキマーベースを真鍮製にすると汚染が発生しなくなる。このように装置自身の部品の材質によって特異な汚染があるので配慮を要する。また導入系からスキマーベースに至る部品を新しいもので交換し次の測定を実施すれば、効果的に前の試料の影響を除くことができるほか、ICP発光分析の場合では、試料導入前に界面活性剤を注入して汚れを落とす等のテクニックも効果があるので推奨したい。

5. おわりに

分析は、常に汚染との戦いといった一面を持っており、その目的を達成するためにいかなる環境下でどのような器具や試薬を用い、いかなる方法で行なうかを確実なものとするのが望ましい。しかし、実際の分析では予期できない汚染に直面することも多く、それらをどれだけ多く認識できるかが重要なポイントとなる。さらには、試験方法の妥当性確認を実施し、かたよりのない結果が得られることを事前に確認しておくことも大切である。

高感度アンモニア測定試薬の開発 ※16ページより続く

に、平成16年10月からは専用の検体前処理試薬(シカリキッドNH₃除蛋白液)を加えて販売中である。

酵素サイクリング法は本稿で紹介した以外にもELISA¹⁰⁾やバイオセンサー¹¹⁾などへの応用が検討されている。また、近年盛んに研究されている μ -TASのような微小空間での微量試料の分析にも有効と思われる。このように酵素サイクリング法は超高感度検出法の一つとして応用性が高いと考えている。

最後に、本試薬の開発にあたり、ご懇篤なるご指導を頂いた旭化成株式会社 診断薬事業部(現旭化成ファーマ株式会社)の皆様に厚くお礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 上代淑人監訳: ハーパー・生化学 原書25版, 343-350, 2001, 丸善.
- 2) Medical Practice編集委員会編: アンモニア窒素 臨床検査ガイド2001~2002, 234-236, 2001, 文光堂.
- 3) 伏見了, 国沢貴久美, 林長蔵: 採血後のアンモニア上昇に対する研究, 臨床化学, **8**: 311-319, 1979.
- 4) 奥田拓道, 藤井節郎: 血中アンモニア直接比色定量法, 最新医学, **21**: 622-627, 1966.
- 5) 伏見了, 木下憲明, 林長蔵: ドライケミスリーの原理とその評価, Medical Technology, **15**: 984-986, 1987.
- 6) Mondzac A, Ehrlich G E, Seegmiller J E: An enzymatic determination of ammonia in biological fluids, *J Lab & Clin Med*, **66**: 526-531, 1965.
- 7) 山田満廣, 小味潤智雄: 新しい酵素反応系を用いた液状による血液中アンモニアの測定法に関する評価, 日本臨床検査自動化学会誌, **25**: 207-212, 2000.
- 8) 美崎英生: 酵素サイクリング法による高感度測定法の原理, 検査と技術, **27**: 973-980, 1999.
- 9) 加藤尚彦: 基礎生化学実験法(阿南功一ら編) vol 6 生化学的測定, 101-146, 1976, 丸善.
- 10) Johannson A, Stanley C J, Self C H: A fast high sensitive colorimetric enzyme immunoassay system demonstrating benefits of enzyme amplification in clinical chemistry, *Clin Chem Acta*, **149**: 119-124, 1985.
- 11) Hasebe Y, Uchiyama S: Chemically amplified adrenal medulla hormone sensor, based on substrate recycling using tyrosinase and l-ascorbic acid, *Anal Sci*, **9**: 855-857, 1993.

ドイツの切手に現れた科学者、技術者達 (10) イマヌエル・カント

Scientists and Engineers in German Stamps (10). Immanuel Kant

筑波大学名誉教授 原田 馨
KAORU HARADA

Professor Emeritus, University of Tsukuba.



ドイツの有名人普通切手全15枚中の1枚。
イマヌエル・カント、哲学者、自然科学者、1724-1804。

イマヌエル・カント

イマヌエル・カント (Immanuel Kant, 1724-1804) 哲学者。

東プロシアのケーニヒスベルク (Königsberg, 現在のロシア領カリニングラード、Kaliningrad) に生まれた。カントの両親はルッター派の敬虔主義派に属した人々であり、この家庭環境がカントの哲学の成立に影響を及ぼした。ケーニヒスベルク大学で哲学、神学、数学、物理学を学んだ後、同大学で教え、1770年哲学の教授となり、亡くなるまでケーニヒスベルクを離れることはなかった。彼はドイツ観念論哲学の創始者とされている。

カントの哲学は前期と後期に分かれる。彼は学生時代から自然科学に親しんでおり、ニュートンの物理学にも通じていた。これらの知識を発展させた自然哲学が、カントの前期哲学の主題であった。前期の代表的著作に「天体の一般自然史と理論」(1755)があるが、ここに描かれた太陽系生成論は明らかにニュートンの物理学の上に立っている。カントの太陽系生成のメカニズムはいわゆるカント・ラプラス (Laplace, 1748-1827) の星雲説と呼ばれるように原始太陽系星雲が次々と組織化を起し太陽系が生成したと考えた。カントはこのように星雲説の発案者として知られている。ラプラスに先んじて提出されたカントの星雲説は定性的であり、ラプラスの説は数理的ではあるが、その物理的内容は同じである。同様な星雲説は現在の物理学的太陽系生成論に於ても受け入れられている。これについては後に述べる。

カントの哲学の後半は種々の批判哲学であり、先ず認識の問題から始まり自然、人間の自由意志、道徳、神などの重要な諸問題を含む合理的哲学体系の批判的創造を試みた。以上のようにカント哲学後期は観念論的批判哲学であり、彼はドイツ観念論哲学の創始者であった。

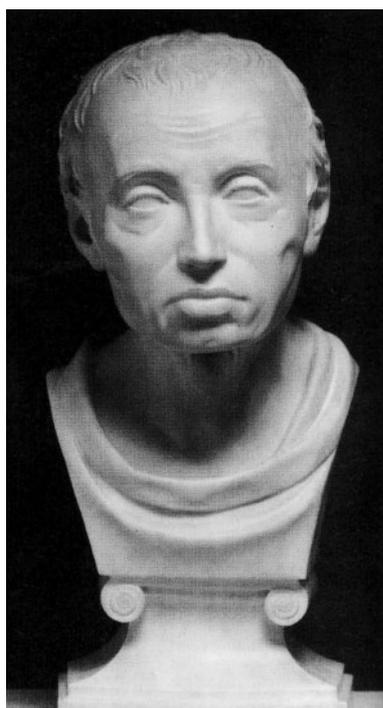
現在の太陽系像は次のようなものである。中心に巨大な太陽があり、そ

のまわりに水星、金星、地球、火星の内側惑星があるが、これらの惑星は岩石と鉄よりなる天体であり、密度が高い。これらの内側惑星の外側には木星、土星、天王星、海王星、冥王星がそれぞれの軌道をまわっているが、これらはガスと氷よりなる巨大な天体で低密度である。また太陽から惑星への距離には「ティティウス・ボーデの法則(Titius-Bode)」が存在し太陽から惑星への距離がほぼ等比級数になっている。もし太陽系生成論が提出されたならば、その生成論は現在の太陽系が持つ力学的特性の多くを説明できなければならない。現在太陽系は上述のように塵を含む巨大な星間ガスから生成したと考えられている。いろいろな条件設定の細かい点を無視して現在の太陽系生成論の大略を述べると次のようになる。

巨大な塵を含むガスが重力により凝集をはじめるとガス体は回転をはじめ、凝集が進むとガスと塵は回転し凝集し原始太陽系星雲となり赤道面に沈澱する。沈澱した物質の質量が増大すると重力不安定を起し、塵の層は分裂凝集して無数の微惑星を生成する。これらの微惑星は更に衝突を繰り返して凝集し原始惑星へと成長する。ガス塵の凝集のために内側惑星に相当する部分の温度は上昇し、ガスは原始太陽系の外側に追いやられる。このようにして内側惑星はガスのない高温の下で生成し、外側惑星はガスの多い低温で生成したので、内側惑星は揮発性物質に乏しく、外側惑星はガスと揮発性物質に富む。このように現代の太陽系生成論により、内側と外側惑星の組成と構造の差などについて説明することができる。火星と木星の間にある小惑星帯は惑星生成の過程で生まれた原始惑星、または原始惑星になり切れないもの、または原始惑星が破壊された様々な段階のものであり、原始太陽系生成の諸段階の残存物であると考えられる。それ故小惑星帯から飛来したと考えられる隕石は太陽系生成の初期の諸段階の残存物であり、太陽系生成過程の化石であると見做すことができる。隕石は小惑星帯から飛来するものばかりでなく、月からのものもある。最近火星から飛来してきた火星隕石と考えられるものが20個あまり発見された。

このようにカントにより提唱された太陽系生成の星雲説は現代に復活し、現在太陽系生成の諸段階に関する物理的に詳細な研究が進行しつつある。

※本稿に掲載の写真は全て著者の撮影したものである。



大理石のカントの頭部の像



22ページの切手のポートレートの原図に相当する肖像画



大学教授の盛装して講議するカントの立像

ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(10) イマニュエル・カント



東ドイツが1974年に発行した有名人切手5枚の内の1枚、カント。

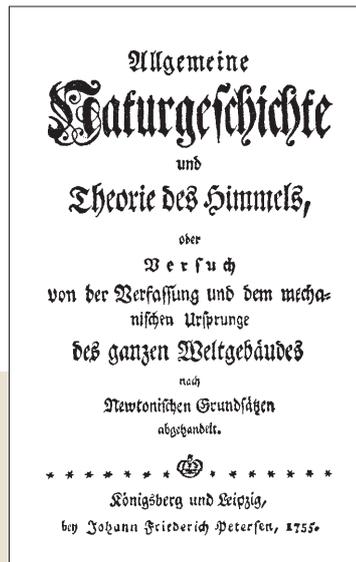


カントの誕生200年記念切手1974年。西ドイツが発行。



カーニンググラード(ケーニヒスベルグ)にあるカントの墓碑。有名な碑文が刻まれている。「それを思うことが、たび重なれば重なるほど、また長ければ長いほど、ますます新たな、かつますます強い感謝と崇敬の念とをもって、心をみたすものが二つある。わが上なる星空と、わが内なる道徳律とである。」

カントの宇宙創造論は星雲説の最初のものであった。星雲説はラプラスによって物理的に論ぜられたのでカント・ラプラスの星雲説と呼ばれる。



カントの規則正しい日常生活はよく知られている。散歩においても勿論そうであった。

表紙写真

水芭蕉 (サトイモ科ミズバショウ属)

開花情報により、この季節の尾瀬の大変な混雑ぶりが名高いように、水芭蕉は高山植物の中で最も親しまれているものの一つでしょう。これは福島県・駒止湿原での撮影ですが、仏炎苞(ぶつえんほう)葉が変形した花びらに見える白いモノが一株から2つ出ているのは、他ではあまり見られない特異なものとなりました。

(写真文 北原)

編集後記

草木が日々その緑を深めるこの季節。今年は、空梅雨が危ぶまれるが、この時期に降り注ぐ雨は、やはり自然の恵みには無くてはならない。山野の草木の姿、形、色、香り、そして食味などは、いにしえから変わらず同じ趣を醸し出し、人々に和みを与え、また食を通じて健康にも深く関わってきた。いわゆる天然物の化学、なかでも光合成は素晴らしい営みである。環境に優しい最高の技術といえる。これを極めるには、まだまだ自然の神様から教わる

ことが多い。それゆえ多くの人達が、自然の科学に畏敬の念をもって接し、これを解明する夢を追い続けているのだと思う。初夏の大地と雨と陽の恵みを受けて、勢いよく成長する草木の中は、化学のお手本の塊のようなもの、自然の不思議と脅威を感じつつ、また楽しい観察のし方があることでしょう。ケミカルタイムズも、研究者のご支援を得て、そのような夢を解きほぐす情報を一つでも多く読者にご紹介できればと願っています。(古藤記)



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 古藤 薫 平成17年7月1日 発行