

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. Cica CHEMICAL TIMES

2008 No.1 (通巻207号)

ISSN 0285-2446

新年を迎えて	代表取締役社長 野澤 俊太郎	2
理想のHPLC用ODSカラムを求めて	須藤 良久	3
検査や化学療法を混乱させる薬剤耐性菌の狡猾な耐性誘導機構 – グラム陰性菌の耐性誘導を中心として –	花木 秀明 久保 亮一	11
新・私の古生物誌(4) – アンモナイトの進化古生物学(その1) –	福田 芳生	17
ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(20) フリードリッヒ・アウグスト・ケクレ・フォン・シュトラドニッツ	原田 馨	22
編集後記		24



新年を迎えて

代表取締役社長 野澤 俊太郎



新年あ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、ならびにご執筆の先生方におかれましては、さぞかし良いお正月をお迎えになられたことと心よりお喜び申し上げます。

亥年にあたる昨年、能登半島沖、三重県中部、中越沖地震の被害に遭われた皆様には心よりお見舞い申し上げます。今年こそ平穏無事な年でありますようお願い申し上げます。

奇しくも『偽』の年と表現された昨年でしたが、名高い多くの老舗が、不祥事によりその信頼を一夜にして失墜し事業継続をも危うくするなど、企業人として身の竦む思いを禁じえない年でもありました。

長期低成長経済を経て、気になる格差を伴いながらも何とか成長が維持され、最近の話題でも再生医療の研究分野で、皮膚など体細胞からクローン技術を使わなければ不可能だと思われていたES細胞に似た細胞（マウス）が作成され、これからの人の再生医療に利用できるのではないかと希望に満ちた成果が報じられるなど、国民の間にもほのぼのと未来を語り合える明るい出来事にも恵まれました。21世紀の子年の新年を迎え、是非にも明るく輝かしい年になるよう期待しています。

わが国の経済環境にあっては、足元では中国をはじめとする新興国の高い成長がもたらす輸出関連企業群の好調さが持続し、景気は堅調さを維持していると言わ

れるものの、米国の信用力の低い個人向け住宅融資（サブプライムローン）問題を契機とする米国景気の減速懸念の台頭、欧米金融機関を中心とする巨大な損失額のスパイラルな増加、高値で推移を続ける原油価格、円高ドル安に転じた為替相場など、わが国のプラス成長を脅かしかねないリスク要因が存在し、我々にあっても少なからずその影響を受けておりまだまだ油断できぬ状況と申せましょう。

弊社では、関東グループの総合展開力の強化、技術力と総合力の結集、CSRの取組み強化、将来を見据えた投資の断行、海外戦略の展開らの施策を掲げ、社員一丸となり邁進してまいりました。長年のやり方・考え方に囚われず、発想の転換を図り、新しいものに挑戦しようとする新たな時代への心構えであります。「我々は未来を考え、新しいものへの挑戦を図り、社会に対し積極的に貢献する」と定めた弊社経営理念は、社会的責任を形にしていく弊社のCSR活動の精神でもあり、より具体的な活動として今後とも積極的に展開してまいります。科学の進歩を支える化学薬品メーカーとして、業界の先駆者たる誇りを持ち、最上の品性と、最高の権威と、最大の努力をもって新たな子年がよき年になりますよう総力を結集し新たな年にチャレンジいたします。

皆様におかれましても、この一年が光輝に満ちた幸多い年でありますよう祈念し、新年のご挨拶といたします。

理想のHPLC用ODSカラムを求めて

Research and Development for Ideal ODS Column of HPLC

財団法人 化学物質評価研究機構 東京事業所 クロマト技術部 須藤 良久
YOSHIHISA SUDO

Chromatography Department, Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo

1. 緒言

オクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲルを代表とするシリカゲル系逆相充填剤は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のための固定相として最も広く使われている。その理由は、機械的強度が高い、理論段数が高い、種々な修飾基が導入でき汎用性が高い、比較的値段が安い、などが挙げられる。

逆相HPLCの保持機構を説明するのにソルボホビック (疎溶媒性) 相互作用^{1, 2)}がよく用いられる。このモデルによると、溶質と非極性固定相との間の疎水性相互作用よりも、溶質と極性移動相との間の反発が、溶質と固定相との会合を引き起こすとしている。従って、中性分子であれば、その保持容量は疎水性 (例えば logPow がその指標になる) と比例し、logPow が分かれば保持容量が推定できる。しかし、水と混合する有機溶媒が異なれば溶質によって反発力が異なる。このため分離を改善するには、有機溶媒の種類を換えるのが一つの方法となる。特に、水-アセトニトリルあるいはメタノールの混合溶媒にテトラヒドロフランを少量添加すると溶出パターンが大きく変化することはよく知られている。

このように逆相HPLCの保持機構は、比較的単純である。しかし、それを複雑にしている大きな要因は残存シラノールとシリカゲル中の金属不純物である。これらを克服して、どんな物質でも誰でも容易にHPLC分析できるカラムを創ることが私どもの開発コンセプトである。

2. ODSが抱える問題

2.1 残存シラノール

シリカゲル表面のシラノールには孤立シラノール、ビシナル (会合した) シラノール、ジェミナルシラノール (図1) の3種類があるとされている³⁾。孤立シラノールの多いシリカゲルか

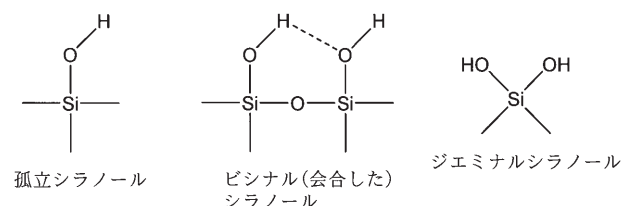


図1 シリカゲル表面のシラノール基

ら合成したトリメチルシリル化シリカゲルは、塩基性化合物との相互作用が強く、しかもトリメチルシリル基が加水分解し易い。一方、ビシナルシラノールがシリカゲル表面に均一に分布しているシリカゲルから合成した充填剤は、塩基性化合物に対する吸着性が低く、加水分解され難いと報告されている^{4, 5)}。このように基材シリカゲルの性質がシリカゲル表面を化学修飾してできた充填剤の性質に影響を与えることが明らかにされており、このことがシリカ系充填剤のメーカー間あるいはロット間のばらつきの原因の一つとなっている。

代表的逆相充填剤であるODS化シリカゲルは図2及び3に示す手順で合成されるが、シリカゲルを充分ODS化し

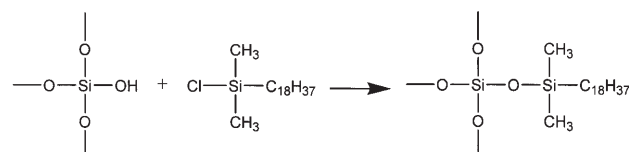


図2 ジメチルオクタデシルクロロシランを用いたODS化

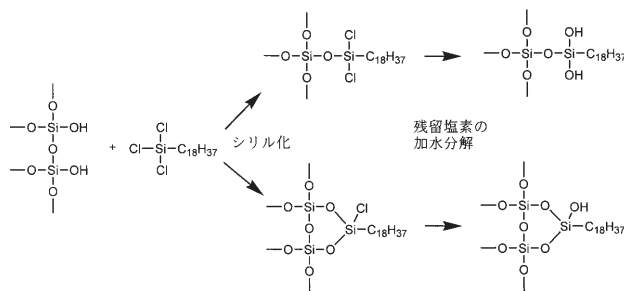


図3 オクタデシルトリクロロシランを用いたODS化

た後も、シリカゲル表面にはシラノール基が残存し⁶⁾、保持機構に影響を与える^{7, 8)}。残存シラノールは、塩基性溶質との親シラノール相互作用によって高い選択性を発揮するため、分離に寄与することが報告された⁸⁾。しかし、塩基性化合物の逆相HPLCにおいては、ピークのテーリング及び再現性の低下が生じ、予期できない長い保持時間の原因となる。この残存シラノールの影響を除くため色々な研究が行われてきた。溶質と残存シラノール基とのこの好ましくない相互作用は、移動相修飾剤の使用、あるいは固定相のエンドキャッピングによりある程度抑制できる。

移動相に各種のアミンを添加することによりピークのテーリングは改善するが⁹⁻¹²⁾、この改善はアミンがシラノール基を封鎖することによると説明された^{8, 13, 14, 15)}。酢酸アンモニウムもシラノールの抑制剤として使用できるとされた¹⁶⁾。また、塩基性溶質と移動相に添加されたアルキルスルホン酸塩とのイオンペアの形成によっても、塩基性溶質の残存シラノールへの吸着を防ぐことができる^{8, 14, 17)}。

一方、ODS化されたシリカゲルは、残存シラノールを除くためにトリメチルシリル化による「エンドキャッピング(二次シリル化)」が施されている。エンドキャッピング剤としては、トリメチルクロロシラン(TMCS)及びヘキサメチルジシラザン(HMDS)が一般に用いられてきた^{18, 19)}。HMDSによるエンドキャッピングは塩基性化合物の分離に効果的であり、水酸基を持った化合物にはTMCSがよいという報告もある²⁰⁾。N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide^{21, 22)}、Trimethylsilylphosphine²³⁾あるいはTrimethylsilylimidazole²⁴⁾を用いても効果的にエンドキャッピングできるとの報告もある。また、シリカゲルのODS化の前に、全シラノールの5%をトリメチルシリル化することにより、高い効率をもつ充填剤が得られること²⁵⁾、またダブルエンドキャッピングが有効であるという報告もある²⁶⁾。しかし、これらの方法では残存シラノールを完全にはエンドキャッピングできないため、塩基性溶質のHPLCでは移動相へのアミン類などの抗テー

リング剤の添加が欠かせない。残存シラノール基の数と性質は制御することが困難であるため、塩基性化合物の吸着に関するロット間差をなくすためには残存シラノールを全てエンドキャッピングするしかない。

2.2 シリカゲル中の金属不純物

金属不純物を多く含んだシリカゲルから合成したODSは、塩基性溶質および錯体のピークのテーリングをより強く示すことから、シリカゲルに含まれる金属不純物も、ODSにおける二次的相互作用の原因となるとみなされている^{27, 28)}。また、シリカゲル表面の金属不純物が吸着活性中心を形成していると報告されている²⁹⁾。一方、シリカゲル中の金属不純物はシラノールの酸性度に影響すると考えられた³⁰⁻³³⁾。シリカーアルミナのような二成分系の金属酸化物の多くが酸性を示す³⁴⁾ことは、シリカゲル骨格中の金属不純物がシリカゲルの酸性度を高めることを示唆している。酸性のシラノールは塩基性溶質と好ましくない相互作用をする^{4, 5, 35)}。よって、塩基性溶質と金属不純物の相互作用は、直接的ではなく、残存シラノール基を通して起こると考えられる。

ODSの金属不純物と直接相互作用する配位性化合物のHPLC分析においては、移動相に金属イオン³⁶⁾あるいはキレート試薬^{37, 38)}を添加することによって、シリカゲル中の金属不純物の影響を低減できる。しかし、移動相中の添加物は、低波長でのUV検出及びLC/MS測定の影響となる。従って、シリカゲルから金属不純物を取り除く必要がある。このためにODS化前にシリカゲルを酸処理することが行われてきた³⁹⁾。

Verzele⁴⁰⁾は充填剤の金属不純物を除去するためには、シリカゲルを1Nの塩酸で煮沸することを推奨している。そのほか、シリカゲルをEDTAで処理する⁴⁾、ODSをメタノール/塩酸(60/40)で処理する²⁶⁾なども報告されている。しかし、4.4で後述するがシリカゲルの酸処理では完全に金属不純物を取り除くことはできない^{28, 40)}(表4参照)。最近では、高純度なシリカゲルの使用が、好ましくない二次的相互作用の低減に有効であるとされている^{28, 41, 42)}が、高純度シリカゲルも活性な酸性シラノールを持っているとも言われている⁴⁾。そのほか、ポリマー被覆による固定相の調製²⁸⁾、三官能性シラン化剤による固定相の合成も金属不純物の影響を低減すると報告されている⁴³⁾。しかし、これらの方法によっても、完全には目的を達成できない^{28, 43)}。

2.3 シリカゲル及び修飾基の加水分解

担体であるシリカゲル及び修飾基であるアルキルシリル基は水溶液中で加水分解し易い⁴⁴⁻⁴⁷⁾。特に、トリフルオロ酢酸を含む低いpHの移動相における修飾基の加水分解に関して多くの報告がある⁴⁸⁻⁵²⁾。修飾基の立体障害効果によりこの欠点は改善できる。すなわち、より嵩高い修飾基を用いる^{49, 50, 53)}、修飾基の導入を高密度にする⁵²⁾、十分なエンドキャッピング⁵⁴⁾、あるいは担体をポリマー被覆する^{28, 55)}などにより、加水分解に対する立体障害効果を与えることができる。また、シリカゲルの高純度化⁴¹⁾及び前処理^{5, 56)}によってもこの加水分解性を改善できる。

このようにして見て来るとODSの欠点は全て残存シラノールが関係している。従って、エンドキャッピングを完璧にすること即理想的なODSができると考えられる。

3. 新規エンドキャッピングによるODSの欠点の克服

3.1 高温シリル化のエンドキャッピングへの応用

前述のようにシリカゲルの化学修飾(ODS化など)の後のエンドキャッピングは有機溶媒中で行われてきた。一方、ガスクロマトグラフィー用キャピラリーカラムの作製においては、熔融シリカカラム内壁を不活性化するとともに固定相液体のぬれを良くするために固定相を被覆する前のカラム内壁をシリル化する。Welshら⁵⁷⁾はヘキサメチルジシラン(HMDS)を用いて、この反応を300°Cで行うことにより、極性物質に対して極めて不活性なカラムを作成できることを見出した。このシリル化は高温シリル化と呼ばれている。しかし、すでに修飾された表面に残存するシラノール基を高温シリル化する試みは行われていなかった。ODSのエンドキャッピングに高温シリル化が適応できれば、非常に不活性な充填剤が得られるはずである。そこで筆者らはこの考えを検証すべく実験を行った。

3.2 ODSの調製

ジメチルオクタデシルクロロシラン、メチルオクタデシルジクロロシランおよびオクタデシルトリクロロシランを用いて、平均粒径5 μ m、平均細孔径120nmのシリカゲルをオクタデシルシリル化して3種類のODSを調製した。これらをそれぞれODS-1、ODS-2 およびODS-3とする。調製は通常の方法³⁹⁾によった。

高温シリル化によるエンドキャッピングは次の手順で行った。ODS 3 gを内容積30mLのガラス製アンプルに入れ140°Cで4時間真空乾燥した。エンドキャッピング剤2.9mmolをこのアンプルに加えて、容器内を窒素置換した。アンプルの口を溶封し恒温槽に入れ350°Cで24時間加熱した。冷却後トルエンとメタノールで洗浄し140°Cで4時間真空乾燥した。

従来法である液相シリル化によるエンドキャッピングは次の手順で行った。ODS 10 gに乾燥トルエン38 mLとHMDS 4 mLを加え、16時間還流した。その後トルエンとメタノールで洗浄し140°Cで4時間真空乾燥した。

3.3 ODSの評価法

充填剤の評価のためには、クロマトグラフィーによる方法と分光学的な測定が用いられる。ピリジンは残存シラノールと強く相互作用する^{58, 59)}ため、試験物質としてよく用いられる。この相互作用が強いほどピリジンの保持時間は長くなり、またピークテーリングが大きくなる。これらの現象はピリジンと基準物質であるフェノールとの分離係数 $\alpha_{ph/py}$ およびアシンメトリー係数 As により数値で表すことができる。 $\alpha_{ph/py}$ が大きいほど、あるいは As が1に近いほど残存シラノール基の影響が小さいと評価される。 $\alpha_{ph/py}$ は次式で定義される。

$$\alpha_{ph/py} = k_{ph} / k_{py} \quad (1)$$

ここで、 k_{ph} および k_{py} は、それぞれフェノールおよびピリジンのキャパシティーファクターであり、次式で定義される。

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2)$$

ここで、 t_R は溶質の保持時間、 t_0 はデッドタイムである。アシンメトリー係数は次式で定義される。

$$As = b/a \quad (3)$$

ここで、 a はピーク高さの10%の位置におけるピークの前半のピーク幅、 b は後半のピーク幅である。

充填剤のIRスペクトル測定には拡散反射法が用いられる^{4, 5, 60)}。ODSのIRスペクトルからは残存シラノール基の種類および濃度の情報が得られる⁶¹⁾。シリカゲルのIRスペクトルの吸収帯の帰属は文献などに要約されている⁶²⁾。また、シリカゲル表面の修飾基の定量は、拡散反射フーリエ変換FT-IRスペクトルによって得られた吸収バンドの面

積を使用することにより可能である⁶³⁾。

4. 結果と考察

4.1 高温シリル化エンドキャッピングにおける反応温度の効果

ODS-1をHMDSによりエンドキャッピングした場合の反応温度の効果を表1に示す。高温シリル化エンドキャッピングされたODS-1は、液相シリル化エンドキャッピングされたODS-1よりもピリジンの早い溶出、すなわち大きな $\alpha_{ph/py}$ を示した。また、ピリジンのピークテーリングも小さくピーク形状は良好であった。これらの結果は、高温シリル化により固定相の残存シラノールが効果的に減少したことを示している。一方、反応温度が高くなるに従って炭素含量が大幅に減少したが、ピリジンのピーク形状は反応温度の高い方が良く、ピリジンに対する吸着性は低いと判断される。これはODS基がエンドキャッピング剤のトリメチルシリル基により置換されたことを示唆している。表1に示したようにエンドキャッピング剤を用いずに同じ条件でODS-1を加熱した場合には、炭素含量の減少は極わずかであり、このことは炭素含量の減少が主にオクタデシル基とトリメチルシリル基の置換反応が原因であるという考えを支持する。

表1 高温シリル化の温度効果

充填剤番号	エンドキャッピング温度(℃)	k'		$\alpha_{ph/py}$	ピリジンのAs	炭素含量の変化 ^a (%)	窒素含量(%)
		ピリジン	フェノール				
1	250	0.83	2.89	3.48	2.47	+2.0	0.07
2	300	0.86	2.93	3.41	2.47	-8.4	0.10
3	350	0.93	2.91	3.13	2.09	-23.7	0.25
4	トルエン還流	1.40	2.97	2.12	—	+1.9	0.08
5 ^b	350	2.21	2.94	1.33	2.70	-4.3	0.01

ODS化剤：ジメチルオクタデシルクロロシラン(炭素含量17.58%)、エンドキャッピング剤：ヘキサメチルジシラザン(反応温度350℃、反応時間24時間)

a 炭素含量の変化は $(C_1-C_0)/C_0 \cdot 100$ で定義され、 C_0 と C_1 はそれぞれエンドキャッピング前と後の炭素含量である。

b 充填剤番号5はエンドキャッピング剤なしで、充填剤番号3と同じ操作を行った。

4.2 モノ、ジ、およびトリクロロオクタデシルシランから合成したODSのエンドキャッピング効果の比較

エンドキャッピング時に炭素含量が大幅に減少するのは、充填剤の性能および製造ロットの再現性において好ましくない。ところで、ODSのオクタデシルシリル基は酸性移動相中で加水分解されるが、トリクロロシランによって合成されたODS-3は、モノクロロシランによって合成されたODS-1より加水分解されにくいことが知られている⁴⁹⁾。そ

の理由は次のように考えられる。ODS-3のオクタデシルシロキシ基($C_{18}H_{37}Si-O-$)のケイ素原子に結合している2個の置換基は電気的に陰性なオキシ基なので、ODS-3のオクタデシルシロキシ基のケイ素が最も親電子的な攻撃を受け難い。これに対して、ODS-1のオクタデシルシロキシ基のケイ素原子に結合している2個の置換基は、電子供与基であるメチル基なので、ODS-1のオクタデシルシロキシ基のケイ素が最も親電子的な攻撃を受け易い。このことは高温シリル化でも同様であると考えられるので以下の方法で検証した。

モノ、ジ、およびトリクロロオクタデシルシランから合成したODS-1、ODS-2およびODS-3をHMDSにより反応温度350℃、反応時間24時間によりエンドキャッピングした結果を表2に示す。トリクロロオクタデシルシランから得られたオ

表2 3種類のODS化剤で合成したODSの高温シリル化効果

充填剤番号	ODSの種類	k'		$\alpha_{ph/py}$	ピリジンのAs	原料ODSの炭素含量(%)	炭素含量の変化(%)	窒素含量(%)
		ピリジン	フェノール					
3	ODS-1	0.93	2.91	3.13	2.09	17.58	-23.7	0.25
6	ODS-2	0.87	2.82	3.24	2.05	17.79	-11.1	0.20
7	ODS-3	1.05	2.79	2.66	1.93	17.47	+1.6	0.14

エンドキャッピング剤：ヘキサメチルジシラザン(反応温度350℃、反応時間24時間)
各ODSに使用したODS化剤：ODS-1=ジメチルオクタデシルクロロシラン、ODS-2=メチルオクタデシルジクロロシラン、ODS-3=オクタデシルトリクロロシラン

クタデシルシリル基は、高温シリル化においても安定であることが確かめられた。なお、 $\alpha_{ph/py}$ はODS-3が最も小さかった。しかし、HMDSは反応性が高く試薬自身が不安定なためか、反応の再現性があまり良くない。また、充填剤の窒素含量が比較的高く含窒素化合物が生成し残留していることを示している。このため $\alpha_{ph/py}$ の値を底上げしている可能性がある。しかも、この含窒素化合物が充填剤の寿命を短くする可能性もある。

以上のことから、高温シリル化によるエンドキャッピングを行うためには、ODSは三官能性シリル化剤を用いて合成することが望ましく、エンドキャッピング剤としてHMDSはあまり好ましくないと結論付けられた。

4.3 高温シリル化エンドキャッピング剤としてのシクロシロキサン

シクロシロキサン及びポリシロキサンもGC用キャピラリーカラムの不活性化によく用いられる。通常は反応性が低く比較的安定な化合物であるが、キャピラリーカラムの高温シリル化では高い反応率を示す。そこで、シクロシロキサンを用いてODS-3を高温シリル化エンドキャッピングし

た。その結果を表3に示す。HMDSの方がシクロシロキサ

表3 オクタデシルトリクロシランで合成したODS-3の高温シリル化での反応温度効果

充填剤番号	エンドキャッピング 温度(℃)	k'		$\alpha_{ph/py}$	ピリジンのAs	炭素含量の 変化(%)	窒素含量(%)
		ピリジン	フェノール				
8	250	1.75	2.79	1.59	4.53	+4.4	0.03
9	300	1.33	2.51	1.89	1.45	+6.9	0.02
10	350	1.15	2.83	2.46	1.24	+1.0	0.04

エンドキャッピング剤：シクロシロキサン（反応時間24時間）

ンより大きな $\alpha_{ph/py}$ を示した。しかし、アシンメトリー係数Asはシクロシロキサンの方が小さく、また反応の再現性も高かった。さらに、窒素含量はODS-1と比べて大幅に少なく(表1参照)、それが $\alpha_{ph/py}$ に影響した可能性が高い。ODS-3をシクロシロキサンで高温シリル化した充填剤とトルエン還流下でトリメチルシリル化エンドキャッピングした充填剤を充填したカラムのピリジンとフェノールのクロマトグラムを図4に示す。高温シリル化エンドキャッピングした方がピ

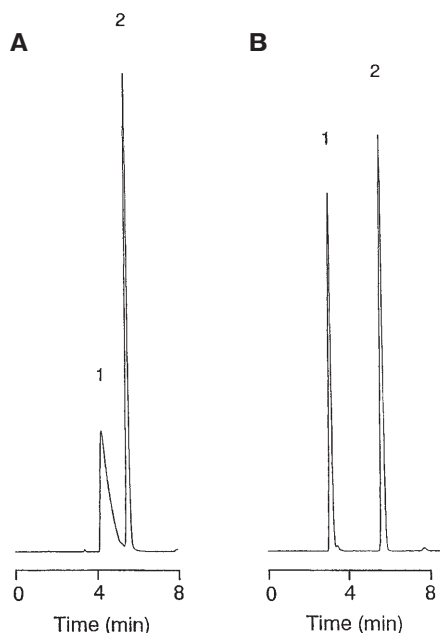


図4 液相シリル化によりエンドキャッピングされたODS-Cl₃ (A) 及び高温シリル化によりエンドキャッピングされたODS-Cl₃ (B) におけるピリジンおよびフェノールのクロマトグラム

HPLC条件 移動相：アセトニトリル/水=30/70, 流速：1mL/min, 検出：UV254 nm. ピーク1：ピリジン, ピーク2：フェノール

リジンのピークが非常に先鋭である。また、両充填剤の残存シラノール基の拡散反射FT-IRスペクトルを図5示す。スペクトルにおけるOHの吸収も高温シリル化エンドキャップ充填剤は非常に小さく、残存シラノールが非常に少ないことを示している。

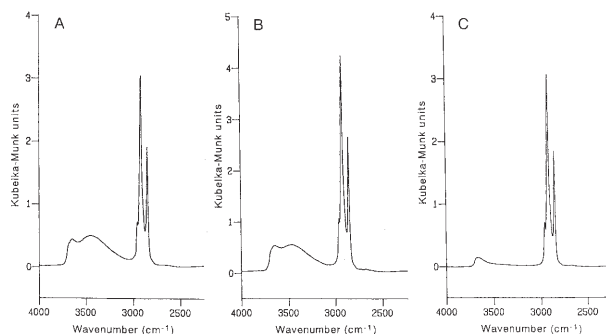


図5 ODSの拡散反射FT-IRスペクトル

(A) エンドキャッピング前のODS-Cl₃
(B) HMDSを用いて液相エンドキャッピングしたODS-Cl₃
(C) 350℃で高温シリル化エンドキャッピングしたODS-Cl₃

4.4 シリカゲル純度の影響と塩酸処理効果

高純度シリカゲルと低純度シリカゲルを塩酸処理したものとし、4種類のシリカゲル(表4)を使って、高温エンドキャッピングしたODS中の金属不純物が塩基性化合物(ピリジン)と配位性化合物(ヒノキチオール)に及ぼす影響を検討した。

表4 高純度シリカゲルと非高純度シリカゲルの塩酸処理結果

シリカ番号	シリカゲル	塩酸処理	シリカゲル中金属含量(μg/g)					
			Na	Mg	Ca	Al	Ti	Fe
11	低純度	なし	54	188	1050	442	132	34
12	低純度	あり	<3	90	440	183	69	5.4
13	高純度	なし	<3	0.33	2.6	<3	0.13	6.4
14	高純度	あり	<3	0.08	0.4	<3	0.07	0.8

シリカ番号11と12は原料シリカゲルが同じものであり13と14が同じものである。

シリカゲルを塩酸処理し高温シリル化エンドキャッピングした場合、ピリジンの吸着に関し原料シリカの純度の影響はわずかであった。これに対して、塩酸処理なしで液相シリル化エンドキャッピングした場合は、低純度原料シリカゲルではピリジンが明確に吸着した(表5)。

表5 高純度シリカゲルと低純度シリカゲルの塩酸処理結果

充填剤番号	シリカゲル ^a	塩酸処理	$\alpha_{ph/py}$			
			ベンゼン/ヒノキチオール ^b トルエン/TMS ^d 高温シリル化 ^e	フェノール/ピリジン ^c トルエン/TMS ^d 高温シリル化 ^e		
18	低純度	なし	— ^f	— ^f	— ^f	1.59
19	低純度	あり	— ^f	— ^f	1.81	3.02
20	高純度	なし	— ^f	1.75	1.18	3.02
21	高純度	あり	1.44	1.76	2.44	3.10

a 表4参照

b HPLC条件 移動相：アセトニトリル/20 mmol/L リン酸 (4/6, v/v), 温度：40℃. 検出：UV 254 nm

c HPLC条件 移動相：アセトニトリル/水 (3/7, v/v), 温度：25℃, 検出：UV 254 nm

d エンドキャッピング トルエン還流下でのトリメチルシリル化

e エンドキャッピング シクロシロキサンを用いた高温シリル化

f 分析時間内に試験物質は溶出しなかった。

Snyderら⁶⁴⁾は、エンドキャッピングによって酸性で活性なシリカの不利な点を完全にカバーすることはできないと述べている。しかし、低純度シリカゲルは金属不純物の影響による酸性のシラノールが含まれていると考えられるが、塩酸処理した低純度シリカゲルより合成されたODSでも、高温シリル化を用いればほぼ完全にエンドキャッピングできることを表5は示している。ODSの性質は、特に塩基性溶質のHPLC分析において、メーカー間だけでなくロット間で異なり、これは主に基材シリカの性質の違いによるということはずでに述べた。しかし、塩酸処理した低純度シリカゲルによるODSを高温シリル化エンドキャッピングしたものと、高純度シリカゲルによるODSを高温シリル化エンドキャッピングしたものの $\alpha_{ph/py}$ 値はほとんど同じである。これは、高温シリル化エンドキャッピングはODSのロット間および製造者間の品質のばらつきの低減に寄与することを示唆している。

配位性化合物のヒノキチオールの結果を表5及び図6に示す。対照物質のベンゼンの保持時間がヒノキチオールよ

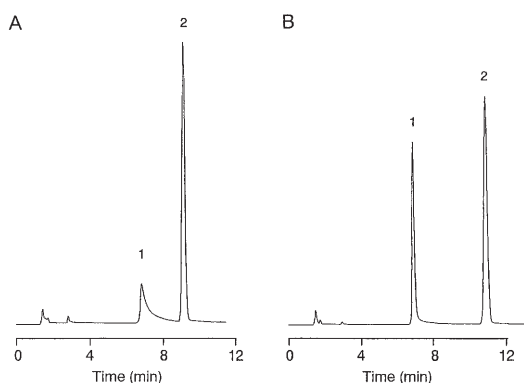


図6 液相エンドキャッピングされたODS(A)及び高温シリル化エンドキャッピングされたODS(B)を用いたヒノキチオールのクロマトグラム
HPLC条件: 移動相, アセトニトリル/20 mmol/L リン酸 (4/6, v/v); 流量, 1 mL/min; 温度, 40 °C; 検出, UV254 nm. ピーク1, ヒノキチオール200 mg/L; 2, ベンゼン2% (v/v).

り大きいと、 α (ベンゼン/ヒノキチオール) が大きいほど吸着が少なくと評価される。低純度シリカゲルでは全ての条件でヒノキチオールは溶出しなかった。高純度シリカゲルを塩酸処理し、高温シリル化エンドキャッピングしたODSが最も吸着の少ないクロマトグラムが得られた。

4.5 耐久性ODSの加水分解に対する安定性

エンドキャッピング修飾基の加水分解に対する安定性について、高温シリル化エンドキャッピングと液相シリル化エンドキャッピングの効果を比較した。酸性の移動相をカラムに通液して、定期的にカラムの $\alpha_{ph/py}$ を測定した。エンドキャッ

ピング修飾基の加水分解に対する安定性を評価した。

高温シリル化エンドキャッピングされたODSの $\alpha_{ph/py}$ 値は液相シリル化エンドキャッピングされたODSより変動が非常に小さく、安定性が高いことが示された。 $\alpha_{ph/py}$ の変動を図7に示す。

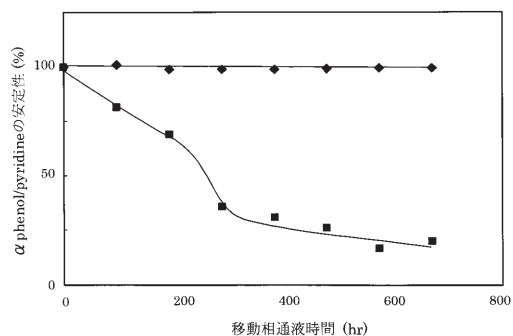


図7 高温シリル化エンドキャッピングされたODS(●)及び液相エンドキャッピングされたODS(■)の酸性移動相中での $\alpha_{phenol/pyridine}$ の安定性

試験条件 移動相: メタノール/20mmol/Lリン酸pH 2.1 (1/1, v/v)
HPLC条件 移動相: アセトニトリル/水 (3/7, v/v), 流量: 1 mL/min, 温度: 25°C, 検出: UV 254 nm, 試験物質: ピリジン及びフェノール

Glajchら⁶⁵⁾は、エンドキャッピングにより導入されたトリメチルシリル基は酸性移動相中で加水分解するので、エンドキャッピングは長期使用には効果がないとしている。しかし、高温シリル化エンドキャッピングによって導入されたエンドキャッピング基は非常に安定であることが確かめられ従来の常識が覆された。高温シリル化によって達成された非常に高い表面被覆率が、ODS表面での加水分解を効果的に阻害すると結論づけられる。また、2%TFA/ (アセトニトリル-水 10:90)、温度80°Cでの加速試験でのナフタレンのkの変化を図8に示した。高温シリル化エンドキャッピングしたODSは修飾基(C18)も加水分解し難いことが示されている。

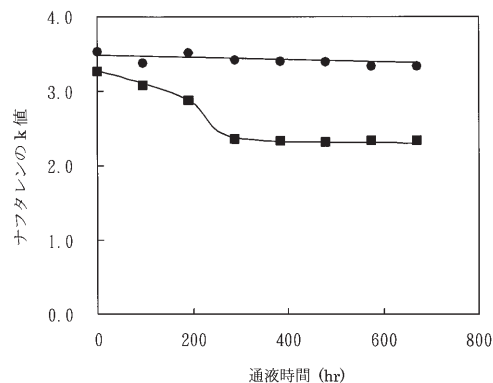


図8 高温シリル化エンドキャッピングされたODS(●)及び液相エンドキャッピングされたODS(■)の酸性移動相中でのナフタレンの保持係数kの安定性

試験条件 移動相: メタノール/20mmol/Lリン酸pH 2.1 (1/1, v/v).
HPLC条件 移動相: メタノール/20mmol/Lリン酸pH 2.1 (1/1, v/v), 流量: 1 mL/min, 温度: 25°C, 検出: UV 254 nm, 試験物質: ナフタレン

5. 新たな挑戦

高温シリル化エンドキャッピングを開発して17年も経つと色々問題点も見えてきた。そこで我々はより効果的な新規エンドキャッピング法を再度開発し、新製品L-column2 ODSを最近上市した。更にエンドキャッピングを徹底したこのODSの特徴は、これまでアセトニトリル／中性緩衝液の移動相では、塩基性化合物はピークがテーリングしたが、この条件でのテーリングがなくなった(メタノール系では他のカラムでもテーリングしない)。一例としてヒスタミン剤類のL-column2 ODSとL-column ODSのクロマトグラムを図9に示す。

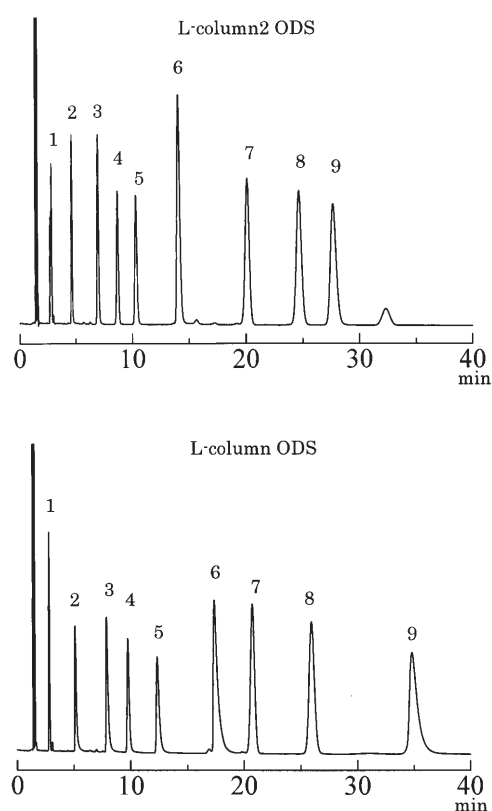


図9 L-column2 ODSとL-column ODSのヒスタミンの分析比較

HPLC条件 カラム：L-column2 ODS 4.6×150 mm(5 μ m,12 nm) and L-column ODS 4.6×150 mm(5 μ m,12 nm), 移動相：アセトニトリル / 25 mM リン酸緩衝液 pH 7.0(40/60), 温度：40℃, 流量：1 mL/min, 検出：UV 220 nm, Inj.vol.: 1 μ L, 試料：1)フェノキシフェナジン(50 mg/L), 2)クロルフェニラミン(50 mg/L), 3)トリプロリジン(50 mg/L), 4) ジフェンヒドラジン(50 mg/L), 5)ジフェニルピラリン(100 mg/L), 6)ホモクロルシクリジン(200 mg/L), 7)ヒドロキシジン(200 mg/L), 8)アミステミゾール(50 mg/L), 9)プロメタジン(200 mg/L)

6. おわりに

高温シリル化によるODSのエンドキャッピングの非常に高い表面被覆効果は、クロマトグラフィーおよび赤外分光法によって明らかにされた。この方法は、塩基性化合物

だけでなく錯体とODSとの好ましくない2次的相互作用の除去にも非常に効果的であった。また、酸性およびアルカリ性移動相中での加水分解に対するODSの安定性を向上させた。特に酸性移動相中では長期間、エンドキャッピング効果は劣化しなかった。さらに充填剤の製造者間およびロット間の品質のばらつきを改善することが示唆された。

残存シラノール基の影響を除去するため、前述のような移動相の工夫がされてきたが、適切な移動相を選択するためには、ある程度の知識と経験が必要である。高温シリル化エンドキャッピングしたODSでは移動相が単純化できるため、初心者でも簡単に逆相HPLCが行えるようになった。また最近、急速に普及しているLC/MSにおいては、不揮発性の移動相添加剤が使用できず、また揮発性の添加剤であってもその添加量は制限される。この分野においても移動相にシラノールマスキング剤を添加する必要のないことは大きな利点である。さらに充填剤の加水分解に対する安定性が向上し、カラムの寿命が延びたため、経済的にも有利である。

従来、残存シラノール基は充填剤の選択性を向上させるために有用であるという意見があり、また近年、充填剤の不活性化は古い問題としてあまり注目されていなかった。しかし、エンドキャッピングの既定の限界が破られ、高度にエンドキャッピングされたODSの優位性が明らかになったことにより、この分野での研究が見直されると思われる。

なお、高温シリル化エンドキャッピングしたカラムはL-columnとしてのみ販売されている。商品化に当たっては反応条件を最適化し、ここで示した性能を更に向上させている。

参考文献

- 1) C. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **125** (1976) 129.
- 2) C. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *Anal. Chem.*, **49** (1977) 142.
- 3) K. K. Unger, Porous Silica, *Elsevier, Amsterdam* (1979) p.7.
- 4) J. Kohler, D. B. Chase, R. D. Farlee, A. J. Vega and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **352** (1986) 275.
- 5) J. Kohler and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **385** (1987) 125.

- 6) K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam, 1979, p102.
- 7) A. Nahum and Cs. Horath, *J. Chromatogr.* **203** (1981) 53.
- 8) K. E. Bij, Cs. Horath, W. R. Melander and A. Nanum, *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 65.
- 9) F. P. B. van der Maeden, P. T. van Rens, F. A. Buytenhuys and E. Buurman, *J. Chromatogr.*, **142** (1977) 715.
- 10) J. C. Kraak and P. Bijster, *J. Chromatogr.*, **143** (1977) 499.
- 11) K.-G. Wahlund and A. Sokolowski, *J. Chromatogr.*, **151** (1978) 299.
- 12) D. Weserlund and E. Erixson, *J. Chromatogr.*, **185** (1979) 593.
- 13) A. Sokolowski and K.-G. Wahlund, *J. Chromatogr.*, **189** (1980) 299.
- 14) W. A. Moats, *J. Chromatogr.*, **366** (1986) 69.
- 15) E. Bayer and A. Paulus, *J. Chromatogr.*, **400** (1987) 1.
- 16) C. K. Lim and T. J. Peters, *J. Chromatogr.*, **316** (1984) 397.
- 17) J. F. Lawrence and R. Leduc, *Anal. Chem.*, **50** (1978) 1161.
- 18) A. Pryde, *J. Chromatogr. Sci.*, **12** (1974) 486.
- 19) R. E. Majors and M. J. Hopper, *J. Chromatogr. Sci.*, **12** (1974) 767.
- 20) C. H. Lochmuller and D. B. Marshall, *Anal. Chim. Acta.*, **142** (1982) 63.
- 21) K. Karch, I. Sebastian and I. Halasz, *J. Chromatogr.*, **122** (1976) 3.
- 22) H. Engelhardt and H. Muller, *Chromatographia*, **19** (1984) 77.
- 23) D. B. Marshall, C. L. Cole and A. D. Norman, *J. Chromatogr. Sci.*, **25** (1987) 262.
- 24) K. D. MC Murtrey, *J. Liq. Chromatogr.*, **11** (1988) 3375.
- 25) D. B. Marshall, K. A. Stutler and C. H. Lochmuller, *J. Chromatogr. Sci.*, **22** (1984) 217.
- 26) J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, H. A. Claessens, *J. Chromatogr. A*, **762** (1997) 97.
- 27) M. Verzele and C. Dewaele, *J. Chromatogr.*, **217** (1981) 399.
- 28) Y. Ohtsu, Y. Shiojima, T. Okumura, J. Koyama, K. Nakamura, O. Nakata, K. Kimata and N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, **481** (1989) 147.
- 29) B. Buszewski, *Chromatographia*, **34** (1992) 573.
- 30) P. C. Sadek, C. J. Koester and L. D. Bowers, *J. Chromatogr. Sci.*, **25** (1987) 489.
- 31) J. Nawrocki, D. L. Moir and W. Szczepaniak, *J. Chromatogr.*, **467** (1989) 31.
- 32) J. Nawrocki, D. L. Moir and W. Szczepaniak, *Chromatographia*, **28** (1989) 143.
- 33) J. J. Kirkland, C. H. Dilks Jr. and J. J. DeStefano, *J. Chromatogr.*, **635** (1993) 19.
- 34) K. Tanabe, T. Sumiyoshi, K. Shibata, T. Kiyoura and J. Kitagawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **47** (1974) 1064.
- 35) M. Muss and H. Engelhardt, *J. Chromatogr.*, **371** (1986) 371.
- 36) P. J. M. Bergers and A. C. De Groot, *Water Res.*, **28** (1994) 639.
- 37) S. M. Cramer, B. Nathanael and Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **295** (1984) 405.
- 38) W. N. Barnes, A. Ray and L. J. Bathes, *J. Chromatogr.*, **347** (1985) 173.
- 39) D. J. I. Kingston and B. B. Gerhart, *J. Chromatogr.*, **116** (1976) 182.
- 40) M. Verzele, M. De Potter and J. Ghysels, *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2** (1979) 151.
- 41) M. Ohhira, F. Ohmura and T. Hanai, *J. Liq. Chromatogr.*, **12** (1989) 1065.
- 42) D. V. McCalley, *J. Chromatogr.*, **636** (1993) 213.
- 43) K. Kimata, N. Tanaka and T. Araki, *J. Chromatogr.*, **594** (1992) 87.
- 44) K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam, 1979, p14.
- 45) W. Noll, *Chemistry and Technology of Silicones*, Academic Press, Orlando, 1968.
- 46) H. A. Claessens, C. A. Cramers, J. W. de Haan, F. A. H. den Otter, L. J. M. van de Ven, P. J. Andree, G. J. de Jong, N. Lammers, J. Wijma and J. Zeeman, *Chromatographia*, **20** (1985) 582.
- 47) H. A. Claessens, J. W. de Haan, L. J. M. van de Ven, P. E. de Bruyn and E. A. Eramers, *J. Chromatogr.*, **436** (1988) 345.
- 48) J. L. Glajch, J. J. Kirkland and J. Kohler, *J. Chromatogr.*, **384** (1987) 81.
- 49) N. Sagliano, Jr., T. R. Floyd, R. A. Hartwick, J. M. Dibussolo and N. T. Miller, *J. Chromatogr.*, **443** (1988) 155.
- 50) J. J. Kirkland, J. L. Glajch and R. D. Farlee, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2.
- 51) N. Tanaka, K. Kimata, Y. Mikawa, K. Hosoya, T. Araki, Y. Ohtsu, Y. Shiojima, R. Tsuboi and H. Tsuchiya, *J. Chromatogr.*, **535** (1990) 12.
- 52) M. J. Wirth and H. O. Fatunmbi, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 822.
- 53) M. J. J. Hetem, J. W. de Haan, L. J. M. van de Ven, C. A. Cramers, J. N. Kinkel, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 2288.
- 54) J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, and H. A. Claessens, *J. Chromatogr.*, **762** (1997) 97.
- 55) M. J. J. Hetem, J. W. de Haan, H. A. Claessens, C. A. Cramers, A. Deege and G. Schomburg, *J. Chromatogr.*, **540** (1991) 53.
- 56) N. T. Miller and J. M. Dibussolo, *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 317.
- 57) T. Welsch, W. Engewald, C. Klaucke, *J. Chromatographia*, **10** (1977) 22.
- 58) P. J. van den Driest and H. J. Ritchie, *Chromatographia*, **24** (1987) 324.
- 59) L. Nondek, B. Buszewski and D. Berek, *J. Chromatogr.*, **360** (1986) 241.
- 60) M. Mauss, H. Engelhardt, *J. Chromatogr.*, **371** (1986) 235.
- 61) S. Kondo, H. Yamauchi, Y. Kajiyama, T. Ishikawa, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **80** (1984) 2033.
- 62) K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam (1979) p.10.
- 63) R. S. S. Murthy, D. E. Leyden, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 1228.
- 64) L. R. Snyder, J. L. Glajch, J. J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Inc. New York, (1988) p.64.
- 65) J. L. Glajch, J. J. Kirkland, J. Kohler, *J. Chromatogr.*, **384** (1987) 81.

検査や化学療法を混乱させる薬剤耐性菌の狡猾な耐性誘導機構

Tricky Resistance Induction of Antibiotic Resistant Microorganisms Confusing Clinical Diagnosis and Chemotherapy

— グラム陰性菌の耐性誘導を中心として —

— *Antibiotic resistance induction of gram negative bacteria* —

北里研究所抗感染症薬研究センター センター長 花木 秀明

HIDEAKI HANAKI Ph.D.

Director, Kitasato Research Center for Anti-infection Drugs

関東化学株式会社 試薬事業本部 ライフサイエンス部 久保 亮一

RYOICHI KUBO

Life Science Dept. Kanto Chemical Co., Inc.

1. はじめに

1928年のFlemingによるペニシリンの発見に始まる抗菌剤の開発は目覚しく¹⁾、今日の感染症治療において抗菌剤を中心とした化学療法は非常に重要な位置を占めている。しかしながら、他方においてこうした抗菌剤に抵抗を示す薬剤耐性菌も進化・発展を遂げ、様々な耐性機構によって、臨床の場を脅かすようになってきたばかりで無く、これらを発見するための臨床検査を難しくしている²⁾。特に大腸菌などに代表されるグラム陰性桿菌と呼ばれる細菌の一群は、耐性が多種・多様にわたり、全ての抗菌剤に対する耐性遺伝子が確認されてきている。

例えば、ペニシリンをはじめとする β -ラクタム系抗菌剤には加水分解酵素による β -ラクタム環の分解³⁾、アミノグリコシド系抗菌剤には修飾酵素(aac, aph, aad)による薬剤の活性部位の失活⁴⁾、テトラサイクリン系薬剤に対しては薬剤排出ポンプによる菌体外への薬剤の排出⁵⁾、キノロン系薬剤に対しては、薬剤の標的部位変化による耐性獲得といったことで耐性獲得が認められている⁶⁾。

また耐性菌の機構は耐性遺伝子により制御されているが、最近の耐性菌においては以前と異なり、複数の遺伝子が獲得されて周囲の環境にあわせて耐性機構を調節しているので耐性の起きる機構が複雑なものになってきている^{7,8)}。特に、細菌の代謝調節機構である「オペロン機構」を利用した薬剤の「耐性誘導」は耐性の強さを常に周囲環境にあわせて変化させているので、耐性菌の検査や治療においては、こうしたメカニズムを理解して進めないと結果が分からなくなったり、治療に失敗したりといったことに繋がることになる。

そこで、本稿ではこうした耐性菌のメカニズムとこれに対する化学療法について、主にグラム陰性桿菌を例にとりて解説してみた。

2. 耐性機構の概要

先に述べたように薬剤耐性菌の示す耐性機構は様々であるが、大きく分けると次のように内因性と外因性に分けることができる。

2.1 内因性の耐性機構

細菌が本来、生物として持っている内在性の遺伝子よる耐性

- (1) 標的部位の変異:フルオロキノロン系薬剤耐性ではDNAジャイレースやトポイソメラーゼなど薬剤が標的する酵素の作用部位が変化して攻撃できなくなる。
- (2) 分解酵素の過剰産生による耐性化:AmpC型 β -ラクタマーゼによる広域セファロスポリン系薬やカルバペネム系薬の耐性化は、本来、これらの薬剤にはほとんど無視できるくらいの分解能しかない酵素であるAmpCが産生を抑制している調節遺伝子(サブレッサー遺伝子)の不活化により大量に産生されることで、結果としてこうした薬剤を無効にするほどの分解力が得られる⁹⁾。
- (3) 細胞外膜の変化による耐性化:細菌の細胞壁にある細胞外膜はポーリンと呼ばれる孔を通じて外部から栄養素を取り込む機能がある。カルバペネム系薬のイミペネムなどは塩基性アミノ酸を取り込むためのポーリン(D2ポーリン)を通じて菌体内に入り込むが、耐性菌はこの外膜を変化させてポーリンの数を減らし、薬剤

が体内に侵入しにくくすることで耐性を獲得する¹⁰⁾。

(4) 薬剤能動排出ポンプの亢進:フルオロキノロンや消毒液の耐性では、細菌の体内に入ったこれらの抗菌剤や殺菌物質をATPを使った能動輸送によって菌体外に排出している。

(5) バイオフィルムの形成¹¹⁾:緑膿菌やブドウ球菌などでは多糖類を産生し、これと生体中のフィブリンなどを組み合わせるマトリックスを作り、バイオフィルムと呼ばれる細菌の巣のようなものを構築する。バイオフィルムは物理的に細菌を抗菌剤や生体防御機構である抗体から守るため、すべての抗菌剤に対する耐性機構として働く。ただし、バイオフィルムの形成にはアルギン酸の結合が必須であるために、これを阻害するマクロライド系抗菌剤はバイオフィルムを作らせない為に有効である^{12,13)}。

2.2 獲得性の耐性機構

内因性の耐性機構に対して、外部からの耐性遺伝子の獲得によっても耐性が起こる。これは耐性菌の耐性遺伝子がプラスミドやトランスポゾンといった移動性の遺伝子集団にある場合、これが耐性を持たない細菌に接合やファージによって導入され、耐性を獲得するもので、ペニシリンなどのβラクタム系抗菌剤を分解するメタロ-β-ラクタマーゼの産生による耐性やアミノ配糖体の作用点を変異させて薬剤の親和性を下げて耐性を生むアミノ配糖体アセチル化酵素の産生、βラクタム系抗菌剤の作用点であるPBPと呼ばれる一連の細胞壁合成酵素を変異させて親和性を失わせて耐性を作るといったものがある¹⁴⁾。

一般に獲得性の耐性は、耐性の伝達を繰り返すことで変異を起こしやすい。例えば、上述のβ-ラクタマーゼの場合は図1に示すように色々な遺伝子型のものが数百にわたっており、しかもDNA上の数個の塩基配列が変わることで、全く違った種になるので膨大な種類が発生する¹⁵⁾。院内感染でこうした耐性菌が発生した場合、早期に発見して封じ込めないと使用できる抗菌剤の幅が急速に狭まって化学療法を困難なものにしてしまう可能性が高い。

以上をまとめると、耐性のメカニズムとしては

- (1) 微生物細胞内への薬剤の透過性の減少。
- (2) 微生物に浸透した薬剤を外部に排出する排出機構の促進。
- (3) 薬剤の標的となる酵素や物質の変異

(4) 標的酵素の産生の飛躍的増大(量が増大しているの
で一部が阻害されても機能が損なわれない)

(5) 薬剤そのものの不活性化といったことが知られている。

種類	報告されている 変異酵素	種類	報告されている 変異酵素
TEM	: 160	CMY	: 28
SHV	: 101	GES	: 9
OXA	: 105	VEB	: 5
CTX-M	: 67	KPC	: 4
IPM	: 23	PER	: 3
VIM	: 14	SME	: 3

図1 βラクタマーゼに見られる多様性

2.3 外部から取り込んで耐性化する場合

インフルエンザ菌は健康な人の鼻腔に通常でも存在するが、しばしば呼吸器系の疾患の原因となる。この場合、最もよく使われてきたのがアンピシリンであり、耐性はほとんど認められないと考えられてきた。ところが、近年、アンピシリン耐性のインフルエンザ菌が現れて問題となってきた¹⁶⁾。アンピシリン耐性のインフルエンザ菌にはβ-ラクタマーゼを産生して耐性となっているもの(BLPAR: β-lactamase positive Ampicillin resistant Haemophilus influenzae)とβ-ラクタマーゼを産生せずにβ-ラクタム系抗菌剤の標的部位である細胞壁合成酵素PBP3を産生する遺伝子*ftsI*が変異してMRSAのようにβ-ラクタム系抗菌剤に親和性のないPBPを作って攻撃を受けないようにするもの(BLNAR: β-lactamase negative Ampicillin resistant Haemophilus influenzae)およびこれら2つの機構のどちらも獲得して耐性となったもの(BLPACAR: β-lactamase positive amoxicillin/clavulanic acid resistant Haemophilus influenzae)がある。これらは、口腔に存在するレンサ球菌がこうした変異遺伝子を持っており、これらが死滅して出てきた変異遺伝子をインフルエンザ菌が取り込んで形質転換の形で耐性を獲得する。BLNARの*ftsI*遺伝子の変異する部位が3カ所あり、変異数が多いほど耐性は高度となるが、生方らは¹⁷⁾感受性の違いを配慮して2カ所以上の変異が起きたものをBLNAR、1カ所だ

けのものをLowBLNARとして分けており、Dabernatら¹⁸⁾はさらに、これを進めて6つに分類している。

3. 耐性はどのように起こるか

我々が耐性という現象を認知する場合、2つのパターンがあることに気がつく。1つは、誘導型の耐性でオペロンと呼ばれる調節機構を駆使して、薬剤にさらされているかどうかに応じて耐性遺伝子を発現させたり、停止したりするという巧妙な機構“誘導”が使われているものである。すなわち、耐性遺伝子を作動させるプロモータ遺伝子と呼ばれる遺伝子(群)に薬剤のない環境下では、これを止めるリプレッサーが働いて鍵をかけているが、薬剤にさらされるとリプレッサーが解除されて耐性遺伝子が作動して耐性を発現するが、薬剤がなくなると再びリプレッサーが働いて耐性を抑える。一般的に薬剤耐性という機能は微生物にとっての本質である「発育・増殖」に使うべき代謝エネルギーの一部をこの機能に振り向けなければならないため、非常に不利である。したがって、周囲の環境に薬剤がないか攻撃できない濃度まで下がれば、即刻、この耐性機能を停止して本来の「発育・増殖」にエネルギーを振り向けるのが微生物側としては合理的なわけである。ところが、病原微生物の検出は一般的に検査材料を分離培地によって個々の細胞を分離して検出するが、この段階では薬剤に“さらす”様な配慮はされないために、耐性が隠れてしまい耐性菌としての検出が困難となってしまう。もう1つは構造型の耐性で、この性質をもつ耐性菌は常時耐性を保つために耐性が現れたり消えたりすることがなく検査や診断が容易である。これらは、もともと合理的な「誘導型」の耐性であったものが、連続して長期間にわたって薬剤にさらされたためにリプレッサーが働かなくなってしまったもので一般に高度耐性である。1980年代に日本で院内感染として問題視されたMRSAをはじめとする耐性菌はこの耐性型が多かったために比較的検査はしやすかったが、今日問題となっている市中感染や耐性菌は「誘導型」であるためにこれまでの検査では検出が難しくなっている。

4. 誘導性の耐性因子

誘導型の耐性は、大きく分けて3つ考えられる。つまり、 β -ラクタマーゼ産生、アミノ配糖体修飾酵素の産生、薬

剤排出機構がある。

4.1 β -ラクタマーゼ産生による耐性

β -ラクタマーゼは既述したように β -ラクタム系抗菌剤を加水分解して不活性化する酵素であるが、この産生を支配している遺伝子はその種類が膨大でわずかな変異で性質が大きく変わるので、PCRをはじめとする遺伝子検査で未知の β -ラクタマーゼを検査することは事実上不可能である。臨床的に現在問題とされている耐性菌が産生する進化した β -ラクタマーゼには、基質拡張性 β -ラクタマーゼ(ESBL:Extended Spectrum Beta Lactamase)、メタロ β -ラクタマーゼ(MBL:Metallo Beta Lactamase)、大量産生型AmpCといったものがあるが、これらは化学療法で重要とされる第3世代セフェムを分解するために、治療を難しくすることが多い。

特に大量産生型AmpCは例外¹⁹⁾を除き、ESBLやMBLのように酵素そのものが進化して抗菌剤に対する分解力が拡大してきたのではなく、単位あたりの分解能力は弱いですが、先に述べた誘導によって酵素を大量に出すことで耐性を獲得しているので、誘導が十分行われていないと検出を誤ることがある。この場合の誘導は、Cristensenらによって明らかにされているが図2に示すように β -ラクタム系抗菌剤によって発生するムレインモノマー断片量が、これをリサイクルする回路の処理を上回ってくると余剰のムレインモノマー断片がリプレッサーとして働くという、やや複雑な機構である。

図3には、こうした耐性菌の年次傾向を示したが、MBLなどが増加してきていることがわかる。

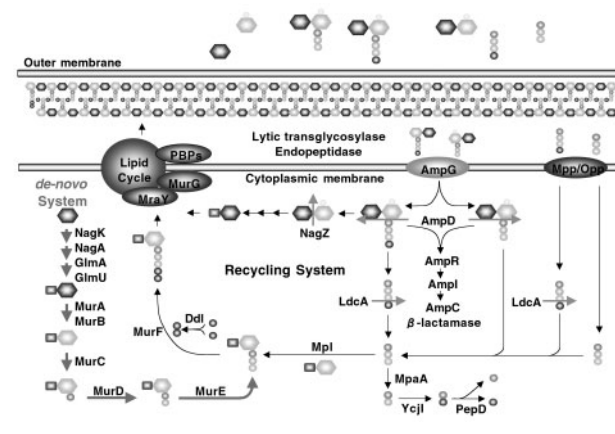


図2 ムレインモノマー断片とリサイクル機構による誘導

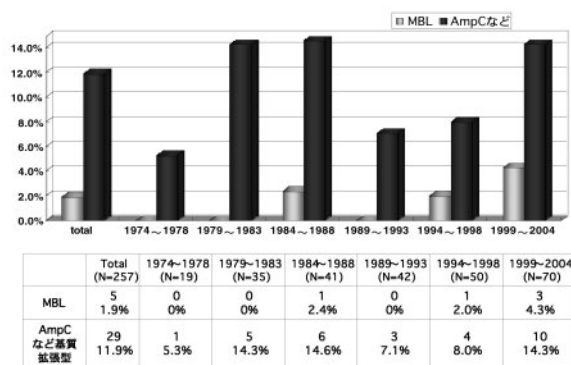


図3 ESBL、MBLとAmpCなどの基質拡張型 β -lactamaseの検出年次推移

ESBLに見られるTEMやSHV型といった β -ラクタマーゼは、進化を拡大して現在使われている第3世代セフェムの抗菌剤も壊す性質を得ているので、進化前の分解力の弱いTEMやSHVと遺伝的にPCRで調べることは非常に難しい。また、数種類の β -ラクタマーゼが染色体にあつて働いている場合や不能になっている場合もあるので、確実に遺伝的に解析しようと思うと、遺伝子シーケンスを同定することになるが、これは検査室では不可能である。

β -ラクタマーゼ産生菌で敢えて患者の症状などから β -ラクタム系抗菌剤に頼らなければいけない場合は、最も抗菌力の期待されるカルバペネム系 β -ラクタム剤が選ばれることになるが、メトロ β -ラクタマーゼには効果がなく、表1に示すようにAmpCの大量産生による耐性菌にも効果がないことがあるので、臨床的にはこれらの β -ラクタマーゼを産生するかどうかを確認することも有用である。最近、問題になっている多剤耐性緑膿菌 (MDRP) のカルバペネム耐性はこのMBL産生あるいはAmpCの大量産生によることが多い²⁰⁾。

表1 AmpC産生緑膿菌(株)の薬剤感受性

Antibacterial agents	MIC range (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)
PIPC	8 ~ >256	128	>256
CAZ	4 ~ 256	32	128
CPZ	8 ~ >256	128	>256
CPR	4 ~ 128	64	128
CZOP	2 ~ 128	16	64
IPM	1 ~ 32	2	32
MEPM	≤ 0.25 ~ 128	1	64
SBT/CPZ	16 ~ 256	64	128
TAZ/PIPC	8 ~ >256	128	256
AZT	8 ~ 256	16	128
LVFX	0.5 ~ >256	1	4
CPFX	≤ 0.25 ~ 256	≤ 0.25	1
PZFX	≤ 0.25 ~ 256	0.5	4
AMK	1 ~ 256	8	16
TOB	≤ 0.25 ~ >256	1	256
ABK	1 ~ 128	4	16
MINO	16 ~ >256	32	256

4.2 アミノ配糖体不活化酵素産生による耐性

アミノ配糖体不活化酵素はアミノ配糖体系抗菌剤 (アミカシン、ハベカシン、トブラマイシンなど) の活性部位であるアミノ基と水酸基をアセチル化、アデニル化、リン酸化といった有機化学的な修飾を行うことで不活化する。図4は北里研究所において過去30年間に、集められた血液から分離されたアミノ配糖体系抗菌剤耐性菌株255株の成績であるが高濃度耐性の細菌が増加しているのがわかるであろう。表2は β -ラクタマーゼ産生緑膿菌の薬剤感受性パターンを見たものであるが、 β -ラクタマーゼ産生菌はアミノ配糖体系抗菌剤にも耐性であることがわかっている。この事は、 β -ラクタマーゼ産生菌が発現すると近傍にあるアミノ配糖体耐性遺伝子も刺激されて発現することが示唆される。

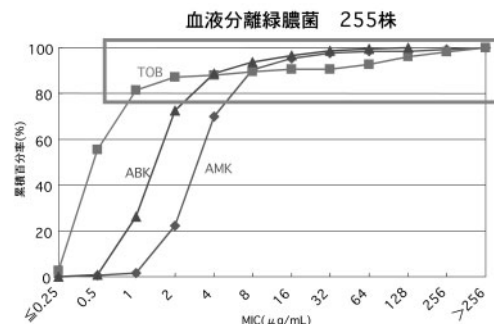


図4 Aminoglycoside系薬の抗菌力

表2 AmpC産生緑膿菌(株)の薬剤感受性

Antibacterial agents	MBL(5株 0.2%)		AmpC(26株 10.5%)		その他(217株)	
	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)
PIPC	32	256	128	>256	8	16
CAZ	>256	>256	32	128	4	16
CPZ	>256	>256	128	>256	8	32
CPR	256	256	64	128	8	16
CZOP	>256	>256	16	64	2	8
IPM	256	>256	2	32	2	8
MEPM	>256	>256	1	64	0.5	2
SBT/CPZ	>256	>256	64	128	16	32
TAZ/PIPC	32	64	128	256	8	32
AZT	8	32	16	128	8	16
LVFX	4	4	1	4	1	4
CPFX	1	1	≤ 0.25	1	≤ 0.25	1
PZFX	2	4	0.5	4	0.5	2
AMK	256	>256	8	16	4	8
TOB	128	256	1	256	0.5	2
ABK	8	32	4	16	2	4
MINO	64	64	32	256	16	64

4.3 薬剤排出機構による耐性

薬剤を分解・不活化できない場合は、薬剤を取り込まない、あるいは取り込まれた薬剤を体外に排出するという耐性を得るものがある。図5はこの2つの機構を模式化したものであるが、薬剤の取り込みを少なくする方法としてはD2ポーリンの減少が有名である。D2ポーリンは細菌に必要な塩基性アミノ酸の取り込み口の働きをするもの

で、カルバペネム系薬剤のイミペネム (IMP) はこの経路を通して細菌の体内に侵入して攻撃するため、耐性はこのポーリンそのものの数を少なくして行われる。ただし、ポーリンは細菌自体にとっても重要なために数を少なくするにも限界がある。そこでATPを使った能動輸送であるプロトンポンプを使って、一度体内に侵入した薬剤を排出する方法がとられる。これによる耐性はテトラサイクリン系やキノロン系抗菌剤の場合によく見られる。排出ポンプの種類はこれまでに MexA-MexB-OprM, と MexC-MexD-OprM, MexE-MexF-OprM, MexX-MexY-OprM の4種類がみつがっている。

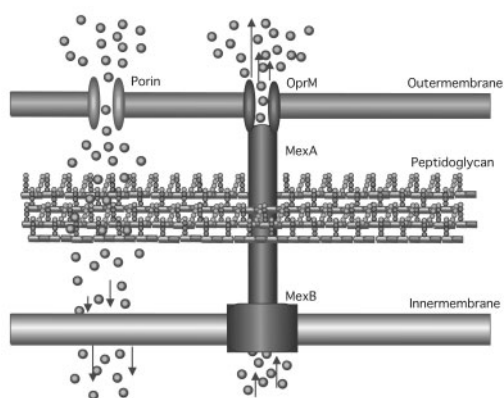


図5 内因性の耐性間メカニズム

β -ラクタム系抗菌物質には MexA-MexB-OprM が主に働くが、アミノ配糖体系抗菌剤では MexX-MexY-OprM が主として働くとされる。図6はこのプロトンポンプ部分の模式を拡大したものであるが、テトラサイクリンなどの抗菌剤はマグネシウムイオンと結合させる形で、マグネシウムを排出してプロトンを導入するというプロトンポンプ系を利用している。

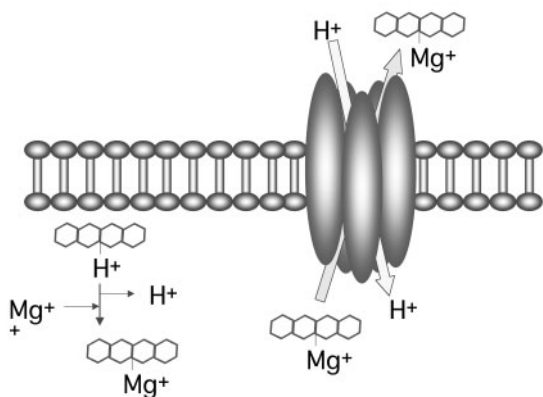


図6 プロトンポンプによる排出

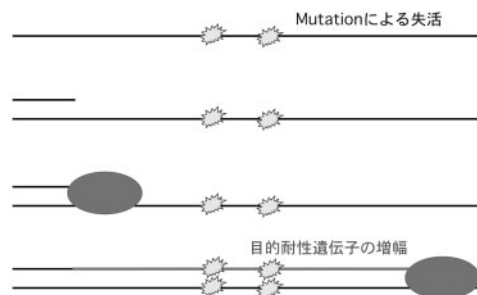


図7 耐性遺伝子の突然異変による失活

耐性能力をなくした遺伝子でもPCRでは増幅されたい耐性遺伝子陽性となる。しかしながら、耐性は発現しないので感受性試験は感受性となる。

5. 耐性菌の検査法における注意

これまで述べてきたように耐性菌の検出・測定には、耐性の誘導をあらかじめ十分行っておくことが大切である。シカ β テストやニトロセフィンで β -ラクタマーゼを直接見る場合のように、臨床検体の状況をそのまま見る場合は、基本的には患者の体内において投与された薬剤の影響が強く、誘導はかかっていると考えられるので検体が新鮮なうちに検査するならば、そのまま感受性や耐性の試験に用いたほうがよい場合がある。特に継代培養などを抗菌剤を含まない培地で繰り返すと、耐性遺伝子を含むプラスミド脱落したり、耐性遺伝子の発現が止まったりするので注意が必要である。

耐性の誘導には一般的に最小発育阻止濃度(MIC)の半分の濃度で培養するのが良いとされるが、未知検体では感受性検査によってMICが決まるまで耐性の検査ができないというのは不便であるし、時間的にもロスである。そこで、著者らは適当な寒天培地(ミューラントン培地やブレインハートインフュージョン培地)に耐性を疑う菌を塗抹して β -ラクタム抗菌剤を含むディスクを置き、35℃~37℃で24時間程度培養し、ディスクの周縁にできた阻止帯の周縁のコロニー(細胞)を取ることを薦めている。この方法を用いると作業が簡単なだけでなく、MICの値が不明でも、抗菌剤の圧力が適当にかかって誘導された状態のコロニーを得ることができる。

誘導を引き起こす抗菌剤は種類によってその誘導能が高いものそれほどでないものがある。誘導はムレインモノマー断片のような細胞壁の部品が関与していることが多く、セファマイシン系抗菌剤やカルバペネム系抗菌剤といった細胞壁を壊す作用のある抗菌剤は誘導能が

強く、セフトジジム (CAZ) やセフトキシム (CTX) 第3世代のセフェム剤は誘導能が弱いようである。

PCRをはじめとする遺伝子診断は耐性を疑う病原菌の耐性遺伝子があるかどうかを調べる上で有力な手段である。しかしながら、遺伝子は耐性能力を失ったいわゆる「壊れた」遺伝子かどうかといったことや、発現が実際行われているかといったことはわからない。こうした場合、発現を検査する感受性試験と遺伝子検査では当然不一致が出てくる。さらに、ESBLのように種類が多く変異しやすい場合はPCRなどは前述のように拾いきれないのでスクリーニング検査には使えない。

6. まとめ

これまで耐性菌は常にその耐性を示す構成型が多かったために、薬剤感受性試験を簡易なディスク拡散法で行っていればよく、せいぜいβ-ラクタマーゼ産生試験を追加すればよいというものであった。しかしながら、誘導型の出現が顕著になるに従って、耐性菌に向き合うにはその耐性機構をよく理解して出てきた検査成績を読まなければならなくなってきた。また、抗菌剤の投与も感受性試験で感受性となった薬剤を適当に選択して単剤を投与するという単純なものでは効果が得られないことが多くなってきたため、薬剤の体内動態をモニタリング (TDM) して適切な量を投与したり、投与も感受性のある薬剤とクラブラン酸やタゾバクタムといった阻害剤を投与して相乗効果をねらったり、作用点の異なる抗菌剤を併用したりすることが推奨されるようになってきた。耐性菌は化学療法の発展と共に常に変化してきており、これに対応する検査や治療も発展してゆかなければならない。今後、診断の迅速化や検査技術の精度管理といったことともに耐性や細菌の代謝といった基礎的な知識がますます要求されてくるであろう。

参考文献

- 1) A.Fleming, *British Journal of Experimental Pathology*, **10**, 226-236 (1929)
- 2) 科学技術庁研究開発局, 院内感染対策に関する緊急研究成果報告書 (平成11年度)
- 3) K.Bush et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **39**, 1211-1233 (1995)
- 4) S.Kondo et.al., *The Journal of Antibiotics*, **46**, 310-315 (1993)
- 5) K.Poole et.al., *The Journal of Bacteriol*, **175**, 7363-7372 (1993)
- 6) H.Ito et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **38**, 2014-2023 (1994)
- 7) F.Jacob, J.Monod, *Journal of Molecular Biology*, **3**, 318 (1961)
- 8) J.H.Miller et.al., *Journal of Molecular Biology*, **38**, 413, (1968)
- 9) C.Jacobs et.al., *Cell*, **88**, 823-832 (1997)
- 10) S.Satake et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **34**, 685-690 (1990)
- 11) L.Dall et.al., *Journal of Infection Disease*, **156**, 736 (1987)
- 12) 佐野正人他, 日本泌尿器科学界誌, **88**, 596-604 (1997)
- 13) 小野憲昭他, 日本化学療法学会誌, **43**, 222-230 (1995)
- 14) B.J.Hartman et.al., *Journal of Bacteriology*, **158**, 513-516 (1984)
- 15) 荒川宣親, 日本臨床微生物学雑誌, **13**, 3, 12-23 (2003)
- 16) S.M.Markowiz et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **17**, 80-83 (1980)
- 17) K.Ubukata et.al., *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, **45**, 1693-1699 (2001)
- 18) H.Dabernat et.al., *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, **46**, 2208-2218 (2002)
- 19) S.Haruta et.al., *Microbiol. Immunol.*, **45** (4), 277-283 (2001)
- 20) S.Satake et.al., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **28**, 199-207 (1991)

新・私の古生物誌(4)

New Series of My Paleontological Notes(4)

—アンモナイトの進化古生物学(その1)—

—Evolutional Paleontology of Ammonites—

医学博士 福田 芳生
M.Dr. YOSHIO FUKUDA

1. はじめに

古生代中頃、正確にはデボン紀中期(およそ4億年前)にオウムガイ類からアンモナイト類が誕生しました。そして、大恐竜時代とも呼ばれる中生代、それもジュラ紀から白亜紀にかけて、当時の海で大繁栄します。その莫大な量の遺骸が世界各地から続々と発見されています。

このアンモナイトは、現生のイカやタコ、オウムガイと同様、頭足類の大きなメンバーとなっています。それは同じ頭足類の中でも、立派な殻を持つオウムガイ類と殻構造の上で、共通点が多いことから、その正体が明らかになったのです。実際、生きている化石オウムガイが発見されるまで、アンモナイトは巻貝の一種と誤認されていたのですから。

皆さん御存知のアンモナイトという名称は、古代エジプトの羊の頭部を持った神様、アモン神に由来しています。殻の形が、このアモン神のグルグルと巻いた角に大変よく似ているからという訳です。

さて、アンモナイトという名称から、殻の形をすぐに頭に思い浮かべることができても、その体の仕組みや古生態について、正しく答えられる人は、少ないのではないのでしょうか。世間では、アンモナイトを指して「あなたの頭は大部アンモナイト化していますね=石頭という意味」という具合に、抽象化して用いることの方が多いと思います。

そこで、今回は謎に満ちたアンモナイトの誕生と、生存をかけて勝ち取った進化の跡を、現生のイカ・タコ、オウムガイなどの頭足類と比較しながら辿ってみましょう。現生の頭足類から得た情報は、絶滅したアンモナイトの身体や生活様式を復元する上で、大変貴重な資料となりますから。

2. 頭足類はどんな動物か

皆さんはイカ・タコを食べたことが御有りでしょう。刺身にしたり、タコ焼きの具になったりして、私達の食卓を賑わし

てくれます。このイカ・タコ類を動物学者は、頭足類と呼びます。それは英語のセファロポダ(セファロ=頭、ポダ=足)の邦訳です。そして、ハマグリやアワビなどの貝類と同様、軟体動物に属する無脊椎動物の大きなグループを構成しています。

なぜ、軟体動物の一員イカ・タコを頭足類と言うのでしょうか。この仲間は奇妙なことに、目や脳、口のある頭部前方に腕(足)が生えていて、頭の後方に胴体があります(図1)。

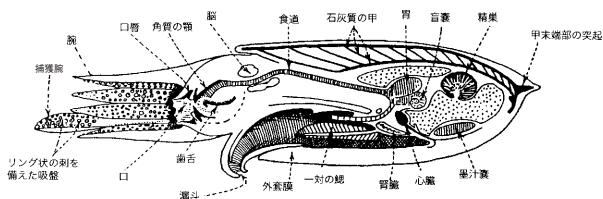


図1 コウイカの身体を縦断して内臓器官を示す(A.ナエフによる)

それで、頭足類と呼ぶのです。殻の内部に胴体が入っているのがオウムガイ(図2)やアンモナイトです。この胴体というのは腹部のことです。その内部に、有対の鰓や心臓、消化器官、対になった腎臓、生殖器官などの重要な内臓器官が収納されています。

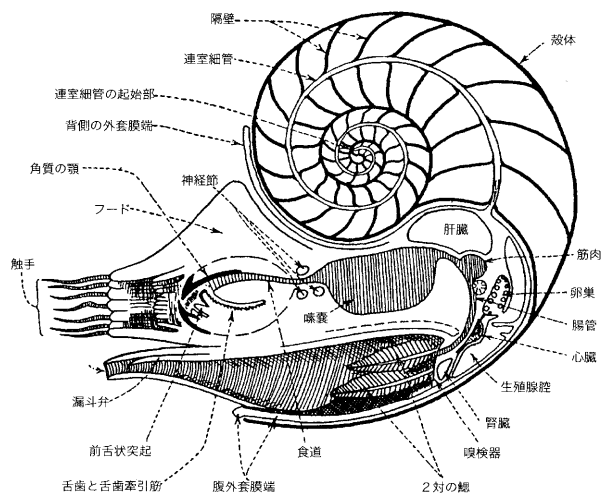


図2 現生のオウムガイの縦断面(A.ナエフによる)

3. 頭足類の心臓・血液・感覚器

頭足類の心臓は体心臓(一心室二心房からなり、本物の心臓に相当する)の他に、各鰓の基部に鰓心臓があって、鰓に静脈血を送り込みます。イカ・タコ類は鰓が2枚あるので、二鰓類と呼ぶことがあります。石灰質の厚い殻を持ったオウムガイ類は鰓(図3のa)が4枚あるので、四鰓類として他と区別されています。余談ですが、筆者の観察したオウムガイの鰓に線虫が寄生していて、驚いたことがあります(図3のb)。

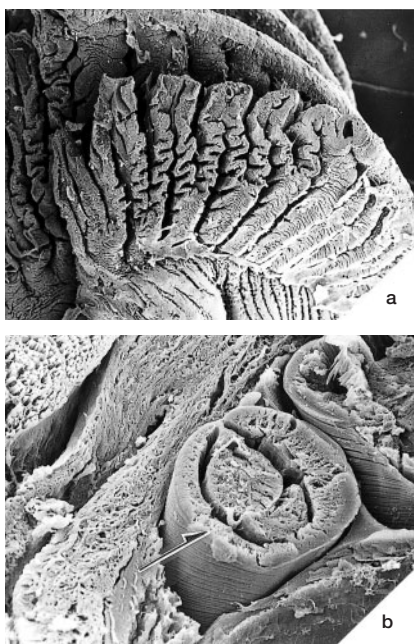


図3 オウムガイの鰓 aは鰓の一部、ガス交換に与る多数の襞が認められる。bは鰓組織の基部に侵入した線虫、矢印は虫体断面を示す。

頭足類の血液中には、銅を含んだ呼吸色素タンパクの一種ヘモシアニンが溶け込んでいて、酸素と結合します。脊椎動物のヘモグロビンの様に、血球中に存在することはありません。酸素と結び付いたヘモシアニンは青色を帯びています。それで、血青素と呼ばれることがあります。血液の流れに乗って、ゆっくりと身体各部に運ばれます。それは、毛細血管を介することが無いので、開放血管系に属し、血液も血リンパという特別な呼称が与えられています。

このヘモシアニンは、軟体動物の多くに見ることができます。その他、エビ・カニなどの甲殻類も呼吸は、専らヘモシアニンに依存しています。

この様なヘモシアニンは頭足類の場合、身体はどこで生成されるのでしょうか。頭足類の鰓の背側には、鰓腺

と呼ばれる大型の分泌組織の塊があります。イカ・タコの鰓腺について、その微細構造と化学組成を調べたドイツの動物学者シッパ博士のグループは、腺細胞の粗面小胞体の内部に大量の銅が蓄積しているのを認め、それらがタンパク質と結び付けられ、直接血リンパ中に放出されることを突き止めました。その観察結果を踏まえて、鰓腺が頭足類の主要な造血器官であると結論を下しました。

無論、この銅は頭足類が独自に生産したものではありません。海水中に溶け込んでいる微量の銅を、鰓腺で濃縮したものです。

軟体部を伴った保存の良いイカ・タコの化石が、ドイツやフランスのジュラ紀層からしばしば発見されています。なかには、鰓の痕跡を止めているものさえあります。こういうのは例外ですが、かつて鰓の存在していた部分の母岩について、その元素組成を調べ、そこに銅の高いピークを認めた時、鰓腺があった可能性極めて大ということになります。

次に感覚器について述べましょう。頭部にある一対の大きな眼、海水の出入りする漏斗の付根にある嗅検器、遊泳時の姿勢を制御する一対の平衡胞が頭足類の主要な感覚器ということになります。

まず眼は軟骨製の被膜に包まれ、全体に球形をしています。そして、角膜やレンズ、網膜があり、脊椎動物の眼と比較しても、少しも遜色がありません。ただ、オウムガイの眼は角膜もレンズも存在せず、縦にスリットが入っているだけの、ひどく簡単なものです(図4)。



図4 オウムガイの眼と触手 aはピンホールカメラの様なオウムガイの眼、アンモナイトもオウムガイ型の眼を持っていたとする復元図があるが、あくまで想像の域を出ない。bは触手を伸ばして餌を探すオウムガイ、触手は鞘(さや)の中に収めることができる。



眼の窪みの底部に網膜があります。その様子は、ピンホールカメラと言ってもよいでしょう。それで、オウムガイの眼をスリット眼と呼ぶことがあります。

嗅検器ですが、これは海水中に溶存する化学物質の検出装置です。有害物質や獲物の匂いを嗅ぎ分けます。人間の鼻に例えることができます。

深海に生息するオウムガイ類は、嗅検器が発達しています。海中に設置したトラップの内部に、腐敗した魚や鶏肉を入れて置くと、新鮮な肉に比べて、集まってくるオウムガイの個体数が増加します。それは、強い匂いに誘引されたからでしょう。オウムガイの眼が未発達なのは、餌を探索する際、嗅検器に依存する度合いが高いからかもしれません。

袋状の平衡胞は精巧なもので、内部に線毛(感覚毛)を備えた物理的受容器が規則正しく並び、石灰質の微小な平衡砂があります。この平衡砂の動きを感覚毛が捕え、姿勢の変化を知ります。

ヤリイカの場合、平衡砂は数100ミクロン単位の高さがあり、水滴の様な形をしています。これなどは平衡石の部類に入れても、的はずれではないでしょう。イギリスの新生代の地層からは、ヤリイカ類の平衡石が多産します。これは微化石のカテゴリーに入ります。

4. 移動と捕食・体内の甲と殻

移動は頭部下側(腹側)の外套膜が筒状に巻いた漏斗より、飲み込んだ海水を勢いよく噴出する、いわゆるジェット推進によっています。ところで、イカ刺しは外套膜の部分を縦に切断したものです。横方向に包丁を入れたのでは、筋線維に平行になるので、噛み切るのに苦労することになります。リング揚げの固い理由がお分かりになりましたか？

さて、足のある体前方に進む際は、漏斗を後方に向け、腹部のある体後方に向う時には、先の逆を行けばよい訳です。胴体を包む外套膜やひれも、移動時の補助装置として立派に機能しています。殻に包まれたオウムガイでは、ジェット推進が主力となっています。

食物は小魚やエビ・カニなどの甲殻類、貝類です。イカの仲間は、伸張した一对の捕獲腕表面の鈎や吸盤を用いて獲物を捕えます(図1)。オウムガイでは、腕が60本から90本近くあります(図4)。腕は大変細く、釣の餌に使用するゴカイの様な感じです。腕の内側に多数の横走る

粘膜襞を備えています。その表面に粘液を分泌して、獲物を捕えます。この細い腕は触手と呼ばれています。オウムガイも、小魚やエビを好んで捕食します。

イカ類は腕が10本あるので十腕目、8本あるタコは八腕目と呼ぶことがあります。

さて、獲物はカラス・トンビと呼ばれる顎で切断され(図5)、おろし金の様な歯舌で細片にして、食道に送られます。

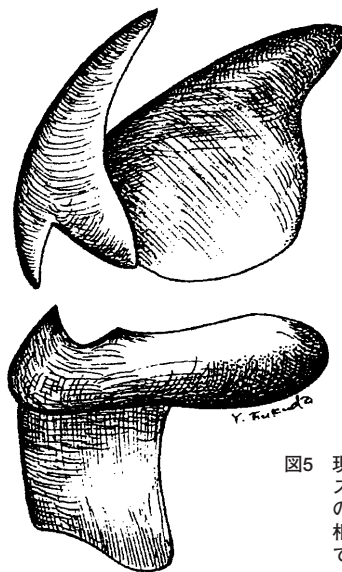
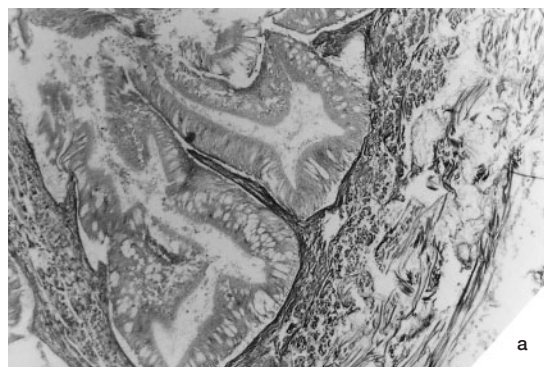


図5 現生のコウイカの顎 俗にカラス・トンビと呼ばれているもの。図の上方がカラス、下方がトンビに相当する。鋭く尖った顎先端部で獲物に大きな損傷を与える。

イカ・タコの食道内側は、キチン質の薄い被膜で覆われています。それは歯舌が小型であるため、食物を粉末状にできないのでしょう。それ故、食物片が食道の粘膜上皮を破壊する危険があります。その損傷を防ぐ目的で、キチン質の被膜を持つようになったのかもしれません。

一方、オウムガイはどうでしょうか。食道には全くキチン質の保護膜がありません(図6)。その代わり、下顎先端には石灰質の鋭い鋸歯が並び、その奥に頑丈な9列の突起を備えた歯舌があります(図7)。この歯舌はベルトコンベヤーの様に、後方から押し出されるようにして、絶えず新しいものと交代します。



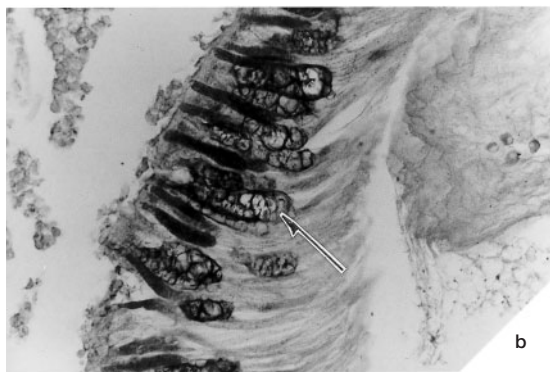


図6 オウムガイの食道断面を示す光学顕微鏡像 aは低倍率像で、食道上皮表面にキチン質の保護膜を認めることができない。bは内皮の一部拡大、粘液分泌細胞(矢印)は、PAS染色に陽性反応を示し、ムコ多糖類の存在を窺わせる。

オウムガイの場合、獲物は大型の顎と歯舌によって、粉末状にすることが可能です。それ故、食道の粘膜上皮は食物が通過する際、傷付けられることが無い訳です。それで、オウムガイではキチン質の保護膜が無くても平気なのでしょう。さらにオウムガイでは、食物の通過をスムーズにするため、粘液を分泌していることも見逃せません(図6のb)。

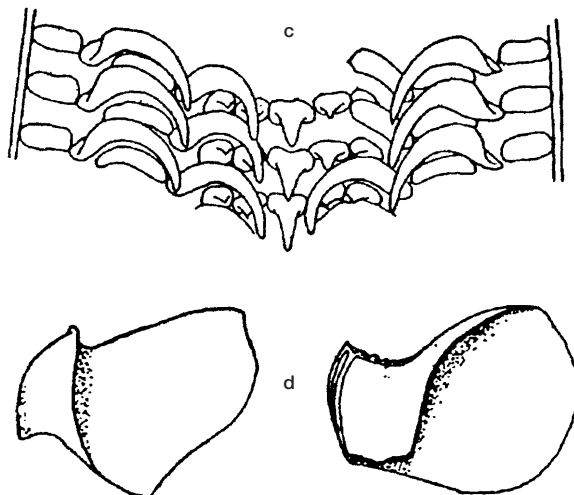
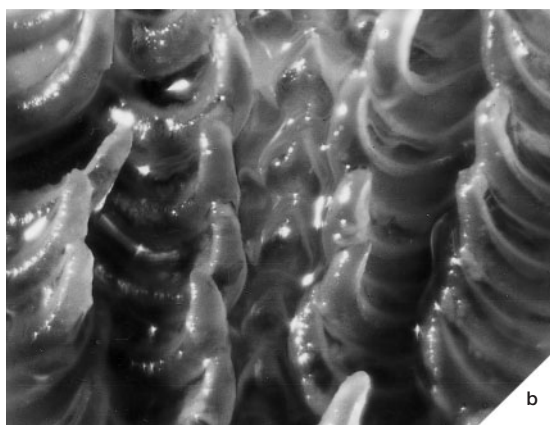


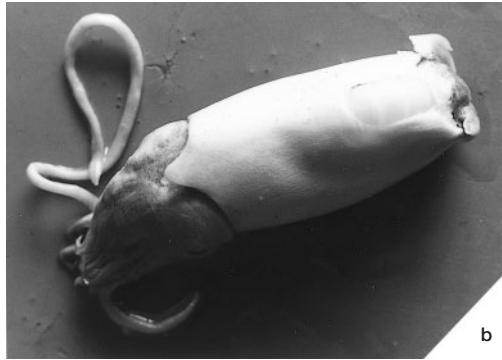
図7 現生のオウムガイの顎と歯舌 aはオウムガイの顎を開いて、口内の歯舌を示す。下顎内側に鋭い鋸歯が並ぶ。bは歯舌の拡大 cは歯舌のスケッチ dは上・下の顎を示す(c~dはA.ナエフによる)

海底の忍者タコは、ホタテガイやエビが大好物です。ホタテガイを見つけると、吸盤を備えた太い腕で貝を支え、貝柱の真上を狙って、殻に直径0.1ミリメートルから0.2ミリメートルほどの小さな孔をあけます。

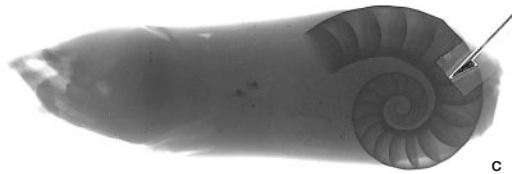
この小孔からチラミンと呼ばれる麻痺物質を貝柱に注入します。かくして、貝柱の緊張が解けて殻が開くと、たちまち内部の軟らかい肉を平らげてしまいます。甲殻類も同様な方法で仕留めます。

次に体内の甲と殻について説明しましょう。オウムガイの殻(図2,4,図8のd)は連室細管の項で、紹介することになります。まず、十腕目のなかでもコウイカ(図8のa)は、舟形をした石灰質の甲を持っています。ヤリイカの仲間はキチン質の細い羽根ペン状の楯があります。スピルラは巻きの緩い螺旋状の殻が筒形の胴体末端にあります(図8のb~c)。これらはいずれも外套膜内にあって、生涯露出することがありません。





b



c



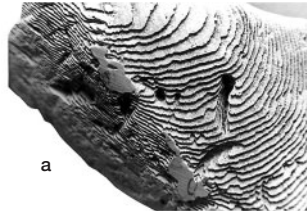
図8 殻を持つ頭足類の仲間
aはコウイカ 腹部(胴体)背側に隙間の多い石灰質の甲がある。b〜cはスピルラ(和名グロコウイカ) 腹部末端に巻きの緩い殻を持つ。cはX線像で、矢印はスピルラ独特の殻、多数の気室に分かれている。dはオウムガイ 美しい火焰状の斑紋で飾られた殻を持つ。殻内に大形の気室がある。

八腕目のタコ類では、アオイガイの雌だけが体外に半月形の薄い殻を持ち(図9)、卵の保育室として機能します。繁殖期を過ぎると、殻を捨て去ります。この殻は単なる卵の容れ物というにすぎません。アオイガイという名称は、殻の形が徳川家の葵の御紋に似ているからだとする説があります。

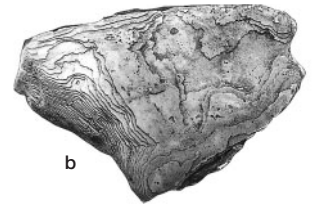


図9 アオイガイ(別名タコブネ)の化石 薄手の殻が溶け去り、その鋳型が残されたもの。房総半島の中新世末(約500万年前)の地層より産出した。

さて、舟形をしたコウイカの甲は、しばしば海岸の波打ち際に転がっているの、御記憶の方も多と思います(図10のa)。コウイカの甲の化石(図10のb〜c)は、既に1億8000万年ほど以前のジュラ紀初期の地層から発見されています。



a



b

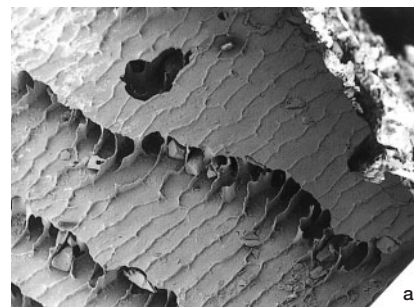


c

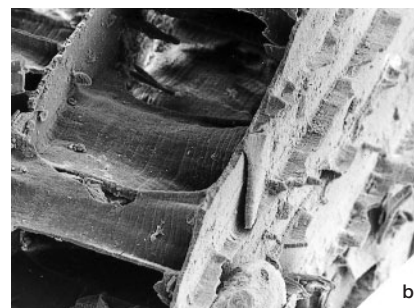
図10 コウイカの甲 aは現在の海岸で得たもの bは10万年前の化石種、房総半島北部の成田層から産出した。甲の前半部(左側)は失われている。cは北米サウスダコタ州の白亜紀後期の地層より得た。甲の大きさは40センチメートル近くある、写真下が甲の前方。

現生のコウイカの甲を細かく調べてみると、波型の垂直な石灰板と平らな石灰板が交互に重なり合って、構成されていることが分かります(図11)。この石灰層の間をゆっくりと水が通過します。

この構造はオウムガイやアンモナイトの隔壁襟と呼ばれる部分が、特別に発達したのではないかとする意見があります。この隔壁襟と連室細管のお陰で、アンモナイトやオウムガイ、スピルラでは独特の気室が形成されると言っても過言ではないでしょう。隔壁襟や連室細管の構造と機能について、オウムガイの項で詳述します。



a



b

図11 コウイカの甲の微細構造 aは低倍率像で、甲は水平な石灰板と波形の垂直な石灰板の互層から成っていることが分かる。bは波形の垂直板の部分を拡大して示す。写真右側は水平板の一部。

ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(20)

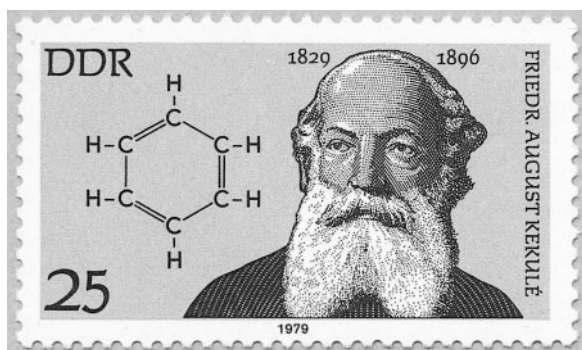
フリードリッヒ・アウグスト・ケクレ・フォン・シュトラドニッツ

Scientists and Engineers in German Stamps (20). Friedrich August Kekule von Stradonitz

筑波大学名誉教授 原田 馨

KAORU HARADA

Professor Emeritus, University of Tsukuba.



ベンゼン分子の構造とケクレの肖像のある記念切手。1979年DDR発行。



ケクレ・ベンゼンの構造発見100年記念切手。1946年西ドイツ発行。

フリードリッヒ・アウグスト・ケクレ・フォン・シュトラドニッツ

フリードリッヒ・アウグスト・ケクレ・フォン・シュトラドニッツ (Friedrich August Kekule von Stradonitz, 1829-1896)、化学者。

ヘッセン・ダルムシュタットの高官の子として生まれ、子供の頃から絵画と数学の才能に恵まれ、建築家を志望した。18才の時建築学を学ぶためギーセン大学に入学したが、J. リービヒ (Justus von Liebig, 1803-1873) の化学の講義に魅せられ、志望を建築学から化学へと変更した。この志望変更で家人との間にトラブルを生じたが、化学を専攻することが認められた。学業を終えた後、異母兄のいるロンドンに留学その後パリの優れた化学者を訪ね友好を深めた。次でハイデルベルク大学の私講師となり、私設実験室を作って研究に従事し、1858年ベルギーのゲント大学化学教授となった。

1850年頃までは分子を表現するには元素組成を以てするのが普通であり、分子の構造については未だ化学者の思考の外にあった。ケクレは1858年原子価論に基づく分子構造論を発表した。この原子価論は特に有機化合物の構造を明らかにするのに役立った。すなわち炭素は4価であり、4つの結合手を持っていることが、化学構造の表現に重要であった。原子価を短い線を以て表現することがA. S. クーパー (A. S. Couper, 1831-1892) により提案され、分子の化学構造は短い線で表現されるようになった。このような分子構造の表現により、元素組成が同じでも異なる分子の場合がある。これをS. アレニウス (Svante Arrhenius, 1859-1927) は異性体 (Isomer) と呼んだ。各々の分子は異なる構造式により表現することができる。

分子の化学構造が明らかになると、化学者は有機化合物を合成する指針を得たことになり、ここに有機合成化学が誕生した。

ケクレは彼の原子価論により有名になり1860年第一回国際化学者会議をカールスルーエで開催した。その会議においてアヴォガドロ (Amedeo Avogadro, 1776-1856) の説をイタリアのカニッツァーロ (Stanislao Cannizzaro, 1826-1910) が紹介したことにより、分子概念が構造化学と結びつくことになった。更に残された重要な問題はベンゼン分子の構造であった。1865年芳香族化合物の分子構造に関する説をたて、ベンゼン分子の構造式は6個の炭素が互いに結合して輪をつくり六角形の形をとると提唱した。

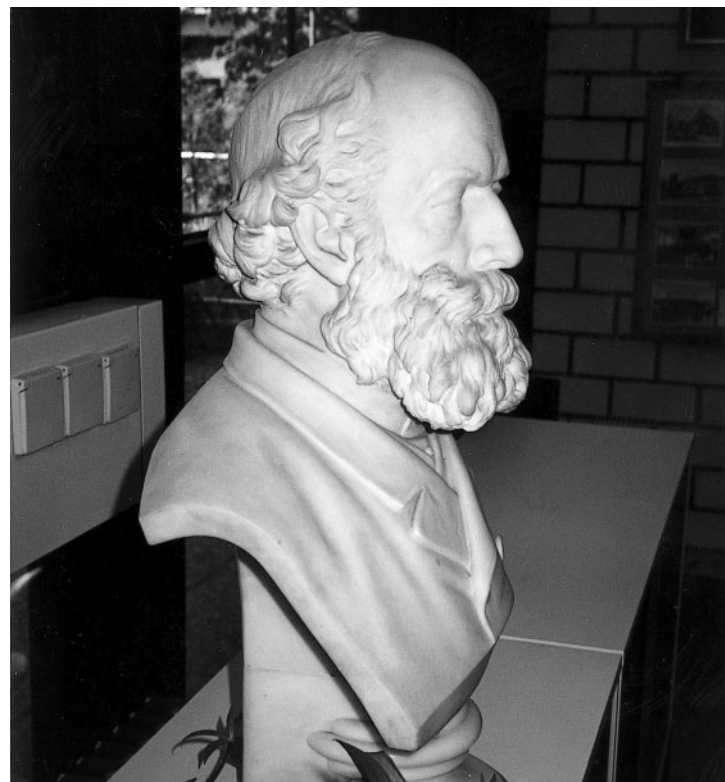
ベンゼン分子の構造の発見 (1865年) から25年後の1890年ベンゼンの構造発見を記念する祝賀会 (ベンゼン祭) がベルリンでドイツの化学会、産業界、及び政界協同で行われた。これは1860年頃からドイツ各地で石炭タール工業が急激に発達し、1890年にはそれらの化学工業が隆盛を極め、ドイツの化学が世界を制する状態になったからである。このことは化学会、産業界、政界の何れにとっても喜ばしいことであり、祝賀会の開催となった。この祝賀会の席でケクレはある冬、暖炉のそばで執筆していた時に、蛇が自分の尾を咬みながら回っている夢を見て、ベンゼンの環状構造を思いついたのがはじまりであると述べた。これは科学的発見の過程を説明する美しい物語である。何時も問題を抱えている人は突然のインスピ



晩年貴族に列せられた時に受けた爵位記。

レーションにより、一挙に問題が解決されることはあり得ることである。しかし実際に蛇の夢を見たか否かは、他人がこれを知ることはできない。私達は夢を見ることで問題が解決したと云うケクレの言葉を、功なり名を遂げた大家の「詩と真実」として受け入れたいと思う。

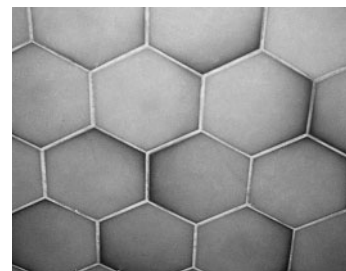
老年になって化学における功績により貴族に列せられ、von シュトラドニッツと称するようになった。



ケクレ・コレクションにあるケクレの大理石の胸像。



ケクレ・コレクションの展示室にある立像。



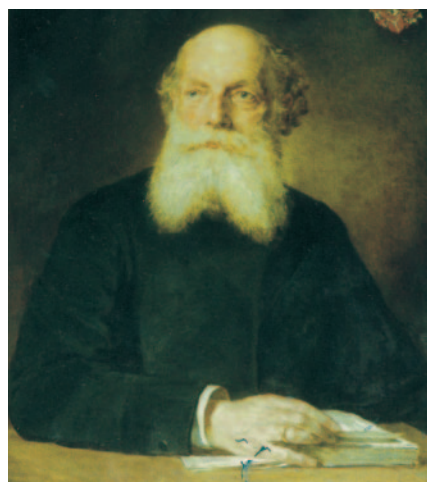
ダルムシュタット工科大学のケクレ講堂はベンゼン構造と同じ六角形であり、床のタイルの形も六角形であった。

ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(20) フリードリヒ・アウグスト・ケクレ・フォン・シュトラドニッツ



2頭のスフィンクスに囲まれた立像の台座に、数人の労働者が知の女神からベンゼンリングを受け取っているレリーフがはめ込まれている。

メッケンハイマー大通りに面した、ダルムシュタット工科大学、旧化学教室前にある立像。



「ベンゼン祭(Benzol Fest)」の時に贈られたケクレの肖像画。



1890年の記念祝賀会「ベンゼン祭」の時に受け取った祝賀状。



墓石にはめ込まれているケクレの拡大写真。

ボンのポッペルストルフ墓地にある赤御影の墓石。

表紙写真

ヒツジグサ「未草・子午蓮」 スイレ科スイレ属

未の刻(午後2時頃)になると花を開くため、この名前が呼ばれるようになった。これが定説のようですが、実際は11時頃から4時頃までは花を咲かせています。平地から亜高山の池や沼などの幅広い範囲に自生し、花の径は、3〜4センチ程度。池塘に群生したヒツジグサと、水面に写る至仏山を組み合わせた写真はよく目にすると思います。睡蓮は、この花を改良した園芸種と言われています。(写真文 北原)

編集後記

あけましておめでとうございます。

読者の皆様、執筆者の皆様におかれましては、より新年をお迎えになられたことと心よりお慶び申し上げます。ケミカルタイムスも皆様の温かいご支援と多くの貴重なご意見に支えられ、お蔭様をもちまして恙無く良き新年を迎えることができました。心より感謝申し上げます。

ケミカルタイムスの編集は、弊社品質システムを通じてあらゆる技術に関連をもつ品質保証部長と各事業部より専門性に優れたスタッフを集めて活動されています。時節柄今年も多くの団塊世代が現役を退かれますが、本誌編集責任者も次号を節目に交代することとなりました。

新風の流れにも大いにご期待頂きたいところですが、弊社スローガン「技術を駆使して明日への創造」を目的とし、及ばずながら化学の文化を常に大切にして社会に貢献できるよう今年もより良い誌面を目指して編集員一同頑張る所存です。

本年も何とぞよろしくお願い申し上げます。(古藤 薫)



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20年1月1日 発行