

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. Cica CHEMICAL TIMES

2008 No.4(通巻210号)

ISSN 0285-2446

非ベンゼン系芳香族単位を含む共役系高分子の合成と特性	高木 幸治	2
フィコリン：自然免疫に働く新たなレクチンファミリー	松下 操	9
膠原病と自己抗体	窪田 哲朗 新居 登紀子	16
液体クロマトグラフィーの基礎技術(2) -順相(吸着)クロマトグラフィーについて-	酒井 芳博	20
ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(23) ロベルト・ヴィルヘルム・ブンゼン	原田 馨	26
編集後記		28



非ベンゼン系芳香族単位を含む共役系高分子の合成と特性

Synthesis and Property of Conjugated Polymers Bearing Non-Benzenoid Aromatic Unit

名古屋工業大学 大学院工学研究科 准教授 高木 幸治

KOJI TAKAGI

*Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering,
Nagoya Institute of Technology*

1. はじめに

木曽ヒノキや青森ヒバから抽出されるヒノキチオールは、炭素7個が環状に結合した芳香族化合物である。炭素6個からなる芳香族化合物とは大きく異なる性質を示すことから、有機構造化学や理論分子化学の分野で盛んに研究が行われてきた。また、ヒノキチオールには、生理活性作用や抗菌作用があるため、最近では、これを含む化粧品（ハンドソープ、育毛剤、歯磨き粉など）も市販されている。ヒノキチオールの名前は、当時台湾大学の教授であった野副鉄男博士（のち東北大教授）が、タイワンヒノキ材の研究をしている過程で発見したことに由来する¹⁾。また、全く別に研究を進めていたDewarも、ほぼ同時期にヒノキチオールの構造に辿り着いた²⁾。ヒノキチオールのような7員環の核をトロポロンと言い、この骨格をもつ一連の分子群をトロポノイド（トロポロン類）と呼ぶ。

トロピリウムイオンは、非局在化した6 π 電子系をもち、環歪みも小さく安定な化合物であることが予想される。Doeringらは、トロピリデンの臭素化、脱臭化水素によって臭化トロピリウム（図1a）を単離し、スペクトルデータやX線構造解析の結果から、平面状正7角形の構造を証明した³⁾。一方、トロポロン（図1b）は、極性6 π 電子系構造の共鳴寄与が大きい場合には、トロピリウムイオン類似の芳香族性が期待される。水にかなり溶解易く吸湿性をもつこと、IRにおけるカルボニルの振動吸収が通常に比べてかなり低波数であることから、トロポンのカルボニル基は分極していることが考えられるが、ポリエノンとしての性質も強い化合物である^{4,5)}。トロポンは、かなり強い塩基性を示し、酸と容易に反応してヒドロキシトロピリウムイ

オンを形成して安定化する^{6,7)}。また、トロポンの α 位にヒドロキシル基をもつ α -トロポロン（図1c）（以下、単にトロポロンと省略）は、ヒノキチオールの母体化合物であり、分子内水素結合に起因した興味深い性質をもっている⁸⁾。トロポロンは、不飽和7員環エノールケトン構造であるにも関わらず著しい安定性をもち、フェノールに類似した反応性を示す。金属イオンと安定な錯塩を形成することも知られており、検出や確認にも利用されている⁹⁻¹¹⁾。

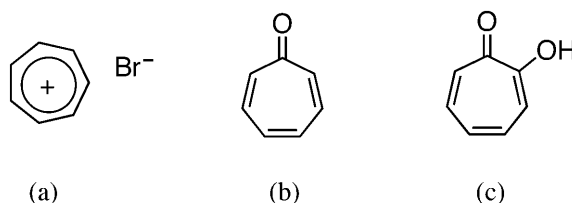


図1 不飽和7員環芳香族化合物の一例

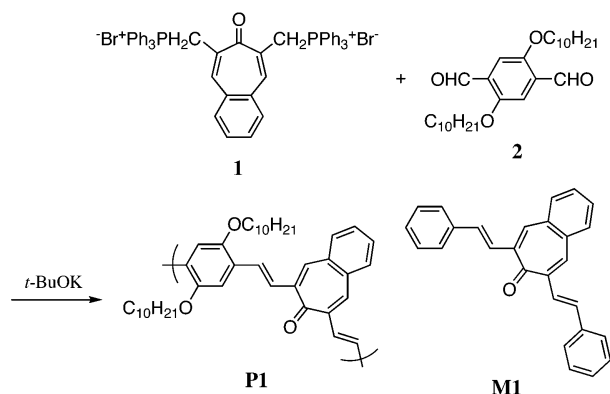
このように、トロポノイド化合物の構造や反応に関しては、半世紀も前に活発な議論が展開されているが、これを機能性材料へと展開した例^{12,13)}は多くない。特に、これらを共役系に組み込んだ場合、その独特な電子構造から、興味深い物性を示す材料の創出が期待される。共役ポリマーは、発光性や導電性、製膜性、力学安定性などの特徴を活かして、さまざまな機能性デバイスへの応用が期待されている。白川英樹博士らによる導電性ポリアセチレンの発見^{14,15)}に端を発し、数多くの共役ポリマーが合成研究されてきた。過去に報告されている共役ポリマーは、ベンゼンやピリジンなどの6員環骨格、チオフェンやピロールなどの5員環骨格を芳香族単位とす

るものがほとんどである。共役ポリマー中に窒素や硫黄といったヘテロ元素をもつ芳香環を導入した場合、金属キレート効果によるイオンセンシング機能が付与される¹⁶⁻²²⁾など、より付加価値の高い材料を得た報告例もある。我々は、7員環構造を有するトロポノイドを新しい芳香族単位として共役ポリマーに導入し、構造と吸収・発光特性の関係を系統的に研究した。トロポノイドは、ベンゼン環が縮環するかどうかで、その性質に大きな違いが現れることが知られている²³⁻²⁵⁾。そこで、ベンゾトロポン型とトロポン型の2つのタイプについて、これらを主鎖にもつ共役ポリマーを合成し、吸収・発光特性を明らかにした。さらに、トロポンをもつ共役ポリマーも合成し、分子内水素結合の形成による吸収・発光特性の変化を検討した。本稿では、これらに関する我々の研究を紹介する。なお、詳細については、各項で挙げた原著論文を参考にしていただきたい。

2. ポリマー合成と特性評価

2.1 ベンゾトロポン型

フタルアルデヒドとジエチルケトンから2,9-ジメチルベンゾトロポンを合成し、N-ブロモスクシンイミド(NBS)によるブロモ化の後、トリフェニルホスフィンとの反応で得たホスホニウム塩(1)をモノマーとした。塩基触媒下、1と2,5-ジデシロキシ-1,4-ジホルミルベンゼン(2)のWittig重縮合を行ったところ、ベンゾトロポンの2,9位でつながったポリマー(P1)が得られた²⁶⁾(スキーム1)。また、比較対象として、繰り返し単位に似た構造をもつモデル化合物(M1)も合成した。



スキーム1 Wittig重縮合によるベンゾトロポンを含む共役ポリマー(P1)の合成、およびモデル化合物(M1)

長鎖アルコキシ基をもつP1は、汎用有機溶媒に高い溶解性を示した。¹H NMRスペクトルから、二重結合はトランス構造のみからなっていることが分かった。MALDI-TOF-MSスペクトルを測定した結果、繰り返し単位の分子量に相当する間隔でピークが観測されたことより、ベンゾトロポンのカルボニル基は重合に関与せず、定量的にポリマー骨格中に残存していることが確認された。ポリマー末端には、イリド中間体に帰属される構造が残っており、ベンゾトロポンを置換基としてもつイリドは、安定イリドに分類されるものであることが分かる。M1と吸収・発光スペクトルを比較した結果、いずれもP1の方が長波長シフトしたことから、ベンゾトロポンユニットを介して共役が伸張していることが分かった(図2)。一方、長鎖アルコキシ基をもつベンゼン-1,4-ビス(ホスホニウム)塩を第3モノマーとして加えたWittig共重縮合により、さまざまな割合でベンゾトロポンを含む共役ポリマーを合成した²⁷⁾。ポリマー中のモノマー組成比は、およそ仕込み比によって制御できた。ベンゾトロポンの含有量が小さくなるほどシス二重結合の比率が高くなったが、ヨウ素を触媒とする異性化反応により、完全なトランス二重結合のみからなるポリマーを得た。極大吸収波長は、ベンゾトロポンの含有量が大きくなるほど短波長シフトした。また、極大発光波長は、いずれのポリマーでも560nm付近(オレンジ色発光)であり、ベンゾトロポンを含むポリマーでは、概して蛍光量子収率が低い値であった(約1%)。これは、ベンゾトロポンを含むほどストークスシフトが大きくなるため、励起エネルギーの損失があることと、カルボニル基が存在することで、励起三重項状態への項間交差を起こしやすいためであると思われる。

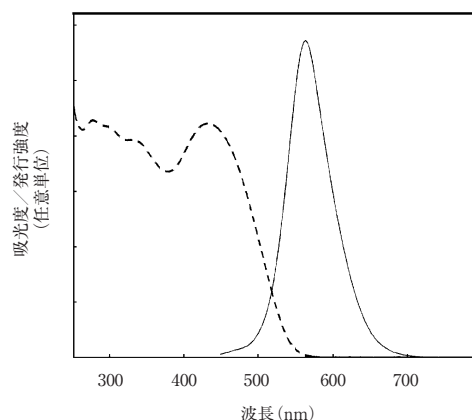


図2 P1の吸収(破線)と発光(実線)スペクトル(CHCl₃溶液、10⁻⁵ M)

同様な方法で、チオフェンを含む共役ポリマー (P2) も合成した²⁷⁾ (図3)。この場合も、二重結合は完全なトランス構造であった。¹³C NMRスペクトルで、カルボニル炭素に帰属されるシグナルがP1よりも高磁場側に見られること、吸収スペクトルの吸収端から算出されるオプティカルバンドギャップがP1よりも狭くなっていることから、チオフェンとベンゾトロポンとの間で分子内電荷移動 (CT) 相互作用が起きていることが示唆された。発光スペクトルは、励起波長によって異なる結果を与えた。極大吸収波長に相当する光 (404nm) で励起した場合、オレンジ色発光を示したのに対し、吸収スペクトルのショルダーが見られた505nmの光で励起した場合、赤色発光が観測された。長波長側での吸収や発光は、前述のCT相互作用に起因するものであると考えられる。

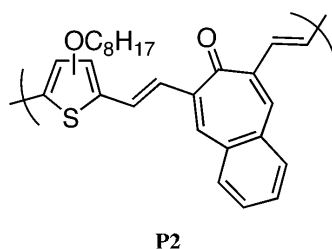


図3 チオフェンを含む共役ポリマー (P2)

繰り返し単位ごとにベンゾトロポンを含むP1にトリフルオロ酢酸 ($pK_a=0.23$) を添加したところ、溶液の色がオレンジ色から濃赤色に変化した²⁸⁾。吸収スペクトルでは、418nmのピーク強度が減少し、長波長側にテーリングが見られた (図4)。M1では、酸を加えてもスペクトルに変化がなかったことから、ベンゾトロポンが共役ポリマー主鎖に組み込まれることでカルボニル基の塩基性が変化したと考えられる。酸性度の高いメタンスルホン酸 ($pK_a=-1.2$) では、少量で同様な変化を生じ、酸性度の低い安息香酸 ($pK_a=4.2$) では、過剰量加えても変化は見られなかった。発光スペクトルは、プロトン酸の添加に伴い短波長シフトしつつ、蛍光量子収率が大きく減少した。AM1法を用いた2,9-ジメチルベンゾトロポンの分子軌道計算より、プロトンがカルボニル基に付加することで、トロポンの7員環が平面構造となることが示唆された (図5) ことから、

ポリマー分子間で凝集した構造をとることに起因するものであると結論づけた。逆に、ルイス塩基 (トリエチルアミン) を添加すると、溶液は元のオレンジ色に戻り、吸収スペクトルもプロトン酸添加前のものに近づいた。

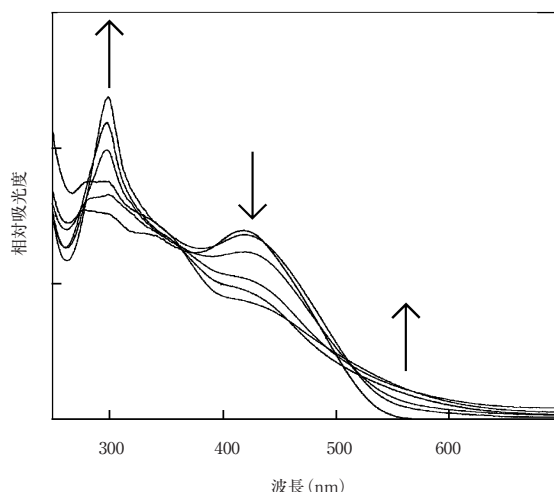


図4 トリフルオロ酢酸の添加に伴うP1の吸収スペクトル変化 ($CHCl_3$ 溶液、 10^{-5} M)

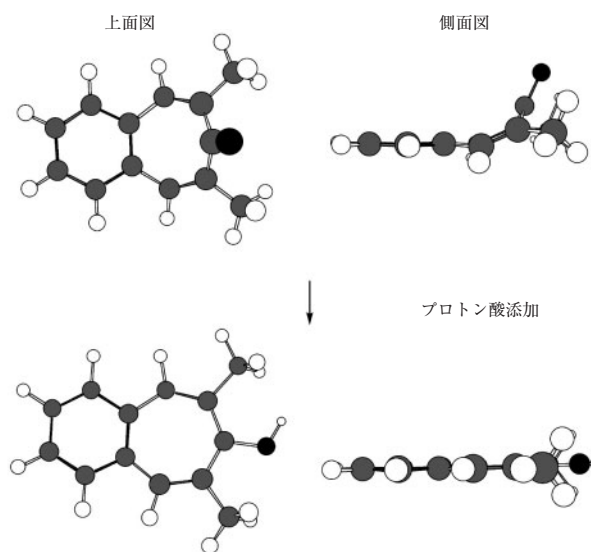


図5 2,9-ジメチルベンゾトロポンの最安定構造 (AM1法)

先に得られている2,9-ジメチルベンゾトロポンに、硫酸銀触媒下で臭素を加え、4,7-ジブromo-2,9-ジメチルベンゾトロポン (3) を合成した。3と2,5-ジデシロキシ-1,4-ジビニルベンゼン (4)、または2,5-ジビニル-3-オクチロキシチオフェン (5) を用いて、酢酸パラジウム触媒によるHeck反応で重合が進行し、トランス二重結合のみからなるポリマー (P3、P4) が得られた²⁹⁾ (スキーム2)。IRスペクトル

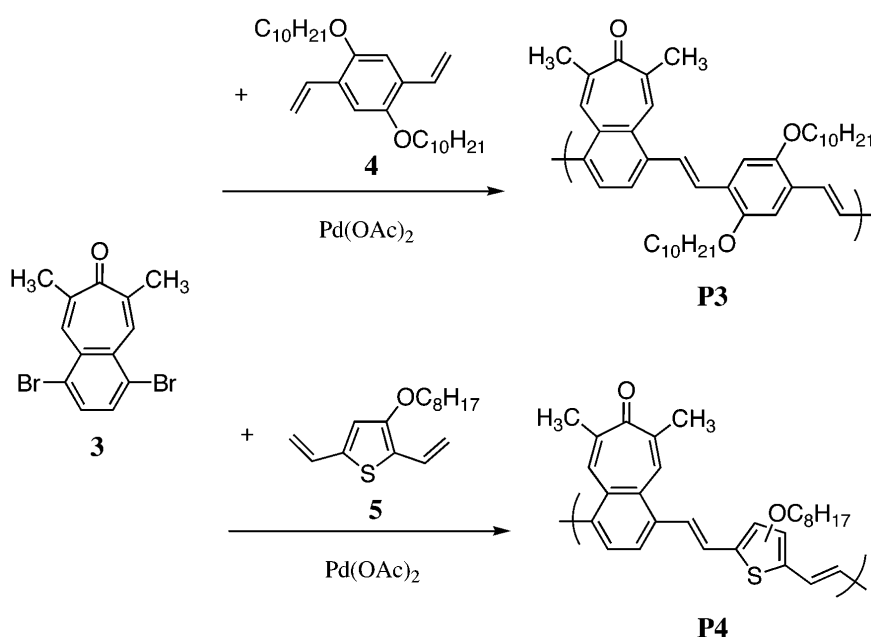
におけるカルボニル基の振動吸収は、P3とP4いずれも 1593cm^{-1} であった。ベンゾトロポンの2,9位でつながったP1とP2では、共重合相手となるユニットがベンゼン環であるかチオフエン環であるかによって、カルボニル基の振動吸収が異なったこと(前述)と対照的であった。P3やP4では、カルボニル基が主鎖の共役から遠い位置にあるため、電子的な摂動を受けていないことが予想される。P3はP1と比べて約8倍蛍光量子収率が上がったこともこれを裏づけている(表1)。

表1 P3とP4の分子量、および光物性

ポリマー	M_n^a	λ_{max} (吸収) ^b (nm)	λ_{max} (発光) ^b (nm)	蛍光量子収率 ^b (%)
P3	7,900 (2.3)	312, 427	544	8.3
P4	2,800 (2.2)	442	561	0.2

^aTHFを溶離液としたGPC測定から算出(括弧内は分子量分布)

^b CHCl_3 溶液 (P3は 10^{-6}M 、P4は 10^{-5}M)



スキーム2 Heck反応による共役ポリマー(P3, P4)の合成

極大吸収波長は、トロポンが縮環しないポリマーと比べて15nmほど短波長シフトしており、3,8位の水素とビニレン水素の立体反発によって主鎖が幾分ねじれた構造をとっていることが原因として考えられる。これに対して、立体反発のない三重結合でつながったポリマー(菌頭カップリングにより合成、構造式は略)は、より長波長側に吸収極大を示した。また、P3よりP4の方が15nmほど極大吸収波長も極大発光波長も長波長シフトしているが、これは先のCT相互作用によるものではなく、チオフエンとビニレンがなす二面角が小さいためであることが分子軌道計算の結果より証明されている。

2.2 トロポン型

トロポンと臭素を反応させて得られる2,7-ジプロモトロポン(6)と4とのHeck反応によりポリマー(P5)を合成した³⁰⁾(スキーム3)。IRスペクトルにおけるカルボニル基の振動吸収(1568cm^{-1})は、ベンゼンが縮環したP1よりも低波数側に観測され、より分極した状態にあることが示唆された。ベンゼン環のあるなしで吸収スペクトルにも大きな違いが見られた。P5の極大吸収波長は515nmに見られ、ベンゼンが縮環したP1よりも約80nm長波長シフトした(図6)。一般的な π 共役系分子の場合、ベンゼンが縮環すると共役が広がり、スペクトルが長波長シフトする傾向にある³¹⁾ことと好対

照であった。トロポンはベンゼンが縮環すると極性6 π 電子系構造の共鳴寄与が小さくなるとされている²³⁻²⁵。P5では、カルボニル基の分極により生じたカチオン電荷がポリマー主鎖に沿って非局在化し、あたかもプロトンドープされたかの如く振る舞うことで、大きく共役が広がった構造をとっていると推測された。これを支持する結果として、P5では、発光が完全に消光すること、トリフルオロ酢酸を添加しても吸収スペクトルに変化が見られないことを確認している。また、フィルム状態とすることで、極大吸収波長が12nm長波長シフトし、吸収端から求めたオプティカルバンドギャップは1.55eVと比較的狭い値を示した。さらに、フィルムのWAXD測定から、P5のポリマー鎖が形成する π - π スタッキングの面間隔は4.0Åであり、ベンゼンが縮環したP1の4.5Åと比較して狭くなっていることから、凝集構造をとりやすいポリマーであることが分かった。

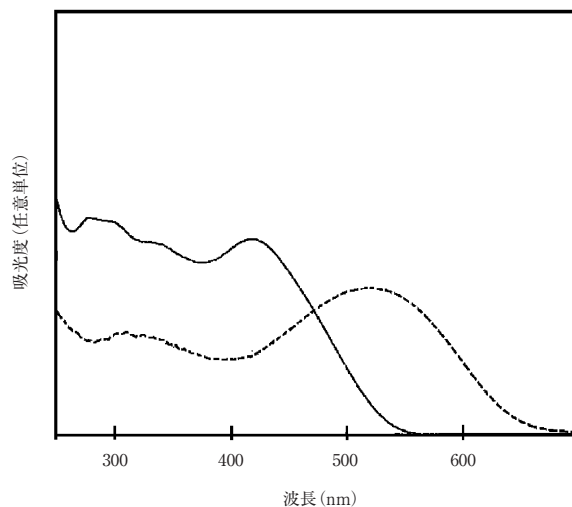
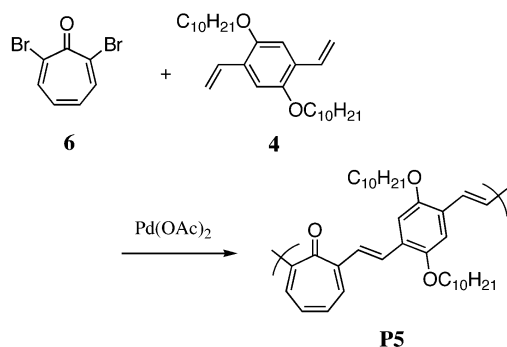


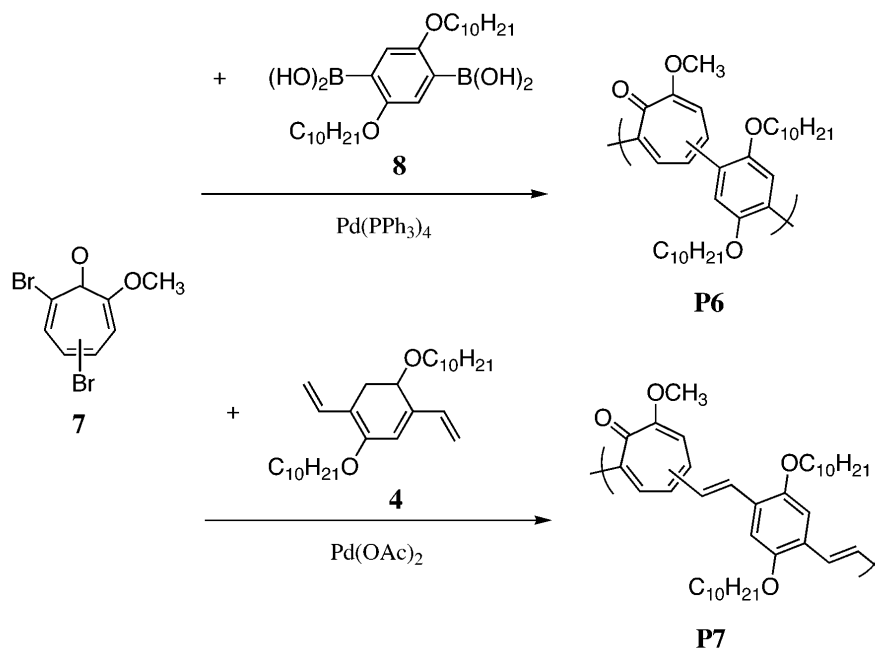
図6 P1(実線)とP5(破線)の吸収スペクトル(CHCl_3 溶液、 10^{-5} M)



スキーム3 Heck反応による共役ポリマー(P5)の合成

2.3 トロポロン型

シクロヘプタノンから出発して2段階(臭素化、求核置換)でジブロモメチルトロポロン(7)を得た。2つの臭素の置換位置は、4,7位と5,7位の混合物であったが、分離精製が困難であったため、このまま重合に用いた。1,4-ジボロン酸-2,5-ジデシロキシベンゼン(8)との鈴木カップリング、あるいは4とのHeck反応により、結合様式が異なる2つのポリマー(P6、P7)を合成した³²(スキーム4)。



スキーム4 メチルトロポロンを含むポリマー(P6、P7)の合成

クロロホルム溶液で吸収・発光スペクトルを測定したところ、P6よりもP7の方が長波長側に観測された(図7)。P6のデシロキシ基をデシル基に変えたポリマー(構造式は略)では、吸収スペクトル、発光スペクトルともに短波長シフトしたことから、アルコキシベンゼンとメチルトロポロンとの間にCT相互作用が存在することが示唆された。続いて、LiIでメチルエーテル基をヒドロキシル基に変換する反応を行ったところ、P6は長鎖アルコキシ基も切断され、有機溶媒に不溶になってしまったのに対し、P7は期待通り反応が進行した。P6については、トロポロンにより活性化されたヨウ素アニオンが、立体的に近傍に存在する長鎖アルコキシ基も切断したと思われる。P7では、ヒドロキシル基となったところで分子内水素結合を形成し、IRスペクトルにおけるカルボニル基の振動吸収が大きく低波数シフトした。さらに、ヒドロキシル基をもつポリマーの溶液に金属イオンを添加したところ、吸収スペクトルでは目立った変化はなく、発光スペクトルでも強度が多少弱くなる程度であった。低分子のトロポロンでは、両スペクトルともに大きく変化することから、トロポロンが共役ポリマー中に組み込まれることで、電子的あるいは立体的な要因により、キレート能力が低下したと思われる。

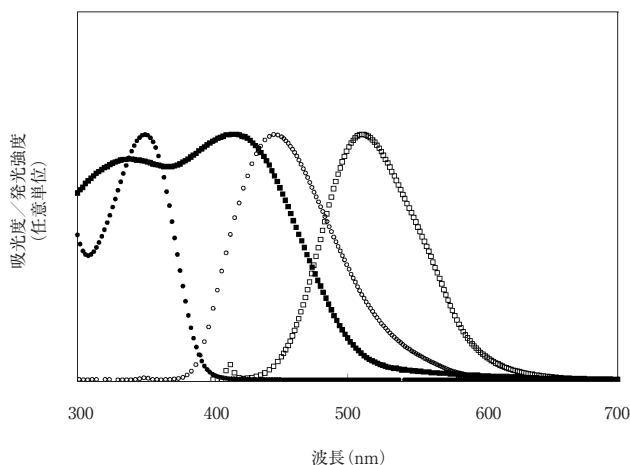


図7 P6とP7の吸収、発光スペクトル(CHCl_3 溶液、 10^{-5} M) P6(●:吸収、○:発光)、P7(■:吸収、□:発光)

3. おわりに

本稿では、非ベンゼン系芳香族化合物を繰り返し単位

とする新しい共役ポリマーの合成と特性について、我々の研究を概説した。トロポロンは、大きな双極子モーメント(3.71 debye)や両極性($\text{pK}_a=0.67$, $\text{pK}_{\text{HB}}=-0.86$)といった特徴³³⁻³⁷⁾に加えて、遷移金属イオンやランタノイドイオンと安定な錯体を形成する³⁸⁻⁴¹⁾ことも知られている。これらは、ベンゼン系芳香族化合物には見られない性質である。最近では、この特徴を利用した刺激応答性の蛍光発色団ならびに超分子ポリマーの開発にも成功している。紙面の都合から取り上げることはできなかったが、古い歴史をもつトロポノイドから新しい機能性材料が生まれることを期待し、引き続き研究を進めていきたい。

最後に、実際の研究に熱心に取り組んでくれた学生諸氏に感謝し、この場を借りてお礼申し上げる。

引用文献

- 1) 野副鉄男, 桂 重男, 薬誌, **64**, 181 (1944).
- 2) M. J. S. Dewar, *Nature*, **155**, 50 (1945).
- 3) W. von E. Doering and L. H. Knox, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3203 (1954).
- 4) D. J. Bertelli and T. G. Andrew, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5280 (1969).
- 5) C. A. Veracini and F. Pietra, *Chem. Commun.*, **1972**, 1262.
- 6) K. M. Harmon, A. B. Harmon, T. Y. Coburn, and J. M. Fisk, *J. Org. Chem.*, **33**, 2567 (1968).
- 7) von E. K. Jensen, N. Tarköy, A. Eschenmoser, and E. Heilbronner, *Helv. Chim. Acta.*, **39**, 786 (1956).
- 8) M. J. Cook and E. J. Forbes, *Tetrahedron*, **24**, 4501 (1968).
- 9) T. Nozoe, S. Seto, Y. Kitahara, M. Kunori, and Y. Nakayama, *Proc. Japan Acad.*, **26**, 38 (1950).
- 10) J. D. Knight and D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4136 (1951).
- 11) W. von E. Doering and L. H. Knox, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2305 (1950).
- 12) M. Takemoto, A. Mori, and S. Ujiie, *Chem. Lett.*, **1999**, 1177.
- 13) R. J. Cornell and L. G. Donaruma, *J. Polym. Sci., Part A*, **3**, 827 (1965).
- 14) H. Shirakawa and S. Ikeda, *Polym. J.*, **2**, 231 (1971).
- 15) H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, and A. J. Heeger, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1977**, 578.
- 16) B. Wang and M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12 (1997).

- 17) Y. Eichen, G. Nakhmanovich, V. Gorelik, O. Epshtein, J. M. Poplawski, and E. Ehrenfreund, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10463 (1998).
- 18) W. Y. Huang, H. Yun, H. S. Lin, T. K. Kwei, and Y. Okamoto, *Macromolecules*, **32**, 8089 (1999).
- 19) L. Lu and S. A. Jenekhe, *Macromolecules*, **34**, 6249 (2001).
- 20) B. Liu, W.-L. Yu, J. Pei, S.-Y. Liu, Y.-H. Lai, and W. Huang, *Macromolecules*, **34**, 7932 (2001).
- 21) C. G. Bangcuyo, M. E. Rampey-Vaughn, L. T. Quan, S. M. Angel, M. D. Smith, and U. H. F. Bunz, *Macromolecules*, **35**, 1563 (2002).
- 22) A. P. Monkman, L.-O. Palsson, R. W. T. Higgins, C. Wang, M. R. Bryce, A. S. Batsanov, and J. A. K. Howard, *J. Am. Chem. Soc.*, **21**, 6049 (2002).
- 23) M. Stiles and A. J. Libbey, *J. Org. Chem.*, **22**, 1243 (1957).
- 24) D. J. Bertelli and T. G. Andrew, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5280 (1969).
- 25) G. L. Buchanan and D. R. Lockhart, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 3586.
- 26) K. Takagi, Y. Nishikawa, H. Kunisada, and Y. Yuki, *Chem. Lett.*, **2001**, 1244.
- 27) K. Takagi, Y. Nishikawa, N. Nishioka, H. Kunisada, and Y. Yuki, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **40**, 3927 (2002).
- 28) K. Takagi, K. Mori, T. Kinoshita, H. Kunisada, and Y. Yuki, *Chem. Lett.*, **32**, 552 (2003).
- 29) N. Nishioka, K. Takagi, T. Kinoshita, H. Kunisada, and Y. Yuki, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **42**, 1208 (2004).
- 30) K. Takagi, K. Mori, H. Kunisada, and Y. Yuki, *Polym. Bull.*, **52**, 125 (2004).
- 31) M. Levitus, K. Schmieder, H. Ricks, K. D. Shimizu, U. H. F. Bunz, M. A. Garcia-Garibay, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4259 (2001).
- 32) K. Takagi, K. Saiki, K. Mori, Y. Yuki, S. Matsuoka, and M. Suzuki, *Polym. J.*, **39**, 813 (2007).
- 33) W. von E. Doering and L. H. Knox, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 828 (1951).
- 34) H. Hosoya and S. Nagakura, *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 1414 (1966).
- 35) Y. Kurita, T. Nozoe, and M. Kubo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **24**, 10 (1951).
- 36) H. Shimanouci, Y. Sasada, *Acta Cryst.*, **B29**, 81 (1973).
- 37) R. W. Gable, M. F. Mackay, M. G. Banwell, and J. N. Lambert, *Acta Crystallogr. C*, **46**, 1308 (1990).
- 38) B. E. Bryant, W. C. Fernelius, and B. E. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3784 (1953).
- 39) B. E. Bryant, W. C. Fernelius, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1696 (1953).
- 40) E. L. Muetterties, C. M. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4706 (1965).
- 41) J. Zhang, P. D. Badger, S. J. Geib, S. Petoud, *Inorg. Chem.*, **46**, 6473 (2007).

フィコリン：自然免疫に働く新たなレクチンファミリー

Ficolins: A novel lectin family involved in innate immunity

東海大学 工学部生命化学科 教授 松下 操

MISAO MATSUSHITA (Professor)

Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

1. はじめに

フィコリンはコラーゲン様ドメインとフィブリノーゲン様ドメインを併せ持つタンパク質のファミリーである^{1,4)}。コラーゲン様ドメインはコラーゲンに見られるように、グリシンが3アミノ酸残基ごとに繰り返す構造をいい、フィブリノーゲン様ドメインは血液凝固因子のフィブリノーゲンの β 鎖と γ 鎖のC末端側のアミノ酸配列に相同性のある約230アミノ酸残基から構成される構造をいう。1993年、ブタ子宮細胞膜上の新規TGF- β 1結合タンパク質が上記2つのドメインのキメラ構造を持つタンパク質として初めて発見されフィコリンと命名された⁵⁾。以来、フィコリン構造を有するタンパク質は脊椎動物と無脊椎動物から多く見いだされている。これらのフィコリンの多くはレクチン活性を持ち、主にN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に結合性を示すことがわかって来た。従って、現在フィコリンはレクチンの新たなファミリーとして位置づけられている。フィコリンは感染初期の自然免疫において重要な働きをしている。本稿ではヒトのフィコリンを取り上げ、その構造と機能を中心に概説する。

2. フィコリンの構造と糖鎖認識

ヒトには3種類のフィコリン (L-ficolin, H-ficolin, M-ficolin) がある。

2.1 L-ficolin

L-ficolin (別称: ficolin 2, ficolin L, EBP-37, hucolin) は35kDaの単一のサブユニットから成るオリゴマーであり、サブユニットは次の4つのドメインから構成される⁶⁾。1) N末端側の2つのシステイン残基を含むドメイン、2) それに続

くコラーゲン様ドメイン、3) 短いセグメントの領域 (ネックドメイン)、4) C末端側のフィブリノーゲン様ドメイン (図1 A)。3分子のサブユニットはコラーゲン様ドメインの部分で結合してヘリックス構造を形成し、またN末端側のシステイン残基を介してジスルフィド結合で架橋することにより1つのユニットとなる。更に4つのユニット同士がジスルフィド結合を介して架橋してL-ficolinのオリゴマー (4量体) となる (図1 B)。

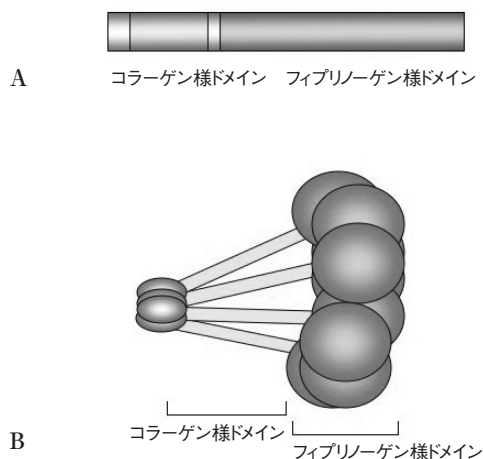


図1 フィコリンのドメイン構造(A)とL-ficolinの4量体構造(B)

フィブリノーゲン様ドメインが球状構造をつくる為に、L-ficolinは全体としてはブーケ状の形態をしている。L-ficolin遺伝子 (FCN2) は第9染色体 (9q34) にあり、8つのエキソンから構成される⁷⁾。各エキソンがコードする部分は以下の通り。第1エキソン:5' UT、シグナルペプチドと9アミノ酸。第2,3エキソン:コラーゲン様ドメイン。第4エキソン:ネックドメイン。第5~7エキソン:フィブリノーゲン様

ドメインの上流部。第8エキソン:フィブリノーゲン様ドメインの残りと3' UT。L-ficolinは肝臓で作られ、血中に分泌される。血清濃度は約3 μ g/ml。L-ficolinはGlcNAcに結合するレクチンとして報告されたが⁶⁾、その後の研究でGlcNAcのアセチル基に結合することが判明した⁸⁾。アセチル基の他に β (1 $\rightarrow$ 3)-D-グルカンに対する結合性もある⁹⁾。後述するように、これらの結合部位はフィブリノーゲン様ドメインに存在する。生理的な意味については不明であるが、L-ficolinはエラスチンとコルチコステロイドにも結合することが報告されている^{10,11)}。

2.2 H-ficolin

H-ficolin (別称: 博多抗原, ficolin H, ficolin 3, β 2 thermolabile macroglycoprotein) は全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清中に存在する自己抗体によって認識される抗原として見つかり、博多抗原の名称で知られていたタンパク質である¹²⁾。1998年にその一次構造が明らかとなりフィコリンファミリーのタンパク質であることが判明した¹³⁾。H-ficolinは34kDaのサブユニットがL-ficolinと同様な様式で結合したオリゴマーであるが、SDS-PAGEで解析すると非還元下において複数のバンドが見られることから、L-ficolinと異なり多様なサイズのオリゴマー構造をしている。一方、電子顕微鏡像からは6量体のモデルが提唱されている¹³⁾。H-ficolin遺伝子 (*FCN3*) は第1染色体 (1p35.3) にあり、L-ficolin遺伝子と類似の8つのエキソンから構成される。H-ficolinは肝臓で合成されて胆管や血中に分泌される。また、肺の気管支上皮細胞やII型肺胞上皮細胞で産生されて気管支や肺胞に分泌されるタイプもある¹⁴⁾。血清濃度は7~23 μ g/ml。H-ficolinはGlcNAc、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、フコースに結合し、マンノースとラクトースには結合しないと報告されている¹³⁾。しかし、筆者らの研究からはH-ficolinのGlcNAcへの結合性は非常に弱いと推定される。H-ficolinの結合が明らかになっている物質は唯一、細菌 *Aerococcus viridans* の細胞壁多糖 (PSA) である¹⁵⁾。PSAはグルコース、マンノース、GlcNAc、キシロースより構成される多糖であるが、H-ficolinがどの糖に親和性を持つかはわかっていない。

2.3 M-ficolin

M-ficolin (別称: ficolin M, ficolin 1) は単球、脾臓、肺にmRNAの発現が見られるフィコリンである¹⁶⁻¹⁸⁾。M-ficolinの遺伝子 (*FCN1*) はL-ficolinと同じく第9染色体

(9q34) に存在しエキソン構成が類似しているが、4つのGly-X-Y繰り返し構造をコードする余分なエキソンを1つ持っている⁷⁾。L-ficolinとH-ficolin、L-ficolinとM-ficolin、H-ficolinとM-ficolinの間の相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ約48%、80%、48%である。M-ficolinは末梢血の単球やU937細胞の表面での発現が報告されている¹⁸⁾。一方、血漿中に微量 (約60ng/ml) に存在するとの報告もある¹⁹⁾。リコンビナントM-ficolinはGlcNAc、GalNAc、シアリル-N-アセチルラクトサミンに結合し²⁰⁾、L-ficolinと同様にアセチル基を認識している²¹⁾。

ヒト以外ではマウス、ブタ、アフリカツメガエル、マボヤなどからフィコリンが単離されている¹⁾。マウスには2種類のフィコリン (Ficolin-AとFicolin-B) が存在する。Ficolin-Aは肝臓で作られ血中に分泌され、一方のFicolin-Bは骨髄や脾臓にmRNAの発現が見られる。いずれのフィコリンもGlcNAcやGalNAcに結合する。遺伝子構造などから、Ficolin-AはヒトL-ficolinに、Ficolin-BはヒトM-ficolinに相同であると考えられている²²⁾。また、ヒトH-ficolinに相同なマウスの遺伝子は偽遺伝子化している。ブタには、GlcNAc結合性を持つFicolin- α が血漿中にあり、また骨髄と好中球にmRNAの発現が見られるFicolin- β も存在する。これらはブタ子宮細胞膜上のTGF- β 1結合タンパク質として発見されたフィコリンと同一である。しかし、ブタフィコリンとTGF- β 1の結合の分子基盤や生理的意味については解明されていない。ヒト、マウス、ブタにおけるmRNAの発現やタンパク質の局在に基づき、フィコリンはL-ficolinやFicolin-Aのように肝臓で合成されて血中に分泌されるタイプ (血清型) とM-ficolinやFicolin-Bのように主に骨髄や脾臓で作られるタイプ (非血清型) に大別される⁴⁾。これはアフリカツメガエルのフィコリンにも当てはまる。

フィブリノーゲン様ドメインを持ち、コラーゲン様ドメインを欠くタンパク質がこれまでにテネイシン (tenascin) など多数報告されている。フィブリノーゲン様ドメインの機能については不明な点が多く残されているが、カプトガニ (*Tachypleus tridentatus*) のヘモリンパ液中に存在するタキレクチン (TL5AとTL5B) は、フィコリンと同様にアセチル基を認識するレクチンである²³⁾。TL5AとTL5BはN末端のシステインを含むセグメントと、フィコリンと高い相同性を有するC末端側のフィブリノーゲン様ドメインから構成される。TL5Aについては糖結合部位の構造が既に明ら

かになっていたが²⁴⁾、最近L-ficolinとH-ficolinのX線構造解析に基づき糖結合部位が解明され、TL5Aと類似したサイト(S1)がL-ficolin、H-ficolinのいずれにも存在することがわかった²⁵⁾。しかし、TL5Aとは異なり、H-ficolinではS1はガラクトースとD-フコースの結合部位であり、L-ficolinのS1には検討したリガンドは一つも結合しなかった。L-ficolinにはS1以外に3箇所の結合部位(S2, S3, S4)があり、GlcNAcなどのアセチル化物の結合部位は2カ所(S2とS3)存在した。また、S2には従来L-ficolinへ結合しないとされていたガラクトースが結合した。L-ficolinには $\beta(1\rightarrow3)$ -D-グルカンが結合するが、グルカンの三つのグルコースユニットがS3とS4に渡って結合することが明らかとなった。このように、L-ficolinは複数の結合部位を有し、対応したリガンドが結合できるタンパク質であることがわかった。一方、M-ficolinの立体構造も解明されたが、GlcNAcが結合するサイトはTL5Aと同様にS1にあった²⁶⁾。

ところで、ヒト血清中にはフィコリンと同様にコラーゲン様ドメインを持つレクチンとしてマンノース結合レクチン(MBL、別称MBP：マンナン結合タンパク質)が存在する²⁷⁾。MBLはコレクチンと呼ばれるレクチンのファミリーに属する²⁸⁾。ヒトMBLは分子量約32kDaの単一のサブユニットから成るオリゴマー構造をしている。サブユニットはN末端側より1) システインに富む領域、2) コラーゲン様ドメイン、3) ネックドメイン、4) 糖鎖認識ドメイン(CRD)から構成される。このドメイン構成はフィコリンと類似しているが、C末端側にあるドメインがフィコリンではフィブリノーゲン様構造

なのに対し、MBLではCRDである点が大きな違いである。MBLはフィコリンと同様な様式でサブユニットが結合してオリゴマー構造を形成する。MBLオリゴマーのサイズには多様性があり、ヒトでは主に3~6量体となっている。MBLはカルシウム存在下でCRDを介してマンノース、GlcNAc、フコースなどの糖に結合する。

3. フィコリンの機能

ヒトとマウスの研究から、フィコリンが免疫系に働いていることがわかってきた。免疫系は自然免疫と獲得免疫の2種類のシステムに大別される。自然免疫は感染に関係なく生体に常時備わっている免疫システムで、好中球、マクロファージなどの食細胞やNK細胞などが関与し感染初期の生体防御において重要である。一方の獲得免疫は病原体の感染により得られる免疫で、抗体やT細胞が関与する。ここでは病原体抗原は抗体やT細胞受容体により特異的に認識される。自然免疫においてはこのような特異的な認識成分はないが、パターン認識タンパク質と総称されるタンパク質が存在する。病原体の表面には細菌のリポ多糖、ペプチドグリカンや真菌の β -グルカンなどのように微生物に特有の成分があり、病原体関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)と呼ばれ、これらを認識する成分がパターン認識タンパク質である。近年注目されているToll様受容体(TLR)はその一つである。フィコリンとMBLもパターン認識タンパク質の範疇に含まれ、特にレクチンであることから「生体防御レクチン」

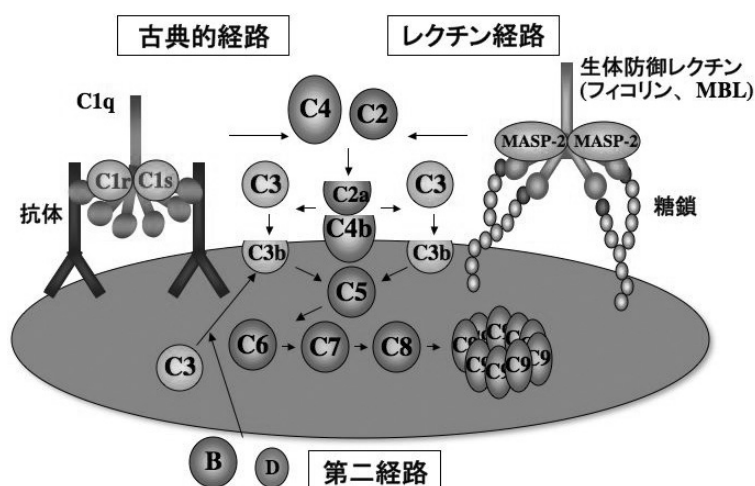


図2 補体系の3つの活性化経路と溶解経路

と呼ばれている²⁹⁾。これらの生体防御レクチンは補体系の活性化能とオプソニンの機能を持っている。

3.1 補体系の活性化

補体系は自然免疫と獲得免疫のいずれにも関与する免疫系のエフェクター機構であり、約30種類の血清タンパク質と膜タンパク質から構成され、各成分の一連の分解と集合反応の結果、自己の細胞は攻撃せずに病原体のみを排除する³⁰⁾。補体系の中心的な役割を担っている成分は第3成分(C3)であり、これが限定分解されることが重要となる。分解の結果生成するC3bは病原体表面に沈着するとオプソニンとして食細胞の機能を亢進させる働きがある。C3の限定分解後は、後期補体成分と呼ばれるC5からC9までのタンパク質が関与する連鎖反応(溶解経路)が起こり、膜障害複合体(MAC)が形成されC9の重合体が病原体を破壊する。病原体上で補体反応が開始後C3の限定分解に至るまでのルートは活性化経路と呼ばれ、古典的経路、第二経路、レクチン経路の3通りある(図2)。これらの中で、古典的経路は抗原抗体複合体が補体活性化の引き金となることから主として獲得免疫に関与し、他の2つの活性化経路は活性化に抗原抗体複合体を必要としないことから自然免疫に働いている。

古典的経路では免疫複合体中の抗体免疫グロブリン分子にC1が結合することが活性化の引き金となる。C1はC1qと2種類のセリンプロテアーゼ(C1rとC1s)の複合体である。C1rとC1sはそれぞれ1本のポリペプチド鎖としてC1qに結合している。C1qはコラーゲン様構造を持つ3種類のポリペプチド(A鎖、B鎖、C鎖)が結合した6量体であり、C1複合体はC1qを介して抗体に結合する。その結果、まずC1rが自己活性化を起こし、次に活性化C1rによりC1sが活性化される。活性化とは、1本のポリペプチド鎖が2本鎖構造に転換してプロテアーゼ活性を獲得することをいう。C1rにより活性化型に転換したC1sが次にC4とセリンプロテアーゼ成分のC2を限定分解することになる。その結果、各々の分解産物が結合したC4bC2a複合体がC3転換酵素として働きC3をC3bに限定分解する。第二経路はC3、2種類のセリンプロテアーゼBとDおよび制御タンパク質から構成される。これらの成分が反応してC3の分解産物であるC3bが常に少しずつ生成しており、病原体が侵入するとその表面にC3bが沈着する。続いて、C3bにBが結合し、DがBを限定分解してC3bBbが形成する。この2分子複合体がC3転換酵素として働き、C3を限定分解

してC3bにする。その結果、多量のC3bが病原体表面に沈着することになる。

レクチン経路は生体防御レクチンのL-ficolin、H-ficolinおよびMBLにより活性化される経路である。これらのレクチンには3種類のMASP (MBL-associated serine protease)、MASP-1、MASP-2、MASP-3と、sMAP (small MBL-associated protein、別称: MAp19) が結合している^{31,32)}。MASPはセリンプロテアーゼに属し、各MASPは互いにアミノ酸レベルで35~40%の相同性を持ち、補体古典的経路の成分であるC1rとC1sを含めて1つのファミリー(MASP/C1r/C1sファミリー)を形成している³³⁻³⁵⁾。共通のドメインとして6つのドメイン(N末端側よりそれぞれCUB、EGF、CUB、CCP、CCPとと呼ばれるドメインとセリンプロテアーゼドメイン)を持つ(図3)。MASPは最初のCUBとEGFを介して生体防御レクチンのコラーゲン様ドメインに結合する。MASPは1本のポリペプチド鎖の未活性型で存在しており、ペプチド結合が1箇所切断されると、2本のポリペプチド(H鎖とL鎖)がジスルフィド結合した活性型に転換する。MASP-1とMASP-3はH鎖を構成する5つのドメインは共通で、セリンプロテアーゼドメインのみ異なる構造をしている。sMAPはMASP-2遺伝子のalternative polyadenylationの結果合成される短縮型タンパク質であり、MASP-2の最初の2つのドメインに4アミノ酸残基がC末端側に付加した構造をしている^{36,37)}。

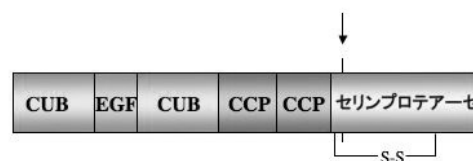


図3 MASP/C1r/C1s ファミリーのドメイン構造。矢印は未活性型が活性型に転換する際に切断される箇所を示す。

前述のように、M-ficolinは血漿中に微量存在するが、これにMASPが結合しているかは現在のところ不明である。しかし、リコンビナントM-ficolinにはMASPが結合する²⁰⁾。更に複合体が補体系を活性化してC4とC2の限定分解が起こる。3種類のMASPのうち、MASP-2がC4とC2の分解を担っている^{34,38)}。一方、MASP-1、MASP-3およびsMAPの機能については、幾つかの報告があるも

の不明な点が多く未だ確定されていない。レクチン経路の活性化はまず、生体防御レクチン-MASP-2複合体が病原微生物表面の糖鎖に結合することから始まる。結合の結果未活性型MASP-2はC1r様に自己活性化を起こし活性型へ転換後、C1s様にC4とC2の分解活性を獲得するというメカニズムが考えられる(図2)。レクチン経路の活性化の結果形成するC4bC2aによりC3が分解されてC3bが生成する。これ以降は溶解経路が進行する。また、C3bは第二経路の活性化の引き金ともなる。血清中にあるマウスのFicolin-AもMASPと複合体を形成してレクチン経路を活性化する。

レクチン経路と古典的経路は、共にコラーゲン様構造を持つタンパク質とMASP/C1r/C1s/ファミリーのセリンプロテアーゼの複合体およびC4とC2を構成成分としており、2つの活性化経路に類似性が見られる(図2)。これは、自然免疫の担い手であるレクチン経路が免疫グロブリンの出現により古典的経路へと進化したことを示唆している³⁹⁾。

3.2 オプソニン

ヒトフィコリンのうち、L-ficolinは*Salmonella Typhimurium* TV119に結合すると、好中球の貪食機能を亢進させる⁶⁾。血清中のH-ficolinにも補体活性化能の他にオプソニン活性があると思われる。また、肺胞に存在するH-ficolinにはMASPが結合しておらず、主な機能はオプソニン活性と推定される。貪食に関連して、単球の表面にM-ficolinが発現しており、これがレクチン様の貪食受容体として機能している可能性がある¹⁸⁾。しかし、最近になりM-ficolinは血漿中に存在することが明らかになったことから¹⁹⁾、その局在と機能については研究の余地がある。マウスのFicolin-Bは補体を活性化しないが、*Staphylococcus aureus*に結合しマクロファージの貪食能を亢進させる⁴⁾。

3.3 アポトーシス

フィコリンは自然免疫に働いている他に、アポトーシス細胞の処理に関わっている。アポトーシスを起こしている3種類の細胞(HL60, U937, Jurkat T細胞)を用いた検討では、L-ficolinは全ての細胞に結合し、H-ficolinはJurkat T細胞に結合する⁴⁰⁾。細胞への結合の結果補体の活性化が起こる。別の報告によると、L-ficolinはアポトーシス後期やネクロシスのJurkat T細胞には結合するが、アポトーシス前期には結合しない⁴¹⁾。結合はGlcNAcでは阻害されないが、DNAにより阻害されるという。L-ficolinのネクロシス細胞への結合により補体が活性化され、細胞にはC4沈

着が起こり、またマクロファージによる貪食が亢進される。

4. フィコリンの感染防御と疾患における役割

フィコリンは種々のグラム陽性菌とグラム陰性菌の表面糖鎖に結合し、補体レクチン経路を活性化する。補体活性化の結果としてC3bのようなオプソニンを生成し、またMACが形成されて溶菌に至る。L-ficolinが結合する細菌としては、*Salmonella Typhimurium* TV119、*E. coli*、莢膜を持つ*Staphylococcus aureus* (血清型はT-1, T-8, T-9, T-11など)などが挙げられる^{6,42,43)}。グラム陽性菌の細胞壁成分のリポテイコ酸(LTA)はグリセロールリン酸が基本単位として直鎖状につながった構造をしており、グリセロールの一部にGlcNAcが付加している。L-ficolinは*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus agalactiae*などの臨床的に重要な細菌のLTAに結合して補体を活性化する⁴⁴⁾。L-ficolinはまた血清型III型などのGroup B *Streptococcus agalactiae* (B群レンサ球菌)の莢膜多糖中のN-アセチルノイラミン酸に結合し、補体活性化とそれに伴うオプソニン化を引き起こす^{45,46)}。その結果好中球の貪食機能が亢進される。前述のように、H-ficolinはPSAを持つ*Aerococcus viridans*に結合するが、結合によりヒト血清中の補体が活性化されて溶菌に至る⁴⁷⁾。M-ficolinは*Staphylococcus aureus*や*Salmonella Typhimurium* LT2に結合する²⁰⁾。

以上の*in vitro*の研究から分かるように、フィコリンは自然免疫に重要な役割を担っていることが推察される。実際、疫学的な研究から、健康人と比較して呼吸器の感染を起こしている小児ではL-ficolin低値者の割合が高いことが明らかとなった⁴⁸⁾。ことにアトピー性疾患において顕著であった。このことは、L-ficolinがアレルギー性疾患を悪化させる微生物の防御に関与していることを示唆している。遠藤らはFicolin-Aの欠損マウスを作成して解析したところ、血液では*Staphylococcus aureus*に対する増殖抑制活性が低下しており、リコンビナントFicolin-Aの補充によってその回復が確認された²⁷⁾。

フィコリンは生体防御の役割を持っている反面、種々の疾患とも関わっている。その一例をIgA腎症に見ることができる。IgA腎症は糸球体にIgAの沈着が見られる疾患である。IgA沈着の結果起こる補体活性化がIgA腎症の病態に深く関わっている。糸球体の沈着成分を検討し

たところ、IgA腎症患者の25%にL-ficolin、MBL、MASP、C4の沈着が観察されたことから、本疾患ではレクチン経路が関与していることが明らかとなった⁴⁹⁾。

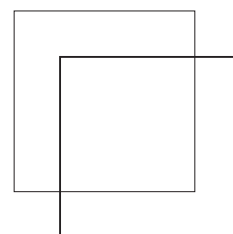
5. おわりに

レクチンであるフィコリンは自然免疫のパターン認識タンパク質の機能を持っている。糖結合特異性はフィコリンにより違いがあるが、主なりガンドはアセチル基を持つGlcNAcであり、これは微生物表面の糖鎖に広く分布している。GlcNAc以外に対する糖結合性も考慮すると、血清型と非血清型のフィコリンが多様な微生物に結合できることになる。両タイプのフィコリンともに食細胞とのつながりが推定される。更に、血清型のフィコリンは補体系ともリンクしている。このように、フィコリンはパターン認識タンパク質として働き、免疫系のエフェクター機構へ橋渡しをすることで自然免疫において重要な役割を担っている。

引用文献

- Matsushita, M., Endo, Y. and Fujita, T. Chapter 34 In "Animal lectins : A functional view" ed. by Vasta, G.R. and Ahmed, H. CRC press, Boca Raton, USA, in press.
- 松下操、濱崎直孝 蛋白質核酸酵素 **45**, 664, (2000).
- Matsushita, M. and Fujita, T., *Immunol. Rev.*, **180**, 78, (2001).
- Endo, Y., Matsushita, M. and Fujita, T. *Immunobiology* **212**, 371, (2007).
- Ichijo, H., Hellman, U., Wernstedt, C., Genez, L. J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H. and Miyazono, K. *J. Biol. Chem.* **268**, 14505, (1993).
- Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M. and Mizuochi, T. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2448, (1996).
- Endo, Y., Sato, Y., Matsushita, M. and Fujita, T. *Genomics* **36**, 515, (1996).
- Krurup, A., Thiel, S., Hansen, A., Fujita, T. and Jensenius, J. C. *J. Biol. Chem.*, **279**, 47513, (2004).
- Ma, Y. G., Cho, M. Y., Zhao, M., Park, J. W., Matsushita, M., Fujita, T. and Lee, B. L. *J. Biol. Chem.*, **279**, 25307, (2004).
- Harumiya, S., Takeda, K., Sugiura, T., Fukumoto, Y., Tachikawa, H., Miyazono, K., Fujimoto, D. and Ichijo, H. *J. Biochem (Tokyo)*. **120**, 745, (1996).
- Edgar, P. F. *FEBS Lett.*, **375**, 159, (1995).
- 稲葉頌一、大河内一男 医学のあゆみ **107**, 690, (1978).
- Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K. and Hamasaki, N. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20721, (1998).
- Akaiwa, M., Yae, Y., Sugimoto, R., Suzuki, S. O., Iwaki, T., Izuhara, K. and Hamasaki, N., *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 777, (1999).
- Tsujimura, M., Ishida, C., Sagara, Y., Miyazaki, T., Murakami, K., Shiraki, H., Okochi, K. and Maeda, Y. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 454, (2001).
- Lu, J., Tay, P. N., Kon, O. L. and Reid, K. B. *Biochem. J.*, **313**, 473, (1996).
- Lu, J., Le, Y., Kon, O. L., Chan, J. and Lee, S. H. *Immunology* **89**, 289, (1996).
- Teh, C., Le, Y., Lee, S. H. and Lu, J. *Immunology* **101**, 225, (2000).
- Honoré, C., Rørvig, S., Munthe-Fog, L., Hummelshøj, T., Madsen, H.O., Borregaard, N. and Garred, P. *Mol. Immunol.*, **45**, 2782, (2008).
- Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., Inoue, K., Munakata, M. and Fujita, T. *J. Immunol.*, **175**, 3150, (2005).
- Frederiksen, P.D., Thiel, S., Larsen, C.B. and Jensenius, J. C. *Scand. J. Immunol.* **62**, 462, (2005).
- Endo, Y., Liu, Y., Kanno, K., Takahashi, M., Matsushita, M. and Fujita, T. *Genomics* **84**, 737, (2004).
- Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S. N., Iwanaga, S. and Kawabata, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 10086, (1999).
- Kairies N, Beisel HG, Fuentes-Prior P, Tsuda R, Muta T, Iwanaga S, Bode W, Huber R, Kawabata S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13519, (2001).
- Garlatti V, Belloy N, Martin L, Lacroix M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ, Thielens NM, and Gaboriaud C. *EMBO J.*, **26**, 623, (2007).
- Garlatti, V., Martin, L., Gout, E., Reiser, J.B, Fujita, T., Arlaud, G.J, Thielens, N.M, and Gaboriaud, C. *J. Biol. Chem.*, **282**, 35814, (2007).
- 遠藤雄一、松下操、藤田禎三 臨床検査 **52**, 841, (2008).
- van de Wetering, J.K., van Golde, L. M. and Batenburg, J. J. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1229, (2004).
- 松下 操 臨床検査 **52**, 839, (2008).
- Walport, M. J. *N. Engl. J. Med.*, 344, 1058, 2001. & *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1140, (2001).
- Matsushita, M., Endo, Y. and Fujita, T. *J. Immunol.*, **164**, 2281, (2000).
- Matsushita, M., Kuraya, M., Hamasaki, N., Tsujimura, M., Shiraki, H. and Fujita, T. *J. Immunol.*, **168**, 3502, (2002).
- Matsushita, M. and Fujita, T. *J. Exp. Med.*, **176**, 1497, (1992).

- 34) Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaebler, W., Laursen, S. B., Poulsen, K., Willis, A. C., Eggleston, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K. B. and Jensenius, J. C. *Nature* **386**, 506, (1997).
- 35) Dahl, M.R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A.C., Christensen, T, Vorup-Jensen, T. and Jensenius, J. C. *Immunity* **15**, 127, (2001).
- 36) Takahashi, M., Endo, Y., Fujita, T. and Matsushita, M. *Int. Immunol.*, **11**, 859, (1999).
- 37) Stover, C. M., Thiel, S., Thelen, M., Lynch, N. J, Vorup-Jensen, T., Jensenius, J. C. and Schwaebler, W. J. *J. Immunol.*, **162**, 3481, (1999).
- 38) Matsushita, M., Thiel S., Jensenius, J. C., Terai, I., and Fujita, T. *J. Immunol.*, **165**, 2637, (2000).
- 39) Fujita, T., Matsushita, M. and Endo, Y. *Immunol. Rev.*, **198**, 185, (2004).
- 40) Kuraya, M., Ming, Z., Liu, X., Matsushita, M. and Fujita, T. *Immunobiology* **209**, 689, (2005).
- 41) Jensen, M. L., Honore, C., Hummelshoj, T., Hansen, B. E., Madsen, H.O. and Garred, P. *Mol. Immunol.*, **44**, 401, (2007).
- 42) Krarup, A., Sorensen, U. B., Matsushita, M., Jensenius, J. C. and Thiel, S. *Infect. Immun.*, **73**, 1052, (2005).
- 43) 高橋信二、青柳祐子 臨床検査 **52**, 887, (2008).
- 44) Lynch, N. J., Roscher, S., Hartung, T., Morath, S., Matsushita, M., Maennel, D. N., Kuraya, M., Fujita, T. and Schwaebler, W. *J. Immunol.*, **172**, 1198, (2004).
- 45) Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Min, J. G., Matsushita, M., Fujita, T., Takahashi, S., Okuwaki, Y. and Bohnsack, J. F. *J. Immunol.*, **174**, 418, (2005).
- 46) Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Rubens, C. E., Bohnsack, J. F., Min, J. G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y. and Takahashi, S. *Infect. Immun.*, **76**, 179, (2008).
- 47) Tsujimura, M., Miyazaki, T., Kojima, E., Sagara, Y., Shiraki, H., Okochi, K. and Maeda, Y. *Clin. Chim. Acta.*, **325**, 139, (2002).
- 48) Atkinson, A. P., Cedzynski, M., Szemraj, J., St Swierzko, A., Bak-Romaniszyn, L., Banasik, M., Zeman, K., Matsushita, M., Turner, M. L. and Kilpatrick, D. C. *Clin. Exp. Immunol.*, **138**, 517, (2004).
- 49) Roos, A., Rastaldi, M.P., Calvaresi, N., Oortwijn, B. D., Schlagwein, N., van Gijlswijk-Janssen, D. J., Stahl, G. L., Matsushita, M., Fujita, T., van Kooten, C. and Daha, M. R. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**, 1724, (2006).



膠原病と自己抗体

Connective tissue diseases and autoantibodies

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 准教授

窪田 哲朗

TETSUO KUBOTA

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 大学院生

新居登紀子

TOKIKO NII

Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Health Sciences

1. はじめに

免疫系はウイルス、細菌、真菌など、外から体内に侵入してくる病原微生物を撃退するためのしくみであり、免疫応答を引き起こす原因物質を抗原と呼ぶ。しかし、たいして害が無いような抗原に対しても過剰に応答してしまうと、かえって不快な結果がもたらされる。これをアレルギー (allergy) または過敏症 (hypersensitivity) とよぶ。近年、花粉症、食物アレルギー、薬剤アレルギー、アトピー性皮膚炎などに悩まされている人は非常に多い。

さらに、真の病因抗原が不明であるけれども、結果的に生じた免疫応答で抗体やリンパ球が自己の正常の抗原とも反応してしまう病態が自己免疫疾患である。これには、たとえば血小板の細胞膜の糖タンパク質と反応する自己抗体が産生されて、血小板減少、出血傾向がもたらされる特発性血小板減少性紫斑病など、特定の細胞または組織のみが標的となる組織特異的自己免疫疾患と、様々な組織に障害がもたらされる全身性自己免疫疾患がある。後者はいわゆる膠原病とよばれる概念とほぼ同義と考えて良い。ここでは膠原病にみられる自己抗体について述べてみたい。

2. 膠原病とは

アメリカの病理学者Paul Klempererによって1942年に提唱された概念で、その当時までの臓器別の疾患概念とは異なって、全身の血管や結合組織にフィブリノイド変性を認める疾患群が存在するという、画期的な概念であった。その後しばらくの間は、全身性エリテマトーデス、関節リウマ

チ、全身性強皮症、多発性筋炎および皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、リウマチ熱の6疾患が膠原病とよばれていたが、近年では混合性結合組織病、顕微鏡的多発血管炎など新しく加わった疾患や、Sjögren症候群、Wegener肉芽腫症、Behçet病、成人Still病、高安動脈炎、好酸球性筋膜炎など、多数の周辺疾患も含めた用語として用いられることが多い。さらに、上記のようにこれらの疾患では自己免疫反応が病態形成に重要な関わりをもっていることが次第に明らかにされ、全身性自己免疫疾患という概念ともオーバーラップするようになった。

3. 膠原病と自己抗体

患者さんからよく「膠原病ってどんな症状がでるんですか?」、「どういう検査で診断できるんですか?」と訊かれる。まず、症状であるが、膠原病といっても多彩で疾患毎に異なるし、同じ疾患であっても患者さんごとに異なるので、簡単には説明できない。検査所見も、たとえば癌であれば、癌細胞が見つかったら自覚症状がなくても癌なのであって、さっさと取ってしまった方がよいのであるが、膠原病を診断できる特異的な検査はないので、これも簡単ではない。いくつか具体的な例を挙げて説明してみよう。

最も患者数が多いのは関節リウマチで、わが国には60万人程の患者さんがいらっしゃるが、この疾患で最も重要な症状は慢性的に、何週間も何ヶ月も何年も続く関節炎による関節の痛みや変形である。その他に発熱、倦怠感、呼吸器症状などを認めることもある。検査所見としては、リウマトイド因子とよばれる自己抗体が有名であるが、感度、特異度ともに80%程度である。すなわち、関節リウマ

チでありながら20%の人はリウマトイド因子が陰性である、他の膠原病や感染症などでも、あるいは健常人でさえもしばしば陽性となる、という点を知っておかなければならない。検診等でリウマトイド因子が陽性と指摘されたという理由でわざわざ大学病院を受診する人も多いが、関節が腫れたり痛かったりという症状がなければ診断することはできないし、もちろん治療も必要ない。

次に多いのが全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)という20~30歳代の女性に好発する疾患である。厚生労働省の特定疾患(難病)に指定されており、わが国の患者数は5万人程度である。原因不明の発熱、皮疹、光線過敏症、関節痛などで始まることが多く、腎炎(ループス腎炎)や中枢神経障害(けいれん、意識障害、精神症状)など重篤な病態を呈することもある。

SLEでは様々な自己抗体が検出されるが、なかでも抗DNA抗体と抗Sm抗体は本疾患に特異性が高く、診断に際して重要な情報となる。特に抗DNA抗体については、典型的な症例では抗DNA抗体高値の状態が続くとループス腎炎を来し、適切な治療が行われないと腎不全に至る。これは、抗体が血液中でDNA、ヒストン、ヌクレオソーム等と結合して免疫複合体を形成し、腎臓の糸球体に沈着して炎症を起こすために発症するもので、ステロイドホルモン剤や免疫抑制剤を投与して治療すれば抗体価の低下とともに軽快する。

一方、抗Sm抗体というのは、細胞の核のなかでRNAのスプライシングを行うRNA-タンパク質複合体であるsnRNPを構成するタンパク質と反応する抗体である。

全身性強皮症は、指先から始まって、全身の皮膚が硬くなる疾患で、肺、消化管などの臓器でも線維化が進行する。わが国の患者数は約6,000人で、特定疾患に指定されている。皮膚硬化が長年、手指のみに限局するタイプでは、抗セントロメア抗体が高率に検出され、染色体のセントロメアタンパク質であるCEMP-A、CEMP-B、CEMP-Cなどと反応する。一方、皮膚硬化が全身に広がるタイプではDNAの超らせん構造をほぐす酵素であるDNA topoisomerase I に対する抗体が検出される。

皮膚筋炎/多発性筋炎は、首、肩、腕、臀部、大腿部など、体に近い部分の筋肉に炎症が起こって力が入らなくなる疾患で、わが国の患者数は約6,000人、これも特定疾患に指定されている。細胞質でタンパク質合成が行われる際に、mRNAの配列に対応したtRNAがアミノ酸を

結合してリボゾームに運搬するが、本疾患では、ヒスチジンをtRNAに結合させるヒスチジルtRNA合成酵素に対する自己抗体が20~30%に検出される。

4. 疾患モデルマウス

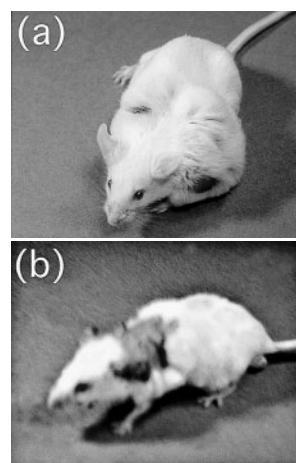


図1 MRL/lprマウス。外見上はリンパ節腫脹(a)や、脱毛(b)を認め、抗DNA抗体、抗Sm抗体などの自己抗体が産生され、糸球体腎炎を発症する。

自己抗体の性質を詳細に検討するために、モノクローナル自己抗体もたくさん作製されているが、患者リンパ球から作製することは容易ではないので、モデルマウスがあると都合が良い。特に、SLEに類似した病態を自然発症するモデルマウスとして、(NZB×NZW)F₁、BXSB、MRL/lprなどが有名で広く用いられている(図1)。これらのマウスは経過とともに抗DNA抗体などの自己抗体を産生し、やがて腎炎を起こして、半年から1年程で死亡する。

5. モノクローナル抗DNA抗体の精製

SLE患者血清中のポリクローナル抗DNA抗体を精製して特異性を検討してみると、2本鎖(ds)DNAと強く反応する抗体や、1本鎖(ss)DNAと強く反応する抗体など、色々な抗体の混合物であることがわかる¹⁾。しかし、患者あるいはモデルマウス由来のモノクローナル抗体で検討すると、抗体が認識する構造をもう少し詳しく明らかにすることができる。

抗体の特異性について詳述する前に、ここで抗体の精製法について少し触れておきたい。一般的には硫酸アンモニウムを用いた塩析法、DEAEカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、プロテインAまたはブ

ロテインG、あるいは抗IgG抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどが広く用いられている。IgM抗体の場合には、水に対して透析する手もある。血清などのポリクローナル抗体から特定の抗原と反応する抗体のみを分離するためには、抗原を担体としたアフィニティーカラムクロマトグラフィーが有効で、これは抗DNA抗体の精製にも応用できる¹⁾。

ここでもうひとつ、関東化学の大瀧氏に教えていただいた便利な方法を紹介する^{2, 3)}。彼らは γ -グロブリンに親和性の高いピロリン酸マグネシウムをカラムの充填剤として使えるように球状粒子として合成し、HPLCでIgGやIgM抗体を簡便に精製する方法を発表している。筆者らは球状ピロリン酸マグネシウムを単に3mlの注射筒の中に入れてフラクションコレクターに接続して用いているが(図2)、食塩を含まない中性のリン酸緩衝液にて平衡化したカラムにIgG抗DNAモノクローナル抗体を吸着させると、500mMの食塩を含んだリン酸緩衝液を用いて溶出することができ、そのピークに一致して抗体活性もほぼ完全に回収される(図3)。このようにして精製した抗体の比活性は、ハイブリドーマの培養上清を50%飽和硫酸アンモニウム溶液で塩析した分画と比べて約10倍高く(図4)、通常の種々の実験に用いるのに十分な純度と活性を有していた。



図2 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによる抗体精製。当研究室では注射用シリンジに充填して(a)、フラクションコレクターに接続している(b)。

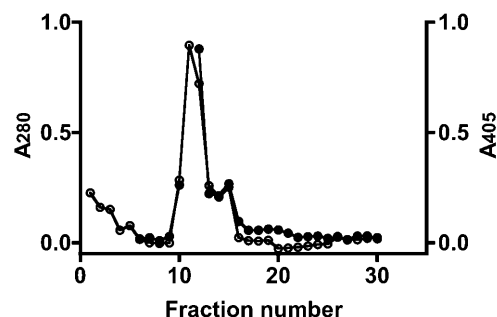


図3 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによるIgGモノクローナル抗dsDNA抗体2C10の精製。フラクションNo. 8から500 mM NaClを含むバッファーで溶出している。左軸にタンパク質濃度(●)、右軸に各フラクションを800倍に希釈してELISAで測定した抗体活性(○)を示す。

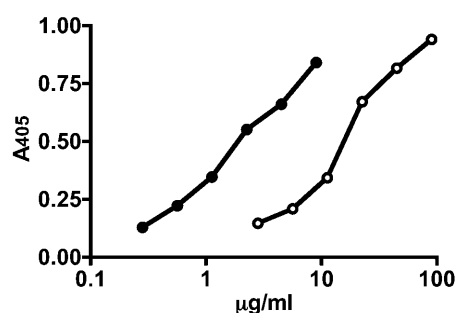


図4 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによるIgGモノクローナル抗dsDNA抗体2C10の精製。カラムに通す前の50%飽和硫酸アンモニウム溶液で塩析した分画(○)と、精製後の抗体(●)の抗体活性をELISAで測定した。

6. 抗DNA抗体の認識する構造

精製したモノクローナル抗体を使って、その認識する構造について様々な研究が行われてきたが、いくつかを紹介する。

従来からSLEではしばしば、梅毒血清反応が偽陽性を呈することが知られていたが、このメカニズムをモノクローナル抗体を用いて初めて証明したのはLaferla⁴⁾であった。梅毒血清反応では抗原としてcardiolipin (diphosphatidyl glycerol) というリン脂質が汎用されているが、DNAの糖リン酸骨格と共通した構造をもっている(図5)。彼女らは、モノクローナル抗DNA抗体の中にはcardiolipinと交叉反応性を示し、かつループスアンチコアグulantとしての活性を示すものがあることを証明したのである。ちなみにループスアンチコアグulantとは血液の凝固反応を阻害する抗体で、これを持っている患者は、かえって血栓症を生じやすい(抗リン脂質抗体症候群: この逆説的現象の解明が現在の筆者らの研究テーマとなっている)。

一方、ループス腎炎の発症と関連する抗dsDNA抗体が

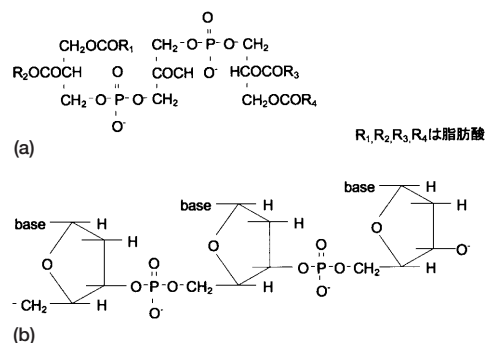


図5 SLEで梅毒血清反応が偽陽性を呈する理由の一つ。炭素原子3つとリン酸基が交互に繰り返す配列はcardiolipin(a)とDNAの糖リン酸骨格(b)に共通して認められるため、抗DNA抗体の中にはcardiolipinと交叉反応性を示すものがある。

認識する構造はどのようなものであろうか。Stollarら⁵⁾は、種々の合成ヌクレオチドとH241と命名されたMRL/lprマウス由来のモノクローナル抗体との反応性を詳細に検討し、この抗体は糖リン酸骨格をまたいでDNAのmajor groove側とminor groove側の両方からグアニン-シトシンの塩基対と接触することを明らかにした。一方、筆者ら⁶⁾は、MRL/lprマウス由来の抗dsDNA抗体2C10は、minor groove側からアデニン-チミン塩基対と接触することを明らかにした。これらを漫画で説明したものが図6であり、H241はモノレールの様にして糖リン酸骨格にまたがり、グアニン-シトシン塩基対が3つくらい連続して存在する場所に来ると停止して強く結合する。2C10は2本のレール上を進んで、アデニン-チミン塩基対が存在する所で停止する。

以上のように、一口に抗DNA抗体と言っても、DNAの骨格部分と反応するもの、塩基と反応するもの、骨格・塩基両方からなる構造を認識するもの、あるいはヌクレオソームの立体構造を好むもの⁷⁾など様々である。

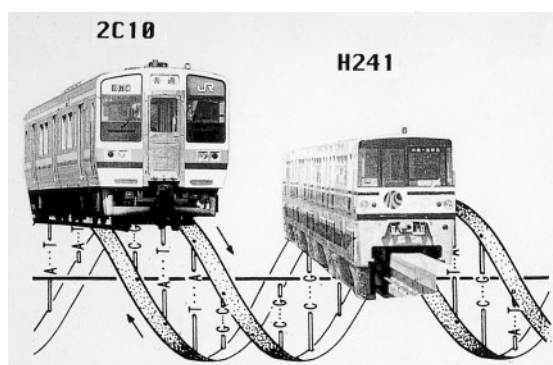


図6 抗dsDNA抗体が認識する構造の例。モノクローナル抗dsDNA抗体2C10は、DNAのminor groove側からA-T塩基対に結合する。H241は、糖リン酸骨格にまたがってmajor groove側とminor groove側からG-C塩基対に結合する。

7. おわりに

以上述べてきたように、膠原病では各疾患に特徴的な様々な自己抗体が産生され、その対応抗原は細胞の表面抗原であったり、細胞質の抗原であったり、核内の分子であったりと、多彩である。しかし、いずれにしてもそれらの自己抗原は正常のヒトや動物には抗原性が乏しく、人為的に動物を免疫しても多くの場合、抗体を得ることはむずかしい。それが何故、患者では産生され続けるのか、という古くからの疑問に対して、未だに明確な答えが見つかっていない。また、それらの抗体が病態の形成に関わっているのか否かについても、わずかに抗DNA抗体とループス腎炎の間に因果関係を認める例を除いて、明らかにされていない。したがって、本稿ではやや古い文献を引用しながらの話にとどまったが、そろそろこのあたりでbreakthroughを期待したいところである。

参考文献

- 1) Kubota T, Akatsuka T, Kanai Y. DNA affinity column chromatography: application in the isolation of distinct antibody populations from SLE sera. *Clin Exp Immunol*, **62**,321 (1985).
- 2) Inoue S, Ohtaki N. Pyrophosphates as biocompatible packing materials for high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **645**,57 (1993).
- 3) 大瀧伸之, 井上千也. 球状ピロリン酸マグネシウムカラムによる免疫グロブリンの分離と精製. *分析化学*, **44**,875 (1995).
- 4) Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski Jr C, Mudd D, Furie B, Schwartz RS, Stollar BD: Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J Exp Med*, **153**,897 (1981).
- 5) Stollar BD, Zon G, Pastor RW. A recognition site on synthetic helical oligonucleotides for monoclonal anti-native DNA autoantibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**,4469 (1986).
- 6) Kubota T, Watanabe N, Kanai Y, Stollar BD. Enhancement of oxidative cleavage of DNA by the binding sites of two anti-double-stranded DNA antibodies. *J Biol Chem*, **271**,6555 (1996).
- 7) 陸青, 宮坂信之, 窪田哲朗. 全身性エリテマトーデスにおける抗ヌクレオソーム抗体の評価方法について. *臨床検査*, **47**,559 (2003).

液体クロマトグラフィーの基礎技術(2)

Fundamental Techniques of Liquid Chromatography

— 順相(吸着)クロマトグラフィーについて —

— *About the Normal Phase (Adsorption) Chromatography* —

関東化学株式会社 草加工場 生産技術部 酒井 芳博

YOSHIHIRO SAKAI

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

1. はじめに

これまで逆相クロマトグラフィー (Reversed Phase Chromatography:RPC) の基礎技術について説明してきたが、今回は順相クロマトグラフィー (Normal Phase Chromatography:NPC) の基礎技術について解説する。

1906年にM.S.Tswettが発表したクロマトグラフィーは、炭酸カルシウムを固定相に、ジエチルエーテルを移動相に使用して葉緑素を分離した実験であったが、これが液体クロマトグラフィーの始まりであり、NPCそのものである。

以来、約100年を経過し、液体クロマトグラフィーはHPLCとして目覚ましい発展を遂げているが、この発展を続けているHPLCの技術の中で、最初に登場したNPCは、現在RPCにその主役の座を奪われている。

吸着クロマトグラフィーとも呼ばれているNPCは、「シリカゲルやアルミナ等の極性の高い固定相を使用し、ヘキサン等の極性の低い移動相を使用する」最も古典的な液体クロマトグラフィーの手法である。

これを試料の溶出の面から見ると、「疎水性の高い試料の溶出は早く、親水性の化合物の溶出は遅れる」ことになり、RPCとは、全く逆の溶出挙動を示すこともよく知られている。

このような特徴を有しているNPCを使用することで良い結果が得られる場合を次に示す。

- 1) 試料の親水性が高くRPCでは保持されない場合。
- 2) 試料の疎水性が高くRPCでは保持が強すぎる場合。
- 3) RPCにおいて十分な分離が得られない場合。
- 4) 試料に位置異性体、立体異性体、ジアステレオマーが含まれている場合。

5) 試料が非極性溶媒に溶ける(極性溶媒に溶けない)場合。

また、最近水系溶離液を使用するNPCが、親水性相相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography:HILIC)^{1,2)}として注目を浴びているように、NPCの新たな展開が期待されている。その理由として、以下のことが言われている。

- 1) 逆相系充填剤ODSの限界が見えてきたこと。
- 2) 高純度シリカゲルが登場したこと。
- 3) LC/MSに最適な系であること。

NPCはクロマトグラフィーの原点でもあり、この技術を見直すことで、液体クロマトグラフィーをより深く理解できるものと考えている。

本稿では、NPCの中で最も多く使用されている固定相(または充填剤)であるシリカゲルを中心に話を進めるが、使用する溶離液により、結果が大きく変わることがあるため、溶離液についても併せて説明する。

2. 順相クロマトグラフィー用充填剤の種類と特徴

NPCに使用される固定相として、シリカゲルが最も多く使用されているが、古来、NPCの固定相には、炭酸カルシウム、アルミナ、活性炭等が使用されていたことはよく知られている。

最近では化学修飾タイプのアミノプロピルシリカゲル充填剤(通称NH₂シリカゲル)、シアノプロピルシリカゲル充填剤(通称CNシリカゲル)、1,2-ジヒドロキシ-3-プロポキシプロピルシリカゲル(通称ジオールシリカゲル)等の充填剤も使用されている。

それぞれの充填剤の特徴は以下に示すとおりである。

- 1) NH_2 シリカゲル充填剤は、吸着・分配モードで使用されることが多く、順相固定相として糖の分離に、弱イオン交換体としてヌクレオチドの分離に使用されている。
- 2) CNシリカゲル充填剤は、使用する溶離液により順相吸着と逆相分配のモードが使い分けできる。主にステロイド等の分離に使用されているが、アルキル鎖の異なる第四級アンモニウム塩の分離にも威力を発揮している。
- 3) ジオールシリカゲル充填剤もCNシリカゲル充填剤と同様、使用する溶離液により順相吸着と逆相分配のモードが使い分けできる。また、サイズ排除クロマトグラフィー用の固定相としても使用できることが特徴である。主に、ステロイド、ペプチドの分離に適している。

一方、シリカゲルを原料としたHPLC用充填剤は、高純度シリカゲル(純度99.99%以上)が使用されるようになったが、この高純度シリカゲルをNPCに使用すると、良好な結果を得ることがある。その一例を図1に示す。

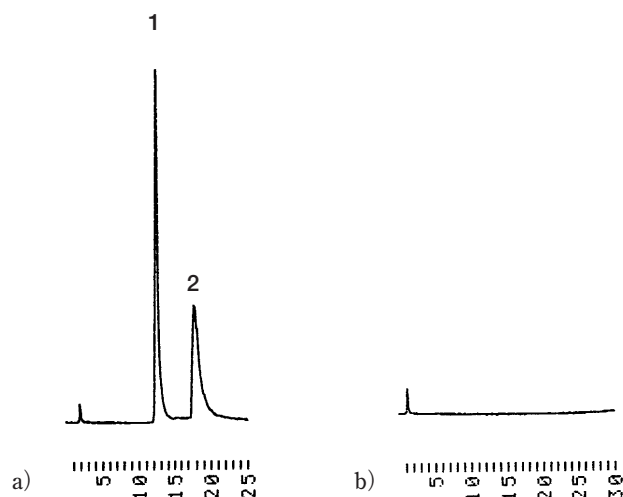


図1 高純度シリカゲル充填剤と旧来のシリカゲル充填剤の 溶離特性の比較
溶離条件

カラム: a) Mightysil Si-60 (5 μm) 4.6mm ϕ ×150mm
b) 旧タイプ Si-60(5 μm) 4mm ϕ ×125mm
溶離液: n-ヘキサン/酢酸エチル=37/63
流速: 1mL/min.
カラム温度: 40°C
検出: UV280nm, 0.04AUFs
試料: 1:カテキン(1 μg)、2:エピガロカテキン(4 μg)

図1は、カテキン類(カテキン、エピガロカテキン)溶出のクロマトグラムを示したものであり、高純度シリカゲルを使用しているMightysil Si-60(5 μm)では、良好なピーク形状で

溶出しているが、旧タイプのシリカゲル(金属不純物の含有量が多く酸性を示すシリカゲル)では、全く溶出しないことが示されている。この結果から、シリカゲルを高純度化すると、配位性が強いといわれている化合物であるカテキン類の溶出が改善されることが判明した。

この様に、高純度シリカゲル充填剤の用途が大きく広がる可能性が出てきた。

3. 順相クロマトグラフィーの長所と短所

NPCの長所と短所を表1に示したが、この表の例は、ごく一般的な特徴を記したものである。

表1 順相クロマトグラフィーの長所と短所

長 所	短 所
①非極性有機溶媒を使用すると、カラムの寿命が長い。	①イオン性化合物は、逆相クロマトグラフィーより分離にくい。
②大量分取用として使用できる。 ・充填剤が比較的安価。 ・多くの化合物が溶離液の有機溶媒に溶ける。	②溶離液の水分量等により溶出が変化しやすい(コントロールが難しい)。
③カラム圧力が低い。 ・粘性の低い溶媒が多く使用される。 ・水溶液で分解する試料には有用。	③グラジエントが困難。 ④順相のカラムの理論段数は、逆相カラムに比べ低い。

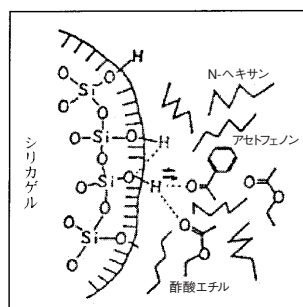
また、NPCは極性の高い固定相と極性の低い有機溶媒を移動相に使用することは既に説明したが、その溶離における特徴として、

- ① 溶出時間はシリカゲルの比表面積に依存する。
- ② 官能基(極性基)の数が分離に反映しやすい。
- ③ 分子構造の違いが分離に反映しやすい。

等があげられるが、これらの具体的な例は、第5項で説明する。

4. 順相(吸着)クロマトグラフィーの分離機構

NPCは、古典的な呼び方では、液-固(Liquid-Solid)クロマトグラフィーである。NPCの分離機構の例として、シリカゲルを固定相にし、アセトフェンを溶質とした場合の分離モデルを図2に示す。クロマトグラフィーの分離は、移動相中の溶質分子と固定相表面(比表面積、細孔径)との相互作用によるものであるが、このモデルの場合、溶質であるアセトフェンは移動相の酢酸エチルとシリカゲル表面への吸着を競合することで分離が展開される。



例 溶質：アセトフェノン
移動相溶媒：n-ヘキサン/
酢酸エチル
アセトフェノンと酢酸エチルが吸着を競合する。

図2 シリカゲル表面における分離モデル

5. 順相クロマトグラフィーの溶出挙動の特徴

5.1 溶出時間はシリカゲルの比表面積に依存する

シリカゲルを固定相に使用したNPCにおける試料の溶出時間は、シリカゲルの比表面積、言い換えるとシラノール基の数に依存する。

シリカゲル表面のシラノール基の構造については、本誌の液体クロマトグラフィーの基礎技術(1)³⁾で説明したように、普通3種類のシラノール基が存在している。

シリカゲルの比表面積は、シラノール基の数により決定されるが、比表面積が大きい場合は、シラノール基が多く存在することになり、試料の保持も強くなる。また、シリカゲルの比表面積は、シリカゲルの平均細孔径の大きさにも依存し、平均細孔径が小さくなると比表面積は大きくなる。

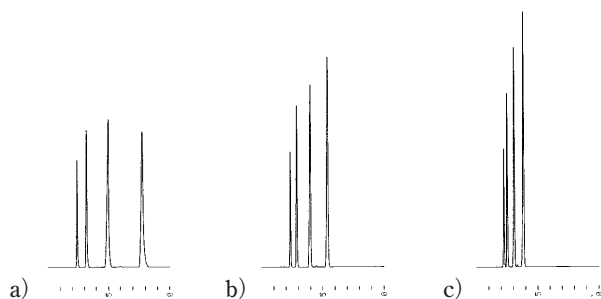


図3 シリカゲルの比表面積の違いによるフタル酸エステル類の溶出時間の変化

溶離条件

カラム：4.6mmφ×150mm
充填剤：a) Si-60 (5μm)、b) Si-120 (5μm)、c) Si-200 (5μm)
溶離液：n-ヘプタン/イソプロピルアルコール=99/1
流速：1mL/min.
カラム温度：40℃

検出：UV254nm、0.64AUFS

試料：フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジメチル (溶出順)

図3に比表面積の異なる3種類のシリカゲル (Si-60:平均細孔径6nm、比表面積:530m²/g、Si-120:平均細孔径12nm、比表面積:360m²/g、Si-200:平均細孔径20nm、比表面積:200m²/g) を充填したカラムを使用し、フタル酸

エステル類のクロマトグラムを測定した結果を示した。

この結果をみると、比表面積が小さくなるにしたがって、フタル酸エステル類の溶出が早くなっていることが示されている。すなわち、比表面積が大きいほどシリカゲル表面と試料の相互作用が強く、保持時間が長くなり、比表面積が小さくなるとシリカゲル表面と試料の相互作用が弱くなり、保持時間が短くなることが示されている。この様に、シリカゲルカラムを使用するNPCの保持時間は、シリカゲルの比表面積に大きく依存していることがわかる。

5.2 官能基数の分離への影響

官能基の数が分離に反映する例として、ステロイドホルモン (プロゲステロン、テストステロン、ヒドロコルチゾン) のクロマトグラムを図4a) に示すが、NPCの場合は、極性基が最も少ないプロゲステロンから溶出し、極性の高い (極性官能基の数が多い) ヒドロコルチゾンはシラノールと相互作用が強く最も遅れて溶出する。

NPCのもう一つの特徴として、既に説明したRPCと比較すると、溶出順序が逆になるが、その実例を図4b) に示す。RPCでは、極性の高いヒドロコルチゾンが最初に溶出し、テストステロン、プロゲステロンの順に溶出する。

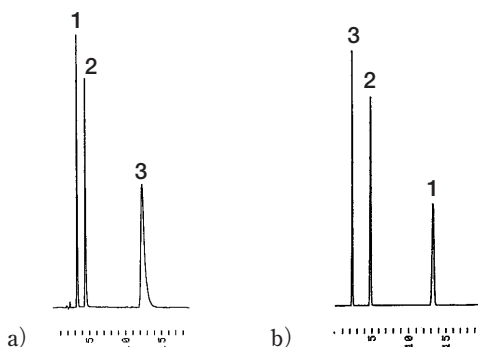
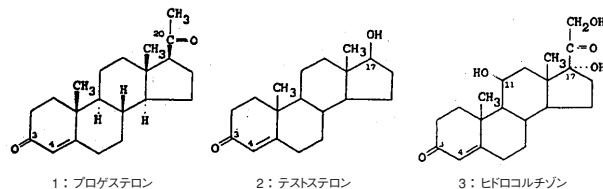


図4 ステロイドホルモンのNPCとRPC

溶離条件

カラム：a) Mightysil Si-60 (5μm) 4.6mmφ×150mm
b) Mightysil RP-18GP (5μm) 4.6mmφ×150mm
溶離液：a) n-ヘキサン/ジエチルエーテル/2-プロパノール=5/4/1
b) アセトニトリル/水=50/50

流速：1mL/min.

カラム温度：40℃

検出：UV240nm、0.16AUFS

試料：1:プロゲステロン、2:テストステロン、3:ヒドロコルチゾン

5.3 分子構造の分離への影響

分子構造の違いが分離に影響する例として、シリカゲルカラムによるスチレンのポリマー(ダイマー、トリマー)のクロマトグラムを、ODSによるクロマトグラフとともに図5に示す。NPCの場合、図5a)のクロマトグラムに示されるように、1. モノマー、2. ダイマー、3. 環状トリマー、4. 鎖状トリマーの順に溶出されており、分子構造の違いが分離にはっきり現れている。

これに対して、RPCの場合は、図5b)のクロマトグラムに示されるように、1. モノマー、2. ダイマー、そして3. トリマー(環状と鎖状の混合ピーク)の順に溶出している。トリマーは環状と鎖状が接近して溶出しており、構造の違いによる分離はされていない。

この結果を比較すると、分析を考慮した場合は、逆相クロマトグラフィーのほうが分離の状況は良好であるが、分取を考慮した場合は、環状及び鎖状トリマーがはっきり分離されることから、NPCのほうが都合の良い分離を示していることになる。

この様に、クロマトグラフィーを行なう目的にもよるが、シリカゲルカラムを使用したNPCは、興味ある溶出特性を示すことを考慮すると応用範囲が広がるものと考えられる。

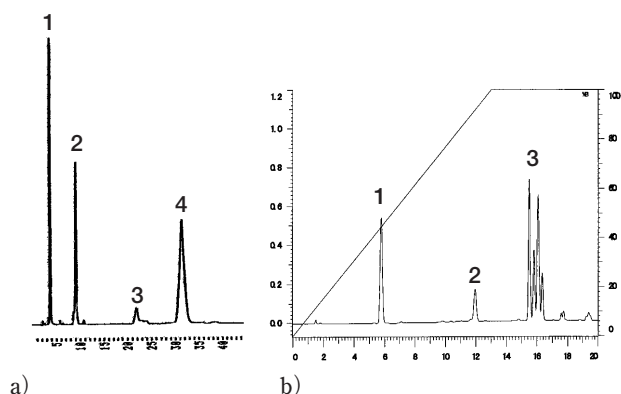


図5 吸着と逆相クロマトグラフィーによるスチレンポリマーの溶出状況の比較

a)	b)
溶離条件	溶離条件
カラム: Mightysil Si-60 (5 μ m)	カラム: Mightysil RP-18GP (5 μ m)
4.6mm ϕ -150mm	4.6mm ϕ -150mm
溶離液: n-ヘキサン	溶離液: A アセトニトリル/水=60/40
流速: 1mL/min.	B アセトニトリル=100
温度: 40°C	グラジエント:
検出: 254nm	0 min. A 100%→13min. B 100%
試料: スチレンペレット抽出液	温度: 40°C
20倍濃縮品	流速: 1mL/min
1:モノマー	検出: 254nm
2:ダイマー	試料: スチレンペレット抽出液20倍濃縮品
3:トリマー(環状)	1:モノマー
4:トリマー(鎖状)	2:ダイマー
注入量: 20 μ L	3:トリマー(環状)、(鎖状)
	注入量: 20 μ L

6. 順相クロマトグラフィーにおける注意点

6.1 溶媒の選択

NPCの溶離液には、非極性溶媒が多用されていることは既に説明したが、特にこれら非極性溶媒を溶離液として使用して炭化水素類を分離する場合、クロロホルムを添加し溶出時間を調整することが良く行われる。この場合、使用するクロロホルムの純度(安定剤の種類)を考慮する必要がある。その理由は、クロロホルムには安定剤として、エタノールを添加した試薬(主に試薬特級グレード)及び不飽和炭化水素を添加した試薬(HPLCグレード)が存在しており、その影響が無視できないからである。

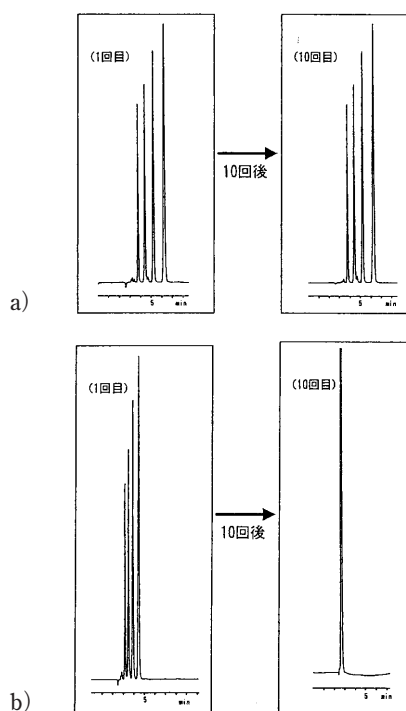


図6 溶媒中の安定剤の違いが順相クロマトグラフィーに与える影響⁴⁾

a)	b)
溶離条件	溶離条件
カラム: LiChroCART 250 $\times$ ϕ 4mm	カラム: LiChroCART 250 $\times$ ϕ 4mm
LiChrospher Si60 (5 μ m)	LiChrospher Si60 (5 μ m)
溶離液: n-ヘプタン/HLC-SOL クロロホルム=4/1	溶離液: n-ヘプタン/特級 クロロホルム=4/1
流速: 1.0mL/min	流速: 1.0mL/min
圧力: 60kg/cm ²	圧力: 60kg/cm ²
温度: 室温	温度: 室温
検出: UV254nm	検出: UV254nm
試料: ビフェニル、テニフェル、クアテルフェニル、キンクエフェニル	試料: ビフェニル、テニフェル、クアテルフェニル、キンクエフェニル

図6は、シリカゲルカラム (Si-60) で芳香族炭化水素類を分離する際、HPLCグレードのクロロホルムと特級グレードのクロロホルムを溶離液に使用した場合の影響を示したものである。図6a)は、HPLCグレードのクロロホルムを使用した例であるが、繰り返し分析を行なっても、芳香族炭化水素類の溶出時間にほとんど変化は見られず、良好な分離を維持している。これに対して、特級グレードのクロロホルムを使用した場合、図6b)に示すように芳香族炭化水素類の溶出時間は、回を重ねるごとに速くなり、分析を10回繰り返すと、分離が不能となった。

これは、特級グレードのクロロホルムにエタノールが安定剤として使用されていることが原因である。この溶離液のクロロホルムの割合は20% (v/v) であり、かつ安定剤として添加されているエタノールの量は約0.5%であるが、NPCに極性溶媒が添加されると、この様な溶出異常が発生することがあるため、使用する溶媒の安定剤及び添加する極性溶媒には十分注意する必要がある。

6.2 逆相モードから順相モードへの切替

NPCは、非極性溶媒を使用することが多いが、通常の分析では、逆相モードで極性溶媒を使用していることが多いと考えられる。このように逆相モードで使用したHPLC装置をNPCモードに切替える場合、シリカゲルカラムを接続する前にポンプ、配管、インジェクター内を逆相モードで使用した極性溶媒と順相モードで使用する非極性溶媒ともに混和する溶媒 (2-プロパノール、クロロホルム、テトラヒドロフラン等) で十分洗浄した後、溶離液で同じ洗浄を行い、その後カラムを接続することが必要である。この操作を怠ると、6-1項で説明した事態を招くことになる。

6.3 シリカゲルカラムの再生

シリカゲルカラムは、長時間の使用や長期間のカラムの保存中に溶媒中の水分を吸着し、活性が弱くなり、保持時間が安定しなくなることがある。

水を吸着して性能が低下したシリカゲルカラムを再生するには、単に溶離液を流してカラムの回復を待つという方法もあるが、この方法は時間がかかり確実といえない。R.A. Bredewegらは、化学反応を利用しカラムに吸着された水を有効に取り除く方法⁵⁾を報告しているが、その方法は、2,2-ジメトキシプロパンをカラムに流し、吸着した水分を除去するものである。この方法では、理論段数が1,200段/カラム (初期理論段数:5,500/カラム) に低下したカラム

が初期理論段数5,500/カラムに再生すると共に、試料の保持時間も初期値に復活したことが報告されている。

7. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) の概念は、1990年にJ.Alpert¹⁾が提唱したが、極性の高い固定相に極性の高い溶媒を移動相に使用するNPCの一種である。しかしながら、このHILICモードによるクロマトグラフィーは、既に1990年以前から使用されていた方法であり、代表的なものとして、アミノプロピルシリカゲル (NH₂シリカゲル) カラムを使用した糖の分離が、水/アセトニトリルの溶離液で行なわれるのはよく知られた方法である。

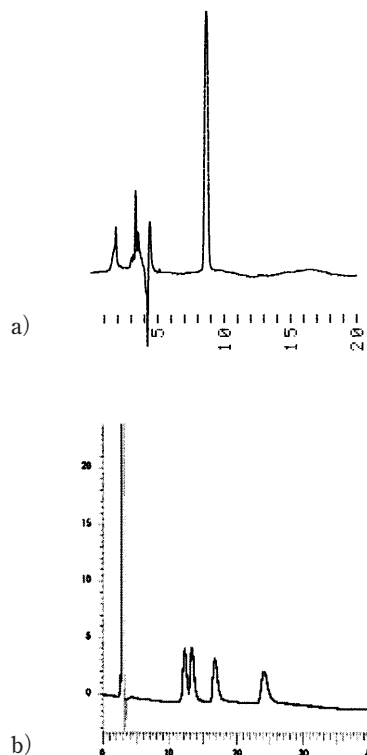


図7 Mightysil Si-60を使用したアミノ酸の分離

溶離条件:

a) カラム Mightysil Si-60 (5 μ m) 4.6mm ϕ ×150mm
溶離液: アセトニトリル/水=75/25
流速: 0.5mL/min.
カラム温度: 40°C
検出: UV 205nm、0.02AUFS
試料: タウリン

b) カラム Mightysil Si-60 (5 μ m) 2mm ϕ ×150mm
溶離液: アセトニトリル/水=85/15
流速: 0.2mL/min.
温度: 室温 (26°C)
検出: RI
試料: ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン (溶出順)

図7にシリカゲルカラムSi-60を使用し、水／アセトニトリル溶離液でアミノ酸を分離した例を示す。図7a)は、タウリンをUV検出器で測定した例であるが、タウリンはUV域でのモル吸光係数が小さいため、試料量が少ない場合測定を低波長の205nmとし、検出感度を上げる必要があり、微量分析が困難である。その解決策として検出器の変更が考えられる。

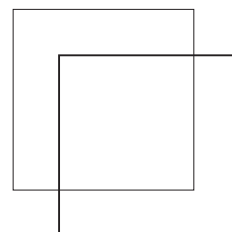
図7b)は、ロイシン等をRI-検出器で測定した例であるが、これらの化合物はODSへの保持が弱いため、逆相カラムでは溶離液を再現性の悪い水100%にしなければならないが、シリカゲルカラムを使用することで、アセトニトリル／水系の溶離液を使用することが可能になる。シリカゲルカラムに水を含む溶離液を流すことは、カラムの寿命を短くすることが知られているが、同じシリカゲルを充填したプレカラムを接続し、溶離液にシリカゲルを飽和させることでカラムの寿命を伸ばすことは可能になると考える。

8. 最後に

以上、シリカゲルカラムを使用したNPCについて説明をしてきたが、現在はシリカゲル自身の純度が向上してきたことから、従来困難であった化合物の溶出が可能となり、新たな展開が期待できる。また、最近、NPCにも水系の溶離液を使用し、この溶離液システムをLC/MSに展開する応用が盛んにおこなわれており、今後もその傾向には拍車がかかるものと考えている。

参考文献

- 1) A.J.Alpert J. Chromatogr., **499**, 177 (1990)
- 2) 中村洋監修 “液クロの巻” p54、筑波出版会 (2003)
- 3) 酒井芳博 THE CHEMICAL TIMES, **205**, 13 (2007)
- 4) 細田誠、酒井芳博 Chromatography, **16**, 45 (1995)
- 5) R.A.Bredewe, L.D.Rothman, C.D.Pfeiffer Anal. Chem., **51**, 2061 (1979)



ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(23)

ロベルト・ヴィルヘルム・ブンゼン

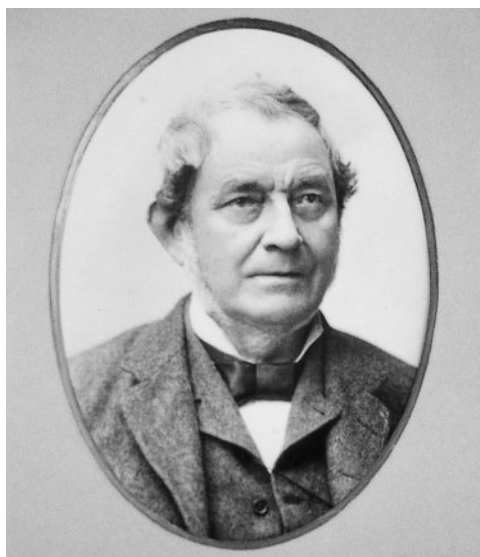
Scientists and Engineers in German Stamps (23). Robert Wilhelm Bunsen

筑波大学名誉教授 原田 馨
KAORU HARADA

Professor Emeritus, University of Tsukuba.



若き日のブンゼンの肖像。



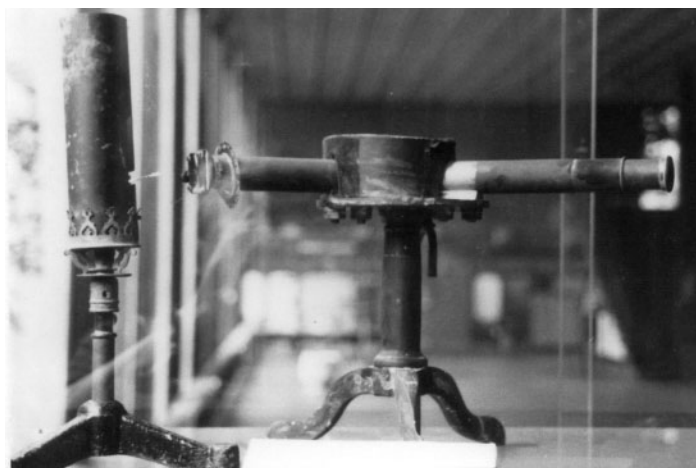
ダルムシュタット工科大学の、ケクレ・コレクションに展示されているブンゼンの肖像。

ロベルト・ヴィルヘルム・ブンゼン

ロベルト・ヴィルヘルム・ブンゼン (Robert Wilhelm Bunsen, 1811-1899)、ドイツの化学者。

ブンゼンはゲッチンゲン大学の言語学教授の息子として生まれ、18才でゲッチンゲン大学に学んだ。多くの理科系科目を学び、更に諸外国で広い科学知識を身につけた。1836年カッセル高等工芸学校の教師として化学を教え、次いでマールブルク大学に転じて化学を教えると共に種々の研究を行った。専攻とする領域は多岐にわたった。研究中にひ素化合物カコシルの研究で爆発事故を起し右目の視力の殆どを失ったが、生涯独身で研究に打ち込んだ。非公開ではあるが、マールブルク大学には現在もブンゼンの使った種々の器具が保存されている。L. グメリン (Leopold Gmelin, 1788-1853) の没後その後任としてハイデルベルク大学に教授として赴任し、1889年に引退するまで教育と研究に専念した。

ブンゼンは有機化学のみならず物理化学、電気化学、地球化学など広範な領域の課題をも研究した。例えば炭素亜鉛電池の



ハイデルベルグ大学の新化学教室に展示されているブンゼン燈(左)と分光分析器。

発明、放電によるアークの生成、光度計の発明、ヨウ素滴定法の発明、マグネシウムの単離、電解法による金属の遊離、ガス燈の発明。また化学に必要な種々の器具、水流ポンプ、熱量計、電池などの発明がある。それらのうち簡単であるが、重要な器具がブンゼン燈である(ケミカルタイムズ209号、キルヒホッフの項にも、古い分光器と共にブンゼン燈の写った写真が掲載されている)。

ブンゼンが改良したブンゼン燈の炎は無色である。これを利用して元素の炎色反応の分析を試みた。一方、キルヒホッフはフラウンホーヘルの発見したスペクトル線を用いて元素の分析を行った。さらにブンゼンとキルヒホッフは、二つの方法(炎色反応とスペクトル線を調べる反応)を結びつけて元素の新しい分光分析法を完成させた。ブンゼンは、彼等の分光分析法により新元素セシウムおよびルビジウムを発見した。分光分析法では、星や太陽などからの光のスペクトルから、それらの天体に含まれる元素を分析することが出来るようになった。

ハイデルベルク市は、ライン川の支流ネッカー川が市内を流れており、川向うにあるハイデルベルク大学の新化学教室・大講堂に、ブンゼンの使用した器具類、ブンゼン燈、分光器、ブンゼンとヴィクトル・マイアー (Viktor Meyer, 1848-1897) の石膏の胸像およびブンゼンのデスマスクなどの展示がある。

ブンゼンは優れた化学研究者であり、また教育者であった。マールブルク大学、ハイデルベルク大学では優れた実験化学者を育てた。数年前筆者を訪ねてきたドイツBASF社の化学者が、ハイデルベルクのブンゼンの研究室の写真を見て「私もこの研究室で実験をした」と懐かしげに語ったことが今も耳に残っている。

ブンゼンの生家はゲッチンゲン市内にあり、現在はホテルになっているが、数年前に新しい記念板が掲げられた。墓はハイデルベルクの山墓地にあり、大きな丸い横顔のブロンズのレリーフが掲げられている。

本シリーズは「ドイツの切手に現れた科学者、技術者達」であるが、優れた科学者でも未だ切手に現れていない科学者がいる。私が調べた限りではブンゼンがその一人であり、本号ではブンゼンの切手のないまま紹介することにした。※本稿に掲載の写真は、著者の撮影によるものである。



ハイデルベルク大学、新化学教室大講堂に展示されているブンゼンの遺物、器具、デスマスクなど。



Rubidium, Element 37, von Bunsen entdeckt und zuerst hergestellt (Original Präparat)

ブンゼンが発見した37番元素ルビジウム
(ブンゼンのオリジナル・サンプル)。



Caesium, Element 55, von Bunsen entdeckt (Original-Präparat)

ブンゼンが発見した55番元素セシウム
(ブンゼンのオリジナル・サンプル)。



ハイデルベルク大学の新化学教室大講堂にあるブンゼンの胸像。



ハイデルベルクの山墓地にあるブンゼンの墓。



ゲッチンゲン市内にあるブンゼン通りの標識。

ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(23) ロベルト・ヴィルヘルム・ブンゼン



ハイデルベルク大学600年記念切手、図柄は大学広場にある「古い大学の建物」1986年、西ドイツ発行。

ドイツ化学会物理化学賞のブンゼンメダル。



上の切手の図柄になったハイデルベルグ大学の古い建物。



ブンゼンの記念板があるマールブルク大学の旧化学教室。



ハイデルベルグのビスマルク広場からハウプト通りに入って間もなく、分光分析法発見の記念板(ケミカルタイムズ209号、キルヒホッフの項に写真掲載)があり、そこからすぐにあるブンゼンの巨大な立像。

表紙写真

チングルマ(稚児車) バラ科

チングルマは高山の雪渓周辺の草地や砂礫地に、背丈が10cmほどの木で群生します。白い花びらで夏山に咲き誇り、その花が落ちタンポポの白い穂のような姿に変る時期、そして秋には鮮やかに赤く染まる葉と、どの時期もチングルマは画になり、チングルマだけを撮り集めているカメラマンもいるほどです。これは穂の時期に霧を浴びてたたずむ姿を大きく載せてみました。チングルマの名前は、鯉のぼりのボールの先端についている風車や、古来の風車の玩具を稚児車と言い、この植物の花が落ち穂がこの稚児車(チゴクルマ)の形に似ていることから由来するそうです。(写真文 北原音作)

編集後記

神無月、八百万の神様が揃って出雲へお出掛けの月となりました。編集室のある日本橋本町では、この十月に薬祖神祭(17日)、べったらし(19、20日)とお祭りが続きます。鬼のいぬ間にと言うことでもないのでしょうか。ケミカルタイムズは、本誌の発行を持ちまして通巻で210号となります。これもご寄稿頂いております諸先生方ならびに読者の皆様のおかげに寄るものと、心からお礼申し上げます。

今後とも、広く化学の領域に携わってられます研究者の皆様のご寄稿を、お待ち申し上げております。

本誌の読者の皆様には、あらためましてご愛読のお礼を申し上げます。通巻210号の節目をむかえ、内容の一層の充実を図り、よりよい情報の提供ができますよう、誌面作りに努めさせていただきます。

今後とも、皆様のご愛読を賜りますよう、宜しくお願い申し上げます。

(築島 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 築島 功 平成20年10月1日 発行