

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. Cica THE CHEMICAL TIMES

2010 No.1(通巻 215 号)

ISSN 0285-2446

新年を迎えて	代表取締役社長 野澤 俊太郎	2
ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(XI) —ヒトミルクオリゴ糖のHPLCによる定量分析—	齋藤 忠夫	3
免疫組織化学染色に使用されるコートスライドガラスの組織切片接着メカニズム	新道 弘規	9
新・私の古生物誌(6) —コウモリの今と昔—	福田 芳生	14
新しい銀イオンクロマトグラフィー用HPLCカラム“Silver column KANTO”の開発(2)	大瀧 伸之	19
ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(28)ロベルト・コッホ	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。

読者の皆様、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。

昨年は米国でも初めて黒人系のオバマ大統領が誕生しました。わが国では55年体制が崩壊し政権交代により民主党の鳩山内閣が成立しました。政治の世界では大きな時代の変革が音を立てて起こり始めています。米国は世界同時不況を招いた金融資本・市場原理主義を否定し、グリーン・ニューディールを初め新たな成長産業の育成を目指しています。一方わが国では鳩山内閣が温室効果ガス排出量の25%削減、高速道路無料化、子育て支援、年金改革、製造業派遣禁止等のマニフェストを実行しようとしています。これらが産業に与える影響が大きいことは間違いなく、それらの変化の兆しをいち早く感じ、企業としてどのように対処できるかが一層重要になると考えております。

米国住宅バブル崩壊を発端に全世界を大混乱に陥れた金融危機も昨年の3月を底に徐々に回復の兆しを示し、国際通貨基金 (IMF) の2010年実質GDP成長率予想では米国、我が国ともプラスとなりましたが、その回復は財政主導による景気の挺入れによるものであり、一つの指標となる失業率の高さを見るとまだまだ自律的な立ち上がりは弱く、

二番底の懸念が払拭されておられません。

それにしても、金融資本主義の申し子達がコンピュータを使い金融工学を駆使して金融・証券商品を作り、高名な格付け会社がトリプルエー (AAA) の評価をすることで、全世界に売りまくり巨額な利益を上げ、その資産規模を膨らし続けた挙句にそのバブルが崩れ全世界を金融危機に陥れました。当社から見れば高名な評価会社がその金融・証券商品にAAAの評価をしたことがこの大きな危機を作り出したように思われます。これらの事実を見るにつけ当社は産業における化学物質の評価の基準になる試薬の製造に従事する会社であり、その使命感とその責任の重さをひしひしと感じています。

「THE CHEMICAL TIMES」は学術誌として昭和25年 (1950) 3月の創刊以来、今年で六十周年を迎えます。今後も益々充実した内容で発行に取り組んでまいります。

社会に積極的に貢献する企業としてその内容が真に誇れる製品を地道に作り続けるとともに科学進歩の一翼を担えるよう鋭意努力して行きます。

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。

ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(XI)

Comparative Biochemistry of Milk Oligosaccharides (XI)

—ヒトミルクオリゴ糖のHPLCによる定量分析—

—Quantitative Analysis of Human Milk Oligosaccharides (HMO) by HPLC—

国立大学法人 東北大学大学院農学研究科 教授 農学博士 齋藤 忠夫

TADAO SAITO Dr. Agric.

Graduate School of Agricultural Science, TOHOKU University

国立大学法人 帯広畜産大学大学院畜産学研究科 教授 農学博士 浦島 匡

TADASU URASHIMA Dr. Agric.

Graduate School of Food Hygiene, OBIHIRO University of Agriculture and Veterinary Medicine

1. はじめに

哺乳動物の泌乳初期に分泌される初乳には、ラクトース(乳糖)以外に多種類のオリゴ糖が含まれており、これらをミルクオリゴ糖(MO)と呼んでいる。著者らのミルクオリゴ糖研究を紹介する本シリーズでは、ヒトを初めとした各種哺乳動物におけるミルクオリゴ糖の構造解析をトピック的に概説した¹⁸⁻²⁷⁾。ヒトミルクオリゴ糖にはすでに93種類の化学構造が報告されており、それらは基本骨格(コア)に基づいて13の系列に分類されている(図1)¹⁾。また最近、(財)野口研究所の天野純子博士により、ラクト-N-デカオースおよびラクト-N-ネオデカオースをコアとする新規な20種類のオリゴ糖の化学構造が報告された²⁾。1950年代から現在に至るまで、ミルクオリゴ糖の化学構造に関する研究が多く報告されているが、人乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖(HMO)の定量分析は未実施であった。近年、糖鎖の化学的標識化法が進展し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離技術とリンクして、代表的な中性ならびに酸性オリゴ糖の各種の泌乳時期における定量分析が実施されるようになった。今回は浦島らの研究グループによる中性および酸性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析について紹介する^{3), 4), 5)}。

2. 日本人女性における中性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析³⁾

泌乳開始後1~3日の12人の健康な日本人女性から提供された初乳において、表1に示したような10種類の代表的な中性ヒトミルクオリゴ糖を定量分析対象とした。各乳試

Gal (β1-4) Glc	Lactose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-tetraose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neotetraose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-hexaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neohexaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neohexaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	para-Lacto-N-hexaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	para-Lacto-N-neohexaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-octaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neooctaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	iso-Lacto-N-octaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	para-Lacto-N-octaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-decaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neodecaose

図1 ヒトミルクオリゴ糖における13系列のコア構造

料1mLに対し、内標準物質として1mgのイソマルトリオースおよびイソマルトペンタオースを添加した。最終的にHPLC上の各オリゴ糖と内標準オリゴ糖のピーク面積比から正確な定量分析を行うため、乳試料に予め内標準物質を添加しておくことがかぎである。ついで、4倍量のクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)抽出により糖質画分を調製してから、Bio Gel P-2カラムによるゲルろ過によりオリゴ糖の分離を行い、図2に示したように2つのピークを回収した。各ピーク中のオリゴ糖は1-methyl-3-phenyl-5-pyrazolone (PMP)または2-

aminopyridine (PA)により化学的に標識した。PMP化はHondaらの方法⁶⁾に基づき、オリゴ糖画分に対して0.5M PMPのメタノール溶液と0.6M NaOH 溶液を添加し、70℃で30分間反応させた。反応液に0.1M 塩酸とクロロホルムを添加し、攪拌後、上層を取り出した。PA化はTakemotoらの方法⁷⁾により、オリゴ糖画分に対し酢酸にPAを溶解した溶液を添加し、90℃で1時間反応させた後、酢酸にホウ酸-ジメチルアミンを溶かした溶液を加えて80℃で50分間還元した。得られたPA誘導体は電気透析によって精製した。定量分析に供したオリゴ糖の標準物質 (各 50, 100, 200 および 400 μ g) は標準曲線および回収率のデータをえるため同様に標識化を行った。

表1 定量分析を行った中性ヒトミルクオリゴ糖

Peak	Oligosaccharide	Molecular Weight	Number of monosaccharide	Structure	
1	2'-fucosyllactose	2'-FL	488.44	3	Fucul-2Gal β 1-4Glc
	3-fucosyllactose	3-FL	488.44	3	Gal β 1-4[Fucul-3]Glc
	lactodifucotetraose	LDFT	634.57	4	Fucul-2Gal β 1-4[Fucul-3]Glc
2	lacto-N-Tetraose	LNT	707.64	4	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Neotetraose	LNnT	707.64	4	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Fucopentaose I	LNFP I	853.70	5	Fucul-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Fucopentaose II	LNFP II	853.70	5	Gal β 1-3Fucul-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-FucopentaoseIII	LNFP III	853.70	5	Gal β 1-4[Fucul-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Difucopentaose I	LNDFH I	999.91	6	Fucul-2Gal β 1-3[Fucul-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Difucopentaose II	LNDFH II	999.91	6	Gal β 1-3[Fucul-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fucul-3]Glc

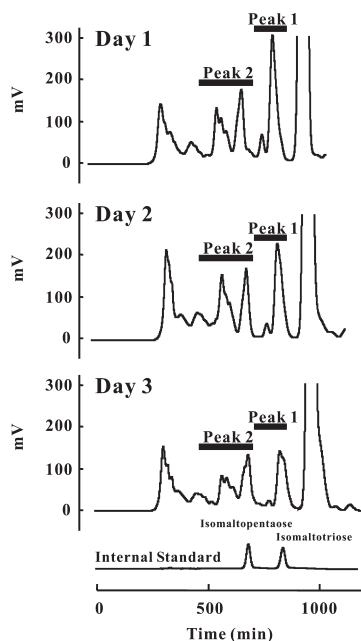


図2 泌乳開始1～3日の人乳から分離した糖質画分のゲルクロマトグラム Bio Gel P-2カラム(2.6×100cm)を使用した。溶出は蒸留水、流速は15mL/hに調整し、各画分は5mLずつ回収した。検出はSmart Chrom softwareを用いた示差屈折で行った。

標識化したオリゴ糖画分はDISMIC-13CP膜を通過した後、Inertsil ODS-3VカラムかODS-100Zカラムによる逆相

HPLCに供して分析した。ピーク1におけるPMP標識化オリゴ糖は1mL/minの流速で60分間16%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH 7.0) で溶出した。ピーク2におけるPMP標識化オリゴ糖は、10%および25%アセトニトリルを含む100mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.5) (各々buffer AおよびBとする)を用い、buffer Bの84–64%直線濃度勾配で70分間0.4mL/minの流速で溶出した。ピーク2のPA化標識オリゴ糖は、PMP化標識オリゴ糖の分析時と同じカラムを使用し、200mMクエン酸buffer (pH 5.0) を溶媒として60分間1mL/minの流速で溶出した。

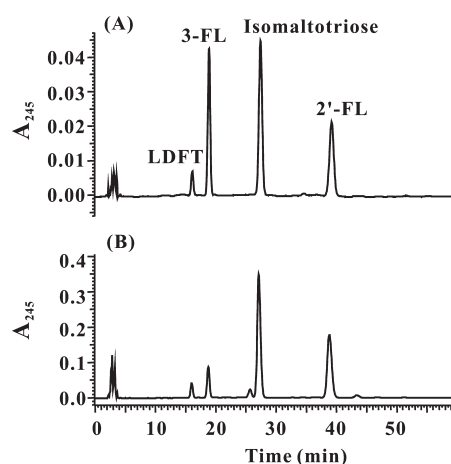


図3 PMP標識化したPeak 1画分のHPLC (A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。 (B) ゲル濾過によって回収したPeak 1画分のHPLC。 HPLCは、ODS-3V (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5 μ m)カラムを使用し、1mL/minの流速で60分間16%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH 7.0)で溶出した。

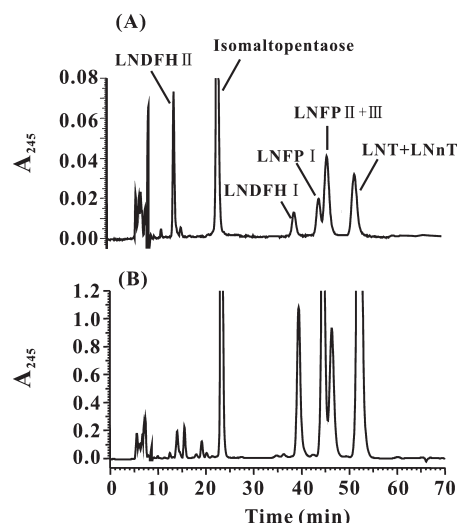


図4 PMP標識化したPeak 2画分のHPLC (A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。 (B) ゲル濾過によって回収したPeak 2画分のHPLC。 HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5 μ m)カラムを使用し、10%および25%アセトニトリルを含む100mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.5) (各々buffer AおよびBとする)を用い、buffer Bの84–64%直線濃度勾配で70分間0.4mL/minの流速で溶出した。

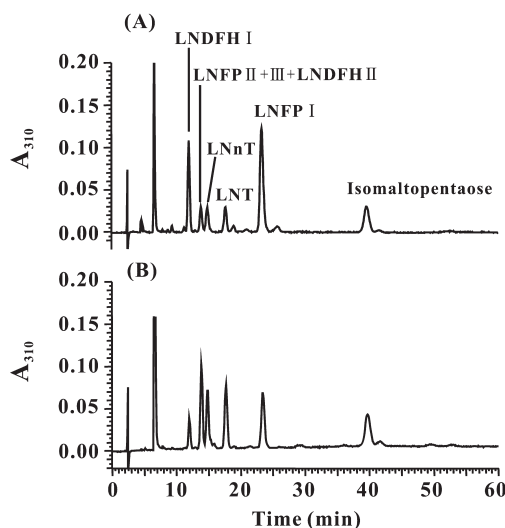


図5 PA標識したPeak 2画分のHPLC
(A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。
(B) ゲル濾過によって回収したPeak 2画分のHPLC。
HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5μm) カラムを使用し、200mM クエン酸buffer (pH 5.0) を溶媒として60分間1mL/minの流速で溶出した。

PMPまたはPA化標識したピーク1および2中のオリゴ糖のHPLCを図3～5に示した。内標準オリゴ糖とのピーク面積比の比較から、泌乳開始後1～3日までの初乳における各オリゴ糖の含量を表2に示したように求めた。この定量分析値に基づいて、これらの代表的なオリゴ糖の中でも2'-FL, LNFP I, LNTおよびLNDFH Iはとくに含有量の高いことが示された。初乳中におけるオリゴ糖の含有量は22～24g/Lと概算されているが、表2の定量値からこれら4種のオリゴ糖の合計値で全オリゴ糖 (130種類以上含まれる) の1/3～1/4を占めることが示唆された。

表2 泌乳開始1～3日の各ヒトミルクオリゴ糖濃度 (g/L)、括弧内は標準偏差

	Day of lactation (n=12)			P Value
	Day 1	Day 2	Day 3	
2'-FL	2.49 ± 1.22 ^a [4.51 - 0.86]	2.01 ± 1.07 ^b [4.06 - 0.60]	1.58 ± 0.73 ^c [2.76 - 0.38]	<0.0001
3-FL	0.26 ± 0.14 [0.50 - 0.05]	0.28 ± 0.26 [0.96 - 0.002]	0.20 ± 0.13 [0.38 - 0.01]	N.S.
LDFT	0.42 ± 0.42 ^a [1.54 - 0.01]	0.28 ± 0.30 ^{ab} [1.10 - 0.04]	0.19 ± 0.14 ^b [0.41 - 0.03]	0.0084
LNT	0.89 ± 0.43 ^b [1.46 - 0.21]	1.44 ± 0.70 ^a [2.09 - 0.38]	1.45 ± 0.73 ^a [3.01 - 0.41]	0.0014
LNnT	0.40 ± 0.09 ^b [0.56 - 0.29]	0.54 ± 0.14 ^a [0.86 - 0.34]	0.42 ± 0.15 ^{ab} [0.75 - 0.30]	0.0229
LNFP I	1.47 ± 1.01 [3.16 - 0.31]	2.08 ± 1.67 [6.42 - 0.66]	1.67 ± 1.03 [3.94 - 0.38]	N.S.
LNFP I + III	0.38 ± 0.24 [1.05 - 0.13]	0.45 ± 0.26 [1.12 - 0.20]	0.42 ± 0.33 [1.32 - 0.13]	N.S.
LNDFH I	1.27 ± 0.54 [2.31 - 0.31]	1.87 ± 1.55 [6.58 - 0.92]	1.41 ± 0.66 [2.94 - 0.78]	N.S.
LNDFH II	0.017 ± 0.018 [0.07 - 0.006]	0.020 ± 0.025 [0.098 - 0.004]	0.019 ± 0.028 [0.106 - 0.003]	N.S.

2'-FLには世界中で乳児に深刻な下痢を引き起こす *Campylobacter jejuni* による感染から乳児を守り、下痢を防止する働きが示唆されている⁸⁾。含有量は泌乳開始1日目から3日目まで有意に低下することが示されたが、このこと

は *Campylobacter jejuni* による新生児の感染に対し、泌乳開始直後の初乳がとくに重要であることを示唆している。

4種類の存在比の高いオリゴ糖のうち、2'-FLを除く3種類はいずれも分子内にGal (β1-3) GlcNAcを含む「タイプI型オリゴ糖」である。筆者らはこれまでに多くの動物種のミルクオリゴ糖の解析を行ったが、ヒトと類人猿以外の動物種ではタイプI型オリゴ糖は発見されず、Gal (β1-4) GlcNAcを含むタイプII型オリゴ糖とラクトース系列 (図1参照) のオリゴ糖しか発見されなかった。類人猿ではゴリラとテナガザルの乳ではタイプII型のオリゴ糖とラクトース系列のオリゴ糖しか発見されず、チンパンジー、ボノボ、オランウータンの乳ではラクトース系列オリゴ糖とともに、タイプI型オリゴ糖、タイプII型オリゴ糖が共存するものの、タイプII型オリゴ糖の方がタイプI型オリゴ糖よりも優先的であった⁹⁾。このことは、タイプI型オリゴ糖の優先性はあらゆる哺乳動物種の中でヒトだけの特徴であることを示している。この意義については別の機会に言及したい。

3. サモア人女性における中性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析⁴⁾

欧米人ドナーには20%くらいの割合で、2'-FLやLNFP Iなどの非還元末端に存在するFuc (α1-2) 残基を持つミルクオリゴ糖を含まない人たちがいる。この人々を非分泌型ドナー (体液に血液型物質を分泌しないという意味) といい、2'-FLやLNFP Iなどを含む人々を分泌型ドナーという。日本人女性のミルクオリゴ糖分析を行ったドナーはすべて分泌型ドナーであるが、ミルクオリゴ糖定量値の人種的な違いをみる目的から、サモア人女性乳についての定量分析を行った。

日本人女性のケースと同様の方法によって分画されたオリゴ糖を含む画分に対し、標識化法としてPA化またはPMP化ではなく、アントラニル酸 (AA) により標識化した¹⁰⁾。標識化試薬はメタノール-酢酸-ホウ酸溶液にAAとシアノホウ素化水素ナトリウムを溶解して調製した。オリゴ糖画分を蒸留水に溶解し、標識化試薬を加えて80℃で50分間反応させた。ついで冷却後、水を加え、クロロホルムを加えて攪拌してから、上層を取り出した。AA標識化されたオリゴ糖を含む画分は、ODS-100Zカラムを使用した逆相HPLCで5%アセトニトリルを含む150mMクエン酸ナトリウムbuffer (pH 4.5) か7.5%アセトニトリルを含む50 mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.0) で溶出した。

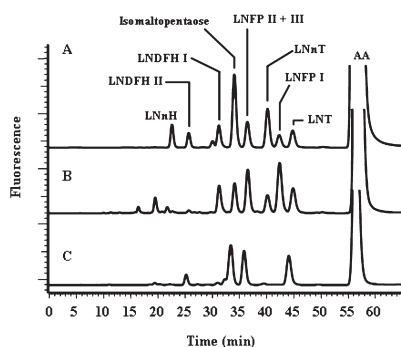


図6 AA標識化したヒトミルクオリゴ糖のHPLC (1)(4~6糖画分)
(A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。
(B) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含むドナーのHPLC。
(C) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含まないドナーのHPLC。
HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5μm)カラムを使用し、5%アセトニトリルを含む150mMクエン酸ナトリウムbuffer (pH 4.5)で溶出した。

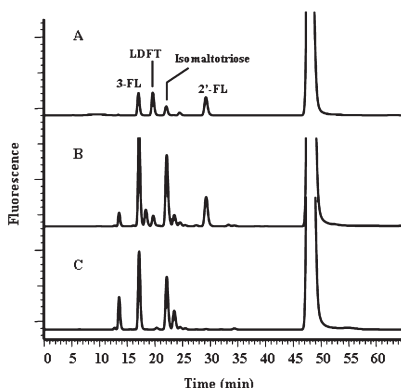


図7 AA標識化したヒトミルクオリゴ糖のHPLC (2)(3糖画分)
(A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。
(B) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含むドナーのHPLC。
(C) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含まないドナーのHPLC。
HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5μm)カラムを使用し、7.5%アセトニトリルを含む50mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.0)で溶出した。

表3 産後5~10日とその後の各ヒトミルクオリゴ糖濃度 (g/L)

Oligosaccharide	Transitional Milk (g/L) 5-10 days post-partum (n=8)	Mature Milk (g/L) > 10 days post-partum (n=8)
LNnH	0.14 ± 0.11	0.02 ± 0.02
LNDFH II	0.96 ± 0.44	0.69 ± 0.78
LNDFH I	0.74 ± 0.68	1.31 ± 1.71
LNFP II + III	5.30 ± 1.41	2.77 ± 2.14
LNFP I	0.26 ± 0.58	0.35 ± 0.45
LNT	3.90 ± 1.86	1.31 ± 0.59
LNnT	0.46 ± 0.36	0.20 ± 0.29
LDFT	0.05 ± 0.06	0.14 ± 0.19
3-FL	1.67 ± 0.82	2.35 ± 1.39
2'-FL	0.22 ± 0.37	0.69 ± 0.81

図6、図7にHPLCのプロファイル、表3に各オリゴ糖の定量分析値を示した。図6、図7にはLNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含むドナーのパターンと含まないドナーのパターンを示した。それらのオリゴ糖を含まないドナーのHPLC

プロファイルは非常に単純である。表3には定量されたオリゴ糖の平均値を示したが、初乳、常乳とも日本人の初乳でえられた値と著しく異なっていることが理解されるであろう。すなわち、サモア人の母乳で最も優先的なオリゴ糖はLNFP II および III、ついでLNTであり、2'-FLやLNFP I は少ない。これはサモア人女性において非分泌型ドナーが優先的であることを意味する。サモア人の多くは非分泌型であり、少数の人はもともとサモア人に対し後に移住してきた人たちが混血して、少量の2'-FLやLNFP I を分泌するようになったとも考えられる。これははるか昔、東南アジア地域からサモアに移住してきた人々が、東南アジアの中でも非分泌型ドナーの限られた集団であった可能性を示唆している。最も優先的なピークには、タイプI型のLNFP II とタイプII型のLNFP III が含まれ、現段階までにこの2つのオリゴ糖の分離には成功していない。どちらがより優先的なオリゴ糖であるかわからないが、LNFP II のコアであるLNT (タイプI型)とLNFP III のコアであるLNnT (タイプII型)では、LNTの方がはるかに優先的である。これはLNFP IIの方がLNFP III よりも優先的であることを推定させ、サモア人女性の乳でもタイプI型オリゴ糖の方がタイプII型オリゴ糖よりも優先的であると考えの方が妥当であろう。

表4 定量分析した酸性ヒトミルクオリゴ糖

oligosaccharide		MW	Structure
3'-Sialyllactose	(3'-SL)	633.6	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc
6'-Sialyllactose	(6'-SL)	633.6	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc
3'-Sialyl-3-fucosyllactose	(3'S-3FL)	779.7	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc
Sialyllacto-N-tetraose a	(LSTa)	998.9	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-tetraose b	(LSTb)	998.9	Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-tetraose c	(LSTc)	998.9	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-fucopentaose I	(SLNFP I)	1145	Fuc α 1-2Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-fucopentaose II	(SLNFP II)	1145	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Disialyl-lacto-N-tetraose	(DSLNT)	1290	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc

4. 日本人女性における酸性ミルクオリゴ糖の定量分析⁵⁾

日本人女性において泌乳開始1~3日の初乳において、表4に示したような代表的な酸性オリゴ糖の定量分析を行った。乳試料に脱イオン水を添加し、同様にクロロホルム/メタノール (2:1, v/v)抽出を行って糖質画分を得た。得られた画分はBond Elut NH2 (1 g/6 mL)によるアニオン交換固相抽出カラムクロマトグラフィーに供して、酸性糖と中性オリゴ糖およびラクトースに分画した。すなわち脱イオン水に溶解した上の画分を同カラムにのせ、水で洗浄した後に吸着した酸性オリゴ糖を含む成分を、0.5Mピリジ

ン酢酸buffer (pH 5.0)で溶出した。溶出液に内標準キシロース溶液(500 μ g/ml)を加えてから凍結乾燥し、ついで中性オリゴ糖の分析と同様Hondaらの方法によってPMPによる標識化を行った。PMP標識化した酸性オリゴ糖画分はDISMIC-13CP膜を通過してから100Vカラムによる逆相HPLCに供した。溶出は10%および25%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH 7.0) (各々buffer CおよびDとする)で、65%から95.7%までのbuffer Dの直線濃度勾配で115分間、0.2mL/minの流速で行った。各PMP化標識した標準オリゴ糖の内標準物質に対するピーク面積の割合は、各種濃度で予め求めた。各オリゴ糖の定量は、内標準物質に対するピーク面積比から求めた。

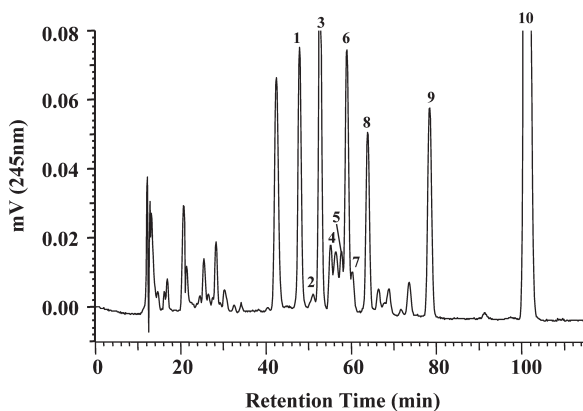


図8 PMP標識化した酸性ヒトミルクオリゴ糖のHPLC
ピーク 1: ジシアリルラクト-N-テトラオース (DSLNT); 2: シアリルラクト-N-フコペンタオース I (SLNFP I); 3: 6'-シアリルラクトース (6'-SL); 4: シアリルラクト-N-テトラオース b (LSTb); 5: 3'シアリル-3-フコシルラクトース (3'-3FL)+シアリルラクト-N-フコペンタオース II (SLNFP II); 6: シアリルラクト-N-テトラオース c (LSTc); 7: シアリルラクト-N-テトラオース a (LSTa); 8: 3'-シアリルラクトース (3'-SL); 9: ラクトース; 10: キシロース (内標準物質)。
HPLCは、100Vカラムを使用し、10%および25%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH7.0) (各々buffer CおよびDとする)で、65%から95.7%までのbufferDの直線濃度勾配で115分間、0.2mL/minの流速で溶出した。

表5 泌乳開始1~3日の酸性ヒトミルクオリゴ糖濃度 (mg/L)

Oligosaccharide	Day of lactation (n=20, Means $\pm$ SD, mg/L)				P
	Day 1	Day 2	Day 3	Means	
3'-SL	362.32 $\pm$ 102.66 ^a	269.33 $\pm$ 70.07 ^b	258.36 $\pm$ 80.44 ^b	296.67 $\pm$ 96.29	< 0.0001
6'-SL	341.83 $\pm$ 119.51 ^b	371.44 $\pm$ 114.68 ^{ab}	396.29 $\pm$ 85.73 ^a	369.86 $\pm$ 108.19	0.0071
LSTa	106.97 $\pm$ 85.24 ^b	154.53 $\pm$ 117.53 ^a	162.44 $\pm$ 111.45 ^a	141.13 $\pm$ 106.76	< 0.0001
LSTb	68.42 $\pm$ 22.24	63.97 $\pm$ 24.78	61.53 $\pm$ 27.21	64.64 $\pm$ 24.57	N.S.
LSTc	659.06 $\pm$ 297.4	706.75 $\pm$ 260.69	693.18 $\pm$ 242.7	686.32 $\pm$ 264.1	N.S.
SLNFP I	75.92 $\pm$ 54.82	79.81 $\pm$ 36.71	78.27 $\pm$ 65.37	78.00 $\pm$ 52.72	N.S.
DSLNT	479.91 $\pm$ 126.33	447.41 $\pm$ 109.72	459.05 $\pm$ 150.56	462.12 $\pm$ 128.45	N.S.
3'-3FL+SLNFP II	148.38 $\pm$ 43.97	156.24 $\pm$ 63.84	165.41 $\pm$ 43.76	156.67 $\pm$ 51.00	N.S.

ヒト初乳から抽出した酸性オリゴ糖のHPLCは図8に、ならびに泌乳開始1~3日間の定量分析値は表5に示した。酸性オリゴ糖の中で最も優先的なのは、LSTcであり、ついでDSLNT, 6'-SL, 3'-SL, LSTaの順であった。各酸性オリゴ糖の含有量は、2'-FL, LNFPI, LNDFHI,

LNTなどの主要中性オリゴ糖よりも低かった。上の結果、人乳では6'-SLは3'-SLよりも優先的であったが、泌乳開始1日目ではその含有量はおおよそ等しいことが注目される。ウシ初乳などにおいては、3'-SLの方が6'-SLよりも優先的である。現代人は出産時の痛みを和らげるため陣痛緩和剤を処置されることの影響で、泌乳の開始が産後2~3日後に遅れることが多い。その間に新生児に人工調合乳を与えることが多いが、上のデータはウシ初乳などより分離した3'-SL主体のシアリルオリゴ糖を人工調合乳に添加することの意義を示していると考えられる。調合乳の原料となるウシの常乳においては、シアリルオリゴ糖の含有量は極めて低い。

表6 中性ヒトミルクオリゴ糖濃度の文献値 (g/L)

Oligosaccharide	Concentration (g/L)					
	Kunz et al ⁽¹⁾	Chaturvedi et al ⁽²⁾	Thurl et al ⁽³⁾	Coppa et al ⁽⁴⁾ (Day 4)	Coppa et al ⁽⁴⁾ (Day 60)	Asakuma et al ⁽⁵⁾ (Day 2)
2'-FL	0.45 $\pm$ 0.43	2.43 $\pm$ 0.26	1.84	3.93 $\pm$ 1.11	1.84 $\pm$ 0.39	2.01 $\pm$ 1.07
3'-FL	0.07 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.10	0.46	0.34 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.26
LDFT		0.43 $\pm$ 0.04	0.17			0.28 $\pm$ 0.30
LNT	1.09 $\pm$ 0.47	0.55 $\pm$ 0.08	0.86	0.84 $\pm$ 0.29	1.56 $\pm$ 0.57	1.44 $\pm$ 0.70
LNnT	Tr	0.17 $\pm$ 0.03	0.11	2.04 $\pm$ 0.55	0.95 $\pm$ 0.83	0.54 $\pm$ 0.14
LNFPI	1.26 $\pm$ 1.11	1.14 $\pm$ 0.18	0.67	1.36 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.61	2.08 $\pm$ 1.67
LNFP II			0.20	0.29 $\pm$ 0.22	0.29 $\pm$ 0.16	
LNFP III			0.28			
LNDFH I		0.50 $\pm$ 0.06	0.58	0.79 $\pm$ 0.25	1.18 $\pm$ 0.22	1.87 $\pm$ 1.55
LNDFH II	0.16 $\pm$ 0.11	0.09 $\pm$ 0.01	0.25			0.020 $\pm$ 0.025
LNH			0.13	0.07 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.02	

表7 酸性ヒトミルクオリゴ糖濃度の文献値 (g/L)

Oligosaccharide	Concentration (g/L)				
	Kunz et al ⁽¹⁾	Martin-Sosa et al ⁽⁶⁾	Bao et al ⁽⁷⁾ (Day 3 to 5)	Bao et al ⁽⁷⁾ (Day 9 to 21)	Asakuma et al ⁽⁵⁾ (Day 1 to 3)
3'-Neu5AcL	0.300 - 0.500	0.100 - 0.300	0.097 $\pm$ 0.038	0.076 $\pm$ 0.014	0.297 $\pm$ 0.096
6'-Neu5AcL	0.100 - 0.300	0.200 - 0.300	0.335 $\pm$ 0.033	0.396 $\pm$ 0.054	0.370 $\pm$ 0.108
LSTa	0.030 - 0.200	1.700 - 3.800	0.026 $\pm$ 0.011	-	0.141 $\pm$ 0.107
LSTb	-	-	0.131 $\pm$ 0.064	0.074 $\pm$ 0.026	0.065 $\pm$ 0.025
LSTc	0.100 - 0.600	1.400 - 3.000	0.232 $\pm$ 0.058	0.148 $\pm$ 0.060	0.686 $\pm$ 0.264
SLNFP I					0.078 $\pm$ 0.053
SLNFP II			-	0.025 $\pm$ 0.018	
DSLNT	0.200 - 0.600	0.700 - 1.500	1.274 $\pm$ 0.503	0.795 $\pm$ 0.234	0.462 $\pm$ 0.128

5. オリゴ糖定量分析値の方法論による違い

表6および表7には、中性および酸性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析値について、文献的な違いを示した。Chaturvedi⁽¹²⁾はメキシコ人女性の乳から中性オリゴ糖画分をO-ベンゾイル誘導体化後、Raininn Microsorb C-8カラムを用いアセトニトリル/イオン交換水を溶出液とするHPLCによって各オリゴ糖の定量分析を行っている。Coppa⁽¹⁴⁾はイタリア人女性のオリゴ糖画分を標識化しないで高pHアニオン交換カラムによる分離方法を使用して定量分析した。上の両者とも乳から抽出した糖質画分から、ラクトースとオリゴ糖の分離を行っていない。

Bao⁽¹⁷⁾は45%のメタノールを添加した100mM SDSを

含む200mMリン酸buffer (pH 7.05)をrunning bufferとするキャピラリー電気泳動法によって、アメリカ人女性の乳について12の酸性オリゴ糖を分離し、定量分析を行った。他の文献値と比べ、筆者らの定量値に比較的近いが、DSLNTの濃度が異なっている。

これらの文献における各ミルクオリゴ糖の定量分析値の違いは、定量方法による違いか、人種による違いか、泌乳期による違いかは明らかではないが、正確な分析方法を確立するために、同一試料を使用した分析方法の比較検討を行うことが今後の検討課題と考えられる。

また、著者らのこれまでの本シリーズにおけるミルクオリゴ糖研究¹⁸⁻²⁷⁾および関連研究²⁸⁻³⁸⁾の紹介も是非参照して頂き、ミルクオリゴ糖の多様性の生物学的意義などについてご興味を持って頂けたら幸いである。

引用文献

- 1) Urashima, T., Kitaoka, M., Asakuma, S. and Messer, M. Advanced Dairy Chemistry, vol. 3, Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. Third Edition. McSweeney, P.L.H. and Fox, P.F (Eds.), Springer, New York (2009).
- 2) Amano, J., Osanai, M., Orita, T., Sugahara, D. and Osumi, K. *Glycobiology* **19**, 601-614 (2009).
- 3) Asakuma, S., Urashima, T., Akahori, M., Obayashi, H., Nakamura, T., Kimura, K., Watanabe, Y., Arai, I. and Sanai, Y. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**, 488-494 (2008).
- 4) Leo, E., Asakuma, S., Nakamura, T., Fukuda, K., Senda, A. and Urashima, T. *J. Chromatogr. A*. **1216**, 1520-1523 (2009).
- 5) Asakuma, S., Akahori, M., Kimura, K., Watanabe, Y., Nakamura, T., Tsunemi, M., Arai, I., Sanai, Y. and Urashima, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1447-1451 (2007).
- 6) Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K. and Nakamura, J. *Anal. Biochem.* **180**, 351-357 (1989).
- 7) Takemoto, H., Hase, S. and Ikenaka, T. *Anal. Biochem.* **145**, 245-250 (1985).
- 8) Ruiz-Palacios, G., Cervants, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguio, B. and Newburg, D.S. *J. Biol. Chem.* **278**, 14112-14120 (2003).
- 9) Urashima, T., Odaka, G., Asakuma, S., Uemura, Y., Goto, K., Senda, A., Saito, T., Fukuda, K., Messer, M. and Oftedal, O.T. *Glycobiology* **19**, 499-508 (2009).
- 10) Anumula, K.R. and Dhume, S.T. *Glycobiology* **8**, 685-694 (1998).
- 11) Kunz, C., Rudloff, S., Schad, W and Braun, D. *Br. J. Nutr.* **82**, 391-399 (1999).
- 12) Chaturvedi, P., Warren, C.D., Altaye, M., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G., Pickerling, L.K. and Newburg, D.S. *Glycobiology* **11**, 365-372 (2001).
- 13) Thurl, S., Muller-Werner, B. and Sawatzki, G. *Anal. Biochem.* **235**, 202-206 (1996).
- 14) Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A. and Gabrielli, O. *Acta Paediatr. Suppl.* **430**, 89-94 (1994).
- 15) Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. and Strobel, S. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 699-722 (2000).
- 16) Martin-Sosa, M.J., Martin, L.A., Garcia-Pardo and Hueso, P. *J. Dairy Sci.* **86**, 52-59 (2003).
- 17) Bao, Y., Zhu, L. and Newburg, D.S. *Anal. Biochem.* **370**, 206-214 (2007).
- 18) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **154**, 13-21 (1994).
- 19) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **165**, 15-20 (1997).
- 20) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **167**, 3-9 (1998).
- 21) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **173**, 2-8 (1999).
- 22) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **175**, 3-8 (2000).
- 23) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **176**, 18-21 (2000).
- 24) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **177**, 11-16 (2000).
- 25) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **183**, 20-24 (2002).
- 26) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **184**, 2-6 (2002).
- 27) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **201**, 2-5 (2006).
- 28) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *化学と生物*, **31**, 80-82 (1993).
- 29) Messer, M., 浦島 匡, *化学と生物*, **33**, 816-824 (1995).
- 30) 浦島 匡, 中村 正, 齋藤忠夫, *Milk Science*, **46**, 211-220 (1997).
- 31) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **37**, 401-403 (1999).
- 32) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *バイオサイエンスとインダストリー*, **57**, 619-620 (1999).
- 33) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *畜産の研究*, **53**, 1155-1160 (1999).
- 34) 齋藤忠夫, *Milk Science*, **48**, 199-205 (1999).
- 35) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *シープジャパン*, **33**, 11-13 (2000).
- 36) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **38**, 447-451 (2000).
- 37) 齋藤忠夫, *乳業技術 (創立50周年記念号)*, **50**, 38-57 (2000).
- 38) 浦島 匡, 齋藤忠夫, 中村 正, 荒井威吉, *Milk Science*, **49**, 195-202 (2000).

免疫組織化学染色に使用されるコートスライドガラスの組織切片接着メカニズム

Adhesion mechanism of tissue section on the coated slide glass in immunohistochemistry staining.

松浪硝子工業株式会社 技術開発部 主席技師 新道 弘規

HIRONORI SHINDO

TECHNICAL DEVELOPMENT, MATSUNAMI GLASS IND., LTD.

1. はじめに

病理検査では組織切片をスライドガラスに貼付し、組織染色や免疫組織化学染色を行い、標本作製するが、この作製過程において組織切片がスライドガラス表面より剥離することが問題となっていた。この問題を改善する為に、スライドガラス表面に正電荷を付与した剥離防止コートスライドガラスが利用されている。

2. 剥離防止コートスライドガラスの歴史

剥離防止コートスライドガラスの歴史は、1990年までの概況が「病理と臨床」に川島ら¹⁾によってまとめられている。これによると、1883年にMayer²⁾により初めて卵白グリセリンコートが使用され、1898年にKoninski²⁾によりゼラチンコートが使用されるようになった。染色液による共染の問題があったが、溶媒にクロムミョウバンやホルマリンを加えた共染防止方法が考案され、凍結切片や合成樹脂包埋切片に応用されたという。1930年にはUlrika³⁾らによりポリ-L-リジン(PLL)コートが考案された。この手法は現在でも利用されており、病理診以外にも細胞培養ディッシュやプレートへのコートとして使用され、培養細胞接着に利用されている。

染色液による共染の問題を解決する新たな手法として、1963年に深見ら⁴⁾により、ネオプレンコートが考案され、クロロプレンゴムをトルエンで0.2%に希釈してスライドガラスにコートし、免疫組織化学の耐熱接着コートとして使用された。さらに1986年Martin Rentrop⁵⁾らにより3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)をコートしたスライドガラスが

考案され、1998年頃まではコートスライドガラスとしてPLLコートとAPSコートがよく認知されており、国内外のスライドガラスメーカーで広く販売されてきた。また、APSコートはコートの容易さから、病理技師によって自作されている施設もある。

しかし、PLLコートやAPSコートには、次のような問題点があった。

①コート表面が疎水性を示し組織切片伸展作業時の水抜けが悪く、乾燥に長時間を要することがある。これを改善するものとして極低濃度APSコートも存在したが、接着性そのものが弱く限定的使用に限られていた。

②ガラスと組織切片の間に気泡や水が入り組織切片の破れや、シワの原因になることがある。

③免疫組織化学染色で行われる抗原賦活化処理(マイクローブ処理、オートクレーブ処理、ER-PgRの抗原賦活化処理<アルカリ処理pH10,95-99℃,40分>等)において接着力が十分でないため組織切片や細胞の剥離が発生することがある。

日本の市場ではこれらの問題点を解消するため、コート表面が親水性で、かつ強固な接着性を有するコートスライドガラスが求められていた。そして1996年に、初めて実用的な親水性剥離防止コートスライドガラスが、松浪硝子によりMASコートの名称で開発された。その約2年後には他社からも同様の親水性を有した剥離防止コートスライドガラスが発売され、日本の市場において剥離防止コートスライドガラスは、表面親水性であることが一般的となった。現在では70%程度を親水性剥離防止コートスライドガラスが占め、APSコートは25%程度となっている。さらに新規開発ガラスを使用し、MASコートの一部共染性を改良した

MAS-GPコートも開発されている。

3. 細胞膜と接着原理について

細胞同士の接着機構は、大きく分けて2つに分類される。

3.1 細胞外マトリックスを介する細胞同士の接着

細胞の成長分裂には足場との接着が必要であり、細胞膜には仲立ちをする細胞外マトリックスが存在している。細胞外マトリックスの例としては、コラーゲン、ラミニン、糖タンパク質群、フィブロネクチンならびにビトロネクチンなどがある。細胞培養には、コラーゲン等をコートしたポリスチレンやガラス基材が広く利用されている。

3.2 細胞接着分子による接着

細胞膜には多くの膜タンパク質や糖脂質より成る糖鎖が接着分子として数種類存在し、細胞同士の接着や相互作用に関与している。糖鎖の末端にはシアル酸という負の電荷を持った糖が結合している。シアル酸は、 COO^- 基を持つため、負電荷を有しており細胞接着などに関係している(図1)。

病理組織標本や免疫組織化学標本における剥離防止用コートスライドガラスの接着効果は、基本的には細胞表面が負電荷を有していることを利用している。

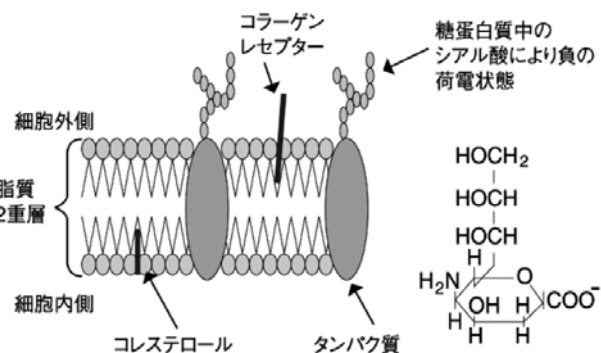


図1 細胞の表面構造

4. PLL、APSおよびMAS コートの接着機構

4.1 PLL コート

ガラス表面にPLLコートを付与することでガラス表面は正電荷に帯電しており、負電荷を有する細胞や組織切片

を静電結合で接着する様にしている。PLLは塩基性アミノ酸の一種であり、側鎖にアミノ基(正電荷)を有したリジンのポリマーであり、PLLのアミノ基がガラス表面のOH基と静電的に結合している。PLLと組織切片や細胞との接着は、細胞表面の負電荷とPLLの正電荷により静電結合している。すなわちスライドガラスと組織切片とはPLLを介して接着固定されている。細胞や組織切片の接着力は、コート剤の特性上、特に免疫組織化学、*in situ* hybridization等の使用では、APSコートやMASコートと比較して弱く注意が必要である。また、コート表面は、少し疎水性を有している(図2)。

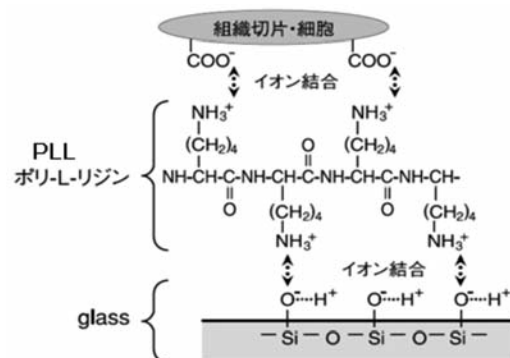


図2 PLLコートの接着機構

4.2 APS コート

APSはガラス表面のOH基と脱水縮合反応して共有結合によるコート膜が形成されている為、ガラス表面上にPLLコートと比較して化学的に安定なアミノ基の正電荷が付与されている。APSコートは、PLLコートと比較して、細胞や組織切片の接着力が強く、特にマイクロウェーブ処理、オートクレーブ処理等の熱処理にも耐久性を有している(図3)。

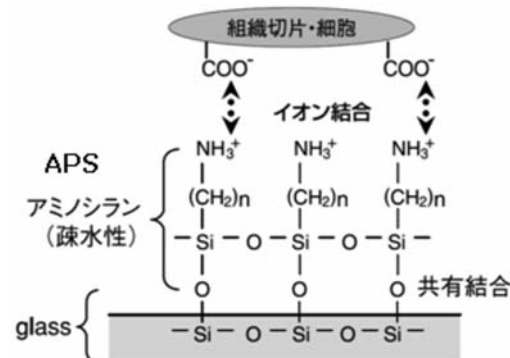


図3 APSコートの接着機構

コート剤の特性上、疎水性が高く切片を固定する場合、適切な温度の水に切片を浮かべてすくい上げたあと、スライドガラスと切片の間の水分を十分乾燥させる必要がある。この手法には技術的にある程度の熟練が必要であり、シワも発生しやすい(図4)。

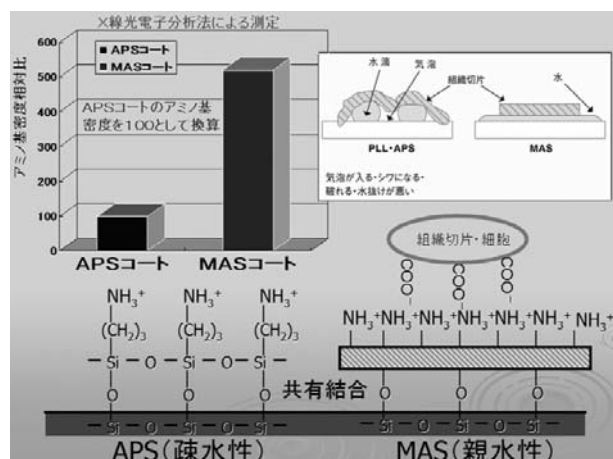


図4 表面親水性・疎水性による切片シワ発生とMASコートの接着機構・アミノ基密度

4.3 MASコート

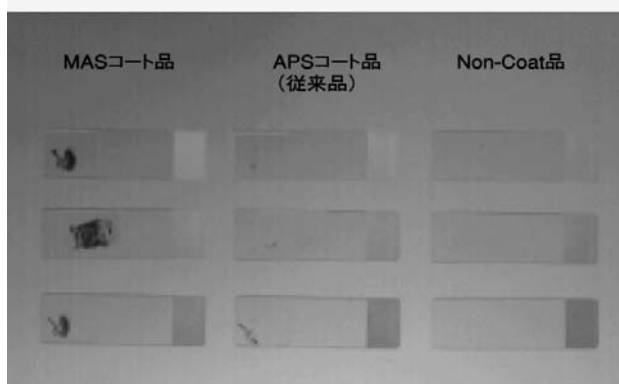
新しいコート剤を、試薬の選定という手法ではなく、新たに合成することを視野に置いて独自技術により開発を行った。従来のPLLコートやAPSコートでは実現不可能であった、細胞や組織切片の接着力の飛躍的な向上と、切片伸展作業を容易にするコート表面の親水性の2大特長を併せ持つMASコートを実現した。コート層は、ガラス表面のOH基と脱水縮合反応後の共有結合によりコート膜が形成され、化学的に安定なアミノ基による正電荷が付与され、かつアミノ基密度がAPSコートより高密度化されており、細胞や組織切片の接着力が向上している。また、APSコートと比較してガラス表面と組織切片の間の水抜け性が良好で乾燥時間の短縮が可能である(図4)。

4.4 PLL、APSおよびMASコートの接着比較

従来のPLLコートやAPSコートでは免疫組織化学等で行われる抗原賦活化処理(マイクロウェーブ処理、オートクレーブ処理、ER-PgRの抗原賦活化処理<アルカリ処理pH10,95-99℃,40分>等)では接着力が十分でないため組織切片や細胞の剥離が発生することがある。MASコート、APSコートおよびNon-Coat(コート無し)のスライドガラスについて、パラフィン切片と凍結切片を用いた組織切片剥離防

止効果を確認した結果を図5に示す。この結果からMASコートの優位性が確認できるが、アルカリ処理においてはMASコートでも剥離発生がある。これはコート剤の問題より、ガラスそのものがアルカリには弱いという問題であり、次に述べるMAS-GPコートを開発し改善した。

1) オートクレーブ処理後の切片剥離防止効果



2) その他の評価結果

	MAS(開発品)	APS(アミノシラン)	Non-Coat
切片伸展作業性	○親水性	×撥水性	○親水性
パラフィン	HCl	○	○
	NaOH	△	×
	プロナーゼ	○	○
	オートクレーブ	○	×
	マイクロウェーブ	○	×
凍結	HCl	○	×
	NaOH	×	×
	プロナーゼ	○	×
	オートクレーブ	○	×
	マイクロウェーブ	○	×

○剥離発生無し △一部剥離 ×剥離発生

図5 組織切片剥離防止効果

4.5 MASコートの改良(MAS-GPコートについて)

MASコートは、抗原賦活化処理での剥離防止等の免疫組織化学染色エリアでの使用を想定し開発を行った。発売後、一部ユーザーにおいてエオジン染色等を行った場合のガラス表面に対する共染の低減やER-PgRの抗原賦活化処理(アルカリ処理pH10,95-99℃,40分)等でも耐えうるコートスライドガラスの要望があり、新たにMAS-GPコートを開発し、2005年末より販売を開始した。MAS-GPコートは、以下の特長を有している。

①光学特性、耐アルカリ性に優れ、かつ低価格な新規

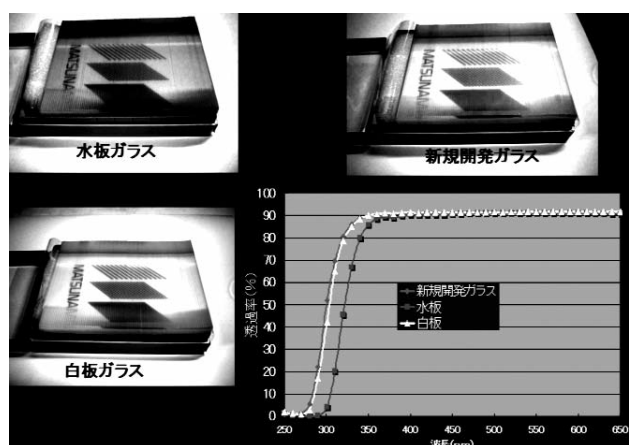
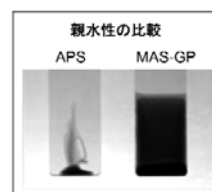


図6 新規開発ガラスの透過率と外観

切片伸展作業を容易にする
・コート表面の親水性の比較
→親水性:APS<MAS-GP

組織切片・細胞接着力
・各種組織切片を使用し、検証を実施
→良好な接着固定性



	乳腺1	乳腺2	乳腺3	皮膚	骨髄1	骨髄2	子宮	脳	肺	心臓
切片の厚さ	25 μm	4 μm	25 μm	5 μm	25 μm	25 μm	5 μm	5 μm	25 μm	25 μm
MAS-GPコートスライド	良好	良好	一部剥がれる	良好	良好	良好	一部剥がれる	良好	良好	良好

オートクレーブ処理(115℃ 15分)

・ER-PgR等のHigh pH領域での使用にも耐える
→pH10 温浴槽95~99℃ 40分での賦活化処理において有効性確認済み

図8 コート表面の親水性比較と各種組織切片を用いた接着試験&ER-PgRでの使用試験

5. 剥離防止コートスライドガラス使用上の注意

ガラスは、一般的には安定した材料という見方がなされている。しかし、組織切片や細胞を直接接着させる剥離防止コートスライドガラスにおいては僅かなガラス表面の化学的変化が、スライドガラスとしての品質性能に大きく影響することがある。特にガラス表面は保管される環境中の水分により、大きな影響を受けることがある。ガラス表面に水分が吸着すると、ガラス成分と反応し、 Na^+ 、 Ba^{2+} およびシリカ等が形成され、さらに炭酸ガス雰囲気や酸性ガス雰囲気によっては、炭酸塩など塩類の結晶が析出し表面が白く焼けたように観察されることがある。析出したアルカリ成分は、シラノール結合 (O-Si-O) を切断する様に働き、結果として剥離防止効果を低減させるように作用する。

また、薄切片を貼付けする際の乾燥方法の違いにより、その後の染色ムラ等の影響を受けることがある。特に70℃以上の温度で長時間乾燥すると、免疫組織化学染色の染色ムラに影響があると考えられる。

最近では自動免疫染色装置が普及してきており、各装置に最適化した、装置メーカーが推奨する標本作製法に従って剥離防止コートスライドガラスを使用する必要がある。

6. 剥離防止コートスライドガラスの今後

従来、免疫組織化学染色における抗原の賦活化処理においては、オートクレーブ処理やマイクロウェーブ処理が利用されてきており、その際の剥離発生防止にコートスライドガラスが多く利用されてきた。さらにここ数

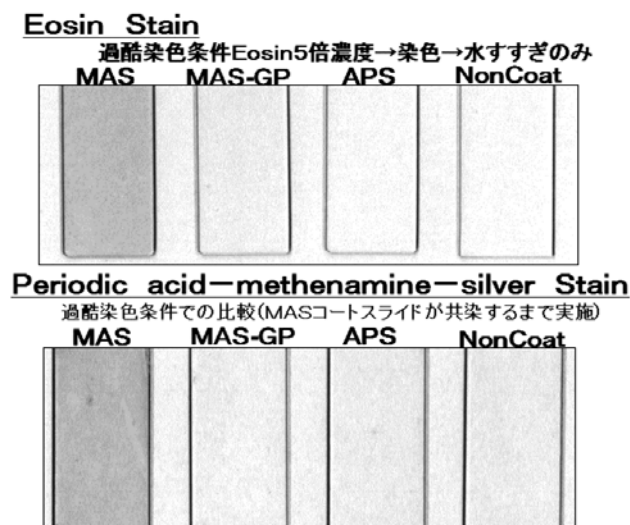


図7 ガラス表面の過酷共染テスト結果
(白黒写真で確認しづらいがMASのみ共染が確認される)

開発ガラスを採用(光学特性に優れるが価格が高い白板ガラスと同等の透過率を有したガラスを新規に開発した)(図6)

②一般染色用途でのガラス表面の共染を低減(エオジン染色、PAM染色等で、MASコートより大幅に共染性を低減した)(図7)

③切片伸展作業が容易(コート表面が親水性)(図8)

④組織切片・細胞接着力が高い(各種組織切片に対し、優位な接着固定性を有し、ER-PgRでのアルカリ処理<pH10,95-99℃,40分>等での使用にも耐える)(図8)

年は、免疫染色の自動化装置が各社より販売され広く普及してきている(ベンタナ社 BENCHMARK XT、ダコ社 Autostainer、三菱化学ヤトロン社 Bond-Max システム、協和メディックス社 i6000、ニチレイ社 ヒストステイナー等)。

各社は、自動免疫染色装置に独自の加熱処理や染色機構を採用し、専用試薬、バッファー等を使用している。また、剥離防止コートスライドガラスがそのまま装置に適合し性能を効果的に発揮するか検証を行い、各社の標本作製法において推奨使用方法を提供している。自動免疫染色装置は、今後も広く普及していくと考えられるので、剥離防止コートスライドガラスも、これら自動化装置と連携した開発が一つのキーとなることは確実である。

7. 剥離防止コートスライドガラスの世界事情

アメリカでは日本以上に自動免疫染色装置が普及しているが、日本同様、親水性剥離防止コートスライドガラスが使用されているかという点、そうではない。アメリカで使われている剥離防止コートスライドガラスの大半はAPSコートである。切片のシワ発生、伸展貼付作業性の悪さを重視していないのか、或いは少々のシワ発生等、診断に影響しないことは気にしないのか、APSコートを越える開発が実現していない状況である。

日本でのみ、親水性剥離防止コートスライドガラスが普及しており、かつ標本作製技術の追求を行っていると言える。欧米のスライドガラスメーカーは数社存在するが、実質1社が大きなシェアを有している状況であり、競争による開発が進んでいないかもしれない。また、中国には大小様々なスライドガラスメーカーが存在しているが、現時点では日本に展開できる品質には到達していない状況である。

今後、世界各国の病理診断事情が明らかになり、有効な情報が共有され、病理技術レベルの世界的な向上につながり、世界中の病気で苦しむ人々を少しでも救う事になることを希望する。

引用文献

- 1) 川島,喜納,石: 病理と臨床, Vol.8 No.3 (1990)
- 2) Siegfried, Fink: Some new method for affixing sections to glass slide. Aqueous adhesives. *Stain Tech.*, **62**, 27-32 (1987)
- 3) Ulrika, V. Mikel: A simple method for study of the same cells by light and scanning electron microscopy. *Acta cytological*, **24**, 252-254 (1980)
- 4) Fukami, A.: On an adhering method of thin film specimens to specimen grids. *J Electronmicroscopy*, **13**, 26-27 (1964)
- 5) Martin, Rentrop: Aminoalkylsilan-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment condition. *Histchem J*, **18**, 271-276 (1986)

新・私の古生物誌(6)

New Series of My Paleontological Notes(6)

—コウモリの今と昔—

—Present and Past of Bat—

医学博士 福田 芳生
M.Dr. YOSHIO FUKUDA

1. はじめに

自分の都合によって味方になったり、敵方に回ったりする人を「あいつはまるでコウモリみたいな奴だ」と言って指弾します。そして、不気味な古城を背にした吸血鬼ドラキュラの周囲を、コウモリがヒラヒラと舞っている光景は、ホラー映画の定番と申せましょう。

ところが、昭和レトロの“黄金バット”は、悪をやっつける強い市民の味方として描かれています。かように、コウモリは人間界で嫌われ者になったり、誉められたりで大忙しです。

今回は、このコウモリについて、今と昔と題して化石の話題を絡めながら筆を進めて行くことにします。

2. コウモリの2大グループと起源

コウモリは哺乳類のなかで唯一の飛行能力を持つ種類です。ムササビは短い距離を滑空するだけなので、飛行とは言えません。現生のコウモリは翼手目として独立し、18科185属977種に上り、ネズミの仲間に次いで、種類の多さを誇っています。そして、専らフルーツを食べるオオコウモリ類、昆虫食のヒナコウモリ類の2つのグループに大別することができます。

コウモリ類の起源は、未だ大きな謎に包まれています。なにしろ、今から約5000万年前の始新世に、突如現代型のヒナコウモリ類が出現したのですから。歯や顎の骨から考えるに、食虫類のグループから誕生したと推定されています。

この食虫類は中生代中頃に出現しました。既に胎盤を持っていて、後に食虫類から様々な進歩的な哺乳類が

登場します。食虫類は現在も生息しており、地上で生活します。一方、絶滅種のなかには樹上生活を送る種類が知られています。コウモリは、どうも樹上生活型の食虫類から誕生したようです。

最古の樹上生活型の食虫類は、1億5000万年前のジュラ紀末の地層から発見されています。ポルトガルの首都リスボンから約150キロメートルほど北上すると、古都レイリアに到着します。その郊外にグイマロタという名前の褐炭坑があります。何と、そこから未知の哺乳類の全身骨格が見つかったのです。

今迄、ジュラ紀の哺乳類化石と言えば、顎の骨(それも断片)か歯に限られていて、全身骨格が発見されることなど、世界中の古生物学者は夢想だにしていなかったのです。

1976年暮のことです。グイマロタで働いていたグラジエラ夫人が、褐炭の表面に小さな化石骨が顔を覗かせていることに気付きました。周囲の褐炭を丹念に取り除いて行くと、そこにハツカネズミ大の動物の全身骨格が姿を現しました。化石はドイツの古生物学者ヘンケル博士による熱心な研究を経て、ようやくその正体が明らかになり、樹上性の食虫類ヘンケロテリウム・グイマロタエと命名されました(最近では、中国の白亜紀やジュラ紀層から続々と被毛を伴う全身骨格が報告されるようになりました)。

このヘンケロテリウムはイチョウの様な大木の枝に登って、長いしっぽで巧みにバランスを取りながら、細長い指で昆虫を捕えて食べていました(図1)。獲物を求めて枝から枝へ飛び移るうちに、飛行膜が形成されたのかもしれない。

しかし、その過渡的な化石が全く存在しないので、古生物学者は翼手目の進化のプロセスをどう描いたらよいの

か、未だ途方に暮れているというのが現状です。多分、白亜紀の中頃(約1億年前)に食虫類からコウモリが誕生し、新生代に入って多様な環境に適応すべく、様々な種に分かれ、世界各地で大発展を遂げたのでしょう。



図1 ジュラ紀末のイチヨウの太い枝に登って、昆虫を捕食するヘンケロテリウム・グイマロタエ。ハツカネズミほどの大きさがある(復元図専門の画家E・グレニングによる)。

3. 最古のコウモリ、オーストラロニクテリス

最古のコウモリは北米ワイオミング州のグリーンリバー層から掘り出された、5200万年前のイカロニクテリス(図2)、次いでドイツのメッセルから産出した4900万年前のパラエオキロプテリクス(図3)の仲間とみなされていました。

1994年になって、オーストラリアのクィーンズランド州南東部から発見された、5460万年前(新生代第三紀始新世の極初期)のオーストラロニクテリス(図4)に大先輩の座を

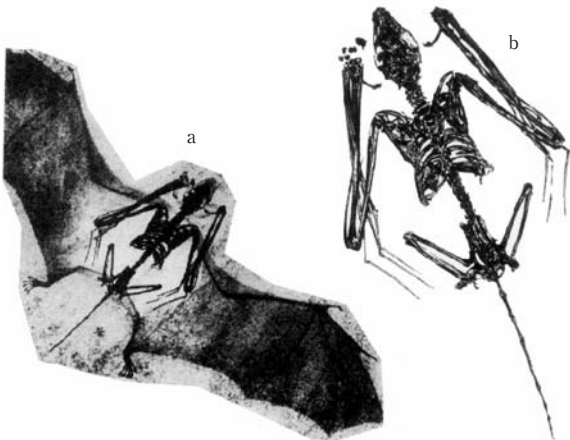


図2 北米ワイオミング州の始新世前期の頁岩層より発見されたコウモリ、イカロニクテリス。aは翼を広げた状態。bは全身骨格で、体長12.5センチメートルほどある(a、bともジェブソンによる)。

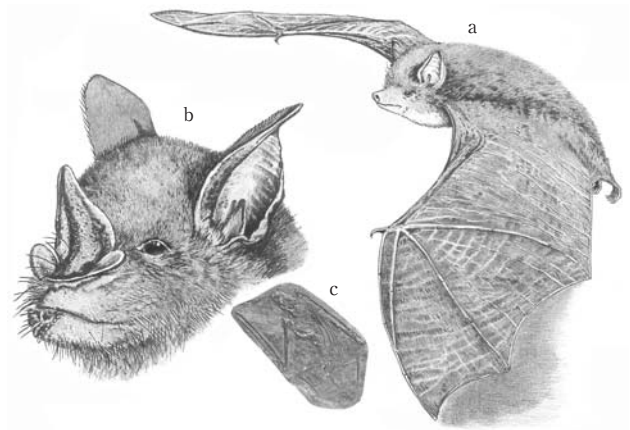


図3 始新世中期のコウモリ、パラエオキロプテリクス。aは湖の上空を飛翔する様子を示す。bは顔面の復元図。大形の耳介は超音波のエコー受信装置。cは全身骨格の化石(a、bはサベージとロングによる)。

明け渡しました。化石は、下顎の臼歯、顎骨、側頭部の聴覚器を収容する骨(鼓室骨)などです。

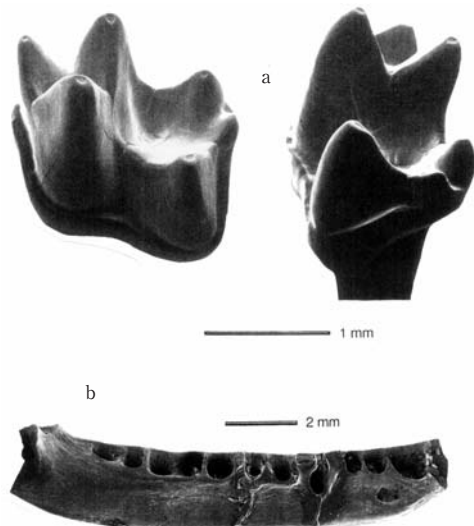


図4 目下、世界最古のコウモリと認定されている、オーストラリアの始新世初期のコウモリ、オーストラロニクテリス。aは臼歯、bは下顎の化石(ハンドほかによる)。

研究の結果、オーストラロニクテリスは、聴覚が大変優れていることが分かりました。夕暮れになると空中に飛び出し、超音波を発して昆虫の所在を知り、捕食していたのでしょう。体長5センチメートルほどの小型種と考えられています。

これはオーストラリアの古生物学者S.J.ハンド博士らのグループによって、明らかにされたことです。オーストラロニクテリスこそ、現代のヒナコウモリの先駆者と申せましょう。

4. 体の仕組み

コウモリは前肢の骨が細長くなって、翼の骨組みを形

成します。翼の本体は皮膚の膜で、第2から第5指の間を埋める手皮膜ということになります。この手皮膜というのは、俗に飛行膜と呼ばれているものです。

後肢は逆さにぶら下がる際に体を支えたり、歩行の役目もします。問題の飛行膜ですが、休息時に畳むことができます。薄い飛行膜の構造は少々変わっています。通常、汗腺は皮膚表面に対して、垂直方向に延びています。

一方、コウモリでは形の悪いキュウリをゴロリと横に転がした様に見えます。図5のリンパ管の下側にある物体がそれです。これはコルテス博士を長とするカリフォルニア大学医学部の皮膚科の医師グループによって発表されたものです。

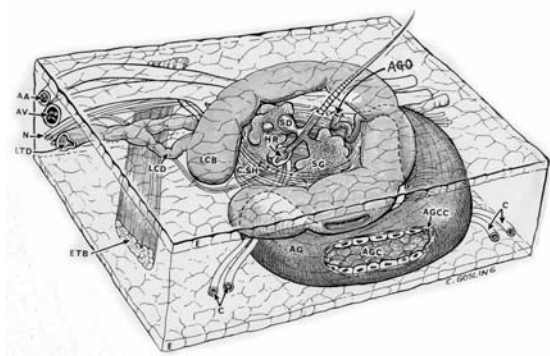


図5 コウモリの皮膚構造を示す模式図。図中央の毛を囲むドーナツ状の構造はリンパ管。下側手前の形の悪いキュウリ状のパイプが汗腺。AGOは、その開孔部(コルテスほかによる)。

コウモリは優れた聴覚器を持っていますが、視力はあまり良いとは言えません。上下の顎には円錐形の鋭い門歯、突起を備えた臼歯が並んでいます。その様子は先祖の食虫類のものに似ています。飛行するためでしょうか、平衡感覚を司る小脳は他と比べて大型です。

体表は柔らかい毛で密に覆われ、体温を保持します。細長いしっぽは、その両側に皮膚が張り出しているの、あまり目立ちません。コウモリはなぜ長い間逆さになって、足の指で木の枝や岩の突起にぶら下がっていても、疲れないのでしょうか。

この謎を解くために、オーストラリアの動物学者ベネット博士はオオコウモリの1種プテロプスの後肢の構造について調べました。その結果、指の骨を支える太い腱(テンドン)の外側に、私達の洋服や靴に付いているマジックテープにそっくりの仕掛けがあることを突き止めました(図6)。

プテロプスは、この付着装置で腱を固定するので、登山家がロープで体を支えるのと同じ効果を発揮するという訳です。

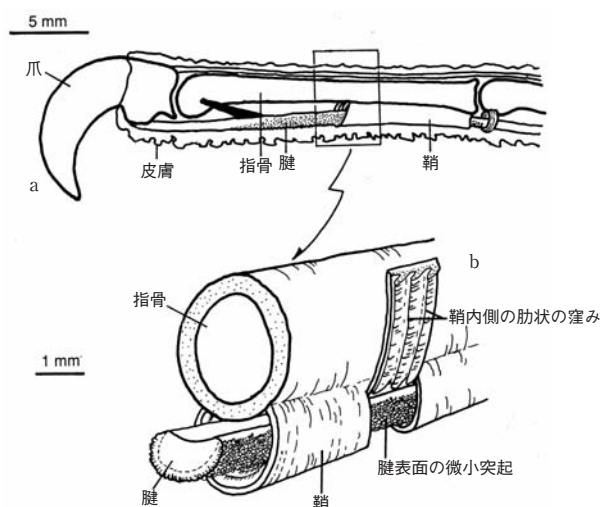


図6 オオコウモリ、プテロプスの後肢の構造を示す。aは後肢の指骨を支える太い腱の様子。bは図aの囲みの部分を拡大して示す。骨下側の太い腱の表面に無数の微小な突起があり、それが鞘(sheath)内側の肋状の窪みとうまく噛み合う。その様子はマジックテープとよく似ている(ベネットによる)。

5. エコーロケーション(反響位置測定)

視力の弱いヒナコウモリは、どうして暗闇でも物に衝突することなく飛行できるのでしょうか。コウモリであれば、どの種類もそんな芸当ができる訳ではありません。

フルーツを主食とするオオコウモリや吸血コウモリは、対象が大きいあまり動きがないためでしょうか、前記のような能力はほとんどありません。視覚や臭覚を頼りに獲物を探します。

今からお話するのは、昆虫食のヒナコウモリ類についてです。このグループの喉頭には、楽器の弦に似た声帯があって、それを激しく振動させます。そして、笛の様な喉から15万ヘルツもの高い周波数の音を鼻孔を介して発射します。この周波数の音は、人間の耳には全く聞こえません。その持続時間も1/2000秒から1/5000秒という極短時間です。

障害物に接近すると、エコーの頻度が増加し、危険信号となります。コウモリはヒラリと方向を変え、危機を回避します。夜間、昆虫を捕える時は1秒間に250回も超音波を発するそうです。無論、動くものとそうでないものを正確に識別します。

獲物は口や翼を使って捕えます。コウモリのエコーロケーションは大変精度が高く、直径0.1ミリメートルの微小な物体でも察知することが可能です。この仲間は超音波のエコーをキャッチするため、大型の耳介を持っています(図7)。こ

のエコーロケーションは日本語に訳すと、反響位置測定ということになります。英語の方が分かりやすいですね。

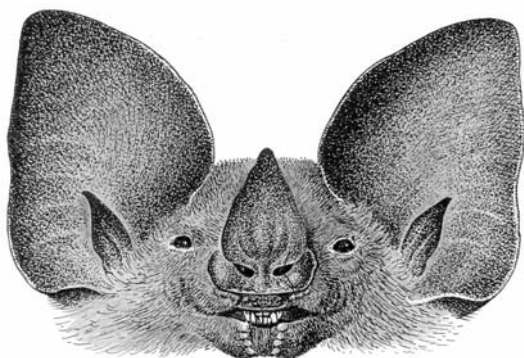


図7 トリニダードに生息するヒナコウモリ類、フィロデルマ。図は顔正面。超音波のエコーを受けるため、大形の耳がある。これは高性能のパラボラアンテナの役目をする。耳介内側の葉状の突起は耳珠(じしゅ)と呼ばれ、分類の目安になる(グッドウインほかによる)。

6. コウモリの生活史

多くのコウモリは秋に交尾し、6月から7月の初め頃出産します。子供は1腹で1匹か2匹です。産まれたばかりの子供は、目も見えず体毛も全くありません。2ヶ月ほどたつと親とほとんど変わらぬ姿になります。

その間、母親は翼で子供を包み、体を暖めてやります。子供が飛行可能になると、母親は子供に超音波信号を送ります。この周波数は固体によって異なるので、子供は自分の母親を間違えることはありません。子供は、その信号を頼りに母親の後について飛行し、生きるための術(すべ)を身に付けて行きます。

北半球の寒冷地では冬眠する以外に、渡り鳥の様に数千キロメートルも旅をし、南の暖かい土地で越冬する種類もあります。コウモリはかなり長命で、何と15～17年間も生き続けます。

ところで、コウモリはノミ、ダニ、シラミなどの寄生虫に悩まされています。これらの吸血動物は、既に1億年以前に出現していますから、始新世のヒナコウモリ類も寄生虫に苦しんだことは確かでしょう。

7. コウモリの食物

ウオクイコウモリはヒナコウモリと同様、エコーロケーション装置を用いて水中の魚を発見し、後肢の鉤爪で捕えます。長い舌で花粉を集め、それを栄養源にするシタナガ

コウモリの様な平和的なものもありますが、中央アメリカに生息するデスマダス(図8)の仲間は家畜ばかりか、人間の生き血まで吸いますから、正に吸血鬼そのものです。それ故、バンパイア・バットとも呼ばれています。

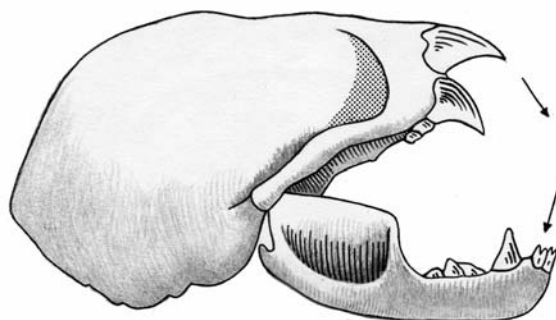


図8 南米に生息する吸血コウモリ、デスマダスの頭骨と歯。口を閉じると、鋭い歯が下顎門歯先端のV字型の窪みにピッタリと入る(矢印)。図はストルヒによる。

体長10センチメートル未満の小型種がほとんどで、夜間眠っている動物の体表に取り付き、ナイフの様な鋭い上顎の門歯で獲物の皮膚に傷を付け、流れ出した血液をストロー型の舌で吸飲します。唾液には血液の凝固阻止や鎮痛物質が含まれているので、動物は知らない間に吸血されてしまいます。

吸血する量は微々たるものですから、その被害は無いに等しいものです。しかし、吸血時に悪性の病原菌を家畜に移すので、油断できません。正に牧畜業者泣かせのコウモリと申せましょう。

化石はエジプトの3000万年以上も昔の地層から発見されていますが、小さな骨の一部であるため、疑問視されて来ました。近年、オーストラリアのニューサウス・ウェルズ州にあるウエリントン洞穴の約300万年前の堆積物から、鋭いナイフ型の門歯の化石が発見され、有史以前に吸血コウモリがいたことがはっきりしました。

マレー半島や南西諸島には、キツネにそっくりの顔立ちをしたオオコウモリが生息しています(図9～10)。このオオコウモリを英語でフォックス・バットと呼ぶのは、前記の理由によっています。昼間、密林の枝にぶら下がっていますが、夕暮れになると甘い芳香を放つ果物を求めて飛来し、マンゴーやパパイヤを貪り食います。

両翼を広げると1メートルにも達し、体重は約1キログラムほどです。その肉はジューシーでひどく味が良いことから、"グルメ族"に目を付けられ、絶滅に瀕しているのが現状です。日本固有種のオガサワラオオコウモリとて同様で

す。最近になって、コウモリ本体ばかりか、その生息地全域を保護区にすることが決定されました。

最古のオオコウモリは、イタリアのベネチア地方にある約3500万年前の褐炭層より発見されています。アルカエオプテロプスがそれで(図9a)、翼の長さは両方で1メートル近くあり、化石種のコウモリでは最大級です。

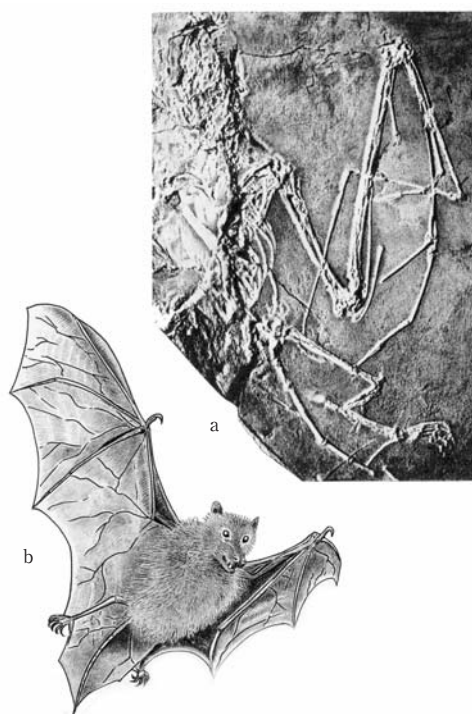


図9 aは最古のオオコウモリ、アルカエオプテロプスの全身骨格。両翼を広げると1メートルほどあった。bは20世紀に入って絶滅したガムオオコウモリ。顔面はキツネにそっくりである(aはピアズ、bはジェブソンによる)。

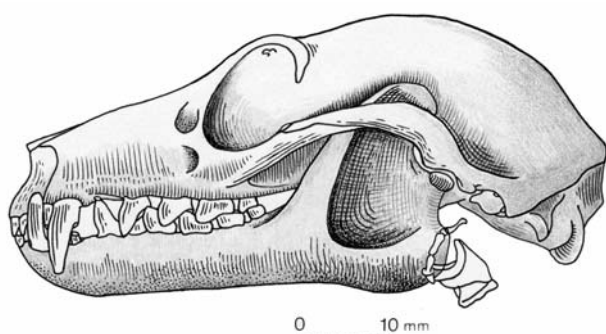


図10 オオコウモリ、プテロプスの頭骨。細長い吻部を備えた頭骨は、なんとなくキツネのものに似ている(グリートほかより改写)。

8. コウモリの生息場所

現生のコウモリは岩山の洞穴、幹に存在する空洞(これを学術用語で樹洞と呼びます)、人家の屋根裏、森林地帯に生息しています。木の枝や岩の隙間に、体を逆さ

にしてぶら下がります。しかし、今から約5000万年以前のコウモリは、湖周辺の森林で生活していたようです。

最古の洞穴居住者は、フランス南部の都市クエルシ近郊にある約3500万年前の洞穴堆積物の中から発見されたベスペルティリアプスでしょう(図11)。

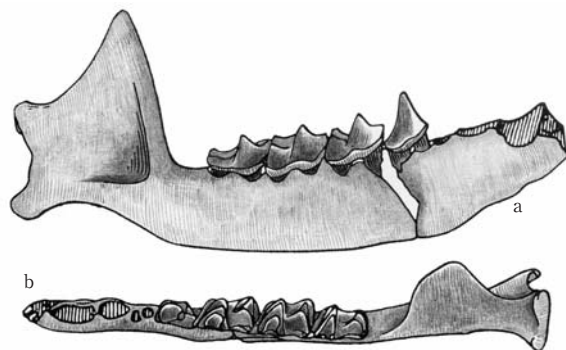


図11 洞穴に棲むコウモリ、ベスペルティリアプス。図は下顎骨の化石で、長さ約2センチメートルほど。aは側面。bは上側(レビリオドより改写)。

このベスペルティリアプスは体長10センチメートルほどの小型種で、夕方周囲が薄暗くなると大挙して空中へ飛び出し、昆虫を捕食していました。

どうして、このベスペルティリアプスが洞穴居住者と見なされたのでしょうか。人は洞穴の中に死骸が偶然まぎれ込んだと思うのではないのでしょうか。クエルシの洞穴内部からコウモリに由来する大量の糞化石が発見され、それが洞穴居住者としての動かぬ証拠となったのです。

北米テキサス州の洞穴には3000万匹ものコウモリが棲み付き、その排泄物の量たるや我々の想像を絶するほどです。でも、付近の農民が糞を肥料として定期的に掘り出し、それを袋に詰めて販売しているので、洞穴が糞で塞がることは無いそうです。

9. 終わりに

コウモリという名前を聞いただけで、人は何となく不気味な気持ちになります。鋭い歯をむき出した小顔は、実に憎々しい限りです。そんなコウモリには5000年以上に及ぶ長い歴史があり、種を維持し発展して来ました。吸血コウモリは数少ない悪玉だとしても、コウモリの大部分を占めるヒナコウモリ類は、毎年全世界で100万トンもの害虫をせっせと退治してくれるのですから、正に天然の殺虫剤と申せましょう。

これを機に、コウモリの見方がわずかでも良い方向に変わることを願って、筆を置くことにします。

新しい銀イオンクロマトグラフィー用HPLC カラム“Silver column KANTO”の開発(2)

Development of New HPLC Column for Silver ion chromatography(2)

関東化学株式会社 草加工場 生産技術部 試薬生産技術課 大瀧 伸之

NOBUYUKI OHTAKI

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

*2009 No.3 (通巻213号) 新しい銀イオンクロマトグラフィー用
HPLCカラム“Silver column KANTO”の開発(1) から続く

4. HPLCカラム“Silver column KANTO”のアプリケーションデータ

4.1 トリアシルグリセロールの分析

トリアシルグリセロールは動植物油脂の主成分であり、1分子のグリセロール(グリセリン)に3分子の脂肪酸がエステル結合した構造(図13)をもつ。炭素数や二重結合数、二重結合の位置などが異なるアシル基の組み合わせによって非常に多くの分子種が存在し得る。

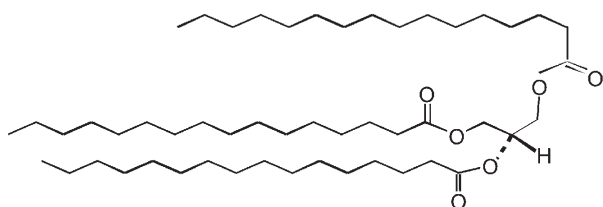


図13 トリアシルグリセロールの構造(例. トリパルミチン)

“Silver column KANTO”では、トリアシルグリセロールを構造の違いに基づいて分離することが可能である。図14は、アセトニトリル/ヘキサンを移動相とするリニアグラジェント溶離による炭素数が18のアシル基をもつトリアシルグリセロール10種のクロマトグラムである。

脂肪酸エステルの場合と同様に、アシル基の二重結合が多いほど強く保持される[SSS($\Delta=0$ (Δ は二重結合の数)、トリステアリン(tristearin);No.1]<OOO($\Delta=3$, トリオレイン(triolein);No.8]<LLL($\Delta=6$, トリリノレン(trilinolein);No.9]<LnLnLn($\Delta=9$, トリリノレニン(trilinolenin);No.10]。また、二重結合数が同じであればcis型二重結合を多く持つ分子種の方が強く保持されている[EEE(trans $\times 3$, トリエライジン(trielaidin);No.6]<OEO(trans $\times 1$, cis $\times 2$, 1,3-ジオレイン-2-エ

イジン(1,3-diolein-2-elaidin);No.7]<OOO(cis $\times 3$, トリオレイン(triolein);No.8]。これに加えて、SES[1,3-ジステアリン-2-エライジン(1,3-distearin-2-elaidin);No.2]とSSE[1,2-ジステアリン-3-エライジン(1,2-distearin-3-elaidin);No.3]やSOS[1,3-ジステアリン-2-オレイン(1,3-distearin-2-olein);No.4]とSSO[1,2-ジステアリン-3-オレイン(1,2-distearin-3-olein);No.5]などの立体位置異性体では二重結合を有する脂肪酸部(E,O)を1(3)位にもつ分子種のほうが2位にもつ分子種よりも強く保持されている。なお、3個のアシル基に二重結合を持たないSSS(No.1)の“Silver column KANTO”に対する保持は3個のカルボニル基とAg⁺との相互作用によるものと考えられる。

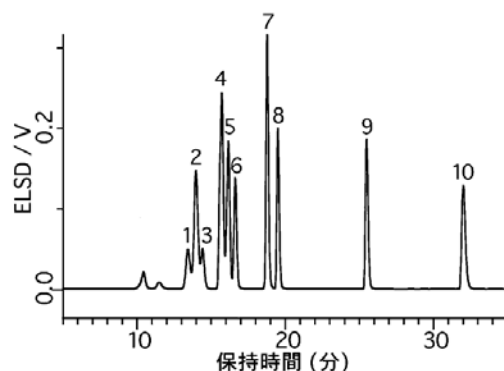


図14 トリアシルグリセロールのクロマトグラム

試料: 1;SSS, 2;SES, 3;SSE, 4;SOS, 5;SSO, 6;EEE, 7;OEO, 8;OOO, 9;LLL, 10;LnLnLn (S: stearin, E: elaidin, O: olein, L: linolein, Ln: linolenin)
移動相: リニアグラジェント溶離, 0.5-2% ACN (30分) /ヘキサン
カラム: Silver column KANTO (4.6φ-250mmL.)
流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

図15は、“Silver column KANTO”によるオリーブ油とナタネ油のクロマトグラムを比較したものである。それぞれに含有されるトリアシルグリセロール種の量的な違いなどを反映して明らかに異なるクロマトグラムが得られた。油脂はその由来

によって特徴的なトリアシルグリセロール組成を有するので、“Silver column KANTO”によるクロマトグラムのパターンを比較することによって試料油脂の由来を知ることができる。試料の前処理などを必要としない簡便な評価方法である。

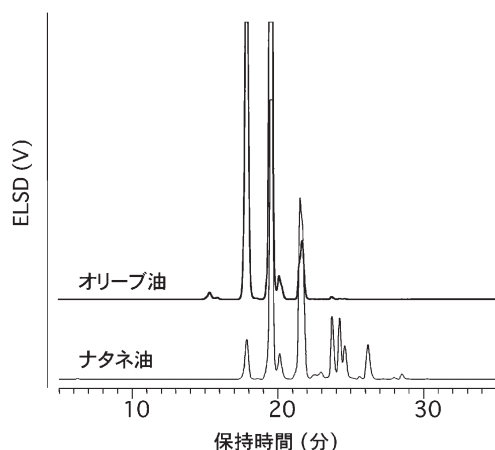


図15 オリーブ油とナタネ油のクロマトグラムの比較
移動相: リニアグラジェント溶離, 0.5-2% ACN (30分)/ヘキサン
カラム: Silver column KANTO (4.6φ-250mmL.)
流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

4.2 油脂中のトランス脂肪酸組成の定量分析

油脂中のトランス脂肪酸の主成分をなすtrans-オクタデセン酸には、二重結合が4位から16位までの位置異性体が存在することが知られている。トランス脂肪酸は心疾患のリスクを高めることが報告されているが、そのリスクの大きさは二重結合の位置によって異なるものと推測されている。乳脂肪などの天然油脂とマーガリンやショートニングなどの加工油脂では、含有されるトランス脂肪酸の位置異性体組成が異なるので、総トランス脂肪酸含量だけではなく、それぞれの脂肪酸の位置異性体組成を定量的に評価することが重要視されている。しかしながら、油脂を構成する多種多様な脂肪酸類を分離分析するのは高分解能のキャピラリーGC法でも困難である。植物油に水添処理して調製された硬化油中の脂肪酸組成を“Silver column KANTO”および“キャピラリーGC¹⁵⁾”により分析し、比較した。図16-aと図16-bは、それぞれ“Silver column KANTO”と“キャピラリーGC”によって得られたクロマトグラムであり、trans-モノエン酸に相当する成分が溶出されている部分を拡大したものである。

なお、試料は硬化油を脂肪酸に分解後、“Silver column KANTO”ではナフタシルエステル化、“キャピラリーGC”ではメチルエステル化したものである。図16-bに示すように、キャピラリーGCではtrans体とcis体のピークの一部が重畳するので、それぞれのピーク面積を正確に求めること

は難しい。場合によってはcis体のピークがtrans体のピークを隠してしまうこともある。キャピラリーGC法によりトランス脂肪酸を正確に分析するための方法として、Ag⁺-TLC¹⁶⁾やAg⁺-HPLC¹⁷⁾によってcis体とtrans体を粗分画して得られたフラクションをGCに供することが推奨されている。これに対して、“Silver column KANTO”ではモノエン酸エステルのcis/trans異性体がよく分離されるので(図16-a)、特別な前処理を必要とせずトランス脂肪酸含量を分析することができる。さらに、“Silver column KANTO”ではそれらの位置異性体が分離されるので(図17)、従来法では困難であった位置異性体組成の定量分析が可能である。

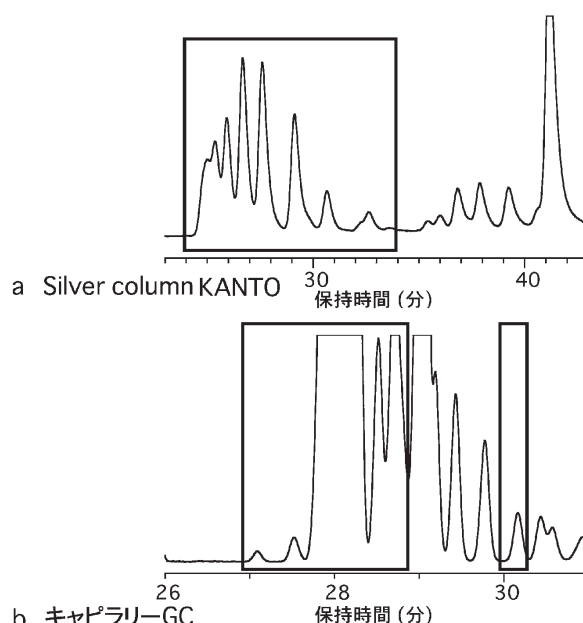


図16 Silver column KANTOとGCにおける硬化油中のtrans-モノエン酸の分離(枠の中のピークがtrans-モノエン酸の分子種)

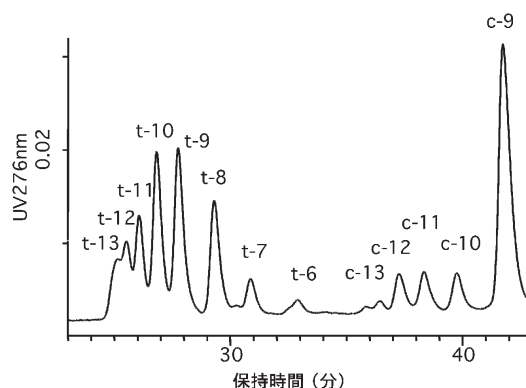


図17 Silver column KANTOによる硬化油中の脂肪酸分析(モノエン酸溶出画分)
試料: 硬化油をけん化後、ナフタシルエステル化, 移動相: リニアグラジェント溶離, 2-5% AcOEt (60分)/ヘキサン, カラム: Silver column KANTO (4.6φ-250mmL.), 流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

表3にトランス脂肪酸含量の異なる3種の硬化油と乳脂肪中のtrans-モノエン酸組成の分析結果を示す。硬化油については総トランス脂肪酸量に関わらずトランス脂肪酸の組成はよく一致しており、8位から11位に二重結合を有するtrans-モノエン酸が多く含まれていること、また、乳脂肪に関しては主に11位に二重結合をもつtrans-モノエン酸が含まれている結果が得られた。これは、過去の研究報告¹⁸⁾と一致しており、“Silver column KANTO”によるトランス脂肪酸の組成分析法の有用性を示すものである。なお、trans-ジエン酸やtrans-トリエン酸の組成分析、cis体を含めた全脂肪酸の組成分析についても、同様の手法によって可能である。

表3 硬化油と乳脂肪中のtrans-モノエン酸位置異性体の組成(g/100g)

試料	trans結合の位置								総量	直接GC法
	6	7	8	9	10	11	12	13		
硬化油A	0.11	0.07	0.41	0.46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.87	0.13
硬化油B	0.26	0.39	0.98	1.81	1.40	0.80	0.56	0.56	6.75	6.55
硬化油C	0.75	1.80	6.93	9.78	8.94	5.18	3.66	3.15	40.20	42.09
乳脂肪	0.21	0.25	0.43	0.59	1.41	0.53	0.87	n.d.	4.29	—

n.d.: 検出されず

5. まとめ

新たに開発した“Silver column KANTO”は不飽和化合物、特に、cis/trans異性体や位置異性体などの分離分析に有用な銀イオンクロマトグラフィー用のHPLCカラムである。その分離特性は銀イオンクロマトグラフィーモードと順相クロマトグラフィーモードを併せ持つものと性格づけられる。従来の分離剤やカラムの課題であった耐久性と安定性を改善し、1,000回の繰り返し使用においても再現性の高いデータが得られることを確認した。銀イオンクロマトグラフィーは脂質関連分野ではよく用いられているのに比べ、ほかの分野でのアプリケーションは多くなく、知名度も低いようである。本稿でも脂肪酸関連物質の分離例を多く紹介したが、そのほかにもいろいろな有機化合物を分離できることを確認している。有機化合物を扱うさまざまな分野で活用できるHPLCカラムであるので、多くの方々のお仕事に役立てていただければ幸いである。

引用文献

- 1) H.J.Dutton, C.R.Scholfield, E.P.Jones, *Chem.Ind. (London)*, 1874-1876 (1961)
- 2) B.de Vries, *Chem.Ind. (London)*, 1049-1050 (1962)
- 3) C.B.Barrett, M.S.J.Dallas, F.B.Padley, *Chem.Ind. (London)*, 1050-1051 (1962)
- 4) L.J.Morris, *Chem.Ind. (London)*, 1238-1240 (1962)
- 5) G.Dobson, W.W.Christie, B.Nikolova-Damyanova, *J.Chromatogr.B*, **671**, 197-222 (1995)
- 6) C.M.Williams, L.N.Mander, *Tetrahedron*, **57**, 425-447 (2001)
- 7) W.W.Christie, *J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, 148-150 (1987)
- 8) C.D.M.Beverwijk, G.J.M. van der Kerk, A.J.Leusink, J.G.Noltes, *Organometal.Chem.Rev.A*, **5**, 215-280 (1970)
- 9) S.D.Ittel, J.A.Iberis, in: *Advances of Organometallic Chemistry Vol.14*, pp.33-61, E.G.A.Stone, R.West (Eds.), Academic Press, New York (1976)
- 10) C.L.de Ligny, in: *Advances in Chromatography, Vol.14*, pp.265-304, J.C.Giddings, E.Grushka, J.Cazes, P.R.Brown (Eds.), Marcel Dekker, New York (1976)
- 11) H.Kasai, D.McLeod, T.Watanabe, *J.Am.Chem.Soc.*, **102**, 179-190 (1980)
- 12) B.Damyanova, S.Momtchilova, S.Bakalova, H.Zuilhof, W.W.Christie, J.Kaneti, *J.Mole.Struc.(Theochem)*, **589/590**, 239-249 (2002)
- 13) B.Nikolova-Damyanova, W.W.Christie, B.Herslof, *J.Planar Chromatogr.*, **7**, 382-385 (1994)
- 14) W.W.Christie, *Lipid Technol.* 17-19 (1998)
- 15) 日本油化学会, 基準油脂分析試験法 暫¹⁷.2007「トランス脂肪酸含量(キャピラリーガスクロマトグラフ法)」
- 16) 日本油化学会, 基準油脂分析試験法 暫⁸.2003「モノトランス脂肪酸(硝酸銀含浸薄層クロマトグラフ-ガスクロマトグラフ法)」
- 17) AOCS Recommended Practice Ce 1g-96 (-1997) (trans fatty acids by silver-ion exchange HPLC)
- 18) 松崎ら, 日本油化学会誌, **47**, 277-282 (1998)

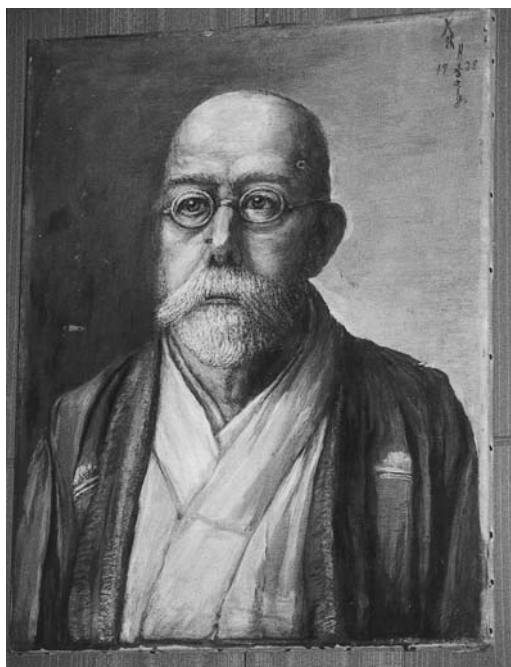
ドイツの切手に現れた科学者、技術者達(28)

ロベルト・コッホ

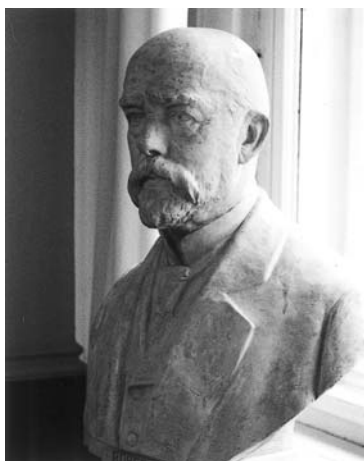
Scientists and Engineers in German Stamps (28). Robert Koch

筑波大学名誉教授 原田 馨
KAORU HARADA

Professor Emeritus, University of Tsukuba.



記念室に掲げられている日本の着物姿のコッホの油絵



コッホの胸像

ロベルト・コッホ

ロベルト・コッホ (Robert Koch, 1843-1910)、ドイツの医師、生物学者、細菌学者。近代細菌学の祖、多くの病原菌の発見者。

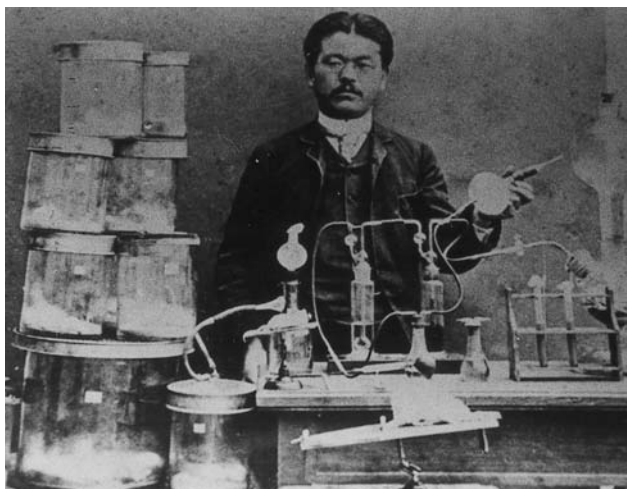
19世紀のドイツは続々と世界をリードする生物学の著名な学者を輩出した。それらの生物学者はシュライデン (Matthias Jakob Schleiden, 1804-1881)、シュヴァン (Theodor Schwann, 1810-1882)、ミューラー (Johannes Muller, 1801-1858)、デュ・ボア・レイモン (Emil Du Bois-Reymond, 1818-1896)、コッホ、ベーリング (Emil von Behring, 1854-1917)らであった。医学を含む生物学分野の研究報告の数は19世紀前半に他の欧州諸国に追いつき、19世紀後半には世界をリードするまでになった。この間に近代生物学の強固な基礎を築き、大きな成果を達成した。生物学における発展は他の科学の発展とも対応している。

コッホは1843年クラウスタール (Klausthal) に生まれ、1866年優れた成績でゲッチンゲン大学を卒業後、医師として病院医、軍医として勤務した。彼は探検家になりたかったが妻に反対され、1872年ヴォルシュタイン地方の保健技師となった。当時家畜の伝染病が流行していたが、彼はこれについて調べ血液の中に病原菌が存在することを発見した。

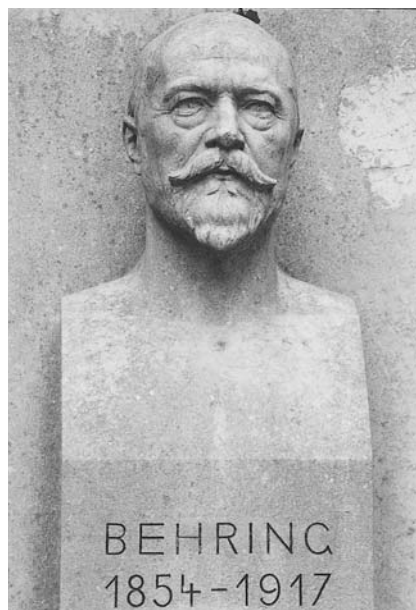
コッホは微生物学の大きな領域を開拓して現代の細菌学を作り上げた生物学者である。1882年に結核菌発見、1885年ベルリン大学衛生学教授となり、1891年には伝染病研究所 (ロベルト・コッホ研究所) 所長となり、熱帯病の研究 (マラリア、牛疫、回帰熱、ペストなど) を行った。同様な研究をした人にフランスのパスツール (Louis Pasteur, 1822-1895、微生物学者、パスツール研究所初代所長) がいる。コッホは1905年、結核菌に関する研究によりノーベル生理学・医学賞を受賞した。また1908年に世界一周の途次、日本にも立ち寄った。コッホの病原菌確

認法は微生物研究の基本となり、世界中で用いられている。コッホに学んで啓発を受けた医学者には日本の北里柴三郎(1853-1931、熊本県出身)がいる。北里の研究にはノーベル賞クラスのものがあると云われたが、ドイツから帰国後は伝染病研究所設立などに追われ、研究のための十分な時間がなかったのが残念である。コッホの助手で北里の同僚であったベーリングは血清療法(特にジフテリアに対する)の研究により、コッホより早く1901年第一回ノーベル生理学・医学賞を受賞した。

※本稿に掲載の写真は、著者の撮影によるものである。



1885年ドイツに留学し、コッホのもとで研究を行った北里柴三郎。当時のリーダー的医学者であり、人格的にも素晴らしい学者であった。



マールブルク、エリザベート教会前にあるベーリングの胸像



コッホ広場にあるコッホの大理石像



ベルリン、コッホ広場の標識



医学微生物および伝染病研究所の正面玄関



コッホの記念室

ドイツの切手に現れた科学者、技術者達 (28) ロベルト・コッホ



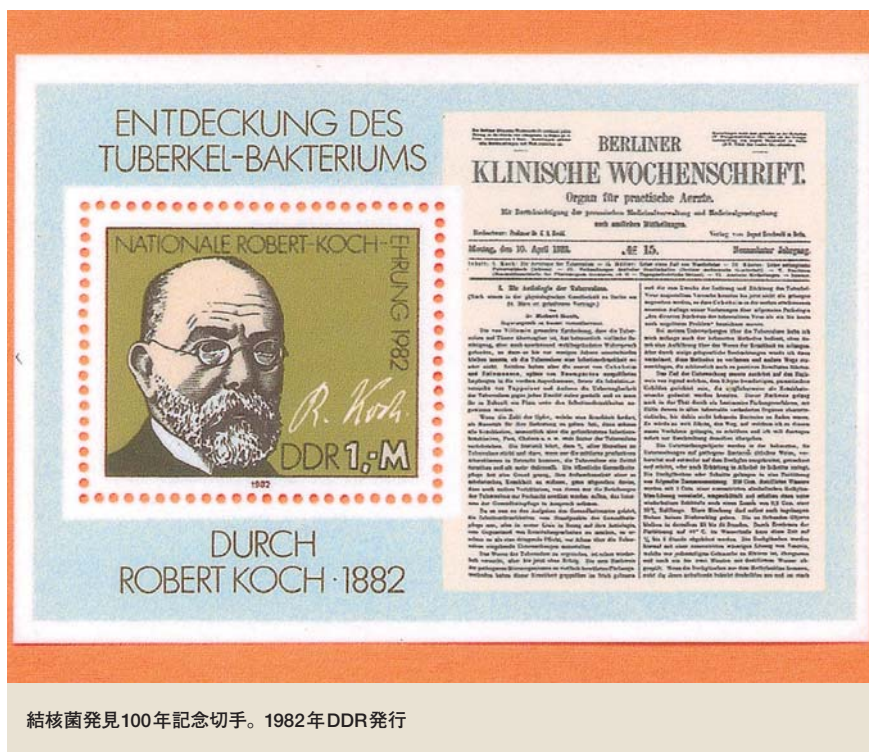
シャリテ設立250年記念切手。1960年DDR発行



結核菌発見(1882年)100年記念切手。
1982年西ドイツ発行



コッホ没後50年記念切手。
1960年ベルリン発行



結核菌発見100年記念切手。1982年DDR発行



ロベルト・コッホ研究所の記念板



結核菌発見により与えられたノーベル生理学・
医学賞のコピー

表紙写真

イワウチワ(岩扇属) (イワウメ科イワウチワ属)

イワウチワは、春の山ではよく見かける草丈5~15cm程度の高山植物です。イワカガミと区別できない光沢のある硬い葉に、鮮やかなピンクの花を付けます(白い種もあります)。これも他の花同様につぼみ~花が小さい時期は色が濃く、花の成長とともに薄い半透明なピンクのように変わっていきます。地表を覆いつくすようなイワウチワの群落は大変見ごたえがあり、何回も々々も同じような写真を撮らせてしまいますが決して飽きないものです。これは富山県の僧ヶ岳登山中の一カットです。(写真・文 北原音作)

あけましておめでとうございます。

読者の皆様、ご執筆頂きました著者の皆様には、よい年をおむかえになられたことと、心よりお慶び申し上げます。

昨年11月のデフレ宣言以来、日銀による量的緩和策をはじめとする様々な対策が取られていますが、デフレ解消の兆しが見られない中で、「庚寅(かのえとら)」の正月を迎えることとなりました。

「庚」は「更(あらた)まる」という意味で、「寅」には、「動く」という意味があります。本年は、経済面では冬に終りを告げ、新たな成長へと向かう気運溢れる年となるはずだと。

ケミカルタイムズは、昭和25年3月の創刊以来、本年で六十周年を迎えます。これも偏に皆様のご愛顧の賜物と深く感謝申し上げます。今後とも分かり易く、お役に立つ情報提供となる誌面作りを心がける所存です。

本誌では、ミルクオリゴ糖、コトスライドガラス、コウモリの今と昔ならびにトランス脂肪酸に係わる銀イオンクロマト等を掲載させて頂きました。

本年が、皆様にとりまして明るく活気の満ちた年となりますよう、お祈り申し上げます。

(築島 記)

編集後記



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22年1月1日 発行

「無断転載および複製を禁じます。」