

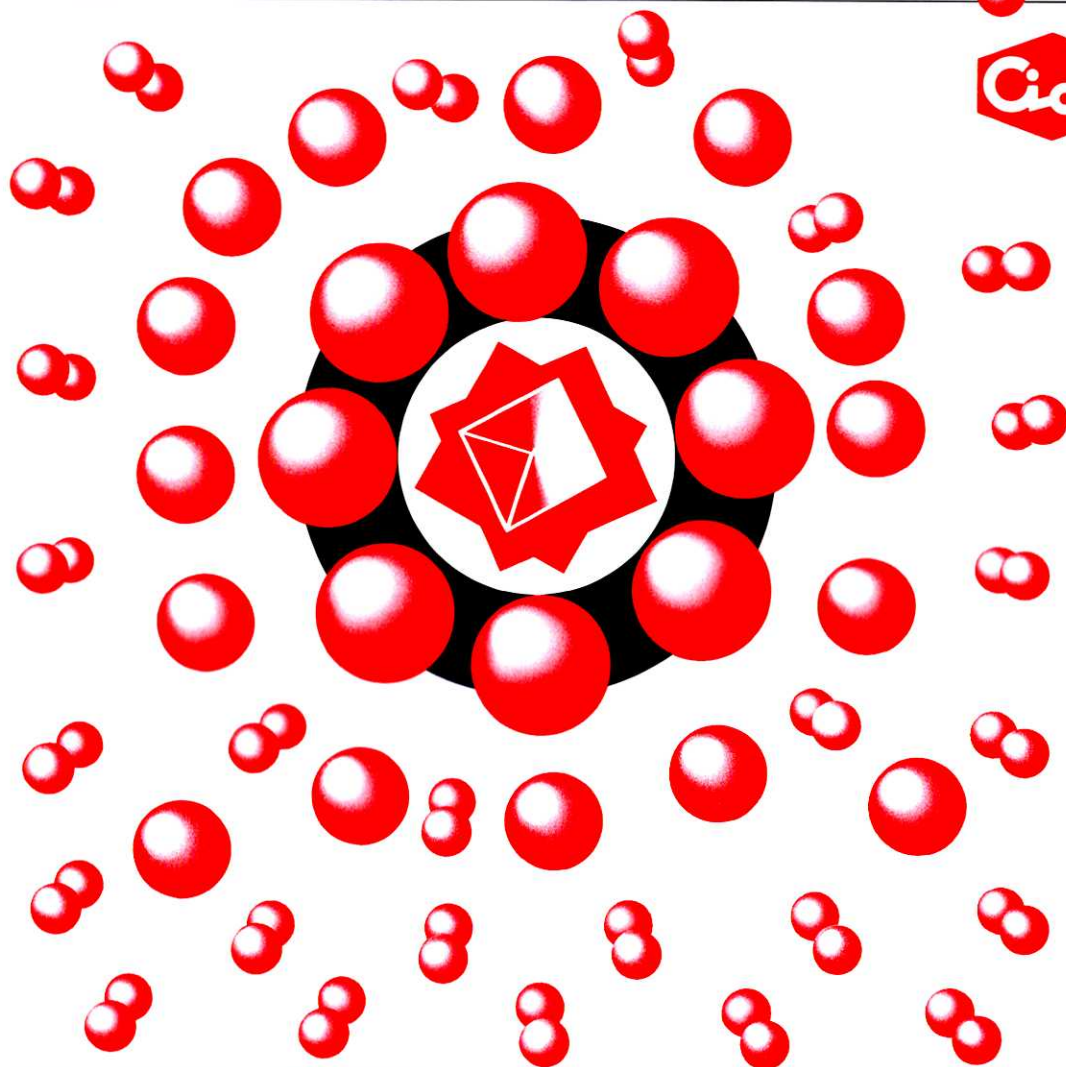
THE

CHEMICAL TIMES

ISSN 0285-2446

KANTO CHEMICAL CO., INC.

2001 No.3 (通巻181号)



目次

高純度有機標準物質の開発.....	井原 俊英.....	2
薬液交換時の PTFE フィルターの乾き問題.....	水野 祥樹.....	8
多孔質 PTFE 膜の表面処理による乾き問題の解決その評価方法		
遺伝子情報を医薬品へ(その4).....	坂田 恒昭.....	13
ファーマコゲノミックス		
魚の寄生虫の話(その2).....	福田 芳生.....	17
寄生性原虫とその生態		
編集後記.....		24

高純度有機標準物質の開発

産業技術総合研究所 計測標準研究部門 有機分析科
主任研究員 工学博士 井原 俊 英

1. はじめに

分析機器の高感度化、高精度化にはめざましいものがあり、今や計測機器そのものの信頼性よりも試験環境や分析法の堅牢性などが計測結果を左右する大きな因子であると言われている。一方、多くの測定機器は対象成分毎に校正が必要であり、この校正に用いる標準物質の信頼性確保も併せて重要な問題であると考えられる。機器校正に用いる標準ガスや標準液等の濃度標準において、その濃度信頼性は主成分と希釈ガス（液）の精確な混合並びにそれぞれの純度に依存するが、特に主成分純度を精確に規定するのは容易ではなく、既に供給されている標準物質においても必ずしも十分な水準で純度が確定されているとは言えない状況である。当研究所では平成8年度より、有機標準ガスおよび標準液などの濃度標準の主成分として用いる高純度有機物質の開発を進めてきた。これらの物質を国家標準として供給するためには、国際単位系に直接つながり、測定される量の標準を参照せず

に絶対測定が可能である分析法（一次標準測定法又は基準分析法）で純度値が付与されていることが重要である。加えて不純物も可能な限り少ない標準物質をめざし高純度化についても検討を重ね、これまでに18種の高純度有機標準物質を開発するに至った。それらのうち、エタノール、トルエン、1,2-ジクロロエタンに関しては当所の認証標準物質 (Certified Reference Material: CRM) として、主に標準供給機関を対象に供給開始されており⁽¹⁾、他品目についても順次 CRM 化される見込みである。そこで、以下にその開発経緯について紹介する。

2. 標準物質開発の概要

有機化合物は同一の化学組成であっても異なる構造の化合物が多数存在することや、無機化合物に比べて容易に酸化や分解などの化学変化を起こすなどの理由から高純度物質の開発は容易ではない。今回、開発した高純度有機標準物質は表1に示す18物質であるが、これらのほ

表1. 開発した高純度有機標準物質

標準物質	認証標準物質番号	特性値(純度), %
1. エタノール	NIMC CRM 4001-a	99.895 ± 0.050
2. ベンゼン		99.98 ± 0.02
3. トルエン	NIMC CRM 4003-a	99.984 ± 0.013
4. 1,2-ジクロロエタン	NIMC CRM 4004-a	99.97 ± 0.02
5. ジクロロメタン		99.95 ± 0.05
6. 四塩化炭素		99.99 ± 0.01
7. クロロホルム		99.91 ± 0.09
8. テトラクロロエチレン		99.95 ± 0.05
9. トリクロロエチレン		99.87 ± 0.13
10. 1,1,1-トリクロロエタン		99.98 ± 0.02
11. <i>o</i> -キシレン		99.01 ± 0.95
12. <i>m</i> -キシレン		99.84 ± 0.16
13. <i>p</i> -キシレン		99.82 ± 0.18
14. 1,1-ジクロロエチレン		99.92 ± 0.08
15. <i>cis</i> -1,2-ジクロロエチレン		99.39 ± 0.58
16. 1,1,2-トリクロロエタン		99.94 ± 0.06
17. <i>trans</i> -1,3-ジクロロプロペン		98.44 ± 1.49
18. <i>cis</i> -1,3-ジクロロプロペン		99.59 ± 0.40

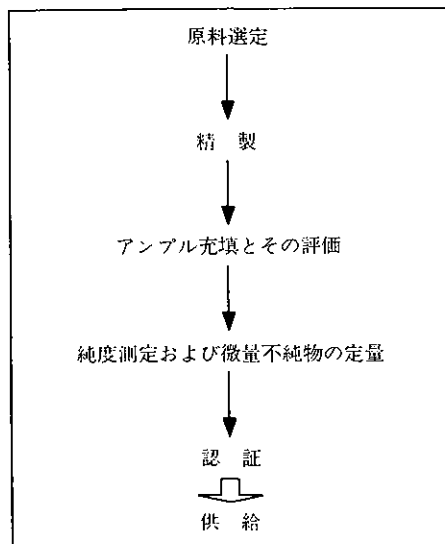


図1. 高純度有機標準物質の開発スキーム

とんでは揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compound: VOC) に相当し物性が似通っていることから、基本的に図1に示すプロセスで標準物質の生産を行った。このとき、原料選定から精製に至る高純度化過程においては、不純物として総有機物含量0.1%以下、水分10ppm以下を目標とした。また、得られた高純度物質の評価に関しては、原則的に一次標準測定法により特性値を付与することを条件として標準物質の開発を行った。そこで、以下に生産プロセスにおける各項目についてその詳細を述べる。

3. 原料の選定

原料物質としては市販品として入手可能な試薬を対象に数種類を購入し、ガスクロマトグラフ法による評価を行った。水素炎イオン化検出器 (Flame Ionization Detector: FID) で検出されるピークを合算したとき、主成分含量が相対的に多く、かつ蒸留等による精製を想定しクロマトグラム上の不純物ピークが主成分近くに多くないことなどを指標に選定を行った。特に、シス、トランスなどの幾何異性体においては両者の精製による分離に限界があることから、異性体の混入量になるべく少ない原料を選定した。また、市販試薬においては表1の物質の約半数に安定化剤が含まれているが、試薬によって安定化剤が異なるので、種類や添加量についても注意を払った。

なお、選定した原料は原則的に同一ロットで用意したが、必要量とした20~40Lの確保が困難な場合はロット間差を確認した上で複数ロットを精製前に混合することとした。

4. 精製

選定された原料について、少量規模でその精製法および精製効率を検討し、必要に応じて精製法を見直し最適と思われる手段で高純度化を行った。その結果、精製には精密蒸留法が有効であり必要に応じて脱水処理を加えることでほとんどの品目で目標とした99.9%以上の高純度化が達成できることが確認できた。図2にクロロホルムの精密蒸留による少量規模での精製結果を一例として示す。装置には回転バンド式精密分留装置 (大科工業製 TAB-SB2型) を用い、精製規模は仕込量で100mL、還流比10:1、回転速度2000rpmという条件で窒素気流下にて蒸留精製を行った。10mL毎に分画し、各フラクションをGC-FIDで分析した。図2では別途定性を行った各不純物および主成分のFIDにおける相対面積値の推移を示したが、蒸留前 (左端) と比べ安定化剤であるエタノ

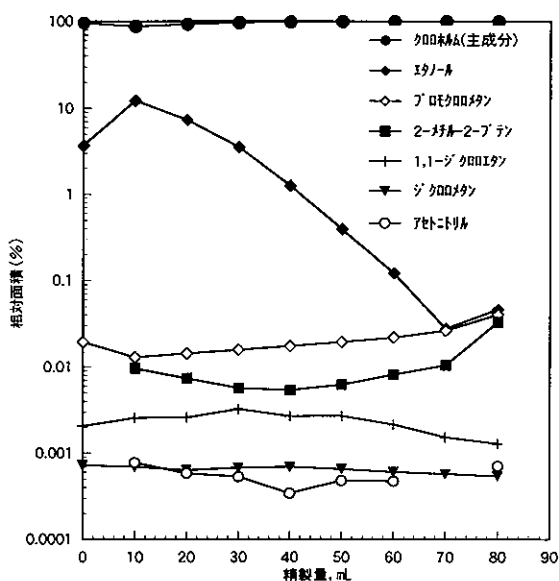


図2. クロロホルムの蒸留精製

表2. 有機塩素系化合物における蒸留精製結果

化合物	主成分含量 (%)	
	蒸留前	蒸留後
トリクロロエチレン	99.44	99.99
クロロホルム	96.28	99.93
テトラクロロエチレン	99.99	100.00
四塩化炭素	99.92	99.98
ジクロロメタン	99.98	99.99

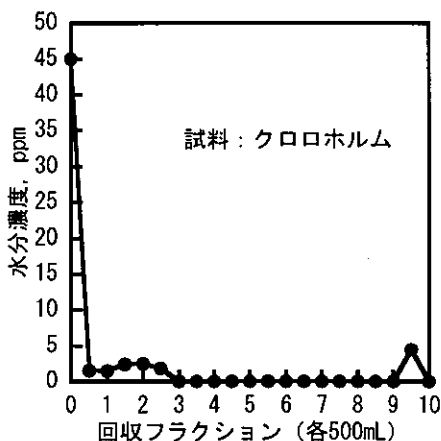


図3. モレキュラーシーブによる脱水精製

ールが減少していく傾向を示し、7番目のフラクションで最も低い値となった。他の不純物は相対的に少ないのでそれほど変化していないが、エタノールの減少に伴いクロロホルム含量は増え、蒸留前が96.28% (GC-FID 相対面積値) であったのに対し、7番目のフラクションでは99.93%となった。表2に同装置による塩素系5物質の小規模蒸留結果を示すが、他の物質においてもほぼ同様の傾向を示した。すなわち、安定化剤が含まれる場合は最も顕著なのがその減少であったが、極低沸点や高沸点分も顕著に除去され、蒸留法により目標とする99.9%以上の高純度化が達成できることが確認できた。なお、1,1-ジクロロエチレンに関しては、安定化剤の除去による分解、反応等の化学変化の促進が著しいため、蒸留時に受器に予め安定化剤を加えておく必要があった。また、水分については、小規模蒸留において目標とした10ppm前後よりも有意に高いと判断された場合は、原則的に蒸留前にモレキュラーシーブによる脱水を行うこととした。図3はクロロホルムにおける脱水結果の一例である。脱水はいわゆるバッチ式よりも連続的に行った方が明らかに効率的であったので、内径50mm、長さ500mmのステンレス製カラムにモレキュラーシーブ3A 60/80を約600g充填し、流量50mL/minでプランジャー式ポンプによりクロロホルムを送液した。その結果、脱水前は50ppm以上の水分値であったが、本操作により10ppm以下の水分値となり6L程度の処理が可能であった。なお、水分値の評価には電量滴定式のカールフィッシャー水分計(平沼産業製AQ-7型)を用いた。

大量スケール(約20L)での精製は、関東化学株式会社草加工場において実施をお願いしたが、小規模精製で得られた知見を元に条件設定を行ったところ、ほとんどの品目ではほぼ同様の精製効率での高純度化が確認できた。

5. アンブル充填とその評価

大量スケールでの精製により得られた高純度物質は標準物質として供給するため、汚染を避け、また安定に保存するなどの理由から高純度アルゴン雰囲気下でアンブルに封入することとした(関東化学株式会社草加工場において実施)。安定性は物質毎に異なるが、市販試薬に安定化剤が加えられておらず比較的安定と思われる表1の1~4および6および11~13については茶褐色硬質ガラスアンブルに封入し、遮光下-20℃での保存とした。一方、市販試薬としては安定化剤が存在する物質でありながら高純度化により安定化剤が除去された表1の7~10および15~18については、安定性が懸念されることから茶褐色パイレックスガラスアンブルに封入し、これら物

質の凝固点以下である-140℃で保存することとした。なお、安定化剤を再添加した一部の品目(表1の5, 14)についても1~4等と同様に茶褐色硬質ガラスアンブルに封入し-20℃での保存とした。

一方、標準物質の特性値は、充填した個々のアンブルに対してではなく一つのロットとして付与することから、アンブルの均一性が確保されていることが重要となる。そこで、加熱封入により生じるばらつきを評価するため水分および有機物に着目し、それぞれ水分計およびGC-FIDにより変動の有無を約10本の抜き取り(全アンブルの2~3%に相当)で評価した。その結果、両者とも不確かさは純度値の10ppm以内であり、全ての品目において純度値に影響を与える水準に充たないと判断し、均一性には問題ないものと考えた。

なお、これらの物質の長期安定性に関しては未知数であるが、それぞれの保存条件下において半年~1年経過した段階での評価では、安定性に問題がないという結果が得られている。

6. 純度測定

主成分の純度を精確に測定するには、国際単位系に直接つながり測定される量の標準を参照せずに絶対測定が可能である分析法で値付けすることが重要であり、一次標準測定法(又は基準分析法)と呼ばれている。凝固点降下法はCCQM(国際度量衡局下の物質質量諮問委員会)において一次標準測定法としての資格を有する測定法として規定されており⁽²⁾、特異性の少ない有機化合物の純度測定には有用性が高いと考えられるため、開発した高純度物質について本法の適用可能性を検討した。

凝固点降下法による純度測定は、凝固点(融点)降下度が不純物濃度に比例するという理論から成り立ち、van't Hoff式に基づく理論式(1)から試料中の不純物のモル分率が求まる。

$$T = T_f^0 - \frac{x_2 R (T_f^0)^2}{\Delta H_f^0} \cdot \frac{1}{F} \quad \text{----- (1)}$$

T : 試料温度
 T_f^0 : 純物質の融点
 x_2 : 試料中の不純物のモル分率
 R : 気体定数
 ΔH_f^0 : 純物質の融解エンタルピー
 F : 融解分率

この原理に基づく純度測定は、古典的な熱量計を用いた熱分析法として歴史的には古くから行われてきたが、近年は微量で測定できることや簡便であることから、示

差走査熱量計 (DSC) が用いられている^(3,4)。しかしながら、(1)式に基づく純度測定はそもそも熱力学的には平衡状態での議論であり、通常のDSCを用いた測定では試料を一定速度で加熱する方法(連続加熱法)で純度測定を行うので、正確な純度が求められないという根本的な問題がある。そこで本研究では、DSCを用いてより高精度の測定を行うため、試料の融解が完了するまで段階的に加熱し、擬似的に熱平衡状態を保ちながら試料を融解させる方法(段階的加熱法)による純度測定を試みた⁽⁵⁾。開発した高純度物質には例えばエタノールのようにきわめて融点が高い物質(融点: -114.15°C)も多数あることから、液体窒素の供給が可能かつ低温測定における温度制御に優れたDSCが必要である。加えて、測定対象の物質はきわめて高純度であることから凝固点降下度が100mKに充たないことが予想され、段階的加熱法における温度ステップとして10~20mK程度の分解能が必要である。これらの条件を満たすDSCを検討し熱流速度型のDSC821e/200(メトラー・トレド製)を用意した。また、なお、DSCの校正に用いる温度と熱量の標準物質には、インジウム(NIST

SRM1745, 融点: 156.5985°C) および水銀(NIST SRM 2225, 融点: -38.85°C , 熱量: 11.469 J/g)を用いた。図4に一例として段階的加熱法によるエタノール(試料量 3.9376 mg)の測定結果を示す。各温度ステップ毎に融解エンタルピーを求め、総融解エンタルピーで除した融解分率の逆数を温度に対してプロットすると図4中に示したような(1)式を満たすほぼ直線関係が得られる。この傾きから凝固点降下度を得ることができるが、十分な精度でこの解析を行うためにはプロット数が少なくとも4~5点以上必要であり、本試料の場合は20mKの温度分解能で測定を行った。本測定結果から得られた凝固点降下度は31.7mKであり、(1)式から不純物の総量として0.0745%が得られた。この測定を6回行った結果を平均し、この測定精度にその他の不確かさを加え、エタノールの純度値としては $99.895 \pm 0.050\%$ とした。このとき約8時間の測定中(1試料の測定時間)、 -100°C 付近において $\pm 1\text{ mK}$ 以下の水準で熱平衡状態を保つことが可能であり、本検討の結果、凝固点降下度が100mKに充たない99.9%程度の高純度有機化合物についても段階的加熱法によ

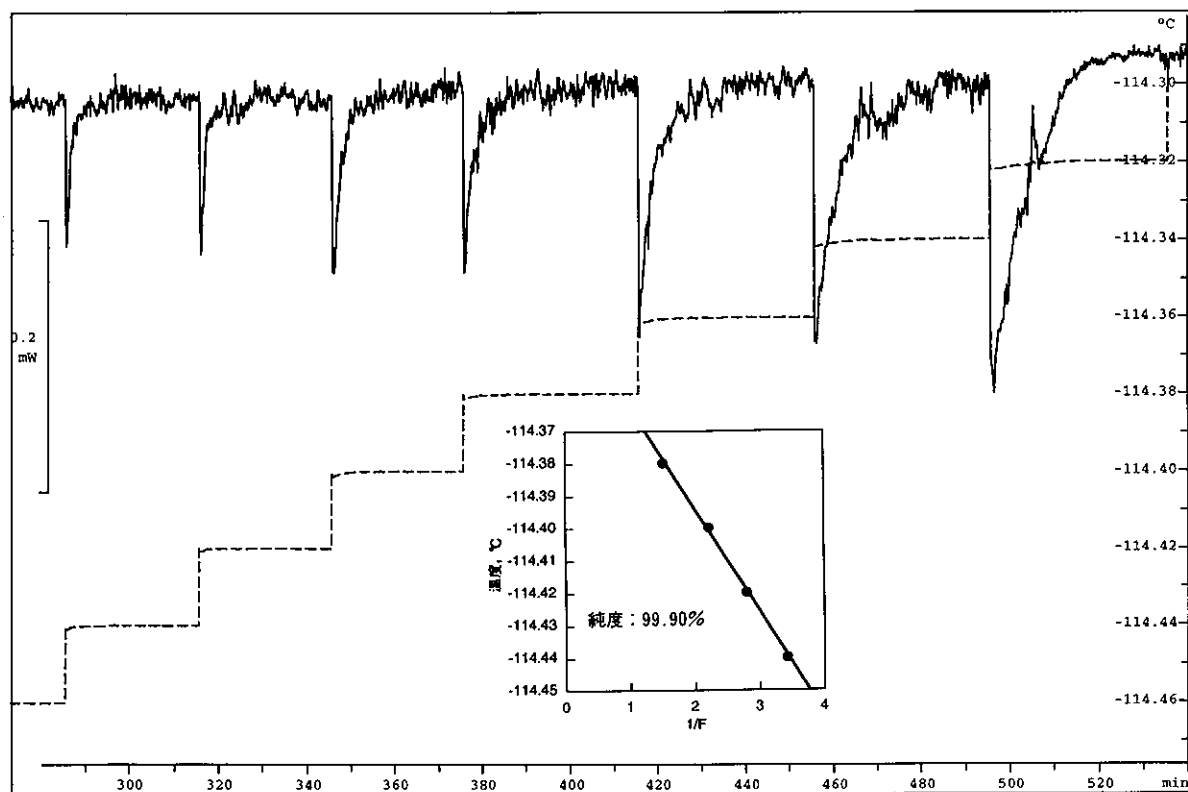


図4. 段階的加熱法によるエタノールの純度測定

る測定が可能であることが確認できた。なお、1,2-ジクロロエタン等、他品目についても同様の測定原理に基づき検討を行ったところ、ほぼ同様の水準で測定可能であった(表1参照)。

7. 微量不純物の定量

本高純度物質は全て蒸留精製により得られたものであることから、金属や無機塩類などの不揮発性あるいは難揮発性物質はほぼ除去されているものと考え、主としてGC-FIDを用いて微量不純物の定量を行った。まず、無極性から強極性まで数種の異なるカラムにより不純物の有無を相互に確認し、不純物間の分離に優れたカラムを開発品目毎に選定した。なお、高沸点不純物に関しては膜圧の薄い無極性カラムを用い、最高使用温度付近まで測定し検出しないことを確認した。次に、スプリット注入法(スプリット比1:20を基本)における相対面積値として1ppm以上の不純物に関して、GC-MS等により推定を試み、最終的には不純物の標品を入手し定性を行った。各不純物の定量は内標準法により行うこととし、適当な内標準物質を選定し測定対象物質に適量添加した。このとき、他の不純物による汚染を排除するため希釈溶媒は用いず、内標準物質を直接添加することとした。ところが、不純物の検量線用標準液の調製には、通常、内

標準物質に加えて別途希釈溶媒が必要であるため、両者に溶媒間差が生じてしまい定量値の信頼性に問題が残る。一方、高純度物質自身が貴重なものであるため、標準添加法も使いにくいと考えられる。そこで、予め内標準物質と各不純物標品の相対感度を求めておき、定量時には測定対象物質に内標準物質のみを加えることで、その際の不純物との相対面積および求めた相対感度から各不純物の定量値を求める方法を考案した。このとき、加熱気化注入法における溶媒間差を最小限にするため、相対感度の測定には精製前の原料物質を用いた。原料物質には、当然、同じ不純物が存在していることから不純物標品を標準添加することとなるため、添加量の異なる2種類の溶液を調製し、元々存在する不純物量を差し引いた上で内標準物質との相対感度を求めた。図5および表3に一例として四塩化炭素における不純物の分析結果を示す。内標準物質としてはフルオロベンゼンを用いており、これを1とした時の相対感度を示してあるが、これと質量比混合法により添加した内標準物質質量(約100ppm)とから各不純物の定量値を求めたところ最も多いクロロホルムで約14ppmであった。一方、GC-FIDでは感度の無い水分についてはアンブル充填の際の評価において測定した値の平均値を水分値とした。また、金属等についてもJISの一般試験法に準じ測定を行ったが、純度値に影響

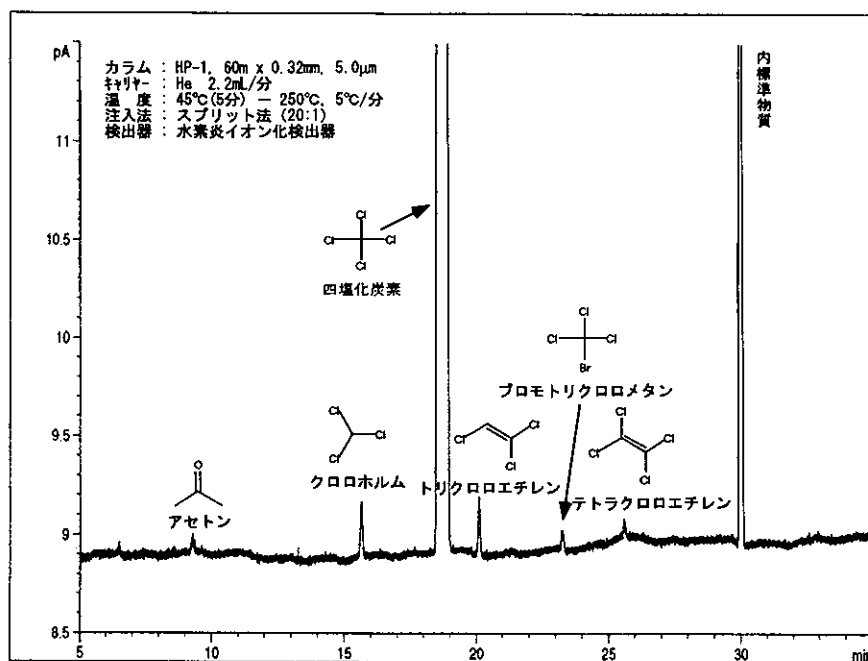


図5. 四塩化炭素における不純物分析

表3. 四塩化炭素における不純物の定量結果

化合物	分析法	相対感度	濃度 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	分子量
アセトン	GC-FID	0.287 ± 0.003	0.7 ± 0.1	58.08
クロロホルム	GC-FID	0.101 ± 0.002	14.2 ± 0.6	119.38
トリクロロエチレン	GC-FID	0.335 ± 0.002	4.9 ± 0.2	131.39
ブromotriクロロメタン	GC-FID	0.092 ± 0.002	11.7 ± 1.2	198.28
テトラクロロエチレン	GC-FID	0.336 ± 0.002	1.9 ± 0.2	165.83
水	カルフィッシャー		52.0 ± 0.5	18.02

を与える不純物は存在しなかった。

なお、これら微量不純物の定量結果は、認証書においては参考値として扱ったが、濃度標準として混合標準ガスや混合標準液を調製する際には必要な情報と思われる。

8. まとめ

本研究において開発した有機高純度物質は、我が国の環境基準、排出基準が設けられている有害物質を中心にトリクロロエチレン、ベンゼン等18成分を選定したものである。したがって、これらの物質の多くは環境計測等に用いる有機標準ガスおよび標準液として計量法トレーサビリティ制度 (Japan Calibration Service System: JCSS) に基づいて供給される予定である。今後とも、標準液は JIS K 0125 対応として、また標準ガスは大気汚染防止法の優先取り組み物質に対応した J-HAPs などの混合標準の供給に向けて整備を急ぐ必要があることから、品目を追加し、本研究で確立した手法をベースに高純度物質の開発を行う予定である。

一方、世界的にも高純度有機標準物質はきわめて不足し

ており、本研究で開発された VOC 関連の標準物質もほとんど供給されていないのが現状である。そこで当研究所では、米国の国立標準技術研究所 (NIST) とも協力し、これら高純度有機標準物質の開発を行っており、順次、認証標準物質として供給していきたいと考えている。

9. 謝辞

本標準物質の開発は数多くの方々のご協力によりなされたものであり、この場を借りて御礼申し上げます。特に、大規模精製およびアンフル充填に関しては関東化学株式会社草加工場の全面的協力のもとに行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 井原俊英, 物質研ニュース, No.47 (2001).
- 2) 倉橋正保, 標準物質協議会会報, 31, 7(1998).
- 3) C. Plato, A. R. Glasgow Jr., *Anal. Chem.*, 41, 330(1969).
- 4) E. E. Marti, *Thermochim. Acta*, 5, 173(1972).
- 5) 井原俊英, 野村 明, 物質研ニュース, No.36(1999).

計量法トレーサビリティ制度 (JCSS) 適合標準液

信頼性の証として、pH 値または濃度の値付け結果を示した証明書が製品に添付されています。

標準液	種別/濃度	品 目
pH 標準液	第2種	pH 1.68, 4.01, 6.86, 7.41, 9.18, 10.01
金属標準液	100mg/L 1,000mg/L	Al, As, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Zn
イオン標準液	1,000mg/L	Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NH_4^+



関東化学株式会社 試薬事業本部

電話 03-3663-7631

薬液交換時の PTFE フィルターの乾き問題

多孔質 PTFE 膜の表面処理による乾き問題の解決その評価方法

日本ポール株式会社 マイクロエレクトロニクステクノロジー
 マテリアルグループ グループリーダー 水 野 祥 樹
 マテリアルグループ 中 村 崇
 SLS/ELC グループ 係 長 能 勢 昌 之

1. はじめに

半導体製造に欠かせないシリコンウエハの洗浄プロセスでは、高温の塩酸-過水やアンモニア水-過水、オゾン水などの様々な攻撃的な薬液が用いられている。このような薬液洗浄プロセスにおいては通常、微粒子付着によるウエハ汚染を防ぐために、耐薬品性にたいへん優れたポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製フィルターが用いられている。PTFE フィルターはこの耐薬品性の他、清浄度や微粒子除去能力などの点でたいへん優れたフィルターであるが、幾つか弱点も知られている。

第一に、疎水性である為に、高い表面張力をもつ流体には濡れない。つまり、水や多くの薬液は、PTFE よりも高い表面張力を持っているので多孔質 PTFE 膜の細孔内に浸透しない。その為、使用前にイソプロパノールのような PTFE よりも表面張力の低い溶媒で一旦フィルターを浸透させた後、水又は対象流体で通液置換する作業を行う必要があり、この作業後によりやろフィルターとして利用することが出来るのである。このプレウエット作業は、大変面倒なものである。最近、フィルターメーカーの方でこの置換作業を終えたプレウエット済みフィルターが販売されている。

更に深刻なのは、上記のように面倒なプレウエット処理を経て使用しているフィルターが使用中に乾いてしまう問題である。例えば、使用済みの70~90℃の塩酸-過水を新液に交換するために、薬液槽やフィルターハウジング内の薬液を全て排水するが、この時にしばしばフィルターが部分的に乾燥し、液交換後に流量低下 (又は圧損の増加) する。また、マイクロバブルを多く含む流体の濾過中に多孔質膜内でバブルが集合成長し、最終的に細孔を塞ぐことにより流量低下を起こすこともまれにある。このように一旦乾いてしまったり、流量低下が起こったりした場合には、再び上記のプレウエット処理を行なえば回復させることが出来るが、総合的な作業効率に著しく悪影響を及ぼす。

ここでは、このような PTFE フィルターの乾き問題を解決する為の多孔質 PTFE 膜 (濾材) の表面改質方法を、紹介すると共に、その適切な評価方法を紹介したい。

2. 乾き易さの因子

乾きの因子は、流体の温度や過酸化水素濃度などの流体由来の因子、流速、脈流の程度、薬液交換時に液を完全に排出する目的としたポンプの空打ちや真空引き条件などの操作条件因子、微多孔膜の性能、流路材の性能、ブリーツ形状やパッキング密度などのフィルター構造由来の因子の三種類に分類することができる。

この中で主要因は、微多孔膜の性能であり、その中でも PTFE 固有の低表面張力が最大要因であると一般的に論じられている。しかし、上述の乾き問題は、目の細かいフィルター (0.05ミクロン) の場合に頻繁に起こり、目が大きくなるに従いこの現象は殆ど観察されなくなることが知られているし、同じ除粒子性能であっても乾き易さにはかなりバラツキが見られるなど、低表面張力だけでは簡単に説明がつかない。おそらくは、細孔径分布、細孔構造の複雑さや、マイクロラフネスなどの因子が相当寄与していると考えている。

3. 表面処理方法

3-1 コーティング法

表面張力の比較的高い物質を PTFE にコーティング又は付着させる方法は、最も簡単に表面張力を下げる方法である。しかしながらコーティング材料には、攻撃的な各種ウエハ洗浄液に晒されることになるので、高い耐薬品性が要求される。また、コーティングした材料が剥離して、洗浄液を逆汚染する可能性や、長期間使用での安定性などの問題点も考えられる。

3-2 γ 線処理法

コバルト60に代表される γ 線照射は、ある程度 PTFE の表面張力を増加させることが可能である。しかしなが

ら、 γ 線の照射は同時に物理的な強度の劣化を引き起こすことが知られている。その為に、濾過操作中の激しい圧力変動により、膜が引き裂けたり、細孔構造を形成しているフィブリルが断線し、十分な濾過精度が得られなくなったりする可能性も否定は出来ない。

重合性化合物を膜に含浸させた状態で γ 線を照射するグラフト重合法は、比較的短時間で照射の効果を期待できるので、 γ 線による強度劣化を低減することが可能だが、反応残渣物の完全除去などの新たな課題を生じる。

3-3 プラズマ処理法

ガスプラズマを利用し表面を改質する方法は広く知られているが、通常ガスプラズマ条件では多孔質膜の内部までプラズマを運ぶことができず、膜の最表面のみが改質される。多孔質膜の細孔内を処理する為には、工夫が必要となる。また、プラズマによりチャンバーがエッチングされ、これが膜に付着するなどの汚染などに対する対策も必要となる。

3-4 紫外光照射

紫外線を利用した光化学修飾法により、細孔内部も改質する事が可能である。光の照射面ほど効率的に改質が進むが、通常の PTFE フィルターに使用する膜は 50 ミクロン程度の厚さであるので裏面までの改質は可能である。但し、物理的強度の劣化、反応残渣等の可能性は γ 線と同様に否定できない。

この他にも数多くの表面改質方法が提案報告されてい

るが、基本的に重要なのは、クリーンなプロセスであることであり、表面改質により PTFE 膜が汚染されることは好ましくない。また、攻撃的な高温薬液での使用に対応する為に、高い耐薬品性を保つことが必要であり、さらには、表面改質効果が長期間安定である必要がある。

4. 評価方法

4-1 薬液でのフィルター乾き試験法

乾き特性をもっとも確実に評価するには、実際に使用されるものと同形状のフィルターカートリッジを製作し、出来るだけ実用条件に近い状態で評価することである。ここでは、ウエハ洗浄液の1つである 80℃ の SC-2 (HCl/H₂O₂/H₂O=1/1/5) での液交換作業を想定した乾き特性測定を例に示す。

図1に示したように薬液槽に試験フィルター（10インチ長）をセットできる循環ラインを設ける。薬液槽に 80℃ の SC-2 を準備し、試験フィルターとしてプレウエット済み PTFE フィルターをセットする。循環ポンプを駆動させ 2 時間の SC-2 循環を行い、その時の流量、圧力損失を記録する。ポンプを止め、フィルターハウジング下部のドレインバルブを開き、薬液を排出する。ドレインバルブを開いてから 3 分後にポンプを稼働させエア圧をかけ、さらに薬液を排出する（1 分間）。ポンプを止め 3 分間放置する。ドレインバルブを閉め、再び 2 時間の SC-2 循環を開始する。この作業を何回か繰り返す。

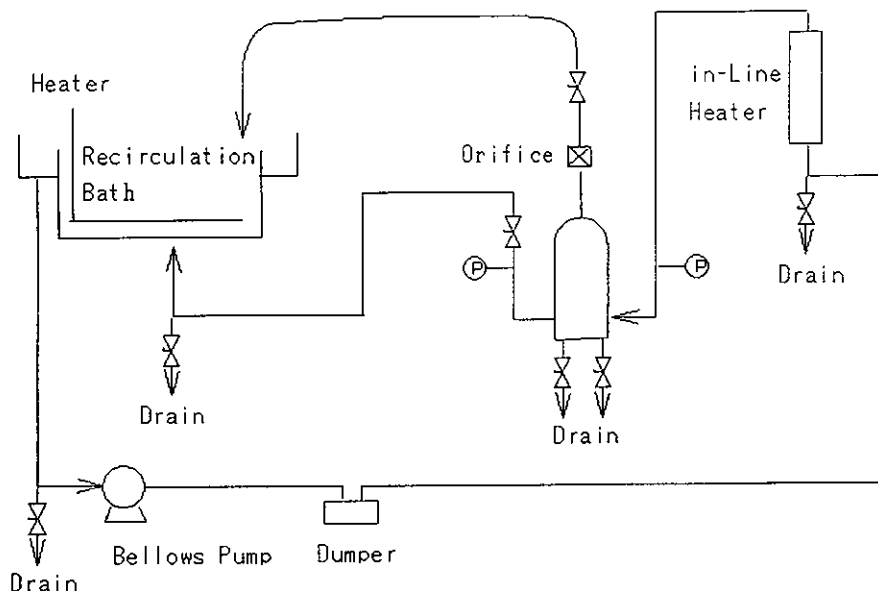


図1. 薬液でのフィルター乾き試験法

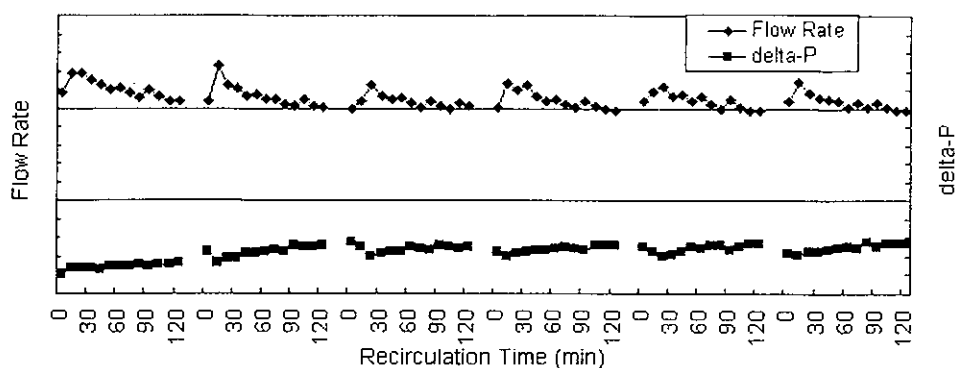


図2. 表面改質 PTFE フィルターの乾き試験結果

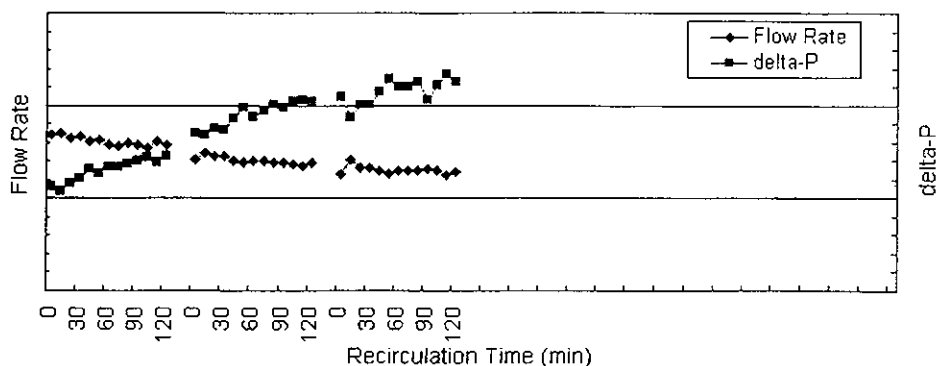


図3. 表面改質していない PTFE フィルターの乾き試験結果

図2には表面改質PTFE膜(0.05ミクロン相当)を用いて製作した試験フィルターでの試験結果、図3には比較実験として表面改質していないPTFE膜を用いて製作したフィルターの結果を示す。表面改質PTFEフィルターでは、上記サイクルによって、若干の乾きによる圧力損失が観察されるものの、ほぼ安定した流量を実現できていることが読みとれる。それに対し、表面改質していないものでは、明らかに急激な圧力損失の上昇と流量の低下が観察された。

このようなフィルターカートリッジを用いての乾き試験は、様々な実用条件に合わせて行えるため、正確な情報を知ることが出来る。一方、PTFE膜改質方法の評価の観点からは、膜以外の因子が多く、カートリッジ製作や試験に時間がかかるという点で問題である。以下には、PTFE膜のみに関する因子を測定する方法を紹介する。

4-2 臨界濡れ表面張力法 (CWST: Critical Wet Surface Tension)

固体の臨界表面張力とは固液の接触角が 0° となる場合の液の表面張力をもって定義される。すなわち、様々な表面張力の値の液によって接触角 θ を測って、 $\cos \theta \sim \gamma$ のプロットを行い $\cos \theta = 1$ に相当する液体の表面張力をその固体の臨界表面張力とする。標題の臨界濡れ表面張力とは、多孔質材料の評価に用いられるもので、様々な表面張力の値の液を多孔質表面に滴下し、細孔内に染み込むかどうかを観察し、染み込むことの出来る液の表面張力の最大値をもって定義する。

ちなみに、PTFEの臨界表面張力は約18dyn/cmであり、精密フィルターに用いられるPTFE多孔質膜の臨界濡れ表面張力は、約28dyn/cmである。

実は本研究開始当初、表面改質によりこのCWSTを増加させることが「乾き問題」の解決にもっとも有効なアプローチであると考えていたが、研究を進めるにつれ、

表1に示すように、主要な因子では無いことが明らかになってきた。

表1. 各乾き難さ評価方法の比較

サンプル		カートリッジ試験		膜試験			
		SC1 80°C ^{*1}	SC2 80°C ^{*1}	CWST (dyn/cm) ^{*2}	減圧濾過サイクル法 ^{*3}	Water KL (psi) ^{*4}	IPA KL (psi) ^{*5}
A	非処理	×	×	26.4~30.0	×	6	56
B	非処理	×	×	26.4~30.0	×	13	39
C	表面処理	×	×	26.4~30.0	○	29	41
D	表面処理	○	○	26.4~30.0	○	36	41
E	表面処理	-	-	26.4~30.0	○	48	38

^{*1} 4-1で記述したフィルターカートリッジでの乾き試験結果。○は顕著な圧損増加がみられないこと、×は顕著な増加がみられたことを示す。

^{*2} 臨界濡れ表面張力。26.4~30.0は、26.4 dyn/cmの表面張力標準液で濡れ、30.0 dyn/cmの標準液で濡れないことを示す。

^{*3} 減圧濾過サイクル法での結果。25℃の純水で試験した。1サイクル目と2サイクル目の流速比が0.90以上を○。0.90未満を×とした。

^{*4} 純水(約72 dyn/cm)で測定したKL値。

^{*5} 2-プロパノール(約21 dyn/cm)で測定したKL値。

4-3 減圧濾過サイクル法

この評価方法のコンセプトは、薬液の液交換作業を想定したフィルターカートリッジでの試験を、実験室レベルで行おうというものであり、減圧濾過ユニットとポンプがあれば、簡単に実施できる。改質PTFE膜の試験片を47mmφの減圧濾過ユニットにセットし、2-プロパノールでプレウェット処理を行う。次に250mlの純水を約0.005 MPaで減圧濾過を行いながら流量測定を行う。250ml全てが通過した後、減圧ポンプを稼働したまま1分間放置し、再び250mlの純水を通液させる。この作業を何回か繰り返し、流速の変化を測定する。改質していない通常のPTFE膜(0.05ミクロン相当)の場合は、ほぼ1サイクルで乾いて流れなくなってしまうが、十分に改質されたPTFE膜で有れば、流速の低下は殆ど見られない。

結果は、フィルターカートリッジでの高温薬液試験との良い相関がみられ、簡易試験としての役割を十分に果たす。より厳しい条件で試験したい場合には、純水の温度を上げると良い。

4-4 フォワードフロー法(KL値)

フォワードフローテスト(図4)は、フィルター濾過精度が規格値を満たしているかどうかを試験する方法として頻繁に用いられている。2-プロパノールなどの低表面張力である液体でフィルターをプレウェットし、片側に徐々に空気圧を加えていくと、最初は毛細管力により液体が細孔内に詰まっているので、拡散透過による極微量の空気しか流れない。しかし、毛細管力を越える圧力を

加えると液体が押し出され、急激に空気の透過量が増加する。この増加し始める点をKL値と呼んでいる。

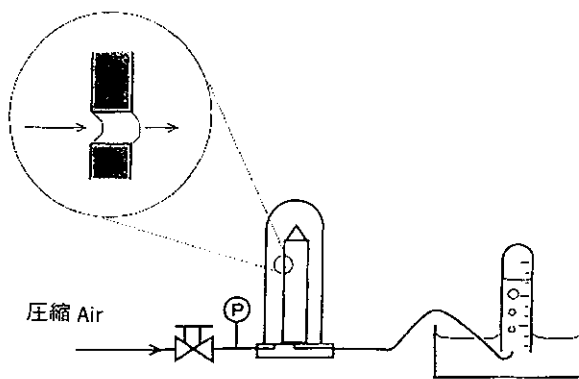


図4. フォワードフロー法の原理

毛細管圧力 P は、 $P=4r\cos\theta/d$ (r : 液体の表面張力、 θ : 接触角、 d : 孔径)で表される(但し、細孔を円筒径近似した場合)。2-プロパノール(21 dyn/cm)のような表面張力の低い液体を用いる場合には、 $\cos\theta=1$ と近似できるので、このKL値の測定によって、多孔質膜の孔径に対する情報が得られる。

このフォワードフロー試験法を応用し、表面張力の高い液体を用いてのKL値測定もすることができる。但し、高表面張力流体を膜に直接含浸することはできないので、

2-プロパノール等で完全に濡らした後に、高表面張力流体に置換する必要がある。高表面張力流体の場合は、 $\cos \theta < 1$ でありKL値の大小は、単に細孔径を反映するのではなく、表面エネルギー分布、細孔構造、細孔径分布などを総合的に反映した複雑な値となる。敢えてこのKL値の意味を一言で表すならば、“膜内に液体を保持する力”である。我々の研究では、表1に示すように、この高表面張力流体を保持する力が実際の薬液交換時の乾き問題と、かなり密接な関係にあることを見いだした。

5. 各評価方法の比較

表1に各試験法による結果を纏めた。A膜、B膜は表面処理を施していないPTFE膜、C膜、D膜、E膜は乾き特性の改善を意図して表面改質を施したものである。A膜、B膜、C膜を用いて製作したフィルターカートリッジは、80℃のSC-1での乾き試験、80℃のSC-2での乾き試験のどちらにおいても、顕著な乾きが見られた。D膜を用いた場合には、いずれの場合も圧損増加は観察されず、十分な表面改質効果が確認できた。これらの膜の臨界濡れ表面張力は、26.4~30.0 dyn/cmの間で殆ど差が見られないので、膜の臨界濡れ表面張力の測定により、フィルターの乾き特性を予測することは難しいと結論できる。

減圧濾過サイクル法では、A膜、B膜で顕著な流速低下が観察されたが、改質を施したC膜、D膜では流速の低下は見られなかった。すなわち、C膜を除いて、フィルターカートリッジでの結果と一致した。C膜とD膜は同じPTFE膜を同じ手法で表面処理したもので、処理量に差をつけたものである。すなわち、減圧濾過サイクル法では、処理効果の有無を判断することは成功したが、それが実際のアプリケーションに対して十分であるかどうかの判断とは一致しなかった。但し、減圧濾過に用いる液種、温度を変えることで、C膜、D膜の差を顕著に検出することには技術的に可能であり、実際に成功したことを付記しておく。この試験方法は、乾き難さの絶対的な程度が解らない点で問題があるが、試験が容易であるので、表面処理効果の品質管理検査方法としては優れる。

高表面張力流体を用いたKL値測定は、表面処理効果を容易に定量化できる点で優れた方法である。表1には例として純水(72 dyn/cm)での試験結果を示した。カートリッジの試験結果との比較から、KL値が大きければ乾き難く、KL値が小さければ乾き易いことが読みとれる。このことは、薬液交換時に生じるフィルターの乾き易さは、高表面張力流体を膜内の封じ込めておく力に大きく依存することを示唆している。表1中のE膜については、

フィルターカートリッジ形状での薬液試験を行っていないが、純水でのKL値が48psiと高いことから、十分に乾きにくいフィルターになると推定できる。

加えて特筆すべきは、A膜とB膜の比較で、A膜の方が、2-プロパノール(21 dyn/cm)でのKL値が高いにもかかわらず、純水(72 dyn/cm)でのKL値の数値が低くなっている点である。この解釈については、今後の検討課題としたいが、細孔構造の複雑さやマイクロラフネスなども反映した値ではないかと推定している。

6. 最新表面処理法による乾き難いPTFE膜の作製

図5は、弊社で開発した最新の表面改質技術により、PTFE膜の乾き特性を制御した例を示す。同改質プロセスについては詳細を公開することはできないが、シリコンウエハの洗浄液用フィルターに使用されることを考慮し、改質プロセスによるPTFE膜の汚染がなく、かつ高い耐化学薬品性を維持できるように開発したものである。

乾き難さの指標である純水でのKL値は、改質時間で制御でき、約5分間の処理で40psi以上のKL値を実現できる。また、減圧濾過サイクルは、微量な表面改質に敏感に検出し、僅か20秒の処理で流量比が0.8まで急激に増加することが解った。

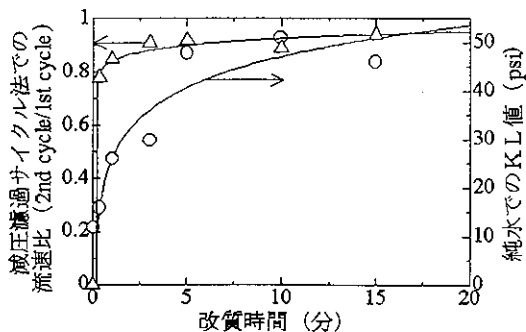


図5. 最新表面処理法による乾き特性の改善

7. まとめ

ここまで論じてきたように、PTFEフィルターの乾き特性は、様々な因子によって支配されている。その中で我々は、主要因子である多孔質PTFE膜の乾き特性を、表面改質によって制御することに成功した。また、膜の乾き特性の評価法として、減圧濾過サイクル法と高表面張力流体でのKL値測定を紹介し、これらの結果から、実際の薬液交換時の乾き特性を推定できることを示した。

遺伝子情報を医薬品へ(その4)

ファーマコゲノミックス

塩野義製薬(株) 創薬研究所 主管研究員 坂 田 恒 昭

最近のトピックスとしてはヒトの遺伝子が従来10万と言われてきたが、実際にはこの予想よりもかなり少なく3万~4万であることがヒトゲノム計画より明らかになった。本章では遺伝子情報が解明されることにより、前回述べたような遺伝子情報から推測される蛋白質を創薬ターゲットに応用しようとする試みばかりでなく、個人個人の遺伝子情報の違いを解析して、個人個人に適した医薬品、医療を提供しようとするアプローチが実用化されようとしている。これがファーマコゲノミックスである。

2.1 はじめに

ファーマコゲノミックスは語句の定義としては「遺伝子配列の変異(遺伝子多型)を薬理的な現象に結びつける研究分野」(NIH, FDA)であり、またそのコンセプトとして「個々の患者の遺伝的特徴を把握し、各々の患者に至適の薬剤を最適の用法用量で与えること」にある。同じ薬であっても患者個人個人の遺伝的背景の違いにより副作用もでる可能性があり、また薬に対する応答性(薬効)にも差が出る。一般的に既存薬の1/4~1/3は患者がレスポンスしないか、しにくいといわれている。

遺伝子多型とは、遺伝暗号のうち人口に対して1%以上の頻度で存在するものであり、①塩基の欠失や挿入(インサクション/ディレーション多型)、②繰り返し配列の回数(マイクロサテライトなど)、③一塩基多型(SNP, RFLP)が挙げられる。このうち最も重要で現在着目されているのは、SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) であるが、これについては下記に詳しく述べる。

欧米大手の製薬企業では、既にファーマコゲノミックスが製薬企業に与える多大な影響を予測し、遺伝子診断を含む技術開発に積極的に取り組んでいる。例えば、Glaxo Wellcomeでは、現在全ての臨床開発品にファーマコゲノミックスの視点を組み入れていると言われている。

また欧米の行政当局も医療コストの削減、医療質的改

善などさまざまな視点からサポートしている。一例として、臨床試験にファーマコゲノミックスのコンセプトを取り入れた Genentech 社の乳癌治療薬である HER2 遺伝子産物に対するヒト型モノクローナル抗体ハーセプチンが過去最短の審査期間(申請後3ヶ月)で FDA に承認された。これは米国に於いて16万人の乳癌患者について調べてみた結果、late stage にある患者の内25~30%の患者において HER2 の高発現が見られた。治験においてこれらの患者だけを対象にしてハーセプチンとタキソールの併用効果を見たところ、半分の患者に50%以上の腫瘍縮小効果が認められたことによる。

2.2 ファーマコゲノミックスの必要性

従来、医薬品の開発は、数多くの化合物のライブラリにより経験に基づくスクリーニング法により開始されることが多かった。しかし、今や医薬品はより科学的な根拠に基づき創製されることが要求されている。ファーマコゲノミックスは、医薬品開発における数多くの局面に多大な影響を及ぼすことが期待される(図1)。

ファーマコゲノミックスのインパクトとして(1)探索研究段階としては、遺伝的多様性に影響されることが少ないリード化合物の選定が可能である。(2)前臨床段階として、より高い精度でヒトでの効果・副作用予測が可能である。(3)臨床開発段階では、遺伝的プロファイルが合致する患者に特化した臨床試験計画の立案が可能である。高い有効性・安全性の実現である投与量の最適化によって、他社競合品との差別化が可能である。(4)医療現場としては、患者に適した薬剤を選択するために、遺伝子診断の発展を促すことができる。患者の遺伝的背景に応じた薬剤の選択・投与量設定が可能である。上記の実現・進展によって①より正確な市場規模の予測が可能である。②少数の重篤な副作用のために開発を中断した薬剤の再評価・再開発が可能である。③上市までの研究開発経費・期間の削減・短縮が可能である。④承認の成功確率向上・適応症の拡大・他剤との差別化・マーケットシェアの拡

ゲノム創薬研究のプロセスとファーマコゲノミクス

(野口照久:第2回ゲノム創薬フォーラム)

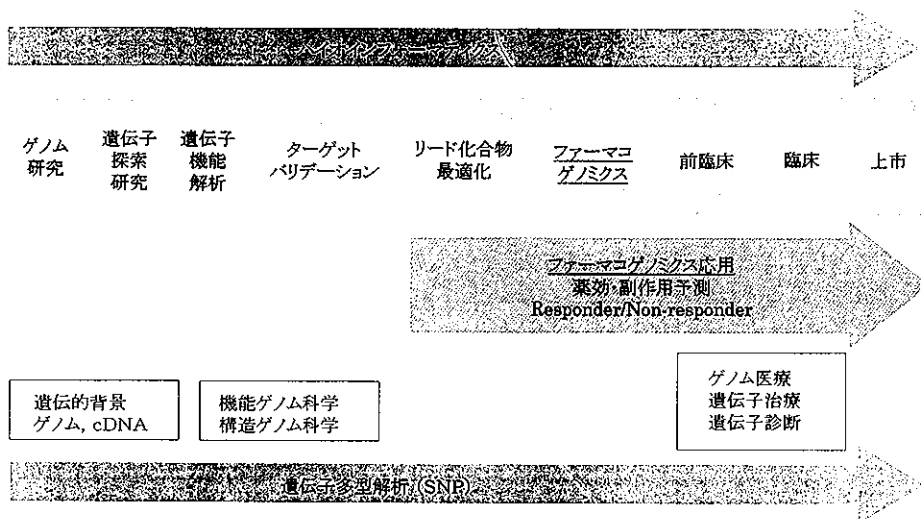


図1. ゲノム創薬研究のプロセスとファーマコゲノミクス

(野口照久:第2回ゲノム創薬フォーラム)

大が可能である。⑤副作用発現頻度の減少による、患者・医療供給側の経済的負担が軽減される。ことが、もたらされると期待できる。

例えば、上記のうちの経済効果に与える影響の例として、米国では1994年の処方箋が30億に対して221.6万人の薬による副作用患者が発生し、10.6万人が死亡している。これは、心臓疾患、癌、脳卒中について死因の4番目であるという。使用された医療費は約700億ドル(約8兆円)にもなると言われている。この副作用の内、薬物代謝酵素、トランスポーター等の遺伝子多型により生じるものについてはファーマコゲノミクスを用いることにより防ぐことができるのではないかと期待されている。

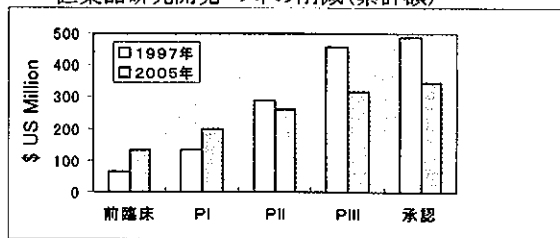
また、医療費の抑制にも貢献できると期待されている。個人個人の薬物代謝酵素遺伝子群などの遺伝的背景によって、その薬効や副作用の出現が類推できるようになれば、個人個人に最適な薬剤と投与量を投与前に決定できるようになる。薬効の期待できない薬剤は使用しないでよいし、副作用が出る可能性が高い場合は、低濃度から投薬を開始することができる。これらは患者の医療コスト低減につながる。

医薬品開発においては、ファーマコゲノミクスを利用することにより、過去に不認可になった医薬品の救済

ファーマコゲノミクスの有用性予測

(Pharma 2005 - Price Waterhouse Coopers)

医薬品研究開発コストの削減(累計額)



開発ステージ移行率の向上

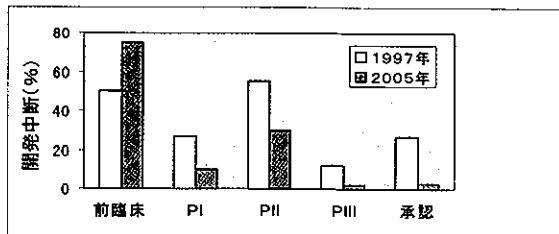


図2. ファーマコゲノミクスの有用性予測

(Pharma 2005-Price Waterhouse Coopers)

になる可能性もある。例えばフェーズII及びIIIの臨床データから、効果の群が存在していた医薬品を選びなおし、遺伝的背景との関連を見出すことにより、限定した患者に対する特定医薬品として再開発することができるかもしれない。もっともこのことによりある特定の医薬品を使用する患者の数が減少し、単位医薬品当たりの売上減少という問題が起こるかもしれない。

ファーマコゲノミックスは医薬品の開発コストやステージ移行確率にも影響を与えていると言われている。図2にファーマコゲノミックスに基づいた医薬品開発が行われていると予測される2005年における医薬品研究開発コストの低減と、臨床段階におけるステージ移行率の向上からみた有用性を示した。

また、遺伝子診断を行うことにより、病気に対する発症の確率を予測して、治療薬という概念ではなく、予防薬が普及するかもしれない。

2.3 一塩基多型 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) によるファーマコゲノミックス

SNP マーカーは、300~1,000 ベースに一箇所あると言われている。ヒトの全ゲノムは30億塩基対であるので、計算上 SNPs はヒトにおいては300万個存在することになる。また、SNPs は人種人種で独自の SNPs が有り、またその頻度も異なるとされる。

この SNPs は、疾患に対してのかかり易さかかり難さ、薬剤感受性、薬剤の副作用に関係していると言われ個人の医療を考えるときに重要な指標になる。また、製薬企業にとっては臨床試験の効率化にも期待されている。

例えば、抗癌剤5-フルオロウラシル(5-FU)の不活性化酵素ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼでは、個人の活性の差が10倍もの差が遺伝子多型により生じるとされている。抗癌剤イリノカテンでは、50倍もの差が遺伝子暗号の違いにより生じる。スタチンにおいても、CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) の遺伝子多型が臨床有効性に影響を与えているという報告がなされている。

また、薬物代謝酵素に関しては多くの酵素に遺伝子的多型がみられることが知られており、これが薬物代謝に個人差が見られる原因になっている。薬物代謝酵素には、シトクロム P450 (CYP450) で代表される主に小胞体にある酸化還元・分解反応に係わる Phase I 酵素 (CYPs, NQO, ADH, ALDH など) と無毒化・排泄に係わる Phase II 酵素 (NAT, TPMT, UGT, GST など) とがある。薬物の約50%が CYP450 により代謝されると言われるが、CYP450 には遺伝子多型が認められ、CYP450 の分子種である薬

物代謝の35%を担う CYP2D6, CYP2C9 にも遺伝子多型があることが分かっている。CYP2D6 あるいは CYP2C9 の遺伝子多型が、子宮筋収縮薬スパルテインや抗てんかん薬メフェニトインのクリアランスに関係していることが報告されている。

我が国においても、SNPs プロジェクトが精力的に行われている。先に述べたように、SNPs の位置、頻度は人種により異なるために、日本人の集団で SNPs 解析を行うことは日本人の医療を考える上で意義あることである。2000年よりスタートしたミレニアム計画によって、東京大学医科学研究所が文部科学省関係の科学技術振興財団 (JST) のプロジェクトで日本人ゲノムの SNPs の位置決めが行われている。この計画では、2年間で15万箇所の SNPs を同定することになっている。また、日本バイオ情報化コンソーシアム (JBIC) のプロジェクトの標準 SNPs 頻度解析センターで、それら位置決めされた SNPs に関しての頻度解析が行われている。

一方で日本人集団の薬剤代謝酵素関連遺伝子群については、日本製薬工業会のプロジェクトとして日本の製薬企業全体のプロジェクト (ファルマ SNP プロジェクト: pSNPs) として精力的に行われている。

現在、世界で最も充実した SNPs のデータベースは、米国国立衛生研究所 (NIH) 傘下の国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) が管理運営している dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) で、2001年1月現在で255万個の SNPs が登録されている。

2.4 ファーマコゲノミックスの実用化予測

Abbott 社の Zylflo は、1997年米国において慢性喘息治療薬として上市されたが、臨床試験で4%の患者に肝障害が起きて、肝機能モニターが義務付けられた。Abbott 社は Genset 社との共同研究で、副作用とリンクする SNPs を同定した。これによりこの医薬品を処方する際に患者の DNA マーカーを検査するとして、SNPs に基づく患者の選別処方を盛り込んだ gPOC (遺伝的投薬基準) ラベルを FDA に申請中であり、認可の見通しである。

この後2001年中にはヒト SNPs マップが完成する。2003年にはヒトゲノムシーケンズ完了を受けて10%の新薬が gPOC を表示し、2010年には30%の新薬が gPOC を表示すると予測されている。また、2005年には最初の SNPs に基づいた予防薬も承認されると予測されている。

今後、SNPs マッピングなどの遺伝子診断が、大きな着目を浴びることになるであろう。このために迅速で大量の SNPs を正確に同定できる技術の開発に向けて、精力的に研究が行われている。現在のところ SNPs の解析

方法には、Invader 法、TaqMan 法、Primer Extension 法、RCA 法、Sniper 法、MALDI-TOF/MS 法などがある。

ただし、今まで述べてきたように、ファーマコゲノミックスの利用による有用性ばかりではない。有用性と表

裏一体にある影の部分にも注意を払う必要がある(図3)。影の部分としては、DNA 多型と疾患の関係が明らかにされ、これらの疾患に関して遺伝子診断が行われるようになると、プライバシーの侵害、社会的差別、出生前診断のような生命倫理の問題も起こる事となる。

ヒトゲノム解析に基づく研究がもたらす光と影

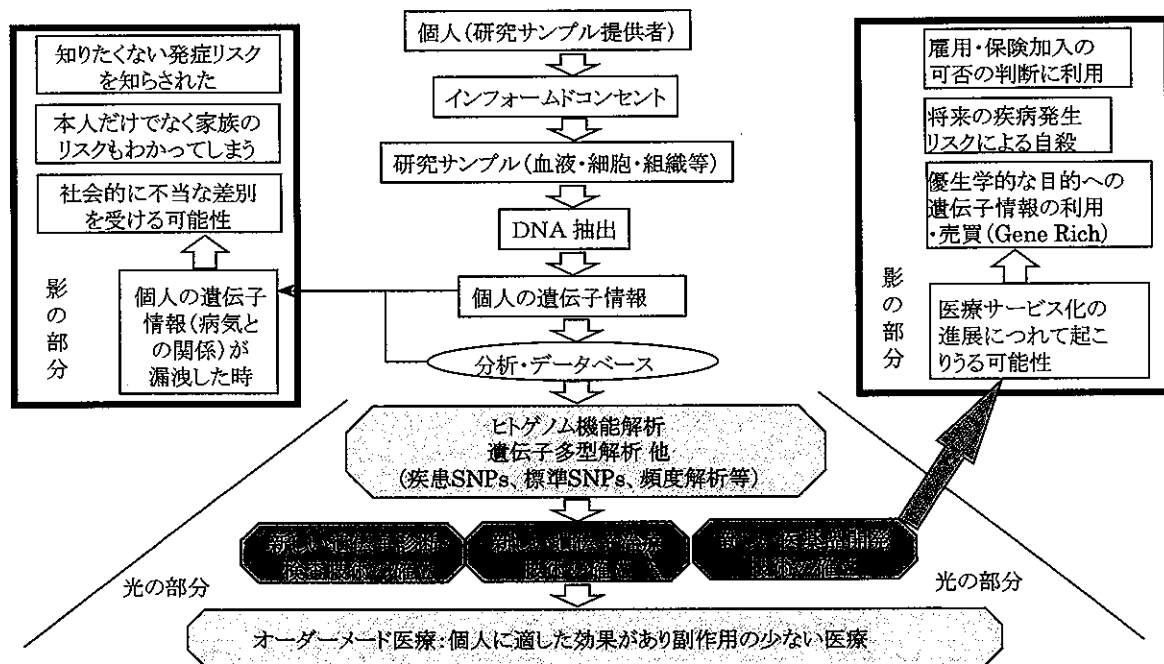


図3. ヒトゲノム解析に基づく研究がもたらす光と影

米国では既に家族の遺伝子診断がもとで、健康保険加入が断られるということが起きている。もちろん遺伝子診断の結果により、保険料にも影響すると言われている。また、遺伝子診断の結果による癌、アルツハイマー病など、および現在のところ有効な治療法の無い病気の発症確率を知ることが、はたして本人のためになるかどうか十分議論されるべきであろう。ミレニアムプロジェクトを始め、現在進行している遺伝子研究の際もその遺伝子材料の提供者、血縁者に対する人権及び利益の保護を十分図ることが必要である。そのために、十分なインフォームドコンセントを取るなどの遺伝子解析研究に対しての倫理問題等に対する指針が示されている。

また、SNPs に関する特許の問題も議論され、単に

SNP 多型を見出しただけでは特許性は無いが、診断と言う産業上の有用性を謳うことにより一定範囲の物質特許の取得が可能になると思われる。

参考文献

1. ファーマコゲノミックス (財)ヒューマンサイエンス振興財団編 (財)ヒューマンサイエンス振興財団。
2. 21世紀の創薬科学 辻本豪三・田中利男 編 共立出版(株)。
3. ゲノム創薬フォーラム 第3回談話会 ゲノム創薬フォーラム。
4. 飯田 有俊, 田中 敏博, 関根 章博, 齋藤 督, 中村 祐輔: SNP による Pharmacogenomics 実験医学 19: 738-742 (2001)。

魚の寄生虫の話 (その2)

寄生性原虫とその生態

千葉県衛生研究所 医学博士 福田 芳生

1. はじめに

前回、寄生虫病の現場とも言うべき表皮と鰓の構造及び機能について概説しました。ここで一寸おさらいをしておきましょう。実際、魚の表皮には角化層がありません。それは水中という特別な環境への適応なのですが、その代りに粘液腺が発達していて、水中に混入した種々の化学物質の刺激から身を護ります。

ところが、身を護るはずの粘液は時間の経過と共に効力が薄れ、細菌や寄生虫類の栄養源へと転化します。鰓ではどうでしょうか。本来分離しているはずの二次鰓弁が融合して、ガス交換の能力が著しく低下します。この二次鰓弁の融合した鰓は、全体に棍棒に似ているので、魚病理学者は“棍棒化”と呼んでいます。

それは呼吸上皮や二次鰓弁基部の上皮が、異常に増殖することから起こる病的な変化です。この異常な組織は、やはり寄生虫にとって貴重な栄養源になります。さて、今回お話しする魚の寄生性原虫はミクロの大きさとはいえ、私達の想像を遙かに越えた、実に奇怪な形のものがいます。この寄生性原虫は海水魚にも淡水魚にも存在します。ここでは淡水魚に絞って述べることにします。前口上はこの辺にして、皆さんを魚の寄生性原虫の世界に御案内しましょう。

2. 寄生性原虫各論

動物性鞭毛虫イクチオボド

水中生活を送る単細胞の植物のなかには、体の末端に細長い鞭毛を持っていて、それを左右に激しく振りながら運動するものがあります。それらは鞭毛藻類と呼ばれています。寄生性原虫のイクチオボド・ネクトールは鞭毛藻類に似ていますが、体内に葉緑素を持たず、体の仕組みも動物そのものなので、動物性鞭毛虫として他と区別されています。

寄生生活に入ったイクチオボドの虫体は扁平な水滴状で、長さ7～8ミクロン、幅4～5ミクロンあります。宿主を求めて水中を泳いでいる時は長方形に近い体つき

をしていて、細胞口は体側に存在します(図1a, b)。この細胞口の近くから長短2本の鞭毛が伸び出しています。

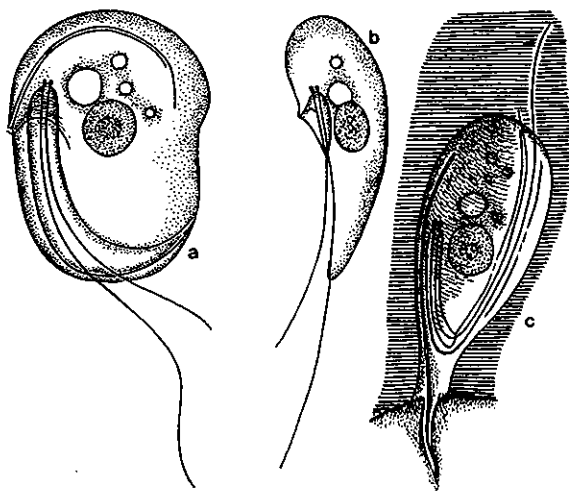


図1. 動物性鞭毛虫イクチオボド

a～bは長短2本の鞭毛を動かして、自由生活を送る虫体。aは正面、bは側面。cは宿主の体表に取り付き、細胞内に鋭く尖った虫体末端を刺入して、養分を吸飲している状態。(ジョンとロムより改写)

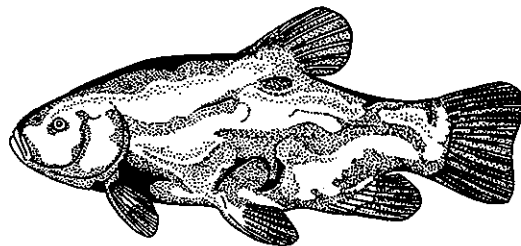


図2. イクチオボドの寄生により、白雲病に陥ったフナの間 (デュウジンより改写)

イクチオポドは、この鞭毛を激しく動かして水中を泳ぎ回ります。うまく宿主に巡り合うと、体はたちまち水滴状に変わり、細胞口は尖った虫体の末端に移動します。この末端部は、まるで鋭い注射針にそっくりです。この注射針をキンギョやコイの表皮細胞や鰓の呼吸上皮内に刺し込んで、細胞内の養分を吸飲します(図1c)。少数のイクチオポドが取り付いても魚は平気なのですが、表皮や鰓に高密度で寄生された際、ひどいことになります。

まず表皮では、注射針のような突起で絶えずチクチクと刺激されるので、大量の粘液を分泌します。この粘液で体表を厚く覆われた魚は、体表に白い雲が浮いているように見えるので、“白雲病”と呼ばれています(図2)。実際はそんなロマンチックなものではありませんが、鰓それも二次鰓弁では、寄生部位に激しい炎症が起こり、浮腫に陥ります。そのため鰓全体が膨化するので、鰓蓋

が閉まらなくなります。そうなっては鰓呼吸ができせんから、魚は間もなく死亡します。

イクチオポドは宿主表面で盛んに縦方向に分裂し、個体数を増します。そして、2週間以内に体表や鰓表面を覆い尽します(図3)。生息環境の悪化や宿主の死亡時に、イクチオポドは魚体より離れて、直径10ミクロン前後のシストを形成し、状況が好転するまで水底でじっとしています。真に恐るべき寄生性原虫と申せましょう。

繊毛虫キロドネラ

繊毛虫といえば、読者の皆さんは水中を活発に泳ぎ回る、長楕円形のゾウリムシを想い浮べるのではないのでしょうか。その仲間のキロドネラ・キブリニイは、コイの表皮や鰓に寄生する最もポピュラーな繊毛虫となっています。

虫体は丸味を帯びた半月形で扁平、長さ30ミクロン、幅20ミクロンほどあります(図4a)。背側には何ら特別な装置は認められませんが、腹側には細胞口と運動のための繊毛が並んでいます。キロドネラは、この繊毛の存在によって、繊毛虫類の仲間入りをしています。

虫体の構造をもう少し詳しく述べますと、腹側前方に直径3ミクロン前後の円形をした突出部があります(図4b)。その中央に細胞口が位置します(図4c矢印)。口器内側に合計20本内外のキチン質の棒(桿状体)を備え、細胞口の支持装置となっています。このような支持装置を欠く前記の動物性鞭毛虫イクチオポドは、生活様式の変化に応じて、細胞口の形や位置を自在に変えることができます。それは一見、ひどく進んでいるように見えますが、原虫類の進化という観点からすると、細胞口の形状が恒常的に維持されているものが、より上位にあります。

腹側両サイドに弓形の繊毛列があります(図4b, c)。この繊毛列の数は体左側では6列前後、右側では5列あり、個体によっても若干のバラツキがあります。キロドネラを電子顕微鏡で観察すると、多くの場合繊毛が失われているのが分かります。以前、繊毛のあった場所に沿って、弓形の線条が走っています。その内側に等間隔で並ぶ直径0.2ミクロンほどの微細な顆粒状構造(図4c)は、繊毛の付着装置です。

キロドネラでは先述のように、繊毛列の数が虫体の左右で異なることから、遊泳時に繊毛列の多い方向へ緩く回転します。キロドネラは宿主の表皮や鰓表面で横分裂し、個体数を増します。生息環境の悪化に伴い、長径40ミクロンほどのシストを形成し、水底に潜んで好機を窺います。

このキロドネラは魚にとって有害か否かが、魚病学者の間で問題になっています。筆者は以下のような理由か



図3. キンギョの鰓に寄生する動物性鞭毛虫イクチオポド

a~bは密集するイクチオポド。写真aの左端では、末だ鞭毛を備えている。bは虫体をやや拡大したもので、鞭毛は消失している。

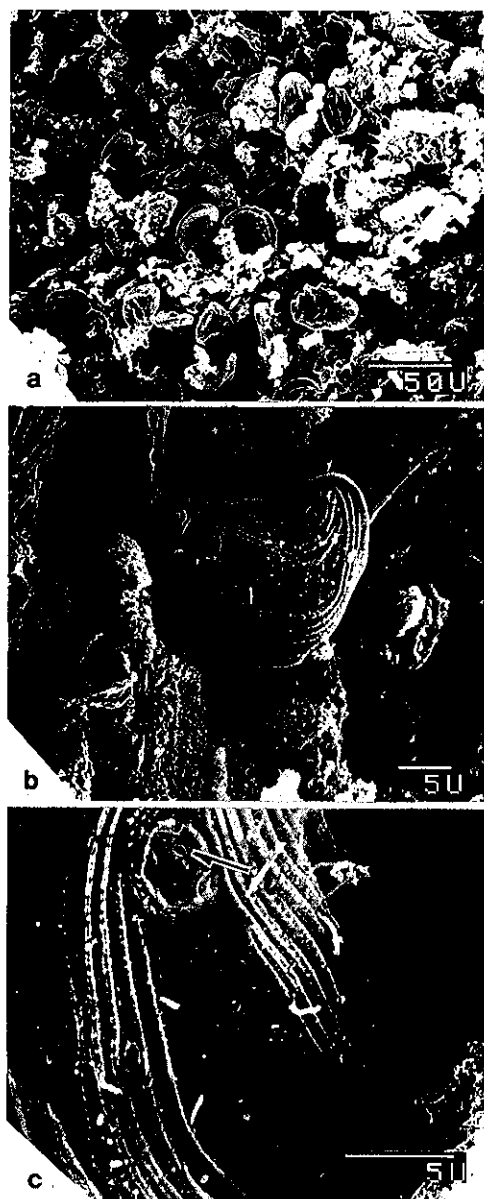


図4. 纖毛虫のキロドネラ

aは棍棒化したニシキゴイの二次鰓弁表面に密集する虫体。**b**は虫体腹側。半月形の虫体両側に弓状の線条が見える。左端の円形の突起は細胞口。**c**は細胞口(矢印)の周辺部を拡大して示す。線条内側の微小な顆粒は、纖毛の付着装置(Uはミクロンを表す。後続する他の写真も総べて同様である)。

ら、有害と考えています。キロドネラが棍棒化した鰓の組織間隙に侵入し、壊死に陥った上皮細胞の崩壊産物を摂取しているうちは、本種は益虫ということになります。しかし、水質が改善され、鰓の呼吸上皮が再生して、呼吸機能が常態に復しても、キロドネラは居すわり続けます。そして、再生した呼吸上皮表面を動き回り、腹側前方の細胞口で上皮表面の細胞質を吸飲します。その結果、呼吸上皮表面が傷付き、そこに滑走菌フレキシバクター・カラムナリスや水カビの胞子を取り付けて増殖しますから、はっきり害虫の仲間とみなすことができます。

それは外国の軍隊が入って来て、敵を追っばらってくれたのはよいのですが、そこに恒久的な軍事基地を構えて居すわり、法外な要求を突き付けるのとひどく似ていますね。

纖毛虫トリコディナ

トリコディナはキンギョやコイの表皮、鰓に寄生する纖毛虫の仲間です。虫体は丈の低い円盤形をしていて、直径30~40ミクロン、高さ10ミクロンほどあります。円盤の背側や腹側周縁部には、それをぐるりと囲むように、纖毛がびっしりと生えています。この特異な纖毛の様子から、周毛虫と呼ばれています。背側(円盤上側)のものを纖毛環、腹側(円盤下側)のものを纖毛帯と呼んで区別します(図5a, 図7)。

誰でも口は、魚体に接する腹側にあると思っているでしょう。驚いたことに、トリコディナでは細胞口が背側にあります(図6a矢印, b)。虫体腹側の纖毛列を纖毛帯と呼ぶのは、4~5本の纖毛が縦方向に隙間なく並んで1束となり、この束がずらりとリング状に並列することによって、虫体はコマのようにクルクルと回転しながら水中を泳ぎ、宿主の表皮や鰓に付着します。

虫体背側の纖毛環は水中の微小な有機物を集め、細胞口に送り込むためのものです。このトリコディナは宿主の体表で、横分裂によって増殖します。虫体の活力が衰えると、有性生殖を行って若返りを計ります。トリコディナの仲間の大きな特徴は、虫体腹側にキチン質の複雑なリングを備えていることです(図5b, 図7)。このリングを原虫学の専門家は、歯状環と名付けています。常に体内にあって、円盤の支持装置の役目を負い、細胞膜が破れでもしない限り、体外に露出することはありません。

このトリコディナは水中を漂う細菌類や水カビの胞子、表皮や鰓の上皮細胞の崩壊産物を摂取するので、魚にとって有難い存在なのだとする意見があります。筆者は、このトリコディナについても害虫の一種と考えています。

その根拠はトリコディナが鰓弁の上皮表面に密着した

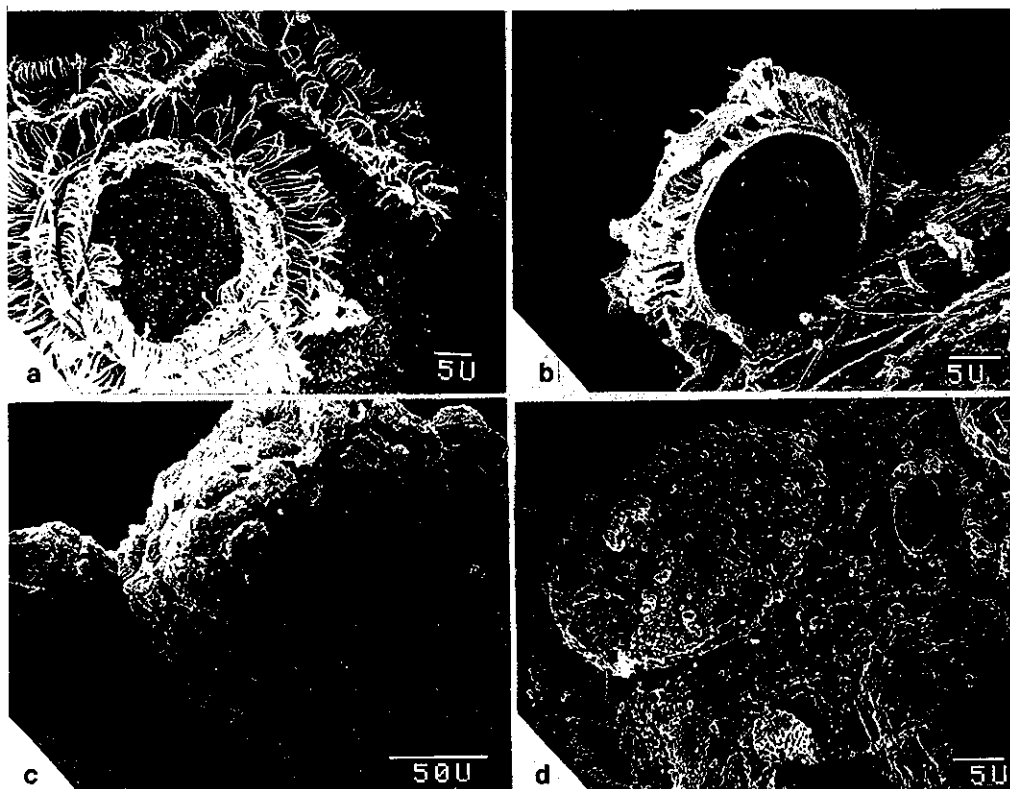


図5. 繊毛虫トリコディナとその付着痕。a~bは円盤形のトリコディナ本体。aは背側で、繊毛環が保存されている。bは腹側。歯状体環の様子がよく分かる。c~dは付着痕。cは低倍率像。dは付着痕の1つを拡大したもの。手前に2個の粘液腺が開口している。

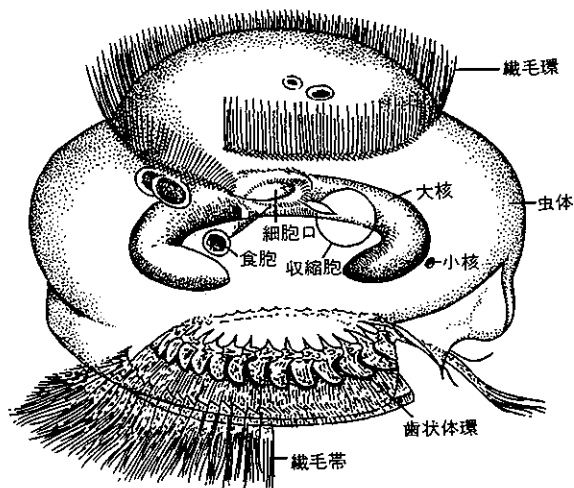


図7. 繊毛虫トリコディナの解剖図(ウズマンとステックニより改写)

際、そこに扁平なドーム状の圧迫痕を形成するからです(図5c, d)。それは虫体下面のリング周囲にある細胞質が、強く収縮することによって引き起こされたものです。この扁平なドーム状の圧迫痕表面では、異常な刺激により粘液分泌が活発になります(図5a)。このような粘液は有害な細菌類や他の寄生性原虫のよい栄養源になりますから、その原因となるトリコディナは、魚にとって有害とみなさなければなりません。

膜口類繊毛虫イクチオフチリウス

水槽でキンギョを飼っていると、体表一面に直径0.2~0.5ミリメートルほどの白点が出現することがあります。(図8a, b)。それを指して白点病と呼びます。この白点病は、膜口類繊毛虫イクチオフチリウス・マルチフィリスの子虫が、宿主表皮の細胞層基底部に侵入することから起った病変です。

イクチオフチリウスの子虫が表皮細胞層の隙間を激しく動き回ります。それが引き金となって、表皮細胞が増

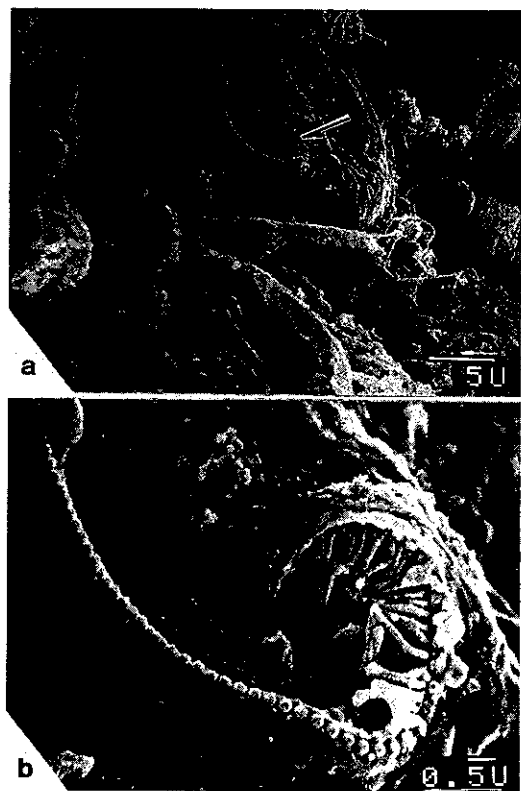


図6. 繊毛虫トリコディナ

aは円盤形をした虫体背側に開口する細胞口(欠印)。繊毛環が消失したため、細胞口が姿を現したもの。**b**は細胞口を拡大して示す。

殖した結果、体表にドーム状の隆起が出現します。その内部に子虫が入っているの、虫室ということになります。この虫室が白点として、私達の目に止まるようになったのです。虫室内で子虫は1週間ほどで成体となり、宿主より脱出しますから、イクチオフチリウスの寄生によって魚が死亡するようなことはありません。子虫は洋梨子形で長さ30ミクロン前後ありますが、成体では実に500ミクロン以上に達します。

子虫は虫室内で1週間前後の短期間に、元の10倍以上の大きさになります。その間、全く食物を摂らずに成長できるのでしょうか。それを筆者は次のように考えています。子虫は虫室内で表皮細胞の分泌物をせっせと取り込んで、体の増大を図るのではないのでしょうか。ここで、イクチオフチリウスの生活史について述べましょう(図9)。

まず、虫室より成虫が脱出します。その体内に等分割により生じた多数の子虫を保持しています。そのことから

成虫を母虫あるいは栄養体と呼びます。子虫の数及び大きさは水温に左右されます。例えば水温が5℃の時、1個の母虫内の子虫は100個ほどで、大きさも50ミクロン前後あります。一方、25℃に上昇すると、子虫は2000個以上に達し、その大きさもやや減じて30ミクロンといったところです。

大量の子虫を体内に蔵した母虫は、水底に沈下した植物の茎や葉の表面に付着し、静止しています。やがて、体壁の一部が破れ、そこから一斉に子虫が遊出します。そして、宿主を探し求めます。この子虫の運動は、体の周囲に生えている繊毛を用いて行われます。この時、子虫がうまく宿主に取り付くことができないければ、24時間以内に死滅する運命にあります。厳しい生活条件下にある自然界では、宿主に巡り合うチャンスが乏しい上、子虫の寿命が限られていることから、1個の母体内にかくも大量の子虫を持つようになったのでしょう。

ドーム状の虫室外壁を電子顕微鏡で観察すると、そこに多数の粘液腺が開口していることが分かります。その結果、虫室外壁は粘液により厚く覆われ、さらに太い粘液糸となって周辺部に伸び出しています(図8c,d)。それはあたかも、粘液性のネットを被せたと表現したらピッタリかもしれません。ドーム状の虫室が白っぽく見えるのは、虫体内の小顆粒が光を乱反射するからだとする説があります。その他に、前記の粘液性の被覆物が白く光って見えることも原因になっているように思います。

ここで繰返すまでもなく、それらの粘液は間もなく有害な細菌類や寄生性原虫類の栄養源となるので、成体が虫室より脱出したからといって、安心できません。この脱出は成虫の体からタンパク分解酵素を放出し、細胞壁を溶解するのだと考えられています。

粘液胞子虫ミクソボルス

これは今迄述べて来た動物性鞭毛虫や各種の繊毛虫類とは、全く異なった魚の寄生性原虫です。粘液胞子虫類はキチン質の殻を被った胞子を形成し、増殖します。キチン質の殻に包まれた胞子は、水温の低下や乾燥に強い耐性を示します。胞子は種によって実に様々な形をとり、まるでみ殻に包まれた穀類の種子のように見えるヘネグヤ(図10)や梅干のタネのような外観をものまであります(図11)。ヘネグヤの電子顕微鏡写真を人に見せたところ、「福田先生、麦の種子の研究を始めたのですか」と本気で質問されたほどです。このヘネグヤは胞子の末端から伸び出した1対のムチ状の突起を、激しく左右に振りながら水中を泳ぎます。

さて、淡水魚に見られる最も一般的な粘液胞子虫は、ミクソボルス・コイでしょう。胞子は尖った洋梨子形を

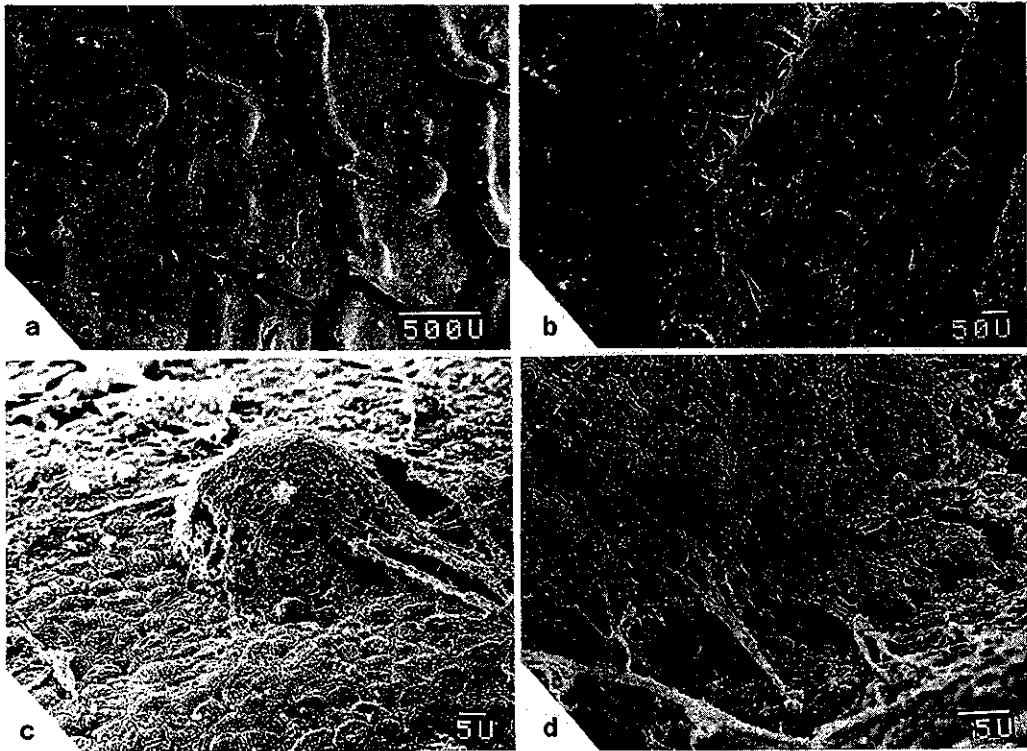


図8. 白点病に罹患したカムルチー。a~bは表皮表面に出現した繊毛虫イクチオフチリウスの虫室。bの虫室は通常のもの2倍ほどあり、内部に2個体の原虫が入っている可能性が高い。c~dは粘液に覆われた虫室を示す。dは虫室外縁部の拡大。白色の太い繊維状構造は粘液糸。

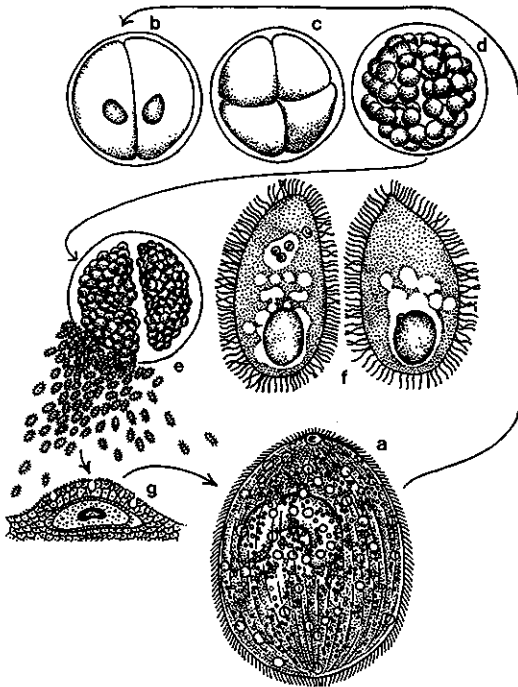


図9. 口膜繊毛虫イクチオフチリウスの生活史。

aは虫室より脱出した母虫。b~dは母虫内で等分割により、多数の子虫が誕生する様子を示す。eは母虫の体壁が破れ、そこから子虫が遊出して行く。fは繊毛で覆われた西洋梨子形の子虫を拡大して示す。gは宿主表皮下に侵入し、虫室を形成する。子虫は、ここで一気に500ミクロン以上の大きさに達し、母虫となる(バウアーより改写)。

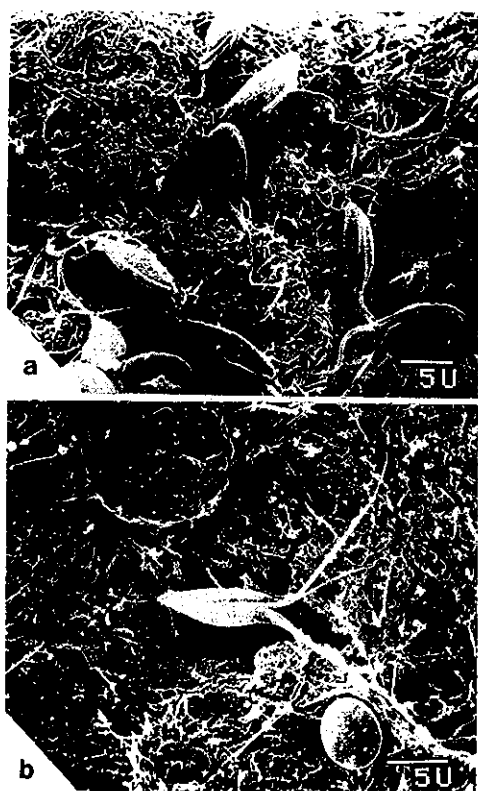


図10. カムルナーの表皮潰瘍部に付着する粘液胞子虫類ヘネグヤ

このヘネグヤの胞子はもみ殻を被った穀類の種子に似ている。**a**では胞子末端の長大な2本の突起は閉じられている。**b**は開いた状態。

して、殻の表面には特別な隆起や条線は認められません。大きさは長径7～8ミクロン、幅5ミクロンほどあります。鰓の血管内腔(図12a,b)や二次鰓弁の毛細血管内腔に胞子が充満していることがあります。それは異物性の血栓と呼ばれるものです。その状態では鰓の血流が著しく阻害されるので、魚は呼吸困難に陥り、死亡する個体も少なくありません。また、二次鰓弁内部にシストを形成することがあります(図13a)。シスト内部の胞子はゼリー状の物質中に埋没しています(図13b)。それは未成熟な胞子の保護と栄養分を補給するためです。

魚の体内に入った胞子は、血流に乗って鰓や表皮下の結合組織の隙間に到達します。すると、細い弾力性に富んだ糸を勢いよく発射して、それを宿主の組織表面の突起に絡み付け、胞子を固定します。胞子が目ざす宿主の体内に侵入しても、血流中を移動し続けていたのでは、

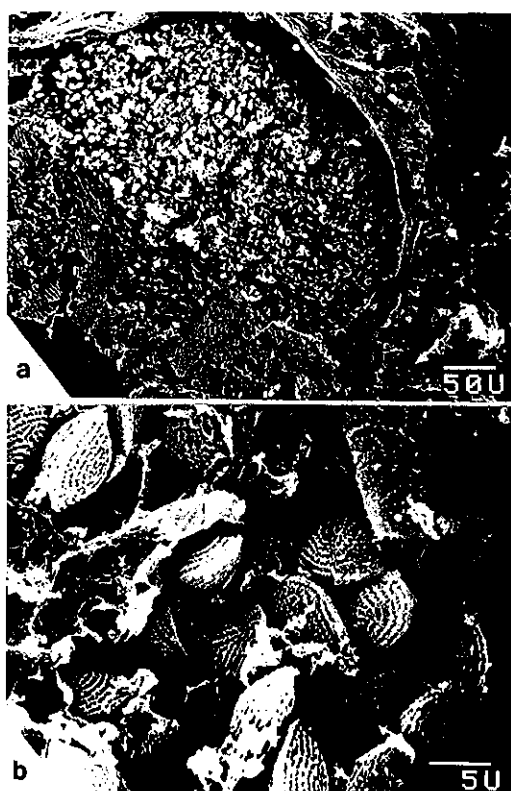


図11. ホトケドジョウの表皮下に形成された粘液胞子虫類のシスト。**a**はシスト断面の低倍率像。**b**はシスト内に充満する胞子群を示す。胞子殻の表面に複雑な隆起線が存在する。一見梅干のタネのような感じである。

キチン質の殻から動物本体が脱出することは難しいでしょう。従って、先きの弾力性に富んだ糸は、胞子を固定するためのアンカーと申せましょう。

胞子殻より脱け出したアメーバ様の動物本体は、鰓あるいは表皮下の組織隙間に潜り込んで、たちまち栄養体となり、多数の胞子母細胞を形成します。1個の胞子母細胞から減数分裂により、2個の胞子が誕生します。各栄養体内部の胞子母細胞の数は数千個にも達します。それらの胞子がシスト(=栄養体)より水中に解き放たれ、新たな宿主の体内に侵入すべく機会を狙っているのですから、全く油断がなりません。このように見て行くと、水中を悠然と泳いでいる魚も私達人間同様、生きるために大変な苦勞を嘗めている訳です。次回は魚に寄生する吸虫類について述べることにします。

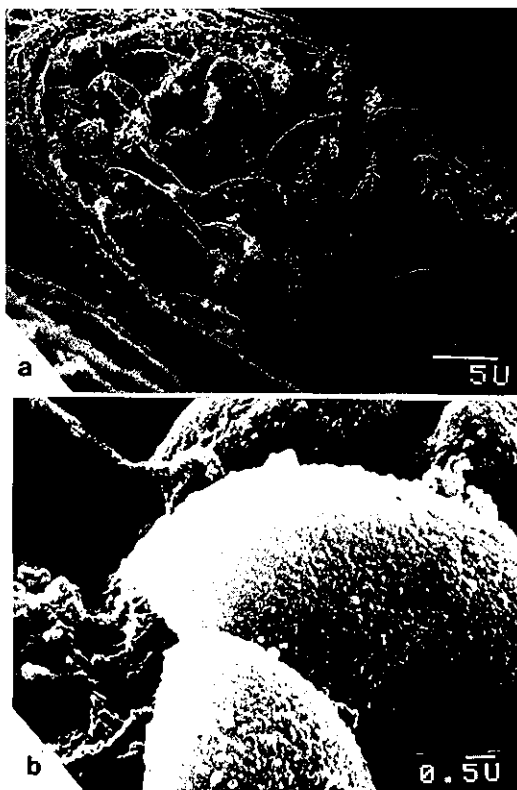


図12. 粘液胞子虫ミクソボルスによる異物性の血栓。
aはコイ鰓の血管腔を埋め尽す胞子。bは血管内の胞子の1つを拡大して示す。

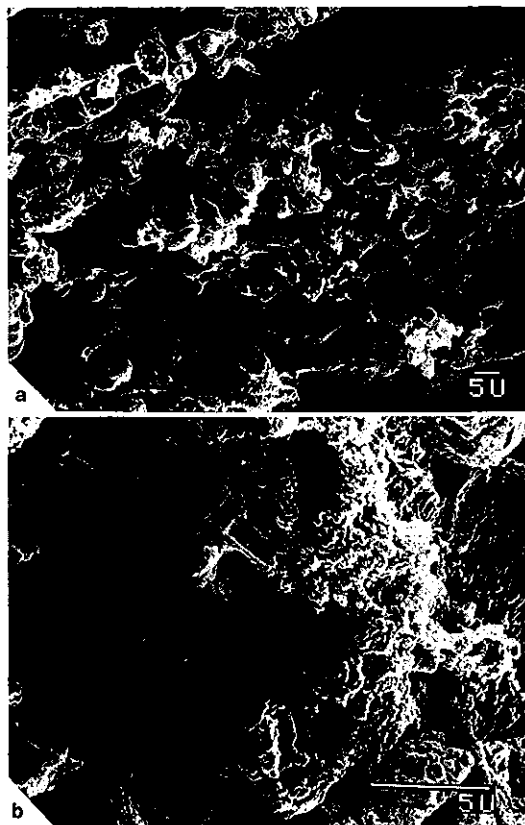


図13. コイの二次鰓弁内部に形成された粘液胞子虫ミクソボルスのシスト。aは胞子の充满するシスト断面の低倍率像。bはaの一部拡大で、ゼリー状の物質中に埋没する胞子を示す。

【お願い】 弊誌はご愛読者の皆様に年4回郵送しております。皆様方に確実にお届けするために郵送先の見直しを行っております。添付の用紙に、「送付先変更又は送付中止」の方のみ、FAX又はEメールで広報室・北原音作まで、ご連絡をお願い申し上げます。FAX 03-3279-5560 E-mail: chemiti-info@gms.kanto.co.jp

〈編集後記〉 6月初めに梅雨入りを迎え、今その衰っただ中で全国的に雨を降らし、暗い経済環境に拍車をかけているが、この梅雨に濡れた紫陽花、菖蒲が彩り、周囲に安らぎを提供している。また、プロ野球の本場メジャーリーグでは、イチロー・新庄両選手の予想を上回る活躍が、ファンの楽しみと気分転換に一役買っている。戦

後の日本は、世界の中の「もの作りの本場」を目標に、国民が一体となってついにその地位を確保したが、ここ最近、その地位が変化しつつある。再度、もの作りの原理原則をみつめ、梅雨に映える花、本場で活躍する両選手のような起爆剤を創出し、本格的な夏に向けて体力増強を図りたいものである。(三城記)



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 三城 侑三 平成13年7月1日 発行