技術にこころをこめて75年

HITACHI

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

AUTUMN 1985
VOL.28 NO.3

U.D.C.616-076.4:621.385.833.22:616.36-003.628.41

● 目　次 ●

特別寄稿

報　文

分析用電子顕微鏡の臨床医学への応用
—とくにトロトラスト沈着肝への適用について—

An Application of Analytical Electron Microscopy in Clinical Medicine : Detection of Thorium Deoxide in Thorotrast Administered Patient

入江　宏*　森　亘**　森　武三郎***　斎藤　司****

(昭和60年5月14日受理)

1. はじめに

透過型電子顕微鏡にX線元素分析装置を組みこむことにより，組織内に沈着する微量元素の分析が可能となって既に約十年が経過する[1),2),3)]。この分析用電顕の手法は今日，臨床医学上人体に沈着した様々の元素に拡大されつつある。その利点は組織に沈着する物質の形をそこなうことなく，本来の沈着した姿で分析出来ることである。本稿では，かつて医療診断用として使用されたX線造影剤であるトロトラストの沈着した患者の肝組織における元素分析にこのX線元素分析装置が極めて有効であった経験について述べたい。

2. トロトラスト沈着症とは

図1は腹部単純X線写真であるが，図の左側，即ち，肝臓に相当する部分と右側脾臓に相当する部分ならびに中央に白色網状と点状のX線不透過の陰影が描出されていることがおわかりいただけるだろう。経験のある医者はこの写真をみただけでこの患者が過去においてトロトラストというX線造影剤の注入をうけたためのトロトラスト粒子の沈着症の可能性を考えるだろう。それほど特徴的な写真である。**図2**は同一患者の腹腔内にカメラ(腹腔鏡)を入れてとった肝臓の表面の写真で，本来，平滑であるはずの肝表面は凹凸不整となり，その陥凹した部分に灰白色網状の沈着物のあることがわかる。こうした肝臓の変化は，トロトラストと呼ばれる後述するる異物粒子とその周囲の線維組織増生による一種の肝硬変といえるものであり，本来安全であるはずの医療用診断薬により生じた一種の医原病といえるものである。そもそもトロトラストなるものは，1930年にドイツのHyden社が製品化して市販した二酸化トリウム($^{232}ThO_2$)コロイド溶液のX線造影剤で副作用が少なく，造影力が

*　公立学校共済組合関東中央病院　臨床検査科　部長　東京大学医学部　非常勤講師
**　東京大学　教授　学長
***　科学技術庁放射線医学総合研究所　生理病理　主任研究官
****株式会社日立製作所那珂工場　応用技術センター

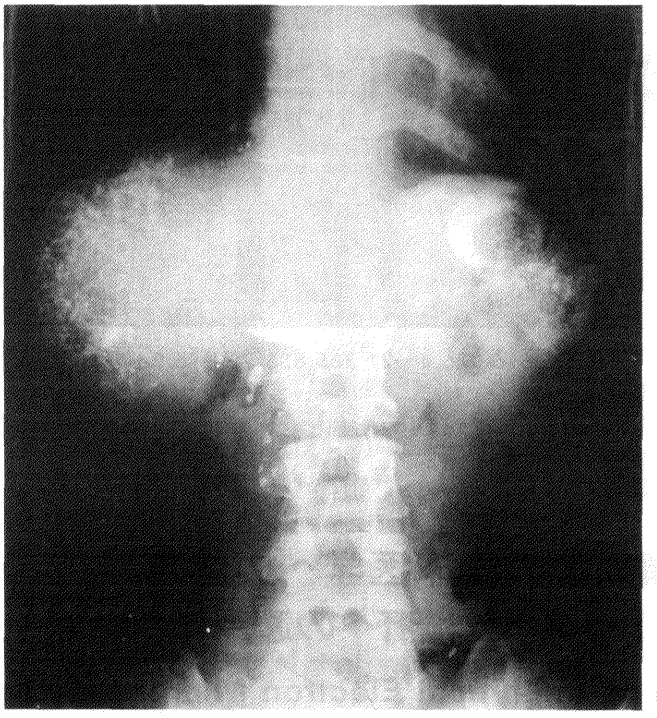


図1 56歳男性のトロトラスト注入後，35年後の腹部単純X線写真
肝臓と脾臓の部分を中心に，X線不透明な網状ならびに点状の陰影をみとめる。

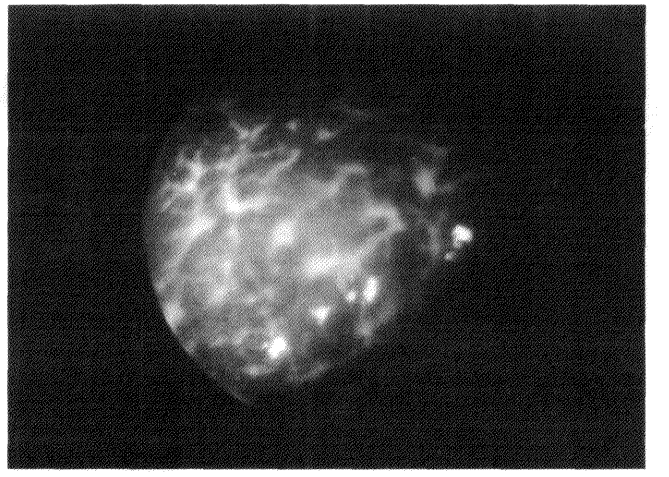


図2 図1と同一症例の腹腔鏡による肝臓の表面，肝表面は凹凸不整で，白色網状の紋理（トロトラストの沈着と周囲の線組化による）をみとめる。

良好なことから，日本をはじめアメリカ，ドイツ，イギリス，フランス，ポルトガルなどで主に血管撮影のための造影剤として1930年から1950年代まで使用された[4),5)]。日本においてはその患者数は2万人から3万人に及び，主に傷痍軍人で，戦傷の診断のための血管撮影時に注入されたものである[6)]。Thorium（以下Thと略す）なる元素は原子番号90，原子量232.0381の銀白色金属でその半減期は139億年とされる。この造影剤は使用当初から二酸化トリウムの生体からの排泄が極めて悪いうえに，その生物学的半減期は約400年と極めて長く，さらに微弱ながらα線を放射することから，それによる慢性の放射線障害が発生する可能性を使用当初から指摘されていた[7),8),9)]。1942年以降，本造影剤注入患者での悪性腫瘍の発生主に胆管癌，肝血管肉腫，肝細胞癌がつぎつぎに報告され，今日，医学領域で一口にトロトラスト沈着症といえば，悪性腫瘍の発生が頭にうかぶほどその率は高い[10),11),12),13)]。医療診断用として本来安全性がたしかめられてはじめて使用されるべき造影剤が，注入された患者の体内に長期に沈着し，しかもそのために癌が発生するなどは医療の進歩した現代においては考えにくいことであるが，こうした過去においてトロトラストを注入された不幸な患者は，現在日本に約250人の生存者が追跡調査され，国家的にも患者への補償の検討や研究班による収集がなされている。

3. 肝生検例への分析用電子顕微鏡の適用

電子顕微鏡的に詳細に観察するためには，組織を生検（患者の臓器の一部を診断の目的で針で穿刺して採取する方法）によって得るのが一番良いことはたしかである。私共は，56歳の男性で約35年前に戦傷による下肢の動脈瘤の診断のために血管撮影を行い，この際，トロトラストの注入をうけた患者を腹腔鏡下に肝生検を行い，肝組織内におけるThの分布について検討を行った。

i） 光学顕微鏡による観察

肝生検組織は半切し一部を10%緩衝ホルマリン液中に入れて固定し，パラフィンに包埋した。これをミクロトームにて2μ程度に薄切し，hematoxylin eosin染色を行い光学顕微鏡下に観察した。**図3**光学顕微鏡所見を示す。矢印は褐黄色粒子（トロトラスト粒子）の沈着を示すが，主にグリソン氏鞘といわれる肝臓内の胆管や血管のとおる個所（写真中央）に沈着していることがわかる（↓↓）。それは細胞内に沈着している如くみえるが細胞境界は不明である。肝小葉内の類洞の一部にも粒子をみとめるが（↓），細胞内か外かはっきりしない。そこで電子顕微鏡による観察が必要となる。

ii） 分析用電子顕微鏡による観察

肝組織の一部は分析用電子顕微鏡による観察をする目的で，4%グルタールアルデヒドで固定後リン酸緩衝液で洗滌，1%オスミウス酸で後固定を行いEPON812に包埋した。さらにLKB800を用い約700Åの超薄切片を作製し銅のメッシュに採取した後，未染のままのものとウラン・鉛二重染色したものの2種類をつくり，未染のものは炭素の蒸着を行った。分析用電子顕微鏡は日立H-600にエネルギー分散型X線分析装置（Kevex）を組みこんだものを使用し，75keVの加速電圧で透過走査像の観察および撮影を行った。**図4**は未染切片の肝組織のグリソン氏鞘の透過走査像を示す。肝組織のグリソン氏鞘の部分にelectron densityの高い物質の沈着が多数みられるが，この部分に細く絞ったビームを固定してX線分析を行った。**図5**はそのX線スペクトルである。低エネルギー側から，TH-M, TH-LA, TH-LBと表示されているのは各々ThM$\alpha_1$2.996keV，Th-Lα（$\alpha_1$12.996keV＋$\alpha_2$12.808keV），Th-Lβ（ThL$\beta_1$16.200keV＋ThLβ15.620keV）のピークに相当する。この部分にThが存在していることは，この結果から明らかである。さ

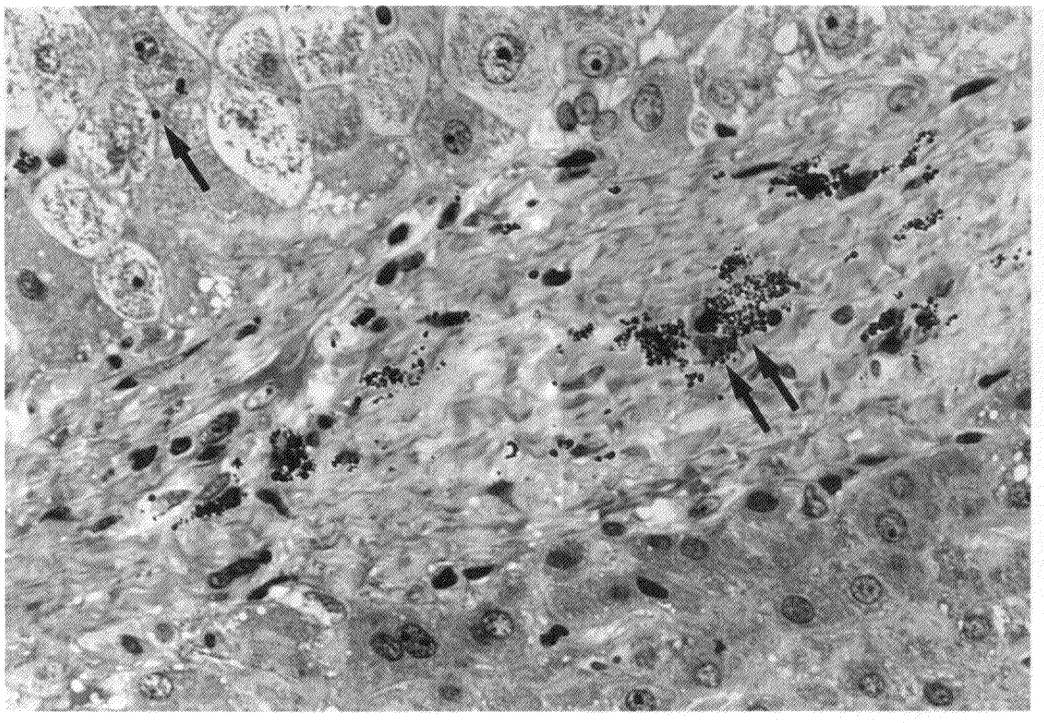


図3　肝生検組織の光学顕微鏡所見。Thorium粒子は主にグリソン氏鞘に沈着（↓↓）し，一部肝類洞内にも（↓）みとめられる。hematoxylin eosin染色　80×

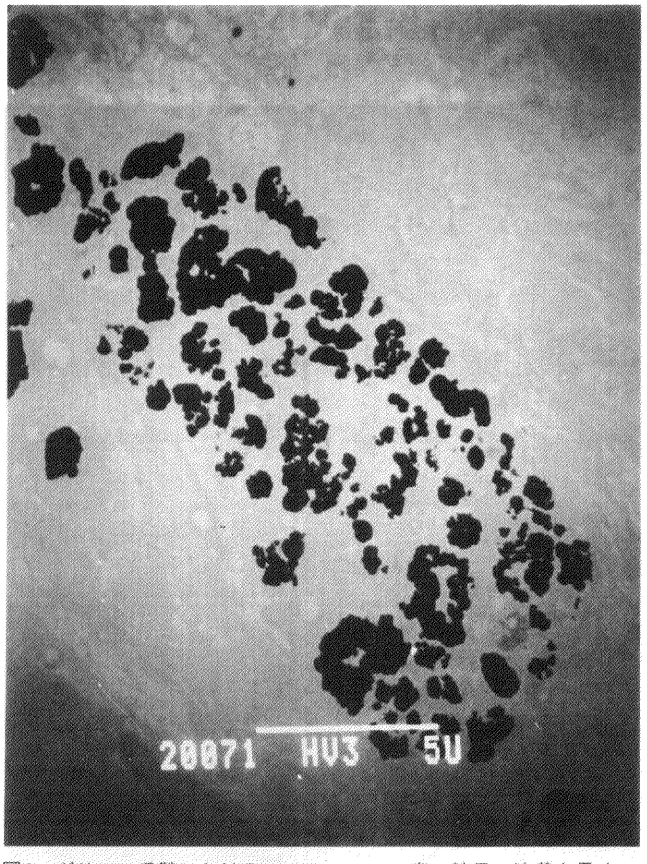


図4　グリソン氏鞘におけるelectrondensityの高い粒子の沈着を示す。未染色炭素蒸着標本

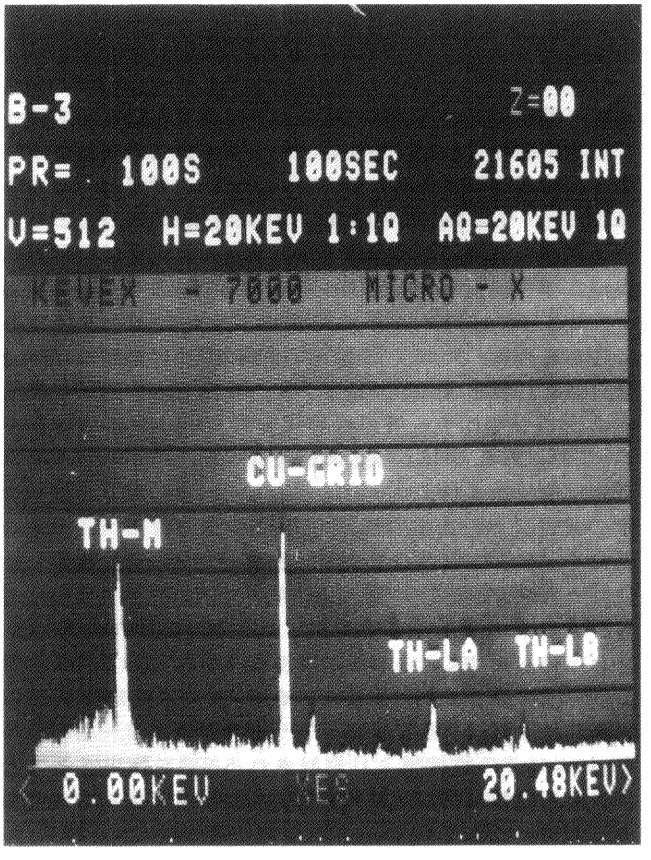


図5　図4のelectron densityの高い部分にビームをあてて得られたX線スペクトラム
Thoriumに特異的なスペクトラムが得られた。

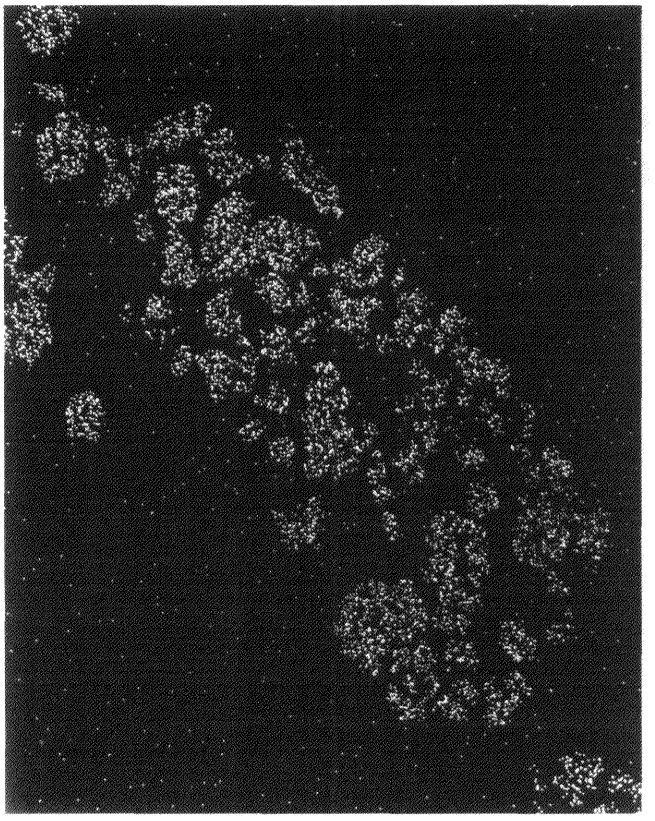


図6　図4と同一視野のX線mappingを示す。

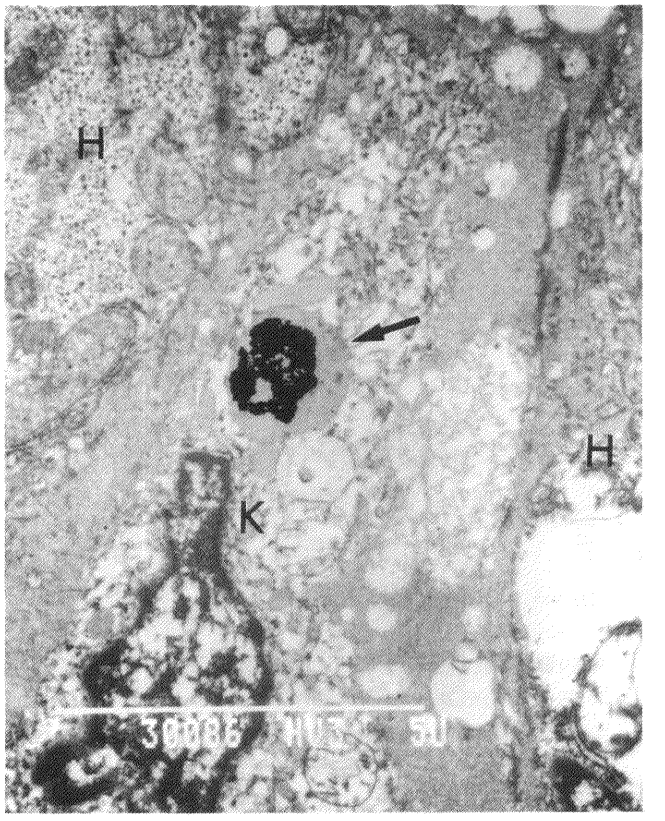


図7　肝類洞内におけるKupffer細胞内のThorium粒子を示す。一層の限界膜を持つvesicle中（phogosome）（矢印）にみられる。
H：肝細胞，K：Kupffer細胞

らに，ThM$\alpha_1$2.996keVに対してウインドを設定して同一部位を走査してmappingを行った。**図6**はこれを示すが，**図4**との対応がよくわかる。こうしたThの粒子はいずれも細胞内（グリソン氏鞘の喰食細胞）に沈着していた。さらに肝小葉内の類洞における粒子を分析した。**図7**は肝類洞内の喰食細胞（kupffer細胞）中の粒子を示す。中央のelectron densityの高い物質にビームをあてて分析を行い，Thであることを確認した後，ThM$\alpha_1$2.996keVに対してmappingを行った。**図8**はmappingを示す。即ち，Thの粒子は**図7**から明らかな如く一層の限界膜を持つvesicleの中にみられ，これはおそらくは，secondary lysosome（phagosome）の中に取りこまれているものと考えられる。**図9**，**図10**は別の視野における喰食細胞中のTh粒子とそのmappingの所見を示す。又，私共は2つの肝小葉の全肝細胞を検索したところ，その中の2つの肝細胞の中に，**図11**に示すようなごく少量のTh粒子の沈着を観察し元素分析を行い確認した。

以上述べた如く，トロトラスト沈着症における分析用電子顕微鏡の果す役割は極めて大きい。それは従来はThを組織切片上で証明するにはオートラジオグラフィーを行ってThおよびその娘核種より放射されるα線を検出することによって証明したが，時間も労力もかかり不便な方法であることはいうまでもない。分析用電子顕微鏡による検索は，そうした点を解決したすぐれた解析方法といえる。さらに，35年余りを経過するような長期間にわたるトロトラスト沈着症においては，一般に肝細胞内にTh粒子の沈着をみとめ

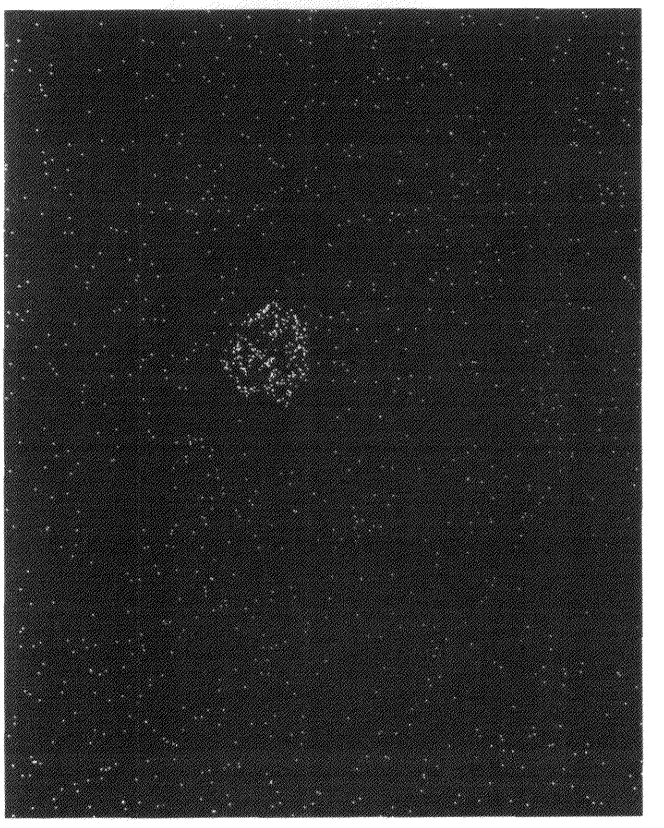


図8　図7のThorium粒子に対するX線mappingを示す。

図9　別の視野での肝類洞内のKupffer細胞中にみられるThorium粒子
ウラン・鉛二重染色透過走査像

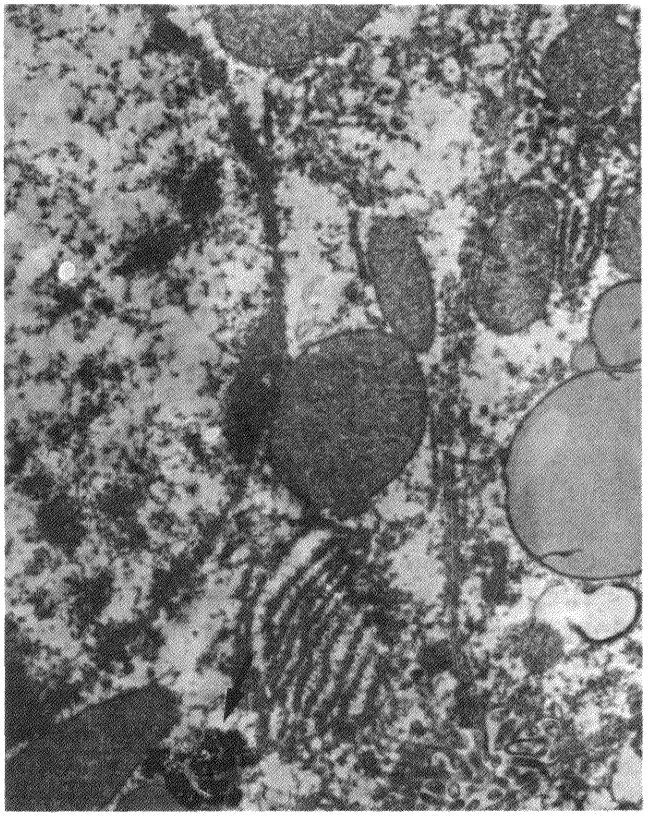


図11　肝細胞内にわずかに沈着したThorium粒子(矢印)の示す。
ウラン・鉛二重染色，12,000×透過走査像

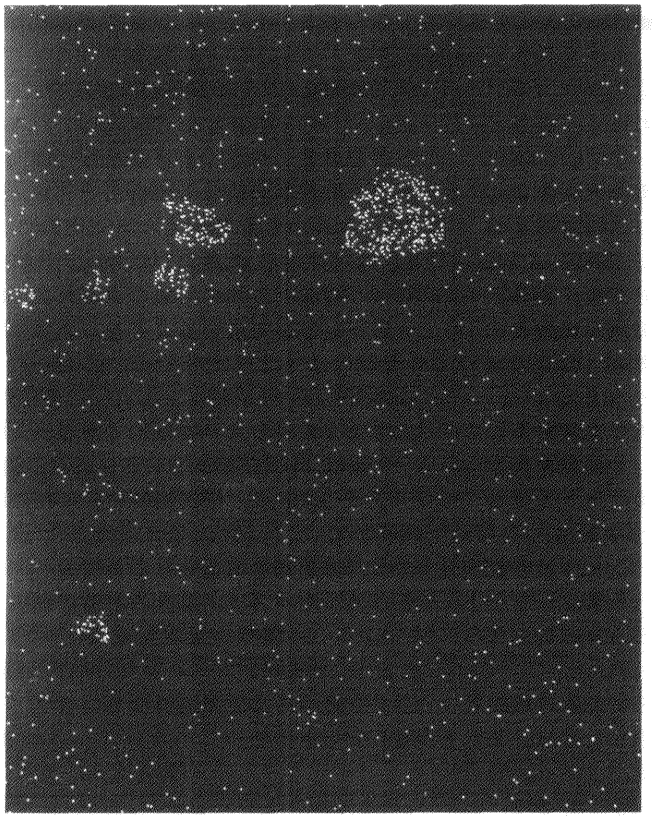


図10　図9と同一視野でのThoriumのX線mappingを示す。

ないとされる。それは注入後6ヶ月程度までは肝細胞にとりこまれ胆汁中に排泄されるが，それ以降は肝細胞へのとりこみは消失し，喰食細胞を主とする網内系のみによってとりこまれるためとされていたが，[14]私共はごく少数の肝細胞の中に極めて小量のTh粒子の沈着を確認したことにより，肝細胞を経由して排泄される経路も，数十年を経過したのちもわずかながら残存して働いていることを明らかにしえた成果は大きいといえる。それは又，電子顕微鏡組織切片上で元素分析が可能となったことによりはじめて証明されたことである。

4.　今後の分析用電子顕微鏡の適用と期待

人間の病気の中には，ここに述べたトロトラスト沈着症を含めて，過剰の金属の沈着する疾患が数多くみとめられる。たとえば，鉄や銅はその代表的なものである。こうした病気は主として代謝障害により過剰になったものが沈着するもので，原発性ヘモクロマトーシスといわれる体内に鉄の過剰沈着をみとめる病気や銅の代謝異常から体内に銅が蓄積するウイルソン病などがあり，こうした患者の組織における元素の分析には，分析用電子顕微鏡は極めて有効といえる。又，人間の生体においては微量に存在する元素の働きが重要であることが多く，こうした微量の元素のわずかなバランスの異常をも組織上に証明出来るほどにX線分析装置の感度があがり，さらには元素の密度を，正確かつ定量的に測定することが今後出来るようになることを期待してやまない。

参考文献

1) Kierszenbaum, A. L., Libanti, C. M. and Landler, C. J. : The distribution of inorganic cations in mouse testis electron microscope microprobe analysis. J. Cell Biology. 48 : 314-323, 1971
2) Panessa, B. J., Genaro, J. F., Kuptsis, J. D. and Cardone, F. : X-ray localization of iron and uranium transported across the leaf of the carnivorous pitcher plant. Electron microscopy-8 th internnational congress II. Biology pp98-99, 1974. the australian academy science, Cambera.
3) Mizuhira, V. and Shiihashi, M. : Quantitative X-ray microanalysis of a mouse cardiac muscule by means of the freeze substitution method. Electron microscope-9th international congress. II. Biology pp124-125, 1978. the microscopical society of Canada, Toronto.
4) 森武三郎：「トロトラスト」慢性障害に関する病理学的及び放射線学的研究第1編人体例における研究，日本医放会誌26：67-129，1966.
5) 森武三郎，野未佑信，岡本堯，田中利彦，杉田暉道，津田忠美：「トロトラスト」注入者の予後調査　日本医放会誌25：1144-1165，1966.
6) 森武三郎：トロトラスト症の病理学的研究，熊取敏之編「我が国におけるトロトラスト症の調査研究（昭程52年-55年度）p.28-35
7) Budin, E. and Gesshon-Cohen, J. : The danger of cancer from thorotrast as a diagnostic medium. Amer. J. Roentgenol. Rad. Nuclear Med. 75 : 1188-1193, 1956.
8) Loony, W. B. : An investigation of the late clinical findings following thorotrast administration. Amer. J. Roentogenol. 83 : 163-185, 1960.
9) Thorotrast, report of council on pharmacy and chemistry. J. Amer. Med. Ass. 99 : 2183-2185, 1932.
10) Wohlwill, F. : Untersuchungen Uber die Gewebersreakion auf Thorotrast. Shweiz. Z. allg Path. 5 : 21-52, 1942.
11) Mori, T., Kato, Y., Shimamine, T. and Watanabe, S. Statistical analysis of Japanese thorotrast-administered autopsy cases. Environ. Res. 18 : 231-244, 1979.
12) Mori, T., Kato, Y., Aoki, N. and Hatakeyama, S. : Statistical analysis of Japanese thorotrast-administered autopsy cases-1980. Health Physics. 44 : 281-291, 1983.
13) Horta, S. : Late effects of thorotrast on the liver and spleen and their efferent lymph nodes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 145 : 676-699, 1967.
14) Frankel, H., Pater, P. and Bernisch, S. : Long term studies of rat reticuloendothelial system and endocrine gland responces to foreign particle. Anat. Rec. 142 : 359-373, 1962.

Topics

ACHEMA'85に日立科学機器を出展

ACHEMA'85（1985年度国際化学工業学会）が，6月9～15日，西独のフランクフルトで開催された。対象分野が広いこともあるが，展示会に出品しているメーカー及び研究機関は，全体で約2,000とピッツバーグ展の3倍の規模を有する。展示内容は，研究用機器及び分析機器の他，プラント機器，自動化機器，素材，素材検査機器，化学プラントに関する各種処理技術，エンジニアリング，原子力機器等である。

那珂工場製品は，研究用機器及び分析機器の展示場において，三つの異なったブースに展示された。まずMerck社のブースの中央に日立の液クロシステムが2セット展示されたが，新製品のD-2000形インテグレータ，L-5000形コントローラ，F-1100形蛍光検出器等を含んでいたため，常に人垣の絶えない状態であった。特にD-2000形は，ピッツバーグ展に引続き好評で，期待が大きい。一方，光学装置関係の西独の販売会社であるColora社が，日立の紫外可視分光光度計，分光蛍光光度計，赤外分光光度計，原子吸光光度計及びフローインジェクション分析計を展示した。特にU-3200/3400形分光光度計及びF-3000形分光蛍光光度計は，ブースの最前面に展示され，Colora社の期待が感じられた。以上とは別に，日製産業ブースにおいて，S-806形走査電子顕微鏡の展示が行なわれた。

今回，研究用機器・分析機器の展示会場を見学して最初に感じたのは，日本メーカーの積極的な進出である。日本メーカーの名前を前面に出さず，OEM形態を取っているところもあるが，販売会社が西独の会社の場合は，日本メーカー名を出して販売しているところが多かった。2番目としては，比較的小さな会社でも分析用データステーションを展示していることである。すなわち，汎用コンピュータを流用し，特定の目的のためのデータステーションとして用いることを，大半のメーカーがおこなつている。またこれらのキーボードの多くが，ドイツ語対応になっている点も特長的である。

一般に，ACHEMA展においては，ピッツバーグ展ほど分析機器の新製品に出会わない。しかし，ピッツバーグ展において発売された各社の新製品が，その後の数ヶ月に，世界の市場においてどのように評価されているかということと，米国とヨーロッパの市場の微妙な差異がある程度表われている点，興味深く感じた。

（野上太郎　記）

U.D.C. 543.422.57.6.062.064:546.33'131-145.2

ファーネス原子吸光法による塩水中の極微量元素の直接定量

Direct Determination of Trace Elements in Brine with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry

佐藤 恒明* 熊木 重次* 西田 貞夫* 青木 敏春*

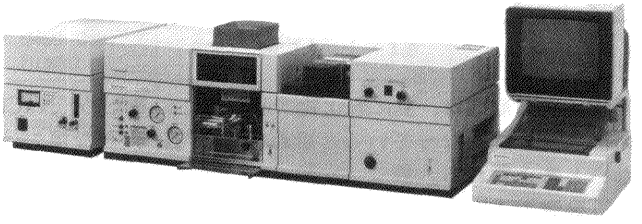
(昭和60年5月20日受理)

1. 緒 言

食塩水のイオン交換膜電解においては，イオン交換膜の孔径が非常に小さく，透過水量も少ない。したがって，供給塩水中の不純物は膜の閉塞，電流効率の低下等の要因を誘起するので，許容濃度は極めて小さく，塩水中の微量元素濃度管理は重要である。主な不純元素としては，Ba, Ni, Fe, Ca, Mg等があげられるが，これら微量元素の許容濃度はppbオーダーのレベルにあり，厳しい管理下にある。したがって，それぞれの微量元素濃度の高精度かつ高感度，簡便な分析法が必要である。このような観点から分析法を考えた場合，ファーネス原子吸光法[1),2)]が一般的であるといえる。しかしながら，飽和に近い塩水の直接分析は，NaClが桁はずれに多く，測定の際，分子吸収，光散乱等のバックグラウンド（BKG）吸収や，原子化時の干渉による精度低下を伴うか，全く測定できないこともあり，直接分析を行なった報文はみあたらない。ファーネス原子吸光法で一般に用いられるBKG補正法としては光学的補正法（D_2ランプ法，二波長補正法，ゼーマン効果法）が用いられているが，これらの補正法のみでは不十分で，マトリックス塩を除去する方法が各種用いられている。通常，前処理法としてイオン交換法[3),4),5)]，共沈法[6),7)]，溶媒抽出法[7),8)]等による目的元素の分離，濃縮を行なった後測定する方法がとられている。また，ファーネス内で原子化過程において目的元素とマトリックスを分離する方法が試みられている[9)]。マトリックスの除去およびBKG吸収を軽減するため，多種の添加剤を用いる，"matricx modification"[10)]は，海水中の微量金属分析等[11),12)]に適用され，EDTA[13),14)]，アスコルビン酸[13)]，硝酸アンモニウム[12)]，硝酸[10)]等を添加して分析されている。

本報ではNaCl除去のための前処理および添加剤を一切使用せず，試料に添加したのは標準添加法に用いる微量の標準液添加のみであり，BKG吸収補正および原子化時の干渉等については，装置の性能でカバーした。これは管理分析として，手間がかかり，微量分析でのコンタミネーション，目的元素の損失等の不都合な問題を考慮に入れる必要があるためで，直接法（標準添加法）を指向した。

偏光ゼーマンファーネス原子吸光法は，正確なBKG補正が得られ，高感度かつ高精度分析が可能であり，さらに光温度制御方式を使用することにより，原子化時の設定温度を瞬時に達成できるため，原子化しにくい元素の高感度分析が可能である。これらハード面の利点を生かし，ソフト面で種々検討した結果，不可能とされていた高濃度塩水中の微量元素の定量が出来たので報告する。



Z-8000形日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計

2. 直接分析法の検討要旨

飽和に近い食塩水を，直接ファーネスに注入した場合，NaClをどのように乾燥-灰化し除去できるか，という問題が最大の検討課題である。これはファーネス内でNaClの形状変化および目的元素の形態変化がどのように進行するかによって，精度に大きな影響を与えることになり厳密な条件設定を行なう必要がある。この変化はファーネス内の温度および滞在時間の因子によってほぼ決定づけられるので，原子化過程における熱力学的な考察も加味しておくことが必要となる。NaClを揮散させる過程は，乾燥段階でゆるやかな昇温により水分除去を行ない，注入によって液滴となった半球状のまま，穏やかにドライアップされれば，NaClの結晶がファーネス内の中央部に比較的平滑に位置しており，偏在による灰化段階での形態変化に影響しなくなると考えられる。ファーネス内の温度分布は，中央部からはずれると極端に温度が低くなり，NaClの揮散が遅れるため，原子化過程まで残存し，BKG補正の範囲を越えることから注意しなければならない。しながって，NaClの揮散除去する過程のなかで安易に考えられやすい乾燥の条件は重要であり，その後のashingにおける目的元素の形態にも影響を与えることになり，定量性が決定づけられることになる。ファーネス内の形状変化を観察する必要があるが，実際にはこれは不可能である。しかし，BKG信号の変化で確認しながら測定条件を詰めていくことが有効であり，本装置ではファーネス内で起こる現象をBKG吸収信号から推察できたので役立った。

特にBa分析では測定波長が553.6nmと長波長であるため，原子化時に発光線の影響を受ける等，測定ピークを防害することから精度に問題があり，Baの測定で起こる不測の現象[15)]について種々検討した。

またNaClの揮散[16)]については，目的元素の損失がない条件の設定が必要である。NaClのm.p.800°C，b.p.1413°Cを考慮して，NaClを揮散させるとき，その附近の温度における

*呉羽化学工業株式会社 錦工場 検査部

表1 測定元素の形態と融点および沸点[17]

	元素		酸化物		塩化物	
	mp ℃	bp ℃	mp ℃	bp ℃	mp ℃	bp ℃
Ba	725	1,637	1,923	2,000<	962	1,560
Ni	1,455	2,732	1,998	分解	1,001	分解
Fe	1,808	3,023	1,370	〃	672	1,023
Ca	1,112	1,757	2,572	2,850	772	1,600
Mg	922	1,363	2,800	3,600	712	1,412

目的元素の形態は，主に酸化物[16]となっているため，NaClの沸点より高くなっていると思われるので，大きな損失はないと考えられる。

3. 装置および試薬

(1) 装　置

日立製作所製偏光ゼーマンファーネス原子吸光光度計(Z-8000形)に光温度制御付属装置を取付けて使用した。試料の注入にはエッペンドルフ製マイクロピペット（20μl）を使用した。中空陰極ランプは日立製作所製のHLA-4SのBa，Ni，Fe，Ca-Mg（複合形）を使用した。

(2) 試　薬

標準溶液はBa，Ni，Fe，Ca，Mgともに，1,000μg/ml溶液（関東化学製，原子吸光標準溶液）を超純水で希釈して使用した。超純水は，日本ミリポア・リミテッド製のMilli-Qシステムの脱イオン水を使用した。硝酸（器具類の洗浄用）は，関東化学製の特級試薬を使用した。

(3) 試料の調製（標準添加サンプルの調製）

加温（1＋3）HNO_3で使用するガラス器具類を洗浄し乾燥したものを使用して，次の要領により試料を調製した。

(a) 10ml容供栓付試験管にホールピペットを用いて塩水10mlを3本に入れる。

(b) 3本の試験管のうち2本に標準溶液10μlおよび20μlを添加し(Ba，Caは0.05，0.1μg/ml，Fe，Ni，Mgは0.1，0.2μg/ml）供試料とする。

（標準液の調製）

マスター溶液の調製：各元素の1,000μg/ml溶液を用いて，それぞれ5ml，10mlを採取し100mlに定容する。

〔Ba，Ca，：50μg/ml，Fe，Ni，Mgは100μg/ml〕

4. 実験方法

4.1 ファーネス原子吸光法の測定条件

塩水の原子化過程で，NaClの揮散条件を設定するうえで目的元素の損失およびBKG補正可能範囲での残存量等を考慮して，標準的な設定を行ない，その後，キュベット間の差をデータ処理装置のCRT上でBKGプロファイルより判断し温度，時間を調整した。Ba，Niは灰化時に炭化物を生成し易いのでパイロ化グラファイトキュベット（PGC）を，更にFe，Ca，Mgは標準のグラファイトキュベット(GC)を使用した。PGCとGCでは表面処理のちがいにより，設定温度は同じ条件にならなかった。

4.1.1 乾燥段階でのNaClの状態

ファーネスに注入できる最大量は50μlであるが，ファーネス内での試料溶液の広がり方によって精度に影響を与えるので，極力少ない方がよいと考えられる。しかしながら，ピペッティング精度も考慮し20μl注入することにした。塩水をキュベットに注入すると，液滴となり拡散は起こらないで，昇温により徐々に水分がなくなり，周囲がやや盛り上がった状態でNaClの結晶が得られる。昇温速度を早めると突沸が起こるので昇温速度は1℃/sec以下で行なう必要があり，それ故ランプモードを用いて穏やかに乾燥した。単に突沸を防止するというだけでは不十分で，乾燥のされ方が重要になる。というのは，ドライアップされたNaClの形状，位置が変化することによって，灰化および原子化時に影響を与えるためである。したがって，安定した形状でファーネスの中央部に比較的平滑な状態をつくるような条件設定が必要である。その後すぐに温度を上げると，NaClがはじけ飛ぶ現象が起こるので，2nd-Stepとして200℃まで比較的穏やかに昇温させる必要がある。

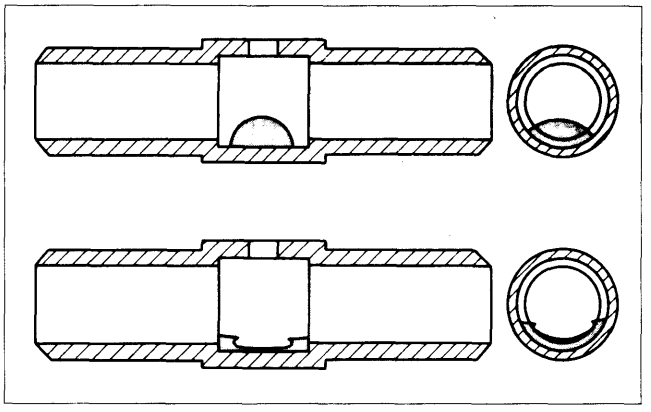


図1 乾燥過程のNaClの形状

4.1.2 灰化過程でのNaCl揮散条件

NaClを揮散させるためには，NaClの沸点付近以上に温度を上げる必要があるが，灰化段階でもNaCl結晶が飛びはねる現象が起こるので，あまり急激な温度上昇は避けねばならない。したがって，乾燥から引き続き徐々に昇温し，NaClが溶融するところまで時間をかけて行なう。その後，測定元素の温度に応じた設定を行なう。

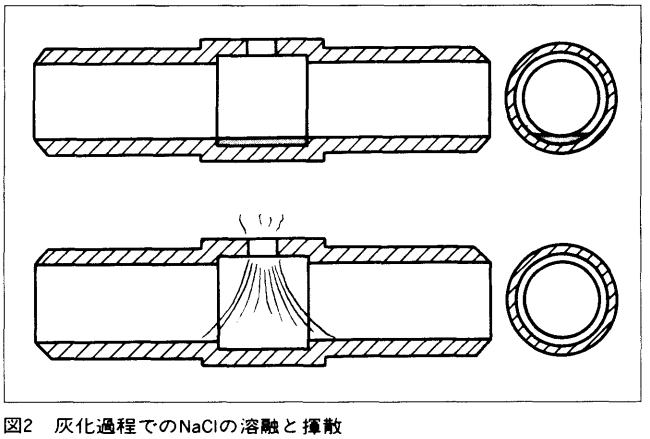


図2 灰化過程でのNaClの溶融と揮散

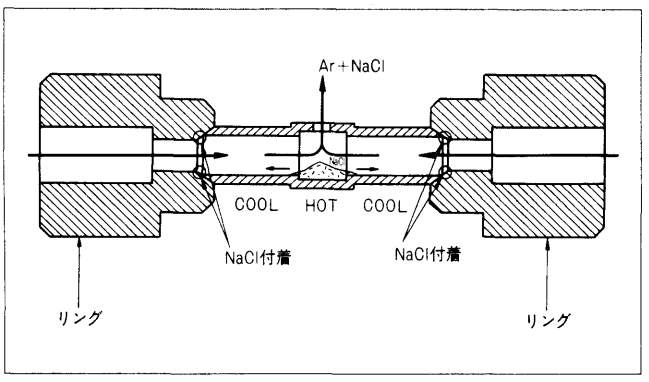


図3 原子化過程でのNaCl付着による影響

4.1.3 原子化過程における条件設定

灰化過程でNaClは大部分揮散されるので，原子化過程は特別問題にはならないが，NaClがキュベット内の比較的低温部[20]に残存する場合BKG吸収として現われ，補正範囲を越えることも考えられるので，注意する必要があった。

4.1.4 各元素の測定条件の設定

表2に各元素の最終測定条件を記載した。NaClの揮散を円滑に行なうためファーネス内にキャリアーガスを300 ml/mimで流し（最大），極力拡散を防止すると同時に，低温部への付着を少なくした。また原子化時には，増感する必要があり50ml/mimに下げた。

5. 結果および考察

測定における原子吸光，BKGプロファイルを**図4**，**5**，

表2 Ba，Ni，Fe，Ca，Mgの測定条件

項目＼元素		Ba	Ni	Fe	Ca	Mg
Lump Current (mA)		15	15	15	7.5	7.5
Wave Length (nm)		553.6	232.0	248.3	422.7	285.2
Slit (mm)		1.3	0.4	0.4	1.3	1.3
Cuvette		Pyrolytic tuve	Pyrolytic tuve	tuve	tuve	tuve
Carrier Gas (ml/min)		300	300	300	300	300
Seath Gas (l/min)		3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Interrupted Gas (ml/min)		50	50	50	50	50
Sample Vdume (μl)		20	20	20	20	20
Heating Program		(℃) (s)	—	—	—	—
Dry	1	70～110(60)	70～110(60)	70～110(60)	70～110(60)	70～110(60)
	2	110～200(30)	110～200(30)	110～200(30)	110～200(30)	110～200(30)
Ash	1	200～1,000(30)	200～1,000(30)	200～1,000(30)	200～1,000(30)	200～1,000(30)
	2	1,000～1,500(30)	1,000～1,500(30)	1,500～1,500(30)	1,000～1,300(30)	1,000～1,300(30)
	3	1,900(10)	1,650(30)	—	1,300(30)	1,300(30)
Atomize		3,000(5)	3,000(5)	2,800(7)	3,000(10)	2,000(10)
Clean		3,000(8)	3,000(8)	3,000(5)	3,000(5)	3,000(5)

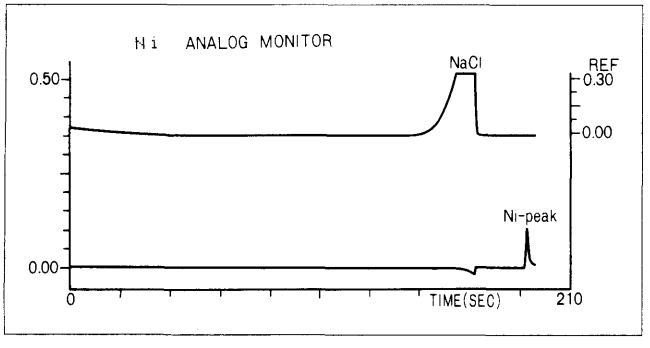


図4 Niの原子吸光およびBKG吸収プロファイル

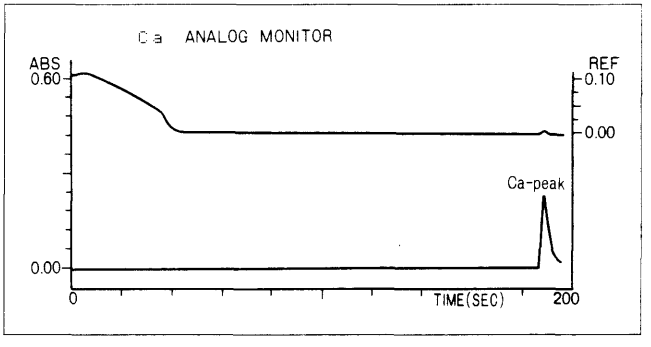


図6 Caの原子吸光およびBKG吸収プロファイル

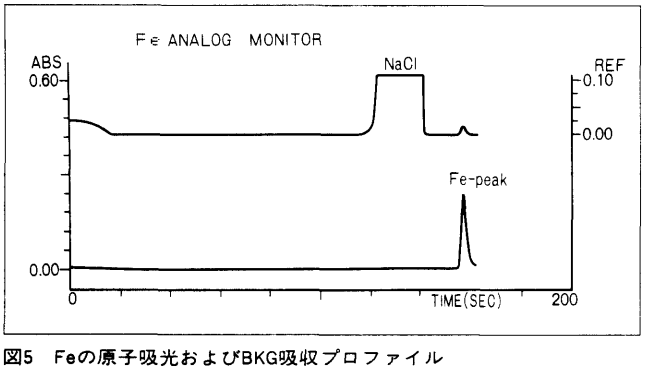


図5 Feの原子吸光およびBKG吸収プロファイル

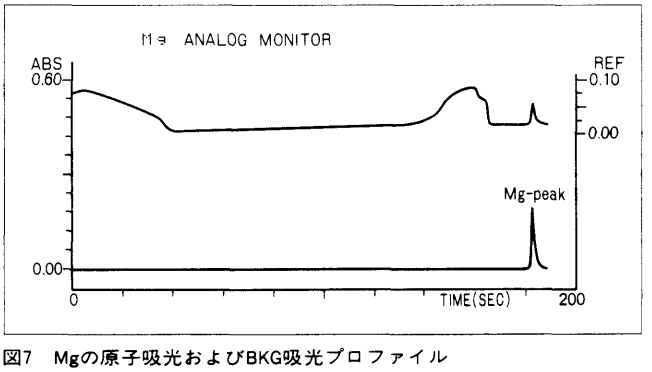


図7 Mgの原子吸光およびBKG吸光プロファイル

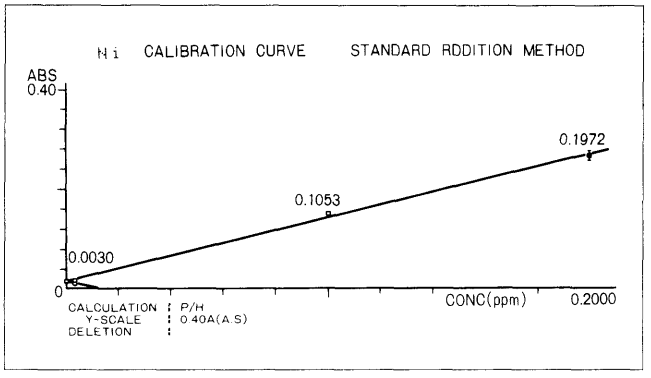


図8 Niの標準添加法による検量線

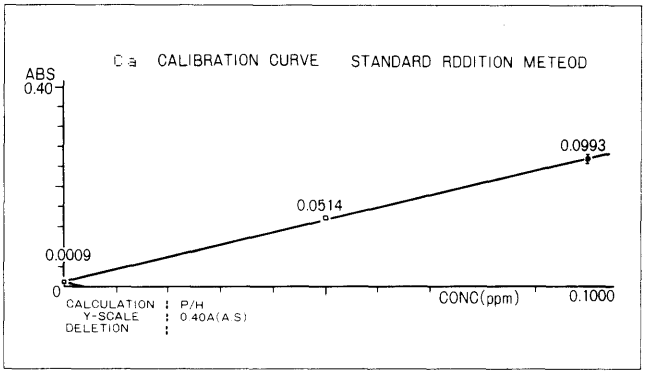


図10 Caの標準添加法による検量線

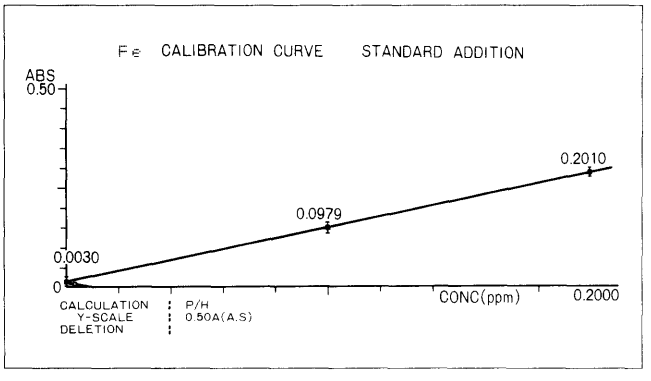


図9 Feの標準添加法による検量線

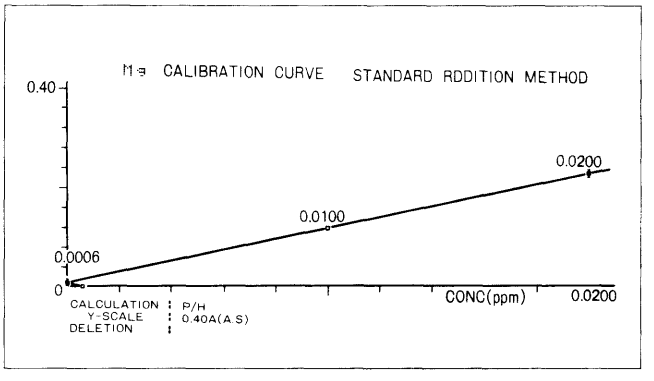


図11 Mgの標準添加法による検量線

6，7に示した。また，標準添加法による検量線を**図8，9，10，11**に示した。

Baについては測定条件等最も注意を要するので別の項目で述べる。Ni，Fe，Ca，Mgは，NaClの揮散除去が，完全に行なえれば，再現性のよい結果が得られる。しかしながら，Caは環境からの汚染に十分注意して測定する必要があった。

5.1 NaClの影響

NaClを直接注入することによって，吸光度が減少する元素と増加する元素がある。標準溶液0.2μg/mlを100とした場合の変化を調べた結果を**表3**に示した。

Ba，Mgは塩水に添加した場合に比べて，標準液（HCl酸性）の方が損失が多かった。これは，酸化物とならずに，塩化物として揮散する部分があるためと考えられる。

5.2 検出限界

検出限界値を**表4**に示した。塩水にマスター溶液20μl添加した溶液を用いてブランクと比較し，SN比の2倍に相当する濃度を検出限界値として算出した。

5.3 検量線

NaClの影響を補正するため，標準溶液を塩水10mlに10μl，20μl添加して作製したが，微量なのでこの補正は行なわずに検量線を求めた。この作製に当たっては，本装置での途中修正は出来ない（標準添加法の場合修正出来ないソフトになっている）ので，注入時のミスは極力避けねばならなかった。

5.4 測定精度

塩水に標準溶液20μl注入した溶液の測定精度はCVで2％程度であった。

表3 NaClによる吸光度への影響

元素名（μg/ml）	STD溶液	塩水＋STD溶液
Ba（0.2）	100	110
Ni（0.2）	100	92
Fe（0.2）	100	64
Ca（0.1）	100	77
Mg（0.02）	100	130

表4 検出限界値

元素名	検出限界値（μg/ml）
Ba	0.005
Ni	0.008
Fe	0.006
Ca	0.001
Mg	0.0004

表5　注入5回の測定精度　(ABS)

注入回数等	Ba	Ni	Fe	Ca	Mg
1	0.2039	0.1464	0.1645	0.2525	0.2478
2	0.2080	0.1467	0.1683	0.2598	0.2380
3	0.1966	0.1419	0.1624	0.2556	0.2404
4	0.2088	0.1428	0.1578	0.2483	0.2480
5	0.2017	0.1481	0.1591	0.2491	0.2493
$\bar{x}$	0.2038	0.1452	0.1624	0.2531	0.2447
σ_{n-1}	0.0050	0.0027	0.0038	0.0048	0.0051
CV%	2.5	1.9	2.3	1.9	2.1

5.5　供給塩水の分析結果

供給塩水中の微量元素測定結果を**表6**に示した。標準添加法により微量元素の定量は精度よく定量できるが，いずれも定量限界以下であり，よい精製状態にあることがわかる。これらの測定に当たっては，検量線を，精度よく作成することが重要であり，本法を用いることにより，供給塩水の管理分析が高精度かつ高感度に行なえる。

5.6　Baの分析

塩水中のBaの形態は，$BaSO_4$となっているが，（一部は$Ba(OH)_2$も考えられる）標準添加するBaは$BaCl_2$であるため，主に2つの形態をもつと考えられる。原子化過程でどのように変化していくかを考察した。

まず，$BaSO_4$は分解して酸化物に変化すると考えられる。

$$BaSO_4 \rightarrow BaO_{(固)} + SO_{3(気)}$$

PGC中でもCの作用を受けやすいので次の反応も考えられる。

$$BaSO_4 + C \rightarrow BaS_{(固)} + CO_{(気)}$$

さらにBaSは，

$$BaS + BaSO_4 \rightarrow BaO_{(固)} + SO_{2(気)}$$

いずれの過程をたどるにしてもBaOの形態に変わると考えられる。しかしながら，BaOはCO又はCと反応してバリウムカーバイド（BaC_2）となり，原子化しにくくなるので昇温速度を早める必要があった。

$$BaO + 3C \rightarrow BaC_2 + CO$$

$Ba(OH)_2$は原子化過程で$BaO_{(固)}$と$H_2O_{(気)}$に変化すると考えられており，主にNaClが揮散される温度（1,300°C以上）で反応していると思われる。

$$Ba(OH)_2 \xrightarrow[1,500°C]{ashing} BaO_{(固)} \xrightarrow[1,900°C]{ashing} BaC_{2(固)} \xrightarrow[3,000°C]{atomizing} Ba_{(気)}$$

$BaCl_2$の場合は次の反応経過をたどると考えられる。

$$BaCl_{2(固)} \xrightarrow{+H} BaCl_{(液)} \xrightarrow{+OH} BaO_{(固)} \xrightarrow{+C} BaC_{2(固)} \rightarrow Ba_{(気)}$$

この反応は温度により変化すると考えられ1,200～1,900°Cの範囲では，大部分がBaC_2になっていると推察される。

なお，NaClは，次のように反応して大部分が分子蒸気として系外に揮散すると考えられる。

$$NaCl_{(固/液)} \rightleftarrows NaCl_{(気)} \rightarrow Na_{(気)} + Cl_{(気)}$$ [1)]

$Na\text{-}Cl_{(気)}$の解離エネルギーが98kcal/molと大きく蒸発熱が比較的小さい[1)]ので，ほとんど$NaCl_{(気)}$のまま蒸発する。

表6　ファーネス原子吸光法による供給塩水中の微量元素の分析結果

元素名	含有量（μg/ml）
Ba	0.01以下
Ni	0.01 〃
Fe	0.01 〃
Ca	0.002 〃
Mg	0.001 〃

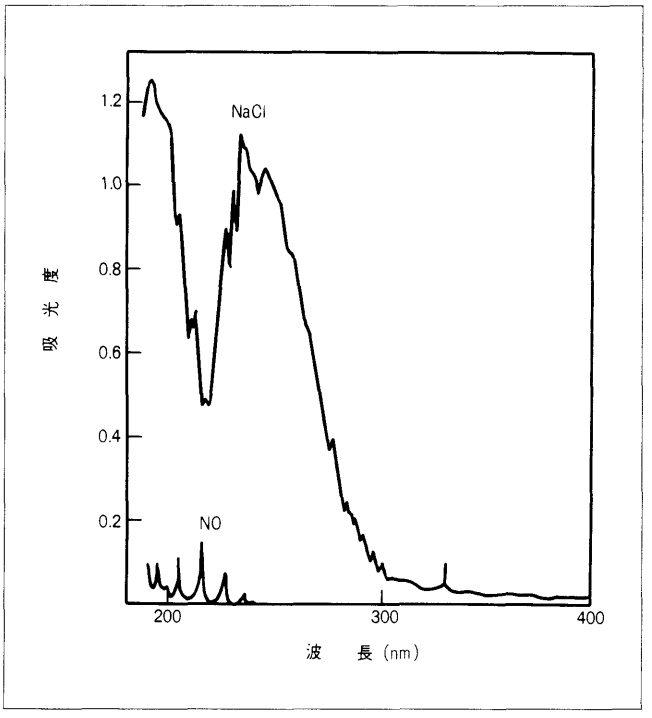


図12　NaClの分子吸収スペクトル[1)]

Baは553.6nmで最大吸収を示すことから，原子化過程でのBKGプロファイルよりNaClの揮散状態をみることは出来ない。しかしながら，塩水注入時の偏在によって起こる変化を克明に補えることができる。**図13**に原子吸光，BKGプロファイルを示した。これは，原子化過程でNaClの結晶が中央部に位置した場合と偏在した場合のちがいにより，異なったプロファイルになることを示している。(2)の悪い状態の原子化では，NaClの結晶がファーネス内で盛り上がっているため，光路を遮ってBKG吸収がみられる。NaClが溶融するとベースラインに戻り，NaClが揮散された後原子化される。このような過程を経た場合は，低温部にNaClが残存すると考えられ，分子吸収以外の影響で見かけの感度が増加すると思われる。またBaは難解離性の物質BaC_2を生成しやすいので，1,000～1,500°Cまで30秒で昇温させ，NaClを蒸発させながら1,900°Cまで温度を上げ10秒Holdした後，3,000°C（光温度制御方式）で原子化した。昇温速度を速めることが有効であり，1,600～1,700°C程度の灰化条件では感度，精度ともに十分でなかった。**図14**にBaの検

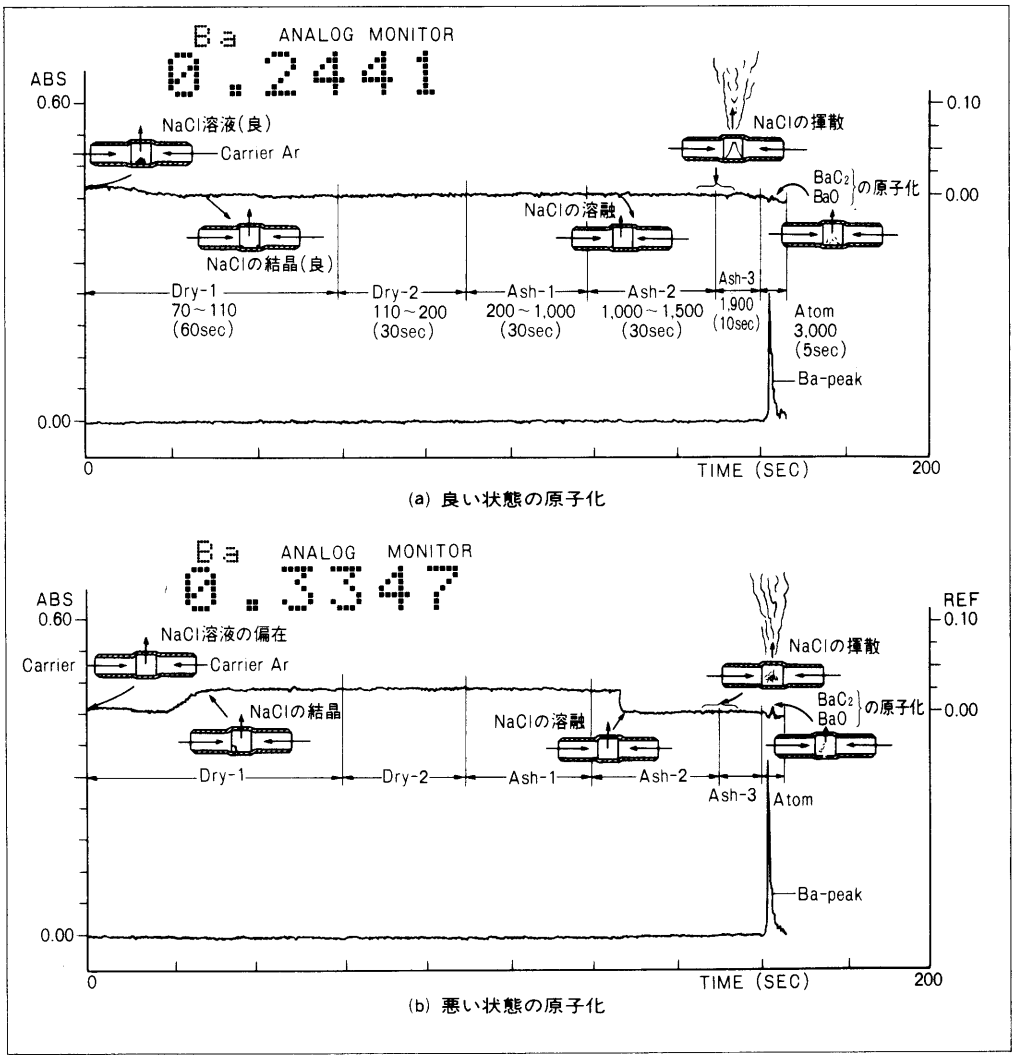


図13 Ba測定における原子吸光, BKGプロファイル

表7 Ba測定条件

```
HITACHI POLARIZED ZEEMAN ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER
     ELEMENT        :  Ba
     DATE           :  85.04.19
     SAMPLE         :  BRAIN
     OPERATOR       :  T.AOKI
     ATOMIZATION    :  G.A.
INSTRUMENTAL CONDITIONS
     LAMP CURRENT        :  15.0  mA
     WAVELENGTH          : 553.6  nm
     SLIT                :   1.3  nm
     CUVETTE             :  TUBE
     CARRIER GAS         :   300  ml/min
     INTERRUPTED GAS     :    50  ml/min
     SAMPLE VOLUME       :    20  ul
CALCULATION
     MEASUREMENT MODE    : STD ADDITION(CONC)
     ZEEMAN A. A. MODE   : ZAA
     CALCULATION         : BOTH P/A AND P/H
     CALCULATION TIME    :   5.0  SEC
     DELAY TIME          :   0.0  SEC
     NO. OF REPLICATE    :     2
     STATISTICS          :  MEAN
     X-SCALE (TIME)      :   200  SEC
     TIME CONSTANT       :   0.2  SEC
     CALIB. CURVE(P/A)   : ABS=F(CONC)LINEAR
                 (P/H)   : ABS=F(CONC)LINEAR
TEMPERATURE PROGRAM
     NO. STAGE    TEMPERATURE (C)  TIME (SEC)
                 START   END
      1  DRY        70    110       60.0
      2  DRY       110    200       30.0
      3  ASH       200   1000       30.0
      4  ASH      1000   1500       30.0
      5  ASH      1900   1900       10.0
      6  ATOM     3000   3000        5.0
      7  CLEAN    3000   3000        8.0
     ANALOG MONITOR      :  1- 6
     CARRIER GAS         : NO INTERRUPT
```

表8 標準添加法によるBa測定結果

```
                    ***** Ba RESULT TABLE *****
          PEAK AREA                PEAK HEIGHT
S.NO  CONC(ppm ) ABS.SEC      CONC(ppm )   ABS          REFERENCE
BLANK    0.000   -0.0015       0.000     0.0170    -0.054    -0.031
BLANK    0.000   -0.0047       0.000     0.0130    -0.014     0.010
    1    0.000    0.0062       0.000     0.0268    -0.008     0.010
    1    0.000    0.0051       0.000     0.0233    -0.008     0.009
STD 1    0.050    0.1734       0.050     0.1616    -0.006     0.009
STD 1    0.050    0.1722       0.050     0.1556    -0.007     0.009
STD 2    0.100    0.3425       0.100     0.2967    -0.003     0.015
STD 2    0.100    0.3472       0.100     0.3031    -0.003     0.009
    1    0.002    0.0057       0.003     0.0250    -0.008     0.009
```

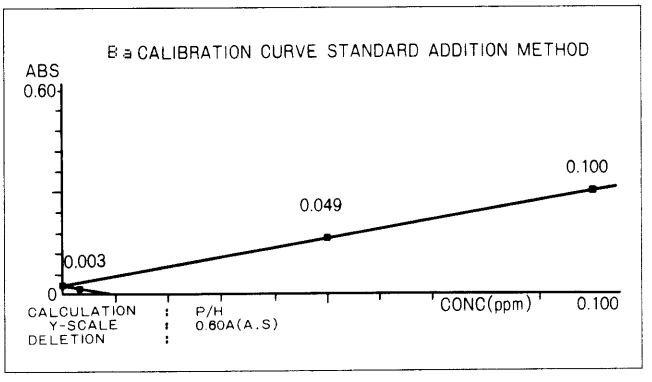


図14 Baの標準添加法による検量線

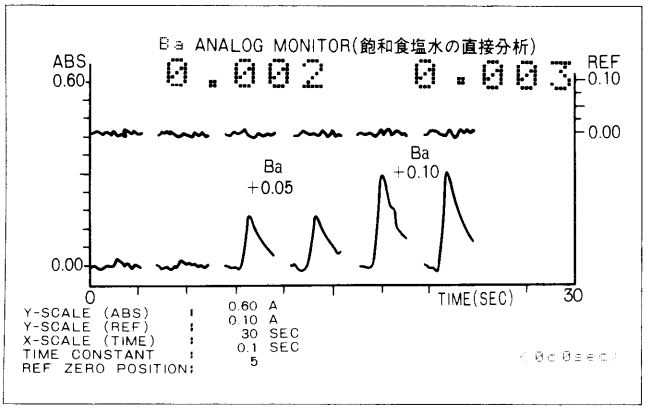


図15 Ba原子吸光プロファイル

量線を，**図15**にはBaの原子吸光プロファイルを示した。

このように原子化条件を選ぶことにより精度よく測定できるが，PGCの品質は必ずしも一定していないため，新しいものを使用する場合は，多少条件を変更し再現性をみてから測定に入る必要がある。またPGCの寿命は40～50回程度である。これ以上になると徐々に感度が低下する傾向がみられる。

5.7 Niの分析

塩水中のNiは，$Ni(OH)_2$になっていると考えられ，標準添加の$NiCl_2$と混合される。ファーネス内での原子化過程において，次のように反応してNiOの形態をとり原子化されると考えられる[19]。

$$\left.\begin{array}{l} Ni(OH)_2 \\ NiCl_2 \end{array}\right\} \xrightarrow{\text{Reaction}} NiO_{(固)} \rightarrow \overbrace{Ni_{(固)} \rightleftarrows \underbrace{Ni_{2(気)} \rightarrow Ni_{(気)}}_{Ea\,50\text{kcal/mol}}}^{Ea\,90\text{kcal/mol}}\ ^{18)}$$

注：*Ea*(自由エネルギー)

水酸化物および塩化物は灰化段階初期において，酸化物に変わる。NiOは約2,000℃で分解しNi原子となるので，灰化設定温度1,650℃ではNaClの揮散後NiOとしてファーネス内に留まると考えられ，大きな損失なく原子化されると思われる。

Niは232.0nmに吸収波長をもつので，NaClの分子吸収，光散乱等の影響を受けるが，灰化過程で完全にNaClを除去できるので，特に注意せずに測定可能である。

5.8 Fe，Ca，Mgの分析

Fe，Ca，Mgの場合はGCを使用するので，PGCよりもNaClの揮散は容易である。したがって，温度プログラムも低温に設定できるが，Fe，Ca元素の損失が最も大きかった。3元素の形態はBa，Niと同様に水酸化物，塩化物で灰化段階で酸化物に変わる。Feは，

$$FeO_{(固)} \xrightarrow{\text{還元}} Fe_{(固)} \xrightarrow{Ea\,97\text{kcal/mol}} Fe_{(気)}\ ^{18)}$$

となり，炭素還元により蒸発熱主体の原子化が行なわれる[18]。

Ca，Mgは酸化物の分解により原子化される。

$$CaO_{(固)} \rightleftarrows CaO_{(気)} \xrightarrow{Ea\,90\text{kcal/mol}} Ca_{(気)} + O_{(気)}\ ^{18)}$$

$$MgO_{(固)} \rightleftarrows MgO_{(気)} \xrightarrow{Ea\,90\text{kcal/mol}} Mg_{(気)} + O_{(気)}\ ^{18)}$$

このように原子化過程で$CaO_{(気)}$となり，$Ca_{(気)}$に原子化される(Mgも同様に原子化される)。MgはMgCl₂の形態では，$MgCl_2$として揮散されやすく，標準液の測定では灰化段階でピークを検出した。これは，ファーネス内で酸素源が不足しているためと考えられる。

6. 結　言

イオン交換膜電解に供給する塩水中の微量元素の定量法として，ファーネス原子吸光法による直接法を検討し，管理分析法として採用できることが明らかとなった。

本法では高感度分析が可能なので，精度，簡便さが要求されたが，いずれの元素も変動係数2％前後で測定でき，前処理も，簡単に行なうことが出来るので，有効な方法と判断できる。しかしながら，塩水の注入法やキュベットの劣化が通常測定よりも早いことなどを考慮して行なう必要がある。本装置により原子化過程における形状変化等についてBKG吸収から異状の有無を確認できたので，条件検討に役立った。

これらの知見を得たことにより，本法を応用して水酸化ナトリウム溶液，塩酸等の微量元素の分析が可能である。

参考文献

1) 高橋　務，大道寺英弘編，：ファーネス原子吸光分析，KK学会出版センター（1984）
2) 保田和雄，広川吉之助著：高感度原子吸光，発光分析，講談社（1980）
3) 黒川一夫：日化，88，188（1967）
4) 清水得夫，酒井　馨：日化p-26（1981）
5) R. E Sturgeon, S. S. Berman, A. Desaulniers, P. S. Russel, Talanta, 27, 85（1980）
6) 竹田菊男，佐々木茂：ソーダ工業技術情報，第328報，25（1983）
7) 清水得夫，酒井　馨：日化，26（1981）
8) T. K. Jan, D. R. Young：Anal. Chem50, 1250（1978）
9) D. A. Seger, J. G. Gonzalez：ibid. 58, 6（1972）
10) K. S. Subramanian, J-C. Meranger, J. E Mackeen：Anal. Chem. 55. 1064（1983）
11) L. A. Powell, R. L. Tease：Anal. Chem. 54, 2154（1982）
12) R. E. Sturgeon, S. S. Berman, A. Desaulniers, D. S. Russell.：Anal, Chem. 51. 2364（1979）
13) D. J Hydes.：Anal Chem 52, 959（1980）
14) R. Guevremont Anal Chem 52, 1574（1980）
15) D. L. Styris Anal. Chem. 56, 1070（1984）
16) 高橋　務，大道寺英弘編：ファーネス原子吸光分析，1章 p.16，学会出版（1984）
17) 日本化学会編：化学便覧，基礎編II，p.64 丸善
18) R. E. Sturgeon, C. L. Chakrabarti, C. H. Langford Anal. Chem. 48, 1792（1976）
19) C. L. Chakrabart, H. A. Hamed, C. C. Wan, W. C. Li, P. C. Bertels D. C. Gregoire, S. Lee, Anal, Chem. 52, 167（1980）
20) R. E. Sturgeon, S. S. Berman Anal. Chem. 55, 190（1983）

U.D.C.577.151.3.086.3:663.12-911.62

構造解析特集

報　文

酵母マイクロボディ複合結晶体を構成する酵素分子の構造解析(I)

Structure Analysis of Enzyme Molecules Composed of the Composite Crystal in Yeast Microbody(I)

大隅　正子*

(昭和60年7月23日受理)

1. はじめに

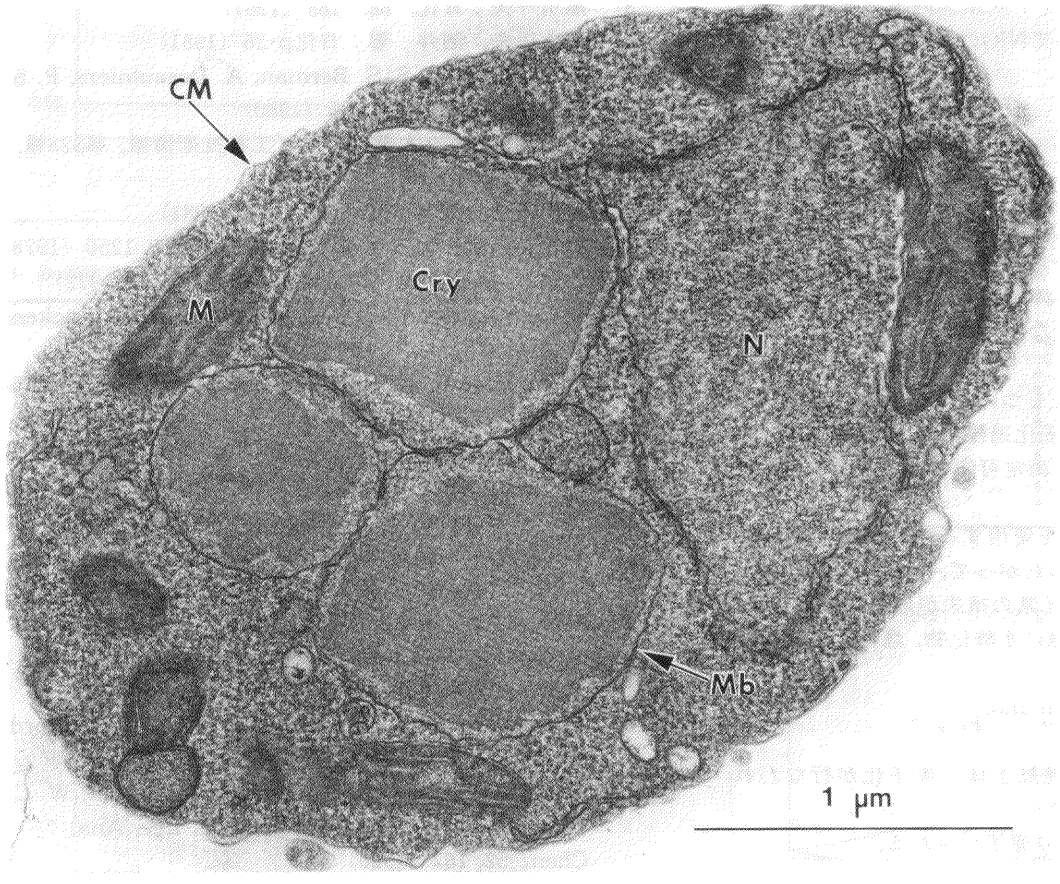
真理の探求こそ，科学の研究の目的であろう。この目的のために，さまざまな観察や実験がなされ，そのための材料や機器が開発されてきた。

今日では自然科学諸分野でルーティン・ワークとなっている電子顕微鏡(以下、電顕と略す)法が確立されたのは，たった半世紀前のことであるが，この50年間に電顕の性能は飛躍的に向上した。現在，分解能は200kVで0.072nmにまでなっており，物質の分子・原子を直接とらえることは理論的には可能である。

ところが，生物試料はノイズが多く，きれいな画像を得にくいため，電顕像からの構造解析は困難を極める。

このような電顕写真の解像度の限界を打開するため，近年，画像処理技術が導入された。これにより，客観的に電顕像を得ることが可能となり，生体物質の微細構造が次々と解明されつつある。

この報文では，酵母マイクロボディ結晶体を取り上げ，その中に局在する2つの酵素分子，アルコールオキシダー



写真略語
CM,　細胞膜
Cry,　結晶体
M,　ミトコンドリア
Mb,　マイクロボディ
N,　核
V,　液胞

図1　メタノール生育酵母 *Kloeckera* sp. no. 2201細胞 ×42,000

*日本女子大学生物学教室教授　医博

ゼとカタラーゼが，どのように配列して結晶体と構成しているかを，画像処理などによりいかにして解明したかを述べ，分子構造解析の1例としたい。

2. 酵母マイクロボディ結晶体を構成する酵素分子の解析

2.1 酵母マイクロボディ結晶体

メタノールを炭素源として生育した酵母には，その細胞中に多数のマイクロボディの形成がみられる[1),2)]（**図1a**）。生化学的には，メタノールの初期酸化に必要なアルコールオキシダーゼとカタラーゼの急激な上昇が認められており（**図2**）[3),4)]，このマイクロボディ形成と現象的に一致している。このマイクロボディはミトコンドリアより大型で，基質中に結晶体を形成する。この結晶体中にアルコールオキシダーゼとカタラーゼが局在していることが，電顕細胞化学的手法[5)~7)]および生化学的手法[6),7)]（**図3～5，表1**）により確認されている。しかし，この結果から2つの酵素の結晶体内の配位を観ることはできない。

メタノール生育酵母*Kloeckera* sp. no.2201のフリーズ・レプリカ像には，大きなマイクロボディがサイコロのような姿で現われ（**図6a**），成熟したマイクロボディがほぼ立方体の形をとることが分る。

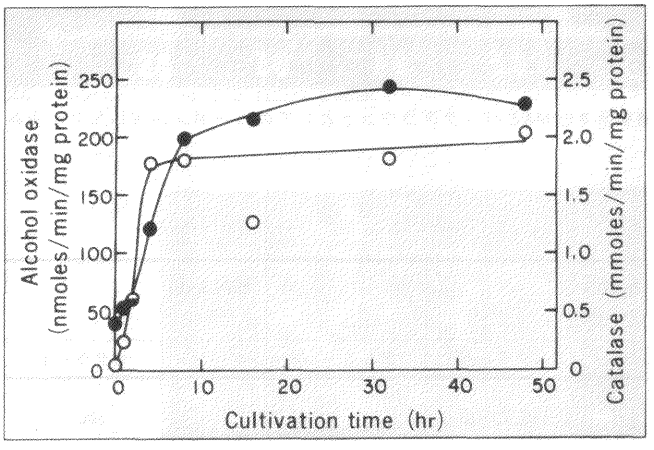


図2　*Kloeckera* sp. no. 2201細胞のメタノール培地における生育と酵素活性の変化，○—○，アルコールオキシダーゼ，●—●，カタラーゼ

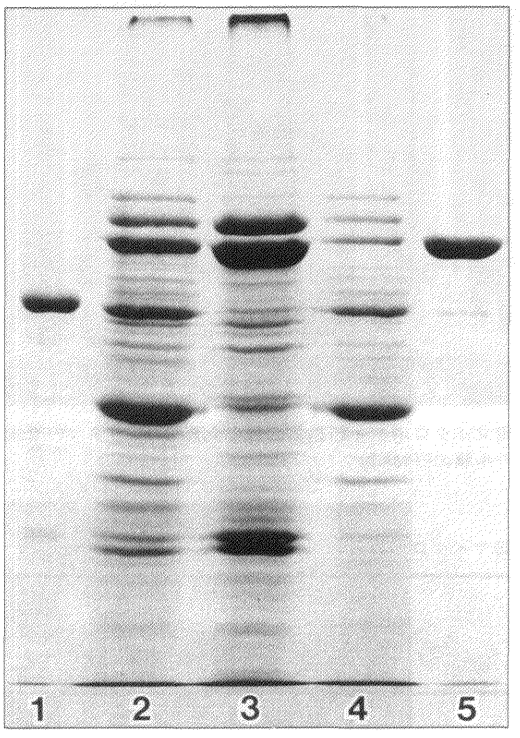


図4　単離された酵母マイクロボディのSDS電気泳動パターン，1．カタラーゼ標品 2．マイクロボディ画分 3．0.001%DOC不溶性画分（結晶体）4．0.001%DOC可溶性画分 5．アルコールオキシダーゼ標品

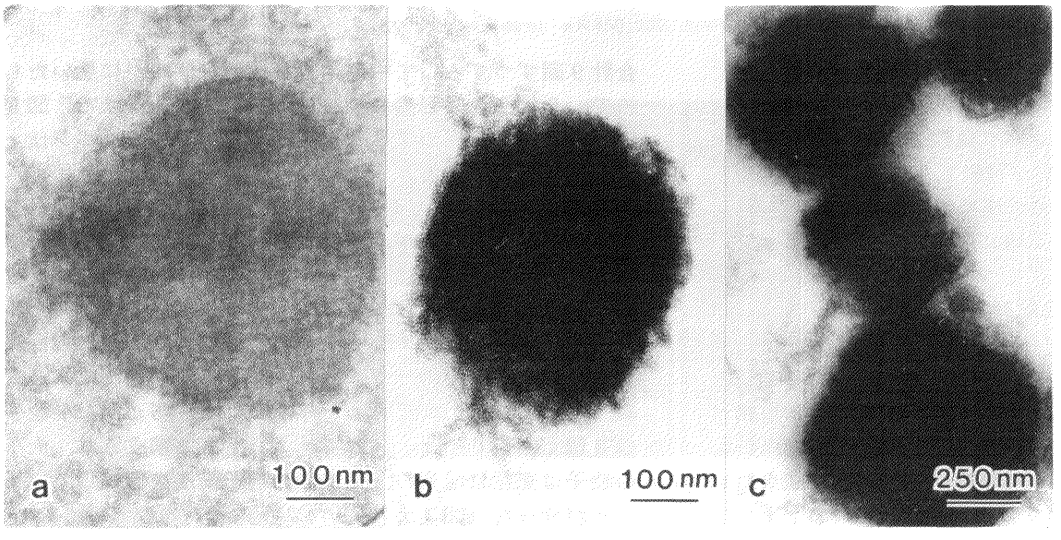


図3　0.001%DOC処理により単離された酵母クイクロボディ結晶体における局在酵素の電顕組織学的検出，a：コントロール，b：カターゼ検出のためのDAB反応，c：アルコールオキシダーゼ検出のための塩化セリウム反応　a，b×90,000，c ×40,000

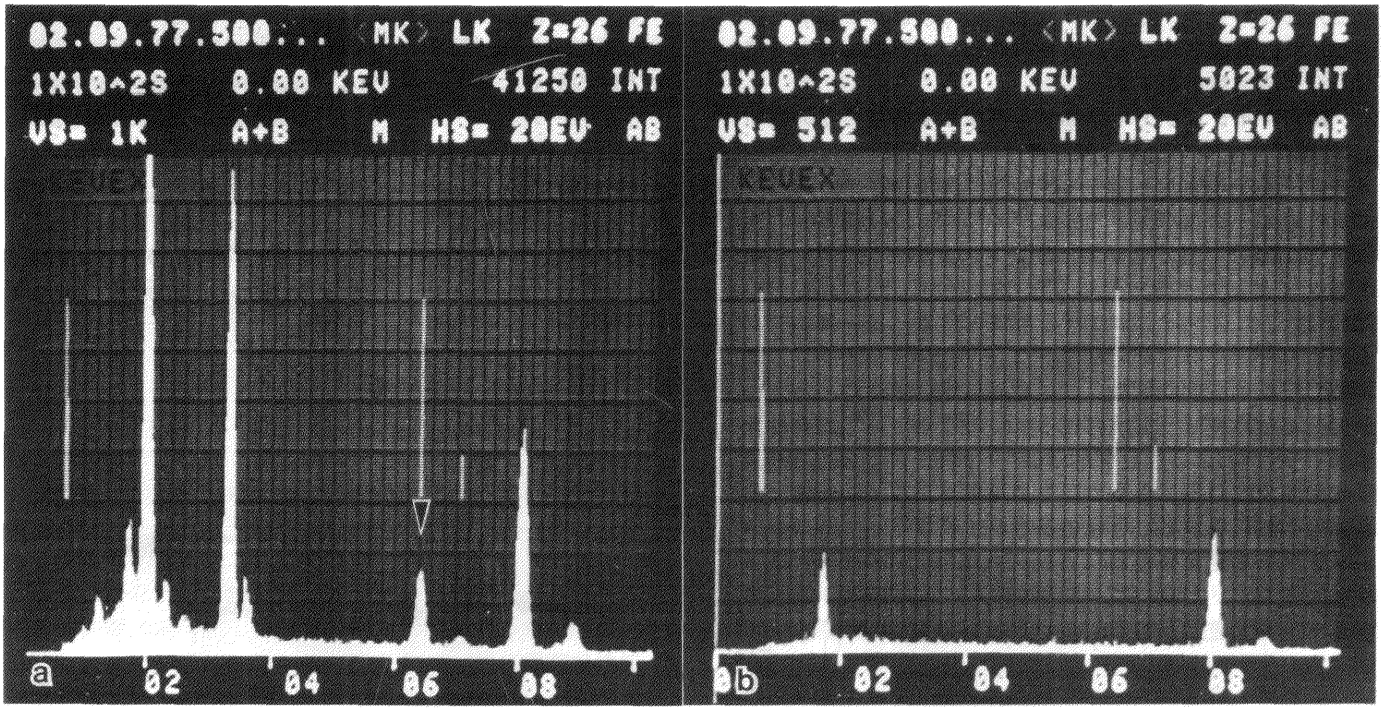


図5 酵母マイクロボディ結晶体の微小元素分析。カタラーゼ由来Feの特性X線◀を示すEPMAとバックグラウンドとしてのカーボン補強したフォルムバール膜のEPMA(b)

表1 酵母マイクロボディの局在酵素活性

	全蛋白量 (μg)	比活性 (n mole/min mg prot.)		相対活性 (%)	
		アルコールオキシダーゼ	カタラーゼ	アルコールオキシダーゼ	カタラーゼ
マイクロボディ画分	5080.3 (100%)	2993.4	476.7×10^3	100.0	100.0
DOC可溶性画分	2668.0 (52%)	255.0	83.8×10^3	3.8	9.3
DOC不溶性画分(単離結晶体)	2412.1 (48%)	4626.0	888.7×10^3	96.2	90.7
精製アルコールオキシダーゼ	1.0[18]	8700.0	—	—	—

しかし，マイクロボディ内のフリーズ・レプリカ像（図6b）からは，結晶体酵素分子の配列に関する有益な情報は得られない。細胞膜の膜内タンパク質粒子の配列は，この手法のような破断面からの解析が可能であるが，マイクロボディ結晶体の場合は，切片像からの構築が必要と考えられる。

そこで，微細な構造をより正確に観察しうるネガティブ染色法を試みた。

2.2 結晶体酵素分子の二次元配列[6)~10)]

凍結超薄切片にネガティブ染色を施して観察したところ，結晶体は大（φ10nm，⇆），小（φ7nm，←）の2種の粒子から構成されており，大小粒子間隔は11nm，単位格子は22nmであった（図7a）。

この像からノイズを除去するために，“重ね焼き”法を行った[9)]。図8aは，粒子を11nmずつ上下，左右，斜め上下の合計9回ずつずらして中間ネガを作製し，ポジに焼いたもので，9×9＝81回重ね焼きしたことになる。また，図8bは粒子を22nmずつずらした中間ネガを作製し，ポジ仕上げをしたものである。

11nmずつずらすと小粒子の上に大粒子が重なり，すべて大粒子の配列となるが，22nmずつ（つまり1つおきに）ずらしたものでは，大粒子の上に大粒子，小粒子の上に小粒子が重なって，白黒のコントラストが強調される。その結果，大粒子は4個のサブユニットから成ることまで示唆された。

さらに大小粒子のサブユニット構造を光沪過法によって調べたところ，二次元的に大粒子は4個（φ5nm），小粒子は2個（3.5×0.7nm）のサブユニットから構成され，大小の粒子は交互に配列し，正方形の格子構造を形成していることが分った（図7b，図9）。

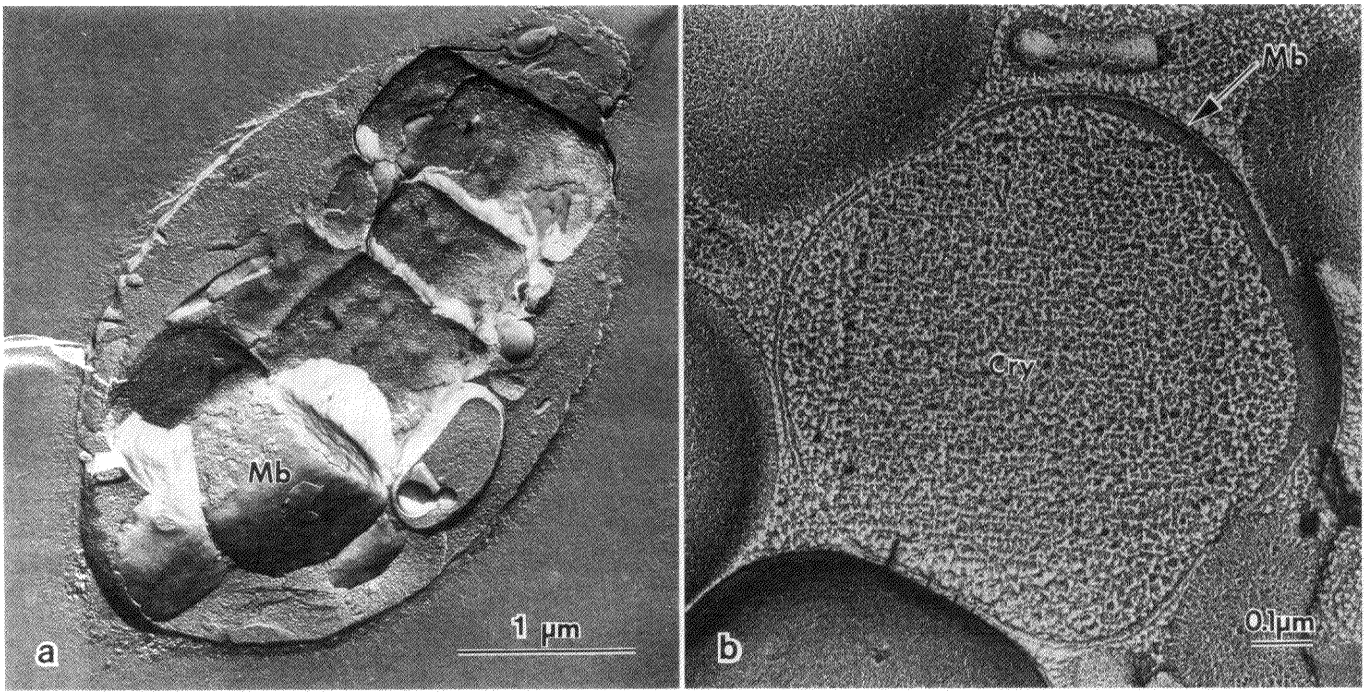


図6　*Kloeckera* sp. no. 2201細胞(a)と単離マイクロボディ(b)のフリーズ・レプリカ像　a×23,000，b×80,000

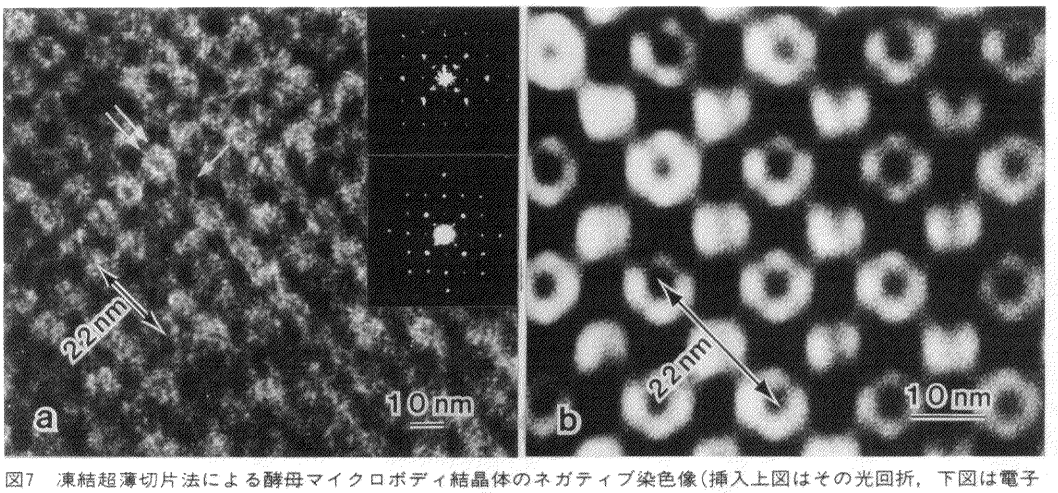


図7　凍結超薄切片法による酵母マイクロボディ結晶体のネガティブ染色像（挿入上図はその光回折，下図は電子回折パターン）(a)とその光沪過像(b)　a×450,000，b×1,000,000

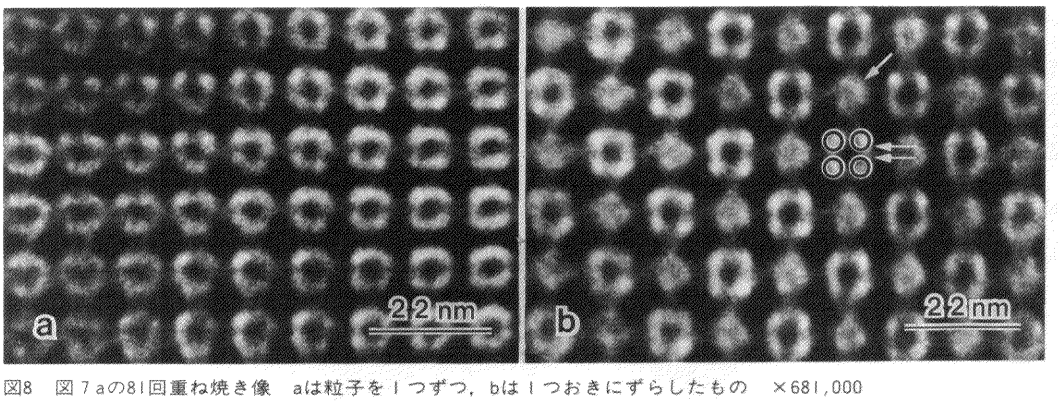


図8　図7aの81回重ね焼き像　aは粒子を1つずつ，bは1つおきにずらしたもの　×681,000

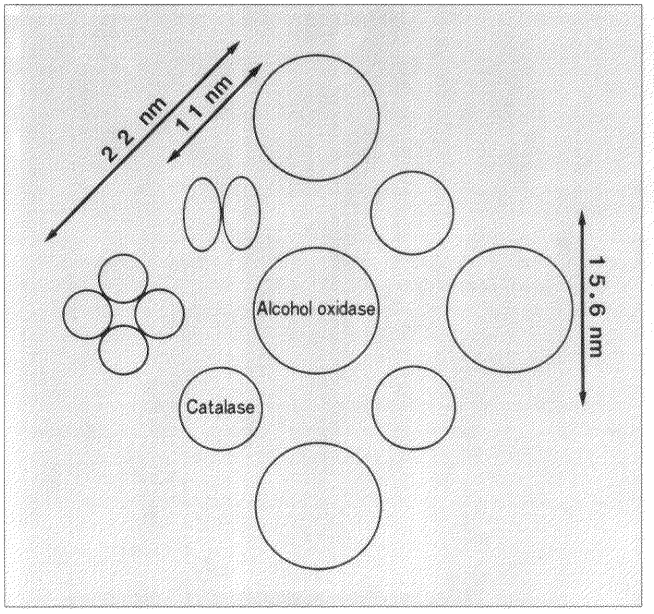


図9 酵母マイクロボディ結晶体の酵素分子配列の二次元モデル

これら大小の粒子は，分子量の違いから，大粒子は3ルコールオキシダーゼ（分子量673,000），小粒子はカタラーゼ（分子量240,000）と推論される。

それでは，これらの酵素分子の三次元的配列は，どのようになっているのであろうか。

2.3 結晶体酵素分子の三次元配列[6)~11)]

結晶体の凍結超薄切片像には，**図10**に示すように，正方形格子（a1），六方形格子（b1），短形格子（c1）の3つのパターンが現れる。**図10-2**に示すそれらの光回折パターンは，電子線回折パターン（**図10-3**）ともよく対応している。これらの回折パターンから，この結晶体は立方晶形であると推定される。

そこで，実際に電顕下で切片を傾斜させて観察すると，これら3つのパターンは相互変換した（**図11**）。この現象はコンピュータシミュレーションによる3Dプロット（**図12, 13**）により明確に裏付けられ，2種の酵素分子は組み合わさって，立方体の複合結晶体を形作っていることが分った（**図14**）。

（以下次号に続く）

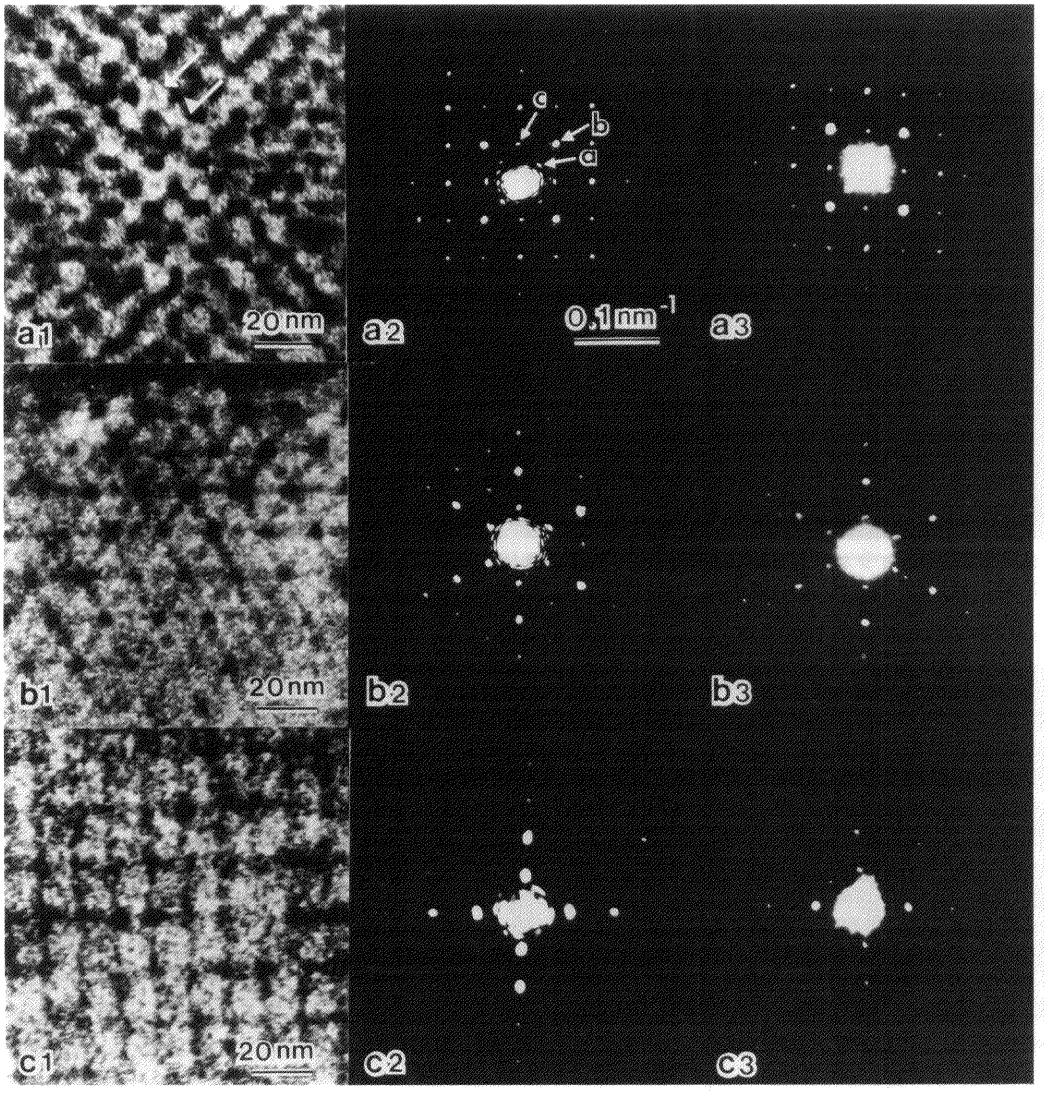


図10 酵母マイクロボディ結晶体の格子構造(1)，光回折像(2)と電子回折像(3) a2中のa, b, cはそれぞれ22, 11, 15.6nmを示す。 ×450,000

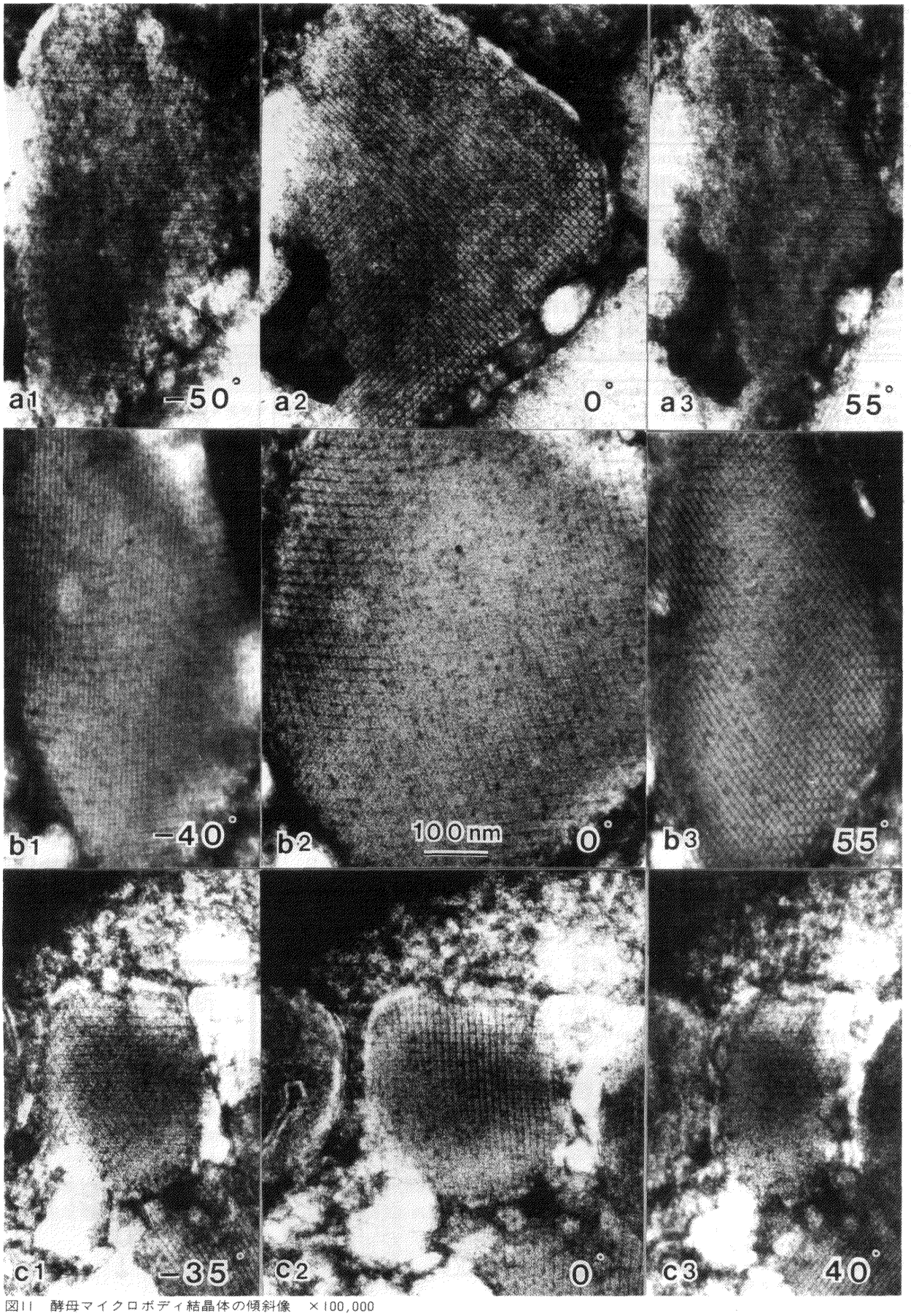


図11　酵母マイクロボディ結晶体の傾斜像　×100,000

Set the original x-, y- and z-coordinates of each lattice point (I,J,K).

$$\left.\begin{array}{l} X(I,J,K)=I-3 \\ Y(I,J,K)=J-3 \\ Z(I,J,K)=K-3 \end{array}\right\} \; I,J,K : 1 \sim 5$$

↓

Calculate the new x-, y- and z-coordinates of the lattice points rotated for θ_x, θ_y and θ_z around the x-, y- and z-axis, respectively.

Rotate the lattice points for θ_x.

$$X_1(I,J,K)=X(I,J,K)$$
$$Y_1(I,J,K)=\cos\theta_x \cdot Y(I,J,K)+\sin\theta_x \cdot Z(I,J,K)$$
$$Z_1(I,J,K)=-\sin\theta_x \cdot Y(I,J,K)+\cos\theta_x \cdot Z(I,J,K)$$

↓

Rotate the lattice points for θ_y.

$$X_2(I,J,K)=\cos\theta_y \cdot X_1(I,J,K)-\sin\theta_y \cdot Z_1(I,J,K)$$
$$Y_2(I,J,K)=Y_1(I,J,K)$$
$$Z_2(I,J,K)=\sin\theta_y \cdot X_1(I,J,K)+\cos\theta_y \cdot Z_1(I,J,K)$$

↓

Rotate the lattice points for θ_z.

$$X_{new}(I,J,K)=\cos\theta_z \cdot X_2(I,J,K)+\sin\theta_z \cdot Y_2(I,J,K)$$
$$Y_{new}(I,J,K)=-\sin\theta_z \cdot X_2(I,J,K)+\cos\theta_z \cdot Y_2(I,J,K)$$
$$Z_{new}(I,J,K)=Z_2(I,J,K)$$

↓

Calculate the distances between the projection plane (z-plane) and each lattice point.
Number each point in order of the shortness of the calculated distances.

↓

Plot the projected lattice points and draw the corresponding circles in order of number, the overlapping parts not being drawn.

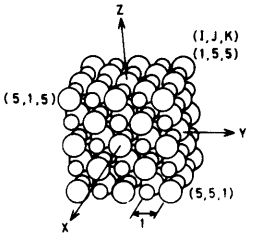


図12 酵母マイクロボディ結晶体のコンピュータシミュレーションのためのフローチャート

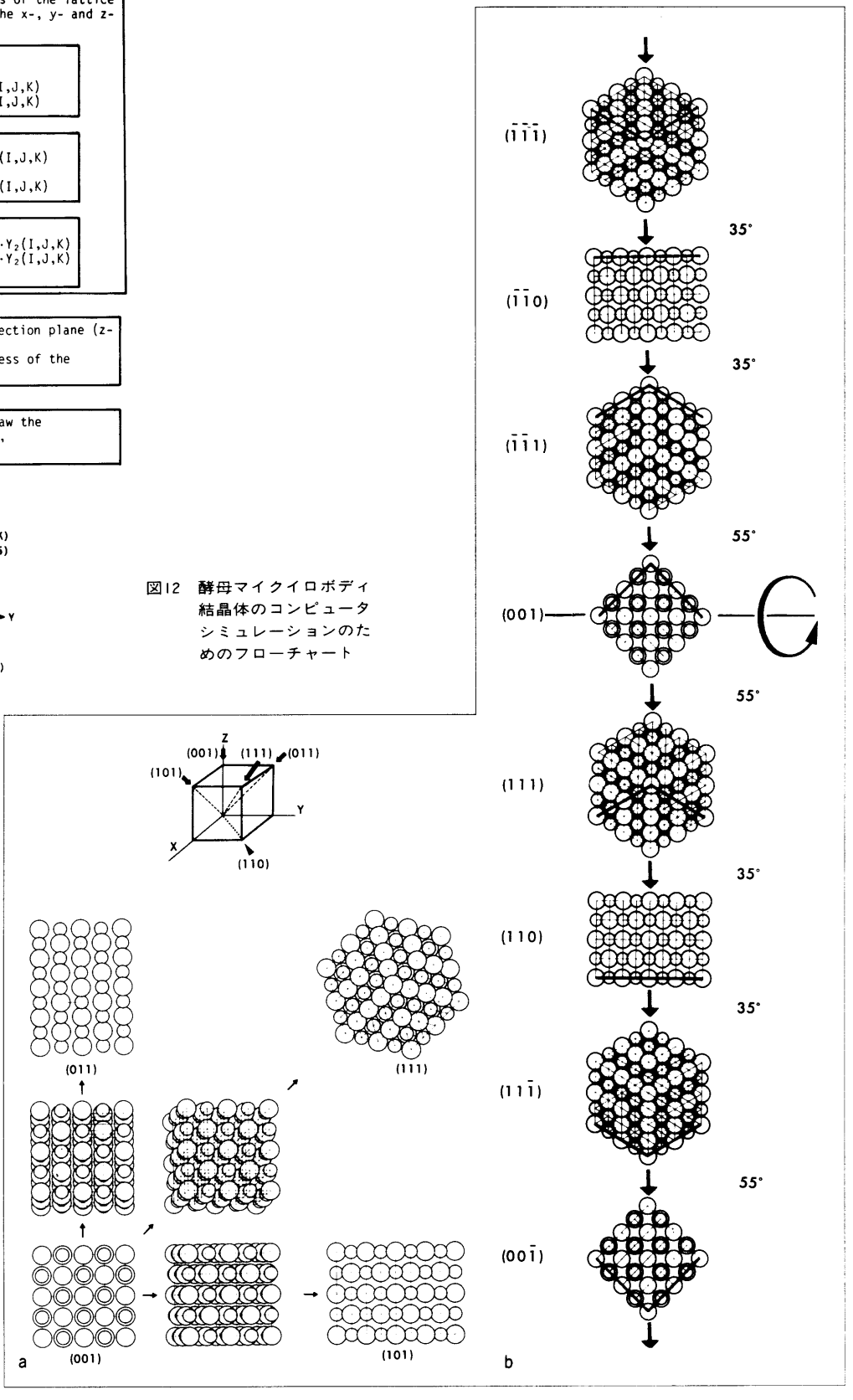


図13 コンピュータシミュレーションによる酵母マイクロボディ結晶体の岩塩型結晶モデルの3Dプロット(a)と対角線上に傾斜させた時に出現する面(b)

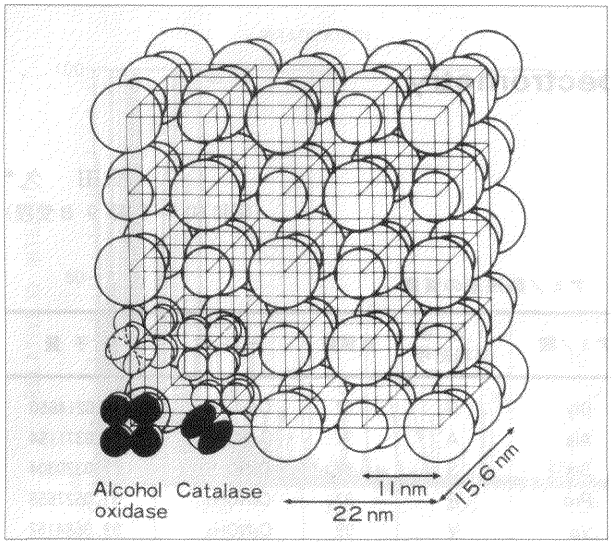


図14 酵母マイクロボディ結晶体の三次元モデル

参考文献

1) S. Fukui, A. Tanaka, and M. Osumi : Microbial growth on C_1-Compounds 139 (1975).
2) S. Fukui, A. Tanaka, S. Kawamoto, S. Yasuhara, Y. Teranishi and M. Osumi, : J. Bacteriol, 123, 317 (1975).
3) S. Fukui, S. Kawamoto, S. Yasuhara, A. Tanaka, M. Osumi and F. Imaizumi. Eur, J, Bioclem, **59**, 561 (1975)
4) A. Tanaka, S. Yasuhara. S. Kawamoto, S. Fukui and M. Osumi, J. Bacteriol. **126** 919 (1976)
5) M. Osumi and M. sato : J. Electron Microsc, **27** 127 (1978)
6) M. Osumi, M. Sato and M. Nagano : Current Developments in Yeast Research (ed. G. Stewart and I. Russell) 69 (1980)
7) M. Osumi, M. Nagano, M. Sato, M. Imai, and N. Yamada : J. Women's Univ. J. **29**, 163 (1982)
8) M. Osumi, M. Sato, T. Sakai, and M. Suzuki : J. Electron Microsc, **28**, 295 (1979)
9) J. Hosoi and M. Osumi : J. Electron Microsc. **30**, 158 (1981).
10) J. Hosoi and M. Osumi : J. Electron Microsc **30** 321 (1981).
11) M. Osumi, M. Nagano, N. Yamada, J. Hosoi and M. Yanagida : J. Bacteriol, **151** 376 (1982).

Topics

昭和60年度質量分析連合討論会開かる

題記の討論会が，5月16日から18日の日程で豊橋技術科学大学（野田保教授のお世話）で開催された。交通の便の悪さ？から参加者が例年より減るのでは（野田先生の談）との危惧も，初日の登録開始でたちまち解消し，結局，最終的には250人の参加となった。

幸い，会期中全て五月晴に恵れ，広大で近代的ビルの立ち並ぶキャンパスには時折雲雀の声も聞えるなか，会場では熱心な発表と討論が行われた。発表は「ミコール酸のガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー」新潟大の矢野教授をはじめ3件の特別講演，一般講演が85件（うち，日立製作所発表8件），奨励賞受賞講演2件などで極めて内容豊富であった。奨励賞を受賞された原田健一氏（名城大薬）はM-80B-SIMSの活用により，多く研究成果をあげられたことが受賞の対象となったもので，氏の今後とも後活躍を期待したい。今回の発表の特徴はCPU（パソコン）によるマススペクトルのアプローチからGC/MS，SIMS（FAB）などを利用した応用，ノウハウなどの広範にわたったことである。その中で特に塩野義研究所の岩谷氏，中川氏による薄層クロマト-STMSの発表は，難揮発性生体関連物質の「分離」と「イオン化」を共に行うことが可能となり，今後の分析の指針を示す画期的な研究として会場内外の注文を浴びた。今後この分析のルーチン化へメーカーとしても努力したい。（加藤　記）

U.D.C. 543.51:547.466.022

MSによるペプチドの構造解析

Structural analysis of Peptide with Mass Spectrometry

松田　久*

(昭和60年7月9日受理)

1. まえがき

ペプチドの一次構造（アミノ酸配列）を決定するのに質量分析法を利用しようという試みは，1959年Biemannら[1]によって始められて以来，多くの研究者によっていろいろな方法が提案されてきた。最近では，FD法，SIMS(FAB)法により，高分子量ペプチドのイオン化も可能となってきている。

私達の研究室でも，数年前からペプチドの質量分析をはじめ，大阪府立母子医療センターの林　昭，和田芳直両氏との共同研究により，人の血液のヘモグロビン異常におけるグロビン鎖のアミノ酸置換を調べ，質量スペクトルからアミノ酸置換の位置と種類を決定する新しい方法（Digital Printing法）を開発した。以下，私達の研究室で経験したいくつかの例を紹介し，簡単に説明させていただくことにする。

2. アミノ酸の分子量

質量分析法によりペプチドのアミノ酸配列を決めることができるのは，ペプチドを構成するアミノ酸の分子量が二つの例外を除いてそれぞれ異なるからである。**表1**にアミノ酸残基の質量数と精確な分子量の値を示す。炭素分子には^{13}C同位体が約1％含まれているので，分子量の大きいペプチドでは同位体ピークが何本も出るが，分析するときはすべて^{12}Cのみによる質量ピークを調べる。LeuとIle（M＝113），LysとGln（M＝128）は質量数が同じであるが，適当な方法（クロマトなど）と組合せると識別することができる。LysとGlnとは高分解能ミリマス分析によっても識別の可能性がある。

3. 単一ペプチドの質量スペクトル

ペプチド分子をMとすると，FD法，SIMS（FAB）法何れも主として$(M+H)^+$［負イオンのときは$(M-H)^-$］のイオンが強くあらわれる。アミノ酸配列を調べるときはこのピークに着目するのである。**図1**にBradykininのSIMSスペクトル[2]を示す。SIMS法ではアミノ酸配列と対応をつけることのできるフラグメントイオンも観測される。このフラグメントスペクトルから，試料ペプチドのアミノ酸配列を決めようという試みもあるが[3]，全く未知試料の場合，現段階では断定することが困難な場合が多い。しかし，多くの場合，$(M+H)^+$イオンを確認することは容易であり，これからペプチドの分子量を知ることができる。

ペプチドの分子量がわかると，エドマン分解法と組み合せることによってアミノ酸配列を決定することができる[4]。すなわち，N端アミノ酸を切断するエドマン分解の前後のペプチドの分子量を測定してその差をとると，それは切断されたアミノ酸残基の質量に等しいから，そのアミノ酸の種類がわかる。これを順次繰返すと，アミノ酸配列がきめられる。**図2**にBradykininのFDスペクトル群を示す。各スペクトルにつけた数字はエドマン分解の回数で，分解が進むと共に残留ペプチドの質量が減っていく有様がよくわかる。この方法は，試料が2種以上の異なるペプチドの混合物であっても，配列決定を同時に平行に行うことができるという利点をもっている。

表1　アミノ酸残基の質量

アミノ酸	1文字省略記号	質量数	分子式	分子量
Gly	G	57	C_2NOH_3	57.0214650
Ala	A	71	C_3NOH_5	71.0371154
Ser	S	87	$C_3NO_2H_5$	87.0320304
Pro	P	97	C_5NOH_7	97.0527658
Val	V	99	C_5NOH_9	99.0684162
Thr	T	101	$C_4NO_2H_7$	101.0476808
Cys	C	103	C_3NOSH_5	103.0091884
Leu	L	113	C_6NOH_{11}	113.0840666
Ile	I	113	C_6NOH_{11}	113.0840666
Asn	N	114	$C_4N_2O_2H_6$	114.0429300
Asp	D	115	$C_4NO_3H_5$	115.0269454
Gln	Q	128	$C_5N_2O_2H_8$	128.0585804
Lys	K	128	$C_6N_2OH_{12}$	128.0949662
Glu	E	129	$C_5NO_3H_7$	129.0425958
Met	M	131	C_5NOSH_9	131.0404892
His	H	137	$C_6N_3OH_7$	137.0589146
Phe	F	147	C_9NOH_9	147.0684162
Arg	R	156	$C_6N_4OH_{12}$	156.1011150
Tyr	Y	163	$C_9NO_2H_9$	163.0633312
Trp	W	186	$C_{11}N_2OH_{10}$	186.0793158

4. 酵素消化したペプチドの質量スペクトル

単一ペプチドをトリプシンなどの酵素で消化してFDあるいはSIMSスペクトルをとると，消化によりつくられる小ペプチドそれぞれのプロトン化イオンがスペクトル線としてあらわれ，それらの分子量を知ることができる。**図3**(a)にGlucagonのキモトリプシン消化物のFDスペクトルを示す。C_1—C_6の小ペプチドに対応するスペクトル線が認められ，それから求めた分子量はGlucagonのアミノ酸配列から計算した値と正確に一致している。このペプチド混合物をそのままエドマン分解して質量スペクトルをとると，**図3**(b)，(c)に示すようになり，これから各成分ペプチドのアミノ酸配列を同時に平行に決めることができる。

このようにして決められた成分小ペプチドのアミノ酸配

*大阪大学教養部　教授　理博

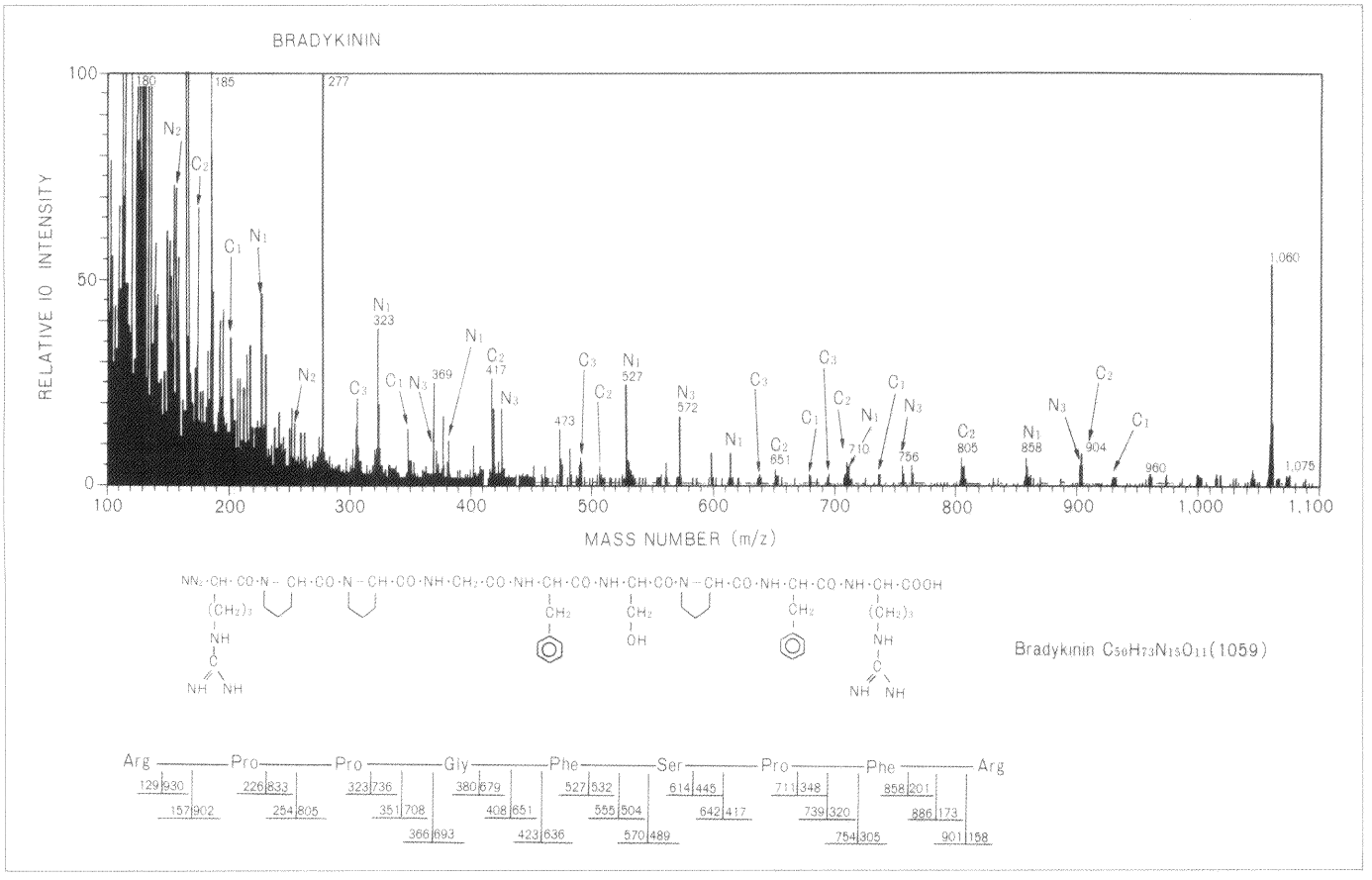


図1　BradykininのSIMSスペクトル

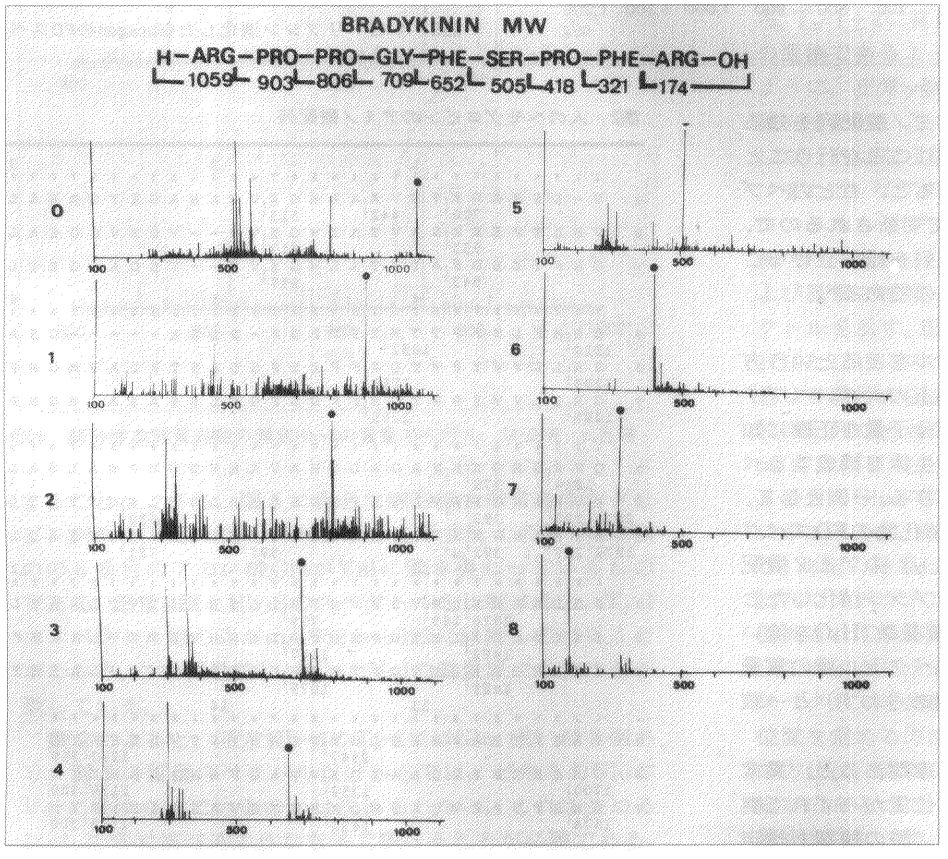


図2　エドマン分解前後のFDスペクトル（Bradykinin）

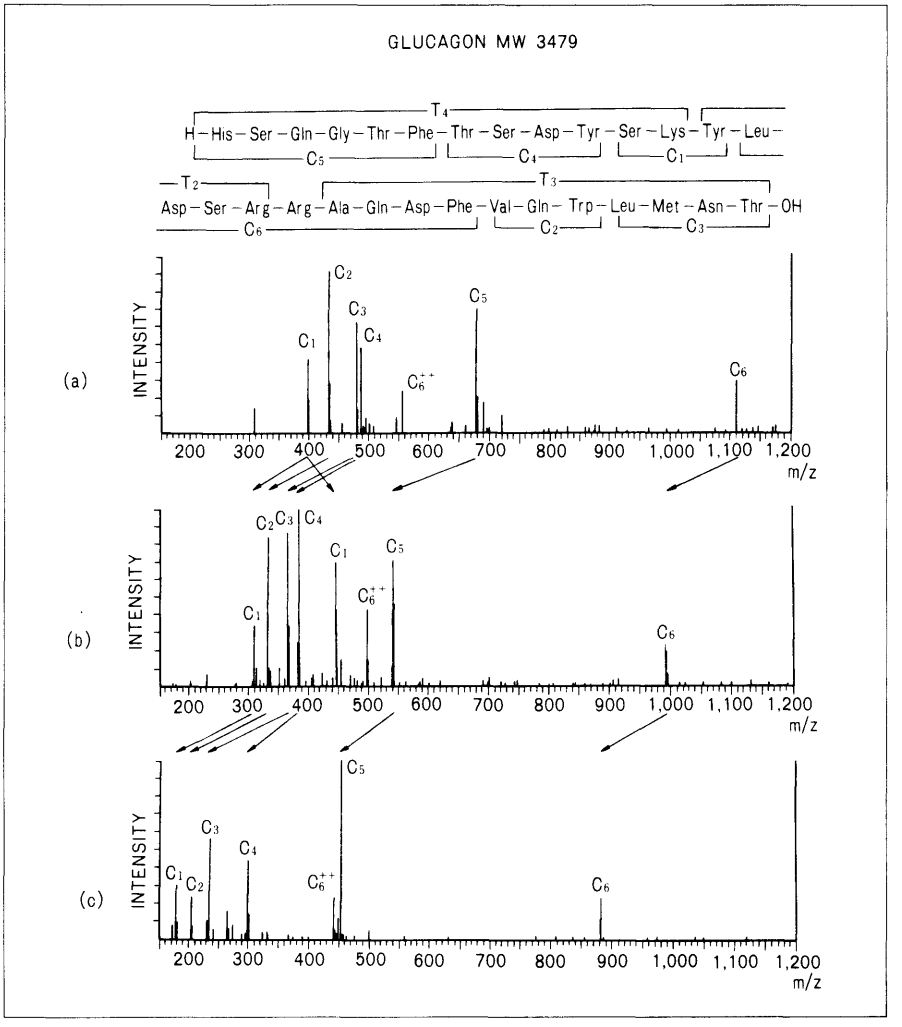


図3 キモトリプシン消化したGlucagonのFDスペクトル

列を接続して，もとのペプチド全体のアミノ酸配列を知る情報は，消化する酵素の種類を変えて同じことを行うことによって得られる。異なる酵素で消化すると，もとのペプチドは，はじめと異なるアミノ酸の位置で切断されるので，両者で得られた小ペプチドのアミノ酸配列を組み合せることにより全体のつながりが明らかとなるのである[5]。

5. アミノ酸置換の検出

ペプチドの酵素消化物の質量スペクトルをとるという方法によると，親ペプチドが分子量1万以上の大きいペプチドであっても，その酵素消化物すべての分子量を正確に知ることができる。このことを利用して，生体を構成するペプチドのアミノ酸置換を調べることができる。一例として，**図4**に，人のグロビンγ鎖のトリプシン消化物のFDスペクトルを示す。**表2**にグロビン鎖（α，β，γ）のアミノ酸配列（1文字省略記号であらわす）とトリプシン消化したときの切断位置，および切断小ペプチドの質量数（H_2Oを除いたもの）を示す。この表から計算したスペクトル線の質量は**図4**のスペクトル線（数字はT_p番号をあらわす）と一致している。

もし配列のどこかにアミノ配置換の異常があると，異常のある小ペプチドのスペクトル線が正常位置からずれて観測される。また，ずれの質量差からアミノ酸の種類も推定

表2 人のヘモグロビンのアミノ酸配列

```
                    1                   2                   3
    1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
α   V - L S P A D K|T N V K|A A W G K|V G A H A G E Y G A E A L
                 710|   442|       513|
β   V H L T P E E K|S A V T A L W G K|V N - - V D E V G G E A L
                 933|               913|
γ   G H F T E E D K|A T I T S L W G K|V N - - V E D A G G E T L
                 943|               957|
                        4                   5                   6
    1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
α   E R|M F L S F P T T K|T Y F P H F - D L S H - - - - - G S A
  1510|             1052|
β   G R|L L V V Y P W T Q R|F F E S F G D L S T P D A V M G N P
  1295|               1255|
γ   G R|L L V V Y P W T Q R|F F D S F G N L S S A S A I M G N P
  1297|               1255|
                        7                   8                   9
    1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
α   Q V K|G H G K|K|V A D A L T N A V A H V D D M P N A L S A L
     1814|   379|
β   K|V K|A H G K|K|V L G A F S D G L A H L D N L K|G T F A T L
 2039|227|     393|                                 1650|
γ   K|V K|A H G K|K|V L T S L G D A I K|H L D D L K|G T F A Q L
 1970|227|     393|                 997|         721|
                       10                  11                  12
    1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
α   S D L H A H K|L R|V D P V N F K|L L S H C L L V T L A A H L
             2976|269|           799|
β   S E L H C D K|L H V D P E N F R|L L G N V L V C V L A H H F
             1402|             1107|
γ   S E L H C D K|L H V D P E N F K|L L G N V L V T V L A I H F
             1429|             1079|
                       13                  14
    1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8
α   P A E F T P A V H A S L D K|F L A S V S T V L T S K|Y R
                           2947|                     1233|319
β   G K|E F T P P V Q A A Y Q K|V V A G V A N A L A H K|Y H
  1700|                   1359|                     1130|300
γ   G K|E F T P E V Q A S W Q K|M V T G V A S A L S S R|Y H
  1674|                   1430|                     1159|300
```

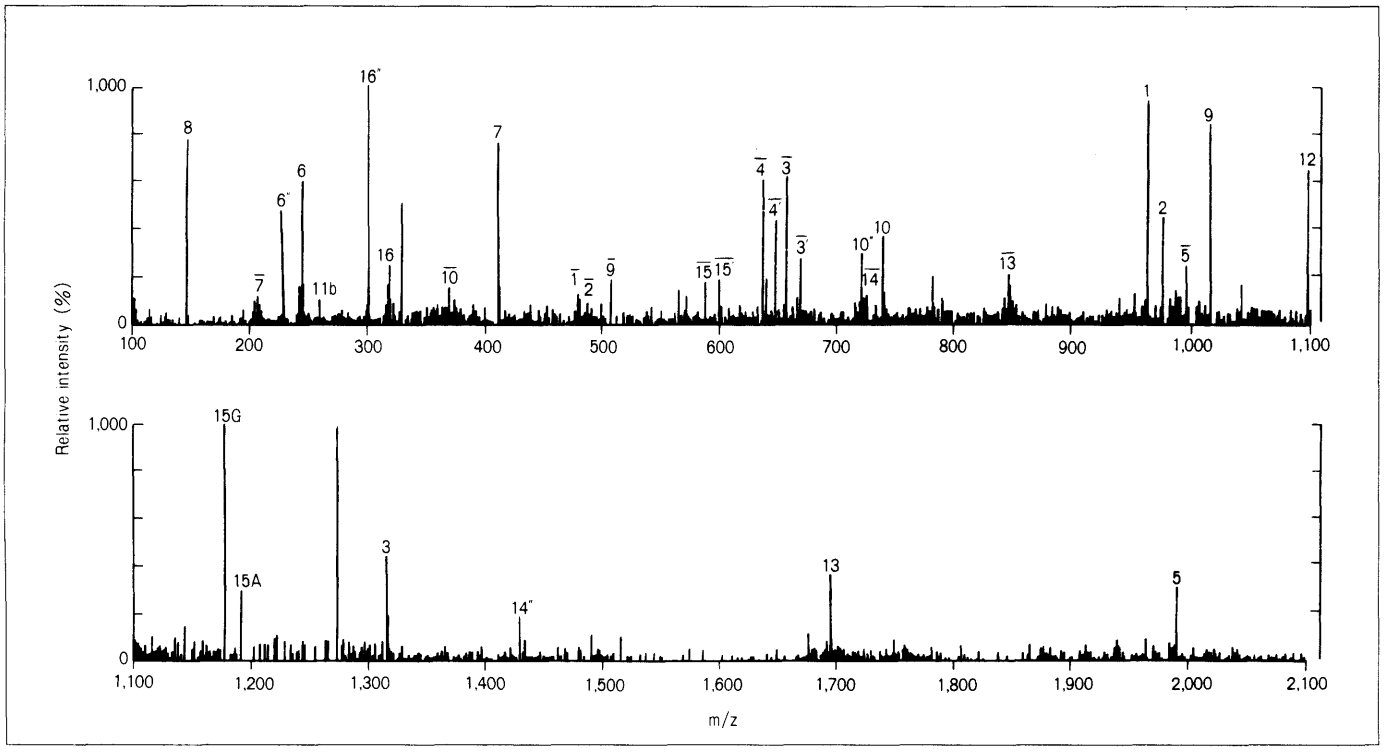


図4　トリプシン消化したグロビンγ鎖のFDスペクトル

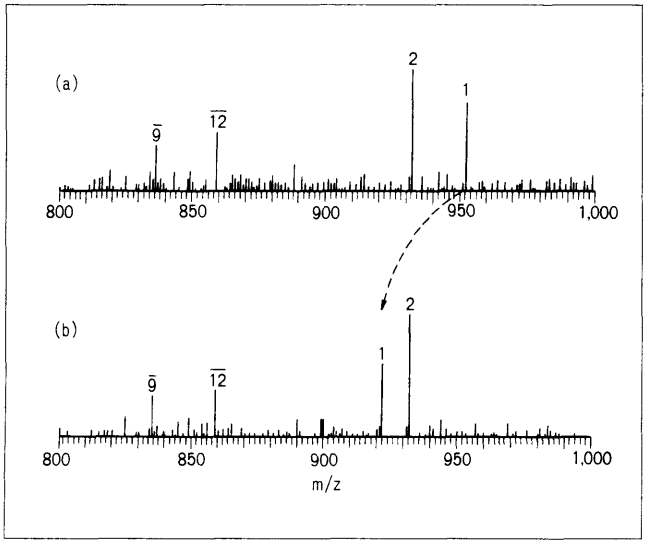


図5　鎌形赤血球貧血症の異常Hb-Sの質量スペクトル　(a)正常，(b)異常

することができる。**図5**に有名な鎌形赤血球貧血症のグロビンβ鎖（Hb-S）のFDスペクトルを示す[6]。この異常はβ鎖のの6番目のアミノ酸GluがValに置き換わっているものである。正常β鎖とHb-Sのスペクトルを比較すると，T_p-1のスペクトル線のみがm/z952から922に移動していることがわかる。この質量差30はGluとValの質量差にちょうど一致している。

表2によると，正常Hb-βのT_p-1にはGlu（E）が2個あり，**図5**の質量スペクトルだけからでは，どちらのGluがValに置換されているのかは決められない。これを決めるには，次章で述べるような方法で調べることが必要である。

6．ヘモグロビンγ鎖の異常

最近新しく発見された新生児の異常ヘモグロビンγ鎖（IZUMIと名づけられている）について述べよう。この異常γ鎖のトリプシン消化物の質量スペクトルを調べたところ，T_p-1＋2に質量数72の減小が認められ，これはGlu→Glyの置換であることがわかった。ところが，**表2**からわかるように，正常γ鎖のT_p-1にもGlu（E）が5，6番目に2個続いており，このどちらのGluが置換しているのかを決定しなければならない。

そこで，ペプチドをGluの位置で切断する酵素，スタフィロコッカル　プロテアーゼで消化してSIMSスペクトルを調べた。**図6**に，γ鎖の21番目までのアミノ酸配列（正常および異常2種類）と，正常（上）および異常（下）のSIMSスペクトルを示す。正常γ鎖では，図に示す位置で切断され，m/z719と1219にスペクトル線が認められる。異常γ鎖の場合，若し5番目のGluがGlyに置き換っているのであれば，最下段の配列からわかるように，m/z1219のピークは動かず，m/z719のピークのみが647に移動する筈である。また，若し6番目のGluがGlyに置換しているのであれば，真中の配列に示すように，m/z590と1276のピークがあらわれるであろう。測定の結果は下のスペクトルに示すように，m/z 590と1276にスペクトル線が移動したので，6番目のGluがGlyに置換されていることが確認された[7]。

このように，適当な酵素で消化して，正常と異常の質量スペクトルを比較することにより，アミノ酸置換の種類と位置を定める方法をDigital Printing法と名づけている。この方法は，濾紙にとられた僅か一滴の血液からでも十分測定ができるので，医学上の調査研究に極めて有用である。現在までに，数十例のヘモグロビン異常のアミノ酸置換が

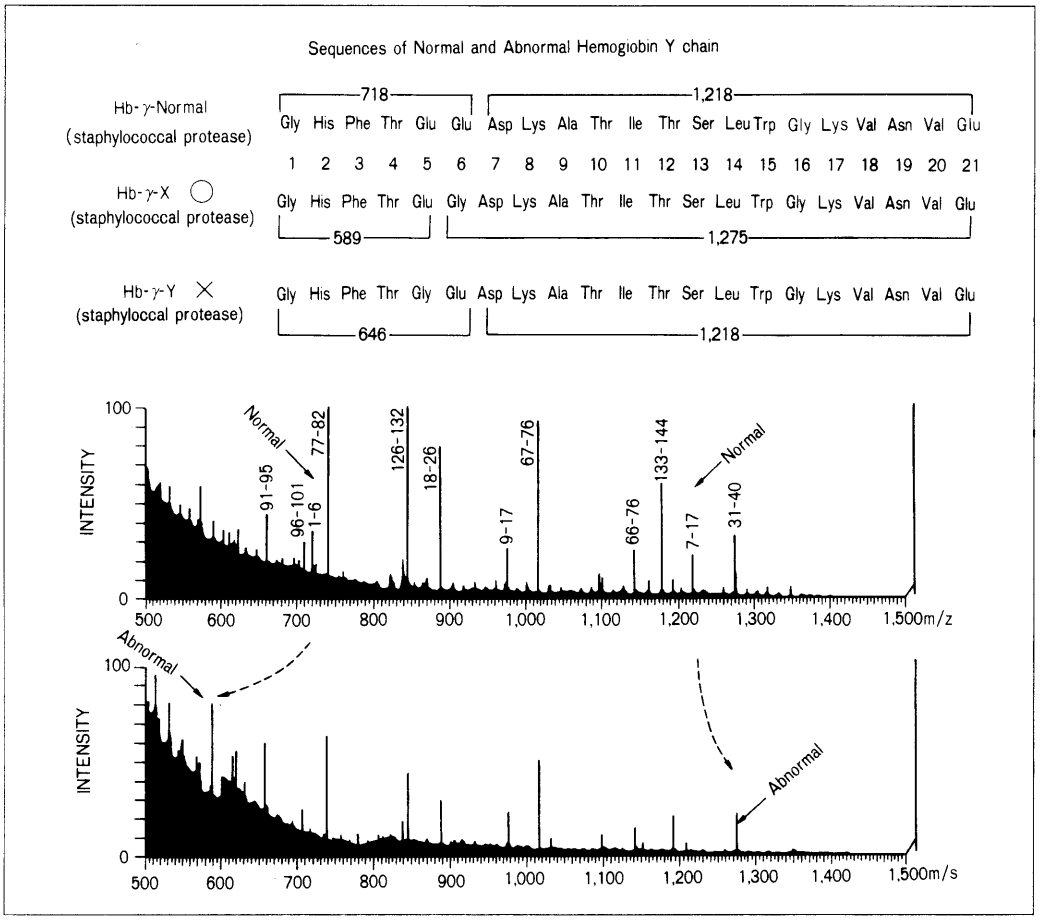


図6 スタフィロコッカル プロテアーゼで消化したHb-γのSIMSスペクトル

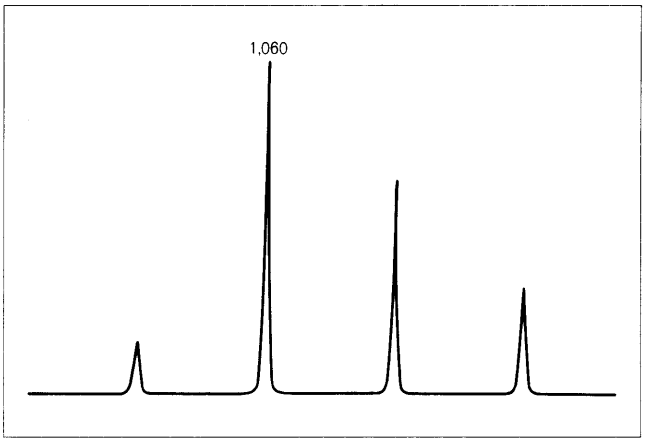


図7 Bradykininの高分解能質量スペクトル

調べられている。

7. あとがき

以上の他にもいくつかの応用例があるが，紙数の関係で省略させていただく。質量分析法は酵素消化やエドマン法を組み合せると，ペプチドの構造解析に非常に有用な方法となるであろう。とくに，構造既知のペプチドから出発して，アミノ酸置換を調べるDigital Printing法は，分子病などの異常ペプチドのスクリーニングや，生物の進化の過程を調べる研究に広く応用されると思われる。

質量分析法では，ペプチドの分子量を手がかりに構造解析をするので，まず，分子量を正確に測定しなければならず，分子量数千のペプチドでもきっちり1まで確定する必要がある。このため，高分解能，高感度の質量分析計が要求される。最近，日立中央研究所と大阪大学の協力により，新しい高分解能，高感度質量分析計が開発されつつある。図7はこの装置でとったBradykininの高分解能質量スペクトルである。今後，研究はより複雑で高分子量のペプチドの構造解析に進むと考えられるので，質量分析計の性能向上も，これからの重要な課題の一つである。

参考文献

1) K. Biemann, F. Gapp and J. Seibl : J. Amer. Chem. Soc., **81**, 2274 (1959)
2) HITACHI TECHNICAL DATA No.28, p.12
3) T. Sakurai, et al. : Biomed. Mass Spectrom., **11**, 396 (1984)
4) Y. Shimonishi, et al. : Chem. Lett. (1979) 1369
5) T. Matsuo, et al. : Mass Spectroscopy, **28**, 169 (1980)
6) T. Matsuo, et al. : Biomed mass Spectrom., **8**, 25 (1981)
7) Y. Wada, et al. : Biochim, Biophys, Acta., **749**, 244 (1983)

U.D.C. 543.422.25:547.993.022:593.3/.4

海洋天然物の構造研究

Structural Studies on Marine Natural Products

上村　大輔*　平田　義正**

（昭和60年7月9日受理）

近年，海洋生物の生産する天然有機化合物に関する研究が世界的に展開されつつある。その理由は，有機資源としての海洋には魅力があるし，学問的にも新しい発展的ヒントを与えてくれるからであろう。最近の筆者らの海洋天然物研究について報告する。

1. 猛毒パリトキシンの構造研究[1)]

パリトキシンは，1971年ハワイ大学Scheuer教授らにより名付けられた腔腸動物毒で，その強い毒性（フグ毒の50倍）と，タンパク質や多糖類と違って単位分子の縮合繰返しを含まない複雑な構造とがその特徴である。この毒の発見は，シガテラ（南方産魚介類による中毒）研究者Banner教授による。シガテラを調査中に，伝説の中に出てくるハワイ原住民の矢毒が，実は*Palythoa*属の腔腸動物に起因することを探り当てたのである。一方，日本でも海洋毒研究者の一人，東京大学故橋本教授による報告が1972年にある。沖縄県石垣島ではソウシハギの内臓を家畜に与えると死ぬと言われており，調査の結果食物連鎖に基づくことが判明し，腔腸動物イワスナギンチャク（*Palythoa tuberculosa*）（**図1**）が原因であるという結論となった。

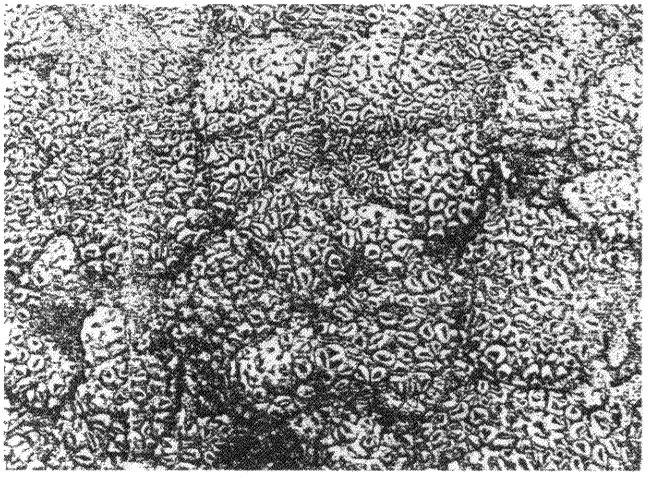


図1　石垣島のサンゴ礁に棲息するイワスナギンチャク（猛毒パリトキシンを含んでいる）

筆者らは東京大学グループが研究を中止したことを確認し，1972年頃からこのパリトキシンに関する構造研究を始めた。5月～6月頃に石垣島で採集したイワスナギンチャクを注意深くアルコール抽出し，そのエキスを種々のカラムクロマトグラフィーを用いて分離，精製を繰返した。特にその頃，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が急速に発展した時期であり，それと伴って新しい型のカラム充塡用高分子が数多く出回った。そのため，水溶性でかつ疎水性でもある物質の取扱いが随分楽になって助かった。精製したパリトキシンは，マウスに対しての腹腔内投与で0.5 μg/kgのLD_{50}（半致死量）を示すが，試験動物によって感度が異なる。

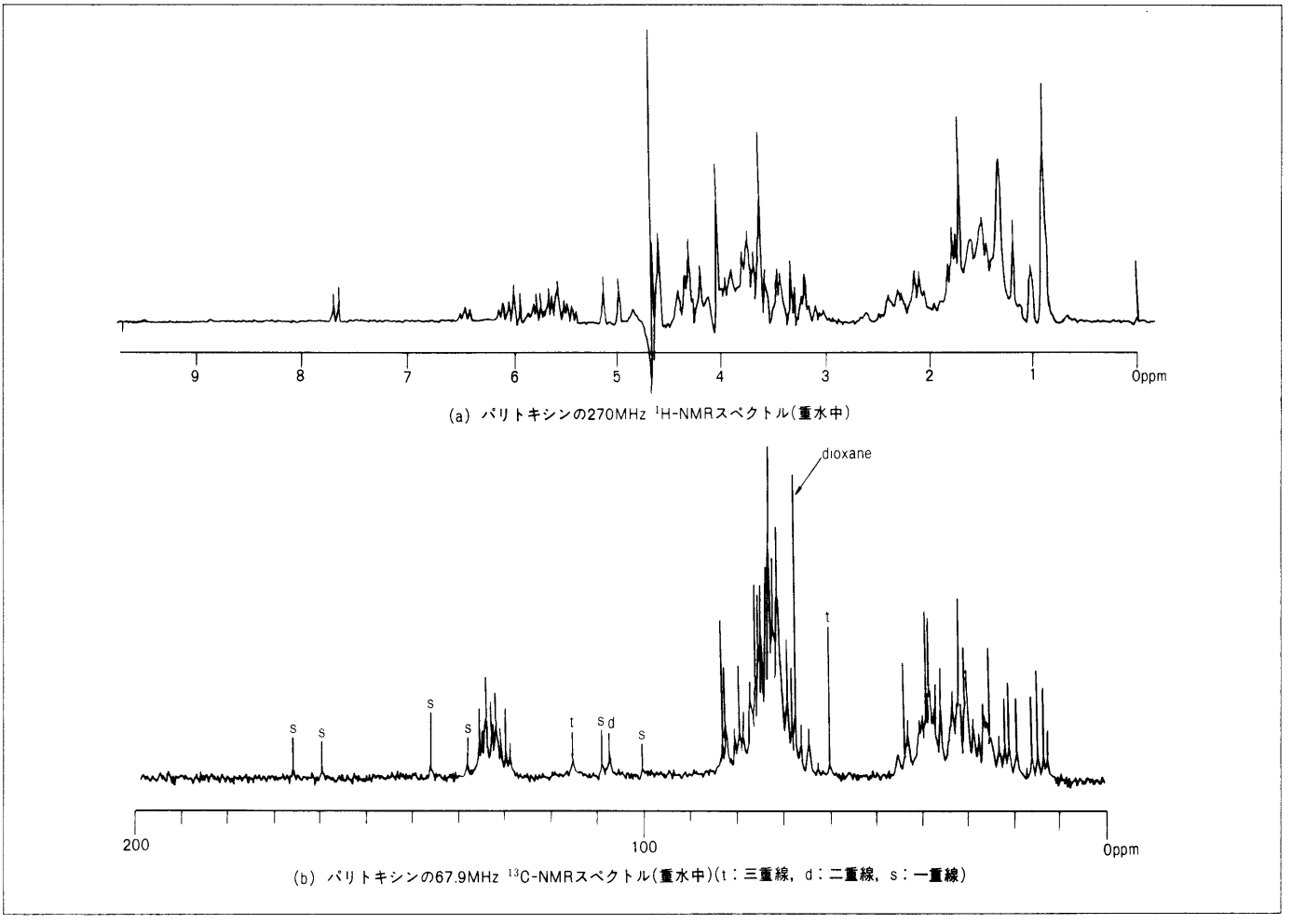
構造研究を始めた頃は，共鳴周波数が100MHzで，CW法の核磁気共鳴（NMR）装置を使っていた。しかし，徐々に超伝導磁石を使った高磁場FT-NMR装置が普及し，研究がどんどん進むようになった。**図2**は，東京大学の270MHz FT-NMR装置によって測定された結果である。^{13}C-NMRスペクトルからは，7個のメチル炭素，酸素のつく多くの炭素，オレフィン炭素等が観測された。^{1}H-NMRスペクトルからは，部分的な二重結合の関係が明らかとなっただけである。それ故，二重結合はオゾン分解で，隣接する水酸基部分は$NaIO_4$分解で分子を小さくする方法をとり，構造研究を進めて行くこととなった。ところでこの分子の毒性と最も関係が深いのは，末端の$-CH_2NH_2$部分であり，これをアセチルあるいは*p*-ブロモベンゾイル化すると，活性が1/100以下に低下する。パリトキシンは神経毒であり，興味あることに神経膜のナトリウムイオン透過性を高めるが，逆の作用を持つフグ毒テトロドトキシンによって阻害されることはない。薬理学的には，異なるNaチャンネルが存在することを示唆する[2)]。

ところでパリトキシンの分子量は，1976年^{252}Cf-PDMS（Plasma Desorption Mass Spectrometry）により測定された（**図3**）[3)]。つまり^{252}Cf核分裂片をサンプル薄膜にあてプラズマ領域をつくり，分子をイオン対としそれぞれ測定しようとする方法である。Macfarlane教授によって開発され，当時不揮発性分子の代表であるパリトキシンが測定されたということで注目された。現在では，FAB MS（Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry）で相当見事に測定されるようになった（**図4**）[4)]。分子量2678であり，最終的な構造とも一致する。現在では分子量10000以上のものでも直接的に測定できるようになった。こうなると，普通の意味での分子量nominal mass，天然で存在性の最も大きな同位体のみで計算したmonoisotopic mass，また化学的平均原子量で計算したaverage massの間で大きな相違が生じ，問題となることが提示されたことは興味深い[5)]。

話を本論へ戻すが，分解反応後注意深く分離した各分解物の構造は，^{1}H-NMRスペクトルを中心とした各種スペクトル解析，X線結晶構造解析で明らかにしていき，パリトキシンの平面構造を1981年決定した[6)]。また，有機合成化学の

* 静岡大学　教養部　理博

** 名城大学　薬学部　理博



(a) パリトキシンの270MHz ^{1}H-NMRスペクトル(重水中)

(b) パリトキシンの67.9MHz ^{13}C-NMRスペクトル(重水中)(t：三重線，d：二重線，s：一重線)

図2 パリトキシンの270MHz^{1}H-NMRスペクトル(a)と67.9MHz^{13}C-NMRスペクトル(b)

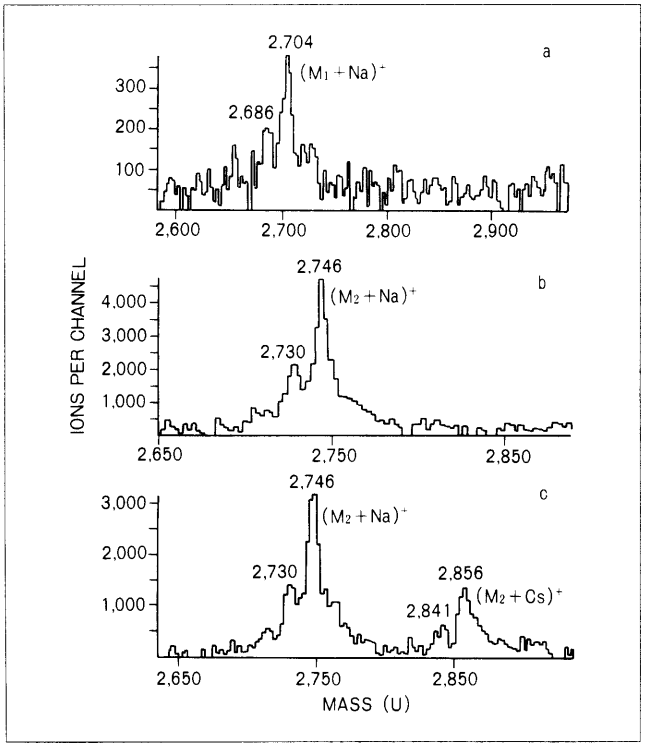


図3 パリトキシンの^{252}Cf-PDMS
a パリトキシン
b N-アセチルパリトキシン
c CsI上でのN-アセナルパリトキシン
C＝12.011で換算。パリトキシンの平均分子量2680.17に^{13}Cを必ず1個含むと考えることによりよく一致する。

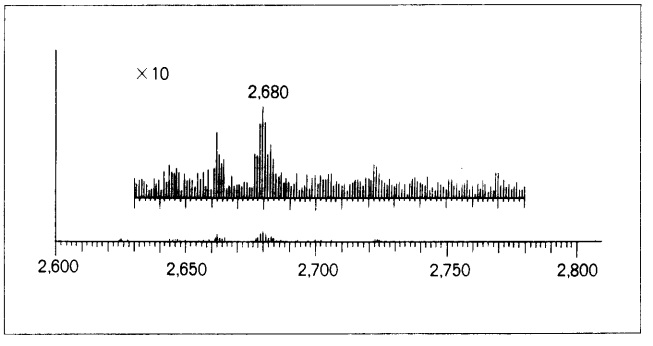


図4 パリトキシンのFABスペクトル
(M＋1)$^{+}$が観測され，monoisotopic massの2678.48に炭素原子129個中必ず1個の^{13}Cを含むことを考慮するとよく一致する。

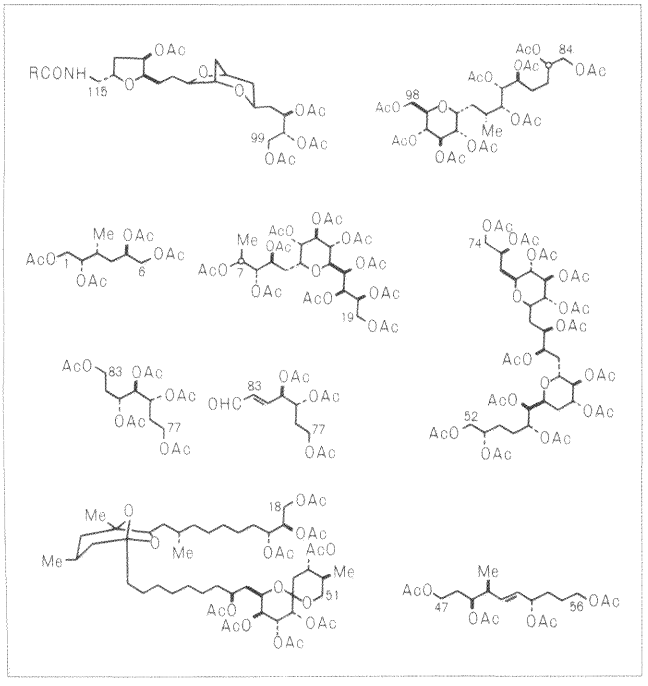


図5　合成されたパリトキシンの各分解物

世界的中心ハーバード大学岸教授は，重要な分解物（**図5**）を立体化学を証明しながら合成していった。筆者らと協同で発表した最終的全構造を**図6**に示す[7]。この研究は，ハワイ大学のグループと競争になったが，結論的には筆者らの結果が正しいことは明らかである。炭素115個が連なる長い鎖状分子で多くの水酸基，エーテル結合，二重結合が組み合わさった複雑な分子で，歴史的な化合物となるであろう。今後筆者らは，500MHz ^{1}H-NMRスペクトル（**図7**）の完全解析と分子の立体配座研究[4]，ハーバード大学岸教授は，いわゆる生体高分子以外では最も大きな分子パリトキシンの全合成研究と，新しい基礎概念発見を目指して研究を進めつつある。

ところで，このような分子がどのように生体内で合成されているかについては謎である。イワスナギンチャク自身が作っているのか，それとも食物連鎖，共生微生物によるものなのか，今後明らかにされて行くと期待される。

2.　クロイソカイメンの抗腫瘍性物質

カイメンは海産生物の中でも面白い生活を営むものの一つである。すなわち，その体内に自分自身の細胞より多くのバクテリア等共生微生物を働かせ生活している。それ故，カイメン自身の代謝産物以外にこの共生微生物による成分

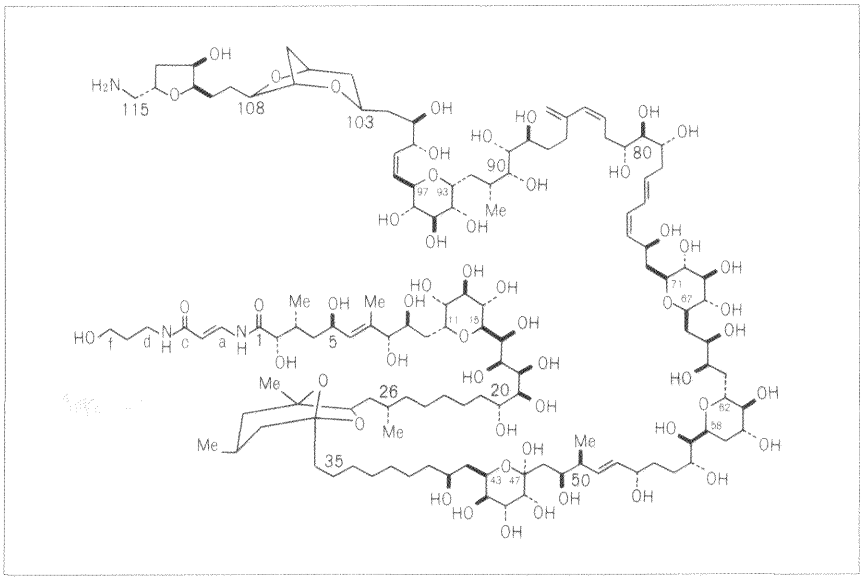


図6　パリトキシンの全構造

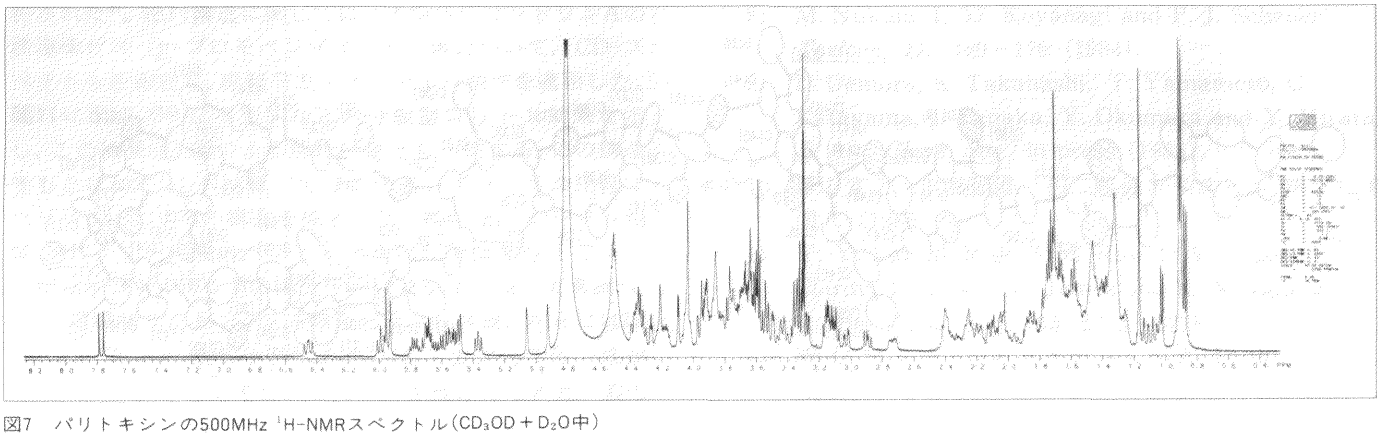


図7　パリトキシンの500MHz ^{1}H-NMRスペクトル（CD_3OD+D_2O中）

図8 クロイソカイメン

を含んでいるはずである。また，海水を日にトン単位で体内に入れ，栄養分を取っているので，海洋の他の生物，特に微生物の代謝産物を多く含んでいることとなる。以上のような観点から，比較的量の多い成分に隠された生物活性物質，すなわちカイメンの微量成分を探せば，必ず有用物質に巡り合えると思い研究を始めた。最近やっと結果が出始めたので以下それについて述べる。

微量成分ということで，まず大量に入手できる，ごく身近にあるカイメン，クロイソカイメン（*Halichondria okadai Kadota*）（**図8**）をその対象として選んだ。三浦半島油壺周辺でよくみかける生物で600kgを採集した。これを抽出し，B-16 melonoma cellを使い，細胞毒性で活性物質を追跡した。その結果HPLC等を駆使し，合計8種類の抗腫瘍活性を示す物質を単離した。このうち特に活性の強いものは600kgから約8mg得られるハリコンドリンBと名付けた物質である。*in vivo*でのP-388，L-1210 leukemia，B-16 melanoma系腫瘍動物に対して顕著な延命効果を示す。特徴的なのは低濃度で活性が表われ，かつ異部位投与でも効果があることであった。これらの物質に対して筆者らが特に興味を持った点は，前述のシガテラ原因毒といわれているシガトキシン[8]と分子量およびスペクトルデータが似ていることである。しかし，ハリコンドリンBには毒性がほとんどなく明らかに異なる物質であるが，今後シガトキシン解明に寄与するし，構造的にも似ている可能性が強いと思われる。

さてその構造決定であるが，分子量はFDMS（Field Desorption Mass Spectrometry）により1110であると決定

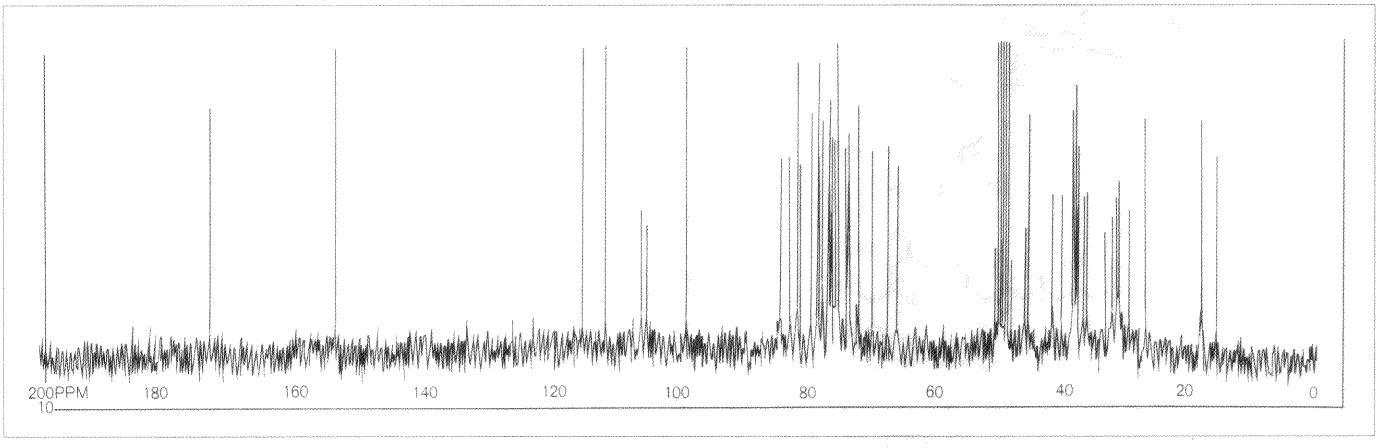


図9 ハリコンドリンBの50.3MHz^{13}C－NMRスペクトル（CD_3OD中）

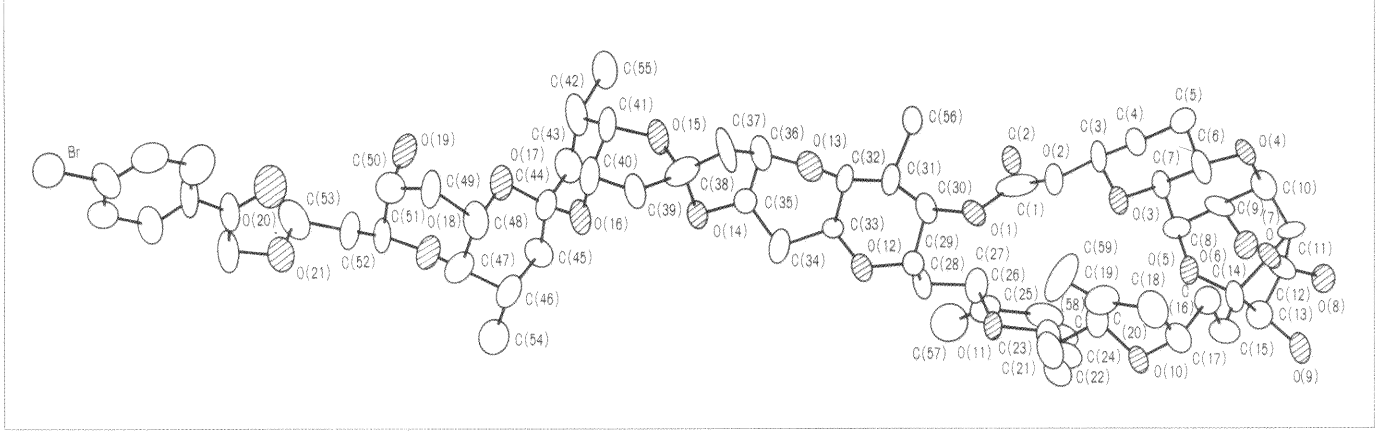


図10 ノルハリコンドリンA *p*-ブロモフェナシル エステルのORTEP図

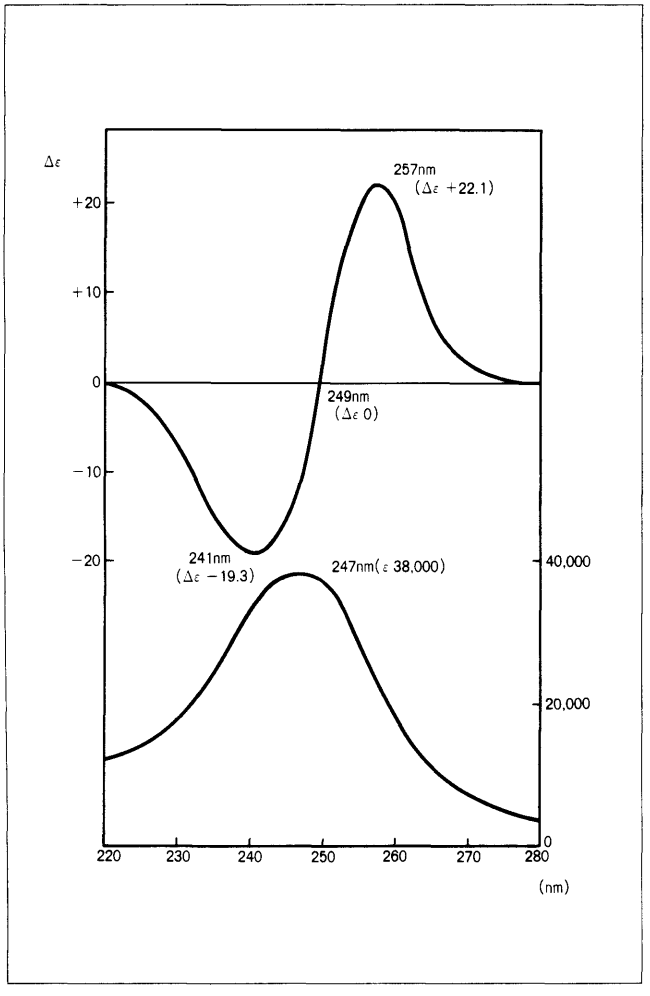


図11 ノルハリコンドリンA ビス（*p*-ブロモベンゾエート）のCDおよびUVスペクトル

された。その^{13}C-NMR（**図9**）より炭素数は60個と確認され，分子式は$C_{60}H_{86}O_{19}$であると判明した。この物質自身結晶であり，構造決定は量も少なく構造も複雑であるので，X線結晶構造解析に委ねた。しかし，重原子を含まず分子量も大きいので解析は不成功に終った。そこで同族体で量も少し多いノルハリコンドリンAを臭素誘導体に変え，その結晶構造解析を行なった。その結果は**図10**に示すように解析された[9]。絶対構造に関しては，ノルハリコンドリンAの誘導体ビス（*p*-ブロモベンゾエート）体について，CD-スペクトルを測定し，励起子カイラリティー法[10]を適用した。**図11**に示すように典型的な正の分裂型コットン効果を示し，この結果はX線による解析結果とも一致する。この構造をもとにして^{1}H-NMR，^{13}C-NMR各スペクトルの比較でハリコンドリンBの構造を推定した。特に^{1}H-^{13}Cシフト相関，^{1}Hシフト相関スペクトルが有効な情報を与えてくれた。ハリコンドリンBの構造を**図12**に示す。長い炭素鎖（C 54），大環状ラクトン，シス縮合ピラノース環，さらには珍しい2, 6, 9-トリオキサトリシクロ〔3, 3, 2, 0^{3,7}〕デカン系が特徴である。パリトキシンと同様，有機合成化学者，薬理学者の興味の対象となっている。

以上，海洋生物のもつ天然有機化合物の中には，明らかに陸産のものとは著しく構造の異なる物質が存在することが判った。特に腔腸動物毒パリトキシン，赤潮毒ブレベトキシン[11]，抗腫瘍性物質ハリコンドリン類は，長い炭素鎖のカルボン酸誘導体として特徴づけられるが，その生合成における基礎的理解は現在もなされていない。赤潮毒の由来は，渦鞭毛藻とはっきりしているが，他はいずれも共生する微生物，特にバクテリア，藍藻由来と考えられる。それらを単離培養すれば，生合成機構解明が現実となる。また，ハリコンドリンBolは，大量入手が可能となり，制がん剤としての実用化の道も開ける。一方，最近Isotope Mass Spectrometryを使って同位体比を測定し，ある物質の由来を探る試み[12]が成功しており，新しい研究の出発点になるように思える。

参考文献

1) a 上村大輔，平田義正：「現代化学」No.145, pp.14～22（1983）.
   b 上村大輔，平田義正：「化学」39巻，1号，pp.16～17（1984）.
2) 伊藤勝昭：「生体の科学」第35巻，第6号，pp.513～515（1984）.
3) R. D. Macfarlane, D. Uemura, K. Ueda, and Y. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 875～876（1980）.
4) 平田義正，上村大輔：薬学雑誌，**105**(1)，1～10（1985）.
5) 中田尚男：第18回天然物化学談話会要旨集，pp. 1～12（1983）.
6) D. Uemura, K. Ueda, Y. Hirata, H. Naoki and T. Iwashita, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1909～1912（1981）.
7) a J. K. Jha, W. J. Christ, J.M. Finan, H. Fujioka, Y. Kishi, L. L. Klein, S. S. Ko, J. Leder, W. W. McWhorter, Jr., K.-P.Pfaff, M. Yonaga, D. Uemura and Y. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7369～7371（1982）.
   b R. E. Moore, G. Bartolini, J. Barchi, A. A. Bothner-By, J.Dadok and J.Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3776～3779（1982）.
   c D. Uemura, Y. Hirata, T. Iwashita and H. Naoki, *Tetrahedron.*, **41**, 1007～1017（1985）.
8) M. Nukina, L. M. Koyanagi and P. J. Scheuer, *Toxicon*, **22**, 169～176（1984）.
9) D. Uemura, K. Takahashi, T. Yamamoto, C. Katayama, J. Tanaka, Y. Okumura and Y. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, in press（1985）.
10) 原田宣之，中西香爾，「円二色性スペクトル」東京化学同人（1982）
11) Y.-Y. Lin, M. Risk, S. M. Ray, D. V. Ergen, J. Clardy, J. Golik, J. C. James and K. Nakamishi. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6773～6775.
12) W. C. M. C. Kokke, S. Epstein, S. A. Look, G. H. Rau, W. Fenical and C. Djerassi, *J. Biol. Chem.*, **259**, 8168～8173（1984）.

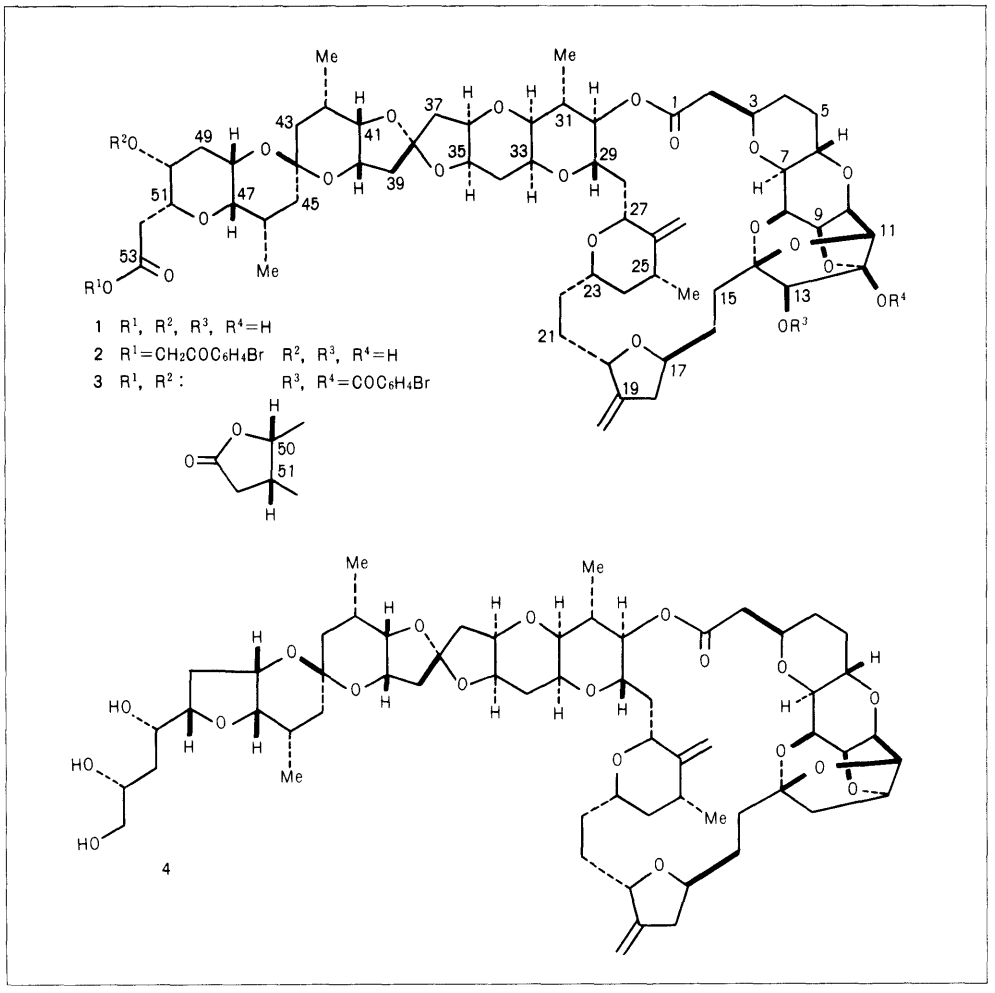


図12 ハリコンドリン類の構造
1：ノルハリコンドリンA，2：ノルハリコンドリンA *p*-ブロモフェナシル エステル，3：ノルハリコンドリンA ビス（*p*-ブロモベンゾエート），4：ハリコンドリンB

〈編集後記〉

■ 本号は，構造解析特集として編集いたしましたが，それ以前よりお願いしていました「分析用電子顕微鏡の臨床医学への適用」ならびに，「ファーネス原子吸光法による塩水中の極微量元素の直接定量」の2編の報文を受理いたしましたので，特別寄稿として区分させて頂きました。

■ 構造解析特集では，大隅先生に，「酵母マイクロボディ複合結晶体を構成する酵素分子の構造解析」について，松田先生には，「MSによるペプチドの構造解析」について，上村・平田両先生には，「海洋天然物の構造研究」について，それぞれ報告して頂きました。

■ 日立科学機器による報文のご投稿を歓迎致します。

■ 本ニュースに関するお問合せは，下記へ，または，日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

○株式会社 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ
茨城県勝田市市毛882番地
〒312 電話 水戸(0292)73－2111(代)
○日製産業株式会社
科学機器営業本部 企画開発部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル
〒105 電話 東京ダイヤルイン(03)504-7187

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
AUTUMN 1985 Vol.28 No.3

発行 昭和60年10月1日(年4回発行)
発行人 岡本匡史
編集人 永谷 隆 岩井孝之
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部 科学機器部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
電話 東京(03)214-3123(直通)
印刷所 日立印刷株式会社