

(3) 北海道分析化学会賞および奨励賞受賞講演要旨集

1991年度

北海道分析 化学受賞講演

ステロイド並びに胆汁酸の生合成、代謝に関する分析化学的研究

東日本学園大学薬学部

池川 繁 男

ステロイド並びに胆汁酸の生理的機能を解明し、病態との関連を解析する上で、これら生体微量成分の生合成、代謝機構を的確に把握することが強く求められる。微量で顕著な生理活性を示す卵胞ホルモンは男性ホルモンであるテストステロンの核間メチル基への水酸化に始まるA環脱水素反応によって生合成される。この芳香化のメカニズムは内因性ステロイドホルモンの消長を論ずる上で重要な問題である。一方、薬物の有効性と安全性の評価においては吸収、代謝、排泄など生体内動態がとみに重要視される。卵胞ホルモン剤として汎用されるエキリンに悪性腫瘍の誘発が示唆されており、作用と関連した代謝機構の解明が強く望まれる。近年、胆汁酸代謝と肝胆道疾患との関連に多大の関心が寄せられており、胆道閉鎖症をはじめとする各種の先天性胆汁酸代謝異常症では早期診断、治療法の確立が緊急の課題となっている。しかしながら、胎児-新生児期における胆汁酸代謝に関する情報は少なく未解決の問題が多々残されてきた。私は、これらステロイド並びに胆汁酸にまつわる生合成代謝の諸問題を有機化学的手法を駆使しつつ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）などとともに、抗原-抗体反応を原理とするイムノアッセイなどの手段を用いて検討した。

微生物による3-ケトステロイドのA環脱水素機構

芳香化機構解明の一助として微生物による3-ケトステロイドのA環脱水素脱離の立体化学をとりあげた。3-ケトステロイドの活性メチレンを立体特異的に重水素標識した基質を用いて微生物変換を行ない、質量分析、シフト試薬を利用したNMRなどの機器分析の結果から、カルボニルの α 位においてはアキシャル水素が選択的に脱離することを証明した。さらにこの手法を男性ホルモンの生合成機構へと展開し、 3β -ヒドロキシ- Δ^4 -ステロイドは 4β 水素の 6β 位への分子内水素転移によって Δ^4 -3-ケトステロイドへ変換され、さらに 4β -アキシャル位への立体特異的水素付加によって活性型男性ホルモンとなることを明らかにした。

エキリンの代謝

まず代謝産物の検索に不可欠な各種水酸化体を特異的全合成法によって調製し、電気化学検出器付きHPLCによる高感度選択的一斉分析法を確立した。ついで、エストロゲンの腸肝循環に着目して、ラットの胆汁中に排泄される代謝産物をGC-MSとの併用によって検索し、2位及び16 α 水酸化代謝物の存在を実証した。さらにこの結果をもとに、子宮内膜のエストロゲンレセプターに対する結合親和性と細胞増殖活性を調べ、17ケト基の還元がホルモン作用発現に必須の構造様式であり、A、D環への水酸化は代謝的不活性化を促進するものであることを確証した。

高速液体クロマトグラフィーによる尿中胆汁酸の一斉分析

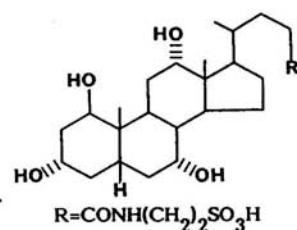
1 β 、6 α -水酸化胆汁酸は胎便、羊水、新生児尿など、胎児-新生児期における体液中胆汁酸の主要成分である。これら水酸化胆汁酸は尿中排泄に特徴的な推移を示し、1 β -水酸化コール酸では妊娠30-40週より急増し出生後の新生児期には総胆汁酸量の50-80%を占め、その後成長にともなって漸減し成人の胆汁酸組成に近づく。この為、胎生期

胆汁酸代謝の特殊性を反映する胎児性胆汁酸として、側鎖アミノ酸抱合をも含めた抱合様式全貌の解析が望まれる。そこで 3α -hydroxysteroid dehydrogenaseをポストカラムに活用した化学発光検出HPLCによって尿中胆汁酸の一斉分析を行なった。その結果、胎児の発育がほぼ完了する妊娠40週の妊婦では常成分はグリシンあるいはグリシン-硫酸、タウリン-硫酸の二重抱合型として排泄されるのに対し、 1β 、 6α 位に水酸化を受けた胎児性胆汁酸はタウリン抱合型としてのみ排泄され、これらの胆汁酸が母体内の胎児に由来することが明らかとなった。またこのタウリン主体の抱合様式は生後20日の新生児尿にも認められた。これらの結果から、特殊な無菌的環境にある胎児は栄養補給を母体に依存して脂質の吸収を必要としない為、 1β 、 6α 位への水酸化により母体を通して体外へ胆汁酸を排泄し、新生児期にもその余韻としてこれらの代謝排泄機構が存在するものと推測される。

ついで臨床医学への応用としては、生体肝移植を受けた先天性胆道閉鎖症患児の尿中胆汁酸組成の分析に本法を適用した。その結果成人に類似した排泄様式を示し、移植された肝臓の胆汁酸合成系が成人と同様の機能状態であることが明らかとなった。

イムノアッセイの開発と動態解析

イムノアッセイは感度並びに簡便性に優れ、特定の胆汁酸をマーカーとしたマススクリーニングに適した分析手段といえる。Tauro 1β -Hydroxychoolic acidは新生児胆汁酸代謝の特徴を最も良く反映し、胆肝系の機能診断に適した胎児性胆汁酸であると思われることからこれを指標としたラジオイムノアッセイの開発を行なった。即ち、本胆汁酸が母核構造に特徴を有すること、またブリッジヘテロローガス酵素免疫測定法への展開等を考慮し、 24 位カルボキシル側鎖の炭素鎖長が異なる2種のハプテン-



Tauro 1β -Hydroxychoolic Acid

蛋白結合体を免疫抗原として抗血清を調製するとともに、抗体の特異性を近縁胆汁酸との交差反応性から評価した。その結果、 ^3H 標識抗原と同一の側鎖長を有するハプテンを免疫抗原とすることにより、親和性並びに特異性の点で満足しうる抗血清が得られた。そこでアッセイ法を確立し尿試料へ適用したところ、新生児は 1β -水酸化によってコール酸の排泄を促進するというこれまでの推測を実証することが出来た。

以上、ステロイド並び胆汁酸にまつわる生合成、代謝の諸問題を各種クロマトグラフィ-光学分析計を用いて明らかにしてきたがここでは時間の制約もあるので、胆汁酸に関する最近の研究を紹介したい。

おわりに

現在これまでの知見をもとに、新生児早期の血液浸染乾燥ろ紙を用いた先天性胆道閉鎖症の早期鑑別診断としてマススクリーニング法の開発に向けて研究を展開中である。今後も有機化学的手法を基盤にしてバイオメディカル分野における分析化学的研究を進展させてゆきたいと願っている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました東日本学園大学薬学部藤間貞彦教授に衷心より深謝致します。また、本研究の機会を与えて下さいました東北大学名誉教授南原利夫先生に御礼申し上げます。本研究は薬品分析化学講座の多数の方々の御協力により行なわれたものであり、ここに記して心から感謝の意を表します。

(北大理) 金田 隆

【結言】キャピラリー電気泳動法は、試料の微量化及び高感度、高精度な多成分の分離定量として大きな可能性を有している。しかしこの方法の高機能化のためには、目的化学種の移動度制御を容易とする泳動系設計の手法の開発が必須である。本研究ではまず水溶液系等速電気泳動法における移動度制御にターミナルゾーンとの錯形成平衡を活用する泳動系を探索した。ついでキャピラリーゾーン電気泳動法に関しても、錯形成平衡の有用性を検討した。さらにはミセルと泳動溶媒間の分配平衡を活用する手法に検討を加えた。この系での中性分子種の分離においては、グルコースの添加が分離能の向上に極めて有効であった。また陰イオン種の分離のために陽イオン界面活性剤ミセルを活用する泳動系を開発し、その有用性を明らかにすると共に、その泳動機構の解明に新しいモデルを導入し、陽イオン界面活性剤と陰イオンとのイオン対生成定数、並びにミセルとの結合定数の評価によって検討した。

【ターミナルゾーンを移動度制御に活用する等速電気泳動分離】

対象として重金属イオンを取り上げ、ターミナルゾーンにシアノ化物イオンを存在させる泳動系を開発した。この系に導入された重金属イオンは一旦ターミナル側へ泳動されるが、シアノ化物イオンとの錯形成反応により負の電荷をもつシアノ錯体に変換され、リーディング側に泳動される。この泳動系を用いるときコバルト、銅、銀、亜鉛、カドミウム、水銀イオンの6種の重金属イオンがシアノ錯体として分離できる。移動度の近接する金イオン及び銀イオンのシアノ錯体、また移動度の大きなためにリーディングゾーンと混合ゾーンを形成するニッケル、白金、パラジウムのシアノ錯体については、リーディングゾーンに鉄(II)フェナントロリン錯体を添加し、これとのイオン対平衡を活用することで、相互分離が可能となった。

さらにこのターミナルゾーンとの錯形成平衡を利用して、中性分子であるカテコール誘導体の分離を試みた。多くのカテコール類は中性領域においては非イオン種として存在し、アルカリ性では o -キノンを生成しやすく、いずれの領域においてもその泳動分離は困難である。しかし、それらカテコール類をホウ酸の共存下におくとき、負電荷をもつ化学種となることに着目して、ターミナルゾーンにホウ酸を共存させる泳動系を創案した。この泳動系によると、中性分子を含む9種のカテコール誘導体が分離検出できた。

これら移動度制御に利用されることの無かったターミナルゾーンを錯化剤の供給源とする泳動系は、通常泳動分離が極めて困難な移動度の小さな化学種を泳動可能な化学種に変換し得る点に特色を持つ。

かねた たかし

【錯形成平衡を移動度制御に活用するキャピラリーゾーン電気泳動分離】

キャピラリーゾーン電気泳動においてはカテコールアミンを対象とし、これとホウ酸との錯形成反応を活用する泳動系を検討した。カテコールアミンの分離能はホウ酸濃度の増加と共に増大する。緩衝溶液の選択も重要でありアンモニア緩衝溶液をホウ酸緩衝溶液に変えるとき分離能は大きく改善される。この手法においては電気浸透流の大きさと方向も分離能の大きな支配因子である。炭素鎖の長さの異なる種々の陽イオン界面活性剤を用い、電気浸透流への影響を詳細に検討した。臭化テトラデシルトリメチルアンモニウムにより電気浸透流を制御することによって、10種のカテコールアミンの分離が達成できた。

【グルコースを移動度制御に用いるミセル動電クロマトグラフィー】

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ミセルを用いる動電クロマトグラフィーにおいて、泳動系へのグルコースの添加はヌクレオシドの分離能を大きく改善した。グルコースの添加はSDSの臨界ミセル濃度を減少させ、ミセル自身の有効移動度を増加させる。また、グルコースが試料化学種のミセルへの分配平衡に与える影響は試料化学種が持つ官能基によっても異なり、グルコース濃度の増加と共に親水性官能基を持つ化合物の分配係数が選択的に減少した。これらの結果はグルコースの添加が親水性化合物や疎水性の大きな化合物の分離選択性の改善に有効な手法であることを示すものである。

【陽イオン界面活性剤ミセルを用いる陰イオンのミセル動電クロマトグラフィー】

陰イオンとして無機陰イオン、及びフェニルカルボン酸イオンを対象とし、塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)の陽イオンミセルを存在させ、CTACが試料としての陰イオンの移動度に与える影響を検討した。陰イオンの有効移動度はCTAC濃度に大きく依存する。これはCTAC濃度が、キャピラリー壁に吸着したCTACとの相互作用、CTACモノマーと陰イオンとのイオン対生成平衡及びCTACミセルへの分配平衡の支配因子であることによる。臨界ミセル濃度以下において、陰イオンの有効移動度(μ_{eff})はイオン対平衡により変化し、次式で表されることがわかった。

$$\frac{1}{\mu_{eff}} = \frac{K_{Ac}C_{Ac}}{\mu_{sp}} + \frac{1}{\mu_{sp}} \quad (1)$$

ここで K_{Ac} 、 C_{Ac} 、 μ_{sp} はそれぞれイオン対生成定数、CTAC濃度、遊離のイオンの移動度である。また遊離のイオン数に対するミセルと結合したイオン数の比を k' とすると、臨界ミセル濃度以上では(2)式で表された。

$$\frac{1}{\mu_{eff}(c_{mc})} = \frac{1 + k'}{k' \mu_{mc} + \mu_{eff}(c_{mc})} \quad (2)$$

ここで $\mu_{eff}(c_{mc})$ は臨界ミセル濃度でのイオンの有効移動度であり、 μ_{mc} はミセルの有効移動度である。これらの式を用いてイオン対生成定数、及びミセルとの結合定数を求めることができた。

1992年度

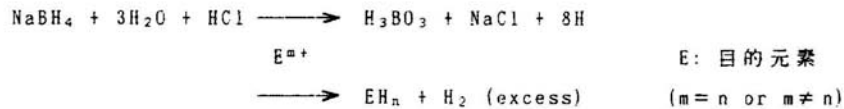
北海道分析
化学賞受賞講演

原子スペクトル分析における水素化
物生成法の研究と化学形態別定量へ
の応用に関する研究

北海道立衛生研究所 神 和 夫

【はじめに】 溶液中の微量の元素(重金属)を測定する手法として、今日、原子吸光法や誘導結合プラズマ発光法(ICPAES)などの原子スペクトル分析法は一般的になっており、pptレベルの定量を可能にするICP質量分析法も急速に普及し始めている。こうした検出器側の進歩による感度の向上は一方では気化導入法を含めた各種分離手法の有用性を再認識させている。亜鉛法によるヒ化水素発生法が原子吸光法に適用され、気化導入のための水素化物発生法がにわかに注目され始めた1970年代中盤、演者は、主に原子吸光法における気化導入法の適用元素の拡大と感度の増大を目的として、テトラヒドロボロン酸ナトリウム(NaBH₄)を還元剤として用いるIV、V、VI属元素の水素化物生成法とその応用に関する研究に着手した。方法指向型で比較的短期間に終わるかも知れないと思われたこの研究は、原子価状態別定量や化学形態別定量に適用できること、環境試料、生物・生体試料への適用など応用面で興味ある展開が出来た(そのような元素が含まれていた)ことから、今日まで継続された。ここではこうした研究の成果の一部とともに、chemical speciationの一環として行った海藻中のヒ素化合物の単離・同定についても言及する。

【水素化物生成-原子吸光法】 NaBH₄と水素化物生成元素の反応は次のような一般式で表される。



この反応は亜鉛法に比べて迅速であり、必ずしも発生した水素化物を捕集する必要がなく、連続法や自動化法を採用しやすい特長を有する。気化導入法は溶液噴霧法に比べて試料の導入効率が高く、また、水素化物が原子化しやすいため著しい感度の増大が可能になる。しかし、反応段階での共存イオンによる妨害があり、この除去が実用化に向けた課題の一つであった。初期の研究では、発生させた水素化物を直ちに原子化部に導くdirect transfer型の装置と一定時間捕集容器に集めるcollection型の装置を用いて、次のような知見を得た。(1) IV属元素(Ge, Sn)、V属元素(As, Sb, Bi)、VI属(Se, Te)の水素化物生成の際、属によって用いるべき酸の種類及び濃度など反応条件の特徴を明らかにした。(2) IV属の鉛では水素化物の発生条件は極めて特殊であり、NaBH₄を添加する前にあらかじめ強力な酸化剤を加えておく必要があること。そして、酸と酸化剤の組み合わせも重要であり、リンゴ酸-ニクロム酸カリウム、硝酸-過酸化水素、硝酸-ペルオキソ二硫酸塩の系が有用であることを見いだした。(3) テルル(VI)はNaBH₄でH₂Teまで還元出来ないので三塩化チタン予備還元法によるテルル(IV)とテルル(VI)の分別定量法を開発した。(4) ゲルマニウム、スズの定量の際のニッケルなどの干渉除去の目的で、酸としてリンゴ酸などの有機酸の使用が有用であることを明らかにした。

こうした知見をもとにSn、Pb、As、Seの連続水素化物生成法を検討・開発し、環境試料や生体試料など多様な試料に応用して好結果を得ている。例えば人血清中のセレン濃度とセレン酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ活性との相関や疾病との関係を調べる中で、慢性膵臓炎患者の血

(じん かずお)

清中セレン濃度が健常人に比べて有意に低いことを明らかにした。また、セレン蛋白の精製過程においても、セレンの定量のために本法を活用して好結果を得ている。さらに、国立環境研究所で調製し、配布している環境標準試料の保証値決定のための分析などに活用した{(No.4人血清:Se)、No.9ホンダワラ(As)、No.11スズキ(Sn)、No.12海底質(Sn)}。

【水素化物生成-原子吸光法によるヒ素化学種の分別定量法の開発と応用】 無機ヒ素(三価、五価)、モノメチルアルシ酸、ジメチルアルシ酸は NaBH_4 による還元で対応する水素化物を生成する(アルシ、メチルアルシ、ジメチルアルシ)。生成した水素化物をHeキャリアガスでコールトトラップに導き捕集した後、室温にもどす際に生成物の沸点の差に基づいて相互分離し、原子化部に導いた。三価と五価の無機ヒ素は反応のpHを調整することで分別できる。条件を詳細に検討し、試作した装置を用いて生物試料、特に海洋生物中のヒ素の存在形態に関する研究への適用して貴重な知見を得た。海藻試料の適用した結果では、入手したほとんどすべての海藻で、ヒ素は“酸又はアルカリで処理したのち、ジメチルアルシ酸として定量されるような化学形”で存在していること、また、褐藻類ホンダワラ科のものは五価の無機ヒ素が主要なヒ素化学種であることを明らかにした。海藻に蓄積されているヒ素の化学形態を明確にするために精製を進め、食用褐藻であるモズクから4種類のジメチルアルシイリホフラノサイト(ヒ素糖)の単離・同定に成功した。緑藻類のミルからもヒ素糖2種類とジメチルアルシ酸の単離・同定に成功した。ごく最近、ホタテガイの中腸腺に蓄積されているヒ素の主要な水溶性化学種はアルセノベタインと並んで“硫酸エステル型ヒ素糖”であることを明らかにした(HPLC-ICPMS法)。WHOではヒ素の摂取量を成人一人一日あたり $200\mu\text{g}$ 以下と勧告しているが、海産性食品を好んで食する日本人はこの値を越えるヒ素を摂取していると推定されている。ヒ素糖の毒性は無機態ヒ素に比べて低いと考えられており、こうした知見は衛生学的観点からも貴重であると考えられる。

【ICPAES、ICP質量分析装置との結合】 環境におけるゲルマニウムの生物学的循環を研究するため、上記のヒ素の場合と同様に、水素化物生成法による無機態およびメチル態ゲルマニウムのpgレベルでの分別定量法を開発した。天然水中のゲルマニウムは無機態および有機態として存在し、その濃度は $\text{sub-ng}\sim\text{ng L}^{-1}$ とされている。そして、海洋におけるモノメチルゲルマニウムの異常ともいえる‘均一な分布’などから、その生成はchemical methylationによるのではないかとする論議もなされていた。演者らはまず水素化物生成-コールトトラップ-軸方向観測型ICPAES法で無機態ゲルマニウムについて 2.7pg の検出限界を達成した。次いでICPMS法に適用し、反応マトリックスとしてリンゴ酸を用いることでほぼ定量的に無機、及びモノ-、ジ-、トリメチル態ゲルマニウムを対応する水素化物に還元することに成功した。検出限界は $0.08\sim 0.10\text{pgGe}$ で、水素化物生成-グラファイト炉AASで報告されていた値より約2000倍高感度である。本法によれば、天然水中ppq~pptレベルのGeの化学形態別定量が10mL以下の試料量で、しかも1試料約10分で可能である。本法を海水、河川水、排水などに適用して好結果を得た。活性汚泥による処理後の排水では処理前のものに比べてメチル態の濃度がいくぶん増加しており、微生物による無機ゲルマニウムのbiomethylationが示唆された。

【謝辞】 本研究は北海道大学理学部化学科教授多賀光彦先生のもとで着手されたものです。長年の御指導に深く感謝致します。ヒ素化合物の単離とICPMSに関する研究は国立環境研究所化学環境部長森田昌敏先生、柴田康行博士に御指導、御援助いただきました。また、本研究は道立衛生研究所生活科学部長都築俊文先生をはじめ、当所の多数の方々への御援助により行われたものであり、深く感謝の意を表します。

【緒言】 イオン選択性電極を用いる分析法は1970年代から急速な進歩を遂げ、無機物質はもちろん、有機化合物や生体関連化合物など、多くのイオン性化合物に選択的に応答する電極が試作され、種々の化学種を定量する強力な手段として広範な分野で活用されている。

本講演では、① 液膜型イオン選択性電極の開発とその応用に関する研究、② 新しいコンセプトを有するイオンセンサーの開発研究、③ 固体膜型イオン選択性電極の接触分析への応用に関する研究に分けてその概要を発表する。

【液膜型イオン選択性電極の開発とその応用に関する研究】

液膜型イオン選択性電極は、目的イオンと反対電荷を有する脂溶性イオンとのイオン対の有機溶媒溶液（または抽出液）をイオン感応膜とする電極で、一般に目的イオン濃度（正しくは活量）の負の対数に比例した起電力（ $59\text{mV}/n$ 、 n は目的イオンの荷電数）を液膜/試料溶液界面に発生する。試作した液膜型イオン選択性電極のうちいくつかについて紹介する。界面活性剤として使用されているドデシルベンゼンスルホン酸、ゼフィラミン、テトラフェニルホウ酸、ベンゼトニウム、スルホコハク酸ビス（2-エチルヘキシル）イオン等に選択的に応答する種々のイオン電極を開発し、それらを電位差滴定における指示電極として応用し、目的イオンと反対の電荷を有する界面活性剤の標準溶液を滴定剤として、確度・精度の高い分析結果を得ることに成功した。また、キレート滴定の金属指示薬であるエリオクロムブラックT、ピロカテコールバイオレット、クロマズロールS、ナフテルアゾキシシ、NN金属指示薬イオンに応答するイオン電極を開発し、これらの電極は被滴定金属と金属指示薬との錯体には応答しないが、フリーの金属指示薬イオンには応答することを利用して、キレート滴定をポテンシオメトリックに行うことに成功した。被滴定金属イオンに応答するイオン電極用いた電位差滴定は数多く紹介されているが、本法は、指示薬の化合状態の変化をイオン電極によって検出し終点を判別する、まったく新しい電位差滴定法である。また酸化剤として広く用いられている過マンガン酸イオンに応答するイオン電極を作製し、酸化-還元滴定の指示電極として使用するとともに、CODの測定に適用し、環境試料を分析して好結果を得た。その他、酸化-還元指示薬として知られているローダミンBに感応するイオン電極を開発し、ローダミンBを指示薬としたスズ(II)、チオ硫酸イオン等のヨウ素による酸化-還元滴定を行った。

【新しいコンセプトを有するイオンセンサーの開発研究】

生体を構成している細胞が有する分析化学的に興味深い現象を化学センサーの概念に取り入れた、新しいコンセプトを有するセンサーの開発研究を行った。イオンチャンネルは神経系やホルモン等の生体活動にかかわりがあり、チャンネルを介しての物質輸送は生体を維持してゆくための極めて一般的な現象である。イオンチャンネルでは、物質の選択的な認識とそれに続くチャンネルスイッチングにより、情報の認識と増幅が行われている。リン脂質二分子膜ベシクルであるリポソーム上で抗原/抗体/補体反応を起こさせると、リポソーム膜を貫通する“チャンネル”状の穴を生起することがある。この穴の生成現象とイオン電極を巧みに組み合わせ

かたおか まさみつ

せ、ユニークな電気化学イムノアッセイを行った。リポソーム膜上にヒトIgGを化学修飾し特異的抗原/抗体/補体反応を行うと、膜面に穴を生成する。その結果、あらかじめベシクル内水相に封入されていたマーカージオン(F⁻イオン)が大量に流出し、抗原や抗体濃度の情報が増幅される。これをF⁻イオン電極で検出し、抗原、抗体のアッセイが可能となった。

またリポソームを用いる免疫測定にフローインジェクション/接触分析法を適用した抗アシアロGM₁抗体の定量では、内水相にマーカージオンとしてモリブデン(VI)を封入し、リポソーム表面での抗原/抗体/補体反応によって生じる“チャンネル”状の穴からマーカージオンを流出させる。モリブデン(VI)は過酸化水素-ヨウ化物イオン酸化・還元系の触媒として働き、反応速度はフローインジェクション法により、一定時間後の反応混液中のヨウ化物イオン減少に基づくイオン電極の電位ピークの高さとして求められる。反応速度はモリブデン(VI)濃度に比例し、モリブデンの流出量は抗体の濃度に相関があることを利用して、抗GA1抗体の定量を行った。

大環状ポリアミン(1, 4, 7, 10, 13-ペンタアゾシクロヘキサデカン)にヘキサデシル基を導入して脂溶化したものをイオン感応物質として含有した感応膜を有する、新しい生体ポリアニオン(ATP⁴⁻)センサーを開発するとともに、膜電位の発生機構についても考察した。またこの電極はジカルボン酸の位置異性体や幾何異性体を識別する能力があることを示した。その他、アンペロメトリックセンサーの範疇にはいるが、Langmuir-Brodgett膜(LB膜)中に脂溶性大環状ポリアミンを抱埋した薄膜を感応膜とした、イオンチャンネル型センサーを開発し、膜を通過するマーカージオンをサイクリックボルタンメトリーで検出し、ポリアミンと相互作用のあるゲストイオンの定量が可能であること等を示した。その結果、ATP⁴⁻、ADP³⁻、AMP²⁻や、フタル酸の位置異性体などが選択性をもって応答することが分かった。

【固体膜型イオン選択性電極の接触分析への応用に関する研究】

接触分析法は酸化-還元反応を接触する極微量の触媒を定量する手法として発展してきたが、反応速度の測定はほとんどが吸光度の時間変化を測定するものであった。演者らは、接触分析にイオン電極を適用し、接触反応によって刻々と変化する反応混液中のヨウ化物イオン濃度をヨウ化物イオン電極でポテンシオメトリックに追跡することにより、極微量の触媒の定量を行った。酸化-還元系としては、過酸化水素-ヨウ化物イオン、ペルオキシホウ酸-ヨウ化物イオン、臭素酸-ヨウ化物イオン系を用い、これらの反応を触媒するモリブデン(VI)、タングステン(VI)、バナジウム(IV,V)、鉄(III)などの高感度分析に成功した。また、接触反応によって消費されるヨウ化物イオンを、例えばアスコルビン酸で還元すると、還元剤がすべて消費された時点(時間 τ)で反応混液中のヨウ化物イオン濃度が減少しはじめるが(これをランドルト反応(時計反応)と呼ぶ)、この時間 τ の逆数は触媒濃度と直線関係にあるから、還元剤の消費に要する時間をヨウ化物イオン選択性電極でモニターし、モリブデン(VI)等の触媒イオンやアスコルビン酸、チオシアン酸イオン等の還元剤の高感度定量を行った。この方法は、海水中の微量のモリブデン酸イオンの定量に応用され、好結果を得た。

【謝辞】これらの研究のうち①および③は故神原富民教授、②の研究は現在東大理学部分析化学講座の梅澤壽夫教授の温かい御指導と、北大理学部化学科分析化学講座の学生諸君のご協力により達成された結果であります。また理学部化学科環境化学講座多賀光彦教授には終始温かいご支援を賜りました。ここに記して深い感謝の意を表します。

【緒言】

近年、理学、工学、医学、薬学などの多くの分野において微量成分の挙動に対する興味が高まっており、環境、生産の場においてもその存在が大きな問題をもたらす場合がある。従って、微量成分の定量法を確立することは重要である。現在、微量金属イオンを定量する方法として原子吸光分析、ICP 発光分析、質量分析などが上げられ、有機物に対してはクロマトグラフィーや比色法などがある。

電気化学的分野における手法としてはポーラログラフィーやボルタンメトリーがあるが、溶出ボルタンメトリーは高感度で、かつ簡便、迅速な分析法である。しかしながら、この方法を実試料へ適用する場合には一層の感度および選択性の向上が望まれ、さらに試料マトリックスから生じる干渉に関する対策も必要である。これらの問題を解決するための一つの方法として、化学修飾電極の使用が試みられている。すなわち、修飾された電極表面と分析物との反応を用いることによって選択性の向上をはかるものであり、様々な化学修飾電極が提案されている。その中でも、化学修飾カーボンペースト電極は炭素粉末、修飾剤、バインダーを混合することによって簡単に調製され、再生が容易で再現性のある電極表面を得ることができるなど利点が多い。本研究では、主に硫黄を含む有機配位子あるいは従来あまり使用されていない有機酸金属塩で修飾した電極を用い錯形成反応に基づいて金属イオン、有機物を電極上に濃縮するボルタンメトリーについて検討し、化学修飾カーボンペースト電極の適用範囲の拡大をはかった。

【有機配位子で修飾したカーボンペースト電極(CPE)による重金属イオンの定量】

有機配位子を混合したCPEを用いると、重金属イオンを錯体として電極上に濃縮でき高感度に定量することが可能である。8,8'-ジキノリルジスルフィド(DQDS)で修飾したCPEでは、一定電位をかけることによりDQDSがチオオキシニに還元される。銅(II)はチオオキシニと錯体を形成し電極上に濃縮され、この錯体の還元波を測定することで銅(II)を定量することができた。この方法を標準岩石試料中の銅の定量に適用したところ参考値とよく一致した。2-(サリチリデンアミノ)チオフェノール(SATP)を修飾剤としたCPEでは、銅(II)は濃縮電位なしに銅(II)-SATP錯体として選択的に電極表面上に濃縮される。確立した方法により国立環境研究所発行の植物標準試料であるりょうぶや頭髮中の銅の定量を行った結果、保証値とよい一致を示した。さらに、2,2'-ジチオジピリジンを修飾剤とした電極を用いて、銀(I)の濃縮ボルタンメトリーの検討も行った。銀(I)はジスルフィド基との相互作用により過塩素酸イオンを対イオンとして電極上に濃縮される。濃縮された銀(I)をいったん還元し、その酸化波を測定することで銀を高

すがわら かずはる

感度に定量することができた。これらの分析法は有機配位子中の硫黄と銀(I)、銅(II)などとの強い相互作用に基づいて選択性の向上をはかったものである。

【有機酸金属塩で修飾したCPEを用いた含硫黄有機物の定量】

上記の例では有機配位子で電極を修飾することにより重金属イオンを定量することができたが、金属を修飾剤とすることによって有機物の電極表面上への濃縮が可能になると考えられる。すなわち、水に不溶性の有機酸金属塩を修飾剤としたCPEにおいて目的有機物と有機配位子が置換するならば、目的有機物は金属との錯体として電極上に濃縮されると予想される。その一例として含硫黄有機物であるシステインが銅と錯体を形成することに着目し、銅(II)-シクロヘキシル酪酸塩で修飾したCPEを用いてシステインのボルタンメトリック挙動の検討を行った。その結果、システインは銅(I)-システイン錯体として電極上に濃縮され電位を正方向に掃引することによって、システインの濃度に比例する銅(I)から銅(II)への酸化波が観察された。コバルトもまたシステインと相互作用を持つので、コバルト(II)-シクロヘキシル酪酸塩で修飾したCPEにより、システインのボルタンメトリック挙動も検討した。システイン共存下でコバルト(II)を還元した時にはシステインの濃度に比例したコバルト(0)-システイン錯体が生成し、コバルト(0)の酸化波を測定することでシステインの定量が可能となる。ニッケルもチオールやジスルフィド基を含む有機物と錯体を形成するので、ニッケル(II)-シクロヘキシル酪酸塩で修飾した電極を用いてリポ酸の電気化学的挙動についての考察を行った。リポ酸はニッケル(0)-リポ酸錯体として電極上に濃縮され、ニッケル(0)の酸化波を測定することで定量された。さらに、チオールやジスルフィド基を含む他の有機物についても、これらの方法を適用することができる。また、修飾する有機酸金属塩の種類によって電極反応が異なることも判明した。

【まとめと展望】

本研究では、有機配位子や有機酸金属塩で修飾したCPEを用いて重金属イオンまたは含硫黄有機物を電極上に濃縮し、それらのredoxを測定するボルタンメトリックが検討された。これらの方法によって重金属イオンならびに有機物が高感度、高選択的に定量され、化学修飾電極の適用範囲を広めることができた。また、これらの錯体の電気化学的挙動を考察することは、金属イオンと有機物質の相互作用の解明に有意義であると考えられる。

現在までに、主に銅(II)やコバルト(II)のシクロヘキシル酪酸塩で修飾した電極を用いて含硫黄化合物のボルタンメトリック挙動を検討したが、今後、これらの電極を使いアミノ酸やタンパク質などの分析も試みる。一方で、電極修飾剤として分子認識機能を有する生体成分などを用いることによってこの方法の新たな展開をはかりたい。

緒言

超微量分析の分野において機器分析が果たしている役割は大きい、一方、物質のセンシングと評価に簡便に利用できる化学反応を利用する分析法の役割も大きくなっている。このような観点から、酵素反応における特異性と化学発光反応における高感度性に注目した分析法の開発が盛んである。

ペルオキシダーゼは(POD)過酸化水素に対し、高い基質特異性を持つ酵素であるが、その酵素サイクルに第二基質として化学発光試薬であるルミノールを加えた場合には、ルミノール化学発光の触媒となる。ルミノール化学発光反応は過酸化水素を高感度に検出することから、過酸化水素を生成する酵素反応系と組み合わせることにより、反応過程で生成する過酸化水素の連続的な測定が可能となる。過酸化水素を生成する酵素反応系は数多く知られており、それらの酵素反応系とPODを触媒とするルミノール化学発光反応系とをカップリングさせる条件を確立することは、酵素反応を利用する化学発光分析システムを構築するうえで重要である。

そこで本研究では、銅(II)含有酵素のモデル反応である銅(II)触媒によるチオールの酸化反応において過酸化水素が生成することに着目し、その検出にPODを触媒とするルミノール化学発光反応をカップリングすることを検討した。その結果、遅延化学発光ならびにPODの由来によって発光応答が変化する現象を見出し、これらを新たな物質センシングに応用した。

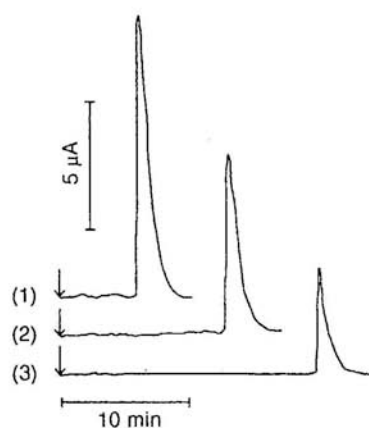
遅延ルミノール化学発光と銅(II)の計測法への応用

銅(II)触媒によるシステアミンの酸化反応から生成する過酸化水素を検出するために、西洋ワサビ由来のPOD(HRP)を触媒とするルミノール化学発光反応を検討した。その結果、酸化反応の開始直後から過酸化水素が生成しているのにも関わらず、ルミノールの発光が一定時間経過した後に突然発現する、新たな遅延化学発光現象を見出した(Fig.1)。この発光機構を詳細に検討した結果、反応開始からHRPと銅(II)は優先してシステアミンの酸化触媒として作用し、システアミンが完全に酸化されるとHRPは溶液内に蓄積した過酸化水素を使ってルミノール化学発光反応の触媒として作用するために発光が遅延することが明らかに

Fig.1 Typical chemiluminescence response curve.

- (1) $[Cu^{2+}] = 1.0 \times 10^{-6} M$
- (2) $[Cu^{2+}] = 5.2 \times 10^{-7} M$
- (3) $[Cu^{2+}] = 1.0 \times 10^{-7} M$

Conditions : $[HRP] = 4.5 \times 10^{-6} M$, $[luminol] = 6.0 \times 10^{-3} M$,
 $[cysteamine] = 6.0 \times 10^{-3} M$.



なった。さらに、遅延時間および発光強度は銅(II)濃度に依存することから、遅延ルミノール化学発光反応を銅(II)の定量法に応用した。その結果、銅濃度と遅延時間の対数値の間に良好な直線関係が成立した。この方法による銅(II)の検出限界は数100pptレベルであった。ゆえに本法の感度は通常の化学発光法による銅(II)の感度と比較して30倍の高感度であり、選択性の点でも優れていることが明らかになった。

由来の異なるPODのキャラクタリゼーション

HRP以外に微生物類由来の*Arthromyces ramosus* ペルオキシダーゼ(ARP)および牛乳由来のラクトペルオキシダーゼ(LPO)を用いて、銅(II)触媒によるシステアミンの酸化反応から生成する過酸化水素の検出を試みた。結果をFig.2に示す。ARPを用いると、システアミンの接触酸化による過酸化水素の生成速度にしたがった発光応答を示した。LPOを触媒に用いると、反応開始直後に微弱な発光が得られただけであった。さらに、反応過程におけるPODのヘム鉄の酸化状態や、システアミンの減少速度あるいは過酸化水素の生成速度などの測定をもとに各PODを用いた際の発光機構を検討した。その結果、LPOの場合はシステアミンの酸化が進行するとともにLPOの分解が進行して失活することが明らかになった。したがって、LPOは反応初期においてのみ発光反応の触媒として作用することがわかった。HRPおよびARPの場合は、水素供与体であるシステアミンとルミノールが共存することからPODとの競争反応が進行し、PODと水素供与体の反応速度の違いがそれぞれの発光応答曲線の違いに反映したものと考えられる。すなわち、HRPの場合は、酵素サイクルにおいてシステアミンの酸化が優先して進行し、システアミンが完全に酸化されると、蓄積した過酸化水素を酸化剤とするルミノール化学発光反応が進行することがわかった。ARPの場合は、システアミンとルミノールの酸化反応に対して同時に作用することがわかった。

このような事実からルミノール化学発光の発光パターンを利用して、由来の異なるPODのキャラクタリゼーションが可能である。PODは、動物、植物、菌類、バクテリアなどに広く分布している。したがって、PODの応用や生体内での働きを調べるうえで、このような簡便なキャラクタリゼーション法が有効であると考えられる。

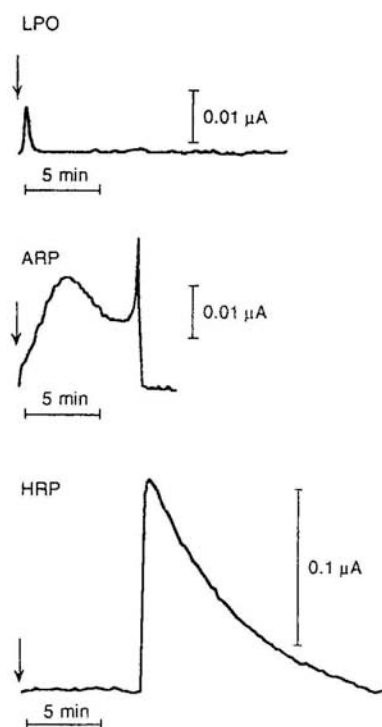


Fig.2 Typical chemiluminescence response curves.

Conditions : [Cu(II)] = 1.0×10^{-6} M, [cysteamine] = 6.0×10^{-3} M, [peroxidase] = 6.0×10^{-7} M, [luminol] = 3.0×10^{-4} M,
At the arrow cysteamine was added.

1993年度

北海道分析化学
奨励賞受賞講演

脂質二分子膜に基づく化学センサーおよび固体の原子吸光法 に関する研究

(北見工大) 南 尚 嗣

【緒言】 生体膜ではそこに存在するタンパク質によって高感度・高選択的な物質認識、情報変換が行われている。その生体膜を構成する厚さ50 Åの脂質二分子膜は、脂質分子が整然と配向を保ち、また物質の選択的認識により、膜電位変化や膜透過性変化が生ずる (transmembrane signalling) 等、ISEの液膜などと比較すると非常に異なる膜といえる。また、レセプターイオンチャンネルタンパクによるリガンド受容時のシグナル増幅を伴う情報変換は、生体膜が発現する最も興味深い高次機能の1つであり、高感度感応素子/センシング膜の基本設計にとって重要な原理となりうる。そこで、この様な特徴を有するイオノフォア/イオンチャンネル包埋脂質二分子膜に基づく化学センサーの可能性を、folding法による平面脂質二分子膜を用いて、(i)膜電位変化及び(ii)膜透過性変化を指標として研究・評価した。

さて原子吸光分析法は高感度分析が可能であり、その感度、正確度、精度は満足すべきレベルに達しているが、前処理の必要性、その段階での試料の希釈、汚染の混入、analyteの損失等の可能性がある。ここで、固体/粉末のまま直接測定できれば上記の問題は全て解決され、定量下限の大幅な向上と分析時間の短縮が可能となるが、固体試料の直接定量では検量線の作成方法が最も困難な問題であった。そこでグラファイト製ミニチュアカップ・セーマン原子吸光分析法での、新しい検量線の作成方法(3点評価標準添加法)の確立とその応用について研究を行った。

【脂質二分子膜に基づく化学センサー】 (i) 22種の天然及び合成イオノフォアを包埋した脂質二分子膜に基づく電位応答型イオンセンサーを開発し、その応答挙動を検討した¹⁾。バリノマイシン包埋脂質二分子膜K⁺イオンセンサーについては、脂質の負電荷量は検出感度を上昇させ、カチオン性脂質膜は感度及びダイナミックレンジを減少させることを見いだした。イオノフォアの種類を変えた実験では、膜電位変化を生起するものとしめないものがあつた。電位応答を示さないものについては、イオノフォア包埋二分子膜のゲストイオン誘起による膜コンダクタンスの測定により、イオノフォアが溶出せず膜中に存在し、選択的錯形成も行われていることを実証した。液膜ではこれら全てのイオノフォアについて電位応答を示すので、脂質二分子膜での応答挙動は二分子膜の特微的な機能によるものだと考えられる。

(ii) ラット小脳神経シナプス後膜より単離精製されたグルタミン酸レセプターイオンチャンネルタンパク(GluR)を感応素子とした脂質二分子膜センサーを製作し、L-グルタミン酸(L-Glu)に対する応答を、シングルチャンネル型(GluR-S.C.)及びマルチチャンネル型(GluR-M.C.)についてチャンネル電流の時間積分値として測定し、ダイナミックレンジ、検出限界、選択性等を評価した^{2,3)}。その結果GluR-S.C., GluR-M.C.共に 10^{-9} - 10^{-6} Mオーダーで傾きの鋭い検量線を得た。また、センサーの

みなみ ひろつぐ

シグナル増幅率を、単位時間(s)当たり1分子のGluRにより誘起された膜透過イオン数と定義すると、GluR-S.C.では 1.9×10^7 となり極めて高いシグナル増幅能が示された。また、選択性として約1000倍のエナンチオマー選択性が認められた。

【固体の原子吸光法】 当研究室ではグラファイト製ミニチュアカップを開発し、ゼーマン原子吸光分析法による粉末生物試料中の多数の元素の直接定量が簡便に行えることを報告してきた。固体試料の直接分析で最も問題となってきたのは検量線の作成方法であったが、これまでに、目的元素の標準溶液の検量線、生物標準試料を用いた検量線、有機試薬共沈合成試料を用いた検量線の作成方法を報告してきた。しかし、何れの方法も一長一短があり例えばオキシシン共沈合成試料ではCrの定量は困難であった。そこで固体試料の為の新しい検量線の作成方法(3点評価標準添加法)を確立し、その有用性について種々の粉末生物試料を用いて検討を行った。

粉末試料の場合は溶液試料における標準添加法の適用の場合とは異なり、試料を毎回同じ量採取する事が困難であるので、本法では3段階の濃度の標準溶液を一定量添加し、それぞれ粉末試料重量と吸光度の関係をプロットし、回帰直線を求める。次に各lineより、粉末試料1 mg当たりの吸光度をそれぞれ求め標準添加法のlineを得る。本法により各種標準試料中の元素の定量を行った結果、定量値は保証値と良く一致した^{6), 7)}。また前灰化濃縮法を併用することにより、sub-ppmレベルでの定量が可能となった^{6), 7)}。固体試料の標準添加法にはEamesらの報告があるが、その方法は1点評価標準添加法と呼べるもので、定量値は外挿法で求める為、測定誤差が甚大され定量結果の正確度に問題があったが、本法はこの問題の解決になり、Solid Samplingのメリットを生かした定量が可能であると考えられる。

本法の応用として、エゾシカサンプル中のCu, Znの定量による生態研究の可能性、IAEA生物試料の保証値決定の検討を行った。

【終わりに】 第一の研究では生体膜の持つ分子認識、情報変換及び信号増幅機能を模倣あるいは直接センサーに組み込むことによって、新しい化学センサーおよびバイオミメティックセンサー、すなわち脂質二分子膜に基づくポテンシオメトリックセンサーおよびグルタメートレセプターイオンチャンネルセンサーを開発した。ポテンシオメトリックセンサーでは、その応答挙動に二分子膜に特徴的な機能を見だし、新しいタイプの感応膜の可能性を示した。グルタメートレセプターイオンチャンネルセンサーでは感応素子としての優れた信号増幅能・選択性を示した。

また固体の原子吸光法に関する研究では、従来ある検量線作成方法の欠点を補いうる固体試料の為の新しい検量線の作成方法(3点評価標準添加法)の確立により、非常に簡便に高感度な、そして正確度の高い定量が可能になった。

- 1) *Anal. Sci.*, 1991, 7, 853-862. 2) *Anal. Chem.*, 1991, 63, 2787-2795.
- 3) *Anal. Sci.*, 1991, 7, 1675-1676. 4) *分析化学*, 1993, 42, 167-172.
- 5) *Microchem. J.*, in press. 6) *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1993, 346, 1054-1057. 7) *分析化学*, 1994, 43, 1-5.

フミン酸と銅との相互作用に関する分析化学的研究

(北大地環科研) 福島 正巳

【緒言】今日、フミン酸と重金属との相互作用に関する詳細な知見が環境化学的見地から要望されている。フミン酸は図1に示したように種々の官能基および広い分子量分布を有する混合物である。ゆえに、重金属との相互作用に関してより詳細な情報を得るためには、(1)重金属化学種の高感度かつ選択的な形態別測定法、(2)結合部位の不均一さを反映した結合能力の定量的な評価法、(3)フミン酸の分画ならびに各分画に対する結合能力の評価に関する検討が必要となる。これまでフミン酸共存下での重金属の形態別測定法に関しては主として電気化学的手法が報告されてきた。しかしながら、この方法ではフミン酸の電極への吸着などが測定に影響を及ぼすことが問題点とされている。また、銅などの重金属とフミン酸との結合能力に関してはまだ十分定量的な取扱いがなされているとはいえない。本研究では、重金属として銅を対象とし、イオン交換体および陽極溶出ボルタンメトリー (ASV)を用いた高感度かつ選択的な形態別分離定量法を確立した。また、これらの手法をフミン酸の銅錯形成能力(条件安定度定数、銅錯化容量)の定量的な評価に適用した。さらに、フミン酸を分子量分画し、各分画の銅錯形成能力を評価し比較検討した。一方、殺菌剤として広く使用されている銅オキシンの溶解度測定により、銅オキシンとフミン酸との結合能力についても定量的な評価を行った。

【フミン酸の調製】泥炭試料を乾燥後、0.1M水酸化ナトリウム溶液を加えフミン質を抽出し、塩酸で $\text{pH} < 1$ としフミン酸を沈殿させる。沈殿物を透析し、凍結乾燥してフミン酸パウダーを得た。本研究では、和光純薬製(WHA)、新篠津(SHHA)、サロベツ原野(SAHA)、美唄(BHA)産の泥炭、噴火湾底質土(FBHA)より抽出したフミン酸を用いた。元素分析の結果からこれらフミン酸の炭素含有量は約50~60%であった。

【ASVによるフミン酸の銅錯形成能力の評価】ASV法は銅(II)イオンの測定に対して簡便、高感度かつ高選択的な手法である。しかも、フミン酸のような高分子の溶存有機物が共存する場合、有機物と錯形成していない銅(II)イオンだけを選択的に測定することが可能である。しかし、銅(II)の酸化液は電極表面へのフミン酸の吸着によりブロード化し、ASVによる遊離の銅(II)イオンの測定を妨害する。そこでフミン酸の電極への吸着を防ぐため、種々の界面活性剤の添加効果について検討を行い、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の添加が最も効果的であることを見いだした。SDSを添加することによりシャープな酸化液が得られ、ピーク電流値は20%程度増加した。このことは、電気毛管曲線による検討からSDSの電極表面への強い吸着がフミン酸の吸着を妨げることに起因すると説明することができた。さらに、この手法をフミン酸の銅錯形成能力の評価に応用した。その結果、SDSを共存させた場合の銅錯化容量の値はC-25法による値とも良い一致を示した。

【フミン酸の分子量分画の銅錯形成能力】Sephadex G-50ゲルを用いてWHAの分子量分画を行い(これら分画を分子量の大きい順からF_a, F_b, F_cとする)、各分画について銅錯形成能力を評価した。ここでは、フミン酸の銅錯形成サイトの強さの分布をガウス分布と仮定した連続安定度分布関数を導入した。フミン酸による銅の滴定曲線は定義された連続安定度分布関数を用いて描かれた滴定曲線とよい一致を示し、定義した安定度分布関数の妥当性が確かめられた。次に、安定度分布関数への非線形最小自乗近似により、個々のサイトと銅(II)イオンとの結合能力の評価が可能となった。さらに、上記分布関数により各分画とそれらの混合物(MIX)の銅錯形成能力を評価し比較検討を行った。その結果、混合物の銅錯形成能力(logK値)は各分画に比べ低い値を示すことがわかった(図2)。フミン酸分画およびその混合物の紫外可視吸収、蛍光およびFTIRスペクトルの解析結果から、分画を混合した場合、各分画間の分子間水素結合が促進されることが推測された。ゆえに、混合物では各分画間の相互作用の促進により、錯形成サイトが遮蔽され銅が配位し難くなり、銅錯形成能力が低くなると結論づけた。

【銅オキシシ錯体とフミン酸との相互作用】殺菌剤である銅オキシシ錯体とフミン酸との相互作用について検討した。銅オキシシ錯体は水には難溶であるが、フミン酸が共存するとその溶解度はかなり増加することが示された。その機構をフミン酸の疎水部分と銅オキシシ錯体の相互作用と考え、図3のような分配モデルを導出することによって、銅オキシシ錯体のフミン酸への分配係数を評価することができた。

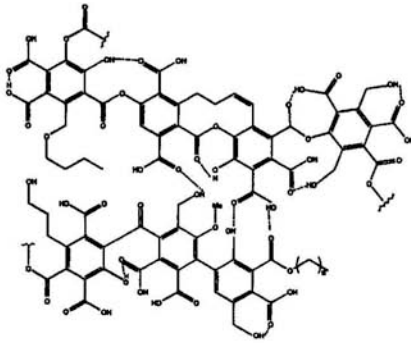


Fig.1 Structure of humic acid

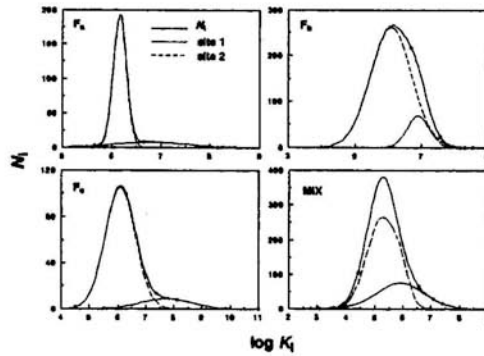


Fig.2 Distribution curves

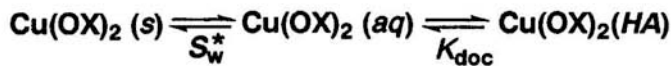


Fig.3 Partition model

ふくしま まさみ

1994年度

北海道分析化学賞受賞講演

吸光検出手段を利用する無機イオンの分離・分析法に関する研究

(北見工大) 星 座

<はじめに>

吸光光度法は一般的な分光光度計を利用する方法や最近では流れ分析法すなわち高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及びフローインジェクション分析法などに広く利用されている検出手段である。分離・濃縮法においては古典的な沈殿分離法や溶媒抽出法などと共に最近では様々な吸着剤、合成高分子、天然物及び機能化された物質を利用するいわゆる固相抽出法が種々の物質の分離濃縮に広く応用されており、その中にはその後の分析法で測定しやすい形に変換して濃縮するなどの工夫がなされている。このような分離・濃縮法と組み合わせることにより吸光光度法のような既存の方法においてもより微量な成分の検出を可能にしている。本研究はこのような観点から行われたものであり、最終検出手段を吸光光度法とし、そのための金属イオンの前処理濃縮法として溶媒抽出法や固相抽出法について検討した結果や吸光検出逆相HPLCに適用可能な金属イオン-試薬系について検討した結果を述べる。

<金属陽イオン錯体と有機色素陰イオンから成る三元錯体の溶媒抽出>

金属陽イオン錯体を与える代表的な配位子として1, 10-フェナントロリン(phen)があるが、Fe(II)の特異的な吸収を利用する方法がある他は吸光分析試薬として利用されることは少ない。本研究ではphenと反応して陽イオン錯体を形成する金属イオンのいくつかを色変わりは少ないが大きなモル吸光係数を持つフルオレセイン系色素(主にテトラヨードフルオレセイン)と三元錯体を形成させて溶媒抽出し吸光分析する方法について検討した。この検討を通じて安定度定数の小さなphen錯体を生成する金属イオン系でも水相中のphen濃度条件や抽出溶媒を選ぶことによりその三元錯体を選択的に抽出できることやphenと安定な錯体を形成するNiやFeが特殊な形の三元錯体としてニトロベンゼンのような特殊な溶媒にのみ抽出されることを明らかにした。これらの結果を利用し、いくつかの金属イオンの抽出吸光光度法に応用した。

<天然高分子キチンを捕集担体とする固相抽出法>

キチンはセルロースと類似構造を持つアミノ多糖類であるが、その不活性な性質のため加工が難しく利用は限られていた。しかし、最近ではその加工技術も改善されいろいろな分野で様々な利用方法が検討されている。本研究ではキチンの分析化学的応用として無機イオンの呈色化学種を溶液中からイオン会合体としてまたキチンの陰イオン交換能を利用して水溶液中から陰イオン化学種を濃縮することすなわち吸光分析法の前処理に利用することを検討した。陽イオン型錯体を形成するFe(II)-phen, Cu(I)-ネオクブロン,

ほしすわる

Cr(III)-ジフェニルカルバゾン, Bi(III)-チオ尿素体がテトラフェニルホウ酸イオンやドデシル硫酸イオンなどの陰イオン共存下で迅速にキチンに捕集可能であり、少量の酢酸水溶液とアセトンなど有機溶媒との適当な割合の混合溶液で簡単に溶出可能であるためこれら金属イオンの吸光分析に利用できた。また、キチンの陰イオン交換体としての機能を利用すればリンモリブデンブルー陰イオンを直接濃縮することやモリブデン酸イオンのようなオキソ酸イオンも簡単に濃縮することができ、溶離後適当な発色試薬により呈色化学種に変換して吸光分析することも可能であった。ここで検討した方法は、溶離液の量をより少なくすることができ最高500倍程度までの濃縮倍率を稼ぐことができるため、簡単な装置、操作でモル吸光係数の小さな系でもかなり低い濃度レベルまでの簡易吸光光度法として利用できる。

＜ジチオセミカルバゾン系キレート試薬の金属イオンの分離・分析試薬としての利用＞

ジチオセミカルバゾン系試薬はN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)などの特殊な溶媒を除き極めて溶解度が低い。このため溶媒抽出法のような分離法に応用できない欠点を持つ。しかし、これら試薬群は硫黄、窒素を配位原子として四座配位子としてのポテンシャルを持ち、銅やパラジウムと反応して特徴のある吸収スペクトルを与える。本研究ではこのように金属イオンの分析試薬として可能性の高いこれら試薬群を分離・分析法の中でより機能的に使う目的でなされた。その結果、生成する金属キレートが速度論的に不活性であるため吸光検出逆相HPLCにおける各金属キレートの相互分離に利用できることを明らかにした。また、アンバーライト樹脂のような合成高分子に担持させるだけで水溶液中からの金属イオン捕集剤として利用可能であることを明らかにした。さらに、捕集後少量のDMFでそれらのキレート化合物の形で簡単に溶出できることを利用し、上記HPLCの前処理法として応用することを試みた。この結果を用いて微量Hgの定量法やPt, Pdの同時定量法の開発を行った。この研究で利用した試薬担持樹脂は調製が簡単であり、硫黄系配位子を使用しているにもかかわらず安定で、デシケーター中で保存すれば3か月後でもその捕集性能は変わらない。また、捕集後DMFにより試薬ごと溶出させるため1回使用であるが、洗浄後試薬担持樹脂として簡単に再生も可能である。このため、今後ジチオセミカルバゾン系試薬と反応する他の金属イオンの吸光検出逆相HPLCの前処理法にも利用できると考えている。

＜謝辞＞本研究の大半は北見工業大学において行われたものであるが、基礎を作るにあたり、現東北大学工学部教授四ツ柳隆夫先生及び元北大工学部教授故青村和夫先生に有用なご助言を頂きましたことに対し心より感謝致します。また、研究を進めるに当たり、現北大工学部教授渡辺寛人先生ほか多くの方からのご助言及びご援助頂きましたことにつきましても深く感謝致します。

1995年度

北海道分析化学
賞受賞講演

有機多座配位子の溶液内反応動態に関する基礎研究

(北大大学院地球環境) 吉田 登

<はじめに>

化学反応の90%以上は溶液中で起こり、反応場としての液相は無機・有機化学反応系において最も重要な相である。特に水は生体反応系において反応媒質としてのみならず自己集合体形成を促す重要な役割を果たしている。水溶液中の反応の平衡論的考察に関しては古くから熱力学的、構造化学的立場から多くの研究が行われてきたが、反応機構、反応速度を微視的構造因子と関連づけた非平衡論的・動力学的立場からの取り扱いは極めて少ないのが現状である。このような観点から、有機多座配位子金属錯体の関与する溶液内反応の「動力学的研究」を下記の4項目について進めてきた。

<非水溶媒系におけるプロトン移行反応>

温度ジャンプ法を初めとする化学緩和法を用いて、OH...N型分子内水素結合を有するo-ヒドロキシアゾ及びo-ヒドロキシアゾメチン化合物のプロトン移行反応をとりあげ、動的過程を支配する重要な因子である溶質・溶媒相互作用と反応機構・反応速度定数(k)との関連を検討し、微視的な誘電率や反応部位近傍の選択的溶媒和構造の重要性を指摘した。本研究は、比較的少ない素過程からなる迅速反応にScatchard式が適用できることを世界で最初に示した例である。

<錯体生成反応における中間体・短寿命化学種の検出・単離と構造>

反応機構や反応速度と微視的構造因子との相関を考えるうえで反応進行中に生成する短寿命反応中間体の単離・特定は極めて重要である。この観点から有機多座配位子の非水溶媒中における金属錯体生成反応のテーマに取り組んだ。代表的金属指示薬PARで代表されるN,N,O三座配位の有機多座配位子群は分子内にOH...N型の強い水素結合を有し、その錯生成反応は通常のエigen-Tamm機構からはずれた配位子側の特性が反映された反応中間体が介在する反応機構が予想される。予想された短寿命「N,N二座配位中間体」は水溶液中では検出されなかったが、非プロトン性溶媒中においてその存在が電子スペクトル法により初めて確認された。さらにこの短寿命化学種を単離し、溶液内挙動を調べ、IR、磁化率、XPS測定等から構造を特定した。一連のCo(III)-ジメチルグリオキシム錯体、 $M^+[Co^{III}-(dmgh)_2(Base)_2]^-$ 、は錯体平面にOH...O型の強い分子内水素結合を有し、その強さは軸配位子のσ-ドナー性とπ逆供与性によって制御される興味深い系である。結晶中における分子内水素結合の強さは溶液中と同様、主に軸配位子によって制御されるが、軸配位子がNO₂⁻の系では軸配位子(Base)のN原子とCo核との結合距離及び配向が対カチオンM⁺との弱い静電相互作用により制御され、分子内水素結合の強さが大きく変化することが見いだされた。

<弱い相互作用による分子包接錯体生成の動的的研究>

酵素-基質、抗原-抗体、ホルモン-レセプターなどの生体反応系においては必ず分子認識が初期過程として生起する。これら高度な生体系分子認識過程においては、水素結合、静電的結合、疎水結合などの弱い相互作用が、多重的且つ動的に関与している。初期の研究においてはニトロフェニルアゾサリチル酸誘導体のシクロデキストリンによる位置選択的取り込みと酸解離制御の動的解明、各種ナフタレン系アゾ化合物の分子包接化反応の活性化パラメーターの算出、低温領域におけるアレニウスプロットの異常性と反応機構の解明などがなされた。特に分子包接化の活性化パラメーターが求められたのは初めてであり、官能基近傍の脱溶媒和が重要な役割を果たしていることが判明した。この事実から酵素の取り込み過程における基質の脱溶媒和の重要性が指摘された。また反応における「方向性」の概念が提出された。ひき続きスルファニル酸のヒドロキシフェニルアゾ誘導体の多段階包接過程、アゾコンプレクソン金属錯体の分岐型包接過程の研究、フタレイン系ゲストの包接過程における構造変化に関する研究等が行われた。次のステップとして静電相互作用の導入を行い、分子認識における特定の官能基の配置に関する研究にとりかかった。正または負電荷を導入した荷電シクロデキストリンの分子認識の動態研究を行なう為に、弱い相互作用の微小変化を検知するためにさまざまな検出系（Fiber optics、蛍光、伝導度）を備えたストップフロー装置を試作・導入した。

<反応活性種の動的局所構造解析の試み>

有機多座配位子の関与する反応過程を支配する重要な因子である活性化状態・中間体の全体構造および金属まわりの局所構造変化に関する情報を光吸収測定のみから求めることは、甚だ困難であり、しばしば、間接的推論の域にとどまることが多かった。そこで静的局所構造解析法として有力なEXAFS（広域X線吸収微細構造）、XANES（X線吸収端構造）にストップフロー法を組み込み、動的局所構造法としての可能性を検討し、実験室系動的EXAFS法の開発を試みた。

<謝辞>本研究を遂行するにあたり研究全般のフィロソフィーに関しては水口アイコ先生、藤本昌利先生（東京理科大学）、田中元治先生（名古屋大学名誉教授）に心から感謝致します。また有機多座配位子に関しましては東北大工学部の四柳隆夫先生、分子認識の研究では故田伏岩夫先生（京大工学部）、EXAFS関連では松下正先生（KEK）、西郷敏先生（自治医科大学）から多くの貴重な助言を頂き有難うございました。また終始暖かく見守ってくださった多賀光彦先生、吉田仁志先生、斎藤和雄先生、松永義夫先生、梅沢喜夫先生、当研究科の市川和彦先生、中村博先生、長谷部清先生に深く感謝致します。多くの装置の試作に関しましては（株）ユニソクの長村俊彦社長に厚く御礼申し上げます。

生体内のステロイド化合物は、各種疾患と関連があるばかりでなく、その存在が微量であると同時に多くの他成分と共存する。従って、ステロイドを指標とする病態解析や新規成分の化学量論的研究を遂行するためには、標品を用いた的確な分析法の開発が必要となる。演者は上記観点より、化学的手法により各種ステロイド化合物の合成を行い、次いでそれら標品を用いて定量分析法の開発を行い、さらに確立した分析法応用して実試料の分析を行った。

I エストロゲンの全合成と分析法の開発

エストロゲンは卵胞ホルモンとして重要な芳香族ステロイドであり、その微量定量法（イムノアッセイ）を新たに開発するために、新規芳香族ステロイド誘導体の合成を行った。即ち、エストロゲンの 11 あるいは 12 位は生物学的にも化学的にも安定な部位であり、この部位にスパーサーを導入したハプテンの合成を企画した。天然のエストロゲンには都合の良い官能基が存在しないため、 β -ケトスルホキシドの熱分解を利用した全合成により、11, 12 位にカルボキシル基あるいはカルボキシメチル基を有する新規ハプテン (1) を合成した。それらを用いて高特異性のラジオイムノアッセイ法を開発した。又、化学的に非常に不安定であるエキンエストロゲン及びその代謝産物を同様に合成し、それらを標品として高速液体クロマトグラフィーによる分析法の開発を行い、代謝経路の解明を行った。

II 副腎皮質ホルモンの分析と病態解析法の開発

近年、原発性アルドステロン症患者尿中に新たに見いだされた 18-ヒドロキシコチゾール (2) は副腎皮質過形成のマーカーとして注目されている。上記疾患の酵素免疫測定法によるマススクリーニング法を開発する目的で、先ず標品の新規合成法の開発を行った。又、同時に関連する代謝産物の標品も合成し、それらを用いて、高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析法を確立し、本症患者尿中の 18-ヒドロキシコチゾール、18-オキシコチゾールの定量を行った。次いで、合成品をハプテンとして用いて、モノクローナル抗体を作成し、新たな酵素免疫測定法を開発し、本症の診断法として病態解析に応用できることを明らかにした。

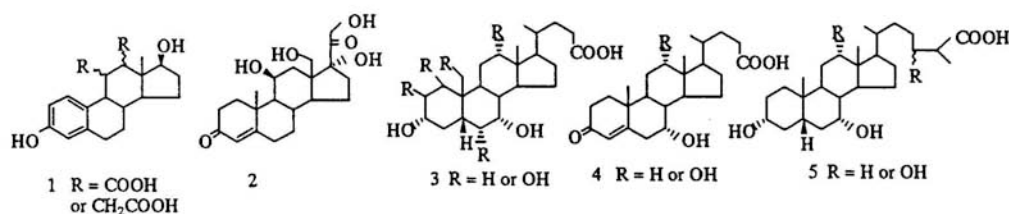
III 胎児性胆汁酸の構造解析と微量分析法の開発、臨床化学への展開

胆汁酸は肝においてコレステロールより生合成されるため、肝機能診断の指標と

して古くより注目されてきた。演者は、胎児-新生児の体液中に健常成人では認められない特有の胆汁酸を見出し、胎児性胆汁酸として提唱した。これら胎児性胆汁酸の体内動態を明らかにする目的で、推定された各種の新規胎児性胆汁酸(3)標品の合成を行った。これらの標品を用いて化学構造を確認し、ガスクロマトグラフィー・質量分析法による一斉微量定量法を開発した。又、胎児性胆汁酸の生成機序を解明するために、各種体液中の胆汁酸組成及び発育に伴う変動、新生児肝胆道疾患と胎児性胆汁酸の関連について検討した。

IV 胆汁酸生合成中間体の分析による生合成機構の解明と先天代謝異常の病態解析

最近、乳児期に原因不明の胆汁うっ滞から肝硬変に進行し、肝不全で死亡する症例が多く認められた。胆汁酸分析の結果、3-オキソ不飽和胆汁酸(4)が多量に認められ、胎児性胆汁酸が低値であることから、3-oxo- Δ^4 -steroid 5 β -reductase 欠損による先天性代謝異常症と考えられた。不安定な本胆汁酸をメトキシム誘導体とした後、ガスクロマトグラフィー・質量分析法を用いたSIM法による微量定量法を確立した。一方、胆汁酸の生合成に関与する酵素系の特異性、あるいは中間体の立体化学はほとんど解明されておらず、胆汁酸と各種疾患との関連を明らかにする上で大きな問題点が残されている。演者は立体異性体を含めた胆汁酸生合成中間体(5)を合成し、それらを標品としてガスクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによる微量一斉定量法を確立した。更に、各種生合成中間体アナログを基質としてその代謝産物の定量並びに生成する生合成中間体の立体化学について検討し、胆汁酸生合成における β -酸化系の特異性を明らかにした。



本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました北海道医療大学薬学部藤間貞彦教授に深謝いたします。又、本研究は北海道医療大学薬学部薬品分析化学講座の多数の方々の御協力のもとに行われたものであり、ここに記して心より感謝の意を表します。

1996年度

北海道分析化学賞 電気化学的分析法における
受賞講演 高機能化に関する研究
(北大院地球環境) 田中 俊逸

〈はじめに〉

本研究は、濃縮ボルタンメトリーや電気化学的アッセイ法に、各種の溶液内反応を導入することにより、あるいは修飾電極や多機能性物質を利用することによって、感度や選択性を改善し、高機能化を図ることを目的として行われたものである。また、キャピラリー電気泳動においては、その分離能の改善と適用範囲の拡大を目指して泳動システムにおける高機能化を図った。さらに、枯葉などを起源に土壤中で生成される腐食物質の、重金属や多環芳香族化合物などの環境汚染物質との相互作用について調べるとともに、腐食物質の環境修復技術への適用に関する基礎的研究を行った。

〈濃縮ボルタンメトリーにおける高機能化に関する研究〉

有機配位子を溶液に添加し、金属イオンを有機錯体として電極表面に濃縮して検出する方法や、有機配位子で修飾したカーボンペースト電極を用いる方法について検討し、分析対象物質の電極への濃縮効率の増大と選択性の改善を図った。例えばSe(IV)は、溶液中に2,3-ジアミノナフタレン(DAN)を添加してすることで、Se-DAN錯体として電極上に選択的に濃縮され、 10^{-8} MレベルのSe(IV)が容易に検出できた。また、5-Br-PADAPやSATPを配位子としてCu(II)の電極への選択的濃縮が達成できた。化学修飾カーボンペースト電極の例としては、チアクラウン化合物で修飾した電極によりAg(I)を、SATPで修飾したものではCu(II)を選択的に濃縮することが可能であった。また、Cu(II)-シクロヘキシル酪酸で修飾したカーボンペースト電極ではアミノ酸などの有機物の濃縮と検出をも可能にした。さらに、電極上で金属に対する配位子剤を電解生成しながら金属を濃縮する方法や、接触水素波など感度的に有利な反応波を導入する方法によって感度・選択性に優れた分析法を開発することができた。

〈新しい移動度制御法に基づくキャピラリー電気泳動法に関する研究〉

キャピラリー電気泳動法の泳動モードの一つである等速電気泳動法において、水溶液系での新しい移動度制御法として、ターミナルイオンとの錯形成反応を用いる方法を開発した。これは分離対象物質をターミナルゾーンに存在させた荷電配位子との反応によって荷電錯体に変換して泳動するもので、従来の等速電気泳動法では不可能とされていた中性分子をも泳動可能とすることができた。例えば、ターミナルイオンとしてシアノ酸イオンを用いると、サンプルとしてインジェクトされた金属イオンのうちシアノ錯体を生成する金属だけが負電荷を持つ化学種として泳動される。またホウ酸をターミナルイオンとする系では、中性分子であるカテコール類

が負電荷を持つホウ酸錯体として泳動検出することができた。キャピラリーゾーン電気泳動法ではホウ酸との錯形成による移動度の制御と陽イオン界面活性剤による電気浸透流の制御を併用することで、カテコールアミンやナイアシン類の分離を達成した。さらに、臨界ミセル濃度以下でキャピラリー壁上に生成したヘミミセルが移動度の制御に寄与していることを明らかにした。

〈多機能性リガンドを用いるレセプターおよび電気化学的アッセイ法の研究〉

生体レセプターに対する結合部位とアビジンというタンパクへの結合部位とを併せ持つ多機能性リガンドを調製することによって、薬物のアッセイ法を開発した。このリガンドは、ベンゾジアゼピン関連物質である1012Sとビオチンとを結合させたものであり、ベンゾジアゼピンレセプターへの1012S部位の結合の様子をアビジン-ビオチン相互作用によって検出するものである。この方法によって高感度なベンゾジアゼピン系薬物のアッセイ法を開発することができた。また、このような多機能性分子を化学情報変換分子としてとらえ、タンパクとの結合という化学情報を電気的な信号に変換する分子の調製と、その分子を用いたタンパク-リガンド相互作用の電気化学検出について検討した。すなわち電極活性なドウノマイシンやフェロセン部位とビオチン部位を併せ持つ分子を調製し、ビオチン部位がアビジンと結合することによって、電極活性部位の電極応答が変化することを利用するものである。調製したリガンドとの競争反応を用いることによってビオチンのアッセイ法としても利用できた。

〈腐植物質と環境汚染物質との相互作用の研究〉

腐植物質は環境中にもっとも多く存在する有機物の一つであり、そのため腐食物質は環境汚染物質の環境中での化学的および動的挙動に大きな影響を与えていると考えられる。このような観点から、重金属イオンや有害有機物などと腐食物質の相互作用を調べるとともに、腐植物質の天然の環境浄化剤としての利用の可能性の評価のためにいくつかの検討を試みた。具体的には、1)銅やクロムなどの重金属イオンと腐植物質との錯形成挙動、2)六価クロムに対する還元作用、3)腐植物質による多環芳香族化合物の可溶化現象について検討した。また、これらの腐食物質の機能を生かして、汚染土壌などの環境修復技術に腐食物質を利用するための基礎研究を行った。

〈謝辞〉

本研究の遂行するにあたり終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました吉田仁志先生、多賀光彦先生に深謝いたします。また、本研究科の中村博、長谷部清教授はじめ研究に協力、助言いただいた先生方、実際に研究を実施していただいた多くの院生の方々に心から感謝の意を表します。

たなか しゅんいつ

1997年度

北海道分析化学賞 生体内情報伝達機構における微量元素の生理的機能の解明
受賞講演

齋藤 健

はじめに

微量元素が生物の成長、発達、恒常性維持などに密接に関与していることは古くから知られていたが、最近の研究により微量元素が中枢神経系での神経伝達やDNAの遺伝情報の転写、翻訳など生命維持の根幹に係わる生体内の情報伝達機構においても重要な役割を担うことが明らかにされてきている。演者らは、微量元素の生体内での役割に注目し、生体内微量元素の動態と生理的機能の解明に関する研究を行っている。本研究では、特に、微量元素が中枢神経系伝達機構において如何なる生理的機能を有しているのかについて、これまでに得られた知見を報告する。

中枢神経伝達機構における微量元素の生理的機能の解析

1) 脳内微量元素の分布の解析

脳内微量元素の分布には部位特異性が存在し、例えば亜鉛は海馬や大脳皮質に高濃度に存在する。本研究では、微量元素が脳機能とどの様に関連するかを明らかにするために、化学的神経伝達の場であるシナプス近傍の微量元素濃度の測定法を確立し、その動態を検討した。Table 1は機能別に分割したラット神経細胞分画中の銅および亜鉛の分布を示している。通常の神経シナプス(small synaptosome (SS))内の亜鉛濃度は、海馬、大脳皮質で高濃度であった。さらに、海馬に特異的に存在する苔状繊維の神経シナプス (large synaptosome (LS))内の亜鉛濃度は、通常のシナプスに比較して約10倍高濃度であった。これらの結果は、記憶や学習機能に密接に関連する海馬の神経伝達に、亜鉛が何らかの役割を果たしていることを示唆している。

2) 生理的刺激時の海馬における神経伝達物質および亜鉛の動態

Fig. 1は、拘束ストレス負荷時のラット海馬の神経シナプス近傍の神経伝達物質および亜鉛の動態を示している。LSとSS中の亜鉛濃度の比(LS/SS)は、ストレス負荷により減少し、一方、シナプス外液の亜鉛および神経伝達物質グルタミン酸は、刺激開始15分後に増加し、30分後にはほぼ負荷前の濃度まで戻った。

以上より、生理的刺激時に、亜鉛が海馬の苔状繊維のシナプスからグルタミン酸と共に放出され、グルタミン酸の神経伝達を調整していること、放出された亜鉛の再吸収機構が存在すること、などが示唆された(Fig. 2)。

3) 微量元素代謝異常と脳内神経伝達物質の動態

先天性銅代謝異常を有し、ウィルソン病のモデル動物であるLECラットを用いて、銅の代謝異常が脳部位別微量元素濃度および神経伝達物質(カテコールアミン)代謝に与える影響を検討した。その結果、急性肝炎発症以前は、脳内銅濃度が著しく低下し、加齢に伴い部位依存性に銅の蓄積が認められること、若齢期に、脳内銅濃度の低下に伴ってドーパミン(DA)からのノルエピネフリン(NE)合成の著しく低下し、DOPACに代謝されてしまうこと、年齢依存性の銅濃度の上昇に伴い、NE、の過剰な合成が起こることが明らかになった(Fig. 3)。

これらの結果より、脳内の微量元素の代謝変動は、種々の神経伝達物質代謝に著しい影響をもたらすこと、さらに、脳への銅の過剰蓄積によると思われるウィルソン病患者の神経障害発症に、それ以前に出現する脳内銅濃度の低下とそれに伴う神経伝達物質代謝異常が関与している可能性が示唆された。

齋藤 健 (さいとう たけし)

Table 1 Subcellular distributions of Cu and Zn in 7 regions of rat brain

| Regions | Cu concentration (ng/mg protein) | | | Zn concentration (ng/mg protein) | | |
|-------------------|----------------------------------|-------------|--------------|----------------------------------|-------------|--------------|
| | Myelin | Synaptosome | Mitochondria | Myelin | Synaptosome | Mitochondria |
| Cerebellum | 4.6 ± 0.32 | 15.6 ± 1.66 | 68.7 ± 4.74 | 43.2 ± 2.94 | 53.5 ± 7.57 | 58.7 ± 5.40 |
| Medulla+Pons | 3.3 ± 0.31 | 14.4 ± 1.26 | 80.2 ± 9.12 | 36.4 ± 6.01 | 46.1 ± 5.06 | 54.5 ± 1.93 |
| Hypothalamus | 6.6 ± 0.53 | 20.7 ± 0.93 | 44.4 ± 2.57 | 58.2 ± 6.95 | 65.4 ± 3.81 | 59.9 ± 5.72 |
| Midbrain+Thalamus | 3.7 ± 0.43 | 14.1 ± 1.26 | 57.7 ± 4.35 | 41.9 ± 3.25 | 46.5 ± 4.01 | 61.2 ± 3.64 |
| Striatum | 4.4 ± 0.25 | 16.7 ± 1.37 | 42.1 ± 3.89 | 60.6 ± 4.53 | 71.4 ± 4.49 | 70.1 ± 3.79 |
| Hippocampus | 4.7 ± 0.22 | 17.3 ± 0.89 | 42.1 ± 2.06 | 74.3 ± 4.95 | 84.7 ± 3.05 | 99.0 ± 6.64 |
| Cerebral cortex | 3.5 ± 0.25 | 14.9 ± 1.82 | 42.2 ± 3.04 | 52.9 ± 3.41 | 84.3 ± 8.43 | 93.5 ± 4.34 |

Mean ± S. E.

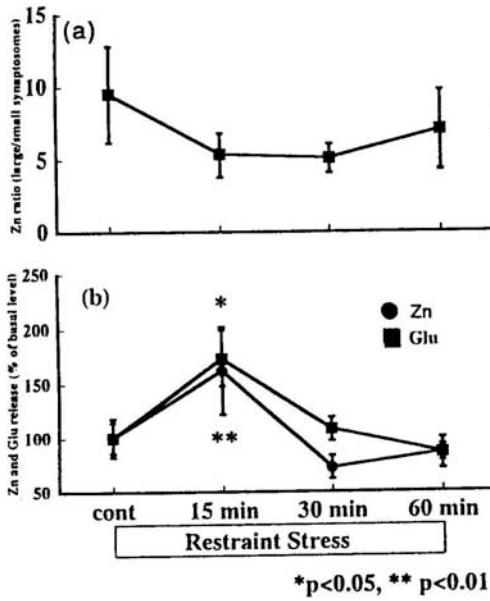


Fig. 1 Effects of restraint stress on the release of Zn and glutamate from neuronal synapses in the hippocampus.

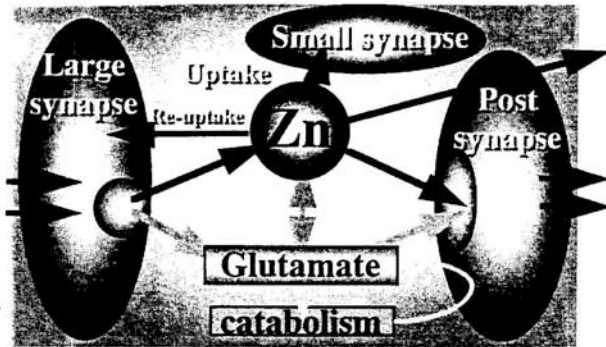


Fig. 2 Dynamics of Zn and glutamate in the hippocampus during physiological stimulation.

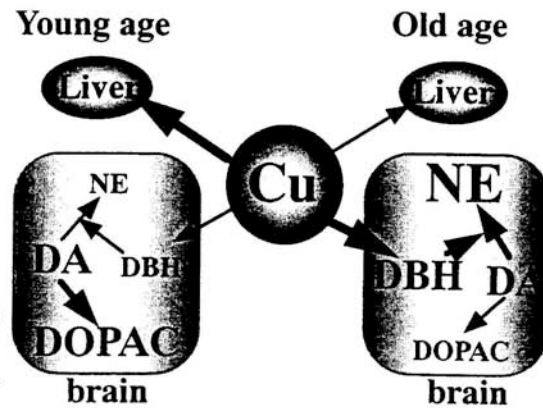


Fig. 3 Changes in the catecholamine metabolism by Cu status in the brain of LEC rat.

1. はじめに

油／水エマルションのような不均一系における液／液界面を經由する反応を定量的に議論することは、液／液抽出に基づいた分離化学やコロイド化学、更には機能膜や生体膜モデルの基礎研究として極めて重要である。このような研究を行うためには、油相、水相及び油／水界面ごとに反応や物質移動を律する因子を分離、検討することが重要である。しかしながら、エマルション中には比表面積の異なる様々なサイズの液滴が存在するため、液／液界面反応の本質的な理解には液滴の集合体を対象とするのではなく、液滴一粒毎の測定が必要不可欠となる。レーザー捕捉法を用いると溶液中の単一液滴を、非破壊・非接触的に任意の位置で捕捉する事ができる。本研究ではこの手法を蛍光及び電気化学法と組み合わせることにより、単一液滴毎に電子移動反応過程を直接測定可能であること、またその特徴を明らかにした。

2. レーザー捕捉・分光・電気化学法

光学顕微鏡にレーザー光 (1064 nm) を導入し溶液中の微粒子に集光すると、光の放射圧により単一微粒子を捕捉することができる。さらに、励起光 (Xe ランプ) をレーザー光と同軸で導入、更には顕微鏡のステージ上に電極を配置した。このような装置と方法を用いることにより、従来は不可能であった液滴一粒毎の化学反応を分光学的、電気化学的に誘起、検出をすることが可能となった。

3. 反応スキーム

透明薄層セル中で水相中のフェロシアン化物イオン (Fe(II)) を定電位電解することによって生成するフェリシアン化物イオン (Fe(III)) と、レーザー捕捉されたリン酸トリブチル (TBP) 油滴中のフェロセンやその誘導体 (FeCp-X) との間の界面電子移動反応を誘起した (図-1)。界面電子移動速度は油滴中の FeCp-X と蛍光プローブとの間の蛍光消光反応を利用して求めることができる。

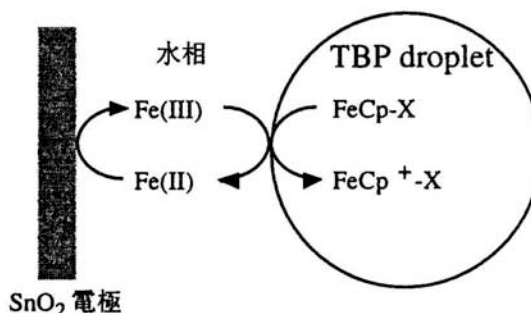


図-1. 反応スキーム

4. 電子移動速度の比表面積依存性

エマルション系全体の測定結果から、反応の律速段階は油滴／水界面における電子移動過程であることを示すとともに、油滴中に添加した9,10-ジフェニルアントラセンの FeCp-H による蛍光消光を利用したフルオロメトリックな測定から、電子移動速度を直接求めることが可能であることを明らかにした¹⁾。その結果、油滴半径 (r) $> 5 \mu\text{m}$ で、見掛けの電子移動速度 ($k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) は、油滴の表面積／体積比に依存することを

示した ($k_{\text{obs}} = (A/V)k_{\text{ET}} = (3/r)k_{\text{ET}}$, k_{ET} : 単位界面面積当たりの速度定数/cmM¹s⁻¹) (図-2 の直線部分)²⁾。この油滴/水界面における電子移動速度を油滴のサイズの関数として議論することが、従来には無い新しい試みである。

一方、界面を經由する電子移動反応は液間電位差や界面電荷などにより影響を受けるものと考えられる。そこで、この液/液界面における液間電位差を変化させることにより、電子移動速度への影響を検討した。その結果、液間電位差の上昇に伴い電子移動速度が増加することを示すとともに、この結果はマーカス理論から予想される電子移動速度の反応の自由エネルギー依存性と一致しており、油滴/水界面における電子移動速度定数を理論的に比較・検討することができた³⁾。

5. 特異的な油滴サイズ効果

$r < \sim 5 \mu\text{m}$ では、 k_{obs} が比表面積 (油滴サイズ) に依存しない (図-2 の直線からのずれ)。これは種々の濃度の支持電解質や液間電位差、FeCp-X に関わらず観測された。界面活性剤を添加するとこの挙動は観測されず、 $r < 5 \mu\text{m}$ でも k_{obs} は比表面積に従った。このことは、油滴サイズ効果は油滴/水界面における界面構造に起因することを示唆している⁴⁾。

このように、レーザー捕捉・分光・電気化学測定システムを用いることにより、初めて、油/水エマルション中の油滴一粒毎の油滴/水界面における電子移動反応速度を直接観測できることを示すとともに、微小球形界面における電子移動反応の特異性を明らかにした。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かい御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院理学研究科喜多村昇教授、金幸夫博士、中谷清治博士、八尾浩史博士に深く感謝いたします。また、本研究は北海道大学大学院理学研究科分析化学研究室の皆様のご協力のもとに行われたものであり、ここに記して心より感謝いたします。

1) K.Nakatani, K.Chikama, H-B.Kim, N.Kitamura, *Chem.Lett.*, **1994**, 793.

2) K.Nakatani, K.Chikama, H-B.Kim, N.Kitamura, *Chem.Phys.Lett.*, **237**, **1995**, 133.

3) K.Chikama, K.Nakatani, N.Kitamura, *Chem.Lett.*, **1996**, 665.

4) K.Chikama, K.Nakatani, N.Kitamura, submitted.

ちかま かつみ

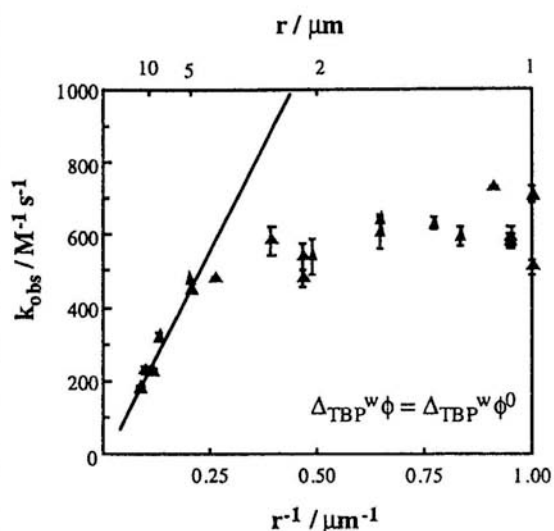


図-2. k_{obs} の比表面積依存性

1998年度

北海道分析化学賞 受賞講演

アルカリ土類金属イオンに対するポリエーテル型
ケイ光分析試薬に関する研究

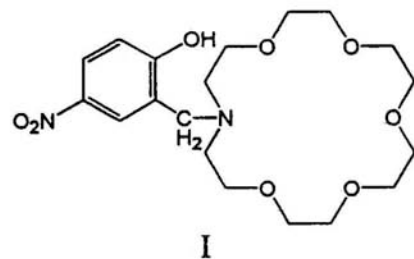
北大院地球環境 中村 博

アルカリ金属やアルカリ土類金属は自然界に広く分布し、環境や生体系に重要な役割を担っている元素である。これらの金属イオンの分析は、原子吸光・発光分析法が主に行われているが、吸光光度法や蛍光光度法ではほとんど行われていない。これは、これらの金属イオンに錯形成して色が変わる試薬知られていなかったからである。EDTAなどの配位子は知られているが、比色試薬としては利用できない。そこで、これらの金属イオンをターゲットとして、比色分析を行うための試薬の開発を行った。

1. 「クラウンエーテル型比色試薬の開発」

クラウンエーテルはアルカリ金属イオンやアルカリ土類金属イオンと錯形成することで知られている化合物である。このクラウンエーテルにニトロフェノールなどの酸解離基を有する色素を導入した化合物(I)とその類縁体を種々合成した。これらの化合物は弱アルカリ性の条件で、水溶液中のナトリウム、カリウム、カルシウムなどの金属イオンと錯形成し、有機溶媒に抽出することができる。水相に金属イオンが存在しない時は有機相は非解離型の色であるが、金属イオンが存在すると解離型の色へと変化する。このことを利用して、カリウムなどのアルカリ金属やアルカリ土類金属イオンの吸光光度定量法に応用することができた。

酸解離部位としてイオン対を好む色素（ピクリルアミンなど）の場合はクラウンエーテルの種類に関係なくカリウム選択性であり、フェノールのようにイオンに配位できるようなものはリチウムやナトリウム選択性となった。このことにより、色素部位とクラウンエーテルを選ぶことによって金属イオンに対する選択性を付与することができた。



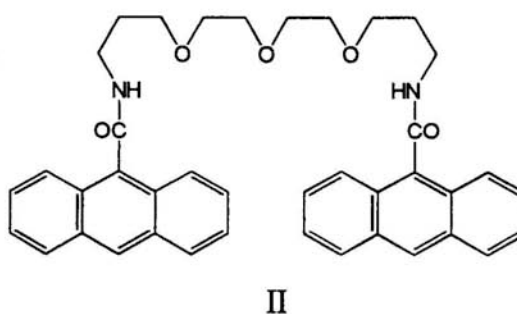
2. 「パイ電子間相互作用を利用した蛍光試薬の開発」

上記の化合物ではクラウンエーテル部位と酸解離部位が独立しているため、均一溶液では、比色試薬としては機能せず、溶媒抽出を併用しなければならないという欠点がある。均一系で吸光光度法が適応できる試薬とするためには錯形成に

よって見かけの酸解離定数が大きく変化しなければならないが、クラウンエーテル部位と酸解離部位が独立していると、原理的にこの変化が小さいのである。

これを克服するため、新しい原理に基づいて発色する試薬の開発を行った。金属イオンと錯形成する部位には、クラウンエーテル類似の直鎖状のポリエーテルを選び、その両端にアントラセンやピレンといった強い蛍光を発する色素官能基を導入した試薬(II)を開発した。このよ

うな試薬の色や蛍光が変化する原理は錯形成による酸解離ではなく、2つの色素の分子軌道間の相互作用(たとえばエキサイプレックスや光誘起電子移動など)によるものである。直鎖状のポリエーテルは、錯形成によって大きく構造が変化



する。これを利用して、錯形成前は両端のアントラセンは離れており、相互作用がなく普通の蛍光発光(モノマー発光)を示す。しかし、錯形成することによって2つの芳香環が近づき、励起されたアントラセンと基底状態のアントラセンが相互作用して新たな蛍光発光(ダイマー発光)が出現する。

さらに、この原理に基づいて、種々の芳香族置換基を導入し、また分子内電子移動によって蛍光が変化する試薬や、希土類イオンと錯形成して、その蛍光強度が著しく増大する試薬などを開発した。さらに、錯形成や蛍光スペクトルに対するポリエーテルの鎖長の効果や配位部位の効果なども検討し、NMRや蛍光寿命などの詳しい測定を行って、錯体の構造を解析した。

3. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導・御協力を賜りました九州大学工学部高木誠教授ならびに松尾沢名誉教授に深く感謝いたします。また、研究に協力いただきました北海道大学大学院地球環境科学研究科物質環境科学専攻の教官・学生の方々に深く感謝いたします。

北海道分析化学 多電子授受を行う多核金属錯体の分子構築とその酸化還元機能 奨励賞受賞講演 (北大院理) 阿部 正明

1. はじめに

多段階かつ多電子の関与する酸化還元反応性は、多核金属錯体の特徴のひとつである。構造を保持したまま多電子授受を行うことのできる金属錯体の合成は、錯体化学、分析化学、電気化学などの観点から重要である。さらに、新たな電解触媒開発への基礎的知見を与えることも期待される。我々は、酸化還元活性な金属イオンを分子内へ複数集積させた錯体を対象に、多核金属錯体をベースとした新たな多電子移動系の構築を試みた。多彩な酸化還元挙動が知られるオキソ架橋ルテニウム三核錯体やその誘導体の構造ユニットへは、種々の末端配位子を導入することが可能である。本講演では末端配位子として酸化還元活性な配位子を導入した新しい系に見られる多段階多電子酸化還元挙動と遠距離配位子間相互作用、およびピリジン配位子とする錯体における溶液内配位子交換反応について述べる。

2. 多電子授受を行う多核金属錯体の合成と多核ユニットを介した配位子間遠距離相互作用

多核金属錯体の多電子酸化還元機能を調べるため、三核骨格へ酸化還元活性なピリジン誘導体 mbpy⁺ (N-methyl-4,4'-bipyridinium) を導入した錯体を分子設計した。本研究では Figure 1 に示す様に、3つのmbpy⁺配位子を持つRu^{III}₃錯体、Rh^{III}₃錯体、混合原子価Ru^{II}Ru^{III}₂錯体および混合金属Ru^{III}₂Rh^{III}錯体、さらに2つのmbpy⁺を含む混合配位子型Ru^{III}₃錯体など合計11種を単離した。

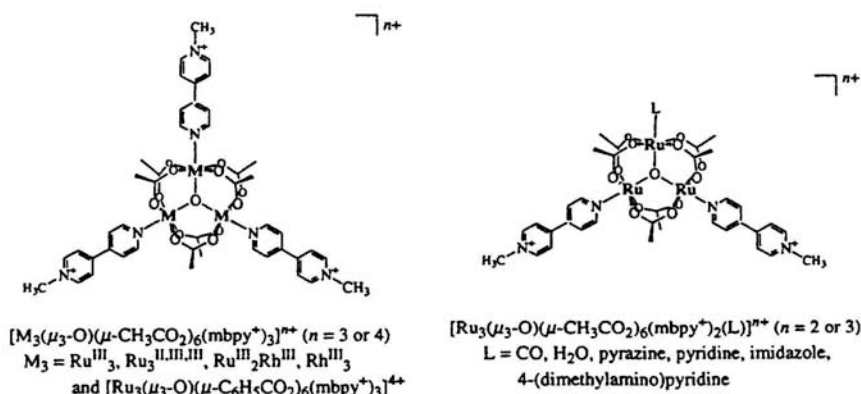


Figure 1. Oxo-centered trinuclear metal complexes with mbpy⁺ ligands for studying multistep redox properties and remote ligand-ligand interactions via cluster cores.

mbpy⁺三核錯体のサイクリックボルタンメトリーおよび微分パルスボルタンメトリーを調べたところ、金属イオンおよび配位子mbpy⁺に基づく多段階かつ可逆な酸化還元波が"Ru₃"および"Ru₂Rh"錯体に観測された。注目される点は、分子あたり2ないし3つの等価な配位子mbpy⁺の還元(mbpy⁺/mbpy[·])が異なる電位で段階的に起こること、さらにその酸化還元パターンは三核ユニットの金属イオンの種類("Ru₂Rh"、"Rh₃")やターミナル配位子の違いによ

り大きく変化することである。この事実は、クラスター骨格を隔て遠距離に配置された末端配位子どうしが相互作用していることを示している [2]。末端配位子mbpy⁺間の相互作用は基本骨格の" $M_3(\mu_3-O)$ " $d\pi-p\pi$ 軌道を経由して起こり、オキソイオンを介した金属間相互作用とも連動していると考えられる。また、最近我々は、この型の三核錯体や金属酵素活性中心に存在するオキソ架橋二核錯体ユニットをAu(111)電極表面へ単分子層集積する研究を行っており [3]、可逆な電子移動反応をはじめ光照射に伴うカルボニル配位子脱離反応などの電極界面反応性が明らかになりつつある。

3. 多核金属錯体ユニット上の配位子交換反応

三核錯体には μ_3 -オキソ配位子のトランス位に合計3つのターミナル単座配位子Lが存在する。本研究では、L = ピリジン (py) の錯体について py/py- d_5 交換反応を種々のルテニウム三核錯体および混合金属 " Ru_2M " 三核錯体 (M = Zn(II), Mg(II)) を対象に詳細に調べた。極めて類似の基本構造を持つ錯体を対象とした結果、配位子交換反応に及ぼす μ_3 -オキソイオン、金属イオンの酸化数、二価金属イオンMの影響、さらに溶媒効果について比較が可能となった。混合金属錯体は一分子内に labile なサイト (M) と inert なサイト (Ru) を両方併せ持つ錯体である。Table 1 に各錯体の py/py- d_5 交換反応の活性化パラメータと交換速度定数を示した。Ru 三核錯体 (1, 2) のRu(III)サイトにおける交換速度 (25 °C) に比べ、Ru平均酸化数が 1/3 低下 (+2.67価) した錯体 (3) では約40倍、二価金属イオンを導入した混合金属錯体 (4, 5) では400倍以上も反応が加速されることが見いだされた [4, 5]。

Table 1. Summary of Activation Parameters and Rate Constants for py/py- d_5 Exchange Reactions at Ru(III) Centers in Oxo-Centered Triruthenium Complexes (1–3) and Mixed-Metal " Ru_2M " Trinuclear Complexes (4 and 5).

| complex | solvent | $\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$ | $\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ | $k(25^\circ\text{C}) / \text{s}^{-1}$ | ref |
|--|---------------------------------|--|---|---------------------------------------|-----|
| $[Ru^{\text{III}}_3(O)(CH_3CO_2)_6(py)_3]^+$ (1) | CD ₃ CN | 123 ± 6 | +41 ± 19 | 2.4×10^{-7} | 4 |
| $[Ru^{\text{III}}Ru^{\text{III}}Ru^{\text{III}}(O)(CH_3CO_2)_6(CO)(py)_2]$ (2) | CD ₃ CN | 126 ± 9 | +52 ± 27 | 2.7×10^{-7} | 4 |
| $[Ru_3^{\text{II,III,III}}(O)(CH_3CO_2)_6(py)_3]$ (3) | CD ₃ CN | 122 ± 14 | +69 ± 44 | 1.1×10^{-5} | 4 |
| $[Ru^{\text{III}}_2Zn^{\text{II}}(O)(CH_3CO_2)_6(py)_3]$ (4) | CD ₃ CN | 112 ± 11 | +53 ± 36 | 8.7×10^{-5} | 5 |
| | CD ₂ Cl ₂ | 106 ± 12 | +35 ± 38 | 1.1×10^{-4} | 5 |
| $[Ru^{\text{III}}_2Mg^{\text{II}}(O)(CH_3CO_2)_6(py)_2(H_2O)]$ (5) | CD ₃ CN | 91 ± 19 | -15 ± 61 | 1.2×10^{-4} | 5 |
| | CD ₂ Cl ₂ | 105 ± 11 | +34 ± 37 | 1.5×10^{-4} | 5 |

References: [1] M. Abe, Y. Sasaki, Y. Yamada, K. Tsukahara, S. Yano, and T. Ito. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 4490–4498. [2] M. Abe, Y. Sasaki, Y. Yamada, K. Tsukahara, S. Yano, T. Yamaguchi, M. Tominaga, I. Taniguchi, and T. Ito. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6724–6734. [3] M. Abe, T. Kondo, K. Uosaki, and Y. Sasaki. *submitted*. [4] M. Abe, Y. Sasaki, A. Nagasawa, and T. Ito. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1411–1414. [5] M. Abe, M. Tanaka, K. Umakoshi, and Y. Sasaki. *submitted*.

あべまさあき

1999年度

1. はじめに

表面増強赤外吸収(Surface-Enhanced Infrared Absorption; SEIRA)は、ある種の金属表面に吸着した分子の赤外吸収強度が異常に増大する現象である[1]。その利用によって、微量化学種の分析が容易になるとともに、金属表面でのダイナミクスをマイクロ秒の時間分割で追跡することが可能になる。SEIRA を利用する赤外分光(SEIRAS)の大きな特徴の一つが、大掛かりな装置を必要としないことである。これが SEIRAS を別名「貧乏分光」と呼ぶ所以である。それにもかかわらず、従来困難であった種々の計測を可能にする。簡単な方法で高度な計測を行うことは、分析化学の目指すべき方向の一つであると考えられる。

2. SEIRAS の原理[1, 2]

SEIRA 活性な金属表面は、真空蒸着ないしは電析で作製する。最も活性の高い金属は、厚さ 10 ~20 nm 程度の薄膜である。これら薄膜は、50~100 nm の微粒子からなる島状膜である。Fig. 1 に示すように、金属微粒子に光があたると、プラズモン励起(分極)によってその周辺に強い電場が生じ、吸着分子の振動を励起する。分子振動と微粒子の相互作用によって金属薄膜の平均的な透過率(反射率)が分子振動の周波数で大きく変化するので、金属薄膜の透過(あるいは反射)スペクトルの測定を通して分子振動を観測することができる。表面電場は表面から隔たるにつれて急速に減衰するので、表面のごく近傍に存在する化学種のみが選択的に検出される。

3. 微量分析への応用

金属薄膜を蒸着した赤外基板(BaF₂, CaF₂, Si, Ge など)を皮膚に軽く押し当てて、微量な汗や分泌物などを試料基板に転写することにより、透過法でそれらの高感度分析ができる[3]。また、ガラスや高分子表面に金属薄膜を蒸着することにより、反射法の測定感度を飛躍的に向上させることが可能である[4]。

4. 電極界面の構造とダイナミクス

電気化学界面の研究は古くから行われているが、従来の電流、電位、電気容量などのマクロな物理量の計測から界面のミクロな構造情報を直接得ることができない。こうした問題を解決するために、新しい in situ 計測手段の開発が活発に行われている。赤外分光も有力な計測手段の一つである。反射吸収分光(RAS)が現在最も一般的に用いられているが、赤外線が直接電解液中を通過するので、測定が難しいなどの様々な問題を抱えている。Fig. 2 に示す ATR 配置の SEIRAS を用いれば、そうした問題は一気に解決され、界面のみが選択的にかつ高感度に計測できる。単結晶電極が用いられないことが唯一の問題点であるが、Au の場合、熱処理により蒸着膜表面に(111)面を選択的に露出させることができる[5]。

ATR 配置の SEIRAS の特徴が最大限に活用できるのが、例えば、電極界面における水分子の挙動解析である[6,7]。電極界面にはバルクの水素結合から切り離された特殊な水分子が存在し、電位(表面電荷)に依存してその配向が変化すると信じら

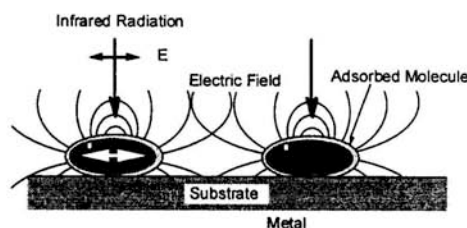


Fig. 1. 光照射による微粒子の分極と、周辺にできる増強電場。

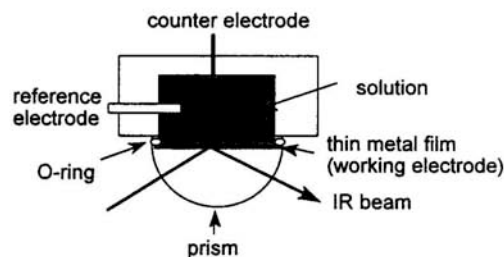


Fig. 2. ATR 配置 SEIRAS による電極界面の in situ 測定。

れてきたが、その実験的証明は殆んどない。過塩素酸中の Au(111)表面のスペクトルを Fig. 3 に示す。3500 cm^{-1} ならびに 1650 cm^{-1} 付近の νOH と δHOH モードは、ピーク波数、半値幅ともに、バルク水と大きく異なっている。また、電位によって強度も大きく変化する。詳細な解析の結果、電位によって水の配向が変化するが、定説とは異なった挙動をすること、界面の構造が特異吸着した陰イオンの影響を強く受けることなどを明らかにした。水分子に限らず、生体分子を含む多くの有機分子やイオンの吸着挙動の解析に利用することができる[8,9]。

Fig. 3 の測定では、電位を走査しながらスペクトルを秒単位で連続的に取り込んでいる。したがって、同時に電気化学的測定が可能である。こうしたマルチ測定は、反応プロセスを理解するのに有効である[10]。ステップスキャン FT-IR を用いれば、マイクロ秒の時間分割計測が可能になる[11-14]。さらに、時間分解スペクトルを二次元相関(2D-IR)解析すれば、ダイナミックな情報を選択的に取り出すことができる[7,12]。

現在の赤外分光の時間分解能は ns のオーダーに到達している。しかしながら、電位変調に伴う電極系のレスポンスは、二重層充電のために、 μs - ms に抑えられる。この電気化学系特有の限界を超えた速いプロセス、例えば電子移動過程など、を検討するために、従来法とはコンセプトの異なる電位変調 FT-IR を開発した[14]。

5. おわりに

本研究は、ごみ箱漁りをして集めた部品で実験装置を作るところから始めた。しかしながら、以上示したように、この極めて単純で安上がりな「貧乏分光」が、これまで困難とされてきた計測を可能にした。この発展ができたのは多くの偶然と幸運に恵まれたところが大きい。研究費がない分をアイデアで補おうと考えたところが鍵ではなかったかと思う（実際には姑息なアプローチがほとんどであったが）。今回「貧乏分光」というあまり適切でない副題を用いたのは、研究費に恵まれない若手研究者にエールを送りたかったためである。

最後に、多大な努力を惜しまなかった共同研究者ならびにご指導、ご鞭撻をいただいた多くの方々へ感謝します。

参考文献

- [1] M. Osawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2861 (1997).
- [2] M. Osawa, K. Ataka, K. Yoshii, and Y. Nishikawa, *Appl. Spectrosc.*, **47**, 1497 (1993).
- [3] Y. Nishikawa, K. Fujiwara, M. Osawa, and K. Takamura, *Anal. Sci.*, **9**, 811 (1993).
- [4] Y. Nishikawa, K. Fujiwara, K. Ataka, and M. Osawa, *Anal. Chem.*, **65**, 556 (1993).
- [5] S.-G. Sun, W.-B. Cai, L.-J. Wan, and M. Osawa, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2460 (1999).
- [6] K. Ataka, T. Yotsuyanagi, and M. Osawa, *J. Phys. Chem.*, **100**, 10664 (1996).
- [7] K. Ataka and M. Osawa, *Langmuir*, **14**, 951 (1998).
- [8] K. Ataka and M. Osawa, *J. Electroanal. Chem.*, **460**, 188 (1999).
- [9] W.-B. Cai, L.-J. Wan, H. Noda, Y. Hibino, K. Ataka, and M. Osawa, *Langmuir*, **14**, 6992 (1998).
- [10] M. Osawa and K. Yoshii, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 512 (1997).
- [11] M. Osawa, K. Yoshii, K. Ataka, and T. Yotsuyanagi, *Langmuir*, **10**, 640 (1994).
- [12] M. Osawa, K. Yoshii, Y. Hibino, T. Nakano, and I. Noda, *J. Electroanal. Chem.*, **426**, 11 (1997).
- [13] H. Noda, K. Ataka, L.-J. Wan, and M. Osawa, *Surf. Sci.*, **427-428**, 190 (1999).
- [14] K. Ataka, Y. Hara, and M. Osawa, *J. Electroanal. Chem.*, **473**, 34 (1999).

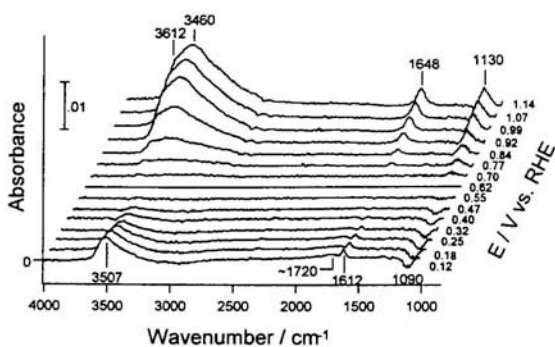


Fig. 3. 1 M HClO_4 中の Au(111)電極表面の SEIRA スペクトル。

1. 光学的な現象をプローブとして用いる液膜界面におけるパームセレクトイビティの研究

液膜型イオン選択性電極(ISE)は、分析対象イオン(目的イオン)を含む試料水溶液と感応素子を含む有機溶媒(液膜)との界面に発生する電位差を測定することにより目的イオン濃度を定量する手法であり、これまで様々な目的イオンに対する ISE が開発され、また実際に利用されている。一般に液膜型 ISE の膜電位応答は、電荷を有するイオン種が対イオンを水溶液側に残したまま液膜界面に取り込まれること(パームセレクトイビティ)によって生起すると考えられている。近年、膜界面におけるパームセレクトイビティを FTIR-ATR 法により直接観測する試みが数例報告されており、膜界面領域における陽イオン錯体の選択的輸送を観測することに成功している。しかし、この手法における赤外線のしみ込みの深さは 0.31 から 1.8 μm であり、それよりも浅い領域の情報を分離して考えるのは困難である。従って、電位応答機構の理解のためには FTIR-ATR 法に加えて、更に界面のごく近傍を観察することのできる手法を用い、それらの結果から総合的に議論することが必要である。

そこで本研究では、液膜型 ISE の電位応答機構について分子レベルでの理解を深めるために、光学的な現象をプローブに用いて液膜界面における陽イオンパームセレクトイビティについて以下の実験的な考察を行った。

(1) 光第二高調波発生(光 SHG)を用いる液膜界面におけるパームセレクトイビティの直接観察^{1,2}

イオノフォアを含有するイオン選択性液膜と試料水溶液との界面から光 SHG を観測することが可能であることを初めて示し、その SHG 応答から、膜界面に SHG 活性な陽イオン-イオノフォア錯体が存在する、すなわち膜界面に錯体が並んで存在していることが明らかになった。また、SHG 応答と ISE の膜電位応答との比較から、膜電位の変化と SHG 強度の変化は対応して起きていることが確認された。しかし対陰イオンとして親水性陰イオンを用い、陽イオンの濃度を非常に高くした場合、SHG 強度は飽和してしまうにも関わらず膜電位は更に上昇した。この結果から、膜電位に寄与している陽イオン錯体の一部は SHG 活性な領域よりも更に膜内部に位置していることが示唆され、観測された SHG 強度は膜界面のごく薄い領域における電荷密度を反映しているものと考えられた。そこで、スペースチャージモデルにより SHG 活性な表面種の数と膜電位と関連づけたところ、陽イオンの濃度が低いところでは SHG 応答から計算した界面電位差と実際に測定した膜電位とはよく一致したが、陽イオン濃度を高くすると計算結果と実測値の間に差が生じ、計算による界面電位差の応答こう配

が小さくなった。これらの結果から、ISE の電位応答機構のモデルに対して、スペースチャージモデルでは無視されている陽イオン錯体の大きさの問題や分子間相互作用を考慮する必要があることが明らかになった。

(2) 光応答性アゾビスクラウンエーテル誘導体を膜電位生起一分子プローブとして用いる液膜界面におけるパームセレクトイビティの基礎研究^{3,4}

膜電位を生起させる分子プローブとして、十分な脂溶性と錯形成能変化を併せ持つ光応答性イオノフォアを新規に合成し、内部参照溶液を持たない液膜電極系を用いて照射条件をコントロールしながら膜電位応答を測定することにより、イオノフォア濃度と膜電位応答との相関について考察した。液膜に紫外光/可視光を一定時間ずつ交互に照射し膜電位を測定したところ、試料溶液中の陽イオンに対して錯体の安定度定数の高い異性体が増加するときには膜電位も上昇し、その異性体が減少するときには膜電位も下降した。また、紫外光照射時あるいは可視光照射時における陽イオンに対する膜電位応答を測定した結果、目的陽イオンに対して錯体の安定度の高いイオノフォア異性体の増加によって、電位応答こう配の増加、膜電位の絶対値の上昇、及び目的イオンに対する検出下限の低濃度側へのシフトが起きることが明らかになった。

2. 生分解性プラスチックの法科学的識別法の開発⁵

生分解性プラスチック (BDP) は「自然界において、微生物が関与して、低分子化合物に分解されるプラスチック」と定義される新素材であり、最近の環境問題(ゴミ廃棄問題)に対する関心の高まりから注目されているプラスチックである。しかしこれらの製品は開発されてまもないため、分析結果について系統的にまとめた報告はなかった。そのため、犯罪現場に残されたプラスチックが BDP であり、かつ分解されて微量であった場合、成分分析に困難が予想される。そこで、現在日本で入手可能な BDP について分析法の検討を行った。その結果、溶解試験、FTIR、熱分解ガスクロマトグラフィー-質量分析(Py-GC/MS)がBDPの種類の特異性、製品の識別に有効であることが明らかになった。BDPのうちポリ乳酸についてはこれらの分析法による製品識別は困難であった。そこで光学分割カラムを用いて Py-GC/MS を行ったところ、熱分解生成物であるラクチド(乳酸の環状二量体)の光学異性体比から、構成する乳酸の D-/L-比を求めることが可能になり、ポリ乳酸の識別に関する情報が得られるようになった。

1 S. Yoshiyagawa, K. Tohda, Y. Umezawa, S. Hashimoto and M. Kawasaki, *Anal. Sci.*, **9**, 715 (1993).

2 K. Tohda, Y. Umezawa, S. Yoshiyagawa, S. Hashimoto and M. Kawasaki, *Anal. Chem.*, **67**, 570 (1995).

3 K. Tohda, S. Yoshiyagawa, M. Kataoka, K. Odashima and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **69**, 3360 (1997).

4 K. Odashima, K. Tohda, S. Yoshiyagawa, S. Yamashita, M. Kataoka and Y. Umezawa, *Heterocycles*, **47**, 847 (1998).

5 S. Yoshiyagawa, Y. Adachi and M. Hata, *Proc. Internat. Workshop Forens. Exam. Trace Evidence*, **99** (1998).

よしやがわ しんじ

2000年度

北海道分析化学賞
受賞講演

ナノ質量分析法の発展と界面機能評価に関する研究

(北大院地球環境) 嶋津克明

1. はじめに

固液界面における物質移動の評価は、界面を用いるあらゆる分析技術の発展に不可欠である。80年代に主流であったスペクトロスコピーによる評価は吸光係数の関係で検出対象物質に制約があり、物質移動の情報は限定的であった。従来より蒸着装置の膜厚計として用いられてきた水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance : QCM) 法は水晶振動子上に物質が吸着することにより生じる共振振動数の微小変化を測定する方法で、対象物質を選ばずあらゆる物質の検出が可能な高感度質量分析法である。本研究では、QCM法を固液界面における単分子層レベルの物質移動評価に用いるとともに、スペクトロスコピーと組み合わせた複合測定法の開発を行った。

2. 電極/溶液界面プロセスの高感度測定

QCMで測定される周波数変化は水晶振動子上の質量変化に比例する (Sauerbreyの式)。比例定数すなわち感度は用いた水晶振動子の基本周波数や倍音数に依存するので、高感度化をはかるには一般的に基本周波数の高い水晶振動子を用いるか倍音モードで測定することが行われる。本研究では汎用の5MHzを用いノイズの低減と周波数の安定化をはかることで高感度化を行った。Sauerbreyの式から5MHz QCMの感度は $17.7 \times 10^{-9} \text{ g cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ である。当研究室ではノイズを0.02 Hzまで減少させることができるので、水素の単分子層の測定も可能である。このような高感度QCMを用いて、感応膜として注目を集めるようになったセルフアセンブリ単分子層 (SAM) などの機能電極における界面プロセスの解析を行った。フェロセニルアルカンチオールセルフアセンブリ過程のその場測定を行うとともに、SAMの酸化還元に伴う質量変化からイオン対形成を明らかにした。また、SAMを脱離させた時の質量変化から末端カルボキシ基の溶媒和数とカチオンとの会合状態を調べ、溶媒和数を明らかにした。未修飾の白金電極上でのユニークな測定も行った。他法では困難な水溶液中での水分子吸着と、C1化合物から生成した吸着種の完全酸化反応の解析をベースにした吸着種の構造の決定である。後者は量の情報から状態の情報を引き出す可能性を示しており、分光法では検出できない吸着種の微細構造解析に有効と考えられる。これらの研究を通して、従来極めて困難と思われていた単分子層レベルの高感度その場QCM測定が可能であることと、QCMにより他法では得られない情報が得られることがわかった。

3. 表面質量滴定法による界面酸塩基特性評価

機能性電極の構築は、表面修飾に用いられる機能分子の物性に立脚して行われる。しかし、界面では環境がバルクとは異なるため機能分子のバルク物性がそのまま発現はしない。したがって、機能性電極の設計にあたっては界面物性を評価することが極めて重要となる。界面酸塩基特性評価を目的として、QCM を用いた表面質量滴定法を開発した。これは滴定中に電離した酸塩基中心（電極上に固定）と溶液中のイオンとの会合を質量変化としてとらえる方法である。これまで種々の酸塩基中心（-COOH、-NH₂、-Py）を有する SAM やポリマー薄膜について検討した。溶液の pH を上げて行くと、酸ではカチオンとの会合により質量が増加し、塩基では酸性側で会合していたアニオンが脱離するため質量が減少した。酸塩基中心密度を全周波数変化から、表面 pKa を全周波数変化の 1/2 を与えるときの pH の値から同時に決定することができる。チオール誘導体 SAM の pKa は、-COOH で 5.8-6.4、-NH₂ で 5.4-8.0、-Py で 4.8 であり、アルキル鎖長にわずかに依存した。吸着率を変えるかアルカンチオールとの混合単分子層を構築することによって SAM 中の -COOH 密度を変化させて滴定を行ったところ、表面 pKa は密度の増加とともに大きくなり隣接-COOH 間の反発の相互作用が存在すること、その大きさおよび表面 pKa は SAM の表面構造に依存することを見出した。また、表面 pKa は付与した電位により大きく変化すること（-0.7 V vs. Ag/AgCl で 4.3）がわかった。これは表面 pKa の外部制御が可能であることを示している。

4. QCM/スペクトロスコピー複合測定法の開発

QCM では分析情報が量のみに限る危険性があるため、これを回避し分析法の高質化をはかる目的で、QCM/スペクトロスコピー複合測定法の開発を行った。これまで透過型の紫外可視分光（UV-vis）と高感度反射赤外分光（IRRAS）との複合化をおこなった。UV-vis/QCM を用いたピオローゲンやプルシアンプルーの析出および酸化還元反応の研究では、状態変化に対応した物質移動機構を明らかにした。IRRAS/QCM では、SAM を構成しているフェロセン末端チオール分子が酸化還元にもない配向を変化させ、その結果として SAM 中に溶媒分子を取り組むという微視的かつ動的な挙動が明らかになった。

5. 謝辞

本研究は、難しい実験に取り組んでくれた当研究室の学生と共同で行った。研究の遂行にあたり、北大大学院地球環境科学研究科物質環境科学専攻の先生方をはじめ多くの先生方にご協力とご支援を賜わった。ここに心より感謝をいたします。

【緒言】生体膜は、そこに存在する蛋白質と共に高感度・高選択的な物質認識・情報変換を行う。その生体膜の構成要素の一つである脂質二分子膜は、厚さ50Å程度の脂質分子が整然と配向した膜である。また、レセプターイオンチャンネルが存在する生体膜は、リガンド受容時に信号増幅を伴う情報変換を行い、センシング膜の基本設計にとって重要な原理となりうる。そこで、このような特徴を有するイオノフォア包埋脂質二分子膜に基づく電気化学センサーの可能性をFolding法及びTip-Dip法により作製した人工平面脂質二分子膜の[1]膜透過性変化および[2]膜電位変化を指標として研究・評価した。

[1]膜透過性変化に基づくイオノフォア包埋平面脂質二分子膜センサー¹⁾

人工平面脂質二分子膜(BLM)を用いるイオン認識、情報変換、信号増幅に基づく電気化学センシングの一般化を目的として、Folding法による直径約200μmの膜(マクロBLM)とTip-dip法による直径約1μmの膜(マイクロBLM)へ種々人工及び天然イオノフォアを直接包埋し、イオノフォア包埋平面脂質二分子膜のイオン選択的膜透過性の変化を目的イオンの濃度依存性、選択性及び膜透過機構の点から検討した。

valinomycinがBLMに包埋できることは既知であり、valinomycin包埋膜の目的イオンがない場合の膜コンダクタンス(バックグラウンドコンダクタンス)が、脂質のみの膜に比べて高いことがわかった。11種のうち7種の人工イオノフォアを包埋したBLMは、脂質のみの膜に比べてバックグラウンドコンダクタンスが高く、また、目的イオンを添加した場合に膜コンダクタンスの上昇が観測された²⁾。このことより、7種の人工イオノフォアの包埋を確認できた。得られたイオノフォア包埋BLMのうちvalinomycin包埋マクロBLM及びETH4120包埋マクロBLMについて、コンダクタンス差(バックグラウンドコンダクタンスを差し引いた値)の濃度依存性及び選択性を検討した。各々のイオノフォア包埋マクロBLMは、イオノフォアの錯形成の選択性(valinomycin-BLM: Rb > Cs ≥ K > Na > Li, ETH4120-BLM: Na > K)を反映した濃度依存性を示した。このとき、cis側が-50mVとなるように電圧を印加した場合にも目的カチオン濃度に依存したコンダクタンス差の増加が観測された。この場合、trans側にイオノフォアと錯形成するイオンがないことから、膜内部のカチオン/イオノフォア錯体を介する対アニオンの対向輸送が起こっていることを初めて見出した。また、より脂溶性の高い対アニオンを用いることにより濃度依存性が増強されることがわかった。イオノフォアを各々包埋したマクロ膜とマイクロ膜の信号変換比(1秒間にイオノフォア1分子が透過させるイオン数)によって評価したイオノフォア包埋マイクロBLMの信号増幅能は、マクロBLMに比べて1万~10万倍優れていることを見出した。

[2]膜電位変化に基づくイオノフォア包埋平面脂質二分子膜センサー^{3,4)}

過去にvalinomycinを包埋した電位応答型の人工平面脂質二分子膜(BLM)センサーが報告された。しかし、電位応答型BLMセンサーは、定量的な分析手法として確立されて

いない。そこで、イオン認識、情報変換に基づく電位応答型のBLMセンサーをより一般化し、定量的なセンシング法の基礎となる知見を得ることを目的とした。具体的には、1) Folding法を用いて、イオン選択性電極 (ISE) に用いられている種々人工イオノフォアの包埋及びISEの電位応答の改善に用いられている脂溶性のアニオン性サイトのBLMへの包埋を試みた。2) 作製したイオノフォア包埋BLM及びアニオン性サイトを同時に包埋したイオノフォア包埋BLMの目的イオン選択性膜電位応答を検討した。

1) イオノフォア包埋BLMは、膜抵抗とエレクトロメーターの入力インピーダンスが合わない場合が多い。 tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate (NaTFPB) または potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTPClPB) などの脂溶性のアニオン性サイトを同時に包埋することにより膜抵抗値が低下し、メーターとのインピーダンスマッチングが達成され、膜電位を測定できる割合が60%から100%に向上した。2) 作製した人工イオノフォア包埋BLMの膜電位応答について検討した結果、目的イオンに対してネルンスト応答を達成できたイオノフォア (valinomycin及びETH 4120) と達成できなかったイオノフォア (クラウンエーテル, クリプタンド, ETH 1001) にわかれること、また、電位応答選択性が錯形成の選択性を反映したイオノフォアと反映しなかったイオノフォア (dibenzo-30-crown-10, bis(12-crown-4), ETH1001) にわかれることがわかった。さらに、アニオン性サイトを同時に包埋した人工イオノフォア包埋BLMの膜電位応答について同様に検討した結果、アニオン性サイトの包埋により、全てのイオノフォア包埋BLMの検出限界、電位応答勾配及び選択性が改善されることがわかった。

イオノフォア包埋BLMの電位応答が膜内部への負電荷 (アニオン性サイト) の導入により改善された結果は、従来から言われてきた「BLM内部の電荷中性が不必要」と言う説明が不十分であることを示している。

【終わりに】本研究は、イオノフォア包埋脂質二分子膜を膜界面でのイオン認識から膜透過性及び膜電位への定量的な情報変換を行うセンシング膜として確立し、人工イオノフォアを用いる電気化学センシング法として一般化した。【1】では、様々な人工イオノフォアを用いること及び脂質二分子膜を膜透過性に基づくセンシング膜として用いることによって、多様なイオンに対応できるチャンネル類似センサーを開発できることを示した。【2】では、脂溶性のアニオン性サイトを包埋することによって、イオノフォア包埋脂質二分子膜を定量的な膜電位応答型脂質二分子膜センサーとして一般化できることを示した。脂質二分子膜を用いる電気化学センシングは、物理的な強度と膜形成時の煩雑さ、そして完全に同一の化学量論比を有する膜を再形成できないことなど改善すべき点が多いが、それらは今後の検討課題である。

- 1) *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.13, pp. 1035~1046 (1998) .
- 2) *Analytical Science*, Vol. 10, pp. 343~347 (1994) .
- 3) *Analytical Sciences*, Vol.13, pp. 437~446 (1997) .
- 4) *Frontiers in Biosensors I, Fundamental Aspects*, pp. 121~131, (1997)

2001年度

北海道分析化学賞
受賞講演

単一微粒子のレーザー操作・顕微計測法の開発と応用に関する研究

(北海道大学大学院理学研究科) 喜多村 昇

1. はじめに

分析化学の分野においてはクロマトグラフィーや液/液抽出実験などで微粒子（樹脂、液滴など）を扱うことが多い。しかしながら、その計測法に限られていたため、これまで単一微粒子の測定に基づいたクロマトグラフィーや液/液抽出過程などの分析化学基礎プロセスの議論は不可能であった。我々はレーザー捕捉法に基づいた単一微粒子の種々の顕微計測・分析法を開発するとともに、これを駆使して「マイクロ分析化学」の研究を進めてきた。

2. 単一微粒子のレーザー捕捉・顕微計測法の開発

1990年、我々は溶液中の単一微粒子を顕微鏡下の集光レーザー光により非破壊・非接触的に操ることのできるレーザーマニピュレーション法を化学の分野に初めて導入した [1]。以来、このレーザー操作法と種々の物理化学的な測定法を顕微鏡技術と組み合わせ、単一微粒子の顕微計測・分析法を提案してきた。実際に、これまで高分子ビーズ、液滴、マイクロカプセル、ベシクル、生細胞など、溶液中の単一微粒子の 1) 顕微吸収・蛍光測定法 [2,3]、2) 3次元空間分解-ピコ秒時間分解蛍光法 [4]、3) 顕微電気化学法 [2]、4) 高圧-顕微ピコ秒蛍光法 [5]、5) 溶液フロー型顕微吸収・蛍光測定法 [6] などを報告してきた。特に、単一微粒子を顕微鏡下でレーザー操作しながら同時に吸収・蛍光分析と電気化学分析する手法は、世界的にも我々の開発したシステムだけである [2]。

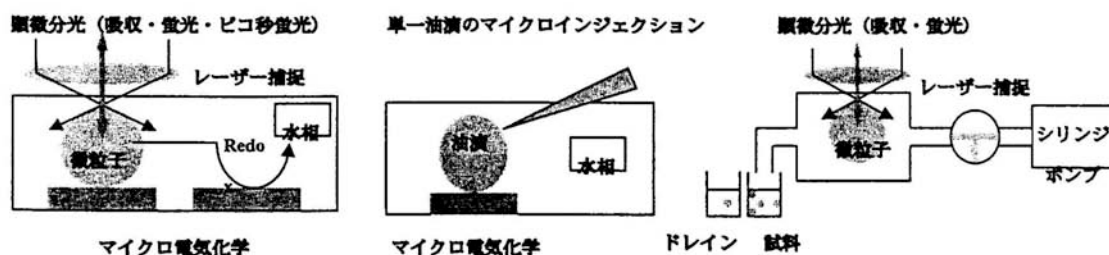


Fig. 1 単一微粒子の顕微計測

3. 単一微粒子化学と分析

このような手法に基づき、分析化学において重要な幾つかの基礎化学過程を単一微粒子レベルで研究を進めてきた。

イオン交換過程：イオン交換は幾つかの過程からなるが、これまで、イオン交換樹脂周囲の溶液中のイオン濃度を測定することにより素過程が議論されてきた。我々は上記の方法を用い、世界で初めて単一樹脂レベルでイオン交換過程を議論できることを示した [7]。例えば、樹脂中におけるイオンの拡散過程を顕微吸収・蛍光法により in situ で直接測定す

ることに成功するとともに、イオンの樹脂内拡散係数の決定に基づき、イオン交換過程を律する因子を明らかにした。特に、蛍光寿命測定、励起エネルギー移動法、動的偏光異方性測定などの光物理化学的手法を単一微粒子レベルの研究に導入し、イオン交換過程を分子レベルで議論できることを示した [8]。

液/液抽出過程: 液/液抽出も分析化学の主要なテーマであるが、抽出過程が単一液滴レベルで議論されたことは無かった。我々は単一油滴/水界面を経由する物質移動過程およびキレート抽出の基礎となる界面電子移動過程を油滴サイズの関数として研究してきた。例えば、ニトロベンゼン油滴から水相へのイオン移動は拡散律速で起こるが、水相からニトロベンゼン油滴への物質移動は溶質の性質に依存して律速過程が変化すること、また、その速度は油滴サイズに依存することを示した [2]。さらに、マイクロ流路を巧みに利用して水相から単一油滴への物質移動のダイナミクス測定を行い、液/液抽出を決定する因子である物質移動係数を決定することにも成功している [6]。

4. おわりに

以上のように、我々は幾つかのレーザー操作・顕微計測法を開発するとともに単一微粒子レベルで分析化学基礎過程を明らかにする試みを行ってきた。また、この他にも単一微粒子に関わる「奇妙」で「楽しい」実験結果も得られつつある。単一微粒子の研究について紹介したが、これに限らず「微小空間」を対象にすることにより、新しい化学と分析化学が生まれることを期待している。

謝 辞

本研究成果は多くの同僚・学生諸氏の日々熱心な努力の賜物であることは言うまでもありません。この場をかりて心から感謝致します。

参考文献

1. H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasaki, N. Kitamura and H. Masuhara. *Chem. Lett.* 1479 (1990).
2. K. Nakatani, K. Chikama and N. Kitamura, *Adv. Photochemistry*, Vol. 25, p.173 (1999).
3. N. Kitamura and H.-B. Kim. *Organic Mesoscopic Chemistry*, Blackwell Science, Oxford, p. 171 (1999).
4. H.-B. Kim, S. Habuchi and N. Kitamura. *Anal. Chem.* Vol. 71, 842 (1999).
5. F. Kitagawa and N. Kitamura. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press.
6. H.-B. Kim, O. Kogi and N. Kitamura. *Anal. Chem.* Vol. 71, 1338 (1999) ; O. Kogi, H.-B. Kim and N. Kitamura. *Anal. Chim. Acta*, Vol. 418, 129 (2000).
7. H.-B. Kim, M. Hayashi, K. Nakatani, N. Kitamura, K. Sasaki, J. Hotta and H. Masuhara. *Anal. Chem.* Vol. 68, 409 (1996).
8. H. -B. Kim, S. Habuchi, M. Hayashi and N. Kitamura. *Anal. Chem.* Vol. 70, 105 (1998) ; S. Habuchi, H.-B. Kim and N. Kitamura. *Anal. Chem.* Vol. 73, 366 (2001).

はじめに

非イオン界面活性剤ミセル水溶液が、ある条件下で界面活性剤が濃縮した相（界面活性剤相）とミセルをほとんど含まない相（水相）の二相に分離する現象が知られている。この二相間への物質の分配に基づく抽出法（ミセル水性二相分配法）¹⁻³⁾は、分離操作やスケールアップが極めて容易であることから、界面活性剤により可溶化した膜タンパク質の疎水性に基づく分離法として、あるいは未知タンパク質の疎水性の評価法として広く利用されている。その反面、使用できる界面活性剤の制限から汎用性に欠けており、また、十分な分離能が得られないことから、膜タンパク質の精製において前処理法として位置づけられているのが現状である。そこで、新たなミセル水性二相分配系を探索するとともに、疎水性に代わる様々な分離モードを導入し、本法の高性能化を試みた。

界面活性剤ミセル 水溶性ポリマー二相分配系の開発^{4,5)}

これまで、ミセル水性二相分配法では Triton X-114 (TX114) などのポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤が使用されてきた。TX114 ミセル水溶液は曇点と呼ばれる温度以上に加熱することによって、水相と界面活性剤相に分離する。TX114 の場合、曇点は 30℃ 付近であり、この温度ではしばしばタンパク質の変性を引き起こしてしまう。また、膜タンパク質の可溶化は、TX114 だけでなく目的に応じて様々なタイプの界面活性剤が使用されている。したがって、ミセル水性二相分配法を汎用性のある方法として応用するには、相分離条件の自由な制御と使用できる界面活性剤の多様化が要求される。演者らは膜タンパク質の可溶化剤として最近よく用いられているアルキルグルコシド系界面活性剤のミセル水溶液が、水溶性ポリマーの添加によってポリマーを含んだ水相と界面活性剤相に相分離することを見いだした。この相分離は低温域で達成できることから、タンパク質の変性を抑えた抽出分離が可能になると考えた。オクチルチオグルコシド (OTG) とポリエチレングリコールを用いて二相分配を行った結果、膜タンパク質であるチトクロム *b*₅ (*b*₅)、チトクロム P450 (P450) およびバクテリオロドプシンはそのほとんどが界面活性剤相に抽出されることが分かった。一方、水溶性タンパク質であるペルオキシダーゼやチトクロム *c*、疎水性ドメインを除去した *b*₅ はいずれも水相に回収された。すなわち本分配系においても、TX114 ミセル水溶液系と同様、タンパク質の疎水性が分配の制御因子となっていることが分かった。また、水溶性ポリマーの添加は、TX114 ミセル水溶液においても曇点の低下を引き起こし、より低温での分離操作が可能であることも見いだした。これらの結果から、ミセル ポリマー二相分配系が TX114 ミセル単独系に代わる新たな相分離系として有用であることが示された。

リガンドポリマーを用いた新たな分離モードの導入⁵⁻⁸⁾

従来のミセル水性二相分配法では、膜タンパク質間の相互分離を目的とした積極的な分配の制御はなされていない。そこで、ミセル ポリマー二相分配系を用いた膜タンパク質間の相互分離を検討した。これまでの実験から、*b*₅ と P450 の本法による相互分離が困難であることが示された。これらは異なった電荷を有していることから、電荷の違いに基づく相互分離を試みた。荷電ポリマーを導入したミセル水性二相分配系を新たに開発し、荷電ポリマーが主に水相に分配すること明らかにした。正電荷を有するジエチル

アミノエチルデキストランと OTG からなる二相分配系において酸性タンパク質である b5 は、その疎水性にも関わらず水相に分配され、b5 と P450 の相互分離が可能であることを示した。さらに、最適な系の探索と種々の条件検討により、実試料である肝ミクロゾーム中の b5 に対してクロマトグラフィーに匹敵する分離能を有する系を確立し、精製時間の大幅な短縮を可能にした。次に、アフィニティリガンドを結合したポリマーを用いてリガンドとの親和性に基づく分配の制御を試みた。メタルキレートはヒスチジンに対して親和性を示すことから、メタルキレートポリマーを合成し、このポリマーを含む二相分配系を確立した。遺伝子工学的にヒスチジントグを融合させた b5 に本法を適用したところ、b5 がメタルキレートポリマーを含む水相に分配することを見いだした。

これらの方法は、タンパク質に対して静電的相互作用やアフィニティを示すリガンドをポリマーに結合させ、かつそのリガンドポリマーを水相に分配させることで目的とする膜タンパク質の水相への分配を促し、他との分離を試みたものである。いずれの系においても、ミセルとの疎水性相互作用と新たに導入したポリマーとの相互作用のバランスが分配を決定していることが分かった。

ポリマー界面活性剤が形成するミセルネットワークによるサイズ排除効果の導入^{9,10)}

ミセル水性二相分配法において水溶性タンパク質は水相に分配されるが、これはタンパク質に対して界面活性剤相のミセルによる立体的な排除効果が働いていることを示唆するものである。したがって、この効果を強調すれば疎水性相互作用により界面活性剤相に分配する膜タンパク質をも水相に排除できる可能性がある。そこで、疎水部と親水部からなるポリマー型の界面活性剤に着目し、これを用いたミセル水性二相分配系を確立した。界面活性剤にはポリエチレンオキシド (PEO) とポリプロピレンオキシド (PPO) からなる PPO-PEO-PPO 型トリブロックコポリマーを使用した。この界面活性剤は、PEO 鎖を介してネットワーク状に繋がったミセルを形成することが知られている。二相分離条件を検討し、膜タンパク質の分配挙動を調べたところ、界面活性剤相への分配が大きく抑制された。低分子の疎水性化合物については、従来の系と同様、界面活性剤相へ分配されることから、本分配系では先に述べた排除効果が強く働いていることが分かった。さらに、本分配系にイオン界面活性剤を添加することで、静電的相互作用、疎水性相互作用およびサイズ排除効果の 3 つの分離モードを兼ね備えた分配系を構築できることを示した。

おわりに

本研究は、ミセル水性二相分配法の高性能化・高機能化を目的とし、新規な分配系の開発と様々な分離モードの導入を行った。タンパク質の分離精製は、精製後の利用目的に応じて様々な純度やスケールが要求される。最近では、ゲノム解析に引き続くプロテオームやトランスクリプトーム解析において、タンパク質のハイスループットな分離精製技術が要求されている。中でも膜タンパク質は水溶性のものに比べ分離精製が困難とされており、本法はこうした要請に応えうる分離法であると考えられる。

参考文献

- 1) *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213 (1995).
- 2) *J. Chromatogr. A*, **780**, 229 (1997).
- 3) *Anal. Sci.*, **14**, 875 (1998).
- 4) *Anal. Sci.*, **10**, 299 (1994).
- 5) *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 311 (1997).
- 6) *J. Chromatogr. B*, **708**, 294 (1998).
- 7) *分析化学*, **47**, 965 (1998).
- 8) *分析化学*, in press (2002).
- 9) *Anal. Sci.*, **13**, 925 (1997).
- 10) *Anal. Chim. Acta*, **429**, 301 (2001).

たに ひろふみ

1. はじめに

油／水界面は、溶媒抽出や相間移動触媒などの分離現象・反応に重要な役割を果たす反応場であるが、その分子レベルの構造に関しては未知の部分が多い。これまでに、液／液界面を対象とした研究は、熱力学、電気化学、分子動力学計算などの方法を用いて行われてきたが、界面の分子レベルでの情報を直接得ることは出来なかった。本研究では、液／液界面の空間次元性に着目した2つの実験的手法を提案した。一つは、界面吸着性色素の分子回転の次元性、もう一つは、界面吸着分子間での励起エネルギー移動次元性である。これらの次元性の評価に基づき、油／水界面の微視的構造の評価を行い、油／水界面の微視的構造と界面自由エネルギーとの間に相関があることを初めて実験的に証明した。¹⁾

2. 界面吸着分子の回転次元性(動的蛍光異方性)

界面に対し強く吸着する蛍光プローブ分子を用いた場合、もし油／水界面の厚さがプローブ分子の大きさ (10 Å) よりも薄ければ、界面における分子回転の自由度は二次元になると考えられる。一方、プローブ分子の大きさよりも厚い界面層 (> 10 Å) が存在するならば、界面層内でプローブ分子は三次元的な分子回転が可能であると予想される。従って、界面吸着分子の回転次元性を評価することにより、油／水界面の厚さを見積もることが可能である。

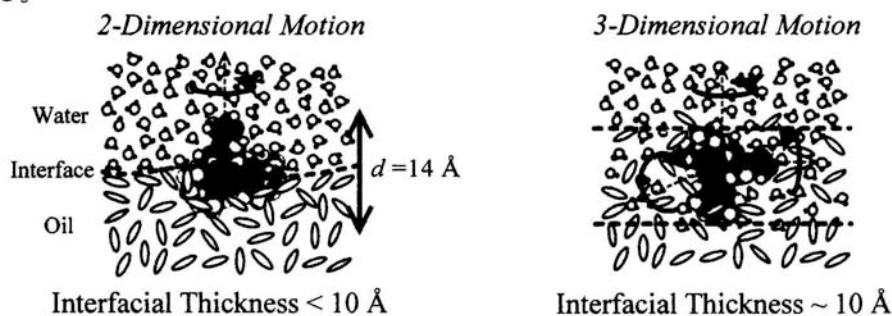


図1 油／水界面の厚さと分子回転の自由度

界面吸着した蛍光プローブ分子の集団に s 偏光のパルスレーザー光を照射すると、励起光の偏光ベクトルと同じ方向に吸収遷移モーメントを持つ蛍光プローブ分子だけが選択的に光励起される。従って、励起直後に発せられる蛍光には偏光の偏り(異方性)が含まれており、この異方性は、励起直後から蛍光プローブ分子が回転運動することによって緩和される。従って、全反射蛍光減衰曲線の動的蛍光異方性を解析する事により、油／水界面におけるプローブ分子の回転自由度に関する情報を得る事が出来る。²⁾

実際に、界面における蛍光プローブ分子(Sulforhodamine 101 ; SR101)の回転自由度の測定を行ったところ、水／四塩化炭素 (CCl_4) 界面において SR101 の回転自由度は二次元的、水／ジクロロエタン (DCE) 界面においては三次元的であった。³⁾ 従って、水と CCl_4 の界面は、分子レベルでシャープ (< 10 Å) な界面を形成しているのに対し、水／ジクロロエタン (DCE) 界面は、比較的厚い界面 (~ 10 Å) である事が分かった。

3. 界面吸着分子間の励起エネルギー移動消光ダイナミクス

励起エネルギー移動消光は分子同士の衝突を必要としない、比較的長距離で起こる消光反応である。従って、界面吸着分子間での励起エネルギー移動消光反応のダイナミクスを解析することにより、油/水界面の広範囲での空間的乱れの評価が可能となる。

蛍光性のエネルギードナー分子 (SR101) と非蛍光性のアクセプター分子 (Acid Blue 1; AB1) を液/液界面に吸着させてドナー分子を光励起すると、励起状態のドナー分子から臨界エネルギー移動距離内 ($\sim 70 \text{ \AA}$) に存在するアクセプター分子へ励起エネルギー移動がおり、ドナー分子の蛍光が消光される。この励起エネルギー移動消光反応のダイナミクスは、Klafter-Blumen の式

$$I_D = A \exp \left[-t/\tau_D - P(t/\tau_D)^d \right] \quad (1)$$

で解析される。この式に含まれる d パラメータは、ドナー分子の周りのアクセプター分子の空間的な分布を反映する。もし、励起エネルギー移動が二次元面内で起こると d は 2.0 の値を取り、三次元的なエネルギー移動であれば d は 3.0 となる。従って、このエネルギー移動次元を用いることにより、面内方向 70 \AA 程度の範囲における界面の空間的な乱れの評価が可能である。

全反射蛍光減衰曲線の測定から、水/ CCl_4 界面において $d = 1.9$ (図 2)、水/DCE 界面において $d = 2.5$ という結果が得られた。³⁾ 従って、水/ CCl_4 界面は $\sim 70 \text{ \AA}$ 程度の空間範囲において二次元的であり、水/DCE 界面は空間的に乱れている事が分かった。

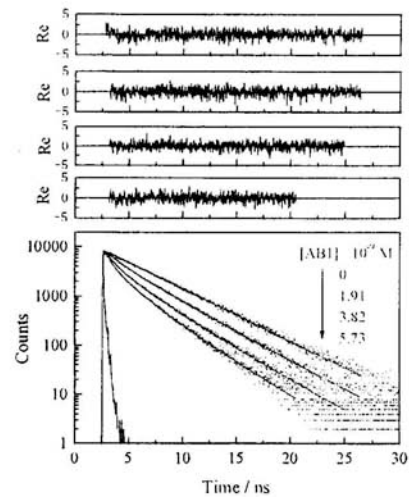


図 2 SR101 全反射蛍光減衰曲線の AB1 濃度依存性 (水/ CCl_4)

4. 液/液界面の微視的構造

上記の測定から、水/ CCl_4 界面は分子レベルでシャープな界面 ($< 10 \text{ \AA}$) であり、比較的広範囲 ($\sim 70 \text{ \AA}$) で平らな界面を形成していると考えられる。一方、水/DCE 界面は、分子動力学計算や Capillary Wave Theory 等の理論的考察を考慮すると、厚さ $\sim 10 \text{ \AA}$ の界面が 70 \AA の空間範囲において揺らいでいると考えられる。また、他の溶媒系においても同様の測定を行ったところ、分子回転自由度、励起エネルギー移動次元ともに、界面張力 (界面自由エネルギー) 及び、溶媒間の溶解度との間に相関があることを実験的に見出した。⁴⁾ 界面自由エネルギーの大きな界面は、単位面積の界面を形成するのに要するエネルギーが大きく、分子レベルにおいても界面積を小さくしようとする傾向があり、分子レベルでシャープで比較的広範囲に平らな界面を形成すると解釈できる。

参考文献

- 1) S. Ishizaka and N. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**(11), 1983-1998 (2001)
- 2) S. Ishizaka, K. Nakatani, S. Habuchi and N. Kitamura, *Anal. Chem.*, **71**, 419-426 (1999)
- 3) S. Ishizaka, S. Habuchi, H.-B. Kim and N. Kitamura, *Anal. Chem.*, **71**, 3382-3389 (1999)
- 4) S. Ishizaka, H.-B. Kim and N. Kitamura, *Anal. Chem.*, **73**, 2421-2428 (2001)

両性イオンの電気的性質に関する分子レベルの研究

北海道大学大学院地球環境科学研究科 ○古月 文志

プラスの電荷とマイナスの電荷を同時に持つ化学物質は両性イオンと呼ばれる。両性イオンは生命に対してはなくてはならない極めて重要な物質である。生命の最小ユニットである細胞は、その膜を形成するために、ホスファチジルコリン(レシチン)と言う両性イオンを使っている。タンパク質、つまり、生体の形を形成する物質は、もっぱら、アミノ酸と言う両性イオンの「かたまり」である。また、遺伝情報を刻む基盤となる核塩基も広い意味の両性イオンである。

何故、生命が両性イオンを必要とするのか？つまり、生命過程における両性イオンの役割は何であろうか？古くから、「両性イオンが特有な電気的性質を持ち、その電気的性質の変動は核酸、タンパク質、酵素などの機能性高分子の立体構造又はその働きに影響を及ぼす」と言われている。このような仮説を立証するためには、先ず、両性イオンの電気的性質を徹底的に解明する必要がある。しかしながら、両性イオンが正と負の電荷を同時に持ち、しかも、正と負の両電荷が極めて近い(サブ nm)ところにあるので、発生した極性の異なる電場が互いに相殺し合い、正電荷と負電荷が発生するそれぞれの静電場を観察又は測定することは極めて困難である。演者らは、独自に開発した分析化学手法を駆使し、両性イオンに関して、特に、その電気的性質に関して、詳細に検討を行ってきた。以下に、その研究成果の概要を紹介する。

使用した分析手法は、演者らが独自に開発した「両性イオンクロマトグラフ法」である。生体性両性イオンを固定化し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の固定相として、分離カラムに充填する。無機イオンのような小さいイオン種を分析の対象物質として、このような分離カラムの中で展開させ、イオンの溶出挙動から生体性両性イオンの電気性質を考察する。このような方法が「生体性両性イオンの電気的性質を研究するには、最もオリジナリティーの高い方法であり、且つ最も有効な方法である」と専門家たちに高く評価されている。

両性イオン固定相としては、①四級アンモニウム塩基/スルホン酸基タイプ、②四級アンモニウム塩基/リン酸基タイプ、及び③四級アンモニウム塩基/カルボキシル基タイプを開発・使用した。プラスの官能基は、3タイプとも同じ四級アンモニウム塩基が用いられている。一方、マイナスの官能基は、①がスルホン酸基、②がリン酸基、及び③がカルボキシル基である。タイプ③、つまり、カルボキシル基をマイナスの官能基とする両性イオンは、展開液のpHを制御することによって、そのカルボキシル基の働きを100%から0%までに、自由に制御することができる。しかし、タイプ①、つまり、スルホン酸基をマイナスの官能基とする両性イオン体はこのような可変性を殆ど持たない。一方、タイプ②は、可変性を持つものの、その程度は、タイプ③と比べかなり低い。このような両性イオンを固定相として用

いた HPLC を使って、両性イオンの電気的な性質について詳細に検討した結果、極めて意味の深いデータが得られた。

両性イオンは、プラスの静電場とマイナスの静電場を同時に作り出すことができる。つまり、両性イオンは、その正電荷と負電荷がそれぞれプラスの静電場とマイナスの静電場を作り出している。両性イオンを固定相として用いた分離カラムは、陽イオンと陰イオンを同時に保持・認識する実験結果から、このような結論を導くことができる。プラスの静電場は陰イオンを保持・認識する能力を持っている。一方、マイナスの静電場は陽イオンを保持・認識する力を持っている。陽イオンがマイナスの静電場に保持されると、両性イオン体の正味の電位、つまり、プラス電場のポテンシャル(Ψ_+)とマイナス電場のポテンシャル(Ψ_-)の差値、 $\Delta\Psi$ は、プラスの方向に向かって増大する。一方、陰イオンがプラスの静電場に保持されると、 $\Delta\Psi$ は、マイナスの方向に向かって増大する。つまり、両性イオンの正味の電位差を、陽イオン又は陰イオンを両性イオンに保持することによって調整することができる。陰イオンの溶出時間が移動相の陽イオンの性質に依存する実験結果、及び、陽イオンの溶出時間が移動相の陰イオンの性質に依存する実験結果から、このような結論を導くことが出来る。両性イオンの Ψ は静止状態のポテンシャルに戻るための所用時間、つまり、保持したイオンを完全放出するための所用時間が、単一性の陽イオン体及び単一性の陰イオン体と比べ、かなり短い。陽イオン及び陰イオンは、両性イオンを固定相として用いた分離カラムからの溶出時間が、同じ数の正電荷を持つ陰イオン交換カラム、又は、同じ数の負電荷を持つ陽イオン交換カラムからの溶出時間と比べ、著しく短い実験結果から、このような結論を導くことが出来る。両性イオンの $\Psi(+)$ と $\Psi(-)$ を静止状態に戻すには、イオン交換を必要としない。つまり、両性イオンに保持されている陽イオン及び陰イオンを、再び両性イオンから離脱させるためには、水で、両性イオンを洗浄するだけで十分可能である。陽イオン及び陰イオンを、純水を移動相として、両性イオンカラムから溶出することができる実験結果から、このような結論を導くことができる。両性イオンが発生したプラス電場とマイナス電場は、互いに「カウント電場」となり、磁石の N 極から発生した磁場と S 極から発生した磁場と同様に、独立に機能するものではない。プラス電場とマイナス電場の同時発生・動作の結果、両性イオンは、独自の作用機構で、その電場強度を自由に且つ迅速的に調整することができるようになっている。両性イオンの電気的性質の巧みさが、生命進化の結果によるものだと考えている。

本研究で得た両性イオンの電気的性質に関する知見は、Biophys. J., Langmuir, Anal. Chem., J. Chromatogr., Chromatographia, Analyst, Anal. Communi., Fresenius, J. Anal. Chem., Anal. Bioanal. Chem., Anal. Chim. Acta, Bull. Chem. Soc. Jpn., Anal. Sci., 「分析化学」などの学術誌に紹介され、生命過程における両性イオン物質の役割の究明に対して、貢献が大きいものであり、内外の関係者から高く評価されている。また、本研究で得た両性イオンの電気的性質に関する知識に基づき、新しい原理を有する分離・精製法の開発をも行い、数多くの研究成果を収めている。現在、この両性イオン技術は、国内外のメーカーによって、実用化され、バイオ、環境及び化学工業などの広い分野で応用されている。

ポリマー基板マイクロチャンネルチップの創製と化学的応用

(北大院理) 上野 貢生

1. はじめに マイクロチップを用いた分析化学は試薬量や廃液量の軽減、分析時間の短縮が可能であるといった点から、新規な分析機器の技術基盤として注目されている。数 cm 四方の固体基板上にマイクロメートルオーダーの微小な流路やチャンバーを形成させたマイクロチャンネルチップは、DNA やたんぱく質の分析など様々な用途に応用されてきた。¹このようなデバイスは、簡便に作製でき且つ低コストであることが望ましく、使い捨てが可能な分析チップの開発が期待されている。そこで、本研究ではマイクロチャンネルチップを構成する材料としてポリスチレン樹脂に着目し、ポリマー基板マイクロチャンネルチップの作製とその化学的応用を目的として研究を行った。ポリマーマイクロチャンネルチップは容易に電極やヒーターなどの機能を流路内に集積することが可能であるといった特徴を有する。²⁻⁴そのため、マイクロチップ内の電極上で化学反応を誘起し、その化学反応過程を微小電気化学測定法^{2,3}や空間分解顕微分光測定法^{5,6}により追跡することが可能である。本講演では、マイクロチャンネルチップ中に形成させた油水界面を反応場とした光化学・電気化学過程について、その特徴や反応メカニズム、更にはデバイスへの応用について検討した結果を述べる。

2. 実験 ポリマー基板マイクロチャンネルチップおよび電極内蔵型チャンネルチップはフォトリソグラフィ/インプリンティング法により作製した。流路となるチャンネル(溝)基板は、シリコン基板上にリソグラフィ/ドライエッチングにより作製した凸型構造を持つ鋳型基板をポリスチレン基板に熱圧着することにより形成した。次に、別のポリスチレン基板と作製したチャンネル基板を熱融着法で接合することにより蓋をし、マイクロチャンネルチップとした。一方、電極内蔵型チップはポリスチレン基板に金を真空蒸着後、リソグラフィ/化学エッチング法により作製した電極基板をチャンネル基板と熱融着法により接合し、マイクロチャンネル-電極チップとした。作製したマイクロチャンネルの幅は 100 μm、深さは 20 μm であり、バンド電極の幅は実験目的に応じて 10~500 μm とした。

マイクロチャンネルチップで行う反応系として、芳香族炭化水素化合物のシアノ化反応に着目した。光反応では、double Y 型構造をしたマイクロチャンネルの一方からピレン及び電子受容体であるジシアノベンゼンのプロピレンカーボネート溶液を、もう一方からシアン化ナトリウム水溶液を

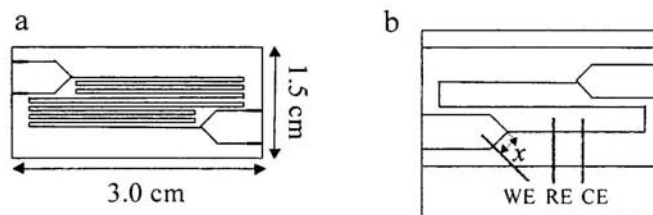


図 1 光反応マイクロチャンネルチップ (左) 及び電解反応マイクロチャンネルチップ (右)

WE: 作用電極 (金)、RE: 参照電極 (銀)、CE: 対電極 (金)

等速度で導入してチャンネル中央部で油水界面を形成させ、チップ全体を光照射することにより光反応を誘起した。一方、電解反応では、チャンネル一方から支持電解質としてテトラブチルアンモニウム過塩素酸を含むピレンのプロピレンカーボネート溶液を、もう一方からシアン化ナトリウムの水溶液を送液して油水界面を形成させ、チャンネル中の電極に 1.5 V (vs. Ag) の電位を印加して反応を誘起した。なお、チャンネル出口から採取したサンプルを GC-MS および LC-MS により分析を行い、反応の収率や選択率の決定を行った。

3. 結果 光反応：図 2 に示すようにチャンネル出口付近の分岐点において油水分離して流れることが確認できたため、流速 $0.2 \mu\text{l min}^{-1}$ で光反応を誘起し、出口から分取した各相のサンプルの GC-MS 測定を行った。水相からは、ピークは観測されないのに対し、油相からは生成物である 1-シアノピレンが絶対収率 29 % で生成することが確認され、溶液の流れとともに光反応が進行していることがわかった。また、流速やチャンネル構造を最

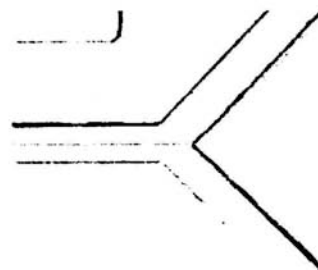


図 2 チャンネル出口付近の分岐点

適化することにより生成物収率として最大 72 % を達成した。ピレンとジシアノベンゼンとの極性溶媒中における光誘起電子移動反応により生じたピレンカチオンラジカルが、油水界面において水相中のシアン化物イオンにより求核置換反応を受け反応が進行する。^{7,8} 詳細な反応の追跡については、反応時間依存性や油水の非界面積を制御した実験から検討を行っている。

電解反応：電解反応ではチャンネル中の電極上で電解酸化により生成したピレンカチオンラジカルが光反応と同様に油水界面においてシアン化物イオンにより求核置換反応を受け 1-シアノピレンを生成する。流速 $0.2 \mu\text{l min}^{-1}$ における電解反応では生成物の収率は 14 % と光反応に比べて低い。しかしながら、電解反応における実験ではマイクロチップならではの特徴的な実験や反応過程を直接追跡することが可能である。図 1 に示すように、作用電極の配置を合流点から $x \text{ mm}$ 上流に移動すると反応率は x の増加に伴い減少した。これは、電解生成されたピレンカチオンラジカルが 2 液の合流後に油水界面でシアン化物イオンと反応する前に失活してしまったためであると考えられる。本発表では、空間分解顕微吸測定法による電気化学反応中間体の直接観測⁹とマイクロチャンネル内の物質移動過程の数値シミュレーション⁵を基に、電極空間配置や流速依存性による実験から反応機構について考察した結果について議論する。

1. Paegle, B. M.; Yeung, S. H.; Maties, R. A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5092-5098.
2. Ueno, K.; Kim, H.-B.; Misawa, H.; Kitamura, N. et al. *Chem. Lett.* **2000**, 858-859.
3. Ueno, K. Kim, H.-B.; Kitamura, N. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2086-2091.
4. Kitamura, N.; Hosoda, Y.; Iwasaki, C.; Ueno, K.; Kim, H.-B. *Langmuir* **2003**, *19*, 8484-8489.
5. Kim, H.-B.; Ueno, K.; Kitamura, N. et al. *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 871-876.
6. Ueno, K.; Kim, H.-B.; Kitamura, N. *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 391-394.
7. Kitagawa, F.; Murase, M.; Kitamura, N. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2524-2531.
8. Ueno, K.; Kitagawa, F.; Kitamura, N. *Lab. Chip* **2002**, *2*, 231-234.
9. Ueno, K.; Kitamura, N. *Analyst* **2003**, *128*, 1401-1405.

解離不活性金属キレートを用いる高性能分離分析法の開発と
その速度論的特性の解明

(北見工業大学工学部) ○齋藤 伸吾

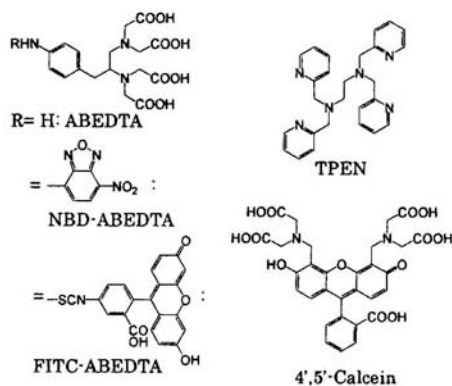
はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの分離と検出を併せ持った分析法において、金属イオンをターゲットとする場合、いかに金属をラベル化し、かつどの様な高効率な分離原理を用いるかがシステム設計の鍵となる。共有結合に基づく有機物質の吸光/蛍光ラベル化法とは異なり、金属イオンのラベル化は、解離しやすい配位結合を基にする。そのため、多くの従来法では、錯形成試薬を泳動液 (移動相) に添加し、錯体の解離を防ぐ必要があった。その動的な錯形成反応を分離に利用することで高分離を達成できるものの、添加した錯形成試薬由来のベースラインの大きな揺らぎを生じるため、感度の低減を招き、従来法では検出器のポテンシャルを最大限に利用しているとは言い難い。そこで、本研究ではプレカラムで誘導体化し、泳動液 (移動相) に配位子を添加しないシステムによって検出の高感度化を図った。しかし、この場合、ラベル化された錯体を検出するためには、泳動時間内で錯体が分解しないことが必要条件となる。さらに錯化試薬には検出のための高光吸収/発光能を付与すること、および金属間分離を達成するための工夫が必要となってくる。本発表では、吸収および発光特性を付与したキレート配位子群をプレキャピラリー誘導体化 CE に適用することで、高感度金属検出システムを構築した一連の研究、および基礎論としての金属キレートの解離反応について調査した研究を紹介する。

①プレキャピラリー誘導体化 CE 法の開発

ランタノイドイオン-芳香族ポリアミノカルボン酸錯体の吸光検出 CE¹

ランタノイドイオン (Ln^{3+}) は、相互分離が難しく、かつ、一般に解離活性錯体を形成する金属群として知られているが、多座ポリアミノカルボン酸 (PAC) とは解離不活性化学種を形成する (②参照)。高い光吸収能を有する PAC として ABEDTA および NBD-ABEDTA を用いた。これらの Ln^{3+} 錯体は 6 座配位であるため、2-4 の残余配位座を有している。泳動液にこの残余配位座と結合する三元



錯体形成試薬を添加し、その動的錯平衡による Ln^{3+} 間相互分離を狙った。三元錯体形成試薬として炭酸イオンやイミノ酢酸を使った場合、 Ln^{3+} 錯体の移動度に大きな変化が見られ、精密分離と共に高感度検出を達成した (4.2×10^{-7} M, 絶対感度 3.4 fmol)。

遷移金属および重金属イオン-ポリアミノメチルピリジン錯体の吸光検出 CE²

HSAB 則でいうところの中間からソフトな金属イオンをプレキャピラリー法で一斉検出することは難しい。なぜならそれら金属イオンの多くと解離不活性錯体を形成する試薬が限られているからである。そこで、ピリジン環を配位および光吸収部位として有する TPEN を本法に適用したところ、第一遷移金属および重金属イオンとのカチオン性錯体

○さいとうしんご

が解離不活性として検出されることを発見し、さらに一斉分離に成功した（検出限界 2.9×10^{-7} M, 絶対感度 2.6 fmol）。また、本法は除タンパク等の煩雑な前処理なしで、血清試料中の微量金属イオンを同時検出することに成功している。これは CE 条件下で生体物質と錯体とが逆方向に泳動することによると考えられる。

発蛍光性遷移金属イオン-ポリアミノカルボン酸錯体の LIF-CE EDTA 骨格にスパーサーを介しフルオレセインを発光部位として導入した配位子 FITC-ABEDTA を合成した。この錯体を LIF-CE に導入したところ、通常は常磁性消光をしてしまう金属錯体も発蛍光性を有し、 Cu^{2+} , Mn^{2+} および Ni^{2+} に選択的な直接蛍光検出に成功し、オンライン濃縮無しで検出限界 1.6×10^{-11} M \sim (0.88 ppt, 絶対感度 160 zmol) という超高感度検出を達成した。本法は、分離が難しいとされるサイズの大きな包摂型錯体同士の相互分離を達成したこと、常磁性イオンを超高感度蛍光検出できたことが特色である。

②キレート錯体の解離速度論

錯体の解離活性/不活性を決定する因子は、上記 CE において検出選択性の鍵となる。しかし、錯形成速度論と比して解離反応速度論は未だ系統的な解釈がなされていない。上述のキレート配位子系において、水分子交換速度が大きく解離活性錯体を形成しやすい金属群が CE 検出される事実は興味深く、その解離速度を制御する因子を調査した。 Ln^{3+} -ポリアミノカルボン酸錯体^{3,4} 6-8 座の Ln^{3+} -PAC 錯体の解離速度および活性化パラメーター (ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) を決定したところ、CE 条件下で Ln^{3+} -PAC 錯体は解離不活性であり、加溶媒分解反応が支配的であることが明らかとなった。また、巨大なエントロピー障壁 ($\Delta S^\ddagger \sim -300 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) が速度を制御する因子として存在することを発見し、配位子の剛性および遷移状態での溶媒和状態が特に重要であると考察した。

閉殻金属-ポリアミノメチルピリジン錯体 閉殻金属は結合エネルギーに軌道特性が表れにくく、解離活性錯体を形成しやすいが、TPEN 錯体は強い電荷-電荷相互作用無しで解離不活性となる。そこで、 Zn^{2+} , Pb^{2+} および Cd^{2+} -tpen 錯体の解離エネルギーを活性化パラメーターによって評価した。HSAB 則から中間の塩基であるピリジンと中間からソフトな金属との錯体では、結合エネルギー（主に ΔH^\ddagger に寄与）が解離において重要であると予想できるが、 ΔS^\ddagger の寄与が大きく、そのエントロピー障壁は平衡論における ΔS よりも大きいことを発見した。これは解離活性/不活性を制御する因子は安定度定数に代表される平衡論的エネルギーでは説明がつかないことを示している。

終わりに

CE や HPLC は、操作が簡易、高感度であり、かつ複雑なマトリクスにも耐えうる、いわば万能法としての優れたポテンシャルを持ちうる。本研究のアプローチは、分離場に光学的、平衡論的および速度論的特性などの物理化学的特性を重畳させ、全体論的に分析システムを構築することで、シンプルでありながらも最大限の感度・選択性を実現しようというものである。さらに CE システム設計に際し鍵となる、錯体の解離速度論の機構解明は学術的にも興味深いモチーフである。

1 S. Saito and H. Hoshino, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1644-1647 (2004).

2 S. Saito, S. Sasamura and S. Hoshi, *Analyst*, submitted

2 S. Saito, H. Hoshino, and T. Yotsuyanagi, *Inorg. Chem.*, **40**, 3819-3823 (2001).

3 S. Saito, H. Hoshino, and T. Yotsuyanagi, *Anal. Sci.*, **16**, 1095-1097 (2000).

北海道分析化学会賞受賞講演

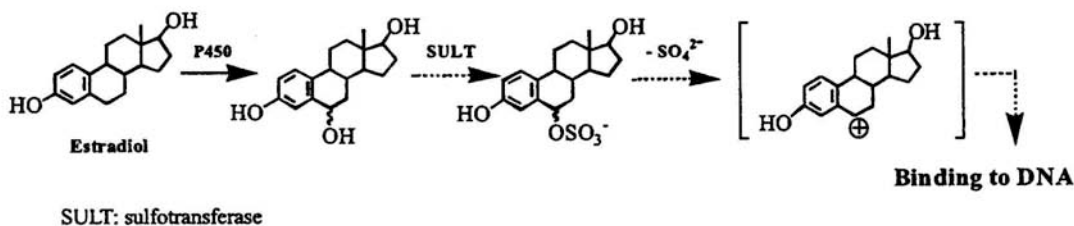
硫酸抱合型ステロイドに関する研究
 (北海道薬科大学) 伊藤 慎二

1. はじめに

ステロイドホルモンは代表的な生理活性物質であるが、その生理的および病理的役割については依然として不明な点が多く、乳がんなど、ステロイドホルモン依存性の疾病の発症機構の解明や診断には、多種類の代謝物も含めた体内動態の詳細な解析が求められている。多くの薬物と同様に、ステロイドホルモンも生体内で第I相反応(酸化、還元)および第II相反応(抱合)を受け、水溶性が増大することによって、その排泄が促進される。尿中に排泄された種々の抱合型代謝物の測定は、ステロイドホルモンの体内動態を解析する上で臨床的にも極めて重要である。また、ステロイドホルモンの代謝は解毒的な反応だけではなく、中には、代謝活性化により毒性の強い反応中間体を生成する場合もある。著者は、ステロイドホルモンの臨床分析化学的研究として、硫酸抱合型ステロイドに注目した。臨床検査の分野では、妊娠末期に尿中排泄量が増加する pregnanediol 3, 20-disulfate (硫酸抱合体) を鉍酸加熱法により加水分解後測定しているが、この加水分解では多数の副生物が生成する。この反応を精査し、pregnanediol 3, 20-disulfate の20位の立体配置の違いから、それぞれ異なる生成物が得られることを立体化学的に明らかにした。本講演では、代謝活性化の例として、ステロイドホルモンの一種である estrogen の6位代謝活性化(水酸化とそれに続く硫酸抱合)と、それに続く DNA 損傷による発がん機構の解明の試みについて紹介する。

2. 研究の背景

乳がん及び子宮体部がんの発現には、内因性及び合成 estrogen、あるいはそれらの代謝物への暴露が関係すると認識されている。Estrogen はイニシエーター及びプロモーターとして作用すると考えられているが、イニシエーションの機序は未だ解明されていない。内因性 estrogen の estradiol あるいは estrone は、cytochrome P 450 酵素により、2位、4位、16 α 位あるいは6位等の水酸化を受ける。このうち、2(or 4)-hydroxyestrogen は、同じく P 450 酵素存在下、セミキノン体及びキノン体に変換されるが、これらは反応性が高く、直接あるいは間接的に DNA に損傷を与えると考えられている。



代謝活性化による estrogen の発がん性を別の観点から解明する試みとして、次の様な機構を提案した(Scheme 1)。即ち、6-hydroxyestrogen の6位水酸基(ベンジルアルコール)が硫酸抱合を受けるならば、サフロールや7,12-ジメチルベンツ(a)アントラセン等の発

いとうしんじ

がん機構に見られるように、生成物は反応性に富むサルフェートと予想される。事実、モデル化合物として合成した 3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-6(α , β)-yl sulfate (3MeE-6 α S or 3MeE-6 β S) は、水中で容易に 6 位カルボカチオンを生成することが確認され、DNA との反応が予想された¹⁾。

3. モデル化合物による検討²⁻⁶⁾

3MeE-6(α , β)-S は核酸塩基や DNA と反応し付加体を生成した。両サルフェートと DNA との反応生成物は、いずれもステロイド 6 位 (α 配置あるいは β 配置) とアデニンの 6 位アミノ基およびグアニンの 2 位アミノ基との付加体であること、いずれの場合も 6 β 体の方が主に生成することが判明した。これら付加体には、突然変異能を有する可能性があるので、これら付加体を取り込んだオリゴマーを用いてヒト DNA polymerase による触媒反応を試みたところ、ミスコーディングが起きた。さらに、これら付加体を含むベクターをトランスフェクトしたサル腎細胞において点突然変異性を示した。また、ステロイド 6 位に結合した塩基の立体配置 (α 又は β) は、修飾 DNA の突然変異性へ影響する可能性もあり興味を持たれた。

4. 内因性 6-hydroxyestrogen による検討⁷⁾

モデル化合物の結果に基づいて、内因性の代謝物 6-hydroxyestrogen に立ち戻り、6 位水酸基の硫酸抱合化、6 位サルフェートの DNA に対する反応性、及び、生成する付加体の点突然変異に及ぼすステロイド 6 位立体配置の影響について検討することにした。

ヒト肝サイトゾールによる 6-hydroxyestrogen の 6 位硫酸抱合化を検討した結果、間接的な方法ではあるが、6 位での硫酸抱合化を確認した。次に、6 位サルフェートの DNA に対する反応性を検討するために、反応活性体として、合成が比較的容易な 6 α -hydroxyestrone 6-sulfate (E1-6 α S) を合成した。E1-6 α S と DNA との反応では、モデル化合物での結果と同様にアデニン及びグアニンとの付加体を与え、そのステロイド 6 位の立体配置も 6 β 体の方が主であった。この結果は、E1-6 α S に DNA 修飾能のあることを示しており、生体内でも同様の反応が起きる可能性を示した。

最後に、付加体の点突然変異に及ぼすステロイド 6 位立体配置の影響について調べるために、特定部位を estradiol で修飾したオリゴマー (6 α 体と 6 β 体) の合成を検討した。修飾部位のデオキシリボヌクレオシドとして dG を選択し、その 2 位アミノ基をフッ素置換した DMT 誘導体を合成した。これと 6 α -aminoestradiol 17-diacetate とのカップリング反応により目的の付加体を合成し、それを含むオリゴマーを合成した。同様に、6 β 異性体を含むオリゴマーについても 6 β -aminoestradiol 17-acetate を用いて合成した。現在、これらのオリゴマーを用いて、点突然変異性に及ぼすステロイド 6 位立体配置の影響について検討中である。

文献

- 1) H. Takagi, K. Komatsu, and I. Yoshizawa, *Steroids*, **56**, 173 (1991).
- 2) S. Itoh, A. Yamauchi, Y. Itoh, H. Takagi, and I. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1754 (1996).
- 3) S. Shibutani, S. Itoh, and I. Yoshizawa, *Biochemistry*, **36**, 1755 (1997).
- 4) I. Terashima, N. Suzuki, S. Itoh, I. Yoshizawa, and S. Shibutani, *Biochemistry*, **37**, 8803-8807 (1998).
- 5) S. Itoh, T. Hirai, Y. Totsuka, H. Takagi, Y. Tashiro, K. Wada, K. Wakabayashi, S. Shibutani, and I. Yoshizawa, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1312-1318 (1998).
- 6) N. Suzuki, S. Itoh, K. Poon, C. Masutani, F. Hanaoka, H. Ohmori, I. Yoshizawa, and S. Shibutani, *Biochemistry*, **43**, 6304-6311 (2004).
- 7) S. Itoh, S. Shibutani, M. Ikegami, S. Watanabe, Y. R. Santosh Laxmi, N. Suzuki, K. Kohda, K. Takanashi, and I. Yoshizawa, *Chem. Res. Toxicol.* submitted.

1. はじめに

半導体微細加工技術を利用して微小な反応器等を加工した小型基板（マイクロチップ）を用いる化学分析は、分析プロセスや分子プローブの集積化により操作の簡便化や分析時間の短縮化などを可能にすることから盛んに研究が行われている。一方、生物学的な分析法である細胞を用いるバイオアッセイは、生体に対する化学物質の毒性などの影響を直接的に評価できることから、環境分析や医薬品のスクリーニングなどに広く利用されているが、煩雑な操作や長い分析時間を必要とするため、これらを軽減しうるオンチップでのバイオアッセイの開発が期待されている。オンチップバイオアッセイでは、少量の試料で多検体・多項目のアッセイを同時に実行できる高性能なアッセイフォーマットが求められるが、現状では微小空間での細胞の集積化および機能発現などの基礎的な研究にとどまっております。そこで本研究では、多検体・多項目の一斉分析が可能な新しいオンチップアッセイフォーマットとして、複数のチップで構成される微小流体ネットワークを用いる方法を開発した。さらに、生物学的分析システムとしての基礎的な性能について検討し、微生物を用いる変異原性試験への応用を試みた。

2. オンチップバイオアッセイフォーマットの開発¹⁾

細胞を固定化する貫通孔（ウェル）をアレイ状に配置したチップと試料を導入するチャンネルを平行に配置したチップを組み合わせ、そこに形成される3次元微小流体ネットワークを利用した新規オンチップバイオアッセイフォーマットを考案した（図1）。このフォーマットでは、2枚のポリジメチルシロキサン製マイクロチャンネルチップとそれに挟まれた1枚のシリコン製貫通ウェルチップを使用する。アガロースに懸濁したアッセイ用試験菌株を一方のチャンネルチップから導入し、ウェル内でゲル化する。次いで、別のチャンネルチップから測定物質を導入して試験菌株と反応させることで、アガロースゲルに固定化した複数のアッセイ用試験菌株と複数の被験物質を掛け合わせた全ての組合せのアッセイを一組のチップ上で行うことが可能である。ここでは、25(5×5)個の貫通ウェルを有する試験菌株固定化用チップならびに5本のチャンネルを有する試験菌株および試料導入用チップをそれぞれ作製した。発現誘導物質としてマイトマイシンC (MMC) によりルシフェラーゼを発現する複数の大腸菌をモデル菌株として用い、考案したフォーマットにおいて発現ルシフェラーゼによる生物発光 (BL) の測定を行った。その結果、モデル大腸菌の種類および MMC の濃度の組合せに応じた強度の異なる25通りの BL を一組のチップ上で一斉に検出することができ、本フォーマットによるオンチップバイオアッセイが可能であることを明らかにした。

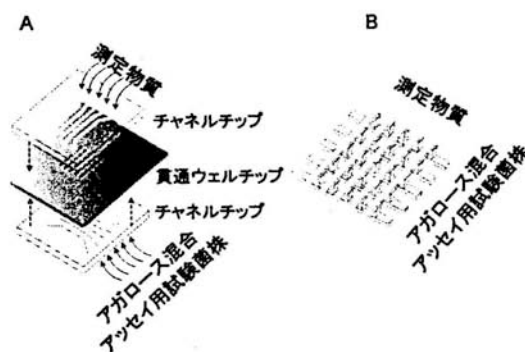


図 1 オンチップバイオアッセイフォーマット (A)および3次元微小流体ネットワーク(B).

3. オンチップバイオアッセイフォーマットの基礎的性能の評価

本オンチップアッセイの分析システムとしての特徴を明らかにするために、アッセイプロセスの速度論的モデルを提案し、BL 反応を用いてその解析を行った。オンチップアッセイでは、チップ内に供給された被験物質や酵素基質が、微生物を保持するゲルと細胞膜を透過し、細胞内で反応するプロセスとなっている。BL 応答曲線から各プロセスのパラメータを求めたところ、物質の細胞膜透過プロセスが発光応答時間や分析感度に影響を与える主な要因であることを明らかにした。

つぎに、本フォーマットにおける固定化菌体の生育および遺伝子機能について検討した。 3×10^8 cells ml⁻¹ の大腸菌を用いて液体培地中で静置培養した場合、菌体濃度は約 5 時間で 2 倍となったのに対し、固定化した場合は、約 2.5 時間で 2 倍となった。一方、 1×10^{10} cells ml⁻¹ の大腸菌を用いた場合、液体培地中では菌体濃度に変化が見られなかったのに対し、固定化した場合は菌体濃度が減少し、約 2.5 時間で 1/2 となった。また、チップ内に保持された菌体は、培養液中に存在する場合と同様の遺伝子発現機能を示した。したがって、固定化された菌体は正常な遺伝子発現機能を有するものの、培養液中とは異なる生育特性を示し、また、その増殖および死滅が菌体濃度に依存することを明らかにした。

4. 変異原性試験への応用

本オンチップフォーマットを SOS 応答に基づくルシフェラーゼの遺伝子発現を指標とした変異原性試験に応用した。変異原物質として MMC を用い、培養液を用いる従来法と比較した。その結果、本フォーマットにおいても変異原性の強さを示す用量反応曲線が従来法と同様に得られ、検出下限はいずれの方法においても 0.2 ng ml⁻¹ となった。その他代表的な変異原物質数種類についても同様の結果が得られた²⁾。

つぎに、高濃度の菌体を微小空間内に固定化した場合にその死滅が促進されることに着目し、致死感受性を指標としたオンチップフォーマットの変異原性試験を新たに考案した。致死感受性に基づく従来の試験法では、感受性の異なる 2 種類の試験菌株を用い、コロニー計測に基づく菌体の生存率の違いから変異原性を評価する。しかしながら、チップ上でコロニー計測を行うのは困難であるため、発現ルシフェラーゼによる発光量を生存率の指標とする方法を新たに考案し、本フォーマットに適用した。MMC を用いて検討したところ、二つの試験菌株の生存率の違いを BL 強度に基づいて算出することが可能となり、MMC の変異原性を検出することができた。また、いずれも一日から数日を要していた従来の変異原性試験をわずか数時間でできることが可能となった。

5. おわりに

本研究では、多検体・多項目の同時アッセイが可能な新規オンチップバイオアッセイフォーマットを開発し、微生物を用いる変異原性試験に有用であることを示した。環境分析や医薬品開発に利用されている現状のバイオアッセイでは、試験管などを用いる古典的な手法を用いているため、増え続ける化学物質に対応するには、あまりにも操作が煩雑でありスループットも低い。したがって、本法はこのような問題に対応しうる新たなアッセイ手法として、これらの分野に大きく貢献することが期待される。

参考文献

- 1) H. Tani, K. Maehana and T. Kamidate, *Anal. Chem.*, **76**, 6693 (2004).
- 2) K. Maehana, H. Tani, T. Shiba and T. Kamidate, *Anal. Chim. Acta*, **522**, 189 (2004).

まえはな こうじ