

THE CHEMICAL TIMES

KANTO CHEMICAL CO., INC.



2013 No.2 (通巻228号)

ISSN 0285-2446

ホウ素の新しい電気化学的分析方法	吉村 和久 竹原 公 原田 義一	2
<i>Bacillus cereus</i> 食中毒と検査	上田 成子	11
カルボニル化合物の高効率な還元剤のアミノ化触媒の開発	渡辺 正人	19
感染症四方山話(6)：菌血症・敗血症—その2	菊池 賢	24
最近のトピックス		28



ホウ素の新しい電気化学的分析方法

Novel electrochemical analysis method of boron

九州大学大学院理学研究院化学部門 教授 理学博士 吉村 和久

Kazuhisa Yoshimura (Professor)

准教授 理学博士 竹原 公

Kô Takehara (Associate Professor)

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University

タカオカ化成工業株式会社環境機器部 部長 原田 義一

Yoshikazu Harata (General Manager)

Department of Environmental Device, Takaoka Chemical Co., Ltd.

1. はじめに

ホウ素はガラス原料、陶器の上薬、洗剤や防腐剤等に利用され、国内では工業用途で利用できるホウ素鉱石は採掘されないため、トルコ、アメリカ、ロシア等から輸入している¹⁾。このため、温泉水を除くと、河川をはじめとする水道水源等、環境中から検出されるホウ素は工業用原料に由来するものが多いことが想定される²⁾。

ホウ素は植物の必須元素で肥料成分として使用されており、ヒトや動物においても代謝機能を整える有用な成分と考えられているが、過剰に摂取した場合は、皮膚炎、嘔吐、下痢等の症状をともなう毒性をもつ。このため、飲料水中のホウ素濃度について、WHOガイドラインでは2.4 mg L⁻¹以下を推奨しており、日本の水道水質基準では1.0 mg L⁻¹以下、加えて、排水基準においては10 mg L⁻¹(海域 230 mg L⁻¹)と規定されている。

現在、水資源の乏しい諸外国では海水を水源として

海水淡水化施設によって飲料水を生産しており、大半の施設では逆浸透膜(以下、RO膜)が利用されている。RO膜によってろ過することで、海水中のナトリウム、カルシウム等のミネラル成分を含むほとんどの不純物を取り除くことができるが、唯一、ホウ素はRO膜からリークすることが知られている。海水には水道水質基準を大きく上回る4 mg L⁻¹程度のホウ素が含まれており、海水淡水化施設ではホウ素の高度処理とその濃度のモニタリングが必要不可欠となっている。

また、水道水質基準の設定を踏まえて、平成13年にホウ素の排水基準10 mg L⁻¹が制定された。当初、対応が困難とされた特定業種向けの暫定基準も継続的な改定措置によって規制の強化が進められている。

ホウ素の定量分析は、現在、吸光光度法とICP法が公定法として利用されている。この他、テトラフルオロホウ酸イオンを生成させてイオン電極で測定する分析法³⁾やホウ素による放射線吸収を応用した分析法⁴⁾も提案

表1 ホウ素の分析方法

分析法	概要 ⁵⁾	評 価 (◎>○>△>×)			
		測定範囲	所要時間	安全性	妨害成分
メチレンブルー吸光光度法	ホウ素化合物に硫酸とフッ化水素酸を加え、テトラフルオロホウ酸イオンとした後、メチレンブルーを加え、イオン会合体を生成させる。このイオン会合体を1,2-ジクロロエタンで抽出し、吸光度を測定する。	○ 0.1~1 mg B L ⁻¹	△ 反応時間: 1時間	× フッ化水素酸を使用	△ クロム酸イオン 濁り成分
アゾメチンH吸光光度法	pH調整液およびアゾメチンHを添加してホウ素-アゾメチンH錯体を生成し、吸光度を測定する。	○ 0.2~10 mg B L ⁻¹	× 反応時間: 2時間	◎	△ 鉄、マンガン、銅、クロム等の重金属およびアルミニウム、濁り成分
ICP発光分光分析法	試料を高周波誘導結合プラズマ中に導入し、ホウ素の発光強度を測定する。	◎ 0.02~8 mg B L ⁻¹	◎ 作業時間: 数分	◎ 薬剤は不要	◎ 妨害成分 無
ICP質量分析法	内標準元素としてイットリウムまたはインジウムを少量添加した試料を高周波プラズマ中に噴霧し、ホウ素と内標準物質の質量/電荷の比率から定量する。	◎ 0.0005~0.5 mg B L ⁻¹	◎ 作業時間: 数分	○ 少量の硝酸を使用	◎ 妨害成分 無

されている。いずれの分析法も高い信頼性と安定性をもっている反面、作業性、安全性、コスト等の面で課題も多く、新たな分析法の開発が待たれていた。

上記課題を踏まえ、ホウ素錯体の電気化学的検出法を応用した新しい分析法を開発したので、その概要を紹介する。

2. ホウ素の分析法

表1にJIS法(JIS K0102:2008)に規定されるホウ素の分析法を示す。いずれの分析法も水道水質基準および排水基準に対する水質管理に対し、十分な感度を備えているが、吸光光度法では反応に要する時間が長いことが課題となる。加えて、未知の共存成分を含む排水を対象とした場合、定量を妨害する成分が存在したり、試料に含まれる、あるいは反応時に生成される濁り成分が測定精度に大きな影響を与える。

これに対し、ICP法は測定感度が極めて高く、微量のホウ素に対しても短時間で高精度な分析を実現でき、煩雑な作業も必要としない優れた分析法といえる。但し、高額な設備投資を要することから、導入できるユーザーは限定される。

以上の背景を踏まえ、各種プラントの維持管理を目的として、現場で手軽に利用できるホウ素の新しい分析法を開発した。

3. ホウ素の電気化学的分析法

専門知識を要さず、迅速で高感度な測定を実現できること、測定系が簡素に構成できること、加えて、取扱いが容易で安全なこと等、現状の分析法が抱える課題をクリアできる手法として、電気化学的検出法を選定した。

3.1 ホウ酸錯体の電気化学的応答特性

通常、ホウ素は水中でホウ酸($\text{B}(\text{OH})_3$)として存在する。

ホウ酸は、電気化学的に反応性の乏しい成分であり、直接的な検出は困難なため、電極活性な錯体に変換して検出する手法を用いた。

なお、錯体形成には次に示す2種の試薬の適用を試みた。

1) タイロン

タイロン(1,2-Dihydroxy-3,5-benzenedisulfonic acid)は鉄をはじめとする各種金属の吸光光度分析に利用されており、毒物・劇物の指定を受けない安全な試薬である。

スキーム1-1にホウ酸-タイロン錯体の反応式を示す。ホウ酸は中性域(pH 6~8)でタイロンと1:1の反応が進み、安定な錯体を形成する。

0~5 mg B L⁻¹の各種濃度のホウ酸水溶液にタイロンを添加し、0.8~1.1 V間の電極応答を測定した結果を図1-1に示す。なお、本試験では、作用極にグラッシーカーボン電極、対極に白金電極、参照電極として銀-塩化銀電極を使用し、微分パルスボルタンメトリー(DPV)法で測定した。

0.9~0.95 Vの間にホウ素濃度と相関をもつ応答が確認され、電気化学的検出法適用の可能性が見出された。

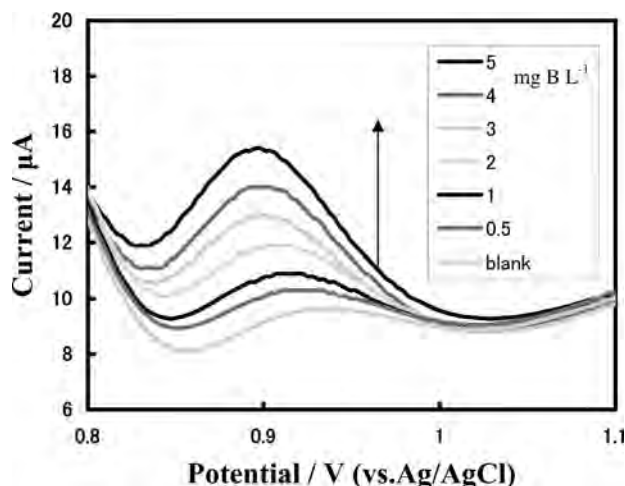


図1-1 ホウ酸-タイロン錯体のDPVによるボルタモグラム⁶⁾

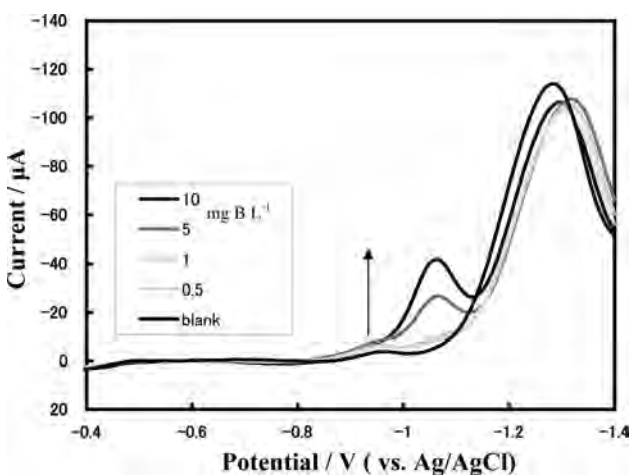
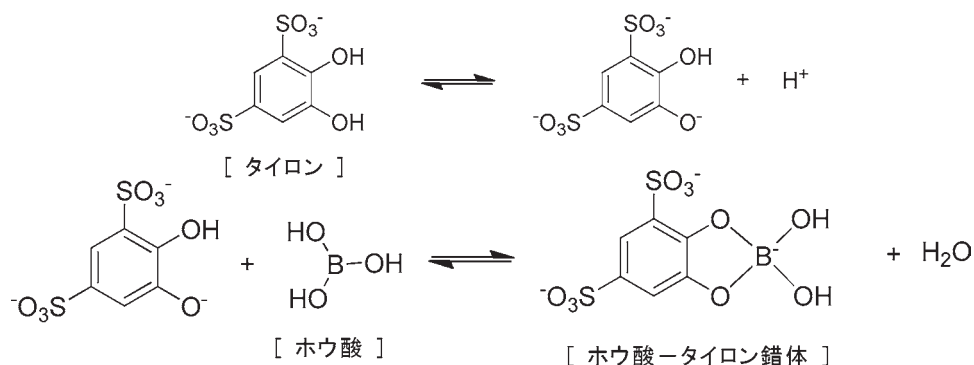
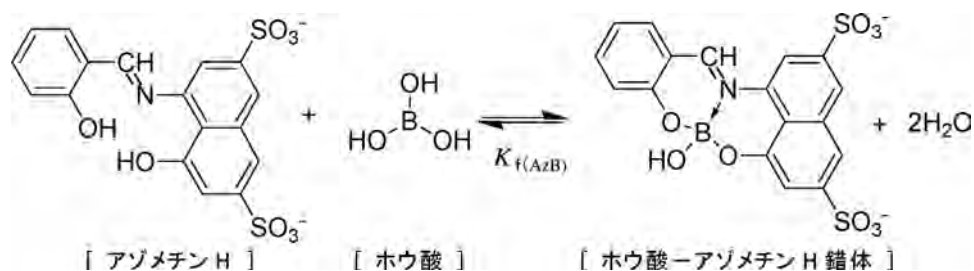


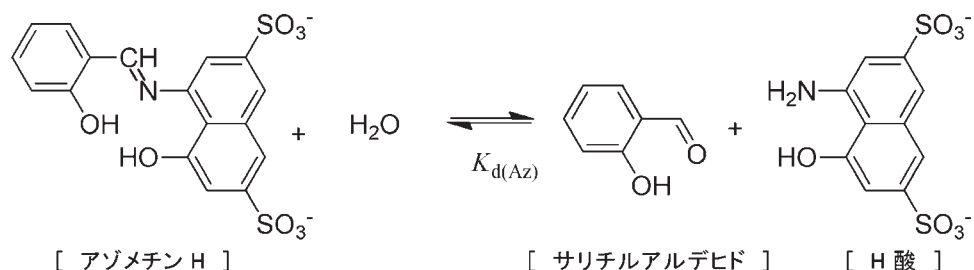
図1-2 ホウ酸-アゾメチンH錯体のSWVによるボルタモグラム⁷⁾



スキーム1-1 ホウ酸-タイロン錯体の生成反応⁶⁾



スキーム1-2 ホウ酸-アゾメチンH錯体の生成反応



スキーム2 アゾメチンHの解離反応

2) アゾメチンH

アゾメチンHは前述の吸光光度法を利用した公定法で使用され、タイロンと同様に毒物・劇物の指定を受けない、取扱いの容易な試薬である。

スキーム1-2にホウ酸-アゾメチンH錯体の反応式を示す。ホウ酸は弱酸性域(pH 4~5)でホウ酸-アゾメチンH錯体を形成する。なお、タイロンに比べ、反応は緩やかに進行するため、20分間の反応時間を確保した。

0~10 mg B L⁻¹のホウ酸水溶液にアゾメチンHを添加し、矩形波ボルタンメトリー(SWV)法で-0.4~-1.4 V間の電極応答を測定した結果を図1-2に示す。なお、本試験でも前記タイロンと同一の電極構成で評価を行った。

-1.07 V付近にホウ素濃度と相関をもつ応答が確認された。ホウ素濃度にとまないピーク位置のドリフトが確

認される前者に対し、ホウ酸-アゾメチンH錯体の場合はほぼ一定の電位でピークが出力される結果を得た。

以上、タイロン、アゾメチンHのいずれを使用した場合もホウ素の定量分析を実現するのに必要な濃度依存性をもつ応答を得ることができた。なお、ホウ酸-タイロン錯体では正電位を印加した際の錯体の酸化反応による電流が流れ、ホウ酸-アゾメチンH錯体では負電位を印加した際の還元反応による電流が流れる。

今回、電気伝導性、耐薬品性に優れたグラッシーカーボンを作作用極に採用しているが、前者の酸化反応下で使用した場合には電極面における酸化皮膜の形成や酸化物の付着など、短期間で電極性能を低下させるリスクをともなうことがわかった。

電極の繰返し応答性や電極寿命は実用性の高い分析法を確立する上で重要なファクターとなるため、長期

的に安定した電極応答が期待できるアゾメチンHを錯体形成の試薬に選定した。

3.2 検出感度の向上

アゾメチンHはサリチルアルデヒドとH酸(8-Amino-1-naphthol-3,6-disulfonic acid)から合成される試薬であり、スキーム2に示すように水に溶解させると二つの成分に解離する。

図1-2に示すホウ酸-アゾメチンH錯体のボルタモグラムでは錯体ピーク(約-1.07 V)に加え、-0.95 Vおよび-1.3 V付近にも応答が確認され、追跡調査によって、前者が未反応のアゾメチンH、後者がサリチルアルデヒドによるものであることが判明した。また、錯体のピークにはサリチルアルデヒド(-1.3 V付近)のピークの一部が重畳しており、0.1 mg B L⁻¹レベルの高感度な分析を行う上で影響が生じる可能性をもつ。

式1にスキーム1-2に示すホウ酸-アゾメチンH錯体の平衡定数($K_f(AzB)$)を示す。

$$K_f(AzB) = [AzB] / ([Az][B]) \\ = K_d(Az) [AzB] / ([HA][SA][B]) \cdots (式1)$$

生成される錯体の濃度[AzB]はH酸[HA]、サリチ

ルアルデヒド[SA]、ホウ素[B]の濃度の積に依存する。スキーム2に示すようにアゾメチンHを添加した場合には、等量の[SA]および[HA]が生じ、添加量を増やすほど錯体の生成は進行するが、これにともない試料中のサリチルアルデヒド濃度も上昇する。

錯体生成に支障をきたすことなく、前記のサリチルアルデヒドの影響を抑制する施策として、サリチルアルデヒド濃度[SA]を最小限に止め、H酸濃度[HA]を高めた反応系の適用を検討した。

図2-1に試薬としてアゾメチンHを用いた場合、図2-2にサリチルアルデヒド、H酸の濃度比を1:12として添加した場合について、ホウ素濃度に対するホウ酸-アゾメチンH錯体の生成量を平衡定数を用いて計算した結果を示す。

ホウ素濃度0~10 mg B L⁻¹のホウ酸水溶液にアゾメチンH 6.9 mmol L⁻¹を添加した場合、サリチルアルデヒド濃度[SA]はホウ素濃度によらず、6 mmol L⁻¹付近で安定している。これに対し、サリチルアルデヒドおよびH酸を1:12で添加した場合、サリチルアルデヒド濃度を2 mmol L⁻¹以下に抑えつつ、前者と等量の錯体を生成できることになり、ボルタンメトリーによる定量分析で課題となるサリチルアルデヒドの影響を大幅に軽減できる見通しを得た。

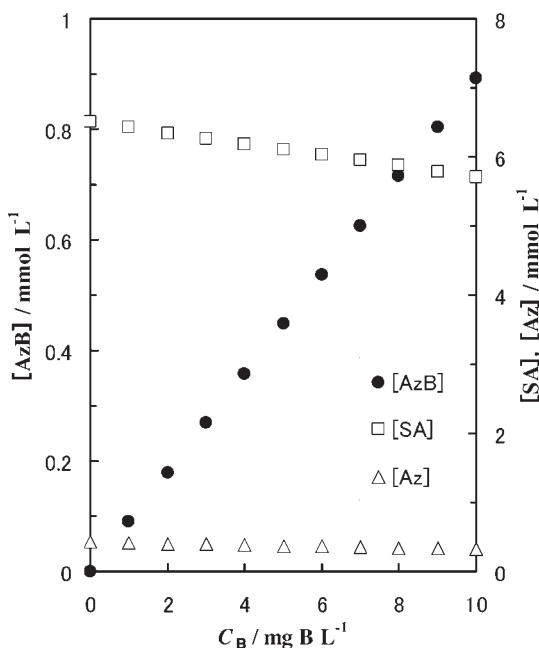


図2-1 各化学種濃度とホウ素濃度の関係
(アゾメチンHを添加した場合)
アゾメチン添加量: 6.9 mmol L⁻¹
ホウ素濃度: 0~10 mg B L⁻¹

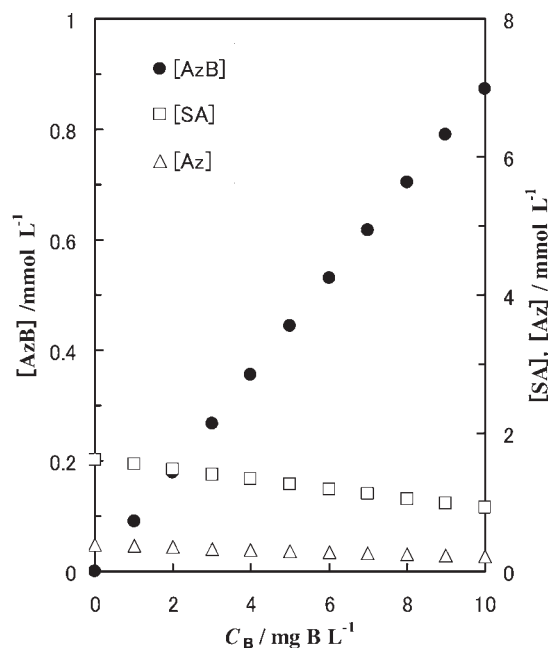


図2-2 各化学種濃度とホウ素濃度の関係
(サリチルアルデヒド、H酸を添加した場合)
サリチルアルデヒド添加量: 2.0 mmol L⁻¹
H酸添加量: 24.0 mmol L⁻¹
ホウ素濃度: 0~10 mg B L⁻¹

なお、後者のシミュレーションではホウ素濃度の最大値 10 mg B L^{-1} ($\approx 1 \text{ mmol L}^{-1}$) に対して、約2倍の物質比に相当するサリチルアルデヒドを添加する条件を設定した。

3.3 試薬の安定性評価

実用性の高い測定器を実現するにあたって、測定に要する試薬の安定性確保も重要なテーマとなる。一般にアルデヒドは揮発性が高く、酸化を受けやすい性質をもち、長期保存にともなう変質が懸念されたため、サリチルアルデヒドの安定性を調査した。

エタノールにサリチルアルデヒドを添加し、高純度水で5倍希釈して 50 mmol L^{-1} のサリチルアルデヒド溶液を調製した。本法で1回の測定に要する分量 1.2 mL を専用のシール付き褐色容器に注ぎ、 N_2 ガスを封入して3ヶ月間の冷蔵保管を行った。なお、サリチルアルデヒドの酸化防止の目的で1 wt%のL-(+)-アスコルビン酸を添加したサンプル、未添加のサンプルで比較した。

図3に保管期間に対するサリチルアルデヒドの濃度変化を示す。サリチルアルデヒドはアスコルビン酸の有無に関わらず、保管期間に応じてゆっくりとした速度で濃度低下を生じる結果となった。したがって、測定試薬として採用することは困難であることがわかった。

以上の結果を踏まえ、ホウ酸-アゾメチンH錯体を利用し、安定した測定を実現する方策として、アゾメチンH、H酸の混合粉末試薬を採用した。

前述したように、アゾメチンHは水に溶解すると同じ物質質量(mol)のサリチルアルデヒドおよびH酸を与える。また、保存性の良好な粉末試薬であるため、安定したサリチルアルデヒドの供給源と成り得る。このアゾメチンHに同じく粉末試薬であるH酸を混合し、H酸で重み付けした専用試薬を構成することで、錯体生成に影響を与えず、サリチルアルデヒドの濃度を可能な限り抑える反応系を実現した。

なお、アゾメチンH、H酸の粉末試薬を個別に添加しても同様の結果を得られるが、試薬の計量⇒添加の一連の作業性を向上する目的で両者を配合した専用試薬を採用した。

図4に専用試薬を利用し、各濃度のホウ酸水溶液でホウ酸-アゾメチンH錯体を生成させた場合のボルタモグラムを示す。本測定では所定濃度のホウ酸水溶液に

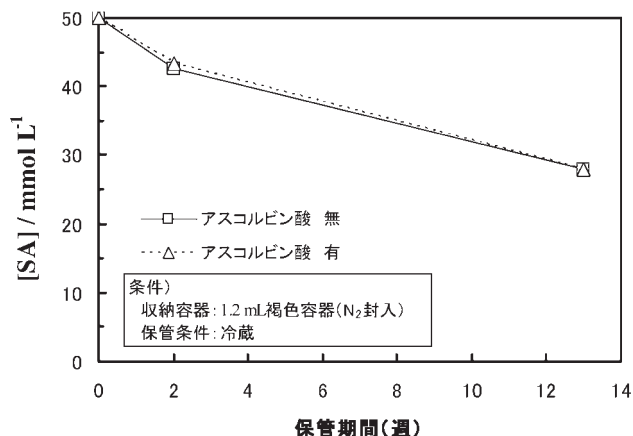


図3 サリチルアルデヒドの安定性

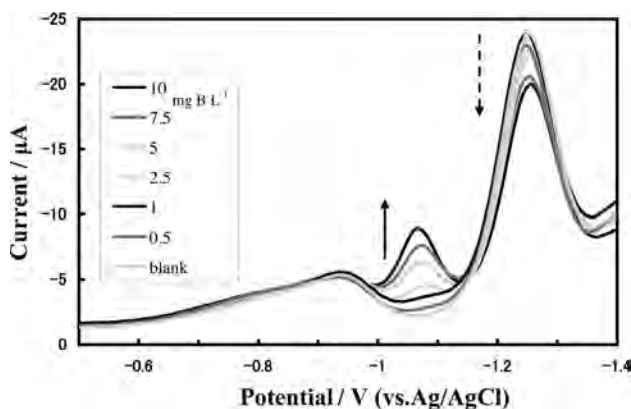


図4 専用試薬使用時のボルタモグラム

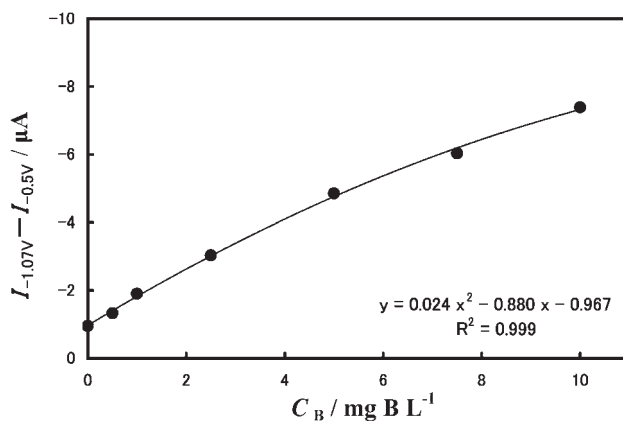


図5 ホウ素濃度と電極応答の関係

酢酸-酢酸アンモニウム溶液を添加してpH 4.5付近に調整した後、L-(+)-アスコルビン酸を加えH酸の酸化を予防した。この試料に、ホウ素濃度 10 mg B L^{-1} に対し 2 mmol L^{-1} のサリチルアルデヒドと 22 mmol L^{-1} のH酸を供給できる専用試薬を添加し、常温で20分間反応させた後に電極応答を計測した。

アゾメチンHのみを使用した場合(図1-2)に比較し、サリチルアルデヒドの応答(-1.3 V付近)による影響が解消された錯体ピーク(-1.07 V付近)を観測することができた。ホウ素濃度の上昇にともなって錯体ピークの高さは増加し、それに伴いサリチルアルデヒドのピーク高さは低下したが、定量性に影響はなかった。

なお、図1-2に対し、図4に示す錯体のピーク高さは約1/4に低下しているが、これは電極応答の信号処理方式が異なる影響であることを付け加えておく。

図5に試料のホウ素濃度と電極応答の関係を示す。低濃度域のサンプルに対して、錯体の応答はほぼ直線的に上昇しているが、5 mg B L⁻¹以上の高濃度域の試料に対しては徐々に応答が上に凸の曲線となることが

確認されている。これは、試薬大過剰一定系となっていないためで、試料中のサリチルアルデヒド濃度の低下が錯体の生成を抑える結果を与えている。

以上、ホウ酸-アゾメチンH錯体の生成にアゾメチンH-H酸混合試薬(専用試薬)を採用することにより、安定した定量分析を実現できる見通しを得た。なお、アゾメチンHの配合比を高めることで高濃度域の電極応答を改善することもできるが、低濃度域の感度確保を優先し、定量評価には検量線に二次回帰曲線を適用することで高濃度域の測定精度を補完することにした。

3.4 共存成分の影響

これまでホウ酸-アゾメチンH錯体の生成法およびボ

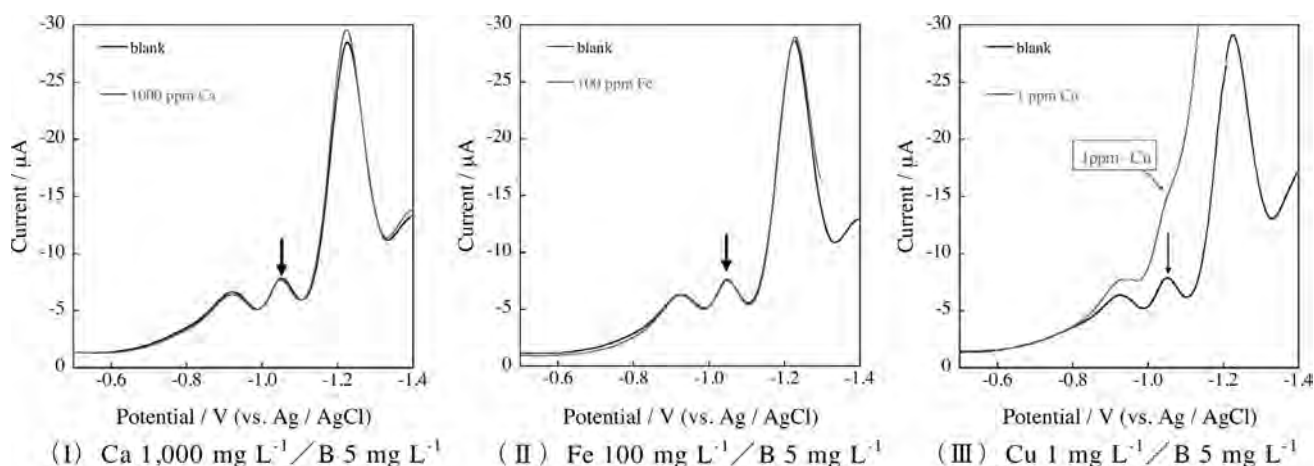


図6 金属イオン共存時のボルタモグラム (注) ↓: ホウ酸錯体のピーク位置

表2 金属イオンの影響評価

共存成分	妨害のない濃度 (mg L ⁻¹)	備考
カルシウム	1,000以下	—
マグネシウム	1,000以下	—
アルミニウム	100以下	—
鉄	100以下	—
銅	0.1以下	左記濃度以上で 影響が生じる
亜鉛	100以下	—
鉛	10以下	左記濃度以上で 影響が生じる

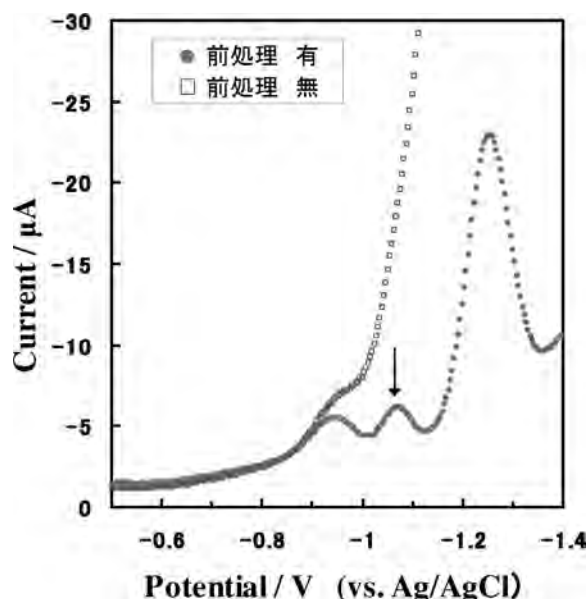


図7 キレート樹脂による前処理の効果 (注) ↓: ホウ酸錯体のピーク位置

ルタンメトリーによるホウ素濃度の測定について詳述した。なお、得られた結果はイオン交換水により所定濃度に調製したホウ酸水溶液を使用しており、共存物質をほとんど含まない試料の評価結果である。

一方、工場排水の水質管理用途を想定した場合、汚染源がホウ素に限定されるケースは少なく、大半は各種共存成分が混在することが想定される。

本分析法はアゾメチンHの添加により錯体を生成させる必要がある。金属イオンを含む試料では、これら共存イオンとの錯体生成でホウ酸-アゾメチンH錯体の生成が阻害されたり、他の錯体が電極応答に影響を与える可能性がある。このため、重金属イオンを中心に、共存成分が本分析法に与える影響を調査した。

図6に各種イオンを含む 5 mg B L^{-1} のホウ酸水溶液を使用した場合の電極応答の一例を示す。

カルシウム、鉄に対しては、高濃度共存しても、 -1.07 V 付近のホウ酸-アゾメチンH錯体の応答に影響は生じないことがわかった。なお、銅イオンについては、 1 mg L^{-1} 程度の低濃度であっても、 -1.2 V 付近に極めて大きなピークが出現するため、ホウ酸-アゾメチンH錯体のピークが隠れてしまう現象が確認された。

今回、調査を行った各種金属イオンの影響を表2にまとめた。本調査では、銅に加え、鉛についても 10 mg L^{-1} を超過すると影響が確認されたが、鉛は排水基準 0.1 mg L^{-1} が既定されているため、排水の水質監視に対して、実用上は障害にはならないと考えている。

工場排水には不特定多数の共存成分が含まれるケースも多く、かつ、濃度も様々であるため、更なるデータの集積を要すると考えているが、本分析法の適用性を拡大する確実な手法として、キレート樹脂を利用した前処理の導入を検討した。キレート樹脂は錯体を形成しやすい不純物、例えば、重金属イオンを取り除く有効なツールとして、水処分野で数多く利用されている。

図7に 80 mg L^{-1} の銅イオンを含む 4 mg B L^{-1} のホウ酸水溶液を用い、キレート樹脂による前処理(ろ過)を施した後に錯体を生成させた場合の電極応答を示す。

微量の共存が著しい影響を与える銅イオンであっても、キレート樹脂による前処理を施すことで完全に影響が取り除かれ、高感度の定量分析が実現できることを確認した。この前処理の採用で銅イオンに限らず、未確認の各種重金属を含めた共存成分による影響を一掃

でき、幅広く本分析法を適用できる見通しが得られた。

4. ホウ素測定器

以上の研究成果から、既存の公定分析法が抱える課題を軽減できる汎用タイプのホウ素測定器を開発した。図8-1に測定器および構成要素の外観を示す。

■ 電極・セル(図8-2)

セルに 20 mL の試料を注入し、3種の試薬(pH調整液、専用試薬、安定化剤)を添加して20分反応させる。この後、3種の電極を適正な間隔および浸漬長に配置できるセルに装着し、ボルタモグラムを計測する。なお、いずれも毒物・劇物の指定を受けない試薬で構成されるため、取扱いや後処理等の煩雑な作業は解消される。

電極は、作用極にグラッシーカーボン電極、対極に白金電極、参照電極に銀-塩化銀電極で構成した。グラッシーカーボン電極はガスや液体を透過せず、化学薬品への耐性も高い。また、電気伝導性に富んでいるため、電気化学測定における電極材料として幅広く利用されている。

■ コントローラ

コントローラには、電極~パーソナルコンピューター間の検出信号の入出力機能を搭載し、検出信号には矩形波ボルタメトリー(SWV: Square Wave Voltammetry)を採用することで高い検出感度と検出時間の短縮(測定時間:2分)を実現した。

■ 解析ソフト(図8-3)

既定濃度に調製したホウ素標準液を測定して得た検量線データを登録後、錯体を生成させた未知試料に電極をセットし、画面上の測定開始コマンドを実行すると電極の応答からホウ素濃度を演算する。

上水、排水等、各種用途への適用を踏まえ、低濃度領域 $0 \sim 1 \text{ mg B L}^{-1}$ 、高濃度領域 $1 \sim 10 \text{ mg B L}^{-1}$ の二つの測定レンジを設けた専用解析ソフトを構築した。なお、前述の電極応答特性から、検量線には二次曲線による回帰式を採用して、測定値の信頼性の向上を図った。

■ 排水対応(図8-4)

重金属イオンに対して高い選択性をもちつつ、ホウ酸との相互作用の小さいイミノ二酢酸基を導入したキレー

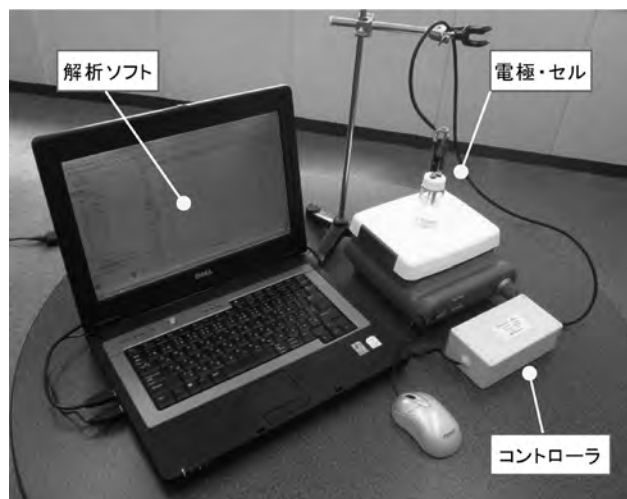


図8-1 ホウ素測定器 外観

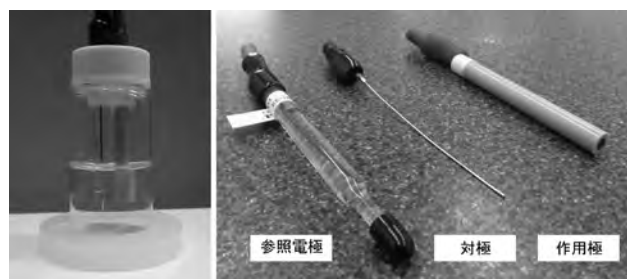


図8-2 セル・電極



図8-3 解析ソフト(メイン画面)

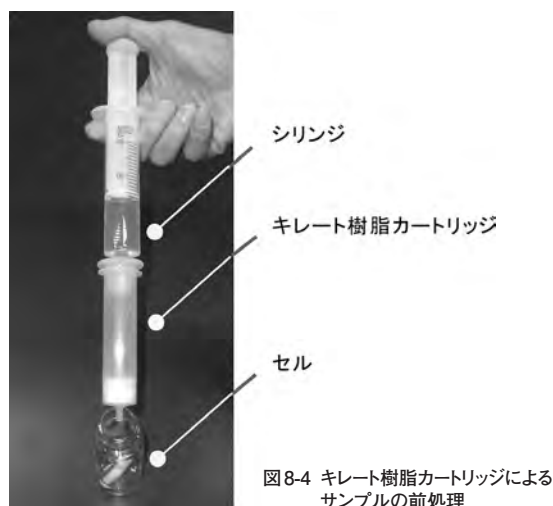


図8-4 キレート樹脂カートリッジによる
サンプルの前処理

ト樹脂カートリッジを採用した。

キレート樹脂は0.5 mol L⁻¹程度の希硝酸を樹脂層に通すことで回収した重金属が脱離し、重金属の回収性能を再生することができる。この特性に着目し、樹脂充填量が僅か1 gのコンパクトなカートリッジを適用し、再生しながら繰り返し使用する方法をとる。

5. 実用例

前項で説明したホウ素測定器を用いて、実プラントの処理水を測定した事例を紹介する。

1) 海水淡水化施設の処理水

RO膜を利用した海水淡水化施設の各工程の処理水について、ホウ素濃度を測定した結果を表3-1に示す。なお、測定結果の信頼性を評価するため、アゾメチンH吸光光度法(公定法)による結果と対比した。また、本評価ではキレート樹脂カートリッジによる前処理は行わず、試料を直接使用した。

公定法との比較では、各種イオンが含まれる原水、最終放流水、高圧RO排水を含めても約10%以下の相違であった。また、繰返し測定(3回)の変動幅も2%以下(0.1 mg B L⁻¹以下)となり、安定した測定結果が得られた。

2) 産業廃棄物処理施設の排水

対象とした施設では各種排水処理設備が装備されており、重金属イオン等の処理を経た後にイオン交換塔でホウ素の回収を行っている。本評価では、イオン交換塔前後の処理水を試料としてホウ素濃度の測定を行った。なお、イオン交換塔入口においては、カルシウム 約1,000 mg L⁻¹、フッ素 約5 mg L⁻¹が含まれているが、基礎検証の結果から測定への影響は少ないと判断し、1)項と同様に前処理を行わず、サンプルを直接使用した。また、同一サンプルをICP発光分光分析法(公定法)で測定し、比較評価した。

測定結果はいずれも公定法に近い値を示しており、当該排水のホウ素濃度監視に適用できることを確認した。

なお、イオン交換塔入口の試料で試薬添加後にサンプルが懸濁する現象が確認された。本分析法と同様のホウ酸-アゾメチンH錯体を利用した吸光光度法(公定法)では、試料の懸濁は大きな測定誤差を与える要因となるが、ボルタンメトリーによる検出手法を用いること

表3-1 海水淡水化施設 処理水の測定結果

試料	ホウ素測定器			アゾメチンH 吸光光度法	イオン強度
	ホウ素濃度 (mg B L ⁻¹) ※1	変動幅 (%)	対公定法比率 (%)	ホウ素濃度 (mg B L ⁻¹)	
原水(海水)	4.96 ± 0.01	±0.2	111	4.46	0.59
UFフィルタ処理水	4.76 ± 0.03	±0.6	102	4.68	0.56
高圧RO処理水	1.58 ± 0.03	±1.9	99	1.59	2.0 × 10 ⁻³
低圧RO原水	2.83 ± 0.01	±0.4	99	2.85	4.6 × 10 ⁻³
低圧RO処理水	0.74 ± 0.01	±1.4	96	0.77	4.1 × 10 ⁻⁵
生産水※2	1.46 ± 0.01	±0.7	110	1.33	1.7 × 10 ⁻³
最終放流水	7.44 ± 0.08	±1.1	103	7.19	1.1
高圧RO排水	8.82 ± 0.04	±0.5	110	8.05	1.3

※1 ホウ素測定器による測定結果:3回の繰り返し測定を実施し、平均値を記載。

※2 生産水:高圧RO処理水と低圧RO処理水をブレンドした水。

表3-2 産業廃棄物処理施設 排水の測定結果

試料	ホウ素濃度 (mg B L ⁻¹)		対公定法比率 (%)
	ホウ素測定器※1	ICP-AES法※3	
イオン交換塔入口	13.6 ※2	13	104
イオン交換塔出口	0.08	0.08	100

※1 ホウ素測定器による測定結果:繰返し測定結果(3回)の平均値

※2 イオン交換塔入口:試料を2倍希釈して測定。

※3 ICP-AES法:ICP発光分光分析法

で、懸濁による影響を受けることなく、良好な測定結果が得られた。

6. おわりに

水資源が豊富な日本においては、水道施設の充実と施設の綿密な維持管理により、誰もが容易に飲料水を利用できる環境が整えられている。加えて、水道水質基準および排水基準における監視項目の拡充や管理値の強化等、継続的な規制の見直しが水道水の安全性を支えてきた。今後も、より高度な水質管理を要求される状況が予想される。

また、分析技術においても、測定感度や安定性の向上に加え、新しい分析手法を用いた各種測定器が実用化されているが、これまでホウ素を対象とした汎用性の高い分析手法は確立されていない。

今回、0.1 mg B L⁻¹の感度を備え、上水から工場排水に至るまで幅広い場面で利用できるホウ素の新しい分析方法を確立し、装置化を図った。環境計測、各種プラン

トの維持管理業務の一助となれば幸いである。また、今後は更なる高感度化や付帯時間(反応時間)の短縮、オンライン化等をテーマとして検討を進めていきたい。

参考文献

- 1) 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構. 鉱物資源マテリアルフロー2011, 2012, p303
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 財団法人化学物質評価研究機構. 化学物質の初期リスク評価書. 1.0(127) ほう素及びその化合物, 2008. 4-9.
- 3) 財団法人電力中央研究所. 排水中のホウ素を15分で自動計測. 電中研ニュース. 2006, (430), 3p.
- 4) 下垣久, 井野場誠治, 中井健二, 延山政八. 中性子を用いたホウ素濃度計測の開発と適用性の評価. 電力中央研究所報告. 2009, V08060, 19p.
- 5) "47. ホウ素(B)". JIS K0102: 2008. 工場排水試験方法. 2010,184-189.
- 6) Fujimori, T.; Akimoto, H.; Tsuji, Y.; Takehara, K.; Yoshimura, K. Electroanalysis. 2010, 22(12), 1337-1343.
- 7) Takehara, K.; Fujimori, T.; Inagi, K.; Kajiwarra, M.; Harata, Y.; Yoshimura, K. Electroanalysis. 2013, 25(2), 387-393.

Bacillus cereus 食中毒と検査

Food poisoning and testing for Bacillus cereus

女子栄養大学 衛生学教室 教授 上田 成子

Professor Shigeko Ueda, Ph. D.

Kagawa Nutrition University Laboratory of Hygiene

1. はじめに

*Bacillus cereus*は環境細菌の一つであり、土壌、空気および河川水等の自然環境、そして農産物、水産物および畜産物などの食料、飼料等に広く分布する好気性の芽胞形成桿菌である。環境に広く分布している本菌は食品への汚染の機会が多く、食料・食材・調理加工食品の衛生的な取扱いがなされなかった場合、腐敗・変敗をもたらし、また食中毒をもたらすことがあり、食品衛生上重要視される¹⁻²⁾。さらに汚染された輸液ラインからの血液感染や種々の日和見感染(気管支炎、髄膜炎、敗血症、眼球炎、)をもたらすことが知られている³⁻⁴⁾。

*B. cereus*食中毒は、臨床症状によって嘔吐型と下痢型の二つに分けられる。*B. cereus*による最初の食中毒事例は、1955年にHaugeによって報告された下痢型食中毒である⁵⁾。この事例はノルウェーの病院と老人ホームで喫食前日に調理され、その後24時間以上室温に放置されていたバナナソースを原因食品とするものであり、患者数は総計600名に達した。その後1971年に、イギリスにおいて中華料理店で米飯または焼飯を原因食品とする嘔吐型食中毒の発生が報告されている⁶⁾。わが国では岡山県の小学校で学童354名がカナダ産の脱脂粉乳によって下痢、腹痛等を主徴とする食中毒発生事例が1960年に初めて報告され、その後本菌食中毒事例が多々報告されるようになった。これに伴い、わが国では1982年より行政的に*B. cereus*が食中毒細菌として扱われるようになった。

2. 食中毒の疫学的現状⁷⁻¹⁰⁾

*B. cereus*による食中毒は、しばしば世界各国で発生する食中毒細菌である。各国の全食中毒発生事例数に対する本菌発生件数の占める割合は、米国では1~2% (2003~2008年)である。また、EUに所属するベルギー、フランス、オランダ、ドイツ、スペインは全EU食中毒発生事例の5~68%と高く、英国、スコットランド、デンマーク、ポーランド、スロバキア等では1~2%と発生率(2007~2009)は低い。

わが国においては、欧米諸国と比較して本菌食中毒発生事例は必ずしも多くない。1978~2011年の34年間の本菌による食中毒事例は422件みられ、その患者数は11,172人であり、1件あたりの患者数は平均26人である。本菌食中毒発生頻度は、全食中毒事例の0.3~2.3%となっている。また、月別発生状況は他の細菌性食中毒と同様に、ほぼ86%が6月~10月の間に発生している。原因施設は、飲食店がほぼ58%と最も多く、次いで家庭、事業所、学校、仕出し屋、食品製造所の順になっている。

原因食品をみると、穀類およびその加工品(焼飯類、米飯類、麺類等)が最も多く(61%)、次いで複合調理食品(弁当類等、調理パン)である。その他に、魚介類およびその加工品、肉類・卵類・野菜類およびその加工品、菓子類が原因食品となった事例もみられている。これらの原因食品のうちわが国においては、特に焼飯類(チャーハン、ピラフを含む)が重要視される。欧米、その他の国では、野菜サラダ、肉料理、魚料理、土鍋料理、あるいはスパゲティや米飯の調理・加工食品のような澱粉性食品、チーズや粉乳を加えたバナナ・スライス等が

原因食品としてあげられ、日本とは様相が異なっている。

また、1978年～2008年までの全国食中毒事件録からみると、*B. cereus* 食中毒の発生要因として食品の取扱いの欠陥、厨房内の衛生管理の欠陥、調理のなかでも、調理食品の長時間室温放置や前日調理食品の使用等によるものが、記載された発生要因数のうちほぼ52%と最も多い。また、厨房内の衛生管理の欠陥によるものが23%あり、主に調理場の汚染が原因とされている。調理従業員の問題については7%であったが、これらは手指の汚染と保菌者によるものである。

また、1978～2011年の34年間における*B. cereus*の1事件当たり患者数が250人以上の大規模発生件数は11事例みられている。これら本菌集団発生事例の原因食品は米飯を含む弁当関連の複合調理食品が大半を占めている。原因施設は飲食店、仕出し屋、乳処理業、学校、保育所および事業所である。本菌食中毒発生要因は食料・調理食品の取扱いの衛生的対応の不備や施設内における調理器具の消毒の不備などである。集団発生はヒトへの危害、経済的・社会的危害は散发事例に比して大きなものになる。従って、厨房等のより一層の衛生管理の徹底が望まれる。

3. 微生物的特性

1) 病原因子と食中毒発症機構¹¹⁻¹⁴⁾

*B. cereus*は、溶血毒(cereolysin)、フォスホリパーゼ、嘔吐毒、下痢原性毒素等の菌体外毒素を産生することが知られている(表1)。

表1 *B. cereus* の産生毒素

	分子量(kDa)		
1. 下痢原性毒素			
ヘモリジンBL	B: 38	L ₁ : 39	L ₂ : 43
非ヘモリチック	44	34	105
Thompson et al.	43	40	38
Kramer & Gilbert	50		
Shinagawa et al.	45		
2. 嘔吐原性毒素		1.2	
3. 溶血毒			
セレオリジン		56	
ヘモリジンBL			
Sphingomyelinase		34	
ヘモリジンII		30	
4. フォスファリパーゼC			
Phosphatidylinositol hydrolase		34	
Sphingomyelinase			
Phosphatidylcholine hydrolase			

(1) 嘔吐毒

わが国に頻繁にみられる嘔吐型食中毒の発症には嘔吐毒が関与し、食物内毒素と考えられている。本毒素はセレウリド(cereulide)と命名され、アミノ酸とオキシ酸からなる環状のデプシペプチドでありD- o-Leu-D-Ala-L-o-Val-L-Valの化学式を示す。本毒素は疎水性で分子量が1153.38で、分子式はC₅₇H₉₆O₁₈N₆であり、抗原性がない。それに、121℃、90分でも失活せず強い耐熱性を示し、pH2、11の強酸性・アルカリ性でも失活せず、ペプシン、タイロシンに対しても失活しない。このように嘔吐毒は物理・化学的要因に対して安定である(表2)。トガリネズミ科のスunks(*Sunkus murinus*)に対するED50(50%催吐量)は経口投与で12.9μg/kg、腹腔内投与で9.8μg/kgである。また、ヒトに対するセレウリドの最小発症量は約1μg程度と推定されている(表3)。嘔吐毒の催吐活性はセロトニン5受容体のアンタゴニストや迷走神経遮断に起因するものと考えられている。

表2 *B. cereus* の下痢原性毒素と嘔吐原性毒素の物理化学的性状

対象	下痢原性毒素	嘔吐原性毒素
物質	蛋白質	環状ペプチド
分子量	38000～46000(SDS PAGE; 1153.38 50000～57000(G 100))	
安	等電点 5.1～6.1	
定	熱 56℃, 5分(－)	121℃, 90分(＋)
性	pH 5～10	2～11
	Trypsin (－)	(＋)
	Pepsin (－)	(＋)
	EDTA (＋)	ND*
	β-glucuronidase (＋)	ND
	alkylation (＋)	ND
	抗原性 (＋)	(－)
	* データなし	

表3 *B. cereus* の下痢原性毒素と嘔吐原性毒素の動物および細胞培養での発症毒素量

対象	下痢原性毒素	嘔吐原性毒素
サル経口投与	下痢(0.5～3.5h)	嘔吐(0.5～5.0h)
スunks経口投与	(－)	12.9 μg/kg
スunks腹腔内投与	(－)	9.8 μg/kg
ウサギ結紮腸管ループ試験	150～300 μg	(－)
マウス結紮腸管ループ試験	12 μg	ND*
ウサギ血管透過性亢進試験	0.05～1.25 μg	(－)
マウス血管透過性亢進試験	0.2 μg	ND
乳飲みマウスの液体貯留	(＋)	ND
マウス致死毒	120～300 μg	ND
サイトトキシン活性	0.1～0.5 μg	ND
(HFS.CHO.INT-407)		
	* データなし	

嘔吐型食中毒の臨床症状は30分～6時間の潜伏期後に悪心と嘔吐がおこるのが特徴であり、また時々、腹部の痙攣や下痢がみられ、症状の持続時間は一般に

24時間以内である(表4)。

表4 *B. cereus* 食中毒の疾病特徴

	嘔吐型	下痢型
感染菌量	$10^5 \sim 10^8/g$	$10^5 \sim 10^8/g$
毒素産生場所	食品(食物内毒素)	小腸(生体内毒素)
毒素物質	環状ペプチド	たんぱく質
潜伏期間	0.5~5時間	8~16時間 (たまに24時間以上)
疾病期間	6~24時間	12~24時間 (たまに数日)
症状	吐気, 嘔吐, 不快 (たまに下痢)	腹痛, 水溶性下痢 吐気
原因食品	いため料理, 米飯, パスタ, ペーストリヌードル	食肉製品, スープ野菜, プディング, ミルク・ミルク製品

(2) 下痢毒

下痢型食中毒の発症に関与している毒素は下痢原性毒素(下痢毒)、ウサギ腸管ループ液体貯留因子、血管透過性亢進因子、腸管壊死毒、皮膚壊死毒、マウス致死因子等とされている。下痢毒は部分精製され、その分子量は嘔吐毒と比較してかなり大きく、38,000~46,000の蛋白質と推定されている。本毒素は加熱、トリプシン、プロナーゼなどの酵素や胃酸などにより失活する(表2)。

本型食中毒時の感染菌量は一般に $10^7 \sim 10^8$ 以上とされている。*B. cereus*が産生する下痢毒はウエルシュ菌のそれとは異なり、食品と共に摂取された本菌が強力な酸性環境の胃を通過し、小腸内に定着・増殖し下痢毒を産生することにより発症すると考えられている。このことから、下痢毒は生体内毒素とされている(表4)。

下痢型食中毒の症状は、6~15時間の潜伏期後に水様性の下痢、腹部の痙攣および腹痛が起る。悪心は下痢にともなっておこるが、嘔吐はめったにみられない。症状はほとんどの例において24時間程度持続する。

2) 検査法

セレウス菌食中毒診断のための検査材料は、推定原因食品、患者の糞便・嘔吐物および原因施設から採取した調理食品の原材料や調理食品、調理器具・機器・設備のふき取り材料などである。

(1) 細菌学的特徴

*B. cereus*は、Bacillaceae科の*Bacillus*属に属するグラム陽性の大型(栄養細胞: $1.0 \sim 1.2 \times 3.5 \mu m$)の芽胞形成桿菌である(図1)。芽胞は孢子嚢を膨出させず、菌体の中央あるいはやや中央に存在し、周毛性の鞭毛を

有している。

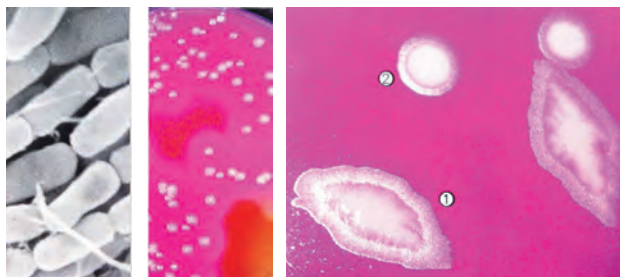


図1 *B. cereus*の電子顕微鏡写真, NGKG培地上コロニー
電子顕微鏡写真 NGKG培地上のコロニー NGKG培地上の①下痢型菌株(でんぶん分解+)と②嘔吐型菌株(でんぶん分解-)
*振とう 6時間培養菌の塗抹培養所見

図1 *B. cereus*の電子顕微鏡写真, NGKG培地上コロニー

本菌は*B. thuringiensis*、*B. mycoides*および*B. anthracis*と遺伝学的に近縁関係にある。これら4菌種の生化学的性状を表5に示した。*B. mycoides*は寒天平板上で根毛状の成育を示し、非運動性であり、平板培地上で他の近縁菌とは容易に区別できる。また、人畜共通感染症として有名な炭疽の病原菌である*B. anthracis*は莢膜を有し、ペニシリンを含む培地では成育できないことから他の近縁菌との区別は可能である。さらに、生物農薬製剤(BT菌製剤)に使用されている*B. thuringiensis*による食中毒事例の報告はみられないが、*B. cereus*と近縁関係にあり、

表5 *B. cereus* および遺伝学的近縁関係菌の生化学性状

生化学的性状	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. anthracis</i>
卵黄反応	+	a	a	+
根様状集落	-	-	+	-
莢膜	-	-	-	+
非染顆粒の形成	+	+	+	-
クリスタル・トキシゲン	-	+	-	-
カタラーゼ反応	+	+	+	+
嫌気条件下での発育	+	+	+	+
pH5.7での発育	+	+	+	+
溶血能: ヒト	+	+	+	-
インドール反応	-	-	-	-
ゼラチンの液化能	+	+	+	+
カゼインの分解能	+	+	+	+
チロシンの分解能	+	+	a	-
フェニルアラニンの脱アミノ作用	-	-	-	-
リゾチーム中での発育	+	+	+	+
7%NaClでの発育能	a	+	a	+
リトマスミルクの還元	+	+	+	+
でんぶんの加水分解能	+	+	+	+
クエン酸塩利用能	a	+	a	b
硝酸塩還元能	+	+	+	+
VP反応	+	a	+	+
尿素分解能	+	+	+	+
運動性	a	a	-	-
糖分解能				
グルコース	+	+	+	+
アラビノース, キシロース, マンニト	-	-	-	-
栄養細胞(μm)・長さ	3~5			
幅	1.0~1.2			
芽胞細胞(μm)・形	楕円形			
位置	中央			
病原性	食中毒・日和見感染	鱗翅目・双翅目・鞘翅目の昆虫に殺虫作用・日和見感染		ヒト・動物に対する感染症

*B. cereus*各種性状

● 栄養細胞 発育温度域: $10 \sim 48^\circ C$ 発育pH域: $4.9 \sim 9.3$ Aw域: $0.912 \sim 0.95$ 熱抵抗性 $D_{100}^\circ C$ 値: $1.2 \sim 8.0$ 分	● 芽胞細胞の発芽 発芽温度域: $1 \sim 59^\circ C$ 発芽pH域: $4.35 \sim 9.30$ Aw域: 0.993 以上 ● 芽胞細胞の熱抵抗性 $D_{95}^\circ C$ 値 でんぶん分解菌: $4.1 \sim 7.0$ 分 でんぶん非分解菌: $6.3 \sim 25$ 分
● 毒素の熱抵抗性 嘔吐毒: $121^\circ C$, 90分 下痢毒: $56^\circ C$, 5分	
+ : 85~100%の菌株が陽性	a: 50~84% b: 15~49% - : 0~14%

B. cereus 食中毒と関係のある下痢毒を産生することが知られている¹⁵⁾。*B. thuringiensis*は*B. cereus*と生化学性状および寒天平板上での生育状況は全く同一であり、これらの区別は顕微鏡的に殺虫性の結晶タンパク(crystal toxin: parasporal body)を形成するか否かによって判定されている(図2)。また、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(2009 年)では*B. pseudomycoides*、*B. weihenstephanensis*が*B. cereus*と遺伝学的に近縁関係にあるとして追加記載されている。

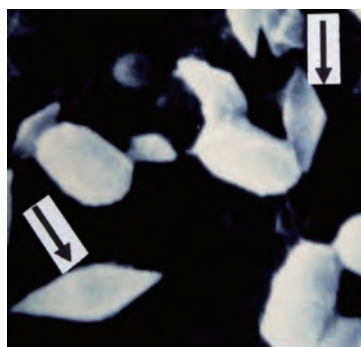


図2 *B. thuringiensis* のクリスタルキシン

一方、*Bacillus* 属のうち*B. cereus* 以外の*B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. pumilus*、*B. sphaericus* および *B. brevis* による食中毒も北欧、豪州および米国で報告されており、日本でも*B. subtilis*による食中毒が2事例報告されている。これら菌種についても食品衛生上注意する必要がある¹⁶⁾。

(2) 検査法

B. cereus の生化学性状については表5に示してあり、その検査法については図3に示した。

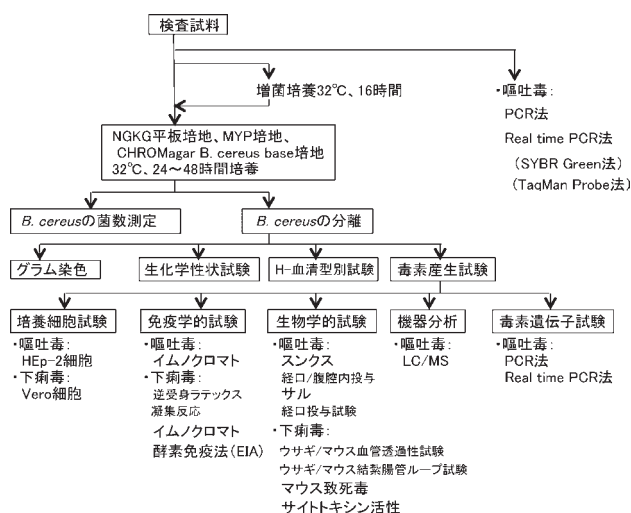


図3 *Bacillus cereus* の分離・同定

本菌は普通寒天培地上で好氣的に培養すると、通常、ワックス状の粗澁で湿潤な灰色から暗灰色の集落を形成する。本菌がマンニートを発酵せず、強いレシチナーゼ活性(卵黄反応)を示すことを利用して、分離に際しては卵黄を加えたNGKG寒天やMYP¹⁷⁾寒天平板が使用されている(図1)。これらの培地上ではレシチナーゼ反応を示し、マンニートを分解しない大型集落を示す。*B. cereus*はブドウ糖加普通寒天培地に培養すると対数増殖期の菌体内に空胞(非染顆粒: unstained granules)を形成する(図4)。

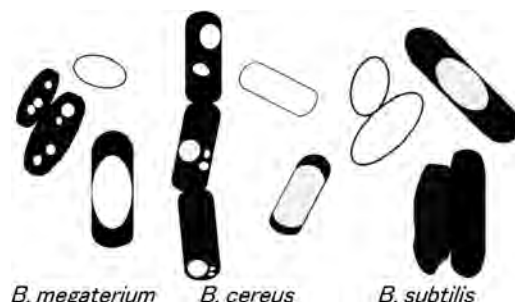


図4 *B. cereus* の非染顆粒

また、本菌は周毛性の鞭毛を有し、この鞭毛(H)抗原によりいくつかの血清型に分類されている。Taylor & Gilbertは食中毒由来株を中心としてH抗原の解析を行ない、26の血清型を分類している¹²⁾。これまでの諸報告を整理すると、食中毒由来株のほとんどはTaylor & Gilbertの1~26型に該当することが明らかにされている。また、わが国における1978~1998年の21年間の全国食中毒事件録の記載によると262件の本菌食中毒事例のうち85件が血清型別されており、1型菌が食中毒発生例の90%弱に関係していることが示されている。また、Gilbertらは、嘔吐型事例には1、3、15、19および26型が関係したと報告している。

本菌が産生する毒素のうち下痢毒については、現在、主に免疫学的方法が使用されており、このほかに結紮腸管ループ試験、血管透過性亢進試験などの生物学的試験法も利用できる。免疫学的手法としては逆受身ラテックス凝集反応に基づくセレウス菌エンテロトキシン検出キットが使用されている。嘔吐毒に関してはHEp-2細胞(ヒト喉頭癌由来)の空胞化変性の有無による形態変化によって測定されている¹⁸⁾。また、LC/MS(Liquid chromatography/mass spectrometry: 液体クロマトグラフィー/質量)分析法¹⁹⁾による検出も可能である。さら

に、嘔吐毒合成酵素を対象としたイムノクロマト法²⁰⁾により定性的な嘔吐毒産生菌の検出も可能であり、LC/MSによる定量実験の前提実験に利用すると労力や経済性を低減させることができ、迅速性からも有効な手法と考えられる。

(3) 培地の評価と培養後の鑑別ポイント

① *B. cereus* 選択培地

B. cereus の選択培地の有効性評価を行うために、NGKG 培地、MYP 培地(A 社)、MYP 培地(B 社)、BACILLUS CEREUS AGAR BASE (PEMBA)、CHROMagar *B. cereus* (CHROMagar) の5種の市販選択平板培地を用い、対照平板培地としてTryptosoy 寒天培地(TSA)とBHI 寒天培地を用いた。図5に各培地の培養所見・培地構成・培養条件・集落を示した。

② 試験に用いた *B. cereus* 菌株と交差試験に用いた菌株

B. cereus 菌株は研究室保存の食中毒由来菌株: No.13の嘔吐型株とNo.48の下痢型株である。各種選択培地での *B. cereus* のコロニー特異性を検討するため、グラム陰性菌である *E. coli* O157:H7 (VT1&VT2: EHEC) を含む12種の大腸菌、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*V. parahaemolyticus*、*C. jejuni*、*Y. enterocolitica*、グラム陽性菌の *L. monocytogenes*、*S. aureus* (毒素型A、B、C、D、E、H、TSST-1、MRSA)、*B. cereus* を含む7菌株の *Bacillus*

属菌、*Clostridium* 属の *C. botulinum*、*C. perfringens* 2菌株の、総計39菌株を用いた。*B. cereus* 選択培地の交差試験の結果を表6に示した。*B. cereus* 選択培地上で *S. Enteritidis*、*L. monocytogenes*、*S. aureus* (毒素型A、B、C、TSST-1)、*B. cereus* は発育したが、*B. cereus* のみが典型的コロニーを示し、5種の市販選択培地は *B. cereus* に対する特異性が高いことが明らかであった。

表6 各種腸管病原菌の生育の有無

Species	Serovar/Toxigenicity/Origin	NGKG		MYP (A社)		MYP (B社)		PEMBA		CHROMagar	
		生育	コロニー ¹⁾	生育	コロニー ¹⁾	生育	コロニー ¹⁾	生育	コロニー ¹⁾	生育	コロニー ¹⁾
1 <i>E. coli</i>	O127:H2 (EPEC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 <i>E. coli</i>	O124:HNM (EPEC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 <i>E. coli</i>	O157:H7 (V1&V2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 <i>E. coli</i>	O157:H7 (V1&V2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 <i>E. coli</i>	O157:H7 (V2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 <i>E. coli</i>	O157:H7 (non VT1/ATCC43888)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7 <i>E. coli</i>	O111:HNM (VT1&VT2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8 <i>E. coli</i>	O26:H11 (VT1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9 <i>E. coli</i>	ST and LT producer (ETEC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 <i>E. coli</i>	type I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 <i>E. coli</i>	V 517	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12 <i>E. coli</i>	IP03001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13 <i>S. aureus</i>	from food	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14 <i>C. freundii</i>	from food	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15 <i>S. Enteritidis</i>	from patient	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
16 <i>S. Typhimurium</i>	from patient	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17 <i>V. parahaemolyticus</i>	from fish	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18 <i>V. parahaemolyticus</i>	from fish	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19 <i>C. jejuni</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20 <i>Y. enterocolitica</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21 <i>A. hydrophila</i>	from water	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22 <i>L. monocytogenes</i>	—	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—
23 <i>S. aureus</i>	Enterotoxin A producer	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—
24 <i>S. aureus</i>	Enterotoxin B producer	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—
25 <i>S. aureus</i>	Enterotoxin C producer	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—
26 <i>S. aureus</i>	Enterotoxin D producer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27 <i>S. aureus</i>	Enterotoxin E producer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
28 <i>S. aureus</i>	Enterotoxin H producer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29 <i>S. aureus</i>	TSST-1	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—
30 <i>S. aureus</i>	Methicillin resistant strain	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
31 <i>B. cereus</i>	Emetic toxin producer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32 <i>B. cereus</i>	Diarrheal toxin producer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33 <i>B. cereus</i>	IP013484	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34 <i>B. subtilis</i>	PC1219	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35 <i>B. licheniformis</i>	ATCC14580	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36 <i>B. licheniformis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37 <i>B. pasteurii</i>	from air	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38 <i>C. botulinum</i>	A type toxin producer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
39 <i>C. perfringens</i>	Hobbs type 13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1) *B. cereus* の典型的なコロニーが発育したもの

③ 5種の市販選択培地における *B. cereus* の回収実験

選択培地での *B. cereus* の検出感度を検討するため、5種の市販選択培地における *B. cereus* の回収実験を行っ

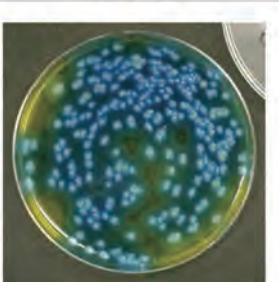
培地名	CHROMagar	PEMBA寒天培地	NGKG培地	MYP寒天培地
培養所見				
培地構成	【基礎培地】 クロモアガーパチルスセウス基礎培地 【添加試薬】 付属サプリメント	【基礎培地】 パチルスセウス選択寒天基礎培地 【添加試薬】 ポリミキシンBサプリメント 卵黄乳液	【基礎培地】 NGKG寒天基礎培地 【添加試薬】 卵黄乳液	【基礎培地】 セレウス菌選択寒天培地 【添加試薬】 卵黄乳液
培養条件	30℃, 24時間	35℃, 24時間	30℃, 18~24時間	32℃, 18~40時間
集落	<i>Bacillus cereus</i> → 青色の集落に白色のハローを形成 その他の <i>Bacillus</i> 属 → 青色、無色の集落、もしくは発育抑制 グラム陰性金 → 発育抑制 カビ・酵母 → 発育抑制	<i>Bacillus cereus</i> → ビーコックブルーの集落、卵黄反応陽性 <i>Bacillus subtilis</i> → 変色の集落 <i>Escherichia coli</i> → 発育抑制	<i>Bacillus cereus</i> → 白色集落、周囲は濁った赤色、 卵黄反応陽性 その他の微生物 → 抑制もしくは微小コロニー	<i>Bacillus cereus</i> → ピンク~紫色、卵黄反応陽性 その他 → 発育抑制もしくは区別可能な集落
備考	酵素基質、ハローの形成により他菌種とのスクリーニングが容易	卵黄反応、マンニト非分解性、培地のアルカリ化(集落と周辺が青色)によりスクリーニングをする。	卵黄反応、培地のアルカリ化(集落周辺が濁った赤色)によりスクリーニングをする。	卵黄反応、マンニト非分解性によりスクリーニングをする。

図5 選択培地上での *B. cereus* の培養所見・培地構成・培養条件・集落について

た結果、5種選択培地はそれぞれ嘔吐型菌、下痢型菌ともに感度よくコロニーを形成し、また培地間に差はみられなかった(表7)。

表7 各種分離培地における*B. cereus*の回収率

評価培地	嘔吐型 <i>B. cereus</i> 回収率(%)			毒素型 <i>B. cereus</i> 回収率(%)		
	M±SD ¹⁾	評価培地/TSA	評価培地/BHI	M±SD	評価培地/TSA	評価培地/BHI
NGKG	370±26.8 (7.2) ²⁾	124.1	108.9	263±23.8 (9.0)	106.8	112.3
MYP(A社)	333±29.9 (9.0)	111.6	97.9	234±18.6 (7.9)	95.4	100.3
MYP(B社)	343±37.2 (10.9)	115.0	100.9	228±18.0 (7.9)	92.6	97.3
PEMBA	303±31.8 (8.8)	121.8	106.7	224±32.7 (13.4)	99.3	104.4
CHROMagar	354±35.5 (10.0)	118.8	104.2	254±25.5 (10.0)	103.3	108.6
TSA	298±18.1 (6.1)	100.0	87.8	246±25.3 (10.3)	100.0	105.1
BHI	340±19.0 (5.6)	114.0	100.0	234±29.6 (12.6)	95.1	100.0

¹⁾32℃, 16時間培養

²⁾1)平均値±標準偏差, 2)変動係数

④ *B. cereus* 検出のために用いた土壌・食品

B. cereus 検出のために、土壌試料4種(水田、畑、グラウンド、花壇)、野菜7種(ほうれん草、サニーレタス、パセリ、みょうが、万能ねぎ、ジャガイモ、切干大根)、乾燥食品その他4種(とろろ昆布、スキムミルク、酒粕、握り飯)を用いた。

添加回収実験として *B. cereus* が検出されなかった生魚生肉5種(鰻、鰯、牛肉、豚肉、鶏肉)、乳製品2種(牛乳、チーズ)、複合調理食品その他6種(チャーハン、焼き飯、ピラフ、スパゲッティ、調理パン、シーフードミックス)の合計13種食材を用いて実験を行った結果、5種の市販選択培地間での有意差は見られず、検出感度に差が認められなかった(表8)。以上の結果から、5種の市販

選択培地は問題なく *B. cereus* を検出できることが明らかであった。また、特に、CHROMagar *B. cereus* 上での培養所見は明確な色彩と集落を示し *B. cereus* の判定が容易であった。

(4) 嘔吐毒遺伝子検査の方法

嘔吐毒を産生する *B. cereus* 検出のための遺伝子検査法はPCR法やReal time PCR法で行うことができる。なお、Fricker等のPrimerは嘔吐毒合成酵素遺伝子を標的とし、各種腸管病原菌や*Bacillus*属間でも特異性が高く、また、食品、水、糞便中からの直接検出に対しても特異性の高い有効なPrimerである。

① PCR 法

PrimerセットにはCACGCCGAAAGTGATTATACCAAとCACGATAAAACCACTG-AGATAGTGを用い、増幅産物の分子量は176bpである。増幅条件はDenaturation: 94℃、1分 / Annealing: 55℃、1分 / Polymerization: 72℃、1分の35回繰り返すと良い。

また、PCR法キットも市販されているが、菌株によって嘔吐毒合成遺伝子を保有していても嘔吐毒を産生しない株もみられることから注意が必要であり、さらに *B. cereus* による食中毒を、直接明らかにするものでない。

② Real time PCR 法

何らかの方法で酵素反応により蛍光が発するようになる。これには、いくつかの方法がある。主な方法として、イ

表8 食材への嘔吐型*B. cereus* 菌の添加回収試験成績

	アジ		タラ		シーフードミックス		チャーハン		焼き飯		ピラフ		スパゲッティ	
	<i>B. cereus</i> M±SD ²⁾	一般生菌数 ¹⁾ 菌数 ³⁾	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数
NGKG	2.8±0.3 (8.9) ⁴⁾	4.1	3.0±0.2 (5.1)	5.6	3.0±0.1 (3.9)	4.2	2.9±0.1 (4.0)	2.7	2.9±0.3 (9.1)	2.6	2.7±0.1 (4.3)	2.6	2.9±0.1 (4.0)	2.4
MYP(A社)	2.3±0.5 (22.6)	4.3	3.0±0.4 (13.7)	5.7	2.7±0.2 (7.6)	3.5	2.6±0.1 (4.4)	2.7	2.6±0.36 (10.2)	2.5	2.7±0.2 (7.4)	2.6	2.5±0.5 (18.2)	2.4
MYP(B社)	2.9±0.2 (5.2)	4.3	2.8±0.1 (2.1)	5.7	2.7±0.1 (3.7)	4.3	2.9±0.2 (6.0)	2.8	2.9±0.1 (3.4)	2.9	2.7±0.2 (7.6)	2.6	2.7±0.2 (7.6)	2.5
PEMBA	2.9±0.2 (6.0)	4.3	2.7±0.2 (5.6)	5.7	2.8±0.1 (2.1)	4.2	2.7±0.0 (0.0)	2.7	2.9±0.1 (3.4)	2.7	2.9±0.1 (3.4)	2.7	2.8±0.1 (2.1)	2.5
CHROMagar	3.1±0.2 (4.9)	4.2	2.7±0.1 (2.2)	5.7	3.0±0.1 (3.3)	4.2	3.1±0.1 (1.9)	2.8	2.8±0.2 (7.1)	2.7	2.8±0.3 (8.9)	2.6	2.7±0.3 (12.1)	2.6

	調理パン		牛肉		豚肉		鶏肉		牛乳		チーズ	
	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数	<i>B. cereus</i> M±SD	一般生菌数 菌数
NGKG	3.2±0.1 (3.1)	2.7	2.5±0.5 (18.2)	5.1	2.4±0.1 (4.9)	5.7	2.6±0.5 (19.2)	4.6	2.9±0.2 (6.0)	2.6	2.7±0.1 (4.2)	2.3
MYP(A社)	2.7±0.1 (2.1)	2.8	2.6±0.3 (11.6)	5.1	2.3±0.3 (13.0)	5.7	2.8±0.2 (5.5)	4.7	2.9±0.2 (6.0)	2.6	2.7±0.2 (6.4)	2.6
MYP(B社)	2.9±0.1 (4.0)	2.8	2.8±0.1 (2.0)	5.0	2.3±0.3 (11.1)	5.2	2.6±0.3 (9.8)	4.5	2.8±0.1 (2.1)	2.5	2.5±0.4 (16.9)	2.6
PEMBA	3.0±0.2 (5.1)	2.9	2.5±0.2 (6.9)	5.0	2.6±0.1 (2.2)	5.6	2.6±0.3 (11.5)	4.7	2.6±0.5 (19.2)	2.6	2.4±0.4 (17.1)	2.6
CHROMagar	2.8±0.1 (3.6)	2.9	2.6±0.3 (11.5)	4.8	2.6±0.3 (10.2)	5.7	2.8±0.3 (8.9)	4.7	2.5±0.5 (18.3)	2.5	2.8±0.0 (0.0)	2.5

食材由来の *B. cereus* は検出されなかった

1)普通寒天培地を用いた混濁平板法, 2)log表示, 3)平均値±標準偏差, 4)変動係数

インターカレート法とTaqManプローブ法があるが、これ以外にモレキュラービーコン法、ハイブリプローブ法などがある。

i. インターカレート法

PCR反応の際に合成された二本鎖DNAに結合し蛍光を発するSYBR Green Iなどの蛍光色素を取り込ませ（インターカレート）、PCR反応に応じた蛍光を検出する。Primerセットは次のようである：

ces-SYBR-FCACGCCGAAAGTGATTATACC

ces-SYBR-RCACGATAAAACCACTGAGATAGTG

増幅条件は95℃、10分（amplitaq gold activation hot start）と95℃、15秒、60℃、1分を40回繰り返す。さらに95℃、15秒 / 60℃、60秒 / 95℃、15秒（Melting curve）操作する。

ii. TaqManプローブ法

2つのPCR Primerに囲まれた増幅配列とハイブリダイズできる第3のオリゴヌクレオチドプローブを準備する。この第3のプローブの5'、3'両末端におおの別の蛍光色素を結合させておく。PCR反応に伴い、TaqDNAポリメラーゼが持つ5'、3'エキソヌクレアーゼ活性により第3のプローブは分解し、Fluorescence resonance energy transfer効果がなくなり出てきた蛍光を検出する。

TaqManプローブ法のPrimerセットは次のようである：

ces_TaqMan_for CGCCGAAAGTGATTATACCAA

ces_TaqMan_rev TATGCCCCG-TTCTCAAA-CTG

ces_TaqMan_probe FAM-GGGAAAATA-

ACGAGAAATGCA-MGB

増幅条件は50℃、2分（UNG activation）と95℃、10分（amplitaq gold activation hot start）、さらに95℃、15秒 / 60℃、60秒を40回繰り返す。Real time PCR法の機器

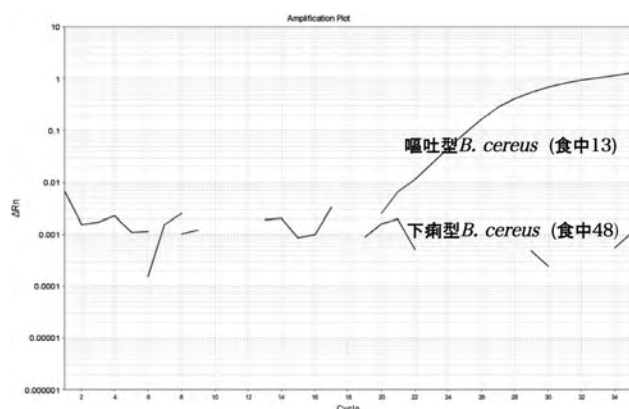


図6 TaqManプローブ法・Real Time PCRによる*B. cereus*嘔吐型（陽性）と下痢型（陰性）の増幅

はApplied Biosystems Step one systemを用いると良い。なお、TaqManプローブ法についての実験方法を下記に示した。なお、TaqManプローブ法およびReal time PCR法の嘔吐方（陽性）と下痢型（陰性）の増幅結果を図6に示した。

*TaqManプローブ法を用いたReal time PCR法

1. Template DNAを作成する。

分離平板上の1コロニーを90μlのTE Buffer（Tris-HCl, 1mM EDTA）に加え、95℃で5分間加熱する。芽胞形成菌は20分間、加熱する。加熱後、遠心分離（10,000rpm、3分間）し、その上清を鋳型DNAとしてReal time PCRに用いる。

2. 試験検体分の試薬を下記の容量で1.5ml容チューブにまとめて調整する。

	1 サンプル
D.W.	7μl
2x TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	10μl
20xTaqMan [®] probe and F,R primer premix	1μl
Total	18μl

3. 各ウェルに18μlずつに分注する。

4. 各ウェルにTemplate DNAを2μlずつ分注する。

5. ウェルの側壁に液が付着していない、ウェルの底に気泡がないことを確認し、プレートにフィルムを密着させる。

6. StepOne real-time PCR systemにセットする。

7. ターゲット遺伝子名、サンプル名等を入力する

8. PCRサイクルコンディションを入力する。

① UNG activation : 50℃ for 2 min.

② AmpliTaq Gold activation(hot start) : 95℃ for 10 min.

③ Cycling Condition : 95℃ for 15 sec. / 64℃ for 60 sec. / 35 cycle

9. 機器のスタート

(5)下痢毒遺伝子の検査

下痢毒を産生する遺伝子によるPCR法のPrimerについては多くの報告があるが、特異的Primerは明らかでない。また、多種由来の菌株のうち下痢毒産生*B. cereus*は90%以上の菌株にみられ、下痢毒を産生するからと

いて、食中毒原因菌と決定づけることは出来ない。食中毒発症に関与する菌株は、その毒素産生活性が2 μ g/ml以上の菌株が対象となる。

4. 予防

*B. cereus*は環境細菌であり、一般に食品からは10³/g程度の菌数が検出され、下痢毒あるいは嘔吐毒を産生する菌株がしばしば認められる。*B. cereus*による下痢型食中毒菌は健康人では10⁷~10⁸/g以上の摂取菌量がなければ感染しない。また、嘔吐型食中毒に関しても同様の菌量がなくては食品中で発症毒素量を形成することは不可能である。このことから一般食品で通常みられる程度の本菌量では感染は成立しない。しかし、本菌は耐熱性芽胞を形成することから、焼飯類のように加熱調理食品であっても、保存・取扱いに欠陥があると発芽・増殖し、それによって発症菌量に達するようになる。それ故に加熱食品といえども調理後なるべく速く喫食させる必要があり、またすぐに喫食しない場合には、低温保存等(10℃以下)の適切で衛生的な取扱いを配慮する必要がある。本食中毒患者は経過が良好であり、ほとんど一両日中に回復する。このことから治療についてはあまり重要視されていない。

おわりに

*B. cereus*は環境細菌の一つであり、広く環境に分布する。食中毒の原因となる本菌は下痢毒や嘔吐毒を産生する。特に下痢毒産生菌は環境中からしばしば検出される。このことから、毒素産生・活性量の把握が重要となる。

また、食品の安全性評価のためには本菌の菌数測定と、分離菌の血清型や毒素(嘔吐毒・下痢毒)産生能を測定しておく必要があり、これは汚染源の追究や汚染防止対策を立てる上で重要である。一方、嘔吐毒検出試験法に関して培養細胞や機器分析によるLC/MS検定に関しては、前者には技術を必要とし、後者は機器が高価であり、両者とも一般的でない。このことから嘔吐毒の検出のためにさらに正確・簡便・迅速な検出法の開発が望まれる。

参考文献

- 1) Schoeni, J.L.; Wong, A.C. J. Food Prot. 2005, 68(3), 636-648.
- 2) 上田成子. “セレウス菌”. HACCP衛生管理計画の作成と実践 改定データ編. 熊谷進 編集代表. 中央法規出版, 2003, p.122.
- 3) Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Haapasalo, M. Microbes and Infection. 2000, 2, 1 89-198.
- 4) Berner, R.; Heinen, F.; Pelz, K.; van Velthoven, V.; Sauer, M.; Korinthenberg R. Neuropediatrics. 1997, 28, 333-334.
- 5) Hauge, S. J. Appl. Bacteriol. 1955, 18, 591-595.
- 6) Mossel, D.A.; Koopman, M.J.; Jongerius, E. Appl. Microbiol. 1967, 15, 650-653.
- 7) “Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks --- United States, 2008”. Morbidity and Mortality Weekly Report. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w
- 8) European Food Safety Authority. EFSA Journal. 2011, 9(3), 2090.
- 9) 厚生省環境衛生局食品衛生課編. 全国食中毒事件録(昭和53-平成10年度版), 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課編. 全国食中毒事件録(平成11-21年度版). 日本食品衛生協会, (1980-2012).
- 10) 財団法人厚生統計協会編. 国民衛生の動向. (2010-2012年).
- 11) Shinagawa, Y.; Ueno, Y.; Hu, D.; Ueda, S.; Sugi, S. Vet. Med. Sci. 1996, 58, 1027-1029.
- 12) Kramer, J.M.; Gilbert, R.J. “Bacillus cereus and other Bacillus species”. Foodborne Bacterial Pathogens. ed. Doyle, M.P. New York, Marcel Dekker Inc., 1989, 21-27.
- 13) Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington D.C., ASM Press, 1997, 768p.
- 14) Isobe, M.; Ishikawa, T.; Suwan, S.; Agata, N.; Ohta, M. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1995, 5, 2855-2858.
- 15) 上田成子. 食衛誌. 1996, 37(3), J145-J154.
- 16) Granum, P.E.; Baird-Parker, T.C. “Bacillus species”. The Microbiological Safety and Quality of food. Lund, B.M.; Baird-Parker, T.C.; Gould, G.W. (eds). Gaithersburg, Aspen Publishers, 2000, 1029-1039.
- 17) de Vasconcellos, F.J.M.; Rabinovitch, L. J. Food Prot. 1995, 58(3), 235-238.
- 18) Hughes, S.; Bartholomew, B.; Hardy, J.C.; Kramer, J.M. FEMS Microbiol. Lett. 1988, 52, 7-11.
- 19) Ueda, S.; Kuwabara, Y. Biocontrol Science. 2011, 16(1), 41-45.
- 20) Ueda, S.; Nakajima, H.; Iwase, M.; Shinagawa, K.; Kuwabara, Y. Biocontrol Science. 2012, 17(4), 191-195.

カルボニル化合物の 高効率な還元的アミノ化触媒の開発

Development of Highly Efficient Catalysts for Reductive Amination of Carbonyl Compounds

関東化学株式会社 技術・開発本部 中央研究所 第一研究室 主任研究員 渡辺 正人

Masahito Watanabe

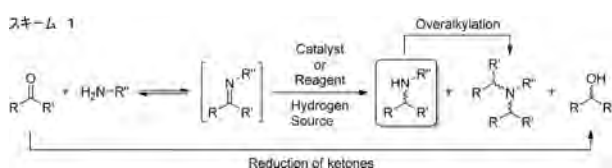
*Chief Researcher, Central Research Laboratory, Technology and Development Division,
Kanto Chemical Co., Inc.*

1. はじめに

アミン化合物は、医薬品、農薬、機能性材料、食品添加物などに含まれる重要な有機化合物である。そのために従来から多くの合成法が知られており、現在でも多種多様な合成法の開発が盛んに行われている。その中でも汎用性の高い手法の一つとして定着しているのが、カルボニル化合物の還元的アミノ化反応である。スキーム1に示すように、カルボニル化合物とアミン化合物からイミン、または、イミニウムイオンを反応系中で生成させ、ついで還元反応、または、水素化反応によりアミン化合物を合成する反応である。2段階の反応を1つの反応容器(1ポット)で実施できることから、製造コストの低減化に有効であり、プロセス化学において推奨される反応の1つである。

しかし、反応は単純ではなく、副生成物を生じさせる問題が内在している。1つめは、生成したアミンが原料のカルボニル化合物と反応してイミンを形成し、これが還元されて過アルキル化反応が進行することである。2つめは、原料のカルボニル化合物がイミンを形成せずにそのまま還元されてアルコール体を与えてしまうことである。本反応では、常にこれら二つの副反応を制御しなければならない困難さを伴っている。

スキーム 1



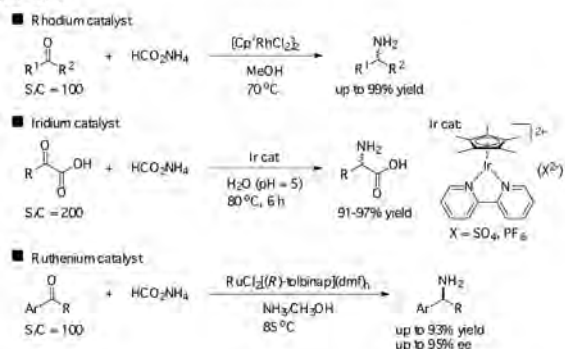
本反応でこれまでに汎用されてきた化学量論量の反

応剤、または、触媒に着目すると、改善の余地が残されているものが多い。例えば、化学量論量の反応剤として古くから知られているNaBH₃CNは、その毒性や廃液処理の観点から工業的使用には難がある。最近では毒性の低さからNaBH(OAc)₃が推奨されているものの、反応に関与するヒドリドが分子内に1つのみであることから、一般的には量論量以上を用いる必要がある。ピリジンボランは熱的安定性に課題があるとされており、これを改良した2-ピコリンボランが開発された。触媒では、Pd/C、Raney-Ni、および、Pt/Cなどの不均一系触媒が汎用されてきた。反応後に濾過するだけで触媒を除去できる利点があり、工業的に利用される手法の1つであるが、分子内にニトロ基、シアノ基、および、炭素-炭素多重結合などの官能基を有する基質の場合、それらの官能基を損なう場合があることから基質の適用範囲が限定されるという欠点がある。以上のことから、副反応を伴わず、高効率で操作性や安全性に優れた還元的アミノ化触媒の開発が望まれていることがわかる。

そのアプローチの一つとして、均一系触媒を用いる水素化反応¹⁾が開発されてきた。近年では、より操作性や安全性に優れた方法として水素移動型反応の開発が進み、ルテニウム²⁾、ロジウム³⁾、または、イリジウム⁴⁾を中心金属とする均一系触媒存在下、水素源として安価なギ酸、または、ギ酸塩を用いるLeuckart-Wallach反応やLeuckart反応が開発されている。その先駆的な触媒反応例をいくつか紹介する。Kitamuraらは、スキーム2に示すようにロジウム錯体存在下、ケトンとギ酸アンモニウムとの還元的アミノ化反応により対応する第1級アミンを高選択的に与えることを見いだした^{3a)}。イリジウム錯体

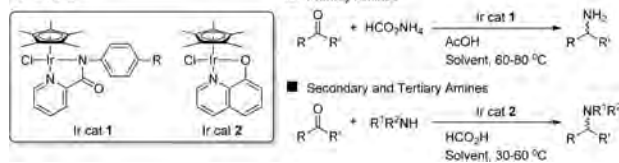
を用いる還元的アミノ化反応としてOgo、FukuzumiらはCp*イリジウム-ピリジル錯体を用い、弱酸性条件下で α -ケト酸とギ酸アンモニウムとの反応により対応する α -アミノ酸を与えることを見いだした^{4a)}。ルテニウム錯体を用いた反応では、Kadyrovらがキラルルテニウム-ジホスフィン錯体触媒を用いた不斉還元的アミノ化反応を報告しており、高い光学純度のアミンが得られる^{2a)}。また、ケトン類やイミン類の優れた水素移動型不斉還元触媒として知られているキラルルテニウムアレーン錯体⁵⁾を用いた不斉還元的アミノ化反応も報告されている^{2b, c)}。これらは安全性や操作性の面からは望ましい反応であるものの、実用的な観点からは触媒効率の向上が望まれる。

スキーム 2



以上の背景をもとに、弊社では水素移動型反応による還元的アミノ化反応に着目し、高活性で実用性に優れた還元的アミノ化触媒の開発をめざし研究を行ってきた。その結果、スキーム3に示すように、ピコリンアミド配位子、および、8-キノリノール配位子をもつ18電子の配位飽和なCp*イリジウム錯体、および、Cp*ロジウム錯体が、水素移動型反応による還元的アミノ化反応の触媒として極めて有効であることを見いだした。本稿では、これらのイリジウム錯体触媒の反応例や特徴を中心に紹介する。

スキーム 3



2. イリジウム錯体触媒を用いる第1級アミンの合成

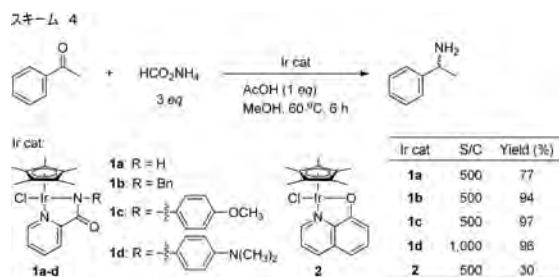
第1級アミンはアミノ基を起点として様々な化合物に

誘導化できることから、簡便で高効率な第1級アミンの合成法は有機合成において最重要な合成反応の一つである。従来よりハロゲン化アルキルを出発原料とするGabriel合成などの様々な第1級アミンの合成法が知られているが、触媒存在下、カルボニル化合物とアンモニア、または、アンモニウム塩からの直接的な還元的アミノ化反応による報告例は少なく、特に穏和な条件で簡便に合成する方法はほとんど知られていない²⁻⁴⁾。その理由の一つとして、スキーム1で述べたように、過アルキル化反応やカルボニル化合物の還元反応の制御が困難であることが主な理由であると考えられる。それ故に、一般的にはカルボニル化合物とベンジルアミンなどの脱保護可能なアミンとを作用させてイミンを形成させた後、還元、または水素化により対応する第2級アミンを合成し、ついで脱保護反応により第1級アミンを取得する方法が行われている。この方法は最短で2工程を要する。還元的アミノ化反応により1工程で簡便、かつ、高効率に第1級アミンを取得できる方法の開発は極めて重要な課題となる。

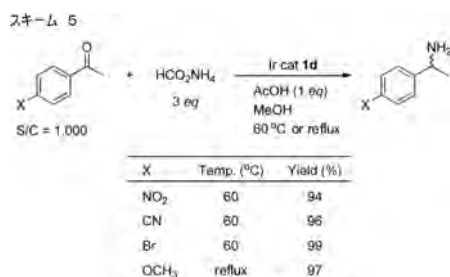
このような背景のもと、弊社では第1級アミン合成に適した触媒開発を進めたところ、ピコリンアミド配位子をもつCp*イリジウム錯体**1**が、第1級アミンの合成に極めて有効な触媒であることを見いだした。本触媒を用いる反応はギ酸アンモニウムを水素源、および、アミン源とする水素移動型条件下で進行することから、耐圧容器などの特殊な反応容器を必要とせず、一般的なガラス製容器を用いて反応を行なえる。反応の進行に伴って二酸化炭素が発生するので密封系での反応は避け、不活性ガスのラインに繋いで反応を実施すればよい。この点は後述するように第2級アミン、および、第3級アミンの合成においても同様である。触媒効率も高く、立体的に嵩高い基質であれば、基質/触媒モル比(S/C) = 1,000 (0.1 mol %)の条件で円滑に反応が進行する場合が多い。触媒は空气中で安定に取り扱え、60℃、もしくは、還流条件下で実施可能であることから実用性も高い。

スキーム4には、種々のピコリンアミド配位子や8-キノリノール配位子をもつCp*イリジウム錯体を用いるアセトフェノンとギ酸アンモニウムとの反応結果を示す。錯体構造に着目すると、ピコリンアミド配位子をもつ錯体(**1a-d**)はより高い触媒活性を示した。窒素上の置換基が重要であり、無置換の錯体**1a**より、電子供与性のアルキル基

やアリール基が置換した錯体(1b-c)が本反応では高い触媒活性を示す。特に、錯体1dを用いた場合、基質/触媒モル比(S/C) = 1,000の条件下、対応する第1級アミンを収率96%で与えた。なお、等電子構造をもつロジウム錯体は低活性であった。一方、後述するように第2級、および、第3級アミン合成に適した8-キノリノール配位子をもつイリジウム錯体2は本反応では低活性であった。

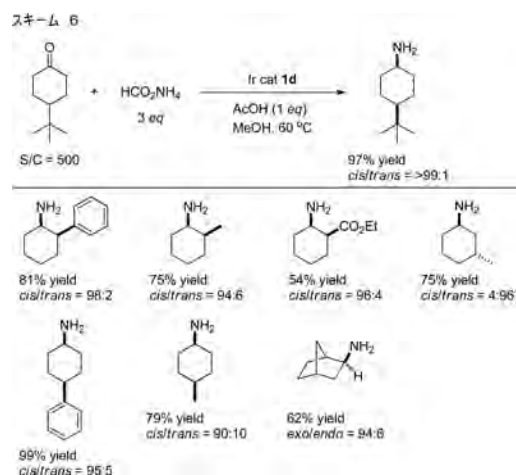


本触媒は官能基選択性にも優れ、スキーム5に示すように、基質/触媒モル比(S/C) = 1,000の条件下、電子求引性基のニトロ基、シアノ基、または、臭素基をもつアセトフェノン類からも60 °C、6時間の反応で官能基を損なうことなく対応する第1級アミンが効率的に得られる。過アルキル化体やアルコール体の生成も僅かであることから、極めて効率的な第1級アミンの合成法といえる。また、電子供与性基であるメキシ基をもつ基質の場合、還流条件下で円滑に反応が進行し、収率97%で対応するアミンが生成する。



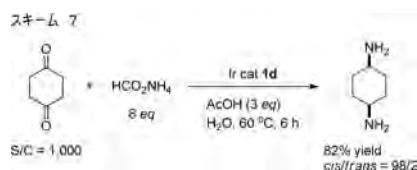
さらに本触媒は、置換基をもつ環状ケトン類の高ジアステレオ選択的な還元的アミノ化反応にも適用できることがわかった。例えば、スキーム6に示すように4-tert-ブチルシクロヘキサノンとギ酸アンモニウムとの反応では、基質/触媒モル比(S/C) = 500の条件下、基質に対して3当量のギ酸アンモニウム、1当量の酢酸を加え、メタノール中、60 °Cで反応させることにより、97%収率で4-tert-ブチルシクロヘキシルアミンを与え、cis/trans = 99:1

trans比は> 99:1と高ジアステレオ選択的に反応が進行した。同様に、他の環状ケトン類の反応にも有効であり、2位に置換基をもつケトン類では高シス選択的に反応が進行し、対応する第1級アミンを与える。3位に置換基をもつケトン類の反応ではトランス選択的に反応が進行し、また、4位に置換基をもつ基質ではシス選択的に反応が進行する。



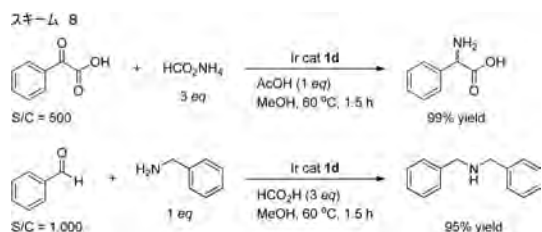
このように、置換基をもつ環状ケトン類の反応では高ジアステレオ選択的な反応が可能であることから、1,4-シクロヘキサンジオンの反応に適用し、ポリマー原料としての使用が期待されるシス-1,4-シクロヘキサンジアミンの合成を行った。スキーム7に示すように基質/触媒モル比(S/C) = 1,000の条件下、基質に対して8当量のギ酸アンモニウム、3当量の酢酸を用い、水中で60 °C、6時間反応させることにより、cis/trans = 98:2のシス-1,4-シクロヘキサンジアミンを収率82%で与えた。本反応では、反応溶媒としてメタノールを用いるよりも水中での反応が副生成物の割合が少なく好適であった。

本法により得られるシス-4-tert-ブチルシクロヘキシルアミン塩酸塩、および、シス-1,4-シクロヘキサンジアミンは弊社から試薬として入手可能であり、バルク供給にも対応可能である。



その他の反応として、スキーム8に示すようにα-ケト酸とギ酸アンモニウムとの反応に適用すると、対応するα

ーアミノ酸を定量的に得ることが可能である。また、本触媒は基質によっては第2級アミンの合成にも用いることが可能で、例えばベンズアルデヒドに対して1当量のベンジルアミンを用い、ギ酸を水素源として反応を行うことで対応するジベンジルアミンを収率95%で与える。



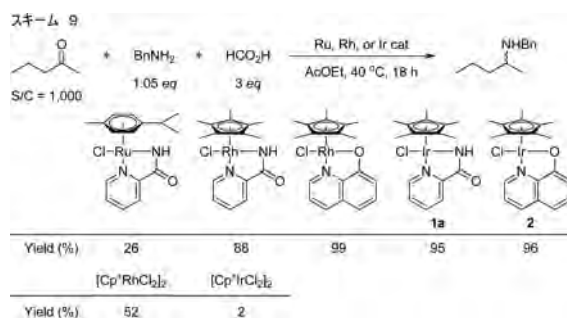
以上、ピコリンアミド配位子をもつCp*イリジウム錯体触媒 **1d** による様々な第1級アミンの合成例を示した。実際の使用にあたっては、基質の種類によりギ酸アンモニウム量や酢酸量、反応温度、基質濃度、および、反応溶媒を最適化することで、最も高い収率が得られる。

3. イリジウム、および、ロジウム錯体触媒を用いる第2級アミン合成

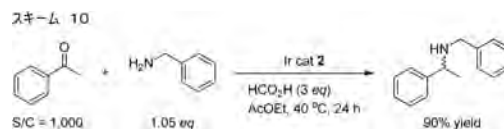
前述の第1級アミンの合成触媒に引き続き、第2級アミン合成に適した触媒開発を進めたところ、8-キノリノール配位子をもつCp*イリジウム錯体、および、Cp*ロジウム錯体が、第2級アミンの合成に極めて有効な触媒であることを見出した。本触媒も上述したピコリンアミド錯体と同様、水素移動型条件下で反応が進行し、ギ酸を水素源とすることから一般的なガラス製容器を用いて容易に反応を実施できる。基本的な反応条件は、カルボニル化合物、アミン化合物、ギ酸、溶媒、および、触媒を混合し、室温から60℃程度の温度で攪拌するだけで対応する第2級アミンが得られる。

最初に、スキーム9に示すように、脂肪族ケトンとの反応を行なった。ピコリンアミド配位子、または、8-キノリノール配位子をもつルテニウム、ロジウム、または、イリジウム錯体存在下(基質/触媒モル比(S/C) = 1,000)、ギ酸を3当量、溶媒として酢酸エチルを用い、40℃、16時間の反応を行なったところ、ピコリンアミド配位子をもつルテニウム錯体では対応する第2級アミンが低収率であったのに対し、同配位子をもつロジウム錯体、および、イリジウム錯体では定量的に反応が進行した。また、8-キノリノール配位子を

もつロジウム錯体、および、イリジウム錯体も高い触媒活性を有することがわかった。一方、これら錯体の原料である[Cp*RhCl₂]₂錯体、および、[Cp*IrCl₂]₂錯体を本反応に用いると低収率であることから、8-キノリノールやピコリンアミドを配位子にもつイリジウム錯体、および、ロジウム錯体が第2級アミンの合成に極めて効果的であることがわかる。



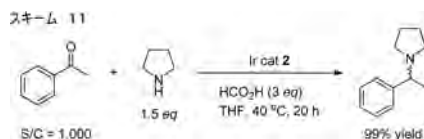
次に、スキーム10に示すように8-キノリノール配位子をもつイリジウム錯体 **2** の存在下(基質/触媒モル比(S/C) = 1,000)、芳香族ケトンのアセトフェノンと小過剰量のベンジルアミンとの還元的アミノ化反応を酢酸エチル中、40℃、24時間の条件で行ったところ、対応する第2級アミンを収率90%で与えた。



4. イリジウム錯体触媒を用いる第3級アミン合成

第2級アミン合成と同様に、第3級アミン合成においても8-キノリノールを配位子にもつCp*イリジウム錯体を用いることが可能である。スキーム11に示すように、イリジウム錯体 **2** の存在下(基質/触媒モル比(S/C) = 1,000)、THF中、40℃、20時間の条件でアセトフェノンとピロリジンの反応を検討したところ、対応するアミン化合物がほぼ定量的に得られた。反応溶媒としては、THF以外にCPMEやMTBE等のエーテル系溶媒、および、トルエンや酢酸エチルなどの非プロトン性溶媒が良好な結果を与えた。本反応では、用いるアミン量が少なく、また、反応溶媒の種類によってもアルコール体の

生成割合が異なる。効率的な反応を構築するためには、適切なアミン量、および、反応溶媒の選択が重要となる。



5. おわりに

ピコリンアミド配位子、および、8-キノリノール配位子をもつ Cp^* イリジウム錯体、および、 Cp^* ロジウム錯体が還元的アミノ化触媒として極めて高い触媒性能を有することを見だし、第1級アミン、第2級アミン、および、第3級アミンの高効率な合成が可能となった。本触媒の最も特筆すべき特徴は、簡便な反応操作で極めて効率的に第1級アミンの合成が可能になったことである。イリジウム錯体 **1d**、および、**2** は弊社にて試薬として販売しており、バルク供給も可能である。また、これらの錯体触媒を用いたアミン化合物の受託製造や製法の受託開発にも応じている。これらのイリジウム触媒が、ラボスケールから工業的規模までアミン合成のための実用的なツールの1つとして広く用いられることを期待したい。

参考文献

- 1) For recent examples of homogeneous hydrogenative reductive amination, see: a) Blaser, H.U.; Buser, H.P.; Jalett, H.P.; Pugin, B.; Spindler, F. *Synlett*. 1999, 867-868.; b) Tararov, V.I.; Kadyrov, R.; Riermeier, T.H.; Börner, A. *Chem. Commun.* 2000, 1867-1868.; c) Gross, T.; Seayad, A.; Mobaligh, A.; Beller, M. *Org. Lett.* 2002, 4, 2055-2058.; d) Chi, Y.; Zhou, Y.G.; Zhang, X.; *J. Org. Chem.* 2003, 68, 4120-4122.; e) Kadyrov, R.; Riermeier, T.H.; Dingerdissen, U.; Tararov, V.; Börner, A. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 4067-4070.; f) Williams, G.D.; Pike, R.A.; Wade, C.E.; Wills, M. *Org. Lett.* 2003, 5, 4227-4230.; g) Imao, D.; Fujihara, S.; Yamamoto, T.; Ohta, T.; Ito, Y. *Tetrahedron*. 2005, 61, 6988-6992.; h) Bunlaksanansorn, T.; Rampf, F. *Synlett*. 2005, 2682-2684.; i) Robichaud, A.; Ajjou, A.N.; *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 3633-3636.; j) Rubio-Pérez, L.; Pérez-Flores, F.J.; Sharma, P.; Velasco, L.; Cabrera, A. *Org. Lett.* 2009, 11, 265-268.; k) Steinhuebel, D.; Sun, Y.K.; Matsumura, K.; Sayo, N.; Saito, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 11316-11317.; l) Li, C.; Villa-Marcos, B.; Xiao, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 6967-6969.; m) Sreedhar, B.; Reddy, P.S.; Devi, D.K. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 8806-8809.; n) Werkmeister, S.; Junge, K.; Beller, M. *Green Chem.* 2012, 14, 2371-2374.
- 2) For selected studies using Ru catalysts, see: a) Kadyrov, R.; Riermeier, T.H. *Angew. Chem.* 2003, 115, 5630-5632.; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 5472-5474.; b) Williams, G.D.; Pike, R.A.; Wade, C.E.; Wills, M. *Org. Lett.* 2003, 5, 4227-4230.; c) Boggs, S.D.; Cobb, J.D.; Gudmundsson, K.S.; Jones, L.A.; Matsuoka, R.T.; Millar, A.; Patterson, D.E.; Samano, V.; Trone, M.D.; Xie, S.; Zhou, X. *Org. Process Res. Dev.* 2007, 11, 539-545.
- 3) For selected studies using Rh catalysts, see: a) Kitamura, M.; Lee, D.; Hayashi, S.; Tanaka, S.; Yoshimura, M. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 8685-8687. b) Ito, M.; Tejima, N.; Yamamura, M.; Endo, Y.; Ikariya, T. *Organometallics*. 2010, 29, 1886-1889.
- 4) For selected studies using Ir catalysts, see: a) Ogo, S.; Uehara, K.; Abura, T.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 3020-3021.; b) Gnanamari, D.; Moores, A.; Rajaseelan, E.; Crabtree, R.H. *Organometallics*. 2007, 26, 1226-1230.; c) Wang, C.; Pettman, A.; Basca, J.; Xiao, J. *Angew. Chem.* 2010, 122, 7710-7714.; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 7548-7552.
- 5) a) Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Takehara, J.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 7562-7563.; b) Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Uematsu, N.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 2521-2522.; c) Haack, K.-J.; Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Ikariya, T.; Noyori, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, 36, 285-288.; d) Uematsu, N.; Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 4916-4917.

感染症四方山話(6):菌血症・敗血症-その2

Various Topics concerning Infectious Disease (6) bacteremia and sepsis - part 2 -

順天堂大学医学部 感染制御科学／細菌学／総合診療科学 准教授 菊池 賢

KEN KIKUCHI, MD, PhD.(Associate Professor)

*Department of Infection Control Science, Department of Bacteriology, Department of General Medicine,
Faculty of Medicine, Juntendo University*

感染症医には様々なタイプがあり、「好みの感染症」が微妙に異なる。尊敬する都立病院感染症科部長だったM先生(こんなことを書くと、ご本人が嫌がられるかも知れないので、下記のK先生同様、匿名にさせていだいた)は「腸管感染症」が大好きで、糞便の検査が来ると、嬉々としてご自分で検査をされ、顕微鏡を覗いて虫卵を探されていた。もう20年も前に研修でお世話になったが、その時に受けた先生の寄生虫感染症のレクチャーはとても印象に残っている。一般検査室で、様々な生標本やスライドを嬉しそうに、「この偏光顕微鏡像、美しいでしょう!」と提示して下さる。私もこの感覚がよくわかるので、「実に美しいです!」と応じていると、「そうですね。そうですね。」と更に、嬉しそうに話される。お互いに琴線に触れるところがあり、楽しみを共有できる、趣味仲間の会話のようであった。おそらく、興味の無い学生が来ると、とても寂しい顔をされるのだろう。

古くからの知り合いのK先生も熱帯病好きでは人後に落ちない。ちなみに、最近では寄生虫疾患とか熱帯病という言い方はせず、自嘲気味に"neglected tropical diseases"と呼ぶことが多いようだ。彼はウイルスや細菌、原虫などよりももう少し大きな生き物、例えば、蛆、サソリ、ムカデ、毒を持った魚、貝、はたまた毒蛇なんかが好きで、職場の本棚には医学書や文献に混じって様々なホルマリン漬けのこうした標本が「所狭し」と並べられ、訪れる者の目を楽しませてくれる。正確にはこれらによって被る疾患すべてが「感染症」ではないのだが、「医動物学」というくくりで感染症医が関与するケースが多い。真菌学者のM先生(前述のM先生とは別の方)のお部屋には凍結乾燥された昆虫類が強烈な自己主張をして鎮

座していた。「うーん。この乾燥ナナフシの緑が退色しない所が素晴らしいですね。」

そう、みんな「同じニオイ」がする。かくいう私も自分の専門のレンサ球菌の「色」「形」「臭」が気に入っている。こんなことを書いていると、読者の方は「感染症医はこういう人ばかりか」と思われるかも知れない。「その通り!」と言いたいが、残念ながら私を含め、こうした感染症医はむしろ少数派である。我々が普段、受けている感染症のコンサルテーションではこうした古典的感染症はむしろ珍しい。一般的な病院感染、common diseasesの方が圧倒的に多い。neglected tropical diseasesを多く経験できる感染症医は非常に限られてしまうのである。私も、感染性心内膜炎などの循環器系感染症は別として、普段診ている感染症は肺炎や耐性菌の菌血症など一般的なもののばかりである。ところが、時に、一般感染症医にもneglected tropical diseasesを念頭に置かねばならないことがある。わかりやすいのは「渡航歴」のある患者である。今回の「心に残る一症例:菌血症・敗血症-その2」はかような普段、見慣れない感染症を紹介してみたい。「他の医療機関では見逃されていた感染症を拾い上げる」感染症医として無上の喜びを読者の方と共有できれば幸いである。

症例¹⁾ 出版社に勤める35歳の女性が夜間に37℃後半の発熱を繰り返して近くのクリニックを受診した。ここでは「かぜ」と診断され、総合感冒薬や経口抗菌薬を投与されたが良くなりず、発熱は39℃を越えるようになり、別の病院に入院となった。ペニシリン系抗菌薬のpiperacillinが点滴投与されると、速やかに解熱し、退院したが、退

院したその日から再び39℃の発熱が出現し、同時に左手首、右膝関節痛を伴うようになった。この時点で私の初診外来に來られた。発熱はなかったが、右膝関節に運動制限があり、両足背に図1のような無痛性の五円玉大の紅斑を複数、認めた。この紅斑、関節痛は場所を変え、出現・消退を繰り返していた。このような紅斑は「結節性紅斑」といわれ、特定の感染症ではしばしばみられる所見である。一般検査では白血球減少(3140/ μ l, 好中球 64.0%, リンパ球 29.0%, 単球 6.4%, 好酸球 0.3%), CRP 0.13 mg/dl 以外に問題となる所見はなかった。胸腹部単純レントゲン写真では特記すべき所見がなかったが、腹部エコーで軽度の脾腫、腹部リンパ節腫大が認められた。



図1 初診時の足背紅斑

ここまでの情報では診断を絞り込むのは難しいであろう。感染症の診断は病歴聴取で大半が決まる。本症例のポイントは発症1ヶ月前にシリアに10日間旅行していたことだった。感染症は基本的に「風土病」である側面が強い。たとえ一般的な肺炎球菌や黄色ブドウ球菌であっても、北米、ヨーロッパ、オセアニア、日本ではその病原体自身や引き起こす感染症病態は微妙に異なる。「どこで罹患したか」は感染症診断の上で決定的な情報となりうる。本症例のように医療機関で精査を3週間以上受けても診断がつかなかった原因不明の発熱を「不明熱」と呼ぶ。中近東付近で起こる「不明熱」「結節性紅斑」で考えられる感染症(もちろん、この時点では「感染症」と決まった訳ではないが、少なくともpiperacillinが投与されている間は解熱していたことから、感染症が最も疑わしいと判断した)には何があるだろうか。

ライム病、レプトスピラ症、バルトネラ症、リケッチア感染、チフス、パラチフス、発疹チフス、恙虫病、マラリア、野兔病などと併せ、鑑別診断の筆頭に上がったのが「ブルセラ症」であった。悩んでいるうちに、答えは速やかに得られた。「外来受診時に採取した血液培養が陽性になりました」との連絡が検査室から来た。しかし、彼は続けて「でも、グラム染色をすると、とても変な菌なんです」と伝えてきた。これは自分で見るしかない。図2にその時の塗抹写真を示す。「何だ? これは?」それが第一印象であった。グラム陰性菌であることはわかるが、形状がよくわからない。球菌なのか桿菌なのか。小さすぎて判別出来ないのである。後で、これこそがこの菌の特徴「fine sand appearance」として知った。図3に血液寒天、TSI, LIM寒天での発育状態を示すように、生化学的性状もさした特徴がない。手っ取り早く、16S rRNA gene sequenceを行った。BLAST searchで出てきた菌名を見て、思わず息を呑んだ。「*Brucella melitensis*」だったのだ。2013年現在、*Brucella* 属に登録されてい

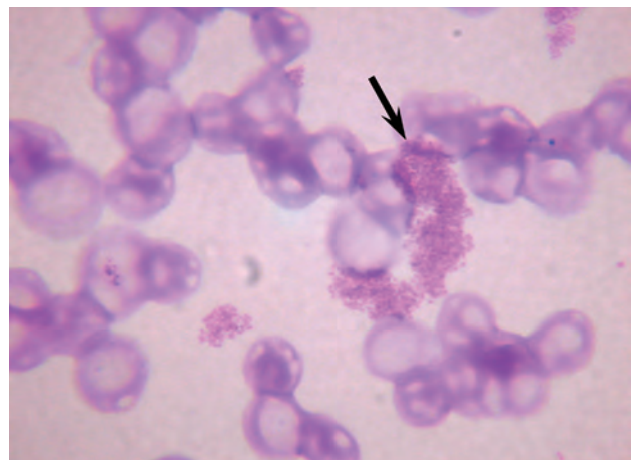
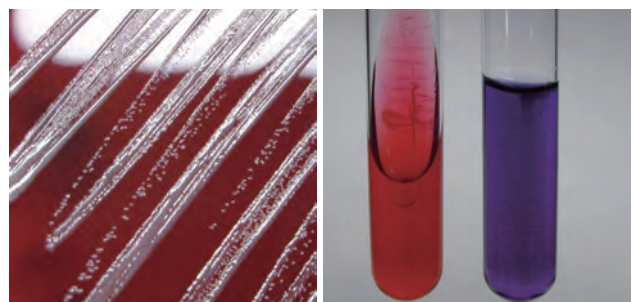


図2 血液培養塗抹鏡検結果



ヒツジ血液寒天培地
35℃72時間CO₂培養
コロニー形態

TSI/LIMの
試験結果
(共に微弱な発育を認める)

図3 コロニー形態と生化学的性状

表1 *Brucella* 菌種一覧

菌種	感染動物種	記載者	記載年	ヒトへの病原性
<i>B. melitensis</i>	ヤギ、ヒツジ、ラクダ	Bruce	1887	++++
<i>B. abortus</i>	ウシ、ラクダ、ヤク、スイギュウ	Bang	1887	++ ~ +++
<i>B. suis</i>	ブタ、ウサギ、カリブー、トナカイ	Traum	1914	+
<i>B. canis</i>	イヌ	Carmichael	1968	+
<i>B. ovis</i>	ヒツジ	Van Drimmelen	1953	-
<i>B. neotomae</i>	desert woodrat	Stonner	1957	-
<i>B. pinnipediae</i>	アザラシ	Foster	2007	-
<i>B. ceti</i>	イルカ、クジラ、ネズミイルカ	Foster	2007	-
<i>B. microti</i>	ハタネズミ、アカキツネ	Scholz	2008	-
<i>B. inopinata</i>	カエル	Scholz	2010	+

る菌は表1に示すように10種ある^{2, 3)}。ヒトに感染するのは*B. melitensis*, *B. abortus*がほとんどで、まれに*B. suis*, *B. canis*の報告がある⁴⁾。本症例で分離された*B. melitensis*は*Brucella*各菌種の中で最も病原性が高い菌だった。2010年に新しく記載された*B. inopinata*は71歳女性の乳房異物感染症および敗血症患者から分離された菌で³⁾、自然界における宿主は不明だったが、2012年カエルから分離されることが明らかになった⁵⁾。ちなみ

に、*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*の6菌種は遺伝的には単一菌種であることが明らかにされているが(通常のルールでは先に命名された*Brucella melitensis*の1菌種だけが存続し、他の菌名はsubspeciesないしbiovar扱いになる)、感染宿主や病原性の違い、歴史的経緯を考慮して、それぞれの菌種は存続する裁定が下った(*Yersinia pestis*の存続と同様である)。生化学的にこれらを分類することは難しく、同定には図4のようなIS711の挿入部位の違いを調べる必要がある。図5に*Brucella*属共通PCR, *B. melitensis*種特異PCR, *B. abortus*特異PCRの結果を示す。

ブルセラ症は地中海沿岸、アラビア半島、インド、メキシコ、南米など、世界各地で年間50万人程の患者が発生し、その症例の大半は地中海周辺域で報告されている。図6に示すように、シリアは世界で最もブルセラ症の報告の多い国だったのだ⁴⁾。

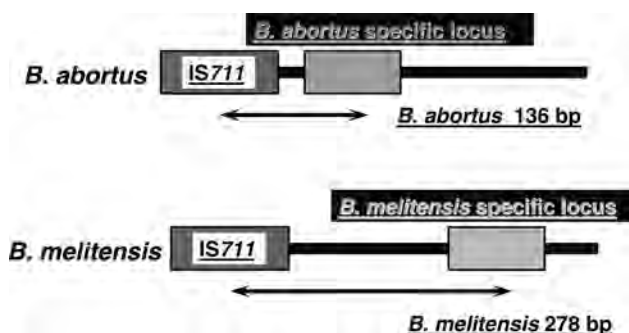


図4 IS711 elementsを用いた菌種特異PCR

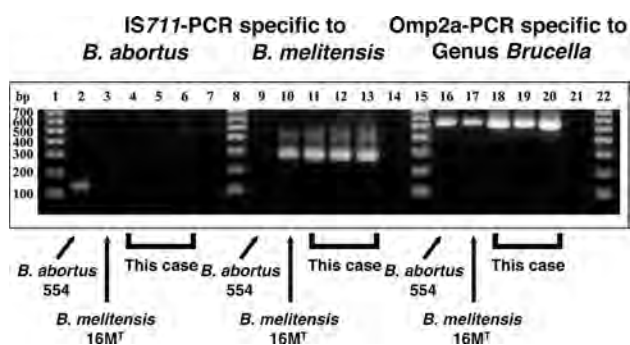
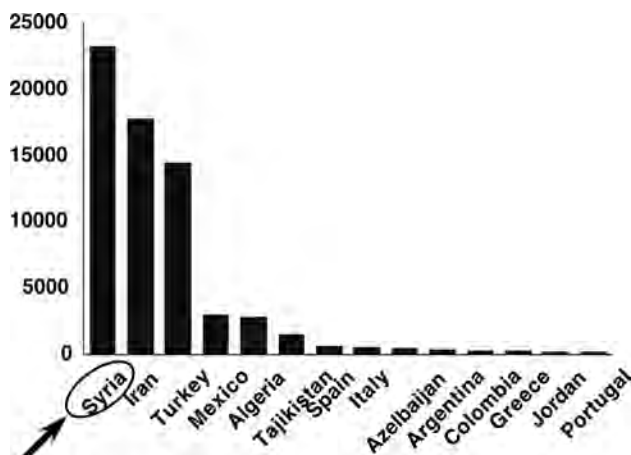
図5 PCRによる*Brucella*菌種同定結果 (IS711 elements-PCR and Omp2a-PCR)

図6 世界各国におけるブルセラ症発症件数(2003年)

ブルセラ症は紀元前450年、既にヒポクラテスにより記載されており、「マルタ熱」「地中海熱」「波状熱」「キプロス熱」など多種多様な名前と呼ばれている。感染ルートは主に経口感染で、菌に汚染された乳製品(生乳、ヨーグルト、チーズなど)の摂食が多く、生肉での感染は低いとされる⁴⁾。他に、家畜の屠殺や獣医師の診察などでの飛沫感染もある。本症例では非加熱乳製品の摂取は確認出来なかったが、「ケバブ」などの羊肉を喫食しており、感染源ではないかと考えられた。

*Brucella*はわずか10~100個の菌の接種で感染が起こる程感染性が強く、生物兵器に使用されることの危惧される菌種リストに入っている。微生物検査室での感染事故も報告されており、実は微生物検査技師は感染リスクの高い職種なのだ。幸い、検査技師や私も含め治療にあたった医師への二次感染は発生しなかった。

潜伏期は2-4週間、間歇的な発熱、関節痛、不快感、結節性紅斑、肝脾腫、リンパ節腫脹などで発症する。合併症として、関節炎、椎体炎、副睾丸炎、中枢神経感染、感染性心内膜炎などが知られており、特に心内膜炎は死亡の主因となっているため、注意が必要で、本症例でもその有無に細心の注意を払った。再発も稀ではなく、再発率は4%に上る⁴⁾。検査成績で相対的リンパ球増加、血小板減少、白血球減少、肝障害などが特徴で、血液培養の施行が診断の決め手になる。血清診断では、ワンポイントで160倍以上、ペア血清で4倍以上の抗体価(凝集価)上昇があればブルセラ症と診断される。本症例での初診時の血清抗体価は抗*B. abortus*抗体で160倍以上、抗*B. canis*抗体で320倍以上の高値を呈していた。*Brucella*は細胞内寄生菌なので、piperacillinのような細胞内に移行しない抗菌薬を使用した場合、血中で増殖している菌を殺すことは可能でも、細胞内に潜んだ菌を除去することはできない。このため、抗菌薬を中止すると、再び、発熱をきたしていたのだ。治療はgentamicinに加え、細胞内の菌にも作用するdoxycyclineを投与し、発熱、紅斑、関節痛などの諸症状は消失した。半年後まで外来でフォローし、感染性心内膜炎の発症、再発の恐れがないことを確認し、診療完了とした。

おわりに

今回提示した症例は、感染症を考える上で、その病歴聴取が如何に重要かを教えてくれる、格好の材料である。毎年、医学部や歯学部での授業に使用させてもらっているが、その真価にはいささかのゆるぎもない。「心に残る一例」であると同時に、感染症教育に大いに貢献してもらっている。一方、本症例の罹患地域と想定されるシリアは、ご存知のように今は大変な内乱状態にある。以前は「シリア」と聞くと、どこだか答えられない学生も大勢いたが、別の意味でその存在は遍く知れ渡った。時の流れを感じると同時に、かの国に平和的解決が早くもたらされることを願ってやまない。

参考文献

- 1) 菊池賢, 瀧村剛, 高瀬清美, 藤純一郎, 安並毅, 井戸田一朗, 平井由児, 朴春成, 山浦常, 戸塚恭一, 後藤亜江子, 鶴澤豊, 原田千絵, 齋藤洋, 高野加寿恵, 石崎正明, 佐藤周三. 病原微生物検出情報. 2005, 26(10), 273-274.
- 2) Ficht, T. Future Microbiol. 2010, 5(6), 859-866.
- 3) Scholz, H.C.; Nöckler, K.; Göllner, C.; Bahn, P.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Kämpfer, P.; Cloeckert, A.; Maquart, M.; Zygmunt, M.S.; Whatmore, A.M.; Pfeffer, M.; Huber, B.; Busse, H.J.; De, B.K. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2010, 801-808.
- 4) Pappas, G.; Akritidis, N.; Bosilkovski, M.; Tsianos, E. N. Engl. J. Med. 2005, 352, 2325-2336.
- 5) Eisenberg, T.; Hamann, H.P.; Kaim, U.; Schlez, K.; Seeger, H.; Schauerte, N.; Melzer, F.; Tomaso, H.; Scholz, H.C.; Koylass, M.S.; Whatmore, A.M.; Zschöck, M. Appl. Environm. Microbiol. 2012, 78, 3753-3755.

最近のトピックス

～セシウム吸着用プルシアンブルーについて～

福島第一原発事故により放射性セシウムの汚染問題が各地で発生しており、浸出水・木材・焼却灰・土壌など大量の汚染物処理が課題となっています。これらの汚染物から放射性セシウムを吸着し、さらには除染後の放射性廃棄物量を減らすためには高効率ならびに高選択な能力を有する吸着材が必要です。吸着材の一つとしてゼオライトが知られていますが、セシウムイオンだけを選択的に吸着することができず、環境中に大量に存在するナトリウムイオンやカリウムイオンなども吸着し効果的な回収は見込めません。

一方、プルシアンブルー(PB)は古来より青色顔料として利用されており葛飾北斎の富嶽百景に使用されていることでも有名な無機顔料ですが、特異的にセシウムを吸着する能力を有する材料としても知られています。独立行政法人 産業技術総合研究所(AIST)は山形大学と共同でPB型錯体の超微粒子(ナノ粒子)製造技術を開発しました。その後、当社はAISTとの共同研究の結果、PBナノ粒子の量産化に成功し、ナノ分散液として試験販売を開始しています(写真1)。

PBはフェロシアン化第二鉄とも言われ、化学式は $A_xFe[Fe(CN)_6]_y \cdot zH_2O$ (Aはナトリウムなどの陽イオン)で表されます。PBの結晶格子は鉄イオンをCNで架橋したものであり、セシウムイオンの大きさと空孔の大きさ(約0.5nm)がほぼ同じであるため、ナトリウムやカリウムイオンなど大きさが異なる陽イオンは吸着されず、セシウムイオンのみが特異的に吸着されると言われています。



写真1 プルシアンブルーナノ分散液

福島第一原発事故により大量の放射性廃棄物が生じています。これらの廃棄物は焼却処理による減容化は可能ですが、高濃度の放射性セシウムを含む汚染焼却灰となります。この汚染焼却灰から放射性セシウムが溶出し二次汚染を引き起こす可能性もあります。そこで汚染焼却灰を水で洗浄しPBで回収するシステム開発が進められています。

一つの方法としては、汚染水にPBナノ分散液をそのまま加え、均一に攪拌してセシウムを吸着させます。その後、PAC(ポリ塩化アルミニウム)などの凝集剤で沈殿させる凝集沈殿法が代表的です。しかし凝集沈殿法により得られた沈殿物の取扱いには注意が必要です。

一方、PBナノ粒子を成型品やフィルター状に二次加工した吸着材を使用する方法があります。二次加工することにより取扱いが容易になります。当社でもスプレードライ造粒法により5～100 μ m、小滴造粒法による1mm粒子(写真2)などの成型品を製造しており、カラムに充填した状態で放射性セシウム除染回収システムの実証試験に利用されています¹⁾。

今後も当社はAISTと共同で、放射性セシウム除染に関する吸着材・吸着システムの開発を進め、除染事業に貢献して参りたいと思います。

参考文献

- 1) (独)産業技術総合研究所,プレスリリース,2012-11-12.
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2012/pr20121112/pr20121112.html



写真2 プルシアンブルー成型品(1mm)



関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング
電話 (03)6214-1056 FAX (03)3241-1029
インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>
編集責任者 金田 尚 平成25年4月1日 発行