

THE CHEMICAL TIMES

KANTO CHEMICAL CO., INC.



2014 No.3 (通巻233号)

ISSN 0285-2446

<i>Yersinia enterocolitica</i> 感染症	林谷 秀樹	2
下痢性貝毒オカダ酸群の機器分析	鈴木 敏之	6
ラボラトリーウォーター	小林 礼治	12
感染症四方山話(9):家庭でできる微生物実験 その2	菊池 賢	18
最近のトピックス		24



Yersinia enterocolitica 感染症

Yersinia enterocolitica

東京農工大学 大学院 農学研究院 動物生命科学部門 准教授 林谷 秀樹

Hideki Hayashidani (Cooperative Department of Veterinary Medicine)

Tokyo University of Agriculture and Technology

1. *Yersinia enterocolitica* とは

Y. enterocolitica は、腸内細菌科 *Yersinia* 属に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌である。本属菌には現在14菌種があり、ペストの病原体として知られる *Y. pestis* も本属菌に含まれる。本菌によって引き起こされる感染症は、仮性結核菌として知られる *Y. pseudotuberculosis* によるものと合わせてエルシニア症と総称される。

Y. enterocolitica は至適発育温度は28℃付近で、4℃以下でも発育可能な低温発育性の病原菌として知られている。*Y. enterocolitica* は、通常、生物型別と血清型別で分類が行われている。生物型は Wauters ら¹⁾の生物型が広く使われており、8つの生化学的性状の違いにより5種の生物型に分けられている。また、血清型別は通常O抗原による型別が行われ、現在、50以上のO血清群に分けられている。このうち、ヒトに病原性を示す血清型は、O3、O4,32、O5,27、O8、O9、O13a,13b、O18、O20およびO21の9つで、ヒトに病原性を示すものは生物型と血清型の特定の組み合わせに限られており、O3が生物型3または4ならびにO5,27とO9が生物型2である以外は病原性を示す菌株の生物型は1Bである(表1)。9つの病原性血清型のうち、O3、O5,27、およびO9は“European strains”と呼ばれ、弱毒であるのに対し、O4,32、O8、O13a,13b、O18、O20およびO21は強毒で、近年まではほぼ北アメリカに局限して分布が報告されていたO8を含め、いずれも北アメリカでのみ分離されることから“American strains”と呼ばれている。“American strains”は“European strains”に比べると病原性が強く、マウスに実験的に経口投与すると“European

strains”では不顕性感染するだけであるが、“American strains”ではほぼ100%近い個体が敗血症を引き起こし死亡する。“American strains”はわが国には分布しないものと考えられていたが、1989年、Iinumaら²⁾は新潟県で捕獲したノネズミからわが国では初めてO8菌を分離し、本菌が我が国にも分布することが明らかになった。翌年には青森県で本菌感染患者が初めて確認され、その後、青森県を中心に東北地方では本菌による感染例が散発している³⁾。最近では奈良、沖縄、長野、東京、神奈川^{4,5)}でも感染患者が報告され、全国的に拡大傾向にある。

表1 病原性 *Yersinia enterocolitica*

血清型	生物型	分布	分類(毒力)
O3	3または4	全世界	European Strains (弱毒)
O5,27	2	全世界	
O9	2	全世界	
O8	1B	全世界	American Strains (強毒)
O4,32	1B	北アメリカ	
O13a,13b	1B	北アメリカ	
O18	1B	北アメリカ	
O20	1B	北アメリカ	
O21	1B	北アメリカ	

2. 疫学

Y. enterocolitica は、1939年によりヒトの腸炎患者から世界で初めて分離された。わが国では、1971年にヒトの下痢症の散発事例からはじめて本菌は分離され、翌年には静岡県で集団感染例が報告された。本菌感染症は、広く世界に分布しているが、特にヨーロッパでは発生が多くみられる。EU諸国における本菌感染症の人

口10万人当たりの患者数は2.5人程度である。ヨーロッパにおける*Y. enterocolitica*本菌は1982年に食中毒菌に指定されているが、届け出られる事件数、患者数ともに多くはなく、年に数例程度である。しかし、1972年以降、現在までに、患者数が100名を超える大きなものを含め、本菌による集団感染例が19件報告されている。表2に*Y. enterocolitica*による集団感染例を示す。ここに示すように、わが国における*Y. enterocolitica*の集団感染例のほとんどが血清型O3によるものであったが、近年になり、血清型O8による集団感染例が報告されるようになった。一方、北米では*Y. enterocolitica*の集団感染例のほとんどはO8によるものである。*Y. enterocolitica*食中毒では、潜伏期間が長いこともあり、ほとんどの事例は原因食品が特定できないが、学校給食が原因と推定されていることが多い(表2)。

家畜では、ブタは*Y. enterocolitica*の代表的な保菌動物として知られている。ブタから分離される*Y. enterocolitica*の血清型はO3、O5,27およびO9がほとんどで、O8感染患者の発生が多い北アメリカでもブタからO8はほとんど分離されない。伴侶動物であるイヌとネコも本菌の保菌動物であり、本菌に対し不顕性感染する。野生動物では、ノネズミが*Y. enterocolitica*を高率に保有しており、特に、我が国ではアカネズミやヒメネズミなどのノネズミが*Y. enterocolitica*血清型O8を高率に保菌し、自然界におけるこれら病原体の主たる保菌動物となっている⁶⁾。

*Y. enterocolitica*のヒトへの主たる感染経路は食品を

介した経口感染であり、本菌に汚染された豚肉あるいは豚肉から2次的に汚染された食品を摂取して感染するのが主たる感染経路と考えられている。しかし、東北地方で散発しているO8の感染事例では、ノネズミなどの野生動物の糞便などにより本菌に汚染された沢水またはこれらの沢水から2次的に汚染された食品などを介した水系感染によるものと推測されている。また、欧米では野菜や牛乳を介した感染例も報告されており^{7,8)}、近年、わが国でも野菜を原因とする本菌感染症が報告され、2004年ならびに2013年の集団感染事例では、野菜サラダが原因と特定または推定されている。保菌動物であるイヌやネコとの接触による感染事例も報告されている。アメリカでは輸血による*Y. enterocolitica*感染例が報告されており、エンドトキシンショックを起こし死亡する場合が多い。2003年にはわが国でも初めて輸血による本菌の感染死亡例が報告されている。本菌の患者の年齢分布は2～3歳をピークとする幼児に多く、成人ではまれである。

3. 臨床症状

*Y. enterocolitica*感染症における一般的な臨床症状は、発熱、下痢、腹痛などを主症状とする胃腸炎である。まれに咽頭炎、心筋炎、髄膜炎、肝膿瘍、敗血症などの腸管以外の病像を示すことがある。潜伏期は2-5日で比較的長い。また、O3、O5,27およびO9といった

表2 我が国における*Y. enterocolitica*による集団感染例

No.	発生年月	発生場所	推定原因食品	患者数	血清型
1	1972年1月	静岡県 小学校・幼稚園	不明(給食)	188人	O3
2	1972年7月	静岡県 小学校	不明(給食)	544人	O3
3	1972年7月	栃木県 中学校	不明(給食)	198人	O3
4	1974年4月	京都府 小学校	不明(給食)	298人	O3
5	1975年6月	宮城県 小学校	不明(給食)	145人	O3
6	1979年1月	宮城県 養護施設	不明(給食)	6人	O3
7	1979年11月	広島県 小学校	不明(給食)	184人	O3
8	1980年4月	沖縄県 小・中学校	加工乳	1051人	O3
9	1981年5月	岡山県 小・中学校	不明(給食)	641人	O3
10	1984年6月	島根県 小学校	不明(給食)	102人	O3
11	1988年12月	三重県 社員寮	不明(寮の食事)	23人	O5, 27
12	1989年9月	三重県 会社	不明(弁当)	19人	O5, 27
13	1994年7月	青森県 小学校、公園	不明(湧水)	52人	O3
14	1997年6月	徳島県 病院・学校の寮	不明(仕出し弁当)	66人	O3
15	2004年8月	奈良県 保育園	野菜サラダ	36人	O8
16	2012年8月	富山県 自宅	不明(簡易水道水)	3人	O8
17	2012年8月	長野県 旅館	不明(旅館の食事)	39人	O8
18	2012年8月	岩手県 旅館	不明(旅館の食事)	92人	O8
19	2013年4月	東京都 学生寮	野菜サラダ	52人	O8

“European Strains”では、胃腸炎症状に留まることが多いが、病原性の強いO8を代表とする“American Strains”では胃腸炎に留まらず、敗血症のような重篤な症状に至り、時に死に至ることが珍しくない。また、北欧では血清型O3やO9による関節炎患者が多発し、胃腸炎を発症した本菌感染患者の約30%程度に観察される。関節炎は*Y. enterocolitica*感染後、数週間後に発症する。関節炎の患者は、組織適合性抗原(HLA)がB27型のヒトに多発するといわれている。なお、ヨーロッパでは関節炎のほかに結節性紅斑も観察されるが、日本では関節炎も結節性紅斑もほとんど観察されない。

4. 病原性

*Y. enterocolitica*の病原因子としては約70メガダルトン(Md)の病原性プラスミドDNAにコードされているものと染色体DNAにコードされているものがあり、前者では腸管上皮細胞への付着、マクロファージの食作用の阻害、食細胞内での殺菌作用に対する抵抗性などに関与すると考えられているYadAおよびYOP(Yersinia Outer Membrane Protein)の産生性があり、後者では上皮細胞侵入性、耐熱性エンテトキシン産生性が知られている。染色体DNA上にはこれらのほかにも“American strains”では鉄と親和性の高い菌体外膜タンパクの産生性が知られており、これがこれらの血清型が強毒であることと関係している。

5. 診断

*Y. enterocolitica*の臨床症状は、上述したように感染型食中毒の症状を示すことが多いため、臨床症状から診断することは難しく、確定診断には感染患者の糞便からの菌検出が必要である。糞便からの菌分離には、選択平板培地としてCIN寒天培地(OXOID)が通常用いられる。しかし、CIN寒天培地上では*Yersinia*属菌はいずれもピンク色のコロニーを形成するため、コロニーの形態や色で*Y. enterocolitica*、特に病原性*Y. enterocolitica*を識別することはできない(図1)。また、CIN寒天培地では*Y. enterocolitica* O3の一部の菌が発育阻害、または発育できないことが報告されている⁵⁾。病原性*Y. enterocolitica*を選択的に分離する目的で、Fukushima

ら⁹⁾はVYE(virulent *Yersinia enterocolitica*)寒天培地を開発しているが、これは病原性*Y. enterocolitica*がエスクリン分解陰性であることを利用したもので、病原性*Y. enterocolitica*は本培地上でピンク色、それ以外の*Yersinia*属菌はエスクリン分解により黒色のコロニーを形成する。最近、CHROMagar社から、病原性*Y. enterocolitica*を選択的に分離できるCHROMagar *Yersinia*が開発、販売されている¹⁰⁾。本培地上では病原性*Y. enterocolitica*は紫色のコロニーを形成し、それ以外の*Yersinia*属菌は青色のコロニーを形成する(図1)。また、本培地ではCIN培地では発育が阻害される病原性*Y. enterocolitica* O3も発育できることが報告されている¹¹⁾。増菌培地はいろいろ開発されているが、*Y. enterocolitica*だけを増菌する適切な増菌培地がないため、菌数の少ない材料からの菌分離には1/15Mリン酸緩衝液に検体を加え、4℃で3週間程度培養する低温増菌培養法が一般的に実施されている。病原性*Y. enterocolitica*の血清型別には、診断用抗血清(デンカ生研)が市販されている。また、PCR、Realtime-PCR、LAMP(loop-mediated isothermal amplification)などによる遺伝学的診断法も開発されている。なお、菌分離に当たり、注意すべき点として培養温度の問題がある。一般的に患者が胃腸炎症状を示し、食中毒が疑われる場合、原因菌分離のため糞便培養が実施されるが、その場合通常培養温度は37℃に設定されることが多い。しかし、37℃での病原性*Y. enterocolitica*の発育は悪く、この培養温度では見逃されてしまうことが多い。また、37℃培養では70kbの病原性プラスミドが脱落してしまうことも多々み

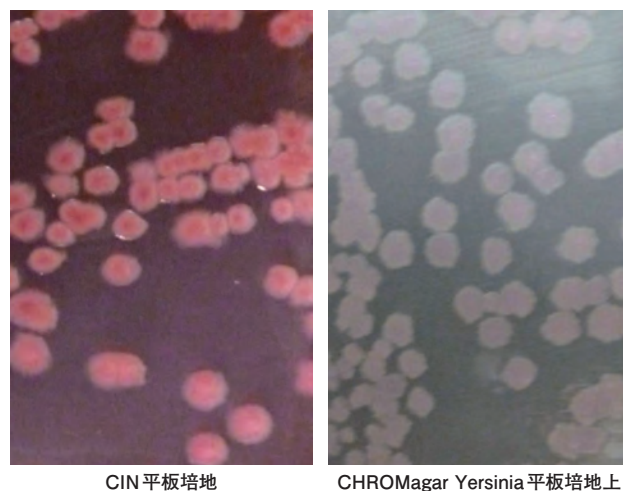


図1 CIN平板培地ならびにCHROMagar *Yersinia*平板培地上の病原性*Yersinia enterocolitica*のコロニー(32℃、36時間)

られる。したがって、*Y. enterocolitica* 感染が疑われる場合には、25℃～32℃で培養することが望ましい。また、*Y. enterocolitica* には病原性・非病原性の菌株があり、その鑑別は重要である。鑑別法として、病原性状試験があり、その代表的なものとしては、自己凝集能試験ならびにカルシウム依存性試験がある。また、分子病原学的試験法として、病原性 *Yersinia* が共通して保有する病原性プラスミド(70kb)にコードされる *VirF* 遺伝子ならびに病原性 *Y. enterocolitica* が保有する *ail* 遺伝子を標的にした PCR がある。血清学的診断として、病原性 *Y. enterocolitica* に対する抗体価(血中凝集素価)を測定し、急性期と回復期のペア血清で抗体価の4倍以上の上昇または160倍以上の抗体価が認められた場合にエルシニア感染症を疑う。また、病原性 *Y. enterocolitica* が産生する菌体外膜タンパクの YOP を抗原とした ELISA 法も開発されており、本菌の感染が疑われるが、菌が糞便等から分離されなかった場合に、確定診断として実施される。なお、*Y. enterocolitica* O9 は *Brucella melitensis* および *Vibrio cholerae* O1 と共通抗原を持つため、注意が必要である。

6. 予防・対策

Y. enterocolitica は食品衛生法で感染型食中毒原因菌に指定されており、患者を診断した医師はもよりの保健所へ届け出る義務がある。また、*Y. enterocolitica* O8 を原因物質とする食中毒事例は、食品衛生法施行規則第73条により、厚生労働省への詳報、速報の報告対象になっている。エルシニア症の予防は、一般的な食中毒の予防法に準じるが、低温菌なので、食品、特に生肉を10℃以下で保存する場合でも保存は短時間に留め、長く保存するときは冷凍する。沢水や井戸水を介した水系感染を防ぐため、加熱・消毒されたものを飲用するよう心がける。また、イヌやネコなどの保菌動物と接触した後は、手洗いを心がける。なお、ワクチンは開発されていない。

7. まとめ

Y. enterocolitica は、代表的な細菌性の食中毒ならびに人獣共通感染症の原因菌として知られている。わが

国では本菌の発生頻度は比較的低いが、近年、強毒である *Y. enterocolitica* 血清型 O8 の集団発生が報告され、社会的な関心が高まっている。本菌は低温発育菌であることから、コールドチェーンが整備された現在の食品流通システム下でも増殖可能であり、他の食中毒菌と比べ、本菌に汚染された食品の取り扱いには注意を要する。病原性 *Y. enterocolitica* の分離・同定する際、非病原性 *Y. enterocolitica* や他の *Yersinia* 属菌との鑑別が重要であり、近年、病原性 *Y. enterocolitica* を選択的に分離できる培地も開発されているが、適切な増菌法の開発も含めて、今後本菌の迅速かつ高感度の分離法の開発が望まれる。

参考文献

- 1) Wauters, G.; Kandolo, K.; Janssens, M. Contrib. Microbiol. Immunol. 1987, 9, 14-21.
- 2) Iinuma, Y.; Hayashidani, H.; Kaneko, K.; Ogawa, M.; Hamasaki, S. J. Clin. Microbiol. 1992, 30(1), 240-242.
- 3) Ohtomo, Y.; Toyokawa, Y.; Saito, M.; Yamaguchi, M.; Kaneko, S.; Maruyama, T. Contrib. Microbiol. Immunol. 1995, 13, 48-50.
- 4) Hosaka, S.; Uchiyama, M.; Ishikawa, M.; Akahoshi, T.; Kondo, H.; Shimauchi, C.; Sasahara, T.; Inoue, M. J. Clin. Microbiol. 1997, 35(12), 3346-3347.
- 5) Sakai, T.; Nakayama, A.; Hashida, M.; Yamamoto, Y.; Takebe, H.; Imai, S. Jpn. J. Infect. Dis. 2005, 58(4), 257-258.
- 6) Hayashidani, H.; Ohtomo, Y.; Toyokawa, Y.; Saito, M.; Kaneko, K.; Kosuge, J.; Kato, M.; Ogawa, M.; Kapperud, G. J. Clin. Microbiol. 1995, 33(5), 1253-1257.
- 7) Longenberger, A.H.; Gronostai, M.P.; Yee, G.Y.; Johnson, L.M.; Lando, J.F.; Voorhees, R.E.; Waller, K.; Weltman, A.C.; Moll, M.; Lyss, S.B.; Cadwell, B.L.; Gladney, L.M.; Ostroff, S.M. Epidemiol. Infect. 2013, 16, 1-11.
- 8) MacDonald, E.; Heier, B.; Stalheim, T.; Cudjoe, K.; Skjerdal, T.; Wester, A.; Lindstedt, B.; Vold, L. Euro Surveill. 2011, 16(19), pii19866.
- 9) Fukushima, H.; Gomyoda, M. J. Clin. Microbiol. 1986, 24(1), 116-120.
- 10) Renaud, N.; Lecci, L.; Courcol, R.J.; Simonet, M.; Gaillot, O. J. Clin. Microbiol. 2013, 51(4), 1184-1187.
- 11) Kamrun Naher, MI Tajul. 久保亮一, 林谷秀樹. “新しい *Yersinia* 選択培地の評価”. 第106回日本食品衛生学会学術集会. 沖縄, 2013, P57.

下痢性貝毒オカダ酸群の機器分析

Instrumental analysis of diarrhetic shellfish toxin okadaic acid analogues

(独)水産総合研究センター中央水産研究所 水産物応用開発研究センター衛生管理グループ グループ長・博士 鈴木 敏之

Toshiyuki Suzuki

National Research Institute of Fisheries Science

はじめに

東北地方では昔から「桐の花が咲く頃、ムラサキイガイを食べるな」という伝承があり、二枚貝がある特定の時期に毒を持つことは古くから知られている。本来毒を持たない二枚貝がどのようにして毒を蓄積するのか、という毒化のメカニズムの詳細については、依然として解明すべき課題も残されているが、ほとんどのケースで、毒の一次生産者である有毒プランクトンを二枚貝が餌として食べ、その毒を体内にそのまま蓄積するか、あるいは代謝により毒の化学構造の一部を変換して蓄積することにより毒化する。こうして毒化した二枚貝は、外見や味覚において普通の二枚貝と識別することが困難であるため、人が中毒許容量を越える二枚貝を食べたときに食中毒が発生する。貝毒には中毒症状に因んで、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、記憶喪失性貝毒など様々な貝毒があるが、我が国で問題になっている貝毒は、麻痺性貝毒と下痢性貝毒である¹⁾。

貝毒による食中毒を防ぐために、水揚げされた二枚貝の毒力は定期的に検査されており、毒力が基準値を越えると、生産者による出荷自主規制措置が講じられる¹⁾。二枚貝の毒力検査は、厚生労働省が定めた公定法に基づいて実施されている²⁾。公定法は、生きたマウスの腹腔内に貝の抽出液を投与し、マウスの生死や死亡時間で毒力を判定するマウス腹腔内投与法(マウス毒性試験)である。マウス毒性試験は、貝毒検査の公定法として国際的にも広く普及しており、二枚貝の安全性を確保するために果たしている役割は極めて大きい。しかし、マウス毒性試験は、マウスの症状からある程度

は検出している毒の種類についての情報が得られるものの、検査対象である貝毒に対して必ずしも特異的な手法とは言えない。マウス毒性試験の代替検査法として様々な分析法が開発されているが、麻痺性貝毒では、蛍光HPLC法³⁾が、また、下痢性貝毒においては、LC/MS/MS法⁴⁾が汎用的な検査法として注目されている。2015年1月から欧州連合(EU)において下痢性貝毒のマウス毒性試験が廃止され、LC/MS/MS法の導入が決定されるなど、欧米諸国ではマウス毒性試験のように生きた動物を使用する検査を可能な限り制限しようとしている。また、国内の情勢としては、食品安全委員会において下痢性貝毒オカダ酸群のリスク評価が行われており、検討内容は評価書として公開されることになる。それを受けて、厚生労働省や農林水産省においては、下痢性貝毒公定法や関連通知等の改正が始まる見通しである。

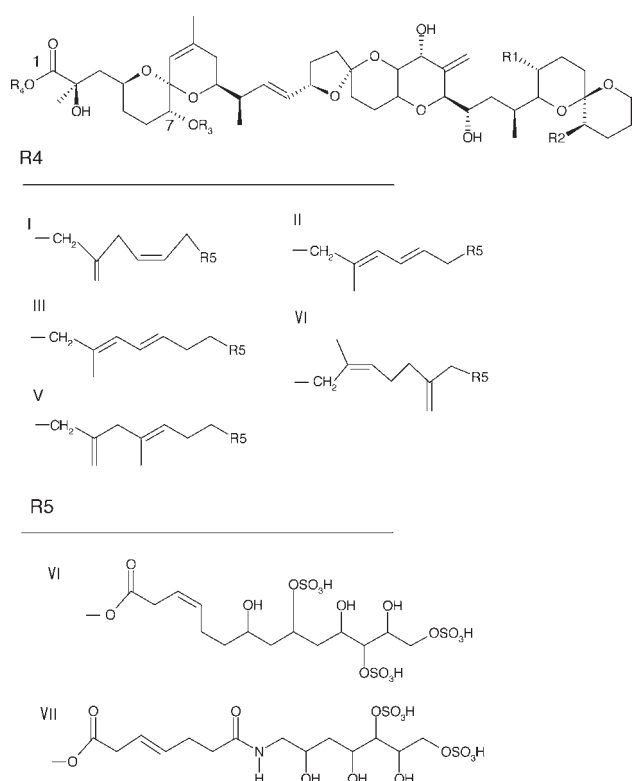
本稿では、食品安全委員会で現在検討している下痢性貝毒について、化学構造と毒性などについて概説し、当センターで学術雑誌等に報告したLC/MS/MSによる研究⁴⁾を中心に分析例を紹介する。

下痢性貝毒オカダ酸(okadaic acid; OA)群による中毒と化学的性状

昭和51年に宮城県で発生したムラサキイガイによる食中毒は下痢性貝毒と命名され、その後、ヨーロッパの大西洋岸など世界的に多くの中毒患者が発生した⁵⁾。毒化した二枚貝をヒトが摂取すると下痢、吐き気、腹痛、嘔吐などの症状を発症する。二枚貝を食べた後通常4時間以内に発症すること、発熱がなく腹痛が激し

くないことでビブリオ菌食中毒などとは区別される。幸い、下痢性貝毒による死亡事例は報告されていない。わが国では、北海道・東北沿岸域の二枚貝が毎年、散発的に毒化している。貝毒監視体制により食中毒の発生はほぼ完全に抑え込まれているが、出荷自主規制措置により二枚貝の出荷が滞るため、二枚貝産業上の大きな問題となっている。

下痢の原因となっているオカダ酸(OA)群⁶⁾は、これまでに10成分を越える類縁体が報告されている(図1)。



	R1	R2	R3	R4	R5	EMW
OA	CH ₃	H	H	H	-	804.5
DTX1	CH ₃	CH ₃	H	H	-	818.5
DTX2	H	CH ₃	H	H	-	804.5
DTX3	(H or CH ₃)		Acyl	H	-	
OA-D7a	CH ₃	H	H	I	OH	914.6
OA-D7b	CH ₃	H	H	II	OH	914.6
OA-D8	CH ₃	H	H	III	OH	928.6
OA-D9a	CH ₃	H	H	IV	OH	942.6
OA-D9b	CH ₃	H	H	V	OH	942.6
DTX4	CH ₃	H	H	III	VI	1472.6
DTX5a	CH ₃	H	H	II	VII	1392.6
DTX5b	CH ₃	H	H	III	VIII	1406.6

図1 オカダ酸(OA)、ジノフィストキシン(DTX)群の化学構造

Dinophysis 属有毒プランクトンが一次生産者であり⁷⁾、有毒プランクトンの摂食により二枚貝が毒化する。7位水酸基に脂肪酸がエステル結合したジノフィストキシン3(dinophysistoxin-3:DTX3)は二枚貝の代謝物であり⁸⁾、*Dinophysis* 属有毒プランクトンが生産するジノフィストキシン1(dinophysistoxin-1:DTX1)が前駆体である。これらはいずれも脂溶性物質であり、メタノール、クロロホルム、アセトンなどの有機溶媒に容易に溶解する。その他に1位カルボキシル基にジオール類がエステル結合したOAジオールエステル類も報告されている。これらは *Prorocentrum lima* や *Dinophysis* 属など有毒藻類により生産され^{9,10)}、二枚貝に取り込まれると加水分解を受けて遊離OAとなるため、二枚貝から検出されることはほとんどない。OAジオールエステルも脂溶性でメタノールなどには容易に溶解するが、DTX5などは極性が高く水溶性である。

OA群のLC/MS及びLC/MS/MS分析

これまでに報告されている下痢性貝毒のLC/MSやLC/MS/MSによる毒の分離は、下痢性貝毒が疎水性化合物であるため、C8やC18などの逆相分配系で内径2mm前後のセミマイクロカラムが用いられ、また、質量分析計による検出の際のイオン化は、電子スプレーイオン化法が採用されている。LC分離の際の移動相として、蒸留水にアセトニトリルかメタノールを混合し、それに酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなどを添加した溶液が用いられている⁴⁾。酢酸やギ酸などの酸を加える理由は、貝毒化合物のイオン化の促進だけではなく、OA、DTX群などカルボキシル基を有する酸性毒をカラムで分離する際に、移動相を酸性にすることにより、酸性官能基の解離が抑制され、酸性毒に対する分離用カラムの保持能が向上し選択性が高まる。その結果、ピーク形状がシャープになり、検出感度が向上する。最近では、カラムの保持力の向上と担体の処理技術の向上による安定性の向上により、塩基性移動相を用いた分析例も報告されている¹¹⁾。陰陽両モードによる検出が可能であるが、定量分析では陰イオンモードによりOAやDTX1の[M-H]⁻を選択する Selected Ion Monitoring (SIM) や、[M-H]⁻のフラグメントイオンである m/z 255 を検出する Multiple Reaction Monitoring (MRM) 分析が

一般的である。図2は有毒プランクトン *Dinophysis fortii* 50細胞からLC/MS/MSにより検出したDTX1とペクテノトキシン2 (Pectenotoxin-2; PTX2) のクロマトグラムである¹²⁾。*Dinophysis*の細胞あたりの毒量は平均すると数ピコグラムから数十ピコグラムであるが、LC/MS/MSは極めて高感度であるため、50細胞程度を集めることにより、容易に毒を検出することが可能である。

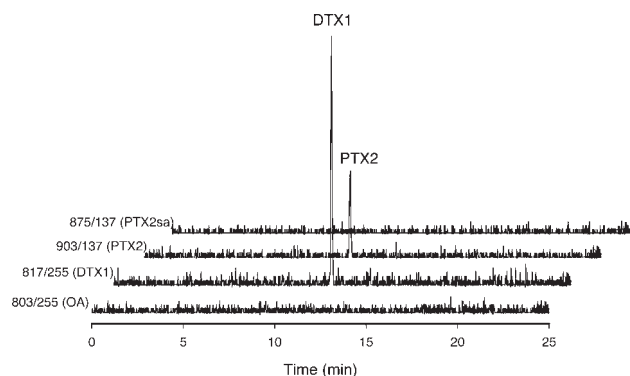


図2 有毒藻類 *Dinophysis fortii* 50細胞から得られるLC/MS/MSクロマトグラム

OAやDTX1の二枚貝代謝物であるDTX3群は、7位水酸基に様々な脂肪酸がエステル結合した化合物であり、総称してDTX3と呼ばれている。DTX3群は、LC/MS/MSにより、結合している脂肪酸種ごとの分析が可能である¹³⁾。分析は陰イオンモードによりDTX3の $[M-H]^-$ を選択し、衝突解離により生じたフラグメントイオンである遊離脂肪酸に相当するイオンを選択するMRMにより、高感度な検出が可能である。二枚貝から検出される主要なDTX3はパルミチン酸(C16:0)が結合した7-O-16:0-DTX1であるが、その他に様々な脂肪酸が結合したDTX3が検出される(図3)。図4,5に様々な脂肪酸が結合したDTX3のMS/MSスペクトルとフラグメンテーションダイアグラムを示す。MS/MSスペクトルは、図4のような各種遊離脂肪酸のイオンに加えて、DTX1の化学構造に帰属させることができる特徴的なフラグメントイオンが検出される。こうしたイオンにより、標準品の入手が困難なDTX3の同定が可能である。

LC/MS/MSはOA群の構造解析にも有効である¹⁰⁾。陽イオンモードにより得られるMS/MSスペクトルの方が、陰イオンモードで得られるそれよりも情報量が豊富であることから、構造解析には適している。選択するイオンは、 $[M+NH_4]^+$ や $[M+H]^+$ が一般的である。 $[M+Na]^+$ は他の化合物と同様に、OA群においても極めて安定なイ

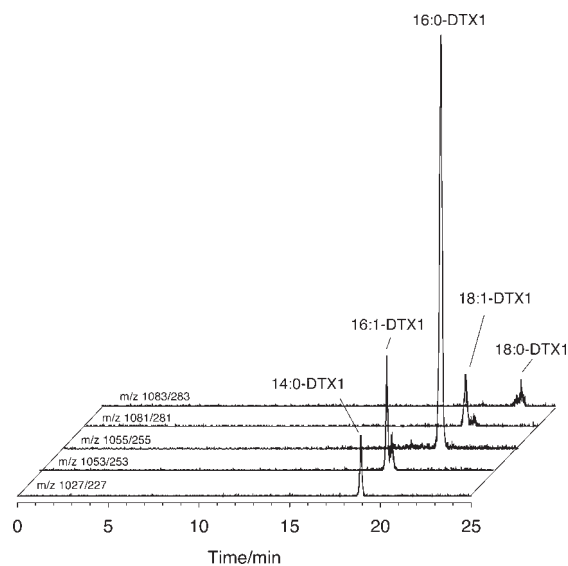


図3 LC/MS/MSによりホタテガイから検出される様々なDTX3群

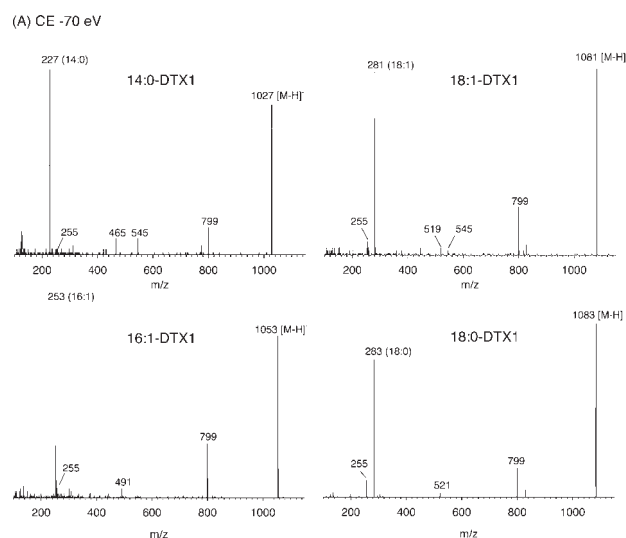


図4 様々な脂肪酸が結合したDTX3のMS/MSフラグメントイオン

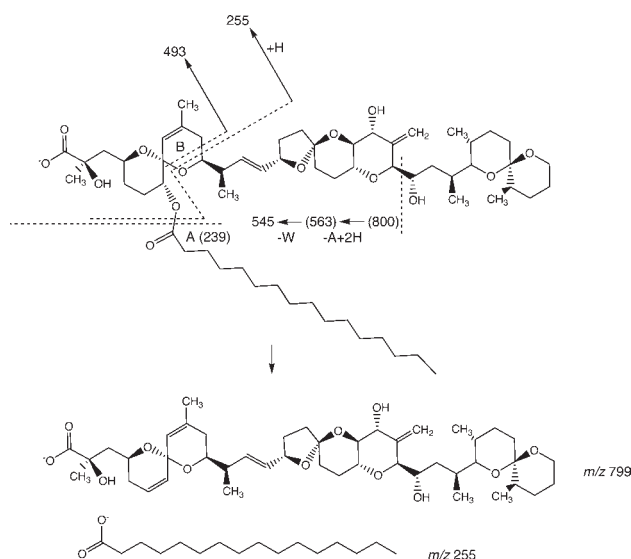


図5 DTX3のMS/MSフラグメンテーションダイアグラム

オンであるため、LC/MS/MSによりフラグメントイオンを得ることは困難である。有毒プランクトン *Dinophysis acuta* から検出される OA ジオールエステル (OA D8) の MS/MS スペクトル及び各スペクトルの化学構造への帰属を図 6, 7 に示す。図 7 の枠付きのフラグメントイオンは、測定した精密質量が理論値との比較において、誤差の範囲である 5 ppm 以内で一致したイオンである。主要なフラグメントイオンピークのほとんどが一致した。下痢性貝毒 OA 群の LC/MS/MS フラグメンテーションは、トリプル四重極 LC/MS/MS や四重極/飛行時間型 LC/MS/MS (qtof LC/MS/MS) においては、異なるメーカーの装置でもほぼ類似した MS/MS スペクトルが得られるため、新規類縁体が発見された場合の化学構造の解析などに極めて有効である。

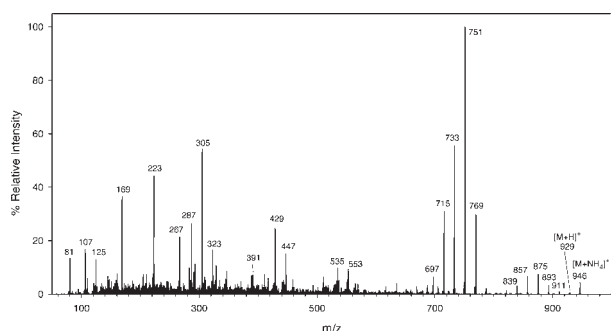


図6 OA ジオールエステル (OA D8) の MS/MS フラグメントイオン

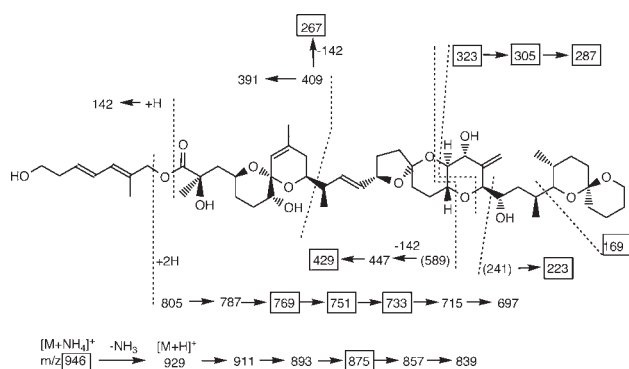


図7 OA ジオールエステル (OA D8) の MS/MS フラグメンテーションダイアグラム

OA 群を対象とした LC/MS/MS 法は、EU などの SOP (Standard Operating Procedures)¹⁴⁾ にも記載された手法である。わが国においても LC/MS/MS 法は下痢性貝毒 OA 群の公定法となる可能性が高い。LC/MS/MS による OA 群の定量分析においては、二枚貝試料マトリクスの影響により定量誤差が生じることが知られている¹⁵⁾。陰陽両モードにおいてマトリクスの影響が出るが、比較的

影響が出にくい陰イオンモードによる OA 群の分析においても、イオン化促進により回収率が 120% を超えることも珍しくない。そのため、マトリクス検量線を用いた定量が有効であるが、装置のイオン源やカラムへの負担を考慮すると、適切な前処理法を検討することも重要である。当センターでは現在、有効な前処理法について検討中であり、近々、学会誌等で公表する予定である。

OA 群のカラムスイッチング自動前処理蛍光 HPLC 分析

OA 群の蛍光 HPLC 分析は、Lee らにより 1987 年に開発された分析法¹⁶⁾ であり、LC/MS や LC/MS/MS が普及するまでは、有毒プランクトンの毒生産能や二枚貝における減毒動態の解析など研究現場を中心に活用されてきた。この分析法は OA 群が有するカルボキシル基に蛍光化試薬アンスリルジアゾメタン (ADAM) を反応させ、蛍光誘導体となった OA 群を特異的に検出する手法である。しかし、OA 蛍光誘導体を調製した後の前処理手順が煩雑であることから、多数検体の分析が必要となる二枚貝の貝毒検査には利用しにくい一面がある。そこで、前処理をカラムスイッチング HPLC により自動化するとともに、抽出手順などの分析手順の改良を行った¹⁷⁾。装置構成及びこの分析法により得られる二枚貝試料中の OA 蛍光誘導体のクロマトグラムを図 8, 9 に示す。OA 群の添加回収実験やバラツキに関するデータは LC/MS や LC/MS/MS と比較して、むしろ良好な結果が得られている。本改良法では、使用する有機溶媒量を減らすとともに、アルカリ処理を加えて DTX3 や OA ジオールエステルを DTX1 や OA に加水分解することにより、エステル毒の一括分析も可能になり、毒化した二枚貝の検査法として、極めて有効な手法である。本法で使用したカラムは内径 4.6 mm のカラムであるが、内径 2.0 mm 以下のセミマイクロカラムやマイクロカラムを利用すれば、使用する移動総量を 1/5 程度に減らすことが可能である。蛍光 HPLC 法は、LC/MS や LC/MS/MS とは異なり、装置の違いによるイオン化効率やマトリクスの影響による定量結果の差異が生じることはほとんどない。したがって、異なる装置を用いた異なる試験室間においても均一な結果を得やすい利点がある。LC/MS や LC/MS/MS による OA 群の検査法の確立が注目されているが、蛍光 HPLC 法についても再度、有効な検査法の一つとして認識する必要がある。

機器分析用OA群標準品

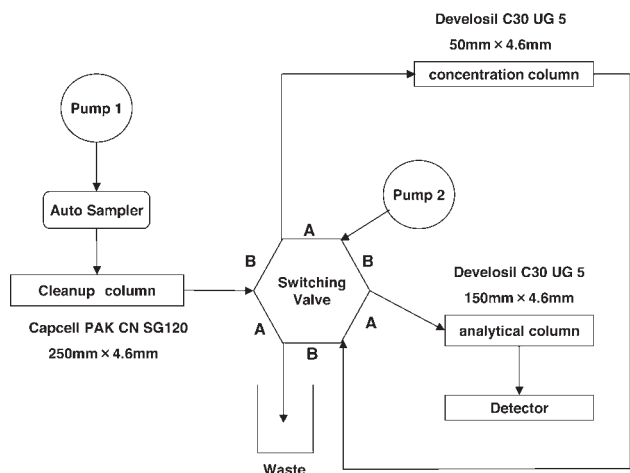


図8 OA群分析用カラムスイッチング自動前処理HPLCシステム

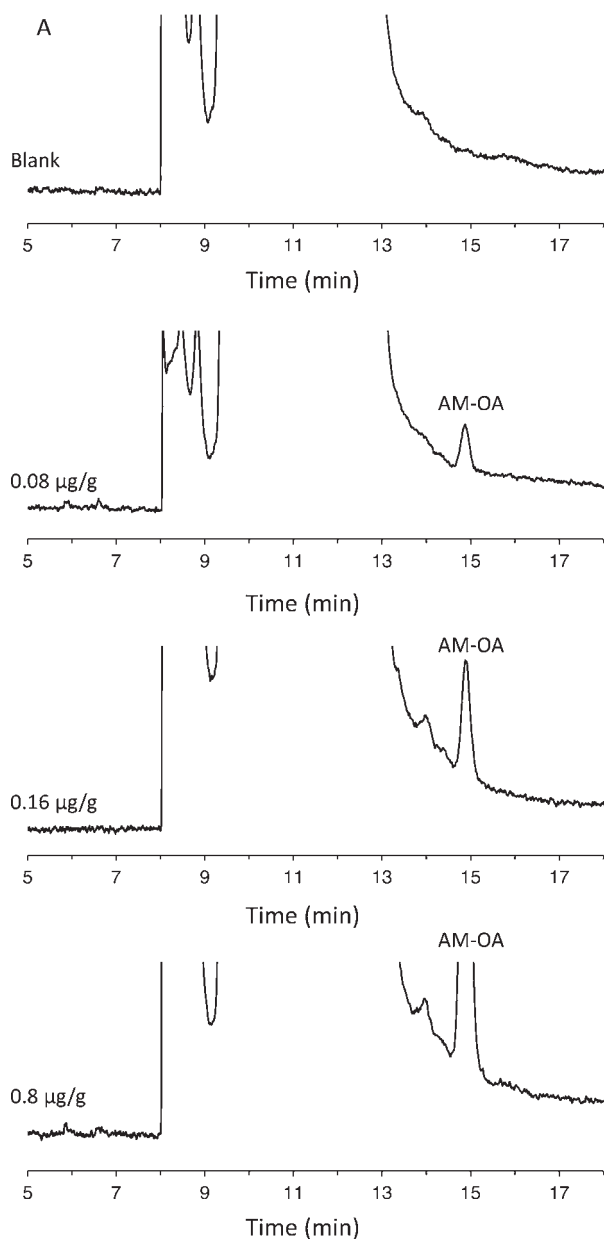


図9 ホタテガイから検出されるOA蛍光誘導体のクロマトグラム

二枚貝の安全性管理のために、二枚貝試料を検査する際には、OA群の分析用標準品が必要になる。さらに、標準品を二枚貝試料に添加し、回収率や定量結果のバラツキなどを調べ、分析手法の妥当性を評価する必要がある。分析用OA標準品は、カナダのNational Research Council (NRC) が販売しており、世界的に普及している国際標準物質である。しかし、在庫は必ずしも十分ではなく、世界的には標準品供給体制の強化が望まれているところである。NRC標準品は、国内でも関東化学(株)を介して入手が可能である。DTX3やOAジオールエステルのようなエステル型OA類縁体の標準品は市販されておらず、入手は極めて困難であるが、これらの化合物はアルカリ加熱条件下で、DTX1やOAに容易に加水分解される^{14, 17)}。したがって、分析手順に簡単な加水分解手順を加えることにより、OAやDTX1に加えて、これらのエステル化合物を一括して分析することができる。現在検討中のCODEX基準値においても、OA群の基準値(160µg/kg二枚貝可食部)は、エステル毒も含めたOA群の総量として定義されているため、試料のアルカリ加水分解は二枚貝の検査においても不可欠な処理である。

当センターではOA標準品を含めた様々な貝毒標準品を農林水産省の事業により製造し、配布を行ってきた。今後、下痢性貝毒検査の公定法が改正され、マウス毒性試験からLC/MS/MSなどの機器分析法に移行した場合に、貝毒の自主検査や流通した二枚貝の貝毒検査は機器分析等により行われることになる。そのためには、供給が不安定な海外の標準品のみに依存することなく、国内でも機器分析用標準品を安定的に供給できる体制を確立することが、二枚貝の安全性を確保し、それに裏付けられた二枚貝産業を振興する上で極めて重要な課題である。当センターでは、農林水産省が推進する「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」において、プロジェクト研究「有毒藻類の培養による各種貝毒標準品の製造技術の確立」を推進し、これまでのように毒化した二枚貝原料に依存せずに、有毒藻類の培養により貝毒標準品を安定的に製造する技術を開発した。本プロジェクト研究には、当センターの他に(株)トリピカルテクノセンターが参画して、下痢性貝毒OAや

DTX1を効率的に生産する優良株を検索し、OA群生産藻類 *Prorocentrum lima* の大量培養技術により、効率的にOA群を製造する技術を開発した(図10)。現在、この技術を利用して、OAやDTX1標準品を大量に製造するとともに、厚生労働省や農林水産省及びその管

轄研究機関や(独)産業技術総合研究所など関係機関が連携して、国家標準物質や国際標準物質を製造することを目標に、関係機関間で調整が進められている。こうして製造された標準品が、将来的には市販され、多くの貝毒検査者に利用されることを願ってやまな

い。また、国産標準品を海外に提供・販売することが可能になれば、東南アジア諸国など、貝毒問題に対して十分な対応がなされていない国々に対しても、少なからず貢献することになるであろう。

謝辞

本研究で紹介した研究の一部は、農林水産省「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」におけるプロジェクト研究「有毒藻類の培養による各種貝毒標準品の製造技術の確立」中で実施された。関係者各位に対して、深く謝意を表します。



藻種: *Prorocentrum lima*
培地: ES1栄養塩培地
温度: $25 \pm 1^\circ\text{C}$
照明: 植物育成灯
照射時間: 14時間明期/10時間暗期

図10 OA群生産藻類 *Prorocentrum lima* の大量培養

参考文献

- 鈴木敏之, 高坂祐樹, 木村淳子, 松嶋良次, 渡邊龍一, 村田昌一. 食品衛生学雑誌. 2013, 54(3), 265-274.
- 厚生省環境衛生局肉肉衛生課長通知.“下痢性貝毒検査法”. 昭和56年5月19日, 環乳第37号別添(1981).
- Oshima, Y. J. AOAC Int. 1995, 78(2), 528-532.
- Suzuki, T.; Quilliam, M.A. Anal. Sci. 2011, 27(6), 571-584.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Yamaguchi, M. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1978, 44(11), 1249-1255.
- Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M.; Matsumoto, G.K.; Clardy, J. Tetrahedron. 1985, 41(6), 1019-1025.
- Lee, J.S.; Igarashi, T.; Fraga, S.; Dahl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T. J. Appl. Phycol. 1989, 1(2), 147-152.
- Suzuki, T.; Ota, H.; Yamasaki, M. Toxicon. 1999, 37(1), 187-198.
- Yasumoto, T.; Seino, N.; Murakami, Y.; Murata, M. Biol. Bull. 1987, 172(1), 128-131.
- Suzuki, T.; Beuzenberg, V.; Mackenzie, L.; Quilliam, M.A. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004, 18(10), 1131-1138.
- Gerssen, A.; Mulder, P.P.J.; McElhinney, M.A.; J. de Boer. J. Chromatogr. A. 2009, 1216(9), 1421-1430.
- Suzuki, T.; Miyazono, A.; Baba, K.; Sugawara, R.; Kamiyama, T. Harmful Algae. 2009, 8(2), 233-238.
- Suzuki, T.; Kamiyama, T.; Okumura, Y.; Ishihara, K.; Matsushima, R.; Kaneniwa, M. Fish. Sci. 2009, 75(4), 1039-1048.
- EU reference laboratory for marine biotoxins ed. “EU-harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in mollusc by LC-MS/MS Version 4”. Vigo. 2011.
- Ito, S.; Tsukada, K. J. Chromatogr. A. 2002, 943(1), 39-46.
- Lee, J.S.; Yanagi, T.; Kenma, R.; Yasumoto, T. Agric. Biol. Chem. 1987, 51(3), 877-881.
- Uchida, H.; Watanabe, R.; Matsushima, R.; Uchida, N.; Nagai, H.; Kamio, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Suzuki, T. J. AOAC Int. 2014, 97(2), 391-397.

ラボラトリーウォーター

Laboratory Water

日本ポール株式会社 バイオファーマ事業部ラボ製品ユニット ユニットマネージャ 小林 礼治

Reiji Kobayashi (Manager)

Nihon Pall Ltd. BioPharmaceuticals Division Laboratory Business Unit

はじめに

ほぼ全ての産業、教育・研究機関でラボ用超純水・純水製造システムは広く普及していますが、超純水および超純水の国内外の規格等についてまで強く意識されることは意外に少ないのではないかと感じます。そこで、National Institutes of Health (NIH) の Laboratory Water (2013年3月発行)¹⁾等を参照しながら、超純水について解説したいと思います。また、我々は昨年末より自社開発のラボ用超純水製造システムの販売を開始しており、国内外の基準に基づく製品の仕様、性能についても一部紹介します。

1. 概略

日々の生活や仕事の中で我々は水を何不自由なく使っています。近年飲料水に関してはかなり意識が高まっているものの、水の品質に関して疑問を持つことはあまりないように感じます。しかし、研究室で使用する場合、実験には試薬グレードに適合した水が必要であり、動物に与える水は細菌感染症等のリスクも考慮すべきです。また、使用者の多くは水のグレードの違いについても無関心です。研究室での水質に関する不注意は予期しない結果や試薬のコンタミ、装置の損傷といった事態を起こしかねません。特にバイオ医薬品研究、医療、施設設計担当者は水質に関して知識が必要で、それぞれのニーズに合わせた最も適切なグレードの水を選択する必要があります。

水は様々な物質を溶解し、他の溶媒より温度によって溶解度も変えることができるため万能溶液として知られています。これは水分子の独特な極性と水酸基によるものです。これにより中性の有機物質を可溶化し、他の分子と水素結合が可能になります。それゆえ水は有用であるが、一方でその反応性により、水質が変化しやすいため注意しなければなりません。実際、水は化学物質、気体、蒸気、水道管や容器から溶出したイオンなどにより容易に汚染されます。これらはガラスや可塑剤からのナトリウムやケイ素、水道管などからの金属イオン、微生物、エンドトキシン、異物などの汚染を含みます。また、水中の有機物汚染の原因の主なもの、イオン交換カートリッジの樹脂に由来することが多いので、品質の高い樹脂（不純物を含まないあるいは溶出しない樹脂）を選択することが重要になります。

一般的な研究室で適切な費用で汚染のリスクを避けるためには、すべての共通なアプリケーションに必要な「プロセス水」あるいは「プロダクト水」グレードに合致し、様々な分析用途に必要な超純水を作り上げるのに適した供給水を製造できるセントラルラボウォーターシステムを構築することが必要です。

2. 水中の汚染物質

水道水には様々な異物が含まれており、異物を除去しないと実験や検査結果に悪影響を与えることがあります。水道水中にはナトリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄などの陽イオン（カチオン）や、重炭酸、塩素、硫酸塩

などの陰イオン(アニオン)が含まれます。更に、窒素、酸素、二酸化炭素などの溶存ガス、粒子やコロイドなども様々なルートから原水に混入し、農場由来の揮発性有機肥料や工場での塩素消毒の副産物としてトリハロメタン(THMs)のような汚染物質も含まれます。また原水中の多くの細菌、ウイルス、寄生虫(ジアルジアやクリプトスポリジウム)などは浄水工程で消毒あるいは不活化されますが、アルカリフォスファターゼ、エンドトキシンのような微生物由来の副産物や細胞断片は除去されずバイオフィーム中に蓄積します。このように多くの汚染物質が水道水に存在しますが、その処理や供給においてすべての異物、汚染物質に厳格な規制を設けて試験されているわけではありません。

3. 水中の汚染物質の測定

水の汚染あるいはきれいさを示す指標には、比抵抗値、導電率、全有機炭素(TOC)、生菌数、エンドトキシン値があります。

1) 比抵抗値

比抵抗値は物質の電気伝導のしにくさを示す物性値です。理論最大値は25℃で18.3MΩ-cm(メガオームセンチメートル)で、水中のイオン量が増えると比抵抗値は下がり、逆にイオン量が低ければ比抵抗値は上がります。比抵抗値は温度変化に影響を受けるため、一般の超純水システムでは通常25℃に補正した値が表示されます。超純水システムでは採水ポイントの直前に比抵抗センサーを設置し水質をモニターするのが一般的です。また、リザーバータンク内に比抵抗センサーを設置すると、タンク貯水の水質をモニターすることもできます。

2) 導電率

導電率は物質の電気伝導のしやすさを示す物性値です。超純水システムでは供給水(水道水)や純水のモニターに使われ、更にRO膜のイオン除去率も表示できます。水中にイオンが多く存在すれば、導電率は上がります。導電率は比抵抗の逆数で、比抵抗値が18.2MΩ-cmのとき導電率は0.055μS/cm(マイクロジーメンズ/センチメートル)となります。

3) TOC(Total Organic Carbon)

TOCは水中の有機汚染物質濃度を示す指標です。TOCが高いことは有機汚染物質が多く含まれることを示します。超純水システムではTOCはUVランプによる水中の有機物の酸化分解反応により測定します。多くの有機物質は微生物の栄養源になり、TOCが高いと微生物などの増殖を促進させることも考えられます。TOCで汚染物質を特定することはできませんが、TOCと導電率(比抵抗値)、生菌数、エンドトキシンレベルなどを組み合わせると、優れた定量的な水質指標となります。供給水のTOCが200ppb程度であれば、セントラルシステムの供給水質としては問題ないと考えられ、超純度水としては1~5ppbの範囲が最適な値です。特に、HPLC、LC/MSのような高感度分析には低いTOCが求められます。

4) 生菌数検査

寒天培地を使った生菌数検査はメンブレンフィルター法と組み合わせると便利な手法であり、広く使われています。しかし、バイオフィームの存在下ではしばしば生菌数を低く算出することがあり、微生物の副産物、不活化した病原菌や細胞性物質に関連した存在は検出されません。

5) エンドトキシン試験

エンドトキシンはグラム陰性菌の外膜に存在しており、リポ多糖を構成成分とする物質で内毒素、リポ多糖、LPS、パイロジェンとも呼ばれています。菌体が死んで溶菌するときや機械的に破壊されたとき、また菌が分裂するときなどに遊離され、過熱に対しても安定であり通常の滅菌ではその活性は失われません。エンドトキシン試験は、カプトガニの血球抽出成分LALにて実施されます。本試験は迅速で効果的な試験で、高感度なアプリケーションに適しています。エンドトキシンは2~5EU/mL(エンドトキシンユニット/mL)以下のレベルが飲料水としては品質が高いと言われています。より低いエンドトキシンレベルは高感度分析(例えば細胞培養や医薬品製造に要求される試験)に使われる超純水に求められます。超純水精製工程によりエンドトキシンレベルは0.004~0.001EU/mLまで下げることができます。

比抵抗、導電率、TOC、生菌数試験、エンドトキシン試験により水中のイオン、有機物、微生物汚染をコントロールすることでより高い水質を保証することができます。特定の汚染が問題になる場合は、その工程が特定の要求や汚染に適切に対応しているか確認することが重要になります。

4. 水の精製方法

水の精製方法には、蒸留、ろ過、脱イオン、電気再生式イオン交換、吸着、UV酸化があります。以下に各精製方法の詳細を説明させていただきます。これらの精製方法は、複合で使用されることもあります。

1) 蒸留

おそらく水の精製として最も知られている方法が蒸留法です。蒸留法は優れた技術で、広範囲な汚染物質を除去し多くのアプリケーションに適応しています。しかし、蒸留には時間がかかり使用するまで容器に保存しなければならず、保存中容器から蒸留水にミネラル分や異物が浸出して汚染されることがあります。さらに、蒸留法は電気代、時間、労働力がかかり維持費が高く、環境的にも優しいものではありません。しっかりした設備設計や操作がないと性能の劣化や不安定な水質を生じ、有機物や浸出した汚染物質が生じます。しかし、蒸留法は優れた技術で、広範囲な汚染物質を除去し多くのアプリケーションに適応します。

2) ろ過

ろ過技術には粒子除去効率の高い順から逆浸透(RO)、ナノろ過、限外ろ過(UF)、精密ろ過(MF)、粒子除去(粗ろ過)があります。MF膜は、孔径サイズで粒子を除去するよう設計されており、システムの様々なポイントで細菌や粒子を除去するために用いられます。設置場所に応じてフィルターの孔径は変わり、前処理工程では10～25 μ m孔径、最終処理、採水段階では0.2～0.45 μ m孔径が選ばれます。また、精密ろ過フィルターの表面修飾(陽性荷電)によりエンドトキシンを除去することも可能です。フィルターは効率的で交換も簡単ですが、日常的に使わない場合細菌汚染を広げます。また、場合によっては溶存物質を除去することができません。

UF膜は、細胞・組織培養や培養液の調製に影響を及ぼす細胞性エンドトキシンやヌクレアーゼの除去が可能です。溶存物質を除去することはできません。

RO膜は供給水の純度やフィルターの有効性にもよりますが、水精製プロセスに最も広く使われています。RO膜は細菌、エンドトキシン、無機物質、幾つかの有機物質を除去できますが、溶存ガスは効率的には除去できません。RO処理には時間がかかるため保存容器が必要になります。塩素やミネラル、コロイドなどによる粒子からRO膜を保護するため、RO処理には供給水の前処理工程が必要となります。RO処理は活性炭吸着、UV酸化のような適切な前処理により、多くのアプリケーションに広く用いることができます。

3) 脱イオン

脱イオン(DI)、脱ミネラルあるいはイオン交換は合成樹脂により供給水中のイオンを除去します。脱イオン(電氣的脱イオンを含む)は、Type I(超純水)、RGW(5. 超純水のグレードの項参照)の比抵抗値要求を安定して作り出す唯一の技術です。完全な脱イオン性能を出すためにはカチオン樹脂とアニオン樹脂を混合することがあります。DIカラムは有効期間中限定されたイオン結合能力を有しますが、粒子、エンドトキシン、細菌を除去できず、多くの有機物に対しては非常に限定された効果しかありません。イオン交換樹脂の品質と純度は重要な問題であり、特に再生時に注意が必要です。イオン交換樹脂から微生物の増殖と粒子の放出が考えられ、適切な水質を安定的に供給するには適切な前処理、モニタリング、メンテナンスが必要となります。脱イオンされた水はしばしば「ハングリーウォーター」とも言われ、汚染されやすく様々な物質の腐食を導く可能性があります。

4) 電気再生式イオン交換

電気再生式イオン交換装置(EDI)は、電氣的透析とイオン交換技術を組合せた方法で、長時間の連続運転も容易です。しかし、EDIシステム自体高価であり常に電力を必要とし、イオン以外の不純物を取り除く能力が低く、有機物、粒子、エンドトキシン、細菌を除去することはできません。また、EDIで脱イオンされた水が一旦リザーバータンクに貯められる場合、タンク内で容易に汚染さ

れやすく、高純水化した水の品質を維持することは難しいと言えます。

5) 吸着

吸着法は表面積の広い活性炭により供給水から塩素やクロラミンを除去するために使用され、サイズと種類を適切に選ぶことでTOCとして測定される有機物を効果的に減少させることもできます。吸着法は、他の方法と組み合わせて比抵抗値を最大限に上げTOCを下げるすることができます。但し、この手法ではイオンや粒子を除去することはできません。

6) UV 酸化

紫外線光(UV)による光化学酸化は、185nmでわずかな有機物を除去し254nmで微生物を不活化します。純水中の有機物の酸化はTOC値を下げますがイオン、コロイド、粒子を除去することはできません。有機物の酸化は二酸化炭素の上昇などのイオン化した汚染物質により比抵抗値を下げることもあります。

5. 超純水のグレード

水に関する仕様は、American Society for Test and Materials (ASTM) D1193, ASTM D1596, International Organization for Standardization (ISO) 3639, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 旧 NCCLS) C3-A4 に記載されています。

NCCLS(表1)では、歴史的に最も純度の高い水は“Type I”と記載され、超純水を意味します。そして、“Type II”, “Type III”はそれより低いグレードとなります。

表1 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards Reagent Grade Water Specifications)²⁾

Parameter	Type I	Type II	Type III
生菌数, max (CFU/ml)	10	1000	NS
pH, units	NS	NS	5-8
比抵抗値, min (MΩ・cm)	10	1.0	0.1
シリカ, max (mg/l)	0.05	0.1	1.0
粒子	0.22μm ろ過	NS	NS
有機物	カーボン ろ過	NS	NS

ISO(表2)は“Type”の代わりに“Grade”を使い、かなり基準が違います。ISO基準の範囲は無機化学物質の分析用試薬水に制限されており、ACS(American Chemical Society)もまた試薬用水の基準を設けていますが、多くの無機化学汚染に特定の制限を含みます。現行の特定されたレベルは多くのバイオメディカル用ラボウォーター用途には十分とは言えません(例えば比抵抗値が2MΩ-cm@25℃)

表2 EN ISO 3696:1995³⁾

Parameter	Grade 1	Grade 2	Grade 3	試験方法
pH at 25℃	Not applicable (Note 1)	Not applicable (Note 1)	5.0 - 7.5	Sub-clause 7.1
電気的導電率 mS/m at 25℃max	0.01 (Note 2)	0.1 (Note 2)	0.5	Sub-clause 7.2
酸化物質 酸素(O)含有量 mg/l, max	Not applicable (Note 3)	0.08	0.4	Sub-clause 7.3
吸光度 at 254nm/パス長1cm abs. unit, max	0.001	0.01	Not specified	Sub-clause 7.4
蒸発後残留物 110℃加熱 mg/kg, max	Not applicable (Note 3)	1	2	Sub-clause 7.5
シリカ(SiO ₂)含有量 mg/l, max	0.01	0.02	Not specified	Sub-clause 7.6

Note1: 高純度水のpH値測定は困難であり、測定値も信用することは難しいため、Grade1/2では数値を設定しない。1mS/m=10μS/cm

Note2: Grade1/2の導電率は新鮮な水に適合する。保存された水は空気中のCO₂やガラス容器からのアルカリ物質などで汚染される可能性があり、導電率に影響を与えるため

Note3: Grade1の酸化物質と蒸発後の残留物についてはこの純度レベルの試験要求に適合させることは難しいので特定しない。しかし、Grade1の水質は他の要求とその調整方法の要求により保証される。

CLSI(表3)はASTM D1193や古いNCCLS標準で使用する“Type I”, “Type II”という単語は使いませんが、代わりにCLRW(Clinical Lab Reagent Water)とSRW(Special Reagent Water), Instrument Feed Waterなどを起用しています。いずれも特別な規定はなく、アプリケーションに基づいて決められています。究極の水質や製造方法は、それぞれの基準をクリアしていると認識することが重要であり、あくまでもガイドとしてみる必要があります。それでも“Type I”, “Type II”という単語の使用は親しまれています。また、日本ではJIS K0557「用水・排水の試験に用いる水」と日本薬局方に精製水の基準があ

ります。以下に各基準を示します。

表3 Clinical Lab Standard Institute (旧CLS), C3-A4 Reagent Laboratory Water²⁾

Parameter	CLRW	SRW	Instrument Feed
生菌数, max (CFU/ml), plate count	10	Application Defined	NS
pH, units	NS	Application Defined	NS
比抵抗値, min (MΩ・cm)	10	Application Defined	NS
シリカ	NS	Application Defined	NS
粒子、コロイド	0.22μm ろ過	Application Defined	NS
有機物 (TOC), (ppb)	500	Application Defined	NS
エンドトキシン	Application Defined	Application Defined	NS

ASTMは以下の表4に示す通り、Type I, II, III, IV 試験グレード水 (D1193-06-20111) を設定しており、水質は更に Type A, B, C と生菌数とエンドトキシンレベルに適合して分類しています。

表4 American Society for Testing and Material ASTM D1193-06 (2011) Reagent Grade Water Specifications²⁾

Parameter	Type I	Type II	Type III	Type IV
比抵抗値 (min.), MΩ・cm (25°C)	18.0	1.0	4.0	0.2
pH (25°C)	NA	NA	NA	5~8
全有機体炭素 TOC (max.), μg/L	50	50	200	NS
ナトリウム (max.), μg/L	1	5	10	50
塩化物イオン (max.), μg/L	1	5	10	50
総シリカ (max.), μg/L	3	3	500	NA
	Type A		Type B	Type C
生菌数 (max.) (CFU/100ml)	1		10	1000
エンドトキシン (EU/ml)	<0.03		0.25	NA

それ以外の水質基準としては、米国薬局方 (USP) に記載されている注射用水 (WFI) と USP 精製水があります。USP には精製水に関するデザインガイダンスが含まれ、微生物の問題も認識しています。USP 精製水には導

電率、TOC、微生物測定を含み供給水システムの適正な水質を提供しますが、WFIを含む USP 精製水は多くの試験薬用ラボウォーターとしての要求には合致していません。

表5 USP27 Pharmaceutical Grade Water⁴⁾

Parameter	仕様
有機物	<0.5 ppm
導電率	<1.3ms/cm at 25°C インライン測定
エンドトキシン by LAL 純水 注射用水 (WFI)	NS <0.2 EU/ml
生菌数 (ガイドラインのみ) 純水 注射用水 (WFI)	100 cfu/ml 10 cfu/100ml

表6 College of American Pathologists National Committee for Clinical Laboratory Standards (CAP/NCCLS) Type⁴⁾

Parameter	Type I	Type II	Type III
導電率 (mS/m at 25°C)	0.1	1.0	10
比抵抗値 (MΩ/cm at 25°C)	10	1	0.1
総シリカ (mg/L)	50	100	1,000
pH	NA	NA	5.0 -8.0
生菌数 (CFU/ml)	10*	1000	NS
粒子	0.22mm フィルター**	NS	NS
有機物	活性炭 フィルター**	NS	NS

* Type I はおそらくバクテリアフリー

** プロセス仕様 (エンドユーザーの測定ではない)

表7 JIS K0557「用水・排水の試験に用いる水」⁵⁾

項目	A1	A2	A3	A4
用途	洗浄水	一般化学分析	試薬調製化学分析	有機物試験・微量成分化学分析
電気伝導率 mS/cm (25°C)	≤5	≤0.1	≤0.1	≤0.1
比抵抗 MΩ・cm (25°C)	≥0.2	≥1	≥1	≥1
全有機体炭素 (TOC) mgC/L	≤1	≤0.5	≤0.2	≤0.05
亜鉛 μgZn/L	≤0.5	≤0.5	≤0.1	≤0.1
シリカ μgSiO ₂ /L		≤50	≤5.0	≤2.5
塩化物イオン μgCl ⁻ /L	≤10	≤2	≤1	≤1
硫酸イオン μgSO ₄ ²⁻ /L	≤10	≤2	≤1	≤1

6. カスカーダ超純水システム(日本ポール株式会社製)

カスカーダII.Iシステムは、「4.水の精製方法」で解説した、ろ過、吸着、脱イオン、UV酸化を適切に統合し、水道水から直接純水を1時間あたり5～30L製造できる完全一体化した超純水製造システムです。本システムは純水(Type II)と超純水(Type I)を採水ディスペンサーから1分あたり2L採水することができ、水質と操作状況はリアルタイムで本体およびディスペンサーに表示されます。

1) 超純水システム

各国のType I水質基準標準(ASTM, CAP, ISO3696, CLSI)に準拠し、あるいは基準以上の品質を有します。超純水は以下のより厳しいアプリケーションに適しています。

- ・分析機器：HPLC、UHPLC、AA、ICP-OES、LC/MS、LC/MS/MS、GC/MS、ICP-MS、イオンクロマトグラフィ、電気化学分析、パーティクルカウンター、TOC分析
- ・ライフサイエンス機器：PCR、DNAシーケンス、電気泳動
- ・細胞培養液調製、モノクローナル抗体調製

2) 純水システム

各国のType II純水標準(ASTM, CAP, ISO3696, CLSI)に準拠あるいは基準以上の品質を有します。また、JIS K0557「用水・排水の試験に用いる水」のA3に相当する水質であり、日本薬局方で定められている精製水の基準も満たしております。純水は以下のより高感度なアプリケーションに適しています。

- ・バッファー調製、pH調製用液、微生物用培地調製、分析・合成用化学試薬調製
- ・超純水製造用水、自動ガラス器具洗浄用水、臨床分析機・蒸気滅菌機用水

3) 製品仕様

水質 Cascada II.I		
タイプ	純水 (Type II)	超純水 (Type I)
比抵抗 (MΩ・cm@25℃)	>5	18.2
TOC (ppb)	<30	≤5***
バクテリア (CFU/mL)	<0.1*	<0.1*
粒子 (>0.2μm)	<1/mL*	<1/mL*
エンドトキシン (EU/mL)	<0.001**	<0.001*

* バクテリア用POU 設置時

** エンドトキシン用POU 設置時

*** 供給水のTOCが2ppm以下の場合

水質 Cascada III.I		
タイプ	純水 (Type II)	超純水 (Type I)
比抵抗 (MΩ・cm@25℃)		18.2
TOC (ppb)		≤5***
バクテリア (CFU/mL)	<0.1*	<0.1*
粒子 (>0.2μm)	<1/mL*	<1/mL*
エンドトキシン (EU/mL)		<0.001*

* バクテリア用POU 設置時

** エンドトキシン用POU 設置時

*** 供給水のTOCが2ppm以下の場合

水質 Cascada III	
タイプ	純水 (Type III)
イオン除去率	>99%
有機物除去率	>99%
バクテリア (CFU/mL)	<0.1*
粒子 (>0.2μm)	<1/mL*

* バクテリア用POU (0.2μm)設置時

水質 Cascada I	
タイプ	超純水 (Type I)
比抵抗 (MΩ・cm@25℃)	18.2
TOC (ppb)	≤5***
バクテリア (CFU/mL)	<0.1*
粒子 (>0.2μm)	<1/mL*
エンドトキシン (EU/mL)	<0.001*

* バクテリア用POU 設置時

** エンドトキシン用POU 設置時

*** 供給水のTOCが2ppm以下の場合

参考文献

- 1) National Institute of Health. Laboratory Water - It's Importance and Application. 2013, 22p.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Fourth Edition. CLSI document C3-A4-AMD. 2006, 49p.
- 3) BS EN ISO 3696:1995. Water for analytical laboratory use - Specification and test methods.
- 4) "USP, ASTM, and CAP pure water standards - 2008". NALCO Cal Water. http://www.cal-water.com/pdf/whitepapers/USP_and_ASTM_pure_water_standards.pdf
- 5) JIS K 0557:1998. 用水・排水の試験に用いる水。

感染症四方山話(9): 家庭でできる微生物実験 その2

Various topics concerning infectious diseases (9) Microbiological experiments in the home (2)

東京女子医科大学 感染症科 教授 菊池 賢
Ken Kikuchi, MD, PhD.(Professor)

Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University

1. はじめに

THE CHEMICAL TIMESの連載もいつの間にやら9回を数えるようになった。感染症ネタは浜の真砂のように尽きるまじ。お楽しみはこれから。

ついでに私事ながら、4月1日より元在籍していた東京女子医科大学に8年ぶりに戻ることにになった。大学院生の指導中心の研究生活から、一気に臨床・感染対策が中心の生活にコペルニクスの転回と相成った。奇しくも前号で述べた自分の描く理想の感染症医を育てることが第一の仕事となった訳である。およそ学問的とは言えないこの随筆ではあるが、日々の気分転換に、今後も引き続きお付き合い願いたい。

さて、2010年、No.3(217号)の感染症四方山話第1回は「家庭でできる微生物実験」であった。時期的に夏休み前であり、問い合わせが結構あったと聞く。以前から、「あの続編を」との希望が編集部にも寄せられていた。出し惜しみしていた訳ではないが、夏休み前というタイミングを逸していたのだ。今回の原稿が掲載される頃は丁度、その時期になろう。ルールは前回同様、夏休み自由研究にも応用ができるように「家庭内にあるもののみを使用する」である。それでは「家庭で楽しむ微生物実験 第二部」の始まり、始まり。

2. テーマの選択:身の回りから抗菌物質を探そう

さて、家庭で微生物実験をしようと思った時、何が一番、子供達の興味を引くのであろうか。家庭内にあるものを用いた上で、

- 1) 結果が目に見え、わかりやすい。
- 2) 自分の日常生活に置き換えて、想像力をかき立てる。
- 3) 安全で、病原性、危険性がない。

ことが条件となろう。それでは、何を調べてみようか。

最近の日本人の抗菌製品好きは異常な程だと思うが、古来、我々は高度な低温殺菌技術であるパスチュリゼーションを日本酒の「火入れ」としてパスツールが記載する200年以上前から使いこなしてきた。一方で、梅干し、わさびなど天然の抗菌物質を食中毒や腐敗防止に役立ててきていた。発酵と抗菌をうまく使い分けてきた民族なのである。こうした技術を応用し、最近では弁当にのせる「わさびシート」も発売されている。また、香辛料のタイム、オレガノ、クローブなどから得られる精油には強い抗菌活性があることも経験的に知られていた。植物には我々の持つような免疫担当細胞による複雑なネットワークを介する生体防御機構はない。その代わり、自身の産生する様々な抗菌物質による自然免疫(innate immunity)を発達させている。我々の身の周りには抗菌物質は思った以上に普遍的にあるのだ。

医療機関においては、抗菌活性は、感染症由来微生物に対する治療薬を選択するため、「感受性試験」という検査で日常、測定されている。古くから用いられているのは「ディスク法」という手法だ。調べたい患者から分離された病原菌を寒天平板に塗り広げ、その上に候補となる治療薬を含んだ濾紙ディスクを置く。濾紙ディスクからは抗菌薬が同心円状に寒天にしみ

出し、一定の濃度勾配を形作る。孵卵器に入れ、培養すると、その病原菌がある抗菌薬に感受性を示せば、一定の濃度の所で発育が阻止される。即ち、濾紙の周りに「発育阻止円」と呼ばれる、菌の発育しない部分ができる。この直径を測定して、抗菌薬が実際に使用された時に、感染巣内で効くかどうかを判定することになる。

抗菌活性の検出はこれをそのまま使用すれば良い。指標微生物の上に、抗菌活性を調べたい物質を液状にして、スポットする。ディスク法では抗菌薬をしみ込ませた小さな(直径6ないし8mm)濾紙を寒天平板上に置いていく。ディスク以外では金属製の円筒を置き、その中に抗菌薬溶液を注入するカップ法等がある。こうした手法は実験室内でしか用いられない特殊な物品(濾紙、金属製カップ)を必要とするが、当然、家庭内にはない。しかし、考えてみよう。第一の目的は「抗菌活性があるか、ないか」の判定にある。厳密な定量性を求めている訳ではない。要は、一定量、あまり平板に広がらないように、載せることができれば良い。とすれば、「試料を寒天平板に直接1滴、滴下する」、「同じ位の面積になるよう、爪楊枝などで塗り付ける」で十分だ。また、実例を後程示すが、ストローを使えば、簡単に寒天に一定口径の穴を開けることはできる。

問題となるのは、抗菌活性を検証する指標微生物に何を選ぶかである。実験室なら、純培養した微生物が保管されており、指標微生物を-80℃などの保管状態から、再度、培養して、汚染がないことを確認した上で、実験に供する。即ち、家庭内実験で一番問題になるのは、「純培養した微生物をどのように入手するか」である。微生物実験では「コンタミネーション、汚染」を最も嫌がる。汚染は実験の失敗を意味し、屈辱である。家庭内実験であってもコンタミネーションは許すまじ。

味噌、ぬか漬け、キムチなどの各種漬け物、甘酒、ヨーグルト、ワイン、最近はやりの麹など、家庭内には生きたままの微生物を含む食品は多く、本来は材料に事欠かない筈である。しかし、発酵食品の多くは複雑な菌叢が地域や「家」の伝統の味を再現している訳で、これらから実験対象となる微生物を分離・増殖させるのは難易度が高く、子供の科学にはちと無理がある。では純培養した微生物はないのだろうか。

麹は近年のブームでスーパーマーケット等でも置いてあるところが増えた。いわゆる「もやし(種麹菌)」は *Aspergillus oryzae* を蒸し米(rice agarだ!)で増殖させたものだ。麹表面の緑色の粉状の分生子を取れば、ほぼ純培養菌として使用することができる。しかし、糸状菌は増殖させれば、菌糸を延ばし、分生子を作る。形態的にも大きくなり、試料に抗菌活性がないか、微弱であれば、周囲の菌糸、分生子に覆い尽くされて、何が何だかわからなくなるだろう。また、麹に病原性・危険性はないが、分生子を周囲に撒き散らすことにはなろう。台所にある様々な食品に麹菌が汚染することにもなりかねない。これは避けたい。

その点、四方山話1に書いたように納豆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *natto*: 正確には枯草菌の亜種)は便利だ。最近では自家製納豆用に純培養した芽胞液も市販されている。台所に納豆菌芽胞を常備している家庭は稀だろうが、納豆はコンビニでも売っている。高温で培養することで、他の腐敗菌の汚染を防いでいるため、ほぼ純培養となっている。また、近年の家庭用ベーカリーの普及等で、スーパーなどでドライイーストが簡単に入手出来る。これも扱いやすいだろう。

それでは、パウル・エーリッヒがフレミングになったつもりで、「抗菌物質、抗真菌物質を探して」みることにしよう。

3. 材料と方法

材料、機器 図1～9参照

■納豆:

何でも良い 今回はおかめ納豆を使用(図4)

■ドライイースト:

日清 ホームベーカリー用スーパーカメラヤ ドライイースト(3g包装品)(図4)

■マグカップ2個(菌液調整用)

■培地の材料(図1)

砂糖や寒天末をg単位で秤量するのは難しいので、簡便なスティックタイプや固形コンソメの素を使用した。

- コンソメの素: 今回は味の素 固形コンソメを使用
- グラニュー糖(コーヒー用のスティックシュガー 3g)

入りを使用)

- 粉末寒天(松本寒天産業製 4g入りスティックタイプ)

■ 培地を流し込む容器:

100円ショップで見つけた蓋にエア弁のついたタッパーウェア 3個 100円(山田化学製 ビストロシェフ)(図3)

■ 滅菌綿棒(100円ショップの開封していない綿棒でOK)

■ スポイト(試料添加用、文房具店やスーパーで入手可能)

■ 駒込ピペット用ゴムキャップ(文房具店で入手可能)

■ ストロー(口径5mmの比較的太い個別包装のもの:駒込ピペット用ゴムキャップがピタリと入る)

■ 消毒用アルコール

■ 大きめの耐熱ガラス容器かタッパーウェア(ここでは、パスタを電子レンジで作るガラス容器を使用した)(図5)

■ ティッシュペーパー

■ おろし金(おろしにんにく作成用)

■ 抗菌力を調べた試料(図2)

- チューブ入り生姜(ハウス食品 おろし生しょうが)
- チューブ入りからし(ハウス食品 ねりからし)
- チューブ入りおろしにんにく(ハウス食品 おろし生にんにく)
- チューブ入りわさび(カメヤ おろし伊豆本わさび)
- チューブ入り西洋わさび(ハウス 無着色ホースラディッシュ)
- チューブ入り梅肉(ハウス 無着色梅肉)
- チューブ入りバジルペースト(イタリア GIA製)
- 辣油(ハウス 辣油 辛口)
- にんにく(青森産)

■ 手指消毒用アルコールゲル(薬局で購入可 コントロール用)



図1 培地材料



図2 抗菌力を調べた試料



図3 寒天を入れた容器



図4 指標微生物として使用したドライイーストと納豆



図7 ストローで培地に穴を穿つ



図5 培地作成用耐熱ガラス容器(パスタ用)

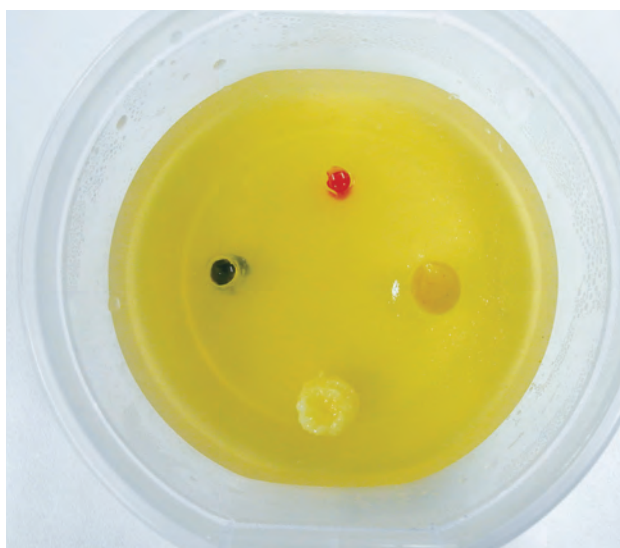


図8 試料添加後の培地

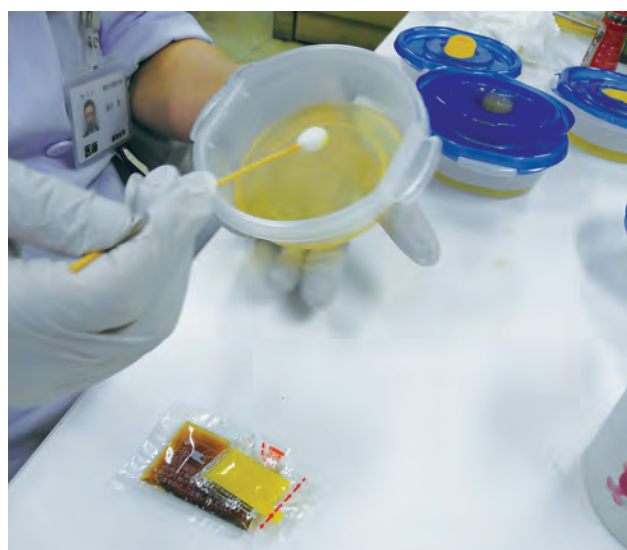


図6 綿棒で培地に菌液を塗布する



図9 試料添加終了した培地

■簡易孵卵器：

発泡スチロール製保冷コンテナ（魚などを入れる保冷箱である）

■2Lのペットボトル

■温度計

■電子レンジ

■やかん

方法

1. 簡易孵卵器の作成

これは四方山話1で使用したもの。保冷コンテナの蓋に錐で穴をあけ、温度計をさして、孵卵器とした。沸騰したお湯を入れたペットボトルが熱源である。12時間程 $>37^{\circ}\text{C}$ を保つことができる。培養用。

2. 培地を入れる容器(図3)は洗って、消毒用アルコールでよく拭いた。

3. 菌液調整用マグカップは水を入れ、電子レンジで沸騰させて、熱湯消毒した。

4. 培地作成

水 300ml、コンソメの素1個、粉末寒天1本(4g)、スティックシュガー1本(3g)を耐熱ガラス容器に入

れ、電子レンジで加熱する。沸騰して、内容物が全て溶解し、透明になったら取り出して、触れる位まで(50°C 位)室温で冷ます。

冷めたら、培地作成用のタッパーウェアに30mlずつ注ぎ込み、固める。

5. 納豆1パックを菌液調整用マグカップに入れ、水100 mlを加えて、よく混ぜる(納豆菌液)。

6. ドライイースト1袋を菌液調整用マグカップに入れ、水100 mlを加えて、よく混ぜる(イースト菌液)。

7. 各菌液に綿棒を浸し、冷えて固まった寒天の上を傷つけないように塗る。寒天が完全に固まってから作業すること(図6)。

8. ストローに駒込ピペットのゴムキャップをかぶせ、ゴムを押したまま、垂直に寒天に穴を開ける。ゴムを開放しながら(ストローの中に入った寒天を吸い上げながら)、ストローをゆっくり引き上げると、ストロー口径の穴が開く(図7)。

9. 調べたい試料を寒天の穴の中にスポイトを用いて入れる(辣油、おろし生にんにく、アルコールゲル、バジルペーストで使用)。チューブ入りのものはそのまま、寒天平板の上に載せる(図8)。

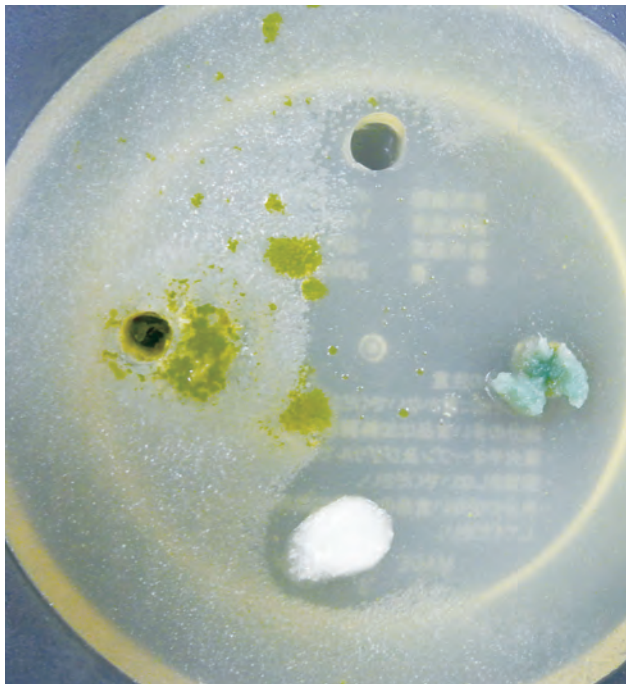


図10 納豆菌の発育阻止円

上より左回りにアルコールゲル、バジルペースト、チューブ入りにんにく、おろし生にんにく(緑色に変色)
おろし生にんにくで大きな阻止円が観察出来る。アルコールでは阻止円内部に芽胞から発育したと思われる数個のコロニーが観察出来る。

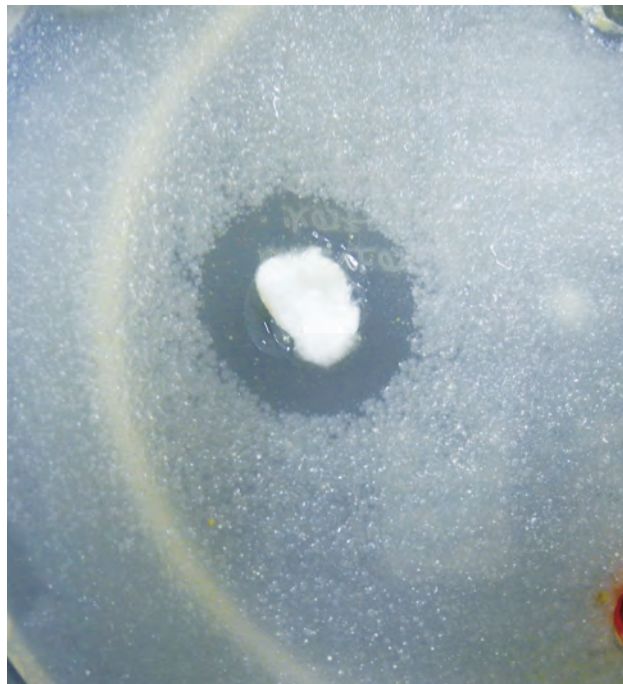


図11 チューブ入りにんにくによる納豆菌の発育阻止円拡大図

10. 寒天容器の蓋をした後、蓋は開のまま簡易孵卵器に入れる(図9)。
11. 温度計を見て、簡易孵卵器の温度が37℃以下にならないように、お湯を時々交換する(1回の交換で12時間位、温度を保つことができる)。
12. 24時間後に取り出して、阻止円ができたかどうか、確認する。

4. 結果

図10, 11にチューブ入りにんにく、おろし生にんにくの納豆菌に対する発育阻止効果(阻止円)を示す。生にんにくの抗菌作用はずば抜けており、非常に大きな阻止円を形成しているのがわかる。チューブ入り生姜にも小さい阻止円を認めた。梅肉は納豆菌の増殖を強力に抑えた。アルコールゲルは芽胞には効かないので、小さな阻止円の中に納豆菌がばらばら生えてきていた。バジルペースト、辣油、チューブ入りわさび、チューブ入り西洋わさび、チューブ入りからしは抗菌活性を示さなかった(表1)。

表1 各試料の抗菌活性

試料	標的微生物に対する 阻止円直径(mm)	
	納豆菌	パン酵母 (イースト)
チューブ入り生姜	7	0
チューブ入りからし	0	0
チューブ入りにんにく	14	8
チューブ入りわさび	0	0
チューブ入り西洋わさび	0	0
チューブ入り梅肉	80	0
チューブ入りバジルペースト	0	0
辣油	0	0
おろし生にんにく	55	35
アルコールゲル	13	14

5. おわりに

にんにくに含まれるアリインはスルホキシドで、システインから合成される。にんにくをすりおろすと、細胞内に含まれるアリナーゼが活性化し、アリインは強力な抗菌物質アリシンに変換される。これがにんにくの抗菌活性の正体である。調べていたら、海外ではこのアリシンがAllimaxというサプリメントとして販売されていることに驚いた。これだけ強力かつ広域抗菌スペクトラムを持つものをサプリメントとして摂取したら、腸内細菌叢は大きく変化すると思うのだが。どのように使用されているのか、興味深い。また、Allimaxはライム病の治療薬として治験も行われているようだ。いつの間にか、にんにくはメジャーの舞台に躍り出ようとしている。

今回、作成した寒天は酵母の発育にはあまり適さなかったようで、発育は納豆菌より不明瞭だった。以前、よく真菌培養に用いるMalt extract agarを模して、「ビール培地」で実験した経験があり、こちらは非常に発育が良かったので、イーストを指標とする場合には、こちらの培地の使用をお勧めする。作り方は簡単である。今回と同じ寒天4g、砂糖3gに、コンソメの素と水の代わりに一晩放置して炭酸とアルコールの蒸発した(気の抜けた)Pure maltのビール(エビス、ピュアモルトなど)300mlを加え、電子レンジで溶かし、容器に流し込めば良い。余談だが、この時、一番最初はいわゆる混釈培地を作成した。すなわち、ドライイーストを冷めたビール培地に塗るのではなく、固まる前にドライイーストを培地の中に加え、均一にしてから、容器に流し込んだのだ。すると、驚くべきことが起こった。みるみる培地は膨張し、あたかも地表に活火山が誕生したように、山頂が炸裂し、「ばふっ」と炭酸ガスを放出した。一瞬の出来事にしばし呆然とした。これは何か細めの容器に入れれば、容器から飛び出してくる寒天の姿に酵母発酵のダイナミックさを更に実感出来るのではないかと思う。お試しあれ。

試料調製には、例えばタイム、オレガノなどの香辛料ならサラダ油などと一緒に砕く、紫蘇、バジルのような葉もの、花卉、みかんの皮のようなものなら水を少し加えてブレンダーにかけるか、すり鉢ですりつぶせば良い。かように本実験は様々なバリエーションが可能である。いろいろ工夫して試して頂ければ、夏休み、親子で楽しいひと時を過ごせるのではないかと思う。是非、お試しあれ。

最近のトピックス

ラボ用超純水・純水製造システム 日本ポール 新カスカダ

正確な研究結果のためには、使用する高品位な水を確保することが重要となって来ています。昨今では、ラボスケールでも、国際基準に適合する高品位な超純水・純水を要求されるケースが増えています。このニーズに応えるラボ用超純水・純水製造システム日本ポール株式会社製「新カスカダ」が昨年販売開始されましたので、紹介させていただきます。

一体型ラボ用超純水製造システム カスカダII.I 5/10/20/30

カスカダII.Iは、供給水(水道水)から純水を1時間あたり5~30L製造できる完全一体化した超純水製造システムです。本システムは純水と超純水を採水ディスペンサーから1分あたり2L採水することができ、採水中の純水や超純水比抵抗値、リザーバータンク内純水の残量、採水速度や消耗品の交換のお知らせ等がリアルタイムに本体またはディスペンサーのディスプレイに表示されます(図1、2)。

また、タンク循環システムによりタンク貯水は超純水ループを通して循環するため、滞留による雑菌の繁殖が効果的に抑制され、タンク貯水の水質を常時高純水レベルに維持する事が可能です。更にリザーバータンクに比抵抗センサーを設置し、タンク水質を管理することができます。リザーバータンク容量は35、70、105Lが用意されております。リモートディスペンサースタンドは上下動タイプで非常にコンパクトに設計されており、限られたスペースを最大限に活用することができます(図3)。その他に、2段階RO精製システム、大容量ダブルイオン交換カートリッジ、ループ消毒機能や使いやすいインターフェースなどを備えた次世代型のシステムです。

その他のラインアップとして別工程で製造された純水を供給水とする超純水製造システムや純水製造システムもございます。

本システムは使いやすさ、メンテナスのしやすさ、ランニングコストの低減はもとより最高級の水質維持を追及しており、日常的に純水・超純水をお使いのお客様に、必ず貢献できると期待しております。



特長		
前処理機能	前処理モジュール	3.2インチカラーディスプレイ・圧力センサー(特許)・加圧ポンプ(特許)
	前処理カートリッジ	供給水質に適合した4種類(精密ろ過・活性炭)のツインカートリッジ
	漏水検知	漏水検知センサー
本体	ROシステム	高純度2段階RO製造システム(特許)
	RO製造量	5/10/20/30L/h、RO水高回収キット
	マルチステージモニタリング	6カ所の比抵抗計・導電率計、3カ所の流量計、3カ所の圧力計
	イオン交換カートリッジ	RO水・DI水・低TOC・低ホウ素用カートリッジ、2段階システム、大容量ツインカートリッジ
	ディスプレイ	7インチ液晶カラータッチパネル
	インターフェース	操作・設定・履歴・メンテナンス・問合せ画面、日本語対応、ソフトウェア更新可能
	データアクセス	SDカード・RS232C対応、専用プリンター
	漏水検知	漏水検知センサー
	消毒	完全消毒システム(純水ループ・超純水ループ)
	タンク循環システム	タンク貯水の水質維持・Type II 純水の採水(カスカダII.Iシリーズのみ)
タンク機能	タンク水質モニタリング	タンク貯水水質を比抵抗計でモニター(業界初)
	タンクUVランプ	254nm UVランプ(オプション)
	タンクレベルセンサー	5段階レベル表示・オートストップ機能
	タンク容量	35/70/105Lの3種類
	耐震機能	転倒防止用フック
採水機能	ディスペンサー	2.4インチカラーディスプレイ、フレキシブルディスペンサー(本体)、リモートディスペンサー
	採水機能	4段階採水スピード・定量採水・コンパクト設計
	フットスイッチ	ブラケットディスプレイ方式



図1 採水ディスペンサーのディスプレイ表示



図2 メインユニット(本体)のディスプレイ表示



図3 設置例