

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ルム中に蓄積します。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、バイオフィル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、導電率に影響をするため

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 試薬グレード水 (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。