ISSN 0911-940X

衛研 技術情報
VOL.12 NO. 2 1988

細菌によるバイオハザードとその対策(II)

"細菌"という生物を取扱う実験室では実験者に対し、常に基本技術が要求される。基本技術は滅菌・消毒、無菌操作についての理論と完璧なテクニック、及び必要に応じこれらが反射的に実行できるよう、平素から訓練しておくことであるといわれている。しかし、この基本技術を身につけていても、ちょっとした気のゆるみ等から、実験室内感染を起こす事例が報告されている。

さきにこの技術情報(VOL 11、No.3)で1978年に国立予防衛生研究所のバイオハザード委員会が日本の国情に合わせて作成した「病原体等の危険度分類基準」による「病原細菌の危険度分類表」を紹介した。今回はこれらを作成するに当って用いられた資料をもとに、実験室内感染の原因など、バイオハザードの対策について述べることにする。

実験室内感染は菌の病原性、毒力等の細菌側の要因と、実験者の菌に対する知識、技術の不足、不注意な取扱い方法等人側の要因の2つに大別できると思われる。

1 細菌側の要因

各種細菌による実験室内感染の頻度を表1に示した。この表には取扱った回数、延時間、人数等が示されていないため、それぞれの菌による実験室内感染の頻度を直接比較することはできない。

NIHの文献集計では11種類の病原菌が示されている。腸チフス菌、ブルセラ、野兎病菌はいずれもチフス症を惹起し、重篤な全身性の疾患の病原菌である。ブルセラ、野兎病菌は人畜共通感染症の病原菌であり、保健所の検査室ではややなじみのうすい細菌と思われる。結核菌を含めたこれらの細菌は危険度分類表ではクラス3aに区分されている。

日本においては米国等と国情が異なることから取扱う菌種にも相違があるものと思われ、NIHと国立予防衛生研究所のデータを比較することはできない。例数は少ないものの国立予防衛生研究所における発生例をみてみると、結核菌によるものが特に多い。以下、赤痢菌、ブルセラ等5菌種がみられる。この表には感染したヒトの知識、経験年数の他に取扱った回数、時間等が示されていないため、それぞれの菌による実験室内感染の頻度を直接比較することはできないが、保健所等の検査室で取扱われる結核菌、赤痢菌、チフス菌等に感染例がみられることは注目されよう。

表1 細菌による実験室内感染の頻度

原因菌	例数	
	文献集計 (NIH Biohazard Safety Guide)	国立予防衛生研究所での発生例
腸チフス菌	293	2
ブルセラ	276	3
結核菌	217	18
野兎病菌	133	
れんさ球菌	67	
サルモネラ	54	
赤痢菌	54	5
レプトスピラ	45	
ジフテリア菌	40	2
炭疽菌	36	
破傷風菌	6	

表2には各種の細菌がボランティアの20～50%を発症せしめる菌量を示した。実験室内感染の頻度の高い菌種は当然のことながら少ない菌量で発症するものであり、B群赤痢菌のある菌型では経口投与した場合、わずか180個で約半数のヒトを発症させることが示されている。さらにこれとは

表2　Volunteersの20～50%を発生せしめた菌量

菌	接種経路	菌数
野兎病菌	経気道	10
赤痢菌（フレキシネル）	経口	180
炭疽菌	経気道	71,300
腸チフス菌	経口	10^5
コレラ菌	〃	10^8
大腸菌	〃	10^8
赤痢菌	〃	10^9

NIH Biohazard Safety Guide（1974）

別に赤痢菌やチフス菌の感染菌量は10^3個以下との記載がみられる。

すでに述べたように、保健所等における検査室では赤痢菌、チフス菌、結核菌等を含んだ臨床材料を検体として取扱っている。一般的に臨床材料中の病原菌は継代培養をくり返した菌株に比較して病原性、毒力ともに強い。その取扱いには充分な注意が必要であろう。

2　人側の要因

実験室内感染の原因を表3に示した。この表からも判るように実験室内感染では原因が判明するものは20%以下であり、80%以上が不明である。

事故原因が判明しているもので、比較的頻度の高いものにピペットから口中への吸い込み、すなわち安易なピペット操作が挙げられている。例えば、実験者が1人で10mlのピペットを用い液状の検体を中試験管に接種する場合、モルトン栓を操作する時など、ピペットの先端から水滴が飛散することを経験された方もあろう。これは2人（術者と助手）で実施することにより防ぐことができるが、やむを得ず1人で行う場合にはピペット缶は常に実験者のきき手の側におき、もし水滴が飛散してもピペットを汚染させないような配慮が必要である。さらに滅菌したピペットをピペット缶から取り出す時にはピペットの先端が缶の上面にふれるよう行うべきである。横道へそれたきらいがあるが、その他事故原因には注射器の操作ミス、実験動物取扱いミス等7項目が示されている。

これらの事故原因の大部分は実験者の不注意や無関心、若しくは横着き等に起因するものである。細菌の取扱いにあたっては常に基本に忠実で、しかも細心の注意のもとに行われるべきであろう。

表3　実験室内感染の原因（3,700例における%）

原因	事故	発生例（%）
判明	1）ピペットから口中への吸込み	4.7
	2）あやまって注射器で接種	4.0
	3）実験動物にかまれた	1.4
	4）注射器から飛散	1.2
	5）遠心沈澱事故	0.8
	6）汚染硝子器による切創	
	7）動物解剖中、器具で切創	
	8）菌培養をこぼした	
計		計<20
不明	おそらく菌のエロゾール	計>80

NIH Biohazard Safety Guide（1974）

不明のものの大部分はおそらく菌のエロゾールによると示している。

表4にエロゾールを発生させると考えられる操作が示されている。この表に示された集落数はこれらの操作を行った場合、その操作の部位から60cmの距離にある空気をサンプリングして培養した平板培地に発育したものである。

この表では空気の採取量、時間等が示されていないが、ブレンダーで混合直後密栓をとった場合などには周囲に無数の細菌が飛散することを示している。陰圧、陽圧を問わず、混合直後に行われる密封容器の開封はエロゾールの発生源となることから、開封にあたっては充分な注意が必要と思われる。

表に示された操作をそのまま行うことは少ないが、保健所等で行われる結核菌の検査においてはここに示された操作に類似した作業のいくつかを行わなければならない。結核菌はさきに示したごとく、国立予防衛生研究所における実験室内感染が最も多いことから、喀痰や菌株の取扱いはより慎重に行わなければならない。

微生物検査必携にはエロゾールの発生源とその対策、エロゾールの拡散及び吸入防止に関する施設、設備が記載されており、ソフト面とハード面からの安全管理が特に示されている。より安全性の高い施設の整備は必要であるが、理想の施設のすべてを短時日のうちに整備することは不可能で

表4　各種操作で空中へ飛散する細菌数

操　　作	集落数
ブレンダーで混合直後、密栓をとる	無　数
凍結乾燥アンプルの開封	36
遠沈上清をフラスコにあける	17
熱した白金耳を培養フラスコに入れる	9
振とう培養瓶の綿栓をとる	5
寒天平板への菌液1㎖ピペット接種	3
50㎖ブイヨン中に菌液1㎖のピペット接種	1

NIH Biohazard Safety Guide (1974)

ある。とりあえずできることから行い、例えば結核菌検査において検体(喀痰)の接種にはゴム帽よりは安全ピペッターを用いるべきであろう。

3　バイオハザードの対策

バイオハザードは実験者個人のモラルである程度防止できるといわれている。このことは実験者の知識、技術、経験、注意力等に負うところが大きいと思われる。例えば、バイオハザードがあまり注目されなかったかなり以前においても、危険防止の面のみではなく、細菌汚染をも防ぐ観点から、いろいろな注意が実験室内の作法として、各種の実験書等に示されている。

それらをここに示す。

(1) 実験室内での飲食、喫煙、食品の保管は行わない。

(2) 雑談をしながら細菌を取扱わない。

(3) 実験室は窓およびドアーを閉鎖する。

(4) 使用済みの培地および菌に汚染した液体廃棄物は可及的すみやかに121℃20分以上加熱したのち廃棄する。

(5) 加熱できない器具等が菌に汚染した場合、直ちに消毒液につける。

(6) 口を用いるピペット操作の場合、なるべく綿栓をつめたピペットで行う。

(7) 作業台は実験終了後毎回、および菌が漏れて汚染した場合にはその都度直ちに消毒する。

このような作法は菌を取扱う者が当然守るべき原則であり、バイオハザード対策はこれを標準として菌の危険度に応じて、いろいろな予防措置がとられるものである。予防措置としては施設の整備、器具器材の改良、実験者に対する教育等があげられるが、最も大切なことは実験者のモラルであろう。

最初に述べたごとく、細菌を取扱うにあたっては実験者のすべてが実験室内の作法を守り、現有の設備および器材の範囲内で工夫し、それぞれがバイオハザードを防止しなければならないと考える。

参考文献

1. 金井興美：病原細菌の危険度分類、日本臨床 38(2)、274−283、1980.
2. 岩田和夫編：微生物によるバイオハザードとその対策、初版、ソフトサイエンス社、東京、1980.
3. 厚生省監修：微生物検査必携、細菌・真菌検査、第3版、財団法人日本公衆衛生協会、東京、1987.
4. 近藤正臣：日本細菌学会バイオハザード防止指針について、日本細菌学会雑誌、39(6)、881−903、1984.
5. 斉藤　誠、中谷林太郎、橋本　博、松原義雄編：腸管感染症、医典社、東京、1984.
6. 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要、改訂5版、丸善、東京、1976.

(細菌部　船橋　満)

逆相クロマトグラフィー

1　逆相クロマトグラフィーとは

分析に携わる者にとって、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、なくてはならない分析法である。クロマトグラフィーとは、固定相と移動相との間の物質の挙動の差を利用して、いろいろな成分の混合物である試料中から単一成分を分離し、定性あるいは定量するという分析法であると定義される。ここでいう固定相と移動相とは、TLCの場合にはTLCプレートと展開溶媒に、GCの場合にはカラムとキャリアーガスに、またHPLCの場合にはカラムと溶離

液（移動相と呼ばれる方が多い）にそれぞれあたり、用いられる固定相と移動相の組合せによりTLC、GC、HPLC等に分類される。またそれとは別に、固定相と移動相に用いられる物質の極性の違いにより順相および逆相クロマトグラフィーに分類される。順相クロマトグラフィーとは、固定相に極性の大きな物質を、移動相に極性の小さな物質を用いるものであり、着色料の分析に用いられるシリカゲルクロマトグラフィーに代表される。反対に、固定相に極性の小さな物質を、移動相に極性の大きな物質を用いるものを順相の逆という意味で逆相クロマトグラフィーと呼ぶ。

この逆相クロマトグラフィーはシリカゲルの表面をシリコンオイルやパラフィンなどでコーティングして従来から行われていたが、操作性や再現性の点で問題があった。しかし、シリカゲル表面の極性基を非極性のアルキル基で化学修飾した、化学修飾型シリカゲルが固定相に用いられるようになってから飛躍的に進歩し、現在では逆相クロマトグラフィーなしではHPLCについて語れないとまで言われるに至っている。HPLCにおける逆相クロマトグラフィーの進歩にともない、化学修飾型のシリカゲルはTLCにも用いられるようになり、それぞれ順相のTLC、HPLCと区別するために逆相（reversed phase，RP－）TLC、HPLCと呼ばれる。

逆相クロマトグラフィーにおいて、試料中の各成分は、固定相と移動相の二相間の分配比の差（溶解度の差）に基づいて互いに分離されると考えられている。従って、極性の小さい成分（脂溶性の高い成分）ほど保持は強く、反対に、極性の大きい成分（水溶性の高い成分）ほど保持が弱くなる。逆相クロマトグラフィーの移動相としては、pH緩衝液などの水溶液にメタノールなどの有機溶剤を一定の割合で混合した溶液を用いるのが普通であるが、実際にRP-TLC、RP-HPLCの分析条件を検討するにあたり、分離に影響を与える因子として考えなければいけないものは、移動相中の 1）有機溶剤の種類、 2）有機溶剤の割合、 3）水溶液のpH、の3点である。

1）については、通常用いられるのはメタノールあるいはアセトニトリルであるが、満足すべき分離が得られない場合には、2種類を混合して用いたり、他の溶剤を添加したりする。2）については、有機溶剤の割合が増えれば固定相への保持が弱くなる、つまりTLCの場合はRf値が大きくなり、HPLCの場合は保持時間が短くなる。反対に、有機溶剤の割合が減れば、保持は強くなり、Rf値は小さく、保持時間は長くなる。従って、適当なRf値あるいは保持時間を得るためには、移動相中の有機溶剤の割合を調節する必要がある。分析対象成分がイオン性物質の場合、 3）の水溶液のpHを調節する必要がある。なぜなら、イオン性の物質は、水溶液中では解離状態と非解離状態の平衡状態で存在しており、もしpHが変化して平衡が解離状態に傾けば水溶性が増し保持が弱くなり、非解離状態に傾けば、反対に保持は強くなる。このように、イオン性物質の保持は移動相のpHに大きく影響されるため、分析の再現性のためにpHを安定させる必要があり、水溶液としてpH緩衝液が用いられる。

一般的に、イオン性物質は水溶性が高いため固定相への保持が弱くそのままでは中性物質と同時に分離、定量することは困難である場合が多い。そこで、イオン性物質の保持を強めるために、イオン抑制法あるいはイオンペア法という方法が用いられる。イオン抑制法は、移動相のpHによって保持が大きく変化するという性質を利用して、イオン性物質の保持を移動相のpHによって調節する方法である。水溶液中のイオン性物質は、それと逆の電荷をもつイオン（カウンターイオン）とイオン対（イオンペア）を形成すると全体の電荷が中和されて水溶性が減少し、固定相に強く保持されるようになる。その性質を利用したのがイオンペア法で、移動相にカウンターイオン即ち、酸性のイオン性物質に対しては塩基性のイオン対試薬を、塩基性のイオン性物質に対しては酸性のイオン対試薬を加え、イオン対を形成させることによってそれぞれのイオン性物質の水溶性を低下させて保持を強める方法を言う。酸性物質に対するイオン対試薬としては、テトラアルキルアンモニウム塩が、塩基性物質には、アルキルスルホン酸塩が一般的に用いられる。

以下に、逆相クロマトグラフィーの応用例として筆者らが報告したRP-HPLCによる保存料およびサッカリンナトリウムの一斉定量法と、RP-TLCによる着色料の分析法について紹介する。

2　RP－HPLC による保存料およびサッカリンナトリウムの一斉定量

ソルビン酸（SOA）、安息香酸（BA）、デヒドロ酢酸（DHA）およびパラオキシ安息香酸エステル類（PHBAs）とサッカリンナトリウム（SA）は、それぞれ保存料あるいは甘味料としてよく使われる食品添加物であり、それらを一度に定量することは、分析時間の短縮や操作の簡略化のために非常に有用である。これらの添加物は互いに極性が著しく異なるため、従来のGC法やTLC法では同時に分離、定量することは困難であるが、RP－HPLC を用いれば可能であると考えた。そこで、これら９種類の食品添加物にパラオキシ安息香酸メチルを加えた10種の添加物の RP－HPLC による一斉定量法を検討した。その結果、次のような条件下で、Fig. 1 に示すような10種の添加物の良好な分離を得ることができた。

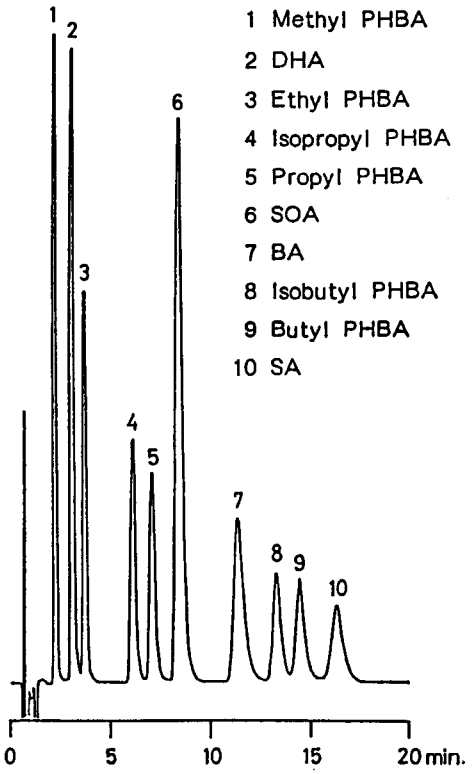

Fig.1　Typical high-performance liquid chromatogram of food additives.

カラム　Nucleosil 3C18（3μm，75×4.6 mm I.D.）

移動相　メタノール：アセトニトリル：0.05M アセトン酸水溶液（pH 4.5）＝1.5：1：3.1 の混液にイオン対試薬としてセチルトリメチルアンモニウムクロライド（CTA）を 2.5 mM の濃度になるように加えたもの

移動相流量　1.0 ml／min　　検出 UV 233 nm

移動相に用いる pH 緩衝液としてはリン酸あるいは酢酸緩衝液が一般的であるが、それらを用いると DHA が著しくテーリングして定量できなかった。しかし、それらの pH 緩衝液の代わりにアセトン酸を用いて pH を調節することにより良好な結果を得ることができた。SOA、BA、DHA および SA は酸性のイオン性化合物であり、そのままでは中性化合物である PHBAs と同時に分離、定量することは困難であった。そこで、それらの酸性化合物の保持を強めるために、移動相にイオン対試薬として CTA を添加してイオンペア法による分離を行った。この HPLC 条件を用いることによって、10種の添加物を約18分で定量することができ、それぞれの検量線は 2～200 ng の範囲で直線性が認められた。本法の詳細については Journal of Chromatography に投稿中である。

3　RP－TLC による着色料の分析

わが国では、11種の着色料が食用色素として食品への使用を認められており、それらの検査はおもにペーパークロマトグラフィーと TLC により行われている。TLC プレートには、シリカゲル、セルロース、ポリアミド等が用いられるが、夾雑物の影響で標準と検体の色素の Rf 値が大きく違ったり、スポットがテーリングしたり、他の色素との分離が不十分であったりして判定に迷うことがよくある。そこで、それらの色素を明確にしかも再現性よく同定するために、RP-TLC による分離条件を検討した。その結果、次の条件を用いて、Fig. 2 に示すように11種の許可色素にエオシン（R-103）とアルラレッド AC（R-40）を加えた13種の色素について良好な分離を得ることができた。

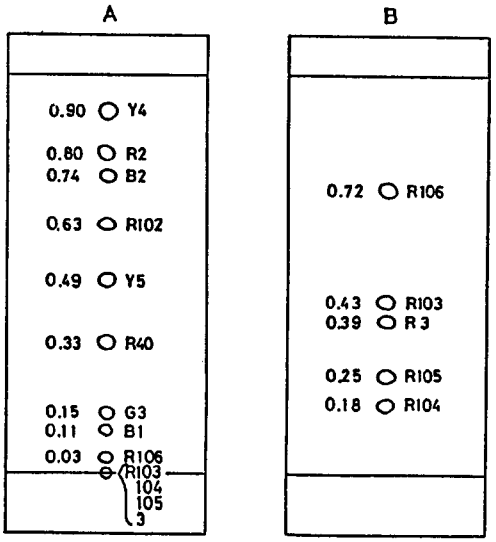

Fig. 2 Separation of food dyes in reversed-phase thin-layer chromatography.

TLC プレート　メルク　RP-18
展開溶媒A　メタノール：アセトニトリル：5％硫酸ナトリウム水溶液＝3：3：10
展開溶媒B　メタノール：メチルエチルケトン：5％硫酸ナトリウム水溶液＝1：1：1

展開溶媒Aはキサンテン系以外の色素（Y-4, Y-5, B-1, B-2, G-3, R-2, R-40, R-102）の分離に用い、展開溶媒Bはキサンテン系色素（R-3, R-103, R-104, R-105, R-106）に用いる。実際には、展開溶媒Aを用いて展開し原点付近にスポットが認められたとき、あるいはキサンテン系の色素の存在が予想されたときのみ、展開溶媒Bを用いて展開すればよいことになる。展開溶媒Bは、調製する際、硫酸ナトリウムが析出するので、析出した硫酸ナトリウムをろ過して除き使用する。分離条件を検討するにあたり、水と有機溶剤の混液を展開溶媒に用いたところ、各色素はテーリングを起こし分離も不十分であった。そのような場合、展開溶媒に酸やアルカリあるいはそれらの塩類を添加すると良好な結果が得られることがあり、検討の結果、硫酸ナトリウムが最もよい結果を示した。展開溶媒中の有機溶剤については、キサンテン系以外の色素群はメタノールとアセトニトリルの組合せで良好な分離を得ることができたが、キサンテン系の色素群は十分な分離を得ることができなかった。しかし、メタノールとメチルエチルケトンの組合せによって良好な分離を得ることができた。このTLC条件を実際の検体の分析に適用してみたところ、Rf値の再現性が非常に優れていた。本法の詳細については Journal of Chromatography, 411 (1987) 437を参照していただきたい。

（食品薬品部　猪飼誉友、岡　尚男）

昭和62年度　備品購入図書の案内

書名	著者名	発行所	保管場所
微生物の分離法	山里一英他編	R&Dプランニング	細菌部
カラーアトラス　感染症	池本秀雄監訳	丸善	ウイルス部
Progress in Medical Virology (VOL. 33, 34)	J. L. Melnick 編	KARGER	ウイルス部
カラーアトラス　実験動物組織学	伊東信行	ソフトサイエンス社	生物部
Handbook on the Toxicology of Metals (VOL. II)	Lars Friberg 他編	ELSEVIER	生物部
環境科学辞典	荒木峻他編	東京化学同人	食品薬品部
科学大辞典	国際科学振興財団編	丸善	食品薬品部
危険物ハンドブック	吉田忠雄他監訳	丸善	食品薬品部
日本の地下水	農業用地下水研究グループ「日本の地下水」編	地球社	生活環境部
独英和活用大辞典	河辺実編	廣川書店	生活環境部
総合衛生公衆衛生学（上・下）	藤原元典他監修	南江堂	庶務課
内科学書（全5巻）	山村雄一他監修	中山書店	庶務課
Feigin-Textbook of Pediatric Infectious Diseases (VOL. I, II)	Ralph D. Feigin 他編	SAUNDERS	庶務課