

### パルスフィールドゲル電気泳動による細菌の分子疫学解析

#### 1 はじめに

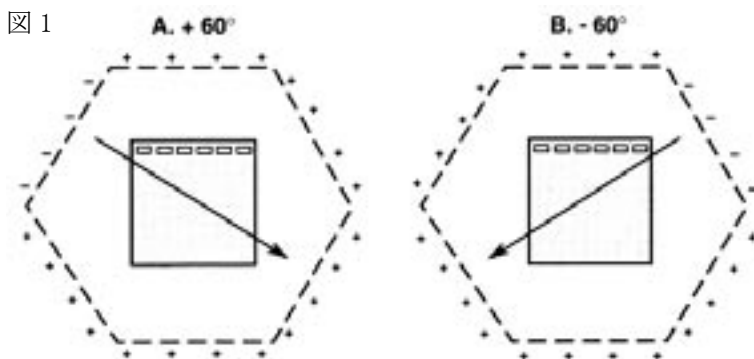
食中毒や院内感染を始めとした集団感染時には、感染源の追跡調査の一環として分子疫学解析が行なわれる。分子疫学解析とは個々の菌株が持つゲノムを解析し、集団感染が疑われる集団から分離された菌株が互いに同一か否かを判定する手法である。細菌の分子疫学解析の方法としては結核菌などの一部の菌種を除き、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)といわれる解析方法を利用する。PFGE法の特徴として、菌株が同一か否かを判定するための解析能力すなわち識別能力が高く、かつ再現性が高いことが挙げられる。この2つの長所のため、通常5日程度と時間がかかることや手技が複雑なこと、特殊な電気泳動装置を必要とすることなどの短所があるにもかかわらず、多くの菌種で標準法として定着している。ここではPFGE法の手技および解析の原則について紹介する。

#### 2 PFGE法の原理

PFGE法では菌株の全ゲノムDNAを制限酵素で切断し、その切断断片を電気泳動により分離し、その電気泳動バンドパターンを利用して、遺伝子型を決

める。使用する制限酵素はゲノム中にその制限酵素の認識部位が多くないものが選ばれる。これは認識部位が多い酵素を使用した場合、DNA断片が多くなりすぎ、電気泳動を行なうとスメア状態となりバンドパターンとして認識できないためである。利用可能な制限酵素の種類は菌種により決まっており、例えば腸管出血性大腸菌0157ではXbaIと呼ばれる酵素が通常使用される。菌種や菌株にもよるが、制限酵素処理によりゲノムDNAはおおよそ700kbp以下のサイズに切断される。これらの断片のうちPFGE解析に利用されるものは約50kbp以上のサイズのものであるが、約100kbp以下のバンドではプラスミドの場合があるので注意が必要である。またPFGE解析で利用するDNA断片の50～700kbpというサイズは通常の電気泳動装置には大きすぎるために分離することができない。そこでパルスフィールドゲル電気泳動装置という特殊な電気泳動装置を使う。PFGE電気泳動装置は進行方向の斜めから電場をかけ、適当な時間の後角度を変えDNAをジグザグに流すことで大きなDNA断片の電気泳動を可能とする(図1)。角度を変えるまでのスイッチングタイムにより分離できるDNAサイズが変わり、例えばス

図1



Voltage clamping by the CHEF-DR III system.

A. Relative electrode potentials when the +60° field vector is activated.

B. Relative electrode potentials when the -60° field vector is activated.

CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems Instruction Manual and Application Guideより抜粋。

スイッチングタイムが4秒程度の場合は、100kbp以下のバンドが分離可能となり、50秒程度の場合は500kbp程度のバンドの分離が可能となる反面、小さいバンドの分離は悪くなる。そこで通常スイッチングタイムを例えば4秒～50秒まで連続的にのばしていくことで広いサイズ範囲のDNA断片を分離可能としている。なお、ここで挙げた数字は電気泳動装置により若干異なるので個々の機種で確認する必要がある。

### 3 PFGE 法の実際

PFGE 法の手技を紹介する。以下のものは国立感染症研究所から提示されている腸管出血性大腸菌 0157 のものである。

1. 新鮮培養菌を蒸留水に懸濁 (OD610 nm = 0.5 - 0.6) し、菌懸濁液とする。
2. 菌懸濁液 200  $\mu$  l と SeaKem Gold Agarose (1%) 200  $\mu$  l を混合した液を冷却し、アガロースを固めて、菌ブロックを作成する。
3. 菌ブロックを Lysis buffer (1mg/ml Proteinase K, 1% N-laurylsarcosine in 0.5 M EDTA) で 50°C、2時間～一晩反応させ、溶菌する。
4. 溶菌処理の済んだ菌ブロックを TE buffer に 4mM の濃度に溶解した Pefabloc SC 溶液で 50°C、20分2回洗浄し、Proteinase K を失活させる。
5. TE buffer で氷上、20分洗浄。
6. Enzyme buffer で氷上、20分洗浄。
7. 1 サンプルあたり 20～30U の制限酵素 (XbaI) で 37°C、2時間～一晩反応。
8. 以下の条件で電気泳動  
電圧：6V/cm、スイッチングタイム：2.2 - 54.2 sec、

泳動時間：19h、温度：12 - 15°C、  
1% SeaKem Gold Agarose、0.5X TBE

以上の一連の手技を行なうには最短で2日、加えて培養に1日を要するため少なくとも3日必要である。PFGE 法はゲノム全体の制限酵素断片を電気泳動するため、全く壊れていない完全長のDNAを取り扱う必要がある。細菌のDNAは数Mbp (1Mbp=100万塩基対) のサイズがあるためピペット操作などで容易に切断されてしまう。また培養が古くなると死菌が増えスマアになりやすくなる。そのため新鮮培養菌をアガロースに包埋したブロックの状態、溶菌、制限酵素処理から泳動ゲルへのアプライに至るまでの操作を行なう。さもないと物理的な力でDNAが切断され泳動像がスマアになり、解析できない。これらのことがPFGE解析を難しくしており、熟練が必要な理由となっていると共に、しばしば失敗の原因となる。

### 4 PFGE パターン解読の原則

PFGE は菌株の持つゲノムDNAの制限酵素切断パターンを利用するため、理論的には制限酵素認識部位の1塩基が変異しただけで2本のバンドが消滅し、新たに1本のバンドが現れ、計3本のバンドが異なる場合が想定される。したがってPFGE解析による結果の判定には表1の原則の適応が提唱されている。

この原則によればバンド3本以内の違いの菌株はほぼ確実に (probably) 同じ由来であると見なすことになり、明らかに由来が異なる菌株と判定するためにはバンド7本の違いが必要となる。実際の集団発生事例から分離された菌株のPFGEパターン解

表1 PFGE バンド解析の原則

分類	遺伝子変異数	バンドの違い	疫学的な評価
区別できない	0	0	分離株は流行株の一部
きわめて関連あり	1	2-3	分離株はほぼ確実に (probably) 流行株の一部
関連の可能性あり	2	4-6	分離株は流行株の一部の可能性 (possibly)
異なる	$\geq 3$	$\geq 7$	分離株は流行株の一部ではない

原典：Tenover FC et al. J Clin Microbiol 1995 33:2233-2239  
「感染対策のための分子疫学入門」より抜粋、一部改変。

析においてもバンド2～3本が異なる PFGE パターンがしばしば見られる。その一方で全く関連のない株間で全く同一の PFGE パターンとなる場合もある。すなわち PFGE 解析は制限酵素認識部位に依存しているため認識部位以外のポイントミューテーションが蓄積しても PFGE パターンの変化としては現れない。またバンドサイズが大きい場合数 kbp 程度の挿入や脱落があってもバンドの位置の変化はわずかであり、PFGE パターンの変化として捉えられないこともある。そこで重要となるのはそれぞれの菌株の由来などを記した疫学情報である。すなわち食中毒であれば食品の摂取状況であり、院内感染などの場合は担当スタッフであったり入院病棟だったりする。このような疫学情報が存在し、同一由来の可能性が濃厚に疑われる株間の PFGE パターンがバンド2～3本の違いであった場合、これらの菌株は同一由来と判断することが多い。逆に全く関連がないと思われる株間ではたとえ全く同一の PFGE パターンであっても同一の株とは判断しない。ただし、同一の PFGE パターンとなる株が頻繁に分離される場合散発的集団発生が疑われ、調査の対象となりうる。

## 5 PFGE 解析の問題点

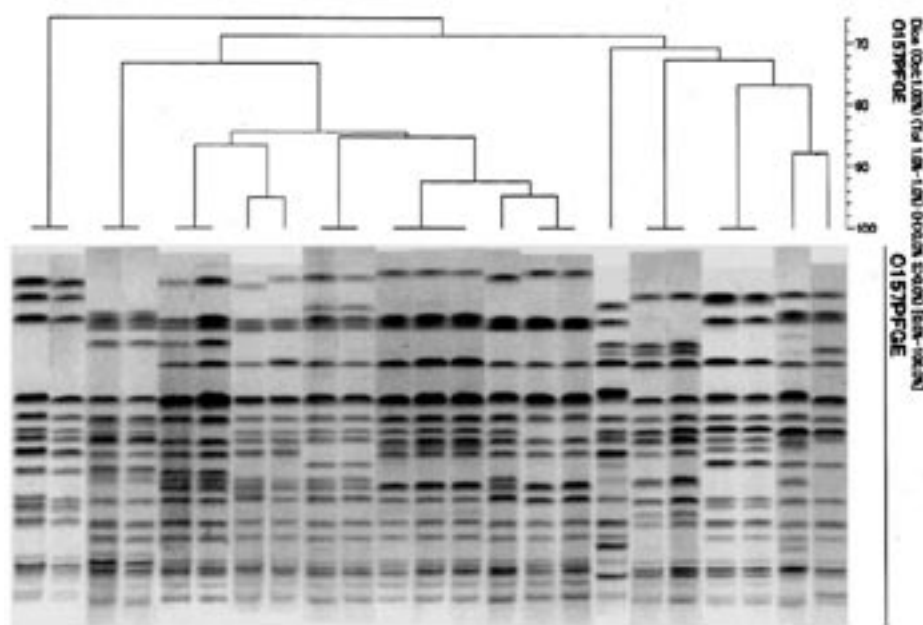
PFGE 解析の問題点としてまず挙げられることは時間がかかるということである。先に示したプロトコルのうち最短時間で反応を完了させ、時間短縮

に努めた場合でも培養から結果が出るまでの日数を3日より短くすることは困難である。また失敗したときは更に倍の時間がかかることになる。もう一つの問題点として、同時に泳動した株同士以外の比較、すなわち異なる日や場所で得られた画像を互いに比較することが困難であることが挙げられる。PFGE 解析はバンドパターンの比較により行なわれる。PFGE で得られるバンド数は通常 10～20 本程度で、そのパターンは複雑であるため、異なる泳動間で比較を行なうには正確にバンドサイズを計測する必要が生じ、目視による比較は難しい。したがってパターンの比較のためには原則として比較したい菌株の全てを同時に泳動する必要がある。しかしこの問題はコンピュータソフトを利用することで、ある程度解決できる(図2)。ソフトウェアにより泳動内、あるいは泳動間における泳動誤差の補正を行なうことで泳動像間のマッチングを行なう。また、バンドパターン間の相同性の計算を行ない数値(百分率)で現し、系統樹の作成もできる。なお、得られる相同性の数値や系統樹は一応の目安であり、解析する菌株の数を増やしたり減らしたりすることで容易に変化してしまうため、絶対的なものではない。

## 6 まとめ

PFGE 解析による分子疫学情報は、感染源調査において重要な位置を占め、多用されている。近年で

図2



腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE 泳動像とソフトウェア (Finger Printing II, BioRad) 解析によるデンドログラム。

は腸管出血性大腸菌 0157 の PFGE パターンについて全国的なデータベース構築の計画もなされている。データベース構築のためにはコンピュータによる解析が必須であり、画像解析技術の進歩によるところが大きい。PFGE 法は 1980 年代からすでに存在し、解析方法は確立されているが、コンピュータによる解析を組み合わせることでより大規模な比較が可能となりつつある。今後も PFGE 法が分子疫学の標準法として利用されるだろう。

#### 【参考文献】

CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems Instruction Manual and Application

Guide. Bio-Rad Laboratories, Hercules, California.

F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 1995, 33:2233-2239.

満田年宏 著、感染対策のための分子疫学入門ーパルスフィールドゲル電気泳動法を中心にー、メデिका出版、2002 年

(文責 微生物部 鈴木匡弘)

## 体に良い水

### 1 はじめに

世の中は健康ブームである。健康食品や栄養補助食品がもてはやされ、「健康」「サプリメント」「ダイエット」などを標榜したお茶やスポーツドリンクが爆発的に売れている。飲料水もその例外ではない。体に良い、病気になりにくい、体質が改善されるなどの謳い文句で、様々な水やそれを造る機器類が売られている。しかし、それらの宣伝パンフレットや雑誌等での紹介記事を読んでも、都合のよい体験談が目につき、よく判らない用語や理論が説明に使われるなどして、実態が把握できない場合が多い。そこで今回、これら体によいとされる水やその製造機器類、さらには、その説明等に用いられる用語について調べて解説を試みた。ただし、飲用による効果については、根拠のしっかりしたものや学説などを除いては紹介しないこととしたため、興味のある方は、インターネット等で調べていただきたい。

### 2 体に良い水

#### 1) アルカリイオン水 (電解水)

水を電気分解すると、陽極 (+) には陰イオンが集まりその周りの水は酸性を呈するのに対し、陰極 (-) 付近は、陽イオンが集まりアルカリ性になる。この電気分解を、イオン透過性の隔膜を介して行ない、陽極側と陰極側より別々に採取した水を電解水 (陽極水、陰極水) と呼ぶ。こ

の電気分解処理は、電流量や原料水に添加する電解質の種類や量を変えることにより、様々な付加価値を付けた水の製造に利用できることが研究により明らかにされている。特に、塩化ナトリウム溶液を電気分解して得られる酸性の陽極水には、高濃度の残留塩素が含まれることから、殺菌作用を有する機能水として食品加工、農業、水産、医療など様々な分野での利用開発が進んでいる。

アルカリイオン水 (飲用アルカリ性電解水) とは、アルカリイオン整水器を用いて乳酸カルシウムなどのカルシウムイオンが添加された水を直流で電気分解した際に、陰極側から吐出される pH9 ~ 10 の水のことである。厚生省 (現厚生労働省) は、今から 40 年近くも以前の 1966 年に薬事法で、アルカリイオン整水器を「医療用物質生成器」として認定しており、この装置から得られる水について「陰極水 (アルカリイオン水) は消化不良、胃酸過多、慢性下痢、胃腸内異常発酵、制酸に有効で、また陽極水はアストリンゼント (astringent、収れん剤、肌を引き締める酸性の化粧水で、さらさらとした感じのもの) として用いられる。」としている。

このように薬事法で効能・効果が認められていることと、当時急速に普及が進んだ浄水器の高級化を狙った商品戦略とがマッチしたことで、大手家電メーカーも製造販売に参入し、浄水機能付

アルカリイオン整水器は10年ほど前にかんりのブームとなった。しかし、「一包の胃腸薬と同じ効果を期待するには5Lの飲用が必要」という調査報告などが引き金となって、そのブームは一旦終息する。ところが最近、後述するような活性水素説（下、用語について参照）などが発表されたことを契機に、体に良い水としてアルカリイオン水が再び脚光を浴びている。そして現在また、アルカリイオン整水器の販売競争が繰り広げられており、2003年時点での普及率は7.6%程度にまで達していると推定されている。しかしながら、販売競争が熾烈になるに従い、誇大広告等が目にあふようになったことから、厚生労働省では、アルカリイオン水の効能として、前述した消化器系疾病への効果以外を標榜しないよう通達を出している。（平成4年10月19日薬監第56号 医療用物質生成器の広告等について）

## 2) $\pi$ （パイ）ウォーター

10年ほど前にマスコミ等に盛んに取り上げられたため、名前ぐらいは覚えている方も多いと思う。この水は、1964年に名古屋大学農学部の下山博士により初めて「生体水」として学会発表され、その後同博士の著書（「生命成立の原理」造型社（1985年））で $\pi$ ウォーターと命名された。この $\pi$ ウォーターは生体内に存在する水に限りなく近いものとされており、生成器等では、水道水等をパイ化セラミックなどの「媒体」に接触、具体的には、小さな粒子状の媒体を層状に詰めたフィルターユニットに原料水を通すことにより造られる。その際、媒体の持つ情報が水に転写されて体に良い $\pi$ ウォーターになるというような説明がされている。

生体水とは、前述の下山博士が植物生理の研究中に発見した、生物の生命活動に重要な役割を果たしていると考えられる水で、「超微量（ $2 \times 10^{-12}$ モル）の二価三価鉄塩に誘導された水」と定義されている。この研究が、 $\pi$ ウォーターの解説や宣伝等に使われていることに対し、同博士は「現在、 $\pi$ ウォーターという名前のもとに販売されている商品に私は全く関与していない。 $\pi$ ウォーターを人工的に作ろうとしても、効果を発揮させる製造技術がまだない。今出回っている $\pi$ ウォーター製品の効果は大いに疑問である。」と言う

ようなコメント（週間文春、1992年4月20日、文藝春秋社）を発表している。

## 3) 磁化水（磁気処理水）

複数の磁石でできた隙間に水道水等を流すことにより得られる水である。この処理方法については、ソビエト連邦（現ロシア共和国）において研究が盛んに行われており、ヴェ・イ・クラッセンというロシア人の「水の磁気処理」（1977）という著書が有名である。処理に用いられる磁石の磁力や配置などは、その水の使用目的や製品により様々に異なるが、磁力線に対して水流の方向が垂直になるように磁石を配置するのが基本のようである。この処理により得られる水は、粘度や表面張力が原料の水と異なることが判っているが、そのメカニズムについては十分な解明がなされていない。このような物性の変化は、水質によりその程度が異なることや、純水など溶質を含まない水では処理の効果が認められないことなどから、この処理には水に溶け込んでいる金属塩などの溶質が関与している可能性が考えられている。また、磁場の中をイオンが移動することによって生じる電気エネルギーで水のクラスター（下、用語について参照）が細分化するという説もある。この磁気処理は、セメントの強度増加、ボイラーの管壁等への水垢の沈着防止や、給配水管の赤錆防止などに効果があるとして産業界では広く用いられている水処理技術である。ちなみに、我が国でもこの磁気処理水生成装置が年間約12万台も販売されており（2002年）、それらは冷凍機の冷却水配管の途中など隠れたところに使用され、メンテナンス回数の低減化や装置寿命の延長、省エネルギー化などに役立っているようである。また、この処理は飲料水に用いてもよく、おいしくて体に良い水が得られるとされている。

## 4) 電子水

高電圧発生装置のマイナス側端子が接続された水槽に水を入れ、その水槽を絶縁状態にして1日程度高電圧をかけて処理することにより得られる水で、電子を豊富に持つという意味から、電子水と呼ばれる。この高電圧処理により、水槽内の水は活性化してクラスター（下、用語について参照）が小さくなり、体によい水となると説明されている。

### 5) バナジウムウォーター

スーパーのミネラルウォーターコーナーなどで見かけるようになったこの水であるが、文字通りバナジウムが高濃度に含まれる天然水である。市販されているもののほとんどは、富士山麓の地下水（バナジウム濃度として0.1mg/L前後、他の地域の平均地下水濃度は0.001mg/L程度）が原料となっている。バナジウム化合物には糖尿病の高血糖を低下させる作用が認められており、この水の飲用が血糖値の改善等に効果があったという情報がインターネット等で流れてから注目を浴びるようになった。しかし、動物実験などで効果が確認されているバナジウムの有効濃度（100mg/L）とバナジウムウォーターに含まれる濃度の間には、1000倍程度の開きがあることから、その効果は疑問視されている。

## 3 用語について

### 1) クラスタ

水分子は単独で存在するのではなく、複数の水分子が水素結合によってお互いに結び付き、100前後の分子量（水分子で5〜6個）の塊となって存在している。この塊を水のクラスタ（葡萄の房という意味）と呼ぶ。以前、NMR（核磁気共鳴分析装置）を用いて水のクラスタの大きさを測定する方法が考案され、「おいしい水はクラスタが小さい」とか「クラスタの小さな水は、体組織への浸透がよく体にいい」などと言うことが話題となった。しかし現在では、その測定方法は間違いであり、クラスタの大きさを測定する方法はまだないというのが学会等での共通の認識となっている。また、水素結合は熱や磁気などのエネルギーを与えることにより切れるため、水のクラスタを一時的に小さくはできるが、与えられるエネルギーがなくなれば元の状態に戻ってしまうため、クラスタを小さなまま保つことは不可能とも言われている。しかしながらこのクラスタ説が、様々な水やそれを造る機器類の説明に、今現在でも頻繁に使われている。

### 2) 活性酸素説

酸素は生命活動に欠かせない元素であるが、それが細胞内で利用される過程で極めて酸化力の強い、言い換えれば、活性の高い「スーパーオキ

シドアニオンラジカル」や「過酸化水素」等の化合物が生成する。これらの化合物を総称して活性酸素と呼ぶ。この活性酸素は生命維持に必要である反面、DNA鎖を切断する作用を有するなど毒性も極めて強いことが知られている。そのため、生体にはこれら活性酸素を消去する機能や、切断されたDNAを修復再生する機能などの防御機能が備わっている。しかし、加齢とともにこの防御機能が減退するため、過剰な活性酸素が原因となって、ガン、糖尿病、動脈硬化、白内障、アレルギー症、アルツハイマー病、色素沈着などさまざまな成人病に罹るのだと言われている。

### 3) 活性水素 / 電解還元水説

九州大学の白畑教授らは、次のような学説を発表している（「還元水による動物細胞の機能制御と医療への応用」日本農芸化学会誌、74、994（2000）など）。アルカリイオン水などの電解水には抗アレルギー効果、抗糖尿病効果、抗腫瘍効果などの生体作用があり、その作用は、電解水に含まれる還元力の強い活性水素が細胞内の活性酸素を消去することにより発現する（電解還元水説）。水素ラジカルとも呼ばれる活性水素は、非常に不安定で、通常はすぐに他の物質と反応して消滅するか、分子同士が結合して分子状水素（H<sub>2</sub>）となり、やがては気泡となって空気中に揮散してしまうと言われている。しかし、電解水中には、電気分解の際に電極から溶け出した微量の白金が微細なコロイド状になって浮遊しており、それが活性水素を吸着、安定させるため、活性水素は消滅することなく比較的安定的に存在する（活性水素金属ナノコロイド還元水説）。また、日田天領水（大分県日田市）など一部の天然水にも、比較的高濃度の活性水素が含まれており、電解水と同様の効果が期待できる。

さらに同教授らは、活性水素量の測定方法も開発・提案している。しかし一方で、その方法では活性水素を測定することはできないし、電解水中での活性水素の存在も疑わしいと主張する学識経験者も現れ、その議論の去就が現在注目の的になっている。

### 4) 機能水

水道水等に何らかの処理を施すことにより、有益な機能を付加した水を「機能水」と呼び、現

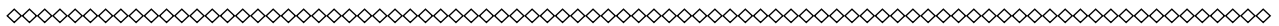
在までに様々な機能化法が考案され実用化されている。上述した電解水やπウォーター、磁化水、電子水もその範疇に入るが、その他にも、セラミック処理水、電場水、波動水、共鳴磁場処理水（ロッドウォーター）、赤外線処理水、超音波処理水、トルマリン水なども機能水に分類される。これらのなかで最も研究開発が進んでいるのが電解水であるが、それ以外の機能水については、機能化処理の機構解明や機能化の程度を評価する方法の開発がほとんど進んでいない、言い換えれば、理論の裏付けがないまま利用法の開発だけが進んでいるというのが現状である。

のところ、このようなテーマを選んで後悔している。なぜなら、調べを進めるうちに、世の中には体に良いとされる水が無数に存在し、販売されているものも少なくないが、その説明等に納得できない部分が多く、また、効能や効果については科学的な根拠が示されていないことから、確かな情報として書くことができないことが判ったためである。逆に、これら体に良いとされる水などの矛盾点を衝くインターネットのサイトもいくつか見つかかり、納得できる内容が多かったことから、こちらを中心に書くことも考えたが、これら水を扱う企業の営業妨害にもなりかねないことから、断念した。本稿はこのようなジレンマの中で書き進めたものであり、充実している内容であるとは言い難いと思うが、多少なりとも役に立てば幸いである。

#### 4 おわりに

今回、長年興味を持ちながらよく判らないと感じていた水やそれに関連した用語について、インターネットや文献等を調べて書かせていただいたが、実

(文責 生活科学部 猪飼誉友)



愛知衛研技術情報 第28巻 第3号 平成16(2004)年12月20日  
照会・連絡先 愛知県衛生研究所  
〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号  
愛知県衛生研究所のホームページ【<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>】

平成13年5月よりダイヤルインとなりました。

所 長 室：052-910-5604	毒性部・毒性病理科：052-910-5654
次 長：052-910-5683	毒性部・毒性化学科：052-910-5664
研 究 監：052-910-5684	化学部・生活化学科：052-910-5638
総 務 課：052-910-5618	化学部・環境化学科：052-910-5639
企 画 情 報 部：052-910-5619	化学部・薬品化学科：052-910-5629
微生物部・細菌：052-910-5669	生活科学部・水質科：052-910-5643
微生物部・ウイルス：052-910-5674	生活科学部・環境物理科：052-910-5644

FAX：052-913-3641(変更ありません)