



高速向流クロマトグラフィーについて

—食用赤色106号の単離と精製を例として—

【はじめに】

混合物中のある成分を定性あるいは定量しようとするとき当然標準品が必要となる。その際、純粋な標準品が入手困難な場合、自らの手でその化合物を単離精製し、標準品を作製しなければならない。これは、時として非常な困難を伴うが従来よりカラムクロマトグラフィーや液-液分配抽出等の種々の精製法を繰り返して目的を達成してきた。最近、化合結合型シリカゲルを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が、高い分離能、迅速性、更には、良好な操作性を有しているために種々の混合物の分離に威力を発揮し、標準品の精製にも分取HPLCとして用いられている。しかし、HPLCは固定相に固体充填剤を使用しているために、つぎに示すような欠点が指摘されている。即ち、1) 充填剤との不可逆的吸着による化合物の損失や変性、2) カラムの劣化、3) 大量の試料の分取には、カラムの分離効率が落ちるために不向きといった点である。そこで、これらの点を補うために、真の液-液分配クロマトグラフィー、即ち、固定相にも移動相にも液体を用いる高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) が開発され、種々の化合物の分離に応用されている。そこで、このHSCCCの原理と本法の食用赤色106号の単離精製に用いた応用例について概説する。

【HSCCCについて】

HSCCCは1950年代にCraigによって開発された向流分配法を基本原理としている。向流分配法の原理は分液ロートをたくさん直列に並べて、最初の分液ロートに試料を添加し、抽出操作を行った後に、その上層又は下層をつぎつぎと順送りにつぎの分液ロートに進め物質を分離する方法である。この方法は大きかりな装置と分離に長時間を必要

とするために次第に用いられなくなったが、1970年代の後半に伊東によってクロマトグラフィー化され、更に高速化されてHSCCCへと発展してきた。

HSCCC装置の基本構成はHPLCと同様に移動相送液ポンプ、カラム、検出系及び記録系から成り立っている。これらの装置は、カラムを除いてすべてHPLC用のものと同じであるが、HPLCと異なる唯一の特徴は固定相にも移動相にも液体を用いることである。その重要なポイントはいかに固定相をカラム内に保持させるかであり、また移動相をHPLCなみの流速で送液し、更にどのような分析条件を設定してより効率的な分配を実現するかも大切な課題である。しかし、これらの問題は伊東によって開発された図1に概略するHSCCC装置により一挙に解決された。図2には本手法の心臓部であるIto coilと呼ばれるカラム部分を示した。これはドラムに連続した一本のテフロン製チューブを幾重にもコイル状に巻き付けたもので、この中に固定相を充填する。(通常に分取用HSCCCの場合、テフロンチューブの内径は1.6mm、カラムの長さは150m、容量は300mlである。) これを強い遠心力場を作り出す公転と、動的な二相平衡を作る自転を組み合わせた惑星運動の場に置くことによって固定相を保持させる。即ち、固定相を満たしたカラムは自転軸と公転軸を中心に同方向に回転する事により独特の力を受け、移動相をHPLCなみに送液しても固定相は十分に保持され、また移動相と固定相の間で効率的な分配が行われる。

使用法は基本的にはHPLCと同様であるが、まずはじめにあらかじめ分液ロートで振盪し平衡化した二相溶媒系のどちらかの相を固定相としてカラムに充填する。コイルを必要とする回転数(通

は、800rpm)で回転し、移動相の送液を開始する。その後、20~30分間は過剰の固定相が溶出するので安定化した後に試料を注入する。その後は、カラムの中で固定相と移動相による効率の良い液-液分配が行われ、混合物は分離され、カラムの出口より溶離されて検出器により検出される。

さて、良好な分離を行うためには回転速度、温度、試料量等いくつかの分析条件を最適な状態に設定しなければならないが、その中でも二相溶媒系の選択は最も重要なポイントである。適切な溶媒系を用いるか否かによって、実験の成否が決定されるといっても過言ではない。

溶媒系の選択に関して注意しなければならないのは、つぎの3点である。1) 二相に分離すること、2) settling timeが短いこと、3) 試料の分配係数が1に近いこと。1)は当然であるが、2)のsettling timeとは溶媒系を振盪後静置したとき、完全に二相に分離するまでの時間を指し、一般に30秒以内が良いとされている。3)の分配係数は、二相溶媒系において試料が上下層にどの様な比率で分配されるのかを示すもので、HSCCC用の溶媒系は分配係数が1に近いものが良いとされている。しかし、一般にクロロホルム-水、n-ヘキサン-メタノールといった単純な溶媒系の

使用で目的が達成される事は少なく、3種類あるいは4種類の溶媒を混合したものや酸あるいは塩基でpHが調整されて用いられることが多い。分配係数は、使用しようとする溶媒系の上下層の一定量ずつを試験管に取り、少量の試料を加えたのちに激しく振盪攪拌して試料を上下層に分配する。しばらく静置したのちに上下層中の試料の濃度を測定して、その比率を求める。もし、ここで分配係数が1に近ければ90%以上実験が成功したと言ってもよい。

【食用色素赤色106号の単離精製】

食用タール系着色料はいずれも化学的合成品で、市販されている標準品は原料物質や反応中間体などの有機性不純物を含んでいることが多い。純度の高い標準品を入手することは、食品衛生上精度の高い分析を実施する上で重要なことと考えられる。しかし、食用色素は分子内に極性基を有した水溶性の塩であるので、固体充填剤を用いたクロマトグラフィーでは満足すべき純度の標準品を得るのが困難な状況にある。

食用色素赤色106号(R-106)は主成分をAcid Redとするキサンテン系の色素で(図3)、かまぼこ等の魚肉ねり製品にしばしば使用されている。市販の標準品は図4に示す様に薄層クロマトグラフィー(TLC)により3つのスポットに、HPLCより9つのピークに分離され、比較的不純物が多い。そこで、このR-106の単離精製をHSCCCにより試みた。

前述のごとくはじめにHSCCCに使用する二相溶媒系を選択せねばならないが、筆者らは、R-106が水に可溶性である事を考慮して、n-ブタノール-水(1:1)を用いて上述の分配係数を算出した。しかし、分配係数は0.5以下を示し、圧倒的に下層の水層に分配された。そこで、この溶媒系中の水の代わりに0.01Mのトリフロロ酢酸(TFA)を用いたところ、分配係数はほぼ1に近く、またsettling timeも短く、理想的な溶媒系で

あることがわかった。そこで、この二相溶媒系を用いて25mgのR-106をHSCCCに適用したところ、図5に示すような溶出曲線が得られた。各

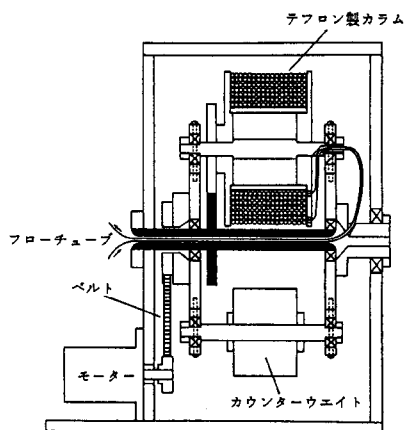


図1 HSCCC装置の概略図

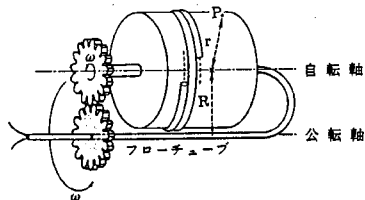


図2 HSCCC用カラム (Ito coil)

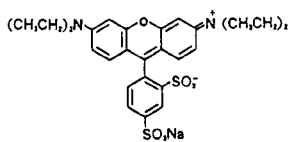
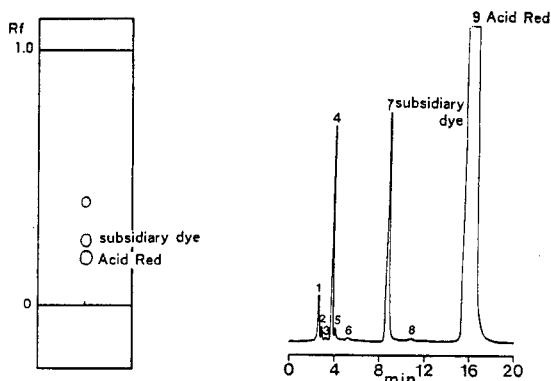


図3 食用赤色106号 (Acid Red)



TLC条件

プレート: RP-18 TLC
 展開溶媒:
 アセトニトリル-1M塩化ナトリウム
 (1-1)

HPLC条件

カラム: Wakosil 5C18
 (5 μm, 250×4.6mm i.d.)
 移動相:
 アセトニトリル-0.01Mトリフロロ酢酸
 (3-7)
 流速: 1 ml/min 検出波長: 254nm

図4 食用赤色106号のTLCおよびHPLCによる分離

の有効な手段になるであろうと思われる。この方法によれば、現在シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製されている化合物は、ほとんどすべてHSCCCにより簡便に単離精製が可能と考えられるが、今後、さらに単離精製が困難な化合物をいかにHSCCCで克服するかが大きな課題である。

【参考文献】

- Y. Ito, W. D. Conway, Anal. Chem., 56, 534A (1984)
 柘植 新, 化学, 40, 208 (1985).
 原田健一, ファルマシア, 25, 551 (1989)

ピークを中心として図に示したような分画に分けたのち、各分画とカラム残留物をHPLCにより分析した。分画IにはHPLC上のピーク1、2、4、5、6が、分画II及び分画IVにはそれぞれHPLC上のピーク7及び9（主成分: Acid Red）が、主として含まれていた。また分画IIIは、ピーク7と9が混合した状態で、そしてカラムの残留物中にはピーク3及び8が含まれていることも判明した。これらの分画のうち、IIとIVに含まれるピーク7及び9はそれぞれ1mgと21mg得られ、図6のHPLCからも明らかな様に、ほとんど単離された状態と言ってもよい。またこれらの化合物は、HPLCピーク9のAcid Redが精製前において、95%であったものが99%に、また不純物であるHPLCピーク7は、2%が98%に精製されていた。したがって、このAcid Redは十分に標準品として使用可能な純度であると考えられた。また、質量分析法により、HPLCピーク7は、Acid Redよりニチル基が一つ脱離したものであることも判明した。

【おわりに】

以上HSCCCの原理とこれをR-106の単離精製に応用した例を概説したが、冒頭で述べたようにHSCCCはHPLCの欠点を補う長所を有しており、さらに従来の手法では分析困難な化合物への応用性も示唆され、化合物の単離精製にはかなり

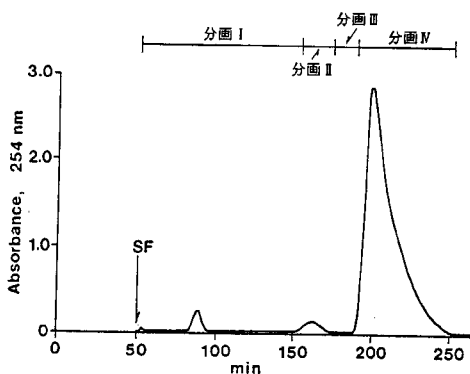


図5 食用赤色106号のHSCCC溶出曲線

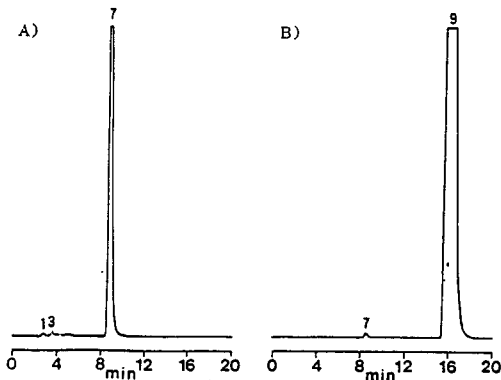


図6 分画IIとIVのHPLCによる分離

A) 分画II B) 分画IV

HPLCは図4に同じ

(食品薬品部 岡 尚男)

総説「エロモナス」

はじめに

エロモナスはもともと水系の常在菌で、河川水、湖沼の水、下水や汽水中に広く分布し、これまで主に魚類の病原菌として水産分野で注目されていた。しかし、1970年代の後半になり、本菌がヒトに下痢、胃腸炎などの消化器系感染症や外傷性感染症などの多彩な疾病を引き起こすこと、また感染防御機能の低下したヒトに日和見感染症を起こすことなどが明らかになってきた。これらのことから、本菌の病原細菌としての位置が明らかとなり、我が国では昭和57年に *Aeromonas hydrophila* と *Aeromonas sobria* を食中毒菌として追加認定した。そこで食中毒菌のなかでも比較的新顔のひとつであるエロモナスについて、当所における若干の知見を加え紹介する。

1. 分類

エロモナスは、ビブリオ科に属するグラム陰性、チトクロムオキシダーゼ陽性、通性嫌気性無芽胞桿菌でビブリオ属の菌と類似の生化学的性状を有する。しかし、*Vibrio static agent* 0/129 に感受性が無く、その発育に食塩を要求しない点でビブリオ属の菌とは異なっている。エロモナス属は運動性の有無により2群に大別されるが、今回はヒトに感染性を有する運動性の中温菌であるエロモナスについて解説する。

エロモナスの分類は、DNA-DNA 相同性などの近代分類学の技法を用いた Popoff & Veron により *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*)、*Aeromonas sobria* (*A. sobria*)、*Aeromonas caviae* (*A. caviae*) の3菌種に分類されている。しかし種々の検体からは上記3菌種以外に同定出来ない菌が分離されることがあったり、上記3菌種以外の *Aeromonas veronii* や *Aeromonas media* といった菌種も報告されている。更にエロモナスをビブリオ科から独立させて新たに科を設ける提案もあり今後エロモナスの分類は、追加、変更の可能性が考えられる。

2. 検査法

エロモナスに対する選択分離培地は市販されて

いない。そこで腸内細菌用培地である DHL、マッコンキー寒天培地、自製の培地で作製の手間はかかるが上記2培地より分離率が高いと言われている PXA (プリルーキシロース-アンピシリン) 寒天培地、DHXA (デスオキシコレート-硫化水素-キシロース-寒天) 培地などが一般に用いられている。またヒト糞便、食品等からの検索にアルカリペプトン水による増菌が有効である。図1にエロモナスの検査法の概略を示した。

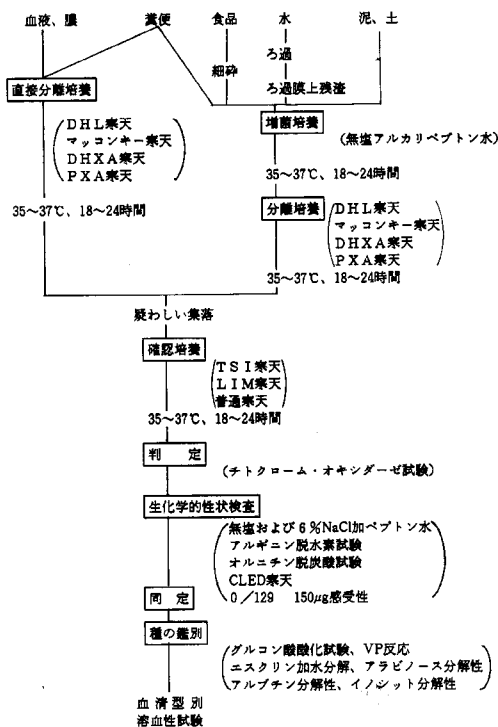


図1 エロモナスの検査法

3. 分布

1) 水

エロモナスは河川水、湖、沿岸海水など広範囲に分布し、水の汚染菌量は、夏期に多く冬期に少ない傾向がある。河川水には年間を通して $10^1 \sim 10^2 / \text{ml}$ の菌が存在すると言われている。広島県下の河川水を検査した報告によると、河川の上流域では、*A. sobria* が優勢であり、下流に行くにしたがい、*A. hydrophila*、*A. caviae* の割合が増加

した。また生活排水が流入する小河川や海水では *A. caviae* が優勢であったという。しかし、エロモナスの菌叢が生育環境により異なる理由は明らかにされていない。

また神奈川県下の一般家庭の井戸水では、高率にエロモナスの汚染があることが認められ、その80%が *A. hydrophila* によると報告されている。

一方オーストラリア、インド、カナダ、米国の上水道の水は塩素消毒がなされているにもかかわらず、エロモナスが生残しているとの報告がある。またオーストラリアでは水道水のエロモナスの消長とエロモナス下痢患者の発生数との間に関連性があると報告されている。しかし、今のところ日本の水道水からエロモナスが検出されたという報告はない。

2) 食品

淡水魚、海産魚介類、市販の野菜など種々の食品がエロモナスに汚染されていることが明らかとなっている。当所での調査においても知多半島沿岸に生息する天然カキでは、冬期の生食される期間にエロモナスが検出され、その菌量は $10^2/g$ であった。市場に入荷直後や市販の広島産カキからも高率で高濃度のエロモナスが検出されている。米国では、エロモナスによるカキの食中毒事例が報告されているが、我が国では、本菌によるカキの食中毒は報告されていない。

水産食品と同様に畜産食品も広くエロモナスに汚染されていることが最近の調査で明らかにされた。米国の小売店で売られている生乳、ソーセージ、豚肉、鶏の肝臓などから $10^2 \sim 10^5/g$ のエロモナスが検出された。これはパック食品のように真空やガス置換したり、低温保存することは食品中に競合する菌の発育を抑制することとなりエロモナスの増殖にはかえって好条件となるためと考えられる。

4. ヒトへの感染

1) 食中毒事例

エロモナスが原因と考えられる国内の食中毒事例は、散発下痢症に比べて極めて少なく現在のところ主な事例は2例である。1例は、1977年5月27日大阪府八尾市の小学校の1学級に集積して嘔吐を主要症状とした患者発生がみられた。この事例は当初、ウイルス感染症が疑われたが、検査の

結果下痢性ウイルスは否定された。発病後24時間以内に採取された4名の下痢糞便の細菌検査では、全例から純培養状 ($10^8/g$) に *A. hydrophila* が検出された。第3病日に、この4名を含む合計14名の下痢症状が軽快した患者糞便から全く検出されず、本菌は比較的速やかに腸管内から消失するものと思われる。また別の1例は、1975年9月23日に海釣りから持ち帰ったシイラの刺し身を喫食した5名中4名が発病した。本事例でも急性期の糞便から $10^8/g$ の *A. hydrophila* が検出されている。

2) 散発下痢症

エロモナスによる下痢症は散発例が多数を占めている。

国あるいは地域によりエロモナスの健康保菌率が大きく異なり、特にタイやペルーなどの発展途上国で保菌率が高い。しかし散発下痢症患者からのエロモナスの検出率は、健康保菌者からの検出率に比べ有意に高いとの報告が多く、エロモナスが下痢原因菌となりうることは疑う余地のないことと思われる。今のところ *A. caviae* は、動物実験などで下痢原性が証明されていないが、臨床的なデータからは下痢の原因菌と考える必要がある。

エロモナスによる下痢は、通常の場合軽症で、数日間水様下痢を排出し回復するが、コレラ様あるいは赤痢様の症状を呈することもある。またエロモナスは、他の病原菌と同時に検出されることがある。我々が検査したエロモナス下痢症でも36.0%が混合感染であり、腸炎ビブリオ、サルモネラと同時に検出される例が多く認められた。

3) 腸管外感染

エロモナスによる腸管外感染例はほぼ全身の組織におよぶが、特に軟組織感染が多く報告されている。健康なヒトには水に関連した創傷感染を起こす。昨年12月には、和歌山県串本市で釣針による創傷から *A. hydrophila* による死亡事故が発生している。またガン患者など免疫機能の低下したヒトや基礎疾患のあるヒトに感染すると、菌血症を併発して死亡率が高いと言われている。

5. 病原性

エロモナスの病原性に関する因子として、プロテアーゼ、エステラーゼ、血清耐性、細胞侵入性、線毛等が報告されているが、いずれも確定までに

は至っていない。現在、最も本菌の下痢起病性に
関係していると考えられているものはヘモリジン
(溶血毒)とコレラ様毒素である。ヘモリジンは、
菌株や菌種によって多少の違いはあるが分子量は
5万前後で、ヒトや家兎の赤血球を溶血する。更
に家兎腸管試験や乳飲みマウス試験において小腸
内液体貯留を示し、Vero細胞に致死的作用を示す
易熱性のサイトトキシン(細胞壊死毒)なエン
テロトキシンである。コレラ様毒素は、サイトトキ
シンではなく、コレラ菌のように細胞の水分代謝
異常を起こさせる毒素であり溶血性はないと報告
されている。図2に溶血性試験の方法の概略を示
した。

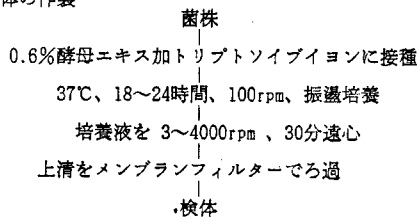
む す び

エロモナスは、自然環境、動物等に広く分布し、
水産食品をはじめ多くの食品が汚染を受けている
と考えられる。今後これら食品の取り扱いにはな
お一層の注意が必要であろう。

参考文献

- 微生物検査必携 細菌・真菌検査第3版
P.D107~D117 1987 日本公衆衛生協会
食中毒Ⅱ新たに認定された食中毒菌 坂崎利一
編集 p69~123 1983 中央法規
メディヤサークル 33(7) p255~266 1988
Aeromonasの下痢症と起病症 小林一寛、田口
真澄

1) 検体の作製



2) 溶血性試験

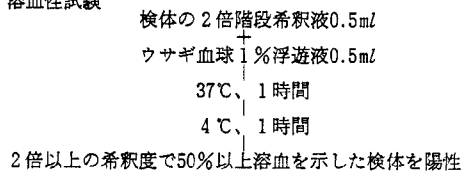


図2 エロモナスの溶血性試験

(細菌部 松本昌門)

昭和63年・平成元年度備品購入図書のご案内

書名	著者名	発行所	保管場所
海外技術調査資料集	材料技術資料センター編	材料技術資料センター	細菌部
ベーターラクタム系薬	上田泰、清水喜八郎	南江堂	細菌部
FOODBORNE BACTERIAL PATHOGENS	MICHAEL P. DOYLE	MARCEL DEKKER	細菌部
小児感染症学	中尾亨	金原出版	ウイルス部
バイオテクノロジー事典	福井三郎、斎藤日向監修	シーエムシー	ウイルス部
DNAプローブ2	高橋豊三	シーエムシー	ウイルス部
オゾン利用の理論と実際	太田静行、清水博則	リアライズ	ウイルス部
電子顕微鏡診断学	日本医科大学WHO電顕診断学センター編	藤田企画出版	ウイルス部
PATHOLOGY OF THE LUNG VOL.1・2	H. SPENCER	PERGAMON PRESS	生物部
LUNG CELL BIOLOGY	DONALD MASSARO	MARCEL DAKKER	生物部
医学大辞典	小川鼎三他編	南山堂	生物部
現代労働衛生ハンドブック	三浦豊彦他編	労働科学研究所出版部	生物部
CELL TO CELL SIGNALLING	ALBERT GOLDBETER	ACADEMIC PRESS	生物部
和漢薬草図鑑	三橋博監修	北隆館	食品薬品部
NATURALLY OCCURRING QUINONES 3	R. H. THOMSON	CHAPMAN AND HALL	食品薬品部
THE AGROCHEMICALS HANDBOOK	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY編	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY	食品薬品部
危険物ハンドブック	吉村忠雄、田村昌三監訳	丸善	生活環境部
微生物による環境制御、管理技術マニュアル	岩井重久他編	環境技術研究会	生活環境部
化学便覧応用化学編	日本化学会編	丸善	生活環境部
EVALUATION OF PESTICIDES IN GROUND WATER	WLLA Y. GARNER他編	THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY	生活環境部
新素材ハンドブック	新素材ハンドブック編集委員会編	丸善	生活環境部
トキシコロジー1, II	福田英臣他監訳	同文書院	生活環境部