レーザーオリジナル

KDP 単結晶育成における溶液内の菌による結晶成長への影響

藤岡 加奈*・横谷 篤至*・西田 裕紀*・佐々木 孝友**
山中 龍彦*・山中 千代衛*,**

(1986年12月1日 受理)

The Effect of the Microbes in KDP Solution on the Growth
Habit of the Crystals

Kana FUJIOKA*, Atushi YOKOTANI*, Yasunori NISHIDA*, Takatomo SASAKI,
Tatuhiko YAMANAKA* and Chiyoe YAMANAKA

(Received December 1, 1986)

Firstly, we have observed microscopic hillocks on tapered prismatic surfaces of a KDP crystal which has grown in the solution with bacteria. The generation mechanism of hillocks was investigated.

Secondary, we have succeeded in the measurement of organic material from bacteria in the KDP crystal by using chromogenic limulus test, of which sensitivity was 10^{-2} ppb.

1. はじめに

最近のレーザー核融合実験では、口径20～40 cmに及ぶガラスレーザーを高調波に変換するために大型 KDP (KH_2PO_4) 単結晶が用いられている。レーザー変換の際、この結晶に高いレーザーエネルギー密度がかかるためダメージが生じ、使用不可能となることがある。結晶育成には長い月日が必要で変換素子として使用するまでには高度な加工技術が積み重ねられる。そのため簡単に交換するというわけにはいかないので、レーザー損傷ができるだけ生じないような強い結晶を作る必要がある。

今までに我々は KDP 結晶の育成溶液内で酵母菌、グラム陰性桿菌、グラム陽性桿菌等の菌類が発生していることを見い出した。そして、

これらの菌由来の有機物が結晶内へ取り込まれ、その菌がレーザー損傷の原因になると仮定した。そして紫外線ランプにより殺菌を行ないながら結晶を育成し菌の発生を抑えることによりレーザー損傷閾値が上昇することを見い出した¹⁾。

今までに無機結晶内に取り込まれた菌等の有機物に対する定量測定は報告がない。今回、我々は細菌内毒素(エンドトキシン)測定によるリムラステスト法を用いて結晶内の菌を初めて定量的に測定することに成功し、これによりレーザー損傷の原因と考えられる菌等の有機物が結晶内に間違いなく存在していることを確認した。同時に育成溶液に多数の菌を添加した時には成長した結晶のプリズム表面に異常が現われること、そして、その異常は結晶のテーパ角の大きい場合に顕著になることを見つけた。ま

*大阪大学レーザー核工学融合研究センター (〒565 吹田市山田丘2-6)

**大阪大学工学部電気教室 (〒565 吹田市山田丘2-1)

*Institute of Laser Engineering, Osaka University, (2-6, Yamada-oka, Suita, Osaka 565)

**Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University, (2-1, Yamada-oka, Suita, Osaka 565)

Fig. 1 Illustrating KDP single crystal.

た、これら結晶表面の異常と菌取り込み量の関係も明らかにした。

2. 菌添加による結晶育成

2.1 KDP 結晶への金属不純物効果

KDP 単結晶は Fig. 1 に示す様な正方晶で c 軸方向に優勢に成長するが、 a, b 軸方向にも幾分成長する。 c 軸方向の成長を目的とする場合、 a, b 軸方向も同時に成長させると c 軸方向の成長率が落ちる。また、 a, b 軸方向への成長は“ス”発生を伴ない易く良好な結晶が得にくい。そのため目的の成長率に適した量の金属不純物 Cr^{3+} , Al^{3+} を育成溶液に添加し a, b 軸方向の成長を抑え、 c 軸方向にのみ成長させる方法が用いられる^{2,3)}。この不純物が過剰に加わると Fig. 1 の様に結晶にテーパ角がつく。

2.2 菌添加育成

KDP 溶液中に菌が存在しており、かつ結晶にテーパ角が生じるような育成の時には Fig. 2 に示すようにプリズム面に必ず多くの小丘状 (Hillock) のものが生じる現象が見つかった。そこで、菌の結晶成長への影響、小丘とテーパ角との関係、菌の結晶内への取り込み等を明ら

Fig. 2 Macroscopic hillocks on the tapered prismatic surfaces of KDP crystal.

かにするための実験を行なった。

育成は溶液を攪拌しながら目的の結晶成長率が得られるための過飽和状態を保つように溶液温度をコントロールする温度降下法で行った。育成溶液は 9 l で飽和温度は 43.0°C 、種結晶は断面 5 cm 角、実質 c 軸成長率は 5.5mm/day であった。最初に金属不純物を a, b 軸方向の成長を抑えテーパ角のつかない程度添加した。

今までに液温 40°C 以下では大部分の菌が死なずに増殖することを確認している⁴⁾。そこで、育成溶液の温度が 38°C 以下になった時点で 10^6 個/ml の割合で菌を添加した。菌が発生している別途の KDP 溶液を滅菌済みのパスツールピペットを用い採取し、トリプトソーヤ寒天培地上に滴下して 36°C 恒温器中で増殖させた菌を添加に用いた。菌の種類は主に酵母菌とグラム陰性桿菌である。この電子顕微鏡写真を Fig. 3 に示す。この様な状態で育成を続け結晶長が 6 cm 程度になった時点 (溶液温度は $\approx 29^{\circ}\text{C}$) でテーパ角をつけるために金属不純物を追加し、さらに 1.5 cm 程度結晶を成長させた。

育成の結果、得られた結晶の写真を Fig. 4 (a) に示す。ピラミッド面 (1) とテーパ角のほとんどついてない部分 (平均テーパ角 0.8°) のプリズム面 (3) には異常が現われていない。ところ

(a)

(b)

Fig.3 Scanning electron micrographs of microbes in KDP solution.

- (a) Yeast (Candida Parapsilosis)
(b) Gram-negative bacillus.

が金属を追加しテーパ角が強くなった図中の矢印の所からのプリズム面 (2) (平均テーパ角 5.7°) には, 明らかに表面に円型の小さな突起物 (Hillocks) が重なる様に多数現われている。その直径は小さなもので数mm, 大きなもので1~2cmにまで及んでいる。

次にこのプリズム面での異常が菌存在下での特有の現象であるのかを確認するために無菌の蒸留水を用いて菌が発生, 生存のできない58~48℃の温度範囲で菌数10個/ml以下の状態で育成を行った。結果はFig.4(b)に示すようにピラミッド面, プリズム面とも, またプリズム面に関してはテーパ角の大小にかかわらず異常は現れなかった。やはり結晶表面の異常は育成溶液内に菌が存在する場合に起る現象である。それでは育成溶液内の菌はどのような状態であってもこの様な現象が起るのか。前記の菌添加育

Fig.4 Change of growth habit of prismatic surfaces of KDP crystals.

成では菌は溶液内で生きた状態で存在したが死骸として存在した場合でも同じ現象が起るのかどうかを調べるためにもう一つ実験を行った。

菌を前記の菌添加育成と同程度 (10^5 個 / ml 上), 育成溶液に添加し溶液温度を約75℃まで上げ菌を殺し, その溶液を用いて新たに菌の発生しないように57~50℃の温度範囲で育成を行った。結果は, Fig. 4(c)に示すようにピラミッド面, プリズム面, またプリズム面に関してテーパー角の大小にかかわらず異常は現われなかった。

以上三つの育成実験より結晶表面に小丘の生じる現象は生きた菌が育成溶液内に存在する場合のみに起り, その場合でも結晶表面のどの部分にも起るのではなくテーパー角の大きな場合のプリズム面によりはつきりと生じることがわかった。また, 小丘部分をX線トポグラフで検査を行っても転位が写らないこと, エッチングを行ってもエッチピットが現れないことより表面の小丘は内部からの転位が原因ではなく結晶表面で起こっている現象である。

テーパーがついていないとこの小丘が生じないことから菌が斜面になった所により取りつきやすくなると考えられるが, 一方もっと斜めの面であるピラミッド面には小丘は生じない。 Al^{3+} , あるいは Cr^{3+} が吸着しているプリズム面にしか生じないことから金属不純物の存在が菌が取りつくための条件と考えられる。プリズム面が小丘を持つ理由はよく分らないが, 死んだ菌では生ぜず生きた菌でしか小丘ができないことから生きている菌がKDPに付着し, その後何等かの酵素を出し, これがKDPに作用してプリズム面に小丘を作るのではないと思われる。

3. 結晶内の菌の定量

3.1 測定原理

KDP 結晶内の微生物由来の有機物量の測定に我々は始めてリムラステスト法を採用した。

リムラステストとはグラム陰性菌由来のエンドトキシンとカプトガニの血球抽出液 (ライセ

ート) との酵素反応を利用して測定する方法である。エンドトキシンとは菌の細胞膜構成成分であるリボ多糖体 (蛋白の複合体), つまり死んだ菌の細胞の一部分のようなものであり体内に摂取されると強い発熱性を示す。そこで現在, 医療関係者の間では注射液に用いる蒸留水等にエンドトキシンが含まれないようにリムラステストによりチェックを行う方法が広く利用されている。極めて微量のエンドトキシンに対し感度を有するのが特徴である。(感度 1 pg/ml , 10^{-3} ppb) 現在, 半導体工業関係等で用いられている総有機炭素測定装置では有機炭素量に対し約 10 ppb の感度が最高なので, このリムラステストはそれより更に高感度で微量の有機炭素を測定できる可能性がある。本研究に用いたトキシカラースystemはリムラステストの一つでカプトガニのライセートと発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) との混合物を凍結乾燥したエンドトキシン用の比色定量キットである。(生化学工業株式会社, トキシカラースystem) また, このシステムは酵母菌等が有する ($1 \rightarrow 3$)- β -D-グルカンにも反応する。反応は Fig. 5 に示すように行なわれる。エンドトキシンまたは ($1 \rightarrow 3$)- β -D-グルカンが加わるとライセート中の凝固酵素が活性化され, それが発色合成基質を水解し p-ニトロアニリン (pNA) を遊離する。この pNA をジアゾ化したジアゾ色素を比色定量する⁵⁾。この測定は菌体の一構成部分を測定する方法なので KDP 結晶内に取り込まれた全有機物を測定するものではない。しかし, 有機物の取り込みの有無, 結晶内の取り込み量の比較などには適用できると考えられる。

3.2 KDP 溶液への適用と感度

このトキシカラースystemは pH 7~8 の検体については 1 pg/ml のエンドトキシンに対してでも十分測定可能なほど高感度である。ところが, 我々が測定しようとするのは KDP 溶液中のエンドトキシンで KDP 溶液は pH 4.2 である上に, 多量の KDP を含んでいる。このた

Fig.5 Reaction of chromogenic limulus test.

め KDP 溶液中では全く反応が進まなかった。そこで反応阻害を解くために溶液中和、溶液希釈を行った。中和、希釈したそれぞれの条件の KDP 溶液中に既知量のエンドトキシンを添加

し純水中の場合と比較し、どれほどの反応性を得られるかという添加回収テストを行った。

添加回収テストは KDP 材料をエンドトキシンプリー蒸留水(エンドトキシシ量： $<10^{-3}$ ppb)に溶かした。希釈もエンドトキシンプリー蒸留水を用い 0.001～1M の範囲で行った。また、溶液はすべて 0.2 μm の滅菌済フィルターを通した。そして、それぞれの溶液に既知量の標準エンドトキシシを添加し測定を行い、その結果を純水中での結果と比較し添加回収率を算出した。それを Fig.6 に示す。横軸は KDP 濃度、縦軸は回収率で、実線は中和した溶液、破線は中和しない溶液である。これを見ると 0.01 M 以下に希釈すれば中和しなくても回収率は 90% 以上であるが検体に含まれるエンドトキシシが少量である場合、希釈しすぎてシングナルが弱くなってしまう恐れがある。そのことも考慮に入れ中和し、0.5～0.8 M に希釈するのが最適と判断した。そして、その辺りで数回テストした結果、KDP 溶液に対しては 10 pg/ml (10^{-2} ppb) までの感度を持つことがわかった。

3.3 エンドトキシシの測定

Fig4(a) の結晶のピラミッド面(1), テーパが

Fig.6 Change of chromogenic efficiency in KDP solution.

Table 1 Results chromogenic limulus test.

Microbes in KDP solution (mΓ ⁻¹)	Region	Endotoxin in KDP crystal (ppb)
~10 ⁶	(1) Pyramid	0.25
	(2) Prism	0.56
	(3) Prism	0.42
	KDP powder	0.04

強く、異常の現われたプリズム面(2)、テーパが弱く、異常の現われなかったプリズム面(3)の3つの部分について測定を行った。

まず、結晶表面1.5~2.0mmの部分の一部カットし化学てんびんで秤量した。そしてカットした結晶の表面に付着している汚れを取り除くために99.8%エチルアルコールで表面を十分ふいた。この様に処理した結晶を試験管に入れ、2M溶液になるようにエンドトキシンフリー蒸留水を加えた。さらにこの溶液を中和するために5N・NaOHを加えた。pH7になっていることはペーパー試験紙で確認した。最後に濃度が0.8Mになるように不足分のエンドトキシンフリー蒸留水を追加し、これを検体とした。なお、操作に用いた器具はすべて乾熱滅菌(250℃, 2時間)したものを用いた。この様に調整した検体に対しエンドトキシン量測定を行い、その値をKDP結晶1g中の値に換算した。結果をTable 1に示す。

この値からKDP結晶にはどの部分にも菌由来の有機物(エンドトキシン)が育成中に外部より取り込まれることがわかる。しかし、その取り込み量には結晶部位により差があり、プリズム面はピラミッド面より取り込み易く、その値は1.5~2倍である。また、プリズム面ではテーパ角の大きい部分の方が小さい部分より取り込み易い。これは2.2節で述べたように同じプリズム面であってもテーパ角をつける金属不純物が存在すると何らかの相互作用を起し、菌が取り込まれ易くなる。そのため、テーパ角が大きいプリズム面の取り込み量が多くなると考えられる。

4. 結 論

育成溶液に菌を添加し結晶育成を行い、添加した菌から由来する有機物の結晶への取り込み量を極めて高感度のリムラステスト法を用い測定した。その結果、ピラミッド面よりもプリズム面、プリズム面でもテーパ角の小さい場合より大きな場合に取り込み量が多いことがわかった。

菌が結晶の晶癖に与える影響として、ピラミッド面には影響はないが、テーパ角が大きいプリズム面にはその表面に円型の小さな突起物が多数生じるという異常が現われることがわかった。これらの結晶表面の異常は生きた菌がプリズム面に付着するためと思われる。表面に多数の小丘が生じるのは生きた菌が何等かの酵素のようなものを出し、これがKDP材料と作用するためではないかと思われる。

今後は以上の成果を基に菌または菌由来の有機物が結晶に入らないような状況でKDP結晶を育成し、耐レーザー損傷性との関係を明らかにしてゆく予定である。

本研究を行うにあたり協力をいただいた生化学工業株式会社の田中重則氏、田村弘志氏、益田多満喜氏に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) A. Yokotani, T. Sasaki, K. Yoshida, T. Yamanaka and C. Yamanaka: Appl. Phys. Letters **48** (1986) 1030.
- 2) A. Yokotani, H. Koide, K. Yamamuro, T. Sasaki, T. Yamanaka and C. Yamanaka: Technol Repts. Osaka University **33** (1983) 301.
- 3) 横谷篤至, 小出博, 山室幸三, 佐々木孝友, 山中龍彦, 山中千代衛: レーザー研究 **11** (1983) 162.
- 4) A. Yokotani, T. Sasaki, K. Yoshida, T. Yamanaka and C. Yamanaka: ILE Internal Repts. Osaka University **ILE 8605P**.
- 5) H. Tominaga, S. Tanaka, N. Tominaga: Nephron **42** (1986) 128.