

水中細菌のリアルタイム検出技術の開発

Technology for Real-Time Detection of Microbes in Water

アズビル株式会社
技術開発本部

小原 太輔
Daisuke Obara

アズビル株式会社
技術開発本部

古谷 雅
Masashi Furuya

アズビル株式会社
技術開発本部

増本 新吾
Shingo Masumoto

アズビル株式会社
技術開発本部

松浦 友朋
Yuho Matsuura

アズビル株式会社
技術開発本部

地下 久哉
Hisaya Jige

アズビル株式会社
技術開発本部

細居 智樹
Tomoki Hosoi

キーワード

蛍光スペクトル, 蛍光, 散乱光, 細菌, 微粒子, レーザ, 水の汚染検出, IMD™ (Instantaneous Microbial Detection)

医薬品, 化粧品, 食品製造などの分野で, 原料および洗浄などの様々な用途で水が使用されている。これらの水については, 含まれる細菌数が基準値以下になるよう管理する必要があるが, 既存の検査方法では, 検査開始から結果が出るまでに数日を要するため, より迅速に結果が得られる細菌検出技術の開発が求められている。本稿では, 水に含まれる細菌のリアルタイム検出を目的とした装置を開発し, 細菌を検出する性能, および, その他の粒子に対する識別性能に関して良好な結果が確認できたので, 報告する。

Water is used for washing, and as an ingredient, and in various other applications in the production of medical supplies, cosmetics, and food. For such uses the number of microorganisms in the water must be kept below some standard amount, but existing laboratory procedures require a wait of several days before results are received. A faster detection method is therefore desirable. This paper reports on the development of a real-time detector for microbes in water. Good results have been obtained both for detection of microbes and for distinguishing them from particles in the water.

1. はじめに

1.1 水中細菌数の検出方法と課題

医薬品, 化粧品, 食品製造などの分野で, 原料および洗浄などの様々な用途で水が使用されている。これらの水については, 用途に応じた水質の基準が定められており, それらの項目の一つとして, 水に含まれる細菌数が基準濃度以下になるよう設備を管理し, 定期的に細菌数を監視することが求められる⁽¹⁾。

細菌の大きさは, 菌種によって多岐にわたるが, 直径約1 μ m前後の微粒子であり(図1), その存在を確認するためには高倍率の顕微鏡などを用いる必要がある。しかし, 実際に水質管理基準となる細菌数は注射用水で0.1CFU/

ml, 精製水で100CFU/ml (CFU:コロニー形成単位)と低濃度であるため, これらの水に含まれる細菌を顕微鏡観察で監視することは現実的ではない。そのため, 細菌の検出には, 主に培養法が用いられる。培養法では, 細菌を含んだ水を培地に塗布した後, 数日かけて細菌の増殖を促し, 目視可能なコロニーと呼ばれる細菌の塊を形成させる。その後, コロニーの数を目視あるいは画像識別などで計数することにより, 水に含まれていた細菌数を把握する(図2)。

培養法は, 長年の実績があり, 検出の特異性などの点で優れた方法ではあるものの, 検査を開始してから実際に細菌数を確認するまでに数日を要するため, 例えば純水製造設備に汚染が発生した場合, それを発見し対処するまで

に数日を要することや、コロニーを形成しにくい細菌については検出できない場合があることがリスクとなる。また、定期検査のたびに作業者による採水、培養、計数などの作業が必要となり、運用コストがかかることも課題である。

このため、水に含まれる細菌を、より迅速に検査するための新たな技術が求められている²⁾。

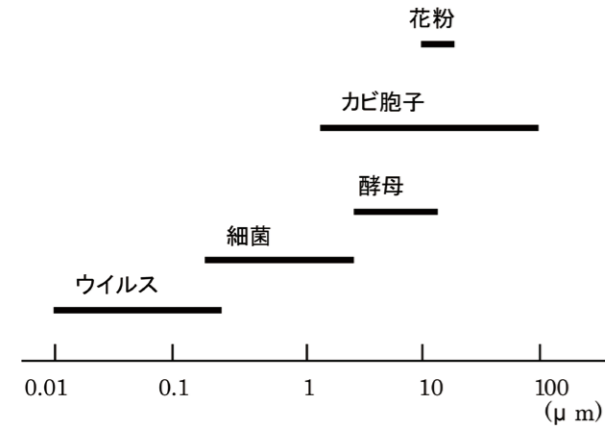


図1 細菌およびその他の生物由来粒子のサイズ

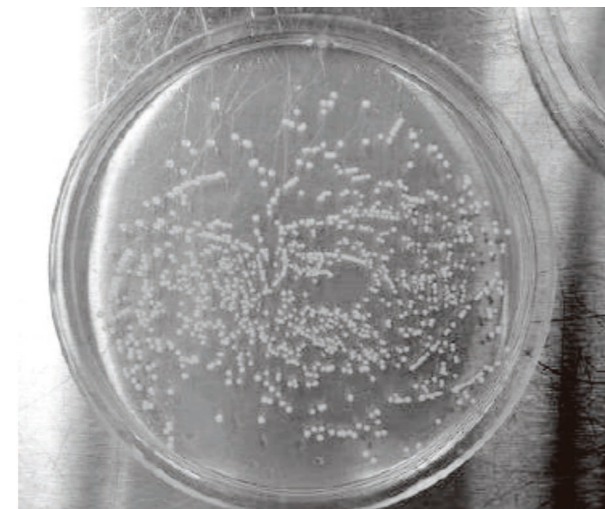


図2 培養により目視可能となったコロニー



図3 IMD-W 外観写真

今回、水に含まれる細菌のリアルタイム検出を目的として、リアルタイム水中浮遊菌ディテクタ IMD-WTMを開発した(図3)。本稿では、IMD-Wの計測原理および、設計思想、基本性能の評価結果について報告する。

2. 水中細菌のリアルタイム検出技術

2.1 計測原理

IMD-Wは、装置内の計測部を計測対象の水が通過する際に、水に対して励起光を照射する。水の中の粒子に励起光が照射された際に発生する光信号を、散乱光および2種類の波長帯の蛍光に分けて、それぞれの光の強度をPMT (Photomultiplier Tube)およびPD (Photo Diode)を用いて計測する。図4に、IMD-Wの光学系の概念図を示す。

水中に粒子が存在すると、励起光を照射された粒子から散乱光が発生する。散乱光の強度は、主に粒径および周辺媒質との屈折率差に依存するため、水中の細菌から生じうるとその散乱光強度が予想できる。

しかし、細菌以外に大小様々な粒子が水中に存在する場合、散乱光強度だけでは細菌とその他の粒子の区別をすることはできない。そのため、粒子から発生する蛍光の強度も計測し、細菌の識別に利用する。

細菌に励起光を照射した際に、細菌に含まれる生理活性物質およびタンパクが特定の波長帯の自家蛍光を発することが知られている。特に、リボフラビン、NADHなどが自家蛍光を発する代表的な物質であるといわれている³⁾⁴⁾。

この細菌に特徴的な自家蛍光を検出することで、様々な粒子の中から細菌を識別することが可能となる。

ここまで紹介した、散乱光と生物由来の自家蛍光に基づいて細菌検出を行う基本的な検出原理は、すでに販売を開始している、リアルタイム細菌ディテクタ IMD-ATMの計測原理と同一であるが、IMD-Aは空気中のバイオエアロゾルの検出を目的としている。

これに対し、水中の粒子から発生する蛍光信号は微弱であるため、IMD-Wの開発では、検出感度を高めるため、新たに液中粒子検出用の光学系を設計した。

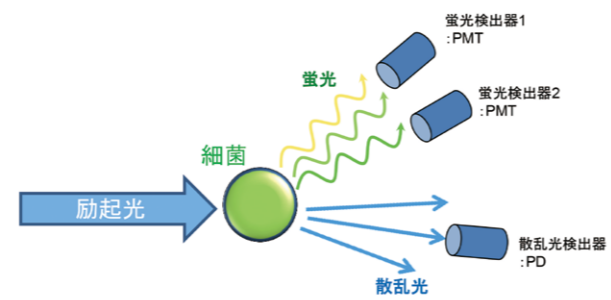


図4 IMD-W 光学系概念図

2.2 蛍光特性に基づく細菌の識別

試作機を用いたフィールドテストの結果、製造現場で実際に使用される水の中には、細菌以外の微粒子が存在し、その一部が自家蛍光を発することが明らかになった。

これらの粒子は、精製水製造プロセスに由来する粒子であり、設備配管の腐食などにより生じる金属酸化物、ガスケット、ポンプなどの可動部から生じる樹脂などの粒子と考えられる。これらは細菌ではないが、自家蛍光を生じるため、単に自家蛍光の有無を計測するだけでは、細菌と混同しやすい。

これらの粒子と細菌を識別する方法を検討するため、蛍光分光光度計を用いて、細菌および樹脂粒子の蛍光スペクトルを計測した。図5に代表的な細菌の蛍光スペクトルと、自家蛍光を生じる樹脂粒子の蛍光スペクトルを示す。図中緑の線で示した2系列は、細菌の蛍光スペクトルを示し、赤で示した4系列は、樹脂材料の蛍光スペクトルを示す。検討の結果、細菌と樹脂材料では、蛍光スペクトルのピークはほぼ重なり合っているものの、強度分布が異なる特徴を示すことを確認した。

リアルタイム計測を旨とするIMD-Wでは、計測時間の制約があるため、蛍光スペクトルの詳細な強度分布を把握することは困難であるが、蛍光を二つの蛍光波長帯に分割して計測し、二つの蛍光波長帯の強度比をとることで、細菌と樹脂粒子の蛍光スペクトルの差異を区別できることが明らかになった。

水中の粒子の蛍光を計測する際のもう一つの設計要素として、水由来のラマン散乱の存在が挙げられる。水由来のラマン散乱は励起光の波長に対し、50-70nm程度長波長側にピークを生じる⁵⁾。粒子由来の微弱な蛍光を検出するためには、ラマン散乱光が蛍光検出波長帯と重ならないよう留意する必要がある。

IMD-Wの励起波長の設定に際して、細菌と樹脂粒子の蛍光スペクトルの差異を区別するために選定した二つの蛍光波長帯の間にラマン散乱ピークが位置するよう励起波長を設定することで、細菌固有の自家蛍光を識別する機能と、検出感度を両立できるよう設計した。有効に機能する蛍光検出波長帯と励起波長の組み合わせは複数存在し、計

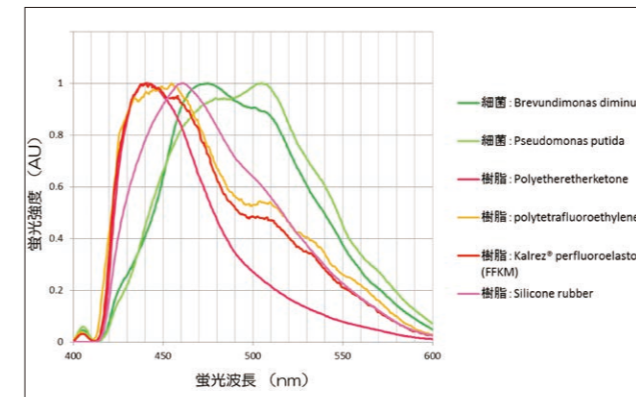


図5 細菌および樹脂材料の蛍光スペクトル

測対象物質の蛍光特性に応じて設定できる。図6に、二つの蛍光検出波長帯とラマン散乱ピーク波長帯の配置を示す。

3. 細菌検出性能の評価

3.1 試験設備

装置の性能評価のため、純水プロセスを模した簡易型純水ループを構築した。純水ループの模式図を、図7に示す。純水が一定流量で循環する構造となっており、このループにIMD-Wを接続することでループ内の水質のリアルタイムモニタリングが可能である。

純水ループには、任意の濃度で試料を混入することができる。今回の性能評価では、ループ内に0.1~1000CFU/mlの濃度範囲で細菌を混入した水を流し、それぞれの濃度で、IMD-Wが細菌を検出できるか、評価を実施した。

同時に、比較対象として、一般的な細菌検出手法である培養法による細菌検出を行い、両者の結果を比較した。試験に使用した細菌は、*Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* (NCTC 6017), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)の7菌種である。再現性を確認するため、各菌種で、4段階の濃度での計測を3回繰り返し実施した。

3.2 実験結果

細菌の濃度を変化させて複数回の計測を行った結果を散布図として図8に示す。縦軸はIMD-Wによる計測でリアルタイムに得られた細菌検出数であり、横軸は同じタイミングで水を採取し、数日間の培養を行って確認した細菌数である。各細菌に対する線形近似と相関係数を示す。

二つの手法は線形関係を示し、相関係数も1菌種を除き0.95以上が得られた。

一方、細菌の検出割合については、線形近似の係数が1以下の系列は、培養法に対してIMD-Wの検出数が少ない

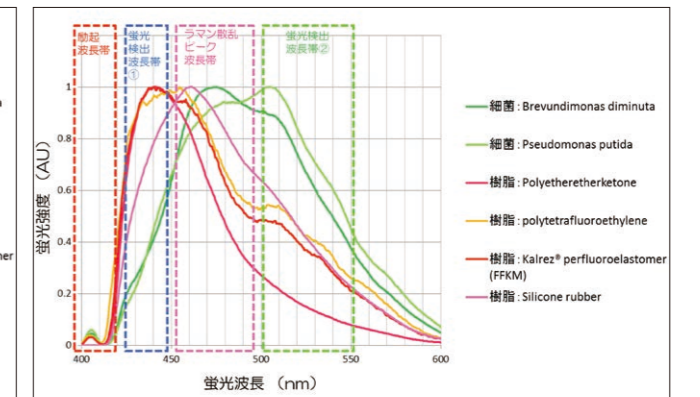


図6 蛍光検出波長帯と水のラマン散乱ピーク

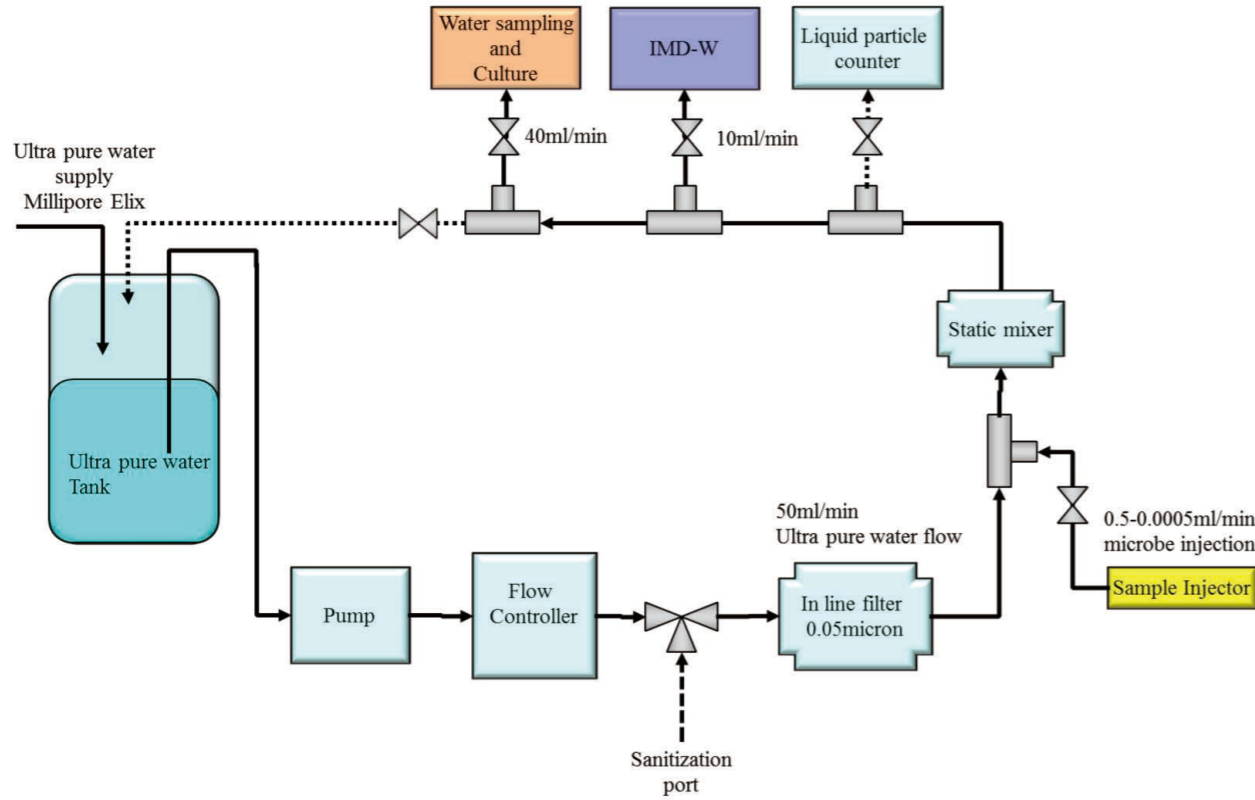


図7 純水ループ

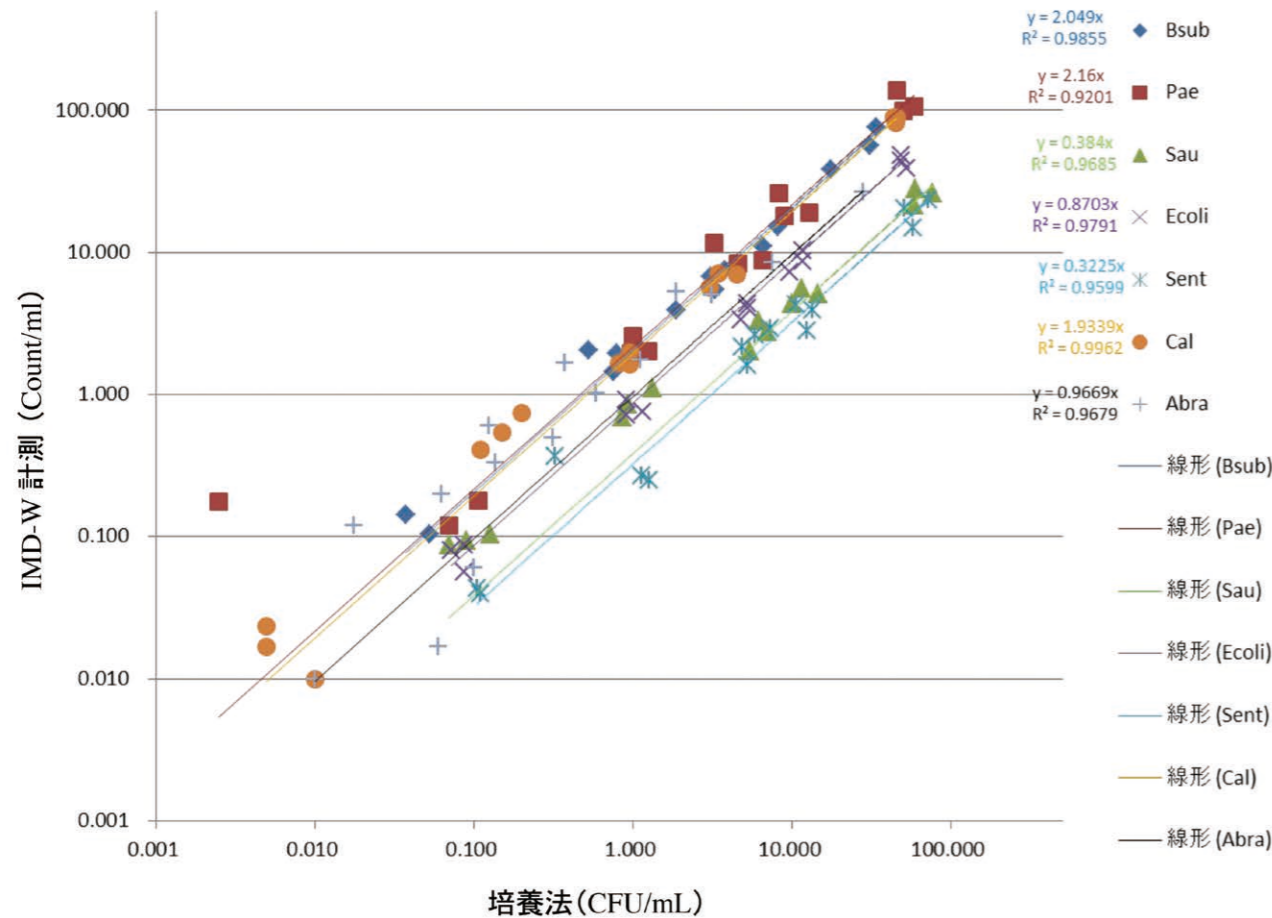


図8: 細菌検出性能 散布図

ことを示す。細菌の菌種に依存して、IMD-Wの検出割合が高い菌種と、低い菌種が存在する。この差は、IMD-Wの感度は粒子の光学特性に依存する傾向があり、一方、培養法の感度は、培養環境に対する細菌の適応度に依存するために生じていると考えている。

今回の実験では、いずれの菌種の試験においても、IMD-Wが、0.1CFU/ml程度の低濃度の細菌汚染から応答を示すこと、また、水中に低濃度で混入している細菌の濃度変化をIMD-Wでモニタリングできることを確認した。

4. 細菌と非生物粒子の識別機能

4.1 IMD-Wの粒子識別機能

IMD-Wは粒子から生じる散乱光および2種類の波長帯の蛍光を計測し、これら3種類の光の強度に基づき、細菌と、それ以外の粒子の識別を行う。図9に、粒子計測時の、三つの光強度の散布図の例を示す。赤色が細菌由来、青色が樹脂由来の信号強度分布である。

細菌と、非生物粒子の信号強度分布を3次元の分布として学習し、それぞれの群を最も効率よく分けられる位置に識別境界面を定義することで、両者を識別している。

今回の試験では、細菌3種類と、樹脂ガasket2種類およびステンレス由来の腐食生成物からなる微粒子を準備し、それぞれの粒子を計測した。

識別結果を表1に示す。細菌3種類に対しては、98%以上の確率で細菌として正しく識別された。樹脂ガasketおよびステンレス由来の腐食生成物に対しては、約90%の確率で細菌ではないと正しく識別された。

このように、自家蛍光を発する非生物粒子に対して、良好な識別結果が得られたが、IMD-Wは粒子の散乱光と蛍光波長特性に基づいた識別を行うため、粒子の種類や状態によって結果が変動する場合があります、引き続きデータの蓄積を進める必要がある。

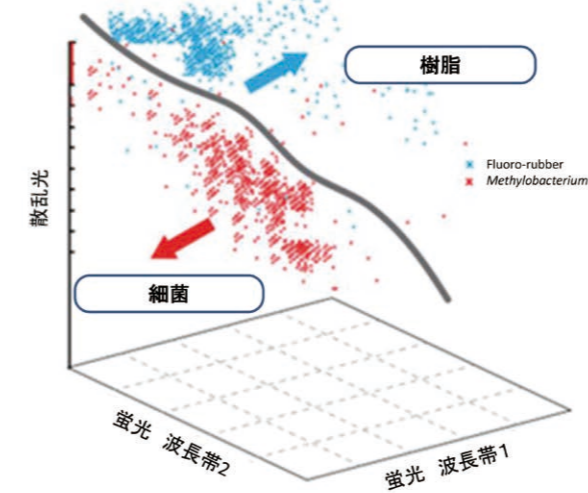


図9 識別境界を用いた細菌識別

表1 樹脂粒子および細菌の識別正解率

対象	陽性除去率	備考
Kalrez® (DuPont社製)	89%	樹脂 フッ素系ガasket材
シリコンゴム	92%	樹脂 ガasket材
ステンレス由来の腐食生成物	91%	Rougeの主成分

対象	菌 陽性識別率	備考
Bd (<i>Brevundimonas diminuta</i>)	99%	水棲菌
Pp (<i>Pseudomonas putida</i>)	99%	水棲菌
Me (<i>Methylobacterium extorquens</i>)	98%	水棲菌

5. まとめ

IMD-Wの計測原理および、基本性能の評価結果について報告した。以下に示す用途を想定し、実証試験に取り組んでいる⁽⁶⁾。

- ・ 公定法で定める周期的培養法を補完し、精製水プロセスの細菌数をリアルタイム・連続で測定することによる、微生物汚染に関する管理レベルの向上
- ・ 水質汚染が発生した場合の即時処理により、汚染リスクの影響範囲の早期特定
- ・ 粒子発生量のトレンド管理に基づいた、設備の健全性の把握

これまで広く使われてきた培養法とは全く異なる原理で細菌を検出する技術であり、特性の違いを踏まえて利用する必要があるが、精製水プロセスにおける細菌のリアルタイム、連続計測管理が可能となることを活かし、ユーザーへのさらなる価値提供を目指す。

<参考文献>

- (1) Pharmacopeial forum : USP<1231> Water for Pharmaceutical Purposes, United States Pharmacopeial Convention, 2008, Vol. 32;
- (2) Cundell, A., Gordon, O., Haycocks, N., Johnston, J., Luebke, M., Lewis, N., et al. : Novel Concept for Online Water Bioburden Analysis: Key Considerations, Applications, and Business Benefits for Microbiological Risk Reduction., 2013 May/June, American Pharmaceutical Review, 26-31.
- (3) Steven C. Hill, Michael W. Mayo, and Richard K. Chang : Fluorescence of Bacteria, Pollens, and Naturally Occurring Airborne Particles, ARL-TR-4722, 2009
- (4) Ammor, M. S. : Recent Advances in the Use of Intrinsic Fluorescence for Bacterial Identification and Characterization, 2007 Journal of Fluorescence, 17:455-459
- (5) Rouessac, F., & Rouessac, A : Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques (2nd ed.), (2013). John Wiley & Sons.
- (6) R Yamasaki, S., & Morris, S : Rapid Microbiological Monitoring (RMM) technologies for purified water monitoring, IFPAC Annual Meeting 2015.

<商標>

リアルタイム細菌ディテクタ, IMD, IMD-A, IMD-Wは,
アズビル株式会社の商標です。

<著者所属>

小原 太輔	技術開発本部	基幹技術開発部
古谷 雅	技術開発本部	基幹技術開発部
増本 新吾	技術開発本部	基幹技術開発部
松浦 友朋	技術開発本部	商品開発部
地下 久哉	技術開発本部	商品開発部
細居 智樹	技術開発本部	商品開発部