

洗浄評価： 微生物のTOC回収率と直線性

はじめに

高品質で安全な製品を消費者へ届けるためには、製造設備の効果的な洗浄が重要です。汚染リスクを適切に減らして品質を保証することが洗浄の目的です。品質と安全性のリスクを知るためには、洗浄プロセスの有効性を検証する方法が必要です。

アメリカ食品医薬品局(FDA)によると、2017年の食品飲料業界における製品回収の主な原因は、微生物による製品汚染でした¹。微生物汚染を低減するためには適切な洗浄プロセスが要求されます。また、洗浄プロセスの有効性を検証する手段も重要です。

全有機炭素(TOC)は、製品残留・洗剤・微生物など、潜在的な汚染物質を検出するために広く採用されている非特異的分析方法です。

TOCを使用するためには、洗浄後に残留が考えられる物質における回収率と直線性を検討する必要があります。TOCによる化学汚染物質や化合物の試験は一般的ですが、微生物の回収率に関する情報は多くはありません。このアプリケーションノートは、微生物のTOC回収率と直線性を検証することで、TOCが洗浄評価項目に適しているかどうかを検討することを目的としています。

実験計画

本実験はコロラド大学ボルダー校と共同で行いました。100mLの枯草菌(*Bacillus subtilis*)をトリプチックソイブロスに接種し、一晚培養しました。培養物から10mlを採取して、4,500 rpmで10分間遠心分離して細胞ペレットを生成しました。遠心分離操作毎に、細胞ペレットの上澄みを超純水 10mLに入れて、ポルテックスミキサーで混合しました。一連の操作を7回繰り返しました。この際、細胞が培地からTOC汚染を受けないように注意しました。その後、DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)染色プロトコル²により、細胞を再懸濁、希釈、カウントしました(図1)。

細胞密度の測定後、TOC計 Sievers* M9型で1ppm 校正確認用標準液セットを測定して測定精度を検証した後、3段階に希釈した細胞密度溶液を測定しました。TOC測定後、残ったサンプルを0.45 μm滅菌フィルターでろ過してバクテリアを除去しました(図2)。さらに、それぞれのバックグラウンドTOCを測定しました(図2)。



図1. 蛍光顕微鏡による細胞カウントのイメージ

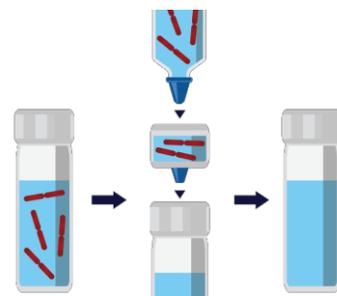


図2. 枯草菌(*Bacillus subtilis*)ろ過手順

結果

細胞密度 (cells / ml)	TOC生値 (ppb)	標準偏差 (ppb)	フィルター後 バックグラウンド TOC(ppb)	標準偏差 (ppb)	バックグラウンド 補正済みTOC (ppb)	標準偏差 (ppb)	RSD (%)
5.80E + 05	262	4.04	191	1.71	71	5.75	8.10
5.80E + 06	1650	38.3	349	7.85	1301	46.15	3.55
5.80E + 07	12400	1450	3270	35.1	9130	1485.1	16.27
フィルター後 Milli-Q水			27	1.83			

微生物とTOCの相関を表1と図3に示します。R²値は0.9981であり、良好な直線性を示しました。図3に示す線形回帰モデルに基づいて、標準偏差の3倍で定義される検出限界 (LOD) は2.74E + 06 cells / mLです。M9 型の最大濃度 TOC 50 ppm は2.49E + 08 cells / ml に相当します。

さらに、目視検査による微生物残留のLODとTOCの相関を比較するために、クーポン滴下試験を実施しました。各サンプル1 mlをステンレスクーポンに滴下して乾燥させました。クーポンに微生物を滴下した様子を図4に示します。

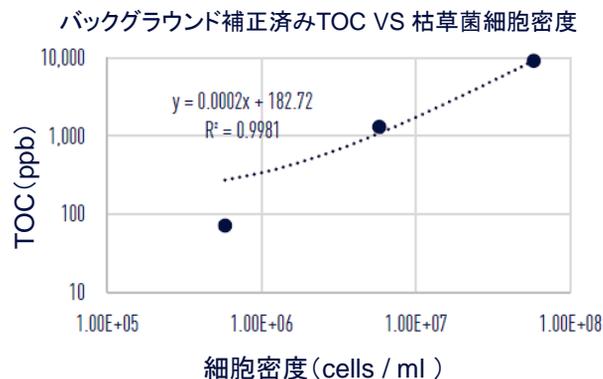


図3. TOCと微生物細胞密度の直線性

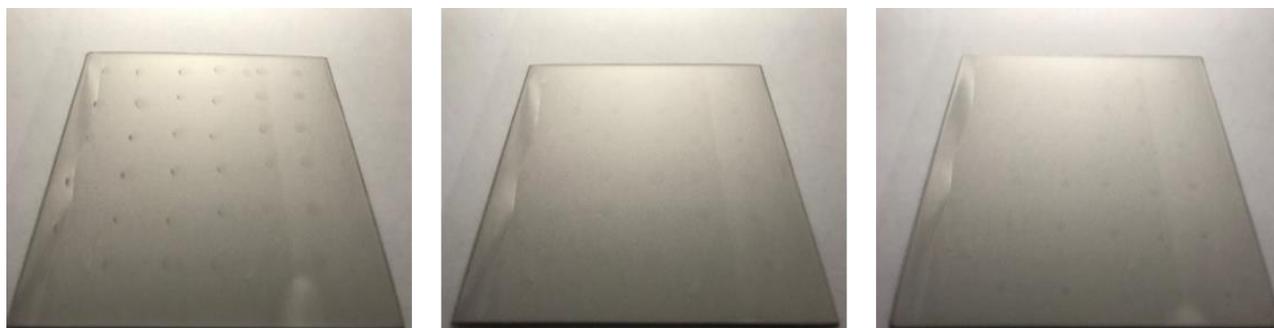


図4. ステンレスクーポンへ微生物を滴下した様子

(A) 5.8E + 07 cells / ml

(B) 5.8E + 06 cells / ml

(C) 5.8E + 05 cells / ml

考察

微生物細胞密度とTOCの相関試験、およびクーボン滴下試験の結果から、洗浄プロセスの有効性の検証が重要であることが示されました。高濃度の細胞密度 ($5.8E + 07$ cells / ml) では、理想的な照明条件下であれば容易に目視で残留が確認できます。一方、低濃度の細胞密度では、理想的な照明条件下でも、目視で残留を確認することが非常に困難です。これは、目視検査以外にも洗浄手順の有効性を検証するための分析が必要であることを示しています。

今回の測定結果から、生産設備において微生物汚染があったとしても、目視検査によって“清浄”と誤判断されてしまい、生産が行われてしまう可能性があると考えられます。既存の洗浄手順の有効性を継続的に監視することで、製品品質と安全性のリスクを減らすことができます。

また、一般的に微生物の分子組成が定まっていないため、微生物溶液のTOC回収率を求めることは困難です。この実験では、生きている微生物細胞の炭素含有量を求めた過去の知見に基づいて、微生物溶液の理論的回収率を算出しました³。微生物の理論的なTOC回収率の計算式を図5に示します。細胞当たりの炭素原子数に基づいた場合、 $5.8E + 07$ cells / ml の理論的なTOC濃度は11.6 ppmです。今回の実験では、 $5.8E + 07$ cells / mlのTOC実測値は9.13 ppmでした。これは78.7%の回収率を示しています。

$$\left\{ 5.8 \times 10^7 \frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right\} \times \left\{ 1.0 \times 10^{10} \frac{\text{carbon atoms}}{\text{cell}} \right\} = \left\{ 5.8 \times 10^{17} \frac{\text{carbon atoms}}{\text{mL}} \right\}$$

$$\left\{ 5.8 \times 10^{17} \frac{\text{carbon atoms}}{\text{mL}} \right\} \div \left\{ 6.022 \times 10^{23} \frac{\text{atoms}}{\text{mol}} \right\} = \left\{ 9.67 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{mL}} \right\}$$

$$\left\{ 9.67 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{mL}} \right\} \times \left\{ 12.01 \frac{\text{g of carbon}}{\text{mol}} \right\} = \left\{ 1.16 \times 10^{-5} \frac{\text{g of carbon}}{\text{mL}} \right\}$$

$$\left\{ 1.16 \times 10^{-5} \frac{\text{g of carbon}}{\text{mL}} \right\} = \left\{ 11.6 \frac{\mu\text{g of carbon}}{\text{mL}} \right\} = \{ 11.6 \text{ ppm} \}$$

$$\frac{9.13 \text{ ppm measured}}{11.6 \text{ ppm expected}} \times 100 = 78.7\% \text{ Recovery}$$

図5. 微生物の理論的TOC回収率の計算式³

結論

TOC計 Sievers M9 型を使用することで、洗浄評価において、目視検査よりもTOCの方がより低濃度まで微生物の残留を検出することができました。今回得られたデータは、設備の清浄度を確認するためにSievers TOC計が有効であることを示し、微生物汚染を監視するためには、目視検査に加えてTOCのような定量的分析方法を検討することの重要性を示しています。TOC分析は、残留物の測定、洗浄プロセスの監視、全体的なリスクの軽減に効果的です。

参考文献

1. Recall Index and Spotlight. Expert Solutions <https://www.stericycleexpertsolutions.com/recall-index/>
2. DAPI Protocol For Fluorescence Imaging Thermo-Fisher Scientific – US https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/protocol/s/c_ell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html
3. Phillips, Rob, and Ron Milo. “A Feeling for the Numbers in Biology.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, no. 51 (December 22, 2009): 21465. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907732106>

(翻訳: セントラル科学株式会社)