

コニカ洗浄度判定キット「フキトリマスター」の開発

Konica Hygiene Monitoring Kit "FUKITORI MASTER"

沼 間 雅 之*

Numa, Masayuki

Konica hygiene Monitoring Kit "FUKITORI MASTER" indicates the hygiene level after cleaning by detecting residuals of proteins. This test has high sensitivity, outputs in very short time, and is used in a simple operation. The hygiene level is decided by comparing the colored reagent with color standards, after swab off the protein residuals on the test surface and put it into the reagent. It easily shows the presence of invisible residuals. "FUKITORI MASTER" will be applied to knowing in place how the food processing instruments and tools are cleaned after cleaning. And it has possibility of preventing secondary contamination by prospectively monitoring hygiene levels.

1 はじめに

今春23年ぶりに食品衛生法が改正され、さらに7月に新たにPL法が施行されるにいたり、食品の安全性についての意識は必然的に高まってきている。

フキトリマスターは洗浄度と言う比較的新しい概念に基づいて企画開発したものである。はじめに食品衛生管理の最近の動向を紹介する。

●食中毒発生の現状と対策の必要性

近年、わが国では「飽食の時代」とか「グルメの時代」などと言われるように豊かな食を楽しんでいる。しかし、反面、依然として毎年多くの食中毒事故が発生している。食中毒患者数は過去数十年間、事件数こそ減少しているが平均して3～4万人台ではほぼ横這いに推移している¹⁾。わが国の食中毒は原因物質から細菌性、化学性、自然毒の3つに大別できるが患者数では殆どが細菌性であり、食中毒と言えば一般的に「細菌性食中毒」を指すことが多い。このように食品の微生物を制御する衛生管理においては飽食文化とは裏腹に十分安心であるとは言いがたい環境にある。

●HACCPシステムによる衛生管理

現在、内外で注目されている衛生管理方式にHACCPシステムと言うのがある。HACCPシステムは、Hazard Analysis Critical Control Point Systemの略称で「危害分析・重点管理点方式」などと訳されている。HACCPはHAとCCPの2つの部分から成っており、食品の安全性・品質を確保するためこれらに関わる危害を確認分析し、これを防除する手段と定義される。今春の食品衛生法の改正においても高度な衛生管理（HACCP）という項目が示されている。

HACCPは7つの原則からなる。すなわち、その1. 危害分析を実施すること、その2. 危害を監視、制御する箇所（CCP）を設定すること、その3. 各CCPにおける管理基準を設定すること、その4. 各CCPにおける監視方

法を定めること、その5. 管理基準を外れた場合の修正処置を予め定めておくこと、その6. 方法が有効に機能しているか検証方法の設定をすること、その7. 方式の実施に係るすべての記録保存を文書化すること、である。

この中で、その4は監視検査結果（モニター）の方法に関してその性格から結果判定までの迅速性が絶対条件として求められる。なぜなら従来のように各工程から検体を採取し、それらについて手間と時間と経費をかけて微生物検査をしていたのでは役に立たず、モニターの結果は絶えずリアルタイムに管理基準に照らし合わされていなければならないからである。通常の微生物検査は菌培養のため24時間以上の時間を必要とする。従ってこのシステムを機能させるために微生物の迅速検出方法、あるいは微生物に代わるある指標の測定方法が望まれることとなってきた。

●監視手段の条件

最近では微生物検査の自動化、迅速化、簡易化された測定方法が開発されてきている。生菌数を直接カウントする手段には生物物理的手法でインピーダンスを計測する、生物化学的手法であるATPバイオルミネッセンスを利用する等あるが感度的に低すぎたり、またノイズが多いなど管理指標とするには問題がある。現在、菌数に拘らず洗浄度（汚れ）という概念でその対象部位を管理したらどうかと言う考え方の普及がなされつつある。

●「フキトリマスター」の開発目的

今回開発した「フキトリマスター」は微生物に代わる管理指標としての「汚れ」の検出を目的としたものである。本キットは主に乳業関連会社を対象に製造工程における製造関連機器の洗浄後の汚れ（タンパク質）をモニターし結果を直ちにフィードバックすることで、微生物の繁殖栄養源であるタンパク質を取り除き、二次汚染低減に有用であると思われる。衛生管理のモニタリングなどいわゆるプロスペクティブな意味あいの検査方法は、結果判定が迅速であるとともに経済的であることも重要であるが、本キットはこれに適用のものである。

* 感材生産本部 第2開発センター



コニカ洗浄度判定キット「フキトリマスター」

2 フキトリマスターの概要

フキトリマスターはスワブ法により拭き取ったタンパク質を呈色反応させ、付属のカラーズケールと比較することにより洗浄度を判定するキットである。

1) タンパク質検出の原理

本キットのタンパク質による呈色反応はビウレット反応の応用系である。タンパク質のアルカリ性水溶液に硫酸銅を加えるとタンパク質-Cuの錯化合物を形成し紫色を呈する。これは水と結晶状態を形成しているときは分子内の二つの-CO-NH-がトランス型をとり、分子内水素結合をして安定に存在しているが、Cu²⁺とアルカリ性で反応すると生成する錯化合物はシス型となって紫色を呈するようになる。pHが高くなるとペプチド群は末端アミノ基に近い部分より順次プロトンを放出しCu⁺に配位することがわかっている。

このようにビウレット反応による呈色はCu²⁺がプロトン(H⁺)を失ったポリペプチド鎖中の窒素原子と配位することに依存するので、呈色の強さはペプチド結合の数に比例し、タンパク質の種類によって呈色差が少ないことが利点である。ただしプロリン残基の場合は放出すべきプロトンがないので留意しなければならない。

フキトリマスターはこうしたタンパク質含有のアルカリ条件下でCu⁺と特異的に結合する試薬を用いている。Fig.1に簡単に呈色の原理を図示した。Cu⁺に配位した試薬は紫の色調を呈し、その水溶液は波長562nmに吸収を持つ。この色調からタンパク質量(濃度)を求めることが可能である²⁾。

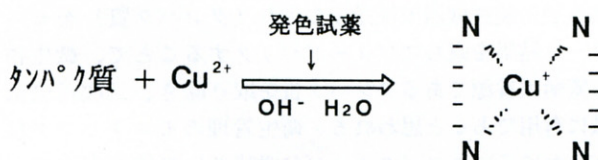


Fig.1 タンパク質による呈色の原理

2) キットの仕様

キットの構成はTable1に示すとおりである。食品製造関連工程に使用することを目的とするので検査対象を汚染することのないように拭き取り液と拭き取り用スワブはγ線照射滅菌処理を施している。

Table1 「フキトリマスター」キット構成

名称	成分/材質	容量	数量
試薬A	発色剤、緩衝液	100 ml	2個
試薬B	硫酸銅水溶液	20 ml	1個
拭き取り液	エタノール水	20 ml	1個
拭き取り用スワブ	ポリエステル	50本/袋	4袋

付属品：カラーズケール(比色表)

• カラーズケールの作製

0~1300 μgの範囲で標準タンパク質を含む試料を用いて検量線を作成し、このとき視覚により識別可能な4段階の呈色濃度域(レベル1~4)を設定した。Table2に該当する反応液のO.D(吸光度)及びタンパク質量を示す。これよりレベル1~4の呈色濃度の標準タンパク質量を決定した。

Table2 洗浄度(レベル)と反応液の吸光度及びタンパク質量との関連

レベル	色調	O.D 562 nm	タンパク質量 (μg)	標準タンパク質量 (μg)
1	黄緑	0.07~0.25	0~25	0
2	青灰	0.50~1.15	55~150	100
3	紫	1.25~2.20	200~420	300
4	濃紫	2.70~4.00	600~1300	1000

標準タンパク質量の反応液の色相当をカラーガイドから選択し、色空間を指定してカラーズケール(Fig.2)を作成した。



Fig.2 「フキトリマスター」カラーズケール

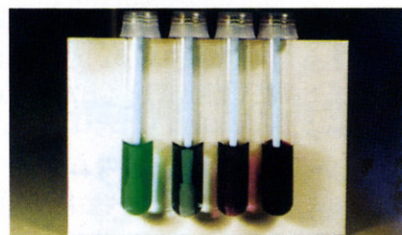


Fig.3 洗浄度(レベル1~4)の判定。左から順に洗浄度レベル1からレベル4を示す。

● 拭き取り用スワブ材質の検討

本キットはタンパク質の持つ弱い還元作用を利用して呈色させているので当然ながら拭き取りスワブ吸水部の材質も非タンパク質、還元性を持たないことが求められる。一般の細菌検査に用いられている綿棒（天然セルロース）、ナイロンを代表とするポリアミド系の合成高分子、ウレタン結合を有するポリウレタン、アクリル繊維（アクリル純度は85%程度）等は還元作用からそれ自身が呈色し、バックグラウンドが大きい。本キットに用いるポリエステルスワブは半導体工場等で粉塵検査に用いられている品質レベルのものである。

3) 洗浄度の判定手順

最初に試薬A 1 ml を試験管等に移し取り、試薬Bを1滴加えて反応液を調製しておく。予めこれを必要数だけ用意する。

洗浄度の判定は以下の手順で行う。

1. 判定したい場所をスワブで拭き取る（10×10 cm程度）。このとき判定したい箇所が乾いているときは拭き取り液をスワブの先端に2～3滴垂らして湿らせると効率よく汚れを拭き取ることができる。
2. 拭き取ったスワブを先に調製した反応液（1 ml）へ浸す。軽く震とうする。
3. 室温 10分間または加温下（40～45℃）3分間そのまま放置する。
4. 試験管を軽く震とう比色表と試薬の呈色を比べ洗浄度を判定する。

Fig. 3に判定の実際を示す。また、Table 3には設定した反応温度と時間における、洗浄度のレベルと対応するタンパク質量を示す。これにより半定量が可能である。

Table 3 洗浄度の判定と汚れ（タンパク質量）の目安

色	調	黄緑	青灰	紫	濃紫		
レ	ベ	1	2	3	4		
洗	浄	高い	>	>	低い		
(汚	れ)	(少ない)			(多い)		
反応条件		0 μg 100 μg 300 μg 1000 μg (タンパク質として)					
湿	時						
度	間						
15℃～25℃	10分						
40℃～45℃	3分						

3 キット性能

1) キャリブレーションカーブ

感度の調整は発色剤の濃度、反応液のpH、温度、時間により行うことができる。本キットでは実際の食品加工現場、特に乳業関連工場における実状と要求レベルを検討して感度を調整した。

Fig. 4は反応液中のタンパク質量と562 nmでのO.Dとの関係である。直線性はレベル3までは良好である。呈色の安定性はO.Dの変動係数でみると9%以内で視

覚判定には全く影響がない。また、カラスケール視覚判定許容範囲と反応温度許容範囲の整合性も確認した。これにより反応液中の0～1300 μgのタンパク質を視覚判定により4段階の発色濃度域に設定した。

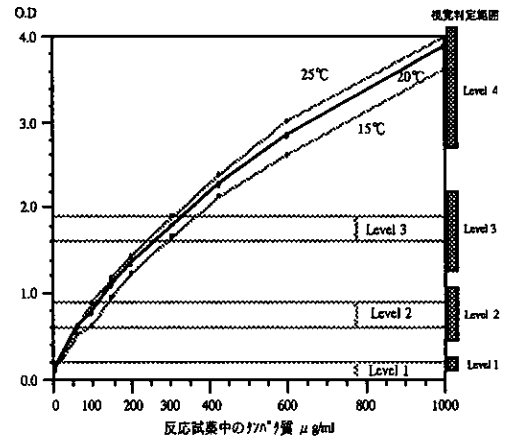


Fig. 4 「フキトリマスター」キャリブレーションカーブ

2) 反応の経時変化

本キットに用いたタンパク質検出の反応は各タンパク質濃度において温度と時間により呈色が決定される。完全な反応終点まではおよそ60℃で30分の条件が必要である。

食品工場の現場での要望にこたえて判定時間を優先したために、本キットによる洗浄度の判定は反応終点で行っていない。従って定量的にタンパク質量を求めたいときには反応の時間と温度を規定範囲に管理する必要がある。

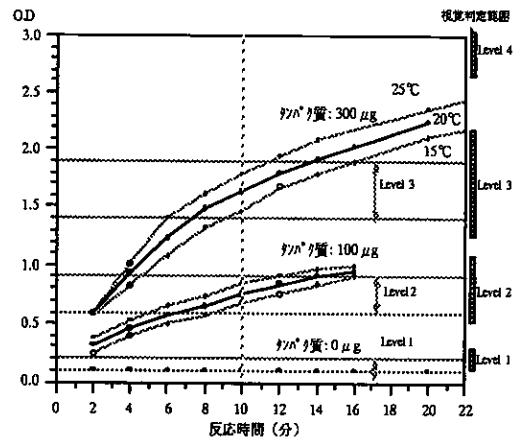


Fig. 6 室温反応条件下の吸光度の経時変化

Fig. 6に室温（15～25℃）条件下で標準タンパク質量、0、100、300 μgを反応させたときの反応時間と吸光度の変化の関係を示した。同様にFig. 7には38～46℃条件下で標準タンパク質量、0、100、300 μgを反応させたときの反応時間と吸光度の変化の関係を示した。室温条件では反応は比較的穏やかに進行し、各レベルの視覚判定範囲に合う時間は1～1.5分程度の許容が得られる。一方、反応条件温度を高めると判定時間を短縮することが

できるが時間管理がより厳しくなる。

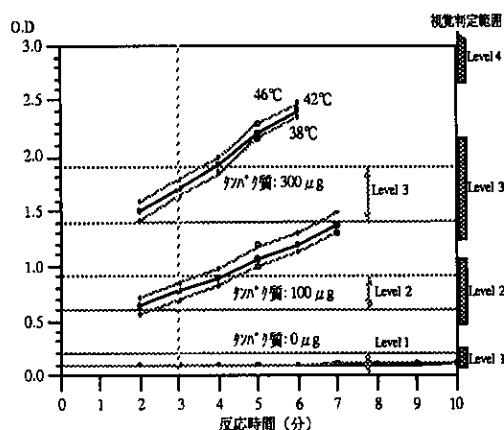


Fig. 7 38～46℃ 反応条件下の吸光度の経時変化

3) 妨害物質の影響

食品製造工程、特に乳業関連工場において機器、器具、ラインなどに残りうるタンパク質以外の物質について、本キットのタンパク質検出反応へ与える影響の程度を確認した。

界面活性剤、アルコール、糖類、油、塩、漂白剤などの代表的な物質を通常使用されると予想される量の倍量から数倍量の濃度に調製し、スワブに最大限保持される液量を反応液へ添加して発色への影響を調べた。

Table 4 に示すように試験した物質の濃度範囲では影響がなかった。ただしブドウ糖に代表される還元糖が多量に存在すると正の誤差を受ける可能性がある。また、還元作用の強い物質、例えばアスコルビン酸、茶の主成分タンニン酸などが多量に存在すると同様な傾向があると予想される。実際の使用される現場の状況によっては留意する必要がある。

Table 4 各基質の「フキトリマスター」に影響を及ぼさない濃度

Brij 35	1%	NP-40	1%
Triton X 100	1%	エタノール	50%
しょ糖	15%	大豆油	20%
ブドウ糖	500 mg/dl	次亜塩素酸	2000 ppm
アスコルビン酸	200 mg/dl	塩 (NaCl)	3 M
一般洗剤 (K 100)	3%	グリシン	100 mg/dl

4 タンパク質汚れの検出

汚れ物質が表面に付着することに関する明確な仕組み、さらに洗浄過程の定量的取扱は極めて困難である。

食品の主成分の一つであるタンパク質の付着を考えた場合、タンパク質の種類だけではなく、それが未変性の

状態であるか否か、その変性の程度や状態により表面への付着量が大きく異なる。一般的に熱変性したタンパク質は付着が多い傾向がある。乳製品に関しては熱殺菌環境下にさらされることが多く、この場合 β -ラクトグロブリンがタンパク質汚れとして主なものである。これも 60℃ の熱変性点を境に付着量は急激に増える。

洗浄度 (汚れ) の視覚による判定とキットによる判定

実験室レベルで簡単な汚れのモデルを作製し、洗浄度の視覚による判定と「フキトリマスター」による判定を行った。熱変性させた卵白アルブミン溶液をステンレス板上に 0 mg/m²、15 mg/m²、40 mg/m²、100 mg/m² になるように塗布乾燥させ、タンパク質汚れのモデルを作製した。次いでステンレス板上の視覚による洗浄度判定とキットを用いた呈色によるレベル判定を行った。

Table 5 に結果をまとめた。「フキトリマスター」を用いてタンパク質の呈色を指標とすることにより視覚では観察できない「汚れ (タンパク質)」のレベルを高感度に測定できることがわかった。

Table 5 洗浄度の視覚による判定とキットによる判定

タンパク質汚れ量	「フキトリマスター」判定	視覚判定
0 (mg/m ²)	レベル 1	清 浄
15 (mg/m ²)	レベル 2	清 浄
40 (mg/m ²)	レベル 3	清 浄
100 (mg/m ²)	レベル 3～4	中度清浄
1500 (mg/m ²)	レベル 4	汚 れ

5 まとめ

わが国の食品製造業数は優に 20 万を越える。その規模は大部分が従業員 30 名以下の近代設備を持たない小規模、零細である³⁾。各工場の自主衛生管理はこれまでいくつかの手法が提案されたが、実際のところこれまでの「経験と勘」に頼っている。今後は HACCP の普及に伴い、原料から流通に渡るまで一貫した合理的な自主衛生管理が要求されよう。

本キットは特別な設備を必要とせず、誰にでも簡単に操作でき、感度よく迅速に洗浄度の結果判定が得られる。衛生監視としてのプロスペクティブな検査手段として経済的でもあり、商品性が期待できよう。今後は「汚れ」と菌との関連性等について検討を重ねていく予定である。

●参考文献

- 厚生省生活衛生局食品保健課編、全国食中毒事件録
- Smith, P. K., et. al., Anal. Biochem., 1985, 150, 76-85
- 川城巖、食品衛生学第 2 版 (光生館)