

バイオトラック (BioTrak™)

リアルタイム浮遊菌カウンター

浮遊菌検出能力

アプリケーションノート CC-103

翻訳：ニッタ株式会社 クリーンエンジニアリング事業部 技術部 モニタリング課

1. はじめに

バイオトラックリアルタイム浮遊菌カウンター（以降 **BioTrak** と表記）は、気中の全浮遊粒子数と、その内の浮遊生菌粒子数を測定する計測器である。さらに、**BioTrak** には粒子捕集用フィルターが搭載され、光学的に検出された粒子の事後の菌種分析が可能である。**BioTrak** には、TSI 社の粒子計測理論、計測器開発、校正に関する経験をもとにした実証済みの技術が採用されている。

BioTrak は、微生物の迅速検査法（RMM）として知られる計測器に分類される。この方法は、製造工程での微生物汚染を監視する際に、大きな利益をもたらす可能性があるものとして過去数年間で高い注目を集めている。

また、リアルタイムで浮遊菌の存在を検出できることは、**BioTrak** の主要な差別化要因の一つである。従来のアクティブエアースAMPLINGと公定法である培養による計数法では、培養と分析に 2 日から 4 日かかっていたが、**BioTrak** により次のようなことが可能になる。

- 製造環境の浮遊菌数の傾向を高い精度で示す
- 浮遊菌汚染の即時の報告は次のようなことを可能にする
 - 汚染に曝された可能性のある製品を隔離する
 - 環境汚染の警告、警報を発する
 - 根本原因調査を迅速に始めることができる
- PAT に基づくプロセス制御への入力
- リアルタイムの製品リリースの可能性
- クリーンルームにおける適切な行動についての人的教育に対するリアルタイムのフィードバック

BioTrak の特性は、浮遊粒子の中から浮遊生菌粒子を識別する能力である。その動作原理については、アプリケーションノート CC-101 で述べている。

2. 浮遊菌検出

浮遊菌検出部はレーザー励起蛍光（LIF）に基づく特許技術を使用しており、LIF を用いた浮遊菌検出の基本は微生物構成成分の自家蛍光である。蛍光する物質は細胞生存性と関係する特定の細胞代謝物質で、紫外線光に励起された時に蛍光する。最も一般的な細胞生存性と関係している代謝物質はトリプトファン、NADH、フラビン（リボフラビン）の3種類の物質で、これらの代謝物質は固有の励起蛍光曲線を持つ。浮遊菌検出部に搭載しているレーザーは405 nm 半導体レーザーで、サイズが小さく、低消費電力で、入手しやすいなどの点から、最も一般的な励起光源である。図1はリボフラビンの波長ごとの励起光と蛍光帯域を示す。

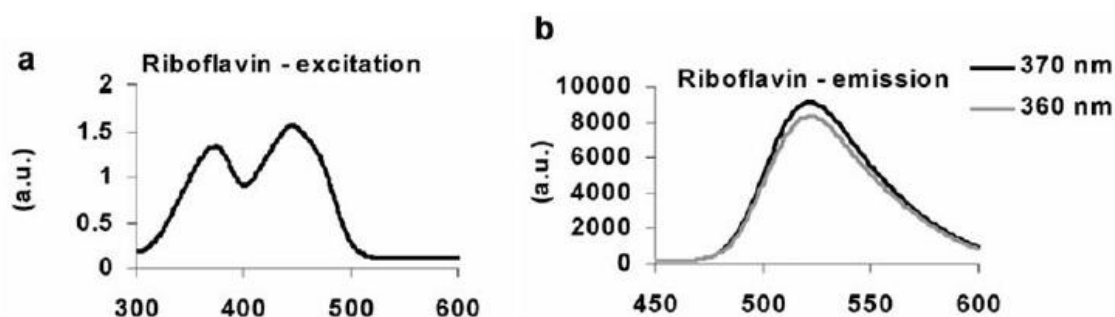


図1 Riboflavin excitation and emission curve

(Plytycs et al *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2006)

代謝物質は励起帯域内のどの波長でも励起される。重要なことは、蛍光帯域の形は励起波長に依存せず、蛍光の強度は励起波長に依存するということである。分子は励起帯域のいずれの波長でも励起され、励起波長を超える波長で蛍光する。また、各生物代謝物質は固有のLIF励起と蛍光曲線を持つ。浮遊菌による蛍光スペクトルはさまざまな代謝物質の混合物で、微生物の種類を特定するに十分なものではないので、LIFによって菌種を同定することはできない。

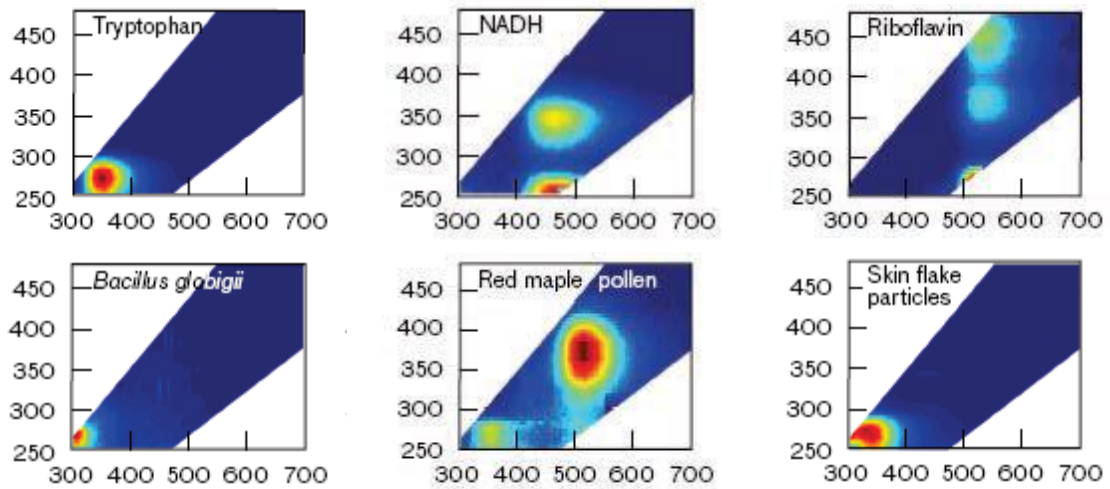


図 2 Excitation emission spectra of viability markers tryptophan, NADH, and riboflavin; the common microorganism *Bacillus globigii*; and common nonviable fluorescent particles red maple pollen and skin flakes

図 2 は、一般的な浮遊生菌と蛍光を示す浮遊粒子についての励起—蛍光スペクトルを示す。

ここでは、粒子が様々な波長で励起され、蛍光が複数の波長で測定された全スペクトルのグラフで、縦軸は励起波長、横軸は蛍光波長を示す。このようなグラフを再現することが理想であるが、実際には、各波長の励起には別々のレーザーが必要であり、蛍光発光をその構成波長ごとに分離する分光計も必要になる。更に、このような測定には高価な装置と大量のサンプルを用意する必要がある。

そこで、BioTrak は完全な分光計ではないが、浮遊菌の検出を行ない易くする為に、広帯域の蛍光発光を二分割しスペクトル情報を活用している。図 3 に光学エンジンとその主要構成要素を示す。粒子が浮遊菌であるかを判定するため、3 種類の光信号が用いられる。

- アバランシェフォトダイオード(APD)：粒径測定
- 光電子増倍管(PMT)A：短波長域蛍光チャンネル
- 光電子増倍管(PMT)B：長波長域蛍光チャンネル

BioTrak では、従来の気中粒子計数器で用いられていたアバランシェフォトダイオード (APD) からの散乱光強度情報に、2 つの光電子増倍管から得られる長短 2 つの蛍光波長帯域の蛍光強度情報を加えることで、測定した粒子から浮遊菌を識別することができるようにした。これにより、一般の環境粒子から浮遊菌を精度良く識別することが可能となる。

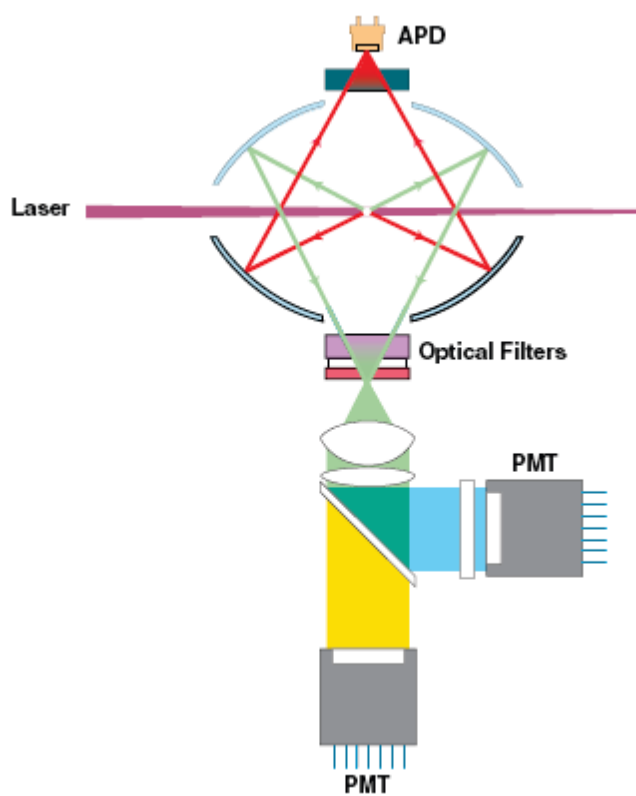


図 3 BioTrak Single Particle LIF Optics

検出に散乱光強度情報（粒径）と2つの蛍光強度情報（蛍光チャンネルA・B）を組み入れることによる識別精度の改善を図4に示す。両方の図には同じデータがプロットされている。青のプロットはバミューダ草の花粉で生菌ではないが蛍光を示し、赤のプロットのラルストニア・ピッケティ（グラム陰性菌の一種）は生菌である。この2種類の粒子の識別が可能であるか確認する。図4Aでは、散乱光強度情報（粒径）と蛍光強度情報（蛍光チャンネルA）の2つのパラメータでプロットしており、データは明確なグループをつくることなく混在しており、非生菌と生菌を識別することはできない。図4Bは検出を3つのパラメータ（粒径、蛍光チャンネルA・B）にした際の効果を示す。解析に蛍光チャンネルBを追加することによりデータが2グループに識別できている様子がわかる。

このように、蛍光を示す非生菌を含む粒子の中から、生菌を識別することは容易ではないが、BioTrakは3つのパラメータを組み合わせることで、生菌・非生菌の識別能力を大幅に向上させることができた。

BioTrakの検出アルゴリズムは図4に示す方法と同様の手法により、粒子が浮遊菌かどうかの判定を行なう際、3つのパラメータを組み合わせる。このデータは実験室で作られたものであるが、実際の製造環境においても役に立つものである。

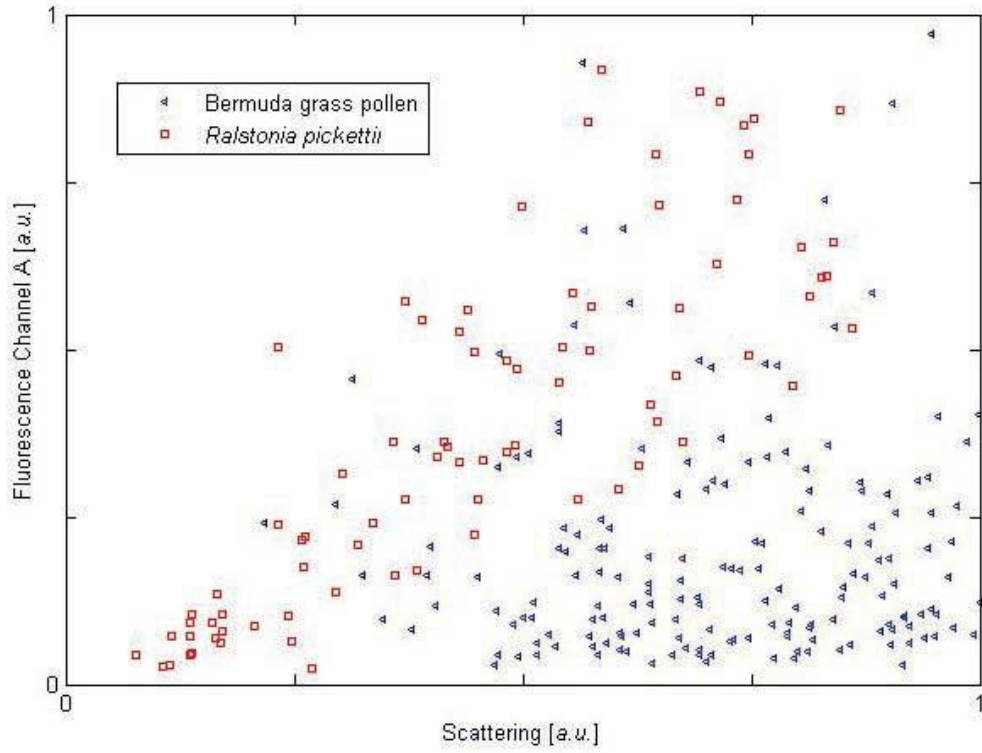


Figure 4A. Raw Data with Two Discrimination Parameters: Particle Size and Fluorescence

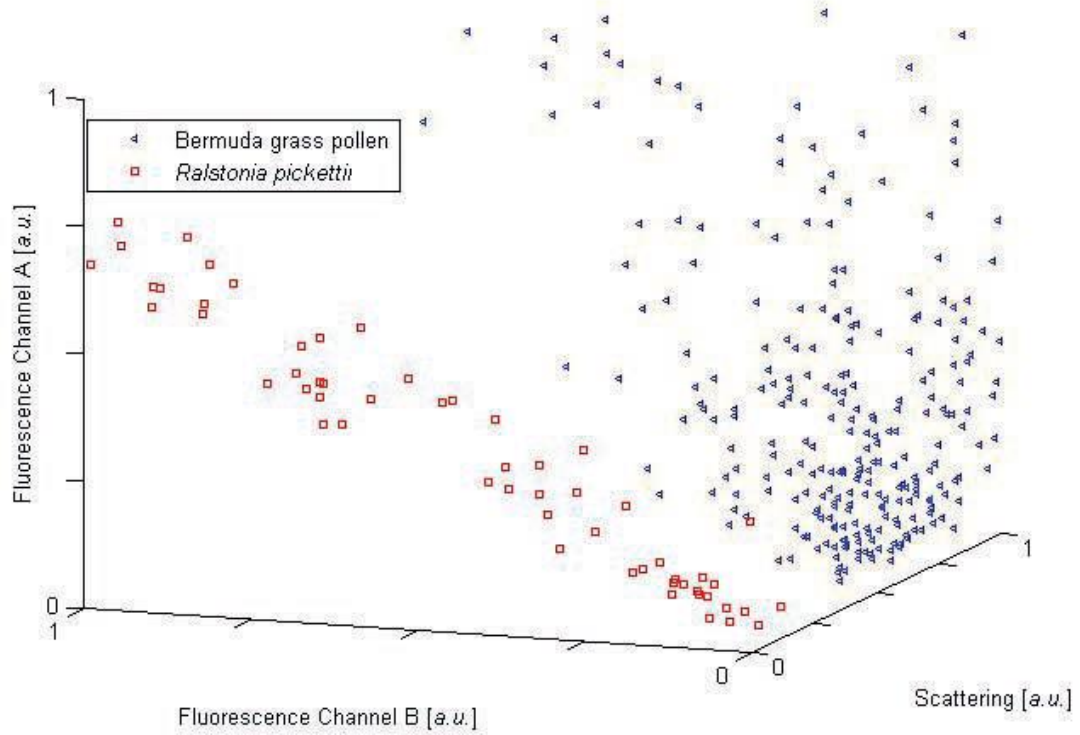


Figure 4B. Raw Data with Three Discrimination Parameters: Particle Size, Fluorescence A, and Fluorescence B

3. 結論

環境粒子から発生するレーザー励起蛍光（LIF）の特性は複雑であり、蛍光を示す非生菌を含む粒子の中から、生菌を識別することは容易ではないが、BioTrak は検出アルゴリズムに 3 つのパラメーターを組み合わせることで、生菌・非生菌の識別能力を大幅に向上させた。

BioTrak についての詳細な資料についてはニッタ㈱までお問い合わせください。

ニッタ株式会社

クリーンエンジニアリング事業部 技術部 モニタリング課

<http://www.nitta.co.jp>

奈良工場 〒639-1085 奈良県大和郡山市池沢町 172

TEL 0743-56-9400 FAX 0743-56-4403

本社 〒556-0022 大阪市浪速区桜川 4-4-26

TEL 06-6563-1235 FAX 06-6563-1265

東京支店 〒104-0061 東京都中央区銀座 8-2-1

TEL 03-6744-2740 FAX 03-6744-2741