

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-125459

(P2008-125459A)

(43) 公開日 平成20年6月5日(2008.6.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 M</b> 1/24 (2006.01)	C 1 2 M 1/24	2 G 0 5 2
<b>C 1 2 M</b> 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	A 4 B 0 2 9
<b>C 1 2 Q</b> 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
<b>G 0 1 N</b> 1/10 (2006.01)	G 0 1 N 1/10	N

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2006-315410 (P2006-315410)	(71) 出願人 501203344
(22) 出願日 平成18年11月22日 (2006.11.22)	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(特許庁注：以下のものは登録商標)	茨城県つくば市観音台3-1-1
1. テフロン	(74) 代理人 100086221
(出願人による申告) 平成17年度農林水産省「食品の安全性及び機能性に関する総合研究」委託事業、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願	弁理士 矢野 裕也
	(72) 発明者 百溪 英一
	茨城県つくば市観音台1-36-14
	(72) 発明者 オドンゲリル
	茨城県つくば市谷田部4774-1 東谷田川団地2棟204号
	Fターム(参考) 2G052 DA01 DA21 JA15
	4B029 AA08 BB02 CC01 GA02 GB09
	4B063 QA05 QQ03 QQ06 QQ16 QS11
	QS31 QS39

(54) 【発明の名称】 温度感作実験用金属製微量試験管及びそれを用いた微量液体試料中の微生物の加熱殺菌実験方法

## (57) 【要約】

【課題】 加熱殺菌評価実験において、特にヨーネ病感染動物の初乳や牛乳中に排菌され仔牛に伝染するヨーネ菌の感染除去のための、加熱殺菌条件の検討、市乳生産工程における、加熱殺菌条件の検討に有用な、温度感作実験用金属製微量試験管及びそれを用いた微量牛乳加熱殺菌実験法を提供することを目的とする。

【解決手段】 材質が金属からなる温度感作実験用微量試験管と、前記温度感作実験用微量試験管を用いることを特徴とする、微量液体試料中の微生物の加熱殺菌実験方法とを提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

材質が金属からなる温度感作実験用微量試験管。

## 【請求項 2】

金属が、熱伝導度 $0.708\text{cal/s/cm}^2$  ( /cm)以上のものである、請求項 1 記載の温度感作実験用微量試験管。

## 【請求項 3】

ヨーネ菌に関する温度感作実験用である、請求項 1 又は 2 記載の温度感作実験用微量試験管。

## 【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の温度感作実験用微量試験管を用いることを特徴とする、微量液体試料中の微生物の加熱殺菌実験方法。

## 【請求項 5】

液体試料が、牛乳である請求項 4 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、温度感作実験用金属製微量試験管と、それを用いた微量液体試料中の微生物の加熱殺菌実験方法、特に微量牛乳加熱殺菌実験方法とに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

牛乳等、食品の安全性に関する評価が厳しくなり、消費者の要求も高まってきた。牛乳は乳幼児から大人まで摂取する重要な食品であり、生産段階での品質維持には家畜衛生技術を背景にした乳牛の健康管理及び伝染病などの疾病予防や治療技術が担っている。一旦搾乳された原乳は農家から牛乳工場に搬入され、種々の条件で加熱殺菌され、食品たる牛乳（市乳）として消費者に供される。

## 【0003】

我が国では、原乳から市乳として供される間の品質管理は、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）（昭和二十六年十二月二十七日）により厳密に管理されている。製造の方法の基準として、摂氏63度から摂氏65度までの間で30分間加熱殺菌するか、又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌することされている。この加熱条件は、人に重要な感染を起こす病原菌である結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*)に対する完全な殺菌条件と、牛乳固有の風味や有効成分を保持する目的で定められたものである。

## 【0004】

しかしながら、近年、欧米において、従来の牛乳の殺菌条件では生残する可能性があるヨーネ菌(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)による牛乳の汚染が指摘されるようになった。

そのため、牛乳中のヨーネ菌の熱耐性機序や、有効な加熱殺菌システム開発のために実験室内で加熱実験を行う強いニーズがでてきた。

牛乳中の病原微生物に対する加熱殺菌評価実験の実施にあたり、実際に牛乳工場で使用されている加熱温度と加熱時間及び加熱冷却の温度スロープの再現を簡易装置により実施することは非常に困難であり、その改善が求められていた。

## 【0005】

ヨーネ病は、抗酸菌の一種であるヨーネ菌に起因する慢性肉芽腫性下痢性伝染病である。我が国の牛群におけるヨーネ病汚染は、1980年以降、その発生頭数、発生地はともに拡大傾向にあり、2004年には発生頭数が1100頭を超え、家畜の法定伝染病として最大の発生件数である。

ヨーネ病は、出生後、早期に子牛が経口的にヨーネ菌に感染することで成立するが、ヨーネ病の感染から発症までのプロセスは、未だ不明の部分が多く、個体レベルでの感染経

10

20

30

40

50

過の差異が他の疾病に類を見ないほど大きい。感染のステージにより診断可能な技術が限られており、現在でも尚、全ての感染ウシを診断するに至っていない。

ヨーネ菌がヒト難病疾患であるクローン病の原因であるとする仮説や論文が出されてきたが、2005年にランセット誌に、クローン病患者の半数の血液から本菌が分離されたという報告が出され、これに先駆けて、米国の市販牛乳の約3%がヨーネ菌生菌に汚染されていたという報告がされ、家畜衛生上、公衆衛生上もこの病気を早期診断して清浄化する社会的ニーズは非常に高まっている。

また、ヨーネ菌が加熱により活性化されるという報告もあり、家畜衛生領域のニーズとして仔牛への経口感染防止のための初乳や原乳中のヨーネ菌殺滅技術や公衆衛生（食品衛生）領域のニーズとして、市乳の加熱殺菌条件の評価をするための実験器具や方法の開発が望まれている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者は、上記した従来の問題点を解消するため鋭意検討を重ねた。

そして牛乳中の病原微生物に対する加熱殺菌評価実験の過程で、これはそのための実験器具の材質に問題があることが明らかになった。

従来、実験室内で用いられる微少チューブは、プラスチック、特にポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィンでできており、これらは熱伝導性が極めて悪い素材であることが分かった。

【0007】

本発明は、このような従来の問題点を解消し、加熱殺菌評価実験において、特にヨーネ病感染動物の初乳や牛乳中に排菌され仔牛に伝染するヨーネ菌の感染除去のための、加熱殺菌条件の検討、市乳生産工程における、加熱殺菌条件の検討に有用な、温度感作実験用金属製微量試験管及びそれを用いた微量牛乳加熱殺菌実験法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

請求項1に係る本発明は、材質が金属からなる温度感作実験用微量試験管を提供するものである。

請求項2に係る本発明は、熱伝導度 $0.708\text{cal/s/cm}^2$  ( $\text{ /cm}$ )以上のものである、請求項1記載の温度感作実験用微量試験管を提供するものである。

請求項3に係る本発明は、ヨーネ菌に関する温度感作実験用である、請求項1又は2記載の温度感作実験用微量試験管を提供するものである。

請求項4に係る本発明は、請求項1乃至3のいずれかに記載の温度感作実験用微量試験管を用いることを特徴とする、微量液体試料中の微生物の加熱殺菌実験方法を提供するものである。

請求項5に係る本発明は、液体試料が、牛乳である請求項4記載の方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、加熱殺菌評価実験において、特にヨーネ病感染動物の初乳や牛乳中に排菌され仔牛に伝染するヨーネ菌の感染除去のための、加熱殺菌条件の検討、市乳生産工程における、加熱殺菌条件の検討に有用な、温度感作実験用金属製微量試験管及びそれを用いた微量牛乳加熱殺菌実験法が提供される。

【0010】

本発明の温度感作実験用金属製微量試験管は、金属で作成されていることから、加熱冷却実験における試料温度応答性に優れており、金属ブロックや冷媒による容器内の温度変化は非常に鋭敏となり、精密な温度感作と実際の牛乳製造工程における加熱条件のシュミレーションが可能である。

10

20

30

40

50

本発明は、牛乳の加熱殺菌の評価に限らず、様々な試料の加熱殺菌評価試験並びに広く化学反応や酵素反応など、内容物（試料）に対する鋭敏な温度感作を必要とする諸実験に広範に利用することができる。

本発明の温度感作実験用金属製微量試験管は、液体試料の加熱及び冷却条件による成分の変化、例えば酵素活性、酵素反応の推移、タンパク質の変性やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）など、様々な化学反応の実施や測定にも応用が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

請求項1に係る本発明は、材質が金属からなる温度感作実験用微量試験管である。

即ち、請求項1に係る本発明の温度感作実験用微量試験管は、材質が金属であることを除いて、その大きさなどはエッペンドルフチューブとして公知のプラスチック製の微量試験管と同様である。

【0012】

請求項1に係る本発明の温度感作実験用微量試験管としては、請求項2に記載したように、金属が、熱伝導度 $0.708\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm）以上のものが好ましい。

熱伝導度 $0.708\text{cal/s/cm}^2$ 以上の金属としては、金（熱伝導度： $0.708\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm））、鉛（熱伝導度： $0.838\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm））、銅（熱伝導度： $0.941\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm））、銀（熱伝導度： $0.998\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm））などを挙げることができる。

【0013】

ここで熱伝導度とは、物体内部の等温面の単位面積を通して単位時間に直角に流れる熱量とその方向における温度こう配との比をいう。

プラスチックの熱伝導度は、金属に比べ一般に低く、最低のポリプロピレン（熱伝導度： $1.3 \times 10^{-4}\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm））から、最高的高密度ポリエチレン（熱伝導度： $12.4 \times 10^{-4}\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm））までの範囲にあり、これは石英ガラスの $33.1 \times 10^{-4}\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm）、普通磁器の $30 \sim 41 \times 10^{-4}\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm）、銅の $0.941\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm）に比べると著しく小さい。

銅の熱伝導度は、銀（熱伝導度： $0.998$ ）に次いで熱伝導度が大きい素材であるために、金属材料の電気伝導度の基準になっている。

従って、実用性では銅が望ましいが、耐薬品性等、目的に応じて他の金属も本発明の温度感作実験用微量試験管の素材としては応用が可能である。この性質はまた微量溶液中の電気伝導度の測定を行う場合等にもチューブとサンプル中に針状の端子を用いることで測定も容易である。

【0014】

従来、小型実験用試験管（通称エッペンチューブ）に用いられてきたポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン材の熱伝導度は、 $8 \sim 12\text{cal/s/cm}^2$ （ /cm）であるとされるが、上記したように金属の熱伝導度は極めて高く、金属の熱伝導度が一般的に高いのは、材料中を自由に移動できる電子が熱の移動に大きく寄与するからとされている。

【0015】

本発明の温度感作実験用微量試験管は主に銅製である。これは銅の塑性加工性のよさ、展延性に富み、圧延・伸線・絞り・曲げなどの加工が極めて容易である点に注目したものであるが、いずれの金属も本発明では利用が可能である。銅はまた切削加工性もよく、仕上面や打ち抜きが美しくでき、加工に用いる工具の痛みも少ないとされる。銅は、めっき及びはんだ付けも容易であるため、実験目的やシーリング用の構造の加工も自由度が高い。

【0016】

このように、本発明の温度感作実験用微量試験管の従来技術との相違点は、プラスチックやガラスといった材質から、熱伝導性の高い金属に変更した点である。これに類した金属製微量試験管は存在しない。

その結果、本発明によれば、微量な牛乳試料を用いて、実際の牛乳生産工場で行われているものに近い加熱冷却温度の条件で牛乳の加熱殺菌試験が再現できるようになった。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 7 】

以下、各種材質の温度感作実験用微量試験管と、これを用いて加熱実験したときの問題点との比較から、本発明の特色を説明する。

## 【 0 0 1 8 】

## 1) プラスチックチューブによる加熱実験

従来からエッペンドルフチューブの名称に代表される蓋付きのポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン製の小型試験管が試料の加熱等の実験に広く用いられている。

しかしながら、これらはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法のように熱感作における温度と時間管理の精密さを求められる場合には、適切ではなかった。

即ち、この方法では、試料の温度を一定まで上昇、また冷却により低下させる際に著しく時間を要し、鋭敏な温度コントロールは困難である。市乳製造過程の加熱殺菌温度カーブは再現困難である。

## 【 0 0 1 9 】

## 2) PCRチューブによる加熱実験

これは、1986年に開発されたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法用に用いられている小型蓋付チューブで、一般用途の小型プラスチックチューブと類似した形状をするが、加熱による内圧に絶えうる、蓋の密閉度と容器の厚さを薄くすることで、熱伝導性を改善したものである。

しかしながら、材質はポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン製である。

このものは、通常のプラスチックチューブに比べ、試料の温度応答性は改善されているが、容器の壁が薄いことと、PCRの目的に限定された製品であるため、0.2~0.5mlの容量の製品のみである。また、市乳製造過程の加熱殺菌温度カーブは再現困難である。

## 【 0 0 2 0 】

## 3) ガラス製試験管による加熱実験

サンプルの加熱には大小のガラス製試験管も用いられてきたが、微量サンプルによる実験の温度管理は困難である。

このものは、プラスチックよりも素材の熱伝導性が高いため、試料の温度応答性は良いが微量な試料を用いた実験には不都合である。

## 【 0 0 2 1 】

加熱法としては、従来は上記した如き容器に試料を入れ、通常のヒーターやペルチェ素子等で温度コントロールするウォーターバスやアルミブロックを用いた加熱冷却装置より加熱による微生物の殺菌効果が調べられている。

このように従来法では上記の小型容器に試料を入れ、種々の方法により加熱し、微生物の殺菌効果が調べられてきたが、用いられる試験容器の熱伝導性が低いため、急速な加熱や急速な冷却が困難であった。

## 【 0 0 2 2 】

また、スケールダウンした連続殺菌装置として、牛乳生産プラントで用いられる連続加熱殺菌装置の小型のものが作られている。

このスケールダウンした連続殺菌装置は、流体の連続加熱殺菌試験には望ましいが、加熱条件の微調整や実験的に病原体を接種しての殺菌効果の評価を繰り返し行うには困難が伴う。また、装置が非常に高価である。

## 【 0 0 2 3 】

これに対して、本発明の温度感作実験用微量試験管には、このような問題点がなく、本発明によれば、微量な牛乳試料を用いて、実際の牛乳生産工場で用いられているものに近い加熱冷却温度の条件で牛乳の加熱殺菌試験が再現できるようになった。

## 【 0 0 2 4 】

また、本発明においては、シリコンコーティング、樹脂コーティング、ニッケルテフロンメッキなどにより、容器内部を薄膜撥水処理加工しておくことが好ましい。このように容器内部を薄膜撥水処理加工することにより、清浄性、試料の内壁への付着ロスや洗浄効

10

20

30

40

50

果を上げることが可能である。

【0025】

次に、本発明の温度感作実験用金属製微量試験管には、蓋、より具体的には、シリコン性のキャップや従来のエッペンチューブ形式の蓋、開閉部分を、熱融着乃至接着することができる。そして、さらにこれらの蓋に穴を開けることで、デジタル温度計用のプローブを固定することもできる。

本発明の温度感作実験用金属製微量試験管にプラスチックキャップを装着し、さらにデジタル温度計用のプローブを付けることで、温度加熱の条件検討や鋭敏な温度上昇と下降を試料に与えることが容易である。この温度加熱には、通常の加熱乃至冷却用のアルミブロックを備えた温度調節装置、乃至は、ウォーターバスや氷、ドライアイスなども利用可能である。

10

【0026】

本発明の温度感作実験用金属製微量試験管は、請求項3に記載したように、特にヨーネ菌に関する温度感作実験用として用いられ、試料としては牛乳が主に用いられるが、牛乳以外の試料についても加熱殺菌試験、酵素反応試験、その他様々な分子生物学的な実験に用いることができる。

【0027】

本発明の温度感作実験用金属製微量試験管は、以上の如きものであるが、以上の如き本発明の温度感作実験用金属製微量試験管を用いることを特徴とする、微量液体試料中の微生物の加熱殺菌実験方法を提供するのが、請求項4に係る本発明である。

20

【0028】

ここで液体試料としては、例えば牛乳、発酵乳、豆乳、飲料水、ソフトドリンク、酒類、スープ類などが挙げられる。

【0029】

請求項4に係る本発明は、加熱冷却実験における試料温度応答性に優れており、各種液体試料、特に実際の牛乳生産工場で用いられているものに近い加熱冷却温度の条件で牛乳の加熱殺菌試験を行うことができ、牛乳の加熱殺菌条件の検討が可能である。特にヨーネ病感染動物の初乳や牛乳中に排菌され仔牛に伝染するヨーネ菌の感染除去のための、牛乳の加熱殺菌条件の検討が可能である。

具体的には、例えば低温長時間法（63 30分間）、高温短時間法（72 15秒間）などの条件にて牛乳の加熱殺菌試験が行われる。

30

【実施例】

【0030】

以下、本発明の実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0031】

実施例1

図1に示す形状を有する温度感作実験用金属製微量試験管（銅製）を用いて、牛乳の72 加熱冷却試験（パッチ法）を行った。

具体的には、以下のようにして行った。

まず、図1に示す形状を有する温度感作実験用金属製微量試験管（銅製）に、試料（牛乳）を0.5ml入れた。

40

これを精密温度制御ヒートブロックに挿入し、デジタル温度レコーダー（TR-71U）を用いて、4 から72 へと温度を上昇させ、次いで72度から再度4 へと冷却する操作を行った。

このときの加熱と冷却操作の温度パターンを図2に示す。

図2によれば、72 への上昇に40秒間、冷却に40秒間要したことが分かる。

【0032】

比較例1

実施例1において、図2に示す形状を有する温度感作実験用金属製微量試験管（銅製）の代わりに、ポリエチレン製のチューブを用いたこと以外は、実施例1と同様にして行っ

50

た。

このときの加熱と冷却操作の温度パターンを図3に示す。

図3によれば、72℃への上昇に240秒間、冷却に260秒間要したことが分かる。

#### 【0033】

実際の牛乳工場における72℃、15秒間殺菌の場合、4℃から約65℃～70℃まで約40秒間かけて加熱され(熱交換部)、さらに72℃まで15秒で上昇する(殺菌部)。その後、72℃で15秒間保持され(ホールド部)、その後、4℃まで約40秒かけて冷却される(熱交換部)。図3に示すように、ポリエチレン製のチューブでは温度上昇に240秒も要すことから、通常殺菌効果のあると考えられる62℃以上の加熱時間が非常に長くなり、同様に、72℃近辺の温度帯も長時間となるため、実際の牛乳殺菌の時間と温度のシュミレーションはできない。しかし、図2や図4によれば、温度感作実験用金属製微量試験管を適切な加熱装置にて用いることによりこれが再現できることがわかる。

10

なお、図4は、実施例1の温度上昇と下降条件に温度72℃、保持時間15秒の条件を加えて、実際の工場における牛乳の72℃、15秒殺菌温度条件ができることを示した実験結果を示すグラフである。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0034】

本発明による温度感作実験用金属製微量試験管は、ヨーネ病感染動物の初乳や牛乳中に排菌され仔牛に伝染するヨーネ菌の感染除去のための、加熱殺菌条件の検討、市乳生産工程における、加熱殺菌条件の検討に有用である。また、液体試料の加熱及び冷却条件による成分の変化、例えば酵素活性、酵素反応の推移、タンパク質の変性など様々な化学反応の測定にも応用が可能である。特に、短時間の経過で温度変化が必要な実験においては有用である。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0035】

【図1】実施例1で用いた温度感作実験用金属製微量試験管(銅製)の形状を示す説明図である。

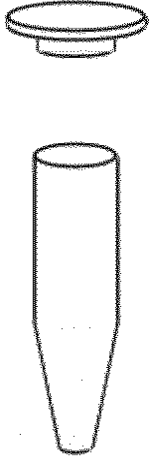
【図2】実施例1における加熱と冷却操作の温度パターンを示すグラフである。

【図3】比較例1における加熱と冷却操作の温度パターンを示すグラフである。

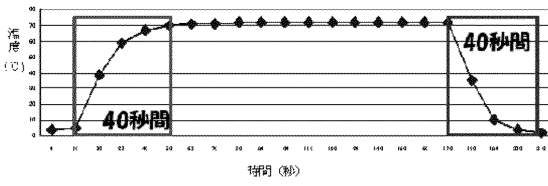
【図4】実施例1の温度上昇と下降条件に温度72℃、保持時間15秒の条件を加えて、実際の工場における牛乳の72℃、15秒殺菌温度条件ができることを示した実験結果を示すグラフである。

30

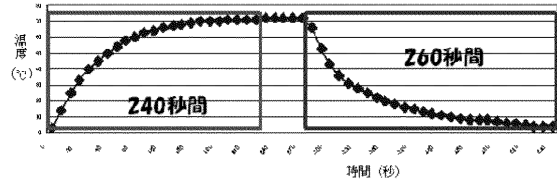
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

