

# Application News

## フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR)

# FTIRによる菌製品の製造工程における異種微生物のコンタミネーション検出

岩崎 祥子<sup>1</sup>、荒木 貴久<sup>1</sup>、伊東 祐敬<sup>2</sup>、関根 均<sup>2</sup>、石川 英史<sup>2</sup>、渡部 和人<sup>2</sup>、新井 隆之<sup>2</sup>  
1. 株式会社島津製作所、2. JSR株式会社

### ユーザーベネフィット

- ◆ 本手法により、菌製品の製造工程における異種微生物のコンタミネーション検出を行えます。
- ◆ 拡散反射測定装置とマイクロフォーカスプレートを用いることで、効率的に多検体の測定が可能です。
- ◆ 1検体あたりの測定時間は約30秒であり、短時間で分析作業を進めることができます。

### ■はじめに

菌製品の製造プロセスは、図1に示す5つのステップからなります。起眠（菌の活性化）、前培養（少量の培地で培養）、拡大培養（大規模に培養）、ハーベスト、そして、菌は加工され、最終製品として市場に出されます。製造過程での微生物汚染は、製品の品質や安全性に深刻な影響を及ぼすため、迅速かつ正確な検出が求められます。

フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) は、物質の分子構造を解析する手法であり、特に微生物の検出においてその有用性が注目されています。FTIRで得られる菌の赤外スペクトルには、脂質、多糖類、タンパク質、炭水化物などに由来する情報が含まれるため<sup>1)</sup>、同一条件（培地、温度、時間）で培養した菌を対象としたモニタリングを行えます。

本アプリケーションでは、IRXross（図2）と拡散反射測定装置DRS-8000特型<sup>\*1</sup>との組み合わせによる菌製品の製造工程における異種微生物のコンタミネーション検出をご紹介します。

\*1：特注品です。詳細は弊社営業および代理店にお問い合わせください。

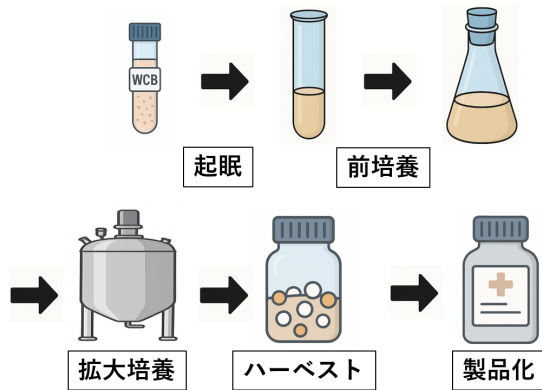


図1 菌製品の製造プロセス例



図2 IRXross™の外観

### ■菌体培養

実験のため、グラム陽性菌 *Staphylococcus cohnii* ATCC 29974株（以下、*S. cohnii*）と異種微生物として、他属他種の *Escherichia coli* ATCC 700926株（以下、*E. coli*）を用意しました。*S. cohnii* 培養液に、*E. coli* 培養液を初期菌量比が1%から $1.0 \times 10^{-6}$ %になるように加え、同一の好気条件（37℃、24時間）で共培養しました。

### ■試料前処理手順

試料前処理手順は次の通りです。1つの試料につき3スポット調製し、測定を行いました。

- (1) 培養液を遠沈管に全量移し、遠心して上清を除く。
- (2) 生理食塩水を加え、室温にて遠心し、洗浄を行う。
- (3) 遠心分離後上清を捨て、超純水を添加し激しく攪拌する。その後、70%エタノール濃度になるようエタノールを加える。
- (4) ジルコニアビーズを適量加え、破碎を行い懸濁液を調製する。
- (5) (4)の希釈液5μLをマイクロフォーカスプレート（64well）に滴下して乾燥させる。

### ■測定条件と解析手法

FTIRの測定条件を表1に示します。試料のクリーニングが容易で多検体測定も可能な拡散反射法（Diffusive Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy : DRS）を採用しました。なお、本実験では、大気中の水蒸気および二酸化炭素の影響を低減するため、窒素を使用してFTIRのシステム全体をパージしました。

赤外スペクトルの測定は、図3に示す自動DRS測定ソフトウェアを使用しました。赤外スペクトルの前処理として、二次微分（Savitzky-Golay）、波数範囲の選択（1300~800 cm<sup>-1</sup>）、そして、単位ベクトル正規化を実施しました。その後、データ解析として、主成分分析（PCA）およびクラスター解析（Average法で評価）を行いました。

表1 FTIRの測定条件

装置	: IRXross、拡散反射測定装置DRS-8000特型
分解	: 4 cm <sup>-1</sup>
積算回数	: 20回
アポダイズ関数	: SqrTriangle
検出器	: DLATGS
パージ	: 窒素

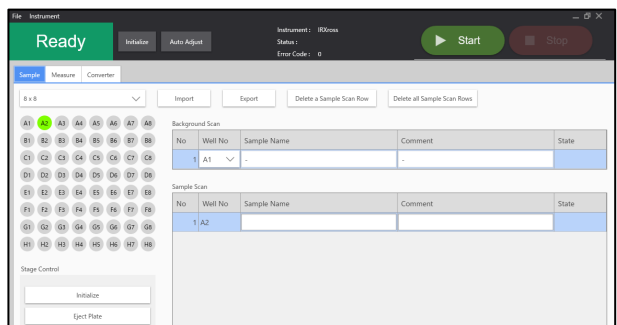


図3 自動DRS測定ソフトウェア画面

## ■ コンタミネーションの検出

各培養液の赤外スペクトルを図4に、波数1300~800 cm<sup>-1</sup>の領域での二次微分スペクトルを図5に示します。

図4より、赤外スペクトル形状は非常に類似していますが、図5の二次微分スペクトルは形状の差異が確認されました。また、二次微分スペクトルを用いたクラスター解析結果（デンドログラム）を図6(a)に示します。この結果から *E. coli* の濃度に応じて、*E. coli* 単独培養、*S. cohnii* に *E. coli* 添加（濃度1から10<sup>-1</sup>%）、*E. coli* 添加（濃度10<sup>-2</sup>%）、*E. coli* 添加（濃度10<sup>-3</sup>から10<sup>-4</sup>%）、そして、*S. cohnii* 単独および *E. coli* 添加（濃度10<sup>-5</sup>から10<sup>-6</sup>%）という5つのクラスターが形成されました。さらに主成分分析の結果、図6(b)においても、5つのグループが確認できました。以上より、*E. coli* 添加量が少ない濃度10<sup>-5</sup>から10<sup>-6</sup>%の培養液では、識別が難しく、*E. coli* 添加量が濃度10<sup>-4</sup>%より高い場合には、コンタミネーションの検出が可能であることがわかりました。

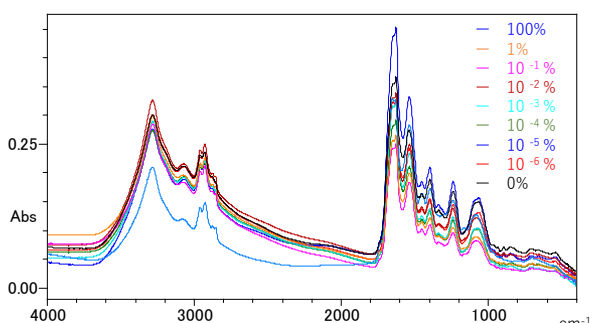


図4 赤外スペクトル

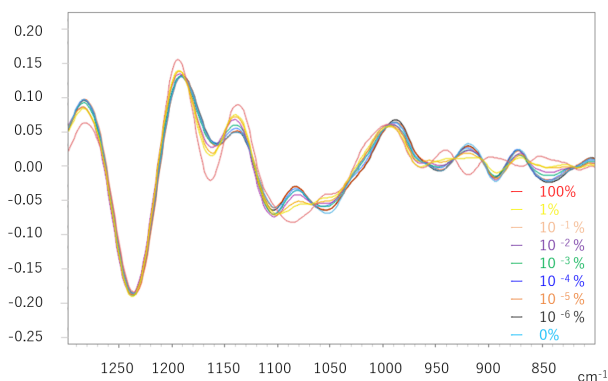
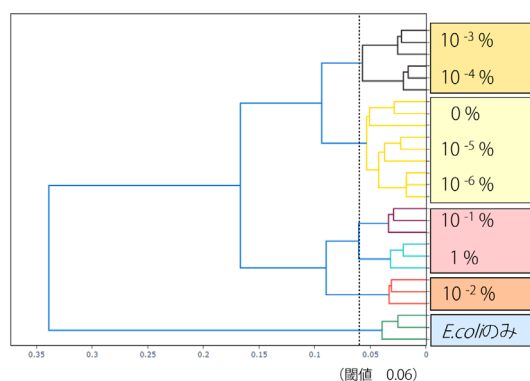
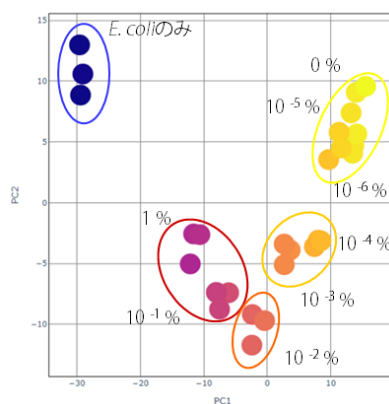


図5 二次微分スペクトル



(a) クラスター解析結果（デンドログラム）  
（クラスタリング法：Average法、距離尺度：ユークリッド距離）



(b) 主成分分析結果（スコアプロット）

図6 コンタミネーションの検出の結果

IRXrossは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
https://www.an.shimadzu.co.jp/

01-00973-JP

初版発行：2025年7月

## ■ 共培養後の菌組成比率

*S. cohnii* と *E. coli* の共培養後に得られた試料中の菌組成比率を求めるために、菌特異的なプライマーを single copy house keeping gene に作製し、リアルタイムPCRを実施しました。既知濃度の control DNA から得られた Ct 値を基に検量線を作成し、各菌種の菌組成比率を算出しました。図7に示す通り、培養初期の *E. coli* 添加菌量が 10<sup>-2</sup>% より高いと、生育しやすい *E. coli* は優先的に増殖し、共培養後は *S. cohnii* より比率が高くなりました。また、*E. coli* 添加菌量が 10<sup>-4</sup>% を超えるとクラスターがわかることから、*E. coli* の割合が 15~27% となると FTIR で異常を検知できることがわかりました。

共培養後の菌組成比率 (%)

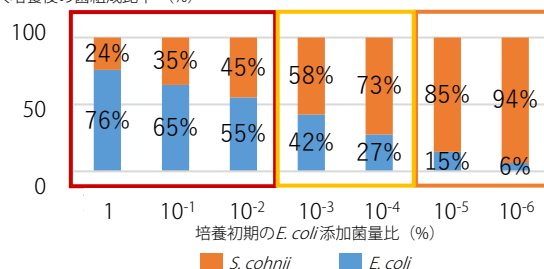


図7 リアルタイムPCRによる菌組成比率

## ■ まとめ

FTIRの拡散反射測定法により、*S. cohnii* 培養に対する他属他種株である *E. coli* のコンタミネーション検出のための分析を行いました。

本手法では、拡散反射測定装置 DRS-8000 特型を用いて窒素による FTIR システム全体のパーズを維持したまま、すべての試料を効率的に測定することができました。また、赤外スペクトルの比較では読み取れない *E. coli* のコンタミネーションを、微分スペクトルを用いたクラスター解析および主成分分析によって識別することができました。さらに、FTIR で識別できる共培養後の菌組成比率をリアルタイムPCRにより求めました。本技術は迅速にモニタリングが可能であり、製造現場での実用性が期待されます。

### <謝辞>

本アプリケーションは、JSR株式会社との共同研究による成果となります。多大なるご協力をいただき、心より感謝申し上げます。

### <参考文献>

1) Lasch, P, Naumann, D, "Infrared Spectroscopy in Microbiology," Encyclopedia of Analytical Chemistry, 3: 1-32, Mar. 2015.

### <関連アプリケーション>

1) IRXrossを用いた乳酸菌の種/株識別分析 [Application News No.01-00567](#)

＞ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ IRXross  
フーリエ変換赤外分光光度計

## 関連分野

＞ ライフサイエンス

＞ 微生物

＞ 医薬・バイオ医薬品

＞ バイオ医薬品

＞ 食品・飲料

＞ 食品汚染

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ