

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

1. 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る。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る。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る。

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る。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¹⁾、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る。

本研究では、IRXross（図2）と拡散反射測定装置DRS-8000特型^{*1}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報告する。

*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。

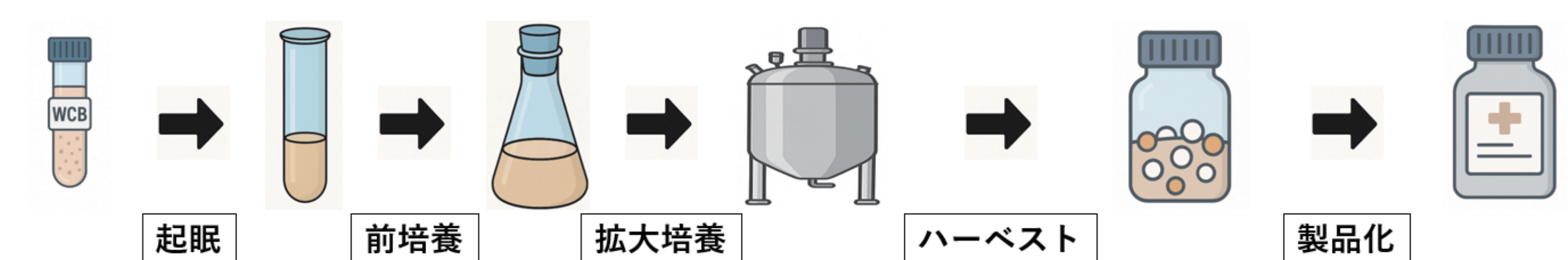


図1 菌製品の製造プロセス例

2. 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*）を用意した。*S. cohnii* 培養液に、*E. coli* 培養液を初期菌量比が1%から1.0×10⁻⁶%になるように加え、同一の好気条件（37℃、24時間）で共培養した。

3. 試料前処理手順

試料前処理手順は次の通りである。1つの試料につき3スポット調製し、測定を行った。

- (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5 μL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。

4. 測定条件と解析手法

FTIRの測定条件を表1に示す。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する。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⁻¹）、そして、単位ベクトル正規化を実施した。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）を行った。



図2 IRXross™の外観

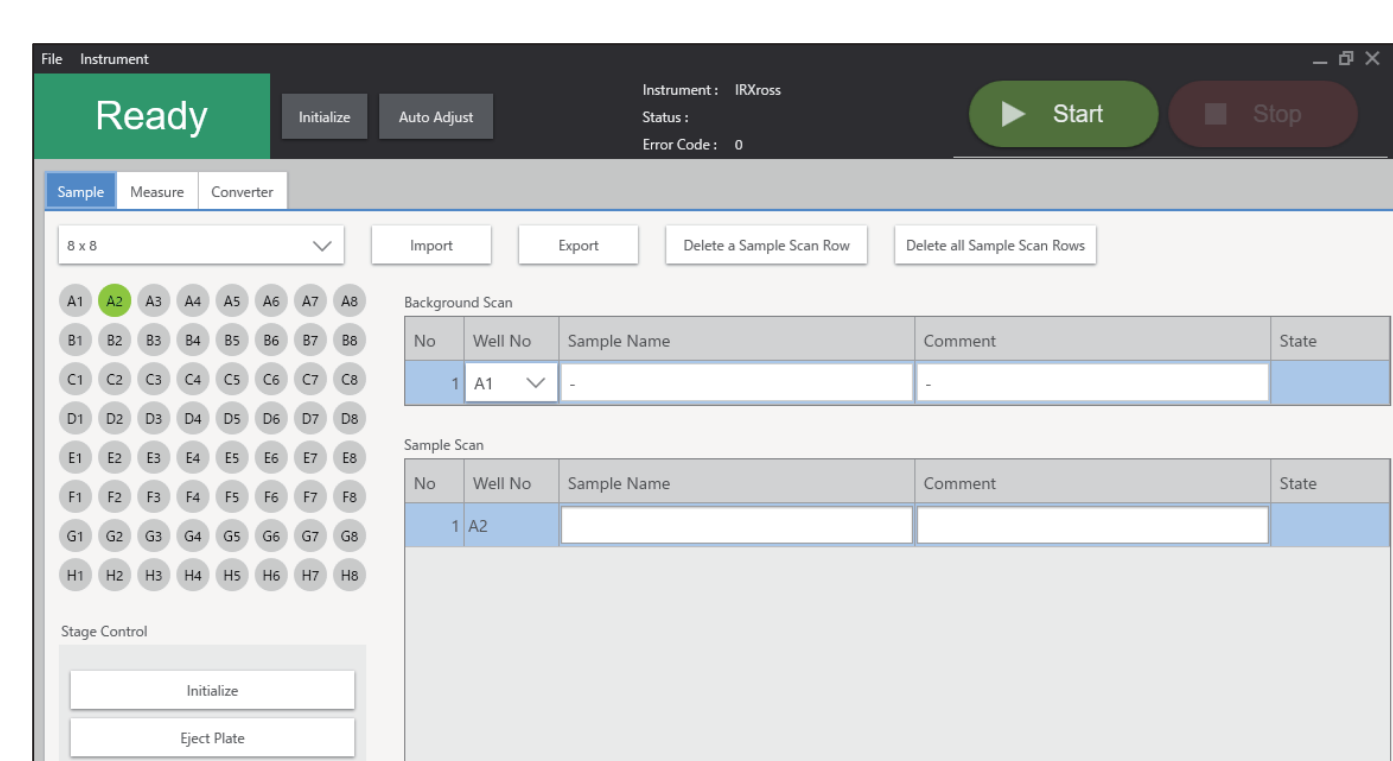


図3 自動DRS測定ソフトウェア画面

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 ⁻¹
積算回数	: 20回
アポダイズ関数	: SqrTriangle
検出器	: DLATGS
パージ	: 窒素

<謝辞>

本研究は、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

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。

5. 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⁻¹の領域での二次微分スペクトルを図5に示す。

図4より、赤外スペクトル形状は非常に類似しているが、図5の二次微分スペクトルは形状の差異が確認された。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10⁻¹ %）、*E. coli* 添加（濃度10⁻² %）、*E. coli* 添加（濃度10⁻³から10⁻⁴ %）、そして、*S. cohnii* 単独および *E. coli* 添加（濃度10⁻⁵から10⁻⁶ %）という5つのクラスターが形成された。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た。以上より、*E. coli* 添加量が少ない濃度10⁻⁵から10⁻⁶ %の培養液では、識別が難しく、*E. coli* 添加量が濃度10⁻⁴ %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った。

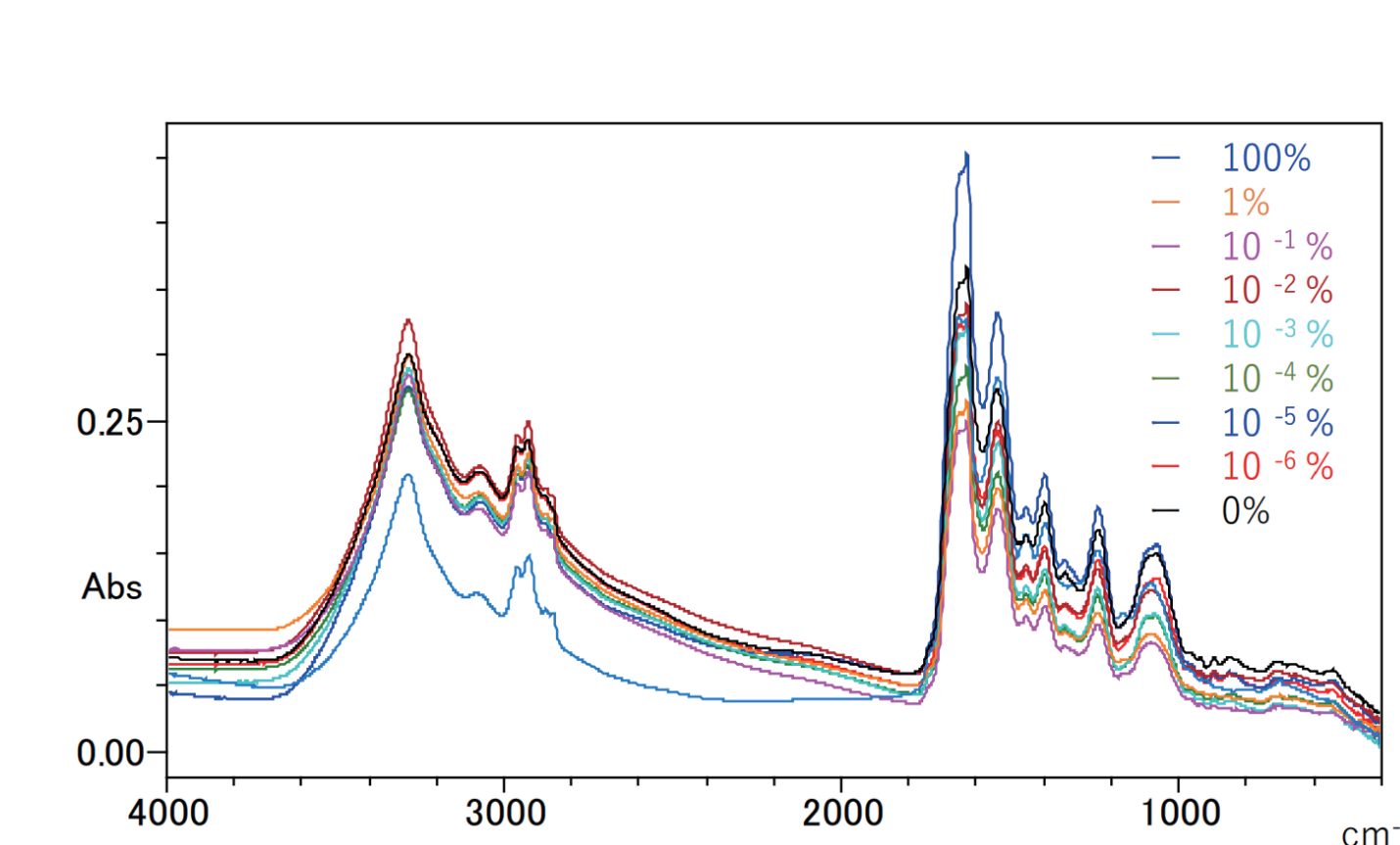


図4 赤外スペクトル

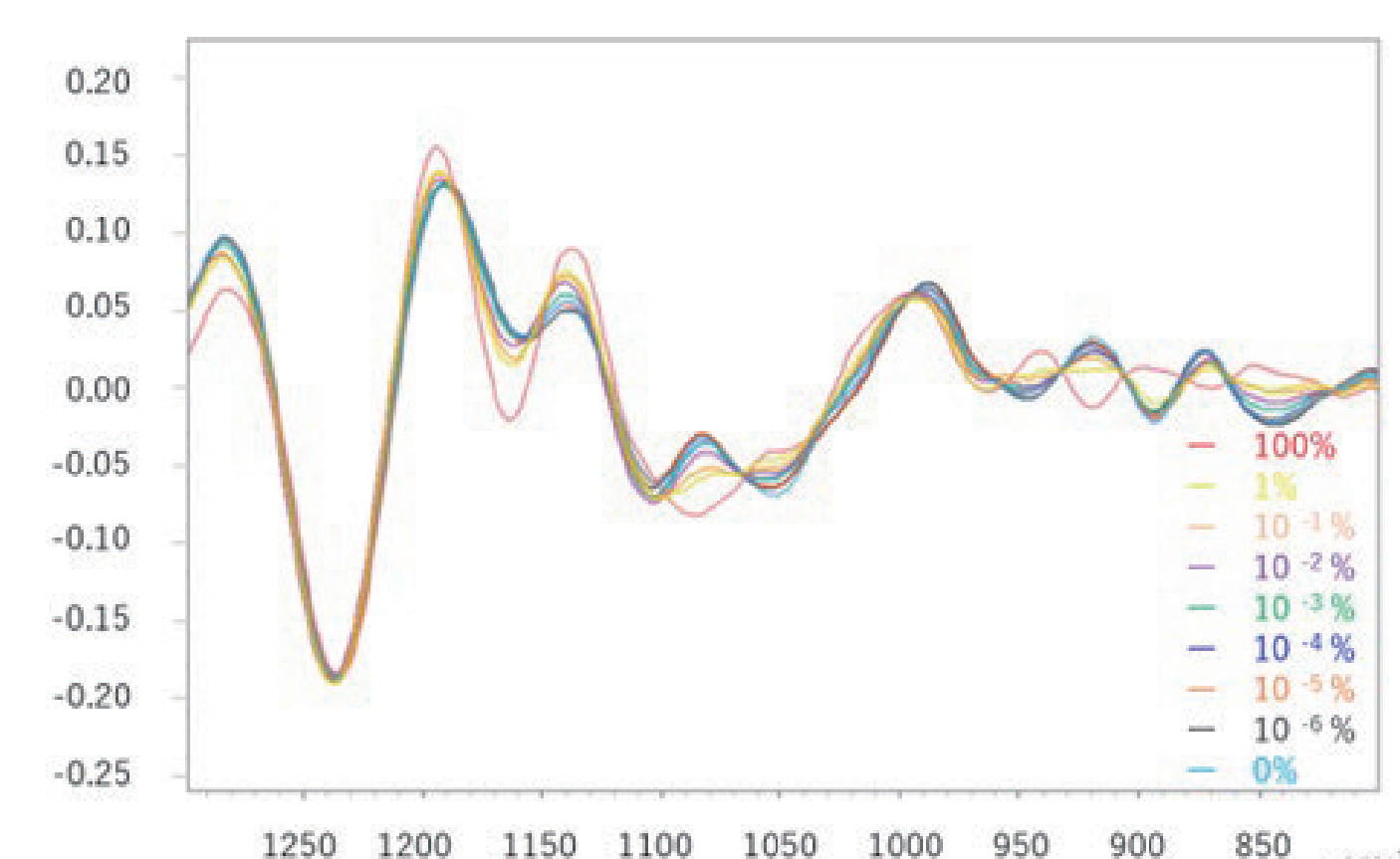


図5 二次微分スペクトル

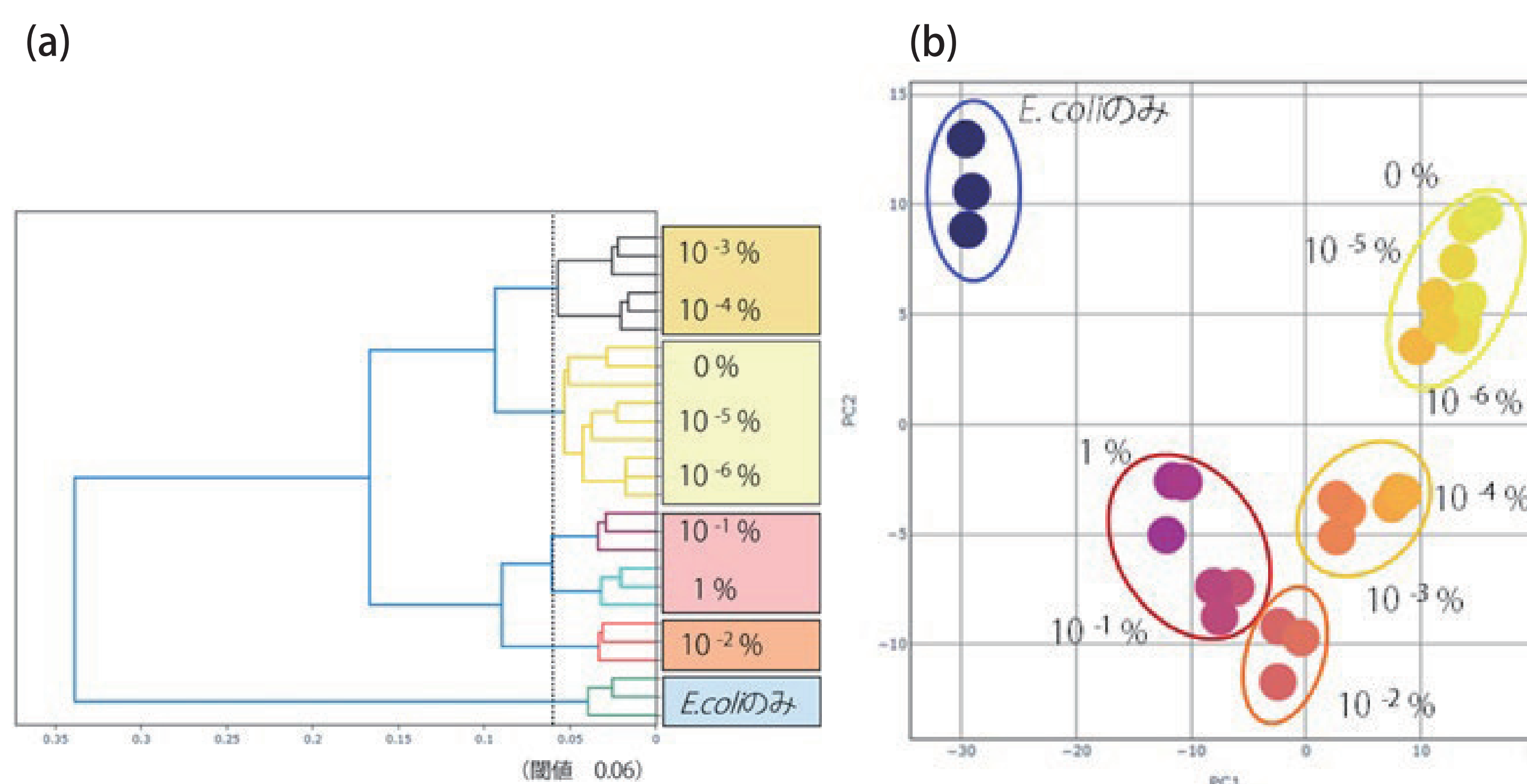


図6 コンタミネーションの検出の結果

(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）

6. 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た。図7に示す通り、培養初期の *E. coli* 添加菌量が10⁻² %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* より比率が高くなった。また、*E. coli* 添加菌量が10⁻⁴ %を超えるとクラスターがわかれることから、*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った。

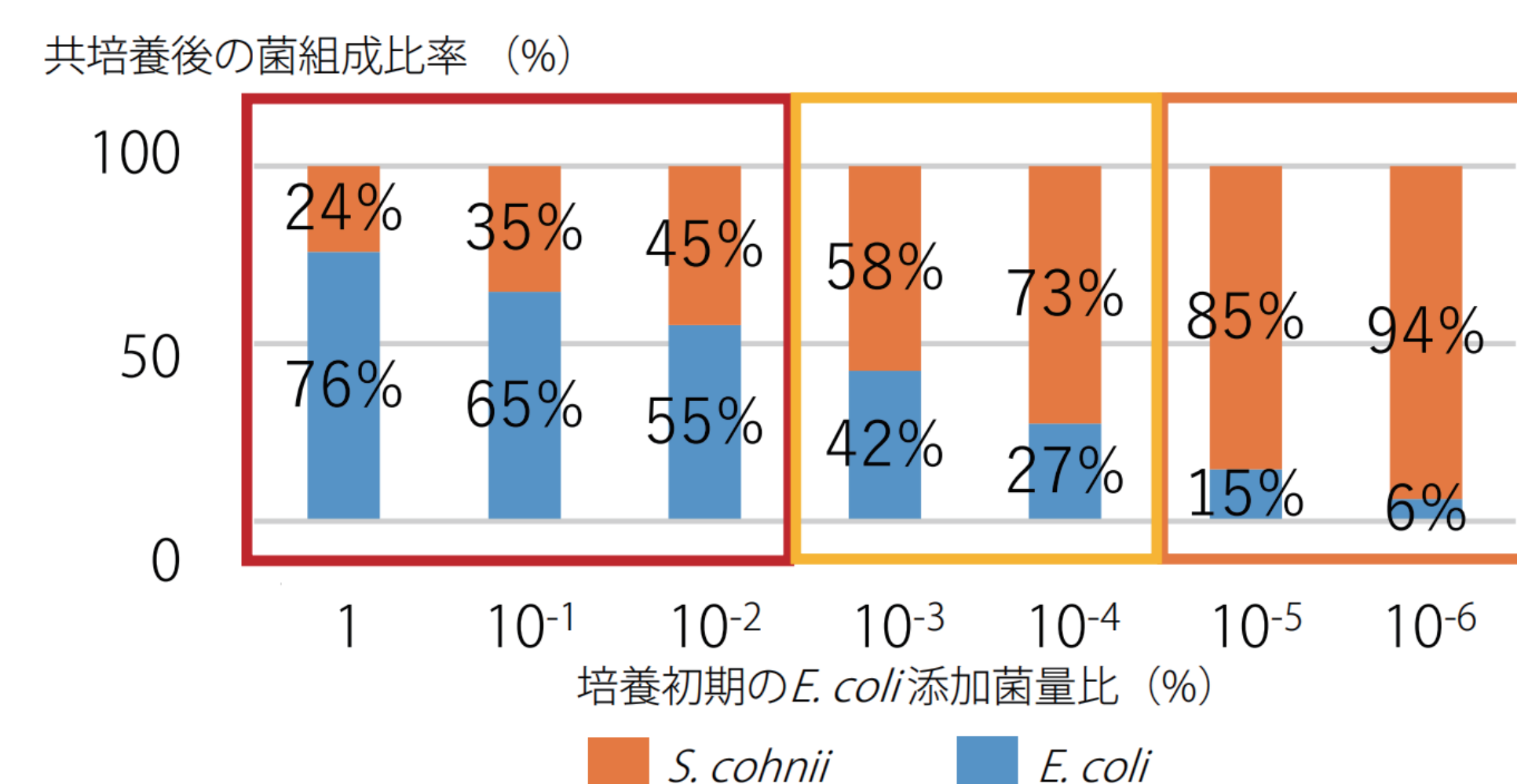


図7 リアルタイムPCRによる菌組成比率

7. 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った。

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ジを維持したまま、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る。