

清涼飲料水等の産業分野で活用できるシグナリングアレイ方式を適用した統合型微生物検査システムの構築

田口 朋之
横河電機株式会社

1. 要約

1cfu 相当の混入レベルにおいても微生物混入とその性状判別を同時に可能とする遺伝子検査システムを構築したので紹介したい。

2. 目的

微生物検査といえば、この一世紀にわたり培養法が主流となっている。製薬分野などにおいては各種技術を応用した迅速法の導入が推奨され始めている。その一つに PCR 法に代表される遺伝子検査法を応用した検査法がある。コロナウイルスのように検出対象が特定されている検査には PCR 法は有効であるが、微生物混入検査では検出対象は特定せずに広い範囲の微生物種を対象とすることが求められる。また、遺伝子検査では依然として専門の検査員、多段の前処理工程が必要などの課題がある。そこで進展したバイオ技術の産業分野での活用をサポートし、清涼飲料水の製造現場において実施可能な簡便な遺伝子検査システム構築を目的として開発を進めた。

3. 方法

開発システムは、増菌培養、核酸抽出、核酸増幅、検出工程から成る。清涼飲料水の製造現場などで問題となる微生物種を選択し、それらを 1cfu 相当に調製して各種飲料製品にスパイクした。増菌培養工程では、試料となる飲料製品を全量フィルタリングして微生物を回収し、そのフィルターを専用の培養器に入れて培養した。核酸抽出工程では、培養液を反応チューブに封入し、独自技術の核酸抽出法 (HTP 法) によりゲノム DNA を抽出した。核酸増幅工程においては、複数のプライマーセットにより構成されている PCR 反応試薬と前記の抽出液を混合し PCR 増幅反応を行った。最後の検出工程では、PCR 増幅産物を DNA アレイと専用のチャンバーを介してハイブリダイズ反応させた。この反応液が封入された状態のまま蛍光読取装置で撮像し、画像解析により微生物混入と判別を行った。

4. 結果

増菌培養工程では、専用培養器を用いることにより遠心分離装置などを用いずに培養液を次工程に供する手順とした。核酸抽出工程においては、HTP 法を適用し微生物種に依らずに同条件下において 1 分程度の極短時間で核酸抽出を可能とした。核酸増幅工程においては、反応成分を予め混合し常温保存可能な試薬を構築し、核酸抽出液を添加するだけで PCR 反応を実施可能とした。検出工程では独自のシグナリングアレイ技術を適用し、煩雑かつ厳密な管理が必要であった洗浄工程を省略可能とした。また、標的核酸への蛍光等のラベリング操作が不要となり検査コストも低減した。これらにより、スキルレスでロバスト性の高い検査システムとなっている。本システムにより、目視等で増殖が確認できる前の段階で、細菌は最短で 8 時間、カビでは最短で 24 時間で対象微生物種について判別可能であった。本システムの特徴は、微生物混入の有無だけでなく DNA アレイを用いたカテゴライズ判定が可能なることにある。例えば、芽胞形成能を有する微生物種など同時に 8 種のカテゴリ判別が可能であることを実証した。さらに、設定したカテゴリに属さない微生物種の検出エラーの防止を目的として、細菌およびカビ各々に共通の遺伝子を検出し想定外の微生物種も網羅的に検出する設計となっている。また、増菌培養工程により生菌だけを検出する、複数の微生物種が混在した場合においても単菌分離を必要とせず判別が可能であるなどの特徴を有している。有事の際に短時間で混入した微生物の有無と性状を同時に判別することができ、迅速に事後の対策を選定することが可能になることが期待される。