(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3788999号
(P3788999)
(45)発行日　平成18年6月21日(2006.6.21)　(24)登録日　平成18年4月7日(2006.4.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	

請求項の数 2　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願平6-73592
(22)出願日　平成6年4月12日(1994.4.12)
(65)公開番号　特開平7-274999
(43)公開日　平成7年10月24日(1995.10.24)
審査請求日　平成13年4月12日(2001.4.12)

(73)特許権者　000108454
ソマール株式会社
東京都中央区銀座４丁目１１番２号
(74)代理人　100071825
弁理士　阿形　明
(74)代理人　100095153
弁理士　水口　崇敏
(72)発明者　山路　宗利
東京都中央区銀座四丁目１１番２号　ソマール株式会社内

審査官　小暮　道明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抄紙斑点の原因となる微生物の検知方法及びそれに用いるプライマー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（Ａ）抄紙の斑点部分からＤＮＡを抽出する工程、（Ｂ）抽出されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼの存在下、ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣで示される塩基配列をもつプライマー及びＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧで示される塩基配列をもつプライマーを用いて化学的に増幅する工程、（Ｃ）増幅されたＤＮＡを単離精製後、標識付与処理を施して標識プローブを調製する工程、（Ｄ）別に白水中に存在する微生物を培養し、それから各微生物を単離し、これらからそれぞれのＤＮＡを抽出する工程及び（Ｅ）（Ｃ）工程で得た標識プローブと（Ｄ）工程で得た各微生物のＤＮＡとの間でそれぞれハイブリッドを形成させる処理を行わせて、斑点中に含まれる微生物ＤＮＡと同一の配列をもつ微生物を特定する工程から成ることを特徴とする抄紙斑点の原因となる微生物の検知方法。

【請求項２】

ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣ又はＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧで示される塩基配列をもつＤＮＡ増幅用プライマー。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は、製紙の際に、抄紙上に発生する斑点の原因となる微生物を検知し、その適切な防止対策を見出すための方法に関するものである。さらに詳しくいえば、本発明は、ＤＮＡを利用して製紙工程中に発生する抄紙上の斑点の原因となっている微生物の種類を迅

速に検知し、その微生物を除去するための適切な処理を行い得るようにすること及びそれに用いるプライマーを提供することに関するものである。

【０００２】

【従来の技術】

製紙工場における製品ロスの原因の１つに抄造工程で発生する抄紙上の斑点状スポットによる汚染がある。この斑点の発生原因としては、大別して原料中に含まれる填料のような無機成分の分散の不均一性と、パルプ繊維に付着している微生物の異常増殖による凝集体の形成が考えられる。

【０００３】

これまで、このような斑点状スポットの原因については、スポットにα‐アミノ基の検出試薬として知られているニンヒドリン溶液を滴下し、呈色した場合は微生物に起因するものと、呈色しない場合は無機物に起因するものと判断し、それぞれに適合した対策を講じていた。

【０００４】

しかしながら、このニンヒドリン反応を利用した判断方法では、例えば微生物に起因することが知られたとしても、その微生物がどのような種類のものかは不明なため、通常、パルプに付着すると思われる、あらゆる種類の有害微生物に対応する、多種の有効成分を組み合わせて調製した工業用殺菌剤を用いて効果があるか否かを確める多くの試験を行わなければならないが、このような方法では、効果のある工業用殺菌剤を求めるために、不必要な試料を用い、多くの不必要な試験を繰り返さなければならず、時間的にも経済的にも著しい不利を伴う。

したがって、抄紙上の斑点の原因となっている微生物を簡単かつ迅速に特定しうる方法の開発が、製紙工業分野における重要な課題の１つとなっていた。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情のもとで、抄紙上の斑点の原因となっている微生物を簡単かつ迅速に特定しうる全く新らしい方法を提供することを目的としてなされたものである。

【０００６】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような事情に鑑み、抄紙上に生じる斑点の原因となる微生物を簡単かつ迅速に検知し、それを除去する対策を講じやすくするために鋭意研究を重ねた結果、斑点部分から抽出したＤＮＡを化学的に増幅して白水中に存在する微生物のＤＮＡと対比同定することにより、斑点の原因となる微生物を簡単に特定しうること、上記のＤＮＡを化学的に増幅するためには、ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣ又はＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧで示される塩基配列をもつＤＮＡ増幅用プライマーが有効であることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【０００７】

すなわち、本発明は、（Ａ）抄紙の斑点部分からＤＮＡを抽出する工程、（Ｂ）抽出されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼの存在下、ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣで示される塩基配列をもつプライマー及びＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧで示される塩基配列をもつプライマーを用いて化学的に増幅する工程、（Ｃ）増幅されたＤＮＡを単離精製後、標識付与処理を施して標識プローブを調製する工程、（Ｄ）別に白水中に存在する微生物を培養し、それから各微生物を単離し、これらからそれぞれのＤＮＡを抽出する工程及び（Ｅ）（Ｃ）工程で得た標識プローブと（Ｄ）工程で得た各微生物のＤＮＡとの間でそれぞれハイブリッドを形成させる処理を行わせて、斑点中に含まれる微生物ＤＮＡと同一の配列をもつ微生物を特定する工程から成ることを特徴とする抄紙斑点の原因となる微生物の検知方法、及びＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣ又はＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧで示される塩基配列をもつＤＮＡ増幅用プライマーを提供するものである。

本発明方法を詳細に説明すると、この方法は、

（Ａ）抄紙の斑点部分からＤＮＡを抽出する工程、

（Ｂ）抽出されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼの存在下、ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣで示される塩基配列をもつプライマー及びＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧで示される塩基配列をもつプライマーを用いて化学的に増幅する工程、
（Ｃ）増幅されたＤＮＡを単離精製後、標識付与処理を施して標識プローブを調製する工程、
（Ｄ）別に白水中に存在する微生物を培養し、それから各微生物を単離し、これらからそれぞれのＤＮＡを抽出する工程及び
（Ｅ）（Ｃ）工程で得た標識プローブと（Ｄ）工程で得た各微生物のＤＮＡとの間でそれぞれハイブリッドを形成させる処理を行わせて、斑点中に含まれる微生物ＤＮＡと同一の配列をもつ微生物を特定する工程から成っている。

【０００８】
この（Ａ）工程における抄紙斑点部分からのＤＮＡ抽出は、例えば抽出溶媒として、ＴＥバッファーを用い、これを細断した抄紙斑点部分と混合し、フェノール‐クロロホルム混合溶媒（容量比１：１）により除タンパク及び精製し、次いで水層からエタノール沈殿させることによって行われる。

【０００９】
次に、（Ｂ）工程における抽出されたＤＮＡの化学的な増幅は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて行うのが有利である。

【００１０】
この化学増幅法は、所定の塩基配列を有するＤＮＡについて、その５′側と３′側に相補的な約１５～２０個の塩基単位をもつプライマー用合成ＤＮＡを調製して、この多量を前記のＤＮＡと混合し、このＤＮＡの１本鎖ＤＮＡへの変性、プライマーの結合、ＤＮＡポリメラーゼによる相補的ＤＮＡの合成という工程を多数回繰り返すことにより、少量のＤＮＡから多量の同一配列ＤＮＡを増幅合成する方法である。

【００１１】
本発明方法で用いられるＤＮＡ増幅用プライマーは、塩基配列ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣ及びＡＴＡＣＧＡＡＣＡＧ（ただし、Ａはアデノシン、Ｃはシチジン、Ｇはグアノシン、Ｔはチミジンの単位をそれぞれ意味する）を有する２種のプライマーを用いる。これらの１０個の塩基単位をもつプライマーは、文献未載の新規物質であって、種々の微生物ＤＮＡの増幅用として好適に用いることができる。

【００１２】
本発明方法においては、（Ａ）工程で得たＤＮＡ抽出液に、上記の２種を加え、ポリメラーゼの存在下、９０℃以上の温度で１～５分、３０～４０℃の温度で１～５分及び７０～８０℃の温度で１～５分という温度サイクルを少なくとも１０回以上好ましくは２０回以上繰り返すことによって増幅反応が行われる。

【００１３】
次に（Ｃ）工程は、必要に応じ（Ｂ）工程で得た増幅反応生成物をゲル電気泳動により確認したのち、例えばスピン・バインドＤＮＡ回収システムを用いて単離、精製し、最後にエタノールを注加して、水溶液中から沈殿させ回収することによって行われる。
そして、このようにして回収されたＤＮＡは、例えば^{32}Ｐ－ＡＴＰやジゴキシジエニン標識ｄＵＴＰ（ベーリンガー・マンハイム社のキットとして市販）を使用して標識を付与し、プローブとして用いる。

【００１４】
（Ｄ）工程においては、上記のプローブとハイブリダイゼーションさせるための、白水中の個々の微生物のＤＮＡを調製する。
すなわち、抄紙機内から採取した白水を、常法に従い、適当な栄養培地例えばワックスマン寒天培地に加え、培養したのち、各コロニーから前記の（Ａ）工程と同様にして抽出溶媒によりＤＮＡを抽出する。このようにして得られたＤＮＡの量が十分な場合には必ずしも必要はないが、このＤＮＡの量が少ない場合には、前記の（Ｂ）工程と同様にＤＮＡ増幅を行うことができる。

【００１５】
そして、（Ｅ）工程において、このようにして得た各単離菌からのＤＮＡをゲル電気泳動し、それぞれのパターンを得るが、微生物から抽出されたＤＮＡは抽出時の分解などにより分子量分布が広く高分子量から低分子量に至る多数のバンドを生じ、そのままでプローブのそれと対比することができないので、（Ｃ）工程で得た標識プローブとハイブリダイゼーションさせ、そのパターンの類似性及び結合性から、斑点の原因となる有害菌を判定する。
この場合のゲル電気泳動は、アガロースゲル電気泳動及びポリアクリルアミドゲル電気泳動のいずれでもよい。
【００１６】
他方、（Ｆ）工程では、（Ｄ）工程における白水中の各微生物の単離を行わずに白水を培養した栄養培地上の微生物コロニーを支持体上に転写し、（Ｃ）工程で得た標識プローブを加え、コロニーハイブリダイゼーションを行わせることにより、有害菌を判定する。
【００１７】
このコロニーハイブリダイゼーションによる判定は、上記の支持体に標識プローブを加えてハイブリッドを形成させ、標識に対して特異的に作用する試薬を反応させ、そのシグナルの有無を観察することによって行われる。
この際の支持体としては、ニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターなどが用いられ、またプローブの標識の例としては、^{32}Ｐ－ＡＴＰやジゴキシジエニン標識ｄＵＴＰがある。
【００１８】
【実施例】
次に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。
【００１９】
実施例
（Ａ）斑点を有する抄紙の斑点を含む部分を、一辺５ｍｍの正方形に切り取り、さらに細かく細断して試料とした。
この試料を滅菌蒸留水で３回洗浄後、抽出溶媒（Ｂｉｏ‐Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製、Ｉｎｓｔａ　Ｇｅｎｅ　ＴＭ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｍａｔｒｉｘ）２００μｌを添加し、３０分間５６℃に保ち、よくかきまぜたのち、１００℃において８分間加熱した。このように処理した溶液をかきまぜたのち、９５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、不溶物を沈殿させ、上清液を採取した。
【００２０】
（Ｂ）次に、このようにして得た上清液１．０μｌを表１に示す組成の反応液と混合して全量１００μｌとし、これを９４℃で１分、３７℃で１分及び７２℃で１分の加熱サイクルを２５回繰り返すことによって、ＤＮＡ増幅反応を行った。
【００２１】
【表１】

成　　分	濃　　度
塩化カリウム	５０ｍＭ
トリス‐塩酸（ｐＨ８．０）	１０ｍＭ
塩化マグネシウム	１．５ｍＭ
ゼラチン	０．００１％（Ｗ／Ｖ）
ｄＡＴＰ	０．２ｍＭ
ｄＣＴＰ	０．２ｍＭ
ｄＧＴＰ	０．２ｍＭ
ｄＴＴＰ	０．２ｍＭ
タックＤＮＡポリメラーゼ	２．５Ｕ／０．１ｍｌ
プライマー１	１．０μＭ
プライマー２	１．０μＭ

【００２２】
この場合のプライマー１としては、ＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣの塩基配列をもつ１０量体を、またプライマー２としては、ＡＴＡＣＧＡＡＧＡＧの塩基配列をもつ１０量体を用いた。

【００２３】
このようにして得た反応生成物を、０．８％アガロースゲルを用いてゲル電気泳動を行った結果を図１に示す。この図１には比較のために、同じ抄紙の斑点を有しない部分（正常部分）を一辺５ｍｍの正方形に切り取り、上記と同様に処理したものについてゲル電気泳動した結果も合わせて示した。

【００２４】
この結果、正常部分（ｂ、ｃ）からは、ＤＮＡバンドが全く観察されず、斑点部分（ｄ）からは、明らかにＤＮＡと思われるバンドが認められた。またポジティブコントロールとして斑点反応液に既知の糸状菌であるアスペルギルス・ニゲル（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）のＤＮＡを大過剰に添加したもの（ｅ）においてもＤＮＡ増幅が観察されており、反応自体は順調に進行していることが確認された。なお、ａは分子量標識用のλ‐ファージ・ＨｉｎｄＩＩＩ分解物のバンドである。

【００２５】
（Ｃ）図１におけるｄバンドの２本のうち分子量の高い方（ロ）をスピン・バインド・ＤＮＡ回収システム（ＦＭＣ　ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ製）を用いて単離・精製し、最終的にエタノールを加え沈殿させてＤＮＡを回収したのち、プローブとして調製した。

【００２６】
（Ｄ）別に、抄紙機内から採取した白水を滅菌蒸留水で希釈したもの約０．５ｍｌを、ワックスマン寒天培地に注加し、コンラージ棒を用いて均一にならしたのち、３５℃で３日間培養した。この結果、黄色粘塊状細菌、淡褐色粘塊状細菌及び淡褐色粘液状細菌の３種のバクテリアコロニーが得られた。

【００２７】
次に、各バクテリアコロニーからそれぞれ少量を取り出し、前記（Ａ）工程と同様にしてＤＮＡを抽出し、前記（Ｂ）工程と同様に処理してＤＮＡの増幅を行った。
このようにして増幅したＤＮＡをアガロースゲル電気泳動処理したところ３種のバクテ

リアはいずれも異なったパターンを示した（図２Ａ）。

【００２８】

次いで（Ｃ）で得たＤＮＡにジゴキシジエニン標識ｄＵＴＰ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ ｍａｎｎｈｅｉｍ製、ＤＩＧ ＤＮＡ Ｌａｂｅｌｉｎｇ ａｎｄ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ）を用いて標識を付すことにより標識プローブを調製した。

【００２９】

次に、上記で得たゲル内のＤＮＡ（図２Ａ）をそのままナイロン膜上にキャピラリー転写し、上記の標識プローブとサザンハイブリダイゼーションを行ったのち、抗ジゴキシジエニン抗体（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ ｍａｎｎｈｅｉｍ製、ＤＩＧ ＤＮＡ Ｌａｂｅｌｉｎｇ ａｎｄ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ）を用いて検出した。結果としてプローブは黄色粘塊状細菌ＤＮＡとハイブリダイズし、同一の配列を有することが分った（図２Ｂ）。このことにより斑点に含まれる微生物は黄色粘塊状細菌であることが確認された。

【００３０】

この図２においてａ′は分子量マーカー、ｂ′は正常部分を化学増幅したもの、ｃ′は紙上の斑点部分イから化学増幅したもの、ｄ′は黄色粘塊状細菌を化学増幅したもの、ｅ′は淡褐色粘塊状細菌を化学増幅したもの、ｆ′は淡褐色粘塊状細菌を化学増幅したもの、ｇ′は紙上の斑点部分から化学増幅したもの（ｃ′とは別部位）である。

【００３１】

参考例

実施例の抄紙における抄造工程で採取したスライム状付着物１ｇを滅菌蒸留水に懸濁し、ポリトロンホモジナイザーを用い、１００００ｒｐｍで５分間粉砕した。次に、この粉砕物を滅菌蒸留水で希釈し、その１ｍｌをワックスマン寒天培地に加え、混合して滅菌シャーレに注入したのち、３５℃で３日間培養した。この培養後、その生菌数を測定した結果を表２に示す。

【００３２】

【表２】

菌　　種	菌数（個）	構成割合（％）
黄色粘塊状細菌	3.6×10^{7}	９９．９８
淡褐色粘液状細菌	9.6×10^{2}	０．００３
淡褐色塊状細菌	1.5×10^{2}	０．０００４
乳白色粘液状細菌	4.5×10^{3}	０．１３

【００３３】

このようにして、付着物からは、４種のバクテリアが検出されたが、その中のほとんどが、黄色粘塊状細菌であることが分った。このことは、抄紙上に発生した斑点の原因が黄色粘塊状細菌であることを示す実施例の結果とよく一致している。

【００３４】

【発明の効果】

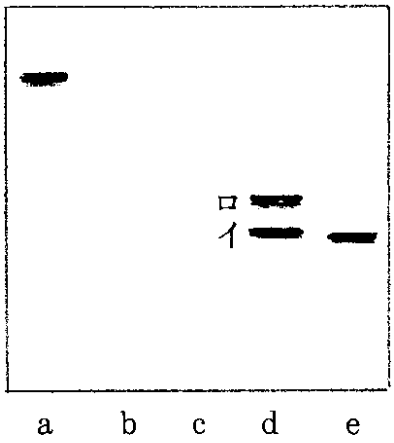
本発明により、従来間接的な方法でしか検出することができなかった抄紙上の斑点の発生原因を、ＤＮＡの化学的な増幅やハイブリダイゼーションを利用することにより直接に検知することができる上に、従来全く不可能であった斑点中に存在する微生物種の特定も可能とすることができた。

【図面の簡単な説明】

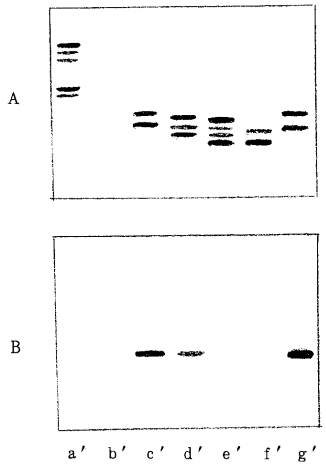
【図１】　実施例で得た増幅反応生成物のゲル電気泳動パターン

【図２】　白水中の微生物から抽出したＤＮＡのゲル電気泳動パターン（Ａ）及び標識プローブをサザンハイブリダイゼーションし、同一配列を検出したパターン（Ｂ）。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０５－２５２９９９（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－２７６９９８（ＪＰ，Ａ）
特開平０４－２２８０８０（ＪＰ，Ａ）
KUSAKA,T et al., I.Antibact.Antifung.Agents, vol.20(3), pp.125-130 (1992)
ARAKI,M et al., TAPPI J., vol.73(8), pp.155-158 (1990)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00
C12Q 1/04
C12Q 1/68
BIOSIS/WPI(DIALOG)
MEDLINE(STN)
CA(STN)