

図 4. SCD 培地および R2A 培地上におけるナチュラルミネラルウォーター中の細菌のマイクロコロニー形成。各培地上で 25°C、24 時間培養。

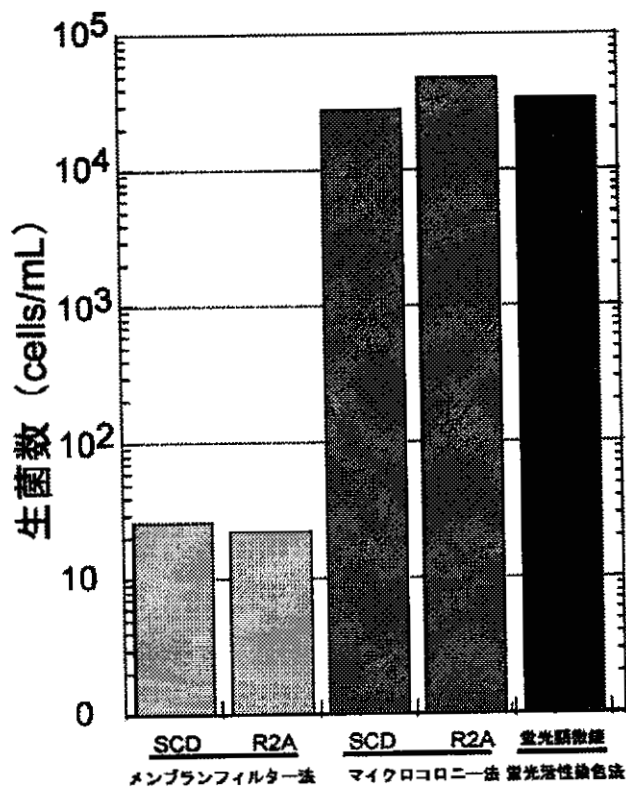


図 5. 培養法、マイクロコロニー法、蛍光活性染色法により求めたナチュラルミネラルウォーター中の生菌数。

蛍光活性染色（CFDA-DAPI 二重染色法）のプロトコール

必要な試薬・装置

蛍光顕微鏡等の細胞計数機器、
フィルターろ過装置、
孔径 0.20 μm のポリカーボネートフィルターまたはセラミックフィルター、
真空ポンプ、
スライドガラス、カバーガラス、封入剤
次亜塩素酸ナトリウム溶液、
滅菌ろ過水、
染色用バッファー（0.1M リン酸バッファー[pH 8.5]、5% NaCl、0.5mM EDTA）、
蛍光染色剤：DAPI（4,6-diamidino-2-phenylindole）、
CFDA（carboxyfluorescein diacetate）

操作

- 1) ろ過装置を滅菌ろ過水で洗浄後、孔径 0.20 μm のフィルターをセットし、
試料を注ぎ、あまり強く引きすぎないように真空ポンプで吸引ろ過する。
- 2) 染色用バッファー（0.1M リン酸バッファー[pH 8.5]、5% NaCl、0.5mM EDTA）を
適量注ぎ、CFDA を終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DAPI を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加する。
3分程度、染色する。
- 3) あまり強く引きすぎないように真空ポンプで吸引ろ過する。
- 4) 適量のろ過滅菌水でフィルター表面を洗浄する。
- 5) スライドガラスに封入剤を 1 滴落とし、ろ過面を上にしてフィルターを置く。
フィルターの上に封入剤を 1 滴落とし、気泡が入らないように注意しながら
カバーガラスを掛ける。
油浸で観察する場合は、さらにカバーガラスの上にエマルジョンオイルを 1 滴落とす。
- 6) 蛍光顕微鏡等の細胞計数機器で観察・計数する。
蛍光顕微鏡を用いた目視計数の場合は、以下の式により全菌数を算出する。

$$\frac{(\text{菌数測定結果 [平均値]}) \times (\text{ろ過面積})}{(\text{ろ過量}) \times (\text{鏡検面積})}$$

注意点

- 1) 1 視野あたりの全菌数が 100 個以上となるようにろ過量を調整する。
- 2) フィルター上の菌体分布のバラつきによる影響を防ぐために、20 視野以上を観察し、

計数する。

- 3) 1視野あたりの平均細胞数が5個以下の場合、または1視野あたりの細胞数が0個の視野が5視野以上ある場合は、検出限界以下とする。
- 4) 蛍光染色剤を扱ったピペット等については、次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理する。

マイクロコロニー法のプロトコール

必要な試薬・装置

蛍光顕微鏡等の細胞計数機器、
フィルターろ過装置、
孔径 0.20 μm のポリカーボネートフィルターまたはセラミックフィルター、
真空ポンプ、
スライドガラス、カバーガラス、封入剤
次亜塩素酸ナトリウム溶液、
滅菌ろ過水、
培地、
蛍光染色剤：DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)

操作

- 1) ろ過装置を滅菌ろ過水で洗浄後、孔径 0.20 μm のフィルターをセットし、試料を注ぎ、あまり強く引きすぎないように真空ポンプで吸引ろ過する。
- 2) フィルターを培地上に静置し、数時間から 1 日培養し、マイクロコロニーを形成させる。
- 3) 蛍光染色剤を浸み込ませたろ紙の上にフィルターを数分間静置し、マイクロコロニーを染色する。
- 4) スライドガラスに封入剤を 1 滴落とし、ろ過面を上にしてフィルターを置く。フィルターの上に封入剤を 1 滴落とし、気泡が入らないように注意しながらカバーガラスを掛ける。
- 5) 蛍光顕微鏡等の細胞計数機器で観察する。

蛍光顕微鏡を用いた目視計数の場合は、以下の式により全菌数を算出する。

$$\frac{(\text{菌数測定結果 [平均値]}) \times (\text{ろ過面積})}{(\text{ろ過量}) \times (\text{鏡検面積})}$$

注意点

- 1) 培養を開始する前に、対物レンズ 40 倍使用時の顕微鏡 1 視野あたりの細菌数が 200 個以上であることを確認する。
不足している場合は 1 視野あたりの細菌数が 200 個以上となるように再度ろ過をする。
- 2) フィルター上の菌体分布のバラつきによる影響を防ぐために、20 視野以上を観察し、計数する。

- 3) 1 視野あたりの平均細胞数が 2 個以下の場合、または 1 視野あたりの細胞数が 0 個の視野が 5 視野以上ある場合は、検出限界以下とする。
- 4) 蛍光染色剤を扱ったピペット等については、次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理する。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究

分担研究者 佐々木学 社団法人北里研究所 生物製剤研究所品質保証部門長
共同研究者 佐々木次雄 国立感染症研究所安全性研究部室長
長井正昭（社団法人北里研究所 生物製剤研究所品質管理部門長）
五反田亨（社団法人北里研究所 生物製剤研究所製造第2部門長）
服部信章（社団法人北里研究所 生物製剤研究所品質保証部門室長）
岩崎電気株式会社

研究要旨：本研究は、厚生労働科学研究（棚元班）「無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究」の一環として「防腐剤無添加剤の無菌性保証に関する研究」に係わる研究として実施したもので、パルス光滅菌によるインフルエンザ HA ワクチンの無菌性保証及び有効性（安定性）に関して、国立感染症研究所（佐々木次雄）、岩崎電気とともに考察した。

A. 研究目的

1. ワクチンの製造は、微生物を培養・精製工程等を経てワクチンの有効成分である抗原を不活化し、（弱毒化された微生物の場合は、微生物そのものがワクチンとなる。）ワクチンとなる。ただし、有効成分は蛋白を主とした抗原であり、熱に対しては弱く加熱滅菌法等が適用できなく、ろ過後に無菌充填を行う無菌操作法による製造方法となっている。
2. 本研究においては、パルス光滅菌法という新しい最終滅菌技術として注目されている滅菌法が、ワクチンの最終滅菌法として適用できるかどうかを検証することとした。ただし、短時間ではあるが多少熱が発生（20数度程度）するため、比較的熱に強く短期間に大量生産が求められる、インフルエンザHAワクチンを用い、パルス光滅菌法による、無菌性保

証（チャレンジテスト）及び有効性に関する長期安定性を検証することとした。

B. 研究方法

1. パルス光滅菌による無菌性保証の検証方法は、試験品はインフルエンザHAワクチンを用い行うこととし、試験を実施する際の前提条件として、容器はポリプロピレン容器、ガラス容器を選択し、容器の分光特性（容器の透過率）の確認、光量は500J、1000J、1500Jとし及び照射条件の確認を行うこととした。無菌性保証の検証（チャレンジテスト）は、パルス光滅菌法とういうことを考慮し2種の菌（*Bacillus Subtilis*, *Aspergillus niger*）を選択し実施する。ワクチンの安定性に関しては、長期安定性（0ヶ月、6ヶ月、12ヶ月）を検証することとした。

C. 研究経過

1. 平成15年10月に研究案を作成し、11月にパルス光滅菌装置を制作している岩崎電気株式会社と、パルス光の照射方法に関する検討を行った。12月に岩崎電気株式会社と2日目に検討会議を行った。平成16年1月にパルス光試験法に関する最終案を作成し、最終案に関して国立感染症研究所(佐々木次雄)、岩崎電気株式会社の了解が得られ、平成16年2月に北里研究所が試験品を作成し、岩崎電気株式会社(行田市)において照射した。照射結果は「防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究」(別添資料1)に作成した。

D. 考察

1. 各容器の分光透過率を測定した結果、殺菌に有効な波長は300nm以内であるが、ガラス容器は「防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究」(別添資料1)図3にあるように280nm以下は0%であり、殺菌が困難であると思われる。ポリプロピレン容器は、図4にあるように250nm付近にピークがある透過率を示し殺菌効果が期待される。
2. チャレンジ試験結果は、*B.subtilis*においては対照と比べポリプロピレン容器で1Log程度減少させる殺菌効力があつたが、ガラス容器では全く殺菌効力がなかつた。*A.niger*では、ポリプロピレン容器

(1500J)において1Log程度減少させる殺菌効力が見られた。ガラス容器では対照とは誤差範囲内であると思われ殺菌効力はなかつた。

殺菌の分光特性から樹脂(ポリプロピレン容器)においては、殺菌効力があると予想されたが大きな効果が得られなかつた。これは、インフルエンザHAワクチンには抗原である蛋白が多く含有(約200~220 $\mu\text{g}/\text{mL}$)し、光量が蛋白に吸収され、チャレンジ菌を殺菌することができなかつたものと考えられる。

E. 結論

分光透過率測定、チャレンジ試験、力価試験等の結果から、ガラス容器へのパルス光滅菌装置による照射は効果がないこと。また、ポリプロピレン容器においても、殺菌効果が低いこと、力価が低下すること等課題があることが判明した。

以上の結果から次年度においては、1)照射量及び照査方法等の検討、2)ワクチンが入っている場合の容器の透過率の確認、3)ワクチンは無菌操作法であり、 $10^6\text{CFU}/\text{mL}$ もの菌が混入することは考えられないことからチャレンジ菌の菌量及び菌種(5種類程度)等の研究を進めることとした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐々木学、坂口孝廣、藤田弘之:生物学的製剤等GMP基準の現状と対応(ワクチン製剤)、PHARM TECH JAPAN Vol.14(No.12)臨時増刊号 p101-111,1998
2. 佐々木学、佐々木次雄、渡辺秀夫、長谷川和光、鈴木崇宣、小幡朗、伊藤浩三山本浩、高

田光昭、鳥居宏明、我妻和夫：平成13年度、平成14年度厚生労働科学研究費（医薬安全総合研究事業）、医薬品におけるバイオセーフティ対策（インフルエンザワクチン製造を例に）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究

1 はじめに

本研究は、厚生労働科学研究（棚元班）「無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究」の一環として「ワクチン製造における無菌性保証」に係わる研究として実施するもので、パルスドキセノン滅菌装置（以下、パルス光滅菌装置という）によるインフルエンザ HA ワクチンの無菌性保証及び安定性の検証を行った。

2 試験計画

試験品の作成、照射後の力価試験及びチャレンジ試験は（社）北里研究所が実施し、容器の確認（測定）、照度等の測定、及び試験品への照射は岩崎電気において実施する。

2.1 試験に使用する製品名

- 1) 製品名
インフルエンザ HA ワクチン
- 2) インフルエンザ HA ワクチンに用いた株名
A/New Caledonia/20/99
A/Panama/2007/99
B/Shangdong/7/97

2.2 使用する容器

- ポリプロピレン容器（2 mL バイアル）
- ガラス容器（2 mL バイアル）

2.3 パルス光滅菌装置及び照射条件

2.3.1 パルス光滅菌装置

- 1) 使用装置 : パルスドキセノン滅菌装置（K 6 0 5）
- 2) 使用ランプ : P X L 2 0 0 0 L - E S 2
- 3) 照度計 : D E F - 2 0 0 0, 受光部 : S Z 0 3 0 3 - 0 4 4 - 3

2.3.2 照度位置での照度・光量の測定

試験品の照射位置でのピーク照度 (W/cm^2)・光量 (mJ/cm^2) に関しては、条件ごとに3回繰り返し測定（値は3回の平均値）する。

2.3.3 容器のUV透過率測定

ガラス、樹脂容器内の溶液はパルス光滅菌装置を用いて滅菌が可能であるか以下の要領で実施する。

- 1) 滅菌作用の分光特性と条件
パルスドキセノンランプの分光分布は（図1）となっており、殺菌作用の分光特性（図2）から、殺菌に有効な波長が200nm～300nm内にある。
- 2) 各容器をカットして分光透過率を測定し滅菌の可能性を検討する。
測定器：分光光時計 U-4100

図 1

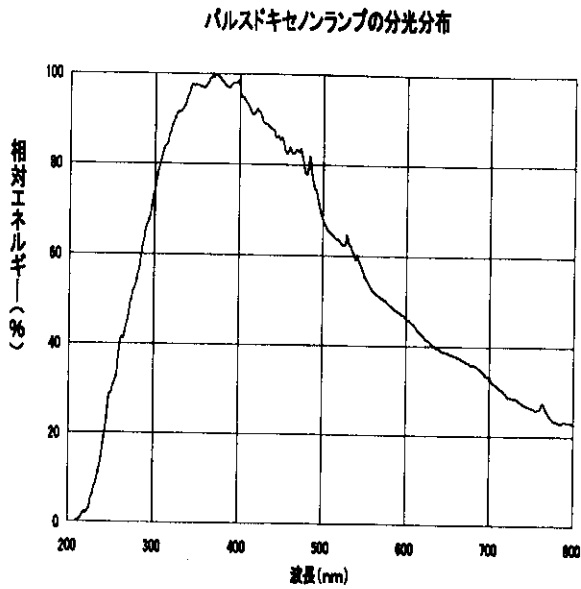
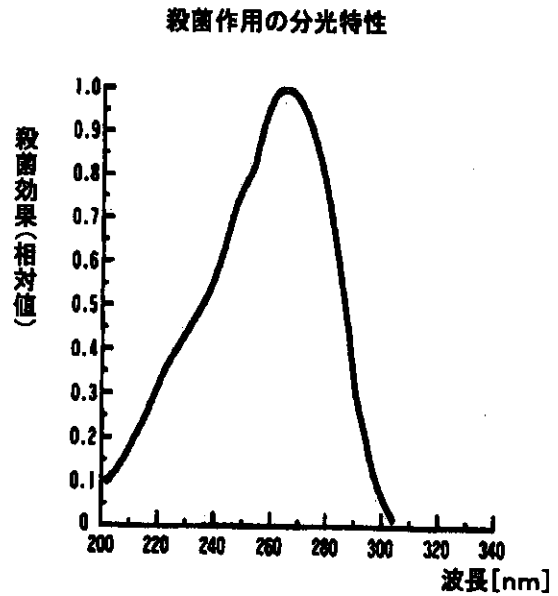


図 2

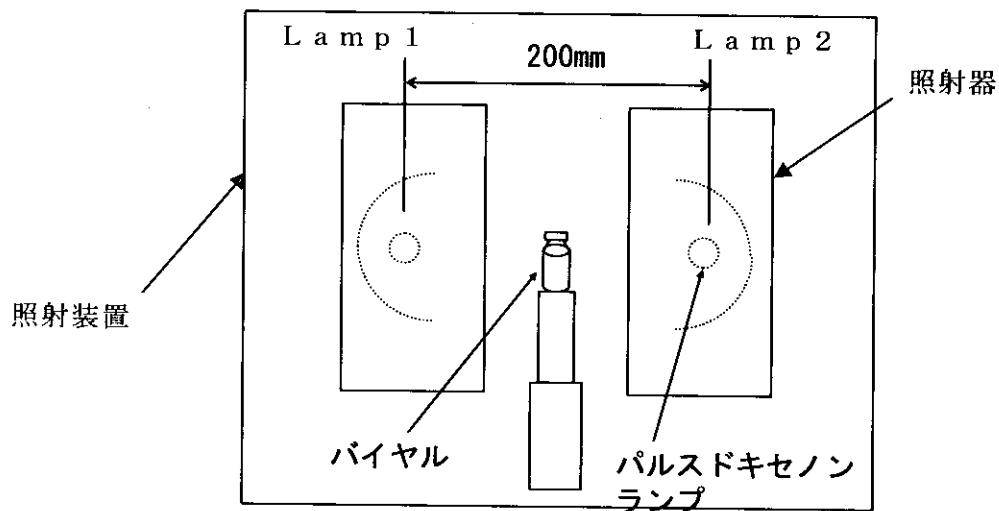


2.3.4 照射条件

- 1) 照射パルス数：1パルス
- 2) 充電エネルギー：500 J、1000 J、1500 Jの3段階
- 3) 照射方法

図 1 の様にパルスドキセノンランプ2本を200 mmの距離で対向させ、その中心にバイアルを設置し、所定の充電エネルギー及びパルス数にて照射を行う。

図 1



2.4 チャレンジ菌及び試験法

2.4.1 チャレンジ菌

パルス光による殺菌方法を考慮しチャレンジ菌2種を選択した。

- 1) *Bacillus subtilis* ATCC6633
- 2) *Aspergillus niger* ATCC16404

2.4.2 チャレンジ試験方法

1) 準備

パルス光照射前には、インフルエンザHAワクチンが入っている容器を照射条件ごとに9本用意する。

チャレンジ菌は 10^6 CFU/mLとなるよう調整し接種する。

2) 培養条件

Bacillus subtilis はSCD（ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト）寒天培地を使用し、 30°C で3日間培養し判定する。

Aspergillus niger はPDA（ポテトデキストロース寒天）培地を使用し、 25°C で7日間培養し判定する。

2.5 安定性（力価）の検証

2.5.1 安定性（力価）の検証

安定性の試験項目は、生物学的製剤基準インフルエンザHAワクチン力価試験法のSRD（第1法 判定値は $30\mu\text{gHA/mL}$ 以上）とする。

2.5.1 長期安定性試験

長期安定性試験は0ヶ月、6ヶ月、12ヶ月の3回とする。

3 試験結果

3.1 照度測定及び分光透過率結果

3.1.1 照度測定結果

照度測定結果（各条件の3回測定の平均値）

充電エネルギー (J)	L a m p 1		L a m p 2	
	ピーク照度 (W/cm^2)	光量 (mJ/cm^2)	ピーク照度 (W/cm^2)	光量 (mJ/cm^2)
500J	30.31	78.55	35.47	89.79
1000J	74.86	213.4	88.55	245.5
1500J	132.5	387.9	153.1	449.8

3.1.2 各容器における分光透過率測定結果

各容器の分光透過率を測定した結果、殺菌に有効な波長は 300nm 内であるが、ガラス容器は図3にあるように 280nm 以下は0%であり、殺菌が困難であると思われる。ポリプロピレン容器は、図4にあるように 250nm 付近にピークがある透過率を示し殺菌効果が期待される。

図 3

透過曲線 (バイアル $t=1.0\text{mm}$)

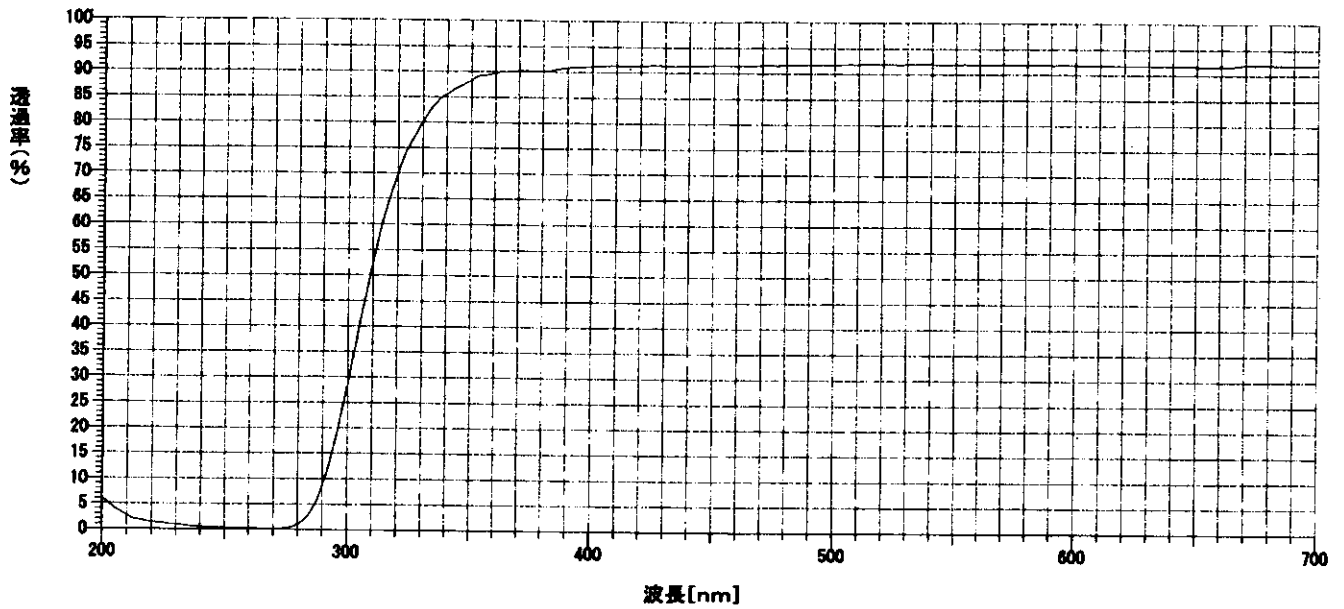
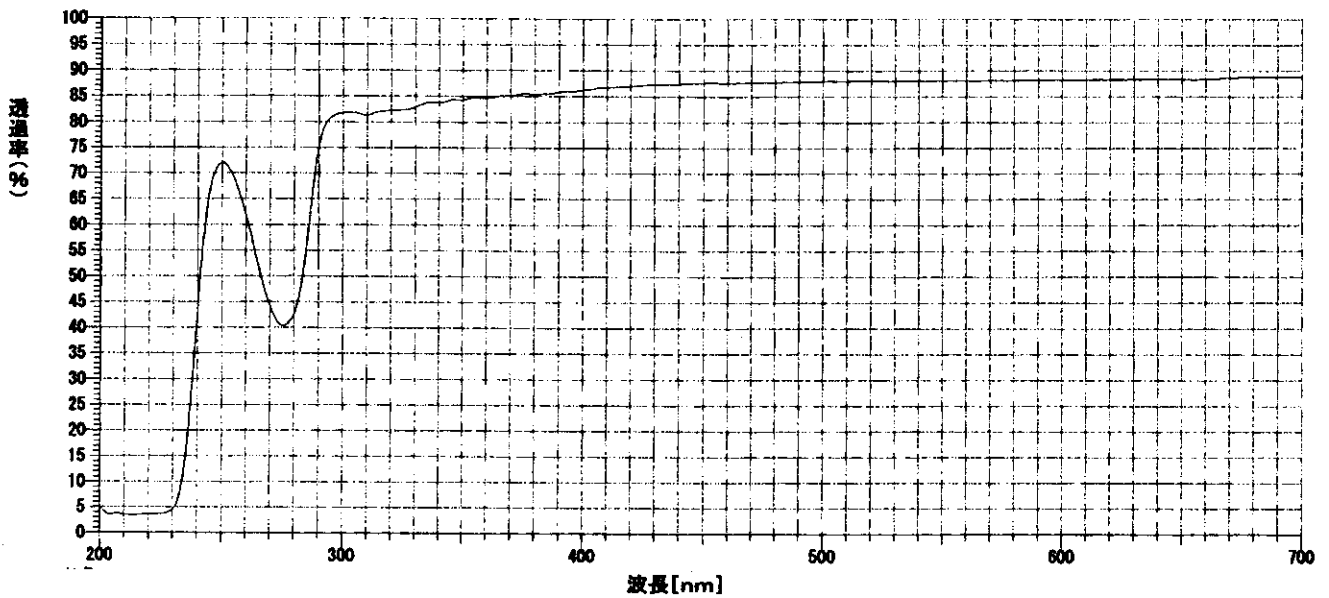


図 4

透過曲線 (PP $t=0.6\text{mm}$)



3.2 チャレンジ試験結果

チャレンジ試験結果は、*B.subtilis* (表-1) においては対照と比べポリプロピレン容器で 1 L o g 程度減少させる殺菌効力があつたが、ガラス容器では全く殺菌効力がなかつた。*A.niger* (表-2) では、ポリプロピレン容器 (1500 J) において 1 L o g 程度減少させる殺菌効力が見られた。ガラス容器では対照とは誤差範囲内であると思われ殺菌効力はなかつた。

殺菌の分光特性から樹脂 (ポリプロピレン容器) においては、殺菌効力があると予想されたが大きな効果が得られなかつた。これは、インフルエンザ HA ワクチンには抗原である蛋白が多く含有 (約 200 ~ 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$) し、光量が蛋白に吸収され、チャレンジ菌を殺菌することができなかつたものと考えられる。

表-1 (*B.subtilis*)

容器		ポリプロピレン容器	ガラス容器	対照 (未照射)
充電エネルギー		CFU/mL	CFU/mL	CFU/mL
500 J	1	4.7×10^4	7.9×10^5	8.0×10^5
	2	5.1×10^4	7.5×10^5	
	3	4.7×10^4	8.0×10^5	
1000 J	1	5.5×10^4	6.7×10^5	
	2	8.1×10^4	6.2×10^5	
	3	5.9×10^4	7.4×10^5	
1500 J	1	6.0×10^4	6.3×10^5	
	2	4.8×10^4	6.8×10^5	
	3	6.2×10^4	5.7×10^5	

表-2 (*A.niger*)

容器		ポリプロピレン容器	ガラス容器	対照 (未照射)
充電エネルギー		CFU/mL	CFU/mL	CFU/mL
500 J	1	1.0×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5
	2	1.4×10^5	9.7×10^4	
	3	1.2×10^5	1.0×10^5	
1000 J	1	7.4×10^4	5.3×10^4	
	2	6.5×10^4	9.1×10^4	
	3	5.6×10^4	4.2×10^4	
1500 J	1	2.0×10^4	5.8×10^4	
	2	3.3×10^4	6.8×10^4	
	3	1.2×10^4	1.1×10^5	

3.3 安定性 (力価) の検証

1) ポリプロピレン容器の力価試験結果 (0ヶ月)

ポリプロピレン容器の力価試験では、表-3にあるように New Caledonia は、照射量間での差はあまり見られなかった。しかし、Panama、Shangdong の各株とも照射量に応じて力価が低下している。

2) ガラス容器の力価試験結果 (0ヶ月)

ガラス容器の力価試験では、表-4にあるように各株とも照射量にかかわらず変化が見られなかった。

表-3

充電エネルギー	500 J	1000 J	1500 J	対照 (未照射)
ウイルスの株				
New Caledonia	37.3	35.0	34.3	36.6
Panama	32.7	32.4	24.8	37.4
Shangdong	30.9	28.7	16.6	32.1

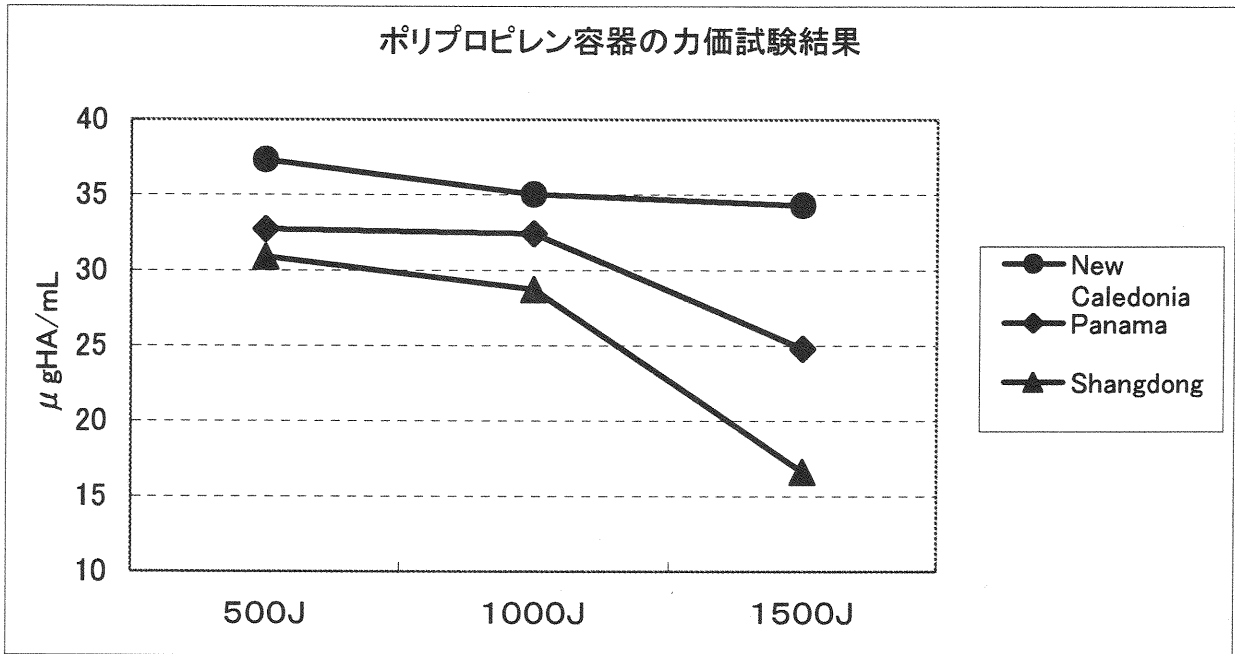
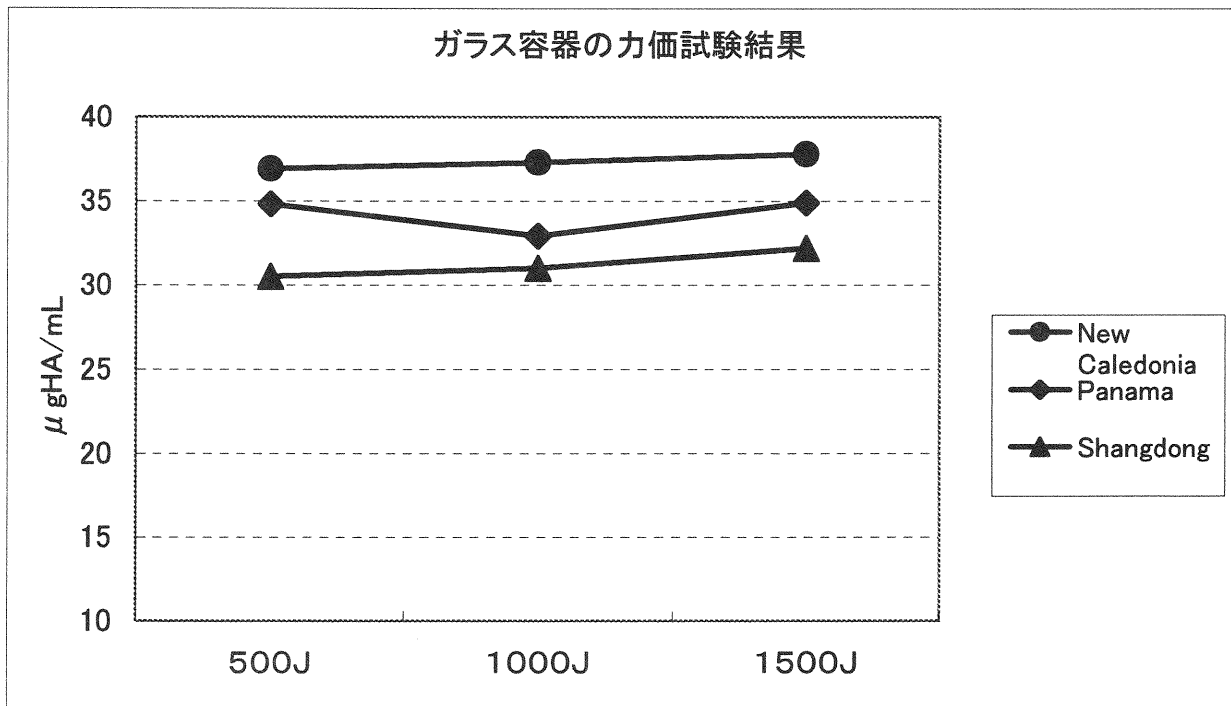


表-4

充電エネルギー ウイルスの株	500J	1000J	1500J	対照 (未照射)
New Caledonia	36.9	37.3	37.8	37.1
Panama	34.8	32.9	34.9	36.1
Shangdong	30.5	31.0	32.2	31.4



5 まとめ

5.1 研究結果

この結果から、ガラス容器へのパルス光滅菌装置による照射は効果がないこと。また、ポリプロピレン容器においても、殺菌効果が低いこと、力価が低下すること等課題があることが判明した。

表－5（各試験結果）

試験項目	ポリプロピレン容器	ガラス容器
分光透過率測定結果	透過率は高い	ほとんど透過しない
チャレンジ試験結果	殺菌効果が少しあった	全く殺菌効果がなかった
力価試験結果	照射量に応じて力価が低下した	全く影響がなかった

5.2 今後の研究方針（平成16年度）

次年度においては、以下の項目について実施することとする。

- 1) 照射量及び照査方法等を検討し実施する。
- 2) ワクチンが入っている場合の容器の透過率の確認を行う。
- 3) ワクチンは無菌操作法であり、 10^6 CFU/mLもの菌が混入することは考えられないことからチャレンジ菌の菌量及び菌種（5種類程度）等を検討し実施する。
- 4) 引き続き長期安定試験を実施する。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究

分担研究報告書

日局指定菌株の特性と維持管理に関する研究

中川 恭好 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部
生物遺伝資源部門（NBRC）

研究要旨：独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門（NBRC）では、日本薬局方に収載されている 25 種 26 株のうち 19 種 20 株を保存しており、依頼に応じて分譲を行っている。これらの菌株は 1985 年以前に財団法人発酵研究所に寄託されており、当時に表現性状だけによって同定され、これまで保存されてきたのが現状である。これら菌株に分類学的な問題が生じていないかを明らかにするため、small subunit ribosomal DNA (ssu rDNA) 塩基配列を決定し再同定を行った。今年度は 14 株について ssu rDNA 塩基配列を決定し、BLAST による相同性検索を行い、これら菌株に問題がないことを確認した。

A. 研究目的

1. NBRC は、日本薬局方に収載されている 25 種 26 株のうち 19 種 20 株を保存している（表 1）。これら菌株の性状を明らかにし、適正に維持するために、下記項目について順次検討を行う。
2. 保存菌株の学名が正しいものであるか、寄託されて以降に菌株の置き換わりがおきていないか等、すなわち分類学的な問題が生じていないかを明らかにするため、small subunit ribosomal DNA (ssu rDNA) 塩基配列を決定し、保存菌株を再同定する。
3. 保存菌株の性状を明らかにするため、市販同定キットによる性状調査、特定微生物試験による性状調査を行う。
4. 多くの一般ユーザーが利用できる保存法による、菌株の保存可能期間につ

いて検討を行う。

5. 抗生物質力価試験に基づく性状を明らかにする。

B. 研究方法

1. NBRC に保存されている 19 種 20 株と *Salmonella typhimurium* NBRC 13245 について、検討を行うこととした。薬局方は *Salmonella* に関して菌株を指定していないため、NBRC では NBRC 13245 を分譲しているためである。
2. ssu rDNA 塩基配列の決定は、以下の方法によって行った。培養菌体から DNeasy Tissue Kit (キアゲン) を用い DNA を調製し、プライマー 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) と 1510R (5'-GGCTACCTTGTTACGA) を用いて 16S rDNA を増幅した。増幅

産物は AMPure (バイオメディカルサイエンス) を用いて精製した。塩基配列決定はダイレクトシーケンシング法により行い、シーケンシング反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズジャパン) を使用した。配列決定には前述した 9F と 1510R に加え、785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTC) と 802R (5'-TACAGGGTATCTAATCC) の計 4 種のプライマーを用いた。反応後のサンプルは CleanSEQ (バイオメディカルサイエンス) を用いて精製した後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズジャパン) で解析した。各プライマーで得られた配列は自動シーケンスアセンブリソフトウェア AutoAssembler (アプライドバイオシステムズジャパン) を用いて連結し、BLAST による日本 DNA データバンク登録配列との相同性検索を行うことによって菌株の再同定を試みた。

C. 結果および考察

1. これまでに 14 株について ssu rDNA 塩基配列を決定し BLAST を用いた相同性検索を行った。その結果、NBRC 12708 を除く 13 株は登録されている学名と一致したため、保存菌株に問題がないことが確認できた (表 2)。
2. *Micrococcus luteus* NBRC 12708 は、16S rDNA 塩基配列から *Micrococcus*

属に含まれる菌株ではなく、*Kocuria rhizophila* であることが明らかとなった。同等株である ATCC 9341 は、すでに ATCC リストにおいて *Kocuria rhizophila* として掲載されている。NBRC においても、平成 16 年中に *Kocuria rhizophila* としてリスト掲載する予定である。ユーザーの混乱を避けるために、薬局方においても NBRC 12708 の菌名変更が必要であると考えられる。

3. *Bacillus stearothermophilus* は *Geobacillus* 属に分類することが提案されており NBRC のみならず他の微生物保存機関においても、現在は *Geobacillus stearothermophilus* として取り扱われている。薬局方においても、NBRC 12550 と NBRC 13737 の菌名を変更が必要であると考えられる。

D. 結論

表現型のみで同定され、これまで保存されてきた NBRC が保有する薬局方収載株のうち、14 株について ssu rDNA 塩基配列に基づく再同定を行い、その株が分類学的には問題なく維持されてきていることを確認できた。未決定の残り 7 株についても、ssu rDNA 塩基配列を決定し、菌株の再同定を行う。

今後、さらに保存菌株に対して市販同定キットを用いた性状調査、特定微生物試験、抗生物質力価試験を行い、各菌株の性状を明らかにする。また一般ユーザーが利用しやすい保存法による菌株の保存可能期間についても検討を行う。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1). Bernardet, J.-F. and Nakagawa, Y. An Introduction to the family *Flavobacteriaceae*. The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd edition, 2003
- (2). Yukphan, P., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. Identification of strains assigned to the genus *Gluconobacter* Asai 1935 based on the sequence and the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. J. Gen. Appl. Microbiol. inpress.
- (3). Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. Proceedings of the 15th Annual General Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB). inpress.
- (4). Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi S., and Abe, M. *Ochrobactrum* sp. as a novel nitrogen-fixing symbiont of *Acacia* tree. J. Gen. Appl. Microbiol. inpress.

2. 学会発表

- (1). Suzuki, K., Nakagawa, Y. and Sakane, T. NBRC (Nite Biological Resource Center) – Our role and activity. International Symposium of Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba Univ., October 2003, Tokyo, Japan.
- (2). 鈴木健一郎、中川恭好、坂根 健. 一般微生物の系統保存事業. 第26回日本分子生物学会年会特別企画「バイオリソース」、12月10～13日、神戸.
- (3). Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. The 15th Annual General Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB), February 2004, Chiang Mai, Thailand.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 薬局方収載菌株

菌名	株名	NBRC no.	微生物限度試験	無菌試験	抗生物質力価試験	保存効力試験法	滅菌法	マイコプラズマ試験
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC13276	13276	○	○	○, ATCC6538P	○		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC13275	13275	○	○		○		
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC3134	3134	○	○	○			
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, CIP 48.72, NBRC1594	1594	○	○		○		
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404, IMI 14900, CIP 1431.83, NBRC9455	9455	○	○		○		
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293	14293		○				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	12993			○			
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240	13867			○			
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	12708			○			
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	—			○			
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ	14237			○			
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 27166	—			○			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	3512			○			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 10490	12582			○			
<i>Comamonas terrigena</i>	ATCC 8461	13299			○			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	—			○			
<i>Candida albicans</i>	Yu 1200	—			○			
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC 10002	4626			○			
<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739, IFO3972	3972				○		
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953, ATCC 12980, NBRC 13737, JCM 9488	12550, 13737					○	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	13721					○	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	ATCC 19146, NBRC 14213, JCM 2438	14213					○	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	—						○
<i>Mycoplasma orale</i>	CH 19299	14477						○
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	DBS 1050	—						○
<i>Salmonella typhimurium</i>		13245						○

表2. ssu rDNA塩基配列に基づく同定結果

菌名	NBRC no.	BLASTサーチ結果
<i>Aspergillus niger</i>	9455	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	12550	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (AB021196)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	13737	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (AB021196)
<i>Bacillus subtilis</i>	3134	<i>Bacillus subtilis</i> (AB018486)
<i>Bacillus subtilis</i>	13721	<i>Bacillus subtilis</i> (AF287011)
<i>Brevundimonas diminuta</i>	14213	<i>Brevundimonas diminuta</i> (X87274)
<i>Candida albicans</i>	1594	
<i>Clostridium sporogenes</i>	14293	<i>Clostridium sporogenes</i> (X68189)
<i>Comamonas terrigena</i>	13299	
<i>Escherichia coli</i>	14237	
<i>Escherichia coli</i>	3972	<i>Escherichia coli</i> (Z83205)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3512	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AF228920)
<i>Micrococcus luteus</i>	12708	<i>Kocuria rhizophila</i> (AY030315)
<i>Micrococcus luteus</i>	13867	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ409096)
<i>Mycoplasma orale</i>	14477	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	4626	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13275	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AJ309500)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12582	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AJ309500)
<i>Salmonella typhimurium</i>	13245	
<i>Staphylococcus aureus</i>	13276	<i>Staphylococcus aureus</i> (L37597)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12993	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (AY030342)