

行うこととし、試験の繰り返しは3回とした。

C. 研究経過

1. 平成16年9月に研究案を作成し、パルス光滅菌装置を制作している岩崎電気株式会社と、10月、11月の2回検討し照射方法に関する検討を行った。平成16年11月に北里研究所が試験品を作成し、平成16年12月に岩崎電気株式会社（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. 熱を発生する波長を減少するために、フィルターを設置し行った結果、（別添資料1）図3と図2に比較してみると500nm以上では前回に比べ減少させることができた。ただし、完全に遮断することは困難であると思われる。
2. チャレンジ試験結果は、試験品がワクチンの場合には、1500Jにおいて 10^6 の滅菌効果があり、対象品の生理食塩水においては500Jでも 10^6 の滅菌効果が得られる。ただし、菌種でみれば *C.albicans* において、 10^3 は保証できるが 10^6 では生存している。これは、菌の

サイズ（大きいため）により影ができ、パルス光が対照されない菌が存在したためと考えられる。

3. 力価試験結果は、A型（H1N1、H3N2）とも照射量に応じて力価が減少している。また、B型は1500Jにおいて減少しているが、これは、B型は比較的耐熱性があるためと考えられる。

E. 結論

パルス光照射による滅菌は、チャレンジ試験結果からも期待できる結果となった。ただし、力価試験結果において、照射量に応じて力価試験結果は減少している。従って蛋白製剤に光パルス滅菌法を導入することは困難であると思われる。現段階ではあるが、パルス光滅菌装置による滅菌は、光が透過する材質の容器（プラスチック類等）が求められること。また、多少熱が発生するため、光が透過し、且つ耐熱性のある物であることが条件となる。平成17年度ではこうした条件を踏まえ、対象物を選択し、パルス光滅菌に関する研究を行うこととしたい。

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 目的

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の検証を行う。

2 試験計画

昨年度の結果に基づいて、次に掲げる計画に従い行うこととした。尚、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、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。

- (1) ワクチンは、平成16年度のインフルエンザHAワクチンを用い検証する。
- (2) 容器に関しては、平成15年度の研究結果から、ポリプロピレン容器は十分透過するが、ガラス容器は透過しないことから、ポリプロピレン容器を選択した。
- (3) 光量は500J、1000J、1500Jとし及び照射条件の確認を行うこととする。
- (4) ワクチンは、熱に弱いことから熱を発生する波長を、フィルターにより最小限にとどめるようパルス光滅菌装置を工夫し照射することとする。
- (5) 無菌性保証の検証（チャレンジテスト）は、パルス光滅菌法ということを検討し5種の菌を選択し行うこととした。また、滅菌効果を確認するために対象の試験品（生理食塩水）を用い行うこととする。
- (6) 有効性の確認として、インフルエンザHAワクチンの力価試験（SRD法）を行うこととし、試験の繰り返しは3回とした。

2.1 試験品（インフルエンザHAワクチン）に使用する株名

A/New Caledonia/20/99

A/Wyoming/3/2003

B/Shanghai/361/2002

2.2 使用する容器

ポリプロピレン容器（2mL バイアル）

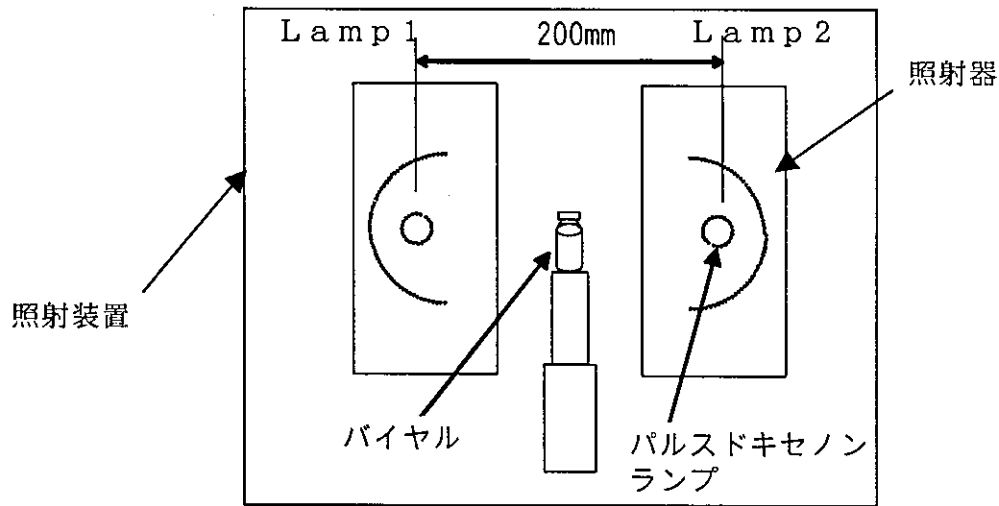
2.3 パルス光滅菌装置

- (1) 使用装置 : パルスドキセノン滅菌装置（K605）
- (2) 使用ランプ : PXL2000L-ES2
- (3) 照度計 : DEF-2000, 受光部 : SZ0303-044-3

2.4 照射条件

- (1) 照射パルス数 : 1パルス
- (2) 充電エネルギー : 500J、1000J、1500J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200mm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



2.5 照度位置での照度・光量の測定及び分光分布の測定

- (1) 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) パルスドキセノンランプの分光分布は(図2)となっており殺菌作用の分光特性(図3)から、殺菌に有効な波長が200nm~300nm内にある。ワクチンは熱により効力(力価)が低下するため、フィルターを用い熱の発生を最小限とする照射条件とする。

図 2

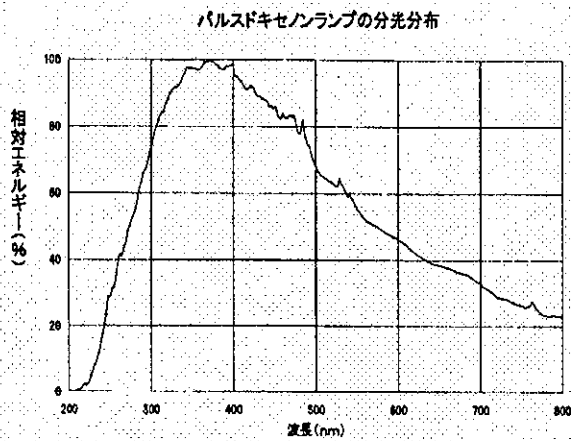
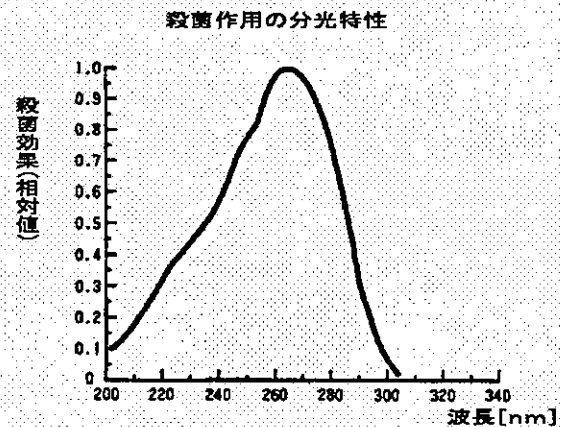


図 3



2.6 チャレンジ菌及び試験法

2.6.1 チャレンジ菌は、パルス光による殺菌方法を考慮し以下のチャレンジ菌5種を選択した。

- Bacillus subtilis* ATCC 6633
- Aspergillus niger* ATCC 16404
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- Candida albicans* ATCC 10231

2.6.2 チャレンジ試験方法

(1) チャレンジ試験方法は、チャレンジ試験計画表（表. 1）にあるように1チャレンジ菌ごとに 10^6 CFU/及び 10^3 CFU/の2群とする。照射量は500J、1000J、1500Jの3段階とする。また、滅菌確認の対象として生理食塩水（チャレンジ量、 10^6 CFU/）を用いる。

(2) 評価方法（混釈培養法）

- ①それぞれの滅菌条件、菌種、容器で10本ずつに分けられた中から無作為に3本取り出す
- ②3本それぞれについて、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 と階段希釈し、これを3枚ずつ行う
- ③それぞれの希釈液を100 μ Lと培地10mLを滅菌済浅型シャーレに分注する
- ④培地が固まった後、同種の培地を5mL分注する
- ⑤*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*はSCD寒天培地を使用し、*Aspergillus niger*、*Candida albicans*はPDA寒天培地を使用する
- ⑥SCD寒天培地は30 $^{\circ}$ Cで3日間、PDA寒天培地は25 $^{\circ}$ Cで7日間培養しコロニーを数え算定する
- ⑦生存率を算出する

表. 1 チャレンジ試験計画表

照射量	チャレンジ菌	インフルエンザウイルス		生食
		検体数 (10^6)	検体数 (10^3)	検体数 (10^6)
500J	<i>Bacillus subtilis</i>	3本	3本	1本
	<i>Aspergillus niger</i>	3本	3本	1本
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3本	3本	1本
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3本	3本	1本
	<i>Candida albicans</i>	3本	3本	1本
1000J	<i>Bacillus subtilis</i>	3本	3本	1本
	<i>Aspergillus niger</i>	3本	3本	1本
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3本	3本	1本
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3本	3本	1本
	<i>Candida albicans</i>	3本	3本	1本
1500J	<i>Bacillus subtilis</i>	3本	3本	1本
	<i>Aspergillus niger</i>	3本	3本	1本
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3本	3本	1本
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3本	3本	1本
	<i>Candida albicans</i>	3本	3本	1本
未照射	<i>Bacillus subtilis</i>	1本	1本	1本
	<i>Aspergillus niger</i>	1本	1本	1本
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1本	1本	1本
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1本	1本	1本
	<i>Candida albicans</i>	1本	1本	1本
合計		50本	50本	20本

2.7 カ価試験

インフルエンザHAワクチンカ価試験は、生物学的製剤基準「インフルエンザHAワクチンカ価試験法 3.2.1」の一元放射免疫拡散試験（SRD）に従い行う。判定基準は、1株当たり30 μ g/mL以上でなければならない。

表. 2 カ価試験計画表

照射量	株名	試験回数
500 J	A/New Caledonia/20/99	3回
	A/Wyoming/3/2003	3回
	B/Shanghai/361/2002	3回
1000 J	//	//
1500 J	//	//
未照射	//	//

3 試験結果

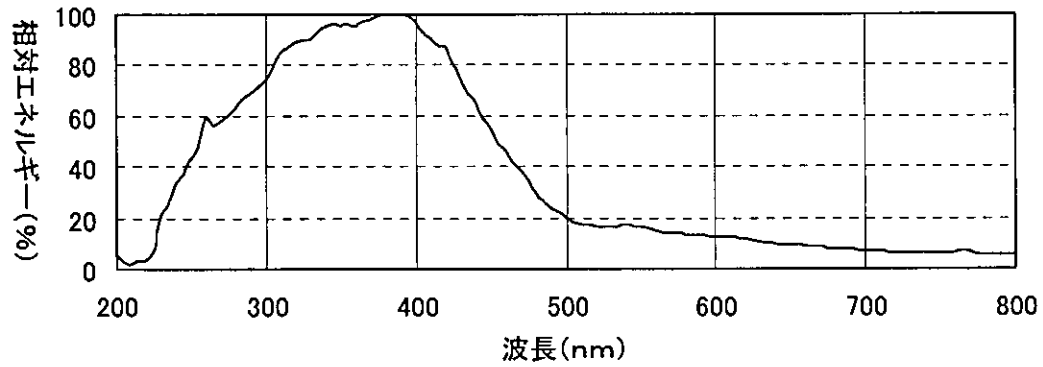
3.1 照度位置での照度・光量の測定

光量及びピーク照度は、表. 3にあるようにランプ1及び2とも有意な差はなく試験品に照射されたことを示す。分光分布は、(図4)に示すよう500nm以上の波長は、フィルターにより減少している。

表. 3 照射充電エネルギーに対する光量、ピーク照度(ダイクロミラー)

照射充電 エネルギー (J)	ランプ1		ランプ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)
500	252.2	95.19	221.7	86.31
	253.3	95.62	221.2	86.37
	253.3	95.70	221.1	86.45
平均	252.9	95.50	221.3	86.38
800	500.9	167.9	468.3	161.8
	502.9	168.1	468.6	162.0
	502.5	168.2	470.0	162.4
平均	502.1	168.1	469.0	162.1
1000	682.4	225.2	650.3	221.5
	682.8	225.5	650.5	221.6
	683.8	225.5	652.2	222.2
平均	683.0	225.4	651.0	221.8
1300	961.8	324.8	938.6	324.0
	962.3	325.3	936.4	324.0
	966.0	326.4	939.8	324.6
平均	963.4	325.5	938.3	324.2
1500	1165	401.2	1132	399.5
	1165	401.4	1135	399.8
	1163	401.2	1136	400.8
平均	1164	401.3	1134	400.0

図4 パルスドキセノンランプの分光分布



3.2 チャレンジ試験結果

チャレンジ試験結果は、チャレンジ試験結果表（表. 4）にあるように、対象である生理食塩水では、十分な滅菌効果が見られる。また、ワクチンにおいても照射条件が1500Jでは滅菌効果が得られた。

表. 4 チャレンジ試験結果表

【*B.subtilis*(2.0×10^6)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 2.0×10^6) × 100
充電 エネルギー 500J	①	2.4×10^5	12%
	②	1.7×10^4	6.9%
	③	5.8×10^4	2.9%
充電 エネルギー 1000J	①	8.8×10^4	4.4%
	②	1.8×10^4	0.9%
	③	0	0%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
未照射	①	2.0×10^6	

【*A.niger*(5.6×10^5)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 5.6×10^5) × 100
充電 エネルギー 500J	①	1.7×10^4	3.0%
	②	6.3×10^2	1.1%
	③	1.6×10^4	2.9%
充電 エネルギー 1000J	①	0.7×10^2	0.01%
	②	5.0×10^2	0.09%
	③	0.3×10^2	0.005%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
未照射	①	5.6×10^5	

【*C.albicans*(1.6×10^6)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 1.6×10^6) × 100
充電 エネルギー 500J	①	6.6×10^5	412%
	②	6.9×10^5	431%
	③	1.2×10^7	7500%
充電 エネルギー 1000J	①	5.9×10^5	36.9%
	②	2.5×10^5	156%
	③	1.5×10^5	94%
充電 エネルギー 1500J	①	1.4×10^5	8.8%
	②	2.3×10^5	14.3%
	③	1.3×10^5	8.1%
未照射	①	1.6×10^6	

【*B.subtilis*(6.5×10^4)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 6.5×10^4) × 100
充電 エネルギー 500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	1.7×10^2	2.6%
充電 エネルギー 1000J	①	1.9×10^3	2.9%
	②	5.3×10^2	0.8%
	③	0	0%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0.3×10^2	0.05%
	③	0	0%
未照射	①	6.5×10^4	

【*A.niger*(5.4×10^5)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 5.4×10^5) × 100
充電 エネルギー 500J	①	4.7×10^2	0.9%
	②	3.3×10^2	0.1%
	③	1.0×10^2	1.9%
充電 エネルギー 1000J	①	0.7×10^2	0.1%
	②	0	0%
	③	0	0%
充電 エネルギー 1500J	①	1.7×10^2	3.1%
	②	0.3×10^2	0.06%
	③	0.3×10^2	0.06%
未照射	①	5.4×10^5	

【*C.albicans*(2.2×10^4)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 2.2×10^4) × 100
充電 エネルギー 500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
充電 エネルギー 1000J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
未照射	①	2.2×10^4	

【生理食塩水*B.subtilis*(1×10^6)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 1×10^6) × 100
充電 エネルギー 500J	①	0.3×10^1	0.0003%
充電 エネルギー 1000J	①	0.3×10^1	0.0003%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
未照射	①	1.0×10^6	

【生理食塩水*A.niger*(1.4×10^5)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 1.4×10^5) × 100
充電 エネルギー 500J	①	9.3×10^2	0.7%
充電 エネルギー 1000J	①	0	0%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
未照射	①	1.4×10^5	

【生理食塩水*C.albicans*(6.5×10^5)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 6.5×10^5) × 100
充電 エネルギー 500J	①	8.5×10^4	1.3%
充電 エネルギー 1000J	①	1.2×10^5	1.8%
充電 エネルギー 1500J	①	8.5×10^2	0.01%
未照射	①	6.5×10^5	

【*S.aureus*(2.0×10^6)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 2.0×10^6) × 100
充電 エネルギー 500J	①	2.4×10^5	1.2%
	②	8.9×10^5	4.5%
	③	1.2×10^5	0.06%
充電 エネルギー 1000J	①	2.1×10^4	0.01%
	②	0.3×10^2	0.00001%
	③	2.5×10^3	0.001%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0.6×10^2	0.00003%
未照射	①	2.0×10^6	

【*P.aeruginosa*(3.3×10^5)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 3.3×10^5) × 100
充電 エネルギー 500J	①	6.9×10^2	0.2%
	②	3.9×10^2	0.1%
	③	1.9×10^2	0.6%
充電 エネルギー 1000J	①	1.7×10^2	0.0005%
	②	8.0×10^2	0.0002%
	③	0	0%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
未照射	①	3.3×10^5	

【*S.aureus*(7.2×10^7)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 7.2×10^7) × 100
充電 エネルギー 500J	①	2.0×10^2	0.03%
	②	8.4×10^1	11.7%
	③	5.2×10^2	0.7%
充電 エネルギー 1000J	①	7.7×10^2	0.1%
	②	1.3×10^3	0.2%
	③	1.6×10^2	0.2%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0	0%
未照射	①	7.2×10^7	

【*P.aeruginosa*(1.1×10^7)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 1.1×10^7) × 100
充電 エネルギー 500J	①	2.0×10^2	1.8%
	②	2.6×10^4	236%
	③	2.6×10^4	236%
充電 エネルギー 1000J	①	0	0%
	②	2.0×10^2	1.8%
	③	0.3×10^2	0.3%
充電 エネルギー 1500J	①	0	0%
	②	0	0%
	③	0.7×10^2	0.6%
未照射	①	1.1×10^7	

【生理食塩水*S.aureus*(2.4×10^7)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 2.4×10^7) × 100
充電 エネルギー 500J	①	1.5×10^4	0.06%
充電 エネルギー 1000J	①	1.2×10^5	0.5%
充電 エネルギー 1500J	①	1.0×10^2	0.0004%
未照射	①	2.4×10^7	

【生理食塩水*P.aeruginosa*(1.6×10^7)接種】

		照射後菌数 (cfu/mL)	生存率(照射後菌数 / 1.6×10^7) × 100
充電 エネルギー 500J	①	0	0%
充電 エネルギー 1000J	①	0.7×10^2	0.0004%
充電 エネルギー 1500J	①	0.3×10^2	0.0002%
未照射	①	1.6×10^7	

3.3 インフルエンザHAワクチン力価試験結果

力価試験結果は、力価試験結果（表. 5）にあるようにA型では照射量に応じて力価が低下し、B型は、1500Jから力価の低下が見られる。（B型のばらつきが大きいのはリングの形状が不鮮明なため測定による誤差が生じたと見られる。）

表. 5 力価試験結果

株		A/New Caledonia /20/99(H1N1)	A/Wyoming /3/2003(H3N2)	B/Shanghai /361/2002
未照射	1	31.9	36.4	32.0
	2	36.9	36.5	44.1
	3	33.3	37.6	33.2
500J	1	16.8	14.8	35.0
	2	16.7	13.3	41.7
	3	21.5	測定不能	42.4
1000J	1	10.9	測定不能	34.2
	2	測定不能	測定不能	34.4
	3	測定不能	測定不能	30.4
1500J	1	測定不能	測定不能	15.9
	2	測定不能	測定不能	測定不能
	3	測定不能	測定不能	測定不能

* 測定不能は、リングが不鮮明なため測定できなかった。（熱により蛋白が変性したと想定される。）

4. まとめ

光パルス照射による滅菌は、チャレンジ試験結果からも期待できる結果となった。ただし、力価試験結果において、照射量に応じて力価試験結果は減少している。従って蛋白製剤に光パルス滅菌法を導入することは困難であると思われる。現段階ではあるが、パルス光滅菌装置による滅菌は、光が透過する材質の容器（プラスチック類等）が求められること。また、多少熱が発生するため、光が透過し、且つ耐熱性のある物であることが条件となる。平成17年度ではこうした条件を踏まえ、対象物を選択し、パルス光滅菌に関する研究を行うこととしたい。

厚生科学研究費補助金（医薬品医療技術リスク評価事業）

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

分担研究者	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）
協力研究者	宮下美香	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）
	高橋麻衣	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、昨年度は 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 16 細菌株について市販同定キットを用いた性状調査を行った。

A. 研究目的

1. NBRC で保存・分譲を行っている日本薬局方収載菌株を適正に維持するために、下記項目について順次検討を行い菌株の性状を明らかにする。
2. 保存菌株の学名が正しいか、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。

B. 研究方法

1. 下記の 16 細菌株について性状試験を行った。

<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 3134
<i>Bacillus atropheus</i>	NBRC 13721
<i>Brevundimonas diminuta</i>	NBRC 14213
<i>Comamonas terrigena</i>	NBRC 13299
<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972
<i>Escherichia coli</i>	NBRC 14237
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NBRC 12550
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NBRC 13737

Klebsiella pneumoniae NBRC 3512
Micrococcus luteus (*Kocuria rhizophila*)
 NBRC 12708
Micrococcus luteus NBRC 13867
Pseudomonas aeruginosa NBRC 12582
Pseudomonas aeruginosa NBRC 13275
Salmonella enterica NBRC 100797
Staphylococcus aureus NBRC 13276
Staphylococcus epidermidis
 NBRC 12993
 2. *Bacillus subtilis* NBRC 3134 ,
Bacillus atrophaeus NBRC 13721 ,
Geobacillus stearothermophilus NBRC
 12550 及び NBRC 13737 については API
 50 CH 及び API 50 CHB (bioMérieux sa)
 を用いて各種炭素源からの酸の生成を試験
 した。
 3. *Brevundimonas diminuta* NBRC
 14213 , *Comamonas terrigena* NBRC
 13299 , *Pseudomonas aeruginosa* NBRC
 12582 及び NBRC 13275 については腸内細
 菌以外のグラム陰性桿菌同定キット API
 20 NE (bioMérieux sa) を用いて試験した。
 4. *Escherichia coli* NBRC 3972 及び
 NBRC 14237 , *Klebsiella pneumoniae*
 NBRC 3512 , *Salmonella enterica* NBRC
 100797 については腸内細菌及び他のグラ
 ム陰性桿菌同定キット ID 32 E
 (bioMérieux sa) を用いた自動細菌検査装
 置 ATB Expression (bioMérieux sa) によ
 る試験を行った。
 5. *Micrococcus luteus* (*Kocuria*
rhizophila) NBRC 12708 , *Micrococcus*
luteus NBRC 13867 , *Staphylococcus*
aureus NBRC 13276 , *Staphylococcus*
epidermidis NBRC 12993 についてはブド

ウ球菌・マイクロコッカス同定キット ID 32
 STAPH (bioMérieux sa) を用いた自動細
 菌検査装置 ATB Expression (bioMérieux
 sa) による試験を行った。

C. 結果および考察

1. *Salmonella* については、日本薬局方に
 おいて菌株の指定がないため、これまでは
 おもに NBRC 13245 を分譲してきた。欧州
 薬局方において指定されてる "*Salmonella*
enterica subsp. *enterica*" CIP 80.39 を入
 手して NBRC 100797 として登録し、分譲
 を開始した。

2. 性状調査結果は表 1 から 16 に示し
 た。得られた性状に基づく同定結果は 11
 株が種名まで一致し、用いた性状試験だ
 けで同定できることが明らかとなった。
 しかしながら、*Bacillus atrophaeus*
 NBRC 13721, *Comamonas terrigena*
 NBRC 13299 と *Salmonella enterica*
 NBRC 100797 の 3 株については属名が
 一致したが種名は一致しなかった。また、
Brevundimonas diminuta NBRC
 14213 と *Micrococcus luteus* (*Kocuria*
rhizophila) NBRC 12708 の 2 株は属名
 も一致しなかった。

D. 結論

得られた菌株の性状データは、保存菌株
 が変異していないことや菌株の置き換わり
 がおきていないかを確認するための有用な
 情報である。しかしながら、今回の結果か
 らは生理・生化学的性状試験だけでは同
 定できない菌株が 5 株存在した。微生物
 の同定について普遍的なことではあるが、
 これらの菌株の同定では 16S rRNA 塩基
 配列データなどを含め総合的に判断して
 行う必要があると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1). Yukphan, P., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & 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.*, 50: 9-15 (2004).
- (2). Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S. & Abe, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50: 17-27 (2004).
- (3). Yukphan, P., Taweesak, M., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50: 189-195 (2004).
- (4). Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50: 235-242 (2004).

2. 学会発表

- (1). 中川恭好. Taxonomic studies of *Cytophaga*-like bacteria (平成 16 年度日本微生物資源学会奨励賞受賞講演), 日本微生物資源学会第 11 回大会, つくば, 2004 年 10 月.
- (2). Takahashi, M., Nakagawa, Y., Yukphan, P., Yamada, Y., Suzuki, K. & Sakane, T. Analysis of the 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences of the genus *Gluconobacter*. The 10th International Collection for Culture Collection, Tsukuba, Japan, October 2004.
- (3). Miyashita, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K. & Sakane, T. Phylogenetic analysis to re-define the species in the genus *Myxococcus*. The 10th International Collection for Culture Collection, Tsukuba, Japan, October 2004.
- (4). Yukphan, P., Taweesak, M., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) regions. The 10th International Collection for Culture Collection, Tsukuba, Japan, October 2004.
- (5). 藤田信之, 関川智洋, 中川恭好, 鈴木健一郎. NITE における有用微生物バイオリソースの整備, 第 27 回日本分子生物学会年会「特別企画, ナショナルバイオリソース」,

神戸，2004年12月。

- (6). 中川恭好．微生物の保存方法 ー微生物管理の実際ー，日本防菌防黴学会「GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム第20回記念大会」，東京，2005年3月。
- (7). 宮下美香，鈴木健一郎，中川恭好．*Myxococcus*属の16S rDNA および16S-23S ITS塩基配列に基づく系統解析．日本農芸化学会2005年度大会，札幌，2005年3月。
- (8). 高橋麻衣，鈴木健一郎，中川恭好．*Flavobacterium-Cytophaga* 類縁細菌群の1属，*Flammeovirga* 属の新種について．日本農芸化学会2005年度大会，札幌，2005年3月。

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. *Bacillus subtilis* NBRC 3134のAPI 50 CH及びAPI 50 CHBによる酸の生成

試験項目	試験結果	試験項目	試験結果
酸の生成		酸の生成	
無基質	-	エスクリン	+
グリセロール	+	サリシン	+
エリスリトール	-	セロビオース	+
D-アラビノース	-	マルトース	+
L-アラビノース	+	ラクトース	-
リボース	+	メリビオース	微弱
D-キシロース	微弱	シュークロース	+
L-キシロース	-	トレハロース	+
アドニトール	-	イヌリン	+
β -メチルキシロシド	-	メレチトース	-
ガラクトース	微弱	D-ラフィノース	-
D-グルコース	+	アミドン	-
D-フラクトース	+	グリコーゲン	-
D-マンノース	-	キシリトール	-
L-ソルボース	-	β -ゲンチオビオース	-
ラムノース	-	D-ツラノース	-
ズルシトール	-	D-リキソース	-
イノシトール	微弱	D-タガトース	-
マンニトール	+	D-フコース	-
ソルビトール	+	L-フコース	-
α -メチル-D-マンノシド	-	D-アラビトール	-
α -メチル-D-グルコシド	+	L-アラビトール	-
N-アセチルグルコサミン	-	グルコネイト	-
アミグダリン	-	2-ケトグルコネイト	-
アルブチン	+	5-ケトグルコネイト	-

表2. *Bacillus atrophaeus* NBRC 13721のAPI 50 CH及びAPI 50 CHBによる酸の生成

試験項目	試験結果	試験項目	試験結果
酸の生成		酸の生成	
無基質	-	エスクリン	+
グリセロール	微弱	サリシン	+
エリスリトール	-	セロピオース	+
D-アラビノース	-	マルトース	+
L-アラビノース	+	ラクトース	-
リボース	+	メリピオース	-
D-キシロース	-	シュークロース	+
L-キシロース	-	トレハロース	+
アドニトール	-	イヌリン	-
β -メチルキシロシド	-	メレチトース	-
ガラクトース	微弱	D-ラフィノース	-
D-グルコース	+	アミドン	微弱
D-フラクトース	+	グリコーゲン	微弱
D-マンノース	+	キシリトール	-
L-ソルボース	-	β -ゲンチオピオース	微弱
ラムノース	-	D-ツラノース	-
ズルシトール	-	D-リキソース	-
イノシトール	+	D-タガトース	-
マンニトール	+	D-フコース	-
ソルビトール	+	L-フコース	-
α -メチル-D-マンノシド	-	D-アラビトール	-
α -メチル-D-グルコシド	+	L-アラビトール	-
N-アセチルグルコサミン	+	グルコネイト	-
アミグダリン	+	2-ケトグルコネイト	-
アルブチン	+	5-ケトグルコネイト	-

表3. *Brevundimonas diminuta* NBRC 14213のAPI 20 NEによる性状

試験項目	試験結果
硝酸塩の還元	—
インドールの生成	—
グルコースの発酵性	—
アルギニンジヒドロラーゼ	—
ウレアーゼ	—
エスクリンの分解	—
ゼラチンの液化	—
β -ガラクトシダーゼ	—
資化性	
グルコース	—
L-アラビノース	—
D-マンノース	—
D-マンニトール	—
N-アセチル-D-グルコサミン	—
マルトース	—
グルコン酸カリウム	—
n-カプリン酸	+
アジピン酸	—
dl-リンゴ酸	—
クエン酸ナトリウム	—
酢酸フェニル	—
オキシダーゼ	+

表4. *Comamonas terrigena* NBRC 13299のAPI 20 NEによる性状

試験項目	試験結果
硝酸塩の還元	+
インドールの生成	-
グルコースの発酵性	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-
ウレアーゼ	-
エスクリンの分解	-
ゼラチンの液化	-
β -ガラクトシダーゼ	-
資化性	
グルコース	-
L-アラビノース	-
D-マンノース	-
D-マンニトール	-
N-アセチル-D-グルコサミン	-
マルトース	-
グルコン酸カリウム	+
n-カブリン酸	-
アジピン酸	+
dL-リンゴ酸	-
クエン酸ナトリウム	-
酢酸フェニル	-
オキシダーゼ	+

表5. *Escherichia coli* NBRC 3972のATB ExpressionによるID 32 Eの性状

試験項目	試験結果
オルニチンデカルボキシラーゼ	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-
リジンデカルボキシラーゼ	+
ウレアーゼ	-
酸の生成	
L-アラビトール	-
D-ガラクツロン酸	+
5-ケトグルコン酸カリウム	-
リパーゼ	-
酸の生成	
ピルビン酸ナトリウム	+
β -グルコシダーゼ	-
酸の生成	
D-マンニトール	+
D-マルトース	+
インドールの生成	+
N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	-
β -ガラクトシダーゼ	+
酸の生成	
グルコース	+
シュークロース	-
L-アラビノース	+
D-アラビトール	-
α -グルコシダーゼ	-
α -ガラクトシダーゼ	+
酸の生成	
トレハロース	+
L-ラムノース	+
イノシトール	-
アドニトール	-
バラチノース	-
β -グルクロニダーゼ	+
酸の生成	
D-セロピオース	-
D-ソルビトール	+
α -マルトシダーゼ	-
マロン酸塩の利用	-
L-アスパラギン酸アリルアミダーゼ	-

表6. *Escherichia coli* NBRC 14237のATB ExpressionによるID 32 Eの性状

試験項目	試験結果
オルニチンデカルボキシラーゼ	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-
リジンデカルボキシラーゼ	-
ウレアーゼ	-
酸の生成	
L-アラビトール	-
D-ガラクトン酸	+
5-ケトグルコン酸カリウム	+
リパーゼ	-
酸の生成	
ピルビン酸ナトリウム	+
β -グルコシダーゼ	-
酸の生成	
D-マンニトール	+
D-マルトース	+
インドールの生成	+
N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	-
β -ガラクトシダーゼ	+
酸の生成	
グルコース	+
シュークロース	-
L-アラビノース	+
D-アラビトール	-
α -グルコシダーゼ	-
α -ガラクトシダーゼ	+
酸の生成	
トレハロース	+
L-ラムノース	+
イノシトール	-
アドニトール	-
パラチノース	-
β -グルクロニダーゼ	+
酸の生成	
D-セロピオース	-
D-ソルビトール	-
α -マルトシダーゼ	-
マロン酸塩の利用	-
L-アスパラギン酸アシルアミダーゼ	-

表7. *Geobacillus stearothermophilus* NBRC 12550のAPI 50 CH及びAPI 50 CHBによる酸の生成

試験項目	試験結果	試験項目	試験結果
酸の生成		酸の生成	
無基質	-	エスクリン	-
グリセロール	-	サリシン	-
エリスリトール	-	セロピオース	-
D-アラビノース	-	マルトース	+
L-アラビノース	-	ラクトース	-
リボース	-	メリピオース	+
D-キシロース	-	シュークロース	+
L-キシロース	-	トレハロース	+
アドニトール	-	イヌリン	-
β -メチルキシロシド	-	メレチトース	+
ガラクトース	-	D-ラフィノース	+
D-グルコース	+	アミドン	+
D-フラクトース	+	グリコーゲン	+
D-マンノース	+	キシリトール	-
L-ソルボース	-	β -ゲンチオピオース	-
ラムノース	-	D-ツラノース	+
ズルシトール	-	D-リキソース	-
イノシトール	-	D-タガトース	-
マンニトール	-	D-フコース	-
ソルビトール	-	L-フコース	-
α -メチル-D-マンノシド	-	D-アラビトール	-
α -メチル-D-グルコシド	+	L-アラビトール	-
N-アセチルグルコサミン	-	グルコネイト	-
アミグダリン	-	2-ケトグルコネイト	-
アルブチン	-	5-ケトグルコネイト	-